การผลิตและทำบริสุทธิ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าว

โดย
นายอิทธิชัย ฉิมพะเนาว์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

มหาวิทยาลัยศิลปากร

การผลิตและทำบริสุทธิ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าว

โดย
นายอิทธิชัย ฉิมพะเนาว์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

PRODUCTION AND PURIFICATION OF MANNOOLIGOSACCHARIDE FROM COPRA MEAL

By

MR. Iththichai CHIMPANAO

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Master of Science (BIOTECHNOLOGY)

Department of BIOTECHNOLOGY

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2018

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

หัวข้อ	การผลิตและทำบริสุทธิ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าว
โดย	อิทธิชัย ฉิมพะเนาว์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุวัฒนา พฤกษะศรี

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

---------- คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

---------- ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. บุษราภรณ์ งามปัญญา)

---------- อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุวัฒนา พฤกษะศรี)

---------- อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จุรีรัตน์ พุดตาลเล็ก)

---------- อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. พิมพ์ชนก จตุรพิรีย์)

---------- ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(อาจารย์ ดร. น้อมจิตต์ สุธีบุตร)

58401211 : เทคโนโลยีชีวภาพ แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
คำสำคัญ : แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์, กากมะพร้าว, พรีไบโอติก, อัลตราฟิลเตรชัน

นาย อิทธิชัย ฉิมพะเนาว์: การผลิตและทำบริสุทธิ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าว
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุวัฒนา พฤกษะศรี

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตและทำบริสุทธิ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ จากกากมะพร้าวโดยใช้แมนนาเนสจากคอกเทลเอนไซม์ 2 ยี่ห้อทางการค้า ได้แก่ Pectinex Ultra SP-L และ Pectinex Ultra Tropical ทำการเปรียบเทียบกิจกรรมแมนนาเนส จากการเปรียบเทียบที่สภาวะเดียวกันพบว่า Pectinex Ultra SP-L มีกิจกรรมแมนนาเนส 706.7±2.42 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่ากิจกรรมสูงกว่า Pectinex Ultra Tropical ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาคุณสมบัติของ Pectinex Ultra SP-L ผลการทดลองพบว่า Pectinex Ultra SP-L มีค่าพีเอช และอุณหภูมิที่ทำให้กิจกรรมแมนนาเนสสูงสุดคือ พีเอชเท่ากับ 4 อุณหภูมิเท่ากับ 65 องศาเซลเซียส (1208 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) แต่เอนไซม์มีความเสถียรต่ำเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ในขณะที่เมื่อบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 4 เป็นเวลา 30 นาที เอนไซม์ยังคงมีค่ากิจกรรมประมาณร้อยละ 50 ค่าจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เมื่อใช้กากมะพร้าวเป็นสารตั้งต้นมีค่า K_m = 534 กรัมต่อลิตร V_{max} = 7.43 กรัมต่อลิตรต่อนาที และเมื่อใช้โลคัสบีนกัมเป็นสารตั้งต้น มีค่า K_m = 6.70 กรัมต่อลิตร V_{max} = 9.71 กรัมต่อลิตรต่อนาที จากการศึกษาการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าวที่ความเข้มข้น 10-250 กรัมต่อลิตร พบว่ายิ่งใช้ความเข้มข้นกากมะพร้าวสูงขึ้น ความเข้มข้นของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ก็สูงขึ้นเช่นกัน ความเข้มข้นกากมะพร้าว 250 กรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่สามารถผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ดีที่สุด (22.1 กรัมต่อลิตร) โดยประกอบด้วยแมนโนไตรโอส 1.94 กรัมต่อลิตร แมนโนไบโอส 20.2 กรัมต่อลิตร แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการผลิตนำมาทำบริสุทธิ์โดยเปรียบเทียบ 2 วิธีการ ได้แก่ วิธีอัลตราฟิลเตรชัน และการใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* เพื่อกำจัดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (กลูโคสและแมนโนส) ทำการเปรียบเทียบร้อยละของโอลิโกแซคคาไรด์ที่เก็บเกี่ยวได้ จากการทดลองพบว่า การใช้เยื่อแผ่นที่อุณหภูมิ 13±1 องศาเซลเซียสที่ความดัน 3 บาร์มีค่าการกักกันของแมนโนไตรโอสดีกว่าการใช้เยื่อแผ่นที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ส่งผลให้สามารถแยกน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจากโอลิโกแซคคาไรด์ได้ดีขึ้น เมื่อศึกษาการใช้เยื่อแผ่นสองชั้นประกบกัน พบว่าการใช้เยื่อแผ่นสองชั้นไม่สามารถทำให้เกิดการคัดแยกระหว่างน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ แต่วิธีดังกล่าวสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้เพิ่มสูงขึ้นจากเดิมร้อยละ 39 เป็นร้อยละ 65 สำหรับการใช้ยีสต์ในการทำบริสุทธิ์ พบว่ายีสต์กำจัดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่งผลให้เก็บเกี่ยวโอลิโกแซคคาไรด์ได้สูงขึ้น โดยแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้มีค่าความบริสุทธิ์สูงถึงร้อยละ 65.6

แต่อย่างไรก็ตามวิธีการใช้ยีสต์ก่อให้เกิดเอทานอลในสารละลายแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ จึงจำเป็นต้องถูกกำจัดออกในขั้นตอนต่อไป

58401211 : Major (BIOTECHNOLOGY)
Keyword : mannooligosaccharide, copra meal, prebiotic, ultrafiltration

MR. ITHTHICHAI CHIMPANAO : PRODUCTION AND PURIFICATION OF MANNOOLIGOSACCHARIDE FROM COPRA MEAL THESIS ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR SUWATTANA PRUKSASRI, Ph.D.

The objectives of this research were to investigate the production and separation of mannooligosaccharides (MOS) from copra meal. The MOS mixture was enzymatically produced by endo-mannanase by commercial cocktail enzymes. Two commercial enzymes, Pectinex Ultra SP-L and Pectinex Ultra Tropical, were compared. The mannanase activity in Pectinex Ultra SP-L was 706.7±2.42 U/mL which was higher than that in Pecinex Ultra Tropical. Therefore, Pectinex Ultra SP-L was chosen for further characterization. The mannanase of Pectinex Ultra SP-L had an optimum condition at 65 °C and pH 4 (1208 U/mL). However, the temperature stability at 65°C was relatively low whereas the thermal stability at 55 °C could retain approximately 50% of the maximum activity after 90 min. incubation at pH 4. The K_m and V_{max} values of mannanase in Pectinex Ultra SP-L for copra meal and locust bean gum were 534 g/L and 7.43 g/L/min versus 6.70 g/L and 9.71 g/L/min, respectively. The concentrations of copra meal for the production of MOS were studied from 10 to 250 g/L. The results indicated that the higher the copra meal concentrations, the higher MOS concentrations were obtained. At the 250 g/L copra meal, the maximum MOS concentration reached 22.1 g/L which consisted of 1.94 g/L mannotriose and 20.2 g/L mannobiose. The obtained MOS was further purified by removal of mannose and glucose from the mixture. The ultrafiltration and yeast treatment by *S. cerevisiae* were compared in terms of monosaccharides removal and OS recovery yield. Ultrafiltration at low temperature (13±1°C) and pressure of 3 bar had a higher rejection value of mannotriose than that at 25±1°C, resulting in a better separation between mono- and OS. To improve the separation efficiency, 2 sheets of membrane were stacked. The results showed that the stacked sheets did not show any selectivity among mono and oligosaccharide, however the OS recovery was improved from 39 to 65%. The yeast treatment could remove monosaccharides more efficiently allowing a high recovery of mannooligosaccharide. The MOS purity of 65.6% was obtained from the yeast

treatment, however the by-products from fermentation such as ethanol should also be removed from the mixture.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยการให้ความช่วยเหลือแนะนำของ ผศ.ดร.สุวัฒนา พฤกษะศรีซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.จุรีรัตน์ พุดตาลเล็กและ รศ.ดร.พิมพ์ชนก จตุรพิรีย์อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ได้กรุณาที่ให้คำแนะนำข้อคิดเห็นตรวจสอบ และแก้ไขร่างวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ผู้เขียนจึงขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. บุษราภรณ์ งามปัญญา ที่กรุณาให้เกียรติเป็นประธาน โดยมี อ.ดร. น้อมจิตต์ สุธีบุตร เป็นกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้กรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น รวมถึงเจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศิลปากร และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพทุกท่านที่ให้ความสะดวกด้านอำนวยการ และประสานงาน ในการทำวิทยานิพนธ์ให้ผู้เขียนตลอดมาตลอดจนค้นคว้าหาข้อมูลในการจัดทำวิทยานิพนธ์ของผู้เขียนครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ท้ายนี้ผู้เขียนขอน้อมรำลึกถึงอำนาจบารมีของคุณพระศรีรัตนตรัย และสิ่งศักดิ์สิทธิ์ทั้งหลายที่อยู่ในสากลโลก อันเป็นที่พึ่งให้ผู้เขียนมีสติปัญญาในการจัดทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ผู้เขียนขอให้เป็นกตเวทิตาแด่บิดา มารดา ครอบครัวของผู้เขียน ตลอดจนผู้เขียนหนังสือ และบทความต่าง ๆ ที่ให้ความรู้แก่ผู้เขียนจนสามารถให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

อิทธิชัย ฉิมพะเนาว์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ฉ

กิตติกรรมประกาศ ..... ช

สารบัญ ..... ฌ

สารบัญรูปภาพ ..... ฎ

สารบัญตาราง ..... ฒ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 3

1.3 ขอบเขตงานวิจัย 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 ตรวจสอบเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 กากมะพร้าว 4

2.2 เอนไซม์แมนนาเนส 6

2.3 โอลิโกแซคคาไรด์ 9

2.4 การทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์ 13

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 16

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 19

3.1 วัตถุดิบ 19

3.2 สารเคมีและจุลินทรีย์ 19

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ 19

3.4 วิธีการทดลองและการวิเคราะห์....20
บทที่ 4 ผลการทดลอง....27
4.1 การศึกษากิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสในเอนไซม์ทางการค้า....27
4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสม และคุณสมบัติของ Pectinex Ultra SP-L....28
4.3 การผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าวโดยใช้แมนนาเนสในคอกเทลเอนไซม์....35
4.4 การทำบริสุทธิ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์....40
4.5 การคำนวณต้นทุนการผลิต....52
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง....54
ข้อเสนอแนะ....55
ภาคผนวก ก....56
ภาคผนวก ข....60
ภาคผนวก ค....67
รายการอ้างอิง....90
ประวัติผู้เขียน....95

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 1 โครงสร้างในสารประกอบแมนแนน [7] 5

รูปที่ 2 กลไกลการทำงานของแมนนาเนสต่อโครงสร้างสารประกอบแมนแนน [4]..... 6

รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นสารตั้งต้น (โลคัสบีนกัม) ที่มีผลต่อค่าจลนพลศาสตร์เอนไซม์แมนนาเนส [9]..... 7

รูปที่ 4 โครงสร้างแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ [15]..... 10

รูปที่ 5 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ BIO-MOS [17]..... 11

รูปที่ 6 กระบวนการผลิตสารสกัดจากยีสต์ [16]..... 12

รูปที่ 7 ระบบการทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์ด้วยอัลตราฟิลเตรชันที่อุณหภูมิ 13±1 องศาเซลเซียส 23

รูปที่ 8 ผลของค่าพีเอชที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนส (Pectinex Ultra SP-L) เมื่อวิเคราะห์โดยใช้โลคัสบีนกัมเป็นสารตั้งต้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร ควบคุมพีเอชเท่ากับ 3-10 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส..... 29

รูปที่ 9 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนส (Pectinex Ultra SP-L) เมื่อวิเคราะห์โดยใช้โลคัสบีนกัมเป็นสารตั้งต้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร ควบคุมพีเอชเท่ากับ 4 อุณหภูมิ 25-75 องศาเซลเซียส..... 30

รูปที่ 10 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์แมนนาเนส (Pectinex Ultra SP-L) เมื่อทำการบ่มเอนไซม์ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์พีเอช 4 เวลา 240 นาที 31

รูปที่ 11 การผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้นกากมะพร้าว 200 กรัมต่อลิตร กิจกรรมแมนนาเนส 100 ยูนิต ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์พีเอช 4 บ่มที่อุณหภูมิ 65 และ 55 องศาเซลเซียส..32

รูปที่ 12 Line weaver Burk Plot ของเอนไซม์แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L เมื่อใช้ (a) โลคัสบีนกัม 0.2–0.8 กรัมต่อลิตร และ (b) กากมะพร้าว ที่ความเข้มข้น 10-80 กรัมต่อลิตรเป็นสารตั้งต้น 34

รูปที่ 13 กากมะพร้าวจากกระบวนการผลิตกะทิจากโรงงานวราฟู้ดแอนดริงค์ จำกัด 35

รูปที่ 14 สารละลายแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าวความเข้มข้น 250 กรัมต่อลิตร 36

รูปที่ 15 HPLC Chromatogram ของ (a) กากมะพร้าวเริ่มต้นก่อนใส่เอนไซม์ (b) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยกากมะพร้าวความเข้มข้น 250 กรัมต่อลิตร โดยเอนไซม์แมนนาเนส 100 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เวลาบ่ม 120 นาที เจือจางตัวอย่าง 10 เท่า (พีคหมายเลข 1 คือ แมนโนไตรโอส พีคหมายเลข 2 คือ แมนโนไบโอส พีคหมายเลข 3 คือ กลูโคสพีคหมายเลข 4 คือ แมนโนส และ (C) เอนไซม์แมนนาเนส 100 ยูนิต 37

รูปที่ 16 ผลิตภัณฑ์จากการย่อยกากมะพร้าวความเข้มข้น 10 50 100 150 200 250 และ 300 กรัมต่อลิตร โดยใช้แมนนาเนสในคอกเทลเอนไซม์ (Pectinex Ultra SP-L) 100 ยูนิต ในสารละลายซิเตรต บัฟเฟอร์ พีเอช 4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (a) ความเข้มข้นกากมะพร้าว 10 กรัมต่อลิตร (b) ความเข้มข้นกากมะพร้าว 50 กรัมต่อลิตร (c) ความเข้มข้นกากมะพร้าว 100 กรัมต่อลิตร (d) ความเข้มข้นกากมะพร้าว 150 กรัมต่อลิตร (e) ความเข้มข้นกากมะพร้าว 200 กรัมต่อลิตร และ (f) ความเข้มข้นกากมะพร้าว 250 กรัมต่อลิตร (g) ความเข้มข้นกากมะพร้าว 300 กรัมต่อลิตร 38

รูปที่ 17 สรุปความเข้มข้นแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (DP2-DP3) สูงสุดที่ผลิตได้จากกากมะพร้าวความเข้มข้นแตกต่างกันโดยใช้แมนนาเนสในคอกเทลเอนไซม์ 100 ยูนิต ควบคุมสภาวะในการทำงานที่พีเอช 4 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 40

รูปที่ 18 ผลของอุณหภูมิในการกรองที่มีต่อร้อยละการกักกันของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาลกลูโคส และแมนโนส เมื่อ VCF = 4 ความดัน 3 บาร์ ความเข้มข้นเริ่มต้นของแมนโนไตรโอส 2.09 กรัมต่อลิตร แมนโนไบโอส 21.1 กรัมต่อลิตร กลูโคส 12.6 กรัมต่อลิตร แมนโนส 23.1 กรัมต่อลิตร41

รูปที่ 19 ผลของอุณหภูมิในการกรองสารละลายโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีผลต่อค่า selectivity ของน้ำตาลแต่ละชนิด เมื่อ VCF = 4 ความดัน 3 บาร์ ความเข้มข้นเริ่มต้นของแมนโนไตรโอส 2.09 กรัมต่อลิตร แมนโนไบโอส 21.1 กรัมต่อลิตร กลูโคส 12.6 กรัมต่อลิตร แมนโนส 23.1 กรัมต่อลิตร.....43

รูปที่ 20 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าฟลักซ์ (Flux) และเวลาของการทำบริสุทธิ์สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ที่อุณหภูมิ 13±1 องศาเซลเซียสและ 25±1 องศาเซลเซียส เมื่อกรองโดยใช้เยื่อแผ่นขนาดรูพรุน 1000 ดอลตัน ความดัน 3 บาร์ ความเข้มข้นเริ่มต้นของแมนโนไตรโอส 2.09 กรัมต่อลิตร แมนโนไบโอส 21.1 กรัมต่อลิตร กลูโคส 12.6 กรัมต่อลิตร แมนโนส 23.1 กรัมต่อลิตร 44

รูปที่ 21 ผลของจำนวนชั้นเยื่อแผ่นในการทำบริสุทธิ์ที่มีผลต่อร้อยละการกักกันของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ โมโนแซคคาไรด์ เมื่อ VCF = 4 ควบคุมความดัน 3 บาร์ อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นแมนโนไตรโอสเริ่มต้น 2.09 กรัมต่อลิตร แมนโนไบโอส 21.1 กรัมต่อลิตร กลูโคส 12.6 กรัมต่อลิตร แมนโนส 23.1 กรัมต่อลิตร 46

รูปที่ 22 ผลของจำนวนชั้นของเยื่อแผ่นในการทำบริสุทธิ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยกระบวนการเยื่อแผ่นที่มีผลต่อ selectivity เมื่อ VCF = 4 อุณหภูมิ 13±1 องศาเซลเซียส ความดัน 3 บาร์ ความเข้มข้นแมนโนไตรโอสเริ่มต้น 2.09 กรัมต่อลิตร แมนโนไบโอส 21.1 กรัมต่อลิตร กลูโคส 12.6 กรัมต่อลิตร แมนโนส 23.1 กรัมต่อลิตร.....47

รูปที่ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าฟลักซ์ (Flux) และเวลาของการทำบริสุทธิ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่จำนวนชั้นของเยื่อแผ่น 1 ชั้นและ 2 ชั้นที่อุณหภูมิ 13±1 องศาเซลเซียสเมื่อกรองโดยใช้เยื่อแผ่นขนาดรูพรุน 1000 ดอลตัน ความดัน 3 บาร์ ความเข้มข้นแมนโนไตรโอสเริ่มต้น 2.09 กรัมต่อลิตร แมนโนไบโอส 21.1 กรัมต่อลิตร กลูโคส 12.6 กรัมต่อลิตร แมนโนส 23.1 กรัมต่อลิตร.....48

รูปที่ 24 ฟลักซ์การทำบริสุทธิ์ของสารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยการควบคุมอุณหภูมิ 13 และ 25 องศาเซลเซียสและเพิ่มจำนวนชั้นของเยื่อแผ่นที่ความดัน 3 บาร์.....49

รูปที่ 25 การทำบริสุทธิ์สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์โดยร้อยละ 1 *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ด้วยความเข้มข้นเริ่มต้น 56 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ความเข้มข้นเริ่มต้นแมนโนไตรโอสเริ่มต้น 3.30 กรัมต่อลิตร แมนโนไบโอส 23.17 กรัมต่อลิตร กลูโคส 13.00 กรัมต่อลิตร แมนโนส 22.88 กรัมต่อลิตร 51

รูปที่ 26 HPLC Chromatogram ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ (a) แบบเยื่อแผ่น (b) ยีสต์ พีคหมายเลข 1 คือ แมนโนไตรโอส พีคหมายเลข 2 คือ แมนโนไบโอส พีคหมายเลข 3 คือ กลูโคส พีคหมายเลข 4 คือ แมนโนส 52

รูปที่ 27 กราฟมาตรฐานน้ำตาลแมนโนสวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS 62

รูปที่ 28 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสวิเคราะห์โดยวิธี HPLC.....62

รูปที่ 29 กราฟมาตรฐานน้ำตาลแมนโนสวิเคราะห์โดยวิธี HPLC.....63

รูปที่ 30 กราฟมาตรฐานน้ำตาลแมนโนไบโอสวิเคราะห์โดยวิธี HPLC.....63

รูปที่ 31 กราฟมาตรฐานน้ำตาลแมนโนไตรโอสวิเคราะห์โดยวิธี HPLC.....64

รูปที่ 32 กราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์ *S. cerevisiae* 64

รูปที่ 33 HPLC Chromatogram กลูโคสความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร Retention time เท่ากับ 18.5 นาที 65

รูปที่ 34 HPLC Chromatogram แมนโนสความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร Retention time เท่ากับ 19.4 นาที 65

รูปที่ 35 HPLC Chromatogram แมนโนไบโอสความเข้มข้น 0.15 กรัมต่อลิตร Retention time เท่ากับ 16.3 นาที.....65

รูปที่ 36 HPLC Chromatogram แมนโนไตรโอสความเข้มข้น 1.2 กรัมต่อลิตร Retention time เท่ากับ 14.1 นาที.....66

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 สารตั้งต้นที่มีผลต่อค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์แมนนาเนส จาก *Aspergillus niger gr* [8] 6

ตารางที่ 2 เอนไซม์แมนนาเนสจากเชื้อสายพันธ์ต่างๆ ในการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ [11] 8

ตารางที่ 3 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ชนิดต่างๆของเอนไซม์ทางการค้าที่ พีเอช 3.5 [6] 9

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ [16] 11

ตารางที่ 5 สารละลายพีเอชบัฟเฟอร์ 21

ตารางที่ 6 กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสในคอกเทลเอนไซม์ทางการค้าเมื่อวิเคราะห์โดยใช้โลคัสบีนกัมเป็นสารตั้งต้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร ควบคุมที่พีเอชเท่ากับ 3 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 27

ตารางที่ 7 อุณหภูมิ พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส และอุณหภูมิที่เสถียร 32

ตารางที่ 8 ความจำเพาะระหว่างสารตั้งต้นกับเอนไซม์แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L ควบคุมความเข้มข้นสารตั้งต้นที่ร้อยละ 1 ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์พีเอช 4 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 33

ตารางที่ 9 การเปรียบเทียบค่าคงที่ Michaelis Menten (K_m) และ อัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา (V_{max}) ของเอนไซม์แมนนาเนส 35

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบผลิตภัณฑ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าวโดยใช้เชื้อแหล่งอื่นๆ 40

ตารางที่ 11 ขนาดรัศมีและสัมประสิทธิ์การแพร่ของน้ำตาลในเยื่อแผ่น 43

ตารางที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่มีต่อค่าร้อยละผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้ และค่าร้อยละการกำจัดโมโนแซคคาไรด์ เมื่อ VCF = 4 ควบคุมความดัน 3 บาร์ 45

ตารางที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนชั้นของเยื่อแผ่นที่มีผลต่อค่าร้อยละผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้ และค่าร้อยละของโมโนแซคคาไรด์ที่ถูกกำจัดเมื่อ VCF = 4 ควบคุมความดัน 3 บาร์ อุณหภูมิ 13±1 48

ตารางที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการใช้ยีสต์ทำบริสุทธิ์ที่มีผลต่อค่าร้อยละของผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้ และร้อยละของโมโนแซคคาไรด์ที่ถูกกำจัด 51

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบผลจากวิธีการทำบริสุทธิ์โดยการใช้เทคโนโลยีเยื่อแผ่น และ ยีสต์ 52

ตารางที่ 16 ต้นทุนการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ปริมาตร 1 ลิตร จากกากมะพร้าวโดยใช้ Pectinex Ultra SP-L ที่มีกิจกรรมแมนนาเนส 100 ยูนิต 53

ตารางที่ 17 ผลของพีเอชที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L.....68

ตารางที่ 18 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนสใน Ultra SP-L 68

ตารางที่ 19 ผลของอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียสมีต่อความเสถียรของเอนไซม์แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L 69

ตารางที่ 20 ผลของอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียสมีต่อความเสถียรของเอนไซม์แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L 69

ตารางที่ 21 จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L.....70

ตารางที่ 22 ผลิตภัณฑ์จากการย่อยกากมะพร้าวความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร โดยใช้แมนนาเนสในคอกเทลเอนไซม์ (Pectinex Ultra SP-L) 100 ยูนิต ในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส.....70

ตารางที่ 23 ผลิตภัณฑ์จากการย่อยกากมะพร้าวความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร โดยใช้แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L 100 ยูนิต ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 71

ตารางที่ 24 ผลิตภัณฑ์จากการย่อยกากมะพร้าวความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร โดยใช้แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L 100 ยูนิต ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 71

ตารางที่ 25 ผลิตภัณฑ์จากการย่อยกากมะพร้าวความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร โดยใช้แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L 100 ยูนิต ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 72

ตารางที่ 26 ผลิตภัณฑ์จากการย่อยกากมะพร้าวความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร โดยใช้แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L 100 ยูนิต ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 73

ตารางที่ 27 ผลิตภัณฑ์จากการย่อยกากมะพร้าวความเข้มข้น 250 กรัมต่อลิตร โดยใช้แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L 100 ยูนิต ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 74

ตารางที่ 28 ผลิตภัณฑ์จากการย่อยกากมะพร้าวความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร โดยใช้แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L 100 ยูนิต ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 75

ตารางที่ 29 mass ของแมนโนไตรโอส แมนโนไบโอส กลูโคสและแมนโนส ในการทำบริสุทธิ์สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยกระบวนการเยื่อแผ่นขนาดรูพรุน 1000 ดอลตัล ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อ VCF = 4.....76

ตารางที่ 30 mass ของแมนโนไตรโอส แมนโนไบโอส กลูโคสและแมนโนส ในการทำบริสุทธิ์สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยกระบวนการเยื่อแผ่นขนาดรูพรุน 1000 ดอลตัล ที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เมื่อ VCF = 4.....76

ตารางที่ 31 mass ของแมนโนไตรโอส แมนโนไบโอส กลูโคสและแมนโนส ในการทำบริสุทธิ์สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยกระบวนการเยื่อแผ่นขนาดรูพรุน 1000 ดอลตัล 2 ชั้น ที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เมื่อ VCF = 4.....77

ตารางที่ 32 ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ selectivity ร้อยละการกักกัน ของการทำบริสุทธิ์ผ่านเยื่อแผ่น ความดัน 3 บาร์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส.....78

ตารางที่ 33 ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ selectivity ร้อยละการกักกัน ของการทำบริสุทธิ์ผ่านเยื่อแผ่น ความดัน 3 บาร์ อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส.....79

ตารางที่ 34 ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ selectivity ร้อยละการกักกัน ของการทำบริสุทธิ์ผ่านเยื่อแผ่น 2 ชั้น ความดัน 3 บาร์ อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส.....80

ตารางที่ 35 ฟลักซ์การทำบริสุทธิ์ผ่านเยื่อแผ่นด้วยการควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส.....81

ตารางที่ 36 ฟลักซ์การทำบริสุทธิ์ผ่านเยื่อแผ่นด้วยการควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ต่อ).....82

ตารางที่ 37 ฟลักซ์การทำบริสุทธิ์ผ่านเยื่อแผ่นด้วยการควบคุมอุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส.....83

ตารางที่ 38 ฟลักซ์การทำบริสุทธิ์ผ่านเยื่อแผ่นด้วยการควบคุมอุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส (ต่อ).....84

ตารางที่ 39 ฟลักซ์การทำบริสุทธิ์ผ่านเยื่อแผ่น 2 ชั้นด้วยการควบคุมอุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส...85

ตารางที่ 40 ฟลักซ์การทำบริสุทธิ์ผ่านเยื่อแผ่น 2 ชั้น ควบคุมอุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส (ต่อ).....86

ตารางที่ 41 ฟลักซ์การทำบริสุทธิ์ผ่านเยื่อแผ่น 2 ชั้นด้วยการควบคุมอุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส(ต่อ) 87

ตารางที่ 42 ความเข้มข้นผลิตภัณฑ์ในการทำบริสุทธิ์สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์โดยร้อยละ 1 *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง 88

ตารางที่ 43 ความเข้มข้นผลิตภัณฑ์ในการทำบริสุทธิ์สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์โดยร้อยละ 1 *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง (ต่อ).....89

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

มะพร้าวเป็นพืชในตระกูลปาล์ม มีชื่อทาง วิทยาศาสตร์ว่า Cocosmucifera L. คนไทยนิยมนำมาประกอบอาหารตั้งแต่สมัยโบราณ สามารถแปรรูปได้หลากหลายชนิด จึงทำให้ความต้องการมะพร้าวภายในประเทศไทยมีตัวเลขที่สูงขึ้น จากข้อมูลของศูนย์อัจฉริยะเพื่ออุตสาหกรรมอาหาร นับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555 การนำเข้ามะพร้าว 0.27 แสนตันกลายเป็น 1.14 แสนตันภายในปี พ.ศ 2558 โดยมีโรงงานรายใหญ่กว่า 8 แห่งและขนาดเล็กนับ 100 แห่งใช้มะพร้าวในการแปรรูปเป็นกะทิ และน้ำมัน [1] และจากการรายงานของบริษัทผลิตน้ำกะทิบรรจุกระป๋องพบว่าในหนึ่งวันจะมีกากมะพร้าวเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตประมาณ 9 ตันต่อวัน [2] จากตัวเลขข้างต้นแสดงให้เห็นถึงปริมาณของเสียจำนวนมากที่เหลือจากกระบวนการผลิต

กากมะพร้าวเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากอุตสาหกรรมกะทิหรือน้ำมัน มีลักษณะเป็นขุยหยาบสีขาว โดยองค์ประกอบของกากมะพร้าวที่เหลือทิ้งจากการคั้นกะทิเมื่อกำจัดน้ำมันออกหมด จะมีส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 62 โปรตีนร้อยละ 13.5 เยื่อใยร้อยละ 10 และเถ้าถ่านร้อยละ 3.5 [3]

กากมะพร้าวส่วนใหญ่จะถูกนำมาเป็นอาหารสัตว์ เนื่องจากคุณค่าทางอาหารเหลืออยู่พอที่จะเป็นอาหารสัตว์ เช่น อาหารวัว ควาย หมู และสัตว์ปีก แต่ด้วยข้อจำกัดของกากมะพร้าวที่มีเยื่อใย ทำให้เป็นอุปสรรคสำหรับการย่อยของสัตว์ปีก จึงต้องมีการปรับปรุงกากมะพร้าวให้ขนาดเยื่อใยเล็กลง เพื่อให้สัตว์ปีกสามารถย่อยได้ดีขึ้น นอกจากอาหารสัตว์ กากมะพร้าวสามารถนำมาทดแทนการใช้แป้ง เพื่อใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารประเภทขนม อาทิ คุกกี้ เค้ก เป็นการเพิ่มคุณค่าทางอาหาร เช่น เพิ่มปริมาณไฟเบอร์ โปรตีน รวมไปถึงการลดค่าใช้จ่ายทางด้านต้นทุนการผลิตขนม

นอกจากการใช้ประโยชน์โดยตรงแล้ว องค์ประกอบภายในของกากมะพร้าวก็ได้รับความสนใจจากนักวิจัย โดยในกากมะพร้าวมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูง มีลักษณะเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่มีน้ำตาลแมนโนสเรียงต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 หรือที่เรียกว่า แมนแนน เมื่อนำมาตัดพันธะให้สายพอลีเมอร์สั้นเหลือ 2-10 หน่วยของแมนแนนจะได้เป็นสารประกอบโอลิโกแซคคาไรด์ที่เรียกว่า แมนโน-โอลิโกแซคคาไรด์ (manno-oligosaccharide)

แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์มีคุณสมบัติเป็นสารพรีไบโอติก นอกจากนั้นยังมีคุณสมบัติสามารถช่วยลดการสะสมไขมันในตับ เนื้อเยื่อ และช่วยลดการดูดซึมไขมันบริเวณลำไส้ รวมไปถึงยังมี

คุณสมบัติเทียบเคียงกับยาปฏิชีวนะ โดยการยืนยันจากการทดลองในลูกกระต่ายโดยการใช้แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์แทนยาปฏิชีวนะ ซึ่งการทดลองพบว่ากระต่ายมีการเจริญเติบโตและมีความอยู่รอดใกล้เคียงกับการใช้ยาปฏิชีวนะ

ในงานวิจัยการผลิตโอลิโกแซคคาไรด์โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ เป็นหนึ่งในวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพที่นิยมใช้ เนื่องจากเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม โดยเอนไซม์แมนนาเนส (mannanase) เป็นกุญแจสำคัญสำหรับการผลิต เนื่องจากเอนไซม์จะย่อยสลายพอลีแซคคาไรด์แบบสุ่มภายในโครงสร้างที่มีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 [4] ซึ่งการทำงานของเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงสูงในการตัดพันธะจึงได้ผลผลิตที่คุ้มค่าและไม่ก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์รองที่ไม่ต้องการซึ่งเป็นข้อดีเหนือกว่าการใช้การย่อยด้วยกรด และดีกว่าการใช้กระบวนการเชิงกล [5]

ในปัจจุบันเอนไซม์แมนนาเนสทางการค้า ถูกผลิต และจำหน่าย โดยหลากหลายบริษัท อาทิ Sigma Aldrich หรือ Novozyme แต่มีราคาที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นเมื่อคำนึงถึงค่าใช้จ่ายเพื่อใช้ในการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ จะเห็นได้ว่า มีความเป็นไปได้ที่น้อยมาก กับการนำเอนไซม์บริสุทธิ์มาประยุกต์ใช้กับของเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรม

เอนไซม์เพกติเนส (pectinase) เป็นเอนไซม์คอกเทล (cocktail) ที่มีราคาถูก และมีค่ากิจกรรมเอนไซม์หลากหลายชนิด รวมไปถึงกิจกรรมของแมนนาเนส (mannanase) ที่มีค่ากิจกรรม 16160 nkat/ml [6] แต่ไม่มีการนำมาศึกษาในการผลิตและใช้ประโยชน์กับแมนโน-โอลิโกแซคคาไรด์เลย จึงทำให้เอนไซม์เพกติเนสเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตและศึกษาในงานวิจัยนี้

จากบทความข้างต้นจึงเป็นที่มาของแนวคิดงานวิจัยในการเพิ่มมูลค่าของกากมะพร้าวเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมที่มีปริมาณเหลือทิ้งมหาศาล ผลิตเป็นแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีคุณสมบัติพรีไบโอติกโดยใช้เอนไซม์คอกเทล ในแนวทางคือ หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต และศึกษาการทำบริสุทธิ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยระบบอัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration) และการใช้ยีสต์เพื่อกำจัดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาการผลิตและการทำบริสุทธิ์แมนโน-โอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าวซึ่งเป็นวัสดุที่เหลือจากกระบวนการผลิตน้ำกะทิสำเร็จรูปด้วยเอนไซม์คอกเทล

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1. ศึกษาคุณสมบัติเอนไซม์แมนนาเนสในเอนไซม์คอกเทลทางการค้า

2. ศึกษาการผลิตแมนโน-โอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์คอกเทล

3. ศึกษาการทำบริสุทธิ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยอัลตราฟิลเตรชัน และการใช้ยีสต์เพื่อกำจัดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีความบริสุทธิ์จากกากมะพร้าว เพื่อเพิ่มมูลค่าของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม และสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ไปต่อยอดและปฏิบัติทางด้านอุตสาหกรรมได้จริง

มหาวิทยาลัยศิลปากร

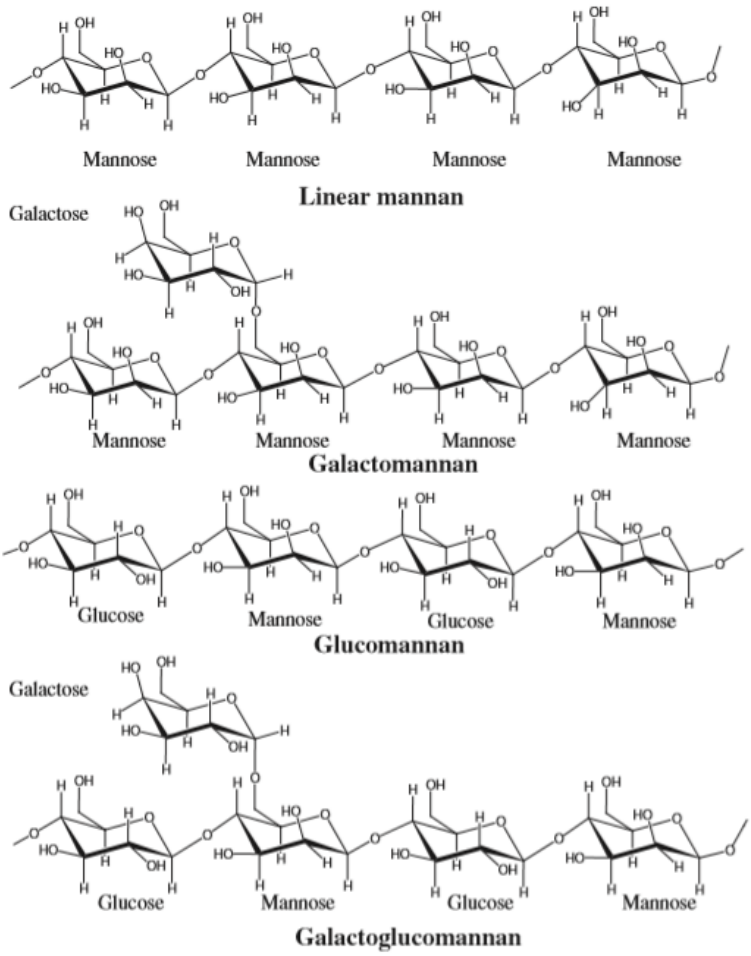
บทที่ 2
ตรวจสอบเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กากมะพร้าว

2.1.1 โครงสร้างของกากมะพร้าว

กากมะพร้าวเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมกะทิหรือน้ำมัน มีลักษณะเป็นขุยหยาบสีขาว โดยองค์ประกอบของกากมะพร้าวที่เหลือทิ้งจากการคั้นกะทิเมื่อกำจัดน้ำมันออกหมด จะมีส่วนประกอบของคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 62 โปรตีนร้อยละ 13.5 เยื่อใยร้อยละ 10 และเถ้าถ่านร้อยละ 3.5 [3] โดยมากกว่าร้อยละ 60 เป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีสวนประกอบของน้ำตาลแมนโนสเป็นองค์ประกอบหลัก เชื่อมต่อกันเป็นแมนแนน ซึ่งเป็นสารในกลุ่มเฮมิเซลลูโลส ซึ่งสารดังกล่าวพบได้ในระหว่างชั้นของเซลลูโลสและลิกนิน โดยแมนแนน และลิกนินจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ และเชื่อมต่อเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจน โดยทั่วไปแล้วจะพบแมนแนนในจิมโนสเปิร์มของไม้เนื้ออ่อน โดยแมนแนนแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ 1. น้ำตาลแมนโนสเพียงชนิดเดียวเรียงต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 2. น้ำตาลแมนโนสและน้ำตาลชนิดอื่นอยู่ภายในโครงสร้าง อาทิ กลูโคแมนแนนที่มีน้ำตาลแมนโนสและน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 ในสายโซ่หลัก กาแลคโตแมนแนนที่มีน้ำตาลแมนโนสเชื่อมต่อกันเป็นสายโซ่หลักและมีน้ำตาลกาแลคโตสเชื่อมต่อเป็นกิ่งกับสายหลักด้วยพันธะ α-1,6 และกาแลคโตกลุโคแมนแนนที่มีสายโซ่หลักเป็นกลูโคแมนแนนและมีสายกิ่งเป็นน้ำตาลกาแลคโตส (รูปที่ 1) ซึ่งในกากมะพร้าวเป็นแมนแนนประเภทที่ 2 (กาแลคโตแมนแนน)

แมนแนนภายในกากมะพร้าวมีเป็นสายยาวที่มากกว่า 2-10 หน่วย ถ้าสามารถตัดพันธะให้สายแมนแนนสั้นลงอยู่ในช่วงของโอลิโกแซคคาไรด์จะสามารถเพิ่มมูลค่าของกากมะพร้าวเหลือทิ้ง ให้กลายเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีคุณค่าทางอาหารได้



รูปที่ 1 โครงสร้างในสารประกอบแมนแนน [7]

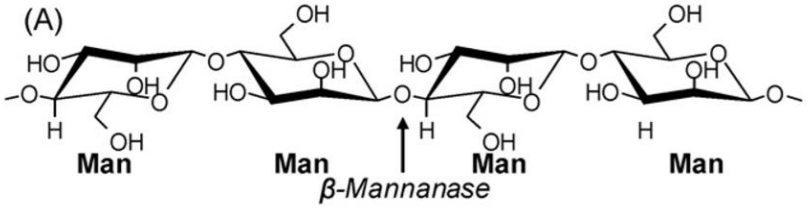
2.1.2 การใช้ประโยชน์จากกากมะพร้าว

กากมะพร้าวส่วนใหญ่จะถูกนำมาเป็นอาหารสัตว์ เนื่องจากคุณค่าทางอาหารเหลืออยู่พอที่จะเป็นอาหารสัตว์ เช่น อาหารวัว ควาย หมู และสัตว์ปีก แต่ด้วยข้อจำกัดของกากมะพร้าวที่มีเยื่อใย ทำให้เป็นอุปสรรคสำหรับการย่อยของสัตว์ปีก จึงต้องมีการปรับปรุงกากมะพร้าวให้ขนาดเยื่อใยเล็กลง เพื่อให้สัตว์ปีกสามารถย่อยได้ดีขึ้น นอกจากอาหารสัตว์ กากมะพร้าวสามารถนำมาทดแทนการใช้แป้ง เพื่อใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารประเภทขนม อาทิ คุกกี้ เค้ก เป็นการเพิ่มขึ้นค่าทางอาหาร เช่น เพิ่มปริมาณไฟเบอร์ โปรตีน รวมไปถึงการลดค่าใช้จ่ายทางด้านต้นทุนการผลิตขนม

2.2 เอนไซม์แมนนาเนส

2.2.1 การทำงาน

แมนนาเนส (mannanase) เป็นเอนไซม์ไฮโดรไลเลส มีคุณสมบัติในการตัดพันธะ β-1,4 ภายในโครงสร้างของแมนแนน เมื่อพันธะภายในโครงสร้างถูกตัดให้สั้นอยู่ในช่วง 2-10 ยูนิต แมนแนนจะได้เป็นสารประกอบแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์หลากหลาย DP เช่น แมนโนไบโอโอส (DP2) แมนโนไตรโอส (DP3) [4]



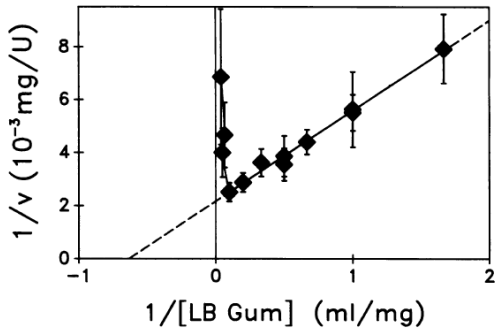
รูปที่ 2 กลไกลการทำงานของแมนนาเนสต่อโครงสร้างสารประกอบแมนแนน [4]

สารตั้งต้นแต่ละชนิดส่งผลต่อค่า V_{max} และ K_m ที่แตกต่างกัน โดยในปี 2009 Naganagouda และคณะ พบว่าสารตั้งต้นแต่ละชนิด ได้แก่ โลคัสบีนกัม กัวกัม และแมนแนนจากมะพร้าว เมื่อนำมาทดสอบเอนไซม์แมนนาเนส จาก *Aspergillus niger gr* พบว่าแมนแนนจากมะพร้าวส่งผลต่อค่า V_{max} ต่ำที่สุดและ K_m สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับโลคัสบีนกัม และกัวกัม รวมไปถึงค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ (relative activity) ที่ให้ค่าต่ำสุดเมื่อเปรียบเทียบกับ 2 ชนิดที่เหลือ (ตารางที่ 1) [8]

ตารางที่ 1 สารตั้งต้นที่มีผลต่อค่า K_m และ V_{max} ของเอนไซม์แมนนาเนส จาก *Aspergillus niger gr* [8]

สารตั้งต้น	ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ร้อยละ	K_m (กรัมต่อลิตร)	V_{max} (10^{-6} โมล/มิลลิลิตร/นาที)
โลคัสบีนกัม	100±5	0.11±0.00	14.13±0.70
กัวกัม	90±4.5	0.28±0.01	11.23±0.56
กากมะพร้าว	67±3.35	0.33±0.01	7.2±0.36

นอกจากสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน มีส่วนส่งผลต่อค่าจลนพลศาสตร์ ความเข้มข้นของสารตั้งต้นมีส่วนส่งผลต่อค่าจลนพลศาสตร์ด้วยเช่นกัน โดยพบว่าเมื่อสารตั้งต้น (โลคัสบีนกัม) ที่ความเข้มข้นสูงค่าความเร็วในการเกิดปฏิกิริยา (V) จะมีค่าต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า (รูปที่ 3) [9]



รูปที่ 3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นสารตั้งต้น (โลคัสบีนกัม) ที่มีผลต่อค่าจลนพลศาสตร์เอนไซม์แมนนาเนส [9]

2.2.2 แหล่งของเอนไซม์

ในปี 2015 Pangsri และคณะ[10] ศึกษาการนำไปใช้ของเอนไซม์แมนนาเนสบริสุทธ์ (ค่ากิจกรรม 295 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) หลังผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยเยื่อแผ่นขนาดรูพรุน 10 ดอลตันและการกรองผ่านเจล Sepharose) จาก *Bacillus circulans* NT6.7 โดยการใช้สารตั้งต้น (ร้อยละ 1 ต่อเอนไซม์) 3 ชนิด คือ ผลบุก (กลูโคแมนแนน) ถั่วโลคัสและกากมะพร้าว (กาแลคโตแมนแนน) ที่พีเอช 6 พบว่า สารตั้งต้น 3 ชนิดเมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์บริสุทธิ์สามารถเปลี่ยนเป็นผลผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ได้ในช่วง Degree of polymerization 2-6 ที่เวลา 5 ชั่วโมง โดยกากมะพร้าวที่มีแมนแนนอยู่ในรูปของกาแลคโตแมนแนน ให้ผลผลิตมากที่สุด นอกจากเชื้อสายพันธ์ *Bacillus circulans* NT6.7 ยังมีสายพันธ์อื่นๆที่ถูกค้นพบและนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ อาทิ *Streptomyces sp*. BF3.1 *Klebsiella oxytoca* KUB-CW2-3 และอื่น ๆ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เอนไซม์แมนนาเนสจากเชื้อสายพันธ์ต่างๆ ในการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ [11]

แหล่งของเอนไซม์	สารตั้งต้น	ชนิดของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์
Bacillus circulans *Bacillus albei*	กากมะพร้าว	Degree of polymerization 2-4
Bacillus sp. MSJ-5	แป้งบุก	Degree of polymerization 2-6
Penicillium *Oxalicum*	กัวกัม โลคัสบีนกัม	Degree of polymerization 2-7
Sclerotium rolfsii	กาแฟ	Degree of polymerization 2-4
Bacillus circulans NT6.7	โลคัสบีนกัม กากมะพร้าว แป้งบุก	Degree of polymerization 2-6
Streptomyces sp. BF3.1	กากมะพร้าว	Degree of polymerization 4

ในปัจจุบันเอนไซม์แมนนาเนสทางการค้า ถูกผลิต และจำหน่าย หลากหลายบริษัท อาทิ Sigma Aldrich (5 ยูนิต/ 5,132 บาท) หรือ Novozyme (250 ยูนิต/ 4,437 บาท) แต่เมื่อคำนึงถึงค่าใช้จ่าย ในการนำใช้ประโยชน์ในการผลิตแมนโน-โอลิโกแซคคาไรด์ มีความเป็นไปได้ที่น้อยมาก กับการนำเอนไซม์บริสุทธิ์มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมที่ต้องการใช้ปริมาณมาก และต้นทุนราคาถูก

เอนไซม์เพกติเนส (pectinase) เป็นเอนไซม์ราคาถูก ที่มีส่วนประกอบของเอนไซม์หลากหลายชนิด อาทิ เอนโดกลูแคนเนส (endoglucanase) ไซแลนเนส (xylanase) แมนนาเนส (mannanase) และเพคติน เมทิลเอสเทอเรส (pectin methylesterase) เป็นต้น (ตารางที่ 3)

เนื่องจากเอนไซม์เพกติเนสมีองค์ประกอบของเอนไซม์หลากหลายชนิด จึงมีการนำมาใช้ในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ในแต่ละด้าน เช่น Aziz และคณะ (2005) [12] ศึกษาการนำคุณสมบัติของเอนไซม์ Fructosyltransferase ที่มีอยู่ในคอกเทล มาผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้น ในสภาวะพีเอช ช่วง 5.5 - 6.5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส หรือ Yakup และคณะ (2007) [13]ศึกษาการผลิต กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ที่ใช้เอนไซม์เบตากาแลคโตซิเดสที่มีอยู่ในคอกเทลมาผลิต โดยใช้พีเอชในช่วงกรด (4-5) ที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส เป็นต้น แต่ในทางกลับกัน กลับไม่พบการนำกิจกรรมของแมนนาเนสมาศึกษา ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนสมีสูงถึง 16160 nkat/ml ใน Pectinex Ultra SP-L

ในงานวิจัยนี้จึงเล็งเห็นการนำคุณสมบัติของเอนไซม์แมนนาเนสมาศึกษาและทำการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ เพราะเนื่องจากมีค่ากิจกรรมของแมนนาเนสที่สูง และมีราคาไม่แพงเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์แมนนาเนสบริสุทธ์ทางการค้าอื่นๆ

ตารางที่ 3 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ชนิดต่างๆของเอนไซม์ทางการค้าที่ พีเอช 3.5 [6]

เอนไซม์ทางการค้า	EG	XYL	MAN	PG	beta-GAL	Alpha-ARA	PME
Econase CE	16,780	30,040	2,110	1,280	64	640	0
Pectinex Smash	1,990	590	30,915	34,885	1,910	774	7,807
Pectinex BE-3L	986	21,630	1,287	4,900	2,804	2,988	2,090
Biopectinase CCM	1,467	1,762	3,139	22,540	691	1,688	5,136
Pectinex Ultra SP-L	1,653	900	16,160	29,300	1,464	715	2,537

Activity (nkat/ml), Katal (kat) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งการเปลี่ยนสารตั้งต้น 1 โมล ในเวลา 1 นาที โดย 16.67 nkat เท่ากับ 1 U, EG = Endoglucanase, XYL = Xylanase, MAN = Mannanase, PG = endopolygalacturonase, beta-GAL = betagalactosidase, Alpha-ARA = Alpha arabinosidase, PME= pectin methylesterase

2.3 โอลิโกแซคคาไรด์

2.3.1 ความหมาย

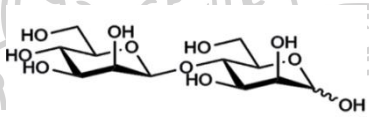
โอลิโกแซคคาไรด์ เป็น คาร์โบไฮเดรตสายสั้นที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ตั้งแต่ 2-10 โมเลกุล เป็นสารประเภทหนึ่งในสารพรีไบโอติก

2.3.2 ชนิดของโอลิโกแซคคาไรด์ [14]

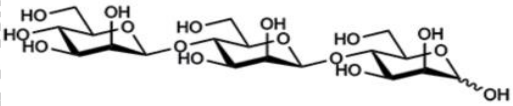
โอลิโกแซคคาไรด์มีหลายชนิด แตกต่างกันที่น้ำตาลที่เชื่อมต่อกัน โดยชื่อเรียกโอลิโกแซคคาไรด์จะมีความสัมพันธ์กับน้ำตาลภายในโครงสร้างโอลิโกแซคคาไรด์ ตัวอย่างเช่น

- ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructooligosaccharide) เป็นสารคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำตาลฟรุกโตสต่อกันด้วยพันธะ β-2,1 และมีปลายสายเป็นน้ำตาลกลูโคสเชื่อมกับฟรุกโตสด้วยพันธะ α-1,2 โดยฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์จะมีความยาว 3-60 หน่วย พบได้ในพืชตามธรรมชาติ เช่น หัวหอม กล้วย กระเทียม น้ำผึ้ง

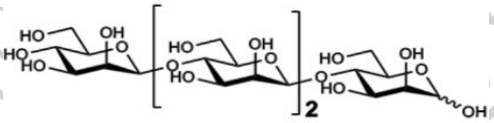
- ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นโอลิโกแซคาไรด์ที่มีน้ำตาลไซโลสเพียงชนิดเดียวกันเรียงต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 มีความยาว 2-10 หน่วย โดยแหล่งของสารตั้งต้นในการผลิตเป็นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ พบได้ ในฟางข้าว ซังข้าวโพด ไผ่ เปลือกเมล็ดข้าว เป็นต้น
- กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ พบได้ในน้ำนมแม่ น้ำนมวัว โยเกิรต หรือสังเคราะห์ขึ้นโดยใช้เอนไซม์เบตากาแลกโตซิเดรสจากสารตั้งต้นแลกโตส โดยกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ประกอบไปด้วยกาแลคโตสเรียงต่อกันด้วยพันธะ β-1,6 และมีปลายสายเป็นกลูโคสเชื่อมต่อด้วยพันธะ α-1,4
- แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (mannooligosaccharide) เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตประเภทพอลีแซคคาไรด์ขนาดสั้น มีน้ำตาลแมนโนสเป็นองค์ประกอบหลักเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 2-10 หน่วย (รูปที่ 4) เป็นสารประเภทหนึ่งในสารพรีไบโอติก



Mannobiose



Mannotriose



Mannotetraose

รูปที่ 4 โครงสร้างแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ [15]

2.3.3 ประโยชน์

โอลิโกแซคคาไรด์ เป็นสารประเภทหนึ่งในสารพรีไบโอติก โดยมีคุณสมบัติ คือ เมื่อบริโภคเข้าสู่ร่างกาย จะไม่ถูกย่อยสลายและดูดซึมภายในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก แต่จะถูกย่อยสลายเป็นแหล่งอาหารให้กับแบคทีเรียประเภทโปรไบโอติก (*Bifido bacteria, Lactobacilli*) ในลำไส้ใหญ่ และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุรินทรีย์ก่อโรค (pathogenic bacteria)

2.3.4 แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้า [16]

แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้าผลิตมาจากผนังเซลล์ยีสต์ มีลักษณะเป็นผงสีเหลือง มีอายุการเก็บรักษา 7 วันถึง 2 ปี นิยมใช้เป็นอาหารสัตว์ จัดจำหน่ายเป็นแพคเกจขนาดใหญ่ หลากหลายบริษัท อาทิ บริษัท Ohly จากประเทศเยอรมัน บริษัท Titan biotech จากประเทศอินเดีย บริษัท Biofeed technology จากประเทศแคนนาดา บริษัท alltech จากประเทศสหรัฐอเมริกา และบริษัทอื่นๆอีกมากมาย จาก รูปที่ 5 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ยี่ห้อ BIO-MOS มีส่วนประกอบของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ร้อยละ 17 ราคาขายอยู่ที่กิโลกรัมละ 12 ดอลลาร์

รูปที่ 5 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ BIO-MOS [17]

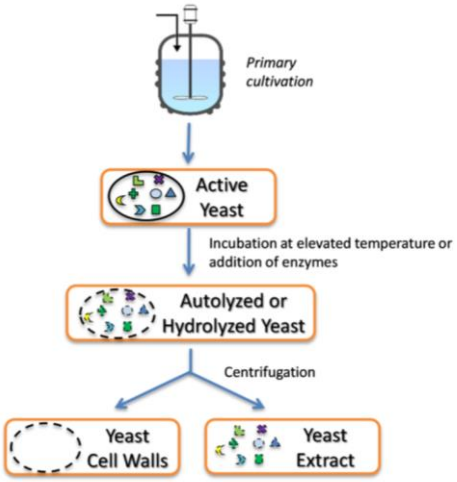
ผนังเซลล์ยีสต์มีส่วนประกอบของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นส่วนประกอบอยู่จำนวนมากจึงทำให้สามารถเรียกเป็นแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ได้ ผนังเซลล์ยีสต์เป็น By product จากอุตสาหกรรมการผลิตสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) โดยส่วนประกอบของเซลล์ผนังเซลล์ยีสต์ (ตารางที่ 4) ประกอบ ด้วย แมนโนโปรตีน (mannoprotein) เบตากลูแคน (beta-glucan) และไคติน (chitin)

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของผนังเซลล์ยีสต์ [16]

macromolecule	ร้อยละโดยน้ำหนัก	DP
แมนโนโปรตีน	25-70	200
กลูแคน	30-60	1500
ไคติน	1-8	190

ในกระบวนการผลิตสารสกัดจากยีสต์ หลังจากการเลี้ยงยีสต์ เซลล์ยีสต์และผนังเซลล์ยีสต์จะถูกแยกออกจากกันด้วยกระบวนการ autolysis หรือ hydrolysis หลังจากนั้นผนังเซลล์จะถูกแยก

ออกโดยการปั่นเหวี่ยง (รูปที่ 6) โดย 1 กิโลกรัมของผลิตภัณฑ์ยีสต์แอคแทรคจะมีผนังเซลล์ยีสต์อยู่ปริมาณ 0.5 กิโลกรัม



