

อิทธิพลของชนิดและปริมาณของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่อการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *Penicillium oxalicum* KUB-SN2-1

พิชามณูชु์ แดงพรม¹ สุดาทิพย์ จันทร^{2*}

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จ.ปทุมธานี 12121

และ สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ³

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทคัดย่อ

สารละลายเอนไซม์สกัดหยาบชนิดขับออกนอกเซลล์จาก *Penicillium oxalicum* KUB-SN2-1 ประกอบด้วย เซลลูเลส ไกลโคเนส และแมนนาเนสที่มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 2.82 ± 0.17 (เมื่อใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส เป็นสับสเตรต) 1.50 ± 0.04 (เมื่อใช้เปรีซทูดไซแลนเป็นสับสเตรต) และ 36.01 ± 0.13 (เมื่อใช้โลคัสบีกันเป็นสับสเตรต) หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 5 ชนิดคือ กากกาแฟ กากชานอ้อย กากถั่วเหลือง กากเนื้อมะพร้าว และเปลือกมันฝรั่งถูกใช้เป็นสับสเตรตสำหรับการผลิตน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบดังกล่าว โดยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรแต่ละชนิดละลายอยู่ในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.0 บ่มกับสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 60 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเมื่อทำการย่อยกากเนื้อมะพร้าวนาน 30 ชั่วโมงมีปริมาณสูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 7.51 ± 0.52 มก./มล. ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเมื่อย่อยกากกาแฟ 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) มก./มล. ตามลำดับ และเมื่อศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร พบว่าปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรของกากเนื้อมะพร้าว กากกาแฟ เปลือกมันฝรั่ง และกากชานอ้อยให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด ในขณะที่ 8 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรของกากถั่วเหลืองให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด จากนั้นวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น พบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลือง คือแมนโนส กากชานอ้อย และเปลือกมันฝรั่งคือกลูโคส ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยกากเนื้อมะพร้าวและกากกาแฟ คือน้ำตาลที่ยังไม่ทราบชนิดแน่ชัด

คำสำคัญ : ลิกโนเซลลูเลส / โอลิโกแซ็กคาไรด์ / *Penicillium oxalicum*

* Corresponding author. E-mail: t_sudathip@yahoo.com, sudathip@tu.ac.th

¹ นักศึกษาปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

² อาจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

³ รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร

Effects of Types and Content of Agricultural Wastes for Oligosaccharide Production by Crude Enzyme from *Penicillium oxalicum* KUB-SN2-1

Pichamon Dangpram¹, Sudathip Chantorn^{2*}

Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani 12121, Thailand

and Sunee Nitisinprasert³

Kasetsart University

Abstract

Extracellular crude enzyme from *Penicillium oxalicum* KUB-SN2-1 composed of cellulase, xylanase and mannanase at 2.82 ± 0.17 (carboxymethylcellulose as substrate), 1.50 ± 0.04 (birch wood xylan as substrate) and 36.01 ± 0.13 (locust bean gum as substrate) Unit/ml, respectively. Five agricultural wastes (AWs) viz. coffee residues, bagasse, soybean meal, copra meal and potato peel were selected for use as substrates for oligosaccharide production. Extracellular crude enzyme was incubated with each type of AWs, which was dissolved in 10 mM citrate-phosphate buffer pH 4.0 at 60°C for 60 h. The highest reducing sugar content of 7.51 ± 0.52 mg/ml was obtained from copra meal hydrolysate after 30 h. The reducing sugar contents from the hydrolysates of coffee residues, potato peel, bagasse and soybean meal were 3.35 ± 0.16 (48 h), 3.31 ± 1.43 (48 h), 4.10 ± 0.40 (48 h) and 2.32 ± 0.15 (48 h) mg/ml, respectively. The optimal concentration of AWs was also investigated. The maximum reducing sugar contents were given by 10% of copra meal, coffee residues, potato peel and bagasse and 8% of soy bean meal. Then, hydrolysate products were analyzed. Mannose was detected as the soybean meal hydrolysate product. Glucose was found as the bagasse and potato peel hydrolysate products, while, unknown sugars were identified as the copra meal and coffee residues hydrolysate products.

Keywords : Lignocellulase / Oligosaccharide / *Penicillium oxalicum*

* Corresponding author. Email: t_sudathip@yahoo.com, sudathip@tu.ac.th

¹ Graduate Student Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology.

² Lecturer, Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology.

³ Assoc. Prof, Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry.

