



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตออลิโกกาแลคโตแมนแนนที่มีสมบัติเป็นพรีไบโอติกจากกากมะพร้าวโดยใช้  
เอนไซม์แมนนาเนส

Production of Galactomannooligosaccharide with prebiotic property  
from copra meal using mananase

ชื่อผู้วิจัย นายประพันธ์ ปิ่นศิริโรตม

นายสุรชัย ใหญ่เย็น

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตออลิโกกาแลคโตแมนแนนที่มีสมบัติเป็นพรีไบโอติกจากกากมะพร้าวโดยใช้  
เอนไซม์แมนนาเนส

Production of Galactomannooligosaccharide with prebiotic property  
from copra meal using mananase

ชื่อผู้วิจัย นายประพันธ์ ปิ่นศิริโรตม

นายสุรชัย ใหญ่เย็น

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก เงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

<b>ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย)</b>	การผลิตออลิโกกลาแลคโตแมนแนนที่มีสมบัติเป็นพรีไบโอติกจากกากมะพร้าว โดยใช้เอนไซม์แมนนาเนส	
<b>แหล่งเงิน</b>	เงินงบประมาณแผ่นดิน	
<b>ประจำปีงบประมาณ2558</b>	จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 485,000 บาท	
<b>ระยะเวลาทำการวิจัย</b>	1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2557 ถึง กันยายน 2558	
<b>หัวหน้าโครงการ</b>	นายประพันธ์ ปิ่นศิริโรตม	คณะอุตสาหกรรมเกษตร
<b>ผู้ร่วมโครงการวิจัย</b>	นายสุรชัย ใหญ่เย็น	คณะอุตสาหกรรมเกษตร

### บทคัดย่อ

จากการศึกษาสภาวะในการสกัดต่อปริมาณผลผลิตของแมนแนนจากกากมะพร้าว และความยาวของแมนแนนโดยเฉลี่ย โดยสภาวะในการสกัดที่ให้ปริมาณแมนแนนสูงที่สุดคือ โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และพีเอชเท่ากับ 5.0 และสภาวะในการสกัดที่ให้ความยาวของแมนแนนโดยเฉลี่ยยาวที่สุด คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่เวลา 30 ชั่วโมง และพีเอชเท่ากับ 5.0 ความสามารถในการละลายของแมนแนนจากกากมะพร้าว โดยแมนแนนที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่พีเอชเท่ากับ 8.0 มีความสามารถในการละลายสูงที่สุด จึงได้เลือกใช้สภาวะในการสกัดที่ให้ปริมาณแมนแนนสูงที่สุดในการทดลองต่อไป

แมนแนนที่สกัดได้เมื่อนำมาผลิตออลิโกกลาแลคโตแมนแนน โดยใช้ วิธี Response surface methodology แบบ Box-Behnken Design (BBD) โดยกำหนดปัจจัย 5 ปัจจัย ประกอบด้วย ค่าความเป็นกรด-ด่าง (3, 6 และ 9), อุณหภูมิ (35, 55 และ 75 องศาเซลเซียส), ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา ( 5, 15 และ 25 นาที), ความเข้มข้นของสับสเตรต (1, 5.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์) และความเข้มข้นของเอนไซม์เบต้าแมนนาเนส จากแอสเปอร์จิลัส ไนเจอร์ (0.6, 0.9 และ 1.2 ยูนิต) ใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นในการวิเคราะห์ค่าการตอบสนอง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 25 นาที ความเข้มข้นของสับสเตรต 4 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.6 ยูนิต พบว่าได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด

ชนิดของออลิโกกลาแลคโตแมนแนนที่ตรวจพบมีขนาดของ Degree of polymerization เท่ากับ 2-6 ได้แก่ แมนโนไบโอส แมนโนไตรโอส แมนโนเตตระโอส แมนโนเพนโตส และแมนโนเฮกโซส นอกจากนี้ความสามารถในการทนย่อยใช้กรดในสภาวะจำลองของกระเพาะอาหาร พบว่า แมนโนโอลิโกแซ็กคาไรด์ มีเปอร์เซ็นต์การไฮโดรไลซิสสูงที่สุด ผลการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ *Lactobacillus*

*plantarum* และการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค พบว่ามีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ได้ดีขึ้น อีกทั้งยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Escherichia coli* O157:H7 และ *Staphylococcus aureus* ได้

**คำสำคัญ :** ออลิโกกาแลคโตแมนแนน, แมนนาเนส, พร็อบิโอติก, กากมะพร้าว

**Research Title:** Production of Galactomannooligosaccharide with prebiotic property from  
copra meal using mananase

**Researcher:** Mr. Praphan Pinsirodom and Mr. Surachai Yaiyen

**Faculty:** Agro-Industry

## ABSTRACT

Study of extraction conditions on the yield of mannan from copra meal, and the length of mannan on average. The extraction conditions for high yield of mannan was sodium hydroxide 16% (w/v), for 24 hours at the pH of 5.0. The best condition for the length of the longest average mannan was sodium hydroxide concentration 25 percent (w/v) for 30 hours at the pH of 5.0. Mannan concentration 0.5 % (w/v), at pH 8.0 was taken the highest solubility. The extraction conditions for highest yield of mannan used in further experiments.

The Response surface methodology with Box-Behnken Design was used to evaluate the optimum condition for mannan hydrolysis to produce Galactomannooligosaccharides. The pH 3-9, reaction temperature 35-75°C, the reaction time 5-25 minutes, the concentration of substrate 1- 10%, and the concentration of the  $\beta$ -mannanase from *Aspergillus niger* 0.6- 1.2 units. The reducing sugar as the measured response. The result showed that the optimum mannan hydrolysis condition was concentration of substrate 4 percent, pH 3 at 60°C for 25 minutes, and enzyme concentration 0.6 units enzyme that has the highest reducing sugar.

The DP of hydrolyzed mannan was among 2-6 units i.e. mannobiose, mannotriose, mannotetraose, mannopentose and mannohexose. The maximum hydrolysis by artificial human gastric juice of MOSs was 3.38%. Additionally, MOSs promoted the growth of the probiotic *Lactobacillus plantarum* which was similar to the inulin reference. The presence of MOSs as a carbon source reduce growth of the pathogens (*Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*).

**Keywords :** Galactomannooligosaccharide,  $\beta$ -mannanase, prebiotic, copra meal

## กิตติกรรมประกาศ

“การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากเงินงบประมาณแผ่นดิน คณะอุตสาหกรรมเกษตร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558” ซึ่งสามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบคุณบริษัทเทพดงพระมะพร้าวจำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างสำหรับงานวิจัย

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ คณะอุตสาหกรรมเกษตรที่ช่วยอำนวยความสะดวกในทุกๆ ด้านระหว่างการทำงานวิจัย

นายประพันธ์ ปิ่นศิริโรตม

นายสุรชัย ใหญ่เย็น

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	IV
สารบัญ.....	V
สารบัญตาราง.....	VII
สารบัญภาพ.....	VIII
<b>บทที่ 1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 บทนำ.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>3</b>
2.1 มะพร้าว.....	3
2.2 แมนแนน.....	5
2.3 เอนไซม์แมนนาเนส.....	7
2.4 พรูโบโอติก.....	8
2.5 โพรโบโอติก.....	16
2.6 วิธีการแสดงผลตอบสนองแบบโครงสร้างพื้นผิว.....	17
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	18
<b>บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....</b>	<b>21</b>
3.1 วัสดุดิบ.....	21
3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์.....	22
3.3 สถานที่ดำเนินงาน.....	23
3.4 วิธีการทดลอง.....	23
<b>บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....</b>	<b>31</b>
4.1 ผลของสภาวะในการสกัดต่อปริมาณผลผลิตของแมนแนน.....	31
4.2 ผลของสภาวะในการสกัดต่อความยาวของแมนแนนโดยเฉลี่ย.....	32
4.3 ความสามารถในการละลาย.....	33

## สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4 ผลการคัดแยกขนาดของออลิโกกาแลคโตแมนแนนโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี.....	35
4.6 ผลของออลิโกกาแลคโตแมนแนนต่อการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์.....	42
4.7 สมการการทำนายและการวิเคราะห์ทางสถิติ.....	44
4.8 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากแมนแนนจากกากมะพร้าวที่ผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส.....	52
โดยใช้เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จาก <i>Aspergillus niger</i> ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบาง	
4.9 ผลของออลิโกกาแลคโตแมนแนนที่ผลิตได้จากสภาวะที่เหมาะสมต่อการส่งเสริม.....	54
การเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ และการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค	
<b>บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....</b>	<b>57</b>
<b>บรรณานุกรม.....</b>	<b>59</b>
<b>ภาคผนวก.....</b>	<b>65</b>
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์.....	66
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด.....	69

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อมะพร้าว.....	4
2.2 องค์ประกอบทางเคมีของกากมะพร้าว.....	5
3.1 สภาวะการย่อยแมนแนนจากมะพร้าวโดยใช้เอนไซม์แมนนาเนส.....	28
4.1 ความสามารถในการละลายของแมนแนนที่สกัดได้จากกากมะพร้าวที่สภาวะต่าง ๆ.....	33
4.2 แผนการทดลองทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้เป็นค่าตอบสนอง.....	45
4.3 ค่าโมเดลการถดถอยของการหาสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เป็นค่าตอบสนอง.....	47
4.4 การเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค <i>E.coli</i> และ <i>S.aureus</i> ที่มีออลิโกกาแลคโตแมนแนนเป็นแหล่งคาร์บอน.....	56

# สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 โครงสร้างของลูกมะพร้าว.....	3
2.2 โครงสร้างของแมนแนนทั้ง 4 ชนิด A: แมนแนน; B: กาแลคโตแมนแนน; C: กลูโคแมนแนน และ D: กาแลคโตกลูโคแมนแนน.....	7
2.3 การเข้าย้อยพันธะ เบต้า-(1,4) ของเอนไซม์ เบต้า-แมนนาเนส และเบต้า-แมนโนซิเดส.....	8
บนโครงสร้างแมนแนน	
2.4 ประโยชน์ของสารพรีไบโอติก.....	13
4.1 ปริมาณผลผลิตของแมนแนนเมื่อใช้สภาวะในการสกัดที่แตกต่างกัน.....	31
4.2 ความยาวของแมนแนนโดยเฉลี่ยที่สกัดได้เมื่อใช้สภาวะในการสกัดที่แตกต่างกัน.....	32
4.3 โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ได้จากการย่อยแมนแนนจากกากมะพร้าวด้วย เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จาก <i>Aspergillus niger</i> . ที่ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส 120 นาที.....	35
4.4 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในแฟรกชันต่างๆที่ได้จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ.....	36
แมนแนนจากกากมะพร้าวด้วยเอนไซม์เบต้าแมนนาเนสจาก <i>Aspergillus niger</i> .ที่ระยะเวลา 120 นาที	
4.5 ภาพ TLC ของชนิดน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในแฟรกชันต่างๆที่แยกได้จาก.....	37
ออลิโกกาแลคโตแมนแนน (A-C).	
4.6 เปอร์เซ็นต์การย่อยของอินูลิน (A) แมนแนน (B) แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ยังไม่ผ่านการคัดแยก (C)...	40
แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผ่านการคัดแยกลำดับที่ 38-42 (D) และ แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผ่านการคัดแยกลำดับที่ 45-48 (E) ในสภาวะพีเอชเท่ากับ 1 (■), 2 (▲), 3 (✕), และ 4 (○) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง	
4.7 การเจริญของ <i>Lactobacillus plantarum</i> NF3.....	43
4.8 การเจริญของ <i>Lactobacillus plantarum</i> RS 54.....	43
4.9 กราฟพื้นที่ผิวตอบสนองแสดงอิทธิพลของปัจจัยที่ศึกษาต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น.....	49
จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยใช้เอนไซม์ของแมนแนนจากกากมะพร้าว	
4.10 ภาพ TLC ของชนิดน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในแผนการทดลองทั้งหมด (A-C).....	53

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.11 การเจริญของ <i>Lactobacillus plantarum</i> NF3 โดยออลิโกกาแลคโตแมนแนนจาก.....	55
กากมะพร้าวได้จากสภาวะการผลิตที่เหมาะสม	
4.12 การเจริญของ <i>Lactobacillus plantarum</i> RS 54 โดยออลิโกกาแลคโตแมนแนนจาก.....	55
กากมะพร้าวได้จากสภาวะการผลิตที่เหมาะสม	

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 บทนำ

ในปัจจุบันพรีไบโอติกเป็นที่แพร่หลายมากในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อสุขภาพ นิยมใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารสำหรับเด็กและอาหารเพื่อสุขภาพอื่น ๆ นอกจากนี้ยังใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (dietary supplement) ทั้งนี้เนื่องจากพรีไบโอติกเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของระบบทางเดินอาหาร การเผาผลาญไขมัน และมีผลดีต่อระบบภูมิคุ้มกัน พรีไบโอติกที่มีผลิตในเชิงการค้าส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่ได้จากพืช ที่รู้จักกันดีได้แก่ อินูลิน (inulin) รวมถึงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยโมเลกุลของอินูลินให้เป็นฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นต้น ออลิโกแมนแนนก็เป็นพรีไบโอติกชนิดหนึ่งที่มีการใช้ในผสมในเครื่องดื่ม เช่น กาแฟ น้ำผลไม้ และใช้ในอาหารสัตว์ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการเตรียมออลิโกแมนแนนโดยการสกัดแมนแนนจากวัตถุดิบพืชต่างๆ และใช้เอนไซม์แมนนาเนสในการย่อยทำให้เกิดเป็นออลิโกแมนแนน ออลิโกแมนแนนมีหลายชนิดขึ้นกับชนิดของแมนแนนที่เป็นองค์ประกอบในพืชที่นำมาสกัด เช่น ออลิโกกลูโคแมนแนนจากกลูโคแมนแนนในบุก และออลิโกกาแลคโตแมนแนนจากกาแลคโตแมนแนนในกัวร์กัม

กากมะพร้าว (Copra meal) เป็นวัสดุเศษเหลืออุตสาหกรรมจากกระบวนการผลิตกะทิและน้ำมันมะพร้าว ซึ่งมีองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตสูงถึง 45-70 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของมะพร้าว (Khuwjitjaru และคณะ, 2012; Yalegama และคณะ, 2013) โดยมีปริมาณกาแลคโตแมนแนน (Galactomannan) 61 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (Balasubramania, 1976) กาแลคโตแมนแนนมีโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยสายหลักของน้ำตาลแมนโนสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1,4 เป็นสายโซ่หลัก ขณะที่น้ำตาลกาแลคโตสเชื่อมต่อกับสายโซ่หลักด้วยพันธะแอลฟา-1,6 (Ramesh และคณะ, 2001) การย่อยกาแลคโตแมนแนนให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลสายสั้นหรือออลิโกกาแลคโตแมนแนน (Galactomannooligosaccharides: GMOSs) สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การใช้คลื่นไมโครเวฟ ความร้อน สารเคมี และเอนไซม์ เป็นต้น (Jian และคณะ, 2013) การผลิตออลิโกกาแลคโตแมนแนน โดยวิธีการย่อยด้วยเอนไซม์ (Enzymatic hydrolysis) เป็นวิธีการที่ได้รับความนิยม เนื่องจาก วิธีการนี้สามารถควบคุมกระบวนการผลิตให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล (Degree of polymerization) ตามที่ต้องการ ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตออลิโกกาแลคโตแมนแนนด้วยวิธีนี้ ประกอบด้วย ค่าความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ ระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยา ความเข้มข้นของสับสเตรต และความเข้มข้นของเอนไซม์ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ย่อมมีอิทธิพลร่วมกันและส่งผลกระทบต่อขนาดและปริมาณออลิโกกาแลคโตแมนแนน ที่ผลิตได้ โดยขนาดของออลิโกกาแลคโตแมนแนน ก็มีผลต่อสมบัติการเป็นพรีไบโอติกอีกด้วย

งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตออลิโกกาแลคโตแมนแนน โดยใช้กาแลคโตแมนแนนที่สกัดได้จากกากมะพร้าว ซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากการคั้นกะทิและสกัดน้ำมันมะพร้าว ออก โดยใช้เอนไซม์แมนนาเนสในการย่อย จึงเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับกากมะพร้าวและทำให้เกิดประโยชน์อย่างคุ้มค่า การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโมเลกุลของกาแลคโตแมนแนนที่สกัดได้จากกากมะพร้าว เพื่อให้ได้ออลิโกกาแลคโตแมนแนนที่มีสมบัติเป็นพรีไบโอติก เหมาะสำหรับนำไปประยุกต์ใช้เสริมในผลิตภัณฑ์อาหารหรือใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร จึงมีความสำคัญที่จะทำให้องค์ความรู้ที่จะนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในการผลิตออลิโกกาแลคโตแมนแนนในระดับอุตสาหกรรมต่อไป นอกจากนี้ยังเป็นการพัฒนาศักยภาพการผลิตของอุตสาหกรรมอาหารของประเทศให้สามารถแข่งขันภายใต้การเปิดตลาดการค้าเสรีอาเซียนอีกด้วย

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 ศึกษาขนาดโมเลกุลของออลิโกกาแลคโตแมนแนน ที่มีคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกที่ดีซึ่งเตรียมได้จากการย่อยโดยเอนไซม์แมนนาเนสจากกาแลคโตแมนแนนในกากมะพร้าว

1.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมกับการผลิตออลิโกกาแลคโตแมนแนน จากการย่อยกาแลคโตแมนแนนจากกากมะพร้าวด้วยเอนไซม์แมนนาเนส

1.2.3 ศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพและสมบัติพรีไบโอติกของออลิโกกาแลคโตแมนแนน ที่ผลิตได้

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการวิจัยเพื่อผลิตออลิโกกาแลคโตแมนแนนที่มีสมบัติเป็นพรีไบโอติกจากกาแลคโตแมนแนนที่สกัดได้จากกากมะพร้าว และใช้เอนไซม์แมนนาเนสในการเตรียมออลิโกกาแลคโตแมนแนน ซึ่งแหล่งที่มาของแมนนาเนสจะมีความสามารถในการย่อยแมนแนนและให้ผลิตภัณฑ์ที่มีความแตกต่างกันด้านปริมาณและน้ำหนักโมเลกุลของออลิโกกาแลคโตแมนแนน ที่ได้ (น้ำหนักโมเลกุลในช่วง 100 -100000 ดาลตัน) ในด้านมวลโมเลกุลนั้นจะมีผลต่อสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของออลิโกกาแลคโตแมนแนน ในการวิจัยครั้งนี้จะใช้แมนนาเนสจาก *Aspergillus* sp. ในการเตรียมออลิโกกาแลคโตแมนแนนจากกากมะพร้าว โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อย ได้แก่ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น อุณหภูมิ ความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลา ซึ่งสภาวะที่ต่างกันจะทำให้ได้ออลิโกกาแลคโตแมนแนน ที่มีความแตกต่างกันทางด้านเคมีกายภาพ เช่น มวลโมเลกุล สมบัติการละลาย ความหนืด และสมบัติการเป็นพรีไบโอติก เป็นต้น

## บทที่ 2

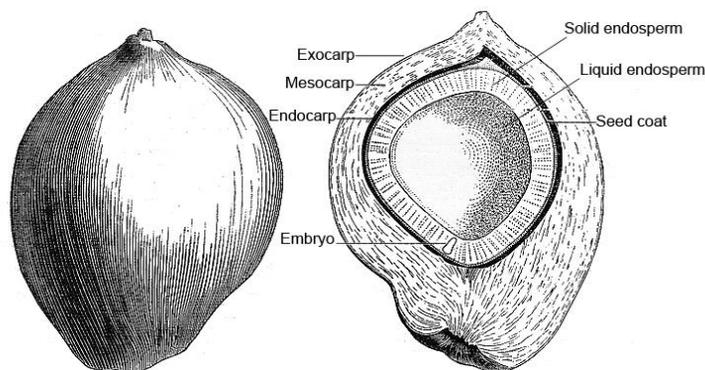
### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 มะพร้าว (Coconut)

มะพร้าว (Coconut) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cocos nucifera* Linn. เป็นพืชยืนต้นใบเลี้ยงเดี่ยว อยู่ในตระกูลปาล์ม พบได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะภาคใต้ พันธุ์มะพร้าวไทยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มด้วยกันคือ มะพร้าวพันธุ์ต้นสูง มีความสูงประมาณ 20 เมตร ขึ้นไป และมะพร้าวพันธุ์ต้นเตี้ย มีความสูงประมาณ 3 เมตร การใช้ประโยชน์จากมะพร้าวสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ทุกส่วน โดยเฉพาะผล เช่น ใช้รับประทานผลสด นำมาประกอบอาหาร เป็นวัตถุดิบในโรงงานอุตสาหกรรม และเป็นอาหารสัตว์ ส่วนที่เหลือสามารถนำไปใช้ประโยชน์อื่น ๆ เช่น เส้นใยของผลไปใช้บุเก้าอี้ ผสมกับดินสำหรับปลูกพืช เป็นต้น (วาสนา, 2525)

##### 2.1.1 โครงสร้างของผลมะพร้าว

ผลมะพร้าวที่สุกแก่พร้อมที่จะเก็บเกี่ยว ลักษณะของผลเป็นแบบไฟบรัส ดรูป (Fibrous drupe) เรียกว่า นัท (Nut) มีเปลือก 3 ชั้น คือ เปลือกชั้นนอก (Exocarp) เป็นเส้นใยที่เหนียวและแข็ง เมื่อแก่อาจมีสีเขียว แดง เหลืองหรือน้ำตาล เปลือกชั้นกลาง (Mesocarp) เป็นชั้นที่อยู่ถัดจากเปลือกนอก เข้ามา เป็นชั้นของเส้นใยที่เรียกว่า กาบมะพร้าว มีความหนาประมาณ 4-8 เซนติเมตร เปลือกชั้นใน (Endocarp) เป็นชั้นในสุดที่มีกามะพร้าวหุ้มล้อมรอบ เมื่อผลแก่จะมีลักษณะแข็ง สีน้ำตาลดำที่เรียกว่ากะลา (Husk or shell) ซึ่งภายในกะลามะพร้าวจะมีเมล็ดมะพร้าว ซึ่งประกอบด้วย เนื้อมะพร้าว (Solid endosperm) และน้ำมะพร้าว (Liquid endosperm) โดยเนื้อมะพร้าวประกอบด้วย Seed coat เป็นแผ่นบางๆ สีน้ำตาลคั่นอยู่ระหว่างกะลา กับเนื้อมะพร้าว ซึ่ง Seed coat นี้จะติดแน่นกับเนื้อมะพร้าว ดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของลูกมะพร้าว

ที่มา: ดัดแปลงจาก <http://delta-intkey.com/angio/images/palm814.gif> (ออนไลน์)

## 2.1.2 เนื้อมะพร้าว

เนื้อมะพร้าว คือ ส่วนของเมล็ดมะพร้าว สีขาวและมีน้ำมันอยู่มาก เมื่อผลอ่อนจะมีน้ำ (liquid endosperm) บรรจุอยู่เต็ม ซึ่งน้ำมะพร้าวมีน้ำตาลพวกกลูโคส และซูโครส เมื่อผลแก่จัดอายุประมาณ 12 เดือน จะมีสารที่ขับออกมาจากเซลล์ของเนื้อมะพร้าว (solid endosperm) รวมอยู่ด้วย ทำให้น้ำมะพร้าวมีรสกร่อยลงไป ปริมาณน้ำก็มีน้อยลง และเนื้อมะพร้าวมีความหนาและแข็งมากขึ้น

องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อมะพร้าว ประกอบด้วย โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน เป็นหลัก (ตารางที่ 2.1) ปริมาณขององค์ประกอบมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ พื้นที่การเพาะปลูก และระดับความแก่-อ่อน เป็นต้น

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อมะพร้าว

องค์ประกอบ	แหล่งที่มา				
	Dendy และ Timmins (1973)	Grimwood (1975)	Balachandran et. al. (1985)	Chakraborty (1985)	Kwon et al. (1996)
ความชื้น	44.0	42-48	35.37	36	40.9
โปรตีน	3.6	4	5.5	4.5	3.8
ไขมัน	38.1	36	44.01	41.5	35.2
เยื่อใย	3.1	2	3.05	3.5	-
เถ้า	1.3	-	0.77	1.1	-
คาร์โบไฮเดรต	9.9	7-20	14.35	16.9	-

ที่มา: ดัดแปลงจาก Kwon และคณะ (1996)

การบริโภคเนื้อมะพร้าว มีทั้งบริโภคสดและนำมาแปรรูปให้เป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ซึ่งอุตสาหกรรมที่นำเนื้อมะพร้าวมาแปรรูป ได้แก่ อุตสาหกรรมมะพร้าวแห้ง อุตสาหกรรมมะพร้าวขูดแห้ง อุตสาหกรรมน้ำมันมะพร้าว และอุตสาหกรรมกะทิเข้มข้น เป็นต้น

## 2.1.3 กากมะพร้าว

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประกอบด้วย สารพวกเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง โดยปริมาณของเฮมิเซลลูโลส มีมากเป็นอันดับสอง ซึ่งโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส มีทั้งแบบที่ประกอบด้วยน้ำตาลเพนโตส หรือน้ำตาลเฮกโซสเพียงหนึ่งชนิด (โฮโมพอลิเมอร์) หรือประกอบด้วยน้ำตาลเพนโตส และน้ำตาลเฮกโซสผสมกัน (เฮเทอโรพอลิเมอร์) เช่น น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลกาแลคโตส

และน้ำตาลกลูโคส เป็นต้น ซึ่งน้ำตาลแต่ละโมเลกุลจะต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1, 3-ไกลโคซิดิก หรือพันธะเบต้า-1, 4-ไกลโคซิดิก ขึ้นกับชนิดของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

เนื้อมะพร้าวที่ผ่านกระบวนการแปรรูปจากอุตสาหกรรมน้ำมันมะพร้าว และอุตสาหกรรมกะทิ ส่วนที่เหลือจากกระบวนการแปรรูปนี้ เรียกว่า กากมะพร้าว โดยมีปริมาณขององค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่ไม่น้อยกว่าในเนื้อมะพร้าว ยกเว้นคาร์โบไฮเดรตที่มีปริมาณสูงกว่า (ตารางที่ 2.2)

การนำกากมะพร้าวไปใช้ประโยชน์ส่วนใหญ่นำไปเป็นอาหารสัตว์ แต่ปัจจุบันมีการนำไปใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในการผลิตเอโนไซม์ และสัปดาห์ที่มีสมบัติเป็นพรีไบโอติก เนื่องจากกากมะพร้าวมีแมนแนน ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่แป้ง (Non-starch polysaccharide, NSP) และมีสมบัติเป็นพรีไบโอติก

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีของกากมะพร้าว

องค์ประกอบ	(ร้อยละ โดยน้ำหนักเปียก)
ความชื้น	3.44
โปรตีน	0.85
ไขมัน	25.59
เถ้า	1.13
คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	68.99
- กาลแลคโตแมนแนน	61*
- แมนแนน	26*
- เซลลูโลส	13*

หมายเหตุ \* คิดจาก ร้อยละของคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

ที่มา: Balasubramania (1976) และKhuwijitjaru และคณะ (2012)

## 2.2 แมนแนน (Mannan)

แมนแนนเป็นเฮมิเซลลูโลส สามารถพบได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อพืช และเป็นส่วนประกอบของไกลโคโปรตีนในผนังเซลล์ของยีสต์ เนื้อเยื่อพืชพบแมนแนนอยู่ระหว่างชั้นของเซลลูโลสและลิกนิน โดยยึดติดกับส่วนของลิกนินด้วยพันธะโควาเลนต์ และเชื่อมกับเซลลูโลสด้วยพันธะไฮโดรเจน ซึ่งช่วยสร้างความแข็งแรงแก่โครงสร้างของแมนแนนทำให้ยากต่อการย่อยสลาย สามารถพบในเอ็นโดสเปิร์มของ เมล็ดกาแฟ โคล์สปีนัม และมะพร้าว (Saittagaroon และคณะ, 1983) ส่วนของแควควิวอลใน บุก โอวอรีนัท กัวร์ และวุ้นหางจระเข้ เป็นต้น (Moreira และ Filho, 2008)

แมนแนนแบ่งได้เป็น 4 ชนิด คือ แมนแนน กาแลคโตแมนแนน กลูโคแมนแนน และกาแลคโตกลูโคแมนแนน (Moreira และ Filho, 2008) ซึ่งจัดเป็นกลุ่มได้ 2 กลุ่ม ดังนี้

2.2.1 กลุ่มที่มีน้ำตาลแมนโนสเพียงชนิดเดียวเป็นสายโซ่หลักเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ เบต้า-(1, 4) หรือ มีน้ำตาลกาแลคโตส มาเป็นสายโซ่กิ่งเชื่อมต่อด้วยพันธะ แอลฟา-(1, 6) ได้แก่ แมนแนน และกาแลคโตแมนแนน แมนแนนทั้ง 2 ชนิดนี้ พบมากในเอ็นโดสเปิร์มของเมล็ดของพืชตระกูลถั่ว กว๊ว ทาร่า และโลคัสปิ่นกัม เป็นต้น

- แมนแนน (Linear mannan) เป็นโฮโมโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ เบต้า-(1,4) เป็นสายโซ่หลัก ไม่มีสายโซ่กิ่งในโครงสร้าง มี degree of polymerization ประมาณ 10-80 แมนแนนชนิดนี้พบมากในโครงสร้างของไม้และเมล็ดพืช และสามารถพบในสาหร่ายสีแดงและสาหร่ายสีเขียว

- กาแลคโตแมนแนน (Galactomannan) มีน้ำตาลแมนโนสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ เบต้า-(1,4) เป็นสายโซ่หลัก และมีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นสายโซ่กิ่ง เชื่อมต่อด้วยพันธะ แอลฟา-(1, 6) สามารถพบในโครงสร้างของเมล็ดปาล์ม และเนื้อมะพร้าว กาแลคโตแมนแนนมี ความสามารถในการละลายน้ำและความข้นหนืด ซึ่งความสามารถทั้งสองขึ้นกับแหล่งที่มาของกาแลคโตแมนแนน ส่วนใหญ่ได้มาจาก โลคัสปิ่นกัม และกว๊ว และยังขึ้นกับ อัตราส่วนของแมนโนส/กาแลคโตส โดยโลคัส-ปิ่นกัม มีอัตราส่วน 5/1 ส่วน กว๊ว มีอัตราส่วน 2/1 จากสมบัติทั้ง 2 ของกาแลคโตแมนแนน ทำให้นิยมใช้เป็น สารเพิ่มความหนืด (Thickener) สารเพิ่มความคงตัว (Stabilizer) สารยึดติด (Binder) ให้กับผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา สี และ สิ่งทอ เป็นต้น

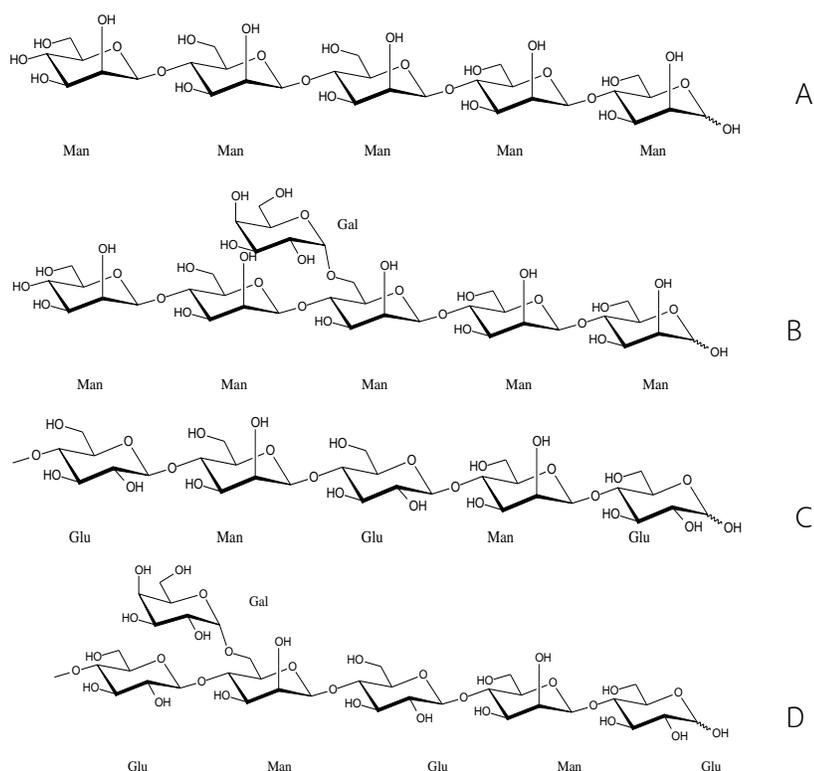
2.2.2 กลุ่มที่ประกอบด้วยน้ำตาลแมนโนส และน้ำตาลกลูโคสในสายโซ่หลัก และมีน้ำตาลเฮกโซส เช่น กลูโคส และกาแลคโตส มาเป็นสายโซ่กิ่ง ได้แก่ กลูโคแมนแนน และกาแลคโตกลูโคแมนแนน

- กลูโคแมนแนน (Glucomannan) มีน้ำตาลแมนโนส และน้ำตาลกลูโคส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ เบต้า-(1,4) เป็นสายโซ่หลัก ไม่มีสายโซ่กิ่งในโครงสร้าง ซึ่งมีอัตราส่วนของน้ำตาลแมนโนสต่อน้ำตาลกลูโคส ที่ 3:1 และมี degree of polymerization มากกว่า 200 พบได้ในไม้เนื้อแข็ง ส่วนกลูโคแมนแนนที่มีอัตราส่วนของน้ำตาลแมนโนสต่อน้ำตาลกลูโคส ที่ 1.5-2:1 และมี degree of polymerization ประมาณ 70 สามารถพบในไม้เนื้ออ่อน เมล็ดพืช ราก หัว และส่วนต่างๆขึ้นกับชนิดของพืช กลูโคแมนแนนนิยมใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมยา

- กาแลคโตกลูโคแมนแนน (Galactoglucomannan) มีน้ำตาลแมนโนส และน้ำตาลกลูโคส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ เบต้า-(1,4) ในสายโซ่หลัก และมีน้ำตาลกาแลคโตสเชื่อมต่อด้วยพันธะ แอลฟา-(1, 6)

เป็นสายโซ่กิ่ง มีอัตราส่วนของน้ำตาลแมนโนสต่อน้ำตาลกลูโคสต่อน้ำตาลกาแลคโตส 3:1:1 มี degree of polymerization ประมาณ 15-100 นอกจากนี้ยังมีหมู่อะซิเตล (O-acetyl group) อยู่ในโครงสร้างด้วย มีประมาณ 5.9-8.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอยู่ที่ตำแหน่ง C-2 หรือ C-3

แมนแนนทั้ง 2 กลุ่ม มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี เนื่องจากโซ่กิ่งของแมนแนนซึ่งเป็นน้ำตาลกาแลคโตส มีจำนวนของหมู่ไฮดรอกซิลมากกว่าที่พบในสายหลักของน้ำตาลแมนโนส ซึ่งเป็นหมู่ที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ดังนั้นจำนวนของหมู่น้ำตาลกาแลคโตสในสารกาแลคโตแมนแนนจึงส่งผลโดยตรงต่อความสามารถในการละลายน้ำของสารประกอบแมนแนน



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของแมนแนนทั้ง 4 ชนิด A: แมนแนน; B: กาแลคโตแมนแนน; C: กลูโคแมนแนน และ D: กาแลคโตกลูโคแมนแนน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Zyl และคณะ (2010)

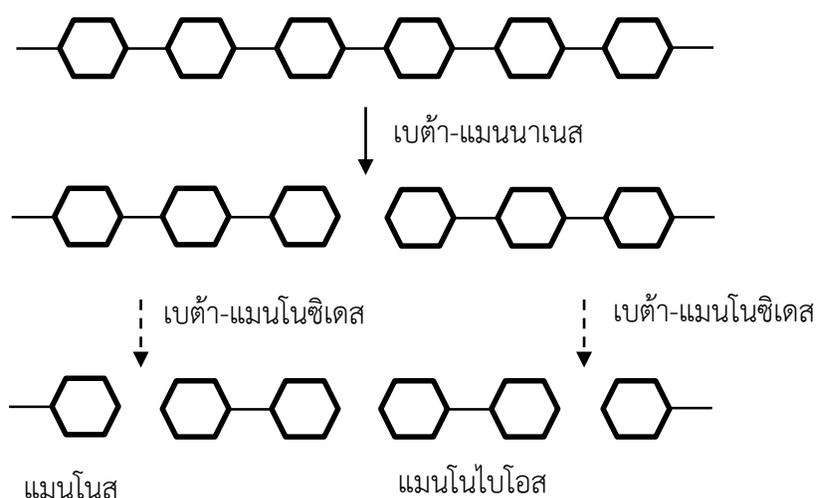
### 2.3 เอนไซม์แมนนาเนส (Mannanase)

แมนนาเนสที่ย่อยแมนแนนและกาแลคโตแมนแนนมี 2 ชนิด คือ เบต้า-แมนนาเนส ( $\beta$ -mannanases) และ เบต้า-แมนโนซิเดส ( $\beta$ -mannosidases) ซึ่งมีชื่อเรียกตามระบบว่า เอนโด-1,4-เบต้า-ดี-แมนแนน แมนโนไฮดรเลส (endo-1,4- $\beta$ -D-mannan mannohydrolases, EC 3.2.1.78) และเอกโซ-1,4-

เบต้า-ดี-แมนโนไพราโนไซด์ ไฮโดรเลส (exo-1,4- $\beta$ -D-mannopyranoside hydrolases, EC 3.2.1.25) ตามลำดับ แมนนาเนส พบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งแบคทีเรีย รา ยีสต์ และแอกติโนมัยซีต โดยส่วนใหญ่ พบทั้งที่เป็นเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นได้เอง (constitutive enzyme) และเอนไซม์ที่ต้องมีการเหนี่ยวนำ

เบต้า-แมนนาเนส ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในการย่อยพันธะ เบต้า-(1,4) แบบสุ่มที่สายโซ่หลักของ แมนแนน หรือ กาแลคโตแมนแนน ให้เป็น ออลิโกกาแลคโตแมนแนน (Galactomannooligosaccharides) หรือน้ำตาลโมเลกุลที่มีเล็กลง เช่น แมนโนไบโอส (mannobiose) และ แมนโนไตรโอส (mannotriose) นอกจากนี้ยังสามารถทำปฏิกิริยา transglycosylation ทำให้สามารถสร้างเป็น Galactomannooligosaccharides ได้อีก

เบต้า-แมนโนซิเดส ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในการย่อยพันธะ เบต้า-(1,4) จากปลายอนรีติวซ์ของออลิโกกาแลคโตแมนแนนให้ความยาวสายสั้นลง และได้น้ำตาลแมนโนสเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย



ภาพที่ 2.3 การเข้าย่อยพันธะ เบต้า-(1,4) ของเอนไซม์ เบต้า-แมนนาเนส และเบต้า-แมนโนซิเดส บนโครงสร้างแมนแนน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Soni และ Kango (2013)

## 2.4 프리ไบโอติก (Prebiotic)

ฟรีไบโอติก หมายถึงอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยและดูดซึมในทางเดินอาหารส่วนบน โดยสามารถทนต่อการย่อยโดยกรดในกระเพาะอาหารและเอนไซม์ในลำไส้เล็ก และมีผลในการส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภคโดยเป็นอาหารสำหรับการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มที่มีประโยชน์ หรือโพรไบโอติกที่อาศัยอยู่ในลำไส้ โดยที่ไม่ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (Gibson and Roberfroid, 1995) โดยจุลินทรีย์กลุ่มที่มี

ประโยชน์หรือเรียกว่าจุลินทรีย์โพรไบโอติก ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* และ *Bifidobacterium* spp. เป็นต้น จุลินทรีย์โพรไบโอติก และพรีไบโอติกมีความเกี่ยวพันกันอย่างใกล้ชิด พรีไบโอติกเป็นสารอาหารที่สามารถส่งเสริมให้จุลินทรีย์โพรไบโอติกมีการเจริญเติบโต เพิ่มจำนวน และแข็งแรงมากยิ่งขึ้น

ดังนั้นสารอาหารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกนั้นต้องสามารถทนต่อการย่อยของกรดในกระเพาะอาหาร และลงสู่ลำไส้ใหญ่ได้โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลง และไม่ถูกดูดซึมในลำไส้เล็ก เพื่อที่จุลินทรีย์ประจำถิ่น (microflora) ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่สามารถใช้สารเหล่านี้ในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน (Gibson, 2004) และส่งผลให้สุขภาพของผู้บริโภคดีขึ้น เช่น ช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม และเหล็ก (Lopez และคณะ, 2000) และสามารถป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้

สารอาหารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่รู้จักกันดีมักเป็นสารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรตในกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) เช่น แลคตูโลส (lactulose) แรฟฟิโนส (raffinose) สตาคซีโอส (starchyose) และฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructooligosaccharide, FOS) นอกจากนี้ยังมีสารอาหารที่เป็นพวกลูกตาลที่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ (resistant starch: RS), โพลีแซคคาไรด์ที่ไม่ใช่สตาร์ช (Non-starch polysaccharide, NSP) รวมไปถึงสารที่ได้จากพืช เช่น แพนคติน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส กัม และไซแลน นอกจากนี้ มีวชิน ไกลโคโปรตีน (mucine glycoprotein) ซึ่งผลิตโดย goblet cell ในลำไส้ใหญ่และไคโตแซนโอลิโกแซคคาไรด์ (COS) แแบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักได้เช่นกัน (นิริญญา , 2550)

#### 2.4.1 ประเภทของพรีไบโอติก

พรีไบโอติกที่มีการใช้อยู่ในขณะนี้อยู่ในกลุ่ม oligosaccharides ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิดมาต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (Glycosidic linkage) โดยพันธะที่เชื่อมกันของน้ำตาลจะมีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ที่สร้างโดยแบคทีเรียโพรไบโอติกว่าสามารถสร้างเอนไซม์มาย่อยพันธะดังกล่าวได้หรือไม่ เช่น ความสามารถของแบคทีเรียในกลุ่ม *Bifidobacteria* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ เบต้า-ฟรุคโตฟูรานอซิเดส ( $\beta$ -fructofuranosidase) มาย่อยพันธะภายใน ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ได้ เป็นต้น ในขณะที่พรีไบโอติกที่มีขนาดใหญ่ และน้ำหนักโมเลกุลสูงจะสามารถถูกนำไปใช้โดยแบคทีเรียได้น้อยลง หรืออาจกล่าวได้ว่า พรีไบโอติกที่ดีควรมีขนาดเล็ก (degree of polymerization น้อย) (Manning and Gibson, 2004)

พรีไบโอติกที่พบมีอยู่ 2 กลุ่ม คือ พรีไบโอติกที่มีในธรรมชาติจะพบได้ในผักและผลไม้ เช่น นม ผลไม้และผัก เช่น หัวหอม ต้นแก่นตะวัน (Jerusalem aetichok) ชิกอรี (chicory) กระเทียม กล้วย ยาคอน (yacon) แซลซิป (salsify) ข้าวไรน์และข้าวบาร์เลย์ และแก้วมังกร เป็นต้น และพรีไบโอติกที่ได้จากการ

สังเคราะห์โดยใช้เอนไซม์ย่อยโพลีแซคคาไรด์ เช่น แป้ง ในปัจจุบันพรีไบโอติกที่นำมาใช้ทางการค้าและในอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่ได้มาจากการสังเคราะห์

#### 2.4.1.1 พรีไบโอติกที่พบในธรรมชาติ

##### - อินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Inulin and Fructooligosaccharide)

อินนูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ ประกอบด้วยน้ำตาลฟรุกโตสต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเบต้า 2, 1 ที่มีทั้งโอลิโกแซคคาไรด์ และพอลิแซคคาไรด์ อินนูลินจากหัวชิกอรี ในธรรมชาติ ประกอบด้วยน้ำตาลฟรุกโตสต่อกันตั้งแต่ 2 หน่วย จนถึงมากกว่า 60 หน่วย โดยพบร้อยละ 88 ของอินนูลิน และโอลิโกฟรุกโตสสามารถต้านการย่อยด้วยเอนไซม์ในน้ำลายและในลำไส้เล็ก ทำให้สามารถผ่านไปถึงลำไส้ใหญ่ได้ นอกจากนี้ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ไม่ถูกย่อยและดูดซึมในระบบทางเดินอาหารส่วนบนของมนุษย์ ทำให้สามารถผ่านไปยังลำไส้ใหญ่และเกิดการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ใหญ่

##### - กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Galato-oligosaccharides; GOS)

กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ หรือทรานสกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (transgalacto-oligosaccharides; TOS) เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยกาแลคโตส กาแลคโต-โอลิโกแซคคาไรด์ไม่ถูกย่อยและไม่ถูกดูดซึมในลำไส้เล็ก ทำให้เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ให้แคลอรีต่ำ คือ 1.73 กิโลแคลอรีต่อกรัม นอกจากนี้การศึกษาในมนุษย์ยังพบว่า กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ มีผลกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม ไบฟิโดแบคทีเรีย เมื่อบริโภคในปริมาณ 2.5-15 กรัมต่อวัน แบคทีเรียกลุ่ม ไบฟิโดแบคทีเรีย และ แลคโตบาซิลไล สามารถใช้ กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นสับสเตรทในการหมัก ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือกรดไขมันสายสั้น เช่น แลกเตท อะซิเตท และโพนพิเนท นอกจากนี้พบว่า กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ถูกหมักอย่างสมบูรณ์ในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์

##### - ออลิโกกาแลคโตแมนแนน (Galactomannooligosaccharides, GMOS)

แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสองชนิด คือ น้ำตาลแมนโนส (Mannose) และน้ำตาลกาแลคโตส (Galactose) โดยโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วย สายหลักของน้ำตาลแมนโนสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะชนิดเบต้าที่คาร์บอนตัวที่ 1 ของน้ำตาลแมนโนสตัวแรกกับคาร์บอนตัวที่ 4 ของน้ำตาลแมนโนสตัวถัดมาในขณะที่น้ำตาลกาแลคโตสต่อกับสายหลักของน้ำตาลแมนโนสด้วยพันธะชนิดแอลฟาที่คาร์บอนตัวที่ 1 ของน้ำตาลกาแลคโตสกับคาร์บอนตัวที่ 6 ของน้ำตาลแมนโนส (Park และ Chang, 1993) ซึ่ง แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ สามารถสกัดจากเมล็ดกาแพ โดยแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ จะช่วยกระตุ้นให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น ส่งผลดีต่อระบบขับถ่าย และการ

ลดความอ้วน นอกจากเมล็ดกาแฟแล้ว แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ ยังสามารถสังเคราะห์ได้จากกากมะพร้าวที่เป็นของเหลือทิ้งทางการเกษตรจากอุตสาหกรรมการผลิตกะทิ นอกจากนี้ยังพบได้ในผนังเซลล์ยีสต์ ออลิโกกาแลคโตแมนแนนที่ได้จากผนังเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มีกลูแคน (glucan, 30%) แมนแนน (mannan, 30%) และโปรตีนไคติน (chitin, 12.5%) เป็นส่วนประกอบ กลูแคนเรียงตัวเป็นชั้นแรก โดยมีน้ำตาลกลูโคสจับกันด้วยพันธะ เบต้า-(1,6) และ เบต้า-(1,3) เป็นโครงสร้างหลักหรือแกน (matrix) ของผนังเซลล์และมีกิ่งก้านหรือแขน (side chain) แมนโนส แมนโนไบโอส แมนโนไตรโอส และแมนโนเตตระโอส ยึดจับอยู่ด้วยพันธะ แอลฟา-(1,2) และ แอลฟา-(1,3) นอกจากนี้ยังมีหมู่ฟอสเฟต (di-esterified phosphate group) เป็นองค์ประกอบ (Lyons, 1994)

#### 2.4.1.2 พรีไบโอติกที่ได้มาจากการสังเคราะห์

##### - แลคทูโลส (Lactulose)

แลคทูโลสผลิตมาจากน้ำตาลแลคโตส มีโครงสร้างคือ  $\beta$ -D-Galgalactose-(1-4)- $\beta$ -D-Fructose แลคทูโลสไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ เบต้า-กาแลคโตซิเดส ซึ่งต่างกับแลคโตส แลคทูโลสจึงไม่ถูกย่อยและดูดซึมในลำไส้เล็กแต่จะถูกหมักโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ คือ ไบฟิโดแบคทีเรีย การหมักแลคทูโลสจะได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นอะซิเตท และแลคเตท ในเนเธอร์แลนด์แลคทูโลส ถูกนำออกมาวางขายเพื่อใช้ในการแก้ท้องผูกกลายเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ จากการศึกษาโดยให้อาสาสมัคร 8 คน รับประทานแลคทูโลส 3 กรัมต่อวัน พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนของ ไบฟิโดแบคทีเรีย ในขณะที่จำนวนของ แบคทีเรียโอสไนด์ และคลอสทริเดียนั้นลดลง และนอกจากนี้อินโดล สคาทอล ฟีนอล พีเอชของอุจจาระ  $\beta$ -glucuronidase, nitroreductase และ azoreductase ยังลดลงอีกด้วย (Kolida และคณะ, 2000)

##### - แลคโตซูโครส (Lactosucrose)

แลคโตซูโครสผลิตจากสารตั้งต้นที่เป็นส่วนผสมของแลคโตสและซูโครส โดยใช้เอนไซม์ เบต้า-ฟรุกโตฟูราโนซิเดส จากเชื้อ *Arthrobacter sp.* มีคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม ไบฟิโดแบคทีเรีย (Gibson, 2004) แลคโตซูโครสไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ภายในปากและลำไส้เล็ก แต่ถูกหมักในลำไส้ใหญ่ด้วยจุลินทรีย์พวก ไบฟิโดแบคทีเรีย แบคทีเรียโอสไนด์ และคลอสทริเดียน ในปี 1992 Yoneyama และคณะ ได้ให้อาสาสมัคร 6 คน รับประทานแลคโตซูโครส 2, 5 และ 10 กรัมต่อวัน พบว่าจำนวน ไบฟิโดแบคทีเรีย นั้นเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในทุกระดับของแลคโตซูโครสที่ได้รับ ต่อมามีการศึกษาในอาสาสมัครที่มีสุขภาพแข็งแรง 3 คน โดยการให้บริโภคแลคโตซูโครสปริมาณ 3 กรัมต่อวัน พบว่าจำนวนของแบคทีเรียกลุ่ม ไบฟิโดแบคทีเรีย เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (0.7 log) ในขณะที่จำนวนของแบคทีเรียกลุ่ม แบคทีเรียโอสไนด์ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (0.6 log) และพบว่าปริมาณของกรดไขมันสายสั้นไม่เปลี่ยนแปลง (Ohkusa

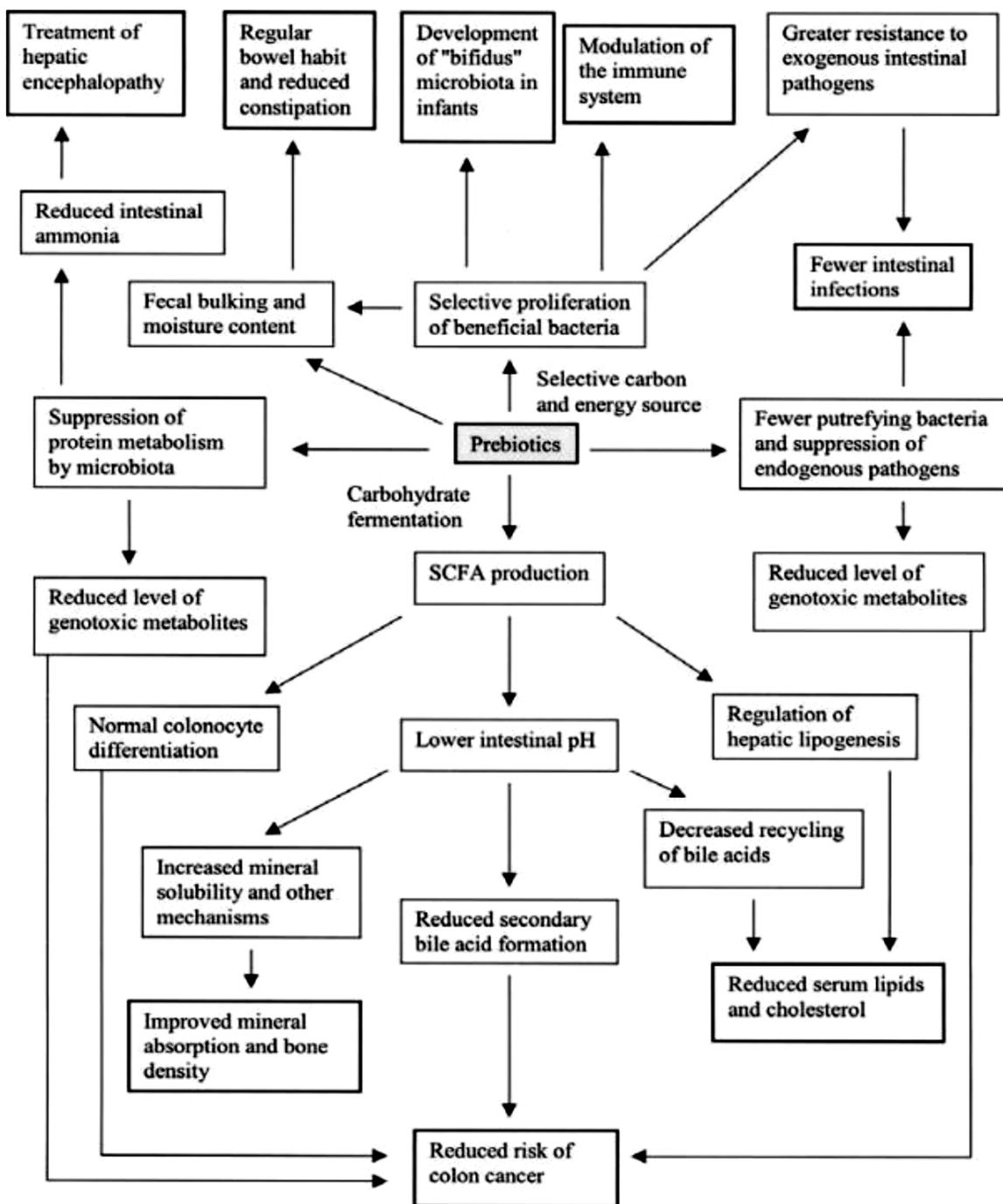
และคณะ, 1995) ในขณะที่ คลอสทริเดียม เพอฟรีนเจนท์ (*Cl. Perfringens*) และแอมโมเนียในอุจจาระนั้นลดลง (Hartemink, 1999)

#### - ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (Xylo-oligosaccharides) (XOS)

ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ มีโครงสร้างหลักประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาล ไซโลสที่ต่อกันด้วยพันธะ เบต้า-(1,4) ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์จะถูกย่อยด้วยจุลินทรีย์กลุ่ม ไบฟิโดแบคทีเรีย และ แลคโตบาซิลไล ซึ่งมีผลให้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เพิ่มขึ้น และสามารถลดจำนวนจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียโอไซด์ได้ มีรายงานถึงผลของแบคทีเรียกลุ่ม ไบฟิโดแบคทีเรีย ที่เพิ่มขึ้น เมื่อผู้บริโภคาสาสมัครได้รับ ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ 5 กรัมต่อวัน โดย ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ สามารถเพิ่มจำนวนของ ไบฟิโดแบคทีเรีย ได้ดีกว่าฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Campbell และคณะ, 1997) และจากผลการศึกษาของ Rycroft และคณะ (2001) ที่ศึกษาจุลินทรีย์ผสมของอุจจาระมนุษย์ พบว่า หลังจากมีการให้ เบต้า-(1,4)ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียว สามารถเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์กลุ่ม ไบฟิโดแบคทีเรีย ภายหลัง24 ชั่วโมง และยังสามารถลดจำนวนแบคทีเรียกลุ่มแบคทีเรียโอไซด์ได้อีกด้วย

