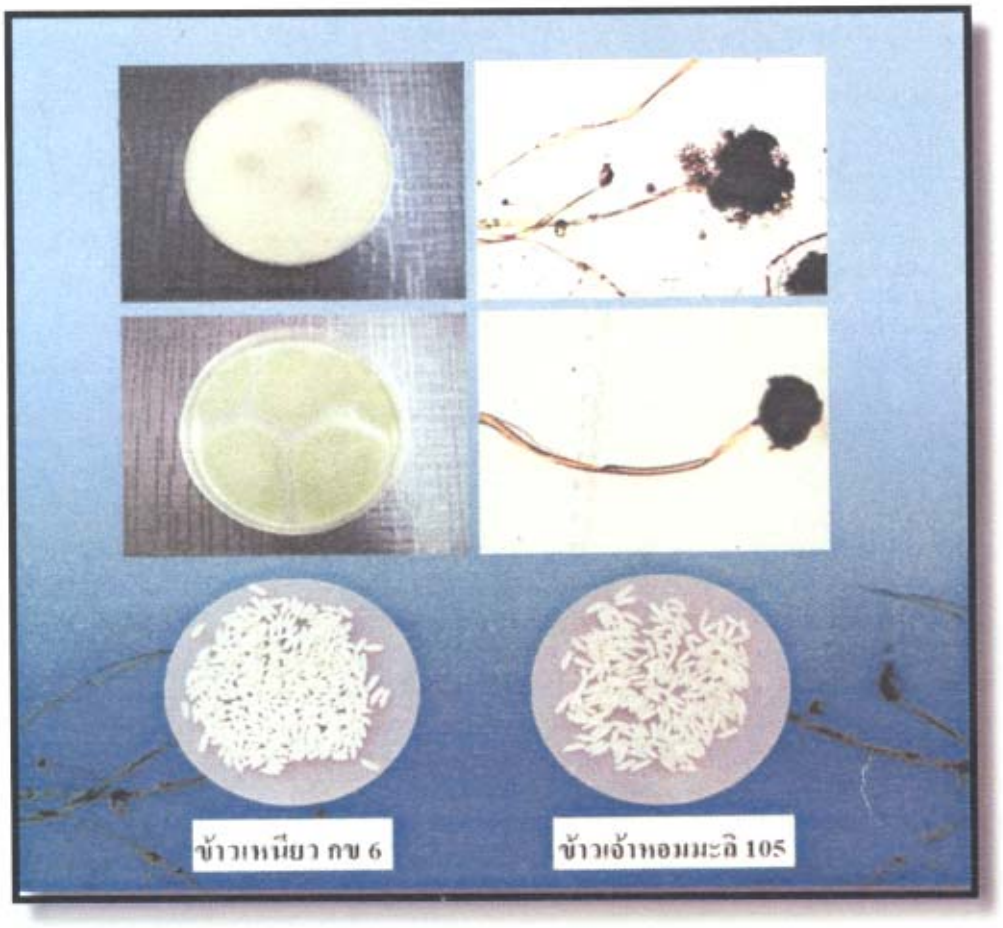
วว.TISTR

โครงการวิจัยที่ ภ.52-06/ย.4/รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)

การวิจัยและพัฒนาการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์พรีไบโอติกจากพืชเศรษฐกิจของไทย



สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

โครงการวิจัยที่ ภ.52-06
การพัฒนาผลิตภัณฑ์สารให้ความหวานเพื่อสุขภาพจากธัญพืช
และวัตถุดิบธรรมชาติ

โครงการย่อยที่ 4
การวิจัยและพัฒนาการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์พรีไบโอติก
จากพืชเศรษฐกิจของไทย

รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)
การวิจัยและพัฒนาการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์พรีไบโอติก
จากพืชเศรษฐกิจของไทย

โดย

เปรมสุดา สมาน **บัณฑิต ฝั่งสินธุ์**
ศิริธรรม สิงโต **ลาวัลย์ ชตานนท์**
วรรณลักษณ์ บัวบาน **สุภาพ อัจฉริยศรีพงศ์**

บรรณาธิการ วว., ปทุมธานี 2559
ศิระ ศิลานนท์
บุญเรียม น้อยชุมแพ
สงวนลิขสิทธิ์

รายงานฉบับนี้ได้รับการอนุมัติให้พิมพ์โดย
ผู้ว่าการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

(นางลักษมี ปลั่งแสงมาศ)
ผู้ว่าการ

กิตติกรรมประกาศ

ขอแสดงความขอบคุณ ดร.สุภาพ อัจฉริยศรีพงศ์ ผู้อำนวยการฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ที่ให้การสนับสนุนการทำงาน และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์.

ขอขอบคุณ ดร. อนวัช สุวรรณกุล ฝ่ายเทคโนโลยีการเกษตร วว. ที่ให้ความอนุเคราะห์ให้ใช้ห้องปฏิบัติการทางเคมีวิเคราะห์.

ขอขอบคุณ ดร.บัณฑิต ฝั่งสินธุ์, ดร.ภูษิตา วรรณิสสร และพนักงานฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงาน ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญตาราง	ค
สารบัญรูป	ง
ABSTRACT	1
บทคัดย่อ	2
1. บทนำ	3
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	5
3. ผลการทดลองและวิจารณ์	11
4. สรุปผลการทดลอง	24
5. ข้อเสนอแนะ	25
6. เอกสารอ้างอิง	26

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1. ปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ในสารละลายโอลิโกแซ็กคาไรด์พรีไบโอติกก่อนการพลาสเจอร์ไรส์ 23

ตารางที่ 2. ปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ในสารละลายโอลิโกแซ็กคาไรด์พรีไบโอติกหลังการพลาสเจอร์ไรส์ 23

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1. สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง 5

รูปที่ 2. ข้าวที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลอง 6

รูปที่ 3. Amylolytic activity, α-amylase activity และ α-glucosidase activity ของ *Aspergillus oryzae* และ *Amylomyces rouxii* ในการหมักแบบแห้ง โดยใช้ข้าวเหนียว กข 6 และข้าวเจ้าหอมมะลิ 105 เป็นวัตถุดิบในการหมัก 12

รูปที่ 4. การเปลี่ยนแปลงทางเคมีในระหว่างการหมักแบบแห้ง ระหว่าง *Aspergillus oryzae* และ *Amylomyces rouxii* โดยใช้ข้าวเหนียว กข 6 และข้าวเจ้าหอมมะลิ 105 เป็นวัตถุดิบในการหมัก 13

รูปที่ 5. ปริมาณ glucose, maltose, maltotriose, isomaltose, panose และ isomaltotriose ในกระบวนการหมักของ *Aspergillus oryzae* ระหว่างข้าวเหนียว กข 6 และข้าวเจ้าหอมมะลิ 105 14

รูปที่ 6. ปริมาณ glucose, maltose, maltotriose, isomaltose, panose และ isomaltotriose ในกระบวนการหมักของ *Amylomyces rouxii* ระหว่างข้าวเหนียว กข 6 และ ข้าวเจ้าหอมมะลิ 105 15

รูปที่ 7. ผลของระดับ pH ต่อปริมาณ TRS และ amylolytic activity ในการหมักข้าวเหนียว เปรียบเทียบระหว่างเชื้อรา *Aspergillus oryzae* และ *Amylomyces rouxii* ที่ 30 °ซ. เป็นเวลา 5 วัน 16

รูปที่ 8. ผลของปริมาณความชื้นของข้าวเหนียวที่ใช้ในการหมักต่อปริมาณ TRS และ amylolytic activity เปรียบเทียบระหว่างเชื้อรา *Aspergillus oryzae* และ *Amylomyces rouxii* ที่ 30 °ซ. เป็นเวลา 5 วัน 17

รูปที่ 9. ผลของปริมาณความเข้มข้นสปอร์ระหว่าง *Aspergillus oryzae* และ *Amylomyces rouxii* ต่อปริมาณ TRS และ amylolytic activity ในการหมักข้าวเหนียว ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลา 5 วัน 18

รูปที่ 10. ปริมาณ glucose, maltose, maltotriose, isomaltose, panose และ isomaltotriose ที่เกิดขึ้นภายหลังจากการย่อยแป้งหมักของ *Amylomyces rouxii* และภายหลังทรานกลูโคซิเลชัน 20

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 11. ปริมาณ glucose, maltose, maltotriose, isomaltose, panose และ isomaltotriose ที่เกิดขึ้นภายหลังจากการย่อยแป้งหมักของ *Aspergillus oryzae* และภายหลังทรานกลูโคซิเลชัน 21

รูปที่ 12. กลไกการทำงานของ transglucosidase ในปฏิกิริยาทรานกลูโคซิเลชัน เกิดสารประกอบ isomaltose, panose และ isomaltotriose 22

RESEARCH AND DEVELOPMENT OF OLIGOSACCHARIDE PREBIOTIC PRODUCTION FROM ECONOMIC CROPS OF THAILAND

Premsuda Saman, Siritham Singhtho, Lawan Chatanon, Bundit Fungsin, and Suparp Artjariyasripong

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the potential use of Thai rice for the production of prebiotic oligosaccharides through fungal fermentation. Solid-state fermentations (SSF) of two rice varieties, glutinous rice RD6 and jasmine rice KDM 105 with two strains of fungi, *Aspergillus oryzae* TISTR 3108 and *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 were compared. The results showed that in all cases, the maximum values of amylolytic activity and total reducing sugar were observed using rice in SSF with initial moisture content of 70% and inoculated with the inoculum size of 10^7 spores/g . The optimal conditions of SSF were performed at initial pH 6 and 30 °C for 5 days. SSF of waxy rice RD6 with *Aspergillus oryzae* produced highest concentrations of isomalto-oligosaccharides which consisted of isomaltose (38 g/l), panose (8 g/l) and isomaltotriose (6 g/l). After fermentation, mash was used to further 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. The productivity of isomalto-oligosaccharides could be improved by transglucosidase activity. The concentration of isomalto-oligosaccharides increased by 21%. The prebiotic isomalto-oligosaccharide syrup could be pasteurised and maintained at 0-4 °C for more than 2 months.

การวิจัยและพัฒนาการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์พรีไบโอติกจากพืชเศรษฐกิจของไทย

เปรมสุดา สมาน[1], ศิริธรรม สิงห์โต[1], ลาวัลย์ ชตานนท์[1], บัณฑิต ฝั่งสินธุ์[1] และ สุภาพ อัจฉริยศรีพงศ์[1]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์พรีไบโอติกจากข้าวไทยโดยใช้กระบวนการหมักแบบแห้ง (solid-state fermentation), เปรียบเทียบระหว่างเชื้อรา 2 สายพันธุ์ คือ *Aspergillus oryzae* TISTR 3108 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182, ข้าวไทยที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักประกอบด้วยข้าวเหนียว กข 6 และข้าวเจ้าหอมมะลิ 105. ผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมของการหมักแบบแห้งที่ให้ค่า amylolytic activity และน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด เมื่อหมักข้าวที่มีความชื้น 70%, ค่า pH เริ่มต้นที่ 6 และใช้หัวเชื้อสปอร์ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อกรัม, โดยบ่มเลี้ยงที่ 30 °ซ. เป็นเวลา 5 วัน, ข้าวเหนียวที่หมักด้วย *Aspergillus oryzae* จะให้ปริมาณ prebitoic isomalto-oligosaccharides ประกอบด้วย isomaltose, panose และ isomaltotriose สูงสุด โดยมีค่า 38 กรัม/ลิตร, 8 กรัม/ลิตร และ 6 กรัม/ลิตร ตามลำดับ. เมื่อสารละลายข้าวเหนียวหมักผ่านกระบวน การย่อยแป้งที่เหลือ (mashing) จะทำให้มีปริมาณ isomaltose, panose และ isomaltotriose เพิ่มขึ้นโดยมีค่าเท่ากับ 44 กรัม/ลิตร, 10 กรัม/ลิตร และ 7 กรัม/ลิตร ตามลำดับ, และเมื่อผ่านกระบวนการ ทรานกลูโคซิเลชัน (transglucosylation) สารละลายข้าวเหนียวที่ได้จะมีปริมาณ isomaltose, panose และ isomaltotriose เพิ่มขึ้นถึง 21%, สารละลาย prebiotic isomalto-oligosaccharides เมื่อผ่านการฆ่าเชื้อแบบพลาสเจอร์ไรส์และเก็บที่อุณภูมิ 0-4 °ซ. จะสามารถเก็บรักษาได้มากกว่า 2 เดือน.

[1]ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

1. บทนำ

ปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหารในประเทศไทยได้มีการพัฒนาเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค โดยเฉพาะอาหารที่ช่วยเสริมสุขภาพป้องกันและรักษาโรค หรือมีส่วนช่วยในการควบคุมน้ำหนัก, ปรับสมดุลในระบบทางเดินอาหาร, เพิ่มปริมาณกากอาหาร และช่วยในการขับถ่าย. อาหารเสริมสุขภาพที่กำลังเป็นที่นิยมส่วนใหญ่จะผลิตจากพืช ผัก และผลไม้ เนื่องจากเป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดรต, ไฟเบอร์, วิตามิน และเกลือแร่. พืชเศรษฐกิจที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อสุขภาพ ได้แก่ ข้าว, อ้อย, มันสำปะหลัง และข้าวโพด เป็นต้น.

ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจของไทยที่สำคัญ และมีคุณค่าอาหารสูง เนื่องจากเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต, โปรตีน, ไขมัน และวิตามินบี (Dendy 2001), ข้าวมีคุณสมบัติที่ย่อยง่าย ปราศจากสารกลูเทนที่ทำให้เกิดอาการแพ้ จึงสามารถนำมาใช้เป็นอาหารและผลิตภัณฑ์ต่างๆ มากมาย (FAO 2004). ข้าวแต่ละสายพันธุ์จะมีองค์ประกอบของแป้งคือ อะไมโลส (amylose) และอะไมโลสเพกทิน (amylopectin) แตกต่างกัน จึงทำให้ข้าวแต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกันออกไป (Zhou *et al*. 2002). ข้าวสามารถแบ่งกลุ่มตามองค์ประกอบของอะไมโลส และอะไมโลสเพกทินได้สองกลุ่มใหญ่ คือ ข้าวเจ้าและข้าวเหนียว, ข้าวเจ้าจะมีอะไมโลสเป็นองค์ประกอบประมาณ 25 % ส่วนข้าวเหนียวจะมีอะไมโลสอยู่เพียง 0-2 % (Juliano 1994).

ข้าวมีคุณสมบัติที่ดีในการผลิตเป็นอาหารต่างๆ เนื่องจากเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญ, ข้าวกล้อง (brown rice) จะมีคุณค่าอาหารสูงมากกว่าข้าวขัดขาว (polished rice) เนื่องจากเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว หรือชั้นรำ (bran) จะมีสารอาหารที่มีประโยชน์ ได้แก่ โปรตีน, กรดแอมิโน, ไขมัน, วิตามินบี, แอนติออกซิแดนต์ และสารที่ให้เยื่อใยที่เป็นประโยชน์ (dietary fiber), ซึ่งวงการแพทย์รายงานว่าเยื่อใยเหล่านี้มีส่วนช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่และกระเพาะอาหาร และความดันโลหิต (Ardiansyah *et al*. 2006; Cai *et al*. 2005). อย่างไรก็ตาม ผู้บริโภคยังเลือกที่จะบริโภคข้าวขัดขาว เนื่องจากข้าวกล้องจะมีความแข็ง ไม่นุ่มเหมือนข้าวขัดขาว, อาหารที่ผลิตจากข้าวขัดขาวจึงให้พลังงานสูงจากคาร์โบไฮเดรตเพียงอย่างเดียว.

เพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารของข้าว และพัฒนาอาหารเพื่อสุขภาพที่ผลิตจากข้าวไทย คณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนากระบวนการแปรรูปอาหารจากข้าว เป็นอาหารเสริมสุขภาพพรีไบโอติก, เนื่องจากข้าวเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่ดีเยี่ยมและราคาถูก, สามารถนำมาพัฒนาเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหาร โดยนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตสารเสริมสุขภาพพวก oligosaccharides เช่น

malto-oligosaccharides และ isomalto-oligosaccharides (Nakakuki 1993; Nakakuki 2002), โดยเฉพาะสาร isomalto-oligosaccharides มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก (Mizubuchi *et al*. 2005; Thitaram *et al*. 2005), นอกจากนี้ isomalto-oligosaccharides ยังช่วยป้องกันฟันผุ และรักษาสมดุลของระบบทางเดินอาหาร โดยเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้ เช่น *Bifidobacterium* spp. และ *Lactobacillus* spp. และยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคต่างๆ ในระบบทางเดินอาหาร (Dikeman, Murphy and Fahey 2006; Fooks, Fuller and Gibson 1999; Gibson 2004; Mussatto and Mancilha 2007), isomalto-oligosaccharides สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารเพื่อสุขภาพหลายประเภท เช่น อาหารสำหรับเด็กอ่อน, ผู้สูงอายุ, ผู้ป่วยที่อยู่ในระยะพักฟื้น และผู้ป่วยเบาหวาน รวมทั้งอาหารควบคุมน้ำหนัก อาหารที่ต้องการแคลอรีต่ำ, นอกจากนี้ยังเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการผลิตยาต่างๆ. ส่วน malto-oligosaccharides เป็นสารให้ความหวานที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและ เครื่องดื่ม, สามารถควบคุมจำนวนเชื้อก่อโรคต่างๆ ในลำไส้ได้ เช่น Clostridium perfringens (Nakakuki 1993).

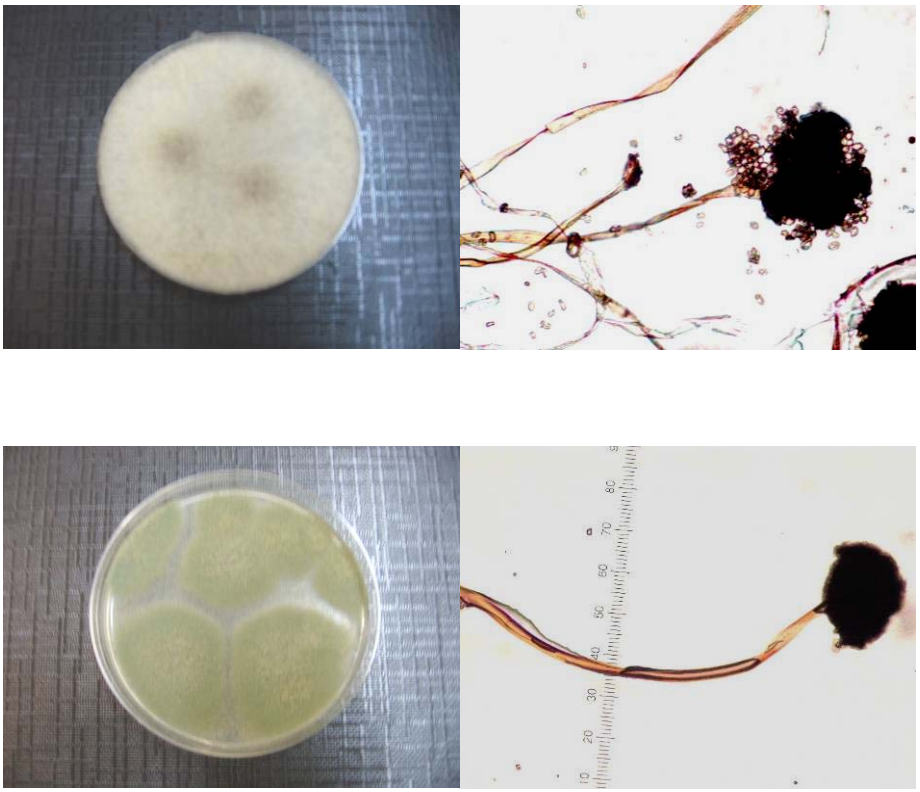
การผลิต prebiotic isomalto-oligosaccharide ในระดับอุตสาหกรรมจะใช้แป้งข้าวโพดเป็นวัตถุดิบในการผลิต, โดยใช้วิธีตรึงเอนไซม์ในการหมักแบบสองขั้นตอน (two stage reactor), หลังจากนั้นสารละลายน้ำตาลจะกลายเป็นวัตถุดิบในการผลิตด้วยปฏิกิริยาทรานกลูโคซิเลชันของ α-glucosidase (Nakakuki 2002), อย่างไรก็ตาม สารละลาย isomalto-oligosaccharide ที่ผลิตได้นั้นมีความบริสุทธิ์เพียง 40%.