1. บทนำ

ปัจจุบันลิกโนเซลลูโลสเป็นสารประกอบชีวมวลที่มีปริมาณมากที่สุดในโลก [1] พบได้ทั่วไปในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร พืชจำพวกไม้เนื้อแข็ง และไม้เนื้ออ่อน องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสแตกต่างกันตามชนิดของพืช แต่โดยทั่วไปแล้วประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน [2] วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประกอบด้วยสารพวกเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง โดยปริมาณของเฮมิเซลลูโลสมีมากเป็นอันดับสอง [3-5] ซึ่งโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสมีทั้งแบบที่ประกอบด้วยน้ำตาลเพนโตสหรือน้ำตาลเฮกโซสเพียงหนึ่งชนิด (โฮโมพอลิเมอร์) หรือประกอบด้วยน้ำตาลเพนโตสและน้ำตาลเฮกโซสผสมกัน (เฮเทอโรพอลิเมอร์) เช่น น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลกาแลคโตส และน้ำตาลกลูโคส เป็นต้น ซึ่งน้ำตาลแต่ละโมเลกุลจะต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1, 3-ไกลโคซิดิก หรือพันธะเบต้า-1, 4-ไกลโคซิดิก ขึ้นกับชนิดของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร [6, 7] จึงทำให้มีความน่าสนใจที่จะนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์ ซึ่งปัจจุบันมีการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นสับสเตรตสำหรับเอนไซม์กลุ่มที่ย่อยเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในลิกโนเซลลูโลส ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ [8, 9] ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมได้ เช่น อุตสาหกรรมพลังงาน อุตสาหกรรมอาหารคน และสัตว์ เป็นต้น [10] ลิกโนเซลลูโลสที่ย่อยสารพอลิแซ็กคาไรด์ในสารชีวมวลเป็นกลุ่มเอนไซม์ไฮโดรเลสที่ประกอบด้วยเอนไซม์หลัก 3 ชนิด ได้แก่ เซลลูเลส (endo-1,4- β -D-glucanase; EC 3.2.1.4) ไซลานเนส (endo-1,4- β -D-xylanase; EC 3.2.1.8) และแมนนาเนส (mannan endo-1,4- β -D-mannosidase; EC 3.2.1.78) [11] การทำงานของเอนไซม์ทั้งสามชนิดจะย่อยสลายแบบสุมภายในสายโมเลกุลของโครงสร้างหลักของสารประกอบลิกโนเซลลูโลส ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้น [12] ซึ่งโดยทั่วไปเพื่อให้เกิดการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ จำเป็นต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดร่วมกันและมีลักษณะการทำงานที่ส่งเสริมกัน (synergistic action)

ในประเทศไทยวิมลทิพย์และคณะ [13] ได้ศึกษาเกี่ยวกับการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยเอนไซม์ในกลุ่มไซลานโอไลติก และเซลลูโอไลติกจาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 พบว่าสามารถย่อยเปลือกข้าวโพดได้สูงสุด รองลงมา คือ ชังข้าวโพด ชานอ้อย ฟางข้าว และ แกลบ ตามลำดับ โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาล ไซโลส และกลูโคส นอกจากนั้นกุศมาและคณะ [14] ศึกษาการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดย cellulosome-like multienzyme complex จาก *B. circulans* B-6 พบว่าเมื่อใช้สารละลายเอนไซม์สกัดหยาบ (crude enzyme) ย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่พีเอช 7.0 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เปลือกข้าวโพดถูกย่อยได้ดีที่สุดรองลงมาคือ ชานอ้อย ชังข้าวโพด ฟางข้าว แกลบ และรำข้าว ตามลำดับ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำสารละลายเอนไซม์ในกลุ่มลิกโนเซลลูเลสมาทำการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อผลิตน้ำตาลชนิดต่างๆ ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบหรือแหล่งคาร์บอนในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้

นอกจากนั้นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั้ง 5 ชนิดที่เลือกใช้ในงานวิจัยเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีปริมาณมากและพบได้ทั่วไปในประเทศไทย [15] และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั้ง 5 ชนิดประกอบด้วยสารกลุ่มเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสเป็นหลัก กล่าวคือ กากเนื้อมะพร้าว ประกอบด้วยส่วนที่เป็นโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต โดยส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตคิดเป็น 45-60 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และเป็นสารประเภทกาแลคโตแมนแนน [16] กากถั่วเหลืองประกอบด้วย โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และส่วนที่เป็นเยื่อใย (crude fiber) โดยส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตเป็นสารประเภทอะราบีโนกาแลคแทน [17] กากชานอ้อย ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินเท่ากับ 43.6, 33.8 และ 18.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ [18] กากกาแฟประกอบด้วยแมนแนน เซลลูโลส และอะราบีโนกาแลคแทน โดยจะมีปริมาณเซลลูโลสประมาณ 13.2-18.4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และมีปริมาณแมนแนนประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง [19] และเปลือกมันฝรั่งประกอบด้วย แป้ง เฮมิเซลลูโลส เพคติน เซลลูโลสและลิกนิน ในส่วนของเฮมิเซลลูโลสมีเฮเทอโร

โรแมนแนนเป็นองค์ประกอบ [20] ดังนั้นจากลักษณะโครงสร้างของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั้ง 5 ชนิด จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำสารละลายเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสและเอมิเซลลูเลสมาทำการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อผลิตน้ำตาลเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้น หรือแหล่งคาร์บอนในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้

จากการศึกษาของ Chaiongkarn และคณะ พบว่า *Penicillium oxalicum* KUB-SN2-1 ที่ถูกคัดแยกจากดินสามารถผลิตลิโนเซลลูเลสได้ โดยผลิตแมนนาเนสได้สูงที่สุดเมื่อใช้กากเนื้อมะพร้าวเป็นตัวเหนียวนำ โดยมีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 19.31 หน่วยต่อมิลลิเมตร และมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือที่พีเอชเท่ากับ 4.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส [21] ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะศึกษาชนิดและปริมาณของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 5 ชนิด ได้แก่ กากเนื้อมะพร้าว กากถั่วเหลือง กากชานอ้อย กากกาแฟ และเปลือกมันฝรั่งที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1 โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่พีเอชเท่ากับ 4.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นสภาวะทดสอบ

