

ศักยภาพการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าวด้วยเชื้อ *Bacillus methylotrophicus*
KS1 เพื่อส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติก

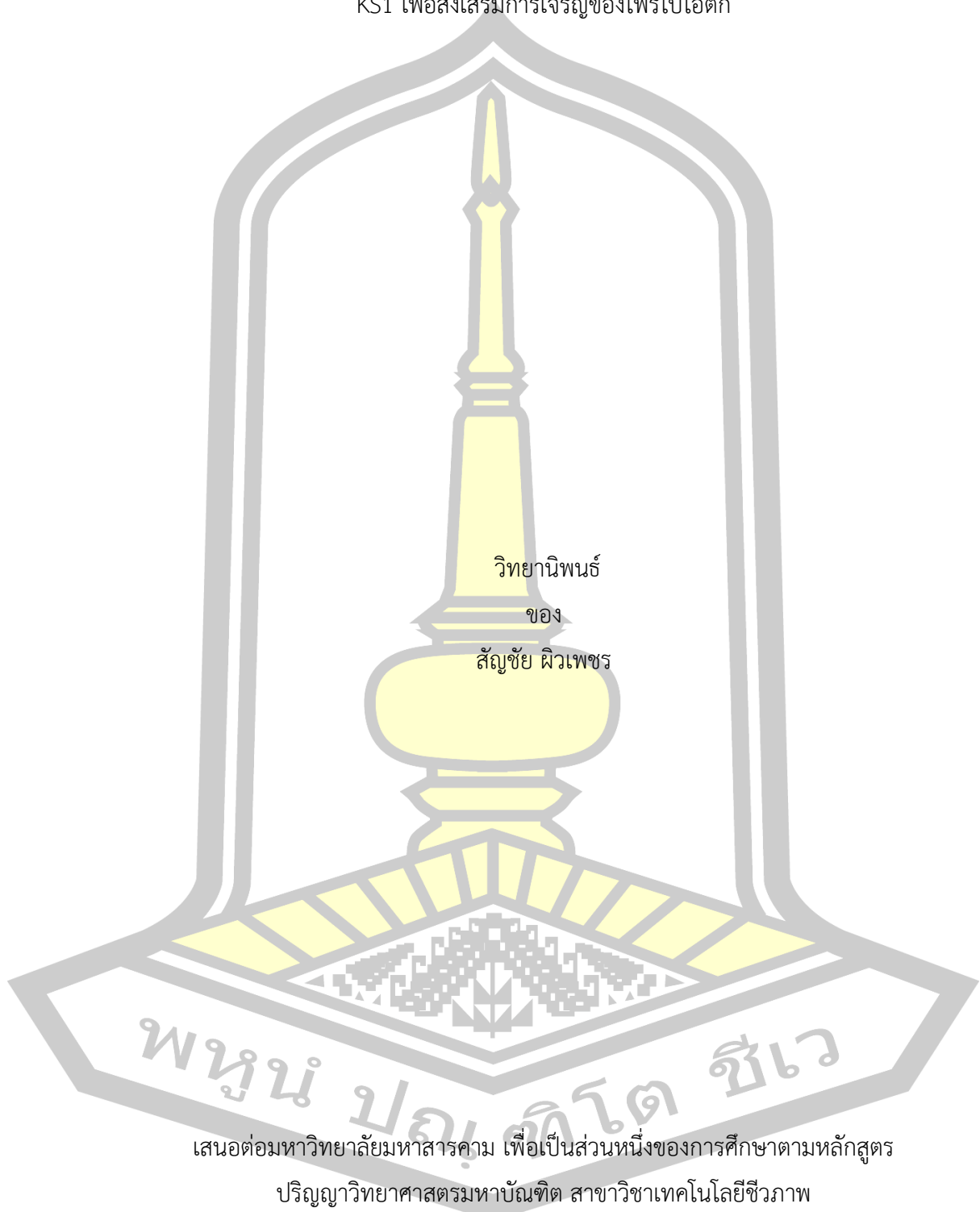
วิทยานิพนธ์
ของ
สัญญาชัย ผิวเพชร

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ธันวาคม 2562

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ศักยภาพการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าวด้วยเชื้อ *Bacillus methylotrophicus*
KS1 เพื่อส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติก



วิทยานิพนธ์
ของ
สฤษฎีชัย ผิวเพชร

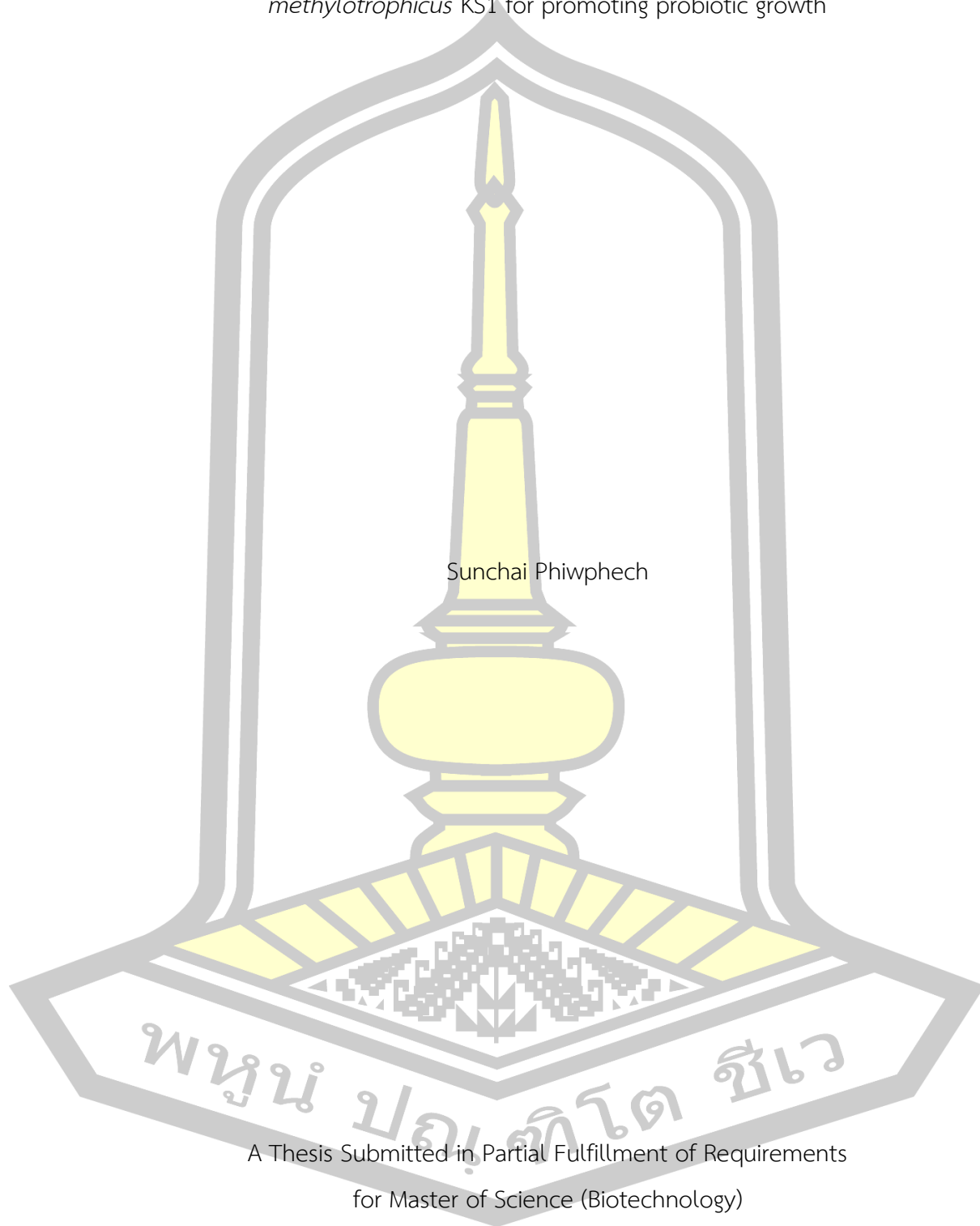
เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ธันวาคม 2562

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Capacity of mannooligosaccharide production using copra meal by *Bacillus methylotrophicus* KS1 for promoting probiotic growth

Sunchai Phiwphech



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for Master of Science (Biotechnology)

December 2019

Copyright of Mahasarakham University



คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนายสัญญาชัย ผิวเพชร แล้ว
เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา
เทคโนโลยีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร. ลือชัย บุตรคุป)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผศ. ดร. ศิริรัตน์ ดีศีลธรรม)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผศ. ดร. วิจิตรา หลวงอินทร์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผศ. ดร. สุรัชย์ รัตนสุข)

กรรมการ

(ผศ. ดร. บุญกร ทองใบ)

กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก

(ผศ. ดร. อรอนงค์ ภูสีฤทธิ์)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

(รศ. ดร. อนุชิตา มุ่งงาม)

คณบดีคณะเทคโนโลยี

(ผศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	ศักยภาพการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าวด้วยเชื้อ <i>Bacillus methylotrophicus</i> KS1 เพื่อส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติก		
ผู้วิจัย	สัญญาชัย ผิวเพชร		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ ดีศีลธรรม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิจิตรา หลวงอินทร์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรัชย์ รัตนสุข		
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	ปีที่พิมพ์	2562

บทคัดย่อ

กากมะพร้าวเป็นของเหลือทิ้งทางการเกษตรในประเทศไทยที่เป็นแหล่งของกาแลคโตแมนแนนที่สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตโพรไบโอติก แบคทีเรีย *Bacillus methylotrophicus* KS1 เป็นแบคทีเรียที่ผลิตแมนนาเนสซึ่งสามารถย่อยสลายแมนแนนได้เป็นแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าวด้วยเชื้อ *B. methylotrophicus* KS1 ทำการแปรผันหัวเชื้อที่ระดับ 1 2 และ 3% (v/v) ปริมาณกากมะพร้าวที่ระดับ 1 2 และ 3% (w/v) บ่มที่ 37 °C เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 168 h พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 1.20 mg/ml ในสภาวะการย่อยที่ใช้เชื้อ KS1 1% ปริมาณกากมะพร้าว 3% ที่ 48 h และพบกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส เท่ากับ 0.50 Unit/ml ผลวิเคราะห์องค์ประกอบของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยวิธีเทคนิค HPLC พบว่ามีองค์ประกอบแมนโนไตรโอส แมนโนเตตราโอส และแมนโนเพนโตส เท่ากับ 0.35, 20.10 และ 4.53 mg/ml ตามลำดับ ผลการศึกษาแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญของเชื้อโพรไบโอติก 7 ชนิด คือ *Lactobacillus bulgaricus* 451, *L. casei* 390, *L. acidophilus* 1338, *L. plantarum* 53343, *Pediococcus pentosaceus* V3-100, *L. lactis* subsp. *Lactis* NM26-6 และ *L. casei* IMAU11561 พบว่าสามารถกระตุ้นการเจริญของเชื้อ *P. pentosaceus* V3-100 ได้ดีที่สุด ที่ความเข้มข้น 15 mg/ml

คำสำคัญ : กากมะพร้าว, แมนแนน, แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์, โพรไบโอติก

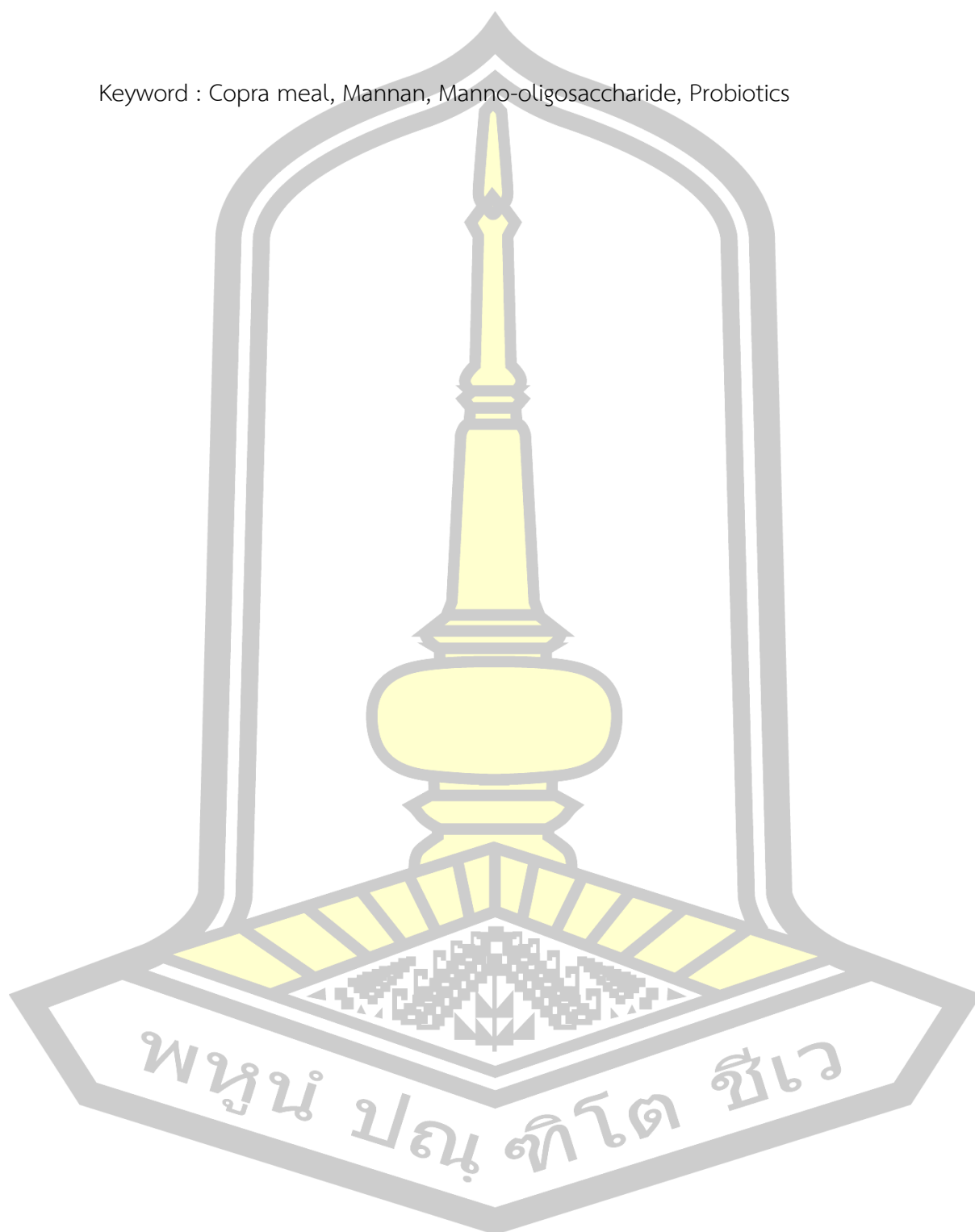
TITLE	Capacity of mannoooligosaccharide production using copra meal by <i>Bacillus methylotrophicus</i> KS1 for promoting probiotic growth		
AUTHOR	Sunchai Phiwphech		
ADVISORS	Assistant Professor Sirirat Deeseenthum , Ph.D. Assistant Professor Vijitra Luangin , Ph.D. Assistant Professor Surachai Rattanasuk , Ph.D.		
DEGREE	Master of Science	MAJOR	Biotechnology
UNIVERSITY	Maharakham University	YEAR	2019

ABSTRACT

Copra meal is an agricultural waste in Thailand contained high amount of galactomannan that can be used as a precursor for the prebiotic production *Bacillus methylotrophicus* KS1 is mannanase-producing bacterium. Mannanases hydrolyze mannan to mannoooligosaccharide (MOS) which be used as prebiotic. The objective of this research was to produce mannoooligosaccharide from copra meal using *B. methylotrophicus* KS1 under variation of bacterial concentration at 1 2 and 3% (v/v) and copra meal concentration at 1 2 and 3% (w/v) as substrate, incubated at 37 °C, 150 rpm for 168 h. The results showed that the maximum of reducing sugar concentration was 1.20 mg/ml in the hydrolysis conditions with 1% bacteria inoculum and 3% copra meal including the mannanase activity was 0.50 Unit/ml after fermentation period 48 h. The compositions of mannoooligosaccharides were analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC) technique. The main compositions of MOS were mannotriose, mannotetraose and mannopentose at 0.35, 20.10 and 4.53 mg/ml, respectively. Effect of MOS on probiotic growth was tested on 7 Lactic acid bacteria including *L. bulgaricus* TISTR451, *L. casei* TISTR390, *L. acidophilus* TISTR1338, *L. plantarum* TISTR543, *P. pentosaceus* V3-100, *L. lactis* subsp. *Lactis* NM26-6 and *L. casei* IMAU11561. The result indicated that MOS produced from copra meal (15 mg/ml) stimulated the growth of *P. pentosaceus* V3-

100.

Keyword : Copra meal, Mannan, Manno-oligosaccharide, Probiotics



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่ง จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ ตีศีลธรรม อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิจิตรา หลวงอินทร์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรัชย์ รัตนสุข อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ลือชัย บุตคุป ประธานกรรมการควบคุมสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.บุษกร ทองใบ กรรมการสอบ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรอนงค์ ภูสีฤทธิ์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก

ขอขอบคุณคณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม และขอขอบคุณคณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด ที่ให้การสนับสนุนอุปกรณ์และเครื่องมือ ตลอดจนสถานที่ในการศึกษาทดลองประกอบการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์ เจ้าหน้าที่วิจัยศูนย์เครื่องมือกลาง และคณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณนิสิตสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ทุกท่าน

ขอขอบคุณทุนภูมิพล ประจำปี พ.ศ. 2561 และทุนอุดหนุนงานวิจัยสำหรับนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา ประจำปี พ.ศ. 2562 คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

สัญญาชัย ผิวเพชร



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพประกอบ.....	ฐ
หน่วยและสัญลักษณ์หน่วย.....	1
บทที่ 1 บทนำ.....	2
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	2
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 กากมะพร้าว (coconut meal).....	5
2.2 프리ไบโอติก (Prebiotic).....	14
2.3 โปรไบโอติก (Probiotic).....	17
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	23
บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง.....	26
3.1 วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือในการวิจัย.....	26

3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าวด้วยเชื้อ <i>B. methylotrophicus</i> KS1.....	27
3.3 การศึกษาผลของการเติมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญของเชื้อโพรไบโอติก.....	30
3.4 การวางแผนการทดลอง.....	32
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	33
4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าวด้วยเชื้อ KS133	
4.2 ผลการศึกษาของการเติมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ต่อการเจริญของเชื้อโพรไบโอติก	69
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	79
บรรณานุกรม.....	80
ภาคผนวก.....	88
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหาร	89
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีและการวิเคราะห์.....	95
ภาคผนวก ค วัสดุและอุปกรณ์.....	118
เอกสารการตีพิมพ์	125
ประวัติผู้เขียน.....	131

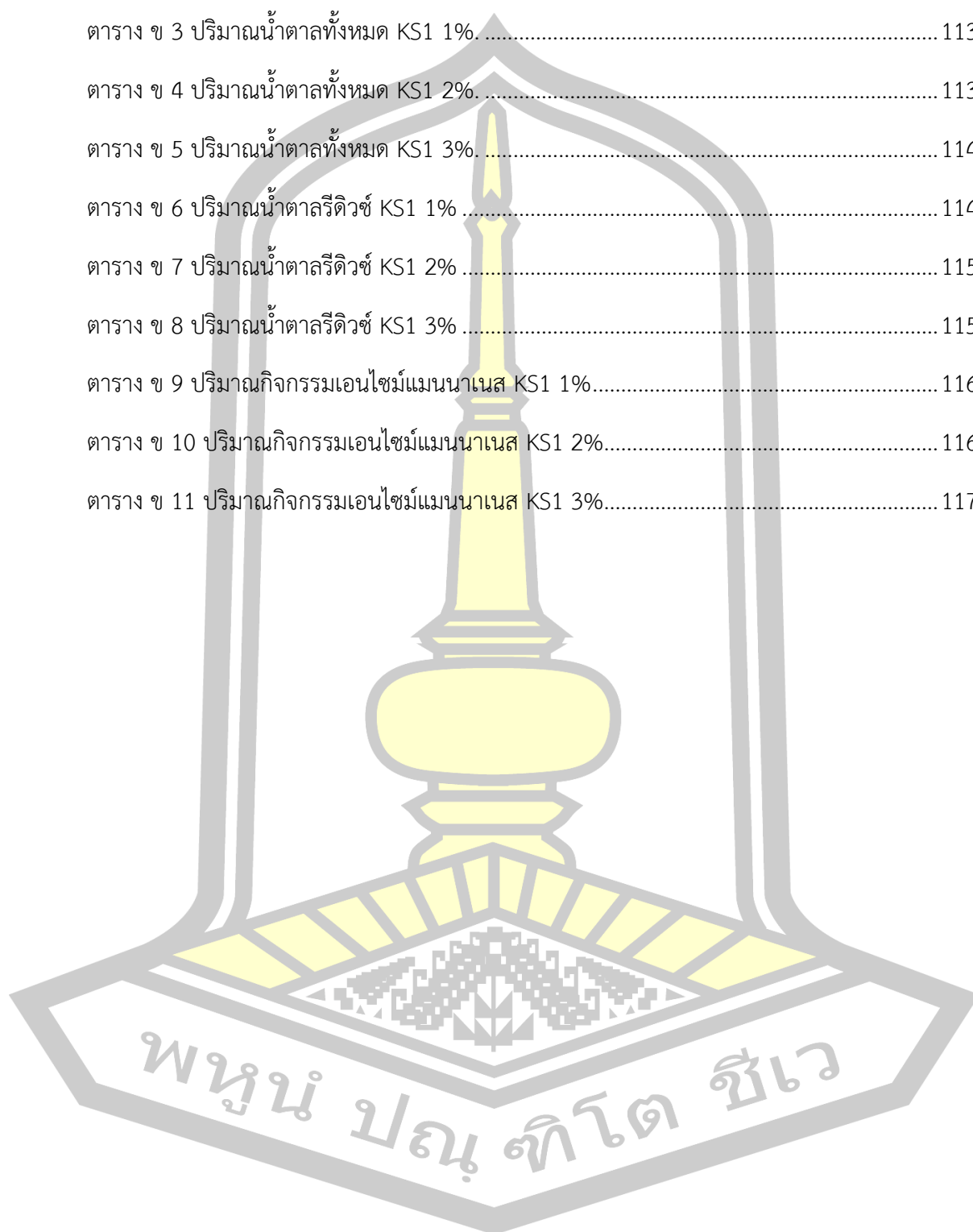


สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 2.1 องค์ประกอบของธาตุอาหาร (% น้ำหนักแห้ง) ของอาหารเนื้อมะพร้าวแห้ง	5
ตาราง 2.2 ตัวอย่างสารประกอบกาแลคโตแมนแนนในพืชชนิดต่าง ๆ	9
ตาราง 2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก	18
ตาราง 4.1 จำนวนเชื้อ KS1 ในอาหาร NB เป็นเวลา 72 h	34
ตาราง 4.2 ปริมาณเชื้อ KS1 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส ที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่ผสมกับ LBG 1% เป็นเวลา 72 h	40
ตาราง 4.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml) เมื่อเลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 1% (v/v) โดยใช้กากมะพร้าว 3 ระดับ คือ 1%, 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h	47
ตาราง 4.4 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml) เมื่อเลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 1% (v/v) โดยใช้กากมะพร้าว 3 ระดับ คือ 1%, 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h	49
ตาราง 4.5 กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส (Unit/ml) เมื่อเลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 1% (v/v) โดยใช้กากมะพร้าว 3 ระดับ คือ 1%, 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h	51
ตาราง 4.6 การจำแนกแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ เลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 1% ในกากมะพร้าว 1% เป็นเวลา 96 h น้ำตาลรีดิวซ์ 0.77 (mg/ml) กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส 0.61 (Unit/ml)	53
ตาราง 4.7 การจำแนกแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ เลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 1% ในกากมะพร้าว 3% เป็นเวลา 48 h น้ำตาลรีดิวซ์ 1.20 (mg/ml) กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส 0.50 (Unit/ml)	53
ตาราง 4.8 การจำแนกแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ เลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 1% ในกากมะพร้าว 3% เป็นเวลา 96 h น้ำตาลรีดิวซ์ 1.30 (mg/ml) กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส 1.99 (Unit/ml)	54
ตาราง 4.9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml) เมื่อเลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 2% (v/v) โดยใช้กากมะพร้าว 3 ระดับ คือ 1%, 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h	55
ตาราง 4.10 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml) เมื่อเลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 2% (v/v) โดยใช้กากมะพร้าว 3 ระดับ คือ 1%, 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h	57

ตาราง 4.11 กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส (Unit/ml) เมื่อเลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 2% (v/v) โดยใช้กากมะพร้าว 3 ระดับ คือ 1%, 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h.....	59
ตาราง 4.12 การจำแนกแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์เลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 2% ในกากมะพร้าว 1% เป็นเวลา 120 h น้ำตาลรีดิวซ์ 0.67 (mg/ml) กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส 0.52 (Unit/ml) ..	61
ตาราง 4.13 การจำแนกแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์เลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 2% ในกากมะพร้าว 2% เป็นเวลา 120 h น้ำตาลรีดิวซ์ 1.03 (mg/ml) กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส 0.73 (Unit/ml) ..	61
ตาราง 4.14 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml) เมื่อเลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 3% (v/v) โดยใช้กากมะพร้าว 3 ระดับ คือ 1%, 2% และ 3% (w/v) ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก 168 h.....	62
ตาราง 4.15 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml) เมื่อเลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 3% (v/v) โดยใช้กากมะพร้าว 3 ระดับ คือ 1%, 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h.....	64
ตาราง 4.16 กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส (Unit/ml) เมื่อเลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 3% (v/v) โดยใช้กากมะพร้าว 3 ระดับ คือ 1%, 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h.....	66
ตาราง 4.17 ผลการจำแนกแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์เลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 3% ในกากมะพร้าว 1% ที่ 120 h น้ำตาลรีดิวซ์ 0.61 (mg/ml) กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส 0.12 (Unit/ml).....	68
ตาราง 4.18 ผลการจำแนก แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ เลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 3% ในกากมะพร้าว 3% ที่ 120 h น้ำตาลรีดิวซ์ 1.30 (mg/ml) กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส 1.17 (Unit/ml).....	68
ตาราง 4.19 ค่า pH เลี้ยงใน MRS ผสม แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 15 (mg/ml) ที่เลี้ยงเชื้อ <i>P. pentosaceus</i> V3-100 ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 72 h	74
ตาราง 4.20 ปริมาณกรดแลกติกด้วย HPLC เลี้ยงใน MRS ผสม แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 15 (mg/ml) ที่เลี้ยงเชื้อ <i>P. pentosaceus</i> V3-100 ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 72 h.....	75
ตาราง 4.21 ปริมาณเชื้อ <i>P. pentosaceus</i> V3-100 (log CFU/ml) ใน MRS ผสม แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 15 (mg/ml) ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 72 h.....	76
ตาราง 4.22 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ใน MRS ผสมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 15 (mg/ml) ที่เลี้ยงเชื้อ <i>P. pentosaceus</i> V3-100 ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 72 h.....	77
ตาราง 4.23 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ใน MRS ผสม แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 15 (mg/ml) ที่เลี้ยงเชื้อ <i>P. pentosaceus</i> V3-100 ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 72 h.....	78
ตาราง ข 1 แสดงส่วนประกอบในการทดสอบกิจกรรมแมนนาเนส	103

ตาราง ข 2 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อ KS1 กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm	106
ตาราง ข 3 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด KS1 1%	113
ตาราง ข 4 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด KS1 2%	113
ตาราง ข 5 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด KS1 3%	114
ตาราง ข 6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ KS1 1%	114
ตาราง ข 7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ KS1 2%	115
ตาราง ข 8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ KS1 3%	115
ตาราง ข 9 ปริมาณกิจกรรมเอนไซม์แมนนานเนส KS1 1%	116
ตาราง ข 10 ปริมาณกิจกรรมเอนไซม์แมนนานเนส KS1 2%	116
ตาราง ข 11 ปริมาณกิจกรรมเอนไซม์แมนนานเนส KS1 3%	117



สารบัญภาพประกอบ

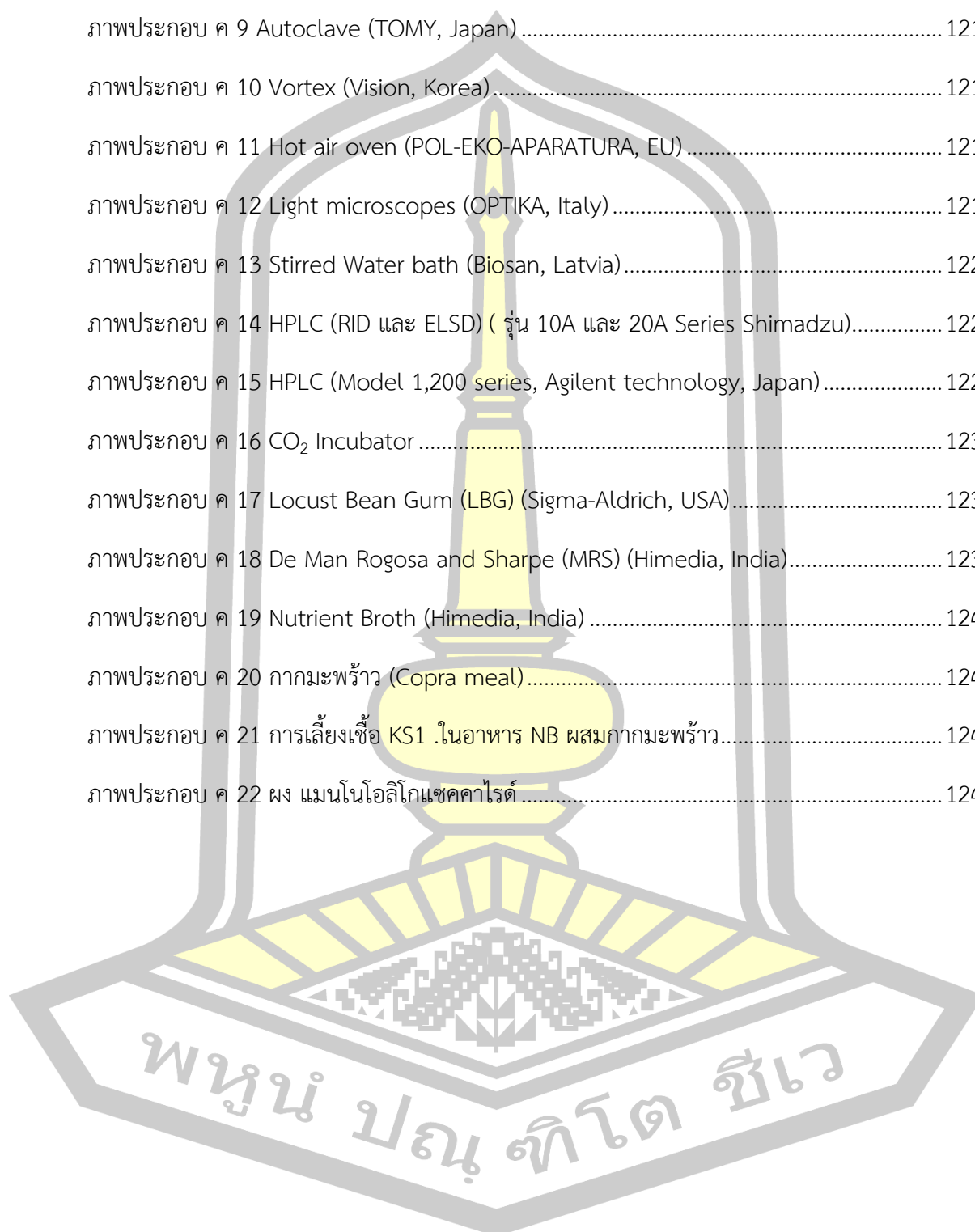
หน้า

ภาพประกอบ 2.1 โครงสร้างของกาแล็คโตแมนแนน (A) โลคัสบีบัก (B) พงบุก (C) กากมะพร้าว....	6
ภาพประกอบ 2.2 โครงสร้างของแมนแนนและสารประกอบแมนแนน A) แมนแนน; B) กาแล็คโตแมนแนน; C) กลูโคแมนแนน; D) กาแล็คโตกลูโคแมนแนน	8
ภาพประกอบ 2.3 โครงสร้างของผนังเซลล์ยีสต์.....	9
ภาพประกอบ 2.4 โครงสร้างสารประกอบแมนแนนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง	11
ภาพประกอบ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของ mannose, mannobiose, mannotriose และ mannotetraose.....	13
ภาพประกอบ 2.6 ภาพรวมแผนผังของ β -mannanase และ β -mannosidase บนผนังเซลล์ของ <i>S. cerevisiae</i> สำหรับการผลิตเอทานอล	14
ภาพประกอบ 2.7 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ของอินูลิน.....	16
ภาพประกอบ 2.8 โครงสร้างของอินูลิน.....	16
ภาพประกอบ 2.9 กลไกการทำงานของพรีไบโอติก	17
ภาพประกอบ 4.1 กราฟการเจริญของเชื้อ KS1 ใน NB เป็นเวลา 72 h	34
ภาพประกอบ 4.2 ภาพการย้อมติดสีแกรมและเอนโดสปอร์ของเชื้อ KS1 ที่เวลา 48 h ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000X.....	36
ภาพประกอบ 4.3 ปริมาณเชื้อ KS1 (log. CFU/ml) กับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml) ที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่ผสมกับ LBG 1% เป็นเวลา 72 h	41
ภาพประกอบ 4.4 การย้อมติดสีแกรมและเอนโดสปอร์ของเชื้อ KS1 เลี้ยงในอาหาร NB ที่ผสมกับ LBG 1% เป็นเวลา 72 h ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000X	42
ภาพประกอบ 4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml) ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 1% (v/v) เมื่อเลี้ยงด้วยกากมะพร้าว 1% 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h	48
ภาพประกอบ 4.6 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด mg/ml ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 1% (v/v) เมื่อเลี้ยงด้วยกากมะพร้าว 1% 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h	50

ภาพประกอบ 4.7 กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส (Unit/ml) ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 1% (v/v) เมื่อเลี้ยงด้วยกากมะพร้าว 1% 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h.....	52
ภาพประกอบ 4.8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml) ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 2% (v/v) เมื่อเลี้ยงด้วยกากมะพร้าว 1% 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h.....	56
ภาพประกอบ 4.9 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml) ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 2% (v/v) เมื่อเลี้ยงด้วยกากมะพร้าว 1% 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h	58
ภาพประกอบ 4.10 กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส (Unit/ml) ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 2% (v/v) เมื่อเลี้ยงด้วยกากมะพร้าว 1% 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h	60
ภาพประกอบ 4.11 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml) ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 3% (v/v) เมื่อเลี้ยงด้วยกากมะพร้าว 1% 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h.....	63
ภาพประกอบ 4.12 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml) ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 3% (v/v) เมื่อเลี้ยงด้วยกากมะพร้าว 1% 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h	65
ภาพประกอบ 4.13 กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส (Unit/ml) ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 3% (v/v) เมื่อเลี้ยงด้วยกากมะพร้าว 1% 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h	67
ภาพประกอบ 4.14 ผลของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญของเชื้อ <i>P. pentosaceus</i> V3-100	70
ภาพประกอบ 4.15 ผลของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญของเชื้อ <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NM26-6.....	70
ภาพประกอบ 4.16 ผลของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญของเชื้อ <i>L. bulgaricus</i> TISTR451	71
ภาพประกอบ 4.17 ผลของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญของเชื้อ <i>L. casei</i> TISTR390	71
ภาพประกอบ 4.18 ผลของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญของเชื้อ <i>L. acidophilus</i> TISTR1338.....	72
ภาพประกอบ 4.19 ผลของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญของ <i>L. plantarum</i> TISTR543..	72
ภาพประกอบ 4.20 ผลของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญของเชื้อ <i>L. casei</i> IMAU11561...	73
ภาพประกอบ ข 1 ปฏิบัติการตรวจสอบน้ำตาลด้วยวิธีกรดไดโนโตรซาลิไซลิกและกลไกการเกิดสีส้มแดงของปฏิปฏิบัติการวัดน้ำตาล	97

ภาพประกอบ ข 2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี DNS ที่ความยาวคลื่น 540 nm	99
ภาพประกอบ ข 3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี Phenol Sulfuric ที่ความยาวคลื่น 492 nm.....	101
ภาพประกอบ ข 4 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อ KS1 กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm.....	106
ภาพประกอบ ข 5 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานคือ แมนโนส (M1) แมนโนไบโอส (M2) แมนโนไตรโอส (M3) แมนโนเตตราโอส (M4) แมนโนเพนโตส (M5) และ แมนโนเฮกโซส (M6) และพิก Deionized water (DI).....	107
ภาพประกอบ ข 6 โครมาโตแกรมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้นที่ระดับ 1% (v/v) ของเชื้อ KS1 ที่เลี้ยงในกากมะพร้าวปริมาณ 3% (w/v) ที่เวลา 48 h	108
ภาพประกอบ ข 7 โครมาโตแกรมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้นที่ระดับ 1% (v/v) ของเชื้อ KS1 ที่เลี้ยงในกากมะพร้าวปริมาณ 3% (w/v) ที่เวลา 96 h	109
ภาพประกอบ ข 8 กราฟมาตรฐานน้ำตาลแมนโนส M1 (mg/ml).....	110
ภาพประกอบ ข 9 กราฟมาตรฐานน้ำตาลแมนโนไบโอส M2 (mg/ml).....	110
ภาพประกอบ ข 10 กราฟมาตรฐานน้ำตาลแมนโนไตรโอส M3 (mg/ml).....	111
ภาพประกอบ ข 11 กราฟมาตรฐานน้ำตาลแมนโนเตตราโอส M4 (mg/ml).....	111
ภาพประกอบ ข 12 กราฟมาตรฐานน้ำตาลแมนโนเพนโตส M5 mg/ml.....	112
ภาพประกอบ ข 13 กราฟมาตรฐานปริมาณกรดแลกติก (g/L).....	112
ภาพประกอบ ค 1 pH meter (FiveEasy™, China).....	119
ภาพประกอบ ค 2 Table Top Centrifuge-PLC-05	119
ภาพประกอบ ค 3 Centrifuge (Scientific Promotion, Korea).....	119
ภาพประกอบ ค 4 Hot plate (DAIHAN Scientific, Korea).....	119
ภาพประกอบ ค 5 Laminar Flow (ESCO, Thailand).....	120
ภาพประกอบ ค 6 Incubator shaker (Scientific Promotion, Korea).....	120
ภาพประกอบ ค 7 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo, USA).....	120

ภาพประกอบ ค 8 Microplate Reader (iMark™, Japan).....	120
ภาพประกอบ ค 9 Autoclave (TOMY, Japan)	121
ภาพประกอบ ค 10 Vortex (Vision, Korea).....	121
ภาพประกอบ ค 11 Hot air oven (POL-EKO-APARATURA, EU)	121
ภาพประกอบ ค 12 Light microscopes (OPTIKA, Italy)	121
ภาพประกอบ ค 13 Stirred Water bath (Biosan, Latvia).....	122
ภาพประกอบ ค 14 HPLC (RID และ ELSD) (รุ่น 10A และ 20A Series Shimadzu).....	122
ภาพประกอบ ค 15 HPLC (Model 1,200 series, Agilent technology, Japan)	122
ภาพประกอบ ค 16 CO ₂ Incubator	123
ภาพประกอบ ค 17 Locust Bean Gum (LBG) (Sigma-Aldrich, USA).....	123
ภาพประกอบ ค 18 De Man Rogosa and Sharpe (MRS) (Himedia, India).....	123
ภาพประกอบ ค 19 Nutrient Broth (Himedia, India)	124
ภาพประกอบ ค 20 กากมะพร้าว (Copra meal)	124
ภาพประกอบ ค 21 การเลี้ยงเชื้อ KS1 .ในอาหาร NB ผสมกากมะพร้าว.....	124
ภาพประกอบ ค 22 ผง แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์	124



หน่วยและสัญลักษณ์หน่วย

หน่วย	สัญลักษณ์ หน่วย	ความหมาย
มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	(mg/ml)	หน่วยของปริมาณสารละลายในรูปของมิลลิกรัม
ไมโครลิตร	(μ l)	หน่วยของสารละลายในรูปของไมโครลิตร
ยูนิตต่อมิลลิลิตร	(Unit/ml)	หน่วยของค่ากิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสของหัวเชื้อ <i>Bacillus methylotrophicus</i> KS1 ที่เร่งปฏิกิริยาให้เกิดแมนโนสในอาหารกากมะพร้าว หรือ LBG 1 ไมโครโมลต่อนาที
กรัมต่อลิตร	(g/L)	หน่วยของค่าปริมาณกรดแลกติกด้วยวิธี HPLC ในรูป g
โคโลนีต่อมิลลิลิตร	(CFU/ml)	CFU เป็นหน่วยที่ได้จากวิธีตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ ของวิธี standard plate count เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ หรือ รา ที่มีชีวิต ซึ่งเจริญขึ้นมาบนผิวหน้าของอาหารแข็งในงานเลี้ยงเชื้อ โดยเจริญและแบ่งตัวจนเป็นกลุ่มเรียกว่า โคโลนี ซึ่งมองเห็นได้ด้วยตา
สปีกำลังแปดโคโลนีต่อมิลลิลิตร	(10^8 CFU/ml)	หัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ KS1 เป็นหน่วยที่ได้จากวิธีตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ ของวิธี standard plate count ในรูปสปียกกำลังแปด
ล็อกโคโลนีต่อมิลลิลิตร	(log CFU/ml)	เป็นหน่วยที่ได้จากวิธีตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ ของวิธี standard plate count ในรูปค่าลอการิทึม
ปริมาตรต่อปริมาตร	(v/v)	คือ ปริมาตรของตัวละลายในสารละลายปริมาตรหน่วยปริมาตรเดียวกัน หน่วยชนิดนี้มักใช้กับตัวถูกละลายและตัวทำละลายที่เป็นของเหลว
น้ำหนักต่อปริมาตร	(w/v)	คือ มวลของตัวถูกละลายในสารละลายทั้งหมด หน่วยชนิดนี้มักใช้กับสารละลายที่ตัวถูกละลายเป็นของแข็งละลายในตัวทำละลายที่เป็นของเหลว
นาโนเมตร	(nm)	คือ เป็นหน่วยของสารละลายที่แสดงช่วงความยาวคลื่นของแสง
องศาเซลเซียส	($^{\circ}$ C)	คือ เป็นหน่วยวัดอุณหภูมิหน่วยหนึ่งในระบบเอสไอ

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

พรีไบโอติก (prebiotics) เป็นสายของคาร์โบไฮเดรตสายสั้น ๆ (oligosaccharides) ที่ร่างกายของทั้งคนและสัตว์ไม่สามารถย่อยได้ แต่คาร์โบไฮเดรตสายสั้น ๆ เหล่านี้ จะเป็นอาหารสำหรับกลุ่มแบคทีเรียที่มีประโยชน์ซึ่งอาศัยอยู่ในลำไส้ หรือ โพรไบโอติก เช่น แบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacteria* และกลุ่ม *Lactobacilli* ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์ได้ (Manning and Gibson, 2004; Roberfroid, 2001; Ziemer and Gibson, 1998) การอาศัยอยู่ของแบคทีเรียที่เป็นมิตรในลำไส้ของสิ่งมีชีวิตนั้นเป็นประโยชน์หลายประการในด้านสุขภาพ เช่น ช่วยในการย่อยอาหาร ช่วยเพิ่มการดูดซึมสารอาหารและแร่ธาตุ ผลิตวิตามินในกล้ามเนื้อ ลดระดับของคอเลสเตอรอล ช่วยขัดขวางและกำจัดแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค ป้องกันการเกิดมะเร็ง กระตุ้นภูมิคุ้มกันและกำจัดสารพิษจำพวกไนเตรตและไนไตรต์ได้ เป็นต้น ในปัจจุบันมีสารพรีไบโอติกมีมากมายหลายชนิดมีวางจำหน่ายในตลาดสำหรับผู้รักสุขภาพ ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่วางจำหน่ายเป็นพรีไบโอติกประเภทโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จัดเป็นพรีไบโอติกอีกชนิดหนึ่งที่มีประโยชน์ต่อคนและสัตว์โดยการไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน อีกทั้งยังกระตุ้นการเจริญของเชื้อโพรไบโอติก มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคบางชนิด (Gibson and Roberfroid, 1995)

ปัจจุบันในประเทศไทยมีวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่น่าสนใจ คือ กากมะพร้าว (copra meal) ที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งหลังจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำกะทิ โดยในองค์ประกอบของกากมะพร้าวนั้นพบว่า มีสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรตสูงถึง 48% ลิกนิน 5% โปรตีน 21% และเป็นไขมันเพียง 10% และสิ่งที่สำคัญพบว่าสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรตที่พบในกากมะพร้าวนั้น เป็นสารประกอบประเภทแมนแนนและอนุพันธ์ของแมนแนนสูงถึง 60-70% ซึ่งสามารถเพิ่มมูลค่าของกากมะพร้าว โดยใช้ แมนนानาเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (mannooligosaccharide, แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์) ซึ่งมีคุณสมบัติ เป็นพรีไบโอติก ซึ่งมีหน้าที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ที่อยู่ในลำไส้ของคนและสัตว์ ที่เรียกว่า โพรไบโอติก (Akhter et al., 2015)

ดังนั้น วัตถุประสงค์ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อศึกษาศักยภาพการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าวด้วยเชื้อ *Bacillus methylotrophicus* KS1 เพื่อส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรให้เกิดประโยชน์สูงสุด

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าวโดยใช้เชื้อ

B. methylotrophicus KS1

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ต่อการเจริญของเชื้อโพรไบโอติก ได้แก่ *Lactobacillus bulgaricus* TISTR451, *L. casei* TISTR390, *L. acidophilus* TISTR1338, *L. plantarum* TISTR543, *Pediococcus pentosaceus* V3-100, *L. lactis* subsp. *lactis* NM26-6 และ *L. casei* IMAU11561

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเชื้อ

B. methylotrophicus KS1

1.3.2 ทราบถึงองค์ประกอบของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้

1.3.3 ทราบถึงผลของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญของโพรไบโอติก

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1.4.1 ศึกษาระยะเวลาการเจริญของเชื้อ *B. methylotrophicus* KS1 และการทำกราฟมาตรฐานจำนวนเชื้อ KS1 เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm

1.4.2 หาสภาวะที่เหมาะสม ในการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ จากกากมะพร้าวด้วยเชื้อ KS1 โดยทำการศึกษาปัจจัย

- การแปรผันปริมาณกากมะพร้าวแห้ง ที่ระดับ 1%, 2% และ 3% (w/v)
- การแปรผันปริมาณเชื้อ KS1 เริ่มต้น ที่ระดับ 1%, 2% และ 3% (v/v)

1.4.3 การศึกษาชนิดและปริมาณแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากเชื้อ KS1

- การวิเคราะห์ปริมาณแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์โดยวิธี DNS
- ศึกษาชนิดของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้โดยใช้เทคนิค HPLC

1.4.4 ศึกษาผลของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ต่อการเจริญของโพรไบโอติก ได้แก่ *L. bulgaricus* TISTR451, *L. casei* TISTR390, *L. acidophilus* TISTR1338, *L. plantarum* TISTR543, *P. pentosaceus* V3-100, *L. lactis* subsp. *lactis* NM26-6 และ *L. casei* IMAU11561

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

1.5.1 กากมะพร้าว (Copra meal) หมายถึง ส่วนที่เหลือจากการคั้นกะทิของมะพร้าว (*Cocos nucifera* L.) มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 43-45 ที่อยู่ในรูปของแมนโนสโพลีแซคคาไรด์ (mannose polysaccharide)

1.5.2 แมนแนน (Mannan) หมายถึง สารประเภทคาร์โบไฮเดรตในกลุ่มเฮมิเซลลูโลส พบทั่วไประหว่างชั้นของเซลล์และลิกนิน โดยแมนแนนจะยึดติดกับส่วนของลิกนินด้วยพันธะโควาเลนต์และจะเชื่อมกับเส้นใยเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจน จากลักษณะโครงสร้างดังกล่าวช่วยสร้างความแข็งแรงและทำให้ยากต่อการย่อยสลาย (Moreira and Filho, 2008)

1.5.3 แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (Mannooligosaccharide) หมายถึง โพรไบโอติกชนิดหนึ่งที่มีประโยชน์ต่อคนและสัตว์ที่ได้จากการย่อยสลายแมนแนน โดยการไปกระตุ้นการเจริญของโพรไบโอติก เช่น *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp. และอื่น ๆ อีกหลายชนิด (Akhter et al., 2015) และช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ที่เป็นประโยชน์ อีกทั้งยังยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้อีกด้วย

1.5.4 โพรไบโอติก (Probiotics) หมายถึง จุลินทรีย์หรือกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ในระบบทางเดินอาหารแล้วก่อให้เกิดประโยชน์ เมื่อคนหรือสัตว์บริโภคเข้าไป จุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกจะหน้าที่เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ ทำให้เกิดความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ลดปริมาณเชื้อก่อโรค และเพิ่มปริมาณเชื้อที่เป็นประโยชน์ (วิรัชชัย แก่นแสนดี, 2553)

พหุ ประสิทธิภาพ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กากมะพร้าว (coconut meal)

มะพร้าว (*Cocos nucifera* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่มีการปลูกอย่างแพร่หลาย นอกจากการกินสดหรือการคั้นกะทิแล้ว ยังมีการนำมะพร้าวมาสกัดน้ำมัน ซึ่งผลพลอยได้ คือ กากมะพร้าว (copra meal) ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 12 ของน้ำหนักสด 1 ผล กากมะพร้าว จากโรงงานสกัดน้ำมันมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 43-45 ที่อยู่ในรูปของแมนโนสโพลีแซคคาไรด์และมีโครงสร้างของกาแลคโตแมนแนน ภาพประกอบ 2.1 (Khuwijtjaru et al., 2012) นอกจากนี้กากมะพร้าวยังมีปริมาณกรดอะมิโน lysine, cysteine, histidine, arginine, methionine และกรดอะมิโนที่จำเป็นอื่น ๆ (Mepba and Achinewhu, 2003) ปัจจุบันได้มีการศึกษาถึงการใช้กากมะพร้าวจากการสกัดน้ำมันทั้งในสัตว์ไม่เคี้ยวเอื้องและสัตว์เคี้ยวเอื้อง อย่างไรก็ตามเนื่องจากกากมะพร้าวคั้นกะทิตากแห้งพบว่ามีความโปรตีนน้อยมาก ขณะที่มีความเส้นใยและไขมันสูง

เนื้อมะพร้าวแห้งคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีรวมทั้งความชื้น โปรตีน ไขมัน เส้นใย และ เถ้า โดยใช้วิธีการ (AOAC, 1995) (ตาราง 2.1)

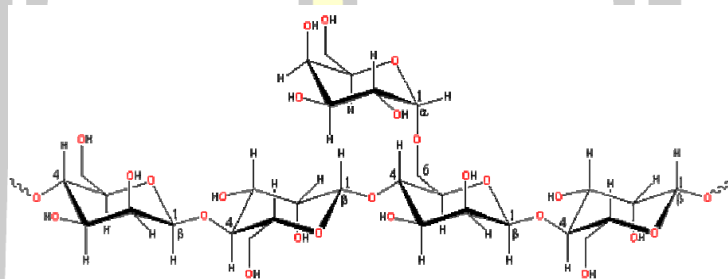
ตาราง 2.1 องค์ประกอบของธาตุอาหาร (% น้ำหนักแห้ง) ของอาหารเนื้อมะพร้าวแห้ง

ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เส้นใย	เถ้า
13.33 ± 0.13	20.02 ± 0.54	0.78 ± 0.32	7.62 ± 0.42	8.51 ± 0.01

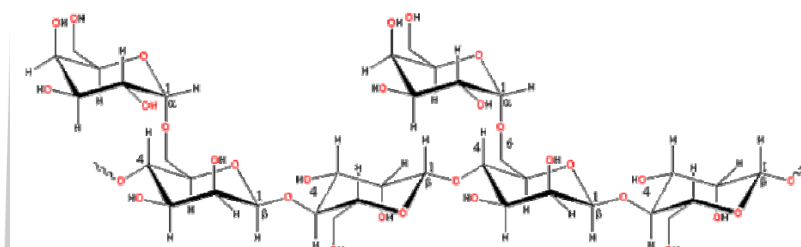
ที่มา: (Ariandi et al., 2015)

กากมะพร้าวจากการคั้นกะทิหรือกากกะทิ (กานต์ สุขสุแพทย์ และคณะ, 2555) รายงานว่า กากกะทิที่ซื้อได้จากแหล่งผลิตที่แน่นชัด เมื่อนำมาตากแดดให้แห้ง และนำไปวิเคราะห์ส่วนประกอบทางเคมีของกากกะทิที่แห้งแล้วมีความชื้น โปรตีน ไขมัน เส้นใย เถ้า แคลเซียม และฟอสฟอรัสเท่ากับ 7.33, 3.75, 27.62, 34.87, 1.01, 0.087 และ 0.072% ตามลำดับ (วินัย ประถมพุกาญจน์, 2529) รายงานว่ากากมะพร้าวคั้นกะทิทำไอศกรีม มีความชื้น โปรตีน ไขมัน เส้นใย เถ้า ไนโตรเจนฟรีเอ็กแทรกซ์แคลเซียม และฟอสฟอรัส เท่ากับ 78.09, 1.09, 7.17, 2.93, 0.21, 9.67, 0.01 และ 0.02% ตามลำดับ

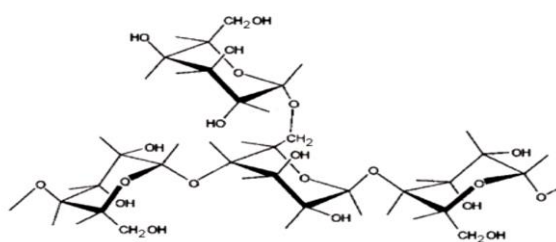
โครงสร้างภายในของกากมะพร้าวนั้นประกอบไปด้วยแมนแนน กาแลคโตแมนแนน และเซลลูโลสในอัตราส่วน 26:61:13% ตามลำดับ โดยพบว่าในส่วนของแมนแนน และกาแลคโตแมนแนน สามารถคิดเป็นอัตราส่วนได้ 25-30% และในส่วนองโครงสร้างภายในของกากมะพร้าวมีส่วนของโพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (non-starch polysaccharides, NSPs) ประกอบอยู่ด้วยนั้น จึงส่งผลให้กากมะพร้าวมีโครงสร้างที่แตกต่างจาก Guar gum คือกาแลคโตแมนแนน ในกากมะพร้าวจะมีความแข็งเรียงตัวกันแบบผลึก (crystalline) และมีอัตราส่วนของน้ำตาลแมนโนส:น้ำตาลกาแลคโตส เท่ากับ 14:1 ในขณะที่ ผงบุก มีอัตราส่วนเท่ากับ 2:1 เพราะเหตุนี้จึงทำให้กากมะพร้าว มีคุณสมบัติที่ละลายน้ำและย่อยสลายได้ยาก (Sunna et al., 2000)



A. โลคัสปินกัม



B. ผงบุก



C. กากมะพร้าว

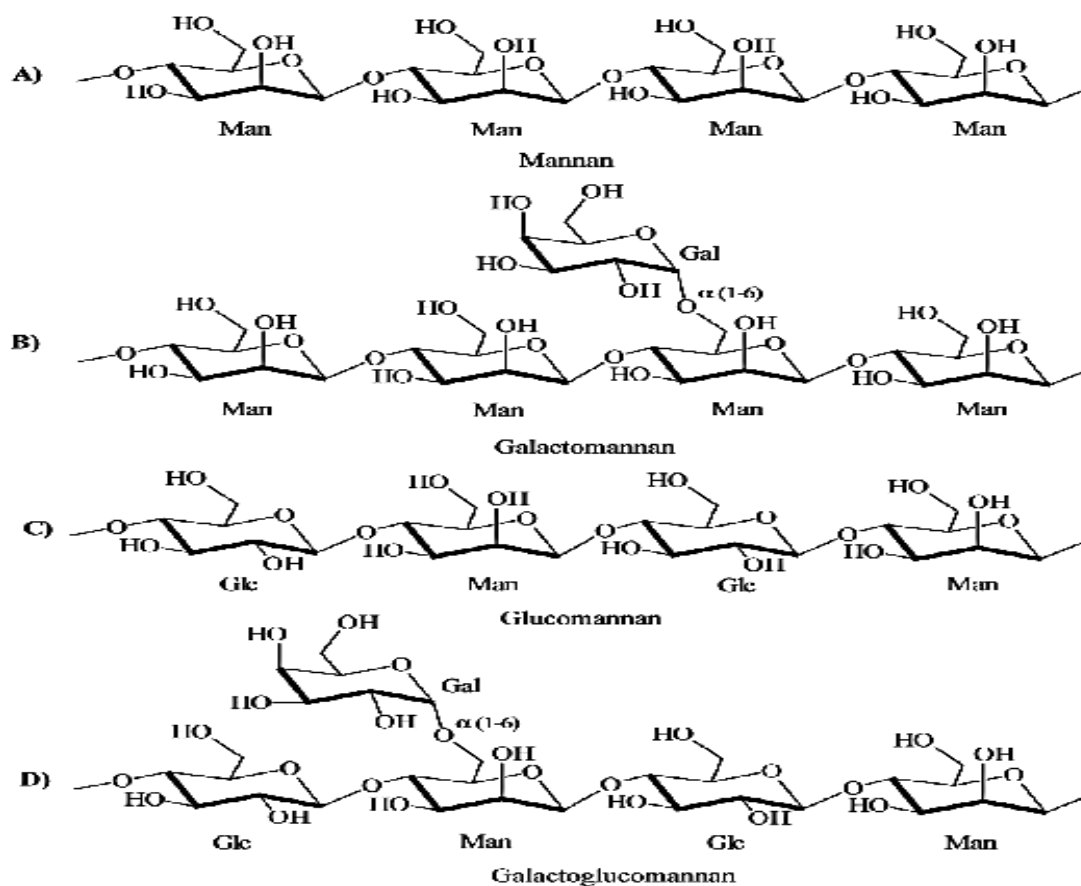
ภาพประกอบ 2.1 โครงสร้างของกาแลคโตแมนแนน (A) โลคัสปินกัม (B) ผงบุก (C) กากมะพร้าว
ที่มา: (Chaplin, 2003)

2.1.1 สารประกอบแมนแนน

แมนแนนเป็นสารในกลุ่มเฮมิเซลลูโลสที่พบทั่วไประหว่างชั้นของเซลลูโลสและลิกนิน โดยพบว่าแมนแนนจะยึดติดกับส่วนของลิกนินด้วยพันธะโควาเลนต์และจะเชื่อมกับเส้นใยเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจน จากลักษณะโครงสร้างดังกล่าวจึงช่วยสร้างความแข็งแรงและทำให้ยากต่อการย่อยสลาย (Moreira and Filho, 2008) สารประกอบแมนแนนพบได้ทั่วไปในจิมโนสเปิร์มของไม้เนื้ออ่อน ส่วนแองจิโอสเปิร์มในไม้เนื้อแข็ง เมล็ดของพืชตระกูลถั่วเมล็ดกาแฟ และสาหร่ายทะเลบางชนิด (Yamasaki et al., 1998)

การแบ่งชนิดของสารประกอบแมนแนนสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มที่มีน้ำตาลแมนโนสเพียงชนิดเดียวเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า 1,4 ไม่มีสายโซ่กิ่ง และ 2) กลุ่มที่ประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนสเป็นน้ำตาลหลักในสายโซ่ตรงเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า 1,4 และมีน้ำตาลเฮกโซส ตัวอื่นอยู่ในโครงสร้าง กล่าวคือ ถ้าในโครงสร้างมีน้ำตาลแมนโนสและน้ำตาลกลูโคสอยู่ในสายโซ่ตรงเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า 1,4 เรียกโครงสร้างดังกล่าวว่า “กลูโคแมนแนน” และถ้าโครงสร้างมีน้ำตาลแมนโนสเป็นสายโซ่ตรงเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า 1,4 และมีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นสายโซ่กิ่งเชื่อมกับสายโซ่ตรงด้วยพันธะแอลฟา 1,6 เรียกโครงสร้างดังกล่าวว่า “กาแลคโตแมนแนน” นอกจากนั้นในไม้เนื้ออ่อนบางชนิดพบโครงสร้างสารประกอบกาแลคโตแมนแนนที่มีน้ำตาลกลูโคสในสายหลักด้วย เรียกโครงสร้างนี้ว่า “กาแลคโตกลูโคแมนแนน” ดังแสดงในภาพประกอบ 2.2





ภาพประกอบ 2.2 โครงสร้างของแมนแนนและสารประกอบแมนแนน A) แมนแนน;
B) กาแลคโตแมนแนน; C) กลูโคแมนแนน; D) กาแลคโตกลูโคแมนแนน
ที่มา: (Lin et al., 2007)

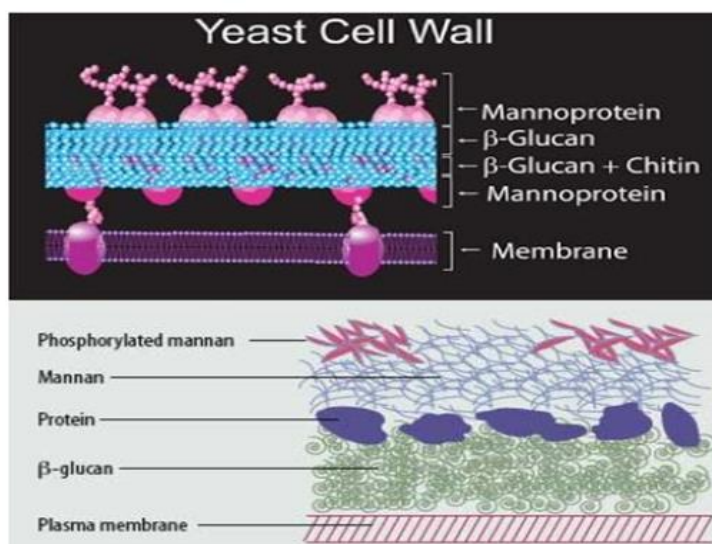
พืชแต่ละชนิดจะมีอัตราส่วนน้ำตาลแมนโนส : กาแลคโตสที่แตกต่างกันคือ น้ำตาลแมนโนส : กาแลคโตสเท่ากับ 1.1:1.0 จัดอยู่ในพวกที่มีน้ำตาลกาแลคโตสมาก (high Gal) และ 3.5:1.0 คือพวกที่มีน้ำตาลกาแลคโตสน้อย (low Gal) ซึ่งปริมาณน้ำตาลกาแลคโตสที่เพิ่มมากขึ้นจะทำให้ความสามารถในการละลายได้ลดลง ตัวอย่าง สารประกอบกาแลคโตแมนแนนในพืชชนิดต่าง ๆ แสดงดังตาราง 2.2

ตาราง 2.2 ตัวอย่างสารประกอบกาแลคโตแมนแนนในพืชชนิดต่าง ๆ

ชนิดของพืช	อัตราส่วนน้ำตาลแมนโนส : น้ำตาลกาแลคโตส
<i>Schizolobium parahybum</i>	3.0:1.0
<i>Mimosa scabrella</i>	1.1:1.0
<i>Cyamopsis tetragonoloba</i>	1.6-2.0:1.0
<i>Caesalpinia spinosa</i>	3.0:1.0
<i>Ceratonia siliqua</i>	4.0:1.0

ที่มา: (Moreira and Filho, 2008)

สับสเตรตที่นิยมใช้ในการศึกษาการทำงานของแมนนาเนส คือ สารประกอบกาแลคโตแมนแนนจากโลคัสبینกัม (locust bean gum, LBG) จาก *Ceratonia siliqua* ซึ่งมีอัตราส่วนน้ำตาล แมนโนส : น้ำตาลกาแลคโตส เท่ากับ 4:1 (McCleary, 1979) กลูโคแมนแนนจากไโวรินท์ (*Phytalephas macrocarpa*) และแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (Le Nours et al., 2005) นอกจากนี้ยังพบแมนแนนในผนังเซลล์ยีสต์ (ภาพประกอบ 2.3)



ภาพประกอบ 2.3 โครงสร้างของผนังเซลล์ยีสต์

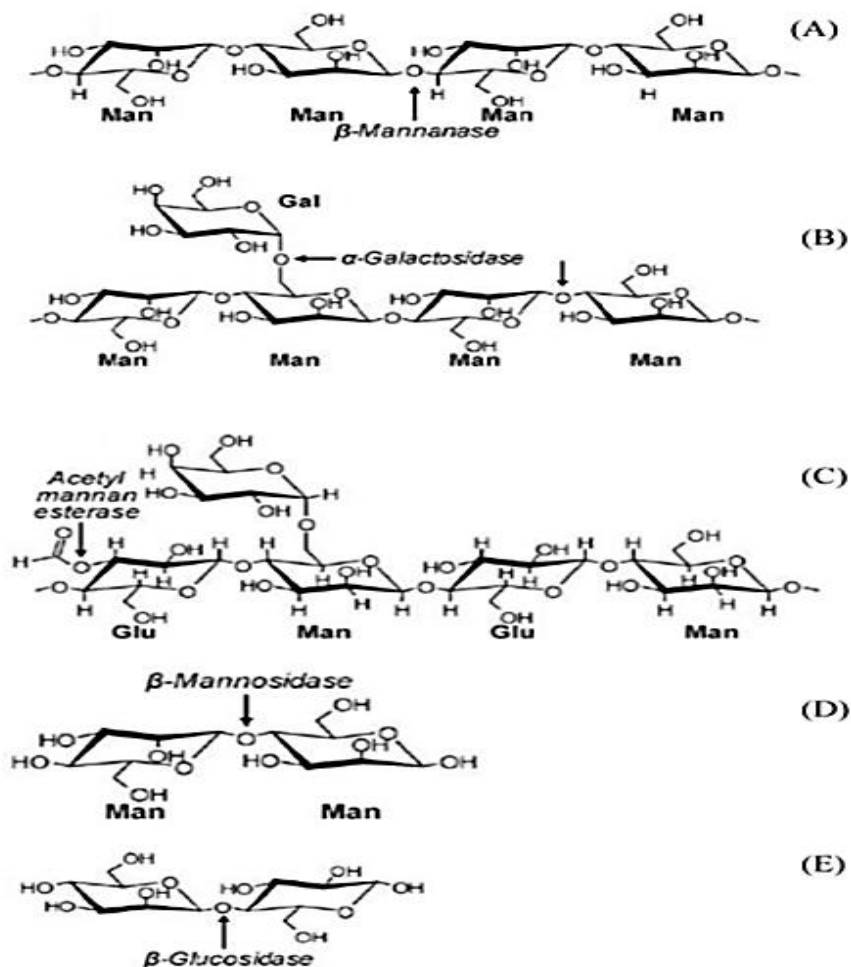
ที่มา: (Kogan and Kocher, 2007)

2.1.2 เอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบแมนแนน

สารประกอบแมนแนนประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนสเรียงต่อกันเป็นโครงสร้างสายหลัก และอาจมีน้ำตาลบางชนิดปนอยู่ในโครงสร้างด้วย เช่น กลูโคสและกาแลคโตส ในการย่อยสลายแมนแนนให้สมบูรณ์จำเป็นต้องใช้เอนไซม์อย่างน้อย 2 ชนิด ทำงานร่วมกัน (synergistic action) คือ แมนนาเนส (EC 3.2.1.78, mannan endo-1,4-mannosidase) และแมนโนซิเดส (EC 3.2.1.25, exo-mannosidase) โดยเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้เป็นเอนไซม์หลักในการย่อยสลายแมนแนนให้สมบูรณ์ นอกจากนั้นยังพบแอลฟา-กลูโคซิเดส, แอลฟา-กาแลคโตซิเดส และอะซิติดแมนแนนเอส-เทอร์เรส (Titapoka et al., 2008) ซึ่งเอนไซม์ทั้งสามชนิดทำหน้าที่ย่อยสลายโซ่กิ่งหรือองค์ประกอบน้ำตาลชนิดอื่นที่ไม่ใช่น้ำตาลแมนโนส ตัวอย่างการย่อยสลายสารประกอบแมนแนนโดยเอนไซม์ในกลุ่มแมนแนนเนสได้แสดงในภาพประกอบ 2.4

แมนนาเนสเป็นเอนไซม์ไฮโดรเลสที่ย่อยสลายแบบสุ่มภายในโครงสร้างที่มีน้ำตาลแมนโนสเป็นองค์ประกอบหลักเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า 1,4 นั่นคือสารกาแลคโตแมนแนน กลูโคแมนแนน กาแลคโตกลูโคแมนแนน และแมนแนน ทำให้ได้โนโอลิโกแซคคาไรด์ (manno-oligosaccharide) เป็นผลิตภัณฑ์ซึ่งอาจประกอบด้วยแมนโนไตรโอส (mannotriose) หรือแมนโนไบโอส (mannobiose) อย่างไรก็ตามบางครั้งจะพบกลไกการทำงานของแมนนาเนสแบบทรานสไกลโคซิเลชัน (transglycosylation) นั่นคือ ปฏิกริยาการย้ายหมู่ตาลจากโมเลกุลหนึ่งไปอีกโมเลกุลหนึ่ง โดยมีแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นสับสเตรต (Schroeder et al., 2004) ประสิทธิภาพการทำงานของแมนนาเนส ขึ้นอยู่กับจำนวนการแทนที่ของน้ำตาลชนิดอื่นที่ไม่ใช่น้ำตาลแมนโนส คือ ในกรณีของสารประกอบกาแลคโตแมนแนน และ กลูโคแมนแนน ประสิทธิภาพการย่อยสลายของแมนนาเนสขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาลกาแลคโตสและกลูโคสในโมเลกุล (McCleary, 1979) จากนั้นแมนโนซิเดสจะใช้แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นสารตั้งต้นย่อยสลายต่อโดยแมนโนซิเดสจะย่อยสลายจากทางด้านปลายสายน้ำตาลแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีความจำเพาะกับพันธะเบต้า 1,4 ทำให้ได้น้ำตาลแมนโนสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย

พูน ปณ จิต ชเว



ภาพประกอบ 2.4 โครงสร้างสารประกอบแมนแนนและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง

(A) ตำแหน่งการย่อยสลายของเบต้า-แมนนาเนส

(B) ตำแหน่งการย่อยสลายของกาแลคโตซิเดส

(C) ตำแหน่งการย่อยสลายของอะซิติลแมนแนนเอสเทอร์เรส

(D) ตำแหน่งการย่อยสลายของเบต้าแมนโนซิเดส

(E) ตำแหน่งการย่อยสลายของเบต้า-กลูโคซิเดส

ที่มา: (Zyl et al., 2010)

2.1.3 การประยุกต์ใช้เอนไซม์แมนนาเนส

มีการจัดแบ่งประเภทตามอุตสาหกรรมได้เป็น 3 ส่วนใหญ่ ๆ คือ เอนไซม์ที่ใช้เพื่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์ อาหารของคนและอาหารของสัตว์ ซึ่งปัจจุบันมีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ดังนี้

เอนไซม์แมนนาเนสที่ทำงานได้ดีในสภาวะด่าง (alkaline mannanase) จะมีประโยชน์อย่างมากต่ออุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษและอุตสาหกรรมผลิตผงซักฟอก ซึ่งล้วนเป็นอุตสาหกรรมที่กระบวนการผลิตมีสภาวะเป็นด่างสูง ตัวอย่างจากการศึกษาของ (He et al., 2008)

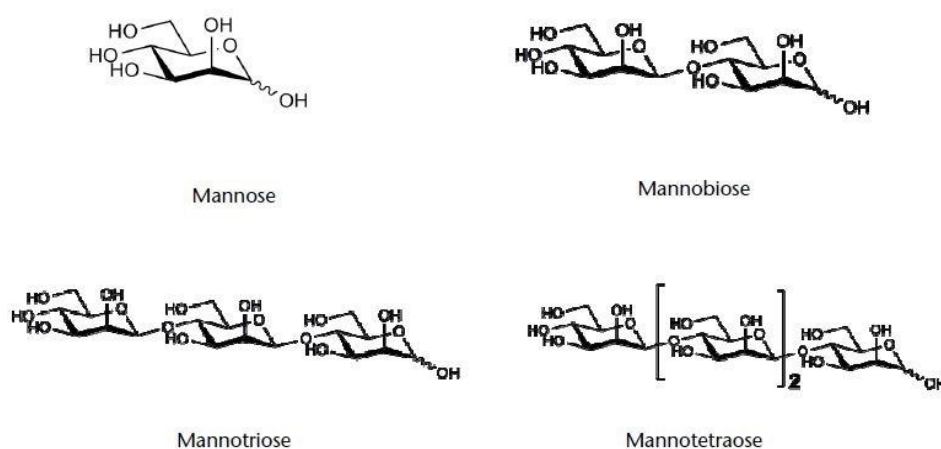
อุตสาหกรรมการซักล้างมีการนำแมนนาเนสมาใช้ร่วมด้วยเพื่อช่วยเป็นสารเพิ่มความคงตัวให้กับผงซักฟอก และน้ำยาปรับผ้านุ่ม อีกทั้งยังใช้แมนนาเนส เพื่อช่วยกำจัดสารจำพวกเจล หรือเมือกต่าง ๆ ที่อาจติดมากับเสื้อผ้าได้ (Kirk et al., 2002) ในขณะที่อุตสาหกรรมผลิตกาแฟได้มีการนำแมนนาเนสไปใช้เพื่อกำจัดส่วนที่เป็นกาแลคโตแมนแนนในเมล็ดกาแฟเพื่อลดความหนืด และป้องกันการเกิดเจลในกระบวนการผลิตกาแฟผง (Sachtlehner et al., 2000) และอุตสาหกรรมผลิตเยื่อกระดาษ แมนนาเนสถูกนำมาใช้เพื่อช่วยในส่วนของการฟอกสีเยื่อกระดาษ เพื่อลดการใช้สารเคมีและไม่เกิดการสูญเสียเยื่อกระดาษ เนื่องจากความจำเพาะของเอนไซม์ที่จะย่อยเฉพาะส่วนที่เป็นแมนแนนเท่านั้น เช่น แมนนาเนสจาก *Phanerochaete chrysosporium* สามารถนำไปใช้ในกระบวนการเตรียมเยื่อกระดาษจากไม้เนื้ออ่อนได้โดยลดการสูญเสียเยื่อกระดาษได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Benech et al., 2007)

นอกจากนี้ยังมีการนำเอนไซม์แมนนาเนสมาใช้ เพื่อเพิ่มมูลค่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น กากมะพร้าว กากอ้อย และ ฟางข้าว ให้มีมูลค่าเพิ่มมากขึ้น โดยการนำแมนนาเนสมาทำการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่าง ๆ เพื่อให้ได้น้ำตาลเป็นผลิตภัณฑ์ และใช้น้ำตาลดังกล่าวที่ได้นำไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไบโอเอทานอล (Chauhan et al., 2012; Howard et al., 2003) หรือใช้แมนนาเนสในการผลิตสารแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกเพื่อใช้เป็นสารเสริมในอาหารสัตว์ได้อีกด้วย (ChemGen corporationen, 2012)

2.1.4 แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์

แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นพรีไบโอติกชนิดหนึ่งที่มีประโยชน์ต่อคนและสัตว์ โดยการไปกระตุ้นการเจริญของเชื้อโปรไบโอติก เช่น *Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp. และอื่นๆ อีกหลากหลายชนิด (Akhter et al., 2015) และช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ที่เป็นประโยชน์ อีกทั้งยังยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้อีกด้วย โดยแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากผงบุกและโลคัสป็นก็สามารถกระตุ้นการเจริญของเชื้อ *Streptococcus thermophiles*, *Enterococcus faecium* และ *Lactobacillus casei* ได้ดี (ศุภเชษฐ์ แซ่ตั้ง และคณะ, 2015) โดยแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ มีความคงตัวสูงและไม่ถูกย่อยทำลายได้โดยกรดหรือด่าง แต่จะถูกย่อยได้โดยเอนไซม์ แมนนาเนส ที่หลังจากแบคทีเรียหรือเชื้อราเพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ปัจจุบันได้มีทางเลือกในการผลิตเอนไซม์แมนนาเนส ด้วยการตัดต่อพันธุกรรมเพื่อช่วยในการเพิ่มผลผลิตเอนไซม์ดังกล่าว (Songsiriththigul et al., 2010)

สารแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ ที่เตรียมได้จากผนังเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (Mycosob หรือ Bio-แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์) มีกลูแคน (glucan) ร้อยละ 30 แมนแนน (mannan) ร้อยละ 30 และไคติน (chitin) ร้อยละ 12.5 เป็นส่วนประกอบ โดยกลูแคนเรียงตัวเป็นชั้นแรกและมีน้ำตาลกลูโคสจับกันด้วยพันธะ 1,6 และ 1,3 เป็นโครงสร้างหลักหรือแกนของผนังเซลล์และมีกิ่งก้านหรือแขนเป็น mannose, mannobiose, mannotriose และ mannotetraose แสดงในภาพประกอบ 2.5 ยึดจับกันอยู่ด้วยพันธะ α -1,2 และ α -1,3 (Kogan and Kocher, 2007)



ภาพประกอบ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของ mannose, mannobiose, mannotriose และ mannotetraose

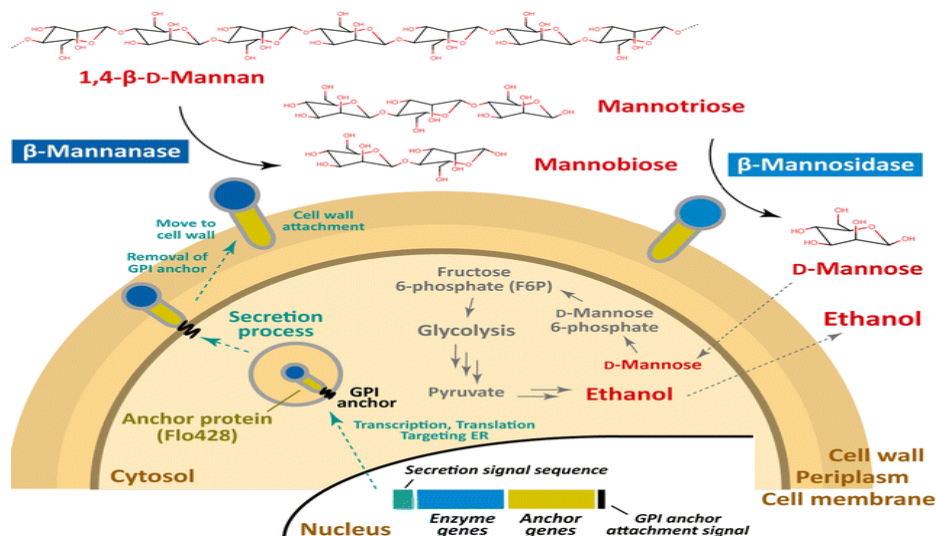
ที่มา: (Megazyme, 2016)

2.1.4.1 แหล่งที่พบของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์

พบได้ในองค์ประกอบของพืชหลายชนิด เช่น กากมะพร้าว โลคัสบินกัม หัวบุก เนื้อไม้ เมล็ดกาแฟ เมล็ดถั่ว และสาหร่ายทะเลบางชนิด (Yamasaki et al., 1998; ศุภเชษฐ์ แซ่ตั้ง และคณะ 2015) นอกจากนี้แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นองค์ประกอบของจุลชีพที่ได้จากผนังเซลล์ยีสต์ (Spring et al., 2000)

2.1.4.2 การย่อยสลายแมนแนนของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ย่อยสลายแมนแนนของเอนไซม์แมนนาเนสด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ recombinant β -mannanase และ β -mannosidase ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลแมนโนสใช้ในการผลิตเอทานอล แสดงในภาพประกอบ 2.6



ภาพประกอบ 2.6 ภาพรวมแผนผังของ β -mannanase และ β -mannosidase บนผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* สำหรับการผลิตเอทานอล
ที่มา: (Ishii et al., 2016)

2.2 พรีไบโอติก (Prebiotic)

พรีไบโอติกเป็นสารประกอบพอลิโกลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ซึ่งเป็นสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยและไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหารส่วนบน และสามารถผ่านไปสู่บริเวณลำไส้ใหญ่ได้ในสภาพที่สมบูรณ์ มีผลช่วยในการกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มโพรไบโอติก ในลำไส้ใหญ่และส่งเสริมกิจกรรมของแบคทีเรียเจ้าบ้าน (Cann et al., 1987) ซึ่งเมื่อพรีไบโอติกเข้าไปอยู่ในระบบของร่างกายมนุษย์และสัตว์ จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ โดยพรีไบโอติกนั้นทำหน้าที่ช่วยปรับสมดุลของสภาพแวดล้อมในระบบลำไส้ ช่วยย่อยอาหารที่มนุษย์ย่อยไม่ได้หรือย่อยได้ไม่หมด ช่วยการดูดซึมของสารอาหาร ลดคอเรสเตอรอล กระตุ้นการสร้างแอนติบอดี และสร้างวิตามินที่เป็นประโยชน์กับร่างกาย (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนานนท์, 2550)

2.2.1 พรีไบโอติกได้เป็นประเภทต่าง ๆ

1) Alcohol sugar จัดเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีดัชนีการสังเคราะห์โพลิเมอร์ (degree of polymerization) หรือความยาวของหน่วยย่อยที่เป็นส่วนประกอบ เพียง 1-2 ตัว ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ เช่น maltitol, sorbitol, isomalt, และ xylitol เป็นต้น

2) Resistant starch จัดเป็นสารประเภทแป้ง polysaccharides ที่ไม่ถูกดูดซับในลำไส้เล็ก ประกอบด้วย amylase ประมาณร้อยละ 20-25

3) Non-starch polysaccharides (NSP) เป็นสารที่ไม่ใช่แป้ง เตรียมได้จากพืชหลายชนิด เช่น pectin, cellulose, hemicellulose, guar และ xylan (กิริณา อยู่หัตถ์ และคณะ, 2556)

4) Inulin เป็นสาร polysaccharides ประเภท fructans เพราะประกอบด้วยน้ำตาล fructose เป็นหลัก พบเป็นส่วนของอาหารสะสมในพืชมากกว่า 36,000 ชนิด เช่น Chicory root แก่นตะวัน เห็ด หัวหอม หัวกระเทียม และกล้วย เป็นต้น

5) Oligosaccharides สำหรับพรีไบโอติกในกลุ่มนี้จัดเป็นพอลิแซ็กคาไรด์สายสั้น ประกอบด้วยน้ำตาลตั้งแต่ 2-20 หน่วย ตัวอย่าง เช่น Saffinose, Stachyose, Fructo-oligosaccharide (FOS), Lactose, Lactulose, Galacto-oligosaccharide (GOS), Manno-oligosaccharide (แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์), Soybean-oligosaccharide (SOS), Lactosucrose, Isomalto-oligosaccharide (IMO), Gluco-oligosaccharides (GOS), Xylo-oligosaccharides (XOS) และ Palatinose

6) Mucin glycoproteins เป็นสารที่ถูกสร้างโดย goblet cells ที่อยู่ในเยื่อบุผิวลำไส้ และเป็นสารตั้งต้น หลักสำหรับกระบวนการหมักในลำไส้

7) Mucopolysaccharides อื่น ๆ ตัวอย่างเช่น chondroitin sulphate, heparin สารคัดหลั่งจากตับอ่อน และแบคทีเรียต่าง ๆ สารเหล่านี้เป็นสารที่มีไว้สำหรับให้จุลินทรีย์ในลำไส้ใช้เป็นแหล่งอาหารและพลังงาน

8) โปรตีนและเปปไทด์ สารเหล่านี้เป็นส่วนประกอบของอาหาร สร้างโดยการหลั่งจากตับอ่อน หรือสร้างโดยแบคทีเรียเหมือน mucopolysaccharides แต่จะมีปริมาณน้อยกว่า

ซึ่งจะมีตัวอย่างผลิตภัณฑ์พรีไบโอติกของอินูลินและโครงสร้างของอินูลิน ดังแสดงในภาพประกอบ 2.7-2.8

2.2.2 กลไกหลักของการทำงานของพรีไบโอติกในการส่งเสริมสุขภาพของคนและจุลินทรีย์

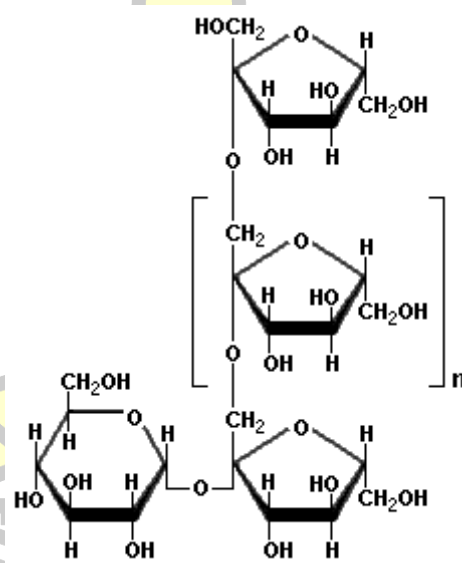
1) เป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญให้กับเฉพาะแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายซึ่งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคแก่ร่างกายจะไม่สามารถนำพรีไบโอติกไปใช้เป็นแหล่งของพลังงานได้ ดังนั้นจึงสามารถใช้ พรีไบโอติกในการเพิ่มการเจริญของแบคทีเรียประจำถิ่นที่เป็นประโยชน์ภายในคนและสัตว์ เพื่อทดแทนการบริโภคจากภายนอกได้

2) พรีไบโอติกจะขัดขวางการเข้าเกาะที่ผนังลำไส้ของแบคทีเรียก่อโรค และพบว่าจะมีการจับกันระหว่างพรีไบโอติกกับรีเซพเตอร์ (receptor) ที่อยู่บนผิวของแบคทีเรีย ซึ่งกระบวนการทั้งสองนี้ทำให้แบคทีเรียก่อโรคไม่สามารถเกาะที่ผนังลำไส้และก่อให้เกิดโรคได้

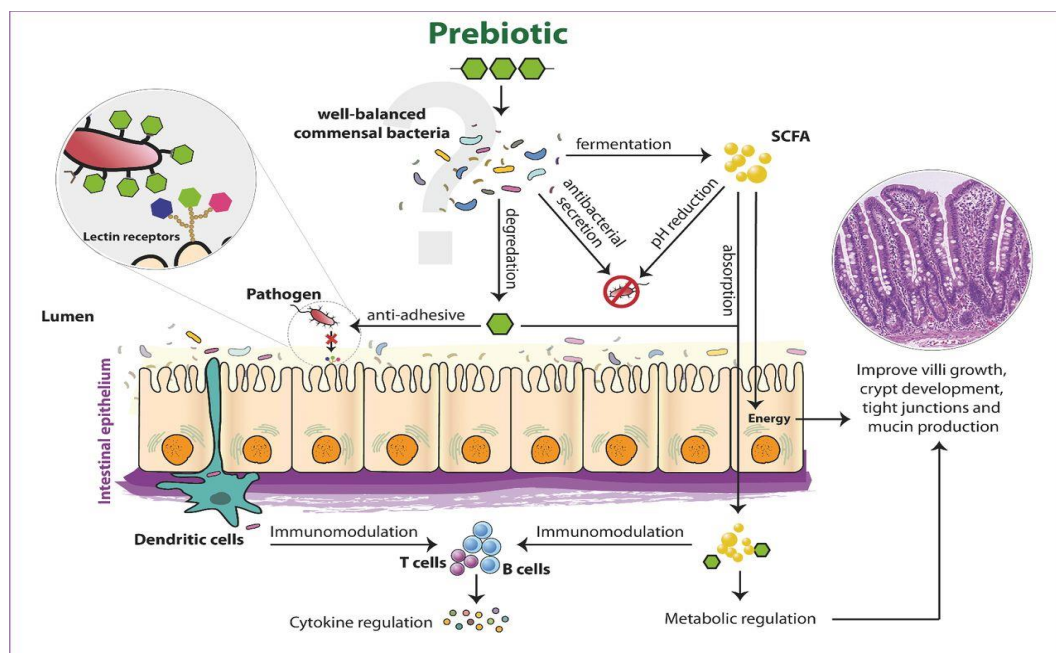
3) พรีไบโอติกสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีที่จำเป็นในร่างกายได้ และยังพบการรายงานว่าพรีไบโอติกสามารถลดการเกิดมะเร็งในลำไส้ได้ด้วย แสดงในภาพประกอบ 2.9



ภาพประกอบ 2.7 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ของอินูลิน
ที่มา: (Amazon, n.d.)



ภาพประกอบ 2.8 โครงสร้างของอินูลิน
ที่มา: (พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนานนท์, ม.ป.ป.)



ภาพประกอบ 2.9 กลไกการทำงานของพรีไบโอติก

ที่มา: (Pourabedin and Zhao, 2015)

2.3 โพรไบโอติก (Probiotic)

โพรไบโอติก หมายถึงอาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตสามารถก่อประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิต โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย (Fuller R, 1989; Ziemer and Gibson, 1998) โพรไบโอติกสามารถรอดชีวิตในผลิตภัณฑ์อาหารได้น้อย (Shah et al., 1995 , 2000) การทำให้โพรไบโอติกมีชีวิตรอดในอาหารและระบบทางเดินอาหารได้นั้น มีหลายปัจจัย ได้แก่ ปริมาณสารอาหาร ออกซิเจนในผลิตภัณฑ์ จำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น ความไวของหัวเชื้อต่อสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตขึ้น และสภาวะการเก็บรักษา (Shah et al., 2000; Tamime et al., 2005) มีรายงานว่า การเติมโพรไบโอติกให้มีจำนวนเริ่มต้น 7-9 log CFU/g ในผลิตภัณฑ์ช่วยส่งเสริมการรอดชีวิตของโพรไบโอติกทั้งในระหว่างกระบวนการผลิตและการเก็บรักษา (Saarela et al., 2000)

การที่เราจะมีสุขภาพดีนอกจากขึ้นอยู่กับ การรับประทานอาหารที่ดีแล้วนั้น ยังขึ้นอยู่กับระบบย่อยอาหารต้องทำงานดีด้วย ร่างกายต้องสามารถดูดซึมสารอาหารและขับถ่ายของเสียออกซึ่ง จุลินทรีย์โพรไบโอติกจะช่วยรักษาสมดุลของระบบทางเดินอาหารและระบบขับถ่าย (ไชยวัฒน์ ไชยสุต และศศิธร ศิริสุน, 2553) ป้องกันหรือรักษาระดับการเกิดสารก่อมะเร็ง จุลินทรีย์โพรไบโอติกมีส่วนช่วยป้องกันมะเร็งลำไส้โดยอาศัยกลไกต่าง ๆ เช่น ช่วยลดการทำงานของสารก่อมะเร็ง ลดสาร

เมแทบอลิต์ที่ไม่พึงประสงค์ เช่น แอมโมเนีย อินโดล สแกโทล และลดปริมาณเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง (ไชยวัฒน์ ไชยสุต และศศิธร ศิริสุน, 2553) ปรับปรุงการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยจุลินทรีย์โพรไบโอติกสามารถกระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาวเพื่อจับกินเชื้อโรคและช่วยหลั่งสารเคมีที่เกี่ยวข้องกับการทำลายเชื้อโรค เช่น ซัยโตไคน์ (cytokines) แกมมาโกลบูลิน A อินเตอร์ลิวคิน 1, 2, 5, 6 (IL-1, IL-2, IL-5, IL-6) และทูเมอริวโครซิสแฟคเตอร์ แอลฟา (TNF-2) ทำให้ร่างกายป้องกันต่อต้านสิ่งแปลกปลอมและกำจัดเชื้อโรคได้ดียิ่งขึ้น (Herich and Levkut, 2002; ไชยวัฒน์ ไชยสุต และศศิธร ศิริสุน, 2553) ลดภาวะภูมิแพ้และการอักเสบรุนแรง จุลินทรีย์โพรไบโอติกช่วยลดการสร้างแอนติบอดีที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสารก่อภูมิแพ้คือ Immunoglobulin E; IgE และการอักเสบอย่างรุนแรงของร่างกายได้ (ไชยวัฒน์ ไชยสุต และศศิธร ศิริสุน, 2553; วารุณี ประดิษฐ์ศรีกุล, 2548) ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด เนื่องจากคอเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เกลือน้ำดี ซึ่งจุลินทรีย์โพรไบโอติกสามารถสร้างเอนไซม์มาย่อยเกลือน้ำดีกลายเป็นเกลือน้ำดีอิสระ และขับออกทางอุจจาระได้ จึงทำให้ร่างกายใช้คอเลสเตอรอลเพิ่มเพื่อมาสังเคราะห์เกลือน้ำดีทดแทน ส่งผลให้ปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือดลดลง (ไชยวัฒน์ ไชยสุต และศศิธร ศิริสุน, 2553; วารุณี ประดิษฐ์ศรีกุล, 2548) จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกแสดงในตาราง 2.3

2.3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก

แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp. และ อื่น ๆ

ตาราง 2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก

<i>Lactobacillus</i> species	<i>Bifidobacterium</i> species	Others
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. anonalis</i>	<i>Clostridium botyricum</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. breve</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. casei</i> sp. <i>Rhamnosus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> sp.
<i>L. crispatus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>cremoriss</i>
<i>L. delbrueckii</i> sp.	<i>B. longum</i>	<i>Lactococcuslactis</i> sp. <i>lactis</i>
<i>bulgaricus</i>		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> sp. <i>dextranicum</i>

ตาราง 2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก (ต่อ)

<i>Lactobacillus species</i>	<i>Bifidobacterium species</i>	<i>Others</i>
<i>L. fermentum</i>		<i>Pediococcus acidilacti</i>
<i>L. gasseri</i>		<i>Propionibacterium</i>
<i>L. helveticus</i>		<i>freudenrecchii</i>
<i>L. johnsonii</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. lactis</i>		
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		

ที่มา: (Prado et al., 2008)

Lactobacillus sp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ มีรูปร่างเป็นท่อนกระจายเป็นเซลล์เดี่ยวหรือต่อกันเป็นเส้นสาย สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นกรดได้สูง และนำมาใช้ประโยชน์ในการหมักอาหารบางชนิด เช่น โยเกิร์ต เนยแข็งต้น พบทั่วไปในสิ่งแวดล้อม และในระบบทางเดินอาหาร (เอกลักษณ์ ทวีโรจนกุล, 2552) และ *Bifidobacterium* sp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน เจริญในสภาพไร้ออกซิเจนและไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ มีอยู่หลายสายพันธุ์ ที่นำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตนมหมัก ได้แก่ *B. bifidum*, *B. longum*, *B. infantis* และ *B. breve* สายพันธุ์ที่พบมากที่สุดในร่างกาย คือ *B. infantis* และพบมากในทารกที่ดื่มนมแม่ มากกว่าดื่มนมขวด (ไชยวัฒน์ ไชยสุต, 2553; เอกภพ สีนงาม, 2555)

2.3.2 ความสำคัญของโพรไบโอติก

ร่างกายของมนุษย์มีแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ด้วยกัน 2 ประเภท ได้แก่ แบคทีเรียที่ย่อยอาหารแล้วสร้างสารเป็นพิษต่อร่างกาย ส่วนอีกประเภทหนึ่งคือแบคทีเรียที่ย่อยอาหารแล้วสร้างสารที่เกิดประโยชน์ต่อร่างกายซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria; LAB) โดยในภาวะที่ร่างกายเป็นปกติ แบคทีเรียดังกล่าวจะรักษาสมดุลโดยควบคุมปริมาณจุลินทรีย์ซึ่งกันและกันให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม โดยมีอัตราส่วนของ LAB ร้อยละ 85 และจุลินทรีย์ก่อโรคอื่น ๆ ร้อยละ 15 แต่เมื่อใดที่ร่างกายมนุษย์อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม หรือทำให้เกิดการสูญเสียสมดุลปริมาณจุลินทรีย์ในลำไส้ไป จะก่อให้เกิดปริมาณของ LAB ลดลงหรือมีจุลินทรีย์ก่อโรคมากขึ้นส่งผลให้เกิดอาการผิดปกติต่าง ๆ เช่น ท้องผูก ภูมิแพ้ เบื่ออาหาร ท้องอืด ท้องเฟ้อ

และระบบการทำงานในร่างกายผิดปกติ เชื้อ *Lactobacillus* และ *bifidobacteria* เป็นเชื้อโพรไบโอติกชนิดหนึ่งซึ่งสามารถปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย

2.3.3 คุณสมบัติของโพรไบโอติกที่ดี

โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ ช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ เจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคที่บริเวณทางเดินอาหาร (Havenaar and Huis, 1992) ดังนั้นการที่จุลินทรีย์โพรไบโอติกสามารถเจริญ และผ่านลงไปในทางเดินอาหารโดยยังสามารถดำรงชีพในลำไส้ได้ จึงต้องมีสมบัติหลายประการเพื่อสามารถทนต่อสภาวะทางเดินอาหารซึ่งรวมถึงหลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็กส่วนต้น ส่วนกลาง ส่วนปลาย และผ่านลงไปถึงในลำไส้ใหญ่ได้ซึ่งแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ดีต้องมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

1) เจริญโดยง่ายและสามารถมีชีวิตอยู่ภายในลำไส้ มีอัตราการรอดชีวิตสูงเมื่อผ่านระบบต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น ในกระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ซึ่งต้องทนได้ในทุกสภาวะในระบบทางเดินอาหาร เช่น ทนกรดที่ pH 2-3 (กระเพาะอาหาร) หรือสามารถทนความเป็นด่างที่ pH 8-9 (ลำไส้เล็ก) เป็นต้น และมีความคงทนต่อสภาพแห้งได้นาน และสามารถรอดชีวิตได้แม้กระทั่งในขณะทำการทดลอง (Fuller, 1989)

2) เป็นเซลล์ที่มีชีวิตโดยเพิ่มจำนวนและแข่งขันกับจุลินทรีย์ก่อโรคในทางเดินอาหาร สามารถยึดเกาะกับเซลล์ในผนังลำไส้ได้ดี และสามารถเจริญได้แม้ในสภาวะที่มีแหล่งอาหารน้อย

3) ทำหน้าที่เป็นสารเสริมภูมิคุ้มกันที่มีคุณสมบัติเพิ่มการเจริญเติบโตของมนุษย์และสัตว์ รวมถึงต้านทานการเกิดโรค และก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกาย (Klein et al, 1998)

4) ไม่ก่อให้เกิดโรคและยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยความสามารถในการผลิตกรดแล็กติก หรือสารแบคทีริโอซิน (bacteriocin) มายับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (Gilliland, 1989; Havenaar and Huis, 1992) ช่วยย่อยสลายกากอาหารเพื่อให้กรดอะมิโน กรดไขมัน และวิตามิน เป็นต้น

นอกจากนี้ยังสามารถลดการเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ ลดการสังเคราะห์สารประกอบแอมีน (amine compounds) ที่เป็นพิษในระบบทางเดินอาหาร

5) สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง

6) มีความปลอดภัย ไม่ก่อให้เกิดหรือสร้างสารพิษ โดยสามารถถูกยอมรับว่าปลอดภัย (GRAS; Generally Recognized As Safe)

7) ไม่มีสมบัติการก่อกลายพันธุ์ หรือสมบัติในการถ่ายทอดพันธุกรรมทางด้านยา

2.3.4 ประโยชน์ของโพรไบโอติก

ประโยชน์ของโพรไบโอติกสามารถสรุปได้ดังนี้

- 1) สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ด้วยกลไกหลายอย่าง เช่น สามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ก่อโรค โดยยึดเกาะบริเวณผนังทางเดินอาหารได้ และแย่งพื้นที่การเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค สร้างสารปฏิชีวนะ เป็นต้น (Guarner and Schaafsma, 1998)
- 2) เป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัยเนื่องจากเป็นที่ยอมรับ และผ่านการคัดเลือกแล้วว่ามีความปลอดภัยไม่ทำให้เกิดโรค และไม่เป็นพิษ (Guarner and Schaafsma, 1998)
- 3) มีความสามารถในการผลิตสารต้านจุลชีพ เช่น แบคเทอริโอซิน กรดแลคติก และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กลุ่มอื่น ๆ ก่อให้เกิดโทษได้ และสารต้านจุลชีพนั้นสามารถเพิ่มความต้านทานต่อสภาวะการติดเชื้อภายในลำไส้ได้ (Guarner and Schaafsma, 1998)
- 4) สามารถส่งเสริมภาวะโภชนาการของผู้บริโภคได้ คือ มีการสังเคราะห์สารอาหารที่จำเป็นและนำมาใช้ประโยชน์ได้ เช่น วิตามินบี 12 ที่ทำให้การเจริญเติบโตของผู้บริโภคดีขึ้น เนื่องจากวิตามินบี 12 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโน และการสร้างโปรตีน (Grosso and Trindade, 2004)
- 5) สามารถกระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันต้านทานในร่างกายผู้บริโภค (Grosso and Trindade, 2004)
- 6) มีความคงตัว และมีอัตราการรอดชีวิตสูง จึงสามารถเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลานานในการผสมอาหารสัตว์ เนื่องจากการผลิตอาหารสัตว์บางชนิดต้องผ่านกระบวนการให้ความร้อนแรงอัดเพื่อการอัดเม็ด สภาพกรด การเอกซ์ (Extrusion) และออกซิเดชัน (Oxidation) เช่น วัตถุดิบที่อยู่ในอาหารสัตว์ และควรมีคุณสมบัติทนทานต่อสารปฏิชีวนะที่ผสมในอาหารสัตว์ (Grosso and Trindade, 2004)
- 7) ไม่ตกค้างสะสมในร่างกาย และไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร (Grosso and Trindade, 2004)
- 8) ช่วยขจัดสารพิษ (detoxification) และมลภาวะต่าง ๆ จากร่างกาย เช่น เอมีน (amine) และ ก๊าซแอมโมเนีย (ammonia) เป็นต้น เนื่องจากโปรตีนถูกเปลี่ยนเป็นเอมัย และ ก๊าซแอมโมเนีย โดยการเพิ่มกิจกรรมเมตาบอลิซึม (metabolism activity) ของเชื้อ *Escherichia coli* (ธารารัตน์ สุภกิจ, 2542)
- 9) สามารถลดระดับคอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ให้อยู่ในระดับปกติ (ธารารัตน์ สุภกิจ, 2542)

10) ช่วยบำบัดภาวะเบื่ออาหาร ภาวะเครียด (ธารารัตน์ ศุภกิจ, 2542)

11) ช่วยในการทำงานของไต และตับให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น (Guarner and Schaafsma, 1998)

12) สามารถส่งเสริมระบบการไหลเวียนของเลือดให้ดียิ่งขึ้น (Guarner and Schaafsma, 1998)

13) สามารถผลิตเอนไซม์แลคเตส (lactase) และเอนไซม์อะไมเลส (amylase) ทำให้ร่างกายได้รับเอนไซม์มากขึ้น จึงสามารถช่วยย่อยน้ำตาลในนมทำให้ไม่มีอาการท้องอืดจากการดื่มนม และช่วยให้การดูดซึมแคลเซียมดีขึ้น ส่งผลลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน โดยเฉพาะกระดูกในลำไส้ใหญ่และกระดูกสันหลัง (ธารารัตน์ ศุภกิจ, 2542)

14) สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และกำจัดมะเร็งบางชนิด (ธารารัตน์ ศุภกิจ, 2542)

15) ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ และไม่เกิดการแพ้ (ธารารัตน์ ศุภกิจ, 2542)

16) จุลินทรีย์มีบทบาทมากในระบบย่อยอาหาร ระบบขับถ่าย และระบบภูมิคุ้มกัน โดยจะเข้าไปอาศัยอยู่ในลำไส้ตั้งแต่เกิด ในลำไส้ควรมีจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์มากกว่าจุลินทรีย์ให้โทษ ในอัตราส่วนจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อจุลินทรีย์ที่ให้โทษ เท่ากับ 85% ต่อ 15%

2.3.5 การทำงานของโพรไบโอติก

1) การสร้างกรดแลคติก โดยจุลินทรีย์กลุ่ม *Lactobacillus* และ *Streptococcus* เป็นปัจจัยหนึ่งในหลาย ๆ ปัจจัยที่เป็นประโยชน์ในการทำงานของจุลินทรีย์เหล่านี้โดยปรับสภาพความเป็นกรดต่างในระบบทางเดินอาหารให้คงที่

2) การสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นตัวทำลายเชื้อโรค

3) การสร้างสารปฏิชีวนะ จุลินทรีย์ *Lactobacillus* และ *Streptococcus* บางสายพันธุ์ที่โดดเด่นได้ถูกนำมาทดสอบในห้องทดลองวิทยาศาสตร์ ได้แก่ *L. acidophilus* และ *L. lactolin* สามารถสร้างสารฆ่าเชื้อโรคในตัวเอง และสัตว์น้ำอื่นได้ เมื่อเชื้อเจริญอยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์นั้น ๆ

4) การสร้างเอนไซม์ ที่มักพบในเชื้อโพรไบโอติกอาจเกี่ยวข้องกับระบบการสร้างน้ำย่อยในระบบการย่อยที่โพรไบโอติกสร้างขึ้น ตัวอย่างเช่น *Lactobacillus* สามารถสร้างน้ำย่อยแลคเตส (lactase) ได้ดีและทำงานในฐานที่เอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกัน

5) การสร้างวิตามินบี จุลินทรีย์โพรไบโอติกเป็นผู้ผลิตวิตามินบีหลายชนิดเช่นเดียวกับการสร้างสารที่ย่อยได้ภายในลำไส้

6) การแข่งขันกับเชื้อโรค การเกาะยึด การยึดติด หรือการอยู่ร่วมกันบริเวณทางเดินอาหารเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งของจุลชีพในการพยายามที่จะอยู่ร่วมกันในพื้นที่พิเศษของกระเพาะโพรไบโอติกมีบทบาทในการขัดขวางเชื้อก่อโรค (Pathogens) จากการเกาะติดหรือรวมตัวกันในระบบทางเดินอาหารหรือมีบทบาทในการป้องกันการเกาะติดโดยตรงของเชื้อก่อโรคกับผนังทางเดินอาหาร

7) การป้องกันสารเอมีนและแอมโมเนีย เมื่อโปรตีนถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบเอมีนและแอมโมเนียโดยปฏิกิริยการย่อยที่เพิ่มขึ้นของเชื้อโรค เช่น *E. coli* ความระคายเคืองและความเป็นพิษของเอมีน จะทำให้เกิดการยึดหดตัวของลำไส้มากขึ้น โพรไบโอติกจะทำให้ระบบย่อยดีขึ้น

8) การกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง เช่น อาจมีบทบาทการกระตุ้นภูมิคุ้มกันบางชนิดในกระเพาะ (ธารารัตน์ ศุภกิจ, 2542)

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.4.1 งานวิจัยในประเทศไทย

สุพจน์ นวลละออง (2552) ได้ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการสกัดพรีไบโอติกจากพืชเกษตรจากผลการทดลองพบว่าแม้สารสกัดจากเปลือกกลูตาไลจะมีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย HPLC พบองค์ประกอบของน้ำตาลที่เป็นพรีไบโอติกเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ในขณะที่พบในเมล็ดขนุนมากกว่า

เอกภพ สีนงาม (2555) ได้ศึกษาความเป็นพรีไบโอติกของฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ที่ได้จากแก่นตะวัน พบว่าสารสกัดจากหัวแก่นตะวันสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น *Bifidobacterium* sp. และ *Lactobacillus casei* TISTR 1340 ได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่เป็นโทษต่อร่างกาย เช่น *E. coli* TISTR 708 และ *Clostridium* sp. ได้ เมื่อเพาะเลี้ยงแบบการเลี้ยงร่วมระหว่างเชื้อที่เป็นประโยชน์และเชื้อที่เป็นโทษต่อร่างกาย

รุสมัน ตะแซสาเมาะ (2557) ได้ทำการศึกษาการสกัดสารโอลิโกแซคคาไรด์จากแก้วมังกร และนำไปทดสอบการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียพบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacteroides* และ *Clostridia*

พรพรรณ แสนภูมิ และสุภาวดี ฉิมทอง (2557) ได้ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการปรับปรุงกากชาด้วยเอนไซม์เพื่อใช้เป็นพรีไบโอติก โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด Completely

Randomized Design (CRD) จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่ากากขี้เถ้าที่ย่อยด้วยเอนไซม์สามารถเพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ได้ส่งผลทำให้มีคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติก แม้ว่า การย่อยด้วยเอนไซม์จะไม่สามารถ ทำให้ปริมาณเยื่อใยลดลงได้ดังนั้น จะเห็นได้ว่าการนำเอาเศษเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดอื่น ๆ มาย่อยด้วยเอนไซม์อาจเป็นแนวทางหนึ่งในการผลิตพรีไบโอติกได้ ซึ่งอาจเป็นการเพิ่มมูลค่าของเศษเหลือทิ้งทางการเกษตรได้อีกด้วย

พรพรรณ แสนภูมิ และคณะ (2558) ได้ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการปรับปรุงเชื้อหุ้มเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ด้วยเอนไซม์ เพื่อใช้เป็นพรีไบโอติกในอาหารสัตว์ จากผลการทดลองพบว่าเชื้อหุ้มเมล็ดหิมพานต์ที่ย่อยด้วยเอนไซม์สามารถลดปริมาณเส้นใย เพิ่มปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และยังสามารถเพิ่มปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *L. acidophilus* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ได้ แสดงให้เห็นว่าเชื้อหุ้มเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ที่ย่อยด้วยเอนไซม์มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกในการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติก แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการนำเอาเศษเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดอื่น ๆ มาย่อยด้วยเอนไซม์ ควรทราบถึงชนิดและปริมาณของโอลิโกแซคคาไรด์ตลอดจนทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกเพื่อใช้เป็นแนวทางหนึ่งในการผลิตพรีไบโอติกได้ซึ่งอาจเป็นการเพิ่มมูลค่าของเศษเหลือทิ้งทางการเกษตรได้อีกด้วย

ศุภเชษฐ์ แซ่ตั้ง และคณะ (2015) ได้ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการผลิตสารแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์จากหัวบุกและโลคัสปินกัมโดยเอนไซม์ไกลโคซิลไฮโดรเลส แฟมมีลี 5 จากเชื้อ *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6 จากการศึกษาการผลิตสารแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์จากหัวบุกและโลคัสปินกัมซึ่งเป็นพืชที่มีสารประกอบแมนแนนสูงด้วยเอนไซม์ไกลโคซิลไฮโดรเลส แฟมมีลี 5 (Cel5A) จากเชื้อ *P. curdlanolyticus* B-6 พบว่าเอนไซม์ไกลโคซิลไฮโดรเลส แฟมมีลี 5 สามารถผลิตสารแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์จากหัวบุกและโลคัสปินกัมได้ โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้มีขนาด degree of polymerization 3-6 หน่วย โดยสารแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์จากหัวบุกและโลคัสปินกัมมีฤทธิ์ในการไป กระตุ้นการเจริญของโพรไบโอติกได้

2.4.2 งานวิจัยต่างประเทศ

Tanimoto และคณะ 2002) ได้ทำการศึกษาการวิเคราะห์ HPLC ของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ มาจาก *Saccharomyces cerevisiae* ใช้คอลัมน์อะมิโนหรือคอลัมน์ Graphitized คาร์บอน ได้ถูกตรวจสอบลำดับของการแยกของแมนโนดอลิโกแซคคาไรด์ โดยคอลัมน์ที่มีอาซิโตน ไตรล็กก็เกือบจะเหมือนกันนั่นคือการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นด้วยการเพิ่มขนาดโมเลกุล อย่างไรก็ตามคอลัมน์ GCC สามารถแยกไอโซเมอร์ทั้งสองของ mannotrioses ได้อย่างสมบูรณ์ (M_3-1 และ M_3-2) โดยมีตำแหน่งเชื่อมโยงต่างกัน และได้ทำการสำรวจโครงสร้างของ mannobiose (M_2), M_3s และ

mannotetraose (M_4) ที่แยกได้โดยวิธี matrix deuter mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) และ NMR spectroscopy

Phothichitto และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาการแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตแมนนาเนส แล้วนำไปย่อยกากมะพร้าวพบว่าแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคกลุ่ม *Salmonella* และ *E. coli* ได้ และยังสามารถกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* AC5 ได้ถึง 49.593%

Cuong และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาผลของการเสริมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากกากมะพร้าวในกุ้งขาว พบว่าการเสริมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากกากมะพร้าวปริมาณ 4-10 ต่ออาหารกุ้ง 1 kg สามารถเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ในกุ้งขาวให้เพิ่มสูงขึ้นถึง 150-300% และยังพบว่าปริมาณของเชื้อก่อโรคกลุ่ม *Vibrio*, *Coliforms*, *Clostridia* และ *Salmonella* มีปริมาณลดลง 39.6-54.1%, 56.9-65.9%, 71.8-86.1% และ 100-100% ตามลำดับ

Ariandi และคณะ (2015) ได้ศึกษาผลของการย่อยการมะพร้าวจากเชื้อ *Streptomyces* sp. BF31 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยกากมะพร้าวด้วยเอนไซม์แมนนาเนสที่อุณหภูมิ 70 °C และความเป็นกรด-ด่าง 6 ความเข้มข้นของกากมะพร้าว 10% บ่มเป็นเวลา 5 h ที่อุณหภูมิ 30 °C ซึ่งสามารถผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ได้หลายชนิด ผลผลิตของน้ำตาลรีดิวซ์คือ 3.83 mg/ml น้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์คำนวณโดยวิธี thin layer chromatography (TLC) บนแผ่นซิลิกาเจล 60F₂₅₄ (Merck Art 20 × 20 cm, Darmstadt, Germany) ตัวอย่างทั้งหมดถูกนำมาใช้ในปริมาณเท่ากัน (3 µl) และจากนั้นมีส่วนผสมของตัวทำละลาย เอ็น-บิวทานอล: กรดอะซิติก: น้ำ (12: 6: 6) โดยการฉีดพ่นสีน้ำตาล (ไดเฟนไฮดรามีน 0.2 g, อนิลีน 0.2 ml, แอซีโตน 10 ml กรดฟอสฟอริก 1.5 ml) และมีความร้อนที่ 120 °C เป็นเวลา 10 min ผลิตภัณฑ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ถูกนำมาวิเคราะห์โดยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC) ใช้คอลัมน์ 250×4.6 mm. รหัส Zorbax SIL เคลือบด้วย 3-amino propyl silane ระยะเคลื่อนที่คือ อะซีโตน ไตรลและน้ำกลั่นในอัตราส่วน 75:25 (v/v) อุณหภูมิคอลัมน์ 30 °C อัตราการไหล 1.4 ml/min พบว่าผลิตภัณฑ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ประกอบด้วย mannobiose, mannotriose, mannotetrose, mannopentose, และ mannohektose

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือในการวิจัย

3.1.1 เชื้อจุลินทรีย์

1) เชื้อ *Bacillus methylotrophicus* KS1

B. methylotrophicus KS1 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากงานวิจัยในปี 2558 จากการคัดเลือกแบคทีเรียทนร้อนที่ผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจากดิน เก็บตัวอย่างไว้ -80 °C ที่ห้องปฏิบัติการสาขาวิชาชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด (Rattanasuk et al., 2015)

2) เชื้อโพรไบโอติกจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ

L. bulgaricus TISTR451, *L. casei* TISTR390, *L. acidophilus* TISTR1338 และ *L. plantarum* TISTR543 สั่งซื้อจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3) เชื้อโพรไบโอติกจากหัวเชื้อคีเฟอร์

P. pentosaceus V3-100, *L. lactis* subsp. *lactis* NM26-6 และ *L. casei* IMAU11561 IMAU11561 จากห้องปฏิบัติการสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

3.1.2 วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือในการวิจัย

1) pH meter (FiveEasy™, China)

2) Centrifuge (Scientific Promotion, Korea)

3) Hot plate (DAIHAN Scientific, Korea)

4) Laminar Flow (ESCO, Thailand)

5) Incubator shaker (Scientific Promotion, Korea)

6) UV-Vis Spectrophotometer (Thermo, USA)

7) Microplate Reader (iMark™, Japan)

8) Autoclave (TOMY, Japan)

9) Vortex (Vision, Korea)

- 10) Hot air oven (POL-EKO-APARATURA, EU)
- 11) Light microscopes (OPTIKA, Italy)
- 12) Stirred Water bath (Biosan, Latvia)
- 13) High performance liquid chromatography (HPLC)
- 13) High performance liquid chromatography (HPLC) (Model 1,200 series, Agilent technology, Japan)
- 14) HPLC (RID และ ELSD) (รุ่น 10A และ 20A Series Shimadzu)
- 15) CO₂ Incubator

3.2.3 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 1) Glucose (Scitrader, Thailand)
- 2) Sunphuric acid 98 % (Qrec, New Zealand)
- 3) Phenol Crystallized 5% (w/v) (Qrec, New Zealand)
- 4) DNS reagent 3,5-Dinitrosalicylic acid (Sigma-Aldrich, India)
- 5) NaOH (Qrec, New Zealand)
- 6) Potassium Sodium Tartrate (Sigma-Aldrich, India)
- 7) Locust Bean Gum (LBG) (Sigma-Aldrich, USA)
- 8) Nutrient Broth (Himedia, India)
- 9) Bacterial Agar (Himedia, India)
- 10) Yeast Extract Powder (Himedia, India)
- 11) Tryptone Type-I (Himedia, India)
- 12) Sodium Chloride, NaCl (Qrec, New Zealand)
- 13) De Man Rogosa and Sharpe (MRS) (Himedia, India)

3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าวด้วยเชื้อ *B. methylotrophicus* KS1

3.2.1 การเตรียมกากมะพร้าวแห้ง

นำกากมะพร้าวที่เหลือจากการคั้นกะทิ 5 kg จากตลาดราชบุรี อำเภอเสลภูมิ จังหวัดร้อยเอ็ด ในเดือนมกราคม พ.ศ. 2561 มาอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 48 h นำมาบดให้ละเอียด จากนั้นเก็บในโถปิดสนิทที่อุณหภูมิห้องเพื่อนำไปทดลองครั้งต่อไป

3.2.2 การเตรียมเชื้อ *B. methylotrophicus* KS1

3.2.2.1 การศึกษาการเจริญของเชื้อ KS1 เลี้ยงในอาหาร NB เป็นเวลา 72 h

เชื้อ KS1 จาก glycerol stock จำนวน 1 loop เลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 100 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 rpm เก็บตัวอย่างทุก 6 h ปริมาตร 1 ml ระยะเวลาการเพาะเลี้ยง 72 h บั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นเวลา 10 min เทส่วนใสทิ้ง แล้วล้างตะกอนแบคทีเรียด้วย NaCl 0.85% ปริมาตร 5 ml จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำไปนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียโดยวิธี standard plate count โดยทำการเจือจาง 10 เท่า (10-fold serial dilution) ปิเปตตัวอย่างที่ระดับการเจือจางต่าง ๆ ปริมาตร 100 μ l นำมา Spread plate บนอาหาร NA จำนวน 3 ซ้ำ บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 18 h ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหาร โดยนับจำนวนโคโลนีที่เจริญในเพลทในช่วง 30-300 โคโลนี จากนั้นทำกราฟการเจริญของเชื้อเป็นจำนวนโคโลนี log CFU/ml

3.2.2.2 การศึกษาการเจริญของเชื้อ KS1 ในอาหาร NB 200 ml ที่ผสมกับ Locus bean gum (LBG) 1% ระยะเวลา 72 h

1) การศึกษาการเจริญของเชื้อ KS1 ในอาหาร NB 200 ml ที่ผสมกับ Locus bean gum (LBG) 1%

นำเชื้อ KS1 เลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 5 ml 18 h (log phase) แล้วปรับเชื้อเริ่มต้นปริมาณ OD = 0.313 $\approx 10^8$ CFU/ml จากนั้นนำเชื้อจำนวน 1 % เลี้ยงในอาหารปริมาตร 200 ml ขวดรูปชมพู่ขนาด 500 ml จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 rpm เก็บตัวอย่างปริมาตร 2 ml ระยะเวลา 72 h จากนั้นบั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นเวลา 10 min ล้างตะกอนแบคทีเรียด้วย 0.85% NaCl ปริมาตร 5 ml จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำไปนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียโดยวิธี Standard plate count ทำการเจือจาง 10 เท่า (10-fold serial dirution) ปิเปตตัวอย่างที่ระดับการเจือจางต่าง ๆ ปริมาตร 100 μ l มา Spread Plate บนอาหาร NA จำนวน 3 ซ้ำ บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 18 h ตรวจนับปริมาณโคโลนีที่เจริญบนอาหาร โดยจะนับจำนวนโคโลนีที่เจริญในเพลทในช่วง 30-300 จากนั้นทำกราฟจำนวนเชื้อมีหน่วยเป็น log CFU/ml เทียบกับ h ในการหมัก

- ย้อมสีแกรมและเอนโดสปอร์
- วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) และน้ำตาลทั้งหมด ด้วยวิธี (Phenol Sulfuric)

2) การศึกษากิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส ด้วยวิธี DNS ของเชื้อ KS1 ในอาหาร NB 200 ml ที่ผสมกับ Locus bean gum (LBG) 1%

นำส่วนใสจากข้อที่ 1) มาปริมาตร 0.5 ml มาผสมกับ 1% LBG pH 7 ปริมาตร 0.5 ml นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลานาน 5 min จากนั้นเติม DNS 1 ml และผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 5 min แช่ในน้ำเย็นทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS จากนั้นการคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนสจะคำนวณในหน่วยยูนิต โดย 1 Unit ของเอนไซม์แมนนาเนส หมายถึงปริมาณของเอนไซม์แมนนาเนสที่ทำให้เกิดน้ำตาลแมนโนส 1 $\mu\text{mol/min}$ (Rattanasuk and Ketudat-Cairns, 2009) โดยเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นเทียบกับกราฟน้ำตาลกลูโคส ดังภาคผนวก ข

3.2.3 การผลิตพรีไบโอติกที่ได้จากกากมะพร้าวด้วยเชื้อ KS1

3.2.3.1 การเตรียมหัวเชื้อ KS1 เริ่มต้น

นำเชื้อ KS1 จาก Stock จำนวน 1 loop เลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 50 ml ที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 rpm เป็นเวลาเท่ากับผลการเจริญในช่วง log phase จากนั้นปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นเวลา 10 min นำตะกอนแบคทีเรียมาปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วยอาหาร NB และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm ให้ได้เท่ากับ 0.313 มีค่าเท่ากับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย $\approx 10^8$ CFU/ml ดังภาคผนวก ข

3.2.3.2 การผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์

เริ่มจากการนำเชื้อ KS1 $\approx 10^8$ CFU/ml มีค่าดูดกลืนแสงเท่า 0.313 ที่มีการแปรผันความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้นที่ระดับ 1% 2% และ 3% (v/v) ใส่ลงในอาหาร NB 250 ml ที่ผสมกับกากมะพร้าวที่การแปรผันปริมาณกากมะพร้าว ที่ระดับ 1%, 2% และ 3% (w/v) โดยใช้ Locust Bean Gum (LBG) เป็นชุดควบคุม เลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 ml จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm เก็บตัวอย่างปริมาณ 2.0 ml ที่เวลา 0-168 h ทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 20 min นำส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ในลำดับต่อไป

3.2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์

3.2.4.1 การหาปริมาณแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยวิธีสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

นำส่วนใสที่สกัดได้ปริมาตร 0.5 ml มาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธีการใช้สารละลายกรดไดโนโตรซาลิกซาลิก (DNS method) (Rattanasuk et al., 2015) โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 540 nm เทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส และการ

วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ด้วยวิธี Phenol Sulfuric (James, 1998) วิธีการวิเคราะห์ ดังภาคผนวก ข

3.2.4.2 การวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์แมนนาเนส

นำส่วนใสมาทดสอบกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส โดยใช้สารผสมปฏิกิริยา มีเอนไซม์แมนนาเนสอย่างหยาบ 0.5 ml และความเข้มข้น 0.1 mol ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาณ 0.5 ml 1% LBG pH7.0 ปริมาตร 0.5 ml วัดได้กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสที่ 50 °C เป็นเวลา 5 min แขน้ำเย็นทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS จากนั้นการคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนส Unit/ml ตามวิธีของ (Rattanasuk and Ketudat-Cairns, 2009)

3.2.4.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ ด้วย HPLC

นำแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์อย่างหยาบที่ผลิตได้จากสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ได้มากที่สุดมากรองด้วยชุดกรอง (0.2 μ m) แล้วนำไปทดสอบหาองค์ประกอบของโอลิโกแซคคาไรด์ที่เกิดขึ้น วิเคราะห์หาชนิดของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Hibar LiChroCART NH2 (250X4.0 mm i.d.) การเคลื่อนที่แบบ reversed phase ใช้กับเฟสคงที่ (stationary phase) ไม่มีขั้ว เช่น octadecylsilane และเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) อัตราส่วน acetonitrile-water 65 : 35 อัตราการไหล 0.5 ml/min ฉีดตัวอย่างละ 20 μ l ใช้ระยะเวลาวิเคราะห์ต่อตัวอย่าง 30 min โดยใช้ Detector ชนิด Shodex RI-71 (Tanimoto et al., 2002) โดยใช้สารมาตรฐาน คือ แมนโนส (M1) แมนโนไบโอส (M2) แมนโนไตรโอส (M3) แมนโนเตตราโอส (M4) แมนโนเพนโตส (M5) และ แมนโนเฮกโซส (M6)

3.3 การศึกษาผลของการเติมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญของเชื้อโพรไบโอติก

3.3.1 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

นำหัวเชื้อโพรไบโอติก *Lactobacillus bulgaricus* TISTR451, *L. casei* TISTR390, *L. acidophilus* TISTR1338, *L. plantarum* TISTR543, *P. pentosaceus* V3-100, *L. lactis* subsp. *lactis* NM26-6 และ *L. casei* IMAU11561 จาก glycerol stock ที่เก็บไว้ที่ -20 °C ปริมาตร 50 μ l ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว De Man Rogosa and Sharpe (MRS) 5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 24 h

3.3.2 การศึกษาการเติมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญของเชื้อโพรไบโอติก

นำสารสกัดแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากสถานะที่เหมาะสมจากเชื้อ KS1 ในหัวข้อที่ 3.2 ทำให้แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นผงแห้งด้วยวิธีการนำตัวอย่างมาระเหยในตู้ Hot air oven ที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลานาน 7 วัน จนตัวอย่างแห้ง จากนั้นนำผงแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้ไปเป็นส่วนผสมแทนน้ำตาลกลูโคสในอาหารเหลว MRS เพื่อเลี้ยงเชื้อโพรไบโอติกทำการทดลองแบบแปรปริมาณแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ปริมาณ 5, 15 และ 15 mg/ml โดยใช้เชื้อโพรไบโอติกทั่วไป *L. bulgaricus*.TISTR451, *L. casei* TISTR390, *L. acidophilus* TISTR1338 และ *L. plantarum* TISTR543 และเชื้อโพรไบโอติกที่ได้จากหัวเชื้อคีเฟอร์ *P. pentosaceus* V3-100, *L. lactis* subsp. *lactis* NM26-6 และ *L. casei* IMAU11561 เป็นเชื้อโพรไบโอติกตัวอย่าง จากนั้นใส่เชื้อโพรไบโอติกที่มีความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้นมีความสูง 600 nm เท่ากับ 0.1 ปีเปตปริมาตร 100 μ l ลงในไมโครเพลท 96 หลุม และใส่อาหารเหลว MRS ที่มีส่วนผสมของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ข้างต้น ปริมาตร 100 μ l จำนวน 3 ซ้ำ โดยใช้ MRS ปกติ เป็นชุดควบคุม แล้วบ่มที่ 37 °C เป็นระยะเวลา 48 h ในสภาวะไร้อากาศ จากนั้นนำไปนับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียโดยวิธี Standard plate count ทำการเจือจาง 10 เท่า ใน NaCl 0.85 % จากนั้นปีเปตตัวอย่างที่ระดับการเจือจางปริมาตร 100 μ l มา Spread Plate บนอาหารแข็ง MRS จำนวน 3 ซ้ำ บ่มที่ 37 °C ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 24-48 h ตรวจนับปริมาณโคโลนีที่เจริญบนอาหาร โดยจะนับจำนวนโคโลนีที่เจริญในเพลทในช่วง 30-300 โคโลนี จากนั้นทำกราฟจำนวนเชื้อโพรไบโอติกมีหน่วยเป็น log CFU/ml เปรียบเทียบแตกต่างระหว่างจำนวนโคโลนีชุดควบคุมที่ใช้อาหาร MRS และ ปริมาณของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์เข้มข้นที่ 5, 15 และ 25 mg/ml นำไปวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

- วิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติก ด้วยเครื่อง HPLC (Model 1,200 series, Agilent technology, Japan) โดยใช้ Detector ชนิด RI (refractive index) ซึ่งน้ำตาลและกรดอินทรีย์ถูกแยกโดยใช้คอลัมน์ชนิด Anion exclusoi (BIO RAD, Aminex, HPX-87H, USA) ที่ตั้งอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 45 °C และใช้ กรดซัลฟูริกความเข้มข้น 4 mM เป็น Mobile phase .ให้อัตราการไหล 0.4 ml/min ฉีดตัวอย่างละ 10 μ l ระยะเวลาวิเคราะห์ต่อตัวอย่าง 45 min และเทียบกับกราฟมาตรฐาน ปริมาณกรดแลคติกในหน่วย g/L

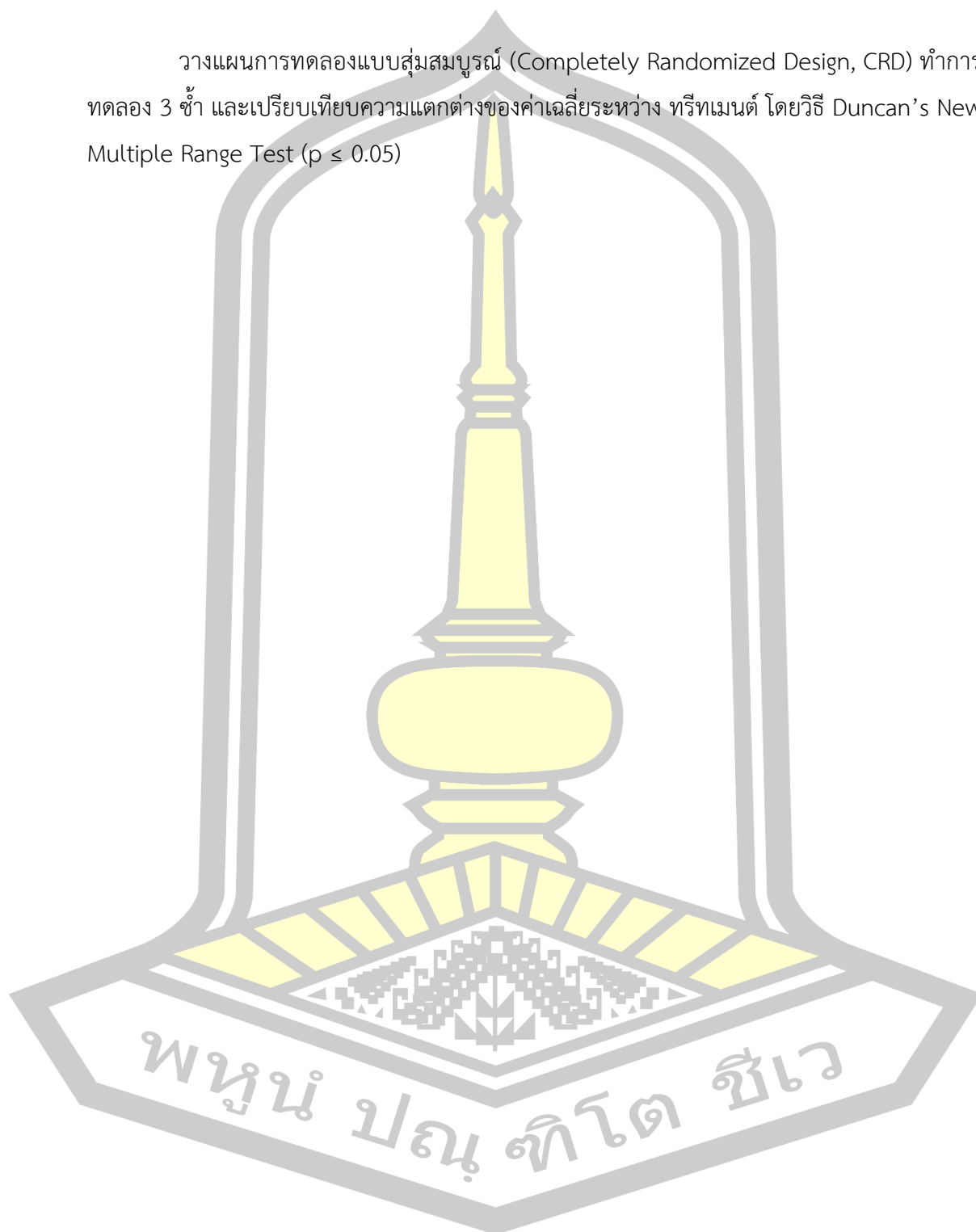
- วัดค่า pH

- หาปริมาณโคโลนี และทำการคำนวณปริมาณเชื้อที่ได้ในหน่วย CFU/ml

- วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) และน้ำตาลทั้งหมด ด้วยวิธี (Phenol Sulfuric)

3.4 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่าง ทรีทเมนต์ โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ($p \leq 0.05$)



บทที่ 4

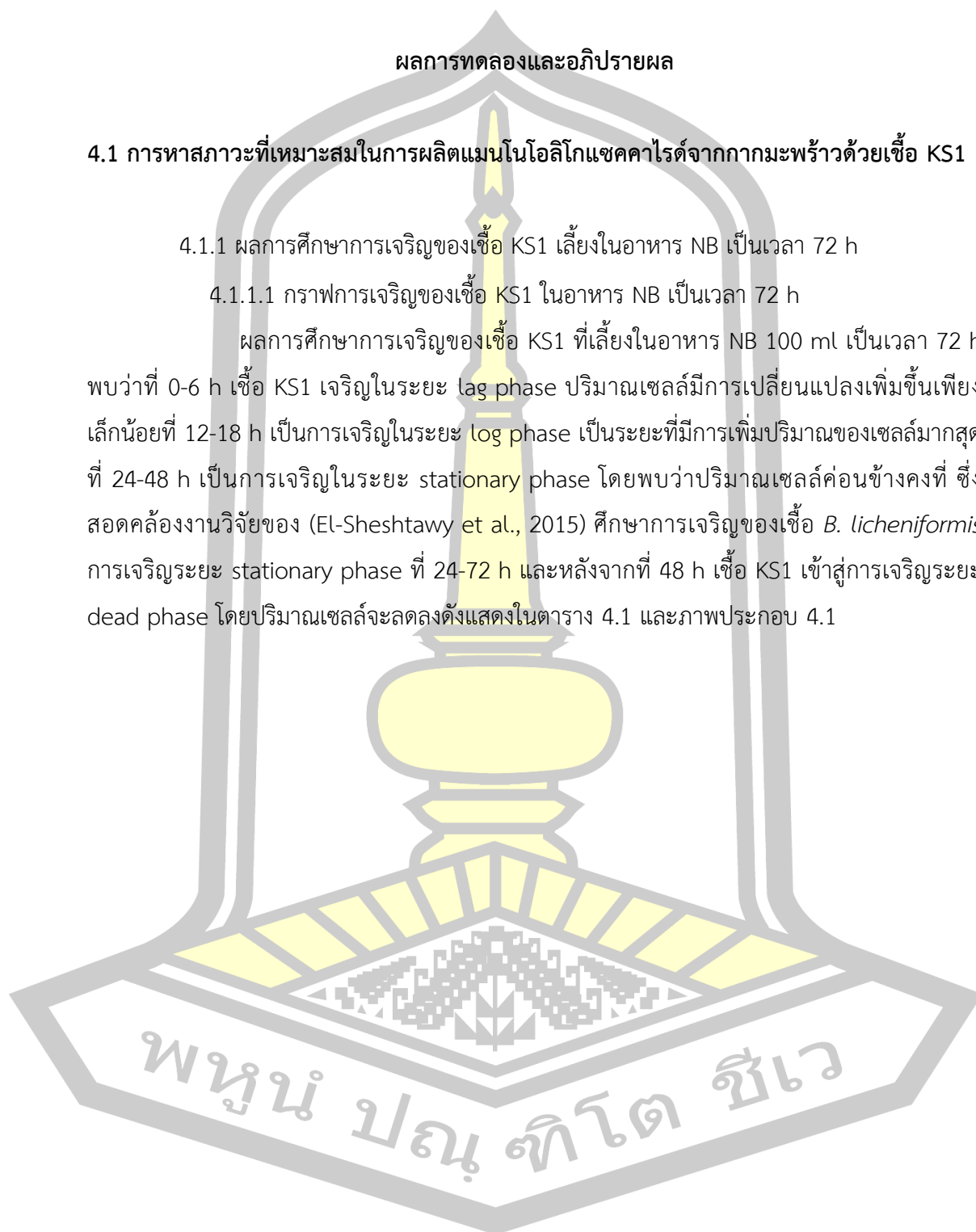
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าวด้วยเชื้อ KS1

4.1.1 ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อ KS1 เลี้ยงในอาหาร NB เป็นเวลา 72 h

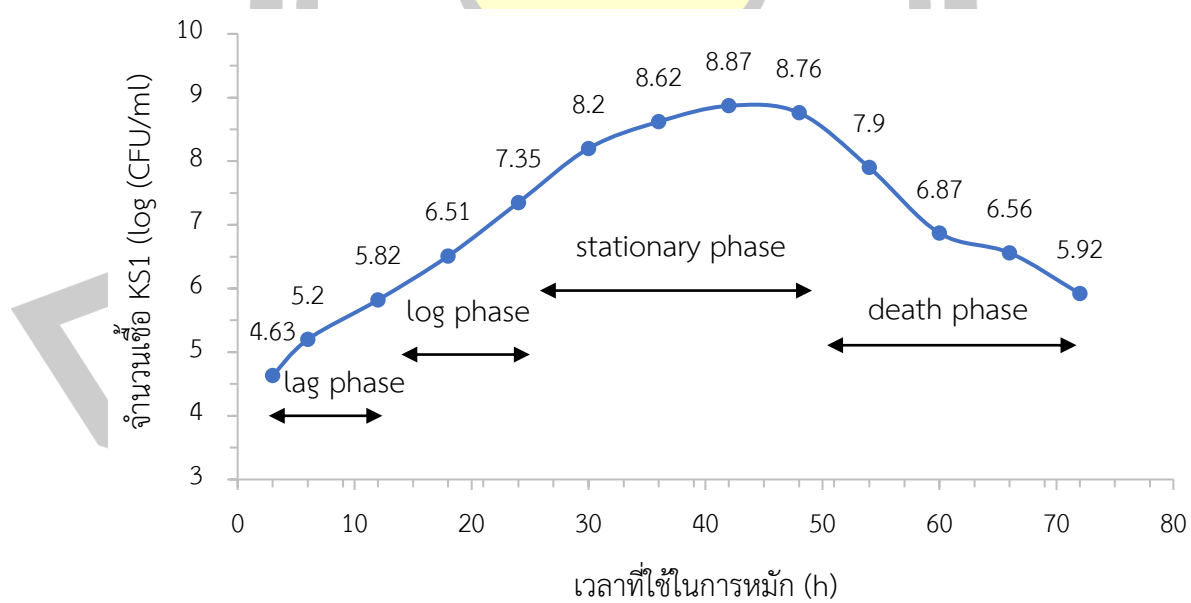
4.1.1.1 กราฟการเจริญของเชื้อ KS1 ในอาหาร NB เป็นเวลา 72 h

ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อ KS1 ที่เลี้ยงในอาหาร NB 100 ml เป็นเวลา 72 h พบว่าที่ 0-6 h เชื้อ KS1 เจริญในระยะ lag phase ปริมาณเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยที่ 12-18 h เป็นการเจริญในระยะ log phase เป็นระยะที่มีการเพิ่มปริมาณของเซลล์มากที่สุดที่ 24-48 h เป็นการเจริญในระยะ stationary phase โดยพบว่าปริมาณเซลล์ค่อนข้างคงที่ ซึ่งสอดคล้องงานวิจัยของ (El-Sheshtawy et al., 2015) ศึกษาการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* การเจริญระยะ stationary phase ที่ 24-72 h และหลังจากที่ 48 h เชื้อ KS1 เข้าสู่การเจริญระยะ dead phase โดยปริมาณเซลล์จะลดลงดังแสดงในตาราง 4.1 และภาพประกอบ 4.1



ตาราง 4.1 จำนวนเชื้อ KS1 ในอาหาร NB เป็นเวลา 72 h

เวลาที่ใช้ในการหมัก (h)	จำนวนเชื้อ KS1 (log CFU/ml)
3	4.63
6	5.2
12	5.82
18	6.51
24	7.35
30	8.2
36	8.62
42	8.87
48	8.76
54	7.9
60	6.87
66	6.56
72	5.92



ภาพประกอบ 4.1 กราฟการเจริญของเชื้อ KS1 ใน NB เป็นเวลา 72 h

4.1.1.2 ผลการศึกษาการย้อมติดสีแกรมและการย้อมเอนโดสปอร์

การศึกษาการย้อมติดสีแกรมและการย้อมเอนโดสปอร์ของเชื้อ KS1 วิธีการย้อมแสดงในภาคผนวก ข จากการศึกษาระยะเวลา 3-48 h พบว่าเชื้อ KS1 เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อนย้อมติดสีม่วงที่ 3 h เชื้อ KS1 มีลักษณะเป็นท่อนยาว แต่ที่ 6-18 h จะมีลักษณะท่อนที่สั้นลงซึ่งเป็นผลมาจากการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวน และเริ่มสร้างเอนโดสปอร์ที่ 24 h ซึ่งเป็นผลมาจากปริมาณอาหารที่จำกัด สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมจึงเกิดการสร้างเอนโดสปอร์เป็นการเจริญส่งผลให้เชื้อ KS1 น้อยลง การศึกษาครั้งนี้จึงได้เลือกช่วงของการเจริญของเชื้อ KS1 ที่ 18 h.แสดงในภาพประกอบ 4.2 เพื่อใช้เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นในการศึกษา ซึ่งการทดลองสอดคล้องกับ (Ge et al., 2016) ได้ศึกษาเชื้อ *B. methylotrophicus* Strain NKG-1 ใช้หัวเชื้อเริ่มต้นที่ 18 h แต่ไม่สอดคล้องกับ (Ramesh and Anbusaravanan, 2015) ได้ศึกษาเชื้อ *B. methylotrophicus* P10 & P11 แต่วัดการเจริญด้วย OD ซึ่งพบว่า lag phase อยู่ที่ 0-135 min log phase อยู่ระหว่าง 135-195 min



ย้อมสีแกรม

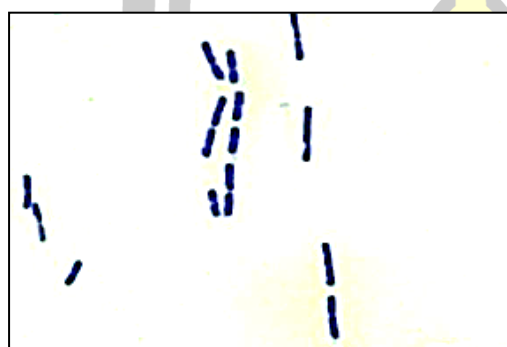
ย้อมเอนโดสปอร์



3 h



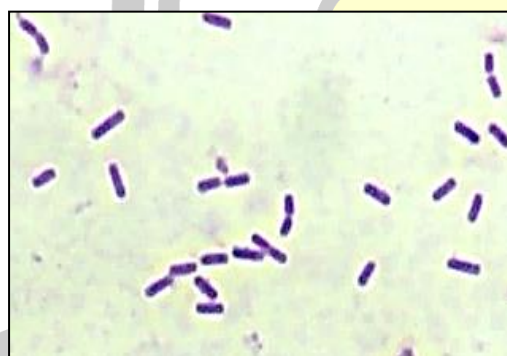
3 h



6 h



6 h



12 h



12 h

ภาพประกอบ 4.2 ภาพการย้อมติดสีแกรมและเอนโดสปอร์ของเชื้อ KS1 ที่เวลา 48 h ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000X

ย้อมสีแกรม

ย้อมเอนโดสปอร์



18 h



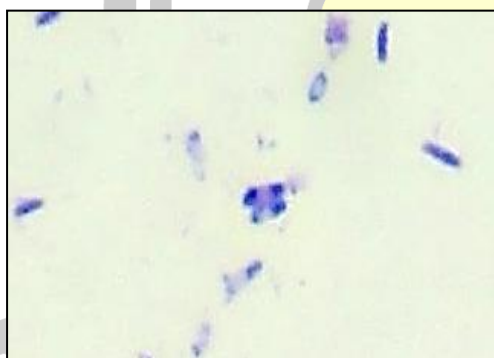
18 h



24 h



24 h



30 h

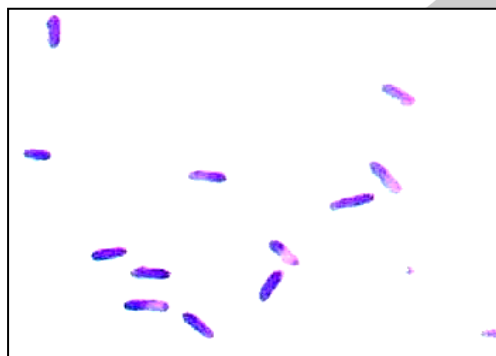


30 h

ภาพประกอบ 4.2 การย้อมติดสีแกรมและเอนโดสปอร์ของเชื้อ KS1 ที่เวลา 48 h ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000X (ต่อ)

ย้อมสีแกรม

ย้อมเอนโดสปอร์



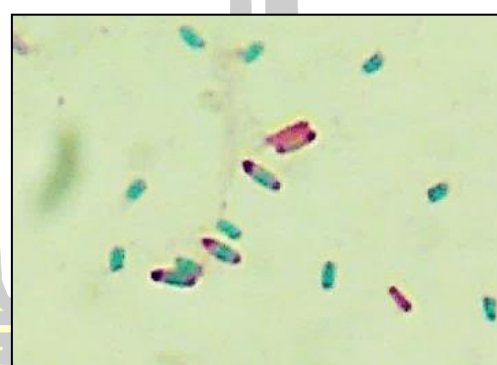
36 h



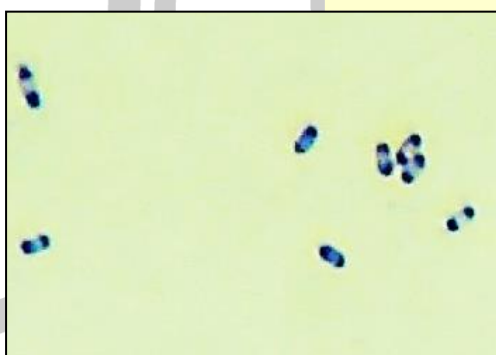
36 h



42 h



42 h



48 h



48 h

ภาพประกอบ 4.2 การย้อมติดสีแกรมและเอนโดสปอร์ของเชื้อ KS1 ที่เวลา 48 h ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000X (ต่อ)

4.1.2 การศึกษาการเจริญของเชื้อ KS1 เลี้ยงในอาหาร NB 200 ml ที่ผสมกับ LBG 1%

4.1.2.1 การเจริญของเชื้อ KS1 เลี้ยงในอาหาร NB 72 ml ที่ผสมกับ LBG 1%

การศึกษาพบว่าที่ 0-3 h เชื้อ KS1 เจริญในระยะ lag phase ปริมาณเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับกับงานวิจัยของ (El-Sheshtawy et al., 2015) ที่ 3-18 h เป็นการเจริญในระยะ log phase เป็นระยะที่มีการเพิ่มปริมาณของเซลล์มากที่สุด โดยพบว่าปริมาณเซลล์ค่อนข้างคงที่ ซึ่งสอดคล้องงานวิจัยของ (Chauhan et al., 2014) ศึกษาการเจริญของเชื้อ *B. nealsonii* PN-11 ที่ 3-18 เป็นการเจริญระยะ log phase และ ที่ 24-42 h เชื้อ KS1 เป็นการเจริญในระยะ stationary phase โดยพบว่าปริมาณเซลล์ค่อนข้างคงที่ ซึ่งสอดคล้องงานวิจัยของ (El-Sheshtawy et al., 2015) ศึกษาการเจริญของเชื้อ *B. licheniformis* ที่ 24-72 h เป็นการเจริญระยะ stationary phase และหลังจากที่ 48 h เชื้อ KS1 เข้าสู่การเจริญระยะ dead phase โดยปริมาณเซลล์จะลดลงดังแสดงในตาราง 4.2

4.1.2.2 การศึกษาการกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสของเชื้อ KS1

ผลการศึกษาการกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส ของเชื้อ KS1 เลี้ยงในอาหาร NB 200 ml ที่ผสมกับ LBG 1% พบว่ากิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสสูงสุดที่ 36 h ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสเท่ากับ 14.32 ± 0.34 Unit/ml ดังตาราง 4.2 และภาพประกอบ 4.3

4.1.2.3 การศึกษาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ด้วยวิธี (Phenol Sulfuric) พบว่าให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงสุดที่ 0 h เท่ากับ 2.24 ± 0.02 mg/ml ในขณะที่การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี DNS ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 18 h เท่ากับ 1.21 ± 0.01 mg/ml ดังตาราง 4.2 และภาพประกอบ 4.3

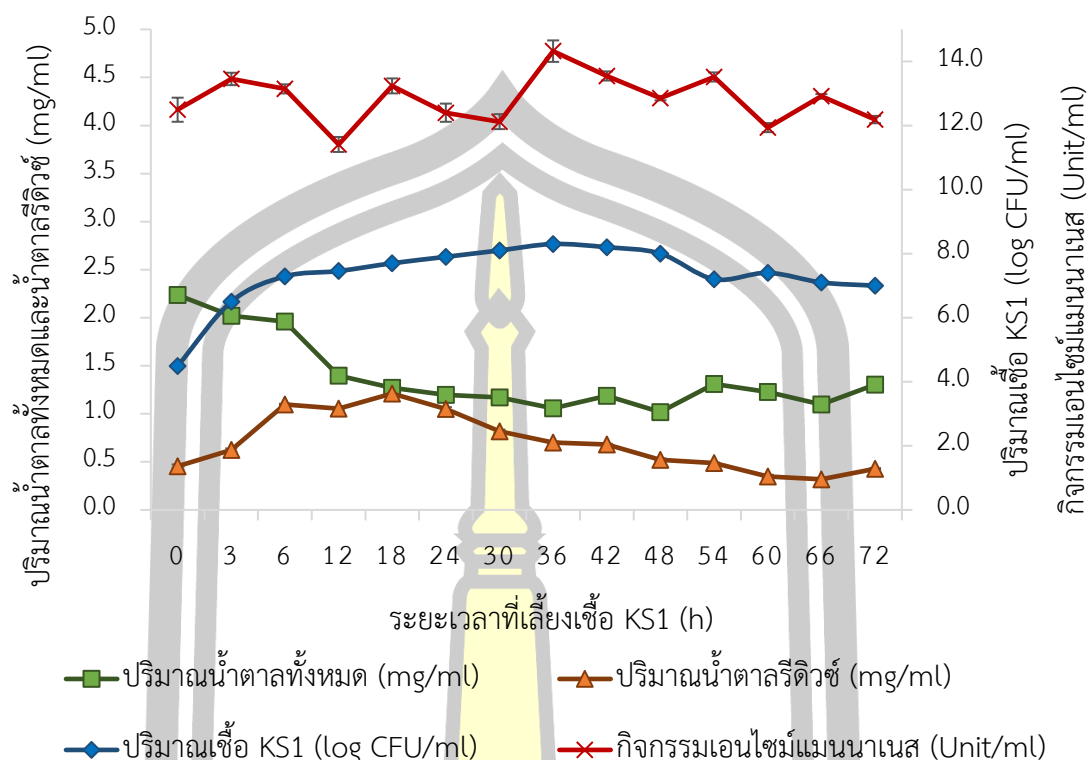


ตาราง 4.2 ปริมาณเชื้อ KS1 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส ที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่ผสมกับ LBG 1% เป็นเวลา 72 h