ดังนั้น ในการดำเนินงานของโครงการจึงได้พัฒนารูปแบบการผลิต prebiotic isomalto-oligosaccharide, โดยเน้นไปที่การย่อยแป้งที่มีประสิทธิภาพในกระบวนการหมักแบบแห้ง (solid-state fermentation), โดยใช้เชื้อราสองสายพันธุ์ คือ *Aspergillus oryzae* และ *Amylomyces rouxii*. น้ำหมักที่ได้จากการหมักข้าวที่สมบูรณ์จะประกอบไปด้วยโมเลกุลน้ำตาล เช่น glucose, malto, oligosaccharides และ isomalto-oligosaccharides.

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

2.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วย *Aspergillus oryzae* TISTR 3108 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182



ก)

ข)

รูปที่ 1. สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

ก) *Aspergillus oryzae* TISTR 3108 ข) *Amylomyces rouxii* TISTR 3182

2.2 วัตถุดิบในการทดลอง

วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักแบบแห้ง ประกอบด้วย ข้าวเหนียว กข 6 และข้าวหอมมะลิ 105.

รูปที่ 2. ข้าวที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลอง
ก) ข้าวเหนียว กข 6 ข) ข้าวเจ้าหอมมะลิ 105

2.3 เอนไซม์ และสารเคมี

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

2.4 อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์ BO61 (Olympus, USA)
2. ตู้บ่มเชื้อจุลินทรีย์ Series 2000 (Scientific, Thailand)
3. pH มิเตอร์ IQ 2000 (Scientific, Thailand)
4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Spectronic 3000 Array (Milton roy, USA)
5. High performance liquid chromatography (HPLC) SP 930 (Young Lin, Taiwan)

2.5 วิธีการ

2.5.1 การเตรียมสปอร์เชื้อรา

เลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus oryzae* และ *Amylomyces rouxii* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar ที่ 30 ºซ. จนกระทั่งเกิดสปอร์เต็มที่เป็นเวลา 7 วัน, จากนั้นเตรียมสารละลายสปอร์โดยใช้น้ำเกลือ 0.85%, ปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้ได้ทำกับ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร.

2.5.2 การเตรียมข้าวเป็นวัตถุดิบในการหมัก

ชั่งข้าวเจ้าหอมมะลิและข้าวเหนียวอย่างละ 200 กรัม, แยกใส่ลงในขวดทดลองขนาด 1 ลิตร ปรับความชื้นให้เป็น 70%, นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ºซ. ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, เป็นเวลา 15 นาที, ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง.

2.5.3 การหมักข้าวด้วยกระบวนการหมักแบบแห้ง (solid-state fermentation)

ผสมละลายสปอร์ปริมาณ 1% ใส่ลงในขวดทดลองที่บรรจุข้าวแต่ละชนิด, ผสมส่วนผสมต่างๆ ให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 30 ºซ. เป็นเวลา 7 วัน, เก็บตัวอย่างข้าวหมักเพื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (total reducing sugar, TRS) (Miller 1959), ปริมาณกรดแอมิโน (Free amino nitrogen, FAN) (Lie 1973), ค่าความเป็นกรด-เบส (pH), กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ย่อยแป้ง (amylolytic activity) (Terashima, Kubo and Suzawa 1994), การทำงานของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) (Sun and Henson 1991), แอลฟากลูโคซิเดส (α-glucosidase) (McCue and Shetty 2003) และวัดปริมาณน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยเครื่อง HPLC.

2.5.4 การหาสภาวะที่เหมาะสมของ amylolytic activity ในการย่อยแป้งข้าว

ผลของเวลาในการหมักข้าว

เตรียมข้าวเหนียวที่ความชื้น 70% ปริมาณ 100 กรัม, นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ºซ., ความดัน15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, เป็นเวลา 15 นาที, ทิ้งไว้ให้เย็น, เติมหัวเชื้อสารละลายสปอร์ปริมาณ 1% ใส่ลงในขวดทดลองที่บรรจุข้าวทั้งสองชนิด, บ่มที่ 30 ºซ. เป็นเวลา 7 วัน, เก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์หากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ย่อยแป้ง (Terashima, Kubo and Suzawa 1994) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Miller 1959).

ผลของ pH ต่อการหมักข้าว

เตรียมวัตถุดิบในการหมักที่ความชื้น 70% ปริมาณ 100 กรัม, แล้วปรับระดับ pH ในแต่ละขวดให้แตกต่างกันในช่วง pH 3 ถึง 8, นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ºซ., ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที, เติมหัวเชื้อสารละลายสปอร์ปริมาณ 1% ใส่ลงในขวดทดลอง, บ่มที่ 30 ºซ. เป็นเวลา 5 วัน, เก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์หากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ย่อยแป้ง (Terashima, Kubo and Suzawa 1994) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Miller 1959).

ผลของปริมาณความชื้นต่อการหมักข้าว

เตรียมวัตถุดิบในการหมักให้มีความชื้นต่างๆ กัน ระหว่าง 40% ถึง 70%, ใส่ลงในขวดทดลองปริมาณ 100 กรัม โดยปรับระดับ pH ให้เหมาะสม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ºซ., ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, เป็นเวลา 15 นาที, เติมหัวเชื้อสารละลายสปอร์ปริมาณ 1% ใส่ลงในขวดทดลอง, บ่มที่ 30 ºซ. เป็นเวลา 5 วัน, เก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์หากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ย่อยแป้ง (Terashima, Kubo and Suzawa 1994) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Miller 1959).

ผลของปริมาณหัวเชื้อสปอร์ต่อการหมักข้าว

เตรียมวัตถุดิบในการหมักให้มีความชื้น 70%, ใส่ลงในขวดทดลองปริมาณ 100 กรัม, ปรับระดับ pH ให้เหมาะสม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ºซ., ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, เป็นเวลา 15 นาที, เติมสารละลายสปอร์ลงในขวดทดลองโดยปรับให้มีปริมาณสปอร์ตั้งต้นระหว่าง 10^5 ถึง 10^8 สปอร์ต่อกรัม, นำไปบ่มที่ 30 ºซ. เป็นเวลา 5 วัน, เก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์หา

กิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ย่อยแป้ง (Terashima, Kubo and Suzawa 1994) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Miller 1959).

2.5.5 การย่อยสลายแป้งข้าวหมัก (mashing)

ข้าวหมักที่ผ่านการหมักในระยะเวลาและสภาวะที่เหมาะสม จะมีเอนไซม์ต่างๆ ที่สามารถนำมาใช้ในการย่อยสลายแป้งข้าวที่เหลือ, เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และโอลิโกแซ็กคาไรด์สูงขึ้น ในกระบวนการย่อยแป้งจะใช้วิธีของ Okafor and Iwouno (1990), โดยนำข้าวหมักมาปรับความเข้มข้นเป็น 30%, เติม $CaCl_2$ ปริมาณ 0.003%, ปรับค่า pH 6 ด้วยกรดแล็กติก, ผสมส่วนผสมต่างๆ ให้เข้ากัน, นำไปบ่มที่ 50 °ซ. เป็นเวลา 30 นาที, หลังจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิเป็น 60 °ซ., บ่มต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง, เมื่อครบตามเวลากำหนด ปรับค่า pH ของข้าวหมักให้เป็น 5.6 แล้วบ่มต่อไปอีก 1 ชั่วโมง, นำสารละลายข้าวหมักที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง No.1 เพื่อแยกกากและสารแขวนลอย, ส่วนน้ำใสที่ได้นำไปต้ม เป็นเวลา 30 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์, เก็บตัวอย่างสารละลายไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล และโอลิโกแซ็กคาไรด์ ด้วยเครื่อง HPLC.

2.5.6 เทคนิคทรานกลูโคซิเลชัน (tranglucosylation)

สารละลายที่ผ่านการกรองจะนำเข้าสู่กระบวนการทรานกลูโคซิเลชันเพื่อเปลี่ยนโมเลกุลน้ำตาลให้กลายเป็นโมเลกุลของโอลิโกแซ็กคาไรด์, โดยการเติม transglucosidase ปริมาณ 0.1% (v/v) ลงในสารละลายข้าวที่ปรับค่า pH ที่ 6, บ่มที่อุณหภูมิ 60 °ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, นำสารละลายที่ได้ไปต้มเป็นเวลา 30 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์และฆ่าเชื้อโรค, เก็บตัวอย่างสารละลายไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล และโอลิโกแซ็กคาไรด์ ด้วยเครื่อง HPLC.

2.5.7 การพาสเจอร์ไรซ์ผลิตภัณฑ์โอลิโกแซ็กคาไรด์พรีไบโอติก

บรรจุสารละลายลงในขวดแก้วฝาเกลียว, นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยวิธีพลาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 70-80 °ซ. เป็นเวลา 15 นาที, จากนั้นนำลงจุ่มในน้ำเย็นทันทีที่อุณหภูมิ 0-5 °ซ. เป็นเวลา 10 นาที, ทำซ้ำอีกครั้งที่อุณหภูมิและเวลาเดียวกัน, นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0-4 °ซ., เก็บตัวอย่างสารละลายเพื่อวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ในช่วงระยะเวลา 100 วัน.

2.5.8 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์

ตัวอย่างสารละลายโอลิโกแซ็กคาไรด์พรีไบโอติกที่เก็บในช่วงเวลาต่างๆ จะนำมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด, เชื้อโคลิฟอร์ม (Coliform), *Escherichia coli*, ยีสต์ และรา, โดยการเจือจางตัวอย่างสารละลายในอัตราส่วนที่เหมาะสมด้วยน้ำเกลือ 0.85%, หยดสารละลาย 1

มิลลิลิตร ลงใน Petri film count plate (3M, USA), นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 1-2 วัน, ยกเว้น ยีสต์ และรานำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 °ซ. เป็นเวลา 3-5 วัน.

การตรวจผลของ *E.coli* /Coliform count plate โดยดูจากโคโลนีของเชื้อโคลิฟอร์มจะมีสีแดงและเกิดฟองอากาศรอบๆ โคโลนี, ส่วนโคโลนีของ *E. coli* จะเป็นสีน้ำเงิน หรือน้ำเงินอมแดง และมีฟองก๊าซรอบๆ โคโลนี.

ตรวจนับปริมาณยีสต์ ที่เกิดบน Yeast & mould count โดยดูจากโคโลนีสีฟ้าอมเขียวขนาดเล็กและขอบเรียบ, ส่วนโคโลนีเชื้อราจะขนาดใหญ่ ขอบเป็นเส้นใย มีหลายสี แล้วแต่ชนิดของเชื้อรา.