2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 การเตรียมวัตถุดิบ

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 5 ชนิด ได้แก่ กากเนื้อมะพร้าว กากชานอ้อย กากถั่วเหลือง กากกาแฟ และเปลือกมันฝรั่งใช้เป็นสับสเตรตในงานวิจัยนี้ โดยวัตถุดิบทั้งหมดที่ใช้เป็นวัตถุดิบที่เตรียมในครั้งเดียวกันและใช้ตลอดงานวิจัย ทำการเตรียมวัตถุดิบโดยนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 5 ชนิด มาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรแต่ละชนิดที่แห้งมาบดให้มีขนาดเล็กด้วยเครื่องปั่น (blender) จากนั้นแยกขนาดด้วยตะแกรงร่อน (sieve plate) ขนาด 45 mesh เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2.2 การเตรียมกล้าเชื้อ

เพาะเลี้ยง *P. oxalicum* KUB-SN2-1 [21] ในอาหาร Potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 30

องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นทำการเตรียมสารแขวนลอยสปอร์โดยให้มีปริมาณสปอร์เท่ากับ 10^6 - 10^7 สปอร์ต่อมิลลิเมตรในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อผสมกับ 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของ Tween 80 นับสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) ทำให้ได้กล้าเชื้อเริ่มต้นเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2.3 การผลิตสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบ

นำกล้าเชื้อเริ่มต้นปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (%v/v) ย้ายลงอาหารผลิตเอนไซม์ที่ประกอบด้วย [เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร; %(w/v)] เปปโตเน 0.4, โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.3, ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.2, แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.05, โคบอลต์คลอไรด์ ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.0002, เพอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.0005, แมงกานีสซัลเฟต ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.0002, ซิงคลอไรด์ (ZnCl_2) 0.0016, สารสกัดยีสต์ (yeast extract) 0.5, กวักกัม (guar gum) 1.0, และกากกาแฟ 0.25 ปริมาณพีเอชเท่ากับ 5.0-5.5 ด้วยกรดทาทาลิก 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีนาน 4 วัน จากนั้นนำมากรองผ่านกระดาษกรอง (Whatman No.4) และปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากความเร็ว 8000 x g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ศึกษาต่อไป

2.4 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

วิเคราะห์กิจกรรมของสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบโดยทำการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ เซลลูเลส [คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส; ใช้คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส [carboxymethylcellulose; CMC] เป็นสับสเตรต และเอวิเซล; ใช้เอวิเซล (Avicel) เป็นสับสเตรต] ไชลานเนส (ใช้เบิร์ชทูดไซแลน (birch wood xylan) เป็นสับสเตรต) และแมนนาเนส (ใช้โลคัสบีนกัม; locust bean gum (LBG) เป็นสับสเตรต) สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์คือ เติมน้ำตาลละลายเอนไซม์สกัดหยาบที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.25 มล. ลงใน 0.25 มล.

สารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.0 ที่มี 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ของสับสเตรต บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid; DNS [22] ทำการทดลอง ทั้งหมด 3 ซ้ำ

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์เท่ากับปริมาณ เอนไซม์ที่ใช้ย่อยสับสเตรตแล้วได้ผลิตภัณฑ์ 1 ไมโครโมล ต่อเวลาที่สภาวะที่ทดสอบ โดยมีน้ำตาลกลูโคส โซโลส หรือแมนโนสเป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐานสำหรับ เซลลูเลส โซลานเนส และแมนนาเนส ตามลำดับ

2.5 การศึกษาชนิดของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ที่เหมาะสมต่อการย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบ จาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1

นำสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบ (ที่มีกิจกรรม แมนนาเนสเท่ากับ 36.01 ± 0.13 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 80 มล. ผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อ ปริมาตรของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่จะละลายใน สารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.0 ปริมาตร 80 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 60 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่เวลา ต่างๆ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid โดยมีสารละลายผสมปริมาตร 80 มล. ที่ประกอบด้วย 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรละลายในสารละลาย ซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4 กับ น้ำกลั่นปริมาตร 80 มล. เป็นชุดควบคุม ทำการทดลอง ทั้งหมด 3 ซ้ำ คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นตาม สมการที่ (1)

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น (มก./มล.) = ปริมาณ น้ำตาลรีดิวซ์ในชุดตัวอย่าง-ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในชุด ควบคุม สมการที่(1)

2.6 การศึกษาปริมาณที่เหมาะสมของวัสดุเหลือทิ้ง ทางทางการเกษตรต่อการย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์สกัด หยาบจาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1

นำสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบ (ที่มีกิจกรรม แมนนาเนสเท่ากับ 36.01 ± 0.13 หน่วยต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 80 มล. ผสมกับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ที่จะละลายในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.0 ปริมาตร 80 มล. ซึ่งมีปริมาณ ของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่แตกต่างกันคือ 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 60 ชั่วโมง เก็บตัวอย่าง ที่เวลาต่างๆ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี 3, 5-dinitrosalicylic acid โดยมีสารละลายผสมปริมาตร 80 มล. ที่ประกอบด้วยปริมาณของวัสดุเหลือทิ้งทางการ เกษตรที่แตกต่างกันคือ 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์น้ำ น้ำหนักต่อปริมาตรในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4 กับน้ำกลั่นปริมาตร 80 มล. เป็น ชุดควบคุม ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นคำนวณ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นตามสมการที่ (1)

2.7 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุ เหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบ จาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของสารละลาย เอนไซม์สกัดหยาบที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดมา วิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลด้วยวิธี Thin Layer Chroma- tography (TLC) โดยดัดแปลงวิธีของ Apiraksakorn และคณะ ทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยนำ ตัวอย่างหยดลงบนแผ่น aluminum silica gel 60 (Merck, Germany) จากนั้นนำไปจุดในภาชนะที่มี mobile phase ที่ประกอบด้วยสารละลายผสม n-butanol : isopropanol : ethanol : distilled water อัตราส่วน 2:3:3:2 เมื่อ mobile phase เคลื่อนที่เกือบสุดแผ่น

aluminum silica gel 60 นำแผ่น aluminum silica gel 60 มาฟุ้งให้แห้ง จากนั้นแช่ในสารละลายผสมของ 0.2 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรของออซินอล (orcinol) ที่ละลายใน 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายกรดซัลฟูริกในเอทานอล จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนเห็นตัวอย่างชัดเจน นำผลที่ได้เปรียบเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส แมนโนส แมนโนไบโอส แมนโนไตรโอส แมนโนเตตระโอส แมนโนเพนโตส และแมนโนเฮกโซส [23]

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

3.1 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ของสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1

ตารางที่ 1 แสดงผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ของสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1 โดยจะเห็นว่า *P. oxalicum* KUB-SN2-1 สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่มลิกโนเซลลูโลสได้หลายชนิด โดยจะผลิตแมนนาเนสสูงที่สุด ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Chaionkarn และคณะ ที่รายงานว่า *P. oxalicum* KUB-SN2-1 สามารถผลิตแมนนาเนสสูงที่สุดเมื่อใช้กากเนื้อมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแสดงกิจกรรมแมนนาเนสเท่ากับ 19.31 หน่วยต่อ

มิลลิลิตร [15] อย่างไรก็ตามค่ากิจกรรมของแมนนาเนสในงานวิจัยนี้มีค่าสูงกว่าคือเท่ากับ 36.01 ± 0.13 หน่วยต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบของอาหารเพื่อผลิตเอนไซม์มีความแตกต่างกัน โดยในงานวิจัยนี้มีทั้งกากและกากกาแฟเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ ซึ่งทั้งกากและกากกาแฟเป็นสารประกอบที่มีโครงสร้างของกาแลคโตแมนแนน และแมนแนนเป็นองค์ประกอบ [19] จึงทำให้สามารถเหนี่ยวนำให้ *P. oxalicum* KUB-SN2-1 ผลิตแมนนาเนสได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามจากตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่า *P. oxalicum* KUB-SN2-1 สามารถผลิตเซลลูเลส และไซลาเนสได้ด้วย ดังนั้นจึงสามารถใช้สารละลายเอนไซม์สกัดหยาบที่ผลิตได้ในงานวิจัยนี้มาทำการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั้ง 5 ชนิดซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ กากเนื้อมะพร้าวและกากถั่วเหลืองที่ประกอบด้วยสารพวกกาแลคโตแมนแนน [24, 25] ส่วนในกากกาแฟประกอบด้วยแมนแนน อะราบีโนกาแลคแทน และเซลลูโลส โดยมีแมนแนนเป็นองค์ประกอบประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง [19] ในขณะที่เปลือกมันฝรั่งประกอบด้วยแป้ง เฮมิเซลลูโลส เพคติน เซลลูโลส และลิกนิน [26] และกากชานอ้อยประกอบด้วยเซลลูโลส 43.6 เฮมิเซลลูโลส 33.8 และลิกนิน 18.1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง [18]

ตารางที่ 1 กิจกรรมเอนไซม์ของสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1

เอนไซม์	กิจกรรมเอนไซม์ (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ Relative activity(%)
แมนนาเนส	36.01 ± 0.13	100
ไซลาเนส	1.50 ± 0.04	4.55
คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส	2.82 ± 0.17	8.57
เอมิเซลลูเลส	0.40 ± 0.08	1.23

3.2 ชนิดของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1

เมื่อนำสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบที่แสดงกิจกรรมแมนนาเนสเท่ากับ 36.01 ± 0.13 หน่วยต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 1) มาทำการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการ

เกษตร 5 ชนิด (1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร) ได้แก่ กากกาแฟ กากชานอ้อย กากถั่วเหลือง กากเนื้อมะพร้าว และเปลือกมันฝรั่งที่ละลายในสารละลายซีเตรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 4.0 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 60 ชั่วโมง พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเมื่อย่อยกากเนื้อมะพร้าวนาน 30 ชั่วโมง

มีปริมาณสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 7.51 ± 0.52 มก./มล. ในขณะที่ชั่วโมงที่ 48 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเมื่อย่อยกากกาแฟ เปลือกมันฝรั่ง กากชานอ้อย และกากถั่วเหลืองสูงที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 3.35 ± 0.16 , 3.31 ± 1.43 , 4.10 ± 0.40 และ 2.32 ± 0.15 มก./มล. ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1 มีความจำเพาะกับกากเนื้อมะพร้าวซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีโครงสร้างเป็นสารกลุ่มกาแลคโตแมนแนน [27] จึงถูกย่อยได้ด้วยแมนนาเนสที่อยู่ในสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบที่ผลิตได้ ซึ่งแมนนาเนสจะย่อยภายในสายอย่างนุ่มที่พันธะเบต้า-1,4-แมนโนซิดิกของสารประกอบแมนแนน ได้แก่ กลูโคแมนแนน กาแลคโตแมนแนน กาแลคโตกลูโคแมนแนน และแมนแนน [12, 20] นอกจากนั้นสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบที่ผลิตได้ยังสามารถย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรอีก 4 ชนิด ได้แก่กากกาแฟ เปลือกมันฝรั่ง กากชานอ้อย และกากถั่วเหลือง ซึ่งเป็นสารประกอบลิโนเซลลูโลส ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าการย่อยสลายสารประกอบลิโนเซลลูโลสจำเป็นต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่เอนไซม์กลุ่มลิโนเซลลูเลสจะมีรูปแบบการทำงานที่ส่งเสริมกัน [28] ซึ่งจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์คือน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ [29]

3.3 ปริมาณของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1

รูปที่ 1 แสดงผลการศึกษ ปริมาณของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่เหมาะสมต่อการย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1 พบว่าปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรของกากเนื้อมะพร้าว กากกาแฟ เปลือกมันฝรั่งและกากชานอ้อยให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด เท่ากับ 28.34 ± 0.52 (48 ชั่วโมง), 19.04 ± 0.16 (48 ชั่วโมง), 17.75 ± 1.43 (60 ชั่วโมง) และ 16.23 ± 0.40 (36 ชั่วโมง) มก./มล. ตามลำดับ ในขณะที่ 8 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรของกากถั่วเหลืองให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดเท่ากับ

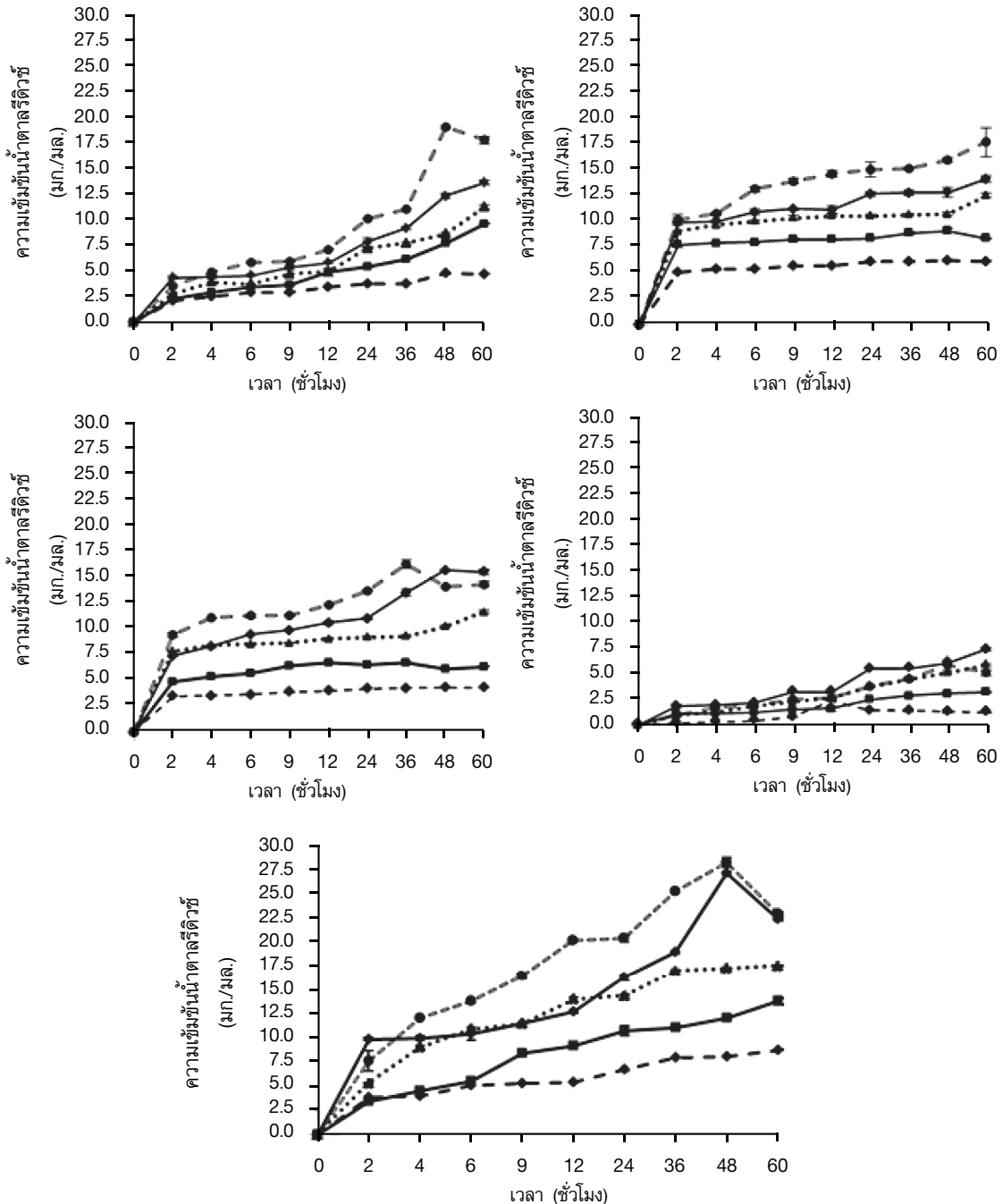
7.34 ± 0.15 (60 ชั่วโมง) มก./มล. (รูปที่ 1) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อปริมาณของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพิ่มมากขึ้นจะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย อย่างไรก็ตามเมื่อทำการทดลองโดยเพิ่มปริมาณวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและระยะเวลาในการย่อยสลายให้นานยิ่งขึ้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้ไม่ได้เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย ทั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับความจำเพาะของการทำงานและความคงตัวของสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบซึ่งจะต้องทำการศึกษาย่างละเอียดเมื่อใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ในการย่อยสลายต่อไป

