ผลิตภัณฑ์จากการหมัก *Bacillus* sp. strain TW-1 ในอาหารที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด

ธนวรรณ ศรีนาง [1] จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ [2] คิน เลย์ คู [3] และ กนก รัตนะกนกชัย [4*]

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ท่าข้าม บางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

และ ยันเซ็คลี [5]

Kyung Hee University, 1 Hoegi-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-701, South Korea

บทคัดย่อ

เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. strain TW-1 ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ต่างๆ ในกลุ่มไซลาโนไลติก ได้แก่ ไซลาเนส เบต้าไซโลซิเดส และอะราบิโนฟูราโนซิเดส กลุ่มเซลลูโลไลติกเอนไซม์ ได้แก่ อะไวซิเลส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และเบต้ากลูโคซิเดส และแมนนาเนส ซึ่งในระหว่างการหมักแบบกะ เอนไซม์กลุ่มเหล่านี้ย่อยไซแลนและเซลลูโลสในเปลือกข้าวโพดได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโลส ไซโลไบโอส และโอลิโกแซ็กคาไรด์ นอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบเอทานอลและกรดแอซีติกในน้ำหมักด้วย เมื่อย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างๆ ด้วยไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติกเอนไซม์จาก *Bacillus* sp. strain TW-1 พบว่าสามารถย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้ดี โดยเอนไซม์จากแบคทีเรียนี้สามารถย่อยเปลือกข้าวโพดได้ดีกว่าซังข้าวโพด รำข้าว ชานอ้อย และฟางข้าว ตามลำดับ

คำสำคัญ : วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร / *Bacillus* sp. strain TW-1 / เปลือกข้าวโพด / ไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติกเอนไซม์

* *Corresponding author: E-mail: khanok.rat@kmutt.ac.th*

[1] *นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

[2] *นักวิจัย ห้องปฏิบัติการเอนไซม์เทคโนโลยี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

[3] *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

[4] *รองศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

[5] *Lecturer, Department of Medical Zoology, College of Medicine*

Fermented Products of *Bacillus* sp. Strain TW-1 Grown on Corn Hull Medium under Limited Oxygen Condition

Thanawan Srinang [1], Chakrit Tachaapaikoon [2], Khin Lay Kyu [3], Khanok Ratanakhanokchai [4*],

King Mongkut's University of Technology Thonburi, Thakham, Bangkhuntien, Bangkok 10150

and Yun-Sik Lee [5]

Kyung Hee University, 1 Hoegi-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-701, South Korea

Abstract

Bacillus sp. strain TW-1, grown on corn hull as a carbon source under limited oxygen condition produced xylanolytic enzyme (xylanase, β-xylosidase and arabinofuranosidase), cellulolytic enzyme (avicelase, carboxymethyl cellulase and β-glucosidase) and mannanase. These enzymes could hydrolyze xylan and cellulose in corn hull to xylose, xylobiose, and oligosaccharides under batch fermentation. Moreover, ethanol and acetic acid were also detected in the medium. Crude xylanolytic and cellulolytic enzymes produced by *Bacillus* sp. strain TW-1 could hydrolyze agricultural residues. The result showed that the crude enzyme could be hydrolyzed corn hull better than corn cob, rice bran, sugarcane bagasse and rice straw respectively.

Keywords : Agricultural Residue / *Bacillus* sp. Strain TW-1 / Corn Hull / Xylanolytic and Cellulolytic Enzymes

---

[*] *Corresponding author: E-mail: khanok.rat@kmutt.ac.th*

[1] *Graduate Student, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

[2] *Researcher, EnzymeTechnology Laboratory, School of Bioresources and Technology.*

[3] *Assistant Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

[4] *Associate Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

[5] *Lecturer, Department of Medical Zoology, College of Medicine.*

1. บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม สินค้าที่ส่งออกไปขายในต่างประเทศส่วนมากเป็นสินค้าทางการเกษตร ดังนั้นในขั้นตอนการผลิตสินค้าทางการเกษตรจะมีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์มากขึ้น ซึ่งนอกจากจะเป็นการเพิ่มมูลค่าจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นแล้วยังลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมและลดภาระการกำจัดของเสียด้วย โดยอาจนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นอาหารสัตว์ ปุ๋ย หรือนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตน้ำตาลโดยใช้เอนไซม์ที่สามารถย่อยองค์ประกอบที่เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ในผนังเซลล์พืช ซึ่งได้แก่เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลส น้ำตาลที่ได้สามารถนำไปใช้ในการผลิตสารให้ความหวานที่มีมูลค่าสูง เช่น น้ำตาลไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ [1] และไซลิทอล [2] กรดอินทรีย์ [3] หรือนำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลทดแทนการผลิตเอทานอลจากแป้งหรือกระบวนการทางเคมีที่มีต้นทุนการผลิตสูงกว่า [4]

ไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติกเอนไซม์ (xylanolytic and cellulolytic enzymes) มีบทบาทที่สำคัญต่อการย่อยเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช โดยเอนไซม์กลุ่มนี้ผลิตได้จากแบคทีเรียและเชื้อราบางชนิดที่เจริญในสภาวะที่มีและปราศจากออกซิเจน [5] นอกจากนี้พบว่าจุลินทรีย์พวก facultative anaerobic bacterium สามารถผลิตไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติกเอนไซม์ได้เช่นเดียวกัน [6] โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช ได้แก่ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โมเลกุลคู่ และโอลิโกแซ็กคาไรด์ [6, 7] มีรายงานว่าไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น ทางการแพทย์ เครื่องสำอาง และอาหาร เป็นต้น [1]

Bacillus sp. สายพันธุ์ TW-1 เป็น facultative anaerobic bacterium ที่สามารถเจริญทั้งในสภาวะที่มีและปราศจากออกซิเจน [8] งานวิจัยนี้สนใจที่จะศึกษาผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่ได้จากการหมัก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 แบบกะภายใต้สภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนจำกัด ได้แก่ เอนไซม์ น้ำตาล เอทานอล และกรดอินทรีย์ โดยใช้เปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้จะตรวจสอบความสามารถของเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติกจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 ในการผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อนำน้ำตาลไปใช้ประโยชน์ต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

