



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพในการสังเคราะห์
ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากลำไย

Bioreactor design for fructooligosaccharide synthesis from longan

โดย

นงคราญ พงศ์ตระกูล และคณะ

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

2556

รหัสโครงการวิจัย มจ.1-55-019



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพในการสังเคราะห์ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากลำไย

Bioreactor design for fructooligosaccharide synthesis from longan

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2555

จำนวน 280,000 บาท

หัวหน้าโครงการ นางสาวนงคราญ พงศ์ตระกูล

ผู้ร่วมโครงการ นางสาวมยุรา ศรีกัลยานุกุล

นายไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน

นายรูปน ชื่นบาล

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

25 กันยายน 2556

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพในการสังเคราะห์ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากลำไย (Bioreactor design for fructooligosaccharide synthesis from longan) ได้สำเร็จลุล่วง โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2555 ผู้วิจัยขอขอบคุณ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อนุเคราะห์เรื่องสถานที่ และอุปกรณ์บางอย่างที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยให้เสร็จสิ้นสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณผู้มีส่วนเกี่ยวข้องในการสนับสนุนการศึกษานำให้การดำเนินงานประสบผลตามที่ตั้งไว้ และหากว่าผลการวิจัยครั้งนี้พอจะมีคุณค่าและได้มีการนำไปใช้ประโยชน์ในการสังเคราะห์ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากลำไย ขอมอบความดีนี้แก่ผู้ที่เกี่ยวข้องข้างต้นทุกท่าน

คณะผู้วิจัย



สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
สารบัญตารางผนวก	ง
สารบัญภาพผนวก	จ
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	17
ผลและการวิจารณ์ผลการวิจัย	22
สรุปผลการวิจัย	29
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	34
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์	35
ภาคผนวก ข ภาพประกอบการทดลอง	38

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	คุณค่าทางโภชนาการและส่วนประกอบทางเคมีของเนื้อลำไยสดและเนื้อลำไยอบแห้ง
ตารางที่ 2	องค์ประกอบน้ำตาลของผลลำไยในระยะเก็บเกี่ยวผล
ตารางที่ 3	ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นโปรไบโอติก
ตารางที่ 4	ปริมาณน้ำตาลในเนื้อลำไยพันธุ์ดอ
ตารางที่ 5	ปริมาณน้ำตาลฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์และชนิดอื่น ๆ ในเนื้อผลไม้แต่ละชนิดจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC
ตารางที่ 6	ผลการผลิตน้ำตาล FOS ชนิดคีสโตสและนิสโตสโดยใช้น้ำลำไยที่ความเข้มข้นต่างๆ
ตารางที่ 7	ผลการผลิตน้ำตาล FOS ชนิดคีสโตสและนิสโตสโดยใช้น้ำลำไยที่ระดับค่า pH ต่าง ๆ
ตารางที่ 8	ผลการผลิตน้ำตาล FOS ชนิดคีสโตสและนิสโตสโดยใช้น้ำลำไยที่ระดับอุณหภูมิ ต่างๆ
ตารางที่ 9	ผลการผลิตน้ำตาล FOS ชนิดคีสโตสและนิสโตสโดยการตรึงเอนไซม์ Pectinex ในโซเดียมอัลจินตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ
ตารางที่ 10	ผลการผลิตน้ำตาล FOS ชนิดคีสโตสและนิสโตสโดยใช้เอนไซม์ Pectinex ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1	7
ภาพที่ 2	8
ภาพที่ 3	14
ภาพที่ 4	14
ภาพที่ 5	16
ภาพที่ 6	21
ภาพที่ 7	28

ภาพที่ 1 โครงสร้างการผลิตและการตลาดลำไย

ภาพที่ 2 ราคาลำไยสดและแห้งในปี 2552

ภาพที่ 3 ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของน้ำตาล FOS ชนิดต่างๆ

ภาพที่ 4 กลไกการสังเคราะห์น้ำตาล FOS จากน้ำตาลซูโครส

ภาพที่ 5 กระบวนการทำเอนไซม์ตรึงรูป แบ่งเป็นวิธีการทางเคมีและการทางกายภาพ

ภาพที่ 6 ถึงปฏิบัติการชีวภาพในการผลิตฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์

ภาพที่ 7 การสังเคราะห์น้ำตาล FOS ชนิดคีสโตสและนิสโตสโดยใช้เอนไซม์ Pectinex ตรึงในถึงปฏิบัติการชีวภาพ



สารบัญตารางผนวก

	หน้า
ตารางผนวกที่ 1 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรต่อ ปริมาณสารละลายโปรตีน	36
ตารางผนวกที่ 2 ความเข้มข้นของโปรตีนในเอนไซม์ตรึงบนโซเดียมแอลจิเนตที่ ความเข้มข้นต่าง ๆ	37



สารบัญภาพผนวก

	หน้า
ภาพผนวกที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารละลายโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร	36
ภาพผนวกที่ 2 ลักษณะของเอนไซม์ Pectinex ตรึงแบบเชื่อมไขว้ด้วยโซเดียมแอลจิเนต	38
ภาพผนวกที่ 3 การติดตั้งถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการสังเคราะห์ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากน้ำตาลไย	39



การออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพในการสังเคราะห์ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากลำไย

Bioreactor design for fructooligosaccharide synthesis from longan

นงคราญ พงศ์ตระกูล มยุรา ศรีกัลยานุกุล ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน และฐปน ชื่นบาล

Nongkran Pongtrakul, Mayura Srikanlayanukul, Pairote Wongputtisin

and Tapana Cheunbarn

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการสังเคราะห์ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากลำไยในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขั้นตอนแรกเป็นการเตรียมน้ำลำไยเข้มข้นจากลำไยสายพันธุ์ดอ จากนั้นทำการหาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากลำไยโดยใช้เอนไซม์ PectinexTM พบว่า การใช้เอนไซม์ PectinexTM 2 ไมโครลิตร สังเคราะห์ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากลำไยเข้มข้นที่ถูกทำให้เจือจางด้วย citrate buffer pH 5.5 ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ได้น้ำตาลซูโครส คีโตส และนิสโตส 503.43, 224.09 และ 9.61 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ขั้นตอนสุดท้ายทำการออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร เพื่อใช้สังเคราะห์ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากลำไยโดยใช้เอนไซม์ PectinexTM ตรึงด้วยวิธีการตรึงแบบห่อหุ้ม (entrapment) โดยใช้โซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 6% พบว่าสามารถผลิตน้ำตาลซูโครส คีโตส และนิสโตส 805.56, 198.11 และ 7.62 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำได้มากกว่า 16 ครั้ง

คำสำคัญ: ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ การตรึงแบบห่อหุ้ม น้ำตาลคีโตส น้ำตาลนิสโตส เอนไซม์ PectinexTM

Abstract

Fructooligosaccharides synthesis from longan juice in bioreactor was investigated in this study. Firstly, concentrated longan juice was prepared from longan (Dor); subsequently, optimal conditions for fructooligosaccharides synthesis using PectinexTM enzyme was studied. It was found that two ml of PectinexTM and 55 °C were the optimal conditions for fructooligosaccharides synthesis from diluted longan juice (diluted by one ml citrate buffer pH 5.5). Sucrose, kestose and nystose were obtained at 503.43, 224.09 and 9.61 mg/ml; respectively, under these optimal conditions. Finally, 1.5 x 10 cm bioreactor for fructooligosaccharides synthesis using immobilized PectinexTM and longan juice was designed. Entrapment -based method by 6% sodium alginate was used in enzyme immobilization step. The results showed that 805.56, 198.11 and 7.62 mg/ml of sucrose, kestose and nystose; respectively, was obtained from this system. Moreover, it was also found that immobilized enzyme could be re-used more than 16 times.

Keywords: fructooligosaccharides, entrapment, kestose, nystose, PectinexTM

คำนำ

ลำไยเป็นผลไม้ท้องถิ่นที่มีการปลูกกันมากในเขตภาคเหนือของประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน ในทุกปีจะมีลำไยที่ตกเกรดหรือมีขนาดเล็กไม่สามารถจำหน่ายได้ในราคาสูงทำให้ลำไยเหล่านี้มีเหลือทิ้งอยู่เป็นจำนวนมาก ลำไยเหล่านี้จะถูกกำจัดโดยการปล่อยให้เน่าคาค้น ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าเสียดายเป็นอย่างมากเพราะลำไยเหล่านี้ยังคงมีสารสำคัญหลายๆ ชนิดหลงเหลืออยู่เป็นจำนวนมาก หนึ่งในนั้นคือน้ำตาล ไม่ว่าจะเป็นน้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุกโตส น้ำตาลเหล่านี้มีศักยภาพที่จะนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเป็นส่วนประกอบอาหารสุขภาพที่มีมูลค่าเพิ่มมากขึ้นอย่างมหาศาล โดยใช้กระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ

ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructooligosaccharide; FOS) เป็นน้ำตาลชนิดหนึ่งที่ได้รับการยอมรับในวงการอาหารว่าเป็นสารพรีไบโอติก (Prebiotic) โดยสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโปรไบโอติก (Probiotic) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ช่วยให้ร่างกายของมนุษย์และสัตว์แข็งแรง เพราะช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร กระตุ้นภูมิคุ้มกัน และผลิตวิตามินต่างๆ ให้แก่ร่างกายได้ น้ำตาล FOS นี้ยังเป็นน้ำตาลที่มีแคลอรีและความหวานต่ำ จึงเหมาะเป็นอย่างยิ่งสำหรับผู้ที่ใส่ใจสุขภาพ น้ำตาล FOS สามารถผลิตได้จากหลายวิธี หนึ่งในนั้นคือการสังเคราะห์โดยใช้เอนไซม์ fructosyltransferase ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่จำเพาะและใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้น และถ้ามีการออกแบบถึงปฏิกรณ์ชีวภาพในการสังเคราะห์น้ำตาล FOS โดยมีกระบวนการผลิตที่เป็นมาตรฐานจะสามารถผลิต FOS ในปริมาณมากได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นน้ำตาลที่สกัดมาจากลำไยนี้คาดว่าจะมีศักยภาพที่จะใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตน้ำตาล FOS ได้ อันจะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับลำไยได้อย่างคาดไม่ถึง งานวิจัยนี้จึงเป็นแนวทางในการเพิ่มมูลค่าให้กับผลผลิตทางการเกษตร

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อสังเคราะห์น้ำตาล fructooligosaccharide จากลำไย
2. เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับลำไย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพิ่มมูลค่าของลำไยที่ตกเกรดหรือมีขนาดเล็ก
2. หน่วยงานภาคเอกชนสามารถนำองค์ความรู้ไปพัฒนาต่อยอดเพื่อผลิตน้ำตาล FOS ในเชิงพาณิชย์ได้ อันเป็นการช่วยลดการนำเข้าน้ำตาลดังกล่าวจากต่างประเทศ
3. ได้ประโยชน์สำหรับนักศึกษาที่ศึกษาปัญหาพิเศษเกี่ยวกับงานทางด้านนี้
4. ได้องค์ความรู้ใหม่ในเรื่องการออกแบบถึงปฏิกรณ์ชีวภาพ
5. ได้ผลงานตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติหรือนานาชาติ
6. สามารถนำผลงานวิจัยมาจดอนุสิทธิบัตรเพื่อต่อยอดในทางธุรกิจได้

การตรวจเอกสาร

ลำไย (longan)