3.4 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยวัสดุทิ้งทางการเกษตรด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1

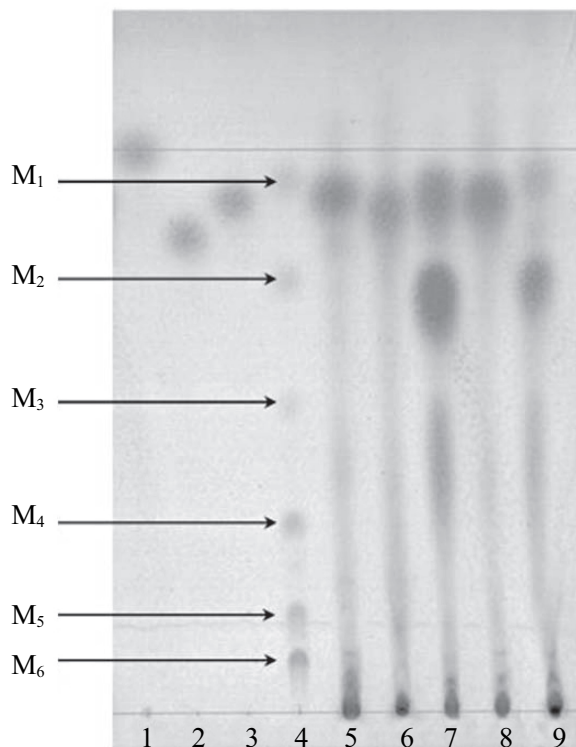
จากผลการทดลองขั้นต้นพบว่า เมื่อนำสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบมาย่อย 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรของกากเนื้อมะพร้าว กากกาแฟ เปลือกมันฝรั่ง และกากชานอ้อย และ 8 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรของกากถั่วเหลืองจะให้ผลิตภัณฑ์ซึ่งเป็นน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด ดังนั้น จึงนำผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมาวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค TLC ด้วยการเปรียบเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 2 ซึ่งพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเปลือกมันฝรั่ง และกากชานอ้อยคือกลูโคส กากถั่วเหลืองคือแมนโนส ในขณะที่ผลิตภัณฑ์จากกากเนื้อมะพร้าวและกากกาแฟคือน้ำตาลแมนโนโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ยังไม่ทราบชนิดแน่ชัด ผลการทดลองที่ได้ทำให้สามารถคาดการณ์รูปแบบการทำงานของเอนไซม์จาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1 ได้ว่าเอนไซม์มีรูปแบบการทำงานที่มีความจำเพาะต่อสับสเตรตสูง นั่นคือ เมื่อทำการบ่มสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบกับสับสเตรตที่มีปริมาณโครงสร้างเซลลูโลสสูงเช่นเปลือกมันฝรั่งและกากชานอ้อย เซลลูเลสในสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจะย่อยเซลลูโลสให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส ในขณะที่เมื่อบ่มสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบกับสับสเตรตที่มีโครงสร้างของสารประกอบแมนแนนคือกากถั่วเหลือง กากเนื้อมะพร้าว และกากกาแฟ แมนนาเนสที่อยู่ในสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจะย่อยสารประกอบ

แมนแนนให้ได้แมนโนโอลิโกแซ็กคาไรด์ ซึ่งการคาดการณ์รูปแบบการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวข้างต้นจะสามารถ

ยืนยันผลการทดลองได้อีกครั้งเมื่อทำการศึกษาผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยด้วยเอนไซม์บริสุทธิ์ซึ่งเป็นการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส, (ก) เปลือกมันฝรั่ง (ข) กากกาแฟ (ค) กากอ้อย (ง) กากถั่วเหลือง (จ) กากมะพร้าว (- ◆ -) 2% (— ■ —) 4% (..... ▲) 6% (— ● —) 8% และ (= ● =) 10%



รูปที่ 2 ผลึกภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1 เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC, แถว 1: โซโลส, แถว 2: กาแลคโตส, แถว 3: กลูโคส, แถว 4: แมนโนโอลิโกแซ็กคาไรด์ (M_1 : แมนโนส, M_2 : แมนโนไบโอส, M_3 : แมนโนไตรโอส, M_4 : แมนโนเตตราโอส, M_5 : แมนโนเพนโตส, M_6 : แมนโนเฮกโซส), แถว 5: กากถั่วเหลือง (8%, w/v), แถว 6: เปลือกมันฝรั่ง (10%, w/v), แถว 7: กากเนื้อมะพร้าว (10%, w/v), แถว 8: กากชานอ้อย (10%, w/v), แถว 9: กากกาแฟ (10%, w/v)

นอกจากนั้น ประเทศไทยได้มีการศึกษานำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาย่อยด้วยเอนไซม์ในกลุ่มเอมิเซลลูเลสดังเช่นการศึกษาของจิตรลดาและคณะ พบว่าแบคทีเรียชอบรอน *Anoxybacillus* sp. สายพันธุ์ JT-12 ซึ่งสามารถผลิตไซลานเนส 3 ชนิด ได้แก่ เบต้าไซโลซิเดส อะราบีโนฟูราโนซิเดส และอะเซทิลเอสเตอเรส เมื่อนำเอนไซม์ย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่างๆ ที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง และตรวจสอบผลึกภัณฑ์น้ำตาลที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค TLC พบว่า เอนไซม์ไซลานโนไลติกย่อยแกลบได้น้ำตาลโซโลส และไซโลเตตระโอส ในขณะที่ย่อยเปลือกข้าวโพด ชังข้าวโพด ชานอ้อย และฟางข้าวได้น้ำตาลไซโลเตตระโอส เพียงชนิดเดียว [30] ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่แสดงให้เห็นรูปแบบการทำงานของเอนไซม์ลิกโน

เซลลูเลสที่มีลักษณะการทำงานร่วมกัน และได้ผลึกภัณฑ์เป็นน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ตามชนิดของน้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

อย่างไรก็ตามผลการทดลองการวิเคราะห์ผลึกภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค TLC มีข้อจำกัดหลายประการเช่น ความชัดเจนในการอ่านแถบสีที่เกิดขึ้น รวมทั้งชนิดของสารละลายน้ำตาลมาตรฐานที่มีอย่างจำกัดในงานวิจัย ดังนั้นงานวิจัยขั้นต่อไปจึงเป็นการศึกษาการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และศึกษาสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้รวมทั้งการประยุกต์ใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ในการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร นอกจากนั้นผลึกภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ประกอบด้วยโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดต่างๆ สามารถนำไปวิเคราะห์เชิงปริมาณและเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค High Performance

Liquid Chromatography (HPLC) เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับประยุกต์ใช้ในการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตเอทานอล หรือสารเสริมในอาหารสัตว์และคนได้โดยจะเป็นการเพิ่มมูลค่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรให้ดียิ่งขึ้นอีกด้วย

4. สรุป

P. oxalicum KUB-SN2-1 ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ไชลานเนส และแมนนาเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในกลุ่มลิกโนเซลลูเลส สารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *P. oxalicum* KUB SN2-1 สามารถย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั้ง 5 ชนิดคือ กากเนื้อมะพร้าว กากถั่วเหลือง กากขานอ้อย กากกาแฟ และเปลือกมันฝรั่ง ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค TLC ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรผลการวิจัยที่ได้ในครั้งนี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแมนโนโอลิโกแซ็กคาไรด์ซึ่งเป็นสารพรีไบโอติกที่สำคัญในอาหารสัตว์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิตที่ช่วยสนับสนุนเงินทุนวิจัย

6. เอกสารอ้างอิง

1. Hsu, T., Guo, G., Chen, W., and Hwang, W., 2010, "Effect of Dilute Acid Pretreatment of Rice Straw on Structural Properties and Enzymatic Hydrolysis", *Bioresource Technology*, Vol. 101, pp. 4907-4913.
2. Hendriks, A.T.W.M., and Zeeman, G., 2009, "Pretreatments to Enhance the Digestibility of Lignocellulosic Biomass", *Bioresource Technology*, Vol. 100, pp. 10-18.
3. Prasad, S., Singh, A., and Joshi, H.C., 2007, "Ethanol as an Alternative Fuel from Agricultural, Industrial and Urban Residues",

Resource Conserve and Recycle, Vol. 50, pp. 1-39.

4. Mckendry, P., 2002, "Energy Production from Biomass: Overview of Biomass". *Bioresource Technology*, Vol. 83, pp. 37-43.
5. Silva, R.D., Lago, E.S., Merheb., C.W., Macchione, M.M., Park, Y.K., and Gomes, E., 2005, "Production of Xylanase and CMCase on Solid State Fermentation in Different Residue by *Thermoascus aurantiacus* Miede", *Brazilian Journal of Microbiology*, Vol. 36, pp. 235-241.
6. Howard, R.L., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, E.L., and Howard, S., 2003, "Lignocellulose Biotechnology: Issues of Bioconversion and Enzyme Production", *African Journal of Biotechnology*, Vol. 2, pp. 602-619.
7. Girio, F.M., Fonseca, C., Carvalho, F., Duarte, L.C., Marques, S., and Bogel-Lukasik, R., 2010, "Hemicelluloses for Fuel Ethanol: A Review", *Bioresource Technology*, Vol. 101, pp. 4775-4800.
8. Mussatto, I., Ercília, M. S., Machado, M., Martins, S., and Teixeira, J.A., 2011, "Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues", *Food and Bioprocess Technology*, Vol. 4, pp. 661-672.
9. Basal, N., Tewari, R., Gupta, J.K., Soni, R., and Soni, S.K., 2011, "A Novel Strain of *Aspergillus niger* Producing a Cocktail of Hydrolytic Depolymerising Enzymes for the Production of Second Generation Biofuels", *BioResources*, Vol. 6, pp. 552-569.
10. Mona, E. M., and Amani, M. D., 2008. "Production of β -Mannanase by *Bacillus amyloliquefaciens* 10A1 Cultured on Potato Peels", *African Journal of Biotechnology*, Vol. 7, pp. 1123-1128.
11. Gubitz, G.M., Lischinig, T., Stebbing, D., and Saddler, J.N., 1997, "Enzymatic Removal of Hemicelluloses from Dissolving Pulps", *Biotechnology Letters*, Vol. 19, pp. 491-495.

12. Zakaria, M.M., Yamamoto, S., and Yagi, T., 1998, "Purification and Characterization of an Endo-1,4- β -Mannanase from *Bacillus subtilis* KU-1", *Letters in Applied Microbiology*, Vol. 158, pp. 25-31.
13. Tripanya, W., Tachaapaikoon, C., Ratanakhanokchai, K., and Kyu, K. L., 2007, "Xylanolytic-Cellulolytic Enzyme System of *Bacillus* sp. TW-1 that Degrades Insoluble Polysaccharides", *Proceedings of 45th Kasetsart University Annual Conference: Science*, pp. 85-92. (in Thai)
14. Kaewintajuk, K., Thuy, N.T., Kyu, K.L., and Ratanakhanokchai, K., 2006, "Hydrolysis of Agricultural Wastes by Cellulosome-Like Multienzyme Complex from *Bacillus circulans* B-6", *Proceedings of 44th Kasetsart University Annual Conference: Science*, pp. 100-108. (in Thai)
15. Office of Agricultural Economics., 2010, "Thailand Agriculture Production Report of 2010", <http://www.oae.go.th/>, at 27 September 2012.
16. Luis, E.S., Teves, F.G., and Calapardo, M.R., 2000, "Nutritional value of copra meal treated with bacterial mannanase in broiler diets", *Philippine Agriculturist*, Vol. 72, pp. 7-14.
17. Huisman, M. M. H., Schols, H. A., and Voragen, A. G. J., 1999. "Enzymatic degradation of cell wall polysaccharides from soybean meal", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 38, pp. 299-307.
18. Sun, J.X., Sun, X.F., Sun, R.C., and Su, Y.Q., 2004, "Fractional Extraction and Structural Characterization of Sugarcane Bagasse Hemicelluloses", *Carbohydrate Polymers*, Vol. 56, pp. 195-204.
19. Alois, S., Gabriele, F., Nikolaus, F., Georg, G., and Dietmar, H., 2000, "Hydrolysis of Isolated Coffee Mannan and Coffee Extract by Mannanases of *Sclerotium rolfsii*", *Journal of Biotechnology*, Vol. 80, pp.127-134.
20. McCleary, B.V., 1988, " β -Mannanase", *Methods in Enzymology*, Vol. 160, pp. 596-610.
21. Chaiongkarn, A., Titapoka, S., Keawsompong, S., and Nitisinprasert, S., 2009, "Identification and Characterization of β -Mannanase Producing Fungal Strain KUB-SN2-1", *Proceeding of ABIC 2009 Agricultural Biotechnology for Better Living and a Clean Environmental*, pp. 69.
22. Miller, G. L., 1959, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugars", *Analytical Chemistry*, Vol. 31, pp. 426-428.
23. Apiraksakorn, J., Nitisinprasert, S., and Robert, E.L., 2008, "Grass Degrading β -1,3-1,4-D-Glucanases from *Bacillus subtilis* GN156: Purification and Characterization of Glucanase J1 and pJ2 Possessing Extremely Acidic pI", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 149, pp. 53-66.
24. Teves, F.G., and Calapardo, M.R., 2000, "Nutritional Value of Copra Meal Treated with Bacterial Mannanase in Broiler Diets", *Philippine Agriculturist*, Vol. 72, pp. 7-14.
25. Pettey, L.A., Carter, S.D., Senne, B.W., and Shriver, J.A., 2002, "Effects of Beta-Mannanase Addition to Corn-Soybean Meal Diets on Growth Performance, Carcass Traits, and Nutrient Digestibility of Weanling and Growing-Finishing Pigs", *Journal of Animal Science*, Vol. 80, pp. 1012-1019.
26. Mahmood, A. U., Greenman, J., and Scragg, A. H., 1998, "Orange and Potato Peel Extracts: Analysis and Use as *Bacillus* substrates for the Production of Extracellular Enzymes in Continuous Culture", *Enzyme and Microbial Technology*, Vol. 22, pp. 130-137.
27. Titapoka, S., Keawsompong, S., Haltrich, D., and Nitisinprasert, S., 2008, "Selection and Characterization of Mannanase-Producing Bacteria Useful for the Formation of Prebiotic Manno-oligosaccharides from Copra Meal", *World Journal*

of *Microbiology and Biotechnology*, Vol. 24, pp. 1425-1433.

28. Dhawan, S., and Kaur, J., 2007, "Microbial Mannanases: an Overview of Production and Applications", *Critical Reviews in Biotechnology*, Vol. 27, pp. 197-216.

29. Zyl, W.H., Rose, S.H., Trollope, K., and Gorgens, J.F., 2010, "Fungal β -Mannanases: Mannan Hydrolysis, Heterologous Production and Biotech-

nological Applications", *Process Biochemistry*, Vol. 45, pp. 1203-1213.

30. Jitladda Thitikorn-amorn, Kyn, K.L., Ratanakhanokchai, K., and Lee, Y., 2009, "Production of Xylotetraose from Agricultural Residues by Using Xylanolytic Enzyme from Thermophilic *Anoxybacillus* sp. Strain JT-12", *KMUTT Research and Development Journal*, Vol. 32, pp. 137-150. (in Thai)