วว.TISTR

โครงการวิจัยที่ ภ. 53-01 / ย. 4 / รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)

การวิจัยและพัฒนาการใช้สารพรีไบโอติกในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

โครงการวิจัยที่ ภ. 53-01
การวิจัยและพัฒนาการใช้สารพรีไบโอติกในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร

โครงการย่อยที่ 4
การวิจัยและพัฒนาการใช้สารพรีไบโอติกในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร

รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)
การวิจัยและพัฒนาการใช้สารพรีไบโอติกในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร

โดย

เปรมสุดา สมาน **อัจฉรา ไชยองค์การ**
สมพร มูลมั่งมี **บัณฑิต ฝั่งสินธุ์**
ลาวัลย์ ชตานนท์ **วรรณลักษณ์ บัวบาน**
ฉันทรา พูนศิริ **สุภาพ อัจฉริยศรีพงศ์**

บรรณาธิการ วว., ปทุมธานี 2557
นฤมล รื่นไวย์
บุญเรียม น้อยชุมแพ
สลิลดา พัฒนศิริ

สงวนลิขสิทธิ์

รายงานฉบับนี้ได้รับการอนุมัติให้พิมพ์โดย
ผู้ว่าการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

(นายยงวุฒิ เสาวพฤกษ์)
ผู้ว่าการ

กิตติกรรมประกาศ

ขอแสดงความขอบคุณ ดร.สุภาพ อัจฉริยศรีพงศ์ รองผู้ว่าการวิจัยและพัฒนาด้านอุตสาหกรรมชีวภาพ ที่ให้การสนับสนุนการทำงานและคำแนะนำที่เป็นประโยชน์.

ขอขอบคุณ อาจารย์สุกัญญา จัตตุพรพงษ์ และอาจารย์วราพันธุ์ จินตณวิชณ์ สถาบันสุวรรณวาจกกสิกิจ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม ที่ให้คำแนะนำและสนับสนุนในการเลี้ยงสุกรในภาคสนาม.

ขอขอบคุณ ผอ.ฉันทรา พูนศิริ ดร.ภูษิตา วรรณิสสร และพนักงานฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงาน ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญตาราง	ค
สารบัญรูป	จ
ABSTRACT	1
บทคัดย่อ	2
1. บทนำ	3
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	5
3. ผลการทดลองและวิจารณ์	12
4. สรุปผลการทดลอง	42
5. สรุปผลทางด้านตลาดและผลกระทบของโครงการ	44
6. เอกสารอ้างอิง	45

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1.	ส่วนประกอบของอาหารทดลองและคุณค่าทางโภชนาการ	25
ตารางที่ 2.	ผลการใช้สารเสริม isomalto-oligosaccharide ต่อสมรรถภาพการผลิตของลูกสุกรอายุ 4-6 สัปดาห์	27
ตารางที่ 3.	ผลการใช้สารเสริม isomalto-oligosaccharide ต่อสมรรถภาพการผลิตของลูกสุกรอายุ 6-8 สัปดาห์	28
ตารางที่ 4.	ผลการใช้สารเสริม isomalto-oligosaccharide ต่อสมรรถภาพการผลิตของลูกสุกรอายุ 8-10 สัปดาห์	29
ตารางที่ 5.	ปริมาณจุลินทรีย์ในสารละลาย isomalto-oligosaccharide ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์ เก็บรักษาในตู้เย็น (0-4°ซ.) และที่อุณหภูมิห้อง (25-30°ซ.)	34
ตารางที่ 6.	ปริมาณจุลินทรีย์ในสารละลาย isomalto-oligosaccharide ที่ระเหยเอาน้ำออก 10 เปอร์เซ็นต์ ฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์ เก็บรักษาในตู้เย็น (0-4°ซ.) และที่อุณหภูมิห้อง (25-30°ซ.)	35
ตารางที่ 7.	ปริมาณจุลินทรีย์ในสารละลาย isomalto-oligosaccharide ที่ระเหยเอาน้ำออก 20 เปอร์เซ็นต์ ฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์ เก็บรักษาในตู้เย็น (0-4°ซ.) และที่อุณหภูมิห้อง (25-30°ซ.)	36
ตารางที่ 8.	ปริมาณจุลินทรีย์ในสารละลาย isomalto-oligosaccharide ที่ระเหยเอาน้ำออก 30 เปอร์เซ็นต์ ฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์ เก็บรักษาในตู้เย็น (0-4°ซ.) และที่อุณหภูมิห้อง (25-30°ซ.)	37
ตารางที่ 9.	ปริมาณจุลินทรีย์ในสารละลาย isomalto-oligosaccharide ที่ระเหยเอาน้ำออก 40 เปอร์เซ็นต์ ฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์ เก็บรักษาในตู้เย็น (0-4°ซ.) และที่อุณหภูมิห้อง (25-30°ซ.)	38
ตารางที่ 10.	ปริมาณจุลินทรีย์ในสารละลาย isomalto-oligosaccharide ที่ระเหยเอาน้ำออก 50 เปอร์เซ็นต์ ฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์ เก็บรักษาในตู้เย็น (0-4°ซ.) และที่อุณหภูมิห้อง (25-30°ซ.)	39
ตารางที่ 11.	ปริมาณจุลินทรีย์ในสารละลาย isomalto-oligosaccharide ที่ระเหยเอาน้ำออก 60 เปอร์เซ็นต์ ฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์ เก็บรักษาในตู้เย็น (0-4°ซ.) และที่อุณหภูมิห้อง (25-30°ซ.)	40

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 12. ปริมาณจุลินทรีย์ในสารละลาย isomalto-oligosaccharide ที่ระเหยเอาน้ำออก 70 เปอร์เซ็นต์ ฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์ เก็บรักษาในตู้เย็น (0-4°ซ.) และที่อุณหภูมิห้อง (25-30°ซ.) 41

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1. ลูกสุกรลูกผสม 3 สายพันธุ์ ที่ใช้ในการทดลอง 10

รูปที่ 2. การเตรียมอาหารสำหรับสุกร 10

รูปที่ 3. เปรียบเทียบปริมาณ α-glucosidase ของเชื้อรา 17 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 7 วัน 13

รูปที่ 4. การผลิต transglucosidase ของ *A. oryzae* TISTR 3102, *A. oryzae* TISTR 3222 และ *A. usamii* TISTR 3140 ในอาหารเหลว PDB ที่อุณหภูมิ 30°ซ. 14

รูปที่ 5. สายพันธุ์เชื้อราที่ใช้ในการทดสอบ transglucosylation 15

รูปที่ 6. ปริมาณ α-glucosidase, amylolytic activity, total reducing sugar และ pH ที่เกิดขึ้นในการหมักแบบแห้งของ *A. usamii* TISTR 3140 17

รูปที่ 7. ปริมาณ α-glucosidase, amylolytic activity, total reducing sugar และ pH ที่เกิดขึ้นในการหมักแบบแห้งของ *A. oryzae* TISTR 3222 17

รูปที่ 8. ปริมาณ α-glucosidase, amylolytic activity, total reducing sugar และ pH ที่เกิดขึ้นในการหมักแบบแห้งของ *A. oryzae* TISTR 3102 18

รูปที่ 9. Thin layer chromatography ของสารตัวอย่าง (ก) สารมาตรฐานน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ข) สารที่ผลิตจากการหมักของ *A. oryzae* TISTR 3222 (ค) สารที่ผลิตจากการหมักของ *A. oryzae* TISTR 3102 และ (ง) สารที่ผลิตจากการหมักของ *A. oryzae* TISTR 3140 ในระยะ 7 วัน 19

รูปที่ 10. ปริมาณ glucose isomaltose และ isomaltotriose ที่เกิดขึ้นในการหมักแบบแห้งของ *A. usamii* TISTR 3140 20

รูปที่ 11. ปริมาณ glucose maltose isomaltose panose และ isomaltotriose ที่เกิดขึ้นในการหมักแบบแห้งของ *A. oryzae* TISTR 3222 20

รูปที่ 12. ปริมาณ glucose maltose isomaltose panose และ isomaltotriose ที่เกิดขึ้นในการหมักแบบแห้งของ *A. oryzae* TISTR 3102 21

รูปที่ 13. ปริมาณ glucose maltose maltotriose isomaltose panose และ isomaltotriose ที่เกิดขึ้นภายหลังจากการย่อยแป้งหมักของ *A. oryzae* TISTR 3222 22

สารบัญรูป (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 14. การเจริญของ *B. animalis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และ MRS+IMO 3 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงที่ 37°ซ. ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	23
รูปที่ 15. การเจริญของ *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และ MRS+IMO 3 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงที่ 37°ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	24
รูปที่ 16. ปริมาณเชื้อ coliform ในมูลสุกร	30
รูปที่ 17. ปริมาณเชื้อ *E. coli* ในมูลสุกร	31
รูปที่ 18. ปริมาณ lactic acid bacteria ในมูลสุกร	32

RESEARCH AND DEVELOPMENT ON PREBIOTIC FOR SWINE PRODUCTION

Premsuda Saman, Achara Chaiongkarn, Somporn Moonmangmee, Bundit Fungsin, Lawan Chatanon, Wannaluk Buaban, Chantra Poonsiri and Suparp Artjariyasripong

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the potential use of prebiotic isomalto-oligosaccharides (IMO) for the swine production. Seventeen fungal strains were investigated for glucosidase and transglucosidase production. These enzymes can synthesize isomalto-oligosaccharides from liquid starch. Three transglucosidase producing strains, *Aspergillus usamii* TISTR 3140, *Aspergillus oryzae* TISTR 3102 and *Aspergillus oryzae* TISTR 3222 were selected and used in solid-stated fermentation (SSF). The maximum value of α-glucosidase was obtained in SSF with *A. oryzae* TISTR 3222, followed by SSF with *A. oryzae* TISTR 3102 and SSF with *A. usamii* TISTR 3140 respectively. The highest concentration of isomalto-oligosaccharides (isomaltose, panose and isomaltotriose) was also observed in SSF with *A. oryzae* TISTR 3222. Thus, SSF with *A. oryzae* TISTR 3222 was selected and used in isomalto-oligosaccharide production. After appropriate fermentation, mashing was used to hydrolyse the remaining starch in rice slurry. The subsequent rice syrup contained higher amounts of isomaltose, panose and isomaltotriose with the values of 44, 10 and 7 g/l respectively. This IMO syrup could enhance the growth of *Bifidobacterium animalis* while the growth of *Eschericia coli* was reduced. The effect of IMO on swine growth was also studied. Results showed that IMO syrup could improve the body weight gain at the early stage of growth (4-6 weeks). Besides, IMO syrup could enhance the growth of lactic acid bacteria in the intestinal content while the number of coliform and *E. coli* were inhibited. IMO syrup could be pasteurised and maintained at 0-4°C more than 7 months.

การวิจัยและพัฒนาการใช้สารพรีไบโอติกในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสุกร

เปรมสุดา สมาน[1], อัจฉรา ไชยองค์การ[1], สมพร มูลมั่งมี[1], บัณฑิต ฝั่งสินธุ์[1], ลาวัลย์ ชตานนท์[1], วรรณลักษณ์ บัวบาน[1], ฉันทรา พูนศิริ[1] และ สุภาพ อัจฉริยศรีพงศ์[2]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการผลิตพรีไบโอติก isomalto-oligosaccharides (IMO) เพื่อใช้สำหรับการเลี้ยงสุกร โดยได้ศึกษาการผลิต α-glucosidase และ transglucosidase ในเชื้อรา 17 สายพันธุ์ พบว่ามีสามสายพันธุ์ที่สามารถสร้าง transglucosidase ได้แก่ *Aspergillus usamii* TISTR 3140, *Aspergillus oryzae* TISTR 3102 และ *Aspergillus oryzae* TISTR 3222 เชื้อราทั้งสามสายพันธุ์ได้นำไปทดสอบในกระบวนการหมักแบบแห้งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์และผลิตภัณฑ์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในกระบวนการหมักแบบแห้งด้วย *A. oryzae* TISTR 3222 ให้ปริมาณ α-glucosidase สูงที่สุด รองลงมา คือ การหมักด้วย *A. oryzae* TISTR 3102 และ *A. usamii* TISTR 3140 ตามลำดับ. นอกจากนี้ การหมักแบบแห้งด้วย *A. oryzae* TISTR 3222 ให้ปริมาณของ isomalto-oligosaccharides (isomaltose, panose และ isomaltotriose) สูงที่สุด, ดังนั้น จึงได้เลือกการหมักแบบแห้งด้วย *A. oryzae* TISTR 3222 ในการผลิต isomalto-oligosaccharides ภายหลังจากดำเนินการหมักแบบแห้งในระยะเวลาที่เหมาะสม ข้าวหมักที่ได้จะนำไปย่อยสลายแป้งที่เหลือ ทำให้มีปริมาณ isomaltose, panose และ isomaltotriose เพิ่มขึ้นโดยมีค่าเท่ากับ 44 กรัม/ลิตร, 10 กรัม/ลิตร และ 7 กรัม/ลิตร ตามลำดับ. สารละลายนี้สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของ *Bifidobacterium animalis* และยับยั้งการเจริญของ *Eschericia coli* เมื่อทดสอบเสริมสารละลาย IMO กับลูกสุกรหย่านม พบว่าสารละลาย IMO สามารถช่วยเพิ่มน้ำหนักตัวของลูกสุกรได้ในช่วงแรกของการเจริญเติบโต (4-6 สัปดาห์) นอกจากนี้สารละลาย IMO มีส่วนช่วยในการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ lactic acid bacteria และลดจำนวนเชื้อ coliform และ *E. coli* ในมูลสุกร สารละลาย IMO เมื่อผ่านการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์และเก็บที่อุณหภูมิ 0-4°ซ. จะสามารถเก็บรักษาได้มากกว่า 7 เดือน.

---

[1]ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

[2]วิจัยและพัฒนาด้านอุตสาหกรรมชีวภาพ (วว.)

1. บทนำ

สุกรหรือหมูเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศ ประชาชนไทยนิยมบริโภคหมูเป็นอาหารประเภทโปรตีน, ซึ่งใกล้เคียงการบริโภคเนื้อไก่ ประเทศไทยมีการเลี้ยงหมูในแต่ละปีในปริมาณ 8-9 ล้านตัวต่อปี, ซึ่งในแต่ก่อนนั้นปริมาณการผลิตสุกรมีปริมาณมากเกินอัตราการความต้องการบริโภคภายในประเทศจึงมีการส่งออก. ในปัจจุบันปริมาณการผลิตสุกรมีปริมาณที่ใกล้เคียงกับปริมาณความต้องการบริโภคภายในประเทศจึงเหลือเพื่อส่งออกในปริมาณไม่มาก ปัญหาการเลี้ยงสุกรในปัจจุบันพบว่า สุกรมีอาการเจ็บป่วยและเสียชีวิตด้วยโรคระบบทางเดินอาหาร เช่น พบว่ามีลูกสุกรเป็นโรคท้องร่วงและตายเป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นปัญหาในการเลี้ยงสุกรที่พบอยู่ในปัจจุบัน ทำให้เกษตรกรต้องใช้ยาปฏิชีวนะผสมให้กินในอาหารหรือโดยการฉีดเพื่อรักษา หากไม่ใส่ยาปฏิชีวนะก็จะทำให้สุกรมีการเจ็บป่วย ทำให้การเจริญเติบโตช้า ทำให้มีกำไรน้อยหรือขาดทุน ตลอดจนมีการใช้สารเร่งเนื้อแดง, ซึ่งเป็นกลุ่มของยาที่ใช้สำหรับขยายหลอดลมสำหรับแก้โรคหืดหอบ แต่การใช้สารเคมีหรือยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงสุกรมีผลทำให้มียาหรือสารตกค้างในเนื้อสุกร, ซึ่งมีผลเสียโดยตรงต่อผู้บริโภคทำให้เกิดเกิดอันตรายต่อสุขภาพ และทำให้เกิดโรคตามมา เช่น โรคมะเร็ง หรือภาวการณ์ดื้อยาของเชื้อจุลินทรีย์ในร่างกายของผู้บริโภค.

พรีไบโอติก (prebiotic) เป็นส่วนประกอบของอาหารที่จะไม่ถูกย่อยในระบบทางเดินอาหารส่วนบนของร่างกายและสามารถเหลือเข้าไปถึงในส่วนของลำไส้, ซึ่งจะเป็นแหล่งอาหารให้กับจุลินทรีย์โพรไบโอติกในลำไส้ จะส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกเจริญเพิ่มปริมาณได้ดีและช่วยส่งเสริมสุขภาพให้แข็งแรง, ส่วนโพรไบโอติก (probiotic) เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ ช่วยป้องกันหรือทำลายจุลินทรีย์ก่อโรคที่จะเข้ามาบุกรุกและทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร ช่วยปรับสภาพสมดุลของกลุ่มจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยอาหารและการดูดซึมอาหารได้ดีขึ้น, ส่งเสริมการสร้างภูมิคุ้มกันโรค (Gibson and Christine 2000), ดังนั้น จึงทำให้สัตว์มีการเจริญเติบโตที่ดี สุขภาพแข็งแรง มีความต้านทานโรค โดยเฉพาะโรคติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร ทำให้อัตราการตายน้อยลง จึงช่วยเพิ่มผลผลิตให้กับเกษตรกร.

สารพรีไบโอติกสามารถแยกได้จากผัก และผลไม้ เช่น กล้วย, หน่อไม้, ถั่ว และกลุ่มธัญพืช ได้แก่ น้ำตาลแอลกอฮอล์, โอลิโกฟรักโทส, โอลิโกแซ็กคาไรด์, แล็กโทส และอินนูลิน เป็นต้น. นอกจากนี้ พรีไบโอติกยังสามารถผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้โดยการย่อยสลาย แป้ง ใยอาหาร หรือจากการสังเคราะห์ด้วยเอนไซม์, ซึ่งปัจจุบันพรีไบโอติกที่นำมาใช้ในทางการค้าและในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ ได้มาจากการสังเคราะห์จากเอนไซม์ เช่น glycosyltransferase ใช้ในการสังเคราะห์ trehalose glucanotransferase ใช้ในการผลิต cyclodextrins β-glucosidase ใช้ในการผลิต gentio-oligosaccharides fungal β-fructofuranosidase ใช้ในการผลิต fructo-oligosaccharides และ α-glucosidase ใช้ในการผลิต isomalto-oligosaccharides (Nakakuki 2002).

α-Glucosidase เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการผลิต isomalto-oligosaccharides จากแป้ง α-glucosidase สามารถสลายพันธะ α-1,4 linkages ที่ปลาย non-reducing ends ของ oligosaccharides หรือ polysaccharides เพื่อสร้างโมเลกุล glucose. นอกจากนี้ α-glucosidase ยังมีความสามารถที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยา transglucosylation เพื่อสร้างพันธะ α-1,6 linkages เกิดเป็นสารประกอบ isomalto-oligosaccharides เช่น isomaltose, panose และ isomaltotriose (Pan and Lee 2005) สารประกอบเหล่านี้จัดเป็นสารเสริมเพื่อสุขภาพ (Barreteau *et al*. 2006) มีแคลอรีต่ำ, ไม่ทำให้เกิดฟันผุ, ไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร ป้องกันโรคมะเร็งในลำไส้ (Goulas *et al*. 2004, Liong 2008, Rycroft *et al*. 2002, Whelan *et al*. 2001). นอกจากนี้ isomalto-oligosaccharides เป็นสารที่ช่วยในการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร เพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เช่น Bifidobacteria และ Lactobacilli (Thitaram *et al*. 2005) และช่วยป้องกันโรคในระบบทางเดินอาหาร จึงได้จัดเป็นสารประกอบเพื่อสุขภาพพรีไบโอติกชนิดหนึ่ง (Mizubuchi *et al*. 2005).

ในการผลิตสารพรีไบโอติก isomalto-oligosaccharides ในเชิงอุตสาหกรรมนั้น ความต้องการ α-glucosidase ที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา transglucosylation นั้นมีความจำเป็นอย่างมาก α-glucosidase ที่สร้างพันธะ α-1,6 linkages เกิดเป็นสารประกอบ isomalto-oligosaccharides มีชื่อเฉพาะเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า transglucosidase โดยมีรายงานว่า α-glucosidase ที่มีคุณสมบัติเป็น transglucosidase, นั้นสามารถแยกได้จากเชื้อรากลุ่ม Aspergillus (Fogarty 1994). อย่างไรก็ตาม transglucosidase ที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรมก็ยังมีปริมาณน้อย และราคาแพง เพราะต้องนำเข้าจากต่างประเทศและผลิตภัณฑ์ isomalto-oligosaccharides ที่ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ยังมีความต้องการเป็นอย่างมากและต้องนำเข้าจากต่างประเทศ เช่นกัน.

ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพได้มีแนวความคิดที่จะวิจัยและพัฒนาสารพรีไบโอติกที่ผลิตจากวัตถุดิบภายในประเทศ โดยใช้ข้าวเหนียว, ซึ่งเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่หาได้ง่ายและราคาไม่แพง ตลอดจนคัดเลือกสายพันธุ์ราที่มีประสิทธิภาพในการผลิต α-glucosidase ในกระบวนการหมักเพื่อนำไปใช้ในการผลิตสารพรีไบโอติก isomalto-oligosaccharides, สารพรีไบโอติกนี้จะนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการเลี้ยงสุกร เพื่อดูผลของการช่วยปรับสมดุลในระบบทางเดินอาหาร ส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติก, ตลอดจนการยับยั้งเชื้อก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร งานวิจัยนี้จึงมีส่วนช่วยในการส่งเสริมสุขภาพสุกร สามารถลดการใช้สารเคมีหรือยาปฏิชีวนะ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุกรที่มีความสะอาดและปลอดภัยต่อผู้บริโภค.

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์

2.1.1 เชื้อรา 17 สายพันธุ์

Amylomyces rouxii TISTR 3182, *Aspergillus oryzae* TISTR 3102, *Aspergillus oryzae* TISTR 3019, *Aspergillus oryzae* TISTR 3222, *Aspergillus niger* TISTR 3063, *Aspergillus niger* TISTR 3025, *Aspergillus niger* TISTR 3254, *Aspergillus usamii varshiro usamii* TISTR 3140, *Aspergillus candidus* TISTR 3268, *Aspergillus japonicus* TISTR 3269, *Aspergillus alliaccus* TISTR 3218, *Aspergillus avenaccus* TISTR 3216, *Aspergillus awamorii* TISTR 3193, *Aspergillus awamorii* TISTR 3379, *Rhizopus oryzae* TISTR 3155, *Aspergillus foetidus* TISTR 3383 และ *Aspergillus kawachi* TISTR 3194.

2.1.2 เชื้อแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์

Bifidobacterium animalis TISTR 1925 และ *Eschericia coli* TISTR 887

2.2 วัตถุดิบในการทดลอง

วัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมักและผลิตสารพรีไบโอติกคือ ข้าวเหนียว กข 6 ที่ซื้อจากห้างสรรพสินค้า Big C สาขาแจ้งวัฒนะ จ. นนทบุรี.

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. Potato dextrose broth, PDB (Merck).
2. Potato dextrose agar, PDA (Merck).
3. de Man, Rogosa Sharpe, MRS (Merck).
4. Nutrient agar, NA (Merck).
5. Eosin methylene blue agar, EMB (Merck).

2.4 สารเคมี

1. 3,5-dinitrosalicylic acid (Sigma).
2. Ninhydrin (Sigma).
3. p-Nitrophenol α-glucopyranoside (Sigma).
4. p-Nitrophenol.
5. Acetonitrile (BDH).
6. Glucose (Sigma).
7. Maltose (Sigma).
8. Isomaltose (Fluka).
9. Maltotriose (Sigma).
10. Panose (Fluka).
11. Isomaltotriose (Supelco).

2.5 อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์ BO61 (Olympus, USA).
2. ตู้บ่มเชื้อจุลินทรีย์ Series 2000 (Scientific, Thailand).
3. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส รุ่น IQ 2000 (Scientific, Thailand).
4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง UV-VIS spectrophotometer รุ่น UV-1800 (Shimadzu, Japan).
5. High performance liquid chromatography (HPLC) รุ่น LC-20AD (Shimadzu, Japan).

2.6 วิธีการ

2.6.1 การคัดเลือกเชื้อราที่สร้าง α-glucosidase

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ใส่ในขวดทดลองปริมาณ 300 มิลลิลิตร นำไปนึ่งเพื่อฆ่าเชื้อที่ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ลงในขวดทดลองแต่ละขวด นำไปเพาะเลี้ยงแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เก็บตัวอย่างในแต่ละวันเป็นเวลา 7 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์หา α-glucosidase activity (McCue and Shetty 2003, Saman 2009).

2.6.1.1 การวิเคราะห์หา α-glucosidase

เตรียมสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อราแต่ละชนิดปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมสารละลาย p-nitrophenol-α-D-glucopyranoside ความเข้มข้น 9 มิลลิโมล ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร และสารละลาย sodium acetate buffer ความเข้มข้น 200 มิลลิโมล pH 4.6 ปริมาณ 0.8 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50°ซ. เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นหยุดการทำงานของเอนไซม์โดยการเติมสารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 100 มิลลิโมล ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมส่วนต่างๆ ให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนน้ำใสที่ความเร็ว 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายใสที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร.

α-glucosidase activity 1 ยูนิต (U) มีค่าเท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์ที่ปลดปล่อย p-nitrophenol 1 ไมโครโมล ต่อนาที ที่ pH 4.6 และที่อุณหภูมิ 50°ซ.

2.6.1.2 การคัดเลือกเชื้อราที่สามารถเกิด transglucosylation

เมื่อได้เชื้อราที่ผลิต α-glucosidase จะทำการทดสอบการเกิด transglucosylation โดยหา transglucosidase activity (Chen *et al*. 2011) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว PDB ใส่ในขวดทดลองปริมาณ 300 มิลลิลิตร นำไปนึ่งเพื่อฆ่าเชื้อที่ 121 °ซ. เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ลงในขวดทดลองแต่ละขวด นำไปเพาะเลี้ยงแบบเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เก็บตัวอย่างในแต่ละวันเป็นเวลา 7 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์หา transglucosidase activity.

Transglucosidase activity จะวิเคราะห์โดยใช้วิธีของ Chen *et al*. (2011) และ Sheu *et al*. (1997) โดยเตรียมสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อราแต่ละชนิดปริมาณ 10 มิลลิลิตร เติม 10 มิลลิลิตร ของสารละลายน้ำตาลมอลโทส (maltose) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ละลายใน sodium acetate buffer 0.1 M pH5 ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยนำไปต้มที่ 100°ซ. เป็นเวลา 10 นาที นำไปวิเคราะห์หาปริมาณ panose ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง HPLC.

Transglucosidase activity 1 ยูนิต (U) มีค่าเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ผลิต panose 1 ไมโครโมลต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°ซ., pH 5.0.

2.6.2 การผลิตสารพรีไบโอติกจากกระบวนหมักด้วยเชื้อรา

2.6.2.1 การเตรียมสปอร์เชื้อรา

เลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่ 30°ซ. จนเกิดสปอร์เต็มที่เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเตรียมสารละลายสปอร์โดยใช้น้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้ได้เท่ากับ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร.

2.6.2.2 การเตรียมวัตถุดิบในการหมัก

ชั่งข้าวเหนียวปริมาณ 200 กรัม ใส่ลงในขวดทดลองขนาด 1 ลิตร ปรับความชื้นให้เป็น 6 เปอร์เซ็นต์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง.

2.6.2.3 การหมักข้าวด้วยกระบวนการหมักแบบแห้ง

ผสมสารละลายสปอร์ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ใส่ลงในขวดทดลองที่บรรจุวัตถุดิบ ผสมส่วนผสมต่างๆ ให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างข้าวหมักเพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (total reducing sugar, TRS) (Miller 1959) ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ย่อยแป้ง (amylolytic activity) (Terashima *et al*. 1994) α-glucosidase (McCue and Shetty 2003) และวัดปริมาณน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยเครื่อง HPLC.

2.6.2.4 การย่อยสลายแป้งข้าวหมัก (Mashing)

ข้าวหมักที่ผ่านการหมักในระยะเวลาและสภาวะที่เหมาะสม จะมีเอนไซม์ต่างๆ ที่สามารถนำมาใช้ในการย่อยสลายแป้งข้าวที่เหลือ เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และโอลิโกแซ็กคาไรด์สูงขึ้น ในกระบวนการย่อยแป้งจะใช้วิธีของ Okafor and Iwouno (1990) โดยนำข้าวหมักที่ได้มาเติมด้วย $CaCl_2$ ปริมาณ 0.003 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่า pH 6 ด้วยกรดแล็กติกผสมส่วนผสมต่างๆ ให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 50°ซ. เป็นเวลา 30 นาที, หลังจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 60°ซ. บ่มต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลากำหนด ปรับค่า pH ของข้าวหมักให้เป็น 5.6 แล้วบ่มต่อไปอีก 1 ชั่วโมง นำสารละลายข้าวหมักที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง เพื่อแยกกากและสารแขวนลอย ส่วนน้ำใสที่ได้นำไปต้มเป็นเวลา 30 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ เก็บตัวอย่างสารละลายไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ ด้วยเครื่อง HPLC.

2.6.3 การทดสอบคุณสมบัติพรีไบโอติก

ทดสอบคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกเบื้องต้นโดยดูจากความสามารถในการกระตุ้นการเจริญของเชื้อโพรไบโอติกและสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค ในการทดสอบทำโดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่ใช้สารตัวอย่างแทนน้ำตาล นำไปนึ่งที่ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที เติมเชื้อ *B. animalis* และ *E. coli* บ่มเลี้ยงที่ 37 °ซ. เป็นเวลา 48 ชั่งโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง เพื่อติดตามการเจริญของเชื้อทั้งสองชนิด.

2.6.4 การทดสอบผลิตภัณฑ์พรีไบโอติกในการเลี้ยงสุกรภาคสนาม

2.6.4.1 สัตว์ทดลอง

ใช้ลูกสุกรลูกผสม 3 สายพันธุ์ (ลาร์จไวท์ × ดูร็อค × แลนด์เรช) อายุ 4 สัปดาห์ น้ำหนักเฉลี่ย 8.0 กิโลกรัม จำนวน 48 ตัว แบ่งลูกสุกรออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 4 ตัว คละเพศ (เพศผู้ตอน 2 ตัว เพศเมีย 2 ตัว) ทดลองเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์.

2.6.4.2 โรงเรือน

เลี้ยงในคอกขนาด 2X2 เมตร พื้นสแลทในโรงเรือนแบบเปิด สุกรสามารถกินอาหารและน้ำได้ตลอดเวลา.

2.6.4.3 อาหารทดลอง

อาหารทดลองทุกสูตรเป็นชนิดผงโดยให้ลูกสุกรแต่ละกลุ่มกินอาหารทดลอง ดังนี้

สูตรที่ 1 อาหารสูตรปลายข้าว ถั่วเหลืองไขมันเต็ม กากถั่วเหลือง (อาหารสูตรควบคุม)

สูตรที 2 อาหารสูตรควบคุม + สารละลาย isomalto-oligosaccharide 2.5 มิลลิลิตร/ตัว/วัน

สูตรที่ 3 อาหารสูตรควบคุม + สารละลาย isomalto-oligosaccharides 5 มิลลิลิตร/ตัว/วัน

สูตรที่ 4 อาหารสูตรควบคุม + สารละลาย isomalto-oligosaccharides 10 มิลลิลิตร/ตัว/วัน

2.6.4.4 การเก็บตัวอย่างและบันทึกข้อมูล

1. วิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนะของอาหารทดลอง ได้แก่ ความชื้น, โปรตีน, ไขมัน, เยื่อใย, เถ้า, แคลเซียม และฟอสฟอรัส ตามวิธีของ A.O.A.C. (1970).

2. บันทึกน้ำหนักเริ่มต้นการทดลอง และชั่งน้ำหนักสุกรทดลองทุก 2 สัปดาห์.

3. บันทึกปริมาณอาหารที่กิน และคำนวณประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหาร.

4. เก็บตัวอย่างมูลสุกรทุกๆ สัปดาห์ เพื่อหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ประกอบด้วย lactic acid bacteria coliform และ *E. coli*.

2.6.4.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด Completely Randomized Design วิเคราะห์ความแปรปรวน Analysis of variance และเปรียบเทียบความแตกต่างโดย Duncan's New Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS.

รูปที่ 1. ลูกสุกรลูกผสม 3 สายพันธุ์ ที่ใช้ในการทดลอง.

(ก) (ข)

รูปที่ 2. การเตรียมอาหารสำหรับสุกร.

2.6.5 การฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์และการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

สารละลาย IMO ที่ได้จะนำมาศึกษาวิธีการเก็บรักษาที่เหมาะสม โดยการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายด้วยวิธีการระเหยเอาน้ำออกปริมาณ 10 ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นบรรจุสารละลายลงในขวดแก้วฝาเกลียว นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยวิธีพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 80°ซ. เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจุ่มลงในน้ำเย็นจัดทันทีที่อุณหภูมิ 0°ซ. เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำอีกครั้งที่อุณหภูมิและเวลาเดียวกัน นำไปเก็บรักษาโดยเปรียบเทียบการเก็บที่อุณหภูมิ 0-4°ซ. และที่อุณหภูมิห้อง (27-30°ซ.) เก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในระยะเวลา 7 เดือน.

เก็บตัวอย่างสารละลายในช่วงเวลาต่างๆ นำมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดที่ต้องการออกซิเจนและไม่ต้องการออกซิเจน *E. coli* coliform ยีสต์ และรา โดยเจือจางตัวอย่างสารละลายในอัตราส่วนที่เหมาะสมด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA EMB และ PDA ที่เติม amoxicillin 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 1-2 วัน ยกเว้น ยีสต์ และรานำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°ซ. เป็นเวลา 3-5 วัน การตรวจผลของ *E.coli* และโคลิฟอร์ม โดยดูจากโคโลนีของเชื้อโคลิฟอร์มจะมีสีแดงและเกิดฟองอากาศรอบๆ โคโลนี ส่วนโคโลนีของ *E. coli* จะมีสีมันวาวคล้ายโลหะ.

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

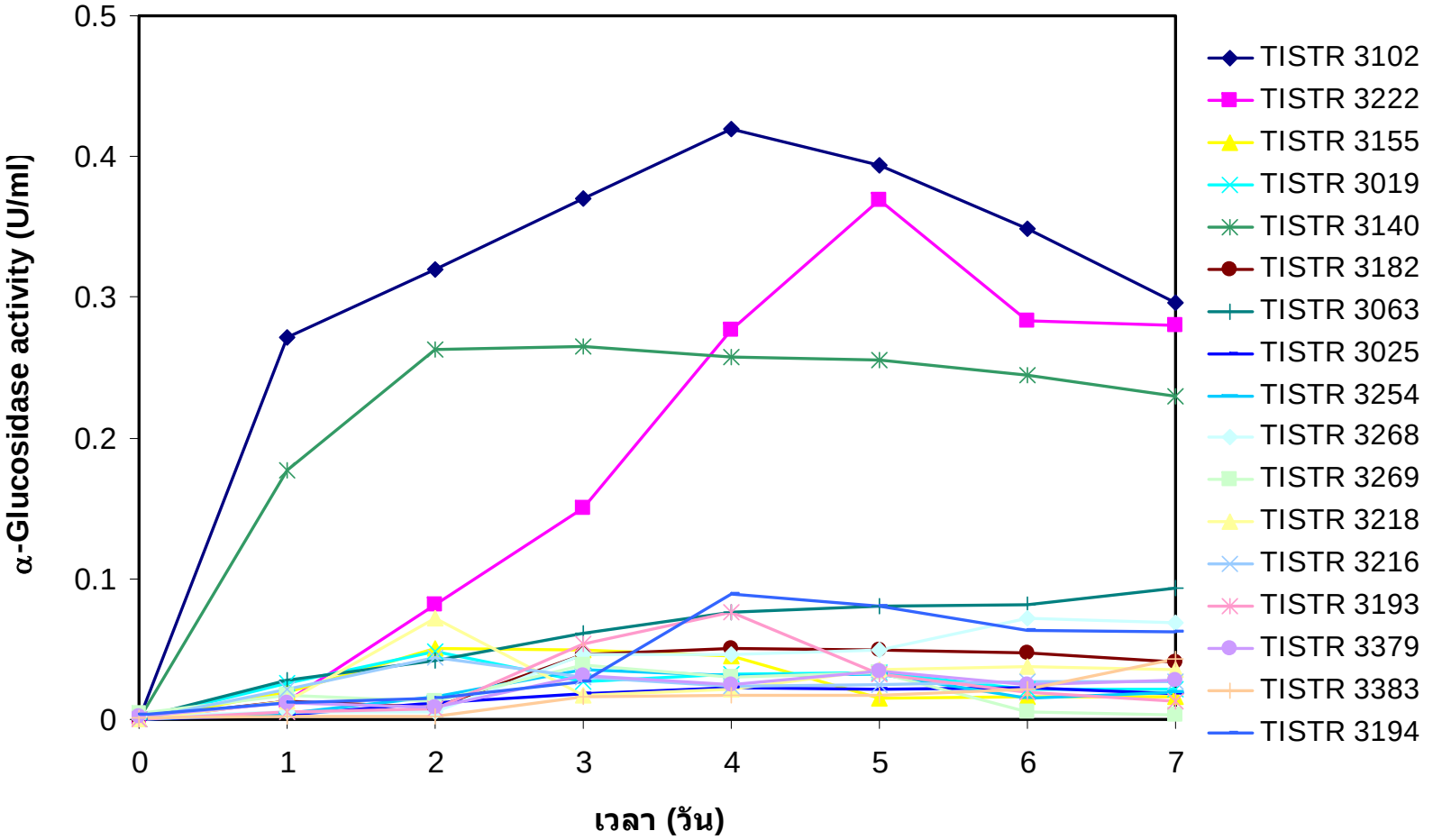
3.1 การคัดเลือกหาเชื้อราที่ผลิต α-glucosidase ที่มี transglucosylation

3.1.1 การหาเชื้อราที่ผลิต α-glucosidase

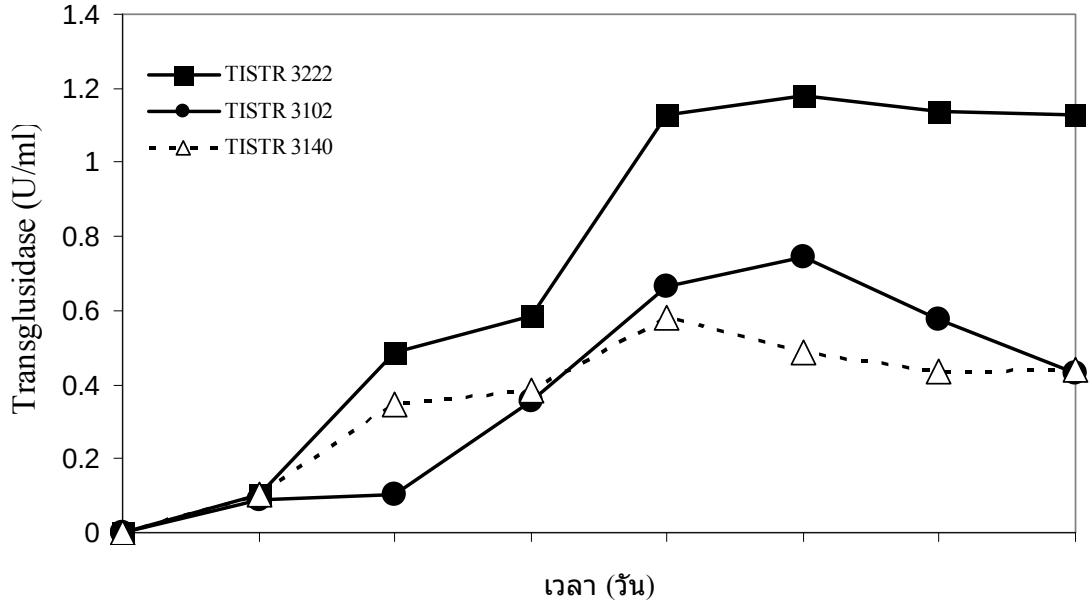
จากการคัดเลือกเชื้อรา 17 สายพันธุ์ ได้แก่ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182, *Aspergillus oryzae* TISTR 3102, *Aspergillus oryzae* TISTR 3019, *Aspergillus oryzae* TISTR 3222, *Aspergillus niger* TISTR 3063, *Aspergillus niger* TISTR 3025, *Aspergillus niger* TISTR 3254, *Aspergillus usamii varshiro usamii* TISTR 3140, *Aspergillus candidus* TISTR 3268, *Aspergillus japonicus* TISTR 3269, *Aspergillus alliaccus* TISTR 3218, *Aspergillus avenaccus* TISTR 3216, *Aspergillus awamorii* TISTR 3193, *Aspergillus awamorii* TISTR 3379, *Rhizopus oryzae* TISTR 3155, *Aspergillus foetidus* TISTR 3383 และ *Aspergillus kawachi* TISTR 3194 เพื่อใช้ในการผลิต α-glucosidase พบว่า *Aspergillus oryzae* TISTR 3102 มีค่า α-glucosidase activity สูงที่สุดที่วันที่ 5 มีค่า 0.43 ยูนิต/มิลลิลิตร รองลงมาคือ *Aspergillus oryzae* TISTR 3222 (0.37 ยูนิต/มิลลิลิตร) และ *Aspergillus usamii* TISTR 3140 (0.25 ยูนิต/มิลลิลิตร) ตามลำดับ ส่วนสายพันธุ์ราที่เหลือให้ค่า α-glucosidase ต่ำกว่า 0.1 ยูนิต/มิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 3.

3.1.2 การทดสอบปฏิกิริยา transglucosylation

การทดสอบการเกิด transglucosylation จะวิเคราะห์โดยหาค่า transglucosidase activity ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4 *A. oryzae* TISTR 3222 มีค่า transglucosidase สูงสุดที่ 1.18 ยูนิต/มิลลิลิตร ในวันที่ 5 รองลงมาคือ *A. oryzae* TISTR 3102 (0.75 ยูนิต/มิลลิลิตร) และ *A. usamii* TISTR 3140 (0.58 ยูนิต/มิลลิลิตร) ตามลำดับ เชื้อราทั้งสามสายพันธุ์นี้จะนำไปทดสอบการผลิตเอนไซม์ในระบบการหมักแบบแห้งในขั้นตอนต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 5.



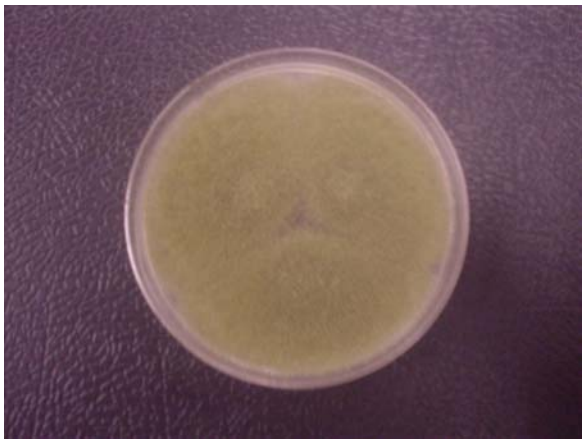
รูปที่ 3. เปรียบเทียบปริมาณ α-glucosidase ของเชื้อรา 17 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงในอาหารเหลว PDB ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 7 วัน.



รูปที่ 4. การผลิต transglucosidase ของ *A. oryzae* TISTR 3102, *A. oryzae* TISTR 3222 และ *A. usamii* TISTR 3140 ในอาหารเหลว PDB ที่อุณหภูมิ 30°ซ.

(ก)

(ข)



(ค)

รูปที่ 5. สายพันธุ์เชื้อราที่ใช้ในการทดสอบ transglucosylation.

(ก) *A. oryzae* TISTR 3102

(ข) *A. oryzae* TISTR 3222

(ค) *A. usamii* TISTR 3140

3.2 การหมักแบบแห้งเพื่อผลิตโอลิโกแซคคาไรด์พรีไบโอติก

จากรายงานของ Pandy *et al.* (1999) และ Holker *et al.* (2004) ได้แสดงให้เห็นว่าการหมักแบบแห้งสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์ได้, การหมักแบบนี้จึงนิยมใช้ในการผลิตเอนไซม์ต่างๆ ที่ใช้ในอุตสาหกรรม เช่น α-amylase, glucoamylase, cellulose, xylanase (Couto and Sanroman 2006), ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่การหมักแบบแห้งจะสามารถเพิ่มปริมาณการผลิต α-glucosidase ได้มากกว่าการเลี้ยงในอาหารเหลว.

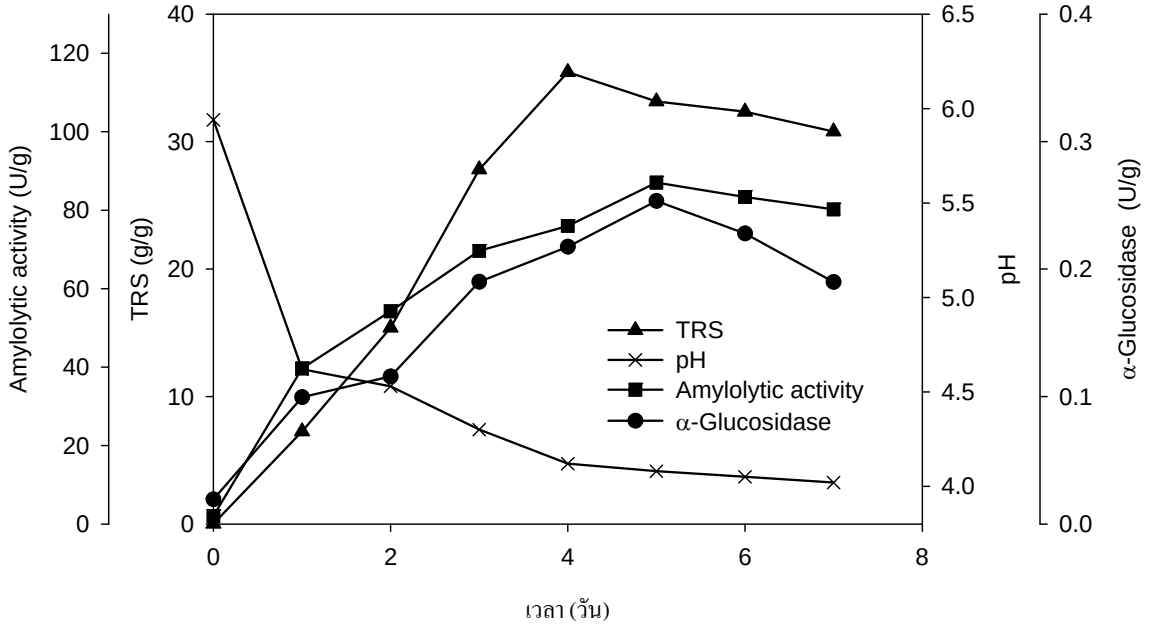
การทดลองในขั้นต่อไปจะทดสอบการผลิต α-glucosidase ในระบบการหมักแบบแห้งโดยใช้ข้าวเหนียวเป็นวัตถุดิบ ทดสอบกับเชื้อราที่คัดเลือกได้ 3 สายพันธุ์ คือ *A. oryzae* TISTR 3102, *A. oryzae* TISTR 3222 และ *A. usamii* TISTR 3140.

ผลการทดลองพบว่า *A. oryzae* TISTR 3222 ผลิต α-glucosidase ได้สูงสุดในวันที่ 5 รองลงมาคือ *A. oryzae* TISTR 3102 และ *A. usamii* TISTR 3140 ตามลำดับ. ปริมาณ amylolytic activity พบสูงสุดเมื่อหมักด้วย *A. oryzae* TISTR 3102 รองลงมาพบในการหมักของ *A. oryzae* TISTR 3222 และ *A. oryzae* TISTR 3140 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 6-8.

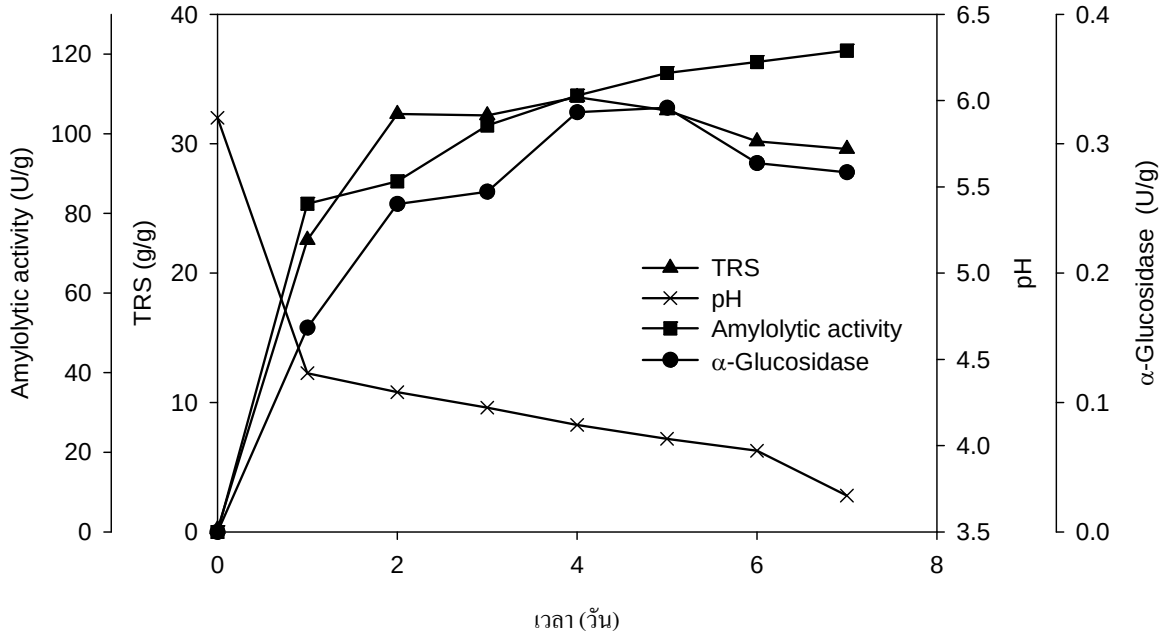
ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบสูงสุดในการหมักด้วย *A. oryzae* TISTR 3140 ในวันที่ 4 รองลงมาพบในการหมักของ *A. oryzae* TISTR 3222 และ *A. oryzae* TISTR 3102, ส่วนค่า pH มีแนวโน้มลดลง เนื่องจากมีการสร้างกรดในระหว่างกระบวนการหมักทั้ง 3 สายพันธุ์.

เมื่อนำตัวอย่างข้าวหมักมาวิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยแผ่น TLC ผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 9 ตัวอย่างข้าวหมักที่เก็บในวันเริ่มต้นของเชื้อรา 3 สายพันธุ์ จะไม่พบแถบสีของน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ แต่จะเริ่มพบแถบสีของน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์เมื่อวันที่ 1 โดยเปรียบเทียบกับแผ่น TLC ที่มีน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ (แผ่น ก) ความเข้มของแถบสีสามารถบอกได้ถึงความเข้มข้นของสารที่เกิดขึ้น เพื่อเป็นการวิเคราะห์หาปริมาณสารที่เกิดจึงจำเป็น ต้องวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC.

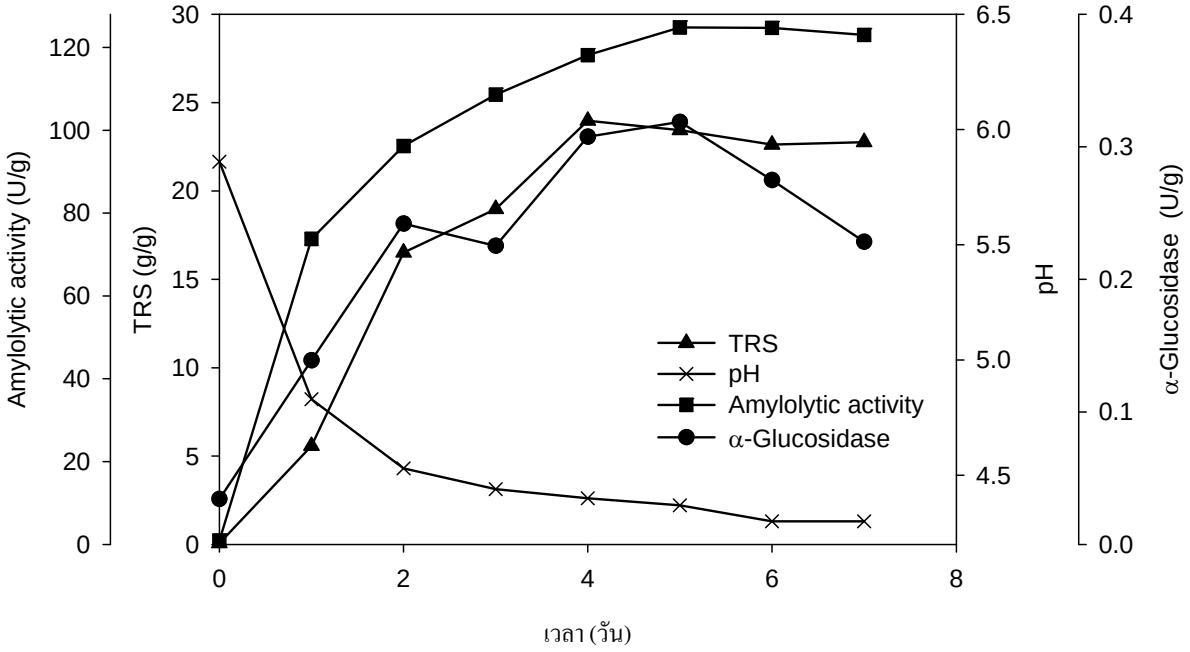
เชื้อราทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถผลิต isomalto-oligosaccharides (isomaltose, panose และ isomaltotriose) โดยที่ *A. oryzae* TISTR 3222 ผลิต isomalto-oligosaccharides ได้สูงสุด รองลงมาคือ *A. oryzae* TISTR 3102 ส่วนเชื้อ *A. usamii* TISTR 3140 ผลิตได้เพียง isomaltose และ isomaltotriose ดังแสดงในรูปที่ 10-12 ดังนั้น ในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้เฉพาะ *A. oryzae* TISTR 3222 ในกระบวนการหมักเพื่อผลิต isomalto-oligosaccharides.



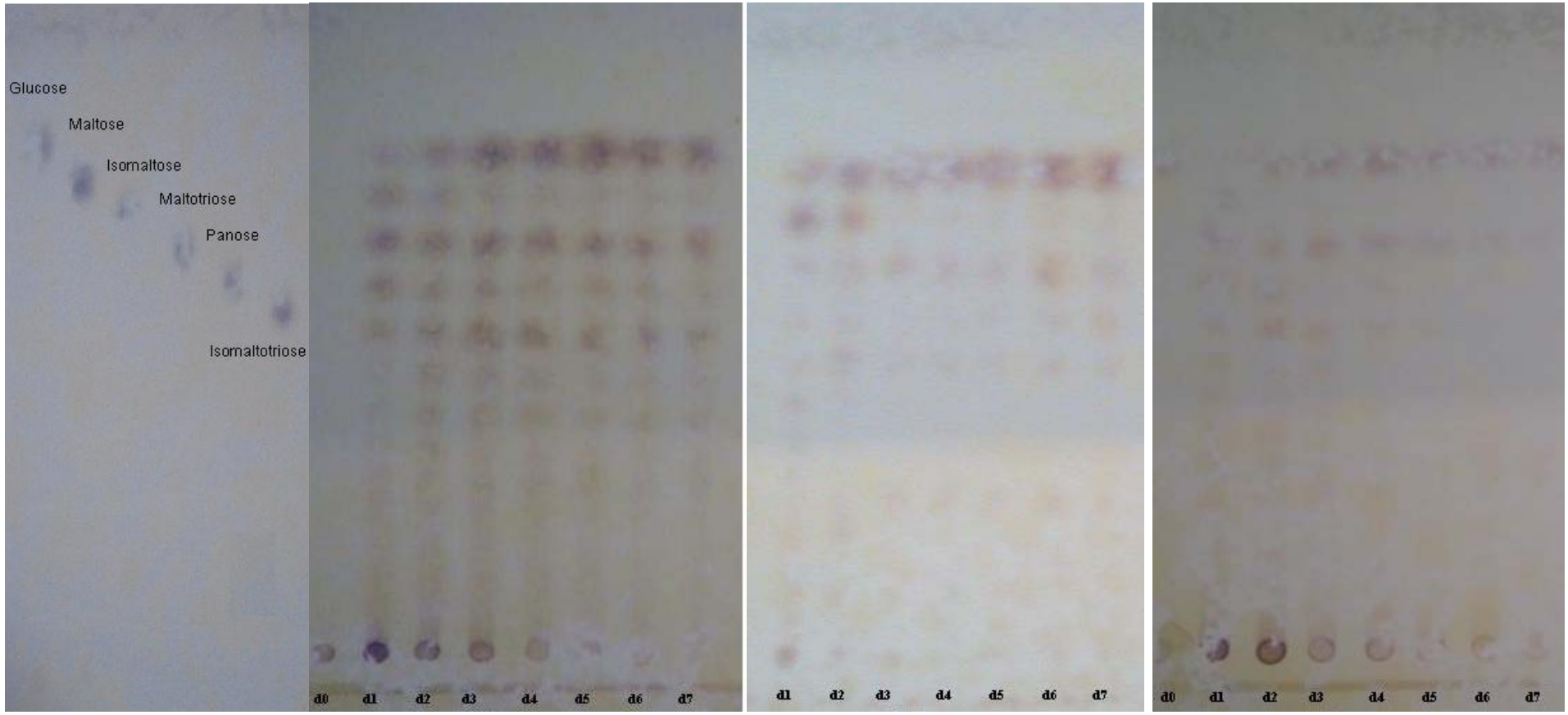
รูปที่ 6. ปริมาณ α-glucosidase, amylolytic activity, total reducing sugar และ pH ที่เกิดขึ้นในการหมักแบบแห้งของ *A. usamii* TISTR 3140.



รูปที่ 7. ปริมาณ α-glucosidase, amylolytic activity, total reducing sugar และ pH ที่เกิดขึ้นในการหมักแบบแห้งของ *A. oryzae* TISTR 3222.

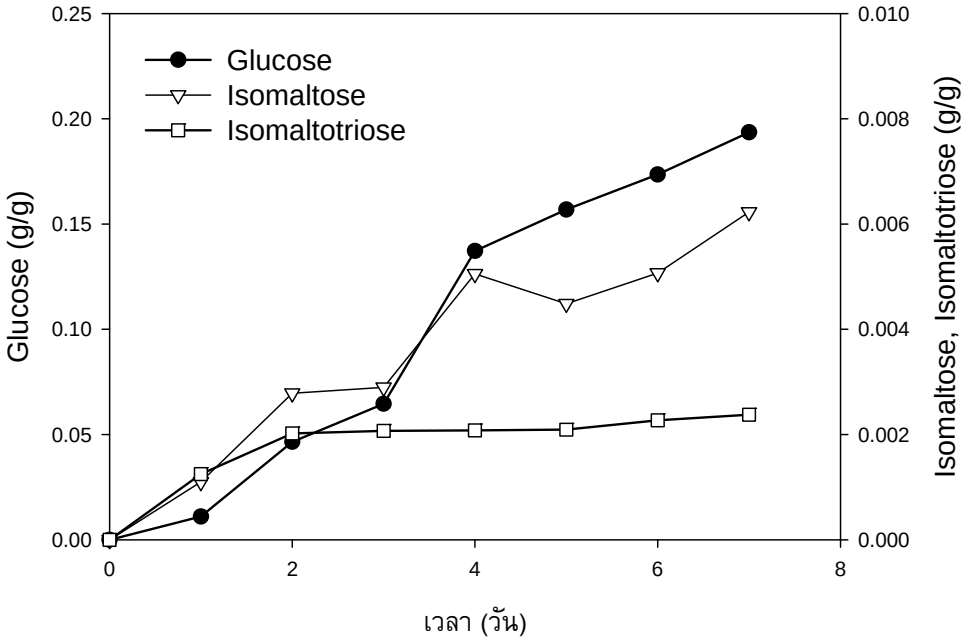


รูปที่ 8. ปริมาณ α-glucosidase, amylolytic activity, total reducing sugar และ pH ที่เกิดขึ้นในการหมักแบบแห้งของ *A. oryzae* TISTR 3102.

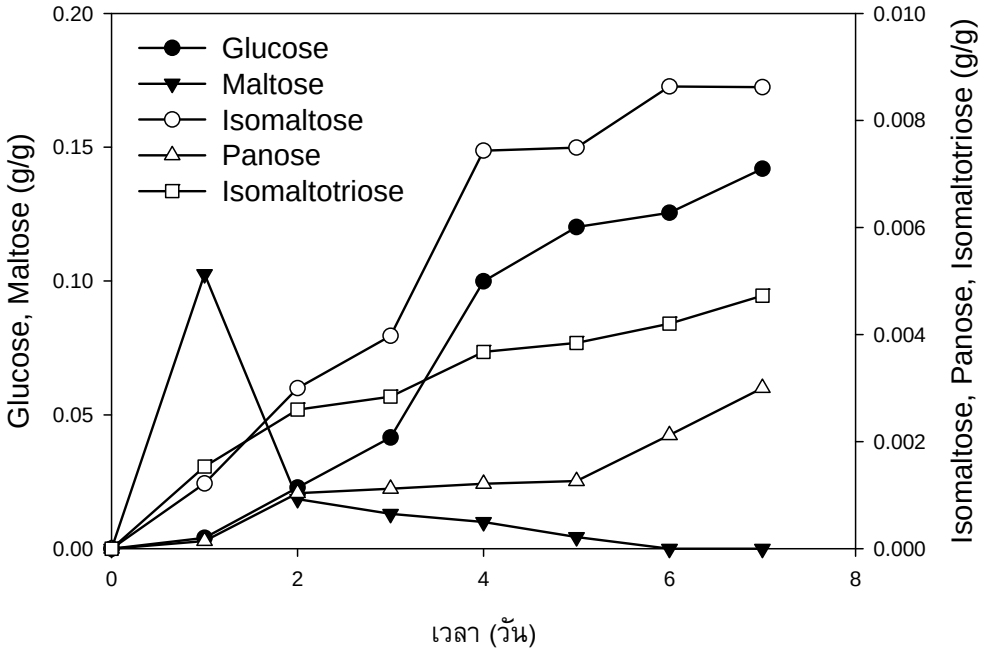


(ก) (ข) (ค) (ง)

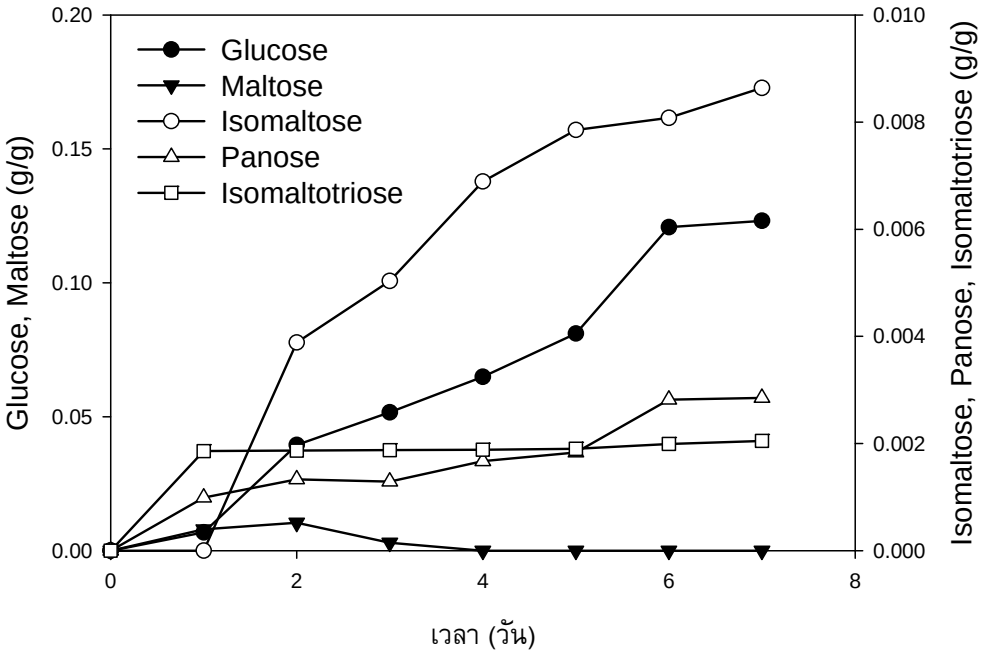
รูปที่ 9. Thin layer chromatography ของสารตัวอย่าง (ก) สารมาตรฐานน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ข) สารที่ผลิตจากการหมักของ *A. oryzae* TISTR 3222 (ค) สารที่ผลิตจากการหมักของ *A. oryzae* TISTR 3102 และ (ง) สารที่ผลิตจากการหมักของ *A. oryzae* TISTR 3140 ในระยะ 7 วัน.



รูปที่ 10. ปริมาณ glucose isomaltose และ isomaltotriose ที่เกิดขึ้นในการหมักแบบแห้งของ *A. usamii* TISTR 3140.



รูปที่ 11. ปริมาณ glucose maltose isomaltose panose และ isomaltotriose ที่เกิดขึ้นในการหมักแบบแห้งของ *A. oryzae* TISTR 3222.

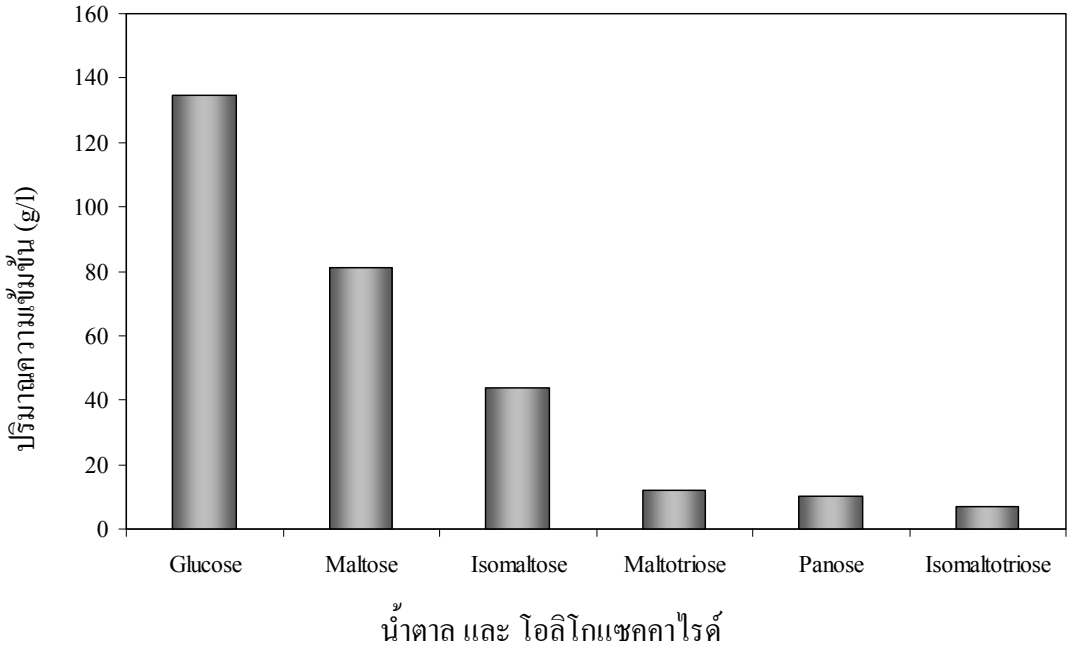


รูปที่ 12. ปริมาณ glucose maltose isomaltose panose และ isomaltotriose ที่เกิดขึ้นในการหมักแบบแห้งของ *A. oryzae* TISTR 3102.

3.3 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีในกระบวนการย่อยแป้งหมัก

ภายหลังจากหมักข้าวเหนียวด้วย *A. oryzae* TISTR 3222 ในสภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลา 5 วัน ข้าวหมักจะมีเอนไซม์ต่างๆ ที่สามารถนำไปใช้ย่อยสลายแป้งที่เหลือ โดยการปรับอุณหภูมิและค่า pH ให้เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ บ่มจนแป้งข้าวถูกย่อยสลายกลายเป็นน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ หลังจากนั้นสารละลายข้าวที่ได้ จะนำเข้าสู่กระบวนการทรานกลูโคซิลเลชันเพื่อเปลี่ยนโมเลกุลน้ำตาลให้กลายเป็นโมเลกุล isomalto-oligosaccharides ด้วยการทำงานของ transglucosidase เอนไซม์นี้เป็น α-glucosidase ชนิดหนึ่งที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา transglucosylation ได้.

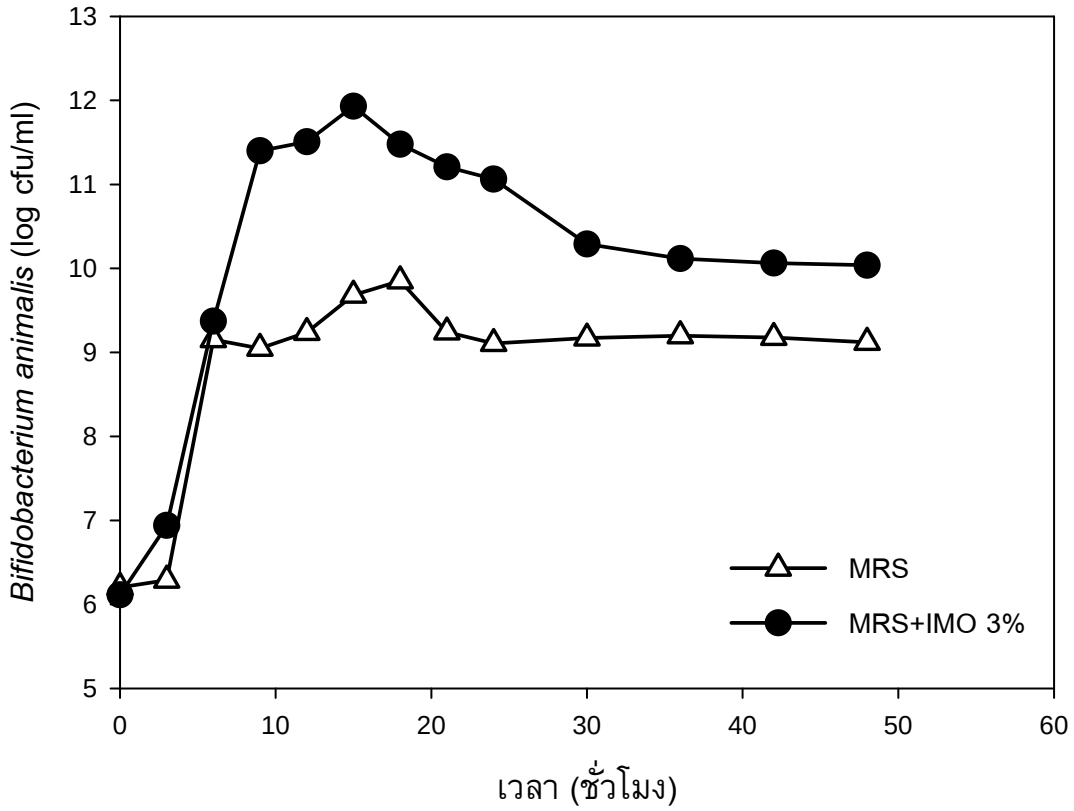
ดังรูปที่ 13 แสดงปริมาณน้ำตาลต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายหลังจากกระบวนการย่อยสลายแป้งข้าวที่หมักด้วย *A. oryzae* TISTR 3222 ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์พบว่าภายหลังกระบวนการย่อยแป้งข้าวหมักจะเกิดสารประกอบและน้ำตาลหลายชนิด โดยมีปริมาณ glucose สูงสุดที่ 135 กรัม/ลิตร รองลงมาคือ maltose (81 กรัม/ลิตร) และ maltotriose (12 กรัม/ลิตร) ส่วนโมเลกุลของ IMO ที่เกิดขึ้น ได้แก่ isomaltose, panose และ isomaltotriose โดยมีปริมาณ 44 กรัม/ลิตร, 10 และ 7 กรัม/ลิตร ตามลำดับ.



รูปที่ 13. ปริมาณ glucose maltose maltotriose isomaltose panose และ isomaltotriose ที่เกิดขึ้นภายหลังจากการย่อยแป้งหมักของ *A. oryzae* TISTR 3222.

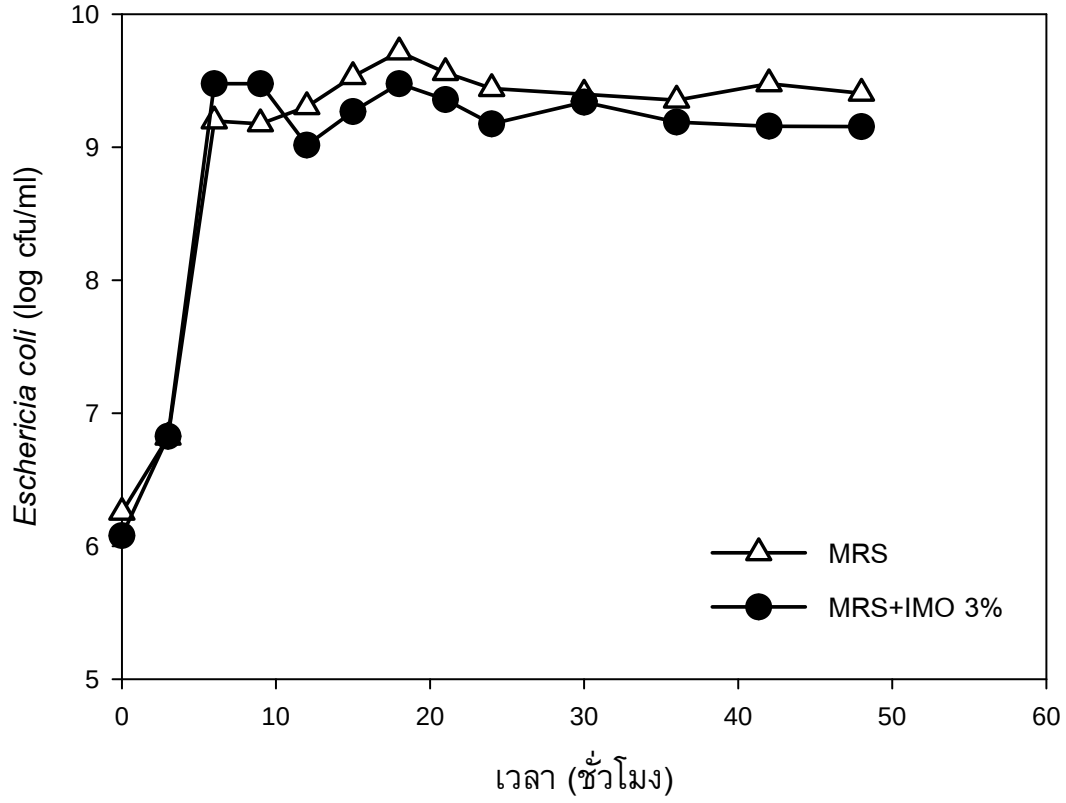
3.3.1 การทดสอบคุณสมบัติพรีไบโอติก

จากการติดตามการเจริญของ *B. aminalis* โดยเปรียบเทียบระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อสองชนิด คือ MRS และ MRS+IMO 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *B. animalis* เจริญในอาหาร MRS+IMO 3 เปอร์เซ็นต์ ได้ดีกว่าอาหาร MRS โดยดูจากปริมาณความเข้มข้นของเชื้อที่มากกว่า ดังแสดงในรูปที่ 14 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า IMO มีส่วนช่วยในการกระตุ้นการเจริญของ *B. aminalis*.



รูปที่ 14. การเจริญของ *B. animalis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และ MRS+IMO 3 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงที่ 37°ซ. ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.

รูปที่ 15 เปรียบเทียบการเจริญของ *E. coli* ระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อสองชนิดคือ MRS และ MRS+IMO 3 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองพบว่า *E. coli* เจริญในอาหาร MRS+IMO 3 เปอร์เซ็นต์ แต่มีปริมาณเซลล์น้อยกว่าในอาหาร MRS ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า *E. coli* เจริญได้ไม่ดีในอาหารที่มี IMO ผสมอยู่.



รูปที่ 15. การเจริญของ *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และ MRS+IMO 3 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงที่ 37°ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.

3.3.2 การทดสอบผลิตภัณฑ์พรีไบโอติกในการเลี้ยงสุกร

ในการทดสอบประสิทธิภาพของ IMO ต่อการเจริญเติบโตของสุกร อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงจะเป็นอาหารที่ผลิตขึ้นเอง เพื่อเป็นการควบคุมคุณภาพอาหารให้เหมาะสมจึงใช้อาหารสูตรเดียวตลอดการทดลอง ผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบและคุณค่าโภชนาการของอาหารที่ใช้ในการทดลองเลี้ยงสุกร ดังแสดงในตารางที่ 1.

ตารางที่ 1. ส่วนประกอบของอาหารทดลองและคุณค่าทางโภชนาการ

วัตถุดิบ	สูตรอาหารควบคุม
ปลายข้าว	53.79
ถั่วเหลืองเอ็กทรูดซ์	20
กากถั่วเหลือง (โปรตีน 48 เปอร์เซ็นต์)	15
ปลาป่น (โปรตีน 60 เปอร์เซ็นต์)	5
น้ำมันถั่วเหลือง	1.80
ไดแคลเซียมฟอสเฟต (ฟอสฟอรัส 18 เปอร์เซ็นต์)	3.10
เกลือ	0.35
แอล-ไลซีน	0.20
ดีแอล-เมทไทโอนีน	0.26
วิตามิน-แร่ธาตุ	0.50
รวม	**100**
องค์ประกอบทางโภชนะจากการคำนวณ	
โปรตีน (เปอร์เซ็นต์)	22
พลังงานใช้ประโยชน์ได้ (กิโลแคลอรี/กิโลกรัม)	3,394
แคลเซียม (เปอร์เซ็นต์)	1.10
ฟอสฟอรัสใช้ประโยชน์ได้ (เปอร์เซ็นต์)	0.80
ไลซีน (เปอร์เซ็นต์)	1.46
เมทไทโอนีน+ซีสติน (เปอร์เซ็นต์)	0.95
ทริปโตเฟน (เปอร์เซ็นต์)	0.29
ทรีโอนีน (เปอร์เซ็นต์)	0.93
ไขมัน (เปอร์เซ็นต์)	5.60
เยื่อใย (เปอร์เซ็นต์)	2.20

3.3.2.1 ผลของสารละลาย IMO ต่อสมรรถภาพการผลิต

ผลการทดลองการเสริมสารละลาย IMO ในลูกสุกรหลังหย่านมที่อายุ 4-10 สัปดาห์ พบว่าลูกสุกรที่อายุ 4-6 สัปดาห์ ดังแสดงในตารางที่ 2 มีปริมาณการกินอาหารใกล้เคียงกันทุกกลุ่มการทดลอง สำหรับน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นพบว่า กลุ่มที่เสริมด้วย IMO ระดับ 2.5 และ 5 มิลลิลิตร/ตัว/วัน มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกันกับลูกสุกรกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้มีการเสริมสาร IMO ส่วนกลุ่มที่ให้สารเสริม IMO 10 มิลลิลิตร/ตัว/วัน (สูตรที่ 4) มีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นสูงกว่ากว่าควบคุม 0.35 กิโลกรัม/ตัว ทำให้สุกรกลุ่มที่ 4 มีประสิทธิภาพการใช้อาหารดีกว่าด้วย คือใช้อาหาร 1.33 กิโลกรัมต่อการเพิ่มน้ำหนักตัว 1กิโลกรัม ในขณะที่กลุ่มควบคุมใช้อาหาร 1.85 กิโลกรัมต่อการเพิ่มน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม แต่ความแตกต่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ส่วนการทดลองในสุกรช่วงอายุ 6-8 สัปดาห์ และ 8-10 สัปดาห์นั้น พบว่ามีสมรรถภาพการผลิตที่ใกล้เคียงกันทุกสูตรการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 3 และ 4.

ตารางที่ 2. ผลการใช้สารเสริม isomalto-oligosaccharide ต่อสมรรถภาพการผลิตของลูกสุกรอายุ 4-6 สัปดาห์

Treatment	น้ำหนักเริ่มต้น (กก./ตัว)	น้ำหนักสุดท้าย (กก./ตัว)	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กก./ตัว)	อัตราการกิน (feed intake) (กก./ตัว)	อัตราการแลกเนื้อ (FCR)	ระยะเวลา (วัน)	น้ำหนักที่เพิ่มต่อวัน (ADG) (กก./วัน)
1	7.97	9.82	1.85	3.06	1.65	14	0.13
2	8.00	9.75	1.75	2.9	1.66	14	0.13
3	8.07	10.01	1.94	3.28	1.69	14	0.14
4	8.03	10.23	2.20	2.93	1.33	14	0.16
p-value	0.9993 ^{ns}	0.8661 ^{ns}	0.8175 ^{ns}	0.7783 ^{ns}	0.8110 ^{ns}		0.8324 ^{ns}

หมายเหตุ:

ns = non significant, P>0.05

1 = ลูกหมูที่ให้อาหารสูตรควบคุม 2 = ลูกหมูที่ให้สารละลาย IMO 2.5 มิลลิลิตร/ตัว/วัน

3 = ลูกหมูที่ให้สารละลาย IMO 5 มิลลิลิตร/ตัว/วัน 4 = ลูกหมูที่ให้สารละลาย IMO 10 มิลลิลิตร/ตัว/วัน

ตารางที่ 3. ผลการใช้สารเสริม isomalto-oligosaccharide ต่อสมรรถภาพการผลิตของลูกสุกรอายุ 6-8 สัปดาห์

Treatment	น้ำหนักเริ่มต้น (กก./ตัว)	น้ำหนักสุดท้าย (กก./ตัว)	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กก./ตัว)	อัตราการกิน (feed intake) (กก./ตัว)	อัตราการแลกเนื้อ (FCR)	ระยะเวลา (วัน)	น้ำหนักที่เพิ่มต่อวัน (ADG) (กก./วัน)
1	9.82	13.88	4.06	7.13	1.76	14	0.29
2	9.75	13.45	3.70	6.78	1.83	14	0.26
3	10.01	13.55	3.54	5.86	1.66	14	0.25
4	10.23	14.13	3.90	6.83	1.75	14	0.28
p-value	0.8661 ns	0.8603 ns	0.8950 ns	0.4454 ns	0.8779 ns		0.8852 ns

หมายเหตุ:

ns = non significant, P>0.05

1 = ลูกหมูที่ให้อาหารสูตรควบคุม 2 = ลูกหมูที่ให้สารละลาย IMO 2.5 มิลลิลิตร/ตัว/วัน

3 = ลูกหมูที่ให้สารละลาย IMO 5 มิลลิลิตร/ตัว/วัน 4 = ลูกหมูที่ให้สารละลาย IMO 10 มิลลิลิตร/ตัว/วัน

ตารางที่ 4. ผลการใช้สารเสริม isomalto-oligosaccharide ต่อสมรรถภาพการผลิตของลูกสุกรอายุ 8-10 สัปดาห์

Treatment	น้ำหนักเริ่มต้น (กก./ตัว)	น้ำหนักสุดท้าย (กก./ตัว)	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กก./ตัว)	อัตราการกิน (feed intake) (กก./ตัว)	อัตราการแลกเนื้อ (FCR)	ระยะเวลา (วัน)	น้ำหนักที่เพิ่มต่อวัน (ADG) (กก./วัน)
1	13.88	18.72	4.84	8.75	1.81	14	0.35
2	13.45	18.62	5.17	9.17	1.77	14	0.37
3	13.55	18.89	5.34	9.13	1.71	14	0.38
4	14.13	19.22	5.09	9.01	1.77	14	0.36
p-value	0.8603^{ns}	0.6274^{ns}	0.5967^{ns}	0.6707^{ns}	0.9792^{ns}		0.5942^{ns}

หมายเหตุ:

ns = non significant, P>0.05

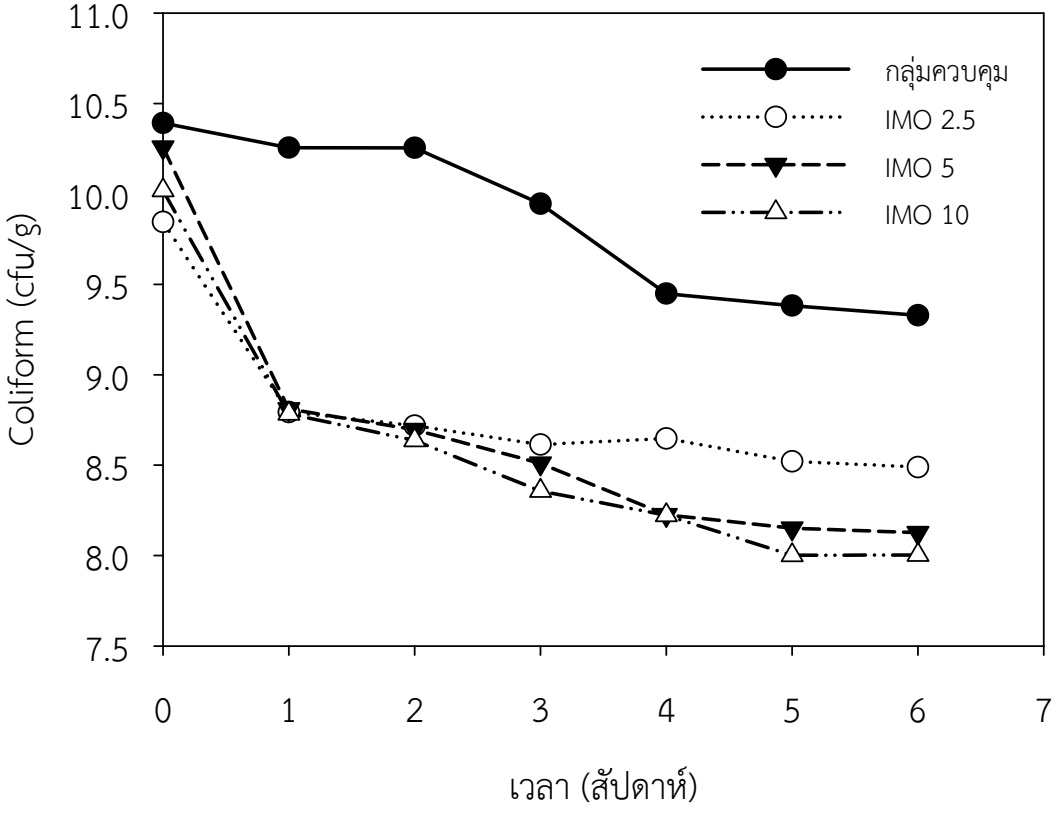
1 = ลูกหมูที่ให้อาหารสูตรควบคุม 2 = ลูกหมูที่ให้สารละลาย IMO 2.5 มิลลิลิตร/ตัว/วัน

3 = ลูกหมูที่ให้สารละลาย IMO 5 มิลลิลิตร/ตัว/วัน 4 = ลูกหมูที่ให้สารละลาย IMO 10 มิลลิลิตร/ตัว/วัน

3.3.2.2 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในมูลสุกร

จากผลการทดสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในมูลสุกรในระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณโคลิฟอร์มในลูกหมูที่ได้รับสารละลาย IMO ทั้งสามระดับ มีปริมาณน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 16 นอกจากนี้ ลูกหมูที่ได้รับสารละลาย IMO ยังมีปริมาณ *E. coli* น้อยกว่ากลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 17.

ปริมาณ lactic acid bacteria ในลูกหมูที่ได้รับสารละลาย IMO ทั้งสามระดับมีปริมาณใกล้เคียงกัน แต่จะมีปริมาณมากกว่าลูกหมูในกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 18 ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ว่า สารละลาย IMO มีส่วนในการช่วยยับยั้งการเจริญของเชื้อโคลิฟอร์ม และส่งเสริมการเจริญของ lactic acid bacteria ในทางเดินอาหารของลูกสุกร.



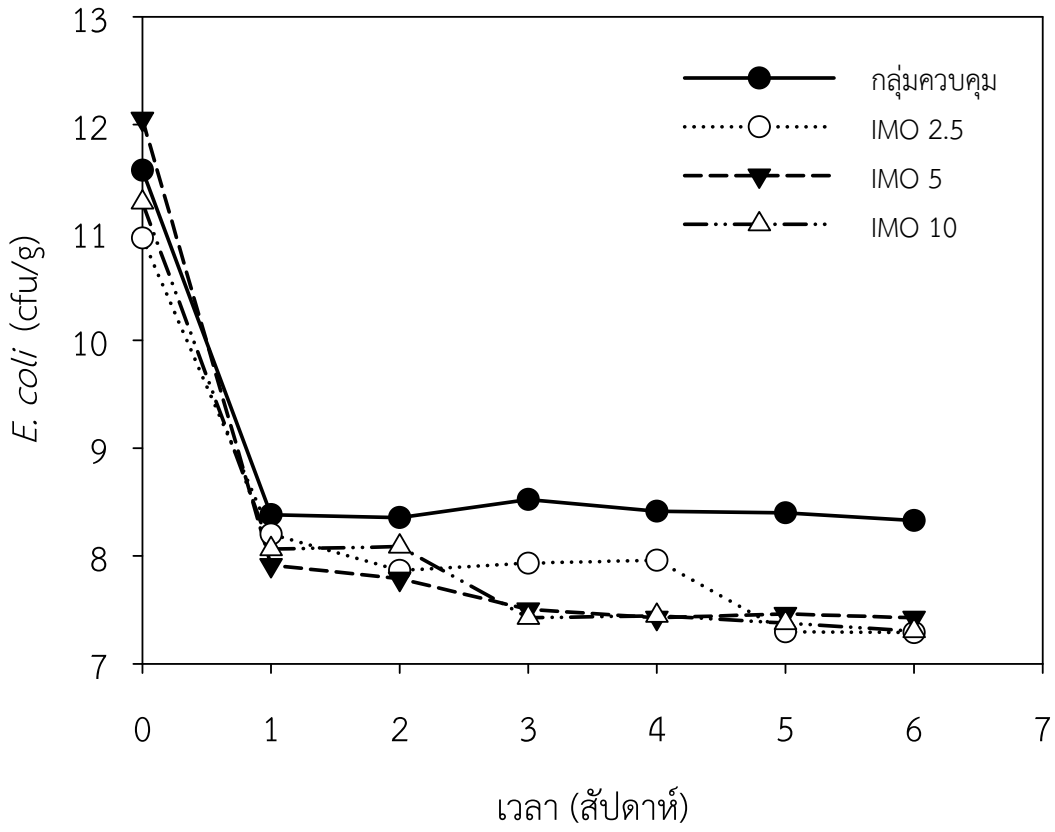
รูปที่ 16. ปริมาณเชื้อ coliform ในมูลสุกร.

ก) ลูกหมูกลุ่มควบคุม

ข) ลูกหมูที่ได้รับ IMO 2.5 มิลลิลิตร/ตัว/วัน

ค) ลูกหมูที่ได้รับ IMO 5 มิลลิลิตร/ตัว/วัน

ง) ลูกหมูที่ได้รับ IMO 10 มิลลิลิตร/ตัว/วัน



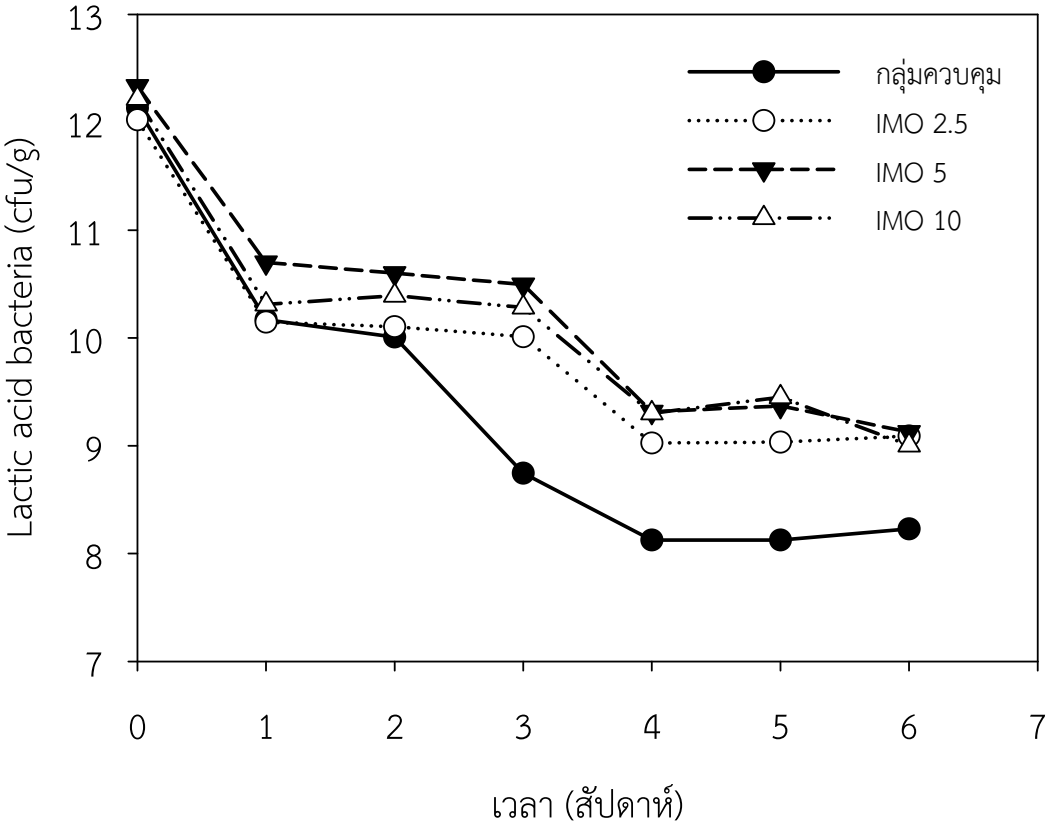
รูปที่ 17. ปริมาณเชื้อ *E. coli* ในมูลสุกร.

ก) ลูกหมูกลุ่มควบคุม

ข) ลูกหมูที่ได้รับ IMO 2.5 มิลลิลิตร/ตัว/วัน

ค) ลูกหมูที่ได้รับ IMO 5 มิลลิลิตร/ตัว/วัน

ง) ลูกหมูที่ได้รับ IMO 10 มิลลิลิตร/ตัว/วัน



รูปที่ 18. ปริมาณ lactic acid bacteria ในมูลสุกร.

ก) ลูกหมูกลุ่มควบคุม

ข) ลูกหมูที่ได้รับ IMO 2.5 มิลลิลิตร/ตัว/วัน

ค) ลูกหมูที่ได้รับ IMO 5 มิลลิลิตร/ตัว/วัน

ง) ลูกหมูที่ได้รับ IMO 10 มิลลิลิตร/ตัว/วัน

3.4 การฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์และการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

จากการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาเพื่อศึกษาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสม พบว่าสารละลาย IMO ที่เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 0-4°ซ. ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ในระยะเวลา 4 เดือน หลังจากนั้นพบว่ามีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ และไม่ต้องการอากาศ.

สารละลาย IMO ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (25-30°ซ.) พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน และไม่ต้องการอากาศในระยะเวลา 3 และ 4 เดือน ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 5.

สารละลาย IMO ที่มีการดึงน้ำออกที่ปริมาณ 10 ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการอากาศในเดือนที่ 7 ดังแสดงในตารางที่ 6-12.

ตารางที่ 5. ปริมาณจุลินทรีย์ในสารละลาย isomalto-oligosaccharide ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์ เก็บรักษาในตู้เย็น (0-4°ซ.) และที่อุณหภูมิห้อง (25-30°ซ.)

เวลา (เดือน)	ปริมาณจุลินทรีย์ (โคโลนี/มิลลิลิตร)											
	จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน		จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจน		*E. coli*		coliform		ยีสต์		รา	
	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	$3x10^{2-}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	$5.2x10^{3}$	-	$4.7x10^{2}$	-	-	-	-	-	-	-	-
5	$2.3x10^{2}$-	$4.3x10^{4}$	-	$2x10^{3}$	-	-	-	-	-	-	-	-
6	$3x10^{3}$	$4x10^{5}$	$1.3x10^{2}$	$7.1x10^{3}$	-	-	-	-	-	-	-	-
7	$4.7x10^{4}$	$5.3x10^{6}$	$3x10^{3}$	$4.6x10^{4}$	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 6. ปริมาณจุลินทรีย์ในสารละลาย isomalto-oligosaccharide ที่ระเหยเอาน้ำออก 10 เปอร์เซ็ฯต์ ฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์ เก็บรักษาในตู้เย็น (0-4°ซ.) และที่อุณหภูมิห้อง (25-30°ซ.)

เวลา (เดือน)	ปริมาณจุลินทรีย์ (โคโลนี/มิลลิลิตร)											
	จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน		จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจน		*E. coli*		coliform		ยีสต์		รา	
	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	3.0×10^3	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 7. ปริมาณจุลินทรีย์ในสารละลาย isomalto-oligosaccharide ที่ระเหยเอาน้ำออก 20 เปอร์เซ็นต์ ฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์ เก็บรักษาในตู้เย็น (0-4°ซ.) และที่อุณหภูมิห้อง (25-30°ซ.)

เวลา (เดือน)	ปริมาณจุลินทรีย์ (โคโลนี/มิลลิลิตร)											
	จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน		จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจน		*E. coli*		coliform		ยีสต์		รา	
	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	2.8×10^3	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 8. ปริมาณจุลินทรีย์ในสารละลาย isomalto-oligosaccharide ที่ระเหยเอาน้ำออก 30 เปอร์เซ็นต์ ฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์ เก็บรักษาในตู้เย็น (0-4°ซ.) และที่อุณหภูมิห้อง (25-30°ซ.)

เวลา (เดือน)	ปริมาณจุลินทรีย์ (โคโลนี/มิลลิลิตร)											
	จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน		จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจน		*E. coli*		coliform		ยีสต์		รา	
	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	1.7×10^3	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 9. ปริมาณจุลินทรีย์ในสารละลาย isomalto-oligosaccharide ที่ระเหยเอาน้ำออก 40 เปอร์เซ็นต์ ฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์ เก็บรักษาในตู้เย็น (0-4°ซ.) และที่อุณหภูมิห้อง (25-30°ซ.)

เวลา (เดือน)	ปริมาณจุลินทรีย์ (โคโลนี/มิลลิลิตร)											
	จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน		จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจน		*E. coli*		coliform		ยีสต์		รา	
	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	$3.0x10^3$	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 10. ปริมาณจุลินทรีย์ในสารละลาย isomalto-oligosaccharide ที่ระเหยเอาน้ำออก 50 เปอร์เซ็นต์ ฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์ เก็บรักษาในตู้เย็น (0-4°ซ.) และที่อุณหภูมิห้อง (25-30°ซ.)

เวลา (เดือน)	ปริมาณจุลินทรีย์ (โคโลนี/มิลลิลิตร)											
	จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน		จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจน		*E. coli*		coliform		ยีสต์		รา	
	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	$2.5x10^3$	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 11. ปริมาณจุลินทรีย์ในสารละลาย isomalto-oligosaccharide ที่ระเหยเอาน้ำออก 60 เปอร์เซ็นต์ ฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์ เก็บรักษาในตู้เย็น (0-4°ซ.) และที่อุณหภูมิห้อง (25-30°ซ.)

เวลา (เดือน)	ปริมาณจุลินทรีย์ (โคโลนี/มิลลิลิตร)											
	จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน		จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจน		*E. coli*		coliform		ยีสต์		รา	
	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	6.0×10^3	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 12. ปริมาณจุลินทรีย์ในสารละลาย isomalto-oligosaccharide ที่ระเหยเอาน้ำออก 70 เปอร์เซ็นต์ ฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์ เก็บรักษาในตู้เย็น (0-4°ซ.) และที่อุณหภูมิห้อง (25-30°ซ.)

เวลา (เดือน)	ปริมาณจุลินทรีย์ (โคโลนี/มิลลิลิตร)											
	จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน		จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการออกซิเจน		*E. coli*		coliform		ยีสต์		รา	
	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง	ตู้เย็น	อุณหภูมิห้อง
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	$3.0x10^3$	-	-	-	-	-	-	-	-

4. สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองสรุปได้ว่า *Aspergillus oryzae* TISTR 3222 มีประสิทธิภาพสูงในการผลิต α-glucosidase ที่เป็น transglucosidase เนื่องจากสามารถเกิด transglucosylation กับสารละลายน้ำแป้งหมัก สร้างสารประกอบ isomalto-oligosaccharides ที่ประกอบด้วย isomaltose panose และ isomaltotriose.

เมื่อเปรียบเทียบกระบวนการผลิต α-glucosidase ในระบบการหมักของเหลว และการหมักแบบแห้ง พบว่าการหมักแบบแห้งสามารถผลิต α-glucosidase ได้สูงกว่า ดังนั้นจึงเลือกใช้การหมักแบบแห้งเป็นแหล่งในการสร้างเอนไซม์ในการย่อยแป้งและเป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิต isomalto-oligosaccharides โดยได้เลือกใช้ข้าวเหนียวเป็นวัตถุดิบและปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการหมัก คือ ให้วัตถุดิบมีความชื้นที่ 60 เปอร์เซ็นต์ มีค่า pH เท่ากับ 6 หัวเชื้อสปอร์มีความเข้มข้น 10^7 สปอร์/กรัม และใช้เวลาในการหมักที่ 5 วัน.

ภายหลังกระบวนการหมักที่เหมาะสม ข้าวหมักจะมีเอนไซม์ต่างๆ ที่สามารถนำไปใช้ในกระบวนการย่อยแป้งที่เหลือได้ เมื่อปรับค่า pH และบ่มในอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นในช่วงเวลาที่พอเหมาะจะทำให้เกิดการย่อยสลายแป้งเพิ่มขึ้น เกิดการสร้างน้ำตาลและสารประกอบ isomalto-oligosaccharides.

สารละลาย isomalto-oligosaccharide ที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายแป้ง จะนำไปทดสอบคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกเบื้องต้น โดยดูความสามารถในกระตุ้นการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ผสม 2 สายพันธุ์ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารละลาย isomalto-oligosaccharide มีส่วนช่วยในการกระตุ้นการเจริญของ *B. animalis* และมีแนวโน้มที่จะยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้.

ผลการทดลองการเสริมสารละลาย isomalto-oligosaccharide ในอาหารลูกสุกรหลังหย่านมที่อายุ 4-10 สัปดาห์ พบว่าสารละลาย isomalto-oligosaccharide มีผลต่อสมรรถภาพการผลิตในช่วงต้นของการเจริญของลูกสุกร โดยในช่วง 4-6 สัปดาห์ ลูกหมูที่เสริมด้วยสารละลาย isomalto-oligosaccharide 10 มิลลิลิตร/ตัว/วัน มีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นสูงกว่ากลุ่มควบคุม 0.35 กิโลกรัม/ตัว และมีประสิทธิภาพการใช้อาหารดีกว่ากลุ่มควบคุม คือใช้อาหาร 1.33 กิโลกรัมต่อการเพิ่มน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม.

เมื่อตรวจหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในมูลสุกรในระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณลูกหมูที่ได้รับสารละลาย isomalto-oligosaccharide มีปริมาณโคลิฟอร์ม และ *E.coli* น้อยกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนปริมาณ lactic acid bacteria ในลูกหมูที่ได้รับสารละลาย isomalto-oligosaccharide ทั้งสามระดับมีปริมาณใกล้เคียงกัน แต่จะมีปริมาณมากกว่าลูกหมูในกลุ่มควบคุม.

ในการเก็บรักษาสารละลาย isomalto-oligosaccharide พบว่าเมื่อนำสารละลายไปผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์ และเก็บที่อุณหภูมิ 0-4°ซ. จะสามารถเก็บรักษาไว้ได้ประมาณ 4 เดือน แต่ถ้าเก็บที่อุณหภูมิห้องที่สูงกว่า 25°ซ. จะเก็บรักษาได้ไม่เกิน 2 เดือน.

เมื่อพัฒนาวิธีการเก็บรักษาสารละลาย isomalto-oligosaccharide โดยดึงน้ำออกจากสารละลายเพื่อเพิ่มความเข้มข้น พบว่าสารละลาย isomalto-oligosaccharide ที่ดึงน้ำออกตั้งแต่ 10 เปอร์เซ็นต์ จะสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0-4°ซ. ได้มากกว่า 7 เดือน แต่ถ้าเก็บที่อุณหภูมิห้องจะสามารถเก็บรักษาได้ไม่เกิน 6 เดือน.

5. สรุปผลทางด้านตลาดและผลกระทบของโครงการ

การวิจัยนี้สามารถนำไปพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่กลุ่มเป้าหมาย ได้แก่ กลุ่มผู้เลี้ยงสุกรที่มีกระจายอยู่ทั่วประเทศ รวมถึงผู้ประกอบการผลิตอาหารสัตว์ และกลุ่มวิสาหกิจชุมชนที่ผลิตผลิตภัณฑ์จากการเลี้ยงสุกร.

เทคโนโลยีจากงานวิจัยที่จะนำไปถ่ายทอดสามารถสร้างรายได้เพิ่มให้กับเกษตรกร โดยลดอัตราการติดเชื้อในสุกร ลดอัตราการตาย ได้ปริมาณสุกรที่มีคุณภาพเนื้อที่ดีขึ้น ลดการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีในการเลี้ยงสัตว์ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์จากสุกรที่มีคุณภาพดีและปลอดภัยต่อผู้บริโภค.

นอกจากนี้องค์ความรู้ทั้งหมดที่ได้จากการวิจัยนี้ สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลสำหรับงานวิจัยในหน่วยงานภาครัฐ ภาคการศึกษา และภาคเอกชน ที่ต้องการนำไปต่อยอดหรือประยุกต์ใช้ในด้านอื่นต่อไป.

6. เอกสารอ้างอิง

Barreteau, H., Delattre, C. and Michaud, P., 2006. Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. Oligosaccharides as Food Additives. *Food Technol Biotechnol*, **44**, pp. 323-333.

Chen, G.-g., Li, W., Zhang, Y.-k., Qin, Y.-l., Wu, K.-y. and Liang, Z.-q., 2011. A high-throughput method for screening of *Aspergillus niger* mutants with high transglycosylation activity by detecting non-fermentable reducing sugar. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **27**, pp. 1519-1523.

Couto, S.R. and Sanroman, M.A., 2006. Application of solid-state fermentation to food industry-A review. *Journal of Food Engineering*, **76**, pp. 291-302.

Fogarty, W.M., 1994. Enzyme of Genus Aspergillus pp. 177-218 *In* Smith JE, ed. Biotechnoloy handbook : Aspergillus, **7**, New York: Plenum Press.

Gibson, G.R. and Christine, M.W., 2000. Functional foods: Concept to product. Cambridge: Woodhead Publishing Limited and CRC Press.

Goulas, A.K., Fisher, D.A., Grimble, G.K., Grandison, A.S. and Rastall, R.A., 2004. Synthesis of isomalto-oligosaccharides and oligodextrans by the combined use of dextransucrase and dextranase. *Enzyme and Microbial Technology*, **35**, pp. 327-338.

Holker, U., Hofer, M. and Lenz, J., 2004. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **64**, pp. 175-186.

Liong, M.T., 2008. Roles of probiotics and prebiotics in colon cancer prevention: Postulated mechanisms and in-vivo evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, **9**, pp. 854-863.

McCue, P. and Shetty, K., 2003. Role of carbohydrate-cleaving enzymes in phenolic antioxidant mobilization from whole soybean fermented with Rhizopus oligosporus. *Food Biotechnology*, **17**, pp. 27-37.

Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, **31**, pp. 426-428.

Mizubuchi, H., Yajima, T., Aoi, N., Tomita, T. and Yoshikai, Y., 2005. Isomalto-oligosaccharides Polarize Th1-Like Responses in Intestinal and Systemic Immunity in *Mice*. *J. Nutr*, **135**, pp. 2857-2861.

Nakakuki, T., 2002. Present status and future of functional oligosaccharide development in Japan. *Pure Appl. Chem*, **74**, pp. 1245-1251.

Okafor, N. and Iwouno, J., 1990. Malting and brewing qualities of some Nigerian rice (*Oryza sativa* L.) varieties and some thoughts on the assessment of malts from tropical cereals. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **6**, pp. 187-194.

Pan, Y.C. and Lee, W.C. 2005. Production of high-purity isomalto-oligosaccharides syrup by the enzymatic conversion of transglucosidase and fermentation of yeast cells. *Biotechnolgy and Bioengineering*, **89**, pp. 797-804.

Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R. and Nigam, P., 1999. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci*., **77**, pp. 149-162.

Rycroft, C., Rastall, R. and Gibson, G. 2002. The role of prebiotics in human gut microbiology. pp. 411-428. Novel frontiers in the production of compounds for biomedical use.

Saman, P., 2009. Bioprocessing strategies to enhance the prebiotic potential of rice and rice fractionsThe University of Manchester, Manchester.

Sheu, D.-C., Huang, C.-I. and Duan, K.-J. 1997. Production of isomalto-oligosaccharides by α-glucosidase immobilized in chitosan beads and by polyethyleneimine-glutaraldehyde treated mycelia of *Aspergillus carbonarious*. *Biotechnology Techniques*, **11**, pp. 287-291.

Terashima, M., Kubo, A. and Suzawa, M., 1994. The roles of the N-linked carbohydrate chain of rice α-amylase in thermostability and enzyme kinetics. Eur. *J. Biochem*, **226**, pp. 249-254.

Thitaram, S.N., Chung, C.H., Day, D.F., Hinton, A., Bailey, J.S. and Siragusa, G.R., 2005. Isomalto-oligosaccharide increases cecal Bifidobacterium population in young broiler chickens. *Poult Sci*, **84**, pp. 998-1003.

Whelan, K., Gibson, G.R., Judd, P.A. and Taylor, M.A., 2001. The role of probiotics and prebiotics in the management of diarrhoea associated with enteral tube feeding. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, **14**, pp. 423-433.