ลำไย เป็นพืชที่อยู่ในตระกูล Sapindaceae และมีชื่อวิทยาศาสตร์หลายชื่อ ได้แก่ *Euphoria longan* Lam.; *E. longan* Strend.; *Nephelium longan* Camb. และ *Dimocarpus longan* Lour. (พาวิน และคณะ 2546; สุรภา, 2548) ซึ่งลำไยที่นิยมปลูกในประเทศเพื่อบริโภคนั้นอาจแบ่งได้เป็น 2 สายพันธุ์ใหญ่ คือ ลำไยพื้นเมือง (ลำไยกระดุก) และลำไยกระโหลก โดยลำไยกระโหลกนี้ก็ยังแบ่งได้ออกเป็นอีกหลายสายพันธุ์ เช่น พันธุ์เบี้ยวเขียวหรืออียีว พันธุ์คอหรืออีค้อ พันธุ์เหหัว และพันธุ์ชมพู เป็นต้น

ลำไยเป็นผลไม้ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอันหนึ่งของภาคเหนือตอนบนของประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งจังหวัดเชียงใหม่ ลำพูน และเชียงราย ซึ่งผลผลิตลำไยสามารถส่งออกจำหน่ายยังต่างประเทศทั้งในรูปผลสด อบแห้ง แช่แข็ง และลำไยกระป๋อง นำรายได้เข้าประเทศปีละหลายล้านบาท (อนันต์, 2547) องค์ประกอบทางเคมีและคุณค่าทางโภชนาการของลำไยสดเปรียบเทียบกับลำไยอบแห้ง แสดงได้ดังตารางที่ 1 และตารางที่ 2

ตารางที่ 1 คุณค่าทางโภชนาการและส่วนประกอบทางเคมีของเนื้อลำไยสดและเนื้อลำไยอบแห้ง

ส่วนประกอบ	เนื้อลำไยสด	เนื้อลำไยอบแห้ง
ความชื้น (%)	81.10	17.80
ไขมัน (%)	0.11	0.40
เส้นใย (%)	0.28	1.60
โปรตีน (%)	0.97	4.60
เถ้า (%)	0.56	2.86
คาร์โบไฮเดรต (%)	16.98	72.70
ค่าพลังงานความร้อน (กิโลจูล/ 100 กรัม)	72.79	311.80
แคลเซียม (มก./100 กรัม)	5.70	27.70
เหล็ก (มก./100 กรัม)	0.35	2.39
ฟอสฟอรัส (มก./100 กรัม)	35.30	159.50
วิตามิน ซี (มก./100 กรัม)	6920	137.80
โซเดียม (มก./100 กรัม)	-	4.50
โพแทสเซียม (มก./100 กรัม)	-	2012.00
ไนอะซีน (มก./100 กรัม)	-	3.03
กรดแพนโททินิก (มก./100 กรัม)	-	0.57
วิตามินบีสอง (มก./100 กรัม)	-	0.375

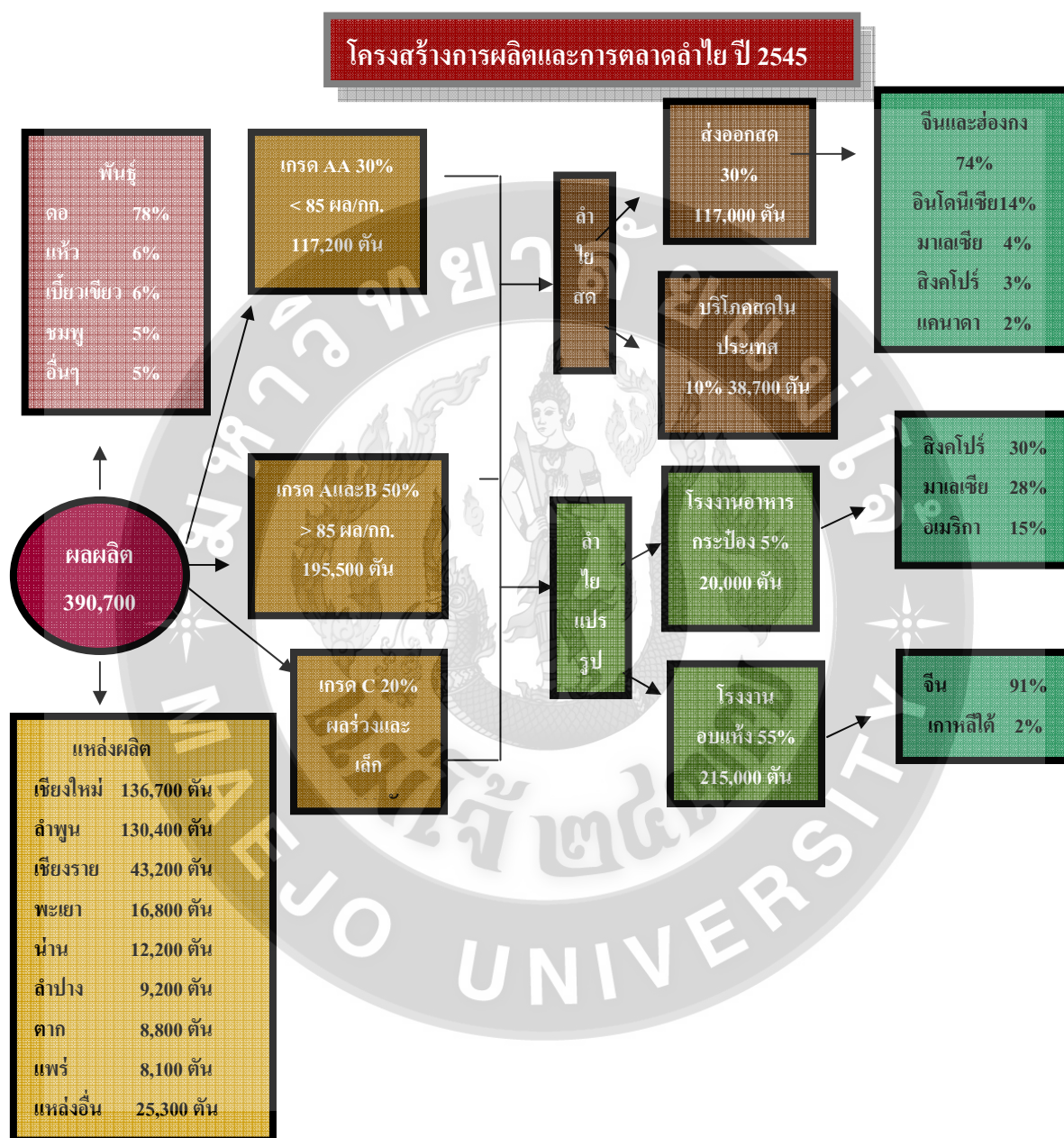
ที่มา: สุรภา, 2548.

ตารางที่ 2 องค์ประกอบน้ำตาลของผลลำไยในระยะเก็บเกี่ยวผล

ส่วนประกอบ	ลำไยปี 2526	ลำไยปี 2527
ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (%)	20.10 $\pm$ 0.10	18.30 $\pm$ 0.20
ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (มก./ กรัม)	184.00 $\pm$ 7.00	154.00 $\pm$ 11.00
ปริมาณน้ำตาลซูโครส (มก./ กรัม)	72.00 $\pm$ 15.00	29.00 $\pm$ 3.00
ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (มก./กรัม)	22.00 $\pm$ 17.00	23.00 $\pm$ 1.00
ปริมาณน้ำตาลฟรุคโตส (มก./กรัม)	28.00 $\pm$ 17.00	17.00 $\pm$ 1.00

ที่มา: คัดแปลงจาก นพดล และคณะ, 2543.

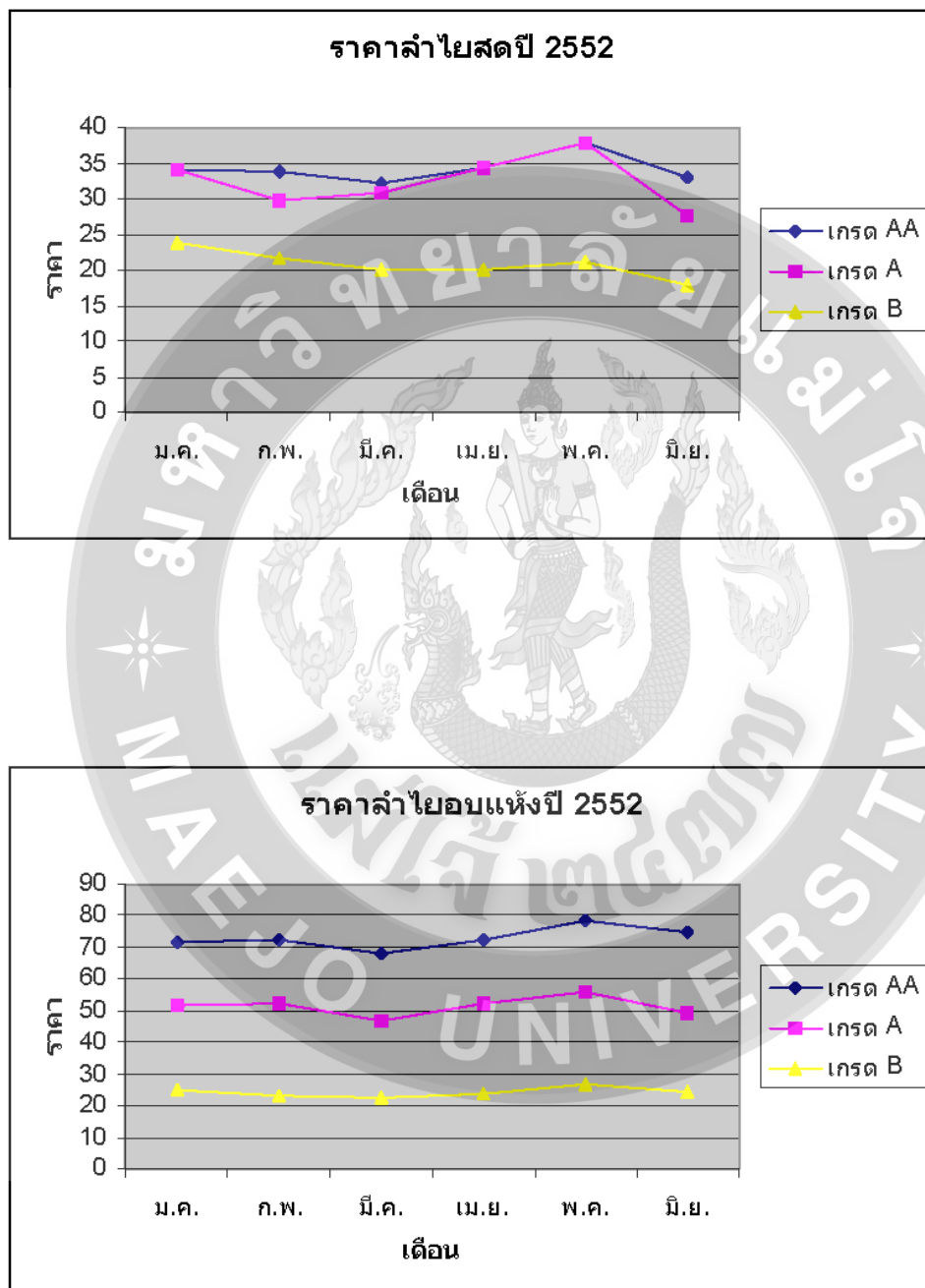
และจากการวิเคราะห์โครงสร้างการผลิตและการตลาดลำไยของประเทศไทยในปี 2545 ก็พบได้ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างการผลิตและการตลาดลำไย

ที่มา: <http://www.moc.go.th/opscenter/cr/long.doc> [online]

ราคาของลำไยทั้งลำไยสดและลำไยแห้งจะใช้ขนาดของลำไยเป็นตัวกำหนดราคาดังแสดงในภาพที่ 2 ซึ่งลำไยมีตกรวดจะมีราคาต่ำมากไม่คุ้มค่าต่อการผลิต



ภาพที่ 2 ราคาลำไยสดและแห้งในปี 2552

ที่มา:

[http://www.oae.go.th/ewtadmin/ewt/oae_baer/ewt_news.php?nid=311&filename=index\[online\]](http://www.oae.go.th/ewtadmin/ewt/oae_baer/ewt_news.php?nid=311&filename=index[online])

โพรไบโอติกและพรีไบโอติก

โพรไบโอติก (Probiotics)

โพรไบโอติก (probiotics) เป็นภาษากรีกที่แปลว่า “for life” โดย Parker เป็นคนแรกที่ให้นิยามของคำว่าโพรไบโอติกในเชิงเดียวกับที่ใช้ในทุกวันนี้ โดยได้ให้นิยามว่า “โพรไบโอติกเป็นสิ่งมีชีวิตหรือสารชนิดที่ก่อให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ขึ้นภายในทางเดินอาหาร”

(Schrezenmer and Vrese 2001) จึงอาจตีความรวมไปได้ถึงสารปฏิชีวนะ ต่อมาในปี 1989 Fuller ก็ได้ปรับปรุงนิยามนี้เสีย ใหม่กล่าวคือ “โพรไบโอติกคือจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เสริมในอาหารสัตว์เพื่อก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสัตว์นั้นๆ โดยปรับปรุงสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้” ส่วน Havennaar และคณะ (1992) ก็ได้นิยามคำว่าโพรไบโอติกไว้เช่นกัน โดยกล่าวไว้ว่า “โพรไบโอติกคือจุลินทรีย์เดี่ยวหรือผสมก็ได้ที่มีชีวิต ที่เมื่อเสริมให้คนหรือสัตว์แล้วก่อให้เกิดประโยชน์ต่อคนหรือสัตว์โดยปรับปรุงคุณสมบัติของจุลินทรีย์เจ้าถิ่น” หลังจากนั้นก็มีผู้ปรับปรุงนิยามเพิ่มเติมเรื่อยมา แต่อย่างไรก็ตามโดยรวมแล้วอาจกล่าวได้ว่า โพรไบโอติกคือจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพของคนและสัตว์นั่นเอง ตัวอย่างของจุลินทรีย์โพรไบโอติกแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นโพรไบโอติก

<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Bifidobacterium</i> sp.	Other lactic acid bacteria	Non-lactic acid bacteria
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> ¹	<i>Bacillus subtilis</i> ¹
<i>L. amylovorus</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ¹
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	strain nissle
<i>L. paracasei</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. plantarum</i>	<i>B. lactis</i>		
<i>L. rhamnosus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	

หมายเหตุ: ¹ ส่วนใหญ่ใช้เสริมในสัตว์

ที่มา: Holzapfel et al., 2001.

ประโยชน์ของการใช้โปรไบโอติกต่อคนและสัตว์มีมากมาย นอกเหนือจากการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogens) ในทางเดินอาหารอันเป็นสาเหตุของอาหารท้องร่วงแล้ว ยังช่วยลดระดับของลิพิดในซีรัมอีกด้วย เช่น *L. acidophilus* สามารถลดระดับโคเลสเตอรอลและลดอัตราการดูดซึม cholesterol micelles ในลำไส้ (Mazza, 1998) โปรไบโอติกบางสายพันธุ์ยังช่วยกำจัดสารก่อมะเร็งและ secondary bile salt ซึ่งจะก่อให้เกิดมะเร็งในลำไส้ได้ (Marteau *et al.*, 2001) Rastall และคณะ (2000) ก็รายงานอีกว่าโปรไบโอติกช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะเจาะจงให้กับร่างกายด้วย และที่เห็นได้ชัดที่สุดอีกประการหนึ่งคือโปรไบโอติกจะช่วยกำจัดน้ำตาลแลคโตสในน้ำนมที่ทำให้บางคนเกิดอาการแพ้ น้ำนม (Wongputtisin, 2003)

พรีไบโอติก (Prebiotics)

คำๆ นี้ได้ถูกเสนอขึ้นมาเป็นครั้งแรกโดย Gibson และ Roberfroid (1995) โดยให้นิยามว่า “พรีไบโอติก คือ ส่วนประกอบของอาหารที่ไม่สามารถถูกย่อยสลายโดยทางเดินอาหารของคนและสัตว์แต่ให้คุณสมบัติแก่คนและสัตว์ โดยการกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกในทางเดินอาหารอย่างเฉพาะเจาะจง” ดังนั้นคุณสมบัติของสารพรีไบโอติกจึงควรมีดังต่อไปนี้

- ไม่ถูกย่อยหรือดูดซึมในทางเดินอาหาร
- เป็นสารอาหารที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของโปรไบโอติกที่เฉพาะเจาะจง
- สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของจุลินทรีย์อันจะก่อให้เกิดสุขภาพที่ดี

พรีไบโอติกสามารถเป็นได้ทั้งเปปไทด์สายสั้นๆ โปรตีน คาร์โบไฮเดรตหรือแม้กระทั่งลิพิด แต่สารกลุ่มที่ได้รับความนิยมและมีการศึกษามากที่สุดคือ โอลิโกแซคคาไรด์ที่ย่อยไม่ได้ (non-digestible oligosaccharides; NDOs) (Wongputtisin, 2003)

มีรายงานว่า การเสริม NDOs ในอาหารคนจะช่วยก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพคือช่วยกระตุ้นการเจริญของโปรไบโอติกในลำไส้ เช่น การเสริม fructooligosaccharides (FOS) ในอาหารจะช่วยให้การเจริญของ *Bifidobacterium* sp. ดีขึ้นส่งผลให้ช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค เช่น *Clostridium* sp. (La Blay *et al.*, 1999; Kullen *et al.*, 1998; Bouhnik *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 1996) น้ำตาล FOS และอนุพันธ์ของซูโครสไม่ก่อให้เกิดฟันผุ ช่วยเพิ่มระดับของ short chain fatty acid (SCFA) เพิ่มการบีบ-หดตัวของลำไส้ (peristalsis) (Mazza, 1998) NDOs ยังช่วยลดระดับไขมันในเลือดจึงช่วยลดโอกาสเกิดโรคหัวใจ ดังเช่นจากการศึกษาในชาย 12 คนที่มีอาการ hypercholesterolemia โดยเสริม inulin 20 กรัม ในไอศกรีมให้กินทุกวันเป็น

เวลา 3 สัปดาห์ พบว่าระดับของไตรกลีเซอไรด์และคอเรสเตอรอลลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Causey *et al.*, 2000)

Cummings และคณะ (2001) กล่าวเกี่ยวกับพรีไบโอติกไว้ว่า ที่มีการศึกษากันมากคือสารกลุ่ม short – chain carbohydrates (SCCs) ที่ไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ในมนุษย์หรือบางครั้งก็เรียกสารกลุ่มนี้ว่า non-digestible oligosaccharide (NDOs) ยกตัวอย่างเช่น Fructooligosaccharide, Isomaltooligosaccharide, Xylooligosaccharide, Polydextrose เป็นต้น ซึ่งมี Degree of Polymerization (DP) ประมาณ 2-10 แต่พรีไบโอติกที่มีในท้องตลาดนั้นพบว่ามี NDOs เป็นองค์ประกอบน้อย เช่น Xylooligosaccharide ซึ่งผลิตโดยบริษัท Suntory ประเทศญี่ปุ่น ประกอบด้วยโอลิโกแซคคาไรด์ 29.4 % , แป้ง 41 % และ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 15 % เป็นต้น จึงเป็นอุปสรรคสำคัญที่ใช้ศึกษาผลของพรีไบโอติกในคนและสัตว์

โอลิโกแซคคาไรด์สามารถได้มาโดยหลายวิธีเช่น (1) การสกัดจากพืช เช่น FOS, α -galactooligosaccharide (2) ใช้วิธีการย่อยโพลีแซคคาไรด์ด้วยเอนไซม์ (Controlled enzymatic hydrolysis) สารโอลิโกแซคคาไรด์ดังกล่าว เช่น FOS, Xylooligosaccharides (XOS) (3) วิธีการสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ (Enzymatic synthesis) โดยเอนไซม์กลุ่ม glycosyl transferase โอลิโกแซคคาไรด์ดังกล่าว เช่น FOS, α -glucoooligosaccharides, β -glucoooligosaccharides และ β -galactooligosaccharide เป็นต้น

ชัยนุสร และคณะ (2539) รายงานว่ากระบวนการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์สามารถสังเคราะห์ได้อีกวิธีคือ ใช้ปฏิกิริยาย้อนกลับของเอนไซม์กลุ่มไกลโคซิเดส (glycosidase) ซึ่งปกติจะทำหน้าที่เร่งการสลายโพลีแซคคาไรด์หรือโอลิโกแซคคาไรด์ แต่เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจะสามารถเร่งการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ได้ด้วย โดยจะนำผลผลิตที่ได้จากการสลายของโพลีแซคคาไรด์หรือโอลิโกแซคคาไรด์มาเป็นสับสเตรทในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ (ส่วนใหญ่จะได้โอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นๆ) แต่พันธะของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้จะมีความจำเพาะน้อยกว่าพวกที่สร้างขึ้นจากเอนไซม์ไกลโคซิลทรานสเฟอเรส (glycosyl transferase) และมักเกิดพันธะหลาย ๆ แบบปนกันอยู่

Cruz และคณะ (1999) ได้ศึกษาการผลิต Transgalactosylated oligosaccharides (TOS) เพื่อใช้เป็นสารพรีไบโอติกเร่งการเจริญของจุลินทรีย์แลคติก (Lactic acid bacteria) โดยผลิตจากการใช้ galactosyltransferase activity ของเอนไซม์ β -galactosidase ที่แยกจากเชื้อ *Penicillium simplicissimum* โดยมีน้ำตาลแลกโตสที่ความเข้มข้นสูง (60 %w/v) เป็นสารตั้งต้น

นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยที่ยืนยันว่าสารพรีไบโอติกสามารถเร่งการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติกได้ เช่น งานของ Gibson และคณะ (1995) ได้ศึกษาผลของการบริโภค FOS ที่มีต่อ

จำนวนจุลินทรีย์ภายในลำไส้ ทำการทดลองในอาสาสมัครผู้ใหญ่ โดยให้บริโภคน FOS หรือ อินูลิน 15 กรัม/วัน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์หลักๆ ที่พบในอุจจาระ ผลปรากฏว่า FOS และ อินูลิน สามารถช่วยเพิ่มจำนวนของเชื้อไบฟิโดแบคทีเรียได้อย่างมีนัยสำคัญ และยังช่วยลดจำนวนของเชื้อ *Clostridium* ลงได้ด้วย ในขณะที่ Bouhnik และคณะ (1999) ก็ได้รายงานผลเหมือนกัน และยังรายงานถึงปริมาณที่น้อยที่สุดของ FOS (threshold dose) ที่มนุษย์บริโภคเข้าไปแต่ละวัน แล้วทำให้จำนวนไบฟิโดแบคทีเรียในลำไส้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญว่า ควรบริโภค FOS ในปริมาณ 10 กรัม/วัน จึงจะสามารถตรวจพบการเพิ่มจำนวนของไบฟิโดแบคทีเรีย