2.1 แหล่งของจุลินทรีย์

Bacillus sp. สายพันธุ์ TW-1 แยกได้จากถังหมักก๊าซชีวภาพที่มีเปลือกสับปะรดเป็นวัตถุดิบ ซึ่งจากการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์โดยวิธีของ Bergey [9] พบว่ามีคุณสมบัติในการย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง สร้างเอนโดสปอร์ (endospore) ผลิตเอนไซม์คะตะเลส (catalase) และเป็น facultative anaerobic bacterium

2.2 การเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1

เพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 ในอาหารที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนจำกัด โดยเพาะเลี้ยงในสูตรอาหารเหลวของ Berg และคณะ [10] ซึ่งประกอบด้วย $NaNO_3$ 0.2% K_2HPO_4 0.05% $MgSO_4.7H_2O$ 0.02% $MnSO_2.H_2O$ 0.002% $FeSO_4.7H_2O$ 0.002% และ $CaCl_2.2H_2O$ 0.002% โดยใช้เปลือกข้าวโพดแบบแผ่นและแบบที่มีขนาด 40 mesh 2% (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเตรียมอาหารเหลวปริมาตร 70 มล. ในขวด vial ขนาด 100 มล. และเติม resazurin 4 มล./ล. เป็นอินดิเคเตอร์ (indicator) ในการตรวจวัดออกซิเจน ซึ่งหากมีออกซิเจนปนอยู่สารละลายจะมีสีชมพู ขณะที่ไม่มีออกซิเจนสารละลายจะมีสีใส นำอาหารเหลวไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 ˚C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อ ($5.7x10^8$ CFU/มล.) 5% ลงในอาหารเหลว ปิดด้วยจุกยาง ครอบด้วยฝาอะลูมิเนียมและผนึกให้แน่น ดูดอากาศภายในขวดออกด้วย syringe แล้วบ่มใน incubator shaker ที่เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 ˚C ระหว่างการหมักเก็บตัวอย่างโดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 ˚C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์

ออกจากสารละลายส่วนใส ซึ่งส่วนที่เป็นสารละลายจะถูกทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องอัลตราฟิวเตรชัน (ultrafiltration) ที่มี molecular weight cut off 5 กิโลดาลตัน แล้วเก็บไว้ใช้ในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก ได้แก่ เอนไซม์ต่างๆ ในกลุ่มไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติก โปรตีน น้ำตาล เอทานอล และกรดอินทรีย์ ขณะที่เปลือกข้าวโพดที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อแล้วส่วนหนึ่งเก็บไว้เพื่อใช้เปรียบเทียบกับเปลือกข้าวโพดที่ไม่ผ่านการเลี้ยง ส่วนที่เหลือเก็บไว้สำหรับแยกโปรตีนที่เกาะอยู่กับผนังเซลล์และ/หรือเปลือกข้าวโพด โดยล้างส่วนตะกอนเซลล์ที่แยกได้ด้วย phosphate buffer saline ที่ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมลาร์ ในโปตัสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.10 โมลาร์ พีเอช 7.0 ที่เย็นหลายๆ ครั้ง จากนั้นชะด้วยไตรเอทิวลาไมน์ (triethylamine) 2% (v/v) สารละลายที่ได้จากการชะจะถูกนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องอัลตราฟิวเตรชัน จากนั้นนำไปไดอะไลซิส (dialysis) เพื่อกำจัดไตรเอทิวลาไมน์ออก ซึ่งเอนไซม์ (crude enzyme) ที่ได้จะนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.3 การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์

ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไซลาเนส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส แมนนาเนส และอะไวซิเลส (เอนไซม์แต่ละชนิดใช้ไซแลน คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส แมนแนน (Locus bean gum) และอะไวเซล (Sigma-Aldrich Inc.) เป็นสับสเตรท ตามลำดับ) ตามวิธีของ Pason และคณะ [6] โดยตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร ตามวิธีของ Somogyi-Nelson [11] สำหรับเอนไซม์ไซลาเนสใช้ไซโลส (Merck KGaA) เป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ส่วนคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส แมนนาเนส และอะไวซิเลส ใช้กลูโคส (Merck KGaA) เป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

เอนไซม์ไซลาเนส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส แมนนาเนส หรือ อะไวซิเลส 1 ยูนิต (U) หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยสับสเตรทโดยให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลไซโลสหรือกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ

ตรวจสอบกิจกรรมของเบต้าไซโลซิเดส เซลโลไบโอไฮโดรเลส และเบต้ากลูโคซิเดส ตามวิธีของ Pason และคณะ [6] โดยเอนไซม์แต่ละชนิดใช้ *p*-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside, *p*-nitrophenyl-β-D-cellobioside และ *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (Sigma-Aldrich Inc.) เป็นสับสเตรท ตามลำดับ และตรวจปริมาณ *p*-nitrophenol (Sigma-Aldrich Inc.) ที่เกิดขึ้น โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

ตรวจสอบกิจกรรมของอะราบิโนฟูราโนซิเดส และอะซิติลเอสเทอเรส โดยวิธีของ Mackenzie และ Bilous [12] โดยใช้ *p*-nitrophenyl-β-D-arabinofuranoside และ *p*-nitrophenyl acetate (Sigma-Aldrich Inc.) เป็นสับสเตรท ตามลำดับ โดยตรวจปริมาณ *p*-nitrophenol ที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร

เอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส เซลโลไบโอไฮโดรเลส เบต้ากลูโคซิเดส อะราบิโนฟูราโนซิเดส และอะซิติลเอสเทอเรส 1 ยูนิต (U) หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่ผลิต *p*-nitrophenol 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลรีดิวซ์

ตรวจสอบปริมาณโปรตีนและน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นในสารละลายตัวอย่างตามวิธีของ Lowry และคณะ [13] และ Somogyi-Nelson [11] โดยใช้สารละลาย bovine serum albumin (Sigma-Aldrich Inc.) และกลูโคส (Merck KGaA) เป็นสารละลายมาตรฐาน ตามลำดับ