รูปที่ 6 กระบวนการผลิตสารสกัดจากยีสต์ [16]

นอกจากแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการกระบวนการผลิตสารสกัดจากยีสต์ ยังพบการนำยีสต์ที่ได้จากโรงงานเครื่องดื่มหรือโรงงานเอทานอลมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ด้วย

ปัจจัยที่มีผลต่อผนังเซลล์ยีสต์

1. สภาวะในการเลี้ยง

สภาวะในการเลี้ยงยีสต์ อาทิ แหล่งคาร์บอน พีเอช อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน มีผลต่อองค์ประกอบของผนังเซลล์ จากตารางที่ พบว่าสภาวะที่แตกต่างกันมีผลทำให้แมนแนนมีอยู่ในส่วนประกอบแตกต่างกันโดยพบว่าการเลี้ยงยีสต์ด้วยกลูโคสจะมีปริมาณแมนแนน (ร้อยละ 51 โดยน้ำหนัก) สูงกว่าการเลี้ยงยีสต์ด้วยซูโครส (ร้อยละ 35 โดยน้ำหนัก) นอกจากนั้นยังพบว่าสภาวะการเลี้ยงยังมีผลต่อ DP ของน้ำตาลภายในผนังเซลล์ยีสต์

2. กระบวนการ

ความแตกต่างของกระบวนการแยกผนังเซลล์ยีสต์และสิ่งที่บรรจุภายในเซลล์ยีสต์ด้วยวิธี autolysis และ hydrolysis มีผลต่อปริมาณแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่อยู่ผนังเซลล์ โดยพบว่ากระบวนการ hydrolysis ด้วยเอนไซม์โปรติเอสเพื่อแยกผนังเซลล์กับสิ่งที่อยู่ภายในเซลล์ยีสต์มีผลทำให้ปริมาณแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ลดลง เนื่องจากเอนไซม์จะมีผลต่อการ lyse cell แล้วยังมีผลต่อแมนแนนโปรตีนให้ละลายมาอยู่ในส่วนของสารละลาย และเมื่อปั่นเหวี่ยงแยกส่วนที่

ละลายกับผนังเซลล์จากกันด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง จึงทำให้มีผลให้ผนังเซลล์มีปริมาณแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ลดลง โดยปริมาณแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ในวิธี hydrolyzed มีปริมาณร้อยละ 50 โดยน้ำหนัก ซึ่งเมื่อเทียบกับวิธี autolysis มีปริมาณน้อยกว่า แต่อย่างไรก็ตาม วิธี autolysis ถึงจะมีขั้นตอนน้อยกว่าวิธี hydrolysis แต่ก็ยังไม่เป็นที่นิยมใช้มากกว่าเนื่องจากวิธี hydrolysis สามารถปลดปล่อย nucleotide ได้ปริมาณเยอะจึงทำให้เป็นผลดีต่อผลิตภัณฑ์ยีสต์แอคแทรค

2.4 การทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์

2.4.1 เยื่อแผ่น

หลักการทำงานของระบบเยื่อแผ่น

เป็นกระบวนการแยกโมเลกุลที่แตกต่างกันในสารละลายเพื่อทำบริสุทธิ์ หรือเพิ่มความเข้มข้น โดยใช้แรงดันเป็นตัวขับเคลื่อน (2-10 บาร์) สารละลายที่มีโมเลกุลขนาดเล็กกว่ารุพรุนของเยื่อแผ่นที่ผ่านไปได้ เรียกว่า เพอมิเอท (permeate) ส่วนสารละลายที่ถูกเยื่อแผ่นกักกันไว้เรียกว่า รีเทนเทท (retentate)

1. กระบวนการเยื่อแผ่นแบ่งออกเป็น 2 ประเภท

- การกรองแบบปิดตาย (Dead-end filtration)

การกรองแบบปิดตาย เป็นการป้อนสารละลายในทิศทางตั้งฉากกับเยื่อแผ่น ทำให้เกิดการสะสมอุดตันของอนุภาคบนผิวหน้าเยื่อแผ่น เรียกว่า เค้ก (cake) ที่ส่งผลต่อค่าฟลักซ์ ทำให้ค่าฟลักซ์ และความต้านทานของการกรองเพิ่มมากขึ้น การกรองลักษณะดังกล่าวเหมาะสำหรับสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำ และสเกลขนาดเล็ก

- การกรองแบบไหลขวาง (Cross-flow filtration)

การกรองแบบไหลขวาง ป้อนสารละลายในทิศทางขนานกับเยื่อแผ่น หรือตั้งฉากกับทิศทางการไหลของเพอมิเอท การกรองไหลขวางสามารถลดการสะสมของอนุภาคที่ผิวหน้าเยื่อแผ่นได้ เหมาะสมสำหรับสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง ที่มีแนวโน้มของการเกิดเค้กสูง ซึ่งนิยมในระดับอุตสาหกรรม

ปัญหาของการกรองด้วยเยื่อแผ่นที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการกรอง คือ การลดลงของฟลักซ์ในระหว่างกระบวนการ ซึ่งเป็นเหตุการณ์ที่พบได้เป็นประจำในการดำเนินการ โดยต้นเหตุของการเกิดปัญหาคือ การเกิดคอนเซ็นเตรชั่นโพลาไรเซชั่น (Concentration polarization) และฟาวลิ่ง (Fouling)

2. ปัจจัยที่ส่งผลต่อสมรรถนะของกระบวนการเยื่อแผ่น

- เยื่อแผ่น

ขนาดของรูพรุนเป็นหนึ่งในคุณสมบัติของเยื่อแผ่น โดยเยื่อแผ่นที่มีขนาดรูพรุนขนาดใหญ่จะมีฟลักซ์ในช่วงแรกที่สูงกว่าเยื่อแผ่นที่มีรูพรุนขนาดเล็ก นอกจากนั้นขนาดรูพรุนยังส่งผลถึง selectivity โดยการศึกษาของ Debora และคณะ (2007) พบว่ารูพรุนขนาดเล็กมีผลทำให้ค่า selectivity สูงกว่ารุพรุน ขนาดใหญ่ [18] แต่ขนาดรูพรุนของระบบอัลตราฟิลเตรชันมักมีข้อจำกัด โดยขนาดรูพรุนของอัลตราฟิลเตรชันมีให้ใช้ทั่วไปขนาดเล็กสุดอยู่ที่ 1000 ดอลตัน ซึ่งทำให้มีค่า selectivity ต่ำเมื่อนำมาใช้แยกขนาดโมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่าขนาดรุพรุน อาทิ การแยกโมโนแซคคาไรด์ออกจากโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดใกล้เคียงกันและเล็กกว่ารูพรุน K.F. และคณะ (2008) พบว่าการใช้เยื่อแผ่น 2 ชั้นช่วยทำให้ลดข้อจำกัดของขนาดรุพรุนและสามารถทำให้ selectivity มีค่าสูงขึ้น โดยข้อมูลดังกล่าวได้มาจากการศึกษาการคัดแยกโปรตีนที่มีขนาดใกล้เคียงกัน (14, 17 กิโลดอลตัน) และขนาดเล็กกว่าขนาดรุพรุน (30 กิโลดอลตัน) และเมื่อเปรียบเทียบ 1 ชั้นและ 2 ชั้น selectivity ของ 2 ชั้นมีค่าสูงกว่าอย่างชัดเจน [19]

- อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีส่วนส่งผลต่อความหนืดและความสามารถในการแพร่ผ่านของสารละลายและค่าฟลักซ์เมื่อเทียบกับอุณหภูมิห้อง จาก Debora และคณะ (2007) ค้นพบว่าการทำบริสุทธิ์ในช่วงอัลตราฟิลเตรชันที่อุณหภูมิห้องไม่สามารถกักกันโมเลกุลที่มีขนาด 0.15, 0.5, 1 กิโลดอลตันได้เลย [18] ซึ่งการทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์ด้วยระบบอัลตราฟิลเตรชันการกักกันด้วยการเพิ่มอุณหภูมิให้แก่ระบบเป็นสิ่งที่ไม่ดีนัก เพราะอาจจะทำให้ระบบกักกันผลิตภัณฑ์ไม่ได้เลย

- ความเข้มข้นของสารตั้งต้น

ความเข้มข้นของสารตั้งต้นมีส่วนส่งผลต่อค่าคอนเซ็นเตรชั่นโพลาไรเซชั่นให้สูงขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นแซคคาไรด์ ก่อให้เกิดการอุดตันของเยื่อแผ่น ส่งผลต่อค่าฟลักซ์ที่ลดลง

- ความดัน

จากการทำบริสุทธิ์ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (Xylo-oligosaccharide) ด้วยการเพิ่มความดันตั้งแต่ 2.6 บาร์ ถึง 8.6 บาร์ พบว่าการเพิ่มความดันทำให้ค่าฟลักซ์เพิ่มสูงขึ้นโดยความสัมพันธ์ระหวังความดันและ ฟลักซ์มีค่าเป็นเส้นตรง นอกจากมีผลต่อค่าฟลักซ์ยังส่งต่อค่า selectivity ของการแยกระหว่างไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ และสิ่งเจือปน โดยพบว่าการเพิ่มขึ้นของค่าฟลักซ์จาก 5 ลิตรต่อชั่วโมงต่อตารางเมตร ไปเป็น 55 ลิตรต่อชั่วโมงต่อตารางเมตร ทำให้การแยกของผลิตภัณฑ์และสิ่งเจือปนมี

ค่า selectivity ต่ำลงจาก 1.75 เป็น 1.5 และมีแนวโน้มเป็นเส้นตรงลดลงสวนทางกับการเพิ่มค่าฟลักซ์ให้แก่ระบบ จากข้อมูลดังกล่าวสรุปได้ว่าการที่ ฟลักซ์เพิ่มขึ้นที่มาจากการเพิ่มความดันมีผลทำให้ค่า selectivity ต่ำลง ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความบริสุทธิ์น้อยลง [18]

2.4.2 การใช้ยีสต์

การใช้ยีสต์สำหรับทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์เป็นวิธีการทางชีวภาพที่อาศัยกระบวนการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ในการกำจัดโมโนแซคคาไรด์ โดยในปี 2009 Oswaldo และคณะได้ใช้ยีสต์ในการทำบริสุทธิ์กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์เพื่อกำจัดน้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตส จากการทดลองพบว่าสามารถกำจัดน้ำตาลดังกล่าวได้หมดภายใน 10 ชั่วโมง แต่ผลการทดลองในครั้งนี้ทางผู้วิจัยได้กล่าวว่า อาจจะต้องพบเอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ในการทำบริสุทธิ์ครั้งนี้ด้วย [20] หรือในงานวิจัยของ Maria และคณะ ที่ใช้ยีสต์ในการทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์จากน้ำผึ้ง โดยผลการทดลองพบว่าน้ำตาลฟรุกโตส และกลูโคสลดลงเหลืออยู่ในองค์ประกอบเพียงร้อยละ 1 จากเดิมที่มีถึงร้อยละ 53 [21]

2.4.3 การดูดซับ

การดูดซับเป็นหนึ่งในวิธีการทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์ โดยการใช้ผงถ่านกัมมันต์ (Active Charcoal) โดยในปี 2009 Oswaldo และคณะได้ศึกษาการทำบริสุทธิ์กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้ผงถ่านกัมมันต์ในสารละลายเอทานอลความเข้มข้นต่างกัน (ร้อยละ 1, 5, 8, 10, และ 100) เพื่อกำจัดโมโนแซคคาไรด์และโดยให้โอลิโกแซคคาไรด์ถูกดูดซับเข้าไปในผงถ่าน ก่อนจะชะโอลิโกแซคคาไรด์จากผงถ่านด้วยเอทานอลร้อยละ 50 จากการทดลองพบว่า ในสารละลายเอทานอลตั้งแต่ความเข้มข้นร้อยละ 5 ขึ้นไป ผงถ่านไม่สามารถเก็บเกี่ยวโมโนแซคคาไรด์ได้เลย [20]

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Luz sanz และคณะ (2005) [21] ศึกษาพรีไบโอติกจากน้ำผึ้ง โดยส่วนหนึ่งของงานวิจัยได้ศึกษาการทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์จากน้ำผึ้งโดยการคัดแยกโมโนแซคคาไรด์ออกจากโอลิโกแซคคาไรด์ 3 วิธี ได้แก่ 1. ใช้เยื่อแผ่นขนาด 1000 ดอลตันในกากกักเก็บโอลิโกแซคคาไรด์และกำจัดโมโนแซคคาไรด์ให้ไหลไปในส่วนเพอมิเอท 2. ใช้ยีสต์ในการกำจัดโมโนแซคคาไรด์ 3. ใช้ชาโคลดูดซับโอลิโกแซคคาไรด์ จากการทดลองใน 3 วิธีพบว่าการทำบริสุทธิ์ด้วยเยื่อแผ่น ในส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์พบว่ายังคงมีส่วนประกอบของโมโนแซคคาไรด์ 36 กรัมต่อ 100 กรัมผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีปริมาณสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการใช้ชาโคลและยีสต์ โดยยีสต์และชาโคลได้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของโมโนแซคคาไรด์เพียง 1 และ 5 กรัมต่อ 100 กรัมผลิตภัณฑ์เท่านั้น ตามลำดับ

Nabarlatz และคณะ (2007) [18] ศึกษาการทำบริสุทธิ์ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการย่อยแบบ Autohydrolysis จาก almond shells โดยในงานวิจัยมีการเปรียบเทียบขนาดรุพรุนของเยื่อแผ่น (1 2.5 3.5 8 กิโลดอลตัน) และความดัน (2.6-9 บาร์) เพื่อหาประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในการใช้เทคโนโลยีเยื่อแผ่น จากการทดลองพบว่าการใช้ขนาดรูพรุนที่มีขนาดใหญ่และความดันที่สูงจะส่งผลต่อ selectivity ให้มีค่าต่ำ โดยงานวิจัยพบว่าที่ขนาดรูพรุน 1 กิโลดอลตันมีประสิทธิภาพดีที่สุด

Yunos และคณะ (2008) [19] ศึกษาการคัดแยกโปรตีนที่มีขนาดใกล้เคียงกันระหว่าง lysozyme (14300 g/mol) และ myoglobin (17400) ในระบบอัลตราฟิลเตรชัน ในการคาดหวังว่าจะทำให้เกิด selectivity ที่สูงขึ้นระหว่างโปรตีนทั้ง 2 ชนิด โดยการเพิ่มจำนวนชั้นเยื่อแผ่นให้มากขึ้นและปรับพีเอชของสารละลายให้เหมาะสมต่อการแยก จากการทดลองพบว่าเมื่อสารละลายมีพีเอชที่ 11 ในสารละลาย tris buffer ที่มีเยื่อแผ่น 2 ชั้นสำหรับการคัดแยก มีผลทำให้ selectivity ของโปรตีนทั้ง 2 ชนิดมีค่าสูงขึ้นจาก 7 เป็น 12.14 เมื่อเปรียบเทียบกับเยื่อแผ่น 1 ชั้น (เยื่อแผ่นมีขนาดรูพรุน 30000 กิโลดอลตัน)

Oswaldo และคณะ (2009) [20] เปรียบเทียบการทำบริสุทธิ์พรีไบโอติกชนิดกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ที่มีส่วนประกอบของโมโนแซคคาไรด์ปะปนในสารโอลิโกแซคคาไรด์ โดยการทำบริสุทธิ์ 4 วิธี ได้แก่ 1. เยื่อแผ่นขนาด 1000 ดอลตัน 2. ยีสต์ 3. ชาโคล 4. เทคนิค size exclusion จากการทดลองพบว่า 1. การใช้เยื่อแผ่นนั้น โอลิโกแซคคาไรด์และโมโนแซคคาไรด์ไม่ถูกคัดแยกออกจากกันทั้งสองชนิดปะปนกันอยู่ในส่วนของเพอมิเอท 2. ยีสต์มีประสิทธิภาพที่ดี โดยกำจัดโมโนแซคคาไรด์ออกได้หมด แต่ไม่สามารถกำจัดไดแซคคาไรด์ได้รวมถึงมีผลิตภัณฑ์ (เอทานอล กรด) ที่ไม่ต้องการเพิ่มขึ้นอีกด้วย ซึ่งเป็นข้อเสียของวิธีดังกล่าว 3. การใช้ชาโคลเป็นอีกหนึ่งวิธีที่มีประสิทธิภาพในการ

กำจัดโมโนแซคคาไรด์ได้ดี แต่เก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้น้อยมาก 4. การใช้เทคนิค size exclusion เป็นวิธีที่เก็บเกี่ยวผลผลิตได้สูงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีก่อนหน้านี้ แต่เป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายสูง และตัวอย่างจะถูกเจือจางในระหว่างกระบวนการทำบริสุทธิ์

Khuwijitjaru และคณะ (2012) [22] ศึกษาการสกัดพอลีแซคคาไรด์จากกากมะพร้าวด้วยวิธี subcritical water ที่อุณหภูมิ 100-200 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30-240 นาที เพื่อหาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมสำหรับการสกัดพอลีแซคคาไรด์ภายในกากมะพร้าวที่ประกอบไปด้วยคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 43-45 จากการศึกษาพบว่าสารสกัดที่พบเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโอลิโกแซคคาไรด์ โดยในช่วงอุณหภูมิ 100-150 องศาเซลเซียส มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต 3.5-5.1 กรัมต่อกรัมกากมะพร้าวเริ่มต้น เมื่อควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 175 องศาเซลเซียสและหาปัจจัยด้านเวลา พบว่าที่เวลาเพิ่มมากขึ้น (30-240 นาที) ผลผลิตคาร์โบไฮเดรตในสารสกัดก็เพิ่มสูงขึ้นจาก 4.9 สูงขึ้นเป็น 9.6 กรัมต่อกรัมกากมะพร้าวเริ่มต้น แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 200 องศาเซลเซียสในช่วงเวลาเดิม เมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้น ผลผลิตคาร์โบไฮเดรตในสารสกัดกลับลดลงจาก 10.6 กรัม เหลือเพียง 6.1 กรัมเท่านั้น

Ariandi และคณะ (2015) [11] ผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากการย่อยกากมะพร้าวโดยใช้เอนไซม์แมนนาเนสจาก *Streptomyces* Sp. BF3.1 โดยในงานวิจัยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อข้างต้น จากการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสและพีเอช 6 เป็นสภาวะที่ทำให้กิจกรรมแมนนาเนสสูงสุด แต่อุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียสมีความเสถียรในระยะเวลาที่สั้นกว่าเมื่อเทียบกับการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากสภาวะดังกล่าว (พีเอช 6 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) เมื่อนำย่อยกากมะพร้าวความเข้มข้นร้อยละ 10 จะได้แมนโนโอลิโกแซคาไรด์ DP4 และผลิตภัณฑ์น้ำตาลรีดิวซ์ 3.83 กรัมต่อลิตร

Alles และคณะ (2015) [23] ศึกษาการทำบริสุทธิ์สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากราก Yacon ที่มีตะกอนขนาดใหญ่และมีน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์เป็นสิ่งเจือปน โดยใช้เทคโนโลยีเยื่อแผ่นแบบระบบอัลตราฟิลเตรชันและนาโนฟิลเตรชันต่อเนื่องกันและการใช้การไดอะฟิลเตรชัน (dia filtration) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำบริสุทธิ์ จากการทดลองพบว่าการทำบริสุทธิ์ด้วยขั้นตอนดังกล่าวสามารถกำจัดน้ำตาลกลูโคสจากสารสกัดตั้งต้นร้อยละ 40.63 ลดลงเหลือร้อยละ 31.61 และฟลุคโตสจากเดิมร้อยละ 25.64 ลดลงเหลือร้อยละ 18.69 โดยท้ายที่สุดแล้วสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ร้อยละ 51.85 มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 19.75 ซึ่งการไดอะฟิลเตรชันด้วยน้ำไม่สามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ให้สูงขึ้นได้

Pangsri และคณะ (2015) [10] ผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจากเชื้อสายพันธ์ *Bacillus circulans* NT6.7 เพื่อใช้ประโยชน์ในการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ โดยในงานวิจัยได้ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ผลิตได้ จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมที่พีเอช 6 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีความจำเพาะกับโลคัสบีนกัมร้อยละ 50 เมื่อให้โกแจกแมนแนน (kojac mannan) มีกิจกรรมสัมพัทธ์ร้อยละร้อย และเมื่อนำเอนไซม์มาผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้กากมะพร้าวความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรจะได้ผลผลิต 5.86 กรัมต่อลิตร

Ahirwar และคณะ (2016) [24] ผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก *Malbranchea cinnamomea* NFCCI 3724 โดยใช้กากมะพร้าวเป็นแหล่งพลังงาน และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์มีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมอยู่ในช่วง 4-6 อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยจำเพาะกับสารตั้งต้นที่เป็นโลคัสบีนกัมมากสุด และมีอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา (V_{max}) เท่ากับ 63 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตรต่อนาที และค่าคงที่ Michaelis menten (K_m) เท่ากับ 4 กรัมต่อลิตร

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

กากมะพร้าวที่เหลือจากกระบวนการผลิตน้ำกะทิได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท วราฟู้ด แอนดริงค์ จำกัด อำเภอดอนตูม จังหวัดนครปฐม

3.2 สารเคมีและจุลินทรีย์

1. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	RCI lab scan Thailand
2. กรดไฮโดรคลอริก (HCl)	RCI lab scan Thailand
3. Pectinex Ultra SP-L	Novozyme Denmark
4. Pectinex Ultra Tropical	Novozyme Denmark
5. แก๊สไนโตรเจน (N_2)	Thailand
6. กรดซิตริก (Citric acid)	RCI lab scan Thailand
7. โซเดียม ซิเตรต (Sodium citrate)	RCI lab scan Thailand
8. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (Disodium hydrogen phosphate)	RCI lab scan Thailand
9. โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟส (Sodium hydrogen phosphate)	RCI lab scan Thailand
10. ไกลซีน (Glycine)	RCI lab scan Thailand
11. แมนโนส (Mannose)	Sigma Germany
12. กลูโคส (Glucose)	Sigma Germany
13. สารมาตรฐานแมนโนไบโอส (Mannobiose)	Megazyme Germany
14. สารมาตรฐานแมนโนไตรโอส (Mannotriose)	Megazyme Germany
15. โลคัสบีนกัม	Sigma Germany
16. ยีสต์ผง (Baker's yeast)	Greathill Thailand

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ตู้อบลมร้อน (Oven)	Binder Germany
2. เครื่องเขย่าสารละลาย (Incubator Shaker)	ika Germany
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)	Eppendorf Germany
4. ปั๊มสุญญากาศ (Vacuum pump) Rocker 300	Gibthai Thailand

5.	เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	Sartorius Germany
6.	pH Meter	Ultra basic Germany
7.	ชุดการกรอง Amicon® Stirred cell model 8400	Millipore USA
8.	เยื่อแผ่นอัลตราฟิลเตรชันชนิด Cellulose acetate ขนาด Molecular weight cut-off 1000 kDa พื้นที่ในการกรอง 41.8 cm^2	Millipore USA
9.	หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)	Tomy Japan

3.4 วิธีการทดลองและการวิเคราะห์

3.4.1 การศึกษาคุณสมบัติเอนไซม์แมนนาเนสในเอนไซม์ทางการค้า

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนสทางการค้า ดัดแปลงจากวิธีของ G.Taibot (1990) โดยใช้สารละลายโลคัสบีนกัม (locust bean gum) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 400 ไมโครลิตรกับสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์พีเอช 3 ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 5 นาที ใน incubator shaker ใส่สารละลายเอนไซม์เจือจาง 500 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายของบัฟเฟอร์เท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์) บ่มต่อ 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 3,5-dinitrosalicylic acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น เทียบกับกราฟมาตรฐานที่ใช้น้ำตาลแมนโนสเป็นสารละลายมาตรฐาน **[9]**

กำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสารตั้งต้นแล้วได้ผลิตภัณฑ์คือน้ำตาลแมนโนส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ (ตัวอย่างการคำนวณแสดงในภาคผนวก ข)

กิจกรรมแมนนาเนส (ยูนิต) =

$$\frac{\text{ความเข้มข้นแมนโนส (กรัมต่อลิตร)} \times \text{dilution enzyme} \times \text{ปริมาตรในการทำปฏิกิริยา (ลิตร)}}{\text{มวลโมเลกุลของแมนนนาโนส (180 กรัมต่อโมล)} \times \text{เวลา (นาที)}}$$

3.4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสม และคุณสมบัติของ Pectinex Ultra SP-L

3.4.2.1 ผลของพีเอชที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L

ทำการศึกษาพีเอชในช่วง 3-10 ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยผสมสารละลายโลคัสบีนกัมปริมาตร 400 ไมโครลิตร ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร กับสารละลายพีเอชบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 5 นาที ใน incubator shaker เติมเอนไซม์ปริมาตร 500 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายของบัฟเฟอร์เท่ากับ 50 มิลลิโมลาร์) บ่มต่อเป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาและคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ ดังข้อ 3.4.1

ตารางที่ 5 สารละลายพีเอชบัฟเฟอร์

พีเอช (pH)	สารละลายบัฟเฟอร์ (buffer)
3-5	ซิเตรตบัฟเฟอร์ (citrate buffer)
6-8	ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer)
9-10	ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Glycine-NaOH buffer)

3.4.2.2 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L

ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ 5 อุณหภูมิ คือที่ 35 45 55 65 และ 75 องศาเซลเซียส โดยผสมสารละลายโลคัสบีนกัมความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร ปริมาตร 400 ไมโครลิตรกับสารละลายพีเอชบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2.1 ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิที่ศึกษาเป็นเวลา 5 นาที ใน incubator shaker เติมเอนไซม์ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มต่อเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิที่ศึกษา หยุดปฏิกิริยาและคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ ดังข้อ 3.4.1

3.4.2.3 ผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L

ทำการศึกษาอุณหภูมิที่มีผลต่อความเสถียรของเอนไซม์ในการทำงานของเอนไซม์ 2 อุณหภูมิ คือที่ 55 และ 65 องศาเซลเซียส โดยการบ่มคอกเทลเอนไซม์ในสารละลายพีเอชบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.2.1 100 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างทุก 1 ชั่วโมงเพื่อมานำวัดค่ากิจกรรมแมนนาเนส โดยกำหนดให้ค่ากิจกรรมที่วัดได้ในชั่วโมงที่ 0 มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เป็นร้อยละ 100

3.4.2.4 ผลของชนิดสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะต่อแมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L

เปรียบเทียบกิจกรรมแมนนาเนสเมื่อใช้สารตั้งต้นที่เป็นโลคัสบีนกัมกับกากมะพร้าวความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร โดยอ้างอิงตามวิธีข้อ 3.4.1 (เลือกใช้พีเอชที่ทำให้ค่ากิจกรรมแมนนาเนสสูงสุด) อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมที่ได้จากสารตั้งต้นที่เป็นโลคัสบีนกัมจะมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เป็นร้อยละ 100

3.4.2.5 ผลของจลนพลศาสตร์ของแมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L

ทำการศึกษาพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์เมื่อใช้ กากมะพร้าวเป็นสารตั้งต้นที่ความเข้มข้น 10-80 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้โลคัสบีนกัมเป็นสารตั้งต้นที่ความเข้มข้น 0.2–0.8 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 4 พลอตกราฟระหว่าง $\frac{1}{s}$ กับ $\frac{1}{v}$ แล้วคำนวณหาค่าคงที่ของ Michalis Menten (K_m) และอัตราเร็วของปฏิกิริยา (V_{max})

3.4.3 การศึกษาการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์

3.4.3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของกากมะพร้าว

นำกากมะพร้าวที่ใช้ในการศึกษาการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์มาวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้น ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า โดยวิธี AOAC (1990) [25] และวิเคราะห์ขนาดอนุภาคเฉลี่ยโดยการทำ Screen analysis โดยใช้ตะแกรงทั้งหมด 5 ขนาด ได้แก่ ขนาด 45 75 150 212 และ 500 ไมโครเมตร และคำนวณขนาดอนุภาคเฉลี่ยในหน่วยมิลลิเมตร (การคำนวณแสดงในภาคผนวก ข)

3.4.3.2 ผลของความเข้มข้นกากมะพร้าวที่มีต่อการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์

เตรียมกากมะพร้าวความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 10 50 100 150 200 250 และ 300 กรัมต่อลิตรในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์พีเอช 4 (ค่าพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานจากผลการทดลองข้อ 3.4.2.1) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์ที่มีกิจกรรมแมนนาเนส 100 ยูนิตลงไป บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างในแต่ละช่วงเวลา คือ ที่เวลา 5 10 15 30 60 120 180 240 และ 300 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ใน water bath นำตัวอย่างที่เก็บได้มาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนกากมะพร้าวที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที นำตัวอย่างส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ และน้ำตาลชนิดต่างๆ โดยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งต่อกับเครื่องวิเคราะห์การหักเหแสง (Refractive Index Detector) คอลัมน์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ คือ Rezex RNM Carbohydrate โดยใช้น้ำปราศจากไอออนที่อัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเฟสเคลื่อนที่ ควบคุมอุณหภูมิ

