



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การผลิตโอลิโกแซคคาไรด์จากเฮมิเซลลูโลสที่ละลาย
ในน้ำและในอัลคาไลจากวัสดุพลอยได้ในการผลิตข้าวโดยวิธีการทาง
เอนไซม์ร่วมกับไมโครเวฟ และประสิทธิภาพต่อแบคทีเรียโพรไบโอติก
ภายใต้สภาวะจำลองระบบย่อยอาหาร

**Production of water-soluble and alkali-soluble hemicelluloses-
derived oligosaccharides from rice production residues by
microwave-assisted enzymatic hydrolysis and their effects on
behaviors of probiotic bacteria under simulated gastrointestinal
conditions**

โดย นางวรรณพร คลังเพชร อุเอโนะ และคณะ

พฤษภาคม 2563

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การผลิตโอลิโกแซคคาไรด์จากเฮมิเซลลูโลสที่ละลายใน
น้ำและในอัลคาไลจากวัสดุพลอยได้ในการผลิตข้าวโดยวิธีการทาง
เอนไซม์ร่วมกับไมโครเวฟ และประสิทธิภาพต่อแบคทีเรียโพรไบโอติก
ภายใต้สภาวะจำลองระบบย่อยอาหาร

**Production of water-soluble and alkali-soluble hemicelluloses-
derived oligosaccharides from rice production residues by
microwave-assisted enzymatic hydrolysis and their effects on
behaviors of probiotic bacteria under simulated gastrointestinal
conditions**

คณะผู้วิจัย

นางวรรณพร คลังเพชร อุเอโนะ

สังกัด

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้จะสำเร็จลงด้วยดีไม่ได้หากไม่ได้รับความอนุเคราะห์และความร่วมมือจากหลาย ๆ ภาควิชา ฝ่าย ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ผู้สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย โครงการพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ ปี พ.ศ. 2561 และขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.อดิสร เสวตวิวัฒน์ นักวิจัยที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำแนะนำในการทำงานวิจัย และช่วยตรวจทานผลงานด้วยดีเสมอมา นอกจากนี้ยังขอขอบพระคุณภาควิชาอุตสาหกรรม เกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการใช้อาคารสถานที่ วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือต่าง ๆ

ผู้วิจัย

นางวรรณพร คลังเพชร อุเอโนะ

พฤษภาคม 2563

บทคัดย่อ

แกลบและฟางข้าวเป็นวัสดุพลอยได้ที่มีปริมาณมหาศาลจากอุตสาหกรรม ผลิตข้าว โดยอุดมไปด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสของแกลบและฟางประกอบไปด้วยอะราบินโนไซแลน (AX) งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของกระบวนการไมโครเวฟในการปรับสภาพวัสดุชีวมวลทั้งสองเพื่อการสกัด AX เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต ไฮโดรอลิโกแซคคาไรด์ (XOS) โดยกระบวนการทางเอนไซม์ วัสดุชีวมวลที่ได้สกัดสารที่ไม่เกี่ยวข้องอื่น ๆ ออกไปแล้ว ได้ถูกนำมาเข้าสู่กระบวนการไมโครเวฟ โดยศึกษาสภาวะของอุณหภูมิที่ 140-180°C เป็นระยะเวลา 5-15 นาที จากนั้นจึงนำไปสกัด AX โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 4% พบว่า เมื่อให้ความร้อนด้วยกระบวนการไมโครเวฟที่ 180°C เวลา 15 นาที สำหรับแกลบ และ 160°C เวลา 10 นาที สำหรับฟาง ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตของ AX รวมถึงปริมาณน้ำตาลไซโลสและอะราบินโนสซึ่งเป็นองค์ประกอบใน AX ด้วย จากนั้นเมื่อนำ AX ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิต XOS โดยบ่มร่วมกับเอนไซม์ไซลานเนสทางการค้าชนิด Pentopan mono BG (BG) และ Ultraflo Max (UM) ที่สภาวะความเข้มข้นเอนไซม์ 50-300 U/g AX อุณหภูมิ 50°C ค่า pH 6.0 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ผล HPAEC แสดงให้เห็นว่าแกลบที่บ่มร่วมกับ UM สามารถให้ผลผลิตน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีไซโลไบโอส และไซโลไตรโอส เป็นองค์ประกอบหลัก ที่ปริมาณ 2205.2 และ 1288.4 ppm ตามลำดับ รวมถึงพบไซโลเตตระโอส ไซโลเพนทาโอส ไซโลเฮกซะโอส และอะราบินโนไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ รวมอยู่ด้วย (RH-XOS) ทั้งนี้เมื่อนำ RH-XOS ไปทดสอบการเป็นพรีไบโอติกสำหรับจุลินทรีย์แลคโตบาซิลไล และไบฟิโดแบคทีเรีย พบว่ามีดัชนีพรีไบโอติกเทียบเท่าหรือสูงกว่า XOS ทางการค้า และจุลินทรีย์กลุ่มนี้ยังสามารถผลิตกรดไขมันสายสั้นได้ในปริมาณที่โดดเด่น นอกจากนี้ยังพบว่า RH-XOS ที่มีความสามารถในการต้านทานต่อการย่อยในสภาวะจำลองการย่อยอาหารได้ถึงกว่า 90% ซึ่งแสดงถึงศักยภาพการเป็นพรีไบโอติกของผลิตภัณฑ์

คำสำคัญ: แกลบ เฮมิเซลลูโลส กระบวนการไมโครเวฟ โอลิโกแซคคาไรด์ พรีไบโอติก

Abstract

Rice husk and rice straw are by-products from rice production process. They were rich in cellulose, hemicellulose and lignin. Their hemicellulose mainly composes of arabinoxylan (AX). This research aimed to investigate the potential of microwave-pretreatment in AX extraction from both rice husk and rice straw and use the AX as a substrate to produce xylooligosaccharides (XOS) by enzymatic hydrolysis. The extractive-free biomass was pretreated by microwave process at 140-180°C for 5-15 min then the AX was extracted with 4% sodium hydroxide. For rice husk and rice straw, using microwave at 180°C for 15 min and 160°C for 10 min, respectively increased AX yield as well as xylose and arabinose content in the AX. The purified AX was then used as a substrate for XOS production by two commercial xylanases of Pentopan mono BG and Ultraflo Max, at the enzyme concentration of 50-300 U/g AX (50°C, pH 6.0) for 24 h. HPAEC results revealed the ability of Ultraflo Max incubated with rice husk to give xylobiose and xylotriose as main oligosaccharides for 2205.2 and 1288.4 ppm, respectively with xylo-tetraose xylo-pentaose xylo-hexaose and some AXOSs (RH-XOS). In addition, the RH-XOS highly exhibited Prebiotic Index for *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. which are proved to produce short chain fatty acids. Furthermore, the RH-XOS resisted to the simulated gastrointestinal condition for more than 90% proving prebiotic potentials.

Keywords: Rice husk, Microwave treatment, Oligosaccharide, Prebiotic

Executive Summary

งานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของวัสดุพลอยได้จากการผลิตข้าวที่มีปริมาณมหาศาลในประเทศไทย ได้แก่ แกลบ และฟางข้าว ในการเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิต สารพรีไบโอติกซึ่งมีมูลค่าสูง โดยพบว่า กระบวนการไมโครเวฟร่วมกับเอนไซม์ สามารถทำให้ได้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีความหลากหลาย และผลิตภัณฑ์ที่ดียังสามารถส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. ได้อย่างโดดเด่น โดยมีดัชนีพรีไบโอติกสูงกว่า XOS ทางการค้า โดยสามารถทำให้เชื้อทั้งสองกลุ่มผลิตกรดไขมันสายสั้นได้อย่างโดดเด่น นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ดียังมีความต้านทานต่อการย่อยในสภาวะในกระเพาะอาหารและในลำไส้เล็กถึงกว่า 90% ซึ่งพิสูจน์ให้เห็นถึงศักยภาพการเป็นพรีไบโอติกของผลิตภัณฑ์

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
บทคัดย่อ	2
Abstract	3
Executive Summary	4
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	9
วัตถุประสงค์ของโครงการ	11
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	12
วิธีดำเนินงานวิจัย	45
ผลการวิจัย	57
สรุปผลการวิจัย	80
เอกสารอ้างอิง	81
ภาคผนวก	90

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพ 1	สิบอันดับประเทศผู้ผลิตข้าวทั่วโลกในปี 2012	12
ภาพ 2	สิบอันดับประเทศผู้ส่งออกข้าวทั่วโลกในปี 2012	13
ภาพ 3	การผลิตข้าวและการใช้ประโยชน์จากข้าวปี 2005-2014	14
ภาพ 4	ลักษณะโครงสร้างของเมล็ดข้าว	15
ภาพ 5	องค์ประกอบของใยอาหารและสารที่เกี่ยวข้องที่พบในพืช	20
ภาพ 6	โครงสร้างเซลลูโลส	22
ภาพ 7	โครงสร้างเฮมิเซลลูโลส	22
ภาพ 8	โครงสร้างอะราบินโนไซแลน	23
ภาพ 9	โครงสร้าง XOS	24
ภาพ 10	โครงสร้าง AXOS	26
ภาพ 11	ประโยชน์ของพรีไบโอติกต่อระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย	28
ภาพ 12	ผลการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์พืชในขั้นตอนการปรับสภาพ	30
ภาพ 13	หลักการทำงานของคลื่นไมโครเวฟ	32
ภาพ 14	ตัวอย่างวิธีการผลิต XOS ที่นิยมในใช้ในปัจจุบัน	34
ภาพ 15	การผลิตโอลิโกแซคคาไรด์จากผนังเซลล์พืชโดยวิธีการทางเคมี ควบคู่เอนไซม์	35
ภาพ 16	การผลิต AXOS และ XOS โดย endoxylanase, arabinofuranosidase และ xylosidase	36
ภาพ 17	จนวนพลศาสตร์ของเอนไซม์ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน	39
ภาพ 18	ตำแหน่งการแต้มนสาร ระดับตัวทำละลาย solvent front ในการ ทำ TLC	43
ภาพ 19	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในแกลบ (A) และ ฟางข้าว (B) ที่ผ่านการ ปรับสภาพด้วยไมโครเวฟที่ 140-180°C เป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที	63
ภาพ 20	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในแกลบ (A) และ ฟางข้าว (B) ที่ผ่านการ ปรับสภาพด้วยไมโครเวฟที่ 140-180°C เป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที	64
ภาพ 21	ร้อยละปริมาณผลผลิตของอะราบินโนไซแลนจากแกลบ (A) และ ฟางข้าว (B) ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยไมโครเวฟที่ 180°C เป็น ระยะเวลา 5, 10 และ 15 นาที	22
ภาพ 22	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใน crude oligosaccharide จาก A-RHH (A) และ A-RSH (B) ที่ผลิตโดยเอนไซม์ Pentopan Mono BG และ Ultraflo Max ที่ความเข้มข้น 50 U/g เป็นเวลา 0 4 8 12 และ 24 ชั่วโมง	67

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพ 23	68
TLC Chromatogram ของ crude oligosaccharide จาก A-RHH ที่ผลิตโดยเอนไซม์ Pentopan Mono BG และ Ultraflo Max ที่ความเข้มข้น 50 U/g เป็นเวลา 0 4 8 12 และ 24 ชั่วโมง	
ภาพ 24	68
TLC Chromatogram ของ crude oligosaccharide จาก A-RSH ที่ผลิตโดยเอนไซม์ Pentopan Mono BG และ Ultraflo Max ที่ความเข้มข้น 50 U/g เป็นเวลา 0 4 8 12 และ 24 ชั่วโมง	
ภาพ 25	69
ผลการศึกษาความเข้มข้นเอนไซม์ Pentopan Mono BG ที่ 50-300 U/g ของแกลบต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวิส์	
ภาพ 26	69
ผลการศึกษาความเข้มข้นเอนไซม์ Ultraflo Max ที่ 50-300 U/g ของแกลบต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวิส์	
ภาพ 27	70
TLC Chromatogram ของ RH-XOS ที่ผลิตจากเอนไซม์ Pentopan Mono BG และ Ultraflo Max ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวิส์ที่ความเข้มข้น 50 U/g เป็นเวลา 0 4 8 12 และ 24 ชั่วโมง	
ภาพ 28	72
HPAEC Chromatogram ของ RH-XOS ที่ผลิตโดยเอนไซม์ Pentopan Mono BG ที่ความเข้มข้น 150 U/g เป็นเวลา 12 ชั่วโมง	
ภาพ 29	74
HPAEC Chromatogram ของ RH-XOS ที่ผลิตโดยเอนไซม์ Ultraflo Max ที่ความเข้มข้น 50 U/g เป็นเวลา 8 ชั่วโมง	
ภาพ 30	75
ผลของ RH-XOS ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของ <i>L. brevis</i> เปรียบเทียบกับไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้า (XOS) และ กลูโคส (Glu)	
ภาพ 31	79
ร้อยละการทนต่อการย่อยของ RH-XOS	

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 ปริมาณร้อยละองค์ประกอบทางเคมีของข้าวเต็มเมล็ด ข้าว กล้อง และข้าวสาร	15
ตาราง 2 ร้อยละองค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ใน วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	20
ตาราง 3 กลุ่มเชื้อโพรไบโอติกที่สามารถใช้น้ำตาลเพนโทสเป็นแหล่ง คาร์บอน	26
ตาราง 4 พรีไบโอติกที่ถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร	28
ตาราง 5 ร้อยละปริมาณ xylan และ XOS จากวัสดุเหลือทิ้งทาง การเกษตรที่ถูกนำมาใช้สกัด xylan และผลิต XOS โดยการใช้ ต่างและเอนไซม์	32
ตาราง 6 เอนไซม์ที่ใช้ผลิต AXOS	36
ตาราง 7 วิธีการทำ XOS ให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคต่าง ๆ	40
ตาราง 8 เอนไซม์เอนโดไซแลนเนสทางการค้าและกิจกรรมของเอนไซม์	52
ตาราง 9 องค์ประกอบของแกลบและฟางข้าว	56
ตาราง 10 ปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและอะราบินโนสแลนของตัวอย่างที่ ผ่านการกำจัดสารแทรก	57
ตาราง 11 ผลของการปรับสภาพแกลบด้วยไมโครเวฟต่อปริมาณน้ำตาล โมเลกุลเดี่ยวและอะราบินโนสแลน	59
ตาราง 12 ผลของการปรับสภาพฟางข้าวด้วยไมโครเวฟต่อปริมาณน้ำตาล โมเลกุลเดี่ยวและอะราบินโนสแลน	60
ตาราง 13 ปริมาณของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ประกอบอยู่ในผลิตภัณฑ์ RH- XOS ที่ผลิตโดยเอนไซม์ Pentopan Mono BG ที่สภาวะต่าง ๆ	71
ตาราง 14 ปริมาณของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ประกอบอยู่ในผลิตภัณฑ์ RH- XOS ที่ผลิตโดยเอนไซม์ Ultraflo MAX ที่สภาวะต่าง ๆ	73
ตาราง 15 ดัชนีพรีไบโอติกต่อเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกของ RS-XOS เปรียบเทียบกับ XOS ทางการค้า (com-XOS)	76
ตาราง 16 ปริมาณกรดไขมันสายสั้นที่แบคทีเรียกรดแลกติกผลิตจากการ บ่มร่วมกับ RS-XOS เปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ	77

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

จากปัญหามลภาวะทางสิ่งแวดล้อมที่ทวีความรุนแรงขึ้นในปัจจุบันและนโยบายของรัฐบาลที่ส่งเสริมการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับวัสดุเหลือทิ้งในการเกษตรและอุตสาหกรรม ส่งผลให้เกิดแรงผลักดันในการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้ง ของเสีย และผลผลิตพลอยได้จากภาคเกษตรและอุตสาหกรรมอย่างต่อเนื่อง ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการบริโภคข้าวเป็นอาหารหลัก ดังนั้นผลพลอยได้จากการผลิตข้าวเช่น ฟางและแกลบซึ่งพบว่ามีปริมาณถึงกว่า 1 ใน 3 ของการผลิตข้าวทั้งหมด โดยส่วนใหญ่แล้วแกลบถูกนำไปเป็นเชื้อเพลิง ผลิตปุ๋ย หรือในอุตสาหกรรมการก่อสร้าง ส่วนฟางข้าวถูกนำไปใช้ประโยชน์ในการเป็นอาหารสัตว์ ทำปุ๋ยหมักหรือถูกเผาทิ้งในแปลงนาโดยเปล่าประโยชน์ (ภาพที่ 2) ซึ่งโดยทั่วไปราคาขายของแกลบและฟางข้าวถูกจำหน่ายในราคาประมาณ 3,000 และ 1,000 บาท/ตัน ตามลำดับ ซึ่งเป็นมูลค่าที่น้อยมาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เล็งเห็นประโยชน์ในการเพิ่มมูลค่า ของแกลบและฟางข้าว องค์ประกอบผนังเซลล์ส่วนใหญ่ของฟางข้าวและแกลบเป็นเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) 9.6 และ 27 % ตามลำดับ โดยเฮมิเซลลูโลสเป็นคาร์โบไฮเดรตประเภท Polysaccharide ที่ประกอบไปด้วยน้ำตาลหลายชนิด ซึ่งมีน้ำตาล Xylose ต่อด้วยพันธะ Glycosidicbond ที่ตำแหน่ง B-1,4 เป็นสายหลัก (ภาพที่ 3) และเมื่อน้ำตาลประเภทอื่นมาต่อเป็นกิ่งแขนงกับสายหลักจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชื่อไปตามน้ำตาลที่เกาะ เช่น Arabinoxylan หรือ Mannan ซึ่งจัดเป็นใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ (Insoluble fiber) ไม่สามารถถูกย่อยหรือถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ (นิธิยา และ พิมพ์เพ็ญ , 2562) แต่จะถูกย่อยด้วยโพรไบโอติก (Probiotic) ที่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ใหญ่ โดยมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกในการส่งเสริมการเจริญเติบโตและการกระตุ้นการทำงานของโพรไบโอติกโดยพรีไบโอติกจัดเป็นอาหารประเภท Functional food (สุนันทา ทองทา, 2557) ในการแยกเฮมิเซลลูโลสออกมาได้นั้น จำเป็นต้องทำการคลายโครงสร้างที่ยึดเกาะกันอย่างหนาแน่นของผนังเซลล์ โดยเข้ากระบวนการปรับสภาพ กระบวนการปรับสภาพจะเป็นกระบวนการที่จะไปเปลี่ยนแปลงชีวมวลของลิกโนเซลลูโลส ทำให้โครงสร้างของชีวมวลเปลี่ยนแปลงเพื่อง่ายต่อการเข้าทำปฏิกิริยาของสารที่ใช้ในการผลิตและช่วยเพิ่มผลผลิตของน้ำตาลที่ต้องการได้ มีการใช้วิธีการสกัดหลายวิธีการปรับสภาพ ในการสกัดแบบดั้งเดิมนั้นจะมีข้อดีและข้อเสียที่แตกต่างกันยกตัวอย่าง เช่น วิธีการหมักโดยใช้ตัวทำละลายไหลผ่านตัวอย่าง โดยเป็นการสกัดที่ไม่ใช้ความร้อน จึงลดการสูญเสียสารสำคัญ แต่มีข้อเสียคือสิ้นเปลืองตัวทำละลายและใช้ระยะเวลาค่อนข้างนานในการสกัด (Handa, 2008 และ Azwanida, 2005) ส่วนการใช้ความร้อนเป็นการสกัดที่อุณหภูมิสูงและระยะเวลานาน ซึ่งอาจทำให้เกิดการสูญเสียสารสำคัญและอาจจะทำให้ กิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในปริมาณมาก วิธีการทำปฏิกิริยาด้วยการใช้ด่าง เป็นการกำจัดลิกนินออกจากโครงสร้างชีวมวล แต่ต้องทำการปรับ pH ให้เป็นกลางหลังจากทำการปรับสภาพเพื่อไม่ให้รบกวนกระบวนการสกัดขั้นต่อไป และวิธีการปรับสภาพด้วยจุลินทรีย์เป็นวิธีที่ใช้พลังงานน้อย ไม่มีการปนเปื้อนจากสารเคมี แต่จะต้องใช้เวลานานในการย่อยสลาย ซึ่งการสกัดด้วยคลื่นไมโครเวฟจะสามารถช่วยหลีกเลี่ยงข้อเสียเหล่านั้นเนื่องจากเป็นวิธีที่มีความสะดวกรวดเร็ว สามารถลดช่วงระยะเวลา และลดปริมาณการใช้ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดได้

และเพื่อให้ได้โอลิโกแซคคาไรด์จึงต้องใช้เอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงมาช่วยเสริมในขั้นตอนการสกัด โดยเอนโดไซลานเนส (Endoxylanase) สามารถย่อยสลาย xylan ที่ไม่ละลายน้ำซึ่งมีโซ่กิ่งต่ำ โดยเอนโดไซลานเนสที่ยึดเกาะและหลุดออกอย่างจำเพาะกับ xylan ที่ไม่ละลายน้ำ จะได้ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีขนาด 2-10 โมเลกุล เป็นผลิตภัณฑ์ (ภัทรฯ ผาสนอน , 2548) ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่สกัดได้จะมีคุณสมบัติในการเป็นพรีไบโอติก (Prebiotic) ซึ่ง Lactic acid bacteria สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้

พรีไบโอติก เป็นกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและมีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์แล ะสัตว์ โดยพรีไบโอติกจะทำหน้าที่ช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย โดยเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ให้มากขึ้น โดยจุลินทรีย์พรีไบโอติกหลั่งสารออกมาต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่นและไปแย่งพื้นที่ไม่ให้จุลินทรีย์ก่อโรคเจริญและทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคไม่สามารถเกาะติดกับลำไส้ และถูกขับออกทางอุจจาระ เชื้อจุลินทรีย์ที่จัดเป็นพรีไบโอติก เช่น Lactic acid bacteria (LAB) และ Bifidobacteria และพรีไบโอติกเป็นส่วนของอาหารที่ไม่ถูกย่อยหรือถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มพรีไบโอติกในบริเวณลำไส้ใหญ่ ปกติแล้วพรีไบโอติกและพรีไบโอติกจะทำงานร่วมกัน นอกจากนี้พรีไบโอติกและพรีไบโอติกยังมีประโยชน์ต่อสุขภาพหลายประการ เช่น ช่วยบรรเทาอาการท้องผูก ป้องกันการเกิดอาการท้องเสีย ท้องเดิน ช่วยเผาผลาญไขมัน เพิ่มการดูดซึมของแคลเซียม ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดและป้องกันมะเร็งลำไส้ เป็นต้น

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาสถานะที่เหมาะสมของการใช้กระบวนการไมโครเวฟร่วมกับเอนไซม์ในการผลิตโอลิโกแซคคาไรด์จากเกล็ดและฟางข้าว และทดสอบศักยภาพการเป็นพรีไบโอติกของผลิตภัณฑ์

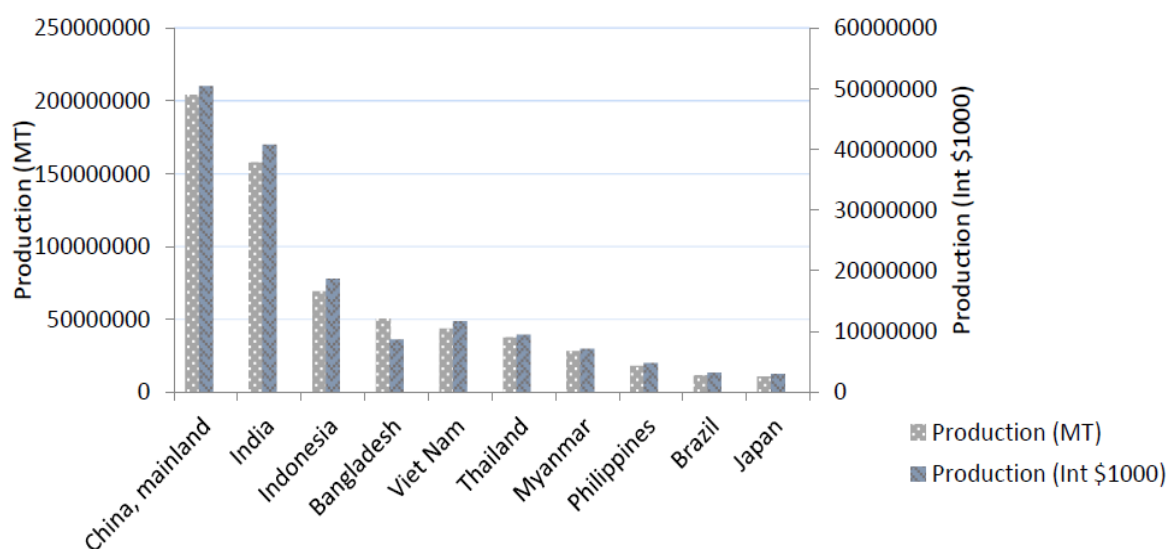
วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของกระบวนการไมโครเวฟต่อการสกัดเฮมิเซลลูโลสจากแกลบและฟางข้าว
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยเฮมิเซลลูโลสจากแกลบและฟางข้าวโดยเอนไซม์เอนโดไซลานเนสทางการค้า
3. เพื่อศึกษาศักยภาพการเป็นพรีไบโอติกของผลิตภัณฑ์โอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

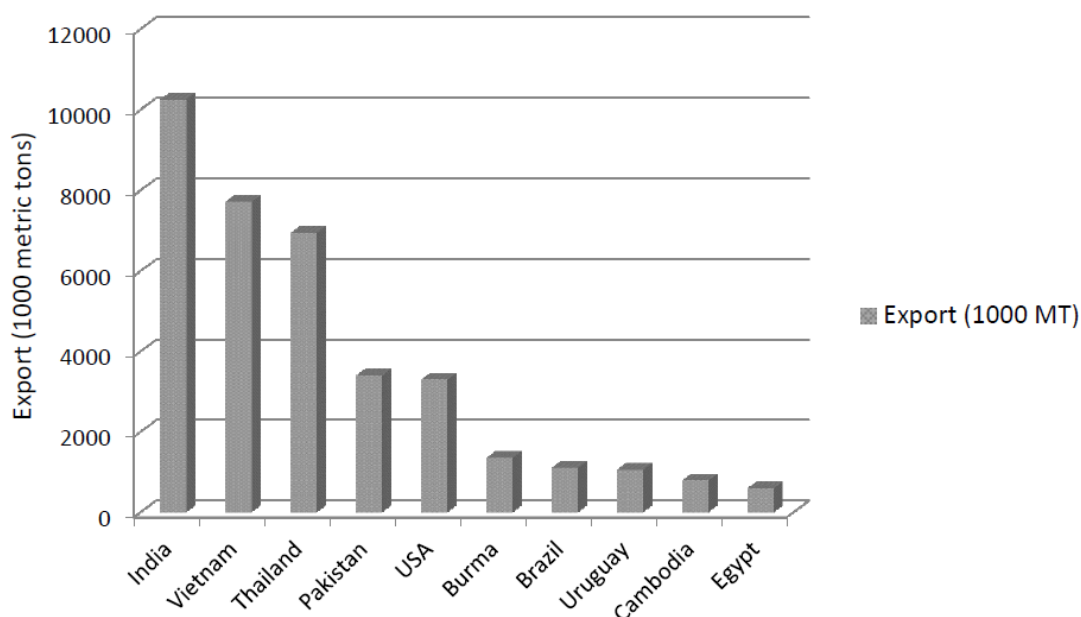
1. การผลิตและการบริโภคข้าว

ผลผลิตทางการเกษตรประจำปี 2012 ข้าวจัดว่าเป็นพืชที่มีการเพาะปลูกเป็นอันดับสองของโลก รองจากข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ซึ่งมีมากกว่า 738 ล้านเมตริกตัน ข้าวยังนับว่าเป็นอาหารหลักสำหรับประชากรโลก มากกว่าครึ่งหนึ่งและประมาณ 90% ของข้าวในโลกมีการผลิตและการบริโภคในเอเชีย โดยมีประเทศจีนเป็นผู้ผลิตรายใหญ่ที่สุดและมีผลผลิตเกือบ 205 ล้านเมตริกตัน ตามด้วยอินเดียที่มีผลผลิต 158 ล้านเมตริกตัน อินโดนีเซีย 69 ล้านเมตริกตัน บังกลาเทศ 51 ล้านเมตริกตัน และเวียดนาม 44 ล้านเมตริกตัน โดยประเทศไทยจัดอยู่ในอันดับที่ 6 ของผู้ผลิตข้าว (FAO Statistical Yearbook, 2012) อย่างไรก็ตามในแง่ของปริมาณการส่งออก พบว่าประเทศอินเดีย เวียดนาม และไทย มีการส่งออกข้าวสูงสุดถึง 10.3 ล้านเมตริกตัน 7.7 ล้านเมตริกตัน และ 6.9 ล้านเมตริกตัน ตามลำดับ (ภาพ 1 และ 2)



ภาพ 1 ลิบอันดับประเทศผู้ผลิตข้าวทั่วโลกในปี 2012

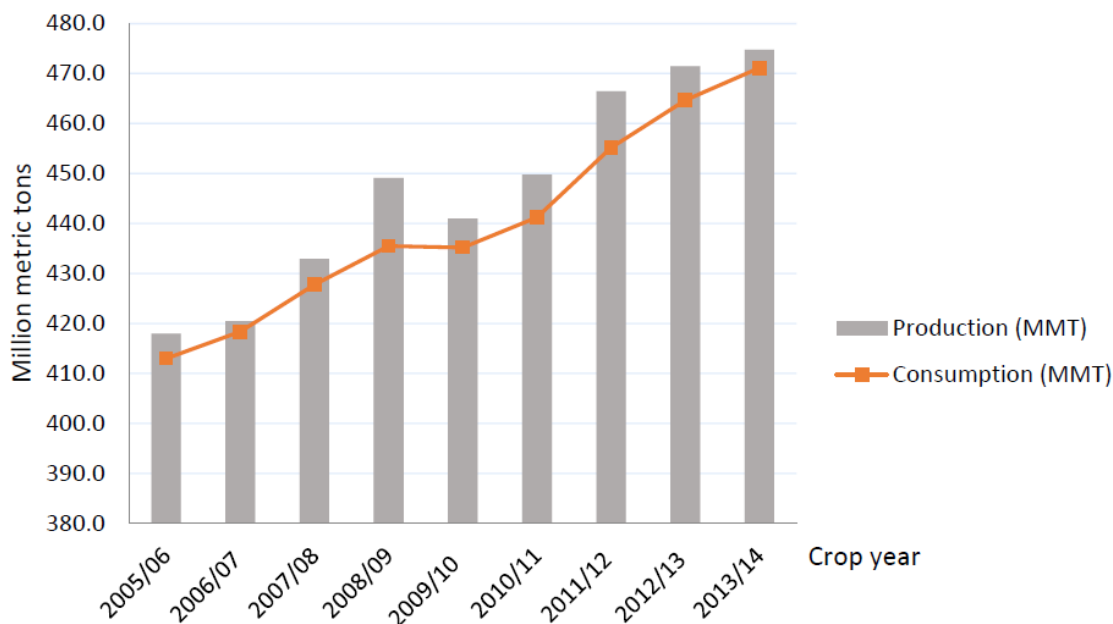
ที่มา: FAO Statistical Yearbook 2012



ภาพ 2 สิบอันดับประเทศผู้ส่งออกข้าวทั่วโลกในปี 2012

ที่มา: USDA Rice Yearbook, 2014 http://www.ers.usda.gov/data-products/rice-yearbook-2014.aspx#.U_0qzvldWSo

ตัวเลขแสดงปริมาณการผลิตข้าวและการใช้ประโยชน์จากข้าวของโลกถูกบันทึกไว้ในปี 2005-2014 โดย USDA (the United States Department of Agriculture) ดังแสดงไว้ในภาพ 3 จะเห็นได้ว่า หลายปีที่ผ่านมาการผลิตและการบริโภคข้าวมีเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศที่กำลังพัฒนาและประเทศในแถบเอเชีย พบว่ามีประชากรที่บริโภคข้าวเป็นอาหารหลักเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง มีรายงานจากองค์การด้านอาหารและเกษตรของสหรัฐอเมริกาว่าข้าวเป็นแหล่งพลังงานหลักของประชากรมากกว่าครึ่งหนึ่งของโลก ในประเทศไทยจัดข้าวอยู่ในอาหารหลักหมู่ที่ 2 ที่ให้สารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) นอกจากนี้ยังมีพวกวิตามินและแร่ธาตุ ยังมีหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่อ้างว่าข้าวที่ไม่ได้ผ่านการขัดสี (ข้าวกล้อง) มีประโยชน์ต่อสุขภาพมากกว่าข้าวขาว ไม่เพียงแต่ข้าวจะถูกบริโภคเป็นอาหารหลักเท่านั้น ข้าวยังถูกนำมาใช้แปรรูปเป็นอาหารในรูปแบบต่าง ๆ เช่น เส้นก๋วยเตี๋ยวข้าวหมัก ซุปอาหารเข้าซีเรียลของว่าง และข้าวพอง เป็นต้น



ภาพ 3 การผลิตข้าวและการใช้ประโยชน์จากข้าวปี 2005-2014

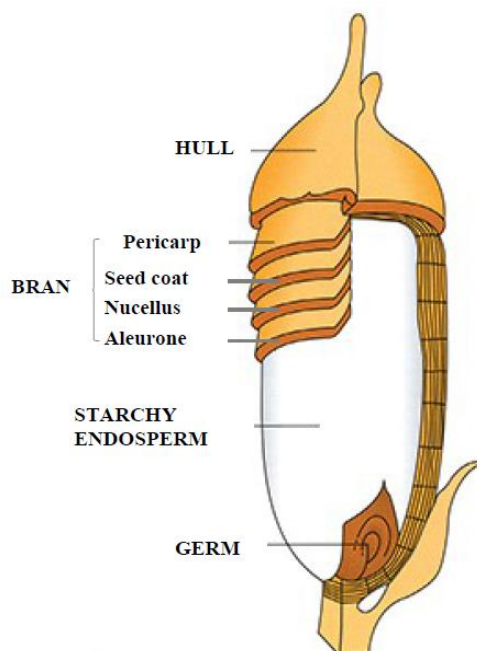
ที่มา: USDA Rice Yearbook, 2014. http://www.ers.usda.gov/data-products/rice-yearbook-2014.aspx#.U_0qzvdWSo

จากปริมาณความต้องการในการใช้ข้าวดังที่กล่าวมาข้างต้นจึงทำให้ในทุกๆปีอุตสาหกรรมโรงสีข้าวจะมีผลผลิตพลอยได้จากการสีข้าวเป็นจำนวนมาก เช่น เปลือกข้าว รำข้าว และปลายข้าว ซึ่งในแต่ละปีทั่วโลกจะขัดสีข้าวเปลือกมากกว่า 600 ล้านเมตริกตัน ซึ่งจะได้ผลผลิตพลอยได้โดยประมาณคือ ข้าวกล้อง 382 ล้านเมตริกตัน ข้าวขาวสำหรับการบริโภคของมนุษย์ 337 ล้านเมตริกตัน (Kahlon, 2009) ในทางกลับกันมีรำข้าวซึ่งเป็นผลผลิตพลอยได้จากการสีข้าวถึง 60-68 ล้านเมตริกตัน

2. โครงสร้างของข้าว

ข้าวเป็นพืชวงศ์หญ้า (family Gramineae) ในจำนวนนี้มีอยู่สองชนิดเท่านั้นที่ปลูกเพื่อใช้เป็นอาหาร (cultivated varieties) คือ *Oryza sativa* (ข้าว, 2536) ซึ่งแบ่งออกได้อีก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ อินดิกา (Indica) จาโปนิกา (Japonica) และจาโวนิกา (Javonica) สายพันธุ์อินดิคามักจะปลูกในภูมิอากาศเขตร้อน เช่น อินเดีย เวียดนาม ไทย และภาคใต้ของประเทศไทย เป็นต้น (Champagne, 2004) ข้าวมีอายุอยู่ได้เพียงปีเดียว ตัวใบถือกำเนิดจากข้อบนลำต้นโดยเรียงกันเป็น 2 แถวในทิศทางตรงกันข้าม ใบเป็นรูปเรียวยาวปลายแหลม คล้ายหอก ลำต้นมีลักษณะทรงกลม ไม่มีแกนกลาง มีข้อซึ่งเป็นส่วนแข็งปิดตันอยู่บนลำต้น และมีหน้าที่แบ่งลำต้นออกเป็นปล้อง ๆ ที่ข้อแต่ละข้อมีตาอยู่บนข้อโดยมีกาบใบหุ้มไว้ มีดอกรวมเป็นกลุ่มเป็นข้อ เรียกว่ารวงข้าว (กรมวิชาการเกษตร, 2527) ความแตกต่างทางสัณฐานวิทยา (morphology) ส่วนใหญ่จะแตกต่างที่การแสดงออกในแต่ละสายพันธุ์ ส่วนลักษณะแตกต่างทางสรีรวิทยา (physiology) นั้นส่วนใหญ่เป็นลักษณะที่มีความสำคัญในทางเศรษฐกิจ ซึ่งได้แก่ ความแตกต่างของประสิทธิภาพการให้ผลผลิต (วาสนา, 2523) นอกจากนี้สามารถแบ่งตามลักษณะเมล็ดได้เป็น 2 ประเภท คือ ข้าวเจ้าและข้าวเหนียว ซึ่งมีลักษณะเหมือนกัน

เกือบทุกอย่างแตกต่างกันตรงที่เนื้อแข็งในเมล็ด เมล็ดข้าวเจ้าประกอบด้วยแป้งอะไมโลส (amylose) เมล็ดข้าวเหนียวประกอบด้วยแป้งอะไมโลเพคติน (amylopectin) เป็นส่วนใหญ่และมีแป้งอะไมโลสประมาณร้อยละ 5-7 เมล็ดข้าวประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังภาพ4



ภาพ 4 ลักษณะโครงสร้างของเมล็ดข้าว

ที่มา:USA Rice Federation. <http://www.menurice.com/all-about-u-s-rice/how-rice-is-grown/rice-anatomy/>

แกลบ (hull หรือ husk) คือ เปลือกแข็งของเมล็ดข้าวที่ได้จากการสีข้าว เป็นส่วนที่เหลือใช้จากการผลิตข้าวสาร เป็นส่วนที่ห่อหุ้มเมล็ดข้าว ประกอบด้วยเปลือกใหญ่ (lemma) เปลือกเล็ก (palea) หาง (awn) ข้าวเมล็ด (rachilla) และกลีบรองเมล็ด (sterile lemmae) แกลบจะมีปริมาณ 18-20 เปอร์เซ็นต์ของข้าวเปลือก ทำหน้าที่ป้องกันการทำลายจากแมลงต่างๆ และป้องกันไม่ให้เมล็ดข้าวสูญเสียความชื้น

ข้าวกล้องหรือส่วนที่บริโภคได้ (brown rice) แบ่งออกเป็นชั้นต่างๆ ดังนี้

เปลือกหุ้มผล (pericarp) หรือ รำข้าว (rice bran) มีประมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์ของข้าวกล้อง (พีชยา, 2541) ประกอบด้วยเซลล์ที่มีรูปร่างตามความหมายของผลที่มีผนังเซลล์บางเป็นชั้นนอก ในกระบวนการทำความสะอาดส่วนของข้าวจะอยู่ภายในเปลือกหุ้มแข็งต้องกะเทาะ เปลือกนี้ออกจึงจะเห็นชั้นนี้ได้ (อรอนงค์, 2532) ซึ่งเป็นผลิตผลพลอยได้ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการขัดสีข้าวกล้องหรือที่เรียกว่า “รำข้าว” อาจมีสารสีอยู่ เช่น ข้าวแดงหรือข้าวเหนียวดำ (งามชื่น, 2539) องค์ประกอบทางเคมีของเปลือกหุ้มผลส่วนใหญ่จะเป็นคาร์โบไฮเดรต เช่น เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เพนโทแซน (pentosan) นอกจากนี้ก็มีแร่ธาตุต่าง ๆ เถ้า โปรตีน และไขมัน เป็นต้น (อรอนงค์, 2532)

เปลือกหุ้มเมล็ด (seed coat) และชั้นเยื่อโปร่งใส (hyaline layer) มีประมาณ 4-6 เปอร์เซ็นต์ของข้าวกล้อง เป็นส่วนที่อยู่ต่อจากชั้นเปลือกหุ้มผลเข้ามาภายในส่วนสารที่เป็นไข (thick cuticle) (พีชยา, 2541)

มีผนังเซลล์บาง รูปร่างยาวรี เซลล์ชั้นในมีสารให้สีอยู่ด้วย ทำให้หุ้มเมล็ดเปลือกมีสีต่าง ๆ เช่น ขาว แดง ส้ม ดำ เป็นต้น ส่วนชั้นเยื่อโปร่งใสจะติดอยู่กับชั้นเปลือกหุ้มเมล็ด มีลักษณะโปร่งใส ในชั้นทั้งสองนี้ ยังประกอบด้วย โปรตีน แร่ธาตุ มีแพนโทแซน เซลลูโลส และไขมันน้อยกว่าเปลือกหุ้มผล (อรอนงค์, 2532)

ชั้นแอลิวโรน (aleurone layer) ชั้นแอลิวโรนหรือเยื่อหุ้มเนื้อเมล็ด มีผนังเซลล์หนา มีนิวเคลียสอยู่ตรงกลาง เป็นชั้นที่สำคัญอดุมด้วยองศ์ประกอบทางเคมีหลายชนิด มีผนังหนาประกอบด้วยเมล็ดแอลิวโรน (แหล่งสะสมโปรตีนชนิดที่มีรูปร่างกลม) และไขมันที่มีขนาดกลม (อรอนงค์, 2532) เป็นชั้นที่ห่อหุ้มทั้งเนื้อเมล็ด เมื่อรวมกับเยื่อหุ้มเมล็ดมีประมาณ 4-6 เปอร์เซ็นต์ของข้าวกล้อง (พิชยา, 2541)

เนื้อเมล็ด (endosperm) มีประมาณ 89-94 เปอร์เซ็นต์ของข้าวกล้อง (พิชยา, 2541) แบ่งเป็น 2 ส่วนคือส่วนที่ติดกับชั้นแอลิวโรนเป็นเซลล์ที่มีผนังบาง ส่วนที่อยู่ถัดไปจะมีผนังเซลล์บาง ภายในเซลล์จะประกอบด้วยสตาร์ช (starch) และโปรตีนเป็นส่วนใหญ่ โปรตีนที่พบในเซลล์เนื้อเมล็ดนั้น มีลักษณะเป็นผลึก ส่วนลักษณะของโปรตีนอีกลักษณะจะเกาะเกี่ยวเป็นร่างแหกับเม็ดสตาร์ช (อรอนงค์, 2532)

คัพพะ (germ หรือ embryo) คือส่วนที่เรียกว่า จมูกข้าว (ชาญ, 2536) มีประมาณ 2-3 เปอร์เซ็นต์ของข้าวกล้อง (พิชยา, 2541) ส่วนนี้สามารถเจริญเป็นตัวอ่อนของเมล็ดหรือกำเนิดของต้น ภายในคัพพะแบ่งเป็น 2 ส่วนใหญ่ คือส่วนสกุเทิลัม (scutellum) ซึ่งเป็นคัพพะที่พร้อมจะเจริญเป็นยอด อ่อน ต้น และรากของพืชต่อไป ทำให้ส่วนคัพพะนี้อุดมไปด้วยสารอาหาร แร่ธาตุ และวิตามิน เพื่อการเจริญเติบโตโดยเฉพาะ โปรตีน ไขมัน และวิตามินบี1 มีมากในส่วนของสกุเทิลัม (อรอนงค์, 2532)

3. องค์ประกอบทางเคมีของข้าว

ข้าวต่างชนิด ต่างสายพันธุ์ และต่างพื้นที่แหล่งเพาะปลูกจะมีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน (Champagne et al., 2004) ตาราง 1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันข้าวเต็มเมล็ด ข้าวกล้อง และข้าวสาร

ตาราง 1 ปริมาณร้อยละองค์ประกอบทางเคมีของข้าวเต็มเมล็ด ข้าวกล้อง และข้าวสาร

Constituent	Rough rice	Brown rice	Milled rice
Moisture	14	14	14
Starch	53.4	66.4	77.6
Protein (N x 5.95)	5.8-7.7	4.3-18.2	4.5-10.5
Crude fat	1.5-2.3	1.6-2.8	0.3-0.5
Crude fiber	7.2-10.4	0.6-1.0	0.2-0.5
Crude ash	2.9-5.2	1.0-1.5	0.3-0.8
Carbohydrates	64-73	73-87	77-98

ที่มา: Champagne, et al., 2004

แป้ง

ในเนื้อเมล็ดข้าวจะมีปริมาณแป้งสูงถึง 78% โดยน้ำหนักเปียก (wet basis) หรือ 90% โดยน้ำหนักแห้ง (dry basis) ของปริมาณข้าวสารทั้งหมด (ตารางที่ 1) แป้งประกอบด้วยอะไมโลเพกตินชนิดกิ่งสูงและอะไมโลสชนิดเชิงเส้นเป็นหลัก ปริมาณอะไมโลสในข้าวจะถูกแบ่งออกเป็น 5 ประเภท ได้แก่ ประเภทข้าวเหนียว (0-2%) ประเภทที่มีปริมาณอะไมโลสระดับต่ำมาก (3-9%) ประเภทที่มีปริมาณอะไมโลสระดับต่ำ (10-19%)

ประเภทมีปริมาณอะไมโล สระดับกลาง (20-24%) และประเภทมีปริมาณอะไมโลสระดับสูง (มากกว่า 24%) (Juliano, 1971) ข้าวสายพันธุ์จาโปนิคาจะมีอะไมโลเพคตินชนิดสายสั้นมากซึ่งมักจะมีระดับของพอลิเมอร์ (degree of polymerization; DP) ในช่วง 6-10 และชนิดสายสั้นมีระดับของพอลิเมอร์ระหว่าง 13 และ 22 เมื่อเทียบกับข้าวสายพันธุ์อินดิกา (Umemoto, et al., 1999)

ใยอาหาร

พันธุ์ข้าวที่แตกต่างกันมักจะมีปริมาณใยอาหารที่แตกต่างกันด้วย โดยทั่วไปสายพันธุ์ข้าวที่มีสีจะมีปริมาณใยอาหารที่สูงกว่าเมื่อเทียบกับข้าวสายพันธุ์ไม่มีสี (Savitha and Singh, 2011) ในรำข้าวกล้องจะมีใยอาหารทั้งหมดมากถึง 71% ในขณะที่เนื้อเมล็ดข้าวมีใยอาหารเป็นองค์ประกอบเพียง 10% (Resurreccion, Juliano, and Tanaka, 1979) นอกจากนี้ยังพบ 3 ส่วนหลักสำคัญที่พบมากในใยอาหารของข้าว ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน Lai, Lu, He, and Chen (2007) รายงานว่าการเตรียมผนังเซลล์ของข้าวกล้องชนิด non-waxy พบเฮมิเซลลูโลสน้อยกว่าเซลลูโลส (23-32%) ในขณะที่การเตรียมผนังเซลล์ของข้าวกล้องชนิด waxy พบ เฮมิเซลลูโลสมากกว่าเซลลูโลส (27-42%)

โปรตีน

โดยทั่วไปเชื่อว่าข้าวกล้องมีปริมาณโปรตีนต่ำที่สุดในกลุ่มของธัญพืช แต่การใช้ประโยชน์โปรตีนจากข้าวกลับเป็นแหล่งที่ให้พลังงานสูงที่สุดในกลุ่มของธัญพืช (Juliano, 1985a) ข้าวจะมีปริมาณโปรตีนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญตามความหลากหลายของสายพันธุ์ (Juliano and Villareal, 1993) ข้าวสายพันธุ์ *Oryza sativa* มีปริมาณโปรตีนตั้งแต่ 4.5-15.9% และข้าวสายพันธุ์ *Oryza glaberrima* มีปริมาณโปรตีนอยู่ระหว่าง 10.2-15.9% ข้าวสายพันธุ์จากเอเชียพบว่ามีความหลากหลายของโปรตีนสูงที่สุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์จากทวีปอื่น ๆ เช่น ออสเตรเลีย อเมริกา ยุโรป และแอฟริกา เป็นต้น (Juliano and Villareal, 1993) โปรตีนจากข้าวสามารถถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มคือ albumin, globulin, prolamin และ glutelin ในข้าวสารสามารถพบโปรตีน albumin 1-3% และ globulin 1-7% ในขณะที่ glutelin และ prolamin พบเพียง 88-93% และ 1-4% ตามลำดับ (Houston, et al., 1968) ซึ่งในโปรตีนจากข้าวกล้องจะประกอบด้วย albumin และ globulin 18.8-20% prolamin 12.5-14.5% และ glutelin 66.0-67.7% (Asano, et al., 2000)

ไขมัน

ส่วนต่าง ๆ ของข้าวเป็นแหล่งอุดมไปด้วยไขมัน เช่น ปริมาณไขมัน 2.3% พบในข้าวกล้อง 18.3% พบในรำข้าว และ 6.3% พบในข้าวสาร (Fujino, 1978) ไขมันที่พบบ่อยในรำข้าว เป็นพวกไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) และในเนื้อเมล็ดข้าว เป็นชนิดกรดไขมันอิสระ (Fujino, 1978) ไขมันในข้าวสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ non-starch lipid ซึ่งพบได้มากในรำข้าวและ starch lipid พบมากในเมล็ดข้าว non-starch lipid มีไขมันชนิดเป็นกลาง 82-91% (73-82% เป็นไตรกลีเซอไรด์) ฟอสโฟไลพิด (phospholipid) 7-10% และไกลโคไลพิด (glycolipid) 2-8% (Choudhury and Juliano, 1980) โดยเฉพาะน้ำมันในข้าวกล้อง ซึ่งไม่มีโคเลสเตอรอล (cholesterol) นอกจากนี้กรดไขมันสำคัญที่พบในข้าวได้แก่ ไลโนเลอิก (linoleic) โอเลอิก (oleic) และกรดปาล์มิติก (palmitic acid) (Choudhury and Juliano, 1980) งานวิจัยในปัจจุบันให้ความสนใจมากเกี่ยวกับแกมมาโอไรซานอล (γ -Oryzanol) ซึ่งพบได้ในน้ำมันรำข้าว สารดังกล่าวมีส่วนผสมของสเตอรอล (sterol) และไตรเทอพেনนิวเอสเทอร์ (triterpenyl ester) ของกรดเพอรูลิก (4-hydroxy-3-methoxy cinnamic acid) ซึ่งมีประโยชน์ต่อสุขภาพ (Chandrashekar, et al., 2014; S. B. Ghatak and S. J.

Panchal, 2012; S. B. Ghatak and S. S. Panchal, 2012; Scavariello and Arellano, 1998; Wilson, et al., 2007)

วิตามิน

ข้าวเต็มเมล็ดส่วนใหญ่มีวิตามินเอ วิตามินซีหรือวิตามินดีในปริมาณที่น้อยมากหรืออาจจะไม่พบเลย เมื่อผ่านกระบวนการขัดสีในข้าวกล้องจะมีวิตามินและแร่ธาตุสูงกว่าข้าวขาว ซึ่งส่วนใหญ่จะพบวิตามินบี 1 และวิตามินบี 2 มีบทบาทช่วยในการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรตเพื่อให้เกิดพลังงานและช่วยให้ระบบประสาทและระบบกล้ามเนื้อทำงานสัมพันธ์กัน ในข้าวกล้องมี ไนอะซิน (niacin) เป็นวิตามินชนิดหนึ่งที่จำเป็นสำหรับสุขภาพของผิวหนัง ลึ้น การทำงานของกระเพาะอาหารและลำไส้ รวมทั้งการทำงานของระบบประสาท แต่อย่างไรก็ตามโรคขาดวิตามินเอยังพบแพร่ระบาดในบางประเทศในทวีปเอเชียที่บริ โภคข้าวเป็นอาหารหลัก (Juliano, 1993) จึงควรมีการทดแทนคุณค่าทางอาหารตามธรรมชาติด้วยการทานอาหารที่หลากหลาย

แร่ธาตุ

มีรายงานบันทึกปริมาณแร่ธาตุที่ถูพบในข้าวชนิดต่าง ๆ ดังนี้ 2.9-5.2% ในข้าวเต็มเมล็ด 1-1.5% ในข้าวกล้อง และ 0.3-0.8% ในข้าวขาว (Champagne, et al., 2004) แร่ธาตุส่วนใหญ่ถูกพบที่เปลือก ชั้นนอกมากกว่าชั้นด้านใน (Itani, et al., 2002) เช่น ปริมาณแร่ธาตุในรำข้าวของข้าวกล้องมีสูงถึง 42% (Resurreccion, et al., 1979) ในข้าวกล้องจะมีแร่ธาตุสูงกว่าข้าวขาว และที่เห็นได้ชัดคือธาตุฟอสฟอรัสและธาตุแมกนีเซียม เป็นต้น Wang, et al. (2011) รายงานว่าชนิดแร่ธาตุที่ถูพบในข้าวกล้องสามารถเรียงตามปริมาณที่พบเจอได้มากที่สุดดังนี้ แมกนีเซียม (Mg) > แคลเซียม (Ca) > แมงกานีส (Mn) > สังกะสี (Zn) > เหล็ก (Ir) > ซีลีเนียม (Se)

สารพฤกษเคมี

รำข้าวส่วนใหญ่มีความหลากหลายของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (phytochemicals) เช่น oryzanol, phytosterols, tocotrienols, squalence, polycosanols, phytic acid, ferulic acid, inositol, hexaphosphate และอื่น ๆ (Devi and Arumughan, 2007) การสกัดสารพฤกษเคมีจากกากรำ ด้วยตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ เอทานอล (ethanol) เมทานอล (methanol) เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) และเฮกเซน (hexane) พบว่าตัวทำละลายทั้ง 4 ชนิดสามารถสกัดสาร oryzanols, tococls และ ferulic acid ได้โดยได้ปริมาณสาร oryzanols 3,263-7,841 ppm ferulic acids 421-5,782 ppm และ total phenols 10,012-55,027 ppm สารพฤกษเคมีเหล่านี้มีผลต่อเซลล์ในสิ่งมีชีวิต โดยสามารถป้องกันความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ ส่งผลให้สามารถป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจและโรคระบบเส้นประสาท (Kehrer, 1993) แต่อย่างไรก็ตามสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพบางส่วนไม่ทนความร้อนและมักจะสูญเสียไปในระหว่างกระบวนการผลิตโดยใช้ความร้อน (Pascual, et al., 2013)

4. วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

ประเทศไทยนับเป็นประเทศเกษตรกรรมที่สำคัญแห่งหนึ่งของโลก ประชาชนมากกว่าร้อยละ 50 ประกอบอาชีพเกษตรกรรม ผลพลอยได้ที่สำคัญนอกเหนือจากผลผลิตการเกษตรก็คือ วัสดุเหลือทิ้งทาง

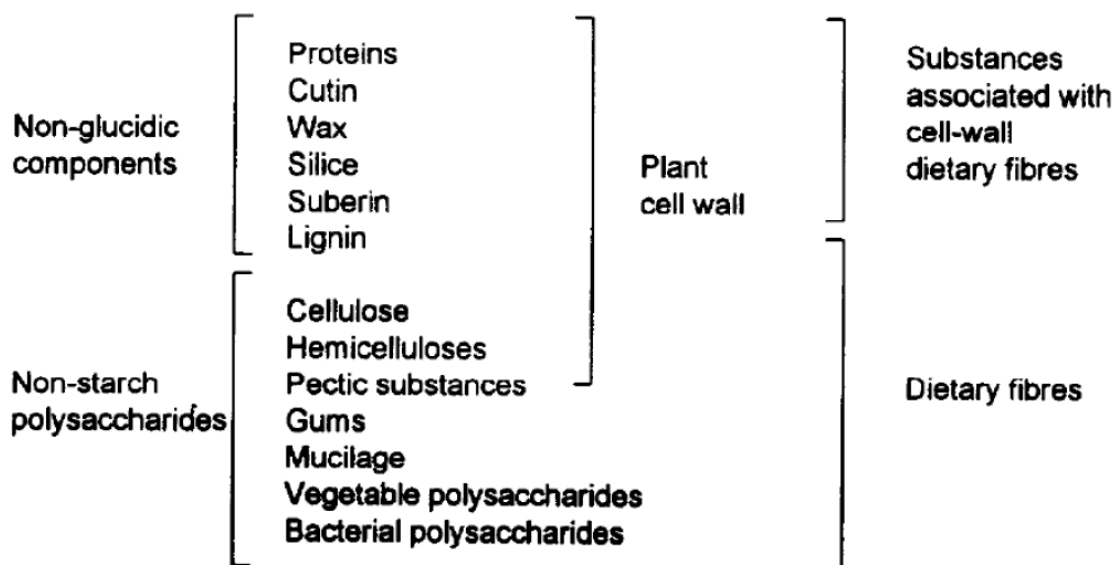
การเกษตร เช่น ฟางข้าว แกลบ กากอ้อย กากไย และทลายปาล์ม เป็นต้น (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2561)

ฟางข้าว

ฟางข้าวเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจากการปลูกข้าว และมีจำนวนมากทุกปี เกษตรกรจะใช้ฟางข้าวนี้เลี้ยงโค-กระบือในช่วงแล้ง (จิระวัชร เข้มสวัสดิ์, 2538) เราสามารถใช้ประโยชน์จากฟางข้าวได้ เช่น ใช้ฟางข้าวเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ ที่ผลิตจากเฮมิเซลลูโลส เนื่องจากองค์ประกอบของฟางข้าวประกอบด้วย ลิกโนเซลลูโลส (lignocellulosic material) ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทคาร์โบไฮเดรต ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของเซลล์พืชที่เกิดขึ้นจากหน่วยย่อยของน้ำตาลหลากหลายชนิด เชื่อมต่อกันเป็นสายยาวหรือพอลิเมอร์ของน้ำตาล ดังนั้นโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตจากเฮมิเซลลูโลสจากฟางข้าวจะมีน้ำตาลไซโลสที่แสดงถึงความเป็นพอลิเมอร์ของสายไซแลน ที่สามารถนำไปเป็นสารตั้ง แต่ในการผลิตไซโลโอลิโกแซคคาไรด์โดยเอนไซม์ได้

แกลบ (Rice hulls)

แกลบเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีราคาต่ำ มีปริมาณมาก และสามารถหาได้ง่ายตามโรงสี ในประเทศที่เพาะปลูกข้าวเป็นหลัก โดยทั่วไปแกลบถูกนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิง อาหารสัตว์และปุ๋ย เป็นต้น ส่วนประกอบของลิกโนเซลลูโลสจากแกลบ โดยมีองค์ประกอบทางเคมีในแกลบมีปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสสูงถึง 22% และ 27% ตามลำดับ ซึ่งสามารถผลิตโอลิโกแซคคาไรด์จากเฮมิเซลลูโลสในแกลบได้ โอลิโกแซคคาไรด์ชนิดไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (XOS) เป็นน้ำตาลที่ประกอบด้วย น้ำตาลไซโลส 2-10 หน่วย ซึ่งอาจมีกิ่งเป็นน้ำตาลอะราบินโนสมาเกาะที่โมเลกุลของสายไซหลักน้ำตาลไซโลส ซึ่งจะเรียกโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดนี้ว่า อะราบินโนไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (AXOS) นอกจากนี้ยังพบว่าคุณสมบัติของโอลิโกแซคคาไรด์ทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นน้ำตาลที่ไม่สามารถถูกย่อยได้ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ และสามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติก ซึ่งมีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ได้อีกด้วย ดังนั้น XOS และ AXOS สามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญให้กับจุลินทรีย์โปรไบโอติกได้ โดยเฉพาะในกลุ่มของ Lactobacilli และ Bifidobacteria (Gibson และ Rastall, 2006)



ภาพ 5 องค์ประกอบของใยอาหารและสารที่เกี่ยวข้องที่พบในพืช

ที่มา: Schweizer, 1986

5. ใยอาหาร

ใยอาหารชนิดไม่ละลายน้ำ (insoluble fiber) จะไม่หนืดจะไม่ถูกหมักหรือถูกหมักได้น้อยมากในลำไส้ใหญ่ และใยอาหารชนิดละลายน้ำ (soluble fiber) ใยอาหารชนิดนี้จะมีคุณสมบัติและจะถูกหมักได้ดีในลำไส้ใหญ่ เช่น เพคติน กัม และเฮมิเซลลูโลสบางส่วนที่ละลายน้ำได้ ในขณะที่ใยอาหารที่มีโครงสร้างหรือเมทริกซ์ เช่น ลิกนินเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสบางชนิดจะไม่ละลายน้ำ ปัจจุบันใยอาหารได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยามีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ ดังนี้

1. ผลต่อระยะเวลาการเคลื่อนของอุจจาระภายในทางเดินอาหาร (Roberfroid, M., 1993) ใยอาหารชนิดละลายน้ำจะทำให้อาหารอยู่ในกระเพาะนานขึ้น (delay gastric emptying time) โดยการรวมตัวเป็นเจลเหนียวในกระเพาะ ส่วนใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ พบว่าลดระยะเวลาการเคลื่อนของอุจจาระ ทำให้ถ่ายอุจจาระได้ดีขึ้น

2. ผลกระทบต่อการดูดซึมของสารอาหาร (Roberfroid, M., 1993; Würsch & Pi-Sunyer, 1997) ใยอาหารที่ละลายน้ำจะลดการดูดซึมของกลูโคสผ่านเยื่อบุผิวของลำไส้ ลดการดูดซึมของไขมันจึงมีประโยชน์ต่อการควบคุมระดับกลูโคสและไขมันในเลือด

3. ผลดีจากกระบวนการหมักของใยอาหารต่อนิเวศวิทยาของลำไส้ใหญ่ (Roberfroid, M., 1993; Roberfroid & Delzenne, 1998) เอนไซม์ในทางเดินอาหารของมนุษย์จะไม่สามารถย่อยใยอาหารได้ แต่แบคทีเรียในลำไส้ใหญ่จะสามารถหมักได้ ทำให้ได้กรดไขมันสายสั้นและพลังงาน กรดไขมันสายสั้นจะถูกดูดซึมผ่านเยื่อผนังของลำไส้ใหญ่เมื่อเข้าไปอยู่ในเยื่อบุแล้วจะถูกใช้เป็นพลังงาน

4. การขับถ่ายของลำไส้ใหญ่ (Roberfroid, M., 1993; Marlett & Slavin, 1997) ใยอาหารชนิดไม่ละลายน้ำจะช่วยเพิ่มเนื้อของอุจจาระและยังสามารถจับกับน้ำได้ด้วยจึงทำให้อุจจาระอ่อนนุ่ม

5. ช่วยควบคุมระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด (Roberfroid, M., 1993; Würsch & Pi-Sunyer, 1997) ในคนไข้เบาหวานที่รับประทานใยอาหาร 8-20 กรัม ต่อ 100 กรัม ของคาร์โบไฮเดรตจะสามารถลด

ระดับกลูโคสและอินซูลินได้ 20-50% นอกจากนี้ใยอาหารชนิดละลายน้ำสามารถช่วยลดระดับโพแทสเซียมและแอลดีแอลโคเลสเตอรอลในเลือดได้

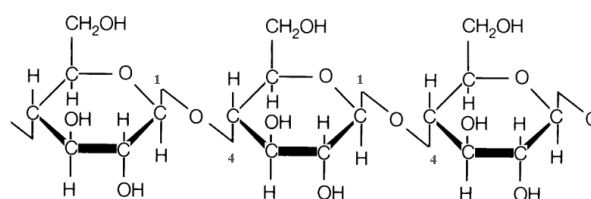
จากที่กล่าวมาข้างต้น ไร่ข้าวและกากไร่ยังคงเป็นแหล่งของใยอาหารที่ดีและมีปริมาณตั้งแต่ 20-51% (Saunders, 1990) ใยอาหารในไร่ข้าวประกอบด้วยส่วนที่ไม่ละลายน้ำเป็นส่วนใหญ่และมีส่วนที่ละลายน้ำได้เพียง 7-13% (Anderson, et al., 1990) ใยอาหารในกากไร่มีเซลลูโลส 27% เฮมิเซลลูโลส 37% และลิกนิน 5% (Hernandez, 2005) นอกจากนี้ยังมีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรอื่น ๆ ที่มีปริมาณเฮมิเซลลูโลสมาก ดังแสดงในตาราง 2 และเมื่อพิจารณาองค์ประกอบหลักที่สำคัญของใยอาหาร สามารถแบ่งได้ดังนี้

1. เซลลูโลส คือสารประกอบที่พบมากที่สุด เนื่องจากเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืช ซึ่งมีลำดับหน่วย β -D-glucopyranosyl เชื่อมพันธะด้วย (1 $\rightarrow$ 4) ไกลโคซิดิกในรูปแบบ โอลิโกเมอร์เชิงเส้นที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (BeMiller and Whistler, 1996) แสดงดังภาพ 6 มักไม่ละลายทั้งในน้ำและในตัวทำละลายอินทรีย์ ผงเซลลูโลสบริสุทธิ์ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น และไม่มีรส มักใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารที่ไม่ให้พลังงาน เช่น ใช้ในผลิตภัณฑ์ขนมอบเพื่อรักษาความชื้นและยืดอายุการเก็บรักษา

ตาราง 2 ร้อยละองค์ประกอบของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

Composition (% dry weight basis)			
Type of biomass	Cellulose	Hemicellulose	Lignin
Banana straw	53	29	15
Barley straw	23	21	21
Canola straw	22	17	20
Coconut fiber	36-43	15-25	41-45
Coffee husk	18	13	-
Corn bran	34	39	49
Corn cob	45	35	15
Oat bran	49	25	18
Oat straw	40	27	18
Rice bran	35	25	17
Rice husk	22	23	15
Rice straw	32	24	18

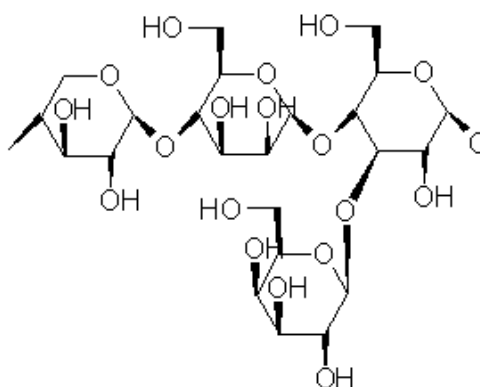
ที่มา: ดัดแปลงจาก Knob et al., 2014



ภาพ 6 โครงสร้างเซลลูโลส

ที่มา: <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0612/cellulose>

2. เฮมิเซลลูโลส มีโครงสร้างทางเคมีไม่เป็นเนื้อเดียวกัน มีโครงสร้างที่ซับซ้อนประกอบด้วยกลุ่มน้ำตาลเฮกโซส น้ำตาลเพนโทสกรดเฮกซูโรนิก และกรดอะมิโน (ภาพ 7) ที่มีการทำงานแตกต่างกัน (Girio, et al., 2010) เฮมิเซลลูโลสประกอบด้วยโซ่สายสั้นเมื่อเทียบกับเซลลูโลส โครงสร้างที่มีความเป็นกิ่งสูงของเฮมิเซลลูโลสนี้เองทำให้เฮมิเซลลูโลสสามารถละลายน้ำและถูกย่อยได้ง่ายในสภาวะกรดเจือจางหรือสารละลายต่าง

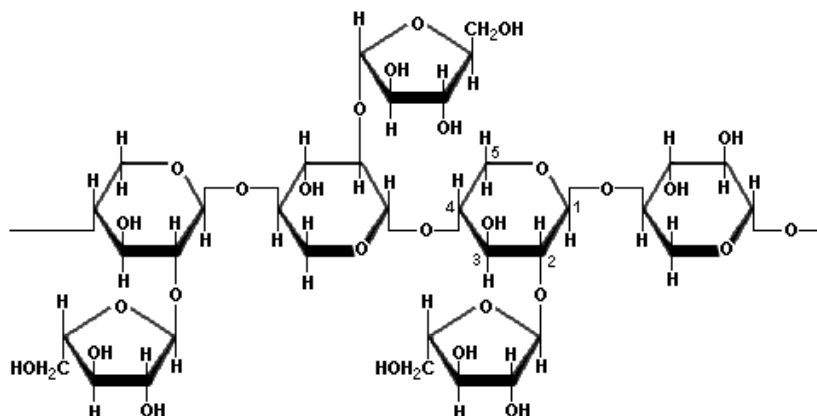


ภาพ 7 โครงสร้างเฮมิเซลลูโลส

ที่มา: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hemicellulose.png>

3. ลิกนิน เป็นองค์ประกอบพอลิเมอร์ธรรมชาติที่พบมากรองลงมาจากเซลลูโลส (Boudet and Grima-Pettenati, 1996) ลิกนินเป็น non-polysaccharide ที่ซับซ้อนซึ่งประกอบด้วย phenylpropane เป็นหน่วยย่อยที่ได้มาจาก aromatic alcohols เช่น coumaryl, coniferyl และ sinapyl alcohols (Chakar and Ragauskas, 2004) ลิกนินมีคุณสมบัติไม่ละลายในน้ำ

เฮมิเซลลูโลสของรำข้าวส่วนใหญ่ประกอบด้วยโครงสร้างที่มีกิ่งสูง เช่น AX (ภาพ 8) และไซโลกลูแคน (xyloglucan) AX ส่วนใหญ่ประกอบด้วยน้ำตาลเพนโทส (Pentose) ได้แก่ อะราบินอส (Arabinose) และไซโลส (Xylose) จึงถูกจัดเป็นกลุ่มเพนโทแซน น้ำตาลกลูโคส (Glucose) อะราบินอสไซโลส และกาแลคโตส (Galactose) เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่พบได้ในรำข้าว (Gremli and Juliano, 1970; Mod, Conkerton, Ory and Normand, 1979; Shibuya and Iwasaki, 1985)



ภาพ 8 โครงสร้างอะราบินไซแลน

ที่มา: <http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates2.html>

Ebringerová และ Heinze (2000) รายงานว่าเฮมิเซลลูโลสจากรำข้าวประกอบด้วยองค์ประกอบหลักคือไซแลนและไซโลกลูแคน โดยเมื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลแล้ว พบว่ามีไซโลส 47.3%, อะราบินอส 42.5%, กาแลคโตส 4.7%, กลูโคส 4.1%, แรมโนส (Rhamnose) 1.1%, ไรโบส (Ribose) 0.3% และอื่นๆ (Harada, et al., 2005) Wang, et al. (2005) ทำการศึกษาองค์ประกอบของรำข้าวพบว่ามีปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharides) 6.5% นอกจากนี้งานวิจัยเรื่องผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพจากรำข้าว (I) ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มธัญพืชผสมรำข้าว เมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่ากากรำมีปริมาณโปรตีน 15.86% โยอาหารทั้งหมด 33.57% และเถ้า 10.97% และเมื่อทำการเปรียบเทียบรำข้าวที่ผ่านและไม่ผ่านการสกัดน้ำมัน พบว่ารำข้าวสกัดน้ำมันจะมีปริมาณโปรตีน โยอาหาร และเถ้าเพิ่มสูงขึ้น (สุนันทาและวัชร, 2551) Patindol, et al. (2007) ได้ทำการวิเคราะห์กากรำพบว่ามีปริมาณแป้ง 31.5% โปรตีน 16.7% เถ้า 10.1% โยอาหารทั้งหมด 41.7% และคาร์โบไฮเดรตอื่น ๆ โดยน้ำหนักแห้ง จากหลักฐานข้างต้นแสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบสำคัญที่ยังคงเหลืออยู่ในกากรำคือโยอาหาร