2.5 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาล

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเปลือกข้าวโพดมาวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลที่ได้โดยเทคนิค Thin layer chromatography (TLC) โดยนำสารละลายตัวอย่างมาหยดลงบน Silica gel 60, F_{254} plate (Merck & Co., Inc. art. No.1.05554 ขนาด 20 x 20 ซม.) จากนั้นนำไปจุ่มลงในถังที่มี mobile phase ซึ่งประกอบด้วย *n*-butanol : acetic acid : distilled water (5 : 2 : 3) เมื่อ mobile phase เคลื่อนที่เกือบสุดแผ่น นำแผ่น Silica gel ออกมาผึ่งให้แห้ง จากนั้นพ่นด้วย reagent ซึ่งประกอบด้วย aniline : α-diphenylamine : acetone : phosphoric acid

(1 มล. : 1 มล. : 50 มล. : 7.5 มล.) ลงบนแผ่นจนทั่ว จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 °C จนเห็นตัวอย่างชัด แล้วเปรียบเทียบกับน้ำตาลกลูโคส เซลโลไบโอส ไซโลส และไซโลไบโอส (Merck KGaA)

2.6 การย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ เปลือกข้าวโพด ซังข้าวโพด รำข้าว ชานอ้อย และฟางข้าว ถูกนำมาบดให้มีขนาดเล็กลงและนำไปร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh ล้างน้ำตาลที่ปนมากับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรออกให้หมดด้วยน้ำกลั่นหลายๆ ครั้ง แล้วทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 °C จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ จากนั้นบ่มวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 1% (w/v) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 กับเอนไซม์ที่ประกอบด้วยไซลาเนส 0.3 ยูนิต และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส 0.09 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 50 °C แล้วตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี Somogyi-Nelson [11]

2.7 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลและกรดอินทรีย์

วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลและกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 ภายใต้สภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนจำกัดด้วยเทคนิค Gas chromatography (GC-FID) โดยใช้ชุดเครื่องมือของบริษัทชิมัสซึ (Shimazu, GC14A+QP2000A) ซึ่งสภาวะที่ทำการทดลองมีดังนี้ คือ Column : Carbo-pack B-DA/ 4% carbowax 20M, Detector : Flame ionization detector (FID), Detector temperature: 230 °C, Column temperature : 170 °C, Injector temperature : 230 °C และ carrier gas: ไนโตรเจน โดยใช้อัตราเร็ว 50 มล./วินาที

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

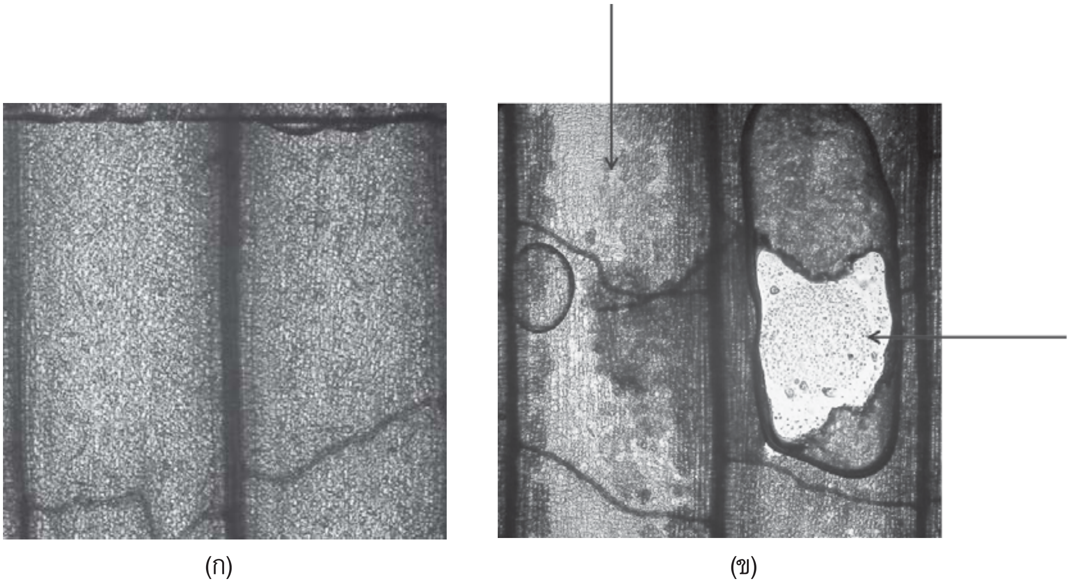
3.1 การเจริญของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 ในเปลือกข้าวโพดแบบแผ่น

เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชเป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบมากในธรรมชาติ ดังนั้นสารพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งสองชนิดนี้จึงเป็นแหล่งคาร์บอนที่น่าสนใจที่จะนำมาผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลส และเปลี่ยนสารพอลิแซ็กคาไรด์เหล่านี้ให้เป็นน้ำตาลเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป

เปลือกข้าวโพดเป็นวัสดุธรรมชาติที่มีปริมาณของเซลลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสสูง (43.8% และ 39.6% ตามลำดับ) [14] เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 ในเปลือกข้าวโพดแบบแผ่นขนาด 2 x 3 x 0.1 ซม. ภายใต้สภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนจำกัด เป็นเวลา 7 วัน พบว่าเปลือกข้าวโพดมีลักษณะบวมน้ำมากขึ้น ขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีลักษณะขุ่นและมีฟองแก๊สเกิดขึ้น (รูปที่ 1ข) เมื่อเปรียบเทียบกับแผ่นชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะเดียวกัน (รูปที่ 1ก) แสดงว่าเซลล์มีการเจริญเกิดขึ้น และเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในเปลือกข้าวโพดถูกย่อยโดยเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 แต่ไม่พบว่ามีออกซิเจนปนเปื้อนในระหว่างการหมักเนื่องจากสีของ resazurin ไม่เปลี่ยนเป็นสีชมพู (ผลการทดลองไม่ได้แสดง) เมื่อนำเปลือกข้าวโพดที่ผ่านการย่อยระหว่างการเพาะเลี้ยงที่ล้างให้สะอาดแล้วมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อดูลักษณะของเปลือกข้าวโพดที่เปลี่ยนแปลงไป จากรูปที่ 2ข จะเห็นว่าแผ่นเปลือกข้าวโพดบางลงและโปร่งแสงขึ้น ซึ่งบริเวณที่เป็นเยื่ออ่อนเป็นบริเวณที่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ทำให้เห็นเป็นรอยบางและใสขึ้น อย่างไรก็ตามบริเวณที่ถูกย่อยสลายบนเปลือกข้าวโพดในแต่ละส่วนมีลักษณะโปร่งแสงไม่เท่ากัน ซึ่งอาจมีสาเหตุจากจุลินทรีย์มีการกระจายตัวบนเปลือกข้าวโพดได้ไม่ทั่วทั้งแผ่น ทำให้เอนไซม์ที่เชื้อผลิตออกมาย่อยเปลือกข้าวโพดในส่วนต่างๆ ได้ไม่เท่ากัน ซึ่งการย่อยขึ้นกับปริมาณเชื้อที่กระจายตัวบนเปลือกข้าวโพด อย่างไรก็ตามบริเวณที่เป็นแกนของเปลือกข้าวโพด (เส้นสีดำตามแนวตั้ง) ซึ่งอาจมีลิกนินเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูงจึงถูกย่อยสลายได้น้อยมาก

