Thesis Title	Quality Improvement of Coconut Meal by Enzyme for Applications in Feed Production	
Author	Mr. Chatchai Sa-nguansook	
Master of Science	Biotechnology	
Examining Committee	Lect.Dr. Chartchai Khanongnuch	Chairman
	Assoc.Prof.Dr. Saisamorn Lumyong	Member
	Assoc.Prof.Dr. Suchon Tangtaweewipat	Member
	Asst.Prof.Dr. Narin Thongwittaya	Member

ABSTRACT

β-Mannanase was produced by *Bacillus subtilis* 5H in jar fermentor using the production medium containing 0.5% (w/v) locust bean gum as a carbon source. β-mannanase obtained (4 units/ml), was partial purified by ammonium sulphate precipitation and DEAE-cellulose column chromatography. The partial purified enzymes had a specific activity of 241 units/mg-protein and showed the same hydrolysis level with crude enzymes and the purified β-mannanase, when coconut meal (CM) was used as a substrate, and released oligosaccharides about 12% hydrolysis with the optimal condition of 60 hour hydrolysis at 37°C using the ratio of β-mannanase (Unit) : CM (g) : distilled water (ml) at 1 : 5 : 75.

The enzymatic treated coconut meal (ETCM) prepared by CM hydrolysis with the crude β-Mannanase at optimal condition. The hydrolysis product from action of the enzyme on CM analyzed by thin layer chromatography were various size of manno-oligosaccharides (MOS) with average 6 degree of polymerization (DP). Furthermore, study for the sugar composition, the main component of MOS was mannose with the trace amount of galactose.

The nutritive values and utilization of ETCM and non-enzymatic treated coconut meal (NTCM) in broiler feeding was measured. The ETCM showed a markedly reduction in crude fiber (CF) from 34.53 to 20.53%, while an ether extract (EE) and nitrogen free extract (NFE) composition were increased from 18.75 to 29.25% and 37.45 to 43.10%, respectively. The metabolizable energy (ME) value of diets with ETCM, measured by using *in vivo* bioassay, were also increased significantly from 3.218 to 3.751 kcal/g when compared to the NTCM. The high of ME values of the ETCM was showed a possibility for reduced the lipid source ingredient of the experiment diets. Furthermore, the digestibility of nutrient components of ETCM was also improved. The digestibility of dry matter, protein, lipid and fiber were increased, especially, the fiber which was improved of 71.98% from 45.35%. Where as nitrogen free extract digestibility was reduced in the ETCM diet.

ETCM and NTCM were used as feed ingredient in broiler diets, using 300 broilers of 7-day old, straight-run Arbre Acre 707 and completely randomized (CRD) design was employed. The experimental were randomly allocated into 5 groups, with 3 replicates. Different levels of each CM as 0, 15 and 20% randomized to mix in diets for feeding at starter (2-3 weeks), grower (4-6 weeks) and finisher (7 weeks) periods throughout the experiment. Which each formulates of diets were adjusted with the isocaloric (3,200 kcal/kg) and protein content were equal with 21% crude protein (CP) in the starter, 19% CP in the grower and 17% CP in the finisher. The findings of this study are:

Body weight gain of broilers was no significantly difference ($P>0.05$) at grower and finisher periods of broilers fed with ETCM, NTCM containing 15 and 20% of each CM mixed and the control diet.

All three periods have a similar result as there was significantly difference ($P<0.05$) in feed consumption. Broiler fed diets containing ETCM and NTCM all of level significantly decreased of feed consumption compared with the control diet.

Feed conversion ratio (FCR) of broilers fed with 15 and 20% ETCM significantly different ($P<0.05$) compared with control diet. Fed diets containing ETCM showed the highest positive effect to FCR ($P>0.05$) at finisher period at all addition levels compare to those obtained from NTCM group.

Mortality (%) of the broilers were significantly decreased when fed diets containing ETCM compare to that of NTCM and control groups. Moreover, the high of ME values of ETCM was showed a possibility to reduce the cost of broiler production.

The total number of Enterobacteriaceae and lactic acid bacteria in feces of all diets group were not different, while the total *E. coli* and *Salmonella* sp. count in feces of broiler fed with ETCM was lower significantly and was decreased to the lowest after 4 weeks.

These results are able to indicate that the β-mannanase enzyme can improve the quality of CM. The 20% of ETCM is possible to used for mixed in the broiler diets without adverse effects on production performance in both grower and finisher periods of broiler raising. The use of ETCM containing oligosaccharides released from CM by β-Mannanase hydrolysis is alternative to substituted antibiotics for maintenanced of a healthy gut flora in broiler.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การปรับปรุงคุณภาพของกากมะพร้าวโดยเอนไซม์เพื่อใช้ในการผลิตอาหารสัตว์	
ชื่อผู้เขียน	นายฉัตรชัย สงวนสุข	
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ	
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	อ.ดร. ชาติชาย โขนงนุช	ประธานกรรมการ
	รศ.ดร. สายสมร ลำยอง	กรรมการ
	รศ.ดร. สุชน ตั้งทวีวิพัฒน์	กรรมการ
	ผศ.ดร. นรินทร์ ทองวิทยา	กรรมการ

บทคัดย่อ

เอนไซม์เบตาแมนนาเนสที่ใช้ในการทดลอง ได้มาจากการเลี้ยง *Bacillus subtilis* 5H ในถังหมัก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบไปด้วย locust bean gum 5 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อได้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 4 ยูนิต/มิลลิลิตร เอนไซม์เบตาแมนนาเนสที่เตรียมได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วน โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และ DEAE-cellulose column chromatography เอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ขึ้นบางส่วนแล้ว มีค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) เท่ากับ 241 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน และมีระดับความสามารถของการย่อยเบตาแมนแนนในกากมะพร้าวได้เหมือนกับ crude enzyme และเอนไซม์บริสุทธิ์ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเป็นน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ประมาณ 12 % w/w ของกากมะพร้าว ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยกากมะพร้าวด้วยเอนไซม์ คือ การใช้อัตราส่วนของ เอนไซม์ / กากมะพร้าว / น้ำกลั่น เป็น 1 ยูนิต / 5 กรัม / 75 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 60 ชั่วโมง

