

สภาวะและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแมนนาเนสจาก *Aspergillus niger* TISTR3013 โดยใช้รำละเอียดเป็นวัสดุหมัก

Optimal Conditions and Nitrogen Source for Mannanase Production of *Aspergillus niger* TISTR3013 Using Rice Bran as Solid Medium

ณิธิญา พิมพ์ และดรุณี ศรีชนะ*

สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Nawinya Pimpa and Darunee Srichana*

Department of Agricultural Technology, Faculty of Science and Technology,

Thammasat University, Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

สภาวะที่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น รวมไปถึงแหล่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยสำคัญต่อการผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาสภาวะและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก *Aspergillus niger* TISTR3013 โดยใช้รำละเอียดเป็นวัสดุหมักภายใต้การหมักแบบอาหารแข็ง ประกอบด้วย 2 การทดลอง การทดลองที่ 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแมนนาเนสจาก *A. niger* TISTR3013 ซึ่งประกอบด้วย ความชื้นของวัสดุหมัก (50, 60 และ 70 เปอร์เซ็นต์) อุณหภูมิในการหมัก (30, 45 และ 60 องศาเซลเซียส) และ pH ของวัสดุหมัก (5, 7 และ 9) หมักเป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แมนนาเนส คือ วัสดุที่มีความชื้น 60 เปอร์เซ็นต์ pH 7 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยผลิตแมนนาเนสสูงที่สุด 763.89 หน่วยต่อกรัมวัตถุแห้ง ($p < 0.01$) และเมื่อนำมาศึกษาแหล่งไนโตรเจนเสริมที่เหมาะสมต่อการผลิตแมนนาเนสจาก *A. niger* TISTR3013 ในการทดลองที่ 2 โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรียความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับการไม่เสริมแหล่งไนโตรเจน พบว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเหมาะสมที่สุด โดยมีการผลิตแมนนาเนสสูงถึง 919.47 หน่วยต่อกรัมวัตถุแห้ง ซึ่งเพิ่มขึ้นถึง 1.2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ การไม่เสริมแหล่งไนโตรเจน (740 หน่วยต่อกรัมวัตถุแห้ง) ($p < 0.01$) นอกจากนั้นผลการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่ารำละเอียดสามารถใช้เป็นวัสดุหมักในการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก *A. niger* TISTR3013

คำสำคัญ : แมนนาเนส; การหมักบนอาหารแข็ง; *Aspergillus niger*

Abstract

Optimal conditions such as temperature, moisture and nitrogen source are important factors for enzyme production by microorganism. Therefore, this study investigated the optimal conditions and nitrogen sources for mannanase production from *Aspergillus niger* TISTR3013 using rice bran as a solid medium. Two experiments were conducted in this research. The first experiment was studied the optimal conditions for mannanase production from *A. niger* TISTR3013, moisture of medium (50, 60 and 70 percent), incubation temperature (30, 45 and 60 °C) and pH of medium (5, 7 and 9). The fermentation period was 3 days. The results showed that the optimal moisture, temperature and pH for mannanase production were 60 percent, 30 °C and pH 7, respectively, which produced mannanase at 763.89 U/g DM ($p < 0.01$). The second experiment was studied optimal nitrogen source for mannanase production from *A. niger* TISTR3013, 1 % ammonium sulfate supplementation, 1 % urea supplementation and the control (without nitrogen supplementation). The result showed that 1 % ammonium sulfate is the most suitable nitrogen source which produced maximum mannanase enzyme at 919.47 U/g DM. The enzyme production was 1.2 folds increase when compared to that of the control (740 U/g DM) ($p < 0.01$). Furthermore, the results from these experiments indicated that rice bran could be used as a medium for mannanase production from *A. niger* TISTR3013.

Keywords: mannanase; solid state fermentation; *Aspergillus niger*

1. บทนำ

อาหารถือเป็นปัจจัยสำคัญต่อการให้ผลผลิตของสัตว์ อย่างไรก็ตาม อาหารที่สัตว์กินจะไม่สามารถถูกย่อยสมบูรณ์ 100 % เนื่องจากวัตถุดิบอาหารสัตว์ส่วนใหญ่มีสารที่สัตว์ไม่สามารถดูดซึมไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน [1] จึงได้มีการใช้เอนไซม์เสริมลงในอาหารเพื่อให้สัตว์ใช้ประโยชน์จากอาหารได้มากขึ้น

การผลิตเอนไซม์นั้นผลิตได้หลายวิธี ซึ่งการใช้จุลินทรีย์เป็นหนึ่งวิธีที่ได้รับความนิยม เนื่องจากสามารถควบคุมสภาวะในการผลิตง่าย ต้นทุนการผลิตต่ำ และได้เอนไซม์ปริมาณมาก [2] ซึ่งการผลิตเอนไซม์โดยจุลินทรีย์ทำได้ 2 วิธี คือ การผลิตโดยวิธีการหมักแบบอาหารเหลว (submerged fermentation) และ

การผลิตโดยวิธีการหมักแบบอาหารแข็ง (solid state fermentation) ซึ่งวิธีการหมักแบบอาหารแข็งเป็นวิธีที่เป็นประโยชน์ต่อจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ ส่งผลให้ปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และการผลิตเอนไซม์ด้วยวิธีการหมักแบบอาหารแข็งส่วนใหญ่จะเหมาะสมกับการผลิตโดยมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น [3,4] โดยราในกลุ่ม *Aspergillus* โดยเฉพาะ *A. niger* มีประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับราสายพันธุ์อื่นและผลิตด้วยวิธีการหมักแบบอาหารแข็ง นอกจากนี้ประสิทธิภาพของการผลิตเอนไซม์โดยจุลินทรีย์ยังขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย แหล่งไนโตรเจนเสริม คือ ปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ เนื่องจากไนโตรเจนเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดอะมิโนและโปรตีน [5]

การผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจำเป็นต้องใช้วัสดุที่เป็นแหล่งของโพลีแซคคาไรด์ที่มีน้ำตาลแมนโนสเป็นองค์ประกอบ ซึ่งพบได้ในพืชตระกูลถั่ว ไม้เนื้ออ่อน ไม้เนื้อแข็ง เมล็ดพืช [6] และข้าวเป็นพืชกลุ่มให้พลังงานเมื่อผ่านกระบวนการสีข้าวแล้วจะได้รำละเอียดเป็นวัสดุพลอยได้ โดยรำละเอียดจัดเป็นวัสดุที่เป็นแหล่งพลังงานและมีเยื่อใยสูง ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์ รำละเอียดจึงมีความเหมาะสมในการใช้เป็นตัวตั้งต้นเพื่อผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจากจุลินทรีย์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก *A. niger* TISTR3013 โดยใช้รำละเอียดเป็นวัสดุหมัก

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก *A. niger*

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) จำนวน 3 ซ้ำ เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ประกอบด้วยความชื้นต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ 50, 60 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ระดับอุณหภูมิ ได้แก่ 30, 45 และ 60 องศาเซลเซียส และ pH 5, 7 และ 9

2.1.1 การเตรียม *A. niger*

เพาะเลี้ยง *A. niger* TISTR3013 บนอาหาร potato dextrose agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เพื่อให้เกิดสปอร์ของรา ล้างสปอร์ออกจากจานเพาะเชื้อโดยใช้ น้ำกลั่นผสม Tween ความเข้มข้น 0.05 % ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ต่อจาน คนสารละลายสปอร์ให้เข้ากันและตรวจนับสปอร์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) โดยให้สารละลายสปอร์มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10^5 - 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร

2.1.2 การหมัก

ชั่งรำละเอียด 25 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับความชื้นตามที่กำหนดไว้ และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติมสารละลายสปอร์ 5 มิลลิลิตรต่อขวด หมักตามสภาวะที่กำหนดไว้ในแผนการทดลอง โดยหมัก 3 วัน จากนั้นนำตัวอย่างไปตรวจสอบกิจกรรมแมนนาสตามวิธีของ Miller [7] โดยใช้โลคัสบีนกัมในซีเตรตบัฟเฟอร์ pH 6 เป็นสารตั้งต้น แล้วเติมสารสกัดเอนไซม์และบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นตรวจวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้สารละลาย DNS และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลแมนโนส เพื่อคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์แมนนาเนส โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นน้ำตาลแมนโนสได้ 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทดสอบ

2.2 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก *A. niger*

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ ประกอบด้วย 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ไม่เสริมแหล่งไนโตรเจน กลุ่มที่เสริมแอมโมเนียมซัลเฟต 1 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่เสริมยูเรีย 1 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มละ 3 ซ้ำ หมักที่ความชื้น อุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมจากผลการทดลองที่ 1 จากนั้นนำมาวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

2.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำค่าเฉลี่ยของกิจกรรมเอนไซม์ที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละสิ่งทดลอง โดยใช้ Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม SAS (2004)

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 ความชื้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก *A. niger* TISTR3013

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแมนนาเนสจาก *A. niger* TISTR3013 โดยใช้รำละเอียดเป็นวัสดุหมัก จำนวนสปอร์ของราที่ใช้หมัก 1.71×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่ารา *A. niger* TISTR3013 สามารถผลิตเอนไซม์แมนนาเนสสูงที่สุดที่ความชื้น 60 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.01$) โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ 681.19 หน่วยต่อกรัมวัตถุดิบแห้ง ขณะที่เมื่อวัสดุหมักมีความชื้น 70 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้กิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสลดลงเหลือ 577.01 หน่วยต่อกรัมวัตถุดิบแห้ง ($p < 0.01$) (รูปที่ 1) โดยมีความสอดคล้องกับ Abdesgharian และคณะ [8] ที่รายงานว่า *A. niger* สามารถผลิตเอนไซม์แมนนาเนสภายใต้การหมักแบบอาหารแข็งดีที่สุดเมื่อวัสดุหมักมีความชื้น 40-60 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณเอนไซม์แมนนาเนสจะเริ่มลดลงเมื่อวัสดุหมักมีความชื้นสูงถึง 70-80 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากน้ำส่งผลให้พื้นผิวของวัสดุบวม จุลินทรีย์จึงสามารถดูดซึมสารอาหารเพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์จากกระบวนการเมตาบอลิซึมอย่างมีประสิทธิภาพ [9] ขณะที่ถ้าในวัสดุหมักมีความชื้นสูงเกินไปพื้นผิวของวัสดุจะเกิดการบวมมาก ความพรุนของพื้นผิวลดลง ส่งผลให้การถ่ายเทออกซิเจนภายในพื้นที่ผิวไม่ดี จุลินทรีย์จึงเจริญเติบโตไม่ดี [10,11]

3.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก *A. niger* TISTR3013

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแมนนาเนสคือ 30 องศาเซลเซียส ($p < 0.01$) โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ 763.89 หน่วยต่อกรัมวัตถุดิบแห้ง ขณะที่เมื่อหมักที่อุณหภูมิ 20 และ 45 องศาเซลเซียส ส่งผลให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลง โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ 316.07

และ 559.34 หน่วยต่อกรัมวัตถุดิบแห้ง ตามลำดับ (รูปที่ 2) โดยจำนวนสปอร์ของราที่ใช้หมัก 6.12×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร อุณหภูมิเป็นสิ่งที่ชี้วัดว่าการหมักบนอาหารแข็งมีประสิทธิภาพ [9,12] โดย Ibrahim และคณะ [13] รายงานว่า *A. niger* สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นอุณหภูมิ

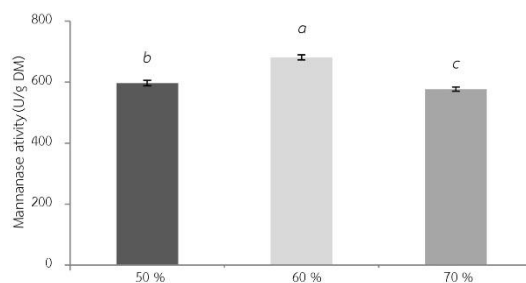


Figure 1 Mannanase activity of *A. niger* TISTR3013 using rice bran as solid medium with various moisture content [a, b, and c show the significant difference ($p < 0.05$) of various treatments (S.E. = 4.72)]

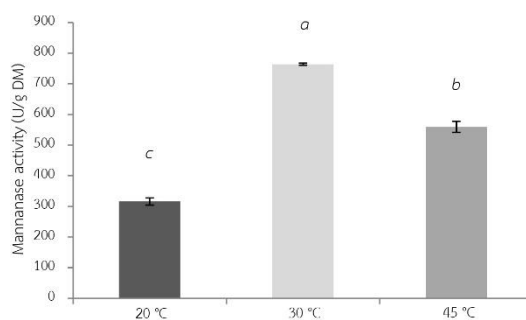


Figure 2 Mannanase activity of *A. niger* TISTR3013 using rice bran as solid medium with 60 % moisture content and incubated at various temperature [a, b, and c show the significant difference ($p < 0.05$) of various treatments (S.E. = 7.20)]

ที่ใกล้เคียงกับสภาพธรรมชาติ ส่งผลให้ราสามารถผลิตแมนนาเนสได้มากที่สุด โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ 97 หน่วยต่อกรัมของสารตั้งต้น ขณะที่เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าราดังกล่าวมีการเจริญเติบโตและผลิตเอนไซม์ได้ลดลง (64.27 หน่วยต่อกรัมของสารตั้งต้น) และเมื่ออุณหภูมิที่ใช้บ่มสูงถึง 45 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ราเจริญเติบโตไม่ดี อีกทั้งยังไม่สามารถวัดกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส

3.2 pH ที่เหมาะต่อการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก *A. niger* TISTR3013

pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก *A. niger* TISTR3013 คือ pH 7 ($p < 0.01$) โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ 786.66 หน่วยต่อกรัมวัตถุดิบ และมีกิจกรรมเอนไซม์ต่ำสุดเมื่อวัสดุหมักมี pH 5 (679.79 หน่วยต่อกรัมวัตถุดิบ) (รูปที่ 3) โดยสปอร์ของราที่ใช้หมักมีความเข้มข้น 8.63×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งโดยทั่วไป pH ที่เหมาะต่อการผลิตแมนนาเนสจากราในกลุ่ม *Aspergillus* คือ 2.4-7.5 [14] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ong [15] ที่พบว่า *A. niger* สามารถผลิตแมนนาเนสสูงที่สุดเมื่ออากาศในปาล์มซึ่งเป็นวัสดุหมักมี pH 7 ภายใต้สภาวะการหมักบนอาหารแข็ง โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ 1,705 หน่วยต่อกรัมของกากเนื้อในปาล์ม

3.4 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก *A. niger* TISTR3013

การศึกษาการเสริมแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ต่อการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก *A. niger* TISTR3013 โดยใช้รำละเอียดเป็นวัสดุหมักที่มีความชื้น 60 เปอร์เซ็นต์ pH 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแมนนาเนสมากที่สุด โดยส่งเสริมให้มีกิจกรรมเอนไซม์สูงถึง

919.47 หน่วยต่อกรัมวัตถุดิบ ($p < 0.01$) ส่วนการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น พบว่าช่วยส่งเสริมการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสได้เช่นกัน โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ 872.51 หน่วยต่อกรัมวัตถุดิบ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่เสริมแหล่งไนโตรเจน (740 หน่วยต่อ

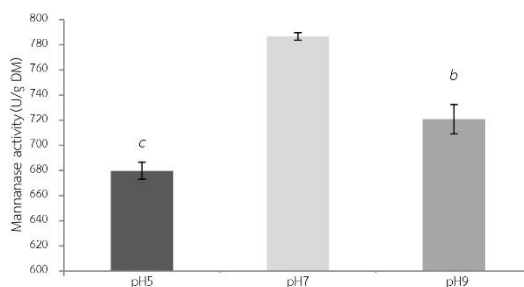


Figure 3 Mannanase activity of *A. niger* TISTR3013 using rice bran as solid medium with 60 % moisture content, incubated at 30 °C and various pH [a, b, and c show the significant difference ($p < 0.05$) of various treatments (S.E. = 4.60)]

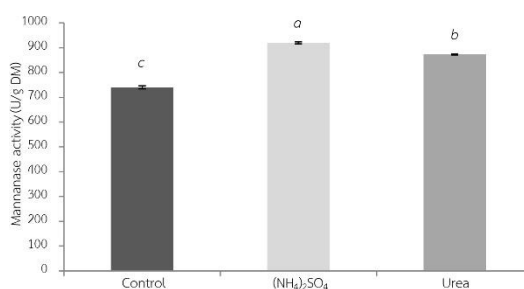


Figure 4 Mannanase activity of *A. niger* TISTR3013 using rice bran as solid medium with 60 % moisture content, pH 7, incubated at 30 °C and supplemented with various nitrogen source [a, b, and c show the significant difference ($p < 0.05$) of various treatments (S.E. = 2.65)]

กรัมวัตถุแห้ง) (รูปที่ 4) สปอร์ของราที่ใช้หมักมีความเข้มข้น 5.7×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าราสามารถผลิตเอนไซม์มากขึ้นถึง 1.2 เท่า เมื่อมีการเติมแหล่งไนโตรเจนลงในวัสดุหมัก สอดคล้องกับ Mohamad และคณะ [16] ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก *A. niger* เมื่อเสริมแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน ทั้งแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน (organic nitrogen source) ได้แก่ ยีสต์เอกซ์แทรก (yeast extract) แบคเทอริจิคอลเพปโตน (bacteriological peptone) และมีทเพปโตน (meat peptone) และแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน (inorganic nitrogen source) ได้แก่ แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) และแอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) พบว่าแบคเทอริจิคอลเพปโตนและแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมมากที่สุด ส่งผลให้ราผลิตแมนนาเนสได้สูงสุด โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ 1,744 และ 235.7 nkat/mL เนื่องจากไนโตรเจน คือ สารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดอะมิโน (amino acid) โปรตีน และวิตามิน ซึ่งโปรตีนหลายชนิดทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ การเสริมไนโตรเจนจึงเสมือนเป็นตัวกระตุ้นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์

4. สรุป

A. niger TISTR3013 สามารถผลิตเอนไซม์แมนนาเนสได้ดีที่สุดเมื่อใช้รำละเอียดเป็นวัสดุหมักที่มีความชื้น 60 เปอร์เซ็นต์ pH 7 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หมักเป็นระยะเวลา 3 วัน โดยมีกิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนส 763.89 หน่วยต่อกรัมวัตถุแห้ง และเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเสริมส่งผลให้มีการผลิตแมนนาเนสเพิ่มขึ้น โดยมีกิจกรรมเอนไซม์สูงถึง 919.47 หน่วยต่อกรัมวัตถุแห้ง แสดงให้เห็นว่ารำละเอียดสามารถใช้เป็นวัสดุหมักใน

การผลิตเอนไซม์แมนนาเนสจาก *A. niger* TISTR3013 โดยหากมีการศึกษารั้วต่อไปควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *A. niger* TISTR3013

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์และสนับสนุนงานวิจัยนี้

6. References

- [1] Zijlstra, R. T. , Owusu- Asiedu, A. and Simmins, P. H. , 2010, Future of NSP-degrading enzymes to improve nutrient utilization of co-products and gut health in pigs, *Livest. Sci.* 134: 255-257.
- [2] Meenakshi, M. , Singh, G. , Bhalla, A. and Hoondal, G. S. , 2010, Solid state fermentation and characterization of partially purified thermostable mannanase from *Bacillus* sp. MG- 33, *Bioresource* 5: 1689-1701.
- [3] Ozturk, B. , Cekmecelioglu, D. , Ogel, Z. B. , 2010, Optimal conditions for enhanced β -mannanase production by recombinant *Aspergillus sojae*, *J. Mol. Catal. B Enzyme* 64: 135-139.
- [4] Beg, Q. K. , Bhushan, B. , Kapoor, M. , Hoondal, G.S., 2000, Effect of amino acids on production of xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16: 211-213.
- [5] Mohamad, S.N., Ramanan, R.N., Mohamad,

- R. and Ariff, A.B. 2011, Improved mannan-degrading enzymes' production by *Aspergillus niger* through medium optimization, N. Biotechnol. 28: 146-152.
- [6] Handford, M.G., Baldwin, T.C., Goubet, F., Prime, T.A., Miles, J., Yu, X. and Dupree, P., 2003, Localization and characterization of cell wall mannan polysaccharides in *Arabidopsis thaliana*, Planta 218: 27-36.
- [7] Miller, G.L., 1959, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, Anal. Chem. 31: 426-428.
- [8] Abdeslahian, P., Samat, N., Hamid, A.A. and Yusoff, W.M.W., 2010, Utilization of palm kernel cake for production of β -mannanase by *Aspergillus niger* FTCC 5003 in solid substrate fermentation using an aerated column bioreactor, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 37: 103-109.
- [9] How, S.P. and Ibrahim, C.O., 2004, Selection and optimization of lipase production from *Aspergillus flavus* USM A10 via solid state fermentation (SSF) on rice husks and wood dusts as substrates, Pak. J. Bio. Sci. 7: 1249-1256.
- [10] Ramesh, M.V. and Lonsane, B.K., 1990, Critical importance of moisture content of the medium in alpha-amylase production by *Bacillus licheniformis* M27 in solid-state fermentation system, Appl. Microb. Biotechnol. 3: 201-205.
- [11] Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G. and Pandey, A., 2005, Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation, Process Biochem. 40: 2689-2694.
- [12] Pang, P. K. and Ibrahim, C. O. , 2005, Xylanase production by a local fungal isolate, *Aspergillus niger* USM AI 1 via solid state fermentation using palm kernel cake (PKC) as substrate, Songklanakarin J. Sci. Technol. 27: 325-336.
- [13] Ibrahim, D., Puspitaloka, H., Abdul Rahim, R. and Sheh Hong, L., 2012, Characterization of solid state fermentation culture conditions for growth and mananase production by *Aspergillus niger* USM F4 on rice husk in tray system, Br. Biotechnol. J. 2: 133-145.
- [14] Dhawan, S. and Kaur, J., 2008, Microbial mannanases: An overview of production and applications, Crit. Rev. Biotechnol. 27: 197-216.
- [15] Ong, L.G.A., 2006, Production of Mannan-degrading Enzymes by *Aspergillus niger* in Solid State and Submerged Fermentation for Hydrolysis of Palm Kernel Cake, Doctoral Dissertation, University Putra, Selangor, 191p.
- [16] Mohamad, S. N. , Ramanan, R. N. , Mohamad, R. and Ariff, A. B. , 2011, Improved mannan- degrading enzymes' production by *Aspergillus niger* through medium optimization, New. Biotechnol. 28: 146-152.