#### 2.4.2 บทบาทและความสำคัญของพรีไบโอติกในระบบทางเดินอาหาร

สารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกไม่ได้ไปมีผลโดยตรงต่อสุขภาพแต่จะใช้เป็น สับสเตรทในกระบวนการหมักภายในลำไส้ใหญ่ โดยไปส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติก ซึ่งแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้พรีไบโอติก และผลิตสารเมตาบอไลต์ที่แตกต่างกัน สารประกอบที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นจากการย่อยและหมักพรีไบโอติก ได้แก่ กรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid; SCFA) สารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยเฉพาะกรดไขมันสายสั้น ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการหมักสารอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตโดยจุลินทรีย์ภายในลำไส้ใหญ่ จะมีปริมาณร้อยละ 40-60 (กรัม SCFA/100 กรัมสับสเตรท) ในแต่ละวันจะผลิตออกมาประมาณ 300-500 มิลลิโมล ประกอบไปด้วย อะซิเตท โพรพิโอเนท และบิวทิเรท (Chummings and Englyst, 1995) ปริมาณของกรดไขมันสายสั้น จะมีปริมาณสูงสุดในลำไส้ใหญ่ส่วนซีคัม (caecum) และส่วนต้น และมีปริมาณลดลงในลำไส้ใหญ่ส่วนปลาย ซึ่งกรดไขมันสายสั้นทั้ง 3 ชนิด จะมีบทบาทการทำงานที่ต่างกัน อะซิเตท จะถูกนำไปใช้ในกล้ามเนื้อ ไต และหัวใจ โพรพิโอเนทจะถูกส่งไปยังตับเพื่อใช้ในการแบ่งเซลล์ลำไส้ใหญ่ บิวทิเรทเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญของเซลล์เยื่อบุผิวในลำไส้ใหญ่ กรดไขมันสายสั้นสามารถควบคุมกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (cellular proliferation) และการตายของเซลล์ (program cell death) แบคทีเรียในลำไส้ใหญ่จะมีประสิทธิภาพในการหมักคาร์โบไฮเดรตแต่ละชนิดได้แตกต่างกัน บทบาทของพรีไบโอติกต่อสุขภาพของผู้บริโภคสามารถสรุปได้ดังภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.4 ประโยชน์ของสารพรีไบโอติก

ที่มา: Neeser และ German (2004)

### 2.4.2.1 การป้องกันการเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่

การเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่มีโอกาสเกิดขึ้นสูง และมากกว่าที่ลำไส้เล็กถึง 10 เท่า (Morotomi และคณะ, 1990) เนื่องจากลำไส้ใหญ่เป็นแหล่งของสะสมของเสีย และเป็นแหล่งรวมของจุลินทรีย์ต่างๆ หลายชนิด ดังนั้นมีโอกาสเกิดโรคต่างๆ โดยเฉพาะโรคมะเร็ง ได้มากกว่าในทางเดินอาหารส่วนอื่น ซึ่งมีการศึกษาพบว่าสารพรีไบโอติกสามารถป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ (Hylla และคณะ, 1998) นอกจากนี้สารที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ใหญ่ยังเป็นสารก่อมะเร็งได้ ดังนั้นแนวทางในการป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่จึงเจาะจงไปที่พรีไบโอติก ซึ่งเป็นอาหารของแบคทีเรียโดยบทบาทของพรีไบโอติกในการป้องกันมะเร็งมีดังนี้

- เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารที่มีบทบาทในการป้องกันการเกิดมะเร็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งบิวทิเรท ซึ่งมีบทบาทในการกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ apoptosis ของเซลล์ในลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้ยังถูกใช้ในการเจริญของเซลล์ได้อีกด้วย โดยบทบาทของบิวทิเรท และกรดไขมันสายสั้นชนิดอื่นๆ คือ โพรพิออนิก และอะซิติก จะส่งผลโดยตรงต่อเซลล์ลำไส้ใหญ่ในการป้องกันมะเร็ง (Scheppach และคณะ, 1995)

- เปลี่ยนแปลงกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ให้เป็นไปแนวโน้มนำที่จะลดการเกิดสารที่ส่งผลเสียต่อร่างกาย เช่น เมแทบอลิซึมของไขมัน และโปรตีนจะทำให้เกิดสารก่อมะเร็งขึ้น โดยอาจจะเปลี่ยนเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย คลอสทริเดียม และ แบคทีเรียโอสโต จากการผลิต โปรติโอไลซิส (Proteolysis) ไปเป็น แซคคาโรไลซิส (Saccharolysis) นอกจากนี้พรีไบโอติกยังมีบทบาทในการส่งเสริมให้แบคทีเรียแลคติกผลิตสารที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่จะผลิตสารก่อมะเร็งในลำไส้ใหญ่ได้ และยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่า พรีไบโอติกยังมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง เช่น เอโซรีดักเทส (azoreductase) ไนโตรรีดักเทส (nitroreductase) และ เบต้า-กลูคูโรนิเดส ( $\beta$ -glucuronidase) เป็นต้น (Reddy, 1998) จากกระบวนการหมักแบบไร้อากาศของคาร์โบไฮเดรตในลำไส้ใหญ่ จะมีการสร้างสารต่างๆ ออกมาซึ่งมีบทบาทต่อการป้องกันการเกิดมะเร็งได้โดยมีกลไกในการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันออกไป นอกจากนี้กลไกต่างๆ ในการป้องกันการเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่นั้นยังมีกลไกต่างๆ ที่เกิดร่วมกันทั้งจากแบคทีเรียพรีไบโอติกและพรีไบโอติก

### 2.4.2.2 การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

สารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกสามารถไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค (pathogen) โดยไปกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* และ *Bifidobacteria* ซึ่งภายในลำไส้ใหญ่มีจุลินทรีย์อยู่หลายกลุ่มทั้งก่อโรคและกลุ่มที่มีประโยชน์ คือเป็นแบคทีเรียพรีไบโอติก ซึ่งสามารถสร้างสารมายับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ เช่น กรดไขมันสายสั้น ซึ่งมีผลให้พีเอชในลำไส้ลดลง ส่งผลให้เกิดสภาวะที่ไม่

เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค นอกจากนี้ยังทำให้ โปรไบโอติกมีการผลิต antibiotics และ antimicrobial สูงขึ้น ดังนั้นอาหารพรีไบโอติกซึ่งเลือกส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียดังกล่าว จึงเป็นการส่งเสริมการผลิตสารยับยั้งด้วย นอกจากนี้กระบวนการเมทาบอลิซึมของ พรีไบโอติกยังส่งผลให้ค่าพีเอชภายในลำไส้ต่ำลงจึงทำให้มีการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้อีกทางหนึ่ง (Fuller, 1997 อ้างโดย Ziemer and Gibson, 1998)

#### 2.4.2.3 เพิ่มการดูดซึมของแคลเซียม

พรีไบโอติกสามารถเพิ่มการดูดซึมของสารอาหารโดยเฉพาะการดูดซึมของแคลเซียม ถึงแม้ว่าการดูดซึมของแคลเซียมจะเกิดขึ้นเป็นหลักในลำไส้เล็กแต่ยังคงมีการดูดซึมภายในลำไส้ใหญ่อยู่ และยังคงได้รับความสนใจอยู่ซึ่งกลไกในการเพิ่มการดูดซึมของแคลเซียมในลำไส้ใหญ่มีดังนี้

- จากกระบวนการหมักของพรีไบโอติกจะทำให้เกิดกรดไขมันสายสั้น ซึ่งทำให้พีเอชในลำไส้ใหญ่ลดลง จึงทำให้แคลเซียมละลายได้ดี ทำให้มีการดูดซึมที่ดีขึ้นด้วย

- สารที่อยู่ในกลุ่มไฟเตท (Phytate) เช่น ไมโออินโนซิทอล เฮกซะฟอสเฟต (myoinositol hexaphosphate) ซึ่งเป็นองค์ประกอบในพืช โดยสารดังกล่าวเป็นสารที่มีความเสถียรสูง และไม่ละลายน้ำ ทำให้เมื่อไปจับกับแคลเซียมทำให้ร่างกายไม่สามารถดูดซึมแคลเซียมได้และจากกระบวนการหมักของไฟเตท โดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ทำให้แคลเซียมถูกปล่อยออกมาเป็นอิสระและมีการดูดซึมเข้าร่างกายได้

- เกิดกลไกในการแลกเปลี่ยนแคลเซียมภายในลำไส้โดยที่เกิดจากการแลกเปลี่ยนโปรตอนระหว่างแคลเซียมและไขมันสายสั้นที่มีอยู่ในลำไส้

#### 2.4.2.4 ลดระดับคอเลสเทอรอล

การลดระดับคอเลสเทอรอล พบว่ากระบวนการหมักสารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกภายในลำไส้ใหญ่มีผลให้สามารถไปลดระดับคอเลสเทอรอลในเลือดได้ Tuohy และคณะ (2003) พบว่าแลคโตบาซิลลัส อะซิโดฟิลัส (*L. acidophilus*) เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นอยู่ในลำไส้ซึ่งจะช่วยสลายคอเลสเทอรอล และยับยั้งการดูดซึมคอเลสเทอรอลผ่านผนังลำไส้ได้

- ไปลดการดูดซึมคอเลสเทอรอล สารกลุ่มแพคติน กัวกัม (gua gum) และ เบต้ากลูแคนที่มีเส้นใยอาหารสูง จะสามารถลดการดูดซึมคอเลสเทอรอลได้ โดยลักษณะเหนียวหนืดของเส้นใยอาหาร จะไปเคลือบผนังลำไส้ทำให้ความสามารถในการดูดซึมคอเลสเทอรอลในร่างกายลดลง

- ในกระบวนการหมักสารพรีไบโอติกในลำไส้ใหญ่จะเกิดผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดไขมันสายสั้น พบว่าโพรพิโอนสามารถลดการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในเซลล์ตับได้

- เพิ่มการขับถ่ายเกลือน้ำดี (bile acid) ซึ่งเกลือน้ำดีเป็นตัวช่วยละลายไขมันทำให้การดูดซึมไขมัน และคอเลสเตอรอลเพิ่มขึ้น (Conway, 2001)

#### 2.4.2.5 ช่วยลดอาการท้องผูก

กรดไขมันซึ่งผลิตโดย ไบฟิโดแบคทีเรีย จะช่วยกระตุ้นการบีบตัวของลำไส้ และเพิ่มความชื้นของอุจจาระ ทำให้อุจจาระนิ่มขึ้นขับถ่ายได้ง่ายขึ้น ซึ่งสารพรีไบโอติกสามารถเสริมการผลิตกรดไขมันสายสั้นในจุลินทรีย์พรีไบโอติกได้

### 2.5 โพรไบโอติก

จุลินทรีย์พรีไบโอติกนั้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับพรีไบโอติก นั่นคือพรีไบโอติก สามารถใช้สารอาหารพวกพรีไบโอติกได้ ทำให้มีการเจริญของพรีไบโอติก และส่งผลดีต่อสุขภาพ ต่อผู้บริโภคได้ตั้งที่กล่าวมาแล้วข้างต้น สำหรับกลุ่มจุลินทรีย์พรีไบโอติกที่มีบทบาทสำคัญต่อ สุขภาพนั้น ได้แก่แบคทีเรียกลุ่มแลคโตบาซิลลัส และไบฟิโดแบคทีเรีย (Saarela, 2000)

**2.5.1** แลคโตบาซิลลัส เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ มีลักษณะเป็นแท่งสั้นๆ เจริญได้ในสภาวะทั้งมีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์ และสัตว์ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ แยกได้จากทางเดินอาหาร ในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ นอกจากนี้ยังพบบริเวณช่องคลอดอีกด้วย เจริญได้ในสภาวะกรดแลคโตบาซิลลัส สามารถใช้น้ำตาล ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนและผลิตกรดแลคติกได้มากกว่าร้อยละ 85 ในการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ หรือได้กรดแลคติกร้อยละ 50 คาร์บอนไดออกไซด์ เอทานอล และกรดอะซิติกในการหมัก แบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ เจริญได้ที่พีเอช 4.0 - 4.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 30-40 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม มีแลคโตบาซิลลัส บางสายพันธุ์เท่านั้นที่มีประสิทธิภาพในการต่อต้าน จุลินทรีย์ก่อโรคในลำไส้ตัวอย่างเชื้อ แลคโตบาซิลลัส ที่ใช้เป็นพรีไบโอติก ได้แก่ *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii subsp. Bulgaricus*, *L. reuteri*, *L. brevis* และ *L. rhamnosus* เป็นต้น (Klein et al, 1998)

**2.5.2** ไบฟิโดแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่ต้องการอากาศอย่างแท้จริง มีรูปร่างเป็นแท่งคล้ายตัว Y และไม่ผลิตก๊าซ ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Tissier ในปี ค.ศ. 1900 ซึ่งแยกได้จากอุจจาระ ของเด็กทารก คุณสมบัติที่สำคัญคือ สามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสได้เป็นกรดแลคติกโดยผ่านวิถี ฟอสโฟคีโตเลท (phosphoketolase pathway) เมื่ออยู่ในสภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญก็จะเกิดการ เปลี่ยนแปลงเซลล์ให้

มีกิ้งก้านมากมายในอาหารที่ขาด เบต้า-เมทิล-ดี-กลูโคซามีน ( $\beta$ -methyl-Dglucosamine) เซลล์ที่มีลักษณะเป็นสองส่วนเท่ากันจะเกิดรูปร่างที่แตกแขนงมากขึ้น และเมื่อมีการ เต็มกรดอะมิโนเพียงเล็กน้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อ เซลล์ที่เป็นกิ้งก้านมากมายจะเปลี่ยนเป็นแท่งโค้ง ไบฟิโดแบคทีเรียนี้พบได้ในลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ และช่องคลอด ผลิตภัณฑ์บิโอฟลูมิที่เหมาะสม ในการเจริญคือ 37 - 41 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมคือ 5.5 - 7.0 ผลิตภัณฑ์ซิติครดแล็กติก ทำให้เพิ่มความเป็นกรดในลำไส้ ตัวอย่างเชื้อไบฟิโดแบคทีเรีย ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก ได้แก่ *B. bifidum*, *B. adolescentis*, *B. animalis*, *B. infantis*, *B. longum* และ *B. thermophilum* เป็นต้น (Boylston, 2004)

## 2.6 วิธีการแสดงผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิว (Response Surface Methodology; RSM)

วิธีการแสดงผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิว หรือ RSM คือ วิธีการทาง คณิตศาสตร์และสถิติ ที่ถูกนำมาใช้สร้างแบบจำลอง โดยอาศัยการวิเคราะห์ผลของตัวแปรต่าง ๆ ต่อ ค่าตอบสนองหรือตัวแปรตามของการทดลอง เนื่องจากค่าตอบสนองนั้น ๆ มีอิทธิพลมาจากตัวแปร อิสระหลายตัวแปร การออกแบบการทดลองด้วยวิธีนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาจุดที่มีความเหมาะสมของตัวแปรแต่ละตัวแปรต่อค่าตอบสนองที่ต้องการ (Montgomery, 1991) โดย เริ่มจากการค้นหาฟังก์ชันที่แท้จริงระหว่างค่าตอบสนอง ต่อตัวแปรอิสระต่าง ๆ ซึ่งโดยมากมักใช้ ความสัมพันธ์แบบพหุนาม (Polynomial) เช่น สมการลำดับที่หนึ่ง (First order) (สมการที่ 1) หรือสมการลำดับที่สอง (second order) (สมการที่ 2) และเมื่อนำค่าการตอบสนองมาพล็อตกับระดับของตัวแปรอิสระ จะได้กราฟแสดงผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิว

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon \quad \dots\dots\dots (1)$$

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_i \sum_{i < j}^k \beta_{ji} X_i X_j + \varepsilon \quad \dots\dots\dots (2)$$

จากสมการที่สร้างขึ้นนี้ สามารถนำมาสร้างภาพกราฟสามมิติที่เรียกว่า response surface plot ซึ่งแสดงระดับของตัวแปรในแนวระนาบและแสดงค่าตอบสนองในแนวแกนตั้ง หรือสร้างกราฟสองมิติที่เรียกว่า contour plot ซึ่งแสดงค่าตอบสนองในแนวรูปเส้นกราฟหลายเส้น กราฟทั้งสองประเภทนี้มีประโยชน์ในการอธิบายผลของตัวแปรที่ศึกษาต่อค่าตอบสนอง ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่ศึกษา รวมถึงผลรวมของตัวแปรที่ศึกษาต่อค่าตอบสนอง และพร้อมกันนั้นจะสามารถแก้ปัญหาสมการชนิดหลายตัวแปรที่มีความสัมพันธ์กันของ dependent variable กับคุณลักษณะทางด้านปริมาณของผลิตภัณฑ์กระบวนการและ/หรือพารามิเตอร์ที่ออกแบบ (Olkku และคณะ, 1983)

Box-Behnken design เป็นรูปแบบการออกแบบการทดลองแบบหนึ่งของการออกแบบการทดลองแบบ RSM ซึ่งรูปแบบของ RSM มีหลายรูปแบบ ได้แก่ Factorial design (3ระดับ), Central composite design (CCD) และ D-optimal design Box-Behnken design คือการออกแบบการทดลองที่สร้างขึ้นจาก

การรวมการออกแบบแบบแฟคทอเรียล 2k และ การออกแบบแบบบล็อกไม่สมบูรณ์ รูปร่างคล้ายกับ cubic หรือลูกบาศก์ที่จุดทุกจุดของการทดลองวางอยู่บนจุดยอดของลูกบาศก์ซึ่งสร้างขึ้นจากขีดจำกัดบนและล่างของแต่ละตัวแปรที่นำมาศึกษา สำหรับจุดที่อยู่ตรงกลางของลูกบาศก์ เป็นจุดที่เชื่อมโยงทุกๆ ปัจจัยเข้าด้วยกัน ที่สำคัญ รูปแบบของมันสามารถหมุนได้หรือเกือบหมุนได้และเมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการทดลองลักษณะอื่นๆ ของ RSM พบว่าการออกแบบแบบ Box-Behnken design เป็นการออกแบบที่มีจำนวนชุดการทดลองน้อย (15 ชุด, จุดกึ่งกลางทำ 3 จุด ) เมื่อการศึกษานั้นประกอบด้วยตัวแปรที่สนใจจำนวน 3 ตัวแปร การออกแบบด้วย Box-Behnken design จึงเป็นรูปแบบการออกแบบการทดลองที่ได้รับความนิยม

## 2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาการผลิตออลิโกกาแลคโตแมนแนน ในปี 2008 Park รายงานผลของการย่อยกาแลคโตแมนแนนจากกากมะพร้าวเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยใช้เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *Trichoderma* sp. เข้มข้น 255 ยูนิต ที่พีเอช 4.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถผลิต แมนโนไบโอส แมนโนไตรโอส และแมนโนเฮกซะโอส ต่อมาในปี 2013 Chantorn และคณะ รายงานผลของการใช้ครูดเอนไซม์จาก *Penicillium oxalicum* KUB-SN2-1 ในการย่อยกาแลคโตแมนแนนจากกากมะพร้าวที่สภาวะ พีเอช 4 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ที่ทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตั้งแต่เวลา 3 ชั่วโมง สามารถย่อยได้ แมนโนส แมนโนไบโอส และแมนโนไตรโอส

นอกจากนี้ยังได้มีการนำวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response surface methodology) ซึ่งเป็นวิธีการทางคณิตศาสตร์มาช่วยหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตออลิโกกาแลคโตแมนแนนด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยใช้เอนไซม์ ซึ่งในปี 2013 Chen และคณะ รายงานผลของสภาวะที่เหมาะสม (พีเอช อุณหภูมิ ระยะเวลา ในการทำปฏิกิริยาและอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อสับสเตรท) ในการผลิตกลูโคออลิโกกาแลคโตแมนแนนจากผงบูก ว่าสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ พีเอช 7.1 อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3.4 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อสับสเตรทเท่ากับ 0.49 ที่ให้ปริมาณผลผลิตสูงสุด และในปีเดียวกัน Jian และคณะ รายงานผลของสภาวะที่เหมาะสม (ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา) ในการผลิตออลิโกกาแลคโตแมนแนนจาก *Gleditsia sinensis* ว่าสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ การใช้เอนไซม์ เบต้า-แมนนาเนสจาก *Aspergillus niger* ที่ 8.1 ยูนิต/กรัม อุณหภูมิ 57.4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 34.1 ชั่วโมง ซึ่งได้ปริมาณผลผลิต 75.9 เปอร์เซ็นต์

ชนิดของออลิโกกาแลคโตแมนแนนจากกากมะพร้าวที่พบส่วนใหญ่ ได้แก่ แมนโนไบโอสและแมนโนไตรโอส (Saittagaroon และคณะ, 1983; Takeda และคณะ, 2005; Park, 2008 และ Ghosh และคณะ, 2015) ซึ่งมีสมบัติเป็นพรีไบโอติก จากรายงานของ Ghosh และคณะ (2015) ได้ศึกษาสมบัติการเป็นพรีไบโอติก

โอดิกในหลอดทดลอง พบว่า ออลิโกกาแลคโตแมนแนนมีความสามารถทนต่อการย่อยในสภาวะที่เป็นกรด ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ แอลฟา-อะไมเลส อีกทั้งยังมีสมบัติเป็นสารต้านการเกิดมะเร็งได้อีกด้วย

ในปี 2005 Manderson และคณะ ได้ศึกษาสมบัติการเป็นพรีไบโอดิกของแพคติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมน้ำตาลในหลอดทดลอง พบว่า แพคติกโอลิโกแซคคาไรด์สามารถเพิ่มจำนวนของ bifidobacterial และ *Eubacterium rectale* นอกจากนี้ยังเพิ่มระดับของบิวทิเรต อีกด้วย ต่อมาในปี 2006 Wang และคณะ ได้ศึกษาสมบัติการเป็นพรีไบโอดิกของอัลจินตโอลิโกแซคคาไรด์ทั้งในหลอดทดลองในสัตว์ทดลอง พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมอัลจินตโอลิโกแซคคาไรด์กระตุ้นการเจริญของ *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521 และ *Bifidobacterium longum* SMU 27001 ได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ ส่วนในสัตว์ทดลองพบว่า อัลจินตโอลิโกแซคคาไรด์สามารถกระตุ้นการเจริญของ bifidobacteria ได้ดีกว่าเติมฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ โดยปริมาณ bifidobacteria ในอุจจาระของสัตว์ทดลองที่ได้กินอาหารที่มี อัลจินตโอลิโกแซคคาไรด์ 2.5% เป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีปริมาณเพิ่มขึ้นถึง 13 เท่า และมีปริมาณ lactobacilli เพิ่มขึ้น 5 เท่า นอกจากนี้ยังสามารถลดการเจริญของ enterobacteriaceae และ enteiococci ถัดมาในปี 2014 Harmayani และคณะ รายงานผลการเป็นพรีไบโอดิกของกลูโคแมนแนนจาก *Amorphophallus oncophyllus* ซึ่งได้ศึกษาในสัตว์ทดลองและได้เปรียบเทียบกับ AIN 93 ผงบุกและอินูลิน พบว่ากลูโคแมนแนน จาก *Amorphophallus oncophyllus* สามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* อีกทั้งยังสามารถผลิตกรดไขมันสายสั้น และลดค่าพีเอชของ cecal content ได้ใกล้เคียงกับ AIN 93 ผงบุก และอินูลิน

การใช้ออลิโกกาแลคโตแมนแนนเพื่อการเลี้ยงสัตว์ Kumprecht และ Zobac (1997) ศึกษาในไก่เนื้อเชิงการค้าที่มีการเสริมออลิโกกาแลคโตแมนแนนในอาหารสัตว์พบว่า ไก่ที่ได้รับออลิโกกาแลคโตแมนแนนจะมีความสามารถในการย่อยกากใย (fiber) เพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลต่อการย่อยไขมันและโปรตีน อีกทั้งยังมีรายงานว่าออลิโกกาแลคโตแมนแนนสามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนที่ถูกดูดซึม (protein utilization) ไว้ในร่างกายสัตว์ (Samarasinghe และคณะ, 2003) ต่อมา Yang และคณะ (2008) รายงานผลของการเสริม ออลิโกกาแลคโตแมนแนน ในอาหารไก่กระทง พบว่าช่วยเพิ่มการย่อยของแป้งที่บริเวณลำไส้เล็กส่วน ileal อีกทั้งยังเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ในลำไส้ นอกจากนี้ยังลดจำนวนของเชื้อโคลิฟอร์ม และ คลอสทริเดียม เพอร์ฟริงเจนส์ (*Clostridium perfringens*)

Cuong และคณะ (2013) ศึกษาสมบัติการเป็นพรีไบโอดิกของออลิโกกาแลคโตแมนแนนจากกากมะพร้าวที่เสริมลงในอาหารของกึ่งขาว พบว่า ออลิโกกาแลคโตแมนแนนช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของกึ่งขาว นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มจำนวนของ *Lactobacilli* และ *bifidobacteria* ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ วับริโอ โคลิฟอร์ม คลอสทริเดียม และ ซาโมเนลลา มีปริมาณลดลง เช่นเดียวกับ Rungrassamee และคณะ

(2014) ได้เสริมออลิโกกาแลคโตแมนแนนจากกากมะพร้าวลงในอาหารของกุ้งขาวเช่นกัน เพื่อศึกษาการรอดชีวิตของกุ้งขาวที่ได้รับเชื้อ *Vibrio harveyi* พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารที่มีการเสริมออลิโกกาแลคโตแมนแนนไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันส่งผลให้สามารถป้องกัน เชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ แต่ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาว

# บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### 3.1 วัตถุประสงค์

#### 3.1.1 ตัวอย่าง

กากมะพร้าวสดจากการนำเนื้อมะพร้าวผ่านกระบวนการคั้นกะทิ ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัทเทพผดุงพรมะพร้าว จำกัด จังหวัดนครปฐม

#### 3.1.2 สารเคมี

- |   |                                   |
|---|-----------------------------------|
| - กรดไฮโดรคลอริก (HCl)  | Merck, ประเทศเยอรมนี              |
| - โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)  | Merck, ประเทศเยอรมนี              |
| - กรดซัลฟูริก (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )   | Merck, ประเทศเยอรมนี              |
| - 3,5-Dinitrosalicylic acid   | Carlo, ประเทศอิตาลี               |
| - ฟีนอล   | Merck, ประเทศเยอรมนี              |
| - ไดโซเดียมฟอสเฟต ไดไฮเดรต (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O)                  | Carlo, ประเทศอิตาลี               |
| - โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )                                     | Carlo, ประเทศอิตาลี               |
| - โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)   | Carlo, ประเทศอิตาลี               |
| - กรดซิตริก (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> ·H <sub>2</sub> O)                      | Merck, ประเทศเยอรมนี              |
| - โซเดียมซิเตรต (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O) | Merck, ประเทศเยอรมนี              |
| - ไกลซีน  | Merck, ประเทศเยอรมนี              |
| - ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )   | Merck, ประเทศเยอรมนี              |
| - โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )                                   | Merck, ประเทศเยอรมนี              |
| - แคลเซียมคลอไรด์ ไดไฮเดรต (CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)                                 | Merck, ประเทศเยอรมนี              |
| - แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)                             | Merck, ประเทศเยอรมนี              |
| - โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO <sub>3</sub> )  | Carlo, ประเทศอิตาลี               |
| - โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (KNaC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> ·4H <sub>2</sub> O)  | Carlo, ประเทศอิตาลี               |
| - ทวิน 80   | Merck, ประเทศเยอรมนี              |
| - กลีโอสีน  | Sigma-Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา |
| - เปปโตน  | Merck, ประเทศเยอรมนี              |
| - บิวทานอล  | Merck, ประเทศเยอรมนี              |

- อินูลิน Sigma-Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- แมนโนส Merck, ประเทศเยอรมนี
- แมนโนไบโอส Meagzyme, Ireland
- แมนโนไตรโอส Meagzyme, Ireland
- แมนโนเตตระโอส Meagzyme, Ireland
- แมนโนเพนโตส Meagzyme, Ireland
- แมนโนเฮกโซส Meagzyme, Ireland
- กาแลคโตส Merck, ประเทศเยอรมนี
- เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จาก *Aspergillus niger* Meagzyme, Ireland
- L-cysteine HCl Sigma-Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา
- Lactobacillus MRS broth Merck, ประเทศเยอรมนี
- Yeast extract Merck, ประเทศเยอรมนี
- Sephadex LH-20 Sigma-Aldrich, ประเทศสหรัฐอเมริกา

### 3.1.3 เชื้อจุลินทรีย์

- *Lactobacillus plantarum* NF3
- *Lactobacillus plantarum* RS54
- *Escherichia coli*
- *Staphylococcus aureus*

### 3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

- Spectrophotometer Shimadzu UV-Vis 1601, ประเทศญี่ปุ่น
- TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub> 20 × 20 cm. Merck, ประเทศเยอรมนี
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง Satorious TE214S, ประเทศเยอรมนี
- ตู้อบลมร้อน Memmert UFB 400, ประเทศเยอรมนี
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ Memmert WB 29, ประเทศเยอรมนี

- |                                    |                                   |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| - Fraction column i.d. 16 × 700 mm | GE Healthcare, ประเทศสหรัฐอเมริกา |
| - Fraction collector               | Pharmacia , ประเทศสวีเดน          |
| - peristatic pump                  | Pharmacia, ประเทศสวีเดน           |
| - Turbidity meter                  | Lovibond, TB210TR                 |

### 3.3 สถานที่ดำเนินงาน

คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

### 3.4 วิธีการทดลอง

#### 3.4.1 การเตรียมตัวอย่างกากมะพร้าว

กากมะพร้าวสด นำมาคัดเอาสิ่งแปลกปลอมทางกายภาพออก เช่น เศษหิน กะลา และใยมะพร้าว เป็นต้น จากนั้นอบไล่ความชื้นด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เพื่อให้เหลือความชื้นในกากมะพร้าวประมาณ 10-11 เปอร์เซ็นต์ นำกากมะพร้าวที่ผ่านการอบแห้ง มาสกัดเอาไขมันออก ด้วยอีเทอร์-เอทานอล (อัตราส่วน 1:1 ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยชั่งตัวอย่างกากมะพร้าวและตัวสารละลายผสมในอัตราส่วน 1: 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำเข้าเครื่องเขย่า ใช้ความเร็วรอบที่ 100 รอบต่อนาที สกัดเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง กรองแยกกากมะพร้าวออกจากสารละลายด้วยผ้ามีสลิน และทำการสกัดซ้ำอีกครั้งหนึ่ง กากมะพร้าวที่ผ่านการสกัดไขมันนำไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างกากมะพร้าวที่ผ่านการสกัดไขมันใส่ถุงพลาสติกโพลีโพร-พิลีน (PP) ปิดผนึกด้วยเครื่องปิดผนึก แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในกล่องพลาสติกที่มีฝาปิดสนิท ที่อุณหภูมิห้อง

#### 3.4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแมนแนน

การสกัดแมนแนนจากกากมะพร้าวใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Saittagaroon และคณะ (1983) โดยนำกากมะพร้าวที่ผ่านการสกัดไขมันแล้วไปสกัดแมนแนนด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และนำไปให้ความร้อนด้วยหม้อน้ำความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที กรองแยกกากมะพร้าวออก ส่วนของเหลวที่ได้นำไปตกตะกอนด้วย เอทานอล 80 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนที่เป็นตะกอน นำตะกอนที่ได้มาสกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่สภาวะต่างๆ ความเข้มข้น 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 18, 24 และ 30 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 4, 5 และ 6 ด้วยกรดอะซิติก

เข้มข้น 98 เปอร์เซ็นต์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 15 นาที เก็บส่วนที่เป็นตะกอน นำตะกอนที่ได้ไปอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จะได้ตัวอย่างแมนแนนจากกากมะพร้าว บดแมนแนนด้วยเครื่องบดแห้งให้เป็นผง บรรจุลงในขวดสีชาเก็บรักษาในโถดูดความชื้น คำนวณหาปริมาณผลผลิตของแมนแนนที่สกัดได้ วิเคราะห์สมบัติทางเคมีบางประการ ได้แก่ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ นอกจากนี้คำนวณหาความยาวของแมนแนนโดยเฉลี่ย โดยมีรายละเอียด ดังนี้

#### 3.4.2.1 ปริมาณผลผลิตของแมนแนนที่สกัดได้ คำนวณได้จากสมการ

$$\text{ปริมาณแมนแนน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักแมนแนนที่สกัดได้ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักกากมะพร้าวเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

#### 3.4.2.2 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ตามวิธีของ Dubois และคณะ (1956)

รายละเอียดวิธีวิเคราะห์ดูได้จากภาคผนวก ข

#### 3.4.2.3 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Miller (1959) รายละเอียดวิธี

วิเคราะห์ดูได้จากภาคผนวก ก

#### 3.4.2.4 ความยาวของแมนแนนโดยเฉลี่ย

ความยาวแมนแนนโดยเฉลี่ย ที่พบได้ในแมนแนน หมายถึง จำนวนของน้ำตาลแมนโนสที่มาต่อกันจนกระทั่งได้สายพอลิเมอร์ของแมนแนน โดยจำนวนของน้ำตาลแมนโนสจะเป็นตัวกำหนดขนาดของแมนแนน การคำนวณหาความยาวแมนแนนโดยเฉลี่ย แสดงดังสมการ

$$\text{ความยาวแมนแนนโดยเฉลี่ย} = \frac{\text{ปริมาณของน้ำตาลทั้งหมด (มิลลิกรัม)}}{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในรูปของน้ำตาลแมนโนส (มิลลิกรัม)}}$$

#### 3.4.3 การศึกษาความสามารถในการละลายของแมนแนนที่สกัดได้ (Water solubility index, WSI)

เลือกใช้แมนแนนที่ได้จากสภาวะในการสกัดที่ให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตสูงสุด มาศึกษาความสามารถในการละลายของแมนแนน ใช้วิธีดัดแปลงของ Kang และคณะ (2014) รายงานความสามารถในการละลายเป็นร้อยละ โดยศึกษาความสามารถในการละลายที่สภาวะต่าง ๆ ดังนี้

### 3.4.3.1 ความสามารถในการละลายของแมนแนนที่ พีเอชต่าง ๆ

เตรียมตัวอย่างสารละลายแมนแนน ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่พีเอชต่าง ๆ ตั้งแต่ 3-9 ด้วย ซิเตรทบัฟเฟอร์ (พีเอช 3-5) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6-8) และไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ บัฟเฟอร์ (pH 9) โดยละลายแมนแนนด้วยบัฟเฟอร์ตามพีเอชที่กำหนด นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องกวนแบบแม่เหล็กความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเทใส่หลอดเซนทริฟิวส์ แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที นาน 40 นาที เทสารละลายส่วนใสด้านบนออก นำตะกอนที่ได้ ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกว่าน้ำหนักคงที่ บันทึกค่าน้ำหนักที่แน่นอน คำนวณหาความสามารถในการละลายดังสมการต่อไปนี้

$$\text{ความสามารถในการละลาย (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักตะกอน (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

### 3.4.3.2 ความสามารถในการละลายของแมนแนนที่ความเข้มข้นต่างๆ

เตรียมตัวอย่างสารละลายแมนแนนที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.1-1เปอร์เซ็นต์) ละลายด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 8) แล้วทำเช่นเดียวกับการหาความสามารถในการละลายที่พีเอชต่างๆ ทุกประการ จากนั้นคำนวณหาความสามารถในการละลายดังสมการข้างต้น

คัดเลือกสภาวะพีเอช และความเข้มข้นที่แมนแนนละลายได้ดีที่สุดสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

### 3.4.4 การศึกษาขนาดโมเลกุลของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่ดี

#### 3.4.4.1 การย่อยสลายแมนแนนด้วยเอนไซม์ เบต้า-แมนนาเนส จาก *A. niger*

เตรียมสารละลายแมนแนนตามสภาวะที่ได้จากข้อ 3.4.3 (ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร) มาย่อยด้วยเอนไซม์แมนนาเนสเข้มข้น 3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายปฏิกิริยาที่ได้มาต้มในน้ำเดือดเพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ จากนั้นนำไปวิเคราะห์หา องค์ประกอบของออลิโกกาแลคโตแมนแนนที่เกิดขึ้นโดยใช้วิธีโครมาโตกราฟีผิวบาง (Thin layer chromatography, TLC) ตามวิธีที่รายงานโดย Park (2008) โดยนำมาหยดบนแผ่นทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีอะลูมิเนียม ชนิด Silica gel 60 F<sub>254</sub> ขนาด 10 × 20 เซนติเมตร ปริมาณ 10 ไมโครลิตร โดยเทียบกับสารมาตรฐาน ได้แก่ น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลแมนโนส แมนโนไบโอส แมนโนไตรโอส แมนโนเตตระโอส แมนโนเพนโตส และแมนโนเฮกโซส ในปริมาณที่เท่ากัน นำแผ่น TLC แชนในโธ TLC ซึ่งมีระบบของตัวทำ

ละลาย บิวทานอล: กรดอะซิติกเข้มข้น: น้ำ อัตราส่วน 2:1:1 โดยปริมาตร ตามลำดับ รอจนตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึงขีดที่กำหนดไว้ นำมาเป่าให้แห้ง หลังจากนั้น แขนง TLC อีกครั้งหนึ่ง เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึงขีดที่กำหนด นำมาเป่าให้แห้ง แล้วนำไปจุดด้วยสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ในเอทานอล แล้วรีบนำขึ้นมาทันที วางไว้จนแห้งในตู้ดูดควัน และตรวจสอบการเกิดสีด้วยความร้อน โดยนำไปอบด้วยตู้อบลมร้อนที่ 120 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จุดสีน้ำตาลจะปรากฏบนแผ่น TLC เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

#### 3.4.4.2 การคัดแยกขนาดออลิโกกาแลคโตแมนแนนที่มีขนาด DP ต่าง ๆ

นำสารละลายออลิโกกาแลคโตแมนแนนที่ได้ ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ได้แมนโนโอลิโกแซ็กคาไรด์ผง จากนั้นนำมาแยกขนาดโมเลกุลของออลิโกกาแลคโตแมนแนน โดยวิธีคอลัมน์โคม่าโตกราฟี ตามวิธีที่รายงานโดย Park (2008) โดยซึ่งแมนโนโอลิโกแซ็กคาไรด์ผง 1 กรัมละลายด้วยน้ำกลั่น ปริมาตรครบ 10 มิลลิลิตร นำไปไหลลงคอลัมน์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายในเท่ากับ  $16 \times 700$  มิลลิลิตร ภายในบรรจุ Sephadex LH-20 สูง 670 มิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใช้ระบบไอโซเครติก มีเฟสเคลื่อนที่คือ น้ำ อัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ด้วย peristaltic pump เก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 นาทีต่อหลอด เป็นจำนวน 60 หลอด ด้วยเครื่องเก็บตัวอย่าง (fraction collector) แล้ววิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี ฟินอล-ซัลฟูริก (Dubois และคณะ, 1956) ตามรายละเอียดในภาคผนวก ข และยืนยันเบื้องต้นด้วย TLC วิธีการเช่นเดียวกับที่กล่าวข้างต้น จากนั้นนำไปวิเคราะห์สมบัติการเป็นพรีไบโอติกของออลิโกกาแลคโตแมนแนนที่แยกได้ในขั้นตอนต่อไป

#### 3.4.5 ความสามารถในการทนต่อการย่อยในสภาวะที่เป็นกรด

นำแมนแนน แมนโนโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จาก 3.4.4.1 และแมนโนโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผ่านการคัดแยกขนาดจาก 3.4.4.2 มา 1 มิลลิลิตร ผสมกับ HCl buffer ที่มี NaCl 1.703 กรัมต่อลิตร, KCl 0.199 กรัมต่อลิตร, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.150 กรัมต่อลิตร และ NaHCO<sub>3</sub> 0.300 กรัมต่อลิตร เป็นองค์ประกอบ (Wichienchot และคณะ, 2010) เพื่อปรับสภาวะของสารละลายให้ใกล้เคียงกับสภาวะของสารละลายอิลคโตรไลต์ในกระเพาะอาหาร ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จึงปรับพีเอชของสารละลายเป็นพีเอชต่าง ๆ ได้แก่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับด้วย กรดไฮโดรคลอริก ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เขย่าเป็นครั้งคราว เก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 1 โมลาร์ ให้มีค่า พีเอชเท่ากับ 7 เพื่อหยุดปฏิบัติการย่อยด้วยกรด โดยเปรียบเทียบกับอินูลิน จากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ตามวิธีของ Dubois และคณะ (1956) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีของ Miller (1959) ตามรายละเอียดในภาคผนวก ก และข แล้วนำไปคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยสลาย โดย

$$\text{การย่อยสลาย (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์หลังย่อย} - \text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนย่อย}}{\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด} - \text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนย่อย}} \times 100$$

### 3.4.6 ความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์

ทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของแมนแนน แมนโนโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จาก 3.4.4.1 และแมนโนโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผ่านการคัดแยกขนาดจาก 3.4.4.2 ต่อแบคทีเรียโปรไบโอติกส์ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacilli* เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้สามารถหมักกรดแลคติกและเป็นจุลินทรีย์ที่พบในทางเดินอาหารของมนุษย์ ในการทดสอบนี้ใช้แบคทีเรีย 2 ชนิดคือ *Lactobacillus plantarum* RS54 และ *Lactobacillus plantarum* NF3 โดยนำแบคทีเรียโปรไบโอติกส์มาเลี้ยงในอาหารเหลว De Man Rogosa Sharpe (MRS) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อร้อยละ 10 (1 มิลลิลิตร) ซึ่งมีความเข้มข้น ของเชื้อเริ่มต้น  $10^6$  CFU ต่อ มิลลิลิตร ลงใน minimal medium ซึ่งประกอบด้วย Peptone water 2 กรัมต่อลิตร Yeast extract 2 กรัมต่อลิตร NaCl 0.1 กรัมต่อลิตร  $K_2HPO_4$  0.04 กรัมต่อลิตร  $KH_2PO_4$  0.04 กรัมต่อลิตร  $CaCl_2 \cdot 6H_2O$  0.01 กรัมต่อลิตร  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01 กรัมต่อลิตร  $NaHCO_3$  2 กรัมต่อลิตร Tween 80 2 มิลลิกรัมต่อลิตร Cysteine-HCl 0.5 กรัมต่อลิตร และ Bile salt 0.5 กรัมต่อลิตร โดยใส่แมนแนน แมนโนโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จาก 3.4.4.1 และแมนโนโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผ่านการคัดแยกขนาดจาก 3.4.4.2 เพื่อเป็นแหล่งของคาร์บอนเปรียบเทียบกับการใช้ น้ำตาลแมนโนส อินูลิน และอลิโกกาแลคโตแมนแนนจากโลคัสบีนกัม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ โดยในการทดสอบความสามารถในการเจริญของโปรไบโอติกส์จะทำการเก็บตัวอย่างที่ เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อนำมาวัดการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกส์ โดยวัดค่า การดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

### 3.4.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยแมนแนนจากมะพร้าวโดยใช้เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส

นำเอนไซม์แมนนาเนสจาก *Aspergillus niger* มาบ่มกับสารละลายแมนแนนจากมะพร้าวที่ สภาวะต่าง ๆ ออกแบบสภาวะการทดลองโดยใช้เทคนิค Response surface method (RSM) แบบ Box-Behnken design (BBD) (3 ระดับ) โดยมีปัจจัยที่ศึกษา 5 ปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของกาแลคโตแมนแนน ความเข้มข้นของเอนไซม์ พีเอช เวลา และอุณหภูมิในการย่อย ได้สภาวะในการทดลอง 40 ชุดการทดลอง และ ชุดการทดลองที่เป็นค่ากลาง (Centre point) 6 ชุดการทดลอง รวมทั้งหมด 46 ชุดการทดลอง แสดงดังตาราง ที่ 3.1 แล้วนำตัวอย่างจากทุกสภาวะการย่อยมาตรวจสอบปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ องค์ประกอบของอลิโกกาแลคโตแมนแนนที่เกิดขึ้นโดยใช้วิธี โครมาโตกราฟีผิวบาง

ตารางที่ 3.1 สภาวะการย่อยแมนแนนจากมะพร้าวโดยใช้เอนไซม์แมนแนนส

Run	A:pH	B:temperature (°C)	C:time (min)	D: substrate conc. (%)	E: enzyme conc. (unit)
1	6	35	15	1	0.9
2	6	35	25	5.5	0.9
3	6	55	25	10	0.9
4	6	35	15	5.5	1.2
5	6	75	15	5.5	1.2
6	3	55	15	5.5	1.2
7	6	55	25	5.5	1.2
8	6	55	15	10	1.2
9	3	55	15	5.5	0.6
10	3	55	15	1	0.9
11	3	55	25	5.5	0.9
12	6	55	15	1	0.6
13	3	55	5	5.5	0.9
14	3	35	15	5.5	0.9
15	6	55	25	5.5	0.6
16	6	55	5	1	0.9
17	6	35	5	5.5	0.9
18	3	55	15	10	0.9
19	6	75	5	5.5	0.9
20	6	55	15	5.5	0.9
21	3	75	15	5.5	0.9
22	6	75	15	10	0.9
23	6	55	15	5.5	0.9

**ตารางที่ 3.1** สภาวะการย่อยแมนแนนจากมะพร้าวโดยใช้เอนไซม์แมนนาเนส (ต่อ)

Run	A:pH	B:temperature (°C)	C:time (min)	D: substrate conc. (%)	E: enzyme conc. (unit)
24	6	55	5	10	0.9
25	9	35	15	5.5	0.9
26	6	75	25	5.5	0.9
27	9	55	5	5.5	0.9
28	6	55	5	5.5	1.2
29	9	55	15	5.5	1.2
30	6	55	15	5.5	0.9
31	6	75	15	1	0.9
32	9	55	25	5.5	0.9
33	9	55	15	5.5	0.6
34	6	55	25	1	0.9
35	9	75	15	5.5	0.9
36	9	55	15	1	0.9
37	6	35	15	10	0.9
38	6	55	15	5.5	0.9
39	6	55	15	5.5	0.9
40	6	55	15	5.5	0.9
41	6	55	15	1	1.2
42	6	35	15	5.5	0.6
43	6	55	5	5.5	0.6
44	6	75	15	5.5	0.6
45	6	55	15	10	0.6
46	9	55	15	10	0.9

เลือกสภาวะในการผลิตที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากปริมาณออลิโกกลูโคสที่ผลิตได้สูงที่สุดไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป สภาวะที่เหมาะสมพิจารณาจากการวิเคราะห์ผลโดยใช้หลักการวิเคราะห์พื้นที่ผิวตอบสนอง โดยพิจารณาค่า ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination:  $R^2$ ) ซึ่งได้จากการคำนวณ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Y) คือค่าตอบสนองที่สนใจแสดงเป็นสมการถดถอย ตัวแปรที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ได้รับเลือกเพื่อวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด กราฟสามมิติ แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (แกน Z) และตัวแปร 2 ตัวแปร

ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination:  $R^2$ ) และ สัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ถูกปรับค่า (Adjusted coefficient of determination: Adj- $R^2$ ) ค่าทั้งสองแสดงถึง ความสัมพันธ์ของตัวแปรในโมเดล ความสามารถของตัวแปรในการอธิบายข้อมูล และความเหมาะสมของโมเดล Lack of

Fit บ่งชี้ถึงความ คลาดเคลื่อนของข้อมูลการทดลอง และความเหมาะสมของสมการถดถอย ซึ่งควรมีค่า p-value > 0.05

3.4.8 ศึกษาสมบัติทางเคมีกายภาพและสมบัติการเป็นพรีไบโอติกส์ของ ออลิโกกาแลคโตแมนแนนที่ผลิตได้จากสภาวะที่เหมาะสม

ผลิตออลิโกกาแลคโตแมนแนนโดยใช้สภาวะที่เหมาะสม จากผลการทดลองข้อ 3.4.7 จากนั้นทำให้แห้งโดยวิธีทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

3.4.8.1 วิเคราะห์ความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของโปรไบโอติกส์ (ตามวิธีวิเคราะห์ในข้อข้อ 3.4.6)

3.4.8.2 วิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค โดยความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค มีวิธีการดังนี้

นำตัวอย่างมาศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อก่อโรค *Escherichia coli* TISTR 527 และ *Staphylococcus aureus* TIRTS 1466 โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อก่อโรคในอาหารเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้เชื้อที่มีความเข้มข้น  $10^8$  CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางเชื้อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในอาหาร minimal medium เท่ากับ  $10^6$  CFU ต่อมิลลิลิตร ที่มีการเติมสารตัวอย่าง ที่มีปริมาณของน้ำตาลทั้งหมด 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีชุดควบคุมคือ น้ำตาลแมนโนส แทนสารสกัด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในสภาวะไร้อากาศ โดยในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค จะทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อนำมาวัดการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.4.9 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

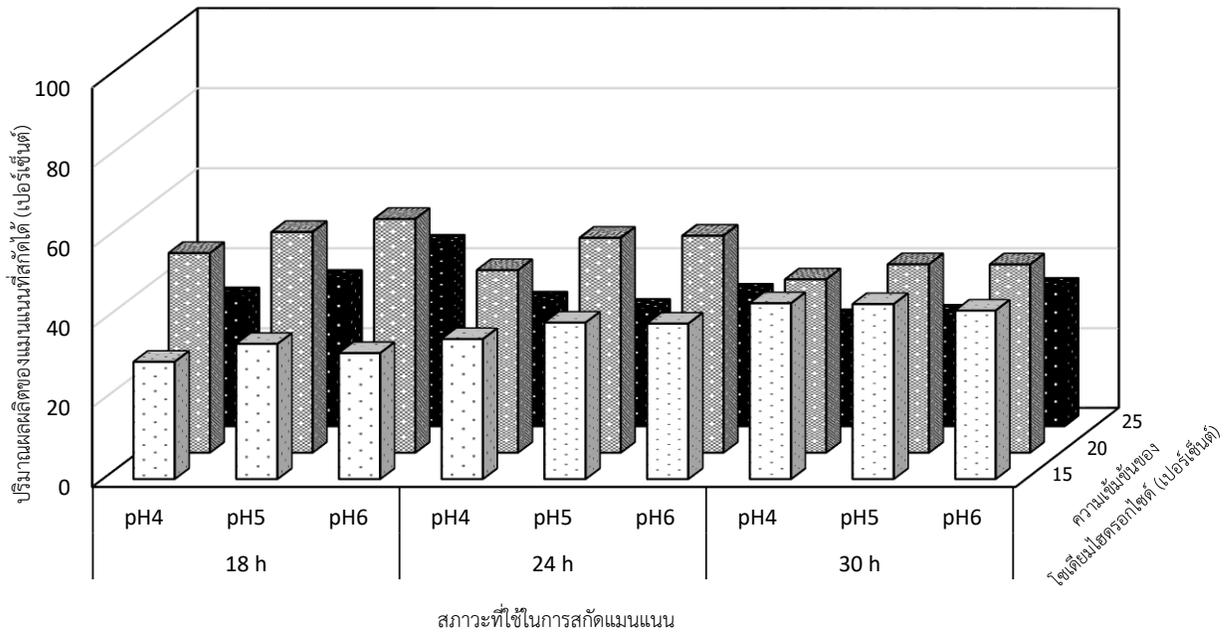
การทดลองตามวิธีการข้อ 3.4.3, 3.4.5, 3.4.6 และ 3.4.8 วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ได้ของค่าเฉลี่ยข้อมูลโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) จากโปรแกรมคำนวณทางสถิติสำเร็จรูป SPSS

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลของสภาวะในการสกัดต่อปริมาณผลผลิตของแมนแนน

จากการนำกากมะพร้าว มาสกัดแมนแนนตามสภาวะการสกัดจากข้อ 3.4.2 พบว่า ปริมาณแมนแนนที่สกัดได้อยู่ในช่วง 26.67-58.61 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังภาพที่ 4.1 ซึ่งสภาวะที่สกัดด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่เวลา 18 ชั่วโมง และพีเอชเท่ากับ 6.0 ได้ปริมาณแมนแนนสูงที่สุด คือ 58.61 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับที่รายงานโดย Saittagaroon และคณะ (1983) ที่สกัดแมนแนนจากกากมะพร้าวโดยมีสภาวะในการสกัดคือ โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และพีเอชเท่ากับ 5.0 ได้ปริมาณแมนแนน ประมาณ 61 เปอร์เซ็นต์



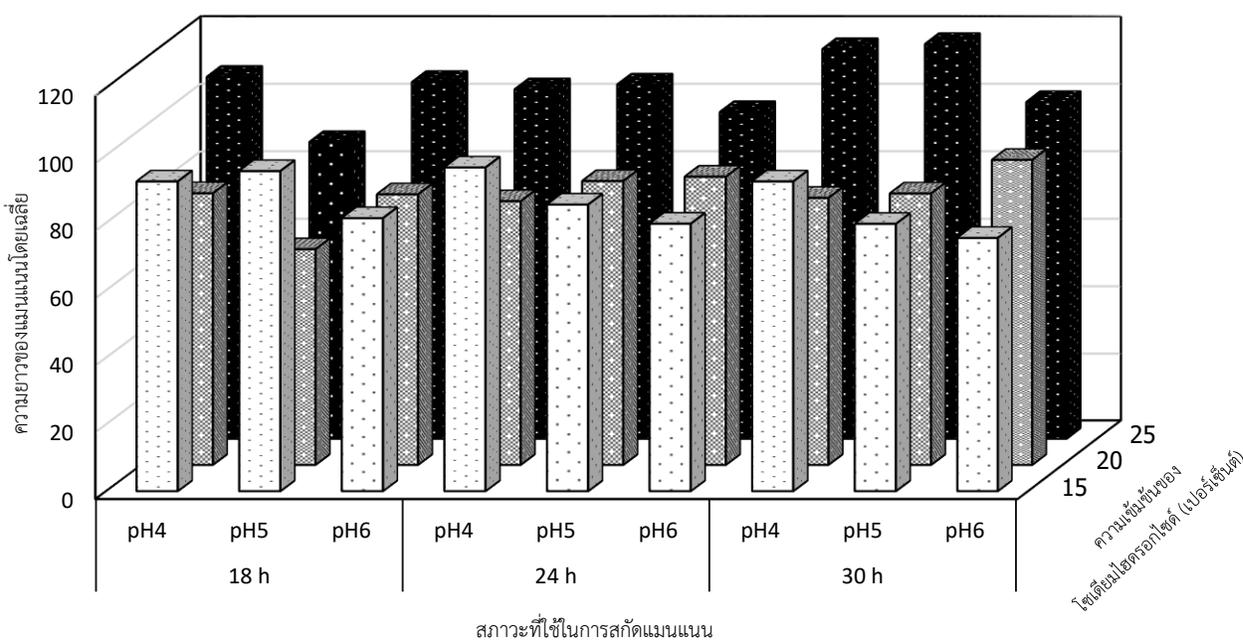
ภาพที่ 4.1 ปริมาณผลผลิตของแมนแนนเมื่อใช้สภาวะในการสกัดที่แตกต่างกัน

นอกจากนี้ การสกัดที่พีเอชที่สูงขึ้น และใช้เวลาในการสกัดที่นานขึ้น มีแนวโน้มของปริมาณแมนแนนที่สกัดได้สูงกว่าการสกัดที่ใช้พีเอชที่ต่ำและใช้เวลาน้อย ส่วนความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการสกัดพบว่าการใช้ความเข้มข้นที่สูงขึ้นปริมาณแมนแนนที่สกัดได้มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเช่นกัน อย่างไรก็ตามการใช้ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่สูงเกินไปส่งผลต่อปริมาณแมนแนนที่สกัดได้มีปริมาณลดลง ซึ่งสังเกตได้ว่าการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น จนถึงที่ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ แมนแนนที่สกัดได้มีปริมาณสูงสุดและจะมีปริมาณลดลงเมื่อใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นมากกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง

สอดคล้องกับรายงานของ Sharmada และคณะ (2016) ที่หาสภาวะในการพรี-ทรีตเมนต์กากเมล็ดน้ำมัน (de-oiled oil seed cake) โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 ถึง 10 นอร์มอล เพื่อสกัดน้ำตาลรีดิวิซ์ พบว่า เมื่อใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์จนถึงความเข้มข้น 4 นอร์มอล สามารถสกัดน้ำตาลรีดิวิซ์ได้ปริมาณสูงสุด แต่เมื่อความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์มากกว่า 4 นอร์มอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ที่สกัดได้กลับมีปริมาณลดลง

#### 4.2 ผลของสภาวะในการสกัดต่อความยาวของแมนแนนโดยเฉลี่ย

ความยาวของแมนแนนโดยเฉลี่ยหรือ ค่า degree polymerization สามารถคำนวณได้จากการนำปริมาณน้ำตาลทั้งหมดหารด้วยปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ที่วิเคราะห์ได้ ซึ่งเป็นการแสดงข้อมูลเชิงปริมาณที่สามารถบอกถึงความสัมพันธ์ต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของแมนแนนได้ในการนำไปประยุกต์ใช้ในอาหาร เช่น การเป็นสารให้ความข้นหนืด หรือการเป็นพรีไบโอติกส์ ซึ่งจากภาพที่ 4.2 พบว่า ความยาวของแมนแนนโดยเฉลี่ยที่สกัดได้อยู่ในช่วง 64.35-117.3 โดยสภาวะที่สกัดด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่เวลา 30 ชั่วโมง และพีเอชเท่ากับ 5.0 ได้ความยาวของแมนแนนโดยเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 117



ภาพที่ 4.2 ความยาวของแมนแนนโดยเฉลี่ยที่สกัดได้เมื่อใช้สภาวะในการสกัดที่แตกต่างกัน

การสกัดที่ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้นมีแนวโน้มทำให้ได้ความยาวแมนแนนโดยเฉลี่ยสูงขึ้น ส่วนพีเอชและเวลาในการสกัดไม่มีแนวโน้มที่ชัดเจน ปัจจุบันทั้ง 3 ปัจจัยอาจมีอิทธิพลร่วมกันที่ส่งผลต่อความยาวแมนแนนโดยเฉลี่ย โดยสภาวะที่สกัดด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ เวลาในการสกัดนานที่สุดและที่พีเอชต่ำ ส่งผลต่อความยาวโดยเฉลี่ยมากที่สุด อย่างไรก็ตาม อาจมีปัจจัยอื่น ๆ ที่

ส่งผลต่อความยาวของแมนแนนโดยเฉลี่ย ได้อีกด้วย เช่น ชนิดของตัวทำละลาย อัตราส่วนระหว่าง วัตถุประสงค์ต่อตัวทำละลาย และอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดเป็นต้น ซึ่ง Moerman และคณะ (2004) รายงานผลของชนิดตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดต่อความยาวของอินนูลินโดยเฉลี่ย ซึ่งพบว่า ความยาวโดยเฉลี่ยของอินนูลินลดลง เมื่อใช้ตัวทำละลายหลายชนิดร่วมกัน นอกจากนี้ Ku และคณะ (2004) รายงานว่าการใช้ตัวทำละลายที่มากเกินไปเร่งการตกตะกอนของคาร์โบไฮเดรตสายสั้นซึ่งส่งผลให้ความยาวของคาร์โบไฮเดรตโดยเฉลี่ยมีปริมาณลดลง ต่อมาในปี 2007 Paseephol และคณะ ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของวัตถุประสงค์เริ่มต้น อัตราส่วนของวัตถุประสงค์ต่อตัวทำละลาย และอุณหภูมิในการตกตะกอน อินนูลินจากแก่นตะวัน ที่ส่งผลต่อความยาวของอินนูลินโดยเฉลี่ย พบว่าความเข้มข้นของวัตถุประสงค์เริ่มต้นมีผลต่อความยาวของอินนูลินโดยเฉลี่ยมากที่สุด

#### 4.3 ความสามารถในการละลาย

ผงแมนแนนที่สกัดได้จากกากมะพร้าว เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการละลาย ที่สภาวะในการละลายต่างๆ โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 พิจารณาความสามารถในการละลายที่ค่าพีเอช 3-9 โดยกำหนดให้ความเข้มข้นของสารละลายแมนแนนคงที่ ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่ 2 พิจารณาความสามารถในการละลายของสารละลายแมนแนนที่ความเข้มข้น 0.1-1 เปอร์เซ็นต์ กำหนดให้ค่าพีเอชเท่ากับ 8 เนื่องจากเป็นค่าพีเอชที่แมนแนนสามารถละลายได้ดีที่สุดโดยทั้ง 2 กลุ่ม ได้กำหนดอุณหภูมิและระยะเวลาในการทดสอบไว้ที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.1

**ตารางที่ 4.1** ความสามารถในการละลายของแมนแนนที่สกัดได้จากกากมะพร้าวที่สภาวะต่าง ๆ

สภาวะในการละลาย	ความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร))	พีเอช	ความสามารถในการละลาย (เปอร์เซ็นต์)
กลุ่มที่ 1	0.5	3	37.1±1.70 <sup>d</sup>
	0.5	4	39.7±1.93 <sup>cd</sup>
	0.5	5	42.0±1.57 <sup>c</sup>
	0.5	6	42.2±0.85 <sup>c</sup>
	0.5	7	52.2±1.57 <sup>ab</sup>
	0.5	8	53.7±1.64 <sup>a</sup>
	0.5	9	50.1±1.26 <sup>b</sup>
กลุ่มที่ 2	0.1	8	45.2±0.80 <sup>a</sup>
	0.2	8	46.3±1.49 <sup>a</sup>
	0.3	8	46.4±2.10 <sup>ab</sup>
	0.4	8	44.6±0.56 <sup>ab</sup>
	0.5	8	41.8±1.47 <sup>b</sup>
	1	8	23.5±2.85 <sup>c</sup>

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

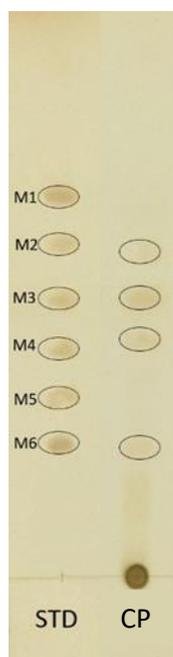
อักษร a, b, c ตามแนวคอลัมน์แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ความสามารถในการละลายของแมนแนนที่ค่าพีเอชต่าง ๆ โดยความเข้มข้นของแมนแนนคงที่ มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีช่วงค่าเท่ากับ  $37.1 \pm 1.70$  ถึง  $53.7 \pm 1.64$  เปอร์เซ็นต์ โดยความสามารถในการละลายแปรผันตามกับค่าพีเอช คือ พีเอชเพิ่มขึ้นความสามารถในการละลายก็เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งความสามารถในการละลายของแมนแนนมีค่าสูงที่สุดที่พีเอช เท่ากับ 8 ส่วนค่าความสามารถในการละลายต่ำสุดพบที่พีเอชเท่ากับ 3 ซึ่งให้ผลทิศทางเดียวกับ Beneke และคณะ (2009) ได้รายงานว่าการเปลี่ยนแปลงพีเอชในช่วง พีเอช 3-11 ส่งผลต่อความสามารถในการละลายของโลคัสปีนกัน ทั้งนี้ โครงสร้างของโลคัสปีนกัน และแมนแนนจากกากมะพร้าวมีโครงสร้างที่คล้ายกัน คือมี น้ำตาลแมนโนส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-(1,4) ในสายโซ่หลัก และมีน้ำตาลกาแลคโตส เชื่อมต่อด้วยพันธะแอลฟา-(1,6) เป็นสายโซ่กิ่ง จากผลการทดลองเป็นที่สังเกตได้ว่า แมนแนนสามารถละลายได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง รองลงมาคือสภาวะที่เป็นกลาง และเป็นกรด ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ในสภาวะที่เป็นด่างส่งเสริมให้เกิดไอออนไฮดรอกไซด์ของหมู่คาร์บอกซิลในสายโพลีแซ็กคาไรด์ โดยประจุลบจากสารละลายเข้าไปจับในสายโซ่ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงในสายโซ่ (Whistler และ BeMiller, 1997) อีกทั้ง อัตราส่วนของแมนโนส/กาแลคโตสที่เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างของแมนแนน ส่งผลต่อความสามารถในการละลายของแมนแนนเช่นกัน โดยหากตัวอย่างมีอัตราส่วนของแมนโนส/กาแลคโตส ในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกันส่งผลให้ ตัวอย่างสามารถละลายได้ดีขึ้น ทั้งนี้เนื่องจาก โครงสร้างของแมนโนส มีโครงสร้างที่สัมพันธ์กับไฮโดรโฟบิก ส่วน กาแลคโตสสัมพันธ์กับไฮโดรฟิลิก (Dionisio และ Grenha, 2012) นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อพีเอชมีค่าสูงขึ้น แมนแนนมีความสามารถในการละลายสูง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ในตัวทำละลายมีหมู่ OH อยู่มากทำให้สามารถเกิดการเข้าไปจับที่พันธะไฮโดรเจนได้เพิ่มขึ้น ส่งผลให้สามารถละลายน้ำได้มากขึ้น (Sharma และคณะ, 2008)

เมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นต่างๆ ของแมนแนนที่พีเอชเท่ากับ 8 พบว่า ความสามารถในการละลายของแมนแนนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ มีช่วงค่าเท่ากับ  $23.5 \pm 2.85$  ถึง  $45.2 \pm 0.80$  เปอร์เซ็นต์โดยความสามารถในการละลายแปรผันกับค่าความเข้มข้นของสารละลาย คือ ความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มขึ้นความสามารถในการละลายลดลง ซึ่งความสามารถในการละลายของแมนแนนมีค่าสูงสุดที่ความเข้มข้น 0.1-0.2 เปอร์เซ็นต์ และความสามารถในการละลายต่ำสุดที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1 เปอร์เซ็นต์ จากการสังเกตลักษณะปรากฏด้วยตา พบว่า สารละลายแมนแนนที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ มีตะกอนมากกว่าที่ความเข้มข้นอื่น ๆ อาจเนื่องมาจาก ความสามารถในการละลายแมนแนนอาจใกล้ถึงจุดอิ่มตัวจึงทำให้ละลายได้น้อยลง เพราะเมื่อเตรียมสารละลายแมนแนนที่ความเข้มข้นสูงขึ้น (5-10 เปอร์เซ็นต์) ค่าความสามารถในการละลายมีค่าไม่แตกต่างจากสารละลายแมนแนนที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ไม่แสดงผลการทดลอง)

#### 4.4 ผลการคัดแยกขนาดของออลิโกกาแลคโตแมนแนนโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี

เมื่อนำสารละลายแมนแนนจากกากมะพร้าวเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์มาทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยใช้ เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จาก เชื้อแอสเปอร์จิลัส ไนเจอร์ ความเข้มข้น 3 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 120 นาที แล้วตรวจสอบ ชนิดของออลิโกกาแลคโตแมนแนนที่ได้ด้วยวิธีทีนเลเยอร์โครมาโทกราฟี แสดงดังภาพที่ 4.3



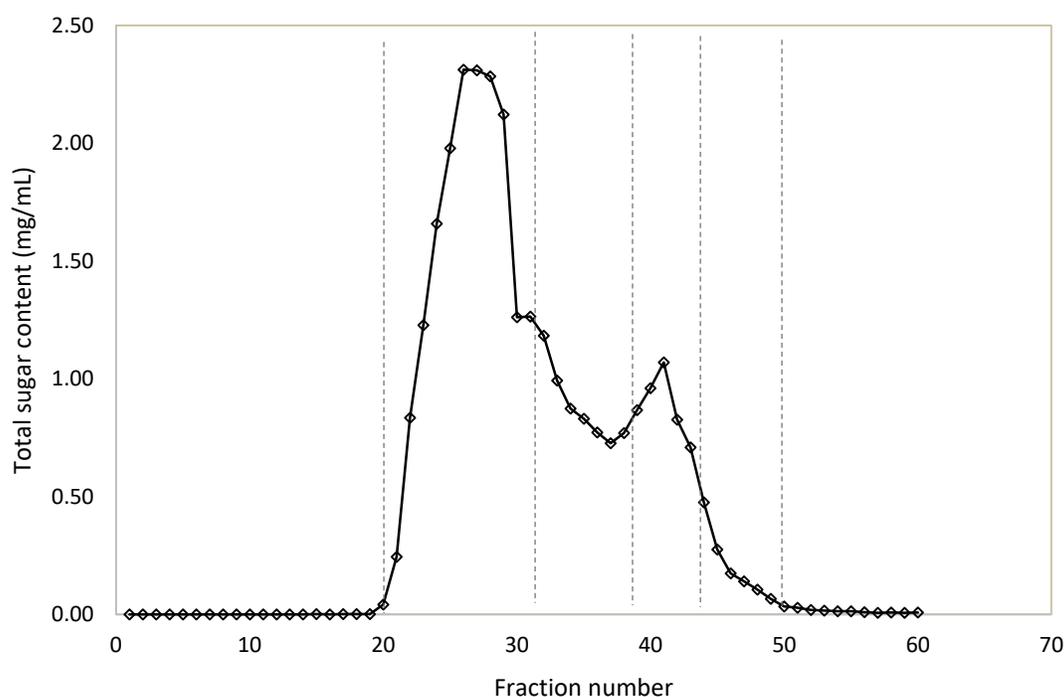
**ภาพที่ 4.3** โครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ได้จากการย่อยแมนแนนจากกากมะพร้าวด้วยเอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จาก *Aspergillus niger*. ที่ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส 120 นาที

หมายเหตุ: STD คือ สารมาตรฐาน ประกอบด้วย: แมนโนส (M1) แมนโนไบโอส (M2) แมนโนไตรโอส (M3) แมนโนเตตระโอส (M4) แมนโนเพนตะโอส (M5) และแมนโนเฮกซะโอส (M6) CP คือ แมนแนนจากกากมะพร้าว

จากภาพผลการวิเคราะห์ชนิดของออลิโกกาแลคโตแมนแนนที่ได้จากการนำแมนแนนจากกากมะพร้าวมาทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เบต้าแมนนาเนสเป็นระยะเวลา 120 นาที ผลลัพธ์ที่ปรากฏมีดังนี้ แมนโนไบโอส แมนโนไตรโอส แมนโนเตตระโอส และแมนโนเฮกซะโอส ซึ่งสอดคล้องกับ Park (2008) รายงานถึง ชนิดของออลิโกกาแลคโตแมนแนนที่พบ จากการนำกากมะพร้าวที่ผ่านการสกัดน้ำมัน มาทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์เบต้าแมนนาเนสจาก *Trichoderma sp.* มีจำนวน 2 ชนิดได้แก่ แมนโนไตรโอส และแมนโนเฮกซะโอส ต่อมาในปี 2013 Chantorn และคณะ รายงานผลของการใช้ครูดเอนไซม์จาก *Penicillium oxalicum* KUB-SN2-1 ในการย่อยแมนแนนจากกากมะพร้าว สามารถย่อยได้ แมนโนส แมนโนไบโอส และแมนโนไตรโอส

เห็นได้ว่าการใช้เอ็นไซม์เบต้าแมนนาเนส ในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับแมนแนน จากกากมะพร้าว ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ส่วนใหญ่ ได้แก่ แมนโนโบไอส แมนโนไตรโอส และแมนโนเตตระโอส

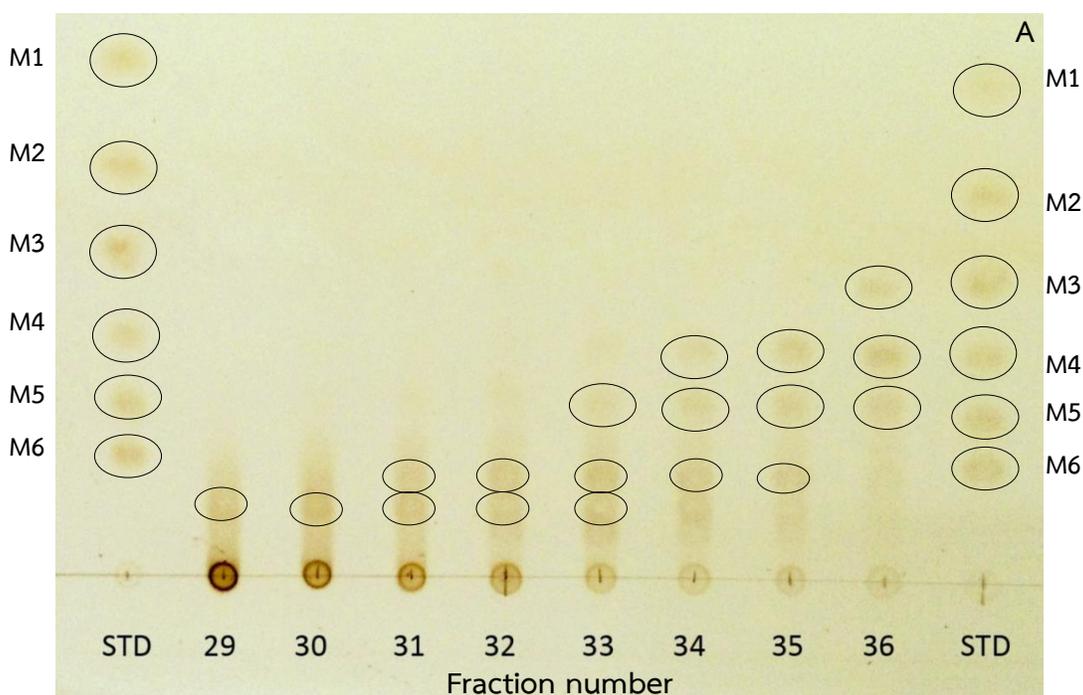
จากนั้นนำมาแยกหาขนาดของออลิโกกลูโคสแมนแนนที่ผลิตได้ด้วยวิธี คอลัมน์โครมาโทกราฟี โดยใช้ sephadex LH20 เป็นมีเดียและใช้น้ำกลั่นเป็นตัวชะ เก็บแฟรกชันจำนวน 60 แฟรกชัน แฟรกชันละ 2 มิลลิลิตร แล้วนำแต่ละแฟรกชันวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟ แสดงดังภาพที่ 4.4



ภาพที่ 4.4 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในแฟรกชันต่างๆที่ได้จากการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของแมนแนนจากกากมะพร้าวด้วยเอ็นไซม์เบต้าแมนนาเนสจาก *Aspergillus niger* ที่ระยะเวลา 120 นาที

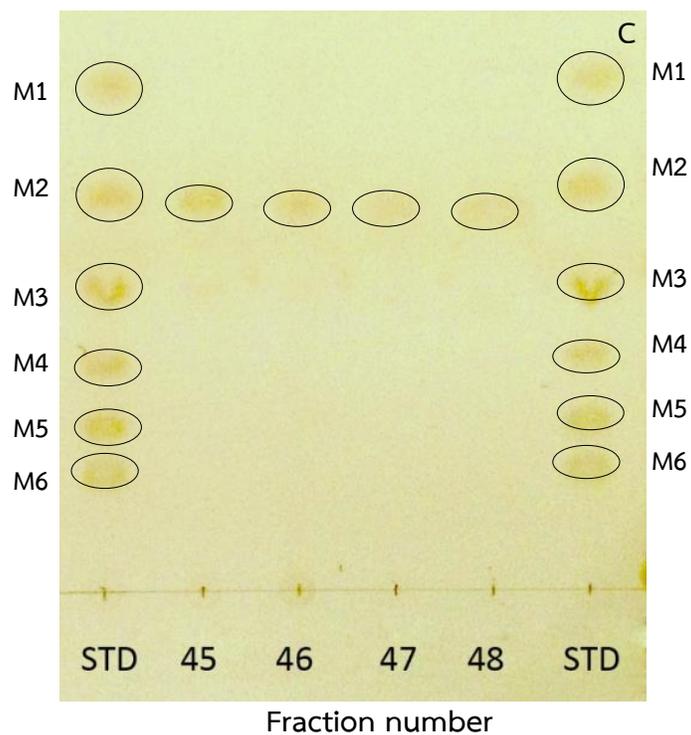
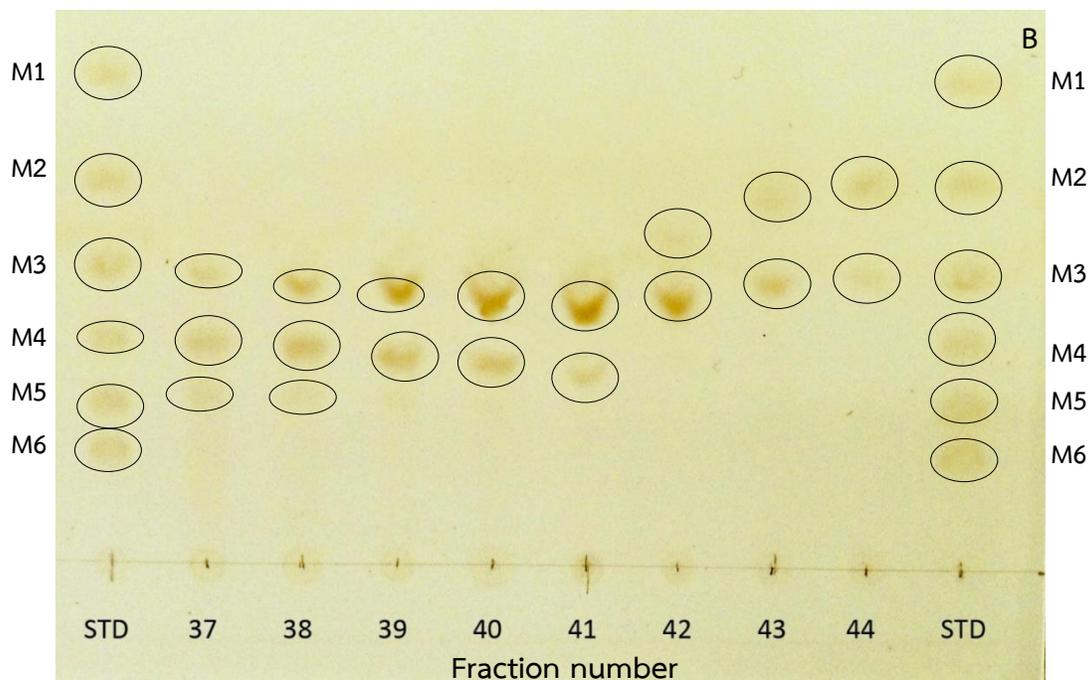
สารละลายแมนแนนที่ผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสด้วยเอ็นไซม์เบต้าแมนนาเนส เมื่อนำมาแยกหาขนาดของออลิโกกลูโคสแมนแนนที่ผลิตได้ด้วยวิธี คอลัมน์โครมาโทกราฟี จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจากแฟรกชันทั้งหมด 60 แฟรกชัน ค่าที่ได้เมื่อนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างแฟรกชันกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยพิจารณาจาก พีคหรือไหลพีคที่ปรากฏขึ้น ซึ่งพีคที่ปรากฏแสดงถึงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่มีในแต่ละแฟรกชัน อีกทั้งยังแสดงถึงชนิดหรือขนาดของน้ำตาล และลำดับของพีคที่ปรากฏ แสดงถึงขนาดของน้ำตาลในช่วงแฟรกชัน มีชนิดของน้ำตาลที่มีโมเลกุลใหญ่ไปจนถึงขนาดเล็กหรือเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว หากพีคสูงแสดงว่ามีปริมาณของน้ำตาลที่มีขนาดโมเลกุลนั้นๆอยู่ปริมาณมาก อย่างไรก็ตาม พีคบางพีคอาจ

ไม่สามารถแยกได้อย่างชัดเจนเกิดเป็นไหลฟุ้ง ซึ่งก็สามารถบอกได้ถึงช่วงการลดลงของปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และชนิดหรือขนาดของน้ำตาลที่มีขนาดเล็กกว่า จากภาพที่ 4.2 สามารถแยกขนาดโมเลกุลของออลิโกกาแลคโตแมนแนน ได้ออกเป็น 3-4 กลุ่มดังนี้ กลุ่มแรกประกอบด้วยแฟรกชันที่ 20-30 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยแฟรกชันที่ 31-37 กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยแฟรกชันที่ 38-42 และกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยแฟรกชันที่ 45-48 ซึ่งแต่ละกลุ่มมี degree of polymerization (DP) ต่างกัน แล้วจึงตรวจสอบยืนยันชนิดหรือขนาดของน้ำตาลที่แยกได้โดยใช้ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี ดังภาพที่ 4.3 พบว่า กลุ่มที่ 1 (แฟรกชันที่ 20-30) มีน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบได้แก่ น้ำตาลที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ เป็นกลุ่มที่มี DP มากกว่า 6 เนื่องจากไม่มีจุดที่ตรงกับสารมาตรฐาน (ภาพที่ 4.3 A) ถัดมากลุ่มที่ 2 (แฟรกชันที่ 31-37) ประกอบด้วย แมนโนเพนตะไอส์ และ แมนโนเฮกซะไอส์ มี DP ผสม เท่ากับ 5-6 (ภาพที่ 4.3 A-B) ถัดมากลุ่มที่ 3 (ประกอบด้วยแฟรกชันที่ 38-42) ประกอบด้วย แมนโนไตรไอส์ และแมนโนเตตระไอส์ มี DP ผสม เท่ากับ 3-4 (ภาพที่ 4.3 B) และกลุ่มที่ 4 (แฟรกชันที่ 45-48) ประกอบด้วย แมนโนไบโอส์ มี DP เท่ากับ 2 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.3 C)



**ภาพที่ 4.5** ภาพ TLC ของชนิดน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในแฟรกชันต่างๆที่แยกได้จากออลิโกกาแลคโตแมนแนน (A-C).

หมายเหตุ: STD คือ สารมาตรฐาน ประกอบด้วย: แมนโนส (M1) แมนโนไบโอส์ (M2) แมนโนไตรไอส์ (M3) แมนโนเตตระไอส์ (M4) แมนโนเพนตะไอส์ (M5) และแมนโนเฮกซะไอส์ (M6)



ภาพที่ 4.4 (ต่อ) ภาพ TLC ของชนิดน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในแฟรกชันต่างๆที่แยกได้จากอลิโกกลाइคโตนแมนแนน (A-C).

หมายเหตุ: STD คือ สารมาตรฐาน ประกอบด้วย: แมนโนส (M1) แมนโนไบโอส (M2) แมนโนไตรโอส (M3) แมนโนเตตระโอส (M4) แมนโนเพนตะโอส (M5) และแมนโนเฮกซะโอส (M6)

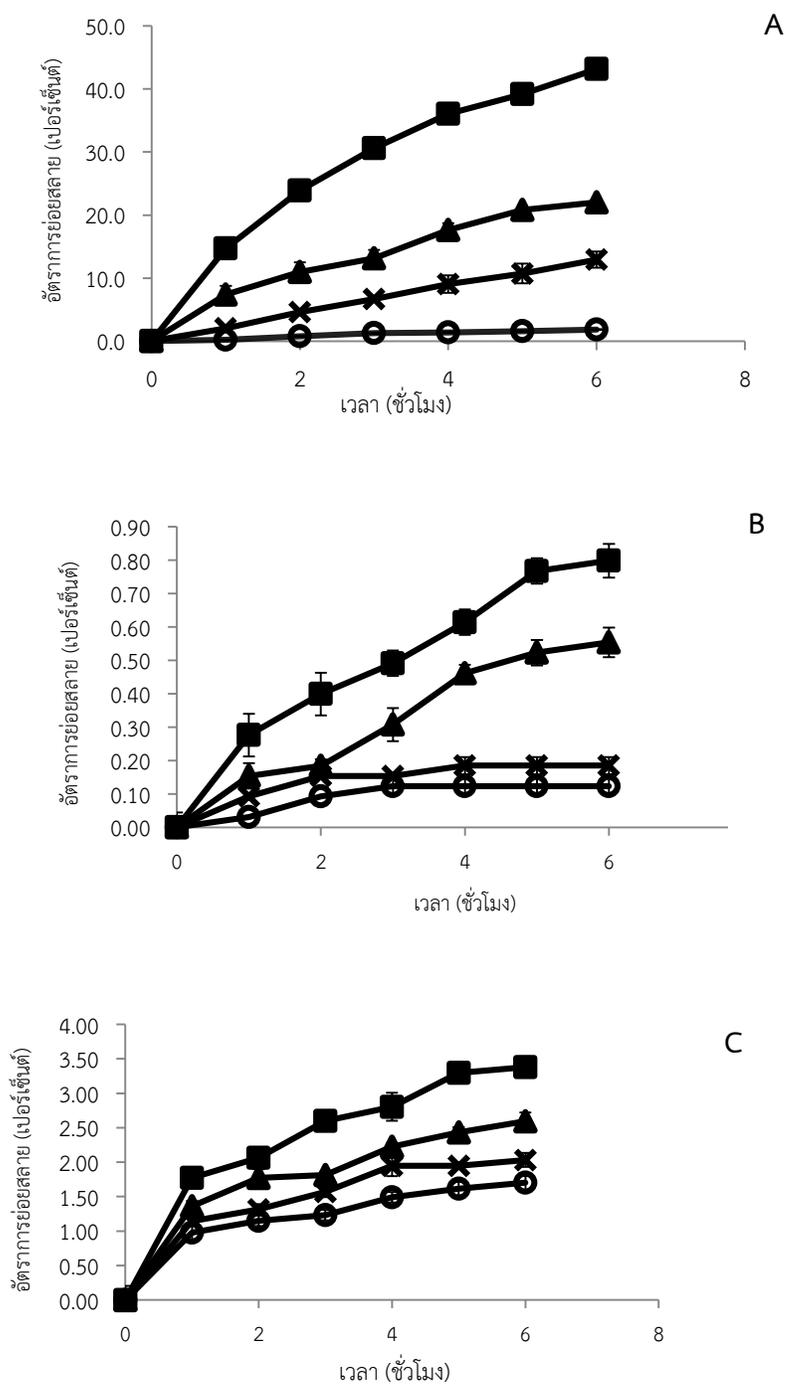
มีรายงานของ Ghosh และคณะ (2015) ที่ได้รายงานการแยกแพรกชั้นแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากกากมะพร้าวจากประเทศอินเดีย ทำผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยใช้เอนไซม์ endo mannanase *CtManf* จาก *C. thermocellum* ATCC27405 สามารถแยกได้ทั้งหมด 3 แพรกชั้น โดยแพรกชั้นแรกมีน้ำตาลแมนโนไตรโอสเป็นองค์ประกอบ กลุ่มที่ 2 น้ำตาลแมนโนไบโอส เป็นองค์ประกอบ และกลุ่มที่ 3 มีน้ำตาลแมนโนสเป็นองค์ประกอบ ซึ่งงานวิจัยครั้งนี้มีผลคล้ายกัน คือสามารถแยกกลุ่มน้ำตาล แมนโนไตรโอส และ แมนโนไบโอส ออกจากกันได้ แต่ยังมีผสมกันบ้างระหว่างแมนโนเตตระโอสกับแมนโนไตรโอส ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวัสดุที่ใช้เป็นเฟสคงที่ ต่างชนิดกัน ส่งผลให้การแยกสารได้ผลแตกต่างกัน

งานวิจัยครั้งนี้ได้คัดเลือกกลุ่มแพรกชั้นที่ 38-42 และกลุ่มที่ 4 ประกอบด้วยแพรกชั้นที่ 45-48 ซึ่งมี DP เท่ากับ 3-4 และ 2 ตามลำดับ มาทดสอบในขั้นต่อไป เนื่องจากแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่มี DP เท่ากับ 2-4 มีรายงานเกี่ยวกับการเป็นพรีไบโอติกที่ดี (Manning และ Gibson, 2004)

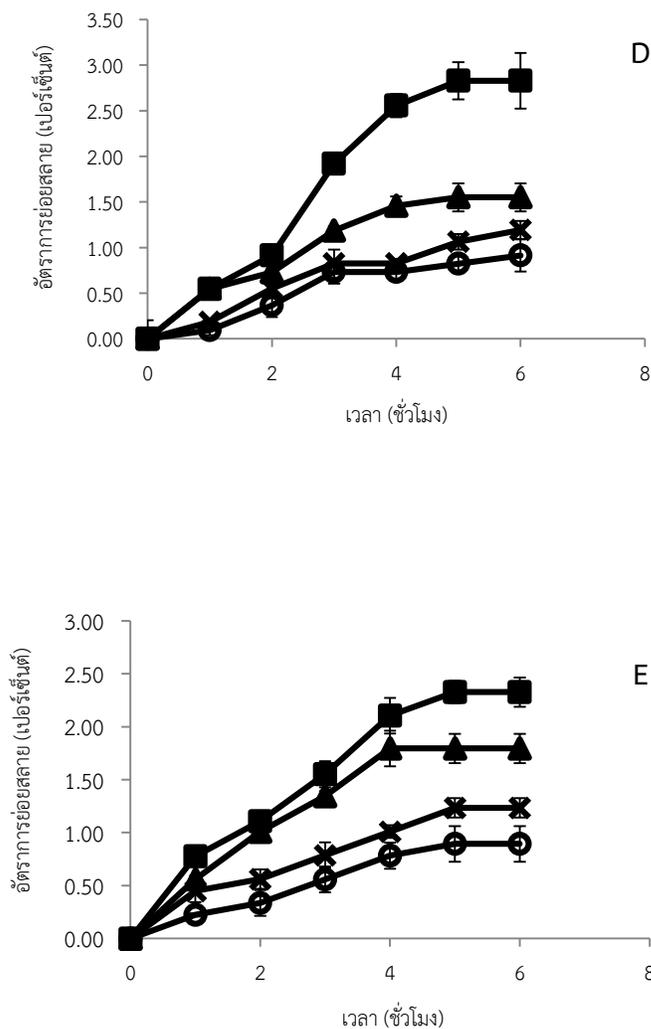
#### 4.5 ผลการทนย่อยของออลิโกกาแลคโตแมนแนนโดยใช้กรดในสภาวะจำลองของกระเพาะอาหาร

การศึกษาการทนย่อยของสารสกัดแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากกากมะพร้าวที่มีขนาดโมเลกุลต่างกัน ในสภาวะจำลองของกระเพาะอาหาร เพื่อพิจารณาศักยภาพของแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่แยกได้ ในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดสูงในกระเพาะอาหาร ซึ่งโดยปกติกระเพาะอาหารของมนุษย์มี พีเอช ประมาณ 1-4

การทดสอบความสามารถในการทนย่อยใช้กรดในสภาวะจำลองของกระเพาะอาหาร ของแมนแนนแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ยังไม่ผ่านการคัดแยก และ แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผ่านการคัดแยก จำนวน 2 กลุ่ม และอินูลินซึ่งใช้เป็นสารเปรียบเทียบ รวมทั้งหมดเป็นจำนวน 5 ตัวอย่าง ที่พีเอชเท่ากับ 1-4 เป็นเวลา 0-6 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 4.3 A-E พบว่า เปอร์เซ็นต์การย่อยมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อพีเอช ลดลงในทุก ๆ ตัวอย่าง โดยเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และเป็นไปอย่างช้า ๆ นอกจากนี้ยังพบว่า ทุกตัวอย่างจะมีเปอร์เซ็นต์การไฮโดรไลซิสลดลงที่พีเอชเพิ่มขึ้น เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง สภาวะกรดที่มีความเข้มข้นสูง (พีเอช 1) สารตัวอย่างสามารถถูกไฮโดรไลซิสได้ดี เนื่องมาจากระดับของกรดที่มีความเข้มข้นสูงจะส่งผลต่อพันธะที่เชื่อมต่อกันของโมเลกุลน้ำตาลที่เชื่อมต่อกันหลุดออกจากกันได้ง่ายกว่าในสภาวะที่มีความเข้มข้นของกรดต่ำ และการไฮโดรไลซิสของสารตัวอย่างเกิดขึ้นแบบสุ่มซึ่งไม่จำเพาะกับชนิดของพันธะภายในสายพอลิเมอร์ ถ้าสารตัวอย่างมีสารประกอบโมเลกุลใหญ่จะมีเปอร์เซ็นต์การถูกย่อยที่ต่ำกว่าสารตัวอย่างที่มีสารประกอบโมเลกุลเล็ก (โสภา, 2551)



ภาพที่ 4.6 เปอร์เซ็นต์การย่อยของอิโนลิน (A) แมนแนน (B) แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ยังไม่ผ่านการตัดแยก (C) แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผ่านการตัดแยกลำดับที่ 38-42 (D) และแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผ่านการตัดแยกลำดับที่ 45-48 (E) ในสภาวะพีเอชเท่ากับ 1 (■), 2 (▲), 3 (×), และ 4 (○) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.6 (ต่อ) เปอร์เซ็นต์การย่อยของอินูลิน (A) แมนแนน (B) แมนโนโอลิโกแซกคาไรด์ที่ยังไม่ผ่านการตัดแยก (C) แมนโนโอลิโกแซกคาไรด์ที่ผ่านการตัดแยกลำดับที่ 38-42 (D) และแมนโนโอลิโกแซกคาไรด์ที่ผ่านการตัดแยกลำดับที่ 45-48 (E) ในสภาวะพีเอชเท่ากับ 1 (■), 2 (▲), 3 (×), และ 4 (○) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

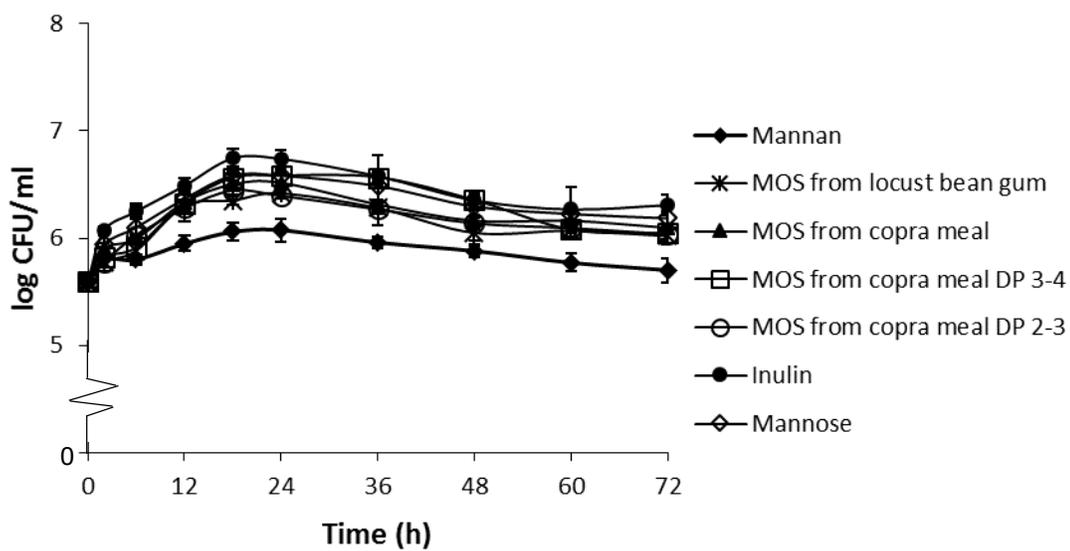
อินูลิน มีเปอร์เซ็นต์การไฮโดรไลซิส ที่พีเอช 1 เท่ากับ 14.7-43.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแมนโนโอลิโกแซกคาไรด์ที่ยังไม่ผ่านการตัดแยก มีเปอร์เซ็นต์การไฮโดรไลซิสสูงสุด รองลงมาคือ แมนโนโอลิโกแซกคาไรด์ที่ผ่านการตัดแยกลำดับที่ 38-42 แมนโนโอลิโกแซกคาไรด์ที่ผ่านการตัดแยกลำดับที่ 45-48 และ แมนแนน ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าเปอร์เซ็นต์การไฮโดรไลซิสสูงสุดของแมนโนโอลิโกแซกคาไรด์ที่ยังไม่ผ่านการตัด

แยก เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่พีเอช เท่ากับ 1-4 มีค่าเปอร์เซ็นต์การไฮโดรไลซิส เท่ากับ 3.381, 2.595, 2.033 และ 1.701 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าสูงกว่า Ghosh และคณะ (2014) ที่ได้รายงานค่าเปอร์เซ็นต์การไฮโดรไลซิส แมนโนโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จากกากมะพร้าวจากประเทศอินเดีย ใช้เอนไซม์ endo mannanase *CtManf* จาก *C. thermocellum* ATCC27405 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่พีเอช 1-4 มีค่าเท่ากับ 2.1, 1.2, 0.8 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก เอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพื่อให้ได้แมนโนโอลิโกแซ็กคาไรด์ แม้ว่า เป็นเอนไซม์ชนิดเดียวกันแต่ได้จากจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน อาจส่งผลถึงความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยา แตกต่างกันได้ อีกทั้งสภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาต่างกันก็มีผลต่อขนาด DP และปริมาณของแมนโนโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ด้วยเช่นกัน

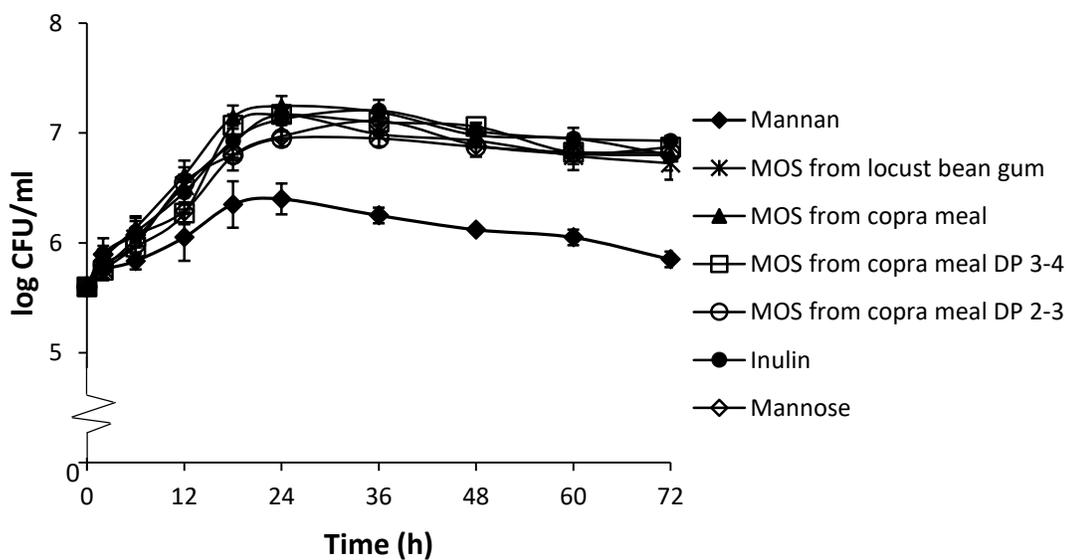
เมื่อเปรียบเทียบกับโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดอื่น เช่น โอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จากแก้วมังกร ซึ่ง Wichienchot และคณะ (2010) ได้ทดสอบสมบัติของโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแก้วมังกรต่อสภาวะการทนย่อย โดยใช้กรดในสภาวะจำลองของกระเพาะอาหาร ที่พีเอช 1-5 เป็นเวลา 0-6 ชั่วโมง พบว่า โอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จากแก้วมังกรมีค่าการย่อยสูงสุดที่พีเอช 1 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.07 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยในครั้งนี้อย่างยิ่ง ต่อมาในปี 2011 Du และคณะ ได้ทดสอบสมบัติของโอลิโกแซ็กคาไรด์จาก ฟักทอง พบว่า โอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จากฟักทองมีค่าการย่อยสูงสุดที่พีเอช 1 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 20.31 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Kothari และคณะ (2015) ได้ทดสอบสมบัติของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่สังเคราะห์จาก *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1426 dextransucrase รายงานว่า ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์มีค่าการย่อยสูงสุดที่พีเอช 1เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 20.9 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าสูงกว่างานวิจัยในครั้งนี้อย่างยิ่ง จากผลการวิจัยที่มีค่า ต่ำกว่า ใกล้เคียง หรือสูงกว่า งานวิจัยชิ้นอื่นๆ มีความเป็นไปได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก แหล่งของเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเพื่อให้ได้โอลิโกแซ็กคาไรด์ วัตถุดิบตั้งต้นที่ใช้ในการสกัดโอลิโกแซ็กคาไรด์ หากวัตถุดิบต่างชนิดกันองค์ประกอบภายในของวัตถุดิบมีความแตกต่างกัน ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในวัตถุดิบมีความแตกต่างกัน ส่งผลให้สกัดได้ชนิดของโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ต่างกัน ความสามารถต่อสภาวะการทนย่อยโดยใช้กรดในสภาวะจำลองของกระเพาะอาหาร ก็แตกต่างกันไปด้วย

#### 4.6 ผลของโอลิโกกาแลคโตแมนแนนต่อการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์

เมื่อนำแมนโนโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากกากมะพร้าวมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ปริมาณคิดเทียบเท่ากับน้ำตาลทั้งหมด 1 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับ น้ำตาลแมนโนส อินูลิน และ แมนโนโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จาก โลคัสปีนัม มาเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ *Lactobacillus plantarum* NF3 และ *Lactobacillus plantarum* RS 54 โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดมีปริมาณเริ่มต้นเท่ากับ  $10^5$  CFUต่อ มิลลิลิตร ทำการบ่มในสภาวะไร้อากาศ ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองแสดงดัง ภาพที่ 4.7 และ 4.8



ภาพที่ 4.7 การเจริญของ *Lactobacillus plantarum* NF3



ภาพที่ 4.8 การเจริญของ *Lactobacillus plantarum* RS 54

เห็นได้ว่า แมนโนโอลิโกแซกคาไรด์ที่สกัดได้จากกากมะพร้าวและผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เบต้าแมนนาเนสจาก *Aspergillus niger* ที่ไม่ผ่านการคัดแยก มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ ทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* NF3 และ *Lactobacillus plantarum* RS 54 ใกล้เคียงกับ แมนโนโอลิโกแซกคาไรด์จากโลตัสปิ่นกัม แมนโนโอลิโกแซกคาไรด์ที่ผ่านการคัดแยกขนาดที่ DP เท่ากับ 2-3 และ 3-4 อีกทั้งยังมีความสามารถใกล้เคียงกับ อินูลินและน้ำตาลแมนโนสอีกด้วย โดยระยะเวลาการส่งเสริมการเจริญได้ดีที่สุดที่ 24 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ เท่ากับ 6.5 และ 7.0 log CFU ต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Ghosh และ Verma (2015) ที่ใช้แมนโนโอลิโกแซกคาไรด์ที่สกัดจากกากมะพร้าว มาศึกษาความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ (*Lactobacillus acidophilus* 449 และ *Bifidobacterium infantis* 41661) เปรียบเทียบกับอินูลิน และน้ำตาลกลูโคส ซึ่งรายงานว่าแมนโนโอลิโกแซกคาไรด์ มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด โดยสามารถส่งเสริมการเจริญได้ดีที่สุดที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับกับพรณวิภา และคณะ (2558) ได้รายงานผลของการใช้แมนโนโอลิโกแซกคาไรด์จากกากมะพร้าวในการส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* TSTR 541 และ *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 พบว่า จุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดมีปริมาณเพิ่มขึ้น 11-15 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้แมนโนโอลิโกแซกคาไรด์ เป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนแมนแนนที่สกัดได้จากกากมะพร้าว มีความสามารถส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ทั้ง 2 ชนิด ได้น้อยที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก แมนแนนเป็นโพลีแซกคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถนำแมนแนนไปใช้ในการเจริญได้

อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์ของทั้ง 2 ชนิดมีความสามารถในการเจริญที่ไม่เท่ากัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความหลากหลายของโครงสร้างและการสร้างเอนไซม์ขึ้นมาย่อยโมเลกุลของโอลิโกแซกคาไรด์ไปใช้งาน ซึ่งสารที่มีสมบัติเป็นพรีไบโอติกส์มี องค์ประกอบ การเชื่อมกันระหว่างโมเลกุลด้วยพันธะภายในโมกุลต่างกัน ดังนั้นแบทีเรียอาจผลิตเอนไซม์ที่มีความสามารถในการสลายพันธะที่เชื่อมต่อกภายในโมเลกุลของโอลิโกแซกคาไรด์ได้จำเพาะเจาะจงแตกต่างกัน ซึ่งความจำเพาะเจาะจงต่อการเข้าทำปฏิกิริยาขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (Rastall และ Gibson, 2002; Papamanoli และคณะ 2003)

#### 4.7 สมการการทำนายและการวิเคราะห์ทางสถิติ

การหาสภาวะที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการย่อยแมนแนนจากกากมะพร้าวให้เป็นออลิโกกาแลคโตแมนแนนด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยใช้เอนไซม์ เบต้า-แมนนาเนสจาก *Aspergillus niger* โดยติดตามปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์แทนการติดตามออลิโกกาแลคโตแมนแนนโดยตรง ใช้การวางแผนการทดลองแบบพื้นที่ตอบสนอง (Response surface methodology; RSM) และออกแบบการทดลองด้วยวิธี Box- Behnken Design (BBD) โดยปัจจัยที่ศึกษามี 5 ปัจจัย ปัจจัยละ 3 ระดับ ประกอบด้วย ค่าความเป็นกรด-ด่าง

( $X_1$ ) (3, 6 และ 9), อุณหภูมิ ( $X_2$ ) (35, 55 และ 75 องศาเซลเซียส), ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา ( $X_3$ ) ( 5, 15 และ 25 นาที), ความเข้มข้นของสับสเตรต ( $X_4$ ) (1, 5.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์) และความเข้มข้นของเอนไซม์ ( $X_5$ ) (0.6, 0.9 และ 1.2 ยูนิต) ส่วนค่าการตอบสนองคือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากการออกแบบการทดลองทำให้ได้สถานะในการทดลอง 40 ชุดการทดลอง และชุดการทดลองที่เป็นค่ากลาง (Centre point) 6 ชุดการทดลอง รวมทั้งหมด 46 ชุดการทดลอง แสดงดังตารางที่ 4.2

**ตารางที่ 4.2** แผนการทดลองทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้เป็นค่าตอบสนอง

Run	A:pH	B:temperature (°C)	C:time (min)	D: substrate conc. (%)	E: enzyme conc. (unit)	RS(mg/ml)	
						predicted	observed
1	6	35	15	1	0.9	0.2814	0.3106
2	6	35	25	5.5	0.9	0.8734	0.8940
3	6	55	25	10	0.9	1.028	1.0971
4	6	35	15	5.5	1.2	0.9569	0.9237
5	6	75	15	5.5	1.2	0.8138	0.8126
6	3	55	15	5.5	1.2	1.0454	1.0707
7	6	55	25	5.5	1.2	1.1144	1.1474
8	6	55	15	10	1.2	1.1008	1.1043
9	3	55	15	5.5	0.6	0.8362	0.8363
10	3	55	15	1	0.9	0.3399	0.3613
11	3	55	25	5.5	0.9	1.0083	1.1025
12	6	55	15	1	0.6	0.3625	0.3268
13	3	55	5	5.5	0.9	0.8115	0.8873
14	3	35	15	5.5	0.9	0.8332	0.8329
15	6	55	25	5.5	0.6	1.0932	1.1463
16	6	55	5	1	0.9	0.2809	0.2809
17	6	35	5	5.5	0.9	0.5969	0.6872
18	3	55	15	10	0.9	0.812	0.9257
19	6	75	5	5.5	0.9	0.5698	0.5990
20	6	55	15	5.5	0.9	0.6063	0.6430
21	3	75	15	5.5	0.9	0.7449	0.6510
22	6	75	15	10	0.9	0.8564	0.9045
23	6	55	15	5.5	0.9	0.6926	0.6434

ตารางที่ 4.2 แผนการทดลองทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้เป็นค่าตอบสนอง (ต่อ)

Run	A:pH	B:temperature (°C)	C:time (min)	D: substrate conc. (%)	E: enzyme conc. (unit)	RS(mg/ml)	
						predicted	observed
24	6	55	5	10	0.9	0.6021	0.5612
25	9	35	15	5.5	0.9	0.6964	0.7856
26	6	75	25	5.5	0.9	1.0303	0.9897
27	9	55	5	5.5	0.9	0.6564	0.5855
28	6	55	5	5.5	1.2	0.898	0.8771
29	9	55	15	5.5	1.2	1.0236	1.0035
30	6	55	15	5.5	0.9	0.6925	0.6962
31	6	75	15	1	0.9	0.2809	0.3184
32	9	55	25	5.5	0.9	1.1963	1.1439
33	9	55	15	5.5	0.6	0.8881	0.9399
34	6	55	25	1	0.9	0.4058	0.3421
35	9	75	15	5.5	0.9	0.9147	1.0104
36	9	55	15	1	0.9	0.4583	0.3310
37	6	35	15	10	0.9	0.7118	0.7373
38	6	55	15	5.5	0.9	0.6926	0.7526
39	6	55	15	5.5	0.9	0.6926	0.6950
40	6	55	15	5.5	0.9	0.6926	0.6254
41	6	55	15	1	1.2	0.405	0.3298
42	6	35	15	5.5	0.6	0.5751	0.4993
43	6	55	5	5.5	0.6	0.572	0.5035
44	6	75	15	5.5	0.6	0.8481	0.8045
45	6	55	15	10	0.6	0.7709	0.7892
46	9	55	15	10	0.9	0.9191	0.9003

จากตารางที่ 4.2 เห็นได้ว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเมื่อสภาวะของปฏิกิริยาแตกต่างกันอยู่ในช่วง 0.28 ถึง 1.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นมีค่าสูงสุดพบอยู่ในชุดการทดลองที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 25 นาที ความเข้มข้นของสับสเตรต เท่ากับ 5.5 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของเอนไซม์ เท่ากับ 1.2 ยูนิต

เมื่อนำผลการวิเคราะห์ข้อมูลมาสร้างความสัมพันธ์ของปัจจัยที่ศึกษาและค่าการตอบสนอง ในรูปแบบสมการพหุนามอันดับสอง (Second-order polynomial) ที่แสดงค่าสัมประสิทธิ์ในแต่ละตัวแปรและระหว่างตัวแปร โดยแสดงสมการได้ดังนี้

$$Y = 1.563 - 0.285 * X_1 + 0.0018 * X_2 - 0.0284 * X_3 + 0.0365 * X_4 - 0.769 * X_5 + 0.0017 * X_1 * X_2 + 0.0029 * X_1 * X_3 + 0.0001 * X_1 * X_4 - 0.0474 * X_1 * X_5 + 0.0002 * X_2 * X_3 + 0.0004 * X_2 * X_4 - 0.017 * X_2 * X_5 + 0.0026 * X_3 * X_4 - 0.031 * X_3 * X_5 + 0.0578 * X_4 * X_5 + 0.016 * X_1^2 - 0.00002 * X_2^2 + 0.0010 * X_3^2 - 0.008 * X_4^2 + 1.362 * X_5^2$$

เมื่อ

$Y$  คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

$X_3$  คือ ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา

$X_1$  คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง

$X_4$  คือ ความเข้มข้นของสับสเตรต

$X_2$  คือ อุณหภูมิ

$X_5$  คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์

จากสมการเห็นได้ว่า ปัจจัยเดี่ยวและปัจจัยที่มีอิทธิพลร่วมกันที่มีค่าสัมประสิทธิ์หน้าตัวแปรสูง ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์( $X_5$ ) และความเข้มข้นของสับสเตรต ร่วมกับความเข้มข้นของเอนไซม์( $X_4 * X_5$ ) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.769 และ 0.0578 ตามลำดับ แสดงว่าปัจจัยทั้งสองนี้ส่งผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นได้ ซึ่งแตกต่างจาก Chen และคณะ (2013) ที่รายงานว่าปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกลูโคโอลิโกแซคคาไรด์จากผงบุก คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก สภาพที่ใช้ในการทดลองแตกต่างกัน

จากนั้นตรวจสอบความเหมาะสมของข้อมูลทั้งหมด (model) โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) สัมประสิทธิ์การถดถอย (Regression coefficient) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Design Expert ผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 4.3