ของคอลัมน์ที่ 80 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาลแต่ละชนิดด้วยการเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟเทียบกับสารละลายมาตรฐานของกลูโคส แมนโนส แมนโนไบโอส (DP2) และ แมนโนไตรโอส (DP3)

3.4.4 การศึกษาการทำบริสุทธิ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์

3.4.4.1 การทำบริสุทธิ์โดยเยื่อแผ่นอัลตราฟิลเตรชัน

ระบบการกรองโดยเยื่อแผ่นอัลตราฟิลเตรชัน ประกอบด้วย ชุดเครื่องกรอง (Amicon® Stirred cell) ถังกาซไนโตรเจนสำหรับให้ความดันแก่ระบบ อ่างน้ำสำหรับควบคุมอุณหภูมิ เครื่องชั่งน้ำหนักสำหรับบันทึกน้ำหนักของเพอมิเอท และเครื่องกวน (Hotplate Stirrer) ดังแสดงในรูปที่ 7

รูปที่ 7 ระบบการทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์ด้วยอัลตราฟิลเตรชันที่อุณหภูมิ 13±1 องศาเซลเซียส

เยื่อแผ่นอัลตราฟิลเตรชันของบริษัท Millipore ทำจากวัสดุเซลลูโลสอะซิเตท มีค่า Molecular Weight Cut-Off 1000 ดอลตัน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเยื่อแผ่นเท่ากับ 76 มิลลิเมตร พื้นที่ในการกรองเท่ากับ 41.8 ตารางเซนติเมตร ในการกรองจะเริ่มจากปริมาตรของสารละลายโอลิโกแซคคาไรด์ปริมาตรเริ่มต้น 200 มิลลิลิตร ควบคุมความดันในการกรองที่ 3 บาร์และความเร็วรอบในการกวนที่ 100 รอบต่อนาที หยุดการกรองเมื่อปริมาตรของสารในส่วนรีเทนเทท (retentate) เหลือ 50 มิลลิลิตร หรือมีค่า Volume Concentration Factor (VCF) เท่ากับ 4 โดยที่

VCF = ปริมาตรของสารป้อน/ปริมาตรของรีเทนเทท

ภายหลังการกรองแต่ละครั้ง ทำการล้างเยื่อแผ่นด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และวิเคราะห์ค่าฟลักซ์ของน้ำทุกครั้งก่อนและหลังใช้ เพื่อให้มั่นใจว่าเยื่อแผ่นที่ใช้ไม่เกิดการอุดตันหรือฉีกขาด

เก็บตัวอย่างทั้งส่วนเพอมิเอท (permeate) และรีเทนเทท เพื่อนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิดโดย HPLC วิเคราะห์ผลที่ได้ในรูปของค่าการกักกัน (Rejection) ค่าฟลักซ์ (Permeate Flux) ค่า Selectivity ค่าความบริสุทธิ์ (Purity) และค่าร้อยละผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้ (Yield)

$$\text{ค่าฟลักซ์ (Flux)} = \frac{\text{ปริมาตรของสารละลายในส่วนที่ไหลผ่านเยื่อแผ่น (ลิตร)}}{\text{พื้นที่ผิวของเยื่อแผ่นที่ใช้ในการแยก (ตารางเมตร)} \times \text{เวลาที่ใช้ในการแยก (ชั่วโมง)}}$$

$$\text{Selectivity} = \frac{\frac{\text{ความเข้มข้นของโมโนแซคคาไรด์ในส่วนเพอมิเอท (กรัมต่อลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นของโมโนแซคคาไรด์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)}}}{\frac{\text{ความเข้มข้นของโอลิโกแซคคาไรด์ในส่วนเพอมิเอท (กรัมต่อลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นของโอลิโกแซคคาไรด์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)}}}$$

$$\text{ค่าการกักกัน (Rejection)} = \left(1 - \left(\frac{\text{ความเข้มข้นของสารใดๆในส่วนเพอมิเอท}}{\text{ความเข้มข้นเริ่มต้น}}\right)\right) \times 100$$

$$\text{ความบริสุทธิ์ (Purity)} = \frac{\text{ความเข้มข้นของแมนโอลิโกแซคคาไรด์}}{\text{ความเข้มข้นของของแมนโอลิโกแซคคาไรด์ โมโนแซคคาไรด์}} \times 100$$

$$\text{ร้อยละผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้ (Yield)} = \frac{\text{น้ำหนักผลิตภัณฑ์ที่เก็บเกี่ยวได้}}{\text{น้ำหนักผลิตภัณฑ์เริ่มต้น}} \times 100$$

$$\text{ร้อยละโมโนแซคคาไรด์ที่ถูกกำจัด} = \left(1 - \frac{\text{น้ำหนักโมโนแซคคาไรด์ที่เก็บเกี่ยวได้}}{\text{น้ำหนักโมโนแซคคาไรด์เริ่มต้น}}\right) \times 100$$

$$\text{Productivity} = \frac{\text{ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้}}{\text{เวลาในการผลิต}}$$

$$\text{อัตราการลดลงของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว} = \frac{\text{น้ำหนักโมโนแซคคาไรด์ก่อนทำบริสุทธิ์-น้ำหนักโมโนแซคคาไรด์หลังทำบริสุทธิ์}}{\text{เวลาที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์}}$$

3.4.4.1.1 ผลของอุณหภูมิ

ทำการศึกษาอุณหภูมิในการกรองที่ 13±1 และ 25±1 องศาเซลเซียส ทำการทดลองดังอธิบายในข้อ 3.4.4.1 ทำการเปรียบเทียบค่าการกักกัน ค่าฟลักซ์ ค่า Selectivity ค่าความบริสุทธิ์ และ ค่าร้อยละผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้ ในแต่ละสภาวะ

3.4.4.1.2 ผลของจำนวนชั้นของเยื่อแผ่น

จำนวนชั้นของเยื่อแผ่นที่ศึกษา ประกอบด้วยเยื่อแผ่น 1 ชั้น และ 2 ชั้น ทำการทดลองดังอธิบายในข้อ 3.4.4.1 ควบคุมอุณหภูมิในการกรองที่ 13±1 องศาเซลเซียส ทำการเปรียบเทียบค่าการกักกัน ค่า ฟลักซ์ ค่า Selectivity ค่าความบริสุทธิ์ และ ค่าร้อยละผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้ในแต่ละสภาวะ

3.4.4.2 การทำบริสุทธิ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์โดยการใช้ยีสต์

3.4.4.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อ (Inoculum)

เลี้ยง Baker’s Yeast 1 กรัม ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YP 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อยีสต์ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YP 450 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จนได้ค่า OD = 1 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จึงนำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์กับสารละลายออกที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อ

นาทีเป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ยีสต์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ก่อนนำไปใช้ในขั้นตอนถัดไป

3.4.4.2.2 การเลี้ยงยีสต์ในสารละลายแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์

นำสารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการทดลองที่ 3.4.2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรปรับพีเอชให้ได้ 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ และเติมเซลล์ยีสต์ร้อยละ 1 ที่ได้จากข้อ 3.4.4.2.1 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ใน Incubator shaker เขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างครั้งละ 1 มิลลิลิตรทุกๆ 1 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ได้จะถูกนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที สารละลายส่วนใสที่ได้นำไปวิเคราะห์น้ำตาลแต่ละชนิดที่เปลี่ยนแปลงไป และปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นโดย HPLC ส่วนตะกอนเซลล์ที่แยกออกจากการปั่นเหวี่ยงนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง (Cell dry weight) วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ ค่าผลผลิตที่ได้ และ อัตราการกำจัดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharide Removal Rate) โดยที่

$$\text{อัตราการกำจัดน้ำตาล (กรัมต่อชั่วโมง)} = \frac{\text{น้ำหนักน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเริ่มต้น} - \text{น้ำหนักน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เหลืออยู่}}{\text{เวลา}}$$

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การศึกษากิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสในเอนไซม์ทางการค้า

จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ ได้มีรายงานว่าเอนไซม์ทางการค้าในกลุ่มเอนไซม์เพคติเนส ที่ใช้ในกระบวนการแปรรูปน้ำผลไม้ นอกจากจะประกอบด้วยกิจกรรมของเอนไซม์เพคติเนสแล้ว ยังประกอบด้วยกิจกรรมของเซลลูเลส (Cellulase) เบต้า-กาแลคโตซิเดส (beta-galactosidase) ฟรุกโตซิล-ทรานเฟอเรส (Fructosyl-transferase) และแมนนาเนส (Mannanase) [6]

ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์แมนนาเนสในคอกเทลเอนไซม์ทางการค้า 2 ชนิด ได้แก่ Pectinex Ultra SP-L และ pectinex Tropical จากบริษัท Novozyme ที่มีจัดจำหน่ายภายในประเทศไทย และการนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์

ตารางที่ 6 กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสในคอกเทลเอนไซม์ทางการค้าเมื่อวิเคราะห์โดยใช้โลคัสบีนกัมเป็นสารตั้งต้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร ควบคุมที่พีเอชเท่ากับ 3 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

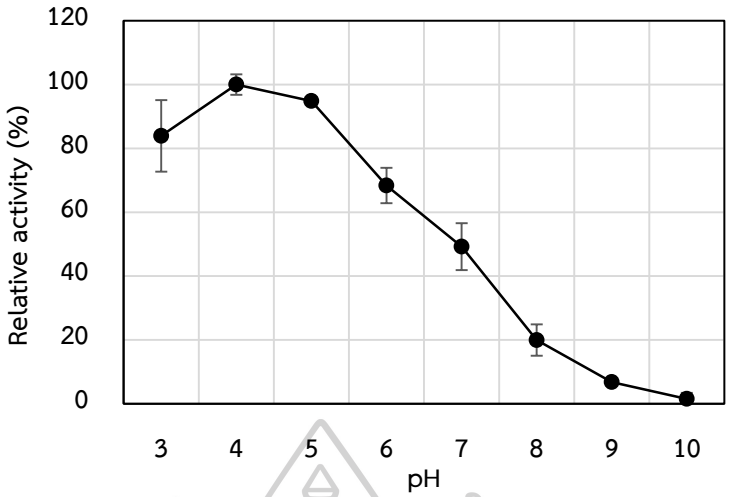
	ค่ากิจกรรม (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
Pectinex Ultra SP-L	706.7±2.42
Pectinex Ultra Tropical	357.5±6.52

จากตารางที่ 6 เมื่อทำการเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสในคอกเทลเอนไซม์ทางการค้าของ Pectinex Ultra SP-L และ Pectinex Ultra Tropical เมื่อใช้โลคัสบีนกัมเป็นสารตั้งต้น โดยควบคุมสภาวะที่ใช้ในการศึกษาค่ากิจกรรมแมนนาเนสที่พีเอช 3 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่า Pectinex Ultra SP-L และPectinex Ultra Tropical มีค่ากิจกรรมแมนนาเนส เท่ากับ 706.7 และ 357.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือก Pectinex Ultra SP-L มาใช้ในการศึกษาตอนต่อไป เมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนสกับงานวิจัยของ Buchert และ คณะ [6] พบว่า เอนไซม์ Pectinex Ultra SP-L มีค่ากิจกรรมของแมนนาเนสเท่ากับ 953 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่พีเอช 3.5 ซึ่งความแตกต่างของค่ากิจกรรมแมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L ระหว่างแหล่งอ้างอิงและผลการทดลอง อาจเนื่องมาจากพีเอชที่ต่างกัน หรืออาจจะเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ที่แต่ต่างกันในแต่ละลอตการผลิต

4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสม และคุณสมบัติของ Pectinex Ultra SP-L

4.2.1 ผลของพีเอชที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L

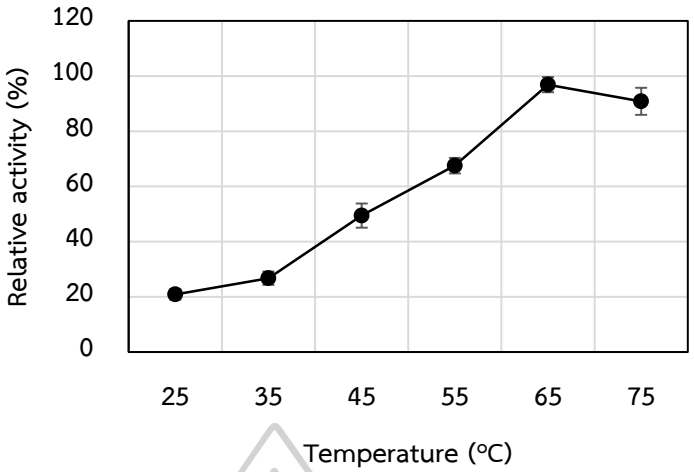
จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนสโดยใช้สารละลายโลคัสบีนกัม ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์เป็นสารตั้งต้นที่พีเอชในช่วง 3-10 โดยใช้สารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์สำหรับพีเอชในช่วง 3-5 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์สำหรับพีเอชในช่วง 6-8 และสารละลายไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์สำหรับพีเอชในช่วง 9-10 บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที พบว่า พีเอชที่ต่างกันมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ดังแสดงในรูปที่ 8 โดยพีเอชในช่วงที่เป็นกรด (3–5) มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์มากกว่าร้อยละ 80 และมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงที่สุดอยู่ที่พีเอช 4 ส่วนในช่วงพีเอช 7-10 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์น้อยกว่าร้อยละ 50 โดยพีเอช 10 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ต่ำที่สุดเพียงร้อยละ 1.50 จากข้อมูลข้างต้นพบว่ากิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสในคอกเทลเอนไซม์ Pectinex Ultra SP-L มีกิจกรรมสัมพัทธ์สูงในช่วงกรด และทำงานได้ดีที่สุดในพีเอช 4 ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่วัดได้เท่ากับ 842 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่า ในสภาวะที่เป็นกรดเกิดการเปลี่ยนแปลงในบริเวณแอคทีฟไซต์ที่มีการแตกตัวของไอออนที่มีผลทำให้เอนไซม์เข้าจับกับสารตั้งต้นได้ดี [26] ซึ่งส่งผลให้เอนไซม์จับกับสารตั้งต้นได้ดี จึงทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ปริมาณสูง นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แมนนาเนสจากแหล่งต่าง ๆ พบว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานมีค่าอยู่ในช่วงที่เป็นกรด เช่น เอนไซม์แมนนาเนสที่ได้จาก *Aspergillus niger* มีพีเอชเหมาะสมที่พีเอช 3 เอนไซม์แมนนาเนสที่ได้จาก *Trichoderma reesei* มีพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 3-4 (ตารางที่ 7) [24]



รูปที่ 8 ผลของค่าพีเอชที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนส (Pectinex Ultra SP-L) เมื่อวิเคราะห์โดยใช้โลคัสบีนกัมเป็นสารตั้งต้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร ควบคุมพีเอชเท่ากับ 3-10 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

4.2.2 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L

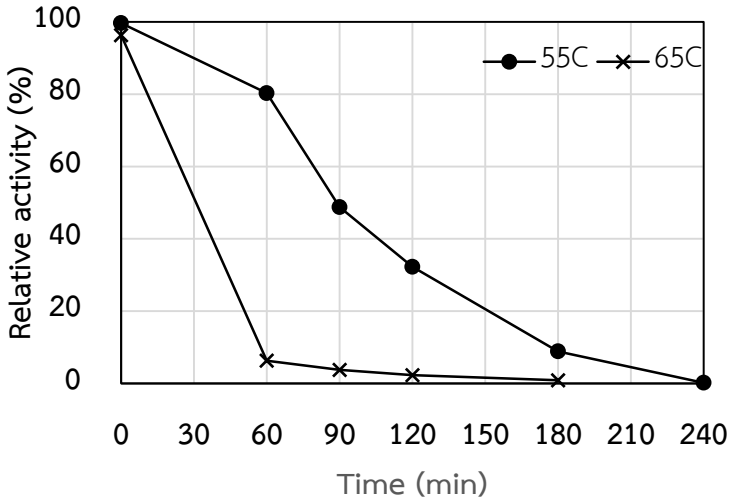
จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนสที่อุณหภูมิ 25 35 45 55 65 และ 75 องศาเซลเซียสในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์พีเอช 4 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่เวลาการบ่ม 5 นาที พบว่า อุณหภูมิส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์อย่างเห็นได้ชัดดังแสดงในรูปที่ 9 โดยสามารถแบ่งค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ออกเป็นสองช่วง โดยช่วงแรกมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์น้อยกว่าร้อยละ 50 ได้แก่ อุณหภูมิในช่วง 25- 45 องศาเซลเซียส ช่วงที่สอง คือ มีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์มากกว่าร้อยละ 50 ได้แก่ อุณหภูมิ 55 - 75 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์สูงที่สุด คือ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส (ค่ากิจกรรมแมนนาเนสเท่ากับ 1208 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิสูงมีผลทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนจากสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์มากขึ้น [26] เช่นเดียวกับเอนไซม์ที่ได้จาก *Pennicilium chrysosporium* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 70 องศาเซลเซียส หรือเอนไซม์จาก *Aspergillus niger* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 60 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 6) [24]



รูปที่ 9 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนส (Pectinex Ultra SP-L) เมื่อวิเคราะห์โดยใช้โลคัสบีนกัมเป็นสารตั้งต้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร ควบคุมพีเอชเท่ากับ 4 อุณหภูมิ 25-75 องศาเซลเซียส

4.2.3 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L

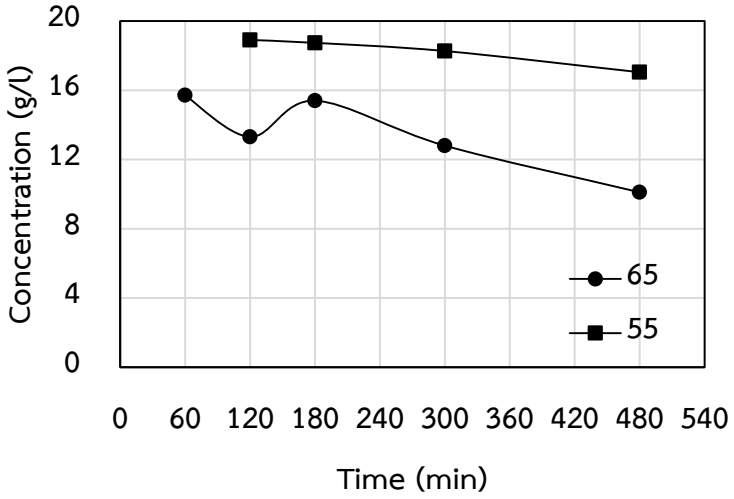
จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์แมนนาเนสที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 4 (อุณหภูมิและพีเอชที่ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์สูงที่สุด) พบว่าเอนไซม์มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ต่ำกว่าร้อยละ 10 เมื่อบ่มเอนไซม์ไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แต่เมื่อลดอุณหภูมิในการบ่มเอนไซม์เหลือ 55 องศาเซลเซียส (เป็นอุณหภูมิที่มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ร้อยละ 68 อยู่ในอันดับ 3 รองจากอุณหภูมิ 65 และ 75) เอนไซม์ยังคงมีค่ากิจกรรมมากกว่าร้อยละ 80 ในเวลาการบ่ม 1 ชั่วโมงซึ่งลดลงไปเพียงร้อยละ 20 เท่านั้นจากเริ่มต้น โดยกิจกรรมสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสลดลงเหลือร้อยละ 0 เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง เหตุผลของการลดลงของกิจกรรมเอนไซม์เกิดจากเอนไซม์เสียสภาพและไม่สามารถจับกับสารตั้งต้นได้จึงทำให้ไม่เกิดผลิตภัณฑ์



รูปที่ 10 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์แมนนาเนส (Pectinex Ultra SP-L) เมื่อทำการบ่มเอนไซม์ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์พีเอช 4 เวลา 240 นาที

จากการศึกษาอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์แมนนาเนสที่อุณหภูมิ 65 และ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 4 พบว่าที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความเสถียรต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แต่ที่ 65 องศาเซลเซียสมีค่ากิจกรรมแมนนาเนสที่สูงกว่า จึงทำให้ทางผู้วิจัยได้ตัดสินใจทดสอบอุณหภูมิที่เสถียรของทั้ง 2 อุณหภูมิในการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ เพื่อเป็นข้อมูลในการตัดสินใจเลือกใช้อุณหภูมิในขั้นการผลิตต่อไป โดยทางผู้วิจัยได้ศึกษาการผลิตแมนโน โอลิโกแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้นกากมะพร้าว 200 กรัมต่อลิตร กิจกรรมแมนนาเนส 100 ยูนิต ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4 บ่มที่อุณหภูมิ 65 และ 55 องศาเซลเซียส จากการทดสอบพบว่าที่อุณหภูมิในการบ่มที่ 55 องศาเซลเซียสให้ผลิตภัณฑ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 11 ซึ่งจากสังเกตในการทดสอบ พบว่าสารละลายบัฟเฟอร์และเอนไซม์เมื่อผสมกับกากมะพร้าวแล้วนั้น กากมะพร้าวบางส่วนจะไม่เกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์เนื่องจากความเข้มข้นของกากมะพร้าวที่สูง การที่เอนไซม์มีความเสถียรที่นานจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลให้เกิดผลิตภัณฑ์โอลิโกแซคคาไรด์ในปริมาณสูงได้

จากข้อมูลดังกล่าว จึงเป็นสาเหตุให้ทางผู้วิจัยได้เลือกนำอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสไปใช้ในการศึกษาการผลิตแมนโนโอลิโกแซคาไรด์ในขั้นตอนถัดไป ด้วยเหตุผลที่ว่า อุณหภูมิดังกล่าวมีความเสถียรที่ยาวนานกว่า เมื่อนำมาทดสอบกับการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์แล้วเกิดผลิตภัณฑ์ที่สูงกว่า



รูปที่ 11 การผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้นกากมะพร้าว 200 กรัมต่อลิตร กิจกรรมแมนนาเนส 100 ยูนิต ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์พีเอช 4 บ่มที่อุณหภูมิ 65 และ 55 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 7 อุณหภูมิ พีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส และอุณหภูมิที่เสถียร

จุลินทรีย์	สภาวะที่เหมาะสม		Thermo stability and half-life	อ้างอิง
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	พีเอช		
Aspergillus niger	60	3.0	70 °C /6 h	[24]
Sclerotium rolfsii	74	2.9	50 °C /6 h	
Trichoderma reesei	70	3.0-4.0	60 °C /6 h	
Pennicillium chrysosporium	60-70	4.0-6.0	60 °C /6 h	
Aspergillus niger gr.	55	5.5	55 °C /6 h	
Malbranchea cinnamomea	70	4.0-6.0	60 °C /8 h	
Aspergillus aculentus (Pectinex Ultra SP-L)	65	4	55 °C /1.5 h	งานวิจัยนี้

4.2.4 การศึกษาสารตั้งต้นที่มีความจำเพาะต่อเอนไซม์แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L

จากการศึกษาความจำเพาะ (specificity) ระหว่างสารตั้งต้น (substrate) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตรกับเอนไซม์แมนนาเนส โดยใช้โลคัสบีนกัมที่มีโครงสร้างของน้ำตาลแมนโนสเชื่อมต่อกันเป็นสายหลัก เป็นสารตั้งต้นมาตรฐานในการทำปฏิกิริยากับคอกเทลเอนไซม์ ให้มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับร้อยละ 100 และทำการเปรียบเทียบความจำเพาะของกากมะพร้าวที่จะใช้เป็น

สารตั้งต้นในการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ ดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่า เอนไซม์แมนนาเนสในคอกเทลเอนไซม์มีความจำเพาะกับกากมะพร้าวประมาณร้อยละ 49 ซึ่งมีความจำเพาะน้อยกว่าโลคัสบีมกัม สาเหตุน่าจะเกิดจากโครงสร้างที่แตกต่างกัน โดยกากมะพร้าวมีลักษณะเป็น Crystalline ในส่วนของเฮมิเซลลูโลสและละลายน้ำได้ไม่ดี ถึงแม้ภายในจะมีส่วนประกอบของน้ำตาลกาแลคโตสที่มีส่วนช่วยให้ละลายน้ำได้ดี แต่มีในอัตราส่วนของน้ำตาลกาแลคโตสต่อน้ำตาลแมนโนส 1 ต่อ 14 แตกต่างจากโลคัสบีนกัมที่มีอัตราส่วนของน้ำตาลกาแลคโตสต่อน้ำตาลแมนโนส 1 ต่อ 4 อาจเป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ไม่ดี [27] โดยในปี 2015 pangsri และคณะ [10] ศึกษาการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส และศึกษาความจำเพาะของสารตั้งต้นกับเอนไซม์แมนนาเนส พบว่าเอนไซม์แมนนาเนสจาก *Bacillus circulans* NT 6.7 มีความจำเพาะกับกากมะพร้าวเพียงร้อยละ 4.81 แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์แมนนาเนสในงานวิจัยนี้มีความจำเพาะต่อกากมะพร้าวที่ดีกว่า จึงมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในการย่อยกากมะพร้าวเพื่อผลิตเป็นสารโอลิโกแซคคาไรด์ต่อไป

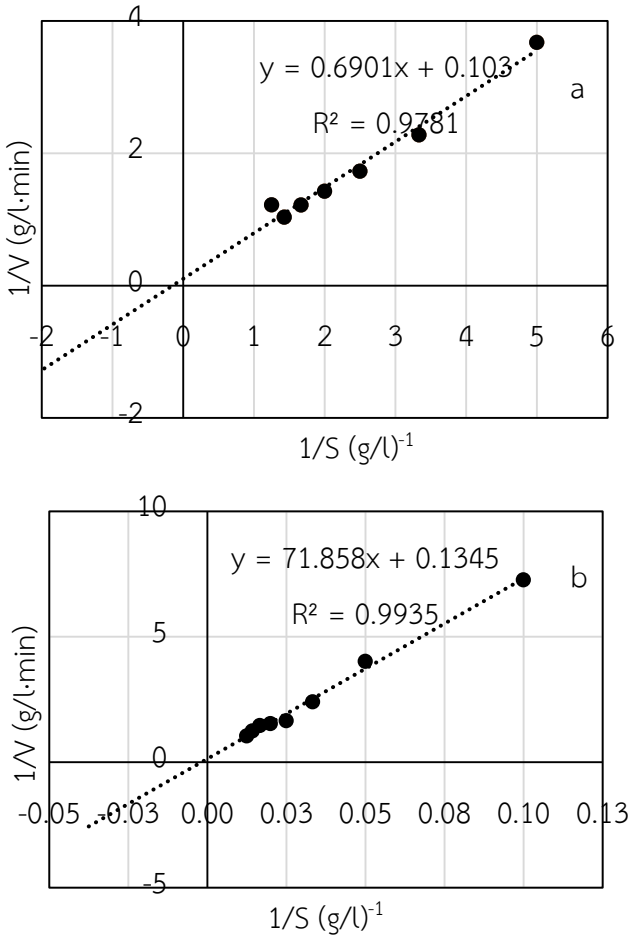
ตารางที่ 8 ความจำเพาะระหว่างสารตั้งต้นกับเอนไซม์แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L ควบคุมความเข้มข้นสารตั้งต้นที่ร้อยละ 1 ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์พีเอช 4 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

สารตั้งต้น	กิจกรรมสัมพัทธ์ (%)
โลคัสบีนกัม	100
กากมะพร้าว	49.35+1.83

4.2.5 จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L

จากการศึกษาพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ (รูปที่ 12) โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลแมนโนสที่เกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 4 โดยใช้โลคัสบีนกัมและกากมะพร้าวเป็นสารตั้งต้น จากการทดลองดังแสดงในรูปที่ 12 พบว่า เมื่อใช้โลคัสบีนกัมเป็นสารตั้งต้นมีค่าอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา (V_{max}) เท่ากับ 9.71 กรัมต่อลิตรต่อนาที และค่าคงที่ Michaelis menten (K_m) เท่ากับ 6.70 กรัมต่อลิตรจากสารตั้งต้นโลคัสบีนกัม ในส่วนสารตั้งต้นที่เป็นกากมะพร้าวมีอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา (V_{max}) เท่ากับ 7.43 กรัมต่อลิตรต่อนาที และค่าคงที่ Michaelis menten (K_m) เท่ากับ 534 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบค่าทางจลนพลศาสตร์ที่ได้เทียบกับเอกสารอ้างอิง ดังแสดงในตารางที่ 9 พบว่า แมนนาเนสจาก Pextinec Ultra SP-L มีค่า K_m ที่สูงกว่าแมนนาเนสจากแหล่งอ้างอิง โดยค่า K_m แสดงถึงความสามารถของเอนไซม์ในการจับ

สารตั้งต้น โดย K_m สูงค่า affinity ต่ำ K_m ต่ำค่า affinity สูง การจับกันของเอนไซม์และสารตั้งต้นต่ำมีผลทำให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดมีปริมาณต่ำไปด้วย



รูปที่ 12 Line weaver Burk Plot ของเอนไซม์แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L เมื่อใช้ (a) โลคัสบีนกัม 0.2–0.8 กรัมต่อลิตร และ (b) กากมะพร้าว ที่ความเข้มข้น 10-80 กรัมต่อลิตรเป็นสารตั้งต้น

ตารางที่ 9 การเปรียบเทียบค่าคงที่ Michaelis Menten (K_m) และ อัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา (V_{max}) ของเอนไซม์แมนนาเนส

จุลินทรีย์/เอนไซม์	สารตั้งต้น	K_m (กรัมต่อลิตร)	v_{max} (กรัมต่อลิตรต่อนาที)	สภาวะที่ใช้		อ้างอิง
				อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	พีเอช	
Aspergillus niger gr	โลคัสบีนกัม	0.11	2.54	55	5.5	[27]
	กัวกัม	0.28	2.02			
	กากมะพร้าว	0.33	1.30			
Pectinex Ultra SP-L	โลคัสบีนกัม	6.70	9.71	55	4	งานวิจัยนี้
	กากมะพร้าว	534	7.43			

4.3 การผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าวโดยใช้แมนนาเนสในคอกเทลเอนไซม์

4.3.1 การศึกษาองค์ประกอบเบื้องต้นของกากมะพร้าว

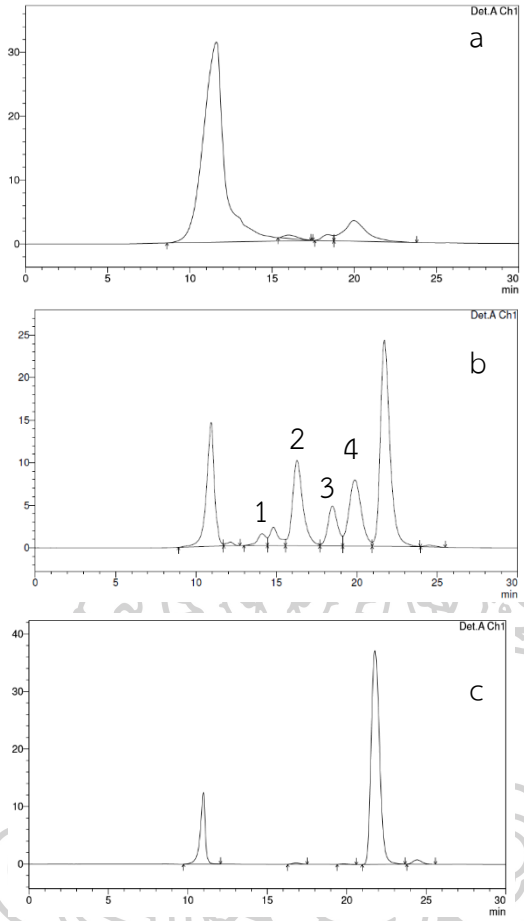
กากมะพร้าวที่นำมาใช้ในการศึกษา เป็นผลิตภัณฑ์ที่เหลือจากกระบวนการผลิตกะทิจากโรงงาน วราฟู้ดแอนดริงค์ จำกัด มีลักษณะขุยหยาบสีขาว ขนาดอนุภาคเฉลี่ย 0.90 มิลลิเมตร ดังแสดงในรูปที่ 13 เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้น ประกอบด้วยความชื้นร้อยละ 52±0.30 โปรตีนร้อยละ 4.17±0.55 ไขมันร้อยละ 10±1.00 และเถ้าร้อยละ 0.85±0.08 เมื่อเปรียบเทียบกับกากมะพร้าวที่ผ่านการทำให้แห้งจากโรงงานผลิตน้ำมันมะพร้าวในประเทศอินโดนิเซีย พบว่าประกอบด้วยความชื้นร้อยละ 13.33±0.13 โปรตีนร้อยละ 20.02±0.54 ไขมันร้อยละ 0.78±0.32 และเถ้าร้อยละ 8.51±0.01 ซึ่งส่วนประกอบที่แตกต่างกันอาจจะมีผลมาจากแหล่งกำเนิดของมะพร้าวและกระบวนการแปรรูปก่อนที่จะผ่านมาเป็นกากมะพร้าว

รูปที่ 13 กากมะพร้าวจากกระบวนการผลิตกะทิจากโรงงานวราฟู้ดแอนดริงค์ จำกัด

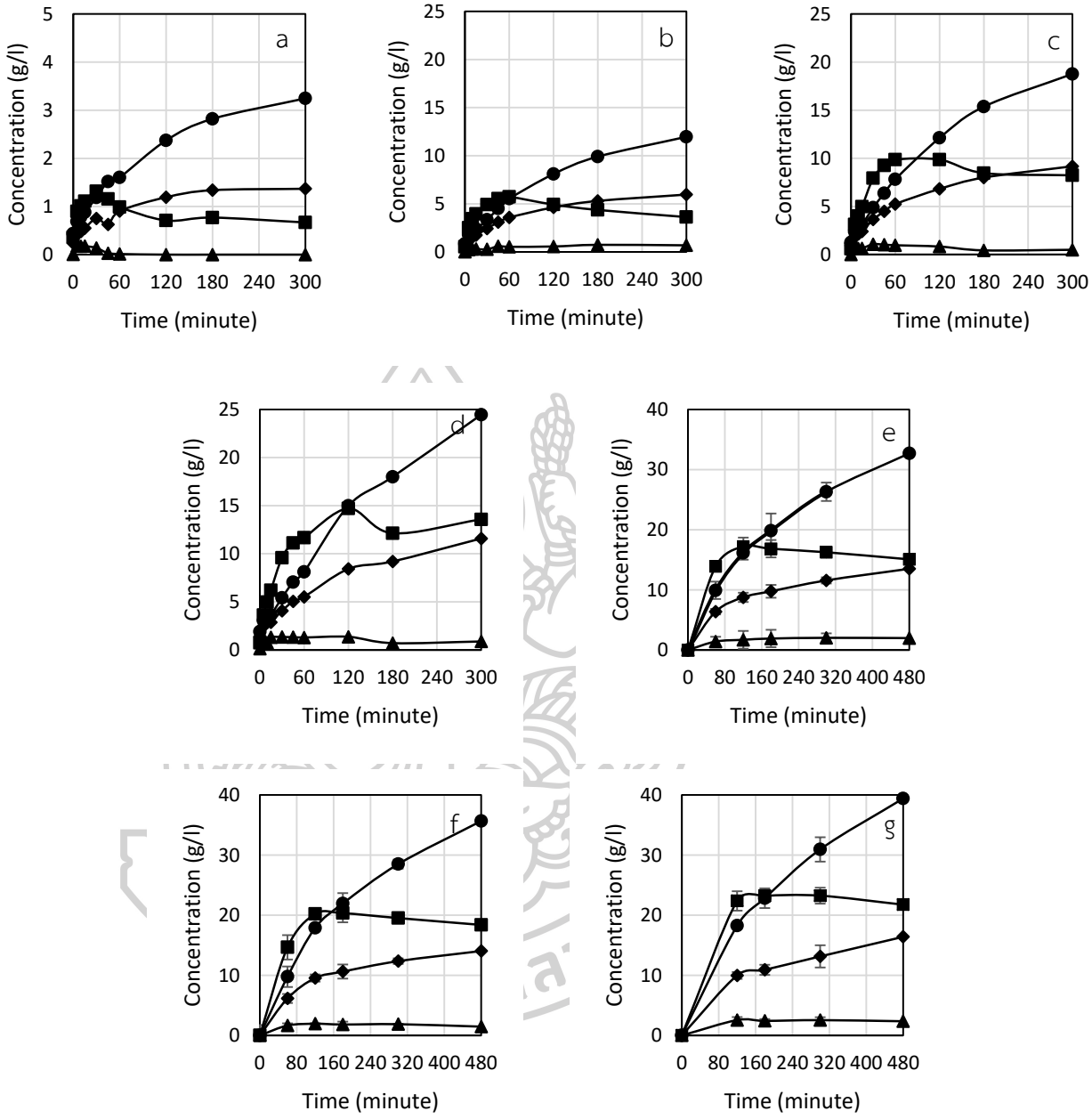
4.3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าว

นำกากมะพร้าวที่เหลือจากกระบวนการผลิตกะทิมาผสมกับสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ พีเอช 4 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เติมเอนไซม์ Pectinex Ultra SP-L โดยควบคุมกิจกรรมของแมนนาเนสเท่ากับ 100 ยูนิต หรือคิดเทียบได้เป็นค่ากิจกรรม 2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในปริมาตร 50 มิลลิลิตร ควบคุมสภาวะการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พบว่า สารละลายที่ผลิตได้มีลักษณะค่อนข้างใส (รูปที่ 14) มีกลิ่นหอมของมะพร้าว เมื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิดที่ได้จากการย่อยกากมะพร้าว พบว่า ประกอบด้วย น้ำตาลแมนโนส กลูโคส และโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ ซึ่งประกอบด้วยแมนโนไบโอส และ แมนโนไตรโอส ดังแสดงในรูปที่ 15 นอกจากนี้ในสารละลายโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ยังประกอบด้วยพีคของน้ำตาลที่เวลาประมาณ 11 และ 22 นาที เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับโครมาโทแกรมของสารละลายเอนไซม์ พบว่า พีคทั้งสองเป็นของเอนไซม์ Pectinex Ultra SP-L ดังแสดงในรูป 15c ซึ่งอาจเป็นส่วนประกอบของสาร preservatives ต่างๆที่ใส่ในเอนไซม์ทางการค้า

รูปที่ 14 สารละลายแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าวความเข้มข้น 250 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 15 HPLC Chromatogram ของ (a) กากมะพร้าวเริ่มต้นก่อนใส่เอนไซม์ (b) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยกากมะพร้าวความเข้มข้น 250 กรัมต่อลิตร โดยเอนไซม์แมนนาเนส 100 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เวลาบ่ม 120 นาที เจือจางตัวอย่าง 10 เท่า (พีคหมายเลข 1 คือ แมนโนไตรโอส พีคหมายเลข 2 คือ แมนโนไบโอส พีคหมายเลข 3 คือ กลูโคสพีคหมายเลข 4 คือ แมนโนส และ (C) เอนไซม์แมนนาเนส 100 ยูนิต



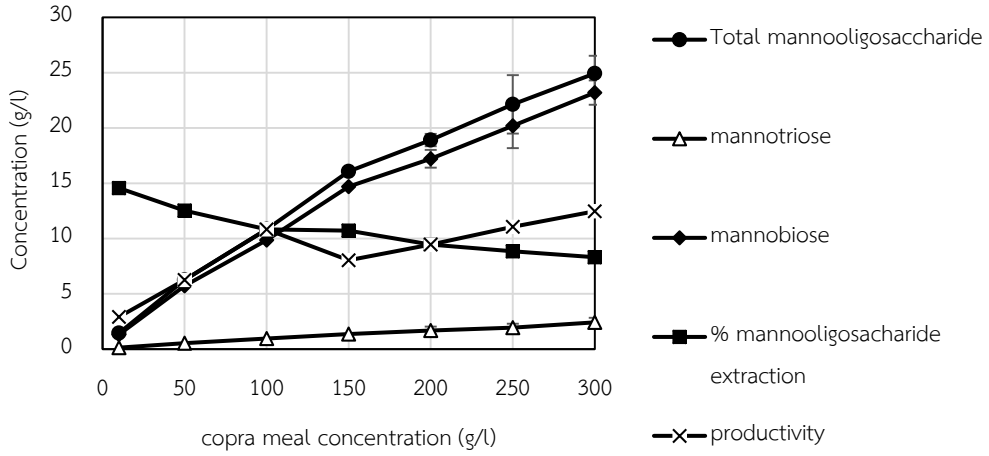
รูปที่ 16 ผลิตภัณฑ์จากการย่อยกากมะพร้าวความเข้มข้น 10 50 100 150 200 250 และ 300 กรัมต่อลิตร โดยใช้แมนนาเนสในคอกเทลเอนไซม์ (Pectinex Ultra SP-L) 100 ยูนิต ในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์ พีเอช 4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (a) ความเข้มข้นกากมะพร้าว 10 กรัมต่อลิตร (b) ความเข้มข้นกากมะพร้าว 50 กรัมต่อลิตร (c) ความเข้มข้นกากมะพร้าว 100 กรัมต่อลิตร (d) ความเข้มข้นกากมะพร้าว 150 กรัมต่อลิตร (e) ความเข้มข้นกากมะพร้าว 200 กรัมต่อลิตร และ (f) ความเข้มข้นกากมะพร้าว 250 กรัมต่อลิตร (g) ความเข้มข้นกากมะพร้าว 300 กรัมต่อลิตร โดยที่สัญลักษณ์ ▲คือแมนโนไตรโอส ■ คือแมนโนไบโอส ◆ คือกลูโคส ●คือแมนโนส

รูปที่ 16 แสดงปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยกากมะพร้าวที่ความเข้มข้นต่างๆกันในแต่ละช่วงเวลา จากรูปจะเห็นได้ว่า ผลิตภัณฑ์ประเภทโอลิโกแซคคาไรด์ทั้งแมนโนไบโอสและแมนโนไตรโอสมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในช่วงแรกของปฏิกิริยาและความเข้มข้นจะเริ่มคงที่ตั้งแต่ช่วงเวลา 60 – 120 นาที ส่วนผลิตภัณฑ์ประเภทโมโนแซคคาไรด์ทั้งน้ำตาลกลูโคสและแมนโนสจะมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นตลอดระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยา 480 นาที ซึ่งสามารถอธิบายได้จากการทำงานของเอนไซม์แมนนาเนส โดยแมนนาเนสจะเข้าตัดพันธะ β-1,4 ของแมนแนนภายในกากมะพร้าวแบบสุ่ม ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเข้าตัดพันธะของแมนนาเนส จะกลายเป็นแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ และโมโนแซคคาไรด์ [4]

เมื่อนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบความเข้มข้นของกากมะพร้าวที่เหมาะสมต่อการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ โดยการพิจารณาทั้งความเข้มข้นของแมนโนไบโอส แมนโนไตรโอส ความเข้มข้นของโอลิโกแซคคาไรด์ทั้งหมดที่ผลิตได้และร้อยละของโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้ ดังแสดงในรูปที่ 17 พบว่า ความเข้มข้นของของแมนโนไบโอส แมนโนไตรโอส และแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ทั้งหมดที่ผลิตได้มีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกากมะพร้าวที่ใช้ ซึ่งมีค่าความเข้มข้นของแมนโนไบโอส 23.2 กรัมต่อลิตร แมนโนไตรโอส 2.4 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์รวมเท่ากับ 24.9 กรัมต่อลิตรที่ความเข้มข้นของกากมะพร้าว 300 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อพิจารณาถึงร้อยละของโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้ พบว่ามีค่าลดลงตามความเข้มข้นของกากมะพร้าว โดยการใช้กากมะพร้าวความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรจะได้ค่าร้อยละการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์สูงที่สุด (ร้อยละ 14.6)

ดังนั้น ในงานทดลองต่อไป ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ความเข้มข้นกากมะพร้าว 250 กรัมต่อลิตรเป็นความเข้มข้นกากมะพร้าวที่ดีที่สุดในการนำมาผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เวลาในการย่อย 120 นาที เนื่องจากผลรวมโอลิโกแซคคาไรด์ (22.1) ที่ได้จากความเข้มข้นกากมะพร้าว 250 กรัมต่อลิตรมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับความเข้มข้นกากมะพร้าว 300 กรัมต่อลิตร

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยกากมะพร้าวเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 10 การผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ของ Pangsri และคณะ [10] ใช้แมนนาเนสบริสุทธิ์ 295 ยูนิต จาก *Bacillus* circulans NT6.7 ผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าวความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส บ่ม 120 นาที ให้ผลผลิตเพียง 5.86 กรัมต่อลิตร (DP3 –DP6) หรืองานวิจัยของ Ariandi และคณะ [11] ที่ใช้แมนนาเนสจาก *Streptomyces* sp. BF3.1 ผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าวความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้เวลาบ่ม 5 ชั่วโมง ได้ผลผลิต 3.83 กรัมต่อลิตร และเป็นผลผลิตที่เกิดจากแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์รวมกับโมโนแซคคาไรด์



รูปที่ 17 สรุปความเข้มข้นแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (DP2-DP3) สูงสุดที่ผลิตได้จากกากมะพร้าวความเข้มข้นแตกต่างกันโดยใช้แมนนาเนสในคอกเทลเอนไซม์ 100 ยูนิต ควบคุมสภาวะในการทำงานที่พีเอช 4 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบผลิตภัณฑ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าวโดยใช้เชื้อแหล่งอื่นๆ

จุลินทรีย์ /เอนไซม์	ความเข้มข้นกากมะพร้าว (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (กรัมต่อลิตร)	อ้างอิง
Bacillus circulans NT6.7	10	5.86	[10, 28]
	150	14.41	
Streptomyces sp. BF3.1	100	3.83	[11]
Pectinex Ultra SP-L	300	24.9	งานวิจัยนี้

4.4 การทำบริสุทธิ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์

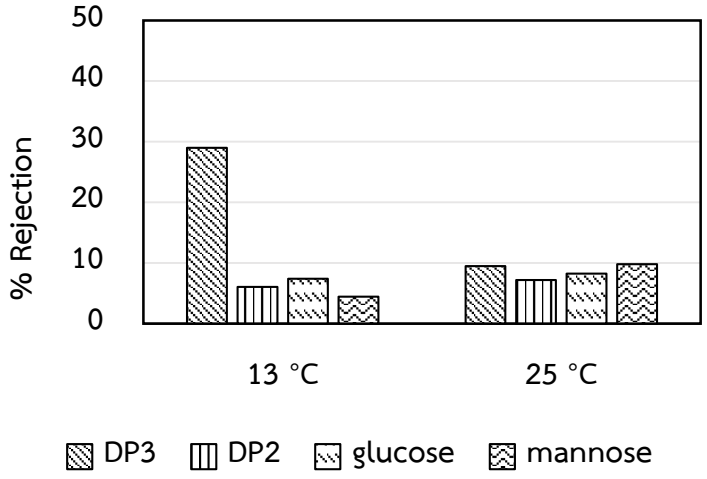
4.4.1 การทำบริสุทธิ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์โดยอัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration)

4.4.1.1 ผลของอุณหภูมิต่อการทำบริสุทธิ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์

การปรับอุณหภูมิของระบบในการทำบริสุทธิ์สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าวโดยวิธีการกรองผ่านเยื่อแผ่น (membrane) ขนาดรูพรุน 1,000 ดอลตัล ในระบบอัลตราฟิลเตรชัน ความดัน 3 บาร์ จากตัวอย่างสารละลายโอลิโกแซคคาไรด์เริ่มต้น 200 มิลลิลิตร ลดปริมาตรในส่วนรีเทนเททลงเหลือ 50 มิลลิลิตร (VCF = 4) พบว่า อุณหภูมิที่แตกต่างกันของระบบมีส่วนส่งผลต่อค่าต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

4.4.1.1.1 การกักกัน

รูปที่ 18 แสดงผลร้อยละการกักกัน (% rejection) ของน้ำตาลแต่ละชนิดเมื่อทำการกรองที่อุณหภูมิห้องหรือ 25±1 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิ 13±1 พบว่าในสภาวะการกรองที่ 25±1 องศาเซลเซียส การกักกันของน้ำตาลแต่ละชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน โดยค่าการกักกันของแมนโนไตรโอส (DP3) มีค่าเท่ากับร้อยละ 9.47 ค่าการกักกันของแมนโนไบโอส (DP2) มีค่าเท่ากับร้อยละ 7.18 ค่าการกักกันของน้ำตาลกลูโคสมีค่าเท่ากับร้อยละ 8.25 และค่าการกักกันของน้ำตาลแมนโนสมีค่าเท่ากับร้อยละ 9.78 แต่เมื่อลดอุณหภูมิให้แก่ระบบเหลือ 13±1 องศาเซลเซียส พบว่าค่าการกักกันของน้ำตาลแต่ละชนิดมีการเปลี่ยนแปลง โดยค่าการกักกันของ DP3 มีค่าเท่ากับร้อยละ 29.0 เพิ่มสูงขึ้นจากเดิมประมาณร้อยละ 20 แต่ในทางกลับกัน พบว่าค่าการกักกันของน้ำตาลที่มี DP ต่ำกว่า DP3 มีค่าต่ำลง โดย DP2 น้ำตาลกลูโคสและแมนโนสมีค่าการกักกันลดลงเหลือ 6.35 7.39 และ 4.44 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า การควบคุมอุณหภูมิของระบบให้มีค่าต่ำลงส่งผลดีต่อการกักกันของผลิตภัณฑ์โอลิโกแซคคาไรด์ รวมถึงการลดการกักกันของโมโนแซคคาไรด์ได้อีกด้วย จากผลข้างต้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pruksasri และคณะ (2015) [29] โดยในงานวิจัยดังกล่าวพบว่าการกรองที่อุณหภูมิสูง (60 องศาเซลเซียส) มีผลทำให้ค่าการกักกันของโอลิโกแซคคาไรด์มีค่าต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการกรองที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ซึ่งผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิกับค่าการกักกันที่มีความสัมพันธ์ในทิศทางตรงกันข้าม โดยการกรองที่อุณหภูมิต่ำมีผลทำให้ขนาดรูพรุนของเยื่อแผ่นมีขนาดเล็กลงจึงทำให้เกิดการกักกันโอลิโกแซคคาไรด์เพิ่มมากขึ้น



รูปที่ 18 ผลของอุณหภูมิในการกรองที่มีต่อร้อยละการกักกันของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาลกลูโคส และแมนโนส เมื่อ VCF = 4 ความดัน 3 บาร์ ความเข้มข้นเริ่มต้นของแมนโนไตรโอส 2.09 กรัมต่อลิตร แมนโนไบโอส 21.1 กรัมต่อลิตร กลูโคส 12.6 กรัมต่อลิตร แมนโนส 23.1 กรัมต่อลิตร

4.4.1.1.2 ค่า selectivity

จากรูปที่ 19 ผล selectivity ระหว่าง แมนโนไตรโอส และ แมนโนไบโอส ต่อน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว พบว่า ที่อุณหภูมิที่ 25±1 องศาเซลเซียส ค่า selectivity ของระบบมีค่าเท่ากับ 1 ซึ่งเกิดจากการแพร่ผ่านของน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดมีค่าเท่ากัน เมื่อนำมาคำนวณหาค่า selectivity จึงมีค่าเท่ากับ 1 ซึ่งตามทฤษฎีแล้ว ถ้าต้องการให้เกิด selectivity ที่สูงระหว่างโอลิโกแซคคาไรด์และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวนั้น น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์จะต้องเกิดการแพร่ผ่านเยื่อแผ่นต่ำและน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ มีการไหลผ่านของเยื่อแผ่นที่สูง ซึ่งการกรองที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียสไม่มีผลทำให้การแพร่ผ่านของน้ำตาลทั้ง 2 แตกต่างกันได้ แต่ในทางกลับกันเมื่อระบบมีอุณหภูมิต่ำลง (13±1 องศาเซลเซียส) ระบบมี selectivity ที่มีแนวโน้มที่ดีขึ้น โดยพบว่า selectivity ของ แมนโนไตรโอสต่อน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมีค่าสูงขึ้น จากเดิมที่มีค่า (แมนโนไตรโอสต่อกลูโคส) 1.01 เพิ่มสูงขึ้นเป็น 1.31 และ selectivity ของแมนโนไตรโอสต่อแมนโนส จากเดิม 0.99 เพิ่มสูงขึ้นเป็น 1.35 จากค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแมนโนไตรโอสเกิดการแพร่ผ่านที่ต่างไปจากเดิม เมื่อมีการลดอุณหภูมิเหลือ 13 องศาเซลเซียส ซึ่ง selectivity มีค่าสูงขึ้นเป็นสัญญาณที่ดีของการทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์

จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถอธิบายได้ด้วยสมการของ Stokes-Einstein

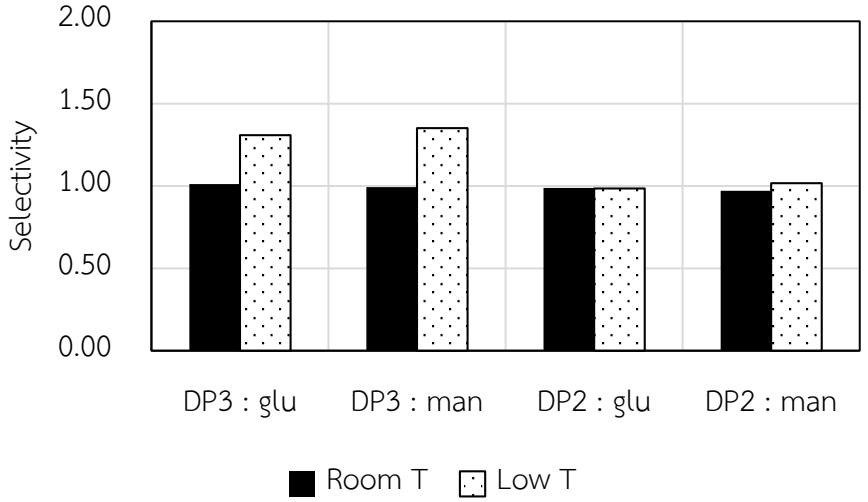
$$D(T) = \frac{k_B T}{6\pi\eta r},$$

ที่อธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่มีต่อการแพร่ จะเห็นได้ว่า การแพร่ของสารจะเกิดได้ดีขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น แต่นอกจากอุณหภูมิจะส่งผลต่อการแพร่แล้ว ค่า r ซึ่งคือขนาดรัศมีของตัวถูกละลายในสารละลายก็ส่งผลเช่นกัน กล่าวคือ เมื่อขนาดรัศมีของตัวถูกละลาย มีค่าสูงขึ้นจะมีผลทำให้ค่าการแพร่มีค่าต่ำลง โดยความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถอธิบายได้กับการทดลอง โดยในการทดลองพบว่า selectivity ของ DP3 ต่อน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมีค่าสูงขึ้น เพราะเนื่องจาก DP3 เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มี radius of solute สูงกว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว จึงทำให้การแพร่ผ่านมีค่าต่ำกว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เมื่อคำนวณ selectivity จึงทำให้เกิด selectivity ที่สูงขึ้น ซึ่งขนาดของน้ำตาลและค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของน้ำตาลแต่ละชนิดแสดงได้ดังตารางที่ 11 โดยน้ำตาลซูโครส และราฟฟิโนสเป็นตัวแทนของแมนโนไบโอสและแมนโนไตรโอส เมื่อพิจารณาขนาดของกลูโคสและแมนโนสจะเห็นได้ว่า ถึงแม้ว่าน้ำตาลทั้งสองชนิดจะมีขนาดมวลโมเลกุลเท่ากัน แต่ขนาดอนุภาคของกลูโคสมีขนาดที่ใหญ่กว่าเล็กน้อย ดังนั้น ในระบบการกรองที่อุณหภูมิต่ำจะมีค่าการกักกันของน้ำตาลกลูโคสมีค่าที่สูงกว่าน้ำตาลแมนโนสซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในข้อ 4.4.1.1.1 ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากทั้งขนาดอนุภาค และขนาดของรูพรุนของเยื่อแผ่นที่มีขนาดที่ลดลงเมื่ออุณหภูมิลดต่ำลง แต่ในการกรองที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะเห็นผลไม่ชัดเจน เนื่องจากการใช้ความดันในการกรองที่

ค่อนข้างต่ำ ส่งผลให้การแยกน้ำตาลแต่ละชนิดจากความแตกต่างของขนาดโมเลกุลเนื่องจากการพา (convection) จะเกิดได้ไม่ดี

ตารางที่ 11 ขนาดรัศมีและสัมประสิทธิ์การแพร่ของน้ำตาลในเยื่อแผ่น

น้ำตาล	น้ำหนักโมเลกุล (กรัมต่อโมล)	ขนาดรัศมี (นาโนเมตร)	สัมประสิทธิ์การแพร่ (10^{-6} cm^2s^{-1})	อ้างอิง
กลูโคส	180	0.316	1.34	[30]
แมนโนส	180	0.311	1.25	
ซูโครส	342	0.471	-	
ราฟฟิโนส	504	0.584	-	

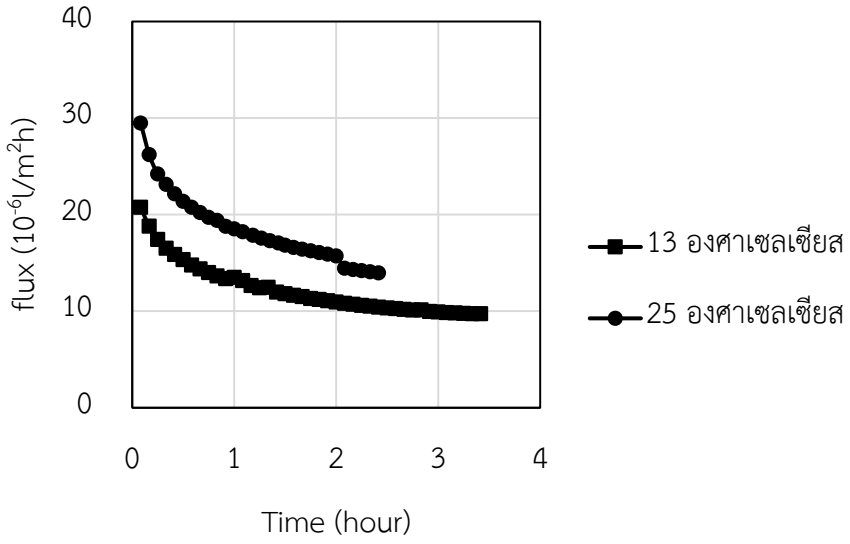


รูปที่ 19 ผลของอุณหภูมิในการกรองสารละลายโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีผลต่อค่า selectivity ของน้ำตาลแต่ละชนิด เมื่อ VCF = 4 ความดัน 3 บาร์ ความเข้มข้นเริ่มต้นของแมนโนไตรโอส 2.09 กรัมต่อลิตร แมนโนไบโอส 21.1 กรัมต่อลิตร กลูโคส 12.6 กรัมต่อลิตร แมนโนส 23.1 กรัมต่อลิตร

4.4.1.1.3 ฟลักซ์

รูปที่ 20 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างฟลักซ์กับเวลาของการควบคุมอุณหภูมิการทำบริสุทธิ์ทั้ง 2 อุณหภูมิ พบว่า ทั้ง 2 อุณหภูมิมีแนวโน้มของความสัมพันธ์ที่คล้ายคลึงกัน คือ ในช่วงแรกของค่าฟลักซ์จะมีค่าสูงแต่เมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้นค่าฟลักซ์จะมีค่าต่ำลง โดยที่อุณหภูมิที่ 25±1 และ 13±1 องศาเซลเซียส มีค่าฟลักซ์เริ่มต้นเท่ากับ 29.5× 10^{-6} และ 20.7 × 10^{-6} ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อระบบมี VCF เท่ากับ 4 ค่าฟลักซ์ลดลงเหลือ 13.9 × 10^{-6} ลิตรต่อตารางเมตรต่อ

ชั่วโมงในอุณหภูมิที่ 25±1 องศาเซลเซียสและ 9.72 × 10^{-6} ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมงที่อุณหภูมิ 13±1 องศาเซลเซียส สำหรับข้อแตกต่างระหว่าง 2 อุณหภูมิคือ ในระบบ 13±1 องศาเซลเซียสจะมีค่าฟลักซ์ที่ต่ำกว่าตั้งแต่เริ่มต้น เนื่องจากอุณหภูมิที่ต่ำกว่าของระบบ จึงทำให้สารสกัดมีความหนืดสูงขึ้นจึงทำให้ค่าฟลักซ์ของระบบมีค่าต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ 25±1 องศาเซลเซียส และต้องใช้เวลานานมากขึ้นเมื่อต้องการทำบริสุทธิ์โดยระบบอัลตราฟิลเตรชันให้มี VCF = 4



รูปที่ 20 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าฟลักซ์ (Flux) และเวลาของการทำบริสุทธิ์สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ที่อุณหภูมิ 13±1 องศาเซลเซียสและ 25±1 องศาเซลเซียส เมื่อกรองโดยใช้เยื่อแผ่นขนาดรูพรุน 1000 ดอลตัน ความดัน 3 บาร์ ความเข้มข้นเริ่มต้นของแมนโนไตรโอส 2.09 กรัมต่อลิตร แมนโนไบโอส 21.1 กรัมต่อลิตร กลูโคส 12.6 กรัมต่อลิตร แมนโนส 23.1 กรัมต่อลิตร

จากตารางที่ 12 แสดงผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้ (Recovery yield) ของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (DP2และ DP3) จากการเปรียบเทียบอุณหภูมิห้องและการลดอุณหภูมิลดลงเหลือ 13±1 องศาเซลเซียส พบว่าการลดของอุณหภูมิลงมีส่วนช่วยทำให้ DP3 มีผลผลิตสูงขึ้นจากเดิมร้อยละ 32 ในอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นร้อยละ 47 โดย DP2 ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆ ในการลดอุณหภูมิ

จากการทดลองปรับอุณหภูมิของระบบให้ต่ำลงเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกักกันในการทำบริสุทธิ์สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้การกรองแบบอัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration) มีผลไปในทิศทางที่ดีขึ้น โดยสรุปได้ว่าการลดอุณหภูมิมีผลให้แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ถูกกักกันได้มากขึ้น

ตารางที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิที่มีต่อค่าร้อยละผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้ และค่าร้อยละการกำจัดโมโนแซคคาไรด์ เมื่อ VCF = 4 ควบคุมความดัน 3 บาร์

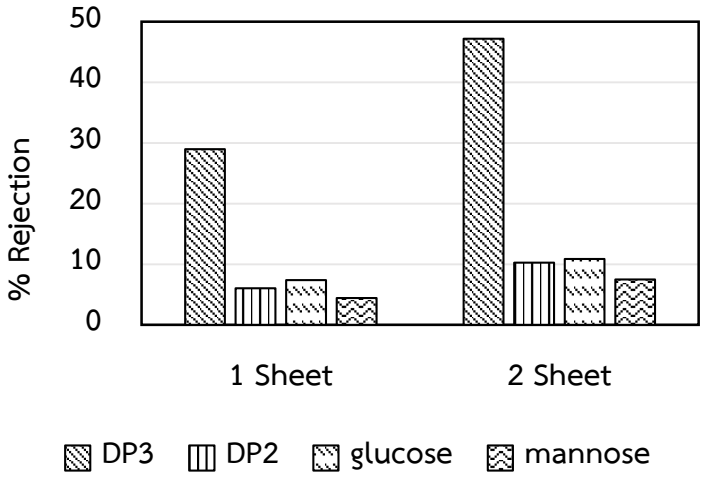
สภาวะ	ร้อยละของผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้		ร้อยละโมโนแซคคาไรด์ที่ถูกกำจัด	
	DP3	DP2	กลูโคส	แมนโนส
13±1℃	47±1	30±1	69±2	72±0
25±1℃	32±3	30±3	69±3	68±0

4.4.1.2 ผลของการเพิ่มจำนวนชั้นเยื่อแผ่นต่อการทำบริสุทธิ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์

การเพิ่มจำนวนชั้นเยื่อแผ่นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการการทำบริสุทธิ์สารสกัดโอลิโก แซคคาไรด์จากกากมะพร้าวโดยวิธีการกรองผ่านเยื่อแผ่น (membrane) ขนาดรุพรุน 1,000 ดอลตัล ในระบบอัลตราฟิลเตรชั่น(Ultrafiltration) ความดัน 3 บาร์ อุณหภูมิ 13±1 องศาเซลเซียส จากตัวอย่างสารสกัดเริ่มต้น 200 มิลลิลิตรลดลงเหลือ 50 มิลลิลิตร (VCF = 4) พบว่า จำนวนชั้นของเยื่อแผ่นมีส่วนส่งผลต่อค่าต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

4.4.1.2.1 การกักกัน

รูปที่ 21 แสดงผลร้อยละการกักกัน (% rejection) ของน้ำตาลแต่ละชนิดเมื่อเปรียบเทียบระบบการกรองที่มีจำนวนชั้นเยื่อแผ่น 1 แผ่น และ 2 แผ่น อุณหภูมิ 13±1 องศาเซลเซียส พบว่าค่าการกักกันของน้ำตาลแต่ละชนิดมีค่าใกล้เคียงกันและมีการเพิ่มขึ้นของการกักกันประมาณร้อยละ 3-4 โดย DP2 มีค่าการกักกันร้อยละ 10.3 กลูโคสมีค่าการกักกันร้อยละ 10.9 และ แมนโนสมีค่าการกักกันร้อยละ 7.5 แต่การกักกันของน้ำตาล DP3 มีการกักกันที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมหลายเท่าตัว โดยเพิ่มขึ้นจากเดิมร้อยละ 28.0 เพิ่มสูงขึ้นเป็นร้อยละ 47.2 จากการควบคุมอุณหภูมิของระบบและการเพิ่มจำนวนชั้นทำให้การกักกันของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ DP3 มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเมื่อเทียบกับจำนวนแผ่น 1 แผ่นที่ 25±1 องศาเซลเซียส มีการกักกันเพิ่มสูงขึ้นเกือบ 6 เท่า ซึ่งถือเป็นข้อดีของระบบ เพราะเมื่อเพิ่มจำนวนแผ่นและลดอุณหภูมิลง น้ำตาลโมโนแซคคาไรด์มีการกักกันเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ส่งผลให้สามารถกำจัดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวออกจากโอลิโกแซคคาไรด์ได้ดีขึ้น จากผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Meredith และคณะ ที่มีการทดลองในการใช้เยื่อแผ่นแบบ stack ในการคัดแยกระหว่าง hemoglobin และอัลบูมิน พบว่าข้อดีของการใช้เยื่อแผ่นแบบ stack ช่วยทำให้ pore size มีขนาดเล็กลง ก่อให้เกิดการกักกันที่ดีขึ้น ถึงแม้จะทำให้ค่าฟลักซ์ต่ำลง [31]



รูปที่ 21 ผลของจำนวนชั้นเยื่อแผ่นในการทำบริสุทธิ์ที่มีผลต่อร้อยละการกักกันของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ โมโนแซคคาไรด์ เมื่อ VCF = 4 ควบคุมความดัน 3 บาร์ อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นแมนโนไตรโอสเริ่มต้น 2.09 กรัมต่อลิตร แมนโนไบโอส 21.1 กรัมต่อลิตร กลูโคส 12.6 กรัมต่อลิตร แมนโนส 23.1 กรัมต่อลิตร

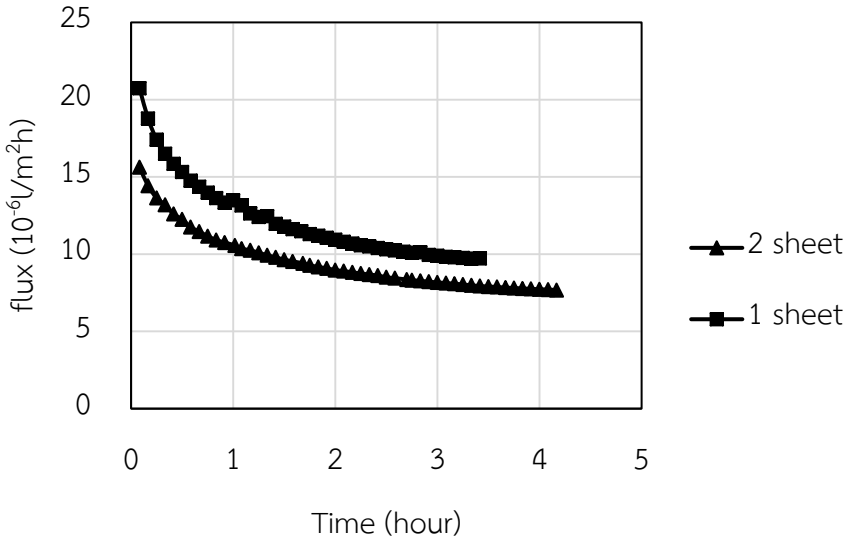
4.4.1.2.2 ค่า selectivity

จากรูปที่ 22 ผล selectivity ระหว่าง แมนโนไตรโอส และ แมนโนไบโอส ต่อน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างการใช้เยื่อแผ่น 1 ชั้นและ 2 ชั้น พบว่าจำนวนชั้นของเยื่อแผ่นไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า selectivity ระหว่างแมนโนไบโอสและน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งค่า selectivity ยังมีค่าเท่ากับ 1 เช่นเดิม แต่ในทางกลับกันการเพิ่มจำนวนชั้นที่เพิ่มมากขึ้น กลับทำให้น้ำตาลแมนโนไตรโอสมีselectivity สูงขึ้นกว่าเดิม เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเยื่อแผ่น 1 แผ่นที่ 25±1 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มจำนวนแผ่นและการลดอุณหภูมิของระบบ

รูปที่ 22 ผลของจำนวนชั้นของเยื่อแผ่นในการทำบริสุทธิ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยกระบวนการเยื่อแผ่นที่มีผลต่อ selectivity เมื่อ VCF = 4 อุณหภูมิ 13±1 องศาเซลเซียส ความดัน 3 บาร์ ความเข้มข้นแมนโนไตรโอสเริ่มต้น 2.09 กรัมต่อลิตร แมนโนไบโอส 21.1 กรัมต่อลิตร กลูโคส 12.6 กรัมต่อลิตร แมนโนส 23.1 กรัมต่อลิตร

4.4.1.2.3 ฟลักซ์

รูปที่ 23 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างฟลักซ์กับเวลาของการเพิ่มจำนวนชั้นเยื่อแผ่นในการทำบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 13±1 องศาเซลเซียส พบว่า ในช่วงแรกของค่าฟลักซ์จะมีค่าสูงแต่เมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้นค่าฟลักซ์จะมีค่าต่ำลง โดยการเพิ่มจำนวนชั้นเป็น 2 ชั้นนั้น มีค่าฟลักซ์เริ่มต้นเท่ากับ 15.7×10^{-6} ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง และเมื่อระบบมี VCF เท่ากับ 4 ค่าฟลักซ์ลดลงเหลือ 7.67×10^{-6} ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบค่าฟลักซ์ที่มีจำนวนชั้นของเยื่อแผ่น 1 แผ่นและ 2 แผ่น ค่าฟลักซ์ของจำนวนชั้นที่มีมากกว่ามีค่าต่ำกว่าตั้งแต่เริ่มต้นของระบบ เนื่องจากรูพรุนบางส่วนจะถูกทับซ้อนด้วยเยื่อแผ่นส่วนที่ไม่ได้เป็นรูพรุน ของการวางซ้อนกันของเยื่อแผ่น 2 ชั้น จึงทำให้สารละลายไหลผ่านได้ต่ำลงทำให้ค่าฟลักซ์ของระบบมีค่าต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ 1 ชั้นมีผลทำให้ใช้เวลานานมากขึ้นเมื่อต้องการทำบริสุทธิ์โดยระบบอัลตราฟิลเตรชันให้มี VCF = 4



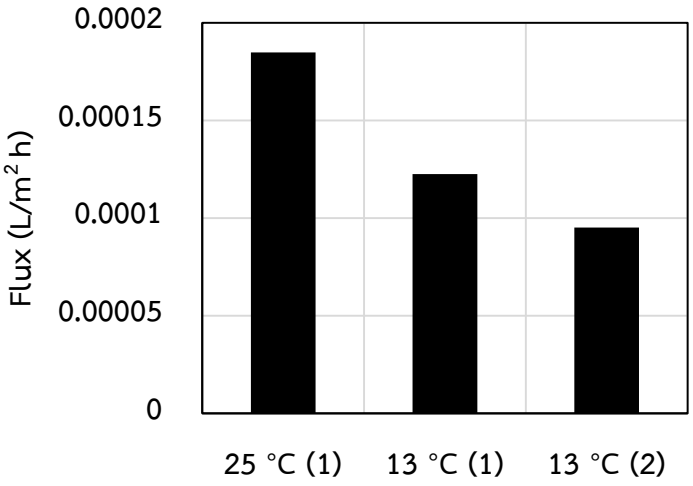
รูปที่ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าฟลักซ์ (Flux) และเวลาของการทำบริสุทธิ์แมนโนโอลิโกแซคาไรด์ที่จำนวนชั้นของเยื่อแผ่น 1 ชั้นและ 2 ชั้นที่อุณหภูมิ 13±1 องศาเซลเซียสเมื่อกรองโดยใช้เยื่อแผ่นขนาดรูพรุน 1000 ดอลตัน ความดัน 3 บาร์ ความเข้มข้นแมนโนไตรโอสเริ่มต้น 2.09 กรัมต่อลิตร แมนโนไบโอส 21.1 กรัมต่อลิตร กลูโคส 12.6 กรัมต่อลิตร แมนโนส 23.1 กรัมต่อลิตร

จากตารางที่ 13 ผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้ (Recovery yield) ของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ (DP2 และ DP3) จากการเปรียบเทียบระหว่างจำนวนชั้นเยื่อแผ่นที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส พบว่าการเพิ่มจำนวนชั้นของเยื่อแผ่นมีส่วนช่วยทำให้ DP3 มีผลผลิตสูงขึ้นจากเดิมจาก 47 เป็น 60 โดย DP2 เกิดการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางที่ดีขึ้นเพียงเล็กน้อยจากเดิม 30 เป็น 33

ตารางที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนชั้นของเยื่อแผ่นที่มีผลต่อค่าร้อยละผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้และค่าร้อยละของโมโนแซคคาไรด์ที่ถูกกำจัดเมื่อ VCF = 4 ควบคุมความดัน 3 บาร์ อุณหภูมิ 13±1 องศาเซลเซียส

สภาวะ	ร้อยละของผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้		ร้อยละของโมโนแซคคาไรด์ที่ถูกกำจัด	
	DP3	DP2	กลูโคส	แมนโนส
1 แผ่น	47±10	30±1	69±2	72±0
2 แผ่น	60±7	33±1	67±1	69±0

จากรูปที่ 24 ค่าฟลักซ์ที่เกิดจากการศึกษาการทำบริสุทธิ์สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยการควบคุม อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียสและเพิ่มจำนวนชั้นของเยื่อแผ่น ที่ความดัน 3 บาร์ พบว่าการลดอุณหภูมิมีผลทำให้ค่าฟลักซ์มีค่าต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิห้อง จากเดิม 18.49×10^{-6} เป็น 12.26×10^{-6} ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมงและเมื่อเพิ่มจำนวนชั้นเยื่อแผ่นเพื่อประสิทธิภาพการกักกันของโอลิโกแซคคาไรด์ให้สูงขึ้น ค่าฟลักซ์มีค่าลดลงเป็น 9.52×10^{-6} ลิตรต่อตารางเมตรต่อชั่วโมงลดลงเป็นครึ่งหนึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการกรองโอลิโกแซคคาไรด์ที่อุณหภูมิห้อง จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มจำนวนชั้นของเยื่อแผ่นและการลดอุณหภูมิให้แก่ระบบในระหว่างการกรองมีผลทำให้ค่าฟลักซ์มีค่าต่ำลง



รูปที่ 24 ฟลักซ์การทำบริสุทธิ์ของสารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยการควบคุมอุณหภูมิ 13 และ 25 องศาเซลเซียสและเพิ่มจำนวนชั้นของเยื่อแผ่นที่ความดัน 3 บาร์

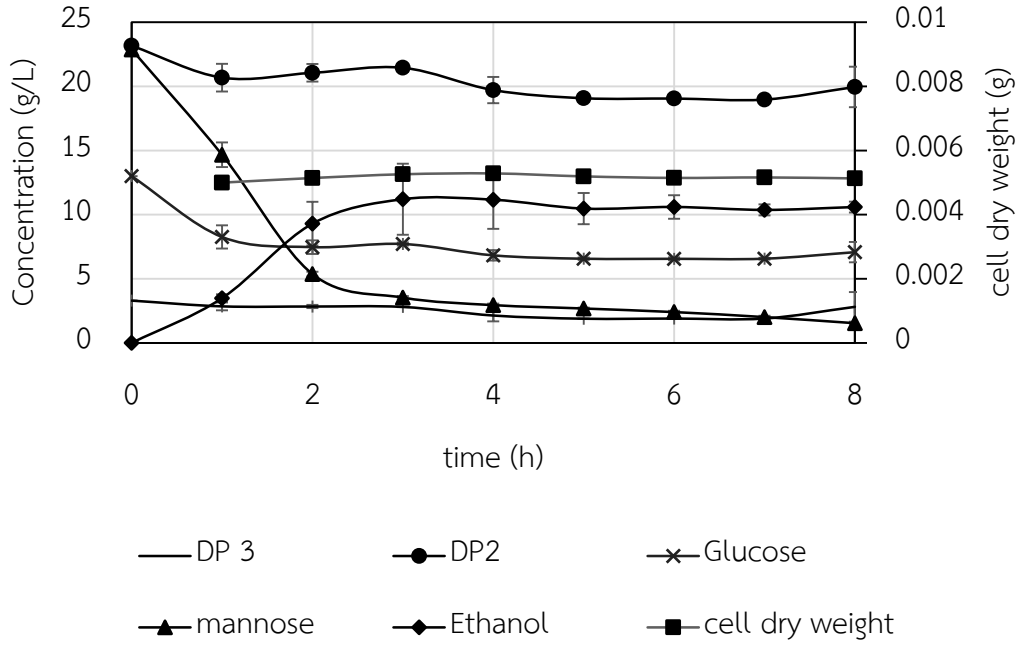
จากการเพิ่มจำนวนชั้นให้แก่ระบบเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการกักกันในการทำบริสุทธิ์สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้การกรองแบบอัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration) มีผลไปในทิศทางที่ดีขึ้น โดยสรุปได้ว่าการเพิ่มจำนวนชั้นมีผลให้แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์มีค่าการแพร่ผ่านต่ำลง เกิดการกักเก็บแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์และผลผลิตที่เพิ่มสูงขึ้น

จากการทำบริสุทธิ์สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์เพื่อเพิ่มความบริสุทธิ์ให้แก่สารสกัด พบว่าเมื่อลดอุณหภูมิให้แก่ระบบและเพิ่มจำนวนชั้นเยื่อแผ่นเพิ่มเป็น 2 แผ่น ความบริสุทธิ์ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงจากเริ่มต้น คงที่ในความบริสุทธิ์ร้อยละ 38.9 เท่ากับเริ่มต้น โดยผลการทำบริสุทธิ์จากงานวิจัยนี้คล้ายคลึงกับการใช้ daifiltration เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำบริสุทธิ์ โดย Maria และคณะ (2015) ทำบริสุทธิ์ฟลุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ที่มีความบริสุทธิ์เริ่มต้น ร้อยละ 19.38 เมื่อทำ diafiltration แล้ว บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 19.75 ในระบบอัลตราฟิลเตรชัน [23] ซึ่งบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเพียงทศนิยมตำแหน่งหลังเท่านั้น นอกจากนี้ยังยืนยันได้ว่าการทำบริสุทธิ์ด้วยการเพิ่มเยื่อแผ่นและลด

อุณหภูมิเพื่อช่วยการกักเก็บของโอลิโกแซคคาไรด์ดีกว่าวิธีการเพิ่มความดันให้สูง (ช่วงความดัน Ultrafiltation) โดย Debora และคณะ (2007) ได้ทำบริสุทธิ์ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์โดยการเปรียบเทียบความดัน พบว่าการเพิ่มความดันทำให้โมเลกุลที่มีน้ำหนักในช่วงโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดเล็กหายไปอยู่ในส่วนเพอมิเอททั้งหมด [18]

4.4.2 การทำบริสุทธิ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์โดยการใช้ยีสต์

รูปที่ 25 แสดงผลที่เกิดจากการทำบริสุทธิ์สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์โดย S. *cerevisiae* ร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ด้วยความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 62.34 กรัมต่อลิตร ประกอบไปด้วยแมนโนไตรโอส 3.30 กรัมต่อลิตร แมนโนไบโอส 23.17 กรัมต่อลิตร กลูโคส 13.00 กรัมต่อลิตรและแมนโนส 22.88 กรัมต่อลิตร จากการทำบริสุทธิ์โดยวิธีดังกล่าวพบว่า น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ประเภทแมนโนสลดลงมากกว่าครึ่งหนึ่งจากเริ่มต้นโดยลดลงอย่างรวดเร็วและคงที่ในชั่วโมงที่ 4 เมื่อครบ 8 ชั่วโมงในการบ่มเหลือน้ำตาลแมนโนส 1.54 กรัมต่อลิตร กลูโคสเหลือ 7.07 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ผลิตภัณฑ์แมนโนไตรโอสและแมนโนไบโอสมีปริมาณลดลงเล็กน้อย โดยน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดมีความเข้มข้น 2.81 และ 19.95 กรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยระบบมีผลผลิตจากยีสต์เป็นเอทานอล 10.59 กรัมต่อลิตรหลังจากบ่มนาน 8 ชั่วโมง และเมื่อนำผลที่ได้มาคำนวณพบว่า วิธีดังกล่าวสามารถกำจัดน้ำตาลกลูโคสและแมนโนสได้ถึงร้อยละ 46 และ 93 ตามลำดับ และมีมีความบริสุทธิ์ของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ร้อยละ 66 (ตารางที่ 15) โดยงานวิจัยคล้ายกับในงานวิจัยของ 2009 Oswaldo และคณะ [20] ได้ใช้ยีสต์ในการทำบริสุทธิ์กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์เพื่อกำจัดน้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตส จากการทดลองพบว่ายีสต์สามารถกำจัดน้ำตาลดังกล่าวได้หมดภายใน 10 ชั่วโมง และในผลการทดลองข้างต้นยังพบว่าน้ำตาลแมนโนสมีอัตราการลดลงที่มากกว่าน้ำตาลกลูโคส มีความคล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Satoshi และคณะ [32] ที่ทำการทดลองการผลิตเอทานอลโดยใช้ *F. velutipes* เปรียบเทียบน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์หลายชนิด โดยหนึ่งในนั้นพบว่าการใช้น้ำตาลของ *F. velutipes* มีอัตราการใช้น้ำตาลแมนโนสเร็วกว่าน้ำตาลกลูโคส



รูปที่ 25 การทำบริสุทธิ์สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์โดยร้อยละ 1 *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ด้วยความเข้มข้นเริ่มต้น 56 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ความเข้มข้นเริ่มต้นแมนโนไตรโอสเริ่มต้น 3.30 กรัมต่อลิตร แมนโนไบโอส 23.17 กรัมต่อลิตร กลูโคส 13.00 กรัมต่อลิตร แมนโนส 22.88 กรัมต่อลิตร

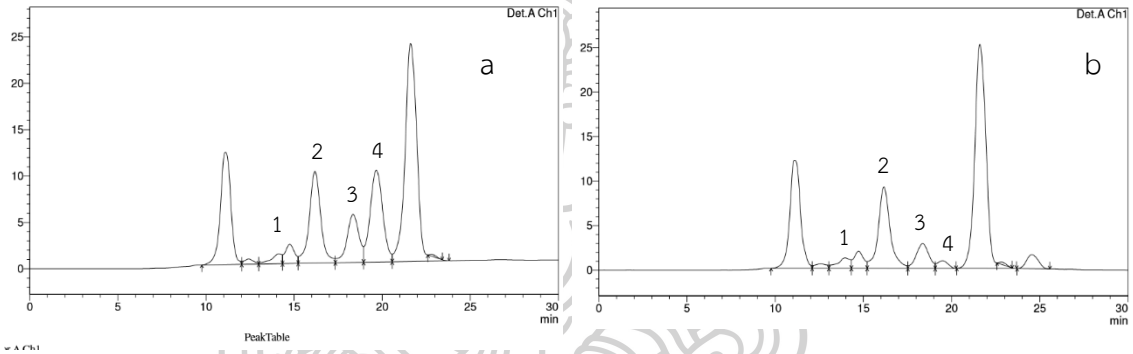
จากข้อมูลตารางที่ 15 ผลเปรียบเทียบการทำบริสุทธิ์สารละลายโอลิโกแซคคาไรด์ใน 2 วิธี ระหว่างการใช้เยื่อแผ่นขนาด 1000 ดอลตัน 2 ชั้น ควบคุมอุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส กับ การใช้ยีสต์ พบว่าการใช้ยีสต์มีประสิทธิภาพในการกำจัดโมโนแซคคาไรด์ได้ดีกว่าการใช้เยื่อแผ่น โดยการใช้ยีสต์สามารถทำให้สารบริสุทธิ์สูงขึ้นเป็นร้อยละ 65.6 มากกว่าการใช้เยื่อแผ่นที่ไม่สามารถทำให้สารบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นได้ จากความบริสุทธิ์เริ่มต้นร้อยละ 38.9 และข้อมูลจากตารางดังกล่าวยังแสดงให้เห็นว่าการใช้ยีสต์มีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้เยื่อแผ่น ในเรื่องของการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 14 ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาในการใช้ยีสต์ทำบริสุทธิ์ที่มีผลต่อค่าร้อยละของผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้ และร้อยละของโมโนแซคคาไรด์ที่ถูกกำจัด

