# การผลิตโอลิโกแซคคาร์ไรด์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *Penicillium oxalicum* KUB-SN2-1

# Oligosaccharide Production from Agricultural Wastes by Crude Enzyme from *Penicillium oxalicum* KUB-SN2-1

**สุดาทิพย์ จันทร*, กุลวดี พิศลยบุตร และรินรดา รัตนพรรณทอง**

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

**สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ**

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

**Sudathip Chantorn*, Kulwadee Pisulyabut and Rinrada Rattanapanthong**

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Centre, Klong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

**Sunee Nitisinprasert**

Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkhen campus, Ladyao, Chatuchak, Bangkok 10900

## บทคัดย่อ

ศึกษาการผลิตโอลิโกแซคคาร์ไรด์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 5 ชนิด ได้แก่ กากอ้อย กากกาแฟ กากถั่วเหลือง กากมะพร้าว และเปลือกมันฝรั่ง ด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *Penicillium oxalicum* KUB-SN2-1 โดยเปรียบเทียบผลการศึกษาระหว่างปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งไม่ผ่านการปรับสภาพกับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร แต่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดร่วมกับการใช้ความร้อน ผลการวิจัยพบว่ากากกาแฟปรับสภาพให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดเท่ากับ 51.33 ± 4.47 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง ในขณะที่เปลือกมันฝรั่งที่ไม่ผ่านการปรับสภาพให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดที่เวลา 18 ชั่วโมง เท่ากับ 44.67 ± 4.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นอกจากนั้นเมื่อวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโอลิโกแซคคาร์ไรด์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ผลิตภัณฑ์ที่ได้ประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนส น้ำตาลแมนโนไบโอส น้ำตาลที่มีขนาด

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** t_sudathip@yahoo.com หรือ sudathip@tu.ac.th

โมเลกุลระหว่างแมนโนไบโอสและแมนโนไตรโอส และน้ำตาลที่มีขนาดใหญ่กว่าแมนโนไตรโอส

**คำสำคัญ :** *Penicillium oxalicum*, วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร, โอลิโกแซคคาร์ไรด์

**Abstract**

Oligosaccharide production from five agricultural wastes (AWs) bagasse, coffee residues, soybean meal, copra meal, and potato peel by crude enzyme from *Penicillium oxalicum* KUB-SN2-1 were investigated. Comparing of the amount of reducing sugar from hydrolysate of non-treatment AWs and hydrolysate of pretreatment with acid and heat of AWs, coffee residues pretreatment had the highest reducing sugar content of 51.33 ± 4.47µg/ml at 36 h of incubation periods. Contrary, non-treatment potato peel showed the highest amount of reducing sugar of 44.67 ± 4.23 µg/ml at 18 h. Hence, types of oligosaccharide from AWs hydrolysate were analyzed by thin layer chromatography (TLC). Compared the standard oligosaccharides, the product were mannose, mannobiose, intermediate molecules between mannobiose and mannotriose, and molecules larger than mannotriose.

**Key words:** *Penicillium oxalicum*, agricultural waste, oligosaccharides

## 1. บทนำ

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรส่วนใหญ่มีองค์ประกอบหลักเป็นสารประกอบลิกโนเซลลูโลสที่ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน [1] การกำจัดวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรส่วนมากทำได้โดยการเผาหรือฝังกลบ ซึ่งอาจก่อให้เกิดมลภาวะเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมได้ นอกจากนั้นยังมีการนำไปทำปุ๋ยหมักหรือปุ๋ยชีวภาพซึ่งมีมูลค่าทางการค้าต่ำ ดังนั้นปัจจุบันจึงมีผู้สนใจที่จะนำลิกโนเซลลูโลสมาใช้ประโยชน์มากขึ้น โดยทำการเปลี่ยนให้เป็นสารที่มีมูลค่าสูงขึ้น เช่น ใช้เป็นแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงแอลกอฮอล์ และน้ำตาลโอลิโกแซคคาร์ไรด์เพื่อเป็นสารเสริมในอาหารคนและสัตว์ [2,3]

