



สมบัติการเป็นฟรีไบโอติกของเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์จากเปลือกของเสาวรสที่ได้จากการทรีตด้วยน้ำ
กึ่งวิกฤต



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต

ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

สมบัติการเป็นฟรีไบโอติกของเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์จากเปลือกของเสาวรสที่ได้จากกา
รหรีตด้วยน้ำกึ่งวิกฤต



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต
ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2564
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

PREBIOTIC PROPERTIES OF PECTIC-OLIGOSACCHARIDES OBTAINED FROM
SUBCRITICAL WATER TREATMENT OF PASSION FRUIT PEEL



By

MR. Thaweesak TANA

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Master of Science (FOOD TECHNOLOGY)

Department of FOOD TECHNOLOGY

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2021

Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ สมบัติการเป็นพรีไบโอติกของเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์จากเปลือก
ของเสาวรสที่ได้จากการทรีตด้วยน้ำกึ่งวิกฤต
โดย นายทวีศักดิ์ ถานะ
สาขาวิชา เทคโนโลยีอาหาร แผนก ก แบบ ก 2 ระดับปริญญามหาบัณฑิต
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รองศาสตราจารย์ ดร. ปราโมทย์ คุวิจิตรจารุ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

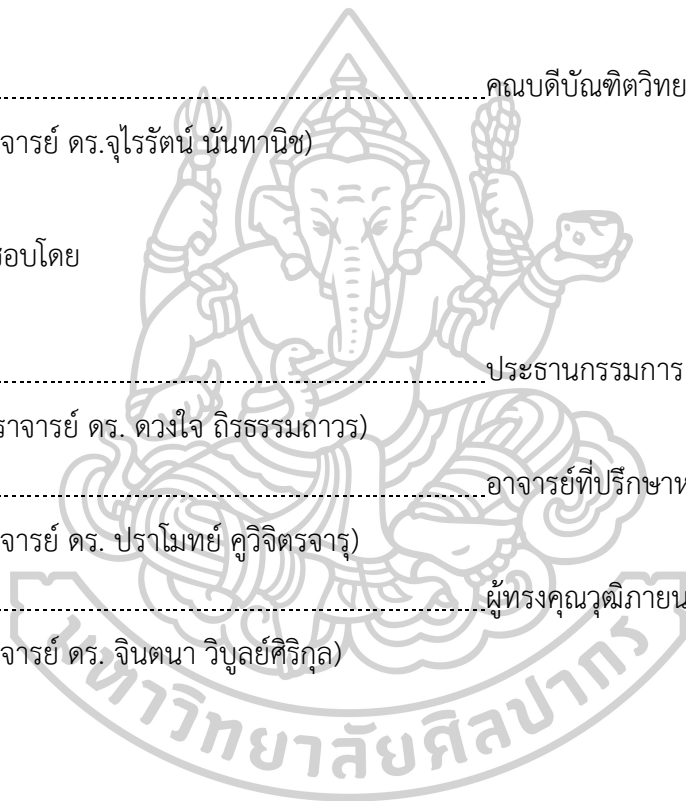
.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.จุไรรัตน์ นันทานิช)

พิจารณาเห็นชอบโดย

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงใจ ธีรธรรมถาวร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. ปราโมทย์ คุวิจิตรจารุ)

.....ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(รองศาสตราจารย์ ดร. จินตนา วิบูลย์ศิริกุล)



60403209 : เทคโนโลยีอาหาร แผน ก แบบ ก 2 ระดับปริญญาโทมหาบัณฑิต

คำสำคัญ : น้ำกึ่งวิกฤต, เพกติกโอลิโกแซคคาไรด์, การหมัก, พรีไบโอติก

นาย ทวีศักดิ์ ถานะ: สมบัติการเป็นพรีไบโอติกของเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์จากเปลือกของเสาวรสที่ได้จากการทรีตด้วยน้ำกึ่งวิกฤต อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รองศาสตราจารย์ ดร. ปราโมทย์ คุวิจิตรจรรุ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสมบัติการเป็นพรีไบโอติกของเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ด้วยน้ำกึ่งวิกฤตจากเปลือกเสาวรสบ โดยการทรีตเปลือกเสาวรสด้วยน้ำกึ่งวิกฤตในภาชนะแบบกจะสามารถผลิตเพกตินได้ร้อยละ 10.91 ± 0.43 ของเปลือกเสาวรสนแห้ง และเมื่อนำเพกตินที่ได้ไปทรีตด้วยน้ำกึ่งวิกฤตในระบบแบบต่อเนื่องได้เป็นเพกตินที่ผ่านการไฮโดรไลซิส (Hydrolyzed pectin) และนำไปกรองด้วยเมมเบรนขนาดต่างๆ แยกเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ได้ 4 ส่วนที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างกัน ได้แก่ POS4 (> 5 kDa), POS3 (3-5 kDa), POS2 (1-3 kDa) และ POS1 (> 1 kDa) โดยมีปริมาณผลผลิตเป็นร้อยละ 78.87, 11.54, 5.80 และ 9.00 ของเปลือกเสาวรสนแห้ง จากนั้นเมื่อทำการวิเคราะห์คุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติกส์ของ hydrolyzed pectin และเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ด้วยการหมักด้วยเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* TISTR2365 และ *Bifidobacterium bifidum* TISTR 2129 โดยเปรียบเทียบกับอินูลิน (Inulin) ผลการทดลองพบว่าเชื้อทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อทำการหมักไป 6 ชั่วโมง และมีจำนวนสูงสุดที่ 24 ชั่วโมง โดยการเติม POS4 เป็นแหล่งคาร์บอนทำให้เชื้อทั้งสองชนิดเจริญเติบโตมากที่สุด โดยมีจำนวนเชื้อ *L. acidophilus* และ *B. bifidum* ที่เกิดขึ้นหลังจากหมักไปแล้ว 24 ชั่วโมง เป็น 2.51×10^6 CFU/mL และ 2.34×10^6 CFU/mL ตามลำดับ (จากจำนวนเชื้อเริ่มต้น 1×10^5 CFU/mL) ค่าความเป็นกรดต่างและวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันสายสั้นจากตัวอย่างที่ใช้ POS4 ให้ผลที่สอดคล้องไปในทิศทางเดียวกัน คือค่าความเป็นกรด-ต่างจากการหมักเชื้อ *L. acidophilus* และ *B. bifidum* มีค่าลดลงจากค่าเริ่มต้น 5.78 เป็น 4.99 และ 5.75 เป็น 4.98 ตามลำดับ และพบกรดไขมันสายสั้นที่ได้จากการหมักด้วย *L. acidophilus* ประกอบไปด้วย อะซิติก โพรไพโอนิก และบิวทิลิก 84.12, 13.44 และ 19.00 mmol/L ตามลำดับ และจากการหมักด้วย *B. bifidum* ประกอบไปด้วย อะซิติก โพรไพโอนิก และบิวทิลิก 70.19, 10.19 และ 14.10 mmol/L ตามลำดับ ซึ่งค่าอัตราส่วนของปริมาณของ อะซิติก:โพรไพโอนิก:บิวทิลิก ที่เกิดขึ้นมีค่าเป็น 1.00:0.15:0.22 ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า hydrolyzed pectin และเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้มีคุณสมบัติเป็นสารพรีไบโอติกเช่นเดียวกับอินูลินโดยในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน POS4 ทำให้มีการเจริญของเชื้อ *L. acidophilus* และ *B. bifidum* ได้มากที่สุด



60403209 : Major (FOOD TECHNOLOGY)

Keyword : subcritical water, pectic-oligosaccharides, fermentation, prebiotic

MR. THAWEESEK TANA : PREBIOTIC PROPERTIES OF PECTIC-OLIGOSACCHARIDES OBTAINED FROM SUBCRITICAL WATER TREATMENT OF PASSION FRUIT PEEL THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR PRAMOTE KHUWIJITJARU

The study aimed to evaluate the prebiotic properties of pectic-oligosaccharides obtained from subcritical water treatment of passion fruit peel. A batch-type treatment of passion fruit peel in subcritical water provided the hydrolyzed pectin at the yield of $10.91 \pm 0.43\%$ of dry passion fruit peel. The pectin was further treated in subcritical water using a continuous flow-type reactor and separated into various pectic-oligosaccharides using membrane filtration. Four pectic-oligosaccharides (POS) with different molecular sizes i.e., POS4 (> 5 kDa), POS3 (3-5 kDa), POS2 (1-3 kDa), and POS1 (> 1 kDa) with the yields of 78.87, 11.54, 5.80, and 9.00% of dry passion fruit peel were obtained. The prebiotic properties of the hydrolyzed pectin, POS3, and POS4 were determined using an *in vitro* fermentation with *Lactobacillus acidophilus* TISTR2365 and *Bifidobacterium bifidum* TISTR 2129 and compared with inulin. The results showed that both strains rapidly increased after 6 h and reached the maximum numbers at 24 h. Addition of POS4 as a carbon source resulted in the highest number of *L. acidophilus* and *B. bifidum* at 24 h of 2.51×10^6 CFU/mL and 2.34×10^6 CFU/mL, respectively (initial number of 1×10^5 CFU/mL). pH and short-chain fatty acids content from the sample with POS4 also showed the similar trend in which pH values of *L. acidophilus* and *B. bifidum* fermentation decreased from 5.78 to 4.99 and 5.75 to 4.98, respectively. The short-chain fatty acids found from *L. acidophilus* fermentation contained acetic, propionic, and butyric acids of 84.12, 13.44, and 19.00 mmol/L, respectively while in those from *B. bifidum* contained acetic, propionic, and butyric acids of 70.19, 10.19, and 14.10 mmol/L, respectively. The ratio of acetic acid:propionic acid:butyric acid was 1.00:0.22:0.15. It could be concluded that the hydrolyzed pectin and both POS possessed the same prebiotic properties as commercial inulin. The POS4 provided the highest growth of both *L. acidophilus* and *B. bifidum*.



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้ได้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เพราะได้รับความช่วยเหลือจากรองศาสตราจารย์ ดร.ปราโมทย์ คุวิจิตรจากรุ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและให้คำแนะนำในทุกๆด้าน ไม่ว่าจะเป็นเรื่องเรียน และเรื่องการใช้ชีวิต รวมทั้งขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงใจ ถิรธรรมถาวร ที่กรุณามาเป็น ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.จินตนา วิบูลย์ศิริกุล ที่กรุณามาเป็น คณะกรรมการภายนอกในการสอบครั้งนี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยศิลปากร ทุกท่าน ที่คอยให้วิชา ความรู้ และคำแนะนำที่ดีเสมอมา ตลอดจนขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่สำนักงาน เจ้าหน้าที่ วิทยาศาสตร์ทุกท่าน ที่คอยอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัว ที่คอยเป็นกำลังใจ และให้ความช่วยเหลือในทุก ด้านจนประสบความสำเร็จ

ขอขอบพระคุณนายพิพัฒน์ อรุณเคนทร์ ที่คอยให้ความช่วยเหลือ และให้คำแนะนำที่ดีในการใช้ ภาษาอังกฤษ ตลอดจนขอขอบพระคุณพี่ก้อย ธีรณัฐ มิละสิงห์ ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำในด้านการ ทำวิจัย ตลอดจนพี่ๆเพื่อนๆทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือ

และงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการวิจัยเรื่อง “การผลิตและสมบัติของเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์จากเศษเปลือกเหลือทิ้งของเสาวรสด้วยน้ำกึ่งวิกฤต” โดยได้รับทุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ปี 2559 (SURDI 59/01/51) ผ่านสำนักงานบริหารการวิจัย นวัตกรรมและการสร้างสรรค์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

นาย ทวีศักดิ์ ถานะ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ช
สารบัญ.....	ฅ
สารบัญตาราง.....	ฐ
สารบัญภาพ.....	ฑ
บทที่ 1	16
บทนำ.....	16
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....	16
1.2 วัตถุประสงค์	17
1.3 ขอบเขตการศึกษา.....	17
1.4 สมมุติฐานของงานวิจัย.....	17
บทที่ 2	18
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย.....	18
2.1 เสาวรสี	18
2.2 คาร์โบไฮเดรตที่เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์พืช.....	20
2.3 การทรีตสารชีวมวลด้วยน้ำกึ่งวิกฤต (Biomass treatment with subcritical water).....	24
2.4 การวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง.....	28
2.5 การกรองด้วยเมมเบรน (Membrane filtration).....	29
2.6 สารพรีไบโอติก.....	30
บทที่ 3	32

วิธีดำเนินการวิจัย	32
3.1 วัตถุประสงค์ สารเคมี และอุปกรณ์	32
3.2 สารเคมี	32
3.3 อุปกรณ์	34
3.4 วิธีการทดลอง	36
บทที่ 4	43
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	43
4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบเริ่มต้นของผงเปลือกเสาวรสแห้ง	43
4.2 สภาวะในการทรีตเปลือกเสาวรสด้วยน้ำกึ่งวิกฤตในภาชนะแบบกะ (batch-type)	45
4.3 การทรีตเพกตินที่ได้จากเปลือกเสาวรสด้วยน้ำกึ่งวิกฤตในระบบแบบต่อเนื่อง (continuous flow-type) และการกรองผ่านเมมเบรน	46
4.4 การวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลด้วย size exclusion chromatography	48
4.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบโมโนแซคคาไรด์ในสารประกอบเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ 50	
4.6 การทดสอบความสามารถในการเป็นสารพรีไบโอติกของสารประกอบเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์	51
4.6.1 การหมักเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และการเพิ่มขึ้นของจำนวนเชื้อจุลินทรีย์	51
4.6.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)	57
4.6.3 ปริมาณกรดไขมันสายสั้น	59
บทที่ 5	62
สรุปผลการทดลอง	62
รายการอ้างอิง	63
ประวัติผู้เขียน	65
ภาคผนวก	74
ภาคผนวก ก	75

วิธีการวิเคราะห์	75
1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (ดัดแปลงจาก (AOAC, 2000)	75
2. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (AOAC, 1990).....	75
3. การวิเคราะห์โปรตีน (AOAC, 2000).....	76
4. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (Ash) (ดัดแปลงจาก (AOAC, 2000)).....	76
5. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอลซัลฟูริก (Phenol-sulfuric method)(ดัดแปลงจาก (Chaplin, 1986)).....	77
6. การวิเคราะห์ขนาดของโอลิโกแซคคาไรด์ในของเหลวที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีโครมาโทกราฟี.....	79
ของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)	79
7. การวิเคราะห์ปริมาณโมโนแซคคาไรด์จากเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ด้วยการย่อยด้วย Trifluoroacetic acid (TFA) และเตรียมอนุพันธ์ 1-phenyl-3-methyl-2-pyrazoline-5-one (PMP) ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC).....	79
8. วิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC).....	83
9. การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันสายสั้น (Short Chain Fatty Acid, SCFA).....	84
10. การล้างแผ่นเมมเบรนในกรณีต้องการใช้แผ่นเมมเบรนซ้ำ	Error! Bookmark not defined.
11. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS (Carbohydrate-free-Man-Rogosa-Sharp) ปริมาตร 1 ลิตร	Error! Bookmark not defined.
ภาคผนวก ข	Error! Bookmark not defined.
รายละเอียดผลการทดลอง.....	Error! Bookmark not defined.
1. จำนวนเชื้อ <i>L. acidophilus</i> และ <i>B. bifidum</i> ที่ได้มาจากการหมักเชื้อจุลินทรีย์ด้วย MRS broth ด้วยการเติมแหล่งคาร์บอน POS3 POS4 Pectin Inulin ในปริมาณ 10 g/L และไม่เติมแหล่งคาร์บอน (Control).....	Error! Bookmark not defined.

2. ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ได้จากการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. acidophilus* และ *B. bifidum* ในอาหาร MRS broth ที่เติมแหล่งคาร์บอน POS3 POS4 Pectin Inulin ในปริมาณ 10 g/L และ ไม่เติมแหล่งคาร์บอน (Control).....**Error! Bookmark not defined.**
3. ปริมาณกรดไขมันสายสั้นที่ได้จากการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. acidophilus* และ *B. bifidum* ในอาหาร MRS broth ที่เติมแหล่งคาร์บอน POS3 POS4 Pectin Inulin ในปริมาณ 10 g/L และ ไม่เติมแหล่งคาร์บอน (Control)**Error! Bookmark not defined.**



สารบัญตาราง

	หน้า
<u>ตารางที่ 1</u> โมโนแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบคาร์โบไฮเดรตในเปลือกเสาวรสม	20
<u>ตารางที่ 2</u> ตัวอย่างการทรีตสารชีวมวลด้วยน้ำกึ่งวิกฤตเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ประเภทคาร์โบไฮเดรต ..	26
<u>ตารางที่ 3</u> ร้อยละของส่วนประกอบต่างๆ ของเสาวรสม	44
<u>ตารางที่ 4</u> ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบในเปลือกเสาวรสมแห้ง.....	45
<u>ตารางที่ 5</u> ขนาดโมเลกุล (Mw) และค่า Degree of polymerization (DP) ของ POS3, POS4, Hydrolyzed pectin และ Inulin.....	49
<u>ตารางที่ 6</u> ปริมาณโมโนแซคคาไรด์ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่าง POS3 POS4 และ Hydrolyzed	51
<u>ตารางที่ 7</u> ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกรดกลูโคสที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร	78
<u>ตารางที่ 8</u> สมการเส้นตรง และค่า R-square ของสารมาตรฐานโมโนแซคคาไรด์	81
<u>ตารางที่ 9</u> จำนวนเชื้อ L. acidophilus ($\times 10^6$ CFU/mL).....	Error! Bookmark not defined.
<u>ตารางที่ 10</u> จำนวนเชื้อ B. bifidum ($\times 10^6$ CFU/mL).....	Error! Bookmark not defined.
<u>ตารางที่ 11</u> ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ได้จากการเจริญเติบโตของเชื้อ L. acidophilus.....	Error! Bookmark not defined.
<u>ตารางที่ 12</u> ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ได้จากการเจริญเติบโตของเชื้อ B. bifidum	Error! Bookmark not defined.
<u>ตารางที่ 13</u> ปริมาณกรดอะซิติก (mM/L) ที่ได้จากการเจริญเติบโตของเชื้อ L. acidophilus	Error! Bookmark not defined.
<u>ตารางที่ 14</u> ปริมาณกรดโพรไพโอนิก (mM/L) ที่ได้จากการเจริญเติบโตของเชื้อ L. acidophilus	Error! Bookmark not defined.
<u>ตารางที่ 15</u> ปริมาณกรดบิวทิลิก (mM/L) ที่ได้จากการเจริญเติบโตของเชื้อ L. acidophilus	Error! Bookmark not defined.
<u>ตารางที่ 16</u> ปริมาณกรดอะซิติก (mM/L) ที่ได้จากการเจริญเติบโตของเชื้อ B. bifidum ...	Error! Bookmark not defined.

ตารางที่ ข.17 ปริมาณกรดโพรไพโอนิก (mmol/L) ที่ได้จากการเจริญเติบโตของเชื้อ B. bifidum
.....Error! Bookmark not defined.

ตารางที่ 18 ปริมาณกรดบิวทิลิก (mmol/L) ที่ได้จากการเจริญเติบโตของเชื้อ B. bifidum..... Error!
Bookmark not defined.



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 เสาวรสพันธุ์สีม่วง	18
ภาพที่ 2 โครงสร้างผนังเซลล์พืชที่ประกอบไปด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และเพกติน	21
ภาพที่ 3 โมเลกุลของ β -D-glucose.....	21
ภาพที่ 4 โครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส.....	22
ภาพที่ 5 โมเดลโครงสร้างของเพกติน.....	23
ภาพที่ 6 ชนิดของเพกติน.....	24
ภาพที่ 7 แผนภูมิวัฏจักรของน้ำ.....	25
ภาพที่ 8 การเปลี่ยนแปลงของค่าไดอิเล็กทริกสัมพัทธ์และค่าคงที่การแตกตัวของน้ำ.....	25
ภาพที่ 9 อุปกรณ์ในการทรีตเปลือกเสาวรสด้วยน้ำกึ่งวิกฤต.....	37
ภาพที่ 10 อุปกรณ์สำหรับทรีตเพกตินด้วยน้ำกึ่งวิกฤตแบบต่อเนื่อง.....	38
ภาพที่ 11 แผนผังกระบวนการทำบริสุทธิ์.....	39
ภาพที่ 12 เสาวรสปันธ์สีม่วง (ก) เปลือก (ข) เมล็ด (ค) โย (ง) และน้ำเสาวร (จ).....	43
ภาพที่ 13 เปลือกเสาวรหลังผ่านการอบแห้งและบด.....	44
ภาพที่ 14 อุณหภูมิระหว่างการทรีตเปลือกเสาวรสด้วยน้ำกึ่งวิกฤต.....	46
ภาพที่ 15 เพกตินหลังตกตะกอนด้วยเอทานอล 95% (ก) เพกตินที่ถูกล้างด้วยเอทานอล 95% และ.....	46
ภาพที่ 16 การกรองสารละลายเพกตินด้วยวิธีการกรองผ่านเมมเบรน.....	47
ภาพที่ 17 ตัวที่ผ่านการแยกด้วยแผ่นเมมเบรน.....	48
ภาพที่ 18 โครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลด้วย size exclusion.....	49
ภาพที่ 19 การเจริญเติบโตของเชื้อ L. acidophilus ในอาหาร MRS ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน.....	53
ภาพที่ 20 การเจริญเติบโตของเชื้อ L. acidophilus ในอาหาร MRS agar ที่ได้มาจากการหมักเชื้อจุลินทรีย์ด้วย MRS broth ด้วยการเติมแหล่งคาร์บอน POS3,.....	54

<u>ภาพที่ 21</u> การเจริญเติบโตของเชื้อ B. bifidum ในอาหาร MRS ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน POS3,	55
<u>ภาพที่ 22</u> การเจริญเติบโตของเชื้อ B. bifidum ในอาหาร MRS agar ที่ได้มาจากการหมัก เชื้อจุลินทรีย์ด้วย MRS broth ด้วยการเติมแหล่งคาร์บอน POS3,.....	56
<u>ภาพที่ 23</u> ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ได้จากการหมักเชื้อ L. acidophilus ในอาหาร MRS ที่มีการเติม	58
<u>ภาพที่ 24</u> ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ได้จากการหมักเชื้อ B. bifidum ในอาหาร MRS ที่มีการเติม.....	58
<u>ภาพที่ 25</u> ปริมาณกรดไขมันสายสั้น (Acetic (A), Propionic (B) และ Butyric (C)) ของเชื้อ.....	60
<u>ภาพที่ 26</u> ปริมาณกรดไขมันสายสั้น (Acetic (A), Propionic (B) และ Butyric (C)) ของเชื้อ.....	61
<u>ภาพที่ ก.27</u> กราฟมาตรฐานกรดกาแลกทูโรนิกสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	78
<u>ภาพที่ ก.28</u> ตัวอย่างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานโมโนแซคคาไรด์ชนิดกาแลกทูโรนิก.....	81
<u>ภาพที่ ก.29</u> โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานโมโนแซคคาไรด์กับตัวอย่าง POS3 POS4 และ Hydrolyzed pectin	82
<u>ภาพที่ ก.30</u> กราฟมาตรฐานขนาดโมเลกุลของสารมาตรฐาน Dextran สำหรับวิเคราะห์ขนาดโมเลกุล	83
<u>ภาพที่ ก.31</u> ตัวอย่างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานกรดอะซีติก.....	84
<u>ภาพที่ ก.32</u> โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานกรดไขมันสายสั้นกับตัวอย่างการหมัก POS4 ด้วย L. acidophilus.....	85

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

ปัจจุบันอุตสาหกรรมน้ำผลไม้มีความหลากหลายมากขึ้น เสาวรสเป็นผลไม้ชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาแปรรูปเป็นน้ำผลไม้และรับประทานผลสด โดยปริมาณผลผลิตเสาวรสนับปีพุทธศักราช 2562 ในประเทศไทย มีประมาณ 11,496 ตัน (Department of Agricultural Extension, 2019) เสาวรสนับปี 1 ผล สามารถใช้ประโยชน์ได้ทั้งผล โดยส่วนที่ทานได้ของเสาวรสนับปีอุดมไปด้วยวิตามินซี สารแอนติออกซิแดนท์ มีรสชาติเปรี้ยวอมหวาน และมีกลิ่นหอมมากกว่าผลไม้ชนิดอื่น ส่วนเปลือกของเสาวรสนับปีเหมาะสมในการเป็นแหล่งวัตถุดิบใหม่ในการผลิตเพกตินเป็นอย่างมาก เนื่องจากเปลือกเสาวรสนับปีมีปริมาณสูงถึง 50% ของน้ำหนักผลสด และมีปริมาณเพกตินประมาณ 15-20 กรัมต่อ 100 กรัม ของน้ำหนักเปลือกแห้ง (Freitas, 2016)

นอกจากเปลือกเสาวรสนับปีมีความเหมาะสมในการผลิตเพกตินแล้ว เปลือกเสาวรสนับปียังเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมในการสกัดโอลิโกแซคคาไรด์ ด้วยเช่นกัน เนื่องจากเปลือกเสาวรสนับปีมีปริมาณเส้นใยอาหารถึงร้อยละ 62.65-0.33 โดยแบ่งเป็นเส้นใยไม่ละลายน้ำร้อยละ 43.43-7.4 และเส้นใยละลายน้ำร้อยละ 19.22±2.07 (Macagnan, 2015) โดยตัวอย่างเส้นใยละลายน้ำก็คือ โอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารพรีไบโอติก และเป็นวัตถุดิบอาหารชนิดหนึ่งที่มีการใช้กันมากในอุตสาหกรรมอาหาร

สารพรีไบโอติก คือส่วนผสมอาหารที่ร่างกายไม่สามารถย่อยได้และมีประโยชน์ต่อร่างกาย เนื่องจากมีผลโดยตรงต่อการเจริญและเพิ่มจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในร่างกาย (Sabater, 2019) ซึ่งเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ ก็จะช่วยนำพาซึ่งสารประกอบที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น เช่น กรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid, SCFA) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์ โดยเฉพาะทำให้ร่างกายมีระบบภูมิคุ้มกันที่ดีขึ้น (Lomax, 2008) ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญในการสร้างกรดไขมันสายสั้น จากการหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต คือ *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* และ *Eubacterium* (B. Gómez, Gullón, Yáñez, Schols, & Alonso, 2016)

การผลิตโอลิโกแซคคาไรด์สามารถทำได้โดยการนำสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่มาลดขนาดโมเลกุลลง ซึ่งสามารถทำได้โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ การไฮโดรไลซิสด้วยกรด และการใช้ Hydrothermal treatment เป็นต้น ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้วิธีไฮโดรไลซิสด้วยน้ำกึ่งวิกฤต (subcritical water) โดยทรีตตัวอย่างในภาชนะแบบกะ (batch-type reactor) เพื่อให้ได้เพกตินในขั้นแรก จากนั้นทรีตอีกครั้งด้วยน้ำกึ่งวิกฤตในระบบท่อแบบต่อเนื่อง (continuous flow-type reactor) เพื่อให้ได้สารสกัดเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ จากนั้นนำสารสกัดเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้ไปทำบริสุทธิ์ต่อด้วยการกรองผ่านเมมเบรน จากนั้นนำเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ไปวิเคราะห์คุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติกส์ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์จากเปลือกเสาวรสดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต
- 1.2.2 เพื่อทำบริสุทธิ์และวิเคราะห์สมบัติการเป็นพรีไบโอติกของสารเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่เตรียมได้

1.3 ขอบเขตการศึกษา

การสกัดเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์จากเปลือกเสาวรสดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต โดยเสาวรสที่ใช้เป็นเสาวรสดที่ปลูกขึ้นในประเทศไทย

1.4 สมมุติฐานของงานวิจัย

- 1.4.1 น้ำกึ่งวิกฤตสามารถไฮโดรไลซิสสารโมเลกุลใหญ่ให้ได้เป็นสารโมเลกุลเล็กได้ จึงเป็นไปได้ในการใช้ผลิตเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์จากวัตถุดิบที่มีเพกตินเป็นองค์ประกอบได้
- 1.4.2 เทคนิคการกรองผ่านเมมเบรนสามารถแยกขนาดโมเลกุลของเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ได้และเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่เตรียมได้มีสมบัติการเป็นพรีไบโอติก

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

2.1 เสาวรส

เสาวรส (ภาพที่ 1) มีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่บริเวณตอนใต้ของประเทศบราซิล และเริ่มมีการขยายไปปลูกในภูมิภาคต่างๆ ทั้งในสหรัฐอเมริกา ไต้หวัน ตั้งแต่คริสต์ศตวรรษที่ 19 เป็นต้นมา ประเทศไทยได้นำพันธุ์เสาวรสมาปลูกตั้งแต่ปีพุทธศักราช 2498 และมีชื่อเรียกเสาวรสในภาษาไทยต่างๆ กันเช่น กะทกรกฝรั่ง กะทกรกยักษ์ กะทกรกสีดา และเสาวรสสีดา เป็นต้น ซึ่งปัจจุบันเสาวรสที่ปลูกกันมากในประเทศไทยมี 3 พันธุ์ คือ 1. พันธุ์ผลสีม่วง (*P. edulis*) เมื่อผลสุกจะมีสีม่วงเข้มผิวเป็นมัน ผลมีลักษณะกลม หรือเป็นรูปไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4-5 เซนติเมตร น้ำจากผลพันธุ์สีม่วงมีรสชาติดีกว่าพันธุ์สีเหลือง มีกรดต่ำ สีสวยและหวาน จึงเหมาะสำหรับรับประทานสด 2. พันธุ์ผลสีเหลือง (*P. edulis f. flavicarpa*) เมื่อผลสุกจะมีสีเหลืองขมื่น ผิวเป็นมัน มีขนาดใหญ่กว่าพันธุ์ผลสีม่วง เส้นผ่านศูนย์กลางผลประมาณ 5-7 เซนติเมตร น้ำคั้นของพันธุ์นี้มีกรดมากเหมาะสำหรับส่งเข้าโรงงานเพื่อแปรรูปมากกว่ารับประทานผลสดและ 3. พันธุ์ลูกผสม เป็นพันธุ์ที่เกิดจากการผสมระหว่างพันธุ์ผลสีม่วงกับพันธุ์ผลสีเหลือง เพื่อคัดเลือกต้นพันธุ์ใหม่ที่มีลักษณะผลที่ดีเด่นของแต่ละพันธุ์ไว้ ทำให้มีลักษณะผลใหญ่ ให้ผลดก ผสมตัวเองได้ เปลือกบาง ต้านทานโรค และมีลูกกลมและลูกยาวรี พันธุ์ผสมนี้เหมาะสำหรับการปลูกเพื่อ อุตสาหกรรมทำน้ำเสาวรส (Phavaphutanon, n.d.)



ภาพที่ 1 เสาวรสพันธุ์สีม่วง

เสาวรสุดมไปด้วยวิตามินซี แคโรทีน ฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ ไนอาซิน และกรดอมิโน เช่น อาจีนิน กรดแอสพาทิก ไกลซีน ลิวซีน โพรลีน ทรีโอนีน ไทโอซีน วาลีน เป็นต้น อีกทั้งน้ำเสาวรสุดยังเป็นยากล่อมประสาทเล็กน้อยอีกด้วย (Morton, 2013) ผลสุกของเสาวรสุมกลื่นหอม นำมาปั่นเป็นน้ำผลไม้ นำมาสกัดเป็นเครื่องดื่มน้ำผลไม้หรือใช้ผสมกับน้ำผลไม้อื่นๆ ประเทศในแถบอเมริกาใต้รับประทานเปลือกเสาวรสุกสดๆ หรือนำไปปั่นผสมกับน้ำตาลและน้ำเสาวรสุ เป็นเครื่องดื่มที่เรียกว่า “refresco” เนื้อเสาวรสุนำไปทำเป็นแยม เยลลี่ เค้ก ไอศกรีม เสาวรสุในแถบยุโรป เปลือกสีส้มสดใส มีรสหวานแต่อย่างเดียว ไม่มีรสเปรี้ยว แต่ก็ไม่หวานจัด มีรายงานว่าเปลือกเสาวรสุที่ยังโตไม่เต็มที่บางพันธุ์ มีสารประกอบไซยาไนด์ในปริมาณเล็กน้อย แต่หากนำเปลือกเสาวรสุมาทำแยมโดยผ่านความร้อนสูง ไซยาไนด์จะถูกทำลายจนหมด ส่วนเนื้อและเมล็ดบดผสมน้ำตาลปั่น ใช้โรยหน้าเค้ก เพิ่มกลิ่นรส ยอดเสาวรสุนำไปแกงหรือต้มจิ้มน้ำพริก นอกจากนี้เมล็ดยังใช้ประโยชน์ในโรงงานอุตสาหกรรม เช่น การสกัดน้ำมันพืช ผสมในเครื่องสำอางค์ ในยา และนำเนยเทียม เปลือกนำไปสกัดได้สารเพกติน (pectin) หรือนำมาตากแห้งผสมเป็นอาหารสัตว์ (Nodda, 2007)

เสาวรสุนั้นมีประโยชน์มาก เราสามารถใช้ประโยชน์จากเสาวรสุได้ทั้งลูก โดยเฉพาะเปลือกของผลเสาวรสุ ซึ่งในงานวิจัยของ Zibadi (2007) ได้รายงานว่า สารสกัดที่ได้จากเปลือกของเสาวรสุ นั้นเป็นทางเลือกใหม่ในการรักษาความดันโลหิตสูงที่จะเป็นความเสี่ยงให้เกิดโรคหัวใจและโรคหลอดเลือดสมอง โดยสารสกัดจากเปลือกเสาวรสุสามารถลดความดันโลหิตในหนูทดลอง เนื่องจากสารสกัดจากเสาวรสุนั้นจะเป็นตัวกลางปรับไนตริกออกไซด์ในกระแสเลือด ซึ่งจะมีผลต่อการลดความดันโลหิต

อีกทั้งในงานวิจัยของ do Espírito Santo (2012) ได้รายงานเกี่ยวกับความเหมาะสมในการเติมผงเปลือกเสาวรสุในการหมักนมในการผลิตเป็นโยเกิร์ต เพื่อเป็นทางเลือกใหม่ในการปรับปรุงกระบวนการผลิตให้ดีขึ้น เนื่องจาก เมื่อมีการเติมผงเปลือกเสาวรสุในการหมักนมลงไปจะสามารถลดระยะเวลาในการหมักนม อีกทั้งปริมาณกรดทั้งหมดก็เพิ่มสูงขึ้น โดยไม่มีผลกระทบต่อคุณสมบัติด้านเนื้อสัมผัส

นอกจากนี้ Yapo and Koffi (2006) ได้ศึกษาเกี่ยวกับคุณลักษณะของเพกตินที่สกัดได้จากเปลือกเสาวรสุ พบว่าสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบหนึ่งที่เป็นแหล่งของเพกตินที่ดี เนื่องจากเพกตินที่สกัดจากเปลือกเสาวรสุมีปริมาณเมทอกซิลเอสเทอร์ต่ำ (Low ester pectin) และมีปริมาณหมู่แทนที่อื่นๆต่ำ เช่น หมู่อะซิติลและน้ำตาล และยังมีคุณสมบัติ การเกิดเจล และการเพิ่มความหนืดของเพกตินไม่แตกต่างจากเพกตินทางการค้าที่ผลิตจากพืชตระกูลส้ม ดังนั้น เปลือกเสาวรสุจึงมีความเหมาะสมในการผลิตเพกตินและต่อมา Yapo and Koffi (2008) ได้รายงานองค์ประกอบของ

คาร์โบไฮเดรตที่ได้จากการสกัดเปลือกเสาวรสด้วยเอนไซม์แล้วตกตะกอนซ้ำด้วยเอทานอล ดังแสดงในตารางที่ 1

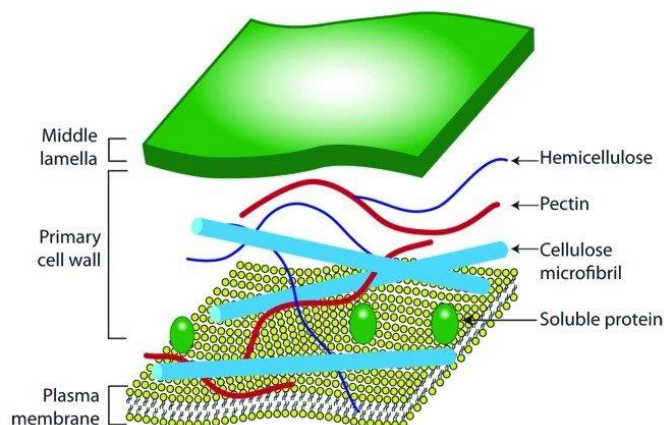
ตารางที่ 1 โมโนแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบคาร์โบไฮเดรตในเปลือกเสาวรส

โมโนแซคคาไรด์	ปริมาณ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
แรมโนส	1.8±0.1
ฟูโคส	0.6±0.1
อะราบิโนส	2.8±0.2
ไซโลส	9.3±0.4
แมนโนส	3.1±0.1
กาแลกโตส	4.7±0.2
กลูโคส	36.1±1.2
กรดยูโรนิก	21.3±0.8
น้ำตาลทั้งหมด	79.7±1.6

ที่มา : Yapo and Koffi (2008)

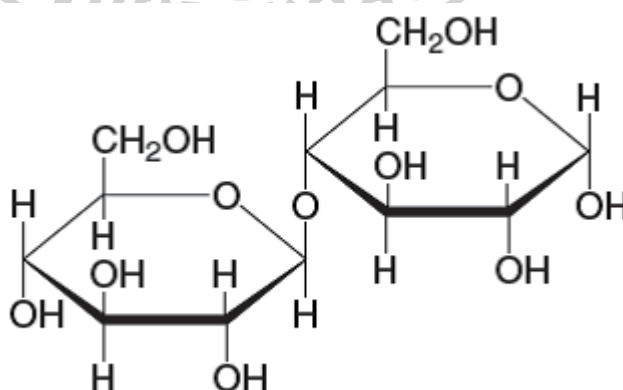
2.2 คาร์โบไฮเดรตที่เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์พืช

นอกจากแป้งและน้ำตาลซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตหลักในผักและผลไม้แล้ว ยังมีคาร์โบไฮเดรตที่เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์อีก คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและเพกติน (ภาพที่ 2) ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่สำคัญในด้านเนื้อสัมผัส รวมไปถึงประโยชน์ทางด้านเส้นใยอาหารเป็นอย่างมาก เพราะเป็นส่วนที่ร่างกายไม่สามารถย่อยได้



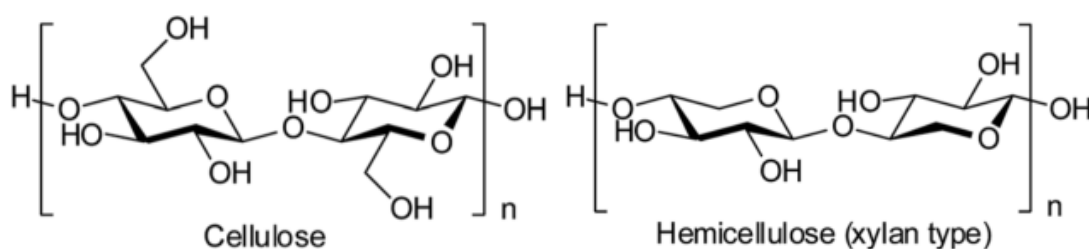
ภาพที่ 2 โครงสร้างผนังเซลล์พืชที่ประกอบไปด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และเพกติน
ที่มา: Flint (2012)

2.2.1 เซลลูโลส (ภาพที่ 4) เป็นพอลิเมอร์ของ β -1,4 glucose ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสเกาะกันอยู่ด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ที่ตำแหน่ง β -1,4 เป็นลูกโซ่ประมาณ 2,000 โมเลกุล ใน primary cell wall และอย่างน้อย 14,000 โมเลกุลใน secondary cell wall โมเลกุลของเซลลูโลสจะเกาะกันเป็นคู่ตามแนวยาวเรียงขนานกันเป็นกลุ่ม 40 คู่ ที่เรียกว่า microfibril (Prarat, 2013) เซลลูโลสเป็นส่วนให้ความแข็งแรงให้กับเซลล์พืช โดยโมเลกุลของ β -D-glucose ที่ยังไม่ได้เชื่อมต่อกันจะเป็นดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โมเลกุลของ β -D-glucose
ที่มา: Janice (2015)

โมเลกุลของ β -D-glucose เชื่อมต่อกันเมื่อโมเลกุลของน้ำถูกกำจัดออก โดยการจับกันของ -OH และ H ซึ่งการเชื่อมพันธะโดยมีโมเลกุลของน้ำตาล 2 โมเลกุล (ไดแซกคาไรด์) เรียกว่า cellobiose เซลลูโลสสามารถพบได้ในปริมาณมากในพืช แต่มนุษย์ไม่มีเอนไซม์ที่จำเป็นในการย่อยพันธะระหว่างโมเลกุลน้ำตาลของเซลลูโลส แต่เราสามารถเพิ่มเซลลูโลสลงไปในอาหารบางอย่างเพื่อลดค่าแคลอรี

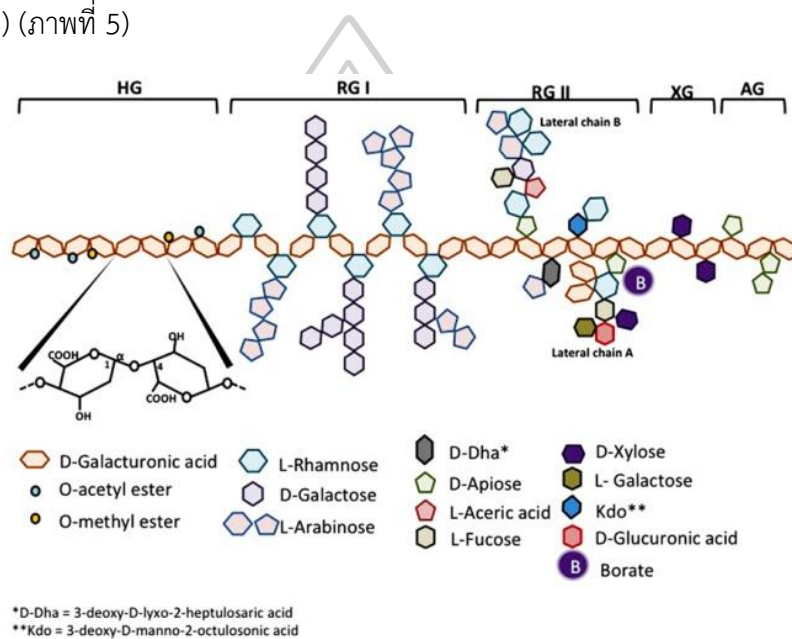


ภาพที่ 4 โครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส

ที่มา: ดัดแปลงจาก Kobayashi (2016)

2.2.2 เฮมิเซลลูโลส (ภาพที่ 4) เป็นกลุ่มของสารประกอบหลายชนิด ในโมเลกุลใหญ่อาจประกอบไปด้วยโมเลกุลย่อยของโมโนแซกคาไรด์ คือ เฮกโซส (hexose) เพนโทส (pentose) และ อากมีกรตกลูคูโรนิก (glucuronic acid) ปะปนอยู่ เฮมิเซลลูโลสนี้จะแทรกและยึดตัวอยู่ระหว่างโมเลกุลของเซลลูโลสในผนังเซลล์พืชจึงมีส่วนให้ความแข็งแรงกับผนังเซลล์ ทั้งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสจัดว่าเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ร่างกายไม่สามารถนำไปใช้ได้ เนื่องจากในร่างกายมนุษย์ไม่มีเอนไซม์ในการย่อยองค์ประกอบทั้งสองนี้ แต่ยังคงมีความสำคัญต่อร่างกายมนุษย์มากเนื่องจากจัดว่าเป็นใยอาหารที่ช่วยให้การขับถ่ายเป็นปกติ (Prarat, 2013)

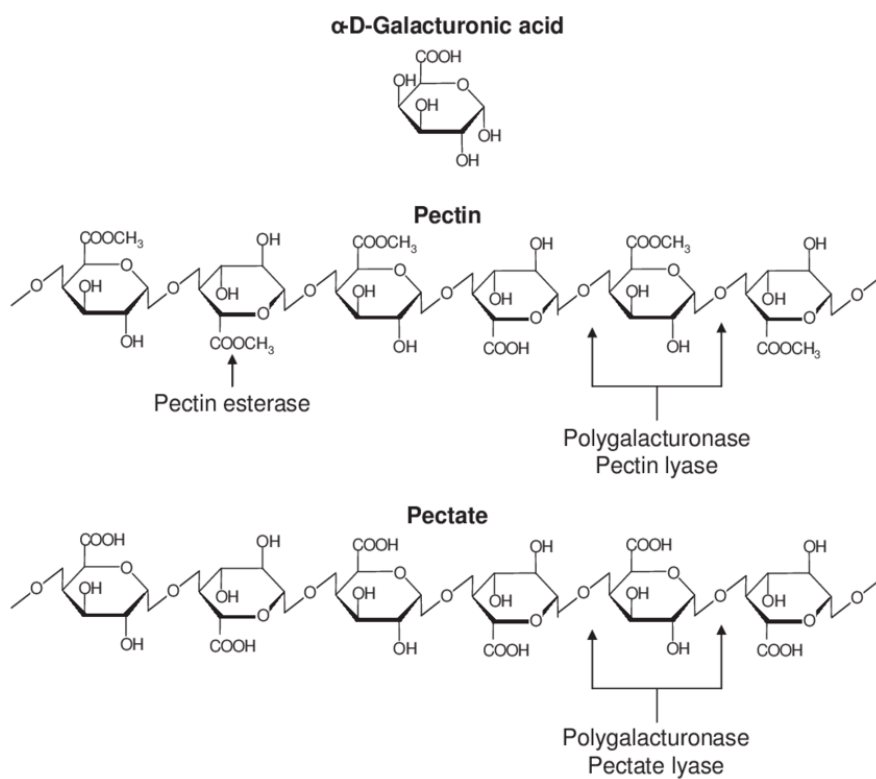
2.2.3 เพกติน เป็นสารประกอบประเภท heteropolysaccharides ที่กระจายอยู่มากในส่วน primary cell wall และ middle lamella ในผนังเซลล์พืช โมเลกุลของเพกตินนั้นเกิดจากการเชื่อมต่อของกรดกาแล็กทูโรนิก (galacturonic acid) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกตรงตำแหน่งเบต้า 1,4 ซึ่งหมู่คาร์บอกซิล D-galacturonic acid บางส่วนทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันกับหมู่เมทิลแอลกอฮอล์หรือกรดอซิติกในกรดคาร์บอกซิลิก ได้เป็นเมทอกซิลเอสเทอร์ (Maran, 2015) นอกจากนี้ยังประกอบด้วย L- rhamnose, arabinose และ galactose ในปริมาณน้อยเกาะอยู่เป็นสายแขนง (W. Wang, Ma, X., Jiang, P., Hu, L., Zhi, Z., Chen, J., Ding, T., Ye, X. and Liu, D., 2016) (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 โมเดลโครงสร้างของเพกติน

ที่มา: Leclere (2013)

โดยร้อยละของเมทอกซิลที่เป็นองค์ประกอบ จะสามารถแบ่งเพกตินออกได้เป็น 2 ประเภท คือ ชนิด Low methoxyl (LM) ซึ่งจะมีค่า DM น้อยกว่า 50 % และชนิด High methoxyl (HM) ซึ่งมีค่า DM มากกว่า 50 % ซึ่งร้อยละของเมทอกซิลนั้นมีความสำคัญมากต่อการเกิดเจลของเพกติน โดยเพกตินชนิด Low methoxyl (LM) จะใช้กับผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณน้ำตาลต่ำและ/หรือมีเกลือของแคลเซียมและ/หรือ pH อยู่ในช่วง 2.0-6.0 (Abid, 2017; Yapo, Robert, Etienne, Wathelet, & Paquot, 2007) ส่วนเพกตินชนิด high methoxyl (HM) จะใช้กับผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณน้ำตาลมากกว่า 55% และ/หรือ pH อยู่ในช่วง 2.0-3.5 ดังแสดงในภาพที่ 6

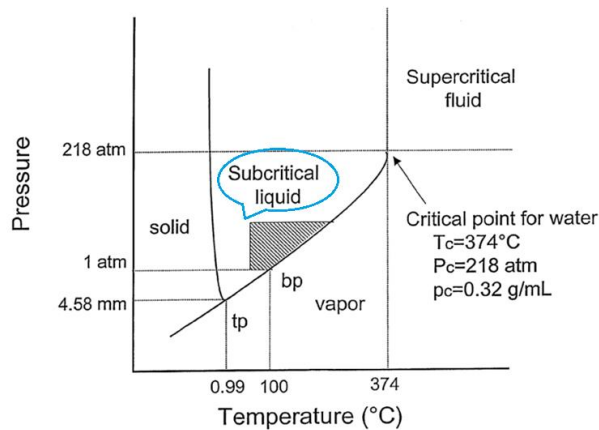


ภาพที่ 6 ชนิดของเพกติน

ที่มา : ดัดแปลงจาก Hoegger (2007)

2.3 การทรีตสารชีวมวลด้วยน้ำกึ่งวิกฤต (Biomass treatment with subcritical water)

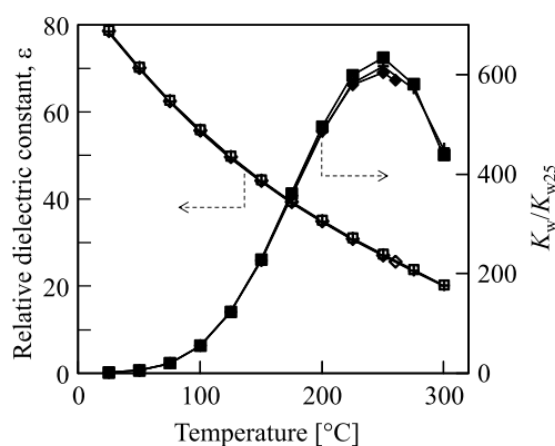
ในแผนภูมิวิภาคของน้ำ (ภาพที่ 7) ซึ่งเป็นการแสดงการเปลี่ยนแปลงสถานะของน้ำตามอุณหภูมิและความดัน จะเห็นว่าน้ำกึ่งวิกฤต (subcritical water) คือน้ำที่มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 100-374 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันสูงเพียงพอที่จะรักษาสถานะของเหลวไว้ได้ และในสภาวะนี้เองที่ทำให้น้ำกึ่งวิกฤตมีคุณสมบัติสำคัญแตกต่างไปจากน้ำที่สภาวะปกติ ซึ่งก็คือ ค่าคงที่ไดอิเล็กตริก (dielectric constant) และค่าคงที่การแตกตัว (ion product) (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 7 แผนภูมิวัฏจักรของน้ำ

ที่มา : Asl (2013)

ค่าคงที่ไดอิเล็กทริกสัมพัทธ์ของน้ำมีค่าลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น นั่นแสดงว่าความเป็นขั้วของโมเลกุลน้ำนั้นลดลงด้วยเช่นกัน จากคุณสมบัติที่เปลี่ยนแปลงไปนี้ทำให้น้ำกึ่งวิกฤตมีพฤติกรรมคล้ายกับตัวทำละลายที่ไม่มีขั้วทั่วไป เช่น เมทานอล หรือ เฮกเซน หรือ อะซีโตน ซึ่งสามารถละลายและชะเอาส่วนประกอบที่ไม่มีขั้วได้ดีกว่าน้ำในสภาวะปกติ ทำให้สามารถสกัดและเข้าทำปฏิกิริยากับสารกลุ่มนี้ได้ ในขณะที่ค่าคงที่การการแตกตัวของน้ำกลับเพิ่มสูงขึ้นตามอุณหภูมิ ส่งผลให้โมเลกุลของน้ำแตกตัวเป็นไฮโดรเนียมไอออน (H_3O^+) และไฮดรอกซีไอออน (OH^-) มากขึ้นซึ่งถือได้ว่าเป็นปัจจัยที่สามารถเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ (Khuwijitjaru, 2006)



ภาพที่ 8 การเปลี่ยนแปลงของค่าไดอิเล็กทริกสัมพัทธ์และค่าคงที่การแตกตัวของน้ำ

ที่มา : (Khuwijitjaru, 2016)

จากคุณสมบัติที่แตกต่างจากน้ำปกติ ทำให้น้ำกึ่งวิกฤตมีความสามารถในการสกัดสารชีวมวล
 ต่างงานวิจัยต่างๆ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างการทรีตสารชีวมวลด้วยน้ำกึ่งวิกฤตเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ประเภทคาร์โบไฮเดรต

วัตถุดิบ	สภาวะที่ใช้ทรีต	ผลิตภัณฑ์	อ้างอิง
เปลือกส้ม	160 °C, 288 นาที	เพกติกโอลิโกแซคคาไรด์	B. Gómez, Gullón, f Remoroza, C., Scho H. A., Parajó, J. C. a Alonso, J. L. (2014)
เปลือกเลมอน	150-180 °C	เพกติกโอลิโกแซคคาไรด์	B. Gómez, Gullón, B., Yáñez, R., Parajó, J. C. and Alonso, J. L. (2013)
เมล็ดมะกอก	150-225 °C, 0-10 นาที	โอลิโกแซคคาไรด์ น้ำตาล กลูโคส ซาโลส อราบิโนส กาแลคโตส	Cuevas (2015)
ฟางข้าว	210 °C	ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์	P. Moniz, Pereira, H., Duarte, L. C. and Carvalheiro, F. (2014)
ต้นมะกอก	170-230 °C, hold 10 นาที	โอลิโกแซคคาไรด์	Cara (2012)
ฟางข้าวสาลี	180 -240 °C, 43-82 นาที	โมนแซคคาไรด์ โอลิโกแซคคาไรด์	Sidiras (2011)
ฟางข้าวโพด	215 °C	ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์	P. Moniz, Ho, A. L., Duarte, L. C., Kolida, S., Rastall, R. A., Pereira, H. and Carvalheiro,

ฟางข้าวโพด	150-240 °C	เฮมิเซลลูโลส	F. (2016) P. Moniz, Pereira, H., Quilhó, T. and Carvalho, F. (2013)
เปลือกเสาวรส	100-245 °C	คาร์โบไฮเดรต	Klinchongkon (2013)
กากมะพร้าว	100-300 °C	โมโนแซคคาไรด์ โอลิโกแซคคาไรด์	Areewan (2012)
กากมะพร้าว	100-200 °C, 30-240 นาที	คาร์โบไฮเดรต	P. Khuwijitjaru, Watsanit, K. and Adachi, S. (2012)
หอมหัวใหญ่	105-180 °C	เพกติน	Benito-Román, Alonso-Riaño, Díaz de Cerio, Sanz, and Beltrán (2022)
เปลือกกล้วย	140-160 °C, 5 นาที	เพกติน	Mohd Rasidek et al. (2021)
เปลือกถั่ว	รอบที่ 1 120 °C, 30 นาที รอบที่ 2 125-155 °C, 10-120 นาที	โอลิโกแซคคาไรด์, เพกติน, เพกติกโอลิโกแซคคาไรด์	Ramirez, Temelli, and Saldaña (2021)
โพลีกาแลกทูโรนิก (polygalacturonic acid)	125 และ 135 °C, 10-120 นาที	โอลิโกกาแลกทูโรนิก (oligogalacturonic acid)	Valdivieso Ramirez, Sanchez Gallego, Gänzle, Temelli, and Saldaña (2021)
ใบกระวาน	100-160 °C, 5-20 นาที	โพลีแซคคาไรด์	Rincón et al. (2021)

2.4 การวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตด้วยโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Chromatography, HPLC) เป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้สำหรับวิเคราะห์สารที่มีส่วนประกอบที่ซับซ้อนได้ ดังนั้นจึงถูกนำมาประยุกต์ใช้กับงานในหลายๆด้าน ทั้งในระดับอุตสาหกรรมและในห้องปฏิบัติการ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร เกษษกรรม ชีวภาพ และตัวอย่างด้านสิ่งแวดล้อม HPLC เป็นเทคนิคที่ประยุกต์มาจากทฤษฎีของโครมาโทกราฟีของเหลว (Liquid Chromatography, LC) โดยการแยกสารด้วย LC แบบดั้งเดิมทำได้โดยบรรจุเฟสอยู่นิ่ง (stationary phase) ในคอลัมน์แก้ว จากนั้นใส่สารที่ต้องการแยกที่ด้านบนของคอลัมน์แล้วชะสารโดยใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือตัวชะที่เป็นตัวทำละลายที่เหมาะสม ซึ่งอาจเป็นตัวทำละลายตัวเดียว หรือเป็นสารละลายก็ได้ การไหลของเฟสเคลื่อนที่ที่อาศัยแรงโน้มถ่วง ทำให้การแยกสารใช้เวลานาน ใช้ปริมาตรของตัวชะค่อนข้างมาก และต้องเก็บสารที่แยกได้เป็นส่วนๆเพื่อนำไปวิเคราะห์ผลต่อไป นอกจากนี้ ประสิทธิภาพของการแยกสารจะเพิ่มขึ้นเมื่ออนุภาคของเฟสอยู่นิ่งมีขนาดเล็กกลง จึงทำให้มีการพัฒนา LC สมัยใหม่ซึ่งนั่นก็คือ HPLC นั่นเอง ใน HPLC จะใช้เฟสอยู่นิ่งที่มีขนาดเล็กมาก ซึ่งส่งผลให้เกิดการต้านการไหลของเฟสเคลื่อนที่ จึงจำเป็นต้องใช้ความดันสูงเพื่อผลักดันให้เฟสเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ได้ สารที่ถูกแยกภายในคอลัมน์สามารถถูกตรวจวัดโดยเครื่องตรวจวัดที่เหมาะสมและ out-put ของเครื่องตรวจวัดเป็นสัญญาณไฟฟ้า และแสดงผลโดยอินทิเกรเตอร์ (integrator) หรือคอมพิวเตอร์ (Supalak, 2009)

Size Exclusion Chromatography (SEC) เป็นเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวที่อาศัยหลักการแยกสารตามความแตกต่างของขนาดโมเลกุล โดยเฟสอยู่นิ่งที่มักใช้วัสดุที่มีรูพรุน ซึ่งสารที่มีขนาดใหญ่เกินกว่าที่จะแพร่เข้าไปในรูจะถูกเฟสเคลื่อนที่ชะออกไปก่อน ในขณะที่สารที่มีขนาดเล็กกว่ารูพรุนนั้นจะแทรกเข้าไปข้างในรู ทำให้ใช้เวลานานกว่าที่เฟสเคลื่อนที่ชะสารออกไปจากคอลัมน์ได้ อย่างไรก็ตาม SEC มีประโยชน์มากในการวิเคราะห์ทางชีวเคมีสำหรับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ เช่น เปปไทด์ โปรตีน ฮีโมโกลบิน และคาร์โบไฮเดรต เนื่องจากสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ก็จะมีน้ำหนักโมเลกุลสูง ดังนั้นระยะเวลาคงค้างของสารตัวอย่างจึงขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของสารตัวอย่างด้วย (Supalak, 2009)

2.5 การกรองด้วยเมมเบรน (Membrane filtration)

เทคโนโลยีการใช้เมมเบรน เป็นวิธีที่นิยมมากในการนำมาประยุกต์ใช้ในการทำความสะอาดชั้น การแยกสาร และการทำบริสุทธิ์ ของวัสดุที่สามารถละลายและไม่ละลายน้ำในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ โดยเฉพาะอาหารทะเล เนื่องจากการล้างสัตว์น้ำที่มาจากทะเล น้ำที่ล้างจะมีสารปนเปื้อนและโปรตีน อยู่ ดังนั้นเพื่อการกำจัดสารปนเปื้อนจะนิยมใช้เทคนิคการกรองด้วยเมมเบรน มากไปกว่านั้น ยังเป็นที่ นิยมนำมาใช้เพื่อบำบัดน้ำเสียในอุตสาหกรรมต่างๆ ตลอดจนนำมาใช้เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ อาหารอีกด้วย (Afonso, 2002) ซึ่งเทคโนโลยีการกรองด้วยเมมเบรนนั้นสามารถแบ่งออกเป็นหลาย ชนิด เช่น ไมโครฟิลเตรชัน อัลตราฟิลเตรชัน นาโนฟิลเตรชัน และออสโมซิสย้อนกลับ เป็นต้น ใน งานวิจัยนี้จะใช้เทคนิคอัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration) มาใช้ในการแยกขนาดของเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ โดยอัลตราฟิลเตรชัน คือ กระบวนการกรองด้วยเมมเบรน ที่มีกระบวนการ (ขนาดเมมเบรน) ระหว่าง นาโนฟิลเตรชัน และ ไมโครฟิลเตรชัน ซึ่งขนาดของเมมเบรนที่ใช้จะมีขนาด ตั้งแต่ 1 นาโนเมตร (นาโนฟิลเตรชัน) จนถึง 0.05 ไมโครเมตร (ไมโครฟิลเตรชัน) โดยวัสดุของเมมเบรนส่วนใหญ่จะผลิตจาก polymeric เช่น polysulfone (PS)/polyethersulfone (PES), polyvinylidene fluoride, polyacrylonitrile, cellulosic, aliphatic และ polyimide เป็นต้น อัลตราฟิลเตรชันจะถูกนำมาใช้กับตัวอย่างที่เจาะจงขนาดโมเลกุล (molecular weight, MW) จึง จำเป็นต้องเลือกขนาดรูพรุนของเมมเบรน (molecular weight cutoff, MWCO) ที่จะนำมาใช้แยกขนาดของสารหรือทำความสะอาดชั้นสาร ถึงแม้ว่าเราจะมี การเลือกขนาดรูพรุนของเมมเบรนก่อนการ แยกขนาดของสารแล้วก็ตาม แต่ก็ไม่สามารถมั่นใจได้ว่าขนาดของสารที่แยกมาได้ นั้นจะตรงตามที่เรา ต้องการหรือไม่ โดยในอุตสาหกรรมจะนำเอาเดกซ์แทรนหรือโปรตีนมาใช้เพื่อจะบอกลักษณะของอัลตราฟิลเตรชันเมมเบรนว่าเป็นไปตามขนาดที่ต้องการหรือไม่ แต่ทั้งนี้ในหลายๆ อุตสาหกรรมจะนิยมใช้ เดกซ์แทรนมากกว่าโปรตีน ดังนั้นแล้วเทคนิคอัลตราฟิลเตรชันจึงเป็นเทคนิคหนึ่งที่น่านำมาใช้สำหรับ แยกสารที่ซึ่งครอบคลุมขนาดโมเลกุลสารที่จะแยกตั้งแต่ขนาด 1000 จนถึง 500,000 Da (Jauregi, 2019) จึงเหมาะสำหรับนำมาใช้ในการแยกสารประกอบเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ (1000 - 3000 Da) ในงานวิจัยนี้เอง

2.6 สารพรีไบโอติก

สารพรีไบโอติก คือ ส่วนผสมอาหารที่ร่างกายไม่สามารถย่อยได้และมีประโยชน์ต่อร่างกาย เนื่องจากมีผลโดยตรงต่อการเจริญและเพิ่มจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในร่างกาย (Sabater, 2019) ซึ่งเมื่อมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ ก็จะนำมาด้วยสารประกอบที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น เช่น กรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid, SCFA) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์ โดยเฉพาะกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้ดีขึ้น (Lomax, 2008) ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญในการสร้างกรดไขมันสายสั้น จากการหมักสารประกอบคาร์โบไฮเดรต คือ *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* และ *Eubacterium* (B. Gómez, Gullón, B., Yáñez, R., Schols, H. and Alonso, J. L., 2016) นอกจากนี้สารพรีไบโอติกยังสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ คือ เป็นสารประกอบชนิด polyols (sugar alcohols), oligosaccharides และ soluble fiber (Mohanty, 2018) ซึ่งแหล่งพรีไบโอติกที่สำคัญโดยทั่วไปจะได้รับจากอาหารที่มาจากพืช (Choque Delgado, 2018) โดยสามารถที่จะสกัดได้จากพืชโดยตรงหรือการนำสารโพลีแซคคาไรด์ที่มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่มาลดขนาดโมเลกุลลงโดยการไฮโดรไลซิสด้วยกรด การใช้เอนไซม์ และ hydrothermal treatment เป็นต้น (Nugent, 2000) ซึ่งโดยทั่วไปมักจะสกัดหรือแยกมาจากพืชโดยตรง และได้มาซึ่ง สารประกอบโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารประกอบพรีไบโอติกเช่น Inulin, oligofructose, xylo-oligosaccharide, fructo-oligosaccharide, mannan-oligosaccharide, galacto-oligosaccharide และ β -glucan เป็นต้น ซึ่งพรีไบโอติกเหล่านี้ได้ผ่านการพิสูจน์ และบางชนิดได้มีการวางขายตามท้องตลาดแล้ว (Dawood, 2016) ในปัจจุบัน ได้เริ่มให้ความสำคัญกับสารพรีไบโอติกมาก และได้มีงานวิจัยเพิ่มขึ้นอย่างมากมาย สำหรับขอบเขตการหาแหล่งผลิตใหม่ๆ และรวมไปถึงการหาสารประกอบพรีไบโอติก ชนิดอื่นๆ

นอกจากที่ได้กล่าวไปข้างต้น โดยพบว่า สารประกอบเพกติน หรือสารประกอบเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ (POS) ก็มีคุณสมบัติเป็นสารพรีไบโอติกเช่นเดียวกัน โดยในงานวิจัยของ P. J. Li, Xia, J. I., Nie, Z. Y. and Shan, Y. (2016) ได้ทำการศึกษาการผลิต POS จากเศษเปลือกส้มเหลืองทิ้งด้วยเทคนิคการสกัดด้วยเอนไซม์จากเชื้อรา *Aspergillus japonicus* PJ01 ซึ่งเขาได้นำ POS ที่ได้ไปทดสอบความสามารถในการเป็นสารพรีไบโอติกโดยการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ รวมไปถึงได้ทำการทดสอบการเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโทษ ซึ่งจากการทดลองได้พบว่า POS มีความสามารถในการเป็นสารพรีไบโอติกและสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโทษได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Gullón (2011) ได้ทำการทดสอบความสามารถในการเป็นสารพรีไบโอติก

กของ POS ที่สกัดได้จากกากแอปเปิ้ลด้วยเทคนิคการสกัดด้วยเอนไซม์ ซึ่งพบว่า POS ที่ได้มีคุณสมบัติเป็นสารพรีไบโอติกเช่นเดียวกัน ตลอดจนในงานวิจัยของ (Zhang, 2018) ได้ทำการศึกษาความสามารถในการเป็นสารพรีไบโอติกของ POS ที่สกัดด้วยกรด trifluoroacetic acid (TFA) ซึ่งพบว่า POS ที่ได้มีคุณสมบัติเป็นสารพรีไบโอติกเช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่า POS จะกลายเป็นสารพรีไบโอติกที่นำมาผลิตและวางจำหน่ายในอนาคตต่อไป



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ สารเคมี และอุปกรณ์

3.1.1 วัตถุดิบ

- เสาวรสพันธุ์ผลสีม่วง จากปากคลองตลาดในประเทศไทย

3.2 สารเคมี

3.2.1 สารเคมีทั่วไป

ชื่อสารเคมี

ความบริสุทธิ์

บริษัทผู้ผลิต

1-Phenyl-3-methyl-2-pyrazolin-5-one (PMP)	99%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Distilled water		Better, Bangkok, Thailand
Disodium hydrogen orthophosphate	99%	Ajax, New South Wales, Australia
Galacturonic acid	≥ 97%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Glucose	≥ 99.5%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Hydrochloric acid	37%	Merck, Darmstadt, Germany
Methanol	99.9%	Lab-Scan, Bangkok, Thailand
Potassium sodium ttrate	99-102%	Ajax, New South Wales, Australia
Phenol	99-100.5%	Merck, Darmstadt, Germany
Sodium hydroxide	≥ 99%	Merck, Darmstadt, Germany
Sulfuric acid	98%	Merck, Darmstadt, Germany
Trifluoroacetic acid (TFA)	99%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol	95%	องค์การสุรา ประเทศไทย

Acetic acid	99.8%	QReC, Bangkok, Thailand
Propionic acid	≥99.5%	Merck, Darmstadt, Germany
Butyric acid	≥99%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
L-Cysteine	≥ 97%	Fluka, BioChemika, Thailand
Dipotassium hydrogen orthophosphate	99%	Ajax, New South Wales, Australia
Manganese sulphate	99%	Ajax, New South Wales, Australia
Ecoteric T80 (TWEEN80)		LabChem, Gauteng, South Africa
Sodium acetate	99%	Ajax, New South Wales, Australia
Magnesium sulphate	96%	PanReac, Spain
Ammonium citrate	≥ 97%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Yeast Extract Powder		Himedia, Einhausen, Germany
Meat extract		Merck, Darmstadt, Germany
Proteose Peptone		Himedia, Einhausen, Germany
Lactobacillus MRS Broth		Himedia, Einhausen, Germany
Lactobacillus MRS Agar		Himedia, Einhausen, Germany
Agar		Himedia, Einhausen, Germany
Inulin	91.7%	COSUCRA, Warcoing, Belgium

3.2.2 สารมาตรฐาน

<u>น้ำตาลมาตรฐาน</u>	<u>ความบริสุทธิ์</u>	<u>บริษัทผู้ผลิต</u>
Arabinose	≥ 98%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Fucose	≥ 98%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Galactose	≥ 99%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Galacturonic acid	≥ 97%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Glucose	≥ 99.5%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Glucuronic acid	≥ 98%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Mannose	≥ 99%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Rhamnose	≥ 99%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ribose	≥ 99%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Xylose	≥ 99%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
<u>โอลิโกแซคคาไรด์มาตรฐาน</u>	<u>ความบริสุทธิ์</u>	<u>บริษัทผู้ผลิต</u>
Dextran (5, 25, 150, 410, and 670 kDa)	≥ 99%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Oligomaltose (360.31, 828 and 1152 Da)	≥ 99%	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

3.3 อุปกรณ์

3.3.1 อุปกรณ์ในการทรีตตัวอย่างด้วยน้ำกึ่งวิกฤต ประกอบด้วย

- เครื่องควบคุมอุณหภูมิพร้อม mantle heater (200 W, Heater Engineer, Tokyo, Japan) และเทอร์โมมิเตอร์คัปเปิล ชนิด type-K (Nanasiam Intertrade, Bangkok, Thailand)
- เวสเซล รูปทรงกระบอก ทำจากสแตนเลส ความจุ 125 มิลลิลิตร (SUS 316, ทนความดันสูงสุด 20 MPa, ทนอุณหภูมิสูงสุด 260 องศาเซลเซียส, Taiatsu Techno, Tokyo, Japan)
- ปัมความดันสูง (LC-20AD, Shimadzu, Kyoto, Japan)
- ท่อสแตนเลส ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.75 มิลลิเมตร ยาว 9.85 เมตร
- Back-pressure valve

3.3.2 เครื่อง High Performance Chromatography (HPLC) ประกอบด้วย

- Photodiode array UV-Vis detector (SPD-M20A, Shimadzu, Kyoto, Japan)

- Solvent delivery module (LC-20AD, Shimadzu, Kyoto, Japan)
- System controller (รุ่น CMB-20A, Shimadzu, Kyoto, Japan)
- C-18 column (Inertsil ODS 3, 150 x 4.6 mm, Ø 5 µm, GL Sciences, Kyoto, Japan)
- Size Exclusion Chromatography Column (TSKgel SuperAWM-H column, 6.0 mm I.D. x 150 mm, TOSOH, Tokyo, Japan)
- Size Exclusion Chromatography Column (YMC-Pack Diol60, 500x8.0 mm YMC, Kyoto, Japan)
- Organic Acid Column (Repromer H column, 250 x 8 mm, Ø 9 µm, Dr. Maisch GmbH, Germany)

3.3.3 อุปกรณ์การทำบริสุทธิ์สารละลายเพกติน ประกอบด้วย

- เครื่องแยกสาร Amicon® 8200 stirred ultrafiltration cell (400 mL) (Merck Millipore, Germany)
- แผ่นเมมเบรน Ultracel® membrane (1, 3 and 5 kDa molecular weight)

3.3.4 อุปกรณ์เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ประกอบด้วย

- เครื่องนิ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์
- ตู้บ่มเชื้อจุลินทรีย์ (Eco-type Oven, Gangwon-do, Korea)
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Metrology Lab, Bangkok, Thailand)
- โถควบคุมออกซิเจน Anaerobic jar (Merck, Darmstadt, Germany)
- สารกำจัดออกซิเจน Oxygen scavenger (Oxoid Anaerogen, Thermo fisher, Singapore)
- อินดิเคเตอร์ตรวจสอบออกซิเจน Mikrobiologie Anaerotest (Merck, Darmstadt, Germany)
- Petridish plastic 90x15 mm (Purity, M&P IMPEX, Bangkok, Thailand)

3.3.5 อุปกรณ์และเครื่องมืออื่นๆ

- เครื่องชั่งดิจิทัลแบบละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (รุ่น BP 221S Sartorius, Göttingen, Germany)
- เครื่อง Hammer mill (ยี่ห้อ Retsch, Vs 1000, Germany)
- ตู้อบลมร้อน (FD 115, Binder, Tuttingen, Germany)
- เครื่องแยกสารแบบหมุนเหวี่ยง (RC6 superspeed, Sorvall, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
- เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ScanVac Coolsafe 100-4, Labogene, Lynge, Denmark)
- เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (ยี่ห้อ Mettler-Toledo รุ่น Seven Easy, Schwerzenbach, Switzerland)
- เครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ (vacuum rotary evaporator) (RV10, IKA, Staufen, Germany)
- ผ้ากรองชนิดไนลอน ความละเอียด 32 ไมโครเมตร (บริษัท พลาสเทค มาร์เก็ตติ้ง จำกัด, กรุงเทพมหานคร)
- เครื่องแก้วต่างๆ

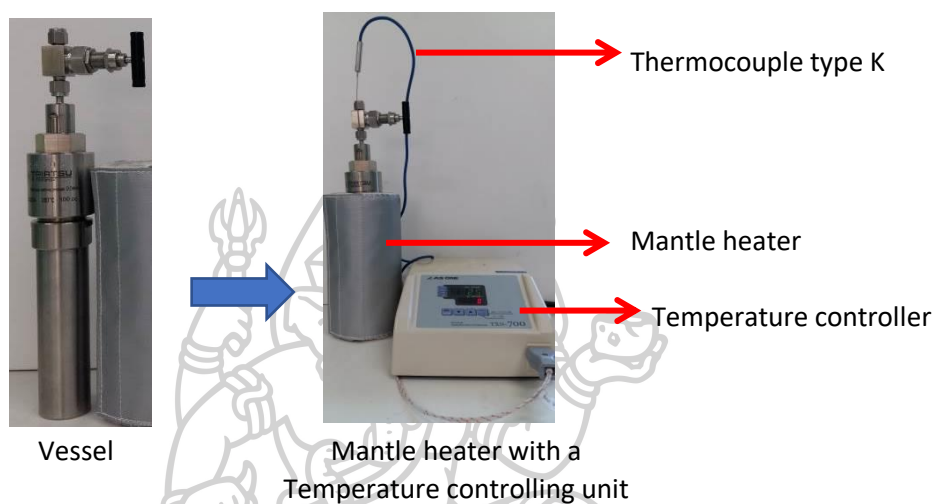
3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำผลเสาวรสสด มาผ่าออกแล้วแยกเนื้อและเมล็ดออกไป จากนั้นนำส่วนของเปลือกที่ล้างสะอาดแล้วมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดด้วยเครื่องบด Hammer mill โดยใช้ตะแกรงขนาด 1.0 มิลลิเมตร และเก็บตัวอย่างไว้ในตู้แช่เยือกแข็ง อุณหภูมิ - 18 องศาเซลเซียส เพื่อรอศึกษาต่อไป

3.4.2 การทรีตเปลือกเสาวรสดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต ในภาชนะแบบกะ (batch-type)

3.4.2.1 นำผงเปลือกเสาวรสดแห้งมาผสมน้ำในสัดส่วน 1:16 (เปลือกเสาวรสด 5 กรัมต่อน้ำ 80 กรัม) ในเวสเซลทนความร้อนและความดัน ปิดเวสเซลแล้วนำไปใส่ใน mantle heater (ภาพที่ 9) จากนั้นให้ความร้อนแก่ตัวอย่างที่จนถึงอุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส โดยเวลาที่ใช้ในการทรีตตัวอย่าง ตั้งแต่อุณหภูมิห้องจนถึง 140 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16.30 นาที (Tana, 2016)



ภาพที่ 9 อุปกรณ์ในการทรีตเปลือกเสาวรสดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต

3.4.2.2 เมื่ออุณหภูมิของตัวอย่างในเวสเซลถึงอุณหภูมิที่ต้องการศึกษาแล้ว จึงนำเวสเซลออกจาก mantle heater นำเวสเซลลงในอ่างน้ำเย็นเพื่อลดอุณหภูมิภายในเวสเซลให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง

3.4.2.3 กรองตัวอย่างที่ผ่านการทรีตแล้วด้วยผ้าไนลอนขนาด 32 ไมโครเมตร จากนั้นนำของเหลวที่กรองได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องแยกสารแบบหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,740 รอบ/วินาที ณ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3.4.2.4 เนื่องจากเครื่องมือที่ใช้สามารถทรีตตัวอย่างเปลือกเสาวรสดได้ครั้งละ 5 กรัม ดังนั้นจึงทำการทรีตตัวอย่างทั้งหมด 350 ครั้ง (เพื่อให้เพียงพอต่อการนำไปทำการทดลองต่อ) โดยจะเก็บรวบรวมสารละลายหลังจากกรองผ่านผ้าไนลอนเข้าด้วยกัน และนำไปปั่นเหวี่ยงพร้อมกัน จากนั้นของเหลวใสที่ได้จะถูกนำไปทำให้เข้มข้น

3.4.2.5 ของเหลวใสที่ได้หลังปั่นเหวี่ยงจะถูกนำไปทำให้เข้มข้นขึ้น 4 เท่า ด้วยเครื่องระเหยแบบหมุนภายใต้สุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

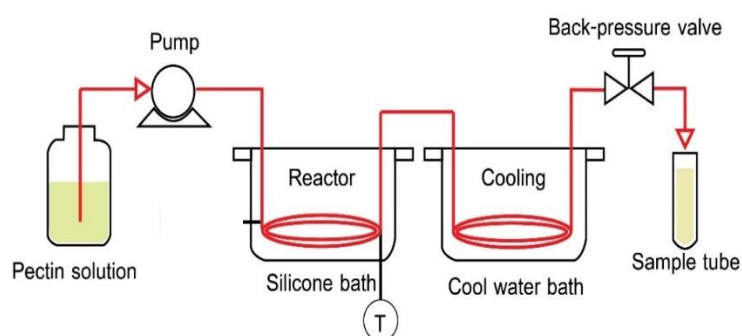
3.4.2.6 นำของเหลวเข้มข้นไปตกตะกอนด้วยเอทานอล 95% ในอัตราส่วนของเหลวเข้มข้นต่อเอทานอล 1:2 v/v ที่อุณหภูมิตู้เย็น 4-8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกรองผ่านผ้ากรองไนลอนความละเอียด 32 ไมครอน

3.2.2.7 นำตะกอนเพกตินที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.3 การทรีตเพกตินที่ได้จากเปลือกเสาวรสด้วยน้ำกึ่งวิกฤตในระบบแบบต่อเนื่อง (continuous flow-type)

3.4.3.1 นำเพกตินที่ได้มาละลายในน้ำอุ่น (อุณหภูมิน้ำประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส) ภายใต้การกวนตลอดเวลา ให้ได้ความเข้มข้น 0.4% w/v

3.4.3.2 จากนั้นนำสารละลายเพกตินที่เตรียมไปทรีตด้วยน้ำกึ่งวิกฤตในภาชนะแบบต่อเนื่อง (continuous flow-type) ดังภาพที่ 10 โดยระบบการทรีตด้วยน้ำกึ่งวิกฤต ในภาชนะแบบต่อเนื่องจะประกอบไปด้วย บั๊มความดันสูง (LC-20AD) ที่ดูดสารละลายเพกตินเข้าสู่ท่อสแตนเลสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.75 มิลลิเมตร ยาว 9.85 เมตร โดยท่อจะถูกจุ่มในซิลิโคน (silicone oil) ที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส โดยมี thermocouple type K เป็นตัวติดตามอุณหภูมิ ซึ่งสารจะไหลผ่านท่อที่จุ่มในซิลิโคนในความเร็ว 0.79 ml/นาที เป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้นจะไหลผ่านท่อที่ถูกแช่ในอ่างน้ำเย็นเพื่อหยุดปฏิกิริยา ภายใต้ความดัน 5 MPa ที่ถูกควบคุมด้วย back-pressure valve (ดัดแปลงจาก (Klinchongkon, Khuwijtjaru, & Adachi, 2017))

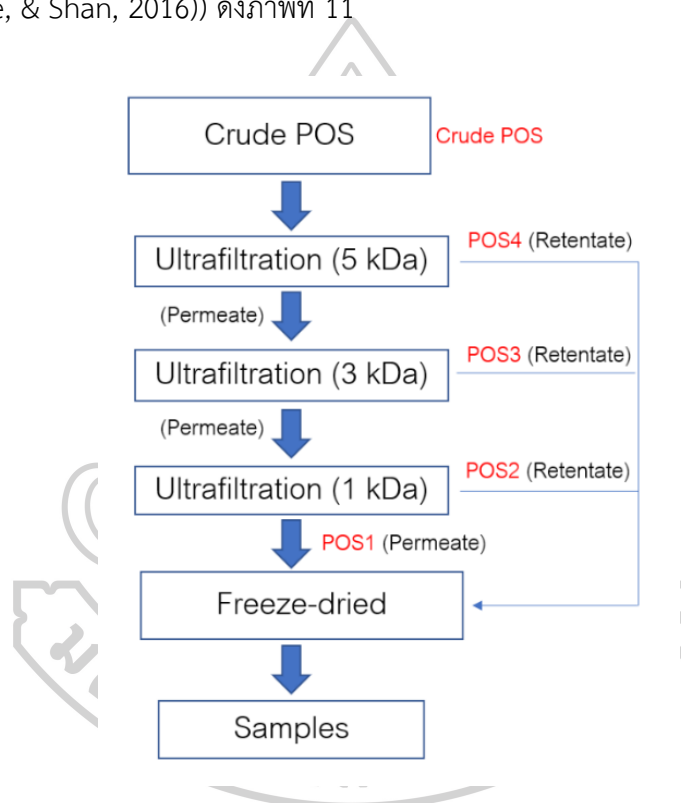


ภาพที่ 10 อุปกรณ์สำหรับทรีตเพกตินด้วยน้ำกึ่งวิกฤตแบบต่อเนื่อง

3.4.3.3 จากนั้นสารละลายใสที่ได้จะถูกนำไปผ่านกระบวนการการทำบริสุทธิ์ต่อไป

3.4.4 การทำบริสุทธิ์เพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ได้ด้วยการกรองผ่านเมมเบรน (Ultrafiltration)

3.4.4.1 นำสารละลายเพกตินที่ได้จากการทรีตด้วยน้ำกึ่งวิกฤตในระบบแบบต่อเนื่องกรองผ่านเมมเบรน ultrafiltration ใน Amicon® stirred cells (Merck Millipore, Germany) โดยใช้เมมเบรน (Ultracel® membrane) ที่มี MWCO ขนาดที่เหมาะสมกับขนาดโมเลกุลที่ต้องการ คือ 5, 3 และ 1 kDa ภายใต้ความดัน 3 บาร์ (ด้วยแก๊สไนโตรเจน) พร้อมกวนตลอดเวลา (ดัดแปลงจาก (P.-j. Li, Xia, Nie, & Shan, 2016)) ดังภาพที่ 11



ภาพที่ 11 แผนผังกระบวนการทำบริสุทธิ์

3.4.4.2 เพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ (POS) ที่ได้แต่ละส่วนจะถูกนำไปทำแห้งด้วยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และเก็บไว้ในโถดูดความชื้น เพื่อทำการศึกษาต่อไป

3.4.5 การทดสอบสมบัติพรีไบโอติกของเพคติกโอลิโกแซคคาไรด์

3.4.5.1 เตรียมเชื้อจุลินทรีย์ (inoculum) *Lactobacillus acidophilus* TISTR 2365 และ *Bifidobacterium bifidum* TISTR 2129 ที่ผ่านการบ่มในอาหาร MRS (สูตรปกติ) ในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจนด้วยการบ่มในถังที่มีฝาปิดสนิท (Anaerobic jar) และใส่สารกำจัดออกซิเจน (Oxygen scavenger) ลงไป ซึ่งจะตรวจสอบการมีออกซิเจนด้วยออกซิเจนอินดิเคเตอร์ โดยเชื้อจุลินทรีย์หลังบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ในขวดที่มีฝาปิดจำนวน 3 ขวด (Duran, 50 ml) เมื่อนำไป pour plate เพื่อนับจำนวนเชื้อเริ่มต้น จะมีเชื้อเริ่มต้นที่ 1×10^5 CFU/ml จากนั้นเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 1% v/v จะถูกนำไปเติมลงในอาหารแต่ละสูตรที่ถูกเตรียมไว้ในหลอดทดลองแบบมีฝาครอบ (โดยเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดจะถูกนำมาทดสอบแยกกัน)

3.4.5.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ MRS ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน โดยเติมแหล่งคาร์บอนจากตัวอย่างที่จะทดสอบในปริมาณ 10 g/L โดยแบ่งออกเป็น 5 สูตร คือ Hydrolyzed Pectin (เพคตินที่ได้หลังจากการทรีตด้วยน้ำกึ่งวิกฤตในระบบแบบต่อเนื่อง), POS4, POS3, Inulin และ Control (ไม่มีแหล่งคาร์บอน) สำหรับเชื้อ *Bifidobacterium bifidum* TISTR 2129 ในอาหารจะมีการเติม 0.05% L-cysteine ลงไปเพิ่มเติมในอาหารที่เตรียม (ดัดแปลงจาก (Chapla, Pandit, & Shah, 2012))

3.4.5.3 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 6, 18, 24, 36, 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน โดยทุกชั่วโมงการหมักจะมีการทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.4.5.4 อาหารแต่ละสูตรที่ถูกหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละช่วงเวลา 0, 6, 18, 24, 36, 48 ชั่วโมง จะถูกดูดมาอย่างละ 0.1 ml เพื่อนำไปนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการ pour plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar โดยทำการบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน

3.4.5.5 อาหารแต่ละสูตรที่ถูกหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละช่วงเวลา 0, 6, 18, 24, 36, 48 ชั่วโมง ที่เหลือจะถูกนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนเชื้อจุลินทรีย์ออก และนำของเหลวที่แยกไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter และหาปริมาณกรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid, SCFA) ที่เชื้อจุลินทรีย์ผลิตได้ ด้วย HPLC ต่อไป

3.4.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบโมโนแซคคาไรด์จากเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก)

3.4.6.1 การย่อยเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ด้วย Trifluoroacetic acid (TFA)

(ดัดแปลงจาก (Dai et al., 2010))

- เตรียมสารละลายเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร (ซึ่งตัวอย่าง 0.0100 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรในขวดปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร)
- ดูดสารละลายเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่เตรียมไว้มา 50 ไมโครลิตร นำไปเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน
- เติม TFA ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไป
- จากนั้นนำไปให้ความร้อนใน heating block ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำตัวอย่างมาลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำแข็ง
- เติม 2-propanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นระเหยตัวทำละลายโดยการเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน ทำ 3 ครั้ง เพื่อกำจัด TFA ออกไป
- จากนั้นเติมน้ำกลั่น 50 ไมโครลิตรลงในตัวอย่างที่กำจัด TFA ออกไปแล้ว

3.4.6.2 การเตรียมอนุพันธ์ 1-phenyl-3-methyl-2- pyrazoline-5-one (PMP) ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) (ดัดแปลงจาก (Honda, Togashi, & Taga, 1997))

- เตรียมสารละลายฟลูออโรสความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในตัวอย่างที่กำจัด TFA ออกไปแล้วเพื่อเป็นสารมาตรฐาน (internal standard)
- เติม NaOH ความเข้มข้น 0.3 M ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายออกมา 50 ไมโครลิตร ใส่ขวดสีชาขนาด 4 มิลลิตร ที่มีฝาปิด
- เติม PMP ความเข้มข้น 0.5 M (ในเมทานอล) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง
- นำไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นรอให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
- เติม HCl ความเข้มข้น 0.3 M ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อปรับค่า pH ของตัวอย่างให้เป็นกลาง
- นำตัวอย่างไปทำแห้งด้วยการเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน

- เติมน้ำกลั่นและคลอโรฟอร์มอย่างละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าขวดและตั้งทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้น
- ดูดสารละลายใส่ชั้นบนออกมา แล้วกรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ต่อด้วย HPLC

3.4.7 การวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก)

3.4.1 ละลายตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ด้วยสารละลาย phosphate pH 6.7 (mobile phase)

3.4.2 ดูดสารละลายที่เตรียมมากรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ต่อด้วย HPLC

3.4.8 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันสายสั้น (Short Chain Fatty Acid, SCFA) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก)

3.4.1 อาหารแต่ละสูตรที่ถูกหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละช่วงเวลา 0, 6, 18, 24, 36, 48 ชั่วโมง ที่เหลือจะถูกนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนเชื้อจุลินทรีย์ออก

3.4.2 ดูดของเหลวใสที่ได้มากรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ต่อด้วย HPLC

3.4.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

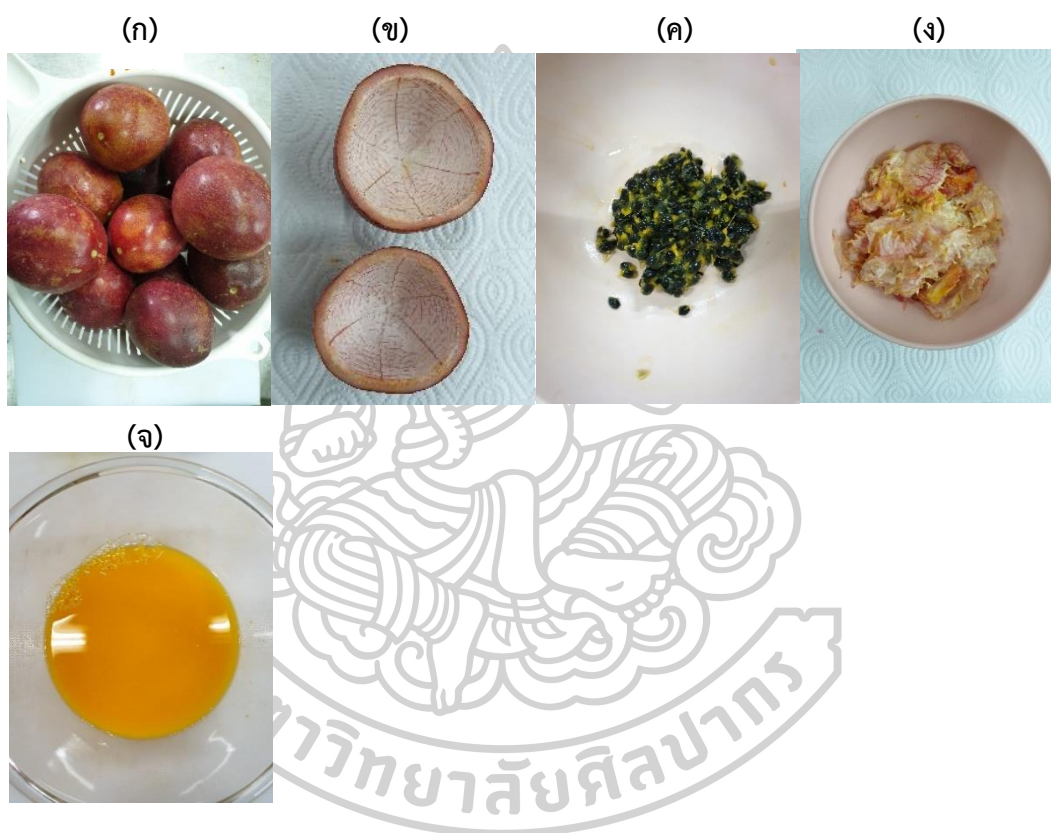
นำข้อมูลที่ได้จากการทำการทดลอง มาทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One-way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น $\alpha=0.05$

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบเริ่มต้นของผงเปลือกเสาวรสมแห้ง

หลังจากนำผลเสาวรสมานำน้ำ เมล็ด และเส้นใย ออก จนเหลือเพียงเปลือกของเสาวรสม ดังภาพที่ 12 พบว่าส่วนเปลือกของเสาวรสมมีมากถึงร้อยละ 44 ของน้ำหนักผลเสาวรสมสด (ตารางที่ 3)

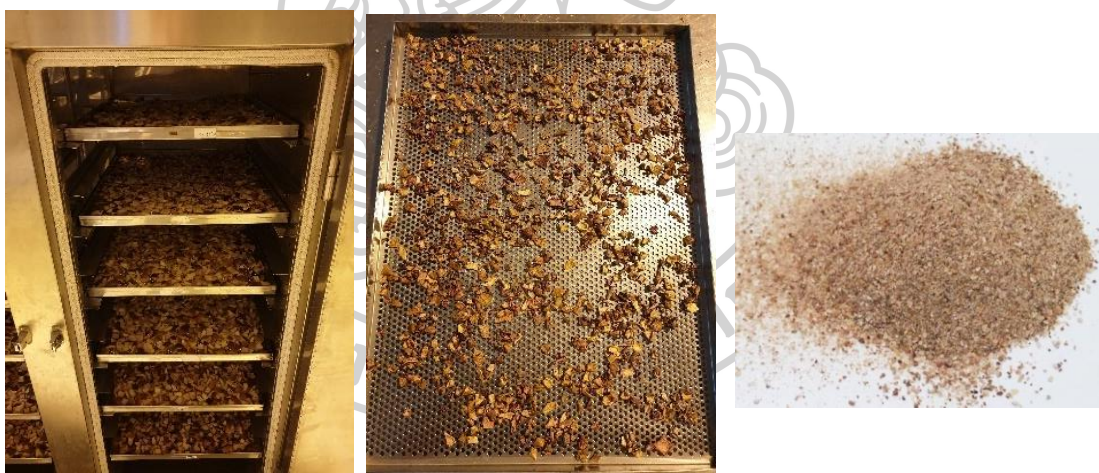


ภาพที่ 12 เสาวรสมพันธุ์สีม่วง (ก) เปลือก (ข) เมล็ด (ค) ใย (ง) และน้ำเสาวรสม (จ)

ตารางที่ 3 ร้อยละของส่วนประกอบต่างๆ ของเสาวรส

รายการ	น้ำหนัก (g)	ร้อยละ
เสาวรสผลสด	77.01±2.19	100.00
เปลือกเสาวรส	34.12±2.59	44.30
เมล็ด	22.41±2.35	29.10
น้ำ	13.36±3.19	17.35
เยื่อ	4.78±0.81	6.21

ดังนั้นจึงเลือกนำเปลือกเสาวรสที่เหลือทิ้งมาทำการศึกษา โดยเริ่มจากนำเปลือกของเสาวรสไปหั่น อบแห้ง และบด (ดังภาพที่ 13) จากนั้นจึงได้นำเอาเปลือกของเสาวรสที่ผ่านการอบแห้งและบดแล้วไปวิเคราะห์องค์ประกอบเริ่มต้นต่อไป



ภาพที่ 13 เปลือกเสาวรสหลังผ่านการอบแห้งและบด

เมื่อนำตัวอย่างผงเปลือกเสาวรสมาวิเคราะห์ค่าองค์ประกอบเริ่มต้น (ตารางที่ 4) พบว่าองค์ประกอบที่พบมากที่สุดในเปลือกเสาวรส คือคาร์โบไฮเดรตซึ่งมีปริมาณสูงถึงร้อยละ 79.53 โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ (Oliveira et al., 2016) และ (Klinchongkon, 2013) ที่รายงานปริมาณ

คาร์โบไฮเดรตไว้ที่ร้อยละ 77.14 และร้อยละ 79.4 ตามลำดับ ดังนั้นเปลือกเสาวรสจึงมีความเหมาะสมในการเป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตสารประกอบโพลิโกแซคคาไรด์

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบในเปลือกเสาวรสอบแห้ง

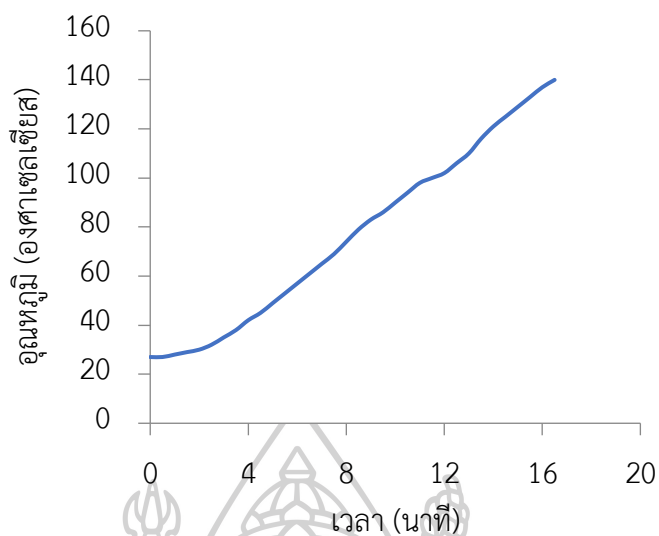
องค์ประกอบ	ร้อยละ(ร้อยละของน้ำหนักเปียก)*
ความชื้น	4.56±0.12
โปรตีน	9.61±0.37
ไขมัน	0.48±0.01
เถ้า	5.82±0.05
คาร์โบไฮเดรต ^a	79.53±0.37

* ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 3)

a คำนวณจาก คาร์โบไฮเดรต = 100- (ความชื้น + ไขมัน + โปรตีน + เถ้า)

4.2 สภาพะในการทรีตเปลือกเสาวรสด้วยน้ำกึ่งวิกฤตในภาชนะแบบกะ (batch-type)

การทรีตเปลือกเสาวรสด้วยน้ำกึ่งวิกฤตแบบกะ ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส เวลา 16.30 นาที (ภาพที่ 14) จะได้สารประกอบเพกตินที่ไม่บริสุทธิ์ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการตกตะกอนสารประกอบเพกตินที่ได้ด้วยเอทานอลความเข้มข้น 95% โดยเพกตินที่ตกตะกอนได้รอบแรกจะมีสีที่เข้ม เนื่องจากมีสารประกอบคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ ตกตะกอนร่วมมาด้วย เช่น โมโนแซคคาไรด์ 5-HMF เป็นต้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการล้างตะกอนเพกตินที่ได้ด้วยเอทานอล 95% ต่ออีก 2 รอบ จึงจะได้เพกตินที่มีสีอ่อนลง และนำเพกตินที่ถูกล้างแล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเพกตินที่ได้จากส่วนนี้มีปริมาณผลผลิตเป็นร้อยละ 10.91±0.43 ของเปลือกเสาวรสแห้ง



ภาพที่ 14 อุณหภูมิระหว่างการทรีตเป็ลือกเสาวรสดด้วยน้ำกึ่งวิกฤต

4.3 การทรีตเพกตินที่ได้จากเปลือกเสาวรสดด้วยน้ำกึ่งวิกฤตในระบบแบบต่อเนื่อง (continuous flow-type) และการกรองผ่านเมมเบรน

นำเพกตินที่อบแห้งแล้ว มาละลายด้วยน้ำกลั่นจนมีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0.4% ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ไปทรีตด้วยน้ำกึ่งวิกฤตในระบบแบบต่อเนื่องภายใต้อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จนได้สารละลายเพกตินที่ผ่านการไฮโดรไลซิส (Hydrolyzed pectin) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร



ภาพที่ 15 เพกตินหลังตกตะกอนด้วยเอทานอล 95% (ก) เพกตินที่ถูกล้างด้วยเอทานอล 95% และนำไปอบแห้ง (ข) และเพกตินที่ถูกละลายด้วยน้ำจนมีความเข้มข้นสุดท้าย 0.4% (ค)

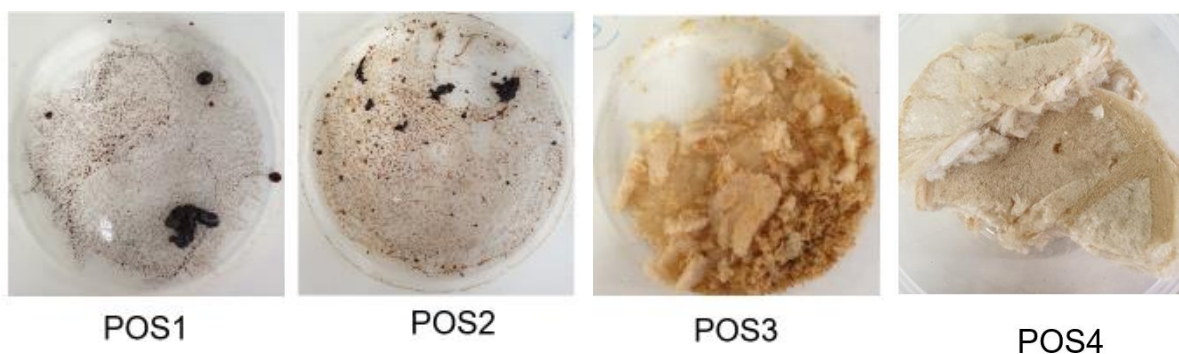
สารละลายเพกตินปริมาตร 300 มิลลิลิตร จะถูกนำไปกรองผ่านเมมเบรน ที่ขนาดกรอง 1, 3 และ 5 kDa ภายใต้ความดัน 3 บาร์ ด้วยก๊าซไนโตรเจน โดยจะกรองจนกว่าเหลือ retentate ~50 ml และ permeate ~250 ml (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 การกรองสารละลายเพกตินด้วยวิธีการกรองผ่านเมมเบรน

หลังจากสารละลายเพกตินผ่านการกรองแยกขนาด สุดท้ายจะแยกขนาดของสารละลายเพกตินได้ทั้งหมด 4 ขนาด คือ <math><1\text{ kDa}</math> (POS1), $1\text{-}3\text{ kDa}$ (POS2), $3\text{-}5\text{ kDa}$ (POS3) และ $>5\text{ kDa}$ (POS4) โดยสารละลายทั้งหมดที่แยกได้ จะถูกนำไปทำแห้งด้วยการทำแบบแช่เยือกแข็ง โดยมีปริมาณผลผลิตเป็นร้อยละ POS1 (8.28), POS2 (5.34), POS3 (10.62) และ POS4 (72.56) ของเพกติน 4.80 กรัม (จากสารละลายเพกตินทั้งหมด 1,200 มิลลิลิตร) ซึ่งเทคนิคการกรองสารผ่านเมมเบรนเพื่อแยกขนาดโมเลกุลของสารประกอบเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ ได้ถูกรายงานมาแล้ว โดย Catarino, Minhalma, Beal, Mateus, and de Pinho (2008) และ Gullón (2011)

จากตัวอย่างที่ได้หลังทำแห้งนั้น (ภาพที่ 17) พบว่าสารประกอบเพกติน POS1 และ POS2 มีปริมาณผลผลิตที่น้อยมาก และมีการปนเปื้อนขององค์ประกอบอื่นๆ โดยสามารถสังเกตได้จากสีที่ค่อนข้างเข้ม ที่ประกอบไปด้วยสารประกอบโมโนแซคคาไรด์ และสารประกอบอื่นๆจากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลของคาร์โบไฮเดรต จึงได้ทำการตัด POS1 และ POS2 ออกจากการวิเคราะห์ต่อไป โดยการวิเคราะห์ต่อไป จะประกอบไปด้วย POS3, POS4, Hydrolyzed pectin และ Inulin



ภาพที่ 17 ตัวที่ผ่านการแยกด้วยแผ่นเมมเบรน

4.4 การวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลด้วย size exclusion chromatography

ภาพที่ 19 แสดงโครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย size exclusion chromatography โดยพบว่า ขนาดโมเลกุล (M_w) และค่า Degree of polymerization (DP) (สมการที่ 1, 2 และ 3) ของ POS3, POS4, Hydrolyzed pectin และ Inulin โดยพบว่า POS4 และ POS3 มีค่า M_w อยู่ในช่วงของขนาดเมมเบรนที่ใช้ คือ POS4 (>5 kDa) มีค่าเท่ากับ 10.59 ± 0.30 kDa และ POS3 (3-5 kDa) มีค่าเท่ากับ 3.00 ± 0.08 kDa

$$\text{ค่าเฉลี่ยน้ำหนักโมเลกุลโดยจำนวน: } Mn = \frac{\sum H_i}{\sum (H_i/W_i)} \quad \text{----- (2)}$$

$$\text{Degree of polymerization: } DP = \frac{Mn}{Mw_{monomer} - Mw_{water}} \quad \text{----- (3)}$$

โดยที่

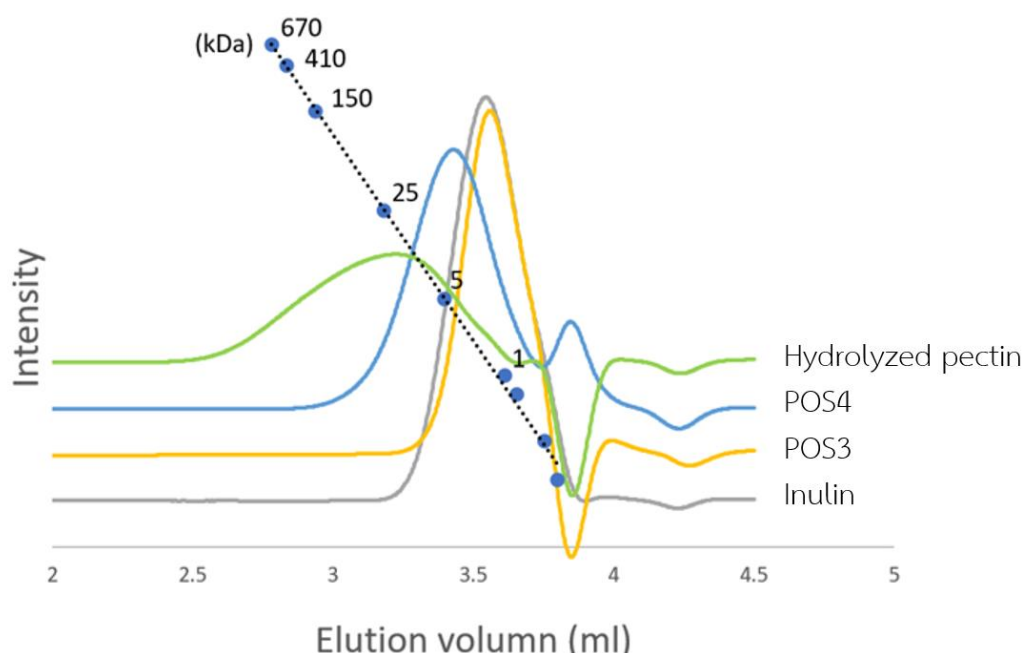
H_i คือ ความสูงของสัญญาณโครมาโทแกรมที่คำนวณจากเส้นที่ฐาน (base line)

W_i คือ น้ำหนักโมเลกุลของสัญญาณโครมาโทแกรมที่ได้มาจากการเตรียมกราฟมาตรฐาน

M_w ของ กรดกาแลกทูโรนิก คือ 194.14

M_w ของ ฟรุคโตส คือ 180.16

M_w ของ น้ำ คือ 18.02



ภาพที่ 18 โครมาโตแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลด้วย size exclusion chromatography (TSKgel SuperAWM-H column) ของสารประกอบเพคติกโอลิโกแซคคาไรด์ POS3, POS4, Hydrolyzed pectin และ Inulin

ตารางที่ 5 ขนาดโมเลกุล (Mw) และค่า Degree of polymerization (DP) ของ POS3, POS4, Hydrolyzed pectin และ Inulin

ตัวอย่าง	Mw (kDa)	DP
Hydrolyzed pectin	236.62±3.14	72±1
POS4	10.59±0.30	15±1
POS3	3.00±0.08	7±0
Inulin	2.67±0.05	7±0

ดังนั้น กระบวนการแยกด้วยเมมเบรนจึงสามารถนำมาใช้ทำบริสุทธิ์สารประกอบเพคติกโอลิโกแซคคาไรด์ได้

4.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบโมโนแซคคาไรด์ในสารประกอบเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้

ก่อนจะนำตัวอย่าง POS3 POS4 และ Hydrolyzed pectin ไปทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติกนั้น ได้ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของโมโนแซคคาไรด์ในตัวอย่าง โดยพบว่า ตัวอย่าง POS3 POS4 และ Hydrolyzed pectin มีกาแลกทูโรนิก กลูโคส กาแลคโตส และอะราบิโนส เป็นโมโนแซคคาไรด์หลัก โดยตัวอย่าง POS3 มีปริมาณกาแลกทูโรนิก กลูโคส กาแลคโตส และอะราบิโนส เป็น 23.84 ± 1.38 26.62 ± 0.76 18.42 ± 0.32 และ 11.86 ± 0.32 g/100g ตัวอย่างตามลำดับ ตัวอย่าง POS4 มีปริมาณกาแลกทูโรนิก กลูโคส กาแลคโตส และอะราบิโนส เป็น 33.15 ± 0.15 19.80 ± 0.53 33.18 ± 1.92 และ 12.65 ± 0.26 g/100g ตัวอย่างตามลำดับ และตัวอย่าง Hydrolyzed pectin มีปริมาณกาแลกทูโรนิก กลูโคส กาแลคโตส และอะราบิโนส เป็น 31.92 ± 0.28 28.58 ± 1.53 22.17 ± 0.09 และ 13.47 ± 0.01 g/100g ตัวอย่างตามลำดับ (ตารางที่ 7) เนื่องจากในเปลือกเสาวรสมีโครงสร้างเป็นเพกตินและเซลลูโลสเป็นหลัก ดังนั้นเมื่อนำเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตมาวิเคราะห์ปริมาณโมโนแซคคาไรด์ จากการย่อยด้วยกรด TFA (Trifluoroacetic acid) จึงมีปริมาณกรดกาแลกทูโรนิก และกลูโคสที่สูง ตลอดจนมีปริมาณกาแลคโตส และอะราบิโนสมากตามไปด้วย เพราะเป็นโมโนแซคคาไรด์ที่อยู่บนสายโซ่กิ่งของโครงสร้างเพกติน (Yapo & Koffi, 2008) ซึ่งปริมาณกรดกาแลกทูโรนิกและกลูโคสที่วิเคราะห์ได้ทั้งสามตัวแบบนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ X. Wang, Chen, and Lü (2014) ที่ได้รายงานปริมาณกรดกาแลกทูโรนิกและกลูโคสที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างเพกตินที่สกัดจากกากแอปเปิ้ลด้วยน้ำการไฮโดรไลซ์ด้วยน้ำและความร้อนที่อุณหภูมิ 130-170 องศาเซลเซียสไว้ 20.67-44.37 และ 14.95-40.95 wt% ตามลำดับ แต่ทั้งนี้ในงานวิจัยของ Benito-Román et al. (2022) ได้รายงานปริมาณกรดกาแลกทูโรนิกและกลูโคสที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่างเพกตินที่สกัดจากเปลือกหัวหอมด้วยน้ำกึ่งวิกฤตที่อุณหภูมิ 125-180 องศาเซลเซียสไว้ที่สูงกว่า คือ 67.0-72.6 %

ตารางที่ 6 ปริมาณโมโนแซคคาไรด์ที่วิเคราะห์ได้จากตัวอย่าง POS3 POS4 และ Hydrolyzed pectin

โมโนแซคคาไรด์	POS3 (g/100g ตัวอย่าง)	POS4 (g/100g ตัวอย่าง)	Hydrolyzed pectin (g/100g ตัวอย่าง)
แมนโนส	8.01±0.18	7.82±0.37	10.30±0.13
กาแลกทูโรนิก	23.84±1.38	33.15±0.15	31.92±0.28
กลูโคส	26.62±0.76	19.80±0.53	28.58±1.53
กาแลคโตส	18.42±0.32	33.18±1.92	22.17±0.09
ไซโลส	12.71±0.21	11.99±0.15	13.55±0.13
อะราบิโนส	11.86±0.32	12.65±0.26	13.47±0.01
ไรโบส	nd	nd	nd
แรมโนส	nd	nd	nd
กลูคูโรนิก	nd	nd	nd

nd หมายถึง ไม่สามารถวิเคราะห์ค่าได้เนื่องจากไม่พบสารดังกล่าว

4.6 การทดสอบความสามารถในการเป็นสารพรีไบโอติกของสารประกอบเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์

4.6.1 การหมักเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และการเพิ่มขึ้นของจำนวนเชื้อจุลินทรีย์

การทดสอบความสามารถในการเป็นสารพรีไบโอติกนั้น ทดสอบจากการนำสารประกอบเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ มาทดสอบหมักเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย หรือเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในร่างกาย โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และอาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่นั้นมีมากมายหลายชนิด โดย การศึกษาที่ผ่านมาของ B. Gómez et al. (2014) และ B. Gómez et al. (2016) ได้ทำการศึกษากลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด 9 กลุ่ม โดยกลุ่มที่สำคัญ ได้แก่ กลุ่มจุลินทรีย์จากอุจจาระที่ขับถ่ายของมนุษย์ กลุ่ม *Bifidobacterium* กลุ่ม *Lactobacillus* และกลุ่ม *Bacteroides* เป็นต้น ซึ่งทั้ง 4 กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญนี้ นิยมใช้นำมาทดสอบความสามารถในการเป็นสารพรีไบโอติกกันอย่างแพร่หลาย ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงเลือกใช้จุลินทรีย์ *L. acidophilus* และ *B. bifidum* ที่สามารถซื้อได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยผลการทดลองนี้ จะทดสอบความสามารถในการเป็นสารพรีไบโอติกของ POS3, POS4, Hydrolyzed pectin, และ Inulin เติมนลงในอาหาร MRS both ที่ปราศจากแหล่งคาร์บอน โดยมีตัวอย่างควบคุมที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน

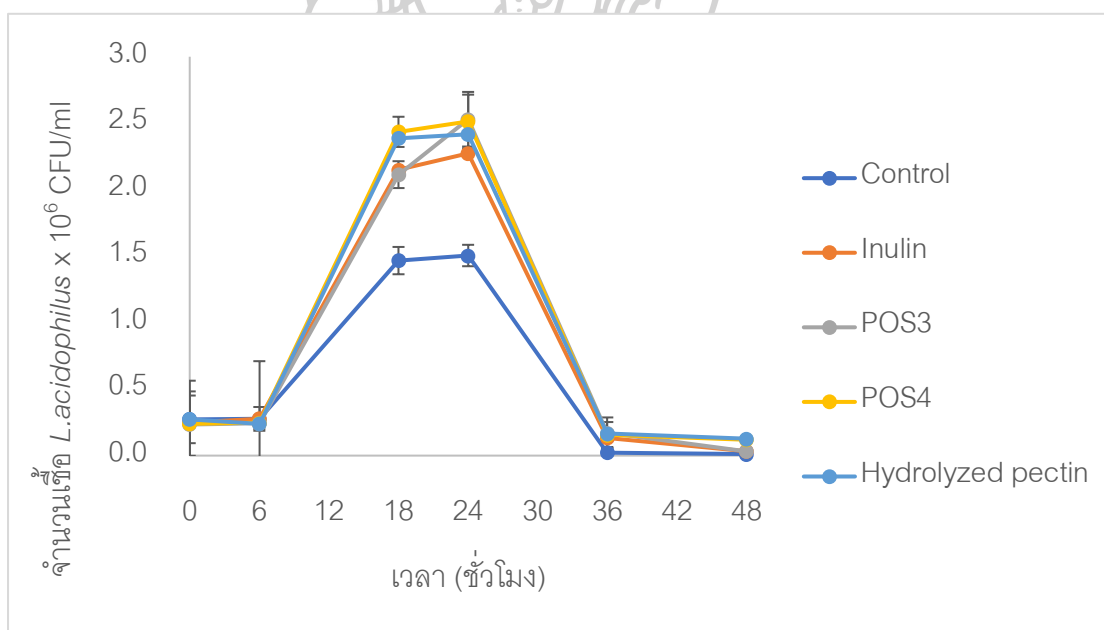
(Control) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า POS3, POS4, และ Hydrolyzed pectin สามารถหมักเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดให้เจริญเติบโตได้ เช่นเดียวกับ Inulin โดยในอาหารทุกชนิดเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง และจะเริ่มคงที่ในช่วง 18-24 ชั่วโมง และจะเริ่มลดลงหลังจากเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง และเหลือจำนวนน้อยหลังจากเวลาผ่านไป 36 ชั่วโมง เนื่องจาก เชื้อจุลินทรีย์จะเริ่มใช้คาร์บอนในการเจริญเติบโตหลังบ่มไป 5-10 ชั่วโมง และจะใช้แหล่งคาร์บอนจากกลูโคส โอลิโกแซคคาไรด์ ตามด้วย กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ ไฮโลโอลิโกแซคคาไรด์ อะราบินโนโอลิโกแซคคาไรด์ และโอลิโกกาแลคทูโรไซด์ ตามลำดับ ซึ่งจะมีการใช้แหล่งคาร์บอนในการเจริญต่อจนถึง 32 ชั่วโมง (Gullón, 2011) ดังนั้นภาพที่ 19 และ 21 จึงแสดงให้เห็นว่าในช่วงแรกเชื้อจะอยู่ในระยะ lag phase และเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง จึงเข้าสู่ระยะ log phase โดยมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว และเริ่มเข้าสู่ stationary phase เมื่อเวลาผ่านไป 18 ชั่วโมง และเข้าสู่ death phase เมื่อเวลาผ่านไป 36 ชั่วโมง

โดยในการทดสอบของเชื้อ *L. acidophilus* นั้น พบว่าในอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอน POS4 และ Hydrolyzed pectin มีจำนวนเชื้อ *L. acidophilus* ที่เจริญเมื่อเวลาผ่านไป 18 ชั่วโมง เป็น 2.44×10^6 CFU/mL และ 2.39×10^6 CFU/mL ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอน POS3 และ Inulin ที่มีจำนวนเชื้อ *L. acidophilus* ที่เจริญเมื่อเวลาผ่านไป 18 ชั่วโมง เป็น 2.11×10^6 CFU/mL และ 2.15×10^6 CFU/mL ตามลำดับ และในอาหารที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน Control มีจำนวนเชื้อ *L. acidophilus* ที่เจริญเมื่อเวลาผ่านไป 18 ชั่วโมง เป็น 1.47×10^6 CFU/mL เนื่องจากตัวอย่าง POS4 และ Hydrolyzed pectin มีปริมาณกลูโคส กาแลคโตส ไฮโลส อะราบินโนส และกาแลคทูโรนิก โดยรวม ที่มากกว่าในตัวอย่าง POS3 (ตารางที่ 7) ดังนั้นเชื้อ *L. acidophilus* จึงมีการเจริญได้ดีกว่า (ภาพที่ 20)

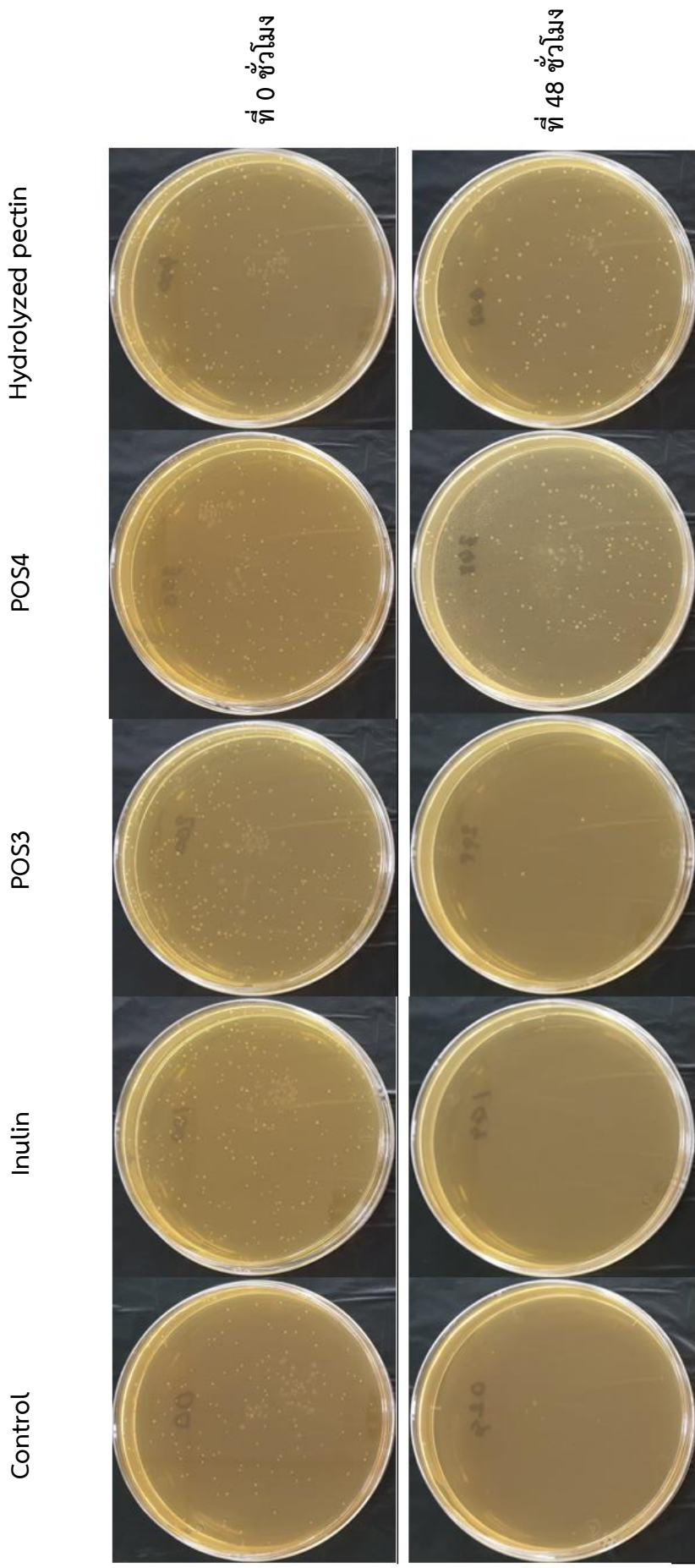
ส่วนในการทดสอบของเชื้อ *B. bifidum* นั้น พบว่ามีการเจริญของเชื้อที่ต่ำกว่า *L. acidophilus* โดยในอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอน POS4 มีจำนวนของเชื้อ *B. bifidum* ที่เจริญเมื่อเวลาผ่านไป 18 ชั่วโมง เป็น 2.11×10^6 CFU/mL ซึ่งมากกว่าอาหารที่เติมแหล่งคาร์บอน Hydrolyzed pectin, POS3 และ Inulin ที่มีจำนวนของเชื้อ *B. bifidum* ที่เจริญเมื่อเวลาผ่านไป 18 ชั่วโมง เป็น 1.77×10^6 CFU/mL, 1.72×10^6 CFU/mL และ 1.65×10^6 CFU/mL ตามลำดับ และในอาหารที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน Control มีจำนวนเชื้อ *B. bifidum* ที่เจริญเมื่อเวลาผ่านไป 18 ชั่วโมง เป็น 1.25×10^6 CFU/mL เนื่องจากในงานวิจัยของ Gullón (2011) ได้รายงานไว้ว่า เชื้อ *B. bifidum* จะไม่นำเอาโอลิโกกาแลคทูโรนิก ไปใช้ในการเจริญเติบโต แต่จะใช้กลูโคส โอลิโกแซคคาไรด์ กาแลค

โพลีโอลิกแซคคาไรด์ ไฮโลโพลีโอลิกแซคคาไรด์ อะราบิโนโพลีโอลิกแซคคาไรด์ ในการเจริญเท่านั้น ดังนั้น จากตารางที่ 7 จึงเห็นได้ว่า POS4 มีปริมาณกลูโคส กาแลคโตส ไฮโลส อะราบิโนส โดยรวมที่มากที่สุด (ภาพที่ 22)

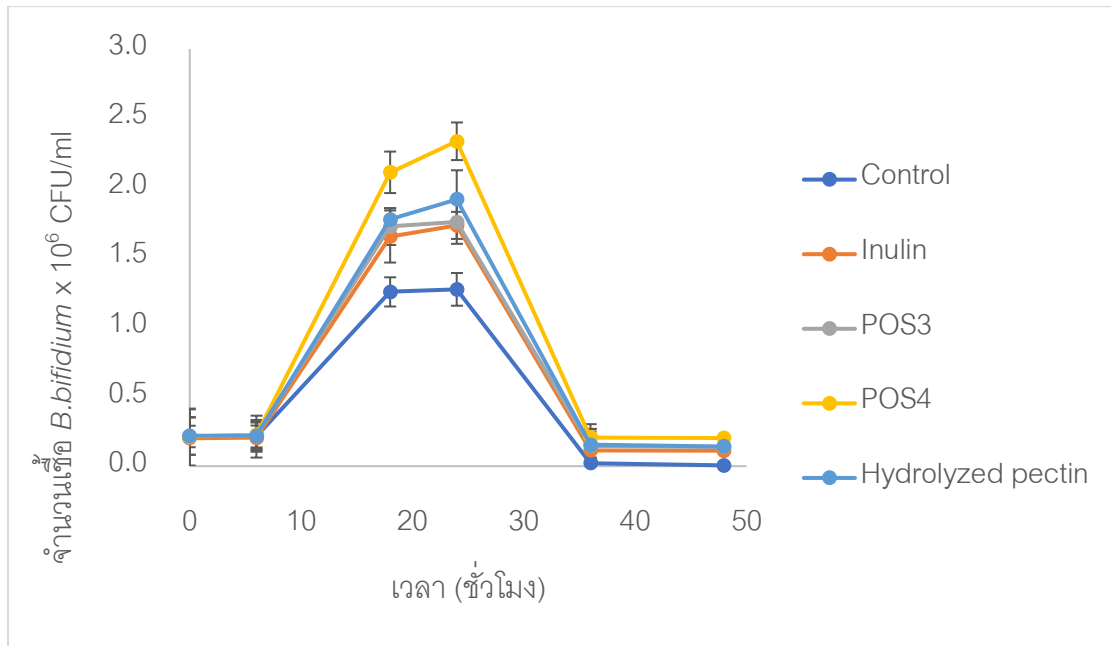
ตลอดจนผลการทดลองนี้ยังชี้ให้เห็นว่าตัวอย่าง POS3 POS4 และ Hydrolyzed pectin มีองค์ประกอบที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดนี้ ไม่ว่าจะเป็นกลูโคส กาแลคโตส ไฮโลส อะราบิโนส และกาแลคทูโรนิก ซึ่งด้วยองค์ประกอบนี้นั่นเอง ที่ส่งเสริมให้ตัวอย่าง POS3 POS4 และ Hydrolyzed pectin ที่ผลิตได้ มีความสามารถในการเป็นสารพรีไบโอติก เช่นเดียวกับ Inulin ทางการค้า โดย POS4 สามารถส่งเสริมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดได้ดีที่สุด ซึ่งผลการทดลองนี้ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ B. Gómez et al. (2016) ที่ได้รายงานไว้ว่า เพกติกโพลีโอลิกแซคคาไรด์จากเปลือกเลมอน และกากของซูก้าบีท ด้วยน้ำและความร้อน ซึ่งขนาดโมเลกุลของเพกติกโพลีโอลิกแซคคาไรด์ที่ได้มีขนาดอยู่ในช่วงประมาณ 5.9 – 11.8 kDa มีความสามารถในการเป็นสารพรีไบโอติกที่เทียบเท่าหรือดีกว่าฟรุคโตโพลีโอลิกแซคคาไรด์ (fructo-oligosaccharides, FOS)



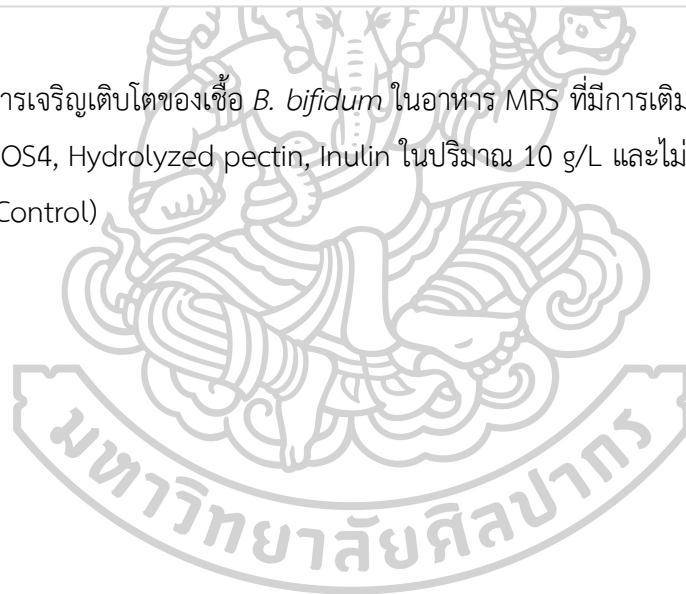
ภาพที่ 19 การเจริญเติบโตของเชื้อ *L. acidophilus* ในอาหาร MRS ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน POS3, POS4, Hydrolyzed pectin, Inulin ในปริมาณ 10 g/L และไม่เติมแหล่งคาร์บอน (Control)

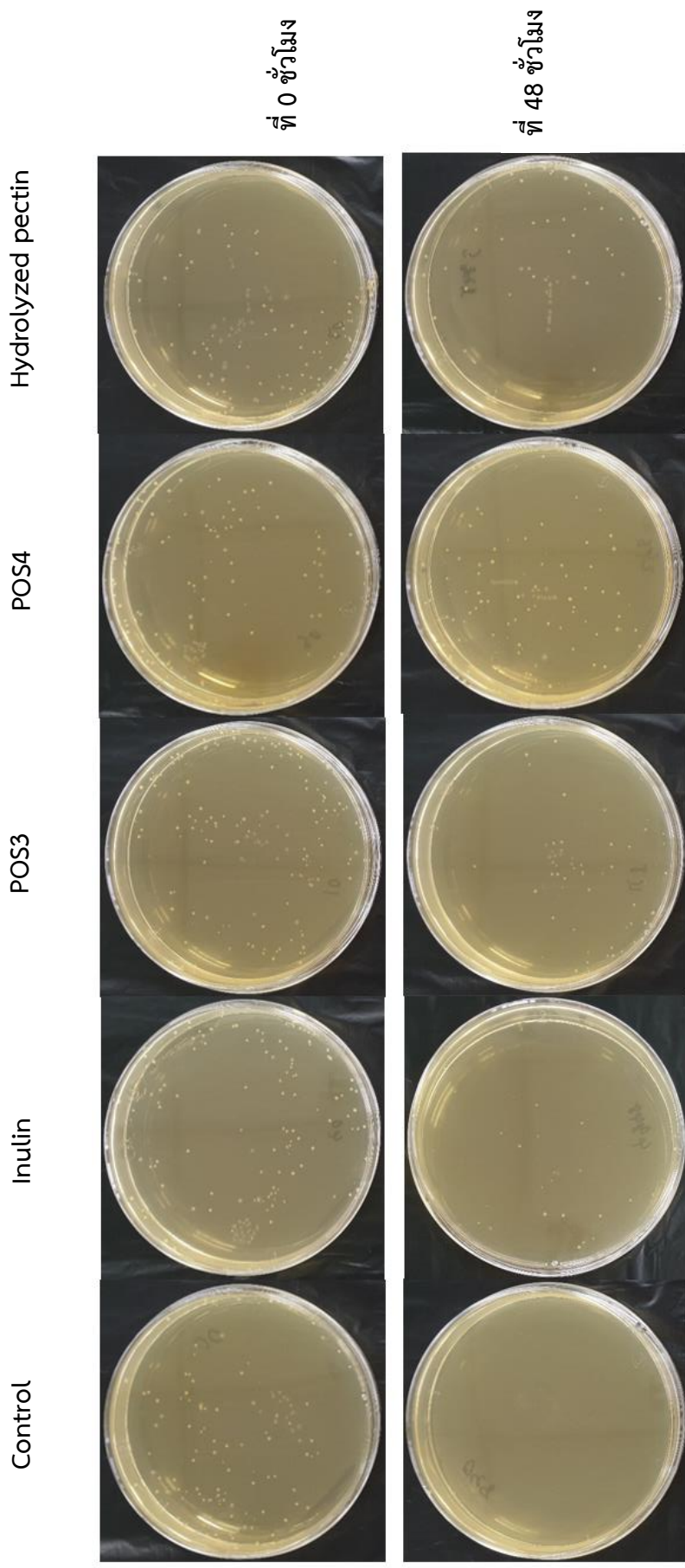


ภาพที่ 20 การเจริญเติบโตของเชื้อ *L. acidophilus* ในอาหาร MRS agar ที่ได้มาจากการหมักเชื้อจุลินทรีย์ด้วย MRS broth ด้วยการเติมแหล่งคาร์บอน POS3, POS4, Hydrolyzed pectin, Inulin ในปริมาณ 10 g/L และไม่เติมแหล่งคาร์บอน (Control)



ภาพที่ 21 การเจริญเติบโตของเชื้อ *B. bifidum* ในอาหาร MRS ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน POS3, POS4, Hydrolyzed pectin, Inulin ในปริมาณ 10 g/L และไม่เติมแหล่งคาร์บอน (Control)





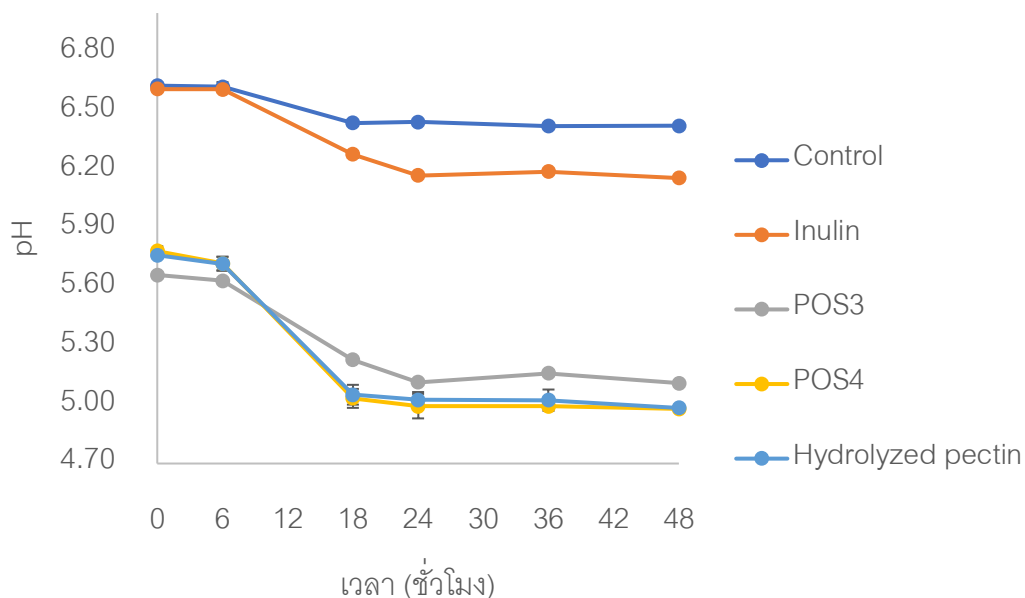
ภาพที่ 22 การเจริญเติบโตของเชื้อ *B. bifidum* ในอาหาร MRS agar ที่ได้มาจากการหมักเชื้อจุลินทรีย์ด้วย MRS broth ด้วยการเติมแหล่งคาร์บอน POS3,

POS4, Hydrolyzed, pectin, Inulin ในปริมาณ 10 g/L และไม่เติมแหล่งคาร์บอน (Control)

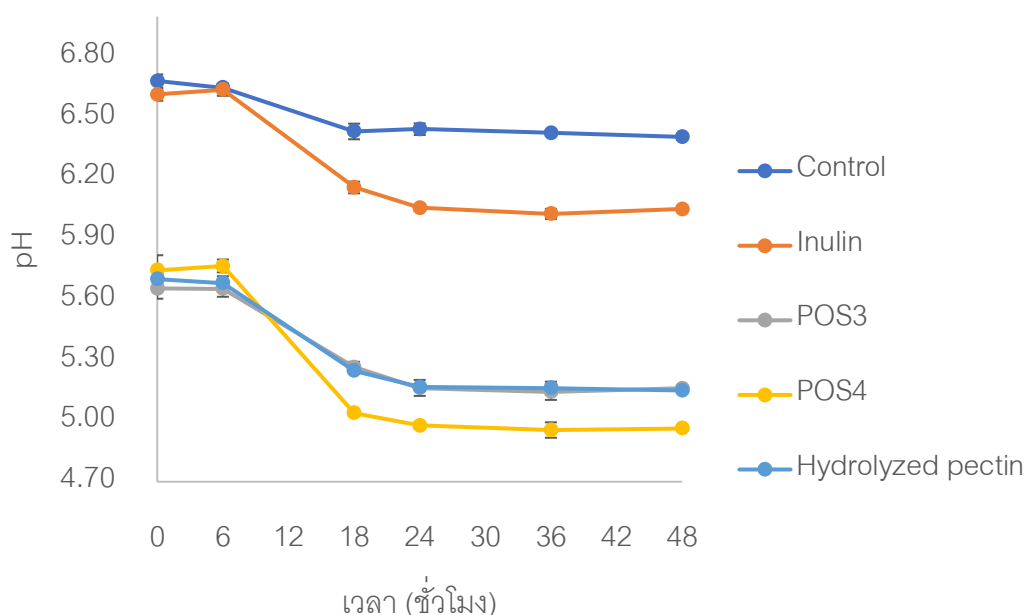
4.6.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

จากผลการทดลองพบว่าในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน POS3, POS4, Hydrolyzed pectin และ Inulin นั้น ค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลง เมื่อมีการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์มากขึ้น เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์จะนำอาหารที่ได้ไปใช้ในการเจริญเติบโตและจะผลิตกรดไขมันสายสั้นขึ้นมา เช่น อะซิติก โพรไพโอนิก และบิวทิริก เป็นต้น จึงทำให้ในอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์มีค่าความเป็นกรดมากขึ้น จากผลการทดลองพบว่า ในทุกๆอาหารจะมีแนวโน้มการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง เช่นเดียวกัน กล่าวคือ สำหรับในการทดสอบของเชื้อ *L. acidophilus* อาหารที่มีแหล่งคาร์บอน POS3, POS4, Hydrolyzed pectin และ Inulin นั้นเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลงจาก 5.63 เป็น 5.23, 5.72 เป็น 5.03, 5.72 เป็น 5.05 และ 6.61 เป็น 6.28 ตามลำดับ และจะเริ่มคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกันใน *B. bifidum* เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง ในอาหารแหล่งคาร์บอน POS3, POS4, Hydrolyzed pectin และ Inulin ค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลงจาก 5.65 เป็น 5.27, 5.77 เป็น 5.04, 5.68 เป็น 5.25 และ 6.64 เป็น 6.16 ตามลำดับ และจะเริ่มคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 24 และ 25) เนื่องจากการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างจะสัมพันธ์กับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นในระยะเวลาดังกล่าวเช่นเดียวกัน โดยเมื่อเชื้อมีการเจริญมากขึ้น ค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Kabel, Kortenoeven, Schols, and Voragen (2002) และ Moura et al. (2008) ที่พบว่าค่าความเป็นกรดต่างจะลดลงเมื่อเวลาหมักเชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 5-14 ชั่วโมง

ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นในตัวอย่างเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ จะมีค่าต่ำกว่า Inulin ทางการค้า และ Control (ไม่เติมคาร์บอน) เนื่องจากเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้นั้น เกิดจากการย่อยสลายประกอบพอลิแซคคาไรด์ให้กลายเป็นสารประกอบโอลิโกแซคคาไรด์ โดยใช้น้ำและความร้อน ซึ่งจะทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ตัวอื่นๆ ตามมาด้วยเช่นเดียวกัน เช่น 5-HMF และกรดเลวูลินิก เป็นต้น (Ramli & Amin, 2018) ซึ่งทำให้เพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้มีค่าเป็นกรด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ B. Gómez, Gullón, B., Yáñez, R., Schols, H. and Alonso, J. L. (2016) ที่ผลิตเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์จากเปลือกเลมอน และกากของชูก้าบิท ด้วยเทคนิคการไฮโดรไลซ์ด้วยน้ำและความร้อน และทดสอบความสามารถในการเป็นสารพรีไบโอติกของตัวอย่างที่ผลิตได้ ได้รายงานผลการทดลองค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้นของตัวอย่างเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์มีค่าความเป็นกรดต่างต่ำกว่า FOS เช่นเดียวกัน



ภาพที่ 23 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ได้จากการหมักเชื้อ *L. acidophilus* ในอาหาร MRS ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน POS3, POS4, Hydrolyzed pectin, Inulin ในปริมาณ 10 g/L และไม่เติมแหล่งคาร์บอน (Control)

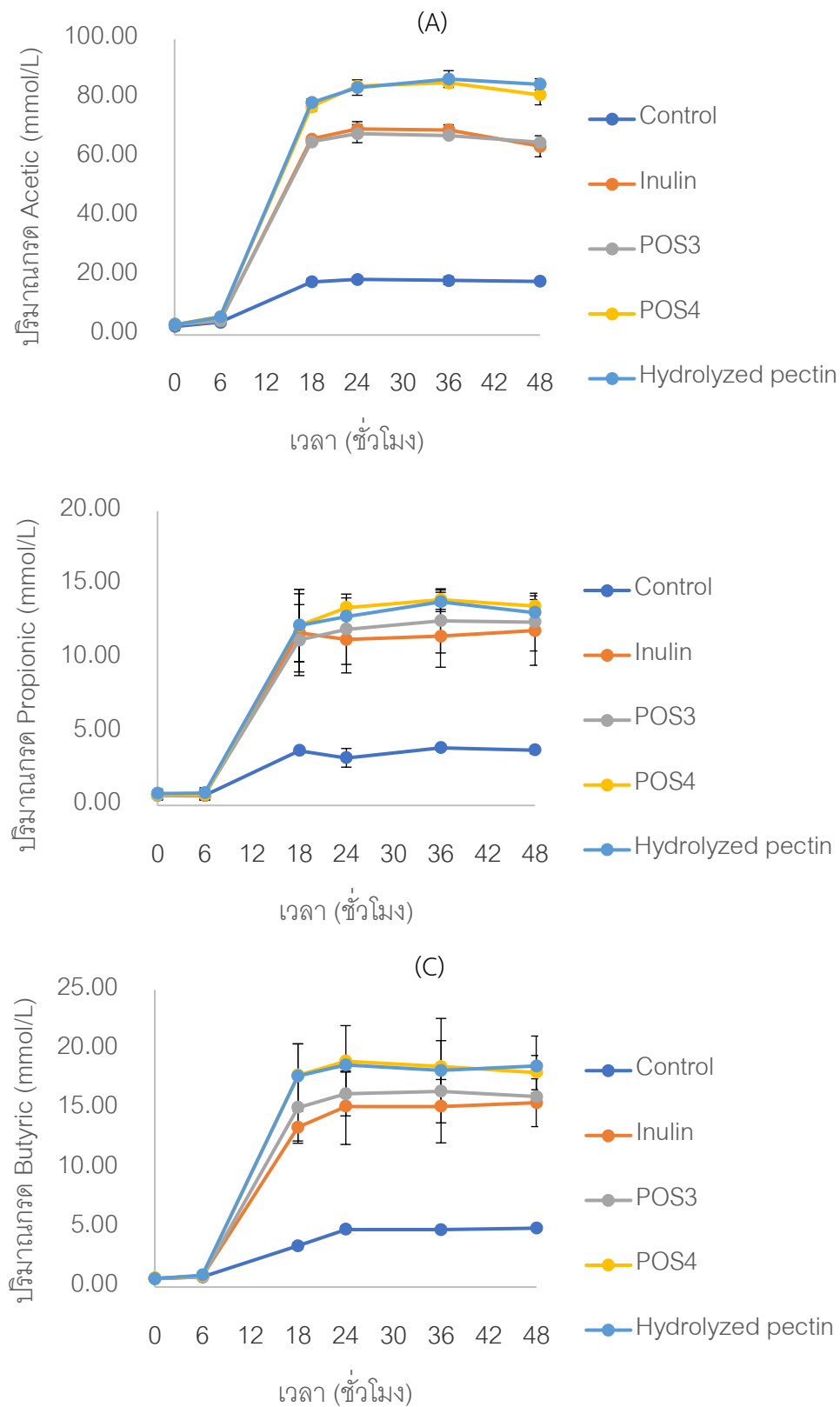


ภาพที่ 24 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ได้จากการหมักเชื้อ *B. bifidum* ในอาหาร MRS ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน POS3, POS4, Hydrolyzed pectin, Inulin ในปริมาณ 10 g/L และไม่เติมแหล่งคาร์บอน (Control)

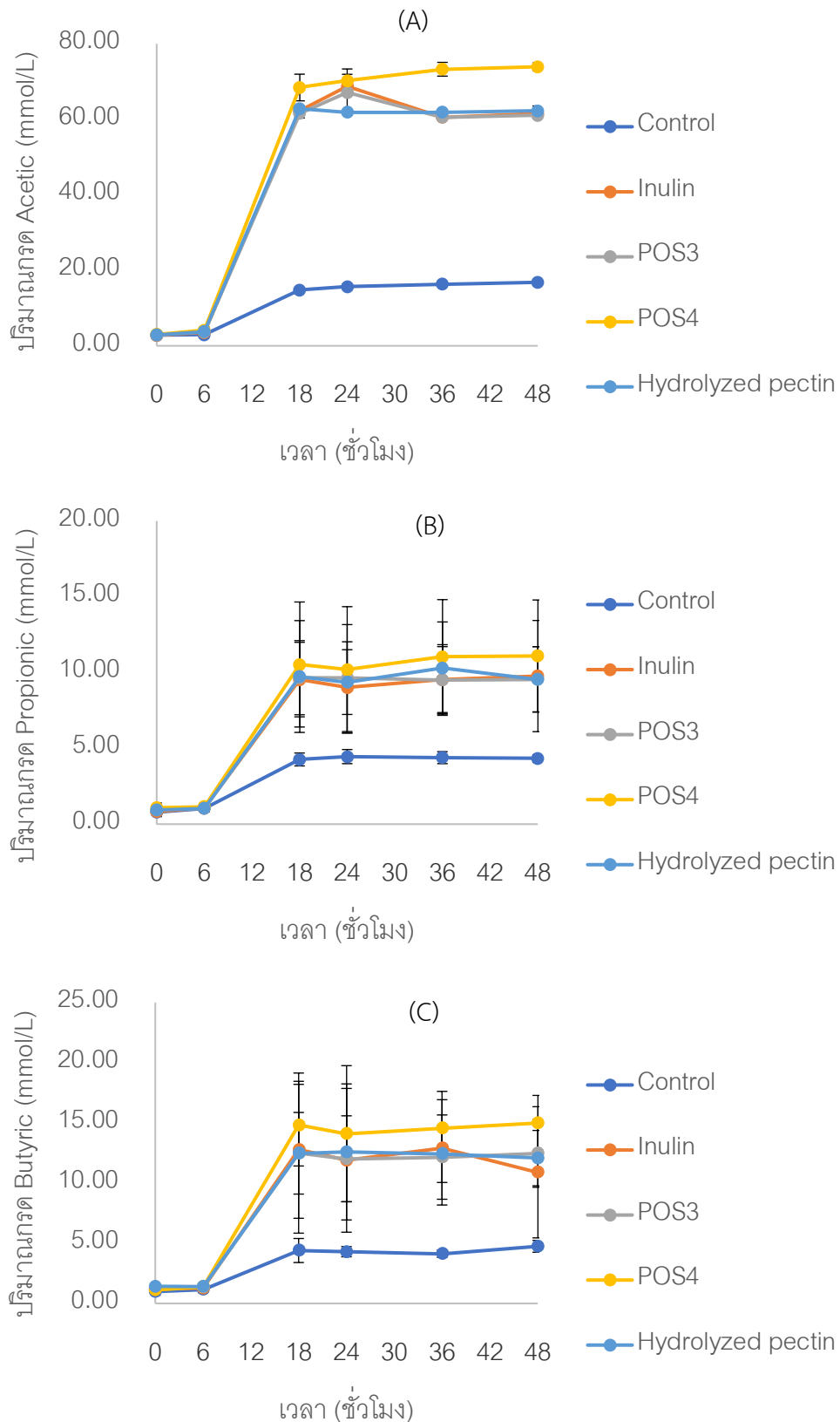
4.6.3 ปริมาณกรดไขมันสายสั้น

สำหรับกรดไขมันสายสั้นที่เกิดขึ้นนั้น พบว่าในทุกๆอาหารมีแนวโน้มเป็นเช่นเดียวกัน กล่าวคือ สำหรับในการทดสอบของเชื้อ *L. acidophilus* อาหารที่มีแหล่งคาร์บอน POS3, POS4, Hydrolyzed pectin และ Inulin นั้นเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง ปริมาณกรดอะซิติกจะเพิ่มขึ้นจาก 4.86 เป็น 65.34, 6.17 เป็น 77.22, 6.06 เป็น 78.55 และ 4.76 เป็น 66.29 mmol/L ตามลำดับ โฟไฟโอนิก เพิ่มขึ้นจาก 0.74 เป็น 11.24, 0.74 เป็น 12.22, 0.86 เป็น 12.23 และ 0.69 เป็น 11.73 mmol/L ตามลำดับ และบิวทิริก 0.72 เป็น 15.12, 0.94 เป็น 17.82, 1.01 เป็น 17.75 และ 0.88 เป็น 13.45 mmol/L ตามลำดับ และจะเริ่มคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 26) ซึ่งเป็นเช่นเดียวกันใน การทดสอบของเชื้อ *B. bifidum* อาหารที่มีแหล่งคาร์บอน POS3, POS4, Hydrolyzed pectin และ Inulin นั้นเมื่อเวลาผ่านไป 6-18 ชั่วโมง ปริมาณกรดอะซิติก จะเพิ่มขึ้นจาก 3.68 เป็น 61.53, 4.15 เป็น 68.41, 3.77 เป็น 62.80 และ 3.55 เป็น 62.19 mmol/L ตามลำดับ โฟไฟโอนิก เพิ่มขึ้นจาก 1.09 เป็น 9.66, 1.15 เป็น 10.53, 1.04 เป็น 9.74 และ 1.06 เป็น 9.54 mmol/L ตามลำดับ และบิวทิริก 1.38 เป็น 12.49, 1.40 เป็น 14.81, 1.40 เป็น 12.48 และ 1.28 เป็น 12.77 mmol/L ตามลำดับ และจะเริ่มคงที่เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 27)

โดยผลการทดลองปริมาณกรดที่ได้จากการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดพบว่า มีปริมาณอะซิติกมากที่สุด ตามมาด้วยบิวทิริก และโฟไฟโอนิก ตามลำดับ และไม่พบกรดแลคติก และฟอร์มิก โดยอัตราส่วนการเพิ่มขึ้นของ อะซิติก:โฟไฟโอนิก:บิวทิริกได้เป็น 1.00:0.15:0.22 เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* จะย่อยคาร์โบไฮเดรตผ่านเมตาบอลิซึม ที่ไม่ใช้ออกซิเจน กลายเป็นไพรูเวทในขั้นตอนแรก และกลายเป็นกรดแลคติกและกรดฟอร์มิกเป็นสารตัวกลาง และเมื่อระยะเวลาการหมักมากกว่า 14 ชั่วโมง สุดท้ายกรดแลคติกและกรดฟอร์มิกจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะซิติก โฟไฟโอนิก และบิวทิริก ตลอดจนเชื้อทั้งสองกลุ่มนี้สามารถผลิตอะซิติก ได้โดยไม่ผ่านตัวกลาง ซึ่งสามารถเปลี่ยนจากไพรูเวท เป็นอะซิติกได้เลย (Belenguer et al., 2006) ดังนั้นผลการทดลองจึงพบปริมาณกรดอะซิติกมากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gullón (2011) ที่ได้รายงานผลปริมาณกรดไขมันสายสั้นในการทดสอบการเป็นสารพรีไบโอติกของไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากกากแอปเปิ้ลด้วยการไฮโดรไลซ์ด้วยน้ำและความร้อน โดยใช้จุลินทรีย์ในอุจจาระของมนุษย์เป็นตัวทดสอบว่า เชื้อจุลินทรีย์มีการผลิตกรดอะซิติกมากที่สุด ตามมาด้วยบิวทิริก และโฟไฟโอนิก ตามลำดับ และมีปริมาณกรด แลคติกเพียงเล็กน้อยในการหมัก 7 ชั่วโมงแรกเท่านั้น โดยอัตราส่วนการเพิ่มขึ้นของกรดอะซิติก:โฟไฟโอนิก:บิวทิริก เป็น 1.00:0.08:0.17



ภาพที่ 25 ปริมาณกรดไขมันสายสั้น (Acetic (A), Propionic (B) และ Butyric (C)) ของเชื้อ *L. acidophilus* ในอาหาร MRS ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน POS3, POS4, Hydrolyzed pectin, Inulin และ (Control)



ภาพที่ 26 ปริมาณกรดไขมันสายสั้น (Acetic (A), Propionic (B) และ Butyric (C)) ของเชื้อ *B. bifidum* ในอาหาร MRS ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอน POS3, POS4, Hydrolyzed pectin, Inulin และ (Control)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าน้ำกึ่งวิกฤตสามารถนำมาใช้ในการสกัดเพกตินจากเปลือกเสาวรสได้ โดยการทรีตด้วยน้ำกึ่งวิกฤตในภาวะแบบกะ ที่อุณหภูมิ 140 องศาเซลเซียส ทำให้ได้เพกตินที่มีขนาดโมเลกุล 236.62 kDa และเมื่อนำเพกตินที่ได้มาทรีตด้วยน้ำกึ่งวิกฤตในระบบแบบต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที สามารถผลิตเพกตินที่ผ่านการไฮโดรไลซิส มีขนาดโมเลกุล 10.59 kDa จากนั้นการใช้การกรองผ่านเมมเบรนขนาดต่างๆ ทำให้แยกขนาดโมเลกุลของเพกติกโกลิโกแซคคาไรด์ออกเป็นขนาดต่างๆ ได้ คือ <1 kDa (POS1), 1-3 kDa (POS2), 3-5 kDa (POS3) และ >5 kDa (POS4)

ในการทดสอบสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติกของเพกตินที่ผ่านการไฮโดรไลซิส และเพกติกโกลิโกแซคคาไรด์ POS3 และ POS4 ในการหมักของเชื้อ *L. acidophilus* และ *B. bifidum* พบว่า POS4 มีคุณสมบัติการเป็นสารพรีไบโอติกที่ดีกว่าหรือเทียบเท่า Inulin ทางการค้า



รายการอ้างอิง





ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ทวีศักดิ์ ถานะ
วัน เดือน ปี เกิด	7 มกราคม 2538
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย
วุฒิการศึกษา	ปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีอาหาร
ที่อยู่ปัจจุบัน	87/55 ซ.เพชรเกษม81/6 แขวงหนองค้างพลู เขตหนองแขม กรุงเทพมหานคร 10160
ผลงานตีพิมพ์	29-31 ตุลาคม 2561 นำเสนอผลงานทางวิชาการ ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยระดับนานาชาติ ครั้งที่ 44 (วทท44) หัวข้อ "EFFECT OF SEVERITY FACTOR ON SUBCRITICAL WATER EXTRACTION OF OLIGOSACCHARIDES FROM PASSION FRUIT PEEL" 25-26 มิถุนายน 2563 นำเสนอผลงานทางวิชาการ ในการประชุมวิชาการบัณฑิตศึกษาระดับชาติ ครั้งที่ 10 หัวข้อ "สมบัติการเป็นพรีไบโอติกของเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์จาก เปลือกของเสาวรสที่ได้จากการทรีตด้วยน้ำกึ่งวิกฤต"



- Abid, M., Cheikhrouhou, S., Renard, C. M. G. C., Bureau, S., Cuvelier, G., Attia, H. and Ayadi, M. A. (2017). Characterization of pectins extracted from pomegranate peel and their gelling properties. *Food Chemistry*, 215, 318-325.
- Afonso, M. D. a. B., R. (2002). Review of the treatment of seafood processing wastewaters and recovery of proteins therein by membrane separation processes — prospects of the ultrafiltration of wastewaters from the fish meal industry. *Desalination*, 142(1), 29-45.
- AOAC. (1990). *Official method of analysis. Association of Official Analytical Chemists* (15 ed.): Washington DC.
- AOAC. (2000). *Official method of analysis. Association of Official Analytical Chemists* (17 ed.): Washington DC.
- Areewan, P. (2012). *Production of oligosaccharides from coconut meal with subcritical water hydrolysis*. Silpakorn University (in Thai),
- Asl, H. A. a. K., M. (2013). Subcritical water extraction. In H. Nakajima (Ed.), *Mass Transfer - Advances in Sustainable Energy and Environment Oriented Numerical Modeling*: IntechOpen.
- Belenguer, A., Duncan, S. H., Calder, A. G., Holtrop, G., Louis, P., Lobley, G. E., & Flint, H. J. (2006). Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Applied and environmental microbiology*, 72(5), 3593-3599.
doi:10.1128/AEM.72.5.3593-3599.2006
- Benito-Román, Ó., Alonso-Riaño, P., Díaz de Cerio, E., Sanz, M. T., & Beltrán, S. (2022). Semi-continuous hydrolysis of onion skin wastes with subcritical water: Pectin recovery and oligomers identification. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(3), 107439. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.107439>
- Cara, C., Ruiz, E., Carvalheiro, F., Moura, P., Ballesteros, I., Castro, E. and Gírio, F. (2012). Production, purification and characterisation of oligosaccharides from olive tree pruning autohydrolysis. *Industrial Crops and Products*, 40, 225-231.

- Catarino, I., Minhalma, M., Beal, L. L., Mateus, M., & de Pinho, M. N. (2008). Assessment of saccharide fractionation by ultrafiltration and nanofiltration. *Journal of Membrane Science*, 312(1), 34-40.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.12.057>
- Chapla, D., Pandit, P., & Shah, A. (2012). Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. *Bioresource Technology*, 115, 215-221.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.083>
- Chaplin, F. M. a. K., F. J. (1986). *Carbohydrate analysis: a practical approach*: IRL Press, Washington DC.
- Choque Delgado, G. T. a. T., W. M. da S. C. (2018). Role of prebiotics in regulation of microbiota and prevention of obesity. *Food Research International*, 113, 183-188.
- Cuevas, M., García, J. F., Hodaifa, G. and Sánchez, S. (2015). Oligosaccharides and sugars production from olive stones by autohydrolysis and enzymatic hydrolysis. *Industrial Crops and Products*, 70, 100-106.
- Dai, J., Wu, Y., Chen, S.-w., Zhu, S., Yin, H.-p., Wang, M., & Tang, J. (2010). Sugar compositional determination of polysaccharides from *Dunaliella salina* by modified RP-HPLC method of precolumn derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 629-635.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.05.029>
- Dawood, M. A. O. a. K., S. (2016). Recent advances in the role of probiotics and prebiotics in carp aquaculture: A review. *Aquaculture*, 454, 243-251.
- Department of Agricultural Extension. (2019). *Report of crop production data (๑๓. 01) 2015/16 (in Thai)*. Retrieved from
- do Espirito Santo, A. P., Perego, P., Converti, A. and Oliveira, M. N. (2012). Influence of milk type and addition of passion fruit peel powder on fermentation kinetics, texture profile and bacterial viability in probiotic yoghurts. *LWT - Food Science and Technology*, 47(2), 393-399.

- Flint, H. J., Scott, K. P., Duncan, S. H., Louis, P. and Forano, E. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut microbes*, 3(4), 289-306. doi:10.4161/gmic.19897
- Freitas, d. O. C., Giordani, D., Lutckemier, R., Gurak, P. D., Cladera-Olivera, F. and Ferreira, M. L. D. (2016). Extraction of pectin from passion fruit peel assisted by ultrasound. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 110-115.
- Gómez, B., Gullón, B., Remoroza, C., Schols, H. A., Parajó, J. C., & Alonso, J. L. (2014). Purification, Characterization, and Prebiotic Properties of Pectic Oligosaccharides from Orange Peel Wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(40), 9769-9782. doi:10.1021/jf503475b
- Gómez, B., Gullón, B., Yáñez, R., Schols, H., & Alonso, J. L. (2016). Prebiotic potential of pectins and pectic oligosaccharides derived from lemon peel wastes and sugar beet pulp: A comparative evaluation. *Journal of Functional Foods*, 20, 108-121. doi:10.1016/j.jff.2015.10.029
- Gómez, B., Gullón, B., Remoroza, C., Schols, H. A., Parajó, J. C. and Alonso, J. L. (2014). Purification, characterization, and prebiotic properties of pectic oligosaccharides from orange peel wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(40), 9769-9782.
- Gómez, B., Gullón, B., Yáñez, R., Parajó, J. C. and Alonso, J. L. (2013). Pectic oligosaccharides from lemon peel wastes: production, purification, and chemical characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(42), 10043-10053.
- Gómez, B., Gullón, B., Yáñez, R., Schols, H. and Alonso, J. L. (2016). Prebiotic potential of pectins and pectic oligosaccharides derived from lemon peel wastes and sugar beet pulp: A comparative evaluation. *Journal of Functional Foods*, 20, 108-121.
- Gullón, B., Gullón, P., Sanz, Y., Alonso, J. L. and Parajó, J. C. (2011). Prebiotic potential of a refined product containing pectic oligosaccharides. *LWT - Food Science and Technology*, 44(8), 1687-1696.

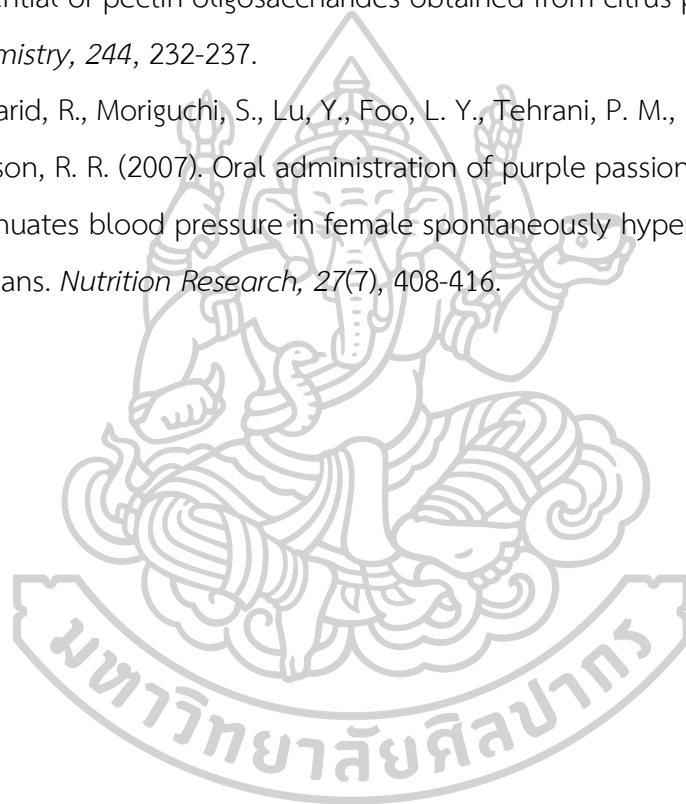
- Hoegger, P., Majcherczyk, A., Dwivedi, R., Svobodová, K. and Kilaru, S. (2007). Enzymes in wood degradation. In U. Kües (Ed.), *Wood production, wood technology, and biotechnological impacts* (pp. 383-432).
- Honda, S., Togashi, K., & Taga, A. J. J. o. C. A. (1997). Unusual separation of 1 -phenyl-3-methyl-5-pyrazolone derivatives of aldoses by capillary zone electrophoresis. *791*, 307-311.
- Janice, G. S. (2015). *General Organic & Biological Chemistry (Loose Leaf)*: McGraw-Hill Education, London, United Kingdom.
- Jauregi, P. a. K., K. (2019). Chapter 3 - Membrane Filtration of Biosurfactants. In C. M. Galanakis (Ed.), *Separation of functional molecules in food by membrane technology* (pp. 79-112): Academic Press.
- Kabel, M. A., Kortenoeven, L., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2002). In Vitro Fermentability of Differently Substituted Xylo-oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(21), 6205-6210. doi:10.1021/jf020220r
- Khuwijitjaru. (2006). Subcritical water and utilization in the food industry. *Journal of Food and Health*, *90*, 51-53 (in Thai).
- Khuwijitjaru. (2016). Utilization of Plant-Based Agricultural Waste by Subcritical Water Treatment. *Japan Journal of Food Engineering*, *17*(2), 33-39. doi:10.11301/jsfe.17.33
- Khuwijitjaru, P., Watsanit, K. and Adachi, S. (2012). Carbohydrate content and composition of product from subcritical water treatment of coconut meal. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *18*(1), 225-229.
- Klinchongkon, K. (2013). *Carbohydrate composition of product from subcritical water treatment of passion fruit peel*. Silpakorn University (in Thai),
- Klinchongkon, K., Khuwijitjaru, P., & Adachi, S. (2017). Degradation kinetics of passion fruit pectin in subcritical water. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *81*(4), 712-717. doi:10.1080/09168451.2016.1277941
- Kobayashi, H., Kaiki, H., Shrotri, A., Techikawara, K. and Fukuoka, A. (2016). Hydrolysis of woody biomass by a biomass-derived reusable heterogeneous catalyst. *Chemical Science*, *7*(1), 692-696.

- Leclere, L., Van, C. P. and Michiels, C. (2013). Anti-cancer activities of pH- or heat-modified pectin. *4*(128).
- Li, P.-j., Xia, J.-l., Nie, Z.-y., & Shan, Y. (2016). Pectic oligosaccharides hydrolyzed from orange peel by fungal multi-enzyme complexes and their prebiotic and antibacterial potentials. *LWT - Food Science and Technology*, *69*, 203-210. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.01.042>
- Li, P. J., Xia, J. I., Nie, Z. Y. and Shan, Y. (2016). Pectic oligosaccharides hydrolyzed from orange peel by fungal multi-enzyme complexes and their prebiotic and antibacterial potentials. *LWT - Food Science and Technology*, *69*, 203-210.
- Lomax, A. R. a. C., P. C. (2008). Prebiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence. *British Journal of Nutrition*, *101*(5), 633-658.
- Macagnan, F. T., Santos, L. R. d., Roberto, B. S., de Moura, F. A., Bizzani, M. and da Silva, L. P. (2015). Biological properties of apple pomace, orange bagasse and passion fruit peel as alternative sources of dietary fibre. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, *6*(1), 1-6.
- Maran, J. P. (2015). Statistical optimization of aqueous extraction of pectin from waste durian rinds. *International Journal of Biological Macromolecules*, *73*, 92-98.
- Mohanty, D., Misra, S., Mohapatra, S. and Sahu, P. S. (2018). Prebiotics and synbiotics: Recent concepts in nutrition. *Food Bioscience*, *26*, 152-160.
- Mohd Rasidek, N. A., Mad Nordin, M. F., Tokuyama, H., Nagatsu, Y., Mili, N., Zaini, A. S., . . . Che Yunus, M. A. (2021). Subcritical water-based pectin from banana peels (*Musa Paradisiaca* Cv.Tanduk) as a natural gelation agent. *Materials Today: Proceedings*, *47*, 1329-1335. doi:<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.02.815>
- Moniz, P., Ho, A. L., Duarte, L. C., Kolida, S., Rastall, R. A., Pereira, H. and Carvalheiro, F. (2016). Assessment of the bifidogenic effect of substituted xylo-oligosaccharides obtained from corn straw. *Carbohydrate Polymers*, *136*, 466-473.

- Moniz, P., Pereira, H., Duarte, L. C. and Carvalheiro, F. (2014). Hydrothermal production and gel filtration purification of xylo-oligosaccharides from rice straw. *Industrial Crops and Products*, 62, 460-465.
- Moniz, P., Pereira, H., Quilhó, T. and Carvalheiro, F. (2013). Characterisation and hydrothermal processing of corn straw towards the selective fractionation of hemicelluloses. *Industrial Crops and Products*, 50, 145-153.
- Morton, J. F. (2013). *Fruits of Warm Climates*: Echo Point Books & Media.
- Moura, P., Cabanas, S., Lourenço, P., Gírio, F., Loureiro-Dias, M. C., & Esteves, M. P. (2008). In vitro fermentation of selected xylo-oligosaccharides by piglet intestinal microbiota. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 1952-1961. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.11.007>
- Nodda, H. a. T., H. (2007). *111 kinds of fruits, food value and eating* Sangdad, Bangkok, Thailand (in Thai).
- Nugent, M. A. (2000). Heparin sequencing brings structure to the function of complex oligosaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(19), 10301-10303.
- Oliveira, C. F. d., Giordani, D., Lutckemier, R., Gurak, P. D., Cladera-Olivera, F., Marczak, L. D. F. J. L.-F. S., & Technology. (2016). Extraction of pectin from passion fruit peel assisted by ultrasound. *71*, 110-115.
- Phavaphutanon, L. (n.d.). Passion fruit planting. In: Agricultural Information Center, Kasetsart University.
- Prarat, S. (2013). *Fruit and vegetable technology*: Odeon Store, Bangkok, Thailand (in Thai).
- Ramirez, C. S. V., Temelli, F., & Saldaña, M. D. A. (2021). Production of pea hull soluble fiber-derived oligosaccharides using subcritical water with carboxylic acids. *The Journal of Supercritical Fluids*, 178, 105349. doi:<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2021.105349>
- Ramli, N. A. S., & Amin, N. A. S. (2018). Thermo-kinetic assessment of glucose decomposition to 5-hydroxymethyl furfural and levulinic acid over acidic functionalized ionic liquid. *Chemical Engineering Journal*, 335, 221-230. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.10.112>

- Rincón, E., Espinosa, E., García-Domínguez, M. T., Balu, A. M., Vilaplana, F., Serrano, L., & Jiménez-Quero, A. (2021). Bioactive pectic polysaccharides from bay tree pruning waste: Sequential subcritical water extraction and application in active food packaging. *Carbohydrate Polymers*, 272, 118477.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118477>
- Sabater, C., Fara, A., Palacios, J., Corzo, N., Requena, T., Montilla, A. and Zárata, G. (2019). Synthesis of prebiotic galactooligosaccharides from lactose and lactulose by dairy propionibacteria. *Food Microbiology*, 77, 93-105.
- Sidiras, D., Batzias, F., Ranjan, R. and Tsapatsis, M. (2011). Simulation and optimization of batch autohydrolysis of wheat straw to monosaccharides and oligosaccharides. *Bioresource Technology*, 102(22), 10486-10492.
- Supalak, S. (2009). *High performance liquid chromatography* (Vol. 1): Khonkaen University, Thailand (in Thai).
- Tana, T. (2016). *Production and characterization of pectic-oligosaccharides from passion fruit peel waste using subcritical water treatment*.
- Valdivieso Ramirez, C. S., Sanchez Gallego, J. E., Gänzle, M., Temelli, F., & Saldaña, M. D. A. (2021). Carboxylic acid-catalysed hydrolysis of polygalacturonic acid in subcritical water media. *The Journal of Supercritical Fluids*, 169, 105103.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.105103>
- Wang, W., Ma, X., Jiang, P., Hu, L., Zhi, Z., Chen, J., Ding, T., Ye, X. and Liu, D. (2016). Characterization of pectin from grapefruit peel: A comparison of ultrasound-assisted and conventional heating extractions. *Food Hydrocolloids*, 61, 730-739.
- Wang, X., Chen, Q., & Lü, X. (2014). Pectin extracted from apple pomace and citrus peel by subcritical water. *Food Hydrocolloids*, 38, 129-137.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.12.003>
- Yapo, B. M., & Koffi, K. L. (2006). Yellow passion fruit rind-a potential source of low-methoxyl pectin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(7), 2738-2744.

- Yapo, B. M., & Koffi, K. L. (2008). Dietary fiber components in yellow passion fruit rind—a potential fiber source. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5880-5883.
- Yapo, B. M., Robert, C., Etienne, I., Wathelet, B., & Paquot, M. (2007). Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. *Food Chemistry*, 100(4), 1356-1364.
- Zhang, S., Hu, H., Wang, L., Liu, F. and Pan, S. (2018). Preparation and prebiotic potential of pectin oligosaccharides obtained from citrus peel pectin. *Food Chemistry*, 244, 232-237.
- Zibadi, S., Farid, R., Moriguchi, S., Lu, Y., Foo, L. Y., Tehrani, P. M., Ulreich, J. B. and Watson, R. R. (2007). Oral administration of purple passion fruit peel extract attenuates blood pressure in female spontaneously hypertensive rats and humans. *Nutrition Research*, 27(7), 408-416.





ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (ตัดแปลงจาก (AOAC, 2000))

1.1 ออบ moisture can ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนัก

1.2 ชั่งตัวอย่างใส่ใน moisture can ประมาณ 5 กรัม แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก

1.3 นำไปอบอีกครั้งที่สภาวะเดิม ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำจนกว่าน้ำหนักจะคงที่

1.4 คำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{ร้อยละของความชื้น} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

2. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (AOAC, 1990)

2.1 ชั่งตัวอย่างใส่ thimble ประมาณ 2-5 กรัม แล้วนำทั้ง thimble นั้นไปใส่ในเครื่อง Soxhlet extractor

2.2 ชั่งน้ำหนักของ extraction cup แล้วเติมตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ลงไปปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปใส่ในเครื่อง extraction unit

2.3 ทำการสกัด (boiling) นาน 90 นาที และทำการชะล้าง (rinsing) นาน 180 นาที

2.4 นำ extraction cup ไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อระเหยตัวทำละลายออกไป

2.5 นำไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็นและนำมาชั่งน้ำหนัก

2.6 คำนวณหาปริมาณไขมันจากสูตร

$$\text{ร้อยละของไขมัน} = \frac{\text{น้ำหนักไขมัน}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

3. การวิเคราะห์โปรตีน (AOAC, 2000)

3.1 ชั่งตัวอย่าง 0.5-1 กรัม ใส่ลงใน Kjeldahl flask เติม anhydrous CuSO_4 0.1 กรัม anhydrous Na_2SO_4 2 กรัม และ conc. H_2SO_4 25 มิลลิลิตร ใส่ antibumping chip 2-3 เม็ดลงใน Kjeldahl flask

3.2 ตั้งอุณหภูมิของเครื่องย่อยไว้ที่ 180 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 20 นาที และเปลี่ยนระดับอุณหภูมิเป็น 380 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 2 ชั่วโมงหรือจนกว่าสารละลายสีทึบให้สารละลายเย็น

3.3 ติดตั้งเครื่องมือกลั่นให้ปลายของ condenser จุ่มลงในสารละลายกรดบอริกความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร หยดเมทิลเรด 2-3 หยด

3.4 เติม NaOH ร้อยละ 50 ปริมาตร 50-70 มิลลิลิตร ลงใน Kjeldahl flask โดยขั้นตอนนี้ NaOH ถูกเติมโดยเครื่องกลั่น

3.5 เก็บสารละลายที่กลั่นได้ จากนั้นไตเตรตด้วยสารละลายมาตรฐาน HCl เข้มข้น 0.1N จนได้จุดยุติเป็นสีชมพู

3.6 คำนวณร้อยละของไนโตรเจนในตัวอย่าง แล้วใช้ conversion factor เท่ากับ 6.25 หา ร้อยละของโปรตีนในตัวอย่าง

$$\text{ร้อยละของไนโตรเจน} = \frac{(\text{มิลลิลิตร HCl} - \text{มิลลิลิตร Blank}) \times \text{Normality of HCl} \times 14.007 \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (มิลลิกรัม)}}$$

$$\text{ร้อยละของโปรตีน} = \text{ร้อยละของไนโตรเจน} \times 6.25$$

หมายเหตุ ใช้น้ำกลั่นเป็น Blank ซึ่งน้ำหนักให้ใกล้เคียงกับตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐาน HCl ต้องเทียบมาตรฐานกับสารละลายมาตรฐาน 0.1 N N_3OH โดยมี phenolphthalein เป็น indicator

4. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (Ash) (ดัดแปลงจาก (AOAC, 2000))

4.1 เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง นำออกจากเตาเผาเก็บไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำจนกระทั่ง น้ำหนักคงที่ (ในแต่ละซ้ำต่างกันไม่เกิน 3 มิลลิกรัม) บันทึกผล

4.2 ชั่งตัวอย่างละเอียดประมาณ 2 กรัม ลงในถ้วยกระเบื้องเคลือบ เผาบนเตาไฟฟ้าจนหมดควัน

4.3 นำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้เถ้าสีอ่อนหรือสีขาวสม่ำเสมอ นำออกจากเตาเผา เก็บไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ (ในแต่ละซ้ำต่างกันไม่เกิน 3 มิลลิกรัม)

4.4 คำนวณหาปริมาณเถ้าจากสูตร

$$\text{ร้อยละของเถ้า} = \frac{\text{น้ำหนักของส่วนที่เหลือจากการเผา} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

5. การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอลซัลฟูริก (Phenol-sulfuric method) (ดัดแปลงจาก (Chaplin, 1986))

5.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานกรดกาแลกทูโรนิก

5.1.1 นำสารละลายกรดกาแลกทูโรนิกปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง

5.1.2 เติมสารละลายฟีนอล (Phenol) ร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

5.1.3 เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

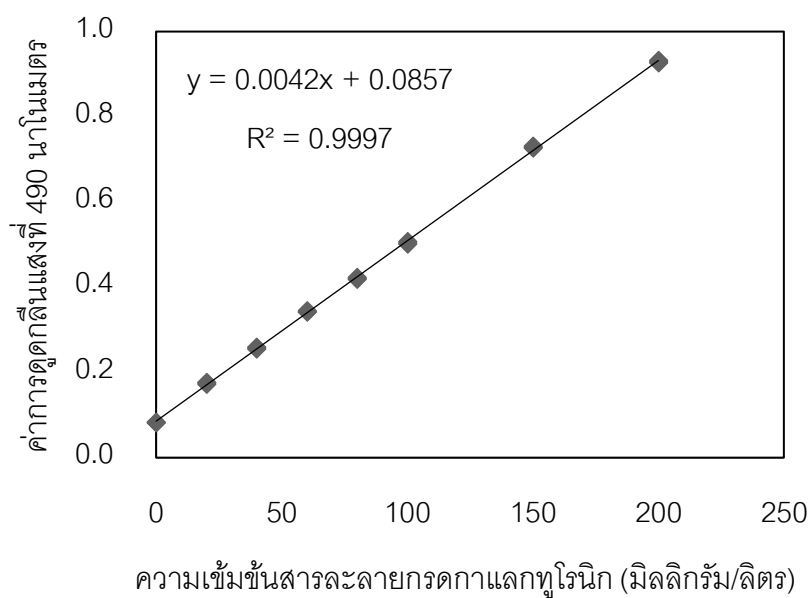
5.1.4 นำตัวอย่างไปใส่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

5.1.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

5.1.6 นำค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของกรดกาแลกทูโรนิก (มิลลิกรัมต่อลิตร) หาความสัมพันธ์ในรูปแบบของสมการเส้นตรง

ตารางที่ ก.7 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกรดกาแลกทูโรนิกที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

สารละลายกรดกาแลกทูโรนิก (มิลลิกรัม/ลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร	
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2
0	0.124	0.124
20	0.126	0.128
40	0.301	0.299
60	0.384	0.383
80	0.461	0.460
100	0.549	0.546
150	0.768	0.769
200	0.971	0.974



ภาพที่ ก.27 กราฟมาตรฐานกรดกาแลกทูโรนิกสำหรับวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

5.2 วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

5.2.1 เจือจางของเหลวที่ได้จากการทรีต 200 เท่า

5.2.2 วิเคราะห์เช่นเดียวกับสารมาตรฐานในข้อ 5.1.1 – 5.1.5

5.2.3 คำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยรายงานผลในหน่วยกรัมต่อเปลือกเสาวรสมแห้ง 100 กรัม

6. การวิเคราะห์ขนาดของโอลิโกแซคคาไรด์ในของเหลวที่ได้จากการทรีตด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

6.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ (Klinchongkon, 2013)

Column Size Exclusion Chromatography Column (YMC-Pack Diol-60, 500 x 8.0 mm, YMC, Kyoto, Japan)

Mobile phase Water

Flow rate 1.00 ml/min

Detection RI detector

Oven temperature room temperature (~ 25 °C)

6.2 กรองตัวอย่างผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตรเข้าเครื่อง HPLC

7. การวิเคราะห์ปริมาณโมโนแซคคาไรด์จากเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ด้วยการย่อยด้วย Trifluoroacetic acid (TFA) และเตรียมอนุพันธ์ 1-phenyl-3-methyl-2-pyrazoline-5-one (PMP) ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

7.1 การย่อยเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ด้วย Trifluoroacetic acid (TFA) (ดัดแปลงจาก (Dai et al., 2010))

- เตรียมสารละลายเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร
- ดูดสารละลายเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่เตรียมไว้มา 50 ไมโครลิตร นำไปเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน
- เติม TFA ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไป
- จากนั้นนำไปให้ความร้อนใน heating block ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำตัวอย่างมาลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำแข็ง

- เติม 2-propanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นระเหยตัวทำละลายโดยการเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน ทำ 3 ครั้ง เพื่อกำจัด TFA ออกไป
- จากนั้นเติมน้ำกลั่น 50 ไมโครลิตรลงไปในตัวอย่างที่กำจัด TFA ออกไปแล้ว

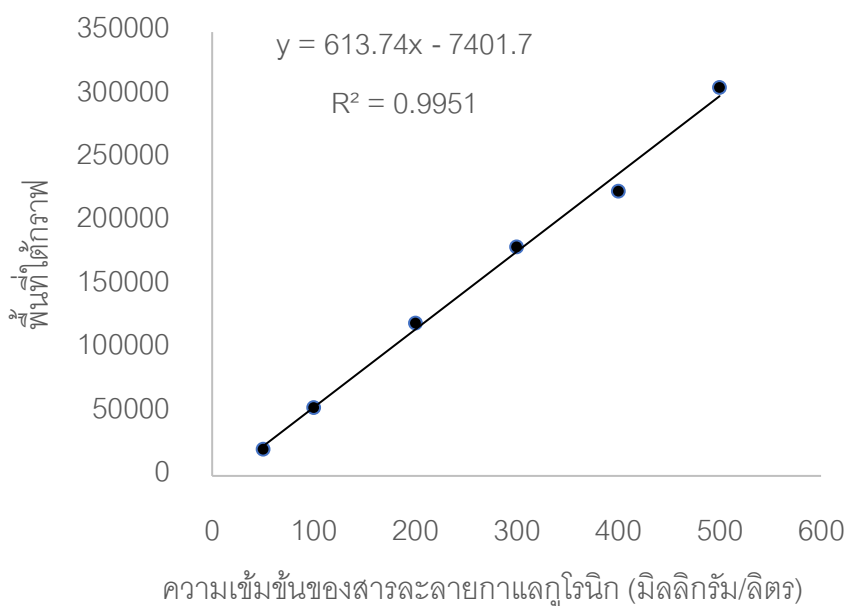
7.2 การเตรียมอนุพันธ์ 1-phenyl-3-methyl-2- pyrazoline-5-one (PMP) ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) (ดัดแปลงจาก (Honda et al., 1997))

- เติมสารละลายฟูโคสความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในตัวอย่างที่กำจัด TFA ออกไปแล้ว
 - เติม NaOH ความเข้มข้น 0.3 M ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายออกมา 50 ไมโครลิตร ใส่ขวดสีชาขนาด 4 มิลลิตร ที่มีฝาปิด
 - เติม PMP ความเข้มข้น 0.5 M (ในเมทานอล) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง
 - นำไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นรอให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
 - เติม HCl ความเข้มข้น 0.3 M ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เพื่อปรับค่า pH ของตัวอย่างให้เป็นกลาง
 - นำตัวอย่างไปทำแห้งด้วยการเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน
 - เติมน้ำกลั่นและคลอโรฟอร์มอย่างละ 1 มิลลิตร จากนั้นเขย่าขวดและตั้งทิ้งไว้จนเกิดการแยกชั้น
 - ดูดสารละลายใสชั้นบนออกมา แล้วกรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC
- โดยสภาวะที่ใช้คือ

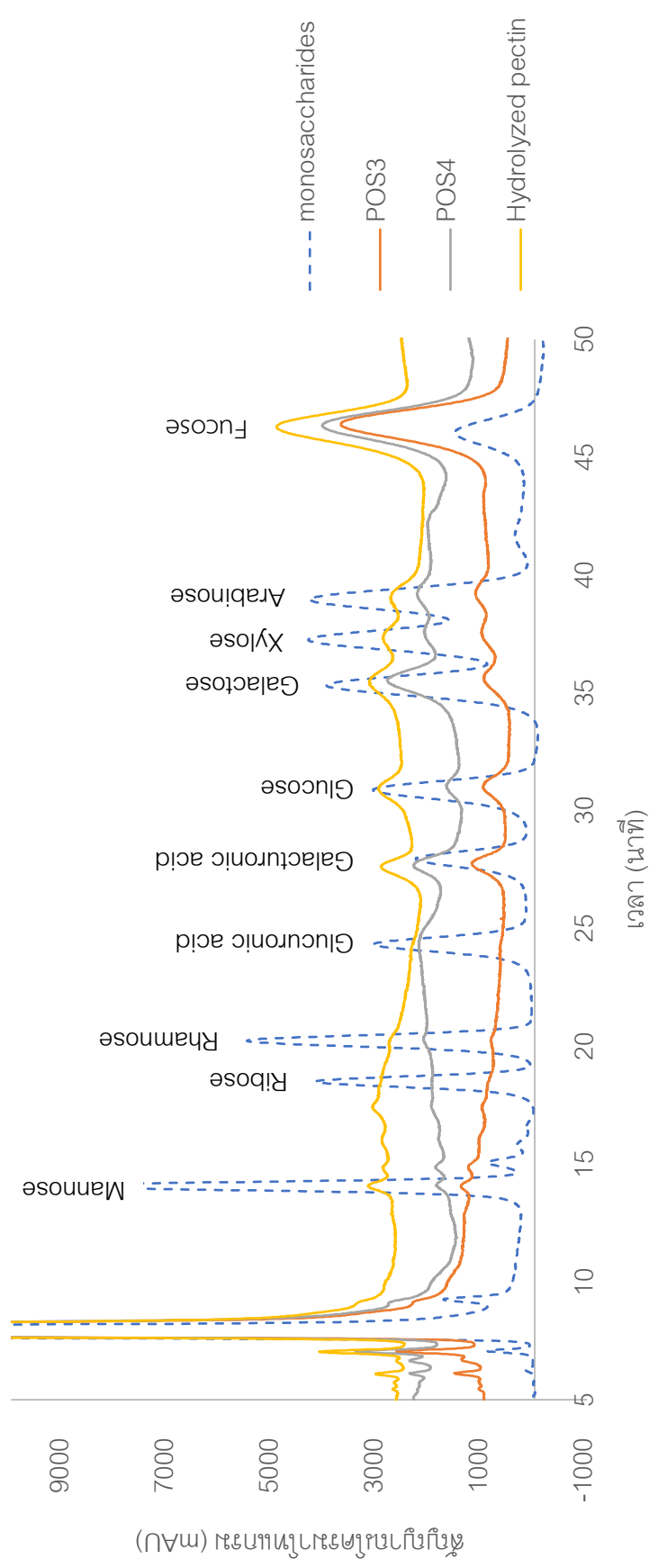
Column	C-18 column (Inertsil® ODS-3, 150 x 4.6 mm, Ø 5 µm, GLSciences, Tokyo, Japan)
Mobile phase	Phosphate buffer pH 6.7: Acetonitrile (86:14)
Flow rate	1.5 mL/min
UV detection	245 nm
Oven temperature	40 °C

ตารางที่ ก.8 สมการเส้นตรง และค่า R-square ของสารมาตรฐานโมโนแซคคาไรด์

สารมาตรฐาน โมโนแซคคาไรด์	สมการเส้นตรง	R-square
แมนโนส	$y = 1313.6x - 17056$	$R^2 = 0.9934$
ไรโบส	$y = 782.02x - 1896.1$	$R^2 = 0.9934$
แรมโนส	$y = 1129x - 11731$	$R^2 = 0.9924$
กลูคูโรนิก	$y = 751.68x - 405.91$	$R^2 = 0.9949$
กาแลกทูโรนิก	$y = 613.74x - 7401.7$	$R^2 = 0.9951$
กลูโคส	$y = 986.34x - 26582$	$R^2 = 0.9930$
กาแลคโตส	$y = 1463.4x - 33735$	$R^2 = 0.9935$
ไซโลส	$y = 1679.3x - 33601$	$R^2 = 0.9922$
อะราบิโนส	$y = 1587.6x - 25706$	$R^2 = 0.9927$



ภาพที่ ก.28 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานโมโนแซคคาไรด์ชนิดกาแลกทูโรนิก



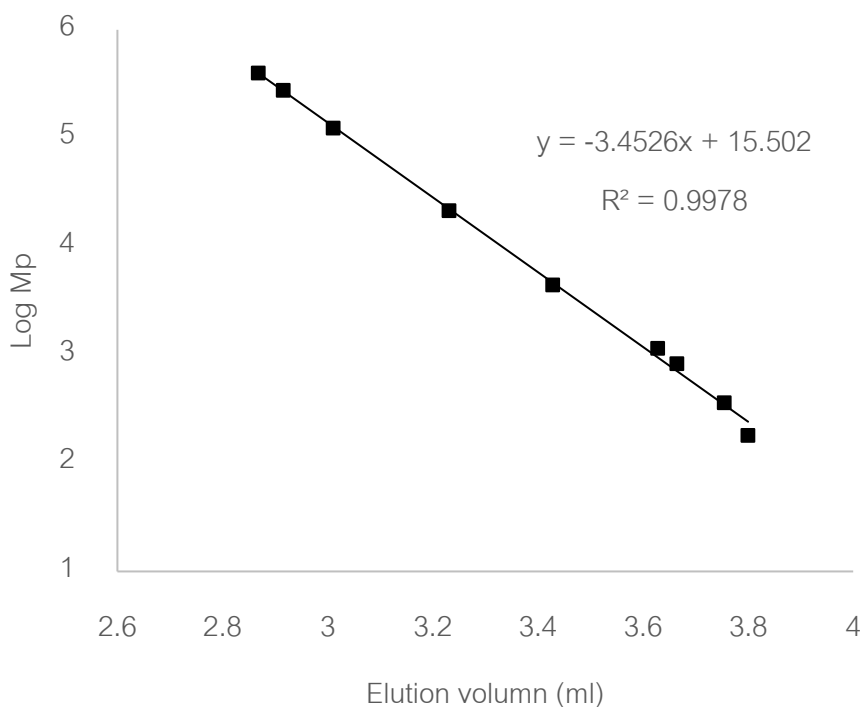
ภาพที่ ๒.29 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานโมโนแซคคาไรด์กับตัวอย่าง POS3 POS4 และ Hydrolyzed pectin

8. วิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์ที่ผลิตได้ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

8.1 สภาวะที่ใช้วิเคราะห์

Column	TSKgel SuperAWM-H column (6.0mm I.D. x 150mm)
Mobile phase	Phosphate buffer pH 6.7
Flow rate	0.6 mL/min
Detection	RI detector (RID-10A, Shimadzu, Japan)
Oven temperature	ambient
Standard	Dextran (5, 25, 150, 410, and 670 kDa), oligomaltose (360, 31, 828 and 1152 Da) และ glucose (180.16 Da)

8.2 กรองตัวอย่างผ่าน syringe filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตรเข้าเครื่อง HPLC

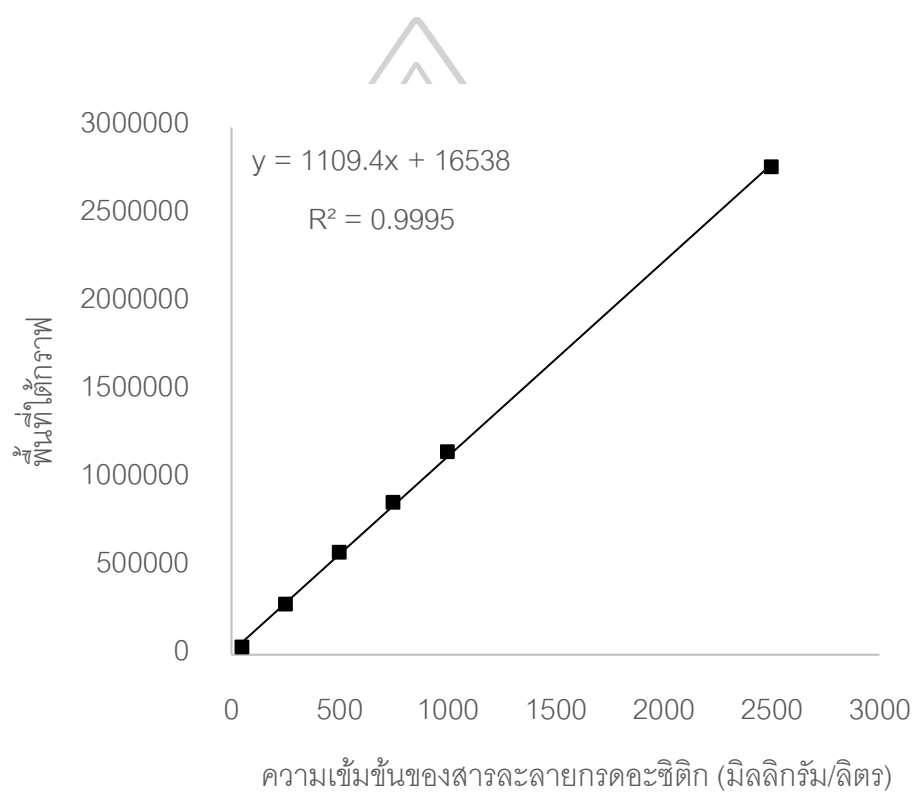


ภาพที่ ก.30 กราฟมาตรฐานขนาดโมเลกุลของสารมาตรฐาน Dextran สำหรับวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลตัวอย่างเพกติกโอลิโกแซคคาไรด์

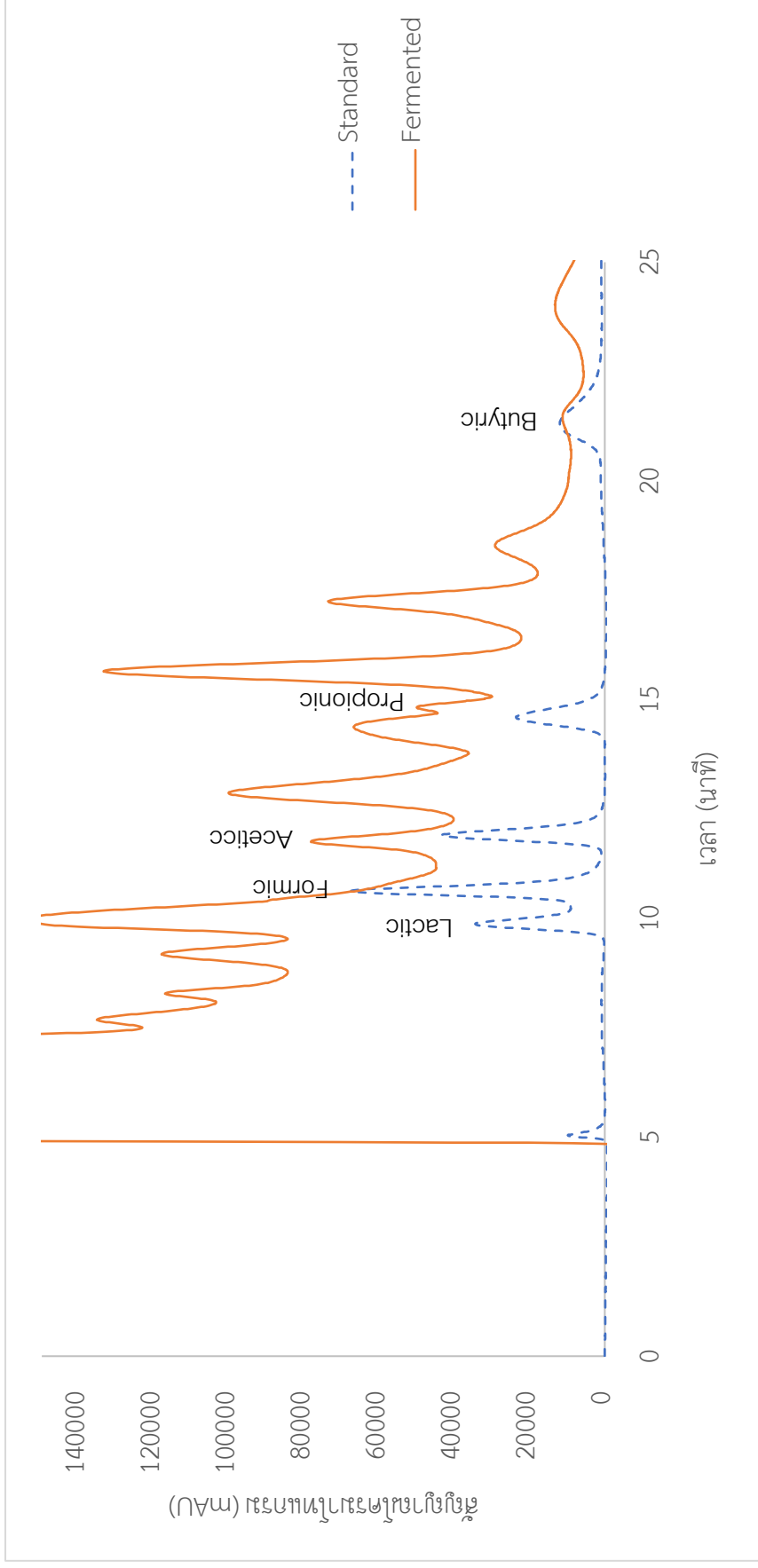
9. การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันสายสั้น (Short Chain Fatty Acid, SCFA)

9.1 สภาวะที่ใช้วิเคราะห์

Column	Repromer H column (250 x 8 mm, Ø 9 µm)
Mobile phase	9 mM sulfuric acid
Flow rate	1 mL/min
UV detection	210 nm
Oven temperature	ambient



ภาพที่ ก.31 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานกรดอะซิติก



ภาพที่ 3.2 โครมาโทแกรมของสารมาตรฐานกรดไขมันสายสั้นกับตัวอย่างการหมัก POS4 ด้วย *L. acidophilus*