เวลา (h)	ปริมาณเชื้อ KS1 (log CFU/ml)	น้ำตาลทั้งหมด (mg/ml)	น้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)	กิจกรรมเอนไซม์ แมนนาเนส (Unit/ml)
0	4.49 ^l ±0.06	2.24 ^a ±0.02	0.46 ^j ±0.02	12.49 ^e ±0.39
3	6.52 ^k ±0.02	2.02 ^b ±0.05	0.62 ^s ±0.02	13.45 ^{bc} ±0.19
6	7.29 ^h ±0.02	1.96 ^c ±0.01	1.10 ^b ±0.01	13.14 ^{cd} ±0.14
12	7.46 ^f ±0.02	1.40 ^d ±0.01	1.05 ^c ±0.01	11.41 ^s ±0.23
18	7.69 ^e ±0.08	1.27 ^f ±0.01	1.21 ^a ±0.01	13.24 ^{bcd} ±0.23
24	7.89 ^d ±0.01	1.20 ^h ±0.01	1.05 ^c ±0.02	12.40 ^e ±0.28
30	8.07 ^c ±0.03	1.17 ^h ±0.01	0.82 ^d ±0.02	12.12 ^{ef} ±0.23
36	8.33 ^a ±0.01	1.06 ^j ±0.00	0.70 ^e ±0.01	14.32 ^a ±0.34
42	8.23 ^b ±0.01	1.19 ^h ±0.01	0.68 ^f ±0.01	13.55 ^b ±0.14
48	8.00 ^c ±0.01	1.02 ^k ±0.03	0.52 ^h ±0.01	12.83 ^d ±0.07
54	7.17 ⁱ ±0.01	1.31 ^e ±0.01	0.49 ⁱ ±0.00	13.67 ^{bc} ±0.19
60	7.38 ^s ±0.02	1.23 ^s ±0.02	0.35 ^l ±0.02	11.90 ^f ±0.14
66	7.11 ^j ±0.02	1.10 ⁱ ±0.01	0.32 ^m ±0.01	12.93 ^d ±0.07
72	7.08 ^j ±0.02	1.30 ^e ±0.02	0.43 ^k ±0.01	12.19 ^{ef} ±0.11

a, b,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

พหุ ประจักษ์ ชีวะ



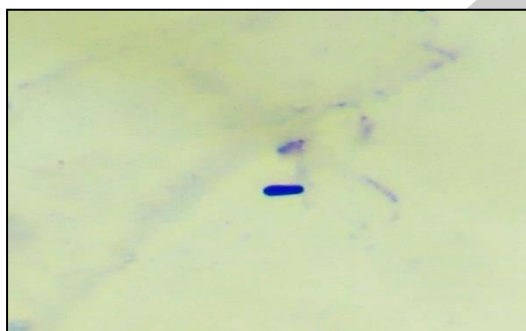
ภาพประกอบ 4.3 ปริมาณเชื้อ KS1 (log. CFU/ml) กับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml) ที่เลี้ยงในอาหาร NB ที่ผสมกับ LBG 1% เป็นเวลา 72 h

4.1.2.4 การศึกษาการย้อมติดสีแกรมและการย้อมเอนโดสปอร์

ผลการย้อมติดสีแกรมและการย้อมเอนโดสปอร์ของเชื้อ KS1 ระยะเวลา 0-72 h พบว่าเชื้อ KS1 เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อนย้อมติดสีม่วงที่ 3 h เชื้อ KS1 มีลักษณะเป็นท่อนยาว แต่พบว่าหลังจากที่ 6 h เชื้อ KS1 จะมีลักษณะท่อนที่สั้นลงซึ่งเป็นผลมาจากการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวน และเริ่มสร้างเอนโดสปอร์ที่ 42 h ดังภาพประกอบ 4.4 ซึ่งเป็นผลมาจากปริมาณอาหารที่จำกัด สภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ ในการศึกษาค้างนี้เชื้อ KS1 เลี้ยงในอาหาร NB 200 ml ที่ผสมกับ LBG 1 % ซึ่ง LBG เป็นแหล่งอาหารอีกหนึ่งแหล่งจึงทำให้พบการสร้างเอนโดสปอร์ช้ากว่ากันเพราะการเลี้ยงด้วยอาหาร NB เพียงอย่างเดียวส่งผลให้กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสลดลงซึ่งอาจเป็นผลมาจากเชื้อ KS1 ได้สร้างเอนโดสปอร์จึงทำให้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์แมนนาเนสได้

ย้อมสีแกรม

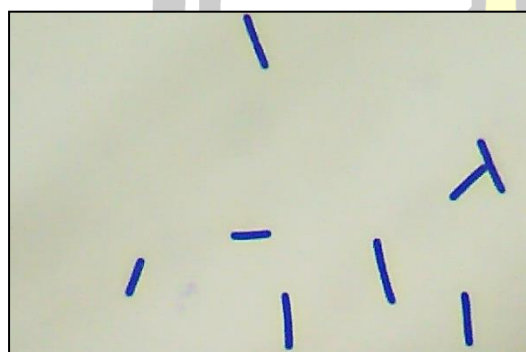
ย้อมแอนโดสปอร์



0 h



0 h



3 h



3 h



6 h

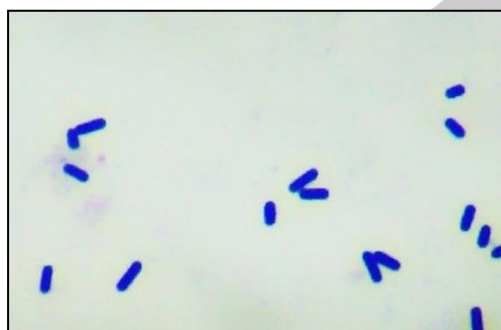


6 h

ภาพประกอบ 4.4 การย้อมติดสีแกรมและแอนโดสปอร์ของเชื้อ KS1 เลี้ยงในอาหาร NB ที่ผสมกับ LBG 1% เป็นเวลา 72 h ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000X

ย้อมสีแกรม

ย้อมแอนโตสปอร์



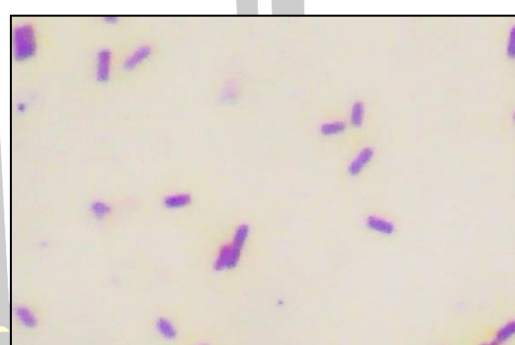
12 h



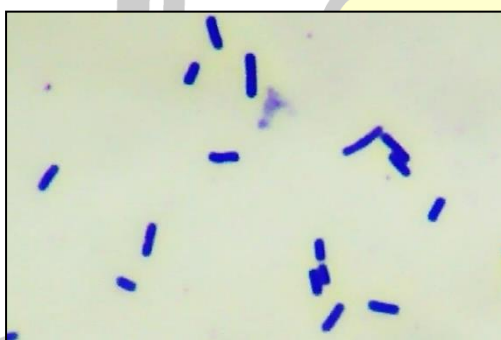
12 h



18 h



18 h



24 h



24 h

ภาพประกอบ 4.4 การย้อมติดสีแกรมและแอนโตสปอร์ของเชื้อ KS1 เลี้ยงในอาหาร NB ที่ผสมกับ LBG 1% เป็นเวลา 72 h ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000X (ต่อ)

ย้อมสีแกรม

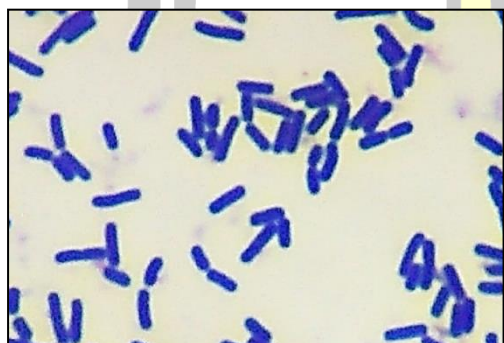
ย้อมแอนโดสปอร์



30 h



30 h



36 h



36 h



42 h

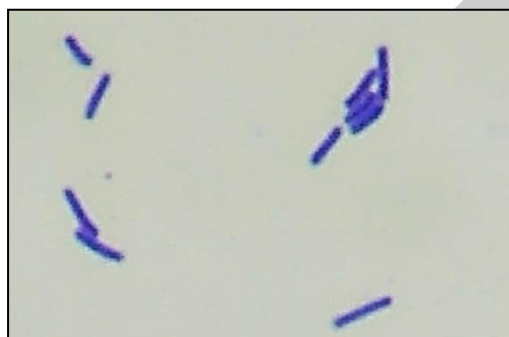


42 h

ภาพประกอบ 4.4 การย้อมติดสีแกรมและแอนโดสปอร์ของเชื้อ KS1 เลี้ยงในอาหาร NB ที่ผสมกับ LBG 1% เป็นเวลา 72 h ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000X (ต่อ)

ย้อมสีแกรม

ย้อมเอนโดสปอร์



48 h



48 h



54 h



54 h

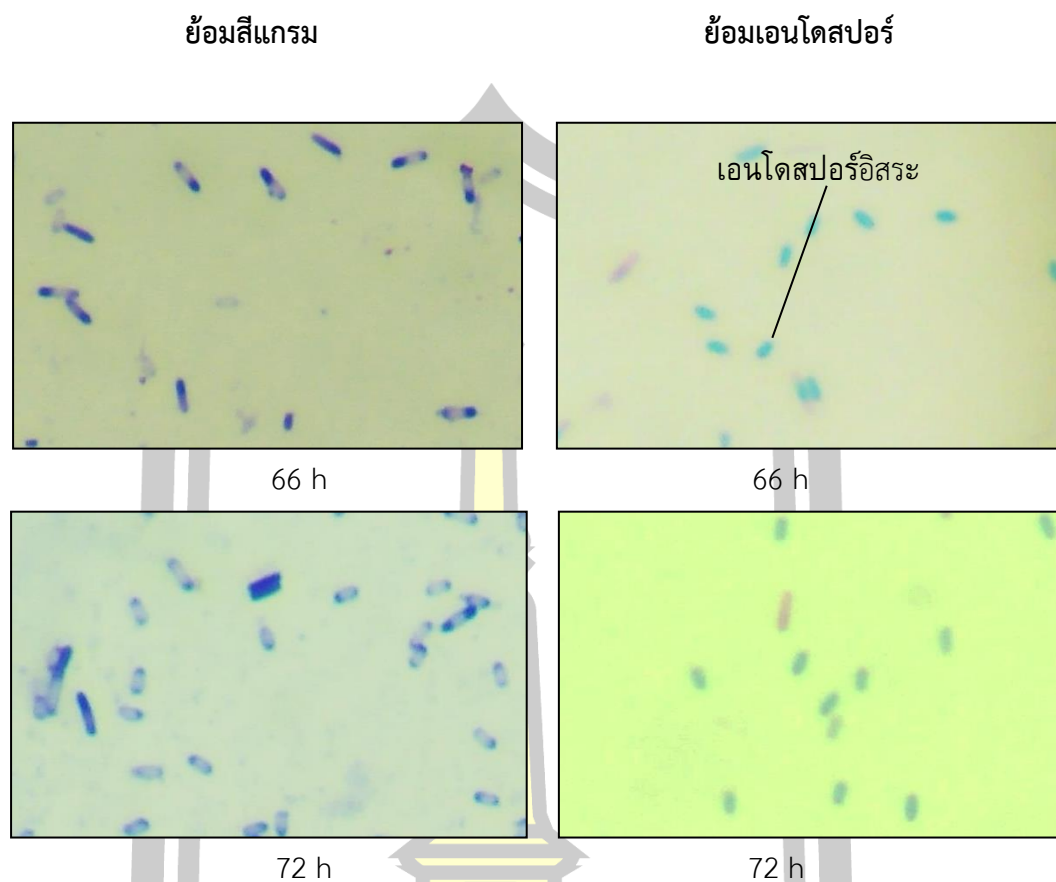


60 h



60 h

ภาพประกอบ 4.4 การย้อมติดสีแกรมและเอนโดสปอร์ของเชื้อ KS1 เลี้ยงในอาหาร NB ที่ผสมกับ LBG 1% เป็นเวลา 72 h ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000X (ต่อ)



ภาพประกอบ 4.4 การย้อมติดสีแกรมและเอนโดสปอร์ของเชื้อ KS1 เลี้ยงในอาหาร NB ที่ผสมกับ LBG 1% เป็นเวลา 72 h ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000X (ต่อ)

4.1.3 การศึกษาหาสภาวะในการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ จากกากมะพร้าวด้วยเชื้อ KS1

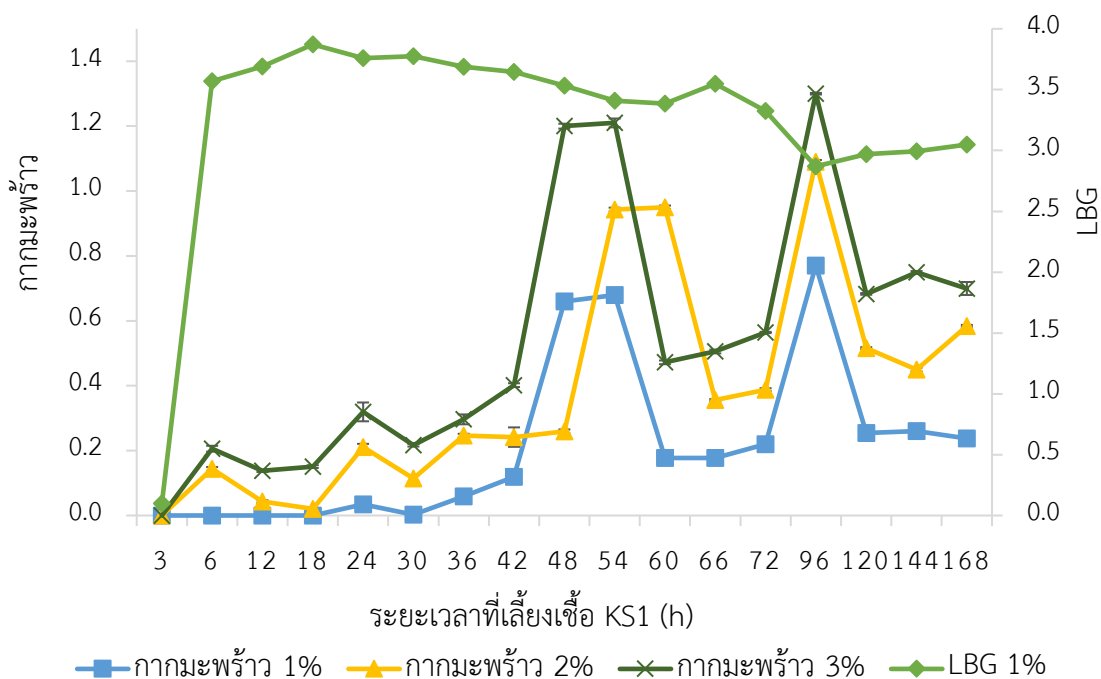
4.1.3.1 การผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นที่ KS1 1% ในอาหารที่มีกากมะพร้าว 1%, 2% และ 3% โดยการศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสและการจำแนกองค์ประกอบแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์

ตาราง 4.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml) เมื่อเลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 1% (v/v) โดยใช้กากมะพร้าว 3 ระดับ คือ 1%, 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)				
เวลา (h)	ชุดควบคุม LBG 1% (w/v)	กากมะพร้าว % (w/v)		
		1%	2%	3%
3	0.10	0.00 ^{Al} ±0.00	0.00 ^{An} ±0.00	0.00 ^{Aa} ±0.00
6	3.57	0.00 ^{Cl} ±0.00	0.15 ^{Bi} ±0.01	0.21 ^{Aj} ±0.01
12	3.69	0.00 ^{Cl} ±0.00	0.04 ^{Bl} ±0.00	0.14 ^{Ak} ±0.00
18	3.87	0.00 ^{Cl} ±0.00	0.02 ^{Bm} ±0.00	0.15 ^{Ak} ±0.00
24	3.76	0.03 ^{Ck} ±0.00	0.21 ^{Bi} ±0.01	0.32 ^{Ai} ±0.03
30	3.77	0.00 ^{Cl} ±0.00	0.11 ^{Bk} ±0.01	0.22 ^{Aj} ±0.00
36	3.69	0.06 ^{Cj} ±0.00	0.25 ^{Bgh} ±0.01	0.32 ^{Ai} ±0.02
42	3.65	0.12 ^{Cl} ±0.00	0.24 ^{Bh} ±0.03	0.40 ^{Ah} ±0.01
48	3.53	0.66 ^{Bc} ±0.01	0.26 ^{Cg} ±0.01	1.20 ^{Ab} ±0.02
54	3.41	0.68 ^{Cb} ±0.01	0.94 ^{Ba} ±0.01	1.21 ^{Ab} ±0.01
60	3.38	0.18 ^{Ch} ±0.00	0.95 ^{Ba} ±0.01	0.47 ^{Ag} ±0.01
66	3.55	0.18 ^{Ch} ±0.00	0.36 ^{Bf} ±0.00	0.51 ^{Af} ±0.01
72	3.33	0.22 ^{Cg} ±0.00	0.39 ^{Be} ±0.00	0.56 ^{Ae} ±0.00
96	2.87	0.77 ^{Ca} ±0.00	1.09 ^{Ba} ±0.01	1.30 ^{Aa} ±0.04
120	2.97	0.25 ^{Ce} ±0.00	0.52 ^{Bc} ±0.00	0.68 ^{Ad} ±0.00
144	2.99	0.26 ^{Cd} ±0.01	0.45 ^{Bd} ±0.01	0.75 ^{Ac} ±0.00
168	3.05	0.24 ^{Cf} ±0.00	0.58 ^{Bb} ±0.00	0.70 ^{Ad} ±0.02

A - C ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่กำกับต่างกันจากแนวแถวเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

a, b,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)



ภาพประกอบ 4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml) ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 1% (v/v) เมื่อเลี้ยงด้วยกากมะพร้าว 1% 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h

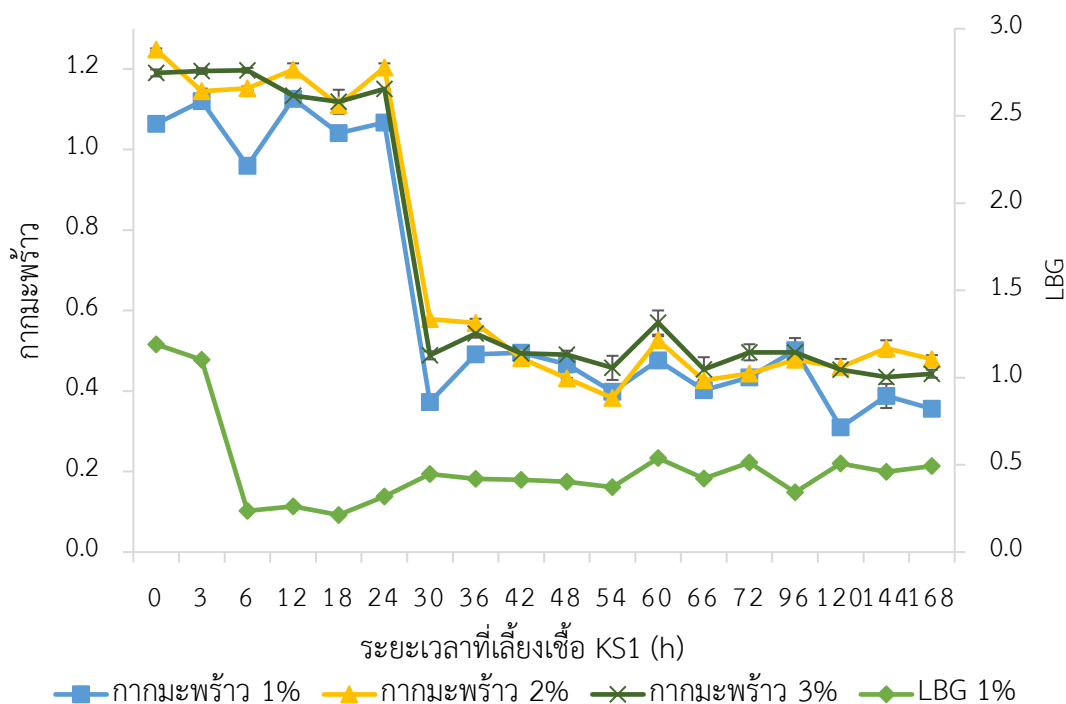
จากตาราง 4.3 และภาพประกอบ 4.5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 1% (v/v) เลี้ยงในอาหาร NB ที่ผสมกากมะพร้าว 1% 2% และ 3% (w/v) และใช้ LBG เป็นชุดควบคุมเป็นเวลา 168 h พบว่าเชื้อ KS1 1% ที่เลี้ยงในอาหาร NB ผสมกากมะพร้าว 3% ระยะเวลาที่ 48 h ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงถึง 1.20 mg/ml และมีกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสเท่ากับ 0.50 Unit/ml และในอาหาร LBG มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าที่เลี้ยงในกากมะพร้าว เนื่องจาก LBG มีองค์ประกอบของน้ำตาลกาแลคโตแมนแนนสูงซึ่งมีอัตราส่วนน้ำตาล แมนโนส : น้ำตาลกาแลคโตส เท่ากับ 4:1 (McCleary, 1979) ในขณะที่กากมะพร้าวมีความแข็งแรงเรียงตัวกันแบบผลึก (crystalline) มีอัตราส่วนน้ำตาล แมนโนส : น้ำตาลกาแลคโตส เท่ากับ 14:1 จึงทำให้กากมะพร้าว มีคุณสมบัติที่ละลายน้ำและย่อยสลายได้ยาก (Sunna et al., 2000)

ตาราง 4.4 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml) เมื่อเลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 1% (v/v) โดยใช้กากมะพร้าว 3 ระดับ คือ 1%, 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml)				
เวลา (h)	ชุดควบคุม LBG 1% (w/v)	กากมะพร้าว % (w/v)		
		1%	2%	3%
0	1.19	1.06 ^{Bb} ±0.00	1.25 ^{Aa} ±0.01	1.27 ^{Aa} ±0.00
3	1.10	1.13 ^{Ca} ±0.02	1.15 ^{ABc} ±0.01	1.17 ^{ABc} ±0.02
6	0.24	0.97 ^{Cd} ±0.01	1.15 ^{Bc} ±0.01	1.19 ^{Ab} ±0.01
12	0.26	1.12 ^{Ba} ±0.01	1.20 ^{Ab} ±0.02	1.14 ^{Bc} ±0.01
18	0.21	1.02 ^{Cc} ±0.03	1.11 ^{Bd} ±0.01	1.16 ^{Ac} ±0.00
24	0.32	1.06 ^{Cb} ±0.02	1.20 ^{Bb} ±0.01	1.15 ^{Ac} ±0.03
30	0.45	0.39 ^{Chi} ±0.03	0.57 ^{Be} ±0.02	0.48 ^{Agh} ±0.02
36	0.42	0.49 ^{Ce} ±0.01	0.58 ^{Be} ±0.02	0.54 ^{Ae} ±0.01
42	0.41	0.50 ^{Ae} ±0.00	0.49 ^{Agh} ±0.01	0.47 ^{Ahi} ±0.02
48	0.40	0.47 ^{Ae} ±0.02	0.48 ^{Agh} ±0.03	0.47 ^{Ahi} ±0.03
54	0.37	0.40 ^{Bh} ±0.01	0.40 ^{Bj} ±0.03	0.45 ^{Ahi} ±0.01
60	0.54	0.48 ^{Ccf} ±0.01	0.53 ^{Bf} ±0.01	0.61 ^{Ad} ±0.01
66	0.42	0.40 ^{Bh} ±0.01	0.43 ^{ABi} ±0.01	0.45 ^{Ai} ±0.02
72	0.51	0.43 ^{Bg} ±0.01	0.44 ^{Bi} ±0.02	0.50 ^{Afg} ±0.01
96	0.34	0.46 ^{Bf} ±0.01	0.47 ^{Bh} ±0.02	0.50 ^{Ahi} ±0.01
120	0.51	0.32 ^{Bj} ±0.03	0.48 ^{Agh} ±0.01	0.45 ^{Ahi} ±0.01
144	0.46	0.40 ^{Bh} ±0.00	0.51 ^{Af} ±0.02	0.52 ^{Aef} ±0.00
168	0.49	0.37 ^{Ci} ±0.02	0.48 ^{Bi} ±0.01	0.45 ^{Ai} ±0.01

A - C ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่กำกับต่างกันจากแนวแถวเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

a, b,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



ภาพประกอบ 4.6 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด mg/ml ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 1% (v/v) เมื่อเลี้ยงด้วยกากมะพร้าว 1% 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h

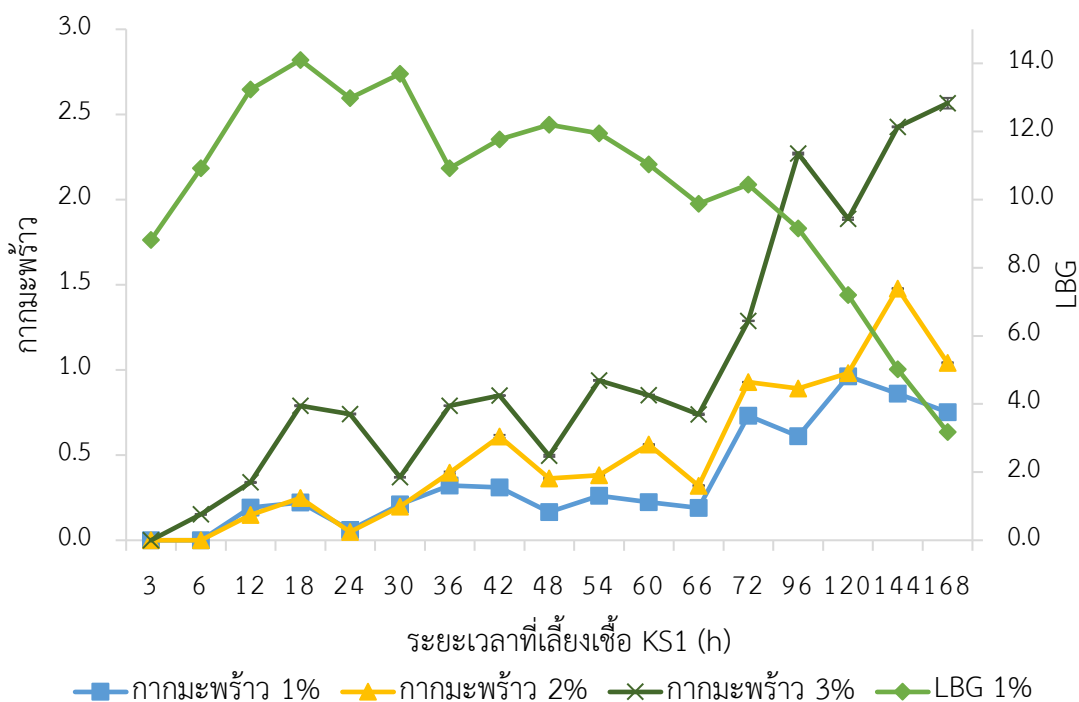
จากตาราง 4.4 และภาพประกอบ 4.6 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 1% (v/v) เมื่อเลี้ยงด้วยกากมะพร้าว 1% 2% และ 3% (w/v) และใช้อาหาร LBG เป็นชุดควบคุม เป็นเวลา 168 h พบว่าที่ระยะเวลา 0 h มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูง แต่เมื่อเวลาผ่านไป 6 h พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงอย่างรวดเร็วเนื่องจากใน LBG มีองค์ประกอบของกาแลคโตแมนแนนสูง เชื้อ KS1 จึงสามารถเจริญได้เร็ว แต่ที่ 30 h ให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะเพิ่มขึ้น ส่วนในอาหารที่ผสมกากมะพร้าวที่ 30 h มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะลดลงจะใช้ระยะเวลาในการย่อยนานกว่า LBG เนื่องจากกาแลคโตแมนแนน ในกากมะพร้าวจะมีความแข็งเรียงตัวกันแบบผลึก (crystalline) และมีอัตราส่วนของน้ำตาลแมนโนส:น้ำตาลกาแลคโตส เท่ากับ 14:1 ในขณะที่ LBG มีอัตราส่วนเท่ากับ 4:1 เพราะเหตุนี้จึงทำให้กากมะพร้าว มีคุณสมบัติที่ละลายน้ำและย่อยสลายได้ยาก (Sunna et al., 2000)

ตาราง 4.5 กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส (Unit/ml) เมื่อเลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 1% (v/v) โดยใช้กากมะพร้าว 3 ระดับ คือ 1%, 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h

กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส (Unit/ml)				
เวลา (h)	ชุดควบคุม LBG 1% (w/v)	กากมะพร้าว % (w/v)		
		1%	2%	3%
3	8.82	0.00 ^{An} ±0.00	0.00 ^{Ap} ±0.00	0.00 ^{An} ±0.00
6	10.92	0.00 ^{Bn} ±0.00	0.00 ^{Bp} ±0.00	0.15 ^{Am} ±0.00
12	13.24	0.19 ^{Bk} ±0.00	0.15 ^{Cn} ±0.00	0.34 ^{Al} ±0.00
18	14.10	0.22 ^{Cl} ±0.00	0.25 ^{Bl} ±0.01	0.79 ^{Ah} ±0.00
24	12.97	0.06 ^{Bm} ±0.00	0.05 ^{Co} ±0.00	0.74 ^{Ai} ±0.00
30	13.69	0.21 ^{Bj} ±0.01	0.20 ^{Cm} ±0.00	0.37 ^{Ak} ±0.00
36	10.92	0.32 ^{Cf} ±0.01	0.40 ^{Bh} ±0.01	0.79 ^{Ah} ±0.00
42	11.77	0.31 ^{Cg} ±0.00	0.61 ^{Bf} ±0.01	0.85 ^{Ag} ±0.00
48	12.20	0.16 ^{Cl} ±0.01	0.36 ^{Bj} ±0.01	0.50 ^{Aj} ±0.01
54	11.94	0.26 ^{Ch} ±0.00	0.38 ^{Bi} ±0.00	0.94 ^{Af} ±0.00
60	11.03	0.22 ^{Cl} ±0.01	0.56 ^{Bg} ±0.00	0.85 ^{Ag} ±0.00
66	9.88	0.19 ^{Ck} ±0.00	0.32 ^{Bk} ±0.00	0.74 ^{Ai} ±0.00
72	10.44	0.73 ^{Cd} ±0.01	0.93 ^{Bd} ±0.00	1.29 ^{Ae} ±0.00
96	9.15	0.61 ^{Ce} ±0.01	0.89 ^{Be} ±0.01	2.27 ^{Ac} ±0.01
120	7.20	0.96 ^{Ca} ±0.00	0.98 ^{Bc} ±0.00	1.89 ^{Ad} ±0.01
144	5.02	0.86 ^{Cb} ±0.00	1.48 ^{Ba} ±0.00	2.43 ^{Ab} ±0.00
168	3.18	0.75 ^{Cc} ±0.00	1.04 ^{Bb} ±0.00	2.57 ^{Aa} ±0.03

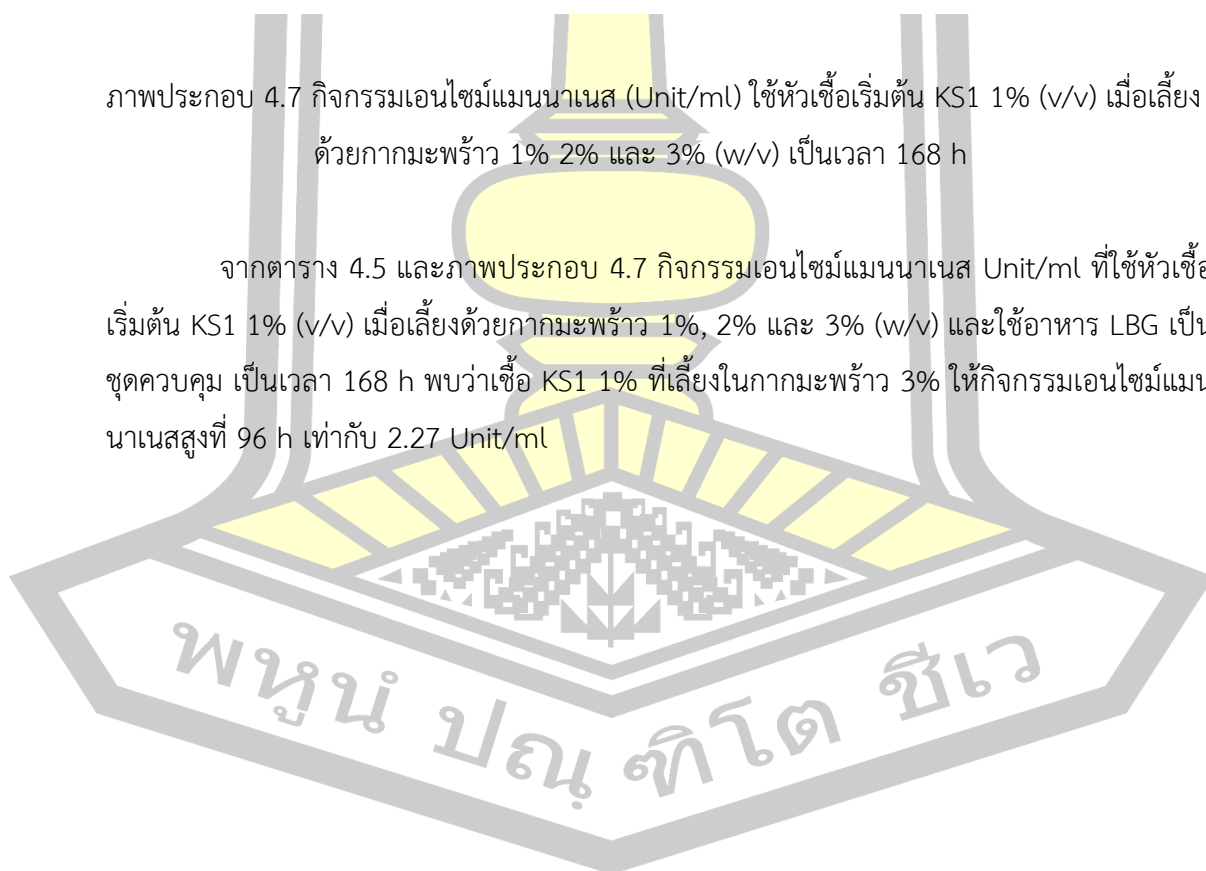
A - C ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่กำกับต่างกันจากแนวแถวเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

a, b,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)



ภาพประกอบ 4.7 กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส (Unit/ml) ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 1% (v/v) เมื่อเลี้ยงด้วยกากมะพร้าว 1% 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h

จากตาราง 4.5 และภาพประกอบ 4.7 กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส Unit/ml ที่ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 1% (v/v) เมื่อเลี้ยงด้วยกากมะพร้าว 1%, 2% และ 3% (w/v) และใช้อาหาร LBG เป็นชุดควบคุม เป็นเวลา 168 h พบว่าเชื้อ KS1 1% ที่เลี้ยงในกากมะพร้าว 3% ให้กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสสูงที่ 96 h เท่ากับ 2.27 Unit/ml



ตาราง 4.6 การจำแนกแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ เลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 1% ในกากมะพร้าว 1% เป็นเวลา 96 h น้ำตาลรีดิวซ์ 0.77 (mg/ml) กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส 0.61 (Unit/ml)

การทดลอง (ซ้ำ)	แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (mg/ml)					มอซทั้งหมด (M5-M3)
	M5	M4	M3	M2	M1	
1	nd	42.259	0.789	0.257	1.006	43.048
2	nd	42.262	0.789	0.257	1.019	43.051
$\bar{X} \pm SD$	nd	42.26 \pm 0.00	0.79 \pm 0.00	0.26 \pm 0.00	1.01 \pm 0.01	43.05 \pm 0.00

M1= แมนโนส M2= แมนโนไบโอส M3= แมนโนไตรโอส M4= แมนโนเตตราโอส M5= แมนโนเพนโตส

\bar{X} = ค่าเฉลี่ย และ SD= ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน nd= not detected

ตาราง 4.7 การจำแนกแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ เลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 1% ในกากมะพร้าว 3% เป็นเวลา 48 h น้ำตาลรีดิวซ์ 1.20 (mg/ml) กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส 0.50 (Unit/ml)

การทดลอง (ซ้ำ)	แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (mg/ml)					มอซทั้งหมด (M5-M3)
	M5	M4	M3	M2	M1	
1	4.297	19.698	0.362	nd	0.741	24.357
2	4.770	20.503	0.329	nd	0.729	25.602
$\bar{X} \pm SD$	4.53 \pm 0.33	20.10 \pm 0.57	0.35 \pm 0.02	nd	0.74 \pm 0.01	24.98 \pm .88

M1= แมนโนส M2= แมนโนไบโอส M3= แมนโนไตรโอส M4= แมนโนเตตราโอส M5= แมนโนเพนโตส

\bar{X} = ค่าเฉลี่ย และ SD= ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน nd= not detected

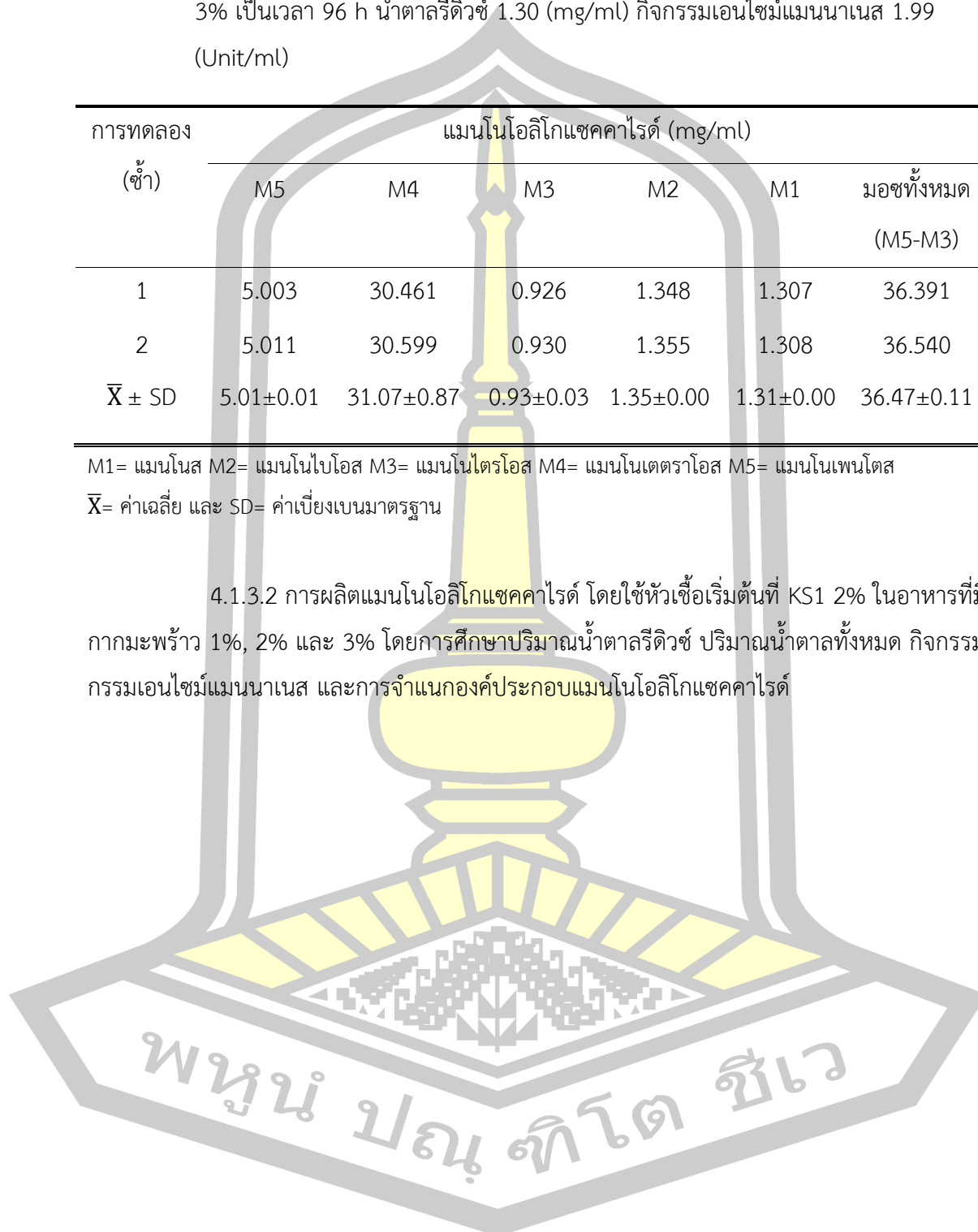
ตาราง 4.8 การจำแนกแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ เลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 1% ในกากมะพร้าว 3% เป็นเวลา 96 h น้ำตาลรีดิวซ์ 1.30 (mg/ml) กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส 1.99 (Unit/ml)

การทดลอง (ซ้ำ)	แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (mg/ml)					มอซทั้งหมด (M5-M3)
	M5	M4	M3	M2	M1	
1	5.003	30.461	0.926	1.348	1.307	36.391
2	5.011	30.599	0.930	1.355	1.308	36.540
$\bar{X} \pm SD$	5.01±0.01	31.07±0.87	0.93±0.03	1.35±0.00	1.31±0.00	36.47±0.11

M1= แมนโนส M2= แมนโนไบโอส M3= แมนโนไตรโอส M4= แมนโนเตตราโอส M5= แมนโนเพนโตส

\bar{X} = ค่าเฉลี่ย และ SD= ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

4.1.3.2 การผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นที่ KS1 2% ในอาหารที่มีกากมะพร้าว 1%, 2% และ 3% โดยการศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส และการจำแนกองค์ประกอบแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์

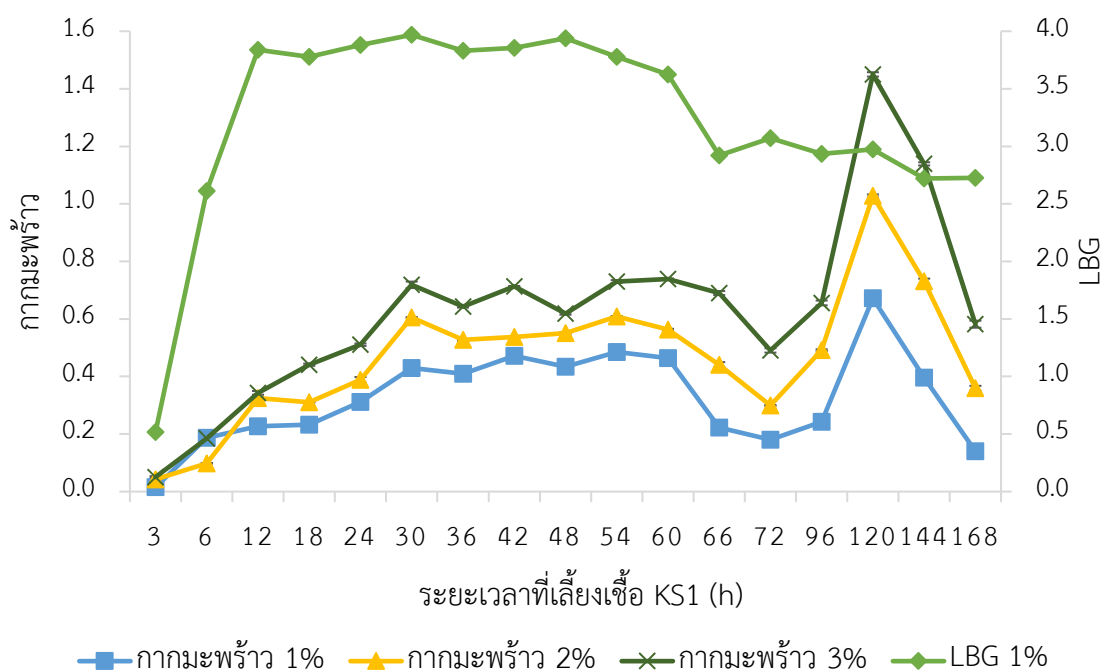


ตาราง 4.9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml) เมื่อเลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 2% (v/v) โดยใช้กากมะพร้าว 3 ระดับ คือ 1%, 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)				
เวลา (h)	ชุดควบคุม LBG 1% (w/v)	กากมะพร้าว % (w/v)		
		1%	2%	3%
3	0.52	0.02 ^{CI} ±0.00	0.04 ^{Bp} ±0.00	0.05 ^{AO} ±0.00
6	2.61	0.19 ^{Ag} ±0.00	0.10 ^{Bo} ±0.00	0.18 ^{An} ±0.00
12	3.84	0.23 ^{Cf} ±0.00	0.32 ^{Bl} ±0.01	0.34 ^{Am} ±0.01
18	3.78	0.23 ^{Cf} ±0.00	0.31 ^{Bm} ±0.00	0.44 ^{Al} ±0.00
24	3.88	0.31 ^{Be} ±0.01	0.39 ^{Bj} ±0.01	0.51 ^{Aj} ±0.00
30	3.97	0.43 ^{Cc} ±0.00	0.60 ^{Bc} ±0.00	0.72 ^{Ad} ±0.01
36	3.83	0.41 ^{Cbc} ±0.00	0.53 ^{Bg} ±0.00	0.64 ^{Ag} ±0.00
42	3.86	0.47 ^{Cb} ±0.01	0.54 ^{Bf} ±0.00	0.71 ^{Ad} ±0.00
48	3.94	0.43 ^{Cc} ±0.02	0.55 ^{Be} ±0.00	0.62 ^{Ah} ±0.00
54	3.78	0.49 ^{Cb} ±0.01	0.61 ^{Bc} ±0.00	0.73 ^{Ac} ±0.01
60	3.63	0.46 ^{Cb} ±0.01	0.56 ^{Bd} ±0.00	0.74 ^{Ac} ±0.00
66	2.92	0.22 ^{Cf} ±0.01	0.44 ^{Bi} ±0.01	0.69 ^{Ae} ±0.01
72	3.07	0.18 ^{Cg} ±0.00	0.30 ^{Bm} ±0.00	0.49 ^{Ak} ±0.01
96	2.94	0.24 ^{Cf} ±0.01	0.49 ^{Bh} ±0.00	0.66 ^{Af} ±0.01
120	2.97	0.67 ^{Ca} ±0.01	1.03 ^{Ba} ±0.01	1.45 ^{Aa} ±0.01
144	2.72	0.40 ^{Cd} ±0.01	0.73 ^{Bb} ±0.01	1.14 ^{Ab} ±0.01
168	2.73	0.14 ^{Ch} ±0.00	0.36 ^{Bk} ±0.01	0.58 ^{Ai} ±0.01

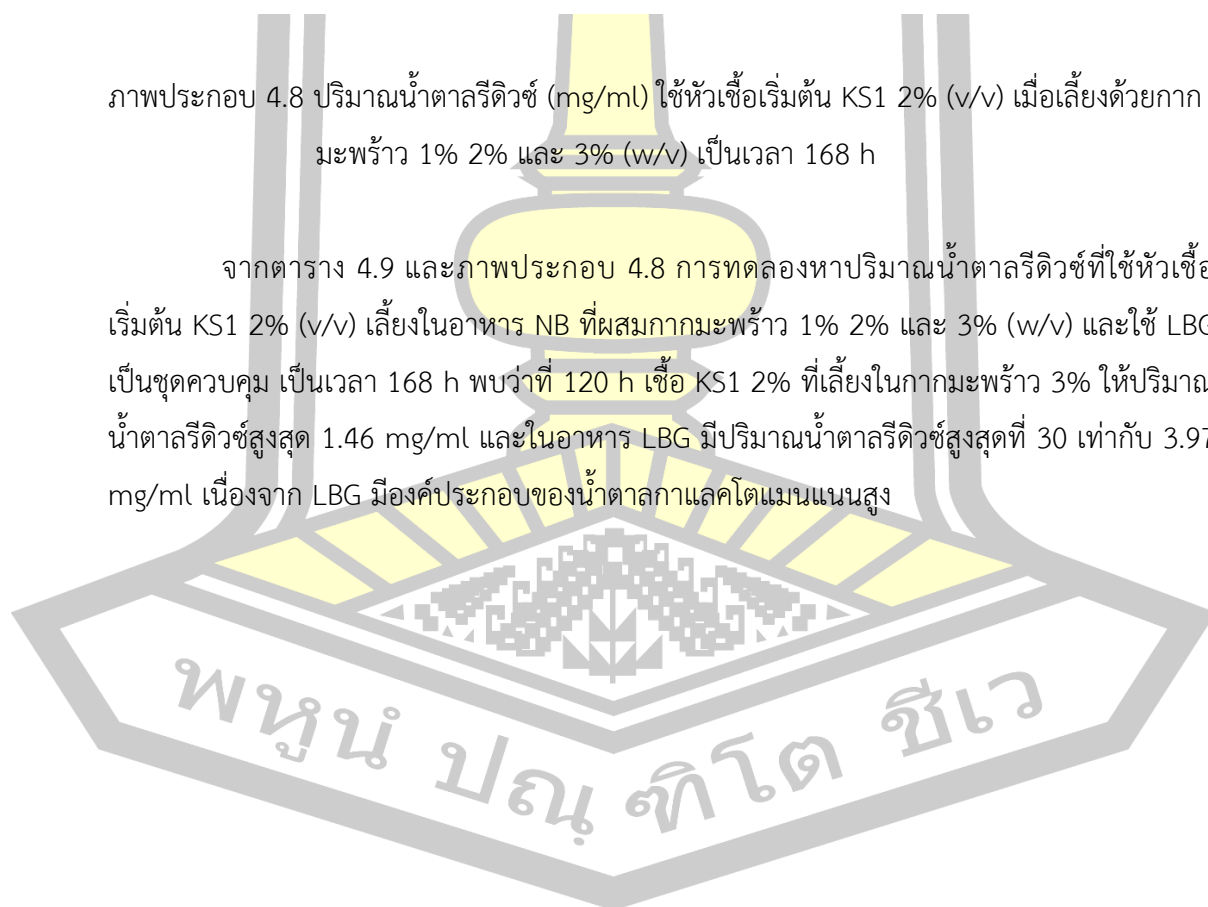
A - C ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่กำกับต่างกันจากแนวแถวเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

a, b,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



ภาพประกอบ 4.8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml) ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 2% (v/v) เมื่อเลี้ยงด้วยกากมะพร้าว 1% 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h

จากตาราง 4.9 และภาพประกอบ 4.8 การทดลองหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 2% (v/v) เลี้ยงในอาหาร NB ที่ผสมกากมะพร้าว 1% 2% และ 3% (w/v) และใช้ LBG เป็นชุดควบคุม เป็นเวลา 168 h พบว่าที่ 120 h เชื้อ KS1 2% ที่เลี้ยงในกากมะพร้าว 3% ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด 1.46 mg/ml และในอาหาร LBG มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่ 30 เท่ากับ 3.97 mg/ml เนื่องจาก LBG มีองค์ประกอบของน้ำตาลกลูโคสและโกลิโคเจนสูง