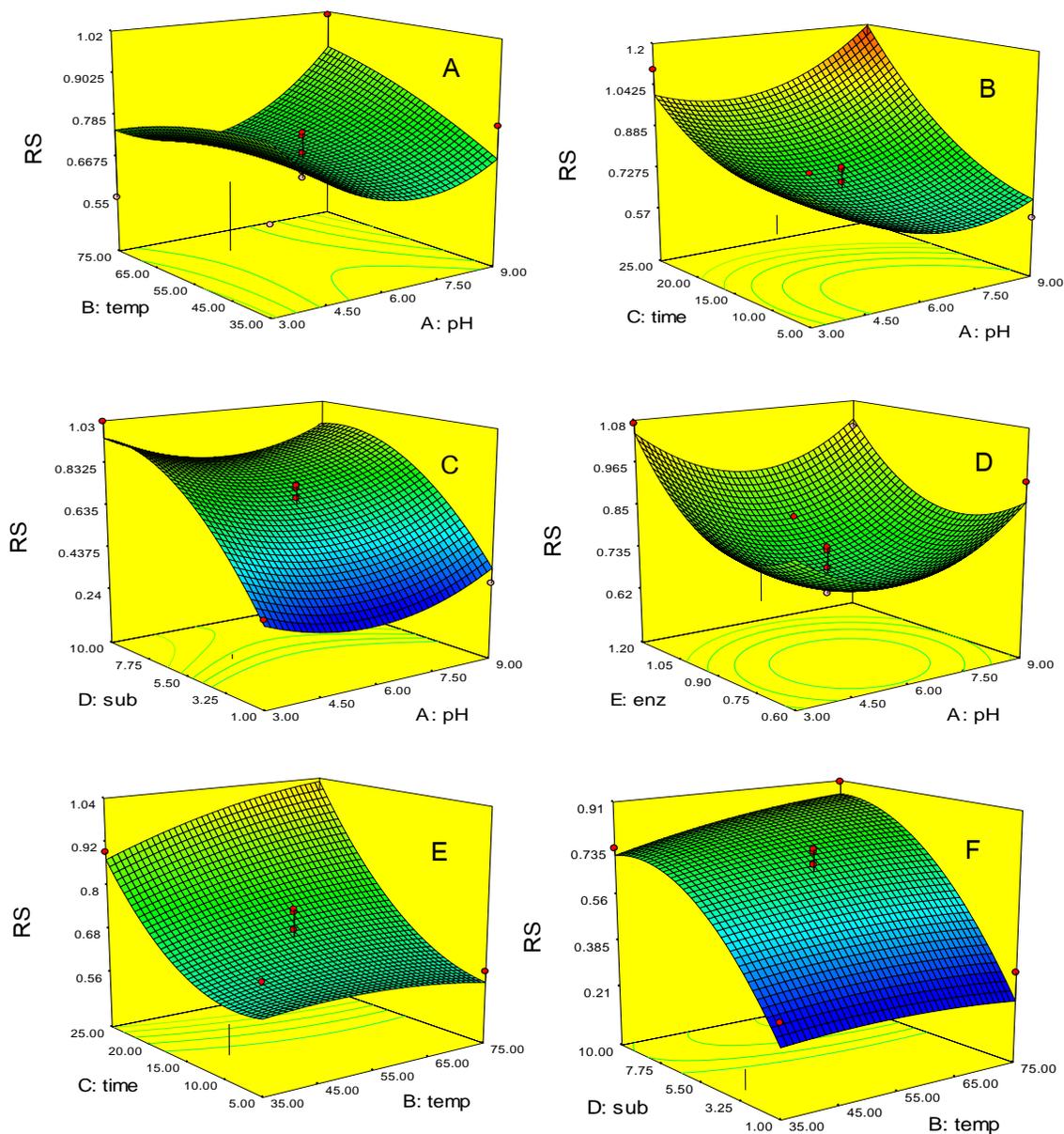
**ตารางที่ 4.3** ค่าโมเดลการถดถอยของการหาสภาวะที่เหมาะสมที่ใช้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เป็นค่าตอบสนอง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Model	2.95	20	0.15	30.80	< 0.0001
Residual	0.12	25	0.00479		
Lack of Fit	0.11	20	0.00542	2.39	0.1699
Pure Error	0.011	5	0.00271		
Total	3.23	45			
	$R^2=0.961$	Adj $R^2=0.930$			

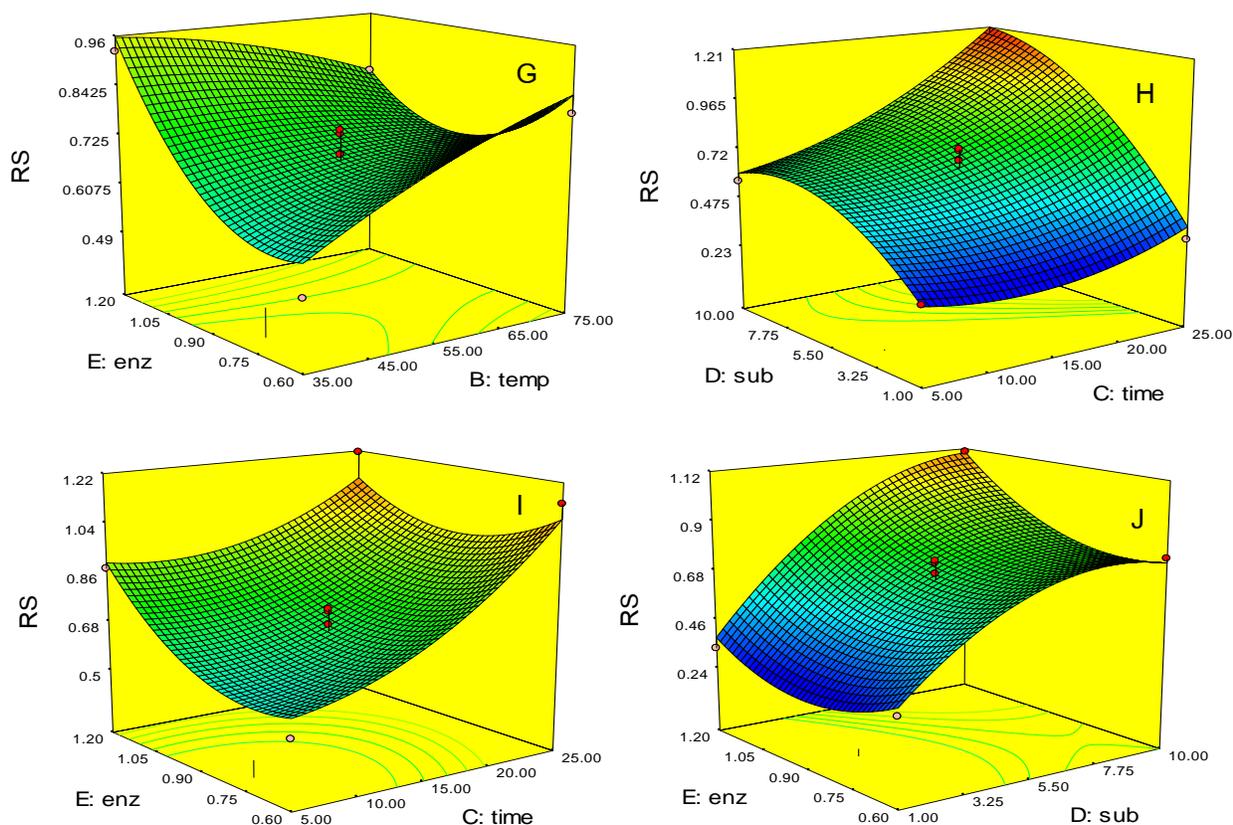
จากตารางที่ 4.3 เห็นได้ว่า โมเดลมีค่า p-value น้อยกว่า 0.0001 แสดงถึงข้อมูลทั้งหมด มีความแปรปรวนสูง และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) อีกทั้งสามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยทั้ง 5 ปัจจัย ที่ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ ยังบ่งบอกถึงผลที่ได้จากการทดลองและการทำนาย มีความสอดคล้องกันอีกด้วย เมื่อพิจารณา Lack of Fit ซึ่ง หมายถึง การวัดความคลาดเคลื่อนของข้อมูลการทดลอง และความเหมาะสมของสมการถดถอย พบว่ามีค่า p-value  $> 0.05$  ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) แสดงว่า ค่าความคลาดเคลื่อนที่แท้จริงจากข้อมูลการทดลองมีความคลาดเคลื่อนไปจากค่าที่ได้จากการทำนายเพียงเล็กน้อย และสมการถดถอยที่ได้จากข้อมูลการทดลองครั้งนี้มีความเหมาะสม และเมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination:  $R^2$ ) และ สัมประสิทธิ์การตัดสินใจที่ถูกรับค่า (Adjusted coefficient of determination:  $Adj-R^2$ ) โดยค่าทั้งสองบ่งบอกถึง ความสัมพันธ์ของตัวแปรในโมเดล ความสามารถในการอธิบายข้อมูล และความเหมาะสมของโมเดล เห็นได้ว่า โมเดลมีค่า  $R^2$  และ  $Adj-R^2$  เท่ากับ 0.961 และ 0.930 ตามลำดับ โดยมีค่าค่อนข้างสูง แสดงให้เห็นว่า ตัวแปรโมเดลนี้มีความสัมพันธ์สูง สามารถใช้อธิบายข้อมูลได้ดี สามารถอธิบายการเปลี่ยนแปลงของข้อมูลได้ 96 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับ Chen และคณะ (2013) ที่รายงานค่า  $R^2$  ที่ได้จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกลูโคโอลิโกแซคคาไรด์จากผงบุก ว่ามีค่าเท่ากับ 93.38 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีแนวโน้มเดียวกับ Jian และคณะ (2013) ที่รายงานค่า  $R^2$  ที่ได้จากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตออลิโกกาแลคโตแมนแนนจาก *Gleditsia sinensis* ว่ามีค่าเท่ากับ 99.37 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดต่างๆ

เมื่อคำนวณการทำนายสภาวะการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแมนแนนจากกากมะพร้าวโดยใช้เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก *Aspergillus niger* ที่ทำให้ได้ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด โดยคำนึงถึงสภาวะที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่สุดและใช้ปริมาณน้อยที่สุด ได้สภาวะการผลิตที่เหมาะสม เป็นดังนี้ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 25 นาที ความเข้มข้นของสับสเตรต 4 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.6 ยูนิต โดยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการทำนาย คือ 1.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำสภาวะนี้ไปทดลอง พบว่า ผลผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการทดลอง คือ  $0.99 \pm 0.048$  มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทำนาย ซึ่งมีความแตกต่างจาก Chen และคณะ (2013) ที่รายงานการทำนายสภาวะในผลิตกลูโคโอลิโกแซคคาไรด์จากผงบุก ไว้ดังนี้ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.1 อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 3.4 ชั่วโมง อัตราส่วนสับสเตรตต่อเอนไซม์ เท่ากับ 0.49 ดังนั้น การทำนายสภาวะการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมนั้น อาจมีความแตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ ปัจจัยที่ศึกษา (ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา ชนิดของสับสเตรต และ ชนิดของเอนไซม์ ฯลฯ) ค่าตอบสนองหรือตัวติดตามผล และ วิธีการออกแบบการทดลอง เป็นต้น

เมื่อนำแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นมาสร้างกราฟ 3 มิติ โดยมีลักษณะความสัมพันธ์แบบเส้นโค้ง (quadratic regression relationship) ระหว่างอิทธิพลของปัจจัยทั้ง 5 ( $X_1$ - $X_5$ ) ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ( $Y$ ) ด้วยโปรแกรม Design Expert เพื่อหาค่าสูงสุดของการทดลอง แสดงดังภาพที่ 4.9



ภาพที่ 4.9 กราฟพื้นที่ผิวตอบสนองแสดงอิทธิพลของปัจจัยที่ศึกษาต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยใช้เอนไซม์ของแมนแนนจากกากมะพร้าว



ภาพที่ 4.9 กราฟพื้นที่ผิวตอบสนองแสดงอิทธิพลของปัจจัยที่ศึกษาต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยใช้เอนไซม์ของแมนแนนจากกากมะพร้าว (ต่อ)

ภาพที่ 4.9 A แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง pH และอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เมื่อกำหนดให้ ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา, ความเข้มข้นของสับสเตรท และความเข้มข้นของเอนไซม์ คงที่ (15 นาที, 5.5% และ 0.9 ยูนิต ตามลำดับ) พบว่า การเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำกว่า 55 องศาเซลเซียส และมี pH ต่ำกว่า 6.0 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นมีปริมาณมากกว่าสภาวะที่มี pH สูงกว่า 6.0 ที่ช่วงอุณหภูมิเดียวกัน ซึ่งแตกต่างจาก Chen และคณะ (2013) ได้รายงานไว้ว่า เมื่อ pH มีค่าเพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก็เพิ่มขึ้นเช่นกัน นอกจากนี้ สภาวะที่มี pH 3.0-4.5 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงกว่า 55 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นมีปริมาณไม่แตกต่างจากการใช้อุณหภูมิต่ำ

ภาพที่ 4.9 B แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง pH และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เมื่อกำหนดให้ อุณหภูมิ, ความเข้มข้นของสับสเตรท และความเข้มข้นของเอนไซม์ คงที่ (55 องศาเซลเซียส, 5.5% และ 0.9 ยูนิต ตามลำดับ) พบว่า ในระยะเวลาการทำปฏิกิริยาน้อยกว่า 15 นาที pH มีผลต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อระยะเวลาการทำปฏิกิริยา และ pH เพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น

มีปริมาณที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน ซึ่งมีแนวโน้มเดียวกับ Chen และคณะ (2013) ได้รายงานว่ ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น

ภาพที่ 4.9 C แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง pH และความเข้มข้นของสับสเตรท ต่อการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เมื่อกำหนดให้ ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา, อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาและความเข้มข้นของเอนไซม์ คงที่ (15 นาที, 55 องศาเซลเซียส และ 0.9 ยูนิต ตามลำดับ) พบว่า เมื่อ pH เพิ่มขึ้น และความเข้มข้นของสับสเตรทสูงขึ้นปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ที่เกิดขึ้นปริมาณเพิ่มขึ้น เนื่องมาจากความเข้มข้นของสับสเตรทที่สูงขึ้น เอนไซม์สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้มากขึ้น ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นย่อมเพิ่มขึ้นเช่นกัน

ภาพที่ 4.9 D แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง pH และความเข้มข้นของเอนไซม์ ต่อการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เมื่อกำหนดให้ อุณหภูมิ, ความเข้มข้นของสับสเตรท และ ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาคงที่ (55 องศาเซลเซียส, 5.5% และ 15 นาที ตามลำดับ) พบว่า การทำปฏิกิริยาที่ 3.0-4.5 ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์น้อยกว่า 0.75 ยูนิต และการทำปฏิกิริยาที่ pH 7.5-9.0 ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์มากกว่า 1.0 ยูนิต ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ที่เกิดขึ้น มีปริมาณที่เพิ่มขึ้น

ภาพที่ 4.9 E แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง อุณหภูมิ และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เมื่อกำหนดให้ pH, ความเข้มข้นของสับสเตรท และความเข้มข้นของเอนไซม์ คงที่ (6.0, 5.5% และ 0.9 ยูนิต ตามลำดับ) พบว่า ที่ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา น้อยกว่า 15 นาที เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ที่เกิดขึ้นมีปริมาณเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิ และระยะเวลาในการทำปฏิกิริยามากกว่า 15 นาที ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ที่เกิดขึ้น มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด แสดงว่า ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่นาน ผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นย่อมมีปริมาณมากกว่าการใช้ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาที่สั้น

ภาพที่ 4.9 F แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของสับสเตรท และอุณหภูมิ ต่อการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เมื่อกำหนดให้ pH, ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา และ ความเข้มข้นของเอนไซม์ คงที่ (6.0, 15 นาที และ 0.9 ยูนิต ตามลำดับ) พบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของสับสเตรทที่ต่ำกว่า 3.25 % และอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ที่เกิดขึ้นมีการเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย แต่เมื่ออุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น และความเข้มข้นของสับสเตรทสูงขึ้นปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ที่เกิดขึ้นปริมาณเพิ่มขึ้น ซึ่งให้ผลในทิศทางเดียวกับ ความสัมพันธ์ระหว่าง อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาและความเข้มข้นของสับสเตรท

ภาพที่ 4.9 G แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง อุณหภูมิ และความเข้มข้นของเอนไซม์ ต่อการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เมื่อกำหนดให้ pH, ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาและ ความเข้มข้นของสับสเตรท คงที่ (6.0, 15 นาที และ 5.5 % ตามลำดับ) พบว่า การทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียส และใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์น้อยกว่า 0.75 ยูนิต ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ที่เกิดขึ้นมีปริมาณน้อย แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น แต่ความเข้มข้นของเอนไซม์ยังคงที่ (น้อยกว่า 0.75 ยูนิต) ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ที่เกิดขึ้นมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์มากกว่า 0.9 ยูนิต ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์ที่เกิดขึ้น และค่อยๆลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

ภาพที่ 4.9 H แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา และความเข้มข้นของ สับสเตรท ต่อการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เมื่อกำหนดให้ pH, อุณหภูมิ และ ความเข้มข้นของเอนไซม์ คงที่ (6.0, 55 องศาเซลเซียส และ 0.9 ยูนิต ตามลำดับ) พบว่า เมื่อระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาและความเข้มข้น ของสับสเตรทเพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นมีเพิ่มขึ้น แต่หากใช้ความเข้มข้นของสับสเตรท น้อยกว่า 3.25 % ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นมีการเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย

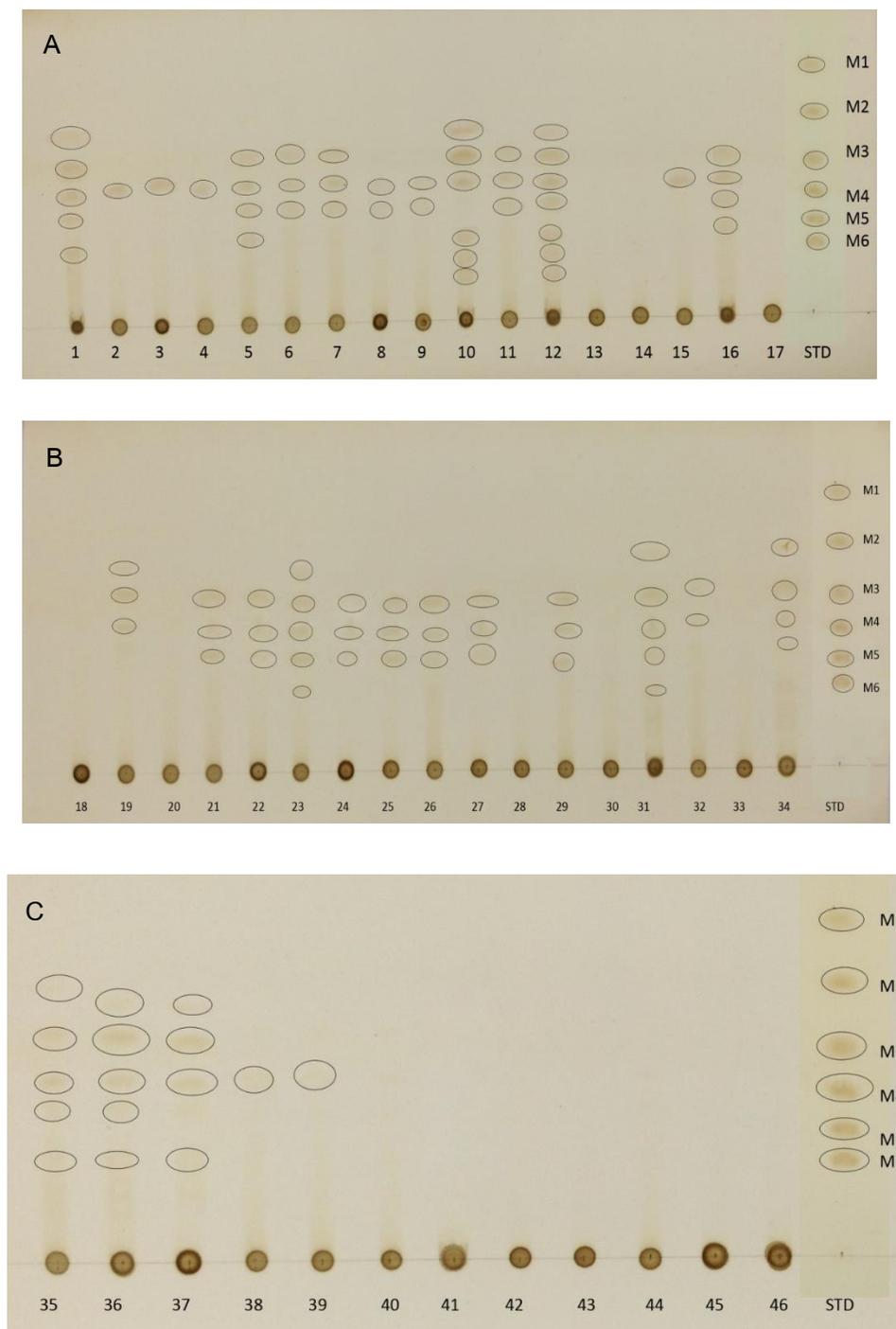
ภาพที่ 4.9 I แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา และความเข้มข้นของ เอนไซม์ ต่อการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เมื่อกำหนดให้ pH, อุณหภูมิและ ความเข้มข้นของสับสเตรท คงที่ (6.0, 55 องศาเซลเซียส และ 5.5 % ตามลำดับ) พบว่า เมื่อระยะเวลาในการทำปฏิกิริยาและความเข้มข้นของ เอนไซม์ เพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นมีเพิ่มขึ้น

ภาพที่ 4.9 J แสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของสับสเตรท และ ความเข้มข้นของเอนไซม์ ต่อการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เมื่อกำหนดให้ pH, อุณหภูมิ และ ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา คงที่ (6.0, 55 องศาเซลเซียส และ 15 นาที ตามลำดับ) พบว่า เมื่อความเข้มข้นของสับสเตรท และ ความเข้มข้นของเอนไซม์ ต่อการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นมีเพิ่มขึ้นเช่นกัน แต่หากใช้ ความเข้มข้น ของสับสเตรทน้อยกว่า 3.25 %แม้จะเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ให้มากขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นมี การเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย

#### 4.8 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากแมนแนนจากกากมะพร้าวที่ผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยใช้ เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จาก *Aspergillus niger* ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีผิวบาง

(Analysis of  $\beta$ -mannanase from *Aspergillus niger* hydrolyzed products of copra mannan by thin layer chromatography)

แมนแนนที่ได้จากกากมะพร้าวเมื่อผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยใช้เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จาก *Aspergillus niger* ที่สภาวะต่างๆ (ตารางที่ 4.2) สามารถเกิดผลิตภัณฑ์กลุ่ม โอลิโกแซคคาไรด์ขึ้น เมื่อทำการ ตรวจสอบด้วยวิธี โครมาโทกราฟีผิวบาง ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นที่สภาวะต่างๆ แสดงดังภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.10 ภาพ TLC ของชนิดน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในแผนการทดลองทั้งหมด (A-C).

จากภาพที่ 4.5 เห็นได้ว่าสภาวะที่เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยใช้เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนส จาก *Aspergillus niger* ส่วนใหญ่ พบว่ามี ผลิตภัณฑ์กลุ่ม ออลิโกกาแลคโตแมนแนน (Galactomannooligosaccharides; GMOs) เกิดขึ้น ซึ่งประกอบด้วย แมนโนไบโอส (Mannobiose; M2)

แมนโนไตรโอส (Mannotriose; M3) แมนโนเตตระโอส (Mannotetraose; M4) แมนโนเพนตะโอส (Mannopentaose; M5) และแมนโนเฮกซะโอส (Mannoheptaose; M6) โดย MOSs ที่พบมากที่สุดเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน ได้แก่ M3 และ M4 รองลงมาคือ M2, M5 และ M6 ตามลำดับ ซึ่งมีรายงานว่า แมนแนนจากกากมะพร้าวเมื่อผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส พบ M2 และ M3 เป็นหลัก (Hossain และคณะ, 1996; Jiang และคณะ, 2006; Chantorn และคณะ, 2013 และ Ghosh และคณะ, 2014) แสดงให้เห็นว่า ผลิตภัณฑ์กลุ่มโอลิโกกาแลคโตแมนแนน ที่เกิดขึ้น เพราะเอนไซม์มีสมบัติเป็น endo-mannanase เนื่องจาก สามารถเข้าไปทำลายพันธะ  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) แบบสุ่มในโครงสร้างของแมนแนนได้ (Ghosh และคณะ, 2014) ผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้นในการทดลองครั้งนี้ต่างจากที่มีรายงานกล่าวไว้ อาจเนื่องมาจาก สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ เบต้า-แมนนาเนส ส่งผลให้ความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยาแตกต่างกัน และเอนไซม์เอนไซม์ เบต้า-แมนนาเนส อาจสามารถ ไฮโดรไลซ์ M3 ไปเป็น M2 และ M4 ด้วยปฏิกิริยาทรานส์ไกลโคซิเลชัน (transglycosylation) (Puchart และคณะ, 2004).