Kaplan และ Hutkins (2000) ศึกษาการใช้ FOS ในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แลคติก และไบฟิโดแบคทีเรีย รวมทั้งหมด 24 สายพันธุ์ บนอาหาร MRS พบว่ามีเพียง *Lactobacillus* 12 สายพันธุ์ (จากทั้งหมด 16 สายพันธุ์) และ *Bifidobacteria* 7 สายพันธุ์ (จากทั้งหมด 8 สายพันธุ์) เท่านั้นที่สามารถเจริญได้

มีผู้ศึกษาถึงประโยชน์ของ FOS ที่มีต่อสุขภาพคนและสัตว์มากมาย ยกตัวอย่าง เช่น Ohta และคณะ (1997) ได้ศึกษาผลของการบริโภค FOS ที่มีต่อการป้องกันการเกิดโรค Osteopenia (โรคผิปกดของกระดูก) ซึ่งพบทั่วไปในมนุษย์ แต่การศึกษานี้ได้ศึกษาในหนู โดยกลุ่มทดลองให้อาหารที่มี FOS ในปริมาณ 75 กรัม/กก. อาหาร เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปกติ ผลการทดลองพบว่าหนูที่ได้รับ FOS ในอาหารเป็นประจำ จะสามารถดูดซึมแคลเซียมในลำไส้ใหญ่ได้มากกว่าหนูที่ไม่ได้รับ FOS นอกจากนี้ FOS ยังช่วยป้องกันการลดลงของแคลเซียมและแร่ธาตุต่างๆ ในกระดูก อันเป็นสาเหตุของการเกิดโรค osteopenia

Takahara และคณะ (2000) มีการศึกษาลำดับกับ Ohta และคณะ คือดูผลของการบริโภค FOS ที่มีต่อการเพิ่มของปริมาตร และปริมาณแร่ธาตุของกระดูกโคนขาในหนู โดยหนูที่นำมาทดลองจำนวน 16 ตัวมีอายุ 42 วัน จะถูกแบ่งเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ที่ให้บริโภค FOS ปริมาณ 5 กรัม/100 กรัมอาหาร หลังจากให้หนูปรับตัวเป็นเวลา 3 วันแล้ว ก็มีการผสมแคลเซียมและแมกนีเซียมลงไปให้อาหารด้วย ในปริมาณ 95 และ 8 มิลลิกรัม/วัน ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าในหนูที่ได้รับ FOS จะมีการดูดซึมแคลเซียมและแมกนีเซียมมาใช้ได้ดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับ FOS ทำให้ปริมาณของแร่ธาตุดังกล่าวในกระดูกสูงขึ้นด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มขึ้นของแร่ธาตุดังกล่าวอันเนื่องจากการบริโภค FOS นี้ยังอาจเป็นสาเหตุที่ช่วยให้ปริมาตรของกระดูกโคนขาของหนูเพิ่มขึ้นด้วย

Swanson และคณะ (2002) ได้ศึกษาผลกระทบที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกัน, ความสามารถการย่อยอาหารของระบบทางเดินอาหาร, จำนวนจุลินทรีย์ และปริมาณของ Protein catabolites (เช่น indole , phenol) ในลำไส้ใหญ่ของสุนัข เมื่อได้รับอาหารที่มีการเสริม FOS และ/หรือ MOS ผลการ

ทดลองหลังจากวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าสุนัขกลุ่มที่ได้รับ MOS เสริมในอาหารจะพบจำนวน *Lactobacillus* spp. มากกว่ากลุ่มควบคุมที่ซึ่งไม่ได้รับ MOS ส่วนในกลุ่มที่ได้รับทั้ง FOS และ MOS จะพบปริมาณ IgA ในลำไส้เล็กส่วนท้าย และในซีรัมมากกว่าในกลุ่มควบคุม ปริมาณของ Lymphocytes ที่ซึ่งวัดจากเปอร์เซ็นต์ของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมดที่พบในกลุ่มที่ได้รับ MOS ก็มากกว่ากลุ่มควบคุมด้วย นอกจากนี้สุนัขที่ได้รับ FOS และ MOS จะพบสาร indole และ phenol ในมูลน้อยกว่ากลุ่มควบคุม โดยสรุปแล้วการเสริม FOS และ MOS ในอาหารจะมีประโยชน์ต่อสุขภาพและระบบภูมิคุ้มกันของสุนัข

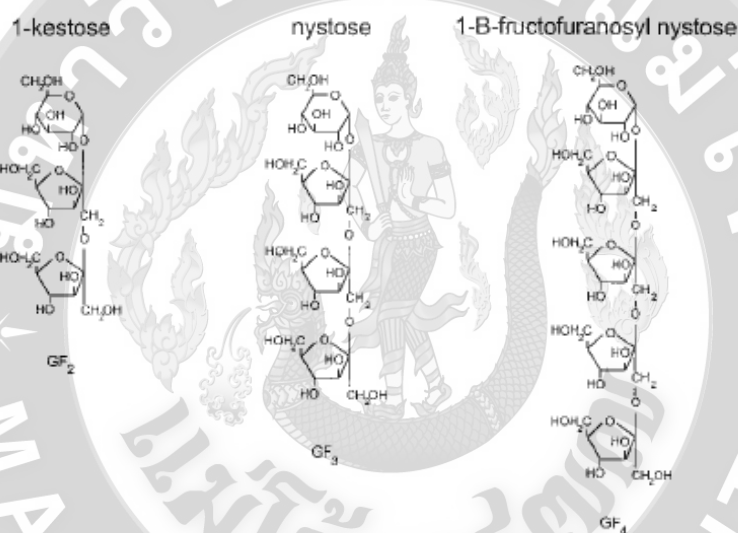
จากรายงานวิจัยข้างต้นพบว่า การจะเพิ่มจำนวนของไบฟิโดแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์โปรไบโอติกอื่น ๆ ซึ่งก่อประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์และสัตว์นั้น สามารถทำได้โดยการบริโภคสารพรีไบโอติกเพื่อเร่งการเจริญของโปรไบโอติก แต่การบริโภคจุลินทรีย์โปรไบโอติกโดยการรับประทานเข้าไปโดยตรงนั้นโอกาสรอดชีวิตของโปรไบโอติกมีค่อนข้างน้อย เนื่องจากสภาวะรุนแรงในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กส่วนต้น ซึ่งผลงานวิจัยของ Amann และคณะ (1998) ได้ชี้ให้เห็นว่าการบริโภคเชื้อไบฟิโดแบคทีเรียเข้าสู่ร่างกายโดยตรงนั้น ไม่ได้ช่วยเพิ่มปริมาณของเชื้อดังกล่าวในร่างกายเลย ทำการศึกษาในอาสาสมัครทั้งชายหญิง โดยให้บริโภคเชื้อไบฟิโดแบคทีเรียในปริมาณ 10^{10} เซลล์เป็นประจำทุกวัน เป็นเวลา 12 วัน กลุ่มนักวิจัยให้คำอธิบายว่า ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อไบฟิโดแบคทีเรียที่บริโภคนั้นไม่สามารถรอดชีวิตจากสภาพกรดที่รุนแรงในกระเพาะอาหาร และสภาพต่างในลำไส้เล็กส่วนต้น ดังนั้นการรับประทานสารพรีไบโอติกเข้าไปเพื่อช่วยเร่งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่มีอยู่ในลำไส้อยู่แล้วให้แข็งแรงขึ้น จึงน่าจะก่อให้เกิดประโยชน์มากกว่าการบริโภคจุลินทรีย์โปรไบโอติกโดยตรง

น้ำตาลฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructooligosaccharide; FOS)

น้ำตาล FOS เป็นน้ำตาลชนิดโอลิโกแซคคาไรด์ที่ประกอบไปด้วยหน่วยของน้ำตาล D-fructose เชื่อมต่อกันอยู่ด้วยพันธะ เบต้า-(2, 1) และที่ส่วนปลายจะปิดท้ายด้วยน้ำตาล D-glucose ชนิดของน้ำตาล FOS จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับจำนวนหน่วยของ D-fructose ในโมเลกุล และมีชื่อเรียกต่างกันไป ชนิดและลักษณะโครงสร้างของน้ำตาล FOS แสดงดังภาพที่ 2 กรณีนของน้ำตาล kestose จะมีค่า specific rotation และค่า melting temperature เท่ากับ $+28.5^\circ$ และ $199-200^\circ\text{C}$ ตามลำดับ (Yun, 1996) น้ำตาล FOS เป็นน้ำตาลแคลอรีต่ำ ไม่เป็นสารก่อมะเร็ง ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในทางเดินอาหาร เช่น *Bifidobacteria* ช่วยลดคอเลสเตอรอล

ฟอสโฟลิปิด และไตรกลีเซอไรด์ในเลือดได้ (Kim *et al.*, 1998; Fernandez *et al.*, 2007) ซึ่งล้วนเป็นคุณสมบัติที่ดีของสารพรีไบโอติก

ในธรรมชาติพบน้ำตาล FOS ได้ในพืชชั้นสูงทั่วไป เช่น หอมหัวใหญ่ กระเทียม อาติไซค์ (Jerusalem artichoke) หน่อไม้ฝรั่ง ถั่วลิสง มะเขือเทศ เป็นต้น จากการสังเคราะห์โดยเอนไซม์ เบต้า-D-fructosyltransferase (FTF) (Yun, 1996; Maiorano *et al.*, 2008) แต่ในทางการค้าจะมีการสังเคราะห์น้ำตาล FOS จากซูโครสโดยใช้เอนไซม์ FTF จากจุลินทรีย์ (Maiorano *et al.*, 2008) กลไกการสังเคราะห์ FOS จากน้ำตาลซูโครสนั้น พบว่าเริ่มต้นจะมีการสลายพันธะระหว่างโมเลกุลน้ำตาลกลูโคสและซูโครสออกจากกัน จากนั้นย้ายฟรุกโตส (donor) ไปยังซูโครส (acceptor) หรือ FOS โมเลกุลอื่นๆ ดังแสดงในภาพที่ 3 และ 4



ภาพที่ 3 ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของน้ำตาล FOS ชนิดต่างๆ

ที่มา: Chow, 2002.



ภาพที่ 4 กลไกการสังเคราะห์น้ำตาล FOS จากน้ำตาลซูโครส

ที่มา: Yun, 1996.

เอนไซม์ตรึงรูป

เอนไซม์ตรึงรูป (immobilized enzymes) คือ เอนไซม์ที่ถูกกำหนดหรือทำให้มาอยู่ในขอบเขตที่จัดไว้ อาจมีโมเลกุลใหญ่ขึ้นด้วยการเชื่อมพันธะเคมี หรือไม่มีพันธะเคมี ละลายน้ำได้ยากหรือไม่ได้เลย มีผลให้เอนไซม์เปลี่ยนจากสถานะตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของเหลวกลายเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นของแข็งขณะทำปฏิกิริยา (solid catalysts) (ปราณี, 2547)

ประโยชน์ของเอนไซม์ตรึงรูป

เอนไซม์ตรึงรูปมีโอกาสเพิ่มคาจกิจกรรม (activity) และเสถียรภาพของเอนไซม์ได้ ภาววิธที่เหมาะสม สามารถใช้กับระบบเอนไซม์หลายชนิดได้ สามารถใช้ซ้ำ ใช้ต่อเนื่อง หรือใช้ในสภาวะการทำปฏิกิริยาที่ต่างไปจากเอนไซม์อิสระเดิมได้ ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดตัวพุงและวิธีการตรึง

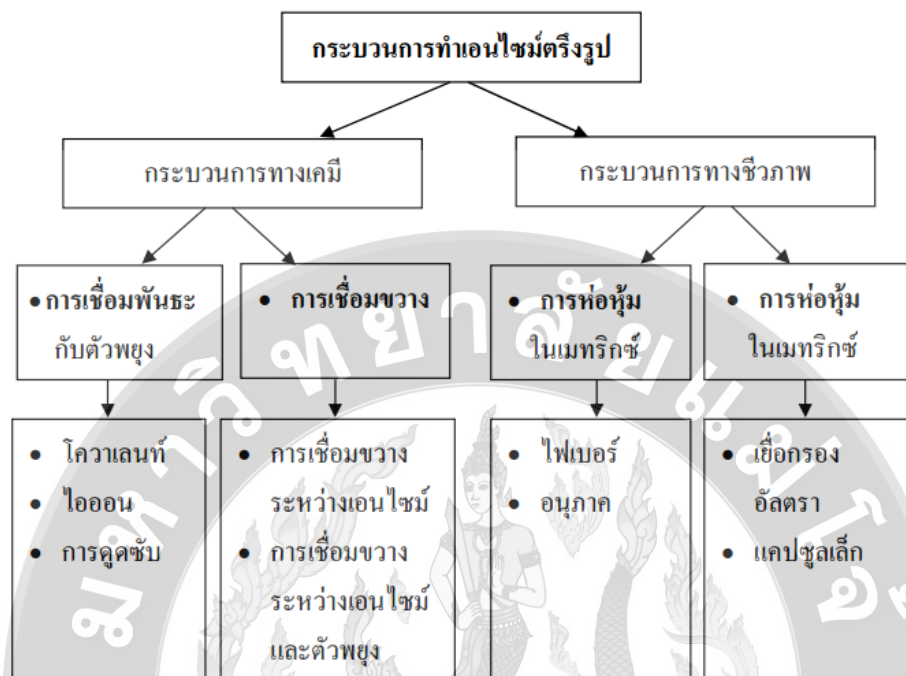
พอลิเมอร์ที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์

พอลิเมอร์ที่ใช้ในการตรึงเอนไซม์ มีทั้งพอลิเมอร์ธรรมชาติเช่น ไคโตซาน (chitosan) เซลลูโลส (cellulose) และพอลิเมอร์สังเคราะห์เช่น พอลิเอไมด์ (polyamide) พอลิโพรไพลีน (polypropylene) พอลิสไตรีน (polystyrene) พอลิเอธิลีน (polyethylene) พอลิเมทิลเมทาอะคริเลต (poly methyl methacrylate), PMMA) และ พอลิเอทิลีนไนมีน (polyethylenimine) การใช้พอลิเมอร์สังเคราะห์ ถึงแม้ว่าจะมีราคาที่สูงกว่าพอลิเมอร์ธรรมชาติ แต่ก็ก็มีข้อดีดังนี้

1. ทนทานต่ออุณหภูมิและพีเอชที่รุนแรงและทนต่อการย่อยสลายทางชีวภาพได้ดี
2. คุณสมบัติของความชอบน้ำและความไม่ชอบน้ำ (hydrophilic-hydrophobic) สามารถปรับให้ตรงกับความต้องการได้โดยการเลือกโคมอนอเมอร์ (co-monomer) ที่เหมาะสมขณะทำการสังเคราะห์
3. สัณฐานวิทยา (morphology) สามารถเปลี่ยนแปลงได้โดยเติมชนิดและสารที่เหมาะสมขณะทำการสังเคราะห์
4. การปรับสภาพผิว (surface modifications) ทำได้ด้วยการเติมหมู่ฟังก์ชันที่ไวต่อปฏิกิริยา (reactive groups)

กระบวนการทำเอนไซม์ตรึงรูป

แบ่งกระบวนการทำเอนไซม์ตรึงรูปตามแผนภาพที่ 5



ภาพที่ 5 กระบวนการทำเอนไซม์ตรึงรูป แบ่งเป็นวิธีการทางเคมีและการทางกายภาพ
ที่มา: ปราณี (2547)

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

ลำไยพันธุ์ค้อ

2. สารเคมี

- 2.1. สารละลาย 5% (w/v) Phenol
- 2.2. สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น
- 2.3. น้ำตาลกลูโคส (HPLC grade)
- 2.4. น้ำตาลฟรุกโตส (HPLC grade)
- 2.5. น้ำตาลซูโครส (HPLC grade)
- 2.6. น้ำตาลคีสโตส(1-kestose) (HPLC grade)
- 2.7. น้ำตาลนิสโตส(Nystose) (HPLC grade)
- 2.8. Acetonitrile (HPLC grade)
- 2.9. บิวทานอล (Butanol)
- 2.10. เอทานอล (Etanol)
- 2.11. โซเดียมแอลจิเนต (sodium alginate)
- 2.12. แคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2)
- 2.13. กลูตารัลดีไฮด์
- 2.14. PectinexTM Ultra SP-L
- 2.15. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- 2.16. Citric acid
- 2.17. Sodium citrate dehydrate

3. เครื่องมือ

- 3.1. ชุดกรอง Nalgene (Reusable bottle top filter unit)
- 3.2. แผ่นกรอง Nylon membrane filter ขนาด 0.2 ไมครอน
- 3.3. แผ่น TLC สำเร็จรูป เคลือบซิลิกาเจล 60 ยี่ห้อ MWRCK
- 3.4. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ
- 3.5. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง
- 3.6. ตู้อบลมร้อน
- 3.7. เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)
- 3.8. เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave)
- 3.9. เครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง (analytical balance)
- 3.10. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
- 3.11. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 3.12. เครื่องระเหยสุญญากาศ (Evaporator)
- 3.13. hot plate
- 3.14. ขาตั้งบิวเรต และที่จับยึด (stand)
- 3.15. คอลัมน์ขนาด 2.5*10 cm
- 3.16. เครื่องแก้วได้แก่ ขวดรูปชมพู่ (erenmayer flask) ปีกเกอร์ (beaker) หลอดทดลอง (test tube) กระบอกตวง (cylinder) และปิเปต (pipette)
- 3.17. อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ชุดกรอง กระดาษกรองเบอร์ 1 (filter paper whatman No.1) ซ้อนตักสาร จุกยาง สายซิลิโคนขนาด 5*8 cm

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมน้ำลำไยเข้มข้น

- 1.1 ล้างลำไยด้วยน้ำสะอาด ปอกเปลือก คว้านเมล็ด นำไปคั้นด้วยเครื่องคั้นน้ำผลไม้ Sakaya กรองผ่านผ้าขาวบาง จากนั้นบรรจุลงขวดพลาสติก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ ต่ำ -20 องศาเซลเซียส
- 1.2 นำน้ำลำไยออกจากตู้ -20 องศาเซลเซียส มาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกลายเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8500 rpm เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปกรองด้วยปั๊มสุญญากาศโดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นนำน้ำลำไยที่กรองได้ไปทำให้เข้มข้นโดย

ใช้เครื่อง Evaporator และเก็บรักษาในตู้ -20 จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์น้ำตาลด้วยวิธี Phenol-sulfuric method

2. การศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลไอโซมัลทอแซ็กเคอไรด์ FOS

2.1 เตรียมน้ำตาลไอโซมัลทอแซ็กเคอไรด์ Citrate buffer พีเอช 5.6 ในอัตราส่วน 10:90, 20:80, 30:70, 40:60, 50:50, 60:40, 70:30, 80:20 และ 100:0 หลอดละ 1 มิลลิลิตร

2.2 นำน้ำตาลไอโซมัลทอแซ็กเคอไรด์ในแต่ละอัตราส่วนมาเติมด้วยเอนไซม์ Pectinex™ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีและ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล FOS

3. การศึกษาหา pH ที่มีการสังเคราะห์น้ำตาล FOS

3.1 เตรียมน้ำตาลไอโซมัลทอแซ็กเคอไรด์ citrate phosphate buffer สกัดส่วนจากข้อ 2 ที่พีเอช 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 หลอดละ 1 มิลลิลิตร

3.2 นำไปเติมด้วยเอนไซม์ Pectinex™ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล FOS

4. การศึกษาหาอุณหภูมิที่มีการสังเคราะห์น้ำตาล FOS

4.1 เตรียมน้ำตาลไอโซมัลทอแซ็กเคอไรด์ citrate phosphate buffer pH และสกัดส่วนตามข้อ 2 และ 3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 5 หลอด

4.2 นำไปเติมด้วยเอนไซม์ Pectinex™ ปริมาณ 2 ไมโครลิตร โดยทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30, 37, 45, 55 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาทีและ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล FOS

5. วิเคราะห์น้ำตาล FOS

5.1 วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Thin Layer Chromatography (TLC)

โดยใช้แผ่นอลูมิเนียมที่เคลือบด้วยซิลิกาเจลเป็น Stationary phase นำตัวอย่างน้ำตาลไอโซมัลทอแซ็กเคอไรด์ที่ผ่านการสังเคราะห์น้ำตาล FOS ปริมาณ 0.25 ไมโครลิตร มาหยดบนแผ่น Silica gel น้ำตาล

มาตรฐานได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส คีโตส และนิสโตส ส่วนวิธีการทำให้เจดน้ำตาลปรากฏนั้นจะใช้การจุ่มแผ่นซิลิกาเจลลงในสารละลายกรดซัลฟริกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ในเมทานอล จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส จนกระทั่งปรากฏจุดสีน้ำตาล

5.2 วิเคราะห์องค์ประกอบและน้ำตาลแต่ละชนิดในน้ำผลไม้ด้วยเทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC)

โดยนำตัวอย่างน้ำลำไยเข้มข้นที่ผ่านการสังเคราะห์น้ำตาล FOS ไปทำการปั่นเหวี่ยงกำจัดตะกอนที่ความเร็วรอบ 10000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำสารละลายส่วนใสกรองผ่าน Nylon membrane ขนาด pore size 0.45 ไมครอน นิดตัวอย่างปริมาณ 30 ไมโครลิตร ผ่านคอลัมน์ Prevail amino 5 micron (Alltech®) สารละลาย mobile phase ที่ใช้คือสารละลายผสมระหว่าง Acetonitrile : DI water อัตราส่วน 75 : 25 ที่อัตราเร็ว 1 มิลลิเมตรต่อนาที อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส อุปกรณ์ตรวจวัดคือ ELSD 2000 (Alltech®) น้ำตาลมาตรฐานที่ใช้คือ กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส คีโตส และนิสโตส ความบริสุทธิ์ระดับ HPLC grade

6. การศึกษาความเข้มข้นของไซเดียมแอลจินेटที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ Pectinex™

6.1. เตรียมไซเดียมแอลจินेट 2-10 เปอร์เซ็นต์ ด้วยสารละลาย 0.1 M Citrate Buffer pH 5.6 ปริมาตร 100 มิลลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.2. เติมด้วยเอนไซม์ Pectinex™ 1.4 มิลลิตรใน 0.1 citrate buffer pH 5.6 ปริมาตร 5 มิลลิตร และ กลูตารัลดีไฮด์ 0.1 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมลงในสารละลายไซเดียมแอลจินेट ผสมให้เข้ากัน

6.3. ทำการตรึงเอนไซม์โดยใช้ไมโครปิเปต ดูดสารละลายผสมและหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl₂) 0.2 โมลาร์ จะเป็นเม็ดเจลขึ้น

6.4 นำเม็ดเจลที่แช่อยู่ในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์มาแช่ใน กลูตารัลดีไฮด์ 0.2% (v/v)

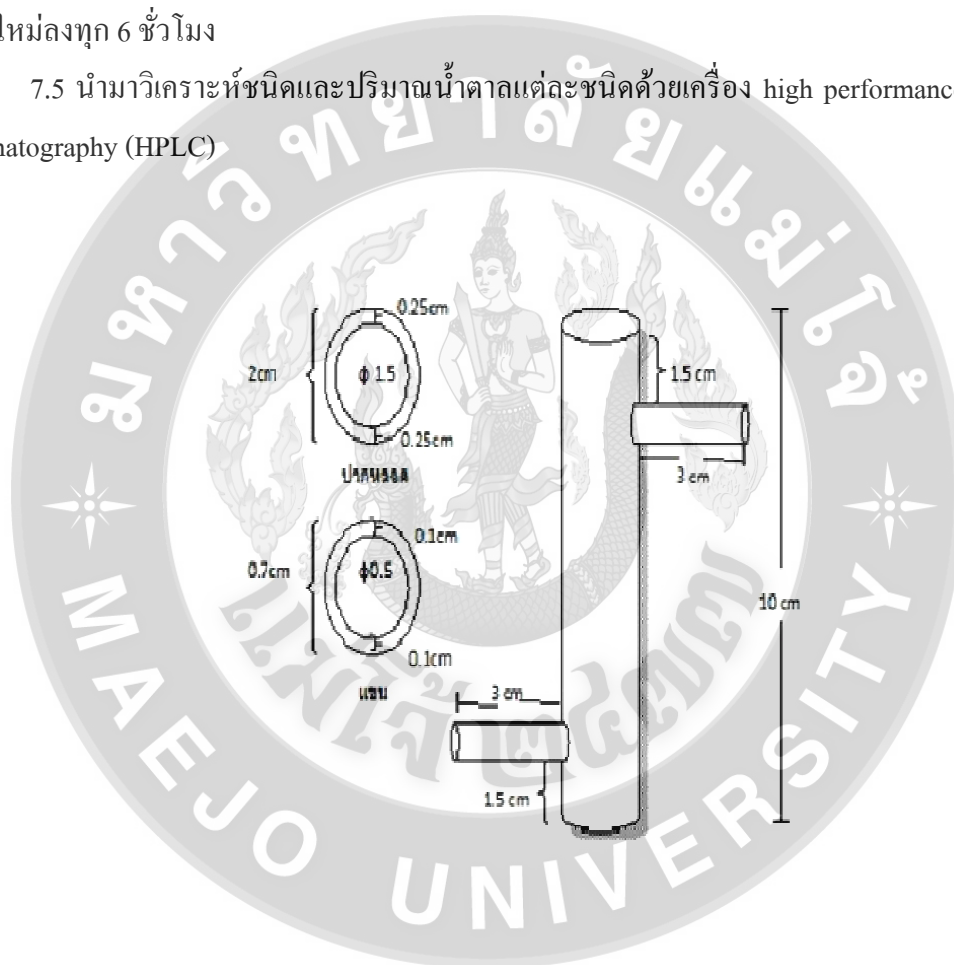
6.5 แช่เม็ดเจลด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์อีกครั้ง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6.6 ล้างเม็ดเจลด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

6.7 นำน้ำล้างเม็ดเจลไปวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Lowry method (ภาคผนวก ก) เพื่อตรวจสอบปริมาณเอนไซม์ที่หลุดออกจากเม็ดเจล

7. การผลิต FOS ด้วยเอนไซม์ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

- 7.1 ทำการออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพดังภาพที่ 6
- 7.2 นำเอนไซม์ Pectinex™ ตรึง 15 กรัม บรรจุในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร
- 7.3 เติมน้ำลำไยเข้มข้นที่เจือจางด้วยสารละลาย citrate buffer pH 5.6 ในอัตราส่วน 1:1
- 7.4 ควบคุมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ถ่ายเอา FOS ออก และเติมน้ำลำไยใหม่ลงทุก 6 ชั่วโมง
- 7.5 นำมาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC)



ภาพที่ 6 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพในการผลิตฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์

ผลและการวิจารณ์ผลการวิจัย

1. การเตรียมน้ำตาลจากลำไยพันธุ์ดอ

พบว่าลำไยพันธุ์ดอที่ใช้เป็นแหล่งของน้ำตาลสำหรับการวิจัยครั้งนี้สามารถเตรียมน้ำลำไยได้ในปริมาณทั้งสิ้นประมาณ 27 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับน้ำหนักผลสด (รวมเมล็ดและเปลือก) และคิดเป็น 49 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับน้ำหนักเนื้อลำไยสด และเมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ ก็พบว่ามียาตาลเป็นองค์ประกอบดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ปริมาณน้ำตาลในเนื้อลำไยพันธุ์ดอ

สายพันธุ์ผลไม้	น้ำตาล (%)	ปริมาณน้ำตาล* (g/kg เนื้อผลไม้) $\pm$ SD		
		Total sugar	Reducing sugar	DP**
ลำไยพันธุ์ดอ	16.2	162.31 $\pm$ 25.00	51.20 $\pm$ 0.49	3.17

*วิเคราะห์ 3 ซ้ำ

**DP = Degree of polymerization

น้ำลำไยนี้ เมื่อนำมาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดด้วยเครื่อง HPLC ก็พบว่าประกอบไปด้วยน้ำตาลโมเลกุลเล็กหลายชนิด เช่น กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส และคีสโตส ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ปริมาณน้ำตาลฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์และชนิดอื่นๆ ในเนื้อผลไม้แต่ละชนิด
จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC

สายพันธุ์ผลไม้	ปริมาณน้ำตาล (g/ kg เนื้อผลไม้)				
	ฟรุคโตส	กลูโคส	ซูโครส	คีสโตส	นิสโตส
ลำไยพันธุ์ดอ	18.12	24.10	93.47	1.10	ND

*Not detected: มีปริมาณน้อยจนไม่สามารถตรวจวัดได้

หลังจากนั้น เมื่อทำการระเหยน้ำออกจากน้ำลำไยด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ ก็จะได้ น้ำลำไยเข้มข้นซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 1000.71 g/l ซึ่งผู้วิจัยจะได้ใช้น้ำลำไยเข้มข้นนี้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์น้ำตาลฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ต่อไป

2. ผลของความเข้มข้นน้ำลำไยที่มีต่อการสังเคราะห์น้ำตาล FOS

น้ำลำไยเข้มข้นได้ถูกนำมาเจือจางด้วยสารละลาย citrate buffer pH ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นเติมด้วยเอนไซม์ PectinexTM แล้วป้อนทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 6 ซึ่งก็พบว่า การเจือจางน้ำลำไยเข้มข้นในสัดส่วน 1:1 (ประมาณ 500 mg น้ำตาล/ml) ทำให้ได้ความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการสังเคราะห์น้ำตาล FOS โดยเอนไซม์ดังกล่าว โดยสามารถสังเคราะห์น้ำตาล FOS ชนิดคีโตสและนิสโตสได้ในปริมาณ 41.7 และ 38.96 mg/ ml ของน้ำลำไยเข้มข้น จึงได้เลือกใช้น้ำลำไยที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 6 ผลการผลิตน้ำตาล FOS ชนิดคีโตสและนิสโตสโดยใช้น้ำลำไยที่มีความเข้มข้นต่างๆ

สัดส่วนของ น้ำลำไยต่อบัฟเฟอร์	ปริมาณน้ำตาล (mg/ ml น้ำลำไยเข้มข้น)	
	คีโตส	นิสโตส
10:90	23.6	23.55
20:80	23.00	ND
30:70	17.46	18.86
40:60	23.72	26.12
50:50	41.7	38.96
60:40	20.6	9.02
70:30	30.92	33.72
80:20	28.12	30.5
100:0	24.21	27.38

*หมายเหตุ: ND คือ ไม่สามารถตรวจพบได้

3. ผลของค่า pH ที่มีต่อการสังเคราะห์น้ำตาล FOS

ค่า pH ที่ทำการศึกษาได้แก่ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ซึ่งภายหลังจากการทำปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ PectinexTM ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล FOS ทั้งสองชนิดแล้ว พบว่าที่ pH 5.5 สามารถเร่งปฏิกิริยาและสังเคราะห์น้ำตาล FOS ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับค่า pH อื่นๆ ที่ได้ทำการศึกษาค้างนี้ ทั้งยังพบว่าสัดส่วนของผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรทที่ได้สูงกว่าการสังเคราะห์ที่ระดับ pH อื่นๆ อีกด้วย ผลดังแสดงในตารางที่ 7 จึงได้เลือกค่า pH ดังกล่าวสำหรับการศึกษาขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 7 ผลการผลิตน้ำตาล FOS ชนิดคิสโตสและนิสโตสโดยใช้น้ำลำไยที่ระดับค่า pH ต่าง ๆ

pH	ปริมาณน้ำตาล mg/ml			สัดส่วน คิสโตส/ซูโครส	สัดส่วน นิสโตส/ซูโครส
	ซูโครส	คิสโตส	นิสโตส		
pH 4.0	535.60	188.81	2.35	0.3525	0.0044
pH 4.5	573.68	170.35	2.07	0.2969	0.0036
pH 5.0	585.39	167.27	ND	0.2858	ND
pH 5.5	549.49	164.82	2.31	0.3000	0.0042
pH 6.0	555.62	143.74	ND	0.2587	ND
pH 6.5	579.25	147.07	2.01	0.2539	0.0035
pH 7.0	587.99	127.68	ND	0.2172	ND

*หมายเหตุ: ND คือ ไม่สามารถตรวจพบได้

4. ผลของอุณหภูมิที่มีต่อการสังเคราะห์น้ำตาล FOS

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ PectinexTM ในการสังเคราะห์น้ำตาล FOS ครั้งนี้ ได้ถูกศึกษา โดยใช้อุณหภูมิในช่วง 30–65 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 8 ซึ่งพบว่าที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ให้ผลการสังเคราะห์น้ำตาล FOS แต่ละชนิดสูงที่สุด แต่อย่างไรก็ตามพบว่า น้ำตาล FOS ที่สังเคราะห์ได้นั้นใกล้เคียงกับการทำปฏิกิริยาที่ 55 องศาเซลเซียส ซึ่งในทางปฏิบัตินั้น อาจจะพิจารณาการทำปฏิกิริยาที่ 55 องศาเซลเซียสแทน เนื่องจากสามารถประหยัดพลังงานในการผลิตได้มากกว่า

ตารางที่ 8 ผลการผลิตน้ำตาล FOS ชนิดกีสโตสและนิสโตสโดยใช้น้ำลำไยที่ระดับอุณหภูมิ ต่างๆ

อุณหภูมิ (°C)	ปริมาณน้ำตาล (mg/ml)			สัดส่วน	
	ซูโครส	กีสโตส	นิสโตส	กีสโตส/ซูโครส	นิสโตส/ซูโครส
30	655.60	58.07	2.00	0.08858	0.0031
37	635.89	100.64	2.26	0.15827	0.0036
45	405.13	155.33	6.42	0.38342	0.0159
55	503.43	224.09	9.61	0.44513	0.0191
65	487.05	228.67	10.96	0.46949	0.0225

5. ผลของความเข้มข้นของโซเดียมแอลจินेटที่เหมาะสมต่อการตรึงเอนไซม์ Pectinex™

พบว่า การตรึงเอนไซม์ Pectinex™ ด้วยโซเดียมแอลจินेट 6 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมที่สุด สำหรับการผลิตน้ำตาล FOS โดยสามารถสังเคราะห์น้ำตาล FOS ชนิดกีสโตสและนิสโตสได้ใน ปริมาณสูงที่สุดดังแสดงในตารางที่ 9 ดังนั้นจึงได้เลือกใช้ความเข้มข้นของโซเดียมแอลจินेट ดังกล่าว

ตารางที่ 9 ผลการผลิตน้ำตาล FOS ชนิดคีโตสและนิสโตสโดยการตรึงเอนไซม์ Pectinex™ ในโซเดียมแอลจิเนตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

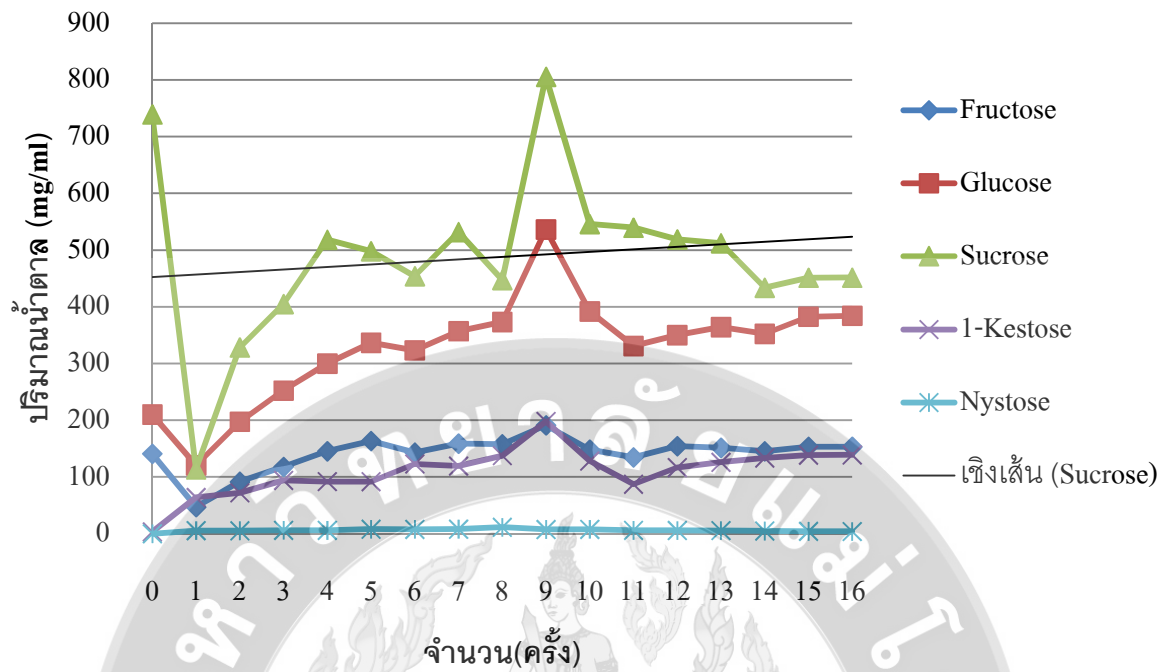
ความเข้มข้นโซเดียมแอลจิเนต (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณน้ำตาล(mg/ml)	
	คีโตส	นิสโตส
2	2.03	2.40
4	1.96	2.10
6	81.01	2.53
8	1.93	2.13
10	2.33	2.22

6. ผลการผลิต FOS ด้วยเอนไซม์ Pectinex™ ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

น้ำตาลไซแคมน์ได้ถูกนำมาเจือจางด้วยสารละลาย citrate buffer pH 5.6 ในสัดส่วน 1:1 (ประมาณ 500 mg น้ำตาล/ ml) จากนั้นเติมด้วยเอนไซม์ Pectinex™ ที่ถูกตรึงบนโซเดียมแอลจิเนตด้วยวิธีเชื่อมไขว้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แล้วบ่มทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เมื่อนำมาวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) พบว่าประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเล็กหลายชนิด เช่น กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส คีโตส และนิสโตส ในระดับสูงผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 10 และภาพที่ 7 นอกจากนี้เอนไซม์ Pectinex™ ตรึงยังสามารถผลิต FOS ได้มากกว่า 16 ครั้ง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ตารางที่ 10 ผลการผลิตน้ำตาล FOS ชนิดคีสโตสและนิสโตสโดยใช้เอนไซม์ PectinexTM ตรึง
ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

จำนวน (ครั้ง)	ปริมาณน้ำตาล (mg/ ml น้ำลำไยเข้มข้น)				
	ฟรุคโตส	กลูโคส	ซูโครส	คีสโตส	นิสโตส
1	47.06	120.47	113.44	63.97	5.59
2	91.57	197.55	328.48	72.24	5.34
3	117.93	252.33	405.09	94.19	6.14
4	145.55	299.91	518.39	92.02	6.02
5	163.59	336.67	498.15	91.85	8.13
6	142.98	323.39	454.14	123.01	7.78
7	159.02	357.18	532.01	119.39	8.20
8	157.95	373.39	447.42	137.74	11.49
9	191.14	536.47	805.56	198.11	7.62
10	148.37	391.83	546.19	128.31	7.84
11	134.55	331.05	539.58	87.35	6.04
12	154.29	350.35	518.99	116.75	5.82
13	151.61	364.47	512.09	126.04	5.65
14	145.34	352.39	433.67	133.61	4.87
15	153.46	382.67	451.46	138.71	4.27
16	153.38	384.33	451.53	138.99	4.06



ภาพที่ 7 การสังเคราะห์น้ำตาล FOS ชนิดคีสโตสและนิสโตสโดยใช้เอนไซม์ PectinexTM ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

สรุปผลการวิจัย

การเตรียมน้ำลำไยเข้มข้นจากลำไยสายพันธุ์คอดด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ ก็จะได้ น้ำลำไยเข้มข้นซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 1000.71 กรัม/ลิตร ประกอบด้วยน้ำตาลรีดิวซ์ ฟรุคโตส กลูโคส ซูโครส และคีสโตส 51.2, 18.12, 24.10, 93.47 และ 1.10 กรัม/กิโลกรัมของเนื้อ ผลไม้ ตามลำดับ

ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการสังเคราะห์ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากน้ำลำไยเข้มข้น คือนำ น้ำลำไยเข้มข้นมาเจือจางด้วย citrate buffer pH 5.5 ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำ ปฏิกิริยากับเอนไซม์ Pectinex™ 2 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ได้ซูโครส คีสโตส และนิสโตส 503.43, 224.09 และ 9.61 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

การสังเคราะห์ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์จากน้ำลำไยเข้มข้นจากเอนไซม์ Pectinex™ ตรึง แบบเชื่อมไขว้ด้วยโซเดียมแอลจินเตความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ได้ซูโครส คีสโตส และนิสโตส 805.56, 198.11 และ 7.62 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และสามารถนำเอนไซม์กลับมาใช้ซ้ำได้ มากกว่า 16 ครั้ง

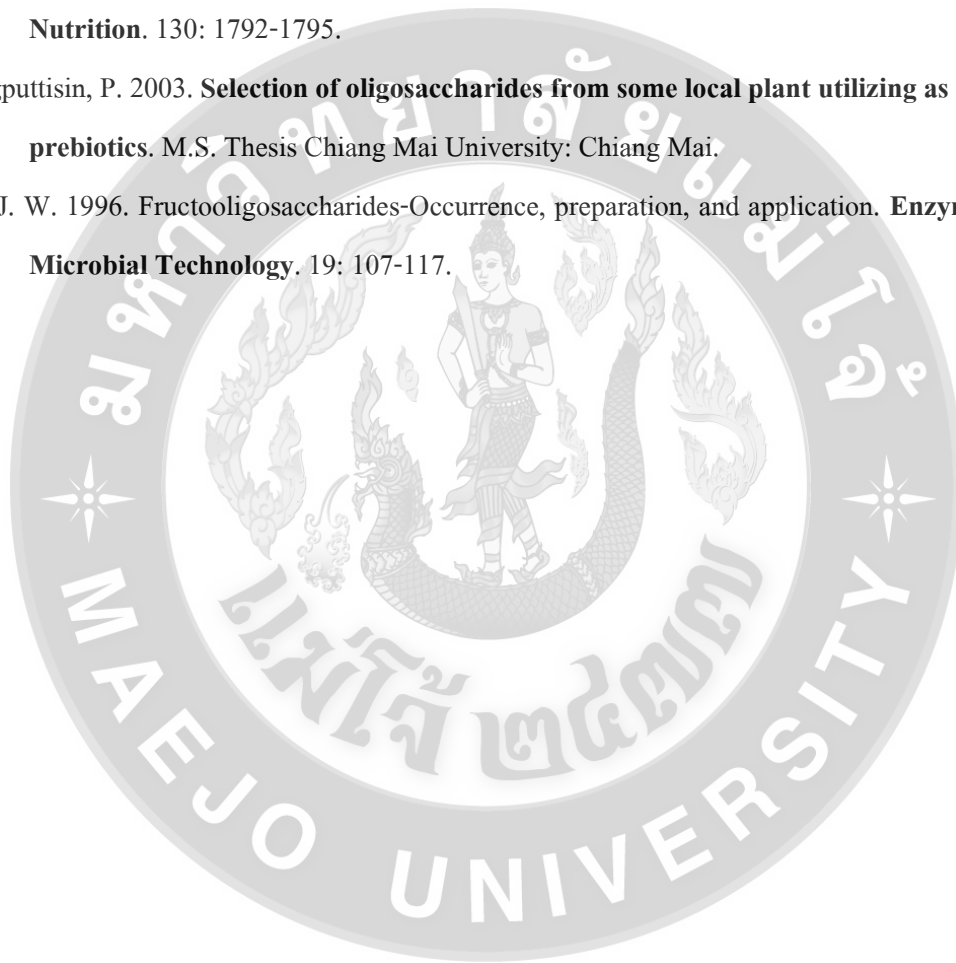
เอกสารอ้างอิง

- ชัยฉัตร สวัสดิวัฒน์ เอ็มอร เบณจวงศ์กุลชัย ฤดี สุราฤทธิและจันทรกานต์ พิภพมงคล. 2539. **การพัฒนาและประยุกต์ใช้เอนไซม์ไกลคโคซิเดสจากพืชในประเทศไทยเพื่อประโยชน์ในการสังเคราะห์คาร์โบไฮเดรต**. รายงานผลการวิจัย. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ: กรุงเทพฯ.
- พาวิน มะโนชัย ยุทธนา เขาสุเมรุ ชิติ ศรีตันทิพย์ และสันติ ช่างเจรจา. 2547. **เทคโนโลยีการผลิตลำไย**. สำนักพิมพ์ฟิสิกส์เซ็นเตอร์: กรุงเทพฯ. 128 น.
- ปราณี อานเปื้อง. 2547. **เอนไซม์ทางอาหาร**. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: กรุงเทพฯ. 442 น.
- นพดล จรัสสัมฤทธิ์, พาวิน มะโนชัย, นพมณี โทบุญญานนท์, ชีรนุช จันทรชิต, วินัย วิริยะอลงกรณ์ และ พิชัย สมบูรณ์วงศ์. 2543. **การผลิตลำไย**. สัณฐานการพิมพ์: เชียงใหม่. 128 น.
- สุรภา จีระสันติกุล. 2548. **ผลการวิเคราะห์ทางกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ของเนื้อลำไยอบแห้งที่ผลิตในจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.
- _____. 2553. **สถานการณ์การผลิต/การตลาดลำไย ปี 2546 จังหวัดเชียงราย**. จาก <http://www.moc.go.th/opscenter/cr/long.doc> [1 กันยายน 2553].
- _____. 2553. **สถานการณ์ลำไยปี 2552**. จาก http://www.oae.go.th/ewtadmin/ewt/oae_baer/ewt_news.php?nid=311&filename=index [1 กันยายน 2553].
- อนันต์ ดำรงค์สุข. 2547. **ลำไย**. อักษรสยามการพิมพ์: กรุงเทพฯ. 152 น.
- Amann, M. M., Kullen, M. J., Martini, M. C., Busta, F. F., and Brady, L. J. 1998. Consumption of Exogenous Bifidobacteria Dose Not Alter Fecal Bifidobacteria and Breath Hydrogen Excretion in Humans. **The Journal of Nutrition**. 128: 9961002.
- Bourhnik, Y., Vahedi, K., Achour, L., Attar, A., Salfati, J., Pochart, P., Marteau, P., Bornet, F., and Rambaud, J. 1998. Short-chain fructo-oligosaccharide administration dose-dependently increases fecal bifidobacteria in healthy human. **Journal of Nutrition**. 129: 113-116.