(ก) (ข)

รูปที่ 1 เปลือกข้าวโพดและอาหารเลี้ยงเชื้อของชุดควบคุมที่ไม่เติมจุลินทรีย์ (ก) เปรียบเทียบกับที่ผ่านการเลี้ยงด้วย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 ภายใต้สภาวะเดียวกันที่มีออกซิเจนจำกัดเป็นเวลา 7 วัน (ข)



(ก) (ข)

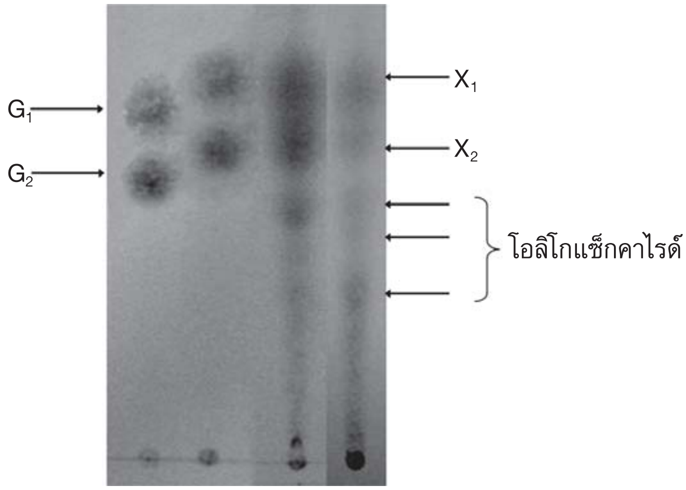
รูปที่ 2 ลักษณะของแผ่นเปลือกข้าวโพดของชุดควบคุมที่ไม่เติมจุลินทรีย์ (ก) เปรียบเทียบกับที่ผ่านการเลี้ยงด้วย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 ภายใต้สภาวะเดียวกันที่มีออกซิเจนจำกัดเป็นเวลา 7 วัน (ข) ลูกศรแสดงบริเวณที่เปลือกข้าวโพดถูกย่อยด้วยเอนไซม์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 (กำลังขยาย 40 เท่า)

3.2 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากการหมัก

3.2.1 การตรวจสอบปริมาณและชนิดของน้ำตาลที่ได้จากการหมัก

การตรวจสอบผลิตภัณฑ์น้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการหมัก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 ในอาหารที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะจำกัดออกซิเจน มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ต่อการย่อยสับสเตรทเพื่อนำน้ำตาลไปประยุกต์ใช้ โดยผลิตภัณฑ์ที่เป็นน้ำตาลโอลิโกเมอร์ เช่น ไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดต่างๆ สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางและเภสัชกรรม เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ [15, 16] ป้องกันและควบคุมโรคโลหิตจาง [17] ต่อต้านการสะสมคอเลสเตอรอล [18]) ยับยั้งการเกิดเมลานิน [19] กระตุ้นการเจริญของเส้นผม [20] เพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซึมแมกนีเซียม [21] ยับยั้ง Gram-positive bacteria [22] anti-inflammatory activity [23] histamine-release inhibitors [24] ป้องกันการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 [25] ป้องกันคราบจุลินทรีย์จับที่ผิวฟัน [26] และใช้เป็นส่วนผสมใน pre- และ pro-biotic สำหรับเด็กทารก และป้องกันระบบภูมิคุ้มกันบกพร่อง [27] เป็นต้น ขณะที่ไซโลไบโอสใช้เป็นอาหารของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์และสัตว์ เช่น *Bifidobacterium* เพื่อช่วยรักษาสภาวะสมดุลภายในลำไส้เล็กให้อยู่ในสภาวะปกติ [28] ส่วนผลิตภัณฑ์ที่เป็นน้ำตาลโมโนเมอร์สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล [4] และไซลิทอล [2] ซึ่งปัจจุบันนิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับการป้องกันฟันผุ

เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 ในอาหารที่มีเปลือกข้าวโพดขนาด 40 mesh เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 14 วัน ภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจน จากนั้นตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำหมัก พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 315.96 มล./ล. (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) เมื่อตรวจสอบชนิดของน้ำตาลใน culture supernatant ด้วยวิธี TLC โดยเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่ได้กับสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสและเซลโลไบโอส (รูปที่ 3 แถวที่ 1) และไซโลสและไซโลไบโอส (รูปที่ 3 แถวที่ 2) พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ 7 วันได้ไซโลสและไซโลไบโอสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ส่วนผลิตภัณฑ์รองเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดอื่นที่มีขนาดใหญ่กว่าน้ำตาลโมเลกุลคู่ (รูปที่ 3 แถวที่ 4) ซึ่งผลที่ได้คล้ายกับการเพาะเลี้ยงเชื้อนาน 14 วัน (รูปที่ 3 แถวที่ 3) แต่ที่ 14 วันให้ปริมาณน้ำตาลมากกว่า อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าน่าจะได้น้ำตาลกลูโคสและเซลโลไบโอส เป็นผลิตภัณฑ์จากการหมักด้วย แต่ไม่สามารถตรวจพบ สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อใช้กลูโคสและเซลโลไบโอส ซึ่งเป็นน้ำตาลที่ใช้ได้ง่ายกว่าในการเจริญเติบโต จึงไม่สามารถตรวจพบในน้ำหมัก ซึ่งการที่ไม่มีกลูโคสและเซลโลไบโอสปนอยู่ในน้ำหมักทำให้ง่ายต่อการทำให้บริสุทธิ์และประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ [1] นอกจากนี้น้ำตาลไซโลส ไซโลไบโอส และไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ยังมีราคาแพงกว่า น้ำตาลกลูโคส เซลโลไบโอส และโอลิโกแซ็กคาไรด์จากเซลลูโลส