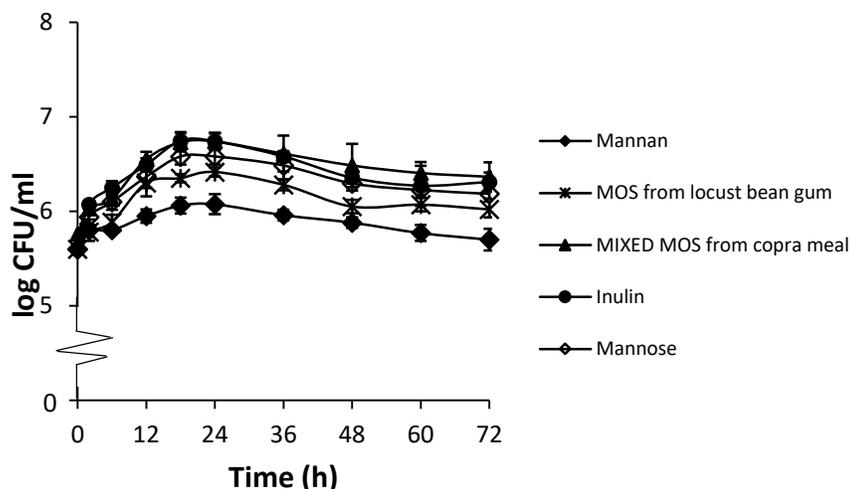
อย่างไรก็ตาม สภาวะการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ที่มี pH เท่ากับ 9 ไม่ปรากฏ ผลิตภัณฑ์กลุ่มโอลิโกกาแลคโตแมนแนน ขึ้น อาจเนื่องมาจาก เป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมกับเอนไซม์ใช้ในการทดลอง งานวิจัยครั้งนี้จากหัวข้อที่ 4.7 และ 4.8 จึงได้เลือกสภาวะในการผลิตโอลิโกกาแลคโตแมนแนนที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงที่สุด โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์น้อยที่สุด มาทดสอบในขั้นต่อไป

#### 4.9 ผลของโอลิโกกาแลคโตแมนแนนที่ผลิตได้จากสภาวะที่เหมาะสมต่อการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ และการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

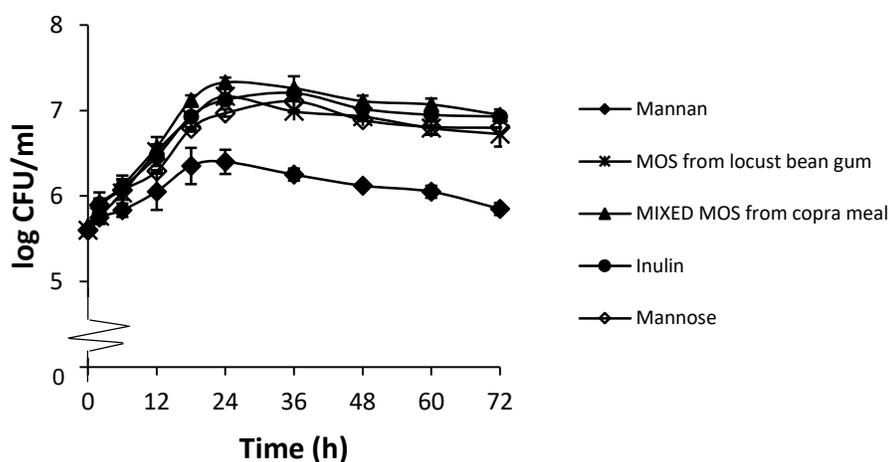
การส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ และการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแมนแนนที่ได้จากกากมะพร้าวเมื่อผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยใช้เอนไซม์ ด้วยสภาวะดังนี้ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 25 นาที ความเข้มข้นของสับสเตรต 4 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.6 ยูนิต

##### 4.9.1 ผลของโอลิโกกาแลคโตแมนแนนที่ผลิตได้จากสภาวะที่เหมาะสมต่อการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์

เมื่อนำแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากสภาวะที่เหมาะสมมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ปริมาณคิดเทียบเท่ากับน้ำตาลทั้งหมด 1 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับ น้ำตาลแมนโนส อินูลิน และ แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จาก โลกัสปิ้งกัม มาเลี้ยงร่วมกับจุลินทรีย์โพรไบโอติกส์ *Lactobacillus plantarum* NF3 และ *Lactobacillus plantarum* RS 54 โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดมีปริมาณเริ่มต้นเท่ากับ  $10^5$  CFUต่อมิลลิลิตร ทำการบ่มในสภาวะไร้อากาศ ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.11 และ 4.12



ภาพที่ 4.11 การเจริญของ *Lactobacillus plantarum* NF3 โดยออลิโกกาแลคโตแมนแนนจากกากมะพร้าวได้จากสภาวะการผลิตที่เหมาะสม



ภาพที่ 4.12 การเจริญของ *Lactobacillus plantarum* RS 54 โดยออลิโกกาแลคโตแมนแนนจากกากมะพร้าวได้จากสภาวะการผลิตที่เหมาะสม

เห็นได้ว่า แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากสภาวะที่เหมาะสม มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ ทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* NF3 และ *Lactobacillus plantarum* RS 54 ใกล้เคียงกับ แมนโนโอลิโกแซคคาไรด์จากโลคัสบีนแกม อินูลินและน้ำตาลแมนโนส โดยระยะเวลาการส่งเสริมการเจริญได้ดีที่สุดที่ 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับกับหัวข้อที่ 4.6 แต่มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์สูงกว่าเล็กน้อย คือ 6.7 และ 7.3 log CFUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า สภาวะในการผลิตออลิโกกา

แลคโตแมนแนนที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด อาจเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีในการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติกส์ใหม่ปริมาณมากขึ้น

#### 4.9.2 ผลของออลิโกกาแลคโตแมนแนนที่ผลิตได้จากสถานะที่เหมาะสมต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

เมื่อนำออลิโกกาแลคโตแมนแนนมาทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค คือ *Escherichia coli* O157:H7 และ *Staphylococcus aureus* พบว่า แบคทีเรียก่อโรคทั้ง 2 ชนิด สามารถใช้ออลิโกกาแลคโตแมนแนน เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.4

**ตารางที่ 4.4** การเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค *E.coli* และ *S.aureus* ที่มีออลิโกกาแลคโตแมนแนนเป็นแหล่งคาร์บอน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (log CFU/ml)			
	<i>E.coli</i>		<i>S.aureus</i>	
	ชุดควบคุม	ออลิโกกาแลคโตแมนแนน	ชุดควบคุม	ออลิโกกาแลคโตแมนแนน
0	5.03±0.07 <sup>d</sup>	5.03±0.07 <sup>e</sup>	5.51±0.11 <sup>c</sup>	5.51±0.11 <sup>d</sup>
6	7.07±0.16 <sup>b</sup>	5.95±0.15 <sup>c</sup>	6.08±0.11 <sup>b</sup>	6.11±0.10 <sup>b</sup>
12	7.97±0.06 <sup>a</sup>	5.75±0.07 <sup>d</sup>	7.48±0.16 <sup>a</sup>	7.07±0.11 <sup>a</sup>
24	8.11±0.08 <sup>a</sup>	7.11±0.09 <sup>a</sup>	7.64±0.15 <sup>a</sup>	7.10±0.10 <sup>a</sup>
48	5.29±0.18 <sup>c</sup>	6.47±0.15 <sup>b</sup>	6.07±0.11 <sup>b</sup>	6.29±0.26 <sup>b</sup>
72	5.14±0.06 <sup>c-d</sup>	5.19±0.10 <sup>e</sup>	5.91±0.10 <sup>b</sup>	5.83±0.21 <sup>c</sup>

หมายเหตุ ชุดควบคุม คือน้ำตาลแมนโนส

ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทดลอง 3 ซ้ำ

อักษร a-e ตามแนวคอลัมน์แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

12 ชั่วโมงแรก มีการเพิ่มขึ้นของจำนวนแบคทีเรียก่อโรค โดยจำนวนแบคทีเรียสูงสุด ของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด *E.coli* และ *S.aureus* เท่ากับ 7.11 และ 7.10 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีการเจริญสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม แต่จำนวนที่เพิ่มขึ้นมีจำนวนที่น้อยกว่าชุดควบคุมที่ใช้แมนโนสเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความสามารถการนำน้ำตาลไปใช้ โดยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวแบคทีเรียอาจสามารถนำไปใช้ได้ง่าย สะดวก เนื่องจากขนาดโมเลกุลของน้ำตาลเชิงเดี่ยวมีขนาดเล็ก กว่าโอลิโกแซคคาไรด์

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาสภาวะในการสกัดต่อปริมาณผลผลิตของแมนแนนจากกากมะพร้าว และความยาวของแมนแนนโดยเฉลี่ย โดยสภาวะในการสกัดที่ให้ปริมาณแมนแนนสูงที่สุดคือ โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และพีเอชเท่ากับ 5.0 และสภาวะในการสกัดที่ให้ความยาวของแมนแนนโดยเฉลี่ยยาวที่สุด คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่เวลา 30 ชั่วโมง และพีเอชเท่ากับ 5.0 ความสามารถในการละลายของแมนแนนจากกากมะพร้าว โดยแมนแนนที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่พีเอชเท่ากับ 8.0 มีความสามารถในการละลายสูงที่สุด

สารละลายแมนแนนจากกากมะพร้าวที่ผ่านการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสโดยใช้เอนไซม์เบต้า-แมนนาเนสจาก เชื้อแอสเพอร์จิลัส ไนเจอร์ นำไปคัดแยกขนาดของออลิโกกลาแลคโตแมนแนนโดยใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟี และตรวจสอบชนิดของออลิโกกลาแลคโตแมนแนนที่ได้ด้วยวิธีทินเลเยอร์โครมาโทกราฟี ซึ่งการคัดแยกขนาดสามารถจัดได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มี DP 2-3 และ 3-4 โดยผลิตภัณฑ์ที่ปรากฏมีดังนี้ แมนโนไบโอส แมนโนไตรโอส และแมนโนเตตระโอส

จากการศึกษาความสามารถในการทนย่อยใช้กรดในสภาวะจำลองของกระเพาะอาหาร ของแมนแนนแมนโนโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ยังไม่ผ่านการคัดแยก แมนโนโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผ่านการคัดแยกลำดับที่ 38-42 และแมนโนโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผ่านการคัดแยกลำดับที่ 45-48 โดย แมนโนโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ยังไม่ผ่านการคัดแยก มีเปอร์เซ็นต์การไฮโดรไลซิสสูงที่สุด ส่วนความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ *Lactobacillus plantarum* NF3 และ *Lactobacillus plantarum* RS 54 แมนโนโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ยังไม่ผ่านการคัดแยก มีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ได้สูงสุด

จากการศึกษาการผลิตออลิโกกลาแลคโตแมนแนน โดยใช้ RSM แบบ Box-Behnken Design (BBD) ทั้งหมด 46 ชุดการทดลอง โดยปัจจัยที่ศึกษามี 5 ปัจจัย ปัจจัยละ 3 ระดับ ประกอบด้วย ค่าความเป็นกรด-ด่าง (3, 6 และ 9), อุณหภูมิ (35, 55 และ 75 องศาเซลเซียส), ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา ( 5, 15 และ 25 นาที), ความเข้มข้นของสับสเตรต (1, 5.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์) และความเข้มข้นของเอนไซม์ (0.6, 0.9 และ 1.2 ยูนิต) โดยติดตามปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นในการวิเคราะห์ค่าการตอบสนองจากผลการทดลองสภาวะที่เหมาะสมที่ได้คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 25 นาที ความเข้มข้นของสับสเตรต 4 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.6 ยูนิต พบว่าได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด

เมื่อทำการเตรียมออลิโกกาแลคโตแมนแนน แล้วนำมาศึกษาการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ และการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค พบว่ามีความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกส์ได้ดีขึ้น อีกทั้งยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Escherichia coli* O157:H7 และ *Staphylococcus aureus* ได้อีกด้วย

## เอกสารอ้างอิง

- นิรัญญา บุญตัน. 2550. การคัดเลือกโปรไบโอติกส์จากสัตว์ทะเล และการใช้สารสกัดจากพืชหัวเป็นพรีไบโอติก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- โสภา บิลละโสย. 2551. การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติพรีไบโอติกของสารสกัดพืชตระกูลถั่ว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- Balasubramaniam, K. (1976). Polysaccharides of the kernel of maturing and matured coconuts. *Journal of Food Science*, 41(6), 1370-1373.
- Beneke, C. E., Viljoen, A. M., & Hamman, J. H. (2009). Polymeric plant-derived excipients in drug delivery. *Molecules*, 14(7), 2602-2620.
- Campbell, J. M., Fahey, G. C., & Wolf, B. W. (1997). Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *The Journal of nutrition*, 127(1), 130-136.
- Chantorn, S. T., Pongsapipatana, N., Keawsompong, S., Ingkakul, A., Haltrich, D., & Nitisinprasert, S. (2013). Characterization of mannanase S1 from *Klebsiella oxytoca* KUB-CW2-3 and its application in copra mannan hydrolysis. *ScienceAsia*, 39(3), 236-245.
- Chen, J., Liu, D., Shi, B., Wang, H., Cheng, Y., & Zhang, W. (2013). Optimization of hydrolysis conditions for the production of glucomanno-oligosaccharides from konjac using  $\beta$ -mannanase by response surface methodology. *Carbohydrate polymers*, 93(1), 81-88.
- Conway, P. L., Gorbach, S. L., & Goldin, B. R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of dairy science*, 70(1), 1-12.
- Cummings, J. H., & Englyst, H. N. (1995). Gastrointestinal effects of food carbohydrate. *The American journal of clinical nutrition*, 61(4), 938S-945S.
- Cuong, D. B., Dung, V. K., Hien, N. T. T., & Thu, D. T. (2013). Prebiotic evaluation of copra-derived manno-oligosaccharides in white-leg shrimps. *J. Aquac. Res. Development*, 4, 188.

- Dionísio, M., & Grenha, A. (2012). Locust bean gum: exploring its potential for biopharmaceutical applications. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 4(3), 175.
- Ghosh, A., Verma, A. K., Tingirikari, J. R., Shukla, R., & Goyal, A. (2015). Recovery and purification of oligosaccharides from copra meal by recombinant endo- $\beta$ -mannanase and deciphering molecular mechanism involved and its role as potent therapeutic agent. *Molecular biotechnology*, 57(2), 111-127.
- Gibson, G. R. 2004. Prebiotic. *J. Gastroenterol. Suppl.* 18: 287-298.
- Harmayani, E., Aprilia, V., & Marsono, Y. (2014). Characterization of glucomannan from *Amorphophallus oncophyllus* and its prebiotic activity in vivo. *Carbohydrate polymers*, 112, 475-479.
- Jian, H. L., Zhu, L. W., Zhang, W. M., Sun, D. F., & Jiang, J. X. (2013). Enzymatic production and characterization of manno-oligosaccharides from *Gleditsia sinensis* galactomannan gum. *International journal of biological macromolecules*, 55, 282-288.
- Jiang, Z., Wei, Y., Li, D., Li, L., Chai, P., & Kusakabe, I. (2006). High-level production, purification and characterization of a thermostable  $\beta$ -mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34. *Carbohydrate Polymers*, 66(1), 88-96.
- Kang, O. L., Ghani, M., Hassan, O., Rahmati, S., & Ramli, N. (2014). Novel agaro-oligosaccharide production through enzymatic hydrolysis: Physicochemical properties and antioxidant activities. *Food Hydrocolloids*, 42, 304-308.
- Kolida, S., Tuohy, K., & Gibson, G. R. (2002). Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87(S2), S193-S197.
- Kothari, D., Delattre, C. and Goyal A. (2015). Bioactive isomalto-oligosaccharides synthesized from *Leuconostoc Mesenteroides* NRRL B-1426 Dextranase with colon cancer cells inhibiting and functional food additive properties. *International Journal of Food and Nutrition Sciences*, 4, 37-46.

- Ku, Y., Jansen, O., Oles, C. J., Lazar, E. Z., & Rader, J. I. (2003). Precipitation of inulins and oligoglucoses by ethanol and other solvents. *Food Chemistry*, 81(1), 125-132.
- Kumprecht, I., & Zobac, P. (1997). The effect of mannan-oligosaccharides in feed mixtures on the performance of chicken broilers. *Zivocisna Vyroba*, 42(3), 117-124.
- Kwon, K., Park, K. H., & Rhee, K. C. (1996). Fractionation and characterization of proteins from coconut (*Cocos nucifera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(7), 1741-1745.
- Lopez, H. W., Coudray, C., Levrat-Verny, M. A., Coudray, F. C., Demigne, C. and Remesy, C. 2000. Fructooligosaccharides enhance mineral absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats. *J. Nutr. Biochem.* 11: 500-508.
- Lyons, T.P. (1994). Biotechnology in the feed industry. Proc. Alltech's 10th Am. Symp. Biotechnology in the feed industry, 1-50
- Manderson, K., Pinart, M., Tuohy, K. M., Grace, W. E., Hotchkiss, A. T., Widmer, W., ... & Rastall, R. A. (2005). In vitro determination of prebiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacturing by-product stream. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8383-8389.
- Manning, T.S. and Gibson, G.R. (2004). Microbial gut interactions in health and disease. Prebiotics. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 18, pp. 287-298.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Moerman, F. T., Van Leeuwen, M. B., & Delcour, J. A. (2004). Enrichment of higher molecular weight fractions in inulin. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(12), 3780-3783.
- Montgomery, D. C. (1991). Design and analysis of experiments.

- 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.
- Ohkusa, T., Ozaki, Y., Sato, C., Mikuni, K., & Ikeda, H. (1995). Long-Term Ingestion of Lactosucrose Increases Bifidobacterium sp. in Human Fecal Flora. *Digestion*, 56(5), 415-420.
- Park, G. G. (2008). Separation and identification of galactosylmanno-oligosaccharides from hydrolyzate of brown copra meal by trichoderma  $\beta$ -mannanase. *Journal of Applied Biological Chemistry*.
- Park, G. G., & Chang, H. G. (1992). Separation and preparation of galactosylmanno-oligosaccharides from copra galactomannan by mannanase from *Penicillium purpurogenum*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2(3), 204-208.
- Paseephol, T., Small, D., & Sherkat, F. (2007). Process optimisation for fractionating Jerusalem artichoke fructans with ethanol using response surface methodology. *Food Chemistry*, 104(1), 73-80.
- Ramesh, H. P., Yamaki, K., Ono, H., & Tsushida, T. (2001). Two-dimensional NMR spectroscopic studies of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) galactomannan without chemical fragmentation. *Carbohydrate polymers*, 45(1), 69-77.
- Rastall, R. A., & Gibson, G. R. (2002). Prebiotic oligosaccharides: evaluation of biological activities and potential future developments. *Probiotics and prebiotics: where are we going*, 1, 107-148.
- Reddy, B. S. (1998). Prevention of colon cancer by pre-and probiotics: evidence from laboratory studies. *The British journal of nutrition*, 80(4), S219-23.
- Rungrassamee, W., Kingcha, Y., Srimarut, Y., Maibunkaew, S., Karoonuthaisiri, N., & Visessanguan, W. (2014). Mannooligosaccharides from copra meal improves survival of the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after exposure to *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*, 434, 403-410.

- Saarela, M., Lahteenmaki, L., Crittenden, R., Salminen, S. and Mattila-Sandholm, T. 2002. Gut bacteria and health foods-theEuropean perspective. *Int. J. Food Microbiol.* 78: 99-117.
- Saittagaroon, S., Kawakishi, S., & Namiki, M. (1983). Characterisation of polysaccharides of copra meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 34(8), 855-860.
- Samarasinghe, K., Wenk, C., Silva, K. F. S. T., & Gunasekera, J. M. D. M. (2003). Turmeric (*Curcuma longa*) root powder and mannanoligosaccharides as alternatives to antibiotics in broiler chicken diets. *ASIAN AUSTRALASIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCES*, 16(10), 1495-1500.
- Scheppach, W., Bartram, H. P. and Richter, F. 1995. Role of short-chain fatty acids in the of colorectal cancer prevention. *Eur. J. Cancer.* 11: 1077-1080.
- Sharmada, N., Punja, A., Shetty, S. S., Shet, V. B., Goveas, L. C., & Rao, C. V. (2016). Optimization of pre-treatment of de-oiled oil seed cake for release of reducing sugars by response surface methodology. *Bioethanol*, 2(1).
- Soni, H., & Kango, N. (2013). Microbial mannanases: properties and applications. In *Advances in Enzyme Biotechnology* (pp. 41-56). Springer India.
- Takeda, N., Hirasawa, K., Uchimura, K., Nogi, Y., Hatada, Y., Usami, R., ... & Horikoshi, K. (2004). Purification and enzymatic properties of a highly alkaline mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain JAMB-750. *J Biol Macromol*, 4, 67-74.
- Touhy, K. M., Probert, H. M., Smejkal, C. W. and Gibson, G. R. 2003. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug. Discov. Today.* 8:692-700.
- Van Zyl, W. H., Rose, S. H., Trollope, K., & Görgens, J. F. (2010). Fungal  $\beta$ -mannanases: mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. *Process Biochemistry*, 45(8), 1203-1213.
- Wang, Y., Han, F., Hu, B., Li, J., & Yu, W. (2006). In vivo prebiotic properties of alginate oligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis of alginate. *Nutrition Research*, 26(11), 597-603.

- Whistler, R.L. and BeMiller, J.N. (1997). *Carbohydrate Chemistry for Food Scientists*. Eagan Press, St. Paul. Minnesota. 117-128.
- Wichienchot, S., Jatupornpipat, M. and Rastall, R. A. 2010. Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chem.* 120: 850-857.
- Yalegama, L. L. W. C., Karunaratne, D. N., Sivakanesan, R., & Jayasekara, C. (2013). Chemical and functional properties of fibre concentrates obtained from by-products of coconut kernel. *Food chemistry*, 141(1), 124-130.
- Yang, Y. I. N. G., Iji, P. A., Kocher, A., Thomson, E., Mikkelsen, L. L., & Choct, M. (2008). Effects of mannanoligosaccharide in broiler chicken diets on growth performance, energy utilisation, nutrient digestibility and intestinal microflora. *British poultry science*, 49(2), 186-194.
- Ziemer, C. J. and Gibson, G. R. 1998. An overview of probiotics prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *Int. Dairy J.* 8: 473-479.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

### การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดย DNS method จะใช้วิธีซึ่งรายงานโดย Miller (1959)

#### สารเคมี

1. กรด 3, 5-ไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-dinitrosalicylic acid)
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH)
3. โพแทสเซียม โซเดียมทาร์เทรท (Potassium sodium tartrate)
4. แมนโนส (Mannose)

#### การเตรียมสารเคมี

##### 1. Dinitrosalicylic reagent (DNS reagent)

ละลาย 3, 5- dinitrosalicylic acid 1 กรัมใน 2 N NaOH 20 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโพแทสเซียม โซเดียมทาร์เทรทลงไป 30 กรัม คนให้ละลาย ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

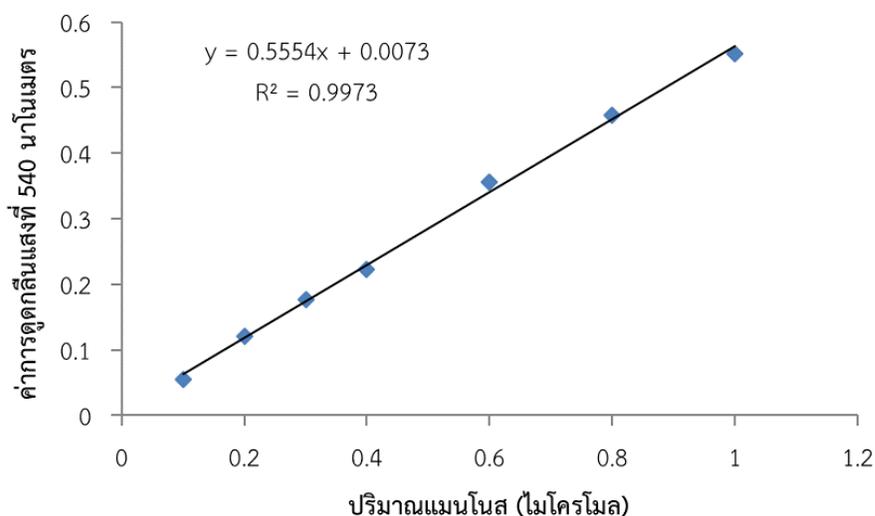
##### 2. สารละลายแมนโนสมาตรฐาน

เตรียมสารละลายแมนโนสที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง (MW = 180.2) โดยละลายแมนโนส 0.0901 กรัมในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1.0 กรัม/ลิตร

#### การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. บเปตสารละลายมาตรฐานแมนโนส 0.1-1.0 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1.0 กรัม/ลิตร) ลงในหลอดทดลองปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 มิลลิลิตร
2. เติม DNS reagents หลอดละ 1 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองแล้วเขย่าให้เข้ากัน
3. นำหลอดทดลองตั้งในอ่างน้ำเดือดนาน 3 นาที เมื่อครบเวลานำมาแช่ในน้ำเย็นทันที
4. เมื่อเย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้ว เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

6. บันทึกผลการทดลองและนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณแมนโนสในแต่ละความเข้มข้น จะได้กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส แสดงดังรูปที่ ก.1



รูปที่ ก.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแมนโนสและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

#### การวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. ปิเปตตัวอย่างสารสกัด 0.2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 0.8 มิลลิลิตรและเติม DNS reagent 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ปิดฝาหลอดทดลองแล้วเขย่าให้เข้ากัน
2. นำหลอดทดลองตั้งในอ่างน้ำเดือดนาน 3 นาที เมื่อครบเวลานำมาแช่ในน้ำเย็นทันที
3. เมื่อเย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้ว เติมน้ำกลั่นลงไปหลอดละ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่างโดยใช้กราฟมาตรฐาน

### การคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

สมการจากกราฟมาตรฐานของสารละลายแมนโนส

$$y = 0.5554x - 0.0073 ; R^2 = 0.9973$$

เมื่อ  $y$  = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

$x$  = ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ไมโครโมล/ 0.2 มิลลิลิตรสารละลายตัวอย่าง)

### ตัวอย่างการคำนวณ

สารละลายแมนแนน

ปริมาณสารละลายแมนแนน 0.2 มิลลิลิตร

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เท่ากับ 0.423

แทนค่าในสูตรจะได้

$$0.423 = 0.5554x - 0.0073$$

$$x = 0.775 \text{ ไมโครโมล} / 0.2 \text{ มิลลิลิตรของสารละลาย}$$

ตัวอย่างสารละลาย 0.2 มิลลิลิตร มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 0.775 ไมโครโมล

ตัวอย่างสารละลาย 1 มิลลิลิตร มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 3.875 ไมโครโมล/ มิลลิลิตร

แมนโนส 1 โมล เท่ากับ 180.2 กรัม

แมนโนส 1 ไมโครโมล เท่ากับ 180.2 ไมโครกรัม

แมนโนส 3.875 ไมโครโมล เท่ากับ 698.28 ไมโครกรัม

หรือคิดเป็น 0.698 มิลลิกรัม

ดังนั้น สารละลายแมนแนน มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 0.698 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

## ภาคผนวก ข

### การวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด

การวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดโดย Phenol-Sulfuric method จะใช้วิธีซึ่งรายงานโดย Dubois และคณะ (1956)

#### สารเคมี

1. ฟีนอล (Phenol)
2. กรดซัลฟูริกเข้มข้น (Sulfuric acid,  $H_2SO_4$ )
3. แมนโนส (Mannose)

#### การเตรียมสารเคมี

1. ฟีนอลเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

ละลาย ฟีนอล 5 กรัม ด้วยน้ำกลั่น คนให้ละลาย ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

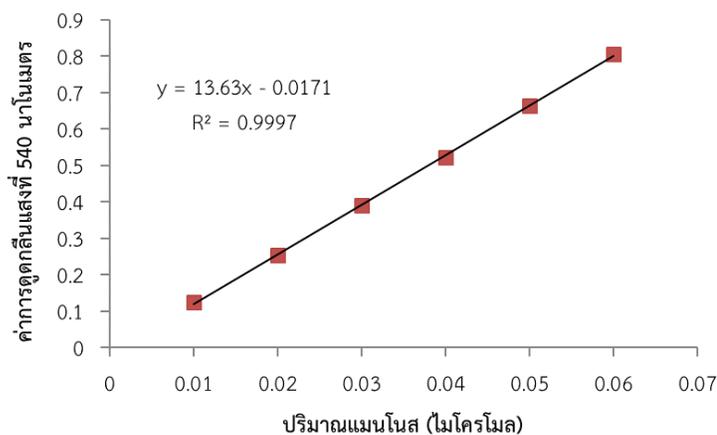
2. สารละลายแมนโนสมาตรฐาน

เตรียมสารละลายแมนโนสที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ( $MW = 180.2$ ) โดยละลายแมนโนส 0.0901 กรัมในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ได้สารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1.0 กรัม/ลิตร

#### การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. ปเปตสารละลายมาตรฐานแมนโนส 0.1-1.0 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1.0 กรัม/ลิตร) ลงในหลอดทดลองปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายฟีนอล หลอดละ 1 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองแล้วเขย่าให้เข้ากัน
3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น หลอดละ 5 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองแล้วเขย่าให้เข้ากัน
4. วางทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำเย็น
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

6. บันทึกผลการทดลองและนำค่าที่ได้มาเขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณแมนโนส ในแต่ละความเข้มข้น จะได้กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส แสดงดังรูปที่ ข.1



รูปที่ ข.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณแมนโนสและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

#### การวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. ปเปตตัวอย่างสารสกัด 0.1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 0.9 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายฟีนอล หลอดละ 1 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองแล้วเขย่าให้เข้ากัน
3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น หลอดละ 5 มิลลิลิตร ปิดฝาหลอดทดลองแล้วเขย่าให้เข้ากัน
4. วางทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นนำมาเชในน้ำเย็น
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 492 นาโนเมตร

#### การคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

สมการจากกราฟมาตรฐานของสารละลายแมนโนส

$$y = 13.63x - 0.0171 ; R^2 = 0.9997$$

เมื่อ  $y$  = ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร

$x$  = ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ไมโครโมล/ 1 มิลลิลิตรสารละลายตัวอย่าง)

## ตัวอย่างการคำนวณ

สารละลายแมนแนน

ปริมาณสารละลายแมนแนน 1 มิลลิลิตร

ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร เท่ากับ 0.514

แทนค่าในสูตรจะได้

$$0.514 = 13.63x - 0.0171$$

$$x = 0.028 \text{ ไมโครโมล} / 0.1 \text{ มิลลิลิตรของสารละลาย}$$

ตัวอย่างสารละลาย 0.1 มิลลิลิตร มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 0.039 ไมโครโมล

ตัวอย่างสารละลาย 1 มิลลิลิตร มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 0.39 ไมโครโมล

แมนโนส 1 โมล เท่ากับ 180.2 กรัม

แมนโนส 1 ไมโครโมล เท่ากับ 180.2 ไมโครกรัม

แมนโนส 0.39 ไมโครโมล เท่ากับ 70.28 ไมโครกรัม

หรือคิดเป็น 0.070 มิลลิกรัม

ดังนั้น สารละลายแมนแนน มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 0.070 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร