การสกัดและการทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกรและการประเมินคุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติก

Extraction and Purification of Oligosaccharide from Dragon fruit's flesh and Evaluation of Prebiotic Properties

รุสมัน ดะแซสาเมาะ

Rusman Dasaesamoh

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Food Technology
Prince of Songkla University
2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การสกัดและการทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกรและการประเมินคุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติก

ผู้เขียน นายรุสมัน ดะแซสาเมาะ

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	คณะกรรมการสอบ
…….	……..…..……..….ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิโรจน์ ยูรวงศ์)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยรัตน์ ศิริวงศ์ไพศาล)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	...……...……...….กรรมการ
……	(รองศาสตราจารย์ ดร. วิโรจน์ ยูรวงศ์)
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สันทัด วิเชียรโชติ)	
	……..……..…….....….กรรมการ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	(รองศาสตราจารย์ ดร. มณฑล เลิศคณาวนิชกุล)
……..…	
(ดร. จุฑา แซ่ว่อง)	……..…….……..……กรรมการ
	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สันทัด วิเชียรโชติ)
	……กรรมการ
	(ดร. จุฑา แซ่ว่อง)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร

……..……...

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลงานมาจากการศึกษาของนักศึกษา และขอขอบคุณผู้ที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่าน ณ ที่นี้

ลงชื่อ…….

(รองศาสตราจารย์ ดร. วิโรจน์ ยูรวงศ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ…….

(นายรุสมัน ดะแซสาเมาะ)

นักศึกษา

ข้าพเจ้ารับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นายรุสมัน ดะแซสาเมาะ)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การสกัดและการทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกรและการประเมินคุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติก

ผู้เขียน นายรุสมัน ดะแซสาเมาะ

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร

ปีการศึกษา 2556

บทคัดย่อ

แก้วมังกรเป็นแหล่งของโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีสมบัติพรีไบโอติก ซึ่งมีประโยชน์ต่อสุขภาพ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้เลือกศึกษาการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกรพันธุ์สีขาวด้วยน้ำและเอนไซม์เพคติเนส ทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้ด้วยการหมักด้วยยีสต์ และนำโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้มาทดสอบความคงทนต่อการย่อยภายใต้สภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารส่วนต้น และประเมินคุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติกโดยการหมักด้วยอุจจาระมนุษย์ และนำน้ำหมักมาทดสอบการต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่มนุษย์ การสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยน้ำ พบว่าของแข็งที่ละลายน้ำและปริมาณน้ำตาลในสารสกัดลดลง เมื่ออัตราส่วนของเนื้อแก้วมังกรต่อน้ำเพิ่มขึ้น สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยน้ำ คือ อัตราส่วนของเนื้อแก้วมังกรต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 2 และอุณหภูมิการสกัด 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ได้ปริมาณผลผลิตโอลิโกแซคคาไรด์สูงสุด เท่ากับ 43.98% (น้ำหนักแห้ง) และน้ำหนักโมเลกุลของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ เท่ากับ 790 ดาลตัล ส่วนการสกัดด้วยเอนไซม์เพคติเนส พบว่าสภาวะที่เหมาะในการสกัดด้วยเพคติเนส คือ อัตราส่วนเนื้อแก้วมังกรต่อน้ำเท่ากับ 1 ต่อ 2 และ ความเข้มข้นของเอนไซม์เพคติเนส เท่ากับ 124 ยูนิตต่อกรัมของแข็งสารสกัด อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสใช้เวลา 45 นาที ให้ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ เท่ากับ 41.92% (น้ำหนักแห้ง) และน้ำหนักโมเลกุลของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดเอนไซม์เพคติเนส อยู่ในช่วง 1609 ดาลตัล ดังนั้นการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยน้ำ และเอนไซม์เพคติเนส ให้ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) แต่การสกัดโดยใช้เอนไซม์เพคติเนสสามารถลดระยะเวลาในการสกัดลงได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ผลจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมการทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร ด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 501 พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเชื้อ

S. cerevisiae TISTR 501 เท่ากับ 2.5% โดยปริมาตร และสามารถกำจัดน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส ได้ 57%, 66% และ 100% ตามลำดับ การเติมยูเรียเป็นแหล่งของไนโตรเจนในการหมักที่ระดับความเข้มข้น 0.1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่า สามารถเพิ่มการกำจัดน้ำตาลกลูโคส ฟรุก-โตส และซูโครสได้สูงขึ้น เป็น 73%, 72% และ 100% ตามลำดับ ระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสม คือ 4 วัน ภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่มีการเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที สามารถกำจัดน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส ได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งทำให้โอลิโกแซคคาไรด์มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นเป็น 99.9% การทดสอบการทนต่อการย่อยของสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารส่วนต้น พบว่า สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกรที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ สามารถทนการย่อยภายใต้สภาวะจำลองในปาก, กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก เป็น 93.3%, 99.3% และ 95.2% ตามลำดับ โดยมีค่าการย่อยรวม เท่ากับ 12.2% ผลการทดสอบการหมักโดยจุลินทรีย์จากอุจจาระมนุษย์โดยการเลี้ยงเชื้อแบบกะ พบว่า โอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกรที่ผ่านการทำบริสุทธิ์และผ่านการย่อยในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารส่วนต้น สามารถส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacteroides* และ *Clostridia* ได้ โดยมีค่าดัชนีความเป็นพรีไบโอติกเท่ากับ 0.41 กรดไขมันสายสั้นที่ถูกผลิตขึ้นจากการหมัก คือ กรดอะซิติก กรดแลคติก โพรพิโอนิก และบิวทาริก โดยมีความเข้มข้นเป็น 860, 265, 15.9 และ 29.6 mM ตามลำดับ นอกจากนี้น้ำหมักที่ได้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Caco-2 จากลำไส้ใหญ่มนุษย์ได้

Thesis Title	Extraction and Purification of Oligosaccharide from Dragon fruit's flesh and Evaluation of Prebiotic Properties
Author	Rusman Dasaesamoh
Major Program	Food Science and Technology
Academic Year	2013

Abstract

The dragon fruits were reported as a potential source of natural prebiotics which are health benefit. This research aimed to optimize conditions for extraction of oligosaccharides from white' flesh using water and pectinase. Then the extract was purified by fermentation with yeast and resistance to digestion of oligosaccharides in upper gastrointestinal was evaluated. The evaluation of prebiotic properties of the oligosaccharides was evaluated by human fecal microflora. Then the cell-free broth was tested on cancer cell. The results showed that total solid and sugar content of the extract decreased as the ratio of flesh to water increased. The optimum conditions for oligosaccharide extraction were 85 °C for 5 hours. The highest yield of oligosaccharide (43.98%, dry basis). The molecular weight of oligosaccharides derived from the extraction with water was 790 daltons. And the optimum conditions for extraction with pectinase were flesh to water ratio of 1: 2, pectinase of 124 units / g solid of extract, at 40°C and extraction time of 45 min. The yields of oligosaccharides were 41.92% (dry basis). The molecular weights of oligosaccharides derived from the extraction with pectinase were in the range of 1609 daltons. The yield of oligosaccharides extraction by water and pectinase were not significantly difference ($P > 0.05$). However, extraction by pectinase could reduce time significantly difference ($P < 0.05$). The optimum conditions for purification of the extract with *S. cerevisiae* TISTR 501 were 2.5% inoculum (v/v) and the maximum percentages of removal of glucose, fructose and sucrose were 57%, 66% and 100%, respectively. The addition of urea as nitrogen source (0.1%, w/v) could increase the percentages of removal of glucose, fructose and sucrose to 73%, 72% and

100%, respectively. At suitable fermentation time (4 days) and shaking at 180 rpm, It could completely remove glucose, fructose and sucrose. Purity of oligosaccharides was increased up to 99.9%. Testing on resistance to upper gut digestion found that purified flesh' oligosaccharides could resist to artificial conditions in mouth, stomach and small intestine for 93.3%, 99.3% and 95.2%, respectively. Total digestion value was 12.2%. In batch culture, fermentation of oligosaccharides by human fecal flora resulted in a significant increase in *Bifidobacteria* and *Lactobacillus* and decrease in *Bacteroides* and *Clostridium* with the prebiotic index of 0.41. Fermentation of oligosaccharides from dragon fruit's flesh could produce the acetic acid, lactic acid, propionic acid and butyric acid at 860, 256, 15.9, 29.6 mM, respectively. In addition the broth from fermentation could inhibits proliferation of colon cancer cell (Caco-2).

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วิโรจน์ ยูรวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ดูแลและให้คำปรึกษาแก่ข้าพเจ้าทั้งในด้านการเรียนและการทำงาน และช่วยแก้ไขปัญหาระหว่างการทำวิจัย ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สันทัด วิเชียรโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้ความรู้ ให้คำปรึกษาปัญหาวิจัยและตรวจแก้วิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณ ดร. จุฑา แซ่ว่อง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาสอนเทคนิคในการทำวิจัย และให้คำปรึกษา ขอขอบคุณคณะกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่กรุณาให้คำแนะนำเพื่อปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. มณฑล เลิศคณาวนิชกุล จากมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ กรรมการจากบัณฑิตวิทยาลัย และขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยรัตน์ ศิริวงศ์ไพศาล ประธานกรรมการจากภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร

ขอขอบคุณแหล่งทุนสนับสนุนทุนการศึกษาและสนับสนุนการวิจัยโครงการมหาวิทยาลัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พ.ศ. 2552 และทุนสถานวิจัยผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและอาหารเพื่อสุขภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และทุนสนับสนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ขอขอบคุณคณะอุตสาหกรรมเกษตรและสถานวิจัยผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและอาหารเพื่อสุขภาพอาจารย์และนักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการ ขอขอบคุณคุณกรวรรณ ชากรี คุณอุราภรณ์ เรืองวัชรินทร์ เพื่อนๆ และน้อง ที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นส่วนหนึ่งของความสำเร็จ ขอขอบคุณพ่อ คุณแม่และครอบครัวที่น่ารัก ผู้ให้กำลังใจและแรงผลักดันที่สำคัญ ทำให้ข้าพเจ้ามีกำลังใจสู้กับปัญหาต่างๆ ที่ผ่านมา สุดท้าย ข้าพเจ้าขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ สถานที่ซึ่งเป็นแหล่งความรู้แก่ข้าพเจ้า ความรู้ที่ข้าพเจ้าได้จากที่แห่งนี้ ข้าพเจ้านำไปสร้างประโยชน์ให้แก่สังคม ประเทศชาติและตัวข้าพเจ้าต่อไป

รุสมัน ดะแซสาเมาะ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	(5)-(6)
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	(7)-(8)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)-(11)
รายการตาราง	(12)
รายการภาพประกอบ	(13)-(15)
บทที่	
1 บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1-2
การตรวจเอกสาร	
แก้วมังกร	3
ประเภทของแก้วมังกร	3
องค์ประกอบของแก้วมังกร	4
สารพรีไบโอติก	5-7
พรีไบโอติกที่พบในธรรมชาติ	7-13
ประโยชน์ของพรีไบโอติก	14-16
การสกัดสารโอลิโกแซคคาไรด์	16-20
การทดสอบความเป็นพรีไบโอติก	20-28
การทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์	29-33
เอกสารอ้างอิง	34-38
2 การสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร	
บทนำ	39
บทตรวจเอกสาร	39-41
วัตถุประสงค์	42
สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์	42
วิธีการทดลอง	43-45
ผลการทดลอง	46-55
สรุปผลการทดลอง	56

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
บทที่		
	เอกสารอ้างอิง	57-58
3	การทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์ด้วยวิธีทางชีวภาพ	59
	บทนำ	59
	บทตรวจเอกสาร	59-60
	วัตถุประสงค์	61
	สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์	61
	วิธีการทดลอง	62-63
	ผลการทดลอง	64-71
	สรุปผลการทดลอง	71
	เอกสารอ้างอิง	72
4	การประเมินคุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติก	73
	บทนำ	73
	บทตรวจเอกสาร	73-74
	วัตถุประสงค์	75
	สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์	76-78
	วิธีการทดลอง	78-83
	ผลการทดลอง	84-91
	สรุปผลการทดลอง	92
	เอกสารอ้างอิง	93-94
5	บทสรุป	95-96
ภาคผนวก		97-107
ประวัติผู้เขียน		108

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1-1	องค์ประกอบภายในเนื้อแก้วมังกรในแต่ละสายพันธุ์	4
1-2	องค์ประกอบทางเคมีของสารพรีไบโอติก	6
1-3	สรุปผลการศึกษาของสารพรีไบโอติกแต่ละชนิด	10-13
1-4	จุลินทรีย์ประจำถิ่นที่พบทางเดินอาหารของมนุษย์	25
1-5	การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมมเบรนในกระบวนการทำบริสุทธิ์จากแหล่งธรรมชาติ	29
2-1	องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อแก้วมังกรพันธุ์เนื้อสีขาว	46
4-1	แสดงลำดับเบสของโพรบแต่ละชนิด	82
4-2	ปริมาณกรดอะซิติก กรดแลคติก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทาริกที่เกิดขึ้นจากการหมักโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร เป็นแหล่งคาร์บอนในระบบจำลองลำไส้ใหญ่มนุษย์แบบกะที่เวลา 0, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ที่พีเอช 6.8 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้อากาศ	90

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1-1	ลักษณะของแก้วมังกรในแต่ละสายพันธุ์	3
1-2	ประโยชน์ของสารพรีไบโอติก	14
1-3	ความแตกต่างของระบบการเผาผลาญสารอาหารที่ย่อยได้และย่อยไม่ได้ในระบบทางเดินอาหาร	26
1-4	ภาพถ่ายการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ที่เวลา 20 วัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิด Transmission Electron Microscopy	27
1-5	วิถีของปฏิกิริยา Embden-Meyerhof-Parnas	31
1-6	วิถีของปฏิกิริยา Entner-Doudoroff	31
2-1	ร้อยละผลผลิตที่ได้ของของแข็งที่ละลายน้ำได้ โอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตส ที่ความแตกต่างของอัตราส่วนของเนื้อแก้วมังกรกับน้ำเป็นเวลา 5 ชั่วโมง	47
2-2	ร้อยละผลผลิตที่ได้ของโอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตสที่อุณหภูมิแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง	48
2-3	ร้อยละผลผลิตของโอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน เป็นเวลา 5 ชั่วโมง	49
2-4	น้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดเนื้อแก้วมังกรที่สกัดด้วยน้ำ	50
2-5	ร้อยละผลผลิตที่ได้ของโอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส ที่สกัดด้วยเอนไซม์เพคติเนส ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง	52
2-6	ร้อยละผลผลิตที่ได้ของโอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส ที่สกัดด้วยเอนไซม์เพคติเนส ที่เวลาการสกัดต่างกัน เป็นเวลา 300 นาที	53
2-7	น้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดเนื้อแก้วมังกรที่สกัดด้วยเอนไซม์เพคติเนส	54
2-8	โครมาโตแกรมของสารสกัดที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เพคติเนส ที่ความเข้มข้น 124 ยูนิตต่อกรัมของแข็ง ที่อุณหภูมิ 40 °C เวลา 60 นาที	54
3-1	กราฟการเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ในสารสกัดเนื้อแก้วมังกร ที่ระดับความเข้มข้น 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% โดยปริมาตร หมักเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง	65

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
3-2	ผลของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ที่ 2.5% โดยปริมาตร ต่อความเข้มข้นน้ำตาลในสารสกัดเนื้อแก้วมังกร หมักเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง	66
3-3	กราฟเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ที่ระดับความเข้มข้น 2.5% โดยปริมาตรในสารสกัดเนื้อแก้วมังกรที่มีการเติมยูเรีย ที่ความเข้มข้น 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.7% และ 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสารสกัด หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง	67
3-4	ผลของความเข้มข้นยูเรีย ที่ระดับความเข้มข้น 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.7% และ 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ร่วมกับการเติมเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ที่ 2.5 % โดยปริมาตรหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ต่อความเข้มข้นน้ำตาลที่มีอยู่ในสารสกัดเนื้อแก้วมังกร	68
3-5	ผลของระยะเวลาการหมักต่อการกำจัดน้ำตาลซูโครส ฟรุกโตส และกลูโคสในสารสกัดเนื้อแก้วมังกร ที่มีการเติมเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ระดับความเข้มข้น 2.5% โดยปริมาตร ร่วมกับการเติมยูเรีย 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หมักเป็นเวลา 5 วัน	70
3-6	โครมาโทแกรมของสารสกัดแก้วมังกร ก่อนการหมัก (a) และหลังการหมัก (b) โดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ร่วมกับการเติมยูเรีย 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร	70-71
4-1	แบบจำลองระบบการหมักแบบกะ	80
4-2	ร้อยละการย่อยของโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร เมื่อผ่านการย่อยด้วย human salivary α-amylase (0.33 unit/ml, พีเอช 6.8) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 120 นาที ภายใต้สภาวะจำลองการย่อยในปาก	84
4-3	ร้อยละการย่อยของโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร เมื่อผ่านการย่อยด้วย HCl buffer (พีเอช 2.0) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240 นาที ภายใต้การจำลองสภาวะกรดในกระเพาะอาหาร	86
4-4	ร้อยละการย่อยของโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร เมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ porcine pancreas α-amylase (0.75 unit/ ml) และ Sucrese (8,000 unit/ ml) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 360 นาที ภายใต้การจำลองสภาวะการย่อยในลำไส้เล็ก	87

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4-5	การเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียในการหมักแบบกะ ที่เวลา 0 และ 24 ชั่วโมงหมักโดยใช้โอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร ในสภาวะไร้อากาศ ที่พีเอช 6.8 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	89
4-6	กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์ Caco-2 ที่เลี้ยงในน้ำ หมักที่ระดับความเข้มข้นต่างกันของโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร ที่เวลาการหมัก 24 ชั่วโมง	91

บทที่ 1
บทนำและการตรวจเอกสาร

1.1 บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันผู้บริโภคส่วนใหญ่เริ่มให้ความสนใจอาหารเพื่อสุขภาพกันมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนไป การใช้ชีวิตประจำวันที่เน้นสะดวกสบาย ไม่มีเวลาในการออกกำลังกายเพื่อสุขภาพ รวมถึงพฤติกรรมการบริโภคอาหารที่เปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้ร่างกายมีความเสี่ยงในการเกิดโรคต่างๆได้ง่าย เช่น ระบบภูมิคุ้มกันลดลง โรคมะเร็ง ระดับคอเลสเตอรอลในเลือดที่สูง รวมถึงโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารต่างๆ เช่น ท้องเสีย ท้องร่วง ท้องผูก การติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร เป็นต้น ทำให้ผู้บริโภคได้เล็งเห็นถึงความสำคัญของอาหารเพื่อสุขภาพมากขึ้น โดยเลือกบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการเติมสารเสริมสุขภาพ สารเสริมสุขภาพที่ได้รับความสนใจมากชนิดหนึ่งคือ พรีไบโอติก (prebiotic) ซึ่งเป็นสารประเภทคาร์โบไฮเดรตชนิดโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มที่มีประโยชน์ที่เรียกว่า โพรไบโอติก (probiotic) อันส่งผลทำให้มนุษย์หรือสัตว์ที่บริโภคสารเหล่านี้มีสุขภาพดีลดความเสี่ยงจากโรคในระบบทางเดินอาหารหรือป้องกันมะเร็งได้ (Rastall, 2000) ซึ่งแหล่งที่พบสารในกลุ่มพรีไบโอติก ส่วนหนึ่งสกัดได้จากแหล่งธรรมชาติ เช่น พืชหัวบางชนิด หรือสังเคราะห์ขึ้นโดยการใช้เอนไซม์ (Rastall and Bucke, 1992) งานวิจัยนี้เล็งเห็นถึงความสำคัญ จึงแสวงหาแหล่งวัตถุดิบใหม่ๆที่จะมาผลิตสารเสริมอาหารในกลุ่มพรีไบโอติก และเลือกเนื้อแก้วมังกร เนื่องจากมี Wichienchot และคณะ (2010) พบว่าเนื้อแก้วมังกรพันธุ์เนื้อสีขาวและพันธุ์เนื้อสีแดงพบปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ 86.2 กรัมต่อกิโลกรัม และ 89 กรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ และโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้ยังส่งเสริมการเจริญของเชื้อในกลุ่ม *Lactobacilli* และ *Bifidobacterium* เนื้อแก้วมังกรเป็นผลไม้ที่มีกากใยสูง เมล็ดสีดำเล็กๆ ที่กระจายอยู่ทั่วไปในเนื้อแก้วมังกรจะอุดมไปด้วยไขมันที่ไม่อิ่มตัวซึ่งช่วยต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน แก้วมังกรจึงมีประโยชน์ต่อสุขภาพในหลายด้านจึงเป็นที่นิยมของผู้บริโภค

ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้เลือกสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร สายพันธุ์เนื้อสีขาว ซึ่งหาได้ง่ายตามท้องตลาด และมีราคาถูกกว่าสายพันธุ์เนื้อแดง และสายพันพันธุ์เนื้อสีขาว เปลือกสีเหลือง แม้ว่าความแตกต่างในด้านสายพันธุ์อาจส่งผลต่อปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้ แต่หากเนื้อแก้วมังกรสายพันธุ์เนื้อสีขาวสามารถใช้เป็นแหล่งพรีไบโอติกที่ดีในอนาคตได้ งานวิจัยนี้จึงอาจนำไปสู่การผลิตพรีไบโอติกที่ใช้ต้นทุนในการผลิตที่ต่ำลง ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิตสารจำนวนมากเพื่อนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมโดยงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาสภาวะการสกัดสารพรีไบโอติกด้วยน้ำและเอนไซม์ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมที่สามารถในการผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ได้ปริมาณที่สูงสุด และใช้เวลาสั้น และรวมไปถึงการทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์ที่มีให้มีความบริสุทธิ์สูง กล่าวคือใช้วิธีทางชีววิทยา (จุลินทรีย์) เพื่อกำจัดน้ำตาลมเลกุลเดี่ยวและคู่ออก แล้วนำมายืนยันคุณสมบัติการเป็นสาร

พรีไบโอติกของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ โดยมาทดสอบการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่มีประโยชน์และ/หรือยับยั้งจุลินทรีย์ที่ให้โทษ โดยการหมักแบบกะด้วยจุลินทรีย์จากอุจจาระมนุษย์และนำน้ำหมักที่ได้มาศึกษาศักยภาพในการต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่มนุษย์ ผลจากการวิจัยนี้คาดหวังว่า สารสกัดโอลิโกแซค-คาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร จะเป็นประโยชน์ในแง่ของการเป็นสารเสริมอาหารที่ช่วยลดความเสี่ยงจากโรคในระบบทางเดินอาหารหรือป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ และเป็นการเพิ่มมูลค่าของเนื้อแก้วมังกรในเชิงพาณิชย์ต่อไป

1.2 การตรวจเอกสาร

1.2.1 แก้วมังกร

แก้วมังกรมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hylocereus undatus* (Haw) *Britton & Rose)* เป็นต้นไม้ประเภทเลื้อยอยู่ในวงศ์ *Caetaceae* หรือกระบองเพชร มีแหล่งกำเนิดในทวีปอเมริกาและเอเชีย ปลูกมากในประเทศเวียดนามและต่อมาได้มีการนำเข้ามาปลูกในประเทศไทย (สุรพงษ์ โกสิยะจินดา, 2541) แบ่งเป็นพวกย่อยคือ *Hylocereanae* ซึ่งมีด้วยกัน 9 สกุล โดยสกุลที่น่าสนใจคือ *Selenicerfeus*, *Mediocactus*, *Hylocereanae* ทั้ง 3 สกุลมีลำต้นเป็นแฉก เป็นหยักๆ คล้ายครีบมังกรหรือหางจระเข้ ตาข้างมีหนาม 1-5 อัน แฉกเกิดจากใบที่เปลี่ยนรูปอวบอิ่มด้วยน้ำ ลำต้นจริงอยู่กึ่งกลางของแฉก ผลแก้วมังกรเกิดบริเวณปลายยอดมีจำนวน 1 ผลต่อ 1 กิ่ง แต่อาจพบ 2 ผลต่อ 1 กิ่งบ้าง ขนาดผลและรสชาติแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ โดยมักมีผลรีหรือกลม มีน้ำหนักประมาณ 200-500 กรัม เปลือกสีชมพูอมส้ม ผลแก่มีสีแดงบานเย็น กลีบเลี้ยงสีเขียว มีเปลือกหนา 2-3 มิลลิเมตร ภายในผลเมื่อผ่าออกจะมีเนื้อสีขาว ภายในเนื้อมีเมล็ดสีดำเล็กๆ คล้ายเมล็ดงาหรือเมล็ดแมงลัก กระจายอยู่ทั่วไปในเนื้อ เนื้อผลฉ่ำมีรสหวานอมเปรี้ยว

1.2.2 ประเภทของแก้วมังกร

แก้วมังกรแบ่งเป็น 3 สายพันธุ์ ตามลักษณะของเนื้อและเปลือก ได้แก่

(1) *Hylocereus undatus* (Red Pitaya) หรือที่นิยมเรียกกันว่า “แก้วมังกรขาว” เป็นสายพันธุ์เวียดนาม มีลำต้นเป็นท่อนๆ หรือข้อยาวสีเขียว มักมี 3 แฉก มีหนามแข็งและแหลม ผลมีเปลือกสีแดง เนื้อภายในมีสีขาว ผลมีขนาดใหญ่กว่าพันธุ์ไทย เนื้อมีรสหวานอมเปรี้ยว พันธุ์ที่นิยมปลูกคือ พันธุ์นัมเบอร์ 100 ผลมีน้ำหนัก 200-900 กรัม

(2) *Hylocereus costaricensis* (Costa Rica Pitaya, *H. polyrhizus*) สายพันธุ์ไต้หวัน ลำต้นมี 3 แฉก ลำต้นอ้วนสีเขียว ผลมีเปลือกสีแดง เนื้อภายในมีสีแดง มีลักษณะสวยงาม ขนาดผลใกล้เคียงแก้วมังกรพันธุ์เวียดนาม มักเรียกว่าแก้วมังกรแดง

(3) *Hylocereus megalanthus* (Yellow Pitaya) หรือ “แก้วมังกรเหลือง” มีเนื้อสีขาวและเปลือกสีเหลือง เป็นสายพันธุ์ที่พบในแถบทวีปแอฟริกาลักษณะของเนื้อและเปลือกของแก้วมังกรแต่ละสายพันธุ์แสดงได้ดังภาพที่ 1-1

(a) Hylocereus undatus (b) *Hylocereus costaricensis* (c) *Hylocereus megalanthus*

ภาพที่ 1-1 ลักษณะของแก้วมังกรในแต่ละสายพันธุ์ ที่มา: Ariffin และคณะ (2009)

1.2.3 องค์ประกอบของแก้วมังกร

แก้วมังกรจัดเป็นผลไม้ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เนื่องจากมีสารอาหารหลายชนิดเป็นส่วนประกอบ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน วิตามิน และเกลือแร่ต่างๆ เช่น วิตามินซี วิตามินบี 1 บี 2 บี 3 แคลเซียม ฟอสฟอรัส และธาตุเหล็ก นอกจากสารดังกล่าวแล้วแก้วมังกรยังมีน้ำเป็นส่วนประกอบมากถึง 80-90 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และมีเส้นใยปริมาณที่สูง แก้วมังกรจึงเป็นแหล่งของสารอาหารที่น่าสนใจ โดยแก้วมังกรในส่วนที่กินได้ 100 กรัม ให้พลังงาน 35-59 กิโลแคลอรี่ เถ้า 0.2-0.7 กรัม และประกอบไปด้วยสารอาหารต่างๆ แสดงดังตารางที่ 1-1

ตารางที่ 1-1 องค์ประกอบภายในเนื้อแก้วมังกรในแต่ละสายพันธุ์

Composition	**Amount per 100 g of pulp**		
	Hylocereus undatus	***Hylocereus costaricensis***	***Hylocereus megalanthus***
Water (g)	89.4	82.5-83	85.4
Protein (g)	0.5	0.159-0.229	0.4
Fat (g)	0.1	0.21-0.61	0.1
Crude fiber (g)	0.3	0.7-0.9	0.5
Ash (g)	0.5	0.28	0.4
Carbohydrate (g)	9.2	16.15-14.98	13.2
Calcium (g)	6	6.3-8.8	10
Phosphorus (mg)	19	30.2-36.1	16
Carotene (mg)	-	0.005-0.012	-
Thiamine (mg)	-	0.028-0.043	-
Riboflavin (mg)	-	0.043-0.045	-
Niacin (mg)	0.2	1.297-1.3	0.2
Ascorbic acid(mg)	25	8-9	4
Brix value	11-19	-	-
pH value	4.7-5.1	5.0-6.0	4.0-6.0

*Carbohydrate content (%) = 100 – (moisture + protein + fat + cube fiber + Ash)

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Morton (1987)

1.2.4 สารพรีไบโอติก

ความหมายและคุณสมบัติของสารพรีไบโอติก

ความหมายของคำว่า พรีไบโอติก คือ ส่วนประกอบของอาหารที่ไม่สามารถถูกย่อย และถูกดูดซึมในทางเดินอาหารส่วนบน แต่จะมีผลในการส่งเสริมสุขภาพของผู้ที่กินเข้าไปโดยเลือกที่จะกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในร่างกายและยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค (Fooks *et al.*, 1999) ดังนั้นสารอาหารที่จัดเป็นพรีไบโอติกจะต้องเป็นสารที่ไม่ย่อยหรือดูดซึมในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก และมีบทบาทในการกระตุ้นและส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ กลุ่ม *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่มีประโยชน์ต่อร่างกายได้และสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคพวก *Clostridium*, Proteolytic bacteria และ *Escherichia coli* (*E. coli*) ในลำไส้

สารอาหารที่ถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักโดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ได้แก่ resistance starch (RS), Non-starch polysaccharide (NSP) ทั้งนี้รวมไปถึงสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ได้จากพืช เช่น แพคติน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส กัวร์ และไซแลน นอกจากนี้ยังมีกลุ่มของโอลิโกแซคคาไรด์ เช่น แลคโตส แลคตูโลส ฟรุตโตสโอลิโกแซคคาไรด์ สาร mucin glycoprotein ซึ่งผลิตโดย goblet cell ในลำไส้ใหญ่ สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมัก โดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ใช้ได้ เช่นกัน สารอาหารกลุ่มนี้ประกอบด้วยน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ที่เชื่อมกันโดยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic linkage) โดยโพรไบโอติกแต่ละชนิดก็สร้างเอนไซม์ที่แตกต่างกันซึ่งทำให้สามารถตัดพันธะของโมโนแซคคาไรด์ได้แตกต่างกันด้วย เช่น ความสามารถของ *Bifidobacterium* ที่สร้างเอนไซม์ β-Fructofuranosidase มาย่อย fructo-oligosaccharide ได้เป็นต้นในขณะที่ พรีไบโอติก ที่มีขนาดใหญ่และน้ำหนักโมเลกุลสูงจะสามารถถูกนำไปใช้โดยแบคทีเรียได้น้อยลงหรืออาจกล่าวได้ว่า พรีไบโอติกที่ดีควรที่จะมีขนาดเล็ก ต่อมี degree of polymerization น้อย (Manning and Gibson, 2004)

สารพรีไบโอติกดังกล่าวสามารถพบได้ในผักและผลไม้หรืออาจจะได้จากการสังเคราะห์โดยการย่อยสารในกลุ่มพอลิแซคคาไรด์หรือการสังเคราะห์โดยการใช้เอนไซม์ซึ่งชนิดและโครงสร้างของของพรีไบโอติกที่มีการใช้ในปัจจุบันได้แสดงไว้ในตารางที่ 1-2

สารพรีไบโอติกสามารถพบได้ในพืชผักต่าง ๆ เช่นพืชตระกูลหอม กระเทียม หน่อไม้ฝรั่ง กล้วย และในธัญพืชต่าง ๆ สารพรีไบโอติกมักเป็นสารอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต เช่น Oligosaccharides, resistant starch, หรือไม่ใช่กลุ่มคาร์โบไฮเดรต (Non-starch polysaccharide, NSP) เช่นไคโตแซน และเส้นใยอาหาร ทั้งนี้รวมไปถึงสารที่ได้จากพืช เช่น แพคติน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส กัม และไซแลน ซึ่งไม่ถูกย่อย และถูกดูดซึมโดยร่างกายมนุษย์

ตารางที่ 1-2 องค์ประกอบทางเคมีของสารพรีไบโอติก

Oligosaccharide	Chemical composition
Fructo-oligosaccharides (Raftilose P95)	95% oligosaccharides β,(2-1) fructan; 60% glucose, $fructose_{(n)}$, 40% $fructose_{(n)}$ dp 2-8, average 4-5
Inulin	>99% oligosaccharides β, (2-1) fructan; average dp 10-12
Oligosaccharide	Chemical composition
Pyrodextrins	Complex mixture of glucose-containing oligosaccharides
Transgalactosylated oligosaccharides (Oligomate 55)	55% Mainly 6' galactosyllactose, dp of oligosaccharide fraction 2-5 (primarily dp 3)
Galacto-oligosaccharides	85% Oligogalactose, small amounts of glucose, galactose, and lactose
Soy- oligosaccharides	Stachyose (fructose, galactose, galactose, glucose) and raffinose (fructose, galactose, glucose), dp 3-4
Xylo-oligosaccharides	β, (1-4) linked xylose; 70% pure, dp of oligosaccharide fraction 2-4
Isomalto-oligosaccharides	Mixture of α, (1-6) linked glucose oligomers (isomaltose, panose, isomaltotriose)
Lactulose	Galactose and fructose-containing disaccharide
Pectic-oligosaccharide	75% D-galacturonic acid,(1⟶4) -linked -D-galacturonic acid

DP= degree of polymerisation

ที่มา: ดัดแปลงจาก George และคณะ (1999)

และเหลือเป็นสารอาหารให้กับจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่สามารถใช้ในการเจริญเติบโต และส่งเสริมสุขภาพของมนุษย์ให้ดีขึ้น (ตารางที่ 1-3) เช่น ผลิตวิตามิน (บี1, บี2) เพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุ (แคลเซียม, แมกนีเซียม) ลดการติดเชื้อในทางเดินอาหาร ลดการดูดซึมคอเลสเตอรอลในเลือด ป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ ช่วยลดอาการท้องผูก ท้องเสีย และผลิตกรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid) เช่น อะซิเตท บิวเทอเรท และโพรพิโอเนท (Gibson *et al*., 1995; Chonan *et al*., 1995) ซึ่งกรดไขมันเหล่านี้จะถูกนำไปใช้โดยเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกาย และมีผลในการป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยบิวเทอเรทมีผลไปกระตุ้นการเกิด apoptosis ในเซลล์ลำไส้ใหญ่ทำให้ลดความเสียงในการเกิดโรคมะเร็งในลำไส้ใหญ่ (Hughes and Rowland, 2001) และนอกจากนี้ mucine glycoprotein ซึ่งผลิตโดย

goblet cell ในลำไส้ใหญ่ และไคโตแซนโอลิโกแซคคาไรด์ (COS) แบคทีเรียโปรไบโอติกสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักได้เช่นกัน โดยจากการศึกษาพบว่า COS ช่วยกระตุ้นการเจริญของ *Bifidobacterium bifidum* KCTC 3440, *Bifidobacterium infantis* KCTC 3249 และ *Lactobacillus* sp. ได้ (Lee *et al*., 2002)

1.2.5 พรีไบโอติกที่พบในธรรมชาติ

(1) กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Galacto-oligosaccharide, GOS) ที่มีกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบซึ่งโครงสร้างเป็น Glu α 1-4[β-Gal 1-6]nโดยที่ n = 2-5 พบในน้ำนมของมนุษย์ น้ำนมวัว โยเกิร์ต และสังเคราะห์มาจากแลคโตส โดยเอนไซม์ เบต้ากาแลคโตซิเดส (β-galactosidase) กาแลคโต-โอลิโกแซคคาไรด์ เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่ร่างกายไม่สามารถย่อยได้ (non-digestible oligosaccharide) จึงสามารถผ่านไปถึงลำไส้ใหญ่ได้โดยที่ถูกย่อย และดูดซึม จึงถูกนำไปใช้โดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ ผลผลิตหลักที่ได้จากการหมักเป็นกรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid) เช่น อะซิ-เตท โพรพิโอเนท บิวเทอรท และมีก๊าซ เช่น ไฮโดรเจน มีเทน และคาร์บอนไดออกไซด์ กาแลโต-โอลิโกแซคคาไรด์ มีผลไปกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria และ Lactobacilli ทั้งในการศึกษาแบบ *in vitro* และ *in vivo* โดยจากการศึกษาของ Tzortziz และคณะ (2004) พบว่า กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการผลิตโดยเอนไซม์ แอลฟากาแลคโตซิเดส (β-galactosidase) สามารถเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ได้โดยทำการเลี้ยงแบบกะ (batch culture) ในอาหาร minimal medium ใช้ faecal เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมัก และเติมกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1% ควบคุมพีเอช อยู่ที่ 6.8 โดยเปรียบเทียบ FOS, melibiose และ Raffinose ซึ่งเป็นพรีไบโอติกทางการค้า เมื่อทำการหมักไป 48 ชั่วโมงพบว่าสามารถเพิ่มจำนวนของ Bifibacterium และ *L. acidophilus* ได้สูงกว่าพรีไบโอติกทางการค้า และสามารถนำไปลดปริมาณ clostridia ได้สูงเท่ากับพรีไบโอติกทางการค้า

นอกจากนี้ในการศึกษาในระดับ *in vivo* ทั้งในคน และสัตว์ก็ให้ผลในทำนองเดียวกันโดย Ito และคณะ (1990 อ้างโดย Kolida *et al*., 2000) ซึ่งได้ให้กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์แก่อาสาสมัคร 12 คน ที่มีจำนวนของจุลินทรีย์ประจำถิ่นต่ำกว่าปกติ บริโภคในปริมาณ 10 กรัมต่อวัน พบว่าปริมาณของจุลินทรีย์ประจำถิ่นเพิ่มขึ้น เมื่ออาสาสมัครได้รับปริมาณกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ นอกจากนี้กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ยังมีผลต่อการเพิ่มการดูดซับแคลเซียมในหนูที่รับอาหารที่มีกาแลค-โตโอลิโกแซคคาไรด์ และยังพบว่าหนูที่ได้รับกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีการดูดซับแคลเซียมได้มากกว่าหนูที่ไม่ได้รับกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Chonan *et al*., 1995) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Yanahira (1997) ที่พบว่าหนูที่ได้รับกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ 5% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 14 วันมีการดูดซึมแคลเซียม และแมนีเซียมได้เพิ่มสูงขึ้นกว่าหนูที่ไม่ได้รับกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์

(2) โอลิโกแซคคาไรด์จากถั่วเหลือง (Soybean oligosaccharide, SOS) ส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม แรฟ-ฟีโนส (Raffinose) และสตาคีโอส (Starchyose) (Gibson, 2004) เป็นกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ที่สามารถทนต่อการย่อยด้วยกรดในกระเพาะอาหาร และเอนไซม์ในลำไส้เล็ก และเหลือไปถึงลำไส้ใหญ่ ถูกจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่นำไปใช้ โดยเฉพาะจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria มีการเพิ่มขึ้น ส่วนการศึกษาในอาสาสมัครเพศชาย 6 คน ที่ได้รับโอลิโกแซคคาไรด์จากถั่วเหลืองเป็นเวลา 3 สัปดาห์พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria ได้อย่างจำเพาะ (Wada *et al*., 1992) และเมื่อศึกษาผลของแรฟฟีโนส โดยมีการให้แรฟฟีโนสในปริมาณ 15 กรัมต่อวัน พบว่าปริมาณของจุลินทรีย์กลุ่ม *Bifidobacteria* เพิ่มขึ้นถึง 6 เท่า อีกทั้งสามารถลดจำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacteroides* spp. ได้ 0.6 เท่า และจุลินทรีย์กลุ่ม *Clostridium* spp. ได้ 1.6 เท่า (Kawaze *et al*., 1981) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Saito และคณะ (1992) พบว่า SOS สามารถเพิ่มแบคทีเรียกลุ่ม Bifidobacteria ได้ 3 เท่า

(3) โอลิโกแซคคาไรด์ และคาร์โบไฮเดรตอื่น ๆ ที่มีอยู่ในธรรมชาติ ที่มีคุณสมบัติเป็น พรีไบ-โอติกที่มีอยู่ในธรรมชาติ ใยอาหารเป็นส่วนหนึ่งของพืชที่เอนไซม์ในร่างกายไม่สามารถย่อยได้ ใยอาหารไม่มีสารอาหาร และไม่ให้พลังงาน แต่มีบทบาทสำคัญต่อภาวะโภชนาการ และสุขภาพของมนุษย์ ใยอาหารเป็นคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อนที่ไม่ใช่แป้ง เป็นส่วนประกอบของพืชผัก และผลไม้ที่รับประทานได้ แต่ไม่ถูกย่อยโดยน้ำย่อยในระบบย่อยอาหาร เมื่อผ่านลำไส้ใหญ่จะมีบางส่วนถูกย่อยโดยจุลินทรีย์ สามารถพบได้ในพืชจำพวก รำข้าวโอ๊ต ถั่วเมล็ดแห้ง ข้าวบาร์เลย์ และแอปเปิ้ล ผักใบเขียว และผลไม้เกือบทุกชนิดจัดเป็นแหล่งอาหารที่ดีของใยอาหาร โดยเฉพาะพวกใยอาหารกลุ่มเซลลูโลส, แพคติน และเฮมิเซลลูโลส ซึ่งพบว่าจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่สามารถที่จะหมักใยอาหารกลุ่มนี้ได้ มีผลให้มวลชีวภาพของแบคทีเรีย (bacteria biomass) เพิ่มขึ้น สารประกอบกลุ่มนี้ส่งผลให้มีการเพิ่มจำนวนแบคทีเรียที่เกิดการหมักแบบ saccharolytic และช่วยเพิ่มความนิ่มให้กับอุจจาระ (Gibson, 2004) พบว่าจากการศึกษาการหมักสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตจากพืชหัว 3 ชนิด คือมันฝรั่ง ถั่ว และ cocoyam ด้วย human faecal bacteria ซึ่งก่อนที่จะทำการหมักนั้นนำสารที่สกัดมาทำการย่อยเบื้องต้นก่อนโดยย่อยด้วยกรด และย่อยด้วยเอนไซม์ผสมระหว่าง porcine α -amylase, amylo glucosidase และ invertase จากนั้นนำสารสกัดที่ไม่ถูกย่อยในขั้นต้นไปศึกษาการหมักพบว่ามีการผลิตกรดไขมันสายสั้น 10 มิลลิโมลต่อกรัม (Laurentin and Edwards, 2004) และในการศึกษาการหมักโอลิโกแซคคาไรด์จาก sugar beet arabinan และ arabinanoligosaccharides โดยจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารพบว่าสามารถเพิ่มการเจริญของแบคทีเรีย Bifidobacteria ได้และส่งผลให้ปริมาณของแบคทีเรีย Clostridia ลดลง (Al-tamimi *et al*., 2006) นอกจากนี้ยังมีสารอาหารที่เป็นพวก resistant starch (RS), Non-starch polysaccharide (NSP) รวมไปถึงสารที่ได้จากพืช เช่น แพคติน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส กัม และ ไซแลน ไคโตแซนโอลิโกแซคคาไรด์ (COS) แบคทีเรียโปรไบโอติกสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมัก

ได้เช่นกัน โดยจากการศึกษาพบว่า COS ช่วยกระตุ้นการเจริญของ *Bifidobacterium bifidium* KCTC 3440, *Bifidobacterium infantis* KCTC 3249 และ *Lactobacillus* sp. ได้ (Lee *et al*., 2002)

(4) เพคติกโอลิโกแซคคาไรด์ (Pectic-oligosaccharide, POS) โอลิโกแซคคาไรด์จากผนังเซลล์พืช หรือ แพคติกโอลิโกแซคคาไรด์ ได้มาจากสารกลุ่ม แพคติน ซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์เชิงซ้อนในพืช พบในพืชชั้นสูงโดยปรากฏในชั้นระหว่างเซลล์หรือจุดเชื่อมต่อระหว่างผนังเซลล์ ดังภาพที่ 3 ทำให้เกิดช่องสำหรับอาหารและน้ำผ่าน ในผนังเซลล์ สารกลุ่มแพคตินเป็นสารเคลือบเส้นใยเซลลูโลสที่สำคัญ และอาจจะเชื่อมต่อกับพันธะโควาเลนต์กับ โพลีเมอร์อื่นๆ สารกลุ่มแพคตินจัดจำแนกได้เป็นโปรโต-แพคติน (แพคตินมีหมู่ methoxyl สูง–แพคตินจัดตัวเร็วและแพคตินจัดตัวช้า- และแพคตินมีหมู่ methoxyl ต่ำ) และกรดแพคติก แพคตินมีอิทธิพลต่อการเจริญ พัฒนาการและการแก่ชรา และมีผลต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของเนื้อเยื่อพืชและผลไม้ มีการใช้เพกทินอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารด้วยคุณสมบัติในการก่อรูปเป็นเจล โดยใช้เป็นสารก่อเจลและความคงตัวในแยม เยลลี่ และผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว แหล่งที่พบแพคตินที่ดี คือผิวของผลพืชตระกูลส้ม กากผลแอปเปิล และหัวของซูการ์ บีท เป็น

(5) ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructooligosaccharides, FOS) และอินนูลิน (Inulin) เป็นสารโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharides) ที่พืชเก็บไว้เป็นอาหารซึ่งเป็นโมเลกุลขนาดเล็กอยู่ในกลุ่ม ฟรุกโต-โอลิโกแซคคาไรด์มีที่ฟรุคโตส (fructose) 3-60 โมเลกุลต่อกันด้วยพันธะ α, 1-2 และβ, 2-1โครงสร้างประกอบด้วย Glu α 1-2[β, Fru (2-1)]n n=10 และFru β, 2-1Frun

อินนูลินไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ในลำไส้เล็ก แต่บางส่วนถูกย่อยโดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ อินนูลินและฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ สามารถละลายน้ำได้ดีโดยเฉพาะในน้ำร้อน (Tanya, 2002) อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส (Kim and Wang, 2002) แต่ละลายได้เพียงเล็กน้อยในน้ำเย็น และแอลกอฮอล์ (Paul, 1997) และมีความคงตัวสูง ไม่มีผลข้างเคียงต่อระบบประสาทสัมผัส รสชาติหวานเล็กน้อย จึงมีการนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรมอาหารในลักษณะต่าง ๆ เช่น นำไปปรับปรุงในรสชาติและเนื้อสัมผัส นอกจากอินนูลินถูกจัดเป็นเส้นใยอาหารแล้วยังมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกด้วย เนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์โพรไบโอติกได้อย่างจำเพาะ โดยพบว่าอาสาสมัครที่ได้รับอินนูลิน 15 กรัมต่อวัน ติดต่อกันเป็นเวลา 15 วัน มีปริมาณจุลินทรีย์ *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* เพิ่มขึ้น 10% และจุลินทรีย์ที่ก่อโรคลดลง (Paul, 1997) และจากการให้อาสาสมัคร 100 คนรับประทานอินูลิน และฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ในปริมาณ 5-20 กรัมต่อวันเป็นเวลา 9 สัปดาห์พบว่ามีปริมาณจุลินทรีย์ Bifidobacterium เพิ่มขึ้น และยังช่วยเพิ่มการดูดซึมแคลเซียม (Van den Heuvel *et al*., 1999; Reddy *et al*., 1997; Gibson *et al*., 1995) และจากการศึกษาในระดับ *in vitro* พบว่าสารสกัดฟรุคโต-โอลิโกแซคคาไรด์จาก Yacon roots สามารถเสริมการเจริญของ *L. acidohphilus* NRRL-1910, *L. plantarum* NRRLB-4496 และ *B. bifidum* ATCC 15696 ได้ และสามารถเสริมการเจริญของ *B. bifidum* ATCC 15696 ได้ดีที่สุด (Pedreschi *et al*.,2003)

ตารางที่ 1-3 สรุปผลการศึกษาสารพรีไบโอติกแต่ละชนิด

Oligosaccharides	Structure	Mode of study	Evidence of prebiotic effect	Reference
Fructo-oligosaccharides	Transfructosylation α-D-Glu-(1-2) -[ß-D-Fru-(1-2)-]n where n= 2-4	*In vitro* human gut model	Bifdogenic effect demonstrated.	Gibson และ Wang (1994)
		In vitro 7 *Bifidobacterium* isolates	FOS inflicted higher increase in *Bifidobacterium* levels as compared to 15 different carbohydrates.	Hopkins และคณะ (1988)
	Inulin hydrolysis: ß-D-Fru-(1-2) -) -[ß-D-Fru-(1-2)-]n where n= 1-9	*In vivo* 40 healthy humans	Dose-dependent increases in bifidobacteria.	Bouhnik และคณะ (1999)
		In vivo placebo controlled 4 males	Significant increase in *Bifidobacterium* numbers, decrease in *Bacteroides*, *Clostridium*, Fusobacterium	Gibson และคณะ (1995)
	α-D-Glu-(1-2) -) -[ß-D-Fru-(1-2)-]n where n= 2-9	*In vitro* continuous culture of human faeces	Selective fermentation of FOS by *Bifidobacterium* spp. And *Lactobacillus* spp.	Sghir และคณะ (1998)
		In vivo human double blind placebo controlled crossover trial of 30 healthy volunteers	Using dot blot hybridization. A mixture of FOS and partially hydrolyzed	Tuohy และคณะ (2000)

ตารางที่ 1-3 สรุปผลการศึกษาสารพรีไบโอติกแต่ละชนิด (ต่อ)

Oligosaccharides	Structure	Mode of study	Evidence of prebiotic effect	Reference
			guar gum (2:1 ratio) resulted in significant increases in *Bifidobacterium* spp. While total cell, *Bacteroides, Lactobacillus, Clostridium,* remained stable, using FISH.	
Isomalto-oligosaccharides	[α-D-Glu-(1-6) -]n where n=2-5	*In vitro* six healthy men and 18 serile persons *In vivo* 14 healthy men	Significant increase in *Bifidobacterium levels.* Proportional increase of growth activity of *Bifidobacterium* with the degree of polymerization of different isomalto-oligosaccharides components.	Kohmoto และคณะ (1988) Kaneko และคณะ (1994)
Xylo-oligosaccharides	[ß-Xyl-(1-4)-]n where n=2-9	*In vivo* rats	Selective fermentation of XOS by *Bifidobacterium* spp. using microbial culture and SCFA analysis	Campbel และคณะ (1997)

ตารางที่ 1-3 สรุปผลการศึกษาสารพรีไบโอติกแต่ละชนิด (ต่อ)

Oligosaccharides	Structure	Mode of study	Evidence of prebiotic effect	Reference
Lactulose	[ß-D-Gal-(1-4)-]-ß-D-Fru	*In vivo* humans and rats	Significant increase of *Bifidobacterium* spp. using microbial culture. No effect was reported on rat.	Howard และคณะ (1995)
		In vivo human double blind placebo controlled ten healthy volunteers	Significant increase in *Bifidobacterium* levels using FISH.	Tuohy และคณะ (2000)
Galacto-Oligosaccharides	α-D-Glu-(1-4) -[ß-D-Gal-(1-6)]n where n=2-5	*In vivo* human (8 healthy volunteers)	Significant increase in *Bifidobacterium* spp.	Terada และคณะ (1992)
		In vivo human single blind 12 healthy human	Significant effect on *Bifidobacterium levels,* lower but significant effect on *Lactobacillus* spp.	Ito และคณะ (1990)
Soybean-oligosaccharides	[α-D-Gal-(1-6)]n-α-D-Glu-(1-2)-ß-D-Fru Where n= 1 or 2	*In vivo* human 7 healthy adults	Significant increase of *Bifidobacterium* spp. total bacterial counts remained stable, *bacteroides and Clostridium*	Ito และคณะ (1993)
		In vitro 125 human faecal bacterial		Benno และคณะ

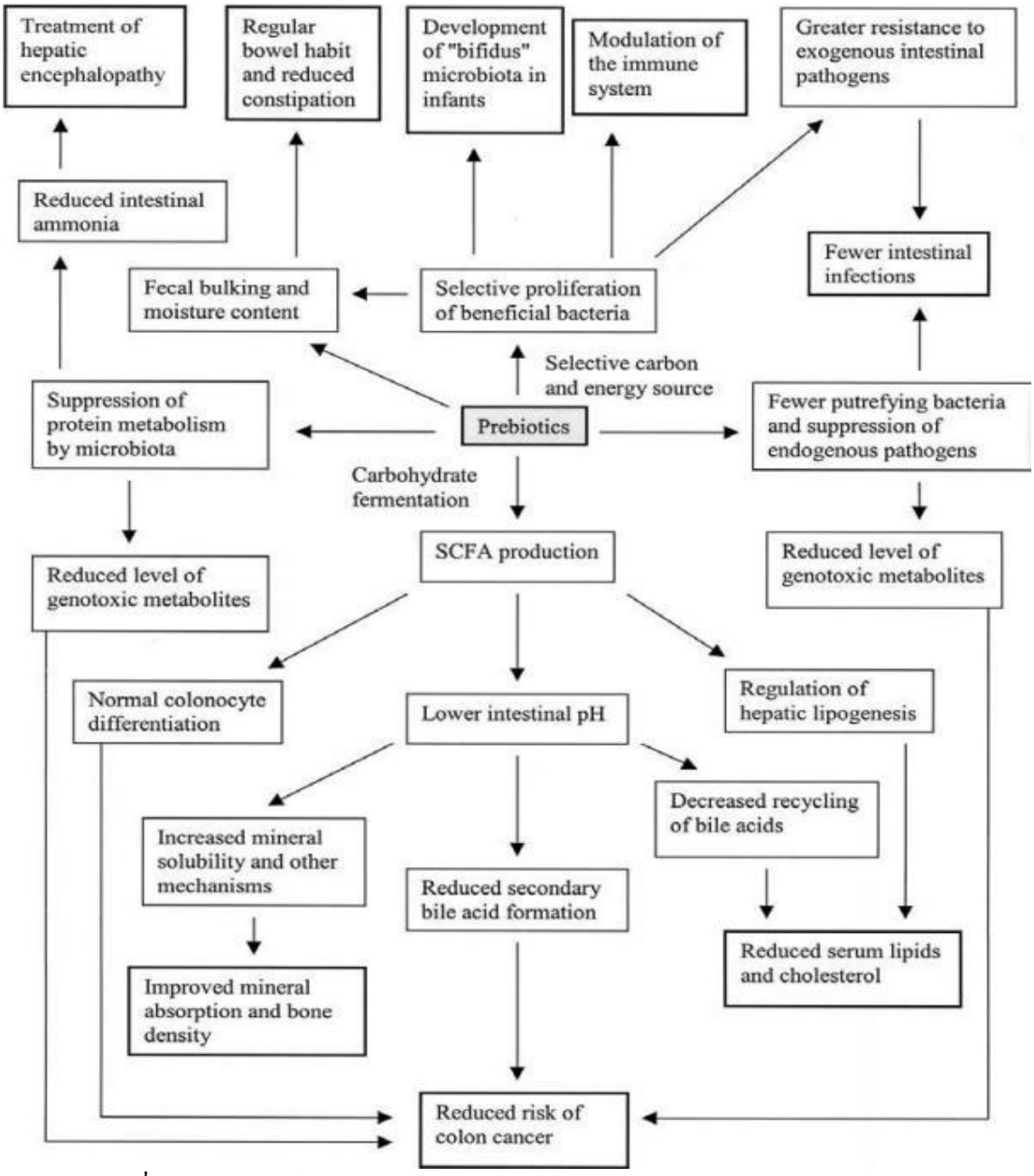
ตารางที่ 1-3 สรุปผลการศึกษาสารพรีไบโอติกแต่ละชนิด (ต่อ)

Oligosaccharides	Structure	Mode of study	Evidence of prebiotic effect	Reference
		strains	significantly	(1987)
		and *In vivo* human 6 healthy	decreased.	Hayakawa และคณะ
		adults	Preferential fermentation by 28 species of	(1990)
			bifidobacteria, except B. bifidum.	
			Significant increase of *Bifidobacterium*	
			spp.,	Saito และคณะ
		In vitro two stage continuous culture	no additional effect of combination of	(1993)
		system with human faeces	SOS	
			with 6×10^6 CFU *B. longum.*	
			Significant increase of *Bifidobacterium*	
			spp.	
			Compared to other bacterial species.	

ที่มา: Sofia และคณะ (2000)

1.2.6 ประโยชน์ของพรีไบโอติก

ประโยชน์ของพรีไบโอติกนั้นนอกจากจะเป็นสารอาหารให้แก่จุลินทรีย์กลุ่มโพรไบโอติก ในร่างกายแล้ว ยังส่งผลโดยตรงต่อสุขภาพของผู้บริโภค ดังภาพที่ 1-2 ดังนี้



ภาพที่ 1-2 ประโยชน์ของสารพรีไบโอติก

ที่มา: Neeser และ German (2004)

(1) การป้องกันการเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่

มีโรคหลายโรคที่เกิดขึ้นในทางเดินอาหาร โดยเฉพาะที่ลำไส้ใหญ่ซึ่งมีโอกาสเกิดมะเร็งมากกว่าในลำไส้เล็กถึง 100 เท่า (Morotomi *et al*., 1990) แต่มีการพิสูจน์ แล้วว่าสารอาหารที่เรียกว่า พรีไบโอติก มีบทบาทในการป้องกันมะเร็งได้ (Hylla *et al*., 1998) โดยมีกลไกในการป้องกัน คือ เปลี่ยนกระบวนการเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ ให้ลดการเกิดสารที่ส่งผลเสียต่อร่างกาย เช่น การเกิดเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ ให้ลดการเกิดสารที่ส่งผลเสียต่อร่างกาย เช่น การเกิดเมทาบอลิซึมของไขมันและโปรตีนจะทำให้เกิดสารก่อมะเร็งขึ้นโดยอาจจะเปลี่ยนเมทาบอลิซึมของแบคทีเรีย *Clostridia* จาก Proteolysis ไปเป็น Saccharolysis นอกจากนี้พรีไบโอติกยังส่งเสริมให้แบคทีเรียแลคติกผลิตสารที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ผลิตสารก่อมะเร็งได้ (Reddy, 1998)

(2) การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

มีหลักฐานที่ยืนยันแล้วว่าพรีไบโอติกเป็นตัวที่เพิ่มความสามารถของแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ต้านทานแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารได้ โดยแบคทีเรียกลุ่มโพรไบโอติกที่มีอยู่ในลำไส้ใหญ่เมื่อเกิดกระบวนการเมทาบอลิซึม โดยใช้สารอาหารที่เหลือจากการดูดซึมของทางเดินอาหารส่วนบน ทำให้เกิดสารประกอบที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยการสร้างกรดซึ่งส่งผลให้ระดับพีเอชในทางเดินอาหารลดลงจึงทำให้สภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (Fuller, 1993)

(3) เพิ่มการดูดซึมของแคลเซียม

สารพรีไบโอติกสามารถเพิ่มการดูดซึมของสารอาหารบางชนิด โดยเฉพาะเพิ่มการดูดซึมแคลเซียม ซึ่งกระบวนการหมักของสารพรีไบโอติกทำให้เกิดกรดไขมันสายสั้นๆ ซึ่งส่งผลต่อค่าพีเอชภายในลำไส้ใหญ่และเกิดการหมักของสาร phytate สารในกลุ่ม phytate นี้เป็นองค์ประกอบในพืช มีความเสถียรสูงและเกิดเป็นสารประกอบที่ไม่ละลายน้ำเมื่อไปจับแคลเซียม ทำให้ร่างกายไม่สามารถดูดซึมแคลเซียมได้ และจากกระบวนการหมักของสาร phytate โดยแบคทีเรียในลำไส้ทำให้แคลเซียมถูกปลดปล่อยมาเป็นอิสระและมีการดูดซึมเข้าร่างกายได้มากขึ้น

(4) ลดระดับคอเลสเตอรอล

พบว่ากระบวนการหมักสารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกภายในลำไส้ใหญ่มีผลให้สามารถไปลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้ (Tuohy *et al.,* 2003) พบว่า *L. acidophilus* เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ซึ่งช่วยย่อยสลายคอเลสเตอรอล และยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอลผ่านลำไส้โดยลดการดูดซึมคอเลสเตอรอล สารในกลุ่มแพคติน กัวกัม และ ß-glucan ที่มีใยอาหารสูง จะสามารถลดการดูดซึมของ

คอเลสเตอรอลได้ โดยลักษณะเหนียวหนืดของใยอาหารไปเคลือบผนังลำไส้ ทำให้ความสามารถในการดูดซึมคอเลสเตอรอลภายในลำไส้ลดลง

(ก) ในกระบวนการหมักสารพรีไบโอติกภายในลำไส้ใหญ่จะเกิดผลิตภัณฑ์สุดท้ายกรดไขมันสายสั้น พบว่าโพรพิโอเนทสามารถไปลดการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในเซลล์ตับ

(ข) เพิ่มการขับถ่ายเกลือน้ำดี ซึ่งเกลือน้ำดีเป็นตัวช่วยละลายไขมันทำให้การดูดซึมไขมันและคอเลสเตอรอลเพิ่มขึ้น (Conway, 2001)

(5) ช่วยลดความดันโลหิต

การศึกษาผลของฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ในผู้ป่วยที่มีระดับไขมันในเลือดสูง โดยให้ผู้ป่วยบริโภค ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าความดันโลหิตลดลงโดยเฉลี่ย 6 มิลลิเมตรปรอท และยังพบว่าความดันโลหิตแปรผกผันกับจำนวนของ *Bifidobacteria* ในลำไส้อีกด้วย (Tomomatsu, 1994)

(6) ช่วยเพิ่มวิตามินบางชนิด

การหมักสารพรีไบโอติกโดยจุลินทรีย์กลุ่ม *Bifidobacteria* พบว่าสามารถผลิตวิตามิน B_1, B_2, B_6, B_{12}, nicotinic acid และ folic acid เพิ่มขึ้น (Conway, 2001)

(7) ช่วยลดอาการท้องผูก

กรดไขมันซึ่งผลิตโดย *Bifidobacteria* ช่วยกระตุ้นการบีบตัวของลำไส้และเพิ่มความชื้นของอุจจาระ ทำให้อุจจาระนิ่มขึ้นขับถ่ายได้ง่าย ซึ่งสารพรีไบโอติกสามารถเสริมการผลิตกรดไขมันสายสั้นในจุลินทรีย์โพรไบโอติกได้ (Tomomatsu, 1994)

1.2.7 การสกัดโอลิโกแซคคาไรด์

การสกัด เป็นกระบวนการแยกที่เกี่ยวข้องกับ 2 เฟส โดยที่ตัวทำละลายเป็นสารที่เติมเข้าไปเพื่อให้เกิดอีกเฟสที่แตกต่างจากเฟสเดิมขององค์ประกอบที่ต้องการแยก การแยกจะเกิดขึ้นได้เมื่อองค์ประกอบที่ต้องการแยกละลายออกมาในตัวทำละลายออกมาในตัวทำละลายขณะที่องค์ประกอบอื่น ที่เหลืออยู่ยังคงอยู่ในเฟสเริ่มต้น สองเฟสดังกล่าวอาจจะเป็นของแข็งกับของเหลว ของเหลวที่ไม่สามารถผสมกันได้ หรือของแข็งกับแก๊สก็ได้ ซึ่งในงานวิจัยนี้จะกล่าวถึงรายละเอียดเกี่ยวกับการสกัดแบบของแข็ง-ของเหลวเท่านั้น ซึ่งในระบบการสกัด สามารถแบ่งชนิดการสกัดออกเป็น 4 ระบบ ได้แก่ การสกัดแบบกะเพียงขั้นเดียว การสกัดแบบการไหลผ่านชนิดหลายขั้น การสกัดแบบไหลสวนทางกันแบบหลายขั้น และการสกัดแบบไหลสวนทางกันอย่างต่อเนื่อง แต่ในงานวิจัยนี้จะกล่าวเพียง การสกัดแบบกะเพียงขั้นตอนเดียว

การสกัดแบบกะเพียงขั้นตอนเดียว

เป็นการสกัดที่อาศัยการสัมผัสระหว่างเฟสของแข็งกับตัวทำละลายที่ไม่มีตัวถูกละลายอยู่จนกระทั้งถึงจุดสมดุล ตัวทำละลายจะถูกปั้มผ่านชั้นของแข็งแล้ว หมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ โดยในชั้นของแข็งอาจแช่อยู่ในตัวทำละลายที่มีการกวนหรือไม่ก็ได้ ซึ่งภายหลังจากสมดุลการสกัด เฟสของตัวทำละลายที่มีตัวถูกละลายอยู่จะถูกระบายออกไปจากของแข็ง จากนั้นตัวทำละลายและน้ำก็จะถูกกำจัดออกไป การสกัดแบบนี้นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลจากหัวบีท

หลักการทั่วไปของการสกัด

ปรากฏการณ์ทางกายภาพที่เกี่ยวข้องกับการสกัด ได้แก่

(1) การแพร่ (Diffusion)

การแพร่เป็นการเคลื่อนย้ายโมเลกุลต่างๆของสารประกอบชนิดหนึ่งผ่านส่วนที่ต่อเนื่อง (Continuum) ในเฟสหนึ่งหรือผ่านผิว (interface) ระหว่างเฟส ในการสกัดของแข็ง-ของเหลว ตัวทำละลายจะต้องแพร่เข้าไปในของแข็งเพื่อละลายตัวถูกละลายออกมา และตัวถูกละลายก็ต้องแพร่ออกมาจากของแข็งที่อิ่มตัวด้วยตัวทำละลายไปยังเฟสของตัวทำละลาย อัตราการแพร่หาได้จากระยะเวลาที่ต้องการให้สมดุลเกิดขึ้นระหว่างเฟสทั้งสอง ซึ่งเวลาที่ต้องการสำหรับกระบวนการแพร่เพื่อให้ถึงสมดุลเป็นสัดส่วนกลับกับสองของระยะทางการแพร่ ดังนั้น ในการสกัดด้วยตัวทำละลาย ยิ่งมีอนุภาคมีขนาดเล็ก ระยะเวลาที่ของแข็งต้องอยู่ในขั้นตอนการสกัดยิ่งสั้น (รุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, 2541) เนื่องจากพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างของแข็งและของเหลวเพิ่มมากขึ้น อัตราการถ่ายเทขององค์ประกอบที่ละลายได้จึงเพิ่มมากขึ้นด้วย อย่างไรก็ตาม แม้ว่าขนาดของอนุภาคของแข็งจะมีผลต่ออัตราการสกัด คือ ยิ่งอนุภาคมีขนาดเล็กมาก พื้นที่สัมผัส ระหว่างของแข็งและของเหลวยิ่งมาก ทำให้อัตราการถ่ายเทขององค์ประกอบที่ละลายได้เพิ่มมากขึ้นก็ตาม แต่ในกรณีที่สารเป็นอนุภาคละเอียดมาก อาจก่อให้เกิดความต้านทานหรือยับยั้งการหมุนเวียนของตัวทำละลายที่จะผ่านชั้นของของแข็ง ทำให้พื้นที่ผิวของการสัมผัสที่มากขึ้นก็ไม่ได้ช่วยในเรื่องอัตราการถ่ายเทมวล

(2) ความสามารถในการละลาย (Solubility)

ความเข้มข้นของตัวถูกละลายสูงสุดที่เป็นไปได้ในสารสกัดสุดท้ายที่ออกจากระบบการสกัด คือ ความเข้มข้นอิ่มตัว ดังนั้น อัตราส่วนของ (ตัวทำละลาย ต่อของแข็ง) ต้องสูงพอที่เมื่อตัวทำละลายบริสุทธิ์สัมผัสของแข็งที่ส่งเข้าเครื่องสกัด สารละลายที่ได้หลังสมดุลต้องมีความเข้มข้นต่ำกว่าความเข้มข้นอิ่มตัวของตัวถูกละลาย หากความสามารถในการละลายของตัวทำลายสูงจะช่วยลดจำนวนครั้งของการหมุนเวียนตัวทำละลายที่ต้องใช้เพื่อกำจัดตัวถูกละลายออกมาไประดับที่ต้องการ

(3) ชนิดของตัวทำละลาย

ในการสกัด ตัวทำละลายที่ใช้ควรมีความหนืดต่ำ เพื่อให้เกิดการหมุนเวียนได้ดี ซึ่งโดยทั่วไป มักใช้ตัวทำละลายที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ในช่วงแรก เนื่องจากขณะที่กระบวนการสกัดมีการดำเนินไปอย่างต่อเนื่อง ความเข้มข้นของตัวถูกละลายในตัวทำละลายจะค่อยๆเพิ่มขึ้น และเมื่อเข้าสู่สมดุลการสกัด อัตราการสกัดจะลดลงอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างของความเข้มข้นลดลงและสารละลายมีความหนืดเพิ่มขึ้น การสกัดน้ำตาลจากพืช มักใช้น้ำและเอทานอลเป็นตัวทำละลาย โดยที่น้ำจัดเป็นโมเลกุลที่มีขั้ว และเอทานอล จัดเป็นโครงสร้างที่มีขั้วและไม่มีขั้วภายในโมเลกุล

(4) อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด

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

(5) ระยะเวลาในการสกัด

สารในของแข็งแพร่เข้าสู่เฟสของตัวทำละลาย ตั้งแต่เริ่มมีการสัมผัสของทั้งสองเฟส จนกระทั้งสองเฟสนั้นเข้าสู่สมดุล หากใช้เวลาในการสกัดน้อย ปริมาณตัวถูกละลายที่ชะได้จากของแข็งก็จะมีปริมาณน้อย หรือหากใช้เวลาในการสกัดนานเกินไป ก็สิ้นเปลือง เนื่องจากไม่ได้ทำให้ปริมาณสารที่สกัดได้เพิ่มมากขึ้น

โดยส่วนใหญ่การสกัดโอลิโกแซคคาร์จากตัวอย่างที่ได้มาจากพืชนั้น ใช้ตัวทำละลายที่มีขั้ว เช่น สารละลายเอทานอล และน้ำ เนื่องจากโอลิโกแซคคาไรด์จัดเป็นคาร์โบไฮเดรตที่สามารถละลายน้ำได้ แต่มีงานหลายงานวิจัยเลือกที่จะใช้ตัวทำละลายเป็นเอทานอล เนื่องจากหากใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ในการสกัดอาจมีการละลายสารอื่นที่ชอบน้ำ เช่น พอลิแซคคาไรด์หรือโปรตีน ร่วมด้วย การสกัดสารเหล่านี้จึงใช้สารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นตัวทำละลาย (Knudsen and Li, 1991) ซึ่งแต่ละงานวิจัยจะให้ผลที่แตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างของตัวอย่างและสภาวะที่ใช้ในการทดลอง เช่น Jonansan และคณะ (1996) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในช่วงร้อยละ 50-90 มีผลทำให้ปริมาณของโอลิโก-แซคคาไรด์ที่สกัดได้จากพืชมีค่าลดลง Xiaoli และคณะ (2008) พบว่าการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์

จาก Chickpea (*Cicer arietinum*) ด้วยน้ำและเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 30, 50, 70 และ 80 การสกัดด้วย เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 สามารถสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ได้ปริมาณที่สูงสุด และการสกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นสูงขึ้นแม้ให้จะให้ปริมาณสารสกัด (Yield) สูง แต่ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้กลับมีปริมาณน้อย ซึ่งเป็นไปได้ว่า การใช้เอทานอลเข้มข้นสูง มีผลทำให้โปรตีนเสียสภาพ ตกตะกอนและขัดขวางการแพร่ของโอลิโกแซคคาร์ที่บริเวณผิวของตัวอย่าง นอกจากนี้ การสกัดในช่วงอุณหภูมิ 10-50 องศาเซลเซียส มีผลทำให้สกัดโอลิโกแซคคาไรด์ได้เพิ่มขึ้น และการสกัดได้น้อยลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น สอดคล้องกับกับการศึกษาการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากถั่วเหลือง โดยการแช่ของ Nissreen และ Mckenna (1997) ซึ่งพบว่าการแช่ถั่วที่อุณหภูมิที่สูงช่วยเพิ่มอัตราการดูดซับน้ำของถั่วและลดเวลาในการแช่ถั่วเข้าสู่สมดุลการสกัดได้เร็วขึ้น และการสกัดที่อุณหภูมิที่สูงกว่า 50 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ปริมาณผลผลิตที่สกัดได้ต่ำลง เนื่องจาก ความร้อนที่สูงขึ้น ทำให้โปรตีนที่ละลายได้เสียสภาพอย่างรวดเร็ว น้ำตาลที่ละลายได้จึงถูกห่อหุ้มไว้ ความสามารถในการสกัดจึงลดลง (Kim *et al*., 2003)

สุพจน์ นวลละออง (2552) ศึกษาผลของระยะเวลาต่อปริมาณสารพรีไบโอติกที่สกัดได้จากเปลือกลูกตาลแห้ง โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย อัตราส่วนตัวอย่างต่อตัวทำละลายเป็น 1 ต่อ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่า การสกัดเป็นเวลานานขึ้น ส่งผลให้สารที่สกัดได้มีปริมาณลดลงเล็กน้อย และเมื่อนำสารสกัดไปวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้น จนเมื่อเวลาผ่านไปเมื่อสารละลายอิ่มตัวด้วยตัวทำละลาย อัตราการสกัดจึงลดลง เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซ์ซึ่งคาดว่าเป็นสารโอลิโกแซคคาไรด์ พบว่าการสกัดเป็นเวลา 120 นาที มีปริมาณน้ำตาลดังกล่าวสูงสุด คือ 50.51 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารสกัดได้

Wichienchot และคณะ (2010) ได้ศึกษาการสกัดสารพรีไบโอติกจากเนื้อแก้วมังกร พันธุ์เนื้อสีขาว ด้วยเอทานอลเข้มข้น 80 และ 20 เปอร์เซ็นต์ และน้ำ พบว่าการสกัดที่ใช้สารละลายเอทานอลเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) ในปริมาณโอลิโกแซคคาร์สูงสุด คือ 27.40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเปียก และมีน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดที่ได้ คือ 275-275, 448-500 และ 787-911 ดอลตัล

Wichienchot และคณะ (2011) ได้ศึกษาแหล่งพรีไบโอติกจากพืชไทย โดยพิจารณาจากปริมาณสารพรีไบโอติกและเส้นใยที่ละลายน้ำได้ (soluble dietary fiber) ในพืชที่เจริญและมีการบริโภคในบริเวณภาคใต้ พบว่าในจำนวนพืชที่ได้คัดเลือกมาทั้งหมด 13 ชนิด เนื้อขนุนพันธุ์ทองประเสริฐที่สกัดด้วย เอทา-นอล เข้มข้นร้อยละ 95 สามารถสกัดสารได้ปริมาณที่สูงสุด โดยอัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวอย่างกับตัวทำละลายคือ 1:2 ขนาดตัวอย่างที่เหมาะสมคือ 0.5×0.5 ×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร อุณหภูมิในการสกัดที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิห้อง โดยสารสกัดที่ได้คิดเป็น 15.70 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของสารสกัดทั้งหมดเท่ากับ 731.11 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียก ประกอบด้วยน้ำตาลฟรุกโตส

กลูโคสและซูโครสเท่ากับ 270.25, 193.50 และ 267.36 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักเปียก ตามลำดับ และมีปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้ต่อปริมาณพอลิแซคคาไรด์ในตัวอย่างเท่ากับ 500.86 มิลลิกรัมต่อกรัม

1.2.8 การทดสอบความเป็นพรีไบโอติกในลำไส้ใหญ่จำลอง

การศึกษาคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกส่วนใหญ่แล้วเกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ที่พบในทางเดินอาหาร ในการศึกษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ชนิดนี้มีอยู่หลายแบบดังนี้

(1) การใช้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) เป็นวิธีที่ง่ายที่สุดในการศึกษาคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของสารโดยการใช้แบคทีเรียบริสุทธิ์ที่เลือกมาศึกษามาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่มีการเติมสารอาหารที่ต้องการทดสอบแล้วนำมาวัดการเจริญในช่วงเวลาต่างๆของการบ่มเชื้อ เปรียบเทียบการเจริญกับเชื้อที่เลี้ยงในอาหารที่ไม่มีการเติมสารอาหารที่ทดสอบ (Gibson and Wang, 1994) วิธีการนี้ทำให้ทราบ เมทาบอลิซึมของสารอาหารที่ศึกษาที่เกิดในสภาวะที่มีจุลินทรีย์เพียงชนิดเดียวแต่ไม่สามารถสะท้อนถึงสภาวะการแข่งขันของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ ที่มีอยู่จริงในลำไส้ใหญ่ซึ่งมีอยู่มากกว่า 500 สปีชีส์ ซึ่งข้อมูลล่าสุดรายงานว่ามีมากกว่า 1000 สายพันธุ์แตกต่างกัน ดังนั้นการทดสอบโดยการใช้เชื้อบริสุทธิ์ทำให้ไม่สามารถระบุความจำเพาะ (selectivity) ในการเสริมการเจริญของสารอาหารที่ทดสอบนั้นได้ วิธีการที่ใช้เชื้อผสมของจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่แยกจากทางเดินอาหารก็จะทำให้สามารถสภาวะในการแข่งขันการเจริญของเชื้อได้แต่ก็ยังไม่เพียงพอที่จะสะท้อนสภาวะอันตรกิริยาเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจริงในลำไส้ได้ อย่างไรก็ตามวิธีการนี้เป็นประโยชน์ในการแสดงแนวโน้มว่าการใช้สารพรีไบโอติกไปส่งเสริมการแข่งขันของจุลินทรีย์โพรไบโอติกและจุลินทรีย์ก่อโรคอย่างไร

(2) การใช้เชื้อผสม (Mixed culture) จัดเป็นวิธีอย่างง่ายที่ใช้ในการวัดกิจกรรมของจุลินทรีย์ในลำไส้โดยใช้การหมักแบบกะที่ใช้จุลินทรีย์จากอุจจาระมนุษย์ (Wang and Gibson, 1993) ในสภาวะไร้อากาศโดยใช้ก๊าซไนโตรเจนและควบคุมพีเอชพร้อมกับกวนผสมตลอดเวลาแต่วิธีนี้ทำในระบบปิดที่มีสารอาหารจำกัดจึงเหมาะสมกับการศึกษาระยะสั้น ซึ่งแตกต่างกับในสภาวะจริงของลำไส้ใหญ่ที่มีสารอาหารใหม่ผ่านอยู่ตลอดเวลา จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาระบบหมักที่มีการเติมสารอาหารใหม่เข้าสู่ระบบหมักอย่างต่อเนื่องโดยควบคุมอัตราการไหลเข้า-ออก และตัวแปรต่างๆที่มีผลต่อกระบวนการหมักในลำไส้ เช่น พีเอชและเวลาที่อาหารอยู่ในลำไส้ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ซึ่งเป็น one-stage continuous culture chemostat จัดเป็น homogeneous system จึงยังไม่สามารถให้ผลการทดสอบที่สะท้อนระบบ heterogeneous microbial system ที่อยู่ในลำไส้ใหญ่จริงๆได้

ระบบลำไส้ใหญ่จำลอง (*In vitro* colon model) เนื่องจากลำไส้ใหญ่มนุษย์เป็นระบบนิเวศน์จุลินทรีย์ที่มีความหลากหลายซึ่งแหล่งอาหารที่สำคัญมาจากอาหารที่รับประทานและผ่านมาจากลำไส้เล็ก