เวลา (ชั่วโมง)	ร้อยละของผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้		ร้อยละของโมโนแซคคาไรด์ที่ถูกกำจัด	
	DP3	DP2	กลูโคส	แมนโนส
4	64.8±14	85.1±4.42	47.5±3.14	87.1±0.51
8	65.7±12	86.1±6.80	45.6±6.08	93.3±0.21

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบผลจากวิธีการทำบริสุทธิ์โดยการใช้เทคโนโลยีเยื่อแผ่น และ ยีสต์

วิธีการทำบริสุทธิ์	ความบริสุทธิ์ (%)	ร้อยละของผลผลิตที่เก็บเกี่ยวได้		อัตราการลดลงของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (กรัมต่อชั่วโมง)	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	
		DP3	DP2		DP3	DP2
เยื่อแผ่น	38.9±1.55	60±7	33±1	1.27±0.1	1.83±0.26	20.7±0.09
ยีสต์	65.6±0.99	65.7±12	86.1±6.80	0.17±0.01	2.81±1.16	19.9±1.58



รูปที่ 26 HPLC Chromatogram ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ (a) แบบเยื่อแผ่น (b) ยีสต์ พีคหมายเลข 1 คือ แมนโนไตรโอส พีคหมายเลข 2 คือ แมนโนไบโอส พีคหมายเลข 3 คือ กลูโคส พีคหมายเลข 4 คือ แมนโนส

4.5 การคำนวณต้นทุนการผลิต

วัตถุดิบในการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ ประกอบด้วย บัฟเฟอร์ เอนไซม์และกากมะพร้าวของเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรม โดยราคาต้นทุนต่อ 1 ลิตรอยู่ที่ 611 บาท ดังแสดงในตารางที่ 16 โดยต้นทุนหลักอยู่ที่เอนไซม์ ที่มีราคาถึง 610 บาท

ผลิตภัณฑ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากงานวิจัยเมื่อยังไม่ได้ทำบริสุทธิ์จะมีส่วนประกอบของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ร้อยละ 38.9 มีความบริสุทธิ์สูงกว่าแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้า ยี่ห้อ BIO-MOS ซึ่งผลิตสำหรับใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์ มีส่วนประกอบของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์เพียงร้อยละ 17 และเมื่อเปรียบเทียบราคาระหว่างทางการค้าและในงานวิจัยพบว่า ราคาขายของผลิตภัณฑ์ทางการค้ามีราคาจำหน่ายอยู่ที่กิโลกรัมละ 12 ดอลลาร์หรือ 360 บาท [17] ซึ่งต่ำกว่าแมน

โนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้เกือบ 2 เท่าแต่ทางการค้ามีส่วนประกอบของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์น้อยกว่า 2 เท่า

ตารางที่ 16 ต้นทุนการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ปริมาตร 1 ลิตร จากกากมะพร้าวโดยใช้ Pectinex Ultra SP-L ที่มีกิจกรรมแมนนาเนส 100 ยูนิต

วัตถุดิบ	ปริมาณ	ราคา*
กากมะพร้าว	250 กรัม	-
บัฟเฟอร์	881.24 มิลลิลิตร	
- กรดซิตริก	6.06 กรัม	0.48 บาท
- โซเดียมซิเตรต	4.47 กรัม	0.30 บาท
Pectinex Ultra SP-L	118.76 มิลลิลิตร	609.97 บาท
		610.75บาท

* กรดซิตริกราคากิโลกรัมละ 79 บาท โซเดียมซิเตรตกิโลกรัมละ 66 บาท ราคาจากบริษัทเคมีภัณฑ์ Pectinex Ultra Sp-L 1 ลิตรราคา 5136 บาท ราคาจากบริษัทเบรนเทค

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

Pectinex Ultra SP-L เป็นคอกเทลเอนไซม์ที่มีกิจกรรมแมนนาเนส โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมและการนำไปใช้ คือ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสในสารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์พีเอช 4 มีกิจกรรมเท่ากับ 842 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อนำเอนไซม์ในสภาวะดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ในการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ พบว่าสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้จากความเข้มข้นกากมะพร้าว 250 กรัมต่อลิตรที่เวลา 2 ชั่วโมง เกิดประโยชน์สูงสุด ได้ผลิตภัณฑ์โอลิโกแซคคาไรด์ความเข้มข้น 22.13 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วยแมนโนไตรโอส 1.94 กรัมต่อลิตร และแมนโนไบโอส 20.19 กรัมต่อลิตร โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเกิดขึ้น จึงต้องมีกำจัดทิ้งโดยการเปรียบเทียบระหว่างเยื่อแผ่นและยีสต์ จากการเปรียบเทียบพบว่าการใช้ยีสต์มีประสิทธิภาพที่ดีกว่า สามารถทำให้สารบริสุทธิ์เพิ่มสูงขึ้นเป็น 65.6 มากกว่าการใช้เยื่อแผ่นที่ไม่สามารถทำให้สารบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นได้ จากความบริสุทธิ์เริ่มต้นร้อยละ 38.9

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ข้อเสนอแนะ

1. การตรึงเอนไซม์เพื่อใช้ในการผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นหนึ่งในแนวทางที่น่าสนใจในการเพิ่มผลผลิตแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์
2. การทำบริสุทธิ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยวิธีนาโนฟิลเตรชันน่าจะได้ผลดีมากขึ้น
3. ผลิตภัณฑ์แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ด้วยการใช้ยีสต์ ถ้ามีขั้นตอนการกำจัด by product น่าจะช่วยให้ผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์มากขึ้น
4. นำไปประยุกต์ใช้ในเครื่องดื่มหรือผลิตภัณฑ์อื่นๆ เพื่อแสดงถึงประโยชน์ของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าว

ภาคผนวก ก

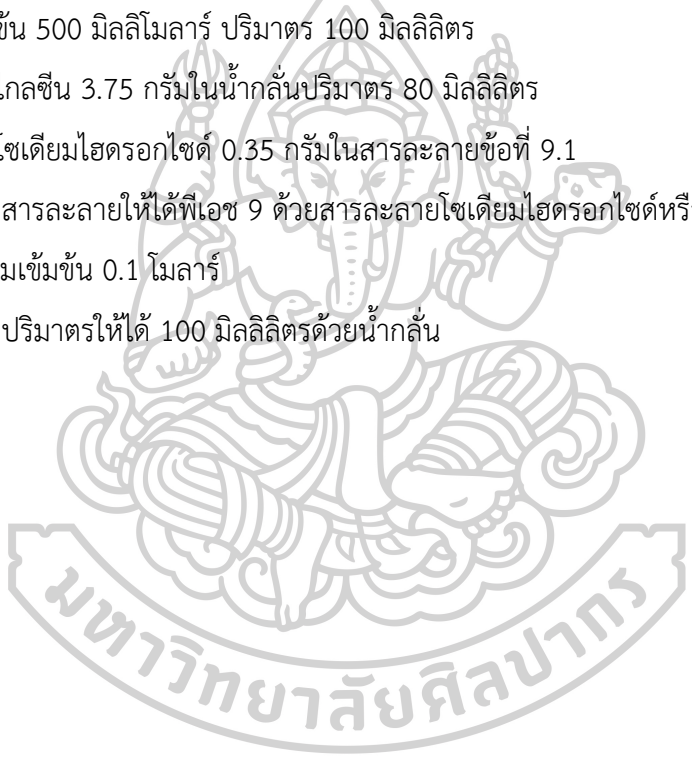
ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ YP
   1.1. ละลายยีสต์ (Yeast extract) 10 กรัมในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร
   1.2. เติมเปปโทน (Peptone) 20 กรัมและน้ำตาลกลูโคส 20 กรัม
   1.3. ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร
   1.4. นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
2. DNS reagent
   2.1. ละลาย 3,5 Dinitrosalicsylic acid 10 กรัมในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร
   2.2. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ 200 มิลลิลิตร และเติม Potassium sodium tartrate 30 กรัมในสารละลายข้อที่ 2.1
   2.3. ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น
3. สารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์พีเอช 3 (Citrate Buffer pH3) ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
   3.1. เติมกรดซิตริก 9.77 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร
   3.2. เติมโซเดียมซิเตรต 1.03 กรัมในสารละลายข้อที่ 3.1
   3.3. ปรับสารละลายให้ได้พีเอช 3 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
   3.4. ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น
4. สารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์พีเอช 4 (Citrate Buffer pH4) ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
   4.1. เติมกรดซิตริก 6.88 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร
   4.2. เติมโซเดียมซิเตรต 5.07 กรัมในสารละลายข้อที่ 4.1
   4.3. ปรับสารละลายให้ได้พีเอช 4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
   4.4. ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

5. สารละลายซิเตรตบัฟเฟอร์พีเอช 5 (Citrate Buffer pH5) ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
   5.1. เติมกรดซิตริก 4.31 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร
   5.2. เติมโซเดียมซิเตรต 8.68 กรัมในสารละลายข้อที่ 5.1
   5.3. ปรับสารละลายให้ได้พีเอช 5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
   5.4. ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น
6. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 6 (Phosphate Buffer pH6) ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
   6.1. เติมไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.1 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร
   6.2. เติมโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 10.26 กรัมในสารละลายข้อที่ 6.1
   6.3. ปรับสารละลายให้ได้พีเอช 6 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
   6.4. ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น
7. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 (Phosphate Buffer pH7) ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
   7.1. เติมไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 5.43 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร
   7.2. เติมโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 4.56 กรัมในสารละลายข้อที่ 7.1
   7.3. ปรับสารละลายให้ได้พีเอช 7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
   7.4. ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น
8. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 8 (Phosphate Buffer pH8) ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
   8.1. เติมไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 8.43 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร
   8.2. เติมโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.62 กรัมในสารละลายข้อที่ 8.1
   8.3. ปรับสารละลายให้ได้พีเอช 8 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
   8.4. ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

9. สารละลายไกลซีนโซเดียมไฮดรอกไซด์พีเอช 9 (Glycine-NaOH Buffer pH9)
   ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
   9.1. เติมไกลซีน 3.75 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร
   9.2. เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.35 กรัมในสารละลายข้อที่ 9.1
   9.3. ปรับสารละลายให้ได้พีเอช 9 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
   9.4. ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น
10. สารละลายไกลซีนโซเดียมไฮดรอกไซด์พีเอช 9 (Glycine-NaOH Buffer pH9)
   ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
   10.1 เติมไกลซีน 3.75 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร
   10.2 เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.35 กรัมในสารละลายข้อที่ 9.1
   10.3 ปรับสารละลายให้ได้พีเอช 9 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
   10.4 ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น



ภาคผนวก ข

ภาคผนวก ข

การคำนวณ กราฟมาตรฐานและ HPLC Chromatogram

การคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์

กิจกรรมแมนนาเนส (ยูนิต) =

$$\frac{\text{ความเข้มข้นแมนโนส (กรัมต่อลิตร)} \times \text{dilution enzyme} \times \text{ปริมาตรในการทำปฏิกิริยา (ลิตร)}}{\text{มวลโมเลกุล} \times \text{เวลา (นาที)}}$$

1. นำความเข้มเข้มข้นแมนโนสที่ได้จากการเทียบกราฟมาตรฐานน้ำตาลแมนโนสด้วยวิธี DNS คูณ dilution ของเอนไซม์
2. คูณด้วยปริมาตรในการทำปฏิกิริยาผลลัพธ์จะได้เป็นหน่วยกรัม
3. เปลี่ยนหน่วยกรัมให้เป็นโมล โดยการหารมวลโมเลกุล (180)
4. เปลี่ยนหน่วยจากโมลเป็นไมโครโมล หารด้วยเวลาเป็นนาที

โดยกำหนดให้ 1 ยูนิตของเอนไซม์เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสารตั้งต้นแล้วได้ผลิตภัณฑ์คือ น้ำตาลแมนโนส 1 ไมโครโมลต่อนาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

<u>ตัวอย่าง</u>

ความเข้มข้นแมนโนส 1 กรัมต่อลิตร dilution enzyme 1000 เท่า

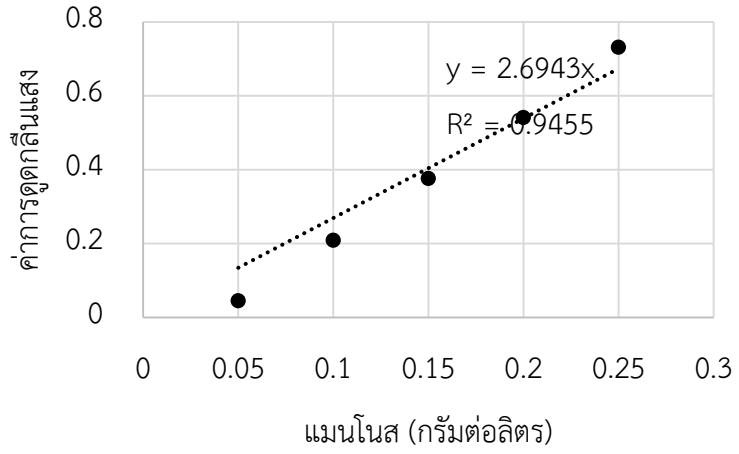
ปริมาตรในการทำปฏิกิริยา 0.001 ลิตร เวลาในการทำปฏิกิริยา 5 นาที

1. 1 g/l × 1000 = 1000 g/l
2. 1000 g/l × 0.001l = 1 g
3. 1÷180 = 0.0056 mol
4. (0.0056 × 10^6 µmol)/5 = 1120 unit

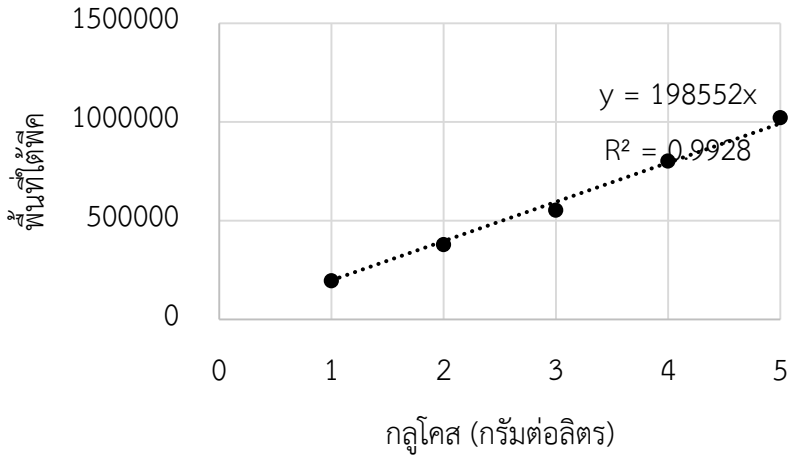
การคำนวณหาอนุภาคเฉลี่ย

1. น้ำหนักตัวอย่างที่ผ่านการร่อนในแต่ละถาดหารด้วยน้ำหนักตัวอย่างจะได้เท่ากับค่า x_i
2. x_i ที่ได้หารด้วยเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (D_{pi}) ของตะแกรงร่อน (=D_{pi}/ x_i)
3. 1 หารด้วยค่าที่ได้จากข้อ 2 จะได้ค่าอนุภาคเฉลี่ย (=1/ (D_{pi}/ x_i))

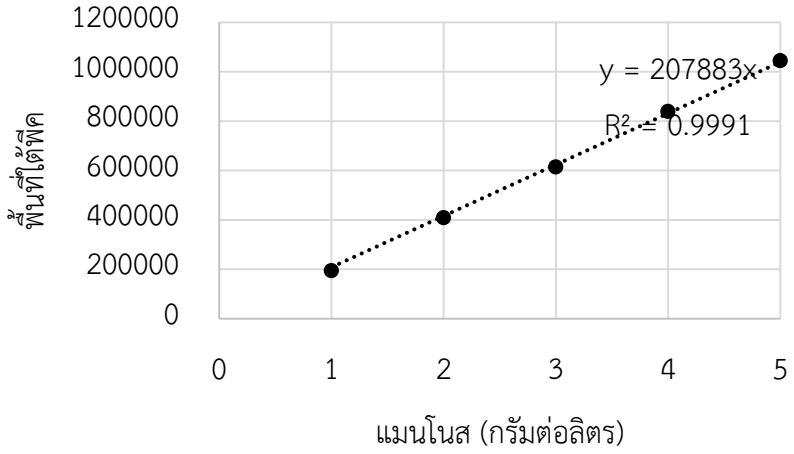
กราฟมาตรฐาน



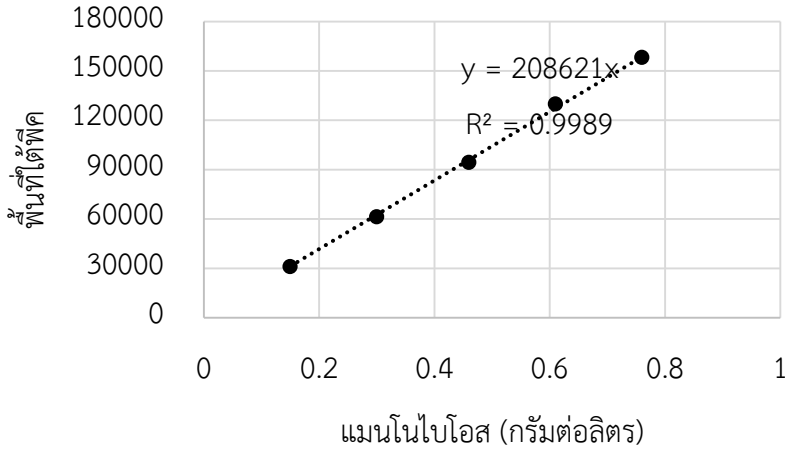
รูปที่ 27 กราฟมาตรฐานน้ำตาลแมนโนสวิเคราะห์ด้วยวิธี DNS



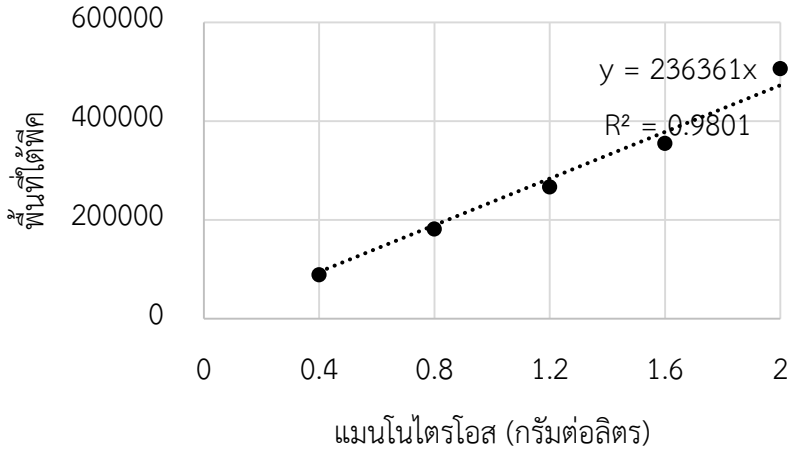
รูปที่ 28 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสวิเคราะห์โดยวิธี HPLC



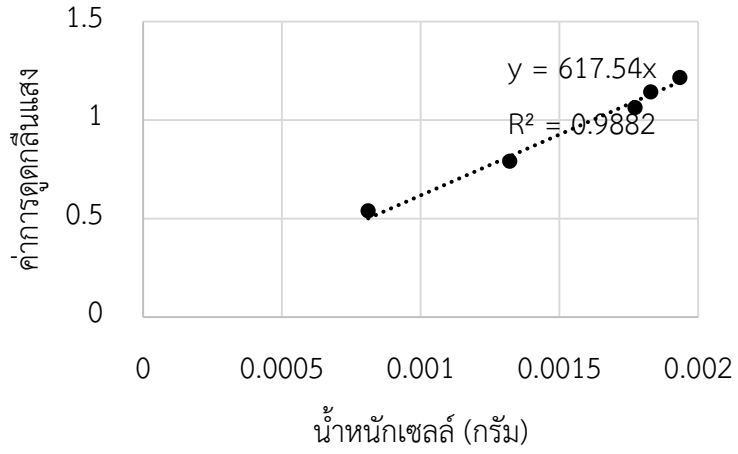
รูปที่ 29 กราฟมาตรฐานน้ำตาลแมนโนสวิเคราะห์โดยวิธี HPLC



รูปที่ 30 กราฟมาตรฐานน้ำตาลแมนโนไบโอสวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

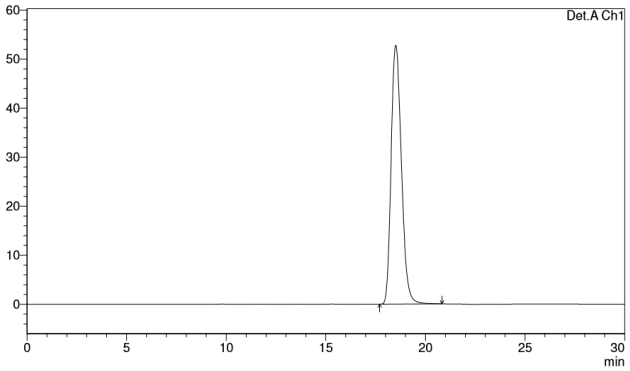


รูปที่ 31 กราฟมาตรฐานน้ำตาลแมนโนไตรโอสวิเคราะห์โดยวิธี HPLC

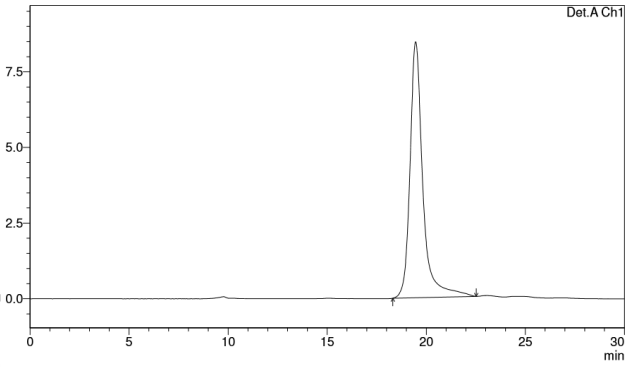


รูปที่ 32 กราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์ *S. cerevisiae*

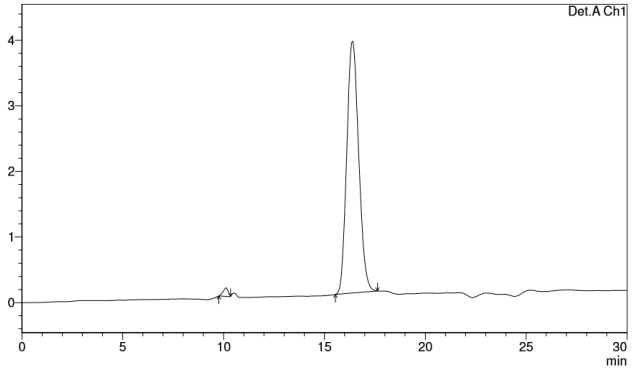
HPLC Chromatogram



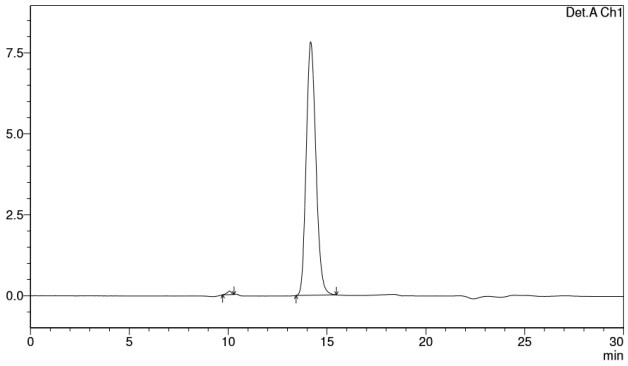
รูปที่ 33 HPLC Chromatogram กลูโคสความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร Retention time เท่ากับ 18.5 นาที



รูปที่ 34 HPLC Chromatogram แมนโนสความเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร Retention time เท่ากับ 19.4 นาที



รูปที่ 35 HPLC Chromatogram แมนโนไบโอสความเข้มข้น 0.15 กรัมต่อลิตร Retention time เท่ากับ 16.3 นาที



รูปที่ 36 HPLC Chromatogram แมนโนไตรโอสความเข้มข้น 1.2 กรัมต่อลิตร Retention time เท่ากับ 14.1 นาที

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ภาคผนวก ค

ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

ตารางที่ 17 ผลของพีเอชที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L

พีเอช	กิจกรรมแมนนาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)		
	1	2	เฉลี่ย
3	708.39	704.97	706.68
4	867.52	817.90	842.71
5	788.81	807.63	798.22
6	638.24	516.75	577.49
7	396.97	431.19	414.08
8	169.06	167.00	168.03
9	47.23	66.39	56.81
10	13.86	11.57	12.71

ตารางที่ 18 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนสใน Ultra SP-L

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	กิจกรรมแมนนาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย
25	239.55	285.75	256.66	260.66
35	367.88	311.42	321.68	333.66
45		578.35	655.35	616.85
55	867.52	817.90		842.71
65	1197.76	1180.65	1247.38	1208.60
75	1170.38	1062.58	1166.96	1133.31

ตารางที่ 19 ผลของอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียสมีต่อความเสถียรของเอนไซม์แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L

เวลา (ชั่วโมง)	กิจกรรมแมนนาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย
0	556.36	552.67		554.52
60	432.50	438.72	468.94	446.72
90	268.03	277.72	268.03	271.26
120	149.93	201.83	186.38	179.38
180	48.44	49.13	50.05	49.21
240	0.96	0.96	1.00	0.97

ตารางที่ 20 ผลของอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียสมีต่อความเสถียรของเอนไซม์แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L

เวลา (ชั่วโมง)	กิจกรรมแมนนาเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)			
	1	2	3	เฉลี่ย
0	371.83	401.36		386.59
60	28.60	23.53	23.53	25.22
90	16.38	15.92	12.69	14.99
120	7.84	9.23	10.15	9.07
180	3.40	3.36	3.41	3.39

ตารางที่ 21 จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L

โลคัสบีนกัม		กากมะพร้าว	
1/s (ml/mg)	1/v (mg/ml×min)	1/s (ml/mg)	1/v (mg/ml×min)
0.10	0.02	0.05	0.02
0.20	0.02	0.08	0.03
0.40	0.03	0.10	0.04
0.80	0.04	0.13	0.05
1.00	0.03	0.15	0.06
1.20	0.05	0.18	0.04
1.41	0.06	0.20	0.06
1.79	0.09	0.23	0.08
2.00	0.06	0.25	0.07

ตารางที่ 22 ผลิตภัณฑ์จากการย่อยกากมะพร้าวความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร โดยใช้แมนนาเนสในคอกเทลเอนไซม์ (Pectinex Ultra SP-L) 100 ยูนิต ในสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 4 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)			
	แมนโนไตรโอส	แมนโนไบโอส	กลูโคส	แมนโนส
0	0.00	0.36	0.24	0.44
5	0.18	0.90	0.42	0.69
10	0.17	1.01	0.48	0.78
15	0.18	1.11	0.55	0.88
30	0.14	1.32	0.75	1.19
45	0.03	1.16	0.63	1.52
120	0.00	0.71	1.19	2.37
180	0.00	0.77	1.34	2.82

ตารางที่ 23 ผลิตภัณฑ์จากการย่อยกากมะพร้าวความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร โดยใช้แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L 100 ยูนิต ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)			
	แมนโนไตรโอส	แมนโนไบโอส	กลูโคส	แมนโนส
0	0.02	0.52	0.64	0.84
5	0.23	2.51	1.30	1.79
10	0.30	3.45	1.53	2.10
15	0.30	3.95	1.74	2.38
30	0.27	4.91	2.42	3.34
45	0.59	5.54	3.09	4.52
60	0.53	5.73	3.58	5.53
120	0.57	4.92	4.63	8.10
180	0.74	4.37	5.30	9.91

ตารางที่ 24 ผลิตภัณฑ์จากการย่อยกากมะพร้าวความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร โดยใช้แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L 100 ยูนิต ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)			
	แมนโนไตรโอส	แมนโนไบโอส	กลูโคส	แมนโนส
0	0.00	0.58	0.94	1.25
5	0.70	3.13	1.85	2.38
10	0.62	3.99	2.13	2.76
15	0.64	4.97	2.40	3.12
30	1.07	7.93	3.64	4.87
45	1.02	9.25	4.48	6.37
60	0.96	9.87	5.24	7.82
120	0.83	9.87	6.82	12.12
180	0.43	8.46	8.00	15.37

ตารางที่ 25 ผลิตภัณฑ์จากการย่อยกากมะพร้าวความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร โดยใช้แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L 100 ยูนิต ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)			
	แมนโนไตรโอส	แมนโนไบโอส	กลูโคส	แมนโนส
0	0.14	0.75	1.40	1.91
5	0.96	3.63	2.48	3.04
10	0.74	4.97	2.86	3.55
15	1.32	6.21	2.88	3.64
30	1.35	9.59	4.07	5.42
45	1.33	11.13	5.05	7.05
60	1.30	11.68	5.52	8.12
120	1.37	14.70	8.43	14.98
180	0.71	12.14	9.20	17.99

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 26 ผลิตภัณฑ์จากการย่อยกากมะพร้าวความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร โดยใช้แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L 100 ยูนิต ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

ครั้งที่	เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)			
		แมนโนไตรโอส	แมนโนไบโอส	กลูโคส	แมนโนส
1	60	1.35	14.63	6.41	9.48
	120	1.44	17.98	9.13	16.04
	180	1.36	18.74	10.76	20.84
	300	1.18	17.50	12.37	26.99
	480	0.00	16.03	13.99	32.36
2	60	1.32	13.69	6.36	10.70
	120	1.54	17.45	8.99	17.80
	180	1.44	15.81	9.27	20.24
	300	1.26	16.83	12.13	29.12
	480	1.11	14.63	13.64	34.55
3	60	1.54	13.43	6.36	9.59
	120	2.09	16.22	8.15	14.58
	180	2.92	15.94	9.25	18.40
	300	3.62	14.42	10.20	22.82
	480	4.82	14.53	12.89	31.20

ตารางที่ 27 ผลิตภัณฑ์จากการย่อยกากมะพร้าวความเข้มข้น 250 กรัมต่อลิตร โดยใช้แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L 100 ยูนิต ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

ครั้งที่	เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)			
		แมนโนไตรโอส	แมนโนไบโอส	กลูโคส	แมนโนส
1	60	1.90	16.83	6.64	10.01
	120	2.03	21.51	10.21	17.43
	180	1.73	21.07	11.35	21.87
	300	2.50	21.47	13.82	29.55
	480	1.42	19.19	14.63	35.50
2	60	1.48	13.99	6.21	10.45
	120	2.30	21.47	9.82	19.98
	180	1.80	19.59	10.08	22.62
	300	1.56	18.72	11.95	29.66
	480	1.41	17.64	13.70	36.56
3	60	1.69	13.13	5.60	8.84
	120	0.46	17.59	8.61	16.23
	180	0.53	20.34	10.42	21.32
	300	0.54	18.37	11.29	26.25
	480	0.54	18.32	13.80	34.92

ตารางที่ 28 ผลิตภัณฑ์จากการย่อยกากมะพร้าวความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร โดยใช้แมนนาเนสใน Pectinex Ultra SP-L 100 ยูนิต ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

ครั้งที่	เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)			
		แมนโนไตรโอส	แมนโนไบโอส	กลูโคส	แมนโนส
1	120	2.48	23.17	10.04	18.08
	180	2.07	23.51	11.52	22.77
	300	2.84	24.54	14.13	31.74
	480	2.61	23.45	16.03	39.39
2	120	2.13	20.96	9.20	19.33
	180	2.12	21.26	10.24	22.98
	300	2.64	22.77	13.03	32.21
	480	2.72	20.72	18.62	41.66
3	120	3.04	23.00	10.67	17.33
	180	3.08	24.82	10.99	22.70
	300	2.16	22.42	12.26	28.86
	480	1.75	21.08	14.54	37.14

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 29 mass ของแมนโนไตรโอส แมนโนไบโอส กลูโคสและแมนโนส ในการทำบริสุทธิ์สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยกระบวนการเยื่อแผ่นขนาดรูพรุน 1000 ดอลตัล ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อ VCF = 4

ตัวอย่าง	ครั้งที่	mass (กรัม)			
		แมนโนไตรโอส	แมนโนไบโอส	กลูโคส	แมนโนส
เริ่มต้น	1	0.30	4.22	2.60	4.97
	2	0.25	3.95	2.44	4.99
รีเทนเทท	1	0.10	1.36	0.86	1.61
	2	0.08	1.12	0.72	1.61
เพอมิเอท	1	0.20	2.87	1.75	3.36
	2	0.18	2.82	1.73	3.38

ตารางที่ 30 mass ของแมนโนไตรโอส แมนโนไบโอส กลูโคสและแมนโนส ในการทำบริสุทธิ์สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยกระบวนการเยื่อแผ่นขนาดรูพรุน 1000 ดอลตัล ที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เมื่อ VCF = 4

ตัวอย่าง	ครั้งที่	mass (กรัม)			
		แมนโนไตรโอส	แมนโนไบโอส	กลูโคส	แมนโนส
เริ่มต้น	1	0.47	4.26	2.42	4.61
	2	0.53	4.27	2.59	4.77
รีเทนเทท	1	0.26	1.28	0.77	1.31
	2	0.21	1.24	0.76	1.34
เพอมิเอท	1	0.22	2.98	1.65	3.30
	2	0.32	3.03	1.83	3.42

ตารางที่ 31 mass ของแมนโนไตรโอส แมนโนไบโอส กลูโคสและแมนโนส ในการทำบริสุทธิ์สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยกระบวนการเยื่อแผ่นขนาดรูพรุน 1000 ดอลตัล 2 ชั้น ที่อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส เมื่อ VCF = 4

ตัวอย่าง	ครั้งที่	mass (กรัม)			
		แมนโนไตรโอส	แมนโนไบโอส	กลูโคส	แมนโนส
เริ่มต้น	1	0.53	4.27	2.59	4.76
	2	0.40	4.02	2.29	4.36
รีเทนเทท	1	0.34	1.42	0.88	1.46
	2	0.22	1.29	0.74	1.33
เพอมิเอท	1	0.18	2.85	1.70	3.30
	2	0.18	2.73	1.56	3.02

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 32 ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ selectivity ร้อยละการกักกัน ของการทำบริสุทธิ์ผ่านเยื่อแผ่น ความดัน 3 บาร์ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				selectivity				ร้อยละการกักกัน
	ครั้งที่	เริ่มต้น	เพอมิเอท	observed sieving	DP3 : glu	DP3 : mn	DP2 : glu	Dp2 : mn	
แมนโนไตรโอส	1	1.47	1.29	0.88	1.02	1.03			12.16
	2	1.25	1.17	0.94	1.01	0.96			6.29
	เฉลี่ย	1.36	1.23	0.91	1.01	0.99			9.47
แมนโนไบโอส	1	20.92	18.92	0.90			0.99	1.00	9.55
	2	19.52	18.62	0.95			0.99	0.95	4.64
	เฉลี่ย	20.22	18.77	0.93			0.99	0.97	7.18
กลูโคส	1	12.89	11.53	0.89					10.56
	2	12.09	11.39	0.94					5.78
	เฉลี่ย	12.49	11.46	0.92					8.25
แมนโนส	1	24.58	22.15	0.90					9.89
	2	24.71	22.32	0.90					9.68
	เฉลี่ย	24.65	22.24	0.90					9.78

ตารางที่ 33 ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ selectivity ร้อยละการกักกัน ของการทำบริสุทธิ์ผ่านเยื่อแผ่น ความดัน 3 บาร์ อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส

	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				selectivity				ร้อยละการกักกัน
	ครั้งที่	เริ่มต้น	เพอมิเอท	observed sieving	DP3 : glu	DP3 : mn	DP2 : glu	DP2 : mn	
แมนโนไตรโอส	1	2.47	1.50	0.61	1.50	1.57			39.17
	2	2.63	2.12	0.81	1.17	1.19			19.40
	เฉลี่ย	2.55	1.81	0.71	1.33	1.38			28.98
แมนโนไบโอส	1	22.20	20.72	0.93			0.98	1.02	6.68
	2	21.28	20.13	0.95			1.00	1.01	5.39
	เฉลี่ย	21.74	20.42	0.94			0.99	1.02	6.05
กลูโคส	1	12.58	11.45	0.91					8.98
	2	12.90	12.15	0.94					5.84
	เฉลี่ย	12.74	11.80	0.93					7.39
แมนโนส	1	24.03	22.92	0.95					4.63
	2	23.75	22.75	0.96					4.25
	เฉลี่ย	23.89	22.83	0.96					4.44

ตารางที่ 34 ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ selectivity ร้อยละการกักกัน ของการทำบริสุทธิ์ผ่านเยื่อแผ่น 2 ชั้น ความดัน 3 บาร์ อุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส

	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				selectivity				ร้อยละการกักกัน
	ครั้งที่	เริ่มต้น	เพอมิเอท	observed sieving	DP3 : glu	DP3 : mn	DP2 : glu	DP2 : mn	
แมนโนไตรโอส	1	2.63	1.23	0.47	1.88	1.98			53.27
	2	2.11	1.27	0.60	1.50	1.53			39.60
	เฉลี่ย	2.37	1.25	0.53	1.69	1.76			47.19
แมนโนไบโอส	1	21.28	18.94	0.89			0.99	1.04	10.96
	2	21.21	19.19	0.90			1.00	1.02	9.56
	เฉลี่ย	21.24	19.07	0.90			0.99	1.03	10.26
กลูโคส	1	12.90	11.33	0.88					12.23
	2	12.08	10.94	0.91					9.43
	เฉลี่ย	12.49	11.13	0.89					10.88
แมนโนส	1	23.75	21.97	0.92					7.51
	2	22.97	21.25	0.92					7.50
	เฉลี่ย	23.36	21.61	0.92					7.50

ตารางที่ 35 ฟลักซ์การทำบริสุทธิ์ผ่านเยื่อแผ่นด้วยการควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

เวลา (นาที)	ครั้งที่			เวลา (ชั่วโมง)	ฟลักซ์ (10^{-6}ลิตรต่อตารางเมตร×ชั่วโมง)
	2	1	เฉลี่ย		
5	5.40	4.41	4.91	0.08	29.45
10	4.74	4.00	4.37	0.17	26.20
15	3.66	4.40	4.03	0.25	24.18
20	4.15	3.56	3.85	0.33	23.12
25	3.98	3.40	3.69	0.42	22.14
30	3.83	3.29	3.56	0.50	21.36
35	3.71	3.20	3.46	0.58	20.74
40	3.61	3.12	3.37	0.67	20.20
45	3.52	3.04	3.28	0.75	19.70
50	3.45	3.02	3.23	0.83	19.39
55	2.91	3.35	3.13	0.92	18.77
60	3.31	2.85	3.08	1.00	18.51
65	3.25	2.82	3.03	1.08	18.21
71	3.18	2.76	2.97	1.18	17.84
76	3.13	2.71	2.92	1.27	17.55
81	3.09	2.68	2.88	1.35	17.28
86	3.04	2.64	2.84	1.43	17.04
90	3.01	2.60	2.80	1.50	16.82
95	2.97	2.56	2.76	1.58	16.58
100	2.94	2.53	2.73	1.67	16.40
105	2.90	2.51	2.71	1.75	16.23
110	2.87	2.48	2.68	1.83	16.06
115	2.84	2.45	2.65	1.92	15.88

ตารางที่ 36 ฟลักซ์การทำบริสุทธิ์ผ่านเยื่อแผ่นด้วยการควบคุมอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ต่อ)

เวลา (นาที)	ครั้งที่			เวลา (ชั่วโมง)	ฟลักซ์ (10^{-6}ลิตรต่อตารางเมตร× ชั่วโมง)
	2	1	เฉลี่ย		
120	2.81	2.43	2.62	2.00	15.70
125		2.40	2.40	2.08	14.42
130		2.38	2.38	2.17	14.29
135		2.36	2.36	2.25	14.18
140		2.34	2.34	2.33	14.06
145		2.32	2.32	2.42	13.95
				เฉลี่ย	18.49

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางที่ 37 ฟลักซ์การทำบริสุทธิ์ผ่านเยื่อแผ่นด้วยการควบคุมอุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส

เวลา (นาที)	ครั้งที่			เวลา (ชั่วโมง)	ฟลักซ์ (10^{-6}ลิตรต่อตารางเมตร× ชั่วโมง)
	2	1	เฉลี่ย		
5	3.15	3.76	3.46	0.08	20.73
10	2.94	3.32	3.13	0.17	18.78
15	2.76	3.04	2.90	0.25	17.41
20	2.63	2.87	2.75	0.33	16.50
25	2.54	2.75	2.64	0.42	15.85
30	2.45	2.66	2.55	0.50	15.32
35	2.36	2.56	2.46	0.58	14.76
40	2.32	2.47	2.39	0.67	14.36
45	2.25	2.41	2.33	0.75	13.98
50	2.21	2.34	2.27	0.83	13.63
55	2.16	2.28	2.22	0.92	13.34
60		2.25	2.25	1.00	13.48
65		2.19	2.19	1.08	13.15
70	2.06	2.16	2.11	1.17	12.63
75	2.02	2.11	2.07	1.25	12.41
80		2.08	2.08	1.33	12.46
85	1.95	2.04	1.99	1.42	11.96
90	1.92	2.01	1.96	1.50	11.78
95	1.89	1.98	1.94	1.58	11.62
100	1.87	1.96	1.91	1.67	11.49
105	1.84	1.92	1.88	1.75	11.30
110	1.83	1.90	1.87	1.83	11.19
115	1.81	1.88	1.84	1.92	11.06

ตารางที่ 38 ฟลักซ์การทำบริสุทธิ์ผ่านเยื่อแผ่นด้วยการควบคุมอุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส (ต่อ)

เวลา (นาที)	ครั้งที่			เวลา (ชั่วโมง)	ฟลักซ์ (10^{-6}ลิตรต่อตารางเมตร× ชั่วโมง)
	2	1	เฉลี่ย		
120	1.79	1.85	1.82	2.00	10.93
125	1.77	1.83	1.80	2.08	10.80
130	1.76	1.81	1.78	2.17	10.69
135	1.73	1.79	1.76	2.25	10.57
140	1.73	1.77	1.75	2.33	10.50
145	1.71	1.75	1.73	2.42	10.39
150	1.70	1.74	1.72	2.50	10.31
155	1.69	1.73	1.71	2.58	10.24
160	1.68	1.71	1.69	2.67	10.16
165	1.67	1.70	1.68	2.75	10.09
170		1.69	1.69	2.83	10.12
175	1.65	1.67	1.66	2.92	9.95
180	1.64	1.67	1.65	3.00	9.90
185	1.63	1.65	1.64	3.08	9.83
190	1.62	1.65	1.63	3.17	9.80
195	1.61	1.64	1.63	3.25	9.75
200	1.61	1.63	1.62	3.33	9.71
205		1.62	1.62	3.42	9.72
				เฉลี่ย	12.26

ตารางที่ 39 ฟลักซ์การทำบริสุทธิ์ผ่านเยื่อแผ่น 2 ชั้นด้วยการควบคุมอุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส

เวลา (นาที)	ครั้งที่			เวลา (ชั่วโมง)	ฟลักซ์ (10^{-6}ลิตรต่อตารางเมตร× ชั่วโมง)
	2	1	เฉลี่ย		
5	2.65	2.56	2.60	0.08	15.63
10	2.44	2.36	2.40	0.17	14.42
15	2.28	2.26	2.27	0.25	13.64
20	2.19	2.21	2.20	0.33	13.19
25	2.10	2.10	2.10	0.42	12.60
30	2.05	2.03	2.04	0.50	12.25
35	1.98	1.94	1.96	0.58	11.75
40	1.92	1.90	1.91	0.67	11.46
45	1.89	1.84	1.86	0.75	11.17
50	1.83	1.81	1.82	0.83	10.92
55	1.80	1.79	1.79	0.92	10.75
61	1.77	1.75	1.76	1.02	10.56
65	1.73	1.72	1.73	1.08	10.36
70	1.70	1.71	1.71	1.17	10.25
75	1.68	1.69	1.68	1.25	10.09
80	1.65	1.66	1.66	1.33	9.93
85	1.63	1.63	1.63	1.42	9.79
90	1.61	1.61	1.61	1.50	9.64
95	1.59	1.59	1.59	1.58	9.53
101	1.57		1.57	1.68	9.41
105	1.55		1.55	1.75	9.28
110	1.53		1.53	1.83	9.17
115	1.51		1.51	1.92	9.08

ตารางที่ 40 ฟลักซ์การทำบริสุทธิ์ผ่านเยื่อแผ่น 2 ชั้น ควบคุมอุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส (ต่อ)

เวลา (นาที)	ครั้งที่			เวลา (ชั่วโมง)	ฟลักซ์ (10^{-6}ลิตรต่อตารางเมตร× ชั่วโมง)
	2	1	เฉลี่ย		
120	1.50		1.50	2.00	8.97
125	1.48		1.48	2.08	8.90
130	1.47	1.48	1.47	2.17	8.83
135	1.45	1.46	1.46	2.25	8.75
140	1.44	1.45	1.45	2.33	8.68
145	1.43	1.44	1.44	2.42	8.61
150	1.41	1.43	1.42	2.50	8.51
155	1.40	1.42	1.41	2.58	8.45
162	1.38	1.41	1.39	2.70	8.36
165	1.37	1.40	1.39	2.75	8.31
170	1.37	1.39	1.38	2.83	8.27
175	1.36	1.38	1.37	2.92	8.22
180	1.35	1.37	1.36	3.00	8.17
185	1.34	1.37	1.35	3.08	8.13
190	1.34	1.36	1.35	3.17	8.09
195	1.33	1.35	1.34	3.25	8.04
200	1.32	1.34	1.33	3.33	7.98
205	1.31	1.33	1.32	3.42	7.94
210	1.31	1.32	1.32	3.50	7.90
215	1.30	1.32	1.31	3.58	7.88
220	1.30	1.31	1.31	3.67	7.83
225	1.29	1.31	1.30	3.75	7.81
230	1.29	1.31	1.30	3.83	7.78

ตารางที่ 41 ฟลักซ์การทำบริสุทธิ์ผ่านเยื่อแผ่น 2 ชั้นด้วยการควบคุมอุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส(ต่อ)

เวลา (นาที)	ครั้งที่			เวลา (ชั่วโมง)	ฟลักซ์ ลิตรต่อตารางเมตร× ชั่วโมง
	2	1	เฉลี่ย		
235	1.28	1.30	1.29	3.92	7.75
240	1.28	1.30	1.29	4.00	7.73
245	1.27	1.30	1.28	4.08	7.71
250	1.27	1.29	1.28	4.17	7.67
				เฉลี่ย	9.52

ตารางที่ 42 ความเข้มข้นผลิตภัณฑ์ในการทำบริสุทธิ์สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์โดยร้อยละ 1 *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ครั้งที่	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				
		แมนโนไตรโอส	แมนโนไบโอส	กลูโคส	แมนโนส	เอทานอล
0	1	3.30	23.17	13.00	22.88	0.00
	2	3.30	23.17	13.00	22.88	0.00
	3	3.30	23.17	13.00	22.88	0.00
1	1	3.00	20.98	8.82	15.09	3.81
	2	2.50	19.48	7.22	13.57	3.22
	3	3.06	21.58	8.74	15.35	3.44
2	1	2.93	21.44	7.83	5.57	11.26
	2	2.70	20.27	6.86	5.21	8.18
	3	2.89	21.46	7.71	5.33	8.46
3	1	2.79	21.11	7.58	3.40	14.39
	2	2.81	21.49	7.75	3.58	9.79
	3	2.82	21.75	7.82	3.62	9.43
4	1	1.87	19.17	6.62	2.87	13.79
	2	1.87	19.06	6.57	2.89	9.84
	3	2.67	20.89	7.30	3.09	9.87
5	1	1.87	18.85	6.50	2.61	11.87
	2	1.90	19.34	6.67	2.74	9.85
	3	1.90	19.03	6.53	2.71	9.70
6	1	1.87	18.81	6.48	2.30	11.65
	2	1.93	19.38	6.68	2.47	10.16
	3	1.90	18.97	6.52	2.45	9.99

ตารางที่ 43 ความเข้มข้นผลิตภัณฑ์ในการทำบริสุทธิ์สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์โดยร้อยละ 1 *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	ครั้งที่	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				
		แมนโนไตรโอส	แมนโนไบโอส	กลูโคส	แมนโนส	เอทานอล
7	1	1.89	18.81	6.52	1.89	10.87
	2	1.92	19.17	6.65	2.07	10.18
	3	1.90	18.94	6.53	2.09	10.06
8	1	4.11	21.76	7.99	1.55	11.08
	2	1.89	18.89	6.57	1.49	10.30
	3	2.45	19.20	6.67	1.58	10.40

มหาวิทยาลัยศิลปากร

รายการอ้างอิง

1. ศูนย์อัจฉริยะเพื่ออุตสาหกรรมอาหาร. อุตสาหกรรมมะพร้าวของไทยปี 2558. [cited 2558; Available from: http://fic.nfi.or.th/info_graphic_detail.php?id=5.
2. สาตสำอางค์, ว. เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแผนกกากมะพร้าวอบแห้ง. [cited 2562; Available from: www.research-system.siam.edu/images/coop/PRODUCTIVITY_OF_DESICCATED/บอความ.pdf.
3. Takahashi, R., I. Kusakabe, A. Maekawa, T. Suzuki, and K. Murakami, *Studies on Mannanase of <I>Actinomycetes</I>*

I. Some Properties of Extracellular Mannanase[*]. Japanese Journal of Tropical Agriculture, 1983. 27(3): p. 140-148.
4. van Zyl, W.H., S.H. Rose, K. Trollope, and J.F. Görgens, *Fungal β-mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications.* Process Biochemistry, 2010. 45(8): p. 1203-1213.
5. Monro, J.A., W.R. Harding, and C.E. Russell, *Dietary fibre of coconuts from a pacific atoll: Soluble and insoluble components in relation to maturity.* Journal of the Science of Food and Agriculture, 1985. 36(10): p. 1013-1018.
6. Buchert, J., J.M. Koponen, M. Suutarinen, A. Mustranta, M. Lille, R. Törrönen, and K. Poutanen, *Effect of enzyme-aided pressing on anthocyanin yield and profiles in bilberry and blackcurrant juices.* Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005. 85(15): p. 2548-2556.
7. Srivastava, P.K. and M. Kapoor, *Production, properties, and applications of endo-β-mannanases.* Biotechnology Advances, 2017. 35(1): p. 1-19.
8. Naganagouda, K., P.V. Salimath, and V.H. Mulimani, *Purification and characterization of endo-beta*-1,4 *mannanase from Aspergillus niger gr for application in food processing industry.* Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009. 19(10): p. 1184-90.
9. Talbot, G. and J. Sygusch, *Purification and characterization of thermostable beta-mannanase and alpha-galactosidase from Bacillus stearothermophilus.* Applied and Environmental Microbiology, 1990. 56(11): p. 3505-10.

10. Pangsri, P., Y. Piwpankaew, A. Ingkakul, S. Nitisinprasert, and S. Keawsompong, *Characterization of mannanase from Bacillus circulans NT 6.7 and its application in mannooligosaccharides preparation as prebiotic.* Springerplus, 2015. 4: p. 771.

11. Ariandi, Yopi, and A. Meryandini, *Enzymatic Hydrolysis of Copra Meal by Mannanase from Streptomyces sp. BF3.1 for The Production of Mannooligosaccharides.* HAYATI Journal of Biosciences, 2015. 22(2): p. 79-86.

12. Tanriseven, A. and Y. Aslan, *Immobilization of Pectinex Ultra SP-L to produce fructooligosaccharides.* Enzyme and Microbial Technology, 2005. 36(4): p. 550-554.

13. Aslan, Y. and A. Tanriseven, *Immobilization of Pectinex Ultra SPL to produce galactooligosaccharides.* Journal of Molecular Catalysis B-enzymatic 2007. 45: p. 73-77.

14. Belorkar, S.A. and A.K. Gupta, *Oligosaccharides: a boon from nature's desk.* AMB Express, 2016. 6(1): p. 82.

15. Megazyme. *Oligosaccharides*. [cited 2019; Available from: https://secure.megazyme.com/carbohydrates/oligosaccharides.

16. Werf, M.v.d. *MOS Products: Not every Yeast Cell Wall is created equal* [cited 2019; Available from: https://www.ohly.com/media/4397/mos-products-not-every-yeast-cell-wall.pdf.

17. store, A. *Bio-Mos® Water Soluble - Dairy Calf Gut Integrity and Performance Supplement*. [cited 2019; Available from: https://store.alltech.com/products/bio-mos%C2%AE-water-soluble.

18. Nabarlatz, D., C. Torras, R. Garcia-Valls, and D. Montané, *Purification of xylo-oligosaccharides from almond shells by ultrafiltration.* Separation and Purification Technology, 2007. 53(3): p. 235-243.

19. Md Yunos, K.F. and R.W. Field, *Rejection amplification in the ultrafiltration of binary protein mixtures using sandwich configurations.* Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 2008. 47(7): p. 1053-1060.

20. Hernández, O., A.I. Ruiz-Matute, A. Olano, F.J. Moreno, and M.L. Sanz, *Comparison of fractionation techniques to obtain prebiotic galactooligosaccharides.* International Dairy Journal, 2009. 19(9): p. 531-536.

21. Sanz, M.L., N. Polemis, V. Morales, N. Corzo, A. Drakoularakou, G.R. Gibson, and R.A. Rastall, *In vitro investigation into the potential prebiotic activity of honey oligosaccharides.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. 53(8): p. 2914-21.

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

23. Alles, M.J.L., I.C. Tessaro, and C.P.Z. Noreña, *Concentration and Purification of Yacon (Smallanthus sonchifolius) Root Fructooligosaccharides Using Membrane Technology.* Food technology and biotechnology, 2015. 53(2): p. 190-200.

24. Ahirwar, S., H. Soni, H.K. Rawat, M.A. Ganaie, K. Pranaw, and N. Kango, *Production optimization and functional characterization of thermostable β-mannanase from Malbranchea cinnamomea NFCCI 3724 and its applicability in mannotetraose (M4) generation.* Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2016. 63: p. 344-353.

25. AOAC. *Official methods of analysis of AOAC*. in *International*. 1990. Association of Official Analytical Chemist International Washington, DC.

26. Saiut, S., *Application of Enzymes for Food Protein-Based Industry.* Burapha Science Journal (วารสาร วิทยาศาสตร์ บูรพา), 2018. 23(3): p. 1234-1252.

27. Pongsapipatana, N., P. Damrongteerapap, S. Chantorn, W. Sintuprapa, S. Keawsompong, and S. Nitisinprasert, *Molecular cloning of kman coding for mannanase from Klebsiella oxytoca KUB-CW2-3 and its hybrid mannanase characters.* Enzyme Microbiology and Technology, 2016. 89: p. 39-51.

28. Rungruangsaphakun, J. and S. Keawsompong, *Optimization of hydrolysis conditions for the mannooligosaccharides copra meal hydrolysate production.* 3 Biotech, 2018. 8(3): p. 169.

29. Pruksasri, S., T.H. Nguyen, D. Haltrich, and S. Novalin, *Fractionation of a galacto-oligosaccharides solution at low and high temperature using nanofiltration.* Seperation and Purification Technology, 2015. 151: p. 124-130.

30. Wang, K.Y. and T.-S. Chung, *The characterization of flat composite nanofiltration membranes and their applications in the separation of Cephalexin*. Journal of Membrane Science, 2005. 247(1): p. 37-50.

31. Feins, M. and K.K. Sirkar, *Novel internally staged ultrafiltration for protein purification.* Journal of Membrane Science, 2005. 248(1): p. 137-148.

32. Kaneko, S., R. Mizuno, T. Maehara, and H. Ichinose. *Consolidated Bioprocessing Ethanol Production by Using a Mushroom*. [cited 2019; Available from: https://www.intechopen.com/books/bioethanol/consolidated-bioprocessing-ethanol-production-by-using-a-mushroom.

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายอิทธิชัย ฉิมพะเนาว์
วัน เดือน ปี เกิด	30 กรกฎาคม 2535
สถานที่เกิด	พิจิตร
วุฒิการศึกษา	2553 : วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต (วศ.บ.) วิศวกรรมกระบวนการชีวภาพ
ที่อยู่ปัจจุบัน	124/1 หมู่ที่ 4 ต.บ้านบุ่ง อ.เมืองพิจิตร จ.พิจิตร 66000
ผลงานตีพิมพ์	Extraction of oligosaccharide from copra meal using alkali treatment