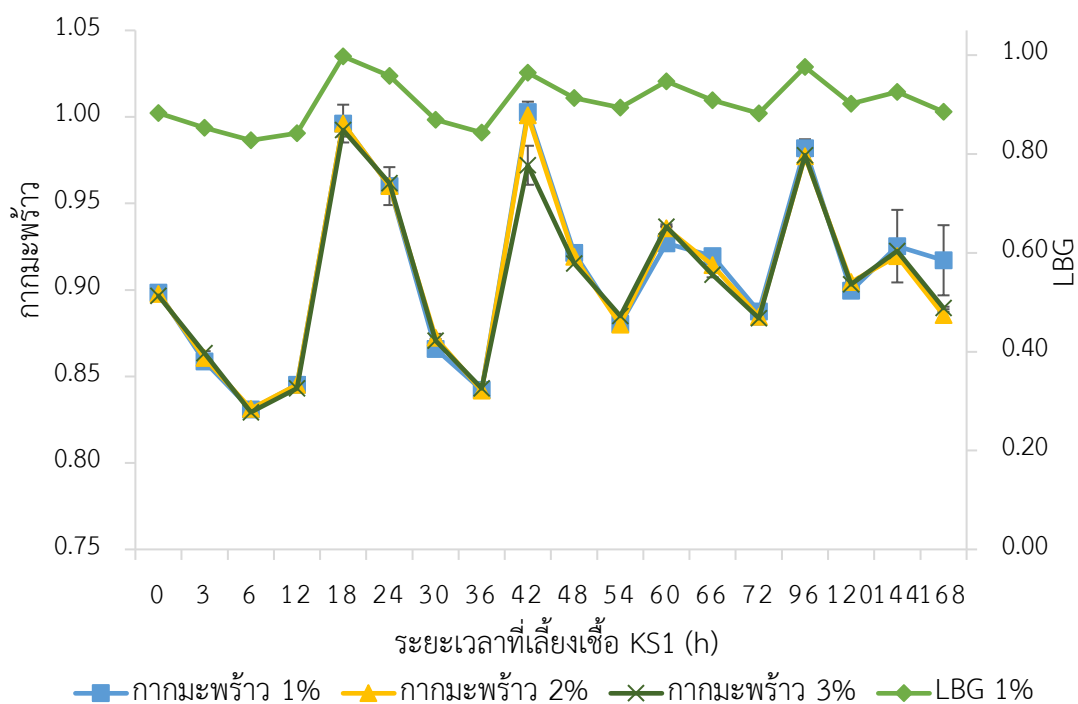


ตาราง 4.10 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml) เมื่อเลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 2% (v/v) โดยใช้กากมะพร้าว 3 ระดับ คือ 1%, 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml)				
เวลา (h)	ชุดควบคุม LBG 1% (w/v)	กากมะพร้าว % (w/v)		
		1%	2%	3%
0	0.88	0.90 ^{Ae} ±0.00	0.90 ^{AI} ±0.00	0.90 ^{Ah} ±0.00
3	0.85	0.86 ^{Bhi} ±0.00	0.86 ^{ABm} ±0.00	0.86 ^{Al} ±0.00
6	0.83	0.83 ^{Aj} ±0.00	0.83 ^{Ac} ±0.00	0.83 ^{An} ±0.00
12	0.84	0.85 ^{Aij} ±0.00	0.85 ^{Ah} ±0.00	0.84 ^{Am} ±0.00
18	1.00	1.00 ^{Aab} ±0.01	1.00 ^{Ab} ±0.00	0.99 ^{Aa} ±0.00
24	0.96	0.96 ^{Ac} ±0.01	0.96 ^{Ad} ±0.00	0.96 ^{Ac} ±0.00
30	0.87	0.87 ^{Bgh} ±0.00	0.87 ^{Al} ±0.00	0.87 ^{Ak} ±0.00
36	0.84	0.84 ^{Aj} ±0.00	0.84 ^{Ah} ±0.00	0.84 ^{Am} ±0.00
42	0.96	1.00 ^{Aa} ±0.01	1.00 ^{Aa} ±0.00	0.97 ^{Bb} ±0.01
48	0.91	0.92 ^{Ad} ±0.00	0.92 ^{Af} ±0.00	0.92 ^{Bf} ±0.00
54	0.89	0.88 ^{Afg} ±0.00	0.88 ^{Bk} ±0.00	0.88 ^{Bij} ±0.00
60	0.95	0.93 ^{Bd} ±0.00	0.94 ^{Ae} ±0.00	0.94 ^{Ad} ±0.00
66	0.91	0.92 ^{Ad} ±0.00	0.91 ^{Ag} ±0.00	0.91 ^{Bg} ±0.00
72	0.88	0.89 ^{Aef} ±0.00	0.88 ^{Aj} ±0.00	0.88 ^{Aj} ±0.00
96	0.98	0.98 ^{Ab} ±0.01	0.98 ^{Ac} ±0.00	0.98 ^{Ab} ±0.00
120	0.90	0.90 ^{Ce} ±0.00	0.90 ^{Ah} ±0.00	0.90 ^{Bg} ±0.00
144	0.93	0.93 ^{Ad} ±0.02	0.92 ^{Af} ±0.00	0.92 ^{Ae} ±0.00
168	0.89	0.92 ^{Ad} ±0.02	0.89 ^{Bj} ±0.00	0.89 ^{Bi} ±0.00

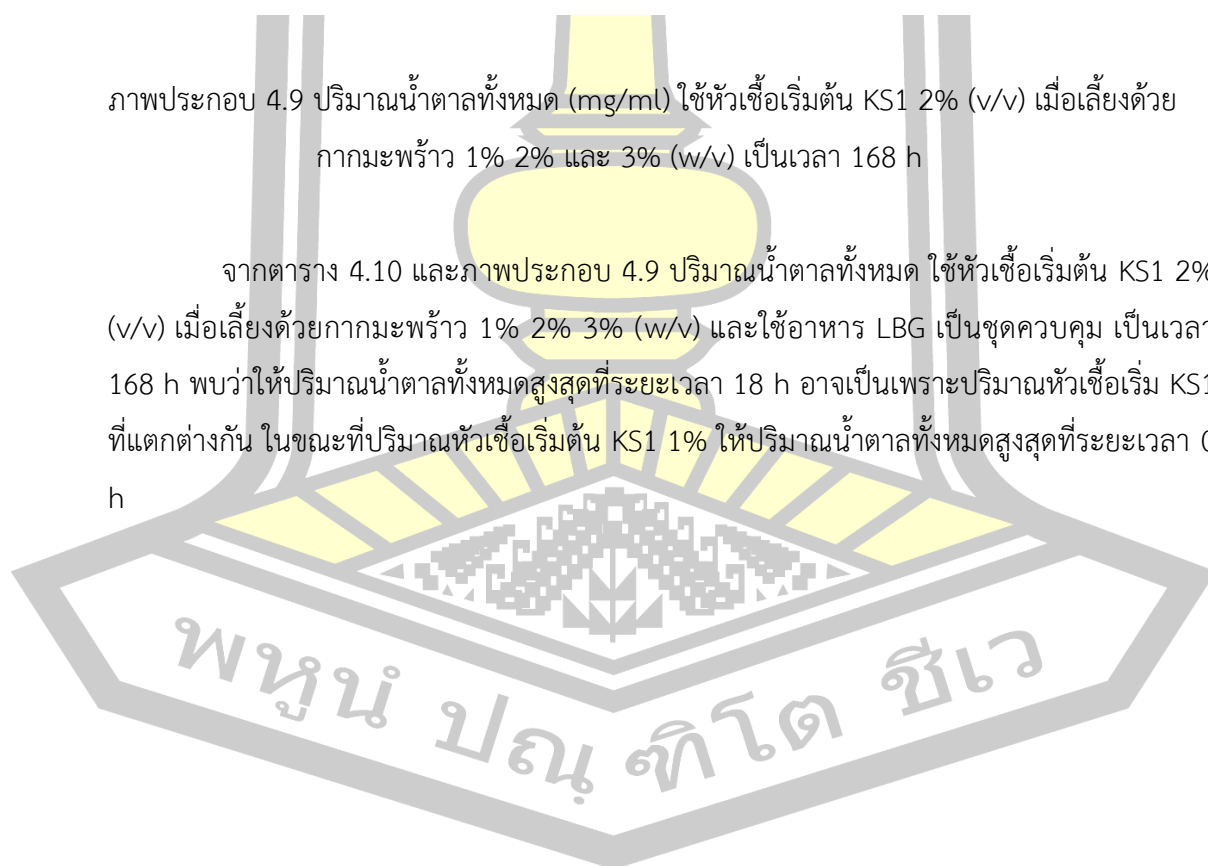
A - C ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่กำกับต่างกันจากแนวแถวเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

a, b,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



ภาพประกอบ 4.9 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml) ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 2% (v/v) เมื่อเลี้ยงด้วยกากมะพร้าว 1% 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h

จากตาราง 4.10 และภาพประกอบ 4.9 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 2% (v/v) เมื่อเลี้ยงด้วยกากมะพร้าว 1% 2% 3% (w/v) และใช้อาหาร LBG เป็นชุดควบคุม เป็นเวลา 168 h พบว่าให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงสุดที่ระยะเวลา 18 h อาจเป็นเพราะปริมาณหัวเชื้อเริ่ม KS1 ที่แตกต่างกัน ในขณะที่ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 1% ให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงสุดที่ระยะเวลา 0 h

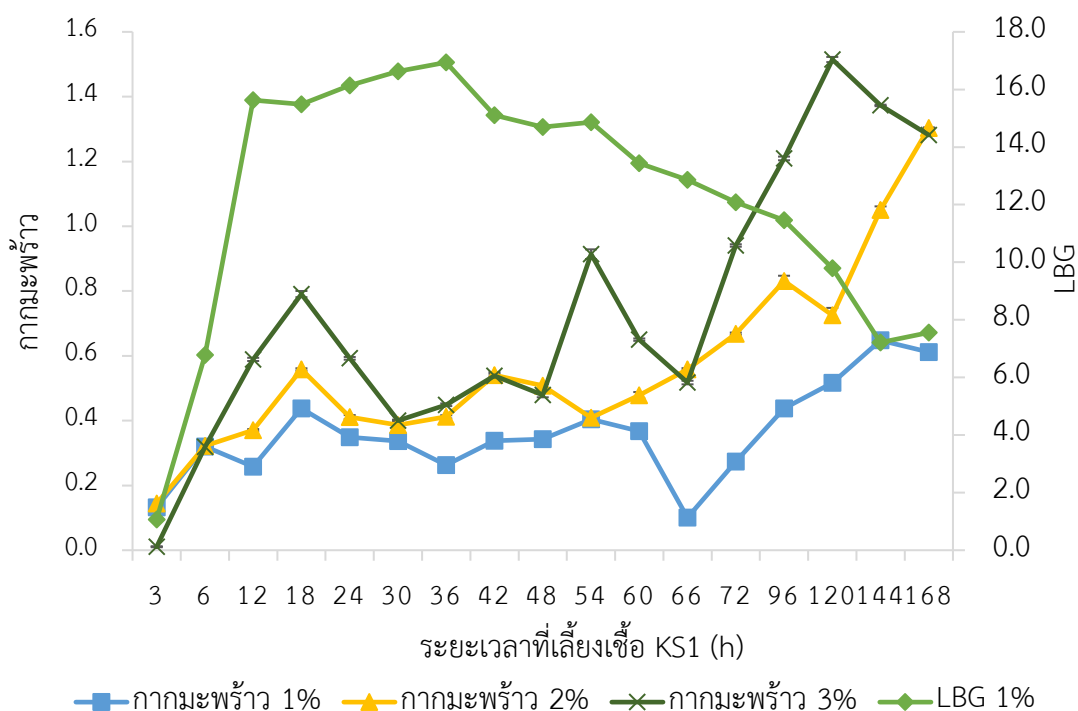


ตาราง 4.11 กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส (Unit/ml) เมื่อเลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 2% (v/v) โดยใช้กากมะพร้าว 3 ระดับ คือ 1%, 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h

กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส (Unit/ml)				
เวลา (h)	ชุดควบคุม LBG 1% (w/v)	กากมะพร้าว % (w/v)		
		1%	2%	3%
3	1.07	0.13 ^{Bk} ±0.00	0.14 ^{An} ±0.00	0.01 ^{Cp} ±0.00
6	6.78	0.32 ^{Ah} ±0.00	0.32 ^{Am} ±0.00	0.32 ^{Ao} ±0.01
12	15.63	0.26 ^{Cj} ±0.01	0.37 ^{Bl} ±0.00	0.59 ^{Ai} ±0.00
18	15.48	0.44 ^{Cd} ±0.00	0.56 ^{Bf} ±0.00	0.79 ^{Ag} ±0.01
24	16.14	0.35 ^{Cg} ±0.01	0.41 ^{Bj} ±0.01	0.59 ^{Ai} ±0.00
30	16.64	0.34 ^{Cg} ±0.01	0.39 ^{Bk} ±0.01	0.40 ^{An} ±0.00
36	16.94	0.26 ^{Cij} ±0.00	0.41 ^{Bj} ±0.00	0.45 ^{Am} ±0.00
42	15.11	0.34 ^{Bg} ±0.00	0.54 ^{Ag} ±0.00	0.54 ^{Aj} ±0.01
48	14.70	0.34 ^{Cg} ±0.02	0.51 ^{Ah} ±0.01	0.48 ^{Bl} ±0.01
54	14.86	0.40 ^{Be} ±0.01	0.41 ^{Bj} ±0.01	0.91 ^{Af} ±0.02
60	13.44	0.37 ^{Cf} ±0.01	0.48 ^{Bi} ±0.01	0.65 ^{Ah} ±0.00
66	12.86	0.10 ^{Cl} ±0.01	0.56 ^{Bf} ±0.00	0.52 ^{Ak} ±0.01
72	12.08	0.27 ^{Cl} ±0.01	0.67 ^{Be} ±0.00	0.94 ^{Ae} ±0.00
96	11.46	0.44 ^{Cd} ±0.01	0.83 ^{Bc} ±0.02	1.21 ^{Ad} ±0.01
120	9.79	0.52 ^{Cc} ±0.00	0.73 ^{Bd} ±0.02	1.51 ^{Aa} ±0.01
144	7.22	0.65 ^{Ca} ±0.00	1.05 ^{Bb} ±0.01	1.37 ^{Ab} ±0.00
168	7.56	0.61 ^{Cb} ±0.01	1.30 ^{Aa} ±0.00	1.28 ^{Bc} ±0.00

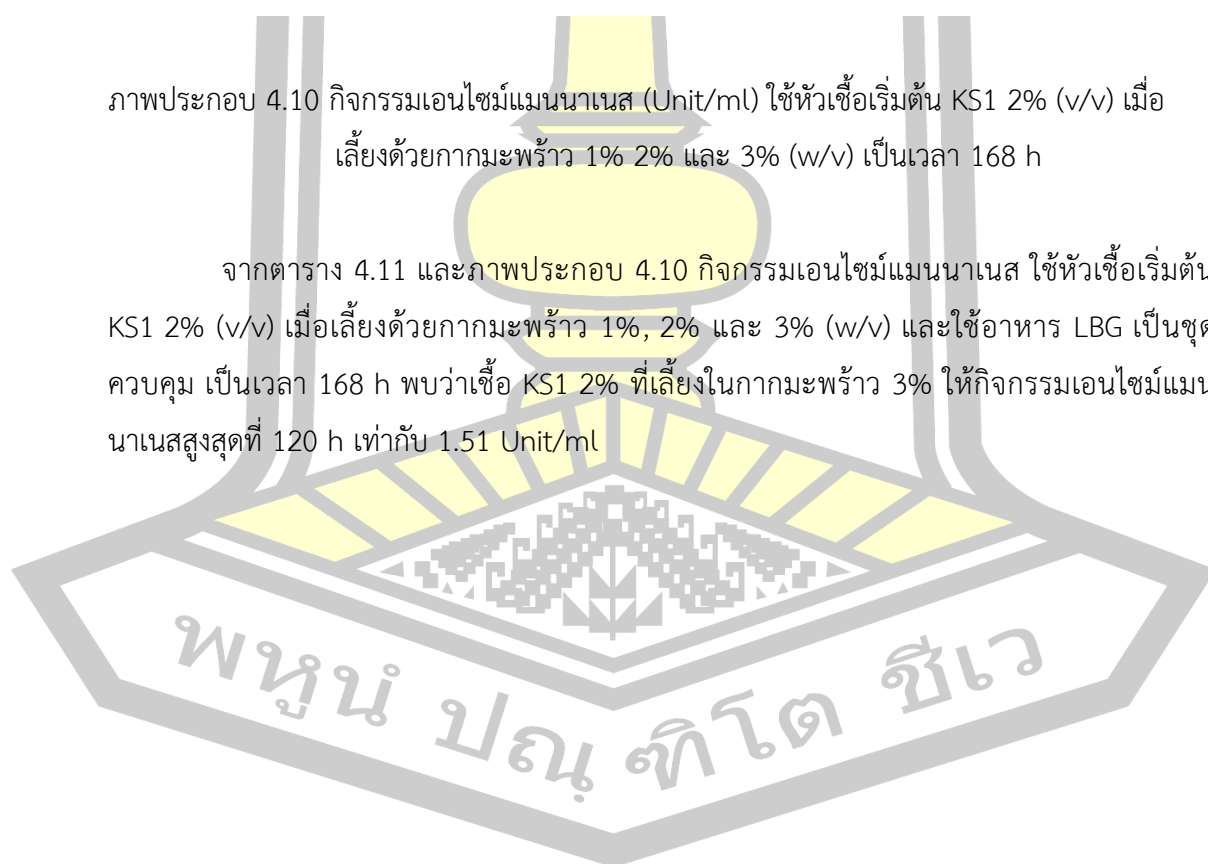
A - C ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่กำกับต่างกันจากแนวแถวเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

a, b,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



ภาพประกอบ 4.10 กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส (Unit/ml) ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 2% (v/v) เมื่อเลี้ยงด้วยกากมะพร้าว 1% 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h

จากตาราง 4.11 และภาพประกอบ 4.10 กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 2% (v/v) เมื่อเลี้ยงด้วยกากมะพร้าว 1%, 2% และ 3% (w/v) และใช้อาหาร LBG เป็นชุดควบคุม เป็นเวลา 168 h พบว่าเชื้อ KS1 2% ที่เลี้ยงในกากมะพร้าว 3% ให้กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสสูงสุดที่ 120 h เท่ากับ 1.51 Unit/ml



ตาราง 4.12 การจำแนกแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์เลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 2% ในกากมะพร้าว 1% เป็นเวลา 120 h น้ำตาลรีดิวซ์ 0.67 (mg/ml) กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส 0.52 (Unit/ml)

การทดลอง (ซ้ำ)	แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (mg/ml)					มอชทั้งหมด (M5-M3)
	M5	M4	M3	M2	M1	
1	nd	30.206	0.145	0.206	nd	30.352
2	nd	30.234	0.146	0.117	nd	30.379
$\bar{X} \pm SD$	nd	30.22±0.02	0.15±0.00	0.16±0.06	nd	30.37±0.02

M1= แมนโนส M2= แมนโนไบโอส M3= แมนโนไตรโอส M4= แมนโนเตตราโอส M5= แมนโนเพนโตส

\bar{X} = ค่าเฉลี่ย และ SD= ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน nd= not detected

ตาราง 4.13 การจำแนกแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์เลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 2% ในกากมะพร้าว 2% เป็นเวลา 120 h น้ำตาลรีดิวซ์ 1.03 (mg/ml) กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส 0.73 (Unit/ml)

การทดลอง (ซ้ำ)	แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (mg/ml)					มอชทั้งหมด (M5-M3)
	M5	M4	M3	M2	M1	
1	nd	33.479	1.256	1.256	1.000	34.307
2	nd	33.475	1.257	1.257	1.000	34.304
$\bar{X} \pm SD$	nd	33.48±0.00	0.83±0.00	1.26±0.00	1.00±0.00	34.31±0.00

M1= แมนโนส M2= แมนโนไบโอส M3= แมนโนไตรโอส M4= แมนโนเตตราโอส M5= แมนโนเพนโตส

\bar{X} = ค่าเฉลี่ย และ SD= ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน nd= not detected

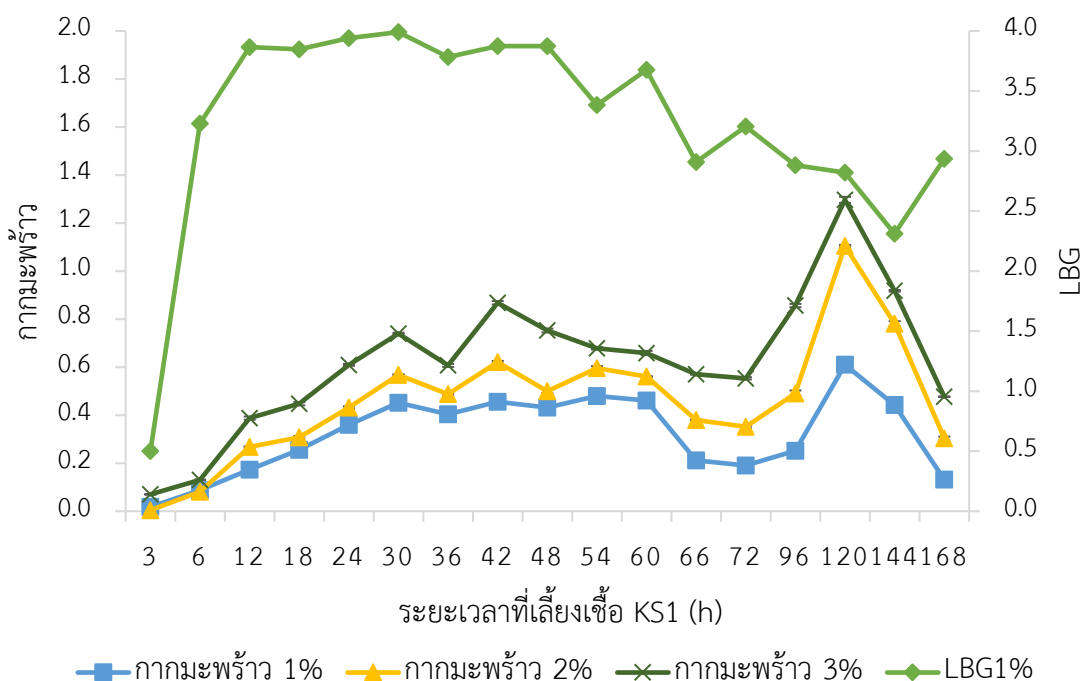
4.1.3.2 การผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นที่ KS1 3% ในอาหารที่มีกากมะพร้าว 1%, 2% และ 3% โดยการศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส และการจำแนกองค์ประกอบแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์

ตาราง 4.14 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml) เมื่อเลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 3% (v/v) โดยใช้กากมะพร้าว 3 ระดับ คือ 1%, 2% และ 3% (w/v) ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก 168 h

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)				
เวลา (h)	ชุดควบคุม LBG 1% (w/v)	กากมะพร้าว % (w/v)		
		1%	2%	3%
3	0.50	0.02 ^{Co} ±0.00	0.00 ^{Bn} ±0.00	0.07 ^{Ap} ±0.00
6	3.23	0.09 ^{Bn} ±0.00	0.08 ^{Cm} ±0.00	0.13 ^{Ao} ±0.00
12	3.87	0.17 ^{Bl} ±0.00	0.27 ^{Bl} ±0.00	0.39 ^{An} ±0.01
18	3.85	0.26 ^{Ci} ±0.00	0.31 ^{Bk} ±0.01	0.45 ^{Am} ±0.01
24	3.94	0.36 ^{Ch} ±0.00	0.43 ^{Bh} ±0.01	0.61 ^{Ai} ±0.00
30	3.99	0.45 ^{Cd} ±0.00	0.57 ^{Bc} ±0.00	0.74 ^{Af} ±0.00
36	3.78	0.40 ^{Cg} ±0.00	0.49 ^{Bg} ±0.00	0.61 ^{Ai} ±0.01
42	3.88	0.46 ^{Cc} ±0.01	0.62 ^{Bc} ±0.01	0.87 ^{Ac} ±0.01
48	3.87	0.43 ^{Cf} ±0.00	0.50 ^{Bf} ±0.01	0.75 ^{Ae} ±0.01
54	3.38	0.48 ^{Cb} ±0.01	0.60 ^{Bd} ±0.01	0.68 ^{Ag} ±0.01
60	3.68	0.46 ^{Cc} ±0.00	0.56 ^{Bc} ±0.00	0.66 ^{Ah} ±0.01
66	2.91	0.21 ^{Cj} ±0.00	0.38 ^{Bi} ±0.00	0.57 ^{Aj} ±0.00
72	3.21	0.19 ^{Ck} ±0.00	0.35 ^{Bj} ±0.00	0.55 ^{Ak} ±0.00
96	2.88	0.25 ^{Ci} ±0.00	0.49 ^{Bfg} ±0.01	0.86 ^{Ad} ±0.01
120	2.82	0.61 ^{Ca} ±0.00	1.10 ^{Ba} ±0.00	1.30 ^{Aa} ±0.01
144	2.31	0.44 ^{Ce} ±0.01	0.78 ^{Bb} ±0.01	0.92 ^{Ab} ±0.00
168	2.94	0.13 ^{Cm} ±0.00	0.30 ^{Bk} ±0.01	0.48 ^{Al} ±0.00

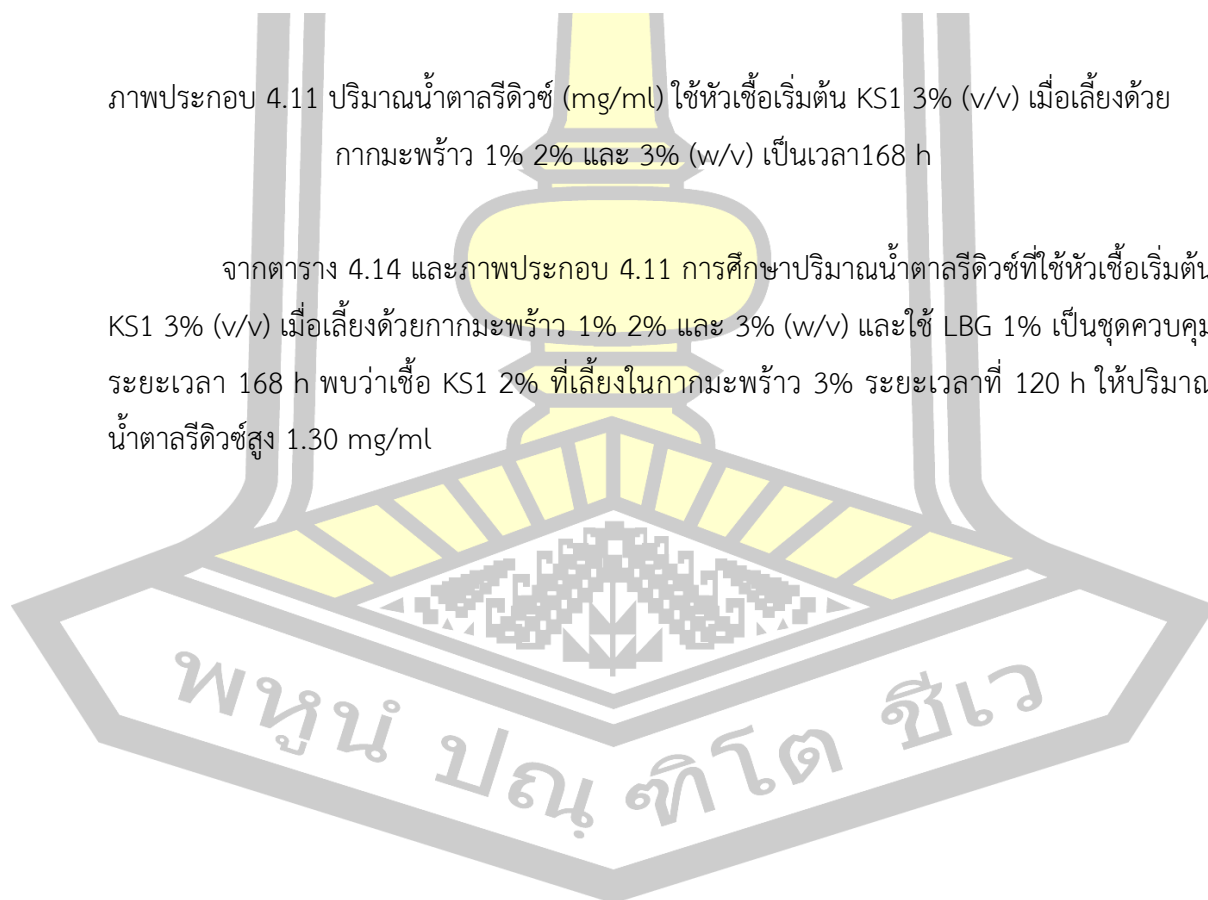
A - C ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่กำกับต่างกันจากแนวแถวเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

a, b,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



ภาพประกอบ 4.11 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml) ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 3% (v/v) เมื่อเลี้ยงด้วยกากมะพร้าว 1% 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h

จากตาราง 4.14 และภาพประกอบ 4.11 การศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 3% (v/v) เมื่อเลี้ยงด้วยกากมะพร้าว 1% 2% และ 3% (w/v) และใช้ LBG 1% เป็นชุดควบคุม ระยะเวลา 168 h พบว่าเชื้อ KS1 2% ที่เลี้ยงในกากมะพร้าว 3% ระยะเวลาที่ 120 h ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูง 1.30 mg/ml

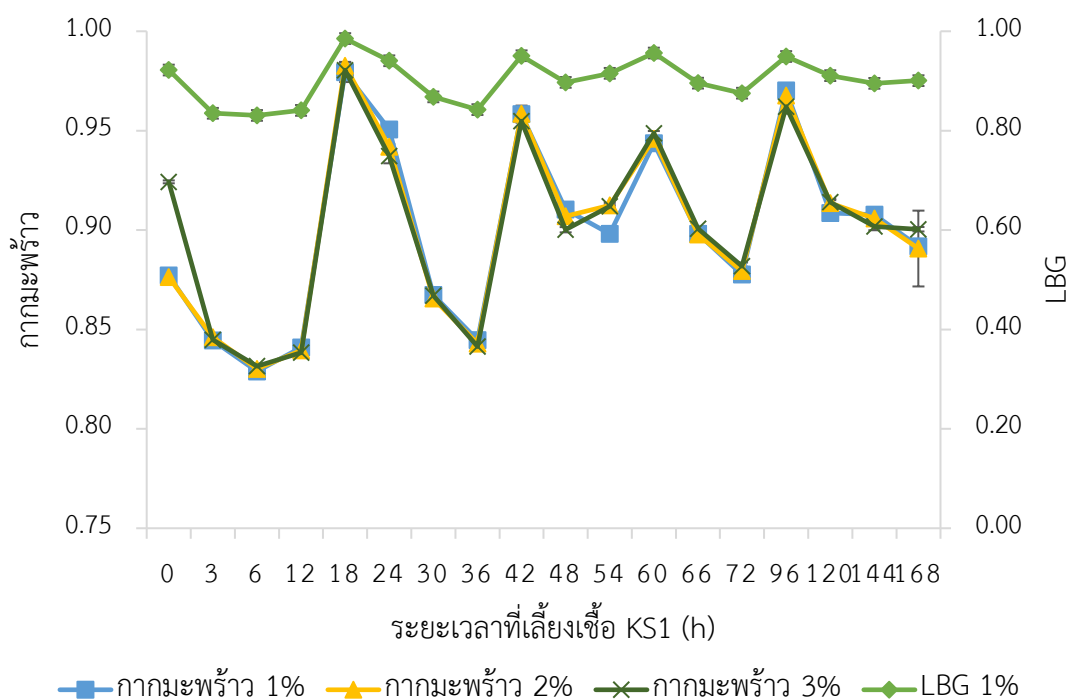


ตาราง 4.15 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml) เมื่อเลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 3% (v/v) โดยใช้กากมะพร้าว 3 ระดับ คือ 1%, 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml)				
เวลา (h)	ชุดควบคุม LBG 1% (w/v)	กากมะพร้าว % (w/v)		
		1%	2%	3%
0	0.92	0.88 ^{Ai} ±0.00	0.88 ^{Ah} ±0.00	0.92 ^{Af} ±0.00
3	0.84	0.84 ^{Ak} ±0.00	0.85 ^{Aj} ±0.00	0.84 ^{Ak} ±0.00
6	0.83	0.83 ^{Bl} ±0.00	0.83 ^{ABk} ±0.00	0.83 ^{Am} ±0.00
12	0.84	0.84 ^{Ak} ±0.00	0.84 ^{As} ±0.00	0.84 ^{Al} ±0.00
18	0.99	0.98 ^{Aa} ±0.00	0.98 ^{Aa} ±0.00	0.98 ^{Aa} ±0.00
24	0.94	0.95 ^{Ad} ±0.00	0.94 ^{Bd} ±0.00	0.94 ^{Be} ±0.00
30	0.87	0.87 ^{Aj} ±0.00	0.87 ^{Ai} ±0.00	0.87 ^{Aj} ±0.00
36	0.84	0.84 ^{Ak} ±0.00	0.84 ^{As} ±0.00	0.84 ^{Akl} ±0.00
42	0.95	0.96 ^{Ac} ±0.00	0.96 ^{Ac} ±0.00	0.95 ^{Ac} ±0.00
48	0.90	0.91 ^{Af} ±0.00	0.91 ^{Bef} ±0.00	0.90 ^{Ch} ±0.00
54	0.92	0.90 ^{Bg} ±0.00	0.91 ^{Ae} ±0.00	0.91 ^{Ag} ±0.00
60	0.96	0.94 ^{Be} ±0.00	0.95 ^{ABd} ±0.00	0.95 ^{Ad} ±0.00
66	0.90	0.90 ^{Ag} ±0.00	0.90 ^{Afg} ±0.00	0.90 ^{Ah} ±0.00
72	0.88	0.88 ^{Ai} ±0.00	0.88 ^{Ah} ±0.00	0.88 ^{Ai} ±0.00
96	0.95	0.97 ^{Ab} ±0.00	0.97 ^{ABb} ±0.00	0.96 ^{Bb} ±0.00
120	0.91	0.91 ^{Bf} ±0.00	0.91 ^{Ae} ±0.00	0.91 ^{Ag} ±0.00
144	0.90	0.91 ^{Af} ±0.00	0.91 ^{Aef} ±0.00	0.90 ^{Bh} ±0.00
168	0.90	0.89 ^{Ah} ±0.00	0.89 ^{Ag} ±0.02	0.90 ^{Ah} ±0.00

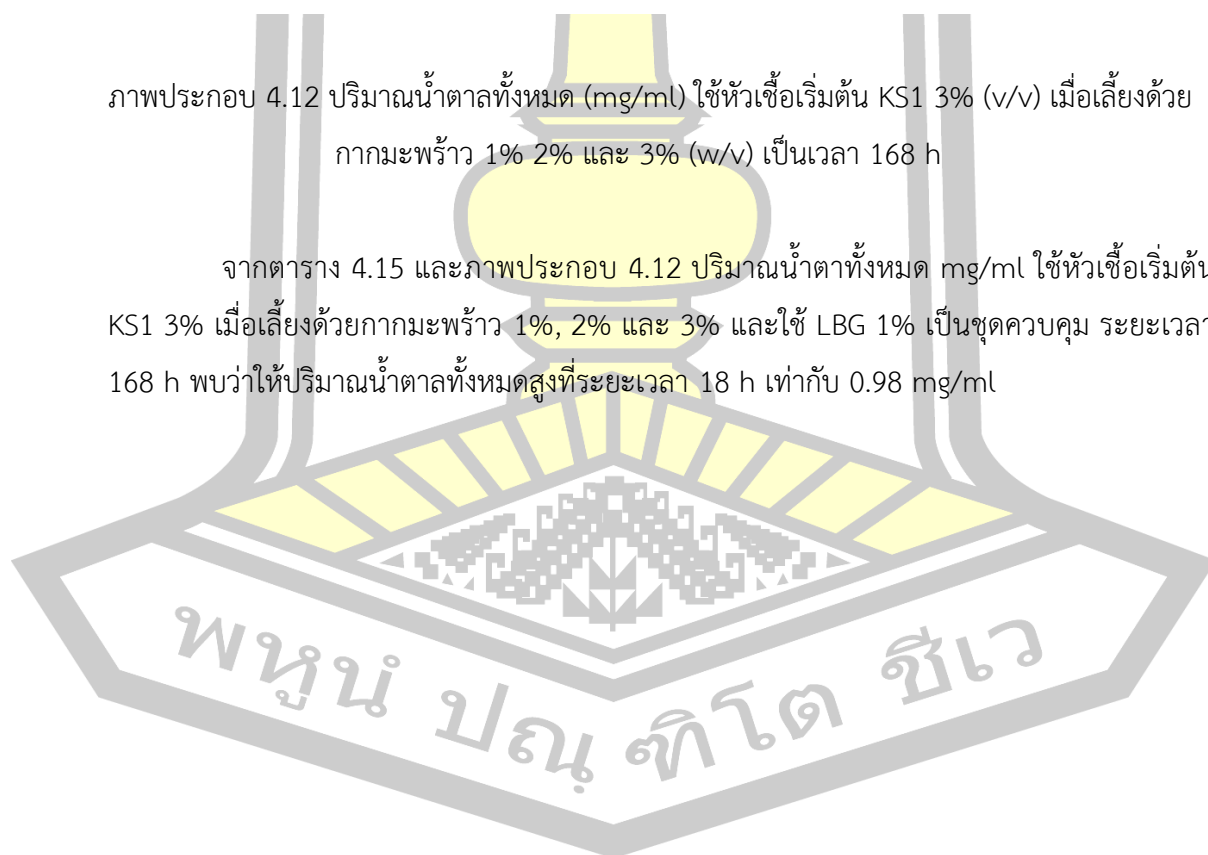
A - C ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่กำกับต่างกันจากแนวแถวเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

a, b,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



ภาพประกอบ 4.12 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml) ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 3% (v/v) เมื่อเลี้ยงด้วยกากมะพร้าว 1% 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h

จากตาราง 4.15 และภาพประกอบ 4.12 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด mg/ml ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 3% เมื่อเลี้ยงด้วยกากมะพร้าว 1%, 2% และ 3% และใช้ LBG 1% เป็นชุดควบคุม ระยะเวลา 168 h พบว่าให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงที่ระยะเวลา 18 h เท่ากับ 0.98 mg/ml

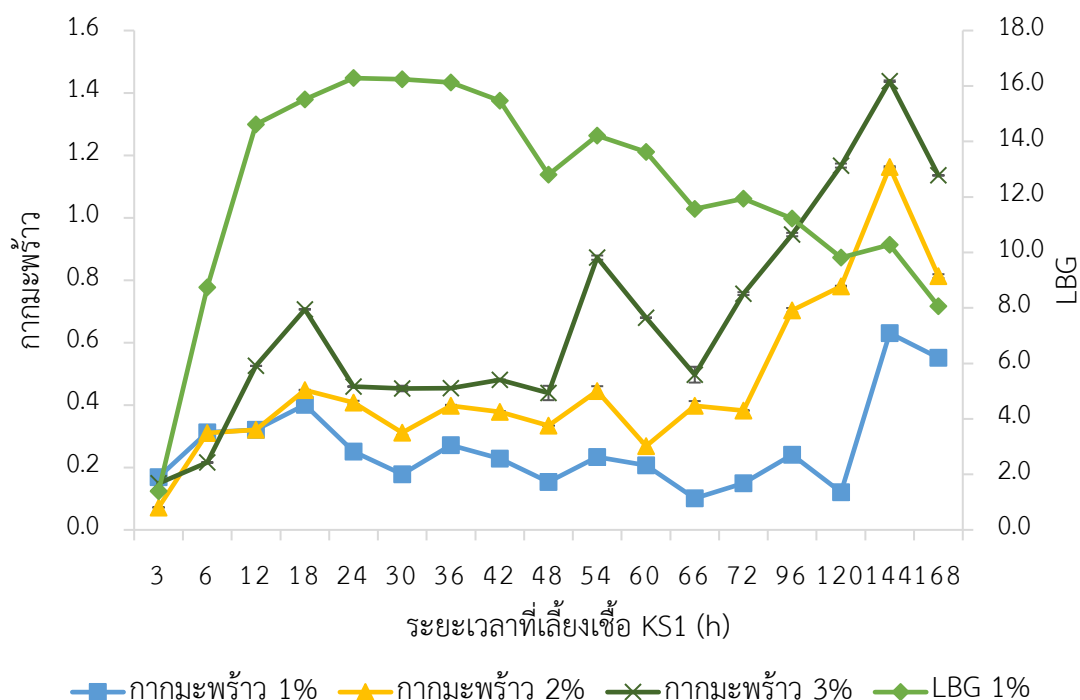


ตาราง 4.16 กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส (Unit/ml) เมื่อเลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 3% (v/v) โดยใช้กากมะพร้าว 3 ระดับ คือ 1%, 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h

กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส (Unit/ml)				
เวลา	ชุดควบคุม LBG 1%	กากมะพร้าว % (w/v)		
(h)	(w/v)	1%	2%	3%
3	1.39	0.17 ^{Ak} ±0.00	0.07 ^{Ck} ±0.00	0.15 ^{Bo} ±0.00
6	8.74	0.31 ^{Ad} ±0.01	0.31 ^{Ai} ±0.01	0.22 ^{Bn} ±0.00
12	14.62	0.32 ^{Bd} ±0.00	0.32 ^{Bhi} ±0.00	0.53 ^{Ai} ±0.00
18	15.51	0.40 ^{Cc} ±0.00	0.45 ^{Be} ±0.00	0.71 ^{Ag} ±0.00
24	16.29	0.25 ^{Cf} ±0.00	0.41 ^{Bf} ±0.01	0.46 ^{Al} ±0.00
30	16.24	0.18 ^{Cj} ±0.00	0.31 ^{Bi} ±0.01	0.45 ^{Alm} ±0.01
36	16.13	0.27 ^{Ce} ±0.00	0.40 ^{Bf} ±0.00	0.45 ^{Alm} ±0.00
42	15.47	0.23 ^{Ch} ±0.00	0.38 ^{Bg} ±0.00	0.48 ^{Ak} ±0.00
48	12.80	0.15 ^{Cl} ±0.00	0.33 ^{Bh} ±0.00	0.44 ^{Am} ±0.01
54	14.22	0.23 ^{Cgh} ±0.01	0.45 ^{Bh} ±0.02	0.87 ^{Ae} ±0.01
60	13.63	0.21 ^{Cj} ±0.01	0.27 ^{Bj} ±0.01	0.68 ^{Ah} ±0.00
66	11.57	0.10 ^{Cn} ±0.01	0.40 ^{Bf} ±0.02	0.50 ^{Aj} ±0.03
72	11.94	0.15 ^{Cl} ±0.00	0.38 ^{Bg} ±0.00	0.76 ^{Af} ±0.00
96	11.23	0.24 ^{Cg} ±0.00	0.70 ^{Bd} ±0.01	0.95 ^{Ad} ±0.01
120	9.82	0.12 ^{Cm} ±0.00	0.78 ^{Bc} ±0.00	1.17 ^{Ab} ±0.01
144	10.27	0.63 ^{Ca} ±0.00	1.16 ^{Ba} ±0.00	1.44 ^{Aa} ±0.00
168	8.06	0.55 ^{Cb} ±0.01	0.81 ^{Bb} ±0.01	1.14 ^{Ac} ±0.00

A - C ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่กำกับต่างกันจากแนวแถวเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

a, b,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



ภาพประกอบ 4.13 กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส (Unit/ml) ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 3% (v/v) เมื่อเลี้ยงด้วยกากมะพร้าว 1% 2% และ 3% (w/v) เป็นเวลา 168 h

จากตาราง 4.16 และภาพประกอบ 4.13 กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส Unit/ml ที่ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น KS1 3% (v/v) เมื่อเลี้ยงด้วยกากมะพร้าว 1%, 2% และ 3% (w/v) และใช้อาหาร LBG 1% เป็นชุดควบคุม ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก 168 h พบว่าเชื้อ KS1 2% ที่เลี้ยงในกากมะพร้าว 3% พบกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสสูงที่ 144 h เท่ากับ 1.44 Unit/ml

4.1.5 การผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากสภาวะที่คัดเลือกได้

จากตารางผลการจำแนก แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ ในหัวข้อ 4.7 สภาวะที่เหมาะสมมาผลิต แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นที่ระดับ 1% (v/v) เลี้ยงในอาหารผสมกากมะพร้าวปริมาณ 3% (w/v) เป็นเวลา 48 h นำไปฉีด HPLC พบสารประกอบ แมนโนไตรโอส (M3) แมนโนเตตราโอส (M4) และ แมนโนเพนโตส (M5) เท่ากับ 0.35, 20.10 และ 4.53 mg/ml ตามลำดับ โดยพบองค์ประกอบของปริมาณแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ M4 สูงสุด ซึ่งเหตุผลที่เลือกสภาวะนี้ในการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ เนื่องจากมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูง ใช้ระยะเวลาในการผลิตสั้นมีความคุ้มค่าในการผลิต

ตาราง 4.17 ผลการจำแนกแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์เลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 3% ในกากมะพร้าว 1% ที่ 120 h น้ำตาลรีดิวซ์ 0.61 (mg/ml) กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส 0.12 (Unit/ml)

การทดลอง (ซ้ำ)	แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (mg/ml)					มอชทั้งหมด (M5-M3)
	M5	M4	M3	M2	M1	
1	6.572	29.556	0.751	0.178	nd	36.898
2	6.588	29.575	0.751	0.178	nd	36.914
$\bar{X} \pm SD$	6.58±0.01	29.57±0.01	0.75±0.00	0.18±0.00	nd	36.91±0.01

M1= แมนโนส M2= แมนโนไบโอส M3= แมนโนไตรโอส M4= แมนโนเตตราโอส M5= แมนโนเพนโตส

\bar{X} = ค่าเฉลี่ย และ SD= ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน nd= not detected

ตาราง 4.18 ผลการจำแนก แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ เลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 3% ในกากมะพร้าว 3% ที่ 120 h น้ำตาลรีดิวซ์ 1.30 (mg/ml) กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส 1.17 (Unit/ml)

การทดลอง (ซ้ำ)	แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (mg/ml)					มอชทั้งหมด (M5-M3)
	M5	M4	M3	M2	M1	
1	6.192	35.223	nd	1.364	1.293	41.415
2	6.170	35.401	nd	1.352	1.286	41.570
$\bar{X} \pm SD$	6.18±0.02	35.31±0.13	nd	1.36±0.01	1.29±0.01	41.49±0.11

M1= แมนโนส M2= แมนโนไบโอส M3= แมนโนไตรโอส M4= แมนโนเตตราโอส M5= แมนโนเพนโตส

\bar{X} = ค่าเฉลี่ย และ SD= ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน nd= not detected

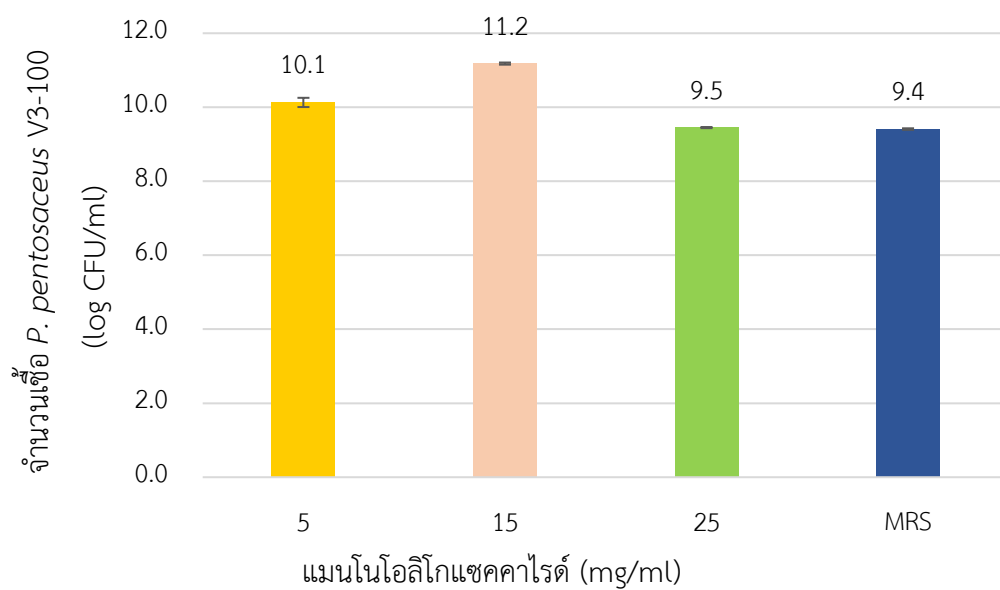
จากตารางการจำแนกแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ เลี้ยงด้วยหัวเชื้อเริ่มต้น KS1 1% 2% และ 3% ในกากมะพร้าว 1% 2% และ 3% ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ตัวอย่างแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ ที่ได้จากสภาวะการผลิตที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด คือ ใช้เชื้อ KS1 1% ในกากมะพร้าว 3% เป็นเวลา 48 h และจากสภาวะที่มีกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสสูงที่สุด คือ เชื้อ KS1 1% ในกากมะพร้าว 3% เป็นเวลา 96 h ผลการศึกษาองค์ประกอบของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ พบว่าสภาวะการผลิตที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดมีองค์ประกอบ แมนโนส (M1) แมนโนไตรโอส (M3) แมนโนเตตราโอส

(M4) และแมนโนเพนโตส (M5) ในขณะที่ แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากสภาวะที่มีกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสสูงที่สุด ประกอบไปด้วย แมนโนส (M1) แมนโนไบโอส (M2) แมนโนไตรโอส (M3) แมนโนเตตราโอส (M4) และ แมนโนเพนโตส (M5) โดยพบว่าระยะเวลาที่ย่อยกากมะพร้าวที่นานกว่าจะทำให้เกิด แมนโนไบโอส M2 ซึ่งเป็นผลมาจากคุณลักษณะของเอนไซม์แมนนาเนสที่ย่อยอย่างสม่ำเสมอในสายของแมนแนน จากการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ (Rungruangsaphakun and Keawsompong, 2018) ที่ทำการศึกษากากมะพร้าวที่เหมาะสมต่อการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากกากมะพร้าว ที่พบว่าแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยกากมะพร้าวด้วยเชื้อ *B. circulans* NT 6.7 มีองค์ประกอบเป็นแมนโนส (M1) แมนโนไบโอส (M2) แมนโนไตรโอส (M3) แมนโนเตตราโอส (M4) แมนโนเพนโตส (M5) และแมนโนเฮกโซส (M6) อีกทั้งยังสอดคล้องกับ (Ariandi et al., 2015) ที่ได้ทำการศึกษากากมะพร้าวที่ผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากการย่อยกากมะพร้าวด้วยเชื้อ *Streptomyces* sp. BF3.1 พบว่ามี องค์ประกอบแมนโนส (M1) แมนโนไบโอส (M2) แมนโนไตรโอส (M3) แมนโนเตตราโอส (M4) แมนโนเพนโตส (M5) และแมนโนเฮกโซส (M6)

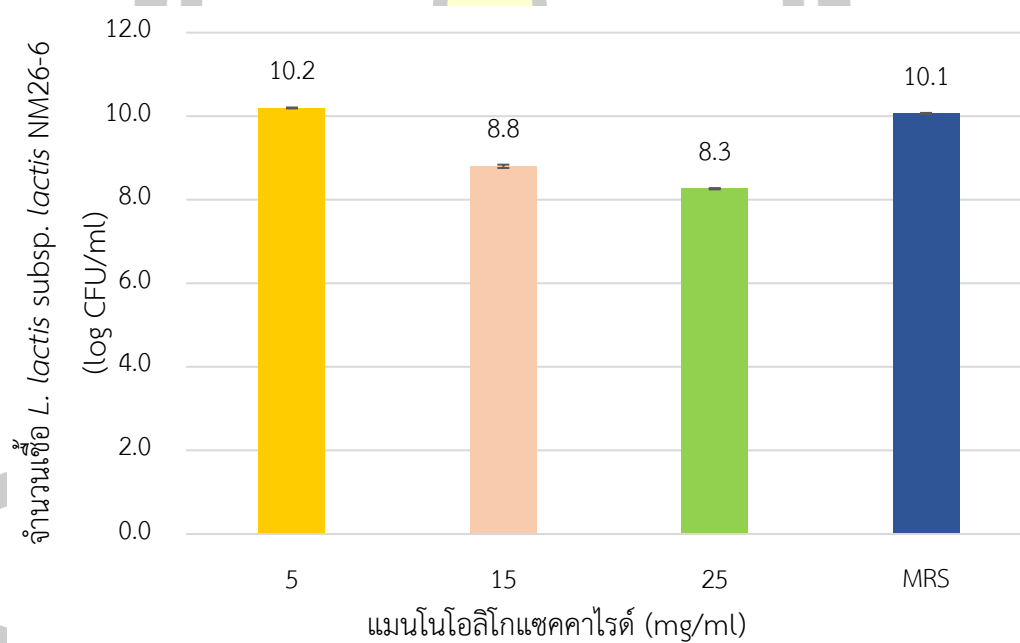
4.2 ผลการศึกษาของการเติมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ต่อการเจริญของเชื้อโพรไบโอติก