ปริมาณจำนวนแบคทีเรียแอโรบิสทั้งหมด ตรวจนับโดยใช้ Total aerobic count, โดยโคโลนีของแบคทีเรียจะเปลี่ยนเป็นสีแดง.

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

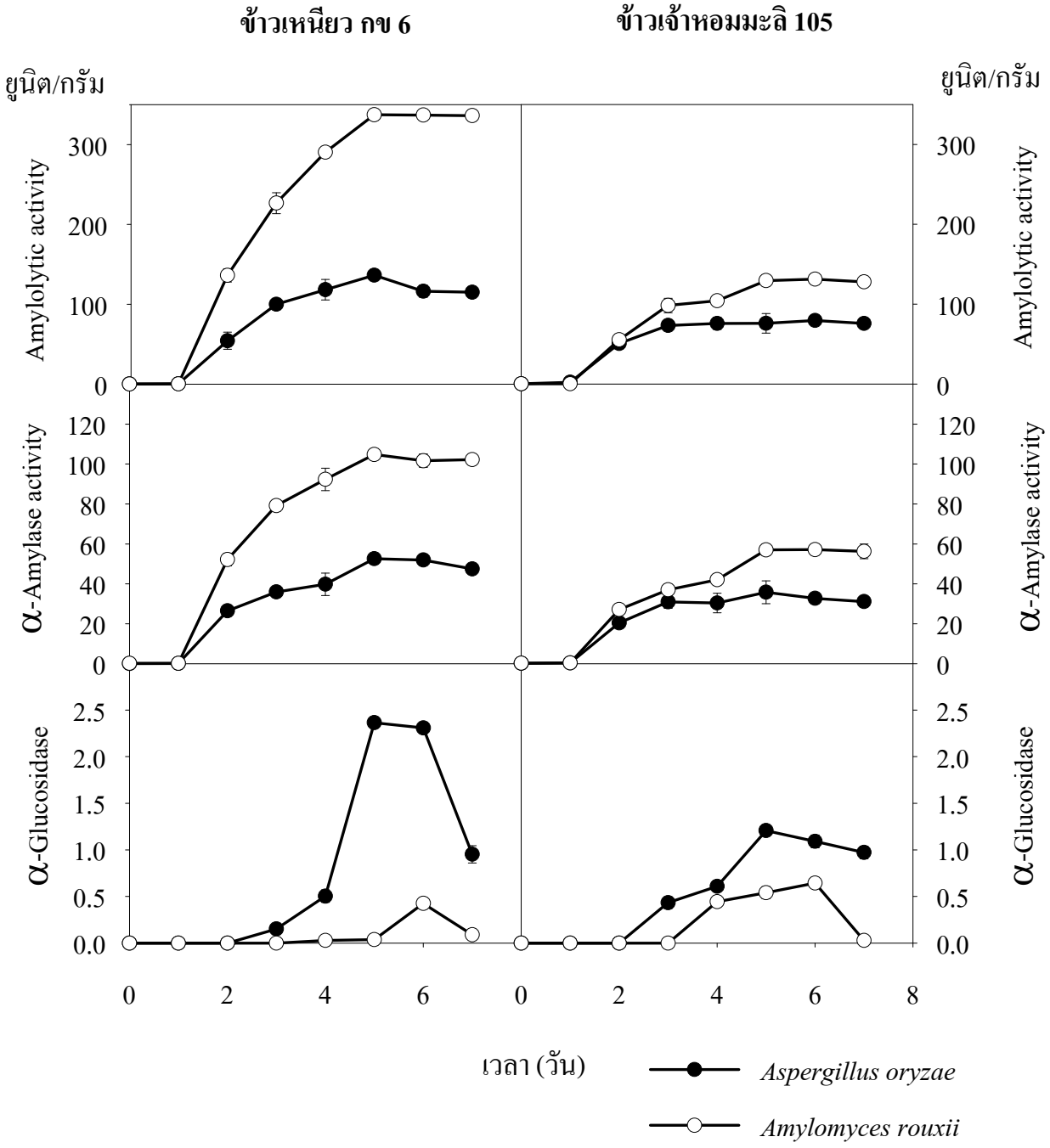
3.1 สภาวะที่เหมาะสมของการหมักแบบแห้งเพื่อผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์พรีไบโอติก

ผลของเวลาในการหมักข้าว

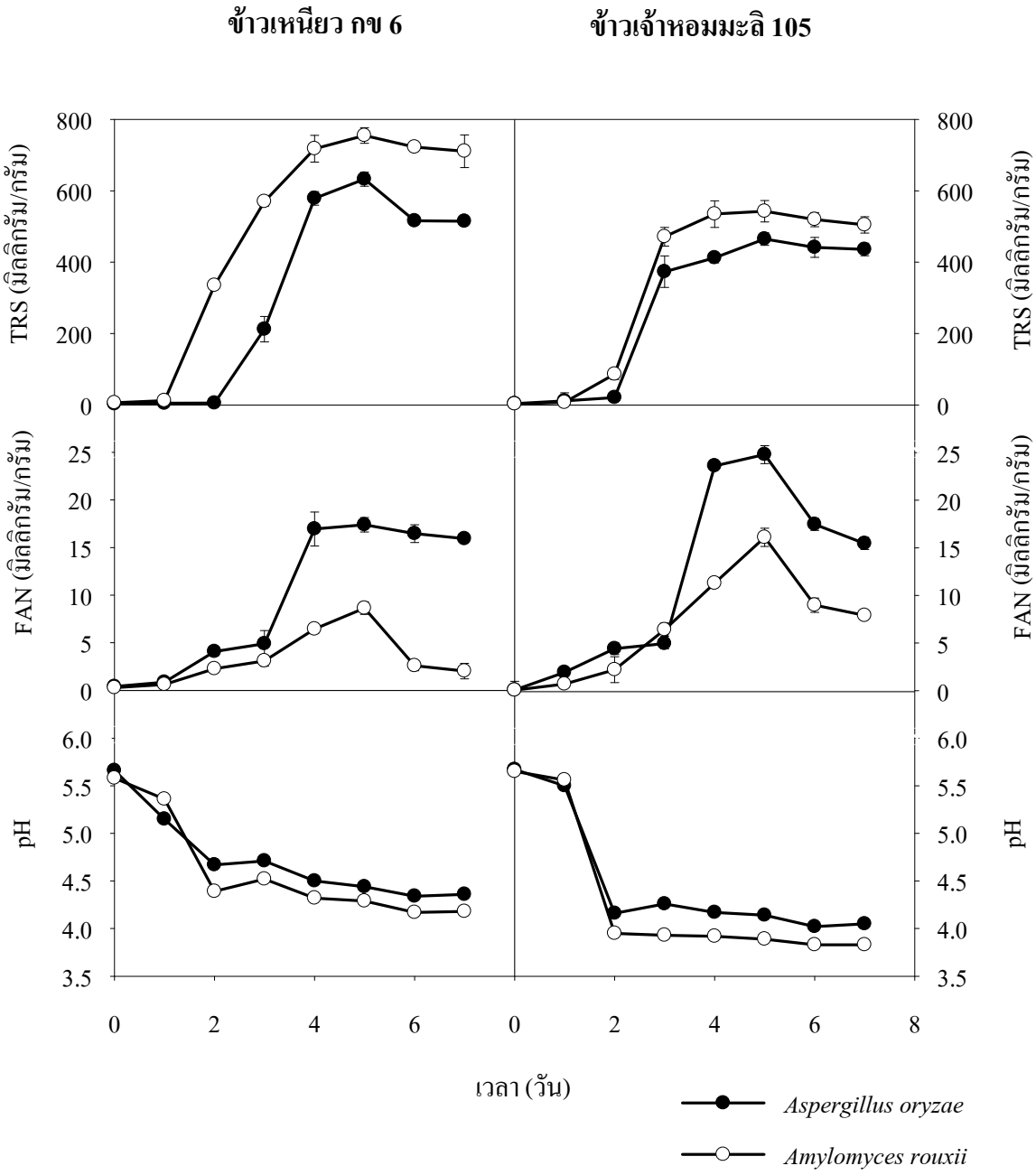
จากการทดลองการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์พรีไบโอติกจากข้าว โดยใช้ข้าวไทย 2 สายพันธุ์ คือ ข้าวเหนียว กข 6 และข้าวเจ้าหอมมะลิ 105 เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักแบบแห้ง และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายแป้งข้าวด้วยเชื้อรา 2 สายพันธุ์ คือ *Aspergillus oryzae* TISTR 3108 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182, พบว่า *Amylomyces rouxii* มีความสามารถในการผลิต amylolytic activity และ α-amylase activity ได้ดีกว่า *Aspergillus oryzae*, โดยมีค่าสูงสุดที่ 331 ยูนิตต่อกรัม และ 104 ยูนิตต่อกรัม ตามลำดับ ภายหลังจากหมักได้ 5 วัน α-glucosidase activity ที่ผลิตจาก *Aspergillus oryzae* สูงกว่าการหมักด้วย *Amylomyces rouxii* ในวัตถุดิบทั้งสองชนิด ดังแสดงในรูปที่ 3, นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบว่า ข้าวเหนียวสามารถผลิตน้ำตาลรีดิวซ์ (TRS) ได้สูงกว่าข้าวเจ้าหอมมะลิ โดยมีค่าสูงสุดที่ 749 มิลลิกรัม/กรัม ในวันที่ 5 ของการหมัก ดังแสดงในรูปที่ 4.

การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ในระหว่างการหมักแบบแห้งด้วย *Aspergillus oryzae* ในวัตถุดิบข้าวเหนียวและข้าวเจ้าหอมมะลิ ดังแสดงในรูปที่ 5. น้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เกิดขึ้น ได้แก่ glucose, maltose, maltotriose, isomaltose, panose และ isomaltotriose, โดยที่การหมักด้วยข้าวเหนียวจะมีปริมาณ isomaltose, panose และ isomaltotriose ที่เป็น prebiotic isomalto-oligosaccharides มากกว่าการหมักด้วยข้าวเจ้าหอมมะลิ.

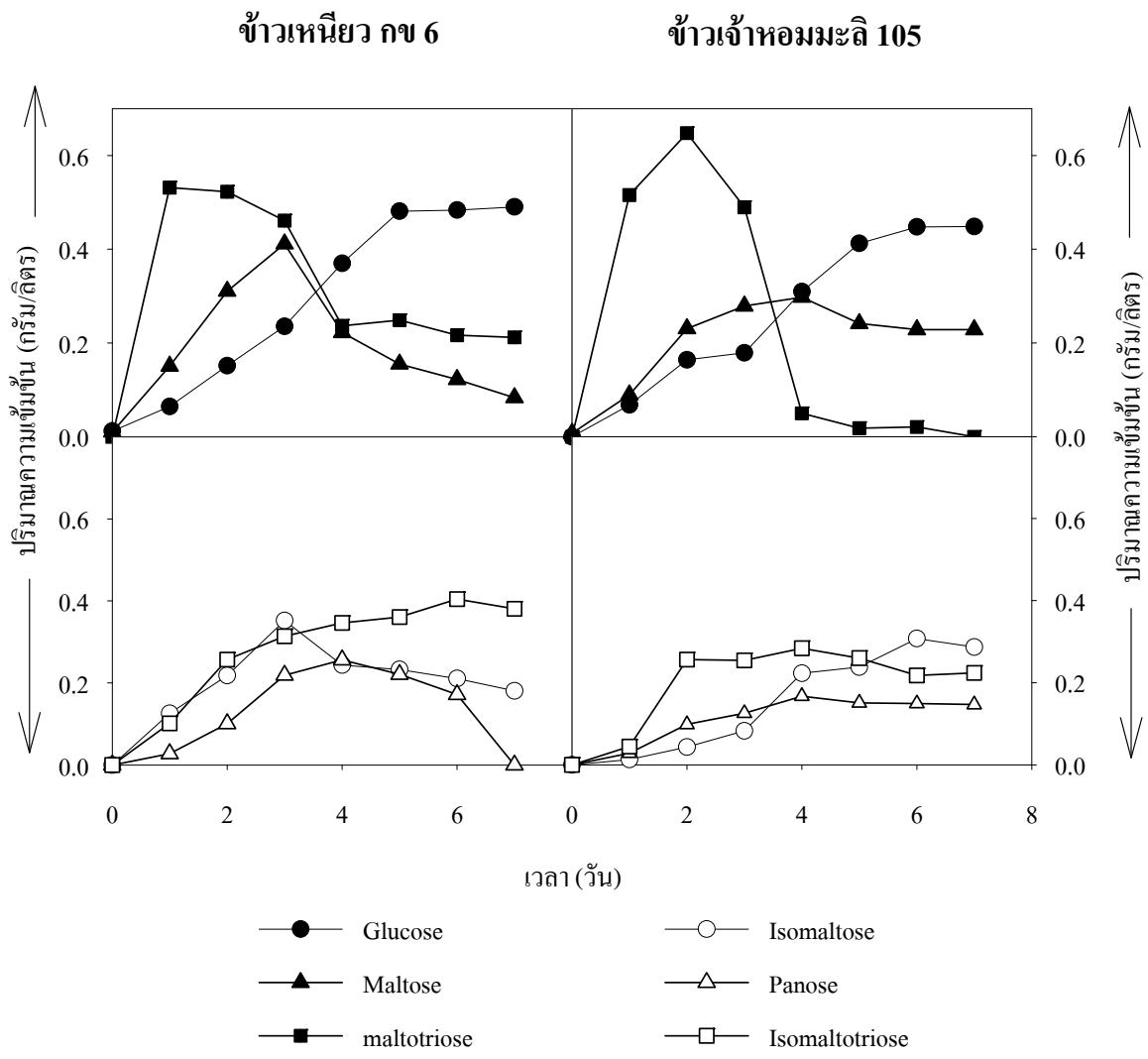
รูปที่ 6 แสดงปริมาณน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักด้วย *Amylomyces rouxii* ในข้าวเหนียวและข้าวเจ้าหอมมะลิ, การหมักข้าวเหนียวจะให้ปริมาณ glucose มากกว่าข้าวเจ้าหอมมะลิ, รองลงมาคือ maltose และ maltotriose, ส่วน isomaltose, panose และ isomaltotriose มีปริมาณน้อยมาก.



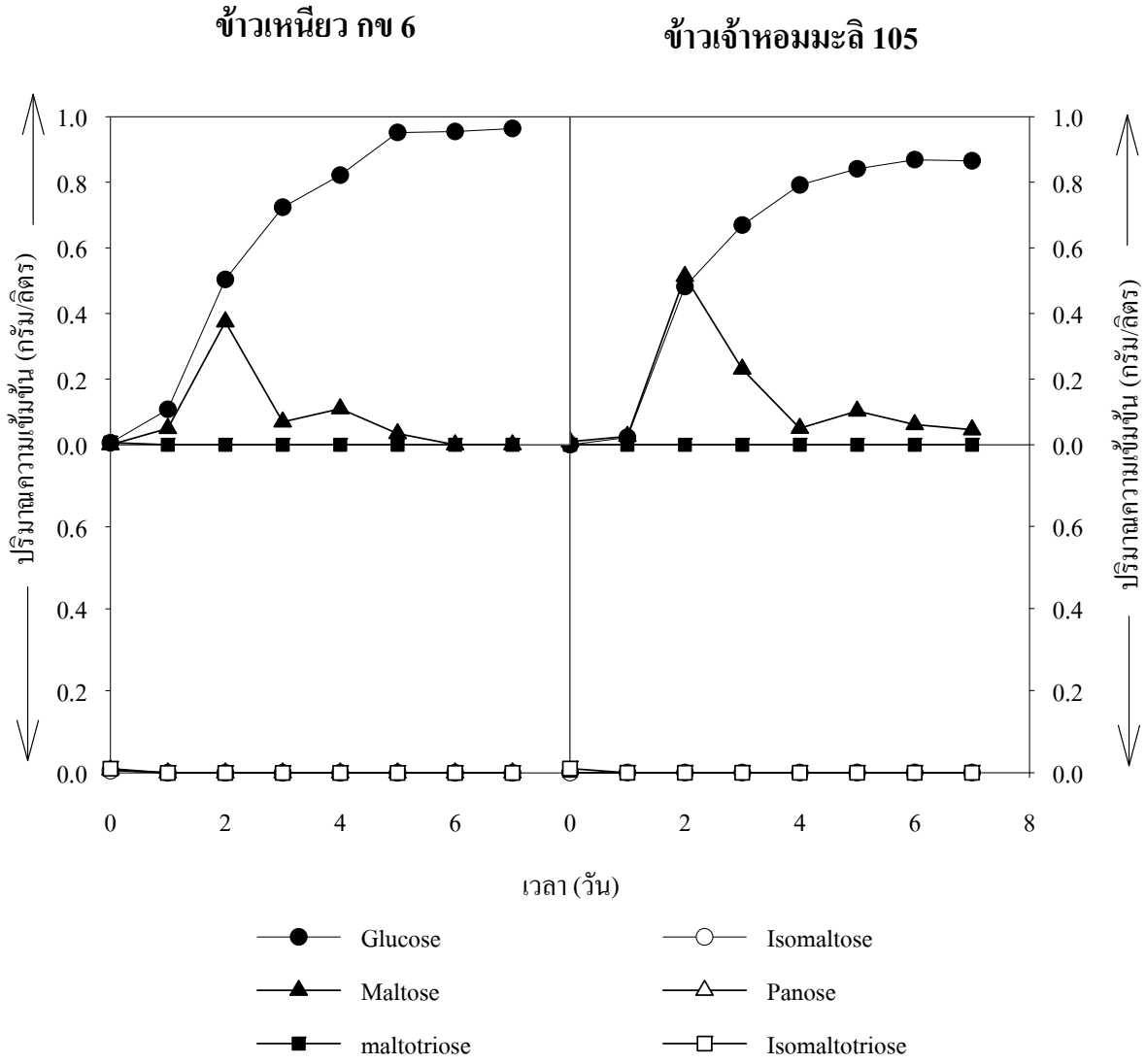
รูปที่ 3. Amylolytic activity, α-amylase activity และ α-glucosidase activity ของ *Aspergillus oryzae* และ *Amylomyces rouxii* ในการหมักแบบแห้ง โดยใช้ข้าวเหนียว กข 6 และข้าวเจ้าหอมมะลิ 105 เป็นวัตถุดิบในการหมัก.



รูปที่ 4. การเปลี่ยนแปลงทางเคมีในระหว่างการหมักแบบแห้ง ระหว่าง *Aspergillus oryzae* และ *Amylomyces rouxii* โดยใช้ข้าวเหนียว กข 6 และข้าวเจ้าหอมมะลิ 105 เป็นวัตถุดิบในการหมัก.



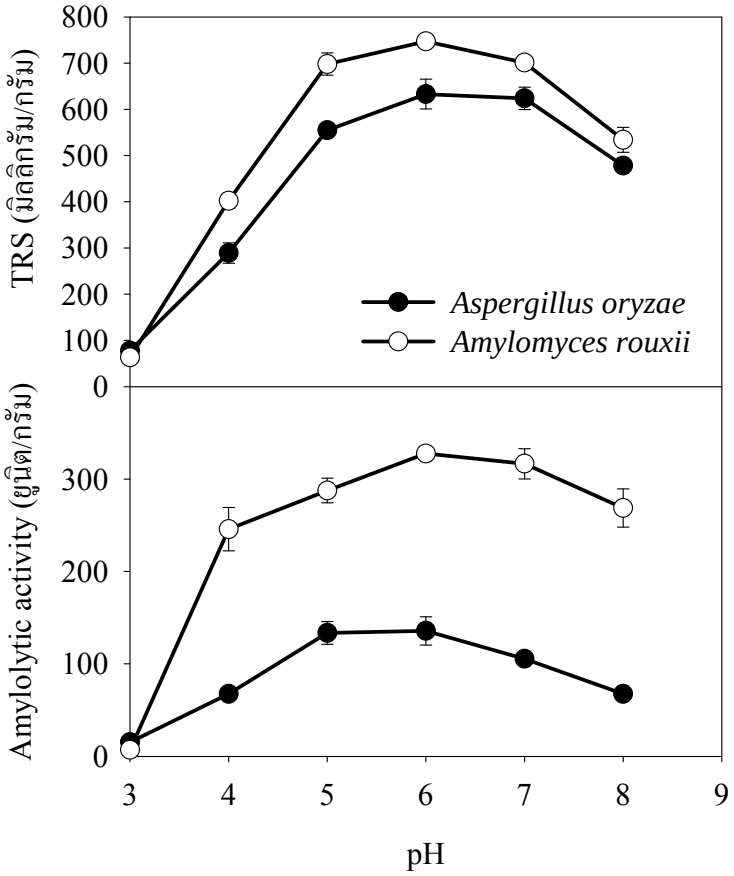
รูปที่ 5. ปริมาณ glucose, maltose, maltotriose, isomaltose, panose และ isomaltotriose ในกระบวนการหมักของ *Aspergillus oryzae* ระหว่างข้าวเหนียว กข 6 และข้าวเจ้าหอมมะลิ 105.



รูปที่ 6. ปริมาณ glucose, maltose, maltotriose, isomaltose, panose และ isomaltotriose ในกระบวนการหมักของ *Amylomyces rouxii* ระหว่างข้าวเหนียว กข 6 และข้าวเจ้าหอมมะลิ 105.

ผลของ pH ต่อการหมักข้าว

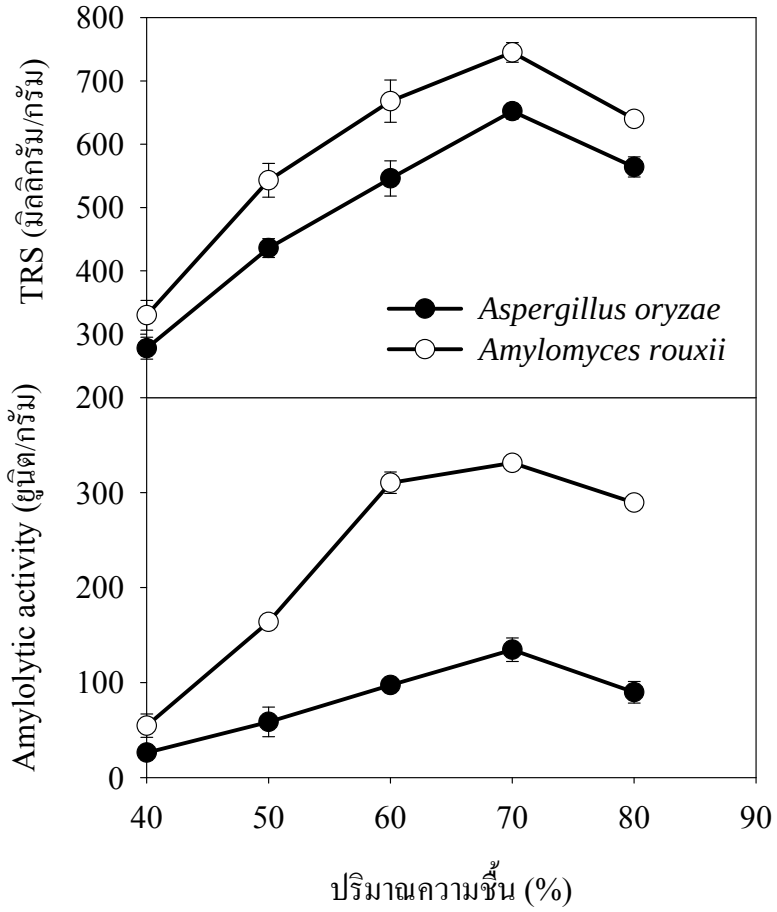
รูปที่ 7 แสดงผลของระดับ pH ต่อการผลิต TRS และ amylolytic activity ในการหมักข้าวเหนียวด้วย *Aspergillus oryzae* และ *Amylomyces rouxii*. ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อทั้งสองชนิดผลิต TRS และ amylolytic activity สูงสุดเมื่อมีค่า pH เริ่มต้นที่ 6, โดยข้าวเหนียวที่หมักด้วย *Amylomyces rouxii* ให้ค่า TRS และ amylolytic activity สูงสุดที่ 701 มิลลิกรัม/กรัม และ 327 ยูนิต/กรัม, ส่วนข้าวเหนียวที่หมักด้วย *Aspergillus oryzae* ให้ค่า TRS และ amylolytic activity สูงสุดที่ 623 มิลลิกรัม/ กรัม และ 135 ยูนิต/กรัม ตามลำดับ.



รูปที่ 7. ผลของระดับ pH ต่อปริมาณ TRS และ amylolytic activity ในการหมักข้าวเหนียวเปรียบเทียบระหว่างเชื้อรา *Aspergillus oryzae* และ *Amylomyces rouxii* ที่ 30 °ซ. เป็นเวลา 5 วัน.

ผลของปริมาณความชื้นต่อการหมักข้าว

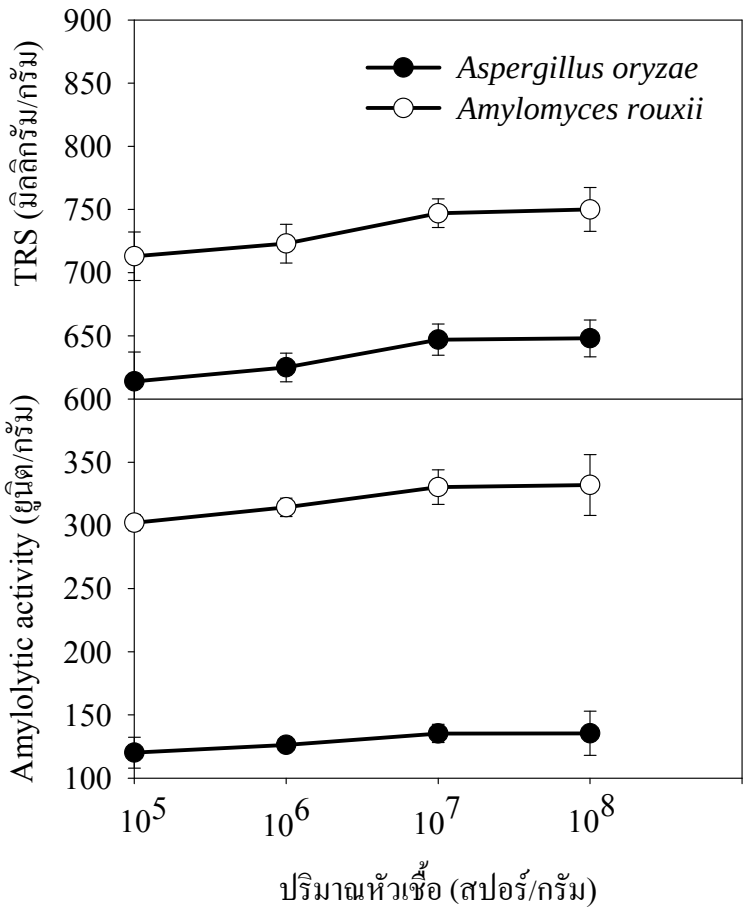
สำหรับการหาปริมาณความชื้นที่เหมาะสมในการหมักแบบแห้งเพื่อผลิตสารโอลิโกแซ็ก-คาไรด์พรีไบโอติก, โดยเปรียบเทียบการหมักข้าวเหนียวด้วยเชื้อรา 2 สายพันธุ์ ระหว่าง *Aspergillus oryzae* และ *Amylomyces rouxii*, ผลการทดลองพบว่า เชื้อทั้งสองสายพันธุ์ผลิต TRS และ amylolytic activity สูงสุดเมื่อหมักด้วยข้าวเหนียวที่ความชื้น 70%, โดยข้าวเหนียวที่หมักด้วย *Amylomyces rouxii* ให้ค่า TRS และ amylolytic activity สูงสุดที่ 745 มิลลิกรัม/กรัม และ 331 ยูนิต/กรัม ตามลำดับ, ส่วนข้าวเหนียวที่หมักด้วย *Aspergillus oryzae* ให้ค่า TRS และ amylolytic activity สูงสุดที่ 652 มิลลิกรัม/ กรัม และ 134 ยูนิต/กรัม, ดังแสดงในรูปที่ 8.



รูปที่ 8. ผลของปริมาณความชื้นของข้าวเหนียวที่ใช้ในการหมักต่อปริมาณ TRS และ amylolytic activity เปรียบเทียบระหว่างเชื้อรา *Aspergillus oryzae* และ *Amylomyces rouxii* ที่ 30 °ซ เป็นเวลา 5 วัน.

ผลของปริมาณหัวเชื้อสปอร์ต่อการหมักข้าว

รูปที่ 9 แสดงผลของปริมาณความเข้มข้นสปอร์ระหว่าง *Amylomyces rouxii* และ *Aspergillus oryzae* ต่อการผลิต TRS และ amylolytic activity, ผลการทดลองพบว่า เชื้อทั้งสองชนิดผลิต TRS และ amylolytic activity สูงสุดเมื่อมีความเข้มข้นสปอร์ที่ 10^7 และ 10^8 สปอร์/กรัม, โดยข้าวเหนียวที่หมักด้วย *Amylomyces rouxii* ให้ค่า TRS และ amylolytic activity สูงสุดที่ 745 มิลลิกรัม/กรัม และ 331 ยูนิต/กรัม, ส่วนข้าวเหนียวที่หมักด้วย *Aspergillus oryzae* ให้ค่า TRS และ amylolytic activity สูงสุดที่ 652 มิลลิกรัม/กรัม และ 134 ยูนิต/กรัม ตามลำดับ, ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ปริมาณความเข้มข้นสปอร์ที่ 10^7 สปอร์/กรัม.



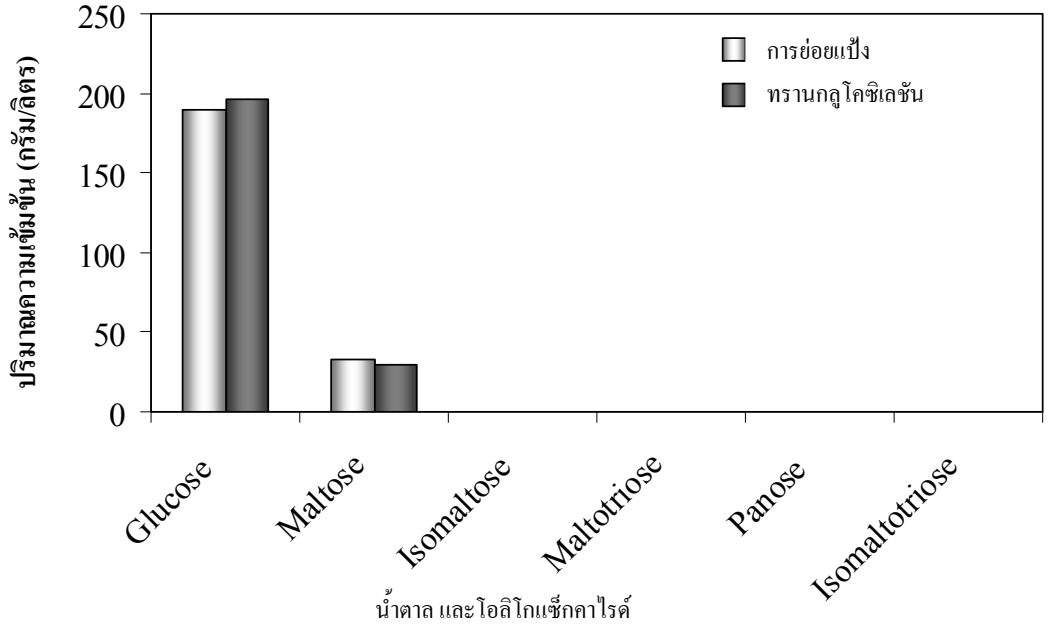
รูปที่ 9. ผลของปริมาณความเข้มข้นสปอร์ระหว่าง *Aspergillus oryzae* และ *Amylomyces rouxii* ต่อปริมาณ TRS และ amylolytic activity ในการหมักข้าวเหนียว ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 5 วัน.

3.5 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีในกระบวนการย่อยแป้งหมักและทรานกลูโคซิเลชัน

จากการทดลองการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์พรีไบโอติกจากข้าวโดยใช้ข้าวไทย 2 สายพันธุ์ คือ ข้าวเหนียว กข 6 และข้าวเจ้าหอมมะลิ 105 เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักแบบแห้ง, และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยสลายแป้งข้าวด้วยเชื้อรา 2 สายพันธุ์ คือ *Aspergillus oryzae* และ *Amylomyces rouxii*, พบว่า ข้าวเหนียวเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมในการหมักแบบแห้ง, และ *Aspergillus oryzae* เป็นเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงในการสร้าง prebiotic isomalto-oligosaccharides (isomaltose panose และ isomaltotriose), ดังนั้น ในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ข้าวเหนียว และ *Aspergillus oryzae* ในกระบวนการหมักแบบแห้ง.

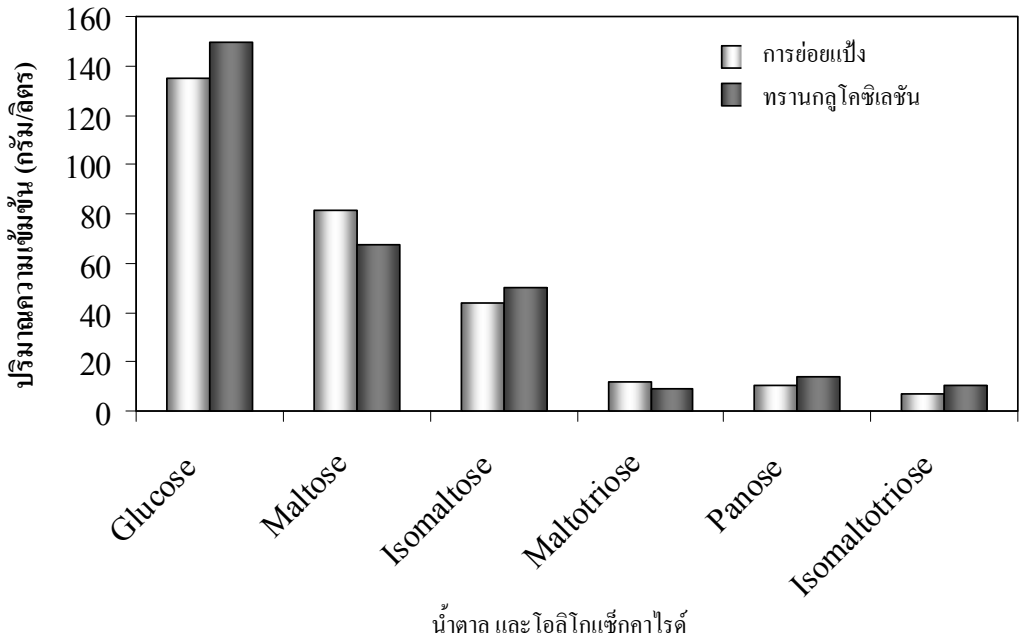
ภายหลังจากหมักข้าวเหนียวในสภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลา 5 วัน ข้าวหมักจะมีเอนไซม์ต่างๆ ที่สามารถนำไปใช้ย่อยสลายแป้งที่เหลือ โดยการปรับอุณหภูมิ และค่า pH ให้เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์, บ่มจนกระทั่งแป้งข้าวถูกย่อยสลายกลายเป็นน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์, หลังจากนั้นสารละลายข้าวที่ได้ จะนำเข้าสู่กระบวนการทรานกลูโคซิเลชันเพื่อเปลี่ยนโมเลกุลน้ำตาลให้กลายเป็นโมเลกุล isomalto-oligosaccharides, ด้วยการทำงานของ trans-glucosidase เอนไซม์นี้เป็น α-glucosidase ชนิดหนึ่งที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาทรานกลูโคซิเลชันได้.

รูปที่ 10 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายหลังจากกระบวนการย่อยสลายแป้งข้าวที่หมักด้วย *Amylomyces rouxii* และภายหลังจากทรานกลูโคซิเลชัน. ผลการทดลองพบว่าสารละลายที่ได้ภายหลังจากกระบวนการย่อยสลายแป้งข้าวหมัก ประกอบด้วยน้ำตาล glucose (189 กรัม/ลิตร) และ maltose (33 กรัม/ลิตร), ส่วนโอลิโกแซ็กคาไรด์จะมีปริมาณน้อยมาก, รวมทั้งไม่มีการสร้างโมเลกุล isomalto-oligosaccharides เมื่อนำสารละลายผ่านเข้าสู่ทรานกลูโคซิเลชันโดยการทำงานของ transglucosidase เอนไซม์นี้จะมีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งและน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ที่เหลืออยู่ให้กลายเป็น glucose, จึงทำให้มีปริมาณความเข้มข้นของ glucose เพิ่มขึ้นเป็น 196 กรัม/ลิตร และปริมาณ maltose ลดลงเหลือ 29 กรัม/ลิตร, ส่วนปริมาณโอลิโกแซ็กคาไรด์มี น้อยมาก เนื่องจากถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์จนเกือบสมบูรณ์ และไม่มีการสร้าง isomalto-oligosaccharides จากปฏิกิริยาทรานกลูโคซิเลชัน.



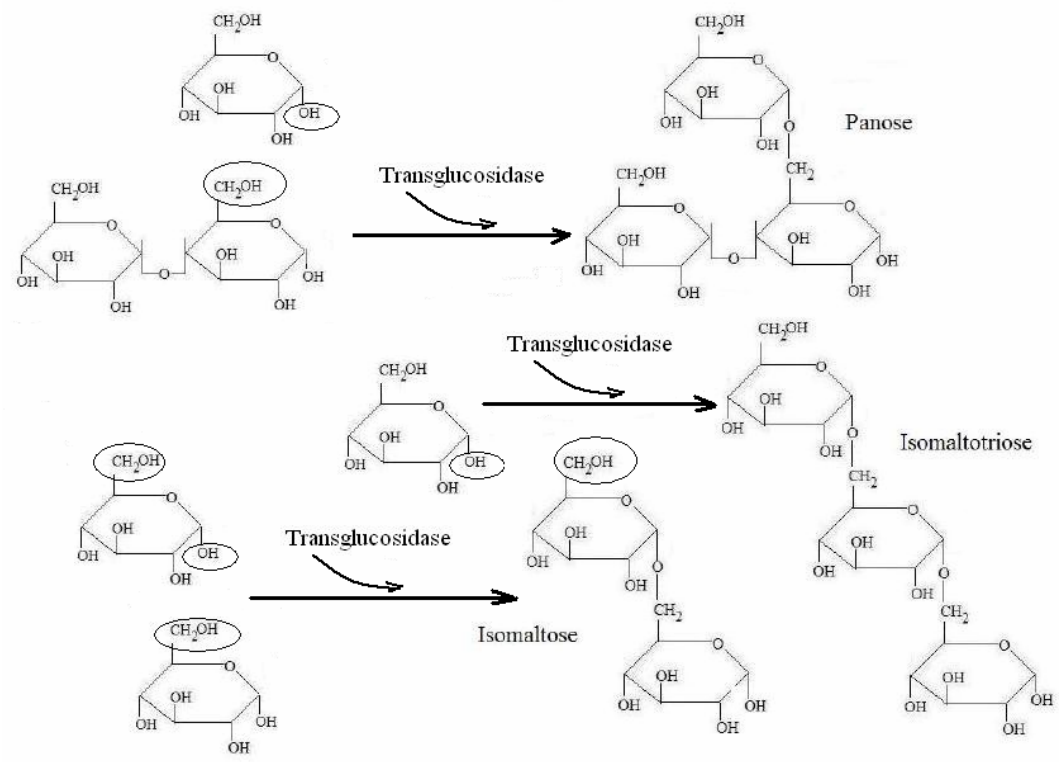
รูปที่ 10. ปริมาณ glucose, maltose, maltotriose, isomaltose, panose และ isomaltotriose ที่เกิดขึ้นภายหลังจากการย่อยแป้งหมักของ *Amylomyces rouxii* และภายหลังทรานกลูโคซิเลชัน.

รูปที่ 11 แสดงปริมาณน้ำตาลต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายหลังจากกระบวนการย่อยสลายแป้งข้าวที่หมักด้วย *Aspergillus oryzae* และภายหลังจากทรานกลูโคซิเลชัน ผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ พบว่า ภายหลังกระบวนการย่อยแป้งข้าวหมักจะเกิดสารประกอบและน้ำตาลหลายชนิด, โดยมีปริมาณ glucose สูงสุดที่ 135 กรัม/ลิตร, รองลงมาคือ maltose (81 กรัม/ลิตร) และ maltotriose (12 กรัม/ลิตร), ส่วนโมเลกุลของ isomalto-oligosaccharides ที่เกิดขึ้น ได้แก่ isomaltose, panose และ isomaltotriose, โดยมีปริมาณ 44 กรัม/ลิตร, 10 กรัม/ลิตร และ 7 กรัม/ลิตร ตามลำดับ. เมื่อนำสารละลายผ่านเข้าสู่กระบวนการทรานกลูโคซิเลชัน ปริมาณความเข้มข้นของ glucose เพิ่มขึ้นถึง 149 กรัม/ลิตร, ส่วนปริมาณ maltose กับ maltotriose ลดลงเหลือ 67 กรัม/ลิตร และ 8 กรัม/ลิตร ตามลำดับ, ปริมาณ isomaltose, panose และ isomaltotriose เพิ่มขึ้นเป็น 50 กรัม/ลิตร, 14 กรัม/ลิตร และ 10 กรัม/ลิตร ตามลำดับ.



รูปที่ 11. ปริมาณ glucose, maltose, maltotriose, isomaltose, panose และ isomaltotriose ที่เกิดขึ้นภายหลังจากการย่อยแป้งหมักของ *Aspergillus oryzae* และภายหลังทรานกลูโคซิเลชัน.

จากผลการทดลองในรูปที่ 11 สามารถอธิบายได้ว่าเมื่อสารละลายข้าวเข้าสู่กระบวนการทรานกลูโคซิเลชันเพื่อเปลี่ยนโมเลกุลน้ำตาลให้เป็นโมเลกุลของ isomalto-oligosaccharides, สารที่เพิ่มขึ้นประกอบด้วย glucose, isomaltose, panose และ isomaltotriose โดยปริมาณ isomaltose, panose และ isomaltotriose เพิ่มขึ้นถึง 21%, ในขณะที่ปริมาณ maltose และ maltotriose ลดลง, ทั้งนี้เนื่องจาก transglucosidase มีความสามารถในการไฮโดรไลซ์โมเลกุลของ maltose, maltotriose และ oligosaccharides ทำให้ปริมาณ glucose สูงขึ้น, ขณะเดียวกัน transglucosidase ก็จะนำโมเลกุล glucose ที่สร้างขึ้นนี้ไปทำปฏิกิริยากับคาร์บอนตัวที่ 6-OH ของ glucose หรือ maltose เกิดเป็นสารประกอบ isomaltose, panose และ isomaltotriose ดังแสดงในรูปที่ 12.



รูปที่ 12. กลไกการทำงานของ transglucosidase ในปฏิกริยาทรานกลูโคซิเลชัน เกิดสารประกอบ isomaltose, panose และ isomaltotriose.

3.3 การฆ่าเชื้อแบบพลาสเจอร์ไรส์และการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

จากการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาเพื่อศึกษาผลของการฆ่าเชื้อแบบพลาสเจอร์ไรส์ต่ออายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โอลิโกแซ็กคาไรด์พรีไบโอติก พบว่า จำนวนแบคทีเรียที่ต้องการอากาศทั้งหมด (Total aerobic count, TAC) ก่อนการพลาสเจอร์ไรส์มีปริมาณ 97 cfu/มิลลิลิตร แต่ตรวจไม่พบเชื้อโคลิฟอร์ม, *Escherichia coli*, ยีสต์ และรา ในตัวอย่างสารละลาย ดังแสดงในตารางที่ 1.

ตารางที่ 2 แสดงผลการตรวจทางจุลชีววิทยาภายหลังจากการฆ่าเชื้อแบบพลาสเจอร์ไรส์ที่ช่วงอายุการเก็บรักษา 80 วัน, ซึ่งจากผลการทดลองไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในระยะเวลา 80 วัน และไม่พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาล และโอลิโกแซ็กคาไรด์พรีไบโอติก

ตารางที่ 1. ปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ในสารละลายโอลิโกแซ็กคาไรด์พรีไบโอติกก่อนการพลาสเจอร์ไรส์

ตัวอย่าง	ปริมาณจุลินทรีย์ (cfu/มิลลิลิตร)				
	TAC	***E. coli***	**Coliform**	**ยีสต์**	**รา**
สารละลายพรีไบโอติก	97	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ

ตารางที่ 2. ปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ในสารละลายโอลิโกแซ็กคาไรด์พรีไบโอติกหลังการพลาสเจอร์ไรส์

อายุการเก็บรักษา (วัน)	ปริมาณจุลินทรีย์ที่พบ (cfu/,มิลลิลิตร)				
	TAC	***E. coli***	**Coliform**	**ยีสต์**	**รา**
1	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
7	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
30	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
60	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ
80	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ	ไม่พบ

4. สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองสรุปได้ว่า ข้าวเหนียว กข 6 และ *Aspergillus oryzae* TISTR 3108 มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตสาร prebiotic isomalto-oligosaccharides ในกระบวนการหมักแบบแห้ง, โดยให้ปริมาณ isomalto-oligosaccharides สูงสุด เมื่อวัตถุดิบมีความชื้น 70% และปรับสภาวะการหมักที่ pH 6, ใช้สปอร์ความเข้มข้น 10^7 สปอร์ต่อกรัม และใช้เวลาในการหมัก 5 วัน.

ภายหลังจากการหมักข้าวเหนียวด้วย *Aspergillus oryzae* ข้าวหมักจะมีเอนไซม์ต่างๆ ที่สามารถนำไปใช้ในกระบวนการย่อยแป้งที่เหลือได้, เมื่อปรับค่า pH และบ่มในอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นในช่วงเวลาที่เหมาะสมจะทำให้เกิดการย่อยสลายแป้งเพิ่มขึ้น, เกิดการสร้างน้ำตาลและสารประกอบ isomalto-oligosaccharides.

เมื่อสารละลายข้าวหมักเข้าสู่กระบวนการทรานกลูโคซิเลชัน, transglucosidase จะทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์และทรานกลูโคซิเลชัน เกิดการสร้างสารประกอบต่าง เช่น glucose, isomaltose, panose และ isomaltotriose, โดยปริมาณ isomaltose, panose และ isomaltotriose เพิ่มขึ้นถึง 21%, เมื่อนำไปผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อแบบพลาสเจอร์ไรส์ และเก็บที่อุณหภูมิ 0-4 °ซ. จะสามารถเก็บรักษาไว้ได้มากกว่า 2 เดือน.

5. ข้อเสนอแนะ

ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารโอลิโกแซ็กคาไรด์พรีไบโอติก สามารถทำได้โดยคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ให้ปริมาณ α-glucosidase สูง, เนื่องจากเอนไซม์นี้ทำให้เกิดปฏิกิริยาทรานกลูโคซิเลชัน เกิดการสร้างสารประกอบ isomaltose, panose และ isomaltotriose ซึ่งเป็น prebiotic isomalto-oligosaccharides.

ผลิตภัณฑ์โอลิโกแซ็กคาไรด์พรีไบโอติกช่วยส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายในระบบทางเดินอาหาร ปรับสมดุลในระบบทางเดินอาหารและป้องกันการติดเชื้อในลำไส้, จึงส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภคให้แข็งแรงสมบูรณ์, นอกจากนี้ ผลิตภัณฑ์โอลิโกแซ็กคาไรด์พรีไบโอติกผลิตจากผลผลิตทางการเกษตรจึงไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม.

สารละลายโอลิโกแซ็กคาไรด์พรีไบโอติกสามารถนำไปพัฒนาเพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มหลายประเภท, โดยเฉพาะอาหารเพื่อสุขภาพ, อาหารควบคุมน้ำหนัก, ผลงานที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จึงเป็นประโยชน์ต่อภาคเอกชนผู้ประกอบการผลิตอาหาร เครื่องดื่ม และยา ตั้งแต่ระดับวิสาหกิจชุมชน วิสาหกิจขนาดกลางและขนาดย่อม จนถึงอุตสาหกรรมขนาดใหญ่, รวมถึงองค์ความรู้ทั้งหมดที่ได้จากการวิจัยที่สามารถใช้เป็นฐานข้อมูลสำหรับหน่วยงานภาครัฐ ภาคการศึกษา และภาคเอกชน ในการนำไปต่อยอดหรือประยุกต์ใช้ในด้านอื่นต่อไป.

6. เอกสารอ้างอิง

Ardiansyah, Shirakawa, H., Koseki, T., Ohinata, K., Hashizume, K. and Komai, M., 2006. Rice bran fractions improve blood pressure, lipid profile, and glucose metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem*., **54**, pp. 1914-1920.

Cai, H., Al-Fayez M., Tunstall, RG., Platton, S., Greaves, P., Steward, WP. and Gescher, AJ., 2005. The rice bran constituent tricin potently inhibits cyclooxygenase enzymes and interferes with intestinal carcinogenesis in ApcMin mice. *Mol Cancer Ther*, **4**, pp. 1287-1292.

Dendy, DAV., 2001. Rice. In: Dendy, DAV., and Dobraszczyk, BJ, ed. Cereals and cereal products:chemistry and technology. Maryland: Aspen Publishers, pp. 276-313.

Dikeman, CL., Murphy, MR. and Fahey, GC., Jr., 2006. Dietary fibers affect viscosity of solutions and simulated humangastric and small intestinal digesta. *J Nutr*, **136**, pp. 913-919.

FAO. 2004. Rice and human nutrition. Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nations, pp. 2.

Fooks, LJ, Fuller, R. and Gibson, GR. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal*, **9**, pp. 53-61.

Gibson, GR., 2004. From Probiotics to prebiotics and ahealthy digestive system. *Journal of Food Science*, **69**, pp. M141-M143.

Gibson, GR., Probert, HM., Loo, JV., Rastall, RA. and Roberfroid, MB., 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, **17**, pp. 259-275.

Juliano, BO., 1994. Biological properties of rice . *In*: Juliano, BO., ed. Rice: Chemistry and Technology, vol. 2. St. Paul, Minnesota American Association of Cereal Chemists.

Lie, S., 1973. Nihydrin method for determination of free a-amino nitrogen. *J Inst Brew*, **79**, pp. 37-41.

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, GL., 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., Yoshikai Y., 2005. Isomalto-oligosaccharides polarize Th1-Like responses in intestinal and systemic immunity in mice. *J. Nutr*, **135**, pp. 2857-2861.

Mussatto, SI. and Mancilha IM., 2007. Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, **68**, pp. 587-597.

Nakakuki, T., 1993. Oligosaccharides: production, properties and applications. Switzerland: Gordon and Breach.

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.

Sun, Z. and Henson, CA., 1991. A quantitative assessment of the importance of barley seed α-amylase, debranching enzyme, and α-glucosidase in starch degradation. *Arch Biochem Biophys*, **1284**, pp. 298-305.

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, SN., Chung, CH., Day, DF., Hinton, A., Jr., Bailey, JS, Siragusa, GR., 2005. Isomaltooligosaccharide increases cecal bifidobacterium population in young broiler chickens. *Poult Sci*, **84**, pp. 998-1003.

Zhou, Z., Robards, K., Helliwell, S. and Blanchrad, C., 2002. Composition and functional properties of rice. *International Journal of Food Science and Technology*, **37**, pp. 849-868.