ในลำไส้ใหญ่ของคนทั่วไปมีเศษอาหารอยู่ประมาณ 200 กรัม ซึ่งกระจายอยู่ทั่วส่วนต่างๆของลำไส้ โดยที่ประมาณ 60% ของน้ำหนักแห้งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ และดังที่กล่าวไว้ข้างต้นว่าเศษอาหารที่ส่งผ่านจากลำไส้เล็กไปยังลำไส้ใหญ่ส่วนต้นนั้นมีสารอาหารสำหรับจุลินทรีย์อยู่มาก จึงมีการเจริญของจุลินทรีย์อย่างรวดเร็วและมีพีเอชค่อนไปทางเป็นกรด เมื่อเศษอาหารผ่านไปถึงลำไส้ใหญ่ส่วนกลางสารอาหารก็ลดน้อยลงและมีพีเอชค่อนข้างเป็นกลาง ดังนั้นในการพัฒนาระบบลำไส้ใหญ่จำลองจึงต้องเลียนแบบส่วนต่างๆของลำไส้ใหญ่ที่มีค่าตัวแปรต่างกัน โดยประกอบด้วยภาชนะหมักที่ 1 (vessel 1) ซึ่งแทนส่วนลำไส้ใหญ่ส่วนต้นที่มีสารอาหารสำหรับจุลินทรีย์อยู่สูงและมีพีเอชต่ำ ส่วนภาชนะหมักที่ 2 และ 3 ซึ่งแทนลำไส้ใหญ่ส่วนกลางและส่วนปลายมีสารอาหารลดน้อยลงและมีพีเอชค่อนข้างเป็นกลาง ทำการควบคุมตัวแปรต่างๆ ตามที่ได้จากการรับรองผลการทดลองกับเศษอาหารที่ได้จากร่างกายผู้ที่เพิ่งเสียชีวิตใหม่ๆ ทำการเติมเชื้อเริ่มต้นจากอุจจาระของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีและไม่ได้รับยาปฏิชีวนะ (Egert *et al*., 2006) ข้อมูลที่ได้จากระบบจำลองนี้สามารถสะท้อนสภาวะที่เกิดขึ้นในลำไส้ใหญ่ได้จริง จึงสามารถนำมาใช้ในการประเมินความเป็นพรีไบโอติกได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การพัฒนาของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของเด็กทารกที่ปลอดจากเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นขึ้นตั้งแต่แรกคลอด โดยมีการพบเชื้อจุลินทรีย์ที่มาจากสิ่งแวดล้อมใกล้เคียงในอุจจาระหลังจากคลอดได้ 2-3 วัน ในช่วงเวลานี้แบคทีเรียกลุ่มแรกที่เข้าไปก่อตัว (colonization) ทำให้เกิดสภาวะไร้อากาศในทางเดินอาหาร ซึ่งอำนวยให้มีการเจริญของแบคทีเรียที่ไม่ชอบอากาศโดยเฉพาะ *Bifidobacteria* ซึ่งจัดเป็นกลุ่มที่เป็น dominant flora ในทางเดินอาหารของเด็กทารกแรกคลอดโดยในช่วงนี้การเปลี่ยนแปลงของกลุ่มประชากรแบคทีเรียยังไม่คงตัวแต่จะเริ่มคงตัวมากขึ้นเมื่ออายุเพิ่มขึ้น โดยจุลินทรีย์ที่พบในช่วงแรกเป็นพวก *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Streptococcus* และ *Clostridium* การก่อตัวของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารส่งผลต่อการปรับสภาพของลำไส้ทารกหลังคลอดเพื่อรักษาสภาพการเป็น mucosal barrier และการดูดซึมสารอาหาร (Favier *et al*., 2002) การทราบข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของจุลินทรีย์และเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นในช่วงแรกหลังคลอดที่มีผลต่อการก่อตัวของจุลินทรีย์ในลำไส้จะทำให้มีโอกาสที่จะหาวิธีปรับเพื่อเสริมให้คุณสมบัติเชิงหน้าที่เหล่านี้ได้ดียิ่งขึ้น กลไกการควบคุมที่มีผลต่อการก่อตัวของแบคทีเรียที่มีความจำเป็นในการปรับสภาพลำไส้ ได้แก่ การเสริมสารอาหารชนิดต่างๆ วิธีการคลอด สุขลักษณะ การได้รับยา และปัจจัยแวดล้อมต่างๆ (Favier *et al*., 2002) โดยการศึกษาของ Harmsen และคณะ (2000) พบว่าอุจจาระของเด็กทารกที่ดื่มนมแม่มีจำนวน *bifidobacteria* เป็นกลุ่มหลักในขณะที่อุจจาระของทารกที่ได้รับนมผสมมีกลุ่มแบคทีเรียที่หลากหลาย ส่วนการศึกษาเด็กทารกที่ได้รับยาปฏิชีวนะและมีน้ำหนักแรกคลอดต่ำมาก พบว่ามี *Bifidobacteria* อยู่น้อยมาก แต่พบแบคทีเรียกลุ่มอื่นมาแทนที่ได้แก่ *Clostridium*, *Klebseilla* และ *E. coli* ซึ่งก็เป็นที่ทราบกันดีว่าการให้ยาปฏิชีวนะไปลดจำนวนจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ส่งผลให้ทางเดินอาหารติดเชื้อ

ได้ง่ายยิ่งขึ้นยังพบความสัมพันธ์ของสายพันธุ์จุลินทรีย์โดยเฉพาะกลุ่ม bifidobacteria ที่พบนั้น ได้มาจากมารดา และจากสิ่งแวดล้อม (Favier *et al*., 2002) ซึ่งกรณีหลังชี้ให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการเสริมจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์จากภายนอกให้เข้าไปก่อตัวในลำไส้ โดยการบริโภคเสริมเข้าไป นอกจากนี้จากการศึกษาทารกกรีกที่ทำคลอดโดยการผ่าออกทางหน้าท้องมีการก่อตัวของแบคทีเรียแลกติคและ bifidobacteria ที่ช้ากว่าและมีจำนวนน้อยกว่าทารกที่คลอดแบบธรรมชาติ โดย bifidobacteria ที่พบมากคือ *Bifidobacterium longum* และ *Bifidobacterium breve*

จากการศึกษาองค์ประกอบในน้ำนมแม่พบว่ามีองค์ประกอบของโอลิแซคคาไรด์ที่ต่อมาเป็นที่รู้จักว่าเป็น Galactooligosaccharides (GOS) ซึ่งมีงานวิจัยจำนวนมากแสดงให้เห็นคุณสมบัติที่เสริมการเจริญของ จุลินทรีย์กลุ่มนี้ได้อย่างจำเพาะ โดย Bouhnik และคณะ (1997) ได้เติม transgalactosylated oligosaccharides (TOS) เข้าสู่ระบบลำไส้ใหญ่จำลองแบบกึ่งต่อเนื่องในปริมาณ 10 กรัมต่อวันโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์จากอุจจาระมนุษย์พบว่าปริมาณกรดแลคติกและอะซิติกเพิ่มสูงขึ้นซึ่งสะท้อนให้เห็นว่ามีการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย Lactic และ bifidobacteria โดยเฉพาะจุลินทรีย์กลุ่มหลังที่เป็นที่ทราบกันดีว่าผลิตกรดอะซิติกในลำไส้ได้ดี ส่วนผลการเติมสาร TOS ให้หนูกิน พบว่า มีการเพิ่มจำนวนของ *Lactobacilli* และ *Bifidobacteria* อย่างมีนัยสำคัญ และทำให้จำนวน *Streptococci*, *Staphylococci* และ *Enterobacteria* ลดลงอย่างมาก (Morishita and Konishi, 1994; Rowland and Tanaka, 1993) นอกจากนี้การศึกษาในคนก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน คืออุจจาระของอาสาสมัครที่ได้รับ TOS ในปริมาณ 10-15 กรัมต่อวันมีจำนวน *Lactobacilli* และ *bifidobacteria* สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่มีจำนวน bacteriodes ลดลง (Ito *et al.*, 1993; Bouhnik *et al*., 1997)

นอกจาก TOS หรือ GOS แล้วโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้รับความสนใจอย่างมากอีกชนิดหนึ่งคือ fructooligosaccharides (FOS) และ inulin ซึ่งมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์มากมายสนับสนุนคุณสมบัติของสารกลุ่มนี้ว่าสามารถเสริมการเจริญของแบคทีเรีย *Bifidobacteria* ได้อย่างจำเพาะไม่ว่าจะเป็นการศึกษาในสัตว์ คนหรือในระบบลำไส้ใหญ่จำลอง จากการศึกษาโดยใช้เชื้อจากอุจจาระในระบบหมักแบบกะโดยใช้ FOS, inulin, polydextrose, แป้ง น้ำตาลฟรุคโตส และ เพคติน พบว่า จำนวน *Bifidobacteria* เพิ่มขึ้นมากที่สุดในชุดการทดลองที่มีการเติม FOS และ inulin (Wang and Gibson, 1993) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในระบบต่อเนื่อง (Gibson and Wang, 1994) โดยพบว่า *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* สามารถเจริญในอาหารที่มี FOS และ inulin ได้ดีกว่าในอาหารที่มีกลูโคส ในขณะที่แบคทีเรียพวก bacteriodes ไม่สามารถเจริญในอาหารทีมี FOS ได้ จากการศึกษาในระบบ three-stage continuous system (colon model) สนับสนุนผลของ FOS ในเรื่องความจำเพาะในการเสริมการเจริญของ *Bifidobacteria* โดยเฉพาะในลำไส้ใหญ่ส่วนต้น (proximal colon) (McBain and Macfarlane 1997)

Palframan และคณะ (2003) ได้เสนอสมการเพื่อประเมินค่าการเป็นพรีไบโอติกในเชิงปริมาณ โดยเรียกค่าที่คำนวณได้ว่า ดัชนีพรีไบโอติก (Prebiotic Index) โดยมีสมการดังนี้

PI = (Bif/Total) - (Bac/Total) + (Lac/Total) – (Clos/Total)

โดยที่ Bif คือจำนวนของ bifidobacteria ที่นับได้ที่เวลาที่เก็บตัวอย่าง/จำนวนที่นับได้ที่เวลาเริ่มเติมเชื้อ ในทำนองเดียวกันกับ Bac, Lac และ Clos ซึ่งเป็นจำนวนของเชื้อในเวลาที่เก็บตัวอย่าง/จำนวนที่เวลาเริ่มเติมเชื้อของ bacteroides, *lactobacilli* และ *clostridia* ตามลำดับ ค่าที่คำนวณได้สามารถใช้ในการเปรียบเทียบความเป็น พรีไบโอติกของสารได้ในเชิงปริมาณและมีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติพรีไบโอติกในด้านคุณภาพการเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ที่ได้จากการทดลองไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งจากการคำนวณและเปรียบเทียบค่าดัชนีพรีไบโอติกของ low methylated pectin (LMP), high methylated pectin (HMP), pectic-oligosaccharide mixtures (POS) ในระบบการหมักแบบกะและมีการกวน พบว่า POS 1 และ POS 2 มีค่าดัชนีพรีไบโอติกสูงที่สุดที่เวลาการหมัก 24 และ 48 ชั่วโมงคือ 3.00, 4.08 และ 2.77, 3.63 ตามลำดับ ในขณะที่ HMP และ LMP มีค่า PI เป็น0.72, 0.86 และ 2.14, 0.30 ตามลำดับ ส่วนการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบ xylooligosaccharides (XOS), FOS, isomalto-oligosacchaides (IMO), inulin, lactulose, GOS, soybean oligosaccharides (SOS) ที่ไม่มีการกวน พบว่า ที่เวลาการหมัก 24 ชั่วโมง lactulose มีค่าดัชนีพรีไบโอติกสูงที่สุดคือ 4.90 รองลงมาเป็น SOS, IMO, GOS, FOS, XOS และ inulin โดยมีค่าดัชนีพรีไบโอติกเป็น 4.36, 3.95, 3.76, 2.31, 2.19 และ 1.82 ตามลำดับ

(3) การใช้สัตว์ทดลอง โดยมากมักใช้หนูในการทดสอบการเป็นพรีไบโอติกของสาร ซึ่งมีข้อเสียคือสัตว์ทดลองมีลักษณะทางสรีระวิทยาของทางเดินอาหารที่แตกต่างไปจากมนุษย์

(4) การทดลองกับมนุษย์ (Human trials) ซึ่งมักเป็นในลักษณะการให้อาสาสมัครรับประทานสารที่ต้องการทดสอบแล้วตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางจุลชีววิทยาในอุจจาระซึ่งเป็นวิธีเดียวที่จะสามารถศึกษาการเปลี่ยนแปลงในลำไส้ได้ แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือต้องมีการวิเคราะห์ตัวอย่างอุจจาระทันทีรอไม่ได้เนื่องจากสภาวะการเก็บสามารถเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ในอุจจาระไปจากเดิมได้ จึงจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการตรวจสอบที่ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในการตรวจสอบติดตาม

การย่อยอาหารของระบบทางเดินอาหาร

เมื่อบริโภคอาหารเข้าสู่ร่างกาย ระบบทางเดินอาหารมีหน้าที่สำคัญในการเปลี่ยนรูปของอาหารที่บริโภค ให้อยู่ในรูปของสารอาหารที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ได้ การย่อยอาหารลำดับแรกเกิดที่บริเวณปากและสิ้นสุดที่ลำไส้เล็ก

น้ำลายมีบทบาทในการย่อยในปาก พบว่าน้ำลายถูกหลั่งออกมาจากต่อมน้ำลายประมาณวันละ 1-1.5 ลิตร น้ำลายมีเอนไซม์แอลฟาอะมัยเลส (α-amylase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยหรือไปทำลายพันธะ

แอลฟา 1,4 ไกโคไลซิส (α-1,4-glycosidic bond) ของโมเลกุลสายยาวของอะมิโลสและอะมิโลเพคตินหากการย่อยคาร์โบไฮเดรตเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ก็จะได้โมเลกุลต่างๆ คือ มอลโตส มอลโตไทรโอส และแอลฟาลิมิทเด็กทรินส์ (α-limit dextrins) โดยปกติการย่อยในช่องปากเกิดขึ้นได้น้อยมากเพราะเวลาที่อาหารอยู่ในปากเป็นช่วงสั้นๆ ไม่กี่วินาที เมื่ออาหารผ่านหลอดอาหารส่งมายังกระเพาะอาหาร มีน้ำย่อยที่หลั่งออกมาจากกระเพาะอาหาร ประกอบด้วย

(ก) กรดเกลือ หรือกรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid: HCl) กรดไฮโดรคลอริกที่หลั่งเข้าไปในกระเพาะอาหารทำให้พีเอชในกระเพาะอาหารมีความเป็นกรด มีพีเอชประมาณ 1-3 ซึ่งสามารถทำลายแบคทีเรียที่ปะปนเข้าไปกับอาหาร แบคทีเรียที่จัดเป็นโพรไบโอติกและสารในกลุ่มพรีไบโอติกต้องมีคุณสมบัติทนต่อกรดจากกระเพาะอาหารได้ เพื่อให้ผ่านไปลำไส้ใหญ่ซึ่งเป็นแหล่งที่จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารรวมถึงโพรไบโอติก

(ข) เปบซิน (pepsin) เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนในอาหาร ที่หลั่งออกมาจากกระเพาะอาหาร แต่ถึงแม้ไม่มีเอนไซม์เปบซินในกระเพาะอาหาร พบว่าน้ำย่อยโปรตีนจากตับอ่อน และลำไส้เล็กก็สามารถที่ย่อยอาหารประเภทโปรตีนได้อย่างสมบูรณ์

(ค) น้ำเมือก (mucus) เป็นไกลโคโปรตีนที่หลั่งเข้าไปในกระเพาะอาหารเพื่อเคลือบชั้นเยื่อบุของกระเพาะอาหาร ป้องกันอันตรายต่อเซลล์เยื่อบุที่เกิดจากอาหารในขณะที่มีการบีบตัวของกระเพาะอาหาร

(ง) สารอินทรินซิค (intrinsic factor) เป็นไกลโคโปรตีนที่หลั่งเข้าไปในกระเพาะอาหารและจับวิตามิน เพื่อไม่ให้ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ต่างๆ จากกระเพาะอาหารและตับอ่อน และถูกดูดซึมได้ในบริเวณลำไส้เล็กส่วนปลาย

เมื่ออาหารตกลงมาถึงลำไส้เล็ก ซึ่งเป็นส่วนที่มีการย่อยเกิดขึ้นมากที่สุด แหล่งของเอนไซม์ย่อยอาหารมาจากตับอ่อนและลำไส้เล็ก โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากตับอ่อนหลั่งออกมาในรูปที่ยังไม่ทำงาน หรือเรียกว่า ไซโมเจน (zymogen) เช่น ทริปซิโนเจน (trypsinogen) และถูกเอนไซม์เอนเทอโรเปบทิเดส (enteropeptidase) ที่ผนังลำไส้เล็กกระตุ้นให้เปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่ทำงานได้ คือ ทริปซิน (trypsin) ส่วนน้ำย่อยที่หลั่งจากตับอ่อน (pancreatic juice) มีสภาพเป็นด่างเนื่องจากมีไบคาร์บอเนตหลั่งออกมาด้วย จึงมีผลทำให้เกิดสภาพที่เป็นกลางของอาหารในลำไส้เล็กซึ่งมาจากกระเพาะอาหารที่มีสภาพเป็นกรด เนื่องจากเอนไซม์จากตับอ่อนจะทำงานได้ดีในสภาพที่เป็นกลาง ลำไส้ใหญ่ทำหน้าที่ดูดกลับน้ำออกจากส่วนที่จะกลายเป็นกากอาหาร แล้วสะสมอยู่ที่ส่วนท้ายสุดลำไส้ คือ ไส้ตรง (rectum) เพื่อรอการขับถ่ายออกเป็นอุจจาระทางทวารหนัก สารคัดหลั่งจากลำไส้ใหญ่ คือสารเมือก ซึ่งอัตราการหลั่งสารเมือกขึ้นอยู่กับการกระตุ้นจากอาหารเหลวภายในลำไส้ใหญ่ สารเมือกที่หลั่งออกมาในบริเวณลำไส้ใหญ่จะทำหน้าที่ป้องกัน

อันตรายต่อชั้นเยื่อบุลำไส้ใหญ่เนื่องมาจากกากอาหาร นอกจากนี้สารเมือกยังช่วยทำให้เกิดการรวมตัวกันของอุจจาระเป็นก้อน และยังช่วยป้องกันอันตรายอันเนื่องมาจากแบคทีเรียที่จะทำอันตรายต่อลำไส้ได้ ส่วนอาหารที่ไม่ถูกย่อยจากระบบทางเดินอาหารเมื่อเดินทางมาถึงลำใส้ใหญ่ จะมีผลต่อการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ (แบคทีเรียโพรไบโอติก) โดยในระบบทางเดินอาหารมนุษย์นั้นมีทั้งแบคทีเรียที่จัดเป็นแบคทีเรียก่อโรค เช่น แบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium* spp. และแบคทีเรียกลุ่มโพรไบโอติก เช่น Lactobacilli และ Bifidobacteria ซึ่งจำนวนแตกต่างกันไปในบริเวณที่พบ ดังแสดงใน ตารางที่ 1-4 เมื่อแบคทีเรียโพรไบโอติกได้รับสารอาหารกลุ่มพรีไบโอติกช่วยให้โปรไบโอติกเพิ่มจำนวน อีกทั้งยังช่วยรักษาสมดุลและยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

ตารางที่ 1-4 จุลินทรีย์ประจำถิ่นที่พบในทางเดินอาหารของมนุษย์

Bacterial flora	Stomach	Jejunum	Ileum	Faeces
Total bacterial count/ml	0-10	$0\text{-}10^5$	$10^3\text{-}10^7$	$10^{10}\text{-}10^{12}$
Aerobic or facultative bacterial				
Enterobacteria	$0\text{-}10^2$	$0\text{-}10^3$	$10^2\text{-}10^6$	$10^{10}\text{-}10^{12}$
Streptococci (including *Peptostreptococcus* sp.)	$0\text{-}10^3$	$0\text{-}10^4$	$10^2\text{-}10^6$	$10^3\text{-}10^6$
Staphylococi	$0\text{-}10^2$	$0\text{-}10^3$	$10^2\text{-}10^5$	$10^4\text{-}10^7$
Lactobacilli	$0\text{-}10^3$	$0\text{-}10^4$	$10^2\text{-}10^5$	$10^6\text{-}10^{10}$
Fungi	$0\text{-}10^2$	$0\text{-}10^2$	$10^2\text{-}10^3$	$10^2\text{-}10^6$
Anaerobic bacteria				
Bacteroides	rare	$0\text{-}10^2$	$10^3\text{-}10^7$	$10^{10}\text{-}10^{12}$
Bifidobacteria	rare	$0\text{-}10^3$	$10^3\text{-}10^5$	$10^8\text{-}10^{12}$
Gram-positive cocci	rare	$0\text{-}10^3$	$10^2\text{-}10^3$	$10^8\text{-}10^{11}$
Clostridium spp.	rare	rare	$10^2\text{-}10^4$	$10^6\text{-}10^{11}$
Eubacteria	rare	rare	rare	rare

ที่มา: Simon และ Gorbach (1984)

กระบวนการหมักพรีไบโอติกในลำไส้ใหญ่

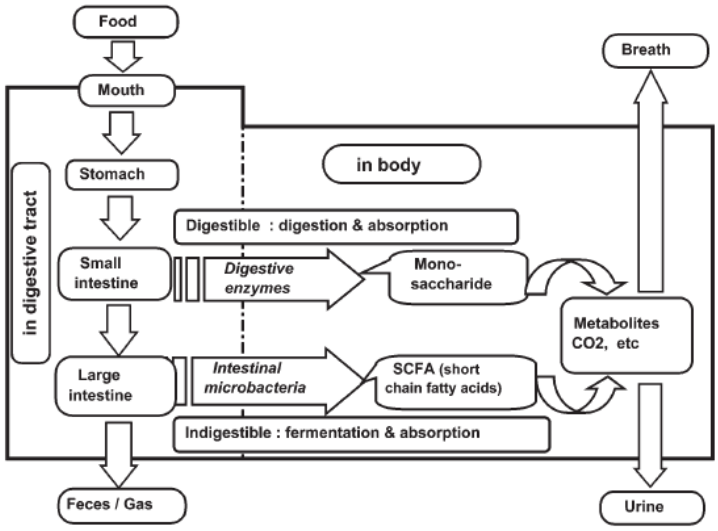
ภายในลำไส้ใหญ่จะเกิดกระบวนการหมักของสารที่เหลือจากการย่อยจากปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก โดยจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ ซึ่งกระบวนการหมักจะเกิดขึ้น 2 แบบด้วยกัน

(ก) การหมักแบบแซคคาโรไลติก (Saccharolytic)

การหมักอาหารในกลุ่มแซคคาไรด์ เช่นโอลิโกแซคคาไรด์ จุลินทรีย์ที่เกิดจากการหมักสารกลุ่มนี้ ได้แก่ Bifidobacteria และ Lactobacilli ผลิตสุดท้ายที่ได้เป็นกรดไขมันสายสั้น เช่น กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก กรดแลคติกและกรดบิวทาริก นอกจากนี้ยังมีก๊าซผลิตเกิดขึ้น (Cumming *et al*., 2001) ซึ่งกรดไขมันที่สร้างขึ้นนี้ จะถูกนำไปใช้ในรูปแบบต่างๆ ภายในร่ายกาย (ภาพที่ 1-3) กรดอะซิติกถูกนำไปใช้ในกล้ามเนื้อ กรดโพรพิโอนิกถูกส่งไปยังตับเพื่อใช้ในการสังเคราะห์พลังงานในรูปของ ATP ส่วนกรดบิวทาริกจะใช้ในการแบ่งเซลล์ของลำไส้ใหญ่ และเป็นสารสำคัญที่มีคุณสมบัติในการต้านมะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วย การหมักแบบแซคคาโรไลติกในลำไส้ใหญ่มีผลทำให้ปริมาณแบคทีเรียเพิ่มสูงขึ้น เพิ่มความนิ่มแก่อุจจาระ ช่วยในการขับถ่ายและช่วยในสังเคราะห์วิตามิน

(ข) การหมักแบบโปรติโอไลติก (Proteolytic)

การหมักสารอาหารกลุ่มโปรตีน โดยจุลินทรีย์กลุ่ม *Clostridia* และ *Bacteroides* ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักของจุลินทรีย์กลุ่มนี้ได้สารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น สารกลุ่มฟีนอลิก เอมีน และแอมโมเนีย ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง (Gibson, 2004)

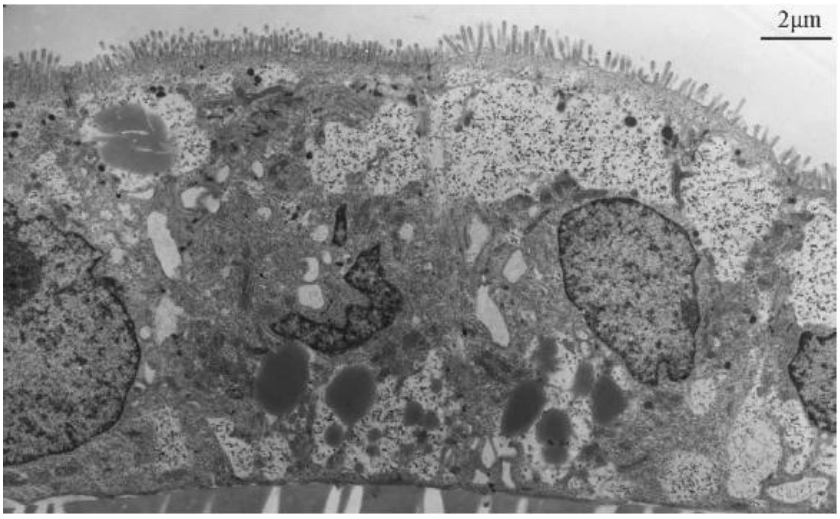


ภาพที่ 1-3 ความแตกต่างของระบบการเผาผลาญของสารอาหารที่ย่อยได้และย่อยไม่ได้ในระบบทางเดินอาหาร

ที่มา: Hirayama (2002)

การทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่

การศึกษาฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ นั้นนิยมใช้เซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 เนื่องจากเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีคุณลักษณะสำคัญของลำไส้มนุษย์ไม่ว่าจะเป็นด้านโครงสร้าง หรือด้านการทำงานที่มีการดูดซึมสารต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นยา และสารอาหารที่คล้ายคลึงกับลำไส้เล็กมนุษย์ เพราะเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 หลังจากวันที่ 6 บริเวณผิวเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงที่เรียกว่า บริเวณบรัสบอร์เดอร์ (brush border) ที่เต็มไปด้วยไมโครวิลไล ซึ่งช่วยในการดูดซึมสารอาหาร แสดงดังภาพที่ 1-4



ภาพที่ 1-4 ภาพถ่ายการเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 ที่เวลา 20 วัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิด Transmission Electron Microscopy

ที่มา: Hidalgo และคณะ (1989)

การวัดความมีชีวิตของเซลล์ (กัลยาณี และ นวลอนงค์, 2550)

ความมีชีวิตของเซลล์วัดจากการมีกิจกรรมของเซลล์ เช่น การแบ่งตัว การมีเมตาโบลิซึม ซึ่งจะระบุการเจริญของเซลล์ได้ ความมีชีวิตของเซลล์สามารถทำได้ง่ายๆด้วย dry exclusion methods ซึ่งบอกความมีชีวิตของเซลล์จากการคงสภาพดีของเมมเบรนที่ไม่ให้สีผ่านเข้าไปได้ เช่น trypan blue นอกจากนี้ยังมีสีอื่นใช้วัดความมีชีวิตของเซลล์ เช่น erythrosine B, nigrosin และ fluorescein diacetate

(ก) Lactate dehydrogenase determination เซลล์ที่สูญเสียความมีชีวิตมีกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น จากการที่เมนเบรนถูกทำลายแล้วทำให้สารโมเลกุลขนาดใหญ่สามารถเข้าและออกจากเซลล์ได้

Lactate dehydrogenase จึงเป็นเอนไซม์ที่ผ่านออกเมนเบรนของเซลล์ที่ไม่มีชีวิต ซึ่งสามารถวัดค่าได้ด้วย spectrometer ในสภาวะที่มี pyruvate และ NADH โดยวัดการลดลงของ NADH ที่ความยาวคลื่น 340 nm

$$\text{Pyruvaate} + \text{NADH} + H^{+} \xleftrightarrow{\text{LDH}} \text{lactate} + NAD^{+}$$

(ข) Adenylate energy charge ค่า energy charge เป็นดัชนีที่ใช้บอกระดับ nucleotide, AMP, ADP และ ATP ภายในเซลล์ ดังนี้

$$\text{The energy charge} = \frac{\text{ATP}+0.5\ \text{ADP}}{\text{ATP}+\text{ADP}+\text{AMP}}$$

โดย adenylate nucleotides สามารถเปลี่ยนรูปไปมาได้ (AMP ⟷ ADP ⟷ ATP) ค่านี้มีค่าระหว่าง 0-1 ตามทฤษฎี เซลล์ปกติจะมีค่า 0.7-0.9 และค่าจะลดลงจะบอกถึงการสูญเสียชีวิตของเซลล์ได้ การวัดปริมาณความเข้มข้นของ nucleotides ด้วย HPLC หรือ วัดการเรืองแสงด้วย luciferin-luciferase enzyme system ไม่สามารถทำได้ง่ายๆในการนับเซลล์เป็นประจำ แต่สามารถใช้เป็นวิธีวัดการสูญเสียความมีชีวิต จากการลดลงของพลังงานได้

(ค) อัตราการสังเคราะห์โปรตีนและนิวคลีอิค เป็นการวัดกิจกรรมของเซลล์ที่มีชีวิต โดยการบ่มเซลล์ในอาหารที่มีกรดอะมิโนหรือนิวคลีโอไทด์ที่ติดสารรังสี เช่น ^{3}H-leucine, ^{35}S-methionine หรือ tritiated thymidine (^{3}H-Tdr)

(ง) Colony-forming assay เป็นวิธีวัดความมีชีวิตของเซลล์ที่ให้ผลแม่นยำที่สุดกว่าวิธีอื่นๆ โดยการวัดความสามารถเจริญของเซลล์โดยตรง ซึ่งเซลล์ที่รู้จำนวนที่ความหนาแน่นเซลล์น้อยๆจะเกาะและเจริญบนจานให้เป็นโคโลนีได้ ดังนั้นจึงเรียกว่าวิธีนี้ว่า Colony-forming efficiency (plating efficiency) วิธีนี้ใช้เวลานาน และนิยมใช้ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ เช่น ดูความสามารถอยู่รอดของเซลล์หลังการเก็บเซลล์แช่แข็ง หรือดูความสามารถเจริญของเซลล์ที่เป็นผลจากอายุของเซลล์ได้ โดยทำการเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นที่รู้จำนวน และมีความหนาแน่นของเซลล์น้อยๆ เป็นระยะเวลาหนึ่ง เช่น 144 ชม. จากนั้น Fix และย้อมเซลล์ด้วย crystal violet และนับโคโลนีได้ ซึ่งเป็นโคโลนีที่มีการเกาะกลุ่มของเซลล์ประมาณ 16-50 เซลล์ มาคำนวณหาค่า Colony-forming efficiency ดังนี้

Colony-forming efficiency (%) = (จำนวนโคโลนี/ จำนวนเซลล์ที่ใส่) × 100

(จ) Tetrazolium assay เป็นวิธีการวัดสีที่เกิดจากกิจกรรมของเซลล์ที่มีชีวิต ด้วยการใช้ MTT (3 [4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide) ซึ่งเป็นสารสีเหลืองที่เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ dehydrogenase แล้วให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีฟ้าของ formazan โดยเซลล์มีชีวิตจะมีปริมาณ mitrochondrial dehydrogenase ในเซลล์หนึ่งๆ คงที่ ดังนั้น ปริมาณ formazan ที่เกิดขึ้นจึงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์มีชีวิต อย่างไรก็ตาม เซลล์แต่ละชนิดจะให้ผลตอบสนองต่อวิธีนี้ได้แตกต่างกัน

1.2.9 การทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์

โดยทั่วไปการทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์สามารถแบ่งได้ 3 วิธี (Zhong *et al*., 2011)

(1) การแยกด้วยวิธีการดูดซับหรือโครมาโทกราฟี

การใช้ไอออนโครมาโทกราฟีในการแยกโมโนแซคคาไรด์และไดแซคคาไรด์ โดยวิธีการนี้สามารถเพิ่มความบริสุทธิ์ของโอลิโกแซคคาไรด์ในตัวอย่างได้ถึงร้อยละ 60-70 ของตัวอย่างต่อหนึ่งรอบกระบวนการ แต่วิธีการมีข้อเสีย คือต้องใช้หลายรอบของกระบวนการในการผลิต ถึงจะได้โอลิโกแซคคา-ไรด์ที่มีความบริสุทธิ์สูงและต้นทุนของเครื่องมือที่สูง

(2) การแยกด้วยกระบวนการเมมเบรน (Membrane Process)

การใช้เมมเบรนในการทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์ เป็นการแยกโมโนแซคคาไรด์และไดแซคคา-ไรด์ที่อยู่ในตัวอย่าง โดยให้เหลือน้ำตาลที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ใหญ่กว่าดังแสดงในตารางที่ 1-5 โดยวิธีนี้สามารถเพิ่มปริมาณความบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์ที่มีในตัวอย่างได้ถึงร้อยละ 80 ของตัวอย่าง แต่วิธีการนี้ยังมีข้อเสียเปรียบในเรื่องของ ต้นทุนที่สูงของเครื่องมือ

ตารางที่ 1-5 การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีเมมเบรนในกระบวนการทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์จากแหล่งธรรมชาติ

Substrate	Type of Separation	Product	Temperature	Pressure	% Purify	Reference
Caprine milk	Purification of oligosaccharides and removal of lactose by NF	Milk-oligosaccharides	Not specified	20-40 bar	> 50%	Sarney และคณะ (2000)
Commercial mixture of saccharides from yacon	Concentration and purification by UF and NF	Oligosaccharides of DP from 3 to 10	Not specified	0.52bar (UF) and 5 bar (NF)	67% -98%	Olano และคณะ (2001)
Liquors from almond shells auto hydrolysis	Separation of lignin-related impurities by UF	Xylo-oligosaccharides	25 °C	2.6-9 bar	90%	Li และคณะ (2004)
Commercial mixture of GOS	Separation of di- and mono-saccharides by NF	Raffinose, sucrose and fructose	25-60 °C	5-30 bar	81 -98%	Goulas และคณะ (2002)

(3) การแยกด้วยวิธีทางชีวภาพ

เป็นกระบวนที่อาศัยจุลินทรีย์ในการย่อยสลายโมโนแซคคาไรด์และไดแซคคาไรด์ อาศัยกระบวนการเผาผลาญของเชื้อจุลิทรีย์ โดยที่เชื้อจุลินทรีย์จะไม่มีผลต่อปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีในตัวอย่าง โดยที่เชื้อจุลินทรีย์ที่นิยมใช้กัน คือ *Z. mobilis* และ *S. cerevisiae* เนื่องจากเชื้อทั้งสองชนิดเจริญได้ในน้ำตาลที่ช่วงแคบ กล่าวคือ สามารถเจริญได้ในน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลซูโครส เป็นต้น ซึ่งข้อดีของวิธีนี้ คือ ต้นทุนการผลิตที่ต่ำ และสามารถนำเชื้อกลับมาใช้ใหม่ได้ ดังนั้นงานวิจัยจึงเลือกวิธีการทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์ ด้วยวิธีการทางชีวภาพ

เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

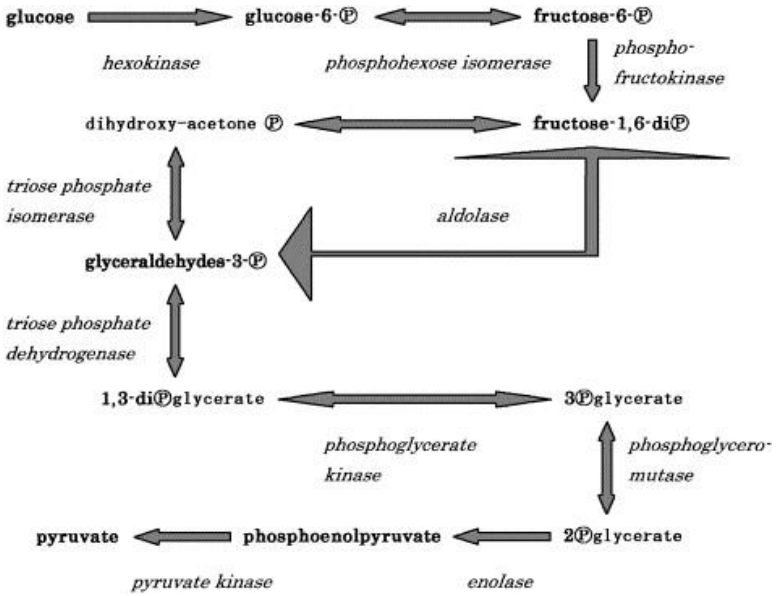
เซลล์มีรูปร่างกลม (spheroidal) รูปทรงไข่ (ellipsodal) ทรงกระบอก (cylindrical) หรือทรงยาว (elongate) สืบพันธุ์ด้วยการแตกหน่อแบบ multilateral budding อาจมีการสร้าง pseudomycelium แต่ไม่มีการสร้าง true mycelium (เป็นเส้นใยซึ่งมีลักษณะคล้ายเส้นใยของเชื้อราและเซลล์แต่ละเซลล์ที่ประกอบขึ้นมาเป็นเส้นใยไม่ได้เกิดขึ้นมาจากการแตกหน่อ)

ยีสต์สายพันธุ์นี้แบ่งออกเป็น 2 ชนิดตามลักษณะการหมักคือ Bottom yeast ซึ่งจะอยู่ใต้ผิวหน้าของน้ำหมักในระหว่างการหมัก และเมื่อการหมักสิ้นสุดจะตกตะกอนอยู่ที่ก้นถังหมัก ส่วน Top yeast นั้นจะเจริญเป็นฟองที่ลอยเป็นฝ้าอยู่ที่ผิว ของน้ำหมักในระหว่างการหมัก แต่เมื่อการหมักลดลงก็จะตกลงก้นถังเช่นกัน (วราวุฒิ ครูส่ง, 2538)

ยีสต์สายพันธุ์นี้ถูกใช้เป็น bread yeast (ยีสต์ขนมปัง) และ brewers' yeast (ยีสต์ทำเบียร์) ตามปกติใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ ไวน์ เอนไซม์อินเวอร์เตส (invertase) กลีเซอรอล และแอลกอฮอล์ โดยที่เชื้อยีสต์สามารถใช้น้ำตาลเฮกโซส (hexose) ได้ทั้งในรูปเชิงเดี่ยวและเชิงซ้อน เช่น น้ำตาลกลูโคส (glucose) น้ำตาลฟรุกโตส (fructose) น้ำตาลกาแลคโตส (galactose) น้ำตาลแมนโนส (mannose) น้ำตาลซูโครส (sucrose) และน้ำตาลแรฟฟิโนส (raffinose) เป็นต้น การหมักแอลกอฮอล์เป็นกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นในไซโทพลาสซึมของเซลล์ยีสต์ โดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในการเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นแอลกอฮอล์กับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic condition) ซึ่งในขั้นตอนแรกกลูโคสจะเปลี่ยนแปลงไปตามวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis) หรือ Embden-Myerhof-Parnas pathway (EMP pathway) จนได้ ไพรูเวท (pyruvate) และจากนั้นก็จะเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ (Paturau, 1989)

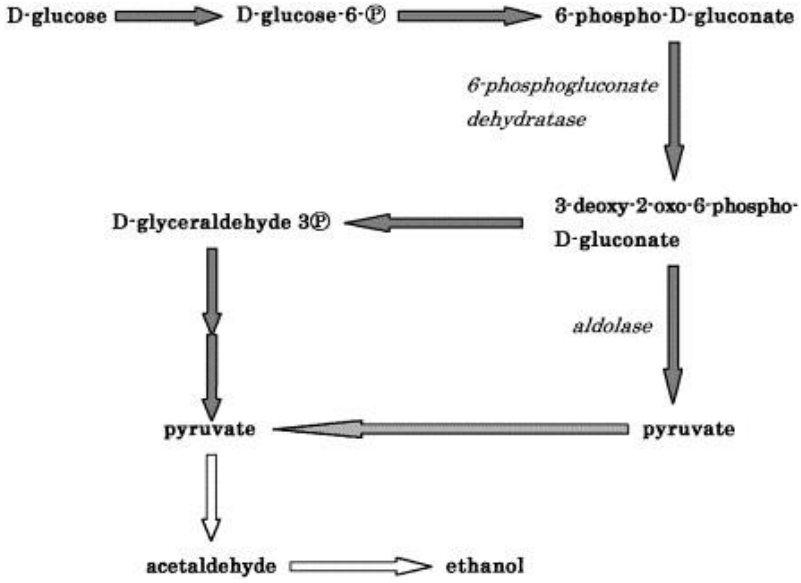
ในขั้นตอนการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นไพรูเวท เชื้อกลุ่ม anaerobic microorganism พบว่าใช้ EMP pathway เชื้อในกลุ่ม facultative aerobic ใช้ EMP และ Hexose monophosphate pathway (HMP pathway) และเชื้อ strict aerobic ใช้เฉพาะ Entner-Doudoroff pathway (ED pathway) ดังแสดงในภาพที่ 1-

5 และ 1-6 หลังจากได้ไพรูเวทแล้วก็จะอาศัยการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวทดีคาร์บอกซิเลส (pyruvate decarboxylase) เพื่อเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นอะซิตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) และเปลี่ยนเป็นเอทานอลโดยการทำงานของเอนไซม์แอลกอฮอล์ไฮโดรจีเนส ซึ่งมี NADH เป็นตัวเร่งปฏิกริยา



ภาพที่ 1-5 วิถีของปฏิกิริยา Embden-Meyerhof-Parnas

ที่มา: Bai และคณะ (2007)



ภาพที่ 1-6 วิถีของปฏิกิริยา Entner-Doudoroff

ที่มา: Bai และคณะ (2007)

Gay-Lussac และ Thenard (1810) ได้เสนอรายงานเกี่ยวกับปริมาณของสารต่างๆ ที่ได้จากการหมักน้ำตาลโดยยีสต์โดยการคำนวณจากสมการต่อไปนี้

$C_6H_{12}O_6$	⟶	$2C_2H_5OH$	$+2CO_2$
Glucose		ethanol	Carbon dioxide
180		92	88

สรุปได้ว่าในการหมักเอทานอลจากกลูโคสนั้น กลูโคส 1 กรัมให้เอทานอล 0.511 กรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 0.489 กรัม นั้นคือมีค่า theoretical yield สำหรับการผลิตเอทานอลเท่ากับ 51.1% แต่เนื่องจากบางส่วนน้ำตาลถูกยีสต์ใช้เพื่อการเจริญ และบางส่วนถูกเปลี่ยนไปเป็นผลผลิตพลอยได้บางชนิด เช่น กลีเซอรอล (glycerol) ซัคซิเนท (succinate) และ higher alcohol หรือ fuel oil ทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้ต่ำกว่าผลผลิตทางทฤษฎีเสมอ ในทางปฏิบัติเอทานอลที่ได้อยู่ในช่วงไม่เกิน 90-95% ของทฤษฎี โดยผลผลิตพลอยได้ที่สร้างขึ้นเกิดจากการใช้สับสเตรท 4-5% และถ้าสามารถป้องกันไม่ให้เกิดการสร้างผลผลิตพลอยได้เหล่านั้นแล้วจะได้เอทานอลเพิ่มขึ้น 2.7%

ปัจจัยที่มีผลต่อการหมัก (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2540)

1. เอทานอล: การเจริญและการหมักเอธานอลจะถูกยับยั้งด้วยเอธานอลที่ความเข้มข้น 1-2% โดยน้ำหนัก ทำให้การเจิญของยีสต์ลดลง และการเจริญของยีสต์จะหยุดเมื่อมีเอธานอล 4.7-7.8% โดยน้ำหนัก

2. ความเข้มข้นของสับสเตรท: การใช้สับสเตรทความเข้มข้นสูงมีผลยับยั้งการเจริญ และการหมักเอธานอล เกิดจากแรงดันออสโมซิส ซึ่งเซลล์ของยีสต์จะเกิดพลาสโมไลซิส เมื่ออยู่ในน้ำตาลความเข้มข้นสูงกว่า 14% โดยน้ำหนัก สำหรับความเข้มข้นของน้ำตาลที่ยับยั้งการหมักที่แท้จริงนั้นเป็นลักษณะประจำสายพันธุ์ ทั้งนี้ถ้าน้ำตาลมีความเข้มข้นสูงกว่า 14% โดยน้ำหนัก อัตราการหมักเริ่มต้นลดลง แต่ผลการยับยั้งของน้ำตาลความเข้มข้นสูงนี้จะน้อยกว่าผลของเอทานอล

3. ธาตุอาหารและโคแฟคเตอร์: ยีสต์ต้องการธาตุอาหารเพื่อการเจริญและการหมักเอธานอล ความต้องการธาตุอาหารที่ใช้เพื่อการเจริญเป็นสัดส่วนกับองค์ประกอบหลักของ ธาตุอาหารเหล่านี้ เช่น คาร์บอน ออกซิเจน ไนโตรเจน และไฮโดรเจน นอกจากนี้ยังต้องการ ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ โปแตสเซียม และแมกนีเซียม เพื่อสังเคราะห์องค์ประกอบรอง และต้องการแมงกานีส โคบอลท์ ทองแดง เหล็กและสารอาหารบางชนิด คือ กรดอะมิโน กรดนิวคลีอิค และวิตามิน ในปริมาณที่น้อยมาก

4. ออกซิเจน: ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็คตรอนขั้นสุดท้ายในลูกโซ่การหายใจ นอกจากนี้ออกซิเจนยังทำหน้าที่เป็น growth factor ของยีสต์ โดยเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์กรดไขมันที่มีพันธะคู่

รวมทั้ง oleic acid และ linoleic acid และเออร์กอสเตอรอล ซึ่งนอกจากช่วยส่งเสริมการเจริญภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจนของยีสต์แล้ว ยังเพิ่มความทนเอธานอลของยีสต์ด้วย

5. คาร์บอนไดออกไซด์: คาร์บอนไดออกไซด์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน ในที่ความดันสูงกว่าบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ยับยั้งการเจริญและการหมักรุนแรงมากขึ้น เช่นเดียวกับเมื่ออาหารมี pH ต่ำ และมีเอธานอลความเข้มข้นสูง เพราะคาร์บอนไดออกไซด์มีอิทธิผลต่อองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบางอย่างของกิจกรรมเอนไซม์ เปลี่ยนแปลงสภาพการซึมผ่านได้ และการขนส่งของตัวถูกละลาย

Crittenden และ Playne (2002) ได้ใช้แบคทีเรีย *Z. mobilis* แบบตรึงเซลล์ในการกำจัดน้ำตาลโมเลกุลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส จากโอลิโกแซคคาไรด์ที่ใช้กันในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น Fructo-, malto-, isomalto-, gentio-oligosaccarides และ inulin พบว่า แบคทีเรีย *Z. mobilis* สามารถกำจัดน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครสที่ผสมอยู่ได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 12 ชั่วโมง และในการหมักจะได้ผลิตภัณฑ์คือ เอธานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนการหมักอินนูลินผสม ยังจะได้ซอร์บิทอลนอกเหนือจากได้เอธานอล และคาร์บอนไดออกไซด์

Wichienchot และคณะ (2010) ได้สกัดสารโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกรพันธุ์ขาวและพันธุ์แดงด้วยสารละลายเอธานอลที่ความเข้มข้น 80% ที่อุณหภูมิห้อง ได้น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตสและโอลิโก-แซคคาไรด์ จากนั้นนำมาทำบริสุทธิ์ด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* BCC 12652 เป็นเวลา 18 ชั่วโมงผลปรากฏว่า *S. cerevisiae* BCC 12652สามารถกำจัดน้ำตาลกลูโคส และฟรุกโตสได้หมด

เอกสารอ้างอิง

กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์. นวลอนงค์ จิระกาญจนากิจ. 2550. ความรู้พื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 1 มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม.

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

วราวุฒิ ครูส่ง. 2538. จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2540. ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี. ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

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

สุรพงษ์ โกสิยะจินดา. 2540. ผลแก้วมังกร. เคหะการเกษตร. 21(10):46.

Al-Tamimi, M. A. H. M., Palframan, R. J. Cooper, J. M., Gibson, G.R. and Rastall, R. A. 2006. *In vitro* fermentation of sugar beet arabinan and arabino-oligosaccharides by the human gut microflora. J Appl. Microbial. 100: 407-414.

Ariffin, A. A., Bakar, J., Tan, C. P., Rahman, R. A., Karim, R., and Loi, C. C. 2008. Essential fatty acids of pitaya (dragon fruit) seed oil. J. Food Chem. 114: 561–564.

Bai, F. W., Anderson, W. A. and Moo-Young, M. 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. Biot. Adv. 26: 89-105.

Bouhnih, Y., Flourie, B., D' Agay-Abensour, L., Pochart, P., Gramet, G., Durand, M. and Rambaud, J. C. 1997. Administration of transgalacto-oligosaccharides increases faecal bifidobacteria and modifies colonic fermentation metabolism in healthy humans. J. Nutr. 127: 444-448.

Chonan, O., Matsumoto, K. and Watanuki, M. 1995. Effect of galactooligosaccharides on calcium absorption and preventing bone loss in ovariectomized rats. Biosci. Biotechnol. Biochem. 59: 236-239.

Conway, P.L. 2001. Prebiotic and human health: the state of the art and further perspectives. Food & Nutri. Res. 45: 13-21.

Crittenden, R. and Playne, M. 2002. Purification of food-grade oligosaccharides using immobilised cells of *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol and Biot. 3: 297-302.

Cummings, J. H., Macfarlane. G. T. and Englyst, H. N. 2001. Prebiotic digestion and fermentation. Am. J. Clin. Nutr. 73 (Suppl.): 415S-240S.

Egert, M., de Graaf, A. A., Smidt, H., de Vos, W.M. and Venema, K. 2006. Beyond diversity: functional microbiomics of the human colon. Trends Microbiol. 14: 86-91.

Favier, C. F. E. E., Vaughan, W. M. De Vos and Akkermans, A. D. L. 2002. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates Appl. Envi Microbial 68: 219-226.

Fooks, L. J., Fuller, R. and Gibson, G. R. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. Int. Dairy J. 9: 53-61.

Fuller, R. 1993. Prebiotic food current use and future developmenteds. Int. Food Ingred. 3: 23-26.

Gay, L. and Thenard. 1810. Notiz der Herrn Gay-Lussac und Thenard von den Aufsätzen, welche sie, auf Veranlassung der Metallisirung der Alkalien, vom 7. März 1808 bis zum 27. Februar 1809 in dem National-Institute vorgelesen haben. Annalen der Physik 35:1-7.

George, T., Macfarlane, G. T. and Cummings, J. H. 1999. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health. BMJ. 318: 999-1003.

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.

Gibson, G. R. 2004. Fiber and effects on probiotic (the prebiotic concept). Clin. Nutr. Suppl. 1: 25-31.

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

Gibson, G. R. and Wang, X. 1994. Regulatory effect of *bifidobacteria* on the growth of other colonic bacteria. J. Appl. Microbiol. 77: 412-420.

Goulas, A. K., Kapasakalidis, P.G., Sinclair, H.R. and Grandisor, A.S. 2002. Purification of oligosaccharides by nanofiltration. J. membrane sci 209: 321-335.

Harmsem, H. J., Raangs, G. C., He T., J. E. and Welling, G. W. 2002. Extensive set of 16s rRNA-based prodes for detection of bacteria in human facses. Appl. Envi. Microbiol. 68: 2982-2990.

Hidalgo, I. J., Raub, T. J. and Borchardt, R. T. 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. Gastroenterology. 96: 736-749.

Hirayama, M. 2002. Novel physiological functions of oligosaccharides. Pure Appl. Chem. 74: 1271-1279.

Hylla, S., Gostner, A. and Dusel, G. 1998. Effect of resistant starch on the colon in healthy volunteers: positive implication for cancer prevention. Am. J. Clinic Nutri. 67: 139-142.

Ito, M., Deguchi, Y., Miyamori, A., Matsumoto, K., Kikuchi, H., Kobayashi, Y., Yajima, T. and Kan, A. 1990. Effects of administration of galactooligosaccharides on the human fecal microflora, stool weight and abdominal sensation. Microb. Ecol. Health and Disease. 3: 285-292.

Johansen, H. N., Glitso, 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. Agri. Food. Chem. 44: 1470-1474.

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

Kawaze, K., Suzuki, T., Kiyosawa, I., Okongi, S., Kawashima, T. and Kuboyama, M. 1981. Effects on composition of infant formulas on the intestinal microflora of infants. Biffidobacteria microflora. 2: 25-31.

Kolida, S., Tuohy, K. and Gibson, G. R. 2000. The human gut flora in nutrition and approaches for its dietary modulation. Nutrition Bulletin. 25: 223–231.

Kim, S., Kim, W. and Hwang, I. K. 2003. Optimization for the extraction and purification of oligosaccharides from defatted soybean meal. Internal. J. Food Sci. & Technol. 38: 337-342.

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

Lee, H. W., Park, Y. W., Jung, J. S. and Shin, W. S. 2002. Chitosan oligosaccharides, dp 2-8, have prebiotic effect on the *Bifidobacteria bifidium* and *Lactobacillus sp.* Food Microbiol. 8: 319-324.

Li, W., Li, j., Chen, T., Zhao, Z. and Chen, C. 2004. Study on nanofiltration for purifying fructo-oligosaccharides: I. operation modes. J. Membrane Sci. 245: 123-129.

Manning, T. S. and Gibson, G. R. 2004. Prebiotics. Best Practice Res: Clinic. Gastroenterol. 18: 287-298.

McBain, G. T., Macfarlane, S. and Gibson, G. R. 1998. Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. Microb. Ecol. 35: 180–187.

Morton, J. F. 1987. Fruits of warm climates. Straubary Pear. Florida Flair Books Miami. Vol. 505 p. 347-348.

Morishita, Y. and Konishi, Y. 1994. Effects of high dietary cellulose on the large intestinal microflora and short-chain fatty acids in rats. Letters in Appl Microbio., 19: 433–435.

Morotomi, M., Guillem, J. G., Logerfo, P. and Weinsten, I. P. 1990. Production of diacylglycerol, an activator of protein kinase C by human intestinal microflora. Cancer Res. 50: 3595-3599.

Neeser, J. R. and German, J. B. 2004. Prebiotics from Lactose, Sucrose, Starch, and Plant Polysaccharides. *In* Bioprocesses and Biotechnology for Functional Foods and Nutraceuticals. p. 100-102. Marcel Dekker, Inc. The United States of America.

Olano-Martin, E., Mountzouris, K. C., Gibson, G. R. and Rastall, R. A. 2001.Continuous Production of Pectic Oligosaccharides in an Enzyme Membrane Reactor. J. food sci. 66: 966-971.

Palframan, R., Gibson, G. R. and Rastall, R. A. 2003. Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. Lett. Appl. Microbiol. 37: 281-284.

Paturau, J. M. 1989. Sugar series. By-Product of the cane sugar. Introduction to their industrial utilition. 3 rd ed. Amsterdam: Elsevier.

Paul, B. 1997. Effect of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine (Online). Available *http://medherb.com.* (3 October 2012)

Pedreschi, R., Campos, D., Noratto, G., Chirinos, R. and Crisneros-Zevallos, L. 2003. Andean Yacon Roots (*Smallanthus sochifolius* Poepp. Endl) fructooligosaccharides as a potential novel source of prebiotic J. Agri. Food Chem. 51: 5278-84.

Rastall, R. A. 2000. Emerging prebiotics. *In* LFRA Ingredients Handbook: Prebiotics and Probiotics. Gibson, G. R. and Angus, F. (eds). Leatherhead Publishing, Surrey. p. 69-83.

Rastall, R. A. and Bucke, C. 1992. Enzymatic synthetis of oligosaccharides. Biotechnol. Gen. Eng. Rev. 10: 253-281.

Reddy, B.S. 1998. Prevention of colon cancer by pre-and probiotic: evidence from laboratory studies. Brit. J. Nutr. 80: S219-S223.

Saito, Y., Takano, T. and Rowland, I. 1992. Effects of soybean oligosaccharides on the human gut microflora in *in vitro* culture. Microb. Ecol. Health Disease. 5: 105-110.

Sarney, D. B., Hale, C., Frankel, G. and vulfson, E. N. 2000. A novel approach to the recovery of biologically active oligosaccharides from milk using a combination of enzymatic treatment and nanofiltration. Biotechol bioeng 69: 461-467.

Simon, G. L., and Gorbach, S. L. 1984. Intestinal flora in health and disease. J. Gastroenterol. 86: 174-198.

Tomomatsu, H. 1994. Health effect of oligosaccharides. Food Technol. 48: 61-65.

Tuohy, K. M., Rouzaud, G. C. M., Brück, W. M. and Gibson, G. R. 2005. Modulation of the human gut microflora towards improved health using prebiotics – assessment of efficacy. Curr. Pharm. Design. 1: 75-90.

Wichienchot, S., Jatupornpipat, M. and Rastall, R. A. 2010. Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. Food Chem. 3: 850-857.

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 sounthern Thailand. Songklanakarin J. Sci Technol. 33: 517-523.

Xiaoli, X., Yang L., Hua, S., L., W., Sun, Y., Ma, H., Zhang, J., and Zeng, X. 2008. Determination of oligosaccharide contents in 19 cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L) seeds by high performance liquid chromatography. Food Chem. 111: 215-219.

Zhong, Z., Zhu, J., Li, X. L., Xu, X. Y. and Mu, X. Method for the removal of monosaccharaides in oligosaccharides production. Patent no.: US 7,906,314 B2 (15 March 2011)

บทที่ 2

การสกัดสารพรีไบโอติกจากเนื้อแก้วมังกร

2.1 บทนำ

พรีไบโอติกเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีบทบาทสำคัญและได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย และเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีบทบาทสำคัญในการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียโพรไบโอติก ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ ช่วยลดจำนวนแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ได้ ช่วยเพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุในร่างกาย ต่อต้านมะเร็ง และช่วยรักษาระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดให้เป็นปกติ เป็นต้น (Gibson and Rastall, 2006) นอกจากนี้ สารพรีไบโอติกได้ถูกนำไปใช้ในการเติมในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น ไอศกรีม โยเกิร์ต ผลิตภัณฑ์อาหารหวาน ได้แก่ เยลลี่ พุดดิ้ง เป็นต้น (Mussatto *et al*., 2007) โดยทั่วไปสารพรีไบโอติกที่ได้จากมา พืชหลายชนิดเช่น หัวหอม กล้วย หน่อไม้ฝรั่ง หัวแก่นตะวัน แก้วมังกร ถั่วหรือธัญพืชต่างๆ พบว่าสามารถสังเคราะห์ได้เองตามธรรมชาติ ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ Wichienchot และคณะ (2010) ได้ศึกษาการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกรด้วยสารละลายเอทานอลและน้ำ ดังนั้นในบทนี้ มุ่งเน้นทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ ด้วยน้ำ และร่วมกับเอนไซม์เพคติเนส ให้ได้ในปริมาณ โอลิโกแซคคา-ไรด์ที่มากที่สุด และใช้ต้นทุนในการผลิตที่ต่ำ ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิตสารจำนวนมากเพื่อนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม

2.2 บทตรวจเอกสาร

แก้วมังกรมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hylocereus undatus* (Haw) เป็นต้นไม้ประเภทเลื้อยอยู่ในวงศ์ *Caetaceae* หรือกระบองเพชร โดยทั่วไปแก้วมังกร มี สามพันธุ์ด้วยกัน คือ แก้วมังกรแดง (*Hylocereus polyrhizus*), แก้วมังกรเหลือง (*Hylocereus megalanthus*) และ แก้วมังกรขาว (*Hylocereus undatus*) (Ariffin *et al*., 2008) ในประเทศไทย สายพันธุ์ที่ปลูกกันอย่างแพร่หลาย คือ แก้วมังกรแดง และแก้วมังกรขาว นิยมส่งออกในรูปของผลไม้ตัดแต่ง ในประเทศสิงคโปร์ ฮ่องกง ไต้หวัน ฟิลิปปินส์ และ มาเลยเซีย (Hoa *et al*., 2006)

เนื้อแก้วมังกร ประกอบด้วยสารอาหารหลายชนิดเป็นส่วนประกอบ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน วิตามิน และเกลือแร่ต่างๆ เช่น วิตามินซี วิตามินบี 1 บี 2 บี 3 แคลเซียม ฟอสฟอรัส และธาตุเหล็ก ในส่วนของคาร์โบไฮเดรต ประกอบด้วย ใยอาหาร พอลิแซคคาไรด์ เช่น แป้ง และ

เพคติน (Nur'aliaa *et al*., 2010) ในปัจจุบัน นิยมบริโภคแก้วมังกรในรูปของผลไม้ตัดแต่ง และน้ำแก้วมังกร ซึ่งในน้ำแก้วมังกรนั้น ผู้ผลิตในระดับอุตสาหกรรม พบปัญหาว่า น้ำแก้วมังกร มีตะกอนขุ่นในน้ำ และหนืด ดังนั้นในทางอุตสาหกรรม นิยมใช้ เอนไซม์เพคติเนส ซึ่งมีสามารถไฮโดรไลซ์โมเลกุลของพอลิแซคคาไรด์และเพคตินที่มีอยู่ในน้ำแก้วมังกร (Sin *et al.,* 2006) มีผลทำให้น้ำแก้วมังกรมีความใส ไม่ตกตะกอน และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยได้โมเลกุลที่มีขนาดเล็กลง เช่น โอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาลโมเลกุลคู่ และโมเลกุลเดี่ยว เป็นต้น

พรีไบโอติก คือ ส่วนประกอบของอาหารที่ไม่สามารถถูกย่อย และถูกดูดซึมในทางเดินอาหารส่วนบน แต่จะมีผลในการส่งเสริมสุขภาพของผู้ที่กินเข้าไปโดยเลือกที่จะกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในร่างกายและยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค (Fooks *et al.*, 1999) ผลไม้ และผักหลายชนิด มีรายงานว่า เป็นแหล่งของสารพรีไบโอติก (Gibson and Rastall, 2006) ซึ่งปัจจุบันนี้ หัวแก่นตะวัน และหัวบุก เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตสารพรีไบโอติกในกลุ่ม โอลิโกฟรุกโตส ซึ่งให้ผลผลิตอยู่ในช่วง 18-20% (Wichienchot *et al*., 2010)

Wu และคณะ (2006) ได้ศึกษาปริมาณสารฟีนอลิก กิจกรรมการต้านสารอนุมูลอิสระ และการเจริญของเซลล์เนื้องอกของแก้วมังกรพันธุ์เนื้อสีแดง ซึ่งพบว่า ทั้งเนื้อและเปลือกแก้วมังกรมีสารฟีนอลิกและมีฤทธิ์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และยังพบว่าเปลือกแก้วมังกรส่งเสริมการยับยั้งการเจริญของเนื้องอก

Ekvall และคณะ (2006) ได้ทำการทดลองเพื่อหาราฟีโนส-โอลิโกแซคคาไรด์ ใน Laguminous vine peas โดยใช้สารละลายเอทานอลเป็นตัวทำละลาย ความเข้มข้นของเอทานอลที่ใช้ คือ ร้อยละ 50 และ 80 ปริมาตรต่อปริมาตร อุณหภูมิในการสกัด คือ อุณหภูมิห้อง (21 องศาเซลเซียส) กับอุณหภูมิจุดเดือด (83 องศาเซลเซียส) เวลาในการสกัดเป็น 15, 30 และ 60 นาที ศึกษาผลของความเข้มข้นของเอทานอลต่อประสิทธิภาพในการสกัดโดยควบคุมอุณหภูมิในการสกัดเป็น 21 องศาเซลเซียส เวลาในการสกัดเป็นเวลา 30 นาที ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อประสิทธิภาพในการสกัดโดยควบคุมความเข้มข้นของเอทานอลเป็นร้อยละ 50 ปริมาตรต่อปริมาตร เวลาในการสกัดเป็น 30 นาที และศึกษาผลของเวลาในการสกัดต่อประสิทธิภาพในการสกัด โดยควบคุมความเข้มข้นของเอทานอลเป็นร้อยละ 50 ปริมาตรต่อปริมาตร อุณหภูมิในการสกัด 21 องศาเซลเซียส โดยจากผลการทดลองพบว่า ผลที่ได้ของโอลิโกแซคคาไรด์ มีค่าโดยเฉลี่ยประมาณ 2 เท่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 50 เปรียบเทียบเอทานอลร้อยละ 80 ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับโอลิโกแซคคาไรด์ ทั้งสามชนิดคือ ราฟีโนส สตาคีโนส และ เวอร์บาสโคส ยกเว้น เวอร์บาสโคส ที่ผลได้จะใกล้เคียงกันกับการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 50 และ 80 และอุณหภูมิในการสกัดมีผลต่อผลได้ของราฟีโนส-โอลิโกแซคคาไรด์ น้อยมาก เมื่อสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 50 การ

เพิ่มอุณหภูมิอาจจะเร่งการสกัด ราฟฟีโนส โอลิโกแซคคาไรด์ แต่การดำเนินการที่จุดเดือดอาจส่งผลกับความเข้มข้นของเอทานอลได้และยากต่อการควบคุมการก่อให้เกิดโปรตีน และผลของเวลาในการสกัดพบว่า เมื่อใช้เวลาในการสกัด 15 นาที ให้ผลได้ต่ำกว่าที่ 30 และ 60 นาที นั่นคือสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดที่อุณหภูมิห้อง (21 องศาเซลเซียส) เวลาในการสกัด 30 นาที โดยความเข้มข้นของเอทานอลเป็นร้อยละ 50 และเพิ่มความเข้มข้นเอทานอลเป็นร้อยละ 80 ทำให้ผลได้ลดลง

Siddeshwar และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาการคัดเลือกและหาปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ในผลไม้ ผัก และรากพืช โดยการสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า แครอท กระเจี๊ยบ หัวหอม กระเทียม บีทรูท มันแกว ฝรั่ง แอปเปิ้ล มะเขือเทศ และกล้วย เป็นแหล่งพรีไบโอติกที่ดีในการนำมาสกัดในเชิงการค้า และพบว่าการอบแห้งไม่มีผลต่อกระบวนการ enzymatic hydrolysis ของโอลิโกแซคคาไรด์แต่ละชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างสด

Wichienchot และคณะ (2010) ได้ศึกษาการสกัดสารพรีไบโอติกจากเนื้อแก้วมังกร พันธุ์เนื้อสีขาว ด้วยเอทานอลเข้มข้น 80 และ 20 เปอร์เซ็นต์ และน้ำ พบว่าการสกัดที่ใช้สารละลายเอทานอลเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) ในปริมาณโอลิโกแซคคาร์สูงสุด คือ 27.40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเปียก และมีน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดที่ได้ คือ 275-275, 448-500 และ 787-911 ดอลตัล

Wichienchot และคณะ (2011) ได้ศึกษาแหล่งพรีไบโอติกจากพืชไทยโดยพิจารณาจากปริมาณสารพรีไบโอติกและเส้นใยที่ละลายน้ำได้ (soluble dietary fiber) ในพืชที่เจริญและมีการบริโภคในบริเวณภาคใต้ พบว่าในจำนวนพืชที่ถูกคัดเลือกทั้งหมด 13 ชนิด เนื้อขนุนพันธุ์ทองประเสริฐที่สกัดด้วยเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 95 สามารถสกัดสารได้ปริมาณสูงสุด โดยอัตราส่วนที่เหมาะสมของตัวอย่างต่อตัวทำละลายคือ 1:2 ขนาดตัวอย่างที่เหมาะสมคือ 0.5×0.5×0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร อุณหภูมิในการสกัดที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิห้อง โดยสารสกัดที่ได้คิดเป็นร้อยละ 15.70 ของน้ำหนักเปียก ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของสารเท่ากับ 731.11 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียก ประกอบด้วยน้ำตาลฟรุกโตส กลูโคสและซูโครสเท่ากับ 270.25, 193.50 และ 267.36 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเปียก ตามลำดับ และมีปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้ต่อปริมาณพอลิแซคคาไรด์ในตัวอย่างเท่ากับ 500.86 มิลลิกรัมต่อกรัม

2.3 วัตถุประสงค์การทดลอง

เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกรด้วยน้ำและเอนไซม์เพคติเนส

2.4 วัสดุและอุปกรณ์

2.4.1 วัตถุดิบ

แก้วมังกรพันธุ์เนื้อสีขาวที่ใช้ในงานวิจัย ซื้อจากเกษตรกรในอำเภอเมืองหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา โดยควบคุมผลของความหลากหลายของวัตถุดิบด้วยการเก็บเกี่ยวแก้วมังกรที่อายุ 45 วัน

2.4.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต/เกรด/ประเทศ
1. Glucose	Sigma/ Analytical/ Germany
2. Fructose	Sigma/ Analytical/ Germany
3. Maltohexose	Sigma/ Analytical/ Germany
4. Pectinase	Sigma/ Analytical/ Germany
5. Sucose	Sigma/ Commercial/ Germany

2.4.3 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการทดลอง

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต/ เกรด/ ประเทศ
1. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น BP2100S	Satorius/ USA
2. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP221S	Satorius/ USA
3. เครื่องผสมสาร (Vortex Mixer)	Labnet/USA
4. Vial ขนาด 20 มิลลิลิตร	-
5. ไมโครปิเปต (ขนาด 10-100 ไมโครลิตร และ 100-1000 ไมโครลิตร)	Gilson/ France
6. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WB 14	Memmert/USA
7. เครื่อง HPLC	Agilent/ 1200s/ Germany
8. ถังสกัดแบบกะ	-
9. ใบพัดหมุนชนิด 4 แฉก	-

2.5 วิธีการทดลอง

2.5.1 ศึกษาองค์ประกอบภายในเนื้อแก้วมังกร

นำเนื้อแก้วมังกรพันธุ์เนื้อสีขาวมา 50,000 กรัมแล้วมาหัน/ สับเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1×1 นิ้วแบ่งตัวอย่างบางส่วน มาศึกษาองค์ประกอบทางเคมีภายในเนื้อแก้วมังกร การทดลองละ 3 ซ้ำ (ปริมาณความชื้น เถ้า โปรตีน เยื่อใย ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตตามวิธี A.O.A.C. (2000) แล้วนำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นผลไม้ บรรจุใส่ในถุงซิป แล้วนำเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรอศึกษาในตอนต่อไป

2.5.2 การสกัดสารพรีไบโอติกจากเนื้อแก้วมังกรด้วยน้ำ

ในการทดลองนี้ใช้แผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลองละ 3 ซ้ำ โดยเลือกสภาวะที่ให้ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์สูงที่สุด นำไปศึกษาตอนต่อไป และวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ ด้วยคอมพิวเตอร์โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชัน 13.0

2.5.2.1 ศึกษาผลของอัตราส่วนของเนื้อแก้วมังกรและน้ำต่อปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์

นำตัวอย่างเนื้อแก้วมังกร ปริมาณ 200 กรัม ที่ได้เตรียมจากตอนที่ 2.5.1 มาเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนของเนื้อแก้วมังกรต่อน้ำเท่ากับ 1:2, 1:5 และ 1:10 กรัมต่อปริมาตรในถังสกัดแบบกะ ซึ่งมีความจุไม่น้อยกว่า 3 ลิตร มีครีบป้องกันการหมุนวน ใบพัดหมุนชนิด 4 แฉก ความเร็วรอบในการสกัด คือ 250 ± 5 รอบ/นาที และสกัดนานเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 85±2 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาที่กำหนด สุ่มตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณ กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส และโอลิโกแซคคาไรด์ ด้วยเทคนิค High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) แล้วเลือกอัตราส่วนของเนื้อแก้วมังกรต่อน้ำที่ให้ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์สูงสุดนำไปศึกษาในตอน 2.5.2.2 ต่อไป

2.5.2.2 ศึกษาผลของอุณภูมิของการสกัดด้วยน้ำต่อปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์

สภาวะที่ดีที่สุดของการศึกษาอัตราส่วนของเนื้อต่อน้ำที่ให้ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์สูงสุดจากตอนที่ 2.5.2.1 นำมาศึกษาผลของอุณหภูมิของการสกัดต่อปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากเนื้อแก้วมังกรที่อุณหภูมิ 30±2, 50±2 และ 85±2 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 ชั่วโมง สารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณ กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส และโอลิโกแซคคาไรด์ ด้วยเทคนิค HPLC แล้วเลือกสภาวะที่ให้ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์สูงสุดนำไปศึกษาในตอนต่อไป

2.5.2.3 ศึกษาผลของเวลาการสกัดด้วยน้ำต่อปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์

สภาวะที่ดีที่สุดของการศึกษาอัตราส่วนระหว่างเนื้อแก้วมังกรกับน้ำและอุณหภูมิที่ให้ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์จากตอนที่ 2.5.2.1 และ 2.5.2.2 นำมาศึกษาผลของเวลาการสกัดต่อ

ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ที่เวลาต่างๆ คือ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง สุ่มสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณ กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส และโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเทคนิค HPLC

2.5.2.4 ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลน้ำตาลภายในเนื้อแก้วมังกรสกัดด้วยน้ำ

สารสกัดที่ได้จากตอน 2.5.2.3 นำมาทำแห้งด้วยเครื่อง ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dehydration) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารสกัด โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (MTEC, กรุงเทพมหานคร) ด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography (GPC) การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์โดยนำตัวอย่างผงแห้งมาละลายใน 0.1 โมลาร์ $NaNO_3$ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 0.1 น้ำหนักต่อปริมาตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรองชนิดไนลอนก่อนฉีดเข้าเครื่อง GPC (Polymer Laboratories, England) โดยใช้คอลัมน์ Ultrahydrogel 120 (Water, USA) โดยฉีดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิคอลัมน์เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหล (Flow rate) เท่ากับ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้ RI detector และใช้ pullulans เป็นสารมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุล วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม PL Logical GPC software (England)

2.5.3 การสกัดสารพรีไบโอติกจากเนื้อแก้วมังกรด้วยเอนไซม์เพคติเนส

ในการทดลองนี้ใช้แผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลองละ 3 ซ้ำ โดยเลือกสภาวะที่ให้ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์สูงที่สุด นำไปศึกษาตอนต่อไป และวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ ด้วยคอมพิวเตอร์โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชัน 13.0

2.5.3.1 ศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์เพคติเนสต่อปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์

นำตัวอย่างเนื้อแก้วมังกร ปริมาณ 200 กรัม ที่ได้เตรียมจากตอนที่ 2.5.1 มาเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วนของเนื้อแก้วมังกรต่อน้ำเท่ากับ 1:2 กรัมต่อปริมาตรในถังสกัดแบบกะ ซึ่งมีความจุไม่น้อยกว่า 3 ลิตร มีครีบป้องกันการหมุนวน ใบพัดหมุนชนิด 4 แฉก จากนั้นเติมเอนไซม์เพคติเนสจาก *Aspergillus niger* ที่ระดับความเข้มข้น 17, 53, 88, 124 และ 177 ยูนิตต่อกรัมของแข็ง ควบคุมอุณหภูมิที่ 40±2 องศาเซลเซียส (Nur' allaa *et al*., 2011) ความเร็วรอบในการสกัด คือ 250 ± 5 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 ชั่วโมง สารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณ กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส และโอลิโกแซคคาไรด์ ด้วยเทคนิค HPLC แล้วเลือกสภาวะที่ให้ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์สูงสุดนำไปศึกษาในตอนต่อไป

2.5.3.2 ศึกษาเวลาของการสกัดด้วยน้ำที่มีเอนไซม์เพคติเนสต่อปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์

สภาวะที่ดีที่สุดของการศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์เพคติเนสที่ให้ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์จากตอนที่ 2.5.3.1 นำมาศึกษาผลของเวลาการสกัดต่อปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ที่เวลาต่างๆ คือ 0, 1, 3, 5, 15, 20, 30, 45 และ 60 นาที สุ่มสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส และโอลิโกแซคคาไรด์ ด้วยเทคนิค HPLC

2.5.3.3 ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลน้ำตาลภายในเนื้อแก้วมังกรสกัดด้วยเอนไซม์เพคติเนส

สารสกัดที่ได้จากตอน 2.5.3.2 นำมาทำแห้งด้วยเครื่อง ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dehydration) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารสกัด โดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ (MTEC, กรุงเทพมหานคร) ด้วยวิธี Gel Permeation Chromatography (GPC) การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์โดยนำตัวอย่างผงแห้งมาละลายใน 0.1 โมลาร์ $NaNO_3$ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 0.1 น้ำหนักต่อปริมาตร แล้วกรองด้วยกระดาษกรองชนิดไนลอนก่อนฉีดเข้าเครื่อง GPC (Polymer Laboratories, England) โดยใช้คอลัมน์ Ultrahydrogel 1 (Water, USA) โดยฉีดปริมาตร 20 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิคอลัมน์เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส อัตราการไหล (Flow rate) เท่ากับ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้ RI detector และใช้ pullulans เป็นสารมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุล วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม PL Logical GPC software (England)

2.5.4 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส และโอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้เทคนิค HPLC

ตัวอย่างที่ได้จากการสุ่ม มากรองด้วยตัวกรองไนลอนขนาด 0.2 ไมครอน แล้วนำส่วนใสฉีดเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใช้คอลัมน์ Rezex RNM-Carbohydrate Na^+ (300 × 7.8 mm) ตัวพา (mobile phase) คือ น้ำ เกรด HPLC เท่ากับ 100% โดยมีอัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์ 80 องศาเซลเซียส สารมาตรฐานประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส และมอลโตเฮกโซส ที่ระดับความเข้มข้น 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คำนวณปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดโดยเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่างเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน วิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโดยเปรียบเทียบกับค่า RT ของน้ำตาลมาตรฐานแต่ละชนิด แล้วคำนวณผลผลิตที่ได้จากการสกัด ตามสมการดังล่างนี้

$$\text{ผลผลิตที่สกัดได้ (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักน้ำตาลที่สกัดได้ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักแห้งวัตถุดิบเริ่มต้นการสกัด (กรัม)}} \times 100 \qquad (1)$$

2.6 ผลการทดลอง

2.6.1 องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อแก้วมังกร

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อแก้วมังกร พันธุ์เนื้อสีขาว ดังแสดงใน ตารางที่ 2-1 พบว่าเนื้อแก้วมังกรส่วนใหญ่ประกอบด้วยน้ำ (moisture) และของแข็ง (solid) อื่นๆ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ซึ่งรวมใยอาหาร (crube fiber) ด้วย รองลงมา คือ เถ้า (ash) ไขมัน (fat) และโปรตีน (protein) ตามลำดับ

ตารางที่ 2-1 องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อแก้วมังกรพันธุ์เนื้อสีขาว

Proximate content (%)	**Value**
Moisture	83.052 ± 0.27
Protein	0.395 ± 0.13
Fat	1.26 ± 0.04
Crude fiber	1.70 ± 0.03
Ash	2.204 ± 3.9
*Carbohydrate	11.39

Values given are the mean of three replicates ± standard deviation.

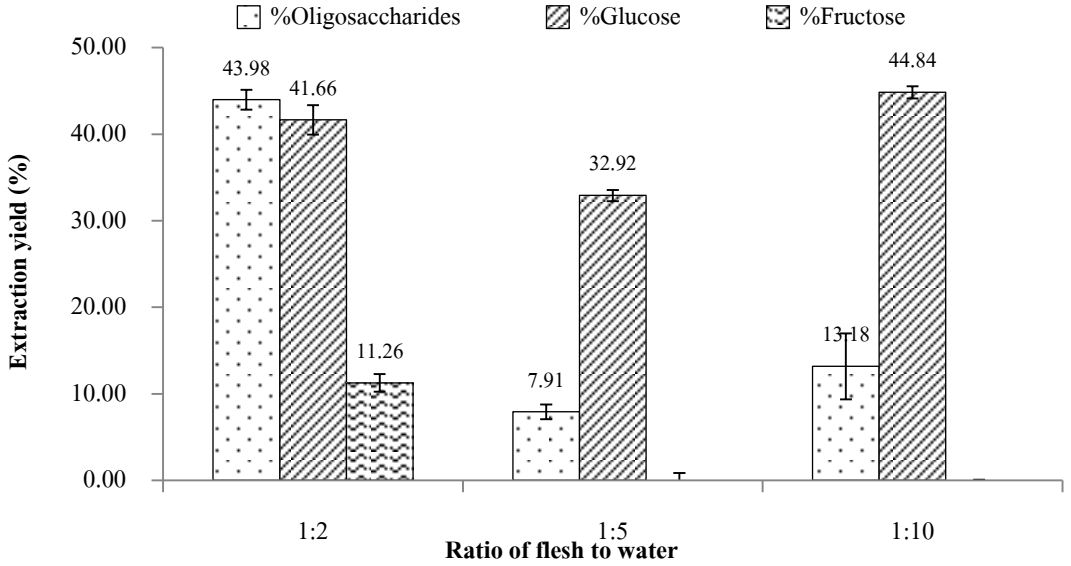
*Carbohydrate content (%) = 100 – (moisture + protein + fat + crude fiber + Ash)

Morton (1987) ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อแก้วมังกร พบว่าเนื้อแก้วมังกรพันธุ์ เนื้อสีขาวมีองค์ประกอบทางเคมี ส่วนใหญ่ประกอบด้วย ความชื้นร้อยละ 89.4, ปริมาณเถ้าร้อยละ 0.50, ปริมาณโปรตีนร้อยละ 0.5 ปริมาณไขมันร้อยละ 0.1 และปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 9.2 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อมาเปรียบเทียบคาร์โบไฮเดรตกับงานวิจัยนี้ ได้ค่าคาร์โบไฮเดรต คือ ร้อยละ 13.09 (คาร์โบไฮเดรต +ใยอาหาร) จะเห็นได้ว่า ค่าที่ได้สูงกว่างานวิจัยก่อนหน้านี้ อาจเนื่องมาจาก สภาพแวดล้อมในการปลูกที่แตกต่างกัน (สภาพอากาศ สภาพดิน สถานที่การเพาะปลูก) อายุการเก็บเกี่ยว ความสุก ปริมาณความชื้น เป็นต้น ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ อาจส่งผลถึงปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อแก้วมังกร ถึงแม้เป็นแก้วมังกรสายพันธุ์เดียวกันก็ตาม

2.6.2 ผลของอัตราส่วนของน้ำและเนื้อแก้วกรต่อปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์

จากการศึกษาอัตราส่วนระหว่างเนื้อแก้วมังกรต่อน้ำ ที่อัตราส่วน 1:2, 1:5 และ 1:10 กรัมต่อปริมาตร สกัดในถังสกัดแบบกะ มีการควบคุมอุณหภูมิตลอดเวลาการสกัด 85±2 องศา-เซลเซียส ความเร็วรอบในการสกัด คือ 250 ± 5 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 ชั่วโมง พบว่า เมื่ออัตราส่วน

เนื้อแก้วมังกรกับน้ำเพิ่มขึ้น พบว่าปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์เพิ่มขึ้นเมื่ออัตราส่วนเนื้อแก้วมังกรต่อน้ำลดลง ดังภาพที่ 2-2 และปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนเนื้อแก้วมังกรต่อน้ำ 1:2 คือ ร้อยละ 43.98 โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งสูงกว่าอัตราส่วนเนื้อแก้วมังกรต่อน้ำที่ 1:5 และ 1:10 ที่ให้ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ ร้อยละ 7.91, 13.18 โดยน้ำหนักแห้ง อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกอัตราส่วนเนื้อแก้วมังกรต่อน้ำที่ 1:2 นำไปศึกษาตอนต่อไป

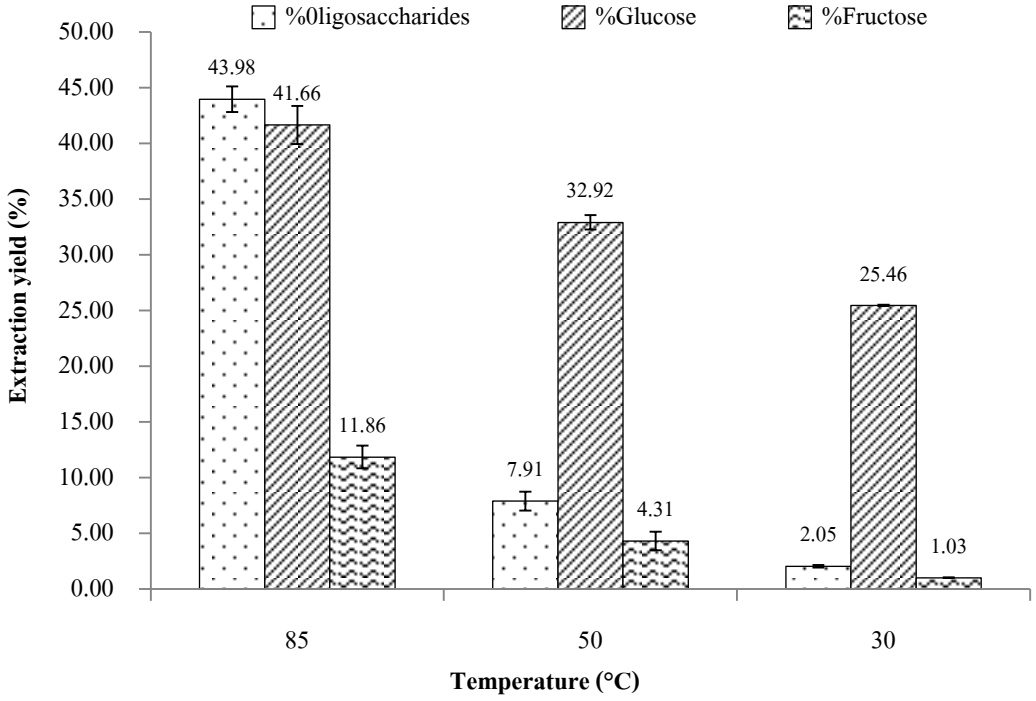


ภาพที่ 2-1 ร้อยผลผลิตที่ได้ของของแข็งที่ละลายได้ โอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตสที่ความแตกต่างของอัตราส่วนของเนื้อแก้วมังกรกับน้ำ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

2.6.3 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์

จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร โดยนำอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเนื้อแก้วมังกร ต่อ น้ำ จากตอนที่ 2.6.2 ที่ให้ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ที่สูง นำมาศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมของการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้แก้วมังกรเริ่มต้น 200 กรัมต่อแต่ละการทดลอง คือ ที่อุณหภูมิ 30 ± 2, 50 ± 2 และ 85 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง พบว่า ที่อุณหภูมิ 85 ± 2 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ที่สูง คือ ร้อยละ 43.98 โดยน้ำหนักแห้ง รองลงมาอุณหภูมิ 50 ± 2 และ 30 ± 2 องศาเซลเซียส คือ ร้อยละ 7.91 และ ร้อยละ 2.05 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ส่วนน้ำตาลกลูโคส ที่อุณหภูมิ 85 ± 2, 50 ± 2 และ 30 ± 2 องศาเซลเซียส มีค่าผลผลิตที่ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) คือ ร้อยละ 41.66, 32.92 และ 25.46 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ส่วนน้ำตาลฟรุกโตส ที่อุณหภูมิ 85 ± 2, 50 ± 2 และ 30 ± 2 องศาเซลเซียส มีค่าผลผลิตที่ได้ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) คือ ร้อยละ10.44, 4.31 และ 1.03 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับแสดงดังภาพที่

2-2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิมีผลต่อปริมาณน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ กลูโคส และฟรุกโตส ที่ได้จากการสกัด ซึ่งสอดคล้องกับ Macedo (2005) กล่าวว่าน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส สามารถละลายน้ำออกมาได้ เมื่อใช้อุณหภูมิการสกัดอยู่ในช่วง 0-95 องศาเซลเซียส และจากการทดลอง Xiaolic และคณะ (2008) ศึกษาสภาวะการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จาก chickpea จำนวน 19 สายพันธุ์ จากการศึกษาผลของอุณหภูมิ ได้แก่ การสกัดที่อุณหภูมิห้อง (30), 50, 70 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิน้ำเดือด พบว่าปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้ในช่วงอุณหภูมิ 10 ถึง 50 องศาเซลเซียส จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นและลดลงอย่างลดเร็วเมื่อ อุณหภูมิที่ใช้ในสกัดสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งต่างกับการทดลองนี้ ต้องใช้อุณหภูมิการสกัดถึง 85 องศาเซลเซียส ที่ให้ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์สูงสุด และเมื่อพิจารณาองค์ประกอบในแก้วมังกร มีปริมาณของคาร์โบไฮเดรตถึงร้อยละ 13.09 ที่ร่วมถึงองค์ประกอบจำพวกเพคติน และพอลิแซคคาไรด์ ที่ยึดเกาะอย่างแน่ภายในเนื้อแก้วมังกร ทำให้ต้องใช้อุณหภูมิที่สูงในการสกัด

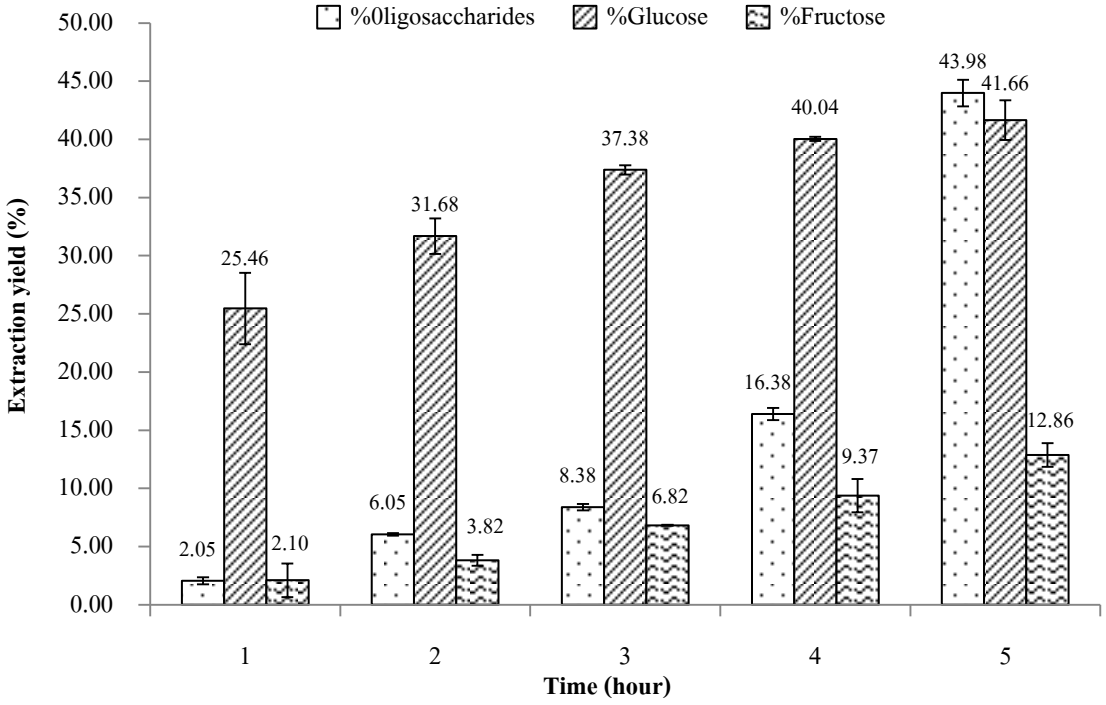


ภาพที่ 2-2 ร้อยละผลผลิตที่ได้ของโอลิโกแซคาร์ไรด์ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

ดังนั้นสรุปได้ว่า อัตราส่วนของเนื้อแก้วมังกรต่อตัวทำละลาย (น้ำ) 1:2 อุณหภูมิมีผลต่อความเข้มข้นน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ โดยที่อุณหภูมิ 85±2 องศาเซลเซียส เวลา 5 ชั่วโมง ให้ค่าที่ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์สูงสุด จึงเลือกศึกษาตอนต่อไป

2.6.4 ผลของเวลาการสกัดด้วยน้ำต่อปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์

จากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการสกัดต่อปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ที่อัตราส่วนเนื้อแก้วมังกรต่อน้ำ 1:2 อุณหภูมิ 85±2 องศาเซลเซียส โดยที่สุ่มเก็บตัวอย่างที่เวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง พบว่าปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์สูงสุดที่อุณหภูมิ 85±2 องศาเซลเซียส อัตราส่วนเนื้อแก้วมังกรต่อน้ำ 1:2 และเวลาการสกัด 5 ชั่วโมงให้ค่า ร้อยละผลผลิตของโอลิโกแซค-คาไรด์ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส เท่ากับ ร้อยละ 43.98, 41.66 และ 12.86 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ แสดงภาพที่ 2-3 พบว่าปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น และน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส ซึ่งเป็นโมเลกุลเดี่ยว และโมเลกุลเดี่ยวละลายออกมาเร็วกว่า โอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ใหญ่กว่า

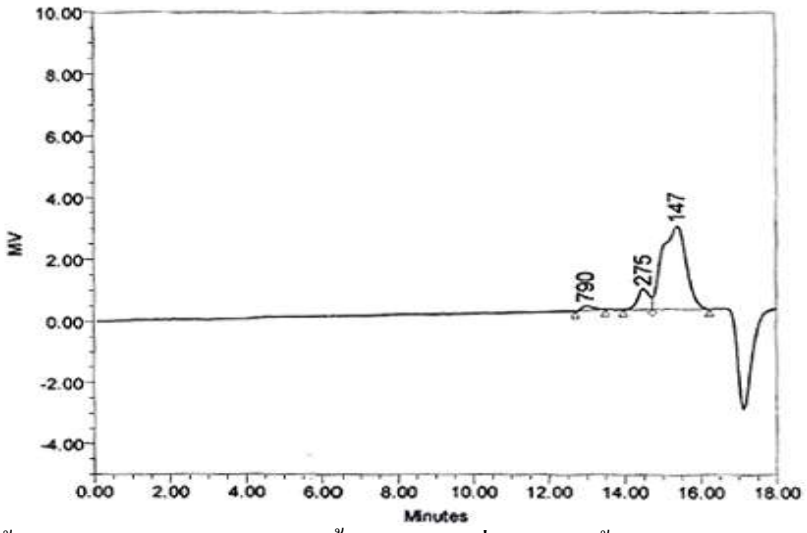


ภาพที่ 2-3 ร้อยละผลผลิตของโอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส ที่ระยะเวลาการสกัดที่เวลาแตกต่างกัน เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

ดังนั้นเลือกที่เวลา 5 ชั่วโมง หากใช้เวลาในการสกัดนานเกินไป จะส่งผลถึงต้นทุนในการผลิตที่สูง เมื่อนำไปสกัดในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

2.6.5 น้ำหนักโมเลกุลของเนื้อแก้วมังกร

จากการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดในแก้วมังกร ด้วยเทคนิค Gel Permeation Chromatography ในสารสกัดจากเนื้อแก้วมังกร อัตราส่วนแก้วมังกรต่อน้ำ เท่ากับ 1:2 พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 790, 275 และ 147 ดอลตัล คิดเป็นร้อยละ 2.34, 10.34 และ 87.32 ตามลำดับ ดังภาพที่ 2-4 ซึ่งสามารถยืนยันได้ว่าในตัวอย่างเนื้อแก้วมังกร สายพันธุ์เนื้อสีขาว มีน้ำตาลในกลุ่มโอลิโกแซคาไรด์ คือ 790 Da คิดเป็น DP (Degree of polymerization) ประมาณ 4 ส่วนน้ำหนักโมเลกุล 275 และ 147 ดอลตัน อาจจะเป็นน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส ตามรายงานก่อนหน้านี้ของ Wichienchot และคณะ (2010) กล่าวว่า ในเนื้อแก้วมังกร มีน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้ มี DP ประมาณ 3-4 อยู่ในช่วงของโอลิโกแซค-คาไรด์ในกลุ่มฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructooligosaccharides) ที่สังเคราะห์ได้มาจาก น้ำตาลซูโครส (DP = 2-4), Oligofructose (DP = 4) ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ไฮโดรไลซิสอินนูลิน และ Soybean oligosaccharides ที่ได้จากการสกัดมาจาก ถั่วเหลือง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ จากข้อมูลข้างต้น สามารถยืนยันได้ว่าสารสกัดแก้วมังกรที่สกัดด้วยน้ำในงานวิจัยนี้ มีน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส โอลิโกแซคคาไรด์

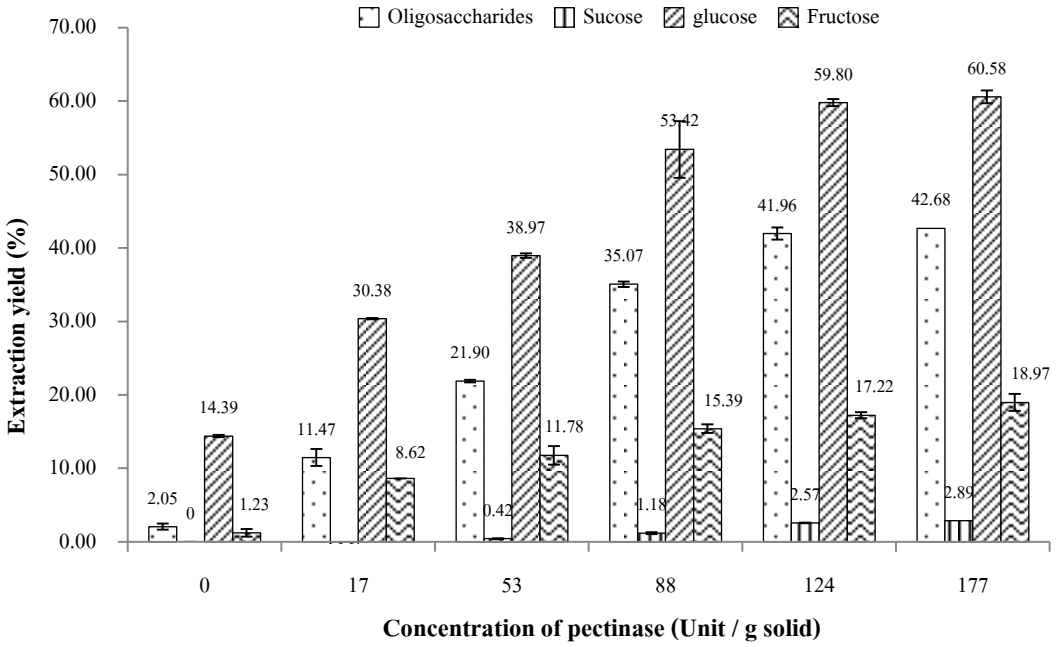


ภาพที่ 2-4 น้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดเนื้อแก้วมังกรที่สกัดด้วยน้ำ

2.6.6 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์เพคติเนสต่อปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์

จากการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร ด้วยเอนไซม์เพคติเนส ที่อัตราส่วนเนื้อแก้วมังกรต่อน้ำเท่ากับ 1:2 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 300 นาที ที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์เพคติเนส ตั้งแต่ ความเข้มข้น 0, 17, 53, 88,

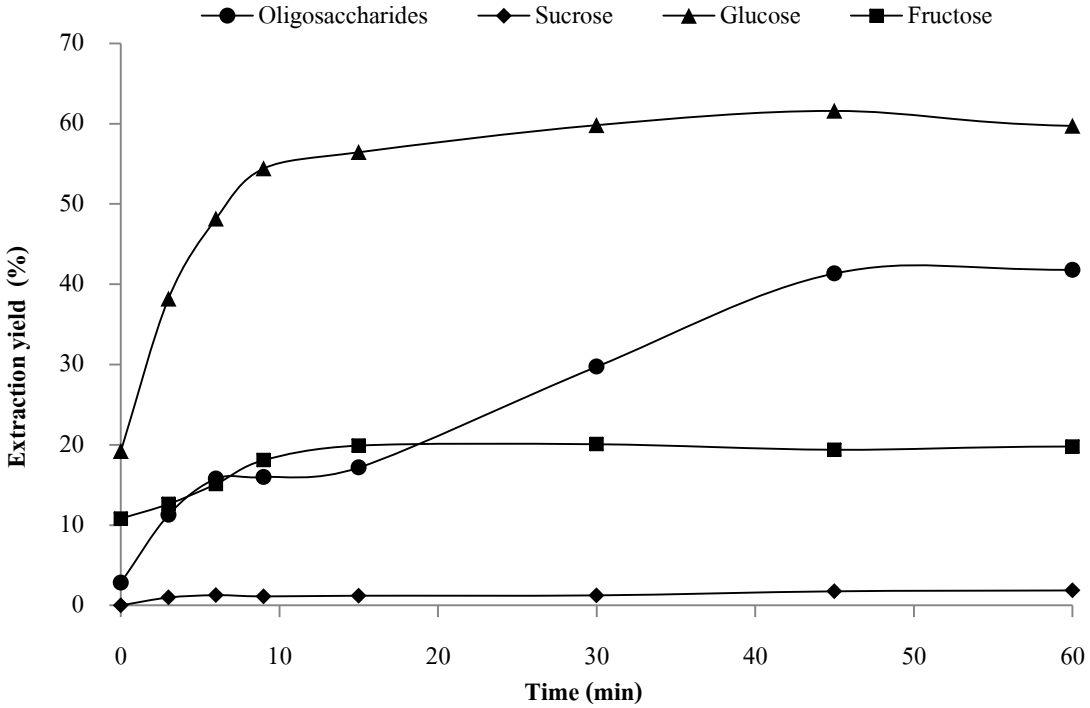
124 และ 177 ยูนิตต่อกรัมของแข็ง โดยที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.6 และ เมื่อครบเวลา 300 นาที หลังจากการไฮโดรไลซิส ด้วยเอนไซม์เพคติเนส พบว่า ค่าพีเอชลดลงเหลือ 4.2 และเมื่อพิจารณาร้อยละผลผลิตของโอลิโกแซคคาไรด์ พบว่า ร้อยละผลผลิตที่ได้ของโอลิโกแซคคาไรด์เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เพคติเนส และมีปริมาณคงที่อย่างไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ที่ความเข้มข้น 124 และ 177 ยูนิตต่อกรัมของแข็ง คือ ร้อยละ 41.92 และ 42.68 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ส่วนองค์ประกอบของน้ำตาลอื่นๆ เช่นน้ำตาลกลูโคส น้ำตาล ฟรุกโตส และน้ำตาลซูโครส ที่เกิดขึ้นระหว่างการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เพคติเนส พบว่า ร้อยละผลผลิตที่ได้เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เพคติเนส และความเข้มข้น 124 และ 177 ยูนิตต่อกรัมของแข็ง มีปริมาณคงที่อย่างไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ที่ เช่นกัน ดังแสดงภาพที่ 2-5 ซึ่งจะเห็นได้ว่า โอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการทดลองนี้ มาจาก 2 แหล่งด้วยกัน คือ โอลิโก-แซคคาไรด์ที่มีอยู่ในแก้วมังกร ซึ่งแสดงให้เห็นในชุดควบคุม กล่าวคือ ไม่เติมเอนไซม์เพคติเนส ในการสกัดก็สามารถปลดปล่อยโอลิโกแซคคาไรด์ได้ และส่วนที่สอง มาจากการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เพคติเนส ซึ่งจะเห็นได้ว่า ภายหลังจากการไฮโดรไลซ์ของ เอมไซม์เพคติเนส ทำให้พีเอชของระบบ มีค่าลดลง และได้ผลิตภัณฑ์ คือ โอลิโกแซคคาไรด์ และโมเลกุลเดี่ยว และคู่ เช่น น้ำตาลซูโครส กลูโครส ฟรุกโตส และน้ำตาลกรดอื่นๆ เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์แพคติเนสที่ใช้ในสกัดโอลิโก-แซคาไรด์ ในการศึกษานี้ ใช้กันแพร่หลายในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำผลไม้ ช่วยให้น้ำผลไม้ใส และไม่ตกตะกอน โดยไปไฮโดรไลซิส ภายในโมเลกุลของสายเพคตินที่มีอยู่ในแก้วมังกร ทำให้ได้โมเลกุลของน้ำตาลที่มีขนาดลดมา จะเห็นได้ว่าในการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกรด้วยเอนไซม์เพคติเนส ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีโอลิโกแซคาไรด์ น้ำตาลกลูโคส น้ำฟรุกโตส และน้ำตาลซูโครส ซึ่งต่างกับการสกัดด้วยน้ำ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีโอลิโกแซคาไรด์ น้ำตาลกลูโคส น้ำฟรุกโตส เท่านั้น และจากการรายงานก่อนหน้าของ Nur Aliaa และคณะ (2010) ได้กล่าว สภาวะที่เหมาะสมในการใช้เอนไซม์เพคติเนส ในอุตสาหกรรมน้ำผลไม้ คือ เอนไซม์เพคติเนส ที่ความเข้มข้น 0.1-0.7 ยูนิตต่อมิลลิลิตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-100 นาที จะเห็นได้ว่าในการทดลองนี้ใช้ปริมาณความเข้มข้นที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบ ซึ่งเป็นไปได้ตัวอย่างวัตถุดิบต่างแหล่งพื้นที่ ทำให้สารตั้งต้นในการไฮโดรไลซิสภายในวัตถุดิบต่างกัน และชนิด และแหล่งที่มาของเอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษาต่างกัน



ภาพที่ 2-5 ร้อยละผลผลิตที่ได้ของโอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส ที่สกัดด้วยเอนไซม์เพคติเนส ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

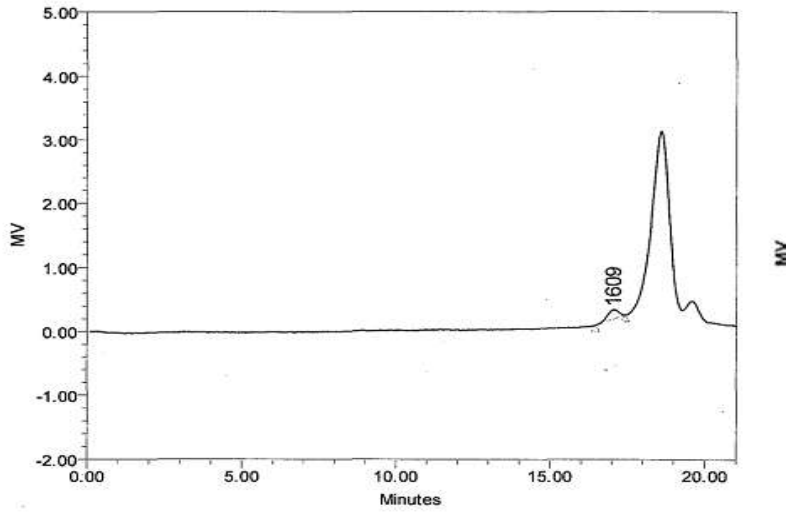
2.6.7 ผลของเวลาการสกัดด้วยเอนไซม์เพคติเนสต่อปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์

ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์จากการศึกษาจากตอน 2.5.6 คือ 124 ยูนิตต่อกรัมของแข็ง นำศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมของการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์เพคติเนส อัตราส่วนเนื้อแก้วมังกรต่อน้ำ 1:2 ที่อุณหภูมิ 40 ± 2 องศาเซลเซียส โดยที่สุ่มเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 3, 5, 15, 20, 30 และ 60 นาที พบว่าปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นและจะคงที่ที่เวลา 45 นาที ส่วนน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตสและซูโครส เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น และจะคงที่ที่เวลา 20 นาที และพบว่าที่สภาวะการสกัด โอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์เพคติเนส ที่อัตราส่วนเนื้อแก้วมังกรต่อน้ำ 1:2 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 124 ยูนิตต่อกรัมของแข็ง อุณหภูมิ 85 ± 2 องศาเซลเซียส ให้ค่าปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส เท่ากับ ร้อยละ 41.49, 2.57, 59.04 และ 17.30 โดยน้ำหนักแห้งตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 2-6 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เพคติสที่เติมลงไปในระบบ สามารถไฮโดรไลซิสสารตั้งต้นที่มีอยู่แก้วมังกรจนหมด แสดงให้เห็นได้จากผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสกัดทุกตัวด้วยเอนไซม์เพคติเนส เริ่มคงที่ ที่เวลา 45 นาทีของการทำปฏิกิริยา

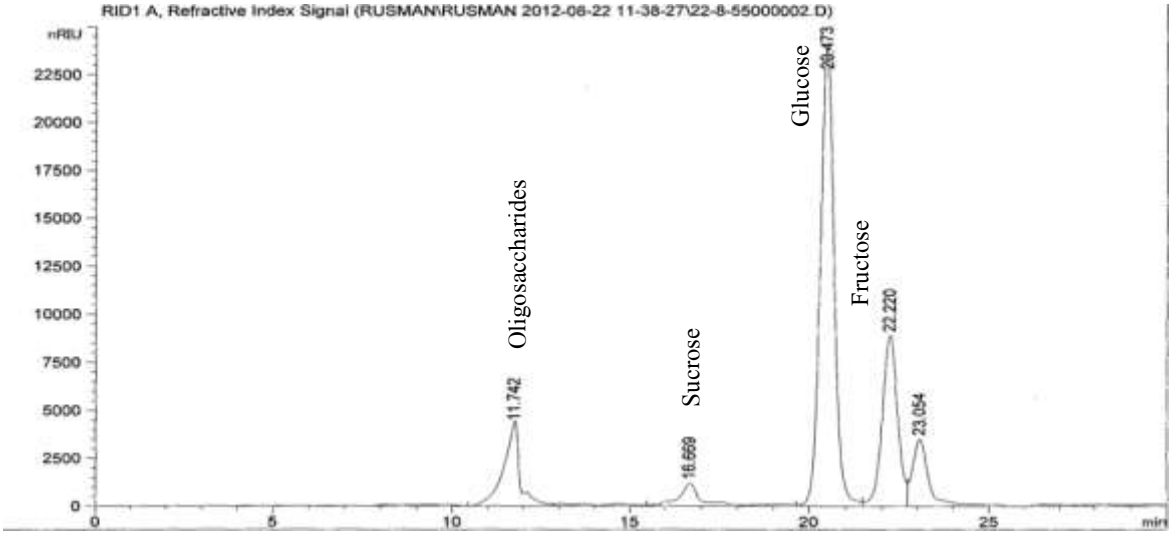


ภาพที่ 2-6 ร้อยละผลผลิตที่ได้ของโอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส ที่สกัดด้วยเอนไซม์เพคติเนส 124 ยูนิตต่อกรัมของแข็งที่เวลาการสกัดต่างกัน เป็นเวลา 60 นาที

และเมื่อนำสารสกัดที่ได้ไปศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดในแก้วมังกร ด้วยเทคนิค Gel Permeation Chromatography พบว่า มีน้ำหนักโมเลกุลโอลิโกแซคคาไรด์ เท่ากับ 1609 ดอลตัน คิดเป็น DP ประมาณ 7 ดังภาพที่ 2-7 และเมื่อพิจารณาชนิดขององค์ประกอบในสารสกัด ด้วยเทคนิค HPLC พบว่า โอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 2-8 สามารถยืนยันได้ว่าในผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการย่อยตัวอย่างเนื้อแก้วมังกรด้วยเอนไซม์เพคติเนส ให้น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และโอลิโกแซคคา-ไรด์ และเมื่อพิจารณาองค์ประกอบน้ำตาลที่ได้จากย่อยด้วยเอนไซม์เพคติเนสนั้น มีโอลิโกแซคคา-ไรด์ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและคู่ คือ น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และ ซูโครส นั้น เป็นไปได้ว่า โอลิโก-แซคคาไรด์ที่อยู่ในสารสกัดนั้น จัดอยู่ในกลุ่มของฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งพืชบางชนิดสามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้ธรรมชาติ โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้น และอาศัยกระบวนการทำงานของเอนไซม์ ได้โอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาดที่แตกต่างกัน คือ DP ตั้งแต่ 2-9 (Rastall, 2010)



ภาพที่ 2-7 น้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดเนื้อแก้วมังกรที่สกัดด้วยเอนไซม์เพคติเนส



ภาพที่ 2-8 โครมาโตแกรมของสารสกัดที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เพคติเนส ที่124 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของแข็ง ที่อุณหภูมิ 40 °C เวลา 60 นาที

จากการศึกษาการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยน้ำ และเอนไซม์เพคติเนส ข้างต้นนั้น พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดด้วยน้ำ คือ อัตราส่วนเนื้อแก้วมังกรต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 2 อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ซึ่งให้ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส เท่ากับ ร้อยละ 43.98, 41.66 และ 12.86 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ ส่วนการสกัดด้วยเอนไซม์เพคติเนส พบว่าสภาวะที่เหมาะในการสกัด คือ อัตราส่วนเนื้อแก้วมังกรต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 2 และความเข้มข้นของเอนไซม์เพคติเนส เท่ากับ 124 ยูนิตต่อกรัมของแข็ง ใช้เวลา 45 นาที ให้ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส เท่ากับ ร้อยละ

41.92, 2.57, 59.04 และ 17.22 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์จากการสกัดทั้งสองวิธีไม่แตกต่างกัน แต่น้ำหนักโมเลกุลของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากวิธีการสกัดต่างกัน คือ การสกัดด้วยเอนไซม์เพคติเนส ให้น้ำหนักโมเลกุล 1609 ดอลตัล (DP=7) ซึ่งใหญ่กว่าการสกัดด้วยน้ำ คือ 790 ดอลตัล (DP=4) และวิธีการสกัด กล่าวคือ การสกัดด้วยน้ำ ต้องใช้พลังงานที่มาก ในการให้ความร้อนให้ถึง 85 องศาเซลเซียส และสกัดเป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นต้องใช้พลังงานในการลดอุณหภูมิถึงอุณหภูมิห้อง เพื่อนำสารสกัดที่ได้ไปทำบริสุทธิ์ในตอนต่อไป ส่วนการสกัดด้วยเอนไซม์เพคติเนส นั้น ใช้พลังงานในการให้ความร้อนการสกัดต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการสกัดด้วยน้ำ เนื่องจาก อุณหภูมิที่ใช้สกัด เพียง 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที และใช้พลังงานในการลดอุณหภูมิให้ถึงอุณหภูมิห้อง ที่ต่ำกว่า แต่การสกัดด้วยเอนไซม์นี้ ต้องใช้เอนไซม์เพคติเนสให้มีความเข้มข้นถึง 124 ยูนิตต่อกรัมของแข็ง ซึ่งเอนไซม์เพคติเนสที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้เอนไซม์เกรดทางการค้า สามารถลดค่าใช้จ่ายได้ระดับหนึ่ง ดังนั้น งานวิจัยนี้ เลือกวิธีการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร เนื่องจากใช้เวลาการสกัดที่สั้น และพลังงานที่ต่ำกว่า ซึ่งสามารถลดต้นทุนในการผลิต เมื่อนำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

จากการทดลองก่อนหน้านี้ของ Wichienchot และคณะ (2010) พบว่า สกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร ด้วยตัวทำละลายต่างกัน คือ น้ำ และสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 80 ให้ค่าเปอร์เซ็นต์พื้นที่ของโอลิโกแซคคาไรด์ที่แตกต่าง คือ สารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้มร้อยละ 80 และ 20 คือ ร้อยละ 27.4 และ 20.6 ตามลำดับ ส่วนการสกัดด้วยน้ำ ที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส คือ ร้อยละ16.4 และร้อยละ 15.1 ตามลำดับ และเมื่อมาเปรียบเทียบกับงานวิจัยนี้ ที่ได้สกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร ด้วยน้ำและเอนไซม์เพคติเนส ให้ค่าเปอร์เซ็นต์พื้นที่ของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ต่ำกว่า การใช้สารละลายเอทานอล คือ ร้อยละ 18.73 ซึ่งจะเห็นได้ว่าชนิดตัวทำละลายมีผลต่อค่าเปอร์เซนต์พื้นที่ของโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Oku และคณะ (1998) พบว่า การสกัดน้ำตาลจากพืช มักใช้สารละลายเอทานอลเป็นตัวทำลาย เนื่องจากโครงสร้างของสารละลายเอทานอลประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) คือ ส่วนที่มีขั้ว (polar) และส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (non-polar) การเจือจางด้วยน้ำจึงเป็นการเพิ่มความมีขั้วให้กับสารละลาย ทำให้โมเลกุลเล็กๆ สามารถละลายออกมาได้ ในขณะที่คาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่หรือ DP สูงจะถูกตกตะกอนออกมาเมื่อใช้เอทานอลที่ความเข้มข้นสูงขึ้น แต่งานวิจัยนี้ไม่สามารถเลือกใช้ตัวทำละลายที่เป็นเอทานอล เนื่องจาก ภายหลังจากการสกัดต้องกำจัดสารละลายเอทานอลออก ด้วยการระเหยออก ก่อนเข้าสู่กระบวนการทำบริสุทธิ์ด้วยจุลินทรีย์ ทำให้เพิ่มต้นทุนในการผลิต เมื่อนำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

2.7 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยน้ำ และเอนไซม์เพคติเนส ข้างต้นนั้น พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดด้วยน้ำ คือ อัตราส่วนเนื้อแก้วมังกรต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 2 อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ซึ่งให้ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส เท่ากับ ร้อยละ 43.85, 41.66 และ 12.86 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และน้ำหนักโมเลกุลของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดเท่ากับ 790 ดอลตัล ส่วนการสกัดด้วยเอนไซม์เพคติเนส พบว่าสภาวะที่เหมาะในการสกัด คือ อัตราส่วนเนื้อแก้วมังกรต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 2 และความเข้มข้นของเอนไซม์เพคติเนส เท่ากับ 124 ยูนิตต่อกรัมของแข็ง ใช้เวลา 45 นาที ให้ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส เท่ากับ ร้อยละ 41.92, 2.57, 59.80 และ 17.22 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ และน้ำหนักโมเลกุลของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยเอนไซม์เพคติเนส อยู่ในช่วง 1609 ดอลตัล

2.8 เอกสารอ้างอิง

Ariffin, A. A., Bakar, J., Tan, C. P., Rahman, R. A., Karim, R. and Loi, C. C. 2008. Essential fatty acids of pitaya (dragon fruit) seed oil. J. Food Chem. 114: 561–564.

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

Ekavall, J., Stegmark, R. and Nyman, M., 2007. Optimization of extraction methods for determination of the raffinose family oligosaccharides in leguminous vine peas (*Pisum sativum* L.) and effect of blanching. J. Food Compos. Anal. 20: 13-18.

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

Johansen, H. N., Glitso, 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. Agri. Food. Chem. 44: 1470-1474.

Kim, S., Wansoo, K. and In K. H. 2003. Optimization of the extraction and purification of oligosaccharides from defatted soybean meal. Int. J. Food Sci. Tech. 38: 337-342.

Siddeshwar, S. 2008. Screening and Estimation of Prebiotic Oligosaccharides in Fruits and Vegetables. Biotech Pharm.

Hoa, T. T., Clark, C. J., Waddell, B. C. and Woolf, A. B. 2006. Postharvest quality of Dragon fruit (*Hylocereus undatus*) following disinfesting hot air treatments. J. Post. Bio. Technol. 41.

Nur'Aliaa, A. R., Siti Mazlina, M. K. and Taip. F. S. 2011. Effects of commercial pectinases application on selected properties of red pitaya juice. J. Food Process Eng. 34: 1523-1534.

Morton, J. F. 1987. Fruits of warm climates. Straubary Pear. Florida Flair Books Miami. Vol. 505 p. 347-348.

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

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

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

Wichienchot, S., Jatupornpipat, M. and R. Rastall. R. A. 2010. Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. Food Chem. 120: 850-857.

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: 517-523.

Wu, L. C., Hsu, H. W., Chen, Y. C., Chiu, C. C., Lin, Y. I. and Ho, J. A. 2006. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya. Food Chem. 95: 319-327.

Xiaoli, X., Yang L., Hua, S., L., W., Sun, Y., Ma, H., Zhang, J. and Zeng, X. 2008. Determination of oligosaccharide contents in 19 cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L) seeds by high performance liquid chromatography. Food Chem. 111: 215-219.

บทที่ 3

การทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกรด้วยวิธีทางชีวภาพ

3.1 บทนำ

การทำบริสุทธิ์สารด้วยเชื้อจุลินทรีย์เป็นวิธีที่มีต้นทุนต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีตกตะกอนด้วยสารเคมี และโครมาโทกราฟี อีกทั้งยังมีความจำเพาะสูง (Zhong *et al*., 2011) แต่ก่อนการทำบริสุทธิ์ ผู้ทดลองควรรู้ก่อนว่าภายในตัวอย่างที่ต้องการทำบริสุทธิ์มีองค์ประกอบอะไรบ้าง และต้องการกำจัดอะไร เพื่อที่จะเป็นข้อมูลในการเลือกเชื้อจุลินทรีย์และสภาวะในการทำบริสุทธิ์ งานวิจัยนี้ ต้องการทำบริสุทธิ์สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากเนื้อแก้วมังกร ซึ่งภายในเนื้อแก้วมังกรประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส และโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นต้น งานวิจัยนี้จึงเลือกศึกษาเชื้อ *S. cerevisiae* ซึ่งเชื้อกลุ่มนี้ใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนได้แก่ น้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุกโตส เป็นต้น

3.2 บทตรวจเอกสาร

ปัจจุบันนี้ การทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์เชิงทางการค้า ส่วนใหญ่ใช้เทคนิคทางด้าน โครมาโทรกราฟฟี และเมมเบรน (Goulas *et al*., 2003) ซึ่งวิธีที่ให้ความบริสุทธิ์มาก คือ โครมาโทกราฟฟี รองลงมา เมมเบรน แต่พบว่าการทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟฟีนั้น มีค่าใช้จ่ายที่สูงเมื่อเทียบกับ เทคนิคเมมเบรน ทำให้การศึกษาการทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์ ในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมา มุ่งเน้นการทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค นาโนฟิลเตรชัน และอัลตราฟิลเตรชัน เป็นทางเลือกในการแยกสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และโมเลกุลคู่ เป็นต้น ออกจากสารที่มีมวลโมเลกุลที่สูงกว่า เช่น โอลิโกแซคคาไรด์ และพอลิแซคคาไรด์ เป็นต้น และยังพบว่าการใช้เมมเบรนในการทำบริสุทธิ์นั้น สามารถปรับและควบคุมระหว่างกระบวนการทำบริสุทธิ์ได้ เช่น ค่าอัตราการไหล ความดัน และอุณหภูมิ เป็นต้น (Pinelo *et al*., 2009)

เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* จัดเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีอากาศแต่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศก็ได้ (van Maris *et al*., 2006) ซึ่งเชื้อ ยีสต์นี้สามารถใช้น้ำตาลเฮกโซส (hexose) ได้ทั้งในรูปเชิงเดี่ยวและเชิงซ้อน เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลแรฟฟีโนส เป็นต้น การหมักแอลกอฮอล์เป็นกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นในไซโทพลาสซึมของเซลล์ยีสต์ โดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสในการเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นแอลกอฮอล์กับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic condition) ซึ่งในขั้นตอนแรกกลูโคสจะเปลี่ยนแปลงไปตามวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis) หรือ Embden-Myerhof-Parnas pathway (EMP pathway) จนได้ ไพรูเวท (pyruvate) และจากนั้นก็จะเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ (Paturau, 1989)

Mehta และ Khanna (1964) ศึกษาสารอาหารที่ควรเพิ่มในการหมักแอลกอฮอลจากกากน้ำตาล พบว่าสารอาหารยูเรียกับแอมโมเนียมซัลเฟตมีผลต่อการเพิ่มปริมาณและเร่งการหมักเอทานอลและปริมาณที่เหมาะสมที่ควรเติมลงไปในกากน้ำตาลชนิด Carbonation molasses คือ ร้อยละ 0.07 และ 0.13 ตามลำดับ

Crittenden และ Playne (2002) ได้ใช้แบคทีเรีย *Z. mobilis* แบบตรึงเซลล์ในการกำจัดน้ำตาลโมเลกุลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส จากโอลิโกแซคคาไรด์ที่ใช้กันในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น Fructo-, malto-, isomalto-, gentio-oligosaccarides และ inulin พบว่า แบคทีเรีย *Z. mobilis* สามารถกำจัดน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครสที่ผสมอยู่ได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 12 ชั่วโมง และในการหมักจะได้ผลิตภัณฑ์คือ เอธานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนการหมักอินนูลินผสม ยังจะได้ซอร์บิ-ทอล นอกเหนือจากได้เอธานอล และคาร์บอนไดออกไซด์

Wichienchot และคณะ (2010) สกัดสารโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกรพันธุ์ขาวและพันธุ์แดงด้วยสารละลายเอธานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 80 ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำเข้มข้นของสารสกัดให้ได้ 18 บริกซ์ จากนั้นนำมาทำบริสุทธิ์ด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* BCC 12652 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ผลปรากฏว่า *S. cerevisiae* BCC 12652 สามารถกำจัดน้ำตาลกลูโคส และฟรุกโตสได้หมด

3.3 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาวิธีการทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์สารสกัดจากเนื้อแก้วมังกรด้วยวิธีทางชีววิทยา (จุลินทรีย์)

3.4 สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

3.4.1 เชื้อ

เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5019 ได้รับจากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมข้อมูลจุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย อ. คลองหลวง จ. ปทุมธานี

3.4.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต/ เกรด/ ประเทศ
1. Glucose	Ajex FineChem/Analytical/Australia
2. Yeast extract	Ajex FineChem/Analytical/Australia
3. Malt extract	Ajex FineChem/Analytical/Australia
4. Peptone	Ajex FineChem/Analytical/Australia
5. Urea	Ajex FineChem/Analytical/Australia

3.4.3 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการทดลอง

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต/ เกรด/ ประเทศ
1. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น BP2100S	Satorius/ USA
2. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP221S	Satorius/ USA
3. เครื่องระเหยสุญญากาศ (rotary evaporation)	Büchi Rotavapor® R-200/205, Switzerland
4. เครื่องผสมสาร (Vortex Mixer)	Labnet/USA
5. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE 500	Schwabach/ Germany
6. ตู้อบแรงดันไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325	Tomy/Japan
7. Vial ขนาด 20 มิลลิลิตร	-
8. ไมโครปิเปต (ขนาด 10-100 ไมโครลิตร และ 100-1000 ไมโครลิตร)	Gilson/ France
9. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WB 14	Memmert/USA
10. เครื่อง HPLC	Agilent/ 1200s/ Germany

3.5 วิธีการทดลอง

ในการทดลองการทำบริสุทธิ์ด้วยโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร ด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ใช้แผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละการทดลอง โดยเลือกสภาวะที่สามารถกำจัดเปอร์เซ็นต์น้ำตาลรวมสูงที่สุด นำไปศึกษาตอนต่อไป

3.5.1 การเตรียมกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 และสารสกัดที่ได้จากเนื้อแก้วมังกร

เตรียมเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ที่ใช้ในการกำจัดน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครสในสารสกัดเนื้อแก้วมังกรจากบทที่ 2 ด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหาร YM (Yeast medium) ในปริมาณ 2.5% เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) และความเร็วของการหมุน 180 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ส่วนสารสกัดที่ให้ปริมาณโอลิโกแซคคาร์ไรด์สูงสุดจากบทที่ 2 นำมาทำปราศจากเชื้อด้วยการให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นให้มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 35±5 องศาเซลเซียส

3.5.2 ศึกษาความเข้มข้นของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ต่อการกำจัดน้ำตาล

สารสกัดแก้วมังกรที่ผ่านการปราศจากเชื้อจากตอนที่ 3.5.1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตรมาใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ จากนั้นใส่เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ที่ระดับความเข้มข้น 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% ปริมาตรต่อปริมาตรสารสกัดแก้วมังกร หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมงที่ความเร็วของการหมุน 180 รอบต่อนาที สุ่มตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงมาวัดค่าความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่องวัดความขุ่น ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นเมื่อครบเวลานำมาต้มที่อุณหภูมิน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อฆ่าเชื้อแล้วมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นน้ำส่วนใสที่ได้วิเคราะห์หาปริมาณ กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส และโอลิโกแซคคาไรด์ ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) แล้วมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การกำจัดน้ำตาลรวมของกลูโคส ฟรุกโตสและซูโครส ที่ให้ค่าสูงสุดไปศึกษาต่อไปตามสมการที่ 2

$$\text{Percentage of removal total sugar (TS \%)} = \frac{\text{TS (initial)} - \text{TS (final)}}{\text{TS (initial)}} \times 100 \qquad (2)$$

โดยที่

$TS_{initial}$ = ผลรวมของน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส ที่เวลาเริ่มต้นของการหมัก (กรัม/100 มิลลิลิตร)

TS_{final} = ผลรวมของน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส ที่เวลาสุดท้ายของการหมัก (กรัม/100 มิลลิลิตร

3.5.3 ศึกษาความเข้มข้นของยูเรียต่อการกำจัดน้ำตาล

สภาวะที่กำจัดน้ำตาลสูงสุดจากข้อ 3.5.2 นำมาศึกษาความเข้มข้นของการเติมยูเรียในสารสกัดแก้วมังกรซึ่งแทนเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้น 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.7% และ 1% กรัมต่อปริมาตรของสารสกัดเนื้อแก้วมังกร หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมงที่ความเร็วของการหมุน 180 รอบต่อนาที สุ่มตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ที่เวลา 0, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงมาวัดค่าความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่องวัดความขุ่น ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นเมื่อครบเวลานำมาต้มที่อุณหภูมิน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อฆ่าเชื้อแล้วมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นน้ำส่วนใสที่ได้วิเคราะห์หาปริมาณ กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส และโอลิโกแซคคาไรด์ ด้วยเทคนิค HPLC แล้วมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การกำจัดน้ำตาลรวมของกลูโคส ฟรุกโตสและซูโครส ที่ให้ค่าสูงสุดไปศึกษาต่อไปตามสมการที่ 2

3.5.4 ศึกษาระยะเวลาการหมักต่อการกำจัดน้ำตาล

สภาวะที่กำจัดน้ำตาลสูงสุดจากข้อ 3.5.2 และ 3.5.3 นำมาศึกษาเวลาที่เหมาะสมของการหมักที่สามารถจำกัดน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส หมดโดยที่สุ่มเก็บตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร วันที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 วันมาวัดค่าความขุ่นของเชื้อด้วยเครื่องวัดความขุ่น ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และนำมาต้มที่อุณหภูมิน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อฆ่าเชื้อแล้วมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นน้ำส่วนใสที่ได้วิเคราะห์หาปริมาณ กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส และโอลิโกแซคคาไรด์ ด้วยเทคนิค HPLC แล้วมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การกำจัดน้ำตาลรวมของกลูโคส ฟรุกโตสและซูโครส ที่ให้ค่าสูงสุดไปศึกษาต่อไปตามสมการที่ 2

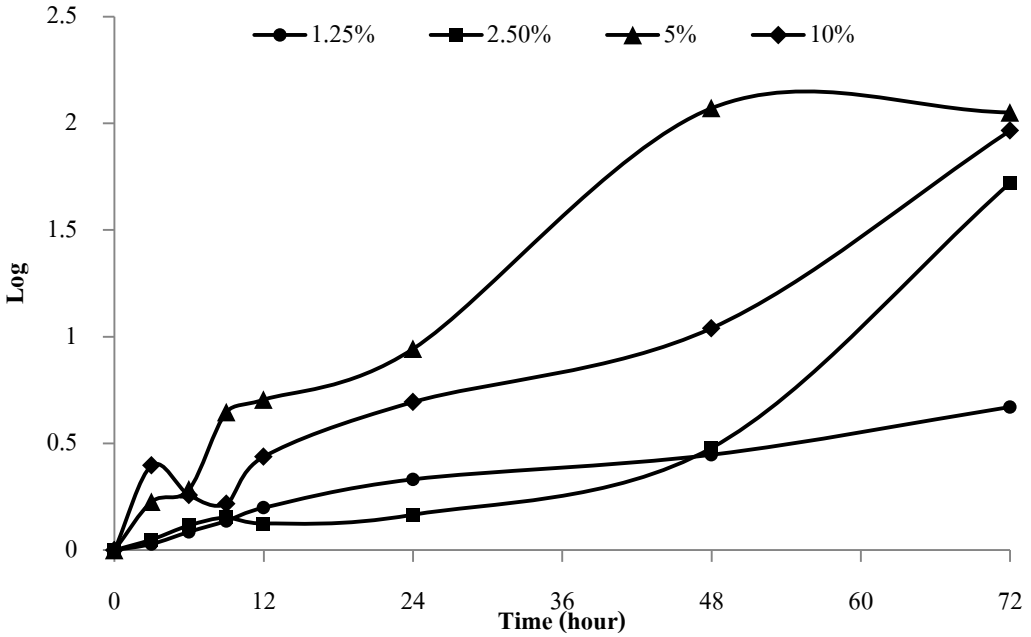
3.5.5 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส และโอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้เทคนิค HPLC

นำตัวอย่างที่ได้จากการสุ่มจากข้อ 3.5.2, 3.5.3 และ 3.5.4 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากส่วนใส แล้วนำส่วนใสฉีดเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใช้คอลัมน์ Rezex RNM-Carbohydrate Na^+ (300 × 7.8 mm) ตัวพา (mobile phase) คือ น้ำ เกรด HPLC โดยมีอัตราการไหล 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์ 80 องศาเซลเซียส สารมาตรฐานประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส และมอลโตเฮกโซส ที่ระดับความเข้มข้น 10, 5, 2.5, 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร คำนวณปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดโดยเปรียบเทียบพื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่างเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน วิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลโดยเปรียบเทียบกับค่า RT ของน้ำตาลมาตรฐานแต่ละชนิด

3.6 ผลการทดลอง

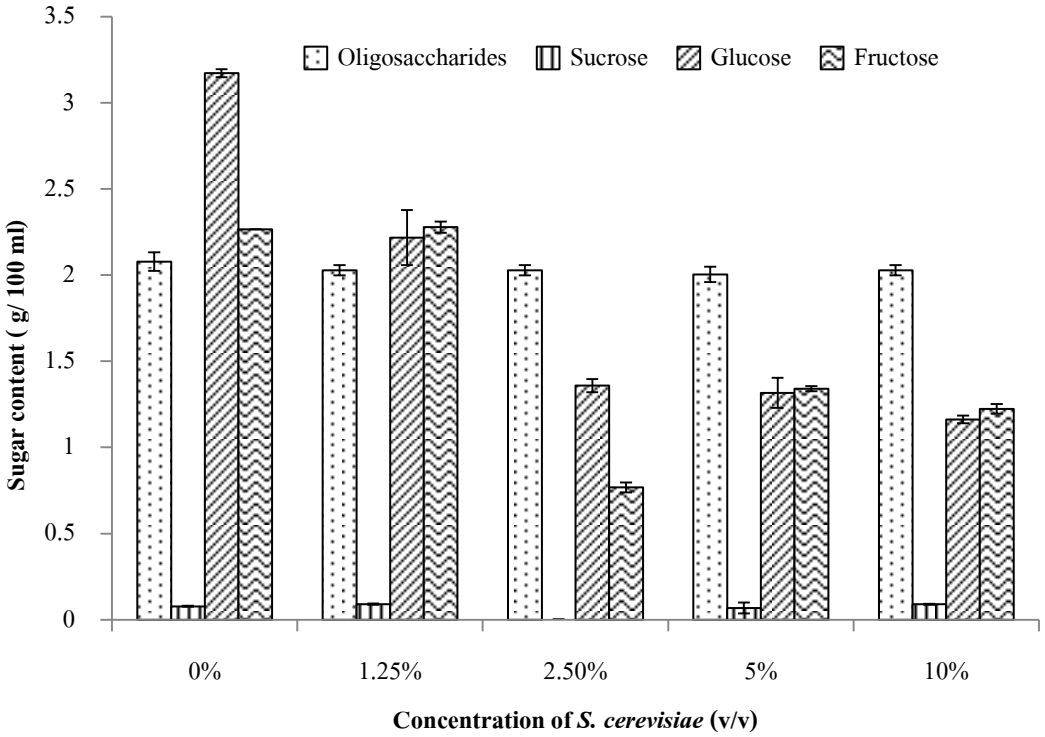
3.61 ผลของความเข้มข้นของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ต่อการกำจัดน้ำตาล

ในการทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์ในงานวิจัยนี้ ได้เลือกวิธีทางชีวภาพ โดยที่เลือกเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ซึ่งสามารถเจริญได้ในน้ำตาลที่ช่วงแคบ กล่าวคือ สามารถย่อยสลายน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครสเท่านั้น และจากการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ในการหมักสารสกัดเนื้อแก้วมังกรจาก บทที่ 2 ที่ระดับความเข้มข้น 0%, 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% ปริมาตรต่อปริมาตรทั้งหมดของสารสกัด เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ความเร็วของการหมุน 180 รอบต่อนาที เพื่อที่กำจัดน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลซูโครส โดยวัดการเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ที่เวลา 0, 3, 6. 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าช่วงแรก คือ 0 ถึง 24 ชั่วโมงของการเจริญ เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ในสารสกัดมีการเจริญที่ต่ำและเมื่อเข้าสู่เวลา 24 ถึง 72 ชั่วโมง เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 เริ่มมีการเจริญเพิ่มขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 3-1 จะเห็นได้ว่าช่วงแรกนั้นเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 เจริญเติบโตช้า อาจอยู่ในระยะพัก (Lag phase) กล่าวคือ เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 เริ่มพบกับสารสกัดแก้วมังกร ต้องปรับเข้ากับอาหารที่มีอยู่ในสารสกัดแก้วมังกร และยังพบว่าความเข้มข้นข้นของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ที่ 10% ปริมาตรต่อปริมาตรของสารสกัด มีการเจริญที่ต่ำกว่า ที่ความเข้มข้น 1.25%, 2.5% และ 5% ปริมาตรต่อปริมาตรทั้งหมดของสารสกัด และเมื่อพิจารณาช่วงที่สอง คือ เวลา 24 ถึง 72 ชั่วโมง เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 มีการเจริญแบบอย่างทวีคูณ ซึ่งเชื้ออยู่ในระยะแบ่งตัวทวีคณู (log phase) โดยพบว่า เมื่อระดับความเข้มข้นของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น และคงที่ที่ความเข้มข้นที่ 5% และ 10% จะเห็นได้ว่า สัดส่วนของปริมาณเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 กับความเข้มข้นของสารสกัดแก้วมังกรที่ใช้ในการหมัก มีผลต่อการเจริญเติบโต ต้องอยู่ในสัดส่วนที่เหมาะสม



ภาพที่ 3-1 กราฟเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ในสารสกัดเนื้อแก้วมังกรที่ระดับความเข้มข้น 1.25%, 2.5%, 5% และ10% โดยปริมาตร หมักเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

และเมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลที่เวลา 72 ชั่วโมงของการหมัก พบว่า ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลซูโครส ลดลงเมื่อความเพิ่มความเข้มข้นของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ที่ความเข้มข้น 1.25% และ 2.5% ปริมาตรต่อปริมาตรทั้งหมดของสารสกัด และมีค่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดน้ำตาลรวม (%TS) คือ 16% และ 61% ตามลำดับ และยังพบว่าที่ความเข้มข้นความเข้มข้นของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ที่ 2.5% ปริมาตรต่อปริมาตรทั้งหมดของสารสกัด สามารถกำจัดน้ำตาลซูโครสกำจัดได้หมด ส่วนความเข้มข้นของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ที่ความเข้มข้น 5% และ 10% ปริมาตรต่อปริมาตรทั้งหมดของสารสกัด มีค่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดน้ำตาลรวม (%TS) คือ 50% และ 55% ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 3-2 และพบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส ลดลงในปริมาณที่เท่ากัน ที่ความเข้มข้นของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ที่ 5% และ 10% ปริมาตรต่อปริมาตรทั้งหมดของสารสกัด ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า การเติมเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ลงไปในระบบการหมัก มีอาหารเลี้ยงเชื้อผสม ที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลกลูโคสอยู่ด้วยทำให้ถูกรบกวนในการวิเคราะห์



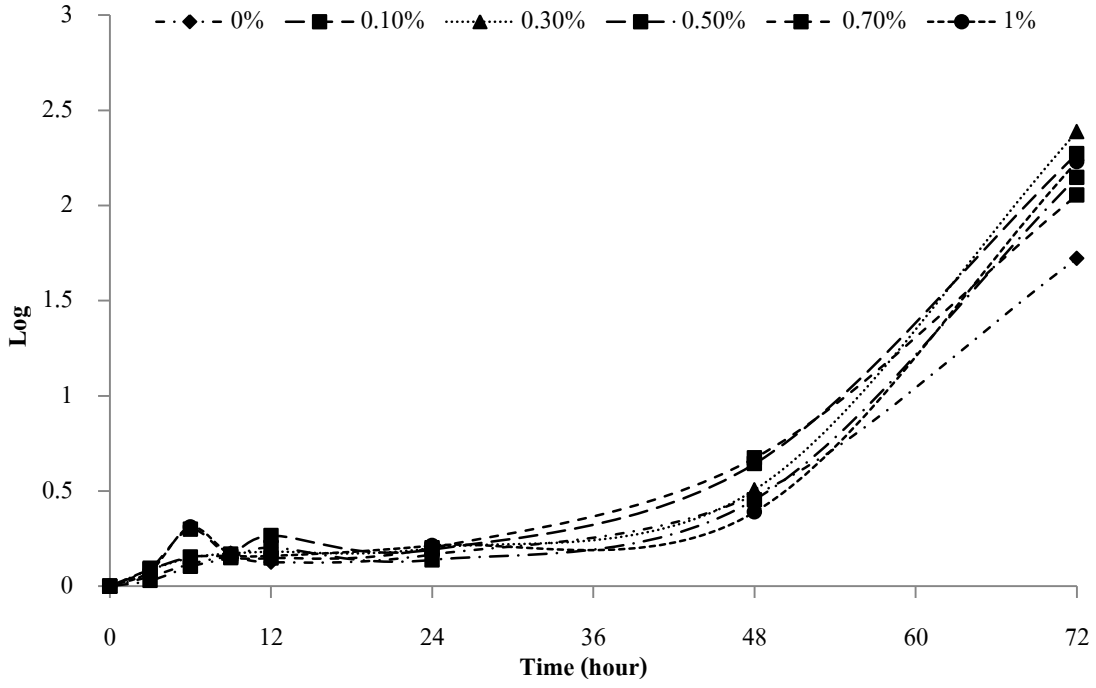
ภาพที่ 3-2 ผลของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ที่ระดับความเข้มข้น 0%, 1.25%, 2.5%, 5% และ 10% โดยปริมาตร ต่อความเข้มข้นของน้ำตาลในสารสกัดเนื้อแก้วมังกร หมักเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง

ดังนั้นเลือกความเข้มข้นของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ที่ 2.5% ปริมาตรต่อปริมาตร เนื่องจากใช้ปริมาณเชื้อในปริมาณที่น้อย สามารถที่กำจัดน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลซูโครสได้สูงสุด จึงนำไปศึกษาตอนต่อไป

3.5.1 ผลของความเข้มข้นยูเรียต่อการกำจัดน้ำตาล

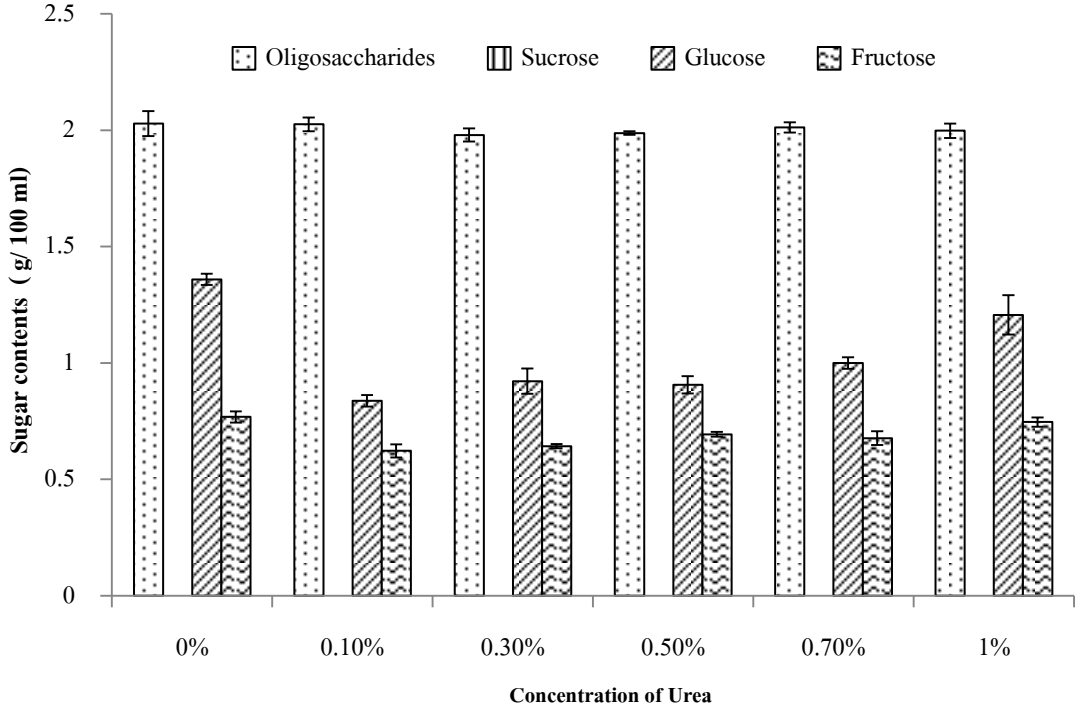
จากการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ ยูเรีย ซึ่งเติมเป็นแหล่งของไนโตรเจนในการหมัก ที่ระดับ 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.7% และ 1% กรัมต่อปริมาตรทั้งหมดของสารสกัด ในการหมักสารสกัดเนื้อแก้วมังกรจาก บทที่ 2 ที่ได้เติมเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ร่วมด้วย ระดับความเข้มข้น 2.5% ปริมาตรต่อปริมาตรทั้งหมดของสารสกัด จากการศึกษาก่อนหน้านี้จากข้อ 3.5.1 หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ความเร็วของการหมุน 180 รอบต่อนาที เพื่อที่กำจัดน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลซูโครส โดยวัดการเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ที่เวลา 0, 3, 6, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าช่วงแรก คือ 0 ถึง 36 ชั่วโมงของการเจริญ เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 มีการเจริญต่ำในทุกความเข้มข้นของการเติมยูเรีย และไม่มีความแตกต่างกับการไม่มีเติมยูเรีย ซึ่งเกิดจากเชื้ออยู่ในระยะพักซึ่งเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ต้องปรับเข้ากับอาหารที่มีอยู่ในสารสกัดแก้วมังกร และยูเรียที่เติมเข้าไปในการหมัก เมื่อเข้าสู่ 36 ถึง 72 ชั่วโมง หรือเข้าสู่ระยะแบ่งตัวทวีคูณ เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 เริ่มมีการเจริญเพิ่มขึ้น โดยพบว่า เมื่อหมักที่มีการเติมยูเรีย มีการเจริญได้ดีกว่าการหมักที่ไม่มีการเติม

ยูเรียในการหมัก และการเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 สูงสุดที่ความเข้มข้นของยูเรีย 0.3% กรัมต่อปริมาตรทั้งหมดของสารสกัด และลดลงตามลำดับ 0.1%, 0.5%, 1% และ 0.7% กรัมต่อปริมาตรทั้งหมดของสารสกัด ดังแสดงในภาพที่ 3-3 ทั้งนี้เนื่องมาจาก ถ้าปริมาณยูเรียที่เติมเข้าไปในระบบการหมักสารสกัดแก้วมังกร ถ้ามากหรือน้อยเกินมีผลทำให้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 เกิดแรงดันออสโมซิสเกิดขึ้น (Bai, 2008) มีผลต่อการเจริญของเชื้อ กล่าวคือถ้าเติมปริมาณยูเรียในระบบการหมักทีมาก ทำให้มีระบบมีปริมาณน้ำน้อย ทำให้น้ำที่มีอยู่ภายในเซลล์ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ก็ไหลออกมา ทำให้เซลล์เหี่ยว ตายในที่สุด และถ้าหากเติมปริมาณยูเรียในระบบการหมักน้อย ส่งผลทำให้น้ำภายในระบบการหมักมากกว่าน้ำภายในเซลล์ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ทำให้น้ำภายนอกไหลเข้าภายในตัวเซลล์ จนกว่าน้ำภายนอกเซลล์เท่ากับภายในเซลล์ แต่ถ้าไหลเข้ามากเกิน ส่งผลทำให้เกิดแรงดันแต่งเซลล์ของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ตายในที่สุด และปริมาณยูเรียที่เติมในการหมักสารสกัดแก้วมังกรที่เหมาะสม สามารถส่งเสริมในการเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ได้ดี โดยผ่านกลไกการย่อยสลายยูเรียเปลี่ยนเป็น แอมโมเนีย เข้าสู่เซลล์โดยใช้เอนไซม์ Urea carboxylase และ allophanate hydrolase (Hofman-Bang, 1999) เพื่อเพิ่มจำนวนของเซลล์ต่อไป ซึ่งจะเห็นได้ว่าเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 เจริญได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับการที่ไม่ได้เติมยูเรียในการหมัก ที่เวลา 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 3-3 กราฟเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ที่ระดับความเข้มข้น 2.5% โดยปริมาตร ในสารสกัดเนื้อแก้วมังกรที่มีการเติมยูเรีย ที่ความเข้มข้น 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.7% และ 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสารสกัด หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

และเมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลที่เวลา 72 ชั่วโมงของการหมัก พบว่า ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลซูโครส ลดลงสูงสุดที่ความเข้มข้นของยูเรีย 0.1% กรัมต่อปริมาตรทั้งหมดของสารสกัด โดยที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดน้ำตาลรวม (%TS) เท่ากับ 73.31% และค่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดน้ำตาลรวม (%TS) มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของยูเรียเพิ่มขึ้น กล่าวคือ ที่ความเข้มข้นของยูเรีย 0.3%, 0.5%, 0.7% และ 1% กรัมต่อปริมาตรทั้งหมดของสกัด มีค่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดน้ำตาลรวม (%TS) เท่ากับ 71.41%, 70.76%, 69.36% และ 64.31% ตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 3-4 และซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Zong และคณะ (2005) ได้แนะนำวิธีการสำหรับการกำจัดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ จากโอลิโกแซคคาร์ไรด์ด้วยยีสต์ 8%-12% กรัมต่อกรัมของวัตถุดิบเริ่มต้นของโอลิโกแซคาไรด์ และผสมคาร์บาไมด์ หรือ ยูเรีย ซึ่งเป็นแหล่งของไนโตรเจนในปริมาณ 0.1%-0.5% กรัมต่อกรัมของวัตถุดิบ แต่การศึกษานี้ใช้ปริมาตรความเข้มข้นของเชื้อยีสต์เพียง 2.5% ปริมาตรต่อปริมาตรทั้งหมดของการหมัก เนื่องจากปริมาณน้ำตาลในวัตถุดิบไม่มาก แต่ขณะที่การเติมยูเรียในปริมาตร 0.1% กรัมต่อปริมาตรทั้งหมดของการหมัก



ภาพที่ 3-4 ผลของความเข้มข้นยูเรีย ที่ระดับความเข้มข้น 0.1%, 0.3%, 0.5%, 0.7% and 1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ร่วมกับการเติมเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ที่ 2.5% โดยปริมาตร ต่อความเข้มข้นของน้ำตาลที่มีอยู่ในสารสกัดเนื้อแก้วมังกร หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

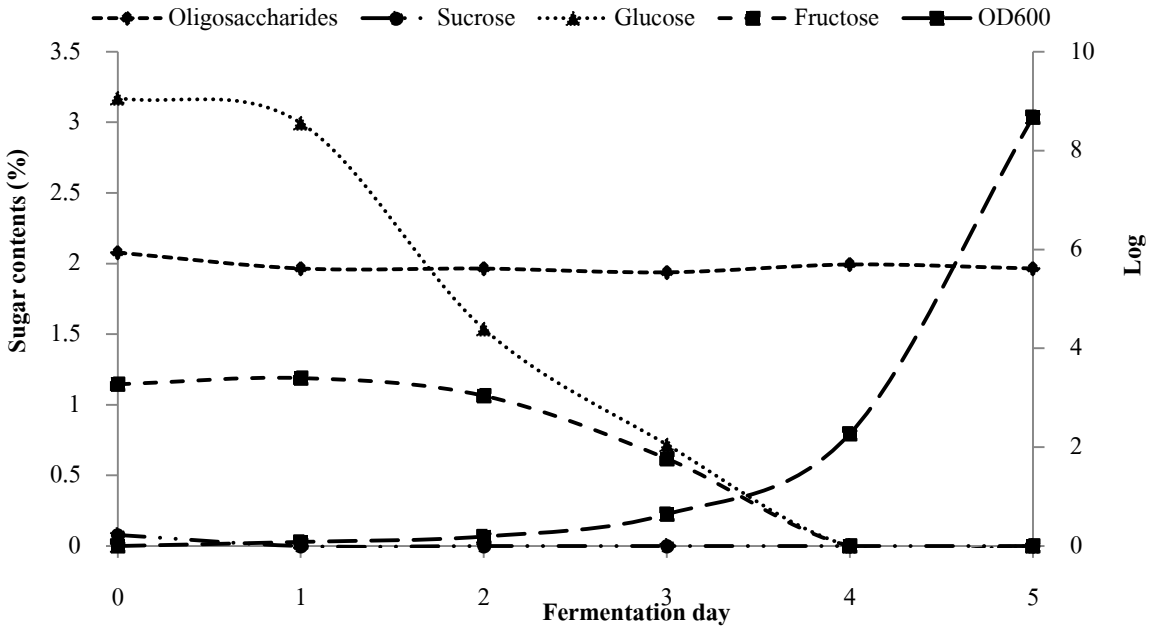
ดังนั้นการศึกษาตอนต่อไป จึงเลือกความเข้มข้นของการเติมยูเรียในการหมักสารสกัดจากแก้วมังกร เป็น 0.1% กรัมต่อปริมาตรของสารสกัดร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ที่ความเข้มข้น

2.5% ปริมาตรต่อปริมาตร เนื่องจากใช้ปริมาณของยูเรียที่น้อย สามารถที่กำจัดน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลซูโครสได้สูงสุด

3.5.3 ผลของระยะเวลาการหมักต่อการกำจัดน้ำตาล

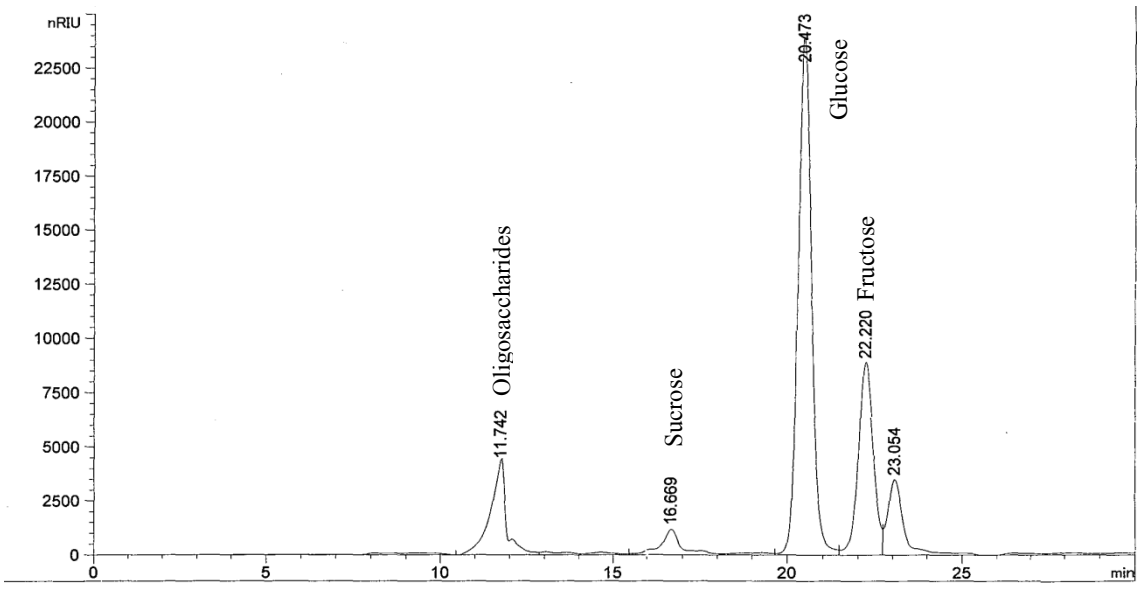
สภาวะเหมาะสมของปริมาณความเข้มข้นของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5019 คือ 2.5% โดยปริมาตร จากตอน 3.5.1 และความเข้มข้นของยูเรีย คือ 0.1% กรัมโดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตอน 3.5.2 การศึกษาขั้นต้น การหมักสารสกัดจากเนื้อแก้วมังกร เพื่อหาระยะเวลาเหมาะสมในการหมักที่สามารถกำจัดน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครสได้หมด โดยสุ่มตัวอย่างวันที่ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน นำตัวอย่างที่ได้จากการหมักไปวิเคราะห์โดย HPLC เพื่อตรวจสอบน้ำตาล ผลการศึกษาพบว่าน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลซูโครสในสารสกัดจากเนื้อแก้วมังกรถูกกำจัดออกอย่างสมบูรณ์ ที่เวลา 4 วันของการหมัก ภาพที่ 3-5 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bai และคณะ (2007) กล่าวว่า ในการศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* น้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล หรือน้ำตาลในกลุ่ม 6 คาร์บอนถูกเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิก 2 โมเลกุล แล้วถูกเปลี่ยนเป็น 2 โมเลกุลก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และ 1 โมเลกุลเอทานอล ด้วยกระบวนการไกลโคไลซิส หรือ EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) ซึ่งการหมักของ เชื้อ *S. cerevisiae* ไม่ได้ส่งผลกระทบต่อโอลิโกแซคคาไรด์ในสารสกัดภาพที่ 3-6 ดังนั้นการทำบริสุทธิ์ของสารสกัดจากเนื้อแก้วมังกรจึงไม่มีผลต่อน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ต้องการ

เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยก่อนหน้าที่ใช้เทคโนโลยีเมมเบรนในกระบวนการทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์ Goulas และคณะ (2002) ได้ศึกษาการทำบริสุทธิ์กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้า ด้วยนาโนฟิลเตรชัน พบว่าผลิตภัณฑ์สุดท้ายของกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ มีความบริสุทธิ์เป็น 81-98% และOlano และคณะ (2001) ได้ศึกษาการทำเข้มข้นและการทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์จาก yacon rootstock ด้วยอัลตราฟิลเตรชันและนาโนฟิลเตรชัน พบว่า ผลิตภัณฑ์สุดท้ายโอลิโกแซคคาไรด์ มีความบริสุทธิ์ เป็น 67-98% และเมื่อเปรียบเทียบกับโอลิโกแซคคาไรด์เชิงการค้า ของ Raftilose P95 (Fructo-oligosaccharides), oligomate 55 (Transgalactosylated oligosaccharides), Galacto-oligosaccharides และ Xylo-oligosaccharides พบว่า ผลิตภัณฑ์สุดท้ายโอลิโกแซคคาไรด์ มีความบริสุทธิ์ เป็น 95%, 55%, 85% และ 70% ตามลำดับ (George *et al*., 1999) จะเห็นได้ว่า โอลิโกแซคคา-ไรด์จากเนื้อแก้วมังกรที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* มีความบริสุทธิ์เป็น 99.9% ซึ่งสูงกว่าโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้าและงานวิจัยก่อนหน้านี้

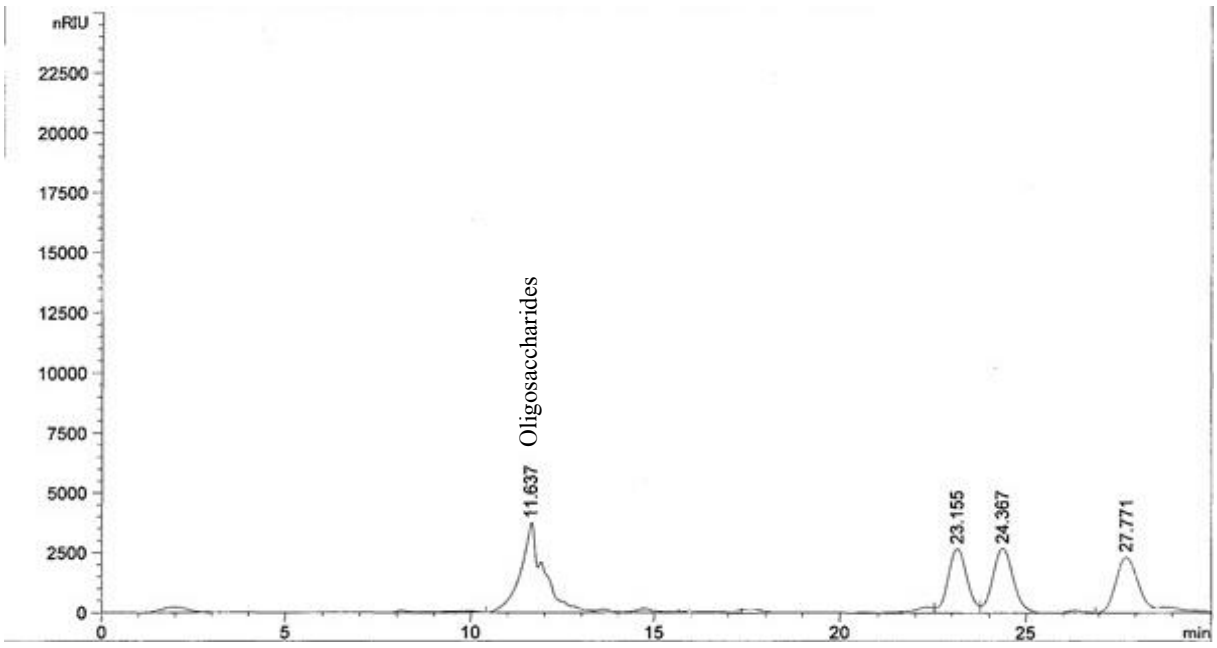


ภาพที่ 3-5 ผลของระยะเวลาการหมักต่อการกำจัดน้ำตาลซูโครส ฟรุกโตส และกลูโครส ในสารสกัดเนื้อแก้วมังกร ที่มีการเติมเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ระดับความเข้มข้น 2.5% โดยปริมาตร ร่วมกับการเติม ยูเรีย 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หมักเป็นเวลา 5 วัน

(a)



(b)



ภาพที่ 3-6โครมาโทแกรมของสารสกัดแก้วมังกร ก่อนการหมัก (a) และหลังการหมัก (b) โดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5019 ร่วมกับการเติมยูเรีย 0.1% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

3.6 สรุปผลการทดลอง

สภาวะที่เหมาะสมของการทำบริสุทธิ์สารสกัดจากเนื้อแก้วมังกรโดย ใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 501 คือความเข้มข้นของเชื้อเป็น 2.5% โดยปริมาตร และเติมยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้น 0.1% กรัม โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสารสกัด ระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสม คือ 4 วัน ภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่มีการเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที สามารถกำจัดน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส ได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งทำให้โอลิโกแซคคาร์ไรด์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น เป็น 99.9%

3.7 เอกสารอ้างอิง

Bai, F. W., Anderson, W. A. and Moo-Young, M. 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. Biotech. Adv. 26: 89-105.

Crittenden, R., and Playne, M. 2002. Purification of food-grade oligosaccharides using immobilised cells of *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol.. And Biot. 3: 297-302.

Goulas, A. K., Kapasakalidis, P.G., Sinclair, H.R. and Grandisor, A.S.2002. Purification of oligosaccharides by nanofiltration. J. membrane sci. 209: 321-335.

Mehta, N. N. and khanna, R. S. 1964. Chem. Age. India. 15: 67.

Paturau, J. M. 1989. Sugar series. By-Product of the cane sugar. Introduction to their inductrial utilition. 3 rd ed. Amsterdam: Elsevier.

Pinelo, M., Gunnar, J. and Anne, S. M. 2009. Membrane technology for purification of enzymatically produced oligosaccharides: Molecular and operational features affecting performance. Sep. Purif. Technol. 70: 1-11.

Hofman-Bang, J. 1999. Nitrogen catabolite repression in Saccharomyces cerevisiae. Mol. Biotechnol. 12: 35-71.

van Maris, A. J., Abbott, D. A., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M. A., Wisselink, H. W., Scheffers, W. A., van Dijken, J. P. and Pronk, J. T. 2006 . Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 90: 391-418.

Wichienchot, S., Jatupornpipat, M. and Rastall, R. A. 2010. Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. Food Chem. 3: 850-7.

Zhong, Z., Jianhua, Z., XiaoLin, L., Xiao, Y. X. and Xiaomei, M. Method for the removal of monosaccharide in oligosaccharides production. U.S. Patent 7,906,14 (15 March 2011).