4.2.1 ผลการเติมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อเชื้อโพรไบโอติก

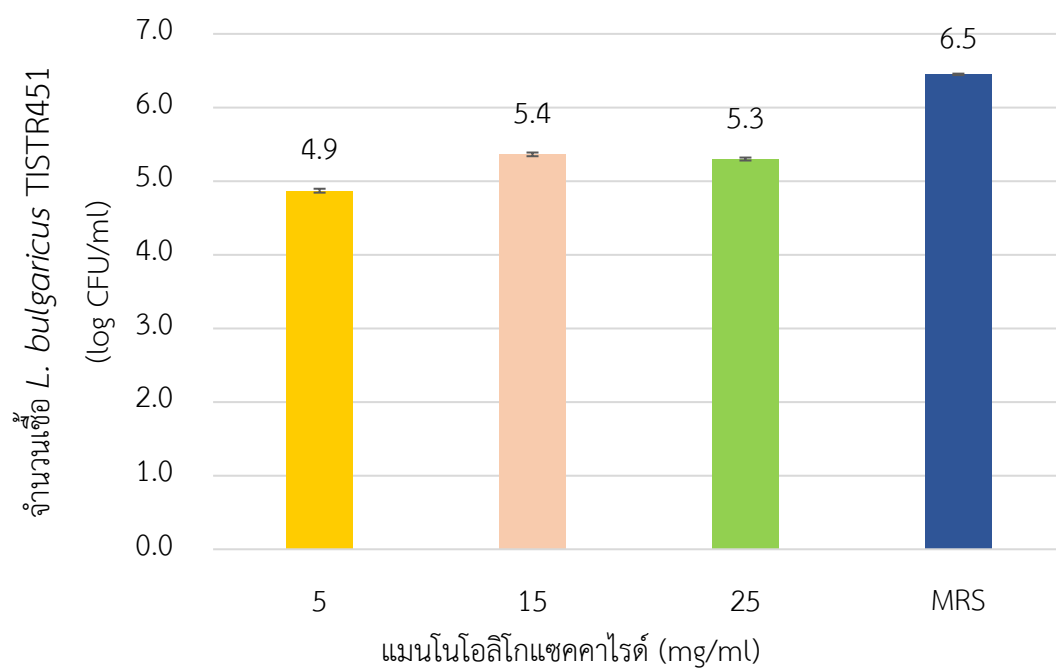
จากการผลของการเติมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 5, 15, 25 mg/ml ต่อการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกได้แก่ *L. bulgaricus*.TISTR451, *L. casei* TISTR390, *L. acidophilus*TISTR1338, *L. plantarum* TISTR543, *P. pentosaceus* V3-100, *L. lactis* subsp. *lactis* NM26-6 และ *L. casei* IMAU11561 พบว่าปริมาณของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 15 mg/ml ให้ผลการเจริญของเชื้อ *P. pentosaceus* V3-100 สูงสุดเท่ากับ 11.2 (log CFU/ml) ดังแสดงในภาพประกอบ 4.14 รองลงมาคือเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* NM26-6 ที่เลี้ยงด้วยปริมาณแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 5 mg/ml ภาพประกอบ 4.15 ในขณะที่เชื้อ *L. bulgaricus*.TISTR451, *L. casei* TISTR390, *L. acidophilus* TISTR1338, *L. plantarum* TISTR543 และ *L. casei* IMAU11561 ให้ปริมาณเชื้อน้อยกว่า MRS ปกติ (ชุดควบคุม) เนื่องจากเชื้อโพรไบโอติกแต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อปริมาณแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่แตกต่างกัน (Rungruangsaphakun and Keawsompong, 2018)ภาพประกอบ 4.14-4.20



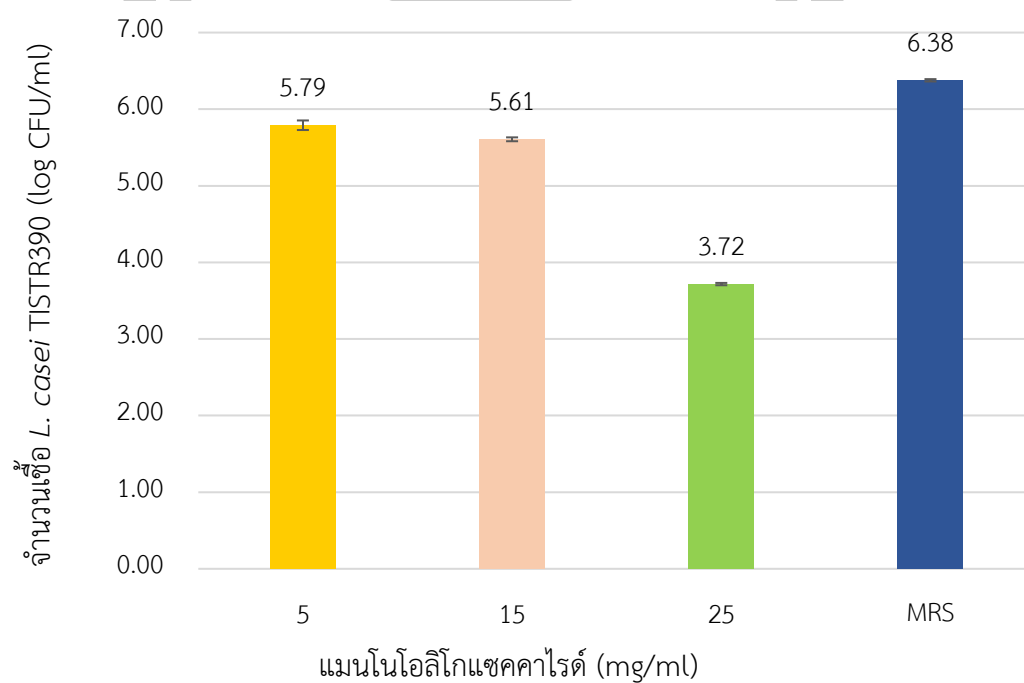
ภาพประกอบ 4.14 ผลของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญของเชื้อ *P. pentosaceus* V3-100



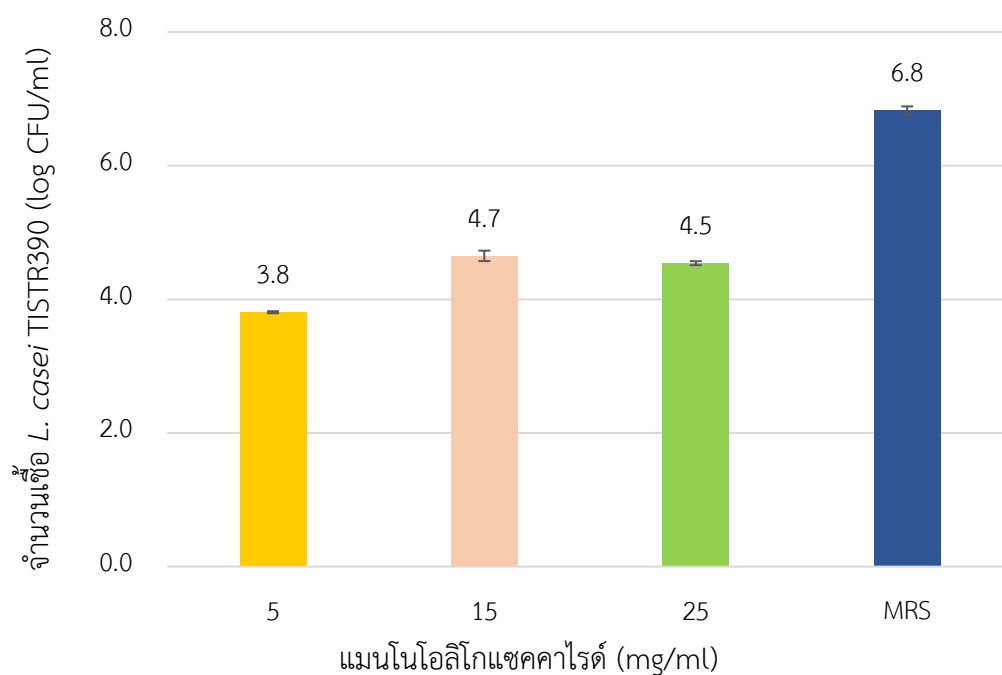
ภาพประกอบ 4.15 ผลของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญของเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* NM26-6



ภาพประกอบ 4.16 ผลของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญของเชื้อ *L. bulgaricus* TISTR451

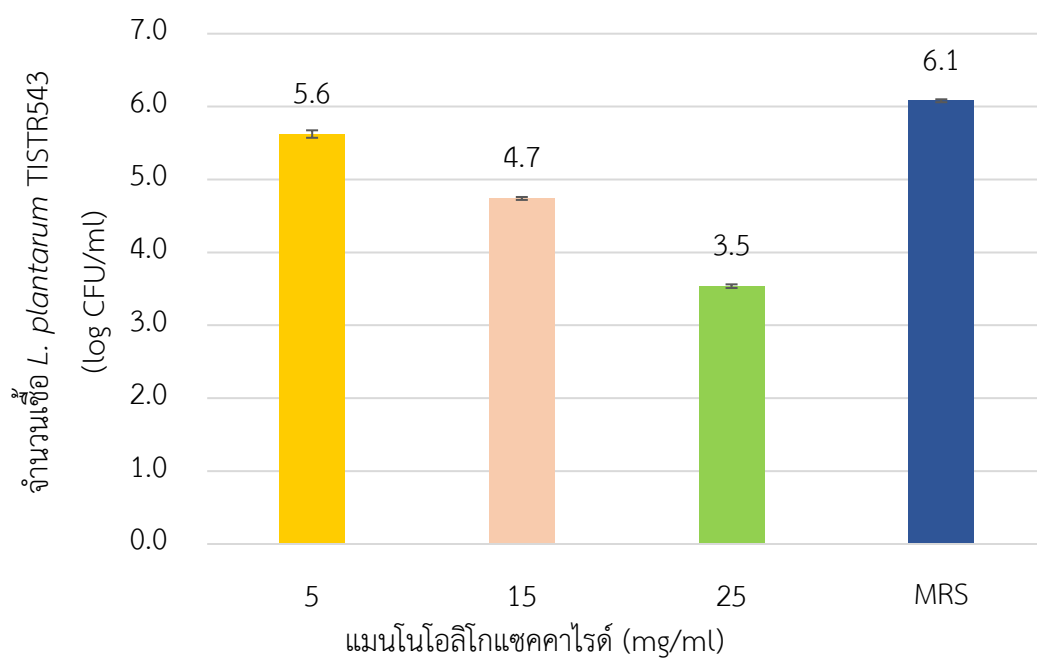


ภาพประกอบ 4.17 ผลของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญของเชื้อ *L. casei* TISTR390

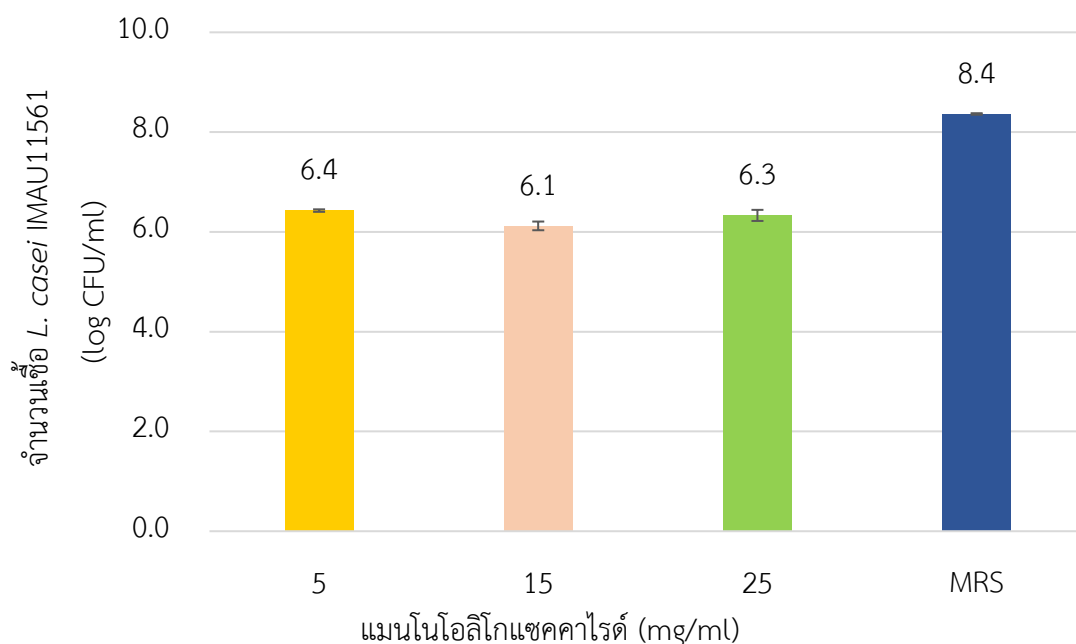


ภาพประกอบ 4.18 ผลของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญของเชื้อ *L. acidophilus*

TISTR1338



ภาพประกอบ 4.19 ผลของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญของ *L. plantarum* TISTR543



ภาพประกอบ 4.20 ผลของแมนโนลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญของเชื้อ *L. casei* IMAU11561

4.2.2 ผลการวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และน้ำตาลรีดิวซ์ของปริมาณเชื้อ *P. pentosaceus* V3-100 ที่เลี้ยงด้วย MRS ผสมแมนโนลิโกแซคคาไรด์ ความเข้มข้น 15 mg/ml

4.2.2.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ผลการศึกษาพบว่า MRS มีน้ำตาลกลูโคสที่ผสมแมนโนลิโกแซคคาไรด์ 15 mg/ml และ MRS (ชุดควบคุม) มีปริมาณ pH น้อยที่สุดช่วง 3.82-4.03 ระยะเวลาที่ 72 h เนื่องจาก *P. pentosaceus* V3-100 เป็นเชื้อที่เจริญได้ดีช่วงแรกๆ ของการหมัก ดังการรายงานของ (บุษกร อุดรชาติ, 2547) กล่าวว่าในระยะแรกของการหมัก เชื้อจุลินทรีย์ที่มักพบ ได้แก่ เชื้อกลุ่ม homofermentative cocci ยกตัวอย่าง เช่น *P. cerevisiae*, *P. pentosaceus* และ *P. acidilactici* เป็นจำนวนมากเติบโตไปพร้อม ๆ กับเชื้อ กลุ่ม heterofermentative lactobacilli มีการใช้น้ำตาลกลูโคสแล้วสร้างกรดแลคติกออกมาเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งทำให้ pH ลดลงจากเดิมในระยะ 3 วันแรกของการหมัก ในขณะที่ MRS เตรียมโดยใช้แมนโนลิโกแซคคาไรด์ 20 mg/ml แทนกลูโคส มีปริมาณ pH ช่วง 5-5.2 เป็นเวลา 72 h ดังตาราง 4.19

ตาราง 4.19 ค่า pH เลี้ยงใน MRS ผสม แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 15 (mg/ml) ที่เลี้ยงเชื้อ *P. pentosaceus* V3-100 ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 72 h

ค่า pH					
Time (h)	MRS glucose 20 mg/ml Control	MRS glucose 20 mg/ml +MOS (48h) 15 mg/ml	MRS non glucose +MOS (48h) 20 mg/ml	MRS glucose 20 mg/ml +MOS (96h) 15 mg/ml	MRS non glucose +MOS (96h) 20 mg/ml
0	6.99 ^{Aa} ±0.00	7.00 ^{Aa} ±0.00	7.00 ^{Aa} ±0.00	7.01 ^{Aa} ±0.00	7.00 ^{Aa} ±0.00
24	3.95 ^{Dc} ±0.02	4.21 ^{Cb} ±0.02	6.46 ^{Bb} ±0.02	4.06 ^{Db} ±0.02	6.77 ^{Ac} ±0.02
48	4.32 ^{Cb} ±0.02	4.06 ^{Dc} ±0.02	6.10 ^{Bc} ±0.02	4.05 ^{Db} ±0.02	6.84 ^{Ab} ±0.02
72	4.00 ^{Dc} ±0.02	3.82 ^{Ed} ±0.02	5.00 ^{Bd} ±0.02	4.03 ^{Cb} ±0.02	5.20 ^{Ad} ±0.02

A - E ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่กำกับต่างกันจากแนวแถวเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

a - d ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

MRS glucose 20 mg/ml= MRS ปกติมีน้ำตาลกลูโคส 20 mg/ml; MRS non glucose= MRS ไม่มีน้ำตาลกลูโคส; แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (48h) 15 mg/ml= ผงแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 48 h 15 mg/ml; แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (48h) 20 mg/ml= ผงแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 48 h 20 mg/ml; แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (96h) 15 mg/ml= ผงแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 96 h 15 mg/ml; แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (96h) 20 mg/ml= ผงแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 96 h 20 mg/ml

4.2.2.2 ผลวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC

ผลการศึกษาพบว่าปริมาณกรดแลกติกเลี้ยงด้วย MRS มีน้ำตาลกลูโคสที่ผสมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (96h) 15 mg/ml ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงที่สุดเท่ากับ 11.54±0.28 g/L รองลงมาคือ MRS มีน้ำตาลกลูโคสที่ผสมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (48h) 15 mg/ml กับ MRS (ชุดควบคุม) ให้ปริมาณกรดแลกติกเท่ากับ 11.04±0.15 และ 10.84±0.10 ตามลำดับ ระยะเวลาที่ 72 h ในขณะที่ MRS เตรียมโดยใช้แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 20 mg/ml แทนน้ำตาลกลูโคส ให้ปริมาณกรดแลกติกที่ต่ำ เนื่องจากการเจริญเชื้อ *P. pentosaceus* V3-100 ใช้น้ำตาลกลูโคสในการเจริญช่วง 3 วันแรกของการหมัก ดังการรายงานของ(บุษกร อุดรภิชชาติ, 2547) จึงทำให้ MRS มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสให้ปริมาณกรดแลกติกที่สูงกว่า MRS ที่ไม่มีน้ำตาลกลูโคส ดังตาราง 4.20

ตาราง 4.20 ปริมาณกรดแลกติกด้วย HPLC เลี้ยงใน MRS ผสม แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 15 (mg/ml) ที่เลี้ยงเชื้อ *P. pentosaceus* V3-100 ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 72 h

ปริมาณกรดแลกติก (g/L)					
Time (h)	MRS glucose 20 mg/ml Control	MRS glucose 20 mg/ml +MOS (48h) 15 mg/ml	MRS non glucose +MOS (48h) 20 mg/ml	MRS glucose 20 mg/ml +MOS (96h) 15 mg/ml	MRS non glucose +MOS (96h) 20 mg/ml
0	0.44 ^{Bc} ±0.01	0.47 ^{ABc} ±0.02	0.51 ^{Aa} ±0.03	0.46 ^{Bc} ±0.02	0.51 ^{Aa} ±0.00
24	10.50 ^{ABb} ±0.04	10.26 ^{Bb} ±0.21	0.36 ^{Cb} ±0.02	10.86 ^{Ab} ±0.26	0.35 ^{Ca} ±0.04
48	10.92 ^{Ba} ±0.17	11.14 ^{ABa} ±0.06	0.22 ^{Cc} ±0.01	11.36 ^{Aab} ±0.13	0.22 ^{Ca} ±0.03
72	10.84 ^{Ba} ±0.10	11.04 ^{Ba} ±0.15	0.10 ^{Cd} ±0.01	11.54 ^{Aa} ±0.28	0.23 ^{Ca} ±0.23

A - C ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่กำกับต่างกันจากแนวแถวเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

a - c ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์เล็กกำกับต่างกันจากคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

MRS glucose 20 mg/ml= MRS ปกติมีน้ำตาลกลูโคส 20 mg/ml; MRS non glucose= MRS ไม่มีน้ำตาลกลูโคส; แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (48h) 15 mg/ml= ผงแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 48 h 15 mg/ml; แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (48h) 20 mg/ml= ผงแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 48 h 20 mg/ml; แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (96h) 15 mg/ml= ผงแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 96 h 15 mg/ml; แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (96h) 20 mg/ml= ผงแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 96 h 20 mg/ml

4.2.2.3 ผลการนับปริมาณเซลล์

ผลการศึกษาพบว่าปริมาณเชื้อ *P. pentosaceus* V3-100 เลี้ยงด้วย MRS มีน้ำตาลกลูโคสที่ผสมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (48h) 15 mg/ml ให้ปริมาณเชื้อ *P. pentosaceus* V3-100 สูงที่สุดเท่ากับ 8.43 ± 0.02 (log CFU/ml) รองลงมาคือ MRS มีน้ำตาลกลูโคสที่ผสมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (96h) 15 mg/ml กับ MRS (ชุดควบคุม) ให้ปริมาณเชื้อ *P. pentosaceus* V3-100 เท่ากับ 8.43 ± 0.02 และ 8.19 ± 0.03 (log CFU/ml) ตามลำดับ ระยะเวลาที่ 72 h ในขณะที่ MRS เติบโตโดยใช้แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 20 mg/ml แทนน้ำตาลกลูโคส ให้ปริมาณเชื้อ *P. pentosaceus* V3-100 ที่ต่ำเนื่องจากการเจริญเชื้อ *P. pentosaceus* V3-100 ใช้น้ำตาลกลูโคสในการเจริญช่วง 3 วันแรกของการหมัก และเป็นเชื้อเจริญได้ดีในสภาวะ pH ต่ำ ดังรายงานของ (บุษกร อุตริชาติ, 2547) แต่ MRS ที่ใช้แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 20 mg/ml แทนน้ำตาลกลูโคส ให้ปริมาณเชื้อที่ต่ำเนื่องจากการปรับตัวในการเจริญ ดังตาราง 4.21

ตาราง 4.21 ปริมาณเชื้อ *P. pentosaceus* V3-100 (log CFU/ml) ใน MRS ผสม แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 15 (mg/ml) ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลาเวลา 72 h

ปริมาณเชื้อ <i>P. pentosaceus</i> V3-100 (log CFU/ml)					
Time (h)	MRS glucose 20 mg/ml Control	MRS glucose 20 mg/ml +MOS (48h) 15 mg/ml	MRS non glucose +MOS (48h) 20 mg/ml	MRS glucose 20 mg/ml +MOS (96h) 15 mg/ml	MRS non glucose +MOS (96h) 20 mg/ml
0	4.54 ^{BCd} ±0.01	4.52 ^{Cd} ±0.01	4.54 ^{BCd} ±0.01	4.55 ^{Bd} ±0.01	4.58 ^{Ad} ±0.01
24	7.87 ^{Ac} ±0.02	7.81 ^{Bc} ±0.03	5.27 ^{Dc} ±0.01	7.76 ^{Cc} ±0.02	5.29 ^{Dc} ±0.01
48	7.96 ^{Bb} ±0.02	8.15 ^{Ab} ±0.02	6.15 ^{Cb} ±0.03	7.96 ^{Bb} ±0.02	6.06 ^{Db} ±0.02
72	8.19 ^{Ca} ±0.03	8.43 ^{Aa} ±0.02	6.32 ^{Da} ±0.02	8.37 ^{Ba} ±0.02	6.29 ^{Ea} ±0.02

A - E ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่กำกับต่างกันจากแนวแถวเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

a - d ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์เล็กกำกับต่างกันจากคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

MRS glucose 20 mg/ml= MRS ปกติมีน้ำตาลกลูโคส 20 mg/ml; MRS non glucose= MRS ไม่มีน้ำตาลกลูโคส; แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (48h) 15 mg/ml= ผงแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 48 h 15 mg/ml; แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (48h) 20 mg/ml= ผงแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 48 h 20 mg/ml; แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (96h) 15 mg/ml= ผงแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 96 h 15 mg/ml; แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (96h) 20 mg/ml= ผงแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 96 h 20 mg/ml

4.2.2.4 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

1) ผลการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ด้วยวิธี (Phenol Sulfuric) พบว่า MRS มีน้ำตาลกลูโคส (ชุดควบคุม) MRS มีน้ำตาลกลูโคสที่ผสมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (48h) 15 mg/ml และ MRS มีน้ำตาลกลูโคสที่แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (96h) 15 mg/ml ระยะเวลาที่ 0 h ให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงสุดในแนวแถวเดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเท่ากับ 0.53±0.01 0.49±0.01 และ 0.50±0.01 mg/ml เมื่อเกิดการหมัก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะลดลงเนื่องจากเชื้อ *P. pentosaceus* V3-100 ใช้น้ำตาลกลูโคสในการเจริญช่วง 3 วันแรกของการหมัก ดังรายงานของ (บุษกร อุตรริชาติ, 2547) ในขณะที่ MRS มีแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 20 mg/ml แทนน้ำตาลกลูโคส ระยะเวลาที่ 0 h ให้ปริมาณทั้งหมดต่ำ เนื่องจาก MRS ไม่มีน้ำตาลกลูโคส ดังตาราง 4.22

ตาราง 4.22 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ใน MRS ผสมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 15 (mg/ml) ที่เลี้ยงเชื้อ *P. pentosaceus* V3-100 ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 72 h

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (mg/ml)					
Time (h)	MRS glucose 20 mg/ml Control	MRS glucose 20 mg/ml +MOS (48h) 15 mg/ml	MRS non glucose +MOS (48h) 20 mg/ml	MRS glucose 20 mg/ml +MOS (96h) 15 mg/ml	MRS non glucose +MOS (96h) 20 mg/ml
0	0.53 ^{Aa} ±0.01	0.49 ^{Aa} ±0.01	0.29 ^{Cb} ±0.00	0.50 ^{Aa} ±0.01	0.35 ^{Ba} ±0.00
24	0.28 ^{Bc} ±0.00	0.41 ^{Ab} ±0.00	0.26 ^{Bb} ±0.01	0.44 ^{Aab} ±0.01	0.31 ^{Bab} ±0.00
48	0.45 ^{Aab} ±0.00	0.38 ^{Bb} ±0.00	0.22 ^{Cc} ±0.00	0.42 ^{Abc} ±0.00	0.22 ^{Cb} ±0.00
72	0.37 ^{Ab} ±0.02	0.37 ^{Ab} ±0.01	0.39 ^{Aa} ±0.00	0.37 ^{Ac} ±0.00	0.28 ^{Aab} ±0.02

A - C ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่กำกับต่างกันจากแนวแถวเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

a - c ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

MRS glucose 20 mg/ml= MRS ปกติมีน้ำตาลกลูโคส 20 mg/ml; MRS non glucose= MRS ไม่มีน้ำตาลกลูโคส; แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (48h) 15 mg/ml= ผงแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 48 h 15 mg/ml; แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (48h) 20 mg/ml= ผงแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 48 h 20 mg/ml; แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (96h) 15 mg/ml= ผงแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 96 h 15 mg/ml; แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (96h) 20 mg/ml= ผงแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 96 h 20 mg/ml

2) ผลการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี DNS พบว่า MRS มีน้ำตาลกลูโคสที่ผสมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (48h) 15 mg/ml ระยะเวลาที่ 24 h ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 1.12 ± 0.02 mg/ml รองลงมาคือ MRS มีแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 20 mg/ml แทนน้ำตาลกลูโคส ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 1.05 ± 0.02 mg/ml และ พบว่า MRS มีน้ำตาลกลูโคสที่ผสมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (96h) 15 mg/ml ระยะเวลาที่ 72 h ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 0.87 ± 0.03 mg/ml ดังตาราง 4.23

ตาราง 4.23 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ใน MRS ผสม แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 15 (mg/ml) ที่เลี้ยงเชื้อ *P. pentosaceus* V3-100 ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 72 h

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)					
Time (h)	MRS glucose 20 mg/ml Control	MRS glucose 20 mg/ml +MOS (48h) 15 mg/ml	MRS non glucose +MOS (48h) 20 mg/ml	MRS glucose 20 mg/ml +MOS (96h) 15 mg/ml	MRS non glucose +MOS (96h) 20 mg/ml
0	0.49 ^{Da} ±0.01	0.95 ^{Ab} ±0.01	0.89 ^{Bb} ±0.02	0.59 ^{Cd} ±0.04	0.40 ^{Ec} ±0.01
24	0.25 ^{Eb} ±0.01	1.12 ^{Aa} ±0.02	1.05 ^{Ba} ±0.02	0.75 ^{Cb} ±0.01	0.43 ^{Db} ±0.02
48	0.19 ^{Dc} ±0.02	0.58 ^{Bd} ±0.02	0.71 ^{Ac} ±0.02	0.70 ^{Ac} ±0.01	0.36 ^{Cd} ±0.03
72	0.48 ^{Da} ±0.01	0.67 ^{Bc} ±0.04	0.17 ^{Ed} ±0.04	0.87 ^{Aa} ±0.03	0.54 ^{Ca} ±0.03

A - E ตัวเลขที่มีอักษรพิมพ์ใหญ่กำกับต่างกันจากแนวแถวเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

a - d ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันจากคอลัมน์เดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

MRS glucose 20 mg/ml= MRS ปกติมีน้ำตาลกลูโคส 20 mg/ml; MRS non glucose= MRS ไม่มีน้ำตาลกลูโคส; แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (48h) 15 mg/ml= ผงแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 48 h 15 mg/ml; แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (48h) 20 mg/ml= ผงแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 48 h 20 mg/ml; แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (96h) 15 mg/ml= ผงแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 96 h 15 mg/ml; แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (96h) 20 mg/ml= ผงแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ 96 h 20 mg/ml



บทที่ 5

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย KS1 โดยเลี้ยงในอาหาร NB พบว่าที่ระยะเวลา 18 h เชื้อ KS1 จะเจริญอยู่ในช่วง log phase และหลังจากเลี้ยง *Bacillus methylotrophicus* KS1 เกิน 18 h พบว่าเชื้อ *Bacillus methylotrophicus* KS1 จะสร้างเอนโดสปอร์ และเมื่อนำเชื้อ *Bacillus methylotrophicus* KS1 มาย้อมสีแกรมพบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน จากการศึกษานี้ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ คือ สภาวะการย่อยกากมะพร้าว 3% ด้วยเชื้อ *Bacillus methylotrophicus* KS1 1% นาน 48 h ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 1.20 mg/ml และองค์ประกอบของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ คือ แมนโนส (M1) แมนโนไตรโอส (M3) แมนโนเตตราโอส (M4) และแมนโนเพนโตส (M6) เท่ากับ 0.35, 20.10 และ 4.53 mg/ml ตามลำดับ และพบว่าแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้สามารถกระตุ้นการเจริญของเชื้อ *P. pentosaceus* V3-100 ได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 15 mg/ml

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาในระบบถึงหมัก
2. ควรทำให้กากมะพร้าวบริสุทธิ์ก่อนด้วยความร้อนหรือวิธีการทางเคมีเพื่อให้ผลึกของกาแลคโตแมนแนนในกากมะพร้าวย่อยสลายได้ง่าย และสามารถลดระยะเวลาในการศึกษา
3. อาจทำให้เอนไซม์ให้บริสุทธิ์ก่อนการศึกษากการย่อยกากมะพร้าว
4. ควรมีการศึกษาผลของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ต่อเชื้อโพรไบโอติกในลำไส้ของสิ่งมีชีวิตจริง

พูน ปณ จิต ชีเว

บรรณานุกรม

- กานต์ สุขสุแพทย์ จรรยา คงฤทธิ์ และณหทัย วิจิตโรทัย. (2555). การใช้ได้ของกากกะทิเป็นอาหารไก่เนื้อ. *การประชุมวิชาการงานเกษตรนครสวรรค์, 10*, 174–181.
- กัณหา อยู่หัตถ์ สุทธิพงศ์ ศักดิ์อุบล และมณฑารพ ยมาภัย. (2556). *การใช้มอดเพื่อการปลูกสัตว์*. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- ไชยวัฒน์ ไชยสุต. (2553). *สุขภาพดีด้วยโปรไบโอติก*. กรุงเทพฯ: บริษัท ไทยเอฟเฟคท์ จำกัด.
- ไชยวัฒน์ ไชยสุต และศศิธร ศิริสุน. (2553). โปรไบโอติก :จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ. *วารสารสำนักการแพทย์ทางเลือก, 3*(3), 4–16.
- ธารรัตน์ ศุภกิจ. (2542). แบคทีเรียเพื่อสุขภาพ. *วารสารวิทยาศาสตร์, 53*(6), 357–360.
- บุษกร อุตริชาติ. (2547). *จุลชีววิทยาทางอาหาร*. สงขลา: มหาวิทยาลัยทักษิณ.
- พรพรรณ แสนภูมิ และสุภาวดี ฉิมทอง. (2557). การปรับปรุงกากชาด้วยเอนไซม์เพื่อใช้เป็นพรีไบโอติก. *วารสารแก่นเกษตร, 42*(1), 368–374.
- พรพรรณ แสนภูมิ สุภาวดี ฉิมทอง กลั่นบุศย์ ญฐกร ประเสริฐพงษ์ มงคล และศักดิ์ธัช อารีรอบ. (2558). การปรับปรุงเยื่อหุ้มเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ด้วยเอนไซม์ เพื่อใช้เป็นพรีไบโอติกในอาหารสัตว์. *วารสารแก่นเกษตร, 43*(1), 505–511.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนพานนท์. (n.d.). อินูลิน. Retrieved from <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/2068/inulin-อินูลิน>
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนพานนท์. (2550). วิธีการทำแห้งและเครื่องทำแห้ง. Retrieved July 25, 2018, from <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0277/dehydration>
- รุสมัน ดะแซสาเมาะ. (2557). *การสกัดและการทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกรและการประเมินคุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติก*. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- วารุณี ประดิษฐ์ศรีกุล. (2548). จุลินทรีย์เพื่อชีวิต : โปรไบโอติกส์. *วารสารอาหาร, 35*(4), 249–257.
- วินัย ประลมภ์กาญจน์. (2529). *อาหารและการให้อาหารสุกร*. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- วิรัชนีย์ แก่นแสนดี. (2553). *การคัดเลือกและจัดจำแนกเชื้อโปรไบโอติกแอลลิดแบคทีเรียจากน้ำนมเหลืองคน*. มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.
- ศุภเชษฐ์ แซ่ตั้ง ภัทรา ผาสอน จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ อะกิอิโกะ โคสุกิ กนก รัตน์กนกชัย และรัตติยา แวนนุกูล. (2015). *Paenibacillus curdianolyticus B-6 Production of Mannan-Oligosaccharides (MOS) from Konjac and Locust Bean Gum Using*

Paenibacillus curdlanolyticus B-6 Glycoside Hydrolase Family 5. 46(3), 637–640.

- สุพจน์ นวลละออง. (2552). *การสกัดพรีไบโอติกจากพืชเกษตร*. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- เอกภพ สีนงาม. (2555). *การศึกษาคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของพริกโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากแก่นตะวัน*. มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- เอกลักษณ์ ทวีโรจนกุล. (2552). Probiotic Prebiotic คู่หูภูมิคุ้มกันโรคในระบบทางเดินอาหาร. 35(203), 66–72.
- Akhter, N., Wu, B., Memon, A. M., & Mohsin, M. (2015). Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: A review. *Fish and Shellfish Immunology*, 45(2), 733–741. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.05.038>
- Amazon. (n.d.). Inulin Powder. Retrieved October 25, 2018, from <https://www.amazon.com/NOW-Supplements-Certified-Organic-Non-GMO/dp/B000MGSI1K?th=1>
- AOAC. (1995). *Official Analytical Chemists Official Methods of Analysis*. Virginia, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Ariandi, Yopi, & Meryandini, A. (2015). Enzymatic Hydrolysis of Copra Meal by Mannanase from *Streptomyces* sp. BF3.1 for The Production of Mannooligosaccharides. *HAYATI Journal of Biosciences*, 22(2), 79–86. <https://doi.org/10.4308/hjb.22.2.79>
- Benech, R. O., Li, X., Patton, D., Powlowski, J., Storms, R., Bourbonnais, R., & Tsang, A. (2007). Recombinant expression, characterization, and pulp prebleaching property of a *Phanerochaete chrysosporium* endo- β -1,4-mannanase. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(6–7), 740–747. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.06.012>
- Cann, R. L., Stoneking, M., & Wilson, A. C. (1987). Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature*, 325(6099), 31–36. <https://doi.org/10.1038/325031a0>
- Chaplin, M. (2003). Water Structure and Behavior. locust bean gum. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/30032890_Water_Structure_and_Behavior
- Chauhan, P. S., Bharadwaj, A., Puri, N., & Gupta, N. (2014). Optimization of medium

composition for alkali-thermostable mannanase production by *Bacillus nealsonii* PN-11 in submerged fermentation. *Interntional Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(10), 1033–1045. Retrieved from file:///D:/TRABAJO/Mendeley/Interntional Journal of Current Microbiology and Applied Sciences/Chauhan et al/2014 - Optimization of medium composition for alkali-thermostable mannanase production by *Bacillus nealsonii* PN-11 in submerged fermenta.pdf

Chauhan, P. S., Puri, N., Sharma, P., & Gupta, N. (2012). Mannanases: Microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93(5), 1817–1830.

<https://doi.org/10.1007/s00253-012-3887-5>

ChemGen corporationen. (2012). ChemGen. Retrieved November 25, 2017, from <http://www.chemgen.com>

Cuong, D. B., Dung, V. K., Thi, N., Hien, T., & Thu, D. T. (2013). Prebiotic Evaluation of Copra-Derived Mannooligosaccharides in White- Leg Shrimps. *Journal of Aquaculture Research and Development*, 4(5), 1–5.

<https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000188>

El-Sheshtawy, H. S., Aiad, I., Osman, M. E., Abo-ELnasr, A. A., & Kobisy, A. S. (2015). Production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria. *Egyptian Journal of Petroleum*, 24(2), 155–162.

<https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.05.005>

Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66, 365–378.

Ge, B., Liu, B., Nwet, T. T., Zhao, W., Shi, L., & Zhang, K. (2016). *Bacillus methylophilus* strain NKG-1, Isolated from changbai mountain, China, Has potential applications as a biofertilizer or biocontrol agent. *PLoS ONE*, 11(11).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166079>

Gibson, G. R., & Roberfroid, M. D. (1995). Dietary modulation of the human colonic Microbiota-Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125(6), 1401–1412. Retrieved from <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2->

s2.0-84923857530&partnerID=40&md5=d59b81d29fa0c06ae709604d12de9291

- Gilliland, S. E. (1989). Acidophilus Milk Products: A Review of Potential Benefits to Consumers. *Journal of Dairy Science*, 72(10), 2483–2494.
[https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(89\)79389-9](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(89)79389-9)
- Grosso, C. R. F., & Trindade, C. S. F. (2004). Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yogurt. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(April 2014), 151–156. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000100025>
- Guarner, F., & Schaafsma, G. J. (1998). Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39(3), 237–238. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00136-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00136-0)
- Havenaar, R., & Huis, J. (1992). Probiotics : A General View. *Elsevier Applied Science*, 1, 151–152.
- He, X., Liu, N., Li, W., Zhang, Z., Zhang, B., & Ma, Y. (2008). Inducible and constitutive expression of a novel thermostable alkaline β -mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(1), 13–18.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enzmtec.2008.03.011>
- Herich, R. H., & Levkut, M. L. (2002). Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. *Veterinary Medicine*, 47(6), 169–180. Retrieved from <http://vri.cz/docs/vetmed/47-6-169.pdf>
- Howard, R.L., Abotsi, E., van Rensburg, E.L.J. and Howard, S. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 602–619. <https://doi.org/10.5897/AJB2003.000-1115>
- Ishii, J., Asai-Nakashima, N., Teramura, H., Tominaga, M., Wakai, S., Kondo, A., Ogino, C. (2016). From mannan to bioethanol: Cell surface co-display of β -mannanase and β -mannosidase on yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 9(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0600-4>
- James, C. S. (1998). *Analytical Chemistry Of Foods*. Retrieved from

https://books.google.co.th/books?id=dOD6N_J4jnoC

Khuwijitjaru, P., Watsanit, K., & Adachi, S. (2012). Carbohydrate content and composition of product from subcritical water treatment of coconut meal. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 18(1), 225–229.

<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2011.11.010>

Kirk, O., Borchert, T. V., & Fuglsang, C. C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(4), 345–351.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00328-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00328-2)

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., & Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria: review. *International Journal of Food Microbiology (Netherlands)*, Vol. 41, pp. 103–125.

Kogan, G., & Kocher, A. (2007). Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livestock Science*, 109(1), 161–165.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.livsci.2007.01.134>

Le Nours, J., Anderson, L., Stoll, D., Stålbrand, H., & Lo Leggio, L. (2005). The Structure and Characterization of a Modular Endo- β -1,4-mannanase from *Cellulomonas fimi*. *Biochemistry*, 44(38), 12700–12708. <https://doi.org/10.1021/bi050779v>

Lin, S. S., Dou, W. F., Xu, H. Y., Li, H. Z., Xu, Z. H., & Ma, Y. H. (2007). Optimization of medium composition for the production of alkaline β -mannanase by alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 using response surface methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(5), 1015–1022.

<https://doi.org/10.1007/s00253-007-0907-y>

Manning, T. S., & Gibson, G. R. (2004). Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18(2), 287–298.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bpg.2003.10.008>

McCleary, B. V. (1979). Modes of action of β -mannanase enzymes of diverse origin on legume seed galactomannans. *Phytochemistry*, 18(5), 757–763.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9422\(79\)80009-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0031-9422(79)80009-6)

Megazyme. (2016). HPLC–Determining Mannose and Mannooligosaccharides using a Refractive Index Detector. Retrieved September 19, 2018, from

<http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=13289>

- Mepba, H. D., & Achinewhu, S. C. (2003). Effects of processing on protein nutritive quality of coconut *Cocos nucifera* products. *Plant Foods for Human Nutrition*, 58(1), 15–25. <https://doi.org/10.1023/A:102400662050>
- Moreira, L. R., & Filho, E. X. (2008). An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(2), 165.
- Phothichitto, K., Nitisinprasert, S., & Keawsompong, S. (2006). Isolation, screening and identification of mannanase producing microorganisms. *Kasetsart Journal - Natural Science*, 40(SUPPL.), 26–38.
- Pourabedin, M., & Zhao, X. (2015). Prebiotics and gut microbiota in chickens. *FEMS Microbiology Letters*, 362(15), 1–8. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnv122>
- Prado, F. C., Parada, J. L., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2008). Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, 41(2), 111–123. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.10.010>
- Ramesh, N., & Anbusaravan, M. (2015). Isolation and Growth Kinetic Studies Of *Bacillus methylotrophicus* P10 & P11 From Godavarikhani Open Cast – Iii Coal Mine Soil Of The Singareni Collieries , Andra Pradesh . *The International Journal Of Engineering And Science (IJES)*, 4(2), 32–38.
- Rattanasuk, S., Prasertsang, K., & Phiwphech, S. (2015). Isolation of thermophilic mannanase-producing bacteria useful for mannooligosaccharide (MOS) production. *2015 International Conference on Science and Technology (TICST)*, 173–177. <https://doi.org/10.1109/TICST.2015.7369356>
- Rattanasuk, S., & Ketudat-Cairns, M. (2009). *Chryseobacterium indologenes*, novel mannanase-producing bacteria. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 31(4), 395–399.
- Roberfroid, M. B. (2001). Prebiotics: Preferential substrates for specific germs? *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 406–409.
- Rungruangsaphakun, J., & Keawsompong, S. (2018). Optimization of hydrolysis conditions for the mannooligosaccharides copra meal hydrolysate production. *3 Biotech*, 8(3), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1178-2>

- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3), 197–215. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00375-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00375-8)
- Sachslehner, A., Foidl, G., Foidl, N., Gübitz, G., & Haltrich, D. (2000). Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanases of *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Biotechnology*, 80(2), 127–134. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00253-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00253-4)
- Schroeder, R., Wegrzyn, T., Bolitho, K., & Redgwell, R. (2004). Mannan transglycosylase: A novel enzyme activity in cell walls of higher plants. *Planta*, 219, 590–600. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1274-x>
- Shah, N. P., Ali, J. F., & Ravula, R. R. (2000). Populations of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., and *Lactobacillus casei* in Commercial Fermented Milk Products. *Bioscience and Microflora*, 19(1), 35–39. <https://doi.org/10.12938/bifidus1996.19.35>
- Shah, N. P., Lankaputhra, W. E. V, Britz, M. L., & Kyle, W. S. A. (1995). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated storage. *International Dairy Journal*, 5(5), 515–521. [https://doi.org/10.1016/0958-6946\(95\)00028-2](https://doi.org/10.1016/0958-6946(95)00028-2)
- Songsiriritthigul, C., Buranabanyat, B., Haltrich, D., & Yamabhai, M. (2010). Efficient recombinant expression and secretion of a thermostable GH26 mannan licheniformis in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 9(20), 1–13.
- Spring, P., Wenk, C., Dawson, K.A., and Newman, M. E. (2000). The Effects of Dietary Mannanoligosaccharides on Cecal Parameters and the Concentrations of Enteric Bacteria in the Ceca of *Salmonella*-Challenged Broiler Chicks. *Poultry Science*, 79(2), 205–211. <https://doi.org/10.1093/ps/79.2.205>
- Sunna, A., Gibbs, M. D., Chin, C. W. J., Nelson, P. J., & Bergquist, P. L. (2000). A gene encoding a novel multidomain β -1,4-mannanase from *Caldibacillus cellulovorans* and action of the recombinant enzyme on kraft pulp. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 664–670. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.664-670.2000>

Tamime, A. Y., Saarela, M., Sondergaard, A. K., Mistry, V. V., & Shah, N. P. (2005).

Production and Maintenance of Viability of Probiotic Micro-Organisms in Dairy Products. In *Probiotic Dairy Products* (pp. 39–72). Oxford, UK: Blackwell.

Tanimoto, T., Ikuta, A., Sugiyama, M., & Koizumi, K. (2002). HPLC Analysis of Manno-

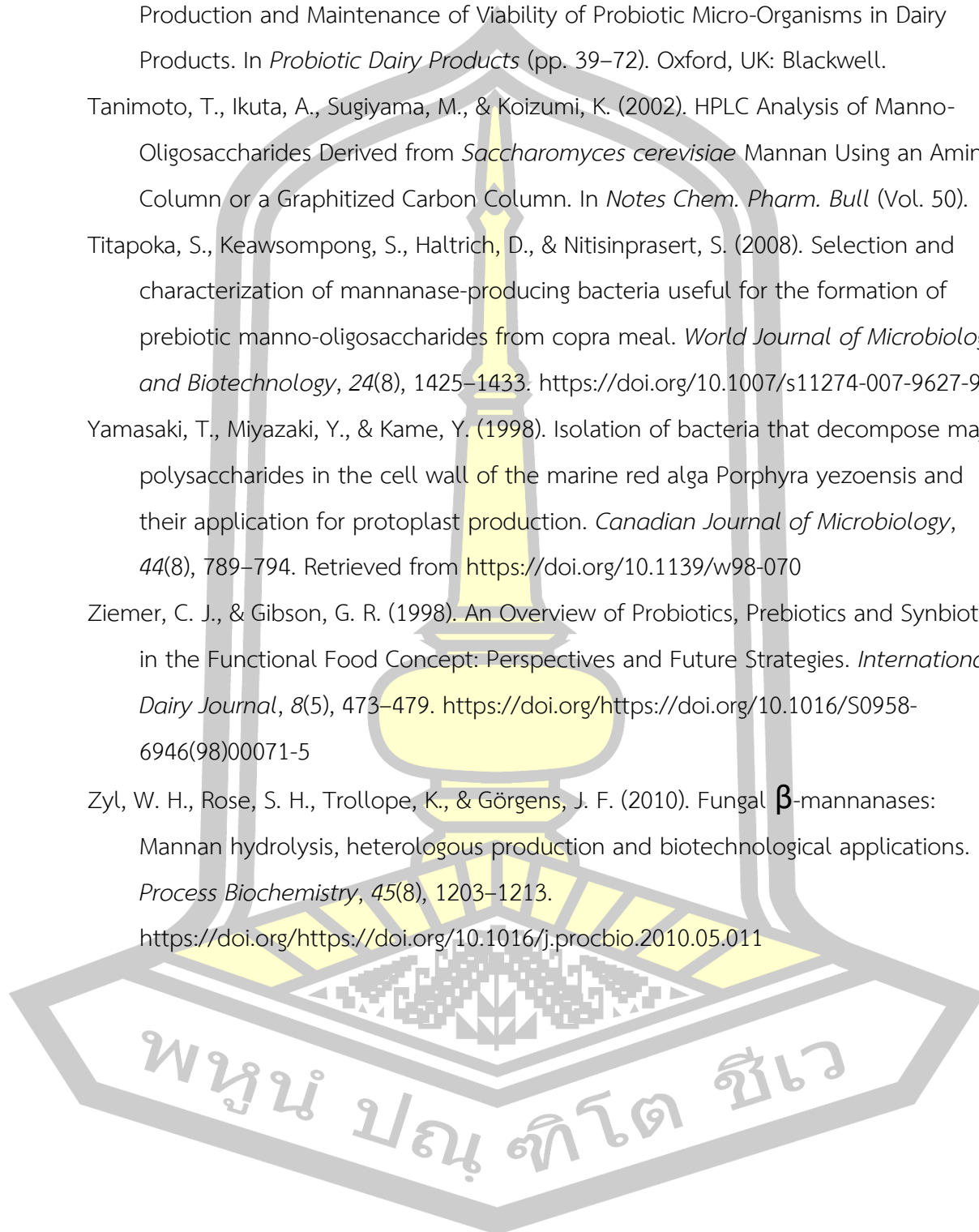
Oligosaccharides Derived from *Saccharomyces cerevisiae* Mannan Using an Amino Column or a Graphitized Carbon Column. In *Notes Chem. Pharm. Bull* (Vol. 50).

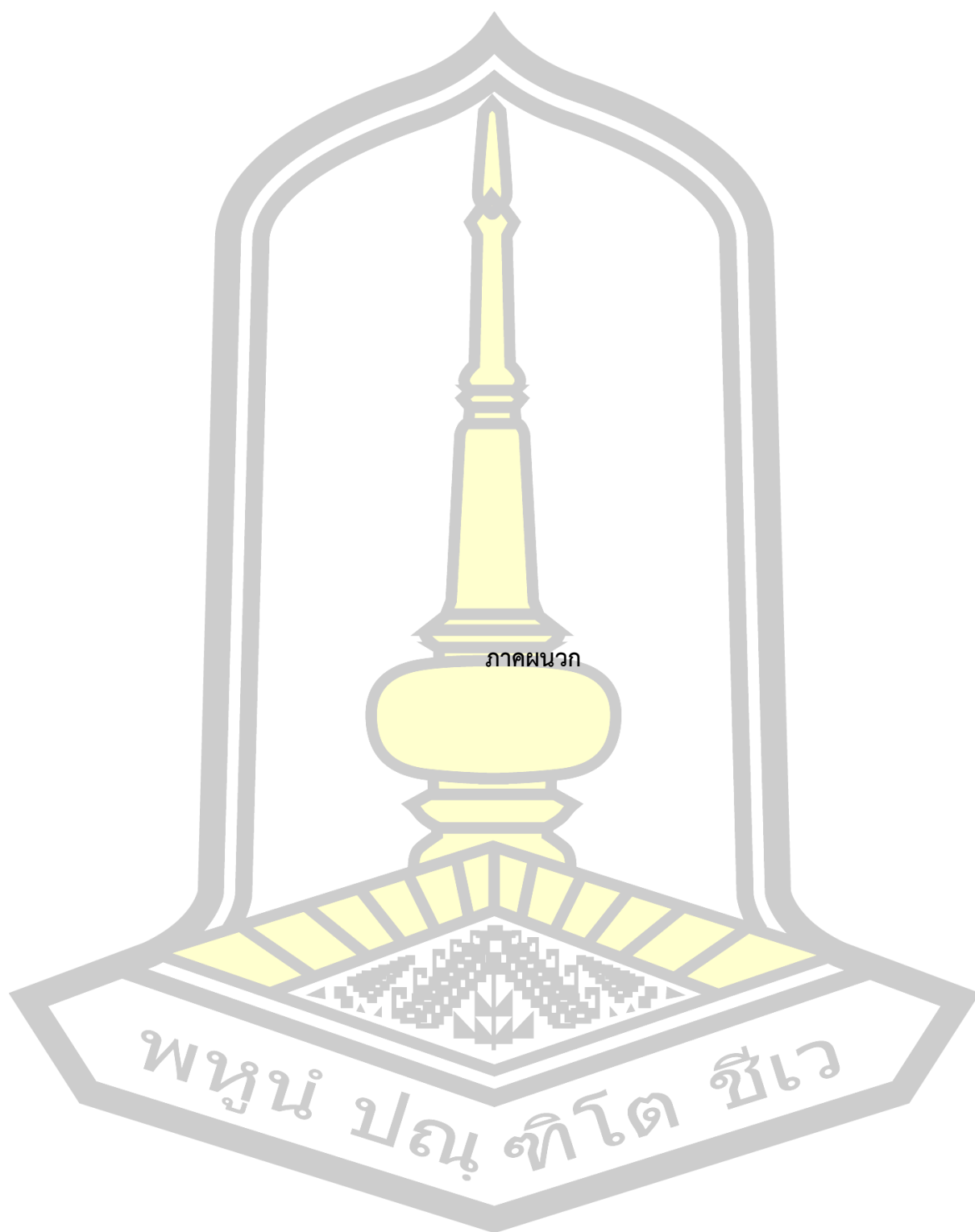
Titapoka, S., Keawsompong, S., Haltrich, D., & Nitisinprasert, S. (2008). Selection and characterization of mannanase-producing bacteria useful for the formation of prebiotic manno-oligosaccharides from copra meal. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(8), 1425–1433. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9627-9>

Yamasaki, T., Miyazaki, Y., & Kame, Y. (1998). Isolation of bacteria that decompose major polysaccharides in the cell wall of the marine red alga *Porphyra yezoensis* and their application for protoplast production. *Canadian Journal of Microbiology*, 44(8), 789–794. Retrieved from <https://doi.org/10.1139/w98-070>

Ziemer, C. J., & Gibson, G. R. (1998). An Overview of Probiotics, Prebiotics and Synbiotics in the Functional Food Concept: Perspectives and Future Strategies. *International Dairy Journal*, 8(5), 473–479. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(98\)00071-5](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(98)00071-5)

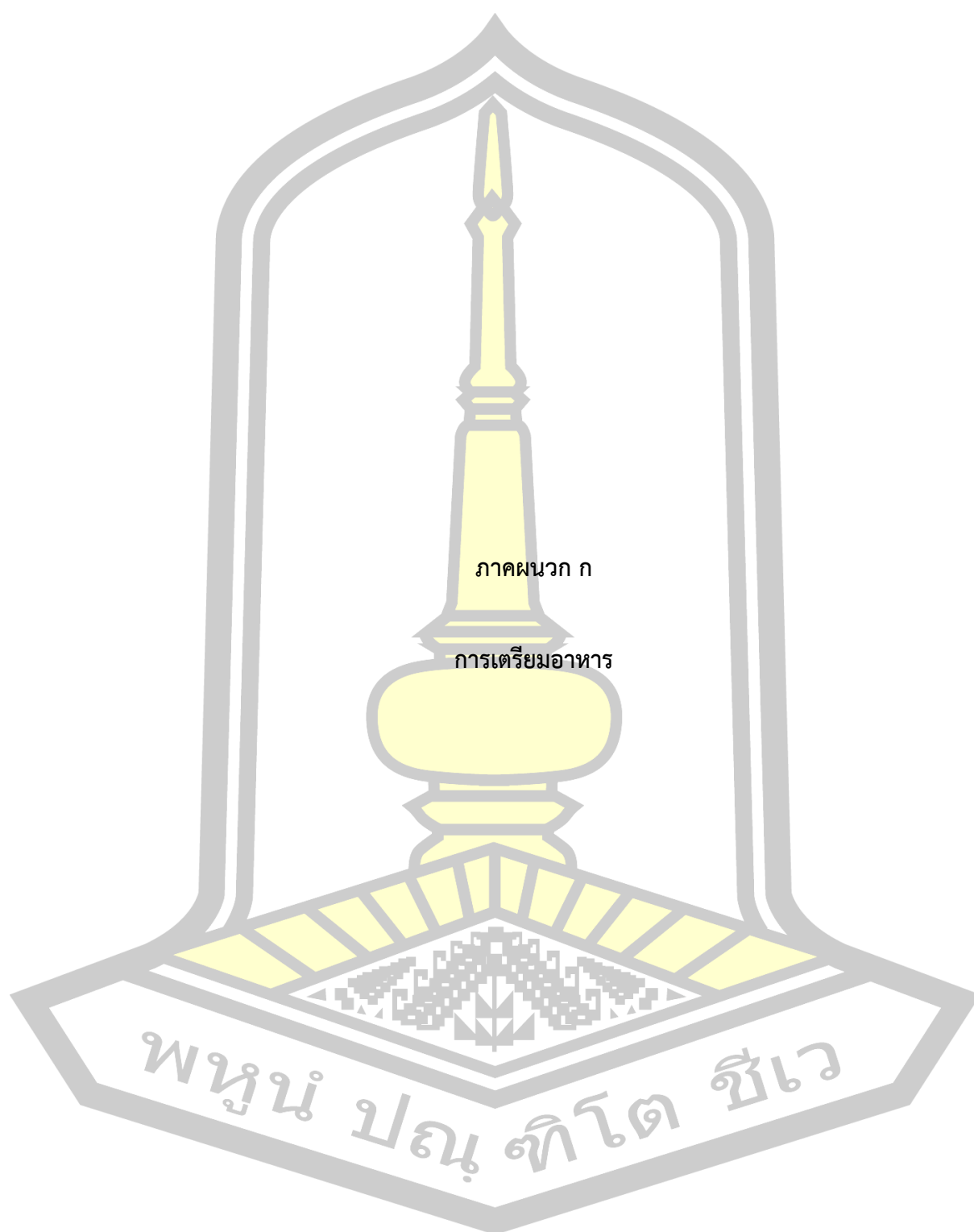
Zyl, W. H., Rose, S. H., Trollope, K., & Görgens, J. F. (2010). Fungal β -mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. *Process Biochemistry*, 45(8), 1203–1213. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2010.05.011>





ภาคผนวก

พูนัน ปณ จิต ชีเว



1. Nutrient agar (NA)

Nutrient broth (Himedia, India)	13.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1,000 ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นจนส่วนผสมละลายเข้ากันดีนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ

121 °C ความดัน 15 psi นาน 15 min

2. Nutrient broth (NB)

Nutrient broth (Himedia, India)	13.0 g
Distilled water	1,000 ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นจนส่วนผสมละลายเข้ากันดีนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ

121 °C ความดัน 15 psi นาน 15 min

3. Nutrient broth (NB) + กาخمะพร้าว 1%

Nutrient broth (Himedia, India)	3.25 g
กาخمะพร้าว	2.50 g
Distilled water	250 ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นจนส่วนผสมละลายเข้ากันดีนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ

121 °C ความดัน 15 psi นาน 15 min

4. Nutrient broth (NB) + กาخمะพร้าว 2 %

Nutrient broth (Himedia, India)	3.25 g
กาخمะพร้าว	5.00 g
Distilled water	250 ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นจนส่วนผสมละลายเข้ากันดีนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ

121 °C ความดัน 15 psi นาน 15 min

5. Nutrient broth (NB) + กากมะพร้าว 3%

Nutrient broth (Himedia, India)	3.25 g
กากมะพร้าว	7.50 g
Distilled water	250 ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นจนส่วนผสมละลายเข้ากันดีนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ

121 °C ความดัน 15 psi นาน 15 min

6. Nutrient broth (NB) + Locus bean gum (LBG) 1%

Nutrient broth (Himedia, India)	3.25 g
Locus bean gum (LBG)	2.50 g
Distilled water	250 ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นจนส่วนผสมละลายเข้ากันดีนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ

121 °C ความดัน 15 psi นาน 15 min

7. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85%

NaCl	8.5 g
Distilled water	1,000 ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นจนส่วนผสมละลายเข้ากันดีนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ

121 °C ความดัน 15 psi นาน 15 min

8. 1% Locus bean gum (LBG) pH 7

Locus bean gum (LBG)	5 g
Phosphate Buffers (pH 7)	500 ml

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มเดือดด้วย hot plate ประมาณ 15 min ทิ้งไว้ให้

เย็น นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm นาน 15 min เพื่อแยกตะกอนออกจากส่วนใส แล้ว

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 psi นาน 15 min

9. De Man Rogosa and Sharpe (MRS) ปกติ

Protease peptone	10.0 g
Beef extract	10.0 g
Yeast extract	5.0 g
Glucose	20 g
Tween 80	1.0 g
Ammonium citrate	2.0 g
Sodium acetate	5.0 g
Magnesium sulfate	0.1 g
Manganese sulfate	0.05 g
Dipotassium phosphate	2.0 g
Agar	15.0 g
Distilled water	1,000 ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นจนส่วนผสมละลายเข้ากันดี ปรับให้พีเอชเท่ากับ 7 ด้วย NaOH และ HCl นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 psi นาน 15 min

10. MRS glucose + Mannooligosaccharide (48h) ความเข้มข้น 15 mg/ml

Protease peptone	1.0 g
Beef extract	1.0 g
Yeast extract	0.5 g
Glucose	2.0 g
Mannooligosaccharide (48h)	1.5 g
Tween 80	0.1 g
Ammonium citrate	0.2 g
Sodium acetate	0.5 g
Magnesium sulfate	0.01 g
Manganese sulfate	0.005 g
Dipotassium phosphate	0.2 g

Agar	1.5 g
Distilled water	100 ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นจนส่วนผสมละลายเข้ากันดี ปรับให้พีเอชเท่ากับ 7 ด้วย NaOH และ HCl นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 psi นาน 15 min

11. MRS non glucose + Mannooligosaccharide (48h) ความเข้มข้น 15 mg/ml

Protease peptone	1.0 g
Beef extract	1.0 g
Yeast extract	0.5 g
Mannooligosaccharide (48h)	1.5 g
Tween 80	0.1 g
Ammonium citrate	0.2 g
Sodium acetate	0.5 g
Magnesium sulfate	0.01 g
Manganese sulfate	0.005 g
Dipotassium phosphate	0.2 g
Agar	1.5 g
Distilled water	100 ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นจนส่วนผสมละลายเข้ากันดี ปรับให้พีเอชเท่ากับ 7 ด้วย NaOH และ HCl นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 psi นาน 15 min

12. MRS glucose + Mannooligosaccharide (96h) ความเข้มข้น 15 mg/ml

Protease peptone	1.0 g
Beef extract	1.0 g
Yeast extract	0.5 g
Glucose	2.0 g
Mannooligosaccharide (96h)	1.5 g
Tween 80	0.1 g
Ammonium citrate	0.2 g

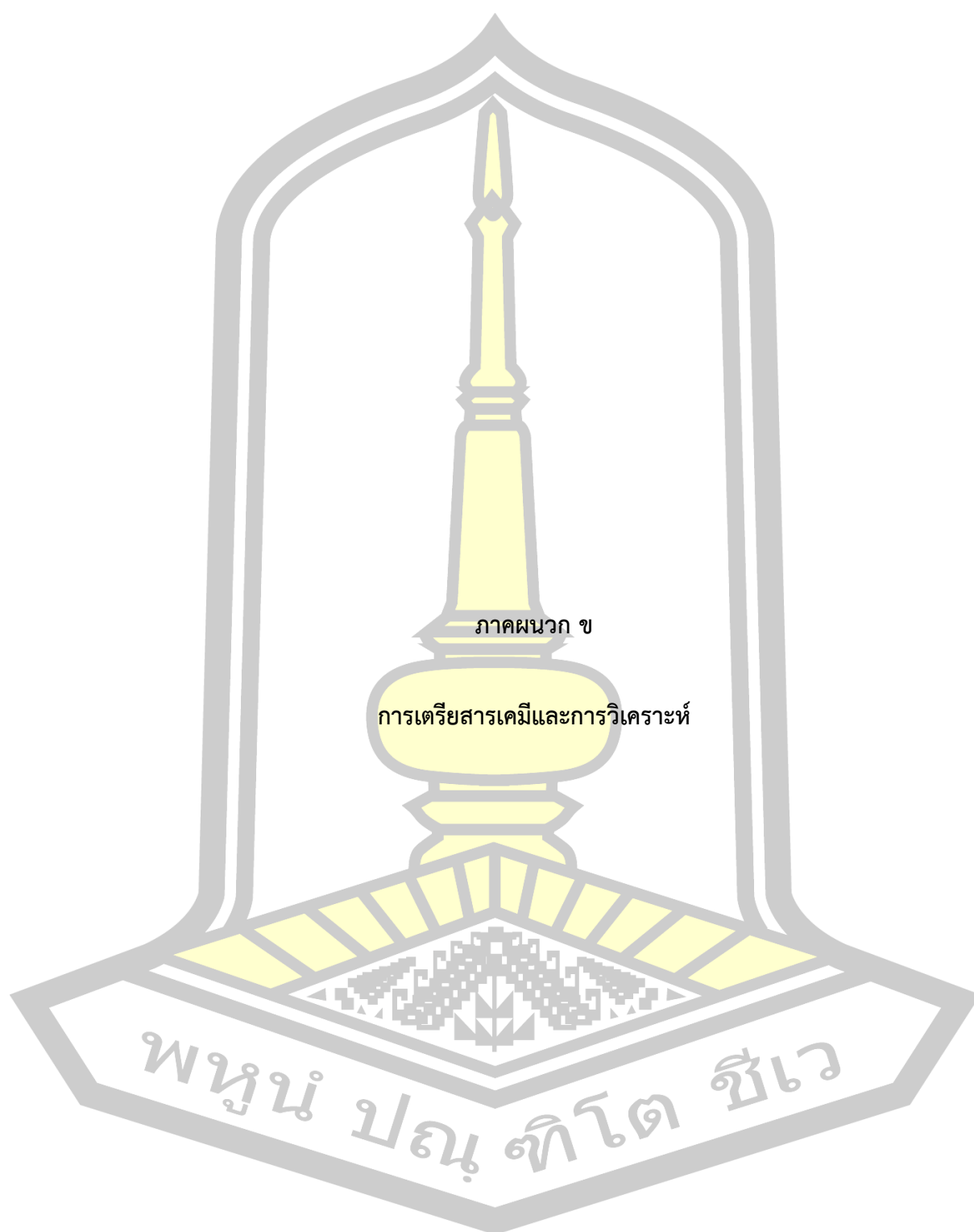
Sodium acetate	0.5 g
Magnesium sulfate	0.01 g
Manganese sulfate	0.005 g
Dipotassium phosphate	0.2 g
Agar	1.5 g
Distilled water	100 ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นจนส่วนผสมละลายเข้ากันดี ปรับให้พีเอชเท่ากับ 7 ด้วย NaOH และ HCl นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 psi นาน 15 min

13. MRS non glucose + Mannooligosaccharide (96h) ความเข้มข้น 15 mg/ml

Protease peptone	1.0 g
Beef extract	1.0 g
Yeast extract	0.5 g
Mannooligosaccharide (96h)	1.5 g
Tween 80	0.1 g
Ammonium citrate	0.2 g
Sodium acetate	0.5 g
Magnesium sulfate	0.01 g
Manganese sulfate	0.005 g
Dipotassium phosphate	0.2 g
Agar	1.5 g
Distilled water	100 ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นจนส่วนผสมละลายเข้ากันดี ปรับให้พีเอชเท่ากับ 7 ด้วย NaOH และ HCl นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 psi นาน 15 min



1. เทคนิคการย้อมแกรม

1.1 วิธีเตรียมสไลด์

- 1) นำห่วงถ่ายเชื้อ (Loop) เผาไฟจนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปแตะหยดน้ำ นำมาแตะวางบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด
- 2) นำห่วงถ่ายเชื้อ (Loop) เผาไฟจนแดง ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปแตะเชื้อ *B. methylotrophicus* KS1 มาผสมกันในหยดน้ำบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด
- 3) Smear เชื้อที่อยู่ในหยดน้ำให้กระจายออกเป็นบริเวณบาง ๆ
- 4) ปล่อยให้สไลด์แห้งในอากาศให้แห้ง (Air dry)
- 5) ทำให้แบคทีเรียติดแน่นบนสไลด์ โดยใช้ความร้อน (Heat fixed) คือ นำสไลด์ไปผ่านเปลวไฟอ่อน ๆ จากตะเกียงแอลกอฮอล์ ประมาณ 5-6 ครั้ง (ลนจากซ้าย ไปขวา นับ 1) ลองสไลด์แตะบนหลังมือ ถ้าสไลด์อุ่น ๆ ก็ใช้ได้
- 6) ปล่อยให้สไลด์เย็นลงแล้วนำไปทำการย้อมสีแกรมต่อไป

1.2 วิธีการย้อมสีแกรม

- 1) หยดสี Crystal violet ลงบนแผ่นสไลด์ เป็นเวลา 1 min แล้วล้างออกด้วยน้ำ
- 2) หยด Gram iodine ลงบนแผ่นสไลด์ เป็นเวลา 1 min แล้วล้างออกด้วยน้ำ
- 3) ล้างแผ่นสไลด์ด้วย Acetone-alcohol (Decolorizer) ให้ Iodine ออกเหลือจาง ๆ แล้วล้างออกด้วยน้ำ
- 4) ย้อมทับด้วยสี Safranin O เป็นเวลา 30-60 seconds แล้วล้างออกด้วยน้ำ ซับด้วยกระดาษทิชชูให้แห้ง
- 5) ทำการตรวจดูด้วย Oil immersion lens ของกล้องจุลทรรศน์แบบที่เรียกว่าเป็นแกรมบวก จะติดสีม่วง หรือน้ำเงินของ Crystal violet และแบคทีเรียที่เป็นแกรมลบ จะติดสีแดง หรือชมพูของ Safranin O

2. เทคนิคการย้อมแอนโดสปอร์

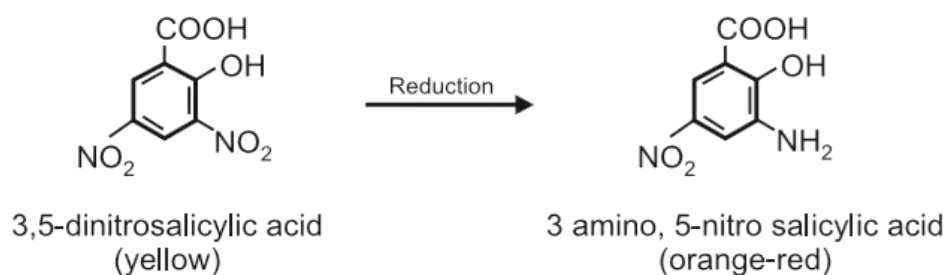
2.1 วิธีการย้อมสีแอนโดสปอร์

- 1) นำเชื้อ KS1 มาทำ Smear แยกกันสองแห่งบนสไลด์แผ่นเดียวกัน
- 2) ปล่อยให้สไลด์ให้แห้ง แล้วนำไปผ่านเปลวไฟ
- 3) ปล่อยให้สไลด์บนที่ย้อมสี

- 4) ใส่สี Malachite green ลงบนสไลด์จนท่วมบริเวณที่มีแบคทีเรีย
- 5) ใช้เปลมไฟอ่อนๆ จากตะเกียงแอลกอฮอล์จนเป็นเวลาประมาณ 5 min ระวังอย่าให้สีย้อมแห้งเต็มสีย้อมเมื่อจำเป็น
- 6) ทิ้งสไลด์จนเย็น ล้างด้วยน้ำ แล้วซับให้แห้ง
- 7) ใส่สี Safranin O ลงไป ทิ้งไว้ 30-60 seconds
- 8). ล้างด้วยน้ำแล้วซับให้แห้ง
- 9) นำสไลด์ไปตรวจดูด้วยเลนส์หัวน้ำมัน (100X) สปอร์จะติดสีเขียว ส่วนเซลล์จะติดสีแดง

3. การตรวจสอบปริมาณน้ำตาลด้วยวิธีการใช้กรดไดไนโตรซาลิไซลิก

การตรวจสอบปริมาณน้ำตาลด้วยกรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-dinitrosalicylic acid, DNS) เป็นวิธีที่ใช้ในการหาปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) ในตัวอย่างสารที่ต้องการตรวจวัด โดยสารละลาย DNS ซึ่งมีหมู่ไนโตร 2 หมู่ จะมีลักษณะสีเหลืองเมื่อหมู่ไนโตร 1 หมู่ถูกรีดิวซ์โดยหมู่แอลดีไฮด์ของน้ำตาลโดยมีความร้อนและสารละลายต่าง (NaOH) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะทำให้สารละลาย 3,5-dinitrosalicylate กลายเป็น 3-amino-5-nitrosalicylic acid ที่มีสีส้มแดง ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 520-540 nm



ภาพประกอบ ข 1 ปฏิกิริยาของการตรวจสอบน้ำตาลด้วยวิธีการใช้กรดไดไนโตรซาลิไซลิกและกลไกการเกิดสีส้มแดงของปฏิกิริยาการวัดน้ำตาล

4. การวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)

4.1 วิธีการเตรียมสารเคมี (Rattanasuk et al., 2015)

1) น้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 10 (mg/ml) เตรียมโดยชั่งกลูโคส 1 g ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 ml

2) สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก DNS เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 8 g ละลายในปริมาตร 100 ml ชั่ง DNS 5 g ผสมให้เข้ากัน ชั่งโซเดียมโพแทสเซียมทาทา-เทรท ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$) 150 g ผสมให้เข้ากัน ทำให้ละลายด้วยเครื่อง hot plate ปรับปริมาตรน้ำกลั่นให้ครบ 500 ml เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

4.2 วิธีการทำมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

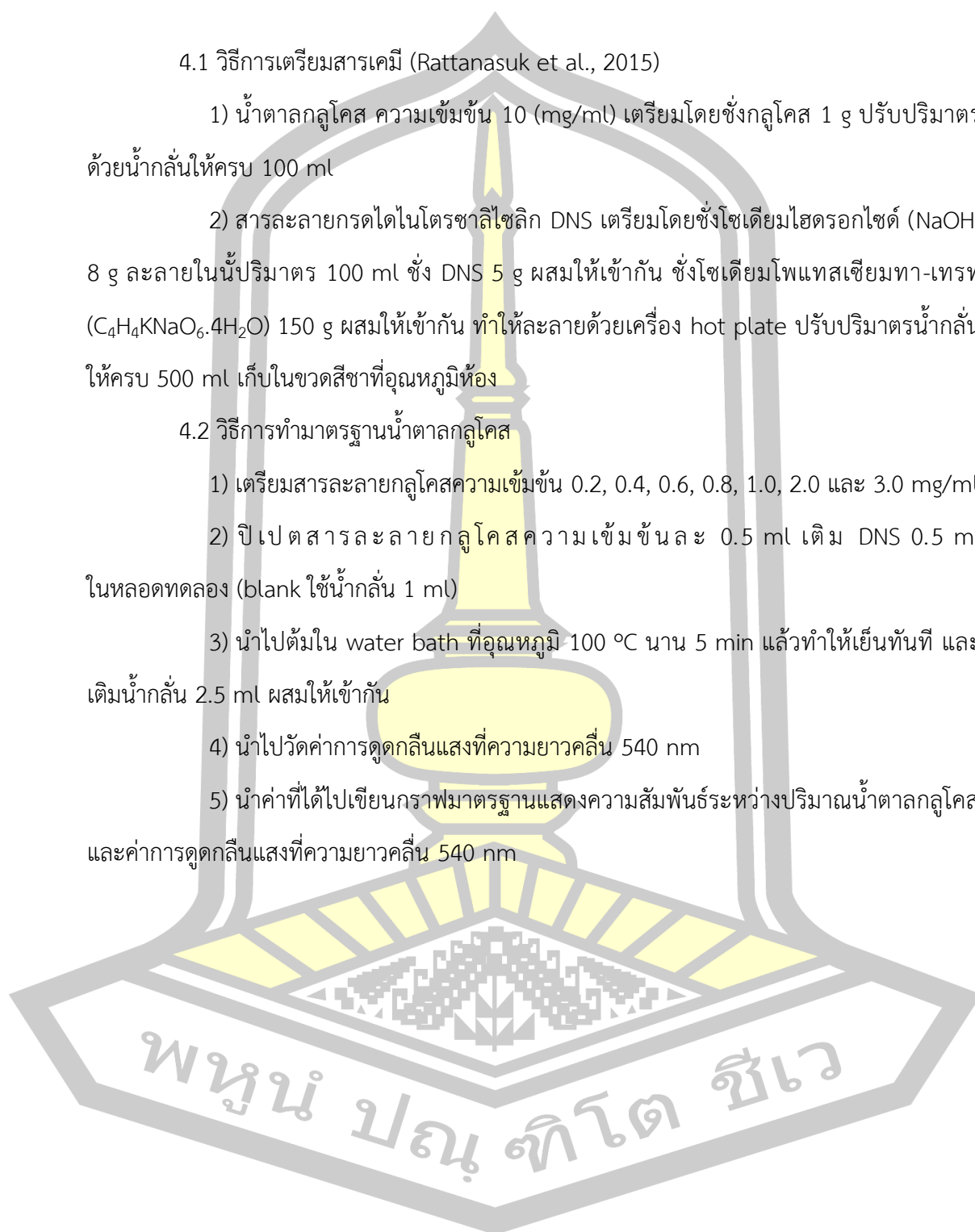
1) เตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 2.0 และ 3.0 mg/ml

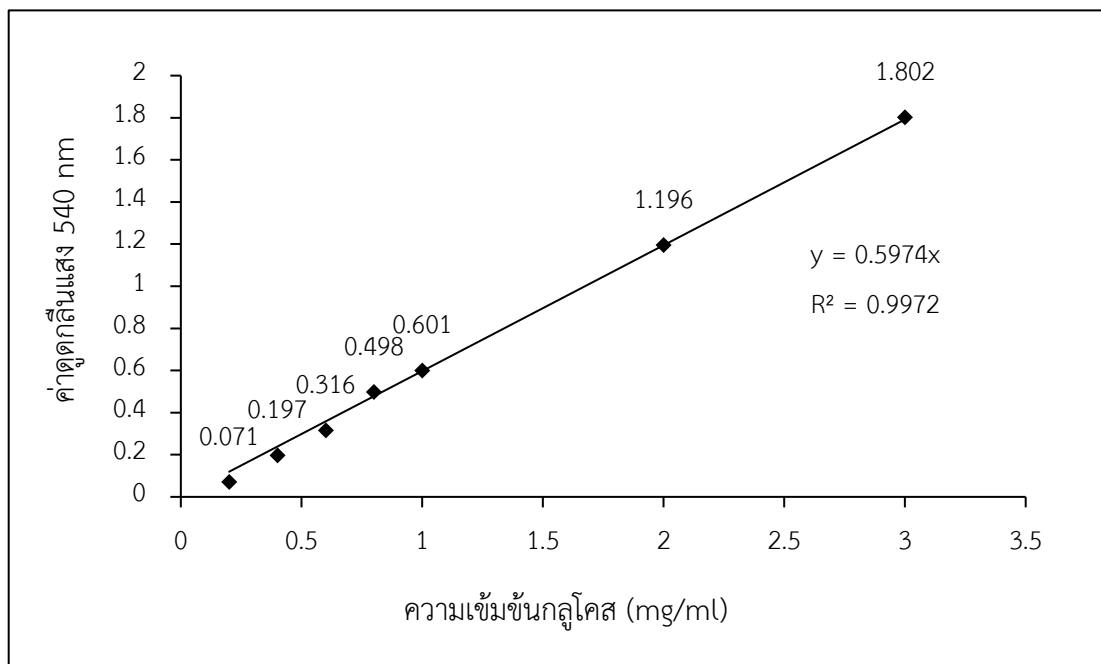
2) ปิเปตสารละลายกลูโคสความเข้มข้นละ 0.5 ml เติมน้ำกลั่น DNS 0.5 ml ในหลอดทดลอง (blank ใช้ น้ำกลั่น 1 ml)

3) นำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 5 min แล้วทำให้เย็นทันที และเติมน้ำกลั่น 2.5 ml ผสมให้เข้ากัน

4) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm

5) นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคส และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm





ภาพประกอบ ข 2 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี DNS ที่ความยาวคลื่น 540 nm

4.3 วิธีวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายตัวอย่าง

ปิเปตสารตัวอย่างปริมาตร 0.5 ml จากนั้นเติม DNS 0.5 ml และเติมน้ำกลั่นปริมาตร 2.5 ml ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 5 min แล้วจุ่มลงในน้ำเย็นทันที จากนั้นนำไปวัดค่าความขุ่นที่ OD 540 nm และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยคำนวณจากกราฟสมการเส้นตรงที่ได้จากเส้นกราฟมาตรฐานกลูโคสในข้อ 4.2

4.4 การคำนวณหาปริมาณน้ำตาล mg/ml

คำนวณจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

$$y = 0.5974x$$

5. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี (Phenol Sulfuric)

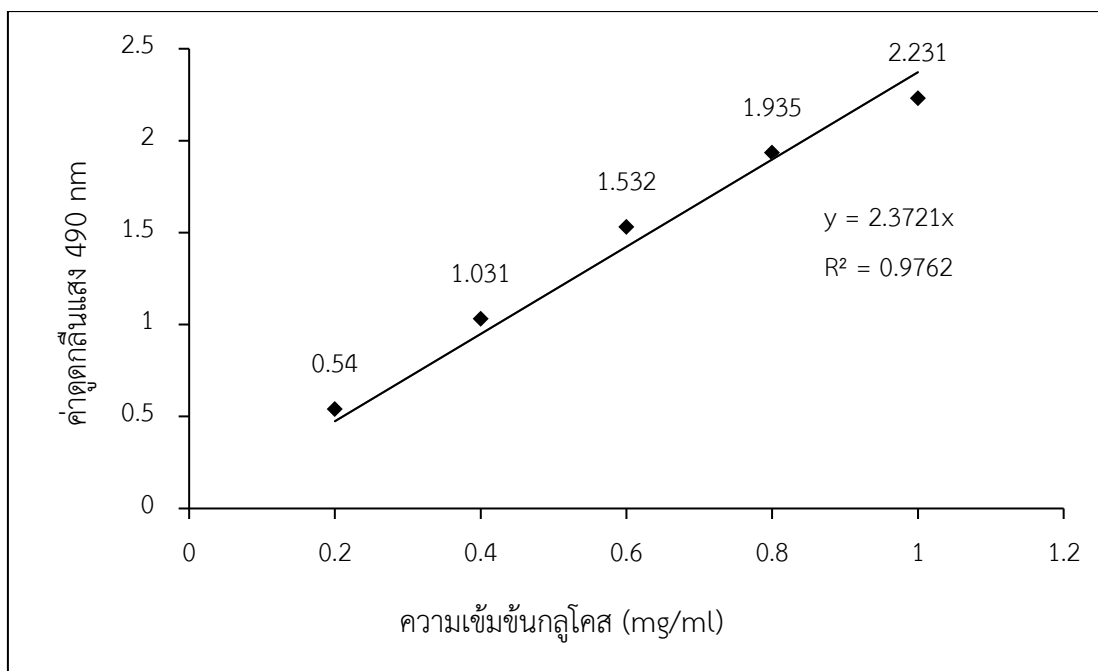
5.1 การเตรียมสารเคมี (James, 1998)

- 1) กรดซัลฟริกเข้มข้น (reagent grade 95.5%)
- 2) สารละลายฟีนอล เข้มข้น 5% (w/v)

5.2 วิธีการเตรียมสารกลูโคสมาตรฐาน

- 1) เตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, และ 1.0 (mg/ml) และใช้น้ำกลั่นเป็นแบลนด์
- 2) ปิเปตสารละลายกลูโคสมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 0.5 ml ลงในหลอดที่มีฝาปิด เติมฟีนอลเข้มข้น 5% (w/v) ปริมาตร 500 μ l พร้อมทั้งเขย่าเบาๆ นาน 2 min
- 3) จากนั้นเติมกรดซัลฟริกเข้มข้น 2.5 ml และเขย่าอีกครั้งเพื่อให้สารผสมเข้ากันอีก 2 min
- 4) จากนั้นนำสารผสมไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 85 °C เป็นเวลา 30 min แล้วทำให้เย็นทันที
- 5) นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 nm ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer
- 6) นำข้อมูลมาสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยการสร้างกราฟเส้นตรง เพื่อแสดงความสัมพันธ์ค่าเฉลี่ยดูดกลืนแสง (แกน Y) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (แกน X) วิเคราะห์หาสมการเส้นตรงและค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, R^2)

พูน ปณ จิต ชีเว



ภาพประกอบ ข 3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี Phenol Sulfuric ที่ความยาวคลื่น 492 nm

5.3. วิธีวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด

ปิเปตสารตัวอย่างปริมาตร 500 μL ลงในหลอดที่มีฝาปิด เติมนิฮอลเข้มข้น 5% (w/v) ปริมาตร 500 μL พร้อมเขย่าเบาๆ นาน 2 min เพื่อให้สารผสมกันและใช้อาหาร NB เป็นแบลนด์ จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 2.5 ml และเขย่าอีกครั้งเพื่อให้เข้ากันอีก 2 min จากนั้นนำสารผสมไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 85 $^{\circ}\text{C}$ นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาว 492 nm ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer นำข้อมูลที่ได้หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยคำนวณจากกราฟสมการเส้นตรงที่ได้จากเส้นกราฟมาตรฐานกลูโคสในข้อ 5.2

5.4 การคำนวณหาปริมาณน้ำตาล mg/ml

คำนวณจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของน้ำตาลทั้งหมด

$$y = 2.3721x$$

6. การวัดกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส

นำเชื้อ *B. methylotrophicus* KS1 (10^8 CFU/ml) ที่มีการแปรรูปความเข้มข้นหัวเชื้อ เริ่มต้นที่ระดับ 1%, 2% และ 3% (v/v) ใส่ลงในอาหาร NB 250 ml ผสมกับกากมะพร้าวโดยแปรรูป ปริมาณกากมะพร้าว ที่ระดับ 1%, 2% และ 3% (w/v) โดยใช้ LBG เป็นชุดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เก็บตัวอย่างปริมาณ 2.0 ml ที่เวลา 0, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 และ 48 h แล้วนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 20 min เพื่อแยกแบคทีเรียออกจากอาหารเหลว แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปใช้เป็น Crude mannanase เพื่อนำไปใช้ทดสอบปริมาณน้ำตาล และกิจกรรมของเอนไซม์ต่อไป ส่วนผลแสดงดังแสดงในตาราง ข 1



ตาราง ข 1 แสดงส่วนประกอบในการทดสอบกิจกรรมแมนนาเนส

หลอดที่	เวลา	1%LBG ใน phosphate buffer pH7 (μl)	Crude mannanase (μl)	ส่วนของแบคทีเรีย ที่เลี้ยงใน NB+กาก มะพร้าวที่ระดับ 1%, 2% และ 3% (μl)	น้ำกลั่น (μl)
1	0	500	ตัวอย่างที่ 1 500	-	-
2	3	500	ตัวอย่างที่ 2 500	-	-
3	6	500	ตัวอย่างที่ 3 500	-	-
4	12	500	ตัวอย่างที่ 4 500	-	-
5	18	500	ตัวอย่างที่ 5 500	-	-
6	24	500	ตัวอย่างที่ 6 500	-	-
7	30	500	ตัวอย่างที่ 7 500	-	-
8	36	500	ตัวอย่างที่ 8 500	-	-
9	42	500	ตัวอย่างที่ 9 500	-	-
10	48	500	ตัวอย่างที่ 10 500	-	-
11	0	-	ตัวอย่างที่ 1 500	-	500
12	3	-	ตัวอย่างที่ 2 500	-	500
13	6	-	ตัวอย่างที่ 3 500	-	500
14	12	-	ตัวอย่างที่ 4 500	-	500
15	18	-	ตัวอย่างที่ 5 500	-	500
16	24	-	ตัวอย่างที่ 6 500	-	500
17	30	-	ตัวอย่างที่ 7 500	-	500
18	36	-	ตัวอย่างที่ 8 500	-	500
19	42	-	ตัวอย่างที่ 9 500	-	500
20	48	-	ตัวอย่างที่ 10 500	-	500
21	0	500	-	ตัวอย่างที่ 1 500	-
22	3	500	-	ตัวอย่างที่ 2 500	-

ตาราง ข 1 แสดงส่วนประกอบในการทดสอบกิจกรรมแมนนาเนส (ต่อ)

หลอดที่	เวลา	1%LBG ใน phosphate buffer pH7 (μl)	Crude mannanase (μl)	ส่วนใสของแบคทีเรีย ที่เลี้ยงใน NB+กาก มะพร้าวที่ระดับ 1%, 2% และ 3% (μl)	น้ำกลั่น (μl)
23	6	500	-	ตัวอย่างที่ 3 500	-
24	12	500	-	ตัวอย่างที่ 4 500	-
25	18	500	-	ตัวอย่างที่ 5 500	-
26	24	500	-	ตัวอย่างที่ 6 500	-
27	30	500	-	ตัวอย่างที่ 7 500	-
28	36	500	-	ตัวอย่างที่ 8 500	-
29	42	500	-	ตัวอย่างที่ 9 500	-
30	48	500	-	ตัวอย่างที่ 10 500	-
Control	-	500	-	-	500
Blank	-		-	-	1,000

6.1 ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนส

ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันในหลอดทดลองตามตาราง ข 1 จากนั้นเติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 ml ลงไปในทุกหลอดทดลองและนำไปต้มไ้ที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 5 min แล้วแช่หลอดทดลองลงในน้ำเย็นเพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นนำทุกหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือด 5 min แล้วแช่หลอดทดลองลงในน้ำเย็นเพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 5 ml เขย่าให้สารผสมเข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm เพื่อตรวจวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนส

6.2 วิเคราะห์ผลการทดลอง

1) ตรวจวัดปริมาณน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของแมนนาเนส

คำนวณหาปริมาณน้ำตาล mg/ml ได้โดยคำนวณจากสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

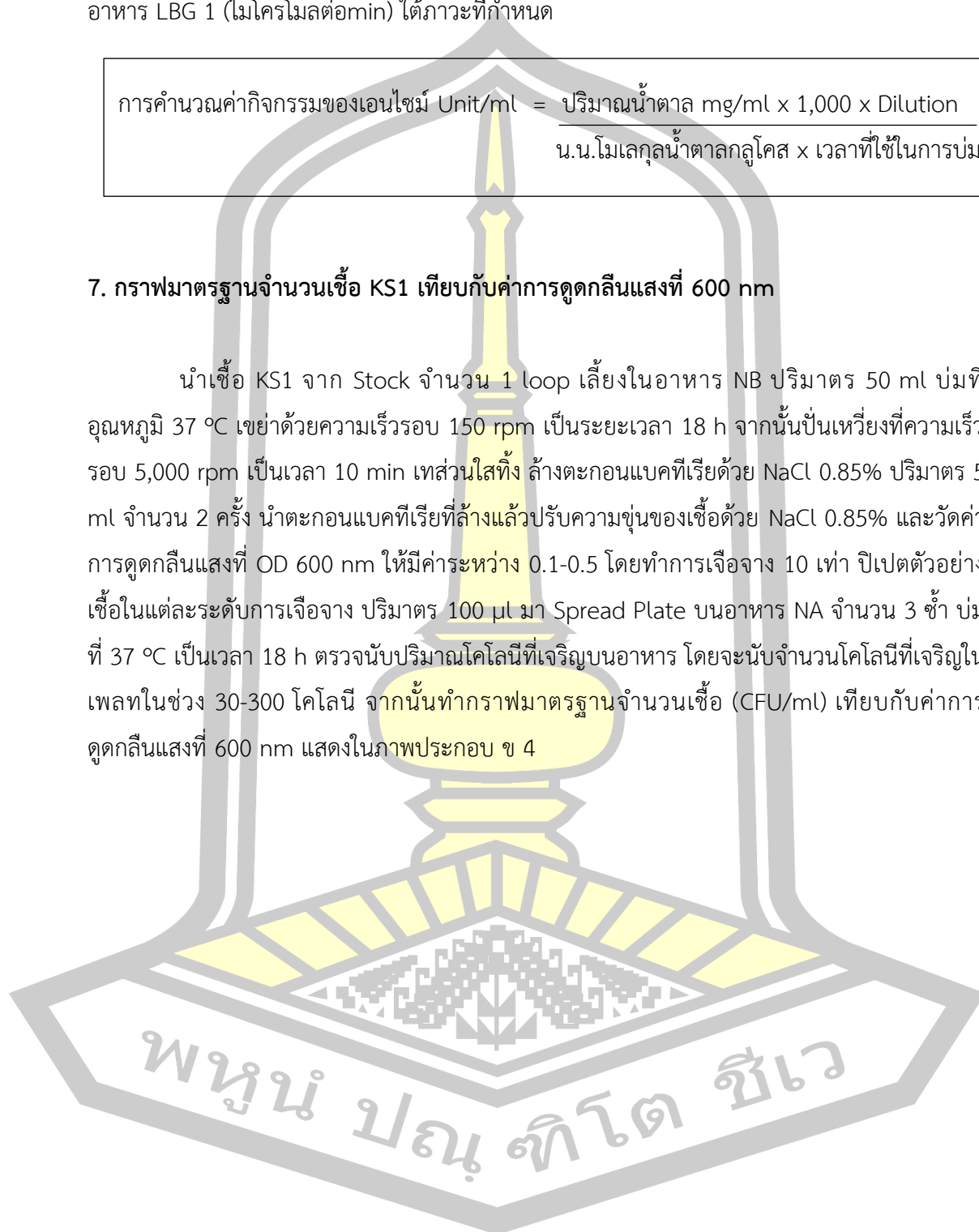
2) ตรวจวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนส

โดยแสดงในหน่วย Unit/ml หมายถึงปริมาณของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาให้เกิดแมนโนสในอาหาร LBG 1 (ไมโครโมลต่อmin) ได้ภาวะที่กำหนด

$$\text{การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Unit/ml} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาล mg/ml} \times 1,000 \times \text{Dilution}}{\text{น.น.โมเลกุลน้ำตาลกลูโคส} \times \text{เวลาที่ใช้ในการบ่ม}}$$

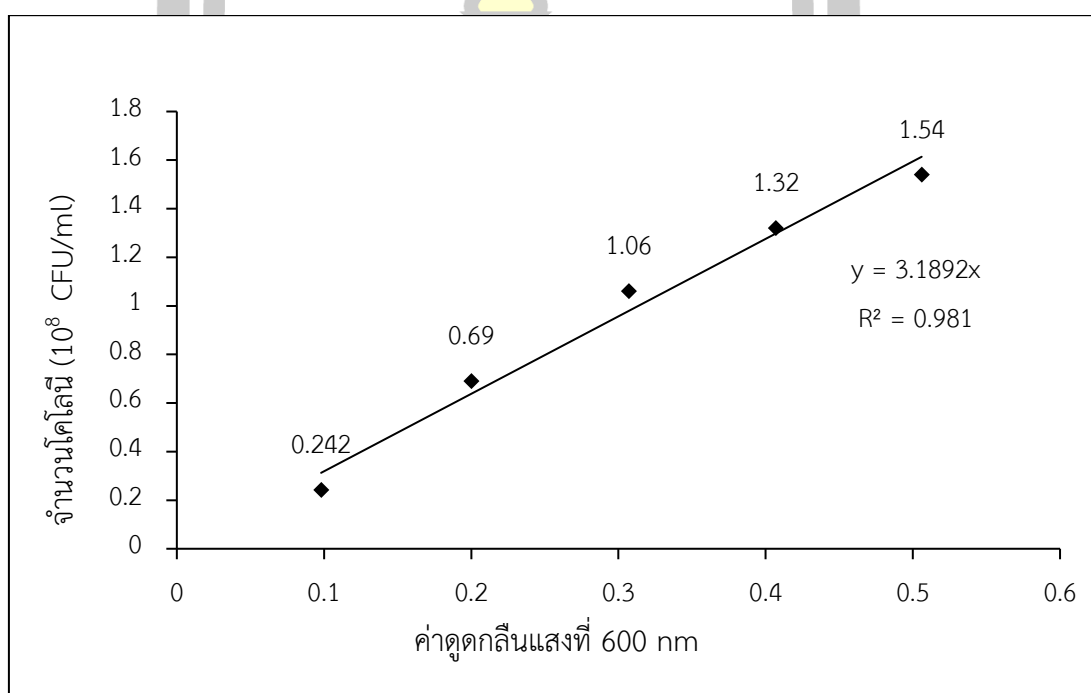
7. กราฟมาตรฐานจำนวนเชื้อ KS1 เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm

นำเชื้อ KS1 จาก Stock จำนวน 1 loop เลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 50 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 rpm เป็นระยะเวลา 18 h จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นเวลา 10 min เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนแบคทีเรียด้วย NaCl 0.85% ปริมาตร 5 ml จำนวน 2 ครั้ง นำตะกอนแบคทีเรียที่ล้างแล้วปรับความเข้มข้นของเชื้อด้วย NaCl 0.85% และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD 600 nm ให้มีค่าระหว่าง 0.1-0.5 โดยทำการเจือจาง 10 เท่า ปิเปิดตัวอย่างเชื้อในแต่ละระดับการเจือจาง ปริมาตร 100 µl มา Spread Plate บนอาหาร NA จำนวน 3 ซ้ำ บ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 18 h ตรวจนับปริมาณโคโลนีที่เจริญบนอาหาร โดยจะนับจำนวนโคโลนีที่เจริญในเพลทในช่วง 30-300 โคโลนี จากนั้นทำกราฟมาตรฐานจำนวนเชื้อ (CFU/ml) เทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm แสดงในภาพประกอบ ข 4



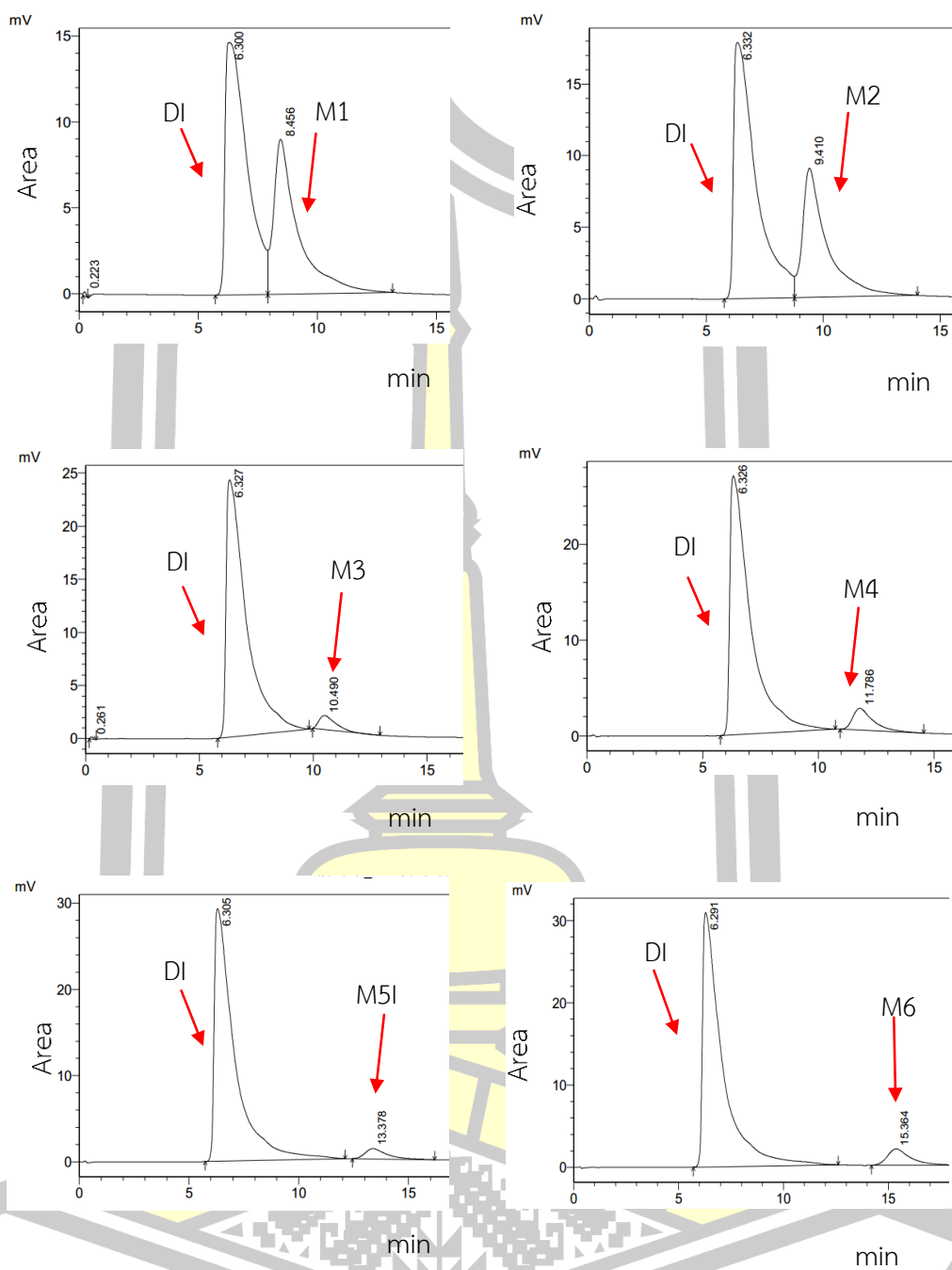
ตาราง ข 2 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อ KS1 กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm

ค่าดูดกลืนแสง 600 nm	จำนวนโคโลนี (CFU/ml)
0.1	0.24×10^8
0.2	0.69×10^8
0.3	1.06×10^8
0.4	1.32×10^8
0.5	1.54×10^8

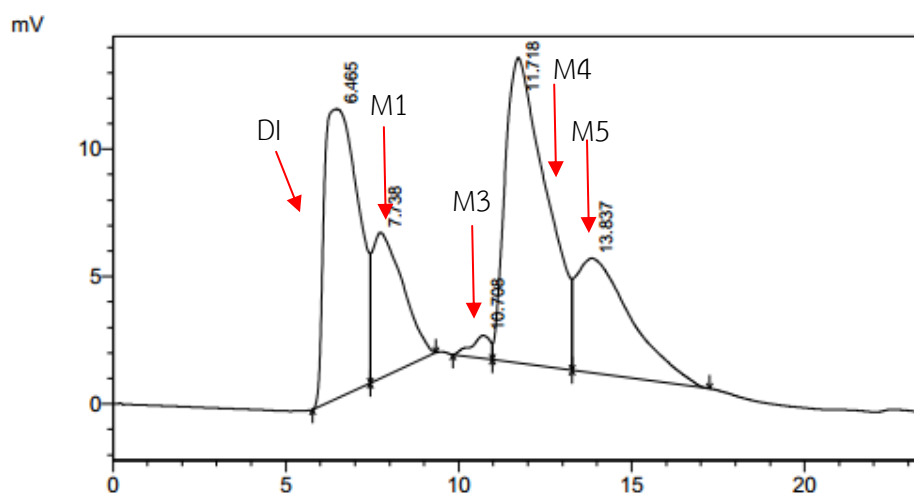


ภาพประกอบ ข 4 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อ KS1 กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm





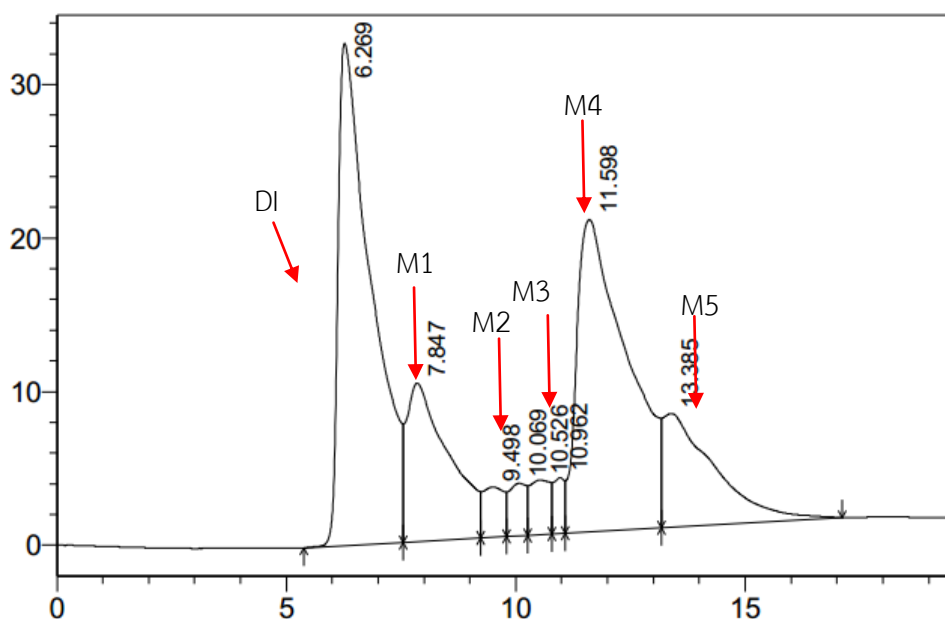
ภาพประกอบ ข.5 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานคือ แมนโนส (M1) แมนโนไบโอส (M2) แมนโนไตรโอส (M3) แมนโนเตตราโอส (M4) แมนโนเพนโตส (M5) และ แมนโนเฮกโซส (M6) และพีค Deionized water (DI)



ภาพประกอบ ข 6 โครมาโตแกรมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้นที่ระดับ 1% (v/v) ของเชื้อ KS1 ที่เลี้ยงในกากมะพร้าวปริมาณ 3% (w/v) ที่เวลา 48 h

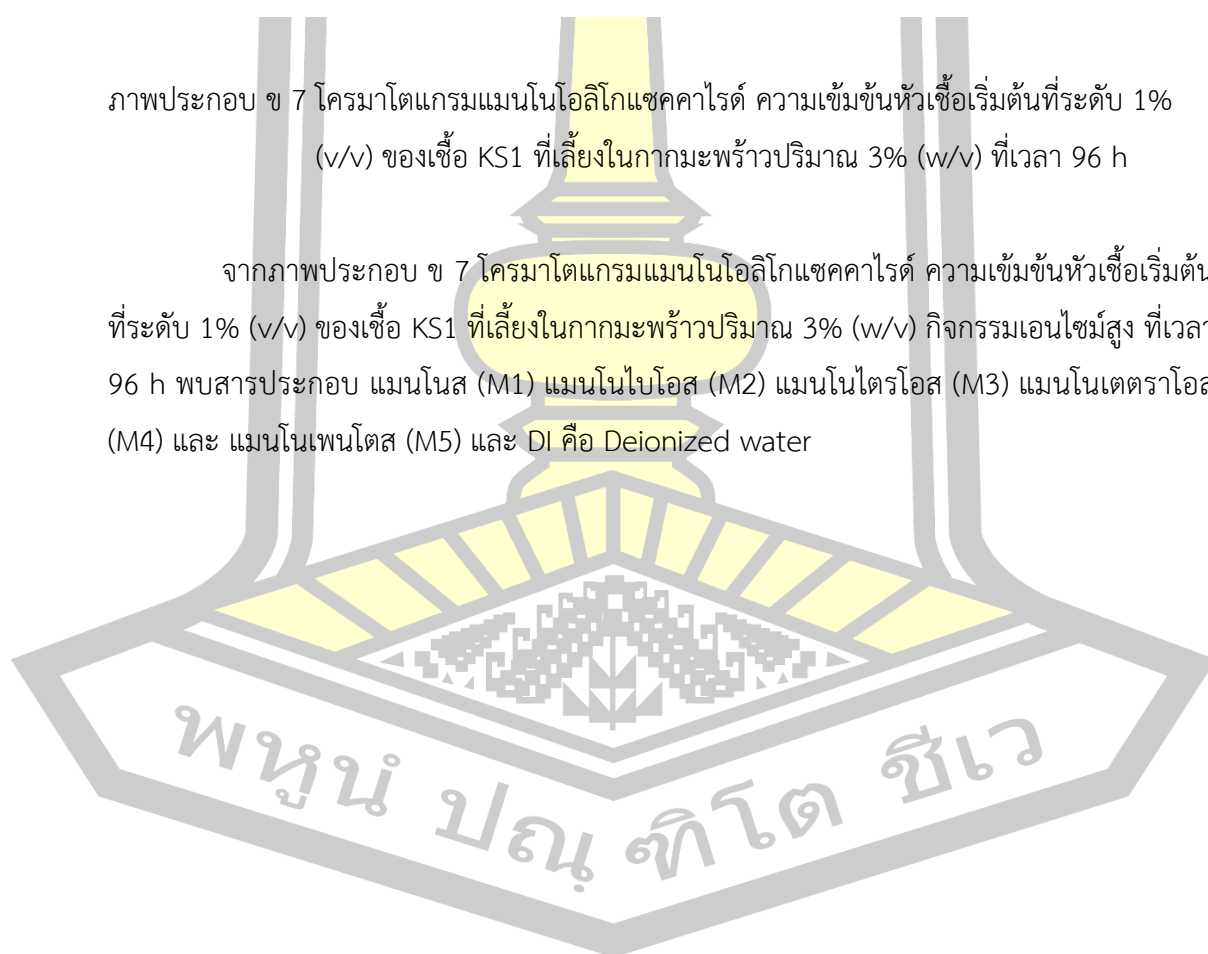
จากภาพประกอบ ข 6 โครมาโตแกรมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้นที่ระดับ 1% (v/v) ของเชื้อ KS1 ที่เลี้ยงในกากมะพร้าวปริมาณ 3% (w/v) ให้น้ำตาลรีดิวซ์สูง ที่เวลา 48 h พบสารประกอบ แมนโนส (M1) แมนโนไตรโอส (M3) แมนโนเตตราโอส (M4) และ แมนโนเพนโตส (M5) และ DI คือ Deionized water

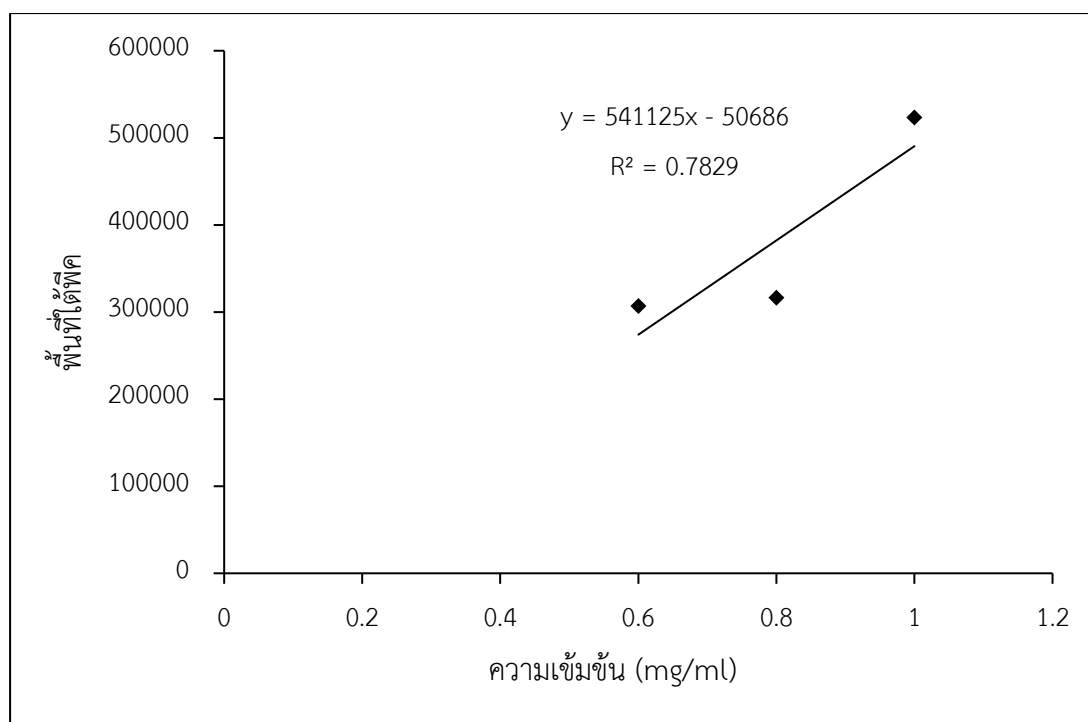




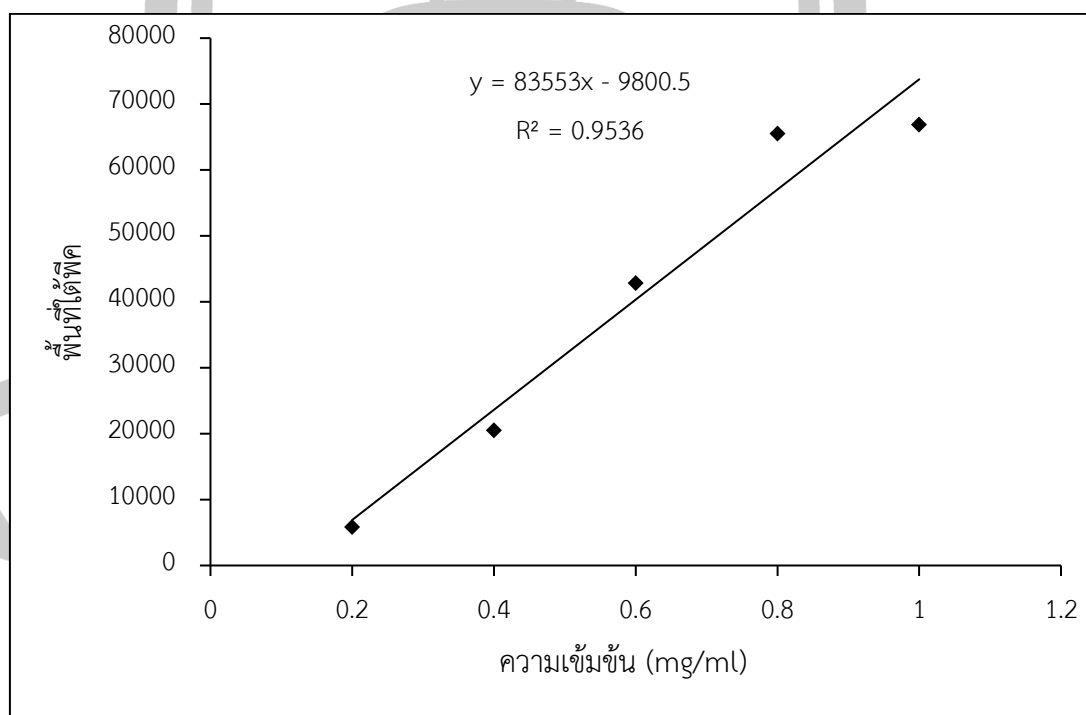
ภาพประกอบ ข 7 โครมาโตแกรมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้นที่ระดับ 1% (v/v) ของเชื้อ KS1 ที่เลี้ยงในกากมะพร้าวปริมาณ 3% (w/v) ที่เวลา 96 h

จากภาพประกอบ ข 7 โครมาโตแกรมแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ ความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้นที่ระดับ 1% (v/v) ของเชื้อ KS1 ที่เลี้ยงในกากมะพร้าวปริมาณ 3% (w/v) กิจกรรมเอนไซม์สูง ที่เวลา 96 h พบสารประกอบ แมนโนส (M1) แมนโนไบโอส (M2) แมนโนไตรโอส (M3) แมนโนเตตราโอส (M4) และ แมนโนเพนโตส (M5) และ DI คือ Deionized water

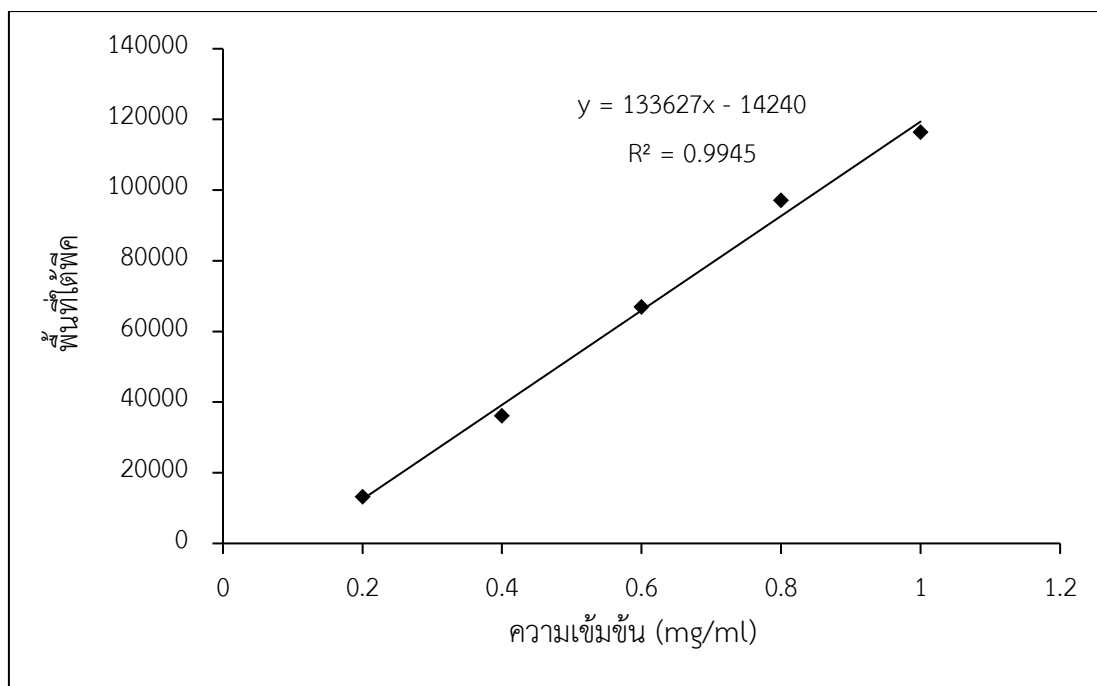




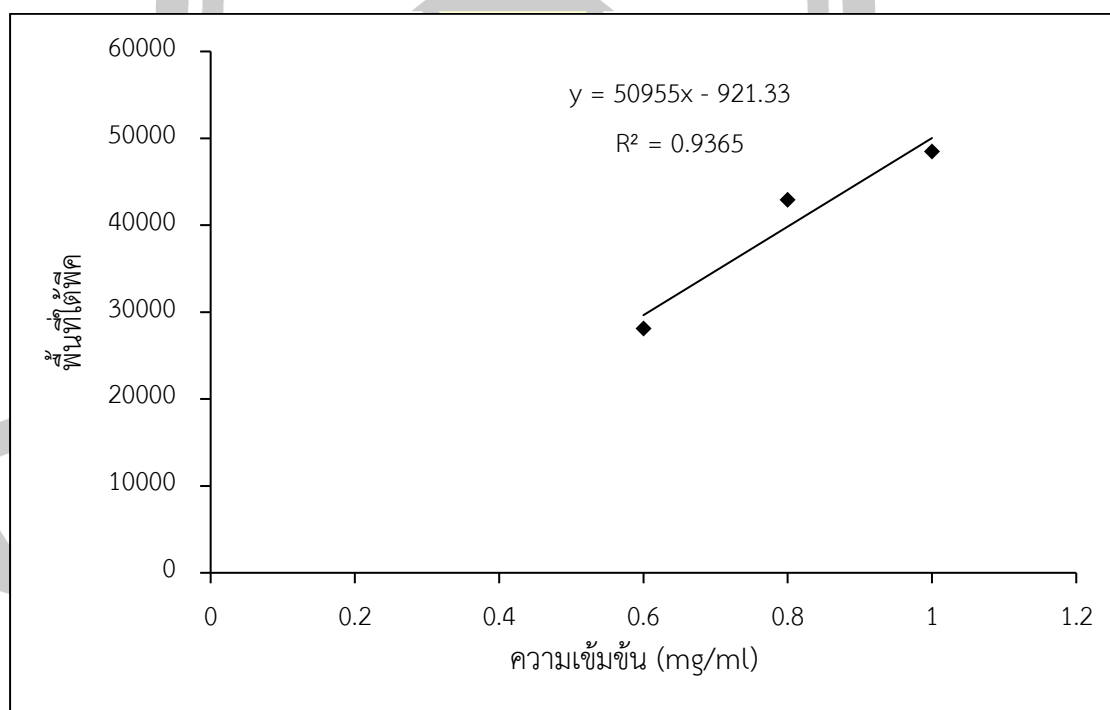
ภาพประกอบ ข 8 กราฟมาตรฐานน้ำตาลแมนโนส M1 (mg/ml)



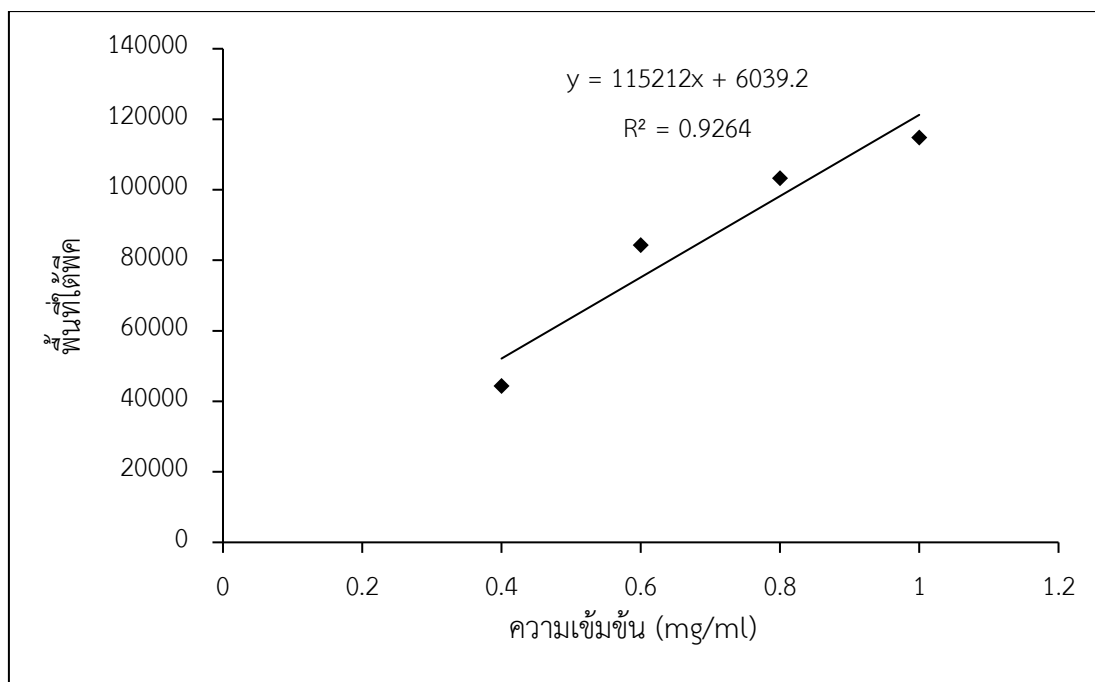
ภาพประกอบ ข 9 กราฟมาตรฐานน้ำตาลแมนโนส M2 (mg/ml)



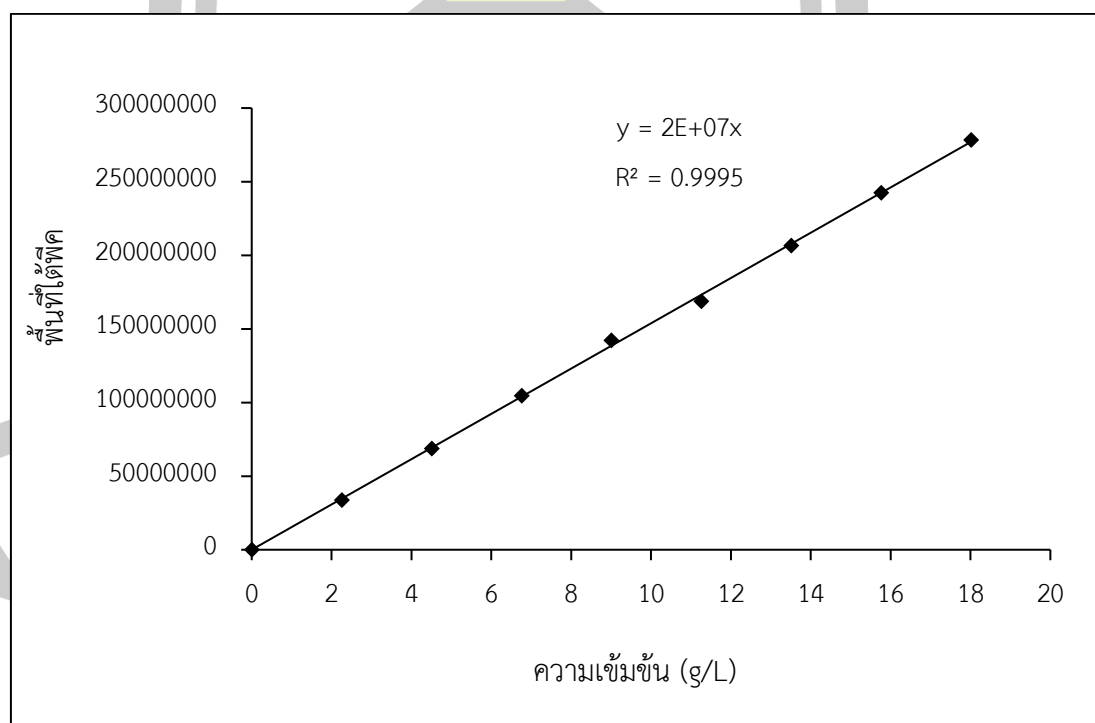
ภาพประกอบ ข 10 กราฟมาตรฐานน้ำตาลแมนโนไตรโอส M3 (mg/ml)



ภาพประกอบ ข 11 กราฟมาตรฐานน้ำตาลแมนโนเตตราโอส M4 (mg/ml)



ภาพประกอบ ข 12 กราฟมาตรฐานน้ำตาลแมนโนเพนโตส M5 mg/ml



ภาพประกอบ ข 13 กราฟมาตรฐานปริมาณกรดแลคติก (g/L)

ตาราง ข 3 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด KS1 1%.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
กากมะพร้าว 1%	Between Groups	5.005	17	.294	1128.265	.000
	Within Groups	.009	36	.000		
	Total	5.014	53			
กากมะพร้าว 2%	Between Groups	5.837	17	.343	1340.551	.000
	Within Groups	.009	36	.000		
	Total	5.847	53			
กากมะพร้าว 3%	Between Groups	5.753	17	.338	1240.142	.000
	Within Groups	.010	36	.000		
	Total	5.763	53			

ตาราง ข 4 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด KS1 2%.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
กากมะพร้าว 1%	Between Groups	.138	17	.008	98.065	.000
	Within Groups	.003	36	.000		
	Total	.141	53			
กากมะพร้าว 2%	Between Groups	.134	17	.008	1334.354	.000
	Within Groups	.000	36	.000		
	Total	.134	53			
กากมะพร้าว 3%	Between Groups	.119	17	.007	554.336	.000
	Within Groups	.000	36	.000		
	Total	.119	53			

ตาราง ข 5 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด KS1 3%.

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
กากมะพร้าว 1%	Between Groups	.108	17	.006	839.713	.000
	Within Groups	.000	36	.000		
	Total	.109	53			
กากมะพร้าว 2%	Between Groups	.108	17	.006	222.732	.000
	Within Groups	.001	36	.000		
	Total	.109	53			
กากมะพร้าว 3%	Between Groups	.103	17	.006	1347.560	.000
	Within Groups	.000	36	.000		
	Total	.103	53			

ตาราง ข 6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ KS1 1%

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
กากมะพร้าว 1%	Between Groups	3.077	16	.192	13058.48	.000
	Within Groups	.001	34	.000		
	Total	3.077	50			
กากมะพร้าว 2%	Between Groups	5.391	16	.337	4053.079	.000
	Within Groups	.003	34	.000		
	Total	5.394	50			
กากมะพร้าว 3%	Between Groups	7.437	16	.465	2010.724	.000
	Within Groups	.008	34	.000		
	Total	7.445	50			

ตาราง ข 7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ KS1 2%

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
กากมะพร้าว 1%	Between Groups	1.280	16	.080	345.202	.000
	Within Groups	.008	34	.000		
	Total	1.288	50			
กากมะพร้าว 2%	Between Groups	2.569	16	.161	6056.748	.000
	Within Groups	.001	34	.000		
	Total	2.570	50			
กากมะพร้าว 3%	Between Groups	4.980	16	.311	7501.292	.000
	Within Groups	.001	34	.000		
	Total	4.981	50			

ตาราง ข 8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ KS1 3%

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
กากมะพร้าว 1%	Between Groups	1.322	16	.083	4510.732	.000
	Within Groups	.001	34	.000		
	Total	1.322	50			
กากมะพร้าว 2%	Between Groups	3.132	16	.196	5460.943	.000
	Within Groups	.001	34	.000		
	Total	3.133	50			
กากมะพร้าว 3%	Between Groups	4.064	16	.254	6931.086	.000
	Within Groups	.001	34	.000		
	Total	4.065	50			

ตาราง ข 9 ปริมาณกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส KS1 1%

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
กากมะพร้าว 1%	Between Groups	4.468	16	.279	10171.848	.000
	Within Groups	.001	34	.000		
	Total	4.469	50			
กากมะพร้าว 2%	Between Groups	8.679	16	.542	27663.250	.000
	Within Groups	.001	34	.000		
	Total	8.679	50			
กากมะพร้าว 3%	Between Groups	30.289	16	1.893	137924.107	.000
	Within Groups	.000	34	.000		
	Total	30.290	50			

ตาราง ข 10 ปริมาณกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส KS1 2%

ANOVA

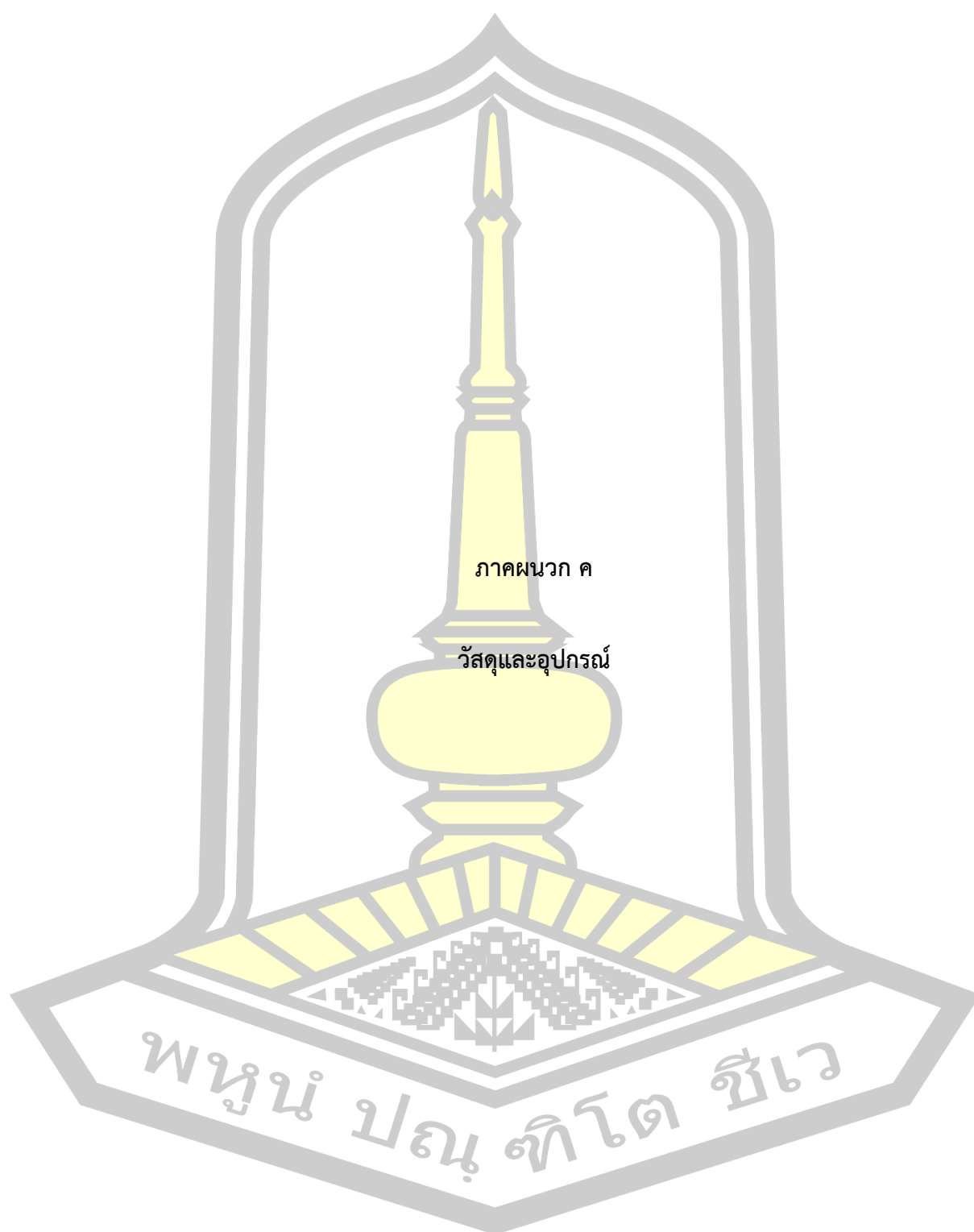
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
กากมะพร้าว 1%	Between Groups	1.004	16	.063	1217.253	.000
	Within Groups	.002	34	.000		
	Total	1.006	50			
กากมะพร้าว 2%	Between Groups	3.830	16	.239	2888.581	.000
	Within Groups	.003	34	.000		
	Total	3.833	50			
กากมะพร้าว 3%	Between Groups	8.123	16	.508	11663.490	.000
	Within Groups	.001	34	.000		
	Total	8.125	50			

ตาราง ข 11 ปริมาณกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส KS1 3%

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
กากมะพร้าว 1%	Between Groups	1.008	16	.063	3078.985	.000
	Within Groups	.001	34	.000		
	Total	1.009	50			
กากมะพร้าว 2%	Between Groups	3.214	16	.201	3955.929	.000
	Within Groups	.002	34	.000		
	Total	3.216	50			
กากมะพร้าว 3%	Between Groups	5.807	16	.363	4391.436	.000
	Within Groups	.003	34	.000		
	Total	5.810	50			







ภาพประกอบ ค 1 pH meter (FiveEasy™, China)



ภาพประกอบ ค 2 Table Top Centrifuge-PLC-05



ภาพประกอบ ค 3 Centrifuge (Scientific Promotion, Korea)



ภาพประกอบ ค 4 Hot plate (DAIHAN Scientific, Korea)



ภาพประกอบ ค 5 Laminar Flow (ESCO, Thailand)



ภาพประกอบ ค 6 Incubator shaker (Scientific Promotion, Korea)



ภาพประกอบ ค 7 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo, USA)



ภาพประกอบ ค 8 Microplate Reader (iMark™, Japan)



ภาพประกอบ ค 9 Autoclave (TOMY, Japan)



ภาพประกอบ ค 10 Vortex (Vision, Korea)



ภาพประกอบ ค 11 Hot air oven (POL-EKO-APARATURA, EU)



ภาพประกอบ ค 12 Light microscopes (OPTIKA, Italy)



ภาพประกอบ ค 13 Stirred Water bath (Biosan, Latvia)



ภาพประกอบ ค 14 HPLC (RID และ ELSD) (รุ่น 10A และ 20A Series Shimadzu)



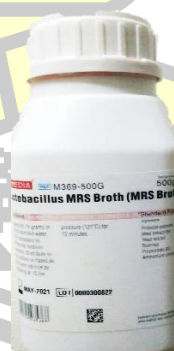
ภาพประกอบ ค 15 HPLC (Model 1,200 series, Agilent technology, Japan)



ภาพประกอบ ค 16 CO₂ Incubator



ภาพประกอบ ค 17 Locust Bean Gum (LBG) (Sigma-Aldrich, USA)



ภาพประกอบ ค 18 De Man Rogosa and Sharpe (MRS) (Himedia, India)



ภาพประกอบ ค 19 Nutrient Broth (Himedia, India)



ภาพประกอบ ค 20 กากมะพร้าว (Copra meal)



ภาพประกอบ ค 21 การเลี้ยงเชื้อ KS1 ในอาหาร NB ผสมกากมะพร้าว



ภาพประกอบ ค 22 ผง แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์

เอกสารการตีพิมพ์

Conference

Proceedings

The 6th International Conference on
Food, Agriculture and Biotechnology

August 26-27, 2019
Maha Sarakham, Thailand



ICoFAB 2019

Locust Bean Gum Hydrolysis for Mannooligosaccharide (MOS) Production Using *Bacillus methylotrophicus* KS1

Sunchai Phiwphech^{1*}, Vijitra Luang-In¹, Sirirat Deeseenthum¹ and Surachai Rattanasuk²

¹Natural Antioxidant Innovation Research Unit, Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Mahasarakham University, Mahasarakham 44150 Thailand

² Major of General Science, Department of Science and Technology, Faculty of Liberal Arts and Science, Roi Et Rajabhat University, Roi Et, 45120 Thailand

*Corresponding author's e-mail: sunchai502@gmail.com

Abstract:

Locust bean gum is a source of galactomannan that can be used as substrate for mannooligosaccharide production with prebiotic potential through mannanase-catalyzed hydrolysis. The aim of this research was to hydrolyze the locust bean gum using *Bacillus methylotrophicus* KS1 isolated from soil collected from Roi Et, Thailand. Locust bean gum hydrolysis conditions were performed using 1% *Bacillus methylotrophicus* KS1 inoculum (10^8 CFU/ml) in nutrient broth containing 1% locust bean gum in 500 ml Erlenmeyer flask and incubated at 37 °C and 150 rpm for 24 h. Five milliliters of cultures were collected at the specific time intervals for mannanase activity determination. The result indicated that the highest mannanase activity was found at 18 h with 14.10 U/ml. Mannooligosaccharide composition of locust bean gum hydrolysis was identified using High Performance Liquid Chromatography method. The result showed that the produced mannooligosaccharide consisted of mannotriose, mannotetraose and mannohexose. These may have prebiotic attributes that will be investigated in the future.

Keywords: *Bacillus methylotrophicus* KS1, Locust bean gum, Mannanase, Mannooligosaccharide, HPLC

Introduction

Locust bean gum (LBG) is a source of galactomannan consists obtained from seed endosperm of fruit pod of *Ceratonia siliqua* L. Chemical structure of LBG of a β -1,4-linkage mannose backbone with galactose monomers linked to it randomly by α -1,6 bonds [1, 2]. It has been used for food, pharmaceuticals, paper, textile, oil well drilling, cosmetics and also beneficial for human health [3]. LBG can be used as substrate for mannooligosaccharides (MOS) production as prebiotics by mannanase-catalyzed hydrolysis.

MOS are an oligosaccharides comprised of mannose residues obtained from mannan hydrolysis including mannan, glucomannan, galactomannan and galactoglucomannan by β -mannanase [4]. MOS are prebiotics that can be used as a feed additive to reduce pathogenic bacteria such as *Vibrio*, *Coliforms*, *Clostridia* and *Salmonella* and modulate the immune system of host animals and also stimulate the growth of probiotics such as *Bifidobacterium* sp. and *Lactobacillus* sp. [5-7].

Mannanase is an enzyme that randomly hydrolyzes of mannan and heteromannan at the 1,4- β -D-mannosidic linkage [1, 8]. Many microorganisms are sources of mannanase such as *Chryseobacterium indologenes*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Neosartorya fischeri* P1, *Bacillus pumilus* GBSW19, *Bacillus* sp. and *Kitasatospora* sp. [1, 9-12]. The aim of this research was to produce MOS from LBG by isolated bacteria, *Bacillus methylotrophicus* KS1.

Materials and methods

Chemical and reagents

LBG was purchased from Sigma (USA). Nutrient broth (NB) was purchased from Himedia Laboratories (India). 3,5-Dinitrosalicylic acid and sodium potassium tartrate were purchased from Sigma (USA). Standard sugars including mannose, mannobiose, mannotriose, mannotetraose, mannopentose and mannohexose were purchased from Megazyme (Wicklow, Ireland).

Bacterial strain

Bacillus methylotrophicus KS1 was isolated from soil in Roi-Et and stored at microbiology laboratory, Department of Science and Technology, Roi Et Rajabhat University, Roi Et, Thailand.

Bacterial growth and staining

Single colony of *B. methylotrophicus* KS1 was cultured using nutrient broth (NB) medium and incubated at 37 °C with 150 rpm for 18 h. One percentage (v/v) of *B. methylotrophicus* KS1 was mixed with 200 ml NB containing 1% LBG and incubated at 37 °C with 150 rpm for 24 h. Five milliliters of cultured medium broth were collected at 0 - 72 h and centrifuged. Supernatant was discarded and cell pellet was resuspended using sterile normal saline. Bacterial cell count was determined by ten-fold dilution method. One hundred microliters of each dilution were spread on to nutrient agar (NA) incubated at 37 °C for 18 h. Bacterial population was calculated from plate containing 30-300 colonies. *B. methylotrophicus* was stained by Gram-staining and endospore staining method.

Mannanase activity assay

B. methylotrophicus KS1 was cultured using nutrient broth (NB) medium at 37 °C with 150 rpm for 18 h. The turbidity of the bacterial cell suspension was adjusted at OD600 to the required concentration of 10^8 CFU/ml. One percentage (v/v) of *B. methylotrophicus* KS1 was mixed with 200 ml NB containing 1% LBG and incubated at 37 °C with 150 rpm for 24 h. Five milliliters of cultured medium broth were collected at 0, 3, 6, 12, 18 and 24 h and centrifuged. Mannanase activities assay was described previously [9]. Briefly, 500 µl of supernatant was mixed with 500 µl of 1% LBG, pH 7 (phosphate buffer) and incubated at 60 °C for 5 min. The reaction was inhibited by adding DNS solution. The mixture was boiled for 5 minutes and cooled on ice. Two thousand and five hundred microliters of water were added. The amount of reducing sugar was determined at OD540 nm. One unit of mannanase activity is defined as the amount of mannanase that hydrolyzes LBG and liberates 1 µmol D-mannose within 1 min of reaction at 60 °C.

Mannooligosaccharide composition analysis

MOS composition was analyzed by high pressure liquid chromatography (HPLC) condition described as previously [13]. Mannose, mannobiose, mannotriose, mannotetraose, mannopentose and mannohexose were used as standard sugars.

Results and discussion

Bacterial growth and staining

B. methylotrophicus KS1 was cultured using NB and cultured broth samples were collected for bacterial count. The result indicated that at lag phase was at 0 - 12 h, exponential phase was at 12 - 18 h, stationary phase was at 18 - 48 h and decline phase was after 48 h (Fig. 1). Result of Gram staining and endospore staining showed that *B. methylotrophicus* KS1 was Gram-positive bacilli, rod shape and produced oval subterminal spores after 18 h. (Fig. 2). This growth curve presented that late exponential phase that had the highest growth rate. This incubation time of 18 h will be used for future experiment and it was similar to the reported value in ref [14].

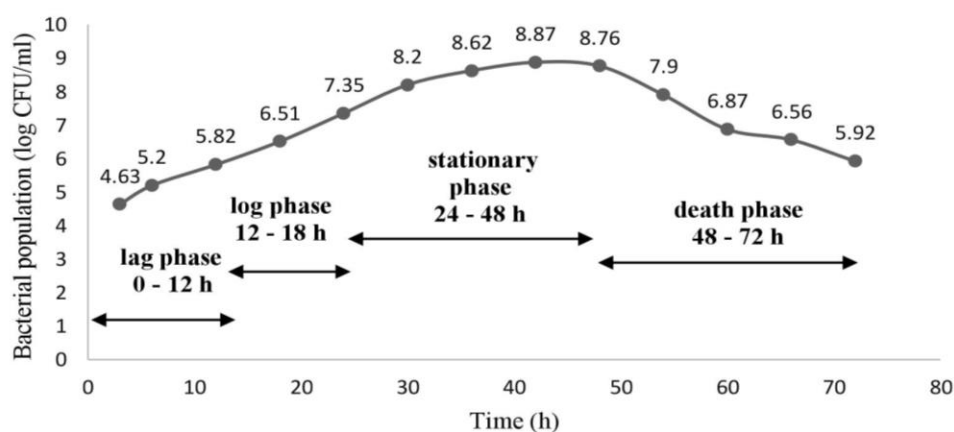


Figure 1 Growth curve of *Bacillus methylotrophicus* KS1 over 72 h.

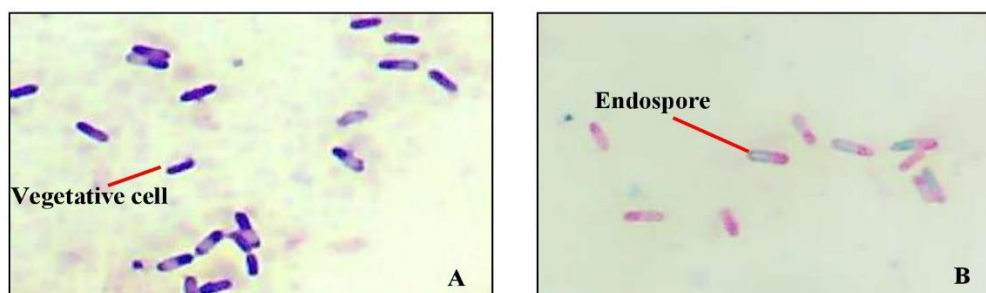


Figure 2 *Bacillus methylotrophicus* KS1 Gram staining and endospore staining under light microscope 1000x.

A. Gram positive bacilli; B. Oval subterminal endospore

Mannanase activity assay

Mannanase activity of *B. methylotrophicus* KS1 was gradually increased until presented the high activity at 18 h (14.10 U/ml) (Fig. 3). From the above result that showed at 18 h after incubation was late log phase that indicated that high cell growth.

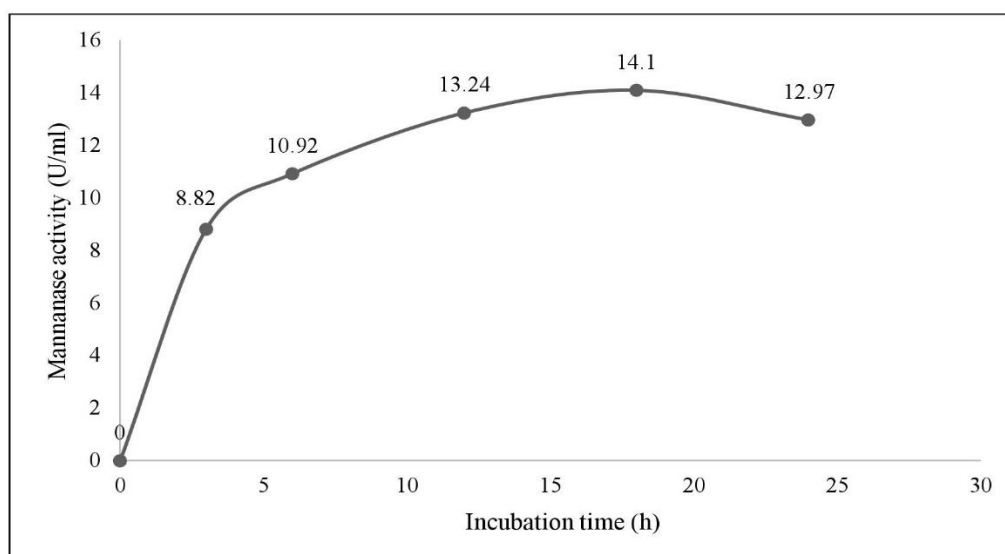


Figure 3 Mannanase activity of *Bacillus methylotrophicus* KS1

Mannooligosaccharide composition analysis

The result from this research found the MOS composition from LBG hydrolysis composed of mannatrios M3 (2.42 ± 0.04 mg/ml), mannotetraose M4 (36.74 ± 0.45 mg/ml) and mannohexose M6 (1.77 ± 0.08 mg/ml) (Table. 1.) obtained from locust bean gum hydrolysis. This result was similar to previous reports [15-17]. However, the composition of MOS is also found from the copra meal by mannanase enzyme from *Bacillus circulans* NT6.7 composed of mannatrios M3, mannotetraose M4 and mannohexose M6 [18]. MOS composition from copra meal hydrolysis by mannanase enzyme from *Streptomyces* sp. BF3.1 composed of mannatrios M3, mannotetraose M4, mannopentose M5 and mannohexose M6 [19].

Acknowledgements

This research was supported by King Bhumibol scholarship and research grants for graduate students (master's degree) for the year 2019 from Faculty of Technology, Mahasarakham University.

Table 1 Mannooligosaccharide composition from LBG hydrolysis by *Bacillus methylotrophicus* KS1

Replicate	Mannooligosaccharide (mg/ml)				Total (M6-M3)
	M6	M4	M3	M1	
1	1.71	36.42	2.44	0.61	40.57
2	1.83	37.05	2.39	0.64	41.27
$\bar{X} \pm SD$	1.77 \pm 0.08	36.74 \pm 0.45	2.42 \pm 0.04	0.63 \pm 0.02	40.92 \pm 0.49

References

- [1] Zang H, Xie S, Wu H, Wang W, Shao X, Wu L, et al. A novel thermostable GH5_7 beta-mannanase from *Bacillus pumilus* GBSW19 and its application in manno-oligosaccharides (MOS) production. *Enzyme Microb Technol.* 2015;78:1-9.
- [2] Kim S, Lee M-H, Lee E-S, Nam Y-D, Seo D-H. Characterization of mannanase from *Bacillus* sp., a novel *Codium fragile* cell wall-degrading bacterium. *Food Sci Biotechnol.* 2017;27(1):115-22.
- [3] Barak S, Mudgil D. Locust bean gum: processing, properties and food applications a review. *International journal of biological macromolecules.* 2014;66:74-80.
- [4] McCleary BV. β -D-Mannanase. *Methods in Enzymology.* 1988;160:596-610.
- [5] Phothichitto K, Nitisinprasert S, Keawsompong S. Isolation, screening and identification of mannanase producing microorganisms. *Kasetsart J(Nat Sci).* 2006;40:26-38.
- [6] Rungrassamee W, Kingcha Y, Srimarut Y, Maibunkaew S, Karoonuthaisiri N, Visessanguan W. Mannooligosaccharides from copra meal improves survival of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after exposure to *Vibrio harveyi*. *Aquaculture.* 2014;434:403-10.
- [7] Cuong D, Dung V, Hien N, Thu D. Prebiotic evaluation of copra-derived mannooligosaccharides in white-leg shrimps. *Journal of Aquaculture Research and Development.* 2013;4(5).
- [8] Rattanasuk S, Prasertsang K, Phiwphech S, editors. Isolation of thermophilic mannanase-producing bacteria useful for mannooligosaccharide (MOS) production. International Conference on Science and Technology (TICST), 2015; 2015: IEEE.
- [9] Rattanasuk S, Ketudat-Cairns M. *Chryseobacterium indologenes*, novel mannanase-producing bacteria. *Sonklanakarin Journal of Science and Technology.* 2009;31(4):395.
- [10] Suwanto A, T Henawidjaja M, T Resnawati PU. Isolation and characterization of mannolytic thermophilic bacteria from palm oil shell and their mannanase enzyme production properties. *BIOTROPLA-The Southeast Asian Journal of Tropical Biology.* 2005(25).
- [11] Yang H, Shi P, Lu H, Wang H, Luo H, Huang H, et al. A thermophilic beta-mannanase from *Neosartorya fischeri* P1 with broad pH stability and significant hydrolysis ability of various mannan polymers. *Food Chem.* 2015;173:283-9.
- [12] Rahmani N, Kashiwagi N, Lee J, Niimi-Nakamura S, Matsumoto H, Kahar P, et al. Mannan endo-1,4- β -mannosidase from *Kitasatospora* sp. isolated in Indonesia and its potential for production of mannooligosaccharides from mannan polymers. *AMB Express.* 2017;7(1):100.
- [13] Tanimoto T, Ikuta A, Sugiyama M, Koizumi K. HPLC analysis of manno-oligosaccharides derived from *Saccharomyces cerevisiae* mannan using an amino column or a graphitized carbon column. *Chemical and pharmaceutical bulletin.* 2002;50(2):280-3.
- [14] Ge B, Liu B, Nwet TT, Zhao W, Shi L, Zhang K. *Bacillus methylotrophicus* Strain NKG-1, Isolated from Changbai Mountain, China, Has Potential Applications as a Biofertilizer or Biocontrol Agent. *PloS one.* 2016;11(11):e0166079-e.
- [15] Nguyen H-M, Pham M-L, Stelzer EM, Plattner E, Grabherr R, Mathiesen G, et al. Constitutive expression and cell-surface display of a bacterial β -mannanase in *Lactobacillus plantarum*. *Microbial cell factories.* 2019;18(1):76.
- [16] Xie S, Zhu B, Yang X, Gu C, Hu B, Gao T, et al. Mannan oligosaccharides trigger multiple defence responses in rice and tobacco as a novel danger-associated molecular pattern. *Molecular plant pathology.* 2019;20(8).
- [17] Pangestu R, Rahmani N, Palar R, Lisdiyanti P, Yopi. The effect of biomass particle size and chemical structure on the enzymatic hydrolysis reaction of galactomannan from sugar palm fruit by β -mannanase from *Kitasatospora* sp. KY576672. *Earth and Environmental Science.* 2019(251).

- [18] Rungruangsaphakun J, Keawsompong S. Optimization of hydrolysis conditions for the manno-oligosaccharides copra meal hydrolysate production. *Journal for Biotechnology*. 2018;8:169.
- [19] Ariandi, Yopi, Meryadini A. Enzymatic hydrolysis of copra meal by mannanase from *Streptomyces* sp. BF3.1 for the production of manno-oligosaccharide. *Journal of Biosciences*. 2015;22(2):79-86.



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นายสัญญาชัย ผิวเพชร
วันเกิด วันที่ 8 มีนาคม พ.ศ. 2537
สถานที่เกิด จังหวัดอำนาจเจริญ ประเทศไทย
สถานที่อยู่ปัจจุบัน บ้านเลขที่ 502/1 หมู่ที่ 5 บ้านยักษ์คุ ตำบลชานุมาน อำเภอชานุมาน
จังหวัดอำนาจเจริญ รหัสไปรษณีย์ 37210
ประวัติการศึกษา พ.ศ. 2555 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนชานุมานวิทยาคม อำเภอชานุมาน จังหวัดอำนาจเจริญ
พ.ศ. 2559 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.บ.) สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยราชภัฏร้อยเอ็ด
พ.ศ. 2562 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

พูน ปณ ภัโต ชีเว