กากมะพร้าวที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ (ETCM) ถูกเตรียมโดยการย่อยกากมะพร้าวด้วยเอนไซม์เบตาแมนนาเนสในสภาวะที่เหมาะสม จากการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยโดย thin layer chromatography พบว่าเกิดผลิตภัณฑ์เป็นแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลประมาณ 6 หน่วย และองค์ประกอบของโอลิโกแซคคไรด์ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลแมนโนส และมีน้ำตาลกาแลคโตสปะปนเล็กน้อย

ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนะแบบหยาบ (proximate analysis) พบว่าปริมาณเยื่อใยของ ETCM ลดลงจาก 34.53 เป็น 20.53% ในขณะที่ไขมันและไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรกเพิ่มขึ้นจาก

18.75 เป็น 29.25% และ 37.45 เป็น 43.10% เมื่อเทียบกับกากมะพร้าวชนิดที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ (NTCM) ตามลำดับ และเมื่อทำการตรวจวัดค่าพลังงานใช้ประโยชน์ และค่าการย่อยได้ของ ETCM ในไก่ทดลอง พบว่ามีค่าพลังงานใช้ประโยชน์ได้เพิ่มขึ้นจาก 3.218 เป็น 3.751 kcal/g เมื่อเปรียบเทียบกับ NTCM พลังงานที่เพิ่มขึ้นนี้สามารถใช้ทดแทนการใช้วัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เป็นแหล่งไขมันในอาหารทดลองได้ มากไปกว่านั้น ความสามารถในการย่อยได้ของ วัตถุแห้ง, โปรตีน, ไขมัน และเยื่อใย ใน ETCM ยังเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการย่อยได้ของเยื่อใยเพิ่มขึ้นจาก 45.35 เป็น 71.98% แต่ในขณะเดียวกันค่าการย่อยได้ของไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรกกลับมีค่าลดลง

เมื่อนำ ETCM และ NTCM ไปใช้เป็นส่วนผสมในอาหารไก่เนื้อ โดยทดลองในไก่เนื้ออายุ 7 วัน จำนวน 300 ตัว สายพันธุ์ Arbre Acre 707 แบ่งออกโดยสุ่มเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 3 ซ้ำ โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอดสมบูรณ์ อาหารทดลองประกอบด้วย กลุ่มอาหารควบคุม และกลุ่มอาหารที่มีกากมะพร้าวแต่ละชนิดที่ระดับ 15 และ 20% โดยปรับค่าพลังงานใช้ประโยชน์เท่ากับ 3.2 kcal/g ในทุกช่วงของการทดลอง และปริมาณโปรตีนเท่ากับ 21, 19 และ 17% ในช่วงไก่เล็ก (2-3 สัปดาห์), ไก่รุ่น (4-6 สัปดาห์) และไก่ขุน (7 สัปดาห์) ตามลำดับ ผลปรากฏว่า ไก่เนื้อที่ได้รับอาหารผสม ETCM, NTCM ทั้งระดับ 15 และ 20% และอาหารควบคุม มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยในช่วงไก่รุ่น, ไก่ขุน และช่วงสุดท้ายของการทดลองไม่แตกต่างกัน (P>0.05) การให้ไก่เนื้อได้รับอาหารผสม ETCM และ NTCM ที่ระดับมากกว่า 15% จะทำให้ไก่กินอาหารลดลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในทุกๆ ช่วงอายุไก่ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม การใช้ ETCM ในสูตรอาหารที่ระดับ 15 และ 20% มีผลทำให้อัตราการแลกน้ำหนัก (FCR) ของไก่ดีขึ้น (P<0.05) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และมีแนวโน้มจะดีกว่าการใช้ NTCM ในสูตรอาหารที่ช่วงสุดท้ายของการทดลอง การตายของไก่เนื้อ พบว่าการให้อาหารที่มี ETCM เป็นส่วนผสมทำให้การตายลดลง เปรียบเทียบกับกลุ่ม NTCM และกลุ่มอาหารควบคุม ยิ่งไปกว่านั้นการใช้ ETCM ในสูตรอาหารยังทำให้ราคาค่าอาหารต่อหน่วยกิโลกรัมลดลงอีกด้วย

จากการตรวจสอบจุลินทรีย์ในมูลไก่พบว่า จำนวน Enterobacteria และแลคติคแบคทีเรียในมูลของกลุ่มที่ให้อาหารแต่ละชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน ส่วนจำนวนจุลินทรีย์ *E. coli* และ *Salmonella sp.* ในมูลลดลงอย่างเห็นได้ชัดหลังทดลองไปได้ 4 สัปดาห์ เมื่อไก่ได้รับอาหารผสม ETCM ดังนั้นเอนไซม์เบตาแมนนาเนสสามารถปรับปรุงคุณภาพของกากมะพร้าวให้ดีขึ้น และจากการทดลองสามารถใช้ ETCM ในอาหารระดับ 20% ได้โดยไม่ก่อให้เกิดผลเสียด้านการผลิต ยิ่งไปกว่านั้นอาหาร ETCM ที่มีโอลิโกแซคคาไรด์เป็นองค์ประกอบ ยังมีคุณสมบัติเป็นสารเสริมในการควบคุมความสมดุลจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะในอาหารสัตว์