นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใย *Butyrivibrio fibrisolvens* ที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของแกะ

สุริยะ สะวานนท์ [1] และ Yosuo Kobayashi [2]

Abstract

Sawanon, S.[1] and Kobayashi, Y.[2]

Studies on fibrolytic bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens* isolated from sheep rumen

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2007, 29(2) : 351-361

Fibrolytic *Butyrivibrio fibrisolvens* was an attractive target for genetic engineering in rumen bacteria. The experiment was initiated in making culture collection of this species, some of which may be useful as candidate strain in the future. Hay suspended in sheep rumen was used as the source of isolates. The source was enriched with filter paper degradation, diluted with an anaerobic solution and used for pure culturing by a roll tube technique. After colony forming, Gram-negative curved rods bacteria were selected and screened for further identification with volatile fatty acid (VFA) profiling and 16S rDNA sequencing. Fibrolytic strains were selected to find fibrolytic enzymes and attachment to and digestion of various fibers. Forty-seven strains of Gram-negative curved rods were isolated. After determining cellulase, xylanase activities

[1]Department of Animal Science, Faculty of Agriculture Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140 Thailand. [2]Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo-shi, Japan

[1]Ph.D. (Bioresources and Production Science; Rumen microbiology) ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140 [2]D.Agr. (Herbivores Nutrition; Gut Microbiology), Prof., Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo-shi, Japan

Corresponding e-mail: agrsusa@ku.ac.th

รับต้นฉบับ 14 กรกฎาคม 2549 รับลงพิมพ์ 10 ตุลาคม 2549

and VFA profile, 2 strains were chosen and employed for 16S rDNA sequencing. Both strains producing butyrate were B. *fibrisolvens*. Of these 2 strains, most fibrolytic S-28 was selected. The strain S-28 could degrade natural fibers but not cellulose and showed strong attachment to them. A strong xylanase activity was detected and presence of cellulase, β-glucosidase, β-xylosidase, α-L-arabinofuranosidase and β-cellobiosidase were also demonstrated.

Key words : rumen bacteria, fiber digestion, *Butyrivibrio fibrisolvens*

บทคัดย่อ

สุริยะ สะวานนท์ และ Yosuo Kobayashi

การศึกษาแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใย *Butyrivibrio fibrisolvens* ที่คัดเลือกจากกระเพาะรูเมนของแกะ

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2550 29(2) : 351-361

Butyrivibrio fibrisolvens **เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยได้ดีชนิดหนึ่ง และได้รับความสนใจนำมาใช้ในกระบวนการทางด้านวิศวพันธุกรรม ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงพยายามคัดเลือก *B. fibrisolvens* ที่มีคุณสมบัติดี เพื่อนำมาใช้ในกระบวนการดังกล่าวในอนาคต แหล่งของแบคทีเรียที่ใช้ในการคัดเลือกครั้งนี้มาจากแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของแกะที่ยึดเกาะอยู่บนหญ้าแห้ง โดยนำแบคทีเรียเหล่านี้มาทำการย่อยกระดาษกรองอีกครั้งหนึ่ง และทำการเจือจางเพื่อทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค roll tube จากนั้นทำการคัดเลือกเอาเฉพาะแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมลบและเซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งโค้ง นำแบคทีเรียเหล่านี้มาจัดจำแนกชนิด โดยดูการผลิตกรดไขมันระเหยได้ง่ายและลำดับเบสของ 16S rDNA ทำการศึกษาคุณสมบัติในการย่อยสลายเยื่อใย ทั้งทางด้านการผลิตเอนไซม์ ความสามารถในการยึดเกาะและการย่อยสลายเยื่อใยชนิดต่าง ๆ ในการคัดเลือกแบคทีเรียในครั้งนี้ ได้แบคทีเรีย 47 สายพันธุ์ที่ย้อมติดสีแกรมลบและเซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งโค้ง เมื่อทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ไซแลนเนส และการผลิตกรดไขมันระเหยได้ง่าย มีสองสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติดี และมีลักษณะใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *B. fibrisolvens* จากนั้นนำแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดบิวทีริกได้สูงมาหาลำดับเบสของ 16S rDNA พบว่าทั้งคู่ คือแบคทีเรีย *B. fibrisolvens* และหนึ่งในสองสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติดีที่สุด ถูกคัดเลือกมาศึกษาคุณสมบัติในการย่อยเยื่อใย พบว่า *B. fibrisolvens* S-28 สามารถย่อยสลายเยื่อใยที่ได้จากธรรมชาติได้ดี แต่ไม่สามารถย่อยเซลลูโลส และมีความสามารถยึดเกาะกับเยื่อใยได้ดีโดยผลิตเอนไซม์ไซแลนเนสได้สูง ในขณะเดียวกันก็สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส, β-glucosidase, β-xylosidase, α-L-arabinofuranosidase และ β-cellobiosidase ได้ด้วย**

สัตว์เคี้ยวเอื้องเป็นสัตว์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนอาหารหยาบคุณภาพต่ำไปเป็นแหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพสูง ทั้งเนื้อ และน้ำนม ความสามารถในการใช้ประโยชน์จากอาหารหยาบของสัตว์เคี้ยวเอื้องขึ้นอยู่กับการทำงานของจุลินทรีย์ย่อยสลายเยื่อใยที่อาศัยอยู่ในกระเพาะรูเมนเป็นหลัก เนื่องจากสัตว์เคี้ยวเอื้องไม่สามารถผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสลายเยื่อใยได้โดยตรง จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมนมีทั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และโปรโตซัว แต่เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าแบคทีเรียมีความสำคัญที่สุดในการย่อยสลายเยื่อใย (Hespell *et al.*, 1997; Stewart *et al.*, 1997) แบคทีเรียที่ทำหน้าที่หลักในการย่อยสลายเยื่อใยที่พบในกระเพาะรูเมนมี 3 ชนิด คือ *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* และ *Ruminococcus flavefaciens* (Forsberg *et al.*, 1997)

Butyrivibrio fibrisolvens เป็นแบคทีเรียแกรมลบ แต่ลักษณะของผนังเซลล์ และลำดับเบสของ 16S ribosomal DNA (16S rDNA) คล้ายกับแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแกรมลบ ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีความพยายามที่จะจัด

ให้ *B. fibrisolvens* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Hespell *et al.*, 1997; Stewart *et al.*, 1997) *B. fibrisolvens* เป็นแบคทีเรียที่พบมากในกระเพาะรูเมน ทำหน้าที่หลักในการย่อยเฮมไมเซลลูโลส และผลผลิตที่ได้จากการย่อยเยื่อใย เช่น ออลิโกแซ็กคาร์ไรด์ (Forsberg *et al.*, 1997) นอกจากนี้ *B. fibrisolvens* เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในการผลิตกรดบิวทีลิกในกระเพาะรูเมน *B. fibrisolvens* ถือว่าเป็นแบคทีเรียที่มีความหลากหลายทั้งทางด้านพันธุกรรม และบทบาทหน้าที่ในกระเพาะรูเมน นอกจากนี้ในกระบวนการวิศวพันธุกรรม *B. fibrisolvens* ยังเป็นแบคทีเรียที่นิยมใช้เพื่อเป็นเซลล์ให้อาศัย (Gregg *et al.*, 1994; Kobayashi *et al.*, 1995) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะทำการคัดเลือกแบคทีเรีย *B. fibrisolvens* สายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายเยื่อใยได้ดี และยึดเกาะกับเยื่อใยได้สูง เพื่อนำไปใช้เป็นเซลล์ให้อาศัยในกระบวนการวิศวพันธุกรรมต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สัตว์ทดลอง

แกะโตเต็มวัยที่ถูกเจาะกระเพาะรูเมนจำนวน 3 ตัว ที่มีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 55.3 กก. ในแต่ละวันสัตว์ได้รับอาหารข้นที่มีค่า CP 12% และ TDN 65% วันละ 300 กรัม เพียงครั้งเดียวเมื่อเวลา 8.30 น. แต่ได้รับหญ้าแห้งออชาร์ด (orchard grass) น้ำ และแร่ธาตุก้อนอย่างเต็มที่ แกะแต่ละตัวถูกขังในคอกขังเดียว ในพื้นที่ 1x1.5 ตร.เมตร

2. การส่งเสริมการเจริญและแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใย

2.1 การส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมนของแกะ โดยนำหญ้าแห้งออชาร์ดที่มีความยาว 1.5 ซม. ใส่ในถุงไนลอน จากนั้นนำไปจุ่มหมักในกระเพาะรูเมนตั้งแต่เวลา 8.30 ถึง 14.30 น. เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง และนำหญ้าแห้งที่มีแบคทีเรียยึดเกาะมาล้าง 1 ครั้ง นาน 1 นาที ในสารละลายทำเจือจางภายใต้สภาวะปลอดออกซิเจน (Ogimoto and Imai, 1981) จากนั้นนำหญ้าที่ผ่านการล้างใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มีกระดาษกรอง (Whatman® No.1) ขนาด 0.5x1.5 ตร.ซม. จำนวน 2 แผ่น เพื่อใช้เป็นแหล่งของคาร์บอน แล้วนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จนกระทั่งกระดาษกรองถูกย่อย สำหรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานดัดแปลงมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร RGCA (Ogimoto and Imai, 1981) มีส่วนประกอบดังนี้ (pH 6.8)

1) 7.5 มล. ของสารละลายแร่ธาตุชนิดที่ 1 (0.6 กรัม K_2HPO_4 น้ำกลั่น 100 มล.)

2) 7.5 มล. ของสารละลายแร่ธาตุชนิดที่ 2 (1.2 กรัม NaCl, 1.2 กรัม $(NH_4)_2SO_4$, 0.6 กรัม KH_2PO_4, 0.12 กรัม $CaCl_2$, 0.25 กรัม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ น้ำกลั่น 100 มล.)

3) 0.05 กรัม ของ L-cysteine-HCl·H_2O

4) 0.1 มล. ของ 0.1% resazurin

5) 0.2 กรัม ของ bactopeptone

6) 0.12 กรัม ของ yeast extract

7) 30.0 มล. ของ rumen fluid

8) 50.0 มล. ของน้ำกลั่น

9) 5 มล. ของสารละลาย 8% Na_2CO_3

2.2 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งของคาร์บอนมาทำการเจือจางในสารละลายทำเจือจางภายใต้สภาวะปลอดออกซิเจน แล้วนำตัวอย่างเชื้อที่เจือจางมาทำการแยกเชื้อในอาหารวุ้น ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มี 0.5% ไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้เทคนิค roll tube (Ogimoto and Imai, 1981)

3. การบ่งชี้แบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใย

3.1 การบ่งชี้เชื้อด้วยวิธีดั้งเดิม โดยศึกษาการติดสีแกรม รูปร่าง การเรียงตัวของเซลล์ ด้วยการย้อมสีแกรม การผลิตกรดบิวทีริกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้เครื่อง gas chromatograph (GC-14B, Shimadzu) (Sawanon *et al.*, 2003)

3.2 การบ่งชี้เชื้อด้วยวิธีการใช้เทคนิคระดับโมเลกุล โดยการหาลำดับเบสบางส่วนของ 16S rDNA (Sawanon *et al.*, 2003) สำหรับขั้นตอนโดยสังเขปมีดังนี้ การสกัด DNA ของแบคทีเรียบริสุทธิ์ นำแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 x g นาน 1 นาที จากนั้นทำให้เซลล์แตกโดยการต้มในสารละลาย lysis

buffer นาน 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 x g นาน 5 นาที แล้วนำสารละลาย DNA ที่ได้มาทำการเพิ่มชิ้นส่วนของ 16S rDNA โดยใช้คู่ไพรเมอร์ ดังนี้ 530-Universal forward primer (5′ GTGCCAGCMGCC GCGG 3′) และ 1392-Universal reverse primer (5′ ACGGGCGGTGTGTRC 3′) ในกระบวนการทำ PCR ประกอบด้วย DNA template 2 µl และ PCR mixture 18 µl (1 x PCR buffer, 2.5 mM $MgCl_2$, 2 mM dNTP, 10 pmol Forward และ Reverse, 1 U *Tag* DNA polymerase (Ampli Taq Gotd™, Roche) และ Distilled water) ปฏิกิริยา PCR เกิดในเครื่อง Thermal cycle (GeneAmp PCR system 2400, USA) ภายใต้ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ดังนี้ ในรอบที่ 1 ทำการ denaturation 94°C, 8 นาที; annealing 58°C, 1 นาที; extension 72°C, 1 นาที รอบที่ 2-47 ทำการ denaturation 94°C, 30 วินาที; annealing 58°C, 1 นาที; extension 72°C, 1 นาที และรอบที่ 48 ทำการ denaturation 94°C, 30 วินาที; annealing 58°C, 1 นาที; extension 72°C, 6 นาที ทำการวิเคราะห์ผลผลิตของ PCR ด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis และทำการสกัดเอาชิ้นส่วนของ DNA ที่มีขนาดประมาณ 900 bp โดยใช้ QIAEX II Gel Etraction Kit (QIAGEN K.K., Japan)

นำชิ้นส่วน DNA ที่ได้มาทำการโคลนนิ่งเข้าไปใน pCR2.1 vector แล้วนำเข้าสู่เซลล์ให้อาศัยของ *E. coli* DH5α ตามวิธีการที่แนะนำใน Original Cloning Kit (Invitrogen Corporation, USA) จากนั้นนำเอา *E. coli* ที่ผ่านการทรานส์ฟอร์เมชั่นมาเลี้ยงในอาหารวุ้น LB ที่มียาปฏิชีวนะกานามัยซิน แอมพิซิลลิน และ X-gal โดยบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วเลือกเอาเฉพาะโคโลนีที่มีสีขาวมาทำการสกัดพลาสมิคด้วยวิธี Alkaline lysis และทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี phenol/chloroform (Sambrook and Russell, 2001) นำพลาสมิคดีเอ็นเอที่ได้ไปหาลำดับเบสของ 16S rDNA โดยใช้ PCR Thermo SequenaseTM Cycle Sequencing Kit (Amersham, UK) ใช้ FITC labeled universal forward และ reverse primer ภายใต้ขั้นตอนของปฏิกิริยา PCR ดังนี้ ในรอบที่ 1 ทำการ denaturation 94°C, 3 นาที; annealing 50°C, 45 วินาที; extension 72°C, 30 วินาที รอบที่ 2-24 ทำการ denaturation 94°C, 1 นาที; annealing 50°C, 45 วินาที; extension 72°C, 30 วินาที และรอบที่ 25 ทำการ denaturation 94°C, 1 นาที; annealing 50°C, 45 วินาที; extension 72°C, 1 นาที นำผลผลิตจากกระบวนการ PCR ไปหาลำดับเบส โดยใช้เครื่อง DNA sequencer (DSQ-2000L, Shimazu) และเมื่อได้ลำดับเบสของ forward และ reverse แล้วนำมาทำการเปรียบเทียบความถูกต้องโดยใช้โปรแกรม Genetry-Mac (version 11.0)

นำลำดับเบสของ 16S rDNA ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสของแบคทีเรียที่ทราบชนิดใน GenBank (BLAST, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) จะทำให้ทราบว่าแบคทีเรียที่แยกได้นั้นมีลำดับเบสของ 16S rDNA ใกล้เคียงกับแบคทีเรียชนิดใดมากที่สุด จากนั้นนำเอาลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ใน GenBank มาทำการ multialigment โดยใช้โปรแกรม Clustal X (version 1.83) แล้วนำมาคำนวณความเหมือนกันของลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม Phylip และทำการเขียนแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม TreeView

4. การทดสอบการเจริญของแบคทีเรียในแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

แบคทีเรียเจริญในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีแหล่งคาร์บอน (0.5% w/v) จาก 6 แหล่ง คือ กลูโคส เซลโลไบโอส ไซแลน กระดาษกรอง หญ้าออชาร์ด หรือฟางข้าว สำหรับการเตรียมกระดาษกรอง หญ้าออชาร์ด และฟางข้าว ใช้วิธีของ Sawanon และคณะ (2003) ทำการวัดการเจริญของแบคทีเรียที่บ่มเพาะในสภาวะปลอดออกซิเจนที่อุณหภูมิ 37°C ทุก ๆหนึ่งชั่วโมง โดยวัดความหนาแน่น (OD_{660}) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Hitachi model no. 101, Japan)

5. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการย่อยสลายเยื่อใยและปริมาณโปรตีน

แบคทีเรียเจริญในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีแหล่งคาร์บอน (0.5% w/v) คือ กลูโคส เซลโลไบโอส หรือไซแลน โดยบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (late-exponential growth phase) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว

20,000 x g นาน 10 นาที เพื่อแยกส่วนที่เป็นของเหลวและตะกอนแบคทีเรียออกจากกัน สำหรับของเหลวที่ได้นำไปกำจัดน้ำตาลด้วยวิธี dialyzed against ในสายละลาย 50 mM phosphate buffer (pH 6.8) ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 16 ชั่วโมง และเพิ่มความเข้มข้นด้วย 20% polyethylene glycol (น้ำหนักโมเลกุล 20,000) จากนั้นนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ที่แบคทีเรียปลดปล่อยออกมา (extracellular activity) (Kobayashi *et al.*, 1998) ส่วนตะกอนแบคทีเรียนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Ultrasonic ภายใต้อุณหภูมิ 2°C นาน 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 20,000 x g นาน 15 นาที เพื่อแยกเอาสารละลายไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular activity) (Sawanon *et al.*, 2003)

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส ใช้ Carboxymethy-cellulose (CMC) (Sigma) เป็นสารตั้งต้น และใช้ 20 mM D-glucose เป็นสารมาตรฐาน ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ไซแลนเนส ใช้ oat spelt xylan (Sigma) เป็นสารตั้งต้น และใช้ 20 mM D-xylose เป็นสารมาตรฐาน การวัดปฏิกิริยาของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนส วัดภายใต้สภาวะดังนี้ 0.1 มล. ของสารละลายเอนไซม์ และ 0.1 มล. ของสารละลายตั้งต้นใน phosphate buffer ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที แล้ววัดปริมาณ D-glucose หรือ D-xylose ที่ถูกปลดปล่อยออกมาด้วยเครื่อง UV-VIS spectrophotometer (Ultrospec 3000) ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ตามวิธีของ Miller (1959) สำหรับหน่วยของเอนไซม์เซลลูเลส และไซแลนเนส 1 nmol min^{-1} ml^{-1} หมายถึง ในหนึ่งนาทีเอนไซม์ที่อยู่ในตัวอย่างปริมาตร 1 มล. สามารถปลดปล่อยน้ำตาล D-glucose หรือ D-xylose ออกมาจาก CMC หรือ oat spelt xylan ได้ 1 นาโนโมล ตามลำดับ และ 1 nmol min^{-1} mg $protein^{-1}$ หมายถึง ในหนึ่งนาทีเอนไซม์ที่อยู่ในรูปของโปรตีน 1 มก. สามารถปลดปล่อยน้ำตาล ออกมาจากสารตั้งต้น ได้ 1 นาโนโมล

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ β-glucosidase ใช้ ρ-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside เป็นสารตั้งต้น เอนไซม์ β-xylosidase ใช้ ρ-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside เป็นสารตั้งต้น เอนไซม์ α-L-arabinofuranosidase ใช้ ρ-nitrophenyl-α-D-arabinofuranoside เป็นสารตั้งต้น เอนไซม์ β-cellobiosidase ใช้ ρ-nitrophenyl-β-D-cellobioside เป็นสารตั้งต้น และเอนไซม์ acetylesterase ใช้ ρ-nitrophenylacetic acid เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยา และปฏิกิริยาของทุกเอนไซม์ใช้ 1.0 mM ρ-nitrophenol เป็นสารมาตรฐาน การวัดปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่างๆ วัดภายใต้สภาวะดังนี้ 0.1 มล. ของสารละลายเอนไซม์ และ 0.1 มล. ของสารละลายสารตั้งต้นใน phosphate buffer ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลาย 1.0 มล. ของ 0.4 M Na_2CO_3 แล้วนำไปวัดปริมาณ ρ-nitrophenol ที่ถูกปลดปล่อยออกมาด้วยเครื่อง UV-VIS spectrometer ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

การวัดปริมาณโปรตีนในสารละลาย โดยใช้ Bio-Rad protein assay Kit (Hercules, C.A., USA) โดยใช้ Bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน การวัดปริมาณโปรตีน วัดภายใต้สภาวะดังนี้ 0.1 มล. ของสารละลายเอนไซม์ และ 5 มล. ของสารละลาย Dye reagent แล้วนำไปวัดการเปลี่ยนแปลงของสีด้วยเครื่อง UV-VIS spectrometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบกับสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

6. การวัดความสามารถของแบคทีเรียในการยึดเกาะกับเยื่อใย

เยื่อใยที่ใช้ในการทดสอบ ประกอบด้วย กระดาษกรอง ฟางข้าว หญ้าออชาร์ด และถั่วอัลฟัลฟ่า โดยบดผ่านตะแกรงขนาด 1.0 มม. สำหรับวิธีการเตรียมเยื่อใย และการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยึดเกาะกับเยื่อใยใช้วิธีของ Sawanon และคณะ (2003)

7. การวัดความสามารถในการย่อยเยื่อใย

เยื่อใยที่ใช้ในการทดสอบ ประกอบด้วย กระดาษกรอง ฟางข้าว หญ้าออชาร์ด และถั่วอัลฟัลฟ่า โดยบดผ่านตะแกรงขนาด 1.5 มม. สำหรับวิธีการเตรียมเยื่อใย และการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยสลายเยื่อใยใช้วิธีของ Sawanon และคณะ (2006)

8. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลต่างๆ ในการทดลองครั้งนี้ ได้ทำ

การวิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) จากการทดลองอย่างน้อย 3 ซ้ำ และถ้าหากข้อมูลมีความแตกต่างทางสถิติแล้ว ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (SAS, 1989)

ผลการทดทองและวิจารณ์

1. ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียย่อยสลายเยื่อใย

การคัดเลือกแบคทีเรียที่ย่อยสลายเยื่อใยในครั้งนี้ ได้มาจากการแยกเชื้อจากแบคทีเรียจำนวน 290 ไอโซเลท เมื่อศึกษาการติดสีแกรมและรูปร่างของเซลล์ พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่างเป็นแท่งโค้งจำนวน 47 ไอโซเลท หรือ 16.2% ของแบคทีเรียทั้งหมด และมีจำนวน 2 ไอโซเลท (S-22 และ S-28) หรือเพียง 2% ของแบคทีเรียแกรมลบและรูปร่างเป็นแท่งโค้งที่ผลิตกรดบิวทีริกได้สูง ซึ่งเป็นลักษณะของ *B. fibrisolvens* และจากการศึกษาตรวจลำดับเบสบน 16S rDNA พบว่าทั้งสองไอโซเลทมีลำดับเบสคล้าย *B. fibrisolvens* มากกว่า 97% และเมื่อนำมาเขียนแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการจะเห็นได้ว่าทั้งสองสายพันธุ์อยู่ในกลุ่มเดียวกับแบคทีเรีย *B. fibrisolvens* (Figure 1)

2. กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวกับการย่อยสลายเยื่อใย

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์หลักที่ใช้ในการย่อยสลายเยื่อใย คือ เซลลูเลส และไซแลนเนส ของ *B. fibrisolvens* สายพันธุ์ S-28 และ S-22 ที่เจริญในเซลโลไบโอส พบว่า *B. fibrisolvens* S-28 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และไซแลนเนสได้ 12.5 และ 73.1 nmol min^{-1} mg $protein^{-1}$ ตามลำดับ สูงกว่า *B. fibrisolvens* S-22 ที่ผลิตได้ 1.0 และ 42.8 nmol min^{-1} mg $protein^{-1}$ ตามลำดับ ดังนั้น *B. fibrisolvens* S-28 เป็นสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเยื่อใยได้ดีที่สุด และถูกคัดเลือกเพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติในการย่อยสลายเยื่อใยในด้านอื่น ๆ ต่อไป

กิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสที่ *B. fibrisolvens* S-28 ผลิตได้ภายในเซลล์และปลดปล่อยออกมานอกเซลล์เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งของคาร์บอนแตกต่างกัน ดังแสดงใน Table 1 จะเห็นได้ว่า *B. fibrisolvens* S-28 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไซแลนเนสได้สูงมากเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีไซแลนเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ยังพบว่า *B. fibrisolvens* S-28 สามารถปลดปล่อยเอนไซม์เหล่านี้ออกมานอกเซลล์เพื่อมาย่อยโปลีแซคคาไรด์ได้สูงถึง 45-88% ของปริมาณเอนไซม์ทั้งหมดที่ผลิตได้ คล้ายกับแบคทีเรียที่ทำหน้าที่หลักในการ

Table 1. Cellulase and xylanase activities of *B. fibrisolvens* S-28 grown in glucose, cellobiose and xylan medium.

Medium	Intracellular activity (nmol min^{-1} ml^{-1} culture)	Extracellular activity (nmol min^{-1} ml^{-1} culture)	Total activity (nmol min^{-1} ml^{-1} culture)	Extracellular portion of total activity (%)	Total protein (intracellular) (mg ml^{-1} culture)	Specific activity (intracellular) (nmol min^{-1} mg^{-1} protein)
Cellulase						
Glucose	0.29 ± 0.09^{c}	2.08 ± 0.10^{c}	2.37^{c}	87.8^{a}	0.009 ± 0.00^{c}	32.22^{b}
Cellobiose	0.89 ± 0.19^{b}	2.49 ± 0.03^{b}	3.38^{b}	73.7^{b}	0.076 ± 0.01^{a}	11.71^{c}
Xylan	3.47 ± 0.10^{a}	2.81 ± 0.22^{a}	6.28^{a}	44.7^{c}	0.057 ± 0.01^{b}	60.88^{a}
Xylanase						
Glucose	0.71 ± 0.21^{c}	4.61 ± 0.09^{b}	5.32^{c}	86.7^{a}	0.009 ± 0.00^{c}	78.89^{b}
Cellobiose	1.80 ± 0.40^{b}	4.73 ± 0.38^{b}	6.53^{b}	72.4^{b}	0.076 ± 0.01^{a}	23.68^{c}
Xylan	10.81 ± 0.47^{a}	12.49 ± 0.16^{a}	23.30^{a}	53.6^{c}	0.057 ± 0.01^{b}	189.65^{a}

Values are means ± standard deviations from three replications of enzyme assay or protein assay
[a,b,c] Means within the same column followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

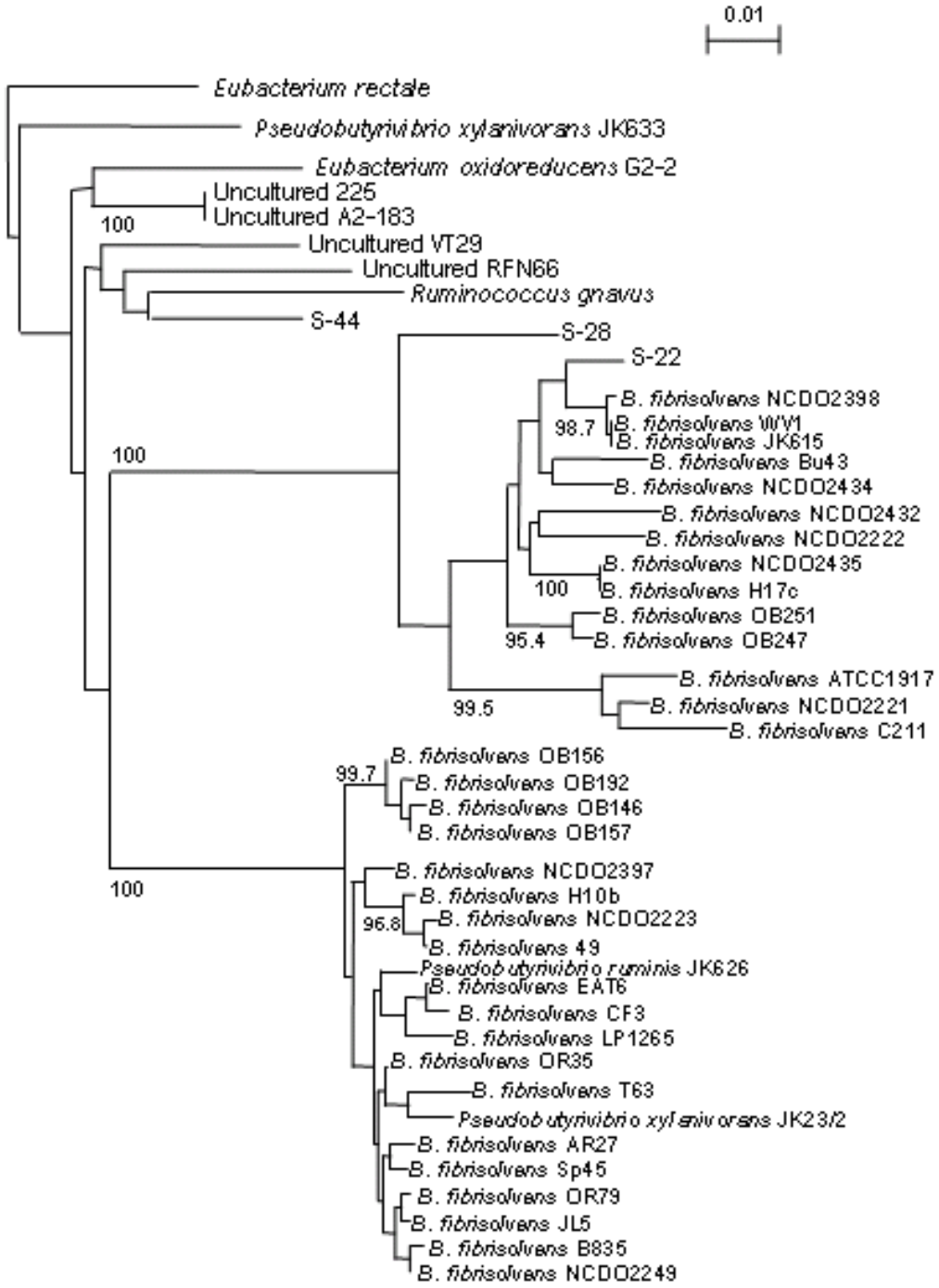

Figure 1. The phylogenetic tree showing relationships of 16S rDNA sequences of different isolates of *Butyrivibrio*. The tree was constructed using neighbor-joining analysis of a distance matrix obtained from a multiple-sequence alignment. *Eubacterium rectale* was used as an out-group sequence. The scale bar represents genetic distance (1 substitution per 1000 nucleotides). Numbers given at the nodes represent bootstrap percentage values (> 95), which show reliability of branching.

Table 2. Cellulase, xylanase, β-glucosidase, β-xylosidase, α-L-arabinofuranosidase, β-cellobiosidase, and acetylesterase activities of *B. fibrisolvens* S-28 grown in xylan medium.

Enzyme activity	Intracellular activity (nmol min^{-1} ml^{-1} culture)	Specific intracellular activity (nmol min^{-1} mg^{-1} protein)
Cellulase	3.47	60.88
Xylanase	10.81	189.65
β-glucosidase	7.31	126.82
β-xylosidase	5.50	95.35
β-cellobiosidase	2.55	44.22
α-L-arabinofuranosidase	7.35	127.47
Acetylesterase	0.00	0.00

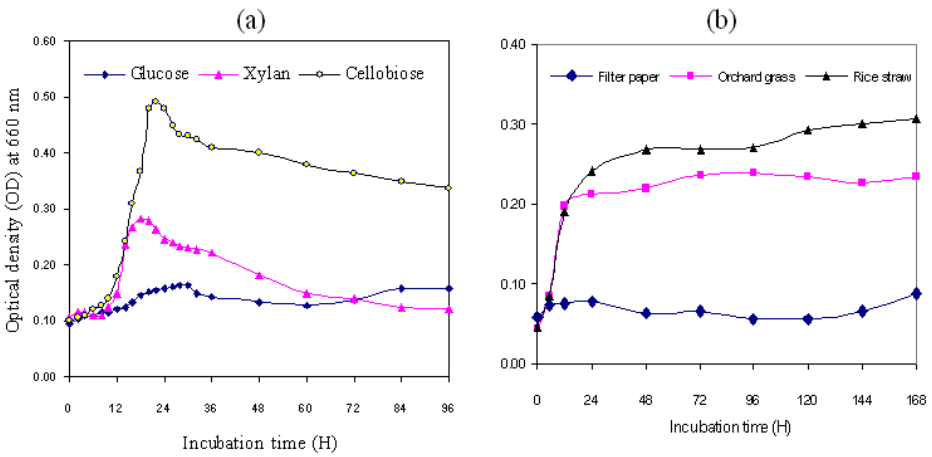

Figure 2. Growth curves of *B. fibrisolvens* S-28 (a) on glucose, cellobiose and xylan medium, (b) on filter paper, orchard grass and rice straw powder medium.

ย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมนชนิดอื่น เช่น *F. succinogenes* และ *Ruminococcus* spp. ที่สามารถปลดปล่อยเอนไซม์เหล่านี้ออกมานอกเซลล์ได้สูงมาก (Forsberg *et al.*, 1997) ดังนั้นจากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้ทำให้เชื่อได้ว่า *B. fibrisolvens* S-28 เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการย่อยสลายเยื่อใยได้ดีสายพันธุ์หนึ่ง และในขณะเดียวกันก็ชี้ให้เห็นว่า ถ้า *B. fibrisolvens* S-28 เจริญในอาหารที่มีไซแลนเป็นแหล่งของคาร์บอน จะกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้ได้ดีกว่ากลูโคสและเซลโลไบโอส

กิจกรรมของเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเยื่อใย (Table 2) จะเห็นได้ว่า *B. fibrisolvens* S-28 เป็นแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ β-glucosidase, β-xylosidase, β-cellobiosidase และ α-L-arabinofuranosidase ได้สูงมาก แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ acetylesterase จากความสามารถในการผลิตเอนไซม์ต่างๆ เหล่านี้ ทำให้ยืนยันได้ว่านอกจาก *B. fibrisolvens* S-28 จะสามารถผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมไมเซลลูโลสสายยาวได้แล้ว *B. fibrisolvens* S-28 ยังสามารถผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยพันธะอื่นๆ ของเยื่อใยได้อีกด้วย

3. การเจริญในอาหารที่มีแหล่งของคาร์บอนแตกต่างกัน

B. fibrisolvens S-28 เจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลโลไบโอสเป็นแหล่งของคาร์บอน รองลงมาคือไซแลนและกลูโคส ตามลำดับ (Figure 2a) ส่วนการเจริญในอาหาร

เลี้ยงเชื้อที่มีเยื่อใยเป็นแหล่งของคาร์บอน พบว่าสายพันธุ์ S-28 เจริญในอาหารที่มีเยื่อใยจากธรรมชาติ เช่น ฟางข้าว และหญ้าออชาร์ด ได้ดีกว่ากระดาษกรอง (Figure 2b) แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ S-28 เป็นแบคทีเรียที่เจริญและใช้ประโยชน์จากไดแซคคาไรด์ (เซลโลไบโอส) และโปลีแซคคาไรด์ (ไซแลน) ได้ดีกว่าโมโนแซคคาไรด์ (กลูโคส) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเซลล์โปรตีนของ *B. fibrisolvens* S-28 ที่เจริญในเซลโลไบโอส และไซเล็นสูงกว่าในกลูโคส (Table 1) และนอกจากนี้สายพันธุ์ S-28 ยังเจริญและใช้ประโยชน์จากเยื่อใยธรรมชาติ (ฟางข้าวและหญ้าแห้ง) ได้ดีกว่าเซลลูโลสบริสุทธิ์ (กระดาษกรอง) ดังนั้นจึงชี้ให้เห็นว่า *B.fibrisolvens* S-28 เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายและใช้ประโยชน์จากเยื่อใยธรรมชาติได้ดี

4. ความสามารถในการยึดเกาะกับเยื่อใย

B. fibrisolvens S-28 มีความสามารถในการยึดเกาะกับเยื่อใยได้เป็นอย่างดี ตั้งแต่ 47.6% ถึง 81.0% ขึ้นกับชนิดของเยื่อใย (Table 3) ในขณะที่ *B. fibrisolvens* OB156 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่นิยมนำมาใช้เป็นเซลล์ให้อาศัยในกระบวนการวิศวพันธุกรรม (Gregg *et al.*, 1994; Kobayashi *et al.*, 1998) มีความสามารถในการยึดเกาะกับเยื่อใยได้เพียง 25.1-47.0% ความสามารถในการยึดเกาะกับเยื่อใยนี้ เป็นคุณสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งของแบคทีเรียที่ย่อยสลายเยื่อใย เช่น *F. succinogenes* S85 สามารถยึดเกาะกับเซลลูโลสได้สูงถึง 83% หรือ *R. flavefaciens* 007 สามารถยึดเกาะกับเซลลูโลสได้ 80% (Roger *et al.*, 1990) นอกจากนี้ยังพบว่า *B. fibrisolvens* S-28 สามารถเข้าไปยึดเกาะกับเยื่อใยได้เร็ว (ภายใน 10 นาที) และยึดเกาะได้สูงสุดภายในเวลา 1 ชั่วโมง จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าเมื่อสัตว์กินอาหารหยาบเข้าไป *B. fibrisolvens* S-28 สามารถเข้าไปยึดเกาะกับอาหารหยาบได้ทันที จากนั้นก็ทำการปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยสลายเยื่อใย ในขณะเดียวกันแบคทีเรียก็เจริญและเพิ่มจำนวนมากขึ้นบนอาหารเยื่อใยนั้น

5. ความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใย

ความสามารถของ *B. fibrisolvens* S-28 ในการย่อยสลายเยื่อใย เมื่อบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37°C นาน 72 ชั่วโมง ดังแสดงใน Table 4 พบว่า *B. fibrisolvens* S-28 สามารถย่อยถั่วอัลฟัลฟ่า (12.7%) ได้สูงที่สุด รองลงมาคือหญ้าออชาร์ด (4.6%) และฟางข้าว (4.0%) ในขณะที่กระดาษกรองถูกย่อยได้น้อยที่สุด (0.5%) ส่วน *B. fibrisolvens* OB156 ไม่สามารถย่อยสลายเยื่อใยทุกชนิด ดังนั้นจากผลการศึกษาในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า *B. fibrisolvens* S-28 สามารถย่อยสลายเยื่อใยจากธรรมชาติได้ดีกว่าเซลลูโลสบริสุทธิ์ เนื่องจาก *B. fibrisolvens* S-28 เป็นแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ไซแลนเนส (Table 1) นอกจากนี้ *B. fibrisolvens* S-28 ยังเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกระดาษกรองเป็นแหล่งคาร์บอนได้ไม่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับฟางข้าว หรือหญ้าออชาร์ด (Figure 2b) รวมทั้งเจริญในกลูโคสได้ไม่ดีด้วย (Figure 2a) ซึ่งชี้ให้ว่า *B. fibrisolvens* S-28 เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ชอบ

Table 3. Adhesion of *B. fibrisolvens* S-28 and OB156 on fiber powder after incubated at 37°C for 30 min.

Fiber powder	Adhesion (%)	
	S-28	OB156†
Filter paper	81.0±2.26[a]	47.0±3.04[a]
Alfalfa	47.6±1.78[d]	43.3±2.96[b]
Orchard grass	68.5±3.00[c]	26.8±1.29[c]
Rice straw	73.1±1.75[b]	25.1±1.76[c]

Values are means ± standard deviations from four replications of adhesion assay.
† *Butyrivibrio fibrisolvens* strain OB156 (Kobayashi *et al.*, 1998)
[a,b,c,d] Means within the same column followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

Table 4. Dry matter digestibility of *B. fibrisolvens* S-28 and OB156 after incubated at 37°C for 72 h.

Fiber powder	Digestibility (% DM)	
	S-28	OB156[†]
Filter paper	0.5±0.37[c]	0.0
Alfalfa	12.7±0.82[a]	0.0
Orchard grass	4.6±1.61[b]	0.0
Rice straw	4.0±0.42[b]	0.0

Values are means ± standard deviations from three replications of dry matter digestibility.
[†] ***Butyrivibrio fibrisolvens* strain OB156 (Kobayashi et al., 1998)**
[a,b,c] **Means within the same column followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).**

เจริญในเซลลูโลสรวมทั้งกลูโคส จึงทำให้ความสามารถในการย่อยสลายเซลลูโลสได้ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับเยื่อใยจากธรรมชาติ เนื่องจาก *B. fibrisolvens* S-28 สามารถผลิตเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเยื่อใยธรรมชาติได้อีกหลายชนิด (Table 2) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเฮมไมเซลลูโลส สอดคล้องกับงานทดลองอื่นๆ ที่แสดงให้เห็นว่า *B. fibrisolvens* เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในการย่อยสลายเฮมไมเซลลูโลสในกระเพาะรูเมน แต่ย่อยสลายเซลลูโลสได้น้อยมาก (Dehority, 1967; Dehority and Scott, 1967; Cotta and Zeltwanger, 1995) ดังนั้นการคัดเลือก *B. fibrisolvens* S-28 ในครั้งนี้ นอกจากจะเป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายเยื่อใยจากธรรมชาติได้ดีแล้ว ยังมีความสามารถในการเข้าไปยึดเกาะบนเยื่อใยได้สูงด้วย ความสามารถเหล่านี้ของ *B. fibrisolvens* S-28 เหมาะที่จะนำไปใช้เป็นเซลล์ให้อาศัยในกระบวนการวิศวพันธุกรรมต่อไป

สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้สามารถคัดเลือก *B. fibrisolvens* S-28 ที่มีความสามารถในการยึดเกาะกับเยื่อใยได้ดี และในขณะเดียวกันก็สามารถย่อยสลายเยื่อใยธรรมชาติได้ดี เนื่องจาก *B. fibrisolvens* S-28 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเยื่อใยธรรมชาติได้เกือบทุกชนิด ขาดเฉพาะเอนไซม์ acetylesterase เท่านั้น ดังนั้นจากคุณสมบัติต่างๆ ที่ดีเหล่านี้ แบคทีเรีย *B. fibrisolvens* สายพันธุ์ S-28 อาจถูกนำไปใช้เป็นเซลล์ให้อาศัยในกระบวนการทางด้านวิศวพันธุกรรม เพื่อใช้ในการปรับปรุงกระบวนการหมักย่อยในกระเพาะรูเมนต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Cotta, M.A., and Zeltwanger, R.L. 1995. Degradation and utilization of xylan by the ruminal bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Selenomonas ruminantium*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 4395-4402.

Dehority, B.A. 1967. Rate of isolated hemicellulose degradation and utilization by pure cultures of rumen bacteria. Appl. Microbiol. 15: 987-993.

Dehority, B.A., and Scott, H.W. 1967. Extent of cellulose and hemicellulose digestion in various forages by pure cultures of rumen bacteria. J. Dairy Sci. 50: 1136-1141.

Forsberg, C.W., Cheng, K.J. and White, B.A. 1997. Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine. **In** Mackie, R.I. and White, B.A. (eds.). Gastrointestinal Microbiology. Vol. 1. Chapman and Hall, New York, 319-379.

Gregg, K., Cooper, C.L., Schafer, D.J., Sharpe, H., Beard, C.E., Allen, G. and Xu, J. 1994. Detoxification of the plant toxin fluoroacetate by a genetically modified rumen bacterium. Bio/technology. 12: 1361-1365.

Hespell, R.B., Akin, D.E. and Dehority, B.A. 1997. Bacteria, fungi, and protozoa of the rumen. **In** Mackie, R.I., White, B.A. and Isaacson, R.E. (eds.). Gastrointestinal Microbiology. Vol. 2. Chapman and Hall, New York, 59-141.

Kobayashi, Y., Forster, R.J., Hefford, M.A., Teather, R.M., Wakita, M., Ohmiya, K. and Hoshino, S. 1995. Analysis of the sequence of a new cryptic plasmid, pRJF2, from a rumen bacterium of the genus *Butyrivibrio*: Comparison with other Butyrivibrio plasmids and application in the development of a cloning vector. FEMS Microbiol. Lett. 130: 137-144.

Kobayashi, Y., Okuda, N., Matsumoto, M., Inoue, K., Wakita, M. and Hoshino, S. 1998. Constitutive expression of a heterologous *Eubacterium ruminantium* xylanase gene (xynA) in *Butyrivibrio fibrisolvens*. FEMS Microbiol. Lett. 163: 11-17.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analyt. Chem. 31: 426-428.

Ogimoto, K., and Imai, S. 1981. Atlas of Rumen Microbiology. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.

Roger, V., Fonty, G., Komisarczuk-Bony, S. and Gouet, P. 1990. Effects of physiochemical factors on the adhesion to cellulose avicel of the ruminal bacteria, *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter succinogenes* subsp. succinogenes. Appl. Environ. Microbiol. 56: 3081-3087.

Sambrook, J., and Russell, D.W. 2001. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Statistical Analysis Software (SAS) 1989. User's Guide: Statistics. Version 6.12 Edition. SAS Inst., Inc., Cary, NC.

Sawanon, S., and Kobayashi, Y. 2006. Synegistic fibrolysis in the rumen by cellulolytic *Ruminococcus flavefaciens* and non-cellulolytic *Selenomonas ruminantium*: Evidence in defined cultures. Anim. Sci. J. 77: 208-214.

Sawanon, S., Shinkai, T., Koike, S., Kobayashi, Y. and Tanaka, K. 2003. Indication of a novel group of *Selenomonas ruminantium* with high cellulase and fiber-attaching activities from the rumen. **In** Ohmiya, K., Sakka, K., Karita, S., Kimura, T., Sakka, M. and Onishi, Y. (eds.). Biotechnology of Lignocellulose Degradation and Biomass Utilization. Uni Publishers Co, Tokyo, 363-368.

Stewart, C.S., Flint, H.J. and Bryant, M.P. 1997. The rumen bacteria. **In** Hobson, P. N. and Stewart, C. S. (eds.). The Rumen Microbial Ecosystem. Chapman and Hall, London, 35-73.