นอกจากนี้เฮมิเซลลูโลสยังสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มมูลค่าได้หลากหลายชนิด เช่น ไซโลส, ไซลิทอล (Xylitol) (Girio, et al., 2010; Akpinar, et al., 2011) พิล์มบิโกลด์ (Bahcegul, et al., 2011) สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) (Hromádková, et al., 2010) และไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (Xylooligosaccharides; XOS) (Garrote, et al., 2002; Parajó, et al., 2004; Akpinar, et al., 2007) ซึ่ง XOS ยังสามารถแสดงคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกได้อีกด้วย

6. พรีไบโอติก

พรีไบโอติก (Prebiotic) คือส่วนประกอบของอาหารที่ไม่สามารถย่อยสลายได้แต่ส่งผลดีต่อโฮสต์ ด้วยการเลือกกระตุ้นการเจริญเติบโตหรือความสามารถของจุลินทรีย์บางชนิดในลำไส้ของโฮสต์ (Gibbson and Roberfroid, 1995) เช่น แบคทีเรียพรีไบโอติก (Probiotic) ในกลุ่มของ Bifidobacteria และ Lactobacilli สามารถหมักพรีไบโอติกเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและผลิตสารสำคัญซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพได้ คุณสมบัติที่แตกต่างกันของพรีไบโอติกจะขึ้นอยู่กับชนิดขององค์ประกอบในพรีไบโอติก สารอาหารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกนั้นต้องสามารถทนต่อการย่อยของกรดและเอนไซม์ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก เช่น ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructo-oligosaccharides), กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Galacto-

oligosaccharides), และ XOS ซึ่งเป็นโอลิโกแซคคาไรด์ส่วนใหญ่ที่ประกอบอยู่ในไซแลน เป็นต้น โอลิโกแซคคาไรด์เหล่านี้กำลังได้รับความนิยมในการใช้เป็นพรีไบโอติกชนิดใหม่ในปัจจุบัน เนื่องจากพันธะไกลโคไซด์ในแซคคาไรด์ (Saccharides) ชนิดนี้ทำให้มีความต้านทานต่อเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารส่วนบน ต้านทานต่อสภาวะเป็นกรดและแก๊ส ทำให้สามารถกลายเป็นสารอาหารที่สำคัญต่อพรีไบโอติกในลำไส้ได้ (Delzenne, 2003) พรีไบโอติก สามารถแบ่งประเภทได้ดังนี้

1. Alcohol sugar จัดเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีดัชนีการสังเคราะห์ หักพอลิเมอร์ DP เพียง 1-2 ตัว ในบางครั้งจะเรียกว่าโพลีออล สามารถเป็นสารให้ความหวานได้ โดยมีความหวานประมาณ 3 ใน 4 หรือครึ่งหนึ่งของน้ำตาลทั่วไป

2. Resistant Starch จัดเป็นพอลิแซคคาไรด์ ซึ่งจะไม่ถูกดูดซับในลำไส้เล็ก ประกอบด้วยอะไมโลสและอะไมโลเพคติน

3. Non-Starch Polysaccharides เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ได้จากพืชซึ่งไม่ใช่แป้ง เช่น เพคติน (Pectin), เซลลูโลส, เฮมิเซลลูโลส, และกัว (Guar) เป็นต้น

4. อินนูลิน (Inulin) เป็นสารพอลิแซคคาไรด์ที่พืชเก็บไว้เป็นอาหาร พบในพืชมากกว่า 36,000 ชนิด

5. Sugar and Oligosaccharides สำหรับพรีไบโอติกในกลุ่มนี้จัดเป็นโพลีแซคคาไรด์สายสั้น (Short-chain polysaccharides) ประกอบด้วยน้ำตาลตั้งแต่ 2-20 หน่วย

6. Mucin Glycoprotein ถูกสร้างโดย Goblet Cells ที่อยู่ในเยื่อบุผิวลำไส้และเป็นสารตั้งต้นหลักสำหรับการหมักในลำไส้

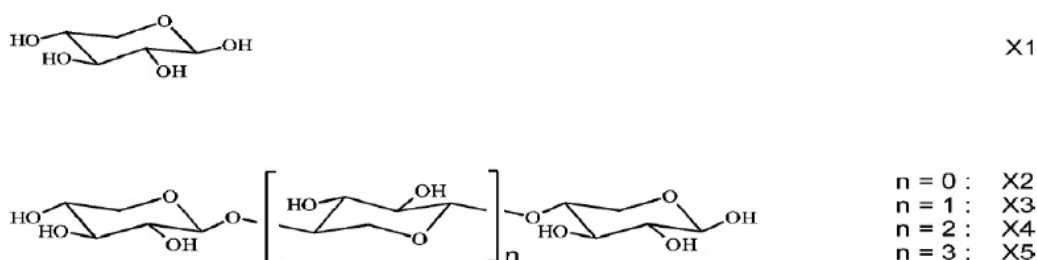
7. Related Mucopolysaccharides เช่น Chondroitin, Sulphate, Heparin, Pancreatic และ Bacterial Secretion ซึ่งสารเหล่านี้เป็นสารที่มีไว้สำหรับจุลินทรีย์ในลำไส้

8. โปรตีน (Protein) และเปปไทด์ (Peptide) สารเหล่านี้สร้างขึ้นในอาหาร สร้างโดยการหลั่งของตับอ่อนหรือสร้างโดยแบคทีเรียแต่มีปริมาณน้อยกว่าพวกคาร์โบไฮเดรต (เฉลิมขวัญและมัลลิกา, 2548)

พรีไบโอติกที่ใช้ในอุตสาหกรรมและมีจำหน่ายทางการค้าส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ซึ่งเป็นน้ำตาลที่เป็นหน่วยย่อย 2-20 หน่วย มาต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ (Covalent) แยกประเภทตามแหล่งที่พบได้ 2 กลุ่ม กลุ่มแรกคือพรีไบโอติกที่มีในธรรมชาติซึ่งจะพบได้ในผักและผลไม้ เช่น กัลย หน่อไม้ฝรั่ง ถั่ว ข้าว เป็นต้น องค์ประกอบหลักที่เป็นแหล่งคาร์บอนในข้าวมีมากมายหลายชนิด เช่น โอลิโกแซคคาไรด์กลุ่มไซโลส ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ กลุ่มที่สองคือพรีไบโอติกที่ได้จากการสังเคราะห์โดยใช้เอนไซม์ย่อยโพลีแซคคาไรด์เช่น แป้ง เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบสารพรีไบโอติกได้ในวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรและอุตสาหกรรม เช่น ชังข้าวโพดกลบรำข้าวสาลีฟางข้าวชานอ้อย เยื่อกระดาษ และเปลือกถั่วต่างๆ เป็นต้น

XOS มีโครงสร้างหลักประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลไซโลสที่ต่อกันด้วยพันธะ β -1,4-D-xylopyranoside แสดงดังภาพ 9 ไม่สามารถย่อยได้ในทางเดินอาหาร แต่จะถูกย่อยด้วยจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria และ Lactobacilli จากการให้ XOS ปริมาณ 6% (w/w) แก่หนูทดลอง พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria ได้ดีกว่าการให้ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Campbell, et al., 1997) และจากผลการศึกษาของ Rycroft, et al. (2001) ที่ศึกษาจุลินทรีย์ผสมจากอุจจาระมนุษย์ พบว่าการให้ XOS เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงแหล่งเดียวสามารถเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria ภายหลัง 24 ชั่วโมงของการบ่มได้ดีกว่าโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดอื่น (Rycroft, et al., 2001) และยังสามารถลดจำนวนแบคทีเรียกลุ่ม Bacteroides ได้อีกด้วย Crittenden, et al. (2002) รายงานไว้ว่า Bifidobacteria หลายสปีชีส์ และ *L. brevis* สามารถเจริญเติบโตได้อย่างโดดเด่นภายใต้สภาวะที่มี XOS ในทางกลับกันแบคทีเรียก่อโรคบางประเภท เช่น *E. coli*, *Enterococci*, *C. difficile*, และ *C. perfringens* ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ภายใต้

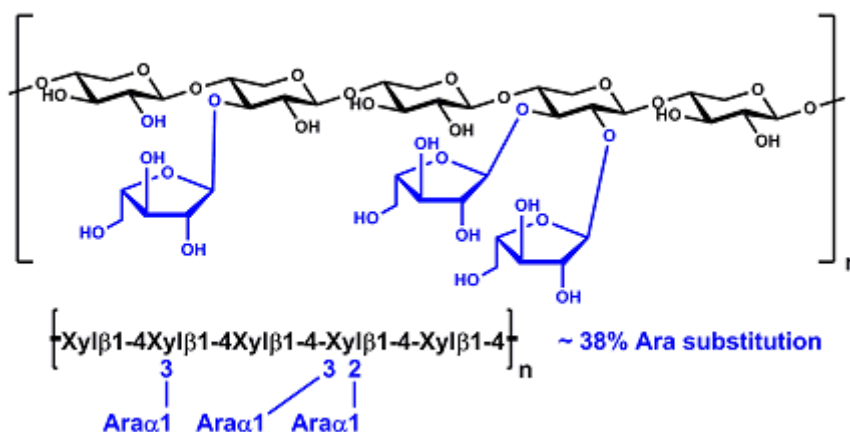
สภาวะเดียวกันนี้ ยังมีการอ้างผลงานวิจัยที่รายงานถึง XOS ที่มี DP2-10 หน่วย สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของ Bifidobacteria โดยยับยั้ง Clostridium นอกจากคุณสมบัติในการเป็นพรีไบโอติกแล้ว ยังมีรายงานว่า การใช้ XOS เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับโพรไบโอติกสามารถสร้างสารเมตาโบไลต์ (metabolize) จำพวกกรดไขมันสายสั้นซึ่งสามารถบรรเทาโรคเบาหวาน โรคหัวใจ และโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ได้ (Swennen, et al., 2006) จากคุณสมบัติเหล่านี้ทำให้ความต้องการในการผลิต XOS มีเพิ่มขึ้นสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารสุขภาพ



ภาพ 9 โครงสร้าง XOS

ที่มา: ดัดแปลงจาก Montane, et al., 2006

AXOS มีโครงสร้างเป็นกิ่งเกาะอยู่บนสายพอลิเมอร์ของไซโลส (Heteroxylans) เชื่อมโยงด้วยพันธะ β -1,4-D-xylopyranoside ซึ่งพบเป็นองค์ประกอบหลักสำคัญของผนังเซลล์พืช แสดงในภาพ 10 (Fry, 1988; Fincher and Stone, 1986) สามารถพบโครงสร้างดังกล่าวได้ในกลุ่มของธัญพืชที่มีโครงสร้างเป็น AX น้ำตาลที่เกาะเป็นกิ่งอยู่บนสายไซแลนส่วนใหญ่คือน้ำตาล อะราบินอสเชื่อมต่อกับพันธะไกลโคซิดิกที่ตำแหน่ง α -1,2 และ α -1,3 บนสายของไซแลน ความถี่การแทนที่ด้วยน้ำตาลอะราบินอสของ AX ขึ้นอยู่กับธรรมชาติและสรีระวิทยาของพืชชนิดนั้น ๆ ซึ่งอาจจะสามารถคำนวณเป็นอัตราส่วนระหว่างน้ำตาลอะราบินอสและน้ำตาลไซโลส เพื่อใช้ระบุ ปริมาณน้ำตาลอะราบินอสที่มีความถี่อยู่บน AX โดยปกติสามารถพบอัตราส่วนอะราบินอสต่อ ไซโลสระหว่าง 0.5-0.7 ใน wheat endosperm และในส่วนของเนื้อเยื่อ ในขณะที่เปลือกหุ้มเมล็ดมีการแทนที่ปริมาณอะราบินอสค่อนข้างต่ำ คือระหว่าง 0.1-0.4 และพบอัตราส่วนที่สูงถึง 1.1-1.3 ในชั้นของรำ (Andersson and Aman, 2001; Cleemput et al., 1993; Gruppen et al., 1993; Barron et al., 2007; Maes and Delcour, 2002; Ordaz-Ortiz and Saulnier, 2005; Schoonveld-Bergmans et al., 1999) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการประเมินคุณสมบัติของ AXOS โดย Yamada et al. (1993) ศึกษาการทนการย่อยในระดับพีเอช 2 ที่อุณหภูมิ 100°C พบว่า AXOS ถูกย่อยเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เมื่อเทียบกับน้ำตาลซูโครสและอินนูลินที่ถูกย่อยอย่างสมบูรณ์ในสภาวะเช่นเดียวกันนี้ และเมื่อทำการทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตต่อโพรไบโอติกเป้าหมายพบว่า Bifidobacteria บางชนิด สามารถใช้ AXOS ในการเจริญเติบโตได้



ภาพ 10 โครงสร้าง AXOS

ที่มา: <https://secure.megazyme.com/Arabinoxylan-Wheat-Flour-High-Viscosity>

7. คุณสมบัติของพรีไบโอติก

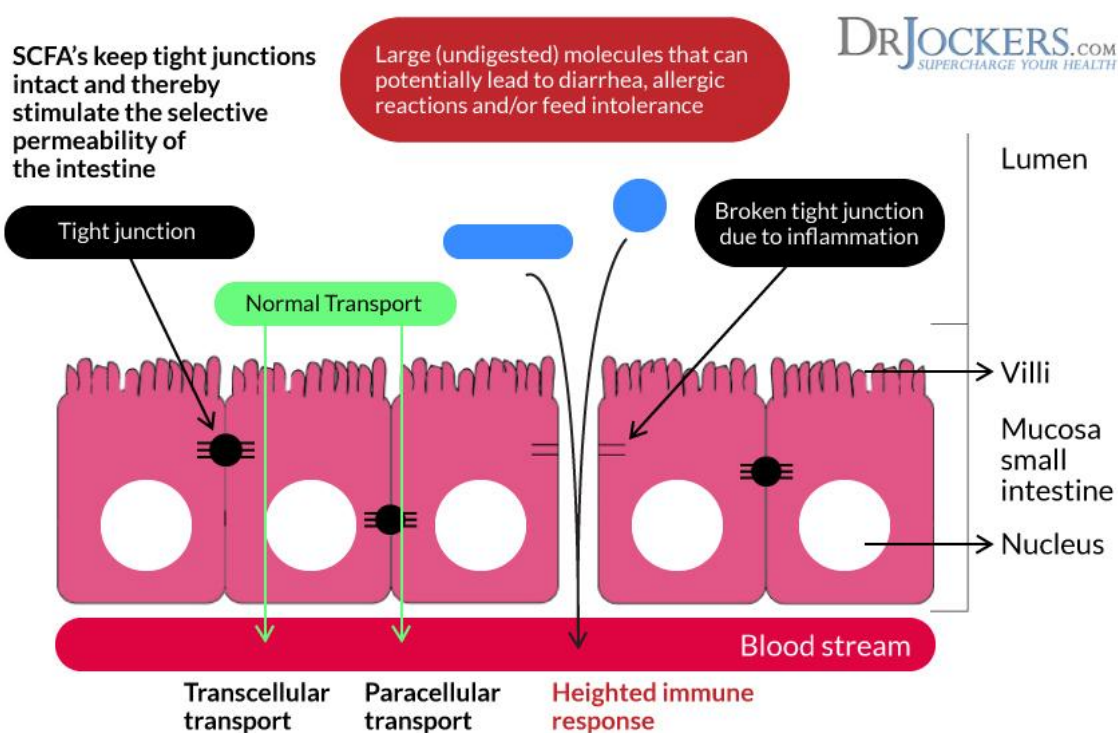
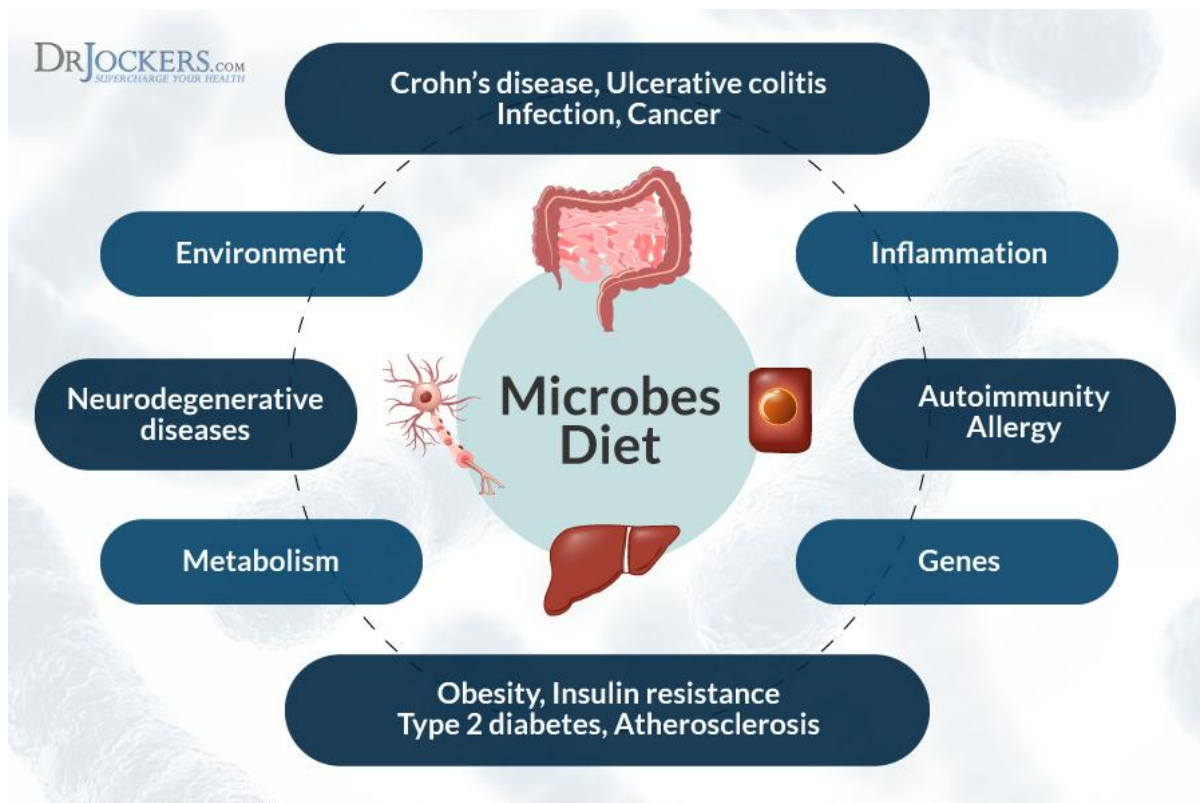
สารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่ดีต้องสามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร และสามารถเคลื่อนที่ลงสู่ลำไส้ใหญ่ได้ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงหรือถูกดูดซึมในกระเพาะ และในลำไส้เล็ก เพื่อที่จุลินทรีย์พรีไบโอติกที่อยู่ในลำไส้ใหญ่จะสามารถนำไปใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ โดยกลุ่มเชื้อพรีไบโอติกที่สามารถใช้น้ำตาลเพนโทสและแสดงบทบาทโดดเด่นในลำไส้ของมนุษย์ ได้แก่

Bifidobacteria และ Lactobacilli แสดงในตาราง 3 เมื่อจุลินทรีย์พรีไบโอติกมีการแข่งขันการเจริญเติบโต พรีไบโอติกจะไปแย่งเกาะบนผิวเยื่อลำไส้ และผลิตสารเมตาบอไลต์ที่สำคัญ เช่น กรดแลคติก เป็นต้น ทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคไม่สามารถเจริญเติบโตได้ จึงส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค นอกจากนี้ เชื้อจุลินทรีย์ พรีไบโอติกยังสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยการสื่อสารกับเนื้อเยื่อน้ำเหลืองในชั้นใต้เยื่อลำไส้ (gut-associated lymphocyte tissue, GALT) ทำให้มีการสร้างสารป้องกันและกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้เข้าสู่ภาวะสมดุลนำไปสู่การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (ภาพ 11) แบบป้องกันมากกว่าการตอบสนองแบบก่อการอักเสบหรือภูมิแพ้ นอกจากนี้พรีไบโอติกอาจนำไปใช้เป็นส่วนผสมของอาหารและนำไปสู่กระบวนการแปรรูปต่อไป ดังนั้นคุณสมบัติของพรีไบโอติกที่ดีจึงควรมีความต้านทานความร้อนและสามารถคงตัวอยู่ได้ภายใต้สภาพแวดล้อมที่กดดันจากกระบวนการแปรรูป (Oku and Sadako, 2002) ในปัจจุบันสารพรีไบโอติกหลายชนิดถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารและส่งผลดีต่อร่างกาย แสดงดังตาราง 4

ตาราง 3 กลุ่มเชื้อโพรไบโอติกที่สามารถใช้น้ำตาลเพนโทสเป็นแหล่งคาร์บอน

Microorganism	Saccharides					
	Xylose	XOS	Xylan	Arabinose	AX	AXOS
Lactobacilli						
<i>L. acidophilus</i>		+	-		-	
<i>L. alimentarius</i>	+		-	+		
<i>L. amylovorus</i>		+	-		-	
<i>L. brevis</i>	-	+	-	-	-	
<i>L. fermentum</i>	-	+	-	+	-	
<i>L. paracasei</i>		+	-		-	+
<i>L. plantarum</i>	-	+	-	+	-	
<i>L. reuteri</i>		+	-		-	
<i>L. rhamnosus</i>		+	-		-	-
Lactococcus						
<i>L. lactis</i>			-			
Bifidobacteria						
<i>B. infantis</i>		+	-		-	-
<i>B. adolescentis</i>	+	+	-	-	+	+
<i>B. bifidum</i>		+	-		-	+
<i>B. breve</i>		+	-		-	
<i>B. longum</i>	+	+	-	+	+	

ที่มา: ดัดแปลงจาก Grootaert et al., 2007



ภาพ 11 ประโยชน์ของพรีไบโอติกต่อระบบต่าง ๆ ในร่างกาย

ที่มา: <https://drjockers.com/top-33-prebiotic-foods/>

ตาราง 4 พรีไบโอติกที่ถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

Class of compounds	Example	Prebiotic effect	Effect on colonic /faecal flora	Effect on SCFA /lower pH
Fructans	Oligofructose, FOS	+++	↑ Bifidobacteria, Lactobacilli ↓ Bacteroides, clostridia	Yes
Galacto-oligosaccharides (GOS)	Trans GOS, natural GOS from human milk	++(+)	↑ Bifidobacteria, Lactobacilli	Yes
Xylo-oligosaccharides (XOS)		++	↑ Bifidobacteria,	Yes

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Delzenne and Williams, 2002

++ มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก ซึ่งยืนยันด้วยผลการทดลอง *In vitro* และ *In vivo* ในบางงานวิจัย

++(+) มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกเช่นเดียวกันกับที่ระบุไว้ใน ++ และพบว่าบางงานวิจัยมีการยืนยันผลแค่ในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น

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

↑ คือส่งเสริมการเจริญเติบโต ↓ คือลดการเจริญเติบโต

8. การสกัดใยอาหาร

1. การสกัดใยอาหารที่ละลายน้ำ

ใยอาหารที่ละลายน้ำ (soluble dietary fiber) มีประโยชน์และนำไปใช้ได้หลากหลายกับอาหาร เมื่อเทียบกับใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ การสกัดใยอาหารที่ละลายน้ำได้จากรำข้าวทำได้โดยวิธีการใช้ต่างและย่อยสลายด้วยกรด ขั้นตอนแรกนำรำข้าวมากำจัดแบ่งโดยการย่อยด้วย glucoamylase จากนั้นผสมด้วยสารละลายต่างหรือกรดและทำการสกัดโดยการเขย่าเป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 60°C หลังจากนั้นสารที่สกัดได้ถูกปรับสภาพให้เป็นกลางด้วยกรดอะซิติกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ และผ่านถุงเยื่อเลือกผ่านโดยการเปิดน้ำไหลผ่าน เป็นเวลา 3 วัน เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนอื่น ๆ จากนั้นสารสกัดถูกนำมาตกตะกอนด้วยเอทานอล 95% เพื่อแยกเอาส่วนตะกอนและทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จากการวิเคราะห์พบว่า ใยอาหารที่ละลายน้ำที่สกัดจากสารละลายต่างมีส่วนประกอบของอะราบินโนและไซโลสที่อัตราส่วน Ara / Xyl เป็น 1.0:1.1 อย่างไรก็ตามสำหรับใยอาหารที่ละลายน้ำโดยสกัดจากกรดไฮโดรคลอริกมีอัตราส่วนของอะราบินโนและไซโลสต่ำกว่า 1:1 นอกจากนี้การสกัดอาหารที่ละลายน้ำได้ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์จะมีสีที่อ่อนที่สุดในขณะที่สกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์จะมีสีที่เข้มกว่า ดังนั้นการสกัดโดยใช้สารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์

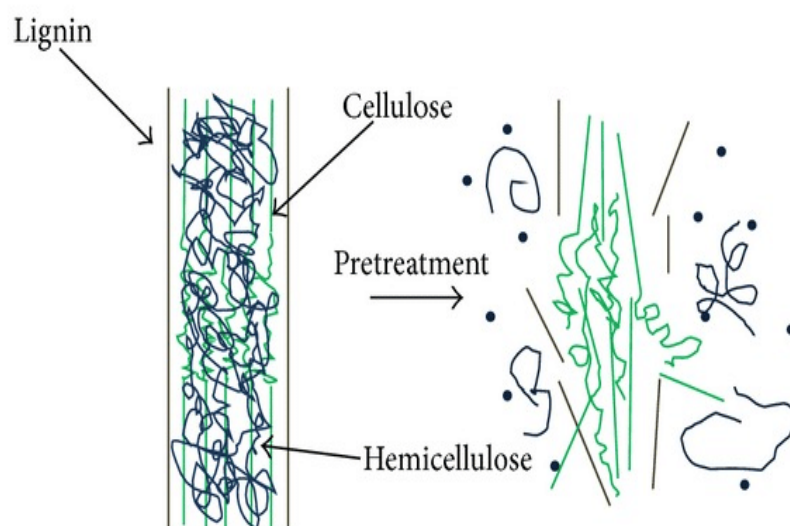
ไซต์ดูเหมือนว่าจะเป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดใยอาหารที่ละลายน้ำจากรำข้าว Wan, et al. (2014) ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดใยอาหารที่ละลายน้ำจากรำข้าวโดยใช้วิธี response surface methodology โดยกำหนดปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการสกัด เช่น อัตราส่วนของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ และอุณหภูมิต่อผลผลิตของใยอาหารที่ละลายน้ำพบว่าอัตราผลตอบแทนสูงสุดของใยอาหารที่ละลายน้ำได้คืออัตราส่วน 3% แคลเซียมไฮดรอกไซด์ต่อรำข้าวเป็น 29.75:1 (มิลลิลิตร / กรัม) ในเวลาที่เหมาะสมในการสกัดคือ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 84°C

2. การสกัดใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ

ปัจจุบันใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำจากรำข้าวยังไม่ได้รับความสนใจมากนัก ซึ่งในอุตสาหกรรมอาหารจะมุ่งเน้นในการสกัดใยอาหารที่ละลายน้ำได้ Claye, et al., (1996) รายงานว่าขั้นตอนการสกัดคือตัวอย่างกากรำถูกนำมาทำจัดแบ่งและโปรตีนโดยใช้เอนไซม์ amyloglucosidase และ trypsin ตามลำดับ จากนั้นคือการกำจัดเพคตินโดยใช้สารละลายเข้มข้น แอมโมเนียมออกซาลเลต 0.5% (w/v) ที่อุณหภูมิ 85°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กากรำที่ผ่านการกำจัด เพคตินแล้วถูกนำไปทำให้แห้งเพื่อสกัดเฮมิเซลลูโลสในขั้นตอนต่อไป กากรำที่ผ่านการทำให้แห้งแล้วถูกนำมาผสมกับสารละลาย โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5% โดยการเติมน้ำไตรเจนและเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกสารละลายที่มีเฮมิเซลลูโลสละลายออกจากส่วนที่ไม่ละลาย จากนั้นสารละลายเฮมิเซลลูโลสถูกนำมาปรับค่าพีเอชอยู่ในช่วง 5.0-5.5 ด้วย 50% กรดอะซิติกและหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเอาตะกอนออก จากนั้นนำของเหลวที่แยกได้มาตกตะกอนด้วย 95% เอทานอล จะได้เฮมิเซลลูโลสเป็นผลิตภัณฑ์

9. การปรับสภาพ

กระบวนการปรับสภาพเป็นกระบวนการที่เปลี่ยนแปลงชีวมวลของลิกโนเซลลูโลส ทำให้โครงสร้างของชีวมวลคล้ายโครงสร้างเพื่อง่ายต่อการเข้าทำปฏิกิริยาของสารที่ใช้ในการผลิตและช่วยเพิ่มผลผลิตของน้ำตาลที่ต้องการได้ (รัชพล พะวงศ์รัตน์, 2558) (ภาพ 12)



ภาพ 12 ผลการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์พืชในขั้นตอนการปรับสภาพ

ที่มา: รัชพล พะวงศ์รัตน์ (2558)

1. วิธีการทางชีวภาพ

จุลินทรีย์สามารถใช้ในการปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสและยังเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในย่อยวัตถุดิบด้วยเอนไซม์ ในการใช้จุลินทรีย์ในการปรับสภาพ ทั้งย่อยลิกนิน รวมทั้งย่อยเฮมิเซลลูโลสด้วย ส่วนเซลลูโลสถูกย่อยน้อยมากซึ่งเซลลูโลสมีความต้านทานในการถูกจุลินทรีย์ย่อยของจุลินทรีย์ได้มากกว่าส่วนอื่นๆของลิกโนเซลลูโลส (Kumar, 2011; Sreenath, 2001 และ Slininger, 1982)

2. วิธีการทางเคมี (Chemical pretreatment)

2.1 การทำปฏิกิริยาด้วยการใช้ต่าง

การใช้ต่างในกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบมีผลต่อโครงสร้างลิกโนเซลลูโลส กลไกการทำงานของต่างนั้นทำให้เกิดการบวมภายในโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสในการทำปฏิกิริยาทำให้วัสดุมีความพรุนเพิ่มขึ้นได้ ลดความเป็นโครงสร้างผลึกของเซลลูโลส ลดขนาดของพอลิเมอร์และเป็นการแยกองค์ประกอบหรือทำลายโครงสร้างของลิกนิน ต่างที่นิยมใช้ในการแยกลิกนินได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ Kim et al. (2008)

2.2 การทำปฏิกิริยาด้วยการใช้กรด

กระบวนการปรับสภาพโดยการใช้กรดนั้นมีจุดประสงค์คือเพื่อให้ได้น้ำตาลในปริมาณที่สูงจากวัสดุชีวมวล ชนิดของกรดที่นำมาปรับสภาพมีมากมายหลายประเภทได้แก่ กรดซัลฟิวริก ไฮโดรคลอริก ไนตริก หรือ ฟอสฟอริก ในกระบวนการปรับสภาพสามารถใช้ได้ทั้งกรดเข้มข้นและเจือจางเพื่อเพิ่มการทำงานของกระบวนการไฮโดรไลซิส (Palmqvist and Hahn, 2002)

2.3 วิธีการทางกายภาพ

2.3.1 การใช้แรงทางกล

วิธีการทำให้วัตถุดิบมีขนาดเล็กลงสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การทุบ การบด การโม่ การเขย่าวัตถุดิบ เป็นต้น ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการลดผลึก (cellulose crystallinity) และเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาให้มากขึ้น ความสามารถในการลดขนาดจะขึ้นอยู่กับขนาดสุดท้ายของวัสดุและคุณสมบัติของวัสดุนั้น ซึ่งปกติขนาดของวัตถุดิบจะทำให้มีขนาดประมาณ 0.2-2 มิลลิเมตร (Sun and Cheng, 2002)

2.3.2 การใช้ความร้อน

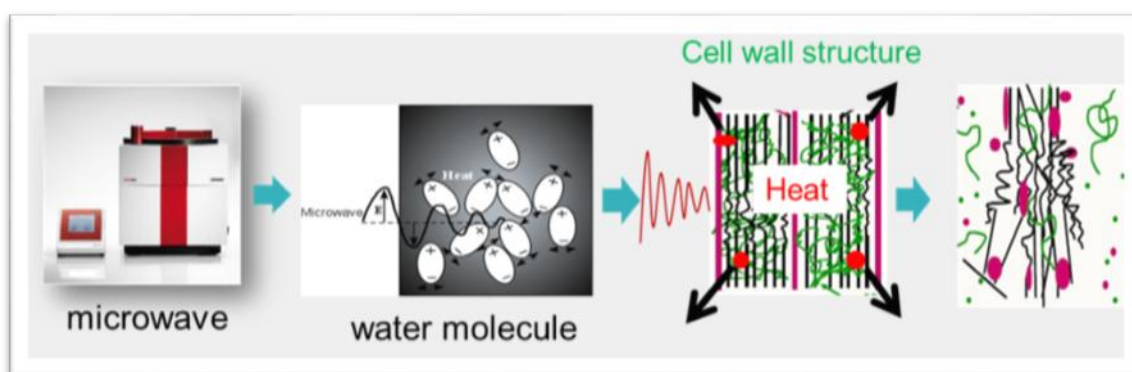
เป็นการปรับสภาพของวัตถุดิบเพื่อทำลายเนื้อเยื่อของเซลลูโลสซึ่งโดยส่วนใหญ่มักจะใช้อุณหภูมิ 150-180 องศาเซลเซียส แต่ต้องทำให้วัสดุมีขนาดที่เล็กลงก่อนเข้าสู่กระบวนการย่อยวัตถุดิบทางความร้อน

2.3.3 การปรับสภาพด้วยคลื่นไมโครเวฟ

การใช้ไมโครเวฟเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เพื่อทำลายโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส กระบวนการนี้เป็น การใช้ความร้อนโดยอาศัยคลื่นความถี่สูงที่ส่งผลให้เกิดการเสียดสีระหว่างโมเลกุลของสารละลายทำให้เกิดความร้อนขึ้น และระยะเวลาที่สั้น ซึ่งวิธีนี้จะทำให้โครงสร้างเยื่อใยของชีวมวลเกิดการคลายตัว และเป็นการช่วยทำให้เอนไซม์ทำงานได้ระหว่างทำปฏิกิริยาในขั้นตอนการผลิตโอลิโกแซคคาไรด์

10. หลักการของการสกัดสารด้วยคลื่นไมโครเวฟ

คลื่นไมโครเวฟเป็นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความถี่สูงเมื่อสารละลายที่มีขั้วได้รับคลื่นไมโครเวฟจะทำให้โมเลกุลของสารละลายนั้นเกิดการเคลื่อนที่สลับไปมาอย่างรวดเร็วทำให้เกิดการเสียดสีกันระหว่างโมเลกุลจึงเกิด ความร้อนขึ้น โดยความร้อนนี้จะไปมีผลต่อโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส ทำให้เกิดการคลายตัวของโครงสร้าง และได้องค์ประกอบย่อยเป็นเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (ชนภัทร ทรงศักดิ์, 2562) (ภาพ 13)



ภาพ 13 หลักการทำงานของคลื่นไมโครเวฟ

ที่มา: อาริรัตน์ ซื่อดี (2560)

11. การผลิต (A)XOS

(A)XOS สามารถผลิตได้จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรทั้งจากอุตสาหกรรมป่านไม้ การเกษตร โรงงานอุตสาหกรรม และของเสียจากชุมชนซึ่งมีไซแลนเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ไม้เนื้อแข็ง ชังข้าวโพด ฟาง ข้าว ชานอ้อย แกลบ รำข้าวโอ๊ต เป็นต้น (ตาราง 5) มีรายงานถึงการผลิต โอลิโกแซคคาไรด์จากกากรำข้าว สกัดน้ำมันโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสเพียงอย่างเดียว พบว่าสามารถสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ได้ถึง 39.9% (Patindol, et al., 2007) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่อ้างถึงการใช้รำข้าวเป็นสารตั้งต้น (Substrate) ในการผลิต เอนไซม์ไซแลนเนสจากจุลินทรีย์อีกด้วย ประสิทธิภาพในการเป็นพรีไบโอติกของรำข้าวได้รับการยืนยันจาก งานวิจัยที่หลากหลาย เช่น Zubaidah et al., (2012) เปิดเผยว่าในการหมักรำข้าวกับเชื้อโพรไบโอติกกลุ่ม Lactobacilli พบว่า *L. plantarum* และ *L. casei* มีการเจริญเติบโตที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับโพรไบโอติกสายพันธุ์อื่นๆ

นอกจากนี้ยังพบว่าโพรไบโอติกที่ใช้โยอาหารจากรำข้าวเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต ยังสามารถผลิตกรดแลกติก (Lactic acid) และกรดไขมันสายสั้น (Short chain fatty acid) ได้อีกด้วย

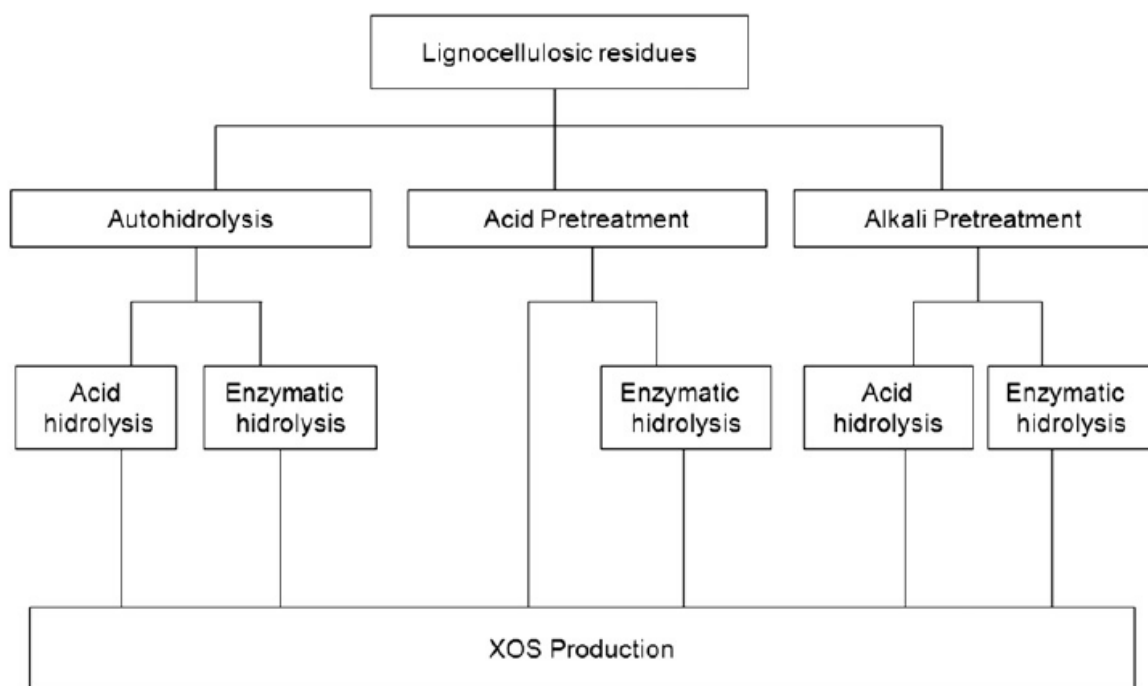
ตาราง 5 ร้อยละปริมาณ xylan และ XOS จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ถูกนำมาใช้สกัด xylan และผลิต XOS โดยการใช้ต่างและเอนไซม์

LCM residue	Xylan extraction	XOS production	Xylan yield (%)	XOS yield (%)	Reference
Corncob	Alkali	Enzymatic hydrolysis	40.8	81.0	Aachary and Prapulla (2009)
Tobacco stalk	Alkali	Enzymatic hydrolysis	21.8	13.8	Akpınar et al. (2009a)
Cane bagasse	Alkali	Enzymatic hydrolysis	86.0	37.1	Brienzo, Carvalho, and Milagres (2010)
Corncob	Alkali	Enzymatic hydrolysis	17.9	60.0	Chapla, Pandit, and Shah (2012)
Cane bagasse	Alkali	Enzymatic hydrolysis	85.0	-	Jayapal et al. (2013)

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Carvalho et al. (2013)

ถึงแม้จะมีงานวิจัยที่กล่าวถึงคุณสมบัติในการเป็นพรีไบโอติกของวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตรหลายชนิด แต่งานวิจัยที่มุ่งเน้นการสกัด (A)XOS จาก AX ในกากรำซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งจำนวนมากจากการสกัดน้ำมันรำข้าว และการทดสอบสมบัติของการเป็นพรีไบโอติกต่อโพรไบโอติกเป้าหมาย ยังคงมีไม่มากนัก เนื่องจากภายในกากรำยังคงมีโปรตีนประกอบอยู่เป็นจำนวนหนึ่ง ดังนั้นในการสกัด (A)XOS ให้มีประสิทธิภาพจึงจำเป็นต้องทำการกำจัดโปรตีนดังกล่าวออก มีงานวิจัยของ Yoon, et al. (2006) ที่นำเสนอขั้นตอนการแยกไซเลนก่อนที่จะผลิต XOS โดยการทำลายพอลิเมอร์แกนหลักของไซเลนด้วยวิธีไฮโดรไลซิส (hydrolysis) มีการศึกษาการแยกไซเลนจากรำข้าวสาลีโดยหลายวิธีการด้วยกัน เช่น การใช้เอนไซม์ความดันสูง (Schooneveld-Bergmans, et al., 1998) การใช้สารละลายต่าง (Bergmans, et al., 1996) และการใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium Hypochlorite) แต่จากข้อจำกัดของการใช้เอนไซม์ความดันสูงที่ทำให้มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวผสมอยู่ในสารสกัดเป็นจำนวนมากและข้อจำกัดในการใช้สารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรท์ซึ่งเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม ทำให้การใช้วิธีสกัดไซเลนด้วยสารละลายต่างเป็นที่นิยมมากกว่า ยิ่งไปกว่านั้นจากการศึกษาการสกัดไซเลนจากชังข้าวโพดยังพบว่าการสกัดด้วยสารละลายต่างเจือจางให้ผลผลิตในปริมาณสูงที่สุด ซึ่งอาจเป็นผลจากการพองตัวจากฤทธิ์ของด่าง ทำให้มีการเพิ่มพื้นที่ผิวภายใน ส่งผลให้ DP ลดลง จึงเกิดการแยกตัวของลิกนิน (lignin) คาร์โบไฮเดรตและการสลายตัวของลิกนินจึงทำให้สามารถสกัดไซเลนได้ในปริมาณมากเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น (Gokhale, et al., 1998) การสกัด XOS จากไซเลนสามารถทำได้

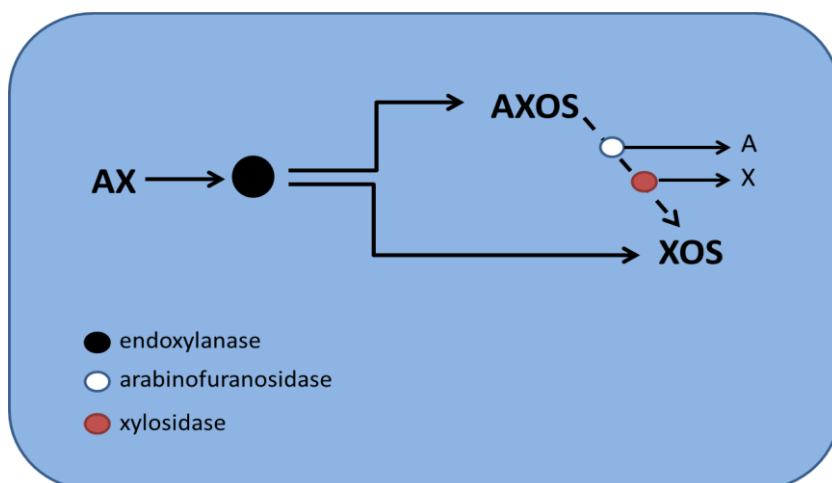
หลายวิธี (ภาพ 14) ทั้งวิธีทางกลควบคู่กับความร้อนสูง เช่น autohydrolysis วิธีทางเคมี เช่น acid hydrolysis (Pellerin, et al., 1991) วิธีทางเอนไซม์หรือวิธีการควบคู่ทั้งทางเคมีและเอนไซม์ เป็นต้น



ภาพ 14 ตัวอย่างวิธีการผลิต XOS ที่นิยมในใช้ในปัจจุบัน

อย่างไรก็ตามการสกัด (A)XOS ด้วยวิธี autohydrolysis และ acid hydrolysis จะทำให้ได้ผลพลอยได้ที่ไม่เป็นที่ต้องการ เช่น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและสารอื่น ๆ ซึ่งไม่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก ทำให้เสียเวลา มีต้นทุนในการกำจัด และอาจจะทำให้ได้สัดส่วนของผลผลิตที่ลดลง วิธีการสกัดที่เป็นที่นิยมในปัจจุบันได้แก่วิธีการทางเคมีควบคู่วิธีการทางเอนไซม์ (ภาพ 15)

วัตถุประสงค์ตั้งต้นที่หลากหลายกว่าวิธีอื่น เช่น การสกัด XOS จากเปลือกข้าวโอ๊ต (Chen et al., 1997) ซึ่งข้าวโพด (Yoon, et al., 2006) ฟางข้าวสาลี (Swennen, et al., 2005) เป็นต้น



ภาพ 16 การผลิต AXOS และ XOS โดย endoxylanase, arabinofuranosidase และ xylosidase

ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาการใช้เอนไซม์ในการสกัดพรีไบโอติก ซึ่งเห็นว่ากลุ่มเอนไซม์ไฮโดรเลส (Hydrolase) ที่ประกอบด้วยเอนไซม์หลัก 3 ชนิด ได้แก่ เซลลูเลส (endo-1,4- β -D-glucanase; EC 3.2.1.4) ไชแลนเนส (endo-1,4- β -D-xylanase; EC 3.2.1.8) และแมนแนนส (mannan endo-1,4- β -D-mannosidase; EC 3.2.1.78) โดยในการสกัด (A)XOS จากไชแลนหรือ AX จะใช้เอนไซม์ไชแลนเนส ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเฮมิเซลลูเลส (Hemicellulase) ชนิดหนึ่งที่มีหน้าที่ย่อยสายพอลิเมอร์ของเฮมิเซลลูโลส ไชแลนเนสแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือเอนโดไชแลนเนส (endo-xylanase) (β -1,4-xylan xylanohydrolase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยแบบสุ่มในสายพอลิเมอร์ของไชแลนหรือ AX ที่มีสายพอลิเมอร์เป็นน้ำตาลไซโลสต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 ทำให้ได้ (A)XOS และอีกชนิดคือเอกโซไชแลนเนส (exo-xylanase) (β -1,4-xylan xylohydrolase) ซึ่งย่อยโอลิโกแซคคาไรด์จากปลายที่ไม่รีดิวซ์ (reduce) ให้สายสั้นลง (ตาราง 6) การเลือกใช้เอนไซม์ไชแลนเนสเป็นสิ่งสำคัญในการย่อยโพลีแซคคาไรด์ การผลิตพรีไบโอติกควรหลีกเลี่ยงการใช้เอนไซม์เอกโซไชแลนเนส เนื่องจากจะทำให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วย (Vázquez, et al., 2000) นอกจากนี้ชนิดของไชแลนเนสมีผลต่อระดับ DP ของ XOS ที่ผลิตได้ (ระหว่าง DP 2-10) ซึ่งส่งผลถึงประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของโพรไบโอติกเป้าหมายที่แตกต่างกันด้วย มีกลไกการทำงานโดยไชแลนเนสจะย่อยบริเวณด้านในของ xylan backbone ให้เป็น XOS ที่มีขนาดตั้งแต่ X2 ขึ้นไป Beta-xylosidase จะย่อย XOS ที่มีขนาดเล็ก ๆ ให้เป็นไซโลส ในส่วนของ branch chain จะถูกย่อยสลายด้วย debranching enzymes เช่น อะราบินอฟูราโนซิเดส (arabinofuranosidase) และอะซิetyl เอคซ์เทอเรส (acetyl esterase) ถ้าเอนไซม์ต่าง ๆ ในกลุ่มเอนไซม์ไซลาลิติก (Xylanolytic enzymes) ถูกแยกออกจากกันจะทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบไชแลนลดลงมาก และหากนำกลับมารวมกันใหม่จะทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายสารประกอบไชแลนเพิ่มขึ้น (Khanok, et al., 2000) Chapla, et al. (2012) รายงานการผลิต XOS จากซึ่งข้าวโพดที่ผ่านการแปรรูปด้วยต่างโดยใช้เอนไซม์ไชแลนเนสจากเชื้อ *Aspergillus foetidus* MTCC 4898 ซึ่งมีเอนไซม์แอกทิวิตี้ (enzyme activity) 8200-8400 U/g ได้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 6.73 ± 0.23 mg/ml เมื่อ

นำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก ได้แก่ *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *Lactobacillus fermentum* และ *L. acidophilus* พบว่าไซโลไบโอส (Xylobiose) และไซโลไตรโอส (Xylotriose) สามารถส่งเสริมการเจริญของ Bifidobacteria ได้ดีกว่า Lactobacilli

ในประเทศไทยมีการศึกษาเกี่ยวกับการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยเอนไซม์ ในกลุ่มไซลาลิโนไลติกและเซลลูโลไลติก (Cellulolytic enzymes) จาก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ TW-1 พบว่าสามารถย่อยเปลือกข้าวโพดได้สูงสุดรองลงมา คือ ชังข้าวโพด ชานอ้อย ฟางข้าว และแกลบตามลำดับ โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลไซโลสและกลูโคส ในงานวิจัยนี้จึงจะกล่าวถึงการใช้เอนไซม์ในการย่อยเฮมิเซลลูโลสในกากำเพื่อผลิต (A)XOS และตรวจสอบคุณสมบัติสำคัญของการเป็นโพรไบโอติกของ (A)XOS อย่างคร่าวๆ

ตาราง 6 เอนไซม์ที่ใช้ผลิต AXOS

Enzyme, GH family (Production organism)	Substrate (AX) origin	AXOS	Reference
Endo-1,4--D-xylanase M3 GH11 (<i>Trichoderma longibrachiatum</i>)	Barley husks	XA ^{2,3} XX	Höije et al., 2006
Endo-1,4--D-xylanase I GH10 (<i>Aspergillus awamori</i>)	Corn cob	A ³ X A ² XX XA ³ X	Kabel et al., 2002
Endo-1,4--D-xylanase I GH10 (<i>Aspergillus awamori</i>)	Wheat bran	A ³ X XA ³ X	Kabel et al., 2002
Endo-1,4--D-xylanase I GH10 (<i>Aspergillus awamori</i>)	Wheat flour	A ³ X XA ³ X A ³ A ³ X A ²⁺³ XX A ²⁺³ A ³ X XA ³ A ³ X XA ²⁺³ XX A ³ A ²⁺³ XX A ²⁺³ A ²⁺³ XX XA ³ A ²⁺³ XX XA ²⁺³ A ²⁺³ XX XA ²⁺³ XA ²⁺³ XX	Kormelink et al., 1993; Gruppen et al., 1993
Endo-1,4--D-xylanase GH11 (<i>Aspergillus</i>)	Wheat flour	XA ³ XX XA ²⁺³ XX XA ³ XXX XXA ³ XX XA ²⁺³ XXX XXA ²⁺³ XX	Hoffmann et al., 1991

12. สภาพที่ใช้ผลิต (A)XOS โดยวิธีการทางเอนไซม์

อัตราเร็วของปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่งนั้นมีอิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยมีผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยา เช่น เวลา อุณหภูมิ ภาวะความเป็นกรด-เบส (pH) ปริมาณของเอนไซม์ ปริมาณของสารตั้งต้น เป็นต้น

1. ความเข้มข้นของเอนไซม์และตัวทำละลาย

เนื่องจากโอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและสามารถละลายน้ำได้ หากใช้น้ำเป็นตัวทำละลายในขั้นตอนการผลิตอาจมีการละลายของสารประกอบอื่นที่ขบ น้ำ เช่น โพลีแซคคาไรด์หรือโปรตีนร่วมด้วย มีรายงานการใช้เอนไซม์เอนโดไซแลนเนสเพื่อย่อยรำข้าวเพื่อให้ได้มาซึ่งใยอาหารและเติมใยอาหารที่ได้ลงไป ในผลิตภัณฑ์ขนมอบ สามารถเพิ่มลักษณะทางเนื้อสัมผัสที่ดีของผลิตภัณฑ์ขนมอบได้ (Lebesi and Tzia, 2012) แต่ยังไม่พบการรายงานผลการผลิตพรีไบโอติกจาก (A)XOS ในกักรำมากนักเอนไซม์ทางการค้าที่ใช้ในการสกัดไซแลนมีอยู่หลายชนิด เช่น เอนโดไซแลนเนสที่ได้จาก *Aspergillus niger*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Thermomyces lanuginosus* โดยมีการรายงานถึงความเข้มข้นที่ใช้ในการสกัด XOS จากไซแลนจากฟางข้าวโอ๊ต ก้านฝ้าย ก้านดอกทานตะวัน จะอยู่ระหว่าง 1-20 U/ml ที่อุณหภูมิ 40-50°C โดยบ่มสารละลายเอนไซม์ 1ml กับสารละลายไซแลน 2% ในซิเตรตบัฟเฟอร์ (Citrates buffer) 50 mM ปริมาตร 10ml ที่ค่าพีเอช 4.6-5.5 (Akpınar, et al., 2007)

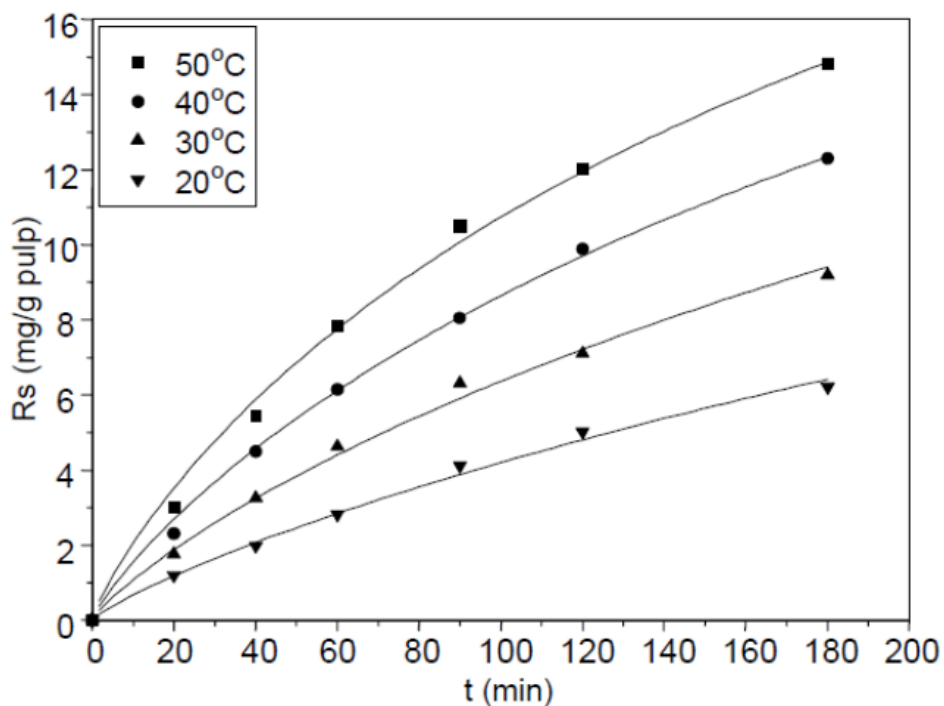
2. อุณหภูมิ

การเพิ่มอุณหภูมิมีผลต่อปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ได้ทั้งทางบวกและทางลบ ถึงแม้การเพิ่มอุณหภูมิจะช่วยเร่งอัตราเร็วของปฏิกิริยา แต่ในขณะเดียวกันการเพิ่มอุณหภูมิก็ จะทำให้เอนไซม์เปลี่ยนสภาพได้ง่ายขึ้น และถ้าเพิ่มอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติ (denaturation) ได้เช่นกัน นอกจากนี้ อุณหภูมิในการสกัดยังมีผลต่อปริมาณสารสกัด กล่าวคือ ในช่วงอุณหภูมิ 10-50°C มีผลทำให้สารสกัดโอลิโกแซคคาไรด์เพิ่มขึ้นและสกัดได้ น้อยลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์จากถั่วเหลืองโดยการแช่ของ ABU-GHANNAM และ McKENNA(1997) พบว่าการแช่ถั่วที่อุณหภูมิสูง ช่วยเพิ่มการดูดซับน้ำและลดเวลาการแช่ถั่วให้เข้าสู่สมดุลการสกัดได้เร็วขึ้น การสกัดที่อุณหภูมิ สูงกว่า 50°C ส่งผลให้ปริมาณสารสกัดต่ำลง เนื่องจากความร้อนที่สูงขึ้นทำให้โปรตีนเสียสภาพอย่างรวดเร็ว น้ำตาลที่ละลายอาจถูกห่อหุ้มไว้ความสามารถในการสกัดลดลง (Kim, et al., 2003)

3. เวลา

เวลามีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เมื่อให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมที่สุดแล้วติดตามการทำงานของเอนไซม์เป็นระยะ ๆ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปนาน ๆ ผลผลิตที่ได้จะมีปริมาณน้อยลงและไม่แปรผันตรงกับเวลา อาจเนื่องมาจากปริมาณของสารตั้งต้นที่เหลือมีจำนวนน้อยลงหรือปริมาณของผลิตภัณฑ์เพิ่มมากขึ้น ถึงระดับที่ทำให้ปฏิกิริยาเข้าสู่จุดสมดุลหรือเกิดการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ นอกจากนี้ระยะเวลาในการสกัดมีผลกับสารในของแข็งแพร่เข้าสู่เฟสของตัวทำละลาย จนกระทั่งความเข้มข้นของตัวถูกละลายในทั้งสองเฟสนั้นเข้าสู่สมดุลหากใช้เวลาในการสกัดน้อยปริมาณตัวถูกละลายที่ชะได้จะมีปริมาณน้อยด้วย สุพจน์ นวลละออง (2552) ศึกษาผลของระยะเวลาต่อปริมาณสารสกัดที่ได้จากเปลือกลูกตาลแห้งโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย โดยกำหนดอัตราส่วนตัวอย่างต่อตัวทำละลายเป็น 1:10 ที่อุณหภูมิ 60°C พบว่าการสกัดโดยใช้เวลานานขึ้นจะได้สารสกัดปริมาณลดลงเล็กน้อย และเมื่อนำสารไปวิเคราะห์ปรีมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์พบว่ามีความเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลอนรีดิวซ์ (Non-reducing

sugar) ที่คาดว่าป็นสารฟรีไบโอติกพบว่าการสกัดเป็นเวลานาน 120 นาทีที่มีปริมาณน้ำตาลอนรีดิวซ์สูงสุด นอกจากนี้สภาวะที่ใช้ในการทำงานของเอนไซม์ไซแลนเนสที่แตกต่างกันจะให้ผลผลิตที่ได้แตกต่างกันด้วย เช่น Valcheva, et al. (2000) ทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ไซแลนเนสที่อุณหภูมิแตกต่างกันพบว่า ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นอุณหภูมิที่ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลสูงที่สุด ซึ่งสามารถอธิบายได้จากภาพ 17



ภาพ 17 จนพลศาสตร์ของเอนไซม์ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน
ที่มา: Valcheva, et al. 2000

13. การทำ (A)XOS ให้บริสุทธิ์

ฟรีไบโอติกรวมถึง (A)XOS ที่ได้จากการผลิตมักอยู่ในรูปของสารละลายซึ่งอาจมีการประปนของสารประกอบอื่น ๆ เช่น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว กรดอะซิติก (Acetic acid) โปรตีน และไขมัน ดังนั้นการแยกสารฟรีไบโอติกให้บริสุทธิ์ก่อนเพื่อลดความเสี่ยงของโอกาสที่เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคจะเจริญเติบโตได้ ความบริสุทธิ์ของฟรีไบโอติกชนิด (A)XOS ทั่วไปทางการค้าจะอยู่ในช่วง 70%-95% เทคนิคต่าง ๆ ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการทำให้ (A)XOS มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น เช่น การระเหยภายใต้สุญญากาศเพื่อกำจัดตัวทำละลาย การสกัดโดยตัวทำละลายเพื่อกำจัดสารที่ไม่ใช่แซคคาไรด์ การตกตะกอนโดยตัวทำละลายเพื่อกำจัดโปรตีน (Vegas, et al., 2004) การดูดซับเพื่อกำจัดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Yuan, et al., 2004) การแลกเปลี่ยนประจุเพื่อกำจัดเกลือ (Ion change) และการแยกโดยโครมาโทกราฟี (Vegas, et al., 2004; Yuan et al., 2004) เทคนิคการดูดซับถูกนำมาใช้ในการแยก XOS จากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและสารประกอบอื่น ๆ (Kokubo and Ikemizu., 2004; Yuan, et al., 2004) มีการใช้แอคติเวตคาร์บอน (Activated carbon) เพื่อดูดซับ XOS ในการผลิต XOS จากเปลือกอัลมอนต์ โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบ XOS 20 g/L และแอคติเวตคาร์บอน 1.5-50 mg/mL (Montane, et al., 2006) เพื่อวัตถุประสงค์การดูดซับและยังมีการใช้

สารละลายเอทานอล (Ethanol) ในความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อแยกน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวออกจาก XOS ให้ได้มากที่สุดแสดงดังตาราง 7 วิธีที่นิยมทำให้สารฟรีโบโอติกบริสุทธิ์สามารถกล่าวโดยสังเขปได้ดังนี้

1. การทำให้บริสุทธิ์ด้วยตัวทำละลายและการตกตะกอน

การผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ให้บริสุทธิ์ด้วยตัวทำละลายเป็นวิธีที่ดีในการกำจัดส่วนประกอบอื่นๆที่ไม่ใช่โอลิโกแซคคาไรด์หลังจากการย่อยและการใช้ตัวทำละลายในการตกตะกอนของสารละลายเพื่อทำให้ (A)XOS บริสุทธิ์ เช่น เอทานอลอะซิโตน (acetone) และโพรพานอล (propanol) (Swennen, et al., 2005) ความบริสุทธิ์และปริมาณสารที่ได้กลับคืนมานั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของตัวทำละลายที่ใช้และลิโนเชลลูโลสของวัตถุดิบที่ใช้ผลิตยังมีรายงานว่าเอทานอลสามารถสกัด XOS ได้ความบริสุทธิ์สูง แต่ยังคงมีข้อจำกัดในแง่ของปริมาณ (Vazquez, et al., 2005)

2. การทำให้บริสุทธิ์ด้วยการดูดซับ

วิธีการดูดซับถูกนำมาใช้ในการทำงานร่วมกับวิธีอื่นๆเพื่อให้ได้โอลิโกแซคคาไรด์ที่บริสุทธิ์โดยการแยกน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือการกำจัดสารประกอบอื่นๆที่ไม่ต้องการออกจากสารละลายสกัด (Kokubo and Ikemizu, 2004; Yuan, et al., 2004) ถ่านกัมมันต์เป็นวัสดุหลักที่นำมาใช้กำจัดสารอินทรีย์ในสารละลายโดยใช้หลักการดูดซับ (Adsorption) และดูดซึม (Absorption) การดูดซับจะเป็นการจับกันอย่างหลวม ๆ ของสารอินทรีย์และคาร์บอนที่ผิวหน้าของถ่านกัมมันต์ โดยยึดกันด้วยแรงแวนเดอร์วาลส์ (van der Waals) เป็นชั้น ๆ ส่วนกระบวนการดูดซึมนั้นจะอาศัยหลักการแพร่ของก๊าซหรือสารประกอบเข้าไปในร่างแหรูพรุนภายในเม็ดถ่านซึ่งภายในจะเกิดปฏิกิริยาเคมี หรือเกิดการจับยึดโดยความเป็นร่างแหยึดเหนี่ยวไว้ โดยโมเลกุลขนาดใหญ่จะถูกกักไว้ในรูขนาดใหญ่ส่วนโมเลกุลขนาดเล็กจะถูกกักไว้ในรูขนาดเล็ก ดังนั้นสารที่ผ่านรูออกมาจึงมีความบริสุทธิ์ Montane, et al. (2006) รายงานผลการใช้ถ่านกัมมันต์เพื่อทำให้ XOS ที่สกัดออกมาจากเปลือกของถั่วอัลมอนด์มีความบริสุทธิ์มากยิ่งขึ้น

3. การทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคโนโลยีเยื่อเลือกผ่าน

เยื่อเลือกผ่านคือเยื่อบาง ๆ ที่ยอมให้สารบางอย่างผ่านได้แต่สารบางอย่างผ่านไม่ได้ตัวอย่างเช่น เยื่อหุ้มเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็นเยื่อเลือกผ่าน เป็นต้น Ultrafiltration นิยมใช้กรองอนุภาคขนาดเล็กหลักการ Ultrafiltration มีดังนี้ สารอนุภาคและตัวถูกละลายถูกดันผ่านเยื่อกรองโดยใช้ความดันเช่นเดียวกับออสโมซิส (Osmosis) ผันกลับแต่แตกต่างกันตรงที่ไม่มีความดันออสโมซิสเข้ามาเกี่ยวข้อง ส่วนขนาดอนุภาคที่ถูกกักไว้โดยเยื่อกรองขึ้นอยู่กับขนาดรูของเยื่อกรองขนาดและรูปร่างของอนุภาคนั้น ๆ เยื่อกรอง Ultrafiltration มักมีความหนา 65-140 ไมครอน มีรูขนาด 0.01-8 ไมครอน ทำให้สามารถแยกอนุภาคที่มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight cut off) ตั้งแต่ 300 จนถึง 100,000 ออกได้ เทคนิคนี้ถูกนำมาใช้ในการทดลองของ Li, et al. (2004) โดยนำมาใช้ในการแยกน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์หลาย ๆ ชนิดออกจากกัน เช่น ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์และมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Malto-oligosaccharide) (Grzeskowiak-Przywecka, 2004) เป็นต้น อย่างไรก็ตามยังคงมีข้อมูลสนับสนุนในการใช้แยก (A)XOS ค่อนข้างน้อย

ตาราง 7 วิธีการทำ XOS ให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคต่าง ๆ

Substrate	Method for XOS generation	Other process stages	References
Pulp slurry	Enzymatic/acid hydrolysis	Concentration (reverse osmosis), filtration, ultrafiltration, adsorption, ion exchange, spray-drying	Izumi et al., 2004
Birchwood xylan	Enzymatic hydrolysis	Anion-exchange and size-exclusion chromatography	Christakopoulos et al., 2003
Corn cobs	Steaming and enzymic Hydrolysis	Flocculation, ion exchange, nanofiltration, adsorption, evaporation	Yuan et al., 2004
Rice husks	Hydrothermal treatments	Evaporation, ethyl acetate extraction, ion exchange	Vegas et al., 2004
Wheat	Enzymatic hydrolysis	Ultrafiltration with membranes of different cut-off	Swennen et al., 2005
Barley husks	Hydrothermal treatments	Evaporation, ethyl acetate extraction, ion exchange	Vegas et al., 2005

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Moure et al. (2006)

14. หลักการวิเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar analysis) ด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid เป็นการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เป็น soluble sugar, oligomeric และ polymeric sugar ทั้งหมดได้ในเวลาเดียวกัน ด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid method ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยม เนื่องจากกรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid) เข้มข้นที่ใช้ในการวิเคราะห์ จะทำให้น้ำตาลทั้งที่เป็น oligomeric และ polymeric sugar ให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว จากนั้นจึงคำนวณหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในสารสกัด โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของสารละลายน้ำตาลมาตรฐานซึ่งส่วนใหญ่ใช้เป็นน้ำตาลกลูโคสหรือซูโครส (Dubois, et al., 1956)

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar analysis) ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ส่วนใหญ่จะมีหมู่คาร์บอนิล (Carbonyl) ซึ่งจะถูกออกซิไดซ์ (Oxidize) ได้ง่าย คาร์โบไฮเดรตเหล่านี้จัดเป็นกลุ่มที่เรียกว่าน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งอาจตรวจสอบปริมาณได้โดยอาศัยคุณสมบัติในการรีดิวซ์โลหะไอออนเช่น Cu^{2+} หรือ Ag^{+} ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ละลายน้ำ คือน้ำตาลที่มีหมู่อัลดีไฮด์ (Aldehyde) หรือคีโตน (Ketone) ที่เป็นอิสระอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลและจะถูกออกซิไดส์ได้ง่ายด้วยตัวออกซิไดส์อย่างอ่อน จากคุณสมบัติดังกล่าวจึงทำให้สามารถวิเคราะห์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid method ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ที่สามารถทำได้ง่ายและราคาไม่แพง ตัวอย่างของน้ำตาลกลุ่มนี้ได้แก่น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวทุกชนิดเช่น กลูโคสกาแลคโทสและฟรุคโทสเป็นต้น และน้ำตาลโมเลกุลคู่บางชนิดเช่น แลคโทสและมอลโทส เป็นต้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่หลงเหลืออยู่อาจยังเป็นกลุ่มของคาร์โบไฮเดรตที่ละลายได้จุลินทรีย์ซึ่งอาศัยอยู่ในกระเพาะสามารถจะนำไปใช้ประโยชน์ในการหมักย่อยเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของจุลินทรีย์ต่างๆ ส่วนคาร์โบไฮเดรตที่ไม่สามารถถูกออกซิไดส์ได้เนื่องจาก anomeric carbon ทั้งคู่ถูกจับยึดไว้โดยพันธะไกลโคไซด์ เช่น ซูโครสจัดว่าเป็นน้ำตาลที่ไม่ถูกรีดิวซ์

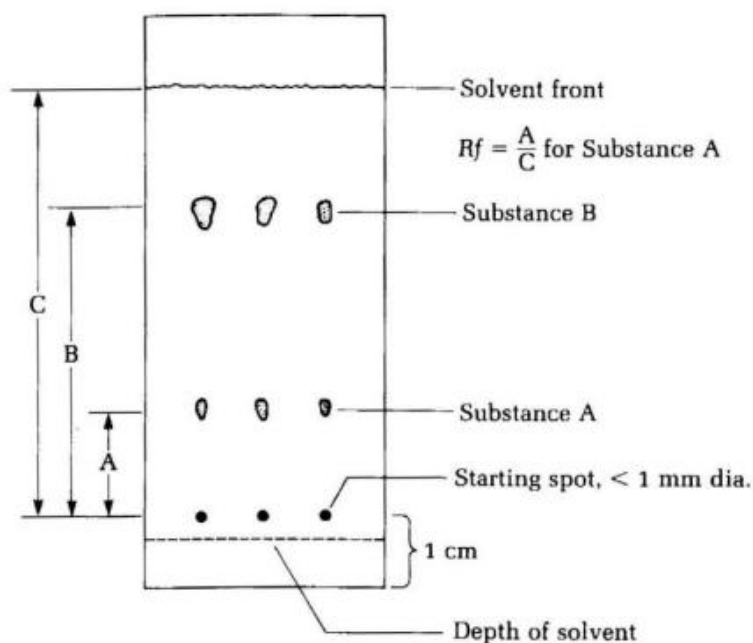
3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลเพนโทแซนทั้งหมด (Total pentosan) ด้วยวิธี orcinol hydrochloric

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลเพนโทแซนมีการใช้อย่างกว้างขวางมากขึ้น เนื่องจากสามารถระบุคุณสมบัติเชิงรีโอโลยีของแป้งโด (Hoseney, 1984) ลักษณะเฉพาะของการผลิตขนมปังโดยใช้แป้งข้าวสาลีและแป้งข้าวไรย์และการแยกประเภทของใยอาหาร (Southgate, et al., 1978; Prosky, et al 1984; Halvarson and Alstin, 1984) น้ำตาลเพนโทแซนเป็นหนึ่งในองค์ประกอบหลักของใยอาหารในกลุ่มธัญพืช Ford (1981) พัฒนาวิธีการตรวจสอบอัตราส่วนของน้ำตาลเฮกโซสและน้ำตาลเพนโทสในสารละลาย ซึ่งเมื่อน้ำตาลเพนโทสทำปฏิกิริยากับกรดจะเปลี่ยนเป็น furfural และรวมตัวกันกับ orcinol ในสภาพที่มี ferric ion เกิดเป็นสีเขียวอมฟ้า ในขณะที่น้ำตาลเฮกโซสจะทำปฏิกิริยากับ orcinol เกิดเป็น 5-hydroxymethyl furfural ให้สีเหลืองอมน้ำตาล

4. การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยการำข้าวสาคัดน้ำมันด้วยเอนไซม์เอนโด-1,4-β-Xylanase ด้วยวิธี Thin Layer Chromatography

ทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (Thin Layer Chromatography; TLC) เป็นเทคนิคการวิเคราะห์องค์ประกอบสารที่สะดวก รวดเร็ว และราคาไม่แพง นิยมใช้ในการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของสารระหว่างกระบวนการแยกสารในขั้นตอนต่างๆ และสามารถตรวจหาจำนวนองค์ประกอบในของผสมหลักการของ TLC คือ วัสดุภาชนะจะถูกเคลือบติดไว้ที่แผ่นกระจก แผ่นพลาสติกบางๆ หรือแผ่นอลูมิเนียม สารจะถูกแต้มไว้ที่ปลายด้านหนึ่งของแผ่น จากนั้นจึงนำไปวางลงในภาชนะที่ใส่ตัวทำละลายเคลื่อนที่ไว้ เมื่อตัวทำละลายถูกดูดซึมขึ้นไปตามตัวดูดซับก็จะพาสารตัวอย่างขึ้นไปด้วย จึงเกิดการแยกของสาร (ภาพ 18) ตัวดูดซับที่นิยมใช้ในเทคนิค

TLC ได้แก่ อลูมินาและซิลิกาเจล โดยทั่ว ๆ ไปแล้วนิยมใช้ตัวดูดซับเป็นอลูมินากับสารกลุ่มที่ไม่มีขั้วหรือมีขั้วน้อยๆ เช่น ไฮโดรคาร์บอน อัลคิลเฮไลด์ อีเทอร์ และนิยมใช้ซิลิกาเจลกับสารที่ค่อนข้างมีขั้ว เช่น แอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ เอมีน เป็นต้น



ภาพ 18 ตำแหน่งการแต้มสาร ระดับตัวทำละลาย solvent front ในการทำ TLC

ที่มา: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในปี 2551 ธนวรรณ ศรีนาง และคณะ ทำการทดสอบผลิตภัณฑ์จากการหมัก *Bacillus sp.* strain TW-1 ในอาหารที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด เมื่อตรวจสอบชนิดของน้ำตาลใน culture supernatant ด้วยวิธี TLC โดยเปรียบเทียบผลิตภัณฑ์ที่ได้กับสารละลายมาตรฐานพบว่า ไดไซโลสและไซโลไบโอสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ส่วนผลิตภัณฑ์รองเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์อื่น ๆ

5. การวิเคราะห์หาปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบโดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

การวิเคราะห์แซคคาไรด์นิยมทำการวัดด้วยเครื่อง HPLC หรือ LC/MS (Liquid Chromatography/Mass spectrometry) ขึ้นอยู่กับลักษณะของตัวอย่างและผลที่ต้องการจากการวิเคราะห์ HPLC เหมาะสำหรับตัวอย่างที่เป็นสารผสมของแซคคาไรด์หลายๆชนิด เพื่อวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของแซคคาไรด์ที่ผสมกันอยู่ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ด้วย HPLC มีให้เลือกด้วยกัน 3 วิธีคือ

5.1 Size exclusion, Ligand exchange เหมาะกับการวิเคราะห์ Saccharides, sugar alcohols และ Polyhydric alcohols ที่มีน้ำหนักโมเลกุล (Molecular weights) ประมาณ 1000 หรือน้อยกว่าและสามารถแยกด้วยน้ำหนักโมเลกุล

Stationary phase: Sulfonated Polystyrene

Mobile phase: Water

5.2 Normal phase (partition) เหมาะกับการแยกสารเป็นชนิดๆ สำหรับ Saccharides, sugar alcohol และ Polyhydric alcohols

Stationary phase: amino base Chemical Bonded Polymer

Mobile phase: Acetonitrile/ Water

5.3 Anion exchange เหมาะกับการแยกสารตัวอย่างที่มีองค์ประกอบเป็นพวกน้ำตาลรีดิคัล

Stationary phase: Anion Exchange Porous Polymers

Mobile phase: Borate Buffer

การเลือกจะใช้วิธีใดในการวิเคราะห์ควรพิจารณาจากชนิดของตัวอย่างเพื่อให้ได้การแยกที่ดีที่สุดเช่นเดียวกับการเลือก detector ที่จะต้องเลือกให้เหมาะสมกับลักษณะของตัวอย่าง โดยปกติการวิเคราะห์แซคคาไรด์ด้วย HPLC มักจะใช้ Refractive index detector ในการวัด แต่ในบางครั้งเช่นการวิเคราะห์แซคคาไรด์ใน Biological sample หรือ Natural products ต้องการวัดที่มีความเฉพาะและ sensitivity ที่สูงกว่า เพราะตัวอย่างมักจะไม่บริสุทธิ์จำนวนมากและปริมาณของแซคคาไรด์ที่ต้องการวิเคราะห์ก็มักจะมีปริมาณต่ำ

15. การทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์และกรดในสภาวะจำลองของระบบทางเดินอาหาร

สารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่ดีต้องสามารถทนต่อการย่อยของกรดในกระเพาะอาหารและลงสู่ลำไส้ใหญ่ได้ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงหรือถูกดูดซึมในลำไส้เล็กหรือในกระเพาะอาหาร เพื่อที่จุลินทรีย์ประจำถิ่นหรือโพรไบโอติกที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่จะสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน (Gibson, 2004) ในการทดสอบโดยจำลองสภาวะในระบบทางเดินอาหาร การทดลองเป็นการทดลองตามลำดับต่อเนื่องเพื่อให้มีสภาวะใกล้เคียงกับสภาวะที่เกิดขึ้นจริงในร่างกายที่อุณหภูมิ 37°C โดยดัดแปลงวิธีทดสอบจาก Fässler et al. (2006) การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อการย่อยในกระเพาะอาหาร (พีเอช 2) และเอนไซม์ human pancreas α -amylase ในสภาวะจำลองลำไส้เล็ก พบว่ามีค่าการต้านทานต่อการย่อยร้อยละ 79.56 และ 90.27 ตามลำดับ ผลการทดสอบความสามารถในการส่งเสริมจุลินทรีย์กลุ่มที่มีประโยชน์ในลำไส้โดยการหมักโพลิแซคคาไรด์ที่ต้านการย่อยในสภาวะจำลองในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กข้างต้นด้วยจุลินทรีย์จากอุจจาระของคนสุขภาพดีในระบบจำลองลำไส้ใหญ่มนุษย์ พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตอย่างจำเพาะต่อแบคทีเรียกลุ่ม Lactobacillus (สันทัด และคณะ, 2553)

วิธีดำเนินงานวิจัย

วัตถุดิบ

วัตถุดิบ แกลบและฟางข้าว ที่ใช้ตลอดงานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก เกษตรกรและโรงสีใน จังหวัดพิษณุโลก

เอนไซม์

1. เอนไซม์เอนโดไซแลนเนสทางการค้าได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท Novozyme Co. Ltd., Denmark ทั้งหมด 2 ชนิด ได้แก่

1.1 Ultraflo MAX (β -glucanase, 250FXU-S/g; Xylanase, 700EGU/g)

1.2 Pentopan mono BG (2,500 FXU(W)/g from *Thermomyces lanuginosus*)

2. Pepsin (lyophilized powder, 3,200-4,500 units/mg protein, Sigma, USA)

3. Pancreatin (from porcine pancreas, 4 × USP specifications, Sigma, USA)

สารเคมี

1. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ด้านเคมี

1.1 Activated carbon (Pancreas, Spain)

1.2 Sodium hydroxide (Lab scan, Ireland)

1.3 Hydrochloric acid (Lab scan, Ireland)

1.4 Ethanol 95-99% (Lab scan, Ireland)

1.5 Sodium chlorite (Sigma, Germany)

1.6 Phenol (Lab scan, Ireland)

1.7 Sulfuric acid (Lab scan, Ireland)

1.8 3,5 dinitrosalicylic acid (Sigma, Germany)

1.9 Sodium potassium tartrate (Lab scan, Ireland)

1.10 Pancreatic (Sigma, Germany)

1.11 Pepsin (Sigma, Germany)

1.12 N-butanol (Lab scan, Ireland)

1.13 Acetic acid (Lab scan, Ireland)

1.14 Me- β -D-Glucoside (Sigma, USA)

1.15 Methanol (Lab scan, Ireland)

1.16 Pyridine (Wako, Japan)

1.17 Acetone (Wako, Japan)

1.18 Barium carbonate (Wako, Japan)

1.19 Sodium borohydride (Wako, Japan)

1.20 Resin Amberlite IR-200C (Wako, Japan)

1.21 Orcinol (Sigma) (Wako, Japan)

- 1.22 Potassium chloride (Lab scan, Ireland)
- 1.23 Potassium dihydrogen phosphate (Lab scan, Ireland)
- 1.24 Sodium hydrogen carbonate (Lab scan, Ireland)
- 1.25 Sodium chloride (Lab scan, Ireland)
- 1.26 Magnesium chloride (Lab scan, Ireland)
- 1.27 Calcium chloride (Lab scan, Ireland)
- 1.28 Bile salt (Sigma, Germany)
- 1.29 Arabinose (Merck, Germany)
- 1.30 Xylose (Merck, Germany)
- 1.31 Xylobiose (Wako, Japan)
- 1.32 Xylotriose (Wako, Japan)

2. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ด้านจุลชีววิทยา

- 2.1 MRS Broth (Difco, USA)
- 2.2 Nutrient broth (Merck, Germany)
- 2.3 Agar (Difco, USA)
- 2.4 Peptone (Difco, USA)
- 2.5 Beef extract (Difco, USA)
- 2.6 Yeast extract (Difco, USA)
- 2.7 Tween 80 (Merck, Germany)
- 2.8 Ammonium citrate (Ajax, Australia)
- 2.9 Sodium acetate (Ajax, Australia)
- 2.10 Magnesium sulphate (Ajax, Australia)
- 2.11 Manganese sulphate (Ajax, Australia)
- 2.12 Dipotassium hydrogen phosphate (Ajax, Australia)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท
 2. เครื่อง Anaerobic Chamber (Bactrone EZ-2, SHELL-LAB, USA)
 3. เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (RC-5C Plus, Sorvall, Germany)
 4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (GENESYS 20 Visible spectrophotometer, Thermo, Germany)
 5. เครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง (PIONEER SERIES, OHAUS, USA)
 6. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (FG2 FiveGo, Mettler Toledo, Switzerland)
 7. เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Labconco 6 Liter Benchtop Freeze Dry System, USA)
 8. แผ่น TLC สำเร็จรูป เคลือบซิลิกาเจล (60F254, Merck, Germany)
 9. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (HVA-85, Hirayama, Japan)
 10. ขาตั้งบิวเรตและที่จับยัด
 12. เครื่องแก้วได้แก่ ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ปีกเกอร์ (beaker) หลอดทดลอง (test tube) กระบอกตวง (cylinder) และไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด (10-100 และ 1000 ไมโครลิตร) ปิเปต (pipette) ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
- อุปกรณ์อื่นๆ

จุลินทรีย์

No.	Microorganisms	Strain No.
1	<i>Lactococcus brevis</i>	TISTR860
2	<i>Lactococcus fermentum</i>	D-18
3	<i>Lactococcus lactis</i>	FFL1-4
4	<i>Lactococcus paracasei</i>	TISTR860
5	<i>Lactobacillus plantarum</i>	JCM1149
6	<i>Lactococcus rhamnosus</i>	LGG
7	<i>Bifidobacterium animalis</i>	TISTR2194
8	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	TISTR2129
9	<i>Bifidobacterium breve</i>	
10	<i>Bifidobacterium infantis</i>	
11	<i>Bifidobacterium longum</i>	

วิธีการทดลอง

งานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนแรกจะเป็นส่วนของการผลิตโพลิโกแซคคาไรด์จากวัสดุพลอยได้จากข้าว ซึ่งได้ดำเนินการในปีที่ 1 จากนั้นในส่วนที่สองจะเป็นการนำโพลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้มาทดสอบคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติก ซึ่งจะดำเนินการในปีที่ 2 ต่อไป

PART I การผลิตโพลิโกแซคคาไรด์จากวัสดุพลอยได้จากข้าว

ทำการผลิตโพลิโกแซคคาไรด์จากเฮมิเซลลูโลสของแกลบและฟางข้าว ตามกระบวนการต่อไปนี้

1. การเตรียมตัวอย่างแกลบและฟางข้าว

แกลบและฟางข้าวได้รับการอนุเคราะห์จากอุตสาหกรรมการผลิตข้าวในจังหวัดพิจิตร ประเทศไทย นำแกลบมาบดด้วยเครื่องบดไฟฟ้า จากนั้นนำไปร่อนด้วยตะแกรงขนาด 70-100 mesh เพื่อให้ได้ขนาดอนุภาคของผงแกลบตั้งแต่ 0.105-0.149 mm ส่วนฟางข้าว นำมาตัดให้ได้ความยาว 0.5 cm นำตัวอย่างทั้งสองมาทำแห้งด้วยตู้อบลมร้อนจนมีความชื้นไม่เกิน 10% ก่อนบรรจุในถุงสุญญากาศและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -200°C สำหรับการใช้งานต่อไป

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของแกลบและฟางข้าว

นำแกลบและฟางข้าวที่เตรียมไว้ข้างต้นมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ปริมาณโปรตีน เถ้า ไขมันและเยื่อใย (AOAC, 2000) วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดด้วยวิธีกรดฟีนอล-ซัลฟูริก (Dubois et al., 1956) วิเคราะห์เฮมิเซลลูโลสโดยใช้วิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวมวลของ NREL

2.1 การวิเคราะห์ความชื้นด้วยเครื่องวิเคราะห์ความชื้นอัตโนมัติ

ซึ่งการทำให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนอย่างละเอียดประมาณ 1-2 กรัม ใส่ในภาชนะหาความชื้นที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้วนำไปอบในเครื่องวิเคราะห์ความชื้นแบบอัตโนมัติที่อุณหภูมิ 105°C จนกระทั่งเครื่องคำนวณปริมาณความชื้นจุดและบันทึกผล

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีเจดัล Kjeldahl Method

อ้างอิงวิธี AOAC, 2000 โดยซึ่งการนำน้ำหนักประมาณ 2-5 กรัม เติม Mixed catalyst: CuSO_4 0.1 กรัม, Na_2SO_4 2 กรัม นำมาผ่านกระบวนการย่อยด้วยกรด H_2SO_4 เข้มข้น 20-25 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 400°C จนกระทั่งสารละลายใส ทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำกลั่นลงในหลอดย่อย 10-15 มิลลิลิตร นำหลอดย่อยมาต่อเข้ากับเครื่องกลั่นและเติม 40% NaOH 40-50 มิลลิลิตร ซึ่งในกระบวนการนี้เมื่อสิ้นสุดกระบวนการไนโตรเจนที่อยู่ในสารตัวอย่างจะอยู่ในรูปของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ จากนั้นนำสารตัวอย่างมาผ่านกระบวนการกลั่น โดยไนโตรเจนที่อยู่ในรูปของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ จะทำปฏิกิริยากับ NaOH เกิดเป็น NH_3 ซึ่งจะถูกลดด้วย 4% boric acid แล้วนำมาไตเตรทด้วย 0.1 M HCl ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนและทำการคำนวณหาปริมาณของโปรตีน

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{(A-B) \times N \times 1.4 \times F}{Wt}$$

เมื่อ

A คือปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B คือปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไทเทรตกับblank (มิลลิลิตร)

Wt คือน้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

N คือความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (N)

F คือค่าแฟคเตอร์

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยวิธี Soxhlet

อ้างอิงวิธี AOAC, 2000 โดยนำกากรำ 2 กรัม ซึ่งน้ำหนักรวมกันกับถ้วยและ thimble ปิดด้วยสำลี จากนั้นเติมปิโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ทำการสกัดเป็นระยะเวลานาน 6 ชั่วโมงเมื่อสกัดเสร็จนำตัวอย่างออกจากSoxhlet ทิ้งให้ตัวทำละลายไหลจาก Soxhlet ลงในขวดก้นกลมจนหมด ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ นำมาทำแห้งในเตาอบที่อุณหภูมิ 105°C จนแห้ง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น จากนั้นนำมาคำนวณหาปริมาณไขมันทั้งหมดจากสูตร

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{W2 \times 100}{W1}$$

เมื่อ

W1 คือน้ำหนักขวดตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

W2 คือน้ำหนักขวดตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณเยื่อใย

เยื่อใยเป็นส่วนหนึ่งของเส้นใยที่ไม่ละลายน้ำ พบในส่วนของผนังเซลล์พืชที่ไม่ใช่ส่วนของ pectins, gums, และ mucilages และไม่สามารถหมักได้ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ สามารถสกัดได้โดยอ้างอิงวิธี AOAC, 1990 นำตัวอย่างที่สกัดเอาไขมันออกแล้วมาหาปริมาณ เยื่อใย โดยนำตัวอย่างใส่ลงในบีกเกอร์ และเติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น ต้มให้เดือดเป็นเวลา 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรองโดยใช้ suction ล้างด้วยน้ำร้อนหลาย ๆ ครั้งจนหมดกรด แล้วเทกากกลับใส่ในบีกเกอร์ใบเดิม เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์แล้วต้มให้เดือดเป็นเวลา 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองโดยใช้ suction ล้างด้วยน้ำร้อนหลาย ๆ ครั้งจนหมดต่าง แล้วเทกากกลับใส่ในบีกเกอร์ใบเดิม ล้างกากด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก 1 % แล้วล้างตามด้วยน้ำร้อนจนหมดกรด นำกากล้างด้วยเอทานอล 95% 2 ครั้ง 15-20 มิลลิลิตร นำกากใส่ลงกระดาษกรองชนิดปราศจากเถ้าเบอร์ 41 ซึ่งผ่านการอบแห้งที่ 80°C และชั่งจนทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไปอบที่อุณหภูมิ 105°C นาน 1 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำกากไปเผาให้เป็นเถ้าในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550°C จนเป็นเถ้าสีขาว ปล่อยให้เย็นใน desiccators ชั่งหาน้ำหนักเถ้าที่ได้ คำนวณหาปริมาณเยื่อใยจากสูตร

$$\text{น้ำหนักเยื่อใย(กรัม)} = \text{น้ำหนักแห้งของกาก(กรัม)} - \text{น้ำหนักเถ้า (กรัม)}$$

$$\text{ปริมาณเยื่อใย(ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักเยื่อใย (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างอาหาร (กรัม)}} \times 100$$

2.5 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

ดัดแปลงจาก AOAC, 2000 โดยชั่งกากรำประมาณ 2 กรัมลงในถ้วยกระเบื้องเคลือบ เผาบนเตาไฟฟ้า จนกระทั่งหมดควัน จากนั้นนำไปเผาที่อุณหภูมิ 550°C จนกระทั่งได้เถ้าสีเทาอ่อนหรือสีขาวสม่ำเสมอ นำออกจากเตาเผาเก็บในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้องคำนวณหาปริมาณเถ้าจากสูตร

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)} = \frac{(W2-W1) \times 100}{S}$$

เมื่อ

W1คือน้ำหนักก่อนอบ (กรัม)

W2คือน้ำหนักหลังอบ (กรัม)

S คือ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

2.6 การวิเคราะห์ใยอาหารทั้งหมด

ใยอาหารทั้งหมด คือผล รวมระหว่างใยอาหารที่ละลายน้ำและใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ ใยอาหารบางชนิดสามารถถูกหมักได้ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบไปด้วย pectins, gums, และ mucilages สามารถสกัดได้โดยอ้างอิงวิธี AOAC, 2000 (993.19) นำกากรำมา 0.5 กรัม เติมฟอสเฟสบัฟเฟอร์ 25 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเป็น 7.0 เติมเอนไซม์ α -amylase 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 95-100°C เป็นเวลา 35 นาที ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้องและปรับพีเอชเป็น 8.0 เติมเอนไซม์ protease 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นปรับพีเอชเป็น 4.0 แล้วเติมเอนไซม์ amyloglucosidase 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกกากรำออก นำตะกอนกากรำมาล้างด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 นำไปอบที่ 105°C และนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและเถ้า นำสารละลายตัวอย่างมาตกตะกอนด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 อุณหภูมิ 60°C ในปริมาณ 4 เท่าของปริมาตรสารละลายตัวอย่าง ทิ้งไว้ 1 คืน กรองผ่านคูชิเบิ้ลด้วยเครื่องกรองสุญญากาศ ล้างตะกอนด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 80 และ 95 ตามลำดับ และสุดท้ายล้างด้วยอะซิโตน นำไปอบที่อุณหภูมิ 105°C และนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและเถ้า จากนั้นคำนวณหาปริมาณใยอาหารทั้งหมดจากสูตร

$$\text{ปริมาณใยอาหารทั้งหมด (ร้อยละ)} = \frac{\left[\frac{R1+R2}{2} \right] - P - A - B}{(M1+M2)/2} \times 100$$

เมื่อ

R1 และ R2 คือ น้ำหนักตะกอนที่เหลือหลังอบของซ้ำที่ 1 และ 2 (กรัม)

P คือ น้ำหนักโปรตีนของตัวอย่าง (กรัม)

A คือ น้ำหนักเถ้าของตัวอย่าง (กรัม)

B คือ blank

M1 และ M2 คือ น้ำหนักตัวอย่างซ้ำที่ 1 และ 2 (กรัม)

3. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

ข้อมูลอัตราส่วนของน้ำตาลอะราบินออสต่อไซโลสในวัตถุดิบ สามารถนำมาทำนายโครงสร้างของพอลิเมอร์เพื่อหาเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตฟรีไบโอติก

ทำการวิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในวัตถุดิบโดยเครื่อง high-performance anion-exchange chromatography (HPAEC) ตามวิธีของ Peng et al (2010) เริ่มจากการการย่อยวัตถุดิบจนอยู่ในรูปของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วย 6% H₂SO₄ เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมงที่ 105°C หลังจากนั้นนำตัวอย่างมาเจือจาง 30 เท่า หลังจากกรองผ่านไซริงฟิลเตอร์ขนาด 0.45 µm จึงนำส่วนของเหลวที่กรองได้ฉีดเข้าเครื่อง HPAEC (Dionex ISC 3000, US) ที่ต่อกับเครื่อง amperometric detector, AS50 autosampler and a CarbowacTM PA1 column (4 × 250 mm, Dionex) โดยใช้สารละลายน้ำตาล l-arabinose, d-glucose, d-xylose, d-mannose และ d-galactose เป็นสารมาตรฐานเพื่อคำนวณหาปริมาณต่อไป

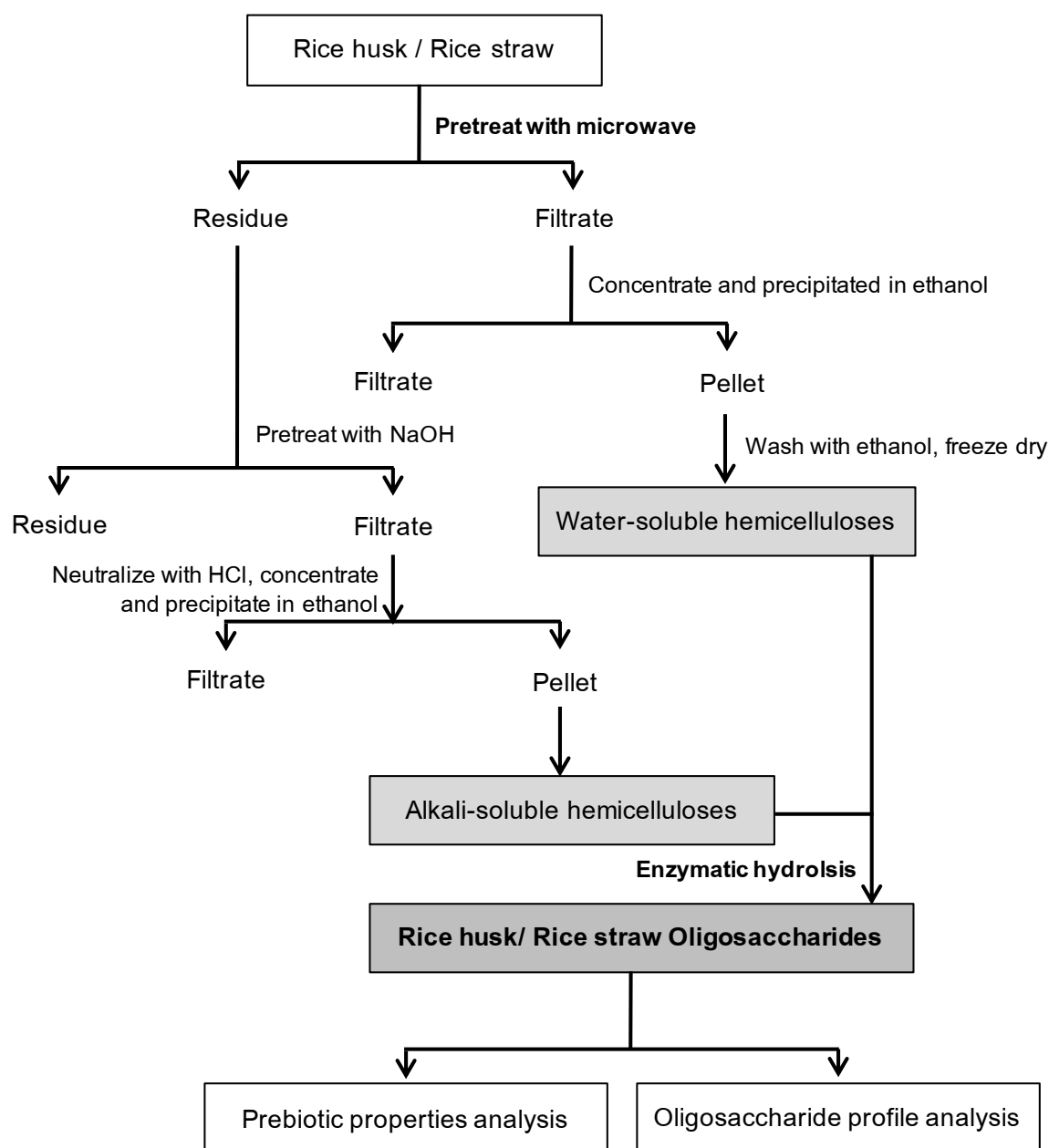
4. การสกัดเฮมิเซลลูโลสจากแกลบและฟางข้าวโดยกระบวนการไมโครเวฟ

ศึกษาความแตกต่างทางโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสที่อยู่ในแกลบและฟางข้าว โดยมีการแยกแต่ละส่วนของเฮมิเซลลูโลสที่ผ่านการสกัดแต่ละขั้นตอนและมีการแยกส่วนตามภาพที่ 1

เริ่มจากการสกัดสารแทรกในวัตถุดิบแกลบและฟางข้าว โดยนำไปแช่ในสารละลายเอทานอลผสมอะซิโตนที่อัตราส่วน 2:1 (v/v) โดยกำหนดให้อัตราส่วนของแข็งต่อของเหลวเป็น 1:30 (w/v) นำไปกวนผสมนาน 24 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำกลั่น กรอง และต้มนาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำตัวอย่างที่ผ่านการสกัดสารแทรกไปอบแห้งที่ 45°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh จะได้ผงแกลบและฟางที่ผ่านการสกัดสารแทรก

นำผงแกลบและฟางข้าวที่ผ่านการสกัดสารแทรกมาเติมน้ำกลั่นให้อัตราส่วนของของแข็งต่อของเหลวเป็น 1:30 (w/v) จากนั้นนำมาเข้าสู่กระบวนการปรับสภาพด้วยไมโครเวฟที่ กำลังไฟฟ้า 1,600 Watt ให้ได้อุณหภูมิเป็น 140, 160 และ 180 °C เป็นระยะเวลา 5, 10 และ 15 min โดยใช้เครื่องไมโครเวฟ ETHOS EASY Microwave Digestion Platform (MILESTONE Srl, ประเทศอิตาลี) และกำหนดตัวอย่างชุดควบคุมคือตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการปรับสภาพด้วยไมโครเวฟ จากนั้นนำตัวอย่างมากรอง นำส่วนน้ำที่กรองได้มาแยกเฮมิเซลลูโลสที่ ละลายน้ำได้ โดยนำมาตกตะกอนด้วยเอทานอล 95% ปริมาตรสามเท่าของสารละลาย จะได้ตะกอนเฮมิเซลลูโลสที่ละลายในน้ำ (Water-soluble hemicellulose) สำหรับกากของแกลบและฟางข้าวที่ผ่านกระบวนการไมโครเวฟและเหลือจากการกรองนั้น จะนำมาปรับสภาพด้วยสารละลาย NaOH 1 M อัตราส่วนของแข็งต่อของเหลวที่ 1:25 (g/mL) โดยเขย่าของผสมดังกล่าว ณ อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง กรองและตกตะกอนด้วยเอทานอลด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น จะได้ตะกอนเฮมิเซลลูโลสที่ละลายในด่าง (Alkali-soluble hemicellulose) ในขั้นตอนสุดท้ายนำตะกอนเฮมิเซลลูโลสทั้งสองชนิด มาล้าง

ด้วยสารละลายเอทานอล 70% และทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (Peng et al., 2010) จากนั้นนำมาชั่งเพื่อวิเคราะห์ปริมาณผลผลิต ใช้อักษรย่อ W-RHH แทนเฮมิเซลลูโลสของแกลบที่ละลายน้ำ , W-RSH แทนเฮมิเซลลูโลสของฟางข้าวที่ละลายน้ำ , A-RHH แทนเฮมิเซลลูโลสของแกลบที่ละลายในด่าง และ A-RSH แทนเฮมิเซลลูโลสของฟางข้าวที่ละลายในด่าง นำเฮมิเซลลูโลสทั้งสองชนิดมาวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยวิธีของ NREL (National Renewable Energy Laboratory) และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำตาลทั้งหมด จากนั้นนำเฮมิเซลลูโลสที่ได้ไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ต่อไป



ขั้นตอนการดำเนินการทดลอง

5. การผลิตโอลิโกแซคคาไรด์จากเฮมิเซลลูโลส

ในขั้นตอนนี้ ได้ทำการย่อย W-RHH, W-RSH, A-RHH และ A-RSH ด้วยเอนไซม์เพื่อผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ เอนไซม์ที่ใช้ได้แก่เอนไซม์เอนโดไซแลนเนสทางการค้า 2 ชนิด ซึ่งจำแนกอยู่ในกลุ่มของ glycosidic hydrolysis (GH family) ที่แตกต่างกัน ได้แก่ กลุ่ม GH10 ได้ใช้ Ultraflo Max และ GH11 ได้ใช้ Pentopan mono BG โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก Novozyme ประเทศ Denmark (ตาราง 8) เพื่อศึกษาผลของเอนไซม์เอนโดไซแลนเนสที่มีความจำเพาะเจาะจงที่แตกต่างกันต่อการผลิตไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (Nguyen et al., 2017) โดยปัจจัยในการย่อยของเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่มีผลต่อการผลิตโอลิโกแซคคาไรด์จาก W-RHH, W-RSH, A-RHH และ A-RSH ที่ pH 6 และ อุณหภูมิ 50°C ที่ทำการศึกษา ได้แก่ ปริมาณของเอนไซม์ ในช่วง 50-300 U และเวลาในช่วง 0-24 ชั่วโมง โดยบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่มีการเขย่าร่วมด้วย เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด ได้ทำการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยนำมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ตามด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 13,000xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเลือกเก็บส่วนใส (crude oligosaccharide) และนำมาวิเคราะห์เชิงปริมาณโดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959)

ตาราง 8 เอนไซม์เอนโดไซแลนเนสทางการค้าและกิจกรรมของเอนไซม์

Supplier	Enzyme (code)	Origin	Enzyme activities (U/g powder, ml)			
			[optimum pH, optimum temp. (°C)]			
			Exase	Xase	AFase	Glase
Novozyme, Denmark	Ultraflo L	<i>Humicola insolens</i>	3,550	-	15	
			470			
			[6.0, 50]	-	[4.0, 50]	[5.0, 30]
Novozyme, Denmark	Ultraflo MAX	-	700	-	-	
			250			
			[6.0, 50]	-	-	[5.0, 30]

^aExase = endo- β -xylanase, ^bXase = β -xylosidase, ^cAFase = α -arabinofuranosidase, ^dGlase = α -glucuronidase

6. การวิเคราะห์เชิงคุณภาพของ crude oligosaccharide โดยวิธีการ Thin-layer chromatography

นำ crude oligosaccharide ที่ผลิตโดยเอนไซม์แต่ละชนิดมาวิเคราะห์เชิงคุณภาพ เพื่อบ่งชี้ชนิดของน้ำตาลโดยเทคนิค TLC ใช้แผ่น TLC ชนิดที่เคลือบด้วยซิลิกา (Merk, Germany) ตามวิธีของ Nguyen et al. (2017) mobile phase ที่ใช้ประกอบด้วย butanol: acetic acid: น้ำ ในสัดส่วน 1: 2: 1 (v/v) หลังจากตัวอย่างเคลื่อนที่ตามเฟสเคลื่อนที่ ทำการฉีดสารที่ประกอบไปด้วย Orcinol และกรดซัลฟูริก พ่นบนแผ่น TLC และทำให้สีจะปรากฏขึ้นโดยการอบแห้งในเตาอบที่ 1050C สารละลายน้ำตาลมาตรฐานที่ใช้ ได้แก่ Xylose (X1), Xylobiose (X2), Xylotriose (X3) และ Xylotetraose (X4)

7. การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของ crude oligosaccharide โดยวิธีการ High performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD)

วิเคราะห์ชนิดของโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเครื่อง HPAEC (Dionex ICS5000+ DP Dionex) โดยใช้คอลัมน์ CarboPac PA200 (3 x 250 mm) ที่ 30°C ตามวิธีการที่อธิบายโดย by McCleary และคณะ (2015) โดยดัดแปลงเล็กน้อย ใช้สารละลายน้ำตาลมาตรฐานของ Xylose (X1), Xylobiose (X2), Xylotriose (X3), Xylotetraose (X4), Xylopentose (X5), Xylohexose (X6), Arabinose (A1), 32- α -L-Arabinofuranosyl-xylobiose (A3X) และ 23- α -L-Arabinofuranosyl-xylotriose (A2XX) (Megazyme, Ireland)

PART II การทดสอบศักยภาพในการเป็นพรีไบโอติกของผลิตภัณฑ์โอลิโกแซคคาไรด์

ประเมินคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับพรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ทางการค้าที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อใช้เป็นพรีไบโอติกอ้างอิง

8. การศึกษาการเจริญของเชื้อโพรไบโอติก

ในงานวิจัยนี้เลือกใช้แบคทีเรียโพรไบโอติก *Lactobacillus* spp. ได้แก่ *L. brevis* *L. fermentum* *L. paracasei* *L. rhamnosus* *plantarum* และ *Bifidobacterium* spp. ได้แก่ *B. infantis* *B. animalis* *B. bifidum* *B. breve* *B. longum*

เชื้อ *Lactobacillus* spp. จะถูกเลี้ยงใน MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาถ่ายลงบนอาหารแข็งด้วยเทคนิค streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

และเลี้ยงลงใน MRS broth อีกครั้งเพื่อเป็นการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อ ในส่วนของเชื้อกลุ่ม *Bifidobacterium* spp. จะถูกเลี้ยงใน MRS broth ผสม L-cystein 0.05% ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาถ่ายลงบนอาหารแข็งผสม L-cystein 0.05% ด้วยเทคนิค streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง และเลี้ยงลงใน MRS broth อีกครั้งโดยทำในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ในโถสุญญากาศ Whitley (stainless steel, with Whitley Schrader valve system) จากนั้นนำสารแขวนลอยเชื้อมาหมุนเหวี่ยง (8000 g, 10 นาที, 4°C) และนำเซลล์จุลินทรีย์ที่ได้มาเติมน้ำเกลือ 0.85% ทำการเจือจางแบบ Serial dilutions เพื่อให้ได้ปริมาณจุลินทรีย์ตามที่ต้องการ

9. การวิเคราะห์ดัชนีพรีไบโอติก

ดัชนีพรีไบโอติก (Prebiotic index) หรือ คะแนนประสิทธิภาพพรีไบโอติก (Prebiotic activity score) เป็นค่าที่ใช้บอกประสิทธิภาพการส่งเสริมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์พรีไบโอติกเปรียบเทียบกับเชื้อก่อโรค เป้าหมาย ทำโดยเริ่มจากนำสารแขวนลอยเชื้อพรีไบโอติกปริมาตร 0.2 ml ใส่ลงในพลาสติกที่มี modified MRS ปริมาตร 10 ml โดยมีสูตรการเตรียม Modified MRS ดังนี้ Peptone 10 g, Beef extract 10 g, Yeast extract 5 g, Dipotassium hydrogen phosphate 2.6 g, Sodium acetate 5 g, Ammonium monohydrogen citrate 1.7 g, Magnesium sulphate 0.2 g, Manganese sulphate 0.05 g และ Tween 80 1 ml ในปริมาตรทั้งหมด 1 ลิตร โดยมีแหล่งคาร์บอนที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ RH-XOS และชุดควบคุมคือ XOS ทางการค้า และกลูโคส ละลายอยู่ที่ความเข้มข้น 2% (w/v) เป็นแหล่งของคาร์บอนแทนน้ำตาลเดกซ์โทรส (Dextrose) ในขณะเดียวกันก็นำสารแขวนลอยเชื้อก่อโรค ได้แก่ *E. coli* มาเตรียมแบบเดียวกันในอาหารเหลว M9 หลังจากนั้น นำตัวอย่างทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์จำนวนเชื้อบน MRS agar หรือ eosin methylene blue agar ตามวิธีข้างต้น และคำนวณเป็นค่า log cfu/ml ดัชนีพรีไบโอติกจะคำนวณตามสูตรด้านล่าง

$$\text{Prebiotic activity score} = \frac{[(\text{probiotic log CFU/ml on the prebiotic at 48 h} - \text{probiotic log CFU/ml on the prebiotic at 0 h}) / (\text{probiotic log CFU/ml on glucose at 48 h} - \text{probiotic log CFU/ml on glucose at 0 h})] - [(\text{enteric log CFU/ml on the prebiotic at 48 h} - \text{enteric log CFU/ml on prebiotic at 0 h}) / (\text{enteric log CFU/ml on glucose at 48 h} - \text{enteric log CFU/ml on glucose at 0 h})]}$$

ซึ่งหากแหล่งคาร์บอนนั้นสามารถที่จะถูกใช้สำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อพรีไบโอติกโดยไม่ถูกใช้โดยเชื้อก่อโรค ดัชนีพรีไบโอติกก็จะมีค่าสูง (Zhang et al., 2018)

10. การวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดของกรดไขมันสายสั้นผลผลิตจากกระบวนการหมักพรีไบโอติกกับ XOS

ปริมาณและชนิดของกรดไขมันสายสั้นเป็นผลิตภัณฑ์หลักของกระบวนการหมักพรีไบโอติก จากเชื้อพรีไบโอติก ผลที่ได้จะทำให้สามารถเข้าใจถึงกลไกการหมัก ของเชื้อต่อสารสกัด XOS ในกากรำข้าวเพื่อใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการหมัก

ปริมาณและชนิดของกรดไขมันสายสั้น lactic acid, formic acid, acetic acid และ butyric acid ที่จุลินทรีย์พรีไบโอติกสามารถผลิตได้ จะถูกนำมาวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC โดยเตรียมตัวอย่างตามวิธีของ

Nakphaichit และคณะ (2014) ดังนี้ นำสารละลายเซลล์ 1 ml มากำจัดเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 15,000xg นาน 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่แยกได้มาผสมกับ internal standard (0.2% w/v tartaric acid) ในอัตราส่วน 1:3 โดยปริมาตร นำสารละลายผสมไปกรองผ่าน PVDF syringe filters ขนาด 0.2 µm และฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาณ 0.2 µl เข้าเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Rezex ROR-Organic Acid (Phenomenex, USA) ปรับอุณหภูมิ 60°C โดยใช้อัตราการไหลของ mobile phase ที่ 0.6 mL/min ตรวจวัดสัญญาณโดยใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 nm คำนวณความเข้มข้นของกรดแต่ละชนิดในสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานโดยใช้กรดแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้น 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4% and 0.5% โดยปริมาตรเป็นสารละลายมาตรฐาน

11. การวิเคราะห์การต้านทานต่อการย่อยในสภาวะจำลองกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก

การทดสอบคุณสมบัติการ ทนต่อสภาวะการย่อยของกรดในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กในมนุษย์ ดัดแปลงวิธีของ Minekus และคณะ (2014) ทำโดยเตรียมสารละลาย (A)XOS ความเข้มข้น 2% ใน Simulated Gastric Fluid (SGF) (SGF ประกอบด้วย; KCl 6.9 mmol/L, KH₂PO₄ 0.9 mmol/L, NaHCO₃ 25 mmol/L, NaCl 47.2 mmol/L, MgCl₂(H₂O)₆ 0.1 mmol/L, CaCl₂(H₂O)₂ 0.15 mmol/L) จากนั้นนำสารละลาย (A)XOS 10 มิลลิลิตร ผสมกับ SGF 7.5 มิลลิลิตร เติม pepsin ความเข้มข้น 25,000 Uml⁻¹ ปริมาณ 1.6 มิลลิลิตร 0.3 M CaCl₂ ปริมาณ 5 มิลลิลิตร 1M HCl ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร เพื่อปรับพีเอชเป็น 3.0 และเติมน้ำปริมาณ 0.695 มิลลิลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างสารละลายผสมจากการทดสอบข้างต้นมา 20 มิลลิลิตร เติม Simulated Intestinal Fluid (SIF) 11 มิลลิลิตร (SIF ประกอบด้วย; KCl 6.8 mmol/L, KH₂PO₄ 0.8 mmol/L, NaHCO₃ 85 mmol/L, NaCl 38.4 mmol/L, MgCl₂(H₂O)₆ 0.33 mmol/L, CaCl₂(H₂O)₂ 0.6mmol/L) เติม pancreatin ความเข้มข้น 800 Uml⁻¹ ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร 160 mM bile salt ปริมาณ 2.5 มิลลิลิตร 0.3 M CaCl₂ ปริมาณ 40 ไมโครลิตร 1M NaOH ปริมาณ 0.15 มิลลิลิตร เพื่อปรับพีเอชเป็น 7.0 และเติมน้ำปริมาณ 1.31 มิลลิลิตร ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยการทดลองทั้งหมดจะสุ่มเก็บตัวอย่างครั้งละ 1 มิลลิลิตร ทุก ๆ 20 นาที ตัวอย่างทั้งหมดจะนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric เพื่อคำนวณร้อยละของปริมาณน้ำตาลที่ถูกย่อยตามสูตรดังต่อไปนี้

$$\% \text{ปริมาณน้ำตาลที่ถูกย่อย} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สุดท้าย} - \text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น}}{\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด} - \text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น}} \times 100$$

12. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แต่ละการทดลอง คำนวณค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูล ดำเนินการการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS 11 มีการเปรียบเทียบค่าข้อมูลแต่ละชุดด้วย Duncan's one-way multiple เพื่อวิเคราะห์หาความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05)

ผลการวิจัย

ผลการทดลองประกอบด้วยสองส่วนคือ การวิเคราะห์คุณภาพของกากรำโดยวิธีการประมาณการผลิต (A)XOS จากกากรำโดยวิธีทางเคมีควบคู่กับเอนไซม์และการประเมินสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของ (A)XOS ที่ผลิตได้ ได้แก่ ผลของcrude (A)XOS ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อโพรไบโอติกเป้าหมายและการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์และกรดในสภาวะจำลองระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ แสดงรายละเอียดดังนี้

PART I ผลการผลิตโอลิโกแซคคาไรด์จากวัสดุพลอยได้จากข้าว

1. องค์ประกอบทางเคมีของแกลบและฟางข้าว

ผลการศึกษาองค์ประกอบโดยประมาณของแกลบและฟางข้าวแสดงดังตารางที่ 1 พบว่าแกลบมีองค์ประกอบหลักเป็นคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 75.08 โปรตีนร้อยละ 2.08 และเถ้าร้อยละ 15.56 และฟางข้าวมีองค์ประกอบหลักเป็นคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 71.47 โปรตีนร้อยละ 4.12 และเถ้าร้อยละ 13.73

ตาราง 9 องค์ประกอบของแกลบและฟางข้าว

Compositions (g/100g)	Rice husk	Rice straw
Moisture	6.78±0.08	9.06±0.11
Fiber	43.58±0.45	31.55±0.07
Protein	2.08±0.02	4.12±0.01
Fat	0.49±0.01	1.61±0.00
Carbohydrate	75.08±0.01	71.47±0.21
Ash	15.56±0.08	13.73±0.31

2. ปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและเฮมิเซลลูโลสของแกลบและฟางข้าวที่ผ่านการพรีทรีทเมนต์

จากตาราง 10 เมื่อนำแกลบมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวพบว่าประกอบด้วยน้ำตาลอะราบินโนสร้อยละ 1.94 กาแลคโตสร้อยละ 0.78 กลูโคสร้อยละ 33.23 และไซโลสร้อยละ 12.42 จึงสามารถบอกได้ว่าเฮมิเซลลูโลสที่ประกอบอยู่จะเป็นประเภทอะราบินโนไซแลน จากผลข้างต้นสามารถนำมาคำนวณเป็นปริมาณอะราบินโนไซแลนได้ที่ร้อยละ 12.63 และปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของฟางข้าวประกอบด้วยน้ำตาลอะราบินโนสร้อยละ 2.69 กาแลคโตสร้อยละ 1.15 กลูโคสร้อยละ 32.86 ไซโลสร้อยละ 13.49 และแมนโนสร้อยละ 0.36 เมื่อนำแกลบและฟางข้าวมาผ่านกระบวนการกำจัดสารแทรกออก พบว่ามีปริมาณน้ำตาลอะ

ราบินโนไซเลนเพิ่มขึ้นร้อยละ 0.53 และ 6.84 ตามลำดับ เนื่องจากการกำจัดสารแทรกทำให้พันธะเอสเทอร์ที่เชื่อมระหว่างโครงสร้างลิกโนเซลลูโลสคลายตัว องค์ประกอบที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสกัดเฮมิเซลลูโลสจึงหลุดออก และทำให้ปริมาณของอะราบินโนไซเลนสามารถปลดปล่อยออกมาได้มากขึ้น โดยพบว่าการกระบวนการนี้มีผลต่อฟางข้าวมากกว่าแกลบ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโครงสร้างที่ต่างกัน แกลบและฟางข้าวที่ผ่านการกำจัดเซลลูโลสพบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นร้อยละ 47.71 และ 68.03 ตามลำดับ และปริมาณอะราบินโนไซเลนลดลง ส่วนที่ผ่านการกำจัดไฮโดรเซลลูโลสพบว่าปริมาณอะราบินโนไซเลนเพิ่มขึ้นร้อยละ 2.09 และ 6.64 ตามลำดับ

ตาราง 10 ปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและอะราบินโนไซเลนของตัวอย่างที่ผ่านการกำจัดสารแทรก

Sample	Monosaccharide (g/100g)					AX content (g/100g)	A/X
	Ara	Gal	Glu	Xyl	Man		
RH	1.94	0.78	33.23	12.42	0.00	12.63	0.16
RHP	1.80	0.71	36.14	13.15	0.00	13.16	0.14
RH Cell	0.12	0.08	80.94	1.65	0.00	1.56	0.07
RH Holo	1.76	0.72	45.61	14.97	0.00	14.72	0.12
RS	2.69	1.15	32.86	13.49	0.36	14.24	0.20
RSP	3.38	1.02	52.17	20.57	0.11	21.08	0.16
RS Cell	0.50	0.12	100.89	2.98	0.00	3.06	0.17
RS Holo	3.49	0.79	53.05	20.25	0.00	20.88	0.17

RH = แกลบ

RHP = แกลบที่ผ่านกระบวนการกำจัดสารแทรก

RH Cell = แกลบที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลลูโลส

RH Holo = แกลบที่ผ่านกระบวนการกำจัดไฮโดรเซลลูโลส

RS = ฟางข้าว

RSP = ฟางข้าวที่ผ่านกระบวนการกำจัดสารแทรก

RS Cell = ฟางข้าวที่ผ่านกระบวนการกำจัดเซลลูโลส

RS Holo = ฟางข้าวที่ผ่านกระบวนการกำจัดไฮโดรเซลลูโลส

3. ผลของการปรับสภาพวัตถุดิบแกลบและฟางข้าวด้วยไมโครเวฟต่อปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและเฮมิเซลลูโลส (อะราบิโนไซแลน)

เมื่อนำตัวอย่างแกลบและฟางข้าวที่ผ่านการกำจัดสารแทรกไปเข้าสู่กระบวนการปรับสภาพด้วยไมโครเวฟเพื่อสกัดเฮมิเซลลูโลส และแยกส่วนที่เป็นของเหลวและของแข็งออกเพื่อสกัดเฮมิเซลลูโลสชนิดที่ละลายในน้ำและละลายในด่าง พบว่าหลังจากทำการตกตะกอนเฮมิเซลลูโลสจากส่วนที่เป็นของเหลว ไม่พบตะกอนของเฮมิเซลลูโลสจากทุกสภาวะที่ทำการทดสอบ ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าจากกระบวนการไมโครเวฟที่อุณหภูมิ 140-180 °C เป็นเวลา 5-15 นาที ทำให้ได้เฮมิเซลลูโลสที่ละลายในด่างเท่านั้น

จากการศึกษาผลของการปรับสภาพแกลบและฟางข้าวด้วยไมโครเวฟที่อุณหภูมิ 140-180 °C เป็นเวลา 5-15 นาที จากผลการทดลองพบว่าอุณหภูมิและเวลาของไมโครเวฟมีผลต่อปริมาณอะราบิโนไซแลน (ตารางที่ 11 และ 12) เมื่อเพิ่มอุณหภูมิและเวลาของไมโครเวฟจะทำให้อะราบิโนไซแลนมีปริมาณเพิ่มขึ้น ผลการทดลองในตารางที่ 3 และ 4 พบว่าที่อุณหภูมิ 140 150 160 และ 180 °C เป็นเวลา 5 นาที ปริมาณอะราบิโนไซแลนจากแกลบร้อยละ 9.41 4.94 8.31 8.52 และ 8.26 ตามลำดับ และปริมาณอะราบิโนไซแลนจากฟางข้าวร้อยละ 12.89 9.80 11.30 8.52 และ 11.90 ตามลำดับ

ตาราง 11 ผลของการปรับสภาพเกลบด้วยไมโครเวฟต่อปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและอะราบิโนไซแลน

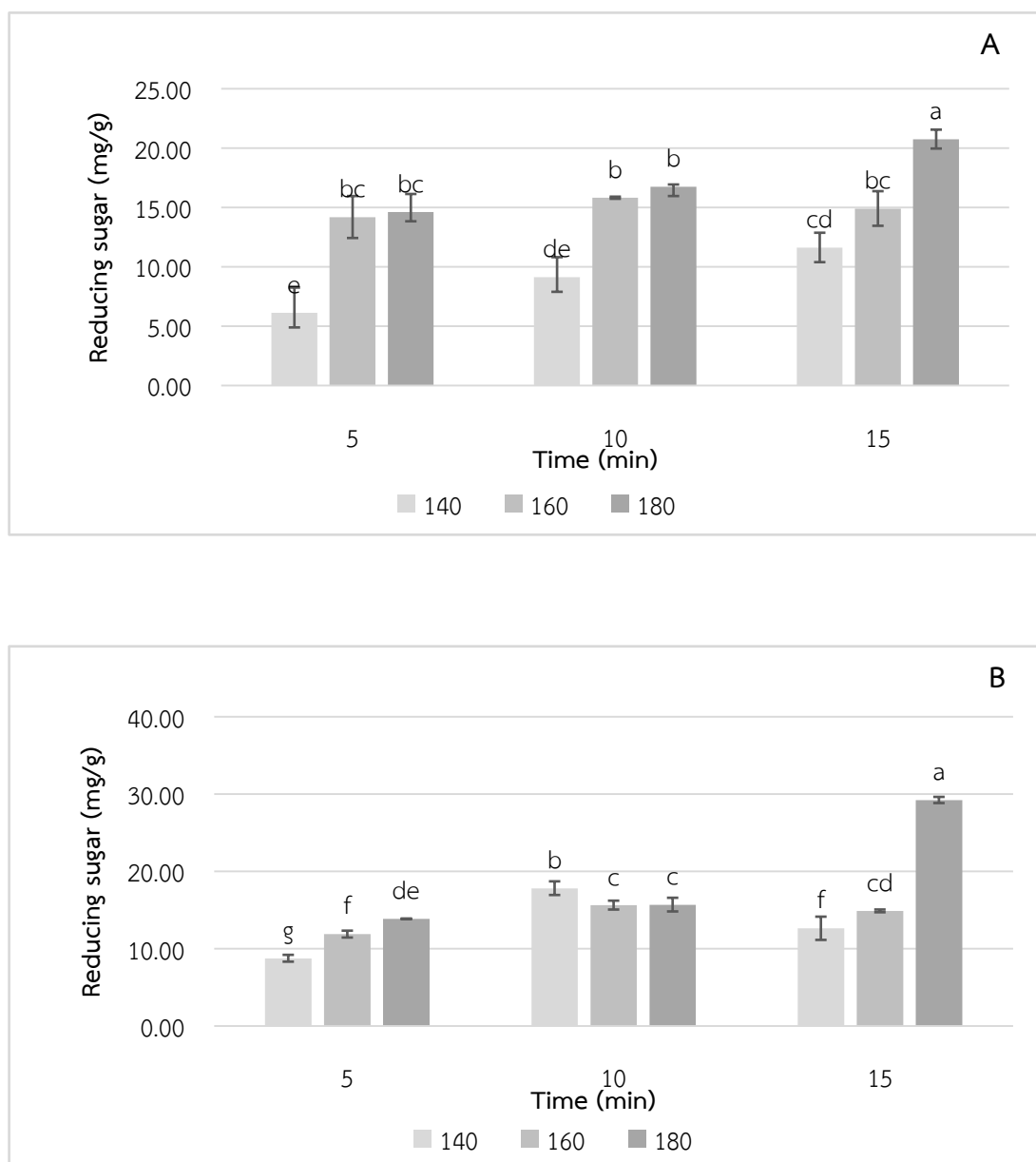
Condition		Monosaccharide (g/100g)					AX	
Temp (°C)	Time (hr)	Ara	Gal	Glu	Xyl	Man	content (g/100g)	A/X
140	5	2.08	0.87	19.11	8.61	0.00	9.41	0.24
	10	1.88	0.64	20.13	7.79	0.00	8.51	0.24
	15	1.81	0.68	16.04	8.15	0.00	8.77	0.22
150	5	1.57	0.51	0.20	4.05	0.00	4.94	0.39
	10	1.36	0.52	11.32	5.37	0.00	5.92	0.25
	15	1.59	0.54	18.93	6.77	0.00	7.36	0.24
160	5	1.84	0.68	13.95	7.60	0.00	8.31	0.24
	10	1.30	0.53	1.11	2.88	0.00	3.67	0.45
	15	0.19	0.12	1.09	0.01	0.01	0.17	33.44
170	5	1.79	0.61	4.87	7.89	0.00	8.52	0.23
	10	1.85	0.34	6.38	7.78	0.00	8.47	0.24
	15	1.25	0.38	6.47	3.34	0.01	4.04	0.38
180	5	1.68	0.51	5.72	7.70	0.00	8.26	0.22
	10	1.68	0.58	19.88	6.89	0.01	7.54	0.24
	15	1.69	0.42	6.38	8.47	0.01	8.94	0.20

ตาราง 12 ผลของการปรับสภาพฟางข้าวด้วยไมโครเวฟต่อปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและอะราบิโนสแลน

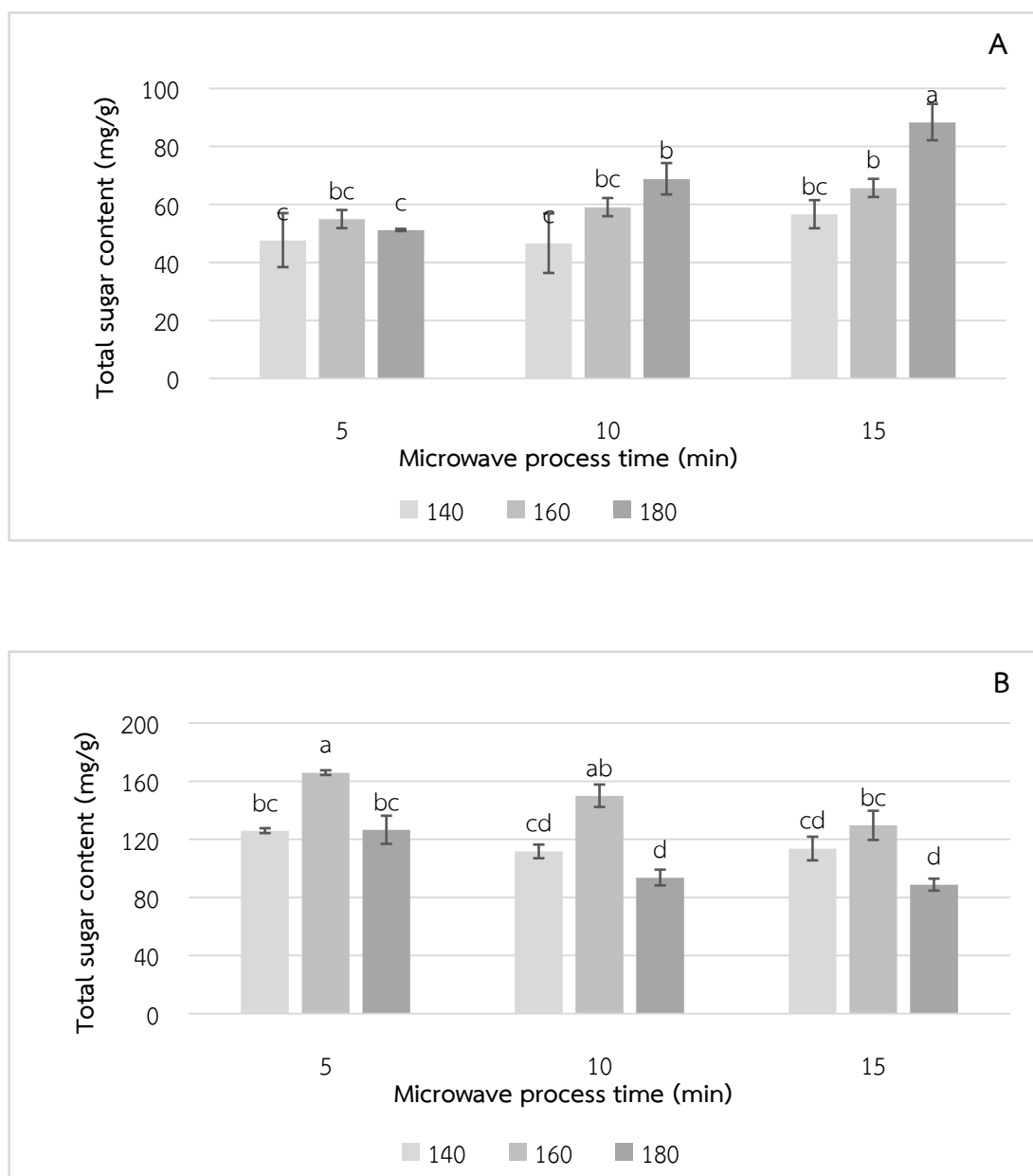
Condition		Monosaccharide (g/100g)					AX content	A/X
Temp (°C)	Time (hr)	Ara	Gal	Glu	Xyl	Man		
140	5	2.71	0.79	28.05	11.95	0.06	12.89	0.23
	10	2.70	0.80	35.49	11.89	0.02	12.84	0.23
	15	2.33	0.75	31.07	11.95	0.01	12.57	0.20
150	5	2.30	0.60	16.24	8.84	0.03	9.80	0.26
	10	2.33	0.69	28.73	11.14	0.02	11.85	0.21
	15	1.86	0.58	27.45	9.54	0.03	10.03	0.20
160	5	2.35	0.63	28.87	10.49	0.01	11.30	0.22
	10	2.90	0.69	23.32	9.99	0.02	11.35	0.29
	15	1.80	0.51	27.68	9.88	0.03	10.28	0.18
170	5	1.81	0.40	20.13	7.88	0.01	8.52	0.23
	10	2.42	0.64	24.31	11.35	0.05	12.12	0.21
	15	1.57	0.36	15.83	6.63	0.04	7.22	0.24
180	5	2.39	0.54	31.89	11.13	0.03	11.90	0.21
	10	1.14	0.34	10.46	7.19	0.01	7.33	0.16
	15	1.19	0.27	36.97	6.30	0.04	6.59	0.19

4. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ในแกลบและฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกระบวนการไมโครเวฟและร้อยละปริมาณผลผลิตของเฮมิเซลลูโลส (อะราบิโนไซแลน)

จากการปรับสภาพแกลบและฟางข้าวด้วยกระบวนการไมโครเวฟที่ 140-180°C เวลา 5 10 และ 15 นาที พบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิและระยะเวลาในการสกัดทำให้แกลบและฟางข้าวมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากขึ้น (ภาพ 19) นอกจากนี้เมื่อเพิ่มอุณหภูมิและระยะเวลาในการให้ความร้อนยังทำให้มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มมากขึ้นด้วย (ภาพ 20) เป็นผลมาจากกระบวนการไมโครเวฟ ที่เป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าความถี่สูงถึง 300-300,000 MHz เคลื่อนที่ผ่านสารละลายที่มีขั้ว ได้ทำให้โมเลกุลสารละลายนั้นเกิดการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว และเกิดความร้อนระหว่างโมเลกุล ความร้อนที่เกิดขึ้นนั้นมีผลต่อการสลายพันธะไกลโคซิดิกที่เป็นพันธะที่ยึดเหนี่ยวสายพอลิเมอร์ไว้ และยังทำให้เกิดการคลายตัวของโครงสร้างเซลล์พืชจึงช่วยให้ปลดปล่อยน้ำตาลออกจากเซลล์พืชได้

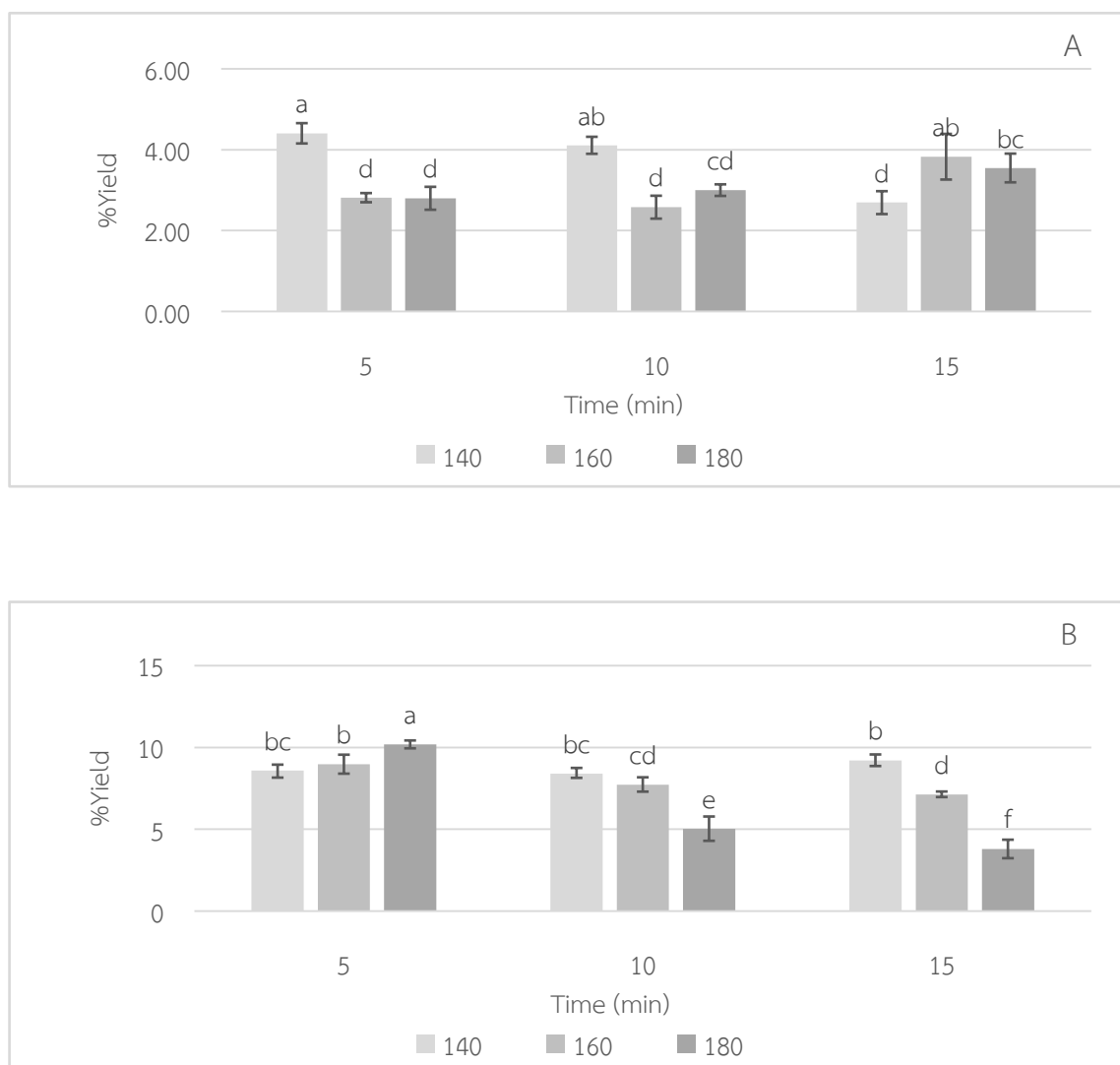


ภาพ 19 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงในแลคต (A) และ ฟางข้าว (B) ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยไมโครเวฟที่ 140-180°C เป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที



ภาพ 20 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในเกลบ (A) และ ฟางข้าว (B) ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยไมโครเวฟที่ 140-180°C เป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที

สำหรับร้อยละปริมาณผลผลิตของเอมิเซลลูโลสที่สามารถละลายในด่างที่สกัดจากเกลบและฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยไมโครเวฟ (A-RHH และ A-RSH) พบว่าในเกลบที่ผ่านการปรับสภาพที่อุณหภูมิ 140°C ที่ระยะเวลา 5 นาที ให้ปริมาณผลผลิตสูงที่สุดที่ 4.41% อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาที่ผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมดแล้วพบว่าที่สภาวะนี้ให้ปริมาณน้ำตาลน้อย ในขณะที่อุณหภูมิ 180°C ที่ให้ปริมาณผลผลิตเป็นระดับสูงรองลงมา พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลทั้งหมดสูงที่สุด (ภาพ 21) สำหรับฟางข้าว พบว่าจากสภาวะที่ผ่านการปรับสภาพที่อุณหภูมิ 140°C ที่ระยะเวลา 5 นาที ให้ปริมาณผลผลิตสูงที่สุดที่ 10% อย่างไรก็ตามพบว่าที่ 160°C ระยะเวลา 10 นาที ให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสูงที่สุด มีรายงานถึงประสิทธิภาพของไมโครเวฟในการตัดและคลายพันธะของพอลิเมอร์ นำไปสู่การปลดปล่อยลิกนินและเอมิเซลลูโลสในชีวมวลซึ่งทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Puligundla et al., 2016).

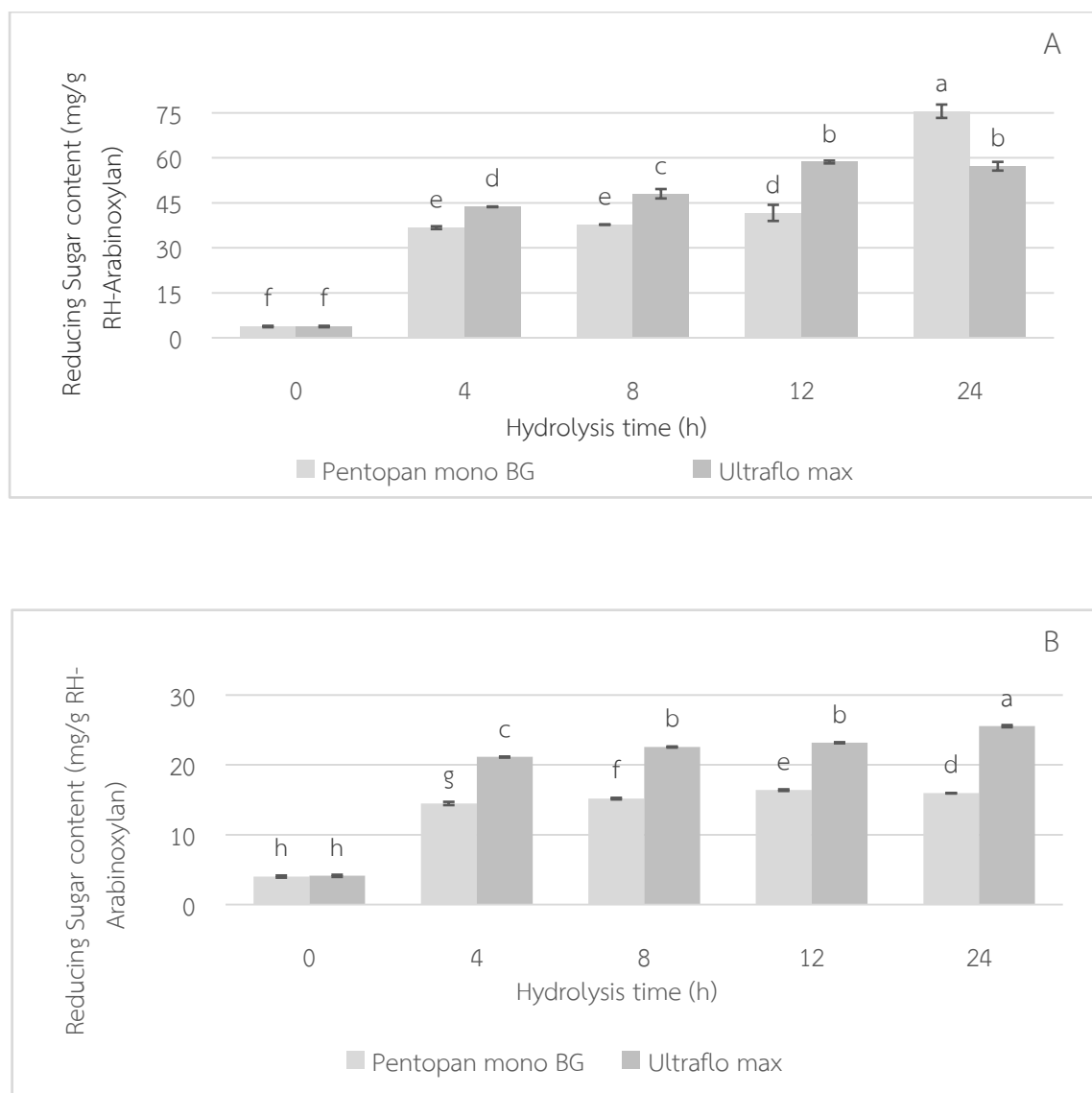


ภาพ 21 ร้อยละปริมาณผลผลิตของอะราบินโนไซแลนจากเกลบ (A) และฟางข้าว (B) ที่ผ่านการปรับสภาพด้วยไมโครเวฟที่ 180°C เป็นระยะเวลา 5, 10 และ 15 นาที

จากผลการทดลองข้างต้น ผู้วิจัยจึงเลือกสภาวะที่ใช้ในการปรับสภาพตัวอย่าง แกลบและฟางข้าวด้วย ไมโครเวฟ ที่สภาวะอุณหภูมิ 180°C ระยะเวลา 15 นาที และที่ 160°C ระยะเวลา 10 นาที เพื่อสกัด A-RHH และ A-RSH ตามลำดับ และนำ A-RHH และ A-RSH ที่สกัดได้ไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์ไซแลนเนสต่อไป

5. ชนิดและปริมาณน้ำตาลใน crude oligosaccharide ที่ผลิตได้จาก A-RHH และ A-RSH

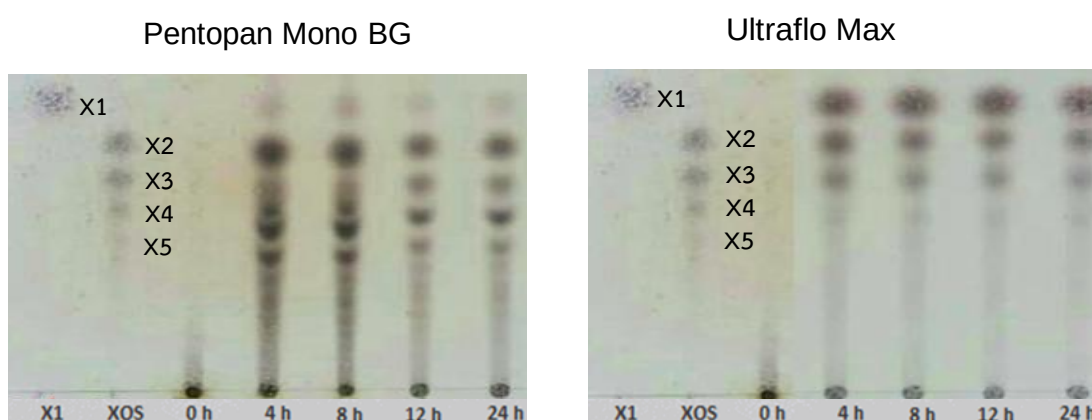
เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถของเอนไซม์ไซแลนเนสกลุ่ม GH10 และ GH11 ที่ความเข้มข้น 50 U/g อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 0 4 8 12 และ 24 ชั่วโมง หลังจากบ่ม A-RHH กับ GH10 คือ Ultraflo Max พบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 3.74 43.67 48.02 58.61 และ 57.20 mg/g ตามลำดับ และกลุ่ม GH11 คือ Pentopan Mono BG พบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 3.74 36.72 37.74 41.64 และ 75.55 mg/g ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้นตามระยะเวลาการบ่ม โดยที่ 24 ชั่วโมง เอนไซม์ Pentopan Mono BG ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดในขณะที่ A-RSH ที่บ่มร่วมกับ Ultraflo Max พบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เท่ากับ 4.12 21.14 22.58 23.19 และ 25.57 mg/g และบ่มร่วมกับ คือ Pentopan Mono BG พบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 4.01 14.49 15.18 16.40 และ 15.96 mg/g ที่เวลา 0 4 8 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยที่ 24 ชั่วโมง เอนไซม์ Ultraflo Max ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ สูงที่สุด (ภาพ 22)



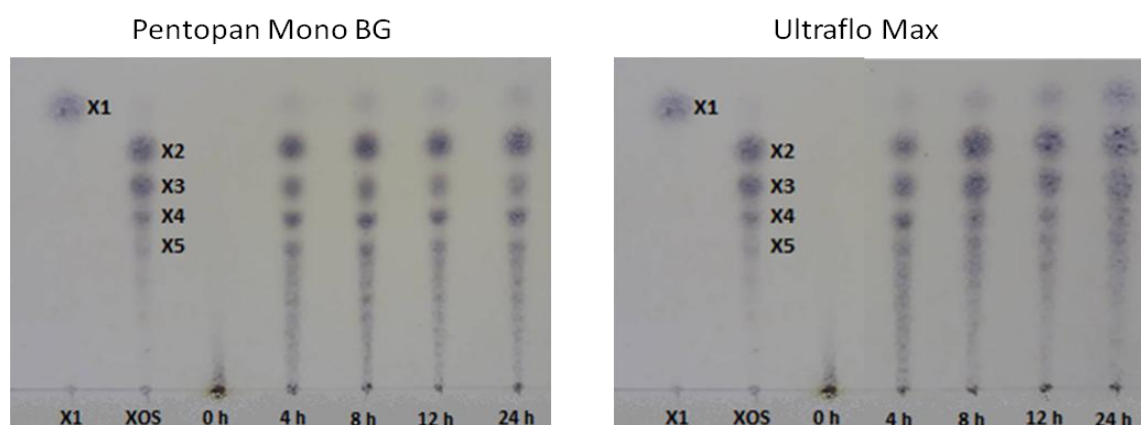
ภาพ 22 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซิงใน crude oligosaccharide จาก A-RHH (A) และ A-RSH (B) ที่ผลิตโดย เอนไซม์ Pentopan Mono BG และ Ultraflo Max ที่ความเข้มข้น 50 U/g เป็นเวลา 0 4 8 12 และ 24 ชั่วโมง

เมื่อทำการวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากเอนไซม์ทั้งสองชนิดโดย วิธี Thin Layer Chromatography (TLC) (Chapla et al, 2012) (ภาพ 23, 24) พบว่าทั้ง Pentopan Mono BG และ Ultraflo Max สามารถผลิตไซโลส ไซโลไบโอส ไซโลไตรโอส และไซโลเตตระโอส (ภาพที่ 4) จากการย่อย A-RHH และ A-RSH เมื่อเพิ่มเวลาในการย่อย พบว่า crude oligosaccharide ที่เป็นผลิตภัณฑ์จากเอนไซม์ Ultraflo Max มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสมากขึ้น แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ Ultraflo Max ผลิตไซโลสได้มากขึ้นเมื่อเวลาดำเนินไป ทั้งนี้เป็นเพราะ Ultraflo Max เป็นไซแลนเนสในกลุ่มของ GH10 และ

เอนไซม์ชนิดนี้อาจมีกิจกรรมของ เอนไซม์ xulosidase ที่สามารถตัดปลายสายพอลิเมอร์ของไซแลน ทำให้ได้ปริมาณไซโลสสูง ทั้งนี้ ไซโลส เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ไม่มีคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกจึงเป็นสภาวะที่ไม่เป็นที่ต้องการสำหรับงานวิจัยนี้ ในขณะที่ Pentopan Mono BG สามารถผลิตไซโลไบโอส ไซโลไตรโอส และ ไซโลเตตร ะโอสได้อย่างโดดเด่น และพบว่าสามารถผลิตไซโลสได้น้อยกว่ามาก ทั้งนี้เนื่องจาก Pentopan Mono เป็นไซแลนเนสกลุ่ม GH 11 จัดเป็น True xylanase ที่เป็นเอนไซม์ที่มีกิจกรรมของ xylanase สูง โดยพบกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดอื่นน้อยมาก จึงทำให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลไซโล โอลิโกแซคคาไรด์ตั้งแต่ 2-4 โมเลกุล

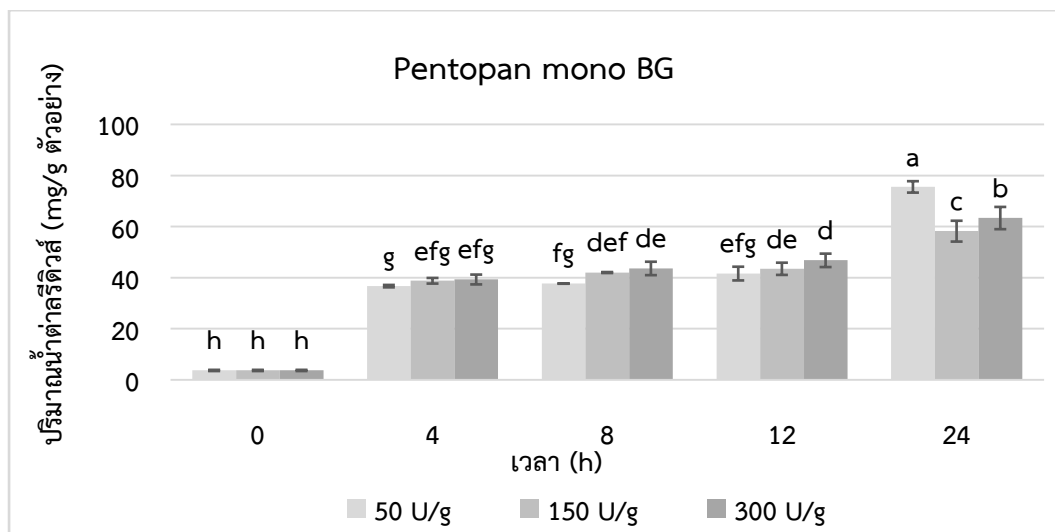


ภาพ 23 TLC Chromatogram ของ crude oligosaccharide จาก A-RHH ที่ผลิตโดยเอนไซม์ Pentopan Mono BG และ Ultraflo Max ที่ความเข้มข้น 50 U/g เป็นเวลา 0 4 8 12 และ 24 ชั่วโมง

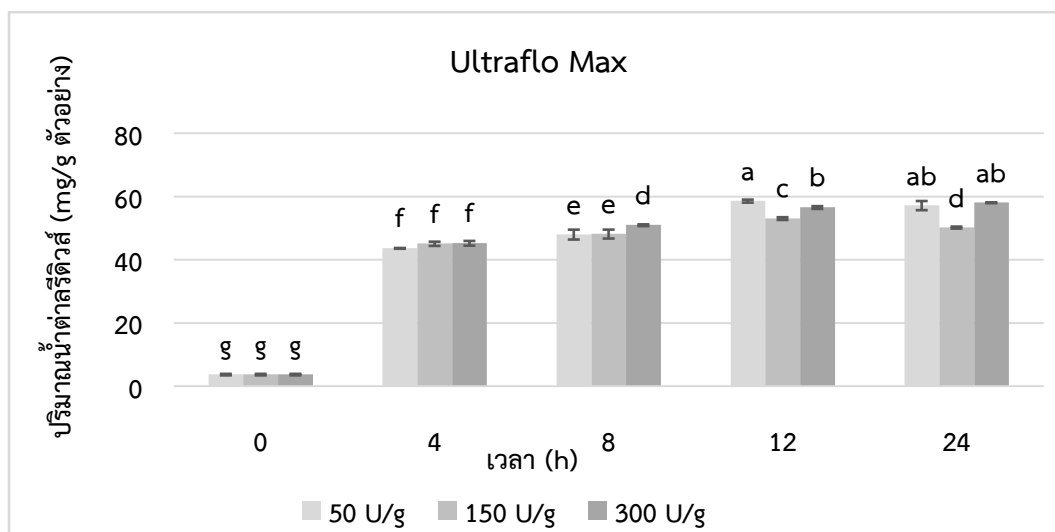


ภาพ 24 TLC Chromatogram ของ crude oligosaccharide จาก A-RSH ที่ผลิตโดยเอนไซม์ Pentopan Mono BG และ Ultraflo Max ที่ความเข้มข้น 50 U/g เป็นเวลา 0 4 8 12 และ 24 ชั่วโมง

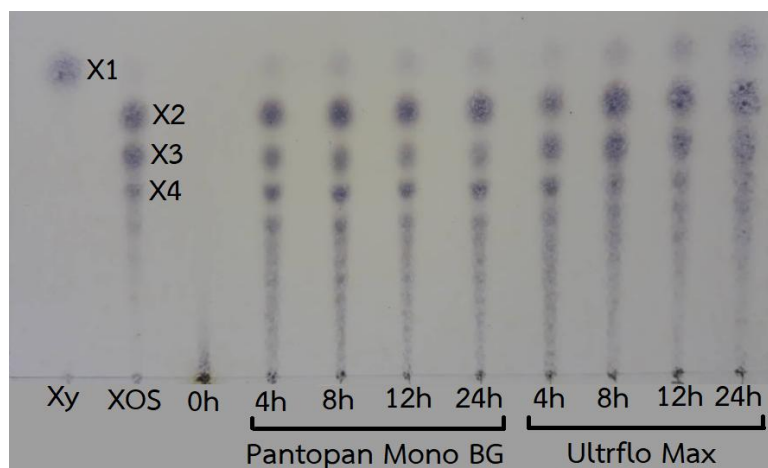
เมื่อทดลองเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 50-300 U/g กลับพบว่า ที่ 50 U/g ทั้งเอนไซม์ Pentopan mono BG และ Ultraflo Max ให้น้ำตาลรีดิวส์สูงโดยไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจนถึงระยะเวลา 12 ชั่วโมงในการบ่ม (ภาพ 25, 26)



ภาพ 25 ผลการศึกษาความเข้มข้นเอนไซม์ Pentopan Mono BG ที่ 50-300 U/g ของเกลบต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวส์



ภาพ 26 ผลการศึกษาความเข้มข้นเอนไซม์ Ultraflo Max ที่ 50-300 U/g ของเกลบต่อปริมาณน้ำตาลรีดิวส์

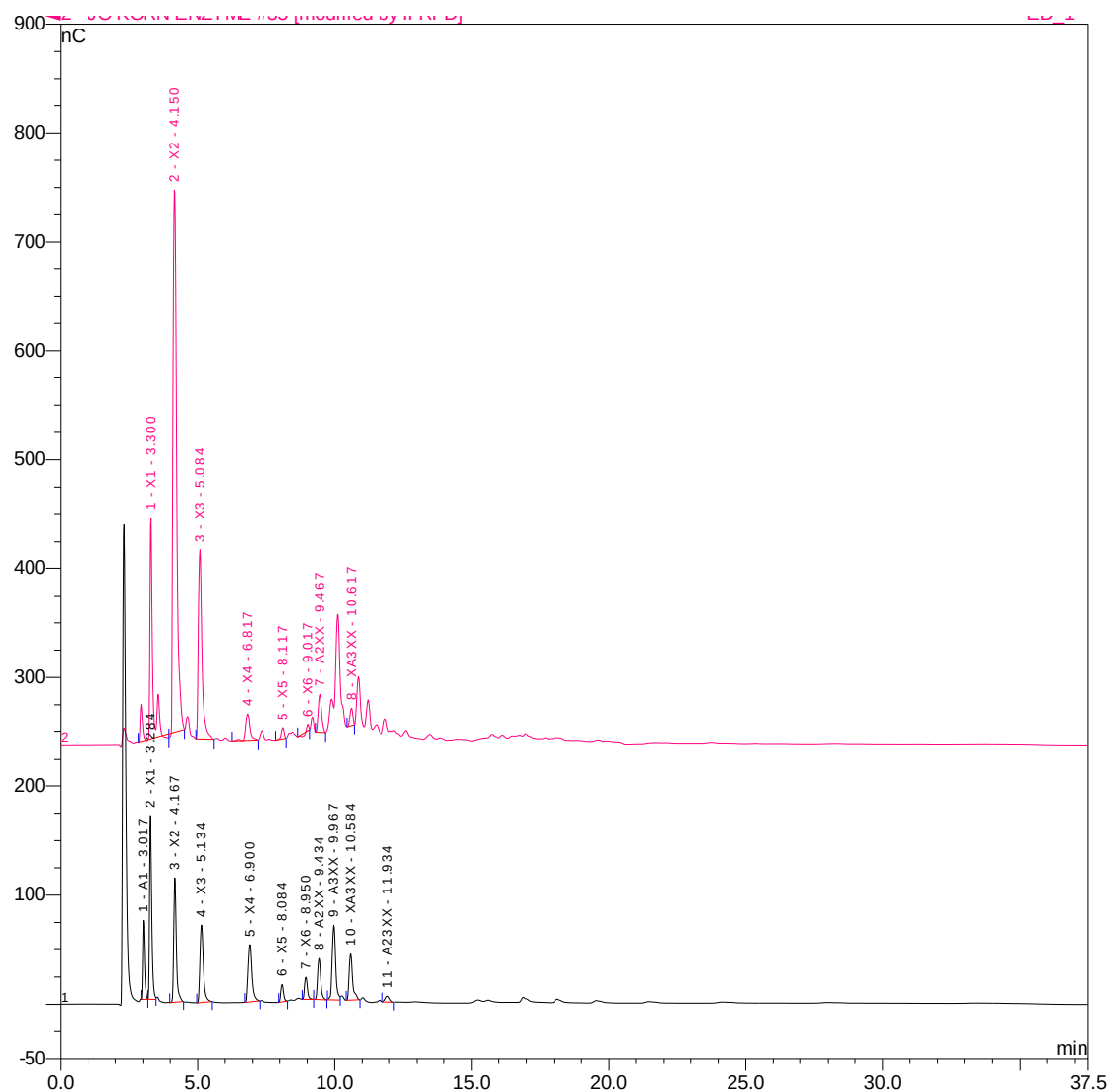


ภาพ 27 TLC Chromatogram ของ RH-XOS ที่ผลิตจากเอนไซม์ Pentopan Mono BG และ Ultraflo Max ต่อปริมาณน้ำตาลรีดิคซ์ที่ความเข้มข้น 50 U/g เป็นเวลา 0 4 8 12 และ 24 ชั่วโมง

จากผลการทดลองข้างต้น จึงได้เลือกผลิตภัณฑ์ RH-XOS ไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของโอลิโกแซคคาไรด์ จากผลการวิเคราะห์โพรไฟล์ RH-XOS ที่ถูกย่อยด้วย Pentopan Mono BG (ตาราง 13, ภาพ 28) พบว่ามีน้ำตาลไซโลโบโอส และไซโลไตรโอสอยู่ในปริมาณที่โดดเด่น และมีค่าสูงที่สุดถึง 2426.5 และ 1411.2 ppm ตามลำดับ เมื่อบ่มร่วมกับเอนไซม์ความเข้มข้น 150 U/g ที่เวลา 12 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อบ่มร่วมกับ Ultraflo Max (ตาราง 14) พบน้ำตาลทั้งสองชนิดมีค่าสูงที่สุดที่ 2205.2 และ 1288.4 ppm ตามลำดับ เมื่อใช้เอนไซม์ความเข้มข้น 50 U/g ที่เวลา 8 ชั่วโมง เท่านั้น (ไม่พบ A_3X และ $A_{23}XX$) จากผลการทดลองข้างต้น จึงนำ RH-XOS จาก Ultraflo Max ณ สภาวะดังกล่าว ที่ความเข้มข้น 2% (w/v) ไปทดสอบความสามารถในการเป็นพรีไบโอติกต่อไป

ตาราง 13 ปริมาณของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ประกอบอยู่ในผลิตภัณฑ์ RH-XOS ที่ผลิตโดยเอนไซม์ Pentopan Mono BG ที่สภาวะต่าง ๆ

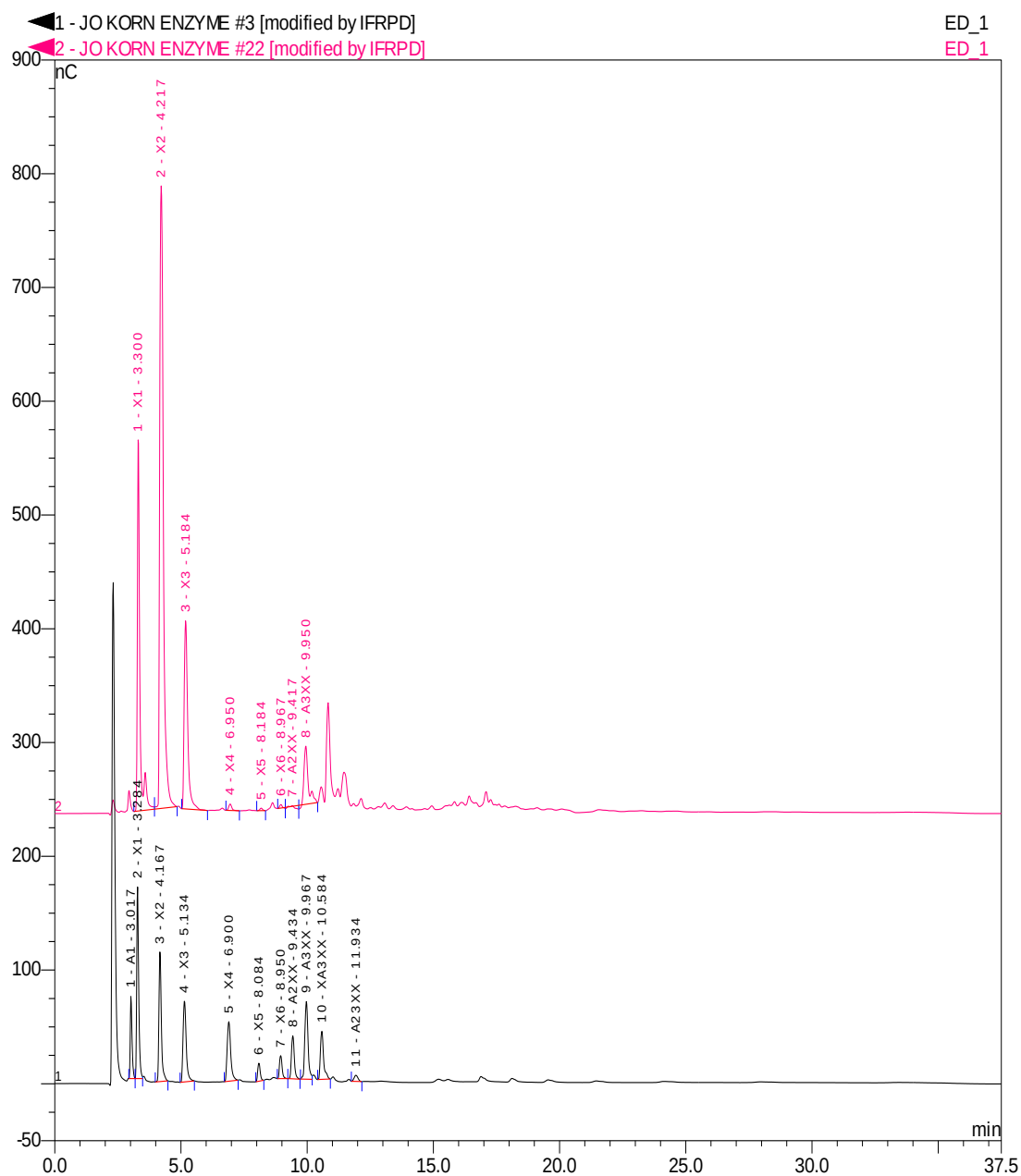
Conc (U)	Time (h)	Sugar concentration (ppm)									
		X1	X2	X3	X4	X5	X6	A2XX	A3X	XA3XX	A23XX
50	4	199.0	1543.1	1274.4	257.1	0	0	0	374.9	0	468.9
	8	267.9	1834.0	1220.9	94.0	31.7	135.6	11.7	346.9	0	271.5
	12	374.4	1978.7	1193.0	108.8	148.8	203.8	22.0	686.5	192.1	860.7
	24	469.8	2337.3	1391.0	103.3	84.2	180.4	19.3	510.0	250.9	20.2
150	4	302.5	1974.4	1116.6	199.1	0	0	0	452.3	0	432.3
	8	438.1	2073.4	974.8	123.8	127.4	217.8	17.8	570.6	149.3	788.8
	12	458.6	2426.5	1411.2	144.1	139.1	247.6	56.0	784.7	171.2	687.6
	24	603.6	2658.5	1234.5	125.6	19.3	205.1	31.5	520.5	167.4	814.8
300	4	471.0	1975.9	970.8	215.1	188.1	0	0	408.0	0	255.0
	8	503.3	2328.1	1039.1	239.6	76.1	274.7	199.8	613.6	126.5	93.5
	12	625.3	2667.0	1142.2	302.5	140.5	289.3	6.7	696.7	145.2	88.2
	24	1062.4	2754.0	729.2	315.7	12.5	80.5	6.7	480.5	153.0	115.6



ภาพ 28 HPAEC Chromatogram ของ RH-XOS ที่ผลิตโดยเอนไซม์ Pentopan Mono BG ที่ความเข้มข้น 150 U/g เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ตาราง 14 ปริมาณของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ประกอบอยู่ในผลิตภัณฑ์ RH-XOS ที่ผลิตโดยเอนไซม์ Ultraflo MAX ที่สภาวะต่าง ๆ

Conc (U)	Time (h)	Sugar concentration (ppm)									
		X1	X2	X3	X4	X5	X6	A2XX	A3X	XA3XX	A23XX
50	4	371.8	1304.6	1240.6	768.5	258.2	102.2	164.8	0	178.7	0
	8	442.7	2205.2	1288.4	594.2	330.3	747.6	670.7	0	590.5	0
	12	1080.1	2096.2	1030.6	143.2	91.8	255.0	471.5	0	219.9	0
	24	2328.1	2648.0	1360.2	102.4	43.2	425.5	612.0	0	496.9	0
150	4	1453.9	1873.3	741.8	123.6	76.1	281.1	375.9	0	339.3	0
	8	2373.4	1625.7	575.7	86.8	63.7	429.6	448.0	0	519.4	0
	12	2932.3	1404.9	448.0	82.3	47.8	184.2	432.5	0	461.0	0
	24	3712.0	925.0	229.5	80.0	21.6	167.3	430.3	0	546.5	0
300	4	2385.8	1388.3	454.8	143.3	90.6	197.1	421.3	0	357.0	0
	8	2973.0	936.4	308.0	121.5	75.5	181.7	432.5	0	374.3	0
	12	3471.6	578.7	141.7	90.5	64.5	179.6	428.7	0	477.4	0
	24	3992.6	318.9	112.1	20.7	25.3	87.8	410.6	0	479.5	0



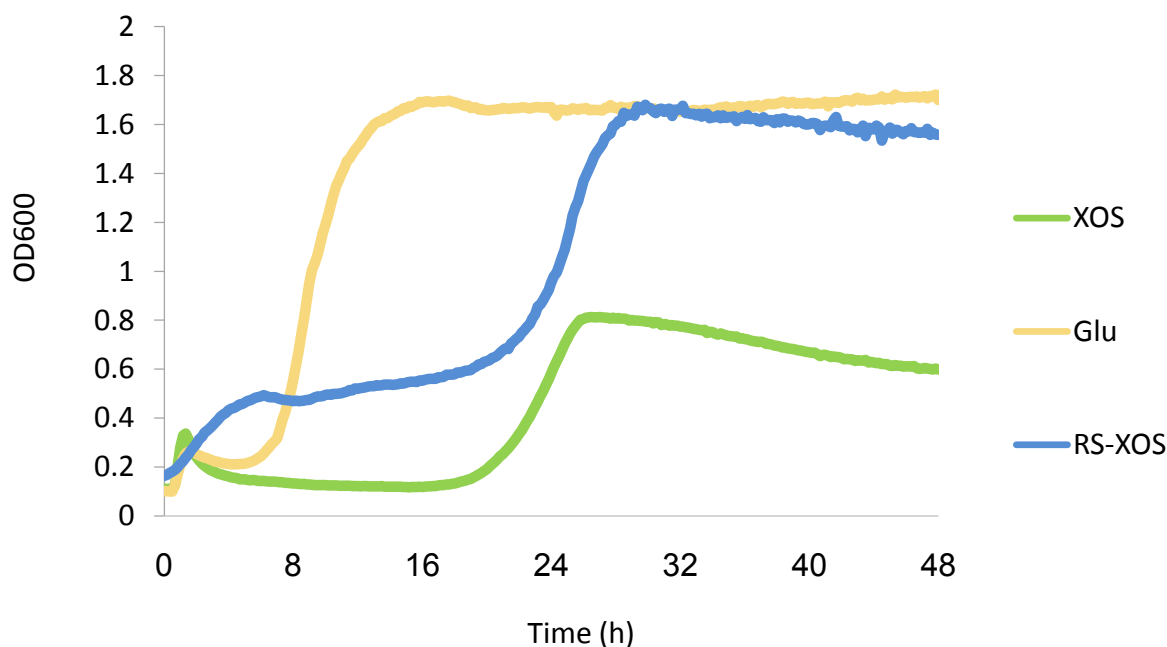
ภาพ 29 HPAEC Chromatogram ของ RH-XOS ที่ผลิตโดยเอนไซม์ Ultraflo Max ที่ความเข้มข้น 50 U/g เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

PART II ผลการทดสอบความสามารถในการเป็นพรีไบโอติก

6. ดัชนีพรีไบโอติก

เมื่อแทนที่น้ำตาลแลคโตสในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และทดสอบผลต่อการส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus* spp. ได้แก่ *L. brevis* *L. fermentum* *L. paracasei* *L. rhamnosus* *plantarum* และ *Bifidobacterium* spp. *B. infantis* *B. animalis* *B. bifidum* *B. breve* *B. longum* ด้วย RH-XOS พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อได้ ทุกสายพันธุ์ ดังเช่น ใน *L. brevis* (ภาพ 30) พบว่าหลังจากบ่มแล้วมีค่า OD₆₃₀ สูงที่สุดที่ประมาณ 1.6 ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับเชื้อที่เลี้ยงใน MRS ที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ และยังสามารถส่งเสริมการเจริญได้ดีกว่า XOS ทางการค้าอีกด้วย ผลการทดลองนี้ได้สอดคล้องกับผลจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่รายงานถึงความสามารถของ XOS ในการกระตุ้นการเจริญของ *L. brevis* อย่างไรก็ดีในงานวิจัยดังกล่าวได้เปิดเผยถึงความแตกต่างของประสิทธิภาพดังกล่าวใน XOS ที่มี Degree of polymerization แตกต่างกัน (Aachary and Prapulla, 2011)

เมื่อวิเคราะห์ค่าดัชนีพรีไบโอติก (Prebiotic index) พบว่ามีค่าที่ใกล้เคียง หรือสูงกว่า XOS ทางการค้า ต่อเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมายทุกสายพันธุ์ที่กล่าวมาข้างต้น โดยพบว่า RH-XOS มีดัชนีพรีไบโอติกสูงที่สุดที่ 0.50 ± 0.05 ต่อเชื้อ *L. brevis* และมีค่าสูงกว่า XOS ทางการค้าอีกด้วย เช่นเดียวกับ *L. plantarum* สำหรับ *Bifidobacteria* พบว่า RH-XOS มีดัชนีพรีไบโอติกสูงที่สุด ที่ 0.46 ± 0.05 ต่อเชื้อ *B. animalis* และมีค่าสูงกว่า XOS ทางการค้าอีกด้วย เช่นเดียวกับ *B. longum* (ตาราง 15)



ภาพ 30 ผลของ RH-XOS ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *L. brevis* เปรียบเทียบกับไซโลลิโกแซคคาไรด์ทางการค้า (XOS) และกลูโคส (Glu)

ตาราง 15 ดัชนีฟรึไบโอติกต่อเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกของ RS-XOS เปรียบเทียบกับ XOS ทางการค้า (com-XOS)

Bacteria	com-XOS	RH-XOS
Lactobacilli		
<i>L. brevis</i>	0.37±0.02	0.50±0.05*
<i>L. fermentum</i>	0.41±0.06	0.39±0.05
<i>L. paracasei</i>	0.18±0.03	0.39±0.02*
<i>L. plantarum</i>	0.43±0.01	0.35±0.04*
<i>L. rhamnosus</i>	0.23±0.06	0.25±0.02
Bifidobacteria		
<i>B. infantis</i>	0.03±0.03	0.08±0.01
<i>B. animalis</i>	0.44±0.03	0.46±0.05*
<i>B. bifidum</i>	0.35±0.04	0.32±0.06
<i>B. breve</i>	0.32±0.04	0.34±0.03
<i>B. longum</i>	0.20±0.01	0.38±0.02*

7. ผลการผลิตกรดไขมันสายสั้นของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก

จากการทดลองข้างต้น พบว่า *L. brevis* และ *B. animalis* สามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นการเจริญโดย RH-XOS ได้ดีที่สุด จึงเลือกเชื้อทั้งสองสายพันธุ์มาศึกษาการผลิตสารเมแทบอลิต์ ได้แก่ กรดไขมันสายสั้น 4 ชนิด จากตาราง 16 พบว่า เมื่อให้ RH-XOS เป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อจุลินทรีย์กรดแลกติกทุกสายพันธุ์สามารถผลิตกรดไขมันสายสั้นได้แก่ กรดอะซิติก กรดบิวทีริก กรดแลกติก และกรดโพรพิโอนิกได้ดีกว่า XOS ทางการค้า

ตาราง 16 ปริมาณกรดไขมันสายสั้นที่แบคทีเรียกรดแลกติกผลิตจากการบ่มร่วมกับ RS-XOS เปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ

SCFA	Carbon Sources	Bacteria					
		<i>L. brevis</i>			<i>B. animalis</i>		
		12 h	24 h	48 h	12 h	24 h	48 h
Acetic	Glucose	31.04±0.13	56.43±1.21	65.01±1.23	25.12±0.09	35.09±0.34	45.02±0.89
	com-XOS	18.01±0.67	28.45±0.67	34.32±0.36	23.23±0.01	20.08±0.26	37.09±0.11
	RH-XOS	25.05±0.34	38.09±0.67	52.01±0.98	30.21±0.29	31.33±0.20	34.42±0.66
Butyric	Glucose	15.02±0.29	19.01±0.11	33.04±0.23	16.02±0.05	20.10±0.11	22.21±0.23
	com-XOS	4.50±0.02	7.80±0.00	15.10±0.11	6.70±0.03	17.30±0.08	23.40±0.03
	RH-XOS	5.04±0.02	8.06±0.02	15.01±0.01	8.03±0.03	18.09±0.11	25.06±0.12
Lactic	Glucose	35.1±0.01	47.8±0.05	63.10±0.11	15.6±0.09	17.80±0.89	20.90±0.12
	com-XOS	29.1±0.09	28.6±0.10	30.30±0.22	9.80±0.13	10.20±0.06	12.40±0.01
	RH-XOS	28.1±0.29	44.5±1.01	48.90±0.22	10.5±0.01	14.20±0.02	15.30±0.02
Propionic	Glucose	28.9±0.33	35.6±0.34	40.5±0.88	22.10±0.05	23.30±0.07	29.20±0.05
	com-XOS	17.4±0.02	15.6±0.02	18.90±0.08	17.30±0.12	18.90±0.27	19.10±0.22
	RH-XOS	16.7±0.03	18.3±0.00	19.30±0.02	14.20±0.02	16.40±0.10	18.50±0.02