บทที่ 4

การประเมินคุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติก

4.1 บทนำ

สารพรีไบโอติก คือ สารอาหารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต ที่ไม่สามารถถูกย่อยในปาก และกระเพาะอาหาร และถูกดูดซึมในลำไส้เล็ก แต่ถูกหมักในลำไส้ใหญ่ และผลิตกรดไขมันสายสั้น เช่น อะซิติก โพรพิโอนิก แลคติกและบิวทาริก และวิตามินบางชนิด เช่น บี 1 บี 2 และกรดโฟลิก เป็นต้น ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักเหล่านี้ ส่งผลทำให้ส่งเสริมสุขภาพของผู้ที่กินเข้าไปโดยกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในร่างกาย (โพรไบโอติก) และยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค อีกทั้งช่วยในการเพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุบางชนิด เช่น แคลเซียส ลดระดับคอเลสเตอรอล และช่วยในการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ เป็นต้น ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้เล็งเห็นถึงความสำคัญในประเด็นนี้ เพื่อยืนยันว่าสารสกัดโอลิโกแซคคาร์ไรด์จากเนื้อแก้วมังกรที่ได้มีคุณสมบัติเป็นสารพรีไบโอติกเป็นทางเลือกหนึ่งในการบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพ

4.2 บทตรวจเอกสาร

เกตุชุลี (2555) ได้ศึกษาการทนต่อการย่อยของน้ำตาลนอนรีดิวซ์ซึ่งเป็นตัวแทนของโอลิโก-แซคคาไรด์จากเนื้อขนุนในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหาร พบว่าน้ำตาลนอนรีดิวซิ่งจากสารสกัดเนื้อขนุนทนต่อการย่อยได้น้อยกว่าอินนูลิน และมีค่าร้อยละของการย่อยภายใต้สภาวะจำลองในปาก กระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก เท่ากับร้อยละ 0, 10.35 และ 52.18 ตามลำดับ ดังนั้น ปริมาณน้ำตาลนอนรีดิวซ์ที่ทนต่อการย่อยและสามารถผ่านไปถึงลำไส้ได้ คือ ร้อยละ 34.47

Nakada และคณะ (2003) พบว่า โคจิโอลิโกแซคคาไรด์ (Koji-oligosaccharide) สามารถต้านการย่อยด้วยเอนไซม์ α-amylase จากน้ำลายมนุษย์และจากตับอ่อนหมู (porcine pancrease α-amylase) ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่โคจิโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลต่ำ (ประกอบด้วยน้ำตาล 2 หน่วย) มีเปอร์เซ็นต์การย่อยอยู่ในช่วง 56.8-87.5

Manderson และคณะ (2005) ได้ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติกของสารเพคติก โอ-ลิโกแซคคาไรด์ (Pectic-oligosaccharide) จากวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการผลิตน้ำส้ม ด้วยระบบการจำลองการหมักแบบกะ โดยควบคุมสภาวะเหมือนจำลองลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย หมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เพคติก- โอลิโกแซคคาไรด์ สามารถส่งเสริมการเจริญของปริมาณเชื้อ bifidobacteria และ *Eubacterium rectale* แต่มีค่าดัชนีพรีไบโอติก (PI) ต่ำกว่าของฟรุกโต-โอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้า และยังสามารถผลิตกรดบิวทาริก ซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์

Al-Tamimi และคณะ (2006) ได้ศึกษาการหมักของจุลินทรีย์จากอุจจาระมนุษย์ ของ Arabino-oligosaccharides ที่ช่วงน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ซึ่งได้จากการไฮโดรไลซ์จาก sugar beet arabinan พบว่า arabino-oligosaccharides ที่น้ำหนักโมเลกุลต่ำที่สุด มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อ Bifidobacteria ได้สูงสุด และพบว่าปริมาณของเชื้อ Bacteroides ลดลงแปรผันตามน้ำหนักโมเลกุล คือ arabinan, arabinose และ higher oligosaccharides (degree of polymerization, DP > 8) ภายใน 24 ชั่วโมง มีเพียงคาร์โบไฮเดรตผสม ที่มี DP = 1-2 เพิ่มขึ้นภายใน 48 ชั่วโมง (log 8.77 ± 0.23) ส่วนเชื้อ Clostridia ลดลงในสารตั้งต้นทุกชนิด

Wichienchot และคณะ (2010) ได้ศึกษาการทนการย่อยในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารและคุณสมบัติการส่งเสริมการเจริญของเชื้อในกลุ่มโพรไบโอติก ของโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกรพันธุ์เนื้อสีขาว พบว่าโอลิโกแซคคาไรด์จากสารสกัดเนื้อแก้วมังกรทนต่อการย่อยภายใต้สภาวะจำลองกระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก เท่ากับร้อยละ 4.04 และ 34.88 ตามลำดับ ดังนั้น ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ที่ทนต่อการย่อยและสามารถผ่านไปถึงลำไส้ได้ คือ ร้อยละ 61.08 และยังพบว่าโอลิ-โกแซคาไรด์ที่ผ่านไปถึงลำไส้ สามารถส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ lactobacilli และ bifidobacteria

4.3 วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบสมบัติการเป็นพรีไบติกของสารสกัดจากเนื้อแก้วมังกรในการต้านการย่อยในสภาวะจำลองทางเดินอาหารมนุษย์
2. เพื่อทดสอบความสามารถในการหมักของโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร โดยจุลินทรีย์จากอุจจาระมุนษย์ เลี้ยงเชื้อแบบกะ (batch culture system)
3. เพื่อศึกษาผลของน้ำหมักที่ได้ต่อการต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่มนุษย์

4.4 สารเคมีและอุปกรณ์

สารเคมี/เอนไซม์	บริษัทผู้ผลิต/เกรด/ประเทศ
1. Acetate	Sigma/ Analytical/ Germany
2. Acetonitrile	Fisher Scientific/ Analytical/ India
3. Antifade	Sigma/ Analytical/ Germany
4. Bile salt	Sigma/ Analytical/ Germany
5. Butyric acid	Sigma/ Analytical/ Germany
6. Calcium chloride hexahydrate	Ajex FineChem/ Analytical/ Australia
7. Cysteine-HCl	Sigma/ Analytical/ Germany
8. Dipotassium phosphate	Ajex FineChem/ Analytical/ Australia
9. 3-(4, 5-dimethythiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)	Sigma/ Analytical/ Germany
10. DNA Probe Bif 164, Bac 303, Lab 158, Chis 150 และ Eub 338	Sigma/ Analytical/ Germany
11. Ethanol	Labscan/ Commercial/ Thailand
12. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma/ Analytical/ Germany
13. foetal calf serum	Sigma/ Analytical/ Germany
14. Glucose	Sigma/ Analytical/ Germany
15. Haemin	Sigma/ Analytical/ Germany
16. Human saliva α-amylase	Sigma/ Analytical/ Germany
17. Lactate	Sigma/ Analytical/ Germany
18. L-glutamine	Sigma/ Analytical/ Germany
19. Magnesium sulfate	Ajex FineChem/ Analytical/ Australia
20. Monopotassium phosphate	Ajex FineChem/ Analytical/ Australia
21. Non-essential amino acids	Sigma/ Analytical/ Germany
22. Paraformaldehyde	Sigma/ Analytical/ Germany
23. Peptone	Ajex FineChem/ Analytical/ Australia
24. Penicillin	Sigma/ Analytical/ Germany
25. Phosphate Buffered Saline	Sigma/ Analytical/ Germany
26. Phenol	Labscan/ Commercial/ Thailand
27. Potassium chloride	Ajex FineChem/ Analytical/ Australia

สารเคมี/เอนไซม์	บริษัทผู้ผลิต/เกรด/ประเทศ
28. Porcine pancreases α-amylase	Sigma/ Analytical/ Germany
29. Propionic acid	Sigma/ Analytical/ Germany
30. Resazuriun	Sigma/ Analytical/ Germany
31. Streptomycin	Sigma/ Analytical/ Germany
32. Sucrase	Sigma/ Analytical/ Germany
33. Sulfuric acid	Labscan/ Commercial/ Thailand
34. Sodium hydroxide	Ajex FineChem/ Analytical/ Australia
35. Sodium potassium tartrate	Ajex FineChem/ Analytical/ Australia
36. Sodium bicarbonate	Ajex FineChem/ Analytical/ Australia
37. Sodium sulfate	Ajex FineChem/ Analytical/ Australia
38. Sodium chloride	Ajex FineChem/ Analytical/ Australia
39. Trichloro acetic acid	Sigma/ Analytical/ Germany
40. Trypsin	Sigma/ Analytical/ Germany
41. Tween 80	Sigma/ Analytical/ Germany
42. Vitamin KI	Sigma/ Analytical/ Germany
43. Water HPLC	Labscan/ Commercial/ Thailand
44. Yeast extract	Ajex FineChem/ Analytical/ Australia

วัสดุอุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต/ เกรด/ ประเทศ
1. กล้องจุลทรรศน์ ชนิดฟลูออเรสเซนต์	Nikon/ USA
2. เครื่องไมโครเพรต	รุ่น Metter Toledo 320 Biotek/ UK
3. เครื่องกวนสารละลาย	Memmert/USA
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง	ยี่ห้อ Hettich zentrifugen รุ่น MIKRO 22/ France
5. ชุดควบคุมพีเอช (pH controller) พร้อมโพรบวัดพีเอช	Mettler Toledo/UK
6. ตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์	Memmert รุ่น BE 500 Schwabach/ Germany
7. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Air Flow)	Hotpack/ Philadelphia/ USA
8. ถังแก๊ซไนโตรเจน และระบบท่อ	

วัสดุอุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต/ เกรด/ ประเทศ
9. โถแก้ว ปริมาตร 320 มิลลิลิตร	
10. แผ่นกรองขนาดรูพรุน 0.22 ไมครอน	Sigma/ Analytical/ Germany
11. หม้อนึ่งอัดความดัน (Autoclave)	Labtech/Korea
12. ไมโครปิเปต (ขนาด 10-100 และ 100-100 มิลลิลิตร)	Labmate/USA
13. เพลต ชนิด 96 หลุม	Sigma/ Analytical/ Germany
14. อุปกรณ์พลาสติกที่ใช้เลี้ยงเซลล์	Sigma/ Analytical/ Germany
15. อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบน้ำวน	Memmert/USA

4.5 วิธีการทดลอง

4.5.1 การทดสอบการทนการย่อยด้วยเอนไซม์และกรดในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหาร

การทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยเอ็นไซม์และกรดในสภาวะจำลอง (*In vitro*) ของระบบทางเดินอาหาร ทำในสารละลายน้ำลายเทียม (Artificial human saliva) ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 6.8 ปริมาตร 500 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก) ที่มีสารสกัดละลายอยู่ปริมาณ 30 กรัม (ดัดแปลงจาก Fässler *et al*., 2006)

4.5.1.1 การทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ human saliva α-amylase

เติมสารละลายเอนไซม์ human saliva α-amylase (ภาคผนวก ก) 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 นาที และแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมดมาวิเคราะห์ปริมาณทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อคำนวณร้อยละของปริมาณน้ำตาลที่ถูกย่อยจากสมการที่ 3

4.5.1.2 การทนต่อการย่อยด้วยกรดในกระเพาะอาหาร

นำสารละลายที่เหลือจากการทดลองในข้อ 4.5.1.1 มาวัดปริมาตรและเติมสารเคมีต่างๆ ดังแสดงในภาคผนวก ก นำไปกวนผสมให้เข้ากันเพื่อปรับสภาวะของสารละลายให้ใกล้เคียงกับสภาวะของสารละลาย อิเล็กโตรไลท์ในกระเพาะอาหาร จากนั้นปรับพีเอชของสารละลายให้เป็น 2 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและสุ่มตัวอย่างที่เวลา 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180 และ 240 นาที โดยภายหลังการสุ่มตัวอย่างให้นำสารละลายมาปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วย 1.0 M NaOH เพื่อหยุดปฏิกิริยาที่เกิดจากการย่อยด้วยกรด ก่อนนำไปวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การย่อยเช่นเดียวกับหัวข้อที่ 4.5.1.1

4.5.1.3 การทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ pancreases porcine α-amylase และ sucrase ในลำไส้เล็ก

นำสารสกัดที่เหลือจากการย่อยด้วยกรดในหัวข้อที่ 4.5.1.2 มาปรับพีเอชให้เป็น 6.9 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เพื่อปรับสภาวะของสารลายให้ใกล้เคียงกับการทำงานของเอนไซม์ในลำไส้เล็ก จากนั้นเติมเอนไซม์ porcine pancreases α-amylase (Type VI-B, Sigma) ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายในสารละลายเท่ากับ 0.75 unit/ml และเอนไซม์ sucrase ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 8,000 unit/ml (Buts *et al*., 2006) นำสารละลายไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และสุ่มตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างมาต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาทีและแช่ในน้ำแข็งทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ก่อนการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การย่อยเช่นเดียวกับข้อที่ 4.5.1.1 และ หลังจากครบ 6 ชั่วโมงทำการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยการต้มตัวอย่างสารละลายให้เดือดประมาณ 15 นาที ทำให้เย็นด้วยการแช่ในน้ำแข็งและตกตะกอนสารละลายตัวอย่างด้วยเอทานอล 95% (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 80%) ตั้งทิ้งค้างคืนไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนที่ตกตะกอนไว้และตกตะกอนอีกครั้งเพื่อแยกน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวออกจากสารละลายตัวอย่าง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโดยใช้เครื่อง HPLC หากยังตรวจพบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอยู่ให้ทำการตกตะกอนอีกครั้ง แต่หากไม่พบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่แล้วให้นำตัวอย่างไประเหยเอทานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ และทำแห้งตัวอย่างโดยใช้เครื่อง freeze dryer นำตัวอย่างผงแห้งที่เก็บไว้ที่ -20 °C เพื่อใช้ทดลองในระบบจำลองลำไส้ส่วนปลายมนุษย์แบบกะ

$$\text{การย่อย (\%)} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สุดท้าย} - \text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น}}{\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด} - \text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น}} \times 100 \qquad (3)$$

การย่อยร่วม (%) = การย่อยในปาก (%) + การย่อยในกระเพาะอาหาร (%) + การย่อยในลำไส้เล็ก (%)

4.5.2 การประเมินผลของการหมักโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกรโดยจุลินทรีย์จากอุจจาระมนุษย์ในการเลี้ยงเชื้อแบบกะ

4.5.2.1 วิธีการเตรียม fecal slurry

ใช้ fecal slurry เป็นหัวเชื้อในการหมักโดยใช้อุจจาระของคนที่มีสุขภาพดี ไม่มีประวัติเป็นโรคเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร และต้องไม่ได้รับยาปฏิชีวนะอย่างน้อย 3 เดือน ก่อนที่จะนำมาศึกษาโดยเตรียม fecal slurry ความเข้มข้นร้อยละ 10 สำหรับใช้เป็นจุลินทรีย์เริ่มต้น (inoculum) ในการหมักโดนนำมาเจือจางด้วย phosphate buffer saline (PBS) และนำไปตีปั่นด้วย stomacher เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำมากรองของแข็งออกเพื่อนำไปใช้งานต่อไป

4.5.2.2 การเตรียมระบบจำลองการหมักแบบกะ

การเลี้ยงเชื้อในระบบจำลองการหมักแบบกะ มีการควบคุมสภาวะเหมือนจำลองลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย เติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ฆ่าเชื้อ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร พ่นด้วยก๊าซไนโตรเจน ลงใน vessel ทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นเติม faecal slurry 100 มิลลิกรัม และตัวอย่างสารสกัดจากข้อ 4.5.1.3 มา 10 กรัมลงใน vessel ควบคุมสภาวะการหมักแบบกะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คนผสมตลอดเวลาด้วยแท่งแม่เหล็ก ควบคุม pH ที่ 6.8 $\pm$ 0.1 ด้วยชุดควบคุมพีเอชแบบอัตโนมัติ โดยการเติม NaOH หรือ HCl 0.5 N เก็บตัวอย่างที่ 0, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพที่ 4-1 เนื่องจากตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ โอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งมีขนาดโมเลกุลต่ำ จุลินทรีย์ในลำไส้สามารถใช้ได้อย่างรวดเร็ว ดังนั้นระยะเวลาในการหมักจึงเลือก 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่เป็นพอลิแซคคาไรด์จะใช้เวลาในการหมักในระบบจำลอง 48 ชั่วโมง เพื่อนำมาตรวจนับจุลินทรีย์โดยเทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) วิเคราะห์กรดไขมันสายสั้น (Short Chain Fatty Acid) ด้วยเครื่อง HPLC (Wichienchot *et al*., 2006)

ภาพที่ 4-1 แบบจำลองระบบการหมักแบบกะ (batch)

วิเคราะห์ความแตกต่างของจำนวนจุลินทรีย์ในชั่วโมงที่ 0 และ 24 ด้วยคอมพิวเตอร์โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS เวอร์ชัน 13.0 ใช้โดยใช้ *t*-tests นำตัวอย่างที่เวลาต่างๆ ไปวิเคราะห์กรดไขมันสายสั้น (SCFA) โดยใช้เทคนิค HPLC

4.5.2.3 การนับจำนวนจุลินทรีย์โดยเทคนิค Fluorescent *in situ* hybridization (FISH)

นำตัวอย่างปริมาตร 375 ไมโครลิตร มาเติม 4 % (w/v) parafomaldehyde solution พีเอช 7.2 ปริมาตร 1125 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืนเพื่อตรึงเซลล์จุลินทรีย์ นำเซลล์ที่ผ่านการตรึงมาล้างด้วย PBS 2 ครั้ง และนำมาละลายกลับด้วย PBS ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เติมเอทานอลเย็นความเข้มข้น 96% (v/v) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 1 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งต้องการใช้ แต่ไม่ควรเก็บไว้เกิน 3 เดือน นำเซลล์ที่ผ่านการตรึงมาทำการเจือจางให้ปริมาณเชื้อเหมาะสม และปิเปตมา 20 ไมโครลิตร เกลี่ยบนหลุมสไลด์ที่มีการเคลือบ TEFLON/Poly-L-Lysine นำมาวางบน slide warmer ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10-12 นาที จนตัวอย่างแห้ง นำสไลด์มาจุ่มในเอทานอลความเข้มข้น 50, 80, และ 96% (v/v) โดยหากเป็นสไลด์สำหรับนับ Lactobacillus ต้องนำมาหยดด้วย Lysozyme ก่อนหลุมละ 20 ไมโครลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นก่อนจุ่มเอทานอล โดยจุ่มที่แต่ละระดับความเข้มข้นละ 3 นาที เพื่อทำลายผนังเซลล์ทำให้ดีเอนเอโพรบสามารถเข้าจับกับดีเอนเอของแบคทีเรียที่จำเพาะได้ นำสไลด์ไปทำให้แห้งบน slide warmer

ทำการ prewarmed hybridization buffer (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิเฉพาะสำหรับทำไฮบริดไดเซชั่นของแต่ละโพรบ (ตารางที่ 4.1) แล้วนำตัวอย่างมา 45 ไมโครลิตร ผสมกับ 5 ไมโครลิตร ของสารละลายดีเอนเอโพรบที่จำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิด โดยโพรบที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ Bifidobacterium คือ Bif 164 วิเคราะห์กลุ่ม Bacteroides คือ Bac 303 วิเคราะห์กลุ่ม Lactobacillus/Enterococcus คือ Lab 158 วิเคราะห์กลุ่ม Clostridium คือ Chis 150 วิเคราะห์กลุ่ม Eubacteria หรือแบคทีเรียทั้งหมด คือ Eub 338 ซึ่งลำดับเบสของโพรบแต่ละชนิดแสดงดังตารางที่ 2.1 (Rycroft *et al*., 2001) ใส่ลงในหลุ่มบนสไลด์ แล้วนำไปบ่มด้วยเครื่อง hybridization oven ที่ตั้งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อโพรบแต่ละชนิด บ่มทิ้งไว้ 4 ชั่วโมงเมื่อครบเวลานำแผ่นสไลด์ไปล้างด้วย washing buffer (ภาคผนวก ก) 50 มิลลิลิตร ที่บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของแต่ละโพรบ โดยแช่นาน 15 นาที เมื่อครบเวลานำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตรที่แช่เย็นไว้ 2 ครั้ง แล้วนำสไลด์ที่ได้ทำแห้งทันที เติมสาร antifade ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมสไลด์ ปิดด้วย cover slide นำสไลด์ไปส่องนับเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด fluorescence microscope โดยนับหลุมละ 15 fields และคำนวณค่า Prebiotic lndex (PI) โดยหาจากสมการต่อไปนี้ (Palframan *et al*, 2003)

$$\text{Prebiotic index (PI)} = \alpha + \beta - \gamma - \delta$$

$$\alpha = (Bif_{24}/Bif_0)/\text{Total}$$

$$\beta = (Lac_{24}/Lac_0)/\text{Total}$$

$$\gamma = (Bac_{24}/Bac_0)/\text{Total}$$

$$\delta = (Clos_{24}/Clos_0)/\text{Total}$$

$$\text{Total} = Eub_{24}/Eub_0$$

โดยกำหนดให้

Eub_0 , Eub_{24} คือ ปริมาณของเชื้อ Eubacteria หรือจุลินทรีย์ทั้งหมด ที่เวลาเริ่มต้น และ เวลา 24 ชั่วโมง

Bif_0 , Bif_{24} คือ ปริมาณของเชื้อ Bifidobacterium ที่เวลาเริ่มต้น และ เวลา 24 ชั่วโมง

Lac_0 , Lac_{24} คือ ปริมาณของเชื้อ Lactobacillus ที่เวลาเริ่มต้น และ เวลา 24 ชั่วโมง

Bac_0 , Bac_{24} คือ ปริมาณของเชื้อ Bacteroid ที่เวลาเริ่มต้น และ เวลา 24 ชั่วโมง

$Clos_0$, $Clos_{24}$ คือ ปริมาณของเชื้อ Clostidium ที่เวลาเริ่มต้น และ เวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4-1 แสดงลำดับเบสของโพรบแต่ละชนิด

Target organisms	**Probe Reference**	**Sequence from 5' to 3'**	**Hybridization temperature (^oC)**
Bacteroides	Bac 303	CCAATGTGGGGGACCTT	48
Bifidobacterium	Bif 164	CATCCGGCATTACCACCC	50
Lactobacillus	Lab 158	GGTATTAGCA(T/C)CTGTTTCCA	50
Clostridium	Chis 150	TTATGCGGTATTAATCT(C/T)CCTTT	50
Eubacterium	Eub 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	48

ที่มา Rycroft *et al* (2001)

4.5.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณของกรดไขมันสายสั้น (Short-chain fatty acid) โดยใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์โดยนำน้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อจาก fecal slurry ที่ใช้โอลิโกแซคคาไรด์จากเปลือกแก้วมังกรเป็นแหล่งคาร์บอนจากตอนที่ 4.5.2 2 มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกตัวเซลล์จุลินทรีย์ออก หลังจากนั้นนำส่วนใส

(supernatant) ที่ได้ไปกรองผ่านกระดาษกรองไนลอนขนาด 0.2 ไมโครเมตร มาวิเคราะห์หาปริมาณของกรดไขมันสายสั้นด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ BIO-RAD Aminex HPX-87 H Ion Exclusion column ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 300 มิลลิเมตร โดยใช้ 0.005 M H_2SO_4 เป็น mobile phase ให้อัตราการไหลเท่ากับ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และใช้ UV detector ที่ 215 นาโนเมตร ซึ่งนำมาคำนวณปริมาณของกรดไขมันสายสั้นแต่ละชนิดจากพื้นที่ใต้พีค (peak) ในการวิเคราะห์ใช้สารมาตรฐาน กรดแลคติกที่ความเข้มข้น 2.5, 25, 50 มิลลิโมลาร์ กรดอะซิติก กรดโพรพิออนิกและกรดบิวทาริก ที่ความเข้มข้น 1, 10, 20 มิลลิโมลาร์ (Olano-Martin *et al*., 2000)

4.5.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของน้ำหมัก

นำน้ำหมักตัวอย่างจาก Vessel มาเหวี่ยงแยกเซลล์และของแข็งออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที นำส่วนของเหลวมาทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่ทำให้เซลล์ตาย ดังนี้

เซลล์ที่ใช้ทดสอบคือ Caco-2 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งจากมนุษย์ซื้อจาก ATCC HTB-37 ในรูปของเหลวปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำเซลล์มาเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนในขวดเลี้ยงเชื้อพลาสติกโดยใช้อาหาร Eagle' Minimum Essential Medium (เติม fetal bovine serum ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 20%, Non-essential amino acid 1% ปริมาตรต่อปริมาตรสารละลาย และยาปฏิชีวนะ Penicillin-streptomycin 1%) ปริมาตร 6-8 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้ CO_2 incubator ที่ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้เซลล์เพิ่มจำนวนเป็น 1×10^6 ถึง 8×10^6 เซลล์/ตร.ซม. นำเซลล์มาทดสอบฤทธิ์การต้านเซลล์มะเร็งโดยทำใน 96-well plate ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ EMEM ปริมาตร 0.2 มล. เติมเซลล์ลงไปในแต่ละหลุมๆ ละ 5×10^4 เซลล์/มล. และเติมตัวอย่างของเหลวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 0.1 มล. ในแต่ละหลุม นำเซลล์ไปเลี้ยงใน ตู้ CO_2 incubator ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มี 5% CO_2 และมีความชื้นประมาณ 95% เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเชื้อออกและเติม 0.25% trypsin-0.53 mM EDTA เพื่อย่อยให้เซลล์หลุดจากการเกาะและแยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ นำมาเติม MTT [3-(4, 5-dimethythiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide] ซึ่งเป็นของเหลวสีเหลือง กรณีเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์จะเปลี่ยน MTT ไปเป็น formazan ซึ่งมีสีน้ำเงิน นำของเหลวมาวัดอัตราการอยู่รอดของเซลล์ด้วย microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง ดังสมการที่ 4 แล้วนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง Caco-2 กับความเข้มข้นของตัวอย่าง (Shoeb *et al*., 2006)

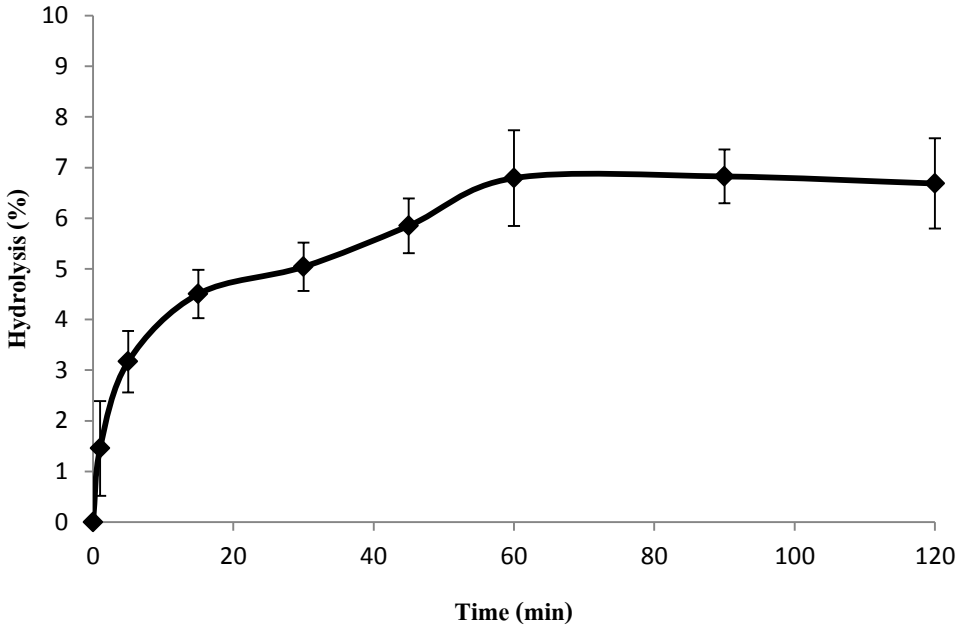
การอยู่รอดของเซลล์มะเร็ง Caco-2 (%)

$$= \frac{\text{ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ใส่ตัวอย่างแต่ละความเข้มข้น – ค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเซลล์}}{\text{ค่าความขุ่นของชุดควบคุม – ค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเซลล์}} \times 100 \qquad (4)$$

4.6 ผลการทดลอง

4.6.1 การทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์และกรดในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหาร

การศึกษาการทดการย่อยของสารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกรที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ในการทดลองบทที่ 4 ในระบบทางเดินอาหารส่วนต้นจำลอง ซึ่งประกอบด้วยปาก กระเพาะและลำไส้เล็ก จากการทดลอง การทดต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ α-amylase จากน้ำลายของตัวอย่างสารสกัดเนื้อแก้วมังกรที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเชื้อ แสดงผลร้อยละการย่อย (% hydrolysis) ที่เวลาต่างๆ เป็นเวลา 10 นาที แสดงใน (ภาพที่ 4-2) พบว่าเมื่อผสมสารสกัดของเนื้อแก้วมังกรกับน้ำลายเทียมและเติมเอนไซม์ human salivary α-amylase เอนไซม์เริ่มย่อยตัวอย่างสารสกัดโดยร้อยละการย่อยเพิ่มสูงขึ้นอย่างเร็วในช่วง 20 นาทีแรกจากนั้นเริ่มย่อยอย่างช้าๆ จนกระทั้งถึงนาทีที่ 60 เป็นจุดที่มีอัตราการย่อยสูงสุดและคงทีจนสิ้นสุดการย่อย โดยที่อัตราการย่อยสูงสุดของสารสกัดในน้ำลายเทียมที่สภาวะการย่อยในปาก คือ 6.7%

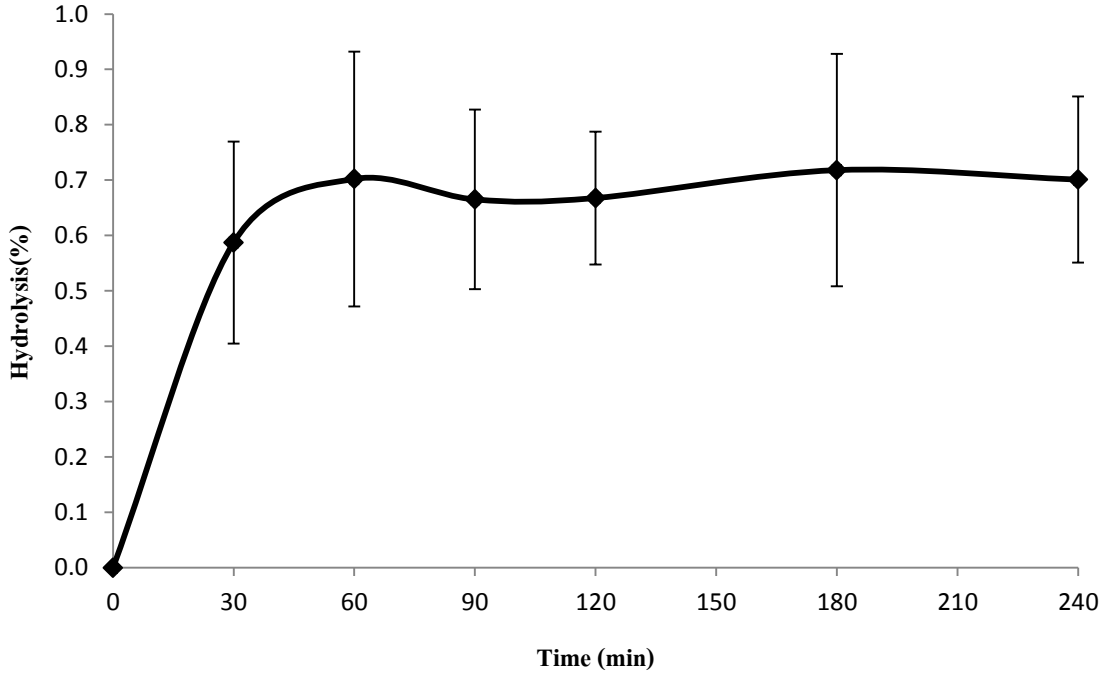


ภาพที่ 4-2 ร้อยละการย่อยของโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร เมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ human salivary α-amylase (0.33 unit/ml, พีเอช 6.8) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที ภายใต้สภาวะจำลองการย่อยในปาก

การทดลองที่ได้พบว่าสอดคล้องกับ Wichienchot และคณะ (2010) ซึ่งพบว่า หากบริโภคโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากแก้วมังกร (DP ในช่วง 3-4) จะเกิดการย่อยในปากสูงสุดไม่เกินร้อยละ 10 เนื่องจากระยะเวลาการย่อยในปากใช้เวลาประมาณ 30 วินาที ในขณะที่การย่อยในลำไส้เล็กอาจเกิดการ

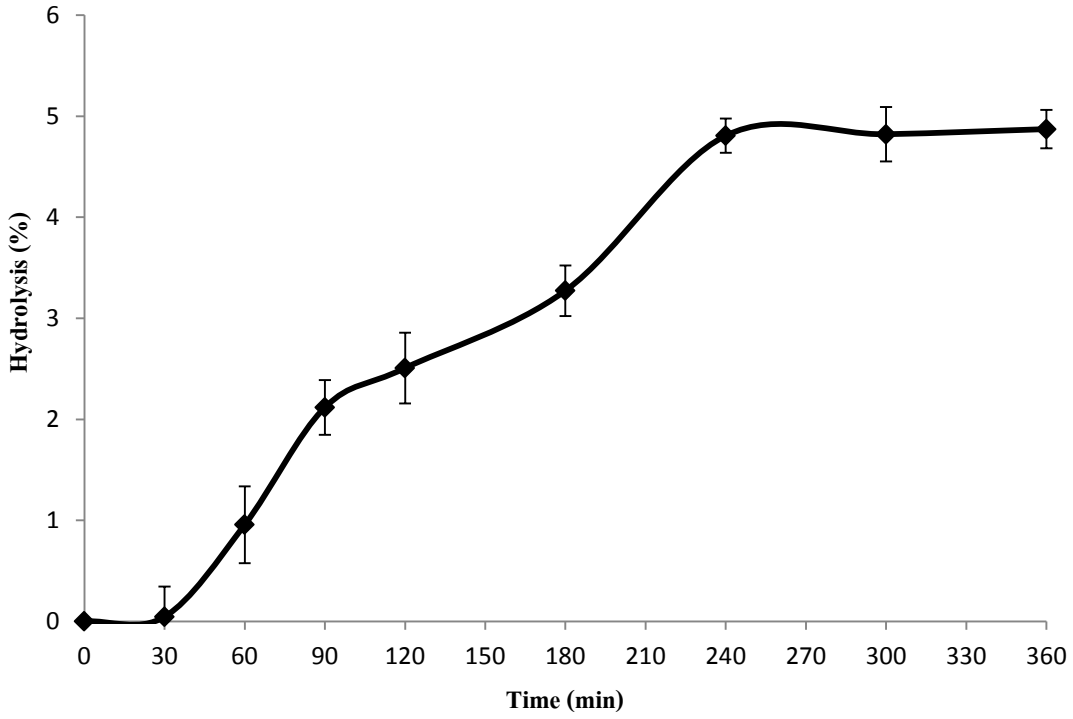
ย่อยได้มากกว่าร้อยละ 30 เนื่องมาจากภายในลำไส้เล็กมีเอนไซม์มากมายที่สามารถย่อยโอลิโกแซคคาไรด์เป็นโมเลกุลเดี่ยว เช่น เอนไซม์มอลเทส แลคเทสและซูเครส เป็นต้น และเอนไซม์ α-amylase (α-1,4 glucan-4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) เป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั้งในพืช และเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและจากเซลล์ของจุลินทรีย์ มีคุณสมบัติในการย่อยสลายพันธะ α- D- (1, 4) glycosidic linkages ของแป้งซึ่งประกอบด้วยอะไมโลส (Amylose) และอะไมโลเพคติน (Amylopectin) ไกลโคเจนและโอลิโกแซคคาไรด์หลายชนิด (Buisson *et al*., 1987) และในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เอนไซม์ชนิดนี้สามารถพบได้ทั้งในน้ำลายและหลั่งมาจากตับอ่อน การย่อยด้วย α-amylase ภายในปาก เป็นการย่อยโมเลกุลสายยาวของแป้ง ให้กลายเป็นโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น ได้แก่ น้ำตาลมอลโตสและเด็กซ์ทรินขนาดต่างๆ ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคส โดยการย่อยของเอนไซม์ α-amylase ที่หลั่งจากตับอ่อนและถูกส่งมายังลำไส้ อย่างไรก็ตาม อัตราการเกิดปฏิกิริยานี้ลดลงเมื่อสารคาร์โบไฮเดรตนั้นมีสายพอลิเมอร์ที่ยาวเพิ่มขึ้น (Lehmann and Robin, 2007)

เมื่อตัวอย่างสารสกัดเนื้อแก้วมังกรผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ในน้ำลายแล้ว ก็ผ่านเข้าไปในกระเพาะอาหารจะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ α-amylase ถูกยับยั้งจากค่าพีเอชที่เปลี่ยนไป แล้วนำมาสุ่มตัวอย่างที่เวลาต่างๆ เป็นเวลา 240 นาที จากการทดลอง พบว่าเมื่อทดสอบการย่อยด้วยกรด (HCl buffer, pH=2) ซึ่งเป็นการจำลองสภาวะการย่อยที่เกิดในกระเพาะอาหาร พบว่าร้อยละการย่อยเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆตั้งแต่เริ่มปรับสภาวะของสารละลายให้เป็นกรดจนถึงที่ 30 นาทีและคงที่ พบว่าการย่อยสูงสุดเท่ากับ 0.7% (ภาพที่ 4-3) ซึ่งให้ค่าต่ำกว่างานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Wichienchot และคณะ (2010) เนื่องมาจากสารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกรที่ได้จากการสกัดด้วยเอนไซม์ pectinase นั้นมี DP คือ 7 เมื่อเทียบกับสารสกัดสารโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกรที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายเอทานอล ที่ให้ DP ผสมคือ 3-4 และยังมีน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำกว่า ส่งผลให้มีโอกาสที่จะเกิดการไฮโดรไลซ์ด้วยกรด HCl ได้มากกว่า



ภาพที่ 4-3 ร้อยละการย่อยของโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร เมื่อผ่านการย่อยด้วย HCl buffer (พีเอช 2.0) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 240 นาที ภายใต้การจำลองสภาวะกรดในกระเพาะอาหาร

หลังจากผ่านการย่อยด้วยกรดในสภาวะจำลองของกระเพาะอาหาร (พีเอช 2) ครบ 240 นาที และนำมาปรับค่าพีเอชของสารลายให้เป็น 6.9 เพื่อให้เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ porcine pancrease α-amylase (0.75 units/ml) ร่วมกับ Sucrase (8,000 units/ml) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.9 เป็นเวลา 360 นาที พบว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นระดับการย่อยของโอลิโกแซคคาร์ไรด์จากเนื้อแก้ว-มังกรเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ และมีค่าสูงสุดที่เวลา 240 นาทีและคงที่ โดยมีระดับการถูกย่อยเท่ากับ 4.81% (ภาพที่ 4-4)



ภาพที่ 4-4 ร้อยละการย่อยของโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร เมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ porcine pancrease α-amylase (0.75 units/ml) และ Sucrose (8,000 units/ml) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 360 นาที ภายใต้การจำลองสภาวะการย่อยในลำไส้เล็ก

โดยทั่วไปคาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่จะถูกย่อยในลำไส้เล็กประมาณ 30% เนื่องจากในลำไส้เล็กมีเอนไซม์ pancreatic α-amylase ที่ถูกหลั่งออกมาจากตับอ่อนและมีเอนไซม์ Oligosaccharidese ซึ่งอยู่บริเวณเยื่อบุ (brush border) ของผนังลำไส้เล็ก เช่น มอลเตส, ไอโซมอลเตส, ซูเครส และแลคเตส เป็นต้น ซึ่งสามารถย่อยพันธะ α-1,4 และ α-1,6 ของน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้กลายเป็นโมเลกุลเดี่ยวได้ (John and Schimt, 2005) ดังนั้นการที่สารสกัดสามารถทดต่อการย่อยได้ดีนั้น อาจเนื่องมาจากน้ำตาลหน่วยย่อยเป็นองค์ประกอบในสายโอลิโกแซคคาไรด์จับกันด้วยพันธะที่ไม่มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ pancreatic α-amylase และ Sucrase ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้มีความจำเพาะกับพันธะ α-1,4 และโอลิโกแซคคาร์ไรด์ที่พบในพืชส่วนใหญ่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิดเชื่อมต่อกันด้วยพันธะที่แตกต่างกัน เช่น α-1,2, α-1,4, α-1,6, ß-1,2 และ ß-1,4 เป็นต้น (Oku and Nakamura, 2002) ดังนั้น อาจสรุปได้ว่า โอลิโกแซคคาร์ไรด์ที่ได้จากแก้วมังกรมีน้ำตาลหน่วยย่อยที่จับกันด้วยพันธะ α-1,4 ไม่มาก เนื่องจากเอนไซม์ไม่สามารถย่อยได้มาก

