การสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากขนุนในระดับห้องปฏิบัติการ ระดับโรงงานทดลองและการประเมินสมบัติการทนต่อการย่อยในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหาร

Non-reducing Sugar Extraction in Laboratory and Pilot Plant Scale and Evaluation of the Resistance to Digestion in Simulated Upper Gut Condition

เกตุชุลี ถึงจอหอ

Ketchulee Thungchoho

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Food Science and Technology
Prince of Songkla University

2555

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากขนุนในระดับห้องปฏิบัติการ ระดับโรงงานทดลอง และการประเมินสมบัติการทนต่อการย่อยในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหาร

ผู้เขียน นางสาวเกตุชุลี ถึงจอหอ

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล วุฒิจำนงค์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ดร.สันทัด วิเชียรโชติ)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ดร.สุนิสา ศิริพงศ์วุฒิกร)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ชูฤทธิ์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล วุฒิจำนงค์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ผกามาศ เจษฎ์พัฒนานนท์) (ดร.สันทัด วิเชียรโชติ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ผกามาศ เจษฎ์พัฒนานนท์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากขนุนในระดับห้องปฏิบัติการ ระดับโรงงานทดลองและการประเมินสมบัติการทนต่อการย่อยในระบบทางเดินอาหารจำลอง
ผู้เขียน นางสาวเกตุชุลี ถึงจอหอ
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา 2555

บทคัดย่อ

งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า สารสกัดจากเนื้อขนุนประกอบด้วยสารกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีน้ำตาลมอนอเมอร์มาต่อกัน (degree of polymerization, DP) จำนวน 6 หน่วย และสารดังกล่าวสามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ ซึ่งเป็นสมบัติของพรีไบโอติก งานวิจัยนี้ จึงเลือกศึกษาการสกัดจากขนุนพันธุ์ทองสุดใจที่มีราคาถูกกว่าพบว่าองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อและซังขนุนพันธุ์ทองสุดใจ ได้แก่ ปริมาณความชื้น เถ้า โปรตีนและคาร์โบไฮเดรตใกล้เคียงกัน ยกเว้นปริมาณไขมัน ซึ่งพบว่าซังขนุนมีปริมาณมากกว่า โดยเนื้อขนุนมีความชื้น เถ้า โปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 78.48, 0.65, 0.88, 0.20 และ 19.78 สำหรับซังขนุน พบว่ามีค่าร้อยละ 79.33, 0.79, 1.13, 0.62 และ 18.13 ตามลำดับ เนื้อและซังขนุนประกอบด้วยน้ำตาลฟรุกโทส กลูโคสและซูโครส โดยที่เนื้อขนุนมีปริมาณสูงกว่า จากการสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งในห้องปฏิบัติการพบว่า การอบแห้งด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำให้ความชื้นในเนื้อและซังขนุนลดลงร้อยละ 68.44 และ 63.41 ปริมาณสารที่สกัดได้จากตัวอย่างเนื้อขนุนสดมากกว่าตัวอย่างแห้งอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ความเข้มข้นของตัวทำละลาย (เอทานอลร้อยละ 50 และ 95) และลักษณะการกวน (กวนเป็นครั้งคราวและกวนต่อเนื่อง 250 รอบต่อนาที) ไม่มีผลต่อปริมาณสารที่สกัดได้อย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) ปริมาณสารสกัดที่ได้จากซังขนุนสดที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ที่มีการกวนต่อเนื่องและซังขนุนแห้งที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 ที่มีการกวนทั้งสองแบบมีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งพบว่า เนื้อขนุนมีปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้สูงสุด (สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 และกวนต่อเนื่อง) มากกว่าซังขนุนซึ่งมีค่าเท่ากับ 321.52 กรัมต่อกิโลกรัม และ 126.89 กรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) พบว่าน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้จากเนื้อขนุนประกอบด้วยโอลิโกแซคคาไรด์ 2 ชนิดคือโอลิโกแซคคาร์ไรด์ที่มี DP=4 และ DP=6-7 ร้อยละ 11.11 และ 2.18 ของปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ตามลำดับ นอกจากนี้ สารสกัดจากเนื้อขนุนยัง

ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นนอนรีดิวซิ่งในปริมาณสูง คือร้อยละ 44.82 และประกอบด้วยน้ำตาลรีดิวซิ่ง 2 ชนิดคือน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโทส คิดเป็นร้อยละ 25.02 และ 16.87 ตามลำดับ

เนื่องจากเนื้อขนุนมีปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งสูงกว่าซังขนุน จึงคัดเลือกเนื้อขนุนไปศึกษาผลของอุณหภูมิ เวลาและอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่อตัวทำละลาย (เอทานอล) ซึ่งออกแบบการทดลองแบบ Box-bhenken design ด้วยวิธีการแสดงผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิว (Response surface methodology, RSM) การคำนวณด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์โดยใช้ข้อมูลการสกัดที่ได้จากการทดลองพบว่าสภาวะที่สกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งได้สูงสุด (414.50 กรัมต่อกิโลกรัมสารสกัด) คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลาสกัด 60 นาที อัตราส่วนตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1 ต่อ 9 ซึ่งผลการทดลองซ้ำในห้องปฏิบัติการพบว่าสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งได้ 453.28 กรัมต่อกิโลกรัมสารสกัด จากการสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งด้วยเครื่องสกัดแบบกะขนาดโรงงานทดลองด้วยสภาวะเดียวกันพบว่า น้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้มีค่า 57.58 กรัมต่อลิตร ซึ่งต่ำกว่าการสกัดในห้องปฏิบัติการ

ผลการศึกษาการทนต่อการย่อยของน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งซึ่งใช้เป็นตัวแทนของโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อขนุนในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหาร พบว่าน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากสารสกัดเนื้อขนุนทนต่อการย่อยได้น้อยกว่าอินนูลิน และมีค่าร้อยละของการย่อยภายใต้สภาวะจำลองในปาก กระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก เท่ากับร้อยละ 0, 10.35 และ 52.18 ตามลำดับ ดังนั้น ปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่ทนต่อการย่อยและสามารถผ่านไปถึงลำไส้ใหญ่ได้คือร้อยละ 34.47

Thesis Title Non-reducing sugar extraction in laboratory and pilot plant scale and evaluation of the resistance to digestion in simulated upper gut condition.

Author Ketchulee Thungchoho

Major Program Food Science and Technology

Academic Year 2012

Abstract

Previous research showed that jackfruit bulb (*Artocarpus heterophyllus*; Thongpresert cultivar) extract contains oligosaccharide with a degree of polymerization (DP) 6 and it could enhance the growth of probiotics which are a benefit bacteria in the colon. The results from this research by using the cheaper cultivar (Thongsudjai cultivar) showed that chemical compositions in bulb and fiber jackfruit (Thongsudjai cultivar) were almost the same. Moisture, ash, protein, lipid and carbohydrate contents in bulb was 78.48%, 0.65%, 0.88%, 0.20% and 19.78%, respectively and all contents in fiber was 79.33%,0.79%,1.13%, 0.62% and 18.13%, respectively. They were composed to fructose, glucose and sucrose but it was higher in bulb. Non-reducing sugar extraction which represented as oligosaccharide in laboratory scale found that air drying at 50^{o}C for 18 hour reduced moisture in bulb and fiber to 68.44% and 63.41%, respectively. Using dried sample induced to get significantly lower (P<0.05) extraction yield than fresh sample while stirring (intermittent, interval 30 minute and continuous stirring, 250 rpm) and solvent concentration (50% and 95% ethanol) were not significantly affected (P>0.05) to extraction yield. The highest content of non-reducing sugar obtained from bulb (95% ethanol with continuous stirring) was higher than fiber with the value of 321.52 and 126.89 g/kg, respectively. High performance liquid chromatography (HPLC) showed that non-reducing sugar in jackfruit bulb extract composed of oligosaccharide DP4 and DP 6-7 in a concentration of 11.11% and 2.18% of total sugar. In addition, it composed of sucrose , glucose and fructose 44.82%, 25.02% and 16.87%, respectively. Due to the higher of non-reducing sugar content, jackfruit bulb was selected to study the effect on temperature, time extraction and sample to solvent ratio by Box-bhenken experimental design in response surface methodology. Computor calculation by mention with the datas from experimentals was found the highest non-reducing sugar content (414.50 g/kg) could be extract at 30^{o}C for 60 minute with a ratio of sample to solvent 1:9 and the value of

repeatable extraction in laboratory was 453.28 g/kg. However, it was found that non-reducing sugar content from the same condition extraction in pilot plant (57.58 g/L) was lower than laboratory scale.

The hydrolysis resistance showed that non-reducing sugar which was representative of oligosaccharide was lower than inulin. The non-reducing sugar in this experiment was hydrolyzed in the simulated condition such as mouth, stomach and and small intestine as 0%, 10.35% and 52.18%, respectively. However, about 34.47% of remaining part could reach to the colon.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) (5)

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) (7)

กิตติกรรมประกาศ (9)

สารบัญ..... (10)

LIST OF TABLES..... (12)

LIST OF APPENDIX TABLES..... (13)

LIST OF FIGURES..... (14)

LIST OF APPENDIX FIGURES..... (16)

บทที่

1. บทนำ.....

บทนำต้นเรื่อง..... 1

การตรวจเอกสาร..... 3

1. ขนุน (Jackfruit)..... 3

1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของขนุน..... 3

1.2 ขนุนพันธุ์ในประเทศไทย..... 4

1.3 ขนุนพันธุ์ทองสุดใจ..... 5

2. ฟังชันนัลฟู้ดส์ (Functional foods)..... 6

3. พรีไบโอติก (Prebiotics)..... 11

3.1 คุณสมบัติของพรีไบโอติก..... 11

3.2 ประโยชน์ของพรีไบโอติกต่อสุขภาพ..... 11

4. คาร์โบไฮเดรตมวลโมเลกุลต่ำ (Low molecular weight carbohydrates) และโอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้ (Non-digestible oligosaccharides; NDOs)..... 14

4.1 แหล่งที่มาของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้..... 18

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์..... 20

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar analysis) ด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid method..... 20
4.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่ง (Reducing sugar analysis) ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid mehtod และการหาปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่ง (Non-reducing sugar)..... 21
4.5 การสกัดโอลิโกแซคคาไรด์..... 22
5. การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)..... 23
5.1 การสกัดแบบกะเพียงขั้นตอนเดียว..... 23
5.2 หลักการทั่วไปของการสกัด..... 23
5.3 หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกชนิดของตัวทำละลาย..... 25
5.4 อุณหภูมิในการสกัด..... 26
5.5 สมดุลในการสกัด..... 26
6. ปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายเทมวลของตัวถูกละลาย..... 27
6.1 ระยะเวลาในการสกัด..... 27
6.2 ขนาดอนุภาคของของแข็ง..... 27
6.3 ตัวทำละลายที่ใช้..... 27
6.4 อุณหภูมิในการสกัด..... 27
6.5 ลักษณะของวัตถุดิบ..... 28
7. วิธีการแสดงผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิว (Response Surface Methodology; RSM)..... 29
วัตถุประสงค์..... 31
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ
วัสดุอุปกรณ์..... 32
วิธีการ..... 36
3. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 43
4. บทสรุปและข้อเสนอแนะ..... 69
เอกสารอ้างอิง..... 72
ภาคผนวก..... 81
ประวัติผู้เขียน..... 101

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Proximate analysis and nutrient compositions of matured bulb, fiber and seed of jackfruit (based on 100 g wet basis).....	4
2.	Wholesale price of jackfruit Thongprasert and Thongsudjai cultivars.....	5
3.	Indigestible polysaccharide concentrations in some Thai plants.....	7
4.	Comparing functional foods with medical food and drugs.....	9
5.	Oligosaccharides used in food products.....	15
6.	Enzymes produced by colonic microflora in colon to hydrolyze non-digestible oligosaccharides.....	18
7.	Code variable of independent variables in Box-behnken design.....	39
8.	Experimental treatment of solvent ratio, extraction temperature and time using Box-behnken design.....	40
9.	Proximate analysis of bulb and fiber of jackfruit Thongsudjai cultivar (% wet basis).....	43
10.	Moisture content of fresh and dried bulb and fiber of jackfruit.....	45
11.	Non-reducing sugar contents of treatment using experimental design by Box-behnken with RSM technique.....	53
12.	Coefficient values of each factors which were investigated.....	54
13.	Predicted non-reducing sugar content which calculated by computer program and three replicated observing values from laboratory scale.....	58
14.	Percentage of non-digestible oligosaccharides from jackfruit bulb and inulin after hydrolysis in simulated upper gut conditions.....	68

LIST OF APPENDIX TABLES

Table	Page
15. Glucose standard preparation for reducing sugar analysis.....	82
16. Glucose standard preparation for total sugar analysis.....	82
17. Sample solution preparation for sugar analysis.....	83
18. Chemical compositions of artifitial human saliva.....	84
19. Chemical compositions of hydrochloric acid buffer.....	84
20. Extraction yield (%), total sugar, reducing sugar and non-reducing sugar content (g/kg extract) of fresh and dried jackfruit bulb and fiber ethanolic extracts under intermittent (interval 30 minute) and continuous stirring (250 rpm) for 3 hour at room temperature (sample to solvent ratio, 1:3 w/v).....	86
21. Extraction yield (%) of jackfruit bulb with ethanol 95%, at sample to solvent ratio of 1:9 (w/v) under room temperature (30 ± 2^{o}C) for 1 hour in pilot plant scale.....	88
22. Total sugar, reducing suagr and non-reducing sugar content (mg/ml extract) of jackfruit bulb obtained from ethanol 95% extraction, at sample to solvent ratio of 1:9 (w/v) under room temperature (30 ± 2^{o}C) for 1 hour in pilot plant scale.....	88
23. Percentage of hydrolysis of inulin and jackfruit oligosaccharides hydrolyzed by human saliva α –amylase (0.33 units/ml, pH 6.8) at 37^{o}C for 40 min.....	89
24. Percentage of hydrolysis of inulin and jackfruit oligosaccharides hydrolyzed by artificial gastric juice (HCl buffer, pH 2.0) at 37^{o}C for 240 min.....	89
25. Percentage of hydrolysis of inulin and jackfruit oligosaccharides hydrolyzed by porcine pancrease α –amylase (0.75 units/ml, pH 6.9) at 37^{o}C for 6 hour.....	90

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Beverage lead global market for functional foods, growth by form, 2007-2013F ($M) (a); Energy leads US market for function foods, growth by benefit, 2007-2012F ($M) (b) and soft drink and dairy leads US market for functional foods, growth by category, 2007-2012F ($M) (c).....	10
2.	Action mechanism of prebiotic.....	12
3.	Batch extractors; a) oil extractor from plant seeds and b) leaching extractor used in sugar extraction from beet root.....	24
4.	Three dimension of surface plot (a) and contour plot (b) in response surface methodology method.....	30
5.	Three dimension picture of pilot plant scale batch extractor.....	33
6.	Photo of external (a) and inner (b) of extraction tank used in this study	34
7.	Photo of extraction tank set up; a) sample bucket, b) sample sieve and (c) installed bucket.....	34
8.	Photo of (a) big and (b) small evaporator.....	35
9.	Photo of condenser (a) heater tank (b) and trap column (c) of batch extractor.....	36
10.	Extraction yield (%) of jackfruit bulbs under intermittent (interval 30 minute) and continuous stirring (250 rpm) at room temperature for 3 hour with sample to solvent ratio at 1:3. *Different small letters above each column show significant* differences of value (P<0.05).....	45
11.	Extraction yield (%) of jackfruit fibers under intermittent (interval 30 minute) and continuous stirring (250 rpm) at room temperature for 3 hour with sample to solvent ratio at 1:3. *Different small letters above each column show significant* differences of value (P<0.05).....	47

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

12. Non-reducing sugar contents of jackfruit bulb (a) and fiber extracts (b) under intermittent (interval 30 minute) and continuous stirring (250 rpm) at room temperature for 3 hour with sample to solvent ratio at 1:3. *Different small letters above each column show significant* differences of value (P<0.05)..... 49
13. HPLC chromatogram of mono-, di- and oligosaccharides in jackfruit bulb extract..... 51
14. Comparision on non-reducing sugar content of predicted and observed values obtained from experiments in the same conditions..... 54
15. Contour plot of extraction temperature and extraction time on non-reducing sugar contents at sample to solvent ratio of a) 1:3, b) 1:6 และ c) 1:9..... 56
16. Extraction yield (%) of jackfruit bulb extract in pilot plant scale under room temperature with sample and solvent at a ratio of 1:9 (w/v)..... 58
17. Total sugar, reducing sugar and non-reducing sugar content of jackfruit bulb extract in pilot plant scale under room temperature with sample and solvent at a ratio of 1:9 (w/v). * The value obtained from calculation by the difference of total sugar and reducing sugar content..... 60
18. Characteristic of sample before and after extraction; (a) prepared fresh sample, (b) laboratory scale extracted sample, (c) pilot plant scale extracted sample at surface and (d) pilot plant scale extracted sample at bottom..... 60
19. Remaining of non-reducing sugar content from jackfruit bulb extract to human saliva α –amylase (0.33 units/ml, pH 6.8) at 37^{o}C for 40 min..... 63
20. Remaining of non-reducing sugar content from jackfruit bulb extract to artificial gastric condition in HCl buffer (pH 2.0) at 37^{o} for 240 min..... 64
21. Remaining of non-reducing sugar content from jackfruit bulb extract to porcine pancrease α-amylase (0.75 units/ml, pH 6.9) at 37^{o}C for 6 hour..... 66

LIST OF APPENDIX FIGURES

Figure **Page**

22. Chromatogram of mono- and disaccharide content in fresh bulb (a) and fiber (b) of jackfruit analyzed by HPLC..... 86
23. Standard curve of total sugar..... 97
24. Standard curve of reducing sugar..... 98

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ในยุคปัจจุบัน ผู้บริโภคมีความใส่ใจและตระหนักถึงความสำคัญของการมีสุขภาพที่ดี นิยมบริโภคอาหารที่มาจากธรรมชาติและมีพฤติกรรมการบริโภคเพื่อป้องกันหรือลดความเสี่ยงในการเกิดโรคบางชนิด ด้วยเหตุนี้จึงส่งผลให้ตลาดอาหารเพื่อสุขภาพหรือฟังชันนัลฟู้ดส์ (functional food) เติบโตเพิ่มมากขึ้น จากข้อมูลการวิจัยของ Freedonia ซึ่งเป็นบริษัทผู้ให้บริการข้อมูลสินค้าและการตลาดโลกพบว่า ในอนาคตกลุ่มอาหารเพื่อสุขภาพมีแนวโน้มได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอาหารในกลุ่มโปรตีนถั่วเหลือง ใยอาหารจากซีลเลียม (Psyllium) กรดไขมันโอเมกา-3 โพรไบโอติก ไลโคพีน แคลเซียมและแมกนีเซียม สำหรับอาหารที่มีการผสมวิตามินคาดว่าจะขยายตัวขึ้นถึงร้อยละ 5.9 หรือคิดเป็นมูลค่าประมาณ 7,100 ล้านเหรียญสหรัฐ และผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรหรือสมุนไพรสกัดคาดว่าจะเติบโตขึ้นถึงร้อยละ 6.2 หรือมีมูลค่ากว่า 2,200 ล้านเหรียญสหรัฐ ในปี พ.ศ. 2556 ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ตลาดอุตสาหกรรมของโลก คาดว่าตลาดพรีไบโอติก (prebiotics) ในแถบยุโรปอาจมีมูลค่าสูงถึง 1.2 พันล้านเหรียญสหรัฐในขณะที่ตลาดในแถบอเมริกาจะมีมูลค่าสูงกว่า 225 ล้านเหรียญสหรัฐในปี 2015 (Neutraceutical World, 2010) ตัวอย่างอาหารที่จัดเป็นฟังชันนัลฟูดส์ ได้แก่ โพรไบโอติก (probiotic) พรีไบโอติก สารต้านออกซิเดชัน และกรดอะมิโน เป็นต้น (Holm, 2003 อ้างโดย ปิ่นมณี ขวัญเมือง, 2543)

พรีไบโอติกเป็นสารคาร์โบไฮเดรตที่มีบทบาทสำคัญและได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย และเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโพรไบโอติก ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ ช่วยลดจำนวนแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ได้ ช่วยเพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุในร่างกาย ต่อต้านการเกิดมะเร็ง และช่วยรักษาระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดให้เป็นปกติ เป็นต้น (Gibson and Rastall, 2006) นอกจากนี้ สารพรีไบโอติกได้ถูกนำมาใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหาร (Nakakuki, 2002) เช่น ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำผลไม้ ผลิตภัณฑ์นมหมักและผลิตภัณฑ์ซินไบโอติก (synbiotic) ได้แก่ ไอศกรีม โยเกิร์ต ผลิตภัณฑ์อาหารหวาน ได้แก่ เยลลี่ พุดดิ้ง ผลิตภัณฑ์ลูกกวาด และผลิตภัณฑ์ขนมอบ เป็นต้น (Mussatto *et al*., 2007) โดยสามารถใช้เป็นสารให้ความหวานที่ให้พลังงานต่ำ ทดแทนการใช้ซูโครส ทำให้อาหารมีกลิ่นรสดีขึ้น ใช้ปรับปรุงเนื้อสัมผัสของอาหารและรสสัมผัสภายในปาก (mouthfeel) ใช้ปรับจุดเยือกแข็งใน

ผลิตภัณฑ์อาหารแช่เยือกแข็ง ใช้ควบคุมความเข้มของสีเนื่องจากปฏิกิริยาสีน้ำตาล(browning reaction) หรือปฏิกิริยาเมลลาร์ด (mailard reaction) ในการผลิตอาหารที่ต้องใช้ความร้อน เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม อุตสาหกรรมอาหารในปัจจุบัน ส่วนใหญ่ใช้พรีไบโอติกที่ได้จากการสังเคราะห์ ในขณะที่พืชหลายชนิดเช่น หัวหอม กล้วย หน่อไม้ฝรั่ง แก้วมังกร ถั่วหรือธัญพืชต่างๆ พบว่าสามารถสังเคราะห์สารพรีไบโอติกได้เองตามธรรมชาติ งานวิจัยด้านพรีไบโอติกจากธรรมชาติจึงเริ่มได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น Wichienchot และคณะ (2011) ได้ศึกษาการสกัดและสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของพืชไทยในภาคใต้จำนวน 13 ชนิด โดยใช้ส่วนต่างๆของพืชรวม 28 ส่วน จากการวิจัยพบว่า สารสกัดจากเนื้อและเมล็ดขนุนพันธ์ทองประเสริฐมีสมบัติการเป็นพรีไบ-โอติกที่ดีและมีศักยภาพสูงที่จะนำไปพัฒนาต่อในระดับอุตสาหกรรมได้ แต่เนื่องจากขนุนพันธุ์นี้มีราคาแพง ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมีความสนใจที่จะศึกษากระบวนการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกจากขนุนพันธุ์ทองสุดใจ ซึ่งหาได้ง่ายจากท้องตลาด และมีราคาถูกกว่าขนุนพันธุ์ทองประเสริฐ แม้ว่าความแตกต่างในด้านสายพันธุ์อาจส่งผลต่อปริมาณพรีไบโอติกที่สกัดได้ แต่หากขนุนพันธุ์ทองสุดใจสามารถใช้เป็นแหล่งพรีไบโอติกที่ดีในอนาคตได้ งานวิจัยนี้จึงอาจนำไปสู่การผลิตพรีไบโอติกที่ใช้ต้นทุนในการผลิตต่ำลง ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิตสารจำนวนมากเพื่อนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม โดยงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและระดับโรงงานทดลอง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สามารถสกัดน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharide) ได้ปริมาณสูงสุด รวมถึงการแยกสารที่สกัดได้ให้บริสุทธิ์และการทดสอบคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติก อันจะเป็นประโยชน์ในการศึกษาต่อไปในระดับอุตสาหกรรม และเป็นต้นแบบแนวทางในการวิจัยการศึกษากระบวนการสกัดสารพรีไบโอติกจากธรรมชาติในอนาคต

การตรวจเอกสาร

1. ขนุน (Jackfruit)

1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของขนุน

ขนุนเป็นไม้ผลเขตร้อนที่มีถิ่นกำเนิดมาจากอินเดียและคาบสมุทรมาเลเซีย จัดอยู่ในกลุ่ม Moraceae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Artocarpus herterophyllus* ลำต้นค่อนข้างกลม มีขนาดใหญ่ สามารถเจริญเติบโตได้ดีในทั่วทุกภาค น้ำหนักผลแก่ทั่วไปอยู่ระหว่าง 10-25 กิโลกรัม หรืออาจมากถึง 50 กิโลกรัม ในฤดูผลผลิต ขนุนจะออกสู่ตลาดตั้งแต่เดือนมกราคมถึงเดือนพฤษภาคม ขนุนนอกฤดูจะออกสู่ตลาดช่วงเดือนมิถุนายนถึงเดือนตุลาคม แหล่งปลูกที่สำคัญได้แก่ ชลบุรี ระยอง ปราจีนบุรี ชุมพร ประจวบคีรีขันธ์ สงขลา กาญจนบุรี และเพชรบุรี เป็นต้น (พานิชย์ ยศ-ปัญญา, 2542) ขนุนสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย ทั้งผลอ่อนและผลสุก สามารถบริโภคเป็นผลไม้สดหรือแปรรูปเป็นขนุนอบกรอบและบรรจุกระป๋องเพื่อจำหน่ายภายในประเทศและส่งออกต่างประเทศ เมล็ดขนุน สามารถนำมาต้มรับประทาน หรือผลิตเป็นแป้งเพื่อใช้ทดแทนแป้งสาลีในผลิตภัณฑ์ (กนกวรรณ สิทธิ์ธนังกูล, 2542 อ้างโดย กาญจนา เหลืองสุวาลัย, 2552) ส่วนเปลือกและซังสามารถนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ (นฤมล มานิพพาน, 2547 อ้างโดย กาญจนา เหลืองสุวาลัย, 2552) เป็นต้น

โดยทั่วไป ผลขนุนมีรูปรีหรือกลม เนื้อสีเหลืองหรือสีดอกจำปา มีกลิ่นหอม ผลประกอบด้วย เนื้อ เมล็ดและเปลือกร้อยละ 29, 12 และ 59 ตามลำดับ (Bhatia *et al*, 1995) ปริมาณแป้ง น้ำตาลทั้งหมด และน้ำตาลรีดิวซ์ในขนุนสุกและดิบ มักมีปริมาณที่แตกต่างกัน ความแตกต่างของขนุนแต่ละสายพันธุ์ มักขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่าง ขนาดของหนามบนเปลือก ยางขนุน ขนาดและสีของยวงขนุน และระยะของการสุก ทำให้ขนุนแต่ละพันธุ์มีความหวาน ความเป็นกรดด่าง กลิ่นรส และรสชาติที่แตกต่างกัน คุณค่าทางโภชนาการของขนุน แสดงดัง Table 1โดยปกติ องค์ประกอบทางเคมีของขนุน ประกอบด้วยวิตามินชนิดต่างๆ น้ำตาลที่สามารถละลายน้ำได้ (water-soluble sugars) แป้ง น้ำตาลอิสระ (free sugars) กรดไขมัน และสารให้กลิ่นรสที่ระเหยได้ (flavor volatiles) (Ahmed *et al*., 1986; Wills *et al*., 1986; Rahman *et al*., 1999; Chowdhury *et al*., 1997; Maia *et al*., 2004) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต สำหรับองค์ประกอบในกลุ่มของน้ำตาล พบว่าน้ำตาลอิสระที่เป็นองค์ประกอบในเนื้อขนุน ประกอบด้วย กลูโคส ซูโครสและฟรุกโทส โดยปริมาณน้ำตาลซูโครส ส่วนใหญ่มักจะสูงกว่าฟรุกโทสและกลูโคสเสมอ และเมื่อขนุนค่อยๆ สุกเพิ่มมากขึ้น ประมาณน้ำตาลอิสระก็จะเพิ่มมากขึ้นด้วย (Rahman *et al*., 1999; Shamsudin *et al*., 2009)

Table 1. Proximate analysis and nutrient compositions of matured bulb, fiber and seed of jackfruit (based on 100 g wet basis).

Composition	**Matured bulb**	**Fiber**	**Seed**
Moisture (%)	72.90	66.60	60.70
Fat (%)	0.30	0.00	0.20
Carbohydrate (%)	23.70	29.20	30.60
Dietary fiber (%)	0.90	1.80	1.60
Protein (%)	1.70	1.40	5.50
Energy (Kcal/g)	94.00	122.00	146.00
Calcium (mg)	27.00	21.00	0.00
Phosphorus (mg)	38.00	13.00	105.00
Iron (mg/)	0.60	0.20	2.90
Vitamin B 1 (mg)	0.09	0.08	1.74
Vitamin B 2 (mg)	0.11	0.15	0.02
Vitamin C (mg)	9.00	13.00	3.25
Niacin (mg)	0.70	0.00	24.00
Vitamin A (IU)	329.00	0.00	22.00

ที่มา: นฤชิต แว่วสีฝอง (2529)

1.2 ขนุนพันธุ์ในประเทศไทย

ขนุนที่นิยมปลูกในประเทศไทยแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1.2.1 ขนุนหนัง มีเนื้อยวงแห้งกรอบ สีเหลืองทอง สีจำปา ยวงโต เนื้อแน่น หวานกรอบ นิยมปลูกกันโดยทั่วไป ขนุนหนังมีหลายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์จำปากรอบ พันธุ์ตาบ๊วย พันธุ์ฟ้าถล่ม พันธุ์ทองประเสริฐและพันธุ์ทองสุดใจ เป็นต้น ขนุนพันธุ์ทองประเสริฐเป็นขนุนพันธุ์เบา สามารถออกดอกติดผลได้เมื่ออายุ 2 ปี หลังการปลูก โดยจะเริ่มออกดอกตั้งแต่เดือนมิถุนายนและเริ่มเก็บเกี่ยวผลผลิตได้ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน ลักษณะผลค่อนข้างกลม มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 10-15

กิโลกรัม ผิวสวย เนื้อยวงหนา มีสีเหลืองทอง รสชาติหวาน กรอบ ซังน้อย และมีเนื้อเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 50 ของน้ำหนักผล

1.2.2 ขนุนละมุด มีเนื้อยวงเปียก เละเหนียว ค่อนข้างบาง ยวงเล็ก รสหวาน มีกลิ่นหอม แต่ไม่ค่อยนิยมปลูกมากนัก ขนุนชนิดหนึ่ง ซึ่งนิยมปลูกกันมากทางภาคใต้ของประเทศไทยคือ จำปาดะ ลักษณะโดยทั่วไปคล้ายขนุน ผลเล็กยาวเรียวคล้ายผลฟัก เปลือกบาง เนื้อเละ รสหวานกลิ่นหอม (คลังปัญญาไทย, 2550)

1.3 ขนุนพันธุ์ทองสุดใจ

ขนุนพันธุ์ทองสุดใจเป็นขนุนที่ติดผลดกมากที่สุดพันธุ์หนึ่ง ลักษณะผลเป็นรูปไข่ค่อนข้างกลมและใหญ่ โดยมากมีผิวเรียบสม่ำเสมอทั้งผล มีซังน้อยและมีสีเหลืองเข้ม รสหวาน น้ำหนักผลประมาณ 8-29 กิโลกรัม หรือน้ำหนักโดยเฉลี่ยประมาณ 20 กิโลกรัมต่อผล เปลือกผลค่อนข้างบาง ปลายหนามแหลม เนื้อยวงใหญ่ หนา สีเหลืองทองเข้มสวยงาม มีรสหวานปานกลาง หากฝนตกชุกช่วงติดผล เนื้อจะจืดชืดเพราะความหวานลดลง ถ้าผลสุกเต็มที่ในช่วงไม่มีฝนตก เนื้อยวงจะแห้งกรอบ รสหวาน จากข้อมูลราคาขายส่งสินค้าของตลาดกลางสินค้าเกษตรแห่งประเทศไทย (2555) พบว่าราคาขายส่งของขนุนพันธุ์ทองประเสริฐมีราคาแพงกว่าขนุนพันธุ์ทองสุดใจ ดังแสดงใน Table 2

Table 2. Wholesale price of jackfruit Thongprasert and Thongsudjai cultivars.

Fruit size	Thongprasert cultivar	Thongsudjai cultivar
	Wholesale price (Baht/ kilogram)	
Big size (15-16 kilograms)	17.50	11.00
Medium size (12-13 kilograms)	14.50	8.00
Small size (8-10 kilograms)	9.50	5.00

ที่มา: ตลาดกลางสินค้าเกษตรแห่งประเทศไทย (2555)

กาญจนา เหลืองสุวาลัย และคณะ (2552) ศึกษาการเจริญเติบโตของขนุนพันธุ์-ทองสุดใจ โดยคัดเลือกขนุนพันธุ์ทองสุดใจที่ปลูกในสวนของเกษตรกรในอำเภอปราณบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ระหว่างเดือนสิงหาคมถึงเดือนธันวาคม ปี 2549 พบว่า ผลขนุนใช้เวลาในการเจริญเติบโตตั้งแต่ระยะกาบหุ้มดอกเปิดออกจนกระทั่งผลสมบูรณ์เต็มที่ประมาณ 16-17 สัปดาห์ ซึ่งระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญอาจแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น แหล่งปลูกขนุน อุณหภูมิ

สภาพลมฟ้าอากาศ การเจริญเติบโตของขนุนพันธุ์ทองสุดใจ แบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ เมื่อผลขนุนมีอายุ 3-11 สัปดาห์ และเมื่อขนุนมีอายุ 11 สัปดาห์ขึ้นไป โดยปกติยวงขนุนจะมีขนาดใหญ่ขึ้นและเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่ออายุได้ 16-17 สัปดาห์ จากการศึกษาการสะสมแป้งของขนุนพันธุ์ทองสุดใจ พบว่าขนุนจะเริ่มมีการสะสมแป้งเมื่ออายุ 10-12 สัปดาห์ โดยเริ่มจากบริเวณเนื้อยวงด้านที่ติดกับแกนผล จากนั้นจึงค่อยๆเพิ่มขึ้นจนกระทั่งอายุ 13 สัปดาห์ พบว่าการสะสมแป้งที่บริเวณเปลือกและแกนเพิ่มมากขึ้น ต่อมาเมื่ออายุ 14-16 สัปดาห์ การสะสมแป้งจะเกิดขึ้นที่บริเวณเปลือกผล จนกระทั่งอายุ 17 สัปดาห์ ไม่พบว่ามีการสะสมแป้งในเนื้อยวงขนุนบริเวณใกล้เปลือก เนื่องจากผลขนุนเริ่มสุก ทำให้มีการเปลี่ยนจากแป้งไปเป็นน้ำตาล (Patastico *et al*., 1975; Quintana *et al*., 1984 อ้างโดย กาญจนา เหลืองสุวาลัย และคณะ, 2552)

จากการศึกษาแหล่งพรีไบโอติกจากพืชไทยโดย Wichienchot และคณะ (2011) โดยคัดเลือกผักและผลไม้ที่มีการบริโภคในเขตภาคใต้ของประเทศที่มีคุณสมบัติหรือศักยภาพที่สามารถนำมาใช้เป็นพรีไบโอติกได้ เช่น มีองค์ประกอบที่เป็นเส้นใยอาหารปริมาณมาก มีราคาถูก และมีผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลือทิ้งซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ จากการศึกษา โดยคัดเลือกพืชจำนวน 13 ชนิด ได้แก่ กล้วยน้ำว้าแก่และสุก, กระเจี๊ยบเขียว, ขนุน, ข้าวสาร, เงาะ, ลูกตาล, จำปาดะ, ทุเรียน, มันขี้หนู, มะขามเปียก, มะพร้าวอ่อน, มะม่วงแก่และหัวข้าวเย็น เมื่อนำส่วนต่างๆของพืชมาสกัดทั้งหมด 28 ตัวอย่าง และวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้ (indigestible polysaccharides) ที่เป็นองค์ประกอบ พบว่าพืชและส่วนต่างๆของพืช ที่มีศักยภาพในการเป็นพรีไบโอติกที่ดี แสดงดัง Table 3 โดยพืช 1 ชนิด ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ที่สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งพรีไบโอติกได้ โดยเฉพาะขนุน (Jackfruit) และผลปาล์ม (palm fruit) แต่เนื่องจากขนุนที่ใช้ในงานวิจัยที่ผ่านมา (พันธุ์ทองประเสิรฐ) มีราคาแพง ส่วนใหญ่จำหน่ายในห้างสรรพสินค้า งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจศึกษาการสกัดสารจากขนุนต่างพันธุ์ โดยใช้ขนุนพันธุ์ทองสุดใจ ซึ่งมีราคาถูกกว่า หาซื้อได้ตามตลาดสดทั่วไป ซึ่งอาจมีความคุ้มค่าต่อการนำไปใช้ประโยชน์และผลิตเชิงพานิชย์ในอนาคต นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ ยังศึกษาวัตถุดิบซังขนุนพันธุ์ทอง-สุดใจเพิ่มเติมด้วย เพื่อเพิ่มทางเลือกในการนำวัสดุเศษเหลือมาใช้ประโยชน์

2. ฟังชันนัลฟู้ดส์ (Functional foods)

ฟังชันนัลฟู้ดส์ หรืออาหารเพื่อสุขภาพ หมายถึง ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการหรือประกอบด้วยสารที่เมื่อบริโภคเข้าสู่ร่างกายแล้ว สามารถทำหน้าที่อื่นๆให้กับร่างกายได้ นอกเหนือจากรสสัมผัสและคุณค่าทางอาหาร ได้แก่ ช่วยปรับปรุงหรือส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน สามารถชะลอการเสื่อมโทรมของอวัยวะต่างๆ จากการสูงอายุได้

รวมถึงป้องกันหรือลดความเสี่ยงต่อโรคต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้นจากภาวะโภชนาการผิดปกติและลดอาการของโรคที่เกิดจากความผิดปกติของร่างกายได้

Table 3. Indigestible polysaccharide concentrations in some of Thai plants.

Plants	Part	Solvent	Indigestible polysaccharides (mg/g dry extract±SD)
1. Palm fruit	Pericarp	Ethalnol 95%	705.80±3.83
2. Jackfruit	Skin	Ethalnol 95%	689.08±15.21
3. Jackfruit	Flesh	Ethalnol 95%	605.76±16.55
4. Rambutan	Flesh	Ethalnol 50%	566.83±8.42
5. Jampadah	Flesh	Ethalnol 95%	542.56±13.82
6. Young coconut	Flesh	Water	513.87±4.29
7. Okra	Pod	Ethalnol 50%	460.73±17.05
8. Palm fruit	Embryo	Ethalnol 50%	409.85±2.88
9. Jackfruit	Seed	Ethalnol 50%	403.44±5.63
10. Palm fruit	Flesh	Ethalnol 95%	334.87±19.45

ที่มา: Wichienchot และคณะ (2011)

ส่วนผสมที่เติมลงในอาหารเพื่อสุขภาพ (Functional ingredients) ที่สำคัญและนิยมใช้ในปัจจุบัน มีมากมายหลายชนิด ได้แก่ ใยอาหาร (Dietary fiber) สารพรีไบโอติก ในกลุ่มของโอ-ลิโกแซคคาไรด์ แบคทีเรียโพรไบโอติกในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria) กรดไขมันอิ่มตัวเชิงซ้อนในกลุ่มโอเมก้า 3 (Omega 3 Polyunsaturate Fatty Acid) และเกลือแร่ชนิดต่างๆ (ไพโรจน์ หลวงพิทักษ์, 2552) อย่างไรก็ตาม จากข้อมูลทั่วโลก พบว่าโพรไบโอติกและพรีไบโอติกเป็นกลุ่มอาหารเพื่อสุขภาพที่ได้รับความนิยมสูงสุด (Cruz *et al*., 2010)

ไพโรจน์ หลวงพิทักษ์ (2552) กล่าวว่า ประเทศญี่ปุ่นซึ่งเป็นประเทศที่มีศักยภาพในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับสุขภาพได้กำหนดลักษณะจำเพาะของผลิตภัณฑ์อาหารที่จัดเป็นฟังชันนัลฟู้ดส์ ไว้ 3 ประการคือ

1) ลักษณะทางกายภาพต้องเป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่แท้จริง คือ ไม่อยู่ในรูปแคปซูลหรือเป็นผงเหมือนยา และเป็นอาหารที่ดัดแปลงจากวัตถุดิบตามธรรมชาติ

2) เป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถบริโภคได้เป็นประจำ โดยไม่จำกัดปริมาณ เวลา และสถานที่ และไม่มีข้อจำกัดเหมือนยา และ

3) เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบที่ให้ผลโดยตรงในการเสริมการทำงานของระบบต่างๆ ในร่างกายและป้องกันโรคต่างๆ ได้

ความแตกต่างของอาหารเพื่อสุขภาพกับอาหารหรือยาในทางการแพทย์ (medical food and drugs) คือ อาหารเพื่อสุขภาพสามารถบริโภคได้ทุกวัน แต่อาหารหรือยาทางการแพทย์สามารถบริโภคได้ในกรณีที่มีการรักษาหรือควบคุมอาการของโรคภายใต้การดูแลของแพทย์ (Pricewaterhouse coopers global network, 2009) สำหรับความแตกต่างในด้านอื่นๆ พิจารณาได้จาก Table 4 ผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพที่ได้รับความนิยมและมีส่วนแบ่งในตลาด (market share) สูงสุด คือผลิตภัณฑ์ในกลุ่มเครื่องดื่ม ซึ่งคาดว่าจะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว คิดเป็นร้อยละ 56 ในปี 2013 (Figure 1a) สำหรับประโยชน์ของผลิตภัณฑ์ที่ผู้บริโภคคาดหวังจะได้จากการบริโภคสูงสุด คือประโยชน์ในด้านพลังงาน โดยเฉพาะเครื่องดื่ม (Energy drinks) ที่ช่วยให้ร่างกายมีความสดชื่นจากการสูญเสียน้ำ เนื่องจาก ผู้บริโภคสามารถรับรู้ถึงประโยชน์ที่ได้รวดเร็วกว่าการบริโภคผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นๆ (Figure 1b) และกลุ่มของผลิตภัณฑ์อาหารโดยรวมที่คาดว่าจะมีการจริญเติบโตสูงสุด คืออาหารในกลุ่มเครื่องดื่มและผลิตภัณฑ์นม (soft drink and dairy products) (Figure 1c) ตามลำดับ

3. พรีไบโอติก

จากคำจำกัดความของ FAO (Food and Agriculture Organization of United Nation) (2007) พรีไบโอติก หมายถึง ส่วนประกอบของอาหารที่ไม่มีชีวิต (non-viable food ingredient) ที่ได้รับการยืนยันว่ามีประโยชน์ต่อสุขภาพของเจ้าบ้าน (host) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ ในขณะที่ Gibson และ Roberfroid (1995) กล่าวว่า พรีไบโอติก หมายถึง สารคาร์ไบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยในระบบทางเดินอาหารส่วนบน สามารถผ่านไปยังลำไส้ใหญ่ และส่งเสริมการเจริญหรือกิจกรรมของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีประโยชน์ภายในลำไส้ใหญ่ ได้แก่ *Bifidobacterium* และ *Lactobacilli* ส่งผลให้เจ้าบ้านมีสุขภาพดีขึ้น

Table 4. Comparing functional foods with medical food and drugs.

Difference	Functional foods	Medical foods	Prescription drugs
Uses	Energy enhancement; weight management; bolster gut, bone or heart health; disease risk reduction; memory improvement	Dietary management of a disease or conduction with distinctive nutritional requirements (e.g. difficulty swallowing, loss of appetite, nutrition repletion post surgery)	Treatment of disease, symptom, or condition
Method of obtainment	No prescription or supervision needed; consumer selects	Used with medical supervision	Prescribed by health provider
Distribution channels	Supermarket, drugstore, online, major retailers	Hospitals, pharmacies, drugstores, online	Pharmacies hospitals
Regulatory body	No specific body, but is considered food and is therefore subject to FDA regulation*	No additional FDA review/approval needed, but must abide by regulations concerning foods, e.g. labeling*	FDA approval needed, a multiyear, multistage review process
Amount consumed	As desired	As needed	As prescribed

* FDA regulates any specific health claims that might be made.

ที่มา: Pricewaterhouse coopers global network (2009)

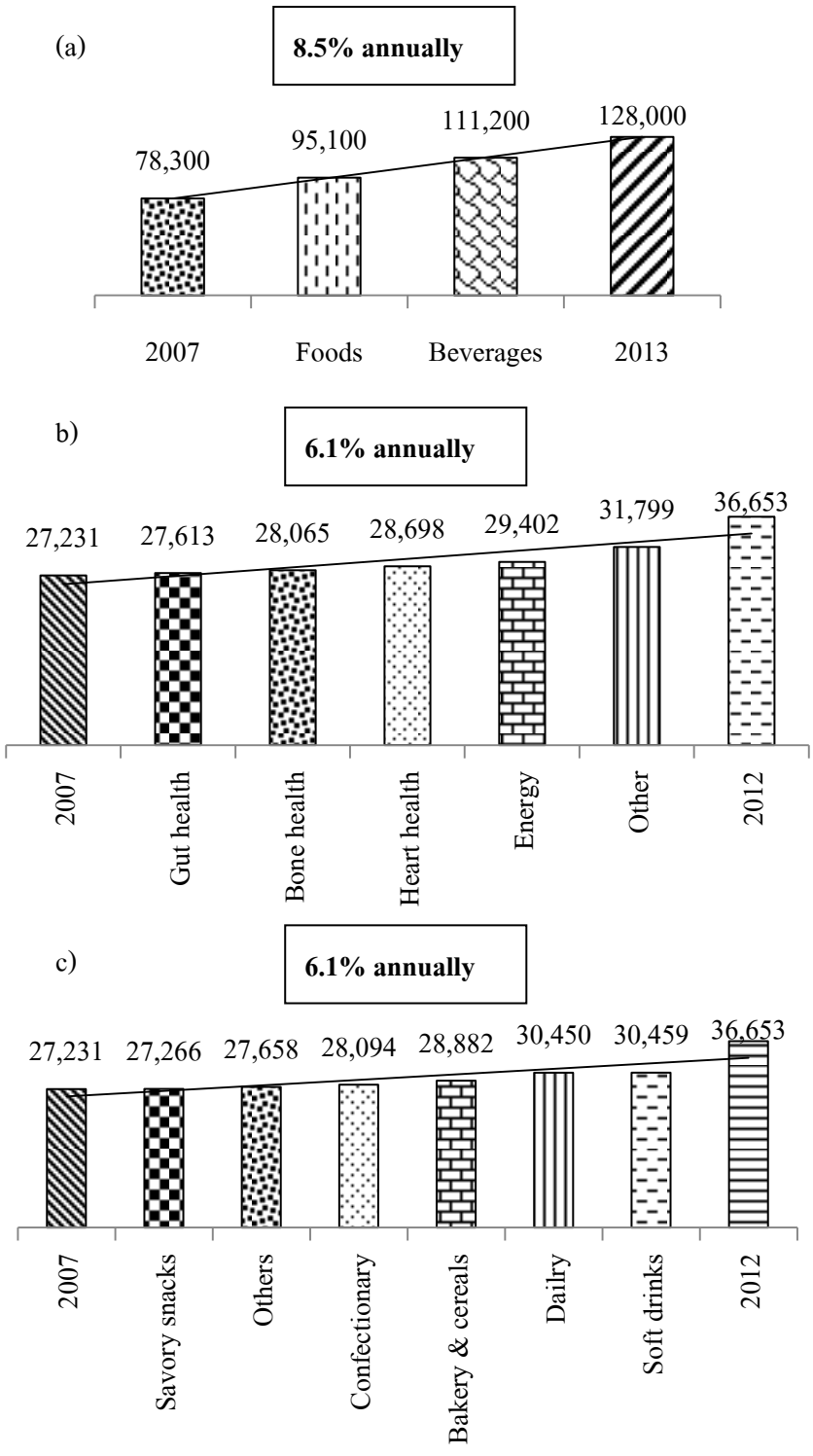


Figure 1. Beverage lead global market for functional foods, growth by form, 2007-2013F ($M) (a); Energy leads US market for function foods, growth by benefit, 2007-2012F ($M) (b) and soft drink and dairy leads US market for functional foods, growth by category, 2007-2012F ($M) (c).

ที่มา: Pricewaterhouse coopers global network (2009)

3.1 คุณสมบัติของพรีไบโอติก

สารที่เป็นพรีไบโอติกต้องมีคุณสมบัติที่สำคัญ คือ สามารถเคลื่อนที่ผ่านไปจนถึงลำไส้ใหญ่ได้โดยไม่ถูกย่อยและไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหารส่วนบนรวมถึงผ่านไปยังลำไส้ใหญ่ได้โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง สามารถถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักของแบคทีเรียประจำถิ่นที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่หรือแบคทีเรียโพรไบโอติกได้ รวมถึงต้องไม่ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (Gibson, 2004; Kolida *et al.*, 2002) นอกจากนี้ พรีไบโอติกที่นำมาใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารจะต้องทนต่อสภาวะในการแปรรูป เช่น ความร้อน ค่าพีเอชต่ำ รวมถึงไม่เกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่ต้องการในผลิตภัณฑ์บางชนิด เป็นต้น (Wang, 2009) ซึ่งการทดสอบสมบัติหรือความคงตัวของสารเหล่านี้ สามารถศึกษาได้ทั้งแบบในห้องปฏิบัติการ (*In vitro*) และการศึกษาในสิ่งมีชีวิต (*In vivo*) (Ellegard *et al*., 1997 อ้างโดย Wang, 2009) ปัจจุบันพรีไบโอติกที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรม ได้แก่ โอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้ (Non-digestible oliosaccharides; NDOs) เช่น ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์, แอลฟา-กาแลกโตโอลิโกแซคคาไรด์, เบต้า-กาแลกโตโอลิโกแซคคาไรด์ และไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นต้น (Rastall and Gibson, 2002 อ้างโดย Van Den Broek and Voragen, 2008) สารเหล่านี้ เมื่อถูกหมักโดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่จะถูกเปลี่ยนให้เป็นกรดอินทรีย์หรือกรดไขมันสายสั้น (Short-chain fatty acid; SCFAs) โดยเฉพาะกรดแลกติก (lactic acid) และกรดอะซีติก (acetic acid) ซึ่งถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานให้กับเจ้าบ้าน (Manning and Gibson, 2004) หากโอลิโกแซคคาไรด์มีสายโมเลกุลที่ยาวมาก การหมักจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆและดูดซึมเข้าสู่ผนังลำไส้ใหญ่ (Manning and Gibson, 2004; Voragen, 1998) นอกจากโอลิโกแซคคาไรด์ สารชนิดอื่นที่มีคุณสมบัติเป็นสารพรีไบโอติก ได้แก่ แป้งที่ต้านการย่อยด้วยเอนไซม์ (resistant starch, RS), พอลิแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (Non-starch polysaccharide, NSP) และสารพอลิแซคคาไรด์อื่นๆ ที่ได้จากพืช เช่น อินนูลิน (inulin) เพคติน (pectin) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) กัม (gum) และไซแลน (xylan) เป็นต้น

3.2 ประโยชน์ของพรีไบโอติกต่อสุขภาพ

กลไกการทำงานของพรีไบโอติกดัง Figure 2 มีผลต่อร่างกาย 2 ทาง คือทางตรงและทางอ้อม โดยพรีไบโอติกมีผลโดยตรงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค (pathogen inhibition) และควบคุมการทำงานที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันของร่างกาย (immune modulation) สำหรับผลทางอ้อม เกิดจากการส่งเสริมการเจริญหรือเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียประจำถิ่นในร่างกายโดยเฉพาะในลำไส้ใหญ่ (Microbiota) จากนั้น การเพิ่มจำนวนเชื้อโพรไบโอติกจึงส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพในด้านต่างๆ แก่ร่างกายดัง Figure 2 สารเมทาบอไลท์ (metabolites) หรือกรดไขมันสายสั้น ที่แบคทีเรียในลำไส้ใหญ่สร้างขึ้นจากการหมักพรีไบโอติก เช่น กรดอะซีติก โพรพิโอนิก

(propionic acid) และบิวทิริก (butyric acid) ถือเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อสุขภาพ (Cummings *et al*., 2001) โดยทำให้ลำไส้มีสภาพเป็นกรด ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก และเป็นผลให้แบคทีเรียก่อโรคมีจำนวนลดลง (Brandt, 2001; Blaut, 2002 อ้างโดย Venter, 2007)

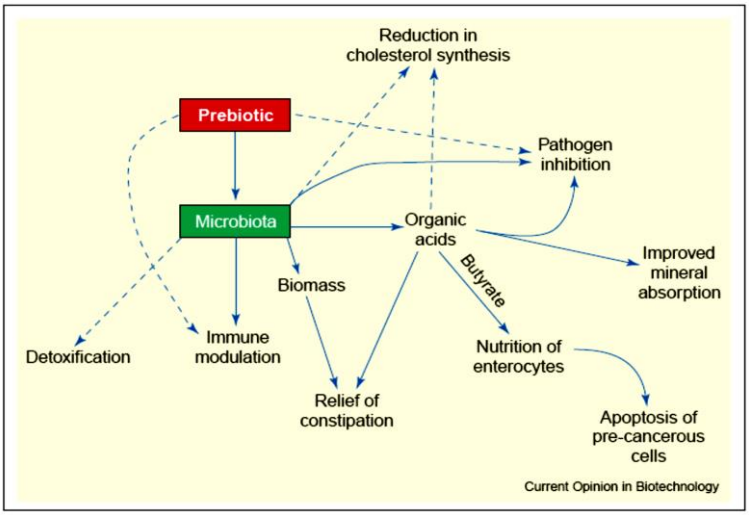


Figure 2. Action mechanism of prebiotic.

ที่มา: Ouwehand และคณะ (2005)

โดยปกติ กรดไขมันสายสั้นจะถูกดูดซึมอย่างรวดเร็วที่บริเวณลำไส้ใหญ่ และใช้เป็นแหล่งพลังงานให้กับส่วนต่างๆ ของร่างกาย เช่น บิวทิเรตถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานให้กับเนื้อเยื่อลำไส้ใหญ่ โพรพิโอเนตและอะซีเตทบางส่วนถูกใช้เป็นพลังงานงานให้กับตับ และอะซีเตทบางส่วนถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานให้กับกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อรอบๆ เซลล์ (Gibson and Roberfroid, 1995; Blaut, 2002) และอะซีเตทที่แบคทีเรียสร้างขึ้น หลังการดูดซึม มีผลทำให้การสังเคราะห์คลอเรสเทอรอลสูงขึ้น จากการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการพบว่า โพรพิโอเนต สามารถยับยั้งการสังเคราะห์คลอเรสเทอรอลได้ (Venter *et al.,* 1991) ดังนั้นจึงสันนิษฐานได้ว่า สารตั้งต้นในการหมักของจุลินทรีย์ที่สามารถลดอัตราส่วนของอะซีเตทต่อโพรพิโอเนตได้ จะมีผลในการลดระดับไขมันในเลือดได้เช่นกัน และสามารถลดความเสี่ยงในการเป็นโรคหลอดเลือดและหัวใจได้ (cardiovascular disease) (Wong *et al*., 2006) สำหรับบิวทิเรตพบว่ามีบทบาทในการป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่โดยการควบคุมการแบ่งเซลล์ของลำไส้ใหญ่ (Manning and Gibson, 2004) สรุปบทบาทของสารพรีไบโอติกต่อสุขภาพได้ดังนี้

3.2.1 บรรเทาอาการท้องผูก

พรีไบโอติกมีคุณสมบัติคล้ายกับยาระบาย เนื่องจากการส่งเสริมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ทำให้มวลเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มมากขึ้น ลำไส้จึงมีความจุเพิ่มขึ้น (Venter, 2007) ทำให้ก้อนอุจจาระมีขนาดใหญ่และมีความอ่อนตัว การเคลื่อนไหวของอุจจาระในลำไส้จึงเกิดได้ดีขึ้น จากการศึกษาภายใต้การควบคุมอย่างดี พบว่า การบริโภคพรีไบโอติก 1 กรัมสามารถเพิ่มมวลให้กับอุจจาระได้ 1.5 ถึง 2.0 กรัม (Gibson *et al*., 1995 อ้างโดย Venter, 2007) พรีไบโอติกจึงสามารถป้องกันอาการท้องผูกได้

3.2.2 เพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุ

จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่า การบริโภคสารพรีไบโอติก ส่งผลให้การดูดซึมแคลเซียม สังกะสี และแมกนีเซียม ที่บริเวณลำไส้ใหญ่สูงขึ้น และพบว่าการดูดซึมแคลเซียมในเด็กผู้หญิงที่มีสุขภาพดีอายุระหว่าง 11-13.9 ปีจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการบริโภคสารอินนูลินร่วมกับฟรุก-โตโอลิโกแซคคาไรด์ (Griffin *et al*., 2002) จากการสันนิษฐาน พบว่ากลไกในการเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมเกิดจากการที่สารพรีไบโอติกถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดแลกติกและกรดไขมันสายสั้น ซึ่งทำให้ค่าพีเอชภายในลำไส้ใหญ่ลดลง แคลเซียมจึงแตกตัวและละลายได้มากขึ้น การดูดซึมจึงดีขึ้น หรืออีกนัยหนึ่ง บิวทิเรตที่ถูกสร้างขึ้นไปเหนี่ยวนำให้เซลล์ลำไส้มีการแบ่งเซลล์ พื้นที่ในการดูดซึมแคลเซียมจึงเพิ่มขึ้น หรืออาจเกิดจากการกระบวนการหมักสารพรีไบโอติกที่เกิดขึ้น ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับสาร calbindin D_{9K} ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าขนส่งแคลเซียมเข้าสู่เซลล์ (Cashman, 2003)

3.2.3 ยับยั้งการก่อมะเร็ง

แบคทีเรียภายในลำไส้ใหญ่หลายชนิดสามารถสร้างสารก่อมะเร็งและสารที่ทำให้เกิดภาวะเนื้องอก (tumour) ได้โดยอาศัยเมแทบอลิซึมของสารอาหาร Pool-Zobel (2005) กล่าวว่ากลไกการยับยั้งการเกิดมะเร็งโดยสารพรีไบโอติกมีอย่างน้อย 2 กลไก คือ การหมักสารพรีไบโอติกทำให้แบคทีเรียโพรไบโอติกสร้างสารเมทาบอไลท์ออกมาป้องกันเซลล์ เช่น บิวทิเรตซึ่งช่วยกระตุ้นการเกิด apoptosis ใน cell lines มะเร็งลำไส้ใหญ่ ประการที่สอง การทำให้การหมักโปรตีนและไขมันซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นสารก่อมะเร็งลดลง เนื่องจากมีการหมักของสารคาร์โบไฮเดรตเพิ่มมากขึ้น (Manning and Gibson, 2004)

3.2.4 กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

จากการวิจัยพบว่า การบริโภคอินนูลิน ช่วยให้เม็ดเลือดขาวจับกับเชื้อโรคได้เพิ่มขึ้น (Venter, 2007) นอกจากนี้ การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายดีขึ้นได้ เกิดจากการสัมผัสโดยตรงระหว่างแบคทีเรียแลกติกหรือผลิตภัณฑ์ของแบคทีเรียกับเซลล์ภูมิคุ้มกันของลำไส้-

ใหญ่ และสารพรีไบโอติกสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ โดยทำให้เซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้มีความแข็งแรงและสามารถป้องกันการติดเชื้อที่ลำไส้ได้ดีขึ้น (Schley and Field, 2002)

3.2.5 ควบคุมเมแทบอลิซึมของไขมัน

การศึกษาผลของพรีไบโอติกต่อเมแทบอลิซึมของไขมันในปัจจุบันมักมีความแปรปรวนสูงและให้ผลที่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความซับซ้อนเกี่ยวกับชีวเคมีของเมทแทบอลิซึมของไขมันในร่างกายมนุษย์ อย่างไรก็ตาม ผลของพรีไบโอติกที่ทำให้ไขมันในเลือดลดต่ำลง (hypolipidaemic) อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลูโคสหรืออินซูลิน โดยสารพรีไบโอติกสามารถลดระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในเลือดและเข้าจับกับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไขมัน (lipogenic enzyme) โดยผ่านกระบวนการ gene transcription ได้ (Roberfroid, 2000) และพบว่าอัตราส่วนของอะซีเตทต่อโพรพิโอเนตที่สร้างขึ้นถือเป็นตัวบ่งชี้คุณสมบัติของสารพรีไบโอติกในการลดระดับไขมันในเลือด Delzenne และ Williams (2002) กล่าวว่า การหมักของสารพรีไบโอติกส่วนใหญ่จะได้กรดไขมันหลัก 3 ชนิด คือ อะซีเตท โพรพิโอเนตและบิวทีเรท ซึ่งบิวทีเรตจะถูกนำไปใช้ในการแบ่งเซลล์ของเซลล์ลำไส้ใหญ่ ส่วนอะซีเตทและโพรพิโอเนตจะถูกส่งไปยังตับผ่านเส้นเลือดดำ หากการหมักมีอะซีเตทเกิดขึ้นสูง เช่นการหมักของแลกตูโลส (lactulose) อะซีเตทที่ถูกส่งไปยังตับจะถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์ cytosolic acetyl-coenzyme A synthatase 2 แล้วเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์ไขมันและคลอเรส-เทอรอล ทำให้ร่างกายเกิดภาวะคลอเรสเทอรอลสูง ในขณะเดียวกันโพรพิโอเนทที่เกิดขึ้นจะทำหน้าที่ยับยั้งโปรตีนซึ่งเป็นตัวพาอะซีเตทไปยังตับ ทำให้การสังเคราะห์ไขมันและคลอเรสเทอรอลเกิดขึ้นน้อยลง อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองดังกล่าว เป็นเพียงการทดลองในเซลล์ตับของหนูเท่านั้น ส่วนการทดลองในมนุษย์ยังไม่มีข้อมูลที่ชัดเจน ปัจจุบันสารพรีไบโอติกถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด แสดงดัง Table 5

4. คาร์โบไฮเดรตมวลโมเลกุลต่ำ (Low molecular weight carbohydrates) และโอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้ (Non-digestible oligosaccharides; NDOs)

Matsuhiro และคณะ (2009 อ้างโดย Moongngarm *et al*., 2011) กล่าวว่า คาร์โบไฮเดรตที่มีมวลโมเลกุลต่ำคือคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 3,500 ดาลตัน ส่วนใหญ่ประกอบด้วยโมโน-, ได-และโอลิโกแซคคาไรด์ อาจพบในผักและผลไม้ตามชาติ หรือได้จากการย่อยแป้งในธัญพืช หรือส่วนต่างๆ ของพืช เช่น ราก และพืชที่มีหัวอยู่ใต้ดิน (tuber crops) ซึ่งกำลังอยู่ในระหว่างการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกในปัจจุบัน

Table 5. Oligosaccharides used in food products.

Class of compounds	**Example**	**Prebiotic effect**	**Effect on colonic /faecal flora**	**Effect on SCFA /lower pH**	**Dose and duration of treatmen (if human studies are available)**
Fructans	Oligofructose, FOS	+++	↑Bifidobacteria, Lactobacilli ↓Bacteroides, clostridia	Yes	4-40 g/day for 1-5 weeks
Galacto-oligosaccharides (GOS)	Trans GOS, natural GOS from human milk	++(+)	↑Bifidobacteria, Lactobacilli	Yes	3-10 g/day
Glucose-based oligosaccharides	Oligodextrans	++	↑Bifidobacteria, Lactobacilli	Yes	-
	Isomalto-oligosaccharides	++(+)	↑Bifidobacteria, Lactobacilli	Yes	13.5 g/days for 2 weeks

Table 5. Oligosaccharides used in food products (Cont.).

Class of compounds	**Example**	**Prebiotic effect**	**Effect on colonic /faecal flora**	**Effect on SCFA /lower pH**	**Dose and duration of treatmen (if human studies are available)**
Xylo-oligosaccharides		++	↑Bifidobacteria	Yes	
Soy-bean oligosaccharides	Raffinose, stachyose	++(+)	↑Bifidobacteria ↑Bacteroides/eubacteria (low dose) ↓Clostridia	Yes	3-10g/day for 3 weeks

ที่มา: ดัดแปลงจาก Delzenne และ Williams (2002)

++ มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก ซึ่งยืนยันด้วยผลการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ (*In vitro*) และการศึกษาในสิ่งมีชีวิต (*In vivo*) ในบางงานวิจัย

++ (+) มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกเช่นเดียวกันกับที่ระบุไว้ใน (++) และพบว่าบางงานวิจัยมีการยืนยันผลแค่ในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น

+++ มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่มีผลการทดลองยืนยันแน่นอนทั้งการทดลองแบบ *In vitro* และ *In vivo*

↑ คือส่งเสริมการเจริญ, ↓ คือลดการเจริญ)

โอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้เป็นสารคาร์โบไฮเดรตมวลโมเลกุลต่ำ ประกอบด้วยหน่วยย่อยของโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) 3 ถึง 10 โมเลกุลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Weijers *et al*., 2008) มีคุณสมบัติทนต่อการย่อยด้วยกรดภายในกระเพาะอาหาร ไม่ถูกไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ที่อยู่ในน้ำลายและลำไส้เล็ก แต่มีความไวและถูกไฮโดรไลซิสได้ง่ายด้วยเอนไซม์ที่แบคทีเรียภายในลำไส้ใหญ่ผลิตขึ้น (Roberfroid and Slavin, 2000) เนื่องจากโครงสร้างของน้ำตาลโมโนเมอร์ที่มาเชื่อมต่อกันส่วนใหญ่จับกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic) แบบเบต้า (β) ซึ่งโดยปกติเอนไซม์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์มีความจำเพาะกับสารตั้งต้นที่มีโครงสร้างพันธะแบบชนิดแอลฟา (α) (Sako *et al*., 1999) สารใดๆ ที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก เมื่อผ่านการย่อยในระบบทางเดินอาหารส่วนบนแล้วจะต้องเหลือผ่านไปถึงลำไส้ใหญ่ได้มากกว่าร้อยละ 60 (Cummings and Englyst, 1995 อ้างโดย โสภา บิลละโสย, 2551) ดังนั้น การศึกษาสมบัติการต้านการย่อยของสารสกัดจากพืชหรือสารที่สังเคราะห์ขึ้น จึงใช้เป็นข้อพิสูจน์เบื้องต้นได้ว่าสารแต่ละชนิดจะมีสมบัติเป็นพรีไบโอติกหรือไม่

การศึกษาสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากแก้วมังกรพบว่า ภายหลังการย่อยในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหารส่วนบน ได้แก่ การต้านการย่อยของเอนไซม์ α-amylase ในน้ำลายเทียมของมนุษย์ การต้านการย่อยในสภาวะกรดของกระเพาะอาหารและการต้านการย่อยของเอนไซม์ α-amylase จากลำไส้เล็ก โอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดจากแก้วมังกรถูกย่อยไปร้อยละ 16, 2.5 และ 30 ตามลำดับ อีกประมาณร้อยละ 50 สามารถผ่านไปยังลำไส้ใหญ่และส่งเสริมการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกทางการค้าได้ (Wichienchot *et al*., 2010) Nakada และคณะ (2003) พบว่าโคจิ-โอลิโกแซคคารด์ (kojioligosaccharide) สามารถต้านการย่อยในสภาวะกรดที่จำลองขึ้นจากกระเพาะอาหารได้ร้อยเปอร์เซ็นต์ ซึ่งโดยปกติอาหารที่อยู่ในลำไส้ใหญ่จะถูกย่อยและกว่าร้อยละ 85 สามารถผ่านไปยังลำไส้เล็กได้ การศึกษาสมบัติการต้านการย่อยของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการสังเคราะห์โดยเชื้อจุลินทรีย์โดย Wichienchot และคณะ (2006) พบว่า กลูโค-โอลิโกแซคคาไรด์ (gluco-oligosaccharide) ที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อ *Gluconobacter oxydans* NCIMB 4943 สามารถต้านการย่อยในสภาวะกรดของกระเพาะอาหารได้ ร้อยละ 98.4 ในขณะที่ Du และคณะ (2011) พบว่าการย่อยพอลิแซคคาไรด์จากเนื้อฟักทองด้วยกรดสามารถผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 5000-324 ดาลตัน และมีสมบัติต้านย่อยในสภาวะกรดจากกระเพาะอาหารในช่วงพี 5 ถึง 1 ได้ร้อยละ 5.76 ถึงร้อยละ 20.31 ตามลำดับ

โอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้ สามารถละลายน้ำและหมักโดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ได้ โดยอาศัยการไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ที่แบคทีเรียในลำไส้ใหญ่สร้างขึ้น (Table 6) ได้เป็นพลังงาน กรดแลคติก และกรดคาร์บอกซิลิกสายสั้น (short-chain carboxylic acids)

(Quigley, 2010) โดยประสิทธิภาพในการหมักขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมี หน่วยของโมโนเมอร์ที่เชื่อมต่อกัน ระดับการเกิดพอลิเมอร์ไรซ์เซชัน (Degree of polymerization, DP) ชนิดของพันธะที่เชื่อมกันระหว่างหน่วยของโมโนเมอร์ และความซับซ้อนของโมเลกุล ว่ามีลักษณะเป็นสายตรงหรือมีกิ่งก้าน รวมถึงการเกิดพันธะกับสารที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในโมเลกุล (Swennen *et al*., 2006) หน่วยย่อยของ NDOs ชนิดต่างๆ มักประกอบด้วย ฟรุกโตส กาแลกโตส กลูโคส และไซโลส เป็นต้น

Table 6. Enzymes produced by colonic microflora in colon to hydrolyze non-digestible oligosaccharides.

Non-digestible oligosaccharides	**Enzymes**	**Bacterial species**
β -Glucooligosaccharides	β -Glucosidase	Bifidobacteria, Bacteroides
α -Glucooligosaccharides	α -Glucosidase	Bifidobacteria, Bacteroides
Fructooligosaccharides	β -Fructofuranosidase /fructanase	Bifidobacteria, Lactobacilli, Clostridia, Bacteroides
β -Galactooligosaccharides	β -Galactosidase	Bifidobacteria
α -Galactooligosaccharides	α -Galactosidase	Bifidobacteria, Lactobacilli, Bacteroides

ที่มา**:** Van Laere (2000 อ้างโดย Swennen *et al*, 2006)

4.1 แหล่งที่มาของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้

โอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มที่ได้จากธรรมชาติและกลุ่มที่ได้จากการสังเคราะห์ โอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้ที่พบในธรรมชาติได้แก่ นม น้ำผึ้ง ผลไม้และผัก เช่น หัวหอม ต้นแก่นตะวัน (Jerusalem aetichok) ชิกอรี่ (chicory) กระเทียม กล้วย ยาคอน (yacon) แซลซิไฟ (salsify) ข้าวไรน์และข้าวบาร์เล่ย์ และแก้วมังกร เป็นต้น ส่วนใหญ่มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงร้อยละ 0.3-6.0 ของน้ำหนักสด ในหัวชิกอรี่และแซลซิไฟมีประมาณร้อยละ 5 ถึง 10 ของน้ำหนักสดและในหัวแก่นตะวัน พบได้ในปริมาณสูงสุดถึง ร้อยละ 20 (Mussatto *et al*., 2007; Wichienchot *et al*., 2010)

การผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้และมีสมบัติเป็นพรีไบโอติกทางการค้า อาจสกัดได้โดยตรงจากพืช หรือนำพอลิแซคคาไรด์จากธรรมชาติมาลดขนาดโมเลกุลลงโดยผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรด (acid hydrolysis) เพื่อให้ได้โอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดโมเลกุลตามต้องการ หรือผลิตโดยอาศัยการสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์โดยใช้น้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น

ซูโครสหรือแลคโตสเป็นสารตั้งต้น และอาศัยการปฏิกิริยา transglycosylation ของเอนไซม์เพื่อผลิตเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดโมเลกุลตามต้องการ หรือผลิตโดยนำแป้งหรือไซแลนมาย่อยด้วยเอนไซม์ ให้ได้โอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้ ที่มีจำนวนโมเลกุลของน้ำตาลขนาดเล็กมาต่อกันเกิดเป็นน้ำตาลที่มีขนาดโมเลกุลในช่วง 3-10 หน่วย และกำจัดสารตั้งต้นที่ไม่เกิดปฏิกิริยา หรือ โมโนแซคคาไรด์ที่อาจเกิดขึ้นโดยใช้เมมเบรนหรือเทคนิคโครมาโทกราฟี เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้นต่อไป (Sun *et al*., 2002; Mussatto and Manchilha, 2007; Patel and Goyal, 2011) ตัวอย่าง พรีไบโอติกในทางการค้า ได้แก่

-ซอยบีน โอลิโกแซคคาไรด์ สกัดจาก ซอยบีนเวย์ ซึ่งเป็นผลพลอยได้ในการผลิตซอยโปรตีน (Johansen *et al*., 1996) ได้เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ในกลุ่มของ ราฟฟิโนส (raffinose) สตาคิโอส (stachyose) และเวอแบสโคส (verbascose) ที่มีความเข้มข้นสูง (Karr-Lilienthal *et al*., 2005)

-กาแลกโตโอลิโกแซคคาไรด์ ผลิตจากน้ำตาลแลกโตสที่มีความเข้มข้นสูงที่แยกได้จากเวย์ของน้ำนมวัวโดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ β-galactosidase ซึ่งสามารถเกิดปฏิกิริยา transgalactosylation และได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นไตรแซคคาไรด์ เช่น 4’- หรือ 6’-galactosyllactose และโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีสายยาวกว่าซึ่งประกอบด้วยโมโนแซคคาไรด์ 4 ตัวหรือมากกว่า (Sako *et al*., 1999)

-แลกตูโลส (lactulose) ผลิตจากน้ำตาลแลกโตส โดยอาศัยกระบวนการ alkali isomerization ในการเปลี่ยนโมเลกุลกลูโคสของน้ำตาลแลกโตสไปเป็นฟรุกโตส สารที่ได้เป็นไดแซคคาไรด์ (Villamiel *et al*., 2002)

-แลกโตซูโครส (lactosucrose) เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้ในกลุ่มไตรแซคคาไรด์ ผลิตได้โดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยา transfructosylation ของเอนไซม์ β-fructofuranosidase โดยใช้น้ำตาลแลกโตสเป็นสารตั้งต้น ซึ่งปฏิกิริยาสามารถเปลี่ยนไปมาระหว่างน้ำตาลแลกโตสและซูโครสได้ โดยหมู่ fructosyl ของซูโครสจะถูกย้ายไปยังโมเลกุลของน้ำตาลแลกโตสเกิดเป็นโมเลกุลของแลกโตซูโครส (Kawase *et al*., 2001)

-ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructo-oligosaccharide) ผลิตจากน้ำตาลซูโครสโดยอาศัยปฏิกิริยา transfructosylation ของเอนไซม์ β-fructofuranosidase ร่วมกับสารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นสูงประมาณ 600-800 กรัมต่อลิตร ทำให้เกิดปฏิกิริยาที่มีประสิทธิภาพ (Yun, 1996) และช่วยลดต้นทุนในการระเหยตัวทำละลาย

-โอลิโกฟรุกโตส (oligofructose) ได้จากย่อยอินนูลิน ซึ่งสกัดได้จาก ชิกอรี่ รูท เป็นต้น สำหรับโอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้ชนิดอื่นๆ ที่มีการผลิตในทางการค้า ได้แก่

ไอโซมอลทูโลส (isomaltulose), ไกลโคซิลซูโครส (glycosylsucrose), ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ (isomaltooligosaccharide) และไซโคลเด็กทรินซ์ (cyclodextrin) เป็นต้น (Mussatto *et al.,* 2007)

4.2 การวิเคราะห์ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์

การวิเคราะห์ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์หรือพรีไบโอติก มีวิธีการที่คล้ายคลึงกับการวิเคราะห์เส้นใย เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่มของฟรุกแทน สามารถทำได้โดยการนำสารสกัดเริ่มต้นมาวิเคราะห์ด้วย HPAEC จากนั้นนำสารสกัดไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส (amyloglucosidase) (หรือใช้ร่วมกันกับเอนไซม์ฟรุกแทนเนส (crude fructanase) และวิเคราะห์ด้วย HPAEC อีกครั้ง เพื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลซูโครสและฟรุกโตสที่มีอยู่ในตัวอย่างก่อนและหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งหากใช้เอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสร่วมกันกับเอนไซม์ฟรุกแทนเนส จะพบว่าพีคของน้ำตาลฟรุกโตสและกลูโคสหลังการย่อยเพิ่มขึ้น สำหรับปริมาณฟรุกแทนที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่าง สามารถคำนวณได้จากการหักลบปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตสและซูโครสอิสระที่ได้จากตัวอย่างและปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อย วิธีการนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับอินนูลิน น้ำตาลที่เป็น non-reducing และ reducing fructo-oligosaccharide (Hoebregs, 1997 อ้างโดย McCleary, 2003) แต่วิธีนี้มีข้อจำกัดในการทำ คือเครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้มีราคาแพง และต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญในการวิเคราะห์ อย่างไรก็ตาม การศึกษาปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีอยู่ในพืชตามธรรมชาติโดยทั่วไป มักอาศัยเทคนิค HPLC (High performance liquid chromatography) หรือ LC/MS (Liquid Chromatography/Mass spectrometry) ในการวิเคราะห์ โดยมุ่งเน้นเกี่ยวกับการแยกสารและการศึกษาทฤษฎีเกี่ยวกับการตรวจหาปริมาณสาร ในขณะที่การวิเคราะห์ทางเคมี การศึกษาถึงอิทธิพลของตัวทำละลายที่ใช้ อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการสกัดสารยังมีการศึกษาไม่มากนัก

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar analysis) ด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid method

การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid method เป็นการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่ได้รับความนิยมเนื่องจากสามารถวิเคราะห์น้ำตาลที่เป็น soluble sugars, oligomeric และ polymeric sugars ในเวลาเดียวกัน เนื่องจากกรดซัลฟุริกเข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ จะทำหน้าที่ย่อยน้ำตาลทั้งที่เป็น oligomeric และ polymeric sugars ให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monomers) โดยสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะสัมพันธ์กันกับโครงสร้างโมเลกุลของน้ำตาลที่อยู่ในสารสกัด จากนั้นจึงคำนวณหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในสารสกัดโดยการเปรียบเทียบ

กับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของสารละลายน้ำตาลมาตรฐานซึ่งส่วนใหญ่จะใช้เป็นน้ำตาลซูโครสหรือกลูโคส (Dubois *et al*., 1956; Saha and Brewer, 1994)

4.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่ง (Reducing sugar analysis) ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid method และหาปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่ง (Non-reducing sugar)

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่งด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid method เป็นวิธีวิเคราะห์ที่สามารถทำได้ง่าย และราคาไม่แพง เพื่อทดสอบการมีอยู่ของหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group, C=O) ซึ่งอยู่ในโครงสร้างของน้ำตาลรีดิวซิ่ง โดยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของหมู่แอลดีไฮด์ (aldehyde group) ที่มีอยู่ในโครงสร้างของน้ำตาลกลูโคสหรือหมู่คีโตนที่มีอยู่ในน้ำตาลฟรุกโทส และทำให้สาร 3, 5-dinitrosalicylic acid (DNS) ที่ละลายอยู่ถูกรีดิวซ์ไปเป็น 3-amino, 5-nitrosalicylic acid ในสภาวะที่เป็นด่าง ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงดังสมการด้านล่าง และเนื่องจากออกซิเจนที่ละลายอยู่อาจรบกวนการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของน้ำตาลกลูโคส ดังนั้นการเตรียมสารละลาย DNS จึงเติมซัลไฟต์ (sulfite) ซึ่งไม่รบกวนการเกิดสีของปฏิกิริยา เพื่อดูดซับออกซิเจนที่ละลายอยู่ในสารละลาย นอกจากนี้น้ำตาลรีดิวซิ่งแต่ละชนิดส่งผลต่อสีปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาลแต่ละชนิดไว้

$$\text{Aldehyde group} \xrightarrow{\text{oxidation}} \text{carboxyl group}$$

$$\text{3, 5-dinitrosalicylic acid} \xrightarrow{\text{reduction}} \text{3-amino, 5-nitrosalicylic acid}$$

สำหรับปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซ์สามารถคำนวณได้จากผลต่างระหว่างปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซิ่ง โดยทั่วไป การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลอิสระในอาหารคือการบ่งชี้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่งทั้งหมด และการวิเคราะห์หาปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์คือการบ่งชี้ปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่ง ที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นตัวแทน อย่างไรก็ตาม ปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่วิเคราะห์ได้จากอาหาร อาจประกอบด้วยโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและมีโครงสร้างที่ซับซ้อนกว่าน้ำตาลซูโครส รวมถึงมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก ได้แก่ ราฟฟิโนส, สตาคิโอสและแวเบอโคส เป็นต้น (Lee *et al*., 1970) ดังนั้น การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งเพื่อใช้เป็นตัวแทนของโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีสมบัติเป็นพรีไบโอติก อาจต้องทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครสในตัวอย่างร่วมด้วย

4.5 การสกัดโอลิโกแซคคาไรด์

เนื่องจาก โอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้เป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและสามารถละลายน้ำได้ หากใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ในการสกัดอาจมีการละลายสารอื่น

ที่ชอบน้ำ เช่น พอลิแซคคาไรด์หรือโปรตีน ร่วมด้วย การสกัดสารเหล่านี้จึงใช้สารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นตัวทำละลาย (Knudsen and Li, 1991; Johansen *et al*., 1996; Oku *et al*., 1998) ซึ่งแต่ละงานวิจัยก็ให้ผลการทดลองที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของตัวอย่างและสภาวะที่ใช้ในการทดลอง เช่น Johansen และคณะ (1996) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในช่วงร้อยละ 50-90 มีผลทำให้ปริมาณของโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากพืชมีค่าลดลง Xiaoli และคณะ (2008) พบว่าการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จาก chickpea (*Cicer arietinum*) ด้วยน้ำและเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 30, 50, 70 และ 80 การสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 สามารถสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ได้ปริมาณสูงสุด และการสกัดด้วยเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นแม้จะให้ปริมาณสารสกัด (yield) สูง แต่ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้กลับมีปริมาณน้อย ซึ่งเป็นไปได้ว่า การใช้เอทานอลความเข้มข้นสูง มีผลทำให้โปรตีนเสียสภาพ ตกตะกอนและขัดขวางการแพร่ของโอลิโกแซคคาไรด์ที่บริเวณผิวตัวอย่าง นอกจากนี้ การสกัดในช่วงอุณหภูมิ 10-50 องศาเซลเซียสมีผลทำให้สกัดโอลิโกแซคคาไรด์ได้เพิ่มขึ้น และสกัดได้น้อยลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น ผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับการศึกษาการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากถั่วเหลืองโดยการแช่ของ Nissreen และ Mckenna (1997) ซึ่งพบว่าการแช่ถั่วที่อุณหภูมิสูงช่วยเพิ่มอัตราการดูดซับน้ำของถั่วและลดเวลาในการแช่ถั่วให้เข้าสู่สมดุลการสกัดได้เร็วขึ้น และการสกัดที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ปริมาณผลผลิตที่สกัดได้ต่ำลง เนื่องจาก ความร้อนที่สูงขึ้นทำให้โปรตีนที่ละลายได้เสียสภาพอย่างรวดเร็ว น้ำตาลที่ละลายได้จึงถูกห่อหุ้มไว้ ความสามารถในการสกัดจึงลดลง (Kim *et al*., 2003)

Wichienchot และคณะ (2011) ได้ศึกษาแหล่งพรีไบโอติกจากพืชไทยโดยพิจารณาจากปริมาณสารพรีไบโอติกและเส้นใยที่ละลายน้ำได้ (soluble dietary fiber) ในพืชที่เจริญและมีการบริโภคในบริเวณภาคใต้ พบว่าในจำนวนพืชที่ถูกคัดเลือกทั้งหมด 13 ชนิด เนื้อขนุนพันธุ์ทอง-ประเสริฐที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 สามารถสกัดสารได้ในปริมาณสูงสุด โดยอัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวอย่างต่อตัวทำละลายคือ 1: 2 ขนาดตัวอย่างที่เหมาะสมคือ 0.5x0.5x0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร อุณหภูมิในการสกัดที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิห้อง โดยสารสกัดที่ได้คิดเป็น 15.70 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของสารสกัดเท่ากับ 731.11 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียก ประกอบด้วยน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคสและซูโครสเท่ากับ 270.25, 193.50 และ 267.36 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียก ตามลำดับ และมีปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้ต่อปริมาณพอลิแซคคาไรด์ในตัวอย่างเท่ากับ 500.86 มิลลิกรัมต่อกรัม อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่ผ่านมาได้ใช้วัตถุดิบต่างสายพันธุ์กับการวิจัยในครั้งนี้ ซึ่งอาจให้ผลที่แตกต่างกัน

5. การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)

การสกัด เป็นกระบวนการแยกที่เกี่ยวข้องกับเฟส 2 เฟส คือ เฟสของตัวทำละลายที่เติมเข้าไปเพื่อให้เกิดอีกเฟสที่แตกต่างจากเฟสเดิมขององค์ประกอบที่ต้องการแยก การแยกจะเกิดขึ้นเมื่อองค์ประกอบที่ต้องการแยกละลายออกมาในตัวทำละลายขณะที่องค์ประกอบอื่นๆ ที่เหลือยังคงอยู่ในเฟสเริ่มต้น โดยที่เฟส 2 เฟสดังกล่าวอาจเป็นของแข็งกับของเหลว (liquid-solid extraction) หรือ ของเหลวที่ไม่สามารถผสมกันได้ หรือของแข็งกับแก๊ส ซึ่งในหัวข้อต่อไป จะกล่าวถึงรายละเอียดเกี่ยวกับการสกัดแบบของแข็ง-ของเหลวเท่านั้น

ในระบบของการสกัด สามารถแบ่งชนิดของการสกัดออกเป็น 4 ระบบ ได้แก่ การสกัดแบบกะเพียงขั้นตอนเดียว การสกัดแบบไหลผ่านชนิดหลายขั้น การสกัดแบบไหลสวนทางกัน และการสกัดแบบไหลสวนทางอย่างต่อเนื่อง แต่ในที่นี้จะกล่าวถึงรายละเอียดของการสกัดแบบกะเพียงขั้นตอนเดียว

5.1 การสกัดแบบกะเพียงขั้นตอนเดียว (single-stage batch extraction)

เป็นการสกัดที่อาศัยการสัมผัสกันระหว่างเฟสของของแข็งกับตัวทำละลายที่ไม่มีตัวถูกละลายอยู่จนกระทั่งถึงสมดุลของการสกัด ตัวทำละลายจะถูกปั๊มผ่านชั้นของของแข็งแล้วหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ โดยในชั้นของของแข็งอาจแช่อยู่ในตัวทำละลายที่มีการกวนหรือไม่ก็ได้ (Figure 3) ซึ่งภายหลังจากสมดุลการสกัด เฟสของตัวทำละลายที่มีตัวถูกละลายอยู่จะถูกระบายออกไปจากของแข็ง จากนั้นตัวทำละลายและน้ำก็จะถูกกำจัดออกไป การสกัดลักษณะนี้นิยมใช้ในการสกัดน้ำตาลจากหัวบีท ใช้สกัดชาหรือกาแฟ เป็นต้น

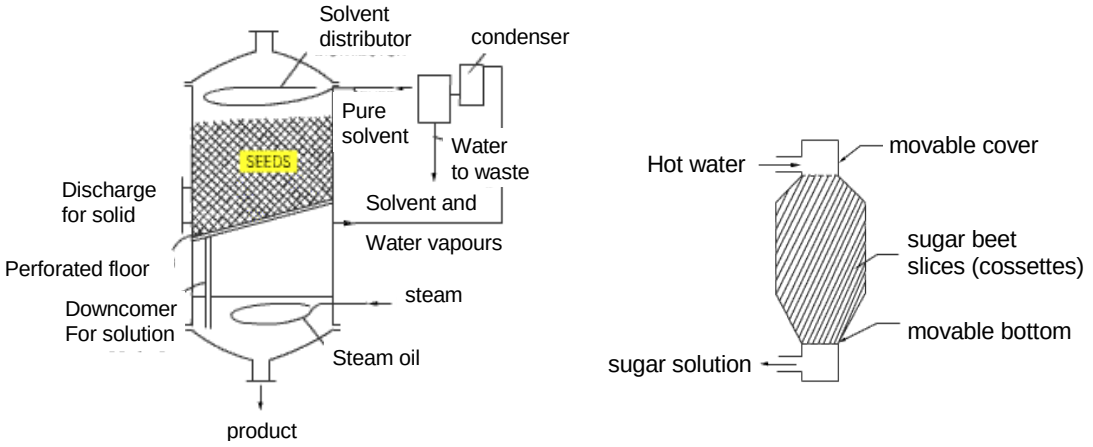
5.2. หลักการทั่วไปของการสกัด

ในกระบวนการสกัด ปรากฏการณ์ทางกายภาพที่เกี่ยวข้องกับการสกัด ได้แก่

5.2.1 การแพร่ (Diffusion)

การแพร่ หมายถึง การเคลื่อนย้ายโมเลกุล ของสารประกอบชนิดหนึ่งผ่านผิวรอยต่อระหว่างเฟส (interface) ในการสกัดของแข็ง-ของเหลว ตัวทำละลายจะแพร่ผ่านเข้าไปในของแข็งและละลายตัวถูกละลายออกมา ในขณะเดียวกันตัวถูกละลายจะแพร่ออกมาจากของแข็งที่อิ่มตัวด้วยตัวทำละลายไปยังเฟสของตัวทำละลาย ซึ่งอัตราการแพร่หาได้จากระยะเวลาที่ต้องการสำหรับกระบวนการแพร่เพื่อให้ถึงจุดสมดุล ซึ่งเป็นสัดส่วนกลับกับกำลังสองของระยะทางของการแพร่ ดังนั้น ในการสกัดด้วยตัวทำละลาย ยิ่งอนุภาคมีขนาดเล็ก ระยะเวลาที่ของแข็งต้องอยู่ในขั้นตอนการสกัดยิ่งสั้น (รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, 2541) เนื่องจากพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างของแข็งและของเหลวเพิ่มมากขึ้น อัตราการถ่ายเทขององค์ประกอบที่ละลายได้จึงเพิ่มมากขึ้นด้วย อย่างไร

ก็ตาม สารมีอนุภาคที่เล็กมากเกินไปก็อาจก่อให้เกิดความต้านทานหรือยับยั้งการหมุนเวียนของตัวทำละลายที่จะผ่านชั้นของของแข็งได้เช่นกัน



(a) (b)

Figure 3. Batch extractors; a) oil extractor from plant seeds and b) leaching extractor used in sugar extraction from beet root.

ที่มา: Charm (1978) และ Geankoplis (1993) (อ้างโดย รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, 2541)

5.2.2 ความสามารถในการละลาย (Solubility)

ความสามารถในการละลายของสาร จะขึ้นอยู่กับ ปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่

5.2.2.1 อัตราส่วนระหว่างตัวทำละลายต่อของแข็ง

เนื่องจาก ความเข้มข้นของตัวถูกละลายสูงสุดที่เป็นไปได้ในสารสกัดสุดท้ายที่ออกจากระบบการสกัด คือ ความเข้มข้นอิ่มตัว ดังนั้น อัตราส่วนของตัวทำละลายต่อของแข็ง จึงจำเป็นต้องสูงพอที่จะชะเอาตัวถูกละลายออกมาจากตัวอย่างได้มากที่สุด หรือในกรณีที่ทำการสกัดและมีการหมุนเวียนตัวทำละลายกลับมาใช้ หากความสามารถในการละลายของตัวทำละลายสูงจะช่วยลดจำนวนครั้งของการหมุนเวียนตัวทำละลายที่ต้องใช้เพื่อกำจัดตัวถูกละลายออกไปในระดับที่ต้องการ Xiaoli และคณะ (2008) พบว่า ความสามารถในการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากเมล็ด chickpea เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่ออัตราส่วนระหว่างตัวอย่างกับตัวทำละลายเพิ่มขึ้น แต่เมื่ออัตราส่วนนั้นเพิ่มขึ้นมากกว่า 1 ต่อ 10 เท่า พบว่า ปริมาณสารที่สกัดได้ไม่มีความแตกต่างกัน

5.2.2.2 ชนิดของตัวทำละลาย

ในการสกัด ตัวทำละลายที่ใช้ควรจะมีความหนืดต่ำเพื่อให้เกิดการหมุนเวียนได้ดี ซึ่งโดยทั่วไป มักใช้ตัวทำละลายที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ในช่วงแรก เนื่องจากขณะที่กระบวนการสกัดมีการดำเนินไปอย่างต่อเนื่อง ความเข้มข้นของตัวถูกละลายในตัวทำละลายจะค่อยๆ เพิ่มขึ้น และเมื่อเข้าสู่สมดุลการสกัด อัตราการสกัดจะลดลงอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างของความเข้มข้นลดลงและสารละลายมีความหนืดเพิ่มขึ้น การสกัดน้ำตาลจากพืช มักใช้เอทานอลเป็นตัวทำ-ละลาย เนื่องจากโครงสร้างของเอทานอลประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) คือส่วนที่มีขั้ว (polar) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ซึ่งไม่มีขั้ว (non-polar) การเจือจางด้วยน้ำจึงเป็นการเพิ่มความมีขั้วให้กับสารละลาย ทำให้น้ำตาลโมเลกุลเล็กๆ สามารถละลายออกมาได้ ในขณะที่คาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่หรือมี DP สูงจะถูกตกตะกอนออกมาเมื่อใช้เอทานอลที่ความเข้มข้นสูงขึ้น (Dobrenz *et al*., 1993; Oku *et al*., 1998)

Giannoccaro และคณะ (2006) พบว่าการสกัดน้ำตาลในกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์จากเมล็ดถั่วเหลืองด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 10 ถึงร้อยละ 50 สามารถสกัดน้ำตาลจากเมล็ดถั่วเหลืองได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) การศึกษาการสกัดสารพรีไบโอติกจากพืชไทยด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิดคือน้ำร้อน น้ำเย็น สารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 และ 95 พบว่าการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายมีประสิทธิภาพในการสกัดสูงกว่าการใช้น้ำ เพราะการสกัดด้วยสารละลายเอทานอล จะใช้เวลาในการสกัด 3 วัน และทำการสกัดซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดมารวมกันเพื่อนำไปวิเคราะห์ ในขณะที่การใช้น้ำเย็นและน้ำร้อนเป็นตัวทำละลาย จะทำเพียงวันเดียว โดยใช้เวลาในการสกัด 4 ชั่วโมง และ 15 นาที ตามลำดับ ทั้งนี้เพราะการใช้น้ำ อาจทำให้เกิดปัญหาการเจริญของจุลินทรีย์ในระหว่างการสกัด (Wichienchot *et al*., 2011)

5.3 หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกชนิดของตัวทำละลาย

ในการเลือกชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสม มีหลักการดังนี้ คือ

1. มีเพียงสารที่เราสนใจเท่านั้นที่สามารถละลายออกมาจากตัวอย่างที่นำมาสกัด (selectivity) โดยสามารถสกัดสารออกมาได้ในปริมาณที่มากแต่ใช้ตัวทำละลายในปริมาณน้อย (capacity)

2. ภายหลังการสกัด เฟสของตัวทำละลายและเฟสของสารที่ถูกสกัดจะต้องแยกออกจากกันภายในถังสกัด โดยเฟสของตัวทำละลายจะต้องถูกแยกออกจากเฟสของสารสกัดได้ง่าย โดยสามารถระเหยตัวทำละลายออกได้ง่ายที่ความดันไอ (vapour pressure) ต่ำ ณ อุณหภูมิที่ทำการสกัด เพื่อป้องกันการสูญเสียของตัวทำละลาย

3. ตัวทำละลายควรมีความหนืด (viscosity) ต่ำ ซึ่งจะทำให้ความดันต่ำลง มีการถ่ายโอนมวลและการถ่ายโอนความร้อนที่ดี รวมถึงมีความคงทน (stability) ต่อปฏิกิริยาเคมีและความร้อนได้ดี

การจัดเรียงลำดับความมีขั้วของตัวทำละลายจากน้อยไปหามาก จะได้ดังนี้

ไซโคเฮกเซน < คาร์บอนเตตระคลอไรด์ < เบนซีน < อีเทอร์ < คลอโรฟอร์ม < อะซีโตน < เอทิลอะซีเทรต < เอทานอล < เมทานอล < น้ำ < กรดและเบส ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม โดยทั่วไปสารละลายแอลกอฮอล์ เช่น เอทานอลหรือเมทานอลถือเป็นตัวทำละลายที่นิยมนำมาใช้ในการสกัด เนื่องจาก เป็นตัวทำละลายที่มีวัตถุประสงค์อย่างกว้างๆ และสามารถละลายสารได้ในช่วงกว้าง

5.4 อุณหภูมิในการสกัด

ในการศึกษากระบวนการสกัดบางกรณี พบว่าอุณหภูมิมีผลต่ออัตราการสกัด โดยอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้ความสามารถในการละลายของสารที่ต้องการเพิ่มขึ้นด้วย และเนื่องจากสัมประสิทธิ์ของการแพร่มักเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่สูงขึ้น ดังนั้นการเพิ่มอุณหภูมิจึงส่งผลให้อัตราการถ่ายเทองค์ประกอบหรือตัวถูกละลายเกิดได้ดีขึ้น Xiaoli และคณะ (2008) ศึกษาสภาวะการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จาก chickpea จำนวน 19 สายพันธุ์ จากการศึกษาผลของอุณหภูมิ ได้แก่ การสกัดที่อุณหภูมิห้อง (30), 50, 70 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิน้ำเดือด พบว่าปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้ในช่วงอุณหภูมิ 10 ถึง 50 องศาเซลเซียส จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นและลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิที่ใช้สกัดสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ นอกจากนี้ Giannoccaro และคณะ (2006) พบว่าการสกัดน้ำตาลจากเมล็ดถั่วเหลืองด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 80 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสกัดให้สูงขึ้น ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่สกัดได้จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเช่นกัน

5.5 สมดุลในการสกัด (Equilibrium)

ในการสกัด เมื่ออัตราส่วนของตัวทำละลายต่อของแข็งมาก สมดุลที่เกิดขึ้น คือ สภาวะที่ความเข้มของตัวถูกละลายในเฟสของของแข็งและเฟสของตัวทำลายละลายเท่ากัน แต่หากปริมาณของตัวทำละลายไม่เพียงพอต่อการละลายของตัวถูกละลายทั้งหมดที่มีอยู่ สมดุลที่เกิดขึ้นหมายถึง สภาวะที่ความเข้มข้นของตัวถูกละลายไม่มีการเปลี่ยนแปลงอีกต่อไปในทั้งสองเฟส แม้ว่าจะมีการสัมผัสกันที่นานขึ้นก็ตาม ดังนั้น เพื่อให้เกิดสมดุลที่มีประสิทธิภาพของกระบวนการสกัด อัตราส่วนระหว่างของแข็งและตัวทำละลายต้องมากพอ ระยะเวลาในการสัมผัสกันของทั้งสองเฟสจะต้องนานพอ เพื่อที่จะสามารถละลายเอาตัวถูกละลายออกจากเฟสของแข็งออกมาให้ได้มากที่สุด ปัจจัยที่ควบคุมการสกัดคือ พื้นที่สัมผัสกันระหว่างเฟสทั้งสอง ระยะเวลาในการสัมผัส คุณสมบัติของวัสดุที่เกี่ยวข้องกับการแจกแจงสมดุลของการถ่ายเทองค์ประกอบ

6. ปัจจัยที่มีผลต่อการถ่ายเทมวลของตัวถูกละลาย

6.1 ระยะเวลาในการสกัด

สารในของแข็งแพร่เข้าสู่เฟสของตัวทำละลาย ตั้งแต่เริ่มมีการสัมผัสกันของทั้งสองเฟส จนกระทั่งความเข้มข้นของตัวถูกละลายในทั้งสองเฟสนั้นเข้าสู่สมดุล หากใช้เวลาในการสกัดน้อย ปริมาณตัวถูกละลายที่ชะได้จากของแข็งก็จะมีปริมาณน้อย หรือหากใช้เวลาในการสกัดนานเกินไป ก็สิ้นเปลือง เนื่องจากไม่ได้ทำให้ปริมาณสารที่สกัดได้เพิ่มมากขึ้น

สุพจน์ นวลละออง (2552) ศึกษาผลของระยะเวลาต่อปริมาณสารพรีไบโอติที่สกัดได้จากเปลือกลูกตาลแห้งโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย อัตราส่วนตัวอย่างต่อตัวทำละลายเป็น 1:10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่า การสกัดเป็นเวลานานขึ้น ส่งผลให้สารที่สกัดได้มีปริมาณลดลงเล็กน้อย และเมื่อนำสารสกัดไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้น จนเมื่อเวลาผ่านไปเมื่อสารละลายอิ่มตัวด้วยตัวทำละลาย อัตราการสกัดจึงลดลง เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซ์ซึ่งคาดว่าเป็นสารพรีไบโอติก พบว่าการสกัดเป็นเวลา 120 นาที มีปริมาณน้ำตาลดังกล่าวสูงสุดคือ 50.51 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารที่สกัดได้

6.2 ขนาดอนุภาคของของแข็ง

การสกัดโดยใช้ของแข็งที่มีอนุภาคเล็ก จะช่วยเพิ่มพื้นที่ในการถ่ายเทมวลสาร และลดระยะทางการเคลื่อนที่ของตัวทำละลายเข้าไปยังเฟสของของแข็ง ทำให้ตัวถูกละลายสามารถแพร่กระจายออกสู่เฟสของตัวทำละลายได้ดี และส่งผลให้การสกัดมีประสิทธิภาพสูงขึ้น Wichienchot และคณะ (2011) ได้ศึกษาผลของขนาดชิ้นตัวอย่างต่อประสิทธิภาพการสกัดสารพรี-โบโอติกจากพืชจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ เนื้อขนุน จาวตาล เมล็ดขนุน เนื้อลูกตาลและกระเจี๊ยบเขียว โดยศึกษาขนาดของตัวอย่าง 3 ขนาด คือ ตัวอย่างสับละเอียด 0.5x0.5x0.5 และ 0.25x0.25x0.25 ลูกบาศก์เซนติเมตร จากการทดลองพบว่า ขนาดตัวอย่าง 0.5x0.5x0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยเฉลี่ยให้ปริมาณสารสกัดสูงสุด โดยตัวอย่างที่มีขนาดเล็กกว่า พบว่า ภายหลังการสกัด ไม่สามารถกรองแยกออกจากตัวทำละลายได้ เนื่องจากเกิดการอุดตันที่บริเวณผิวหน้าของกระดาษกรอง

6.3 ตัวทำละลายที่ใช้ (ดังแสดงในหัวข้อ 5.2.2.2)

6.4 อุณหภูมิในการสกัด

โดยทั่วไปพบว่า การสกัดที่อุณหภูมิสูงขึ้น จะส่งผลให้อัตราการสกัดหรือการชะละลายสูงขึ้นด้วย เนื่องจากความหนืดของของเหลวมีค่าลดลง การแพร่ของตัวถูกละลายและตัวทำ-ละลายมีค่าเพิ่มขึ้น ทำให้ความเข้มข้นของตัวถูกละลายในสารสกัดมีค่าเพิ่มขึ้นด้วย แต่สิ่งที่ควรระวังคือ การสกัดที่อุณหภูมิสูง อาจมีการละลายของสารที่ไม่ต้องการออกมาระหว่างการสกัด หรือ

อาจทำให้ต้องมีการสูญเสียตัวทำละลายมากเกินไป ดังนั้นการคัดเลือกอุณหภูมิในการสกัดที่เหมาะสม จึงมีความจำเป็นต้องพิจารณาถึงปัจจัยหลายประการ

วีระพงศ์ พรสมิทธิกุล (2552) ได้ทำการสกัดสารพรีไบโอติกจากเปลือกด้านในขนุนด้วยน้ำ โดยใช้ตัวอย่างแห้ง อัตราส่วนตัวอย่างต่อตัวทำละลายเป็น 1 ต่อ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ระยะเวลาในการสกัด 120 นาที ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 30, 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่า ผลได้ของการสกัดมีค่าที่ใกล้เคียงกันคือ 23.86, 22.42 และ 24.64 กรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาจากปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งซึ่งคาดว่าเป็นสารพรีไบโอติก พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดจาก 30 เป็น 50 องศาเซลเซียส ทำให้ปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซ์เพิ่มขึ้นจาก 216.39 เป็น 252.68 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัด แต่เมื่อเพิ่มไปจนถึง 60 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณสารที่สกัดได้มีค่าลดลงเป็น 172.65 มิลลิกรัมต่อกรัมสารสกัด ทั้งนี้เนื่องจากเปลือกขนุนมีองค์ประกอบที่เป็นโปรตีนซึ่งสามารถละลายน้ำได้ดี การตกตะกอนของโปรตีน ทำให้โปรตีนเกิดล้อมรอบวัตถุดิบ ทำให้การละลายของสารออกมาจากตัวอย่างเกิดได้น้อยลง

6.5 ลักษณะของวัตถุดิบ

การสกัดในอุตสาหกรรม จำเป็นต้องนำตัวอย่างมาทำแห้งก่อน และเพื่อให้ตัววัตถุดิบยังคงคุณภาพของสมุนไพรหรือสารที่ต้องการสกัด ควรทำแห้งด้วยวิธีที่รวดเร็ว และทำที่อุณหภูมิต่ำ เนื่องจากการใช้อุณหภูมิสูงอาจทำให้สารสำคัญสลายตัวไป ซึ่งวิธีการทำแห้งวัตถุดิบ มีหลายวิธี ดังนี้

6.5.1 การอบแห้งด้วยลมร้อน (Air drying)

วิธีนี้เป็นการทำแห้งในอากาศ สามารถทำได้ทั้งในที่ร่ม (Shade drying) หรือตากกลางแดด (Sun drying) การทำแห้งด้วยลมร้อน เป็นการกำจัดน้ำออกจากวัสดุโดยอาศัยการพาความร้อน (Convection) ซึ่งทำให้วัสดุเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง โดยโครงสร้างธรรมชาติของวัสดุจะถูกทำลายและสูญเสียความสามารถในการยอมให้สารต่างๆ ไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ โครงสร้างภายนอกของวัสดุมีความแข็งมากขึ้น (Kerel, 1980; Lewicki, 1998; Lewicki and Jakubczyk, 2004) ในระหว่างการทำแห้ง น้ำที่ถูกกำจัดออกจะทำให้ภายในเซลล์มีลักษณะเป็นโพรง และหดตัวลงเมื่อเวลาผ่านไป เนื่องจากเซลล์เคลื่อนตัวเข้ามาอยู่ชิดกันทำให้วัสดุเกิดการเสียรูป (Lewicki and Pawlak, 2003) ส่งผลต่อคุณสมบัติในการถ่ายโอนมวลที่บริเวณเนื้อเยื่อด้านนอก (Witrowa-Rajchert, 1999) ซึ่งการทำแห้งพืชผักหรือผลไม้ การหดตัวที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์กับปริมาณความชื้นเริ่มต้นของตัวอย่าง (Sjöholm and Gekas, 1995; Wang and Brennan, 1995; Lewicki and Jakubczyk, 2004)

6.5.2 การทำแห้งโดยใช้แหล่งความร้อนที่สร้างขึ้น (Artificial heat)

การทำแห้งวิธีนี้จะอาศัยความร้อนจากแหล่งพลังงานอื่น เช่น การใช้ตู้อบไฟฟ้า ที่มีการควบคุมอากาศที่ผ่านเข้าออก มีการควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งวิธีนี้จะมีประสิทธิภาพกว่าวิธีแรก เนื่องจาก สามารถควบคุมอุณหภูมิในการทำแห้งได้ดีกว่า จากการศึกษาผลของชนิดตัวทำละลายคือ น้ำและเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 และผลจากความชื้นของวัตถุดิบต่อปริมาณสารพรีไบโอติกที่สกัดได้จากเปลือกด้านในของขนุน พบว่า การใช้ตัวอย่างแห้ง มีผลทำให้เซลล์ของตัวอย่างมีการหดตัว การแพร่ผ่านของตัวทำละลายเข้าสู่ตัวอย่างเกิดได้ยาก ในการสกัดจึงต้องมีระยะเวลาเพื่อให้ตัวอย่างเกิดการพองตัวก่อน จากการทดลองพบว่าเอทานอลมีกลไกในการแพร่เข้าสู่ตัวอย่างได้น้อยกว่าน้ำเนื่องจากให้ปริมาณสารสกัดที่ต่ำกว่าน้ำ (น้ำ = 25.22, เอทานอล = 5.38 กรัมต่อ 100 กรัมวัตถุดิบแห้ง) ในขณะที่การใช้ตัวอย่างสดในการสกัด พบว่าไม่มีปัญหาจากตัวทำละลายเนื่องจากไม่มีขั้นตอนที่ต้องทำให้วัตถุดิบมีการพองตัว (วีระพงศ์ พรสมิทธิกุล, 2552)

7. วิธีการแสดงผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิว (Response Surface Methodology; RSM)

วิธีการแสดงผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิว หรือ RSM คือ วิธีการทางคณิตศาสตร์และสถิติ ที่ถูกนำมาใช้สร้างแบบจำลอง โดยอาศัยการวิเคราะห์ผลของตัวแปรต่างๆ ต่อค่าตอบสนองหรือตัวแปรตามของการทดลอง เนื่องจากค่าตอบสนองนั้นๆ มีอิทธิพลมาจากตัวแปรอิสระหลายตัวแปร การออกแบบการทดลองด้วยวิธีนี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาจุดที่มีความเหมาะสมของตัวแปรแต่ละตัวแปรต่อค่าตอบสนองที่ต้องการ (ดัดแปลงจาก Montgomery, 1991) โดยเริ่มจากการค้นหาฟังก์ชันที่แท้จริงระหว่างค่าตอบสนอง ต่อตัวแปรอิสระต่างๆ ซึ่งโดยมากมักใช้ความสัมพันธ์แบบโพลีโนเมียล (Polynomial) เช่น สมการลำดับที่หนึ่ง (First order) (สมการที่ 1) หรือสมการลำดับที่สอง (second order) (สมการที่ 2) และเมื่อนำค่าการตอบสนองมาพล๊อตกับระดับของตัวแปรอิสระ จะได้กราฟผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิว

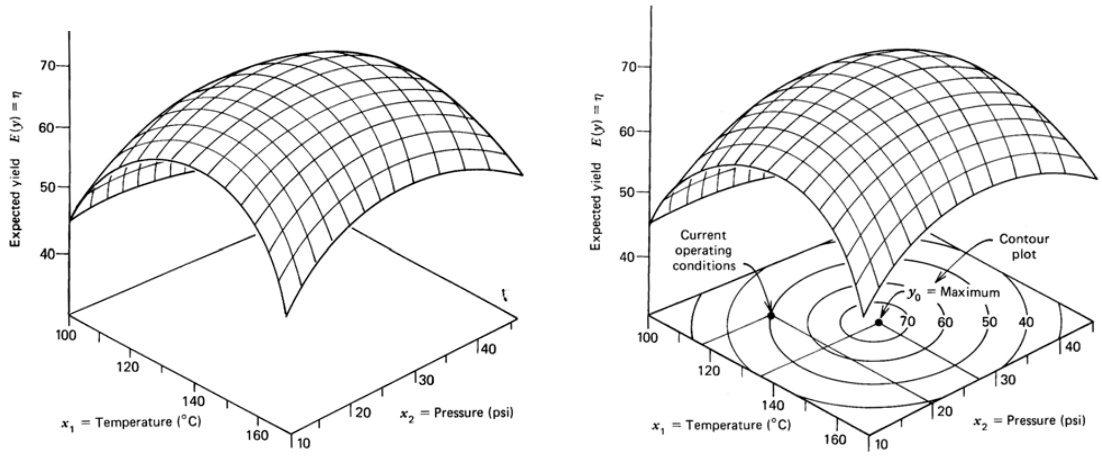
สมการที่ 1 $Y = \beta_0 + \beta_1 X_{1+} \beta_2 X_2 + \cdots + \beta_k X_k + \varepsilon$

สมการที่ 2 $Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i}^{k} \sum_{i_{i<j}}^{k} \beta_{ji} X_i X_j + \varepsilon$

ตัวอย่างการศึกษาแบบ RSM เช่น นักวิศวกรรมอาหารต้องการศึกษาระดับอุณหภูมิ (X_1) และความดัน (X_2) ที่ทำให้กระบวนการผลิตได้ผลผลิตสูงสุด จากวัตถุประสงค์ พบว่าผลผลิตที่ได้เป็นฟังก์ชันของระดับอุณหภูมิและความดัน หรือ $Y = f(X_1, X_2) + \varepsilon$ โดยที่ ε คือ ค่าความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นในค่าสังเกต Y และหากค่าคาดหมายของการตอบสนองเป็น $E(Y) = f$

$(X_1, X_2) = \eta$ ดังนั้น พื้นผิวตอบสนองสามารถแสดงได้ว่า $\eta = f(X_1, X_2)$ ดังแสดงใน Figure 4a และ 4b ตามลำดับ (อิสระพงษ์ พงษ์ศิริกุล, 2550)

Box-Behnken design เป็นรูปแบบการออกแบบการทดลองแบบหนึ่งของการออกแบบการทดลองแบบ RSM ซึ่งรูปแบบของ RSM มีหลายรูปแบบ ได้แก่ Factorial design (3 ระดับ), Central composite design (CCD) และ D-optimal design Box-Behnken design คือการออกแบบการทดลองที่สร้างขึ้นจากการรวมการออกแบบแบบแฟคทอเรียล 2^k และ การออกแบบแบบบล็อกไม่สมบูรณ์ รูปร่างคล้ายกับ cubic หรือลูกบาศก์ที่จุดทุกจุดของการทดลองวางอยู่บนจุดยอดของลูกบาศก์ซึ่งสร้างขึ้นจากขีดจำกัดบนและล่างของแต่ละตัวแปรที่นำมาศึกษา สำหรับจุดที่อยู่ตรงกลางของลูกบาศก์ เป็นจุดที่เชื่อมโยงทุกๆ ปัจจัยเข้าด้วยกัน ที่สำคัญ รูปแบบของมันสามารถหมุนได้หรือเกือบหมุนได้และเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการทดลองลักษณะอื่นๆ ของ RSM พบว่าการออกแบบแบบ Box-Behnken design เป็นการออกแบบที่มีจำนวนชุดการทดลองน้อย (15 ชุด, จุดกึ่งกลางทำ 3 ซ้ำ) เมื่อการศึกษานั้นประกอบด้วยตัวแปรที่สนใจจำนวน 3 ตัวแปร การออกแบบด้วย Box-Behnken design จึงเป็นรูปแบบการออกแบบการทดลองที่ได้รับความนิยม



(a) (b)

Figure 4. Three dimension of surface plot (a) and contour plot (b) in response surface methodology method.

ที่มา: Montgomery (1991)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษากระบวนการที่เหมาะสมในการสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากเนื้อและซังขนุนพันธุ์ทองสุดใจในระดับห้องปฏิบัติการ

2. เพื่อสกัดตัวอย่างขนุนด้วยเครื่องสกัดแบบกะในระดับโรงงานทดลอง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งสูงสุด

3. เพื่อทดสอบสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของสารสกัดจากเนื้อขนุนในการต้านการย่อยในสภาวะจำลองทางเดินอาหารมนุษย์

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. วัตถุดิบ

ขนุนพันธุ์ทองสุดใจที่ใช้ในงานวิจัย ซื้อจากผู้ขายรายเดียว จากตลาดสดพลาซ่าในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา มีลักษณะเนื้อแน่น สีเหลืองนวล เลือกเฉพาะส่วนเนื้อและซังขนุนซึ่งเป็นเศษเหลือไปใช้ในการทดลอง โดยควบคุมผลของความหลากหลายของวัตถุดิบด้วยการซื้อเนื้อและซังขนุนคราวเดียวกัน สำหรับแต่ละชุดการทดลอง

2. สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต/เกรด/ประเทศ
1. เอทานอล (C_2H_5OH) เข้มข้นร้อยละ 95 (v/v)	Labscan/ Commercial/ Thailand
2. Ammonium nitrate	Ajex FineChem/ Analytical/ Australia
4. α-amylase from human saliva	Sigma/ Analytical/ Germany
5. α-amylase from porcine pancrease	Sigma/ Analytical/ Germany
6. Calcium chloride	Ajex FineChem/ Analytical/ Australia
7. 3, 5-Dinitrosalicylic acid	Fluka /Analytical/ Germany
8. HPLC water	Labscan/ HPLC grade/ Thailand
9. Hydrochloric acid (H_2SO_4, conc.)	Merck/ Analytical/ Germany
10. Lactic acid sodium salt	Fluka/ Analytical/ Germany
11. Phenol	Rankem/ Analytical/ India
12. Potassium chloride	Ajex FineChem/ Analytical/ Australia
13. Potassium citrate monohydrate	Ajex FineChem/ Analytical/ Australia
14. Potassium phosphate	Ajex FineChem/ Analytical/ Australia
15. Sodium bicarbonate	Ajex FineChem/ Analytical/ Australia
16. Sodium chloride	Ajex FineChem/ Analytical/ Australia
17. Sodium hydroxide	Labscan/ Analytical/ Thailand
18. Sodium potassium tartrate	Fisher Scientific/Analytical/ India
19. Urea	Ajex FineChem/ Analytical/ Australia
20. Uric acid sodium salt	Sigma/ Analytical/ Germany

3. อุปกรณ์

1. อ่างควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WNB 22 ยี่ห้อ Mamert ประเทศเยอรมันนี

2. Microplate spectrophotometer readern รุ่น Power Wave XS ยี่ห้อ Biotek ประเทศสหราช-อาณาจักร

3. Rotary vacuum evaporator รุ่น R-200/205 ยี่ห้อ Buchi Rotavapor® ประเทศสวิตเซอแลนด์

4. Vortex Mixer ยี่ห้อ Labnet ประเทศสหรัฐเอมริกา

5. เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ยี่ห้อ Agilent รุ่น 1100, Refractive Index Detector ยี่ห้อ Agilent ประเทศเยอรมันนี

6. เครื่องหมุนเหวี่ยง ยี่ห้อ Hettich Zentrifugen รุ่น Mikro 22R ประเทศเยอรมันนี

7. เครื่องสกัดแบบกะขนาดโรงงานทดลอง ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ดังแสดงใน Figure 5

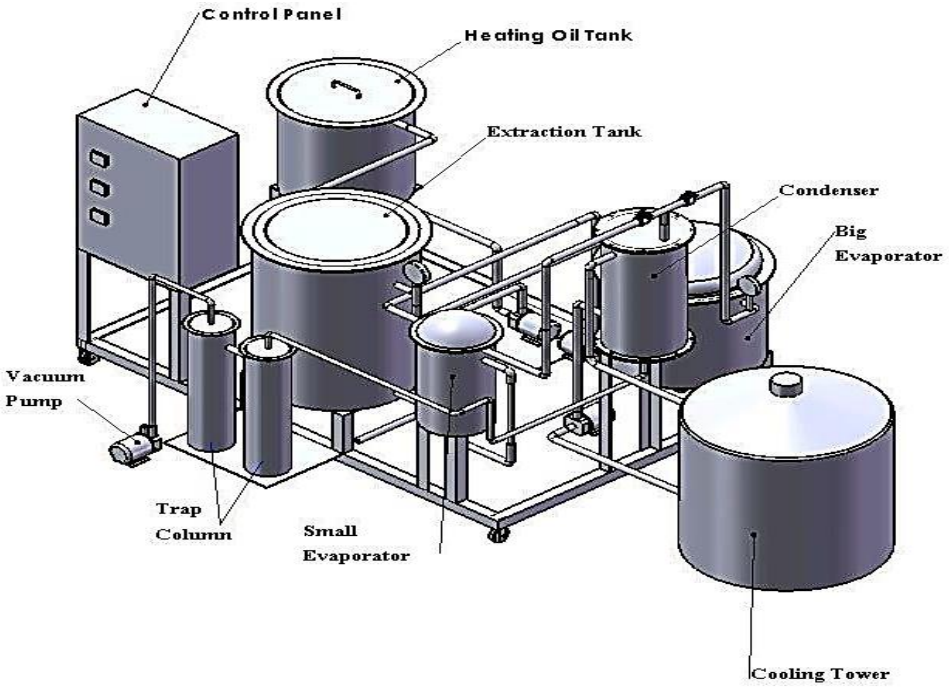
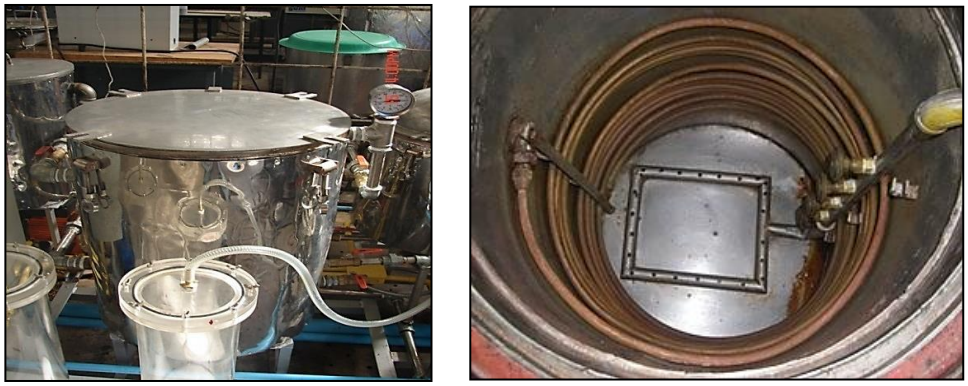


Figure 5. Three dimension picture of pilot plant scale batch extractor.

ส่วนประกอบต่างๆ ของเครื่องสกัดแบบกะขนาดโรงงานทดลอง ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ที่สำคัญ ดังนี้

1. ถังสกัด (Extraction tank)

ประกอบด้วยถังสกัดรูปทรงกระบอก ฝาถังเป็นฝาแบน ผลิตจากสแตนเลส ตัวถังแบ่งออกเป็น 2 ชั้น ชั้นแรกประกอบด้วยขดลวดทองแดงที่บรรจุสารให้ความร้อนซึ่งจะเป็นตัวควบคุมอุณหภูมิให้แก่ระบบ และช่องว่างสำหรับใส่ถังที่บรรจุตัวอย่าง (Figure 6) ซึ่งจะมีตะแกรงเป็นตัวกั้นสำหรับแบ่งใส่ตัวอย่างเป็นชั้นๆ (Figure 7) ด้านข้างของถังมีการติดตั้งหัวฉีด ซึ่งจะอัดฉีดตัวทำละลายเข้าสู่ระบบจากบริเวณด้านล่างของถัง เพื่อช่วยในการผสมกันระหว่างตัวอย่างและตัวทำละลาย



(a) (b)

Figure 6. Photo of external (a) and inner (b) of extraction tank used in this study.

(a) (b) (c)

Figure 7. Photo of extraction tank set up; a) sample bucket, b) sample sieve and c) installed bucket.

2.ถังระเหยตัวทำละลาย (Evaporator)

ถังระเหยตัวทำละลายเป็นถังที่มีฝาปิดเป็นฝาโค้ง จำนวน 2 ถังคือถังใหญ่และถังเล็ก (Figure 8) ในถังระเหยใหญ่มี heater ซึ่งเป็นตัวให้ความร้อน ทำให้เกิดการระเหยของตัวทำละลายติดตั้งอยู่ภายในถัง ส่วนถังระเหยเล็กมีตัว heater ให้ความร้อนติดตั้งอยู่ภายนอกถัง เมื่อระเหยตัวทำละลายออกจากสารละลายที่ส่งมาจากถังสกัดภายในถังระเหยขนาดใหญ่จนระดับของสารละลายภายในถังอยู่เหนือตัว heater ภายในถังเล็กน้อย สารละลายจะถูกถ่ายไประเหยตัวทำละลายต่อในถังระเหยขนาดเล็ก เพื่อป้องกันไม่ให้ heater เกิดความร้อนสูงและไหม้ ซึ่งอาจมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของ heater นอกจากนี้อาจส่งผลต่อสีหรือองค์ประกอบของสารสกัดที่ได้ เมื่อสารสกัดระเหยตัวทำละลายออกแล้วจะถูกส่งไปยังถังเก็บตัวอย่างต่อไป

(a) (b)

Figure 8. Photo of (a) big (a) and (b) small evaporator.

3. เครื่องควบแน่น (Condensor)

เครื่องควบแน่นเป็นถังทรงกระบอกที่บรรจุน้ำหล่อเย็นอยู่ภายใน ตัวทำละลายที่ผ่านเข้ามาจะอยู่ในสถานะไอซึ่งบรรจุอยู่ในขดลวดทองแดงที่ติดตั้งอยู่ภายในตัวถัง น้ำหล่อเย็นภายในถังจะทำให้ไอของตัวทำละลายมีอุณหภูมิต่ำลงและกลั่นตัวเป็นของเหลว โดยมีทิศทางการไหลของสารทั้งสองชนิดสวนทางกัน

4. ถังให้ความร้อน (Heater tank)

ถังให้ความร้อนเป็นถังสำหรับต้มสารให้ความร้อน เช่น น้ำมันหรือน้ำเพื่อใช้เป็นตัวควบคุมความร้อนภายในถังสกัด ฝาถังเป็นฝาแบน โดยมีแหล่งให้ความร้อนเป็น Heater 3 เฟส ขนาด 10 กิโลวัตต์ ในการสกัดสารที่ต้องควบคุมอุณหภูมิ สารให้ความร้อนจะถูกสูบผ่านปั๊มให้ไหลวนเข้าไปในขดลวดทองแดงที่บรรจุอยู่ภายในถังสกัด

5. คอลัมน์กักเก็บตัวทำละลาย (Trap column)

คอลัมน์กักเก็บตัวทำละลายมีลักษณะเป็นถังพลาสติกใสรูปทรงกระบอก ใช้สำหรับกักเก็บตัวทำละลายเหลวที่ได้จากการควบแน่น ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการสกัดในภายหลังได้ ภาพของเครื่องควบแน่น ถังให้ความร้อน และคอลัมน์กักเก็บตัวทำละลายแสดงดัง Figure 9

(a) (b) (c)

Figure 9. Photo of condenser (a), heater tank (b) and trap column (c) of batch extractor.

วิธีการทดลอง

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (proximate analysis) ของเนื้อและซังขนุน

นำเนื้อและซังขนุนสดมาล้างทำความสะอาด ปั่นให้ละเอียด แล้วสุ่มตัวอย่างไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (การทดลองละ 3 ซ้ำ) ได้แก่ ความชื้น เถ้า ไขมันโปรตีน และปริมาณสารคาร์โบไฮเดรต ตามวิธีการที่ระบุไว้ใน A.O.A.C (2000) วิเคราะห์และหาค่าเฉลี่ยเพื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อและซังขนุน

2. การเตรียมตัวอย่าง

ตัวอย่างที่นำมาใช้ในการทดลองที่ 1, 3 และ 4 คือการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบที่ใช้, การสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่ง (หัวข้อที่ 3.1 และ 3.2) และการทดสอบสมบัติการต้านการย่อยของสารสกัด เป็นตัวอย่างคนละล็อต โดยเนื้อและซังขนุนที่นำมาใช้ในการทดลองหัวข้อที่ 3.1 ซื้อมาเตรียมและวิเคราะห์พร้อมกัน ตัวอย่างที่นำไปวิเคราะห์ค่าความชื้นและตัวอย่างที่นำไปสกัดเป็นตัวอย่างที่เตรียมในล็อตเดียวกัน วิธีการเตรียมตัวอย่างคือ นำเนื้อและซังขนุนมาล้างทำความสะอาด แยกเมล็ดออกจากเนื้อขนุน ปั่นเนื้อและซังขนุนให้ละเอียดขนาดอนุภาคประมาณ 0.5x0.5x0.5 เซ็นติเมตร ด้วยเครื่องปั่น ทั้งเนื้อและซังขนุนที่เตรียมไว้จะถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งใช้เตรียมเป็นตัวอย่างสด โดยนำไปบรรจุใส่ถุงพลาสติกปิดสนิท นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20

องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการสกัดต่อไป ส่วนที่เหลือนำไปเตรียมเป็นตัวอย่างแห้ง โดยนำไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ความชื้นสุดท้ายของเนื้อและซังขนุนที่ทำให้แห้งมีค่าไม่เกินร้อยละ 30

3. การสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งในระดับห้องปฏิบัติการ

3.1 ชนิดของตัวอย่าง ระดับความเข้มข้นของตัวทำละลายและการกวนต่อร้อยละของปริมาณสารที่สกัดได้และปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งในสารสกัด

นำตัวอย่างที่เตรียมไว้ข้างต้นได้แก่ เนื้อและซังขนุน ทั้งแบบสดและแบบแห้ง มาสกัดด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 และ 95 การสกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดให้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด คือ ชุดที่มีการกวนผสมต่อเนื่องด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาทีและชุดที่มีการกวนเป็นครั้งคราวทุกๆ 30 นาที เพื่อป้องกันการเกาะตัวของอนุภาคตัวอย่างในระหว่างการสกัด ทำการสกัดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่อตัวทำละลายเป็น 1 ต่อ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) เมื่อทำการสกัดจนครบเวลา ให้กรองสารละลายที่ได้ด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อกำจัดตะกอนขนาดเล็กในสารสกัด นำส่วนที่เป็นสารละลายใสไปกำจัดตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ (Vacuum rotary evaporator) ที่ระดับความดัน 175 มิลลิบาร์ (mbar) และควบคุมอุณหภูมิของอ่างน้ำ (water bath) ไว้ที่ 60 องศาเซลเซียส วัดปริมาตรของสารละลายที่เหลือ

นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณสารที่สกัดได้ (Percentage of extraction yield) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar analysis) ด้วยวิธี Modified phenol sulfuric method (Fox and Robyt, 1991) และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar analysis) ด้วยวิธี Modified dinitrosalicylic acid (Miller, 1959) (ตามรายละเอียดที่แสดงในภาคผนวก ค) จากนั้นคำนวณปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งซึ่งคาดว่ามีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก จากสมการที่ (3) เปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ เพื่อคัดเลือกชนิดตัวอย่าง ความเข้มข้นของตัวทำละลายและความจำเป็นของการกวนผสมในระหว่างการสกัด ที่สามารถสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งได้ในปริมาณสูงสุด เพื่อนำไปใช้สำหรับการทดลองในขั้นตอนถัดไป

สมการที่ (3)

ปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่ง (g/kg extract) = ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด - ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (3)

3.2 อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่อตัวทำละลาย อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด และระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

นำตัวอย่างที่ผ่านการคัดเลือกจากหัวข้อ 3.1 มาศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสกัด ดังนี้

ก) อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่อตัวทำละลายในช่วง 1 ต่อ 3 ถึง 1 ต่อ 9 โดยกำหนดสัดส่วนออกเป็น 3 ค่าคือ 1 ต่อ 3, 1 ต่อ 6 และ 1 ต่อ 9 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ

ข) อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดในช่วง 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส โดยกำหนดค่าเป็น 30, 45 และ 60 องศาเซลเซียส

ค) ระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดในช่วง 60 ถึง 180 นาที โดยกำหนดค่าเป็น 60 120 และ 180 นาที

โดยออกแบบการทดลองด้วยเทคนิค Response Surface Methodology (RSM) แบบ Box-behnken design (การศึกษาตัวแปรอิสระ 3 ตัวแปร, ตัวแปรละ 3 ระดับ) และมีค่าตอบสนองของการทดลองคือปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่มีอยู่ในสารสกัด ในการออกแบบการทดลอง เมื่อนำค่าสูงสุดและต่ำสุดของตัวแปรอิสระแต่ละตัวมาแทนลงในสมการที่ 4 ซึ่งเป็นสมการที่ใช้ในการสร้างตัวแปรเข้ารหัสเพื่อจะได้ค่า Code variable ที่แสดงถึงระดับของปัจจัยที่ใช้ (-1, 0 และ 1) พบว่าได้ผลดังแสดงใน Table 7 และสภาวะจริงที่จะใช้ในการสกัดจริงแสดงดัง Table 8 จากนั้นจึงทำการสกัดตัวอย่างที่คัดเลือกได้ตามสภาวะที่กำหนดและทำการวิเคราะห์สารสกัดเช่นเดียวกับหัวข้อที่ 3.1 ทำการวิเคราะห์ข้อมูลระหว่างอิทธิพลของตัวแปรต่อค่าตอบสนอง (Analysis of variance, ANOVA) และสร้างแบบจำลองคณิตศาสตร์แบบสมการกำลังสอง (Full quadratic model) จากโปรแกรม Minitab version 14.0 ดังแสดงในสมการที่ 5

สมการที่ (4)

การคำนวณค่า Code variable;

$$X = \left(\frac{x - \frac{x_{max} - x_{min}}{2}}{\frac{x_{max} - x_{min}}{2}} \right) \qquad (4)$$

เมื่อ X คือค่า Code variable

x คือตัวแปรอิสระ

x_{min} คือค่าต่ำสุดของตัวแปรอิสระ

x_{max} คือค่าสูงสุดของตัวแปรอิสระ

สมการที่ (5) สมการแบบจำลองทางคณิตศาสตร์จำนวน 3 ตัวแปร

$$Y = \sum A_o + \sum_{i=1}^{3} A_i X_i + \sum_{i=1}^{3} A_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{2} \sum_{j=i+1}^{3} A_{ij} X_i X_j \qquad (5)$$

เมื่อ X_1 = คืออัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่อตัวทำละลายเอทานอล (w/v)

X_2 = คืออุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (องศาเซลเซียส)

และ X_3 = คือเวลาที่ใช้ในการสกัด (นาที)

จากสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระกับปริมาณน้ำตาลนอนรีดิว-ซิ่ง ทำให้สามารถวิเคราะห์หาสภาวะที่สกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากตัวอย่างได้สูงสุด จากนั้นนำสภาวะที่ได้ไปทำการสกัดซ้ำในระดับห้องปฏิบัติการ เปรียบเทียบค่าที่วิเคราะห์ได้จริงและค่าที่คำนวณได้จากสมการคณิตศาสตร์ที่ได้จากการทดลองข้างต้น

Table 7. Code variable of independent variables in Box-behnken design.

Treatment	Sample to solvent ratio (w/v)	Temperature (^{o}C)	Time (min)
1	1	1	0
2	-1	0	1
3	0	-1	1
4	1	0	1
5	1	-1	0
6	-1	1	0
7	0	1	-1
8	-1	-1	0
9	0	0	0
10	0	-1	-1
11	0	0	0
12	1	0	-1
13	-1	0	-1
14	0	0	0
15	0	1	1

Table 8. Experimental treatment of solvent ratio, extraction temperature and time using Box-behnken design.

Treatment	Sample to solvent ratio (w/v)	Temperature (^{o}C)	Time (min)
1	1:9	60	120
2	1:3	45	180
3	1:6	30	180
4	1:9	45	180
5	1:9	30	120
6	1:3	60	120
7	1:6	60	60
8	1:3	30	120
9	1:6	45	120
10	1:6	30	60
11	1:6	45	120
12	1:9	45	60
13	1:3	45	60
14	1:6	45	120
15	1:6	60	180

3.3 การสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งด้วยเครื่องสกัดขนาดโรงงานทดลอง

จากสภาวะที่คัดเลือกได้ในหัวข้อที่ 3.2 ให้นำสภาวะดังกล่าวมาสกัดด้วยเครื่องสกัดแบบกะขนาดโรงงานทดลอง เพื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้ ระหว่างการสกัดในระดับห้องปฏิบัติการและการสกัดในระดับโรงงานทดลอง โดยเมื่อเตรียมตัวอย่างแล้ว ให้ทำการทดลองตามขั้นตอนดังต่อไปนี้คือ

1. ใส่ตัวอย่างลงบนตะแกรงใส่ตัวอย่างซึ่งบรรจุอยู่ในถังบรรจุตะแกรงทีละชั้นจากด้านล่าง โดยเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายออกเต็มชั้นอย่างสม่ำเสมอ จนถึงชั้นบนสุด จากนั้นปิดฝาตะแกรง

2. ปั๊มตัวทำละลายซึ่งมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิที่ต้องการเข้าสู่ระบบจากด้านล่างของถังสกัด ซึ่งเชื่อมต่อกับหัวฉีดที่ทำหน้าที่สเปรย์ตัวทำละลายเข้าสู่ถังสกัดที่บรรจุตะแกรงใส่ตัวอย่างอยู่ภายใน ทำให้การสัมผัสกันระหว่างตัวอย่างกับตัวทำละลายเกิดได้ทั่วถึง

3. ทำการสกัดตัวอย่างจนครบเวลาที่กำหนด โดยสุ่มตัวอย่างในระหว่างการสกัดออกมาวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่สกัดได้ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซิ่ง และคำนวณหาปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งเช่นเดียวกับการทดลองในหัวข้อ 3.1 และ 3.2 เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้ จนสิ้นสุดระยะเวลาในการสกัด ให้ทำการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้ในระดับห้องปฏิบัติการและจากการสกัดด้วยเครื่องสกัดแบบกะขนาดโรงงานทดลอง รวมถึงเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลองทั้งสองสภาวะกับปริมาณน้ำตาลที่คำนวณได้จากสมการทางคณิตศาสตร์ซึ่งได้จากผลการทดลองหัวข้อที่ 3.2

4. การทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์และกรดในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหาร

การทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์และกรดในสภาวะจำลอง (*In vitro*) ของระบบทางเดินอาหาร จะทำในสารละลายน้ำลายเทียม (Artificial human saliva) ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 6.8 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร (ชั่งและเตรียมสารตามวิธีที่แสดงดังภาคผนวก ก ข้อที่ 3.1) ที่มีสารสกัดละลายอยู่ปริมาณ 30 กรัม (ดัดแปลงจาก Fässler *et al.,* 2006)

4.1 การทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ human saliva α –amylase

เติมสารละลายเอนไซม์ human saliva α –amylase (วิธีเตรียมแสดงใน ภาคผนวก ก ข้อ 3.2) ลงในสารละลายน้ำลายเทียมที่มีตัวอย่างละลายอยู่ซึ่งเตรียมไว้ข้างต้น ให้เอนไซม์มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.33 unit/ml นำส่วนผสมที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 40 นาที โดยสุ่มเก็บตัวอย่างครั้งละ 5 มิลลิลิตรใส่ไว้ในหลอดทดลองที่มีฝาปิดที่เวลา 0, 5, 10, 15, 20, 30 และ 40 นาที นำมาต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาทีและแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ของตัวอย่างที่สุ่มมา เพื่อคำนวณร้อยละของปริมาณน้ำตาลที่ถูกย่อยจากสมการที่ 6

สมการที่ (6)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การย่อย (\%)} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สุดท้าย} - \text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น}}{\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด} - \text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น}} \text{ X } 100 \quad (6)$$

4.2 การทนต่อการย่อยด้วยกรดในกระเพาะอาหาร

นำสารละลายที่เหลือจากการทดลองในหัวข้อที่ 5.1 มาวัดปริมาตร และเติมสารเคมีต่างๆ ดังแสดงในภาคผนวก ก นำไปกวนผสมให้เข้ากันเพื่อปรับสภาวะของสารละลายให้ใกล้เคียงกับสภาวะของสารละลายอิเล็กโตรไลท์ในกระเพาะอาหาร จากนั้นปรับพีเอชของสารละลายให้เป็น 2.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และสุ่มตัวอย่างที่เวลา 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180 และ 240 นาที โดยภายหลังการสุ่มตัวอย่างให้นำสารละลายมาปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วย 1.0 M NaOH เพื่อหยุดปฏิกิริยาที่เกิดจากการย่อยด้วยกรด ก่อนนำไปทำการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การย่อยเช่นเดียวกับหัวข้อที่ 4.1

4.3 การทดสอบความสามารถในการทนต่อการทนต่อการย่อยของเอนไซม์ในลำไส้เล็ก (pancrease porcine α –amylase)

นำสารสกัดที่เหลือจากการย่อยด้วยกรดในหัวข้อที่ 4.2 มาปรับพีเอชให้เป็น 6.9 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อปรับสภาวะของสารละลายให้ใกล้เคียงกับการทำงานของเอนไซม์ในลำไส้เล็ก จากนั้นเติมเอนไซม์ porcine pancrease α –amylase (type VI-B, Sigma) ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายในสารละลายเท่ากับ 0.75 unit/ml นำสารละลายไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และสุ่มตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาทีและแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ก่อนทำการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การย่อยเช่นเดียวกับหัวข้อที่ 4.1 และ 4.2

บทที่ 3

ผล และวิจารณ์ผลการทดลอง

1. องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อขนุนและซังขนุน

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อขนุน (bulb) และซังขนุน (fiber) ดังแสดงใน Table 9 พบว่าเนื้อและซังขนุนประกอบด้วยน้ำ (moisture) และของแข็ง (solid) อื่นๆ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) รองลงมาคือโปรตีน (protein) เถ้า (ash) และไขมัน (fat) ตามลำดับ โดยแต่ละองค์ประกอบในตัวอย่างทั้งสองชนิด พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน ยกเว้นไขมัน ซึ่งพบว่าในซังขนุนมีปริมาณสูงกว่าเนื้อขนุนประมาณ 3 เท่า

Table 9. Proximate analysis of bulb and fiber of jackfruit Thongsudjai cultivar (% wet basis).

Proximate content (%)	Bulbs	Fibers
Moisture	78.49±0.02	79.33±0.17
Ash	0.65±0.02	0.79±0.04
Fat	0.20±0.05	0.62±0.02
Protein	0.88±0.02	1.13±0.05
*Carbohydrate	19.78±0.14	18.13±0.11

*Carbohydrate content (%) = 100- moisture- ash- lipid- protein

การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของขนุนส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในส่วนของเนื้อและเมล็ดขนุน ในขณะที่การศึกษาในซังขนุนพบว่ามีน้อยมาก จากรายงานของ Goswami และคณะ (2011) พบว่าเนื้อขนุนจำนวน 3 สายพันธุ์ (*Khaja, Dorasha* และ *Ghila*) ที่ปลูกบนพื้นที่ที่แตกต่างกันในประเทศบังกลาเทศทั้งหมด 5 ตัวอย่าง มีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างของสายพันธุ์ บริเวณที่เพาะปลูก และปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของพืช โดยเนื้อขนุนที่นำมาศึกษาทั้งหมด พบว่า มีความชื้นร้อยละ 79.62-84.44, ปริมาณเถ้าร้อยละ 0.70-1.04 และมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 0.57-0.97 ตามลำดับ ในขณะที่ Baliga และคณะ (2011) ได้รวบรวมรายงานเกี่ยวกับการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อขนุนอ่อน ขนุนสุกและเมล็ดขนุน พบว่าเนื้อขนุนสุกมีความชื้นร้อยละ 72.0-94.0, ปริมาณไขมันร้อยละ 0.1-0.4 และมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 1.2-1.9 ตามลำดับ จากข้อมูลองค์ประกอบทางทางเคมีในเนื้อขนุนพันธุ์ทองสุดใจที่ได้จาก

การทดลอง พบว่ามีความสอดคล้องกับรายงานของ Souza และคณะ (2009) ซึ่งพบว่าเนื้อขนุนมีปริมาณความชื้น, ไขมัน, โปรตีนและคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 75.39, 0.30, 0.77 และ 19.63 ตามลำดับ นอกจากนี้ การศึกษาชนิดของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและคู่ที่เป็นองค์ประกอบในเนื้อและซังขนุน พบว่า วัตถุดิบทั้งสอง ประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิดที่เหมือนกัน คือฟรุกโทส (fructose), กลูโคส (glucose) และ ซูโครส (sucrose) (ดังแสดงในภาคผนวก ข) แต่มีปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดแตกต่างกัน กล่าวคือ โดยรวมในเนื้อขนุนมีปริมาณน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด สูงกว่าในซังขนุน โดยเฉพาะน้ำตาลซูโครสซึ่งมีปริมาณสูงกว่าในซังขนุนมาก Shamasudin และคณะ (2009) กล่าวว่าในกระบวนการสุก (ripening process) เนื้อขนุนจะมีปริมาณน้ำตาลซูโครสสูงกว่าน้ำตาลฟรุกโทสและกลูโคสเสมอ โดยปริมาณน้ำตาลทั้งสามชนิดจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ในระหว่างกระบวนการสุกของวันที่ 3 ถึงวันที่ 8 ซึ่งเป็นลักษณะทั่วไปของผลไม้ที่จะมีปริมาณน้ำตาลอิสระเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีความสุกเพิ่มขึ้น โดยปริมาณน้ำตาลซูโครสจะเพิ่มขึ้นเป็นสามเท่าในขณะที่น้ำตาลฟรุกโทสและกลูโคสจะเพิ่มขึ้นถึงหกเท่าในระหว่างการสุก (Selvaraj and Pal, 1989)

เนื่องจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและคู่ที่พบในเนื้อและซังขนุนเป็นน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโทสและซูโครส จึงมีความเป็นไปได้ว่า โอลิโกแซคคาไรด์ในเนื้อและซังขนุนอาจจัดอยู่ในกลุ่มของฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งพืชบางชนิดสามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ในธรรมชาติ โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้น และอาศัยกระบวนการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์เพื่อสังเคราะห์เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดแตกต่างกัน (n = 2- 9)

2. การสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งในระดับห้องปฏิบัติการ

2.1 ผลของความชื้น ความเข้มข้นตัวทำละลายและการกวนผสมต่อปริมาณสารที่สกัดได้

ในการเตรียมตัวอย่าง เมื่อนำเนื้อและซังขนุนทั้งแบบสดและที่ผ่านการอบแห้งมาวิเคราะห์ความชื้นก่อนนำไปใช้ในการสกัด พบว่าตัวอย่างมีความชื้นแตกต่างกันดังแสดงใน Table 10 โดยการอบแห้งเนื้อขนุนด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำให้ความชื้นของเนื้อขนุนลดลงร้อยละ 68.44 โดยความชื้นเริ่มต้นคือร้อยละ 86.61 เมื่อผ่านการอบแห้ง (dried bulb) พบว่ามีความชื้นร้อยละ 27.33 สำหรับซังขนุน พบว่าความชื้นมีค่าลดลงร้อยละ 63.21 จากความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 71.04 เมื่ออบแห้ง (dried fiber) พบว่ามีความชื้นร้อยละ 26.13

Table 10. Moisture content of fresh and dried bulb and fiber of jackfruit.

Sample	Moisture content (%)
Fresh bulb	86.61±0.34
Dried bulb	27.33±0.27
Fresh fiber	71.04±0.02
Dried fiber	26.13±0.06

การวิเคราะห์ผลผลิตสารที่สกัดได้ (Extraction yield) จากเนื้อขนุนดังแสดงใน Figure 10 พบว่าความเข้มข้นของตัวทำละลาย (เอทานอล) ที่ใช้และลักษณะของการกวน (ครั้งคราวและต่อเนื่อง)ไม่มีผลต่อปริมาณสารที่สกัดได้อย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) แต่ปริมาณความชื้นในตัวอย่างที่ใช้สกัดส่งผลต่อปริมาณสารที่สกัดได้อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) โดยตัวอย่างสดมีปริมาณสารที่สกัดได้สูงกว่าตัวอย่างแห้ง

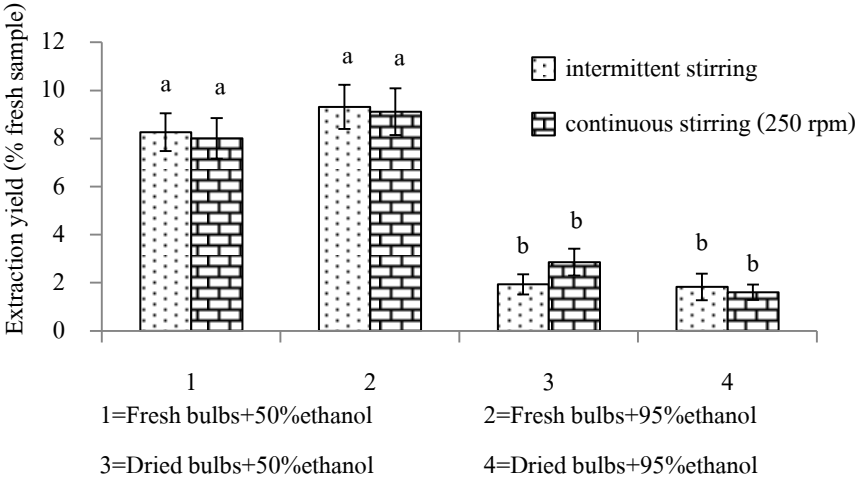


Figure 10. Extraction yield (%) of jackfruit bulbs under intermittent (interval 30 minute) and continuous stirring (250 rpm) at room temperature for 3 hour with sample to solvent ratio of 1:3. Different small letters above each column show significant differences of value (P<0.05).

การเตรียมตัวอย่างแห้งด้วยการอบแห้งแบบใช้ลมร้อน เป็นการกำจัดน้ำออกจากวัสดุโดยอาศัยการพาความร้อน (Convection) ซึ่งทำให้วัสดุเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง โดยโครงสร้างธรรมชาติของวัสดุจะถูกทำลายและสูญเสียความสามารถในการยอมให้สารต่างๆ ไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ โครงสร้างภายนอกจะมีความแข็งมากขึ้น (Karel, 1980; Lewicki, 1998; Lewicki

and Jakubczyk, 2004) ในระหว่างการทำแห้ง น้ำที่ถูกกำจัดออกจะทำให้ภายในเซลล์มีลักษณะเป็นโพรง และหดตัวลงเมื่อเวลาผ่านไป เนื่องจากเซลล์เคลื่อนตัวเข้ามาอยู่ชิดกัน วัสดุจึงเกิดการเสียรูป และส่งผลต่อคุณสมบัติในการถ่ายโอนมวลที่บริเวณเนื้อเยื่อด้านนอก การหดตัวเนื่องจากการทำแห้งผักและผลไม้ที่เกิดขึ้น ส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณความชื้นเริ่มต้นของตัวอย่าง (Sjöholm and Gekas, 1995; Wang and Brennan, 1995; Witrowa-Rajchert, 1999 Lewicki and Pawlak, 2003) เนื้อขนุนสดที่นำมาสกัดมีความชื้นเริ่มต้นสูง การอบแห้งด้วยลมร้อนทำให้ความชื้นลดลงถึงร้อยละ 68.44 จึงทำให้โครงสร้างภายในเกิดการหดตัว ผิวด้านนอกของตัวอย่างแข็งมากขึ้น การถ่ายโอนมวลของตัวถูกละลายระหว่างเฟสของตัวทำละลายและตัวอย่าง จึงเกิดได้ยากขึ้น ในทางตรงกันข้าม เนื้อขนุนสดประกอบด้วยเซลล์ที่มีความยืดหยุ่นมากกว่า การที่ตัวทำละลายจะเข้าไปสัมผัสกับตัวถูกละลายภายในเซลล์ตัวอย่างจึงอาจเกิดได้ง่ายกว่า ส่งผลให้การถ่ายโอนมวลสารในระหว่างการสกัดด้วยตัวอย่างสดเกิดได้ดีกว่า ปริมาณสารที่สกัดได้จากตัวอย่างเนื้อขนุนสดจึงมีปริมาณมากกว่าการสกัดด้วยตัวอย่างแห้ง โดยปริมาณสารที่สกัดได้สูงสุดได้จากการสกัดเนื้อขนุนสดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ในสภาวะที่กวนต่อเนื่องและกวนเป็นครั้งคราว ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 9.32 และ 9.11 ตามลำดับ (Figure 11) ผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของวีระพงศ์ พรสมิทธิกุล (2552) ซึ่งพบว่า การสกัดเปลือกด้านในขนุนด้วยสารละลายเอทานอลร้อยละ 95 หรือการใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย การทำแห้งก่อนการสกัด มีผลทำให้เซลล์ตัวอย่างมีการหดตัว การแพร่ผ่านของตัวทำละลายเข้าสู่ตัวอย่างเกิดได้ยาก ในการสกัดจึงต้องแช่ตัวอย่างกับตัวทำละลายไว้ระยะเวลาหนึ่งเพื่อให้ตัวอย่างพองตัวหรือมีการดูดซับตัวทำละลายไว้ก่อนเริ่มทำการสกัด

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ปริมาณสารที่สกัดได้จากเนื้อขนุนสดและแห้งไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเอทานอลหรือลักษณะของการกวน แต่ขึ้นอยู่กับความชื้นของตัวอย่าง (สดหรือแห้ง) ที่นำมาใช้สกัดอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) นอกจากนี้ การสกัดเนื้อขนุนพันธุ์ทองประเสริฐด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกัน โดยการเติมตัวทำละลายจนท่วมตัวอย่างแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ในระหว่างการสกัดมีการกรองแยกตัวอย่างออกแล้วเติมตัวทำละลายลงไปใหม่จำนวน 3 ครั้ง พบว่าปริมาณสารที่สกัดได้มีค่าเท่ากับร้อยละ 10.84 ของน้ำหนักสด (ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก, 2550) ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทดลองครั้งนี้

การสกัดซังขนุนสดด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ในสภาวะที่มีการกวนอย่างต่อเนื่องสามารถสกัดตัวถูกละลายออกมาได้ปริมาณสูงสุด คิดเป็นร้อยละ 5.89 ของน้ำหนักตัวอย่างสด รองลงมา คือการสกัดตัวอย่างสดด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 ที่มีการกวนเป็นครั้งคราว ปริมาณสารที่สกัดได้คิดเป็นร้อยละ 4.60 ในขณะที่การสกัดตัวอย่างสดด้วยเอทานอลร้อยละ 50 ที่มีกวนแบบต่อเนื่องและการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 ที่มีการกวนเป็นครั้ง

คราวมีปริมาณสารที่สกัดได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) โดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 3.36 และ 3.32 ตามลำดับ สำหรับปริมาณสารที่สกัดได้จากซังขนุนแห้งพบว่า ลักษณะของการกวนไม่มีผลต่อปริมาณสารที่สกัดได้อย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) การใช้สารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 ได้ปริมาณสารสกัดจากซังขนุนแห้งมากกว่าการใช้สารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 (Figure 11)

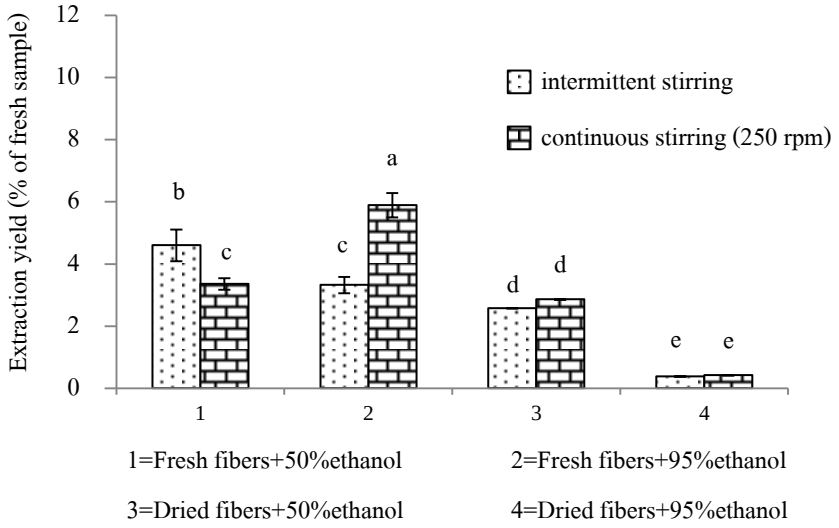


Figure 11. Extraction yield (%) of jackfruit fibers under intermittent (interval 30 minute) and continuous stirring (250 rpm) at room temperature for 3 hour with sample to solvent ratio of 1:3. Different small letters above each column show significant differences of value (P<0.05).

โดยทั่วไปการกวนในระหว่างการสกัดจะทำให้เกิดแรงเฉือน (shear stress) ที่บริเวณผิวของตัวอย่างกับตัวทำละลาย การสัมผัสกันระหว่างเฟสทั้งสองจึงเกิดได้ดีขึ้น (Joshi *et al*., 1996) โอกาสที่จะเกิดการถ่ายโอนมวลของตัวถูกละลายไปยังเฟสของตัวทำละลายจึงเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งจากการทดลอง พบว่าปริมาณสารสกัดเมื่อสกัดซังขนุนสดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ที่มีการกวนต่อเนื่องสูงกว่าการซังขนุนสดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ที่มีการกวนเป็นครั้งคราว (Figure 11) อย่างไรก็ตาม เมื่อสกัดซังขนุนสดด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 ที่มีการกวนอย่างต่อเนื่อง พบว่าปริมาณสารที่สกัดได้มีค่าลดลง ผลที่ได้อาจเกิดจากตัวอย่างจากการสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 กรองออกได้ยาก เป็นเมือกและยุ่ย จึงอาจมีการปะปนของตัวถูกละลายไปในของเสียที่กำจัดทิ้ง ทำให้ข้อมูลคลาดเคลื่อน ส่วนตัวอย่างจากการสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 แยกออกจากตัวทำละลายได้ง่ายกว่า จึงได้ผลการทดลองที่แม่นยำกว่า

Knudsen และ Li (1991) กล่าวว่า การสกัดสารคาร์โบไฮเดรตมวลโมเลกุลต่ำ (low-molecular weight carbohydrates) จากพืช ควรใช้น้ำหรือตัวทำละลายชนิดที่ละลายน้ำได้เป็นตัวทำละลาย แต่เนื่องจากการใช้น้ำเป็นตัวทำละลายระบบอาจถูกรบกวนจากการละลายของสารอื่นๆ ที่มีขั้วเช่นเดียวกับน้ำ ได้แก่ เส้นใยพอลิแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำได้และสารในกลุ่มโปรตีน (Johensen *et al*., 1996) ดังนั้น การสกัดสารในกลุ่มนี้จึงนิยมใช้สารละลายแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นสูงแทนการใช้น้ำ เช่น ในกรณีที่ต้องการสกัดสารคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ที่มีค่า DP หรือหน่วยย่อยของน้ำตาลที่มาประกอบกันเป็นสารพอลิเมอร์มากกว่า 20 มักจะใช้เอทานอลร้อยละ 80 เป็นตัวทำ-ละลาย เนื่องจากที่ความเข้มข้นดังกล่าว สามารถตกตะกอนและแยกสารดังกล่าวออกมาได้ ในขณะที่สารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าจะละลายอยู่ในสารละลาย เอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) คือส่วนที่มีขั้ว (polar) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ซึ่งไม่มีขั้ว (non-polar) การเจือจางด้วยน้ำจึงเป็นการเพิ่มความมีขั้วให้กับสารละลาย ทำให้น้ำตาลโมเลกุลเล็กๆ สามารถละลายออกมาได้มากขึ้น ในขณะที่คาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่หรือมี DP สูงจะถูกตกตะกอนออกมาเมื่อใช้เอทานอลที่ความเข้มข้นสูงขึ้น (Dobrenz *et al*., 1993; Oku *et al*., 1998)

เมื่อนำสารสกัดจากเนื้อและซังขนุนทั้งแบบสดและแบบแห้ง ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซิ่ง เพื่อคำนวณปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่ง ผลการวิเคราะห์แสดงดัง Figure 12a และ 12b ตามลำดับ ปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้จากเนื้อขนุนสด (Figure 12a) มีค่ามากกว่าในเนื้อขนุนแห้ง โดยการสกัดเนื้อขนุนสดด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ที่มีการกวนอย่างต่อเนื่องสามารถสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งได้สูงสุด คือ 321.52 กรัมต่อกิโลกรัมสารสกัด (g/kg extract) มากกว่าชุดทดลองที่มีการกวนเป็นครั้งคราว (122.48 g/kg extract) ซึ่งสอดคล้องกันกับปริมาณสารที่สกัดได้จากเนื้อขนุน (Figure 10) ในขณะที่การสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 พบว่าการกวนไม่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งอย่างมีนัยสำคัญ (P >0.05)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้จากซังขนุนดังแสดงใน Figure 12b พบว่า การสกัดซังขนุนสดด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ในสภาวะที่มีการกวนอย่างต่อเนื่องสามารถสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งได้สูงสุดคิดเป็นร้อยละ 126.89 g/kg extract ซึ่งไม่แตกต่างกันกับการสกัดซังขนุนแห้งด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 ทั้งในแบบที่มีการกวนอย่างต่อเนื่องและกวนเป็นครั้งคราวซึ่งมีปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้เท่ากับ 150.39 และ 130. 39 g/kg extract ตามลำดับ ในขณะที่ชุดการทดลองอื่นๆ มีปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

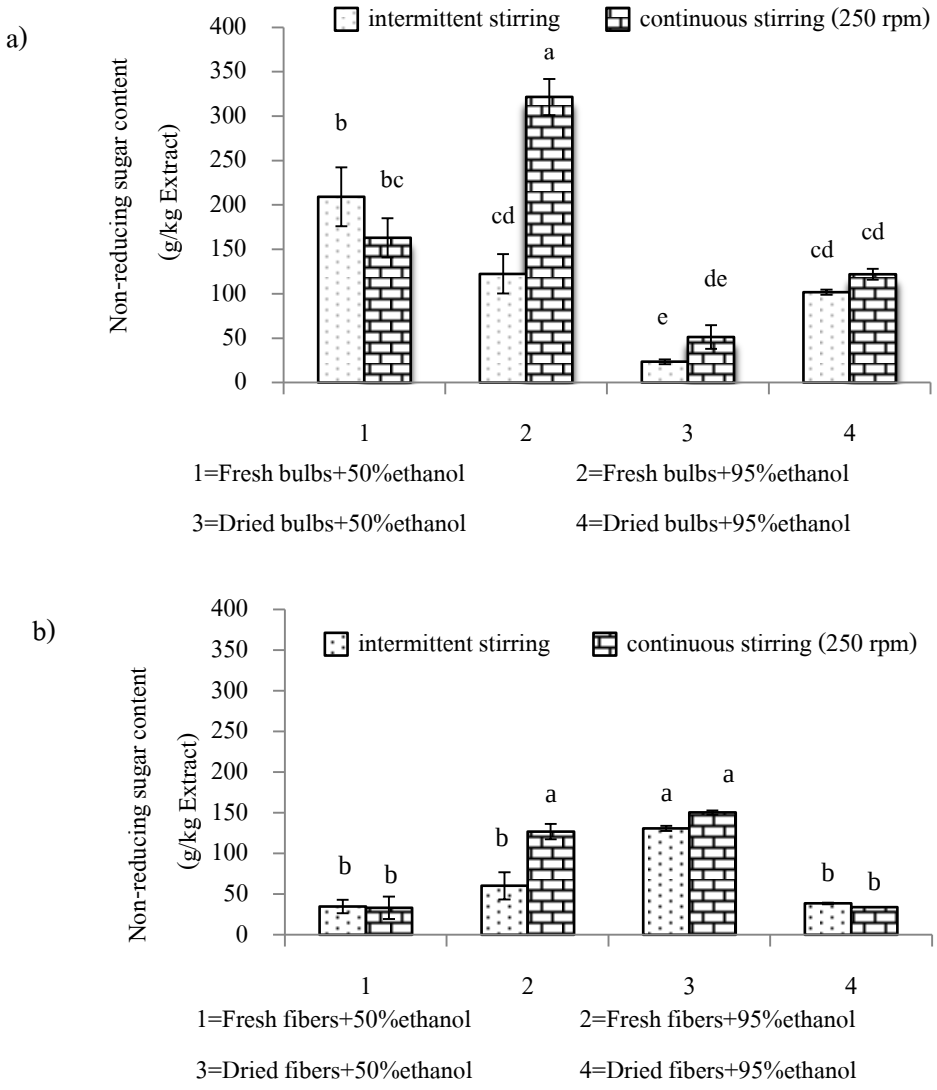


Figure 12. Non-reducing sugar contents of jackfruit bulb (a) and fiber extracts (b) under intermittent (interval 30 minute) and continuous stirring (250 rpm) at room temperature for 3 hour with sample to solvent ratio of 1:3. Different small letters above each column show significant differences of value (P<0.05).

เนื่องจากใช้ตัวทำละลายที่แตกต่างกันในการสกัด แต่สามารถสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน ผลการทดลองที่ได้อาจเกิดจากตัวอย่างและความสามารถของตัวทำละลายที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งจาก Figure 12b จะเห็นว่า ถ้าใช้ตัวอย่างสดในการสกัด การใช้เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 มีแนวโน้มที่จะสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งออกมาได้ในปริมาณมากกว่า ในทางตรงกันข้าม ถ้าใช้ตัวอย่างแห้งในการสกัด การใช้เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 สามารถสกัดน้ำตาล

นอนรีดิวซิ่งออกมาได้มากกว่า ทั้งนี้ อาจเกิดจากการทำแห้งทำให้องค์ประกอบที่เป็นน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งในซังขนุนที่สามารถละลายน้ำได้มีความเข้มข้นขึ้น ทำให้สามารถสกัดออกมาได้ในปริมาณมากขึ้น และไม่แตกต่างกันกับปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดจากตัวอย่างสดโดยใช้เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ในสภาวะที่มีการกวนต่อเนื่องอย่างมีนัยสำคัญ (P >0.05)

ตัวอย่างการสกัดน้ำตาลจากเมล็ดถั่วเหลืองของ Giannoccaro และคณะ (2006) พบว่าการใช้สารละลายเอทานอลในช่วงร้อยละ 10 ถึงร้อยละ 50 สามารถสกัดน้ำตาลจากเมล็ดถั่วเหลืองได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) แม้จะเพิ่มอุณหภูมิในระหว่างการสกัดจาก 25 เป็น 50 และ 80 องศาเซลเซียสแล้วก็ตาม ขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลเป็นร้อยละ 80 สามารถสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้สกัดให้สูงขึ้นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่สกัดได้ก็จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเช่นกัน น้ำตาลนอนรีดิวซิ่งซึ่งเป็นสารคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลต่ำ มีค่า DP ไม่เกิน 20 ซึ่งโดยทั่วไปมี DP 3-10 ถูกสกัดได้ด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วสูงหรือใช้เอทานอลความเข้มข้นต่ำ (Xiaoli *et al*., 2008) แต่จากการทดลองนี้ พบว่าการใช้สารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 สามารถสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากเนื้อขนุนสดได้มากกว่าเนื้อขนุนแห้ง ในขณะที่สารละลายเอทานอลทั้งสองความเข้มข้นคือร้อยละ 50 และ 95 สามารถสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากซังขนุนสดและแห้งได้มีปริมาณไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้กับงานวิจัยของ Giannoccaro และคณะ (2006) เป็นพืชต่างชนิดกัน ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก และคณะ (2550) กล่าวว่า ชนิดและปริมาณของโอลิโกแซคคาไรด์หรือพรีไบโอติกที่เป็นองค์ประกอบในพืชแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช อายุที่เก็บเกี่ยว ความสุก ปริมาณความชื้นและสภาพที่ทำการเพาะปลูก นอกจากนี้ ในการทดลองไม่ได้มีการบ่งชี้ชนิดของน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งซึ่งคาดว่าเป็นน้ำตาลในกลุ่มของโอลิโกแซคคาไรด์ แต่ใช้ค่าที่ได้จากการคำนวณผลต่างของปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid method โดยการย่อยน้ำตาลทั้งที่เป็น oligomeric และ polymeric sugars ให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monomers) ด้วยกรดซัลฟุริกเข้มข้น (Fox and Robyt, 1991) จากนั้นจึงนำมาหักลบกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่งที่มีอยู่ในสารสกัด ซึ่งวิเคราะห์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid method (Miller,1959) และเนื่องจากตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองมีน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งเป็นองค์ประกอบร่วมด้วย โดยเฉพาะในเนื้อขนุน ซึ่งพบในปริมาณสูง ดังนั้น ปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างทั้งสองส่วน จึงอาจมีค่าน้อยกว่าค่าที่ได้จากการทดลอง

Figure 13 แสดงโครมาโทแกรมของสารสกัดที่ได้จากเนื้อขนุนซึ่งวิเคราะห์โดยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) พบว่าสารสกัดจากเนื้อขนุนที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ประกอบด้วยน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีค่า DP เท่ากับ 4 (RT= 27.745

min) และ DP ในช่วง 6-7 (RT= 22.448 min) ประมาณร้อยละ 11 และ 2.18 ตามลำดับ และประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส (RT= 32.851 min) กลูโคส (RT= 40.329 min) และฟรุกโทส (RT= 43.812 min) เท่ากับร้อยละ 44.82, 25.02 และ 18.86 ของสารสกัด ตามลำดับ จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยเทคนิค GPC (Gel permeation chromatography) ในงานวิจัยของ Wichienchot และคณะ (2011) พบว่าเนื้อขนุนพันธุ์ทองประเสริฐที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ประกอบด้วยสารคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1,116, 461 และ 1,080 ดาลตัน ตามลำดับ โดยโอลิโกแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบค่า DP เท่ากับ 6 ซึ่งเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีความยาวโซ่ปานกลาง (medium chain lengths) และจากการทดลองพบว่าโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อขนุนพันธุ์ทองสุดใจก็มี DP ที่ใกล้เคียงกัน แต่มีโอลิโกแซคคาไรด์ที่มี DP เท่ากับ 4 รวมอยู่ด้วย ซึ่งทั้งนี้ อาจเกิดจากพันธุ์ของพืช อายุในการเก็บเกี่ยวและสภาวะที่เพาะปลูกที่แตกต่างกัน

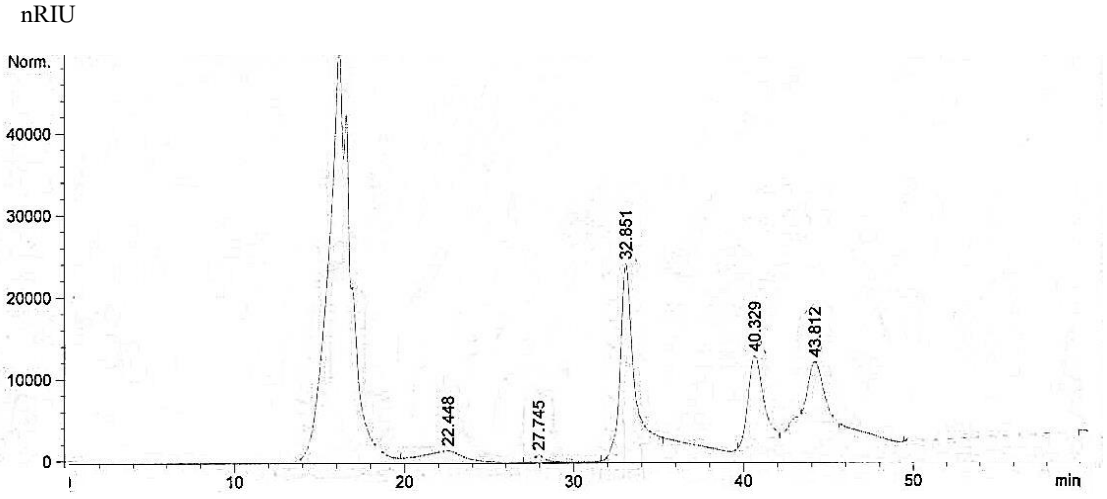


Figure 13. HPLC chromatogram of mono-, di- and oligosaccharides in jackfruit bulb extract.

จากผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดข้างต้น เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสารเป้าหมายที่สกัดได้ ซึ่งพบว่าน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้จากเนื้อขนุนมีปริมาณสูงกว่า ดังนั้น จึงคัดเลือกการสกัดเนื้อขนุนสดด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ในสภาวะที่มีการกวนต่อเนื่องด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที (rpm) ไปใช้สำหรับการศึกษาในขั้นตอนถัดไป

2.2 อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่อตัวทำละลาย อุณหภูมิที่ใช้ในสกัด และระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัด

เมื่อนำเนื้อขนุนสดมาสกัดด้วยสารเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 กวนต่อเนื่องด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาทีตามสภาวะที่กำหนดไว้ใน Table 8 ได้ผลแสดงดัง Table 11 ภายหลังการวิเคราะห์ผลของตัวแปร (Analysis of variance, ANOVA) และสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ตามแบบจำลองสมการกำลังสอง (Full quadratic model) ที่อธิบายไว้ในบทที่ 2 หัวข้อที่ 3.2 ได้สมการแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ดังสมการที่ 7

สมการที่ (7)

$$Y = -497.755-21.95X_1+0.831X_2+24.725X_3+9.649X_3^2-1.854X_1X_3$$

เมื่อ Y = ปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซ์ (Non-reducing sugar content, g/kg extract)

X_1 = อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (Temperature, ^oC)

X_2 = เวลาที่ใช้ในการสกัด (Time extraction, min)

X_3 = อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่อตัวทำละลาย (w/v)

ข้อมูลที่ได้จากสมการจำลองทางคณิตศาสตร์ ในสมการที่ 7 ซึ่งแสดงถึงอิทธิพลของตัวแปรแต่ละตัวต่อค่าตอบสนอง ประกอบด้วย ตัวแปรเชิงเส้น (X_1, X_2 และ X_3) ตัวแปรเชิงซ้อน (X_1X_2, X_2X_3 และ X_1X_3) และตัวแปรยกกำลังสอง (X_1^2, X_2^2 และ X_3^2) จากสมการเมื่อทดลองแทนค่าของตัวแปรต่างๆ ลงในสมการด้วยตัวเลขเดียวกับที่ใช้จริงในการทดลอง เพื่อทำนายปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซึ่งที่ควรสกัดได้ และนำมาพล๊อตกราฟเพื่อเปรียบเทียบกันระหว่างค่าที่ได้จากการทำนายและค่าที่ได้จากการทดลองจริงพบว่า กราฟมีลักษณะแสดงดัง Figure 14 ซึ่งพบว่าปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซึ่งที่ได้จากการทำนายและที่ได้จากการทดลองจริงมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่า R^2 (Multiple correlation coefficient) ที่แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างค่าทั้งสองค่า และความน่าเชื่อถือของสมการแบบจำลองที่ได้ เท่ากับ 0.872 ซึ่งเข้าใกล้ 1 แสดงว่าปริมาณน้ำตาลนอนรีดิว-ซึ่งที่ได้จากการทำนายมีค่าใกล้เคียงกับค่าจริงที่ได้จากการทดลองร้อยละ 87.2 ซึ่งโดยรวมแล้วให้ค่าต่ำกว่าที่สกัดได้จริง

Table 11. Non-reducing sugar contents of treatment using experimental design by Box-behnken with RSM technique.

Treatment	Sample to solvent ratio (w/v)	Temperature (C^o)	Time (min)	Non-reducing sugar content (g/kg extract)
1	1:3	30	120	143.24±2.55
2	1:9	30	120	310.82±1.81
3	1:6	30	180	160.25±0.77
4	1:3	45	180	232.93±2.70
5	1:3	45	60	97.50±0.28
6	1:9	45	60	388.23±1.81
7	1:6	45	120	112.36±0.62
8	1:9	45	180	261.56±0.89
9	1:9	60	120	62.51±3.02
10	1:6	45	120	132.61±3.19
11	1:6	45	120	115.89±1.07
12	1:6	60	60	152.80±1.95
13	1:6	60	180	97.04±1.85
14	1:3	60	120	222.76±1.33
15	1:6	30	60	128.18±2.59

เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์หน้าตัวแปรอิสระแต่ละตัวข้างต้นที่ได้จากแบบจำลองสมการทางคณิตศาสตร์ โดยไม่คำนึงถึงเครื่องหมายบวกหรือลบซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่ศึกษากับค่าตอบสนอง ว่าแต่ละปัจจัยนั้นมีความแปรผันตรงหรือแปรผันแบบผกผันกับปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้ พบว่าสัมประสิทธิ์หน้าตัวแปรแสดงอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่อตัวทำละลาย (X_3) มีค่าสูงกว่าอุณหภูมิ (X_1) และเวลาที่ใช้ในการสกัด (X_2) ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 12 โดยตัวเลขที่ระบุในตาราง แสดงให้เห็นถึงลำดับความสำคัญของตัวแปรต่อค่าตอบสนองหรือปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้ ซึ่งพบว่าปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้มีอิทธิพลมาจากอัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลายที่ใช้เป็นปัจจัยหลัก ปัจจัยที่มีผลรองลงมาคืออุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดและเวลาที่ใช้ในการสกัด ตามลำดับ

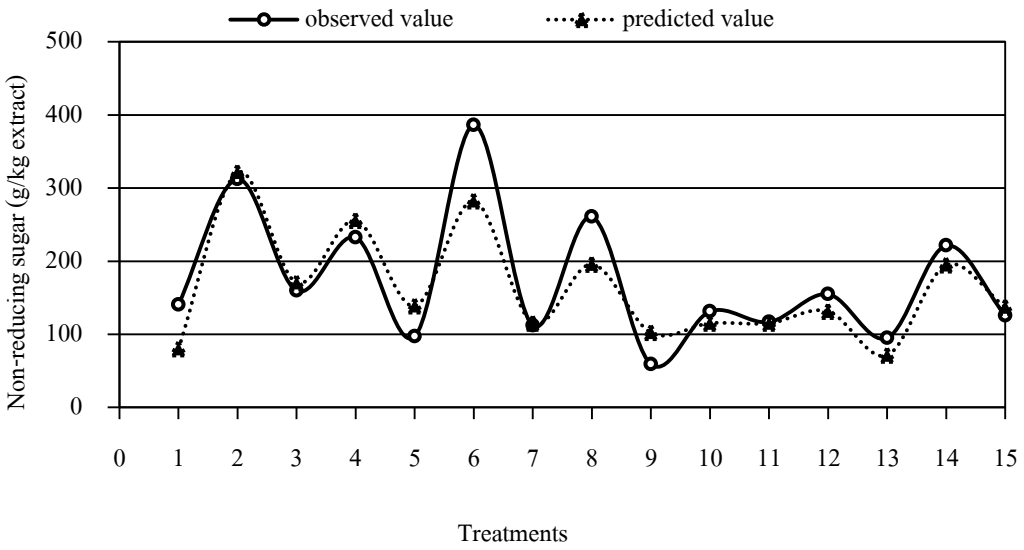


Figure 14. Comparison on non-reducing sugar content of predicted and observed values obtained from experiments in the same conditions.

Table 12. Coefficient values of each factors which were investigated.

Variables	Factors	Coefficient values
Constant	-	(-) 497.755
X_1	Extraction temperature (^oC)	(-) 21.950
X_2	Extraction time (min)	(+) 0.831
X_3	Sample to solvent ratio (w/v)	(+) 24.725
$X_1 X_3$	Interaction effect	(-) 1.854
X_3^2	Square effect	(-) 9.649

(-) หมายถึง ปัจจัยมีผลในทางลบหรือมีความแปรผันแบบผกผันกับค่าตอบสนอง

(+) หมายถึง ปัจจัยมีผลในทางบวกหรือมีความแปรผันตรงกับค่าตอบสนอง

เมื่อพิจารณาเครื่องหมายทางคณิตศาสตร์หน้าสัมประสิทธิ์ของตัวแปรอิสระแต่ละตัวพบว่าเครื่องหมายหน้าตัวแปร X_2 และ X_3 มีค่าเป็นบวก หมายถึงการเพิ่มระดับของปัจจัยส่งผลให้ค่าตอบสนองมีค่าเพิ่มขึ้นด้วย หรืออธิบายได้ว่าการเพิ่มเวลาในการสกัด (60, 90 และ 120 นาที) และอัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลาย (1:3, 1: 6 และ 1:9 w/v) ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้มีค่าสูงขึ้น แต่เนื่องจากสัมประสิทธิ์หน้าตัวแปร X_2 มีค่าน้อยมาก อิทธิพลเนื่องจาก

เวลาที่ใช้การสกัดจึงไม่มีผลต่อปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้อย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) ตรงกันข้ามกับค่าสัมประสิทธิ์หน้าตัวแปร X_1 ซึ่งมีค่าติดลบ หมายถึงการการลดระดับของปัจจัยส่งผลให้ค่าตอบสนองมีค่าเพิ่มสูงขึ้น หรือหมายถึงการลดอุณหภูมิในการสกัด (30, 45 และ 60 องศาเซลเซียส) ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้มีค่าเพิ่มขึ้น หรืออาจกล่าวโดยสรุปว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดมีความแปรผันแบบผกผัน และอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างกับตัวทำละลายที่ใช้มีความสัมพันธ์แบบแปรผันตรงกับปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้ ตามลำดับ

จากข้อมูลแบบจำลองที่ได้สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรทั้ง 3 ตัวต่อความสามารถในการสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากเนื้อขนุนได้ โดยอาศัยการพล๊อตกราฟโครงร่าง (Contour plot) เพื่อพิจารณาถึงแนวโน้มของตัวแปรแต่ละตัวต่อปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้และคาดคะเนสภาวะที่เหมาะสมของการทดลอง แต่เนื่องจากในการพล๊อตกราฟสามารถพิจารณาผลของตัวแปรต่อค่าตอบสนองได้เพียงครั้งละ 2 ปัจจัยเท่านั้น จึงจำเป็นต้องกำหนดให้อีก 1 ปัจจัยมีค่าคงที่ โดยกำหนดให้อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่อตัวทำละลาย (X_3) มีค่าคงที่ กราฟที่ได้จึงแบ่งออกเป็น 3 รูปตามระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง (1:3, 1:6 และ 1:9, w/v) และจากการวาดกราฟด้วยโปรแกรมทางสถิติที่ใช้ในการออกแบบการทดลอง พบว่าให้ผลแสดงดัง Figure 15 ซึ่งพบว่า การเพิ่มอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่อตัวทำละลาย ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งมีแนวโน้มสูงขึ้น ถ้าพิจารณาจากกราฟ เมื่ออัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่อตัวทำละลายเป็น 1 ต่อ 9 ปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้จะมีค่าสูงสุดซึ่งมากกว่า 350 g/ kg extract จากการศึกษาอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่อตัวทำละลายในการสกัดสารพรีไบโอติกจากพืชไทยโดย ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก และคณะ (2550) พบว่า การการสกัดโดยการแช่ตัวอย่างในตัวทำละลาย และมีการเติมตัวทำละลายเข้าไปใหม่ในระหว่างการสกัดทั้งหมด 3 ครั้ง ภายในระยะเวลา 3 วัน เมื่อเติมตัวทำละลายลงในตัวอย่าง ตัวอย่างจะขยายขนาดและพองตัวขึ้น เนื่องจากการดูดซับตัวทำละลายเข้าไปในชิ้นตัวอย่าง ซึ่งการใช้อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างและตัวทำละลายน้อย ทำให้ตัวอย่างพองตัวมากขึ้น และตัวอย่างส่วนใหญ่ไม่แช่อยู่ในตัวทำละลายในระหว่างการสกัด การสกัดจึงมีประสิทธิภาพต่ำ นอกจากนี้ ยังพบว่าการสกัดเนื้อขนุนพันธุ์ทองประเสริฐโดยการแช่ในเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ถือเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสม หากเปรียบเทียบกับอัตราส่วนที่ทำการศึกษาในการทดลองครั้งนี้ ซึ่งพบว่าใช้อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่อตัวทำละลายค่อนข้างสูง ดังนั้น โอกาสในการดูดซับตัวทำละลายเข้าไปใช้ชิ้นตัวอย่างให้มากพอและละลายน้ำตาลที่มีอยู่ในตัวอย่างจึงน่าจะเกิดได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตาม เทคนิค และเวลาที่ใช้ในการสกัดของการทดลองทั้งสองมีความแตกต่างกัน ตัวอย่างขนุนก็ต่างสายพันธุ์กัน จึงทำให้ผลการทดลองมีความแตกต่างกัน

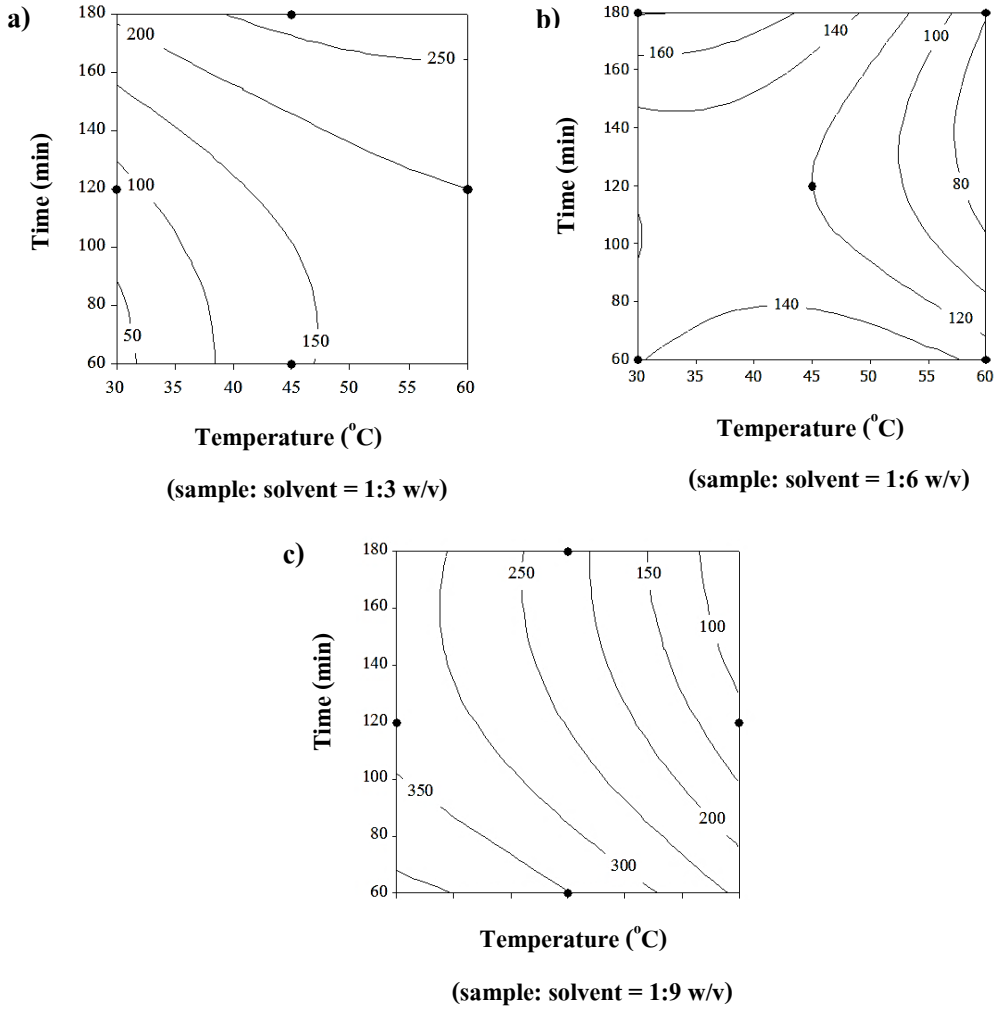


Figure 15. Contour and surfce plot of extraction temperature and extraction time on non-reducing sugar contents at sample to solvent ratio of a) 1:3; b) 1:6 และ c) 1:9.

ผลของอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพในการสกัด พบว่าเมื่อใช้อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่อตัวทำละลายต่ำสุดคือ 1 ต่อ 3 การเพิ่มอุณหภูมิระหว่าง 30 ถึง 60 องศาเซลเซียสจะส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซึ่งที่สกัดได้มีค่าสูงขึ้น ซึ่งขัดแย้งกับการสกัดพรีไบโอติกจากเนื้อขนุนพันธุ์ทองประเสริฐโดยวิธีการแช่ของ ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก และคณะ (2550) ซึ่งพบว่าการสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อใช้อุณหภูมิในการสกัดสูงขึ้นคือ อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส), 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ปริมาณสารที่สกัดได้จากตัวอย่างจะมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับการสกัดที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้น อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดสารพรีไบโอติกจากเนื้อขนุนพันธุ์ทองประเสริฐคือการสกัดที่อุณหภูมิห้อง ในขณะที่ Giannoccaro และคณะ (2006) พบว่า การสกัดน้ำตาล (คาดว่าเป็นโอลิโกแซคคาไรด์หรือนอนรีดิว-

ซึ่ง) จากเมล็ดถั่วเหลืองด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 80 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดจะช่วยเพิ่มความสามารถในการสกัดน้ำตาลออกจากตัวอย่างเมล็ดถั่วเหลืองได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่อตัวทำละลายเป็น 1 ต่อ 6 และ 1 ต่อ 9 ตามลำดับ จะให้ผลตรงกันข้ามกัน คือเมื่ออัตราส่วนที่ใช้มีค่าสูงขึ้น การเพิ่มอุณหภูมิในการสกัดส่งผลปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้มีค่าต่ำลง ซึ่งความแตกต่างของผลการทดลองในทั้งสองกรณีนี้ อาจเกิดจากการมีผลร่วมกันระหว่าง 2 ปัจจัยคืออุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดและอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่อตัวทำละลายที่ใช้ (X_1X_3) ดังแสดงใน Table 12 ในขณะที่ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดเพียงอย่างเดียว แม้จะมีผลต่อปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดในบางอัตราส่วนแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P >0.05) Giannoccaro และคณะ (2006) กล่าวว่า การใช้สารละลายเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงในการสกัดน้ำตาล ปริมาณน้ำตาลที่สกัดได้จะมีผลมาจากอุณหภูมิที่ใช้สกัดและอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่อตัวทำละลายที่ใช้อย่างมีนัยสำคัญ ($P\leq$0.05) สอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ซึ่งพบว่า การใช้เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ในการสกัดน้ำตาลจากเนื้อขนุน อัตราส่วนของตัวอย่างต่อตัวทำละลายมีอิทธิพลต่อปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้ และมีผลร่วมกันกับอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดด้วย เนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้สกัดเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างมากในการศึกษาการสกัดสารใดๆ จากพืช การศึกษาส่วนใหญ่จึงนิยมศึกษาเรื่องอุณหภูมิร่วมด้วยเสมอ Xiaoli และคณะ (2008) ศึกษาสภาวะในการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จาก chickpea จำนวน 19 สายพันธุ์ โดยศึกษาผลของอุณภูมิที่ใช้สกัดคือ การสกัดที่อุณหภูมิห้อง, 50, 70 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิน้ำเดือด พบว่า ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้ในช่วงอุณหภูมิ 10 ถึง 50 องศาเซลเซียส ค่อยๆ เพิ่มขึ้นและลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิที่ใช้สกัดสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส

อย่างไรก็ตาม แม้ว่าผลการทดลองข้างต้น พบว่าปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้สูงสุดจากแผนการทดลอง (Table 8 ในบทที่ 2) ได้จากการสกัดเนื้อขนุนสด 1 ส่วนต่อสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 9 ส่วน โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำการสกัดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้ คิดเป็น 386.1 g/ kg extract แต่จากการวิเคราะห์โดยอาศัยข้อมูลจากการทดลองและคำนวณโดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ พบว่าสภาวะที่สามารถสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งได้สูงสุด คือ การสกัดเนื้อขนุนสด ด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 โดยใช้อัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่อตัวทำละลายเป็น 1 ต่อ 9 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที ซึ่งควรจะสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งออกมาได้ 414.50 g/ kg extract และจากการทดลองทำการสกัดซ้ำตามสภาวะดังกล่าวจำนวน 3 ครั้งพบว่า มีค่าใกล้เคียงกับที่ได้จากการคำนวณ (Table 13) โดยค่าจากการคำนวณมีค่าต่ำกว่าค่าที่ได้จากการทดลองจริงร้อยละ 9.4 แสดง

ว่าเพราะว่าแบบจำลองคณิตศาสตร์สมการที่ 7 สามารถใช้ทำนายปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้ เนื่องจากมีค่าความคลาดเคลื่อนต่ำกว่าค่าจริงไม่เกินร้อยละ 10

Table 13. Predicted non-reducing sugar content which calculated by computer program and three replicated observing values from laboratory scale.

Replication	Non-reducing sugar content (g/kg extract)	
	Predicted value	Observed values from experiment
1		429.65
2	414.50	476.92
3		453.28
	Average	453.28±23.64

3. การสกัดด้วยเครื่องสกัดขนาดโรงงานทดลอง

จากผลการทดลองที่ได้ในข้อ 2 เมื่อสกัดเนื้อขนุนสด ด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ในอัตราส่วนตัวอย่างต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1 ต่อ 9 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิห้อง (30±2°C) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และสุ่มตัวอย่างที่เวลา 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที มาวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่สกัดได้ (ร้อยละ) ผลการทดลองแสดงดัง Figure 16

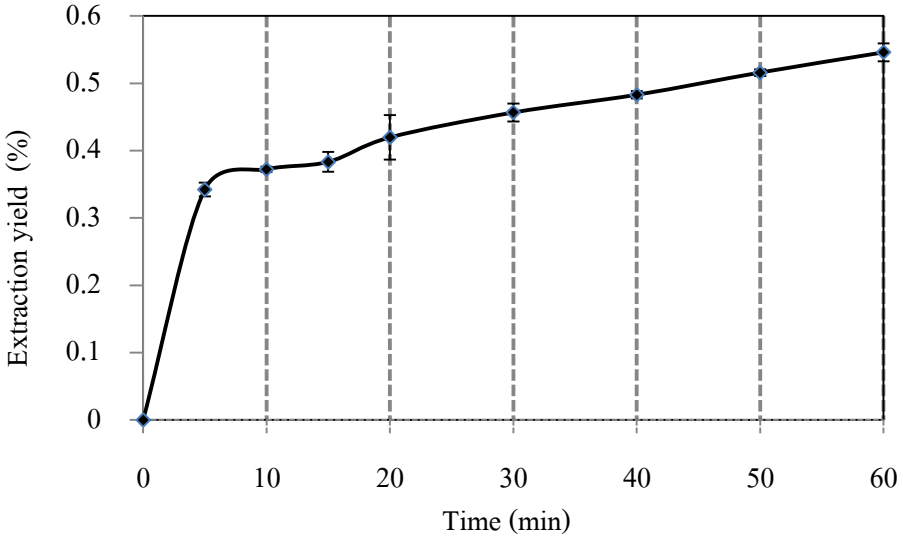


Figure 16. Extraction yield (%) of jackfruit bulb extract in pilot plant scale under room temperature with sample and solvent at a ratio of 1:9 (w/v).

จาก Figure 16 พบว่าปริมาณของแข็งที่วิเคราะห์ได้จากสารสกัดหยาบ (crude extract) ซึ่งไม่ได้มีการกำจัดตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 5 นาทีแรกของการสกัดและค่อยๆเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดการสกัดที่ 60 นาที และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มสูงขึ้น หากใช้เวลาในการสกัดนานขึ้น จากการสกัดด้วยเครื่องสกัดแบบกะขนาดโรงงานทดลองเครื่องเดียวกัน สุพจน์ นวลละออง (2551) พบว่าปริมาณของแข็งและปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่สกัดได้จากเมล็ดขนุนขนาด 1.0- 2.0 ตารางมิลลิเมตรด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 อัตราส่วนเมล็ดขนุนต่อตัวทำละลาย 1:8 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีค่าสูงกว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเพียงเล็กน้อย และมีสมดุลของการสกัดเกิดขึ้นที่เวลา 90 นาที ภายหลังการแช่เมล็ดขนุนในตัวทำละลายก่อนเริ่มทำการสกัดนาน 12 ชั่วโมง โดยแนวโน้มของสารที่สกัดได้มีลักษณะเดียวกันคือ ค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้นเมื่อทำการสกัดนานขึ้น อย่างไรก็ตาม เนื่องจากความแตกต่างของลักษณะการกวนผสมหรือการทำให้เกิดการสัมผัสกันระหว่างเฟสของตัวทำละลายและตัวอย่าง และปริมาณของตัวอย่างที่ใช้ ในการสกัดระดับห้องปฏิบัติการและการใช้เครื่องสกัดขนาดโรงงานทดลอง จึงทำให้ปริมาณสารที่สกัดได้จากการทดลองทั้งสองส่วนมีความแตกต่างกัน แม้จะทำการสกัดในสภาวะเดียวกันก็ตาม

จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในสารสกัดหยาบ (Figure 17) พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้น แม้ว่าในช่วง 5-10 นาทีและในช่วง 30-50 นาที ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดแทบจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง และมีค่าสูงสุดเมื่อสิ้นสุดการสกัดที่เวลา 60 นาที โดยมีค่าเท่ากับ 17.53 กรัมต่อลิตรของสารสกัดหยาบ (g/L crude extract) สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่งพบว่า มีค่าเพิ่มขึ้นทีละเล็กน้อยในระหว่างการสกัดและมีค่าสูงสุดเมื่อสิ้นสุดการสกัด คิดเป็น 2.12 g/L ซึ่งต่ำมาก เมื่อเทียบกับการสกัดในห้องปฏิบัติการ โดยหลังจากระเหยตัวทำละลายแล้วพบว่าสารสกัดมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซิ่งและน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งเท่ากับ 84.16, 26.57 และ 57.58 g/L และมีความเป็นไปได้ว่า หากทำการสกัดนานขึ้น ปริมาณน้ำตาลนอน-รีดิวซิ่งที่สกัดได้อาจมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นด้วย จากการสังเกตลักษณะตัวอย่างภายหลังการสกัดในการทดลองทั้งสองแบบดังแสดงใน Figure 18 พบว่าตัวอย่างที่ผ่านการกรองด้วยผ้าขาวบางภายหลังการสกัดในห้องปฏิบัติการ (Figure 18b) จะมีสีซีดกว่า แห้ง มีลักษณะเป็นกากร่วน สามารถแยกออกจากตัวทำละลายได้ง่าย ในขณะที่ตัวอย่างที่แยกได้จากการเครื่องสกัดขนาดโรงงานทดลอง (Figure 18c) สามารถสังเกตได้เป็นสองส่วนคือ บริเวณด้านบนของผิวตัวอย่าง มีสีซีดเป็นแผ่นแข็ง สามารถพลิกขึ้นเพื่อให้เห็นตัวอย่างที่อยู่อีกด้านหนึ่งได้ชัดเจน (Figure 18d) ซึ่งเป็นตัวอย่างที่มีลักษณะเหมือนตัวอย่างที่เตรียมใหม่ก่อนเริ่มทำการสกัด (Figure 18a)

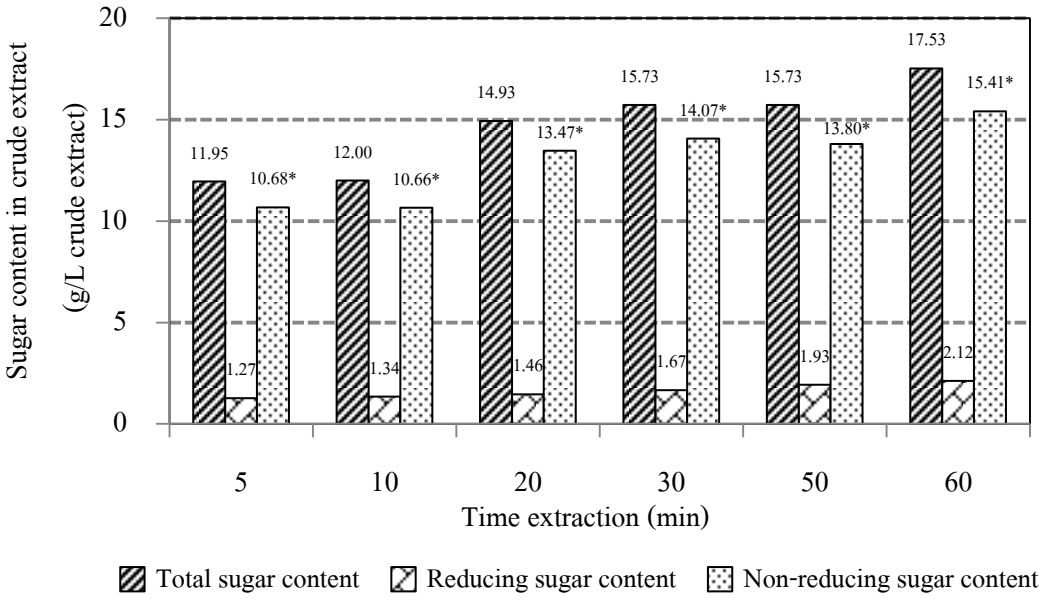


Figure 17. Total sugar, reducing sugar and non-reducing sugar content of jackfruit bulb extract in pilot plant scale under room temperature with sample and solvent at a ratio of 1:9 (w/v). * The value obtained from calculation by the difference of total sugar and reducing sugar content.

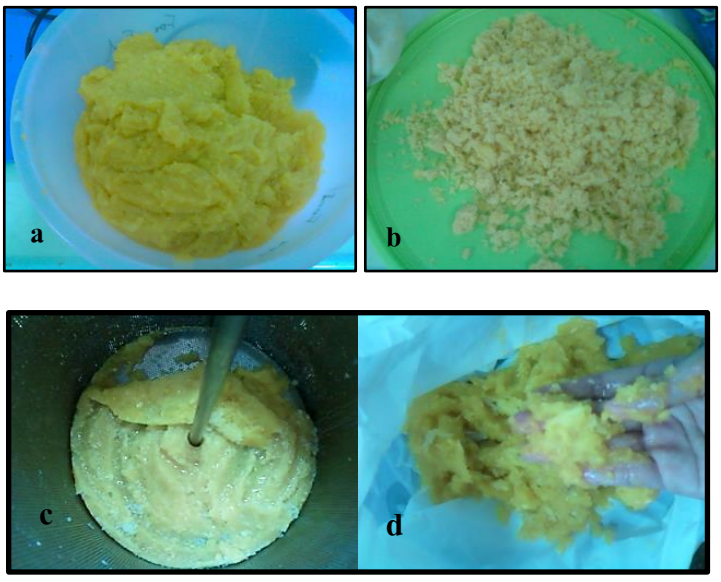


Figure 18. Characteristic of sample before and after extraction; (a) prepared fresh sample, (b) laboratory scale extracted sample, (c) pilot plant scale extracted sample at surface and (d) pilot plant scale extracted sample at bottom .

จากผลการทดลองที่ได้ข้างต้น มีความเป็นไปได้ว่า ตัวอย่างที่สกัดในระดับโรงงานทดลอง อาจถูกสกัดแค่บริเวณผิวหน้าของตัวอย่าง เช่นเดียวกันกับการสกัดในห้องปฏิบัติการที่มีการกวนเป็นครั้งคราว ซึ่งพบว่า เมื่อเติมตัวทำละลายลงไป อนุภาคของตัวอย่างจะจับกันเป็นก้อน ทำให้ในระหว่างการสกัดต้องมีการกวนเป็นครั้งคราวเพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างจับตัวกัน และเนื่องจากการใช้ใบพัดเป็นตัวกวนผสมในห้องปฏิบัติการ ทำให้เกิดการสัมผัสกันระหว่างอนุภาคของตัวอย่างและตัวทำละลายตลอดเวลาที่ทำการสกัดได้มากกว่า ความสามารถในการชะเอาตัวถูกละลายออกจากตัวอย่าง จึงเกิดขึ้นได้ง่ายและทั่วถึง ในขณะที่การผสมที่เกิดขึ้นในเครื่องสกัดแบบกะขนาดโรงงานทดลองเป็นระบบฉีดที่มีการฉีดพ่นตัวทำละลายจากด้านล่างของถังผ่านหัวฉีดแรงดันสูง จากนั้นจึงผ่านเข้าสู่รูของตะแกรงใส่ตัวอย่างที่มีตัวอย่างบรรจุเป็นชั้นๆ อยู่ภายใน ด้วยแรงอัดฉีดที่ต้องผ่านจากบริเวณด้านข้างของตัวถังที่บรรจุตัวอย่างก่อน จากนั้นจึงจะผ่านเข้าไปสัมผัสกับอนุภาคของตัวอย่างภายใน แรงจากหัวฉีดจึงอาจไม่เพียงพอที่จะทำให้ตัวอย่างกับตัวทำละลายเกิดการผสมกันได้ดี อีกทั้งการฉีดพ่นตัวทำละลายภายในตัวถังเกิดขึ้นเพียงด้านเดียว (ด้านขวา) และถังสกัดมีขนาดใหญ่ ด้วยเหตุนี้การผสมที่เกิดขึ้นจึงไม่สม่ำเสมอและไม่ทั่วถึง อีกทั้งตัวอย่างที่ใช้เป็นตัวอย่างสด มีน้ำหนัก ต่างจากการสกัดเมล็ดขนุน ซึ่งมีลักษณะเป็นผงที่มีความชื้นอยู่เล็กน้อยแต่มีน้ำหนักเบากว่า การฉีดพ่นเพื่อทำให้เกิดการผสมในระบบ ทำให้เกิดการปั่นป่วน อนุภาคของตัวอย่างลอยขึ้นและสัมผัสกับตัวทำละลายในระหว่างการสกัดได้ดีกว่า (สุพจน์ นวลละออง, 2551) ในขณะที่การสกัดเนื้อขนุนนั้น ตัวอย่างถูกสกัดด้วยตัวทำละลายแค่ที่บริเวณผิวหน้าเท่านั้น

จากผลการทดลอง จึงอาจกล่าวได้ว่า การสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากเนื้อขนุนอาจไม่เหมาะสมกับเครื่องสกัดแบบกะขนาดโรงงานทดลองที่มี ซึ่งหากต้องการให้ปริมาณสารที่สกัดได้ใกล้เคียงกัน สภาวะของระบบโดยรวมที่ใช้สกัดควรมีลักษณะที่ใกล้เคียงกัน เช่น อาจต้องมีการปรับปรุงพัฒนาระบบในการกวนผสมเพื่อให้การสัมผัสระหว่างตัวอย่างกับตัวทำละลาย เกิดได้ดีขึ้น อย่างไรก็ตาม ข้อดีของถังสกัดที่มีคือสามารถสกัดที่อุณหภูมิสูงได้ ดังนั้น ในกรณีที่การสกัดในห้องฏิบัติพบว่า การกวนไม่มีผลต่อการสกัด การสกัดด้วยถังสกัดที่มีสามารถสกัดสารได้ในปริมาณใกล้เคียงกว่า หรือการเพิ่มเวลาในการสกัดอาจเป็นอีกแนวทางหนึ่งเพื่อเพิ่มปริมาณสาร นอกจากนี้การติดตั้งใบพัดเพื่อให้มีลักษณะการผสมที่ใกล้เคียงกันกับการสกัดในห้องปฏิบัติการ อาจจำเป็นต้องมีการออกแบบรูปแบบของถังสกัดใหม่ หรือหากใช้ระบบผสมแบบเก่าซึ่งอาศัยแรงฉีดพ่นของตัวทำละลาย ก็อาจเพิ่มแรงฉีดให้มีกำลังมากขึ้นในหลายทิศทาง เพื่อให้เครื่องมีประสิทธิภาพในการสกัดดีขึ้น รวมถึงสามารถใช้สกัดตัวอย่างที่อาจมีลักษณะที่แตกต่างกันได้

4. การทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์และกรดในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหาร

การทดสอบในขั้นตอนนี้ น้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดเนื้อขนุนถือเป็นตัวแทนของโอลิโกแซคคาไรด์ที่คาดว่ามีสมบัติเป็นพรีไบโอติก และเนื่องจากสารสกัดมีน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งชนิดหนึ่ง แต่ไม่ได้มีสมบัติเป็นพรีไบโอติกเป็นองค์ประกอบด้วย ดังนั้นปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่คำนวณเพื่อนำมาใช้ในการทดลองส่วนนี้จึงรวมถึงปริมาณน้ำตาลซูโครสด้วย ความเข้มข้นของสารสกัดที่นำมาใช้ในการทดสอบประกอบด้วยน้ำตาลทั้งหมด 140 g/L น้ำตาลรีดิวซิ่ง 31.14 g/L และปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่ง 108.89 g/L ในการคำนวณความเข้มข้นของตัวอย่างที่ละลายอยู่ในสารละลายน้ำลายเทียม คิดจากความเข้มข้นของน้ำตาลนอนรีดิวซิ่ง

จากการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบการทนต่อการย่อยของน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งในสารสกัดจากเนื้อขนุนเทียบกับชุดควบคุมคือ อินนูลินซึ่งเป็นสารพรีไบโอติกทางการค้า พบว่า อินนูลินถูกย่อยด้วยเอนไซม์ α –amylase จากน้ำลายได้น้อยมากคิดเป็นร้อยละ 0.05 ในขณะที่ระดับการถูกย่อย (Hydrolysis, %) ของน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากเนื้อขนุนจะค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วง 5 นาทีแรกจนถึงนาทีที่ 30 และมีระดับการย่อยค่อนข้างคงที่จนถึงนาทีที่ 40 โดยมีระดับการถูกย่อยของน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งซึ่งวัดจากปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่งที่เพิ่มขึ้นในแต่ละช่วงเวลา คิดเป็นร้อยละ 4.95 ดังแสดงใน Figure 19

การทดลองที่ได้พบว่าสอดคล้องกับ Wichienchot และคณะ (2009) ซึ่งพบว่า หากบริโภคโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากแก้วมังกร (DP ในช่วง 3-4) จะเกิดการย่อยในปากได้สูงสุดไม่เกินร้อยละ 10 เนื่องจากระยะเวลาที่เกิดการย่อยในปากใช้เวลาประมาณ 30 วินาที ในขณะที่การย่อยในลำไส้เล็กอาจเกิดได้มากกว่าร้อยละ 30 เนื่องจากมีเอนไซม์ในกลุ่มที่สามารถย่อยโอลิโก-แซคคาไรด์ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น เอนไซม์มอลเทส แลคเทสและซูเครส เป็นต้น เอนไซม์ α –amylase (α- 1, 4 glucan- 4 – glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั้งในพืช ในเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและจากเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ มีคุณสมบัติในการเร่งการย่อยสลาย (hydrolysis) ของพันธะ α- D- (1, 4) glycosidic linkages ของแป้งซึ่งประกอบด้วยอะไมโลส (Amylose) และอะไมโลเพคติน (Amylopectin) ไกลโคเจนและโอลิโกแซคคาไรด์หลายชนิด (Buisson *et al*., 1987) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เอนไซม์ชนิดนี้สามารถพบได้ทั้งในน้ำลายและจากการหลั่งของตับอ่อน การย่อยด้วย α –amylase ภายในปาก เป็นการย่อยโมเลกุลสายยาวของแป้ง (starch polymeric chains) ให้กลายเป็นโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น ได้แก่ น้ำตาลมอลโตสและเด็กซ์-ทรินขนาดต่างๆ ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคส โดยการย่อยของเอนไซม์ α –amylase ที่หลั่ง

จากตับอ่อนและถูกส่งมายังลำไส้เล็ก อย่างไรก็ตาม อัตราการเกิดปฏิกิริยานี้ลดลงเมื่อสารคาร์โบไฮเดรตนั้นมีสายพอลิเมอร์ที่ยาวเพิ่มขึ้น (Lehmann and Robin, 2007)

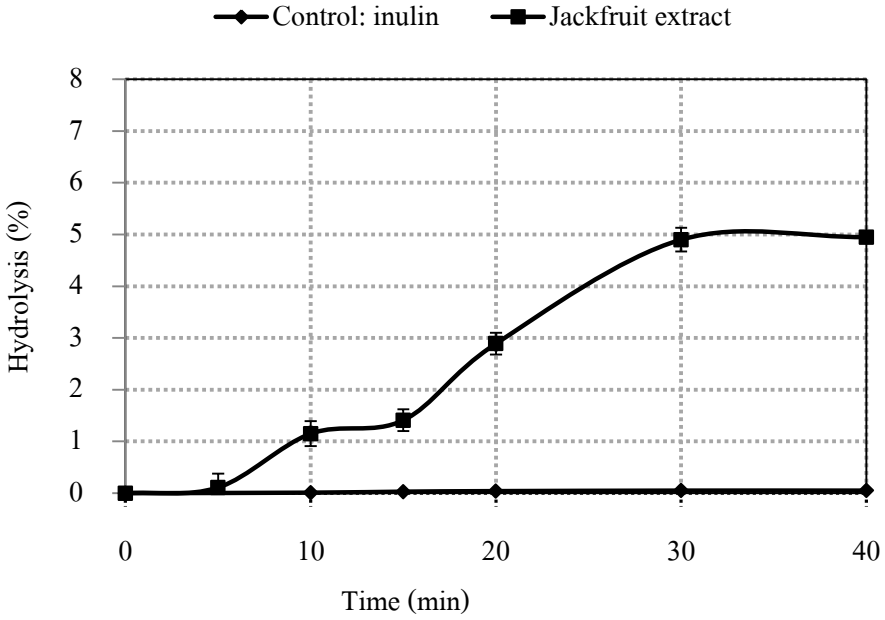


Figure 19. Remaining of non-reducing sugar content from jackfruit bulb extract and inulin (control) to human saliva α –amylase (0.33 units/ml, pH 6.8) at 37°C for 40 min.

เมื่ออาหารผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ในน้ำลายแล้ว การผ่านเข้าไปในกระเพาะอาหารจะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งจากค่าพีเอชที่เปลี่ยนไป จากการทดลอง พบว่ามากกว่าร้อยละ 99 ของอินนูลินและร้อยละ 95 ของน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งในสารสกัดเนื้อขนุนสามารถผ่านไปยังกระเพาะอาหารได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งในสารสกัดมีความยาวของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มาเชื่อมต่อกันสั้นกว่าในอินนูลิน หรือมีชนิดของพันธะที่เอนไซม์ α –amylase สามารถย่อยได้แตกต่างกัน

การทนต่อการย่อยของน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากเนื้อขนุนและอินนูลินในสภาวะกรดในกระเพาะอาหารดังแสดงใน Figure 20 ซึ่งจำลองขึ้นโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ของกรดไฮโดร-คลอริกที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 2 เป็นเวลา 240 นาที พบว่า น้ำตาลนอนรีดิวซิ่งในสารสกัดจากเนื้อขนุนสามารถทนต่อการย่อยในสภาวะกรดจำลองได้ดีกว่าอินนูลิน เมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ระดับการถูกย่อยของอินนูลินและน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากเนื้อขนุนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน โดยในช่วง 90 นาทีแรก ระดับการถูกย่อยของอินนูลินเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและคงที่ในช่วง 90-120 นาที จากนั้นจึงเพิ่มสูงขึ้นจนสิ้นสุดการย่อยที่เวลา 240 นาที ซึ่งมีระดับการถูกย่อยคิดเป็นร้อยละ 22.99 สำหรับน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากเนื้อขนุน พบว่าระดับการถูกย่อยมีค่าเพิ่มขึ้นในช่วง 30 นาทีแรกของการย่อย

จากนั้นจึงคงที่และเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยจนสิ้นสุดการย่อย โดยมีระดับการถูกย่อยคิดเป็นร้อยละ 8.86 ตามลำดับ

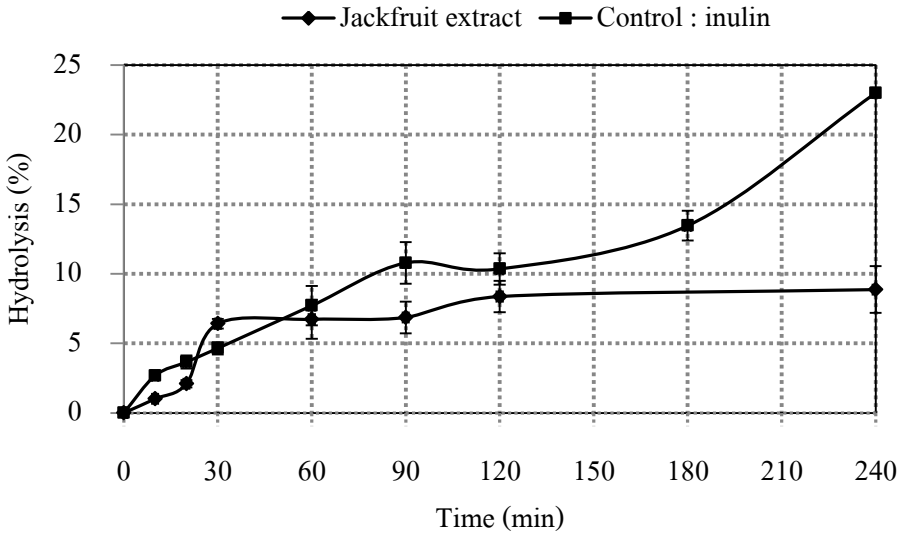


Figure 20. Remaining of non-reducing sugar content from jackfruit bulb extract and inulin (control) to artificial gastric condition in HCl buffer (pH 2.0) at 37°C for 240 min.

Wichienchot และคณะ (2010) พบว่าสารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากแก้วมังกรสามารถทนต่อการย่อยในสภาวะกรดของกระเพาะอาหารได้ดีกว่าอินนูลิน โดยที่ค่าพีเอชเท่ากับ 2 โอลิโกแซคคาไรด์จากแก้วมังกรมีระดับการถูกย่อยคิดเป็นร้อยละ 2.43 ในขณะที่อินนูลินถูกย่อยไปร้อยละ 23.22 แม้ว่าการวิเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อขนุนโดยเทคนิค HPLC จะชี้ให้เห็นว่าน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งของสารสกัดเนื้อขนุนพันธุ์ทองสุดใจประกอบด้วยโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีค่า DP เท่ากับ 4 และ 6-7 ซึ่งใหญ่กว่าโอลิโกแซคคาไรด์จากแก้วมังกรที่มีค่า DP ประมาณ 3-4 แต่ในสารสกัดเนื้อขนุนก็มีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบร่วมด้วย ดังนั้น การย่อยของน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในสภาวะกรดจึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ระดับการถูกย่อยของน้ำตาลของสารสกัดขนุนมีค่าสูงกว่าโอลิโกแซคคาไรด์จากแก้วมังกร โดยปกติ อาหารที่ผ่านเข้ามาในกระเพาะ-อาหารซึ่งมีค่าพีเอชในช่วง 2-4 จะถูกย่อยและเหลือผ่านเข้าไปยังลำไส้เล็กต่อไปได้ประมาณร้อยละ 85 (Du *et al*., 2011) จากผลการทดลองนี้ พบว่า น้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากเนื้อขนุนที่สามารถผ่านเข้าไปยังบริเวณลำไส้เล็กได้ คิดเป็นร้อยละ 86.19 ในขณะที่อินนูลินสามารถผ่านเข้าไปยังลำไส้เล็กได้คิดเป็นร้อยละ 76.96 Du และคณะ (2011) พบว่าโอลิโกแซคคาไรด์ที่เตรียมได้จากนำพอลิแซคคา-ไรด์ที่มีอยู่ในเนื้อฟักทองมาย่อยด้วยกรด (acid hydrolysis) เมื่อนำไปวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลด้วยเทคนิค High performance size exclusion chromatography (HPSEC) พบว่าโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้

มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 5000-324 ดาลตัน ประกอบด้วยน้ำตาล กาแลกโตส ร้อยละ 99.03 และน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 0.97 เมื่อนำมาย่อยในสภาวะกรดที่จำลองจากกระเพาะอาหารที่มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 5 ถึง 1 พบว่ามีระดับการถูกย่อยคิดเป็นร้อยละ 5.76 ถึงร้อยละ 20.31 ตามลำดับ ในขณะที่ระดับการถูกย่อยของอินนูลินในชุดควบคุมที่วิเคราะห์ในช่วงพีเอชเดียวกัน มีค่าร้อยละ 0.76 ถึงร้อยละ 66.22 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้พบว่า การถูกย่อยด้วยกรดที่ค่าพีเอชเท่ากับ 2 เช่นเดียวกับการทดลองนี้ ระดับการถูกย่อยของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากเนื้อฟักทองและอินนูลินที่เวลา 4 ชั่วโมง มีค่าประมาณร้อยละ 14 และร้อยละ 10 ตามลำดับ ในขณะที่การถูกย่อยอินนูลินและน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากเนื้อขนุนในการทดลองมีค่าเท่ากับ 22.99 และ 8.86 ตามลำดับ

การย่อยที่เกิดขึ้นในกระเพาะอาหาร เกิดจากการสัมผัสของอาหารกับน้ำย่อย (gastric juice) ซึ่งประกอบด้วยกรดไฮโดรคลอริก มิวซิน เอนไซม์เพปซิน ที่มีค่าพีเอชน้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 กรดไฮโดรคลอริกจะถูกหลั่งออกมาจากเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างกรดไฮโดรคลอริก (parietal cells) ส่วนเพปซินจะถูกหลั่งออกมาจากเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างสารเพปซิโนเจนในกระเพาะอาหาร (Sardesai, 2012) แต่เนื่องจากบทบาทของเอนไซม์ในกระเพาะอาหารทำหน้าที่ในการย่อยโปรตีนเท่านั้น ดังนั้นการย่อยสลายของคาร์โบไฮเดรตที่ผ่านมายังกระเพาะอาหารจึงเป็นผลมาจากค่าพีเอชที่ต่ำมาก ซึ่งการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์เกิดขึ้นในลักษณะที่แตกต่างกัน โดยการย่อยด้วยกรดเป็นปฏิกิริยาการย่อยแบบสุ่มที่ไม่จำเพาะต่อโครงสร้างของสารแต่การย่อยด้วยเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยอาศัยความจำเพาะเจาะจงกันระหว่างโครงสร้างภายในของสารประกอบและความสามารถในการเข้าตัดพันธะของเอนไซม์ (โสภา บิลละโสย, 2551)

Figure 21 แสดงระดับการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ porcine pancrease α –amylase ของน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากเนื้อขนุนและอินนูลิน หลังจากผ่านการย่อยด้วยกรดในสภาวะจำลองของกระเพาะอาหาร (พีเอช 2) และนำมาปรับค่าพีเอชของสารละลายให้เป็น 6.9 เพื่อให้เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ porcine pancrease α –amylase ในระหว่างการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นระดับการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ของน้ำตาลนอน-รีดิวซิ่งจากเนื้อขนุนมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและมีค่าสูงสุดเมื่อสิ้นสุดการย่อยเท่ากับร้อยละ 63.58 ในขณะที่การถูกย่อยของอินนูลิน พบว่าระดับการถูกย่อยเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องใน 2 ชั่วโมงแรกและเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อจนสิ้นสุดการย่อยที่ 6 ชั่วโมง โดยมีระดับการถูกย่อยเท่ากับร้อยละ 10.32 เห็นได้ว่าการย่อยที่เกิดขึ้นจากตัวอย่างทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของโครงสร้างทางเคมีและความจำเพาะในการตัดพันธะระหว่างหน่วยย่อยของน้ำตาลมอนอเมอร์ที่มาเชื่อมต่อกันของเอนไซม์

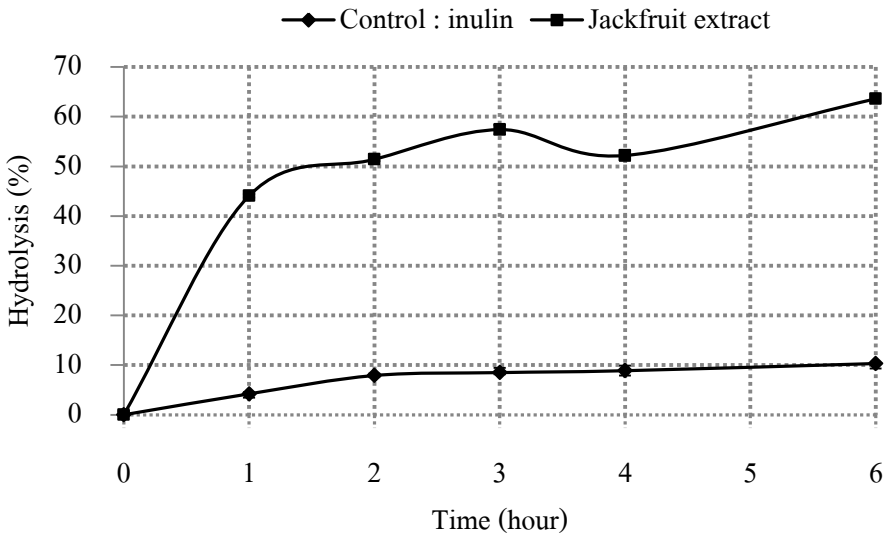


Figure 21. Remaining of non-reducing sugar content from jackfruit bulb extract and inulin (control) to porcine pancrease α –amylase (0.75 units/ml, pH 6.9) at 37°C for 6 hour.

อินนูลินประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโทสหรือหน่วยย่อยของน้ำตาลฟรุกโทสเพียงอย่างเดียวมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1, 2 และ β-1, 2 ซึ่งไม่จำเพาะต่อการทำงานของเอนไซม์ที่สามารถตัดพันธะในตำแหน่ง α -1, 4 ได้ แต่เนื่องจากอินนูลินที่ใช้เป็นอินนูลินทางการค้าซึ่งประกอบด้วยขนาดโมเลกุลใหญ่และเล็กปนกัน ทำให้อินนูลินถูกย่อยไปเฉพาะส่วนที่เป็นโอลิโกสายสั้นๆ ที่ปะปนมา จากนั้นจึงเหลือผ่านไปยังลำไส้ใหญ่ได้เป็นส่วนใหญ่ ในทางตรงกันข้าม เป็นไปได้ว่า น้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากเนื้อขนุนอาจมีโครงสร้างของสารที่จับกันในลักษณะ α -1, 4 มากกว่า ประกอบกับการย่อยที่เกิดขึ้นภายในลำไส้เล็กใช้เวลาค่อนข้างนาน เมื่อเทียบกับบริเวณอื่น ทำให้ตัวอย่างถูกย่อยไปเป็นจำนวนมากคือร้อยละ 63.58

Nakada และคณะ (2003 อ้างโดย สันทัด วิเชียรโชติและมาริสา จาตุพรพิพัฒน์, 2551) พบว่า โคจิโอลิโกแซคคาไรด์ (Kojioligosaccharide) สามารถต้านการย่อยด้วยเอนไซม์ α –amylase จากน้ำลายมนุษย์และจากตับอ่อนหมู (porcine pancrease α –amylase) ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่โคจิโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (ประกอบด้วยน้ำตาล 2 หน่วย) มีเปอร์เซ็นต์การย่อยอยู่ในช่วง 56.8-87.5 จากข้อมูลที่ได้จึงมีความเป็นไปได้ว่า การที่น้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากเนื้อขนุนถูกย่อยด้วยเอนไซม์ porcine pancrease α –amylase ได้มาก อาจเป็นเพราะโมเลกุลของน้ำตาลหรือสารคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในสารสกัดซึ่งรวมอยู่ในน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งทั้งหมด เป็นสารคาร์โบไฮเดรตมวลโมเลกุลต่ำด้วย ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้กล่าวไปข้างต้น เนื่องจากโอลิโกแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดเนื้อขนุนมีค่า DP เท่ากับ 4 และ 6-7 และมีน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโทส

เป็นองค์ประกอบ ดังนั้น สารคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในสารสกัดจึงอาจจัดอยู่ในกลุ่มของฟรุกโตโอลิ-โกแซคคาไรด์ ซึ่งโดยธรรมชาติ สารในกลุ่มของฟรุกโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์จะประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลฟรุกโทสที่มาเชื่อมต่อกับน้ำตาลกลูโคสจำนวน 2 ถึง 9 หน่วย (Rastall, 2010)

จากการย่อยด้วยเอนไซม์ α –amylase ที่มีอยู่ในน้ำลาย ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นน้ำตาลมอลโทสเด็กซ์ทรินที่มีขนาดสายต่างๆ ซึ่งเป็นโอลิโกเมอร์ (oligomer) ของน้ำตาลกลูโคส 4 ถึง 9 หน่วยมาเชื่อมต่อกัน และน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ แต่เนื่องจากน้ำตาลเหล่านี้จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ในน้ำลายแค่ช่วงเวลาสั้นๆ จึงต้องถูกเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ เช่น น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโทสและกาแลกโทสเพื่อให้ร่างกายดูดซึมได้ โดยการย่อยด้วยด้วยเอนไซม์ที่อยู่ในลำไส้เล็ก ได้แก่ เอนไซม์มอลเทส (maltase) ซูเครส (sucrase)และแลกเทส (lactase) รวมถึงเอนไซม์ α –amylase ที่หลั่งมาจากตับอ่อน เป็นต้น จากนั้นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจะถูกดูดซึมผ่านผนังลำไส้เล็กต่อไป (Sardesai, 2012) ส่วนที่เหลือจึงถูกส่งต่อไปยังลำไส้ใหญ่ สารที่เป็นพรีไบ-โอติกต้องไม่ถูกย่อยหรือดูดซึมในระบบทางเดินอาหารส่วนบน สามารถถูกหมักโดยเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่นที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่และปรับเปลี่ยนสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ ทำให้เจ้า-บ้านมีสุขภาพที่ดีขึ้นได้ จากเกณฑ์ดังกล่าว ทำให้มีสารเพียงไม่กี่ชนิดที่เป็นสารพรีไบโอติกที่มีคุณภาพที่สามารถนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารได้ (Ogueke *et al*., 2010) อย่างไรก็ตาม ผลของการย่อยที่ควรเกิดขึ้นจริงในร่างกายมนุษย์ทั้งสามส่วน (Table 14) ได้แก่ การย่อยด้วยเอนไซม์ α –amylase ในน้ำลาย การย่อยในสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารและการย่อยด้วยเอนไซม์ α –amylase from porcine pancrease ที่เวลา 30 วินาที 2 ชั่วโมงและ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ ทำให้สรุปได้ว่า น้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่เหลือจากการย่อยในระบบทางเดินอาหารส่วนบนและสามารถผ่านไปยังลำไส้ใหญ่ของน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งและอินนูลินคือ 34.47 และ 82.76 ตามลำดับ

อย่างไรก็ตาม ปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากสารสกัดเนื้อขนุนที่สามารถผ่านไปยังลำไส้ใหญ่ได้ และเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่แท้จริงอาจมีค่าน้อยกว่าร้อยละ 34.47 เนื่องจากน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่หลงเหลือจากการย่อยอาจเป็นน้ำตาลซูโครสที่มีอยู่ในสารสกัด ทั้งนี้สามารถเพิ่มปริมาณของโอลิโกแซคคาไรด์ได้ โดยการกำจัดน้ำตาลซูโครสก่อน Cummings และ Englyst (1995 อ้างโดย โสภา บิลละโสย, 2551) กล่าวว่า สารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่ผ่านการย่อยในระบบทางเดินอาหารส่วนบนแล้วจะต้องเหลือผ่านไปถึงลำไส้ใหญ่ได้มากกว่าร้อยละ 60 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากเนื้อขนุนกับชุดควบคุมคืออินนูลินในทางการค้า พบว่าปริมาณอินนูลินที่สามารถผ่านไปยังลำไส้ใหญ่ได้ มีปริมาณสูงกว่าน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากเนื้อขนุน เพราะอินนูลินเป็นสารคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลใหญ่ ความสามารถในการต้านการย่อยจึงสูงกว่า ในขณะที่น้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากเนื้อขนุนมีจำนวนน้ำตาลโมโนเมอร์ที่มาเชื่อมต่อกันน้อยกว่า อีก

ทั้งโครงสร้างทางเคมีอาจจำเพาะกับการทำงานของเอนไซม์ในร่างกาย การถูกย่อยจากระบบทางเดินอาหารส่วนบนจึงเกิดได้มากและมีปริมาณคงเหลือที่สามารถผ่านไปยังบริเวณลำไส้ใหญ่น้อยกว่า ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ข้อดีของโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น ที่สามารถเหลือผ่านไปยังลำไส้ใหญ่ได้คือสามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกได้เร็วกว่าพรีไบโอติกที่มีสายยาว เนื่องจากการหมักพรีไบโอติกที่มีสายยาวจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ และค่อยๆ มีการดูดซึมสารเมทา-บอไลท์ที่เกิดจากการหมักเข้าสู่บริเวณลำไส้ใหญ่ ตามลำดับ

Table 14. Percentage of non-digestible non-reducing sugar from jackfruit bulb and inulin after hydrolysis in simulated upper gut conditions.

Upper gut location	**Hydrolysis (%)**	
	inulin	**Oligosaccharides from jackfruit bulb**
Mouth (resistance to α –amylase from human saliva) (30 second after hydrolysis)	0.00	0.00
Stomach (resistance to acid condition, pH 2) (2 hour after hydrolysis)	8.37	10.35
Small intestine (resistance to α –amylase from porcine pancrease) (4 hour after hydrolysis)	8.87	52.18
Remaining of non-reducing sugar (%)	82.76	34.47

แม้ว่าในงานวิจัยนี้ไม่ได้นำสารสกัดจากเนื้อขนุนไปทดสอบการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติก แต่จากข้อมูลงานวิจัยที่ผ่านมาโดย Wichienchot และคณะ (2011) พบว่าสารสกัดจากเนื้อขนุน ซึ่งมี DP เท่ากับ 6 สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อโพรไบโอติกทางการค้าได้ดีจำนวน 3 ชนิดคือ *L. acidophilus*, *L. plantarum* และ *B. bifidum* ตามลำดับ

บทที่ 4

บทสรุป

เนื้อขนุนและซังขนุนมีองค์ประกอบทางเคมีที่ใกล้เคียงกัน โดยเนื้อขนุนมีความชื้น ปริมาณเถ้า ไขมัน โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต เท่ากับร้อยละ 78.49, 0.65, 0.20, 0.88 และ 19.78 ตามลำดับ ในขณะที่ซังขนุนมีองค์ประกอบดังกล่าวข้างต้นเท่ากับร้อยละ 79.33, 0.79, 0.62, 1.13 และ 18.13 ตามลำดับ เนื้อและซังขนุนประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ กลูโคส และฟรุกโทส และน้ำตาลโมเลกุลคู่ ได้แก่ ซูโครส แต่ในเนื้อขนุนพบว่ามีปริมาณมากกว่า โดยเฉพาะน้ำตาลซูโครส ซึ่งเป็นธรรมชาติของขนุนที่ปริมาณน้ำตาลซูโครสในเนื้อขนุนสูงกว่าฟรุกโทสและกลูโคส

การสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งในระดับห้องปฏิบัติการพบว่า การอบแห้งแบบลมร้อนทำให้เนื้อและซังขนุนมีค่าความชื้นลดลงร้อยละ 68.44 และ 63.21 การสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 และ 95 ในอัตราส่วนตัวอย่างต่อตัวทำละลาย 1 ต่อ 3 ที่อุณหภูมิห้องพบว่า ความเข้มข้นของตัวทำละลายและลักษณะของการกวน (เป็นครั้งคราวและแบบต่อเนื่อง)ไม่ส่งผลต่อปริมาณสารที่สกัดได้จากเนื้อขนุนอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) แต่ปริมาณความชื้นของตัวอย่างที่ใช้ส่งผลต่อปริมาณสารที่สกัดได้อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) โดยตัวอย่างสดมีปริมาณสารที่สกัดได้สูงกว่าตัวอย่างแห้ง ปริมาณสารที่สกัดได้จากซังขนุนพบว่ามีแนวโน้มใกล้เคียงกัน จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งพบว่า เนื้อขนุนมีปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งสูงกว่าซังขนุน โดยการสกัดเนื้อขนุนสดด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 ในสภาวะที่มีการกวนต่อเนื่องด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที สามารถสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งได้สูงสุด (321 g/kg extract) สภาวะนี้จึงถูกคัดเลือกเพื่อนำไปศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างตัวอย่างต่อตัวทำละลาย อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการสกัด การศึกษาการสกัดสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งในห้องปฏิบัติการโดยออกแบบการทดลองแบบ Box-behnken design สามารถสร้างสภาวะที่ใช้ในการสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งได้จำนวน 15 ชุดการทดลอง ผลการทดลองพบว่าสภาวะที่สามารถสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งได้สูงสุด คือการสกัดเนื้อขนุนสดด้วยอัตราส่วนเนื้อขนุนต่อสารละลายเอทานอลร้อยละ 95 เป็น 1 ต่อ 9 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที (388.23 g/kg extract) และจากการคำนวณด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์โดยอาศัยข้อมูลที่ได้จากการทดลอง พบว่าสภาวะที่สามารถสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งได้สูงสุดคือการสกัดในอัตราส่วนตัวอย่างต่อตัวทำละลายเป็น 1 ต่อ 9 ที่อุณหภูมิห้อง (30+2^{o}C) เป็นเวลา 60 นาที ปริมาณสารที่คาดว่าจะสกัดได้คือ 414.50 g/kg extract ซึ่งจากการทดลองซ้ำในระดับห้องปฏิบัติการพบว่าปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งที่วิเคราะห์ได้ มีค่าเท่ากับ 453.28 g/kg extract

ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า สารสกัดจากเนื้อขนุนประกอบด้วยโอลิโกแซคคาไรด์ 2 ชนิดคือโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีค่า DP เท่ากับ 4 และ DP ในช่วง 6-7 ประมาณร้อยละ 11.11 และ 2.18 ของน้ำตาลทั้งหมด ตามลำดับ ในขณะที่ การวิจัยที่ผ่านมาโดยใช้ขนุนต่างพันธุ์ คือขนุนพันธุ์ทองประเสิรฐพบว่าสารสกัดเนื้อขนุนด้วยตัวทำละลายชนิดเดียวกันมี โอลิโกแซคคาไรด์ DP เท่ากับ 6 เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ สารสกัดจากเนื้อขนุนพันธุ์ทองสุดใจที่ใช้ในการทดลองยังประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส กลูโคสและฟรุกโทสร้อยละ 44.82, 25.02 และ 18.86 ของสารสกัด ตามลำดับ

การสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งในระดับโรงงานทดลองด้วยเครื่องสกัดแบบกะด้วยสภาวะที่คัดเลือกได้จากการสกัดในระดับห้องปฏิบัติการพบว่า ปริมาณของแข็งที่สกัดได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น จนสิ้นสุดการสกัดคือ 60 นาที ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลพบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซิ่งและน้ำตาลนอนรีดิวซิ่ง มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันกับปริมาณสารที่สกัดได้ โดยภายหลังการระเหยตัวทำละลายออกแล้ว สารสกัดจากเนื้อขนุนที่เวลา 60 นาที มีปริมาณน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดข้างต้นเท่ากับ 84.16, 26.57 และ 57.78 mg/ml extract ซึ่งน้อยมากเมื่อเทียบกับการสกัดในห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของสภาวะที่ใช้ในการสกัด เช่น ลักษณะการกวนผสมที่แตกต่างกัน (การใช้ใบพัดกวนในห้องปฏิบัติการ/การฉีดพ่นเพื่อหมุนเวียนตัวทำละลายในถังสกัดขนาดโรงงานทดลอง) และปริมาณตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง นอกจากนี้ พบว่าตัวอย่างที่สกัดด้วยเครื่องสกัดขนาดโรงงานทดลอง บริเวณผิวด้านบนของตัวอย่างมีสีซีด ในขณะที่ตัวอย่างด้านล่างยังคงมีลักษณะเดียวกันกับตัวอย่างที่ไม่ได้ทำการสกัด จึงเป็นไปได้ว่า การสกัดเกิดขึ้นเฉพาะบริเวณผิวชั้นบนของตัวอย่างเท่านั้น ดังนั้น หากต้องการเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดด้วยเครื่องสกัดขนาดโรงงานทดลองเพื่อให้ได้สารที่ต้องการใกล้เคียงกันกับการทดลองในห้องปฏิบัติการ อาจทำการปรับปรุงโครงสร้างภายในถังสกัด เช่น การติดตั้งใบพัดภายในตัวถัง เพื่อให้การผสมเกิดได้ทั่วถึงและสม่ำเสมอมากขึ้น หรืออาจเพิ่มแรงดันในการฉีดพ่นตัวทำละลาย เพื่อให้ตัวอย่างเคลื่อนที่และสัมผัสกับตัวทำละลายดีขึ้น

ผลการทดสอบคุณสมบัติการทนต่อการย่อยของน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากสารสกัดเนื้อขนุนซึ่งคาดว่ามีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก เทียบกับอินนูลินซึ่งเป็นพรีไบโอติกที่ใช้ในทางการค้า โดยการจำลองสภาวะของระบบทางเดินอาหารส่วนบน พบว่า น้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากเนื้อขนุนและอินนูลินสามารถทนการย่อยจากเอนไซม์ α –amylase ในน้ำลายได้ร้อยละ 95.05 และ 99.95 ถูกย่อยได้ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 2 ร้อยละ 8.89 และ 22.99 ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ porcine pancrease α –amylase ซึ่งเป็นตัวแทนของเอนไซม์ pancrease α –amylase ที่หลั่งมาจากตับ ร้อยละ 63.58 และ 10.32 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ในสภาวะจริง

ระยะเวลาที่ร่างกายย่อยอาหารในปาก กระเพาะอาหารและลำไส้ใช้เวลาประมาณ 30 วินาที 2 ชั่วโมง และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังนั้น การถูกย่อยของน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากสารสกัดเนื้อขนุนในสภาวะจำลองด้วยเอนไซม์ในน้ำลาย, การย่อยด้วยกรดในกระเพาะอาหาร และการย่อยด้วยเอนไซม์ในลำไส้เล็ก จึงมีค่าเท่ากับร้อยละ 0, 10.35 และ 52.18 ตามลำดับ และการถูกย่อยของอินนูลินจากบริเวณเดียวกันมีค่าเท่ากับร้อยละ 0, 8.37 และ 8.97 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งซึ่งในการทดลองใช้เป็นตัวแทนของโอลิโกแซคคาไรด์ มีความสามารถในการทนต่อการย่อยในระบบทางเดินอาหารส่วนบนได้น้อยกว่าอินนูลิน ทั้งนี้ เนื่องจากอินนูลิน เป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า ความสามารถในการทนต่อการย่อยจึงสูงกว่า แนวทางการเพิ่มร้อยละของปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากเนื้อขนุน อาจทำได้โดยการกำจัดน้ำตาลซูโครสออกด้วยวิธีที่เหมาะสม เช่น การย่อยด้วยเอนไซม์ซูเครสหรือกำจัดออกด้วยวิธีการหมัก

เอกสารอ้างอิง

กาญจนา เหลืองสุวาลัย, ประพนธ์ ปัญญาสร้างสรรค์ และสุธิภรณ์ ศิริกำเลิศ. 2552. การเจริญเติบโตของผลขนุนพันธุ์ทองสุดใจ. ว. วิทยาศาสตร์การเกษตร. 40 (1): 161-164.

คลังปัญญาไทย. 2550. ขนุน (ออนไลน์). สืบค้นจาก: http://www.panyathai.or.th/wiki/index.php/ขนุน (23 กันยายน 2552)

ตลาดกลางสินค้าเกษตรแห่งประเทศไทย. 2555. ราคาขายส่งสินค้า. สืบค้นจาก: http://www.talaadthai.com/price/default.php?gettid=9&maxdate= (4 มกราคม 2555)

นฤชิต แว่วศรีฝอง. 2529. การปลูกขนุน. บริษัท พิมพ์สวย จำกัด. กรุงเทพมหานคร.

ปิ่นมณี ขวัญเมือง. 2548. ฟังก์ชันนัลฟูดส์: อาหารเพื่อสุขภาพ (Functional Foods: Foods for health). ว. ครุศาสตร์อุตสาหกรรม. 4: 43-46.

พานิชย์ ยศปัญญา. 2542. ขนุน ยักษ์ใหญ่แห่งวงการไม้ผล. พิมพ์ครั้งที่ 4. สำนักพิมพ์มติชน. กรุงเทพ. หน้า 11.

ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก, ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี, สุพิชญา จันทะชุม, ก่องกาญจน์ กิจรุ่งโรจน์. วันทนา เหรียญมงคล, สุภิญญา ติ๋วตระกูล และอรุณพร อิฐรัตน์. 2550. การศึกษาแหล่งของพรีไบโอติกจากพืชไทยบางชนิด. โครงการสมองไหลกลับ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.

ไพโรจน์ หลวงพิทักษ์. 2552. ผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพ (Functional Foods). ภาควิชาเทคโนโลยีชีว-ภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2544. วิศวกรรมอาหาร: หน่วยปฏิบัติการในอุตสาหกรรม.พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ. หน้า 57-65.

วีระพงศ์ พรสมิทธิกุล. 2551. การสกัดพรีไบโอติกส์จากเปลือกด้านในและเมล็ดขนุนด้วยกระบวนการต่อเนื่อง. วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา. คณะวิศวกรรมศาสตร์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุพจน์ นวลละออง. 2552. การสารสารพรีไบโอติกส์จากพืชเกษตร. วิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา. คณะวิศวกรรมศาสตร์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

โสภา บิลละโสย. 2551. การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติพรีไบโอติกของสารสกัดจากพืชตระกูลถั่ว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Ahmed, K., Malek, M., Jahan, K. and Salamatulah, K. 1986. Nutritive value of food stuff 3rd Ed. Institute of Nutrition and Food Science. University of Dhaka. Bangladesh. p. 16-17.

A.O.A.C. 2000. Official method of analysis of assosiation of official analysis chemist. 17th Ed. The Assosiation of Official Analysis Chemist. Inc. Verginia.

Baliga, S. M., Shivashankara, R. A., Haniadka, R., Dsouza, J. and Bhat, P. H. 2011. Phytochemistry, nutritional and pharmacological properties of *Artocarpus heterophyllus* Lam (jackfruit): A review. Food Res. Int. 44: 1800-1811.

Bhatia, B. S. , Siddapa, G. S. and Lal, G. 1995. Composition and nutritive value of jackfruit. Indian J. Agric. Sci. 25: 303-306.

Blaut, M. 2002. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. Eur. J. Nutr. 41(1): 11-16.

Cashman, K. 2003. Prebiotics and calcium bioavailability. Current Issues in Intestinal Microbiology. 4: 21-32.

Chowdhury, A. F., Raman, A. M. and Mian, J. A. 1997. Distribution of free sugars and fatty acids in jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*). Food Chem. 60 (1): 25-28.

Cruz, A. G., Cadena, R. S., Walter, E. H. M., Mortazavian, A. M., Granato, D., Faria, J. A. F. and Bolini, H. M. A. 2010. Sensory analysis: relevance for prebiotic, probiotic, synbiotic product development. Compr Rev Food Sci F. 9 (4):358-373.

Cummings, J. H., Macfarlane, G. T. and Englyst, H. N. 2001. Prebiotic digestion. Am. J. Clin. Nutr. 73: 415S-420S.

Delzenne, N. M and Williams, C. M. 2002. Prebiotics and lipid metabolism. Nutr. Metab. 13: 61-67.

Dobrenz, A, K., Smith, S. E., Poteet, D. and Miller, W. E. 1993. Carbohydrates in alfalfa seed developed for salt tolerance during germination. Agron. J. 85 (4): 834-836.

Dubois, M., Grilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-356.

Fässler, Arrigoni, E., Venema, K., Hafner, Vlk Brouns, F. and Amadò, R. 2006. Digestibility of resistant starch containing preparations using two in vitro models. Eur. J. Nutr. 45: 445-453.

Fox, I. D and Robyt, J. F. 1991. Miniaturization of three carbohydrate analysis using a microplate reader. Anal. Biochem. 195: 93-96.

Gibson, G. R. 2004. Prebiotics. Best Pract Res Cl Ga. 18 (2): 287-298.

Gibson, G. R and Rastall, R. A. 2006. Prebiotics: Development and application (G. R. Gibson and R. A. Rastall Eds.). John Wiley and Sons Ltd. England.

Gibson, G. R and Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of human colonic microbiota: introduction the concept of prebiotics. J. Nutr. 125: 1401-1412.

Giannoccaro, E., Wang, Y. J. and Chen, P. 2006. Effects of solvent, temperature, time, solvent-to-sample ratio, sample size, and defatting on the extraction of soluble sugars in soybean. J. Food Sci. 71: 59-64.

Goswami, C, Hossain, A. M, Kader. and Islam, R. 2011. Assessment of physicochemical properties of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam) pulps. Journal of Horticulture Forestry and Biotechnology. 15 (3): 26-31.

Griffen, I. J., Davila, P. M. and Abrms, S. A. 2002. Non-digestible oligosaccharides and calcium absorption in girls with adequate calcium intakes. Br. J. Nutr. 87: S187-S191.

Johansen, H. N., Glitsø, V. and Knudsen, K. E. B. 1996. Influence of extraction solvent and temperature on the quantitative determination of oligosaccharides from plant material by High Performance Liquid chromatography.J. Agric. Food. Chem. 44: 1470-1474.

Joshi, J. B., Elias, C. B., Patole, M. S. 1996. Role of hydrodynamic shearing the cultivation of animal, plant and microbial cells. Chem. Eng. J. 62: 121-141.

Karr-Lilienthal, L. K., Kadzere, C. T., Grieshop, C. M. and Fahey Jr, G. C. 2005. Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to non-ruminants. Livest. Prod. Sci. 97: 1-12.

Karel, M. 1980. Theory of drying process. *In* A. Spicer (Ed.). New methods dehydration and drying of food. P. 53-100. Warszawa WNT (in Polish).

Kawase, M., Pilgrim, A., Araki, T. and Hashimoto, K. 2001. Lactosucrose using a stimulated moving bed reactor. Chem. Eng. Sci. 56: 453-458.

Kim, S., Kim, W and Whang, I. K. 2003. Optimization of extraction and purification of oligosaccharides from defatted soybean meal. Int. J. Food Sci Technol. 38: 337-342.

Kolida, S., Tuohy, K and Gibson, G. R. 2002. Prebiotic effect of inulin and oligofructose. Br. J. Nutr. 87: S193-S197.

Knudsen, K. E. F and Li, B. W. 1991. Determintaion of oligosaccharides in protein-rich feedstuffs by gas-liquid chromatography and high liquid chromatography. J. Agric. Food. Chem. 39: 689-694.

Lee, C. Y., Shallenberger, R. S. and Vittum, M. T. 1970. Free sugar in fruits and vegetables. Food Sci. Technol. 1: 1-12.

Lehmann, U and Robin, F. 2007. Slowly digestible starch- its structure and health implications: A review. Trends Food Sci Technol. 18: 346-355.

Lewicki, P. P. 1998. Effect of pre-drying treatment, drying and rehydration on plant tissue properties: A review. Int. J. Food Prop. 1(1): 1-22.

Lewicki, P. P and Jakubczyk, E. 2004. Effect of hot air temperature on mechanical properties of dried apples. J. Food Eng. 64: 307-314.

Lewicki, P. P and Pawlak, G. 2003. Effect of drying on microstructure of plant tissue. Drying Technol. 21(4): 657-683.

Maia, J. G. S., Andrade, E, H. A. and Zoghbi, M. G. B. 2004. Aroma volatiles feom two fruit varieties of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). Food Chem. 85: 195-197.

Manning, T. S and Gibson, G. R. 2004. Prebiotics. Best Pract Res Cl Ga. 18: 287-298.

McCleary, B. V. 2003. Dietary fibre analysis. Proceeding of the Nutrition Society. 62: 3-9.

Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid readgent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-428.

Montgomery, D.C. 1991. Design and Analysis of Experiments. 3rd Ed. John Wiley and Sons.

Moongngram, A., Trachoo, N. and Sirigungwan, N. 2011. Low molecular weight carbohydrates, Prebiotic content, and prebiotic activity of selected food plants in Thailand. Advance Journal of Food Science and Technology. 3(4): 269-274.

Mussatto, I. S and Mancilha, M. I. 2007. Non-digestible oligosaccharides: A review. Carbohydr. polym. 68:587-597.

Nakada, T., Nishimoto, T., Chaen, H. and Fukada, S. 2003. Kojioligosaccharides: application of kojibiose, phosphorylase on the formation of various kojioligosaccharides. In *Oligosaccharides in Food and Agricultural*. Eggleston, G. and Cote, G. L. (eds). pp 104-117. ACS Press, Washington DC.

Nakakuki, T. 2002. Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. Pure Appl. Chem. 74 (7): 1245-1251.

Neutraceutical World. 2010. Report Finds Significant Potential in Prebiotics Market (online). Available: http://nutraceuticalsworld.com/contents/view_breaking-news/2010-02-23/report-finds-significant-potential-in-prebiotics-m/2010 (3 January 2012)

Nissreen, A. G and Mckenna, B. 1997. Hydration kinetics of res kedney beans (*Phaseolus Vugaris* L.). Food Science. 62 (1): 520-523.

Ogueke, C. C., Owuamanam, C. I., Ihediohanma, N. C. and Iwouno, J. O. 2010. Probiotics and prebiotics: unolding prospects for better human health. Pak. J. Nutr. 9: 833-843.

Oku, K., Sawatani, I., Chaen, H. Fukuda, S. and Kurimoto, M. 1998. Trehalose content in foods. J. Jpn Soc Food Sci Technol. 45(6): 381-384.

Ouwehand., A. C., Derrien, M., Vos de, W., Tiihonen, K. and Nina Rautonen, N. 2005. Prebiotics and other microbial substrates for gut functionality. Curr. Opin. Biotechnol. 16: 212-217.

Patel, S and Goyal, A. 2011. Functional oligosaccharides:production, properties and applicaions. World J. Microbiol. Biotechnol.. 27 (5): 1119-1128.

Pool-Zobel, B. L. 2005. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. Br. J. Nutr. 93: S73-S90.

Pricewaterhouse cooper global network. 2009. Leveraging growth in the emerging functional foods industry: trend and market opportunities (online). Available:

http://download.pwc.com/ie/pubs/pwc_leveraging_growth_in_the_emerging.pdf (1 July 2012)

Quigley, E. M. M. 2010. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. Pharmacol. Res. 61:213–218.

Rahman, M. A., Nahar, N., Mian , A. J. and Mosihuzzaman, M. 1999. Variation of carbohydrate composition of two forms of jacktree (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) with maturity and climatic condition. Food Chem. 65: 91-99.

Rastall, A. R. 2010. Functional oligosaccharides: application and manufacturing. Annu. Rev. Food Sci. Technol. 1: 305- 339.

Roberfroid, M and Slavin, J. 2000. Nondigestible oligosaccharides. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 40: 461–480.

Saha, S. K and Brewer, C. F. 1994. Determination of the concentration of oligosaccharides, complex type carbohydrates, and glycoproteins using the phenol-sulfuric acid method. Carbohydr. Res. 254: 157-167.

Sako, T. Matsumoto, K. and Tanaka, R. 1999. Recent progress on research and applications of non- digestible oligosaccharides. Int. Dairy J. 9: 69-80.

Sardesai, V. 2012. Digestion of carbohydrates, lipids and protein. *In* Introduction to clinical nutririon. 3rd Ed. CRC Press. P. 23-26.

Schley, D. P and Field, J. C. 2002. The immune-enhancing effects of dietary fibers and prebiotics. Br. J. Nutr. 87 (2): S221-S230.

Selvaraj, Y and Pal, D. K. 1989. Bichemical changes during ripening of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). J. Food Sci. Technol. 26: 304-306.

Shamasudin, R., Ling, C. S., Ling, C. N., Muda, N. and Hassan, O. 2009. Chemical compositions of the jackfruit juice (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) cultivar J33 during storage. J. Appl. Sci. 9 (17): 3202-3204.

Shiomi, N., Benkeblia, N. and Onodera, S. 2005. The metabolism of the fructooligosaccharides in onion bulbs: A comprehensive review. J. Appl. Glycosci. 52: 121-127.

Sjöholm, I and Gekas, V. 1995. Apple shrinkage upon drying. Journal of Food Engineering. 25: 123-130.

Souza, M. A., Bonomo, R. C. F., Fontan, R. C. I., Minim, L. A. and Coimbra, J. S. D. R. 2009. Themophysical properties of jackfruit pulp affected by changes in moiture content and temperature. J. Food Process Eng. P. 1-4.

Sun, H. J., Yoshida, S., Park, N. H. and Kusakabe, I. 2002. Preparation of (1→4)-β-D-xylooligosaccharides from an acid hydrolysate of cotton-seed xylan: Suitability of cotton-seed xylan as a starting material for the preparation of (1→4)-D-xylooligosaccharides. Carbohydr. Res. 337 (7): 657-661.

Swennen, K, Courtin, C. H. and Delcour, J. A. 2006. Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. Cri. Rev. Food Sci. Nutr. 46: 459-471.

Van Den Broek, L. A. M and Voragen, A, G. J. 2008. *Bifidobacterium* glycoside hydrolases and (Potential) prebiotics. Innov. Food Sci. Emerg. Tehcnol. 9: 401-407.

Venter, C. S. 2007. Prebiotics: an update. J. Fam. Ecol. Con. Sci. 35: 17-25.

Venter, C. S., Vorster, H. H. and Van Der Nest, D. G. 1991. Effects of konjac-glucomannan and propionate on plasma fibrinogen and serum and liver lipids in Zucker rats. S. Afr. J. Clin. Nutr. 4 (1): 6-11.

Villamiel, M., Corzo, N., Foda, M. I., Montes, F. and Olano, A. 2002. Lactulose formation catalyzed by alkaline-substituted sepiolites in milk permeate. Food Chem. 76: 7-11.

Voragen, A. G. J. 1998. Technological aspect of functional food-relates carbohydrates. Trends Food Sci. Technol. 9: 328-335.

Wang, Y. 2009. Prebiotics: present and future in food science and technology. Food Res. Int. 42: 8-12.

Wang, N and Brennan, J. G. 1995. Changes in structure, density and porosity of potato during dehydration. J. Food Eng. 24: 61-76.

Weijers, C. A. G. M., Franssen, M.C. R. and Visser, G. M. 2008. Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. Biotechnol Adv. 26: 436-456.

Wichienchot, S., Jatupornpipat, M. and Rastall, R.A.. 2010. Oligosaccharides of Pitaya (dragon fruit) Flesh and their Prebiotic properties. Food Chem.120(3): 850-857.

Wichienchot, S., Prasertsan, P., Hongpattatakere, T., Rastall, R. A. and Gibson, G. R. 2006. *In vitro* three-stage continuous fermentation of gluco-oligosaccharides, produced by

Gluconobacter oxydans NCIMB 4943, by the human colonic microflora. Curr. Iss. Intest. Microbiol. 7. 13-18.

Wichienchot, S., Thammarutwasik, P., Jongjareonrak, A., Chansuwan, W., Hmadhlu, P., Hongpattarakere, T., Itharat, A. and Ooraikul, B. 2011. Extraction and analysis of prebiotics from selected plants from southern Thailand. Songklanakarin J. Sci. Technol. 33 (5): 517-523.

Wills, R. B. H., Lim, J. S. K. and Greenfield, H. 1986. Composition of Australian food. 31. Tropical and subtropical fruit. Food Tech. Austr. 31-38, 118-123.

Witrowa-Rajchert, D. 1999. Rehydration as an index of changes occurring in plant tissues during drying. Warsaw: Fundacja Rozwój SGGW (in Polish).

Wong, J. M., De Souza, R., Kendall, C. W., Eman, A. and Jenkins, D. J. 2006. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. Journal of Clinical Gastroenterology. 40: 235-243.

Xiaoli, X., Yang, L., Hua, S., Li, W., Sun, Y., Ma, Hao., Zhang, J. and Zeng, X. 2008. Determination of oligosaccharide content in 19 chickpea (*Cicer arietinum* L) seed by high performance liquid chromatography. Anal. Methods. 111: 215-219.

Yun, J. W. 1996. Fructooligosaccharides-occurrence, preparation, and application. Enzyme Microb. Technol. 19: 107-117.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์

1.1 การเตรียมสารละลายฟีนอล ร้อยละ 5

ชั่งฟีนอลที่เป็นของแข็ง (Phenol crystal) ปริมาณ 5 กรัม นำไปละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

1.2 การเตรียมสารละลาย Dinitrosalicylic acid

สารเคมี

Dinitrosalicylic acid	10	กรัมต่อลิตร
Phenol	20	กรัมต่อลิตร
Sodium sulfite	0.5	กรัมต่อลิตร
Sodium hydroxide	10	กรัมต่อลิตร
Sodium potassium tartrate	200	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียม

เติมสาร Dinitrosalicylic acid, phenol, sodium sulfite และ Sodium potassium tartrate ลงในสารละลาย Sodium hydroxide ร้อยละ 1 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวโดยใช้ magnetic bar กวนผสมบน magnetic stirrer จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แต่หากเก็บรักษาเป็นเวลานาน สาร sodium sulfite ในสารละลายอาจเสื่อมสภาพได้ ให้เติม sodium sulfite เมื่อต้องการทำปฏิกิริยา

1.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์

การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ชั่งน้ำตาล D-glucose 0.25 มิลลิกรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเริ่มต้น (stock solution) ความเข้มข้นเท่ากับ 10^4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้เจือจางสารละลายลงเป็น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในกรณีที่ต้องการเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ (สารละลายที่ต้องการมีความเข้มข้น 100-600 μg/ml) และเจือจางลงเป็น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในกรณีที่ต้องการเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปเจือจางต่อเพื่อให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงใน Appendix table 1 และ 2 ตามลำดับ

Appendix table 1. Glucose standard preparation for reducing sugar analysis.

Standard concentration (µg/ml)	Stock solution (1000 µg/ml) (ml)	Distilled water (ml)	Total volume (ml)
0	0	2	2
100	0.2	1.8	2
150	0.3	1.7	2
200	0.4	1.6	2
250	0.5	1.5	2
300	0.6	1.4	2
350	0.7	1.3	2
400	0.8	1.2	2
450	0.9	1.1	2
500	1.0	1.0	2
600	1.2	0.8	2

Appendix table 2. Glucose standard preparation for total sugar analysis.

Standard concentration (µg/ml)	Stock solution (200 µg/ml) (ml)	Distilled water (ml)	Total volume (ml)
0	0	2	2
20	0.2	1.8	2
40	0.4	1.6	2
60	0.6	1.4	2
80	0.8	1.2	2
100	1.0	1.0	2
120	1.2	0.8	2
140	1.4	0.6	2
160	1.6	0.4	2
180	1.8	0.2	2
200	2.0	0	2

สูตรที่ใช้ในการคำนวณ

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

เมื่อ C_1 และ V_1 คือความเข้มข้นและปริมาตรของ stock solution

C_2 และ V_2 คือความเข้มข้นและปริมาตรของสารที่ต้องการเจือจางลง

1.4 การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์น้ำตาล

ในการวิเคราะห์น้ำตาลถ้าตัวอย่างมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นมาก ให้ทำการเจือจางลงเป็นร้อยละ 1 (Stock solution) จากนั้นจึงเจือจางลงเป็นเท่า ดังแสดงใน Appendix table 3

Appendix table 3. Sample solution preparation for sugar analysis.

Dilution (Time)	Total volume (µl)	Stock solution (µl)	Distilled water (µl)
5 (A)	2000	400	1,600
10 (B)	2000	1000-จากสาร A	1000
20 (C)	2000	1000-จากสาร B	1000
40 (D)	2000	1000-จากสาร C	1000
100 (E)	1000	400-จากสาร D	600
200	1000	500-จากสาร E	500

2. การเตรียมสารที่ใช้ในการทดสอบสมบัติการต้านการย่อยของสารสกัดในระบบทางเดินอาหารจำลอง

2.1 การเตรียมสารละลายน้ำลายเทียม (Artificial saliva)

ชั่งสารเคมีตามรายการที่แสดงไว้ใน Appendix table 4 และนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 450 มิลลิลิตร โดยกวนตลอดเวลาเพื่อให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 6.9 ด้วย 0.1 M NaOH และปรับปริมาตรของสารละลายจนเป็น 500 ด้วยน้ำกลั่น

2.2 การเตรียมเอนไซม์ Human saliva α-amylase

เตรียมเอนไซม์ Human saliva α-amylase type XIII-A (Sigma A1031, 66.3 units/mg solid) โดยชั่งเอนไซม์ 3.02 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่นแช่เย็น (4 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (เอนไซม์เข้มข้นเท่ากับ 100.113 unit/ml) สารละลายน้ำลายเทียมที่มีตัวอย่างอยู่มีปริมาตร 500 มิลลิลิตร ต้องการให้เอนไซม์ที่ละลายอยู่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.33 unit/ml ดังนั้นให้เติมสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้ลงในขวดตัวอย่างปริมาตร 1.65 มิลลิลิตร

Appendix table 4. Chemical compositions of artificial human saliva.

Number	Chemical lists	Chemical formula	Quantity (g/500 ml)
1	Sodium chloride	NaCl	0.797
2	Ammonium nitrate	NH_4NO_3	0.164
3	Potassium phosphate	KH_2PO_4	0.318
4	Potassium chloride	KCl	0.101
5	Potassium citrate monohydrate	$K_3C_6H_5O_7 \cdot H_2O$	0.154
6	Uric acid sodium salt	$C_5H_3N_4O_3Na$	0.0105
7	Urea	H_2NCONH_2	0.099
8	Lactic acid sodium salt	$C_3H_3O_3Na$	0.073
9	DI water	H_2O	For volume adjusting

ที่มา: ดัดแปลงจาก Sarkar และคณะ (2009)

2.3 การเตรียมสารไฮโครคลอริกบัฟเฟอร์เพื่อใช้ในการย่อยตัวอย่างในสภาวะกรด

การเตรียมสารไฮโครคลอริกบัฟเฟอร์ ให้วัดปริมาตรของตัวอย่างที่เหลือจากการสุ่มตัวอย่างในขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์ Human saliva α-amylase ก่อน (เพื่อนำไปคำนวณปริมาณสารเคมีที่ต้องใช้) จากนั้นจึงชั่งสารเคมีชนิดต่างๆ ดังแสดงใน Appendix table 5 นำมาละลายในขวดตัวอย่าง และปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 2.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.2 N ก่อนนำไปบ่มต่อไป

Appendix table 5. Chemical compositions of hydrochloric acid buffer.

Chemical lists	Chemical formula	Quantity (g/L)
Sodium chloride	NaCl	1.703
Potassium chloride	KCl	0.199
Calcium chloride	$CaCl \cdot 2H_2O$	0.15
Sodium bicarbonate	$NaHCO_3$	0.30

ที่มา: Fässler และคณะ (2006)

2.4 การเตรียมเอนไซม์ porcine pancrease α-amylase

เตรียมเอนไซม์ porcine pancrease α-amylase (Sigma A3176, 332.8 units/mg solid) ต้องทำการเตรียมในสารละลาย phosphate buffer

2.4.1 การเตรียมสารละลาย phosphate buffer

ชั่ง Na_2HPO_4 1.42 กรัม และ KH_2PO_4 1.36 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร และปรับพีเอชเป็น 6.9 ด้วย 1N NaOH

ตัวอย่างที่เหลือจากการสุ่มตัวอย่างภายหลังการย่อยในสภาวะกรดคือ 420 มิลลิลิตร ต้องการให้เอนไซม์มีความเข้มข้นสุดท้ายในสารละลายทั้งหมดเท่ากับ 0.75 unit/ml

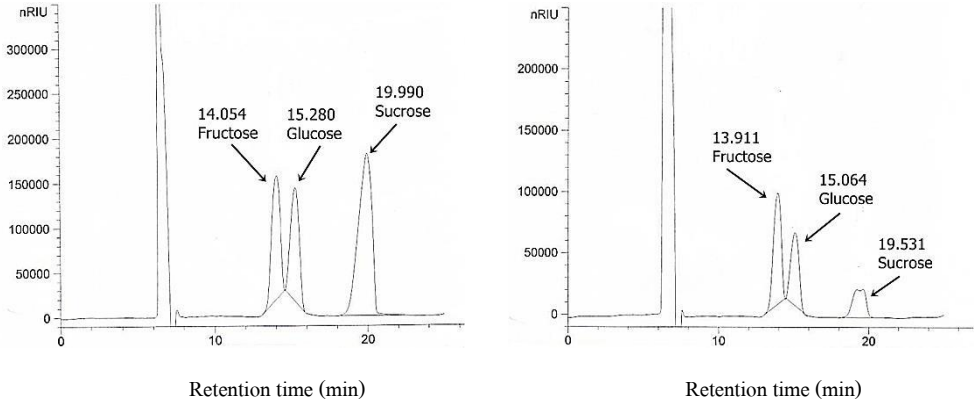
2.4.2 การเตรียมสารละลายเอนไซม์

ต้องทำ stock solution ของเอนไซม์โดยชั่งเอนไซม์ 4.755 มิลลิกรัม ละลายใน phosphate buffer ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (สำหรับตัวอย่างและชุดควบคุม) จะได้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้น 316.5 unit/ml ดูดสารละลายเอนไซม์ 2 มิลลิลิตรลงในขวดตัวอย่าง จะได้ตัวอย่างที่มี porcine pancrease α-amylase ละลายอยู่ 0.75 unit/ml

ภาคผนวก ข

ผลการทดลอง

1. องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อและซังขนุน



a) jackfruit bulb b) jackfruit fiber

Appendix figure 1. Chromatogram of mono- and disaccharide content in fresh bulb (a) and fiber (b) of jackfruit analyzed by HPLC.

2. การสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งในระดับห้องปฏิบัติการ

Appendix table 6. Extraction yield and non-reducing sugar content (g/kg extract) of fresh and dried jackfruit bulb and fiber ethanolic extracts under intermittent (interval 30 minute) and continuous stirring (250 rpm) for 3 hour at room temperature (sample to solvent ratio, 1:3 w/v).

1. Extraction yield (%)

Sample		Intermittent stirring		Continuous stirring (250rpm)	
		Ethanol 50%	Ethanol 95%	Ethanol 50%	Ethanol 95%
Jackfruit bulb	Fresh	8.26±0.78	9.32±0.92	8.01±0.85	9.11±0.97
	Dried	1.93±0.42	1.83+0.55	2.86+0.56	1.61±0.32

Appendix table 6. Extraction yield and non-reducing sugar content (g/kg extract) of fresh and dried jackfruit bulb and fiber ethanolic extracts under intermittent (interval 30 minute) and continuous stirring (250 rpm) for 3 hour at room temperature (sample to solvent ratio, 1:3 w/v) (cont.).

Sample		Intermittent stirring		Continuous stirring (250rpm)	
		Ethanol 50%	Ethanol 95%	Ethanol 50%	Ethanol 95%
Jackfruit fiber	Fresh	4.60±0.51	3.32±0.26	3.36±0.18	5.89±0.39
	Dried	2.57±0.01	0.38±0.01	2.86±0.01	0.42±0.00

2. Non-reducing sugar based on g/kg sample

Sample		Intermittent stirring		Continuous stirring (250rpm)	
		Ethanol 50%	Ethanol 95%	Ethanol 50%	Ethanol 95%
Jackfruit bulb	Fresh	209.25±33.14	122.48±22.27	163.19±21.96	321.52±20.44
	Dried	23.41±2.72	101.81±2.76	51.23±13.42	121.88±6.12
Jackfruit fiber	Fresh	34.89±8.22	60.30±16.80	33.16±13.69	126.89±9.41
	Dried	130.91±3.18	38.561.07	150.39±2.46	33.97±0.15

3. การสกัดน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งในระดับโรงงานทดลอง

Appendix table 7. Extraction yield (%) of jackfruit bulb with ethanol 95%, at sample to solvent ratio of 1:9 (w/v) under room temperature (30±2°C) for 1 hour in pilot plant scale.

Extraction time (min)	Extraction yield (%)
5	0.34±0.01
10	0.37±0.00
15	0.38±0.01
20	0.42±0.03
30	0.46±0.01
40	0.48±0.01
50	0.52±0.01
60	0.55±0.01

Appendix table 8. Total sugar, reducing suagr and non-reducing sugar content (mg/ml extract) of jackfruit bulb obtained from ethanol 95% extraction, at sample to solvent ratio of 1:9 (w/v) under room temperature (30±2°C) for 1 hour in pilot plant scale.

Extraction time (min)	Total sugar (mg/ml extract)	Reducing sugar (mg/ml extract)	Non-reducing sugar (mg/ml extract)
5	11.95±0.04	1.27±0.00	10.68±0.14
10	12.00±0.09	1.34±0.00	10.66±0.11
20	14.93±0.12	1.46±0.01	13.47±0.09
30	15.73±0.01	1.67±0.01	14.07±0.06
50	15.73±0.02	1.93±0.00	13.80±0.12
60	17.53±0.11	2.12±0.01	15.41±0.13

3. การทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์และกรดในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหาร

Appendix table 9. Percentage of hydrolysis of inulin and jackfruit oligosaccharides hydrolyzed by human saliva α –amylase (0.33 units/ml, pH 6.8) at 37°C for 40 min.

Incubation time (min)	Hydrolysis percentage (%)	
	inulin	Jackfruit oligosaccharides
5	0.00±0.00	0.11±0.00
10	0.01±0.03	1.15±0.27
15	0.03±0.01	1.41±0.24
20	0.04±0.01	2.89±0.21
30	0.05±0.01	4.90±0.21
40	0.05±0.01	4.95±0.23

Appendix table 10. Percentage of hydrolysis of inulin and jackfruit oligosaccharides hydrolyzed by artificial gastric juice (HCl buffer, pH 2.0) at 37°C for 240 min.

Incubation time (min)	Hydrolysis percentage (%)	
	inulin	Jackfruit oligosaccharides
10	2.68±0.03	1.01±0.02
20	3.66±0.03	2.10±0.47
30	4.65±0.27	6.41±0.44
60	7.71±0.35	6.73±1.41
90	10.78±1.14	6.86±1.50
120	10.35±1.12	8.37±1.13
240	22.99±2.01	8.86±1.06

Appendix table 11. Percentage of hydrolysis of inulin and jackfruit oligosaccharides hydrolyzed by porcine pancrease α –amylase (0.75 units/ml, pH 6.9) at 37°C for 6 hour.

Incubation time (min)	Hydrolysis percentage (%)	
	inulin	Jackfruit oligosaccharides
1	4.21±0.76	44.07±1.99
2	7.91±0.36	51.40±1.86
3	8.49±0.36	57.39±2.00
4	8.87±0.96	52.18±2.26
6	10.35±1.03	63.58±1.26

ภาคผนวก ค

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

1.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น โดยใช้ตู้อบไฟฟ้า (A.O.A.C., 2000)

อุปกรณ์

1. ตู้อบไฟฟ้าที่สามารถปรับและควบคุมอุณหภูมิได้
2. ภาชนะหาความชื้น (ถ้วยอะลูมิเนียมพร้อมฝา)
3. โถดูดความชื้น
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. อบถ้วยอะลูมิเนียมพร้อมฝา ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมง จากนั้นนำออกจากตู้อบและใส่ไว้ในโถดูดความชื้น จนกระทั่งมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง จึงชั่งน้ำหนักและบันทึกผล

2. ทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อที่ จนกระทั่งน้ำหนักของภาชนะดังกล่าว มีน้ำหนักที่ชั่งติดกันสองครั้งไม่เกิน1-3 มิลลิกรัม

3. ชั่งตัวอย่างใส่ในถ้วยอะลูมิเนียมให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1-3 มิลลิกรัม จากนั้นนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 ถึง 6 ชั่วโมง ทำเช่นเดียวกับข้อที่ 1 และ 2 จนกระทั่งน้ำหนักตัวอย่างและภาชนะที่ชั่งติดกันสองครั้งไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม นำหนักตัวอย่างที่ได้ไปคำนวณปริมาณความชื้นในตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้นในตัวอย่าง (ร้อยละ)} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100$$

เมื่อ W_1 คือน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ และ W_2 คือน้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีเจลดาห์ล (A.O.A.C., 2000)

อุปกรณ์

1. ชุดย่อยโปรตีน ประกอบด้วยเตาย่อย และเครื่องดักจบไอกรด (scrubber)
2. ขวดย่อยโปรตีน (Kjeldahl flask) ขนาด 250-300 มิลลิลิตร
3. ชุดกลั่นโปรตีน
4. ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร (volumetric flask)
5. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร
6. ปิเปตขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร (volumetric pipette)
7. บิวเรตขนาด 25 มิลลิลิตร
8. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
9. กระดาษกรองสำหรับใส่ตัวอย่าง

สารเคมี

1. กรดซัลฟุริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4)

2. สารผสมระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) และโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10

3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 สำหรับการกลั่นและร้อยละ 20 สำหรับการย่อยโปรตีน

4. สารละลายกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 (กรดบอริกให้ละลายในน้ำร้อน 60 องศา-เซลเซียส)

5. สารละลายกรดเกลือความเข้มข้น 0.01 นอร์มาล

6. อินดิเคเตอร์ (indicator) ซึ่งเป็นสารผสมระหว่าง เมทิลเรด เมทิลีนบลู และโบรโม-ครีซอลกรีน

การเตรียมอินดิเคเตอร์

ชั่งเมทิลเรด 0.125 กรัมและชั่งเมทิลีนบลู 0.082 กรัม นำไปละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นชั่งโบรโมครีซอลกรีน 0.1 กรัม นำไปละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ผสมสารละลายทั้งสองในอัตราส่วน 1 ต่อ 1.5 ก่อนจะนำไปวิเคราะห์โปรตีน

วิธีการ

การย่อยโปรตีน

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 0.5-1 กรัม

2. บนกระดาษกรอง ก่อนนำไปใส่ลงในหลอดย่อยโปรตีนและทำแบลงค์ด้วย

3. ใส่สารผสม $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ และ K_2SO_2 ปริมาณ 5 กรัม

4. เติมกรดซัลฟุริกเข้มข้นปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นวางหลอดย่อยในเตาย่อยแล้วประกอบสายยางระหว่างฝาครอบของขวดใส่ด่าง (สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 20) และเครื่องดักจับไอกรดให้เรียบร้อย

5. เปิดสวิทช์เครื่องดักจับไอกรดและเตาย่อย โดยตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 400 องศาเซลเซียส ย่อยเป็นเวลา 45-60 นาที หรือจนกว่าจะได้สารละลายใส จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น

6. นำสารละลายใสที่ได้ไปกลั่นด้วยชุดกลั่นโปรตีน

การกลั่นโปรตีน

1. เปิดสวิทช์ให้ความร้อนและเปิดน้ำหล่อเย็นของเครื่องควบแน่น บรรจุหลอดตัวอย่างที่ผ่านการย่อยเข้ากับอุปกรณ์กลั่น

2. นำขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรและเติมอินดิเคเตอร์เรียบร้อยแล้วไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้ โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มลงในสารละลายกรดนี้

3. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 20 มิลลิลิตรลงในตัวอย่าง จากนั้นกลั่นตัวอย่างเป็นเวลา 5 นาที ล้างปลายอุปกรณ์ควบแน่นด้วยน้ำกลั่นลงในขวดรองรับ

4. ไตเตรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วยสารละลายกรดเกลือความเข้มข้น 0.01 นอร์มาล จนได้สารละลายสีม่วง จากนั้นให้คำนวณหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{(A-B)\times N\times 1.4007\times F}{W}$$

เมื่อ A = ปริมาตรกรดที่ใช้ไตเตรตกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรกรดที่ใช้ไตเตรตกับ blank (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของกรด (นอร์มาล)

F = แฟกเตอร์ (6.25)

W = น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

1.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน (Soxhlet apparatus) ประกอบด้วย ขวดก้นกลมสำหรับใส่ตัวทำละลาย ซอคเลต (soxhlet) อุปกรณ์ควบแน่น (condenser) และเตาให้ความร้อน (heating mantle)

2. หลอดใส่ตัวอย่าง (extraction thimble)

3. กระดาษกรองเบอร์หนึ่ง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร

4. สำลี

5. กระดาษฟอยล์

6. ตู้อบไฟฟ้า

7. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

8. โถดูดความชื้น

สารเคมี ปิโตรเลียมอีเทอร์

วิธีการ

1. อบขวดก้นกลมสำหรับหาปริมาณไขมัน ขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร ในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 3-5 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นจนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง นำไปชั่งน้ำหนัก แล้วอบซ้ำเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำเช่นเดิมจนกระทั่งได้น้ำหนักคงที่หรือน้ำหนักขวดที่ชั่งติดกันสองครั้งต่างกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

2. ชั่งตัวอย่างลงบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก ถ้าตัวอย่างเป็นชีววัสดุที่มีไขมันมากให้ชั่ง 1-2 กรัม ถ้าเป็นชนิดที่มีไขมันน้อยให้ชั่ง 3-5 กรัม ห่อให้มิดชิด แล้วห่อซ้ำด้วยกระดาษกรองอีกครั้ง ใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง คลุมด้วยสำลีที่ด้านบนของหลอดตัวอย่างเพื่อให้ตัวทำละลายมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ

3. นำหลอดตัวอย่างใส่ลงในซอคเลต จากนั้นเติมปิโตรเลียมอีเทอร์ ลงในขวดก้นกลมปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตา

4. ประกอบอุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน พร้อมทั้งเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่นและเปิดสวิทช์ ให้ความร้อนเพื่อทำการสกัดนาน 14 ชั่วโมง โดยปรับความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่นด้วยอัตรา 150 หยดต่อนาที

5. เมื่อครบ 14 ชั่วโมง นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอคเลต ทิ้งให้ตัวทำละลายไหลจากซอคเลตลงในขวดก้อนกลมจนหมด

6. ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปใส่ในโถดูดความชื้นจนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง นำไปชั่งน้ำหนักและอบซ้ำ จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักสองครั้งติดกันห่างกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

7. คำนวณปริมาณไขมันในตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมันในตัวอย่าง (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = 100\times \frac{\text{น้ำหนักไขมันหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

อุปกรณ์

1. เตาเผา (muffle furnace)
2. ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (porcelain crucible)
3. โถดูดความชื้น
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นปิดสวิทช์เตาเผาแล้วรอประมาณ 30-45 นาที เพื่อให้อุณหภูมิในเตาเผาลดลงประมาณ 200 องศาเซลเซียส จึงนำถ้วยออกจากเตาเผา นำไปใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนัก

2. นำถ้วยกระเบื้องไปเผาซ้ำครั้งละประมาณ 30 นาที และทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้งสองครั้งติดต่อกัน ไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 1-2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปเผาในตู้ควันจนหมดควัน แล้วจึงนำเข้าเตาเผา ตั้งอุณหภูมิเตาเผาไว้ที่ 600 องศาเซลเซียส ทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 1 และ 2 จากนั้นจึงคำนวณปริมาณเถ้าในตัวอย่าง จากสูตรคำนวณด้านล่าง

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้าในตัวอย่าง (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = 100 \times \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

5. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Modified phenol sulfuric acid method (Fox and Robyte, 1991)

อุปกรณ์

1. หลอด eppendorf ขนาด 2 มิลลิลิตร สำหรับเจือจางตัวอย่างและสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน
2. ไมโครปิเปตขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร
3. plastic wrapped
4. ถุงซิป
5. น้ำแข็ง
6. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
7. เครื่อง microplate reader
8. Microplate 96 หลุม สำหรับทำปฏิกิริยา

สารเคมี

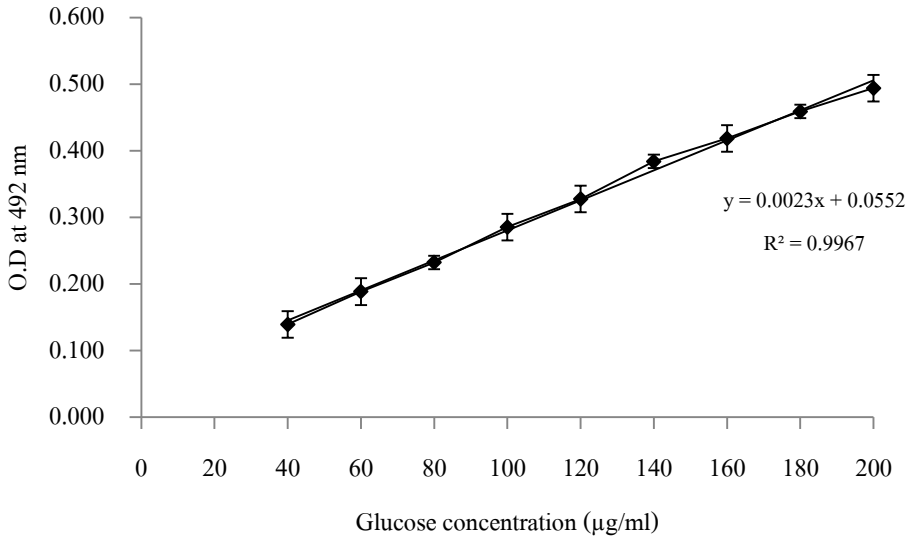
1. สารละลายฟีนอลเข้มข้นร้อยละ 5 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)
2. กรดซัลฟุริกเข้มข้นร้อยละ 98 (conc. H_2SO_4)
3. สารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการ

1. เจือจางตัวอย่างด้วยน้ำที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (0-200 เท่า) แล้วดูดตัวอย่างปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงใน Microplate 96 หลุม
2. เติมสารละลายฟีนอลเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เขย่าเพลทเบาๆ เพื่อให้สารผสมกันประมาณ 30 วินาที
3. นำไมโครเพลทไปวางบนน้ำแข็ง และเติม conc. H_2SO_4 ปริมาตร 125 มิลลิลิตร และเขย่าเช่นเดียวกับข้อ 2

4. ห่อเพลทด้วย plastic wrapped บรรจุใส่ถุงพลาสติกแล้วนำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 80±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

5. ทำให้เย็นแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่มีในตัวอย่าง โดยเทียบจากกราฟของสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน



Appendix figure 1. Standard curve of total sugar.

6. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี Modified Dinitrosalicylic acid method (Miller, 1959)

อุปกรณ์

1. หลอด eppendorf ขนาด 2 มิลลิลิตร สำหรับเจือจางตัวอย่างและสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน
2. ไมโครปิเปตขนาด 200 และ 1000 ไมโครลิตร
3. plastic wrapped
4. ถุงซิป
5. น้ำแข็ง
6. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ
7. เครื่อง microplate reader
8. Microplate 96 หลุม สำหรับทำปฏิกิริยา

สารเคมี

1. สารละลาย Dinitrosalicylic acid (DNS) ประกอบด้วย

2. สารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 และ 600 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

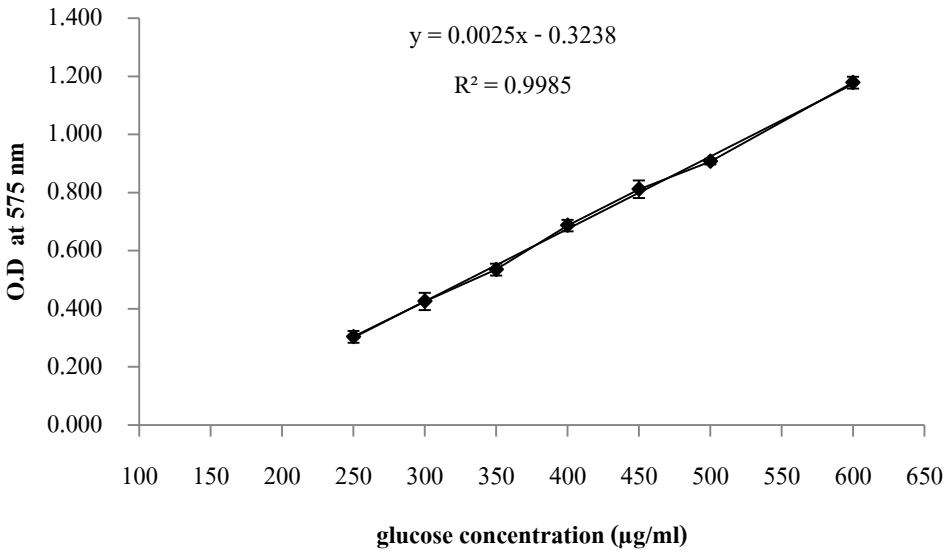
วิธีการ

1. เจือจางตัวอย่างเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ในข้อที่ 1 แล้วดูดตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Microplate 96 หลุม

2. เติมสารละลาย Dinitrosalicylic acid ปริมาณ 100 ไมโครลิตร เขย่าเพลทเบาๆ ให้สารผสมกัน ประมาณ 30 วินาที

3. ห่อเพลทด้วย plastic wrapped บรรจุใส่ถุงพลาสติกแล้วนำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 80±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

4. ทำให้เย็นแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตร จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่มีในตัวอย่าง โดยเทียบจากกราฟของสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน



Appendix figure 2. Standard curve of reducing sugar.

7. การวิเคราะห์ปริมาณสารที่สกัดได้ (ดัดแปลงจาก สุพจน์ นวลละออง, 2552)

อุปกรณ์

ถ้วยกระเบื้องเซรามิก

วิธีการ

1.นำถ้วยเซรามิคไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่

2. เติมสารสกัดลงในถ้วยเซรามิคประมาณ 10 มิลลิลิตร ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง แล้วนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยอ่างควบคุมความร้อนที่อุณหภูมิ 80±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3. นำถ้วยเซรามิคพร้อมตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสอีกครั้ง จนกระทั่งน้ำหนักถ้วยและตัวอย่างมีค่าคงที่ (ดัดแปลงจาก สุพจน์ นวลละออง, 2552) นำค่าน้ำหนักที่บันทึกได้ไปคำนวณร้อยละของปริมาณสารสกัดได้ดังสมการที่ 4

สมการที่ 4

$$\text{ร้อยละปริมาณสารที่สกัดได้ (\%yield)} = \frac{\text{น้ำหนักของสารสกัดหลังจากระเหยตัวทำละลาย (กรัม)}}{\text{น้ำหนักวัตถุดิบเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

8. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัด ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

อุปกรณ์

1. เครื่อง High performance liquid chromatography รุ่น Agilent 1200, RI Detector
2. Vial ขนาด 2 มิลลิลิตรสำหรับใส่ตัวอย่างและสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน
3. HPLC syringe Filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร
4. Vacuum pump และอุปกรณ์สำหรับการเตรียม mobile phase
5. HPLC Column

สารเคมี

1. Acetronitrile HPCL grade
2. Water HPLC grade
3. Iso-propanol HPLC grade

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

Mobile phase: Acetronitrile: water 80:20

Flow rate: 0.2 ml/min

Temperature: 40^{o}

Inject: 5 µl

วิธีการ

เตรียมสารละลายมาตรฐาน ประกอบด้วยน้ำตาล D-Fructose, D-Glucose และ Sucrose และโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีค่า DP ตั้งแต่ 3-9 ที่ความเข้มข้น มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้น้ำ HPLC grade เป็นตัวทำละลาย กรองด้วย syringe filter ขนาด 0.2 ไมโครลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในขวด Vial จากนั้นนำไปฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ตามสภาวะที่กำหนดไว้ข้างต้น โดยเริ่มจากการฉีดสารละลายมาตรฐาน เพื่อพิจารณา retention time (RT) ของพีคที่ได้จากการวิเคราะห์ ก่อนนำไปเปรียบเทียบกับพีคที่วิเคราะห์ได้ในสารสกัด