รูปที่ 3 TLC ของน้ำตาลที่เกิดจากการย่อยเปลือกข้าวโพดขนาด 40 mesh ในน้ำหมักที่เลี้ยง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด

แถวที่ 1 = น้ำตาลกลูโคส (G_1) และเซลโลไบโอส (G_2) มาตรฐาน

แถวที่ 2 = น้ำตาลไซโลส (X_1) และไซโลไบโอส (X_2) มาตรฐาน

แถวที่ 3, 4 = น้ำตาลในน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 และ 7 วัน ตามลำดับ

3.2.2 การตรวจสอบเอนไซม์

เมื่อตรวจวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมดในส่วนของน้ำหมัก พบว่ามีปริมาณ 259.20 มก. (ตารางที่ 1) ส่วนโปรตีนทั้งหมดที่เกาะอยู่กับผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ และเปลือกข้าวโพดมีปริมาณ 608.40 มก. ซึ่งมากกว่าโปรตีนในน้ำหมัก นอกจากนี้เมื่อนำส่วนของน้ำหมักมาตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ พบไซลาเนส 78.98 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน แต่ไม่พบกิจกรรมของคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ขณะที่ส่วนที่เกาะอยู่กับตะกอนเซลล์เมื่อนำมาตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ พบกิจกรรมไซลาเนส 324.00 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส 23.33 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำหมักน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับที่พบในส่วนของตะกอนเซลล์ และเมื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ ในส่วนที่เกาะกับตะกอนเซลล์ (ตารางที่ 2) พบเอนไซม์ทั้งในกลุ่มที่ย่อยสลายไซแลนและเซลลูโลส ทั้งเอนไซม์ที่ย่อยโครงสร้างหลักได้แก่ ไซลาเนส เบต้าไซโลซิเดส อะไวซิเลส คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส และเบต้ากลูโคซิเดส และเอนไซม์ที่ย่อยสลายโครงสร้างรองหรือส่วนที่เป็นกิ่งก้านของไซแลน (debrancing enzymes) ได้แก่ อะราบิโนฟูราโนซิเดส นอกจากนี้ยังตรวจพบเอนไซม์แมนนาเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งในกลุ่มเฮมิเซลลูเลส อย่างไรก็ตามไม่สามารถตรวจวัดเซลโลไบโอไฮโดรเลส และอะซิติลเอสเทอเรส ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มที่ย่อยเซลลูโลส และไซแลน ตามลำดับ ในส่วนที่ชะออกจากตะกอนเซลล์แม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นแล้วก็ตาม จากการทดลองนี้แสดงว่าเมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 ในสภาวะจำกัดออกซิเจนที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน โปรตีนและเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสและไซลาเนสส่วนใหญ่ยังคงเกาะอยู่กับส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์ นอกจากนี้เป็นที่น่าสังเกตว่าปกติเอนไซม์เซลลูเลสทั่วๆไปย่อยอะไวเซล (microcrystalline cellulose) ได้ยากมาก แต่เอนไซม์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 ย่อยอะไวเซลที่อยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำได้ดีกว่าคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสซึ่งละลายน้ำได้ ซึ่งคุณสมบัติต่างๆนี้เป็นคุณสมบัติที่สำคัญของเอนไซม์เชิงซ้อน (multienzyme complex) เช่น เซลลูโลโซม [29] และไซลาโนโซม [30] ที่มีโครงสร้างซับซ้อนและมีขนาด

โมเลกุลใหญ่ที่ประกอบด้วยเอนไซม์หลายหน่วยย่อยในกลุ่มไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติกที่ทำงานร่วมกันในการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ รวมทั้งส่วนที่เรียกว่า non-catalytic binding domain ซึ่งทำหน้าที่ยึดเกาะกับพอลิแซ็กคาไรด์ ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้น [31, 32] ดังนั้นจึงมีแนวโน้มว่ากลุ่มเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 น่าจะเป็นเอนไซม์เชิงซ้อน ซึ่งจะต้องมีการดำเนินการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 1 ปริมาณโปรตีน ไซลาเนส และคาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส ในน้ำหมัก และในส่วนที่ชะจากตะกอนเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด

แหล่งโปรตีน	โปรตีนทั้งหมด* (มิลลิกรัม)	กิจกรรมจำเพาะ ไซลาเนส (ยูนิตต่อกรัมโปรตีน)	กิจกรรมจำเพาะ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส (ยูนิตต่อกรัมโปรตีน)
น้ำหมัก	259.20	78.98	ND
ตะกอนเซลล์	608.40	324.00	23.33

ND : ไม่สามารถตรวจวัดภายใต้สภาวะที่ศึกษา

* คำนวณจากปริมาณโปรตีนต่อมิลลิลิตร คูณด้วยปริมาตรของตัวอย่างทั้งหมด

ตารางที่ 2 กิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ ในส่วนของตะกอนเซลล์ เมื่อเลี้ยง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 ในอาหารที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด

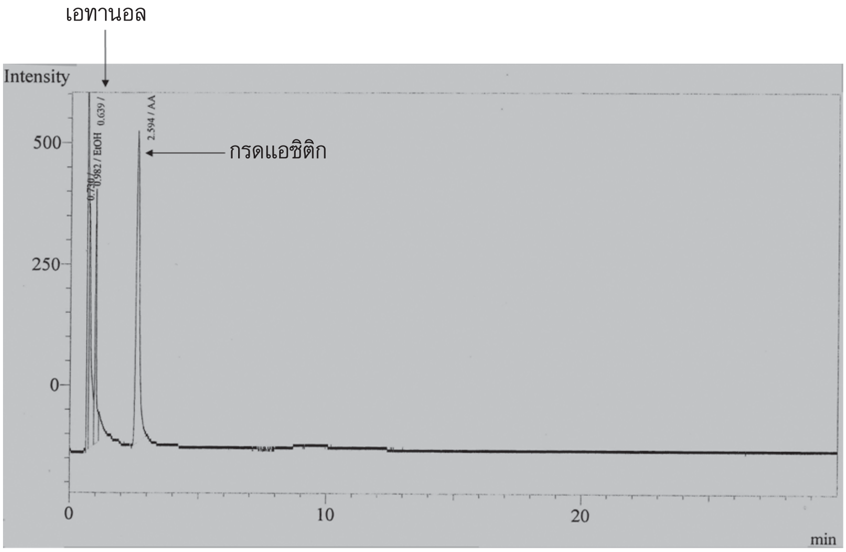
เอนไซม์	กิจกรรมจำเพาะ (ยูนิตต่อกรัมโปรตีน)
ไซลาเนส	324.00
อะไวซิเลส	33.88
แมนนาเนส	25.63
คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	23.33
เบต้าไซโลซิเดส	0.12
เบต้ากลูโคซิเดส	0.10
อะราบิโนฟูราโนซิเดส	0.02
เซลโลไบโอไฮโดรเลส	ND
อะซิติลเอสเทอเรส	ND