- Campbell, J. M., Fahey, G. C., and 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: 130-136.
- Causey, J. L., Feirtag, J. M., Gallaher, D. D., Tungland, B. C., and Slavin, J. L. 2000. Effects of dietary inulin on serum lipids, blood glucose and the gastrointestinal environment in hypercholesterolemic men. **Nutrition Research**. 20: 191-201.
- Chow, J. 2002. Probiotics and Prebiotics: a brief overview. **Journal of Renal Nutrition**. 12: 76-86.
- Cruz, R., Gruz, V., Belote, J. G., Khenayfes, M. O., Dorta, C., Oliveira, L. H. S., and Ardiles, E. 1999. Production of transgalactosylated oligosaccharides(TOS) by Galactosyltransferase activity from *Penicillium simplicissimum*. **Bioresource Technology**. 70: 165-171.
- Cummings, J.H., Macfarlane, G. T., and Englyst, H. N. 2001. Prebiotic digestion and Fermentation. **The American Journal of Clinical Nutrition**. 73 : 361s-364s.
- Fernandez, R.C., Ottoni, C.A., Silva, E.S.D, Matsubara, R.M.S., Carter, J.M., Magossi, L.R., Wada, M.A.A., Rodrigues, M.F.D.A, Marresma, B.G. and Maiorano, A.E. 2007. Screening of β -Fructofuranosidase producing microorganisms and effect of pH and temperature on enzymatic rate. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 75: 87-93.
- Gibson, G. R., and Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**. 125: 1401-1412.
- Hanvonnar, R. And Huis In't Veld, M.J.H. 1992. **Probiotics: a general view. In: Lactic acid bacteria in health and disease**. Elsevier Applied Science Publishers: Amsterdam. 151-170 pp.
- Holzappel, W. H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J., and Schillinger, U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**. 73: 365s-373s.
- Jiang, Y., Zhang, Z., Joyce, D.C., and Ketsa, S. 2002. Postharvest biology and handling of longan fruit (*Dimocarpus longan* Lour.). **Postharvest Biology and Technology**. 26: 241-252.
- Kaplan, H. and Hutkins, R. W. 2000. Fermentation of Fructooligosaccharides by LAB and Bifidobacteria. **Apply and Environmental Microbiology**. 66 : 2682-2684.

- Khwanta Kaewnarin. 2008. **Effect of enzyme inactivation by microwave pretreatment on the quality of dried-longan pulp**. M.S. Thesis Chiang Mai University: Chiang Mai.
- Kim, B.W., Choi, J.W., and Yun, J.W. 1998. Selective production of GF4-fructooligosaccharide from sucrose by a new transfructosylating enzyme. **Biotechnology Letters**. 20: 1031-1034.
- Kullen, M. J., Khil, J., Busta, F. F., Gallaher, D. D., and Brady, L. 1998. Carbohydrate source and bifidobacteria influence the growth of *Clostridium perfringens* *in vivo* and *in vitro*. **Nutrition. Research**. 18: 1889-1897.
- Le Blay, G., Michel, C., Blottiere, H. M., and Cherbut, C. 1999. Prolong intake of fructooligosaccharides induces a short term elevation of lactic acid- producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats. **Journal of Nutrition**. 129: 2231-2235.
- Maiorano, A.E., Piccoli, R.M., Silva, E.S., Rodrigues, M.F.D.A. 2008. Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. **Biotechnology Letters**. 30: 1867-1877.
- Marteau, P. R., Vrese, M. D., Cellier, C. J., and Schrezenmeir, J. 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. **American Journal of Clinical. Nutrition**. 73: 430s-436s.
- Mazza, G. 1998. **Vegetables Rich in Nondigestible Oligosaccharide. In Functional Foods: Biochemical & Processing Aspects**. Technomic Publishing Company: Pennsylvania. 215-220 pp.
- Ohta, A., Ohtsuki, M., Hosono. A., Adachi, T., Hara, H., and Sakata, T. 1997. Dietary Fructooligosaccharides Prevent Osteopenia After Gastrectomy in Rats. **The Journal of Nutrition**. 128: 106.
- Rastall, R. A., Fuller, R., Gaskins, H. R., and Gibson, G. R. 2000. In Gibson, G. R., and Williams, C. M., (Ed.), **Functional Foods: Concept to product**. Woodhead Publishing Limited: Cambridge. 71-95 pp.
- Scherzenmeir, J., and Vrese, M. 2001. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics- approaching a definition **American Journal of Clinical. Nutrition**. 73: 361s-364s.

- Swanson, K. S., Grieshop, C. M., Flickinger, E. A., Bauer, L. L., Healy, H., Dawson, K. A., Merchen, N. R., and Fahey, G. C. 2002. Supplemental FOS and MOS Influence Immune Function, Ileal and Total Tract Nutrient Digestibilities , Microbial Populations and Concentrations of Protein Catabolites in the Large Bowel of Dogs. **The Journal of Nutrition**. 132: 980-989.
- Takahara, S., Morohashi, T., Sano, T., Ohta, A., Yamada, S., and Sasa, R. 2000. **The Journal of Nutrition**. 130: 1792-1795.
- Wongputtisin, P. 2003. **Selection of oligosaccharides from some local plant utilizing as prebiotics**. M.S. Thesis Chiang Mai University: Chiang Mai.
- Yun, J. W. 1996. Fructooligosaccharides-Occurrence, preparation, and application. **Enzyme and Microbial Technology**. 19: 107-117.





ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์

สารละลายสำหรับหาโปรตีนโดยวิธี Lowry

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลาย A เตรียมสารละลาย Na_2CO_3 2 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายต่าง NaOH ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล
2. สารละลาย B เตรียมสารละลาย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรต 1.0 เปอร์เซ็นต์ $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$
3. สารละลาย C สารละลายต่างคอปเปอร์เตรียมโดยผสมสารละลาย A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กับสารละลาย B ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน สารละลาย C จะต้องเตรียมใหม่ก่อนนำไปวิเคราะห์เท่านั้น
4. สารละลาย D เตรียมโดยการเจือจาง Folin-Ciocalteu reagent ด้วยอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร

กราฟมาตรฐานสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (โดยวิธี Lowry)

1. เตรียมสารละลายโปรตีนของ BSA (bovine serum albumin) ในการปฏิบัติใช้โปรตีนไข่ขาว โดยละลายโปรตีน 0.020 g ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 ml จะได้สารละลายโปรตีนที่มีความเข้มข้น 200 ($\mu\text{g/ml}$) และเจือจางให้มีความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 0-200 ($\mu\text{g/ml}$) ดังตารางที่ 10

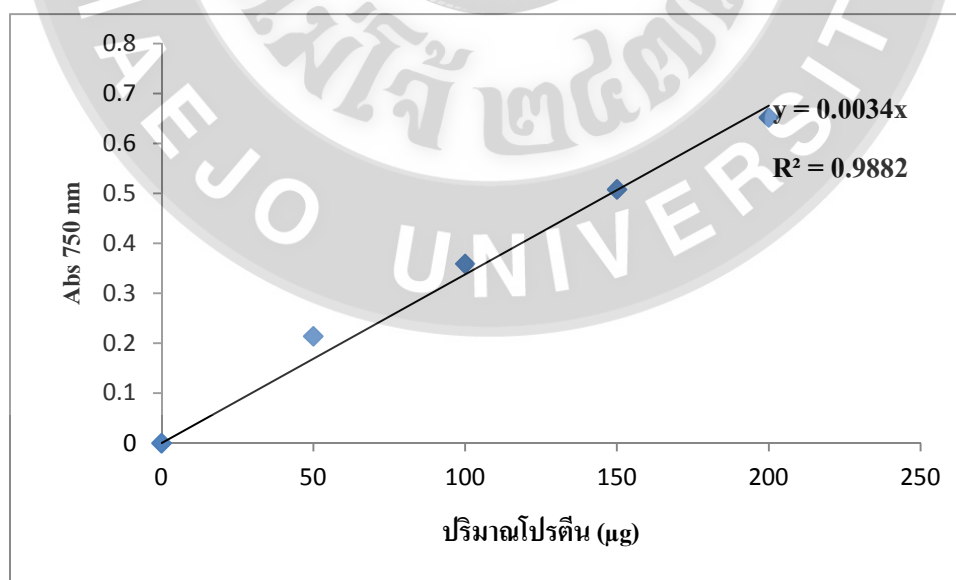
ตารางที่ 10 ปริมาณโปรตีนในการวิเคราะห์โดยวิธี Lowry

หลอดที่	สารละลายโปรตีน 200 ($\mu\text{g/ml}$) (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	สารละลายโปรตีนมาตรฐาน 200 ($\mu\text{g/ml}$)
1	0	1000	0
2	250	750	50
3	500	500	100
4	750	250	150
5	1000	0	200

2. คูดสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ต้องการวิเคราะห์ 1 ml ลงในหลอด
3. เติมสารละลาย C 5 ml ลงในแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
4. เติมสารละลาย D 0.5 ml ลงในแต่ละหลอด เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ให้เกิดสีสมบูรณ์เป็นเวลา 30 นาที
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ A750 nm โดยใช้หลอดที่ 1 เป็น blank

ตารางผนวกที่ 1 ผลของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรต่อปริมาณสารละลายโปรตีน

สารละลายโปรตีนมาตรฐาน 200 (µg/ml)	ค่า Abs750
0	0.000
50	0.234
100	0.359
150	0.508
200	0.652



ภาพผนวกที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารละลายโปรตีนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

ตารางผนวกที่ 2 ความเข้มข้นของโปรตีนในเอนไซม์ตรึงบนโซเดียมแอลจิเนตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

Sodium alginate (%)	1 st crosslinking reaction time (60min)			ความเข้มข้นโปรตีน (g/l)	Protein loading (%)
	A 280 nm				
	rep1	rep2	(x)		
2	1.322	1.139	1.230	0.410	71.32
4	1.184	1.154	1.169	0.389	72.79
6	1.163	1.180	1.171	0.390	72.72
8	0.743	0.805	0.774	0.258	81.95
10	0.738	0.641	0.689	0.229	83.98
Sodium alginate (%)	2 nd crosslinking reaction time (2hr)			ความเข้มข้นโปรตีน (g/l)	Protein loading(%)
	A 750 nm				
	rep1	rep2	(x)		
2	0.055	0.065	0.060	0.020	98.60
4	0.054	0.077	0.066	0.022	98.46
6	0.071	0.084	0.077	0.025	98.25
8	0.053	0.058	0.055	0.018	98.74
10	0.083	0.091	0.087	0.029	97.97

ความเข้มข้นของโปรตีน (กรัมต่อลิตร) = $\frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 (nm)} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}) \times 1,000}$

ความชันของกราฟมาตรฐาน (m) = 0.003

ภาคผนวก ข
ภาพประกอบการทดลอง



ภาพผนวกที่ 2 ลักษณะของเอนไซม์ PectinexTM ตรึงแบบเชื่อมไขว้ด้วยโซเดียมแอลจิเนต



ภาพผนวกที่ 3 การติดตั้งถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการสังเคราะห์ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์
จากน้ำลำไย