

1. หลักการเหตุผลและระบุสาเหตุที่ต้องดำเนินการวิจัย

ในปัจจุบันมนุษย์มีความสนใจในสุขภาพของตนเองเพิ่มมากขึ้น ทำให้อาหารเสริมสุขภาพ เช่น โพรไบโอติก พรีไบโอติก วิตามิน ฯลฯ ได้รับความนิยมที่เพิ่มมากขึ้น โพรไบโอติกมีการใช้อย่างแพร่หลายในรูปอาหารเสริม เช่น Fructooligosaccharides, Galactooligosaccharides ฯลฯ มีมูลค่าการตลาดที่สูงและยังส่งผลเชิงบวกต่อสุขภาพของผู้บริโภคอย่างชัดเจน จากการศึกษาเบื้องต้นของนักวิจัยจากมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์พบว่า การเตรียมสารเสริมสุขภาพพรีไบโอติกจากกากมะพร้าวด้วยเอนไซม์แมนนาเนสจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นสาร Mannooligosaccharides ที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ ดังนั้นในการศึกษาการเตรียมสารเสริมสุขภาพพรีไบโอติกจากกากมะพร้าวด้วยเอนไซม์แมนนาเนสโดยละเอียดในครั้งนี้จะเป็นการสร้างนวัตกรรมการเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตรจากผลิตผลพลอยได้ระหว่างการผลิตสินค้าเกษตร

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนากระบวนการเตรียมสารเสริมสุขภาพพรีไบโอติกจากกากมะพร้าวด้วยเอนไซม์แมนนาเนส
2. เพื่อทดสอบผลิตภัณฑ์สารเสริมสุขภาพพรีไบโอติกจากกากมะพร้าวระบบย่อยอาหารจำลอง

3. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

1. แมนแนน

1.1 แหล่งและโครงสร้างทางเคมี

แมนแนนเป็นสารประกอบประเภทเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) ซึ่งพบในส่วน of ผนังเซลล์พืช เช่น พืชไม้เนื้ออ่อน (soft wood) โดยพบอยู่ระหว่างชั้นของเซลลูโลสและลิกนิน (Ethier *et al.*, 1998) แมนแนนจากพืชนั้นสามารถแบ่งตามลักษณะโครงสร้างได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

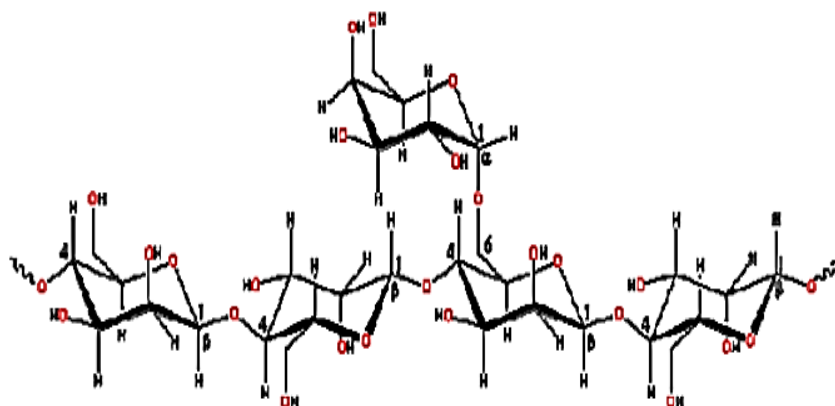
1.1.1 Heterogeneous backbone

เป็นกลุ่มของแมนแนนที่โครงสร้างหลักประกอบด้วยน้ำตาล 2 ชนิดคือกลูโคสและแมนโนส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 เรียกว่า กลูโคแมนแนน (glucomannan) เช่น แมนแนนในหัวบุก (konjac glucomannan) (Behr, 2003) โดยน้ำตาลกลูโคสในโครงสร้างหลักของกลูโคแมนแนนนั้นมีการเรียงตัวอย่างกระจัดกระจาย และอัตราส่วนโมเลกุลของน้ำตาลแมนโนส:กลูโคส ในโครงสร้างหลักอยู่ในช่วง 4:1 จนถึง 1:1 (Meier *et al.*, 1982) ซึ่งแมนแนนจากหัวบุกนั้นจะมีอัตราส่วนโมเลกุลของน้ำตาลแมนโนส:กลูโคส เป็น 16:1 และมีอันดับของการเกิดโพลิเมอร์ (Degree of polymerization: DP) มากกว่า 6,000

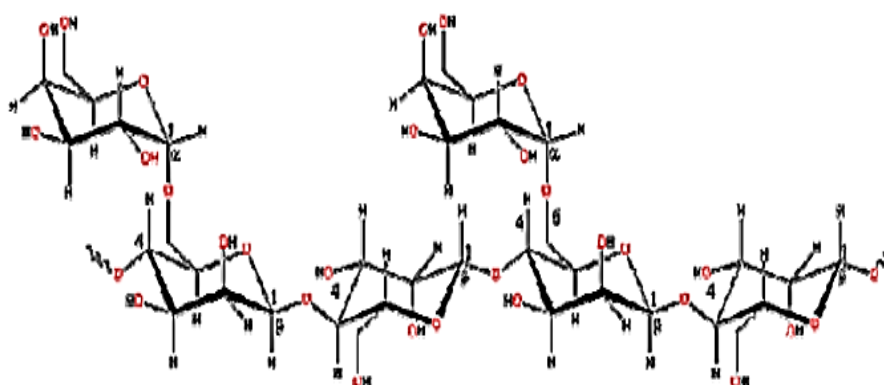
1.1.2 Homogeneous backbone

เป็นกลุ่มของแมนแนนที่โครงสร้างหลักประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนสเพียงชนิดเดียวเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 และส่วนของกิ่งแขนงเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -1,6 ระหว่างน้ำตาล กาแลคโตสกับน้ำตาลแมนโนสเรียกแมนแนนกลุ่มนี้ว่า กาแลคโตแมนแนน (Ethier *et al.*, 1998) ซึ่งพบมากในพืชเช่น เอนโดสเปิร์มของพืชตระกูลถั่ว กากเมล็ดกาแฟ เนื้อในของเมล็ดปาล์ม และกากมะพร้าวในส่วน of Kernels เป็นต้น ตัวอย่างของกาแลคโตแมนแนนที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ กาแลคโตแมนแนนใน Locust bean gum (LBG) จากเมล็ดของ *Ceratonia siliqua* และ Guar gum จากเมล็ดของ *Cyanopsis tetragonolobus* ซึ่งกาแลคโตแมนแนนในพืชแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันที่ตำแหน่งการเชื่อมด้วยพันธะ α -1,6 ในสายกิ่งแขนงระหว่างน้ำตาลกาแลคโตสกับน้ำตาลแมนโนส โดยกาแลคโตแมนแนนใน LBG มีอัตราส่วนโมเลกุลของน้ำตาลแมนโนส : กาแลคโตส ประมาณ 5:1 มีน้ำหนักโมเลกุล 310,000 ดาลตัน และจะเกิดพันธะ α -1,6 ระหว่างน้ำตาลแมนโนสประมาณ 3-4 โมเลกุล ขณะที่กาแลคโตแมนแนนใน Guar gum มีอัตราส่วนโมเลกุลของน้ำตาลแมนโนส:กาแลคโตส ประมาณ 2:1 มีน้ำหนักโมเลกุล 220,000 ดาลตัน และจะเกิดพันธะ α -1,6 ระหว่างน้ำตาลแมนโนสประมาณ 1-2 โมเลกุล

ดังภาพที่ 1



Locust bean gum



Guar gum

ภาพที่ 1 โครงสร้างกาแลคโตแมนแนนใน Locust bean gum และ Guar gum
ที่มา: Chaplin, 2005

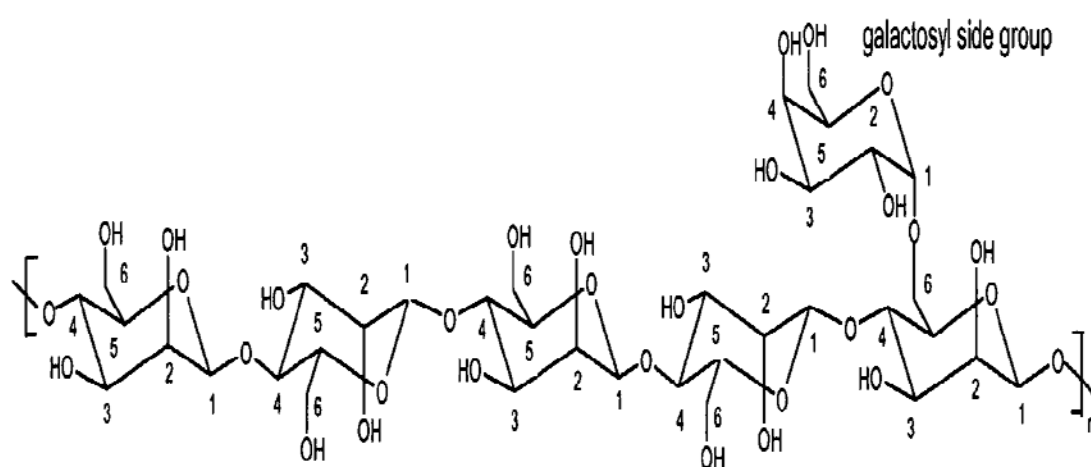
กากมะพร้าวประกอบด้วยแมนแนน กาแลคโตแมนแนน และเซลลูโลสในอัตราส่วน 26:61 และ 13 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Balasubramaniam, 1976) โดยส่วนของแมนแนนและกาแลคโตแมนแนนคิดเป็น 25-30 เปอร์เซ็นต์ของค่าที่รายงานบนพื้นฐานวัตถุแห้ง (dry matter basis) (Sundu and Dingel, 2006) โครงสร้างของกากมะพร้าวนั้นประกอบด้วยส่วนของโพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง มีผลทำให้กาแลคโตแมนแนนในกากมะพร้าวเรียงตัวเป็นผลึกแข็งและมีอัตราส่วนของน้ำตาลแมนโนสต่อน้ำตาลกาแลคโตสเท่ากับ 14:1 นอกจากนี้โครงสร้างของกาแลคโตแมนแนนที่พบนั้นยังแตกต่างจากแหล่งอื่นๆ

เช่น Guar Gum มีอัตราส่วนของน้ำตาลแมนโนสต่อน้ำตาลกาแลคโตสเป็น 2:1 ส่งผลให้กากมะพร้าวย่อยสลายยากและละลายน้ำได้น้อย (Sundu and Dingel, 2006) ซึ่งแสดงโครงสร้างของกาแลคโตแมนแนนในกากมะพร้าวดังภาพที่ 2

1.1 โครงสร้างสับสเตรท

เอนไซม์แมนนาเนสสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายแบบสุ่มที่พันธะ β -1,4 ของสับสเตรทจำพวก แมนแนน กาแลคโตแมนแนน กลูโคแมนแนน กาแลคโตกลูโคแมนแนน (จารุตา, 2548)

1.1.1 แมนแนน ประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลแมนโนสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ และพบมากใน Ivory-nuts, *Phoenix canariensis* และพวกบังกะโลปาล์ม เป็นต้น (วิไลญา, 2548)



ภาพที่ 2 โครงสร้างของกาแลคโตแมนแนนในกากมะพร้าว

ที่มา: Carole et al., 2010

1.1.2 กาแลคโตแมนแนนประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 เป็นสายหลัก และมีกิ่งก้านเป็นน้ำตาลกาแลคโตสต่อกันด้วยพันธะ α -1,6 พบใน Locust bean gum, Guar gum และกากมะพร้าว เป็นต้น (วัลญา, 2548)

1.1.3 กลูโคแมนแนนประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 ซึ่งสามารถละลายน้ำได้มากกว่าแมนแนน และเป็นโครงสร้างหลักของผนังเซลล์พืช (วัลญา, 2548)

1.1.4 กาแลคโตกลูโคแมนแนนประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนสเชื่อมต่อกับน้ำตาลกลูโคสด้วยพันธะ β -1,4 เป็นสายหลัก และมีกิ่งเป็นน้ำตาลกาแลคโตสต่อกันด้วยพันธะ α -1,6 ซึ่งอัตราส่วนของน้ำตาลต่างๆขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของสารโพลิเมอร์ (วัลญา, 2548)

2. แมนนาเนส

เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส (β -mannanase) หรือ Endo- β -1,4-D-mannanase (EC 3.2.1.78) เป็นเอนไซม์ประเภทเอนโดไฮโดรเลส ที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายแบบสุ่มที่พันธะ β -1,4 ของสับสเตรทพวก แมนแนน เฮทเทอโรแมนแนน กาแลคโตแมนแนน กลูโคแมนแนน และกาแลคโตกลูโคแมนแนน ซึ่งสารโพลิเมอร์เหล่านี้พบได้ในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรหลายชนิด เช่น หัวบุก เมล็ดพืชตระกูลถั่ว เมล็ดกาแฟ กากมะพร้าว หรือแม้แต่ผนังเซลล์ของยีสต์ (อัจฉรา, 2547)

2.1 กลไกการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส

เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเบต้า-1,4 ที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของน้ำตาลแมนโนสในโครงสร้างหลักของแมนแนน กาแลคโตแมนแนน กลูโคแมนแนน และกาแลคโตกลูโคแมนแนน (Stoll *et al.*, 1999) ในลักษณะแบบสุ่มโดยจะย่อยสลายจากบริเวณด้านในโมเลกุล (Cann *et al.*, 1999) ดังภาพที่ 3 และผลผลิตที่ได้จากการย่อยสลายคือน้ำตาลแมนโนสและแมนโนไบโอส (Xu *et al.*, 2002)

2.2 การจัดแบ่งหมวดหมู่และลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส

ไกลโคไซด์ไฮโดรเลสเป็นเอนไซม์กลุ่มที่ทำหน้าที่ย่อยพันธะไกลโคซิดิกที่เชื่อมต่อการโบไฮเดรตสองโมเลกุลหรือมากกว่า หรือระหว่างคาร์โบไฮเดรตกับส่วนที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรตโดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้สามารถแยกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามกิจกรรมหลักในปฏิกิริยาการย่อยสลาย กลุ่มที่ 1 คือ เอนไซม์ที่มีกิจกรรมการย่อยสลายจากปลายสายโซ่โพลีแซคคาไรด์และกลุ่มที่ 2 คือ เอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกจากภายในสายโซ่โพลีแซคคาไรด์ จากการวิเคราะห์โครงสร้างของเอนไซม์ต่าง ๆ พบว่าตำแหน่งที่สำคัญต่อการย่อยสลายพันธะนั้น มีผลมาจากโครงสร้างที่เป็นบริเวณเร่งปฏิกิริยา (Henrissat, 1995) ดังนั้นการศึกษาถึงกลไกในการเร่งปฏิกิริยา การจัดแบ่งหมวดหมู่ และลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ จึงมีความสำคัญที่จะช่วยให้ นักวิทยาศาสตร์สามารถใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.3 แหล่งของเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส

เอนไซม์แมนนาเนสสามารถผลิตได้จากหลายกลุ่มสิ่งมีชีวิต เช่นแบคทีเรียทั้งชนิดที่ต้องการอากาศและไม่ต้องการอากาศในการเจริญ (aerobic and anaerobic bacteria) เชื้อรา (fungi) ยูคาริโอตชั้นสูง (higher eukaryote) เช่นโปรโตซัว แมลง หอยทาก รวมทั้งเมล็ดพืชขณะเกิดการงอก (germinating plant seeds) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสได้แสดงในตารางที่ 1 และ 2

แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์แมนนาเนสสามารถแยกได้จากหลายแหล่ง ซึ่งจากการทดลองของ Hossain *et al.*, (1969) และ Abe *et al.*, (1994) ได้คัดแยกแบคทีเรียจากดินโดยใช้กากมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์แมนนาเนส ที่ขับออกสู่ภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ได้นั้นส่วนใหญ่จัดอยู่ในยีส *Bacillus* ในปี 1998 Kataowa และ Tokiwa ได้คัดแยกแบคทีเรียชนิดที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ (anaerobic bacteria) จากดินและตะกอน (sludges) พบเชื้อ *Clostridium terianum* KT-5A ซึ่งมีค่ากิจกรรมแมนนาเนสสูงที่สุด โดยปริมาณของเอนไซม์จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีการเหนี่ยวนำโดยใช้กาแลคโตแมนแนน, Guar gum, beef extract และ peptone เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ

Montiel *et al.*, (2002) คัดแยกเชื้อแอคติโนมัยซิสที่สามารถผลิตเอนไซม์แมนนาเนสได้ทั้งหมด 50 สายพันธุ์จากการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์ระหว่างการเจริญในอาหารแข่งกับอาหารเหลวที่มี locust bean gum (LBG) เป็นส่วนประกอบ พบว่า *Streptomyces scabies* CECT 3340 และ *Streptomyces ipomoea* CECT 3341 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดคือ 294.3 และ 242.9 หน่วยต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมการฟอกสีกระดาษคราฟได้

Phothichito (2006) ได้คัดแยกจุลินทรีย์จากดินในจังหวัดนครปฐม พบแบคทีเรีย 19 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสได้ โดยแบคทีเรีย *Bacillus circulans* NT 6.7 มีกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสสูงที่สุดเท่ากับ 0.306 หน่วยต่อมิลลิเมตร เมื่อใช้ LBG เป็นสับสเตรท ค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เป็น 6.0 และ 45 องศาเซลเซียสตามลำดับ เอนไซม์มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง และสารแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายแมนแนนด้วยเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสยังมีคุณสมบัติเป็นสารพรีไบโอติก ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคบางชนิด เช่น *Salmonella serovar Eteritidis* S003 และ *E. coli* E010 ได้

ตารางที่ 1 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส

จุลินทรีย์	แหล่งอ้างอิง
<i>Acinetobacter</i> sp. ST1-1	Titapoka, 2007
<i>Bacillus</i> sp.	Ooi and Kikuchi, 1995
<i>Bacillus subtilis</i>	Ratto and Poutanen, 1988
<i>Bacillus</i> sp. AM-001	Akino <i>et al.</i> , 1989
<i>Bacillus subtilis</i> NM-39	Mendoza <i>et al.</i> , 1995
<i>Bacillus</i> sp. KK01	Hossain <i>et al.</i> , 1996
<i>Bacillus subtilis</i> KU-1	Zakaria <i>et al.</i> , 1998
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Talbot <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacillus licheniformis</i>	Feng <i>et al.</i> , 2003
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> NT 6.3	Phothichito, 2006
<i>Bacillus circulans</i> NT 6.7	Phothichito, 2006
<i>Vibrio</i> sp. MA-128	Araki <i>et al.</i> , 1992
<i>Cellulomonas fimi</i>	Stoll <i>et al.</i> , 1999
<i>Caldocellum saccharolyticum</i>	Bicho <i>et al.</i> , 1991, Gibbs <i>et al.</i> , 1992
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Oda <i>et al.</i> , 1993
<i>Krebsiella oxytoca</i> CW2-3	Titapoka, 2007
<i>Pseudomonas cellulosa</i>	Hogg <i>et al.</i> , 2001
<i>Pseudomonas</i> sp.	Yamaura <i>et al.</i> , 1990
<i>Streptomyces</i> sp.	Takahashi <i>et al.</i> , 1984
<i>Streptomyces ipomoea</i>	Monitel <i>et al.</i> , 1999
<i>Streptomyces lividans</i> 66	Arcand <i>et al.</i> , 1993
<i>Thermomonospora fusca</i>	Hilge <i>et al.</i> , 1998
<i>Thermotoga neapolitana</i> 5068	McCutchen <i>et al.</i> , 1996, Duffaud <i>et al.</i> , 1997
<i>Thermotoga maritima</i>	Brown <i>et al.</i> , 1993
<i>Polyporus versicolor</i>	Johnson and Ross, 1990

ตารางที่ 2 เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส

จุลินทรีย์	แหล่งอ้างอิง
<i>Aspergillus niger</i>	Lin and Chen, 2003
<i>Aspergillus oryzae</i>	Regalado <i>et al.</i> , 2002
<i>Aspergillus aculeatus</i>	Setati <i>et al.</i> , 2001
<i>Penicillium hirsutum</i>	Bradner <i>et al.</i> , 1999
<i>Penicillium purpurogenum</i>	Park <i>et al.</i> , 1987
<i>Penicillium brasilianum</i> IPT 20888	Jorgensen <i>et al.</i> , 2003
<i>Rhodothermus marianus</i>	Politiz <i>et al.</i> , 2000
<i>Sclerotiumrolfsii</i>	Sachslehner <i>et al.</i> , 2000
<i>Trichoderma harzianum</i> T4	Ferreira and Filho, 2004
<i>Trichoderma reesei</i>	Juhasz <i>et al.</i> , 2005
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Puchart <i>et al.</i> , 1999

Jiang *et al.*, (2006) ศึกษาเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* WY34 ซึ่งมีปริมาณเอนไซม์เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสเท่ากับ 1105 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ konjac glucomannan เป็นแหล่งคาร์บอนโดยมีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เป็น 6.0 และ 65 องศาเซลเซียสตามลำดับมีความคงตัวที่พีเอช 5.5-10.1 และมีค่า Km เป็น 7.6, 10.5 และ 27.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อใช้ LBG, Guar Gum และ konjac glucomannan เป็นสับสเตรท

นฤมล (2549) ได้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์แมนนาเนสจากแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* NT6.3 ที่ Phothichitto (2006) คัดแยกได้จากดินในจังหวัดนครปฐม พบว่า อุณหภูมิ และพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 50 องศาเซลเซียส และ 6.0 ตามลำดับ เอนไซม์มีความคงตัวมากที่สุดที่พีเอช 8.0 โดยค่ากิจกรรมเอนไซม์คงเหลือเท่ากับ 59.51 เปอร์เซ็นต์และที่พีเอช 6.0 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์คงเหลือ เท่ากับ 25.24 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งข้อมูลเกี่ยวกับ คุณสมบัติของเอนไซม์นี้เป็นประโยชน์ในการศึกษาค้นคว้าทางด้านการผลิตสารแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ เพื่อใช้เป็นสารพรีไบโอติกในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์

Hossain *et al.*, (1996) ศึกษาเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *Bacillus sp.* KK01 ที่แยกได้จากดิน โดยใช้กากมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยง หลังการทำบริสุทธิ์เอนไซม์พบว่า เอนไซม์ เบต้า-แมนนาเนสที่ศึกษามี 4 ไอโซเมอร์ดังนี้ F1, F2, F3 และ F4 โดยทุก ไอโซเมอร์มี กิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุด ที่พีเอช 7.1 และอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส นอกจากนี้เมื่อศึกษาถึง ปฏิกริยาการย่อยสลายแมนแนน พบว่าเอนไซม์ทั้ง 4 ไอโซเมอร์นั้นเร่งปฏิกริยาการย่อยสลาย

แมนแนนจากกากมะพร้าวคิดเป็นสัดส่วน 23-31 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย LBG คิดเป็นสัดส่วน 19-22 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ผลิตภัณฑ์เป็น mannobiose, mannotriose และ mannotetraose

Mabrouk และ El Ahwany(2008) ศึกษาการผลิตเอนไซม์เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จาก *Bacillus amyloliquefaciens* 10A1 โดยใช้อาหาร mineral salts medium ที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน แหล่งคาร์บอนที่ใช้ประกอบด้วย เมล็ดปาล์ม เปลือกส้ม เปลือกแอปเปิ้ล ชั่งข้าวโพด ฟางข้าว เปลือกมันฝรั่ง เปลือกมะม่วง และแกลบ ส่วนแหล่งไนโตรเจนประกอบด้วย $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ และ NH_4NO_3 เพื่อเลือกอาหารผลิตเอนไซม์ที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูง โดยพบว่าแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดคือเปลือกมันฝรั่งที่ความเข้มข้น 14 กรัมต่อลิตร และแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดคือ NH_4NO_3 โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ 61.5 หน่วยต่อมิลลิกรัม โปรตีนเมื่อบ่มในอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมคือ 35 องศาเซลเซียสและ 7 ตามลำดับ

Mou และคณะ (2010) การผลิตเอนไซม์เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *Bacillus circulans* M-21 ซึ่งแยกได้จากดินโดย *Bacillus* สายพันธุ์นี้จะเจริญได้ดีเมื่อใช้แมนแนน (konjac gum, guar gum ,LBG) เป็นแหล่งคาร์บอนโดยสภาวะการหมักที่เหมาะสม คือ พีเอช 8.0 อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส 180 รอบต่อนาที และใช้ 4 กรัมต่อลิตร guar gum เป็นแหล่งคาร์บอน 20 กรัมต่อลิตร soybean powder และใช้ 5 กรัมต่อลิตร $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนโดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดที่ 36 ชั่วโมงคือ 1487 หน่วยต่อมิลลิกรัม

สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) (2554) ประสบความสำเร็จในการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสที่บริสุทธิ์จากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* และทดสอบคุณสมบัติการเร่งปฏิกิริยาที่สภาวะต่างๆ พบว่าเอนไซม์ทำงานได้ดีที่พีเอช 6.0-7.0 อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้งานจริงในระดับอุตสาหกรรมโดยการวิเคราะห์ผลผลิตที่ได้จากการย่อยโมเลกุลน้ำตาลของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์มีความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาสารตั้งต้นโมเลกุลของน้ำตาลต่างชนิดแตกต่างกัน จากนั้นทำการทดสอบคุณสมบัติโครงสร้างหน่วยย่อยและน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ รวมถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆด้วยซึ่งพบว่าโครงสร้างทุติยภูมิของเอนไซม์จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในระดับที่ทำให้โปรตีนสูญเสียคุณสมบัติโดยผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อคุณสมบัติความเสถียรของเอนไซม์

3. 프리ไบโอติก

3.1 ความหมายและคุณสมบัติของพรีไบโอติก

พรีไบโอติก (prebiotics) คือส่วนประกอบของอาหารที่ไม่สามารถย่อยได้ซึ่งมีประโยชน์ต่อเจ้าบ้านโดยจะมีผลเจาะจงในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและ/หรือกิจกรรมของจุลินทรีย์บางชนิดในลำไส้ใหญ่ซึ่งทำให้สุขภาพของเจ้าบ้านดีขึ้น (Gibson and Roberfroid, 1995) พรีไบโอติกเป็นสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ไม่ถูกดูดซึมในทางเดินอาหารส่วนบนหรือลำไส้เล็กและสามารถผ่านไปยังลำไส้ใหญ่ซึ่งเป็นที่อยู่ของจุลินทรีย์เจ้าถิ่นโดยจะส่งเสริมการเจริญเติบโตเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่เท่านั้น ได้แก่ *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* นอกจากนี้จะต้องไม่ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเช่น *Clostridium perfringens* (Vernazza *et al.*, 2006; Gibson and Roberfroid, 1995) ซึ่งมีผลในการส่งเสริมสุขภาพของผู้ที่รับประทานเข้าไป (Roberfroid, 2002) สารประกอบจำพวกโอลิโก-แซคคาไรด์และ โพลีแซคคาไรด์รวมทั้งเส้นใยอาหาร (dietary fibre) ส่วนใหญ่พบว่ามีกิจกรรมเป็นพรีไบโอติก แต่สารประกอบจำพวกคาร์โบไฮเดรตนั้นไม่ได้เป็นพรีไบโอติกทั้งหมด ในการจำแนกส่วนประกอบอาหารชนิดนั้นๆว่ามีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกส่วนประกอบอาหารดังกล่าวจะต้องมีคุณสมบัติทั้งหมดนี้ (Gibson, 2004; Gibson and Roberfroid, 1995)

- 3.1.1 ทนต่อกระบวนการย่อยการดูดซึมและดูดซับของกระเพาะอาหารและ ลำไส้เล็ก
- 3.1.2 ถูกหมักโดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่
- 3.1.3 มีผลเจาะจงในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและ/หรือกิจกรรมของจุลินทรีย์บางชนิดในระบบทางเดินอาหาร
- 3.1.4 ทำให้จุลินทรีย์นั้นสร้างสารที่ส่งผลดีต่อสุขภาพของเจ้าบ้าน

3.2 ประเภทของพรีไบโอติก

เฉลิมขวัญ และมัลลิกา (2548) รายงานว่าสารที่สามารถจัดเป็นพรีไบโอติกได้ จำเป็นต้องมีลักษณะที่สำคัญอย่างน้อย 3 ประการ คือ สารนั้นจะต้องไม่ถูกย่อยหรือดูดซึมในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก มีความจำเพาะกับแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ และการหมักของสารนั้นมีการกระตุ้นที่เป็นประโยชน์ต่อเจ้าบ้านซึ่งสามารถแบ่งประเภทของพรีไบโอติกได้ดังนี้

3.2.1 กรดน้ำตาล (sugar acid)

จัดเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีการสังเคราะห์โพลิเมอร์ (degree of polymerization) เพียง 1-2 ตัว ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ เช่น maltitol, sorbitol, isomalt, xylitol และ lactitol เป็นต้น ในบางครั้งเรียกน้ำตาลแอลกอฮอล์ ว่า POLYOLS สามารถเป็นสารให้ความหวานได้ โดยมีความหวานประมาณ 3 ใน 4 หรือ ครึ่งหนึ่งของน้ำตาล Salminen *et al.* (1993) รายงานว่า lactitol ช่วยเพิ่มจำนวนของ

Bifidobacteria ในลำไส้ใหญ่ของคน ช่วยป้องกันการติดเชื้อในลำไส้และป้องกันการก่อมะเร็ง อีกทั้งยังสามารถช่วยเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียแกรมบวกและลดระดับความเป็นกรด-ด่างในมูลได้

3.2.2 โอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharides)

สำหรับพรีไบโอติกในกลุ่มนี้ เกิดจากโมโนแซคคาไรด์จัดเป็น short-chain polysaccharide ประกอบด้วยน้ำตาลตั้งแต่ 2 ถึง 20 หน่วย มาต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก(glycosidic linkage) โอลิโกแซคคาไรด์หลายชนิดมีคุณสมบัติเป็นสารอาหารของจุลินทรีย์กลุ่มที่มีประโยชน์ซึ่งในบางครั้ง อาจเรียกว่า โคลอนิกฟู้ด (colonic food) ได้แก่ ราฟิโนส (raffinose), สตาร์ชีโอต์ (stachyose), ไชโล-โอลิโกแซคคาไรด์ (xylo-oligosaccharides), พาราติโนส(palatinose) และฟรุคโต-โอลิโกแซคคาไรด์ (fructo-oligosaccharides; FOS) ซึ่งจัดเป็น nondigestible oligosaccharides ที่สามารถจัดเป็นพรีไบโอติกได้ด้วย (กรรณิการ์, 2545) โอลิโกแซคคาไรด์สามารถแบ่งออกได้ดังนี้

3.2.2.1 แลคทูโลส (Lactulose)

แลคทูโลส เป็นน้ำตาลไดแซคคาไรด์ ที่แยกได้จากน้ำนม ไม่สามารถย่อยได้ในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์แต่สามารถถูกย่อยได้ด้วยจุลินทรีย์ในกลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรียในลำไส้ ได้ผลิตเป็นกรดไขมันสายโซ่สั้นทำให้ระดับความเป็นกรด-ด่างในลำไส้ลดต่ำลง จนไม่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคพวก *Bacteriodes*, *Clostridium* และ *Eubacterium* นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มจำนวน *Bifidobacteria*, *Lactobacillus* และ *Streptococcus* (Ross,1999) Newman (1995) รายงานว่าโอลิโกแซคคาไรด์นอกจากจะเป็นอาหารสำหรับจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์แล้ว พบว่ายังสามารถจับกับรีเซพเตอร์ บนผิวของแบคทีเรียที่ก่อโรค เช่น *E.coli* และ *Salmonella* เพื่อป้องกันหรือลดการเกาะบนผนังลำไส้ของแบคทีเรียก่อโรค และพาเอาจุลินทรีย์ออกมาทางมูลของสัตว์ ซึ่งก็สอดคล้องกับ Terada *et al.* (1992) ที่รายงานว่าการเสริมแลคทูโลสในอาหารคน 3 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีผลให้จำนวนของ *Bifidobacteria* ในมูลเพิ่มขึ้น และมีระดับความเป็นกรด-ด่างในมูลลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

3.2.2.2 ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructo – oligosaccharide; FOS)

ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์เป็นคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลเชิงซ้อนของเบต้าแทน (β -D- fructans) สายโซ่สั้นและปานกลาง ประกอบด้วย ฟรุคโตซิล (fructosyl) มาต่อกันด้วยพันธะเบต้า-2-1ไกลโคซิดิก (β -2-1 glycosidic linkage) (Campbell *et al.*, 1997) ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์สังเคราะห์ได้จากน้ำตาลซูโครส (sucrose) โดยใช้เอนไซม์ทรานสฟรุคโตซิลเลส (transfructosylase) ซึ่งมีโครงสร้างของกลูโคส (glucose) เชื่อมกับฟรุคโตส (fructose) 2-4 หน่วย หรือใช้การสกัดอินูลิน (inulin) จากหัวชิคอรี (chicory roots) จากนั้นนำอินูลินมาผ่านขบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) จะได้ผลผลิต 2 ชนิด คือ ชนิดที่มีกลูโคสและไม่มีกลูโคส (Monsan and Paul, 1995) ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์เป็นโอลิ

โกแซคคาไรด์ที่เอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของคน และสัตว์ไม่สามารถย่อยได้แต่จะถูกหมักย่อยโดยจุลินทรีย์บริเวณลำไส้ใหญ่ ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ ได้แก่ *Bifidobacteria* และ *Lactobacillus* เป็นต้น แบคทีเรียเหล่านี้สามารถควบคุมหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ก่อให้เกิดโรคโดยการผลิตกรดไขมันสายโซ่สั้น ส่งผลให้ความเป็นกรด - ด่างในลำไส้ลดลงทำให้เกิดความไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค (Ross, 1999) นอกจากนี้ Campbell *et al.* (1997) รายงานว่าการเสริมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ 6% ในอาหารหนู เป็นเวลา 14 วัน พบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacteria* และจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ใช้ออกซิเจนมีจำนวนสูงขึ้นสอดคล้องกับการศึกษาของ Gibson and Roberfroid (1995) ทดลองเสริมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 15 กรัมต่อวันในอาหารของคนจำนวน 15 วัน พบว่าสามารถเพิ่มจำนวน *Bifidobacteria* ในมูลสูงขึ้น

3.2.2.3 กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (galacto-oligosaccharide; GOS)

กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ หรือ ทรานสกาแลคโตซิเลสโอลิโกแซคคาไรด์ (transgalactosylase -oligosaccharide; TOS) สังเคราะห์จากน้ำตาลแลคโตส (lactose) ในนมโดยขบวนการทรานสกาแลคโตซิลเลชัน (transgalactosylation) ด้วยเอนไซม์เบต้า-ทรานสกาแลคโตไซด์เอส (β -transgalactosydase) (Ross, 1999) กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ไม่สามารถถูกย่อยและดูดซึมได้ในลำไส้เล็กของคนและสัตว์แต่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของ *Bifidobacteria* ในหลอดทดลองได้ (Bouhnik *et al.*, 1997)

3.2.2.4 โอลิโกแซคคาไรด์จากถั่วเหลือง (soybean - oligosaccharide)

โอลิโกแซคคาไรด์จากถั่วเหลือง ประกอบด้วย ไตรแซคคาไรด์ราฟิโนส (trisaccharide raffinose) และเตตราแซคคาไรด์ สตาร์ชีโอส (tetrasaccharide stachyose) สามารถสกัดได้จากถั่วเหลืองโดยตรง (Ross, 1999)

3.2.2.5 โอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้ชนิดอื่น (non - digestible oligosaccharide)

นอกจากโอลิโกแซคคาไรด์ ดังที่กล่าวข้างต้นแล้วยังมีโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดที่ไม่สามารถย่อยได้ชนิดอื่น (nondigestible oligosaccharide) เช่น แอลฟา-กลูโค-โอลิโกแซคคาไรด์ (α -gluco-oligosaccharide) เบต้า-กลูโค-โอลิโกแซคคาไรด์ (β -glyco-oligosaccharide) ไอโซมอลโต-โอลิโกแซคคาไรด์ (isomalto-oligosaccharide) แลคโตซูโครส (lactosucrose) และไซโต-โอลิโกแซคคาไรด์ (xyto-oligosaccharide) โอลิโกแซคคาไรด์ดังกล่าวจัดเป็นอาหารของจุลินทรีย์เป็นประโยชน์ในลำไส้ (Ross, 1999; Monsan and Paul, 1995)

3.2.3 โพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide)

3.2.3.1 อินนูลิน

อินนูลินสกัดจากหัวชิคอรี่ อินนูลินไม่สามารถย่อยสลายและดูดซึมในลำไส้เล็ก และมีคุณสมบัติในการเป็นพรีไบโอติกได้เช่นเดียวกับฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ การเสริมอินนูลินในอาหารคนสามารถ ออกฤทธิ์เป็นพรีไบโอติกได้ (Ross, 1999) สอดคล้องกับ Gibson and Roberfroid (1995) รายงานการวิจัยเกี่ยวกับคุณสมบัติทางเคมี และการย่อยอินนูลินและฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากหัว ชิคอรี่ โดยจุลินทรีย์จากลำไส้ในหลอดทดลองด้วยวิธี Gas chromatography พบว่าอินนูลินและ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ถูกย่อยสลายและนำไปใช้ทั้งหมด โดยเฉพาะจุลินทรีย์ *Bifidobacteria* สามารถย่อยสลายฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ได้ดีกว่าอินนูลิน

3.2.3.2 รีซิสแตนท์ สตาร์ท (resistant starch)

แป้งบางส่วนที่ไม่สามารถย่อยได้โดยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (α -amylase) และ แอลฟา-อะไมโลกลูโคซิเดส (α -amylglucosidase) ในลำไส้เล็ก เนื่องจากมีโครงสร้างที่ย่อยยาก เช่น เมล็ดธัญพืช ถั่วที่ยังไม่ผ่านการบด และแป้งที่มีโครงสร้างเป็นผลึกมีความหนาแน่นสูง เช่น แป้งในมันฝรั่ง แป้งข้าวโพด ข้าวที่ไม่ผ่านการทำให้สุก และแป้งที่ผ่านกระบวนการความร้อนหรือเย็นมากเกินไปจะทำให้ย่อยยาก หรืออีกสาเหตุหนึ่งคือการที่มีสารประกอบอื่นในอาหาร เช่น ไฟเตท และลิกนินไปจับเป็นสารประกอบเชิงซ้อนทำให้เอนไซม์ไม่สามารถย่อยได้ รีซิสแตนท์ สตาร์ท จะผ่านลำไส้เล็กลงไปสู่ลำไส้ใหญ่โดยไม่ถูกย่อยซึ่งรีซิสแตนท์สตาร์ท ยังไม่ถูกจัดเป็นพรีไบโอติก ถึงแม้ว่ามีผลช่วยเพิ่มการขยายจำนวนของ *Bifidobacteria* และ *Lactobacillus* ในหนู เนื่องจากยังไม่ทราบผลต่อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ที่แน่นอนในคนและสัตว์อื่น (Ross, 1999)

3.2.4 กลุ่มอื่นๆ

Mucin glycoproteins ถูกสร้างโดย goblet cells ที่อยู่ในเยื่อบุผิวลำไส้และเป็นสารตั้งต้นหลักสำหรับการหมักในลำไส้ (สารโรซ, 2547) Related mucopolysaccharides เช่น chondroitin sulphate, heparin, pancreatic และ bacterial secretions ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารที่มีไว้สำหรับจุลินทรีย์ในลำไส้ (เนลิมขวัญ และมัลลิกา 2548) และ Protein and peptides สารเหล่านี้สร้างขึ้นในอาหารสร้างโดยการหลั่งของตับอ่อนหรือสร้างโดยแบคทีเรียแต่จะมีปริมาณน้อยกว่าพวกคาร์โบไฮเดรต (Ross, 1999)

3.3 กลไกการทำงานของพรีไบโอติก

เนื่องจากพรีไบโอติกมีแหล่งที่มาหลากหลายและมีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน จึงมีกลไกการทำงานหลายวิธีคือ เลือกระดับการเจริญเติบโตและการทำงานของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ โดยกลไกช่วยในการเลือกทำงาน 2 กลไก คือ การกีดกันเพื่อขจัดออก (competitive exclusion, CE) ถูกย่อยได้โดยเอนไซม์จำเพาะ เช่น เอนไซม์ β -fructosidase และ β -galactosidase เป็นต้น (สารโรซ, 2547)

และพรีไบโอติกจะจับเกาะกับเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นโทษ ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถยึดเกาะกับเยื่อผนังลำไส้ได้ จึงถูกขจัดออกไป (Aniansson *et al.*, 1990) นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้โดยพรีไบโอติกจะทำปฏิกิริยากับ protein receptors บนผนังเซลล์สร้างภูมิคุ้มกันของเยื่อผนังลำไส้ ยังส่งผลให้มีการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น (Chesson, 1993; Savage *et al.*, 1996) โดยการเพิ่มจำนวนของเซลล์ goblet ซึ่งเป็นเซลล์สร้างเยื่อเมือก (mucins) ของผนังลำไส้เล็กช่วยปกป้องลำไส้จากการติดเชื้อ (Savage *et al.*, 1997) จากการศึกษาเชื่อว่าพรีไบโอติก อาจมีผลในการยับยั้งมะเร็งโดยออกฤทธิ์ยับยั้งการกลายพันธุ์และการต้านอนุมูลอิสระ (Chorvaticova *et al.*, 1999; Krizkova *et al.*, 2001)

นอกจากนี้พรีไบโอติกยังอาจช่วยลดการโยกย้าย (translocation) ของเชื้อจุลินทรีย์มิให้เข้าไปในระบบของร่างกาย อันเป็นการช่วยรักษาสารภูมิคุ้มกันไว้ ไม่ให้ถูกใช้โดยไม่จำเป็น (Monsanand Paul, 1995) เนื่องจากคุณสมบัติของพรีไบโอติกที่ไม่ถูกย่อยและดูดซึมในลำไส้ส่วนต้นของสัตว์กระเพาะเดี่ยว สาร์โซ (2547) รายงานว่าปกติแป้งจะถูกย่อยโดยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (α -amylase) หรือแอลฟา-1,4 กลูแคน-4-กลูโคโนไฮโดรเลส (α -1,4 glucan-4-gluconohydrolase) เป็นเอนไซม์ที่พบในน้ำลายและตับอ่อน สามารถย่อยพันธะแอลฟา (1,4) ไกลโคซิดิกของแป้ง แต่เอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์กระเพาะเดี่ยวไม่สามารถย่อยพันธะเบต้า-ไกลโคซิดิกทำให้พรีไบโอติกไม่สามารถถูกย่อยได้ แต่ถูกใช้เป็นอาหารและหมักย่อยโดยจุลินทรีย์ (colonic fermentation) ในลำไส้ พรีไบโอติกมีคุณสมบัติเป็นแหล่งคาร์บอนที่จำเพาะถูกเลือกใช้โดยจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์แต่ไม่ถูกใช้โดยจุลินทรีย์ที่เป็นโทษ

4. การผลิตพรีไบโอติกในกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์

ผลิตภัณฑ์ของพรีไบโอติกในกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์จะสามารถผลิตได้จากหนึ่งใน 3 กระบวนการโดยทั่วไป (Grizard และ Barthomeuf, 1999) คือ การสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากพืชโดยตรง การควบคุมการย่อย (hydrolysis) จากโพลีแซคคาไรด์ และการสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ โดยใช้ไฮโดรเลส (hydrolases) หรือไกลโคซิล ทรานสเฟอเรส (glycosyl transferases) จากพืชหรือมีแหล่งกำเนิดจุลินทรีย์ (L'Hocine *et al.*, 2000)

4.1 การผลิตกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (GOS)

การผลิตกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (GOS) จากยีสต์ *Trichosporon mucoides* TISTR 5755 ที่คัดแยกได้จากดินบริเวณแหล่งน้ำทิ้งของศูนย์ผลิตภัณฑนม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สามารถผลิตเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสได้ดีที่ผนังเซลล์ในถังหมักภายใต้การควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 6.8 อัตราการกวน 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm ซึ่งพบว่าการผลิตกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากแลคโตสด้วยเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสถึงบริสุทธิ์ในสภาวะที่เหมาะสมต่อ

กิจกรรมไฮโดรลิซิสและถ่ายโอนหมู่กาแลคโตซิลของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสคือ การใช้โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียสตามลำดับ และใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นของแลคโตสที่ 300 กรัมต่อลิตรนอกจากนี้ยังพบว่าสามารถใช้มอลโทสและเซลโลไบโอสเป็นสับสเตรทโดยกาแลคโตโอลิโกแซคคาร์ไรต์ที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 55.1 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้แลคโตสที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 300 กรัมต่อลิตร และเอนไซม์ 3.4 หน่วยต่อกรัมแลคโตส ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งให้ผลได้และอัตราการผลิตเชิงปริมาตรของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.48 กรัมต่อกรัมแลคโตส และ 8.4 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ตามลำดับ และให้ผลได้ผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.49 และ 0.21 กรัมต่อกรัม เมื่อใช้มอลโทสและไซโลสเป็นสับสเตรทที่ระดับความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร (सारจัน,2556) จากการศึกษาพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตน้ำตาลกาแลคโต โอลิโกแซคคาร์ไรต์โดยปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของน้ำตาลแลคโตส ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลแลคโตส ความเข้มข้นของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส พีเอช อุณหภูมิ แหล่งที่มาของเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส รวมทั้งชนิดและความเข้มข้นของไอออนโลหะที่ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งและตัวยับยั้งอินทรีย์ในการทำงานของเอนไซม์

จากการศึกษาพิกษามณูช์, สุดาทิพย์ และสุนีย์ (2556) พบว่าสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบชนิดขับออกนอกเซลล์จาก *Penicillium oxalicum* KUB-SN2-1 ประกอบด้วยเซลลูเลส ไซลานเนส และแมนนาเนสที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 2.82 ± 0.17 (เมื่อใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส เป็นสับสเตรต) 1.50 ± 0.04 (เมื่อใช้เบิร์ชหวูดไซแลนเป็นสับสเตรต) และ 36.01 ± 0.13 (เมื่อใช้โลคัสบินกัมเป็นสับสเตรต) หน่วยต่อมิลลิกรัมตามลำดับ วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 5 ชนิดคือ กากกาแฟ กากชานอ้อย กากถั่วเหลือง กากเนื้อมะพร้าว และเปลือกมันฝรั่งถูกใช้เป็นสับสเตรตสำหรับการผลิตน้ำตาลโอลิโกแซคคาร์ไรต์ด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบดังกล่าว โดยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรแต่ละชนิดละลายอยู่ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.0 บ่มกับสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 60 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเมื่อทำการย่อยกากเนื้อมะพร้าวนาน 30 ชั่วโมงมีปริมาณสูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 7.51 ± 0.52 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัมในขณะที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเมื่อย่อยกากกาแฟ เปลือกมันฝรั่ง กากชานอ้อย และกากถั่วเหลืองมีค่าเท่ากับ 3.35 ± 0.16 (48 ชั่วโมง) 3.31 ± 1.43 (48 ชั่วโมง) 4.10 ± 0.40 (48 ชั่วโมง) และ 2.32 ± 0.15 (48 ชั่วโมง) มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และเมื่อศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร พบว่าปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรของกากเนื้อมะพร้าว กากกาแฟ เปลือกมันฝรั่ง และกากชานอ้อยให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด ในขณะที่ 8 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรของกากถั่วเหลืองให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด จากนั้นวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง คือแมนโนส กากชานอ้อย และเปลือกมันฝรั่งคือกลูโคส ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยกากเนื้อมะพร้าวและกากกาแฟ คือน้ำตาลที่ยังไม่ทราบชนิดแน่ชัด

4.2 แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ (mannanoligosaccharide, MOS)

สารแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์จัดเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่ง ซึ่งมีน้ำตาลแมนโนสเป็นองค์ประกอบ (mannose containing carbohydrate) มีความคงตัวสูงและไม่ถูกย่อยโดยกรดหรือด่าง แต่จะถูกย่อยโดยเอนไซม์ที่หลังจากแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและฟอสเฟตได้ สารแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ใช้ในการดูดสารพิษจากเชื้อราภายใต้ชื่อการค้า Mycosob (alltech Inc.) เป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งได้จากการดัดแปลงผนังเซลล์ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* (Alltech Ins.) โดยการนำเซลล์ยีสต์มาทำให้เกิดการแตกตัว (lysed yeast culture) โดยวิธีการปั่นแยก (centrifugation) (Spring *et al.*, 2000)

สารแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ (mannan oligosaccharide, Mycosob หรือ Bio-Mos) ที่ได้จากผนังเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มีกลูแคน (glucan, 30%) แมนแนน (mannan, 30%) และโปรตีนไคติน (chitin, 12.5%) เป็นส่วนประกอบ กลูแคนเรียงตัวเป็นชั้นแรก โดยมีน้ำตาลกลูโคสจับกันด้วยพันธะ β -1,6 และ β -1,3 เป็นโครงสร้างหลักหรือแกน (matrix) ของผนังเซลล์และมีกิ่งก้านหรือแขน(side chain) mannose, mannobiose, mannotriose และ monotrtrrose ยึดจับอยู่ด้วยพันธะ α -1,2 และ α -1,3 นอกจากนั้นยังมีหมู่ฟอสเฟต (di-esterified phosphate group) เป็นองค์ประกอบ (Lyons, 1994)

5. การใช้แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารสัตว์ปีกและสุกร

ในการใช้แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในสูตรอาหารสำหรับสัตว์ปีกและสุกรนั้นส่วนใหญ่นำมาใช้เป็นสารเสริมในอาหารโดยเสริมร่วมกับอาหารให้สัตว์ปีกและสุกร โดยระดับการใช้ที่เหมาะสมนั้นยังไม่ได้มีรายงานที่ชัดเจน แต่หากใช้ในระดับที่ต่ำเกินไปก็อาจส่งผลให้ไม่เกิดผลตามวัตถุประสงค์ของการใช้หรือหากใช้ในระดับที่สูงเกินไปอาจไปลดระดับการใช้ประโยชน์ในส่วนของพลังงานได้เนื่องจากแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ไม่สามารถถูกย่อยได้ด้วยน้ำย่อยของสัตว์ปีกหรือสุกร สำหรับในสัตว์ปีกมีรายงานการศึกษาการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารสัตว์ปีกอย่างแพร่หลาย โดยมีความแปรปรวนของระดับการเสริมอยู่ที่ 0.025-0.2 เปอร์เซ็นต์ในสูตรอาหาร ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดและชนิดของสัตว์ปีก โดยจากการศึกษาในไก่วงมีความแปรปรวนของระดับการเสริมอยู่ที่ 0.05-0.2 เปอร์เซ็นต์ในสูตรอาหาร และพบว่าที่ระดับการเสริมที่ 0.05 เปอร์เซ็นต์ในสูตรอาหารให้ผลดีต่อน้ำหนักตัวและประสิทธิภาพการใช้อาหารมากที่สุด (Fritts and Waldroup, 2003) ส่วนในการศึกษาในนกกะทพบว่า มีความแปรปรวนของระดับการเสริมอยู่ที่ 0.01-0.02 เท่านั้น (Oguz and Parlat, 2004) สำหรับการศึกษาในไก่กระທงและไก่ไข่นั้น ความแปรปรวนของระดับการเสริมที่ใช้ในการศึกษานั้นมีค่าตั้งแต่ 0.025-0.1 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าระดับการเสริมที่สูงขึ้นจะส่งผลต่อปริมาณการกินและให้ค่าน้ำหนักตัวที่เปลี่ยนแปลง (Zou *et al.*, 2006) ซึ่งหากเสริมในระดับที่สูงขึ้นก็ส่งผลให้ระดับภูมิคุ้มกันสูงขึ้นด้วย

สำหรับการใช้แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารสุกรมีรายงานการเสริมตั้งแต่ 0.1-0.5 เปอร์เซ็นต์ และพบว่ามีการศึกษาในสุกรเล็กหรือลูกสุกรเป็นส่วนใหญ่ โดยการเสริมที่ระดับ 0.3 เปอร์เซ็นต์ในสูตรอาหารจะให้ผลดีต่อน้ำหนักตัวและประสิทธิภาพการใช้อาหารมากที่สุด (Davis *et al.*, 2002) และพบว่าที่ระดับการเสริมที่เพิ่มสูงขึ้นมีผลเพิ่มการผลิตภูมิคุ้มกันที่สูงขึ้น ในสุกรที่เป็นสุกรรุ่นและสุกรขุนพบว่า ระดับที่ควรเสริมควรอยู่ที่ 0.1 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ในสูตรอาหาร (Davis *et al.*, 2004) ตามลำดับ เนื่องจากการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในสุกรที่เจริญเติบโตมักไม่ได้ผลที่ชัดเจน ทั้งนี้เนื่องจากสุกรที่โตแล้วมีภูมิคุ้มกันที่เพียงพอแล้ว จากข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นได้ว่าระดับของการใช้แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในสูตรอาหารของสัตว์นั้นแปรปรวนตามชนิดและขนาด โดยในไก่กระທงและไก่ไข่ควรเสริมที่ระดับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในสุกรเล็กควรเสริมที่ 0.3 เปอร์เซ็นต์ และในสุกรรุ่นและขุนควรใช้ที่ 0.1 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ผลของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการกระตุ้นการพัฒนาระบบทางเดินอาหาร

มีการรายงานว่าแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์สามารถส่งผลต่อการเพิ่มจำนวน goblet cell ซึ่งเป็นเซลล์สร้างเยื่อเมือก (mucins) ของผนังลำไส้เล็ก มีหน้าที่ช่วยปกป้องลำไส้จากการติดเชื้อ โดยได้มีการศึกษาพบว่า เมื่อทำการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารไก่ จะมีผลให้ความยาวของ villi ซึ่งเป็นส่วนที่ยื่นออกมาจากผนังด้านในของลำไส้เล็กเพิ่มมากขึ้น (Iji *et al.*, 2001; Loddi *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2007) ทำให้ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซึมอาหารที่ย่อยแล้วอย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังช่วยเพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุ สังกะสี ทองแดงและซีลีเนียมในลูกสุกรอีกด้วย (Shao *et al.*, 2000) และพบว่าแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก ที่มีประสิทธิภาพชนิดหนึ่ง เพราะสามารถเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับสัตว์ เพิ่มจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหาร และช่วยเพิ่มน้ำหนักให้แก่สัตว์พาณิขย์หลายประเภทรวมทั้งสัตว์เลี้ยงด้วย ในปัจจุบันได้มีการผลิตแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ออกจำหน่ายในท้องตลาดเพื่อการค้าภายใต้ชื่อผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น Agrimos, ImmunoWall, Royal Canin และ Bio-MOS โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ Bio-MOS นั้น ได้มีการยืนยันผลการวิจัยว่า สามารถช่วยเพิ่มน้ำหนักให้แก่สัตว์ และสามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารซึ่งเป็นผลดีต่อระบบภูมิคุ้มกันเป็นจำนวนมาก รวมทั้งช่วยลดการอักเสบและติดเชื้ออีกด้วย ดังนั้นแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกของสารเสริมที่นำมาใช้ในการเพิ่มผลผลิตทางปศุสัตว์ และลดปัญหาที่เกิดขึ้นจากการใช้สารปฏิชีวนะ โดยการใช้เป็นสารเสริมเพื่อทดแทนการใช้สารปฏิชีวนะควรทำ ควบคู่กันไปกับปรับปรุงพื้นฐานการจัดการฟาร์ม รวมทั้งการป้องกันโรค การจัดระบบสุขศาสตร์สัตว์ที่ได้มาตรฐาน เพื่อจะช่วยเพิ่มผลผลิตให้มากยิ่งขึ้นและลดต้นทุนลง

4. ระเบียบวิธีวิจัย

ในการทำวิจัยมีขั้นตอนที่สำคัญ 3 ขั้นตอนคือ

1. ทดสอบปัจจัยต่างๆ ที่มีต่อการย่อยกากมะพร้าวด้วยเอนไซม์แมนนาเนส เช่น ปริมาณเอนไซม์ ระยะเวลา ฯลฯ โดยวัดจากชนิดและปริมาณ Mannooligosaccharide ที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อย
2. ทดลองผลิตสารเสริมสุขภาพพรีไบโอติกจากการมะพร้าวด้วยเอนไซม์แมนนาเนสโดยการย่อยด้วยเอนไซม์และทำให้อยู่ในรูปผงแห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer
3. ทดสอบคุณภาพของสารเสริมสุขภาพพรีไบโอติกที่ผลิตได้โดยมีการทดสอบดังนี้
 - การทนต่อกรดในกระเพาะ
 - การทนต่อน้ำย่อยอะไมเลสในลำไส้เล็ก
 - การทดสอบในระบบลำไส้จำลอง (*in vitro* system) โดยวัดการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล (Realtime PCRและ/หรือ FISH) และปริมาณกรดที่เกิดขึ้น

โดยมีรายละเอียดวิธีการทดลองดังนี้

1. แบคทีเรียและการเพาะเลี้ยง

เชื้อ *Bacillus circulans* NT 6.7 สำหรับใช้ในการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสที่เก็บใน 40 เปอร์เซ็นต์ กลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำมาเลี้ยงในอาหาร Nutrient Broth (NB) บ่มภายใต้สภาวะให้อากาศที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

2. การเตรียมกากมะพร้าว

กากมะพร้าวเตรียมโดยนำกากมะพร้าวไปตากแดด 1 วัน แล้วทำแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมงแล้วนำมาบดและบดด้วยเครื่อง Hammer mill (Janke & Kunkel IKA Labortechnik) ให้มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร และนำมาสกัดไขมันออกโดยวิธี soxhlet จะได้กากมะพร้าวที่ปราศจากไขมัน (Defatted copra meal)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการศึกษามี 2 สูตร สูตรแรกคือ Producing medium (ดัดแปลงจาก Abe *et al.*, 1994) ซึ่งประกอบด้วยกากมะพร้าวปราศจากไขมัน 1 เปอร์เซ็นต์ Poly peptone 3 เปอร์เซ็นต์ KH_2PO_4 1.50 เปอร์เซ็นต์ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.06 เปอร์เซ็นต์ และ Corn steep liquor (v/v) 2.5 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที สูตรที่สองคือ Mineral salts medium (ดัดแปลงจาก Jones และ Ballou, 1969) ซึ่งประกอบด้วยกากมะพร้าวปราศจากไขมัน 1 เปอร์เซ็นต์, NH_4NO_3 0.03 เปอร์เซ็นต์, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02 เปอร์เซ็นต์ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001

เปอร์เซ็นต์ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.005 เปอร์เซ็นต์ K_2HPO_4 0.754 เปอร์เซ็นต์และ KH_2PO_4 0.232 เปอร์เซ็นต์ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

4. การวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนส

วัดกิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนสโดยนำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการผลิตและสารละลายสับสเตรทซึ่งประกอบด้วย 1 เปอร์เซ็นต์ LBG ร่วมกับ 50 มิลลิโมลาร์โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดสารละลายเอนไซม์ที่ได้ 0.1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดสอบที่มีสารละลายสับสเตรทอยู่ 0.1 มิลลิลิตรบ่มอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที วัดน้ำตาล reducing sugar ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แมนนาเนสโดยวิธี dinitrosalicylic acid (DNS) method (Miller, 1959) ส่วนหลอดควบคุมให้วิเคราะห์วิธีเดียวกับหลอดทดสอบแต่เติมสารละลาย DNS ก่อนเติมสารละลายเอนไซม์ โดยให้ 1 ยูนิตของกิจกรรมของเอนไซม์หมายถึงปริมาณแมนโนส 1 ไมโครโมลต่อนาทีที่เอนไซม์ย่อยได้ภายใต้สภาวะในการทดลอง

5. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยกากมะพร้าวโดยเอนไซม์ที่เตรียม

วางแผนการทดสอบปัจจัย 3 ปัจจัยคือ ความเข้มข้นเอนไซม์ ความเข้มข้นกากมะพร้าว และเวลา ทำการออกแบบการทดลองด้วยโปรแกรม Minitab 16 โดยใช้ Response surface methodology แบบ central composite design ทำการทดสอบตามสภาวะที่ออกแบบการทดลองไว้โดยเติมสารละลายเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างๆ 10 มิลลิลิตร และสารละลายสับสเตรทที่ความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งประกอบด้วยกากมะพร้าวที่ปราศจากไขมัน ใน 50 มิลลิโมลาร์โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 จำนวน 10 มิลลิลิตร ลงในขวด Duran ขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ใน water bath shakerตามเวลาที่กำหนด จากนั้นหยุดปฏิบัติการย่อยโดยการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายใส่ปิเปตต์วิเคราะห์ค่า reducing sugars และ total carbohydrate ด้วยวิธีทางเคมี และปริมาณโกลิโกแซคคาร์ไรด์ด้วยเครื่อง HPLC

5.1การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

- 5.1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานที่ประกอบด้วย mannobiose, mannotriose, mannotetraose, mannopentose, mannohexose และmannose ที่มีความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตรแล้วเจือจางอีก 4 ความเข้มข้น
- 5.1.2 ฉีดสารละลายมาตรฐานที่เตรียมในข้อ 6.1 เข้าเครื่อง HPLC จำนวน 20 ไมโครลิตรในแต่ละความเข้มข้นจะได้โครมาโตแกรมที่ต้องการ จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของสารและความสูงของพีคของสารละลายมาตรฐาน
- 5.1.3 ฉีดสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์เข้าเครื่อง HPLC จำนวน 20 ไมโครลิตร

- 5.1.4 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์โพลิโกแซกคาร์ไรด์
- 5.1.4.1 ตัวชะคือน้ำที่ปราศจากไอออน
- 5.1.4.2 อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที
- 5.1.4.3 อุนหนุมิคอลัมน์ 75 องศาเซลเซียส และอุนหนุมิdetector 40 องศาเซลเซียส
- 5.1.4.4 คอลัมน์ Aminex Carbohydrate HPX-42C
- 5.1.4.5 ตัวตรวจวัด RI-detector

6. การทดสอบความเป็นพรีไบโอติก

กลุ่มตัวอย่างนำสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมะพร้าวด้วยเอนไซม์มา 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดสอบที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 มิลลิลิตร เติมเชื้อสำหรับทดสอบ ที่เลี้ยงให้อยู่ในช่วง log phase 50 ไมโครลิตร ก่อนเติมทำการเจือจางเชื้อ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้อยู่ในช่วงค่าความขุ่น 0.5 - 0.6 กลุ่มควบคุมใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมะพร้าว โดยเชื้อแบคทีเรียกลุ่มแลคติก *Lactobacillus* เลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มในสภาวะไร้อากาศที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำส่วนหนึ่งมาวัดค่าการดูดกลืนแสงและนำส่วนที่เหลือมาทำการเจือจางที่ 10^{-1} - 10^{-8} ทำการ Spread plate ที่ลำดับการเจือจาง 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส over night สำหรับเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* JCM 5885 เลี้ยงในอาหาร BHI broth ส่วน *Enterococcus faecalis* JCM5805 เลี้ยงในอาหาร NB broth บ่มใน incubator shaker ที่ความเร็วรอบ 150 rpm 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำส่วนหนึ่งมาวัดค่าการดูดกลืนแสงและนำส่วนที่เหลือมาทำการเจือจางที่ 10^{-1} - 10^{-8} ทำการ Spread plate ที่ลำดับการเจือจาง 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส over night ทำการตรวจนับโคโลนีที่เกิดขึ้นและรายงานผลการทดสอบเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมะพร้าว และเชื้อกลุ่มก่อโรค 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli* E010, *Salmonella enteritidis* S003, *Shigella dysenteriae* DMST 1511 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 029 เลี้ยงในอาหาร NB broth บ่มใน incubator shaker ที่ความเร็วรอบ 150 rpm ที่ 37 องศาเซลเซียสเวลา 4 ชั่วโมง นำส่วนหนึ่งมาวัดค่าการดูดกลืนแสงและนำส่วนที่เหลือมาทำการเจือจางที่ 10^{-1} - 10^{-8} ทำการ Spread plate ที่ลำดับการเจือจาง 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส over night ทำการตรวจนับโคโลนีที่เกิดขึ้นและรายงานผลการทดสอบเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมะพร้าว (Nitisinprasert *et al.*, 2000) และคำนวณหาค่า Effect of culture filtrate on Lactic acid bacteria และ Effect of of culture filtrate on pathogen

สูตร Effect of culture filtrate on Lactic acid bacteria :

$$\text{Enhanced activity (\%)} = ((\text{SB} - \text{CB}) / \text{CB}) \times 100$$

สูตร Effect of of culture filtrate on pathogen :

$$\text{Inhibition activity (\%)} = ((\text{CB} - \text{SB}) / \text{CB}) \times 100$$

7. การทดสอบในระบบลำไส้จำลอง (*in vitro* system)

ทำการทดสอบในระบบลำไส้จำลอง โดยเก็บตัวอย่างอุจจาระจากผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีการใช้สารปฏิชีวนะและไม่รับประทานจุลินทรีย์โพรไบโอติกจำนวน 4 คน มาใช้เป็น หัวเชื้อในการหมักในระบบจำลองลำไส้ใหญ่ในอาหาร Basal medium ปริมาตร 45 มิลลิลิตร (peptone water 2g/l (Oxoid), yeast extract 2 g/l (Oxoid), NaCl 0.1 g/l, K_2HPO_4 0.04 g/l, KH_2PO_4 0.04 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/l, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.01 g/l, $NaHCO_3$ 2 g/l, Tween-80 2 ml (BDH), haemin 0.05 g/l, vitamin K1 10 ml, cysteine.HCl 0.5 g/l, bile salts 0.5 g/l, pH 7.0) ในสภาวะไร้อากาศที่ 37°C, pH 6.7 - 6.9 โดยความเข้มข้นสุดท้ายของโพรไบโอติกที่ทดสอบคือ 1% (w/v) เก็บตัวอย่างที่เวลาในการบ่ม 0, 5, 10, 24, และ 34 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์จำนวน แบคทีเรียโดย fluorescent *in situ* hybridization โดยใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบดังตารางที่ 1 และวัด ปริมาณ short chain fatty acid (SCFA) ด้วย HPLCและนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ t-test ที่ $P < 0.05$ ด้วยโปรแกรม SPSS for Windows (version 21.0; SPSS, Inc.) สำหรับค่าจำนวนแบคทีเรีย และค่าการผลิต SCFA และใช้ One-way ANOVA และ post hoc Tukey's tests เพื่อหาค่าความ แตกต่างของโพรไบโอติกที่ใช้ระหว่างกลุ่มของแบคทีเรียและ SCFA ที่เกิดขึ้นที่ $P < 0.05$

ตารางที่ 3 16S ribosomal RNA oligonucleotide probes used in this study

Probe name	Specificity	Sequence (5'-3')	Reference
Bif164	<i>Bifidobacterium</i> spp.	CAT CCG GCA TTA CCA CCC	Langendijk <i>et al.</i> (1995)
Lab158	<i>Lactobacillus</i> – <i>Enterococcus</i> group	GGT ATT AGC AYC TGT TTC CA	Harmsen <i>et al.</i> (1999)
Bac303	Most Bacteroidaceae and Prevotellaceae, some Porphyromonadaceae	CCA ATG TGG GGG ACC TT	Manz <i>et al.</i> (1996)
Ato291	<i>Atopobium</i> cluster	GGT CGG TCT CTC AAC CC	Harmsen <i>et al.</i> (2000)
Chis150	Most of the <i>Clostridium</i> <i>histolyticum</i> group (<i>Clostridium</i> clusters I and II)	TTA TGC GGT ATT AAT CTY CCT TT	Franks <i>et al.</i> (1998)
Erec482	Most of the <i>Clostridium</i> <i>coccoides</i> – <i>Eubacterium rectale</i> group (<i>Clostridium</i> clusters XIVa and XIVb)	GCT TCT TAG TCA RGT ACC G	Franks <i>et al.</i> (1998)
Rrec584	<i>Roseburia</i> genus	TCA GAC TTG CCG YAC CGC	Walker <i>et al.</i> (2005)
Fpra655	<i>Faecalibacterium</i> <i>prausnitzii</i> and relatives	CGC CTA CCT CTG CAC TAC	Hold <i>et al.</i> (2003)
Prop853	<i>Clostridium</i> cluster IX	ATT GCG TTA ACT CCG GC	Walker <i>et al.</i> (2005)

5. ผลการวิจัยและการวิเคราะห์ผลการวิจัย

5.1 การเตรียมกากมะพร้าว

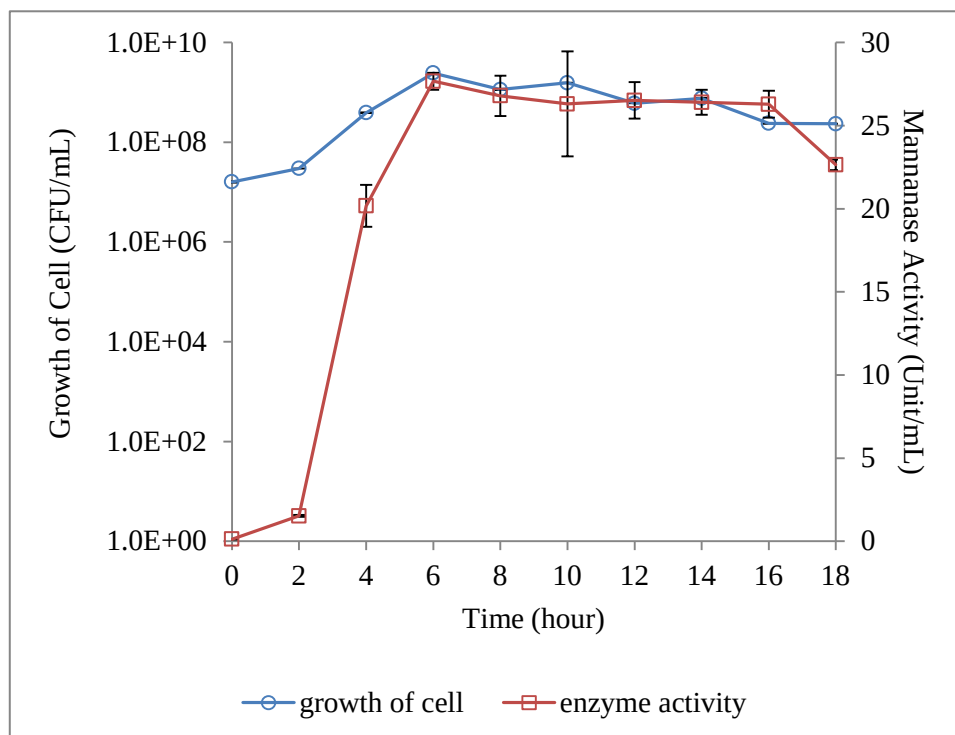
นำกากมะพร้าวที่ผ่านการคั่นกะทิไปตากแดด 1 วัน แล้วอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมงแล้วนำมาบดและบดด้วยเครื่อง Hammer mill (Janke & Kunkel IKA Labortechnik) ให้มีขนาด 0.5 มิลลิเมตร และนำมาสกัดไขมันออกโดยวิธี soxhlet โดยใช้เฮกเซน (Hexane) เป็นตัวทำละลาย จะได้กากมะพร้าวที่ปราศจากไขมัน (Defatted copra meal) จากนั้นนำไปวิเคราะห์ค่า proximate ของกากมะพร้าวพบว่ามียาค่าดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 Proximate of copra meal and defatted copra meal

Raw materials	moisture (%)	fat (%)	ash (%)	protein (%)	fiber (%)	carbohydrate (%)
Copra meal	5.01	75.90	1.30	15.37	13.75	2.42
Defatted copra meal	3.22	0.00	2.19	21.24	13.08	60.64

5.2 การผลิตเอนไซม์แมนนาเนส

ผลิตเอนไซม์แมนนาเนส ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus circulans* 6.7 พบว่าอัตราการเจริญของแบคทีเรียและการสร้างเอนไซม์เป็นดังภาพที่ 4 เห็นได้ว่าเอนไซม์ปริมาณสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 6 ของการเพาะเลี้ยง จึงทำการแยกเซลล์ออกจากเอนไซม์โดยการปั่นเหวี่ยง นำเอนไซม์ไปหาค่ากิจกรรมและใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 4 Mannanase production in 5 litre fermenter using defatted copra meal as carbon source

5.3 การทดสอบปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยกากมะพร้าวด้วยเอนไซม์แมนนาเนส

วางแผนการทดสอบปัจจัย 3 ปัจจัยคือ ความเข้มข้นเอนไซม์ ความเข้มข้นกากมะพร้าว และเวลา ทำการออกแบบการทดลองด้วยโปรแกรม Minitab 16 โดยใช้ Response surface methodology แบบ central composite design ทำการทดสอบตามสภาวะที่ออกแบบการทดลองไว้ (ตารางที่ 5) โดยเติมสารละลายเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ 10 มิลลิลิตร และสารละลายสับสเตรทที่มีความเข้มข้นต่างๆ ซึ่งประกอบด้วยกากมะพร้าวที่ปราศจากไขมัน ใน 50 มิลลิโมลาร์โพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6.0 จำนวน 10 มิลลิลิตร ลงในขวด Duran ขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ใน water bath shakerตามเวลาที่กำหนด จากนั้นหยุดปฏิกิริยาการย่อยโดยการต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายใสไปวิเคราะห์ค่า reducing sugars และ total carbohydrate ด้วยวิธีทางเคมี และปริมาณโอลิโกแซคคาร์ไรต์ด้วยเครื่อง HPLC ผลการทดลองดังตารางที่ 6 จากนั้นทำนายสภาวะที่เหมาะสมด้วยโปรแกรม Minitab 16 ผลดังตารางที่ 7 โดย RUN1 ทำนายจากค่าต่ำสุดของ reducing sugar และค่าสูงสุดของโอลิโกแซคคาร์ไรต์ ส่วน RUN 2 ทำนายจากค่าสูงสุดของ reducing sugar และค่าสูงสุดของโอลิโกแซคคาร์ไรต์

ไรต์เมื่อทำการทดลองย่อยกากมะพร้าวด้วยเอนไซม์แมนนาเนสตามสภาวะที่ทำนายได้พบว่าปริมาณโอลิโกแซคคาร์ไรต์และ reducing sugar มีค่าแตกต่างจากค่าทำนายได้ดังตารางที่ 8 และ 9 และเมื่อนำค่าที่ได้จากการทดลองมาพิจารณาดังตารางที่ 10 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยกากมะพร้าวด้วยเอนไซม์แมนนาเนสคือ ปริมาณเอนไซม์ 20 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาณมะพร้าว 2.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรรวม 20 มิลลิลิตร และเวลา 210 นาที โดยตัดสินใจจากปริมาณโอลิโกแซคคาร์ไรต์ที่เกิดขึ้น นำสภาวะนี้ไปศึกษาการขยายขนาดการผลิตต่อไป

ตารางที่ 5 แสดงการออกแบบการทดลองแบบ central composite design โดยใช้ Response surface methodology

Std Order	Run Order	Pt Type	Block	[E] (U/ml)	[S] (%)	TIME (min)
1	1	1	1	9.05	0.91	66
2	2	1	1	20.95	0.91	66
3	3	1	1	9.05	2.09	66
4	4	1	1	20.95	2.09	66
5	5	1	1	9.05	0.91	174
6	6	1	1	20.95	0.91	174
7	7	1	1	9.05	2.09	174
8	8	1	1	20.95	2.09	174
9	9	-1	1	5.00	1.50	120
10	10	-1	1	25.00	1.50	120
11	11	-1	1	15.00	0.50	120
12	12	-1	1	15.00	2.50	120
13	13	-1	1	15.00	1.50	30
14	14	-1	1	15.00	1.50	210
15	15	0	1	15.00	1.50	120
16	16	0	1	15.00	1.50	120
17	17	0	1	15.00	1.50	120
18	18	0	1	15.00	1.50	120
19	19	0	1	15.00	1.50	120
20	20	0	1	15.00	1.50	120

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์, Reducing sugar และ Total carbohydrate ที่ได้จากการย่อยกากมะพร้าวที่สภาวะต่างๆตามการออกแบบการทดลองแบบ central composite design โดยใช้ Response surface methodology

RUN	[E](U/ml)	[S](%)	TIME (min)	Oligosaccharide (mg/ml) (M2-M6)	Total CHO (mg/ml)	Reducing sugar (mg/ml)
1	9.05	0.91	66	1.868	1.85	0.51
2	20.95	0.91	66	1.752	2.11	0.87
3	9.05	2.09	66	2.542	2.14	0.98
4	20.95	2.09	66	2.279	2.59	1.60
5	9.05	0.91	174	2.223	1.78	0.65
6	20.95	0.91	174	0.966	2.12	1.05
7	9.05	2.09	174	2.600	2.60	1.26
8	20.95	2.09	174	2.500	2.66	1.97
9	5	1.5	120	2.314	1.63	0.71
10	25	1.5	120	1.951	2.42	1.69
11	15	0.5	120	1.640	1.16	0.59
12	15	2.5	120	2.418	3.38	1.73
13	15	1.5	30	1.937	1.64	0.86
14	15	1.5	210	2.139	2.05	1.27
15	15	1.5	120	2.082	2.26	1.14
16	15	1.5	120	1.870	2.17	1.13
17	15	1.5	120	2.038	1.89	1.15
18	15	1.5	120	2.046	2.35	1.16
19	15	1.5	120	2.108	1.99	1.17
20	15	1.5	120	1.768	2.19	1.16

ตารางที่ 7 แสดงสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยกากมะพร้าวที่ได้จากการทำนายโดย Response surface methodology

RUN	[E](U/ml)	[S] (%)	TIME (min)
1	5	2.5	210
2	25	2.5	39.09

ตารางที่ 8 แสดงปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยกากมะพร้าวที่สภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ Response surface methodology ในการทำนาย

RUN	[E](U/ml)	[S] (%)	TIME (min)	Expect value of Oligosaccharide(mg/ml)(M2-M6)	Experimental value of Oligosaccharide(mg/ml)(M2-M6)
1	5	2.5	210	3.131	<u>2.884</u>
2	25	2.5	39.09	2.408	2.613

ตารางที่ 9 แสดงปริมาณ reducing sugar ที่ได้จากการย่อยกากมะพร้าวที่สภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ Response surface methodology ในการทำนาย

RUN	[E](U/ml)	[S] (%)	TIME (min)	Expect value of reducing sugar (mg/ml)	Experimental value of reducing sugar (mg/ml)
1	5	2.5	210	1.264	1.16
2	25	2.5	39.09	1.988	1.42

ตารางที่ 10 แสดงปริมาณ Reducing sugar, Total CHO และโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยกากมะพร้าวที่สภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ Response surface methodology ในการทำนาย

RUN	Total CHO (mg/ml)	Reducing sugar (mg/ml)	Oligosaccharide (mg/ml)
1	1.58	1.16	2.884
2	1.68	1.42	2.613

5.4 การขยายขนาดการย่อยกากมะพร้าวด้วยเอนไซม์แมนนาเนส

ทดลองขยายขนาดการผลิตเพิ่มขึ้นเป็น 10 เท่า จากขนาดปริมาตรรวมของของการย่อย 20 มิลลิลิตร เป็น 200 มิลลิลิตร พบว่าสามารถผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ได้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน ผลดังแสดงในตารางที่ 11

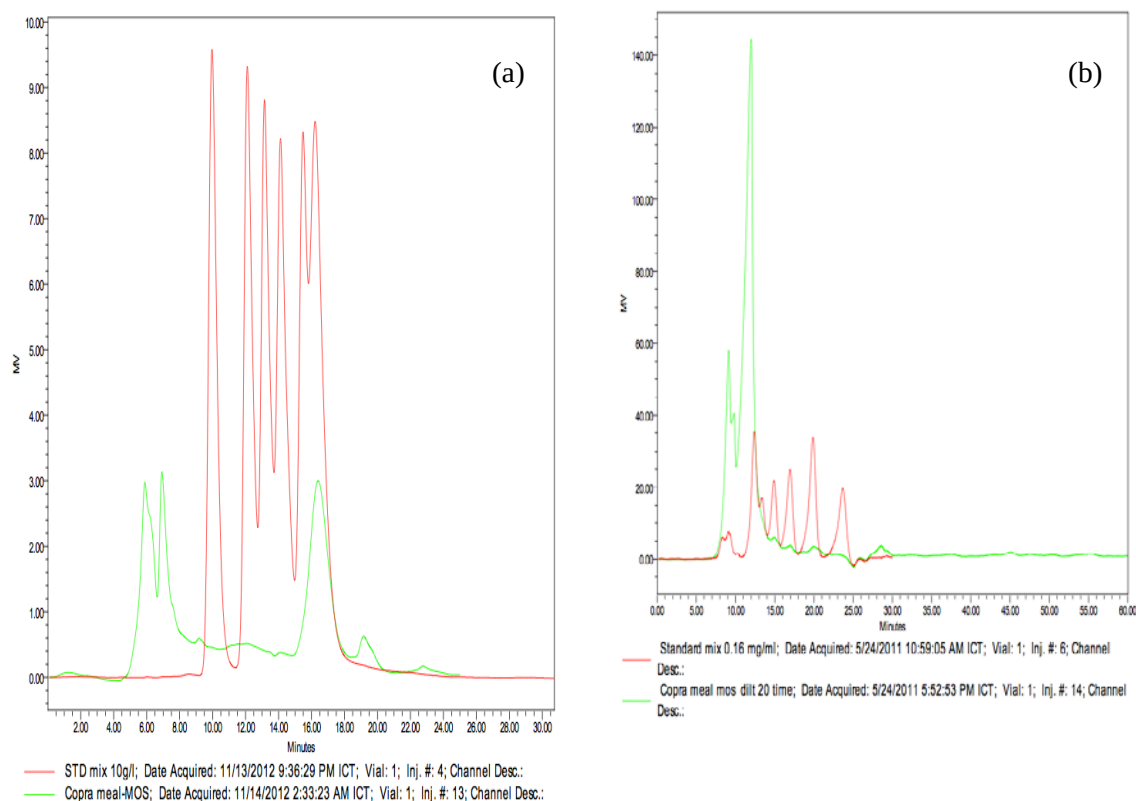
ตารางที่ 11 ผลการขยายขนาดการย่อยกากมะพร้าวด้วยเอนไซม์แมนนาเนสโดยเพิ่มปริมาตรของการย่อยรวมขึ้นเป็น 10 เท่า

Total volume	Total CHO(mg/ml)	Reducing sugar (mg/ml)	Oligosaccharide(mg/ml)
20ml	2.68±0.07	1.26±0.03	2.67±0.09
200ml	2.48 ±0.05	1.13±0.08	2.87±0.12

5.5 การทดสอบความเป็นฟรีไบโอติกของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยกากมะพร้าวด้วยเอนไซม์แมนนาเนส

นำผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้จากการย่อยกากมะพร้าวด้วยเอนไซม์แมนนาเนสมาวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาลและปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ ด้วย HPLC ผลปรากฏดังภาพที่ 5 โดยน้ำตาลชนิดหลักที่พบคือน้ำตาลแมนโนส และโอลิโกแซคคาไรด์ที่พบส่วนใหญ่มีขนาดประมาณ 5-6 หน่วย น้ำตาลแมนโนส นำผลิตภัณฑ์ไปทดสอบการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกพบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญได้ดี ดังตารางที่ 12 อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรสดังตารางที่ 13เมื่อนำไปทดสอบความทนต่อกรดและเอนไซม์ในสภาวะจำลองของกระเพาะและลำไส้เล็กพบว่ามีกร่อย่อยได้ในปริมาณต่ำ ดังภาพที่ 6และตารางที่ 14 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์สามารถผ่านการย่อยของระบบย่อยอาหารส่วนต้น ไปยังลำไส้ใหญ่ได้ กล่าวโดยรวมจะเห็นว่าผลิตภัณฑ์กากมะพร้าวที่ได้จากการ

ย่อยด้วยเอนไซม์แมนนาเนสมีแนวโน้มที่จะเป็นพรีไบโอติกที่ดี สามารถนำไปทดสอบในระบบลำไส้ใหญ่จำลอง (*in vitro* system) โดยวัดการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล (Realtime PCR และ/หรือ FISH) และปริมาณกรดที่เกิดขึ้น



ภาพที่ 5 The sugar composition of Copra meal-MOS. (a) Type of sugar in Copra meal – Mos analyzed by (Column Aminex-HPX-87P, BioRad), (b) Oligosaccharide analyzed by (Column Aminex-HPX-42C, BioRad).

ตารางที่ 12 แสดงเปอร์เซ็นต์ของการส่งเสริมการเจริญของเชื้อกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่ใช้สำหรับการทดสอบคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยกากมะพร้าวที่สภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ Response surface methodology ในการทำนาย

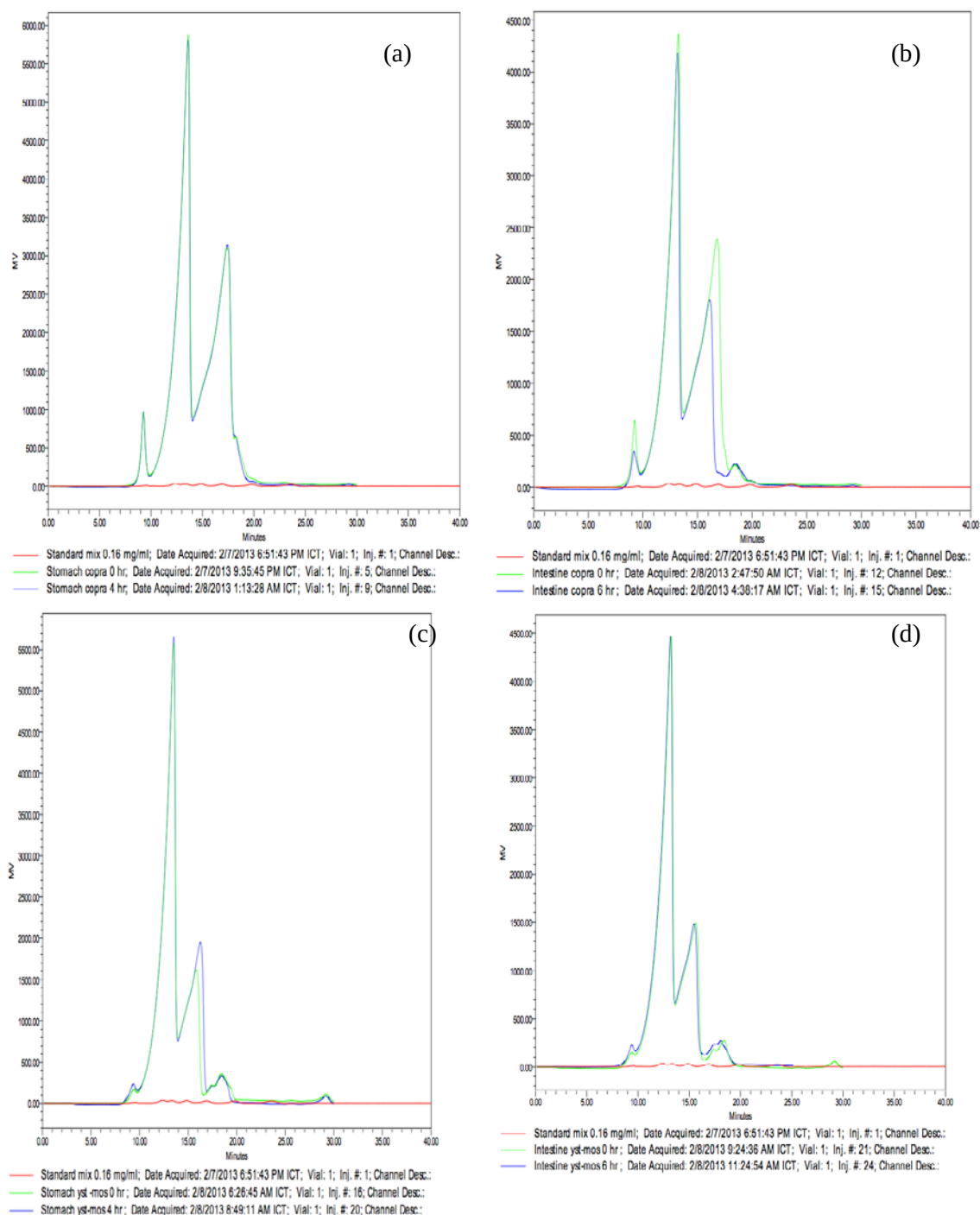
% enhance <i>Lactobacillus reuteri</i> KUB-AC5	% enhance <i>Lactobacillus cirspatus</i> JCM5810	% enhance <i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM 5885	% enhance <i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803
35.28	18.64	31.16	4.65

ตารางที่13 แสดงเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้งการเจริญของเชื้อกลุ่มแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่ใช้สำหรับการทดสอบคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยกากมะพร้าวที่สภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ Response surface methodology ในการทำนาย

% inhibit <i>Escherichia coli</i> E010	% inhibit <i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 029	% inhibit <i>Salmonella enteritidis</i> S003	% inhibit <i>Shigella dysenteriae</i> DMST 1511
39.47	47.39	57.23	37.07

ตารางที่ 14 The Copra meal-MOS hydrolysate before and after *in vitro* gastric and small intestine digestion

<i>In vitro</i> test	Substrate	% Hydrolysis
Stomach	Copra meal-MOS	1.89
	Yeast-MOS	1.08
Small intestine	Copra meal-MOS	5.69
	Yeast-MOS	17.75



ภาพที่ 6 The Copra meal-MOS and Yeast-MOS digestibility HPLC profiles under gastric juice hydrolysis and human α -amylase hydrolysis; (a) Copra meal-MOS digestibility under gastric juice at 0 and 4 h, (b) Copra meal-MOS digestibility under human α -amylase at 0 and 6 h, (c) Yeast-MOS digestibility under gastric juice at 0 and 4 h, (b) Yeast-MOS digestibility under human α -amylase at 0 and 6 h.

5.6 การทดสอบในระบบลำไส้จำลอง (*in vitro* system)

ทำการทดสอบในระบบลำไส้จำลอง โดยเก็บตัวอย่างอุจจาระจากผู้ที่มีสุขภาพแข็งแรง ไม่มีการใช้สารปฏิชีวนะและโพรไบโอติก โดยวัดการเจริญของจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล (FISH) และปริมาณกรด (SCFA) ที่เกิดขึ้นผลดังตารางที่ 15 และ 16 เห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่เตรียมได้จากการย่อยกากมะพร้าวด้วยเอนไซม์แมนนาเนสสามารถส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ได้ใกล้เคียงกับโพรไบโอติกทางการค้า คือ Yeast Mannooligosaccharide และ Fructooligosaccharide

ตารางที่ 15 Changes in bacterial population (log 10 cells/ml) in batch cultures with difference substrate

Probe	Time (h)	Bacterial population (log 10 cells/ml) ^e		
		Copra meal-hydrolysate	Yeast-MOS	FOS
Bif164	0	8.15 ± 0.09	8.15 ± 0.09	8.15 ± 0.09
	10	8.66 ± 0.76 ^{ab**}	8.56 ± 0.09 ^{a**}	8.80 ± 0.01 ^{b**}
	24	8.75 ± 0.06 ^{a**}	8.59 ± 0.25 ^{a*}	8.85 ± 0.02 ^{a**}
	34	8.37 ± 0.14 ^{a*}	8.16 ± 0.32 ^a	8.54 ± 0.07 ^{a*}
Lab158	0	8.42 ± 0.09	8.42 ± 0.09	8.42 ± 0.09
	10	8.98 ± 0.11 ^{a**}	9.21 ± 0.11 ^{b**}	9.18 ± 0.07 ^{ab*}
	24	9.30 ± 0.07 ^{a**}	9.28 ± 0.08 ^{a**}	9.38 ± 0.02 ^{a**}
	34	8.83 ± 0.10 ^{a**}	8.93 ± 0.10 ^{a**}	8.93 ± 0.24 ^a
Ato291	0	8.29 ± 0.15	8.29 ± 0.15	8.29 ± 0.15
	10	8.62 ± 0.06 ^{a*}	8.59 ± 0.15 ^{a*}	8.70 ± 0.08 ^a
	24	8.79 ± 0.03 ^{a**}	8.77 ± 0.11 ^{a*}	8.75 ± 0.07 ^{a*}
	34	8.68 ± 0.11 ^{a**}	8.68 ± 0.13 ^{a*}	8.69 ± 0.05 ^{a*}
Bac303	0	8.34 ± 0.08	8.34 ± 0.08	8.34 ± 0.08
	10	8.84 ± 0.12 ^{a**}	9.00 ± 0.19 ^{a**}	9.04 ± 0.18 ^{a*}
	24	9.08 ± 0.05 ^{a**}	9.11 ± 0.02 ^{a**}	9.18 ± 0.01 ^{b**}
	34	8.99 ± 0.03 ^{a**}	9.06 ± 0.01 ^{b**}	9.13 ± 0.01 ^{c**}

Chis150	0	8.14 ± 0.07	8.14 ± 0.07	8.14 ± 0.07
	10	8.13 ± 0.33 ^a	8.03 ± 0.40 ^a	7.97 ± 0.43 ^a
	24	8.06 ± 0.32 ^a	7.89 ± 0.27 ^a	7.70 ± 0.33 ^a
	34	7.80 ± 0.36 ^a	7.53 ± 0.20 ^{a**}	7.37 ± 0.31 ^a
Erec482	0	8.51 ± 0.05	8.51 ± 0.05	8.51 ± 0.05
	10	8.74 ± 0.10 ^{a*}	8.62 ± 0.31 ^a	8.56 ± 0.27 ^a
	24	8.97 ± 0.07 ^{a**}	8.90 ± 0.09 ^{a**}	8.70 ± 0.25 ^a
	34	8.72 ± 0.17 ^a	8.79 ± 0.19 ^a	8.40 ± 0.57 ^a
Rrec584	0	8.09 ± 0.16	8.09 ± 0.16	8.09 ± 0.16
	10	8.16 ± 0.10 ^a	7.88 ± 0.52 ^a	7.87 ± 0.37 ^a
	24	8.20 ± 0.21 ^a	8.01 ± 0.12 ^a	9.75 ± 0.35 ^a
	34	7.92 ± 0.07 ^a	7.88 ± 0.10 ^{a*}	7.72 ± 0.37 ^a
Fpra655	0	8.21 ± 0.06	8.21 ± 0.06	8.21 ± 0.06
	10	8.17 ± 0.16 ^a	7.97 ± 0.26 ^a	8.10 ± 0.11 ^a
	24	8.00 ± 0.19 ^a	7.84 ± 0.20 ^{a*}	8.03 ± 0.28 ^a
	34	7.96 ± 0.21 ^a	7.77 ± 0.20 ^{a*}	7.96 ± 0.29 ^a
Prop853	0	7.74 ± 0.19	7.74 ± 0.19	7.74 ± 0.19
	10	8.05 ± 0.10 ^a	7.91 ± 0.25 ^a	7.65 ± 0.51 ^a
	24	7.98 ± 0.29 ^a	7.92 ± 0.37 ^a	7.59 ± 0.54 ^a
	34	7.59 ± 0.19 ^a	7.49 ± 0.12 ^a	7.35 ± 0.28 ^a
DAPI	0	9.27 ± 0.06	9.27 ± 0.06	9.27 ± 0.06
	10	9.67 ± 0.21 ^{a**}	9.72 ± 0.01 ^{b**}	9.78 ± 0.02 ^{c**}
	24	9.77 ± 0.11 ^{a**}	9.79 ± 0.01 ^{a**}	9.84 ± 0.02 ^{b**}
	34	9.58 ± 0.01 ^{a**}	9.67 ± 0.03 ^{b**}	9.70 ± 0.02 ^{b*}

^e Mean bacterial count ± standard deviations (n=4) ** significantly different from the bacteria population at 0 h value, ($P < 0.01$).

* significantly different from the population at 0 h value, ($P < 0.05$).

^{a,b,c} significantly different ($P < 0.05$) between treatment at the same time point.

ตารางที่ 16 Concentrations of short chain fatty acid produced during fermentation of each carbohydrate source at 0, 10, 24, and 34 h.

SCFA	Time (h)	SCFA concentration (mM) ^d		
		Copra meal-hydrolysate	Yeast-MOS	FOS
Acetate	0	4.33 ± 0.47 ^a	5.42 ± 4.12 ^a	8.72 ± 0.77 ^a
	10	21.78 ± 3.12 ^{a**}	22.37 ± 6.59 ^{a*}	54.52 ± 9.55 ^{b**}
	24	31.03 ± 4.09 ^{a**}	31.60 ± 3.68 ^{a**}	53.36 ± 18.83 ^{b**}
	34	36.02 ± 3.06 ^{a**}	35.55 ± 4.40 ^{a**}	51.26 ± 23.81 ^{a**}
Propionate	0	0.27 ± 0.31 ^a	0.15 ± 0.31 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
	10	7.66 ± 0.52 ^{a**}	9.88 ± 5.93 ^{a*}	5.28 ± 4.48 ^a
	24	9.23 ± 0.49 ^{a**}	18.71 ± 6.53 ^{a**}	12.41 ± 7.18 ^a
	34	11.19 ± 2.02 ^{a**}	22.45 ± 2.30 ^{b**}	11.83 ± 7.42 ^a
Butyrate	0	0.13 ± 0.15 ^a	0.15 ± 0.18 ^a	0.10 ± 0.18 ^a
	10	1.46 ± 0.86 ^a	3.00 ± 2.37 ^a	3.51 ± 3.43 ^a
	24	4.27 ± 1.26 ^{a**}	6.12 ± 3.72 ^a	10.06 ± 2.85 ^{a*}
	34	5.14 ± 2.06 ^{a*}	7.39 ± 2.72 ^{a*}	10.29 ± 3.79 ^{a*}
Lactate	0	0.89 ± 0.15 ^a	0.92 ± 0.52 ^a	1.57 ± 0.30 ^a
	10	0.44 ± 0.34 ^a	0.58 ± 0.64 ^a	15.84 ± 7.67 ^b
	24	0.00 ± 0.00 ^{a**}	0.12 ± 0.24 ^a	0.00 ± 0.00 ^{a*}
	34	0.00 ± 0.00 ^{**}	0.00 ± 0.00 [*]	0.00 ± 0.00 [*]
Formate	0	4.73 ± 0.63 ^b	2.99 ± 2.10 ^b	0.00 ± 0.00 ^a
	10	1.13 ± 1.30 ^{a*}	3.01 ± 2.32 ^a	14.80 ± 5.32 ^{b*}
	24	1.28 ± 2.56 ^a	0.96 ± 1.93 ^a	0.00 ± 0.00 ^a
	34	0.00 ± 0.00 ^{**}	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Total	0	10.25 ± 0.48 ^a	9.90 ± 2.73 ^a	10.79 ± 1.23 ^a
	10	32.97 ± 2.18 ^{a**}	39.07 ± 15.7 ^{a**}	93.97 ± 8.99 ^{b**}
	24	47.52 ± 6.24 ^{a**}	57.87 ± 14.57 ^{a**}	75.89 ± 23.17 ^{a**}
	34	55.22 ± 2.67 ^{a**}	65.91 ± 2.54 ^{a**}	73.48 ± 30.13 ^{a**}

^d Mean SCFA concentration ± standard deviations (n=4). ** significantly different 0 h value, ($P < 0.01$), * significantly different 0 h value, ($P < 0.05$). ^{a,b,c} significantly different ($P < 0.05$) between treatment at the same time point.

6. สรุปผลการวิจัย

1. ได้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวภาพจากกากมะพร้าวด้วย เอนไซม์แมนนาเนสคือปริมาณเอนไซม์ 20 ยูนิตต่อมิลลิลิตรปริมาณมะพร้าว 2.5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรรวม 20 มิลลิลิตรและเวลา 210 นาที ซึ่งสภาวะนี้สามารถนำไปใช้ขยายขนาดการผลิตได้ถึง 10 เท่า
2. ผลิตภัณฑ์สารเสริมชีวภาพจากกากมะพร้าว ต้นแบบที่เตรียมได้จากวิธีการดังกล่าวมีคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกเทียบได้กับพรีไบโอติกทางการค้า (Yeast MOS และ FOS)

7. ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในประเด็นต่อไปนี้

1. การขยายขนาดผลิตเอนไซม์แมนนาเนส
2. การทดสอบผลของ Copra-meal MOS ในสัตว์ทดลอง
3. การทดสอบ Toxicity, allergenicity, และคุณสมบัติอื่นๆที่เกี่ยวข้องเพื่อการขึ้นทะเบียน

8. เอกสารอ้างอิง

- กรรณิการ์พนาบุญเจริญ. 2545. ผลการเสริมฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์และกรดอินทรีย์รวมในอาหาร
ลูกสุกรหย่านม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เฉลิมขวัญคำคำและมัลลิกาชนาวัง. 2548. คุณรู้จักPrebioticแล้วหรือยัง. *อาหาร* 35 (2): 96-102.
- จารุตา ปัญญากำพล. 2548. ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสใน *B. amyloliquefaciens* NT 6.3. รายงานเทคนิควิจัยปริญญาตรี. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- นฤมล ทรัพย์มณีกุล. 2549. ลักษณะเฉพาะของเอนไซม์แมนนาเนสจากแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพ.
เทคนิควิจัยปริญญาตรี. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะอุตสาหกรรมเกษตร,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- พิชามญช์ แดงพราหม, สุดาทิพย์ จันทระและสุนีย์ นิธิสินประเสริฐ. 2556. อิทธิพลของชนิดและปริมาณ
ของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่อการผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบ
จาก *Penicillium oxalicum* KUB-SN2-1. *วารสารวิจัยและพัฒนา มจร*. ปีที่ 36 ฉบับที่ 1
มกราคม - มีนาคม 2556. หน้า 73.
- วันชนะ ขจรกล้า. 2554. คุณสมบัติของเอนไซม์แมนนาเนสเพื่อใช้ผลิตสารพรีไบโอติก. เทคนิควิจัย
ปริญญาตรี. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วัลยา วิสุทธิมรกุล. 2548. ผลไม้แหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสใน
B. amyloliquefaciens NT6.3. รายงานเทคนิควิจัยปริญญาตรี. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ,
คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน). 2554. การศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์แมนนาเนส
เพื่อใช้ในการอธิบายคุณสมบัติการเร่งปฏิกิริยา .
แหล่งที่มา: http://www.slri.or.th/th/index.php?option=com_content&view=article&id=1221:2012-05-30-07-59-39&catid=44:2010-11-01-18-55-24, 31มกราคม2556.

สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล.2556.วิศวกรรมกระบวนการหมัก. ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีการหมัก. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สาโรชคำเจริญ. 2547. อาหารและการให้อาหารสัตว์ไม่เคี้ยวเอื้อง. ภาควิชาสัตวศาสตร์, คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น. หน้า 321-327.

สุภาสกลศิริรัตน์. 2551. การโคลนและวิเคราะห์โครงสร้างของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* NT6.3 และ *Bacillus circulans* NT6.7. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อัจฉรา ไชยองค์การ. 2547. ปรไบโอติกกับการประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงสัตว์. รายงานสัมมนาปริญาตรี. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Abe, J., Z.M.Hossain and S. Hizukari. 1994. Isolation of beta- mannanase producing microorganism.J. **Ferment. Bioeng.**3:259-261

Akino, T., C. Kato and K. Horikoshi. 1989. Two Bacillus β -mannanase having difference COOH termini are produced in *Escherichia coli* carrying pMAH5. **Appl. Environ.Microbiol.** 55:3178-3183.

Aniansson G., B. Andersson, R. Lindstedt and C. Svanbrong. 1990. Anti-adhesive activity of humun casein against *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. **MicrobialPathology**8: 315-323.

Araki, T., Y. Tamaru and T. Morishita. 1992. Beta-1, 4-mannanase from marines bacteria *Vibrio spp.* MA-129 and MA-138. **Appl. Microbiol.** 38:343-351.

Arcand, N., D. Kluepfel., F.W. Paradis., R. Morosoil and F. Shareck. 1993. Beta-mannanase of *Streptomyces lividans* 66: Cloning and DNA sequence of the ManA gene and characterization of the enzyme. **J. Biochem.** 290:857-863.

- Balasubramaniam, K. 1976. Polysaccharides of the kernel of maturing and mature coconuts. **J. Food Sci. Biotechnol.** 41:1370-1373.
- Behr Winfried. 2003. **Dietetic and pharmaceutical raw material: Konjacmannan.** Available source: <http://www.behrobonn.com/literat/konjacmb.html>, January 31, 2013.
- Bicho, P.A., T.A. Clark., K. Meckie., H.W. Morgan and R.M. Daniel. 1991. The characterization of a thermostable endo-beta-mannanase cloned from *Caldocellum saccharolyticum*. **Appl. Microbiol. Technol.** 36:337-343.
- Bradner, J.R., R.K. Sidhu., M. Gillings and K.M.H. Nevalainen. 1999. Hemicellulase activity of Antarctic microfungi. **Appl. Microbiol.** 87:366-370.
- Brown, S.H., C. Sjöholm and R.M. Kelly. 1993. Purification and characterization of a highly thermostable glucose isomerase produced by the extremely thermophilic eubacterium, *Thermotoga maritima*. **Biotechnol. Bioeng.** 41:878-886.
- Bouhnik, Y., B. Flourie., D' Agay-Abensour Laurence., P. Pochart., G. Gramet and M. Durand. 1997. Administration of Transgalacto-oligosaccharides Increase Fecal Bifidobacteria and Modifies Colonic Fermentation Metabolism in Healthy Humans. **Journal of Nutrition** 127 : 444-448.
- Boze, H., G. Moulin and P. Galzy. 1995. Production of microbial biomass, pp.170-220. In H.J. Rehm, G. Reed, A. Puhler and P. Stadler, eds. **Biotechnology : Enzyme, Biomass, Food and Feed.** 2 ed., VCH.
- Cann, I. K.O., S. Kocherginskaya, M. R. King, B. A. White, R. I. Mackie. 1999. Molecular cloning, sequencing, and expression of a novel multidomain mannanase gene from *Thermoanaerobacterium polysaccharolyticum*. **J. Bacteriol.** 181:1643-1651.

- Campbell J.M., G.C. Fahey and B.W. Wolf. 1997. Selected indigestible oligosaccharide affect large bowel mass cecal and fecal short chain fatty acid pH microflora in rat. **Journal of Nutrition** (127): 444-448.
- Carole A. Lepilleur, Denise W. Rafferty, Joseph A. Zella, Jeffrey A. 2010. Fruscella Cationic polymers and fixative application therefor. US patent no. 7759296 B2, July 2010.
- Chaplin, Martin. 2005. **Water structural and behavior: locust bean gum**. Available Source: <http://www.lsbu.ac.uk/water/hyloc.html>, January 28, 2013.
- Chaiongkarn, A., Titapoka, S., Keawsompong, S., and Nitisinprasert, S., 2009, "Identification and Characterization of β -Mannanase Producing Fungal Strain KUB-SN2-1", **Proceeding of ABIC2009 Agricultural Biotechnology for Better Living and a Clean Environmental**, pp. 69.
- Chesson, A. 1993. **Probiotics and other intestinal mediators**. In Cole, D.J.A., J. Wiseman and M.A. Varley eds. **Principles of Pig Science**. Nottingham University Press. Loughborough, UK. pp. 197-214.
- Chorvaticova, D., E. Machova, J. Sandula and G. Kogan. 1999. **Mutation Research** 444: 117-122.
- Daniel, I.C.W., C.L. Cooney, A.L. Demain, P. Dunnill, A.E. Humphrey and M.D. Lilly. 1979. Aeration and agitation, pp. 157-193. In C.G. Heden, ed. **Ferment. Enzyme Technol.** John Wiley & Sons Inc., New York.
- Davis, M.E., C.V. Maxwell, G.F. Erf, D.C. Brown, B.Z. de Rodas, Z.B. Johnson, E.B. Kegley, D.H. Hellwig, and R.A. Dvorak. 2002. Effect of dietary mannan oligosaccharides and (or) pharmacological additions of copper sulfate on growth performance and immunocompetence of weanling and growing/finishing pigs. **J. Anim. Sci.** 80:2887-2894.

- Davis, M.E., C.V. Maxwell, G.F. Erf, D.C. Brown, and T.J. Wistuba. 2004. Dietary supplementation with phosphorylated mannans improves growth response and modulates immune function of weanling pigs. **J. Anim. Sci.** 82:1882-1891.
- Duffaud, G.D., C.M. McCutchen., P. Leduc., K.N. Parker and R.M. Kelly. 1997. Purification and Characterization of extremely thermostable β -mannanase, β -mannosidase, and α -galactosidase from the hyperthermophilic Eubacterium *Thermotoga neapolitana* 5068. **Appl. Environ. Microbiol.** 63:169-177.
- Ethier, N., G. Talbot and J. Sygusch. 1998. Gene cloning, DNA sequencing and expression of Thermostable β -mannanase from *Bacillus sterothermophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 64:4428-4432.
- Feng, Y., Z. He., S.L. Ong., J. Hu., Z. Zhang and W.J. Ng. 2003. Optimization of agitation, aeration, and temperature conditions for maximum beta-mannanase production. **Enz. Microb. Technol.** 32:282-289.
- Ferreira, H.M. and E.X.F Filho. 2004. Purification and characterization of a β -mannanase from *Trichoderma harzianum* strain T4. **Carbohydr. Polym.** 57:23-29.
- Fritts, C.A., and P.W. Waldroup. 2003. Evaluation of Bio-Mos mannanoligosaccharide as a replacement for growth promoting antibiotics in diets for turkeys. **Internat. J. Poult. Sci.** 2 (1):19-22.
- Gibbs, M.D., D.J. Saul., E. Luthi and P.L. Bergquist. 1992. The β -mannanase from "*Caldocellum Saccharolyticum*" is part of a multidomain enzyme. **Appl. Environ. Microbiol.** 58:3864-3867.
- Gibson, G.R. and M.B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation on the human colonic microflora: Introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition** (125): 1404-1412.

- Grizard, D., and Barthomeuf, C. 1999. "Dietary modulation of the human colonic microbiota : introduction the concept of prebiotics." **J. Nutri.** 125(1):1401-1402.
- Gubitz, G.M., M. Hayn., M. Sommerauer and W. Steiner. 1996. Mannan-degrading enzymes from *Sclerotium rolfsii*. Characterization and synergism of two endo β -mannanase and β -mannosidase. **Biores. Technol.** 58:127-138.
- Hilge, M., S.M. Gloor., W. Ryphiewski., O. Sauer., T.D. Heightman., W. Zimmerman., K. Winterhalter and K. Piontek . 1998. High-resolution native and complex structures of Thermostable β -mannanase from *Thermomonospora fusca* – substrate specificity in glycosyl hydrolase family 5. **Structure.** 6:1433-1444.
- Hogg, D.E., J. Woo., D. Nola., V.A. McKie., H.J. Gibert and R.W. Pickersgill. 2001. Crystal Structure of mannanase 26A from *Pseudomonas cellulosa* and analysis of residues involved in substrate binding. **J. Biol. Chem.** 276:31186-31192.
- Hossain, M. Z., J. Abe. And S. Hizukuri. 1996. Multiple forms of β -mannanase from *Bacillus sp.* KK01. **Enzyme. Microbial. Technol.** 18:95-98.
- Iji, P.A., Saki, A.A., and Tivey, D.R. (2001). Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a mannan oligosaccharide. **J. Sci. Food Agric.** 81: 1186-1192.
- Jiang, Z., Y. Wei., D. Li., L. Li., P. Chai and I. Kusakabe. 2006. High-level Production, Purification and Characterization of a thermostable beta-mannanases from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34. **Carbohydr. Polym.** 57:1-9.
- Johnson, K.G and N.W. Ross. 1990. Enzymatic properties of beta-mannanase from *Polyporus versicolor*. **Enz. Microb. Technol.** 12:960-964.
- Jones GH, Ballou CE (1969). Studies on the structure of yeast mannan. **J. Biol. Chem.** 244: 1043-1045.

- Jorgensen, H., T. Eriksson., J. Borjesson., F. Tjerneld and L.Olsson. 2003. Purification and Characterization of five cellulase and xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. **Enz.Microb. Technol.** 32:851-861.
- Juhasz, T., Z. Szengyel., K. Roczey., M. Siika-aho and L. Viikari. 2005. Characterization of cellulase and hemicellulose produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Proc. Biochem.** 40:3519-3525.
- Kataowa, N. and Y. Tokiwa.1998.Isolation and characterization of and active mannanase producing anaerobic bacterium, *Clostridium tertium* KT-5A, from lotus soil. **Appl. Microbiol.** 84:357-367.
- Khanongnuch, C., T. Ooi and S. Kinoshita. 1999. Cloning and nucleotide sequence of β -mannanase and cellulose genes from *Bacillus* sp. 5H. **World Journal of Microbiology & Biotechnol.** 15: 221-228.
- Krizkova L., Z. Durackova, J. Sasinkova and J. Krajcovic. 2001. Antioxidative and antimutagenic activity of yeast cell wall mannans *in vitro*. **Mutation Restriction.**(497):213-222.
- L'Hocine, L., Wang, Z., Jiang, B., and Xu, S. 2000. "Purification and partial characterization of fructosyltransferase and invertase from *Aspergillus niger* AS0023." **J. Biotechnol.** 81(1):73-84.
- Lin, T.C. and C. Chen. 2003. Enhanced mannanase production by submerged culture of *Aspergillus niger*. NCH-189 using defatted copra based media. **Proc. Biochem.** 32:1103-1109.
- Loddi, M.M., Moraes, V.M.B., Nakaghi, L.S.O., Tucci, F.M., Hannas, M.I., Ariki, J., and Bruno, L.D.G. (2002). Mannan oligosaccharide and organic acids on intestinal morphology integrity of broilers evaluated by scanning electron microscopy.

Proceeding 11th European Poultry Science Conference, Bremen, Germany.
121.

Lyons, T.P. 1994. **Biotechnology in the feed industry**. Proc. Alltech's 10th Am. Symp. Nottingham Uni. Press, Nottingham, U.K.

Luis, E.S., F.G. Teves and M.R. Calapardo. 2000. Nutritional value of copra meal treated with bacterial mannanase in broiler diets. **Philipp. Agric. Sci.** 72:7-14.

McCleary, B.V. and N.K. Matheson. 1983. Action patterns and substrate binding requirements of beta-D - Mannanase with Mannosaccharide and mannan-type polysaccharides. **Carbohydr.** 119:191-217.

McCleary, B.V. 1988. Soluble, dye-labeled polysaccharides for the assay of endo-hydrolase. **Methods. Enzymol.** 160:74-86.

McCutchen, C.M., G.D. Duffaud., P. Leduc., A.R.H. Peterson., A.Tayal., S.A. Khan. and R.M.Kelly. 1996. Characterization of extremelythermostable enzymatic breaker (α -1,6-galactosidase and β -1,4-mannanase) from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga neapolitana* 5068 for hydrolysis of guar gum. **Biotechnol. Bioeng.** 52:332-339.

Meier, H. and J.S.G. Reid. 1982. Reserve polysaccharides other than starch in higher plants. **Encyclopedia of Plant Physiology New Ser.** 13A:418-471.

Mendoza, N.S., N. Arai., K. Sugimoto., M. Ueda., T. Kawaguchi. and L.M. Josen. 1995. Cloning and sequencing of β -mannanase from *Bacillus subtilis* NM-39. **Biochem. Biophys. Acta.** 1243: 552-554.

Merce, A.L., E. Fernandes., A.S. Mangrich., M.R. Sierakowki. and B. Szpoganicz. 2001. **Fe(III)–Galactomannan Solid and Aqueous Complexes. Potentiometric, EPR Spectroscopy and Thermal Data.** Available source <http://www.scielo.br/img/fbpe/jbchs/>, February 1, 2013.

- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31:426-428.
- Mona, E.M. Mabrouk and Amani, M.D.El Ahwany.2008.Production of β -mannanase by *Bacillus amylolequifaciens* 10A1 cultured on potato peels. **Afr. J. Biotechnol.** 7:1123-1128.
- Monitel, M.D., J. Rodriguez., M.I. Perez-Leblic., M. Hernandez., M.E. Arias and J.L. Copa-Patino. 1999. Screening of mannanases in actinomyces and their potential application in the biobleaching of pine kraft pulps. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 52:240-245.
- Montiel, M.D., M. Hernandez., J. Rodriguez. and M.E. Arias. 2002. Evaluation of and endo-mannanase produced by *Streptomyces ipomoea* CECT 3341 for the biobleaching of pine kraft pulps. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**58(1):67-72.
- Monsan, P.F. and F. Paul. 1995. **Oligosaccharide feed additive**, pp. 233-245. *In* R.J Wallace.and A. Chesson (eds.). *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding*. Wilhelm, New York.
- Mou, H., Zhou, F., Jiang, X. and Liu, Z.2010.Production, Purification and properties of β -mannanase from soil bacterium *Bacillus circulans* M-21.**J. of food Biochemistry**. ISSN1745-4514:1451-1460.
- Newman, K.T. 1995. **Saccharomyces boulardii: More application of yeast culture in monogastric**, pp. 379-381. *In* T.P. Lyons (ed.). *Biotechnolgy in the feed industry*.Alltech.Publication, Nicholasville, Kentucky.
- Nitisinprasert, S., V. Nilphai, P. Bunyun, P. Sukyai, K. Doi and K. Sonomoto. 2000. Screening and identification of effective thermotolerant lactic acid bacteria producing antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Salmonella sp.* Resistant to antibiotics. **Kasetsart J. (Nat. Sci.)**34: 387-400.

- Oda, Y., T. Komaki and K. Tonomura. 1993. Purification and properties of extracellular β -mannanase produced by *Enterococcus casseliflavus* FL2121 isolated from decayedkonjak. **J. Ferment. Bioeng.** 76:14-18.
- Oguz, H., and S.S. Parlat. 2004. Effects of dietary mannanoligosaccharide on performance of Japanese quail affected by aflatoxicosis. **Sout. African J. of Anim. Sci.** 34(30):144-148.
- Ooi, T. and D. Kikuchi. 1995. Purification and some properties of beta-mannanase from *Bacillus* sp. **Microbiol. Biotechnol.** 11:310-314.
- Parks, K.K., I. Kusakabe., Y. Komatsu., G. Kobayashi., T. Yasui and K. Murakami. 1987. Purification and some properties of beta-mannanase from *Penicillium purpurogenum*. **Agric. BioChem.** 51:2709-2716.
- Phothichito, K. 2006. **Isolation and characterization of mannanase producing microorganism.** Master thesis, Kasetsart University.
- Politz, O., M. Krash., K.K. Thomsen and R. Borriss. 2000. A highly thermostableendo-(1,4)-beta mannanase from the marine bacterium *Rhodothermus marinus*. **Appl. Microbiol.Biotechnol.** 53:715-721.
- Puchart, V., P. Katapodis., P. Biely., L.Kremnický., P. Christakopoulos., M. Versanska., D.Kekos., B.J. Macris. and M.K. Bhat. 1999. Production of xylanase, Mannanase and pectinase by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Enz.Microb. Technol.** 24:355-361.
- Ratto, M. and K. Pourtanen. 1988. Production of mannan-degrading enzymes. **Biotechnol.Lett.** 10:661-664.
- Regalado, C., B.E. Garcia-Almendarez., L.M. Venegas-Barrera., A. Tellez-Jurado., G. Rodriguez-Serrano., S. Huerta-Ochoa and J.R. Whitaker. 2002. Production, partial

purification and properties of beta-mannanase obtained by solid substrate fermentation of spent soluble coffee waste and copra paste using *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*. **J. Sci. Food. Agric.** 80:1343-1350.

Ross, G.C. 1999. **Prebiotic**, pp. 141-156. In W.T. Gopal (ed.). Prebiotics a Critical Review. Horizon Scientific Press, Wymondham.

Sachtlehner, A., G. Foidl, G. Gubitz, and D. Haltrich. 2000. Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanases of *Sclerotium rolfsii*. **J. Biotechnol.** 80:127-134.

Salminen, S., M. Deighton and S. Gorbach. 1993. **Lactic Acid Bacteria in health and disease**, pp. 199-225. In S. Salminen and W. Attevo (eds.). Lactic Acid Bacteria. Lea and Febiger Malvern, Pennsylvania.

Savage, T.F., P.F. Cotter and E.I. Zakrzewska. 1996. **Journal of Poultry Science** 75(Suppl.1):143.

Savage, T.F., E.I. Zakrzewska and J.R. Andreasen. 1997. **Journal of Poultry Science** 76(Suppl.1): 139.

Setati, M.E., P. Ademark, W.H. Van-Zyl, B. H. Hagerdal and H. Stalbrand. 2001. Expression of *Aspergillus aculeatus* β -1,4-mannanase encoding gene (man.1) in *Saccharomyces Cerevisiae* and characterization of the recombinant enzyme. **Prot. Exp. Purif.** 21:105-114.

Shao, L.P., Zhou, L.J., and Fei, Z.F. (2000). Effect of mannonoligosaccharide on immune function and blood antioxidant enzymes in sucking piglets. **Acta.Nutr.Sinica.** 22: 82-84.

Spring, P., C. Wenk, K.A. Dawson, and M.E. Newman. 2000. The effect of dietary mannoooligosaccharides on cecal parameters and the concentration of enteric bacteria in cecal of Salmonella Challenged broiler chicks. **Poul. Sci.** 79:205-211.

- Stoll, D., H. Stalbrand and R.A. J. Warren. 1999. Mannan-degrading enzymes from *Cellulomonas fimi*. **Appl. Environ. Microbiol.** 65:2598-2605.
- Sundu, B. and J. Dingle. 2006. Use of enzymes to improve the nutritional value of palm kernel meal and copra meal. **Proc. Quensl and Poult. Sci. Symp. Australia.** 11:1-15.
- Takahashi, R., I. Kusabae., S. Kusama., Y. Sakurai., K. Murakami., A. Maekawa. and T. Suzyki. 1984. Structure of glucomanno-oligosaccharides from the hydrolytic productions of Konjac glucomannan produced by a β -mannanase from *Streptomyces sp.* **Agric. Biochem.** 48:2943-2950.
- Talbot, G. and J. Sygusch. 1990. Purification and characterization of thermostable β -mannanase and α -galactosidase from *Bacillus stearothermophilus*. **Appl. Environ. Microbiol.** 56:3505-3510.
- Terada, A., H. Hara, M. Kataoka and T. Mitsuka. 1992. Effect of lactose on the composition and metabolic activity of the human fecal flora. **Microbial Ecology in Health and Disease** 5: 43-50.
- Titapoka, S. 2007. **Characterization of mannanase from effective bacterial strains and their application for prebiotic production.** Doctoral thesis, Kasetsart University.
- Titapoka, S., K. Buengsrirawat., A. Pokaseam., T. Sombat., P. Dangpram., K. Jantawon and S. Nitisinprasert. 2013. Optimization of extracellular mannanase production from *Penicillium oxalicum* KUB-SN2-1 and application for hydrolysis property. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 35 (1), 17-22, Jan. - Feb. 2013.
- Xu, B., P. Hagglund., H. Stalbrand and J.C. Janson. 2002. Endo- β -1,4-mannanase from blue mussel, *Mytilus edulis* : purification, characterization and mode of action. **J. Biotechnol.** 92:267-277.

- Yamaura, I., T. Matsumoto., M. Funatu and Y. Funatu. 1990. Purification and some properties of endo-1,4- β -D-mannanase from *Pseudomonas* sp. PT-5. **Agric. Biochem.** 54:2425-242.
- Yang, Y., Iji, P.A., Kocher, A., Mikkelsen, L.L. and Choct, M. (2008). Effects of mannanoligosaccharides on the growth performance, nutrient digestibility and gut development of young birds given different cereal-based diets. **Animal Physiology and Animal Nutrition.** 92(6): 650-659.
- Zakaria, M.M., S. Yamamoto and T. Yagi. 1998. Purification and characterization of and Endo- β -1,4-mannanase from *Bacillus subtilis* KU-1. **FEM. Microbiol. Lett.** 158:25-31.
- Zou, X.T., X.J. Qiao, and Z.R. Xu. 2006. Effect of β -Mannanase (Hemicell) on growth performance and immunity of broilers. **Poul. Sci.** 85:2176-2179.

9. ประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นาย สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Suttipun Keawsompong
2. รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ 47040102
3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์
4. หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จังหวัด กรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10900

โทรศัพท์ 02-5625074 โทรสาร 02-5794096

e-mail fagisuk@ku.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปริญญาตรี สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีที่สำเร็จ พ. ศ. 2536

ปริญญาโท สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปีที่สำเร็จ พ. ศ. 2540

หัวข้อวิทยานิพนธ์ที่ทำ Study on Keartinase from Highly Efficient Feather Hydrolyzing Microorganisms

ปริญญาเอก สาขาวิชา Life Sciences: Molecular Biology and Biotechnology

สถาบัน The University of Nottingham ประเทศ อังกฤษ ปีที่สำเร็จ พ. ศ. 2544

หัวข้อวิทยานิพนธ์ที่ทำ Cloning of A Cellobiohydrolase II Gene and Its Expression in *Pleurotus sajor-caju*

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษเทคโนโลยีของยีน และเทคโนโลยีของเอนไซม์

ประวัตินักวิจัยร่วม

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาว สุนีย์ นามสกุล นิตินประเสริฐ

(ภาษาอังกฤษ) Miss Sunee Nitisinprasert

2. รหัสประจำตัวนักวิจัยแห่งชาติ 38400601

3. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
50 ถนนพหลโยธิน เขตจตุจักร กทม. 10900 โทร. 0-2562-5089 โทรสาร 0-2579-4096

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2522	ปริญญาตรี	วท.บ. (วิทยาศาสตร์บัณฑิต)	เคมี	ม. ขอนแก่น	ไทย
2526	ปริญญาโท	วท.ม. (วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต)	วิทยาศาสตร์การอาหาร	ม. เกษตรศาสตร์	ไทย
2533	ปริญญาเอก	D.Sc. (Doctor of Agriculture and Forestry)	Microbiology & Genetic Engineering	University of Helsinki	Finland

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

Microbial Enzymatic System, Microbial Genetics