การเพิ่มมูลค่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมีทั้งการใช้สารเคมี และวิธีทางชีวภาพโดยการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ ซึ่งมีข้อดีมากกว่าการใช้สารเคมีเนื่องจากการใช้เอนไซม์มีความจำเพาะสูงและสภาวะที่ใช้ในการย่อยสลายไม่รุนแรงเหมือนกับวิธีทางเคมี นอกจากนั้นไม่มีการสูญเสียผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือน้ำตาลโอลิโกแซคคาร์ไรด์เหมือนกับการใช้สารเคมี [4]

อย่างไรก็ตามวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรส่วนใหญ่อาจต้องนำไปปรับสภาพก่อน (pretreatment) เพื่อปรับปรุงโครงสร้างของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรนั้น ๆ ให้อยู่ในรูปที่ง่ายต่อการนำไปพัฒนาให้เป็นสารที่มีมูลค่าทางการค้าเพิ่มมากขึ้น นั่นคือง่ายต่อการเข้าทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายนั่นเอง วิธีการปรับสภาพอาจทำได้โดยการบดอัดให้มีขนาดเล็ก การใช้กรดหรือด่าง เป็นต้น ซึ่งวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเมื่อผ่านการปรับสภาพแล้วนำมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์ย่อยสลายจะทำให้ได้ผลผลิตที่เป็นน้ำตาลสูงขึ้นอีกด้วย [5]

จากการศึกษาของ Chaiongkarn และคณะ (2009) พบว่า *Penicillium oxalicum* KUB-SN2-1 ที่ถูกคัดแยกจากดินสามารถผลิตแมนนาเนสได้เมื่อใช้กากมะพร้าวเป็นสับสเตรต โดยมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คืออุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอชเท่ากับ 4.0 [6] ดังนั้นการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาชนิดของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่เหมาะสมต่อการย่อยของสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบ (crude enzyme) จาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1 โดยเปรียบเทียบวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดร่วมกับการใช้ความร้อนกับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรซึ่งไม่ผ่านการปรับสภาพ แล้ววิเคราะห์ปริมาณและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการวางแผนพัฒนาการผลิตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ในปริมาณมากสำหรับใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

## 2. อุปกรณ์และวิธีการ

### 2.1 วัตถุดิบ

งานวิจัยนี้ใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 5 ชนิดได้แก่ กากมะพร้าว กากอ้อย กากถั่วเหลือง กากกาแฟ และเปลือกมันฝรั่ง โดยวัตถุดิบทั้งหมดที่ใช้ในงานวิจัยเป็นวัตถุดิบที่เตรียมในครั้งเดียวกันและใช้ตลอดงานวิจัย ทำการเตรียมวัตถุดิบโดยนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร 5 ชนิด มาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรแต่ละชนิดที่แห้งมาปั่นให้มีขนาดเล็กด้วยเครื่องปั่น (blender) จากนั้นทำการแยกขนาดด้วยตะแกรงร่อน (sieve plate) ขนาด 45 mesh เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

### 2.2 จุลินทรีย์

*Penicillium oxalicum* KUB-SN2-1 เก็บในอาหาร potato dextrose agar (PDA) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อใช้เก็บรักษาสายพันธุ์ จากนั้นทำการเตรียมสารแขวนลอยสปอร์โดยให้มีปริมาณสปอร์เท่ากับ $10^6$-$10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อผสมกับ 0.2 % (v/v) Tween 80 ตรวจนับสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) ทำให้ได้กล้าเชื้อเริ่มต้นเพื่อใช้ทำการศึกษาต่อไป

### 2.3 การผลิตสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1

กล้าเชื้อเริ่มต้นปริมาณ 10 % (v/v) ย้ายลงอาหารเพื่อผลิตเอนไซม์ประกอบด้วย 0.4 % (w/v) เพปโตน, 0.3 % (w/v) โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4$), 0.2 % (w/v) ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($K_2HPO_4$), 0.05 % (w/v) แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$), 0.0002 % (w/v) โคบอลคลอไรด์ ($CoCl_2.6H_2O$), 0.0005 % (w/v) เฟอรัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$), 0.0002 % (w/v) แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.H_2O$), 0.0016 % (w/v) ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$), 0.25 % (w/v) แอมโมเนียมไนเตรต ($NH_4NO_3$), 0.5 % (w/v) สารสกัดยีสต์ (yeast extract), 0.25 % (w/v) กากกาแฟ, 0.5 % (w/v) กัวกัม (guar gum) ปรับค่าพีเอชให้ได้เท่ากับ 5 ด้วยกรดทาทาริก 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที นาน 96 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาต่อไป

### 2.4 การวิเคราะห์กิจกรรมของสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1

วิเคราะห์กิจกรรมของสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบด้วยวิธี 3,5-dinitrosalicylic acid; DNS [7] โดยจากการศึกษาเบื้องต้นของ Chaiongkarn และคณะ (2009) ที่พบว่าสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1 มีการผลิตแมนนาเนสสูงที่สุด ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงกำหนดให้ 1 หน่วยของแมนนาเนส เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ย่อยแมนแนนแล้วได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลแมนโนส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ โดยมีน้ำตาลแมนโนสเป็นสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

**2.5 การปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร**

ปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั้ง 5 ชนิด คือ กากมะพร้าว กากอ้อย กากถั่วเหลือง กากกาแฟ และเปลือกมันฝรั่ง โดยดัดแปลงวิธีของ Lloyd และ Wyman (2005) โดยแช่ 10 % (w/v) วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรแต่ละชนิดใน 1 % (v/v) กรดซัลฟิวริก ($H_2SO_4$) แล้วนำสารละลายที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสนาน 10 นาที [8] จากนั้นกรองวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรออก ล้างด้วยน้ำกลั่นจนหมดความเป็นกรด (ทำการวัดพีเอชให้เท่ากับพีเอชเริ่มต้น) แล้วนำไปอบให้แห้ง เก็บไว้ใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

**2.6 การศึกษาชนิดของวัสดุทิ้งทางการเกษตรที่เหมาะสมต่อการย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1**

เตรียมชุดตัวอย่างโดยนำสารละลายผสมปริมาณ 10 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 0.5 % (w/v) วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรละลายใน 0.1 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.0 กับสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบ (กิจกรรมแมนนาเนสเท่ากับ 5.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) อัตราส่วน 1:1 บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี DNS โดยมีสารละลายผสมปริมาณ 10 มิลลิลิตรที่ประกอบด้วย 0.5 % (w/v) วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรละลายใน 0.1 โมลาร์ ซิเตรตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.0 กับน้ำกลั่น อัตราส่วน 1:1 เป็นชุดควบคุม

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น (µg/ml) = ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในชุดตัวอย่าง - ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในชุดควบคุม

**2.7 การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1**

วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุทิ้งทางการเกษตรด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) ดัดแปลงวิธีของ Apiraksakorn และคณะ (2008) [9] โดยมีสารละลายน้ำตาลมาตรฐานได้แก่ กลูโคส (glucose) กาแลคโตส (galactose) แมนโนส (mannose) แมนโนไบโอส (mannobiose) และแมนโนไตรโอส (manno-triose)

## 3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

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

การปรับสภาพวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทำได้หลายวิธี เช่น ทางกล (บด ปั่น หรือทำให้ขนาดเล็กลง) การให้ความร้อน การใช้ด่าง และการใช้กรด เป็นต้น [10] ในงานวิจัยนี้เลือกวิธีการปรับสภาพโดยการใช้กรดร่วมกับการให้ความร้อน เนื่องจากการใช้กรดจะเป็นการช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายได้ของสารประกอบเฮมิเซลลูโลส โดยเฉพาะอย่างยิ่งไซแลนและแมนแนน และช่วยกำจัดลิกนินซึ่งเป็น

สารสำคัญที่ขัดขวางการเข้าทำงานของเอนไซม์ย่อยสลาย ส่วนการใช้ความร้อนสูงจะมีส่วนช่วยให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้ดียิ่งขึ้น [11] นอกจากนั้นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ใช้ในการวิจัยนี้ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ เปลือกมันฝรั่ง กากกาแฟ กากอ้อย กากมะพร้าว และกากถั่วเหลือง เป็นสารประกอบซึ่งมีโครงสร้างหลักเป็นสารประกอบในกลุ่มเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส จึงสามารถปรับสภาพด้วยกรดได้

ผลการศึกษาเมื่อทำการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบที่แสดงกิจกรรมแมนนาเนสเท่ากับ 5.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ คือ เปลือกมันฝรั่ง โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 44.67 ± 4.23 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือกากอ้อย กากมะพร้าว กากกาแฟ และกากถั่วเหลือง โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 24.00 ± 3.21, 11.33 ± 2.82, 10.00 ± 1.41 และ 4.67 ± 2.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1 ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดที่ได้จากการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ผ่านการปรับสภาพพบว่ากากกาแฟมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด รองลงมาคือกากมะพร้าว เปลือกมันฝรั่ง กากอ้อย และกากถั่วเหลือง โดยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 51.33 ± 4.47, 30.67 ± 0.71, 12.00 ± 2.89, 8.00 ± 1.41 และ 2.00 ± 0.57 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 1)

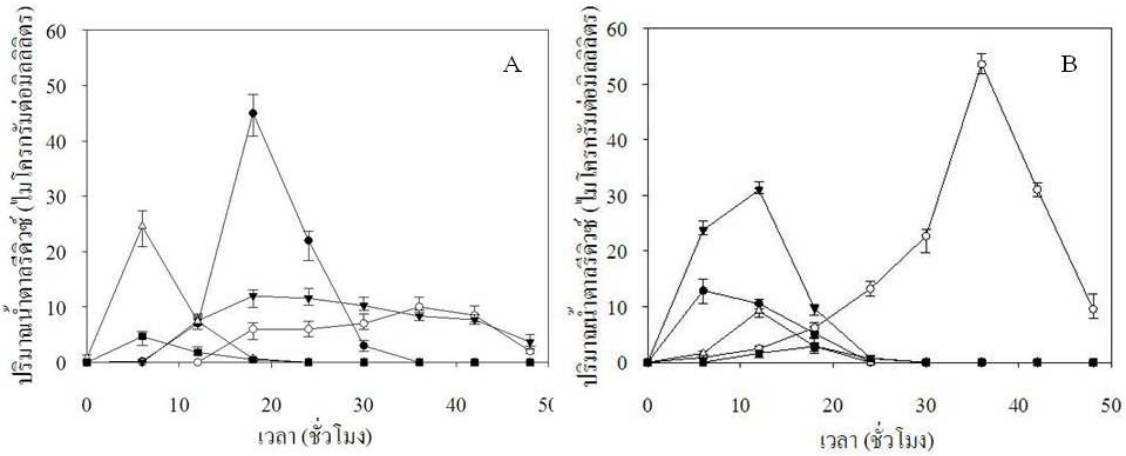
**ตารางที่ 1** ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดที่เกิดขึ้นจากการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรแบบไม่ปรับสภาพและปรับสภาพ

| | ไม่ปรับสภาพ (non-pretreatment) | | ปรับสภาพ (pretreatment) | |
|---|---|---|---|---|
| ชนิดของวัสดุเหลือทิ้ง | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (µg/ml) | เวลา (ชั่วโมง) | ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (µg/ml) | เวลา (ชั่วโมง) |
| กากกาแฟ | 10.00 ± 1.41 | 36 | 51.33 ± 4.47 | 36 |
| กากมะพร้าว | 11.33 ± 2.82 | 24 | 30.67 ± 0.71 | 12 |
| กากอ้อย | 24.00 ± 3.21 | 6 | 8.00 ± 1.41 | 12 |
| กากถั่วเหลือง | 4.67 ± 2.10 | 6 | 2.00 ± 0.57 | 18 |
| เปลือกมันฝรั่ง | 44.67 ± 4.23 | 18 | 12.00 ± 2.89 | 6 |

ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1 สามารถย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่หลากหลาย แสดงให้เห็นว่าสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบในงานวิจัยนี้น่าจะมีเอนไซม์ในกลุ่มลิกโนเซลลูเลสอื่นนอกเหนือจากแมนนาเนส เช่น เซลลูเลส และไซลาเนสอีกด้วย เนื่องจากสามารถย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรซึ่งมีโครงสร้างหลักเป็นสารลิกโนเซลลูโลสได้ นอกจากนั้นกลุ่มเอนไซม์ดังกล่าวมักเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่พบได้ในกลุ่มของเชื้อ

จุลินทรีย์ที่ผลิตแมนนาเนสและมีกลไกการทำงานที่ส่งเสริมกัน (synergistic action) [12] จึงทำให้สารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1 สามารถย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้หลากหลายนั่นเอง

อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบชนิดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั้งสองชนิด (ไม่ปรับและปรับสภาพ) มีความแตกต่างกัน นั่นคือ วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ไม่ปรับสภาพ เปลือกมันฝรั่งมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด ในขณะที่วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ปรับสภาพ กากกาแฟมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากเมื่อวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรผ่านการปรับสภาพแล้วมีโครงสร้างที่ง่ายต่อการเข้าทำงานของแมนนาเนส จึงทำให้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีโครงสร้างเป็นแมนแนนเป็นโครงสร้างหลักเช่นกากกาแฟ [13] ถูกย่อยสลายได้ง่ายยิ่งขึ้น จึงปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ได้เพิ่มมากขึ้นด้วย อย่างไรก็ตาม เพื่อตรวจสอบผลการวิจัยให้ถูกต้องมากยิ่งขึ้น ในการวิจัยขั้นต่อไปจึงใช้แมนนาเนสบริสุทธิ์ในการศึกษา



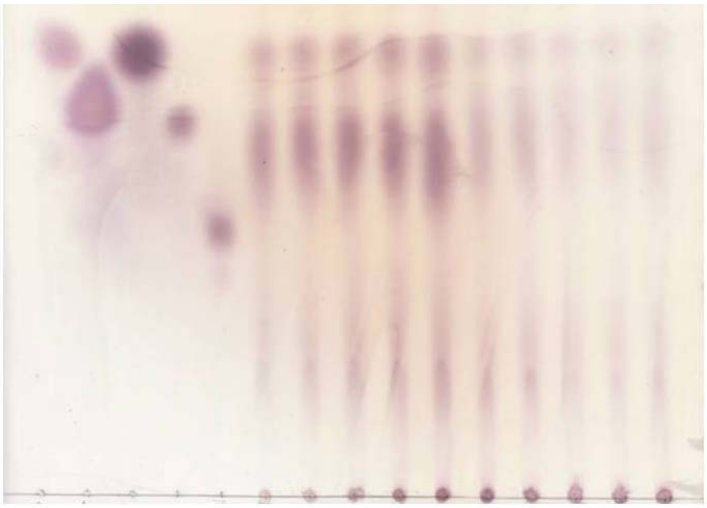

**รูปที่ 1** ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ไม่ปรับสภาพ (A) และปรับสภาพ (B) เมื่อถูกย่อยสลายด้วยสารละลายแมนนาเนสสกัดหยาบจาก *P.oxalicum* KUB-SN2-1 (เมื่อ —●— เปลือกมันฝรั่ง, —○— กากกาแฟ, —▼— กากมะพร้าว, —△— กากอ้อย และ —■— กากถั่วเหลือง)

จากรูปที่ 1 พบว่าการปรับสภาพกากกาแฟและกากมะพร้าวซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างหลักเป็นแมนแนน [14] จะทำให้การปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มสูงขึ้นโดยมีค่าเพิ่มมากขึ้นประมาณ 5 และ 3 เท่าตามลำดับ นอกจากนั้นระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยเพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดจากกากมะพร้าวยังเร็วขึ้นอีกด้วย (จาก 24 ชั่วโมง เหลือเพียง 12 ชั่วโมง) จึงเป็นการยืนยันว่าการปรับสภาพมีส่วนช่วยทำให้แมนนาเนสสามารถเข้าไปย่อยบริเวณโครงสร้างแมนแนนที่อยู่ในชั้นเฮมิเซลลูโลสของกากกาแฟและกากมะพร้าวได้ดียิ่งขึ้น อย่างไรก็ตาม เปลือกมันฝรั่ง กากอ้อย และกากถั่วเหลืองที่ผ่านการปรับสภาพมีการ

ปลดปล่อยน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง (รูปที่ 1B) ทั้งนี้อาจเกิดจากวิธีการปรับสภาพทำให้โครงสร้างของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั้ง 3 ชนิด เปลี่ยนแปลงจนทำให้สารละลายแมนนาเนสกัดหยาบไม่สามารถย่อยสลายได้ หรือทำงานได้ลดลงนั่นเอง

**3.2 ผลวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยวัสดุทิ้งทางการเกษตรด้วยสารละลายแมนนาเนสกัดหยาบ**

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นหลังจากการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั้ง 2 ชนิด (ปรับสภาพและไม่ปรับสภาพ) ด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1 (ตารางที่ 1) แสดงให้เห็นว่ากากกาแฟที่ผ่านการปรับสภาพเกิดผลิตภัณฑ์คือน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด ดังนั้นการวิจัยในขั้นต่อมาจึงทำการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโอลิโกแซคคาร์ไรด์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิค TLC




**รูปที่ 2** ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยกากกาแฟที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและปรับสภาพด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1 (เลน 1 กลูโคส; เลน 2 กาแลคโตส; เลน 3 แมนโนส; เลน 4 แมนโนไบโอส; เลน 5 แมนโนไตรโอส; เลน 6-10 ผลิตภัณฑ์จากกากกาแฟที่ผ่านการปรับสภาพที่ชั่วโมงที่ 24, 30, 36, 42 และ 48 ตามลำดับ; เลน 11-15 ผลิตภัณฑ์จากกากกาแฟที่ไม่ผ่านการปรับสภาพที่ชั่วโมงที่ 24, 30, 36, 42 และ 48 ตามลำดับ)

รูปที่ 2 แสดงผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยกากกาแฟที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและปรับสภาพ พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐานเป็นน้ำตาลโอลิโกแซคคาร์ไรด์ในกลุ่มแมนโนโอลิโกแซคคาร์ไรด์และน้ำตาลแมนโนส โดยพบโมเลกุลของน้ำตาลที่มีขนาดอยู่ระหว่างแมนโนไบโอสและแมนโนไตรโอส และน้ำตาลที่มีขนาดใหญ่กว่าแมนโนไตรโอส ซึ่งชนิดของน้ำตาลที่วิเคราะห์ได้สอดคล้องกันทั้งกากกาแฟประเภทที่ผ่านการปรับสภาพและไม่ผ่านการปรับสภาพ อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยขั้นต่อไปจำเป็นต้องศึกษาชนิดและปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ได้หลังจาก

การย่อยสลายด้วยสารละลายเอนไซม์ด้วยเทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้ชนิดของสารละลายน้ำตาลมาตรฐานที่หลากหลายมากยิ่งขึ้น นอกจากนั้นจากผลการวิจัยที่ได้แสดงให้เห็นว่าแมนนาเนสจาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1 เป็นเอนไซม์ที่มีกลไกการทำงานแบบย่อยสลายแบบสุ่มภายในสายโครงสร้างของสารประกอบแมนแนน ซึ่งเห็นได้จากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเป็นสารประกอบในกลุ่มโอลิโกแซคคาร์ไรด์นั่นเอง สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Kurakake และคณะ (2006) [15] ที่รายงานผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการทำงานของแมนนาเนสจาก *P. oxalicum* SO ว่าเป็นโอลิโกแซคคาร์ไรด์เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค PLC ร่วมกับเทคนิค MALDI-TOF-MS

## 4. สรุป

การศึกษาการผลิตโอลิโกแซคคาร์ไรด์จากการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *P. oxalicum* KUB-SN2-1 พบว่ากากกาแฟและกากมะพร้าวที่ปรับสภาพให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าที่ไม่ปรับสภาพ โดยกากกาแฟปรับสภาพมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด ในขณะที่เปลือกมันฝรั่งที่ไม่ปรับสภาพให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด และเมื่อทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยกากกาแฟปรับสภาพด้วยวิธี TLC พบว่ามีน้ำตาลแมนโนส แมนโนไบโอส น้ำตาลที่มีขนาดโมเลกุลระหว่างแมนโนไบโอสและแมนโนไตรโอส และน้ำตาลที่มีขนาดใหญ่กว่าแมนโนไตรโอสเป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งผลการวิจัยที่ได้ในครั้งนี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการผลิตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแมนโนโอลิโกแซคคาร์ไรด์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

## 5. เอกสารอ้างอิง


[1] Zyl, W.H., Rose, S.H., Trollope, K. and Gorgens, J.F., 2010, Fungal β-mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications, Proc. Biochem. 45: 1203-1213.

[2] Howard, R.L., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, E.L. and Howard, S., 2003, Lignocellulose biotechnology: Issues of bioconversion and enzyme production, Afr. J. Biotechnol. 2: 602-619.

[3] สุดาทิพย์ ฐิตะโภคา, 2552, พรีไบโอติก, ว.วิทยาศาสตร์ มข. 37: 366-375.

[4] Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L. and Saddler, J.N., 1988, Multiplicity of β-1,4-xylanase in microorganisms: Functions and applications, Microbiology 52: 305-317.

[5] Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Holtzapple, Y.Y.L.M. and Ladisch, M., 2005, Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, Biores. Technol. 96: 673-686.

[6] Chaiongkarn, A., Titapoka, S., Keawsompong, S. and Nitisinprasert, S., 2009, Identication and characterization of β-mannanase producing fungal strain KUB-SN2-1, p. 69, In Proceeding of ABIC 2009 Agricultural Biotechnology for Better Living and a Clean Environmental, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok.

[7] Miller, G.L., 1959, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars,

Anal. Chem. 31: 426-428.

[8] Lloyd, T.A., Wyman, C.E., 2005, Combined sugar yields for dilute acid sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids, Biores. Technol. 96: 1967-1977.

[9] Apiraksakorn, J., Nitisinprasert, S. and Robert, E.L., 2008, Grass degrading β-1,3-1,4-D-glucanases from *Bacillus subtilis* GN156: Purification and characterization of glucanase J1 and pJ2 possessing extremely acidic pI, Appl. Biochem. Biotechnol. 149: 53-66.

[10] Kumar, P., Barrett, D.M., Delwiche, M.J. and Stroeve, P., 2009, Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production, Ind. Eng. Chem. Res. 48: 3713-3729.

[11] Hendriks, A.T.W.M. and Zeeman, G., 2009, Pretreatment to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass, Biores. Technol. 100: 10-18.

[12] Dhawan, S. and Kaur, J., 2007, Microbial mannanases: An overview of production and applications, Crit. Rev. Biotechnol. 27: 197-216.

[13] Sachslehner, A., Foidl, G., Foidl, N., Gubitz , G. and Haltrich, D., 2000, Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanases of *Sclerotium rolfsii*, J. Biotecnol. 80:127-134.

[14] Clifford, M.N., 1986, Tea Coffee Trade J. 158: 30-32.

[15] Kurakake, M., Sumida, T., Masuda, D., Oonishi, S. and Komaki, T., 2006, Production of galacto-manno-oligosaccharides from guar gum by β-mannanase from *Penicillium oxalicum* SO, J. Agric. Food. Chem. 54: 7885-7889.