

การผลิตเซลล์โพลิโกแซคคาไรด์จากผลลำไยอ่อนและคุณสมบัติ
การเป็นพรีไบโอติก



ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2567

การผลิตเซลล์โพลิโกลแซคคาไรด์จากผลลำไยอ่อนและคุณสมบัติ
การเป็นพรีไบโอติก



กัญญาภัค ฉางข้าวไชย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักบริหารและพัฒนานิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

พ.ศ. 2567

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้

การผลิตเซลล์โพลิโกแซคคาไรด์จากผลลำไยอ่อนและคุณสมบัติ
การเป็นพรีไบโอติก

กัญญาภัค ฉางข้าวไชย

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(อาจารย์ ดร.จุฑามาศ มณีวงศ์)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ ดร.เอกวิทย์ ตรีเนตร)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ประธานอาจารย์ผู้รับผิดชอบหลักสูตร

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์)

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ชัยยศ สัมฤทธิ์สกุล)

รักษาการแทนรองอธิการบดี

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.

ชื่อเรื่อง	การผลิตเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์จากผลลำไยอ่อนและคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติก
ชื่อผู้เขียน	นางสาวกัญญาภัค ฉางข้าวไชย
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	อาจารย์ ดร.จุฑามาศ มณีวงศ์

บทคัดย่อ

ลำไยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของภาคเหนือของไทย ในการเพิ่มผลผลิตให้มีผลขนาดใหญ่เพื่อให้ได้ราคาสูงขึ้นนั้นเกษตรกรมักทำการตัดแต่งช่อผลลำไย ในการตัดแต่งช่อผลลำไยนี้เกิดของเหลือทิ้งทางการเกษตรคือลำไยผลอ่อน เพื่อต้องการเพิ่มมูลค่าให้กับลำไยผลอ่อนซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็นเซลลูโลสซึ่งสามารถนำมาผลิตเป็นเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ (Cello-oligosaccharides, COS) ได้ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์จากลำไยผลอ่อน และศึกษาคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกบางประการของผงเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์จากลำไยผลอ่อน จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผงลำไยผลอ่อนพบว่าประกอบด้วยเซลลูโลสร้อยละ 12.82 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 10.76 ลิกนินร้อยละ 11.86 และเถ้าร้อยละ 2.79 ในการสกัดเซลลูโลสจากลำไยผลอ่อนพบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ สัดส่วนระหว่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 6.0 กับผงลำไยผลอ่อน คือ 70:30 ให้ปริมาณเซลลูโลสหายาบสูงสุด ที่ร้อยละ 46.96 ± 0.85 (โดยน้ำหนัก) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเซลลูโลสหายาบที่ได้นี้ไปเตรียมเป็น COS โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์เฮมิเซลลูเลส พบว่าเมื่อทำการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 3.6 หน่วยต่อผงเซลลูโลสหายาบ 1 กรัม และเอนไซม์เฮมิเซลลูเลส 0.60 หน่วยต่อผงเซลลูโลสหายาบ 1 กรัม ที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิทซ์และน้ำตาลทั้งหมดสูงสุดคือ 36.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 278.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ชนิดของ COS ที่เวลาต่างๆ ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง (Thin layer chromatography, TLC) พบเซลโลไตรโอสและพอลิโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้นในทุกตัวอย่าง เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าเมื่อเกิดปฏิกิริยานาน 3 ชั่วโมง ให้ปริมาณเซลโลไตรโอสสูงสุดคือ 0.63 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำ COS ที่ผลิตได้นี้ไปใช้เป็นพรีไบโอติกโดยใช้ห่อหุ้มเซลล์โพรไบโอติก คือ *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus lactis* และนำไปทำแห้งแบบเยือกแข็ง พบว่าการใช้เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ร้อยละ 5 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) พบการเหลือรอดของเชื้อโพรไบโอติกมากที่สุดคือ 8.29 ± 0.08 log CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อนำ COS

กับโปรไบโอติกมาทดสอบร่วมกับเชื้อก่อโรค คือ *Escherichia coli* และ *Salmonella Typhimurium* TISTR292 พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อโปรไบโอติกขณะเดียวกันก็ลดการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ เมื่อทดสอบการทนย่อยในสภาวะย่อยจำลองในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าโปรไบโอติกที่ห่อหุ้มด้วย COS เหลือรอด $7.00 \pm 0.02 \log$ CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับโปรไบโอติกที่ห่อหุ้มด้วยอินนูลิน จากการศึกษาพบว่าลำไยผลอ่อนสามารถนำมาผลิตเป็นเซลล์โอลิโกแซคคาไรด์ และยังสามารถนำมาปรับปรุงหรือพัฒนาให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพมากยิ่งขึ้น

คำสำคัญ : เซลล์โอลิโกแซคคาไรด์, เซลลูโลส, การสกัด, ลำไยผลอ่อน, โปรไบโอติก



Title	PRODUCTION OF CELLO-OLIGOSACCHARIDES FROM YOUNG RAW LONGAN FRUIT AND PREBIOTIC PROPERTIES
Author	Miss Kanyapak Changkhaochai
Degree	Master of Science in Biotechnology
Advisory Committee Chairperson	Dr. Chutamas Maneewong

ABSTRACT

Longan is an important economic crop of in northern Thailand. To increase yield with larger fruits and obtain higher prices, farmers frequently prune young longan fruit. Pruning longan bunches causes agricultural waste in the form of young longan fruit. To enhance the value of young longans, which contain cellulose, they can be produced into cello-oligosaccharides (COS). Therefore, the aim of this research is to investigate optimal conditions for preparing COS from young longan fruit and to investigate some prebiotic properties of COS powder derived from young longan fruit. The results found that young longan powder contained 12.82 % cellulose, 10.76 % hemicellulose, 11.86 % lignin, and 2.79 % ash. The optimal conditions for extracting cellulose from young longans were found to be a 70:30 ratio of 6.0% sodium hydroxide to young longan powder, which yielded the highest amount of crude cellulose at $46.96 \pm 0.85\%$ (by weight) at 30 °C. The crude cellulose was then prepared as COS using cellulase and hemicellulase. When hydrolyzed with cellulase 3.6 Unit/g of crude cellulose and hemicellulase 0.60 Unit/g of crude cellulose at 40 °C for 24 hours, the highest amounts of reducing sugar and total sugar obtained were 36.72 mg/ml and 278.15 mg/ml, respectively. The COS were analyzed by Thin-layer chromatography (TLC) at various times, cellotriose and other oligosaccharides were observed, glucose also detected in all samples. HPLC analysis showed that the highest amount of cellotriose 0.63 g/L was obtained at 3-hour reaction. The COS was then used as a prebiotic. Probiotic cells, such as *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus lactis*, were encapsulated with COS and subsequently

freeze-dried. It was observed that using 5% (w/v) COS resulted in the highest probiotic survival, which was 8.29 ± 0.08 log CFU/ ml. Consequently, COS was mixed with probiotics and tested against pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* TISTR 292. It was found that COS was able to promote the growth of probiotic while inhibiting the growth of pathogens. Viability in simulated gastrointestinal tract (GIT) conditions, COS-encapsulated probiotics demonstrated survival rates of 7.00 ± 0.02 log CFU/ml, comparable to those encapsulated with inulin. Research indicates that young longans can be utilized for the production of COS and can enhance or develop products to achieve higher quality.

Keywords : cello-oligosaccharides, cellulose, extraction, young longan, prebiotic



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความกรุณาของคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ให้คำแนะนำและความช่วยเหลืออย่างดียิ่งในการจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อ.ดร.จุฑามาศ มณีวงศ์ ที่ได้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะที่มีคุณค่ารวมถึงความใส่ใจข้าพเจ้าอย่างดีตลอดการทำวิทยานิพนธ์ รวมถึงผู้ทรงคุณวุฒิ ผศ.ดร. ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน และ อ.ดร.เอกวิทย์ ตรีเนตร ที่ได้เป็นที่ปรึกษาร่วมในการให้คำแนะนำและสนับสนุนตลอดระยะเวลาการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณผศ.ดร.ภักวรัตน์ เดชชีวะ อาจารย์ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้คำแนะนำและให้คำปรึกษาที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์นี้สมบูรณ์และมีคุณภาพมากขึ้น และขอขอบพระคุณกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (กองทุน ววน.) ผ่านทางมหาวิทยาลัยแม่โจ้ ปีงบประมาณ 2565 อย่างยิ่งในการสนับสนุนงบประมาณในการศึกษางานวิจัยฉบับนี้

ข้าพเจ้าต้องการขอขอบคุณบิดา มารดา และครอบครัวทุกท่านที่ให้การสนับสนุนและความห่วงใยตลอดการทำวิทยานิพนธ์นี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ นักวิทยาศาสตร์ และเพื่อนๆ ที่ได้ช่วยเสริมการทำงานที่ดีขึ้นด้วยคำแนะนำที่มีประโยชน์ และขอบคุณห้องปฏิบัติการของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่เตรียมพร้อมให้ความสะดวกในการทำงานของข้าพเจ้า

ผู้วิจัยหวังว่าวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะมีประโยชน์และคุณค่าต่อสังคม และข้าพเจ้ายินดีที่จะรับฟังคำแนะนำและข้อเสนอแนะเพื่อพัฒนางานวิจัยในอนาคต ขอขอบคุณทุกท่านที่มีส่วนร่วมและสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์นี้ด้วยความเต็มใจและห่วงใย

กัญญาภัค ฉางข้าวไชย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ช
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์การศึกษา	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและการตรวจเอกสาร	4
ชีวมวลลิกโนเซลลูโลส	6
เซลโล-โอลิโกแซ็กคาไรด์ (Cello-oligosaccharides : COS)	10
โพรไบโอติก (Probiotic)	16
พรีไบโอติก (Prebiotic)	17
การห่อหุ้มเซลลีโอโปรไบโอติก	18
บทที่ 3 อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	20
อุปกรณ์และสารเคมี	20
1. การเตรียม Cellulose	24
2. การศึกษาสภาวะการเตรียม Cello-oligosaccharide (COS) ด้วยวิธีทางเอนไซม์	25
4. การห่อหุ้มจุลินทรีย์โพรไบโอติก	26

วิธีวิเคราะห์.....	29
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์.....	30
การศึกษาหาสภาวะสกัดเซลลูโลส Cellulose.....	30
การศึกษาสภาวะในการผลิตเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์.....	33
การศึกษาความเข้มข้นของ COS ที่เหมาะสมในการการห่อหุ้มเซลล์.....	38
สรุปผลการวิจัย.....	42
บรรณานุกรม.....	43
ภาคผนวก.....	49
ภาคผนวก อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	50
ภาคผนวก การเตรียมและวิเคราะห์ทางเคมี.....	52
ประวัติผู้วิจัย.....	56



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 คุณค่าทางโภชนาการของผลลำไย	5
ตารางที่ 2 การศึกษาการห่อหุ้มเชื้อโปรไบโอติกด้วยพรีไบโอติกแต่ละชนิด	19
ตารางที่ 3 ส่วนประกอบทางเคมีของลำไยผลอ่อนอบแห้งพันธุ์อีดอ	30
ตารางที่ 4 ปริมาณผงของเซลล์ulosที่ยาบที่สกัดจากลำไยผลอ่อนด้วยวิธีทางเคมี	32



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ผลลำไยอ่อนพันธุ์อีตอ อายุ 150 ถึง 180 วัน	4
ภาพที่ 2 ภาพรวมของโครงสร้างลิกโนเซลลูโลส	6
ภาพที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของลิกนินที่ประกอบด้วย p-coumaryl, coniferyl และ sinapyl alcohol.....	7
ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของเฮมิเซลลูโลสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์	8
ภาพที่ 5 โครงสร้างของเซลลูโลสที่มีกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก	9
ภาพที่ 6 การทำงานเอนไซม์ เอนโดกลูคาเนส เอกโซกลูคาเนสและเบต้ากลูโคซิเดส สำหรับการย่อย เซลลูโลส.....	12
ภาพที่ 7 โครงสร้างของกลูโคสและสารยับยั้งการทำงานของเบต้ากลูโคซิเดส	13
ภาพที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของเซลโล-โอลิโกแซคคาไรด์แต่ละประเภท G2:Cellobiose G3: Cellotriose, G4:Cellotetraose, G5:Cellopentaose, G6:Cellohexaose.....	15
ภาพที่ 9 ลำไยผลอ่อนพันธุ์อีตอ ที่เก็บในช่วงอายุ 180 วัน	24
ภาพที่ 10 ผงเซลลูโลสหยาบจากลำไยผลอ่อน ก่อนพอกด้วยโซเดียมคลอไรด์ (A)	32
ภาพที่ 11 สเปกตรัม FTIR เซลลูโลสหยาบที่ได้จากการสกัดจากลำไยผลอ่อนด้วยวิธีทางเคมีในสถานะ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สัดส่วน 70 ต่อ 30 ที่ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 6 (A) , อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สัดส่วน 80 ต่อ 20 ที่ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 6 (B) และ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส สัดส่วน 70 ต่อ 30 ที่ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 4 หลังจากพอกสีด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 (C)	33
ภาพที่ 12 ผลการวิเคราะห์หาเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์เชิงคุณภาพด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบเยื่อ บาง ชั่วโมงที่ 3 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	35
ภาพที่ 13 HPLC โครมาโตแกรมของน้ำตาลเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ชั่วโมงที่ 0 (A), ชั่วโมงที่ 3 (B), ชั่วโมงที่ 6 (C) และ ชั่วโมงที่ 12 (D)	36
ภาพที่ 14 HPLC โครมาโตแกรมน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ ที่ศึกษาการยับยั้งการทำงานของ.....	37

ภาพที่ 15 การเลือรอดของเชื้อโปรไบโอติกที่ห่อหุ้มด้วยเซลโลโอสไตรก์ก่อนและหลังจาก
 การทำแห้งแบบเยือกแข็ง38

ภาพที่ 16 เชื้อโปรไบโอติกที่เลือรอดหลังจาก การทำแห้งแบบเยือกแข็ง ผงของเชื้อโปรไบโอติกที่
 ห่อหุ้มด้วยน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 หลังจากการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (A)และ
 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้อง อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (B).....39

ภาพที่ 17 กราฟแสดงการเจริญการเติบโตของเชื้อโปรไบโอติกและเชื้อก่อโรคโดยใช้
 น้ำตาลเซลโลโอสไตรก์เป็นแหล่งพลังงาน (A) น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งพลังงาน (B) และไม่มี
 น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงาน (C).....40

ภาพที่ 18 การเลือรอดของเชื้อโปรไบโอติกก่อน และหลังจากการทดสอบการทนย่อยในระบบ
 ทางเดินอาหารแบบจำลองในห้องปฏิบัติการ41



บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การผลิตลำไยในปัจจุบัน มีการศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีต่าง ๆ เพื่อกระตุ้นการออกผลผลิตนอกฤดูของลำไย ทำให้ต้นลำไยมีผลผลิตให้เก็บเกี่ยวตลอดทั้งปี ซึ่งเกษตรกรจำเป็นต้องตัดแต่งช่อผลลำไย เพื่อการควบคุมผลผลิตที่ออกมานั้นให้มีคุณภาพ มีขนาดผลที่ใหญ่และขายได้ในราคาที่สูง โดยเกษตรกรจะทำการตัดแต่งช่อผลลำไยอ่อนที่มีอายุอยู่ในช่วง 150 – 180 วัน โดยตัดแต่งช่อผลลำไยอ่อนให้เหลือไม่เกิน 50 ผลต่อช่อ ผลลำไยที่ถูกตัดแต่งออกจากพวงจะมีขนาดเท่าเมล็ดถั่วเหลืองไปจนถึงขนาดเท่ามะเขือพวง การตัดแต่งช่อผลลำไยจะทำให้ลำไยผลอ่อนจะถูกทิ้งไปจึงเกิดเป็นของเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีมีการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรม

การนำของเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มนับเป็นแนวทางที่มีประสิทธิภาพในการตอบสนองแนวคิด Zero Waste ซึ่งเป็นวิธีที่เป็นประโยชน์ต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ การใช้วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรยังเป็นส่วนหนึ่งของแนวคิด Zero Waste Agriculture ซึ่งมุ่งเน้นการผลิตทางการเกษตรที่ปราศจากวัสดุเหลือใช้ พร้อมกับส่งเสริมความคิดสร้างสรรค์ในการนำวัสดุเหลือทิ้งมาสร้างสรรค์นวัตกรรมและการออกแบบผลิตภัณฑ์ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2565) ชีวมวลลิกโนเซลลูโลสได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นเนื่องจากมีศักยภาพในการผลิตสารประกอบที่มีมูลค่าสูง โดยไม่ใช้ทรัพยากรที่จำเป็นต่อการผลิตอาหารหรืออาหารสัตว์ (Sakamoto et al., 2012) ตัวอย่างหนึ่งของของเหลือทิ้งทางการเกษตรที่สามารถใช้เป็นแหล่งชีวมวลลิกโนเซลลูโลสได้คือผลลำไยอ่อนที่ถูกตัดทิ้ง การนำผลลำไยอ่อนมาใช้ประโยชน์จะช่วยลดปริมาณขยะและเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้ง นอกจากนี้จะช่วยลดปริมาณขยะแล้วยังส่งเสริมการใช้ทรัพยากรอย่างยั่งยืนและลดการพึ่งพาทรัพยากรธรรมชาติที่มีจำกัด การแปรรูปชีวมวลลิกโนเซลลูโลสสามารถนำไปผลิตสารประกอบต่าง ๆ ที่มีมูลค่า เช่น เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ (Cello-oligosaccharide, COS) ซึ่งเกิดจากย่อยชีวมวลลิกโนเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ โดยจะได้สารประกอบที่มีคุณสมบัติหลากหลาย เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์เป็นผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพที่มีศักยภาพในด้านอุตสาหกรรมยา อาหาร เคมีและอาหารสัตว์ นอกจากนี้งานวิจัยของ (Jiao et al., 2014) ยังระบุว่าเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์สามารถเป็นวัสดุพรีไบโอติกที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อที่เป็นประโยชน์ เช่น *Bifidobacterium* sp. และ *Lactobacillus* sp. ซึ่งเชื้อโปรไบโอติกนี้ช่วยปรับสมดุลระบบต่างๆในร่างกาย ดังนั้น การนำเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์จาก

ผลลำไยอ่อนมาเป็นวัสดุส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อโปรไบโอติกจะช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับผลลำไยอ่อน นอกจากนี้ยังเป็นการจัดการของเหลือทิ้งทางการเกษตรอย่างมีประสิทธิภาพอีกด้วย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาและพัฒนากระบวนการเตรียมเซลล์โอลิโกแซคคาไรด์จากลำไยผลอ่อน รวมถึงทดสอบประสิทธิภาพของผงเซลล์โอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากลำไยผลอ่อนในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อโปรไบโอติก ลำไยผลอ่อนที่นำมาใช้ในการศึกษาเป็นลำไยที่มีอายุ 150 – 180 วัน ซึ่งเก็บจากแปลงเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่



วัตถุประสงค์การศึกษา

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเซลล์โพลิโกแซคคาไรด์จากลำไยผลอ่อนพันธุ์อีดอ
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกบางประการของผงเซลล์โพลิโกแซคคาไรด์จากผลลำไยอ่อน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

งานวิจัยนี้ คาดว่าจะเกิดประโยชน์แก่ภาคอุตสาหกรรมอาหารและภาคเกษตรกรรม โดย

1. ภาคอุตสาหกรรมอาหาร ผลิตน้ำตาลเซลล์โพลิโกแซคคาไรด์ (COS) สำหรับเป็นอาหารเสริมทางเลือกสำหรับผู้บริโภค หรือผู้ผลิตที่ต้องการต่อยอดในเชิงพาณิชย์ เช่นด้าน อาหารเสริม ผลิตภัณฑ์ยา เป็นต้น
2. ภาคเกษตรกรรม เป็นการเพิ่มมูลค่าทางตลาดให้กับลำไย และเป็นการลดของเหลือทิ้งทางการเกษตรให้กับเกษตรกร



บทที่ 2

ทฤษฎีและการตรวจเอกสาร

ลำไย (ชื่อวิทยาศาสตร์: *Dimocarpus longan* Lour. วงศ์ : Sapindaceae) เป็นผลไม้เขตร้อนและกึ่งร้อน มีถิ่นกำเนิดอยู่ที่ประเทศจีนตอนใต้ และได้แพร่เข้ามาในประเทศไทยปี พ.ศ. 2439 โดยแหล่งเพาะปลูกที่สำคัญของไทยอยู่ใน 8 จังหวัดทางภาคเหนือ คือ เชียงราย เชียงใหม่ ลำพูน พะเยา น่าน แพร่ ลำปาง และตาก ซึ่งเป็นภูมิประเทศและภูมิอากาศที่เหมาะสมแก่การเพาะปลูกพืชชนิดนี้ โดยในปัจจุบันได้มีเทคโนโลยีในการบังคับให้ลำไยออกผลผลิตตลอดทั้งปีโดยไม่ต้องใช้อากาศหนาวเย็น

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของลำไยนั้นจะมีลำต้นที่เป็นทรงพุ่มแผ่กว้าง มีขนาดกลางจนไปถึงขนาดใหญ่ ซึ่งหากเจริญเติบโตเต็มที่จะมีขนาดลำต้นสูง 10 – 12 เมตร กว้างประมาณ 6 - 8 เมตร โดยลำต้นจะมีเปลือกสีน้ำตาลเป็นสะเก็ดและมีร่องขรุขระ มีลักษณะใบเป็นรูปวงรีหรือรูปหอก มีขนาดกว้าง 3 – 6 เซนติเมตรและยาว 10 – 15 เซนติเมตร ขอบใบเรียบไม่ยัก ไม่มีวุ้น ปลายใบแหลมและฐานใบค่อนข้างป้าน โดยทั่วไปแล้วลำไยจะเริ่มออกช่อดอกช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนกุมภาพันธ์และเมื่อหลังดอกบานเต็มที่ 2 สัปดาห์จะเริ่มติดผล โดยผลลำไยจะมีรูปร่างค่อนข้างกลมหรือกลมแป้น เปลือกผลอาจเป็นตุ่มหรือค่อนข้างเรียบ ดังภาพที่ 1 และจะสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้หลังติดผล 4 – 6 เดือน (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2551) ซึ่งในผลลำไยประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน ไขมัน เยื่อใย และพลังงาน ดังแสดงในตารางที่ 1



ภาพที่ 1 ผลลำไยอ่อนพันธุ์อีตอ อายุ 150 ถึง 180 วัน

ตารางที่ 1 คุณค่าทางโภชนาการของผลลำไย

องค์ประกอบทางเคมี	ร้อยละ
คาร์โบไฮเดรต	15.14
เถ้า	1.77
โปรตีน	1.31
ไขมัน	0.12
เยื่อใย	1.1
พลังงาน	60

ที่มา : นันทา (2554)

ลำไยผลอ่อน

ลำไยผลอ่อนเกิดจากการปลิดผลและตัดแต่งช่อผลลำไย เพื่อให้ขนาดของผลลำไยมีขนาดที่ใหญ่มากขึ้น ซึ่งหากต้นลำไยมีผลที่ดกมากกว่า 80 ผลต่อช่อ ส่งผลให้อาหารในการลำเลียงไปเลี้ยงผลไม่พอทำให้ผลผลิตมีคุณภาพที่ต่ำลงและไม่เป็นที่ต้องการของตลาด ในการจัดการคือการผลิตผลลำไยให้ไม่เกิน 60 ผลต่อช่อ โดยปลิดผลอ่อนของลำไยที่มีขนาดเท่ากับ 0.5 เซนติเมตรหรือขนาดเท่าเมล็ดถั่วเขียว อายุประมาณ 2 เดือนหลังจากการติดผล การตัดแต่งช่อมี ทั้งหมด 3 วิธีการคือ การตัดทั้งแบบทั้งช่อ การตัดช่วงปลายช่อ และตัดทั้งกิ่งการตัดแต่งช่อผลลำไยทำให้เกิดของเหลือทิ้งทางการเกษตรมากมายเนื่องจากการตัดแต่งช่อผลลำไยทั้งในฤดูและนอกฤดู ส่วนมากมีการจัดการโดยการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรไปหมักเป็นปุ๋ยหรือนำไปเป็นอาหารสัตว์ (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2551)

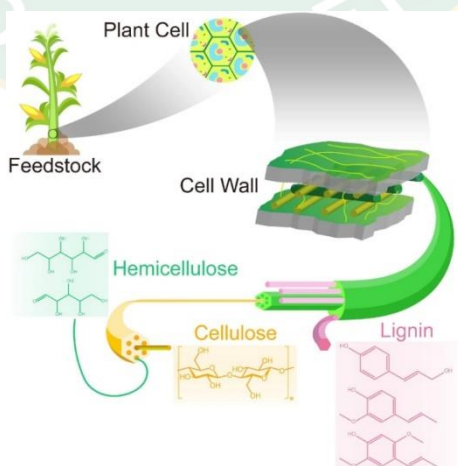
จากองค์ประกอบทางเคมีดังกล่าวได้มีผู้วิจัยเกี่ยวกับการนำผลลำไยไปใช้ประโยชน์ในด้านการผลิตไบโอเอทานอล โดย (Nguyen et al., 2020) ได้ทำการวิจัยการผลิตไบโอเอทานอลจากลำไยคุณภาพต่ำโดยการปรับสภาพลำไยด้วยเอนไซม์เพื่อผลิตเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตไบโอเอทานอลโดยใช้การปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนและน้ำภายใต้ความดันสูงตามด้วยการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อปรับเปลี่ยนเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสของลำไยคุณภาพต่ำให้เป็นน้ำตาลที่หมักได้ จากผลการวิจัยพบว่าสารตั้งต้นที่ได้จากลำไยคุณภาพต่ำเป็นวัตถุดิบที่ดีสำหรับการผลิตเอทานอลที่สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงหรือเครื่องต้มได้ ทั้งนี้ การศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับการนำลำไยผลอ่อนมาผลิตเป็นชีวมวลลิกโนเซลลูโลสยังมีอยู่อย่างจำกัด การนำของเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดนี้มาใช้เป็นวัสดุชีวมวลลิกโน

เซลลูโลสจึงเป็นอีกทางเลือกที่มีศักยภาพในการเพิ่มมูลค่าทางการเกษตรได้ โดยสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้

ชีวมวลลิกโนเซลลูโลส

วัสดุเหลือทิ้งลิกโนเซลลูโลสเป็นวัสดุธรรมชาติที่มีเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินเป็นองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ ดังที่แสดงในภาพที่ 2 โดยมีปริมาณแตกต่างกันขึ้นอยู่กับประเภทและสายพันธุ์ของวัสดุเหลือทิ้งลิกโนเซลลูโลส อากาศ และความสมบูรณ์ของดิน โดยทั่วไป วัสดุเหลือทิ้งลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยเซลลูโลสร้อยละ 30-50 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 15-35 และลิกนินร้อยละ 10-20

วัสดุลิกโนเซลลูโลสที่ได้จากการเกษตรหรือวัสดุเหลือทิ้งทางอุตสาหกรรมเป็นแหล่งที่มีเซลลูโลสมากและมีการใช้ประโยชน์ที่หลากหลาย อย่างไรก็ตามการใช้งานเซลลูโลสมีข้อจำกัดหลายอย่างเนื่องจากเซลลูโลสมีเส้นใยของ เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่แข็งแรงล้อมรอบและขัดขวางการเข้าถึงของเอนไซม์เซลลูโลไลติกที่จะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลลูโลส ด้วยเหตุนี้จึงมีการปรับปรุงสภาพของวัตถุดิบเพื่อปรับปรุงเส้นใยให้มีการเข้าถึงเซลลูโลสได้ง่ายมากขึ้นและเพื่อเพิ่มการเข้าถึงเซลลูโลสในการผลิต เซลโล-โอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ และมีงานวิจัยที่ค่อนข้างน้อยเกี่ยวกับการรวบรวมแหล่งลิกโนเซลลูโลสที่ผ่านการปรับปรุงและได้ออกมาเป็นเส้นใยเซลลูโลสสำหรับการผลิต เซลโล-โอลิโกแซ็กคาไรด์ เช่น ฟางอ้อย (Barbosa et al., 2020) และ spruce (A. Kamaouri et al., 2019) ฟางข้าวสาลี, ไร่ข้าวโพด (Birhade et al., 2017) และ ไร่ข้าวโพด (Chu et al., 2014)

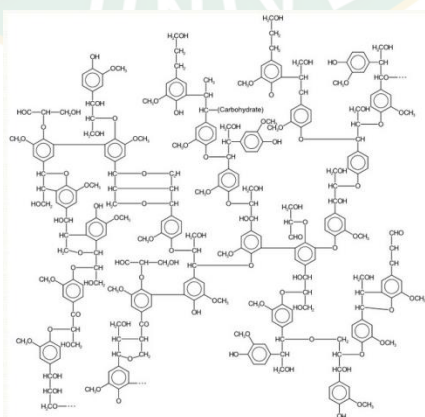


ภาพที่ 2 ภาพรวมของโครงสร้างลิกโนเซลลูโลส

ที่มา : Zheng et al. (2022)

ลิกนิน (Lignin)

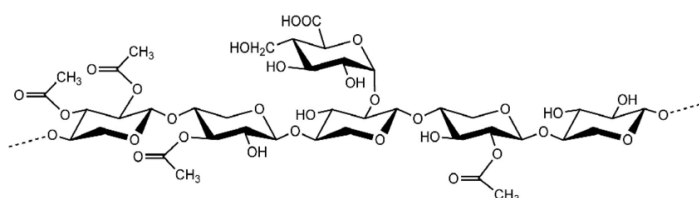
ลิกนินถือเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่พบมากที่สุดในโลกเป็นอันดับสองรองจากเซลลูโลส มีโครงสร้างเป็นพอลิเมอร์เชื่อมโยงข้ามที่มีมวลโมเลกุลเกิน 10,000 หน่วยมวลอะตอม และมีคุณสมบัติเป็นสารประกอบอะโรมาติกที่เป็นไฮโดรโฟบิก (Yinghuai et al., 2013) มอนอเมอร์ของลิกนินประกอบด้วยมอนอลิกนอลสามชนิด ได้แก่ พาราคูมาริลแอลกอฮอล์ คอนิเฟอริลแอลกอฮอล์ และซินาพิลแอลกอฮอล์ โดยมอนอลิกนอลเหล่านี้จะรวมตัวในรูปของฟีนิลโพรพานอยด์สามแบบคือ p-hydroxyphenyl (H), guaiacyl (G) และ syringyl (S) ดังที่แสดงในภาพที่ 3 พืชเมล็ดเปลือยมักจะมีลิกนินที่ประกอบด้วยฟีนิลโพรพานอยด์แบบ G เป็นส่วนใหญ่ ขณะที่พืชใบเลี้ยงคู่ส่วนใหญ่จะเป็นแบบผสมระหว่าง G และ S ส่วนพืชใบเลี้ยงเดี่ยวจะเป็นแบบผสมกันทั้งสามแบบ พืชแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบของลิกนินที่แตกต่างกันไป ตัวอย่างเช่น แอสเพน (หมู่ *Populus* sect. *Populus*) ประกอบด้วยคาร์บอนร้อยละ 63.4 ออกซิเจนร้อยละ 30 ไฮโดรเจนร้อยละ 5.9 และเถ้าร้อยละ 0.7 ลิกนินสามารถเขียนในรูปสูตรเคมีทั่วไปได้ว่า $(C_{31}H_{34}O_{11})_n$ (Boerjan et al., 2003) ให้โครงสร้างความคงที่แก่พืช ป้องกันการซึมผ่าน และต้านทานการโจมตีจากจุลินทรีย์และออกซิเดชันได้ ซึ่งเชื่อมโยงกันด้วยพันธะประเภทต่างๆ วัตถุประสงค์หลักของลิกนินคือเพื่อให้พืชมีโครงสร้างที่มั่นคง ป้องกันการซึมผ่าน และต้านทานการโจมตีจากจุลินทรีย์และความเครียดจากออกซิเดชัน ลิกนินเป็นเฮเทอโรพอลิเมอร์แบบอะมอร์ฟัสที่ไม่ละลายน้ำและไม่มีฤทธิ์ทางแสง ซึ่งทำให้อยู่สลายได้ยากมาก (Fengel & Wegener, 2011) การละลายของลิกนินในสภาพแวดล้อมที่เป็นกรด เป็นกลาง หรือเป็นด่างขึ้นอยู่กับสารตั้งต้น (p-coumaryl, coniferyl, sinapyl alcohol หรือส่วนผสมของทั้งสาม) ของลิกนิน (Grabber, 2005)



ภาพที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีของลิกนินที่ประกอบด้วย p-coumaryl, coniferyl และ sinapyl alcohol
ที่มา : Adler (1977)

เฮมิเซลลูโลส

เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ที่เป็น heteropolysaccharide ประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด ในโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลส น้ำตาลไซโลส (xylose) จะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ที่ตำแหน่งปีตา (1-4) เป็นโซ่หลัก นอกจากนี้ยังมีน้ำตาลแมนโนส (mannose), กาแล็กโทส (galactose) หรือกลูโคส (glucose) มาต่อกันเป็นโซ่หลัก ดังที่แสดงในภาพที่ 4 (Ebringerová et al., 2005) เฮมิเซลลูโลสมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าเซลลูโลส และมีโครงสร้างแตกแขนงด้วยสายข้างที่สั้นซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ทำให้เป็นพอลิเมอร์ที่สามารถไฮโดรไลซ์ได้ง่าย (Fengel & Wegener, 2011) นอกจากนี้ เฮมิเซลลูโลสยังทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมระหว่างลิกนินและเส้นใยของเซลลูโลส ส่งผลให้โครงสร้างของเซลลูโลส-เฮมิเซลลูโลส-ลิกนินทั้งหมดมีความแข็งแรงมากขึ้น (Laureano-Perez et al., 2005) ซึ่งความสามารถในการละลายของเฮมิเซลลูโลสเรียงลำดับจากมากไปน้อยคือ แมนโนส ไซโลส กลูโคส อาราบิโนส และกาแล็กโทส โดยความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น สำหรับพอลิเมอร์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ความสามารถในการละลายไม่สามารถทำนายได้เนื่องจากจุดหลอมเหลวที่ไม่ทราบแน่ชัด (Gray et al., 2003) การละลายของสารประกอบเฮมิเซลลูโลสในน้ำเริ่มต้นที่ประมาณ 180 องศาเซลเซียส ในสภาพเป็นกลางตาม Bobleter (1994) อย่างไรก็ตาม Garrote et al. (1999) ได้กล่าวว่าบางส่วนของเฮมิเซลลูโลสเริ่มละลายได้แล้วที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส การละลายของส่วนประกอบลิกนินเซลลูโลสไม่เพียงขึ้นอยู่กับอุณหภูมิเท่านั้น แต่ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ เช่น ปริมาณความชื้นและค่าความเป็นกรดต่าง (Fengel & Wegener, 2011) ในบรรดาเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เฮมิเซลลูโลสเป็นสารที่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงทางความร้อนและเคมีมากที่สุด ในระหว่างการปรับสภาพด้วยความร้อน-เคมี กลุ่มข้างของเฮมิเซลลูโลสจะทำปฏิกิริยาก่อน ตามด้วยโครงสร้างหลักของเฮมิเซลลูโลส (Sweet & Winandy, 1999)

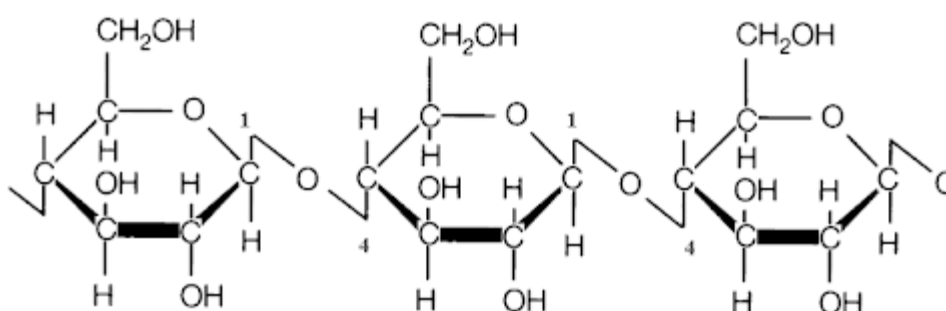


ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของเฮมิเซลลูโลสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์

ที่มา: Hu et al. (2020)

เซลลูโลส

เซลลูโลสจากแหล่งธรรมชาติส่วนมากถูกใช้งานในอุตสาหกรรม เส้นใยสิ่งทอที่เป็นกระดาษ การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ และยังเป็นแหล่งสำคัญในการผลิตเซลโลลอลิโกแซคคาไรด์ เซลลูโลสเป็นโพลีแซ็กคาไรด์เชิงเส้นที่ประกอบด้วย หน่วย D – anhydroglucopyranose (AGUs) ที่เชื่อมโยงด้วยคาร์บอนที่มีพันธะ β -1,4 และมี degree of polymerization (DP) สูงถึง 10,000 AGUs โดยโครงสร้างของเซลลูโลสประกอบไปด้วยกลูโคสดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 โครงสร้างของเซลลูโลสที่มีกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก

ที่มา : (พรรณพงศ์, 2014)

เซลลูโลสซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 500-15,000 โมเลกุล เชื่อมต่อกันเป็นเส้นตรงด้วยพันธะ β -1,4-ไกลโคซิดิกระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลในโมเลกุลของกลูโคส โดยแต่ละโมเลกุลสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนได้ ทำให้เซลลูโลสมีความแข็งแรงและมีความเป็นผลึกสูง เฮมิเซลลูโลส ประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิด ทั้งน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอม ได้แก่ ไซโลสและอาราบินอส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4-ไกลโคซิดิกเป็นโครงสร้างหลัก และมีน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส และแมนโนส หรือกรดน้ำตาล เช่น กรดกลูควิโรนิก กาแลคทูโรนิก และเมทิลกาแลคทูโรนิก มาเชื่อมต่อกับโครงสร้างหลักเกิดเป็นโครงสร้างแบบกิ่ง ซึ่งขึ้นอยู่กับธรรมชาติของวัสดุเหลือทิ้งลิกโนเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่าเซลลูโลสเนื่องจากมีความเป็นผลึกลดกว่า ลิกนิน มีโครงสร้างแบบสามมิติประกอบด้วยฟีนิลโพรพานอยด์ที่แตกต่างกัน 3 หน่วยย่อย คือ พาราไฮดรอกซีฟีนิล (p-hydroxyphenyl: H) กัวอีเอซิล (guaiacyl: G) และไซริงกิล (syringyl: S) เชื่อมต่อกันโดย aryl ether linkage ทำให้ลิกนินไม่ละลายน้ำและย่อยสลายยาก Popanyasak et al. (2022)

เซลโล-โอลิโกแซ็กคาไรด์ (Cello-oligosaccharides : COS)

เซลโล-โอลิโกแซ็กคาไรด์ (Cello-oligosaccharides : COS) เป็นโอลิโกเมอร์ของ D-glucose ที่เชื่อมด้วยพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic bond) และมีโครงสร้างเหมือนกับเซลลูโลสแต่มี degree of polymerization (DP) น้อยกว่าเซลลูโลสและมีความสามารถละลายน้ำได้ซึ่งมีค่า DP อยู่ที่ 3 (cellotriose) ถึง 6 (cellohexaose) ซึ่งมนุษย์ไม่สามารถย่อย COS ได้ และมีงานวิจัยเกี่ยวกับคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของ COS ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตแก่เชื้อ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* (Fujii et al., 2016; Karnaouri et al., 2019; Sanz et al., 2005) อย่างไรก็ตามข้อจำกัดในการใช้งานมีค่อนข้างมากและยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับผลกระทบการเป็นพรีไบโอติกในร่างกายมนุษย์ (Barbosa, 2020)

การผลิตเซลโล-โอลิโกแซ็กคาไรด์

ผนังเซลล์พืชเป็นองค์ประกอบพันกันที่ประกอบด้วยไมโครไฟบริลเซลลูโลสที่เป็นผลึกซึ่งล้อมรอบด้วยเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ดังนั้นจึงต้องคลายโครงสร้างเฮมิเซลลูโลสและลิกนินเพื่อให้ได้เส้นใยเซลลูโลสที่นำมาผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มสูง เช่น เซลโล-โอลิโกแซ็กคาไรด์ (COS) โอลิโกแซ็กคาไรด์เหล่านี้ถือเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ สำหรับการใช้งานในด้านอาหารคนและอาหารสัตว์ อย่างไรก็ตามยังคงมีข้อจำกัดในการผลิตเซลโล-โอลิโกแซ็กคาไรด์ในระดับอุตสาหกรรม เช่น วัตถุประสงค์หลักสำหรับการผลิต COS มักมาจากเซลลูโลสที่พบในพืช วัสดุเหล่านี้จำเป็นต้องผ่านกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบ ซึ่งอาจใช้เวลานานและต้องการการใช้สารเคมีที่มีความเข้มข้น อีกทั้งการใช้เอนไซม์หรือกรดเพื่อผลิต COS เป็นกระบวนการที่ต้องการความแม่นยำสูง ซึ่งหากไม่สามารถควบคุมได้ดีอาจทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพต่ำหรือมีสารปนเปื้อน (Karnaouri et al., 2019) โดยทั่วไปในการผลิตเซลโล-โอลิโกแซ็กคาไรด์มักใช้กระบวนการทางกายภาพ เคมีและเอนไซม์ ดังนี้

วิธีการทางกายภาพและเคมี

วิธีการทางกายภาพและเคมีเป็นวิธีทั่วไปในการปรับสภาพโดยสามารถมีและไม่มีกรดอ่อนตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงในการไฮโดรไลซิสเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสบางส่วน ทำให้เกิดเป็นไซโล-โอลิโกแซ็กคาไรด์และเซลโล-โอลิโกเมอร์พร้อมกับน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว อย่างไรก็ตามสภาวะที่เหมาะสม (อุณหภูมิ เวลา ปริมาณกรด ปริมาณสารชีวมวล) มีความสำคัญอย่างมากในการผลิตเนื่องจากส่งผลต่อคุณภาพของโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้ (Awasthi et al., 2019) หากมีการใช้กรดที่มีปริมาณและความเข้มข้นมากจะทำให้เกิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและทำให้โอลิโกแซ็กคาไรด์กลายเป็น

เพอร์ฟูรัลและ 5 - ไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟูรัลตามด้วยการผลิตกรดเลวูลินิก(Cano et al., 2020; Cho et al., 2020)

การปรับสภาพด้วยกรด (Acidic hydrolysis)

การปรับสภาพด้วยกรดเป็นวิธีการปรับสภาพชีวมวลลิกโนเซลลูโลสก่อนนำไปย่อยด้วย เอนไซม์ เซลลูโลสถูกย่อยได้ยากมากเนื่องจากโครงสร้างที่แข็งแรง ซึ่งในกรณีนี้การย่อยนั้นถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยกรดเข้มข้น การย่อยด้วยกรดนั้นทำให้ได้ กลูโคส ไซโลส อนุพันธ์ของฟูแรน หรือกรดเลวูลินิก (Cano et al., 2020) อย่างไรก็ตาม (Zhang & Lynd, 2003) ได้ศึกษาสถานะในการเตรียม cellulose nanocrystals (CNC) จากกระดาษกราฟที่ถูกฟอกขาวแล้วเพื่อให้ได้ เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์โดยการย่อยด้วยกรดซัลฟูริกร้อยละ 64 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที พบว่าค่า degree of polymerization (DP) ของเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์อยู่ที่ 7– 20 และในการศึกษาสถานะอื่นพบว่ามีค่า DP อยู่ 3 – 11 เมื่อใช้สถานะอุณหภูมิห้อง (22 องศาเซลเซียส) โดยกรดที่ใช้คือไฮโดรคลอริกและซัลฟูริก (อัตราส่วน 4 : 1) เป็นเวลา 4 – 6 ชั่วโมง จากนั้นโอลิโกแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำได้จะถูกตกตะกอนด้วยอะซิโตนและทำให้บริสุทธิ์โดยโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์แลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange column chromatography) และ (Isogai et al., 2008) ได้ศึกษาการผลิตเซลลูโลสจากวัสดุต่างๆ (เส้นใย, ไมโครคริสตัลไลน์เซลลูโลส เป็นเส้นและเส้นใยของเซลลูโลสหลังการย่อยด้วยกรด) โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งมีค่า DP สูงสุดอยู่ที่ 35–101 และต่ำสุดที่ DP 18–24

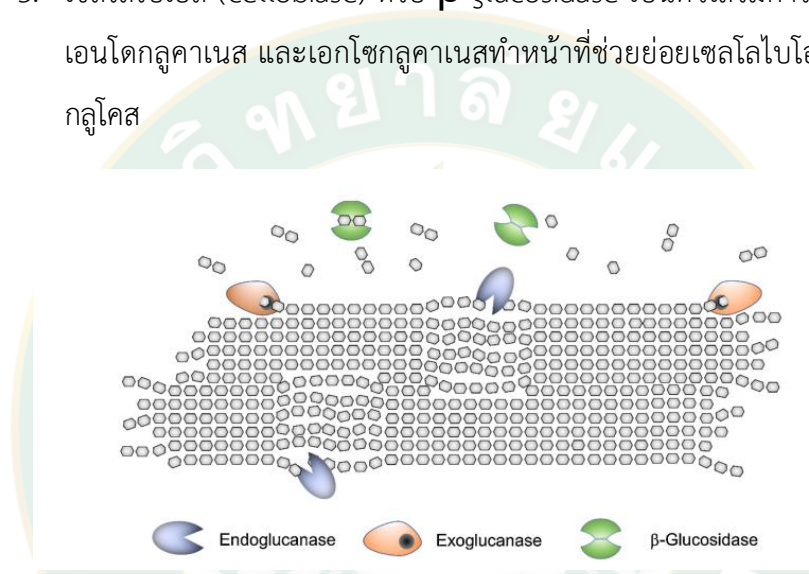
การปรับสภาพด้วยวิธีการทางเอนไซม์ (Enzymatic process)

การไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์จัดเป็นวิธีการที่น่าสนใจกว่าเมื่อเทียบกับวิธีทางกายภาพและวิธีทางเคมี เนื่องจากปฏิกิริยาไม่รุนแรงแต่ผลผลิตน้อยลง เซลลูเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อยสารประกอบเซลลูโลส โดยมีชนิดของเอนไซม์อย่างน้อย 3 ชนิดที่ทำงานร่วมกัน (สุksomบัติ & ลาวัญย์, 2553) โดยแสดงในภาพที่ 6 ดังนี้

1. เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) หรือ Endo- β -1,4 glucan glucanohydrolase เอนไซม์ชนิดนี้ไม่สามารถย่อยในส่วนที่เป็นผลึกได้ เช่น ใยฝ้าย แต่สามารถย่อยเซลลูโลส ส่วนที่ไม่เป็นผลึกได้ โดยเอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาการตัดพันธะ เบต้า 1,4 (β -1,4-linkage) ซึ่งจะทำความยาวของสายเซลลูโลสสั้นลง บริเวณปลายที่ถูกตัดจะมี

คุณสมบัติเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ ได้ผลผลิตคือ เซลโลเดกซ์ตริน (cellodextrin) ที่มีขนาดโมเลกุลต่างกัน นอกจากนี้ยังมีเซลโลไบโอส (cellobiose) และกลูโคส แต่มีปริมาณกลูโคสที่ออกมาน้อยมาก

2. เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) หรือ Exo- β -1,4-glucan glucanohydrolase ทำหน้าที่ย่อยส่วนปลายของเซลลูโลสที่มีความสามารถในการรีดิวซ์ผลผลิตส่วนใหญ่เป็นเซลโลไบโอส
3. เซลโลไบเอส (cellobiase) หรือ β -glucosidase เป็นตัวเสริมการทำงานของเอนไซม์เอนโดกลูคาเนส และเอกโซกลูคาเนสทำหน้าที่ช่วยย่อยเซลโลไบโอส ผลผลิตที่ได้เป็นกลูโคส



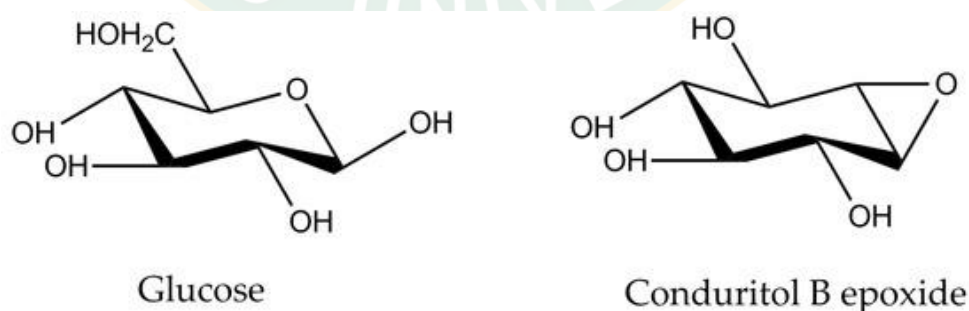
ภาพที่ 6 การทำงานเอนไซม์ เอนโดกลูคาเนส เอกโซกลูคาเนสและเบต้ากลูโคซิเดส สำหรับการย่อยเซลลูโลส

ที่มา : Chen et al. (2021)

ในการทำงานของเอนไซม์มีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อการไฮโดรไลซิส เช่น ปริมาณเอนไซม์ ชนิดเอนไซม์ที่ทำงานร่วมกัน อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และเทคนิคการกวนผสม ที่ต้องคำนึงถึง ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่นำเสนอการผลิตเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้วิธีการทางเอนไซม์ ซึ่งมีการศึกษาถึงการศึกษาการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ผสมและควบคุมการผลิตผลิตภัณฑ์และลดการผลิตน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวให้น้อยลง (Karnaouri et al., 2018) และยังมีการศึกษาการปรับเปลี่ยนสภาวะในการทำปฏิกิริยา เช่นการปรับเปลี่ยนบัฟเฟอร์เพื่อยับยั้งการผลิตน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Vanderghem et al., 2010)การปรับแต่งประสิทธิภาพของเอนไซม์ผสมที่มีจำหน่ายทั่วไป เช่นการเพิ่มตัวยับยั้งการทำงานของกลูโคซิเดส (Tsuji et al., 2013) เช่น Conduiritol- β -epoxide

Conduritol- β -epoxide

Conduritol-B-epoxide เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างคล้ายกับน้ำตาล (glucose) โดยเป็นหนึ่งในอนุพันธ์ของ conduritol ซึ่งมีวงแหวน cyclohexene ที่ประกอบด้วยกลุ่ม epoxide นอกจากนี้ Conduritol- β -epoxide เป็นสารยับยั้งที่มีความเฉพาะเจาะจงต่อเอนไซม์ β -glucosidase ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลาย β -glucose ในหลายระบบชีวภาพ โดยกระบวนการทำงานของ Conduritol- β -epoxide ในการยับยั้ง β -glucosidase คือ Conduritol- β -epoxide ทำงานโดยการเลียนแบบโครงสร้างของ β -glucose ดังที่แสดงในภาพที่ 7 เพื่อจับกับเอนไซม์ β -glucosidase และผ่านการเปิดวง epoxide โดยกลุ่มนิวคลีโอไฟล์ (เช่น กลุ่ม -OH หรือ -NH₂) ในตำแหน่งการทำงานของเอนไซม์ β -glucosidase จะทำการเปิดวง epoxide ของ Conduritol- β -epoxide ปฏิกริยานี้ทำให้เกิดการแตกหักของพันธะ C-O ในวง epoxide และสร้างพันธะใหม่ระหว่างเอนไซม์กับ Conduritol- β -epoxide การเปิดวง epoxide จะทำให้เกิดพันธะเอสเทอร์ระหว่างกลุ่ม OH ของ Conduritol- β -epoxide และกลุ่มนิวคลีโอไฟล์ในตำแหน่งการทำงานของเอนไซม์ β -glucosidase เมื่อเกิดพันธะเอสเทอร์แล้ว Conduritol- β -epoxide จะจับกับเอนไซม์ β -glucosidase อย่างถาวร ซึ่งทำให้เอนไซม์สูญเสียความสามารถในการทำงานเมื่อ β -glucosidase ถูกยับยั้ง การย่อยสลายของ β -glucose จะหยุดลง ซึ่งทำให้เซลโลไบโอส (cellobiose) สะสมมากขึ้น การสะสมของเซลโลไบโอสสามารถนำไปใช้ในกระบวนการผลิตพรีไบโอติกหรือการผลิตชีวมวลที่มีมูลค่าสูง (Witte et al., 2011)



ภาพที่ 7 โครงสร้างของกลูโคสและสารยับยั้งการทำงานของเบต้ากลูโคซิเดส

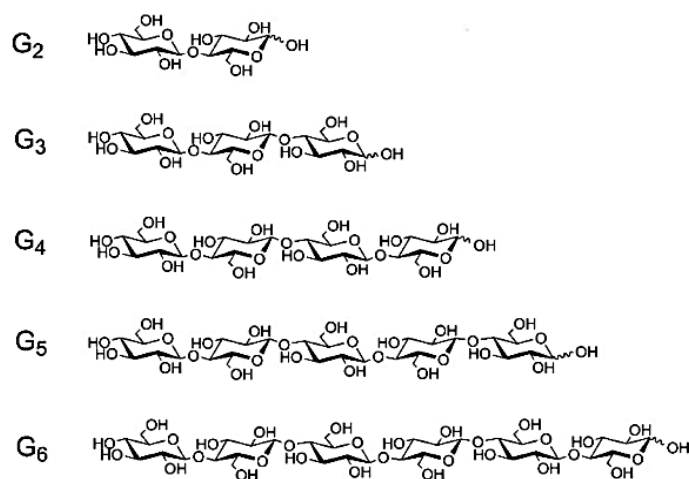
ที่มา : Karnaouri (2019)

นอกจากนี้ β -glucosidase ยังส่งผลให้เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์มีปริมาณที่น้อยลงเพราะ เอนไซม์ชนิดนี้จะไฮโดรไลซิสเซลโลโบโอสให้ได้เป็นกลูโคสสูง ดังนั้นการกำจัดหรือลดกิจกรรมของ เอนไซม์ผสมจะทำให้ปริมาณโอลิโกแซคคาไรด์มีค่า DP สูง ซึ่งจากการศึกษาของ Chu et al. (2014) การเลือกกำจัดกิจกรรมของ β -glucosidase ในระหว่างการไฮโดรไลซิสซึ่งข้าวโพด พบว่าการผลิต เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าหลังจากการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ จาก 0.15 กรัม เป็น 0.25 กรัม ซึ่งสอดคล้องกับความเข้มข้นสุดท้ายคือ 7.6 กรัมต่อลิตร และ 12.6 กรัมต่อลิตร

เมื่อไม่นานมานี้ได้มีการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส โพรเซสทีฟเอนโดกลูคานาเนส และเอ็นไซม์เสริม เช่น lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs) (Barbosa, 2020; Karnaouri et al., 2019; Karnaouri et al., 2018) ซึ่ง LPMOs ทำหน้าที่ร่วมกับเอนโดกลูคาเนสโดยทำหน้าที่ปลดปล่อยน้ำตาลออกซิไดซ์และ น้ำตาลทั่วไป โดย เอนโดกลูคาเนสจะเริ่มต้นด้วยทำลายพันธะเบต้า-1,4-ไกลโคซิดิก (β -1,4-glycosidic bond) ซึ่งทำให้เกิดเอนโดกลูแคน (endoglucan) ที่มีขนาดย่อยลง โดยไม่เกิดการตัดขาดที่ส่วนของเซลลูโลสด้านข้าง จากนั้น LPMOs จะทำหน้าที่ในการเข้าถึงเซลลูโลสที่มีการตัดขาดในส่วนกลาง และเพิ่มออกซิเจนเข้าไป ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการตัดขาดอย่างอื่นที่ช่วยให้เซลลูโลสย่อยสลายได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Barbosa, 2020; Fushinobu, 2014) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับ แต่ LPMOs สามารถช่วยในกระบวนการย่อยสลายเซลลูโลส โดยมีผลโดยตรงกับการลดความเป็นผลึกของเซลลูโลสในบางกรณี โดย LPMOs จะเข้ามาทำงานโดยการเพิ่มออกซิเจนเข้าไปในโมเนียมเอนโดไซลูโลส ซึ่งจะทำให้เกิดการตัดขาดและการย่อยสลายซึ่งเป็นผลึกของโมเนียมเอนโดไซลูโลสเกิดขึ้น โดยทำให้โมเนียมเอนโดไซลูโลสแยกออกเป็นส่วนย่อยๆ และเกิดการลดความเป็นผลึกของเซลลูโลสในขบวนการนี้ การลดความเป็นผลึกของเซลลูโลสนี้อาจมีผลต่อความสามารถในการย่อยสลายของเซลลูโลสในขั้นตอนถัดไป และทำให้สารชีวมวลสามารถย่อยสลายได้ง่ายขึ้น (Barbosa, 2020; Selig et al., 2015; Vermaas et al., 2015)

คุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติก

เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์มีความสำคัญและมีศักยภาพสูงในการใช้งานในกลุ่มอุตสาหกรรมที่หลากหลายเช่น ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา เครื่องสำอาง และเคมี ตลอดจนในการผลิตอาหารสัตว์ พลังงานชีวภาพ และอื่นๆ เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์มีคุณสมบัติในการดูดซับน้ำมันได้ดี highly fluid powders มีความทนต่อแรงอัดและทนต่อความร้อนได้ดี คุณสมบัติและการใช้งานของเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่จะกล่าวต่อไปนี้จะ เป็นเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ในรูปผสมที่มีโอลิโกเมอร์ที่มีหน่วยกลูโคส 2 ถึง 6 หน่วย ดังภาพที่ 8



ภาพที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของเซลโล-โอลิโกแซคคาไรด์แต่ละประเภท G2: Cellobiose
G3: Cellotriose, G4: Cellotetraose, G5: Cellopentaose, G6: Cellohexaose
ที่มา : (Chen et al., 2021)

คุณสมบัติที่สำคัญของเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่สำคัญคือ การเป็นพรีไบโอติกโดยเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อโปรไบโอติกได้ดี ได้แก่ แบคทีเรีย *Bifidobacterium sp.* และ *Lactobacillus sp.* (Jiao et al., 2014) อีกทั้งยังสามารถทนต่อการย่อยของกระบวนการย่อยของร่างกายตั้งแต่ระยะเริ่มต้นของการย่อยจนถึงลำไส้ใหญ่ ซึ่งความเสียหายมีน้อยมากจึงสามารถทำหน้าที่เป็นสารอาหารสำหรับจุลินทรีย์ในลำไส้ที่เป็นประโยชน์ในลำไส้ โดยการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เหล่านี้จะส่งเสริมการผลิตกรดไขมันสายสั้น (SCFAs) เช่น อะซิเตท โพรไพโอเนต และบิวทีเรต ซึ่งนำประโยชน์มากมายมาสู่ตัวโฮสต์ที่รับประทาน

Mano et al. (2018) เซลโลโอลลีโกแซคคาไรด์ยังมีบทบาทสำคัญในการต่อต้านการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค เช่น *Helicobacter pylori* แบคทีเรียที่สามารถต้านทาน pH ของกรดในกระเพาะอาหารได้ทำให้เกิดโรคกระเพาะและลำไส้อักเสบอย่างรุนแรง (Kluge et al., 2019) นอกจากนี้ยังมีการยับยั้งเชื้อโรคอื่นๆ เช่น แบคทีเรียในสกุล *Clostridium sp.* ที่สามารถทำให้เกิดความเสียหายต่อระบบทางเดินอาหารและอวัยวะอื่นๆ (Uyeno et al., 2013) และเมื่อรับประทานเข้าไปเซลโลโอลลีโกแซคคาไรด์ยังสามารถลดคอเลสเตอรอลรวมและความเข้มข้นของไขมันในตับ (Kluge et al., 2019) และยังสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคผิวหนัง เช่น *Staphylococcus sp.*, *Pseudomonas sp.* ได้เมื่อนำไปเป็นสารประกอบในเครื่องสำอาง

Zhong et al. (2020) เมื่อนำเซลโลโอลลีโกแซคคาไรด์ทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อโปรไบโอติกโดยเทียบกับอินนูลินพบว่าสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของ *Clostridium butyricum*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* และ *Lactobacillus rhamnosus* ได้ 4.1 เท่าเมื่อเทียบกับอินนูลิน แต่เชื้อ *Bifidobacterium sp.* นั้นมีผลน้อยกว่าอินนูลิน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลโลโอลลีโกแซคคาไรด์มีศักยภาพความเป็นโปรไบโอติก

โปรไบโอติก (Probiotic)

Fuller (1989) แม้ว่าจะมีการเสนอคำนิยามที่หลากหลายของโปรไบโอติก คำนิยามที่ถูกใช้กันอย่างแพร่หลาย มีความถูกต้องทางวิทยาศาสตร์ และเป็นที่ยอมรับมากที่สุด คือคำนิยามของ Fuller ซึ่งหมายถึง อาหารเสริมจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งส่งผลดีต่อสัตว์เจ้าบ้านโดยการปรับสมดุลจุลินทรีย์ในลำไส้ สำหรับการใช้งานในผู้ใหญ่ มักรวมถึงผลิตภัณฑ์นมหมักและผลิตภัณฑ์ที่มีแบคทีเรียที่ถูกแช่แข็งแห้ง จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องมักเป็นผู้ผลิตกรดแลคติก เช่น เชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ กลุ่ม *Lactobacillus spp.* เป็นแบคทีเรียที่เกาะติดลำไส้และ *Bifidobacterium spp.* เป็นแบคทีเรียที่ทนต่อกรดในกระเพาะอาหาร สามารถอยู่ในลำไส้ได้นาน เช่น *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus casei subsp.* และ *Lactococcus lactis* เป็นต้น

เชื้อยีสต์ เช่น *Saccharomyces boulardii* เป็นต้น

คุณสมบัติโปรไบโอติก

1. สามารถสร้างกรดแลคติก และปรับสภาพของระบบทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่แบคทีเรียก่อโรคเจริญได้ยาก
2. สามารถทนต่อการกรดในกระเพาะอาหารได้ดี
3. สามารถทนต่อน้ำดีได้เนื่องจากในทางเดินอาหารส่วนต้นโดยเฉพาะลำไส้เล็กจะมีเกลือ น้ำดีที่หลั่งออกมาย่อยอาหารจำพวกไขมัน
4. สามารถแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการยึดเกาะผนังลำไส้ ซึ่งการเคลือบของโปรไบโอติกในลำไส้ นั้นจะทำให้การย่อยและการดูดซึมเป็นไปตามปกติ
5. กระตุ้นภูมิคุ้มกันให้กับผู้บริโภคนำเชื้อโปรไบโอติก
6. สามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อก่อโรคได้
7. กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์
8. ลดการสังเคราะห์เอมีนที่เป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหาร
9. แย่งอาหารเชื้อก่อโรค
10. สร้างสารอาหารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย
11. ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด

พรีไบโอติก (Prebiotic)

รัตนอุบล (2552) องค์ประกอบของอาหารที่ไม่ถูกย่อยจากทางเดินอาหาร โดยทั่วไปแล้วนั้น พรีไบโอติกจะส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในทางเดินอาหาร และไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคที่ทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร อีกทั้งยังส่งเสริมสุขภาพแก่เจ้าบ้าน (host) ให้ดีขึ้น เช่นการช่วยดูดซึมแร่ธาตุ ป้องกันมะเร็งลำไส้ สารที่เป็นพรีไบโอติก เช่น เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ ไซโล-โอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งมีกลูโคส (Glucose), กาแลคโตส (Galactose) และฟรุคโตส (Fructose) รวมทั้ง เอ็น-อาเซทิลกลูโคซามีน (N-acetylglucosamine) เป็นองค์ประกอบ และยังมีอาหารที่จัดได้ว่าเป็น พรีไบโอติก ได้แก่ เห็ด, หัวหอม, หัวกระเทียม, กล้วย, ผลไม้ตระกูลเบอรี่, อาร์ติโชค (artichoke), ผักชิโครี (Chicory), ต้นหญ้า (dandelion greens), หน่อไม้ฝรั่ง, ต้นหอม, เมล็ดแฟลกซ์ (flax seed) และพืชตระกูลถั่ว (Legumes)

ชนิดของพรีไบโอติก

พรีไบโอติกที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและใช้ในทางการค้าอยู่ในกลุ่มของโอลิโกแซคคาไรด์ โดยส่วนใหญ่ที่ได้มาจากการสังเคราะห์ เช่น

กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Galacto-Oligosaccharides, GOS) เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบ มักพบในน้ำนมของมนุษย์ น้ำนมวัว โยเกิร์ต และสังเคราะห์มาจากกาแลคโตสด้วยเอนไซม์ β -galactosidase น้ำตาลที่ได้ออกมาจากการสังเคราะห์อยู่ในกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ที่เอนไซม์ในร่างกายมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ แต่เชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่สามารถย่อยได้ จึงได้เป็นกรดไขมันสายสั้น เช่น โพรพิโอเนต บิวไทเรต อะซิเตท นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อโปรไบโอติกได้ โดยจุลินทรีย์กลุ่มนี้ช่วยสังเคราะห์วิตามิน กระตุ้นภูมิคุ้มกันและป้องกันการเกิดท้องเสีย

ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructo-Oligosaccharides, FOS) และ อินนูลิน (Inulin) พบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในพืช แบคทีเรียและราบางชนิด ซึ่งอินนูลินมักพบในผักและผลไม้มากกว่า 3600 ชนิด อินนูลินไม่สามารถย่อยได้ในลำไส้เล็ก แต่บางส่วนจะถูกย่อยในลำไส้ใหญ่ โดย อินนูลินและฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์สามารถละลายน้ำได้ดีโดยเฉพาะน้ำร้อน แต่จะละลายได้เพียงเล็กน้อยในน้ำเย็นและแอลกอฮอล์ มีรสชาติดหวานเล็กน้อย จึงมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ

ซอเยบินโอลิโกแซคคาไรด์ (Soybean Oligosaccharides, SOS) เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่อยู่ในถั่วเหลืองซึ่งเป็นกลุ่ม แรฟฟิโนส และ สตาคีโอส สามารถทนต่อการย่อยโดยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก

การห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติก

เป็นการห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติกนั้นเป็นการป้องกันเซลล์จากสภาวะที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ของแบคทีเรีย วิธีการที่ได้รับความนิยมนั้นเช่นการทำ ไมโครเอนแคปซูล โดยการห่อหุ้มหรือการตรึงเซลล์แบคทีเรียที่ต้องการไว้ในวัสดุห่อหุ้ม สารที่นิยมใช้ห่อหุ้มเซลล์ เช่น calcium alginate, sodium alginate, carrageenan, cellulose acetate phthalate และ gelatin เป็นต้น ซึ่งในช่วงที่ผ่านมาได้มีนักวิจัยมากมายที่สนใจจะพัฒนาสูตรพรีไบโอติกเพื่อห่อหุ้มเชื้อโปรไบโอติกเพื่อป้องกันและรักษาเชื้อให้อยู่รอดในระบบทางเดินอาหาร โดยสรุปได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การศึกษาการห่อหุ้มเชื้อโปรไบโอติกด้วยพรีไบโอติกแต่ละชนิด

ลำดับ	พรีไบโอติกหรือโปรไบโอติกที่ใช้	วิธีการ	ศักยภาพ	อ้างอิง
1	อินนูลิน	Emulsion filled gels	เพื่อลดปริมาณไขมันในอาหาร	(Paradiso et al., 2015)
2	<i>Lactobacillus salivarius</i> NRRL B-30514 เป็นโปรไบโอติกและเพกตินเป็นพรีไบโอติก	อิมัลชัน	เพื่อเพิ่มศักยภาพของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้ม	(Zhang et al., 2016)
3	แป้งมันฝรั่ง (PS), <i>Plantago psyllium</i> (PSY) และ อินนูลิน (IN) เป็นพรีไบโอติก และ <i>Lactobacillus casei</i> Shirota (Lc) และ <i>Lactobacillus plantarum</i> (Lp33 และ Lp17) เป็นโปรไบโอติก	ไมโครแคปซูล	เพื่อปกป้องแบคทีเรียที่ห่อหุ้มและเพิ่มการรอดชีวิต	(Peredo et al., 2016)
4	แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นโปรไบโอติกและเปลือก cactus pear เป็นพรีไบโอติก	ไมโครแคปซูล	เพื่อปกป้องแบคทีเรียที่ห่อหุ้มและเพิ่มควมมีชีวิต	(Serrano-Casas et al., 2017)
5	<i>Bacillus coagulans</i> เป็นโปรไบโอติกและเพกตินเป็นพรีไบโอติก	ไบโอนานोकอมโพสิต	เพื่อเพิ่มการป้องกันแบคทีเรียที่ห่อหุ้ม	(Khorasani & Shojaosadati, 2017)
6	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ในรูปโปรบิโทกและรำข้าว อินนูลิน และข้าวโพดเลี้ยงสัตว์สูงเป็นพรีไบโอติก	อนุภาคแอลจินต	เพื่อเพิ่มศักยภาพของแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ห่อหุ้ม	(Poletto et al., 2019)
7	<i>Enterococcus faecium</i> เป็นโปรไบโอติกและ อินนูลิน เป็นพรีไบโอติก	นาโนอิมัลชัน	เพื่อเพิ่มศักยภาพและป้องกันแบคทีเรียโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้ม	กฤติกาและปรีดา (2019)

บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เชื้อจุลินทรีย์
 - 1.1 *Lactobacillus plantarum*
 - 1.2 *Lactobacillus lactis*
 - 1.3 *Escherichia coli*
 - 1.4 *Salmonella* Typhimurium enterica
serovar Typhimurium TISTR292
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ
 - 2.1. Eosin Methylene Blue Agar Himedia, India
 - 2.2. De Man, Rogosa and Sharpe agar Himedia, India
 - 2.3. Salmonella-Shigella agar Himedia, India
3. สารเคมี
 - 3.1. Acitic acid ACL Labscan, Thailand
 - 3.2. Bromocresol purple QReC™, China
 - 3.3. Buthanol QReC™, China
 - 3.4. Conduritol-B-epoxide Sigma-Aldrich, USA
 - 3.5. Dinitrosalicyclic acid Loba, india
 - 3.6. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl scavenging capacity Kumar Carpets, india
 - 3.7. Ethanol ACL Labscan, Thailand
 - 3.8. Folin - Ciocalteu reagent Loba, india
 - 3.9. Hexane ACL Labscan, Thailand
 - 3.10. Hydrochoric QReC™, China
 - 3.11. Iron (III) chloride hexahydrate QReC™, China
 - 3.12. Methanol ACL Labscan, Thailand
 - 3.13. Phenol Fisher Chemical™, USA

3.14. Peptone water	Himedia™, india
3.15. Sodium acetate	Loba Chemie™, india
3.16. Sodium bicarbonate	Merck, Germany, Germany
3.17. Sodium chloride	ACL Labscan, Thailand
3.18. Sodium hydroxide	QReC™, China
3.19. Sodium chlorite	Loba Chemie™, india
3.20. Sulfuric acid	QReC™, China
3.21. 2,4,6-tripyridyl-5-triazine	Sigma-Aldrich, USA
3.22. กลูโคส (Glucose)	KEMAUS, Australia
3.23. เซลโลไตรโอส (Cellotriose)	Megazyme, Ireland
3.24. เซลโลเพนตะโอส (Cellopentaose)	Megazyme, Ireland
3.25. ผงวุ้น	
4. เอนไซม์	
4.1. เซลลูเลส 12,000 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Cellulase)	
4.2. เฮมิเซลลูเลส 1.5 หน่วยต่อกรัม (Hemicellulase)	Sigma-Aldrich , USA
5. อุปกรณ์	
5.1. กระบอกตวง	Vit-Lab, Germany
5.2. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)	TESCAN รุ่น VEGA3,
5.3. กระดาษวัดค่าพีเอช (pH 0-14)	MERCK, Germany
5.4. ขวดปรับปริมาตร	Duran, Germany
5.5. ขวดรูปชมพู่	Pyrex, USA
5.6. ขวดใส่สารเคมีที่มีฝาเกลียว	Duran, Germany
5.7. คิวเวทท์พลาสติก	Brand, Germany
5.8. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ	Hycon, USA
5.9. ช้อนตักสาร	Spatula
5.10. ตะแกรงวางหลอดทดลอง	Potamax
5.11. ตะเกียงแอลกอฮอล์	
5.12. ตู้ดูดควัน	EASY LAB© , Thailand

5.13. ตู้บ่มเชื้อจุลินทรีย์	Gallenkamp, UK
5.14. ตู้เขย่าควบคุมอุณหภูมิ	Wiggins, Germany
5.15. ตู้อบลมร้อน	WollenLab, Germany
5.16. ตู้เขี่ยเชื้อ	BIOBASE, China
5.17. ถังมือดีสโทรมีแป็ง	Sritrang, Thailand
5.18. เตากวนสารให้ความร้อน	IKA Heating, German
5.19. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	METTER TOLEDO, Switzerland
5.20. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	OHAUS, USA
5.21. เครื่องนับจำนวนแบบไม่มีฐาน	ACTION
5.22. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง	Thermo, USA
5.23. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง	Eutech Instruments, Singapore
5.24. เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Dry)	Ivollen lab
5.25. โกรงบดยาพร้อมที่ปิด	
5.26. แท่งแก้วคนสาร	
5.27. แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ	
5.28. ปีกเกอร์	PYREX®, USA
5.29. ผ้าขาวบาง	
5.30. ปากคิบบแตนเลสปลายตรงยาว	Mira, Germany
5.31. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อแรงดันไอน้ำ	Zealway รุ่น GR60 DF, China
5.32. หลอดทดลอง	PYREX®, USA
5.33. หลอดปั่นเหวี่ยง	SPLTM, Korea
5.34. หลอดไมโครเซนติฟิวก์พลาสติก	Axygen, USA
5.35. ไมโครปิเปต 20 – 200 ไมโครลิตร	MiniOne®, USA
5.36. ไมโครปิเปต 50 – 500 ไมโครลิตร	LUNA NANOTECH, USA
5.37. ไมโครปิเปต 100 -1000 ไมโครลิตร	LUNA NANOTECH, USA

5.38. ไมโครปิเปตทิป 2 ไมโครลิตร	Hycon, USA
5.39. ไมโครปิเปตทิป 200 ไมโครลิตร	Hycon, USA
5.40. ไมโครปิเปตทิป 500 ไมโครลิตร	Hycon, USA
5.41. ไมโครปิเปตทิป 1000 ไมโครลิตร	Hycon, USA
5.42. Laboratory Sealing Film	Merck, Germany
5.43. Fourier Transform Infrared Spectrometer	PerkinElmer, England
5.44. TLC Aluminium sheet	Parafilm-M, USA
5.45. Vortex	Scientific Industries, USA



1. การเตรียม Cellulose

1.1 การเตรียมผงลำไยผลอ่อนสายพันธุ์อีดอ

ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของลำไยผลอ่อนในขั้นแรกได้ทำการเตรียมผงของลำไยผลอ่อน ซึ่งทำการคัดขนาดของลำไยผลอ่อนโดยให้ขนาดใกล้เคียงกันอยู่ที่ 0.5 – 2.0 เซนติเมตร ซึ่งจะมีอายุหลังติดดอกอยู่ที่ 121 - 158 วัน นำลำไยผลอ่อนพันธุ์อีดอขนาดเฉลี่ย 1 – 2.0 เซนติเมตร ดังภาพที่ 9 มาอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดเป็นผงละเอียดแล้วนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในผงผลลำไยอ่อน นำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และ เถ้า ด้วยวิธีการ AOAC (White, 1957)



ภาพที่ 9 ลำไยผลอ่อนพันธุ์อีดอ ที่เก็บในช่วงอายุ 180 วัน

1.2 การศึกษาหาสภาวะการสกัดเซลลูโลสจากผงลำไยผลอ่อนพันธุ์อีดอ

ทำการสกัดเซลลูโลสจากลำไยผลอ่อนโดยนำผงลำไยอ่อนมาเติมสารละลาย NaOH ความเข้มข้นร้อยละ 4.0 และ 6.0 เพื่อทำการสกัดนำเซลลูโลสออกมาโดยใช้สัดส่วนสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อผงลำไยอ่อนที่ 70 ต่อ 30 และ 80 ต่อ 20 โดยเปรียบเทียบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเส้นใยที่สกัดได้ออกมาล้างด้วยน้ำร้อน นำไปกวนในเฮกเซนเป็นเวลา 10 นาทีและล้างเส้นใยด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 จากนั้นกรองเอาเส้นใยด้วยผ้าขาวบาง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นจนค่าความเป็นกรดต่าง มีค่าเท่ากับ 7.0 และนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวิเคราะห์เซลลูโลสเชิงคุณภาพด้วยวิธีการ Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR)

1.3 การฟอกสีเซลลูโลสที่สกัดได้จากลำไยผลอ่อนสายพันธุ์อีดอ

นำผงเซลลูโลสที่ได้จากการสกัดมาผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรท์ (Sodium Chlorite, NaClO_2) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในสัดส่วนเส้นใยเซลลูโลสต่อโซเดียมคลอไรท์ 1 ต่อ 50 (กรัมต่อมิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 90 – 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นกรองเส้นใยที่ฟอกแล้วด้วยผ้าขาวบาง ล้างเส้นใยเซลลูโลสด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 ตามด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำเส้นใยไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. การศึกษาสภาวะการเตรียม Cello-oligosaccharide (COS) ด้วยวิธีทางเอนไซม์

นำผงเซลลูโลสมา 1 กรัม ย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส 1.2 , 1.8, 2.4, 3 และ 3.6 unit ต่อกรัมเซลลูโลสหยาบ และเอนไซม์เฮมิเซลลูเลส(กรัมต่อกรัมเซลลูโลส) 0.15, 0.30, 0.45, 0.60 และ 0.75 unit ต่อกรัมเซลลูโลสหยาบ ใน Citrate-phosphate buffer (1 โมลาร์, pH 5.0) ปริมาณ 25 มิลลิลิตร บ่มเป็นเวลาทั้งหมด 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 130 รอบต่อ นาที โดยเก็บส่วนใสที่ 0, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมงนำตัวอย่างต้มในน้ำร้อน 5 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นนำเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยวิธีการ High-performance liquid chromatography (HPLC) วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-Sulfuric, วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS หาชนิดน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์เชิงคุณภาพด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC)

3. การศึกษาการยับยั้งเอนไซม์ β - glucosidase เพื่อลดการผลิตน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

เตรียมสารละลาย Conduritol-B-epoxide ความเข้มข้น ที่ 40.0 มิลลิโมลาร์ เป็นตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาการย่อยของเอนไซม์ β -glucosidase ดัดแปลงมาจาก Karnaouri et al. (2019) ในชุดการทดลองที่ได้จากข้อ 2 จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณและชนิดของ COS ด้วยวิธีการ High-performance liquid chromatography (HPLC), วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-Sulfuric, วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS ,หาน้ำตาลเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์เชิงคุณภาพด้วยวิธี Thin layer chromatography (TLC) ทำการเปรียบเทียบกับชุดทดลองที่ไม่ได้ใส่สารยับยั้ง

4. การห่อหุ้มจุลินทรีย์โปรไบโอติก

4.1 การเตรียมจุลินทรีย์

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ นำเชื้อ *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus lactis* เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ในสภาวะไร้อากาศ ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นเตรียมเซลล์ความเข้มข้นที่ 10^9 - 10^{10} CFU ต่อมิลลิตรใน Peptone water เพื่อใช้ศึกษาการห่อหุ้มเซลล์ต่อไป

4.2 การศึกษาความเข้มข้นของ COS ที่เหมาะสมต่อการเหลือรอดของเชื้อโปรไบโอติกหลังจาก Freeze Dry

เตรียมสารละลาย COS ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1.0, 3.0 และ 5.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นนำสารละลายเหล่านี้มาเปรียบเทียบกับสารละลายน้ำตาลอินนูลินและน้ำตาลกลูโคส ที่ความเข้มข้นเดียวกัน เพื่อศึกษาประสิทธิภาพและคุณสมบัติของการห่อหุ้มในแต่ละความเข้มข้น น้ำตาลทั้งสามชนิดถูกละลายในผสมใน Peptone water ความเข้มข้นร้อยละ 1 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำเซลล์โปรไบโอติกที่เตรียมไว้มาผสมให้เข้ากัน โดยให้ปริมาณเซลล์เท่ากับ 10^9 - 10^{10} CFU ต่อมิลลิตร โดยเปรียบเทียบกับน้ำตาล อินนูลิน และน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 จากนั้นนำไปทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Dry) นำผลิตภัณฑ์เก็บไว้ในที่แห้งและเย็น ศึกษาลักษณะและคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก ดังนี้ นำตัวอย่างเซลล์โปรไบโอติกที่ห่อหุ้มด้วยเซลล์โพลิโกลิโกแซคคาไรต์ไปศึกษาลักษณะ สัณฐานวิทยาของเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)

5. การศึกษาจำนวนเซลล์โปรไบโอติกที่เหลือรอดจากการทำแห้งแบบ Freeze dry

นำตัวอย่างเซลล์โปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยน้ำตาล COS อินนูลิน และกลูโคส 1 กรัม สารละลายใน NaCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MRS ด้วย วิธีการเกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Spread plate) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ที่เหลือรอด โดยเทียบกับจำนวนเซลล์ก่อนทำแห้ง

6. ทดสอบคุณสมบัติบางประการของความเป็นโปรไบโอติก

การทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อโปรไบโอติกด้วยวิธีการ Mixed culture ในอาหาร Basal medium โดยเตรียมเซลล์โอลิโกแซคคาไรด์ในอัตราส่วนร้อยละ 5 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติก *Lactobacillus lactis* และ *Lactobacillus lactis* ปริมาณ 10^7 CFU และเชื้อก่อโรค *Escherichia coli* และ *Salmonella Typhimurium enterica serovar Typhimurium* TISTR292 ปริมาณ 10^7 CFU โดยทำการนับเชื้อบนอาหาร selective medium ของเชื้อแต่ละชนิด ได้แก่ MRS agar (*Lactobacillus* MRS Broth) สำหรับเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก SS agar (*Salmonella Shigella* Agar) และ EMB agar , Levine (Eosin Methylene Blue Agar) สำหรับเชื้อก่อโรค

7. การเหลือรอดของเชื้อโปรไบโอติก หลังจากการย่อยในระบบทางเดินอาหารจำลอง ดัดแปลงจาก (Li et al., 2019)

นำผงเชื้อโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วยน้ำตาล COS อินนูลิน และกลูโคส ด้วยวิธี Freeze Dry ผสมกับ simulated saliva solution 2 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 1.0 M HCl เพื่อปรับค่าความเป็นกรดต่าง ให้เท่ากับ 1.5 จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้ผสมกับ simulated gastric solution 15 มิลลิลิตรจากนั้นนำไปบ่มและเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นปรับ ค่าความเป็นกรดต่าง ให้เป็นกลาง ด้วย 0.1M NaHCO_3 แล้วเติม Intestinal juice นำไปบ่มและเขย่าที่ 120 รอบต่อนาที ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 ชั่วโมง นับจุลินทรีย์ที่เหลือรอดในระหว่างการทำปฏิกิริยาในแต่ละส่วนของทางเดินอาหารมาศึกษาการรอดชีวิตเชื้อโปรไบโอติก

8. การหาวิเคราะห์เชิงปริมาณ และเชิงคุณภาพของโอลิโกแซคคาไรด์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟี

นำผงเซลล์โอลิโกแซคคาไรด์ ที่ได้มากรองหาผ่านเมมเบรนฟิวเตอร์ขนาด 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นนำตัวอย่างสารละลายและสารมาตรฐาน มาวิเคราะห์ ด้วยเทคนิค High Performance High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ BIO-RAD Aminex HPX-87H Made in USA ขนาดคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร [ID]x300มิลลิเมตร [L] ตัวตรวจวัดคือ RI Detector Hitachi Chromaster 5450 ที่สภาวะอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เฟสเคลื่อนที่คือ กรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ต่อน้ำปราศจากไอออน ที่สัดส่วน 70 ต่อ 30 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

อัตราไหลเท่ากับ 0.75 มิลลิลิตรต่อนาทีโดยเปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน กลูโคส เซลโลไตรโอส และ เซลโลเพนตะโอส

9. การวิเคราะห์หาเซลลูโลสจากลำไยผลอ่อนเชิงคุณภาพด้วยวิธีการ Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR)

เตรียมตัวอย่างเซลลูโลสที่สกัดได้จากลำไยผลอ่อนโดยการบดให้ละเอียด และนำตัวอย่างเซลลูโลส 2 มิลลิกรัม ผสมกับ โปแทสเซียมโบรไมด์ 200 มิลลิกรัม ตัวอย่างเซลลูโลสถูกอัดในอุปกรณ์ไว้ตัวอย่างโดยใช้แรงดัน 98 kN/cm² จากนั้นทำการวิเคราะห์ด้วยสภาวะสูญญากาศ และแรงดัน 1.3 x 10⁻² ปาสคาล เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้เครื่อง Fourier Transform Infrared Spectrometer (PerkinElmer model Spectrum RX I, PerkinElmer, England) แล้วทำการบันทึกสเปกตรัมอินฟราเรด ในช่วง 4000-400 cm⁻¹



วิธีวิเคราะห์

การวิเคราะห์ Cellulose, hemicellulose และ lignin

นำผงตัวอย่างผงลำไยแห้งมาหาปริมาณ neutral detergent fiber (NDF) ปริมาณ acid detergent fiber (ADF) ปริมาณ permanganate lignin (PML) เพื่อคำนวณหาปริมาณ cellulose, hemicellulose และ ลิกนิน ในตัวอย่าง

ความชื้น

นำผงลำไย ชั่งลงไปในภาชนะที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน 5.0000 กรัม นำไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส นำไปอบและนำมาชั่งน้ำหนักหลังอบจนค่าน้ำหนักของตัวอย่างคงที่ นำออกจากตู้อบแล้วนำไปไว้ในโถดูดความชื้นจนตัวอย่างมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาความชื้น

วิธีการคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนและหลังอบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักของตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

เถ้า

เตรียมผงลำไย 2.0000 กรัม ใส่ในถ้วยเถ้าที่ทราบน้ำหนัก 550 องศาเซลเซียสนาน 12-18 ชั่วโมง นำถ้วยเถ้าออกจากเตาเผา ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งหาน้ำหนักเถ้าที่ได้

วิธีการคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า(ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา(กรัม)}}{\text{น้ำหนักของตัวอย่างเริ่มต้น(กรัม)}} \times 100$$

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ขั้นตอนในการวิจัยและผลการทดลองทำทั้งหมด 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของความเข้มข้นของไซเตียมไฮดรอกไซด์ สัดส่วนของผงลำไยอ่อนต่อปริมาณไซเตียมไฮดรอกไซด์ในการผลิตเซลลูโลส ปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการผลิตเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ ที่ระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์

องค์ประกอบของลำไยผลอ่อน

เมื่อนำผลลำไยผลอ่อนมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพบว่าประกอบด้วยเซลลูโลส ร้อยละ 12.82 ± 0.11 เฮมิเซลลูโลสร้อยละ 10.76 ± 0.11 ลิกนินร้อยละ 11.86 ± 0.00 และเถ้าร้อยละ 2.79 ± 0.00 ดังที่แสดงในตารางที่ 3 เนื่องจาก ในลำไยนั้นเซลลูโลสเป็นส่วนสำคัญของเซลล์พืชและเป็นส่วนหนึ่งของชีวมวลลิกโนเซลลูโลส ซึ่งประกอบด้วยองค์ประกอบต่างๆที่มีบทบาทสำคัญต่อโครงสร้างและการทำงานของพืช นอกจากเซลลูโลสแล้วยังมีเฮมิเซลลูโลสและลิกนินซึ่งเป็นสารประกอบที่เสริมความแข็งแรงของโครงสร้างพืชเช่นกัน จากนั้นนำผลลำไยไปศึกษาการสกัดเซลลูโลสด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆและอุณหภูมิที่ต่างกัน

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบทางเคมีของลำไยผลอ่อนอบแห้งพันธุ์อีดอ

องค์ประกอบทางเคมี	ปริมาณ (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง)
เซลลูโลส (Cellulose)	12.82 ± 0.11
เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose)	10.76 ± 0.11
ลิกนิน (Lignin)	11.86 ± 0.00
เถ้า (Ash)	2.79 ± 0.00

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 2 ซ้ำ \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การศึกษาหาสภาวะสกัดเซลลูโลส Cellulose

ในการศึกษาสภาวะการสกัดเซลลูโลสหายาบจากลำไยผลอ่อน โดยเปรียบเทียบสัดส่วนระหว่างลำไยผลอ่อนและโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ และอุณหภูมิในการสกัด พบว่าที่สัดส่วน 70 ต่อ 30 มิลลิลิตรต่อกรัม (โซเดียมไฮดรอกไซด์และผลลำไยอ่อน) ที่ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 6.0 สกัดที่อุณหภูมิห้อง พบเซลลูโลสหายาบที่เหลือที่ร้อยละ 46.96 ± 0.85 และการสกัดที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่สัดส่วน 70 ต่อ 30 (โซเดียมไฮดรอกไซด์และผลลำไยอ่อน) ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ร้อยละ 4.0 พบปริมาณเซลลูโลสหายาบร้อยละ 47.07 ± 1.19 ทั้งสองสภาวะพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์เพิ่มขึ้นพบว่าปริมาณเซลลูโลสหายาบลดลงเนื่องจากการปฏิกิริยาของ

โซเดียมไฮดรอกไซด์ ในการย่อยเซลลูโลสร่วมกับความร้อนเกี่ยวข้องกับกระบวนการที่เรียกว่าการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) การใช้ความร้อนเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการนี้ช่วยให้เกิดการละลายของเซลลูโลสได้อย่างมีประสิทธิภาพและรวดเร็วมากยิ่งขึ้น และเป็นการช่วยในกระบวนการการย่อยให้สารตั้งต้นออกมาได้อย่างมากที่สุด (ปานทอง, 2557) นำไปสู่กระบวนการแตกตัวของเซลลูโลสเป็นกลุ่มขององค์ประกอบที่เรียกว่า hydroxyl groups และ โพลีเมอร์ (polymers) ที่มีขนาดเล็กลงดังที่แสดงในตารางที่ 4 เซลลูโลสหยาบที่ได้จากการลำไยผลอ่อนยังคงมีสีน้ำตาลเข้มจึงนำไปฟอกสีด้วยโซเดียมคลอไรท์ร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสพบว่าผงเซลลูโลสหยาบมีสีที่สว่างขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับผงเซลลูโลสหยาบก่อนการฟอกสี การที่เซลลูโลสมีสีสว่างมากขึ้นนี้เนื่องจากโซเดียมคลอไรท์ (Sodium chlorite) มีสารที่เรียกว่าไฮโปคลอไรต์ (hypochlorite ion: OCl^-) ซึ่งมีความสามารถในการออกซิเดชัน (oxidation) สารประกอบอินทรีย์ที่เป็นส่วนหนึ่งของสีที่ต้องการฟอกออกจากเซลลูโลส โดยปฏิกิริยาออกซิเดชันนี้จะทำลายสารประกอบอินทรีย์ที่ทำให้เกิดสี ส่งผลให้สีของเซลลูโลสมีสีที่สว่างมากขึ้น (Abdel-Halim, 2014) แสดงดังภาพที่ 10 เมื่อนำผงเซลลูโลสหยาบไปวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (Fourier transform Infrared (FTIR) Spectroscopy) พบว่าในทุกๆ สภาวะของการสกัดเซลลูโลสหยาบจากลำไยผลอ่อนพบการดูดกลืนแสงช่วงที่ $4,000$ ถึง $2,995\text{ cm}^{-1}$ ซึ่งแสดงถึง O-H stretching ของหมู่ OH การดูดกลืนแสงช่วงที่ $1,170$ ถึง $1,082\text{ cm}^{-1}$ แสดง C = O stretching ซึ่งเป็นหมู่คาร์บอนิล และการดูดกลืนแสงที่ $2,890\text{ cm}^{-1}$ แสดง CH_2 bending ในโมเลกุลของเซลลูโลส แต่ยังคงพบค่าการดูดกลืนแสงช่วงที่ $1,765$ ถึง $1,715\text{ cm}^{-1}$ แสดงถึง C = O Ketone และ Carbonyl ในโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลส ค่าการดูดกลืนแสงที่ $1,632\text{ cm}^{-1}$ แสดงถึง C = O วงแหวนเบนซีน และ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 780 cm^{-1} แสดงถึง C-H แสดงถึง Aromatic Hydrogen ในโมเลกุลของลิกนิน (Yang et al., 2007) แสดงให้เห็นว่ายังคงมีลิกนินและเฮมิเซลลูโลสที่เหลืออยู่ในผงเซลลูโลสหยาบที่สกัดจากลำไยผลอ่อน ซึ่งอาจส่งผลให้ค่าการดูดกลืนแสงที่เกี่ยวข้องกับลิกนินยังคงปรากฏอยู่ เมื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีพบว่าปริมาณเซลลูโลสร้อยละ 42.44 ± 0.09 โดยมีเฮมิเซลลูโลสร้อยละ 15.44 ± 0.21 และลิกนินร้อยละ 0.88 ± 0.11 แสดงดังภาพที่ 11 ซึ่งให้เห็นว่าการสกัดเซลลูโลสจากลำไยผลอ่อนด้วยวิธีทางเคมีและนำไปฟอกสีด้วยโซเดียมคลอไรท์นั้นยังคงมีปริมาณลิกนินหลงเหลืออยู่ทั้งนี้จะยังคงนำวิธีดังกล่าวไปปรับปรุงและพัฒนากระบวนการสกัดในอนาคตเพื่อลดปริมาณของสารลิกนินที่เหลืออยู่ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย

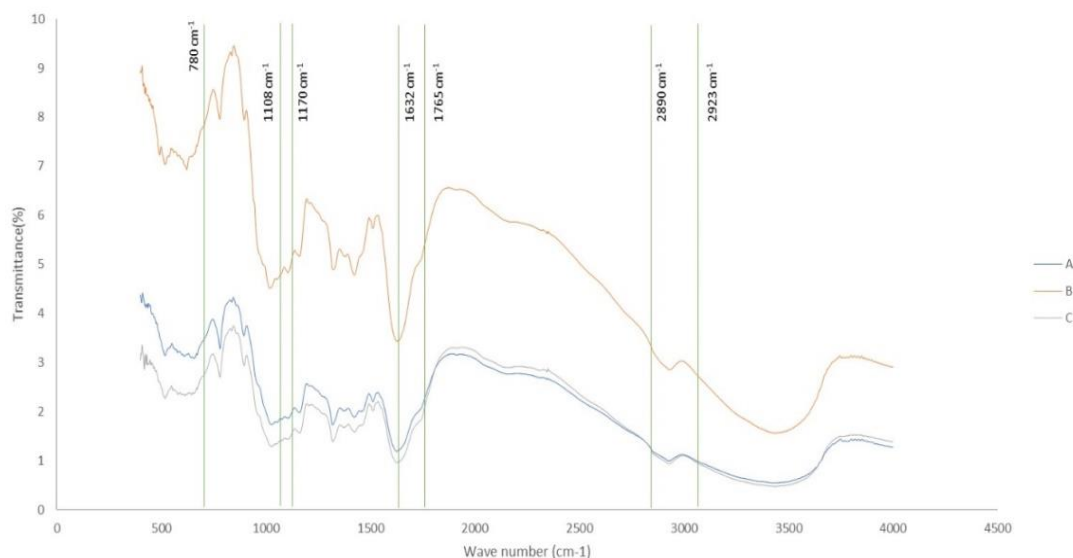
ตารางที่ 4 ปริมาณผงของเซลลูโลสที่ยาบที่สกัดจากลำไยผลอ่อนด้วยวิธีทางเคมี

Ratio (NaOH : young raw longan powder)	% Yield of crude cellulose			
	30 °C		121 °C	
	4.0% NaOH	6.0% NaOH	4.0% NaOH	6.0% NaOH
70 : 30	42.07±0.21 ^{ab}	46.96±0.85 ^a	47.07±1.19 ^a	38.60±0.32 ^{ab}
80 : 20	45.18±0.36 ^a	42.76±0.32 ^a	33.62±0.38 ^{ab}	26.45±0.00 ^b

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
ตัวอักษร a,b หมายถึงมีค่าแตกต่าง/ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)



ภาพที่ 10 ผงเซลลูโลสที่ยาบจากลำไยผลอ่อน ก่อนฟอกด้วยโซเดียมคลอไรด์ (A)
และหลังจากฟอกด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 (B)



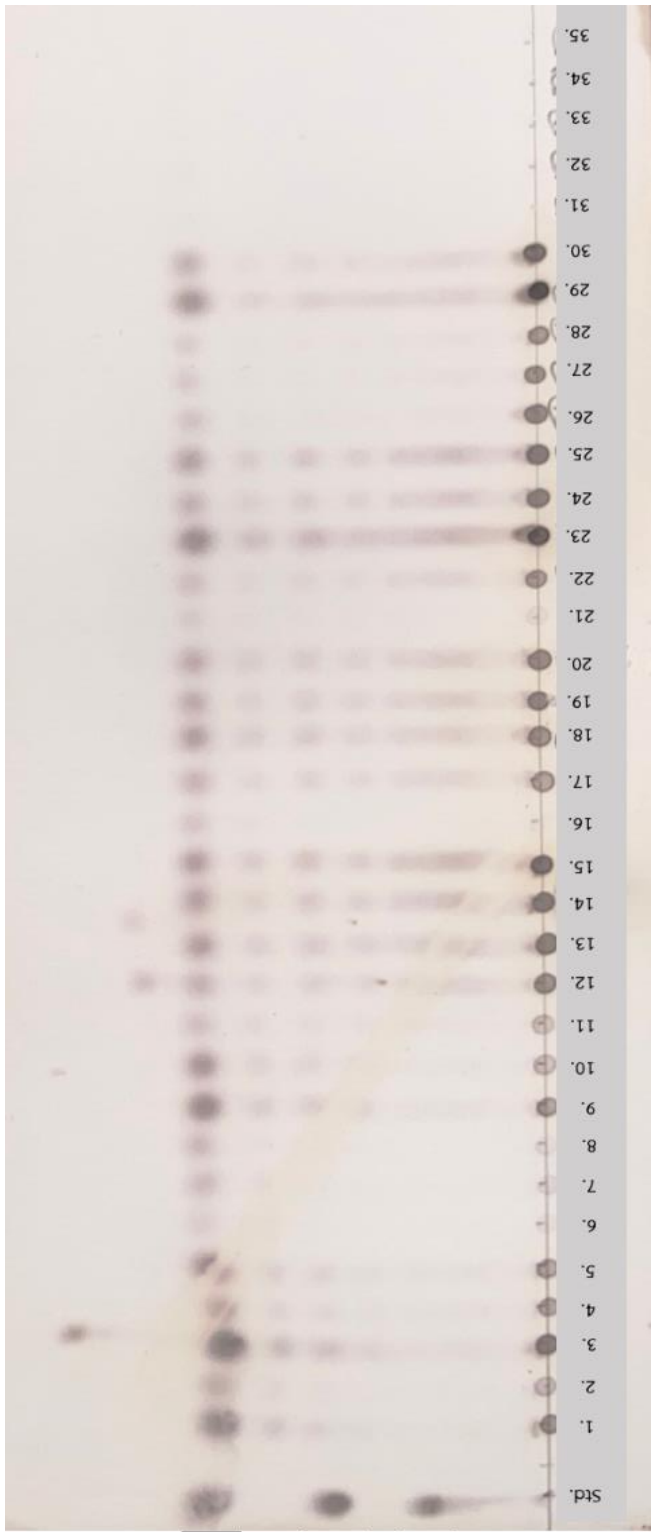
ภาพที่ 11 สเปกตรัม FTIR เซลลูโลสหยาบที่ได้จากการสกัดจากลำไยผลอ่อนด้วยวิธีทางเคมีในสภาวะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สัดส่วน 70 ต่อ 30 ที่ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 6 (A) , อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สัดส่วน 80 ต่อ 20 ที่ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 6 (B) และ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส สัดส่วน 70 ต่อ 30 ที่ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 4 หลังจากฟอกสีด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 (C)

การศึกษาสภาวะในการผลิตเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์

นำผงเซลลูโลสหยาบที่ได้การศึกษาสภาวะการสกัดเซลลูโลส ศึกษาสภาวะการผลิตเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์โดยศึกษาสัดส่วนปริมาณที่ต่างกันของเอนไซม์เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง โดยได้วิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง (Thin layer chromatography, TLC) พบว่าในทุกๆ สัดส่วนพบปริมาณของน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลเซลโลไตรโอส และยังคงพบน้ำตาลชนิดอื่น ซึ่งคาดว่าเป็นน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ แต่ยังคงมีปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเกิดขึ้นอยู่โดยสังเกตจากการเกิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่แสดงในภาพที่ 12 และเมื่อวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลด้วยวิธี Phenol-Sulfuric พบว่าในสัดส่วนเซลลูเลส 2.4 Unit ต่อเซลลูโลสหยาบ 1 กรัม ต่อ เฮมิเซลลูเลส 0.75 Unit ต่อเซลลูโลสหยาบ 1 กรัม ที่ 24 ชั่วโมง พบปริมาณน้ำตาลทั้งหมดอยู่ที่ 134.44 มิลลิกรัมต่อกรัมมิลลิลิตร มีน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ที่ 32.39 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในสัดส่วนเซลลูเลส 3.6 Unit ต่อเซลลูโลสหยาบ 1 กรัม ต่อ เฮมิเซลลูเลส 0.60 Unit ต่อเซลลูโลสหยาบ 1 กรัม ที่ 24 ชั่วโมงปริมาณน้ำตาลทั้งหมดอยู่ที่ 278.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ที่ 36.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นสัดส่วนที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดเมื่อเทียบกับส่วนอื่น ในการศึกษาหาน้ำตาลเชิงคุณภาพในสัดส่วนต่างๆ จึงเลือกสัดส่วนที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ด้วย HPLC พบว่า

ที่ 3 ชั่วโมงพบปริมาณน้ำตาลเซลโลไตรโอส ที่ 0.63 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นเวลาในการผลิตเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้มากที่สุด อีกทั้งยังคงพบน้ำตาลชนิดอื่นซึ่งคาดว่าเป็นน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดเซลโลไบโอส หรือโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดอื่น ทั้งนี้ไม่พบการเกิดน้ำตาลเซลโลเพนตะโอส ดังที่แสดงในภาพที่ 13 จะเห็นได้ว่าพบการเกิดน้ำตาลเซลโลไตรโอส มีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จากชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 12 ในขณะเดียวกันปริมาณของน้ำตาลกลูโคสก็เพิ่มขึ้นเมื่อถึงชั่วโมงที่ 24 พบว่าปริมาณของน้ำตาลเซลโลไตรโอสมีการลดลง และน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้นมากขึ้น จะเห็นได้ว่าการผลิตเซลโลไตรโอสควรใช้เวลาไม่เกิน 12 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการเกิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมากเกินไปในผลิตภัณฑ์สุดท้าย

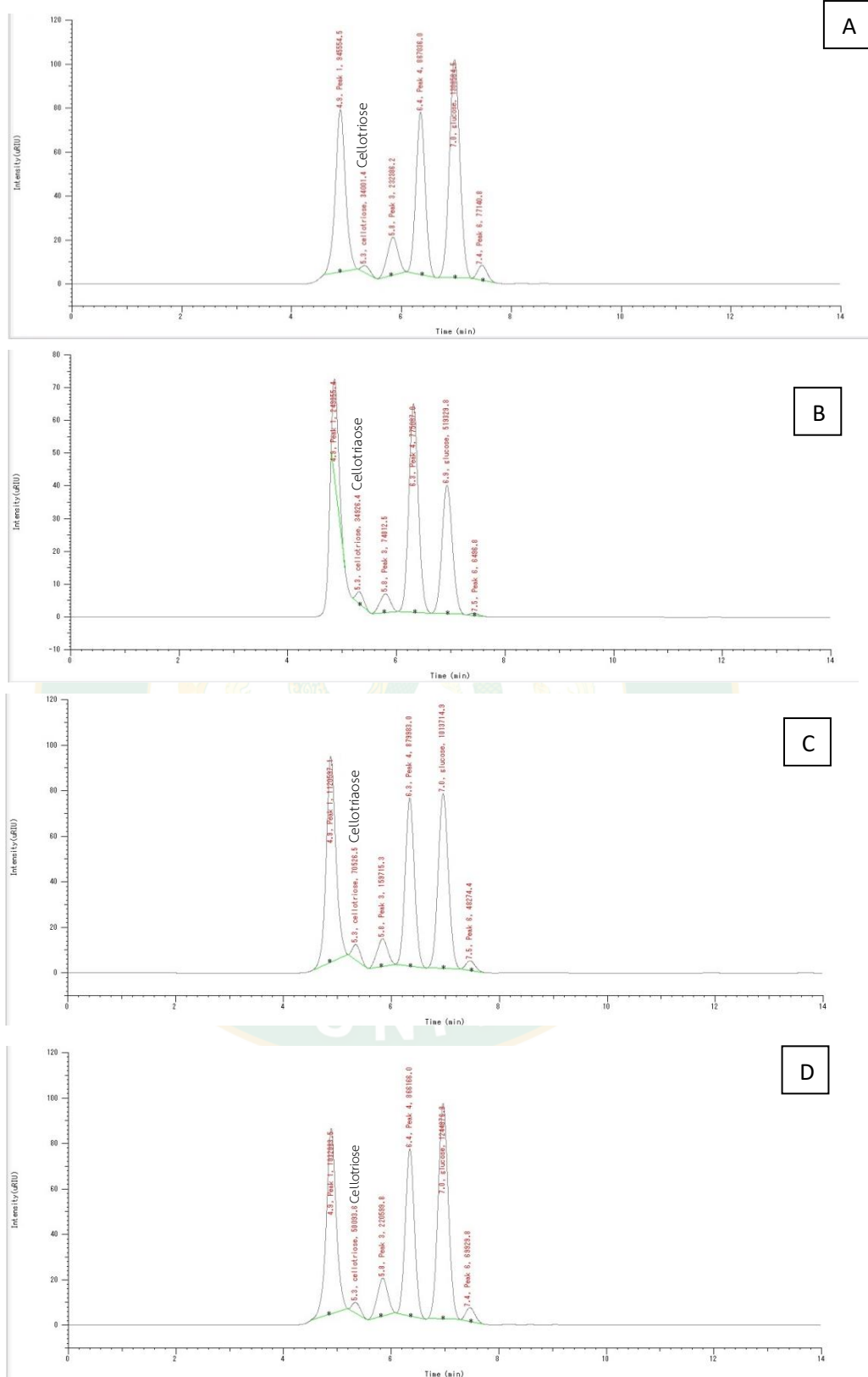




ภาพที่ 12 ผลการวิเคราะห์หาเซลล์โลโลไกแซคคาไรด์เชิงคุณภาพด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง ชั่วโมงที่ 3 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
Cellulase	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	3.6	1.2	1.8	2.4	3.0	3.6	-	-	-	-	-
Hemicellulase	0.15	0.30	0.45	0.60	0.75	1.15	1.30	1.45	1.60	1.80	2.40	2.40	2.40	2.40	2.40	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	3.60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

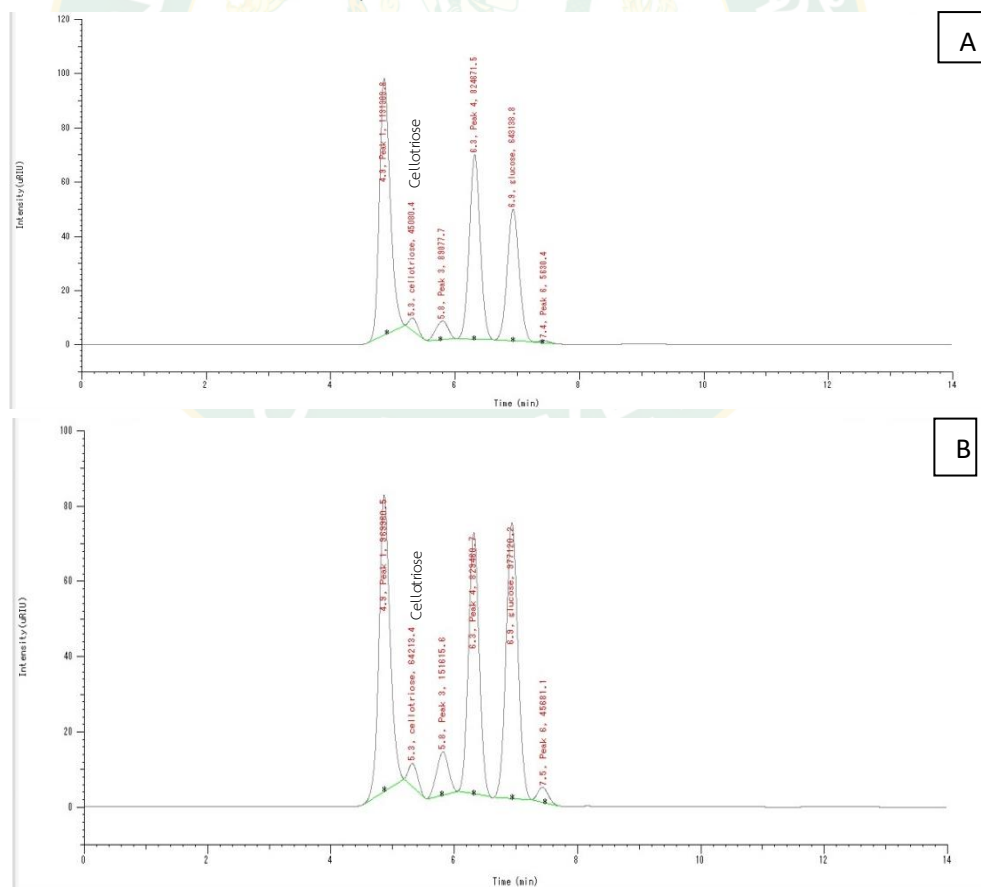
หมายเหตุ เซลลูเลส (Unit ต่อกรัมเซลลูโลส) และ เฮมิเซลลูเลส (Unit ต่อกรัมเซลลูโลส)



ภาพที่ 13 HPLC โครมาโตแกรมของน้ำตาลเซลโลลิโกลิโกลูโคสที่ชั่วโมงที่ 0 (A), ชั่วโมงที่ 3 (B), ชั่วโมงที่ 6 (C) และ ชั่วโมงที่ 12 (D)

วิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ β - glucosidase เพื่อลดการผลิตน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

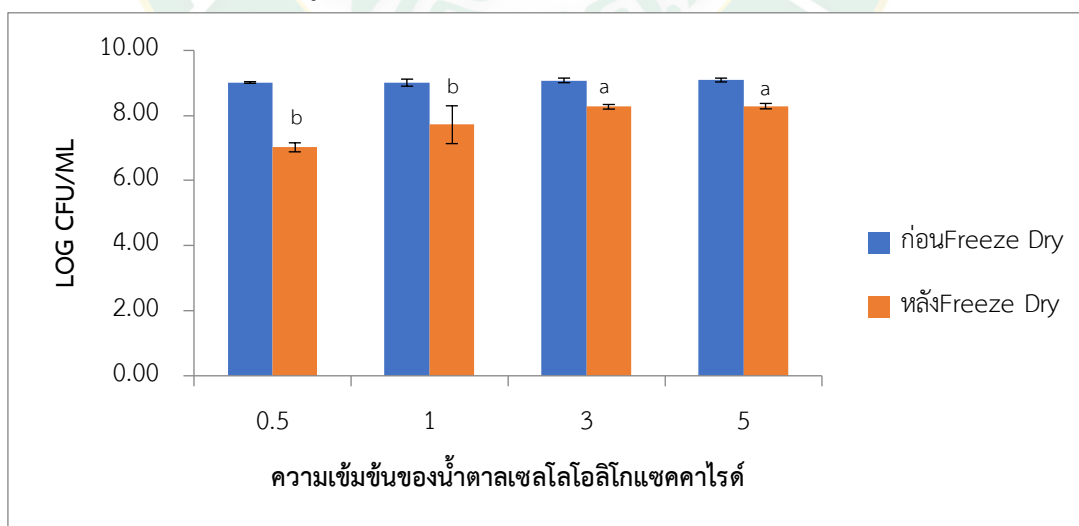
เนื่องจากการผลิตเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ยังคงเกิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ค่อนข้างสูงทำให้ปริมาณผลิตภัณฑ์มีปริมาณลดลง ดังนั้นจึงศึกษาการยับยั้งการเกิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวโดยใช้สาร Conduritol- β -epoxide ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของ β - glucosidase จากการศึกษาการยับยั้งพบว่ายังคงเกิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเกิดขึ้น ซึ่งจะเห็นได้ว่าที่ 12 ชั่วโมงปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมีปริมาณอยู่ที่ 10.21 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับที่ 0 ชั่วโมงมีปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอยู่ที่ 6.72 กรัมต่อลิตร แต่ยังคงเกิดการผลิตน้ำตาลเซลโลไตรโอสอยู่ที่ 0.57 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับ ชั่วโมงที่ 0 มีปริมาณน้ำตาลเซลโลไตรโอสอยู่ที่ 0.40 กรัมต่อลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสาร Conduritol- β -epoxide อาจจะไม่มีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α -glucosidase อย่างชัดเจนหรือมีการยับยั้งเกิดขึ้นน้อย นอกจากนี้ ความเข้มข้นและเวลาในการทำปฏิกิริยาอาจไม่เหมาะสมหรือไม่เพียงพอในการทำให้เกิดการยับยั้งอย่างชัดเจน อย่างเฉพาะเจาะจง นอกจากนี้ การศึกษาพบว่า Conduritol- β -epoxide มีความเข้มข้นและเวลาที่จำเป็นในการทำให้เกิดการยับยั้ง (Shou-jun et al., 1985; Stephens et al., 1981) ดังที่แสดงในภาพที่ 14



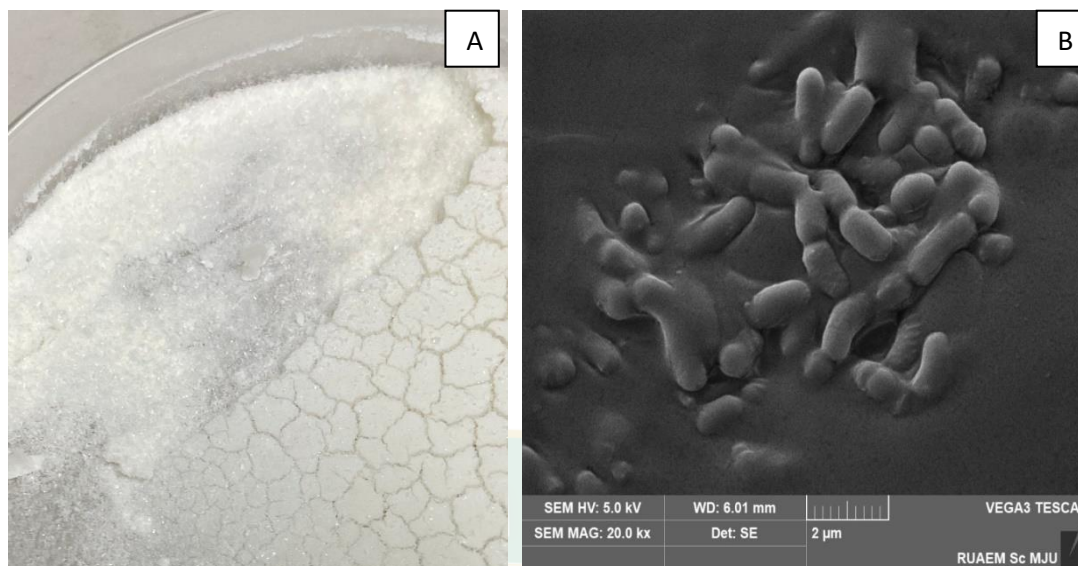
ภาพที่ 14 HPLC โครมาโตแกรมน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ ที่ศึกษาการยับยั้งการทำงานของ β - glucosidase ที่ทำให้เกิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในการผลิตเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ในชั่วโมงที่ 0 และชั่วโมงที่ 12

การศึกษาความเข้มข้นของ COS ที่เหมาะสมในการการห่อหุ้มเซลล์

ในการศึกษาความเข้มข้นในการห่อหุ้มเซลล์โปรไบโอติก ด้วยการผสมเชื้อโปรไบโอติกเข้ากับน้ำตาลเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่เตรียมได้ แล้วทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือก (Freeze Dry) ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้นของเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ร้อยละ 5 พบปริมาณเชื้อโปรไบโอติกเหลือรอดมากที่สุดอยู่ที่ 8.29 ± 0.08 log CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับความเข้มข้นของน้ำตาลเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ร้อยละ 3 ซึ่งมีเชื้อโปรไบโอติกเหลือรอด อยู่ที่ 8.27 ± 0.07 log CFU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่น โดยที่ความเข้มข้นของน้ำเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ร้อยละ 1 พบปริมาณเชื้อโปรไบโอติกเหลือรอดอยู่ที่ 7.72 ± 0.58 log CFU ต่อมิลลิลิตร และที่ความเข้มข้นของน้ำเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ร้อยละ 0.5 พบปริมาณเชื้อโปรไบโอติกเหลือรอดอยู่ที่ 7.02 ± 0.14 log CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งในแต่ละความเข้มข้นของเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์พบอัตราการรอดชีวิตของเชื้อโปรไบโอติกหลังจากการทำแห้งแบบเยือกแข็ง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังที่แสดงในภาพที่ 15 ซึ่งเมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 หลังจากการทำแห้งแบบเยือกแข็ง พบว่าเซลล์ของโปรไบโอติกยังคงรูปร่างของเซลล์โปรไบโอติกดังที่แสดงในภาพที่ 16 เนื่องจากการใช้น้ำตาลเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ในกระบวนการการทำแห้งแบบเยือกแข็ง มีคุณสมบัติที่ช่วยปกป้องเชื้อโปรไบโอติก โดยน้ำตาลเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ช่วยลดความเสียหายที่เกิดจากการแตกตัวของเซลล์ อีกทั้ง น้ำตาลเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ช่วยเสริมโครงสร้างของเซลล์โดยเชื่อมโยงกับโครงสร้างเซลล์ ซึ่งช่วยลดการทำลายของเซลล์ที่อาจเกิดขึ้นในขณะที่ถูกแช่แข็งและแห้ง (Peredo et al., 2016)



ภาพที่ 15 การเหลือรอดของเชื้อโปรไบโอติกที่ห่อหุ้มด้วยเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ก่อนและหลังจากการทำแห้งแบบเยือกแข็ง
ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

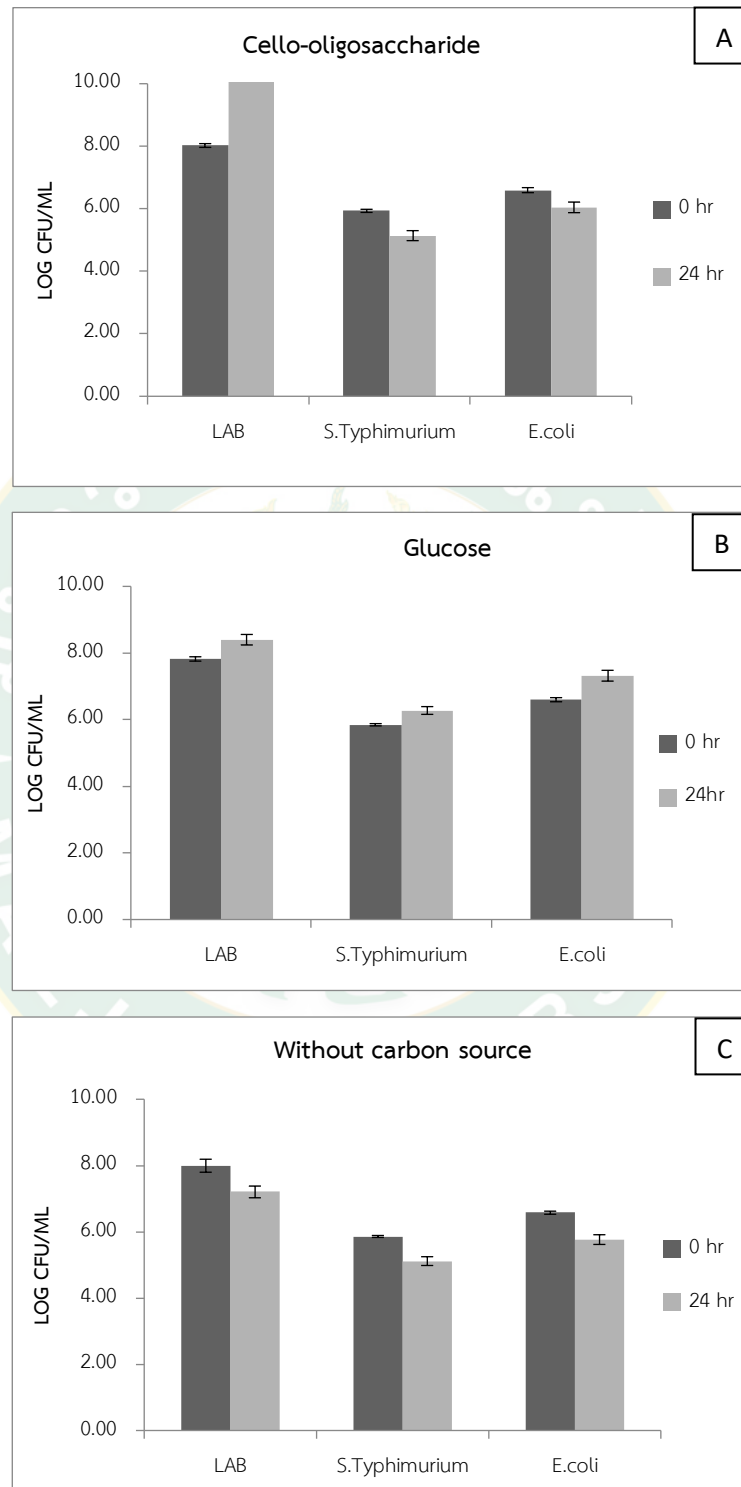


ภาพที่ 16 เชื้อโปรไบโอติกที่เหลืรอดหลังจาก การทำแห้งแบบเยือกแข็ง ผงของเชื้อโปรไบโอติกที่ ห่อหุ้มด้วยน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 หลังจากการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (A) และ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้อง อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (B)

ทดสอบคุณสมบัติบางประการของความเป็นพรีไบโอติก

การทดสอบการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อโปรไบโอติกด้วยวิธีการ Mixed culture โดยเตรียมเซลล์โอลิโกแซคคาไรด์ในอัตราส่วนร้อยละ 5 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลคติก ปริมาณ 8 log CFU ต่อมิลลิลิตร และเชื้อก่อโรค ปริมาณ 6 ถึง 7 log CFU ต่อ มิลลิลิตร โดยทำการนับเชื้อบนอาหาร selective medium ของเชื้อแต่ละชนิด พบว่าการใช้น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ในอัตราส่วนร้อยละ 5 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ทำให้เชื้อโปรไบโอติกเจริญเติบโตได้ดีที่สุด โดยมีปริมาณเชื้อโปรไบโอติกอยู่ที่ 10.46 log CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณเชื้อมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ การใช้น้ำตาลกลูโคสหรือไม่มีน้ำตาล ในขณะที่เดียวกันการใช้น้ำตาลเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ยังมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคโดยเซลล์โอลิโกแซคคาไรด์นั้นไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคซึ่ง เมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ทำให้ปริมาณเชื้อก่อโรคเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ไม่ได้มีการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค น้ำตาลเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นอาหารสำหรับเชื้อโปรไบโอติกซึ่งทำให้เชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นคู่แข่งกับเชื้อโรคในการแข่งขันเพื่อที่จะใช้แหล่งอาหาร ซึ่งสามารถลดปริมาณการเจริญเติบโตของเชื้อโรคได้ อีกทั้งเชื้อโปรไบโอติกที่เจริญเติบโตเป็นจำนวนมากกว่าเชื้อก่อโรคแล้วนั้นยังสร้างสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อโรค โดยเช่นเปลี่ยน ค่าความเป็นกรดต่าง

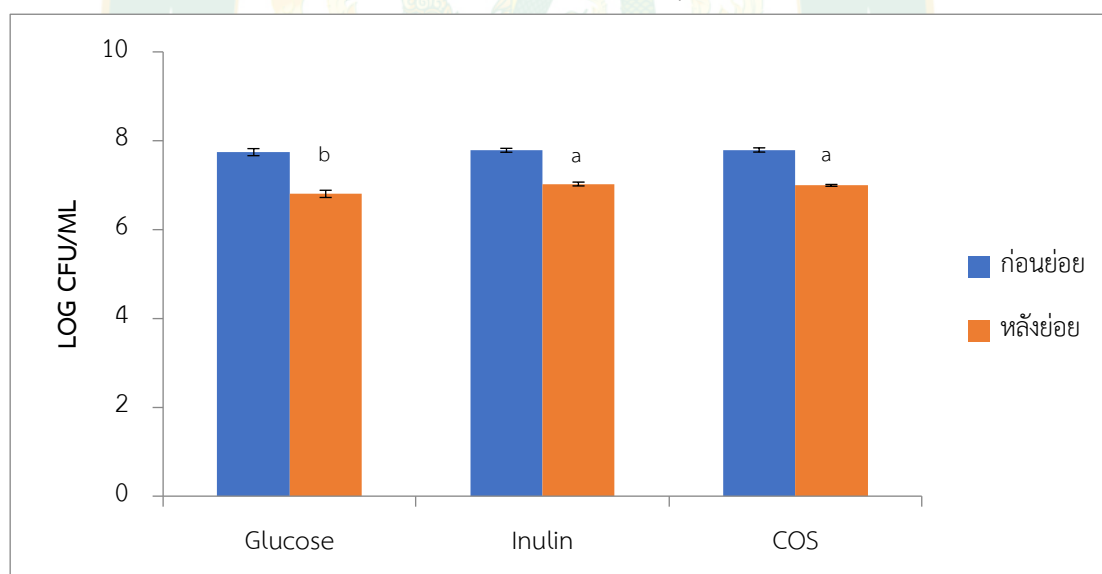
หรือสร้างสภาพที่เป็นอุปสรรคต่อการเจริญเติบโตของเชื้อโรคอีกด้วย (รัตนอุบล, 2552) ดังที่แสดงในภาพที่ 17



ภาพที่ 17 กราฟแสดงการเจริญการเติบโตของเชื้อโปรไบโอติกและเชื้อก่อโรคโดยใช้ น้ำตาลเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์เป็นแหล่งพลังงาน (A) น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งพลังงาน (B) และไม่มี น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงาน (C)

การเหลือรอดของเชื้อโปรไบโอติก หลังจากการย่อยในระบบทางเดินอาหารจำลอง

จากการศึกษาการเหลือรอดของเชื้อโปรไบโอติกที่ถูกห่อหุ้มด้วย COS โดยเปรียบเทียบกับน้ำตาลอินนูลินและน้ำตาลกลูโคส พบว่าในน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์พบการเหลือรอดหลังจากการย่อยอยู่ที่ 7.00 ± 0.02 log CFU ต่อมิลลิลิตร น้ำตาลอินนูลินพบการเหลือรอดของเชื้อโปรไบโอติกอยู่ที่ 7.03 ± 0.04 log CFU ต่อมิลลิลิตร และน้ำตาลกลูโคสพบการเหลือรอดของเชื้อโปรไบโอติกอยู่ที่ 6.80 ± 0.08 log CFU ต่อมิลลิลิตร ดังที่แสดงในภาพที่ 18 ซึ่งเมื่อทดสอบการทยอยของน้ำตาลเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์พบว่าร้อยละของการย่อยน้ำตาลโดยเอนไซม์ชนิดต่างๆในทางเดินอาหารพบว่าน้ำตาลเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์มีอัตราการถูกย่อยอยู่ที่ร้อยละ 66.20 น้ำตาลอินนูลินอยู่ที่ร้อยละ 86.53 และน้ำตาลกลูโคสอยู่ที่ร้อยละ 100 จะเห็นได้ว่าน้ำตาลเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์มีอัตราการถูกย่อยน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับน้ำตาลชนิดอื่น ๆ เนื่องจากเชื้อโปรไบโอติกสามารถทนต่อการย่อยต่อระบบทางเดินอาหารได้ไม่ว่าจะเป็นการทนต่อน้ำย่อยในกระเพาะอาหารหรือน้ำดีในลำไส้เล็ก (รัตนอุบล, 2552) ทำให้อัตราการรอดชีวิตของเชื้อโปรไบโอติกหลังจากการย่อยนั้นทำให้อัตราการรอดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับน้ำตาลชนิดอื่น ๆ ในการทดลอง



ภาพที่ 18 การเหลือรอดของเชื้อโปรไบโอติกก่อน และหลังจากการทดสอบการทยอยในระบบทางเดินอาหารแบบจำลองในห้องปฏิบัติการ

ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

สรุปผลการวิจัย

จากการสกัดเซลล์จากผงลำไยผลอ่อนพันธุ์อีดอ โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวช่วยในกระบวนการสกัด ผลการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์และสัดส่วนระหว่างโซเดียมไฮดรอกไซด์กับผงลำไยผลอ่อนมีผลต่อปริมาณเซลล์ulos ที่เหลือหลังจากการคือ 70:30 โซเดียมไฮดรอกไซด์ต่อผงลำไยผลอ่อน ที่ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นร้อยละ 4 ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส พบเซลล์ulosหายามากที่สุดร้อยละ 47.07 ± 1.19

เมื่อเตรียมเซลล์โอลลีโกแซคคาไรด์ด้วยวิธีทางเอนไซม์ โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลสที่สัดส่วน 3.0 หน่วยต่อกรัมเซลล์ulos ต่อ 0.60 หน่วยต่อกรัมเซลล์ulos ทำปฏิกิริยา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 278.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำตาลรีดิซ 36.72 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลด้วย HPLC พบว่าน้ำตาลเซลโลไตรออสมีปริมาณ 0.63 กรัมต่อลิตรเมื่อเกิดปฏิกิริยานาน 3 ชั่วโมง

เพื่อยับยั้งการเกิดน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเกิดขึ้น ด้วยสาร Conduritol- β -epoxide ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของ β -glucosidase พบว่าน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวยังคงเกิดขึ้นที่ 12 ชั่วโมง

การศึกษาคือความเป็นพรีไบโอติกของน้ำตาลเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์โดยใช้ Mix culture ผสมเชื้อโปรไบโอติก ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus lactis* และ เชื้อก่อโรค ได้แก่ *Escherichia coli* และ *Salmonella Typhimurium* พบว่าใช้น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ในอัตราส่วนร้อยละ 5 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ทำให้เชื้อโปรไบโอติกเจริญเติบโตได้ดีที่สุด โดยมีปริมาณเชื้อโปรไบโอติกอยู่ที่ $10.46 \log \text{CFU}$ ต่อมิลลิลิตร อีกทั้งน้ำตาลเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ยังทนต่อน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหารแบบจำลองในห้องปฏิบัติการ โดยมีการย่อยน้ำตาลเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์เพียงร้อยละ 66.20 เทียบกับน้ำตาลกลูโคสที่ถูกร้อยละ 100

การศึกษาคือความเข้มข้นของน้ำตาลเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ในการห่อหุ้มเชื้อโปรไบโอติกที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 มีปริมาณเชื้อโปรไบโอติกเหลือรอดหลังจากการทำแห้งอยู่ที่ $8.29 \pm 0.08 \log \text{CFU}$ ต่อมิลลิลิตรซึ่งเป็นการเหลือรอดของเชื้อโปรไบโอติกมากที่สุด

ดังนั้นน้ำตาลเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้จากการเตรียมจากลำไยผลอ่อนสามารถนำไปใช้เป็นพรีไบโอติกได้เพื่อพัฒนาประสิทธิภาพการใช้เป็นพรีไบโอติกควรมีการใช้น้ำตาลเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ร่วมกับพรีไบโอติกชนิดอื่นอีกทั้งยังสามารถนำกระบวนการนี้ไปใช้ในการเตรียมน้ำตาลเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์จากวัตถุดิบชนิดอื่น

บรรณานุกรม

- ปานทอง, จ. (2557). การประยุกต์ใช้สารลดแรงตึงผิวชนิดไม่มีประจุในกระบวนการปรับสภาพและย่อยเส้นใยปาล์มด้วยเอนไซม์เพื่อการผลิตเอทานอล มหาวิทยาลัย สงขลา นครินทร์].
- พรรณพงษ์, ด. (2014). การสกัดและประเมินคุณลักษณะของเซลลูโลสจากขาน้อยผักตบชวาและธูปฤๅษี.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2565). สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี2567 [AGRICULTURAL STATISTICS OF THAILAND 2021]. Article 401. <http://www.oae.go.th>
- Abdel-Halim, E. (2014). Chemical modification of cellulose extracted from sugarcane bagasse: Preparation of hydroxyethyl cellulose. *Arabian Journal of Chemistry*, 7(3), 362-371.
- Adler, E. (1977). Lignin chemistry—past, present and future. *Wood science and technology*, 11(3), 169-218.
- Awasthi, M. K., Sarsaiya, S., Wainaina, S., Rajendran, K., Kumar, S., Quan, W., Duan, Y., Awasthi, S. K., Chen, H., Pandey, A., Zhang, Z., Jain, A., & Taherzadeh, M. J. (2019). A critical review of organic manure biorefinery models toward sustainable circular bioeconomy: technological challenges, advancements, innovations, and future perspectives. *Renew Sustain Energy Rev*, 111.
- Barbosa. (2020). Cellulase and oxidative enzymes: new approaches, challenges and perspectives on cellulose degradation for bioethanol production. *Biotechnol Lett*, 42.
- Barbosa, F. C., Kendrick, E., Brenelli, L. B., Arruda, H. S., Pastore, G. M., Rabelo, S. C., Damásio, A., Franco, T. T., Leak, D., & Goldbeck, R. (2020). Optimization of cello-oligosaccharides production by enzymatic hydrolysis of hydrothermally pretreated sugarcane straw using cellulolytic and oxidative enzymes. *Biomass and bioenergy*, 141, 105697.
- Birhade, S., Pednekar, M., Sagwal, S., Odaneth, A., & Lali, A. (2017). Preparation of cellulase concoction using differential adsorption phenomenon. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 47(5), 520-529.
- Bobleter, O. (1994). Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. *Progress in polymer science*, 19(5), 797-841.

- Boerjan, W., Ralph, J., & Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual review of plant biology*, 54(1), 519-546.
- Cano, M. E., García-Martin, A., Comendador Morales, P., Wojtusik, M., Santos, V. E., Kovensky, J., & Ladero, M. (2020). Production of oligosaccharides from agrofood wastes. *Fermentation*, 6(1), 31.
- Chen, P., Shrotri, A., & Fukuoka, A. (2021). Synthesis of cello-oligosaccharides by depolymerization of cellulose: A review. *Applied Catalysis A: General*, 621, 118177.
- Cho, E. J., Trinh, L. T. P., Song, Y., Lee, Y. G., & Bae, H. J. (2020). Bioconversion of biomass waste into high value chemicals. *Bioresour Technol*, 298.
- Chu, Q., Li, X., Xu, Y., Wang, Z., Huang, J., Yu, S., & Yong, Q. (2014). Functional cello-oligosaccharides production from the corncob residues of xylo-oligosaccharides manufacture. *Process Biochemistry*, 49(8), 1217-1222.
- Ebringerová, A., Hromádková, Z., & Heinze, T. (2005). Hemicellulose. *Polysaccharides I: Structure, characterization and use*, 1-67.
- Fengel, D., & Wegener, G. (2011). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions*. Walter de Gruyter.
- Fujii, S., Takahashi, N., Inoue, H., Katsumata, S.-i., Kikkawa, Y., Machida, M., Ishimi, Y., & Uehara, M. (2016). A combination of soy isoflavones and cello-oligosaccharides changes equol/O-desmethylangolensin production ratio and attenuates bone fragility in ovariectomized mice. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(8), 1632-1635.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *The Journal of applied bacteriology*, 66(5), 365-378.
- Fushinobu, S. (2014). A new face for biomass breakdown. *Nat Chem Biol*, 10.
- Garrote, G., Dominguez, H., & Parajó, J. (1999). Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. *Holz als roh-und werkstoff*, 57, 191-202.
- Grabber, J. H. (2005). How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop science*, 45(3), 820-831.
- Gray, M. C., Converse, A. O., & Wyman, C. E. (2003). Sugar monomer and oligomer solubility: data and predictions for application to biomass hydrolysis.

- Biotechnology for Fuels and Chemicals: The Twenty-Fourth Symposium, Hu, L., Fang, X., Du, M., Luo, F., & Guo, S. (2020). Hemicellulose-based polymers processing and application. *American Journal of Plant Sciences*, 11(12), 2066-2079.
- Isogai, T., Yanagisawa, M., & Isogai, A. (2008). Degrees of polymerization (DP) and DP distribution of dilute acid-hydrolyzed products of alkali-treated native and regenerated celluloses. *Cellulose*, 15.
- Jiao, L., Song, Z., Ke, Y., Xiao, K., Hu, C., & Shi, B. (2014). Cello-oligosaccharide influences intestinal microflora, mucosal architecture and nutrient transport in weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 195, 85-91.
- Karnaouri, Matsakas, L., Krikigianni, E., Rova, U., & Christakopoulos, P. (2019). Valorization of waste forest biomass toward the production of cello-oligosaccharides with potential prebiotic activity by utilizing customized enzyme cocktails. *Biotechnol Biofuels*, 12.
- Karnaouri, Topakas, E., Matsakas, L., Rova, U., & Christakopoulos, P. (2018). Fine-tuned enzymatic hydrolysis of organosolv pretreated forest materials for the efficient production of cellobiose. *Front Chem*, 6.
- Karnaouri, A., et al. (2019). Tailoring celluclast® cocktail's performance towards the production of prebiotic cello-oligosaccharides from waste forest biomass. *Catalysts*, 9(11), 897.
- Karnaouri, A., Matsakas, L., Krikigianni, E., Rova, U., & Christakopoulos, P. (2019). Valorization of waste forest biomass toward the production of cello-oligosaccharides with potential prebiotic activity by utilizing customized enzyme cocktails. *Biotechnology for biofuels*, 12(1), 1-19.
- Khorasani, A. C., & Shojaosadati, S. A. (2017). Starch-and carboxymethylcellulose-coated bacterial nanocellulose-pectin bionanocomposite as novel protective prebiotic matrices. *Food Hydrocolloids*, 63, 273-285.
- Kluge, S., Bonhage, B., Viell, J., Granström, M., Kindler, A., & Spiess, A. C. (2019). Enzymatic production of cello-oligomers with endoglucanases. *Cellulose*, 26.
- Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., & Dale, B. E. (2005). Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass: characterization of pretreated corn

- stover. *Applied biochemistry and biotechnology*, 124, 1081-1099.
- Li, E., Yang, H., Zou, Y., Wang, H., Hu, T., Li, Q., & Liao, S. (2019). In-vitro digestion by simulated gastrointestinal juices of *Lactobacillus rhamnosus* cultured with mulberry oligosaccharides and subsequent fermentation with human fecal inocula. *Lwt*, 101, 61-68.
- Mano, M. C. R., Neri-Numa, I. A., Silva, J. B., Paulino, B. N., Pessoa, M. G., & Pastore, G. M. (2018). Oligosaccharide biotechnology: an approach of prebiotic revolution on the industry. *Appl Microbiol Biotechnol*, 102.
- Nguyen, T. V. T., Unpaprom, Y., Manmai, N., Whangchai, K., & Ramaraj, R. (2020). Impact and significance of pretreatment on the fermentable sugar production from low-grade longan fruit wastes for bioethanol production. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-13.
- Paradiso, V. M., Giarnetti, M., Summo, C., Pasqualone, A., Minervini, F., & Caponio, F. (2015). Production and characterization of emulsion filled gels based on inulin and extra virgin olive oil. *Food Hydrocolloids*, 45, 30-40.
- Peredo, A., Beristain, C., Pascual, L., Azuara, E., & Jimenez, M. (2016). The effect of prebiotics on the viability of encapsulated probiotic bacteria. *LWT*, 73, 191-196.
- Poletto, G., Fonseca, B. d. S., Raddatz, G. C., Wagner, R., Lopes, E. J., Barin, J. S., Flores, E. M. d. M., & Menezes, C. R. d. (2019). Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and different prebiotic agents by external ionic gelation followed by freeze-drying. *Ciência Rural*, 49.
- Popanyasak, J., Suppadit, T., & Vatanyoopaisan, S. (2022). การใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งลิกโนเซลลูโลสสำหรับผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี หัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ, 8(2), 107-121.
- Sanz, M. L., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2005). Influence of disaccharide structure on prebiotic selectivity in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(13), 5192-5199.
- Selig, M. J., Vuong, T. V., Gudmundsson, M., Forsberg, Z., Westereng, B., Felby, C., & Master, E. R. (2015). Modified cellobiohydrolase–cellulose interactions following treatment with lytic polysaccharide monooxygenase CelS2 (S c LPMO1 0 C) observed by QCM-D. *Cellulose*, 22.

- Serrano-Casas, V., Pérez-Chabela, M. L., Cortés-Barberena, E., & Totosaus, A. (2017). Improvement of lactic acid bacteria viability in acid conditions employing agroindustrial co-products as prebiotic on alginate ionotropic gel matrix co-encapsulation. *Journal of Functional Foods*, 38, 293-297.
- Shou-jun, Y., Su-guo, G., Yu-cheng, Z., & Shu-zheng, Z. (1985). Inactivation of α -glucosidase by the active-site-directed inhibitor, conduritol B epoxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 828(3), 236-240.
- Stephens, M. C., Bernatsky, A., Singh, H., Kanfer, J. N., & Legler, G. (1981). Distribution of conduritol B epoxide in the animal model for Gaucher's disease (Gaucher mouse). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 672(1), 29-32.
- Sweet, M. S., & Winandy, J. E. (1999). Influence of degree of polymerization of cellulose and hemicellulose on strength loss in fire-retardant-treated southern pine.
- Tsuji, A., Tominaga, K., Nishiyama, N., & Yuasa, K. (2013). Comprehensive enzymatic analysis of the cellulolytic system in digestive fluid of the Sea Hare *Aplysia kurodai*. Efficient glucose release from sea lettuce by synergistic action of 45 kDa endoglucanase and 210 kDa β -glucosidase. *PLoS ONE*, 8.
- Uyeno, Y., Kawashima, K., Hasunuma, T., Wakimoto, W., Noda, M., & Nagashima, S. (2013). Effects of cellooligosaccharide or a combination of cellooligosaccharide and live *Clostridium butyricum* culture on performance and intestinal ecology in holstein calves fed milk or milk replacer. *Livestock Sci*, 153.
- Vanderghem, C., Boquel, P., Blecker, C., & Paquot, M. (2010). A multistage process to enhance cellobiose production from cellulosic materials. *Appl Biochem Biotechnol*, 160.
- Vermaas, J. V., Crowley, M. F., Beckham, G. T., & Payne, C. M. (2015). Effects of lytic polysaccharide monooxygenase oxidation on cellulose structure and binding of oxidized cellulose oligomers to cellulases. *J Phys Chem B*, 119.
- White, W. (1957). AOAC Method of Analysis. *Food Drug Cosm. LJ*, 12, 327.
- Witte, M. D., van der Marel, G. A., Aerts, J. M., & Overkleeft, H. S. (2011). Irreversible inhibitors and activity-based probes as research tools in chemical glycobiology.

Organic & biomolecular chemistry, 9(17), 5908-5926.

- Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D. H., & Zheng, C. (2007). Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*, 86(12-13), 1781-1788.
- Yinghuai, Z., Yuanting, K. T., & Hosmane, N. S. (2013). Applications of ionic liquids in lignin chemistry. *Ionic Liquids—New Aspects for the Future*, 315-346.
- Zhang, & Lynd, L. R. (2003). Cellodextrin preparation by mixed-acid hydrolysis and chromatographic separation. *Anal Biochem*, 322.
- Zhang, Y., Lin, J., & Zhong, Q. (2016). S/O/W emulsions prepared with sugar beet pectin to enhance the viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514. *Food Hydrocolloids*, 52, 804-810.
- Zheng, B., Yu, S., Chen, Z., & Huo, Y.-X. (2022). A consolidated review of commercial-scale high-value products from lignocellulosic biomass. *Frontiers in Microbiology*, 13, 933882.
- Zhong, C., Ukowitz, C., Domig, K. J., & Nidetzky, B. (2020). Short-chain cello-oligosaccharides: intensification and scale-up of their enzymatic production and selective growth promotion among probiotic bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(32), 8557-8567.



ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร Eosin Methylene Blue Agar (EMB)

Peptone	10.00 กรัม
Dipotassium phosphate	2.00 กรัม
Lactose	10.00 กรัม
Eosin - Y	0.40 กรัม
Methylene blue	0.065 กรัม
Agar	15.00 กรัม
distilled water	1000 มิลลิลิตร

2. อาหาร De Man, Rogosa and Sharpe agar (TSA)

Pancreatic Digest of Casein	15.00 กรัม
Papaic Digest of Soybean	5.00 กรัม
Sodium Chloride	5.00 กรัม
Agar	15.00 กรัม
distilled water	1000 มิลลิลิตร

3. อาหาร Salmonella-Shigella agar (SS)

Peptone	5.00 กรัม
HM peptone B #	5.00 กรัม
Lactose	10.00 กรัม
Bile salts mixture	8.50 กรัม
Sodium citrate	10.00 กรัม
Sodium thiosulphate	8.50 กรัม
Ferric citrate	1.00 กรัม
Brilliant green	0.00033 กรัม
Neutral red	0.025 กรัม
Agar	15.00 กรัม
distilled water	1000 มิลลิลิตร

การเตรียมอาหาร Basal Medium

ส่วนประกอบสำหรับ 1 ลิตร

1. Magnesium sulfate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.20 กรัม
2. Potassium nitrate (KNO_3)	1.90 กรัม
3. Sodium chloride (NaCl)	1.00 กรัม
4. Calcium chloride (CaCl_2)	0.10 กรัม
5. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	0.17 กรัม
6. Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	1.65 กรัม
7. Sodium dihydrogen phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.25 กรัม

วิธีการเตรียม

1. ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น (distilled water) ประมาณ 900 มิลลิลิตร
2. เติมน้ำตาล เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ ร้อยละ 5 โดยเปรียบเทียบกับน้ำตาล อินนูลินและน้ำตาลกลูโคส ในความเข้มข้นเดียวกัน
3. ปรับค่า pH ของสารละลายให้เป็น 5.8 โดยใช้สารละลาย NaOH หรือ HCl
4. เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร
5. กรองสารละลายผ่านแผ่นกรอง 0.22 ไมโครเมตรเพื่อฆ่าเชื้อ
6. เก็บสารละลายไว้ในภาชนะที่สะอาดและปิดสนิท เก็บในตู้เย็นที่ 2-8 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก

การเตรียมและวิเคราะห์ทางเคมี

วิธีฟีนอล-ซัลฟูริก (Phenol- Sulfuric acid method)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริก
2. ฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 5

วิธีการ

1. เจือจางน้ำตาลเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ให้เหมาะสม
2. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
3. เติมสารละลายฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 5 ลงไป 0.5 มิลลิลิตร
4. เขย่าให้เข้ากัน
5. เติมกรดซัลฟูริก 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยความระมัดระวัง ตั้งไว้ 10 นาที
6. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 490 nm นำค่าที่ได้ไปคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

วิธี 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid (DNS) method)

สารเคมี

1. สารละลาย DNS

วิธีการ

1. เจือจางน้ำตาลเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ให้เหมาะสม
2. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
3. เติมสารละลาย DNS ลงไป 0.5 มิลลิลิตร
4. เขย่าให้เข้ากัน
5. นำไปต้มที่น้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที และพักสาร เติมน้ำกลั่นลงไป 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
6. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 nm นำค่าที่ได้ไปคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

เทคนิคโครมาโตกราฟีแบบเยื่อบาง (Thinlayer Chromatography : TLC)

สารเคมี

1. Butanol
2. Ethanol
3. Methanol
4. Sulfuric acid
5. Distilled water
6. Mix standard (Glucose, Cellotriose และ Cellopentaose)

7. แผ่น TLC

วิธีการ

1. เจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม
2. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 1 ไมโครลิตร ใส่ลงในแผ่น TLC เว้นระยะห่างให้เหมาะสม และรอให้แห้ง
8. จุ่มแผ่น TLC ลงใน Camber ที่มีสารละลาย Mobile phase (Butanol : Ethanol : Distilled water อัตราส่วน 5:3:2) ปิดฝาและทิ้งไว้ จนกว่า Mobile phase จะเคลื่อนที่ไปถึงจุดที่กำหนด
3. นำแผ่น TLC ออกมาเป่าให้แห้งสนิท จากนั้นนำไปจุ่มในสารละลาย 5% ซัลฟูริกในเมทานอล
4. เป่าให้แห้ง
5. นำไปอบที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
6. บันทึกผลที่ได้จาก จุดสีดำนที่เกิดบนแผ่น TLC

สูตรการเตรียมสารละลายสำหรับการทดลองการทอนย่อยในระบบทางเดินอาหารจำลอง

1. สารละลาย Saliva Solution

ส่วนประกอบ

1. Na_2HPO_4	2.38 กรัม
2. KH_2PO_4	0.19 กรัม
3. NaCl	8.00 กรัม
4. α -amylase	0.91 กรัม

วิธีการ

1. ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น (distilled water) ปริมาตร 1 ลิตร
2. ปรับค่า pH ของสารละลายให้เป็น 6.75 โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (phosphate buffer)

2. สารละลาย Gastric Solution

ส่วนประกอบ

1. Pepsin	3.20 กรัม
2. NaCl	17.55 กรัม

วิธีการ

1. ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร
2. ปรับค่า pH ของสารละลายให้เป็น 1.2 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 1.0 M

3. สารละลาย Intestinal Juice

ส่วนประกอบ

1. Trypsin	1.25 กรัม
2. Bile salts	7.50 กรัม
3. NaHCO_3	8.40 กรัม

วิธีการ

1. ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร

หมายเหตุ

ควรทำการเตรียมสารละลายในสภาพแวดล้อมที่สะอาดและปลอดเชื้อเพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อน การปรับ pH ควรทำอย่างระมัดระวังและตรวจสอบด้วย pH meter เพื่อความแม่นยำเก็บสารละลายที่เตรียมไว้ในภาชนะที่สะอาดและปิดสนิท



ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	กัญญาภัค ฉางข้าวไชย
เกิดเมื่อ	27 พฤศจิกายน 2540
ประวัติการศึกษา	ปริญญาตรี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ คณะวิทยาศาสตร์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ