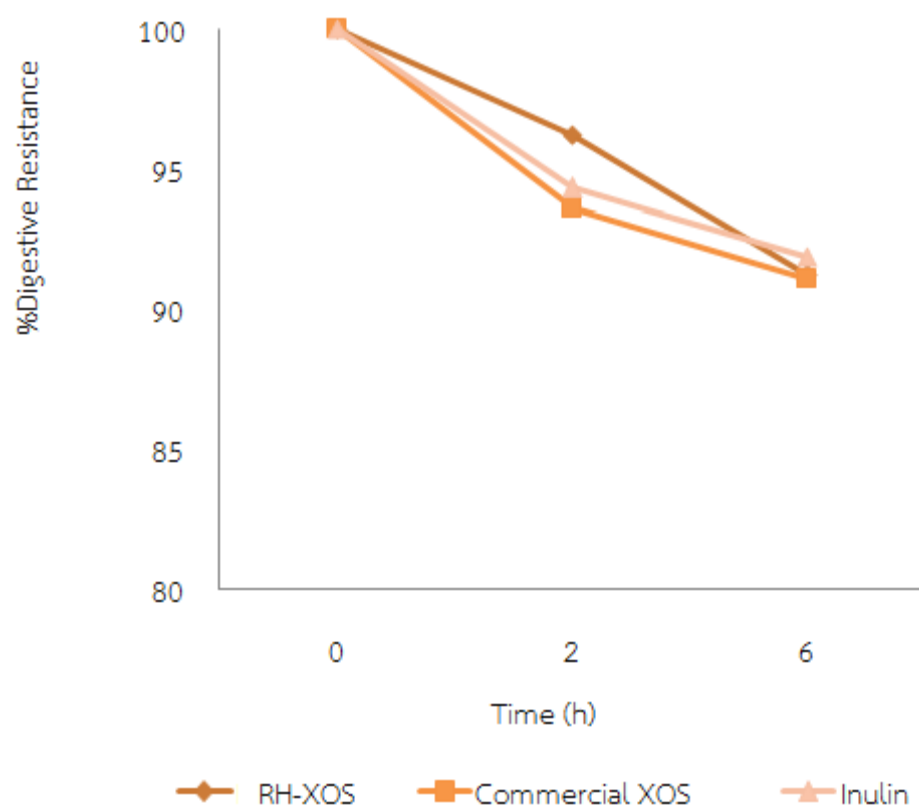
8. ความสามารถในการทนต่อการย่อยภายใต้สภาวะจำลองการย่อยอาหาร

สารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกที่ดีต้องสามารถทนต่อการย่อยของกรดในกระเพาะอาหารและลงสู่ลำไส้ใหญ่ได้ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงหรือถูกดูดซึมในลำไส้เล็กหรือในกระเพาะอาหาร เพื่อที่จุลินทรีย์ประจำถิ่นหรือพรีไบโอติกที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่จะสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน (Gibson, 2004)

เมื่อทดสอบการทนต่อการย่อยในสภาวะจำลองการย่อยอาหารของ RH-XOS โดยแบ่งเป็น กระเพาะอาหาร (2 ชั่วโมงแรก) และลำไส้เล็ก (4 ชั่วโมงหลัง) โดยเปรียบเทียบกับ XOS ทางการค้า และอินูลิน ซึ่งเป็นพรีไบโอติกที่เป็นที่นิยมในอุตสาหกรรมอาหาร พบว่า ณ การย่อยที่ 2 ชั่วโมง RH-XOS มีการต้านทานที่สูงที่สุดที่ 97% อย่างไรก็ตามเมื่อการย่อยดำเนินจนครบกระบวนการที่ 6 ชั่วโมง การต้านทานได้มีค่าใกล้เคียงกับ XOS ทางการค้า และอินูลิน ที่ประมาณ 91%

XOS ที่ผลิตได้ในงานวิจัยนี้โดยทดสอบในสภาวะจำลองกรดในกระเพาะอาหารพบว่ามีค่าใกล้เคียงกับโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตจากแก้วมังกรซึ่งถูกย่อยสูงสุด 4% (Wichienchot et al., 2010) และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Courtin et al. (2009) ทำการทดสอบในสภาวะจำลองในกระเพาะอาหารที่ค่าพีเอช 2.0 อุณหภูมิ 37°C เป็นระยะเวลานานกว่า 14 วัน พบว่าร้อยละการย่อยของ AXOS และ XOS มีค่าน้อยกว่า 10% เมื่อเทียบกับฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ที่ถูกย่อยมากกว่า 50% ในระยะเวลา 3 วันแรกของการบ่ม หลังจากผ่านการย่อยในระบบกระเพาะอาหารจนครบ 120 นาที ได้ทำการปรับพีเอชเป็น 6.9 และเติมเอนไซม์ pancreatin และ Bile salt ลงไปเพื่อจำลองสภาวะการย่อยที่เกิดในลำไส้เล็ก พบว่า (A)XOS สามารถทนต่อการย่อยในสภาวะดังกล่าวได้ดีโดยมีการย่อย 12% ในเวลาที่ 20 หลังจากนั้นมีการย่อยเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ และมีค่าสูงที่สุดเมื่อบ่มไว้นาน 120 นาที ซึ่งมีค่าเท่ากับ 18% แสดงในภาพ 27 โดยปกติแล้วคาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่จะถูกย่อยที่ลำไส้เล็กมากถึง 30% เนื่องจากในลำไส้เล็กมีเอนไซม์ที่ถูกหลั่งออกมาจากตับอ่อน ซึ่งสามารถย่อยพันธะ α -1,4 และ α -1,6 ของโอลิโกแซคคาไรด์ให้เป็นโมเลกุลเดี่ยวได้ และมีรายงานว่า maltodextrin ถูกย่อยได้เกือบสมบูรณ์ที่ลำไส้เล็ก (Engfer et al., 2000) ดังนั้นการที่ (A)XOS ที่ผลิตได้สามารถทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ในลำไส้เล็กได้นั้นอาจเนื่องมาจากโครงสร้างของน้ำตาลหน่วยย่อยที่ยึดติดกันด้วยพันธะ β -1,4 และ β -1,6 นั้นเอง

นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการรายงานถึงคุณสมบัติของสารที่เป็นพรีไบโอติก กล่าวคือต้องสามารถทนต่อการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารและต้องเหลือไปถึงลำไส้ใหญ่ได้มากกว่า 60% โดยพรีไบโอติกที่มีการวิจัยอย่างกว้างขวางในปัจจุบันเช่น โอลิโกฟรุคโตสและอินูลินสามารถทนต่อการย่อยในระบบทางเดินอาหารและเหลือไปถึงลำไส้ใหญ่ได้ถึง 85-89% (Cumming et al., 2001) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า RH-XOS มีคุณสมบัติเป็นสารพรีไบโอติกที่ดีในแง่ความสามารถในการทนต่อการย่อยในระบบทางเดินอาหาร



ภาพ 31 ร้อยละการทนต่อการย่อยของ RH-XOS

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของวัสดุพลอยได้จากการผลิตข้าว ได้แก่ แกลบ และฟางข้าว ในการเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตอะราบินโนไซแลน โดยพบว่ากระบวนการไมโครเวฟที่สภาวะอุณหภูมิ 180°C ระยะเวลา 15 นาที และที่ 160°C ระยะเวลา 10 นาที สำหรับแกลบและฟางข้าว สามารถช่วยให้สกัดอะราบินโนไซแลนออกมาได้ในปริมาณสูงที่สุด และเมื่อนำอะราบินโนไซแลนที่ได้มาทดสอบการเป็นสารตั้งต้นในการผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ พบว่าอะราบินโนไซแลนที่ผลิตจากแกลบโดยบ่มร่วมกับไซลานเนสทางการค้าชนิด Ultraflo Max ให้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีความหลากหลาย และประกอบด้วยน้ำตาลหลัก ได้แก่ ไซโลไบโอส และไซโลไตรโอส สูงที่สุด ที่ 2205.2 และ 1288.4 ppm ตามลำดับ เมื่อบ่มร่วมกับเอนไซม์ความเข้มข้น 50 U/g ที่เวลา 8 ชั่วโมง เมื่อนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทดสอบศักยภาพการเป็นพรีไบโอติก ผลก็ปรากฏอย่างชัดเจนว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. ได้อย่างโดดเด่น โดยมีดัชนีพรีไบโอติกสูงที่สุดต่อเชื้อ *L. brevis* และ *B. animalis* โดยมีค่าสูงกว่า XOS ทางการค้า และสามารถทำให้เชื้อทั้งสองสายพันธุ์ผลิตกรดไขมันสายสั้น ได้แก่ กรดอะซิติก กรดบิวทีริก กรดแลคติก และกรดโพรพิโอนิก ได้ในปริมาณที่สูงกว่า XOS ทางการค้า นอกจากนี้ยังผลิตภัณฑ์น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้ยังมีความต้านทานต่อการย่อยในสภาวะในกระเพาะอาหารและในลำไส้เล็กถึงกว่า 90% อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

- เฉลิมขวัญ และมัลลิกา . (2548). ผลของการเสริมพรีไบโอติกโซเดียมกลูโคเนตต่อสมรรถภาพการเจริญเติบโตของระบบทางเดินอาหารและระบบภูมิคุ้มกันของไก่กระตังศรีวิทยา . วิทยานิพนธ์ วท .ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ธนวรรณ ศรีนาง, จักรกฤษณ์ เตชะอภัยคุณ, คินเลย์ คู, กนก รัตน์ะกนกชัย และย่น เซคลี . (2551). ผลผลิตจากจากการหมักBacillus sp. strain TW-1 ในอาหารที่มีเปลือกข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด. วารสารวิจัยและพัฒนาจหมมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี , 31(2), 291-304.
- สันตติ วิเชียรโชติ, วรพนิต จันทรสุวรรณ์ และปรียา หมดหลู . (2553). การประเมินความเป็นพรีไบโอติกของโอลิโกแซคคาไรด์จากเนื้อขนุนในระบบจำลองลำไส้ใหญ่มนุษย์ . สงขลา: สถาบันวิจัยผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและอาหารเพื่อสุขภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตรมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุพจน์ นวล ละออง .(2552).สารพรีไบโอติกส์จากพืชเกษตร .วิทยานิพนธ์วศ .ม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ , สงขลา.
- Aachary, A. A., & Prapulla, S. G. (2011). Xylooligosaccharides (XOS) as an emerging prebiotic: microbial synthesis, utilization, structural characterization, bioactive properties, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(1), 2-16.
- Akpinar, O., Ak, O., Kavas, A., Bakir, U., & Yilmaz, L. (2007). Enzymatic production of xylooligosaccharides from cotton stalks. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(14), 5544-5551.
- Akpinar, O., Levent, O., Bostanci, S., Bakir, U., & Yilmaz, L. (2011). The Optimization of Dilute Acid Hydrolysis of Cotton Stalk in Xylose Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 163(2), 313-325. doi: 10.1007/s12010-010-9040-y
- Andersson, R. and Aman, P. (2001). Cereal arabinoxylan: Occurrence, structure and properties. In: *Advanced Dietary Fiber Technology*. pp. 301–314. McCleary, B. V. and Prosky, L., Eds. Blackwell Science Ltd., Oxford.
- Anderson, J. W., Deakins, D. A., Floore, T. L., Smith, B. M., & Whitis, S. E. (1990). Dietary fiber and coronary heart disease. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 29(2), 95-147.
- Asano, H., Hirano, F., Isobe, K., & Sakurai, H. (2000). Effect of harvest time on the protein composition (glutelin, prolamin, albumin) and amylose content in paddy rice cultivated by aigamo duck farming system. *Japanese Journal of Crop Science*, 69(3), 320-323.
- Bahcegul, E., Toraman, H. E., Ozkan, N., & Bakir, U. (2012). Evaluation of alkaline pretreatment temperature on a multi-product basis for the co-production of glucose and hemicellulose based films from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 103(1), 440-445. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.138>

- Barron, C., Surget, A., & Rouau, X. (2007). Relative amounts of tissues in mature wheat (*Triticum aestivum* L.) grain and their carbohydrate and phenolic acid composition. *Journal of Cereal Science*, 45(1), 88-96.
- Bataillon, M., Mathaly, P., Cardinali, A.-P. N., & Duchiron, F. (1998). Extraction and purification of arabinoxylan from destarched wheat bran in a pilot scale. *Industrial Crops and Products*, 8(1), 37-43.
- BeMiller, J.N. and Whistler, R.L. (1996). Carbohydrates. In: Food chemistry, O.R. Fennema (Ed.), CRC Press Taylor & Francis Group: Boca Raton, FL. pp.157-223.
- Bergmans, M., Beldman, G., Gruppen, H., & Voragen, A. (1996). Optimisation of the selective extraction of (glucurono) arabinoxylans from wheat bran: use of barium and calcium hydroxide solution at elevated temperatures. *Journal of Cereal Science*, 23(3), 235-245.
- Boudet, A. M., & Grima-Pettenati, J. (1996). Lignin genetic engineering. *Molecular Breeding*, 2(1), 25-39.
- Broekaert, W. F., Courtin, C. M., Verbeke, K., Van de Wiele, T., Verstraete, W., & Delcour, J. A. (2011). Prebiotic and other health-related effects of cereal-derived arabinoxylans, arabinoxylan-oligosaccharides, and xylooligosaccharides. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 51(2), 178-194.
- Campbell, J. M., Fahey, G. C., Jr., & Wolf, B. W. (1997). Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *Journal of Nutrition*, 127(1), 130-136.
- Carvalho, A. F. A., Neto, P. d. O., da Silva, D. F., & Pastore, G. M. (2013). Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 51(1), 75-85. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.021>
- Chakar, F. S., & Ragauskas, A. J. (2004). Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry. *Industrial Crops and Products*, 20(2), 131-141. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2004.04.016>
- Champagne, E., Wood, D. F., Juliano, B. O., & Bechtel, D. B. (2004). The rice grain and its gross composition. *Rice chemistry and technology*, 3, 77-100.
- Chapla, D., Pandit, P., & Shah, A. (2012). Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. *Bioresource Technology*, 115, 215-221.
- Chen, C., Chen, J.-L., & Lin, T.-Y. (1997). Purification and characterization of a xylanase from *Trichoderma longibrachiatum* for xylooligosaccharide production. *Enzyme and Microbial Technology*, 21(2), 91-96.

- Chen, M.-H., Bowman, M. J., Dien, B. S., Rausch, K. D., Tumbleson, M., & Singh, V. (2014). Autohydrolysis of *Miscanthus x giganteus* for the production of xylooligosaccharides (XOS): Kinetics, characterization and recovery. *Bioresource Technology*, 155, 359-365.
- Choudhury, N. H., & Juliano, B. O. (1980). Effect of amylose content on the lipids of mature rice grain. *Phytochemistry*, 19(7), 1385-1389.
- Claye, S. S., Idouraine, A., & Weber, C. W. (1996). Extraction and fractionation of insoluble fiber from five fiber sources. *Food Chemistry*, 57(2), 305-310. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00250-2](http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146(95)00250-2)
- Cleemput, G., Roels, S., Oort, M. v., Grobet, P., & Delcour, J. (1993). Heterogeneity in the structure of water-soluble arabinoxylans in European wheat flours of variable bread-making quality. *Cereal chemistry (USA)*.
- Courtin, C. M., Broekaert, W. F., Swennen, K., Aerts, G., Van Craeyveld, V., & Delcour, J. A. (2009). Occurrence of arabinoxylo-oligosaccharides and arabinogalactan peptides in beer. *Journal of the american society of brewing chemists*, 67(2), 112-117.
- Crittenden, R., Karppinen, S., Ojanen, S., Tenkanen, M., Fagerström, R., Mättö, J., Poutanen, K. (2002). In vitro fermentation of cereal dietary fibre carbohydrates by probiotic and intestinal bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(8), 781-789. doi: 10.1002/jsfa.1095
- Cummings, J. H., Macfarlane, G. T., & Englyst, H. N. (2001). Prebiotic digestion and fermentation. *The American journal of clinical nutrition*, 73(2), 415s-420s.
- Delzenne, N. M. (2003). Oligosaccharides: state of the art. *Proceedings of the Nutrition Society*, 62(1), 177-182.
- Delzenne, N. M., & Williams, C. M. (2002). Prebiotics and lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 13(1), 61-67.
- DuBois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. t., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Ebringerova, A., & Heinze, T. (2000). Xylan and xylan derivatives– biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular rapid communications*, 21(9), 542-556.
- Engfer, M. B., Stahl, B., Finke, B., Sawatzki, G., & Daniel, H. (2000). Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *The American journal of clinical nutrition*, 71(6), 1589-1596.
- Food and agriculture organization of the united nations. (2012), *FAO Statistical Yearbook*, Rome. <http://www.fao.org/docrep/015/i2490e/i2490e00.htm>.
- Fässler, C., Arrigoni, E., Venema, K., Hafner, V., Brouns, F., & Amadò, R. (2006). Digestibility of resistant starch containing preparations using two in vitro models. *European journal of nutrition*, 45(8), 445-453.

- Fernell, W., & King, H. (1953). The simultaneous determination of pentose and hexose in mixtures of sugars. *Analyst*, 78(923), 80-83.
- Fooks, L., & Gibson, G. R. (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88(S1), s39-s49.
- Ford, C. W. (1981). Estimation of hexose: Pentose ratios in solution using the phenol-sulphuric acid method. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 32(2), 153-156.
- Fujino, Y. (1978). Rice lipids. *Cereal Chemistry*, 55(5), 559-571.
- Garrote, G., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2002). Autohydrolysis of corncob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production. *Journal of Food Engineering*, 52(3), 211-218. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774\(01\)00108-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0260-8774(01)00108-X).
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J., Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition research reviews*, 17(02), 259-275.
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125(6), 1401-1412.
- Girio, F. M., Fonseca, C., Carneiro, F., Duarte, L. C., Marques, S., & Bogel-Lukasik, R. (2010). Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*, 101(13), 4775-4800. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.088>
- Gokhale, D., Patil, S., & Bastawde, K. (1998). Potential application of yeast cellulase-free xylanase in agrowaste material treatment to remove hemicellulose fractions. *Bioresource Technology*, 63(2), 187-191.
- Gremli, H., & Juliano, B. (1970). Studies on alkali-soluble, rice-bran hemicelluloses. *Carbohydrate Research*, 12(2), 273-276.
- Grootaert, C., Delcour, J. A., Courtin, C. M., Broekaert, W. F., Verstraete, W., & Van de Wiele, T. (2007). Microbial metabolism and prebiotic potency of arabinoxylan oligosaccharides in the human intestine. *Trends in Food Science & Technology*, 18(2), 64-71. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2006.08.004>
- Gruppen, H., Kormelink, F., & Voragen, A. (1993). Water-unextractable cell wall material from wheat flour. 3. A structural model for arabinoxylans. *Journal of Cereal Science*, 18(2), 111-128.
- Grzeskowiak-Przywecka, A. (2004). Study on the membrane filtration of starch hydrolysates. *Desalination*, 162, 255-261.
- Halvarson, H., & Alstin, F. (1984). Dietary fiber determination methods. *Cereal foods world* (USA).

- Hashimoto, S., Shogren, M., Bolte, L., & Pomeranz, Y. (1987). Cereal pentosans: their estimation and significance. 3. Pentosans in abraded grains and milling by-products. *Cereal Chemistry*, 64(1), 39-41.
- Hoseney, R. (1984). Functional properties of pentosans in baked foods. *Food Technology*.
- Houston, D. F., Iwasaki, T., Mohammad, A., & Chen, L. (1968). Radial distribution of protein by solubility classes in the milled rice kernel. *Journal of agricultural and food chemistry*, 16(5), 720-724.
- Hromádková, Z., Hirsch, J., & Ebringerová, A. (2010). Chemical evaluation of Fallopia species leaves and antioxidant properties of their non-cellulosic polysaccharides. *Chemical Papers*, 64(5), 663-672. doi: 10.2478/s11696-010-0054-2
- Itani, T., Tamaki, M., Arai, E., & Horino, T. (2002). Distribution of amylose, nitrogen, and minerals in rice kernels with various characters. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(19), 5326-5332.
- Itoh, T., Tamura, T., & Matsumoto, T. (1973). Sterol composition of 19 vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 50(4), 122-125.
- Iwasaki, T., Shibuya, N., Suzuki, T., & Chikubu, S. (1982). Gel-Filtration and Electrophoresis of Soluble Rice Proteins Extracted from Long, Medium, and Short Grain Varieties. *Cereal Chemistry*, 59(3), 192-195.
- Jaskari, J., Kontula, P., Siitonen, A., Jousimies-Somer, H., Mattila-Sandholm, T., & Poutanen, K. (1998). Oat β -glucan and xylan hydrolysates as selective substrates for Bifidobacterium and Lactobacillus strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(2), 175-181.
- Juliano, B. O. (1971). A Simplified Assay for Milled-Rice Amylose. *Cereal Science Today*, 16(10), 334.
- Juliano, B. O. (1993). *Rice in Human Nutrition*. Rome: International Rice Research Institute & Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Juliano, B. O., & Villareal, C. P. (1993). *Grain Quality Evaluation of World Rices*. Manila, Philippines: IRRI.
- Kehrer, J. P. (1993). Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical reviews in toxicology*, 23(1), 21-48.
- Khanok Ratanakhanokchai, Khin Lay Kyu, Ubol Choensamran and Kunio Ohmiya. (2000). การศึกษาชนิดและการเหนี่ยวนำการผลิตกลุ่มเอ็นไซม์ไซลาลเนสที่ผลิตโดย Bacillus circulans B6. สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมีคณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี.
- Kim, S., Kim, W., & Hwang, I. K. (2003). Optimization of the extraction and purification of oligosaccharides from defatted soybean meal. *International journal of food science & technology*, 38(3), 337-342.
- Knob, A., Fortkamp, D., Prolo, T., Izidoro, S. C., & Almeida, J. M. (2014). *Agro-residues as Alternative for Xylanase Production by Filamentous Fungi* (Vol. 9).

- Krishnan, H. B., White, J. A., & Pueppke, S. G. (1992). Characterization and localization of rice (*Oryza sativa* L.) seed globulins. *Plant Science*, 81(1), 1-11.
- Lai, V. M., Lu, S., He, W. H., & Chen, H. H. (2007). Non-starch polysaccharide compositions of rice grains with respect to rice variety and degree of milling. *Food Chemistry*, 101(3), 1205-1210.
- Lebesi, D. M., & Tzia, C. (2012). Use of endoxylanase treated cereal brans for development of dietary fiber enriched cakes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 13, 207-214.
- Li, W., Li, J., Chen, T., & Chen, C. (2004). Study on nanofiltration for purifying fructo-oligosaccharides: I. Operation modes. *Journal of membrane science*, 245(1), 123-129.
- Maes, C., & Delcour, J. (2002). Structural characterisation of water-extractable and water-unextractable arabinoxylans in wheat bran. *Journal of Cereal Science*, 35(3), 315-326.
- Marlett, J. A., & Slavin, J. L. (1997). Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 97(10), 1157.
- Mawal, Y. R., Mawal, M. R., & Ranjekar, P. (1987). Biochemical and immunological characterization of rice albumin. *Bioscience reports*, 7(1), 1-9.
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., . . . Dupont, D. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food—an international consensus. *Food & function*, 5(6), 1113-1124.
- Montané, D., Nabarlantz, D., Martorell, A., Torné-Fernández, V., & Fierro, V. (2006). Removal of Lignin and Associated Impurities from Xylo-oligosaccharides by Activated Carbon Adsorption. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 45(7), 2294-2302. doi: 10.1021/ie051051d
- Moura, P., Barata, R., Carvalheiro, F., Gírio, F., Loureiro-Dias, M. C., & Esteves, M. P. (2007). In vitro fermentation of xylo-oligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *LWT-Food Science and Technology*, 40(6), 963-972.
- Moure, A., Gullón, P., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2006). Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochemistry*, 41(9), 1913-1923.
- Okazaki, M., Fujikawa, S., & Matsumoto, N. (1990). Effect of xylooligosaccharide on the growth of bifidobacteria. *Bifidobacteria and Microflora*, 9(2), 77-86.
- Okazaki, M., Koda, H., Izumi, R., Fujikawa, S., & Matsumoto, N. (1991). In vitro digestibility and in vivo utilization of xylobiose. *Journal of Japanese Society of Nutrition and Food Science (Japan)*.

- Oku, T., & Nakamura, S. (2002). Digestion, absorption, fermentation, and metabolism of functional sugar substitutes and their available energy *Pure and Applied Chemistry* (Vol. 74, pp. 1253).
- Ordaz-Ortiz, J., & Saulnier, L. (2005). Structural variability of arabinoxylans from wheat flour. Comparison of water-extractable and xylanase-extractable arabinoxylans. *Journal of Cereal Science*, 42(1), 119-125.
- Palframan, R. J., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2003). Carbohydrate preferences of *Bifidobacterium* species isolated from the human gut. *Current issues in intestinal microbiology*, 4(2), 71-75.
- Parajó, J. C., Garrote, G., Cruz, J. M., & Dominguez, H. (2004). Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials. *Trends in Food Science & Technology*, 15(3-4), 115-120. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.009>
- Pascual, C. d. S. C. I., Massaretto, I. L., Kawassaki, F., Barros, R. M. C., Noldin, J. A., & Marquez, U. M. L. (2013). Effects of parboiling, storage and cooking on the levels of tocopherols, tocotrienols and γ -oryzanol in brown rice (*Oryza sativa* L.). *Food Research International*, 50(2), 676-681.
- Pellerin, P., Gosselin, M., Lepoutre, J.-P., Samain, E., & Debeire, P. (1991). Enzymic production of oligosaccharides from corncob xylan. *Enzyme and Microbial Technology*, 13(8), 617-621.
- Peng, F., Ren, J.-L., Xu, F., Bian, J., Peng, P., & Sun, R.-C. (2010). Comparative studies on the physico-chemical properties of hemicelluloses obtained by DEAE-cellulose-52 chromatography from sugarcane bagasse. *Food Research International*, 43(3), 683-693.
- Prosky, L., Asp, N.-G., Furda, I., DeVries, J. W., Schweizer, T. F., & Harland, B. F. (1984). Determination of total dietary fiber in foods and food products: collaborative study. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, 68(4), 677-679.
- Resurrection, A. P., Juliano, B. O., & Tanaka, Y. (1979). Nutrient content and distribution in milling fractions of rice grain. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 30(5), 475-481.
- Roberfroid, M. (1993). Dietary fiber, inulin, and oligofructose: a review comparing their physiological effects. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 33(2), 103-148.
- Roberfroid, M. B., & Delzenne, N. M. (1998). Dietary fructans. *Annual review of nutrition*, 18(1), 117-143.
- Rose, D. J., & Inglett, G. E. (2010). Production of feruloylated arabinoxyloligosaccharides from maize (*Zea mays*) bran by microwave-assisted autohydrolysis. *Food Chemistry*, 119(4), 1613-1618.

- Rycroft, C. E., Jones, M. R., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2001). A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 91(5), 878-887.
- Sanchez, J., Marzorati, M., Grootaert, C., Baran, M., Van Craeyveld, V., Courtin, C., Van de Wiele, T. (2009). Arabinoxylan- oligosaccharides (AXOS) affect the protein/carbohydrate fermentation balance and microbial population dynamics of the Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem. *Microbial biotechnology*, 2(1), 101-113.
- Schooneveld-Bergmans, M., Hopman, A., Beldman, G., & Voragen, A. (1998). Extraction and partial characterization of feruloylated glucuronoarabinoxylans from wheat bran. *Carbohydrate polymers*, 35(1), 39-47.
- Schooneveld-Bergmans, M., Beldman, G., & Voragen, A. (1999). Structural features of (glucurono) arabinoxylans extracted from wheat bran by barium hydroxide. *Journal of Cereal Science*, 29(1), 63-75.
- Shibuya, N., & Iwasaki, T. (1985). Structural features of rice bran hemicellulose. *Phytochemistry*, 24(2), 285-289.
- Shyur, L.-F., Wen, T.-N., & Chen, C. (1994). Purification and characterization of rice prolamins. *Bot. Bull. Acad. Sin*, 35, 65-71.
- Sun, R. (2010). *Cereal straw as a resource for sustainable biomaterials and biofuels: chemistry, extractives, lignins, hemicelluloses and cellulose*: Elsevier.
- Swennen, K., Courtin, C. M., & Delcour, J. A. (2006). Non-digestible oligosaccharides with prebiotic properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(6), 459-471. doi: 10.1080/10408390500215746
- Swennen, K., Courtin, C. M., Van der Bruggen, B., Vandecasteele, C., & Delcour, J. A. (2005). Ultrafiltration and ethanol precipitation for isolation of arabinoxyloligosaccharides with different structures. *Carbohydrate polymers*, 62(3), 283-292.
- Umemoto, T., Terashima, K., Nakamura, Y., & Satoh, H. (1999). Differences in amylopectin structure between two rice varieties in relation to the effects of temperature during grain-filling. *Starch-Stärke*, 51(2-3), 58-62.
- USDA Rice Yearbook, (2014). http://www.ers.usda.gov/data-products/rice-yearbook-2014.aspx#.U_0qzvldWSo
- Valcheva, E., Veleva, S., Valchev, I., & Dimitrov, I. (2000). Kinetic model of xylanase action on kraft pulp. *Reaction Kinetics and Catalysis Letters*, 71(2), 231-238.
- Van Laere, K. M., Hartemink, R., Bosveld, M., Schols, H. A., & Voragen, A. G. (2000). Fermentation of plant cell wall derived polysaccharides and their corresponding oligosaccharides by intestinal bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(5), 1644-1652.

- Vazquez, M., Alonso, J., Dominguez, H., & Parajo, J. (2000). Xylooligosaccharides: manufacture and applications. *Trends in Food Science & Technology*, 11(11), 387-393.
- Vázquez, M., Garrote, G., Alonso, J., Domínguez, H., & Parajó, J. (2005). Refining of autohydrolysis liquors for manufacturing xylooligosaccharides: evaluation of operational strategies. *Bioresource Technology*, 96(8), 889-896.
- Vegas, R., Alonso, J. L., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2005). Manufacture and refining of oligosaccharides from industrial solid wastes. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 44(3), 614-620.
- Wang, L., Patindol, J., and Wang, Y.J. (2005). Increasing oligosaccharides content in rice bran by physical and enzymatic means. *Book of Abstracts. American Association of Cereal Chemists Annual Meeting*.
- Wang, K. M., Wu, J. G., Li, G., Yang, Z. W., & Shi, C. H. (2011). Distribution of phytic acid and mineral elements in three indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Journal of Cereal Science*, 54(1), 116-121.
- Wichienchot, S., Jatupornpipat, M., & Rastall, R. (2010). Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chemistry*, 120(3), 850-857.
- Würsch, P., & Pi-Sunyer, F. X. (1997). The role of viscous soluble fiber in the metabolic control of diabetes: a review with special emphasis on cereals rich in β -glucan. *Diabetes Care*, 20(11), 1774-1780.
- Yamada, H., Itoh, K., Morishita, Y., and Taniguchi, H. (1993). Structure and properties of oligosaccharides from wheat bran. *Cereal Foods World* 38:490-492.
- Yoon, K. Y., Woodams, E. E., & Hang, Y. D. (2006). Enzymatic production of pentoses from the hemicellulose fraction of corn residues. *LWT-Food Science and Technology*, 39(4), 388-392.
- Yoshida, S., Ono, T., Matsuo, N., & Kusakabe, I. (1994). Structure of Hardwood Xylan and Specificity of *Streptomyces* β -Xylanase toward the Xylan. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(11), 2068-2070. doi: 10.1271/bbb.58.2068
- Yuan, Q., Zhang, H., Qian, Z., & Yang, X. (2004). Pilot-plant production of xylo-oligosaccharides from corncob by steaming, enzymatic hydrolysis and nanofiltration. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79(10), 1073-1079.
- Zhang, S., Hu, H., Wang, L., Liu, F., & Pan, S. (2018). Preparation and prebiotic potential of pectin oligosaccharides obtained from citrus peel pectin. *Food Chemistry*, 244, 232-237.
- Zubaidah, E., Nurcholis, M., Wulan, S. N., & Kusuma, A. (2012). Comparative Study on Synbiotic Effect of Fermented Rice Bran by Probiotic Lactic Acid Bacteria *Lactobacillus casei* and Newly Isolated *Lactobacillus plantarum* B2 in Wistar Rats. *APCBEE Procedia*, 2, 170-177.

ภาคผนวก

สไลด์นำเสนอรายงานความก้าวหน้า MMS-5 ณ วันที่ 27 พฤษภาคม 2563

Production of water-soluble and alkali-soluble hemicelluloses-derived oligosaccharides from rice production residues by microwave-assisted enzymatic hydrolysis and their effects on behaviors of probiotic bacteria under simulated gastrointestinal conditions

MMS5 e-Conference

MSC018299
Wanaporn Kiatprich Ueno^{a,*}, Adisorn Suetvivakarn
^aDepartment of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Assiut University and
 Environment Science and Technology, Pathumthani 12120, Thailand
^bFaculty of Agriculture, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
 (KMITL), Chalongkrong Road, Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

Biomass & Lignocellulose

Probiotic potential Xylooligosaccharide 1,500 Baht/kg

Market Price 1,500 Baht/Ton

"GOOD SOURCE OF LIGNOCELLULOSE MATERIAL"

Objectives

- To investigate the potential of microwave-pretreatment on hemicellulose extraction of rice straw.
- To investigate the commercial xylanases on xylooligosaccharides production from rice straw hemicellulose and their prebiotic properties.

Outline of Methodology

A Biomass Preparation
 • Sterilization
 • Pretreatment
 • Rice straw (RS)

B Microwave Pretreatment
 • 140, 150, 160, 170, 180°C/5, 10, 15 min

C Alkali Extraction
 • DNS

D Enzymatic Hydrolysis & Purification
 • XOS production
 • Application of xylooligosaccharides
 • DNS
 • TLC
 • HPLC

E Probiotic Properties Analysis
 • Lactic acid bacteria growth promotion
 • Resistance under simulated GI tract

DNS: Dinitrosalicylic acid
 TLC: Thin layer chromatography
 HPLC: High performance liquid chromatography

Microwave Pretreatment

Cellulose
 Hemicellulose
 Lignin

Microwave irradiation

Alkali

Increasing the accessible surface area of cellulose to enzymes

Cellulose
 Lignin

- Fastest heat transfer/shorter time
- Specific on molecules with dipole
- High products yields
- Low degradation of sideproduct

Nguyen & Nguyen et al., 2017

Chemical and composition of RS

Chemical composition	Content (Nw/Fw)
Moisture	52.95 ± 0.11
As	15.75 ± 0.12
Acid	4.11 ± 0.08
Protein	1.33 ± 0.03
Total carbohydrate	71.47 ± 0.21
Crude fiber	18.75 ± 0.20
Hemicellulose	75.10 ± 0.12
Cellulose	44.61 ± 0.46
Total lignin ^a	12.10 ± 0.10
Acid soluble lignin	0.75 ± 0.11
Acid insoluble lignin	11.35 ± 0.09
Cellulose	32.86 ± 0.45
Arabinose	1.89 ± 0.12
Xylose	13.25 ± 0.13
Galactose	1.12 ± 0.03
Mannose	0.75 ± 0.11
Rhamnose	18.24 ± 0.20

Table 1 Saccharide analysis of RS before and after treated with MW 180°C for 10 min

Saccharides	RS (Nw/Fw)	MWRS (Nw/Fw)
Arabinose	2.69 ± 0.01	3.18 ± 0.01
Xylose	13.49 ± 0.18	10.57 ± 0.12
Arabinoxylan	4.01 ± 0.03	7.78 ± 0.02