ND : ไม่สามารถตรวจวัดภายใต้สภาวะที่ศึกษา

ปัจจุบันไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติกเอนไซม์นอกจากนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตน้ำตาลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรแล้วยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น นำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ โดยพบว่าไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติกเอนไซม์สามารถช่วยให้สัตว์ปีกใช้ประโยชน์จากเศษพืชต่างๆ ได้มากขึ้น [33] และในปัจจุบันมีการนำไซลาเนสมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษในขั้นตอนก่อนการฟอกสีเยื่อกระดาษ โดยเฉพาะเยื่อกระดาษคราฟท์ที่ผ่านการต้มด้วยด่าง [34] เนื่องจากการใช้เอนไซม์สามารถช่วยรักษาสภาพแวดล้อม โดยลดปริมาณสาร adsorbable organic halogen ซึ่งย่อยได้ยากมากในธรรมชาติ ที่เกิดจากการฟอกสีเยื่อกระดาษคราฟท์ด้วยสารคลอรีน ส่วนในด้านผลิตภัณฑ์พบว่าช่วยลดปริมาณคลอรีนอิสระที่มีอยู่ในเยื่อกระดาษ ปรับปรุงคุณสมบัติของเส้นใยกระดาษ การดูดซับน้ำของเยื่อกระดาษเพิ่มขึ้น และช่วยเพิ่มความสว่างให้แก่เยื่อกระดาษ [35]

3.2.3 การตรวจสอบปริมาณเอทานอลและกรดอินทรีย์

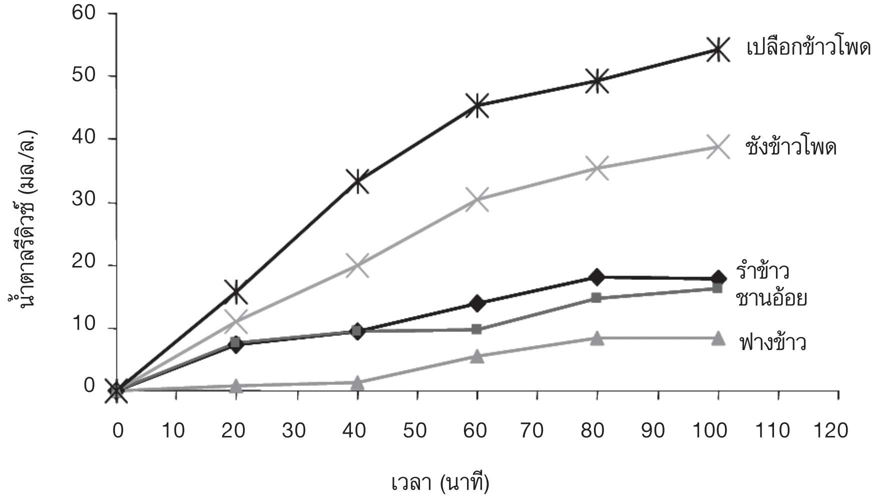
จากการตรวจสอบเอทานอลและกรดอินทรีย์ต่างๆ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักเปลือกข้าวโพดด้วย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 ภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจน พบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 ผลิตเอทานอลและกรดแอซีติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก โดยตัวอย่างในวันที่ 7 และ 14 ให้ผลที่คล้ายกัน อย่างไรก็ตามในวันที่ 14 พบว่าได้ผลิตภัณฑ์หลักมากกว่า โดยตรวจพบเอทานอล 0.27 มิลลิโมลาร์ และกรดแอซีติก 5.02 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4) จากผลการทดลองตรวจพบเพียงกรดแอซีติกและเอทานอลโดยเทคนิค Gas chromatography เท่านั้น ซึ่งอาจง่ายต่อการทำให้บริสุทธิ์และการนำไปประยุกต์ใช้ เมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์อื่น เช่น *Bacteroides* sp. สายพันธุ์ P-1 ที่เมื่อเลี้ยงภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน โดยมีเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ผลิตภัณฑ์หลักนอกกรดแอซีติกและเอทานอลแล้วยังตรวจพบกรดโพรพิโอนิก กรดไอโซวาเลริก กรดไอโซบิวเทอริก และกรดบิวเทอริกด้วย [36] นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้บ่งชี้ว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 ผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้ในขั้นตอนเดียว จึงน่าสนใจที่จะนำไปศึกษาต่อ



รูปที่ 4 Chromatogram ของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด โดยมีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 14 วัน

3.3 การย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยเอนไซม์

การย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างๆ ด้วยเอนไซม์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวสามารถย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์พืชได้ต่างกัน (รูปที่ 5) ซึ่งน่าจะมีสาเหตุจากพืชแต่ละชนิดมีองค์ประกอบทางเคมี และโครงสร้างที่ต่างกัน [37, 38] โดยเปลือกข้าวโพดถูกย่อยได้ดีที่สุดเนื่องจากมีปริมาณของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสสูงกว่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดอื่น [14, 37, 38] รองลงมาคือ ซังข้าวโพด รำข้าว ชานอ้อย และฟางข้าว ตามลำดับ ส่วนฟางข้าวถึงแม้ว่าจะมีปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสอยู่สูง แต่เอนไซม์จากแบคทีเรียดังกล่าวย่อยได้ยาก ซึ่งสาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากในฟางข้าวมีปริมาณซิลิกาสูง [39] อย่างไรก็ตามแม้ว่าปริมาณเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสในชานอ้อยสูงกว่ารำข้าว แต่เอนไซม์สามารถย่อยรำข้าวได้ดีกว่าชานอ้อย ซึ่งอาจเนื่องจากการเรียงตัวของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในโครงสร้างของชานอ้อยอยู่ในตำแหน่งที่ถูกย่อยสลายได้ยากกว่า โดยโครงสร้างของลิกนินอาจไปบดบังการทำงานของเอนไซม์ เอนไซม์จึงสามารถย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในรำข้าวได้ดีกว่าชานอ้อย ซึ่งผลการทดลองที่ได้แตกต่างจากงานวิจัยของ Tachaapaikoon และคณะ [40] และ Kaewintajuk และคณะ [41] ที่พบว่า *Bacillus halodurans* สายพันธุ์ C-1 และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ BK ตามลำดับ ย่อยเปลือกข้าวโพดได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ชานอ้อย ฟางข้าว ซังข้าวโพด และรำข้าว ตามลำดับ แสดงว่ากลุ่มเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 มีความสามารถในการย่อยพอลิแซ็กคาไรด์ในผนังเซลล์ของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ต่างจากเอนไซม์ที่ผลิตจาก *Bacillus halodurans* สายพันธุ์ C-1 และ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ BK



รูปที่ 5 การย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างๆด้วยเอนไซม์จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1

4. สรุปผลการวิจัย

ผลิตภัณฑ์จากการหมัก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 ในอาหารที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนจำกัด ได้แก่ เอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกและเซลลูโลไลติก น้ำตาลไซโลส ไซโลไบโอส โอลิโกแซ็กคาไรด์ต่างๆ เอทานอล และกรดแอซีติก ซึ่งผลิตภัณฑ์ต่างๆ เหล่านี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ต่อไปได้

5. กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน หมวดเงินอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2551-2552 ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

6. เอกสารอ้างอิง

1. Moure, A., Gullon, P., Dominguez, H., and Parajo, J.C., 2006, “Advances in the Manufacture, Purification and Applications of Xylo-oligosaccharides as Food Additives and Nutraceuticals”, *Process Biochemistry,* Vol. 41, pp. 1913-1923.

2. Parajo, J.C., Dominguez, H., and Dominguez, J.M., 1998, “Biotechnological Product of Xylitol. Part 3: Operation in Culture Media Made from Lignocellulose Hydrolysates”, *Bioresource Technology,* Vol. 66, pp. 25-40.

3. Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T., Vandenberghe, L.P.S., and Mohan, R., 2000, “Biotechnological Potential of Agro-industrial Residues. II : Cassava Bagasse”, *Bioresource Technology,* Vol. 74, pp. 81-87.

4. Millati, R., Edebo, L., and Taherzadeh, M.J., 2005, “Performance of *Rhizopus, Rhizomucor* and *Mucor* in Ethanol Production from Glucose, Xylose and Wood Hydrolyzates”, *Enzyme and Microbial Technology,* Vol. 36, pp. 294-300.

5. Doi, R.H., and Kosugi, A., 2004, “Cellulosomes : Plant-Cell-Wall-Degrading Enzyme Complexes”, *Nature Reviews Microbiology,* Vol. 2, pp. 541-551.

6. Pason, P., Kyu, K.L., and Ratanakhanokchai, K., 2006, “*Paenibacillus curdlanolyticus* strain B-6 Xylanolytic-Cellulolytic Enzyme System that Degrades Insoluble Polysaccharides”, *Applied and Environmental Microbiology,* Vol. 72, pp. 2483-2490.

7. Tachaapaikoon, C., Lee Y.S., Ratanakhanokchai, K., Pinitglang, S., Kyu, K.L., Rho, M.S., and Lee, S.K., 2006, “Purification and Characterization of Two Endoxylanases from an Alkaliphilic *Bacillus halodurans* C-1”, *Journal of Microbiology and Biotechnology,* Vol. 16, pp. 613-618.

8. Srinang, T., Tachaapaikoon, C., Kyu, K.L., and Ratanakhanokchai, K., 2007, “Xylanolytic and Cellulolytic Enzymes of *Bacillus* sp. strain TW-1 under Limited Oxygen”, *Proceeding of the 45th Kasetsart University Annual Conference,* 30 January-2 February 2007 at Kasetsart University. pp. 76-84.

9. Sneath, P.H.A., 1986, “Endospore-Forming Gram-Positive Rods and Cocci”, In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology,* Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore, MD, pp. 1104-1139.

10. Berg, B., Hofstan, B.V., and Petterson, G., 1972, “Growth and Cellulose Fermentation by *Cellvibrio fulvus*”, *Journal of Applied Bacteriology,* Vol. 35, pp. 201-214.

11. Somogyi, M., 1952, “Notes in Sugar Determination”, *Journal of Biological Chemistry,* Vol. 195, pp. 19-23.

12. Mackenzie, C.R., and Bilous, D., 1988, “”Ferulic and Esterase Activity from *Schizophyllum commune*”, *Applied and Environmental Microbiology,* Vol. 54, pp. 1170-1173.

13. Lowry, O.H., Roasebrough, N.J., Fan, A.L., and Randail, R.S., 1951, "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent", *Journal of Biological Chemistry,* Vol. 193, pp. 265-275.

14. Tachaapaikoon, C., Kyu, K.L., and Ratanakhanokchai, K., 2006, "Purification of Xylanase from Alkaliphilic *Bacillus* sp. K-8 by Using Corn Husk Column", *Process Biochemistry,* Vol. 41, pp. 2441-2445.

15. Katapodis, P., Vardakou, M., Kalogeris E., Kekos, D., Macris, B.J., and Christakopoulos, P., 2003, "Enzymatic Production of a Feruloylated Oligosaccharide with Antioxidant Activity from Wheat Flour Arabinoxylan", *European Journal of Nutrition*, Vol. 42, pp. 55-60.

16. Yuan X., Wang, J., and Yao, H., 2005, "Antioxidant Activity of Feruloylated Oligosaccharides from Wheat Bran", *Food Chemistry*, Vol. 90, pp. 759-764.

17. Matsuoka, M., 2005, "Xylooligosaccharides for Manufacture of Dietary Fiber Health Foods", *International Patent WO* 2,005,092,124.

18. Izumi, Y., and Kojo, A., 2003, "Long-Chain Xylooligosaccharide Compositions with Intestinal Function-Improving and Hypolipemic Activities, and Their Manufacture", *Japan Patent JP,* 2003,048,901.

19. Ikemizu, S., and Azumi, N., 2002, "Melanin Formation Inhibitors Containing Acidic Xylooligosaccharides", *Japan Patent JP,* 200,217,137.

20. Ikemizu, S., and Kojo, A. 2003, "Hair Growth Stimulants Containing Acidic Xylooligosaccharides", *Japan Patent JP*, 2,003,183,133.

21. Brouns, F.J.P.H., Bornet, F.R.J., Coudray, C., and Rayssiguier, Y.G. 2002, "Indigestible Oligosaccharides and Magnesium Absorption in Humans", *International Patent WO,* 2,002,039,835.

22. Christakopoulos, P, Katapodis, P., Kalogeris, E., Kekos, D., Macris, B.J., Stamatis, H., and Skaltsa, H., 2003, "Antimicrobial Activity of Acidic Xylo-oligosaccharides Produced by Family 10 and 11 Endoxylanases", *International Journal of Biological and Macromolecules,* Vol. 31, pp. 171-175.

23. Kokubo, I., and Ikemizu, S., 2003, "Acidic Xylooligosaccharides as Topical Anti-Inflammatory Agents," *Japan Patent JP,* 2003,221,339.

24. Kokubo, I., and Ikemizu, S., 2004, "Histamine-Release Inhibitors Containing Xylooligosaccharides," *Japan Patent JP*, 2004,059, 481.

25. Monsan, P., Valet, P., Remaud, S.M., and Saulnier, B.J.S., 2004, "Use of Prebiotics for the Prevention of Onset of Type II Diabetes", *France Patent FR,* 2,844,453.

26. Sugiyama, S., Kobayashi, H., and Matsumoto, A., 2004, "Oral Cavity Compositions Containing Lactic Acid Bacteria Products and Gluconates and/or Oligosaccharides", *Japan Patent JP,* 2,004,250,374.

27. Speelmans, G., Knol, J., Haarman, M., and Garssen, J., 2005, "Pre- and Probiotic Compositions for Infants, Especially those not Breast Fed in Prevention and Treatment of Immune Disorders," *International Patent WO,* 2,005,039,319.

28. Jaskari, J., Kontula, P., Siitonen, A., Jousimies-Somer, H., Mattila-Sandholm, T., and Poutanen, K., 1998, "Oat β-Glucan and Xylan Hydrolysates as Selective Substrates for *Bafidobacterium* and *Lactobacillus* Strains", *Applied Microbiology and Biotechnology,* Vol. 49, pp. 175-181.

29. Bayer, E.A., Morag, E., and Lamed, R., 1994, "The Cellulosome : a Treasure-Trove for Biotechnology", *Trends in Biotechnology,* Vol. 12, pp. 379-386.

30. Jiang, Z.-Q., Deng, W., Li, L.T., Ding, C.H., Kusakabe, I., and Tan, S.S., 2004, "A Novel, Ultra-large Xylanolytic Complex (Xylanosome) Secreted by *Streptomyces olivaceoviridis*", *Biotechnology Letters,* Vol. 26, pp. 431-436.

31. Bayer, E.A., Chanzy, H., Lamed, R., and Shoham, Y., 1998, "Cellulose, Cellulase and Cellulosome", *Journal of Structural Biology,* Vol. 8, pp. 548-557.

32. Doi, R.H., Kosugi, A., Murashima, K., Tamaru, Y., and Han, S.O., 2003, "Cellulosome from Mesophilic Bacteria", *Journal of Bacteriology,* Vol. 185, pp. 5907-5917.

33. Gerand, A.W., Ronar, F.P., and Denis, R.H., 1993, "Enzyme in the Animal-Feed Industry", *Trends in Biotechnology,* Vol. 11, pp. 424-430.

34. Sunna, A., and Antranikien, G., 1997, "Xylanolytic Enzymes from Fungi and Bacterial", *Critical Review in Biotechnology,* Vol. 17, pp. 39-67.

35. Beg, Q.K., Bhushan, B., Kapoor, M., and Hoondal, G.S., 2000, "Enhanced Production of a Thermostable Xylanase from *Streptomyces* sp. QG-11-3 and Its Application in Biobleaching of Eucalyptus Kraft Pulp", *Enzyme and Microbial Technology,* Vol. 27, pp. 459-466.

36. Ponpium, P., Ratanakhanokchai, K., and Kyu, K.L., 2000, "Isolation and Properties of a Cellulosome-Type Multienzyme Complex of the Thermophilic *Bacteroides* sp. Strain P-1, *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 26, pp. 459-465.

37. Kuhad, R.C., 1993, "Lignocellulose Biotechnology: Current and Future Prospects", *Critical Reviews in Biotechnology,* Vol. 13, pp. 151-172.

38. Benber, S., and Benedito de Barder, C., 1974, "Basic and Applied Research Needs for Optimizing Utilization of Rice Bran as Food and Feed," *Proceeding of the Rice By-Products Utilization International Conference,* Institute of Agrochemistry and Food Technology, Valencia Vol. 4, pp. 1-99.

39. Real, C., Alcla, M., and Criaeo, J.M., 1996, "Preparation of Silica from Rice Husks", *Journal of American Ceramic Society,* Vol. 79, pp. 2012-2016.

40. Tachaapaikoon, C., Ratanakhanokchai, K., and Kyu, K.L., 2003, "Cellulase-Free Xylanase from Alkaliphilic Thermotolerant *Bacillus halodurans* Strain C-1 for Hydrolysis of Agricultural Residues and Kraft Pulps", *KMUTT Research and Development Journal,* Vol. 26, pp. 201-217.

41. Kaewintajuk, K., Chon, G.H., Lee, J.S., Kongkiattikajorn, J., Ratanakhanokchai, K., Kyu, K.L., Lee, J.H., Roh, M.S., Choi, Y.Y., Park, H., and Lee, Y.S. 2006, "Hydrolysis of Agricultural Residues and Kraft Pulps by Xylanolytic Enzymes from Alkaliphilic *Bacillus* sp. Strain BK", *Journal of Microbiology and Biotechnology,* Vol. 16, pp. 1255-1261.