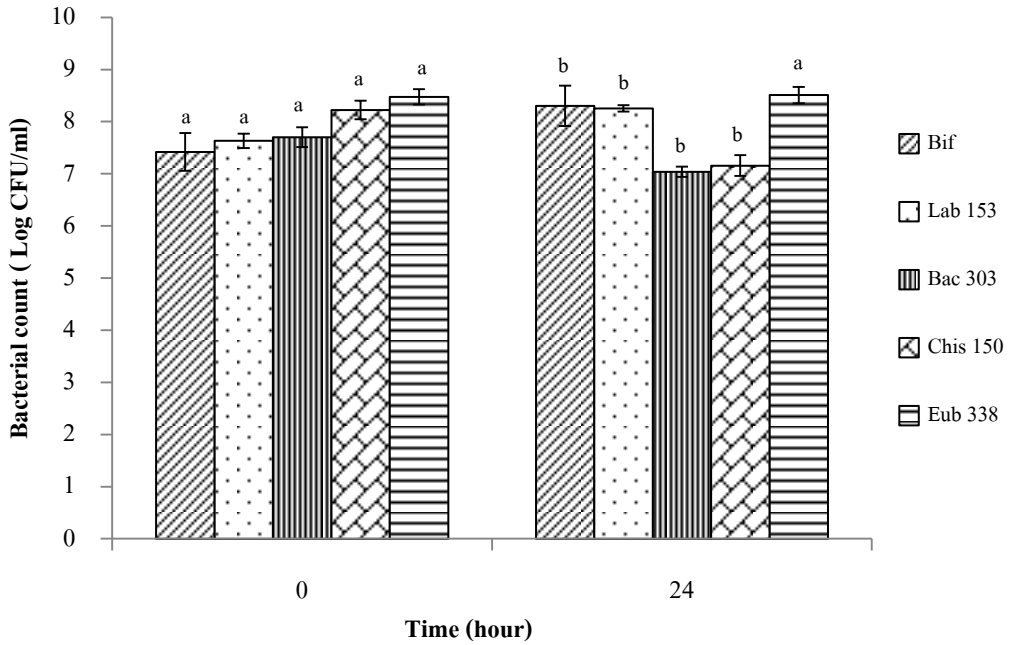
จากการทดสอบร้อยละการย่อยของสารสกัดโอลิโกแซคคาร์ไรด์จากเนื้อแก้วมังกรในระบบทางเดินอาหารซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ปาก กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก พบว่ามีระดับการถูกย่อย คือ 6.7%, 0.7% และ 4.81% ตามลำดับพบว่าสารสกัดโอลิโกแซคคาร์ไรด์จากเนื้อแก้วมังกรมีร้อยละการ

ย่อยรวม เท่ากับ 12.21 แสดงว่าสารสกัดโอลิโกแซคคาร์ไรด์จากเนื้อแก้วมังกรสามารถทดต่อการย่อยของเอนไซม์และกรดในระบบทางเดินอาหารได้ดี และมีสารสกัดประมาณ 87.79% ที่เหลือไปถึงลำไส้ใหญ่ ซึ่งสารที่มีคุณสมบัติในการเป็นพรีไบโอติกที่ดีนั้น ต้องสามารถทนต่อการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ได้ และต้องเหลือไปถึงลำไส้ใหญ่ได้มากกว่า 60% โอลิโกฟรุกโตสและอินนูลินสามารถทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์และกรดในระบบทางเดินอาหารส่วนบนและเหลือไปถึงลำไส้ใหญ่ 85-89% (Cumming *et al*., 2001) ดังนั้นสรุปได้ว่าสารสกัดโอลิโกแซคาร์ไรด์จากเนื้อแก้วมังกรมีคุณสมบัติเป็นสารพรีไบโอติกที่ดีเนื่องจากสามารถทนต่อการย่อยในระบบทางเดินอาหารส่วนบน

4.6.2 การประเมินผลของโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกรต่อการหมักด้วยจุลินทรีย์จากอุจจาระมนุษย์ในการเลี้ยงแบบกะ

จากการทดลอง เมื่อเติมเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมมาจากอาสาสมัครสุขภาพดีและเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาตรวจนับจุลินทรีย์ด้วยเทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) โดยนับแบคทีเรีย 5 กลุ่ม ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียในกลุ่มดีและไม่ดีภายในร่างกายของมนุษย์ พบว่า ที่เวลาเริ่มต้นก่อนเติมตัวอย่างที่ผ่านการย่อยในระบบย่อยอาหารส่วนบน มีจำนวนแบคทีเรียกลุ่ม *Bifidobacteria*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium* และ *Eubacterium* คือ 7.4, 7.6, 7.7, 8.2 และ 8.4 Log CFU/ml ตามลำดับ และเมื่อเติมตัวอย่างที่ผ่านการย่อยในระบบย่อยอาหารส่วนบนหมัก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า จำนวนแบคทีเรียในกลุ่มดี คือ *Bifidobacteria* และ *Lactobacillus* มีค่าเพิ่มขึ้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) คือ 8.30 และ 8.25 Log CFU/ml ตามลำดับ และยังพบว่า จำนวนแบคทีเรียในกลุ่มไม่ดี คือ *Bacteroides*, *Clostridium* มีค่าลดลง คือ 7.03 และ 7.15 Log CFU/ml ตามลำดับในส่วนของจำนวนแบคทีเรียในกลุ่ม *Eubacterium* ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) คือ 8.5 Log CFU/ml ดังแสดงในภาพที่ 4-5 จะเห็นได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มดีมีจำนวนที่เพิ่มขึ้นและเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มไม่ดีจำนวนลดลงเมื่อเทียบกับชั่วโมงที่ 0

Gibson และ Roberfroid (1995) พบว่าการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Bifidobacteria* และ *Lactobacillus* ภายในลำไส้ใหญ่ ช่วยในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในระหว่างของการหมัก เนื่องมาจากในระหว่างการหมักมีการผลิตกรดไขมันอิสระ กรดอะซิติก และกรดซิตริก ซึ่งมีผลทำให้ค่าพีเอชลดลง ส่งผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค อีกทั้งยังผลิตวิตามินบี มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อประจำถิ่น และลดระดับไขมันในเลือกได้อีกด้วย



ภาพที่ 4-5 การเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียในการหมักแบบกะ ที่เวลา 0 และ 24 ชั่วโมง เมื่อหมักโดยใช้โอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร ในสภาวะไร้อากาศ ที่พีเอช 6.8 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เมื่อนำจำนวนแบคทีเรียที่นับได้ก่อนและหลังเติมโอลิโกแซคคาร์ไรด์จากเนื้อแก้วมังกรมาคำนวณค่าดัชนีความเป็นพรีไบโอติก (Prebiotic index, PI) พบว่ามีค่า 0.41 ซึ่งพบว่าสารสกัดโอลิโก-แซคคาร์ไรด์จากเนื้อแก้วมังกรมีคุณสมบัติเป็นสารพรีไบโอติก เนื่องจากให้ค่า PI เป็นบวก ซึ่งจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Manderson และคณะ (2005) ได้ประเมินคุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติกของโอลิโกแซคคาไรด์จากเปลือกส้ม เปรียบเทียบกับ ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้า หมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า ค่า PI ของโอลิโกแซคคาไรด์จากเปลือกส้ม และฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ มีค่า 7.65 และ 7.84 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าที่ได้เป็นบวก และมีค่าใกล้เคียงกัน และเมื่อเปรียบเทียบค่า PI ในงานวิจัยนี้ พบว่าโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร ให้ค่า PI ต่ำกว่า แต่ทั้งนี้ก็ไม่สามารถมาเปรียบเทียบได้ เนื่องจากอาจมีแปรปรวนของเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากอุจจาระมนุษย์สุขภาพที่ดีต่างกัน และความบริสุทธิ์ของตัวอย่างโอลิโกแซคคาไรด์ที่ใช้ในทดสอบ แต่ถือว่าโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร เป็นแหล่งทางเลือกของแหล่งพรีไบโอติก ที่มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ดี และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มไม่ดี

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันสายสั้นด้วยเครื่อง HPLC ในตัวอย่างน้ำหมักที่ใช้โอลิโก-แซคคาร์ไรด์จากเนื้อแก้วมังกรที่เวลาต่างๆ พบทั้งกรดอะซิติก แลกติก โพรพิโอนิกและบิวทาริก แสดงในตารางที่ 4-2โดยที่กรดอะซิติก และโพรพิโอนิกมีความเข้มข้นเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญ (P >0.05) จากเวลาที่เริ่มเติมตัวอย่างโอลิโกแซคคาร์ไรด์จากเนื้อแก้วมังกรจนถึง 24 ชั่วโมง ในส่วนของกรดแลกติก

และ บิวทาริกมีความเข้มข้นเพิ่มจากชั่วโมงที่ 0 และจะคงที่ชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก และเมื่อเปรียบเทียบกรดไขมันอิสระที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณกรดอะซิติกสูงที่สุด รองลงมากรดแลกติก บิวทาริก และ โพรพิโอนิก ตามลำดับ ซึ่งกรดไขมันเหล่านี้ได้มาจากการหมักของโอลิโกแซคคาไรด์จากแก้วมังกรกับเชื้อ *Bifidobacteria* และ *Lactobacillus* ซึ่งที่มีอยู่ในอุจจาระมนุษย์ (Gibson and Roberfroid, 1995) โดยปกติแล้วกรดไขมันอิสระที่ได้จากการกระบวนการหมักภายในลำไส้ใหญ่มนุษย์นั้น มีอัตราส่วนของกรดอะซิเตท ต่อ กรดโพรพิโอนิก ต่อ บิวทาริก คือ 60: 25: 10 มิลลิโมลต่อลิตร แต่ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับชนิดของโอลิโกแซคคาไรด์ เชื้อเริ่มต้นในอุจจาระ และระยะเวลาในการหมัก อีกด้วย (Basson *et al*., 1998)

ซึ่งการพบกรดไขมันสายสั้น คือ โพรพิโอนิก และ บิวทาริกทั้ง 2 ชนิดมีรายงานว่ามีประโยชน์ต่อสุขภาพตามการทดลองของ Naidu และคณะ (1999) ที่ระบุว่ากรดไขมันทั้งสองชนิดจะช่วยสนับสนุนการสร้างพลังงานให้แก่เซลล์ลำไส้ใหญ่ ในขณะเดียวกันช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในเนื้อเยื่อเมือกของลำไส้ และช่วยยับยั้งการเกิดเนื้องอกในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ และจากการทดลองของ Cummings และ Englyst (1995) ระบุว่าโพรพิโอเนทจะถูกส่งไปยังตับเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ ATP และมีผลในการเปลี่ยนแปลงระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ส่วนบิวทิริกจะใช้ในการแบ่งเซลล์ลำไส้ใหญ่ ซึ่งกรดไขมันสายสั้นสามารถควบคุมกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cellular proliferation) และการตายของเซลล์ (program cell death)

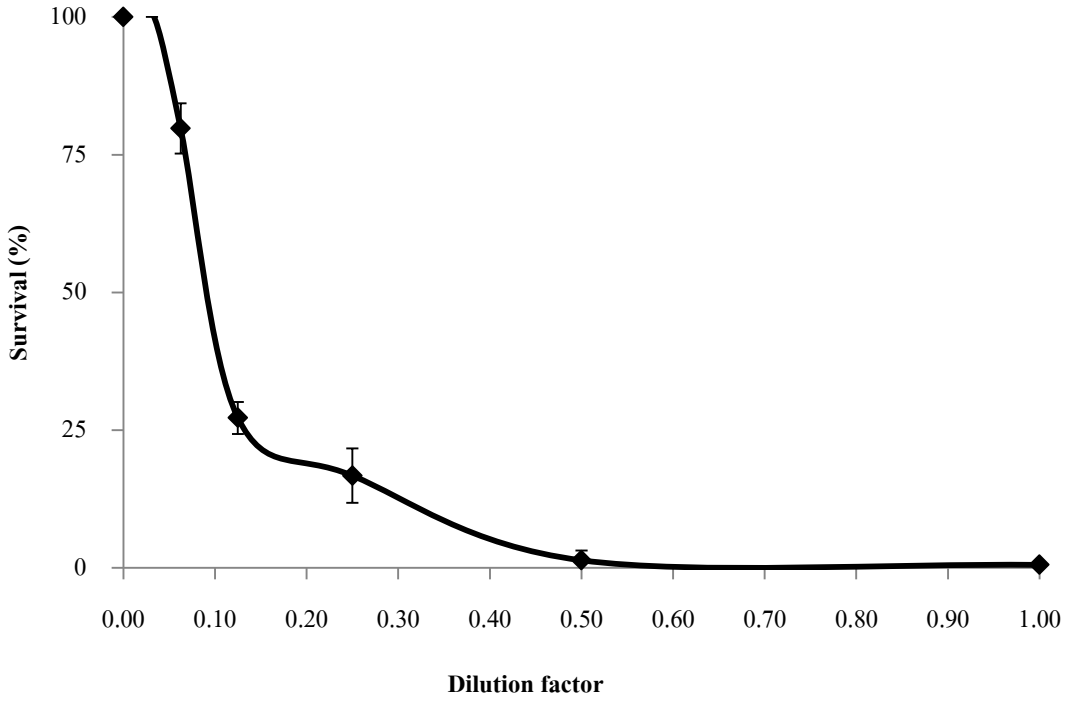
ตารางที่ 4-2 ปริมาณกรดอะซิติก กรดแลคติก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทาริก ที่เกิดขึ้นจากการหมักโอลิ-โกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร เป็นแหล่งคาร์บอนในระบบจำลองลำไส้ใหญ่มนุษย์แบบกะ ที่เวลา 0, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ที่พีเอช 6.8 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้อากาศ

Time	**Short chain fatty acid (mM)**			
	Acetic acid	**Lactic acid**	**Propionic**	**Butyric acid**
0	336.04 ± 1.39^{d}	114.92 ± 2.25^{c}	1.18 ± 0.04^{d}	0 ± 0.00^{c}
6	433.44 ± 23.75^{c}	183.77 ± 0.96^{b}	5.23 ± 0.44^{c}	13.30 ± 0.05^{b}
12	651.44 ± 5.01^{b}	267.38 ± 5.20^{a}	12.42 ± 0.83^{b}	27.10 ± 0.37^{a}
24	860.06 ± 29.64^{a}	265.71 ± 9.92^{a}	15.96 ± 0.31^{a}	29.63 ± 0.88^{a}

4.6.3 ผลของน้ำหมักต่อฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่

เมื่อนำน้ำหมักโอลิโกแซคคาไรด์จากระบบการหมักแบบกะที่เวลา 24 ชั่วโมงจากข้อ 4.5.2.2 มาศึกษาฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของเซลล์ Caco-2 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่จากมนุษย์ เป็นเวลา 24

ชั่วโมง เมื่อทำการเจือจางน้ำหมักด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Eagle' Minimum Essential Medium ที่ระดับต่างๆ แล้วมาตรวจวัดการเจริญด้วยวิธี Tetrazolium assay แล้วมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำหมักที่สูงที่ไม่มีการเจือจางน้ำหมัก เซลล์มะเร็ง Caco-2 จะไม่มีการเจริญ แต่เมื่อเจือจางน้ำหมักที่ระดับ 0.5 เท่าของน้ำหมักเริ่มต้น เซลล์เริ่มสามารถเจริญได้แต่น้อยมาก และเมื่อที่ระดับการเจือจางที่มากขึ้น เซลล์ค่อยๆเจริญเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนถึงความเข้มข้นของน้ำหมักเป็นศูนย์ มีผลทำให้เซลล์มะเร็ง Caco-2 เจริญได้ 100% ดังแสดงภาพที่ 4-6



ภาพที่ 4-6 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์ Caco-2 ที่เลี้ยงในน้ำหมักที่ระดับความเข้มข้นต่างกันของโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร ที่เวลาการหมัก 24 ชั่วโมง

ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากรดไขมันอิสระที่มีอยู่ในน้ำหมัก เช่น กรดอะซิติก กรดซิติก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทิริก เป็นต้น มีผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Caco-2 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Scheppech และคณะ (1995) พบว่า ปริมาณความเข้มข้นของบิวทาริก 1-5 มิลลิโมล สามารถที่ยับยั้งการเจริญของเซลล์ Caco-2 ได้ และความเข้มข้น 10-60 มิลลิโมลไม่ผลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์ลำไส้ใหญ่ปกติ ซึ่งกลไลการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งของกรดบิวทาริกนั้นพบว่าเกี่ยวข้องกับกระบวนการเติมหมู่เมทิลดีเอ็นเอ (DNA Methylation) ซึ่งผลต่อการเจริญและขยายตัวของเซลล์มะเร็ง Caco-2 (Archer *et al*., 1998)

4.7 สรุปผลการทดลอง

เมื่อนำสารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกรมาทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติก เช่น การทดต่อการย่อยของระบบทางเดินอาหารส่วนต้น พบว่า สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร สามารถทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ในน้ำลาย การย่อยด้วยกรดในกระเพาะอาหาร และการย่อยด้วยเอนไซม์ในลำไส้เล็ก คือ 93.3%, 99.3% และ 95.2% ตามลำดับ โดยมีร้อยละการย่อยรวม เท่ากับ 12.21 จากนั้นนำโอลิโกแซคคาไรด์ที่เหลือจากการย่อย 87.79% เข้าสู่การการหมักลำใส้ใหญ่มนุษย์แบบกะ พบว่า โอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร สามารถส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ดี และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ไม่ดี อีกทั้งยังผลิตกรดไขมันอิสระ เช่น กรดอะซิติก กรดซิติก โพรพิโอนิก และบิวทาริก เป็นต้นและยังสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ได้อีกด้วย

4.8 เอกสารอ้างอิง

เกตุชุลี ถึงจอหอ. 2555. การสกัดนอนรีดิวซ์ซิ่งจากขนุนในระดับห้องปฏิบัติการ ระดับโรงงานทดลอง และการประเมินสมบัติการทนต่อการย่อยในระบบทางเดินอาหารจำลอง. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Al-Tamimi, M. A. H. M., Palframan, R. J., Cooper, J. M., Gibson, G. R. and Rastall. R. A. 2006. *In vitro* fermentation of sugar beet arabinan and arabino-oligosaccharides by the human gut microflora. J. Appl. Microbiol. 100: 407-414.

Archer, S., Meng, S., Wu, J., Johnson, J., Tang, R. and Hodin, R. 1998. Butyrate inhibits colon carcinoma cell growth through two distinct pathways. Surgery. 124: 248-253.

Basson, M. D., Emenaker N. J. and Hong, F. 1998. Differential modulation of human (Caco-2) colon cancer cell line phenotype by short chain fatty acids. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY), Royal Society of Medicine.

Buts, J. P. and De Keyser, N. 2006. Effects of *Saccharomyces boulardii* on intestinal mucosa. Digest. Dis. Sci. 51: 1485-1492.

Cummings, J. H. and Englyst, H. N. 1995. Gastrointestinal effects of food carbohydrate. The *Am. J.* Clin. Nutr. 61: 938–945.

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

Johnson, C. D. and Schmit, G. D. 2005. Mayo clinic gastrointestinal imaging review, Mayo Clinic Scientific Press.

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

Manderson, K., Pinart, M., Tuohy, K. M., Grace, W. E., Hotchkiss, A. T., Widmer, W., Yadhav, M. P., Gibson, G. R. and Rastall, R. A. 2005. *In vitro* determination of prebiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacturing by-product stream. Appl. Environ. Microb. 71: 8383-8389.

Nakada, T., Nishimoto, T., Chaen, H. and Fukada, S. 2003. Kojioligosaccharides: application of kojibiose, phosphorylase on the formation of various kojioligosaccharide. In

Oligosaccharides in Food and Agricultural. Eggleston, G. and Cote, G. L. (eds). pp 104-117. ACS Press, Washington DC.

Naidu, A. S., Bidlack, W. R. and Clemens, R. A. 1999. Probotic Srectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). Crit Rev Food Sci. and Nutr. 38: 13-126.

Olano-Martin, E., Mountzouris, K. C., Gibson, G. R. and Rastall, R. A. 2000. *In vitro* fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria. Brit. J. Nutr. 83: 247-255.

Oku, T. and Nakamura, S. 2002. Digestion, absorption, fermentation, and metabolism of functional sugar substitutes and their available energy. Pure Appl. Chem. 74: 1253-1261.

Palframan, R., Gibson, G. R. and Rastall, R. A. 2003. Development of a quantitative tool for the comparison of the prebiotic effect of dietary oligosaccharides. Lett. Appl. Microbiol. 37: 281-284.

Scheppach, W., Bartram, H. P. and Richter, F. 1995. Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. EUR. J. Cancer Care. 31: 1077-1080.

Shoeb, M., MacManus, S. M., Jaspars, M., Trevidu, J., Nahar, L., Kong-Thoo-Lin, P. and Sarker S. D. 2006. Montamine, a unique dimeric indole alkaloid, from the seeds of *Centaurea montana* (Asteraceae), and its *in vitro* cytotoxic activity against the CaCo2 colon cancer cells. Tetrahedron. 62: 11172-7.

Wichienchot, S., Jatupornpipat, M. and Rastall, R. A. 2010. Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. Food Chem. 120: 850-857.

Wichienchot, S., Prasertsan, P., Hongpattakre, T., Rastall, R. A. and Gibson, G. R. 2006. *In vitro* three-stage continuous fermentation of gluco-oligosaccharides, produced by *Gluconobacter oxybans* NCIMB 4943, by the human colonic microflora. Curr. Iss. Intest. Microbiol. 7. 13-18.

บทที่ 5

บทสรุป

เนื้อแก้วมังกร พันธุ์เนื้อสีขาว มีองค์ประกอบทางเคมี คือ ความชื้น เถ้า ใยอาหาร ไขมัน โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต เท่ากับ 83.05%, 2.24%, 1.70%, 1.26%, 0.39% และ 11.39% ตามลำดับ เนื้อแก้วมังกรส่วนใหญ่ประกอบด้วยน้ำ (moisture) และของแข็ง (solid) อื่นๆ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ซึ่งรวมใยอาหาร (crude fiber) ด้วย รองลงมา คือ เถ้า (ash) ไขมัน (fat) และโปรตีน (protein) ตามลำดับ การสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยน้ำ พบว่าของแข็งที่ละลายน้ำและปริมาณน้ำตาลในสารสกัดลดลง เมื่ออัตราส่วนของเนื้อแก้วมังกรต่อน้ำเพิ่มขึ้น สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยน้ำ คือ อัตราส่วนของเนื้อแก้วมังกรต่อน้ำ เท่ากับ 1 ต่อ 2 และอุณหภูมิการสกัด 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ได้ปริมาณผลผลิตโอลิโกแซคคาไรด์สูงสุด เท่ากับ 43.98 % (น้ำหนักแห้ง) และน้ำหนักโมเลกุลของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ เท่ากับ 790 ดาลตัล ส่วนการสกัดด้วยเอนไซม์เพคติเนส พบว่าสภาวะที่เหมาะในการสกัดด้วยเพคติเนส คือ อัตราส่วนเนื้อแก้วมังกรต่อน้ำเท่ากับ 1 ต่อ 2 และ ความเข้มข้นของเอนไซม์เพค-ติเนส เท่ากับ 124 ยูนิตต่อกรัมของแข็งสารสกัด อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสใช้เวลา 45 นาที ให้ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ เท่ากับ 41.92% (น้ำหนักแห้ง) และน้ำหนักโมเลกุลของโอลิโกแซคคา-ไรด์ที่ได้จากการสกัดเอนไซม์เพคติเนส อยู่ในช่วง 1609 ดาลตัล ดังนั้นการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยน้ำ และเอนไซม์เพคติเนส ให้ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) แต่การสกัดโดยใช้เอนไซม์เพคติเนสสามารถลดระยะเวลาในการสกัดลงได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

การทำบริสุทธิ์โอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร ด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 501 พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 501 ที่สามารถลดลงปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลซูโครส ได้สูงสุดคือ 2.5% โดยปริมาตร ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดน้ำตาลรวม (%TS) เท่ากับ 61% สูงกว่าความเข้มข้นของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 501 ที่ 1.25%, 5% และ 10% (โดยปริมาตร) และความเข้มข้นที่เหมาะสมของ ยูเรีย ซึ่งเติมเป็นแหล่งของไนโตรเจนในการหมัก พบว่า ความเข้มข้นที่เหมาะสมของยูเรีย ที่เติมร่วมกับ เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 501 2.5% (โดยปริมาตร) ที่สามารถที่สามารถลดลงปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลซูโครส ได้สูงสุดคือ 0.1% (กรัมโดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งให้ค่าเปอร์เซ็นต์การกำจัดน้ำตาลรวม เท่ากับ 73.31% สูงกว่าความเข้มข้นยูเรีย ที่ 0.3%, 0.5%, 0.7% และ 10% (กรัมโดยน้ำหนักต่อปริมาตรป ที่สภาวะการทดลองเดียวกัน เมื่อนำมาสภาวะที่เหมาะสมที่กล่าวข้างต้น คือ

ความเข้มข้นของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 501 2.5% โดยปริมาตร ร่วมกับการเติมยูเรียร้อยละ 0.1 กรัม (น้ำหนักโดยปริมาตร) มาศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการกำจัดน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส พบว่า ระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสม คือ 4 วัน ภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่มีการเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที สามารถกำจัดน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส ได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งทำให้โอลิโกแซคคาร์ไรด์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเป็น 99.9%

เมื่อนำสารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกรมาทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารพรี-ไบโอติก เริ่มด้วยการทดสอบการทดต่อการย่อยของสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารส่วนต้น พบว่า สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกรที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ สามารถทนการย่อยภายใต้สภาวะจำลองในปาก, กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก เป็น 93.3%, 99.3% และ 95.2% ตามลำดับ โดยมีค่าการย่อยรวม เท่ากับ 12.21% ผลการทดสอบการหมักโดยจุลินทรีย์จากอุจจาระมนุษย์โดยการเลี้ยงเชื้อแบบกะ พบว่า โอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกรที่ผ่านการทำบริสุทธิ์และผ่านการย่อยในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารส่วนต้น สามารถส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacteroides* และ *Clostridia* ได้โดยมีค่าดัชนีความเป็นพรีไบโอติกเท่ากับ 0.41 กรดไขมันสายสั้นที่ถูกผลิตขึ้นจากการหมัก คือ กรดอะซิติก กรดแลคติก โพรพิโอนิก และบิวทาริก โดยมีความเข้มข้นเป็น 860, 265, 15.9 และ 29.6 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ นอกจากนี้น้ำหมักที่ได้ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง Caco-2 จากลำไส้ใหญ่มนุษย์ได้ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า โอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อแก้วมังกร มีคุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติก ซึ่งสามารถเป็นทางเลือกหนึ่งในการบริโภคสารพรีไบโอติกต่อไป

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียมสาร

1. การเตรียมน้ำลายเทียม

1.1 ชั่งสารเคมีตามรายการที่แสดงในตารางที่ 1 และนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 450 มิลลิลิตร โดยกวนตลอดเวลาจนกระทั่งละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของน้ำลายเทียม (Sarkar, Goh and Singh, 2009)

รายการที่	ชื่อสารเคมี	สูตรเคมี	ปริมาณ (กรัม/ 500 มิลลิลิตร)
1	Sodium chloride	NaCl	0.797
2	Ammonium nitrate	NH_4NO_3	0.164
3	Potassium phosphate	NH_2PO_4	0.318
4	Potassium chloride	KCl	0.101
5	Potassium citrate Monohydrate	$K_3C_6H_5O_7.H_2O$	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	Porcine gastric mucin type II	-	15
10	DI water	H_2O	Make up Volume

1.2 ปรับ pH ของสารละลายเป็น 6.8 ด้วย 0.1 M NaOH

1.3 ปรับปริมาตรสารละลายจนเป็น 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. การเตรียมเอนไซม์

2.1 การเตรียมเอนไซม์ Human salivary α-amylase

เตรียมเอนไซม์ Human salivary α-amylase type XIII-A (sigma A1031, Buchs, CH, 15.1 mg solid; 66.3 unit/mg solid) โดยชั่งเอนไซม์ 3.02 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่นแช่เย็นปริมาตร 2 มิลลิลิตร (เอนไซม์มีความเข้มข้น เท่ากับ 100.113 unit/ml)

2.2 การเตรียมเอนไซม์ Human pancreatic α-amylase

2.2.1 เตรียม Phosphate buffer (Na_2HPO_4 1.42 กรัมต่อลิตร และ KH_2PO_4 1.36 กรัมต่อลิตร) ปรับ pH เป็น 6.9 ด้วย 1N NaOH

2.2.2 ดูด PBS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่เก็บเอนไซม์ เขย่าจนกระทั่งละลาย และดูดสารละลายเอนไซม์เก็บในหลอด centrifuge

2.2.3 เติม PBS ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในหลอดเก็บเอนไซม์ เขย่าเพื่อ rinse เอนไซม์ที่ค้างอยู่ในหลอด ทำซ้ำอีก 3 ครั้ง (ปริมาตรรวมของ PBS ที่ใช้ เท่ากับ 2 มิลลิลิตร)

2.2.4 stock ของสารละลายเอนไซม์ที่เตรียมได้จะมีความเข้มข้น เท่ากับ 564.25 unit/ml

2.2.5 แบ่งสารละลายเอนไซม์เก็บไว้ในหลอด หลอดละ 0.665 มิลลิลิตร จำนวน 6 หลอด (มีความเข้มข้นของเอนไซม์สุกท้าย เท่ากับ 375.23 unit) เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะทำการทดสอบ

3. อาหารสูตรพื้นฐาน (Basal medium) สำหรับการเลี้ยงเชื้อแบบกะ

Peptone	2	กรัม
Yeast extract	2	กรัม
NaCl	0.1	กรัม
$NaHCO_3$	2	กรัม
$MgSO_4$	0.01	กรัม
Cysteine-HCl	0.5	กรัม
K_2HPO_4	0.04	กรัม
Bile salts	0.5	กรัม
$CaCl_2.6H_2O$	0.01	กรัม
Haemin	0.005	กรัม
Tween 80	2	มิลลิลิตร
Vitamin K1	10	ไมโครลิตร
Resazurin	1	มิลลิลิตร

3. การเตรียมสารละลาย

3.1 Phosphate Buffer Saline/ Sodium Dodecyl Sulfate (PBS/SDS)

NaCl	8	กรัม
KCl	0.2	กรัม
K_2HPO_4	1.15	กรัม
KH_2PO_4	0.2	กรัม
น้ำกลั่น HPLC	100	มิลลิลิตร

10% SDS	100	ไมโครลิตร

3.2 HCl Buffer

สารเคมี	ปริมาณ (g/l)
Sodium chloride	1.703
Potassium chloride	0.199
Calcium chloride	0.15
Sodium bicarbonate	0.30

3.3 Phosphate Buffer Saline

สารเคมี	ปริมาณ
NaCl	8 กรัม
KCl	0.2 กรัม
K_2HPO_4	1.15 กรัม
KH_2PO_4	0.2 กรัม
น้ำกลั่น HPLC	100 มิลลิลิตร

3.4 Washing buffer

ส่วนประกอบ	สำหรับทุกเชื้อ ยกเว้นเชื้อ Eubacteria	สำหรับเชื้อ Eubacteria
NaCl	9 มิลลิลิตร	0.70 มิลลิลิตร
1M Tris/HCL (pH 8.0)	1 มิลลิลิตร	1 มิลลิลิตร
0.5 M EDTA	0 มิลลิลิตร	0.5 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	40 มิลลิลิตร	47.8 มิลลิลิตร

3.5 4% paraformadihide

Paraformadihide	2	กรัม
1N NaOH	100	ไมโครลิตร
1 N HCl	100	ไมโครลิตร
PBS	16.6	มิลลิลิตร

น้ำกลั่น HPLC	50	มิลลิลิตร

3.6 Hybridization buffer

ส่วนประกอบ	สำหรับทุกเชื้อ ยกเว้นเชื้อ Eubacteria	สำหรับเชื้อ Eubacteria
5 M NaCl	180 ไมโครลิตร	180 ไมโครลิตร
1M Tris/HCL (pH 8.0)	20 ไมโครลิตร	20 ไมโครลิตร
Formamide	0 ไมโครลิตร	350 ไมโครลิตร
น้ำกลั่น	799 ไมโครลิตร	499 ไมโครลิตร
10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)	1 ไมโครลิตร	1 ไมโครลิตร

ภาคผนวก ข

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 1 จนกระทั่งน้ำหนักของภาชนะดังกล่าว มีน้ำหนักที่ชั่งติดกันสองครั้งไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

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

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้นในตัวอย่าง (ร้อยละ)} = \frac{W1-W2}{w1} \times 100$$

เมื่อ W_1 คือน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ และ W_2 คือน้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

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

อุปกรณ์

1. ชุดย่อยโปรตีน ประกอบด้วยเตาย่อย และเครื่องดักจับไอกรด (scrubber)
2. ขวดย่อยโปรตีน (Kjeldahl flask) ขนาด 250-300 มิลลิลิตร
3. ชุดกลั่นโปรตีนขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร (volumetric flask)
4. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร

5. ปิเปตขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร

6. บิวเรตขนาด 25 มิลลิลิตร

7. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

8. กระดาษกรองสำหรับใส่ตัวอย่าง

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc. H_2SO_4)

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

3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 สำหรับการกลั่นและร้อยละ 20 สำหรับการย่อยโปรตีน

4. สารละลายกรอบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 (กรดบอริกให้ละลายในน้ำร้อน 60 องศาเซลเซียส)

5. สารละลายกรดเกลือความเข้มข้น 0.01 นอร์มอล

6. อินดิเคเตอร์ (Indicator) ซึ่งเป็นสารผสมระหว่าง เมทิลเรด เมทิลีนบลู และโบรโมครีซอลกรีน

การเตรียมอินดิเคเตอร์

ชั่งเมทิลเรด 0.125 กรัมและชั่งเมทีลีนบลู 0.082 กรัม นำไปละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นชั่งโบรโมครีซอลกรีม 0.1 กรัม นำไปละลายในน้ำกลันและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ผสมสารละลายทั้งสองในอัตราส่วน 1 ต่อ 1.5 ก่อนจะนำๆปวิเคราะห์โปรตีน

วิธีการ

การย่อยโปรตีน

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 0.5-1 กรัมบนกระดาษกรอง ก่อนนำไปใส่ลงในหลอดย่อยโปรตีนและทำแบลงค์

2. ใส่สารผสม $CuSO_4 . 5H_2O$ และ K_2SO_2 ปริมาตร 5 กรัม

3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นวางหลอดย่อยในเตาย่อยแล้วประกอบสายยางระหว่างฝาครอบของขวดใส่ด่าง (สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 20) และเครื่องดักจับไอกรดให้เรียบร้อย

4. เปิดสวิทช์เครื่องจับไอกรดและเตาย่อย โดยตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 400 องศาเซลเซียส ย่อยเป็นเวลา 45-60 นาที หรือจนกว่าจะได้สารละลายใส จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น

5. นำสารละลายใสที่ได้ไปกลั่นด้วยชุดกลั่นโปรตีน

การกลั่นโปรตีน

1. เปิดสวิทช์ให้ความร้อนและเปิดน้ำหล่อเย็นของเครื่องควบแน่น บรรจุหลอดตัวอย่างที่ผ่านการย่อยเข้ากับอุปกรณ์กลั่น

2. นำขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรและเติมอินดิเคเตอร์เรียบร้อยแล้วไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้ โดยส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มลงในสารละลายกรดนี้

3. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง 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 (นอร์มอล)

F= แฟกเตอร์ (6.25)

W= น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น

1.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน (Soxhlet apparatus) ประกอบด้วย ขวดก้นกลมสำหรับใส่ตัวทำละลายซอตเลต (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 ทำเช่นเดิมจนกระทั่งได้น้ำหนักตงที่หรือน้ำหนักขวดที่ชั่งติดกันสองครั้งต่างกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

2. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก ถ้าตัวอย่างเป็นชีววัสดุที่มีไขมันมากให้ชั่ง 1-2 กรัม ถ้าเป็นชนิดที่มีไขมันน้อยให้ชั่ง 3-5 กรัม ห่อให้มิดชิด แล้วห่อซ้ำด้วยกระดาษกรองอีกครั้ง ใส่ลงในหลอดทดลองสำหรับตัวอย่าง คลุมด้วยสำลีที่ด้านบนของหลอดตัวอย่างเพื่อให้ตัวทำลายมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ

3. นำหลอดตัวอย่างใสในซอตเลต จากนั้นเติมปิโตรเลียมอีเทอร์ ลงในขวดกันกลมปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตา

4. ประกอบอุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน พร้อมทั้งเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่นและเปิดสวิทช์ ให้ความร้อนเพื่อทำการสกัดนาน 14 ชั่วโมง โดยปรับความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่นด้วยอัตรา 150 หยดต่อนาที

5. เมื่อครบ 14 ชั่วโมง นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอคเลต ทิ้งให้ตัวทำละลายไหลจากซอตเลตลงในขวดก้อนกลมจนหมด

6. ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปใส่ในโถดูดความชื้นจนมีอุหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง นำไปชั่งน้ำหนักแห้งแลอบซ้ำ จนกระทั้งผลต่างของน้ำหนักสองครั้งคิดกันห่างกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

7. คำนวณปริมาณไขมันตัวอย่าง

การคำนวณ

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. เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตสเผสที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นปิดสวิทช์เตาเผาแล้วรอประมาณ 30-45 นาที เพื่อให้อุณหภูมิในเตาเผาลดลงประมาณ 200 องศาเซลเซียส จึงนำถ้วยออกจากเตาเผา นำไปใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

2. นำถ้วยกระเบื้องไปเผาซ้ำครั้งละประมาณ 30 นาที และทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อที่ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้งสองครั้งคชติดต่อกัน ไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 1-2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปเผาในตู้ควัน แล้วจึงนำเข้าเตาเผา ตั้งอุณหภูมิเตาเผาไว้ที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส ทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 1 และ 2 จากนั้นจึงคำนวณปริมาณเถ้าในตัวอย่างจากสูตรคำนวณด้านล่าง

การคำนวณ

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

2. การวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการ Modified dinitrosalicylic acid method (Fox and Robyt, 1991)

2.1 การเตรียมตัวอย่างสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

โดยทำการเตรียมตัวอย่างสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสให้ได้ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม /มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสให้ได้ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 และ 450 ไมโครกรัม / มิลลิลิตร ทำการทดลองในไมโครไตเตอร์เพลท 96 หลุม โดยเติมสารละลายกลูโคส 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) 100 ไมโครลิตรเขย่าผสมให้เข้ากัน ปิดไมโครไตเตอร์เพลท ด้วย Polyvinylchloride cling film แล้วใส่ในถุงซิป นำไปต้มในน้ำอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นทันที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตร ใช้สารละลายกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 – 500 ไมโครกรัม /มิลลิลิตร นำค่าที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานหาสมการ

2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล

ดูดตัวอย่างน้ำตาลที่เจือจางเหมาะสม (ช่วง 100 หรือ 200 เท่า) 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมของไมโครไตเตอร์เพลท 3 หลุม 3 ซ้ำ เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) 100

ไมโครลิตร เขย่าผสมให้เข้ากันปิดไมโครไตเตอร์เพลท ด้วย Polyvinylchloride cling film แล้วใส่ในถุงซิป นำไปต้มในน้ำอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นทันที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตร ใช้สารละลายกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0 – 500 ไมโครกรัม /มิลลิลิตร นำค่าที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานหาสมการ

3. **การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Modified Phenol Sulfuric Method (Dubois *et al.*, 1956)**

ทำการทดลองโดยการดูดสารละลายตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสมปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในไมโครไตเตอร์เพลท ขนาด 96 หลุม เติม 5% Phenol 25 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยการเขย่าเบาๆ 30 วินาที นำไมโครไตเตอร์เพลท ไปแช่น้ำแข็ง จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 95% ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ปิดไมโครไตเตอร์เพลท ด้วย Polyvinylchloride cling film แล้วใส่ในถุงซิป นำไปต้มในน้ำอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นทันที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 50-500 ไมโครกรัม / ไมโครลิตร เทียบค่า OD ที่ได้กับกราฟมาตรฐานของกลูโคส

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายรุสมัน ดะแซเสาเมาะ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5211020020

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (เทคโนโลยีชีวภาพ)	2551

ทุนการศึกษา

- ทุนการศึกษาระดับปริญญาโทจากสถานวิจัยผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและอาหารเพื่อสุขภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พ.ศ. 2552
- ทุนสนับสนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พ.ศ. 2552
- ทุนการศึกษาและสนับสนุนการวิจัยโครงการมหาวิทยาลัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ พ.ศ. 2552

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Dasaesamoh, R., Youravong, W. and Wichienchot, S. 2012. Optimization of oligosaccharides extraction from dragon fruit's flesh. In Proceeding of The 4th International Conference on Natural products for health and Beauty. 28-30 November 2012,Chiang Mai, Thailand.