



การผลิตเครื่องต้มไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์จากข้าวเหนียวพันธุ์ กข6

ชัยณรงค์ ช่วยจำ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเกษตรศาสตร์

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปีการศึกษา 2564

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี



PRODUCTION OF ISOMALTOOLIGOSACCHARIDE DRINK FROM
GLUTINOUS RICE Var.RD6

CHAINARONG CHUAYJUM

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
MAJOR IN FOOD TECHNOLOGY
FACULTY OF AGRICULTURE
ACADEMIC YEAR 2021
COPYRIGHT OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิริยา อ่อนสอาด อาจารย์ที่ปรึกษาหลักวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัย วัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ทางวิชาการ วิธีการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนให้คำปรึกษาและชี้แนะในการทำวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และ ดร.อนิรุธ สืบสิงห์ ผู้จัดการ ห้างหุ้นส่วนจำกัด เอ็มเคเอ็ม พรีเมียม แบรินด์ ที่ได้ให้การสนับสนุนทุนในการทำวิจัยทั้งหมดภายใต้ทุนวิจัยโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ละมุล วิเศษ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และดร.วชิราพรธณ บุญญาพุทธิพงศ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้สละเวลามาทำการสอบวิทยานิพนธ์ ให้คำปรึกษาและช่วยแนะนำแก้ไขวิทยานิพนธ์ตลอดจนได้แนะแนวทางในการเขียนวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้ศึกษาใคร่ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ทางวิทยาศาสตร์ในการทำวิจัยในครั้งนี้ รวมทั้งบุคลากร นักวิชาการที่ได้แนะนำการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ต่าง ๆ รวมทั้งพี่ เพื่อนและน้อง นักศึกษาปริญญาโทและปริญญาตรีในสาขาเทคโนโลยีการอาหาร ที่ได้ช่วยเหลือและให้กำลังใจในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบพระคุณครอบครัวทั้ง บิดา มารดา ของข้าพเจ้า ที่เป็นกำลังใจในการ ผ่านอุปสรรคและสนับสนุนในการเรียนต่อปริญญาโทในครั้งนี้ ขอขอบคุณนางสาวอัยลดา คันธนู ผู้ที่เป็นคนที่คอยช่วยเหลือ สนับสนุนและให้กำลังใจรวมถึงการตัดสินใจในการผ่านอุปสรรคต่าง ๆ ขอขอบคุณตัวข้าพเจ้าที่พยายามผ่านอุปสรรคที่พบเจอและสามารถแก้ไขปัญหามาให้ผ่านไปได้ด้วยดี จนถึงตอนนี้ รวมทั้งเพื่อน พี่ น้องที่ตลอดจนผู้มีพระคุณที่มีส่วนเกี่ยวข้องทุกท่านที่ไม่สามารถกล่าวได้หมด ผู้ศึกษารู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและกำลังใจอันดียิ่งจากทุกท่าน จึงขอกราบขอบพระคุณ ณ โอกาสนี้

ชัยณรงค์ ช่วยจำ

ผู้วิจัย

บทคัดย่อ

เรื่อง : การผลิตเครื่องดื่มไอโซมอลโตลิโกแซ็กคาร์ไรด์จากข้าวเหนียวพันธุ์ กข6
 ผู้วิจัย : ชัยณรงค์ ช่วยจำ
 ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
 สาขาวิชา : เทคโนโลยีการอาหาร
 อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิริยา อ่อนสอาด
 อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิจชัยวัฒนา
 คำสำคัญ : ไอโซมอลโตลิโกแซ็กคาไรด์, ข้าวระยะเม่า, ข้าวระยะสุกแก่, การหมักแบบของแข็ง

การผลิต IMOs ด้วยกระบวนการหมักแบบของแข็งด้วยสปอร์ของเชื้อรา 2 ชนิดคือ *Aspergillus oryzae* TISTR 3102 และ *Aspergillus niger* TISTR 3012 โดยใช้แป้งข้าวระยะเม่าเกิดเจลาตินในเซชันเป็นสารตั้งต้นในการหมักแบบของแข็ง พบว่าราทั้งสองชนิดสามารถผลิต IMOs ชนิด ไอโซมอลโตส ปริมาณ 38.06 ± 0.68 และ 40.49 ± 0.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดตลอดการหมัก 7 วัน เมื่อเปรียบเทียบการใช้แป้งข้าวระยะเม่าและระยะสุกแก่ โดยใช้สปอร์ของรา *A. oryzae* ที่ผ่านการคัดเลือก พบว่าปริมาณกลูโคส มอลโตส และไอโซมอลโตสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ซึ่งปริมาณไอโซมอลโตสสูงสุด คือ 39.67 ± 0.85 และ 40.57 ± 0.14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในการขยายกำลังการผลิต IMOs ที่ 2 กิโลกรัม พบว่าปริมาณกลูโคสและมอลโตสมีความแตกต่างกันในแป้งข้าวสองระยะ ($P \leq 0.05$) แต่ปริมาณไอโซมอลโตสไม่ต่างกัน ($P > 0.05$) นอกจากนี้ปริมาณกลูโคสที่ผลิตได้จากการขยายกำลังการผลิตสูงกว่าการผลิตในระดับปฏิบัติการ ($P \leq 0.05$) แต่ปริมาณไอโซมอลโตสที่ได้ในระดับห้องปฏิบัติการมีปริมาณสูงกว่า ($P \leq 0.05$) ส่วนปริมาณมอลโตสไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$) เมื่อกำจัดกลูโคสด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* พบว่าปริมาณกลูโคสจากแป้งทั้งสองระยะลดลงร้อยละ 75.50 ถึง 76.08 แต่ปริมาณไอโซมอลโตสไม่เปลี่ยนแปลง ($P > 0.05$) ปริมาณกลูโคสและไอโซมอลโตสของแป้งข้าวสองระยะไม่เปลี่ยนแปลงหลังการทำแห้ง ($P > 0.05$) แต่ปริมาณมอลโตสลดลงหลังการทำแห้ง ($P \leq 0.05$) องค์ประกอบของ IMOs จากแป้งข้าวสองระยะ มีกลูโคส ปริมาณร้อยละ 50.38 ถึง 51.10 มอลโตสร้อยละ 23.99 ถึง 24.25 และไอโซมอลโตสร้อยละ 23.99 ถึง 24.42 และพบมอลโตสและไอโซมอลโทไโดสใน IMOs ทางการค้าในปริมาณร้อยละ 47.82 และ 52.18 ตามลำดับ ปริมาณความชื้นของ IMOs ทั้งสามตัวอย่างมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 4.91 ถึง 5.42 และค่า Water activity มีค่าระหว่าง 0.29 ถึง 0.32 ซึ่งพบว่าแตกต่างกับ IMOs เจริญการค้า ($P \leq 0.05$) แต่มีความสามารถในการละลายไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) และผง IMOs ของแป้งข้าวระยะสุก

แก้มีค่าความหนาแน่นรวมแตกต่างกับ IMO's เจริญการค้า ($P \leq 0.05$) จากการวิเคราะห์กิจกรรมการเป็นฟรีไปโอดิก พบว่ามีค่าคะแนนระหว่าง 3.21 ถึง 3.35 ($P > 0.05$) แสดงให้เห็นว่า IMO's จากแปงข้าวทั้งสองระยะมีสมบัติฟรีไปโอดิกเทียบกับ IMO's เจริญการค้า และสามารถนำไปใช้เป็นผงขงดื่มได้

ABSTRACT

TITLE : PRODUCTION OF ISOMALTOOLIGOSACCHARIDE DRINK FROM
GLUTINOUS RICE Var.RD6

AUTHOR : CHAINARONG CHUAYJUM

DEGREE : MASTER OF SCIENCE

MAJOR : FOOD TECHNOLOGY

ADVISOR : ASST. PROF. WIRIYA ONSAARD, Ph.D.

COADVISOR : ASSOC. PROF. CHUENJIT PRAKITCHAIWATTANA, Ph.D.

KEYWORDS : ISOMALTOOLIGOSACCHARIDE, IMMATURE RICE, MATURE RICE,
SOLID STATE FERMENTATION

Production of IMO by solid-state fermentation using two fungal spores, *Aspergillus oryzae* TISTR 3102 and *Aspergillus niger* TISTR 3012, and using gelatinized immature rice flour as a substrate. It was found that both fungi were capable of producing IMO i.e. isomaltose at 38.06 ± 0.68 and 40.49 ± 0.60 mg/ml, respectively. This corresponded to an increase in total sugar content after 7 days of fermentation. The spores of *A. oryzae* were selected for further investigation by comparing immature and mature rice flour. It was found that glucose, maltose, and isomaltose content tended to increase during fermentation. The highest isomaltose content was 39.67 ± 0.85 and 40.57 ± 0.14 mg/ml, respectively. The up-scaling of IMO production was conducted with 2 kg of flour slurry and it was found that employing an up-scaling process provided glucose and maltose content higher than the laboratory level ($P \leq 0.05$). Nevertheless, the isomaltose content obtained at the laboratory scale was found to be higher than that of the up-scaled level ($P \leq 0.05$). However, upon comparing the two stages of rice, glucose and maltose content were found to be significantly different ($P \leq 0.05$), but the isomaltose content was the same ($P > 0.05$). When glucose was eliminated by yeast *S. cerevisiae*, glucose content was reduced by 75.50% to 76.08%; however, the isomaltose content was unchanged ($P > 0.05$). Glucose and isomaltose content obtained from the two stages of rice flour remained constant after drying ($P > 0.05$), but maltose content was reduced ($P \leq 0.05$). The composition of IMO obtained from the two stages of rice flour contained

glucose ranging from 50.38% to 51.10%, maltose content at 23.99% to 24.25% and isomaltose was between 23.99% to 24.42%. In comparison, maltose and isomaltotriose in commercial IMOs were found to be 47.82% and 52.18% respectively. The moisture content of the IMO powder ranged from 4.91% to 5.42% and water activity ranged from 0.29 to 0.32, significantly different from the commercial IMOs ($P \leq 0.05$). However, solubility was not significantly different ($P > 0.05$). Moreover, the bulk density of IMO powder obtained from mature rice flour did not significantly differ from the commercial IMOs ($P > 0.05$). The prebiotic activity score ranged from 3.21 to 3.35 ($P > 0.05$). Therefore, IMO powder from rice flour at both growth stages exhibited prebiotic properties comparable to those of commercial IMOs and can thus be used as an instant drink powder.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 สมมุติฐานของการวิจัย	4
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	4
1.6 ความหมายหรือนิยามศัพท์เฉพาะ	5
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	
2.1 คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate)	6
2.2 ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Isomalto-oligosaccharides: IMOs)	10
2.3 การประยุกต์ใช้ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์	12
2.4 ความสำคัญต่อสุขภาพของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์	14
2.5 กลไกการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์	15
2.6 วิธีการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์	19
2.7 การศึกษาการใช้ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในผลิตภัณฑ์อาหาร	24
2.8 พรีไบโอติก	28
2.9 ข้าว (Rice)	31
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 วัตถุประสงค์ สารเคมีและอุปกรณ์	44
3.2 วิธีดำเนินการ	52

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง	
4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และสมบัติทางเคมีกายภาพของแป้งข้าวเหนียวพันธุ์ กข6	71
4.2 กิจกรรมที่ 1 การคัดเลือกชนิดจุลินทรีย์สำหรับผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์	85
4.3 กิจกรรมที่ 2 การศึกษาการย่อยแป้งจากข้าวระยะเฒ่าและแป้งข้าวระยะสุกแก่ด้วยเอนไซม์	97
4.4 กิจกรรมที่ 3 การศึกษาการใช้แป้งข้าวระยะต่าง ๆ ที่มีต่อการสังเคราะห์ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์	106
4.5 การขยายกำลังการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์และการทำให้บริสุทธิ์	118
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	144
เอกสารอ้างอิง	146
ภาคผนวก	
ก วิธีวิเคราะห์ทางกายภาพ	161
ข วิธีวิเคราะห์ทางเคมี	166
ค การวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ของแป้ง	177
ง การวิเคราะห์ด้านจุลินทรีย์	179
ประวัติผู้วิจัย	182

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณการใช้ไอโซมอลโทลิโกแซ็กคารไรด์สูงสุดที่แนะนำในอาหารต่าง ๆ	13
2	การควบคุมปริมาณการใช้ของมอลโตเดกซ์ทริน	14
3	การผลิตไอโซมอลโทลิโกแซ็กคารไรด์โดยวิธีต่าง ๆ	27
4	ปริมาณอะไมโลสและอะไมโลเพกตินของแป้งชนิดต่าง ๆ	37
5	สมบัติทางความร้อนของแป้งที่วิเคราะห์จากเครื่อง Differential Scanning Carorimetry (DSC) ของสตาร์ชข้าวระยะเม่าและระยะแก่	41
6	ค่าความหนืดของแป้งข้าวระยะเม่าและระยะแก่	43
7	องค์ประกอบทางเคมีของแป้งข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ในระยะต่าง ๆ	72
8	พฤติกรรมการเปลี่ยนแปลงความหนืดของแป้งข้าวเหนียวพันธุ์ กข 6 ระยะต่าง ๆ	76
9	สมบัติทางความร้อนของแป้งข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ระยะต่าง ๆ	78
10	ปริมาณโครงสร้างผลึกของแป้งข้าวพันธุ์ กข6 ระยะต่าง	81
11	ปริมาณน้ำตาลที่วิเคราะห์โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC) จากการหมักแป้งข้าวระยะเม่าด้วยสปอร์ของเชื้อราสองชนิด	96
12	ปริมาณน้ำตาลในการสังเคราะห์ไอโซมอลโทลิโกแซ็กคารไรด์ด้วยเอนไซม์ Tranglucosidase ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ	105
13	ปริมาณน้ำตาลที่วิเคราะห์โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC) จากการหมักแป้งข้าวระยะต่าง ๆ	116
14	สมบัติทางเคมีของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวสองระยะที่ผ่านการผลิตในระดับกำลัง การผลิต 2 กิโลกรัม ที่ผ่านการหมักสปอร์ของเชื้อรา <i>A. oryzae</i>	119
15	สมบัติทางเคมีและค่าสมมูลมูลเดกซ์โทรสของน้ำเชื่อมข้าวระยะเม่าและระยะสุกแก่ ที่ด้วยสปอร์ของเชื้อรา <i>A. oryzae</i> ขยายกำลังการผลิต 2 กิโลกรัม	120
16	ปริมาณน้ำตาลและไอโซมอลโทลิโกแซ็กคารไรด์ของน้ำเชื่อมที่ได้จากการหมักด้วย <i>A. oryzae</i> ในแป้งข้าวสองระยะที่ระดับการผลิต 2 กิโลกรัม	123
17	ปริมาณน้ำตาลและไอโซมอลโทลิโกแซ็กคารไรด์ของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าว ระยะเม่าและระยะสุกแก่ที่ผ่านการหมักด้วยยีสต์ <i>S. cerevisiae</i>	129

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
18	สมบัติทางกายภาพและเคมีของผง IMO จากข้าวระยะเม่าและระยะสุกแก่ที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย	132
19	สมบัติทางกายภาพของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม่าและระยะสุกแก่ที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย	135
20	ปริมาณน้ำตาลและไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์ของน้ำเชื่อมของน้ำเชื่อมข้าวระยะเม่าและระยะสุกแก่ ก่อนและหลังจากการทำแห้งแบบพ่นฝอย	139
21	องค์ประกอบน้ำตาลและไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์ของผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่าและระยะสุกแก่	140
22	ปริมาณน้ำตาลและไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์ของ IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่า แป้งข้าวระยะสุกแก่ และ IMOs เจริญการค้า	141
ข.1	การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol sulfuric	174

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของเดกซ์ทรินซ์	8
2	ชื่อสามัญและโครงสร้างทางเคมีของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์	11
3	กระบวนการ liquefaction และ saccharification ของแป้ง	14
4	กลไกการเกิดทรานกลูโคซิเลชัน (Transglucosylation) ของเอนไซม์ glucosidases	16
5	ขั้นตอนการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในเชิงพาณิชย์	18
6	การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์โดยตรง	19
7	การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้จุลินทรีย์	21
8	การเพิ่มผลผลิตของการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้จุลินทรีย์	22
9	ระยะการสร้างเมล็ดข้าว	30
10	โครงสร้างของเมล็ดข้าว	33
11	โครงสร้างของสตาร์ช	34
12	โครงสร้าง Amylose	35
13	โครงสร้าง Amylopectin	36
14	โครงสร้างอะไมโลสและอะไมโอเพกติน	36
15	การเกิดเจลตาในเซชันของเม็ดแป้ง	38
16	การเกิดเจลและเกิดรีโทรกราเดชันของอะไมโลส	39
17	กราฟ Thermogram แสดงการเกิดเจลตาในเซชันของสตาร์ชข้าวระยะเม่า วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Differential scanning calorimetry (DSC)	39
18	กราฟ Thermogram แสดงการเกิดเจลตาในเซชันของสตาร์ชข้าวระยะแก่ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Differential scanning calorimetry (DSC)	40
19	พฤติกรรมความหนืดของสตาร์ชข้าวระยะเม่าและระยะแก่ วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Rapid Visco Analyzer (RVA)	42
20	สปอร์ของเชื้อรา <i>A. oryzae</i> TISTR 3102 ที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA)	53
21	สปอร์ของเชื้อรา <i>A. niger</i> TISTR 3012 ที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA)	53
22	ลักษณะปรากฏข้าวเปลือกระยะเม่า	54
23	ลักษณะปรากฏข้าวเปลือกระยะเม่าดิบ	55

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
24	ลักษณะปรากฏข้าวเปลือกกระยะสุกแก่	55
25	อาหารแข็งที่ใช้สำหรับเตรียมโคจิ	56
26	การเตรียมก้อนเชื้อโคจิจากรา <i>A. oryzae</i> และรา <i>A. niger</i>	57
27	ขั้นตอนการหมักอาหารแข็งจากข้าวระยะเม่าด้วยด้วยสปอร์เชื้อรา	58
28	ขั้นตอนย่อยแป้งด้วยเอนไซม์เบต้าอะไมเลส	61
29	ขั้นตอนการเติมเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส	63
30	ขั้นตอนการหมักแป้งข้าวด้วยด้วยสปอร์ของเชื้อรา	65
31	ขั้นตอนการหมักแป้งข้าวด้วยด้วยสปอร์ของเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในระดับกำลังการผลิต 2 กิโลกรัม	61
32	การกรองตัวอย่างน้ำเชื่อมที่ได้จากข้าวระยะเม่าด้วยถ่านกัมมันต์ (activated carbon)	68
33	เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray dryer) ที่ใช้ในการทำแห้งน้ำเชื่อมจากแป้งข้าว	69
34	Thermogram ของการวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของแป้งข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ระยะต่าง ๆ ด้วยเครื่องวัดสมบัติทางความร้อน (Differential Scanning Calorimetry: DSC)	77
35	Thermogram การวิเคราะห์โครงสร้างผลึกของแป้งข้าวพันธุ์ กข6 ระยะต่าง ๆ ด้วยเทคนิคการหักเหรังสีเอ็กซ์เรย์ (X-ray diffraction: XRD)	80
36	ลักษณะและรูปร่างของเม็ดแป้งข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ระยะต่าง ๆ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์	84
37	ก้อนเชื้อโคจิจากรา <i>A. oryzae</i> และรา <i>A. niger</i>	86
38	การเปลี่ยนแปลงปริมาตรและคุณสมบัติทางเคมีของน้ำเชื่อมแป้งข้าวระยะเม่าใน ระหว่างการหมักแบบของแข็ง โดยสปอร์ของเชื้อรา <i>A. oryzae</i> และ <i>A. niger</i>	88
39	การเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม่าในระหว่างการหมัก แบบ solid state โดยใช้สปอร์จากเชื้อรา <i>A. oryzae</i> และ <i>A. niger</i>	90
40	น้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม่าในระหว่างการหมักแบบของแข็งโดยใช้สปอร์ของเชื้อรา <i>A. oryzae</i> และ <i>A. niger</i>	90
41	Chromatogram ของสารมาตรฐานฟรุคโตสที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของ เหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC)	91

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
42	Chromatogram ของสารมาตรฐานกลูโคส มอลโตส และไอโซมอลโตสที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC)	92
43	Chromatogram สารมาตรฐานของมอลโทไตรโอส ไอโซมอลโทไตรโอส พาโนส และไอโซพาโนส ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC)	92
44	Chromatogram ของการวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์จากน้ำเชื่อมที่ใช้แป้งข้าวที่ผ่านหมักด้วยราโดยใช้สปอร์เชื้อ <i>A. oryzae</i> และ <i>A. niger</i> ในระหว่างการหมักแบบของแข็ง	93
45	ชนิดและปริมาณน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่วิเคราะห์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC) จากการหมักแบบของแข็งของสปอร์ของ <i>A. oryzae</i> และ <i>A. niger</i> โดยใช้แป้งข้าวระยะเม่า	95
46	ตัวอย่างน้ำเชื่อมข้าวระยะเม่าและข้าวระยะสุกแก่ระหว่างการหมักด้วยเอนไซม์เบต้าอะไมเลส	97
47	การเปลี่ยนแปลงของปริมาตรและค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม่าและแป้งข้าวระยะสุกแก่หมักด้วยเอนไซม์เบต้าอะไมเลส ความเข้มข้นต่างๆ	98
48	การเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมีของน้ำเชื่อมข้าวระยะเม่าและข้าวระยะสุกแก่ที่หมักด้วยเอนไซม์เบต้าอะไมเลสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	100
49	การเปลี่ยนแปลงร้อยละของแข็งทั้งหมดและค่าสมมูลเดกซ์โทรส (DE) ของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม่าและแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่หมักด้วยเอนไซม์เบต้าอะไมเลส ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	102
50	ปริมาณน้ำตาลในน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม่าและแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่หมักด้วยเอนไซม์เบต้าอะไมเลสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	103
51	ตัวอย่างน้ำเชื่อมที่ได้จากแป้งข้าวระยะเม่าและข้าวระยะสุกแก่ที่หมักด้วยสปอร์ของเชื้อรา <i>A. oryzae</i>	107

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
52	การเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีของน้ำเชื่อมจากกระบวนการหมักจากแป้งข้าว ระยะเฝ้าและแป้งข้าวระยะสุกแก่ ด้วยสปอร์ของ <i>A. oryzae</i> TISTR 3102	108
53	การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและค่าสมมูลมูลเดกซ์ โทรสของน้ำเชื่อมแป้งข้าวระยะเฝ้าและแป้งข้าวระยะสุกแก่ระหว่างการหมักสปอร์ ของเชื้อรา <i>A. oryzae</i> TISTR 3102	110
54	Chromatogram สารมาตรฐานฟรุกโตสที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของ เหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC)	111
55	Chromatogram ของสารมาตรฐานกลูโคส มอลโตส และไอโซมอลโตสที่วิเคราะห์ ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC)	112
56	Chromatogram สารมาตรฐานของมอลโทไตรโอส ไอโซมอลโทไตรโอส พาโนส และไอโซพาโนส ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC)	112
57.	Chromatogram ของการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลและไอโซมอลโตโอลิโกแซ็ก คาร์ไรด์ของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเฝ้าและแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่หมักด้วยสปอร์ ของเชื้อรา <i>A. oryzae</i> ในระหว่างการหมักแบบของแข็ง	113
58.	ปริมาณและชนิดของน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเฝ้า และระยะสุกแก่ภายใต้การหมักแบบของแข็งด้วยสปอร์ของเชื้อรา <i>A. oryzae</i>	115
59.	Chromatogram ของการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลและไอโซมอลโตโอลิโกแซ็ก คาร์ไรด์ของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเฝ้าและข้าวระยะสุกแก่ที่หมักด้วยราโดยใช้ สปอร์ของ <i>A. oryzae</i> จากการขยายกำลังการผลิตเป็น 2 กิโลกรัม	121
60	การกรองตัวอย่างน้ำเชื่อมที่ได้จากข้าวระยะเฝ้าด้วยถ่านกัมมันต์ (activated carbon)	124
61	น้ำเชื่อมที่ได้จากแป้งข้าวระยะเฝ้าและแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่ผ่านการหมักโดย ใช้ยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> ในระดับการผลิต 2 กิโลกรัม	124
62	Chromatogram สารมาตรฐานฟรุกโตสที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของ เหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC)	125

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
63	Chromatogram ของสารมาตรฐานกลูโคส มอลโตส และไอโซมอลโตสที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC)	126
64	Chromatogram สารมาตรฐานของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ประเภทต่าง ๆ ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC)	126
65	Chromatogram ของการวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลและไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม่าและแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่หลังการหมักด้วยยีสต์ <i>S. cerevisiae</i>	127
66	น้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม่าและแป้งข้าวข้าวระยะสุกแก่ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยง (Centifugal)	130
67	ลักษณะปรากฏของผงจากแป้งข้าวระยะเม่า แป้งข้าวระยะสุกแก่และผง IMOs เเชิงการค้า	131
68	Chromatogram สารมาตรฐานฟรุคโตสที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatograph: UHPLC)	136
69.	Chromatogram ของสารมาตรฐานกลูโคส มอลโตส และไอโซมอลโตสที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC)	136
70	Chromatogram สารมาตรฐานของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ประเภทต่าง ๆ ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC)	137
71	Chromatogram ของการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลและไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ของผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่า แป้งข้าวระยะสุกแก่และ IMOs เเชิงการค้า	138
72	คะแนนกิจกรรมฟรีโบไอติกของผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่า แป้งข้าวข้าวระยะสุกแก่เปรียบเทียบกับผง IMOs เเชิงการค้าที่ทดสอบโดยใช้เชื้อ <i>L. acidophilus</i>	143

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสำคัญต่ออาหารเพื่อสุขภาพมากขึ้น โดยเฉพาะในประเด็นของคุณค่าทางอาหารและผลของสารอาหารต่อสุขภาพ ซึ่งเรียกว่าฟังก์ชันนัลฟู้ด (functional food) ซึ่งเป็นประเภทของกลุ่มอาหารที่มีผลต่อการทำหน้าที่ต่าง ๆ ของร่างกายและให้ผลดีต่อสุขภาพ โดยเฉพาะอาหารที่เป็นมิตรต่อลำไส้ ซึ่งคนจำนวนมากเริ่มตระหนักถึงอาหารที่ดีต่อลำไส้ โดยการมีสุขภาพลำไส้ที่ดีส่งผลต่อสุขภาพโดยรวมและจิตใจด้วย (Justin et al., 2018) หนึ่งในฟังก์ชันนัลฟู้ดที่คนปัจจุบันนิยม คือ พรีไบโอติก

พรีไบโอติก (prebiotics) จัดเป็นฟังก์ชันนัลฟู้ดชนิดหนึ่ง ซึ่งไม่สามารถย่อยและดูดซึมที่ลำไส้เล็ก จึงผ่านเข้าสู่ลำไส้ใหญ่โดยไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆ จึงทำให้จุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่นำไปใช้ในกระบวนการหมักแล้วผลิตเป็นกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acid) โดยพรีไบโอติกทำหน้าที่ส่งเสริมและกระตุ้นการเจริญเติบโตที่เฉพาะเจาะจงกับจุลินทรีย์ที่มีผลดีต่อสุขภาพ (probiotic) มีการย่อยสลายในระบบนิเวศน์ เช่น แล็กโทบาซิลลัส (*Lactobacillus*) บิฟิโดแบคทีเรีย (*Bifidobacteria*) และจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ชนิดอื่นๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ โดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะสร้างกรดแล็กติก (*lactic acid*) และไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) ทำให้จุลินทรีย์ที่มีผลเสียต่อสุขภาพลดจำนวนลง ดังนั้นพรีไบโอติกจึงส่งผลดีต่อสุขภาพผู้บริโภค เช่น ช่วยบรรเทาอาการท้องผูก ลดการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร ป้องกันภาวะภูมิไวเกิน ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด และเพิ่มการดูดซึมแคลเซียม และลดความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (สุระกานต์ ฤติกุลธำรง และจารุณี ควรพิบูลย์, 2555)

อาหารที่จัดเป็นพรีไบโอติกมีหลายประเภท เช่น น้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ (sugar and oligosaccharide) น้ำตาลแอลกอฮอล์ (sugar alcohol) หรือ (polyols) แป้งต้านทานการย่อย (resistant starch) พอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ใช่สตาร์ช (non-starch polysaccharides, NSP) อินูลิน (inulin) (Related mucopolysaccharides) โปรตีน (protein) และเปปไทด์ (peptides) และพบว่าหนึ่งในประเภทของพรีไบโอติกที่ได้รับความสนใจ คือ น้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ (sugar and oligosaccharide) ซึ่งเป็นพรีไบโอติกกลุ่มใหญ่ที่สุด จัดเป็น short-chain oligosaccharide ที่เป็น non-digestible oligosaccharide (NDO) ประกอบด้วยน้ำตาลตั้งแต่ 2-20 หน่วย ตัวอย่าง เช่น

แรฟฟิโนส (raffinose) สแตคีโอส (stachyose) ฟรุคโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (fructo-oligosaccharides: FOS) กาแล็กโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (galacto-oligosaccharides: GOS) มอลโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (malto-oligosaccharides: MOS) ไกซ์โอลิโกแซ็กคาไรด์ (xylo-oligosaccharides: XOS) และ ไอโซมอลโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (isomalto-oligosaccharides: IMOs)

หนึ่งในปัจจัยที่สำคัญในการผลิตพรีไบโอติก คือการเลือกใช้วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต ซึ่งข้าวเป็นวัตถุดิบที่สำคัญ มีการผลิตเป็นอันดับต้น ๆ ของประเทศไทยและสามารถจัดหาได้ง่าย ในประเทศไทยมีข้าวเป็นสินค้าส่งออกเป็นอันดับหนึ่งของประเทศ โดยในปี 2564 มีการส่งออกข้าวมีปริมาณ 2,587,170 ตัน มูลค่า 48,973 ล้านบาท (สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย, 2564) แม้ว่าประเทศไทยจะมีการส่งออกข้าวไปขายต่างประเทศมากมาย แต่ไม่ได้เป็นผู้กำหนดราคา การเปลี่ยนแปลงราคาข้าวเป็นไปตามกลไกการตลาด ดังนั้นราคาข้าวจึงเป็นปัญหาที่ประเทศประสบตลอดมา เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับข้าวจึงมีการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ หนึ่งในผลิตภัณฑ์ในขณะนี้กำลังได้รับความนิยมและมีอัตราการเติบโตที่สูง จึงมีการนำวัตถุดิบจากข้าวมาใช้เป็นส่วนประกอบหลักในเครื่องดื่มร่วมกับการใช้เทคโนโลยีและนวัตกรรม เพื่อผลิตวัตถุดิบจากข้าวมีส่วนประกอบที่มีสมบัติเชิงหน้าที่นั้นแต่ต้องมีการดัดแปรสภาพแป้งในข้าวเพื่อให้มีสมบัติที่ต้องการ

จากการค้นคว้าเอกสารพบว่าการดัดแปรแป้งเพื่อปรับเปลี่ยนโครงสร้างของแป้งให้เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ ให้อยู่ในกลุ่มไอโซมอลโทโอลิโกแซ็กคาไรด์ (IMOs) สามารถช่วยยกระดับคุณค่าและมูลค่าของแป้งข้าวให้สูงขึ้น จากการค้นคว้าเอกสารพบว่า IMOs นำมาใช้เป็นสารเติมแต่งอาหาร (food additive) ที่มีสมบัติเป็น พรีไบโอติก ซึ่งขั้นตอนการผลิตเริ่มจากกระบวนการลิเคอฟแฟกชัน (liquefaction) แซ็กคาริฟิเคชัน (saccharification) และทรานสกลูโคซิเลชัน (transglucosylation) โดยใช้เอนไซม์ในกลุ่ม glucanohydrolase (เพื่อตัดสายพอลิแซ็กคาไรด์ในแป้งให้เป็นน้ำตาล) เพื่อให้ได้น้ำตาลหน่วยย่อย ต่อมาคือการนำน้ำตาลหน่วยย่อยมาต่อกันด้วยเอนไซม์กลุ่ม glucanotransferase โดยเปลี่ยน α -1,4 glycosidic linkage ให้เป็น α -1,6 glycosidic linkage (Van der zala et al., 2018) วัตถุดิบที่ใช้ผลิตมีหลายชนิด เช่น ข้าวอินทรี (Kim et al., 2017) รำข้าว (Pan and Lee, 2004) ข้าวเหนียวผสมรำข้าว (Sawangwan and Saman, 2016a) ข้าวและมันสำปะหลัง (Saman et al., 2016) และข้าวโพด (Niu et al., 2017) นอกจากมีสมบัติที่เป็นพรีไบโอติกแล้ว ยังพบว่า IMOs เป็นสารให้ความหวานที่ให้พลังงานต่ำและไม่มีผลต่ออินซูลินในเลือด สามารถลดการปลดปล่อยน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่กระแสโลหิตทำให้สามารถระดับน้ำตาลไว้ให้คงที่ และช่วยเพิ่มการถ่ายโอนอัลฟาไกลูแคนที่ผ่านการย่อยแล้วไปยังลำไส้ใหญ่ (Sorndech et al., 2018; อ้างอิงจาก Gibson, 2006) และยังพบว่า IMOs ทำให้เกิดความคงตัวระหว่างการแปรรูป ให้ความหวานระดับปานกลาง มีสมบัติในการอุ้มน้ำคงความชื้นในผลิตภัณฑ์อาหาร สามารถลดค่า water activity ในอาหารได้ (Sorndech et al.,

2018; อ้างอิงจาก Gourineni Icoz and Zimmer, 2018) นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่า IMO's มีสมบัติเชิงหน้าที่ในการเป็นสารป้องกันการเปลี่ยนสีในอาหารได้ (anti-fading agent for food pigment) และเป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชันในอาหารได้ (Food Oxidation) (Saman et al., 2012) อย่างไรก็ตามสมบัติเชิงหน้าที่ของ IMO's ขึ้นอยู่กับประเภทของ IMO's ที่ผลิตได้ (Sorndech et al., 2017; อ้างอิง Kaneko et al., 1994; Kaulpiboon et al., 2015; Kobayashi Funane and Oquma, 1995)

จากการค้นคว้าเอกสารวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่าชนิดของ IMO's ที่ผลิตได้จะแตกต่างกันไปขึ้นกับประเภทและโครงสร้างของแป้ง การผลิตโดยทั่วไปจะใช้แป้งที่มีโครงสร้างอะไมโลสและอะไมโลเพคตินที่สมบูรณ์แล้ว หรือแป้งจากพืชที่โตเต็มที่แล้ว (Sorndech et al., 2018) ใช้เทคนิคเอนไซม์หรือเอนไซม์ร่วมกับจุลินทรีย์หรือใช้จุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์ในการย่อยแป้งและเปลี่ยนเป็นโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ (Sorndech et al., 201; Niu et al., 2016; Pan and Lee, 2005; Kim et al., 2017; Saman et al., 2012; Sawangwan and Saman, 2016b) อย่างไรก็ตาม พบว่าการผลิต IMO's จากกระบวนการทางจุลินทรีย์จะเป็นการประหยัดต้นทุนในการผลิตมากกว่าการใช้เอนไซม์โดยตรง (Sorndech et al., 2018) ปริมาณผลผลิตที่ได้จะสูงกว่า และมีความบริสุทธิ์มากขึ้น แต่ระยะเวลาในการผลิตอาจใช้เวลานานกว่าการใช้เอนไซม์โดยตรง ดังนั้นการใช้แป้งข้าวระยะอ่อนที่โครงสร้างของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินยังไม่สมบูรณ์ อาจทำให้เอนไซม์ที่สร้างมาจากจุลินทรีย์เข้าไปย่อยพันธะของแป้งง่ายขึ้น

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีการทดลองเปรียบเทียบการใช้ข้าวระยะต่าง ๆ เพื่อนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิต IMO's ซึ่งยังไม่มีการศึกษามาก่อน แต่จากการศึกษาของวัชรเกียรติ อินธิเดช (2559) พบว่าค่าพลังงานในการเกิดเจลละตินเซชัน (Enthalpy, J/g) ของแป้งข้าวระยะเมามีค่าต่ำกว่าระยะแก่ อาจเป็นเพราะลักษณะโครงสร้างของอะไมโลสหรือกิ่งก้านของอะไมโลเพคตินในแป้งข้าวระยะเม่าอาจจะยังไม่สมบูรณ์ และจากการศึกษาพฤติกรรมด้านความหนืดของแป้งข้าวเหนียวระยะเม่า และระยะแก่ สายพันธุ์หลิ้นก พบว่าแป้งข้าวระยะเม่ามี peak viscosity สูงกว่าแป้งระยะแก่ เนื่องจากจากแป้งข้าวระยะเม่ามีโครงสร้างอะไมโลสสายสั้น เมื่อได้รับความร้อนในการเกิดเจลจึงสามารถทำให้โมเลกุลเกิดการเคลื่อนที่ได้ดีกว่าแป้งข้าวระยะแก่ นอกจากนี้ยังมีการนำผลิตภัณฑ์ IMO's ที่ผ่านกระบวนการผลิตในรูปของไซรัปมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์พร้อมดื่มอยู่ในรูปผงพร้อมชงดื่ม เพื่อให้สามารถละลายน้ำได้ง่ายขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ในการย่อยแป้งที่ดีที่สุด

1.2.2 เพื่อคัดเลือกกระยะข้าวเหนียวเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในการสังเคราะห์ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ (Isomalto oligosaccharides) สูงที่สุด

1.2.3 เพื่อผลิต IMOs ในรูปเป็นผง

1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

1.3.1 ในแป้งข้าวเหนียว 2 ระยะ มีความสมบูรณ์ของโครงสร้างอะไมโลสและอะไมเพกตินแตกต่างกัน ซึ่งน่าจะมีผลต่อความสามารถในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ และได้ชนิดของ IMOs และปริมาณที่แตกต่างกัน

1.3.2 ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ที่ได้จากแป้งข้าวเหนียว 2 ระยะ คือ ข้าวเหนียวระยะเม่าและข้าวเหนียวระยะแก่จะเป็น IMOs ที่มี degree of polymerization ระหว่าง 4-6 ($DP = 4-10$)

1.3.3 การเลือกใช้จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เพื่อย่อยแป้งให้เป็นไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ โดยวิธีการเตรียมตัวอย่างที่ไม่ซับซ้อน เพื่อช่วยลดต้นทุนในการผลิตมากกว่าการใช้เอนไซม์โดยตรง

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

1.4.1 ใช้ข้าวเหนียว 2 ระยะ คือ ข้าวเหนียวระยะเม่าและระยะแก่ พันธุ์ กข6 เป็นวัตถุดิบในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์

1.4.2 ใช้จุลินทรีย์ในการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งสำหรับนำไปผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์

1.4.3 ผลิตเครื่องดื่มโดยใช้ไซรัป IMOs ที่ผลิตได้ ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของเครื่องดื่มอยู่ในรูปผง ที่มีสมบัติเชิงหน้าที่ ที่ใช้งานสะดวกและละลายในน้ำได้ดี

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 สามารถลดต้นทุนในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ โดยใช้จุลินทรีย์ในการผลิตแทนการใช้เอนไซม์โดยตรง

1.5.2 สามารถผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ (Isomalto-oligosaccharides) จากข้าวเหนียว เพื่อลดการนำเข้าไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ (Isomalto-oligosaccharides) จากต่างประเทศ

1.5.3 สามารถผลิตเครื่องดื่มที่มีสมบัติเป็นพรีไบโอติกได้

1.5.4 สามารถเพิ่มมูลค่าของข้าวเหนียวได้

1.6 ความหมายหรือนิยามศัพท์เฉพาะ

1.6.1 ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Isomaltooligosaccharides, IMO) คือ เป็นผลผลิตจากการใช้เทคโนโลยีเอนไซม์เพื่อเปลี่ยนแป้งเป็นหน่วยกลูโคสย่อยในกลุ่มมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharide) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -1,2, α -1,3 α -1,4 และ α -1,6 glucosidic bonds ได้แก่ ชนิดที่มี degree of polymerization (DP2) น้ำตาลไอโซมอลโตส (isomaltose) และชนิดที่มี (DP $\geq$ 3) พาโนส (panose) ไอโซมอลโตไตรโอส (isomaltotriose) และไนเจอโรส (nigerose) โคจิไบโอส (kajibiose) long chain IMOs และ cycle- IMOs เป็นต้น

1.6.2 ข้าวระยะเმა คือ ข้าวที่มีระยะเป็นไต หรือเป็นโด (dough stage) ใช้เวลาประมาณ 14-21 วัน หลังผสมเกสร เปลือกใหญ่และเปลือกเล็กเริ่มแข็ง สีเขียวอมน้ำตาล เนื้อในเมล็ดซึ่งเป็นน้ำนมจะมีน้ำน้อยลง เหนียวและแข็งขึ้น

1.6.3 ข้าวระยะสุกแก่ คือ หรือระยะเก็บเกี่ยว (maturation stage) ใช้เวลาประมาณ 30 วัน หลังผสมเกสร เมล็ดจะมีโครงสร้างสมบูรณ์เต็มที่ ทั้งขนาดความแข็งของเปลือก และสีเปลือกที่สุกเต็มที่ที่จะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลทองเป็นส่วนใหญ่ อาจมีน้ำตาลเข้ม น้ำตาลม่วง หรือน้ำตาลดำ ขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าว ส่วนเนื้อของเมล็ดจะมีสีขาว

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) (รัชฎา แก่นสาร, 2544)

คาร์โบไฮเดรตเป็นสารชีวโมเลกุลที่จัดเป็นสารประกอบอินทรีย์ เป็นแหล่งของพลังงานที่สำคัญสำหรับสิ่งมีชีวิตในพืชและสัตว์ทั่วไป ในพืชมีคาร์โบไฮเดรตกลุ่มใหญ่ ๆ เช่น แป้ง เป็นอาหารที่สะสมไว้ตามส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ราก หัว ใบ หรือ เซลลูโลส ช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้กับพืช เช่น ลำต้น หรือ ส่วนอื่น ๆ นอกจากนี้คาร์โบไฮเดรตยังรวมอยู่ร่วมกับสารอื่น ๆ ในพืช วิตามินซีในพืชก็มาจากสารพวกคาร์โบไฮเดรต สารปฏิชีวนะก็มีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบเช่นกัน

คาร์โบไฮเดรตประกอบด้วยธาตุที่สำคัญ 3 ธาตุ คือ C H และ O และมีคุณสมบัติทางเคมีอนุพันธ์ (derivative) ของแอลดีไฮด์ หรือ คีโตน ของแอลกอฮอล์ที่มีหมู่ $-OH$ (hydroxyl group) มากกว่า 1 หมู่ เรียกว่า polyhydroxy aldehyde หรือ polyhydroxy ketone โดยมีสูตรโครงสร้างหลักทั่วไปดังนี้ คือ $(CH_2O)_n$ เมื่อ n เป็นตัวเลขแสดงจำนวนอะตอมของธาตุคาร์บอน

2.1.1 ประเภทของคาร์โบไฮเดรต

คาร์โบไฮเดรตที่มีอยู่ทั้งหมดอาจจำแนกตามสารที่เป็นองค์ประกอบได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ simple carbohydrate หมายถึง คาร์โบไฮเดรตที่ไม่มีสารชนิดอื่นประกอบอยู่ในโมเลกุลด้วย และ complex carbohydrate หมายถึง คาร์โบไฮเดรตที่มีสารชนิดอื่นซึ่งอาจจะเป็นโปรตีน ไขมัน หรือ กรดนิวคลีอิกอยู่ในโมเลกุล

2.1.1.1 คาร์โบไฮเดรตอย่างง่าย (simple carbohydrate) จำแนกออกได้เป็น

1) มอโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharides)

มอโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharides) คือ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเป็นหน่วยที่เล็กที่สุดของคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ได้เป็นอิสระในธรรมชาติ มีหมู่แอลดีไฮด์หรือหมู่คีโตนเพียงหมู่เดียว และหมู่ไฮดรอกซีอย่างน้อยที่สุด 2 หมู่ มีสูตรโครงสร้างพื้นฐาน (empirical formula) คือ $(CH_2O)_n$ เมื่อ $n=3$ ขึ้นไป ทำให้แบ่งมอโนแซ็กคาไรด์ ออกได้ตามจำนวนของคาร์บอนในโมเลกุล ที่พบตามธรรมชาติมีคาร์บอน 3-7 อะตอม นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งชนิดของมอโนแซ็กคาไรด์ตามหมู่ฟังก์ชันัลของน้ำตาล ถ้าเป็น Aldehyde เรียก aldose sugar ถ้าเป็น ketone เรียก ketose sugar (รัชฎา แก่นสาร; 2544; อ้างอิงจาก ธาดา สืบหลินวงศ์ และคณะ, 2537: 6) มอโนแซ็กคาไรด์มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี ส่วนใหญ่มีรสหวาน เช่น โรโบส กลูโคส ฟรุคโตส เป็นต้น

2) โอลิโกแซ็กคาไรด์ (Oligosaccharides)

โอลิโกแซ็กคาไรด์ (Oligosaccharides) เกิดจากโมโนแซ็กคาไรด์ตั้งแต่ 2-6 โมเลกุลขึ้นไปมาต่อกันด้วยพันธะโควาเลนต์ โอลิโกแซ็กคาไรด์ที่พบในธรรมชาติ คือ ไดแซ็กคาไรด์ (Disaccharides) ซึ่งประกอบไปด้วยโมโนแซ็กคาไรด์ 2 โมเลกุลที่อาจจะเหมือนกันหรือไม่ก็ได้ เช่น มอลโตส (maltose) เกิดจากโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสจับกับน้ำตาลกลูโคส ซูโครส (sucrose) เกิดจากโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสจับกับฟรุคโตส แลคโตส (lactose) เกิดจากโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสจับกับน้ำตาลกาแล็คโตส

คุณสมบัติของคาร์โบไฮเดรตพวกโอลิโกแซ็กคาไรด์ส่วนใหญ่พิจารณาจากน้ำตาลพวกไดแซ็กคาไรด์ 2 โมเลกุลมาต่อกันด้วยพันธะเคมีที่เรียกว่า (glycosidic linkage) มีอะตอมของออกซิเจนเป็นตัวเชื่อมโยงโมเลกุลของทั้งสองเข้าด้วยกัน (ในลักษณะที่เรียกว่า oxygen bridge) ทำให้โมเลกุลของไดแซ็กคาไรด์มีคุณสมบัติแตกต่างกัน แบ่งออกได้เป็น

2.1) Reducing disaccharides หรือ reducing sugar คุณสมบัตินี้เกิดจากการจับเกาะกันของ -OH ของ anomeric carbon ของโมโนแซ็กคาไรด์ตัวหนึ่งกับหมู่ฮดรอกซิลของคาร์บอนอะตอมอื่นที่ไม่ใช่ anomeric carbon ของโมโนแซ็กคาไรด์อีกตัวหนึ่ง ทำให้มี reducing group อิสระเหลืออยู่

2.2) Non-reducing disaccharides หรือ Non-reducing sugar คุณสมบัตินี้เกิดจากการจับเกาะกันของ -OH ของ anomeric carbon ในโมโนแซ็กคาไรด์ทั้ง 2 โมเลกุล ทำให้ไม่มีหมู่รีดิวซ์อิสระเหลืออยู่

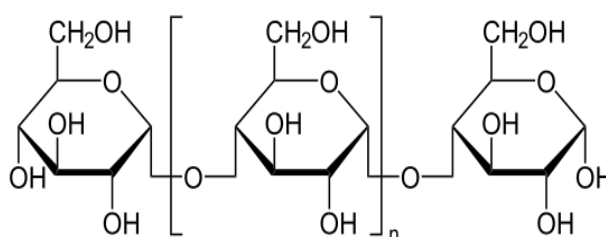
3) พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide)

พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) เป็นคาร์โบไฮเดรตขนาดโมเลกุลใหญ่ ประกอบด้วยโมโนแซ็กคาไรด์ตั้งแต่ 6 โมเลกุลขึ้นไปมาต่อกันด้วย glucosidic linkage มีมวลโมเลกุลสูงประมาณ 25,000-15,000,000 ดาลตัน พบมากที่สุดในธรรมชาติ เป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเนื้อเยื่อหลายชนิดของพืชและสัตว์ พอลิแซ็กคาไรด์มีโครงสร้างเป็นชนิดโฮโมพอลิเมอร์ (homopolymers) เมื่อถูกย่อยสลายจะได้โมโนแซ็กคาไรด์เพียงชนิดเดียว คือ กลูโคส จัดเป็นอนรีดิวิชันคาร์โบไฮเดรตที่ไม่มีรสหวานและไม่เกิดมิวตาโรเตชัน (Mutarotation) พอลิแซ็กคาไรด์จัดแบ่งตามหน้าที่ได้เป็น 2 พวกใหญ่ ดังนี้

3.1) Storage polysaccharides ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมอาหารแบ่งออกเป็น

3.1.1) แป้ง (Starch) เป็นแหล่งสะสมอาหารที่สำคัญของพืช ประกอบด้วยหน่วยย่อยที่เป็นกลูโคสทั้งหมด (homopolysaccharides) โมเลกุลของแป้งประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ 2 ชนิดปนกันอยู่ คือ อะไมโลส (amylose) เป็นกลูโคสพอลิเมอร์ที่ต่อกันเป็นแบบ

เส้นตรงมีประมาณร้อยละ 15-20 มีกลูโคสอยู่ประมาณ 250-300 โมเลกุลที่ต่อกันด้วย α 1,4-glycosidic linkage เป็นเส้นตรง (straight chain) ที่มีโครงสร้างขดเป็นเกลียว (helical structure) เป็นส่วนที่ละลายน้ำได้ดี และอีกส่วนเป็นอะไมโลเพกติน (amylopectin) เป็นส่วนที่ไม่ละลายน้ำ ประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 1,000 โมเลกุลที่ต่อกันด้วย α 1,4-glycosidic linkage ในส่วนที่เป็นเส้นตรง และมีแขนง branching ที่ต่อกันด้วย α 1,6-glycosidic linkage มีอยู่ประมาณร้อยละ 80-85 แบ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ถูกย่อยโดยวิธีไฮโดรลิซิสจะแตกออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ที่เรียกว่า เดกซ์ทรินส์ (dextrins) และเมื่อไฮโดรไลส์ต่อไปอีกจะได้มอลโตส และกลูโคสเป็นอันดับสุดท้าย



ภาพที่ 1 โครงสร้างของเดกซ์ทรินส์

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Stephen and Phillips (2016)

3.1.2) ไกลโคเจน (glycogen) เป็นแหล่งสะสมอาหารในสัตว์พบในสัตว์และกล้ามเนื้อมีโครงสร้างคล้ายอะไมโลเพกตินในแป้งแต่มีการแตกแขนง (α -1,6 glycosidic linkage) มากกว่าคือทุก 8-10 โมเลกุลของกลูโคสที่ต่อกันเป็นเส้นตรง (α -1,4 glycosidic linkage) เมื่อคนกินคาร์โบไฮเดรตเข้าไปกลูโคสที่ได้จากการย่อยบางส่วนจะถูกให้เปลี่ยนเป็นไกลโคเจน โดยกระบวนการไกลโคเจนิซิส (glycogenesis) แต่เมื่อระดับของกลูโคสในเลือดลดลง ไกลโคเจนจะถูกไฮโดรไลซ์กลับมาเป็นกลูโคสโดยการบวนการ ไกลโคไลซิส (glycogenolysis) ซึ่งร่างกายนำไปใช้ได้

3.2) โครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ ทำหน้าที่เป็นส่วนประกอบทางโครงสร้างของเซลล์และเนื้อเยื่อต่าง ๆ ที่สำคัญ ได้แก่

3.2.1) อินูลิน (Inulin) เป็นโพลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของฟรุกโตสต่อกันด้วย (α -1,2 glycosidic linkage) พบในหัวและรากของพืช ได้แก่ หัวปลีพลิงหรือเหง้ารักเร่ หัวหอม หัวกระเทียม

3.2.2) เซลลูโลส (Cellulose) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์พืชที่ประกอบด้วยเซลล์ลูโลสประมาณร้อยละ 50 เซลลูโลสเป็นส่วนที่สร้างความแข็งแรงให้แก่พืชและไม่ละลายน้ำเนื่องจากประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสต่อกันโดยเบต้า 1-4 ไกลโคซิดิก เป็น

เส้นตรงไม่มีแขนง เรียงตัวขนานกันอย่างมีระเบียบ โดยระหว่างแต่ละสายจะยึดกันด้วยพันธะไฮโดรเจน

3.2.3) ไคติน (chitin) เป็นโพลิเมอร์เชิงเส้นของ N-acetyl-D-glucosamine ที่ต่อกันด้วย β -1,4 glycosidic linkage ต่อเนื่องเรียงกันเป็นเส้นขนานเช่นเดียวกับเซลลูโลส เป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่ทำให้ความแข็งแรงในเขาสัตว์ ผนังเซลล์ของเปลือกกุ้ง ปู หอย และแมลง ไคตินไม่ละลายน้ำ เมื่อทำการไฮโดรไลซ์อย่างสมบูรณ์จะได้กลูโคซามีน (glucosamine) และกรดอะซิติก

3.2.4) กรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid) เป็นเฮเทอโรโพลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วย D-glucuronic acid และ N-acetyl-D-glucosamine สลับกัน พบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ได้แก่ น้ำวุ้นและน้ำหล่อตา (vitreous fluid และ aqueous humor) น้ำไขข้อ (synovial fluid) และเป็นองค์ประกอบเนื้อเยื่อของข้อต่อทั้งหลาย

3.2.5) คอนดรอยติน (Chondroitin) เป็นเฮเทอโรโพลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วย glucuronic acid และ N-acetylgalactosamine พบมากในกระดูกอ่อน (cartilage) และเป็นองค์ประกอบของกระจกตา (cornea)

3.2.6) เฮปาริน (Heparin) เป็นสารสำคัญที่ทำหน้าที่ป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulation) และเป็นโพลิแซ็กคาไรด์ในน้ำนมของร่างกาย ถูกสร้างขึ้นโดย mast cell (จัดเป็นเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดหนึ่ง) ซึ่งประกอบด้วยอนุพันธ์ของซัลเฟต (sulfate derivatives) ของ และ N-acetyl-D-glucosamine และ D-iduronate

3.2.7) เดอร์มาแทน ซัลเฟต (Dermatan sulfate glucosamine และ D-iduronate) เป็นโพลิแซ็กคาไรด์ ประกอบด้วย D-iduronate และ N-acetylgalactosamine-4-sulfate พบมากในผิวหนังมนุษย์

3.2.8) เพคติน (Pectin) เป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์พืช เป็นแขนงของโพลิแซ็กคาไรด์ (branched polysaccharides) และเป็นเฮเทอโรโพลิแซ็กคาไรด์ จัดเป็นสารเชิงซ้อน (complex compound) ที่มีโครงสร้างใหญ่มาก ประกอบด้วย glucuronic acid, rhamnose, glucose, galactose, fructose, xylose และ arabinose

2.1.1.2 คาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน (Complex carbohydrate) เป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีสารชนิดอื่นอยู่ในโมเลกุลอาจจะเป็นโปรตีน ไขมันหรือกรดคลอริกได้แก่

1) ไกลโคโปรตีน (Glycoprotein)

เป็นสารประกอบระหว่างโพลิแซ็กคาไรด์และโปรตีน ตัวอย่างไกลโคโปรตีนที่สำคัญได้แก่ สารหมู่เลือด (blood group substance) บนเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงซึ่งเรียกว่า glycophorin เช่น ไฟบริโนเจน (fibrinogen) อิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin) ฮอร์โมน

บางชนิด เช่น ฮอร์โมนกระตุ้นต่อมไทรอยด์ ฮอร์โมนกระตุ้นฟอลลิเคิล เอนไซม์บางตัว เช่น ไรโบนิวคลีเอส บี, เป็ปซิน และเบต้ากลูโคซิเดส เป็นต้น

2) ไกลโคลิพิด (Glycolipid)

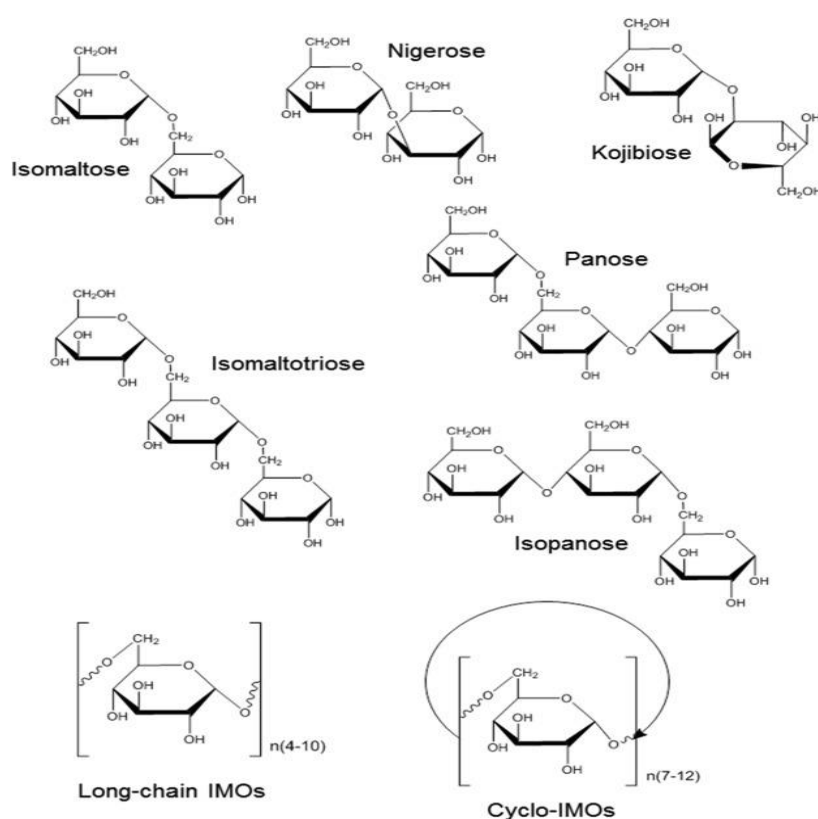
เป็นสารประกอบระหว่างพอลิแซ็กคาไรด์ และลิพิด เป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีสถานะขั้วเป็นโพลาร์ ส่วนที่เป็นลิพิดเป็นกรดไขมันสองตัวและกลีเซอรอล หรือแอลกอฮอล์ที่คล้ายกัน ไกลโคลิพิดที่สำคัญที่สุดได้แก่ โมโนกาแลคโตซิลไดอะซิลไกลเซอรอล (monogalactosyl diacylglycerol) พบในพืชและจุลินทรีย์ อีกชนิดหนึ่ง คือ เซเรโบไซด์ (cereboside) พบในเยื่อหุ้มเซลล์ของสมองและระบบเส้นประสาท โดยเฉพาะอย่างยิ่งแผ่นเยื่อไมอีลิน (myelin sheath) ทั้งสองชนิดนี้มีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นส่วนของคาร์โบไฮเดรต และอีกชนิดหนึ่งคือแองกริโอไซด์ (ganglioside) ซึ่งมีคาร์โบไฮเดรตมากกว่า 1 หน่วย และมีอนุพันธ์มากกว่าคาร์โบไฮเดรตที่มีกรดอะมิโนอยู่ด้วย เช่น N-acetyl glucosamine และ N-acetylneuraminic acid มักจะพบอยู่บนผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์ประสาท

2.2 ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Isomalto-oligosaccharides: IMOs)

ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีหน่วยย่อยเป็นน้ำตาลกลูโคสต่อกันด้วยพันธะแอลฟา -ดี- 1,6 กลูโคซิดิก (α -D-1,6 glucosidic linkages) ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถสังเคราะห์ได้ด้วยเอนไซม์ทรานสกลูโคซิเดส (Transglucosidase) ที่มีการต่อพันธะแบบจำเพาะเจาะจง ชนิดของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ประกอบด้วย น้ำตาลไอโซมอลโตส (Isomaltose) พาโนส (Panose) ไอโซมอลโตไตรโอส (Isomaltotriose) และไนเจอโรส (Nigerose) โคจิโรโบส (Kojibiose) และโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะเป็นกิ่งก้านชนิดอื่น ๆ

ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นผลผลิตจากการใช้เทคโนโลยีเอนไซม์เพื่อเปลี่ยนแป้งเป็นหน่วยกลูโคสย่อยในกลุ่มโอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharide) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -1,2, α -1,3 α -1,4 และ α -1,6 glucosidic bonds ได้แก่ ชนิดที่มี degree of polymerization เท่ากับ 2 (DP2) ได้แก่ น้ำตาลไอโซมอลโตสและชนิดที่มี degree of polymerization มากกว่า 3 ขึ้นไป (DP $\geq$ 3) ได้แก่ พาโนส ไอโซมอลโตไตรโอส ไนเจอโรส และโคจิโรโบส นอกจากนี้ ยังพบไอโซมอลโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลกลูโคสในรูปสายโซ่ยาว ซึ่งเรียกว่า long chain IMOs มี degree of polymerization มี (DP4-10) และแบบวงกลม cycle- IMOs ที่พบว่ามี degree of polymerization เท่ากับ (DP7-12) สำหรับโครงสร้างทางเคมีและชื่อสามัญของ IMOs จะแสดงในภาพที่ 2 ได้แก่ ไอโซมอลโตส พาโนส ไอโซมอลโตไตรโอส ไนเจอโรส โคจิโรโบสและโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะ long chain IMOs และ cycle- IMOs

โครงสร้างของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ มี DP ในช่วง 2-10 และมีการต่อพันธะในรูปแบบ (α , 1-2, 3, 4 หรือ 6) มีสัดส่วนตำแหน่งของพันธะที่จำเพาะ โดยไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่พบส่วนใหญ่ คือ isomaltose [α -DGlc p (1,6) α - DGlc p], panose [α -DGlc p (1,6) α - DGlc p (1,4)-D-Glc p], isomaltotriose [α -DGlc p (1,6) α - DGlc p (1,6)-D-Glc p], kojibiose [α -DGlc p (1,2) α - DGlc p], nigerose [α -DGlc p (1,3) α - DGlc p], Glc-maltotriose [α -DGlc p (1,6) α - DGlc p (1,4))2-D-Glc p], Glc-panose [α -DGlc p (1,6) α - DGlc p (1,6)-D-Glc p- α - DGlc p (1,4)-D-Glc p] และ isomaltotetraose [α -DGlc p (1,6) α - DGlc p (1,6))2-D-Glc p] ดังแสดงใน (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ชื่อสามัญและโครงสร้างทางเคมีของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์
ที่มา: Sorndech et al. (2018)

การผลิต IMOs ที่มีโครงสร้างและคุณสมบัติต่างกัันนั้น พบว่ามีความต้องการสูงในอุตสาหกรรมการดัดแปรแป้งและส่วนผสมอาหารที่มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ ซึ่งโครงสร้างที่แตกต่างกันของ IMOs มีการนำไปใช้ที่แตกต่างกันไปตามคุณสมบัติ เช่น การละลาย การให้ค่าระดับความหวาน ความหนืด และสมบัติการเป็นพรีไบโอติก เป็นต้น ซึ่งสามารถแยกชนิดของ IMOs ได้ออกเป็น 2 ชนิด ชนิดแรกคือ IMOs แบบสายสั้น (short chain) ชนิดที่ 2 คือสายยาว (long chain) IMOs ทั้ง 2 ชนิด

โดยรายละเอียดของคุณสมบัติมีความแตกต่างกัน ดังนี้ โดย IMO แบบสายสั้น (short chain) จะมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก แต่จะทนต่อการย่อยได้น้อยกว่า IMO สายยาว (long chain IMOs) สำหรับ IMO สายยาว (long chain IMOs) จะสามารถทนต่อการย่อยได้มากกว่าแบบ IMO แบบสายสั้น (short chain) เนื่องจากจากโครงสร้างมีความซับซ้อนมากกว่า จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ทนต่อการย่อย

2.3 การประยุกต์ใช้ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์

ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์เชิงพาณิชย์ที่มีการจำหน่ายในปัจจุบันผลิตจากเอนไซม์และใช้แปรงเป็นสารตั้งต้นผ่านกระบวนการทรานส์โคซิเลชัน ปัจจุบันก็มีการพัฒนากระบวนการผลิต ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ที่แตกต่างกันมากมายและพบว่ามี การจดสิทธิบัตรในเรื่องวิธีการผลิตเป็นจำนวนมาก ซึ่งมีมากกว่า 700 เรื่องที่มีการจดที่ประเทศสหรัฐอเมริกา (Sorndech et al., 2018) และปัจจุบันมีการขยายกำลังการผลิตในเชิงอุตสาหกรรมแล้ว รวมทั้งพบว่ามี การวางจำหน่ายผลิตภัณฑ์ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ในรูปแบบผงและไซรัป ซึ่งถูกบรรจุไว้ในรายชื่อมาตรฐานความปลอดภัยขององค์การอาหารและยา (GRAS, EFSA, Health Canada Novel Ingredient/Novel Fiber, FSANZ) เพื่อให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลายและแตกต่างกันไปตามวัตถุประสงค์การใช้งาน

ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์เชิงพาณิชย์โดยทั่วไปคือมีความหวานร้อยละ 60 ของน้ำตาลซูโครส (Health Canada Novel Ingredient / Novel Fiber) และระดับความหวานขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของ IMOs โดยเฉพาะอย่างยิ่งไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ที่มีโมเลกุลต่ำ ดังนั้นไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์จึงไม่สามารถแทนที่กลูโคสหรือซูโครสในอัตราส่วนหนึ่งต่อหนึ่งได้ เนื่องจากระดับความหวานต่ำจึงสามารถใช้ ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์เป็นสารทดแทนความหวานได้

ในหลาย ๆ ประเทศไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ถูกจัดเป็นส่วนผสมของอาหารที่มีความปลอดภัย รูปแบบ IMOs ที่ใช้จะเป็นของของเหลวและผงซึ่งเป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวางของลูกค้า และพบว่ามีอาหารหลายประเภทสามารถใช้งาน IMOs ไปเป็นส่วนผสมของอาหารได้ ดังตารางที่ 1 อย่างไรก็ตามต้องมีการควบคุมปริมาณที่ใช้เติมในอาหาร โดยอาหารแต่ละชนิดจะให้ได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน และปริมาณสูงสุดที่แนะนำสำหรับอาหารต่าง ๆ เพื่อป้องกันระบบทางเดินอาหารที่ทำให้ความรู้สึกไม่สบาย โดยเฉพาะการผลิตก๊าซแล้วนำไปสู่อาการท้องอืด (Sorndech et al., 2018; อ้างอิงจาก Roberfroid and Slavin, 2000) ดังแสดงใน (ตารางที่ 1) แสดงปริมาณการใช้ IMOs สูงสุดที่แนะนำในอาหารต่าง ๆ (ข้อมูลจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (FDA, E.U. food Standards Agency (EFSA) และมาตรฐานอาหารแห่งนิวซีแลนด์ของออสเตรเลีย, FSANZ) ได้แก่ เครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์จากธัญพืช ผลิตภัณฑ์ขนมหวาน อาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ สมบูรณ์หรืออาหารเสริม และอาหารอื่น ๆ (European Food Safety Authority (EFSA), (2010);

Health Canada Novel Ingredient/Novel Fiber and Food Standards Australia New Zealand (FSANZ), (2017)

ในประเทศญี่ปุ่นมีการใช้ IMO ในเชิงพาณิชย์ในรูปแบบเป็นสารให้ความหวาน การเติม IMO ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มและผลิตภัณฑ์นมอื่น ๆ หลัก ๆ คือ ใช้เป็นสารทดแทนความหวานที่สามารถปลดปล่อยน้ำตาลได้อย่างช้าและให้การทำงานของระบบประสาทที่เหมาะสม (Singla and Chakkaravarthi, 2017) จึงมีการใช้ประโยชน์จาก IMO สายสั้น (Short-chain IMOs) ในการประยุกต์ใช้ IMO ในอุตสาหกรรมหรือการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มต่าง ๆ เช่น เครื่องดื่มพลังงาน (Energy drink) เครื่องดื่มสำหรับนักกีฬา (Sport drink) หรือเติมลงในน้ำผลไม้ (Fruit juices) แต่ต้องเติมลงในปริมาณที่ควบคุม และการนำไปใช้เป็นสารทดแทนความหวานจากน้ำตาลซูโครส หรือใช้เป็นส่วนผสมเพื่อเพิ่มเยื่อใยที่ละลายน้ำได้และทดแทนการใช้ไขมันและน้ำตาลในผลิตภัณฑ์ซีเรียลและเบเกอรี่ หรือใช้ในผลิตภัณฑ์ลูกอมและช็อคโกแลต (Heine, 2017)

ตารางที่ 1 ปริมาณการใช้ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สูงสุดที่แนะนำในอาหารต่าง ๆ

Food category	Serving size (g or mL)	Maximum use level per serving size (g or mL)
Beverages		
Energy-reduced soft drinks	240 g	15.6 g
Energy drinks	240 g	12.0 g
Sport and isotonic drinks	240 g	15.6 g
Fruit juices	140 g	12.0 g
Processed vegetable and vegetable juices	100 g	12.0 g
Other soft drinks	240 g	12.0 g
Dairy products		
Flavored milk	250 mL	12.0 mL
Flavored soy milk	250 mL	12.0 mL
Active cultured milk or yogurt	175 mL	17.0 mL
Milk based meal replacement	40 g	8.0 g
Sugar confectionary		
Hard candies	10 g	9.7 g
Soft candies/chocolate	30 g	8.2 g
Nutritionally complete and fortified foods		
Meal replacement bars	40 g	8.0 g
Meats and alternates		
Peanut butter	30 mL	3.0 mL
Other foods		
condiments	15 mL	5.0 mL
Toppings	25 mL	10.0 mL

ที่มา: Sorndech et al. (2018)

นอกเหนือจากเหตุผลทางด้านสมบัติเชิงหน้าที่ของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เติมลงในอาหารแล้ว ยังพบว่า IMOs นั้นยังช่วยให้ความคงตัวในระหว่างการแปรรูป โดยมีความหวานระดับปานกลางและมีคุณสมบัติในการอุ้มน้ำเพื่อกักความชื้นในผลิตภัณฑ์อาหาร สามารถลดค่ากิจกรรมของน้ำ (water activity) ในอาหารได้ (Sorndech et al., 2018; อ้างอิงจาก Gourineni et al., 2018) นอกจากนี้ยังมีการรายงานสมบัติเชิงหน้าที่ของ IMOs ในการเป็นสารป้องกันการเปลี่ยนสีในอาหารได้ (anti-fading agent) และเป็นสารต้านการเกิดออกซิเดชันในอาหารได้ (Food Oxidation) (Saman et al., 2012) สำหรับข้อกำหนดในประกาศกระทรวงสาธารณสุข เนื่องจากไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ยังไม่ได้กำหนดในประกาศกระทรวงสาธารณสุข ดังนั้นจึงได้ศึกษาสารที่มีลักษณะใกล้เคียงกับไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ เช่น มอลโตเดกซ์ทริน (ตารางที่ 2) โดยมอลโตเดกซ์ทรินซ์ ทำหน้าที่ คือ สารช่วยทำละลายหรือช่วยพา อิมัลซิไฟเออร์ สารทำให้คงตัว สารให้ความข้นเหนียว และสารเพิ่มปริมาณ ซึ่งพบว่าปริมาณสูงสุดที่อนุญาต (มก./กก.) คือ ใช้ปริมาณที่เหมาะสม

ตารางที่ 2 การควบคุมปริมาณการใช้ของมอลโตเดกซ์ทรินซ์

รหัสของ หมวดอาหาร	หมวดอาหาร	ปริมาณสูงสุดที่ อนุญาต (มก./กก.)	เงื่อนไข	ปีที่รับค่า กำหนด
13.1	ผลิตภัณฑ์สำหรับ ทารกและเด็กเล็ก	ปริมาณที่เหมาะสม		2561
13.2	อาหารเสริมสำหรับ ทารกและเด็กเล็ก	ปริมาณที่เหมาะสม		2561

ที่มา: สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (2559)

2.4 ความสำคัญต่อสุขภาพของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

จากรายงานของ Sorndech et al. (2018) พบว่าไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีโครงสร้างแบบสายสั้น (short-chain IMOs) สามารถลดการปลดปล่อยน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่กระแสโลหิตทำให้สามารถคงระดับน้ำตาลไว้ให้คงที่ และช่วยเพิ่มการถ่ายโอนอัลฟาไกลูแคน (alpha-glucan) ที่ผ่านการย่อยแล้วไปยังลำไส้ใหญ่ และพบว่าโอลิโกแซ็กคาไรด์บางประเภทไม่สามารถถูกย่อยได้โดยเอนไซม์ในกระบวนกรย่อยในร่างกาย เช่น IMOs สายยาว (long-chain IMOs) และ Cyclo-IMOs ดังนั้นจึงสามารถผ่านไปยังลำไส้ใหญ่ได้จึงทำให้จุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่นำไปใช้ในกระบวนการหมักแล้วผลิตเป็นกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acid) ซึ่งถือว่ามีสมบัติเป็น โปรไบโอติก โดยจะกระตุ้นการทำงานและส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โปรไบโอติก (probiotic) เช่น แบคทีเรียในกลุ่มแล็กติกแอซิด

แบคทีเรีย (*lactic acid bacteria*) ได้แก่ แล็กโทบาซิลลัส (*lactobacillus*) และไบฟิโดแบคทีเรีย (*bifidobacteria*) โปรไบโอติกและโปรไบโอติกทำงานร่วมกัน จะเรียกว่า ซินไบโอติก (*synbiotics*) ซึ่งจะเป็นผลดีต่อร่างกายมากช่วยให้ผู้บริโภคมีสุขภาพดีกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ภายในทางเดินอาหารให้เหมาะสม ทำให้โปรไบโอติกมีการย่อยสลายในระบบนิเวศน์จุลินทรีย์ที่มีการแข่งขันกัน ซึ่งมีประโยชน์ต่อสุขภาพ จัดเป็นอาหารในกลุ่มอาหารฟังก์ชัน (*functional food*) (Sorndech et al., 2018; อ้างอิงจาก Yen et al., 2011; Gibson, 2006; Kaneko et al., 1994; Kaulpiboon et al., 2015; Kobayashi, Funane and Oguma, 1995) และจากการศึกษาของ (Kobayashi, Funane, and Oguma, 1995) พบว่า Cyclo-IMOs สามารถนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่สามารถป้องกันฟันผุจากจุลินทรีย์ *Streptococcus* sp. ได้

2.5 กลไกการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

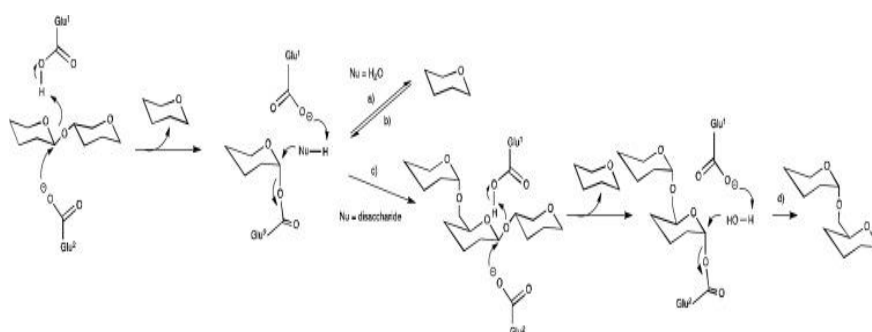
จากการศึกษาพบว่ากลุ่มและประเภทของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จะใช้เอนไซม์ในกลุ่ม *glucanohydrolase* และ *glucanotransferase* ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะมีคุณสมบัติในการย่อยแป้ง กระบวนการผลิต IMOs นี้เริ่มจากกระบวนการ *liquefaction* และ *saccharification* โดยใช้เอนไซม์ในกลุ่ม *glucanohydrolases* เพื่อตัดสายพันธะในกลุ่มกลูแคนให้สั้นลง ดังภาพที่ 3 และใช้เอนไซม์ในกลุ่ม *glucanotransferases* เพื่อเร่งปฏิกิริยาทรานสกลูโคซิเลชัน (*transglucosylation*) เปลี่ยนพันธะ α -(1,4) glycosidic linkage เป็นพันธะ α (1,6) glycosidic linkage (Van der Zala et al., 2018) โดยมีขั้นตอนและกลไก ดังรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.5.1 ลิเคอแฟกชัน (Liquefaction)

การทำน้ำแป้งให้เหลว การย่อยแป้งเป็นน้ำตาลจะนิยมใช้กรดในการย่อย โดยปรับค่าพีเอชเป็น 1.5 ถึง 2.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกร่วมกับการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 140-150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ถึง 8 นาที โดยเรียกขั้นตอนนี้ว่า “thining” หลังจากนั้นจึงลดอุณหภูมิให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว แล้วปรับค่าพีเอชให้เป็นกลางเพื่อทำให้การกรองได้ง่าย แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีสีเข้มและเกิดสารประกอบเฟอร์ฟูรัลดีไฮด์ (*furfuraldehyde*) นอกจากนี้กรดยังทำปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะ ทำให้ได้ผลผลิตน้ำตาลลดลง (กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

ในการทำน้ำแป้งให้เหลว อาจใช้เอนไซม์แอลฟา-แอมิเลส (α -amylase) ร่วมกับการใช้ความร้อนในขั้นตอนเดียว โดยปรับค่าพีเอชน้ำแป้งเป็น 5.8 ถึง 6.2 แล้วจึงเติมเอนไซม์แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 105 ถึง 107 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังทำได้โดยใช้กรดร่วมกับเอนไซม์ โดยปรับค่าพีเอชของน้ำแป้งด้วยกรดให้มีค่าพีเอช 2.0 ถึง 5.0 และให้ความร้อนเป็นเวลา 5 นาที แล้วลดอุณหภูมิลงเหลือ 95-100 องศาเซลเซียส แล้วปรับค่าพีเอชเป็น 5.8 ถึง 6.2 แล้วจึงเติมเอนไซม์ พบว่าการใช้

ไฮโดรไลซิสพันธะ α -D-(1,4) กลูโคซิดิกเดิม โดยเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่ OH ใกล้เคียง สร้างโมเลกุลที่มีสายกิ่งเพิ่มขึ้น โดยสายกิ่งเกิดขึ้นอาจเป็น α -D-(1,2), α -D-(1,3) และ α -D-(1,6) ทำให้ได้โอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เชื่อมด้วยพันธะแอลฟา-ดี-(1,6) (α -D-(1,6)) ได้แก่ ไอโซมอลโตส พาโนส ไอโซมอลโตไตรโอส และเตตระแซ็กคาไรด์ เอนไซม์ (α -glucosidases) เป็นเอนไซม์ที่มีกิจกรรมการย่อยและการย้ายหน่วยน้ำตาลมาต่อกันเพื่อให้ได้พันธะชนิด α -1,6 ราที่ผลิตเอนไซม์นี้ ได้แก่ *Aspergillus niger* และ *aspergillus nidulans*



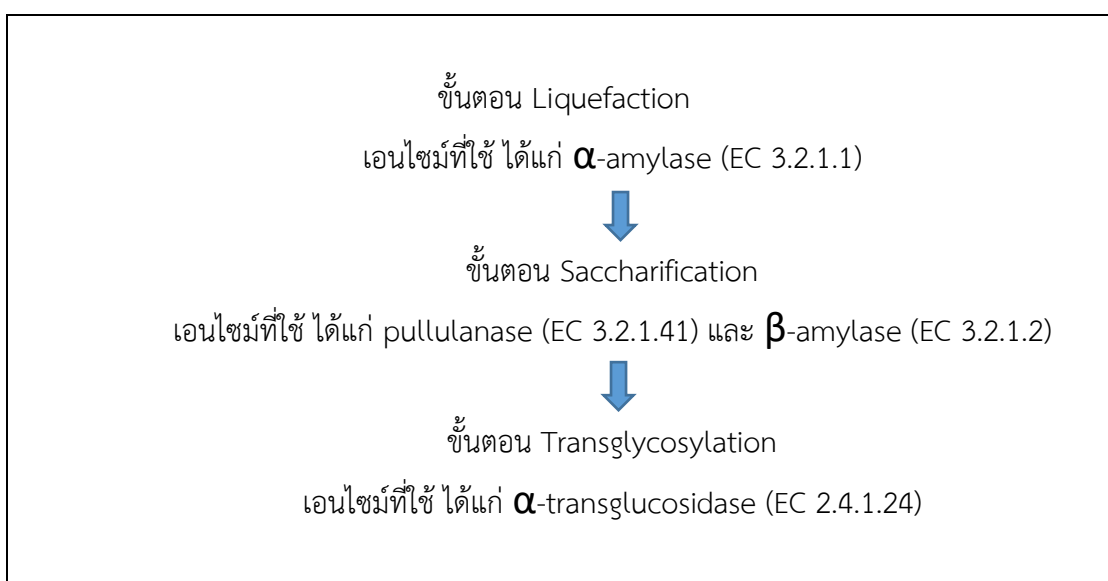
ภาพที่ 4 กลไกการเกิดทรานกลูโคซิเลชัน (Transglucosylation) ของเอนไซม์ glucosidases
ที่มา: Sanchez and Adlercreutz (2015)

2.5.4 เพียวริฟิเคชัน (Purification)

ขั้นตอนนี้เป็นการทำให้ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้มีความความบริสุทธิ์มากขึ้น ซึ่งการทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นนั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น สามารถกรองโดยใช้สารช่วยกรองและผงถ่านพร้อมกันได้ปกติสามารถใช้เครื่องกรอง เช่น filter press หรือ vacuum drum filter ได้ และมีการศึกษาจาก Pan and Lee, (2005) ได้ศึกษาการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากรำข้าวให้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น โดยการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จะใช้เอนไซม์ในการผลิตโดยใช้เอนไซม์กลุ่มกลูโคสไมเลสและเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส (transglucosidas) หลังจากนั้นจะถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์ ด้วยการหมักของเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Saccharomyces carlsbergensis* ซึ่งพบว่า IMOs ที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น เนื่องจากยีสต์ย่อยน้ำตาลกลูโคส มอลโตส และมอลโตไตรโอส เป็นอาหารหรือแหล่งคาร์บอนและผลิตเป็นเอทานอล ดังนั้นจึงทำให้ IMOs ที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น นอกจากนี้ Kim et al. (2017) ได้ผลิต IMOs ในรูปไซรัป โดยใช้ข้าวอินทรีย์ และพบว่าการเติม *Lactobacillus planturum* ในระหว่างกระบวนการหมักจะทำให้ได้ IMOs ไซรัปที่ได้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น เนื่องจากจุลินทรีย์ในกลุ่มแลคโตบาซิลลัสสามารถเปลี่ยนน้ำตาลรีดิคซ์ที่เกิดจากการหมักเป็นกรดแลคติก จึงทำให้ได้ IMOs มีความบริสุทธิ์มากขึ้นหลังกระบวนการหมัก

ยีสต์สปีชีส์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์ที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์เอทานอล และโปรไบโอติก (Capozzi et al., 2015) เนื่องจากมีความปลอดภัย และสามารถเพาะเลี้ยงในระดับขยายขนาดได้ง่าย (Fadel et al., 2017) ยีสต์จะสามารถเจริญได้ดีในสภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างที่ประมาณ 4-5 และอุณหภูมิประมาณ 30-40 องศาเซลเซียส โดยยีสต์ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน เจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำตาลมาก เช่น ผลไม้ ที่มีรสหวาน น้ำผึ้ง แยม (jam) สามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็น คาร์บอนไดออกไซด์และเอทิลแอลกอฮอล์ในกระบวนการหมัก (fermentation)

ไอโซมอลโตอลิโกแซ็กคาร์ไรด์เชิงพาณิชย์ส่วนใหญ่ผลิตจากเอนไซม์กลุ่มลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) ในขั้นตอนเพื่อลดความหนืดของแป้งและเพื่อเป็นการเตรียมสารตั้งต้นให้มีค่า DE ตามที่ต้องการก่อนนำมาผ่านกระบวนการทรานสโกซิเลชัน (transglycosylation) เพื่อสังเคราะห์เป็น IMO's สำหรับกระบวนการโดยทั่วไปของการผลิตไอโซมอลโตอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ในเชิงพาณิชย์ ดังนี้



ภาพที่ 5 แสดงขั้นตอนการผลิตไอโซมอลโตอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ในเชิงพาณิชย์

ที่มา: Pan and Lee (2004)

จากภาพที่ 5 จะเริ่มจากกระบวนการลิโคแพคชัน เพื่อให้แป้งกลายเป็นมอลโตเดกซ์ทรินโดยใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียที่ทนร้อน โดยใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (α -amylase, EC 3.2.1.1) จากนั้นต่อกับกระบวนการแซ็กคาริฟิเคชัน เพื่อสร้างน้ำเชื่อมมอลโตสและมอลโตไตรออส จะใช้เอนไซม์ α -amylase หรือ β -amylase (EC 3.2.1.2) อาจจะมีการใช้

เอนไซม์ pullulanase (EC 3.2.1.41) จากจุลินทรีย์กลุ่มเชื้อรา เพื่อให้ได้น้ำเชื่อมมอลโตสเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 40 ถึง 50 ด้วยการทำให้มอลโตเดกซ์ทรินที่เหลืออยู่มี DP ต่ำ เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในขั้นตอนต่อไป และขั้นตอนสุดท้ายคือกระบวนการทรานกลูโคซิเลชัน จะใช้จุลินทรีย์กลุ่มรา เช่น *Aspergillus niger* ที่สร้างเอนไซม์ α -transglucosidase (EC 2.4.1.24) ใช้สำหรับการสังเคราะห์ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์ หรือใช้เอนไซม์ α -transglucosidase ซึ่งสามารถตัดได้ทั้งพันธะ α ,1-4 และเชื่อมต่อพันธะ α ,1-6 ของโมเลกุลสตาร์ช เป็นเอนไซม์ที่มีกิจกรรมการย่อยและการย้ายหน่วยน้ำตาลมาต่อกันเพื่อให้ได้พันธะชนิด α -1,6 ของโอลิโกแซ็กคารไรด์

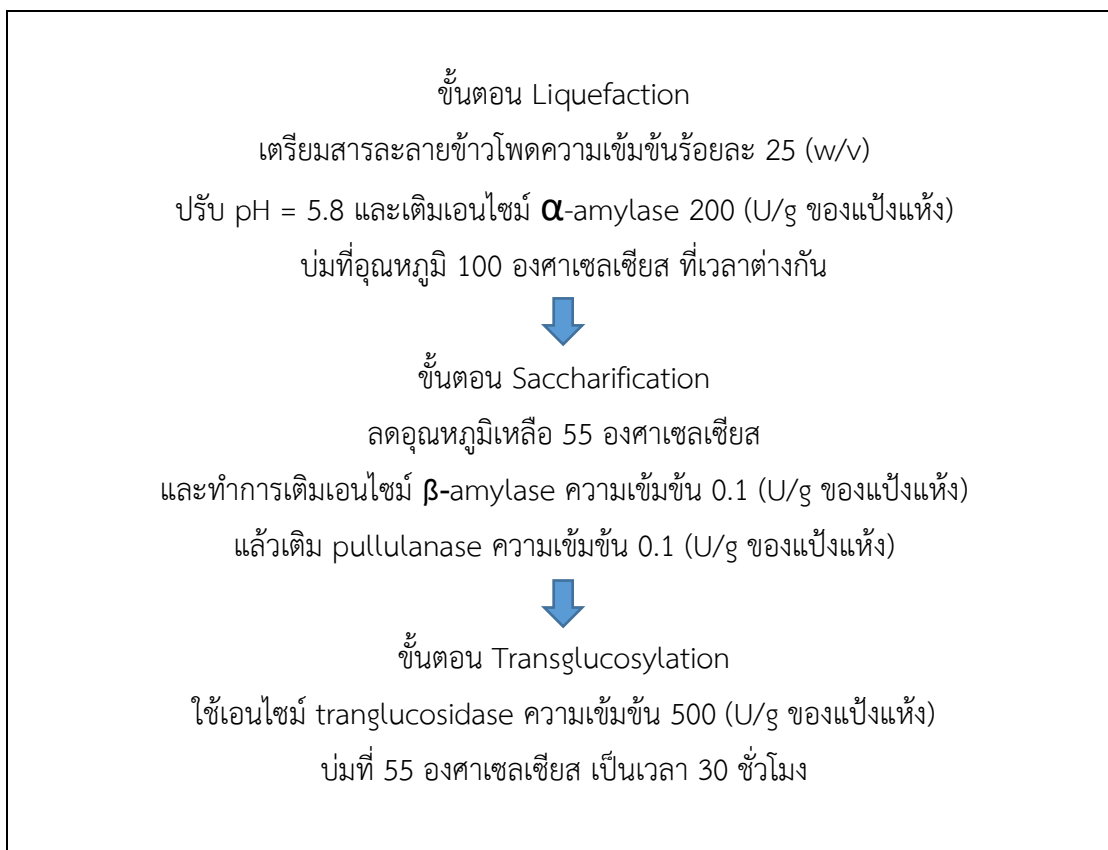
2.6 วิธีการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์

จากการค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่าจะสามารถแบ่งวิธีการผลิต IMO's ได้ออกเป็น 2 กลุ่มวิธี ดังนี้ คือ การใช้เอนไซม์โดยตรงและการใช้จุลินทรีย์ในการผลิต ซึ่งการใช้เอนไซม์โดยตรงในการผลิตจะทำให้ได้ปริมาณของ IMO's ที่สูงกว่าการใช้จุลินทรีย์ในการหมัก แต่จะมีข้อด้อยคือ IMO's ที่ได้จะมีโครงสร้างที่ซับซ้อนน้อยกว่าและทนต่อการย่อยได้น้อยกว่า

2.6.1 การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์โดยใช้เอนไซม์โดยตรง

จากการศึกษาของ Nui et al. (2017) มีการผลิต IMO's โดยใช้เอนไซม์โดยตรง ซึ่งจะใช้ enzyme cocktail ในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์จากแป้งข้าวโพด มีการเตรียมสารตั้งต้นในรูปของสารละลาย และในกระบวนการลิเคอแฟกชันได้ใช้เอนไซม์ α -amylase โดยใช้เทคนิคการสร้าง DNA สายผสมของจุลินทรีย์ *Bacillus naganensis* และ *Bacillus licheniformis* (PulA) ผลิตเอนไซม์ pullulanase เพื่อใช้ในกระบวนการแซ็กคาริฟิเคชัน มีการใช้ร่วมกับ β -amylase และนอกจากนี้มีการใช้รา *A. niger* ที่ผลิตเอนไซม์ α -transglucosidase (An-TGase) ในการสังเคราะห์ IMO's ในกลไกทรานกลูโคซิเลชันดังสรุปต่อไปนี้

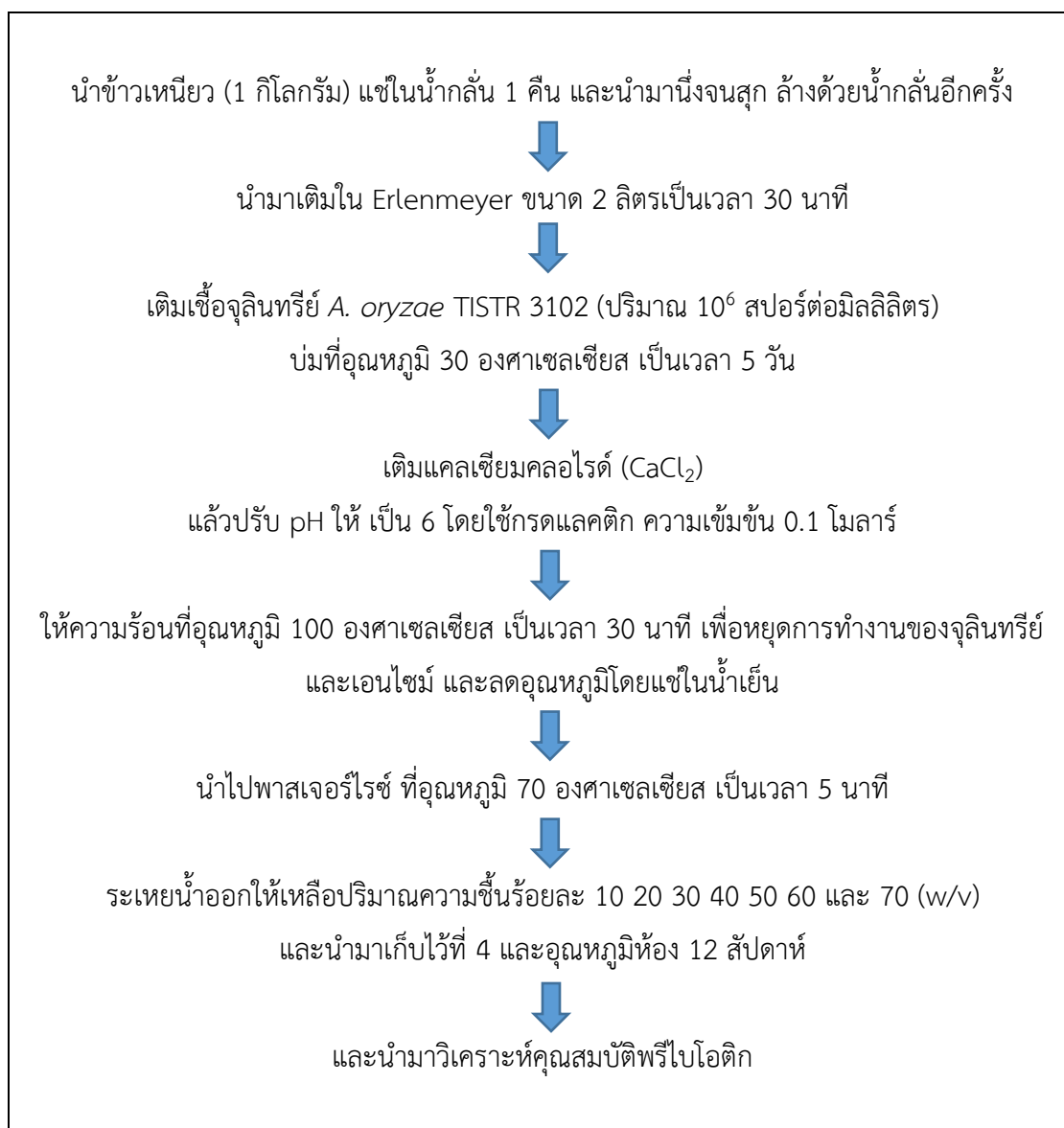
จากการศึกษาพบว่าสามารถผลิต IMO's ได้หลายชนิด ได้แก่ isomaltose maltotriose isomaltotriose panose maltotetraose maltopentanoise maltohexaose เป็นต้น ซึ่งข้อดีของการใช้เอนไซม์ cocktail จะทำให้ประหยัดเวลาในการผลิตมากขึ้น โดยปกติจะใช้เวลาประมาณ 13 ชั่วโมง เมื่อใช้เอนไซม์ cocktail จะทำให้ประหยัดเวลาเหลือ 4 ชั่วโมง เนื่องจากจะทำให้เอนไซม์ทุกตัวที่ใช้สามารถทำงานพร้อมกัน โดยสามารถเกิดกลไกแซ็กคาริฟิเคชันและทรานกลูโคซิเลชันไปพร้อมกัน



ภาพที่ 6 การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรต์โดยใช้เอนไซม์โดยตรง
ที่มา: Nui et al. (2017)

2.6.2 การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรต์โดยใช้จุลินทรีย์

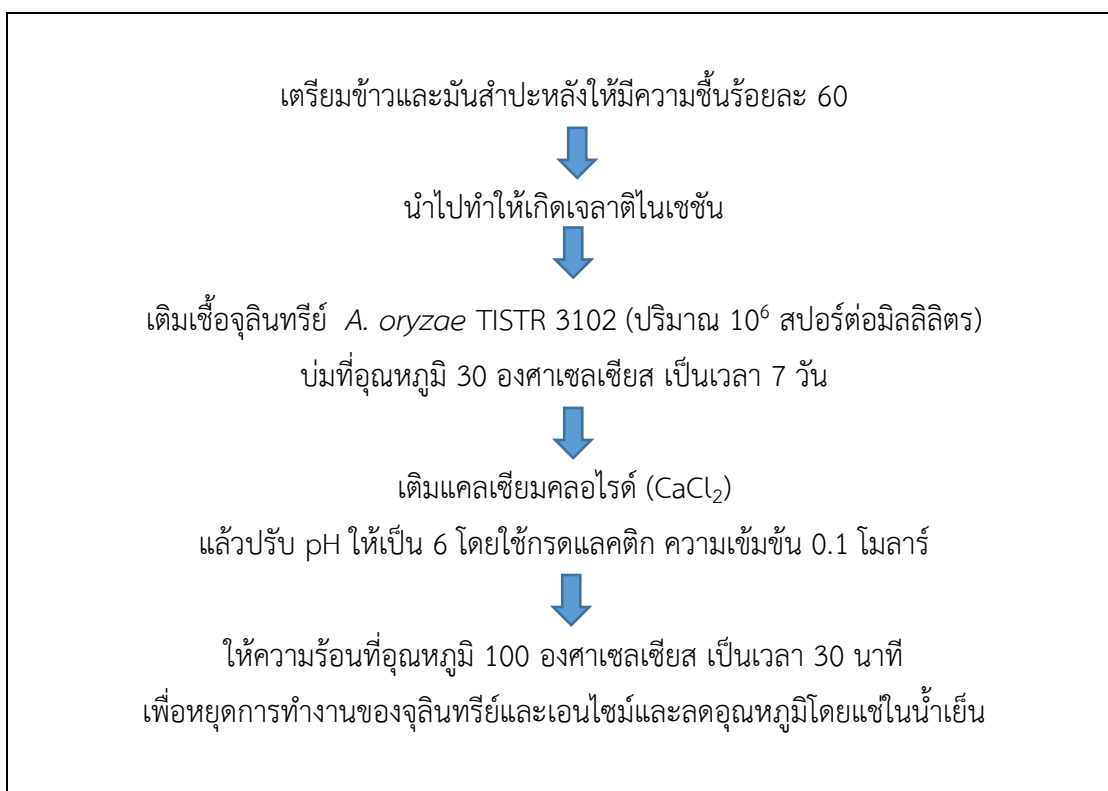
จากรายงานวิจัยอีกบางกลุ่มใช้จุลินทรีย์เพียงอย่างเดียว ซึ่งเป็นการผลิต IMOs จากจุลินทรีย์ที่มีการสร้างเอนไซม์แทนการใช้เอนไซม์โดยตรง ซึ่งอาจจะเป็นผลดีสำหรับการประหยัดต้นทุนในการผลิต IMOs จากการค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่า Sawangwan and Saman (2016a) ศึกษาการผลิต IMOs จากข้าวเหนียวผสมรำข้าว โดยเตรียมตัวอย่างในรูปของแข็งก่อนการเติมสปอร์ของเชื้อ *Aspergillus oryzae* เพื่อผลิตเอนไซม์กลุ่ม amylolytic ซึ่งทำหน้าที่เพื่อเปลี่ยนแป้งที่เป็นพอลิเมอร์สายยาวให้เป็นพอลิเมอร์สายสั้นในกลุ่มโอลิโกแซ็กคาร์ไรต์ ได้แก่ maltose isomaltose maltotriose isomaltotriose และ panose เป็นต้น ซึ่งผู้วิจัยเสนอว่าวิธีการผลิตแบบของแข็ง (Solid state fermentation) โดยใช้จุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์ออกมาแทนการใช้เอนไซม์โดยตรงจะสามารถลดต้นทุนในการผลิตลงได้ แต่ต้องเตรียมตัวอย่างเริ่มต้นที่ทำให้ เอนไซม์ที่ผลิตขึ้นมาสามารถเข้าไปใช้ประโยชน์จากสารตั้งต้นในวัตถุดิบเริ่มต้นได้ง่ายขึ้น ได้เตรียมตัวอย่างโดยการทำให้ข้าวเกิดเจลลาติไนเซชันก่อนการเติมเชื้อจุลินทรีย์ แต่พบว่า IMOs ที่ได้ยังไม่มีความบริสุทธิ์ ซึ่งสามารถสรุปขั้นตอนการดำเนินการดังต่อไปนี้



ภาพที่ 7 การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้จุลินทรีย์

ที่มา: Sawangwan and Saman (2016a)

นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Saman et al. (2012) ได้ศึกษาการผลิต IMOs โดยการหมักของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3102 โดยใช้พืชเศรษฐกิจ เช่น ข้าว และมันสำปะหลังเป็นสารตั้งต้น เพื่อต้องการเพิ่มผลผลิต IMOs ให้มีปริมาณได้สูงสุด โดยได้ทำการหมักแบบของแข็ง (SSF) ซึ่งการศึกษานี้ได้ใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Aspergillus oryzae* TISTR 3102 เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ในการผลิต IMOs ได้ โดยจะสร้างเอนไซม์ α -amylase ในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล และสร้างเอนไซม์ α -glucosidase เพื่อสังเคราะห์เป็น IMOs ได้แก่ isomaltose, panose และ isomaltotriose เป็นต้น



ภาพที่ 8 การเพิ่มผลผลิตของการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์โดยใช้จุลินทรีย์
ที่มา: Saman et al. (2012)

จากการศึกษาการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์โดยทั่วไป หลังจากการผลิตผ่านกลไกที่เกิดขึ้น 3 กลไก คือ กระบวนการลิเคอฟแฟชัน แซ็กคาริฟิเคชัน และทรานกลูโคซิเลชัน ได้พบปัญหาว่าปริมาณผลผลิตของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์ที่ได้มีปริมาณน้อย Saman et al. (2012) จึงได้เพิ่มกระบวนการ Mashing ในการผลิตเพื่อให้ได้ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์มากขึ้น โดยกระบวนการ Mashing เป็นการปรับสภาวะเพื่อทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ พบว่าในน้ำเชื่อมข้าวพองค์ประกอบของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ คือ ไอโซมอลโตส พาโนส และไอโซมอลโตไตรโอส เท่ากับ 6.4 4.5 และ 1.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่เดียวกันน้ำเชื่อมมันสำปะหลังให้ความเข้มข้นเท่ากับ 1, 1 และ 0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Cui et al. (2017) ได้ศึกษาการผลิตและการทำให้บริสุทธิ์ของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์จากแป้งเกาลัด นอกจากนี้ยังทำการศึกษาผลของฟรีไบโอติกโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์กลุ่ม *Lactobacillus* ในระหว่างการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์ในขั้นตอน liquefaction เอนไซม์ที่ใช้ คือ α -Amylase สำหรับขั้นตอน saccharification ใช้เอนไซม์ β -amylase, pullulanase และ fungal α -amylase จากเชื้อจุลินทรีย์ (Microbial) เอนไซม์ที่ใช้ในขั้นตอน

transglycosylation ได้แก่ เอนไซม์ α -transglucosidase สำหรับขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ ใช้วิธี ion-exchange chromatography acidic cation exchange resins (Na^+) พบว่าสามารถผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้นจากร้อยละ 30.53 เป็นร้อยละ 61.5

Kim et al. (2017) ศึกษาการผลิตน้ำเชื่อมจากข้าวอินทรีย์ที่มีไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยกระบวนการหมัก ใช้เชื้อ *Lactobacillus plantarum* ในการผลิตผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ สารตั้งต้นที่ใช้ คือ ข้าวอินทรีย์ พบว่าน้ำเชื่อมไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้ยังมีความบริสุทธิ์ต่ำ จึงได้เพิ่มขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สูงขึ้นโดยจะหมักต่อด้วยเชื้อ *L. plantarum* ทำให้ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น เนื่องจากการสังเคราะห์อาหารของเชื้อ *L. Plantarum*

Rudeekulthamarong et al. (2013) ศึกษาการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยจะใช้มอลโทไตรโอสเป็นสารตั้งต้นในการผลิตและใช้เอนไซม์ amylomaltase และ transglucosidase ในกาสังเคราะห์เป็น IMOs พบว่าไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้มีคุณสมบัติปรับโอติกที่มีประสิทธิภาพสูง

Lin Q. et al. (2011) ได้ทำการผลิตน้ำเชื่อมไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้งข้าวโดยใช้วิธีทางชีวภาพเพียงขั้นตอนเดียว พบว่าเมื่อเติมปริมาณเอนไซม์พูลลาเนสและแอลฟาอะไมเลสลงในน้ำแป้ง และปรับพีเอชที่ 6.0 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 และ 120 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง และพบว่าชั่วโมงที่ 72 สามารถผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 59.20

Chockchaisawasdee and Naiyatat (2013) ได้ทำการศึกษาการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้งกล้วย ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และเบตาอะไมเลส พบว่าไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากเอนไซม์ Fungamyl ให้ความเข้มข้นสูงสุด คือ 76.67 กรัมต่อลิตร ส่วนที่ผลิตจากเอนไซม์ β -amylase ให้ความเข้มข้นเท่ากับ 70.74 กรัมต่อลิตร

Kim et al. (2012) ผลิต IMO โดยใช้เอนไซม์เดกซ์แทนซูเครส (dextranucrase) จากเชื้อแบคทีเรีย *Leuconostoc mesenteroides* B-512F ซึ่งใช้มอลโตสเป็นสารตั้งต้น โดยเปรียบเทียบอัตราส่วนของซูโครสและมอลโตสในอัตราที่ต่างกัน และความเข้มข้นของซูโครสและมอลโตส อัตราส่วนของซูโครสและมอลโตสที่ระดับต่าง ๆ ดังนี้ 1:4, 1:2, 1:1 และ 2:1 ความเข้มข้นของซูโครสและมอลโตสตั้งแต่ร้อยละ 2 ถึง 20 ให้ผลการทดลองว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้น 61 ของซูโครสในอัตราส่วน 2:1 ผลลัพธ์ที่พบคือ ไอโซมอลโตซิลมอลโตส (DP4) หรือ ไอโซมอลโตไตรโอซิลมอลโตส (DP5) และน้ำตาลแซ็กคาไรด์สายยาวคือ DP8 หรือ DP9 แสดงให้เห็นว่า อัตราส่วนระหว่างซูโครสและมอลโตส (1:1) จะให้ผลผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ระหว่างร้อยละ 40 และ 70 และเมื่อมอลโตสมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าจะให้อัตราการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้น

ประมาณร้อยละ 70-90 ตามที่สรุปผลผลิตของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สูงสุดเท่ากับร้อยละ 91.5 เมื่อซูโครสและมอลโตสมีความเข้มข้นที่ร้อยละ 10 และ 5 ตามลำดับ

นอกจากนี้ในงานวิจัยของ ยุทธชัย เพชรรัตน์ไพศาล (2557) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้งมันสำปะหลัง โดยจะสกัดเอาเอนไซม์ *transglucosidase* ที่ใช้ในการสังเคราะห์ IMOs จากเชื้อรา *Aspergillus niger* ก่อนนำมาใช้ในการผลิต IMOs จากการศึกษาพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสจากอาหารเหลือได้สูงสุดเท่ากับ 1,668.25 หน่วยต่อมิลลิกรัม เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 วัน พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส และพบว่าการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยใช้เอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส พบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ทำการย่อยเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง จะสามารถผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีองค์ประกอบของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ เช่น พาโนส มอลโตไตรโอส และไอโซมอลโตไตรโอสเท่ากับ 16.95 12.13 และ 24.72 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ดังนั้นเห็นได้ว่างานวิจัยของ ยุทธชัย เพชรรัตน์ไพศาล (2557) การสกัดเอาเอนไซม์มาใช้จะมีขั้นตอนที่มากเกินไป เช่นเดียวกันกับการใช้เอนไซม์โดยตรงในการผลิต IMO ที่มีขั้นตอนที่มากเกินไป อาจจะทำให้สิ้นเปลืองพลังงานและนอกจากนี้การใช้เอนไซม์ยังทำให้มีค่าใช้จ่ายที่สูง ดังนั้นการหมักแบบของแข็งโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Aspergillus oryzae* และ *Aspergillus niger* โดยตรงก็เป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่น่าสนใจเนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ในการผลิต IMOs ได้ โดยจะสร้างเอนไซม์ α -amylase ในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล และสร้างเอนไซม์ α -glucosidase เพื่อสังเคราะห์เป็น IMOs ได้แก่ isomaltose panose และ isomaltotriose เป็นต้น

2.7 การศึกษาการใช้ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในผลิตภัณฑ์อาหาร

สันทัด วิเชียรโชติ (2561) ได้ศึกษาการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากข้าวสังข์หยดและนำไปพัฒนาและนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสำหรับทารกที่แพ้นมโค ผลการศึกษาสภาวะในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้งข้าวสังข์หยดในระดับโรงงานต้นแบบถึงปฏิกิริยาขนาด 72 ลิตร พบว่าการใช้เอนไซม์ 3 ชนิด คือ แอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ย่อยน้ำแป้งร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ย่อยต่อด้วยเอนไซม์เบต้า อะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.08 และเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส ความเข้มข้นร้อยละ 0.10 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเชื่อมไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dryer) พบว่าไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีค่า DP2-7 ร้อยละ 36.57 เมื่อนำผงไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้งข้าวสังข์หยดที่ผลิตได้มาทดสอบความ

เป็นพรไบโอติก โดยการหมักในระบบจำลองในลำไส้มนุษย์แบบกะเทียบกับผลิตภัณฑ์ทางการค้า ได้แก่ ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์จากแป้งข้าวโพดและจากแป้งมันสำปะหลัง พบว่าไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์จากแป้งข้าวสาลีหยาบมีสมบัติพรไบโอติกสูงกว่าไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์จากแป้งข้าวโพดและแป้งมันสำปะหลัง โดยให้ค่าดัชนีความเป็นพรไบโอติกเท่ากับ 1.22 1.18 และ 1.07 ตามลำดับ เมื่อไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์จากแป้งข้าวสาลีหยาบมาเป็นส่วนผสมในสูตรผลิตภัณฑ์โภชนาการที่ไม่ก่อให้เกิดภูมิแพ้สำหรับทารกและนำไปทดสอบการหมักกับผลิตภัณฑ์ไม่ก่อภูมิแพ้ทางการค้า พบว่าผลิตภัณฑ์ไม่ก่อภูมิแพ้ทั้งสูตรที่พัฒนาขึ้นและสูตรทางการค้า

ภคธีมา สุขพันธ์ (2552) ได้ศึกษาพัฒนาผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองเสริมพรไบโอติกสำหรับผู้บริโภคสูงอายุ โดยศึกษาอัตราส่วนของพรไบโอติกที่เหมาะสมในผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลือง โดยใช้แผนการทดลองแบบผสม โดยเติมอินูลิน (I) กาแลคโตโอลิโกแซ็กคารไรด์ (GOS) และไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์ (IMO) ในผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองร้อยละ 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเปรียบเทียบนมถั่วเหลืองทั้ง 13 สูตร ด้วยวิธีการวิเคราะห์การส่งเสริมการเจริญของพรไบโอติก (*B. bifidum* DSM 20456, *L. plantarum* TISTR 875 และ *L. acidophilus* TISTR 1034) ผลของการส่งเสริมการเจริญของพรไบโอติกแสดงให้เห็นว่า GOS สามารถส่งเสริมการเจริญของพรไบโอติกทั้ง 3 ชนิดได้ดีที่สุด ขณะที่อินูลิน สามารถส่งเสริมการเจริญของพรไบโอติกได้ต่ำที่สุด ($P \leq 0.05$) อัตราส่วนพรไบโอติกที่เหมาะสม คือ I, GOS และ IMO ร้อยละ 11, 62 และ 27 ตามลำดับ ซึ่งพิจารณาจากการส่งเสริมพรไบโอติกสูงสุด โดยสามารถส่งเสริมการเจริญของ *B. bifidum* DSM 20456 จาก 6.58 เป็น 7.54 log CFU/ml (การหมัก 48 ชั่วโมง), *L. plantarum* TISTR 875 จาก 6.59 เป็น 8.65 log CFU/ml (การหมัก 24 ชั่วโมง) และ *L. acidophilus* TISTR 1034 จาก 6.83 เป็น 8.44 log CFU/ml (การหมัก 24 ชั่วโมง) โดยพรไบโอติกอัตราส่วนดังกล่าวสามารถส่งเสริมการเจริญของพรไบโอติกได้ดี

สุวิมล โชคชัยสวัสดิ์ (2552) ได้การศึกษาการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์ IMO จากแป้งกล้วยและศึกษาคุณสมบัติด้านการหมักของ IMO ที่สังเคราะห์ขึ้นในโยเกิร์ต โดยเชื้อพรไบโอติกส์ การสังเคราะห์ IMO ทำโดยการผลิตลิเคอร์แฟกชันแป้งกล้วยโดยเอนไซม์ Termamyl1 SC (E.C. 3.2.1.1) จากนั้นทำการแซ็กคาริฟิเคชันโดยเอนไซม์ Fungamyl 800L (E.C.3.2.1.1) หรือ เบต้า อะไมเลส (E.C.3.2.1.1) จากนั้นนำสารละลายแซ็กคาริฟิเคชันทั้งสองมาทำการสังเคราะห์ IMO โดย Transglucosidase L (E.C. 3.2.1.20) พบว่า IMO สูงสุดที่ได้จากสารละลายทั้งสองไม่แตกต่างกัน (ประมาณร้อยละ 30 ของน้ำตาลทั้งหมด) โดย IMO ที่ได้จากการแซ็กคาริฟิเคชัน โดย Fungamyl 800L และเบต้า อะไมเลส ได้เท่ากับร้อยละ 7.67 ± 0.27 น้ำหนักโดยปริมาตร และร้อยละ 7.06 ± 0.49 น้ำหนักโดยปริมาตร ตามลำดับ จากนั้นนำ IMO ที่ได้มาทำเจตน้ำตาลกลูโคสและมอลโตส โดยใช้การหมักของยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักปริมาตร พบว่าหลังจากการหมัก 24 ชั่วโมง สามารถกำจัดกลูโคสและมอลโตสได้ และ IMO ที่ได้ประกอบด้วยไอโซมอลโตไตรออส พาโนส ร้อยละ 53 ไอ

โซมอลโตเตตระโอส ร้อยละ 21 และมอลโตโอลิโกเฮปตะโอสและโมเลกุลสูงกว่า ร้อยละ 26 จากการ
ใช้ IMO ที่สังเคราะห์ได้ผสมในโยเกิร์ตและใช้เชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิด คือ *Streptococcus*
thermophiles ร่วมกับ *Lactobacillus delbrueckii* spp. *Lactobacillus bulgaricus* และ
Lactobacillus acidophilus ร่วมกับ *Lactobacillus casei* พบว่าหลังจากการเก็บรักษา 28 วัน
จำนวนเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดในโยเกิร์ตผสม IMO ไม่เปลี่ยนแปลง น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่
เชื้อใช้มากที่สุด (ถูกใช้ไปร้อยละ 50) และลำดับถัดมาคือ IMO (ถูกใช้ไปร้อยละ 40)

ตารางที่ 3 การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยวิธีต่าง ๆ

ผู้วิจัย	วัตถุดิบ	กระบวนการ	ชนิด IMO	ผลผลิตที่ได้ (%)
Sung, L.M. et al. (2008)	มอลโตส	เอนไซม์	Long chain IMO	91.5
Lin Q. et al. (2011)	แป้งข้าว	เอนไซม์	Short chain IMO	59.20
Nui et al. (2017)	แป้งข้าวโพด	เอนไซม์	isomaltose, maltotriose, isomaltotriose, panose, maltotetraose, maltopentanose, maltohexaose	49
Rudeekulthamarong et al. (2013)	แป้งมันฝรั่ง	เอนไซม์	Long chain IMO	สูง
Kim et al. (2017)	ข้าวอินทรีย์	เอนไซม์	Short chain IMO	ต่ำ
Pan and Lee (2004)	รำข้าว	เอนไซม์	Short chain IMO	ต่ำ
Jie et al. (2017)	แป้งเกล็ด	เอนไซม์	Short chain IMO	สูง
Sawangwan and Saman (2016a)	ข้าวเหนียว ผสมรำข้าว	จุลินทรีย์	Isomaltose, isomaltotriose panose	ต่ำ
Saman et al. (2012)	ข้าวและมัน สำปะหลัง	จุลินทรีย์	Isomaltose, panose, isomaltotriose	ต่ำ
Sorndech et al. (2018)	ข้าวเหนียว	จุลินทรีย์	Short chain IMO	ต่ำ

2.8 พรีไบโอติก (ประกานต์ ฤดีกุลธรร และจารุณี ควรพิบูลย์, 2555)

พรีไบโอติกมีทั้งที่สกัดมาจากพืชอาหารบางชนิดและสังเคราะห์ขึ้นมา ซึ่งอาหารที่มีลักษณะเป็นพรีไบโอติก เมื่อบริโภคแล้วไม่มีการย่อยสลาย และไม่ถูกดูดซึมในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กและจะถูกหมักให้ย่อยสลายโดยแบคทีเรียโปรไบโอติก

2.8.1 ประเภทของพรีไบโอติก

ประเภทของพรีไบโอติกที่ร่างกายไม่สามารถย่อยได้มีหลายประเภทยังมีดังนี้

2.8.1.1 น้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ (sugar and oligosaccharides) เป็นพรีไบโอติกกลุ่มใหญ่ที่สุด จัดเป็นพวก short-chain oligosaccharide ที่เป็น non-digestible oligosaccharide (NDO) ประกอบด้วยน้ำตาลตั้งแต่ 2-20 หน่วย ตัวอย่างเช่น raffinose, stachyose, FOS, GOS, MOS, XOS, และ IMO

2.8.1.2 น้ำตาลแอลกอฮอล์ (alcohol sugar) เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์พรีไบโอติกที่มีค่าดัชนีการสังเคราะห์พอลิเมอร์ (degree of polymerization) เพียง 1-2 ตัว ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ได้แก่ maltitol, sorbitol, isomalt และ xylitol เป็นต้น บางครั้งสามารถเรียกน้ำตาลแอลกอฮอล์ว่า polyol ใช้เป็นสารให้ความหวาน ที่ระดับความหวานเป็นครึ่งหนึ่งของน้ำตาลซูโครส น้ำตาลแอลกอฮอล์จะถูกดูดซับในลำไส้เล็กได้ช้ากว่าน้ำตาลซูโครส จึงทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ นิยมใช้เป็นสารให้ความหวานในผลิตภัณฑ์ประเภท diet food

2.8.1.3 Resistant starch จัดเป็นพอลิแซ็กคาไรด์พรีไบโอติกที่ไม่ถูกย่อย และไม่ถูกดูดซึมในทางเดินอาหารของมนุษย์ เนื่องจากเป็นแป้งที่มีองค์ประกอบของอะไมโลเพกติน (amylopectin) มากกว่าร้อยละ 20-24

2.8.1.4 Non-starch polysaccharides (NSPs) จัดเป็นพอลิแซ็กคาไรด์พรีไบโอติกที่ได้รับจากพืช ได้แก่ เพกติน (pectin), เซลลูโลส (cellulose), เฮมิเซลลูโลส (hemi-cellulose), กวักกัม (guar gum) และ ไซเลน (xylan)

2.8.1.5 อินนูลิน (Inulin) จัดเป็นพอลิแซ็กคาไรด์พรีไบโอติกที่พืชเก็บไว้เป็นอาหารพบในพืชมากมายหลายชนิด เช่น รากชิคอรี่ หัวอาร์ทิโชค หัวหอม หัวกระเทียม กล้วย และหน่อไม้ฝรั่ง เป็นต้น

2.8.1.6 Related mucopolysaccharides เป็นพอลิแซ็กคาไรด์โครงสร้างของสัตว์ที่ไม่มีการแตกกิ่งก้าน ประกอบด้วยสายของคาร์โบไฮเดรตที่มีน้ำตาลอะมิโนพวกเฮกโซซามีน (hexosamine) และกรดยูโรนิค ลักษณะเด่นที่พบได้ในโครงสร้างของน้ำตาลมิวโคพอลิแซ็กคาไรด์ คือ น้ำตาลในหน่วยซ้ำไคแซ็กคาไรด์ของมิวโคพอลิแซ็กคาไรด์อย่างน้อย 1 หน่วย มีหมู่ซัลเฟตหรือหมู่คาร์บอกซิเลตที่แสดงประจุลบ ดังนั้นจึงจัดเป็นโปรตีน-คาร์โบไฮเดรตพอลิแซ็กคาไรด์พรีไบโอติก ซึ่งถูกสร้างโดย goblet cells ที่อยู่ในเยื่อบุผิวลำไส้ เป็นสารตั้งต้นหลักสำหรับการหมักในลำไส้

ตัวอย่างเช่น คอนดรอยทรินซัลเฟต (chondroitin sulfate), เฮปาริน (heparin), สารคัดหลั่งจากตับอ่อน (pancreatic secretion) และ สารคัดหลั่งจากแบคทีเรีย (bacterial secretion)

2.8.1.7 โปรตีนและเพปไทด์ (Proteins and peptides) พรไบโอติกกลุ่มนี้ได้จาก สารอาหารกลุ่มโปรตีนและภายหลังเกิดการดัดแปรด้วยเอนไซม์ในระบบย่อยอาหาร (digestive enzymes) จนได้เป็นสายเพปไทด์สั้น ๆ แต่พบได้น้อยกว่าพรไบโอติกในกลุ่มคาร์โบไฮเดรต

2.8.2 ประโยชน์ของพรไบโอติกต่อสุขภาพผู้บริโภค (ประกานต์ ฤติกุลธรรง และจารุณี ควรพิบูลย์, 2555)

ประโยชน์ต่อสุขภาพของพรไบโอติกจะมีความเกี่ยวข้องกันกับประโยชน์ของโปรไบโอติก พรไบโอติกจะต้านทานต่อการย่อยในทางเดินอาหารส่วนบน เมื่อเดินทางถึงก็จะเป็อาหารให้กับ เชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ และที่สำคัญเชื้อจุลินทรีย์สุขภาพนำไปใช้ได้ดีกว่าเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น และ เจริญเติบโตได้ดี ซึ่งเมื่อมีการเพิ่มการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่มนี้แล้ว ทั้งแบคทีเรียเองและสารที่เกิด จากกระบวนการในการใช้พรไบโอติกเป็นแหล่งคาร์บอนก็มีบทบาทต่อผู้บริโภค เช่น ช่วยส่งเสริมการ ทำงานของระบบทางเดินอาหาร มีผลต่อการดูดซึมแร่ธาตุบางชนิด และมีผลต่อเมตาบอลิซึมของไขมัน โดยสามารถอธิบายได้ดังนี้

2.8.2.1 บรรเทาอาการท้องผูก

พรไบโอติกจัดเป็นออลิโกแซ็กคาร์ไรด์ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายเส้นใย ซึ่งจะถูกหมัก และเมแทบอลิซึมด้วยแบคทีเรียที่ลำไส้ใหญ่ได้เป็นก๊าซชนิดต่าง ๆ เช่น H_2S , H_2 , CO_2 , NH_3 และ CH_4 ก๊าซชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตกกระบวนการหมักจะเพิ่มปริมาณและลด transit time ของการย่อยอาหารใน ลำไส้ ส่วนใหญ่ปัญหาอาการท้องผูกเกิดจาก slow transit time ดังนั้นการลด transit time จึงช่วย บรรเทาอาการท้องผูกได้ นอกจากนี้พรไบโอติกยังช่วยเพิ่มปริมาณน้ำในลำไส้และผลิต short chain carboxylic acids เช่น acetate, propionate, butyrate และ lactate จากกระบวนการหมักด้วย แบคทีเรีย ซึ่งผลจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำและกรดในลำไส้ทำให้เกิดการขับอุจจาระได้ง่ายขึ้น

2.8.2.2 ลดค่าพีเอช (pH) ของลำไส้และผลิต Short Chain Fatty Acids (SCFA)

กระบวนการหมักโปรตีนในลำไส้จะส่งผลให้ค่า pH ของลำไส้สูงจากผลของการ ผลิตแก๊สแอมโมเนีย (NH_3) พบได้ใน Croh's disease ในขณะที่กระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต พรไบโอติกที่ลำไส้ใหญ่ให้เป็น SCFA ได้แก่ acetate propionate, butyrate ซึ่ง SCFA ที่เกิดขึ้นจะทำให้ pH ลดลง มีผลทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของ pathogenic bacteria แต่ส่งเสริมการเจริญของ lactic acid bacteria และ bifidobacteria นอกจากนี้ acetate, propionate และ butyrate ที่ เกิดขึ้นยังใช้เป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของร่างกายผ่านวัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle)

2.8.2.3 ลดภาวะเสี่ยงต่อโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่

มีการรายงานไว้ว่า butyrate ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักพรีไบโอติกด้วยแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในทางเดินอาหาร สามารถกระตุ้นช่วยให้เซลล์หยุดการเจริญเติบโต หยุดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ และยังสามารถช่วยเพิ่มการตายตามธรรมชาติของเซลล์ (apoptosis) อาจมีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งได้ (ประกานต์ ฤดีกุลธรง และจารุณี ควรพิบูลย์, 2555 อ้างอิงจาก Gibson and Rastall, 2006)

2.8.2.4 ช่วยในการดูดซึม Ca^{2+} และ Mg^{2+}

Scholz-Ahrens et al. (2001) ได้รายงานว่าผลกระทบทางอ้อมจากกระบวนการหมักพรีไบโอติกที่ทำให้ค่า pH ของทางเดินอาหารลดลง (เพิ่ม cation ion) ช่วยให้มีการเพิ่มความเข้มข้นของ Ca^{2+} และ Mg^{2+} ในลำไส้ใหญ่ทำให้มีการดูดซับแร่ธาตุที่ดีขึ้น เป็นประโยชน์ต่อการป้องกันโรคกระดูกพรุน

2.8.2.5 ช่วยลดระดับ LDL ในเลือด

มีรายงานการใช้สารสกัดจาก chicory (ซึ่งเป็นแหล่งสร้างอินนูลินพรีไบโอติก) และอินนูลินกับหนูเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าหนูกลุ่มที่ได้สารสกัดจาก chicory และหนูที่ได้รับอินนูลิน มีปริมาณ HDL เพิ่มขึ้นและมีปริมาณ LDL ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

2.8.2.6 กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

พรีไบโอติกแสดงบทบาทที่สำคัญอย่างหนึ่งในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของ lactobacilli และ bifidobacteria จึงส่งผลทางอ้อมต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ป้องกันการติดเชื้อได้ดีด้วย โดยจากการของ Kato et al (1999) พบว่าแบคทีเรีย lactobacilli สามารถกระตุ้นการทำงานของโมโนไซต์หรือแมคโครฟาจในการสร้าง IL-12, $\text{TNF}\alpha$ และ IFN- γ ซึ่งจัดเป็นสารกลุ่ม pro-inflammatory cytokines หรือ anti-inflammatory cytokines ที่มีบทบาทสำคัญในการต่อต้านเชื้อก่อโรคต่าง ๆ ได้แก่ ไวรัส แบคทีเรีย โปรโตซัว รวมทั้งสารก่อมะเร็ง

2.8.2.7 ผลต่อการเผาผลาญไขมัน

การศึกษาเกี่ยวกับการช่วยลดระดับไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) แต่ยังไม่มีความมากนัก ส่วนเรื่องของการลดคอเลสเตอรอลก็เช่นกัน อย่างไรก็ตามมีผู้เสนอกลไกที่เป็นไปได้คือการที่จุลินทรีย์สุขภาพ เจริญจำนวนมากขึ้นก็จะช่วยย่อยสลายคอเลสเตอรอล และยับยั้งการดูดซึมผ่านผนังลำไส้ หรืออาจเนื่องจาก ผลจากกระบวนการหมักที่ได้กรดไขมันสายสั้นบางชนิด โดยเฉพาะกรดโพรพิโอนิก (propionic acid) ซึ่ง สามารถไปยับยั้งการสังเคราะห์ไขมันรวมทั้งคอเลสเตอรอล ดังนั้นพรีไบโอติกอาจช่วยลดความเสี่ยงต่อโรค หลอดเลือดแข็งซึ่งมีสาเหตุจากไขมันได้

2.9 ข้าว (Rice) (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2550)

ข้าว มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Oryza sativa* Linn. ข้าวเป็นพืชล้มลุกตระกูลหญ้า (annual grass) ถูกจัดอยู่ในสกุลออไรซา (Genus *Oryza*) ของวงศ์เกรมินี (Family Gramineae) ที่สามารถกินเมล็ดได้ ถือเป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวเช่นเดียวกับหญ้า มีลักษณะภายนอก เช่น ใบ กาบใบ ลำต้นและรากคล้ายต้นหญ้า สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในเขตร้อน (tropical zone) และเขตอบอุ่น (temperate zone)

ข้าวที่ขึ้นอยู่ในท้องที่ต่าง ๆ ของโลกแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่ ออไรซา ซาไทวา (*Oryza sativa*) ซึ่งมีแหล่งกำเนิดในทวีปเอเชียและมีการปลูกทั่วไปในทวีปเอเชียและแหล่งอื่นของโลก ออไรซา กลาเบอร์ริมา (*Oryza glaberrima*) ซึ่งมีแหล่งกำเนิดและปลูกเฉพาะในแอฟริกา และข้าวป่า (wild rice) ซึ่งเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติในประเทศต่าง ๆ ของทุกทวีปที่ปลูกข้าว เช่น ออไรซา เพอเรนนิส (*Oryza perennis*) ออไรซา ออฟฟิซินาลิส (*Oryza officinalis*) ออไรซา สปอนทาเนีย (*Oryza spontanea*) ออไรซา นิวารา (*Oryza nivara*) เป็นต้น

สำหรับประเทศไทยข้าวที่ปลูกเป็นชนิด อินดิกา (Indica) โดยแบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ ข้าวเจ้า และข้าวเหนียว ข้าวมีลำต้นกลวงและเจริญเติบโตแบบแตกกอ ใบเรียวยาว สากเหมือนใบตะไคร้ หรือไม้หญ้าคา ออกดอกเป็นช่อรวมกันที่ปลายยอด เรียกว่า รวงข้าว ผลหรือเมล็ดเมื่ออ่อนจะมีสีเขียว เมื่อแก่จะเป็นสีเหลืองทอง ข้าวเป็นอาหารหลักของชาวตะวันออก อีกทั้งยังเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทย มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และยังเป็นอาหารหลักของคนไทยอีกด้วย

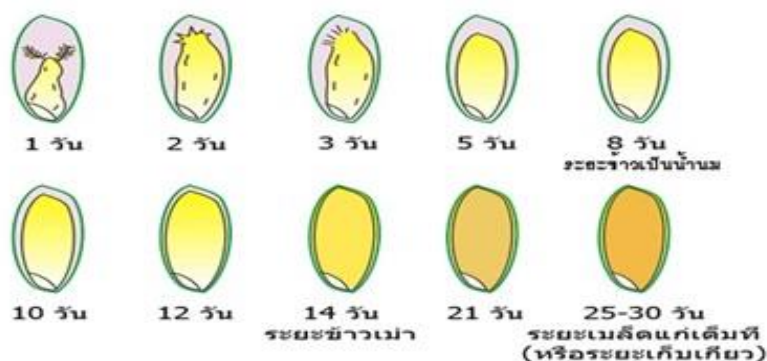
2.9.1 ระยะการสร้างเมล็ดของข้าว (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2550)

การสร้างเมล็ดข้าวแบ่งออกเป็น 3 ระยะ ดังภาพที่ 9 คือ ระยะข้าวเป็นนํ้านม (milk stage) ระยะข้าวเმა หรือเป็นไต หรือเป็นโด (dough stage) และระยะเมล็ดแก่เต็มที่ หรือระยะเก็บเกี่ยว (maturation stage)

2.9.1.1 ระยะข้าวเป็นนํ้านม (milk stage) ใช้เวลา 7 วัน หลังผสมเกสรและผสมพันธุ์ ในระยะแรกลักษณะภายในของเมล็ดข้าวเป็นของเหลวคล้ายนํ้านม เปลือกของเมล็ดมีสีเขียว

2.9.1.2 ระยะข้าวเმა หรือเป็นไต หรือเป็นโด (dough stage) ใช้เวลา 14 ถึง 21 วัน หลังผสมเกสร เปลือกใหญ่และเปลือกเล็กเริ่มแข็ง สีเขียวอมน้ำตาล เนื้อในเมล็ดซึ่งเป็นนํ้านมมีนํ้าน้อยลง เหนียวและแข็งขึ้น ตามลำดับ

2.9.1.3 ระยะเมล็ดแก่เต็มที่ หรือระยะเก็บเกี่ยว (maturation stage) ใช้เวลาประมาณ 30 วัน หลังผสมเกสร เมล็ดจะมีโครงสร้างสมบูรณ์เต็มที่ ทั้งขนาดความแข็งของเปลือก และสีเปลือกที่สุกเต็มที่ที่จะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำตาลทองเป็นส่วนใหญ่ อาจมีน้ำตาลเข้ม น้ำตาลม่วง หรือน้ำตาลดำ ขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าว ส่วนเนื้อของเมล็ดจะมีสีขาว แข็งมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับพันธุ์ของข้าวด้วยเช่นกัน



ภาพที่ 9 ระยะการสร้างเมล็ดข้าว

ที่มา: กองวิจัยและพัฒนาข้าว (2559)

2.9.2 ส่วนประกอบของเมล็ดข้าว (อรอนงค์ นัยวิกุล, 2550)

เมล็ดข้าวประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก คือ (1) ส่วนที่ห่อหุ้มเมล็ด (หรือผล) เรียกว่า แกลบ (hull หรือ husk) และ (2) ส่วนเนื้อผล หรือ ผลแท้ (true fruit หรือ caryopsis grain) หรือ ข้าวกล้อง (caryopsis หรือ brown rice) มีรายละเอียดดังนี้

2.9.2.1 แกลบ ประกอบด้วย เปลือกใหญ่ (lemma) เปลือกเล็ก (palea) ขน ทาง ข้าวเมล็ด (rachilla) และกลีบรองเมล็ด (sterile lemmas)

2.9.2.2 ข้าวกล้องหรือ เนื้อผล ประกอบด้วย

1) เยื่อหุ้มผล เป็นเนื้อเยื่อชั้นนอก มีความหนาประมาณ 10 ไมครอน มีลักษณะเป็นเซลล์ที่มีผนังเซลล์เส้นใย 6 ชั้น มีสารสีหรือรงควัตถุปนอยู่ แบ่งย่อยออกเป็น 3 ชั้น คือ เอพิคาร์พ หรือ เอ็กโซคาร์พ (epicarp หรือ exocarp) เป็นผิวหนังหรือเปลือกที่อยู่นอกสุด มีลักษณะเรียบเหนียวและมัน ประกอบด้วยเซลล์ชั้นเดียว เมโซคาร์พ หรือ ไฮพอดERM (mesocarp หรือ hypoderm) เป็นผนังเซลล์ผลชั้นกลาง และเอนโดคาร์พ (endocarp) เป็นเยื่อชั้นในสุด ในเยื่อชั้นในสุด ในเยื่อหุ้มผลนี้มีโปรตีนเอมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบสำคัญ นอกจากนี้ยังมีสารอาหารหรือรงควัตถุปนอยู่ทำให้ข้าวมีสีต่าง ๆ

2) เยื่อหุ้มเมล็ด อยู่ถัดเยื่อหุ้มผลเข้ามา ประกอบด้วยเซลล์ 2 ชั้น รูปยาว เรียงตามขวาง และมีผนังบางกัน หนาประมาณ 0.5 ไมครอน ภายในเซลล์มีสารสี เช่นเดียวกับเยื่อหุ้มเซลล์

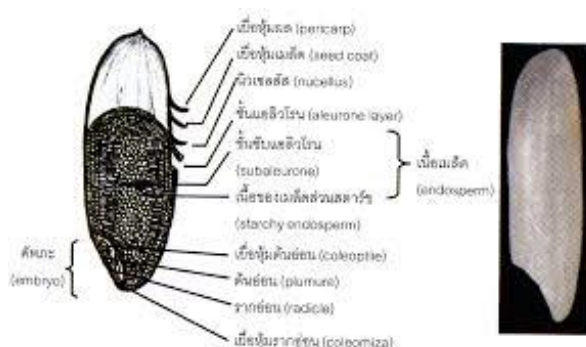
3) นิวเซลลัส (nucellus) เป็นผนังเซลล์ชั้นที่ติดกับเยื่อหุ้มเมล็ด แต่พันระหว่าง นิวเซลลัสกับเยื่อหุ้มเมล็ดไม่ติดแน่นจึงแยกออกกันง่าย มีความหนาประมาณ 0.8 – 2.5 ไมครอน

4) เยื่อชั้นแอลิวโรน (aleurone layer) เป็นเยื่อชั้นถัดจากเยื่อหุ้มเมล็ด ประกอบด้วยเซลล์ 1-7 ชั้น และมีลักษณะของเยื่อหุ้มด้านหลังของเมล็ดจะหนากว่าเยื่อหุ้มด้านท้อง

ซึ่งความหนาจะแตกต่างกันไปตามพันธุ์ข้าว แบ่งลักษณะออกเป็น 2 ลักษณะ คือ เซลล์ส่วนที่หุ้มรอบเนื้อของเมล็ดจะมีรูปร่างเป็นลูกบาศก์และมีไซโทพลาสซึม (Cytoplasm) อยู่หนาแน่นในเซลล์ มีกลุ่มโปรตีนที่มีรูปร่าง (Protein bodies) กลุ่มไขมัน (Lipid bodies) และสารอื่น เช่น นิวเคลียส (Nucleus) ไมโครบอดี (Micro bodies) ไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (Endoplasmicreticulum) เวสิเคิล (Vesicle) เป็นต้น ส่วนเซลล์แอลิวโรน ที่ห่อหุ้มคัพภะจะบางและมีไซโทพลาสซึมน้อย รูปร่างยาว มีกลุ่มไขมันและโปรตีนน้อย

4.1) คัพภะหรือเชื้อชีวิต จะอยู่ที่โคนเมล็ดด้านเปลือกใหญ่ ส่วนท้องของเมล็ดมีส่วนประกอบเป็นรากอ่อน เรดิเคิล (Radicle) ต้นอ่อน (Plumule) เยื่อหุ้มรากอ่อน (Coleorhizae) เยื่อหุ้มต้นอ่อน (Coleoptile) ท่อน้ำ ท่ออาหารและใบเลี้ยง (Scutellum) ซึ่งเป็นใบเลี้ยงเดี่ยว คัพภะเป็นแหล่งสะสมอาหารที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของต้นอ่อน จึงอุดมไปด้วยโปรตีนและไขมันในส่วนต่าง ๆ

4.2) เนื้อเมล็ด หรือเนื้อข้าว ส่วนที่เป็นแป้ง เรียกว่า เอ็นโดสเปิร์ม (Endosperm) มีมากที่สุดในเมล็ดข้าว (ประมาณร้อยละ 80 ของน้ำหนักเมล็ดข้าวทั้งหมด) เอนโดสเปิร์มจะถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อแอลิวโรนหรือเยื่อชั้นใน และประกอบด้วย เซลล์พาเรนไคมา (Parenchyma cell) ที่มีผนังบางบรรจุเม็ดแป้ง (Compound starch granule) ไว้เต็มโดยมีโปรตีนแทรกอยู่รอบนอกใกล้กับชั้นของเยื่อแอลิวโรน



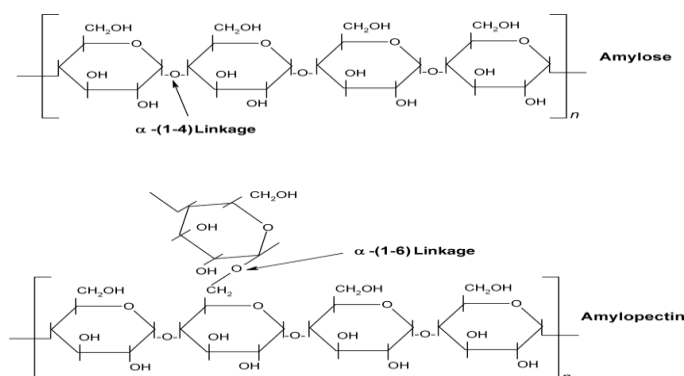
ภาพที่ 10 โครงสร้างของเมล็ดข้าว

ที่มา: อรอนงค์ นัยวิกุล (2550)

2.9.3 สตาร์ช (Starch)

สตาร์ช (Starch) หรือแป้ง เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลแอนไฮโดรกลูโคส ซึ่งประกอบไปด้วยหน่วยของน้ำตาลกลูโคสมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะกลูโคซิดิก (glucosidic linkage) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 กับคาร์บอนตำแหน่งที่ 4 (หรือ 6) ของ

น้ำตาลแอนไฮโดรกลูโคสถัดไป ทางด้านตอนปลายของสายพอลิเมอร์ที่มีหน่วยกลูโคสที่มีหมู่ แอลดีไฮด์ (Aldehyde group) เรียกว่า ปลายรีดิวซิง (Reducing end group) แบ่งประกอบด้วยพอลิเมอร์กลูโคส 2 ชนิด คือ พอลิเมอร์เชิงเส้น (อะไมโลส) และพอลิเมอร์เชิงกิ่ง (อะไมโลเพคติน) แบ่งที่มาจากแหล่งที่แตกต่างกันจะมีอัตราส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินต่างกัน



ภาพที่ 11 โครงสร้างของสตาร์ช

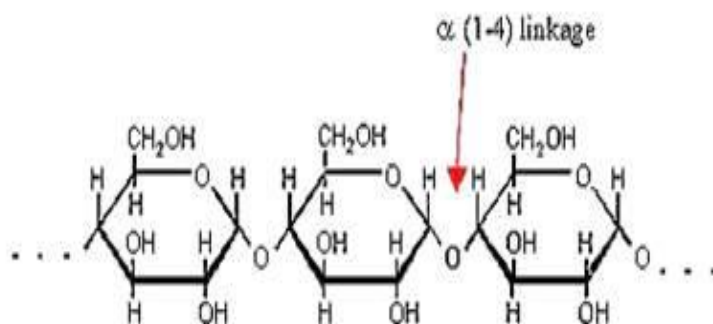
ที่มา: Luftl et al. (2014)

2.9.4 องค์ประกอบภายในสตาร์ช (กล้านรงค์ ศรีรอต และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

2.9.4.1 อะไมโลส (Amylose)

เป็นพอลิเมอร์เชิงเส้นที่ประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 2,000 หน่วย เชื่อมต่อกันพันธะไกลโคซิดิก(glycosidic linkage) ชนิดแอลฟา-1,4 (α -1,4) แสดงดังภาพที่ 7 แบ่งจากธัญพืช เช่น แป้งข้าวโพด แป้งสาลีแป้ง ข้าวฟ่าง มีปริมาณอะไมโลสสูงประมาณร้อยละ 28 ข้าวเหนียวมีปริมาณอะไมโลส ประมาณร้อยละ 2 ข้าวเจ้ามีปริมาณอะไมโลสประมาณร้อยละ 10 ถึง 34 แบ่งจากรากและหัว เช่น แป้งมันสำปะหลัง แป้งมันฝรั่ง แป้งสาคุมีปริมาณอะไมโลสต่ำ ประมาณร้อยละ 20 น้ำหนักโมเลกุลของอะไมโลสอยู่ในช่วง 10^5 ถึง 10^6 ดาลตัน ซึ่งอะไมโลสในแป้งแต่ละชนิดมีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกันไป ในแป้งมันฝรั่งและแป้งมันสำปะหลังมีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า แป้งข้าวโพดและแป้งสาลี แป้งแต่ละชนิดมีความเข้มข้นและระดับขั้นพอลิเมอร์ (Degree of polymerization, DP) ของอะไมโลสแตกต่างกัน แป้งมันฝรั่งและแป้งมันสำปะหลัง มีขนาด โมเลกุลของอะไมโลสอยู่ในช่วง 1,000 ถึง 6,000 ซึ่งสูงกว่าแป้งข้าวโพดและแป้งสาลี ซึ่งมีขนาดโมเลกุลของอะไมโลสในช่วง 200 ถึง 1,200 แป้งที่มีโมเลกุลของอะไมโลสยาวขึ้นจะมีแนวโน้มในการเกิดรีโทรเกรเดชัน (retrogradation) ลดลง อะไมโลสสามารถรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับไอโอดีน 10 ให้สีน้ำเงินและสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ เช่น บิวทานอล กรดไขมัน สารลดแรงตึงผิว ฟีนอลและไฮโดรคาร์บอน สารประกอบเชิงซ้อนเหล่านี้ไม่ละลายน้ำ โดยอะไมโลสพันเป็นเกลียวล้อมรอบ สารประกอบอินทรีย์ นอกจากนี้

อะไมโลสที่รวมตัวกับไอโอดีนจะให้สีน้ำเงิน ซึ่งใช้เป็นลักษณะเฉพาะที่บ่งบอกถึงแป้งที่มีองค์ประกอบของอะไมโลส

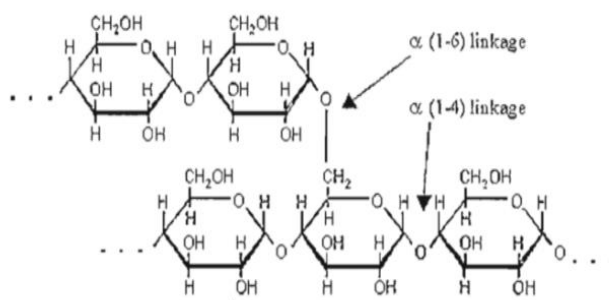


ภาพที่ 12 โครงสร้าง Amylose

ที่มา: Kasemsuwan et al. (1999)

2.9.4.2 อะไมโลเพกติน (Amylopectin)

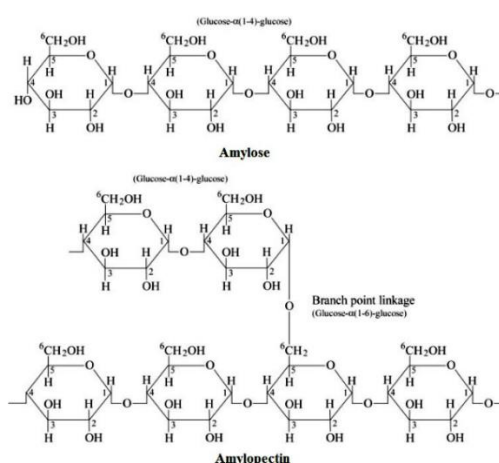
อะไมโลเพกติน (amylopectin) เป็นพอลิเมอร์เชิงกิ่งของกลูโคส ส่วนที่เป็นเส้นตรง ของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α -1, 4 และส่วนที่เป็นกิ่งสาขาที่เป็นพอลิเมอร์ กลูโคสสายสั้น มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 10 ถึง 60 หน่วย เชื่อมต่อกัน ด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิด α -1, 6 แสดงดัง (ภาพที่ 13) ขนาดของโมเลกุลของอะไมโลเพกตินในแป้งแต่ละชนิดมีค่าประมาณ 2 ล้านหน่วยอะไมโลเพกตินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1,000 เท่าของอะไมโลส คือประมาณ 10^7 ถึง 10^9 ดาลตัน และมีอัตราในการคืนตัวต่ำ เนื่องจากอะไมโลเพกตินมีลักษณะโครงสร้างเป็นกิ่ง ปริมาณ กิ่ง ในอะไมเพกตินจะมีประมาณร้อยละ 4 ถึง 5 เมื่อย้อมอะไมโลเพกตินด้วยสารละลายไอโอดีนจะให้สีม่วง แดง เมื่ออะไมโลเพกตินอยู่ในสารละลายในสภาวะที่เป็นกลางจะไม่เกิดรีโทรเกรเดชัน เนื่องจากโมเลกุลจะเสถียรหรือคงตัวเพราะการมีกิ่งก้านมากทำให้ไม่สามารถรวมตัวกัน ได้ง่ายเหมือนอะไมโลส และอะไมโลเพกตินของแป้งแต่ละชนิดมีปริมาณที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 13 โครงสร้าง Amylopectin

ที่มา: จุฬาลักษณ์ จวนสง (2553)

อะไมโลสจะไม่มีกิ่งแยกออกมาจาก starch chain (เป็นเพียงสายของโมเลกุล กลูโคส ต่อกันยาว ๆ เป็นโซ่) ส่วนอะไมโลเพกติน โมเลกุลจะมีกิ่งแยกออกมาจากจุดศูนย์กลาง และปลายสุดของโมเลกุลจะเชื่อมกับกิ่งอีกสองกิ่ง และปลายของอีกทั้งสองกิ่งก็จะเชื่อมกับกิ่งอีกสองกิ่ง โครงสร้างของอะไมโลเพกตินจะมีโครงสร้างซับซ้อนกว่าอะไมโลสมาก ปลายของ chain ของ amylose และ amylopectin จะมี end อยู่สองแบบคือ reducing และ nonreducing end ใน amylopectin นั้นปลายของกิ่งจะเป็น nonreducing end ทั้งหมด ส่วนโมเลกุลที่เป็นก้านจะเป็น reducing end ส่วน amylose นั้นมีปลายอยู่สองด้าน ปลายด้านหนึ่งจะเป็น reducing end และปลายอีกด้านหนึ่งเป็น nonreducing end



ภาพที่ 14 โครงสร้างอะไมโลสและอะไมเพกติน

ที่มา: Babak and Hadi (2013)

โดยทั่วไปแล้วในแป้งชนิดต่าง ๆ จะมีปริมาณอะไมโลสและอะไมโลเพกตินของแป้งที่แตกต่างกัน (ดังตารางที่ 4) ซึ่งปริมาณของอะไมโลสและอะไมโลเพกตินของแป้งที่แตกต่างกันนั้นจะทำให้แป้งมีคุณสมบัติต่างกัน

ตารางที่ 4 ปริมาณอะไมโลสและอะไมโลเพกตินของแป้งชนิดต่าง ๆ

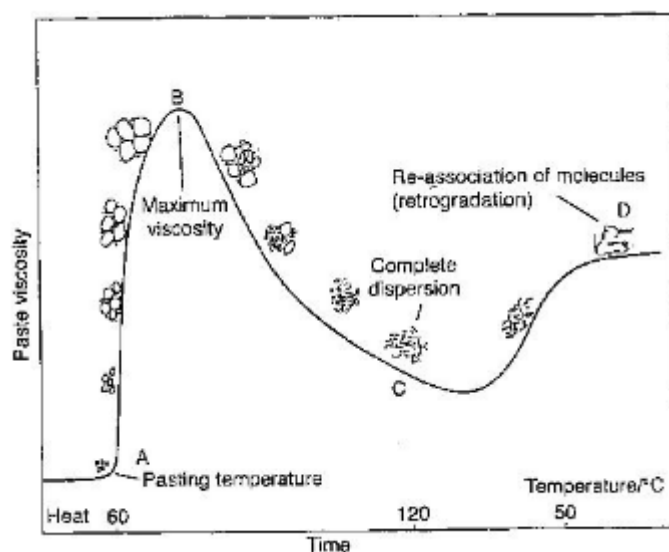
ชนิดของแป้ง	ปริมาณอะไมโลส (%)	ปริมาณอะไมโลเพกติน (%)
แป้งสาลี	28	72
แป้งข้าวโพด	28	72
แป้งมันสำปะหลัง	17	83
แป้งมันฝรั่ง	21	79
แป้งข้าวเหนียว	2	98
แป้งข้าวเจ้า	17	83

ที่มา: กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ (2546)

2.9.5 สมบัติทางเคมีกายภาพของข้าว

2.9.5.1 การเกิดเจลาตินในเซชัน (gelatinization)

การเกิดเจลาตินในเซชัน (gelatinization) คือปรากฏการณ์ของน้ำแป้งเมื่อได้รับความร้อนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในโมเลกุลของเม็ดแป้ง (starch granule) เนื่องจากความร้อนทำลายพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลของสตาร์ชในเม็ดแป้ง สายโพลีเมอร์ของอะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพกติน (amylopectin) ที่อัดแน่นอยู่ในเม็ดแป้งจะคลายตัวและรวมกับน้ำที่ล้อมรอบ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเม็ดแป้งพองตัว และความหนืดของน้ำแป้งเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง อุณหภูมิที่สตาร์ชเริ่มเกิดการเจลาตินในเซชัน เรียกว่า gelatinization temperature อยู่ในช่วงอุณหภูมิ ประมาณ 60 ถึง 70 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ช่วงนี้เม็ดแป้งยังคงมีสภาพอยู่ได้โดยไม่แตกออก เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นเม็ดแป้งจะพองตัวเพิ่มขึ้นและมีความหนืดสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง เกิดลักษณะของน้ำแป้งข้น (starch paste) ความหนืดจะเพิ่มสูงขึ้นจนกระทั่งถึงจุดที่เม็ดแป้งเกิดการพองตัวสูงสุด และให้ความหนืดสูงสุด (maximum viscosity) จากนั้นเม็ดแป้งจะแตกมากที่สุดซึ่งไม่สามารถคืนสภาพได้หรือ มีการกวนอย่างรุนแรงจนเม็ดแป้งแตกออก แป้งที่ละลายได้จะละลายออกมาทำให้ความหนืดของ สารละลายน้ำแป้งเพิ่มขึ้น แสดงดังภาพที่ 9 (กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2546)

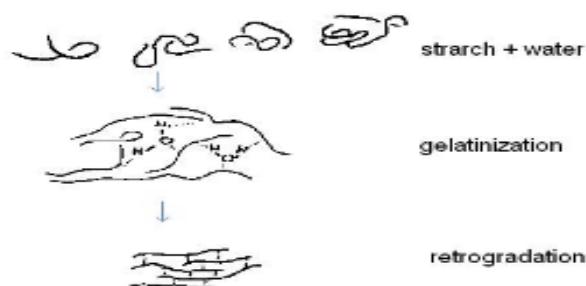


ภาพที่ 15 การเกิดเจลลิตินเซชันของเม็ดแป้ง

ที่มา: จุฬาลักษณ์ จวนสง (2553)

2.9.5.2 การเกิดรีโทรเกรเดชัน (Retrogradation)

การเกิดรีโทรเกรเดชัน (retrogradation) การคืนตัวของแป้งสุกเป็นปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้น เมื่อนำน้ำแป้งสุกหลังการให้ความร้อนมาลดอุณหภูมิทำให้โมเลกุลอิสระของอะไมโลสซึ่งอยู่ไกลกันเคลื่อนที่เข้ามาใกล้กันและจับกัน ด้วยพันธะไฮโดรเจนทำให้เกิดสภาพการจัดเรียงตัวของโมเลกุลใหม่แสดงดัง (ภาพที่ 16) ถ้าน้ำแป้งสุกมีความเข้มข้นต่ำ การจัดเรียงตัวของโมเลกุลเหล่านี้จะทำให้เกิดลักษณะตะกอนขุ่นสีขาว แต่ถ้าน้ำแป้งมีความเข้มข้นสูง จำนวนโมเลกุลที่มาจัดเรียงตัวกันใหม่มีมาก และระหว่างเคลื่อนที่เข้ามาจับกันจะสามารถกักเก็บน้ำไว้ได้ทำให้ความหนืดเพิ่มขึ้นและในที่สุดเกิดลักษณะเจลที่อ่อนนุ่ม การคืนตัวของน้ำแป้งโดยทั่วไปจะเกิดได้ดีเมื่อน้ำแป้งมีความเข้มข้นสูง และทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิต่ำ แป้งแต่ละชนิดมีอัตราการคืนตัวของน้ำแป้งสุกแตกต่างกัน เม็ดแป้ง หรือโมเลกุลอะไมโลสอิสระที่หลุดออกมาทำให้เกิดสภาพเป็น matrix ซึ่งยึดจับเป็นโครงร่างอยู่ด้วยกันด้วยพันธะไฮโดรเจน และสามารถกักเก็บน้ำไว้ได้การมีอะไมโลเพกตินอยู่ด้วยทำให้อัตราการคืนตัวของน้ำแป้งสุกช้าลง เนื่องจากโมเลกุลอะไมโลเพกตินมีกิ่งก้านทำให้ขัดเกะกยากที่โมเลกุลอะไมโลสจะเคลื่อนที่เข้ามาจับกันใหม่ได้ ขนาดโมเลกุลของอะไมโลสในแป้งแต่ละชนิดมีผลในการเกิดการคืนตัวของน้ำแป้งสุกด้วย โดยโมเลกุลอะไมโลสที่มีขนาดพอเหมาะในการเคลื่อนที่มาจับกันคือในช่วง 120 ถึง 200 หน่วยกลูโคส ส่วนแป้งที่มีอะไมโลสที่มีขนาดใหญ่ ประมาณ 1,000 ถึง 6,000 หน่วยกลูโคส เช่น แป้งมันฝรั่งอะไมโลสจะเคลื่อนที่เข้ามาจับกันได้ยาก แต่ขณะเดียวกัน ถ้าโมเลกุลของอะไมโลสสั้นเกินไปจะเคลื่อนที่อยู่ตลอดเวลาทำให้จับกันยากเช่นกัน (อริญา ลามโคสูง, 2555)

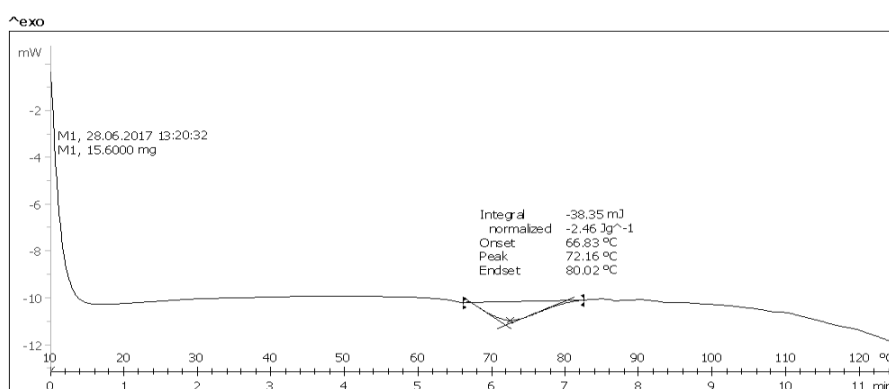


ภาพที่ 16 การเกิดเจลและเกิดรีโทรกราเดชันของอะไมโลส

ที่มา: ปาริตา ขุนแอ (2550)

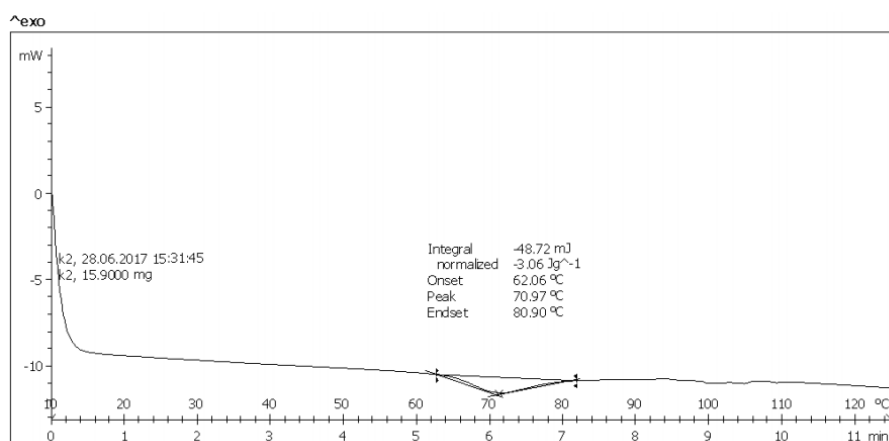
2.9.6 สมบัติทางความร้อน (Thermal properties) ของแป้งข้าวพันธุ์หลิ้นกระยะเมาและระยะแก่

วัชรเกียรติ อินธิเดช (2559) ได้ทำการวิเคราะห์การเกิดเจลลาตินในเซชันของแป้งข้าวพันธุ์หลิ้นกระยะเมาและระยะแก่ด้วยการวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของแป้งข้าวระยะเมาและระยะแก่พันธุ์หลิ้นกโดยใช้เครื่อง Differential scanning calorimetry (DSC) จากการศึกษาการให้ความร้อนแก่ตัวอย่างแป้งที่ความเข้มข้นร้อยละ 50 (w/w) ช่วงอุณหภูมิการวิเคราะห์ 10 ถึง 120 องศาเซลเซียส อัตราการให้ความร้อน 10 องศาเซลเซียสต่อนาที (Puncha-arnon et al., 2007) โดยแสดงในรูปแบบ Thermogram ซึ่งเป็นกราฟระหว่าง Heat flow กับอุณหภูมิและพลังงานที่ใช้ในการเกิดเจลลาตินในเซชัน (Enthalpy, J/g) ได้จากพื้นที่ใต้กราฟหารน้ำหนักแป้งตัวอย่าง (แสดงดังภาพที่ 17 และ 18) โดยกราฟที่ได้จะมีลักษณะเป็น endothermal เป็นการดูดพลังงานเข้าไปเพื่อทำลายพันธะไฮโดรเจนของแป้งทำให้กราฟที่ได้มีลักษณะดังลงค่าที่ได้จึงติดลบ



ภาพที่ 17 กราฟ Thermogram แสดงการเกิดเจลลาตินในเซชันของสตาร์ชข้าวระยะเมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Differential scanning calorimetry

ที่มา: วัชรเกียรติ อินธิเดช (2559)



ภาพที่ 18 กราฟ Thermogram แสดงการเกิดเจลลิตีในเซชันของสตาร์ชข้าวระยะแแก้ววิเคราะห์ด้วยเครื่อง Differential scanning calorimetry

ที่มา: วุชรเกียรติ อินธิเดช (2559)

สำหรับแป้งข้าวพันธุ์ลิ้นกระยะเฒ่าและระยะแแก้ว พบว่ามีช่วงอุณหภูมิในการเกิดเจลลิตีในเซชันที่แตกต่างกัน โดยจะเห็นว่าแป้งข้าวระยะเฒ่ามีช่วงอุณหภูมิเริ่มเปลี่ยนแปลง (onset temperature) มีค่า 66.40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดในการเกิดเจลลิตีในเซชัน (peak temperature) มีค่า 72.44 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสุดท้ายในการเกิดเจลลิตีในเซชัน (enset temperature) มีค่า 79.85 องศาเซลเซียส และเมื่อทำการศึกษาช่วงอุณหภูมิในการเกิด เจลลิตีในเซชันในแป้งข้าวระยะแแก้วซึ่งใช้วิธีวิเคราะห์เช่นเดียวกับแป้งข้าวระยะเฒ่า พบว่าแป้งข้าวระยะแแก้วมีช่วงอุณหภูมิเริ่มเปลี่ยนแปลง (onset temperature) มีค่า 62.11 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดในการเกิด เจลลิตีในเซชัน (peak temperature) มีค่า 71.05 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสุดท้ายในการเกิด เจลลิตีในเซชัน (enset temperature) มีค่า 80.94 องศาเซลเซียส และสำหรับค่าพลังงานที่ใช้ในการเกิดเจลลิตีในเซชัน (Enthalpy, J/g) ของแป้งข้าวระยะเฒ่า เท่ากับ 2.32 (J/g) และแป้งข้าวระยะแแก้ว เท่ากับ 3.06 (J/g) เมื่อทำการเปรียบเทียบ จะเห็นได้ว่าแป้งข้าวระยะแแก้วมีค่าพลังงานที่ใช้ในการเกิด เจลลิตีในเซชันสูงกว่าแป้งข้าวระยะเฒ่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ดังตารางที่ 5) และจาก ตารางจะเห็นได้ว่าอุณหภูมิเริ่มต้นของการเกิดเจลลิตีในเซชันของแป้งข้าวระยะเฒ่าสูงกว่าแป้งข้าว ระยะแแก้ว อาจเกิดเนื่องจากแป้งข้าวระยะเฒ่ามีปริมาณไขมันสูงกว่าแป้งข้าวระยะแแก้ว ซึ่งไขมันจะไป ส่งผลต่อคุณสมบัติของแป้งโดยจะไปลดความสามารถในการละลายการดูดซับน้ำ และการพองตัวของ เม็ดแป้ง (กล้านรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2546) ส่งผลให้แป้งข้าวระยะเฒ่าใช้อุณหภูมิ เริ่มต้นในการเกิดเจลลิตีในเซชัน สูงกว่าแป้งข้าวระยะแแก้ว ($P \leq 0.05$) เพื่อทำให้เม็ดแป้งแตกออก (ดัง แสดงผลในตารางที่ 5) แต่กลับพบว่า อุณหภูมิสุดท้ายในการเกิดเจลลิตีในเซชันของแป้งข้าวระยะเฒ่ามี ค่าต่ำ กว่าแป้งข้าวระยะแแก้ว ($P \leq 0.05$) จึงส่งผลต่อค่าความแตกต่างของอุณหภูมิเริ่มต้นและอุณหภูมิ

สุดท้ายของแป้งข้าวยะเยมีค่าต่ำกว่าแป้งข้าวยะเยแก่ ($P \leq 0.05$) และส่งผลต่อค่าพลังงานในการเกิดเจลลิตในเซชันของแป้งข้าวยะเยมีค่าต่ำกว่าแป้งข้าวยะเยแก่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) นั้นอาจเป็นเพราะว่าลักษณะโครงสร้างของอะไมโลสหรือกิ่งก้านของอะไมโลเพคตินในแป้งข้าวยะเยมีค่าอาจยังพัฒนาเป็นแป้งไม่สมบูรณ์ ซึ่งทำให้พลังงานในการเกิดเจลลิตในเซชันมีค่าต่ำก็ว่าได้ สำหรับแป้งข้าวยะเยแก่ที่มีการพัฒนาเป็นแป้งสมบูรณ์และเม็ดแป้งมีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบทำให้มีช่วงอุณหภูมิการเกิดเจลลิตในเซชันที่กว้างกว่าแป้งข้าวยะเยมีค่า อย่างไรก็ตามแนวโน้มผลการทดลองนี้ก็ยังไม่ชัดเจน แต่จากการศึกษาของ Bello-Perez et al. (2000) ที่ทำการศึกษาการเกิดเจลลิตในเซชันของแป้งกล้วย Macho พบว่าอุณหภูมิในการเกิดเจลลิตในเซชันต่ำกว่าแป้งกล้วย Square และมีค่าพลังงานในการเกิดเจลลิตในเซชัน สูงกว่าแป้งกล้วย Kaur et al. (2004) ได้ทำการศึกษาการเกิดเจลลิตในเซชันของแป้งมะม่วง ซึ่งพบว่ามีอุณหภูมิในการเกิดเจลลิตในเซชันสูงกว่าแป้งกล้วย Square และมีค่าพลังงานในการเกิดเจลลิตในเซชันต่ำกว่าแป้งกล้วย Square ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลการศึกษาที่ได้มีแนวโน้มเป็นไปในทิศทางเดียวกัน เนื่องจากได้ทำการศึกษาแป้งคนละชนิด ซึ่งอาจมีส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินที่แตกต่างกัน ส่งผลให้มีการจัดเรียงตัวกันภายในเม็ดแป้งที่อาจมีโครงสร้างที่ไม่สม่ำเสมอจึงทำให้เม็ดแป้งมีขนาดที่แตกต่างกันดังนั้นแป้งแต่ละชนิดจึงมีอุณหภูมิและค่าพลังงานที่ใช้ในการเกิดเจลลิตในเซชันที่แตกต่างกันไปตามองค์ประกอบและชนิดของแป้ง (Torre-Gutierrez et al., 2008)

ตารางที่ 5 สมบัติทางความร้อนของแป้งที่วิเคราะห์จากเครื่อง Differential Scanning Calorimetry (DSC) ของสตาร์ข้าวยะเยมีและยะเยแก่

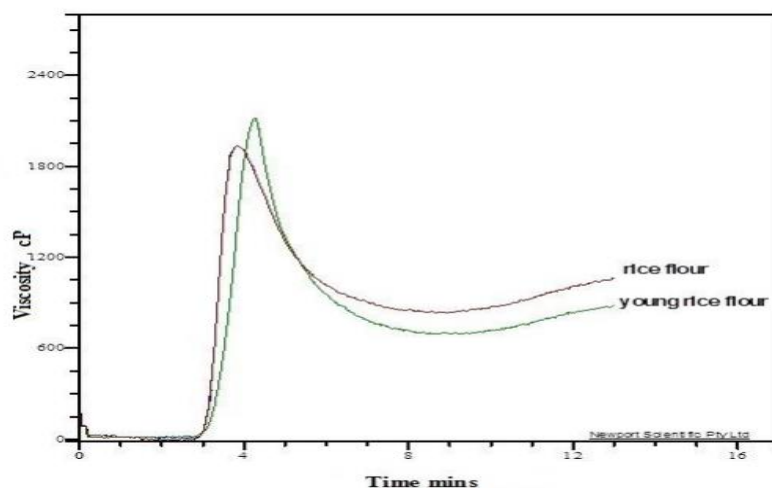
ชนิดของแป้ง	Gelatinization temperature (°C)				Enthpy (ΔH) (J/g) ^(ns)
	$T_0^{(ns)}$	T_p	T_e	$T_e - T_0$	
ข้าวยะเยมี	62.75±0.53	72.51±0.16 ^a	80.88±2.59 ^a	18.13±3.09 ^a	3.44±0.30
ข้าวยะเยแก่	63.81±1.19	71.04±0.26 ^b	78.92±1.46 ^b	15.11±2.63 ^b	3.78±0.17

หมายเหตุ: ^{a-b} ที่ต่างกันแนวตั้งหมายถึงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
^(ns) หมายถึงค่าเฉลี่ยในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ที่มา: วชรเกียรติ อินธิเดช (2559)

2.9.7 การศึกษาพฤติกรรมด้านความหนืดของแป้งข้าวเหนียวพันธุ์หลิ้นกระยะเฒ่าและระยะแก่

จากการศึกษาของ วัชรเกียรติ อินธิเดช (2559) ได้ศึกษาพฤติกรรมด้านความหนืดของแป้งข้าวพันธุ์หลิ้นกระยะเฒ่าและระยะแก่ ด้วยเครื่อง Rapid Visco Analyzer (RVA) (ดังภาพที่19) พบว่าแป้งข้าวระยะเฒ่ามีค่า Peak viscosity, Break down, Final viscosity และ Set back ดังนี้ 1955, 1239.33, 876.00 และ 177.00 cP ตามลำดับ ส่วน แป้งข้าวระยะแก่มีค่า Peak viscosity, Break down, Final viscosity และ Set back ดังนี้ 1875, 1094.33, 1060.33 และ 233.00 cP ตามลำดับ



ภาพที่ 19 พฤติกรรมความหนืดของสตร้าข้าวระยะเฒ่าและระยะแก่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Rapid ViscoAnalyzer (RVA)

ที่มา: วัชรเกียรติ อินธิเดช (2559)

จากพฤติกรรมด้านความหนืดของแป้งข้าวทั้งสองระยะจะเห็นได้ว่าแป้งข้าวระยะเฒ่ามีค่า Peak viscosity สูงกว่าแป้งข้าวระยะแก่ เนื่องจากแป้งข้าวระยะเฒ่ามีโครงสร้างอะไมโลสสายสั้น เมื่อได้รับความร้อนในการเกิดเจลจึงสามารถทำให้โมเลกุลเกิดการเคลื่อนที่ได้ดีกว่าแป้งข้าวระยะแก่ ส่งผลให้แป้งข้าวระยะเฒ่ามีค่า Peak viscosity สูงกว่าแป้งข้าวระยะแก่ สำหรับแป้งข้าวระยะแก่มีค่า Final viscosity และค่า Set back สูงกว่าแป้งข้าวระยะเฒ่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) (ดังตารางที่ 6) เนื่องจากแป้งข้าวระยะเฒ่ามีปริมาณไขมันมากกว่าแป้งข้าวระยะแก่ ซึ่งทำให้ไขมันในแป้งข้าวระยะเฒ่าไปขัดขวางการดูดซับน้ำ การพองตัวของเม็ดแป้งในระยะเวลาทำให้ส่งผลต่อ ค่าความหนืดของแป้งข้าวระยะเฒ่ามีค่าต่ำกว่าแป้งข้าวระยะแก่ สำหรับค่า Set back ของแป้งข้าวทั้งสองระยะพบว่าแป้งข้าวแป้งข้าวระยะแก่มีค่า Set back สูงกว่าแป้งข้าวระยะเฒ่า เนื่องจากแป้งข้าวระยะแก่มีอะไมโลส

ที่มีโครงสร้างสมบูรณ์กว่าและเมื่อแบ่งเกิดเป็นเจล และเมื่อลดอุณหภูมิลงทำให้อะไมโลสเกิดการจัดเรียงตัวได้ต่ำกว่าแป้งข้าวระยะเม่า จึงทำให้มีค่าความหนืดสูงกว่าแป้งข้าวระยะเม่า ซึ่งจะส่งผลต่อการผลิตแป้งที่ย่อยได้ช้า เพราะการที่แป้งที่เกิดการจัดเรียงตัวกันได้ดีจะส่งเสริมให้ผลึกและโครงสร้างของแป้งมีความแข็งแรง ซึ่งจะส่งผลต่อปริมาณแป้งที่ย่อยได้ช้า สำหรับค่า Break down พบว่าแป้งข้าวระยะเม่ามีค่าสูงกว่าแป้งข้าวระยะแก่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ซึ่งค่า Break down จะบอกถึงความคงทนของเม็ดแป้งต่ออุณหภูมิและการกวนที่เป็นปัจจัยสำคัญในการผลิต การที่แป้งข้าวระยะแก่มีค่า Break down ต่ำกว่าแป้งระยะเม่าบ่งบอกว่าเม็ดแป้งมีความแข็งแรง ซึ่งอาจเกิดจากโครงสร้างของแป้งที่มีการพัฒนาสมบูรณ์ นอกจากนี้ความหนืดของแป้งยังขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยรวมทั้งสมบัติทางโครงสร้างของแป้งด้วย เช่น ปริมาณอะไมโลส ไขมัน ความยาวของกิ่งก้าน อะไมโลเพคติน ซึ่งอะไมโลเพคตินจะช่วยส่งเสริมให้เม็ดแป้งสามารถพองตัวได้ง่ายและทำให้แป้งมีความหนืดสูงในขณะที่มีปริมาณอะไมโลสที่มีผลต่อค่าความหนืด ซึ่งความหนืดของแป้งที่มีปริมาณอะไมโลสสูงจะสูงกว่าแป้งข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสต่ำ เมื่อพิจารณาจากองค์ประกอบทางเคมีของแป้งข้าวทั้งสองชนิดจะเห็นได้ว่า แป้งข้าวระยะเม่าที่มีปริมาณไขมันสูงกว่าแป้งข้าวระยะแก่ จึงเป็นผลทำให้แป้งข้าวระยะเม่ามีค่า Peak viscosity สูงกว่าแป้งข้าวระยะแก่ โดยแม้ว่าแป้งข้าวทั้งสองระยะจะมีปริมาณอะไมโลสที่ไม่แตกต่างกัน องค์ประกอบอื่น ๆ ของแป้ง เช่น โปรตีน หรือ ไขมันก็มีบทบาทต่อสมบัติด้านความหนืดของแป้งด้วยเช่นกัน (สันถณีย์ ปัญจอนันท์ และคณะ, 2557; อ้างอิงจาก Hamaker and Griffin, 1993) ซึ่งจากการทดลองพบว่าโปรตีนในแป้งข้าวทั้งสองระยะไม่แตกต่างกัน แต่แป้งข้าวระยะเม่ามีปริมาณไขมันสูงกว่าแป้งข้าวระยะแก่ ซึ่งผลการทดลองของสอดคล้องกับสันถณีย์ ปัญจอนันท์ และคณะ (2557) ซึ่งได้ศึกษาพฤติกรรมด้านความหนืดของแป้งมันมือเสือและแป้งกลอย โดย พบว่าแป้งกลอยมีปริมาณไขมันและโปรตีนสูงกว่าแป้งมันมือเสือเป็นผลให้แป้งกลอยมีค่า Peak viscosity Break down และ Set back ต่ำกว่าแป้งมันมือเสือ

ตารางที่ 6 ค่าความหนืดของแป้งข้าวระยะเม่าและระยะแก่

ชนิดของแป้ง	Peak viscosity (cP)	Breakdown (cP)	Final Viscosity (cP)	Setback (cP)
ระยะเม่า	1995.00±20.52 ^a	1239.33±21.73 ^a	876.00±9.54 ^b	177.00±13.11 ^b
ระยะแก่	1875±17.44 ^b	1094.33±24.01 ^b	1060.33±14.19 ^a	233.00±2.65 ^a

หมายเหตุ: ^{a-b} ที่ต่างกันในแนวตั้งหมายถึงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ที่มา: วุชรเกียรติ อินธิเดช (2559)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ สารเคมี และอุปกรณ์

3.1.1 วัตถุดิบ

ข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ประกอบด้วยข้าวในระยะเმაและข้าวในระยะสุกแก่ ซึ่งได้จากแหล่งเพาะปลูกของเกษตรกร อำเภอโพธิ์ไทร จังหวัดอุบลราชธานี โดยข้าวในระยะเมาจะเก็บเกี่ยวข้าวเปลือกในหลังระย่น้ำนม 5-7 วัน หรือหลังดอกบานประมาณ 14 วัน โดยเก็บเกี่ยวในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2562 และนำข้าวเปลือกระยะเมามาบรรจุในถุงอะลูมิเนียมฟลอยด์ ก่อนนำมาเก็บที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส สำหรับข้าวระยะสุกแก่เก็บเกี่ยวข้าวเปลือกในเวลาหลังดอกบานประมาณ 30 วัน โดยเก็บเกี่ยวในเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2562 และนำมาบรรจุในถุงอะลูมิเนียมฟลอยด์ แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 มอลโตเดรกซ์ตริน (Maltodextrin) DE12 Food Grade จาก บริษัท เคมีภัณฑ์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด ประเทศไทย

3.1.2.2 ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Isomaltooligosaccharide) เชิงการค้า จาก บริษัท Richest Group Limited ประเทศจีน

3.1.2.3 กลูโคส (D-glucose) ยี่ห้อ DR. Enrenstofer GmbH (High Performance Liquid Chromatography grade, HPLC grade) ประเทศเยอรมัน (Germany)

3.1.2.4 ฟรุคโตส (D-fructose) ยี่ห้อ DR. Enrenstofer GmbH (High Performance Liquid Chromatography grade, HPLC grade) ประเทศเยอรมัน (Germany)

3.1.2.5 มอลโตส (maltose) ยี่ห้อ DR. Enrenstofer GmbH (High Performance Liquid Chromatography grade, HPLC grade) ประเทศเยอรมัน (Germany)

3.1.2.6 ซูโครส (D-saccharose) ยี่ห้อ DR. Enrenstofer GmbH (High Performance Liquid Chromatography grade, HPLC grade) ประเทศเยอรมัน (Germany)

3.1.2.7 ไอโซมอลโตส (Isomaltose) ยี่ห้อ Megazyme (High Performance Liquid Chromatography grade, HPLC grade) ประเทศอเมริกาเหนือ (North American)

3.1.2.8 มอลโตไตรโอส (maltotriose) ยี่ห้อ Megazyme (High Performance Liquid Chromatography grade, HPLC grade) ประเทศอเมริกาเหนือ (North American)

3.1.2.9 ไอโซมอลโตไตรโอส (isomaltotriose) ยี่ห้อ Megazyme (High Performance Liquid Chromatography grade ย่อ HPLC grade) ประเทศอเมริกาเหนือ (North American)

3.1.2.10 พาโนส (panose) ยี่ห้อ Megazyme (High Performance Liquid Chromatography grade ย่อ HPLC grade) ประเทศอเมริกาเหนือ (North American)

3.1.2.11 ไอโซพาโนส (Isopanose) ยี่ห้อ Megazyme (High Performance Liquid Chromatography grade ย่อ HPLC grade) ประเทศอเมริกาเหนือ (North American)

3.1.2.12 โคจิไรโบส (kojiribose) ยี่ห้อ Megazyme (High Performance Liquid Chromatography grade ย่อ HPLC grade) ประเทศอเมริกาเหนือ (North American)

3.1.2.13 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride, NaCl) ยี่ห้อ KemAus ประเทศออสเตรเลีย (Australia) เกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade ย่อ AR grade)

3.1.2.14 อาซิโตไนไตรล์ (CH_3CN) ยี่ห้อ Fisher ChemAlert (High Performance Liquid Chromatography grade ย่อ HPLC grade) ประเทศสหรัฐอเมริกา (United States of America, USA)

3.1.2.15 เอทิล แอลกอฮอล์ (Ethyl Alcohol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 99.9% ยี่ห้อ KemAus ประเทศออสเตรเลีย (Australia) เกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade ย่อ AR grade)

3.1.2.16 Hydrochloric acid (HCL) 37% ยี่ห้อ Qrec ประเทศนิวซีแลนด์ (Newzealand) เกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade ย่อ AR grade)

3.1.2.17 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide, NaOH) ยี่ห้อ Ajax ประเทศออสเตรเลีย (Australia) เกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade ย่อ AR grade)

3.1.2.18 กรดแลคติก (Lactic acid, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$) 88% ยี่ห้อ Loba Chemie เกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade ย่อ AR grade)

3.1.2.19 กลีเซอรอล (glycerol, $\text{CH}_2\text{OHCHOHCH}_2\text{OH}$) ยี่ห้อ CARLO ERBA ประเทศอิตาลี (Italy) เกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade ย่อ AR grade)

3.1.2.20 ฟีนอล (phenol, $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) ยี่ห้อ CARLO ERBA ประเทศอิตาลี (Italy) เกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade ย่อ AR grade)

3.1.2.21 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride, NaCl) ยี่ห้อ KemAus ประเทศออสเตรเลีย (Australia) เกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade ย่อ AR grade)

3.1.2.22 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate, Na_2CO_3) ยี่ห้อ KemAus ประเทศออสเตรเลีย (Australia) เกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade ย่อ AR grade)

3.1.2.23 โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium Chloride, KCl) ยี่ห้อ Ajax ประเทศออสเตรเลีย (Australia) เกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade ย่อ AR grade)

3.1.2.24 โซเดียมอะซิเตต ไตรไฮเดรต (Sodium Acetate Trihydrate, $C_2H_3NaO_5$) ยี่ห้อ Ajax ประเทศออสเตรเลีย (Australia) เกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade ย่อ AR grade)

3.1.2.25 ปีโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether) ยี่ห้อ RIC Labscan™

3.1.2.26 คอปเปอร์ ซัลเฟต (Copper (II) Sulphate, $CuSO_4$) ยี่ห้อ Ajax ประเทศออสเตรเลีย (Australia) เกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade ย่อ AR grade)

3.1.2.27 ลูกอลโซลูชัน (Lugol solution) ยี่ห้อ sigma ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ (Switzerland) เกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade ย่อ AR grade)

3.1.2.28 โพแทสเซียม ซัลเฟต (Potassium sulphate, K_2SO_4) ยี่ห้อ CARLO ERBA ประเทศอิตาลี (Italy) เกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade ย่อ AR grade)

3.1.2.29 เมทิลเรด (Methyl Red) ยี่ห้อ CARLO ERBA ประเทศอิตาลี (Italy) เกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade ย่อ AR grade)

3.1.2.30 กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid, H_2SO_4) ยี่ห้อ Loba Chemie™ ประเทศอินเดีย (India) เกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade ย่อ AR grade)

3.1.2.31 โปเตโต้ อะไมโลส (Potato from amylose) ยี่ห้อ sigma ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ (Switzerland) เกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade ย่อ AR grade)

3.1.2.32 กรดอะซิติก (Acetic acid, H_3CCOOH) ยี่ห้อ J.T. Baker เกรดวิเคราะห์ ประเทศสหรัฐอเมริกา (United States of America, USA) (Analytical reagent grade ย่อ AR grade)

3.1.2.33 ไอโอดีน (Iodine, I_2) ยี่ห้อ Ajax ประเทศออสเตรเลีย (Australia) เกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade ย่อ AR grade)

3.1.2.34 3,5 ไดไนโตรซาลิซิลิก (3,5- dinitrosalicylic acid, DNS) ยี่ห้อ CARLO ERBA ประเทศอิตาลี (Italy) เกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade ย่อ AR grade)

3.1.2.35 โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต (Potassium sodium tartrate, $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) ยี่ห้อ CARLO ERBA ประเทศอิตาลี (Italy) เกรดวิเคราะห์ (Analytical reagent grade ย่อ AR grade)

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.3.1 Plate count agar (PCA) ยี่ห้อ HIMEDIA ประเทศอินเดีย (India)

3.1.3.2 Potato dextrose agar (PDA) ยี่ห้อ HIMEDIA ประเทศอินเดีย (India)

3.1.3.3 Lactobacilli de Man Rogosa Sharpe agar (Lactobacilli MRS) ยี่ห้อ HIMEDIA ประเทศอินเดีย (India)

3.1.3.4 Lactobacillus MRS broth (MRS Broth) ยี่ห้อ HIMEDIA ประเทศอินเดีย (India)

3.1.3.5 Malt Extract Powder ยี่ห้อ HIMEDIA ประเทศอินเดีย (India)

3.1.3.6 Yeast extract peptone dextrose (YPD) ยี่ห้อ HIMEDIA ประเทศอินเดีย (India)

3.1.3.7 Yeast malt broth (YM Broth) ยี่ห้อ HIMEDIA ประเทศอินเดีย (India)

3.1.3.8 Tryptic Soy Agar (TSA) ยี่ห้อ HIMEDIA ประเทศอินเดีย (India)

3.1.3.9 Lauryl tryptose broth (LST) ยี่ห้อ HIMEDIA ประเทศอินเดีย (India)

3.1.3.10 EC broth ยี่ห้อ HIMEDIA ประเทศอินเดีย (India)

3.1.4 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.1.4.1 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC) (ยี่ห้อ Sunnyvale CA รุ่น DIONEX Ultimate 3000, ประเทศสหรัฐอเมริกา (United States of America)

3.1.4.2 คอลัมน์ ยี่ห้อ YMC-Pack Polyamine II column (4.6x250 mm) ประเทศญี่ปุ่น (Japan)

3.1.4.3 เครื่องวัดสี (Color meter) ยี่ห้อ Color Flex รุ่น Color Flex 45/0, ประเทศฝรั่งเศส (France)

3.1.4.4 เครื่องวัดการดูดกลืนแสงของสาร (Ultra violet -Visible Spectrophotometer: UV-VIS) ยี่ห้อ PG Instruments Limited, รุ่น T60UV/Visible, ประเทศสหรัฐอเมริกา (United States of America)

3.1.4.5 เครื่องวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน (Apparatus of Nitrogen Determination) ยี่ห้อ GERHARDT รุ่น Vap45S ประเทศอังกฤษ (England)

3.1.4.6 เครื่องสกัดไขมัน Solvent Extractors) ยี่ห้อ VELP Scientifica รุ่น SER148, ประเทศอิตาลี (Italy)

3.1.4.7 เครื่องวัดความหนืดแบบรวดเร็ว (Rapid Visco Analyser: RVA) ยี่ห้อ Perten Instruments รุ่น RVA 4500, ประเทศสหรัฐอเมริกา (United States of America)

3.1.4.8 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) (ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น FE20/FG2, ประเทศอังกฤษ (England)

3.1.4.9 กล้องจุลทรรศน์ (microscope) (ยี่ห้อ Optika รุ่น B-192 ประเทศอิตาลี (Italy)

3.1.4.10 เครื่องวิเคราะห์การเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ (X-ray diffraction: XRD) ยี่ห้อ PANalytical Empyrean รุ่น Xpert PRO ประเทศนิวซีแลนด์ (Newzealand)

4.1.4.11 เครื่องวิเคราะห์สมบัติทางความร้อน (Differential Scanning Calorimetry: DSC) ยี่ห้อ METTLER TOLEDO รุ่น DSC 1 Module ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ (Switzerland)

3.1.5 อุปกรณ์สำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

3.1.5.1 เตาไฟฟ้า (Hot plate) ยี่ห้อ M TOPS, รุ่น HP330D, ประเทศไทย (Thailand)

3.1.5.2 ตู้อบความร้อน (Hot Air Oven) ยี่ห้อ Memmert รุ่น UN10, ประเทศเยอรมัน (Germany)

3.1.5.3 ตู้บ่ม (Incubator) ยี่ห้อ Memmert รุ่น IN30, ประเทศเยอรมัน (Germany)

3.1.5.4 ตู้นึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave) ยี่ห้อ Tomy รุ่น ES315, ประเทศญี่ปุ่น (Japan)

3.1.5.5 ตู้ปลอดเชื้อ/ตู้กรองอากาศปราศจากเชื้อ (BSC/Laminar Flow) ยี่ห้อ HYSC LAB) รุ่น CB Series ประเทศไทย (Thailand)

3.1.5.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ยี่ห้อ Memmert, รุ่น BE600 S/NE601.0265 ประเทศเยอรมัน (Germany)

3.1.5.7 เครื่องเขย่า (Vortex shaker) รุ่น Vortex Genius 3, ยี่ห้อ IKA, ประเทศเยอรมัน (Germany)

3.1.5.8 กระบอกตวงแก้ว ขนาด 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml และ 1000 ml ยี่ห้อ PYREX ประเทศเยอรมนี (Germany)

3.1.5.9 เครื่องวัดอุณหภูมิ Thermometer ยี่ห้อ SATO รุ่น SK ประเทศญี่ปุ่น (Japan)

3.1.5.10 Erlenmeyer flasks ขนาด 100 ml และ 250 ml ยี่ห้อ PYREX ประเทศเยอรมนี (Germany)

3.1.5.11 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml และ 1000 ml ยี่ห้อ PYREX ประเทศเยอรมนี (Germany)

3.1.5.12 ปีกเกอร์ ขนาด 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml และ 1000 ml ยี่ห้อ PYREX ประเทศเยอรมนี (Germany)

3.1.5.13 Volumetric flask ขนาด 10 ml, 25 ml, 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml และ 1000 ml ยี่ห้อ PYREX ประเทศเยอรมนี (Germany)

3.1.5.14 ขวดใส่สารใส ขนาด 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml และ 1000 ml ยี่ห้อ PYREX ประเทศเยอรมนี (Germany)

3.1.5.15 ขวดใส่สารสีชา ปากกว้าง จุกแก้ว Reagent bottle amber ขนาด 250 ml และ 500 ml ยี่ห้อ PYREX ประเทศเยอรมนี (Germany)

3.1.5.16 Quartz Cuvette ขนาด 3.5 ml ยี่ห้อ LARK CIENTIFICO ประเทศฝรั่งเศส (France)

3.1.5.17 บิวเรต รุ่น 50 ml PTFE Stopcock ยี่ห้อ FAVORIT ประเทศเยอรมนี (Germany)

3.1.5.18 เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Auto Pipette) ยี่ห้อ RAININ ประเทศเยอรมนี (Germany)

3.1.5.19 หลอดทดลอง ขนาด 20 ml และ 25 ml ยี่ห้อ HGB ประเทศเยอรมนี (Germany)

3.1.5.20 ตะแกรงวางหลอดทดลอง ขนาด 5 x 10 ช่อง ยี่ห้อ HAIJULAB ประเทศสหรัฐอเมริกา (United States of America)

3.1.5.21 กระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาดรูกรอง 110 mm และเบอร์ 4 ขนาดรูกรอง 90 mm ยี่ห้อ Whatman ประเทศอังกฤษ (England)

3.1.5.22 กระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน ยี่ห้อ Whatman ประเทศอังกฤษ (England)

3.1.5.23 Aluminium pan ขนาด 40 µm ยี่ห้อ METTLER TOLEDO ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ (Switzerland)

3.1.5.24 ถาดสแตนเลสสี่เหลี่ยม ขนาด 50 x 35 x 3 cm

3.1.5.25 ขาตั้ง Lab เหล็กขาตั้งรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า

3.1.5.26 ข้อนสแตนเลส

3.1.5.27 ข้อนตักสารพลาสติก

3.1.5.28 ข้อนตักสารสแตนเลส

3.1.5.29 นาฬิกาจับเวลา

3.1.5.30 กรวยกรองแก้ว

3.1.5.31 กระบอกฉีดน้ำกลั่น ขนาด 500 ml

3.1.5.32 แท่งแก้วคนสาร

3.1.5.33 โถดูดความชื้น

3.1.5.34 จานเพาะเชื้อ (plate)

3.1.5.35 เข็มเย็บเชื้อ (Needle)

3.1.5.36 แท่งแก้วคนสาร (Stirring rod)

3.1.5.37 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.5.38 กระบอกฉีด (Foggy)

3.1.5.39 ห่วงเย็บเชื้อ (Loop)

3.1.5.40. คีม (Forcep)

- 3.1.5.41 Crucible tong
- 3.1.5.42 แผ่นสไลด์
- 3.1.5.43 สำลี
- 3.1.5.44 หม้อสแตนเลส
- 3.1.5.45 ผ้าขาวบาง ขนาด 90×115 cm
- 3.1.5.46 ถังพลาสติกซีปล็อก
- 3.1.5.47 อะลูมิเนียมฟลอยด์
- 3.1.5.48 ถ้วยพลาสติก ขนาด 100 กรัม
- 3.1.5.49 ไฟเบอร์แบค

3.1.6 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.1.6.1 *Aspergillus oryzae* TISTR 3102 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.1.6.2 *Aspergillus niger* TISTR 3102 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.1.6.3 *Escherichia coli* ATCC 25922 จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย อุบลราชธานี

3.1.6.4 *Lactobacillus acidophilus* La-14 จากสาขาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะ วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.6.5 *Saccharomyces cerevisiae* strain 1026 จากสาขาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

3.1.7 เครื่องมือวิทยาศาสตร์

3.1.7.1 เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (Analytical balance 4 digital) ยี่ห้อ Precisa รุ่น XB 220A ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ (Switzerland)

3.1.7.2 เครื่องชั่งน้ำหนัก 2 ตำแหน่ง (Analytical balance 2 digital) ยี่ห้อ METTLER TOLEDO รุ่น PB3002-S/FACT, ประเทศสหรัฐอเมริกา (United States of America)

3.1.7.3 เครื่องวัดวอเตอร์แอคติวิตี ยี่ห้อ Novasina รุ่น 21CFR11 LabSwift-AW ประเทศฟินแลนด์ (Finland)

3.1.7.4 เครื่องวัดการหักเหของแสงแบบมือ (Hand Refractometer) ช่วงที่วัด 28-62 °Brix ยี่ห้อ ATC รุ่น RHB-62ATC ประเทศอังกฤษ (England)

3.1.7.5 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuges) (ยี่ห้อ Universal, รุ่น 32R, ประเทศ สหรัฐอเมริกา (United States of America)

3.1.7.6 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Refrigerated centrifuge) ยี่ห้อ Hermle, รุ่น Z36HK, ประเทศเยอรมนี (Germany)

3.1.7.7 เครื่องกวน (Stirrer) รุ่น RW20 digital, ยี่ห้อ IKA, ประเทศเยอรมนี (Germany)

3.1.7.8 เครื่องบด (Grinding machine) รุ่น 643, ยี่ห้อ Moulinex, ประเทศเม็กซิโก (Mexico)

3.1.7.9 เครื่องเขย่าตะแกรงร่อน (Sieve shaker) ยี่ห้อ ENDECOTTS รุ่น OCTAGON 200 ประเทศอังกฤษ (England)

3.1.7.10 ตู้แช่เย็น (Refrigerator) ยี่ห้อ MIRAGE รุ่น BC-249(F) ประเทศไทย (Thailand)

3.1.7.11 ตู้แช่แข็ง (Freezer) ยี่ห้อ HAIER รุ่น HCF-478C 15.2, ประเทศไทย (Thailand)

3.1.7.12 เครื่องผลิตน้ำปราศจากไอออน (Deionized Water) ยี่ห้อ Sichuan Zhuoyue, รุ่น ZYMICRO, ประเทศจีน (China)

3.1.7.13 เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray dryer) ยี่ห้อ Niro A/S, รุ่น Gladsaxevej 305, ประเทศเดนมาร์ก (Denmark)

3.1.7.14 เครื่องกวนสาร (Magnetic stirrer) รุ่น G56OE, ยี่ห้อ VORTEX-2GENIE ประเทศไทย (Thailand)

3.1.7.15 เครื่องปั่นละเอียด (ยี่ห้อ ELECTROLUX Juice Blender รุ่น EBR3416 ประเทศไทย (Thailand)

3.1.7.16 เตาเผาอุณหภูมิสูง (Furnaces) ยี่ห้อ nabertherm, รุ่น llt, ประเทศไทย (Thailand)

3.1.7.17 อุปกรณ์วิเคราะห์เยื่อใยและชุดกรองเยื่อใย ชุดวิเคราะห์เยื่อใย ยี่ห้อ Gerhardt รุ่น EV16 ประเทศเยอรมนี (Germany)

3.1.8 เอนไซม์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.1.8.1 เอนไซม์แอลฟา อะไมเลส (alpha amylase) (EC 3.2.1.1; 1,4-a-D-glucanohydrolase) ยี่ห้อ Dupont ประเทศสิงคโปร์ (Singapore) (Activity: 40,000 (SKBU/g), pH: 5.5 to 6.5, Specific gravity: 1.14 g/ml)

3.1.8.2 เอนไซม์เบต้า อะไมเลส (beta amylase) ยี่ห้อ REACH ประเทศไทย (Thailand) (Enzyme activity: 130 (SKU/g), pH: 5 - 6, Specific gravity: 1.12 g/ml)

3.1.8.3 เอนไซม์พุลูลาเนส (pululanase) (E.C. 3.2.1.41) ยี่ห้อ Dupont ประเทศสิงคโปร์ (Singapore) (Activity: 1000 ASPU/g (minimum), pH: 4.0 - 4.5, Specific gravity: 1.16 - 1.19 g/ml)

3.1.8.4 เอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส (Transglucosidase L-2000) (EC 2.4.1.24) ยี่ห้อ Dupont ประเทศสิงคโปร์ (Singapore) (Enzyme activity: 1 700 TGU/g (minimum), pH: 5, Specific gravity: 1.15 g/ml)

3.2 วิธีดำเนินการ

การศึกษาในครั้งนี้ต้องการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์ โดยใช้จุลินทรีย์ในการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งเพื่อให้ได้ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์ ดังนั้นจึงแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กิจกรรม คือ กิจกรรมที่ 1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์สูงที่สุดจากข้าวระยะเฝ้า กิจกรรมที่ 2 การหาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ในการผลิตไอโซมอลโตสจากแป้งข้าวระยะเฝ้าและระยะสุกแก่ กิจกรรมที่ 3 การคัดเลือกระยะของข้าวที่มีผลต่อการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์ กิจกรรมที่ 4 การขยายกำลังการผลิต

3.2.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

3.2.1.1 การเตรียมสปอร์เชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3102

นำเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3102 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) เป็นระยะเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อราเจริญและมีการสร้างสปอร์ โดยนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราด้วยวิธี Haemocytometer ทำให้ปริมาณของเชื้อเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 20) หลังจากนั้นนำมาเตรียมในรูปสารแขวนลอยสปอร์ของรา *A. oryzae* โดยการเขี่ยเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) ที่ผ่านเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ซึ่งในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) จะมีความเข้มข้นของสปอร์ที่ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร โดยนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราด้วยวิธี Haemocytometer (Saman et al., 2012) การเตรียมในรูปสารแขวนลอยเพื่อนำไปเติมในอาหารแข็งที่ใช้ในการเตรียมโคจิต่อไป



ภาพที่ 20 สปอร์ของเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3102 ที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA)

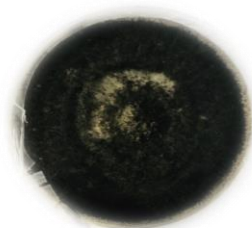
การวิเคราะห์คุณภาพที่ทางด้านจุลินทรีย์

ปริมาณความเข้มข้นของสปอร์ โดยใช้ Haemocytometer ตามวิธีของ

เดชาวุฒิ วานิชสรรพ และคณะ (2558) ดังแสดงในภาคผนวกที่ (ง.1)

3.2.1.2 การเตรียมสปอร์เชื้อรา *A. niger* TISTR 3012

นำเชื้อรา *A. niger* TISTR 3012 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) เป็นระยะเวลา 7 วัน เพื่อให้เชื้อราเจริญและมีการสร้างสปอร์ โดยนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราด้วยวิธี Haemocytometer ทำให้ปริมาณของเชื้อเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 21) หลังจากนั้นนำมาเตรียมในรูปสารแขวนลอยสปอร์ของ *A. niger* โดยการเขี่ยเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) ที่ผ่านเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ซึ่งในสารละลายโซเดียมคลอไรด์จะมีความเข้มข้นของสปอร์ที่ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราด้วยวิธี Haemocytometer (Saman et al., 2012) การเตรียมในรูปสารแขวนลอยเพื่อนำไปเติมในอาหารแข็งที่ใช้ในการเตรียมโคจิต่อไป



ภาพที่ 21 สปอร์ของเชื้อรา *A. niger* TISTR 3012 ที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA)

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์

ปริมาณความเข้มข้นของสปอร์ โดยใช้ Haemocytometer ตามวิธีของ

เดชาวุฒิ วานิชสรรพ และคณะ (2558) ดังแสดงในภาคผนวกที่ (ง.1)

3.2.1.3 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

นำเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract peptone dextrose (YPD) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน หลังจากนั้นแยกเซลล์ของเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ลงใน Yeast malt broth (YM Broth) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เพื่อเพิ่มปริมาณของเชื้อก่อนนำไปใช้ในการหมัก ซึ่งในขั้นตอนนี้ต้องได้ปริมาณของเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ความเข้มข้น 10^6 cfu/ml

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์

ความเข้มข้นของเซลล์ โดยวิธี pour plate ตามวิธีของกวิตา แก้วชูเชิด และคณะ (2020) ดังแสดงในภาคผนวกที่ (ง2)

3.2.2 การเตรียมวัตถุดิบ

3.2.2.1 การเตรียมข้าวระยะเม่าแบบเจลาติไนเซชัน

นำข้าวเปลือกระยะเม่า ภาพที่ 22 (ก) ล้างน้ำ 3 ครั้ง ก่อนนำไปทำให้เกิดเจลาติไนเซชัน เป็นเวลา 20 นาที และนำไปทำแห้งโดยเครื่องฟลูอิดไดเบต เพื่อลดความชื้นให้ได้ประมาณร้อยละ 12 แล้วนำไปทำการกะเทาะเปลือก เพื่อได้เป็นข้าวระยะเม่าแห้ง ภาพที่ 22 (ข) หลังจากนั้นนำมาบดให้เป็นผงละเอียดโดยใช้เครื่องบดลดขนาดและร่อนผ่านตระแกรงเพื่อให้มีขนาดอนุภาคของแป้งน้อยกว่า 150 ไมโครเมตร ซึ่งเรียกว่า แป้งข้าวระยะเม่า ภาพที่ 22 (ค) และทำการเก็บรักษาในถุงอูมิเนียมพอลิที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทำการทดลองต่อไป

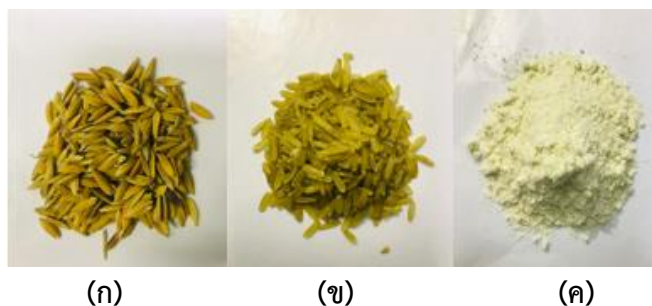


ภาพที่ 22 ลักษณะปรากฏข้าวเปลือกระยะเม่า (ก) ข้าวระยะเม่าแห้ง (ข) และแป้งข้าวระยะเม่า (ค)

3.2.2.2 การเตรียมแป้งข้าวเม่าดิบ

นำข้าวเปลือกระยะเม่า ภาพที่ 23 (ก) ล้างน้ำ 3 ครั้ง และนำไปทำแห้งโดยเครื่องอบแห้งแบบลมร้อน เพื่อลดความชื้นให้ได้ประมาณร้อยละ 12 ก่อนนำไปทำการกะเทาะเปลือก

เพื่อให้ได้เป็นข้าวระยะเม่าแห้ง ภาพที่ 23 (ข) แล้วนำมาบดให้เป็นผงละเอียดโดยใช้เครื่องบดลดขนาด และร่อนผ่านตระแกรง เพื่อให้มีขนาดอนุภาคของแป้งให้น้อยกว่า 150 ไมโครเมตร ซึ่งเรียกว่า แป้งข้าวระยะเม่า ภาพที่ 23 (ค) และทำการเก็บรักษาในถุงออลูมิเนียมฟอยล์ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปทำการทดลองต่อไป



ภาพที่ 23 ลักษณะปรากฏข้าวเปลือกระยะเม่าดิบ (ก) ข้าวระยะเม่าแห้ง (ข) และแป้งข้าวระยะเม่า (ค)

3.2.2.3 การเตรียมข้าวระยะสุกแก่

นำข้าวเปลือกระยะสุกแก่ ภาพที่ 24 (ก) ไปตากแดด เพื่อลดความชื้นให้ได้ประมาณร้อยละ 12 ก่อนนำไปขัดสี ซึ่งจะให้เป็นข้าวขาว ภาพที่ 24 (ข) และนำมาบดให้เป็นผงละเอียดโดยใช้เครื่องบดลดขนาดและร่อนผ่านตระแกรง เพื่อให้มีขนาดอนุภาคของแป้งน้อยกว่า 150 ไมโครเมตรซึ่งเรียกว่า แป้งข้าวระยะสุกแก่ ภาพที่ 24 (ค) และเก็บรักษาในถุงออลูมิเนียมฟอยล์ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปทำการทดลองต่อไป



ภาพที่ 24 ลักษณะปรากฏข้าวเปลือกระยะสุกแก่ (ก) ข้าวสาร (ข) และแป้งข้าวระยะสุกแก่ (ค)

3.2.2.4 การวิเคราะห์คุณภาพ

1) การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (proximate analysis) ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า และการโบไฮเดรตตามวิธี (AOAC, 2000) โดยแสดงรายละเอียดใน

ภาคผนวกที่ (ข.4)

- 2) วิเคราะห์ปริมาณอะไมโลสและอะไมโลเพคตินตามวิธีของ (Juliano, 1971) โดยแสดงรายละเอียดในภาคผนวกที่ (ข.6)
- 3) ลักษณะทางกายภาพของของแป้งข้าวด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยแสดงรายละเอียดในภาคผนวกที่ (ก.7)
- 4) ลักษณะโครงสร้างผลึกของแป้งข้าวด้วยเทคนิค X-Ray Diffractometer (XRD) โดยแสดงรายละเอียดในภาคผนวกที่ (ก.8)
- 5) สมบัติทางความร้อนด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) ตามวิธีของ ฌ็ซซี ฌ็ซปภาสัณณ และคณะ (2559) โดยแสดงรายละเอียดในภาคผนวกที่ (ค1.)
- 6) ความหนืดของแป้งข้าวด้วยเครื่อง Rapid Visco Analyzer (RVA) ตามวิธี วิจิตรา เหลียวตระกูล และวชิรญา เหลียวตระกูล (2556) โดยแสดงรายละเอียดในภาคผนวกที่ (ค 2)

3.2.3 วิธีการเตรียมอาหารแข็งและก้อนเชื้อโคจิ

3.2.3.1 การเตรียมอาหารแข็ง

ซังข้าวระยะสุกแก่ที่ได้จากข้อ 3.2.2.3 ปริมาณ 50 กรัม มาบรรจุลงในขวดรูปชมพู่ (flask) (ภาพที่ 25) และปรับปริมาณความชื้นข้าวให้ได้ร้อยละ 20 ตามวิธีของ Saman et al. (2012) หลังจากนั้นให้ความร้อนเพื่อทำให้ตัวอย่างเกิดเจลลาติไนเซชัน โดยใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลาประมาณ 20 นาที จะได้อาหารแข็งเพื่อไว้ในขั้นตอนต่อไป

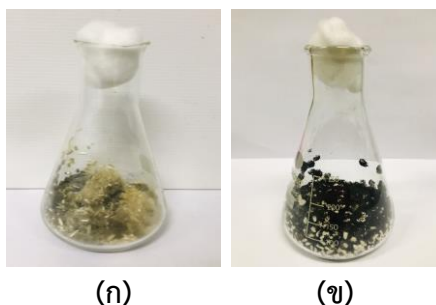


ภาพที่ 25 อาหารแข็งที่ใช้สำหรับเตรียมโคจิ

3.2.3.2 การเตรียมก้อนเชื้อโคจิ

นำอาหารแข็งที่ได้จากการเตรียมจากข้อ 3.2.3.1 มาเติมด้วยสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อราที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.1.1 หรือ 3.2.1.2 โดยคลุกเคล้าสารแขวนลอยของสปอร์เชื้อรากับของแข็งในขวดรูปชมพู่ (flask) แล้วนำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อ โดยควบคุมปริมาณความเข้มข้นของสปอร์เริ่มต้นที่ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยนับจำนวนสปอร์ของเชื้อราด้วยวิธี Haemocytometer

(Wanichsan et al., (2015) แล้วนำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3 วัน ก่อนนำไปใช้สำหรับการหมักแป้งข้าวต่อไป

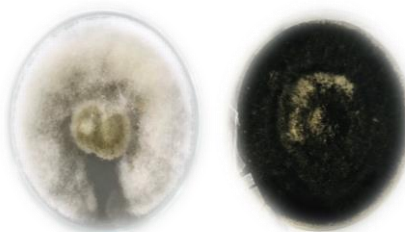


ภาพที่ 26 การเตรียมก้อนเชื้อโคจิจากรา *A. oryzae* (ก) และรา *A. niger* (ข)

3.2.4 กิจกรรมที่ 1 การคัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์

3.2.4.1 การหมักอาหารแข็งด้วยสปอร์ของเชื้อรา

เตรียมสารละลายน้ำแป้งข้าวปริมาณ 400 กรัม ที่ปริมาณความเข้มข้นร้อยละ 30 (w/v) โดยนำตัวอย่างแป้งข้าวระยะเม่าที่ผ่านการเตรียมในข้อ 3.2.2.1 มาเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาณให้ได้ตามกำหนด หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปทำให้เกิดเจลาติไนเซชันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) และลดอุณหภูมิตัวอย่างลงที่ประมาณ 38-40 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาผสมกับโคจิจองเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3102 หรือ *A. niger* TISTR 3012 ที่ถูกเตรียมไว้ในข้อ 3.2.1.1 หรือข้อ 3.2.1.2 โดยคลุกเคล้าให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปบ่มที่ตู้บ่มเชื้อ (Model 30-1060, Memmert) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (Saman et al., 2012) เก็บตัวอย่างในระหว่างการบ่มทุก 1 วัน โดยนำน้ำเชื่อมจากตัวอย่างไปวิเคราะห์คุณภาพทางด้านกายภาพและเคมี เพื่อไปคัดเลือกชนิดของเชื้อราที่สามารถผลิต IMO's ได้ปริมาณมากที่สุด



เลี้ยงเชื้อรา *A. oryzae* และรา *A. niger* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เป็นเวลา 7 วัน





ถ่ายสปอร์เชื้อราที่เลี้ยงไว้ในอาหาร PDA ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์



เติมสารละลายสปอร์เชื้อราในอาหารแข็ง



เตรียมโคจิจากรา *A. oryzae* และรา *A. niger*



นำโคจิมาคูลูกเคล้าแป้งข้าวระยะเม่าแล้วบ่มในตู้อบ

ภาพที่ 27 ขั้นตอนการหมักอาหารแข็งจากข้าวระยะเม่าด้วยสปอร์เชื้อรา

3.2.4.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านกายภาพของน้ำเชื่อม

- 1) ปริมาตรของน้ำเชื่อม โดยใช้กระบอกตวงขนาด 250 มิลลิตร (WITEG, ประเทศเยอรมัน)

2) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (Total soluble solid, TSS) โดยใช้เครื่องวัดการหักเหของแสงแบบมือ ATAGO รุ่น G-50 Brix 0-50, ประเทศญี่ปุ่น (Japan)

3.2.4.3 การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านเคมีของน้ำเชื่อม

1) ค่าความเป็นกรด-ด่าง ใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) ยี่ห้อ METTLER TOLEDO รุ่น Schwerzenbach, ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ (Switzerland)

2) ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solid, TS) วัดได้โดยใช้วิธี (AOAC, 2000) ดังแสดงในภาคผนวกที่ (ข.9)

3) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี dinitrosalicylic colorimetric method (Miller, 1959) ดังแสดงในภาคผนวกที่ (ข.7)

4) วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol Sulfuric Method ตามวิธีของ Dubois et al. (1956) ดังแสดงในภาคผนวกที่ (ข.8)

5) คำนวณค่าสมมูลเดกโทรส (DE value) ตามวิธีของกล้านรงค์ ศรีรอด และ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ (2550) โดยรายละเอียดดังแสดงในภาคผนวกที่ (ข.10)

6) วิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลและโพลิแซ็กคาไรด์ โดยเครื่อง (Ultra-High-Performance liquid Chromatography: UHPLC) (DIONEX, Ultimate 3000, Sunnyvale, CA, USA) โดยรายละเอียดดังแสดงในภาคผนวกที่ (ข.11)

3.2.4.4 วางแผนการทดลอง

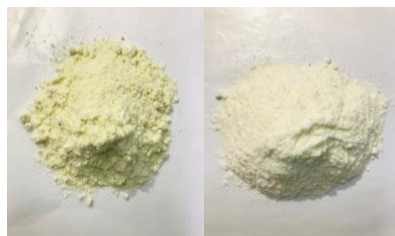
การทดลองนี้มีปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัย คือ ชนิดของรา ได้แก่ *A. oryzae* และ *A. niger* และปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาในการบ่มจำนวน 7 วัน โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบข้อมูลโดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) โดยโปรแกรม Statistical Package for Social Science (SPSS)

3.2.5 กิจกรรมที่ 2 การหาสภาวะในการผลิตไอโซมอลโตสด้วยการใช้เอนไซม์

3.2.5.1 ขั้นตอนย่อยแป้งด้วยเอนไซม์เบต้าอะไมเลส

นำตัวอย่างแป้งข้าวระยะเฝ้าและระยะสุกแก่ที่ผ่านการเตรียมในข้อ 3.2.2.1 มาเตรียมในความเข้มข้นร้อยละ 30 (w/v) โดยใช้แป้งข้าวในปริมาณ 60 กรัม และเติมน้ำกลั่นปริมาณ 140 มิลลิกรัม หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปทำให้เกิดเจลาตีไนเซชันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ ลดอุณหภูมิตัวอย่างลงที่ประมาณ 38 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้ได้ประมาณ 5.5 โดยกรดแลกติกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ตามวิธีของ Nui et al. (2017) แล้วเติมเอนไซม์เบต้าอะไมเลสที่ปริมาณความเข้มข้น 3 ระดับ คือร้อยละ 1, 1.5 และ 2 ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เป็น

เวลา 36 ชั่วโมง (ตามวิธีของ Nui et al., 2017) เมื่อครบเวลาตามกำหนด นำตัวอย่างที่ได้ไปยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ โดยนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำตัวอย่างน้ำเชื่อมไปวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและเคมี



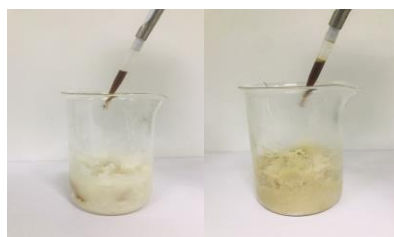
เตรียมแป้งแป้งข้าวระยะต่างๆ



เตรียมเป็นสารละลายน้ำแป้งข้าวโดยเติมน้ำกลั่น



นำสารละลายน้ำแป้งไปทำให้เกิดเจลในเซชัน



เติมเอนไซม์เบต้าอะไมเลสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ





บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)



ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์



กรองตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์คุณภาพ

ภาพที่ 28 ขั้นตอนย่อยแบ่งด้วยเอนไซม์เบต้าอะไมเลส

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านกายภาพของน้ำเชื่อม

1) ปริมาตรของน้ำเชื่อม โดยใช้กระบอกตวงขนาด 250 มิลลิตร (WITEG, ประเทศเยอรมัน)

2) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (Total soluble solid, TSS) โดยใช้เครื่องวัดการหักเหของแสงแบบมือ ATAGO รุ่น G-50 Brix 0-50, ประเทศญี่ปุ่น (Japan)

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านเคมีของน้ำเชื่อม

1) ค่าความเป็นกรด-ด่าง ใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) ยี่ห้อ METTLER TOLEDO รุ่น Schwerzenbach, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ (Switzerland)

2) ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solid, TS) วัดได้โดยใช้วิธี (AOAC, 2000)

ดังแสดงในภาคผนวกที่ (ข.9)

3) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี dinitrosalicylic colorimetric method (Miller,1959) ดังแสดงในภาคผนวกที่ (ข.7)

4) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol Sulfuric Method ตามวิธีของ Dubois et al. (1956) ดังแสดงในภาคผนวกที่ (ข.8)

5) คำนวณค่าสมมูลเดกโทรส (DE value) ตามวิธีของกล้านรงค์ ศรีรอด และ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ (2550) โดยรายละเอียดดังแสดงในภาคผนวกที่ (ข.10)

วางแผนการทดลอง

การทดลองนี้มีปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัย คือ ปริมาณความเข้มข้นเอนไซม์อะไมเลส ที่ 3 ระดับ ได้แก่ ความเข้มข้นร้อยละ 1 1.5 และ 2 ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาในการบ่ม 6 ระดับ ได้แก่ 6 12 18 24 30 และ 36 ชั่วโมง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบข้อมูลโดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) โดยโปรแกรม Statistical Package for Social Science (SPSS)

3.2.5.2 การสังเคราะห์ IMOs ด้วยเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดส

นำตัวอย่างแป้งข้าว (ที่ผ่านการคัดเลือกจากสภาวะการหมักด้วยเอนไซม์ เบต้าอะไมเลสที่ให้ปริมาณน้ำตาลมอลโตสสูงที่สุด และค่าสมมูลเดกซ์โทรสประมาณ 12 จากข้อ 3.2.5.1 มาปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ 5.5 โดยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.25 โมลาร์ หรือ กรดแลคติกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ แล้วเติมเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสที่ปริมาณความเข้มข้นร้อยละ 0.025 0.038 และ 0.050 ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 74 ชั่วโมง และนำตัวอย่างที่ได้ไปยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ โดยนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บตัวอย่างน้ำเชื่อมทุก 24 ชั่วโมง ไปวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำเชื่อมต่อไป



นำตัวอย่างแป้งข้าวที่ได้จากข้อ 3.2.5.1 มาปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)





เติมเอนไซม์ทรานกลูโคไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ



บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)



ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์



กรองตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์คุณภาพ

ภาพที่ 29 ขั้นตอนการเติมเอนไซม์ทรานกลูโคไซด์

การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านเคมีของน้ำเชื่อม

วิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลและโพลิโกแซ็กคาไรด์ โดยเครื่อง (Ultra-High-Performance liquid Chromatography: UHPLC) (DIONEX, Ultimate 3000, Sunnyvale,

CA, USA) โดยรายละเอียดดังแสดงในภาคผนวกที่ (ข.11)

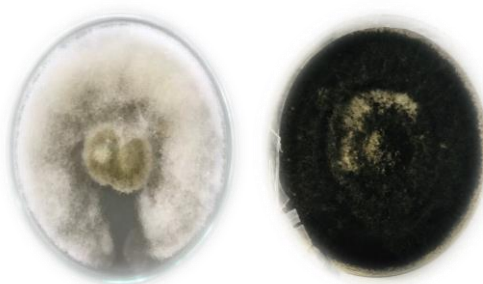
วางแผนการทดลอง

การทดลองนี้มีปัจจัยที่ศึกษา 2 ปัจจัย คือ ปริมาณความเข้มข้นเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสที่ 3 ระดับ ได้แก่ ร้อยละ 0.025 0.038 และ 0.050 ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาในการบ่ม 3 ระดับ ได้แก่ 24 48 และ 72 ชั่วโมง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบข้อมูลโดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) โดยโปรแกรม Statistical Package for Social Science (SPSS)

3.2.6 กิจกรรมที่ 3 การคัดเลือกระยะของข้าวสำหรับผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์

3.2.6.1 ขั้นตอนการหมัก

เตรียมสารละลายนำแป้งข้าวที่ปริมาตรความเข้มข้นร้อยละ 30 (w/v) โดยใช้ตัวอย่างแป้งข้าวระยะเม่าที่ผ่านการเตรียมในข้อ 3.2.2.1 และตัวอย่างแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่ผ่านการเตรียมในข้อ 3.2.2.2 ในปริมาณ 120 กรัมและเติมน้ำกลั่นปริมาตร 280 มิลลิลิตร ก่อนนำตัวอย่างไปทำให้เกิดเจลลาติในเซชันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) หลังจากนั้นทำการลดอุณหภูมิตัวอย่างลงประมาณ 38 องศาเซลเซียส และเติมโคจิจของเชื้อรา *A. oryzae* หรือ *A. niger* ที่ถูกเตรียมไว้ในข้อ 3.2.3.2 โดยคลุกเคล้าให้เข้ากัน ก่อนนำไปบ่มที่ในตู้บ่มเชื้อ (Model 30-1060, Memmert) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างในระหว่างการบ่มทุก ๆ 1 วัน โดยกรองเอาน้ำเชื่อมจากตัวอย่างไปวิเคราะห์คุณภาพทางด้านกายภาพและเคมี



เลี้ยงเชื้อรา *A. oryzae* และรา *A. niger* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA





ถ่ายสปอร์เชื้อราที่เลี้ยงไว้ในอาหาร PDA ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์



เติมสปอร์เชื้อราในอาหารแข็ง



คลุกเคล้าสปอร์เชื้อราในอาหารแข็ง



นำไปป้อนในตู้บ่ม

ภาพที่ 30 ขั้นตอนการหมักแบ่งข้าวด้วยสปอร์ของเชื้อรา

3.2.6.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านกายภาพของน้ำเชื่อม

- 1) ปริมาตรของน้ำเชื่อม โดยใช้กระบอกตวงขนาด 250 มิลลิตร (WITEG, ประเทศเยอรมัน)

2) ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด (Total soluble solid, TSS) โดยใช้เครื่องวัดการหักเหของแสงแบบมือ ATAGO รุ่น G-50 Brix 0-50, ประเทศญี่ปุ่น (Japan)

3.2.6.3 การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านเคมีของน้ำเชื่อม

- 1) ค่าความเป็นกรด-ด่าง ใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) ยี่ห้อ METTLER TOLEDO รุ่น Schwerzenbach, ประเทศสวิสเซอร์แลนด์ (Switzerland)
- 2) ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solid, TS) วัดได้โดยใช้วิธี (AOAC, 2000) ดังแสดงในภาคผนวกที่ (ข.9)
- 3) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี dinitrosalicylic colorimetric method (Miller, 1959) ดังแสดงในภาคผนวกที่ (ข.7)
- 4) วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol Sulfuric Method ตามวิธีของ Dubois et al. (1956) ดังแสดงในภาคผนวกที่ (ข.8)
- 5) คำนวณค่าสมมูลเดกโทรส (DE value) ตามวิธีของกล้านรงค์ ศรีรอด และ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ (2550) โดยรายละเอียดดังแสดงในภาคผนวกที่ (ข.10)
- 6) วิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลและโพลีฟีนอลโดยวิธี (Ultra-High-Performance liquid Chromatography: UHPLC) (DIONEX, Ultimate 3000, Sunnyvale, CA, USA) โดยรายละเอียดดังแสดงในภาคผนวกที่ (ข.11)

3.2.6.4 วางแผนการทดลอง

การทดลองนี้มีปัจจัยที่ศึกษา 1 ปัจจัย คือ ระยะของข้าว 2 ระยะ ได้แก่ ระยะเม่าและระยะสุกแก่ และปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาในการบ่มจำนวน 7 วัน โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบข้อมูลโดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) โดยโปรแกรม Statistical Package for Social Science (SPSS)

3.2.7 กิจกรรมที่ 4 การขยายกำลังการผลิต

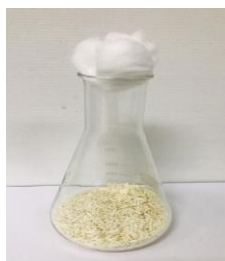
3.2.7.1 ขั้นตอนการหมักแป้งข้าวด้วยสปอร์เชื้อรา

เตรียมสารละลายน้ำแป้งที่ความเข้มข้นร้อยละ 30 (w/v) โดยนำตัวอย่างแป้งข้าวระยะเม่าและระยะสุกแก่ที่ผ่านการเตรียมในข้อ 3.2.2.1 ปริมาณ 600 กรัม มาเติมน้ำกลั่นปริมาณ 1400 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำตัวอย่างทำให้เกิดเจลาตินในเซชันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที โดยใช้เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) หลังจากนั้นลดอุณหภูมิลงประมาณ 38 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาผสมกับโคจิจของเชื้อราที่ถูกรีดิวซ์ไว้ในข้อ 3.2.3.2 โดยคัดเลือกรากกิจกรรมในข้อ 3.2.6 โดยคลุกเคล้าให้เข้ากัน ก่อนจะนำไปบ่มที่ในตู้บ่มเชื้อ (Model 30-1060, Memmert) ที่อุณหภูมิ

30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ก่อนนำไปวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพและเคมี



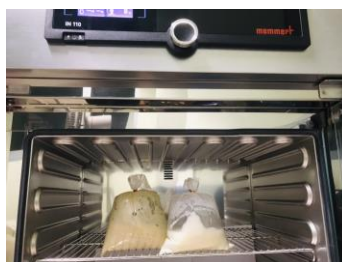
ถ่ายเชื้อราที่เลี้ยงไว้ในอาหาร PDA ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์



เตรียมอาหารแข็งโดยข้าวระยะสุกแก่



คลุกเคล้าสปอร์เชื้อราในอาหารแข็ง



นำไปป่มในตู้ป่ม

ภาพที่ 31 ขั้นตอนการหมักแป้งข้าวด้วยด้วยสปอร์ของเชื้อราที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
ในระดับกำลังการผลิต 2 กิโลกรัม

3.2.7.2 กระบวนการทำให้บริสุทธิ์

นำตัวอย่างน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวจ้าวระยะเฝ้าและระยะสุกแก่ที่ได้จากหมัก มายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และลดอุณหภูมิลงที่ 38 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาเติมกล้าเชื้อ (Starter) ของยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ผ่านการบ่มจากอาหารเลี้ยงเชื้อ YM Broth และบ่มในตูบ่ม (Incubator) ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน และควบคุมจำนวนเซลล์เริ่มต้นให้ได้ปริมาณความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^6 cfu/ml ก่อนนำมาเติมลงในตัวอย่างน้ำเชื่อมที่ปริมาณ 300 มิลลิลิตร และนำไปบ่มในตูบ่ม (Incubator) เป็นเวลา 5 วัน เพื่อกำจัดน้ำตาลกลูโคส หลังจากนั้นทำการยับยั้งการทำงานของจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และลดอุณหภูมิลงที่ 38 องศาเซลเซียส และนำตัวอย่างน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวจ้าวระยะเฝ้าและระยะสุกแก่ที่ผ่านการหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* และผ่านการยับยั้งจุลินทรีย์ มากรองด้วยถ่านกัมมันต์ (activated carbon) เพื่อกำจัดกลิ่นหมัก โดยใช้ผ้าขาวบาง สาลี และถ่านกัมมันต์ (activate carbon) เป็นชุดกรอง (เจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 3 : 1) และการกรองด้วยการใช้ชุดกรวยกรอง (buchner funnel) ร่วมกับการใช้ปั๊มสุญญากาศ (ยี่ห้อ Rocker รุ่น VF 12 ประเทศไต้หวัน)



ภาพที่ 32 การกรองตัวอย่างน้ำเชื่อมที่ได้จากข้าวจ้าวระยะเฝ้าด้วยถ่านกัมมันต์ (activated carbon)

นำตัวอย่างที่ผ่านการกรองด้วยถ่านกัมมันต์ (activate carbon) ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัดตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifugal) โดยใช้ความเร็วรอบที่ 7500 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 10 นาที ก่อนเก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านกายภาพและเคมี ก่อนนำไปทำแห้งต่อไป

3.2.7.3 การทำแห้งให้เป็นผง

นำตัวอย่างที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงมาปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดผสมกับมอลโตเดกซ์ทริน (DE = 12) โดยในขั้นตอนนี้จะควบคุมปริมาณของแข็งที่ละลายได้ของตัวอย่าง

สุดท้ายที่ร้อยละ 16 ตามวิธีของ Patil et al. (2014) โดยนำตัวอย่างที่ผ่านการปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้มาการทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray dryer) ชนิดหัวฉีดพ่นฝอยแบบแรงดันสูง (pressure nozzles) โดยควบคุมความดันของลม 5 บาร์ ปริมาณลมที่ใช้คือร้อยละ 80 ของปริมาณลมทั้งหมดจากปั๊มลมควบคุมอุณหภูมิลมร้อนเข้า 150 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิขาออกที่ 100 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นสารละลายตัวอย่างจะถูกดูดโดยปั๊มรีดท่อ (peristaltic pump) โดยมีอัตราการป้อนตัวอย่างเข้าที่ 0.95 มิลลิลิตรต่อนาที หลังจากทำแห้งแล้วบรรจุตัวอย่างในถุงถุงซิปล็อคและถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์คุณภาพต่อไป



ภาพที่ 33 เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray dryer) ที่ใช้ในการทำแห้งน้ำเชื่อมจากแป้งข้าว

3.2.7.4 การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านกายภาพของผง IMOs

- 1) ปริมาณของแข็งที่สารละลายได้ ($^{\circ}\text{Brix}$) ด้วยเครื่อง Hand refractometer ดังแสดงในภาคผนวกที่ (ก.1)
- 2) ปริมาณร้อยละผลผลิตที่ได้ (% yield) ตามวิธีของ Fischer et al. (2019) ดังแสดงในภาคผนวกที่ (ก.3)
- 3) ค่าความหนาแน่นรวม (bulk density) ตามวิธีของ Goula and Adamopoulos (2005) ดังแสดงในภาคผนวกที่ (ก.4)
- 4) ค่าสีในระบบ Hunter Lab วัดค่า L^* , a^* และ b^* โดยใช้เครื่อง Chroma meter รุ่น Color Flex ดังแสดงในภาคผนวกที่ (ก.6)
- 5) ค่าการละลาย ตามวิธีของ Cano-Chauca et al. (2005) ดังแสดงในภาคผนวกที่ (ก.5)

3.2.7.5 การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านเคมีของผง IMOs

- 1) ปริมาณความชื้นตามวิธีของ (A.O.A.C, 2000) ดังแสดงในภาคผนวกที่ (ข.1)
- 2) ค่า water activity (A_w) โดยใช้เครื่อง Novasina รุ่น 21CFR11 LabSwift-AW ดังแสดงในภาคผนวกที่ (ข.3)

3) วิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลและโพลิโกแซ็กคาไรด์ โดยเครื่อง (Ultra-High- liquid Chromatography: UHPLC) (DIONEX, Ultimate 3000, Sunnyvale, CA, USA) โดยรายละเอียดดังแสดงในภาคผนวกที่ (ข.11)

3.2.7.6 การวิเคราะห์วัดกิจกรรมพรีไบโอติก

การทดสอบคุณสมบัติพรีไบโอติก โดยใช้เชื้อ *L. acidophilus* ตามวิธีของ Srisuvor et al. (2013) ดังแสดงในภาคผนวกที่ (ง.2)

3.2.7.8 วางแผนการทดลอง

การทดลองนี้มีปัจจัยที่ศึกษา 1 ปัจจัย คือ ตัวอย่างน้ำเชื่อมจากข้าว 2 ระยะ ได้แก่ ระยะเม่าและระยะสุกแก่ การวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design: CRD) เปรียบเทียบข้อมูลโดยวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Independent Sample T-test โดยโปรแกรม Statistical Package for Social Science) (SPSS)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และสมบัติทางเคมีกายภาพของแป้งข้าวเหนียวพันธุ์ กข6

4.1.1 องค์ประกอบทางเคมีของแป้งข้าว

จากการเตรียมแป้งข้าวแป้งข้าวพันธุ์ กข6 ระยะเฒ่า แบบเกิดเจลลาติไนเซชัน แบบไม่เกิดเจลลาติไนเซชันและข้าวระยะสุกแก่ ที่ได้จากอำเภอโพธิ์ไทรในจังหวัดอุบลราชธานี เพื่อนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของ พบว่าองค์ประกอบทางเคมีของข้าวระยะเฒ่า มีปริมาณความชื้น โปรตีน เถ้า เยื่อใย คาร์โบไฮเดรต อะไมโลสและอะไมโลเพกตินมีความแตกต่างกันทางสถิติกับข้าวระยะสุกแก่ ($P \leq 0.05$) (ตารางที่ 7) โดยพบว่าในแป้งข้าวระยะเฒ่า มีปริมาณโปรตีน เถ้า เยื่อใย คาร์โบไฮเดรต อะไมโลส สูงกว่าในข้าวระยะสุกแก่ ($P \leq 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Eiko and Tomio (2007) ที่วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และปริมาณ อะไมโลสในข้าว Koshihikari และข้าว Nakateshisenbon 3 ระยะ ได้แก่ ข้าวระยะน้ำนม ระยะเฒ่า และข้าวระยะเก็บเกี่ยวปกติหรือข้าวระยะสุกแก่ และข้าวระยะเก็บเกี่ยวช้า พบว่าปริมาณโปรตีน และปริมาณอะไมโลสในข้าวลดลงเมื่อข้าวระยะน้ำนม และระยะเฒ่า เข้าสู่ข้าวระยะเก็บเกี่ยวปกติหรือข้าวระยะสุกแก่และข้าวระยะเก็บเกี่ยวช้า และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณอะไมโลสและอะไมโลเพกตินในข้าว 2 ระยะ พบว่าปริมาณอะไมโลสในข้าวระยะเฒ่าสูงกว่าในข้าวระยะสุกแก่ ($P \leq 0.05$) ซึ่งการที่ข้าวระยะเฒ่าได้มีการพัฒนาโครงสร้างแป้งสมบูรณ์เพิ่มขึ้นในระยะสุกแก่ สอดคล้องกับการวิเคราะห์ที่พบว่าปริมาณอะไมโลเพกตินในข้าวระยะสุกแก่สูงกว่าในระยะเฒ่า ซึ่งการที่โครงสร้างของแป้งที่มีปริมาณอะไมโลเพกตินเพิ่มขึ้นจะส่งผลต่อกระบวนการย่อยของเอนไซม์ และพบว่าเอนไซม์สามารถย่อยแป้งจากแป้งที่มีอะไมโลเพกตินได้มากกว่าแป้งที่มีอะไมโลสสูงเป็นองค์ประกอบ (Blazek and Copeland, 2010) โดยผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับการวิเคราะห์โครงสร้างที่เป็นผลึกด้วยวิธีการทดสอบ X-Ray diffraction และเมื่อพิจารณาแป้งข้าวระยะเฒ่า (เกิดเจลลาติไนเซชัน) พบว่าปริมาณโครงสร้างผลึกคิดเป็นร้อยละน้อยกว่าเมื่อเทียบกับแป้งข้าวระยะเฒ่า ($P \leq 0.05$) เนื่องจากในระหว่างการเตรียมแป้งข้าวระยะเฒ่าได้รับความร้อนจนเกิดเจลลาติไนเซชัน ส่งผลให้โครงสร้างของแป้งส่วนที่เป็นอสัณฐาน (amorphous) และโครงสร้างผลึก (crystalline) หรือพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลแป้งถูกทำลายเนื่องจากความร้อน เมื่อวิเคราะห์ปริมาณผลึกด้วยเครื่อง x-ray diffraction จึงทำให้ตรวจพบปริมาณโครงสร้างผลึก ของแป้งข้าวระยะเฒ่า (เจลลาติไนเซชัน) ต่ำกว่า และการที่พบว่าปริมาณโครงสร้างผลึกของแป้งข้าวระยะเฒ่าต่ำกว่าแป้งข้าวระยะสุกแก่ นั่นคือข้าวระยะเฒ่าเป็นระยะที่แป้งได้มีการพัฒนาโครงสร้างของแป้งจากส่วน

ที่เป็นเส้นตรง (อะไมโลส) เกิดการพัฒนาไปเป็นโครงสร้างที่เป็นโครงสร้างแบบกิ่งก้าน (อะไมโลเพคติน) ทำให้พบปริมาณอะไมโลเพคตินในข้าวระยะสุกแก่สูงกว่าในระยะเฝ้า สำหรับแป้งข้าวระยะเฝ้าที่ผ่านการเกิดเจลาติไนซ์เซชันนั้น ทำให้องค์ประกอบทางเคมี เช่น ไขมัน โปรตีน เยื่อใย ที่พบในปริมาณมากในระยะนี้ สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะไมโลสและไขมัน (Amylose-lipid complex) หรืออะไมโลสและโปรตีน (Amylose-protein complex) ในระหว่างการทำให้แป้งสุกและเย็นตัวลง ทำให้โครงสร้างของแป้งมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น (Alcázar-Alay and Meireles, 2015) นอกจากนี้พบว่าปริมาณเยื่อใยในข้าวระยะเฝ้าที่สูงกว่าในข้าวระยะสุกแก่ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์โดยจะไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์และทำให้เอนไซม์เข้าไปย่อยได้ยากขึ้น

ตารางที่ 7 องค์ประกอบทางเคมีของแป้งข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ในระยะต่าง ๆ

องค์ประกอบทางเคมี (%, dry basis)	ระยะของแป้งข้าว		
	ระยะเฝ้า (เจลาติไนซ์เซชัน)	ระยะเฝ้า	ระยะสุกแก่
ความชื้น	11.06±0.05 ^b	10.97±0.21 ^c	11.61±0.03 ^a
ไขมัน	3.80±0.13 ^a	3.07±0.30 ^b	0.74±0.13 ^c
โปรตีน	6.32±0.07 ^b	7.12±0.07 ^a	5.18±0.03 ^c
เถ้า	1.58±0.04 ^a	1.26±0.01 ^b	1.53±0.05 ^a
เยื่อใย	1.06±0.05 ^a	1.14±0.02 ^a	0.38±0.02 ^b
คาร์โบไฮเดรต	76.18±0.19 ^c	76.43±0.30 ^b	80.67±0.11 ^a
อะไมโลส	9.31±0.07 ^a	9.34±0.36 ^a	7.92±0.08 ^b
อะไมโลเพคติน	90.69±0.07 ^a	90.66±0.36 ^a	92.08±0.08 ^b

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนหมายถึงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.1.2 สมบัติด้านความหนืด (Pasting properties) ของแป้งข้าวพันธุ์ กข6

จากการวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลสข้าวระยะสุกแก่ของแป้งข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 พบว่ามีความสอดคล้องกับการศึกษาของอาทิตย์ ผาภูมิมา และคณะ (2020) โดยศึกษาการวิเคราะห์ประเมินปริมาณ อะไมโลส เนื้อสัมผัส และคุณภาพการหุงต้มของข้าวเหนียวพันธุ์คัดเลือกบางสายพันธุ์ ซึ่งพบปริมาณอะไมโลสในข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ประมาณร้อยละ 7.33 และเห็นได้ว่าปริมาณอะไมโลส

จากการวิเคราะห์ในข้าวระยะสุกแก่พันธุ์ กข6 มีแนวโน้มใกล้เคียงกันกับการศึกษาของอาทิตย์ ผาภูมิมา และคณะ (2020) ซึ่งการที่ข้าวมีปริมาณอะไมโลสระดับนี้ถือว่าเป็นข้าวอะไมโลสสูง และมีผลต่อกิจกรรมการย่อยของเอนไซม์ โดยสามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะไมโลสและไขมัน (Amylose-lipid complex) ทำให้โครงสร้างของแป้งมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น (Alcázar-Alay and Meireles, 2015)

จากการทดลองศึกษาการเปลี่ยนแปลงความหนืดของแป้งข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ในข้าวระยะเฝ้าเกิดเจลาติไนเซชัน ข้าวระยะเฝ้าและระยะสุกแก่ด้วยเครื่องวัดความหนืดแบบรวดเร็ว (Rapid Visco Analyzer, RVA) (ตารางที่ 8) พบว่าแป้งข้าวระยะเฝ้าที่ผ่านการเกิดเจลาติไนเซชัน มีค่า Peak time Pasting Temp Peak viscosity Trough Break down Final viscosity และ Set back ดังนี้ 5.84 ± 0.14 นาที 83.13 ± 0.80 องศาเซลเซียส 1003.67 ± 1.84 cPs 899.67 ± 1.22 cPs 104.00 ± 2.65 cPs 994.00 ± 1.90 cPs และ 94.33 ± 7.31 cPs ตามลำดับ พบว่าแป้งข้าวระยะเฝ้ามีค่า Peak time Pasting Temp Peak viscosity Trough Break down Final viscosity และ Set back ดังนี้ 4.24 ± 0.06 นาที 75.38 ± 0.58 องศาเซลเซียส 486.00 ± 1.73 cPs 235.67 ± 1.15 cPs 252.33 ± 2.08 cPs 284.00 ± 1.73 cPs และ 50.33 ± 0.58 cPs ตามลำดับ ส่วนแป้งข้าวระยะสุกแก่มีค่า Peak time Pasting Temp Peak viscosity Trough Break down Final viscosity และ Set back ดังนี้ 4.24 ± 0.06 นาที 75.38 ± 0.58 องศาเซลเซียส 486.00 ± 1.73 cPs 235.67 ± 1.15 cPs 252.33 ± 2.08 cPs 284.00 ± 1.73 cPs และ 50.33 ± 0.58 cPs ตามลำดับ

จากพฤติกรรมด้านการเปลี่ยนแปลงความหนืดของแป้งข้าวข้าวระยะเฝ้าเจลาติไนเซชัน และระยะสุกแก่ จะเห็นได้ว่าเวลาในการเกิดเจลาติไนเซชัน (Peak Time) พบว่าแป้งข้าวระยะเฝ้าที่ผ่านการเกิดเจลาติไนเซชัน และแป้งข้าวระยะสุกแก่มากกว่าแป้งข้าวระยะเฝ้าดิบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) อาจจะเป็นเนื่องจากแป้งข้าวระยะเฝ้า (เจลาติไนเซชัน) มีปริมาณไขมันที่สูงกว่า ซึ่งไขมันจะสามารถรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อน เช่น สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะไมโลสและไขมัน ซึ่งทำให้โครงสร้างมีความแข็งแรง จึงทำให้เวลาในการเกิดเจลาติไนเซชันสูงกว่า และนอกจากนี้ในแป้งข้าวระยะสุกแก่มีโครงสร้างของเม็ดแป้งที่สมบูรณ์และการจัดเรียงตัวกันได้ดีจะส่งเสริมให้ผลึกและโครงสร้างของแป้งมีความแข็งแรง ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ X-ray diffraction ที่พบมีปริมาณโครงสร้างผลึกของแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่สูงกว่าในแป้งข้าวระยะเฝ้า เนื่องจากแป้งข้าวระยะเฝ้าได้มีการพัฒนาโครงสร้างของแป้งจากอะไมโลส (เส้นตรง) ไปเป็นโครงสร้างที่เป็นโครงสร้างแบบแบบกึ่งก้าน (อะไมโลเพคติน) ทำให้พบปริมาณอะไมโลเพคตินในแป้งข้าวระยะสุกแก่สูงกว่าในระยะเฝ้า ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ดังนั้นจึงทำให้เวลาในการเกิดเจลาติไนเซชันมากกว่า

จากพฤติกรรมด้านการเปลี่ยนแปลงความหนืดของแป้งข้าวข้าวระยะเฝ้าเจลาติไนเซชัน และระยะสุกแก่ จะเห็นได้ว่าอุณหภูมิเริ่มเกิดการเกิดเจลาติไนเซชัน (Pasting Temp) ระหว่างแป้ง

ข้าว 2 ระยะแตกต่างกัน ($P \leq 0.05$) โดยพบว่าแป้งระยะเม่าที่ผ่านการเกิดเจลลาติไนเซชัน แสดงอุณหภูมิในการเกิดการเจลลาติไนซ์เซชันสูงกว่าแป้งข้าวระยะสุกแก่ ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากองค์ประกอบทางเคมีของแป้งข้าวระยะเม่าที่ผ่านการเกิดเจลลาติไนเซชัน เช่น ไขมันและโปรตีน โดยในแป้งข้าวระยะเม่ามีปริมาณไขมันและโปรตีนที่สูงกว่าข้าวระยะสุกแก่ ซึ่งปริมาณไขมันและโปรตีนจะสามารถรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อน เช่น สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะไมโลสและไขมัน (Alcázar-Alay and Meireles, 2015) ส่งผลให้อุณหภูมิในการเกิดเจลลาติไนเซชันสูง แล้วเมื่อเทียบแป้งข้าวระยะเม่า (เจลลาติไนเซชัน) กับแป้งข้าวระยะสุกแก่ พบว่าแป้งระยะเม่าที่ผ่านการเกิดเจลลาติไนเซชัน แสดงอุณหภูมิในการเกิดการเจลลาติไนซ์เซชันสูงกว่าแป้งข้าวเม่า ($P \leq 0.05$) เนื่องจากเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะไมโลสและไขมันในข้าวระยะเม่า (เจลลาติไนเซชัน) นอกจากนี้แป้งข้าวระยะเม่าในระหว่างการเตรียมไม่ได้ทำให้แป้งเกิดเจลลาติไนเซชัน จึงทำให้มีความสมบูรณ์ของเม็ดแป้งมากกว่าและไม่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะไมโลสและไขมันหรือเกิดได้น้อยมาก

สำหรับค่าความหนืดสูงสุด (Peak viscosity) พบว่าแป้งข้าวระยะเม่า (เจลลาติไนเซชัน) มีค่าต่ำกว่าแป้งข้าวระยะสุกแก่ เพราะแป้งข้าวระยะเม่าที่ผ่านการเกิดเจลลาติไนเซชันแล้วทำให้เย็นตัวลง แล้วจะเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะไมโลสและไขมัน จึงทำให้ความสามารถในการอุ้มน้ำลดลง เมื่อเทียบกับข้าวระยะสุกแก่ที่ในระหว่างการเตรียมโครงสร้างของเม็ดแป้งไม่ถูกทำลาย จึงทำให้โครงสร้างของเม็ดแป้งมีความสมบูรณ์ นอกจากนี้ในข้าวระยะสุกแก่มีปริมาณของอะไมโลเพคตินที่สูงกว่าข้าวระยะเม่า (เจลลาติไนเซชัน) ส่งผลให้มีความสามารถในการอุ้มน้ำที่ดีกว่า ดังนั้นเมื่อนำมาวัดพฤติกรรมเปลี่ยนแปลงความหนืดจึงทำให้พบว่าค่าความหนืดในข้าวระยะสุกแก่สูงกว่า เมื่อทำการเปรียบเทียบแป้งข้าวระยะเม่า (เจลลาติไนเซชัน) และแป้งข้าวระยะสุกแก่ พบว่าแป้งข้าวระยะเม่า (เจลลาติไนเซชัน) มีค่าความหนืดสูงกว่าแป้งข้าวระยะสุกแก่ เนื่องจากในระหว่างการเตรียมไม่ได้ทำให้แป้งเกิดเจลลาติไนเซชัน ทำให้อะไมโลสและอะไมโลเพคตินที่จัดเรียงตัวในเม็ดแป้งเป็นโครงสร้างทั้งส่วนที่เป็นอสัณฐานและส่วนผลึกซึ่งเกิดการชะของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินออกมาได้มากขึ้นทำให้สามารถจับกับน้ำได้มากขึ้น ดังนั้นจึงส่งผลให้มีความหนืดสูงขึ้น

ค่า Breakdown แสดงถึงพฤติกรรมของแป้งที่มีการเปลี่ยนแปลงค่าความหนืดที่เมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลง หรือแสดงความคงตัวของแป้งในระหว่างการให้ความร้อน พบว่าแป้งข้าวระยะเม่า (เจลลาติไนเซชัน) มีค่า breakdown ต่ำกว่าแป้งข้าวระยะสุกแก่ อาจจะเป็นเนื่องจากแป้งข้าวระยะเม่ามีปริมาณไขมันและโปรตีนที่สูงกว่าข้าวระยะสุกแก่ ซึ่งปริมาณไขมันและโปรตีนจะสามารถรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อน เช่น สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะไมโลสและไขมัน ส่งผลให้ความทนต่อการเปลี่ยนแปลงเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลง แล้วเมื่อเทียบแป้งข้าวระยะเม่า (เจลลาติไนเซชัน) กับแป้งข้าวระยะสุกแก่ พบว่าแป้งข้าวระยะเม่ามีค่า Breakdown สูงกว่า เนื่องจากแป้งข้าวระยะเม่าเป็นระยะที่มีโครงสร้างของแป้งยังไม่สมบูรณ์ ดังนั้น เมื่อได้รับความร้อนจึงทำให้ถูกทำลายได้ง่าย ทำให้ไม่มีความคง

ตัวของแป้งในระหว่างการให้ความร้อนเท่าแป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) ที่เกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะไมโลสและไขมัน

ค่าความหนืดสุดท้าย (Final viscosity) แสดงถึงความสามารถของแป้งต่อการรักษาความหนืดเมื่อเกิดเจลาตินในเซชัน ส่วนค่าผลต่างความหนืดสุดท้ายกับความหนืดสูงสุด (Setback) บ่งบอกถึงการจับตัวกันใหม่ของอะไมโลส ซึ่งค่าความหนืดสุดท้ายและค่าความหนืดสูงสุดของแป้งข้าวระยะสุกแก่สูงกว่าแป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เนื่องจากแป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) มีปริมาณไขมันมากกว่าแป้งข้าวระยะสุกแก่ ซึ่งทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะไมโลสและไขมันในข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) หลังจากแป้งเย็นตัวลง ซึ่งจะไปขัดขวางการจัดเรียงตัวกันใหม่ของอะไมโลส และไขมันในแป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) ไปขัดขวางการดูดซับน้ำและการพองตัวของเม็ดแป้ง ทำให้ส่งผลต่อค่าความหนืดสุดท้ายและค่าผลต่างความหนืดสุดท้ายกับความหนืดสูงสุดต่ำกว่า ซึ่งต่างจากแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่ในระหว่างการเตรียมโครงสร้างของเม็ดแป้งไม่ถูกทำลาย จึงทำให้โครงสร้างของเม็ดแป้งมีความสมบูรณ์ นอกจากนี้ในข้าวระยะสุกแก่มีปริมาณของอะไมโลเพคตินที่สูงกว่าข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) ส่งผลให้มีความสามารถของแป้งต่อการรักษาความหนืดเมื่อเกิดเจลาตินในเซชันมากกว่า และเมื่อเปรียบเทียบแป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) กับแป้งข้าวระยะเม่า พบว่าทำให้ค่าความหนืดสุดท้ายสูงกว่า ($P \leq 0.05$) แต่พบว่าค่า ผลต่างความหนืดสุดท้ายกับความหนืดสูงสุดของแป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) จะสูงกว่าแป้งข้าวระยะเม่า ($P \leq 0.05$) เนื่องจากในระหว่างการเตรียมได้ทำให้แป้งเกิดเจลาตินในเซชัน ทำให้อะไมโลสที่จัดเรียงตัวในเม็ดแป้งเป็นโครงสร้างทั้งส่วนที่เป็นอสัณฐานซึ่งเกิดการชะของอะไมโลสออกมาได้มากขึ้น ดังนั้นเมื่อแป้งเย็นตัวลงจึงทำให้เกิดการจัดเรียงตัวกันใหม่ของอะไมโลสมากขึ้น

อย่างไรก็ตามความหนืดของแป้งยังขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยรวมทั้งสมบัติทางโครงสร้างของแป้งด้วย เช่น ปริมาณอะไมโลส ปริมาณไขมัน ความยาวของกิ่งก้านอะไมโลเพคติน ซึ่งอะไมโลเพคตินจะช่วยส่งเสริมให้เม็ดแป้งสามารถพองตัวได้ง่ายและทำให้แป้งมีความหนืดสูง ในขณะที่ปริมาณอะไมโลสก็มีผลต่อค่าความหนืด ซึ่งความหนืดของแป้งที่มีปริมาณอะไมโลสสูงจะสูงกว่าแป้งข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสต่ำ เมื่อพิจารณาจากองค์ประกอบทางเคมีของแป้งข้าวทั้งสองชนิดจะเห็นได้ว่า แป้งข้าวระยะเม่าที่มีปริมาณไขมันและโปรตีนสูงกว่าแป้งข้าวระยะสุกแก่ (ตารางที่ 7) จึงเป็นผลทำให้แป้งข้าวระยะสุกแก่มีค่า Peak viscosity สูงกว่าแป้งข้าวระยะเม่า ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากสมบัติการเปลี่ยนแปลงความหนืดของแป้งข้าวระยะเม่าและแป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) จึงได้เลือกแป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) ไปศึกษาต่อในการเป็นสารตั้งต้นในการผลิต IMOs เพื่อเปรียบเทียบกับแป้งข้าวระยะสุกแก่ เนื่องจากจะเห็นได้ว่าเวลาในการเกิดเจลาตินในเซชัน (Peak Time) ที่สูงนอกจากนี้ยังมีค่า Breakdown ซึ่งแสดงถึงพฤติกรรมของแป้งที่มีการเปลี่ยนแปลงค่าความหนืดที่เมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลงหรือแสดงความคงตัวของแป้งในระหว่างการให้ความร้อน และไม่เลือกแป้งข้าว

ระยะเม่าไปศึกษาต่อ เนื่องจากมีค่า Breakdown ที่สูงทำให้แป้งไม่มีความคงตัวระหว่างการให้ความร้อน

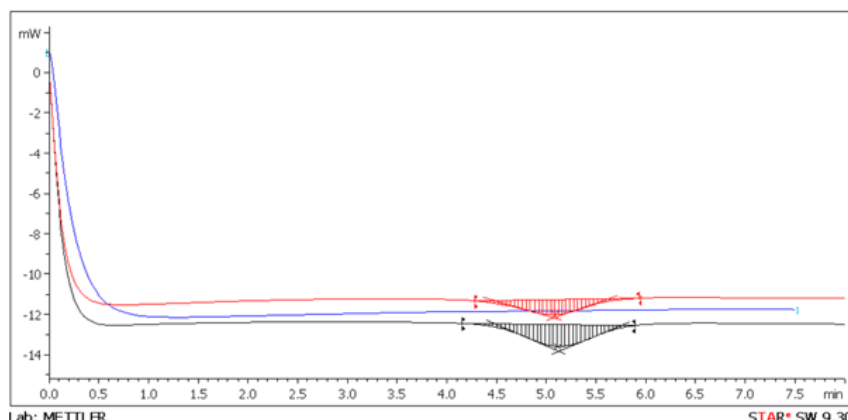
ตารางที่ 8 พฤติกรรมการเปลี่ยนแปลงความหนืดของแป้งข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ระยะต่าง ๆ

สมบัติด้านความหนืด	ระยะของแป้งข้าว		
	ระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน)	ระยะเม่า	ระยะสุกแก่
Peak Time (min.)	5.84±0.14 ^a	4.24±0.06 ^b	5.58±0.04 ^a
Pasting Temp. (°C)	83.13±0.80 ^a	75.38±0.58 ^c	79.87±0.03 ^b
Peak viscosity (cPs)	1003.67±1.84 ^b	486.00±1.73 ^c	1339.33±1.81 ^a
Trough (cPs)	899.67±1.22 ^b	235.67±1.15 ^c	1164.67±5.77 ^a
Breakdown (cPs)	104.00±2.65 ^c	252.33±2.08 ^a	174.67±4.04 ^b
Final Viscosity (cPs)	994.00±1.90 ^b	284.00±1.73 ^c	1326.67±2.24 ^a
Setback (cPs)	94.33±7.31 ^b	50.33±0.58 ^c	162.00±3.46 ^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนหมายถึงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.1.3 สมบัติทางความร้อน (Thermal properties) ของแป้งข้าวพันธุ์ กข6 ระยะต่าง ๆ

ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงพลังงานและอุณหภูมิในการเกิดเจลาตินในเซชันของแป้งข้าวพันธุ์ กข6 ที่ระยะต่าง ๆ ดังแสดงใน (ภาพที่ 34) โดยใช้เครื่องวิเคราะห์สมบัติทางความร้อน (Differential scanning calorimeter: DSC) พบว่าแป้งข้าวระยะเม่าที่ผ่านการทำให้เกิดเจลาตินในเซชัน ไม่พบอุณหภูมิในการเกิดเจลาตินในเซชัน เนื่องจากในระหว่างขั้นตอนการเตรียมแป้งข้าวได้มีการเกิดเจลาตินในเซชันไปแล้ว ดังนั้นเมื่อนำมาวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของแป้งจึงไม่พบการเกิดเจลาตินในเซชันอีก สำหรับแป้งข้าวระยะเม่าและระยะสุกแก่กราฟที่ได้แสดงให้เห็นลักษณะการดูดพลังงานความร้อน (Endothermal) นั้นแสดงให้เห็นว่าแป้งมีการดูดพลังงานเข้าไปเพื่อทำลายพันธะไฮโดรเจนของแป้ง เพื่อทำให้แป้งเกิดเจลาตินในเซชัน (กล้านรงค์และเกื้อกุล, 2546) จึงได้กราฟที่มีลักษณะพาราโบลาหงาย



ภาพที่ 34 Thermogram การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนของแป้งข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ระยะต่าง ๆ ด้วยเครื่องวัดสมบัติทางความร้อน (Differential Scanning Carorimetry: DSC) (-) เส้นสีน้ำเงินแสดงข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) (-) เส้นสีแดงแสดงข้าวระยะเม่าและ (-) เส้นสีดำแสดงข้าวระยะสุกแก่

โดยจากการวิเคราะห์ผลดังแสดงใน (ตารางที่ 9) และกราฟ thermogram ใน (ภาพที่ 34) พบว่าแป้งข้าวระยะเม่ามีอุณหภูมิเริ่มการเกิดเจลาตินในเซชัน (onset temperature) เท่ากับ 63.69 ± 0.55 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดในการเกิดเจลาตินในเซชัน (peak temperature) มีค่า 70.31 ± 0.10 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสุดท้ายในการเกิดเจลาตินในเซชัน (enset temperature) มีค่า 80.48 ± 1.88 องศาเซลเซียส และสำหรับค่าพลังงานที่ใช้ในการเกิดเจลาตินในเซชัน (Enthalpy, J/g) ของแป้งข้าวระยะเม่าเท่ากับ 6.14 ± 0.97 (J/g) ในขณะที่แป้งข้าวระยะสุกแก่ พบว่าอุณหภูมิที่แป้งเริ่มเกิดเจลาตินในเซชัน (onset temperature) มีค่า 64.28 ± 1.19 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดในการเกิดเจลาตินในเซชัน (peak temperature) มีค่า 71.48 ± 0.26 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสุดท้ายในการเกิดเจลาตินในเซชัน (enset temperature) มีค่า 81.37 ± 1.46 องศาเซลเซียส และค่าพลังงานที่ใช้ในการเกิดเจลาตินในเซชัน (Enthalpy, J/g) ของแป้งข้าวระยะสุกแก่ เท่ากับ 7.84 ± 0.17 (J/g) และเมื่อทำการเปรียบเทียบอุณหภูมิในการเกิดเจลาตินในเซชันของข้าวระยะเม่า (ที่ไม่ผ่านการเกิดเจลาตินในเซชัน) และข้าวระยะสุกแก่ พบว่าแป้งข้าวระยะสุกแก่มีอุณหภูมิในการเกิดเจลาตินในเซชันสูงกว่าแป้งข้าวระยะเม่า พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 นอกจากนี้ยังพบว่าช่วงในการเกิดเจลาตินในเซชันของแป้งข้าวระยะสุกแก่ ($T_e - T_0$) สูงกว่าแป้งข้าวข้าวระยะเม่า (ที่ไม่ผ่านการเกิดเจลาตินในเซชัน) แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และสอดคล้องกับค่าการเปลี่ยนแปลงพลังงานในการเกิดเจลาตินในเซชันที่พบในแป้งข้าวระยะสุกแก่สูงกว่าในแป้งข้าวระยะเม่าเล็กน้อย อาจเป็นเพราะว่าลักษณะโครงสร้างของอะไมโลสหรือกิ่งก้านของอะไมโลเพคตินในแป้งข้าวระยะเม่าอาจยังพัฒนาเป็นแป้งยังไม่สมบูรณ์ (Eiko and Tomio, 2007) ดังนั้น

จึงทำให้ใช้พลังงานที่มีลักษณะเป็น endothermal เป็นการดูดพลังงานเข้าไปเพื่อทำลายพันธะไฮโดรเจนในการเกิดเจลลิตในเซชันของแป้งมีค่าต่ำ ทำให้มีช่วงอุณหภูมิการเกิดเจลลิตในเซชันที่แคบกว่าแป้งข้าวระยะสุกแก่ สำหรับแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่มีการพัฒนาเป็นแป้งสมบูรณ์และเม็ดแป้งมีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ ทำให้มีช่วงอุณหภูมิการเกิดเจลลิตในเซชันที่กว้างกว่าแป้งข้าวระยะเม่า (Eiko and Tomio, 2007) แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งไปสอดคล้องกับ ปริมาณโครงสร้างผลึกที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง x-ray diffraction ที่พบในแป้งข้าวระยะสุกแก่สูงกว่าในข้าวระยะเม่า ซึ่งค่าพลังงานที่ใช้ในการเกิด เจลลิตในเซชัน (ΔH , J/g) เป็นค่าที่ใช้บ่งบอกถึงปริมาณหรือความแข็งแรงของโครงสร้างผลึกในเม็ดแป้ง หรือปริมาณเกลียวคู่ของโมเลกุลอะไมโลเพกตินและจำนวนพันธะไฮโดรเจน ดังนั้นค่าพลังงานที่ใช้ในการเกิดเจลลิตในเซชัน (ΔH , J/g) ในข้าวระยะสุกแก่ที่สูง เนื่องจากในข้าวระยะสุกแก่จะมี ปริมาณโครงสร้างผลึกมากกว่าของแป้งข้าวระยะเม่า

ตารางที่ 9 สมบัติทางความร้อนของแป้งข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ระยะต่าง ๆ

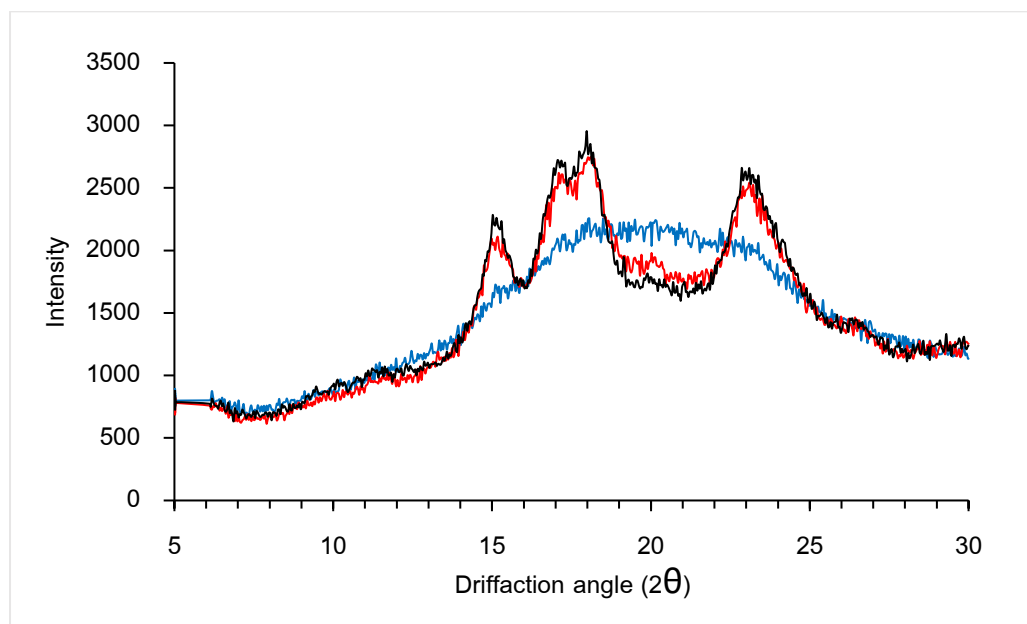
อุณหภูมิ (°C)	ชนิดของแป้งข้าว		
	ระยะเม่า (เจลลิตในเซชัน)	ระยะเม่า	ระยะสุกแก่
T_0^{ns}	-	63.69 ± 0.55	64.28 ± 1.19
T_p^{ns}	-	70.31 ± 0.10	71.48 ± 0.26
T_e^{ns}	-	80.48 ± 1.88	81.37 ± 1.46
$T_e - T_0^{ns}$	-	16.79 ± 2.42	17.09 ± 0.63
Enthpy (J/g) ^{ns}	-	6.14 ± 0.97	7.84 ± 0.17

หมายเหตุ: ^{ns} แสดงค่าเฉลี่ยในแนวนอนไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ไม่สามารถตรวจพบ

4.1.4 โครงสร้างผลึกของแป้งข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ระยะต่างๆ

โดยทั่วไปเม็ดแป้งจะมีลักษณะโครงสร้างผลึกของเม็ดแป้งเป็น 3 แบบ ขึ้นอยู่กับความหนาแน่นในการจัดเรียงตัวของเกลียวคู่ ถ้าเกิดการจัดเรียงตัวแบบหนาแน่นมากจะเกิดเป็นผลึกแบบ A พบได้ในแป้งจากธัญพืช ถ้าเรียงตัวกันแบบหลวมๆ จะเกิดผลึกแบบ B โดยจะพบจากแป้งจำพวกตระกูลหัว ถ้าแป้งมีการจัดเรียงตัวทั้งแบบ A และ B รวมกันจัดเป็นแบบ C ซึ่งพบในแป้งจากพืชตระกูลถั่ว (Jenkins and Donald, 1995) ซึ่งจากการวิเคราะห์รูปแบบโครงสร้างผลึกของเม็ดแป้งโดยใช้เทคนิคของการหักเหรังสีเอ็กซ์เรย์ (X-ray diffraction: XRD) ดังแสดงใน (ภาพที่ 35) พบว่า

เม็ดแป้งมีโครงสร้างแบบกึ่งผลึก (semi-crystalline structure) โดยมีระดับความเป็นผลึกในช่วงร้อยละ 20-40 ส่วนที่เป็นผลึกเกิดจากการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบของสายโซ่เกลียวคู่ (double helices) ที่เป็นสายโซ่กิ่งของอะไมโลเพคติน โดยเป็นกลุ่มที่มีโครงสร้างผลึกแบบ A ซึ่งในหนึ่งยูนิตเซลล์ (unit cell) ประกอบด้วยกลูโคส 12 หน่วย มีลักษณะ ผลึกแบบโมโนคลินิก (monoclinic symmetry) โดย $a = 2.124 \text{ nm}$, $b = 1.172 \text{ nm}$, and $c = 1.05 \text{ nm}$ และมีโมเลกุลน้ำ ภายในจำนวน 4 โมเลกุล ซึ่งจากการวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างของผลึกของแป้งข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ระยะต่าง ๆ ได้แก่ แป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเขชัน) แป้งข้าวระยะเม่าและระยะสุกแก่ (ภาพที่ 35) พบว่าจาก X-ray diffraction pattern ของแป้งตัวข้าวระยะเม่าจะปรากฏ single peak ที่มุม 2θ ที่ 5° 17° 18° และ 23° เช่นเดียวกับแป้งข้าวระยะสุกแก่จะปรากฏ single peak ที่มุม 2θ ที่ 5° 17° 18° และ 23° ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแป้งที่มีโครงสร้างผลึกแบบ A แป้งในกลุ่มนี้เป็นแป้งจากธัญพืช แต่แป้งข้าวระยะเม่าที่ผ่านการเกิดเจลาตินในเขชันพบ single peak ที่มุม 2θ ที่ 19° และ 23° ที่ต่ำมาก เนื่องจากในระหว่างเตรียมข้าวระยะเม่าได้มีการให้ความร้อนจนทำให้เกิดเจลาตินในเขชัน ซึ่งส่งผลให้การจัดเรียงตัวของโครงสร้างผลึก โดยโมเลกุลของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินที่จัดเรียงตัวในเม็ดแป้งเป็นโครงสร้างทั้งส่วนที่เป็นผลึก (Crystalline region) และส่วนอสัณฐาน (Amorphous region) ซึ่งส่วนสายโซ่สั้นของอะไมโลเพคตินจะจัดเรียงตัวในลักษณะเกลียวม้วนคู่ (Double helices) ระหว่างโมเลกุลด้วยพันธะไฮโดรเจนและแรงแวนเดอร์วาลส์รวมเป็นกลุ่ม (Cluster) ซึ่งการเรียงตัวอย่างมีระเบียบทำให้เกิดโครงสร้างที่เป็นผลึก และเมื่อแป้งได้รับความร้อน ทำให้เกิดการทำลายพันธะไฮโดรเจนที่อยู่ภายในโครงสร้างของแป้ง เป็นผลให้ทำให้โครงสร้างของเม็ดแป้งแป้งถูกทำลาย และเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณโครงสร้างผลึก (ตารางที่ 10) พบว่าปริมาณโครงสร้างผลึกของแป้ง (Relative crystallinity, %) มีค่าต่ำคือคิดเป็นร้อยละ 2.34 ซึ่งเมื่อเทียบกับแป้งข้าวระยะเม่าแบบดิบและระยะสุกแก่ พบว่าระดับความเข้มของการหักเหของแสงสูงกว่า ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ปริมาณโครงสร้างผลึกของแป้ง (Relative crystallinity, %) ของแป้งข้าวระยะเม่าแบบดิบและแป้งข้าวระยะสุกแก่ มีค่าความเป็นผลึกที่ร้อยละ 31.64 และ 35.12 ตามลำดับ (ตารางที่ 10)



ภาพที่ 35 Thermogram การวิเคราะห์โครงสร้างผลึกของแป้งข้าวพันธุ์ กข6 ระยะต่าง ๆ ด้วยเทคนิคการหักเหรังสีเอ็กซ์เรย์ (X-ray diffraction: XRD) (-) เส้นสีน้ำเงินแสดงข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) (-) เส้นสีแดงแสดงข้าวระยะเม่า (-) เส้นสีดำแสดงข้าวระยะสุกแก่

จากการวิเคราะห์ปริมาณโครงสร้างผลึกของแป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) แป้งข้าวระยะเม่าแบบดิบ และแป้งข้าวระยะสุกแก่ (ตารางที่ 10) พบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งการที่พบว่าปริมาณโครงสร้างผลึกของแป้งข้าวระยะเม่าแบบเกิดเจลาตินในเซชันต่ำกว่าแป้งข้าวระยะเม่าแบบดิบ และแป้งข้าวระยะสุกแก่ เนื่องจากในระหว่างการเตรียมแป้งข้าวระยะเม่าได้รับความร้อนจนเกิดเจลาตินในเซชัน ส่งผลให้โครงสร้างของแป้งส่วนที่เป็นอสัณฐานและโครงสร้างผลึกหรือพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลแป้งถูกทำลายเนื่องจากความร้อน เมื่อวิเคราะห์ปริมาณผลึกด้วยเครื่อง x-ray diffraction จึงทำให้ตรวจพบ ปริมาณโครงสร้างผลึกของแป้งข้าวระยะเม่าที่ผ่านการเกิดเจลาตินในเซชันจึงมีค่าต่ำกว่าแป้งข้าวระยะเม่าแบบดิบและแป้งข้าวระยะสุกแก่ เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณโครงสร้างผลึกของแป้งข้าวระยะเม่าแบบดิบและแป้งข้าวระยะสุกแก่ พบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งการที่พบว่าปริมาณโครงสร้างผลึกของแป้งข้าวระยะเม่าแบบดิบต่ำกว่าแป้งข้าวระยะสุกแก่ อาจเกิดเนื่องจากข้าวระยะเม่าแบบดิบเป็นระยะที่แป้งได้มีโครงสร้างของแป้งจากส่วนที่เป็น เส้นตรง (อะไมโลส) เกิดการพัฒนาไปเป็นโครงสร้างที่เป็นโครงสร้างแบบแบบกึ่งก้าน (อะไมโลเพคติน) ในข้าวระยะสุกแก่

ซึ่งการที่ข้าวระยะเม่าได้มีการพัฒนาโครงสร้างแป้งที่สมบูรณ์เพิ่มขึ้นในข้าวระยะสุกแก่เป็นผลให้เม็ดแป้งเกิดการพัฒนาไปเป็นโครงสร้างที่เป็นแบบกึ่งก้าน (อะไมโลเพคติน) เพิ่มขึ้น ทำให้พบ

ปริมาณอะไมโลเพกตินในข้าวระยะสุกแก่สูงกว่าในระยะเม่า ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (ตารางที่ 7) ดังนั้นจึงส่งผลให้ปริมาณโครงสร้างผลึกที่พบของแป้งข้าวระยะสุกแก่มากกว่า นอกจากนี้ปริมาณโครงสร้างผลึกยังสอดคล้องกับค่าการเปลี่ยนแปลงพลังงานที่ใช้ในการเกิดเจลลาติไนเซชัน (ΔH , J/g) ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์สมบัติทางความร้อน (DSC) ซึ่งแสดงค่าพลังงานที่ใช้ในการเกิดเจลลาติไนเซชัน (ΔH , J/g) ของแป้งข้าวระยะเม่า (ที่ไม่ผ่านการเกิดเจลลาติไนเซชัน) ที่ต่ำกว่าแป้งข้าวระยะสุกแก่ (ตารางที่ 8) โดยค่าการเปลี่ยนแปลงพลังงานที่ใช้ในการเกิดเจลลาติไนเซชัน (ΔH , J/g) เป็นค่าที่ใช้บ่งบอกถึงปริมาณหรือความแข็งแรงของโครงสร้างผลึกในเม็ดแป้งหรือปริมาณเกลียวคู่ของโมเลกุลอะไมโลเพกตินและจำนวนพันธะไฮโดรเจน (ณัชชชี ณัชปภาสัณณ และคณะ 2559) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในแป้งข้าวระยะสุกแก่มีปริมาณโครงสร้างผลึกมากกว่าของแป้งข้าวระยะเม่า

การตรวจสอบรูปแบบโครงสร้างผลึกของเม็ดแป้งทำได้โดยใช้เทคนิคของการหักเหรังสีเอ็กซ์เรย์ (X-ray diffraction: XRD) การวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างผลึกด้วยเครื่อง XRD ของแป้งดิบหรือแป้งที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการแปรรูปที่มีผลให้แป้งสามารถเกิดเจลลาติไนเซชันได้ ทำให้สามารถพบฟิสิกบนดิฟเฟรคโตแกรมได้ ซึ่งแสดงถึงความเป็นผลึก และหากแป้งผ่านกระบวนการทำให้สุกหรือกระบวนการเกิดเจลลาติไนเซชันมีผลให้โครงสร้างผลึกในเม็ดแป้งถูกทำลายทำให้ฟิสิกเหล่านี้หายไป (ณัชชชี ณัชปภาสัณณ และคณะ 2559)

ตารางที่ 10 ปริมาณโครงสร้างผลึกของแป้งข้าวพันธุ์ กข6 ระยะต่าง ๆ

ชนิดของแป้งข้าว	ปริมาณโครงสร้างผลึก (%)
ระยะเม่า (เจลลาติไนเซชัน)	2.34±0.00 ^c
ระยะเม่า	31.64±0.00 ^b
ระยะสุกแก่	35.12±0.00 ^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.1.5 รูปร่างของเม็ดแป้งข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ในระยะต่าง ๆ

นอกจากนี้สามารถตรวจสอบความเป็นผลึกของเม็ดแป้งด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีระบบแสงโพลาไรซ์ เนื่องจากเม็ดแป้งโดยเฉพาะส่วนที่เป็นผลึกมีคุณสมบัติในการบิดระนาบแสงโพลาไรซ์หรือเรียกว่าไบฟิงเจน (birefringence) ทำให้มองเห็นลักษณะคล้ายเครื่องหมายกากบาท จากการวิเคราะห์ลักษณะและรูปร่างของเม็ดแป้งข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ระยะต่าง ๆ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา

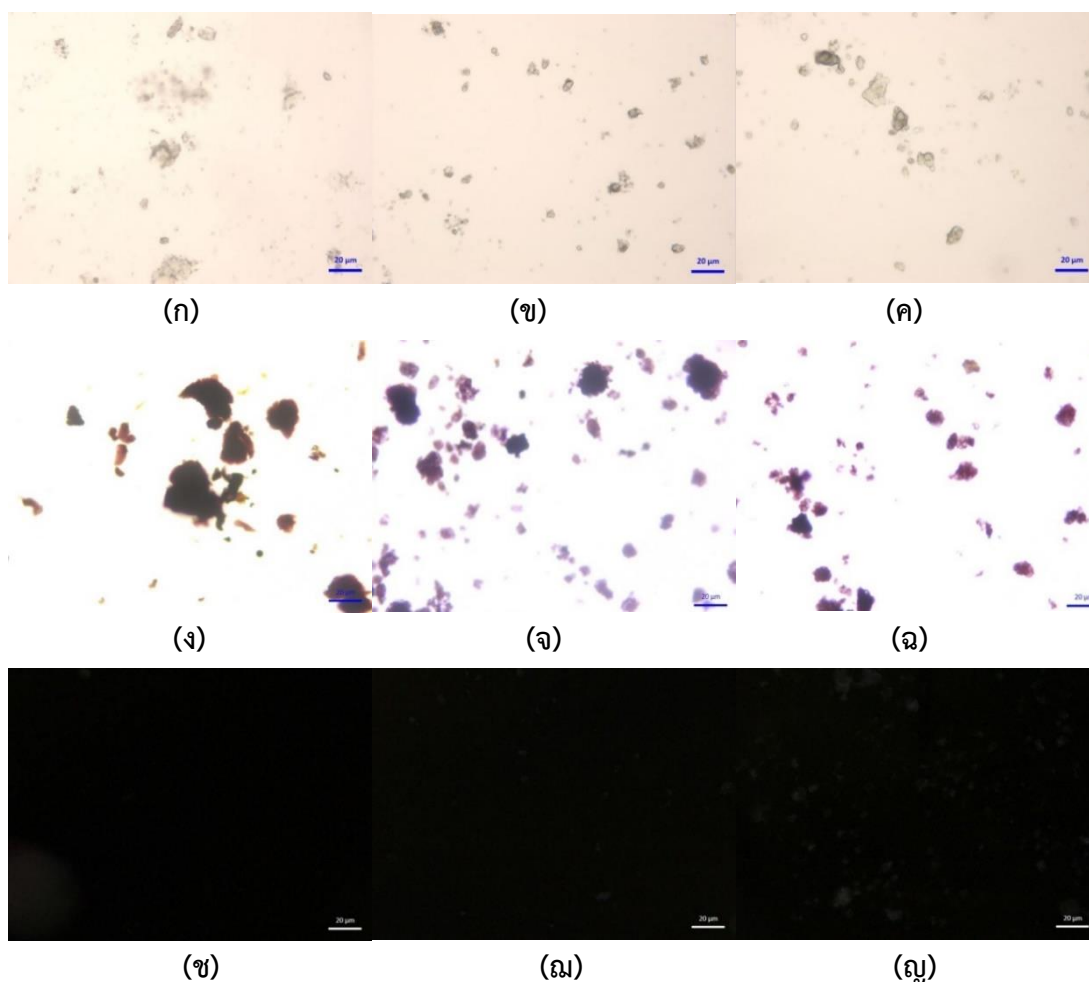
และแบบย้อมด้วยสารละลายไอโอดีนที่กำลังขยาย 40 เท่า (ภาพที่ 36) แป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา ภาพที่ 36 (ก) พบว่าตัวอย่างเม็ดแป้งข้าวระยะเม่าที่ผ่านการทำให้เกิดเจลาตินในเซชันจะมีลักษณะรูปร่างบวม มีการเกาะตัวกัน (Agglomeration) ระหว่างเม็ดแป้งและมีขนาดใหญ่กว่าแป้งข้าวระยะเม่าแบบดิบและแป้งข้าวระยะสุกแก่ เนื่องจากในระหว่างการเตรียมข้าวระยะเม่าได้มีการให้ความร้อนจนทำให้เกิดเจลาตินในเซชัน ซึ่งจะไปทำลายพันธะไฮโดรเจนที่อยู่ภายในโครงสร้างของแป้ง ส่งผลให้ไปทำลายการจัดเรียงตัวของโครงสร้างผลึกของโมเลกุลของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินที่จัดเรียงตัวในเม็ดแป้งเป็นโครงสร้างทั้งส่วนที่เป็นผลึก (Crystalline region) และส่วนอสัณฐาน (Amorphous region) ซึ่งส่วนสายโซ่สั้นของอะไมโลเพคตินจะจัดเรียงตัวในลักษณะเกลียวม้วนคู่ (Double helices) ระหว่างโมเลกุลด้วยพันธะไฮโดรเจนและแรงแวนเดอร์วาลส์รวมเป็นกลุ่ม (Cluster) ซึ่งการเรียงตัวอย่างมีระเบียบทำให้เกิดโครงสร้างที่เป็นผลึกของแป้ง เมื่อถูกทำลายด้วยความร้อน จะทำให้อะไมโลสถูกชะออกจากโครงสร้างของแป้งได้มากขึ้น (amylose leaching) (ณัชชชี ณัชปภัสสมณ และคณะ 2559) ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลสที่พบในแป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) มากกว่าในแป้งข้าวระยะสุกแก่ และเมื่อนำแป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) ไปย้อมสีสารละลายไอโอดีนและส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบย้อมสารละลายไอโอดีน ภาพที่ 36 (ง) พบว่าเม็ดแป้งมีสีน้ำเงินเข้มมากกว่าในแป้งข้าวระยะเม่าแบบดิบและระยะสุกแก่ ซึ่งเกิดจากปริมาณอะไมโลสจำนวนมากสามารถจับกับไอโอดีนโดยจะพันเป็นเกลียวรอบไอโอดีนได้ สารประกอบเชิงซ้อน (amylose-iodine complex) เป็นสีน้ำเงินเข้ม (กล้านรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2546) และเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีระบบแสงโพลาไรซ์ เพื่อดูส่วนที่เป็นผลึกมีคุณสมบัติในการบิดระนาบแสงโพลาไรซ์หรือเรียกว่าไบฟิงเจน (birefringence) มีลักษณะคล้ายเครื่องหมายกากบาท แต่ในแป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) ภาพที่ 36 (ข) เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีระบบแสงโพลาไรซ์ ไม่พบไบฟิงเจน เนื่องจากทำให้โครงสร้างของเม็ดแป้งถูกทำลาย จึงทำให้ไม่สามารถพบได้ ซึ่งจะสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเครื่อง DSC ที่ไม่อุณหภูมิในการเกิดเจลาตินในเซชัน นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณโครงสร้างผลึกที่พบปริมาณผลึกในแป้งข้าวระยะเม่าที่ต่ำ

สำหรับแป้งข้าวระยะเม่าที่ผ่านการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา ภาพที่ 36 (ข) พบว่าตัวอย่างเม็ดแป้งข้าวระยะเม่าที่ไม่ผ่านการทำให้เกิดเจลาตินในเซชันจะมีลักษณะรูปร่างบวม มีการเกาะตัวกัน (Agglomeration) ระหว่างเม็ดแป้งและมีขนาดใหญ่กว่าแป้งข้าวระยะสุกแก่ เนื่องจากโครงสร้างของแป้งยังไม่สมบูรณ์และการจัดเรียงตัวของโครงสร้างในส่วนที่เป็นเส้นตรง (อะไมโลส) และส่วนที่เป็นกิ่งก้าน (อะไมโลเพคติน) ยังไม่เป็นระเบียบ ดังนั้น จึงทำให้สามารถดูดซึมน้ำเข้าไปในโครงสร้างได้ง่าย ส่งผลให้เม็ดแป้งบวมและเกิดการพองตัวได้อย่างรวดเร็ว แต่เมื่อเทียบแป้งข้าวระยะเม่ากับข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) พบว่าแป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) จะมีรูปร่างบวมและมี

ขนาดใหญ่กว่า และเมื่อนำข้าวระยะเม่าไปย้อมสีสารละลายไอโอดีนและส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบย้อมสารละลายไอโอดีน ภาพที่ 36 (ฉ) พบว่าเม็ดแป้งมีสีน้ำเงินเข้มมากกว่าในแป้งข้าวระยะสุกแก่ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณอะไมโลสที่พบในแป้งข้าวระยะเม่ามากกว่าแป้งข้าวระยะสุกแก่ แต่สีอ่อนกว่าแป้งข้าวระยะเม่าที่ผ่านการเกิดเจลลิตินเซชัน เพราะในแป้งข้าวระยะเม่าเมื่อผ่านการทำให้เกิดเจลลิตินเซชัน ทำให้โครงสร้างของเม็ดแป้งถูกทำลายและเกิดการชะของอะไมโลส (amylose leaching) ออกมาได้มากขึ้น จึงทำให้เมื่อย้อมสีด้วยสารละลายไอโอดีนจึงทำให้ได้สีน้ำเงินเข้มกว่า และเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีระบบแสงโพลาไรซ์ เพื่อดูส่วนที่เป็นผลึกมีคุณสมบัติในการบิดระนาบแสงโพลาไรซ์หรือเรียกว่าไบฟิงเจน (birefringence) มีลักษณะคล้ายเครื่องหมายกากบาท พบว่าในแป้งข้าวระยะเม่า ภาพที่ 36 (ณ) เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีระบบแสงโพลาไรซ์ จะพบไบฟิงเจน แต่เห็นได้น้อยมาก อาจจะเนื่องจากทำให้โครงสร้างของเม็ดแป้งยังไม่สมบูรณ์จึงทำให้พบได้ในปริมาณต่ำ

สำหรับแป้งข้าวระยะสุกแก่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา ภาพที่ 36 (ค) พบว่าตัวอย่างเม็ดแป้งข้าวระยะสุกแก่จะมีรูปทรงหลายเหลี่ยม มีขนาดไม่สม่ำเสมอ มีการเกาะตัวกัน (Agglomeration) ระหว่างเม็ดแป้ง และขนาดเล็กกว่าแป้งข้าวระยะเม่า (เจลลิตินเซชัน) และข้าวระยะเม่าแบบดิบ เนื่องจากโครงสร้างแป้งได้มีการพัฒนาโครงสร้างที่เป็น แบบกึ่งก้าน (อะไมโลเพคติน) ทำให้โครงสร้างแป้งสมบูรณ์มากขึ้นและโครงสร้างมีความแข็งแรงมากขึ้น เพราะโครงสร้างแบบผลึก (crystalline) ที่มากขึ้น ดังนั้นการดูดซับน้ำเข้าไปในโครงสร้างจึงต่ำ ส่งผลให้การบวมของเม็ดแป้งต่ำกว่าระยะเม่า (เจลลิตินเซชัน) และข้าวระยะเม่า ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Thiranusornkij et al. (2019) ที่ได้ทำการศึกษาลักษณะโครงสร้างของแป้งข้าวหอมมะลิและแป้งข้าวไรซ์เบอร์รี่ โดยใช้ SEM พบว่ามีรูปทรงหลายเหลี่ยมและมีการเกาะตัวกัน (Agglomeration) ระหว่างเม็ดแป้งและองค์ประกอบอื่น ๆ และเมื่อนำข้าวระยะสุกแก่ไปย้อมสีสารละลายไอโอดีนและส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบย้อมสารละลายไอโอดีน ภาพที่ 36 (ฉ) พบว่าเม็ดแป้งมีสีน้ำเงินเข้มน้อยกว่าในแป้งข้าวระยะเม่า (เจลลิตินเซชัน) และระยะเม่าแบบดิบ เนื่องจากการพัฒนาโครงสร้างของแป้งข้าวระยะเม่าเป็นแป้งข้าวระยะสุกแก่จะทำให้พบปริมาณอะไมโลสลดลง และส่งผลให้ปริมาณอะไมโลเพคตินเพิ่มขึ้นซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (ตาราง 7) และเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีระบบแสงโพลาไรซ์ เพื่อดูส่วนที่เป็นผลึกมีคุณสมบัติในการบิดระนาบแสงโพลาไรซ์หรือเรียกว่าไบฟิงเจน (birefringence) มีลักษณะคล้ายเครื่องหมายกากบาท พบว่าในแป้งข้าวระยะสุกแก่ ภาพที่ 36 (ณ) เมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีระบบแสงโพลาไรซ์ ซึ่งจะเห็นลักษณะของเม็ดแป้งและพบไบฟิงเจนในเม็ดแป้ง อาจจะเนื่องจากในโครงสร้างของเม็ดแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่ได้มีการพัฒนาโครงสร้างที่สมบูรณ์มากขึ้นจากแป้งระยะเม่า ซึ่งจะสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์สมบัติทางความร้อนด้วยเครื่อง DSC ที่พบอุณหภูมิในการเกิดเจลลิตินเซชัน นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณโครงสร้างผลึกที่พบปริมาณผลึกที่สูงในแป้งข้าวระยะสุกแก่ ซึ่งจะเห็นลักษณะของไบฟิงเจนใน

เม็ดแป้งไม่ชัด อาจจะเนื่องจากในโครงสร้างของเม็ดแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่ไม่เป็นวงกลม ซึ่งทำให้ดูใบ
 ฟุ้งจนได้ยาก นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบของทางเคมี เช่น โปรตีน ไขมัน ที่จับกับโครงสร้างในแป้งก็
 เป็นอีกสาเหตุที่ทำให้ไม่พบใบฟุ้งจนในข้าวระยะสุกแก่



ภาพที่ 36 ลักษณะและรูปร่างของเม็ดแป้งข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ระยะต่าง ๆ โดยใช้กล้อง
 จุลทรรศน์ แบบธรรมดา (กำลังขยาย 40 เท่า) ของแป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินเซชัน)
 (ก) แป้งข้าวระยะเม่า (ข) แป้งข้าวระยะสุกแก่ (ค) แบบย้อมสารละลายไอโอดีนของ
 แป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินเซชัน) (ง) แป้งข้าวระยะเม่า (จ) แป้งข้าวระยะสุกแก่ (ฉ)
 ภายใต้แสงโพลาไรซ์ของแป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินเซชัน) (ช) แป้งข้าวระยะเม่า
 (ณ) และแป้งข้าวระยะสุกแก่ (ญ)

จากการวิเคราะห์สมบัติต่าง ๆ จากแป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) แป้งข้าวระยะเม่า และจากแป้งและแป้งแป้งข้าวระยะสุกแก่ นั้น ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่าแป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) และแป้งข้าวระยะเม่า จะมีปริมาณอะไมโลสสูงกว่าแป้งข้าวระยะสุกแก่ เพราะข้าวระยะเม่าได้มีการพัฒนาโครงสร้างแป้งสมบูรณ์เพิ่มขึ้นในระยะสุกแก่ สอดคล้องกับการวิเคราะห์ที่พบว่าปริมาณอะไมโลเพคตินในข้าวระยะสุกแก่สูงกว่าในระยะเม่า การที่ในแป้งข้าวระยะเม่ามีโครงสร้างที่ยังไม่สมบูรณ์ อาจจะทำให้เอนไซม์เข้าไปย่อยได้ง่ายขึ้น และจากการวิเคราะห์สมบัติทางความร้อน โดยใช้เครื่องวิเคราะห์สมบัติทางความร้อน (Differential scanning calorimeter: DSC) พบว่าแป้งข้าวระยะเม่าที่ผ่านการทำให้เกิดเจลาตินในเซชัน ไม่พบอุณหภูมิในการเกิดเจลาตินในเซชัน เนื่องจากในระหว่างขั้นตอนการเตรียมแป้งข้าวได้มีการเกิดเจลาตินในเซชันไปแล้ว ซึ่งต่างจากข้าวระยะเม่าและระยะสุกแก่ที่พบอุณหภูมิในการเกิดเจลาตินในเซชัน และนอกจากนี้การวิเคราะห์โครงสร้างผลึก โดยใช้เทคนิคของการหักเหรังสีเอ็กซ์เรย์ (X-ray diffraction: XRD) ยังพบว่าปริมาณโครงสร้างผลึกของแป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) พบว่ามีปริมาณที่ต่ำกว่าแป้งข้าวระยะเม่าและระยะสุกแก่ เนื่องจากโครงสร้างถูกทำลายด้วยความร้อนในการทำให้เกิดเจลาตินในเซชัน และจากการการดูลักษณะและรูปร่างของเม็ดแป้งโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ แบบธรรมดาและย้อมด้วยสารละลายไอโอดีน จะเห็นได้ว่าเม็ดแป้งของข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) มีการบวมและขนาดของเม็ดแป้งที่ใหญ่กว่าแป้งข้าวระยะเม่าและระยะสุกแก่ และเมื่อย้อมสีด้วยสารละลายไอโอดีน พบว่ามีสีน้ำเงินเข้มมากกว่า ซึ่งเป็นผลมาจากการชะของอะไมโลส อาจจะเป็นสาเหตุทำให้เอนไซม์เข้าไปย่อยได้ง่ายขึ้น ซึ่งผลเหล่านี้ของแป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) อาจส่งผลต่อกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยทำให้เอนไซม์เข้าไปย่อยแป้งระยะเม่าที่ผ่านเจลาตินในเซชันได้ง่ายขึ้น ดังนั้นจึงมีแนวคิดที่จะนำแป้งข้าวระยะเม่าที่ผ่านการเกิดเจลาตินในเซชันไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิต IMO's เพื่อเปรียบเทียบกับแป้งข้าวระยะสุกแก่

4.2 กิจกรรมที่ 1 การคัดเลือกชนิดจุลินทรีย์สำหรับผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์

จากการเตรียมโคจิจากสปอร์ของเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3102 และเชื้อรา *A. niger* TISTR 3012 โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้ราสร้างสปอร์ แล้วนำสปอร์จาก PDA มาเตรียมในรูปสารแขวนลอยสปอร์เพื่อให้มีปริมาณ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (Saman et al., 2012) ตรวจสอบจำนวนสปอร์โดยใช้ haemocytometer นำสารแขวนลอยสปอร์ที่ได้ไปใช้ในการเตรียมโคจิ โดยการเพาะเลี้ยงสปอร์ในข้าวให้เจริญสร้างเส้นใยและสร้างสปอร์บนเมล็ดข้าวจนมีปริมาณมากพอ

สำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับใช้ในกระบวนการย่อยแป้งในเมล็ดข้าวให้เป็นน้ำตาลต่อไป ดังแสดงใน (ภาพที่ 37) พบว่าโคจิจที่ได้จากการเตรียมภายใต้สภาวะการทดลองนี้ *A. oryzae* TISTR 3102 มีปริมาณสปอร์เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อกรัมข้าว และ *A. niger* TISTR 3012 มีปริมาณสปอร์เท่ากับ 10^6 สปอร์ต่อกรัมข้าว



(ก)

(ข)

ภาพที่ 37 ก้อนเชื้อโคจิจจากสปอร์ของเชื้อรา *A. oryzae* (ก) และรา *A. niger* (ข)

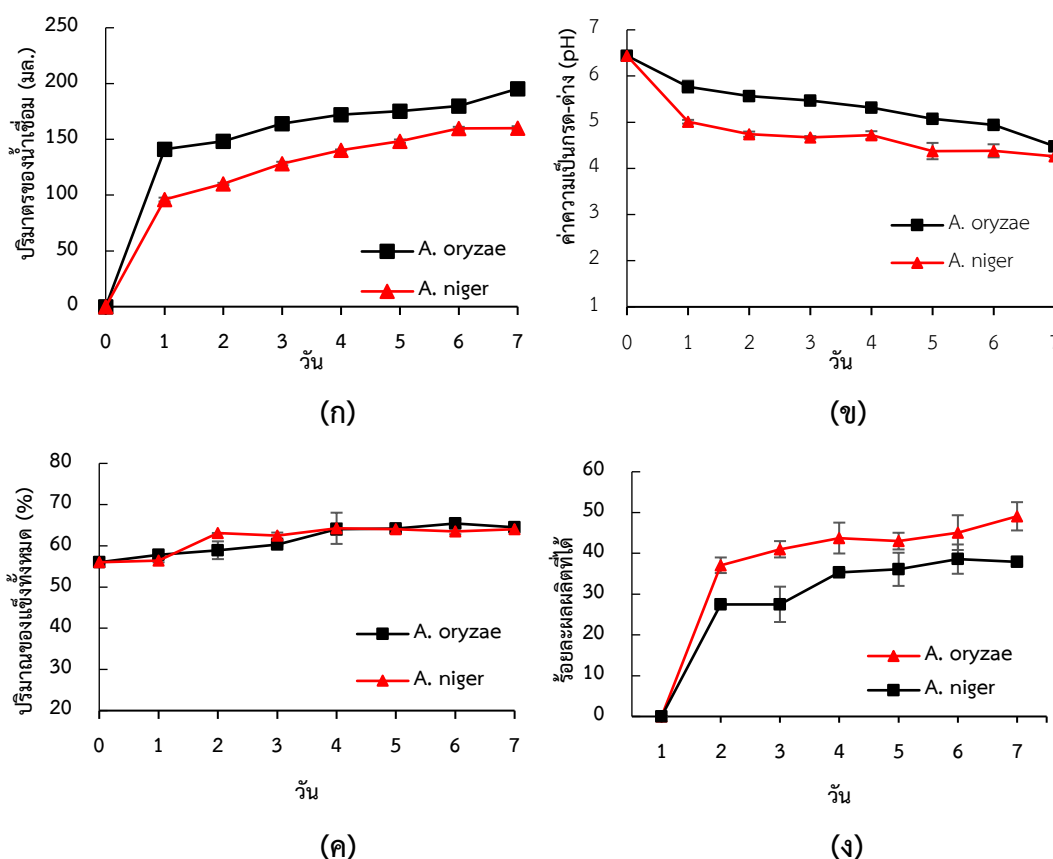
การประเมินสมบัติการย่อยแป้งข้าวของราทั้งสองชนิด โดยการนำโคจิจ มาผสมกับแป้งข้าวระยะเม้าที่ผ่านการทำให้เกิดเจลในเซชัน ให้มีปริมาณสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ 10^4 สปอร์ต่อกรัมข้าว เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ซึ่งการประเมินสมบัติการหมักโดยการตรวจวัดปริมาณน้ำเชื่อมที่เพิ่มขึ้นระหว่างการหมัก พบว่าราทั้งสองชนิดเริ่มกิจกรรมการหมักโดยย่อยแป้งข้าวได้น้ำเชื่อมและได้ปริมาตรสูงสุดภายในวันแรกของการหมัก และพบว่า *A. oryzae* สามารถย่อยแป้งได้น้ำเชื่อมปริมาตรสูงกว่า *A. niger* คือ 195.33 ± 1.53 มิลลิลิตร และ 160.00 ± 1.73 มิลลิลิตร ตามลำดับ และในการหมักระหว่างวันที่ 2-7 ปริมาตรของน้ำเชื่อมเพิ่มขึ้นในอัตราที่น้อยกว่าการหมักในวันที่ 1 และการเพิ่มขึ้นของน้ำเชื่อมที่หมักด้วย *A. oryzae* มีปริมาตรสูงกว่า *A. niger* ตลอดการหมัก ($P \leq 0.05$) ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเริ่มต้นการหมักข้าวด้วยโคจิจทำให้เราสามารถเริ่มกระบวนการหมักได้อย่างรวดเร็วเนื่องจากในระหว่างการเตรียมโคจิจราเริ่มสร้างเอนไซม์กลุ่มอะไมเลส (Amylase) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Hydrolases และเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล โดยไฮโดรไลซ์พันธะ 1,4-glycosidase bond ในโมเลกุลของแป้งให้มีขนาดของโมเลกุลเล็กลง ทำให้ได้เป็นเดกซ์ทรินและน้ำตาลไดแซ็กคาไรด์ เช่น มอลโทส (maltose) มอนแซ็กคาไรด์ เช่น กลูโคส (MacGregor et al., 1999) โดยเอนไซม์กลุ่มอะไมเลสเริ่มย่อยสลายแป้งเบื้องต้นและการเข้าจับกับสับสเตรทและการเริ่มกระบวนการย่อยทำให้การเร่งการสร้างเอนไซม์เพื่อให้สามารถย่อยสลายแป้งได้มากขึ้นไปพร้อมกัน จึงพบอัตราการเพิ่มของน้ำเชื่อมสูงสุดในวันที่ 1 ของการหมัก หลังจากแป้งส่วนใหญ่ถูกย่อยเป็นของเหลวทำให้เอนไซม์เข้าจับได้น้อยประกอบกับเซลล์และเอนไซม์เริ่มเข้าสู่ช่วง

feedback regulation จึงทำให้การหมักในวันที่ 2 มีอัตราการย่อยลดลงอย่างมีนัยสำคัญไปจนถึงวันสุดท้ายของการหมัก

ปริมาณน้ำเชื่อมที่หมักโดยสปอร์ของรา *A. oryzae* นั้นสูงกว่าการใช้สปอร์ *A. niger* ภาพที่ 38 (ก) เนื่องจากรา *A. oryzae* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์หลักๆ คือ กลุ่มอะไมเลส เช่น แอลฟาอะไมเลสได้ดี ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Hydrolases และเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแปลงเป็นน้ำตาล ช่วยลดความหนืดของแป้ง ซึ่งต่างจากเชื้อรา *A. niger* ที่สามารถผลิตเอนไซม์หลักๆ คือ ทรานกลูโคสเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดกิจกรรมการย้ายหมู่ของน้ำตาล จึงส่งผลให้ปริมาณน้ำเชื่อมที่หมักโดยสปอร์ของรา *A. oryzae* นั้นสูงกว่าการใช้สปอร์ *A. niger* เมื่อพิจารณาสมบัติของน้ำเชื่อมระหว่างการหมัก พบว่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำเชื่อมสอดคล้องกับค่า pH ภาพที่ 38 (ข) พบว่าค่า pH ของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม่าที่หมักโดยสปอร์ของ *A. oryzae* และ *A. niger* ลดลงตลอดระยะเวลา

7 วันของการหมักแบบของแข็ง โดยเริ่มจาก 6.44 ± 0.01 ถึง 4.56 ± 0.03 และ 6.44 ± 0.01 ถึง 3.83 ± 0.02 ตามลำดับ ($P \leq 0.05$) ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าการเกิดกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ของเชื้อรา (Yanfang et al., 2008) ในระหว่างการหมักทำให้เกิดสารประกอบอื่นๆ เช่น กรดอินทรีย์ เช่น กรดซิตริก (Konlam et al., 2014) ดังนั้นจึงทำให้พบว่าค่า pH ลดลง (Vandenbergh et al., 2000) นอกจากนี้ จากผลการศึกษาพบว่าค่า pH ของน้ำเชื่อมที่หมักด้วยสปอร์ของ *A. niger* ต่ำกว่าการใช้สปอร์ของเชื้อรา *A. oryzae* ในการหมัก ดังนั้นที่สภาวะของน้ำเชื่อมที่ได้จากการบ่มและมีค่า pH ที่ต่ำกว่านั้น อาจไม่เหมาะสมต่อกิจกรรมอะไมโลไลติก (amylolytic) หรืออะไมโลไลซิส (amylolysis) สำหรับกิจกรรมการเปลี่ยนแปลงแป้งเป็นน้ำตาล จึงส่งผลให้ได้ปริมาณน้ำเชื่อมที่ต่ำในการหมักโดยใช้สปอร์ของ *A. niger* ภาพที่ 38 (ก) ซึ่งโดยทั่วไปสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมการย่อยแป้งของเอนไซม์อะไมโลลิติก ได้แก่ α -amylase, β -amylase และ glucoamylase ควรอยู่ในช่วง 4.5 ถึง 6 (Sriroth and Piyachomkwan, 2005) ซึ่งค่าเป็นกรดต่างของตัวอย่างที่ได้จากบ่มแป้งระยะเม่าด้วยสปอร์ของเชื้อราทั้ง 2 ชนิดมีความเป็นกรด-ด่างลดลง นอกจากนี้การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ส่งผลให้ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเพิ่มขึ้น ภาพที่ 38 (ค) ทั้งสำหรับการหมักด้วยสปอร์ของ *A. oryzae* และ *A. niger* ซึ่งเอนไซม์จากเชื้อราสามารถแทรกซึมเข้าไปในสารตั้งต้นก่อนที่จะเกิดการไฮโดรไลซิสโดยเอนไซม์อะไมโลไลติกของเชื้อรา เช่น α -อะไมเลส (Sivaramakrishnan et al., 2007) และกลูโคอะไมเลส (Zambare, 2010) ซึ่งแอลฟา-อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์พันธะไกลโคไซด์ภายในสายพอลิเมอร์ของโมเลกุลของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินในแป้งและไกลโคเจนที่ตำแหน่งแอลฟา 1-4 แบบสุ่ม (Nielsen, 2000) นอกจากนี้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) ยังไปทำหน้าที่ไฮโดรไลซ์พันธะ α -1,4 และ α -1,6 ไกลโคซิดิกจากทางด้านปลายนอนรีดิวซ์ของสายโซ่แป้ง

(Uhling, 1998) ได้เป็นน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ ที่ส่งผลให้ปริมาณของแข็งทั้งหมดเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงส่งผลให้ค่าปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) ภาพที่ 38 (ง) หลังจากการหมักในวันที่ 7 เพิ่มขึ้นสูงสุด ทั้งการหมักโดยใช้สปอร์ของ *A. oryzae* และ *A. niger* ($P \leq 0.05$) และพบว่าปริมาณของแข็งทั้งหมดในน้ำเชื่อมที่หมักโดยใช้สปอร์ของ *A. oryzae* สูงกว่าการหมักด้วยสปอร์ของ *A. niger* ($P \leq 0.05$) ซึ่งเหตุผลก็เช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงปริมาตรของน้ำเชื่อมที่ได้ นอกจากนี้ พบว่าร้อยละผลผลิตที่ได้ของน้ำเชื่อมของข้าวระยะเฒ่าที่หมักโดยใช้สปอร์ของรา *A. oryzae* และ *A. niger* เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น 49.08 ± 3.47 และ 38.58 ± 3.59 มิลลิลิตร ตามลำดับ ($P \leq 0.05$) ซึ่งร้อยละผลผลิตที่ได้ของน้ำเชื่อมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่วันที่ 2 ของการหมักและพบว่าปริมาตรน้ำเชื่อมที่หมักโดยสปอร์ของรา *A. oryzae* นั้นสูงกว่าการใช้สปอร์ *A. niger* ภาพที่ 38 (ง)

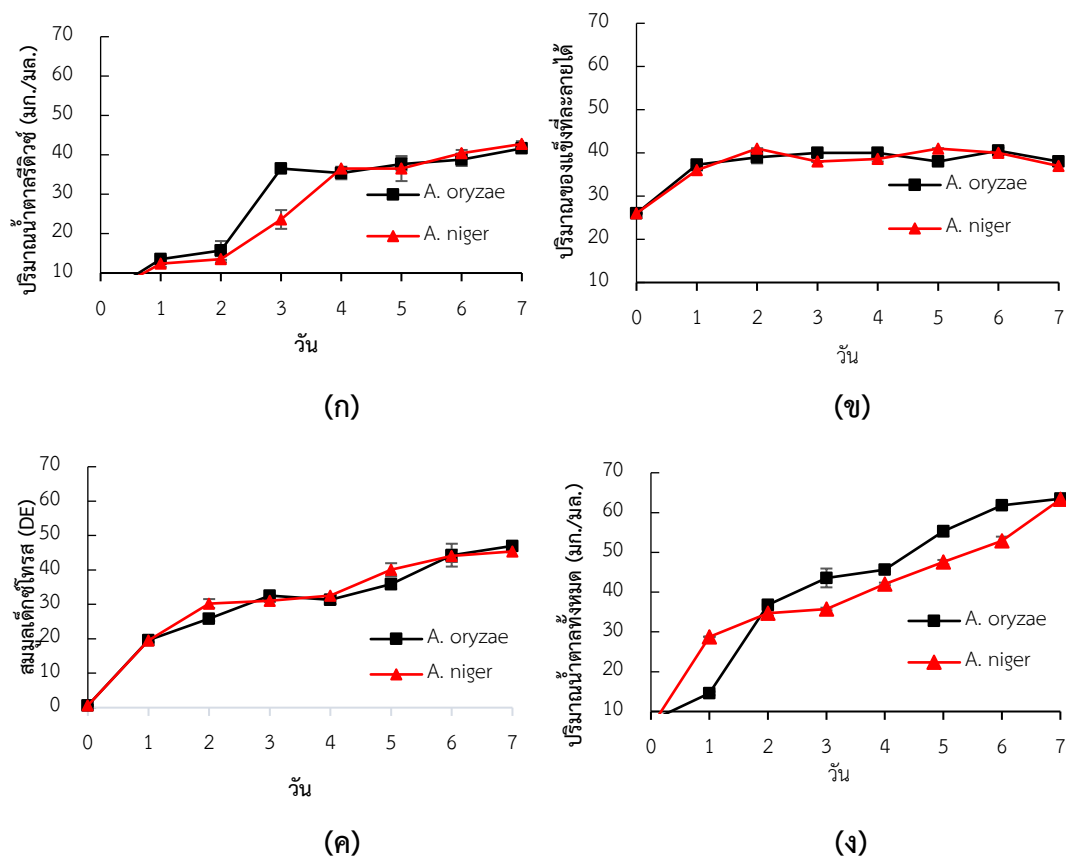


ภาพที่ 38 การเปลี่ยนแปลงปริมาตรและคุณสมบัติทางเคมีของน้ำเชื่อมแป้งข้าวระยะเฒ่าในระหว่างการหมักแบบของแข็ง โดยสปอร์ของเชื้อรา *A. oryzae* และ *A. niger*

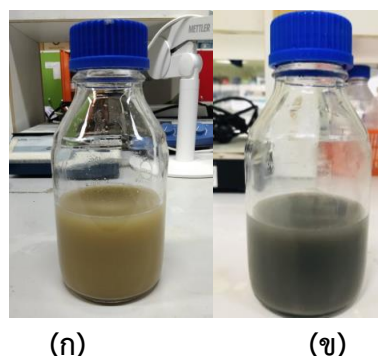
อย่างไรก็ตามในการศึกษาในครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้งจากข้าวระยะเฒ่าให้ได้ปริมาณ IMO's สูงที่สุด โดยการทดลองได้ใช้สปอร์ของ *A. oryzae*

TISTR 3102 และ *A. niger* TISTR 3012 ในการหมักแบบของแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน พบว่าปริมาณน้ำเชื่อมและปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดมีค่าสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดดังแสดงใน ภาพที่ 39 (ก) และภาพที่ 39 (ข) ซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในน้ำเชื่อมที่หมักโดยใช้สปอร์ของ *A. oryzae* และ *A. niger* เพิ่มขึ้นในช่วง 7 วันของการหมัก ($P \leq 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของน้ำเชื่อมที่หมักโดยสปอร์ของ *A. oryzae* มีค่ามากกว่า *A. niger* ($P \leq 0.05$) และพบว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในน้ำเชื่อมที่หมักโดยใช้สปอร์ของ *A. oryzae* และ *A. niger* มีผลต่อปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก ภาพที่ 39 (ง) ($P \leq 0.05$) ซึ่งการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลในน้ำเชื่อมที่หมักด้วยสปอร์ของ *A. oryzae* และ *A. niger* ส่งผลให้ได้ค่าสมมูลเดกซ์โทรสสูงขึ้น (DE-value) ประมาณ 67 และ 54 ตามลำดับ ($P \leq 0.05$) เนื่องจากเกิดการสังเคราะห์กลูโคสและมอลโตสที่ได้จากการหมักด้วยสปอร์ของราโดยใช้ข้าวระยะเมาเป็นสารตั้งต้น และยังพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าสมมูลเดกซ์โทรสของน้ำเชื่อมที่หมักโดยใช้สปอร์ของ *A. oryzae* มีค่ามากกว่าการใช้สปอร์ของ *A. niger* ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสปอร์รา *A. oryzae* ผลิตเอนไซม์อะไมโลไลติก เช่น α -amylase, β -amylase และ glucoamylase ที่มีความจำเพาะเจาะจงสำหรับการสังเคราะห์น้ำตาล โดยปกติแล้วเอนไซม์เหล่านี้จะมีกิจกรรมที่ดีในสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม คือ อยู่ในช่วงประมาณ 4.2 ถึง 7.2 และจากการทดลองนี้ มีค่าความเป็นกรด-ด่าง อยู่ระหว่าง 4.6-6.4 ซึ่งส่งผลที่ดีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ จึงส่งผลให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่สูง และในทางกลับกันพบว่าการใช้สปอร์ของ *A. niger* ในการหมักแบบของแข็ง พบว่ามีค่าความเป็นกรด-ด่าง ลดลงถึง 3.8 ในช่วงระยะเวลาในการหมักตั้งแต่วันที่ 7 ซึ่งเป็นสภาวะที่มีความเป็นกรดสูง ซึ่งอาจไม่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์อะไมโลไลติก ดังนั้นจึงส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าสมมูลเดกซ์โทรสที่ได้ต่ำกว่า

นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำเชื่อมที่ผลิตได้จากรา *A. oryzae* เมื่อดูด้วยตาเปล่าพบว่าจะมีลักษณะปรากฏเป็นสีเหลือง ภาพที่ 39 (ก) แต่น้ำเชื่อมที่ผลิตได้จากรา *A. niger* จะมีลักษณะเป็นสีดำ ภาพที่ 39 (ข) อย่างไรก็ตามสปอร์ของ *A. niger* ไม่เพียงแต่ผลิตเอนไซม์ α -amylase และ β -amylase แต่ยังสามารถผลิตเอนไซม์ทรานสกลูโคไซด์ (transglucosidase) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในขั้นตอนทรานสไกลิโคเลชัน (transglycosylation) ที่มีความจำเพาะเจาะจงสำหรับการสังเคราะห์ IMO's ซึ่งในการทดลองนี้ได้มีการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลโดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC) ต่อไปเพื่อวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของ IMO's ในตัวอย่างน้ำเชื่อม



ภาพที่ 39 การเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเฝ้าในระหว่างการหมักแบบ solid state โดยใช้สปอร์จากเชื้อรา *A. oryzae* และ *A. niger*

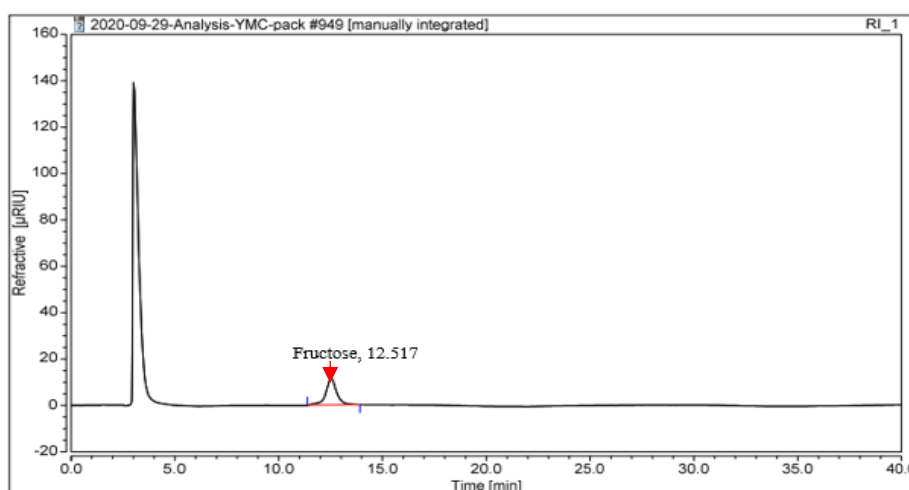


ภาพที่ 40 น้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเฝ้าในระหว่างการหมักแบบของแข็งโดยใช้สปอร์ของเชื้อรา *A. oryzae* (ก.) และ *A. niger* (ข.)

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาล โดยการวิเคราะห์แบบเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC) โดยจะทำการเปรียบเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ดังนี้ ฟรุคโตส กลูโคส มอลโตส ไอโซมอลโตส มอลโทไตร

โอส ไอโซมอลโทไตรโอส พาโนส และไอโซพาโนส และจากการวิเคราะห์โดยใช้สารละลายน้ำตาลมาตรฐานฟรุกโตส ซึ่งมี Retention Time คือ 12.517 นาที โดยสารละลายน้ำตาลมาตรฐานมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (Coefficient of Determination) ดังนี้ น้ำตาลฟรุกโตส มีค่า $R^2 = 0.9968$ (ภาพที่ 41) โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดหาได้จากการคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเทียบกับสารมาตรฐาน

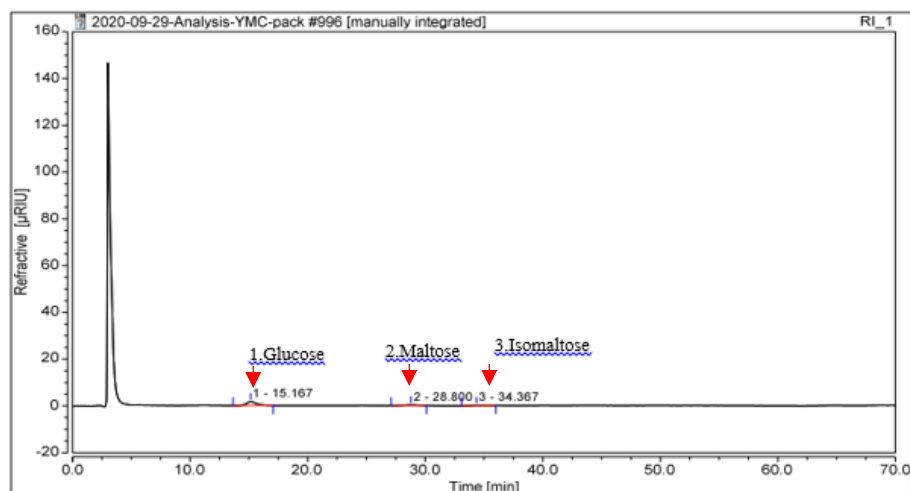
เมื่อทำการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักโดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC) พบ กลูโคส มอลโตส และไอโซมอลโตส ซึ่งมี Retention Time คือ 15.41 29.43 และ 35.15 นาที ตามลำดับ ภาพที่ (42) โดยสารมาตรฐานมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (Coefficient of Determination) ดังนี้ น้ำตาลกลูโคส มีค่า $R^2 = 0.9995$, น้ำตาลมอลโตสมีค่า $R^2 = 0.9986$, และไอโซมอลโตส มีค่า $R^2 = 0.9982$ โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดหาได้จากการคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเทียบกับสารมาตรฐาน



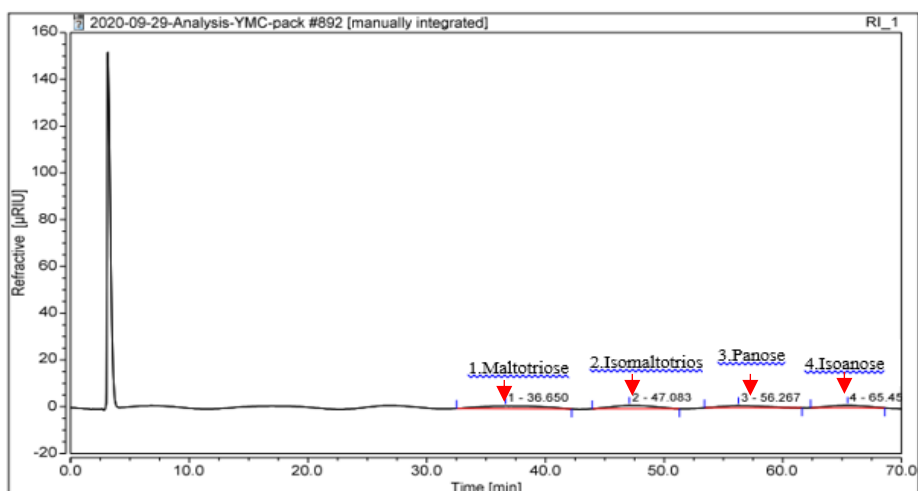
ภาพที่ 41 Chromatogram ของสารมาตรฐานฟรุกโตสที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC)

สำหรับการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค โครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC) โดยใช้สารมาตรฐานดังนี้ มอลโทไตรโอส ไอโซมอลโทไตรโอส พาโนส และไอโซพาโนส ซึ่งมี Retention Time คือ 36.650 47.063 56.267 และ 65.450 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 43) โดยสารมาตรฐานมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (Coefficient of Determination) ดังนี้ มอลโทไตรโอส มี

ค่า $R^2 = 0.9972$, ไอโซมอลโทไตรโอส มีค่า $R^2 = 0.9959$, พาโนส มีค่า $R^2 = 0.9987$ และมีไอโซพาโนส มีค่า $R^2 = 0.9987$ โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดหาได้จากการคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเทียบกับสารมาตรฐาน

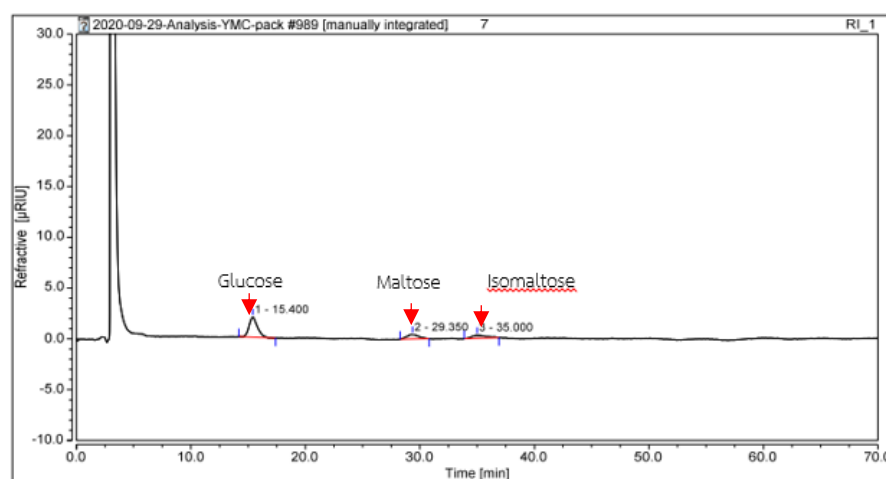


ภาพที่ 42 Chromatogram ของสารมาตรฐานกลูโคส มอลโตส และไอโซมอลโตสที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC)

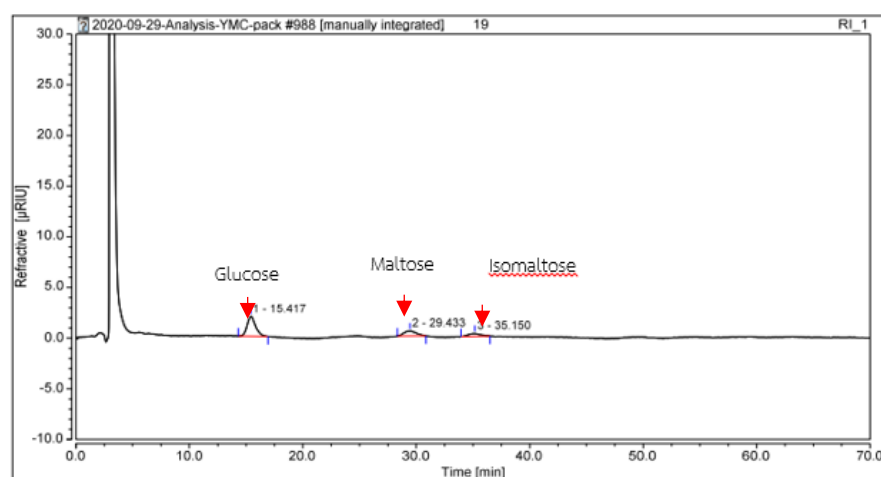


ภาพที่ 43 Chromatogram สารมาตรฐานของมอลโทไตรโอส ไอโซมอลโทไตรโอส พาโนส และไอโซพาโนส ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC)

เมื่อทำการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักโดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC) ของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม้าหมักแบบของแข็งโดยใช้สปอร์ *A. oryzae* และ *A. niger* ซึ่งพบน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้แก่ กลูโคส มอลโตส และไอโซมอลโตส ซึ่งมี Retention Time คือ 15.41 29.43 และ 35.15 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 44) โดยแต่ละสารละลายมาตรฐานมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (Coefficient of Determination) ดังนี้ น้ำตาลฟรุคโตส มีค่า $R^2 = 0.9968$, น้ำตาลกลูโคส มีค่า $R^2 = 0.9995$, น้ำตาลมอลโตสมีค่า $R^2 = 0.9986$, และไอโซมอลโตส มีค่า $R^2 = 0.9982$ โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดหาได้จากการคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเทียบกับสารมาตรฐาน



(ก)

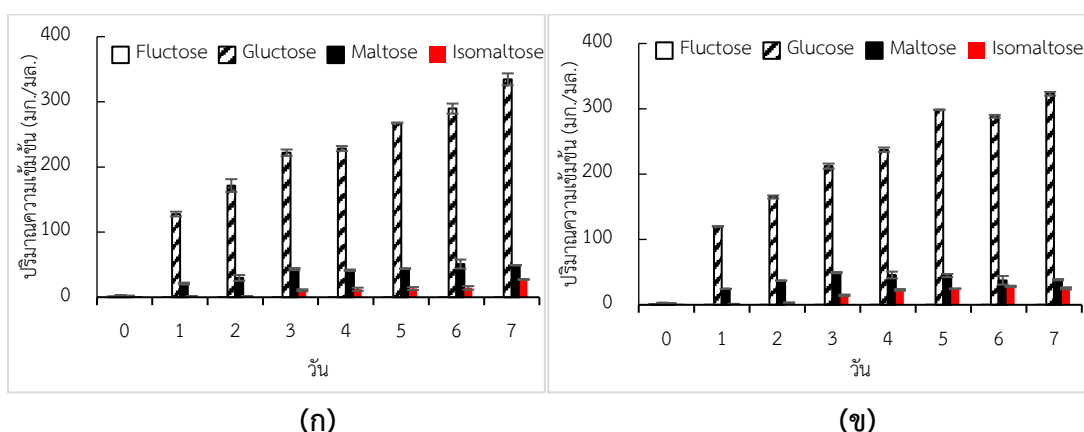


(ข)

ภาพที่ 44 Chromatogram ของการวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์จากน้ำเชื่อมที่ใช้แป้งข้าวที่ผ่านหมักด้วยราโดยใช้สปอร์เชื้อ *A. oryzae* (ก) และ *A. niger* (ข) ในระหว่างการหมักแบบของแข็ง

และจากภาพที่ 45 (ก) และภาพที่ 45 (ข) ที่แสดงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลกลูโคส พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 42) ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมักด้วยการใช้สปอร์ของราทั้ง 2 ชนิด การเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลกลูโคส เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสแป้งโดยเอนไซม์อะไมโลไลติกที่มีในสปอร์ของเชื้อราดังที่ได้กล่าวมาแล้ว นอกจากนี้พบว่าปริมาณน้ำตาลมอลโตสในน้ำเชื่อมที่ทำการหมักด้วยสปอร์ของ *A. oryzae* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก ซึ่งปริมาณสูงสุดพบในวันที่ 6 ของการหมัก ($P \leq 0.05$) อย่างไรก็ตามปริมาณน้ำตาลมอลโตสในน้ำเชื่อมของข้าวระยะเม่าที่หมักด้วยสปอร์ของ *A. niger* พบว่าเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 4 ของการหมัก ($P \leq 0.05$) และมีแนวโน้มลดลงหลังการหมักจนถึงวันที่ 7 ($P \leq 0.05$) โดยการลดลงของปริมาณน้ำตาลมอลโตสที่หมักโดยใช้สปอร์ของ *A. niger* สามารถอธิบายได้ว่าน้ำตาลมอลโตสน่าจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์เป็น IMOs ตามขั้นตอนทรานสไกลโคซิเลชัน โดยเอนไซม์ transglucosidase ที่ผลิตโดยรา *A. niger* (ยุทธชัย เพชรรัตน์ไพศาล, 2557) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณไอโซมอลโตสเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเทียบกับการใช้สปอร์ของ *A. oryzae* โดยพบว่าปริมาณไอโซมอลโตสในน้ำเชื่อมที่ใช้สปอร์ *A. niger* มีค่าสูงกว่าน้ำเชื่อมที่ใช้สปอร์ของ *A. oryzae* แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) ซึ่งชี้ให้เห็นว่ารา *A. niger* ผลิตเอนไซม์ transglucosidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงสำหรับการสังเคราะห์ IMO โดยจะเร่งการไฮโดรไลซิสของ α -D-glucopoligosaccharides และถ่ายโอน glycosyl moiety เป็น 6-OH ของกลูโคส และผลิตไอโซมอลโตส (Kim et al., 2017) และในทางกลับกันเชื้อรา *A. oryzae* สามารถผลิตเอนไซม์ α -amylase, β -amylase และ glucoamylase amylase ที่ย่อยแป้งข้าวระยะเม่าได้ โดยเฉพาะตำแหน่งที่มีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -1,4-ไกลโคซิดิก เป็นโครงสร้างที่มีสายยาวของแป้ง โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์อะไมโลไลติกจะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสตำแหน่งที่มีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -1,4-ไกลโคซิดิกภายในสายโซ่ของแป้ง แต่โมเลกุลของแป้งที่เป็นกิ่งก้านและเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ (α -1,6-ไกลโคซิดิก) อาจจะไม่ถูกตัด ซึ่งการที่โครงสร้างที่เป็นกิ่งก้านที่เชื่อมต่อกันด้วย พันธะ (α -1,6-ไกลโคซิดิก) ที่เป็นผลผลิตที่เกิดขึ้นจากการใช้แป้งข้าวที่มีปริมาณอะไมโลเพคตินสูง อาจจะช่วยให้ได้ปริมาณ IMOs เพิ่มขึ้น ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบระหว่างรา *A. oryzae* กับ *A. niger* พบว่ารา *Aspergillus sp.* ทั้ง 2 สามารถสังเคราะห์ IMOs ได้ และพบว่าปริมาณไอโซมอลโตสที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังแสดงผลในตารางที่ 11 โดยจะเห็นว่าปริมาณไอโซมอลโตสเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 7 ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก 7 วัน และปริมาณน้ำตาลมอลโตสมีปริมาณสูงสุดในวันที่ 5 และ 3 ของการหมักด้วยรา *A. oryzae* กับ *A. niger* หลังจากนั้นจะมีแนวโน้มลดลง แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลมอลโตส น่าจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์เป็น IMOs ตามขั้นตอนทรานสไกลโคซิเลชัน (transglycosylation) โดยเอนไซม์

transglucosidase แต่อย่างไรก็ตามพบปริมาณกลูโคสที่สูงภายใต้การหมักแบบของแข็งด้วยสปอร์ของ *A. oryzae* เมื่อเปรียบเทียบกับสปอร์ของ *A. niger* แต่เมื่อพิจารณาการใช้สปอร์ของเชื้อราที่ทำการหมักแบบของแข็ง โดยการเตรียมจากสปอร์ของ *A. oryzae* เพื่อผลิตในรูปแบบโคจินั้น พบว่ามีประโยชน์และสะดวกมากต่อการใช้งานทางอุตสาหกรรม และอีกทั้งยังได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย และได้รับการอนุมัติจากองค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) ในอุตสาหกรรมอาหาร (Sorndech et al., 2018) เมื่อพิจารณาถึงสิ่งเจือปนของ IMOs อาจจะต้องมีการกำจัดน้ำตาลอื่นๆที่หลงเหลือ เช่น น้ำตาลกลูโคสและมอลโตส โดยเลือกวิธีการที่สะดวกและปลอดภัยโดยใช้แบคทีเรียกลุ่มสร้างกรดแลคติกหรือยีสต์ที่มีสถานะปลอดภัย ในรายการประเมินความปลอดภัยวัตถุเจือปนอาหารในรายชื่อที่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย (Generally Recognized as Safe/GRAS) ซึ่งจะมีการดำเนินการในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 45 ชนิดและปริมาณน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่วิเคราะห์โดยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC) จากการหมักแบบของแข็งของสปอร์ของ *A. oryzae* (ก) และ *A. niger* (ข) โดยใช้แป้งข้าวระยะเม่า

จากการทดลองในกิจกรรมที่ 2 การใช้สปอร์จากเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3102 และ *A. niger* TISTR. 3012 ในการหมักแบบขั้นตอนเดียว พบว่าสามารถผลิต IMOs ได้ โดยใช้ข้าวระยะเม่าเป็นสารตั้งต้น ซึ่งปริมาณไอโซมอลโตสของทั้ง 2 เชื้อราไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดคือปริมาณของ IMOs ที่ได้ซึ่งยังถือว่ามีความต่ำ ดังนั้นเพื่อเพิ่มปริมาณของ IMOs และจากการศึกษา Nui et al. (2017) พบว่าการใช้เอนไซม์ในการผลิตจะช่วยให้ได้ปริมาณ IMOs ที่สูง ดังนั้นในกิจกรรมต่อไปจึงได้มีการทดลองใช้เอนไซม์เบตาอะไมเลส และเอนไซม์ทรานสกลูโคซิเดสในการผลิต IMOs เพื่อเปรียบเทียบการผลิต IMOs จากจุลินทรีย์

ตารางที่ 11 ปริมาณน้ำตาลที่วิเคราะห์โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC) จากการหมักแป้งข้าวระยะเม่าด้วยสปอร์ของเชื้อราสองชนิด

วันที่ หมัก	ปริมาณฟรุกโตส (มก./มล.)		ปริมาณกลูโคส (มก./มล.)		ปริมาณมอลโตส (มก./มล.)		ปริมาณไอโซมอลโตส (มก./มล.)	
	<i>A. oryzae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. oryzae</i>	<i>A. niger</i>
0	0.86±0.03 ^{aA}	0.83±0.02 ^{aA}	2.73±0.13 ^{hA}	2.71±0.13 ^{hA}	2.04±0.03 ^{gA}	2.00±0.03 ^{gA}	0.00±0.00	0.00±0.00
1	0.00±0.00	0.00±0.00	132.33±2.83 ^{gA}	124.47±0.87 ^{gB}	21.09±1.03 ^{fB}	24.37±0.00 ^{fA}	1.20±0.00 ^{fB}	6.24±0.11 ^{eA}
2	0.00±0.00	0.00±0.00	176.13±2.03 ^{fA}	162.79±1.63 ^{fB}	30.74±1.86 ^{eB}	36.96±0.24 ^{eA}	21.91±0.59 ^{eB}	28.64±0.31 ^{deA}
3	0.00±0.00	0.00±0.00	222.06±3.48 ^{eA}	207.45±2.80 ^{eB}	40.76±0.63 ^{dB}	49.21±0.72 ^{aA}	25.32±0.47 ^{dB}	30.05±0.60 ^{cdA}
4	0.00±0.00	0.00±0.00	233.13±2.38 ^{dA}	228.21±2.78 ^{dB}	41.45±0.85 ^{dB}	47.29±0.85 ^{bA}	24.68±0.85 ^{dB}	33.13±0.53 ^{bcA}
5	0.00±0.00	0.00±0.00	267.91±0.68 ^{cA}	247.35±1.96 ^{cB}	43.97±0.32 ^{cA}	44.70±1.70 ^{cA}	29.40±0.87 ^{cB}	34.62±0.39 ^{bA}
6	0.00±0.00	0.00±0.00	293.10±2.52 ^{bA}	284.71±2.05 ^{bB}	55.01±0.88 ^{aA}	39.85±0.67 ^{dB}	34.99±0.58 ^{bA}	36.64±1.75 ^{aA}
7	0.00±0.00	0.00±0.00	339.97±1.71 ^{aA}	323.00±2.00 ^{aB}	48.65±0.39 ^{bA}	38.47±0.63 ^{dA}	38.06±0.68 ^{aA}	40.49±0.60 ^{aA}

หมายเหตุ: ตัวอักษร ^{a-h} ที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

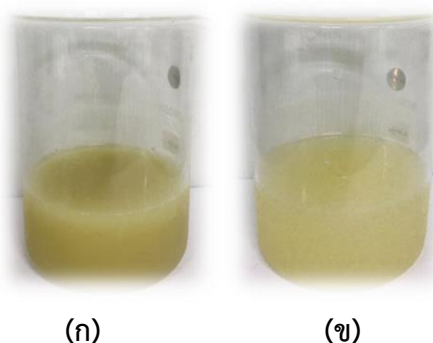
ตัวอักษร ^{A-B} ที่แตกต่างกันในแนวนอนของแต่ละน้ำตาล หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.3 กิจกรรมที่ 2 การศึกษาการย่อยแป้งจากข้าวระยะเม่าและแป้งข้าวระยะสุกแก่ด้วยเอนไซม์

จากการศึกษาของ Nui et al. (2017) ได้ผลิต IMOs โดยใช้เอนไซม์แบบ enzyme cocktail ในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์จากแป้งข้าวโพด มีการเตรียมสารตั้งต้นในรูปของสารละลาย และในกระบวนการ Liquefaction ได้ใช้เอนไซม์ α -amylase จากจุลินทรีย์ *Bacillus naganensis* และ *Bacillus licheniformis* (PulA) ผลิตเอนไซม์ pullulanase ใช้ในกระบวนการ Saccharification และยังมีการใช้ร่วมกับ β -amylase และมีการใช้ *A. niger* ที่ผลิตเอนไซม์ α -transglucosidase (An-TGase) เพื่อผลิต IMOs ในกลไก Transglucosylation พบว่าสามารถผลิต IMOs ได้หลายชนิด ได้แก่ isomaltose maltotriose isomaltotriose panose maltotetraose maltopentanoose maltohexaose เป็นต้น ซึ่งข้อดีของการใช้เอนไซม์ cocktail จะทำให้ประหยัดเวลาในการผลิตมากขึ้น โดยปกติจะใช้เวลาประมาณ 13 ชั่วโมง เมื่อใช้เอนไซม์ cocktail จะทำให้ประหยัดเวลาเหลือ 4 ชั่วโมง เนื่องจากจะทำให้เอนไซม์ทุกตัวที่ใช้สามารถทำงานพร้อมกัน โดยสามารถเกิดกลไกแซ็กคาริฟิเคชันและทรานสโกลูซิเลชันไปพร้อมกัน

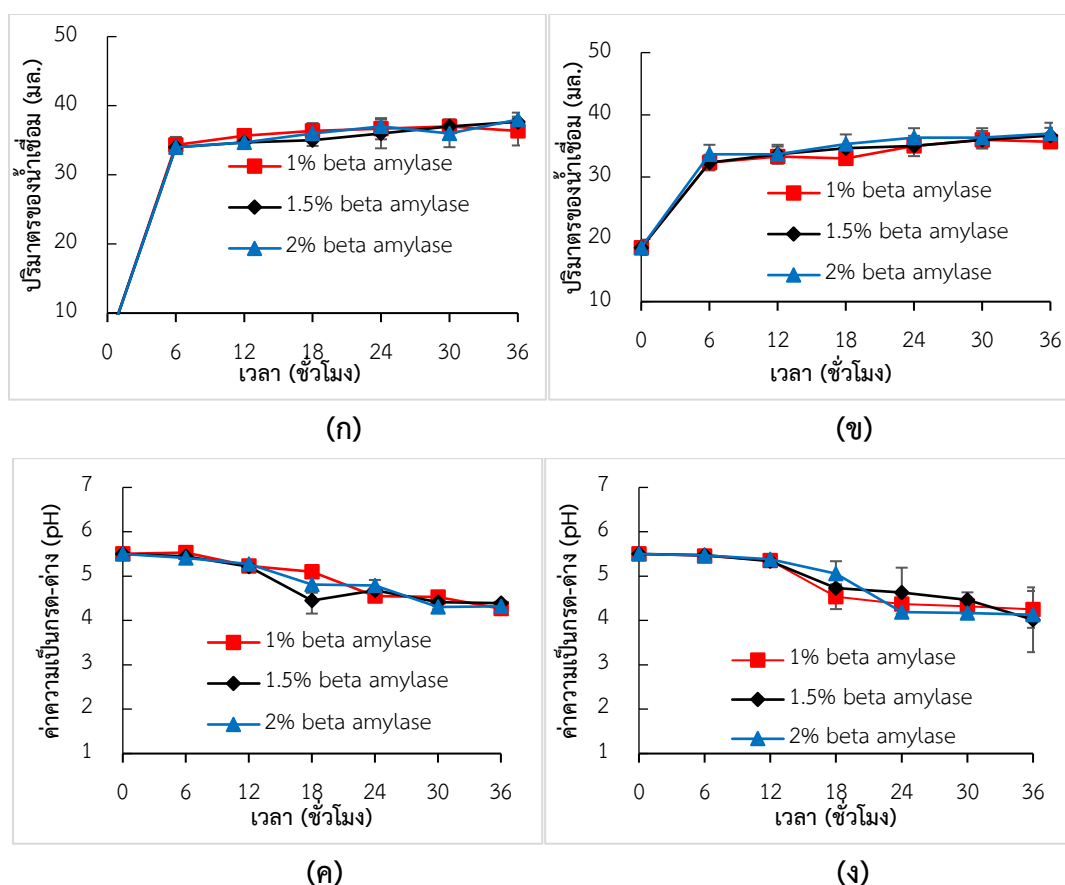
4.3.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์เบต้าอะไมเลสในขั้นตอนแซ็กคาริฟิเคชัน

ในการศึกษาการหาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์เบต้าอะไมเลสเพื่อย่อยแป้งจากข้าวระยะเม่าและข้าวระยะสุกแก่ให้ได้ปริมาณน้ำตาลมอลโตสสูงที่สุด โดยใช้ข้าวระยะเม่า (เจลาติโนเซชัน) และข้าวระยะสุกแก่ที่ผ่านการทำให้เกิดเจลเป็นสารตั้งต้น และจะทำการย่อยแป้งโดยใช้เอนไซม์เบต้าอะไมเลสที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ร้อยละ 1 1.5 และ 2 และบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เวลา 36 ชั่วโมง (กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2554) ลักษณะปรากฏของน้ำเชื่อมที่ได้จากข้าวระยะเม่าและระยะสุกแก่ (ภาพที่ 46)



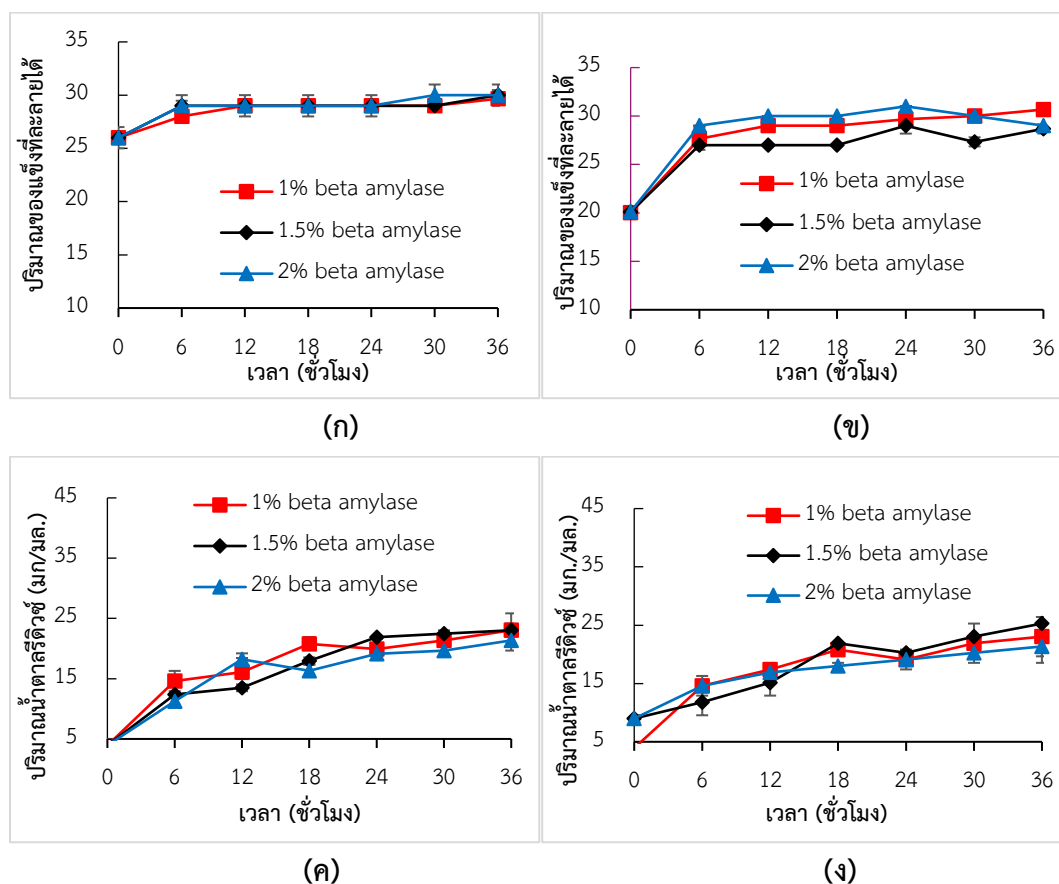
ภาพที่ 46 ตัวอย่างน้ำเชื่อมข้าวระยะเม่า (ก) และข้าวระยะสุกแก่ (ข) ระหว่างการหมักด้วยเอนไซม์เบต้าอะไมเลส

จากการทดลองแป้งข้าวจะยะเฒ่า (เจลาตินในเซชัน) และแป้งข้าวจะยะสุกแก่ พบว่า ปริมาณน้ำเชื่อมของแป้งข้าวจะยะเฒ่าที่เติมเอนไซม์ β -amylase ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 1.5 และ 2 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น 34 มิลลิลิตร ภาพที่ 47 (ก) เมื่อเวลาการบ่มที่ 6 ชั่วโมง ($P \leq 0.05$) และมี แนวน้มน้ำเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังการหมัก 6 ชั่วโมง ($P > 0.05$)เช่นเดียวกับน้ำเชื่อมของข้าวจะยะสุกแก่ที่ พบว่าปริมาณของแป้งข้าวจะยะสุกแก่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น 32 มิลลิลิตร ที่เวลาในการบ่ม 6 ชั่วโมง ($P \leq 0.05$) และมีแนวน้มน้ำเพิ่มขึ้นเล็กน้อย 18 ชั่วโมง ($P \leq 0.05$) ภาพที่ 47 (ข) สำหรับการ เปลี่ยนแปลงของค่ากรด-ด่าง (pH) ที่เปลี่ยนแปลง ภาพที่ 47 (ค) และภาพที่ 47 (ง) พบว่ากรด-ด่าง (pH) ของน้ำเชื่อมข้าวจะยะเฒ่า (เจลาตินในเซชัน) และข้าวจะยะสุกแก่มีแนวน้มน้ำลดลง ($P \leq 0.05$) การ ลดลงของค่ากรด-ด่าง (pH) อาจเป็นเพราะจุลินทรีย์ในแป้งข้าวจะยะมีการผลิตสารประกอบอื่น ๆ เช่น กรด อินทรีย์ ดังกลไกที่กล่าวมาแล้วข้างต้นในกิจกรรมที่ 1



ภาพที่ 47 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณและค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำเชื่อมจากแป้ง ข้าวจะยะเฒ่า (ก และ ค) และแป้งข้าวจะยะสุกแก่ (ข และ ง) ที่หมักด้วยเอนไซม์ เบต้าอะไมเลสความเข้มข้นต่าง ๆ

จากการใช้แป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) และข้าวระยะสุกแก่ที่ผ่านการทำให้เกิดเจลเป็นสารตั้งต้น และจะทำการย่อยแป้งโดยใช้เอนไซม์เบต้าอะไมเลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 1.5 และ 2 และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เวลา 36 ชั่วโมง พบว่าเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดในข้าวแป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินในเซชัน) และแป้งข้าวระยะสุกแก่เพิ่มขึ้นตั้งแต่การหมักที่เวลา 6 ชั่วโมง และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อใช้เวลาในการบ่มถึง 36 ชั่วโมง ($P \leq 0.05$) ภาพที่ 48 (ก) และ 48 (ข) อย่างไรก็ตาม พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นหลังจากการหมัก 6 ชั่วโมง ($P \leq 0.05$) ในข้าวทั้ง 2 ระยะ ภาพที่ 48 (ค) และภาพที่ 48 (ง) ทั้งนี้เนื่องจาก β -amylase เป็นเอนไซม์ที่สามารถไฮโดรไลซ์แป้งได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลและ โอลิโกแซ็กคาไรด์ (Beck and Ziegler, 1989) นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำเชื่อมของแข็งที่ละลายได้ และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น สามารถอธิบายได้ว่า เอนไซม์ β -amylase ทำการไฮโดรไลซ์สตาร์ช (starch) ที่ตำแหน่งแอลฟา 1-4 ของพันธะไกลโคไซด์ที่เฉพาะส่วนปลายสายด้านที่เป็นนอนรีดิวส์ (non reducing end) เข้ามาที่ละ 2 หน่วย ทำให้ได้น้ำตาลมอลโทส (maltose) เพิ่มขึ้น (กล้านรงค์และเกื้อกุล, 2546) นอกจากนี้ในระหว่างการเตรียมตัวอย่างในข้าวทั้ง 2 ระยะ ได้มีการทำให้เกิดเจลาตินในเซชันของแป้ง เพื่อทำให้เอนไซม์สามารถเข้าไปไฮโดรไลซ์สารตั้งต้นได้ง่าย โดยที่เอนไซม์จะไฮโดรไลซ์พันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลของแป้งในส่วนอสัณฐานและผลึก โดยกระบวนการที่แป้งเกิดเจลาตินในเซชันทำให้เกิดการคลายตัวของสายพอลิเมอร์อะมิโลสและอะมิโลเพกติน ส่งผลให้การจับตัวกับน้ำเพิ่มขึ้นทำให้เม็ดแป้งเกิดการบวม (ฉัษชชี ฉัษปภาสัณณ และคณะ 2559) นอกจากนี้จะทำให้เกิดการชะของอะมิโลส (amylose leaching) และอะมิโลเพกตินจากบริเวณอสัณฐานและบริเวณผลึกจะถูกย่อยโดยเอนไซม์ ทำให้ได้เป็นน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Nielsen, 2000) และเมื่อกระบวนการหมักใช้เวลานาน ยิ่งทำให้เกิดกิจกรรมการย่อยของเอนไซม์ β -amylase มากขึ้น ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ (Beck and Ziegler, 1989)

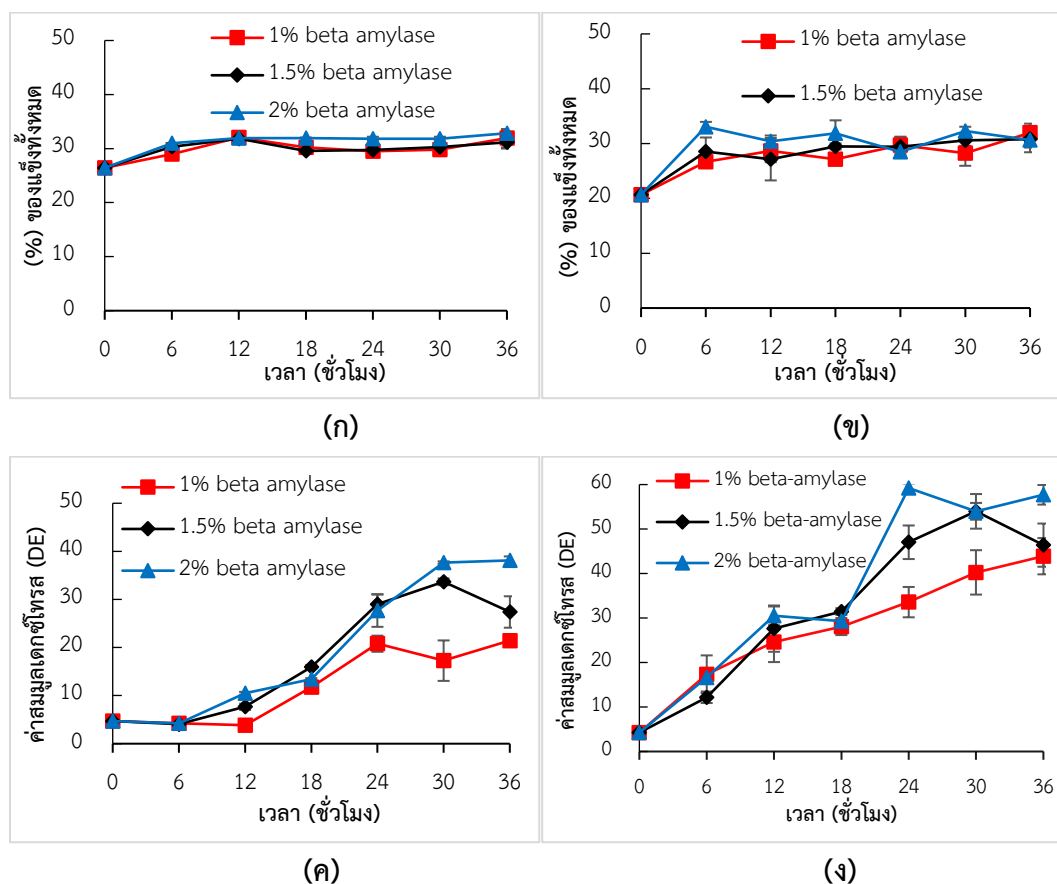


ภาพที่ 48 การเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบทางเคมีของน้ำเชื่อมข้าวระยะเม่า (ก และ ค) และ ข้าวระยะสุกแก่ (ข และ ง) ที่หมักด้วยเอนไซม์เบต้าอะไมเลสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จากการศึกษาการใช้แป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินเซชัน) และแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่ผ่านการทำให้เกิดเจลาตินในเซชันเป็นสารตั้งต้น และจะทำการย่อยแป้งโดยใช้เอนไซม์เบต้าอะไมเลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 1.5 และ 2 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าค่าปริมาณของแข็งทั้งหมด (TS) ของน้ำเชื่อมแป้งข้าวระยะเม่า (เจลาตินเซชัน) และแป้งข้าวระยะสุกแก่เพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังจากการหมักที่เวลา 6 ชั่วโมง ภาพที่ 49 (ก) และ 49 (ข) และพบค่าสูงสุดของการหมักคือที่ 36 ชั่วโมง ของทั้ง 2 ตัวอย่างสารตั้งต้น ($P \leq 0.05$) ซึ่งจะเห็นได้ว่าเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เบต้าอะไมเลสเพิ่มขึ้นและเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น จะทำให้ร้อยละปริมาณของแข็งทั้งหมดเพิ่มขึ้น ($P \leq 0.05$) เนื่องจากเอนไซม์เบต้าอะไมเลส เกิดการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) โมเลกุลของแป้งและได้เป็นโมโนแซ็กคาไรด์และไดแซ็กคาไรด์หรือโอลิโกแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ค่าสมมูลเดกซ์โทรส (DE) ในข้าวระยะเม่า (เจลาตินเซชัน) และข้าวระยะสุกแก่ ($P \leq 0.05$) เพิ่มขึ้น ภาพที่ 49 (ค) และภาพที่ 49 (ง) เนื่องจากในระหว่างการหมักด้วยเอนไซม์ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณของแข็งที่ละลายได้สูงขึ้น ซึ่งโดยทั่วไปในอุตสาหกรรมอาหารจะใช้ค่าสมมูลเดกซ์โทรส (DE) แสดงถึงระดับการย่อยแป้ง

(flour) หรือ สตาร์ช (starch) ให้เป็นน้ำตาลกลูโคสหรือเดกซ์โทรส โดยสตาร์ช (starch) มีค่าสมมูลเดกซ์โทรส (DE) เท่ากับ 0 ขณะที่น้ำตาลกลูโคสมีค่าสมมูลเดกซ์โทรส (DE) เท่ากับ 100 และคาร์โบไฮเดรตบางชนิด เช่น มอลโทเดกซ์ทริน (maltodextrin) มีค่าสมมูลเดกซ์โทรส (DE) น้อยกว่า 20 เป็นต้น (กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2554)

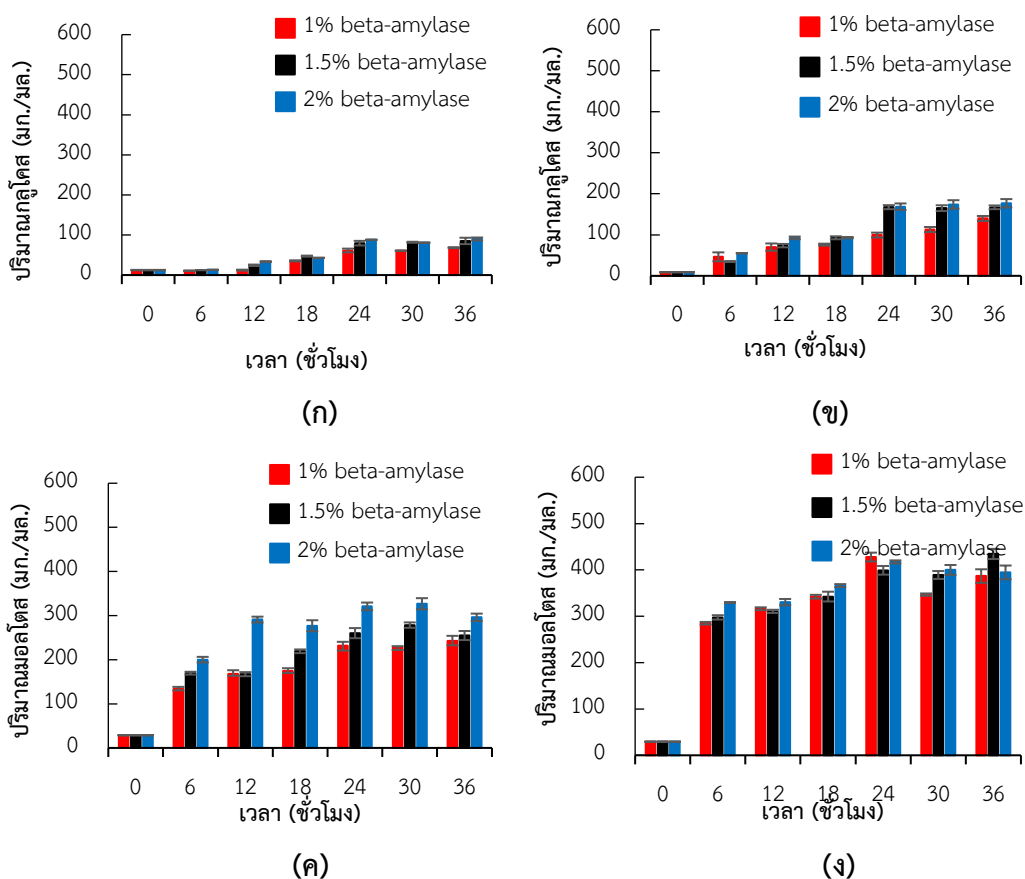
จากการทดลองพบว่าปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์มีผลต่อค่าสมมูลเดกซ์โทรส (DE) เมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์เบต้าอะไมเลสในการย่อยแป้งข้าวข้าวระยะเฝ้าและระยะสุกแก่ส่งผลให้ค่าสมมูลเดกซ์โทรสเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) เนื่องจากเมื่อปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นทำให้เอนไซม์มีปริมาณที่มากพอในการย่อยสารตั้งต้นทั้งสอง ภาพที่ 49 (ค) และภาพที่ 49 (ง) จะเห็นได้ว่าการใช้ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ร้อยละ 2 ทำให้ได้ค่าสมมูลเดกซ์โทรสที่สูงของแป้งข้าวระยะเฝ้าและแป้งข้าวระยะสุกแก่ คือ 31.73 ± 1.93 และ 57.71 ± 2.21 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาพบว่าการใช้เอนไซม์เบต้าอะไมเลสในกระบวนการหมักที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เวลาการบ่ม 18 ชั่วโมงของข้าวระยะเฝ้า (เจลาตินในเซชัน) เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ในการสังเคราะห์ IMO's เนื่องจากมีค่าสมมูลเดกซ์โทรส (DE) อยู่ระหว่าง 12 และมีปริมาณน้ำตาลมอลโตสที่สูง โดยทั่วไปแล้วข้อกำหนดสำหรับการผลิต IMO's เพื่อให้ได้น้ำเชื่อมที่มี IMO's สูงหลังจากระบวนการ saccharification จำเป็นต้องมีค่าสมมูลเดกซ์โทรส (DE) เท่ากับ 12 (Niu et al., 2017) ซึ่งในกระบวนการนี้ เอนไซม์จะไฮโดรไลซ์แป้งให้เป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสสายสั้น เช่น มอลโตไตรโอสและเดกซ์ทรินในปริมาณสูง ด้วยการตัดพันธะ 1,4-glycosidase bond ในโมเลกุลของแป้งให้มีขนาดของโมเลกุลเล็กลง แต่สำหรับแป้งข้าวระยะสุกแก่พบว่ามีค่า DE ที่ 57.71 ± 2.21 ซึ่งค่า DE ที่สูงกว่าแป้งข้าวระยะเฝ้า สำหรับแป้งข้าวระยะเฝ้าที่ผ่านการเกิดเจลาตินในเซชันนั้น ทำให้องค์ประกอบทางเคมี เช่น ไขมัน โปรตีน เยื่อใย ที่พบในปริมาณที่สูงในระยะนี้ สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะไมโลสและไขมัน (Amylose-lipid complex) หรืออะไมโลสและโปรตีน (Amylose-protein complex) ในระหว่างการทำแป้งสุกและเย็นตัวลงทำให้โครงสร้างของแป้งมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น (Alcázar-Alay and Meireles, 2015) นอกจากนี้พบว่าปริมาณเยื่อใยในข้าวระยะเฝ้าที่สูงกว่าในข้าวระยะสุกแก่ ซึ่งอาจจะส่งผลต่อกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์โดยจะไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์และทำให้เอนไซม์เข้าไปย่อยได้ยากขึ้น ดังนั้นอาจจะไม่เหมาะสมสำหรับนำมาผลิต IMO's เพราะข้าวระยะสุกแก่ทำให้ได้ปริมาณกลูโคสที่สูง ซึ่งดูจากผลการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลดังแสดงใน (ภาพที่ 50) โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC)



ภาพที่ 49 การเปลี่ยนแปลงร้อยละของแข็งทั้งหมดและค่าสมมูลเดกซ์โทรส (DE) ของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม่า (ก และ ค) และแป้งข้าวระยะสุกแก่ (ข และ ง) ที่หมักด้วยเอนไซม์เบต้าอะไมเลสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลของน้ำเชื่อมข้าวระยะเม่า (เจลาตินเซชัน) และข้าวระยะสุกแก่ที่หมักด้วยเอนไซม์เบต้าอะไมเลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 1.5 และ 2 (ภาพที่ 50) พบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสในน้ำเชื่อมของข้าวทั้ง 2 ระยะเพิ่มขึ้น ($P \leq 0.05$) เมื่อระดับความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อใช้เวลานานในการหมักเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้น ($P \leq 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของแข็งที่ละลายได้และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลมอลโตส ($P \leq 0.05$) เหมือนกันกับน้ำตาลกลูโคสตามระดับความเข้มข้นของเอนไซม์และเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น เนื่องจากเอนไซม์เบต้าอะไมเลสสามารถไฮโดรไลซ์แป้งที่ตำแหน่งแอลฟา 1-4 ของพันธะไกลโคไซด์ที่เฉพาะส่วนปลายสายด้านที่เป็นนอนรีดิวซ์ (non reducing end) เข้ามาที่ละ 2 หน่วย ทำให้ได้น้ำตาลมอลโตส (maltose) (กล้าณรงค์ ศรีรอด และ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2554) ในขั้นตอนการทำให้เป็นของเหลว (liquefaction) เพื่อลดความหนืดของแป้งร่วมกับการให้ความร้อน อาจส่งผลให้ปริมาณกลูโคสเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ในขั้นตอนเปลี่ยน

แบ่งเป็นน้ำตาล (saccharification) โดยเติมเอนไซม์เบต้าอะไมเลสเข้าไปไฮโดรไลซ์ (hydrolysis) โมเลกุลของแป้งยังส่งผลให้ปริมาณกลูโคสในตัวอย่างทั้งสองเพิ่มขึ้น ดังนั้นการที่พบปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่สูง อาจจะไม่เหมาะนำไปสังเคราะห์เป็น IMOs ซึ่งจากการทดลองจะเห็นได้ว่าการหมักด้วยเอนไซม์เบต้าอะไมเลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 ในข้าวระยะเม่า (เจลาตินเซชัน) บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เวลาการบ่ม 18 ชั่วโมง เอนไซม์สามารถสังเคราะห์แบ่งได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูง และนอกจากนี้ค่าสมมูลเดกซ์โทรส (DE) มีค่าเท่ากับ 12 และได้ปริมาณน้ำตาลมอลโตสที่สูง สำหรับการใช้แป้งข้าวระยะสุกแก่ที่นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตน้ำตาลมอลโตส พบว่ามีค่า DE คือ 29.30 ± 2.24 ซึ่งค่า DE สูงเกินไป ซึ่งจะส่งผลให้ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่สูงเมื่อนำไปสังเคราะห์เป็น IMOs เมื่อเปรียบเทียบกับข้าวระยะเม่า ดังนั้น การใช้ข้าวระยะเม่า (เจลาตินเซชัน) เป็นสารตั้งต้น และการใช้เอนไซม์เบต้าอะไมเลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 เหมาะสมสำหรับนำไปสังเคราะห์ IMOs เนื่องจากที่ปริมาณของเอนไซม์ที่ร้อยละ 2 นั้นเป็นปริมาณที่ทำให้ได้ผลผลิตของปฏิกิริยาที่สูง คือ มอลโตส เพื่อนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ IMOs ต่อไป



ภาพที่ 50 ปริมาณน้ำตาลในน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม่า (ก และ ค) และแป้งข้าวระยะสุกแก่ (ข และ ง) ที่หมักด้วยเอนไซม์เบต้าอะไมเลสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

4.3.2 การศึกษาการสังเคราะห์ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ในขั้นตอนทรานสไกลโคซิเลชัน (transglycosilation)

หลังจากที่ได้คัดเลือกปริมาณของเอนไซม์เบต้าอะไมเลสในขั้นตอนตอน saccharification คือ การใช้แป้งข้าวระยะมาเป็นสารตั้งต้นและหมักด้วยเอนไซม์เบต้าอะไมเลสที่ปริมาณความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิ 55°C เวลา 18 ชั่วโมง ที่ได้ปริมาณน้ำตาลมอลโตสที่สูง และมีค่าสมมูลเดกซ์โทรส (DE) เท่ากับ 12 ได้ถูกนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยสารตั้งต้นในขั้น saccharification เป็นน้ำตาลกลูโคสและมอลโตสในปริมาณ 113.12 ± 0.61 และ 155.16 ± 0.98 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขั้นตอนนี้มีค่าสมมูลเดกซ์โทรส (equivalent dextrose ; DE) ประมาณ 12 ซึ่งเป็นค่า DE ที่เหมาะสำหรับการย่อยแบ่งให้เป็นพอลิเมอร์กลูโคสสายสั้นๆ เช่น มอลโตรไตรโอส และเดกซ์ทรินในปริมาณสูง (Guzman et al., 1995) ซึ่งจะถูกนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในขั้นตอนทรานสไกลโคซิเลชัน ซึ่งในขั้นตอนนี้จะมีการเติมเอนไซม์ทรานสไกลโคซิเลส เนื่องจากเป็นเอนไซม์ทรานสไกลโคซิเลสเพื่อเร่งปฏิกิริยาทรานสไกลโคซิเลชัน เป็นการสร้างพันธะไกลโคซิดิกใหม่เกิดขึ้นภายหลังจากการตัดหรือไฮโดรไลซิสพันธะ α -D-(1,4) ไกลโคซิดิกเดิม โดยเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่ OH ไกลเคียง สร้างโมเลกุลที่มีสายกิ่งเพิ่มขึ้น โดยสายกิ่งเกิดขึ้นอาจเป็น α -D-(1,2), α -D-(1,3) และ α -D-(1,6) ทำให้ได้โอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เชื่อมด้วย α -D-(1,6) ได้แก่ ไอโซมอลโตส พาโนส ไอโซมอลโตไตรโอส และเตตระแซ็กคาไรด์ (Niu et al., 2017)

ซึ่งในการศึกษานี้ทำการทดลองเติมเอนไซม์ทรานสไกลโคซิเลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.025 0.038 และ 0.050 โดยควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ของสารละลายน้ำแป้งเท่ากับ 5.5 โดยใช้สารละลายกรดอะซิติก (acetic acid) และทำการบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (Niu et al., 2017) จากการทดลองพบว่าเมื่อมีการเติมเอนไซม์ทรานสไกลโคซิเลสที่ระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้น และเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้นเป็น 72 ชั่วโมง ส่งผลให้เกิดกิจกรรมการย่อยสารตั้งต้นเป็นน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้น ($P \leq 0.05$) และทำให้ปริมาณน้ำตาลมอลโตสลดลง ($P \leq 0.05$) (ดังตารางที่ 12) เนื่องจาก เอนไซม์เกิดกิจกรรมการไฮโดรไลซ์สารตั้งต้น เช่น น้ำตาลมอลโตส มากกว่าการเกิดกิจกรรมการย้ายหมู่ ดังนั้น จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลมอลโตสลดลงและส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้น โดยปกติแล้วเอนไซม์ทรานสไกลโคซิเลสสามารถเกิดได้ทั้งกิจกรรมการย่อยและกิจกรรมการย้ายหมู่ ซึ่งการเกิดกิจกรรมไฮโดรไลซ์มากกว่ากิจกรรมการย้ายหมู่ อาจจะเนื่องจากสภาวะการทดลองอาจจะยังไม่เหมาะสม เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ เวลาในการบ่ม

ตารางที่ 12 ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการสังเคราะห์ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรต์ด้วยเอนไซม์ traglucosidase ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ

ขั้นตอน	เวลาบ่ม (ชั่วโมง)	ปริมาณเอนไซม์ (%)	ปริมาณกลูโคส (มก./มล.)	ปริมาณมอลโตส (มก./มล.)	ปริมาณ IMO's (มก./มล.)
Saccharification	18	0.00	113.12±0.61 ^a	155.16±0.98 ^a	0.00
Traglucosilation	24	0.025	282.74±0.40 ^c	24.45±0.09 ^a	0.00
		0.038	302.16±0.67 ^b	21.48±0.16 ^b	0.00
		0.050	332.38±0.80 ^a	20.05±0.25 ^c	0.00
Traglucosilation	48	0.025	291.79±0.46 ^c	14.50±0.49 ^e	0.00
		0.038	325.85±0.53 ^b	13.48±0.25 ^b	0.00
		0.050	362.27±0.52 ^a	10.42±0.20 ^c	0.00
Traglucosilation	72	0.025	329.17±0.39 ^c	9.99±0.13 ^a	0.00
		0.038	358.08±0.48 ^b	8.05±0.06 ^b	0.00
		0.050	377.82±1.41 ^a	5.45±0.18 ^c	0.00

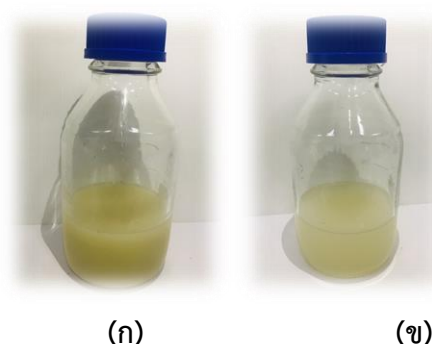
หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งในแต่ละขั้นตอน หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากการทดลองการสังเคราะห์ IMOs ด้วยเอนไซม์ พบว่าไม่สามารถเกิดกิจกรรมการสร้างพันธะไกลโคซิดิกใหม่เกิดขึ้นหลังจากการตัดหรือไฮโดรไลซิสพันธะ α -D-(1,4) ไกลโคซิดิกเดิม โดยเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่ OH ไกล่เคียง สร้างโมเลกุลที่มีสายกิ่งเพิ่มขึ้น เพื่อเปลี่ยนเป็นไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์ได้ในการศึกษาครั้งนี้ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการใช้จุลินทรีย์สามารถผลิต IMOs ได้ โดยจากการทดลองในกิจกรรมที่ 1 ด้วยการใช้สปอร์จากเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3102 และ *A. niger* TISTR 3012 ในการหมักแบบขั้นตอนเดียว ซึ่งพบว่าสามารถผลิต IMOs ได้ โดยใช้ข้าวระยะเมาเป็นสารตั้งต้น ซึ่งปริมาณไอโซมอลโตสของทั้ง 2 เชื้อราไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามยังมีข้อจำกัดคือปริมาณของ IMOs ที่ได้ซึ่งยังถือว่ามีปริมาณที่ต่ำ ดังนั้นเพื่อเพิ่มปริมาณของ IMOs และจากการศึกษาของ Eiko and Tomio (2007) รายงานว่า ปริมาณอะไมโลสในข้าวลดลงเมื่อข้าวระยะน้ำนมหรือระยะเมาเข้าสู่ข้าวระยะเก็บเกี่ยวปกติหรือข้าวระยะสุกแก่และข้าวระยะเก็บเกี่ยวข้าว และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณอะไมโลสและอะไมโลเพคตินในข้าว 2 ระยะ พบว่าปริมาณอะไมโลสในข้าวระยะเมาสูงกว่าในข้าวระยะสุกแก่ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่ทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (ตารางที่ 7) ซึ่งพบปริมาณอะไมโลสลดลงเมื่อข้าวเข้าสู่ระยะสุกแก่ ทั้งนี้เนื่องจากจากข้าวระยะเมาเป็นระยะที่โครงสร้างของแป้งยังคงเป็นเส้นตรงมากกว่า (อะไมโลส) และพัฒนาเกิดการเชื่อมต่อนเป็นแบบกิ่งก้าน (อะไมโลเพคติน) ต่อไปเมื่อเข้าสู่ระยะสุกแก่ และสอดคล้องกับปริมาณอะไมโลสในข้าวระยะสุกแก่ลดลง ซึ่งการที่ข้าวระยะเมาได้มีการพัฒนาโครงสร้างแป้งสมบูรณ์เพิ่มขึ้นในระยะสุกแก่ ทำให้พบว่าปริมาณอะไมโลเพคตินในข้าวระยะสุกแก่สูงกว่าในระยะเมา ซึ่งการที่โครงสร้างของแป้งที่มีปริมาณอะไมโลเพคตินเพิ่มขึ้นอาจส่งผลกระทบต่อกระบวนการย่อยของเอนไซม์ ซึ่งมีการรายงานเอนไซม์สามารถย่อยแป้ง จากแป้งที่มีอะไมโลเพคตินได้มากกว่าแป้งที่มีอะไมโลสสูงเป็นองค์ประกอบ (Blazek and Copeland, 2010) ดังนั้นจึงได้มีการออกแบบการทดลองในกิจกรรมที่ 4 โดยทำการเปรียบเทียบข้าวระยะเมาและระยะสุกแก่ เพื่อผลิต IMOs ด้วยการใช้สปอร์ของเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3102

4.4 กิจกรรมที่ 3 การศึกษาการใช้แป้งข้าวระยะต่าง ๆ ที่มีต่อการสังเคราะห์ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการใช้สารตั้งต้นในการหมักเป็นแป้งข้าว 2 ระยะ คือแป้งข้าวระยะเมาที่ผ่านการเตรียมแบบทำให้เกิดเจลาตินในเซชัน โดยวิธีการเตรียมจะทำให้ข้าวระยะเมาเกิดเจลาตินในเซชันก่อน ซึ่งนำไปนึ่ง 20 นาที และนำไปทำแห้งโดยเครื่องฟลูอิดไดเบตจนได้ความชื้นร้อยละ 12 ก่อนขัดสีแล้วนำมาบดให้มีขนาดเล็กกลงโดยใช้เครื่องบดลดขนาดและร่อนผ่านตระแกรงให้มีขนาดอนุภาคของแป้งให้น้อยกว่า 150 ไมโครเมตรซึ่งเรียกว่า แป้งข้าวระยะเมาและแป้งข้าวระยะสุกแก่ โดยจะเตรียมแบบไม่ผ่านการทำให้เกิดเจลาตินในเซชัน โดยนำข้าวระยะสุกแก่ที่มีความชื้นร้อยละ 12 ไปกะเทาะ

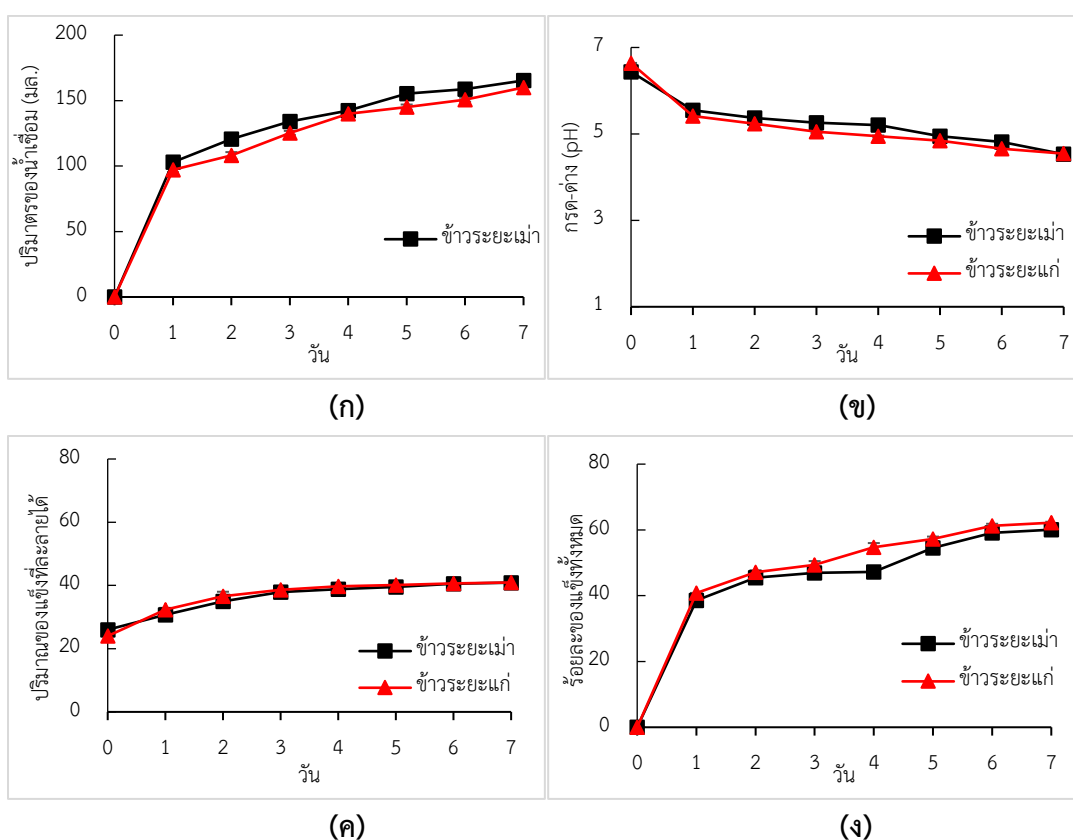
เปลือก หลังจากนั้นนำไปบดให้มีขนาดอนุภาคของแป้งให้น้อยกว่า 150 ไมโครเมตร ซึ่งเรียกว่า แป้งข้าวระยะสุกแก่ ในกิจกรรมนี้ข้าวทั้ง 2 ระยะจะถูกนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักแบบของแข็งด้วยสปอร์ของ *Aspergillus oryzae* TISTR 3102 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ซึ่งลักษณะปรากฏจะแสดง (ดังภาพที่ 51)



ภาพที่ 51 ตัวอย่างน้ำเชื่อมที่ได้จากแป้งข้าวระยะเმა (ก) และข้าวระยะสุก (ข) แก่ที่หมักด้วยสปอร์ของเชื้อรา *A. oryzae*

จากการทดลองพบว่าปริมาณน้ำเชื่อมของสารตั้งต้นที่เป็นแป้งข้าวระยะเมาที่ผ่านการทำให้เกิดเจลและแป้งข้าวระยะสุกแก่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น 196.33 ± 1.53 และ 160.00 ± 1.73 มิลลิลิตร ตามลำดับ ในระหว่างการบ่ม 7 วัน ($P \leq 0.05$) และพบว่าการใช้แป้งข้าวระยะเมาเป็นสารตั้งต้น ได้ปริมาณน้ำเชื่อมสูงกว่าแป้งข้าวระยะสุกแก่ ภาพที่ 52 (ก) สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ภาพที่ 52 (ข) พบว่าค่า ความเป็นกรด-ด่างในน้ำเชื่อมที่ได้จากการใช้แป้งข้าวระยะเมาและแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่ผ่านการหมักลดลงจาก 6.44 ± 0.01 เป็น 4.53 ± 0.03 และ 6.64 ± 0.01 เป็น 4.54 ± 0.03 ตามลำดับ ในระหว่างการหมักเป็นเวลา 7 วัน การลดลงของค่า pH อาจเกิดเนื่องจากกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ของเชื้อรา (Yanfang et al., 2008) และในระหว่างการหมักโดยสภาวะแบบของแข็งของเชื้อราจะทำให้เกิดสารประกอบอื่น ๆ เช่น กรดอินทรีย์ (Konlam et al., 2014) ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง แต่พบว่าปริมาณน้ำเชื่อมที่เพิ่มขึ้นไม่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณของแข็งทั้งหมดและปริมาณของแข็งที่ไม่ละลายน้ำ โดยปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในระหว่างการหมัก 7 วัน ภาพที่ 52 (ค) ในการใช้สารตั้งต้นจากแป้งข้าวทั้งสองระยะไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายน้ำได้ ยังส่งผลให้ค่าร้อยละปริมาณของแข็งทั้งหมดของการใช้แป้งข้าวแป้งข้าวระยะเมาและแป้งข้าวระยะสุกแก่ ในช่วงการบ่ม 7 วันเพิ่มขึ้น ภาพที่ 52 (ง) ซึ่งอาจเนื่องจากในสปอร์ของเชื้อรายังมีเอนไซม์อื่นๆ เช่น โปรตีเอสและเอนไซม์อะไมโลไลติก ซึ่งมีบทบาทในการย่อยสลายสารตั้งต้น (Saman et al.,

2012) ส่งผลให้ปริมาณของแข็งทั้งหมดเพิ่มขึ้นในระหว่างการบ่ม และเมื่อทำการเปรียบเทียบพบว่าการหมักโดยใช้สารตั้งต้นข้าวระยะสุกแก่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดและปริมาณของแข็งที่ละลายได้สูงกว่าการใช้แป้งข้าวระยะเม่า ($P \leq 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของแป้งข้าวระยะเม่าและระยะสุกแก่ที่พบว่าปริมาณอะไมโลเพคตินในข้าวระยะสุกแก่สูงกว่าในข้าวระยะเม่า (ตารางที่ 7) แต่ไม่สอดคล้องกับปริมาณน้ำเชื่อมที่ได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าปริมาณของแข็งทั้งหมดจะประกอบด้วยของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดและของแข็งที่ไม่ละลายน้ำเช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน เป็นต้น ซึ่งในแป้งข้าวระยะเม่ามีปริมาณสูงกว่าในแป้งข้าวระยะสุกแก่



ภาพที่ 52 การเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมีของน้ำเชื่อมจากกระบวนการหมักจากแป้งข้าวระยะเม่าและแป้งข้าวระยะสุกแก่ ด้วยสปอร์ของ *A. oryzae* TISTR 3102

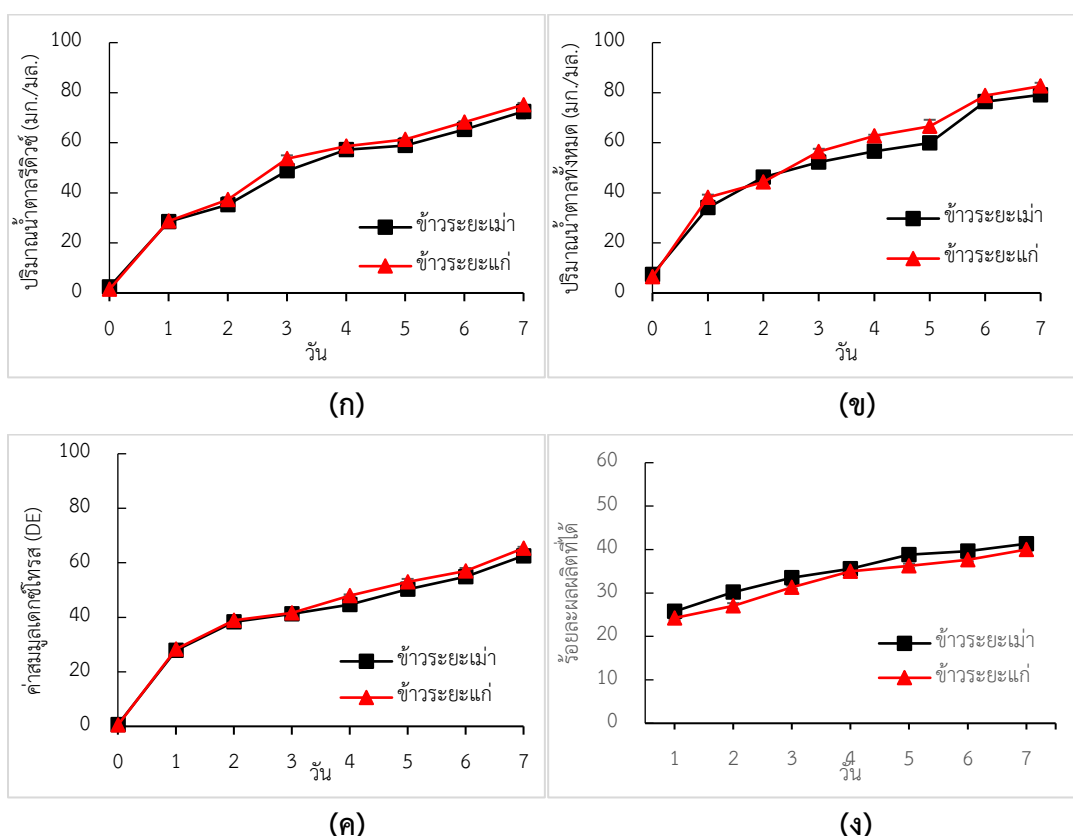
นอกจากนี้แป้งข้าวระยะเม่าได้ผ่านการทำให้เกิดเจลลาตินในเซชันถึงสองครั้งคือในระหว่างการเตรียมเป็นแป้งและระหว่างการเตรียมเป็นสารตั้งต้นในระหว่างการหมัก ทำให้โครงสร้างของเม็ดแป้งถูกทำลายและอะไมโลสเกิดการชะออกมา แต่พบว่าปริมาณของแข็งทั้งหมดและของแข็งที่ละลายน้ำได้ต่ำกว่า อาจเป็นไปได้ว่าอาจเกิดปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างไขมันกับแป้ง (amylose lipid complex) เป็นสารประกอบเชิงซ้อน จะไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์และทำให้เอนไซม์เข้าไป

ย่อยโมเลกุลของแป้งได้ยากขึ้น (Seneviratne and Biliaderis, 1991) นอกจากนี้ปริมาณเยื่อใยที่สูงในแป้งข้าวระยะเม่าจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์อีกด้วย เพราะกลุ่มของเอนไซม์ที่สร้างขึ้นไม่สามารถย่อยสารตั้งต้นกลุ่มเยื่อใยได้ (จิรนาถ บุญคง และคณะ 2558)

อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณของแป้งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดมีความสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ภาพที่ 53 (ก) เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำเชื่อมที่ได้จากการใช้แป้งข้าวระยะเม่าที่ผ่านการเกิดเจลลิตินเซชันและแป้งข้าวระยะสุกแก่ พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการบ่ม 7 วัน ($P \leq 0.05$) และพบว่าการใช้ข้าวระยะสุกแก่เป็นสารตั้งต้นในการบ่มจะพบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูง นอกจากนี้ผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำเชื่อมของสารตั้งต้นทั้งสองยังส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นในช่วง 7 วันของการหมัก ($P \leq 0.05$) ภาพที่ 53 (ข) เนื่องจากกิจกรรมการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์อะไมโลไลติกของสปอร์จากเชื้อรา ซึ่งผลที่เกิดขึ้นนี้สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณของแป้งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยสปอร์ของเชื้อราสามารถเคลื่อนตัวไปจับที่ผนังของเม็ดแป้งข้าวและเอนไซม์ในสปอร์สามารถแทรกซึมไปทั่วเม็ดแป้งข้าวก่อนที่จะเกิดกิจกรรมการไฮโดรไลซิสของเอนไซม์อะไมโลไลติก ได้แก่ แอลฟาอะไมเลส (Sivaramakrishnan et al., 2007) และเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Zambare, 2010) โดยแอลฟาอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์พันธะไกลโคไซด์ภายในสายพอลิเมอร์ของโมเลกุลที่เป็นอะไมโลสและอะไมโลเพคตินในแป้งและไกลโคเจนที่ตำแหน่งแอลฟา 1-4 ไกลโคไซด์แบบสุ่ม (Nielsen, 2000) ซึ่งในแป้งข้าวระยะเม่าจะมีพันธะแอลฟา 1-4 ไกลโคไซด์ มากกว่าข้าวระยะสุกแก่ ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่พบปริมาณของอะไมโลสในข้าวระยะเม่ามากกว่าในข้าวระยะสุกแก่ ดังนั้นจึงทำให้โมเลกุลของแป้งและไกลโคเจนถูกไฮโดรไลซ์ได้น้ำตาล เช่น น้ำตาลมอลโทส (maltose) กลูโคส (glucose) อย่างรวดเร็ว รวมทั้งโอลิโกแซ็กคารไรด์ (Uhling, 1998) นอกจากนี้การหมักที่ใช้เวลานานยิ่งทำให้เกิดการย่อยมากขึ้น ทำให้พบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูง แต่เมื่อเปรียบเทียบพบว่าการใช้ข้าวระยะเม่าเป็นสารตั้งต้น ทำให้ปริมาณน้ำตาลต่ำกว่าแป้งข้าวระยะสุกแก่ ($P \leq 0.05$) เพราะในระหว่างการเตรียมข้าวระยะเม่าที่ผ่านการเกิดเจลลิตินเซชันแล้ว อาจทำให้ไขมันที่บริเวณเยื่อหุ้มเมล็ดของข้าวแทรกซึมเข้ามาในโครงสร้างที่เป็นรูพรุนของข้าว และทำให้เกิดการจับรวมกันระหว่างไขมันและแป้ง (amylose-lipid complex) (Kaur and Singh, 2000) จึงส่งผลให้ในระหว่างการหมักเอนไซม์จากสปอร์ของราเข้าไปย่อยแป้งเป็นน้ำตาลได้ยากขึ้น ดังนั้นจึงพบปริมาณน้ำตาลในสารตั้งต้นแป้งข้าวระยะเม่าต่ำกว่าในแป้งข้าวระยะสุกแก่ นอกจากนี้ในแป้งข้าวระยะเม่าที่พบปริมาณอะไมโลสที่สูงกว่าในข้าวระยะสุกแก่ แสดงให้เห็นถึงโครงสร้างของแป้งมีการจัดเรียงตัวด้วยพันธะแอลฟา 1-4 ไกลโคไซด์ อย่างเป็นระเบียบจึงส่งผลให้เอนไซม์จากราแทรกซึมเข้าไปได้ยาก

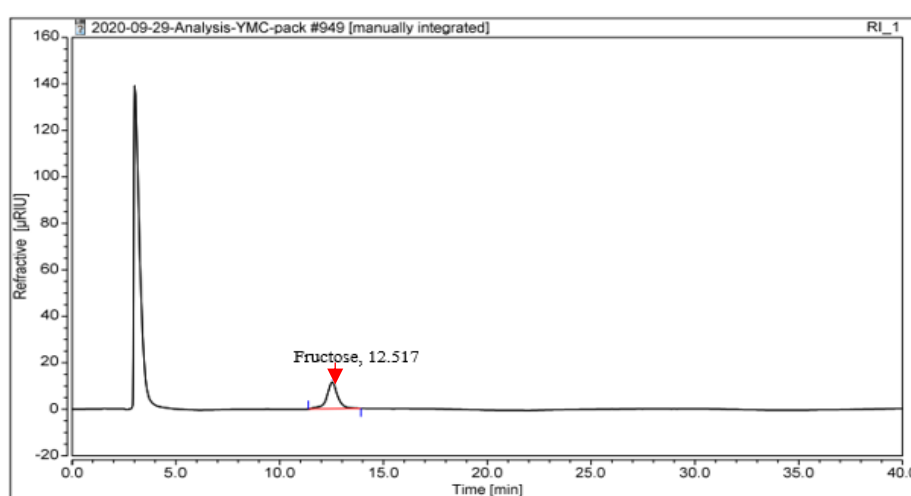
และผลจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำเชื่อมของข้าวทั้งสองระยะที่หมักด้วยสปอร์ของ *A. oryzae* ส่งผลให้ค่าสมมูลเดกซ์โทรสสูงขึ้น (DE-value) สูงถึง 62.56 ± 1.32 และ

65.35 ± 0.50 สำหรับแป้งข้าวระยะเმაและแป้งข้าวระยะสุกแก่ ตามลำดับ ในระหว่างการหมัก 7 วัน ภาพที่ 53 (ค) เมื่อทำการเปรียบเทียบกันพบว่าการใช้แป้งข้าวระยะเมาเป็นสารตั้งต้นในการหมักมีค่าสมมูลเด็กโตรสต่ำกว่าการใช้ข้าวระยะสุกแก่ ($P \leq 0.05$) ซึ่งค่า DE-value ที่สูงจะแสดงถึงระดับการย่อยแป้งหรือสตาร์ชให้เป็นน้ำตาลกลูโคสหรือเด็กซ์โทรสที่สูง และค่า DE-value ระดับนี้จะเหมาะนำไปใช้เป็นสารให้ความหวาน (sweetener) (กลั่นรงค์ ศรีรอด และเกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ, 2554) และสามารถนำน้ำเชื่อมที่ได้ไปผลิตเบะแซได้ แต่ถ้าต้องการนำเชื่อมที่มีสมบัติที่เชิงสุขภาพต้องใช้ระยะเวลาการหมักไม่เกินหนึ่งวัน เพื่อให้มีค่าสมมูลเด็กซ์โทรส (DE-value) ระหว่าง 8 ถึง 11 เพื่อได้น้ำเชื่อมที่ต้องการที่มีส่วนประกอบของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Guzman et al., 1995) และผลจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณในน้ำเชื่อมของข้าวทั้งสองระยะที่หมักด้วยสปอร์ของ *A. oryzae* ส่งผลให้ค่าร้อยละผลผลิตที่ได้สูงขึ้น คือ 41.33 ± 0.38 และ 40.00 ± 0.40 ตามลำดับ สำหรับแป้งข้าวระยะเมาและแป้งข้าวระยะสุกแก่ ตามลำดับ ในระหว่างการหมัก 7 วัน ภาพที่ 53 (ง) เมื่อเปรียบเทียบกันพบว่าการใช้แป้งข้าวระยะเมาในการหมักมีค่าร้อยละผลผลิตที่ได้สูงกว่าการใช้ข้าวระยะสุกแก่ ($P \leq 0.05$)



ภาพที่ 53 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและค่าสมมูลมุลเด็กซ์โทรสของน้ำเชื่อมแป้งข้าวระยะเมาและแป้งข้าวระยะสุกแก่ระหว่างการหมักสปอร์ของเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3102

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยการวิเคราะห์แบบเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC) โดยจะทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ดังนี้ ฟรุคโตส กลูโคส มอลโตส ไอโซมอลโตส มอลโทไตรโอส ไอโซมอลโทไตรโอส พาโนส และไอโซพาโนส และจากการวิเคราะห์โดยใช้สารมาตรฐานฟรุคโตส ซึ่งมี Retention Time คือ 12.517 นาที โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (Coefficient of Determination) ดังนี้ น้ำตาลฟรุคโตส มีค่า $R^2 = 0.9968$ (ภาพที่ 54) โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดหาได้จากการคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเทียบกับสารมาตรฐาน

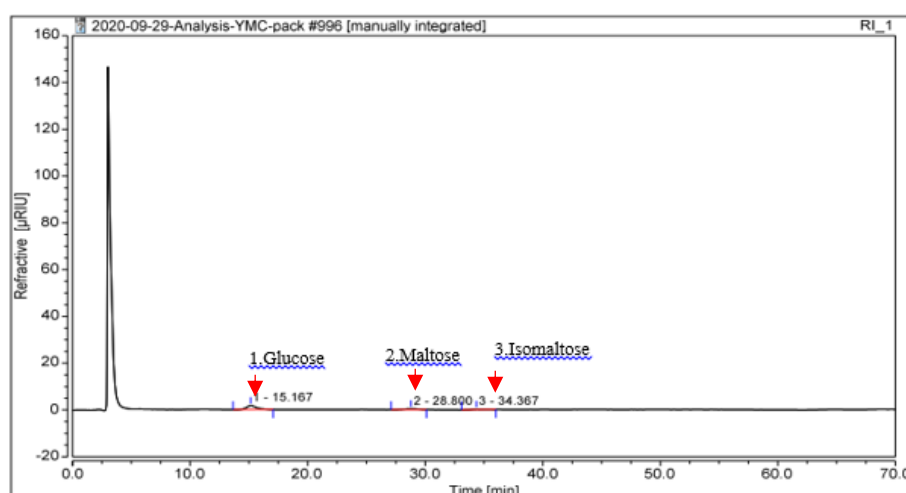


ภาพที่ 54 Chromatogram ของสารมาตรฐานฟรุคโตสที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC)

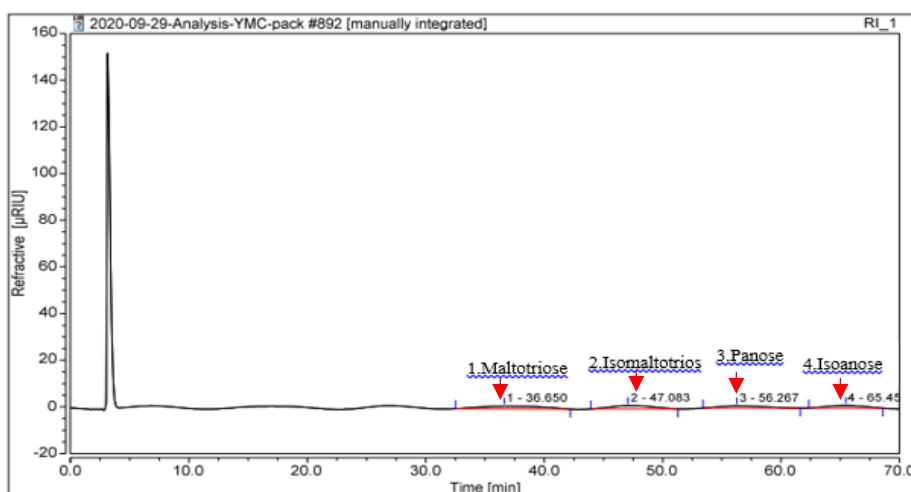
เมื่อทำการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC) ได้แก่ กลูโคส มอลโตส และไอโซมอลโตส ซึ่งมี Retention Time คือ 15.41 29.43 และ 35.15 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 55) โดยสารมาตรฐานมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (Coefficient of Determination) ดังนี้ น้ำตาลกลูโคส มีค่า $R^2 = 0.9995$, น้ำตาลมอลโตสมีค่า $R^2 = 0.9986$, และไอโซมอลโตส มีค่า $R^2 = 0.9982$ โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดหาได้จากการคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเทียบกับสารมาตรฐาน

สำหรับการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC) โดยใช้สารมาตรฐานดังนี้ มอลโทไตรโอส ไอโซมอลโทไตรโอส พาโนส และไอโซพาโนส ซึ่งมี

Retention Time คือ 36.650 47.063 56.267 และ 65.450 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 56) โดยสารมาตรฐานมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (Coefficient of Determination) ดังนี้ มอลโทไตรโอส มีค่า $R^2 = 0.9972$, ไอโซมอลโทไตรโอส มีค่า $R^2 = 0.9959$, พาโนส มีค่า $R^2 = 0.9987$ และไอโซพาโนส มีค่า $R^2 = 0.9987$ โดยการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดหาได้จากการคำนวณพื้นที่ใต้กราฟเทียบกับสารมาตรฐาน

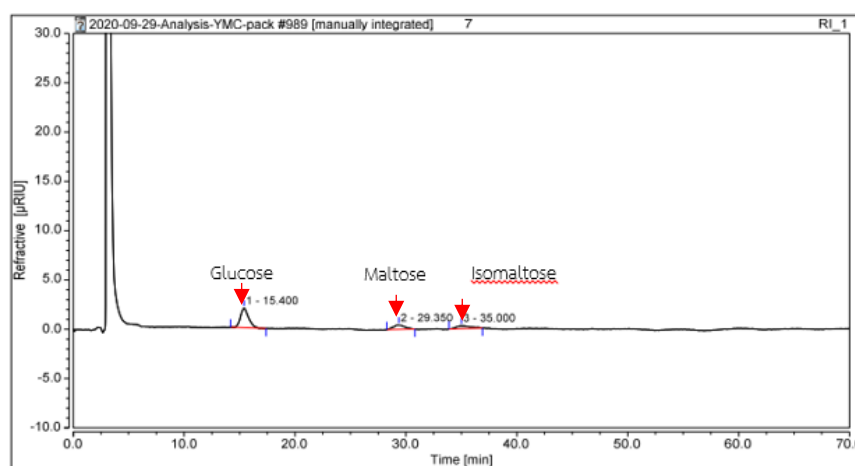


ภาพที่ 55 Chromatogram ของสารมาตรฐานกลูโคส มอลโตส และไอโซมอลโตสที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC)

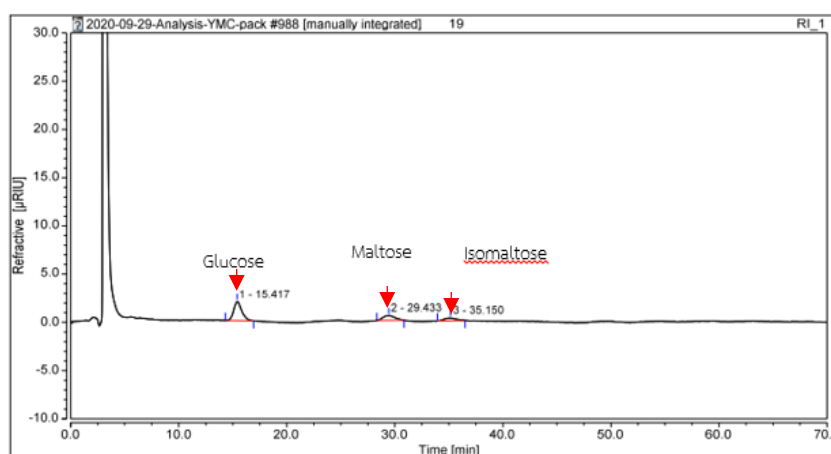


ภาพที่ 56 Chromatogram สารมาตรฐานของมอลโทไตรโอส ไอโซมอลโทไตรโอส พาโนส และไอโซพาโนส ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC)

เมื่อทำการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักโดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC) ของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม้าหมักและระยะสุกแก่แบบของแข็งโดยใช้สปอร์ *A. oryzae* ซึ่งพบน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ 3 ชนิด ได้แก่ กลูโคส มอลโตส และไอโซมอลโตส ซึ่งมี Retention Time คือ 15.41 29.43 และ 35.15 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 57) โดยแต่ละสารมาตรฐานมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (Coefficient of Determination) ดังนี้ น้ำตาล ฟรุคโตส มีค่า $R^2 = 0.9968$, น้ำตาลกลูโคส มีค่า $R^2 = 0.9995$, น้ำตาลมอลโตสมีค่า $R^2 = 0.9986$, และไอโซมอลโตส มีค่า $R^2 = 0.9982$



(ก)

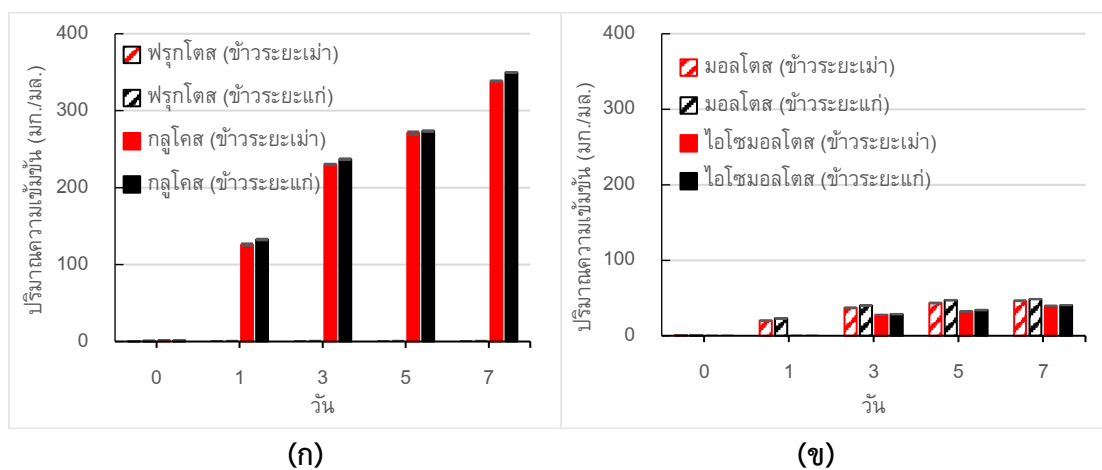


(ข)

ภาพที่ 57 Chromatogram ของการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลและไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม้า (ก) และแป้งข้าวระยะสุกแก่ (ข) ที่หมักด้วยสปอร์ของเชื้อรา *A. oryzae* ในระหว่างการหมักแบบของแข็ง

จากการหมักของข้าวระยะเฝ้าและข้าวระยะสุกแก่ที่หมักด้วยราโดยใช้สปอร์ *A. oryzae* ในระหว่างการหมักแบบของแข็งที่อุณหภูมิ 30 เซลเซียส เวลา 7 วัน พบว่าปริมาณน้ำตาลฟรุคโตสในสารตั้งต้นของข้าวทั้งสองระยะลดลง ($P \leq 0.05$) (ดังแสดงในตารางที่ 13) ซึ่งการลดลงของน้ำตาลฟรุคโตสอาจเป็นเพราะน้ำตาลชนิดนี้ถูกนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเอนไซม์ในสปอร์ของเชื้อรา (Yanfeng et al., 2008) แต่พบว่าปริมาณกลูโคสในน้ำเชื่อมที่ได้จากแป้งข้าวระยะเฝ้าและแป้งระยะสุกแก่มีค่าสูงสุดคือในวันที่ 7 ของกระบวนการหมัก (ตารางที่ 13) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่วัดโดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS method) (ภาพที่ 55) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสในน้ำเชื่อมที่ได้จากแป้งข้าวระยะสุกแก่ พบว่ามีปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่มากกว่า ($P \leq 0.05$)

สำหรับปริมาณน้ำตาลมอลโตส พบว่ามีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก ในน้ำเชื่อมของข้าวทั้ง 2 ระยะ และมีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงสุดในวันที่ 7 ของกระบวนการหมัก ($P \leq 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบพบว่าปริมาณน้ำตาลมอลโตสในน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะสุกแก่มีค่าสูงกว่าในแป้งข้าวระยะเฝ้า ($P \leq 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณไอโซมอลโตสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในกระบวนการหมักในแป้งข้าวทั้งสองระยะ ($P > 0.05$) และพบสูงสุดในวันที่ 7 ของการหมัก แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบในแป้งข้าวทั้งสองระยะพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) อย่างไรก็ตาม การเพิ่มขึ้นของปริมาณไอโซมอลโตส เมื่อระยะเวลาในกระบวนการหมักเพิ่มขึ้น อาจเนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ α -glucosidase ที่ผลิตขึ้นจากสปอร์ของ *A. oryzae* โดยไฮโดรไลซ์พันธะไกลโคไซด์ภายในสายพอลิเมอร์ของโมเลกุลแป้งและไกลโคเจนที่ตำแหน่งแอลฟา 1-4 แบบสุ่ม ทำให้โมเลกุลของแป้งและไกลโคเจนถูกไฮโดรไลซ์ได้ น้ำตาล เช่น น้ำตาลมอลโทส และกลูโคส และยังทำให้หลงเหลือสายพอลิเมอร์ของแป้งที่เชื่อมกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ที่ตำแหน่งแอลฟา 1-6 ทำให้ได้โมเลกุลของอะโมโลเพกติน ซึ่งโมเลกุลมีสายแขนงและได้น้ำตาลที่เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ เช่น ไอโซมอลโตส นอกจากนี้เอนไซม์ทรานสกลูโคซิเดสยังสามารถเร่งปฏิกิริยาทรานสกลูโคซิเลชัน โดยเป็นการสร้างพันธะไกลโคซิดิกใหม่เกิดขึ้นภายหลังจากการตัดหรือไฮโดรไลซิสพันธะ α -D-(1,4) ไกลโคซิดิกเดิม โดยเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่ OH ไกล์เคียง สร้างโมเลกุลที่มีสายกิ่งเพิ่มขึ้น โดยสายกิ่งเกิดขึ้นอาจเป็น α -D-(1,2), α -D-(1,3) และ α -D-(1,6) ทำให้ได้โอลิโกแซ็กคาไรด์ที่เชื่อมด้วย α -D-(1,6) (Niu et al., 2017) แล้วการศึกษานี้สอดคล้องกับงานของ Premasuda et al. (2012) ที่ได้ศึกษาการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากพืชชนิดต่าง ๆ เช่น ข้าว และมันสำปะหลัง โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3102 บนอาหารแข็ง (solid-state fermentation) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ได้ผลผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากข้าว ซึ่งประกอบด้วย ไอโซมอลโตส นอกจากนี้ยังพบ พาโนส และไอโซมอลโตไตรออส แต่ในการศึกษารั้งนี้พบแค่ ไอโซมอลโตส อาจจะเนื่องจากวัตถุดิบและวิธีการที่ใช้ในการผลิตที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 58 ปริมาณและชนิดของน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม่า (ก) และระยะสุกแก่ (ข) ภายใต้การหมักแบบของแข็งด้วยสปอร์ของเชื้อรา *A. oryzae*

ตารางที่ 13 ปริมาณน้ำตาลและโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่วิเคราะห์โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography, HPLC) จากการหมักแป้งข้าวระยะต่าง ๆ

เวลาบ่ม (วัน)	ปริมาณฟรุกโตส (มก./มล.)		ปริมาณกลูโคส (มก./มล.)		ปริมาณมอลโตส (มก./มล.)		ปริมาณไอโซมอลโตส (มก./มล.)	
	ระยะเม่า	ระยะสุกแก่	ระยะเม่า	ระยะสุกแก่	ระยะเม่า	ระยะสุกแก่	ระยะเม่า	ระยะสุกแก่
0	0.86±0.03 ^A	0.83±0.02 ^B	1.39±0.02 ^{eA}	1.26±0.02 ^{eB}	0.93±0.01 ^{eA}	0.83±0.03 ^{eB}	0.00±0.00	0.00±0.00
1	0.00±0.00	0.00±0.00	125.98±1.59 ^{dB}	132.55±1.04 ^{dA}	19.97±0.33 ^{dB}	24.37±0.00 ^{dA}	0.00±0.00	0.00±0.00
3	0.00±0.00	0.00±0.00	230.14±0.87 ^{cB}	236.95±1.09 ^{cA}	36.94±0.55 ^{cB}	40.10±0.12 ^{cA}	27.61±0.66 ^{cB}	28.57±0.34 ^{cA}
5	0.00±0.00	0.00±0.00	270.98±2.09 ^{bA}	273.54±0.97 ^{bA}	43.29±0.62 ^{bB}	47.07±0.39 ^{bA}	32.26±0.26 ^{bB}	34.02±0.42 ^{bA}
7	0.00±0.00	0.00±0.00	338.57±0.80 ^{aB}	349.68±0.48 ^{aA}	46.31±0.56 ^{aB}	48.62±0.17 ^{aA}	39.67±0.85 ^{aA}	40.57±0.14 ^{aA}

หมายเหตุ: ตัวอักษร ^{a-h} ที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษร ^{A-B} ที่แตกต่างกันในแนวนอนของน้ำตาลแต่ละชนิด หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการผลิตน้ำตาลและไอโซมอลโตสโดยใช้แป้งข้าวระยะเม่าและแป้งระยะสุกแก่ด้วยสปอร์ของ *Aspergillus oryzae* TISTR 3102 ที่ใช้กระบวนการหมักแบบแข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าปริมาณน้ำเชื่อมของแป้งข้าวระยะสุกแก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) สูงกว่าแป้งข้าวระยะเม่า แต่พบว่ามีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องค์ประกอบ) ปริมาณของแข็งทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในแป้งข้าวระยะสุกแก่สูงกว่าแป้งข้าวระยะเม่า และการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในแป้งข้าวระยะสุกแก่ ยังส่งผลให้ค่าสมมูลเดกซ์โทรสในข้าวระยะสุกแก่เพิ่มขึ้น คือ 65.35 ± 0.50 ผลแสดงให้เห็นว่าการใช้แป้งข้าวระยะสุกแก่เป็นสารตั้งต้นในการหมักด้วยรา *A. oryzae* ส่งผลให้ได้ปริมาณน้ำตาลสูงกว่าการใช้แป้งข้าวระยะเม่าเป็นสารตั้งต้น ซึ่งสอดคล้องกับผลองค์ประกอบทางเคมีที่พบ โปรตีน เยื่อใย ไขมันและอะไมโลสในข้าวระยะสุกแก่มีปริมาณต่ำกว่าในแป้งข้าวระยะเม่า เป็นผลให้เอนไซม์เข้าไปย่อยสารตั้งต้นได้ง่ายกว่า ซึ่งการที่แป้งข้าวระยะเม่ามีปริมาณไขมันสูงอาจเกิดการจับกันระหว่างไขมันและแป้ง ที่เรียกว่า สารประกอบเชิงซ้อน อาจจะทำให้เกิดโครงสร้างที่แข็งแรงและจับกันแน่นของโมเลกุลของแป้ง ทำให้เอนไซม์เข้าไปย่อยโมเลกุลของแป้งได้ไม่ดี และการผลิตน้ำตาลและไอโซมอลโตสด้วยสปอร์ของเชื้อราในข้าวทั้ง 2 ระยะที่ผ่านกระบวนการหมัก 7 วัน จะให้ผลผลิตของไอโซมอลโตสมากที่สุด และพบว่าร้อยละผลผลิตที่ได้ในการทดลองนี้เท่ากับ 41.33 ± 0.38 และ 40.00 ± 0.43 สำหรับแป้งข้าวระยะเม่าและระยะสุกแก่ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของยุทธชัย เพชรรัตน์ไพศาล (2557) ที่ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากแป้งมันสำปะหลัง ที่ได้มีการสกัดเอนไซม์ *transglucosidase* ที่ใช้ในการสังเคราะห์ IMO's จากเชื้อรา *A. niger* ก่อนนำมาใช้ในการผลิต IMO's จากการศึกษพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ทรานกลูโคซิเดสจากอาหารเหลวได้และมีกิจกรรมของเอนไซม์ 1,668.25 หน่วยต่อมิลลิลิตร สามารถผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีองค์ประกอบของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ เช่น พาโนส มอลโตไตรออส และไอโซมอลโตไตรออสเท่ากับ 16.95, 12.13 และ 24.72 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่เห็นได้ว่าการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยเอนไซม์มีหลายขั้นตอน และเมื่อเทียบกับงานของ Premasuda et al. (2012) ที่ได้ศึกษาการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากพืชชนิดต่าง ๆ เช่น ข้าว และมันสำปะหลัง โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3102 บนอาหารแข็ง (solid-state fermentation) โดยเชื้อราดังกล่าวจะผลิตเอนไซม์ แอลฟาอะไมเลส (52.5 หน่วยต่อกรัม) และแอลฟาไกลูโคซิเดส (2.4 หน่วยต่อกรัม) ได้ผลผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากข้าว ซึ่งประกอบด้วย ไอโซมอลโตส พาโนส และไอโซมอลโตไตรออส

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้แตกต่างจากงานวิจัยอื่น เนื่องจากวัตถุดิบ สภาวะที่ใช้ในการผลิต และกระบวนการผลิตมีความแตกต่างกัน ดังนั้นการหมักแบบ Solid state fermentation (SSF) โดยเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ *A. oryzae* ในรูปแบบก้อนโคจิกก็เป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่น่าสนใจเนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ได้หลายชนิด ซึ่งสามารถ

สร้างเอนไซม์ในการผลิต IMO's ได้ โดยสร้างเอนไซม์ α -amylase ในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล และสร้างเอนไซม์ α -glucosidase เพื่อสังเคราะห์เป็น IMO's ได้แก่ isomaltose เป็นต้น ดังนั้นที่สภาวะการหมักแป้งข้าวระยะเม่าและแป้งข้าวระยะสุกแก่ด้วยสปอร์ของเชื้อรา *A. oryzae* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 7 วัน จึงเป็นวิธีการที่สามารถนำไปใช้ในการผลิตเชิงพาณิชย์ได้ ซึ่งในการกิจกรรมต่อไปจึงต้องศึกษาการผลิตที่มีการเพิ่มขนาดกำลังการผลิตในระดับที่สามารถนำไปผลิตจริง ก่อนนำไปทำเป็นผงขงดื่ม อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาองค์ประกอบของน้ำตาลต่าง ๆ ในน้ำเชื่อมที่ได้จากการหมักด้วยสปอร์ของเชื้อรา *A. oryzae* ด้วยวิธีการหมักแบบของแข็งพบว่ายังมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่สูง ดังนั้นอาจจะต้องมีการกำจัดกลูโคสต่อไป

4.5 การขยายกำลังการผลิตไอโซมอลโตลิโกแซ็กคารไรด์และการทำให้บริสุทธิ์

จากการศึกษาครั้งการใช้แป้งข้าวระยะเม่าที่ผ่านการการทำให้เกิดเจลลิตในเซชันและแป้งข้าวระยะสุกแก่เป็นการใช้สารตั้งต้นในการหมักด้วยสปอร์ของเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3102 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 7 วัน ในกิจกรรมที่ผ่านมาเป็นระดับการศึกษาโดยใช้สารละลายแป้งข้าวปริมาณ 400 กรัม ซึ่งพบว่าในระหว่างการหมัก ปริมาณของน้ำเชื่อม ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าสมมูลเดกซ์โทรส มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก 7 วัน ปริมาณกลูโคสในน้ำเชื่อมที่ได้จากแป้งข้าวระยะเม่าและแป้งข้าวระยะสุกแก่มีค่าสูงสุดคือในวันที่ 7 ของกระบวนการหมัก และพบปริมาณไอโซมอลโตสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในกระบวนการหมักในแป้งข้าวทั้งสอง แต่เมื่อทำการเปรียบเทียบในแป้งข้าวทั้งสองระยะพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ดังนั้นในการศึกษาในกิจกรรมนี้จึงทดลองขยายกำลังการผลิตโดยใช้สารละลายแป้งข้าวระยะเม่าและระยะสุกแก่ในปริมาณ 2 กิโลกรัม โดยดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีทำในห้องปฏิบัติการและทำการบ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 7 วัน จากนั้นนำมาวิเคราะห์คุณสมบัติทางด้านกายภาพของน้ำเชื่อม พบว่าปริมาณน้ำเชื่อมของสารตั้งต้นเป็นแป้งข้าวระยะเม่าที่ผ่านการทำให้เกิดเจลและแป้งข้าวระยะสุกแก่ คือ 706.00 ± 1.73 มิลลิลิตร และ 684.33 ± 3.2 มิลลิลิตร ตามลำดับ ในระหว่างการบ่ม 7 วัน และเมื่อเปรียบเทียบกันพบว่าการใช้แป้งข้าวระยะเม่าเป็นสารตั้งต้นได้ปริมาณน้ำเชื่อมสูงกว่าแป้งข้าวระยะสุกแก่ ($P \leq 0.05$) (ตารางที่ 14) คิดเป็นร้อยละ 35.38 ± 0.08 และ 34.23 ± 0.02 ตามลำดับของแป้งข้าวระยะเม่าและระยะสุกแก่ของสารละลายน้ำแป้งที่เตรียมเริ่มต้นปริมาณ 2 กิโลกรัม และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าร้อยละปริมาณของน้ำเชื่อมที่ได้จากการขยายกำลังการผลิตและการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการมีความแตกต่างกัน โดยพบว่าร้อยละปริมาณน้ำเชื่อมจากการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการมีค่าสูงกว่า คือ คิดเป็นร้อยละ 41.33 ± 0.38 และ 40.00 ± 0.40 สำหรับแป้งข้าวระยะเม่าและระยะสุกแก่ตามลำดับ

สำหรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ พบว่าการใช้สารตั้งต้นเป็นแป้งข้าวระยะเฒ่าที่ผ่านการทำให้เกิดเจลและแป้งข้าวระยะสุกแก่ คือ 39.67 ± 0.58 และ 40.33 ± 0.58 องศาบริกซ์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกันพบว่าการใช้แป้งข้าวระยะสุกแก่เป็นสารตั้งต้นจะได้ปริมาณของแข็งที่ละลายได้สูงกว่าแป้งข้าวระยะเฒ่า ($P \leq 0.05$) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) (ตารางที่ 14) พบค่าความเป็นกรด-ด่าง ในน้ำเชื่อมที่ได้จากการใช้แป้งข้าวระยะเฒ่าและแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่ผ่านการหมัก คือ 4.47 ± 0.03 และ 4.48 ± 0.03 ตามลำดับ ในเวลาการหมัก 7 วัน ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อเทียบกับผลการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำเชื่อมที่ได้จากการทดลองในระดับขยายกำลังการผลิตมีค่าต่ำกว่าในระดับปฏิบัติการ โดยในระดับห้องปฏิบัติการ มีค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่า ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 41.33 ± 0.38 และ 40.00 ± 0.40 สำหรับแป้งข้าวระยะเฒ่าและระยะสุกแก่ ตามลำดับ สำหรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ พบว่าการใช้สารตั้งต้นเป็นแป้งข้าวระยะเฒ่าที่ผ่านการทำให้เกิดเจลาตินในเซชันและแป้งข้าวระยะสุกแก่ คือ 39.67 ± 0.58 และ 40.33 ± 0.58 องศาบริกซ์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกันพบว่าการใช้แป้งข้าวระยะสุกแก่เป็นสารตั้งต้นจะได้ปริมาณของแข็งที่ละลายได้สูงกว่าแป้งข้าวระยะเฒ่า ($P \leq 0.05$) สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) (ตารางที่ 14) พบค่าความเป็นกรด-ด่าง ในน้ำเชื่อมที่ได้จากการใช้แป้งข้าวระยะเฒ่าและแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่ผ่านการหมัก คือ 4.47 ± 0.03 และ 4.48 ± 0.03 ตามลำดับ เพราะการขยายกำลังการผลิตเป็น 2 กิโลกรัม ทำให้มีปริมาณสารตั้งต้นสูง ทำให้เส้นใยของราสามารถเกาะจับและเจริญได้ง่ายและเพิ่มจำนวนสปอร์ได้มาก ทำให้เกิดการแข่งขันในการเจริญและเกิดกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ของเชื้อราได้ดี จึงทำให้เกิดสารประกอบอื่นๆ เช่น กรดอินทรีย์ได้มากจึงส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดต่ำลง

ตารางที่ 14 สมบัติทางเคมีของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวสองระยะที่ผ่านการผลิตในระดับกำลังการผลิต 2 กิโลกรัม ที่ผ่านการหมักด้วยสปอร์ของเชื้อรา *A. oryzae*

ตัวอย่างแป้งข้าว	ปริมาตรของน้ำเชื่อม (มล.)	ร้อยละผลผลิตที่ได้ (%)	ปริมาณของแข็งที่ละลายได้	กรด-ด่าง (pH)
ระยะเฒ่า	706.00 ± 1.73^a	35.38 ± 0.08^a	39.67 ± 0.58^b	4.47 ± 0.03^a
ระยะสุกแก่	684.33 ± 3.21^b	34.23 ± 0.02^b	40.33 ± 0.58^a	4.48 ± 0.03^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สำหรับร้อยละปริมาณของแข็งทั้งหมด พบว่าการใช้สารตั้งต้นเป็นแป้งข้าวระยะเฒ่าที่ผ่านการทำให้เกิดเจลลาตินเซชันและแป้งข้าวระยะสุกแก่ คือ 59.40 ± 0.90 และ 62.06 ± 0.45 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกันพบว่าการใช้แป้งข้าวระยะสุกแก่เป็นสารตั้งต้นจะได้ปริมาณของแข็งทั้งหมดสูงกว่าแป้งข้าวระยะเฒ่า ($P \leq 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าร้อยละปริมาณของแข็งทั้งหมดเท่ากัน

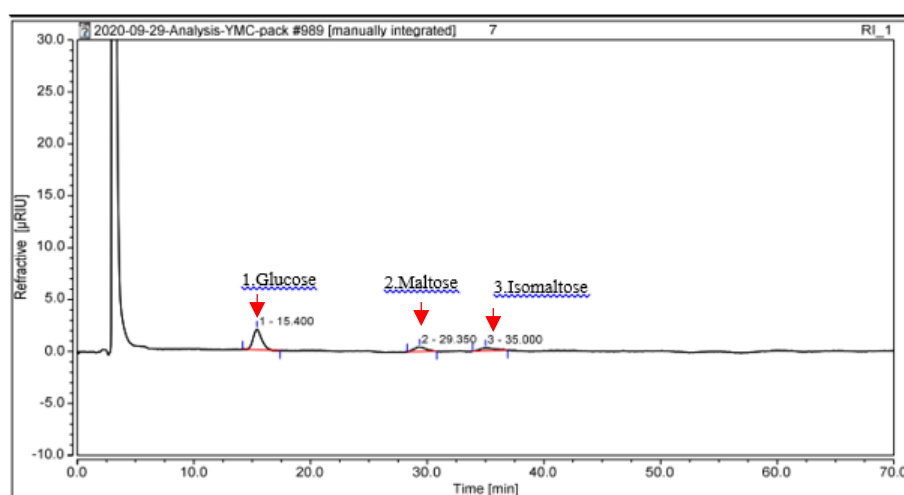
จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลของน้ำเชื่อมของแป้งข้าวระยะเฒ่าและแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่ผลิตในปริมาณ 2 กิโลกรัม ในระหว่างการหมักด้วยอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 7 วันด้วยสปอร์ของเชื้อรา *A. oryzae* พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสารตั้งต้นที่เป็นแป้งข้าวระยะเฒ่าที่ผ่านการทำให้เกิดเจลลาตินเซชันและแป้งข้าวระยะสุกแก่ คือ 71.18 ± 0.99 และ 76.48 ± 1.37 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกันพบว่าการใช้แป้งข้าวระยะสุกแก่เป็นสารตั้งต้นได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าแป้งข้าวระยะสุกแก่ ($P \leq 0.05$) (ตารางที่ 15) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ทั้งหมดในตารางที่ 14 นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่พบในแป้งข้าวระยะสุกแก่สูงกว่าในแป้งข้าวระยะเฒ่า ($P \leq 0.05$) ในเวลาการหมัก 7 วัน และผลของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในน้ำเชื่อมของสารตั้งต้นของแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่สูงกว่ากว่าการใช้แป้งข้าวระยะเฒ่ายังส่งผลให้ค่าสมมูลเดกโทรส (DE) ที่ได้สูงกว่า คือ 65.75 ± 0.34 และ 61.98 ± 0.61 ตามลำดับและผลการทดลองนี้ในระดับการขยายกำลังการผลิตเป็น 2 กิโลกรัม โดยเมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองกับระดับห้องปฏิบัติการ พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าสมมูลเดกโทรส (DE-value) เท่ากัน เนื่องจากการควบคุมปริมาณสปอร์ของเชื้อเริ่มต้นในโคจิในปริมาณที่เท่ากัน และมีการควบคุมปริมาณของโคจิต่อสารตั้งต้นที่อัตราส่วนเท่ากัน ดังนั้นจึงส่งผลให้เกิดกลไกการหมักที่ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและค่าสมมูลเดกโทรส (DE-value) ที่เท่ากัน

ตารางที่ 15 สมบัติทางเคมีและค่าสมมูลเดกโทรสของน้ำเชื่อมข้าวระยะเฒ่าและระยะสุกแก่ที่หมักด้วยสปอร์ของเชื้อรา *A. oryzae* ขยายกำลังการผลิต 2 กิโลกรัม

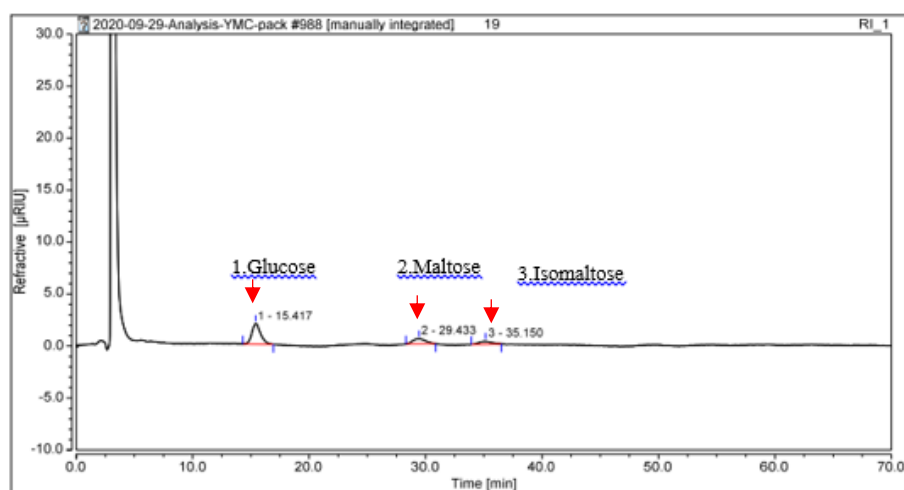
ตัวอย่าง แป้งข้าว	ปริมาณของแข็ง ทั้งหมด (%)	ปริมาณน้ำตาล รีดิวซ์ (มก/มล.)	ปริมาณน้ำตาล ทั้งหมด (มก/มล)	ค่าสมมูล เดกโทรส (DE-value)
ระยะเฒ่า	59.40 ± 0.90^b	71.18 ± 0.99^b	79.45 ± 0.82^b	61.98 ± 0.61^b
ระยะสุกแก่	62.06 ± 0.45^a	76.48 ± 1.37^a	82.51 ± 0.67^a	65.75 ± 0.34^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลและไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC) ซึ่งพบ 3 ชนิด ได้แก่ กลูโคส มอลโตส และไอโซมอลโตส ซึ่งมี Retention Time คือ 15.41 29.43 และ 35.15 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 59) โดยแต่ละสารละลายน้ำตาลมาตรฐานมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (Coefficient of Determination) ดังนี้ น้ำตาลฟรุกโตส มีค่า $R^2 = 0.9968$, น้ำตาลกลูโคส มีค่า $R^2 = 0.9995$, น้ำตาลมอลโตสมีค่า $R^2 = 0.9986$, และน้ำตาลไอโซมอลโตส มีค่า $R^2 = 0.9982$



(ก.)



(ข.)

ภาพที่ 59 Chromatogram ของการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลและไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม่า (ก.) และข้าวระยะสุกแก่ (ข.) ที่หมักด้วยรา โดยใช้สปอร์ของ *A. oryzae* จากการขยายกำลังการผลิตเป็น 2 กิโลกรัม

จากการวิเคราะห์พบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสของสารตั้งต้นที่เป็นแป้งข้าวระยะเม่าที่ผ่านการทำให้เกิดเจลและแป้งข้าวระยะสุกแก่ คือ 346.44 ± 1.78 และ 351.57 ± 1.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 16) และพบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสในน้ำเชื่อมแป้งข้าวระยะเม่าต่ำกว่าในแป้งข้าวระยะสุกแก่ ($P \leq 0.05$) เช่นเดียวกับปริมาณน้ำตาลมอลโตสที่พบในน้ำเชื่อมแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่สูงกว่าแป้งข้าวระยะเม่า ($P \leq 0.05$) แต่สำหรับปริมาณไอโซมอลโตส พบว่าการใช้แป้งข้าวระยะเม่าที่ผ่านการทำให้เกิดเจลาตินในเซชันและแป้งข้าวระยะสุกแก่พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน คือ 40.19 ± 0.31 และ 40.36 ± 0.49 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับร้อยละผลผลิตที่ได้ของไอโซมอลโตสกับผลการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการในน้ำเชื่อมข้าวทั้ง 2 ระยะ พบว่าการทดลองการใช้ในระดับปฏิบัติการได้ร้อยละผลผลิตที่ได้สูงกว่าการขยายการกำลังการผลิต คือ ร้อยละ 9.34 และ 9.24 สำหรับข้าวระยะเม่าและระยะสุกแก่ ตามลำดับ แต่สำหรับขั้นตอนการขยายกำลังการผลิตพบว่าได้ร้อยละผลผลิตคือ ร้อยละ 5.24 และ 5.26 ตามลำดับ และเมื่อเทียบกับผลการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการในน้ำเชื่อมข้าวทั้ง 2 ระยะ พบว่าชนิดของน้ำตาลที่ได้เป็นชนิดเดียวกัน นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสที่ได้ พบว่าเมื่อมีการขยายกำลังการผลิตเพิ่มเป็น 2 กิโลกรัม ได้ปริมาณของน้ำตาลกลูโคสสูงกว่า แต่สำหรับปริมาณน้ำตาลมอลโตส พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยจากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC) พบว่าเมื่อทำการหมักโดยใช้แป้งข้าวระยะเม่าและแป้งข้าวระยะสุกแก่เป็นสารตั้งต้นในปริมาณ 2 กิโลกรัม ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่สูงคือ 346.44 ± 1.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 351.57 ± 1.60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ทำเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ ดังนั้น จึงต้องมีการกำจัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสในน้ำเชื่อม ซึ่งในการทดลองนี้ใช้วิธีหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ตามวิธีของ Kim et al. (2017) เพื่อใช้กิจกรรมการหมักของยีสต์ชนิดนี้กำจัดน้ำตาลกลูโคสของน้ำเชื่อมที่ได้จากแป้งข้าวระยะเม่าและระยะสุกแก่

ตารางที่ 16 ปริมาณน้ำตาลและไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรต์ของน้ำเชื่อมที่ได้จากการหมักด้วย *A. oryzae* ในแป้งข้าวสองระยะ
ที่ระดับการผลิต 2 กิโลกรัม

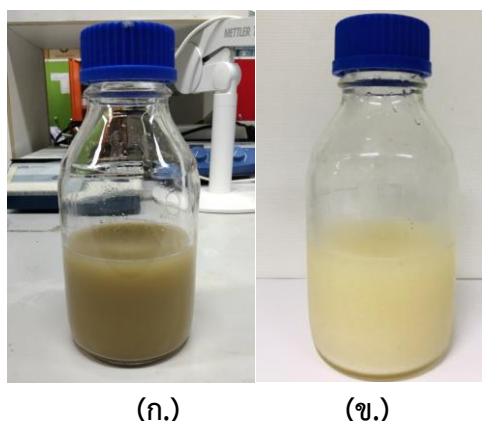
ตัวอย่างแป้ง	ปริมาณกลูโคส (มก/มล)	ปริมาณมอลโตส (มก/มล)	ปริมาณไอโซมอลโตส (มก/มล)	ผลผลิตที่ได้ (%)
ข้าวระยะเม่า (ระดับปฏิบัติการ)	338.57±0.80 ^d	46.31±0.56 ^b	39.67±0.85 ^a	9.34 ^a
ข้าวระยะสุกแก่ (ระดับปฏิบัติการ)	349.68±0.48 ^b	48.62±0.17 ^a	40.57±0.14 ^a	9.24 ^a
ข้าวระยะเม่า (ขยายกำลังผลิต 2 กิโลกรัม)	346.44±1.78 ^c	46.65±0.36 ^b	40.19±0.31 ^a	5.24 ^b
ข้าวระยะสุกแก่ (ขยายกำลังผลิต 2 กิโลกรัม)	351.57±1.60 ^a	48.24±0.57 ^a	40.36±0.49 ^a	5.26 ^b

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

น้ำเชื่อมที่ได้จากการหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* เป็นเวลา 5 วัน พบว่าน้ำเชื่อมที่ได้มีกลิ่นแอลกอฮอล์ (Kiran Sree et al., 2000) เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสถูกนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของยีสต์เพื่อใช้ในการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ ซึ่งเกิดกลไกการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นกลิ่นและรสชาติที่ไม่พึงประสงค์ ดังนั้น จึงได้มีการนำน้ำเชื่อมที่ได้มากำจัดกลิ่นโดยใช้ถ่านกัมมันต์ (Activated Carbon) ดังแสดงใน (ภาพที่ 60) เมื่อนำน้ำเชื่อมที่ผ่านการหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* เป็นเวลา 5 วัน มากรองด้วยถ่านกัมมันต์ พบว่ากลิ่นหมักของน้ำเชื่อมลดลง ซึ่งทำการทดสอบโดยใช้ประสาทสัมผัสทางจมูกในการรับกลิ่น ดังแสดงใน (ภาพที่ 61)



ภาพที่ 60 การกรองตัวอย่างน้ำเชื่อมที่ได้จากข้าวระยะเฒ่าด้วยถ่านกัมมันต์ (activated carbon)

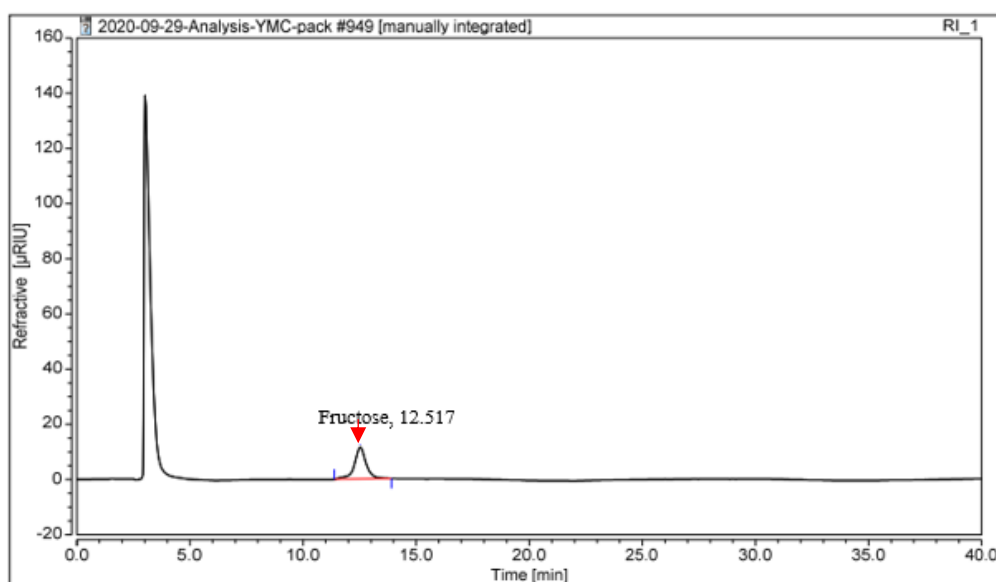


(ก.)

(ข.)

ภาพที่ 61 น้ำเชื่อมที่ได้จากแป้งข้าวระยะเฒ่า (ก) และแป้งข้าวระยะสุกแก่ (ข) ที่ผ่านการหมักโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* ในระดับการผลิต 2 กิโลกรัม

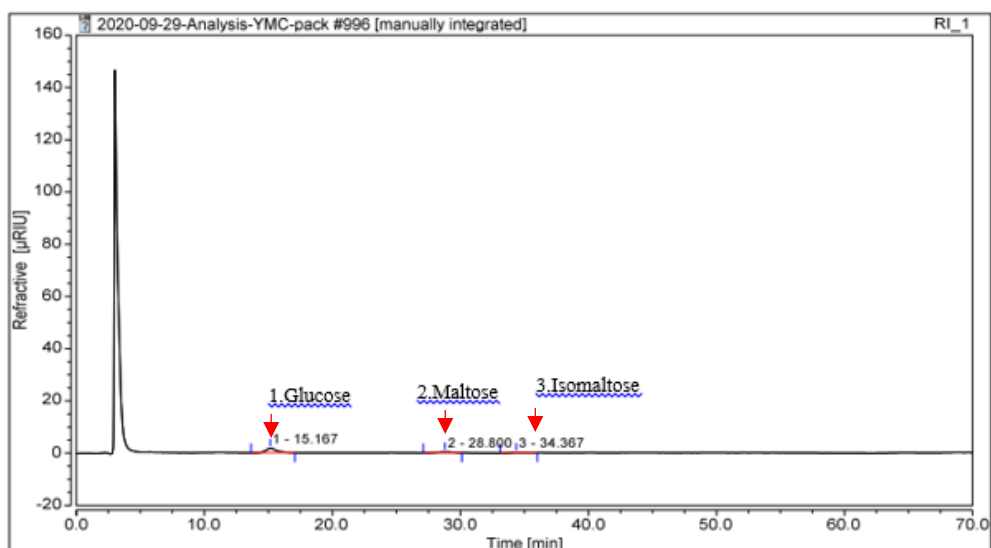
การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลและไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์ โดยการวิเคราะห์แบบเทคนิคโครมาโทกราฟี ของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC) ของน้ำเชื่อมที่ได้จากแป้งข้าวระยะเม่าและแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่ผ่านการหมักโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* เป็นเวลา 5 วัน โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ดังนี้ ฟรุคโตส กลูโคส มอลโตส ไอโซมอลโตส มอลโทไตรโอส ไอโซมอลโทไตรโอส พาโนส และไอโซพาโนส และจากการวิเคราะห์โดยใช้สารมาตรฐานฟรุคโตส กลูโคส มอลโตส และไอโซมอลโตส ซึ่งมี Retention Time คือ 12.517 นาที (ภาพที่ 62) 15.41 นาที 29.43 นาที และ 35.15 นาที ตามลำดับ โดยสารมาตรฐานมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (Coefficient of Determination) ดังนี้ น้ำตาลฟรุคโตส มีค่า $R^2 = 0.9968$ น้ำตาลกลูโคส มีค่า $R^2 = 0.9995$ น้ำตาลมอลโตสมีค่า $R^2 = 0.9986$ และน้ำตาลไอโซมอลโตส มีค่า $R^2 = 0.9982$ (ภาพที่ 63)



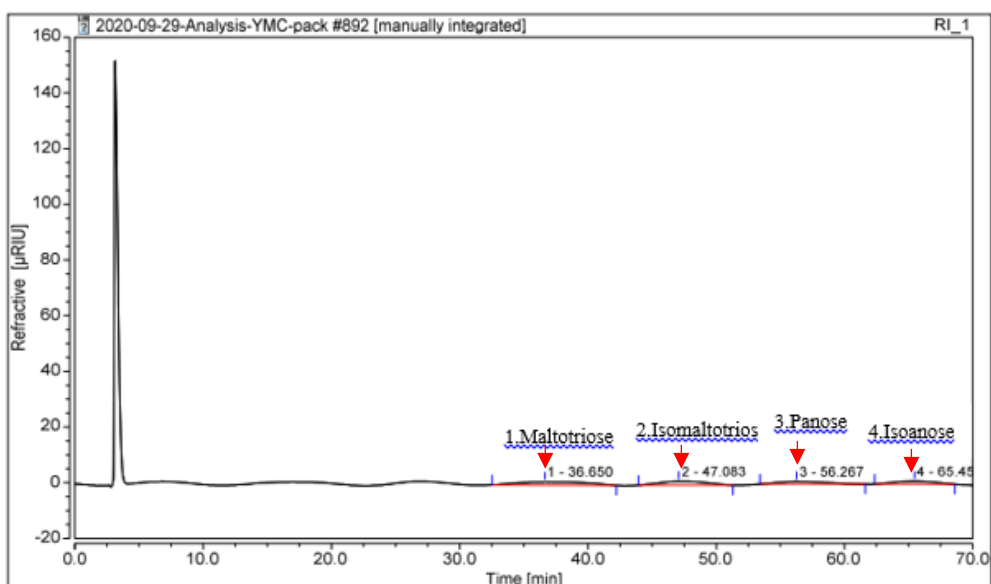
ภาพที่ 62 Chromatogram ของสารมาตรฐานฟรุคโตสที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC)

สำหรับการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของโอลิโกแซ็กคารไรด์ โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC) โดยใช้สารมาตรฐานดังนี้ มอลโทไตรโอส ไอโซมอลโทไตรโอส พาโนส และไอโซพาโนส ซึ่งมี Retention Time คือ 36.650 47.063 56.267 และ 65.450 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 64) โดยสารมาตรฐานมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (Coefficient of Determination) ดังนี้ มอลโทไตรโอส มี

ค่า $R^2 = 0.9972$, ไอโซมอลโทไตรโอส มีค่า $R^2 = 0.9959$, พาโนส มีค่า $R^2 = 0.9987$ และมีไอโซพาโนส มีค่า $R^2 = 0.9987$

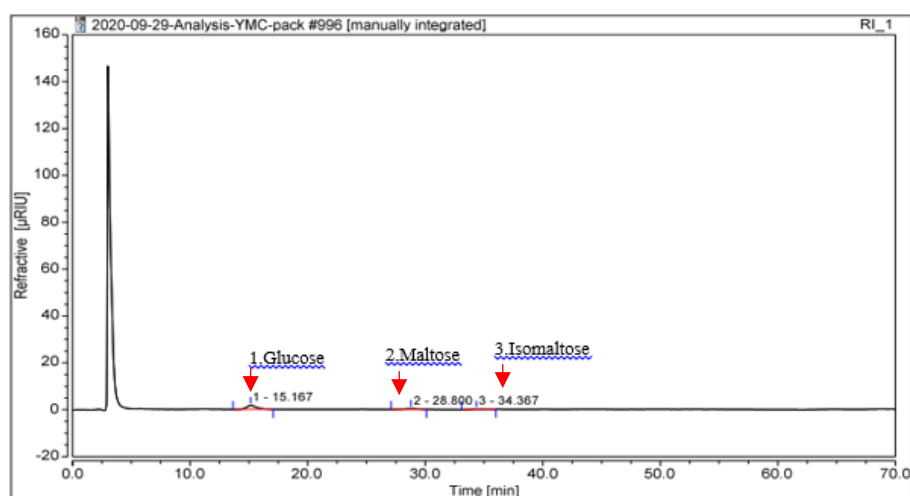


ภาพที่ 63 Chromatogram ของสารมาตรฐานกลูโคส มอลโตส และไอโซมอลโตสที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC)

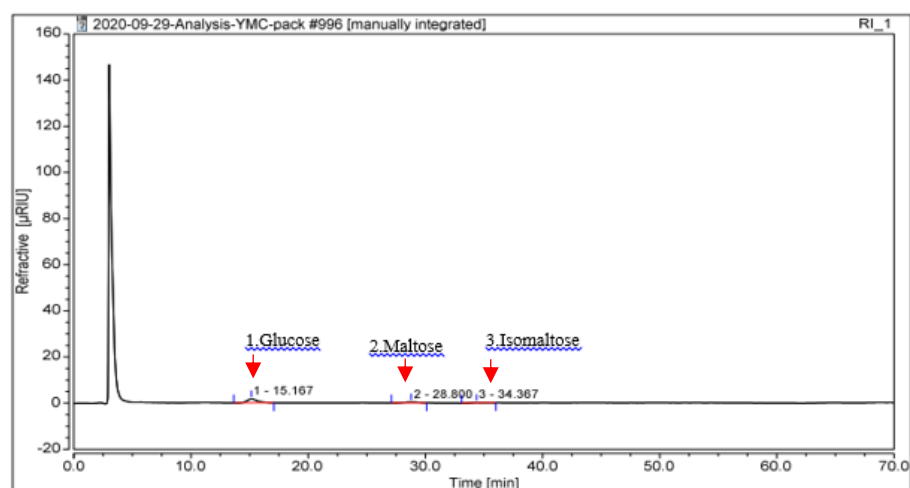


ภาพที่ 64 Chromatogram สารมาตรฐานของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ประเภทต่าง ๆ ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC)

จากการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลและไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าว
 ระยะเวลาและระยะสูกแก่หลังจากการหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็น
 เวลา 5 วัน ดังแสดงใน (ภาพที่ 65) พบน้ำตาลกลูโคส มอลโตส และไอโซมอลโตส ซึ่งมี Retention
 Time คือ 15.41 29.43 และ 35.15 นาที ตามลำดับ โดยสารมาตรฐานมีค่าสัมประสิทธิ์ของการ
 ตัดสินใจ (Coefficient of Determination) ดังนี้ น้ำตาลฟรุกโตส มีค่า $R^2 = 0.9968$ น้ำตาลกลูโคส มี
 ค่า $R^2 = 0.9995$ น้ำตาลมอลโตสมีค่า $R^2 = 0.9986$ และไอโซมอลโตส มีค่า $R^2 = 0.9982$



(ก)



(ข)

ภาพที่ 65 Chromatogram ของการวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลและไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ของ
 น้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเฝ้า (ก.) และแป้งข้าวระยะสุกแก่ (ข.) ที่หลังการหมักด้วย
 ยีสต์ *S. cerevisiae*

จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลของน้ำเชื่อม (แสดงในตารางที่ 17) พบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเมื่อก่อนและหลังการหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* คือ 344.85 ± 0.29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 84.49 ± 0.17 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยลดลงประมาณร้อยละ 75.49 เช่นเดียวกันกับปริมาณน้ำตาลกลูโคสของน้ำเชื่อมจากแป้งระยะสุกแก่ก่อนและหลังจากหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* คือ 355.02 ± 0.29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 84.92 ± 0.97 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยลดลงประมาณร้อยละ 76.07 โดยการลดลงของน้ำตาลกลูโคส เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสถูกนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของยีสต์และใช้ในการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยมีกลไกในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ โดยน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุลถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล 2 โมเลกุล และคาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของเชื้อยีสต์จะเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย และมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเชื้อยีสต์ (Sree et al., 2000) และร้อยละปริมาณกลูโคสที่เหลืออยู่ในน้ำเชื่อมของแป้งข้าวระยะเมื่อก่อนและข้าวระยะสุกแก่ คือ ร้อยละ 51.10 และ 50.38 ขององค์ประกอบของน้ำเชื่อมตามลำดับ (ตารางที่ 17) และปริมาณของกลูโคสที่เหลือสามารถยอมรับได้ สามารถนำไปผลิตเป็นผงขงดื่มต่อไปได้

สำหรับปริมาณน้ำตาลมอลโตสของน้ำเชื่อมแป้งข้าวระยะเมื่อก่อนและหลังจากการหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* มีปริมาณ 45.66 ± 0.29 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 40.47 ± 0.21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะเห็นว่าปริมาณน้ำตาลมอลโตสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) หลังจากการหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* เช่นเดียวกับปริมาณน้ำตาลมอลโตสของน้ำเชื่อมแป้งระยะสุกแก่ คือ 48.03 ± 0.45 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 43.20 ± 0.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) นั้นแสดงให้เห็นว่านอกจากน้ำตาลกลูโคสแล้ว น้ำตาลมอลโตสยังถูกนำไปใช้เป็นอาหารของยีสต์ เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและผลิตเป็นเอทานอล อีกทั้งยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งมีความสามารถในการย่อยน้ำตาลมอลโตส (Sree et al., 2000) ทำให้น้ำตาลมอลโตสลดลงหลังจากการหมัก

ปริมาณไอโซมอลโตสของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเมื่อก่อนและหลังจากการหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* คือ 40.89 ± 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 40.37 ± 0.64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งพบว่าจะไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) สำหรับปริมาณไอโซมอลโตสของน้ำเชื่อมจากแป้งระยะสุกแก่ก่อนและหลังจากการหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* มีปริมาณ 41.23 ± 0.64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 40.43 ± 0.40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) เพราะปกติแล้วยีสต์ใช้น้ำตาลประเภทโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส ฟรุคโตส กาแล็คโตส และโมเลกุลคู่ เช่น

ซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ของจุลินทรีย์ และผลิตเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ (Sree et al., 2000) และยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลส (เพชรดา ทองเงิน และคณะ 2021) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ไม่สามารถย่อยไฮโดรโมลโตสที่เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีโครงสร้างเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิกชนิดแอลฟา 1,6 ได้ ดังนั้นจึงทำให้ปริมาณของไฮโดรโมลโตสไม่ลดลง ซึ่งปริมาณไฮโดรโมลโตสที่คงที่ จะทำให้เกิดน้ำเชื่อมที่มีคุณภาพที่ดี เนื่องจากต้องการนำน้ำเชื่อมไปพัฒนาเป็นเครื่องดื่มที่มีคุณสมบัติฟรีไบโอติกต่อไป นอกจากนี้ในระหว่างขั้นตอนการหมักของยีสต์ *S. cerevisiae* อาจจะมีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) เช่น glutathione (Stephen and Jamieson, 1996) ซึ่งเป็นสารที่สามารถยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Oxidation) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ (Free Radical) จะช่วยทำให้เครื่องดื่มมีคุณสมบัติเชิงหน้าที่เพิ่มขึ้น

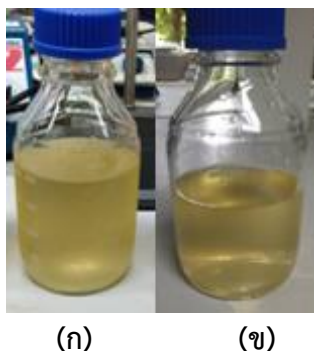
ตารางที่ 17 ปริมาณน้ำตาลและไฮโดรโมลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม่า และระยะสุกแก่ที่ผ่านการหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae*

ตัวอย่างน้ำเชื่อมจาก แป้งข้าวระยะต่าง ๆ	ปริมาณกลูโคส (มก/มล)	ปริมาณมอลโตส (มก/มล)	ปริมาณไฮโดรโมลโตส (มก/มล) (ns)
ข้าวระยะเม่า (ก่อนหมักด้วยยีสต์)	344.85±0.29 ^b	45.66±0.29 ^b	40.89±0.08
ข้าวระยะเม่า (หลังหมักด้วยยีสต์)	84.49±0.17 ^c	40.47±21 ^d	40.37±0.64
ข้าวระยะสุกแก่ (ก่อนหมักด้วย ยีสต์)	355.02±0.29 ^a	48.03±0.45 ^a	41.23±0.64
ข้าวระยะสุกแก่ (หลังหมักด้วย ยีสต์)	84.92±0.97 ^c	43.20±0.58 ^c	40.43±0.40

หมายเหตุ: ^{a-c} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

(ns) ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

หลังจากที่ได้น้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม่าและแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่กำจัดน้ำตาลกลูโคสโดยผ่านการหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 5 วัน และผ่านการกรองด้วยถ่านกัมมันต์ (Activated Carbon) เพื่อกำจัดกลิ่น ต่อมาได้นำน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม่าและแป้งข้าวระยะสุกแก่ไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centifugal) เพื่อกำจัดตะกอนเพื่อให้ใส ดังแสดงใน (ภาพที่ 66)



ภาพที่ 66 น้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม่า (ก) และแป้งข้าวข้าวระยะสุกแก่ (ข) ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยง (Centifugal)

หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงมาปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดผสมกับมอลโตเดกซ์ตริน (maltodextrin DE = 12) โดยในขั้นตอนนี้ได้ควบคุมปริมาณของแข็งที่ละลายได้ของตัวอย่างสุดท้ายที่ร้อยละ 16 (Patil et al., 2014) ก่อนที่จะนำไปทำแห้งโดยใช้เทคนิคการแห้งแบบพ่นฝอย (Spray drying) โดยสภาวะที่ใช้ คือ ควบคุมอุณหภูมิลมร้อนขาเข้า 150 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิขาออกที่ 100 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการป้อนสารเข้าที่ 0.95 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้หัวฉีดแรงดันสูง (pressure nozzles) ควบคุมแรงดันลมที่ 5 บาร์ และเมื่อตัวอย่างน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม่าและข้าวระยะสุกแก่ที่ทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray dryer) พบว่าผงของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม่าและข้าวระยะสุกแก่จะมีสีขาวและมีขนาดไม่ค่อยสมำเสมอ ภาพที่ 67 (ก) และภาพที่ 67 (ข) เมื่อเปรียบเทียบกับ IMOs เชิงการค้า ภาพที่ 67 (ค) ที่พบว่ามีสีขาวมากกว่าและขนาดของผงจะมีขนาดเล็กกว่าและมีขนาดสม่ำเสมอมากกว่า (จากการสังเกตด้วยตา) นอกจากนี้ยังพบว่าผงน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม่า ข้าวระยะสุกแก่ และผง IMOs เชิงการค้า มีความเหนียวเมื่อใช้มือสัมผัส เนื่องจากในการระหว่างการทำแห้งด้วยการพ่นฝอย เนื่องจากในผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่าและแป้งข้าวระยะสุกแก่มีน้ำตาลกลูโคสและมอลโมสเป็นองค์ประกอบ โดยโมเลกุลของน้ำตาลประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน เมื่อสัมผัสกับของเหลว พันธะไฮโดรเจนที่แข็งแรงในน้ำตาลจะเริ่มถูกทำลายเนื่องจากพลังงานความร้อน ซึ่งอะตอมของไฮโดรเจนบางส่วนจะเกาะติดกับพื้นผิวที่อยู่ใกล้ที่สุด บางส่วนจะจับโมเลกุลไฮโดรเจนในของเหลว และบางส่วนจะจับกับไฮโดรเจนหรืออะตอมออกซิเจนอื่นในน้ำตาล (BeMiller and James, 2018) ดังนั้นเมื่อจับน้ำตาลไว้ในมือที่มีเหงื่อออกเพียงเล็กน้อยจึงส่งผลให้เกิดความเหนียวเมื่อสัมผัส



ภาพที่ 67 ลักษณะปรากฏของผงจากแป้งข้าวระยะเม่า (ก) แป้งข้าวระยะสุกแก่ (ข) และผง IMOs เชิงการค้า (ค)

จากการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ ได้แก่ ร้อยละผลผลิตที่ได้ (% Yield) ปริมาณความชื้น (%) ค่า water activity ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (Total soluble solid) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และค่าความหนาแน่นรวม (bulk density) ดังแสดงใน (ตารางที่ 18) พบว่าร้อยละผลผลิตที่ได้จากผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่าที่ผ่านการทำให้แห้งแบบพ่นฝอยให้ร้อยละผลผลิตที่ได้สูงกว่าผง IMOs ที่ได้จากแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่ คือ ร้อยละ 24.00 ± 0.29 และ 22.16 ± 0.46 ตามลำดับ ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

จากการวิเคราะห์ความชื้น (ตารางที่ 18) ของผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่า แป้งข้าวระยะสุกแก่ที่ผ่านการทำให้แห้งแบบพ่นฝอย และ IMOs เชิงการค้า คือร้อยละ 5.42 ± 0.22 4.91 ± 0.12 และ 5.01 ± 0.01 ตามลำดับ และเมื่อทำการเปรียบเทียบพบว่าผง IMOs จากข้าวระยะเม่าที่ผ่านการทำให้แห้งแบบพ่นฝอยมีปริมาณความชื้นสูงกว่าในผง IMOs ข้าวระยะสุกแก่ที่ผ่านการทำให้แห้งแบบพ่นฝอย ($P \leq 0.05$) และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับ IMOs เชิงการค้าพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)

จากการวิเคราะห์ water activity (A_w) ของผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่า แป้งข้าวระยะสุกแก่ที่ผ่านการทำให้แห้งแบบพ่นฝอยและ IMOs เชิงการค้า คือ 0.30 ± 0.00 0.29 ± 0.00 และ 0.32 ± 0.00 ตามลำดับ และเมื่อทำการเปรียบเทียบพบว่าผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่าที่ผ่านการทำให้แห้งแบบพ่นฝอยจะมีค่า A_w สูงกว่าในผง IMOs จากแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่ผ่านการทำให้แห้งแบบพ่นฝอย และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับ IMOs เชิงการค้า พบว่าผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่าและแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่ผ่านการทำให้แห้งแบบพ่นฝอยมีค่า A_w ต่ำกว่าของ IMOs เชิงการค้า ($P \leq 0.05$) ซึ่งค่า A_w ที่พบในช่วงนี้จะเป็นช่วงที่จุลินทรีย์ทุกชนิดไม่สามารถเจริญได้ ส่งผลให้อาหารมีความปลอดภัยสูง นอกจากนี้ยังเป็นช่วงที่เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิด (lipid oxidation) ได้ต่ำ (Frankel and Edwin, 1984)

จากการวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (องศาบริกซ์) ของผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่าและแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่ผ่านการทำให้แห้งแบบพ่นฝอยและ IMOs เจริญการค้า คือ 10.06 ± 0.10 องศาบริกซ์ 10.17 ± 0.00 องศาบริกซ์ และ 10.00 ± 0.00 องศาบริกซ์ ตามลำดับ และเมื่อทำการเปรียบเทียบกันพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) สำหรับการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่า แป้งข้าวระยะสุกแก่ที่ผ่านการทำให้แห้งแบบพ่นฝอยและ IMOs เจริญการค้า คือ 5.09 ± 0.02 4.97 ± 0.01 และ 5.17 ± 0.01 ตามลำดับ และเมื่อทำการเปรียบเทียบพบว่าผง IMOs จากข้าวระยะเม่าที่ผ่านการทำให้แห้งแบบพ่นฝอยมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) สูงกว่าในผง IMOs จากแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่ผ่านการทำให้แห้งแบบพ่นฝอย และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับ IMOs เจริญการค้า พบว่าผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่าและแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่ผ่านการทำให้แห้งแบบพ่นฝอยมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่ำกว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของ IMOs เจริญการค้า ($P \leq 0.05$) เนื่องจากกิจกรรมการย่อยสลายตั้งต้นของเชื้อรา *A. oryzae* ในแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่สูงกว่า ซึ่งสอดคล้องกับผลที่พบปริมาณน้ำตาลที่พบในแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่มากกว่าแป้งข้าวระยะเม่า นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะสุกแก่สูงกว่าในแป้งข้าวระยะเม่า และการที่พบค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่าต่ำกว่า IMOs จากแป้งข้าวระยะสุกแก่เนื่องจากในน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม่าจะมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่สูงกว่าในแป้งข้าวระยะเม่า ซึ่งน้ำตาลกลูโคสจะเป็นแหล่งอาหารหลักของยีสต์ เมื่อนำหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* จะทำให้ยีสต์ใช้ในการเจริญและมีสร้างกรดอินทรีย์ที่สูงกว่า ส่งผลให้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่ามีค่าต่ำ

ตารางที่ 18 สมบัติทางกายภาพและเคมีของผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่าและระยะสุกแก่ที่ผ่านการทำให้แห้งแบบพ่นฝอย

ตัวอย่าง IMOs	ปริมาณ ผลผลิต (%)	ปริมาณ ความชื้น (%)	Water activity (Aw)	ปริมาณของแข็ง ที่ละลายได้ ^(ns)	ค่าความเป็น กรด-ด่าง (pH)
ข้าวระยะเม่า	60.15 ± 1.45^a	5.42 ± 0.22^a	0.30 ± 0.00^b	10.06 ± 0.10	5.09 ± 0.02^{ab}
ข้าวระยะสุกแก่	54.04 ± 0.97^b	4.91 ± 0.12^b	0.29 ± 0.00^b	10.17 ± 0.00	4.97 ± 0.01^c
ผงทางการค้า	-	5.01 ± 0.01^{ab}	0.32 ± 0.00^a	10.00 ± 0.00	5.17 ± 0.01^a

หมายเหตุ: ^{a-c} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความ

เชื่อมั่นร้อยละ 95

^(ns) ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

การวิเคราะห์ค่าสีด้วยเครื่องวัดสี Hunter Lab (ตารางที่ 19) โดยค่าสี (L^*) เป็นค่าความสว่าง (Lightness) เมื่อ L คือค่าความสว่างมีค่าอยู่ในช่วง 0 ถึง 100 a คือค่าสีแดงและสีเขียว (a^*) เป็นค่าสีที่บ่งบอกความเป็นสีแดงและสีเขียว (Redness / Greenness) เมื่อ a มีค่าเป็นบวก เป็นสีแดง เมื่อ a มีค่าเป็นลบ เป็นสีเขียว b คือค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน และ (b^*) เป็นค่าสีที่บ่งบอกความเป็นสีเหลืองและสีน้ำเงิน (Yellowness / Blueness) เมื่อ b มีค่าเป็นบวก เป็นสีเหลือง เมื่อ b มีค่าเป็นลบเป็นสีน้ำเงิน จากการทดลองพบว่าผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่า IMOs แป้งข้าวระยะสุกแก่ และ IMOs เจริญการค้ำมีค่าความสว่าง (L^*) คือ 92.14 ± 0.54 , 91.38 ± 0.01 และ 92.22 ± 0.44 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าค่า (L^*) ของผงน้ำเชื่อมข้าวระยะเม่ากับข้าวระยะสุกแก่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เช่นเดียวกับ IMOs เจริญการค้ำที่พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบผงข้าวระยะสุกแก่และ IMOs เจริญการค้ำพบว่ามีค่า (L^*) ที่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

สำหรับค่า (a^*) พบว่าผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่า ข้าวระยะสุกแก่ และ IMOs เจริญการค้ำมีค่า (a^*) คือ -1.55 ± 0.11 , -1.59 ± 0.10 และ -1.76 ± 0.05 ตามลำดับ ค่าเหล่านี้ ซึ่งค่าที่ติดลบแสดงความเป็นสีเขียว จะเห็นได้ว่าค่า (a^*) ของน้ำเชื่อมข้าวระยะเม่ากับข้าวระยะสุกแก่ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบ ผง IMOs ข้าวระยะเม่าและ IMOs เจริญการค้ำ พบว่าผง IMOs จากข้าวระยะเม่ามีค่า (a^*) สูงกว่า ($P \leq 0.05$) เนื่องในระหว่างการทำแห้งแบบพ่นฝอยอาจเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (browning reaction) ที่เกิดขึ้นระหว่างน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) กับหมู่แอมิโน (RNH_2) ของกรดแอมิโน หรือสารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ โดยมีความร้อนเร่งปฏิกิริยาผลิตผลที่ได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ด เป็นสารประกอบหลายชนิดที่ให้สีน้ำตาล (Martins et al., 2000) ซึ่งในผง IMOs มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูง ซึ่งสอดคล้องกับองค์ประกอบทางเคมีของแป้งข้าวระยะเม่าและแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่พบปริมาณโปรตีนที่สูง จึงเป็นสาเหตุทำให้เกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด ส่งผลให้ค่า (a^*) จากผง IMOs แป้งข้าวระยะเม่าและข้าวระยะสุกแก่สูงกว่า IMOs เจริญการค้ำ ($P \leq 0.05$)

สำหรับค่า (b^*) พบว่าผง IMOs ข้าวระยะเม่า ผง IMOs จากข้าวระยะสุกแก่และผง IMOs เจริญการค้ำมีค่า (b^*) คือ 4.22 ± 0.08 , 4.09 ± 0.53 และ 0.71 ± 0.0 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าค่า (b^*) ของข้าวระยะเม่ากับข้าวระยะสุกแก่ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเปรียบเทียบผง IMOs จากผง IMOs แป้งข้าวระยะเม่าและข้าวระยะสุกแก่กับ IMOs เจริญการค้ำ พบว่าผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่าและข้าวระยะสุกแก่กับมีค่า (b^*) มากกว่า และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

จากการวิเคราะห์ค่าความหนาแน่นรวม (bulk density) ตารางที่ 19 ของผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่า แป้งข้าวระยะสุกแก่ที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยและ IMOs เจริญการค้ำ คือ 308.92 ± 0.43 , 313.58 ± 0.60 และ 408.48 ± 1.09 Kg/m^3 ตามลำดับ และเมื่อทำการเปรียบเทียบพบว่าผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่าที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยมีค่าความหนาแน่นรวมต่ำกว่าในผง IMOs จากแป้ง

ข้าวระยะสุกแก่ที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย ($P \leq 0.05$) และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับ IMO's เจริญการค้า พบว่า IMO's จากแป้งข้าวระยะเฒ่าและแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยมีค่าความหนาแน่นรวมสูงกว่าของ IMO's เจริญการค้า ($P \leq 0.05$) การที่พบค่าความหนาแน่นของ IMO's จากแป้งข้าวระยะเฒ่า แป้งข้าวระยะสุกแก่ ที่ต่ำกว่า IMO's เจริญการค้าเนื่องจากอนุภาคของผงมีขนาดใหญ่กว่า ซึ่งแตกต่างจาก IMO's เจริญการค้ามีอนุภาคของผงขนาดเล็กที่เรียบและมีรูปร่างที่คล้ายกันทำให้มีปริมาตรต่ำ โดยขนาดของอนุภาคผงเล็กทำให้มีช่องว่างระหว่างอนุภาคน้อยลง ส่งผลให้ทำให้ความหนาแน่นรวมเพิ่มขึ้น แต่สำหรับ IMO's ข้าวระยะเฒ่าและระยะสุกแก่มีอนุภาคขนาดใหญ่ ทำให้มีปริมาตรสูง และส่งผลต่อค่าความหนาแน่นรวมที่ลดลง ซึ่งค่าความหนาแน่นรวมที่สูงมีผลดีต่อการบรรจุและการขนส่ง (Tontul and Topuz, 2017)

จากการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายของ IMO's จากแป้งข้าวระยะเฒ่า แป้งข้าวระยะสุกแก่ที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยและ IMO's เจริญการค้า คือ ร้อยละ 19.94 ± 0.38 19.58 ± 0.68 และ 20.64 ± 0.40 ตามลำดับ และเมื่อทำการเปรียบเทียบพบว่า IMO's จากแป้งข้าวระยะเฒ่า มีค่าความสามารถในการละลายไม่แตกต่างกันกับ IMO's จากแป้งข้าวระยะสุกแก่ เนื่องจาก ใน IMO's จากแป้งข้าวทั้งสองระยะมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบหลัก จึงทำให้ละลายน้ำได้ดี เพราะน้ำตาลกลูโคสมีขนาดโมเลกุลที่เล็ก (6 คาร์บอน) ซึ่งละลายได้ง่ายในน้ำ เพราะมีกลุ่ม OH ที่มีขั้วจำนวนหนึ่งติดอยู่กับคาร์บอน นอกจากนี้ยังมีไอโซมอลโตสเป็นองค์ประกอบที่มีคุณสมบัติที่ช่วยในเรื่องของการละลายน้ำได้ดีเหมือนกับ IMO's เจริญการค้าที่มีคุณสมบัติที่ช่วยในเรื่องของการละลายน้ำได้ดีและการป้องกันการเกาะเป็นก้อน (Srondech et al., 2018) ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการละลายจึงไม่พบความแตกต่างกัน ($P > 0.05$) และเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่าง IMO's ที่ผลิตจากแป้งข้าวระยะสุกแก่กับ IMO's เจริญการค้า พบว่า IMO's เจริญการค้ามีค่าความสามารถในการละลายสูงกว่า ($P \leq 0.05$) อาจจะเนื่องจากขนาดอนุภาคของ IMO's เจริญการค้าที่เล็กกว่าของ IMO's จากแป้งข้าวระยะเฒ่าและสุกแก่ (โดยดูจากสายตา) ดังนั้น IMO's เจริญการค้าที่มีขนาดอนุภาคเล็ก จึงทำให้มีพื้นที่ผิวที่มากกว่าและทำให้น้ำแทรกซึมเข้าไปในโครงสร้างได้ง่ายกว่า (ศิริพร 2561) ทำให้ค่าความสามารถในการละลายในน้ำได้สูง แต่พบว่า IMO's จากแป้งข้าวระยะเฒ่าที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยมีค่าความสามารถในการละลายไม่แตกต่างกันกับ IMO's เจริญการค้า ($P > 0.05$)

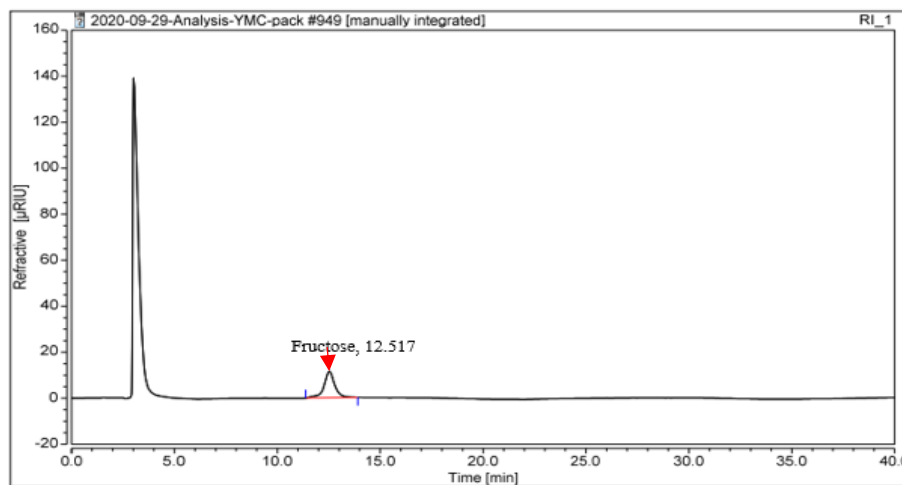
ตารางที่ 19 สมบัติทางกายภาพของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม่าและระยะสุแก่ที่ผ่านการทำ
แห้งแบบพ่นฝอย

ตัวอย่าง IMOs	ค่าสี			ความหนา แน่นรวม (Kg/m ³)	ความสามารถ ในการละลาย (%)
	(L*)	(a*)	(b*)		
ระยะเม่า	92.14±0.54 ^{ab}	-1.55±0.11 ^b	4.22±0.08 ^a	308.92±0.43 ^c	19.94±0.38 ^{ab}
ระยะสุแก่	91.38±0.01 ^b	-1.59±0.10 ^{ab}	4.09±0.53 ^a	313.58±0.60 ^b	19.58±0.68 ^b
เชิงการค้า	92.22±0.44 ^a	-1.76±0.05 ^a	0.71±0.0 ^b	408.48±1.09 ^a	20.64±0.40 ^a

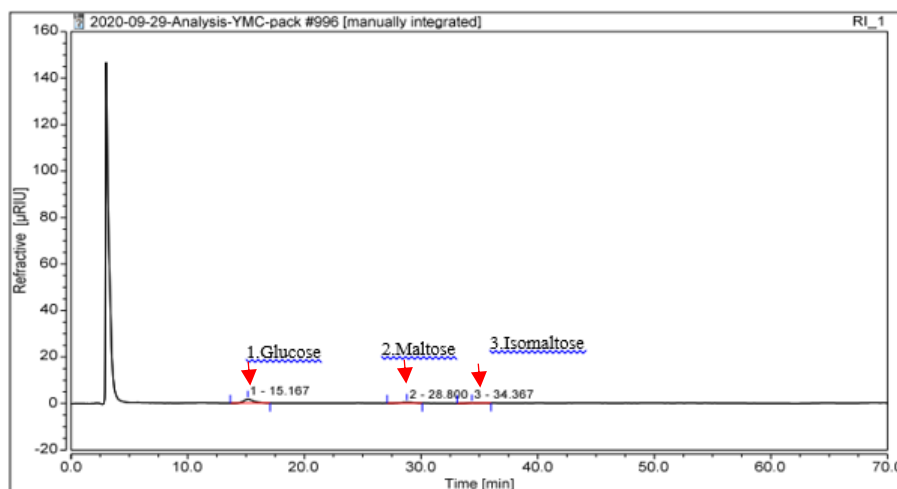
หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น
ร้อยละ 95

การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลและไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์ โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ดังนี้ ฟรุคโตส กลูโคส มอลโตส ไอโซมอลโตส มอลโทไตรโอส ไอโซมอลโทไตรโอส พาโนส และไอโซพาโนส ดังรายละเอียดที่ได้กล่าวมาก่อนหน้านี้แล้ว เมื่อทำการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลและไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคารไรด์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักโดยใช้เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC) ได้แก่ กลูโคส มอลโตส และไอโซมอลโตส ซึ่งมี Retention Time คือ 15.41 29.43 และ 35.15 นาที ตามลำดับ โดยสารมาตรฐานมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (Coefficient of Determination) ดังนี้ น้ำตาลฟรุคโตส มีค่า $R^2 = 0.9968$ (ภาพที่ 68) น้ำตาลกลูโคส มีค่า $R^2 = 0.9995$ น้ำตาลมอลโตสมีค่า $R^2 = 0.9986$ และไอโซมอลโตส มีค่า $R^2 = 0.9982$ (ภาพที่ 69)

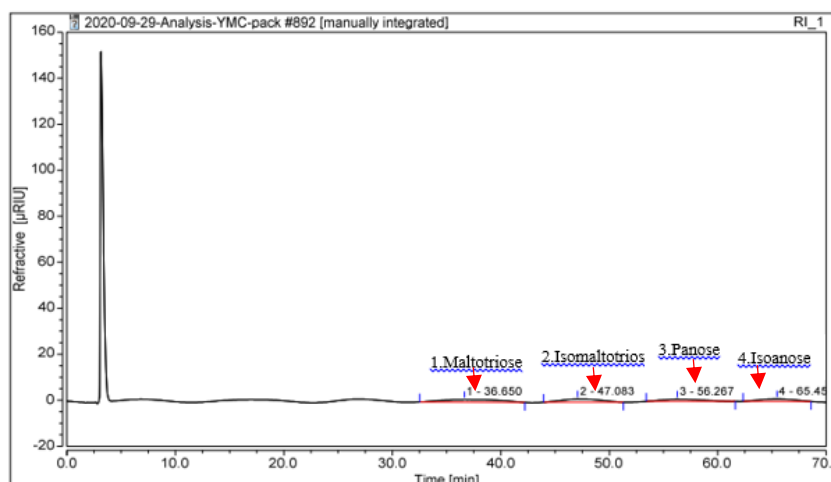
สำหรับการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของโอลิโกแซ็กคารไรด์โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC) โดยใช้สารมาตรฐานดังนี้ มอลโทไตรโอส ไอโซมอลโทไตรโอส พาโนส และไอโซพาโนส ซึ่งมี Retention Time คือ 36.650 47.063 56.267 และ 65.450 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 70) โดยสารมาตรฐานมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (Coefficient of Determination) ดังนี้ มอลโทไตรโอส มีค่า $R^2 = 0.9972$ ไอโซมอลโทไตรโอส มีค่า $R^2 = 0.9959$ พาโนส มีค่า $R^2 = 0.9987$ และมีไอโซพาโนส มีค่า $R^2 = 0.9987$



ภาพที่ 68 Chromatogram ของสารมาตรฐานฟรุกโตสที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC)

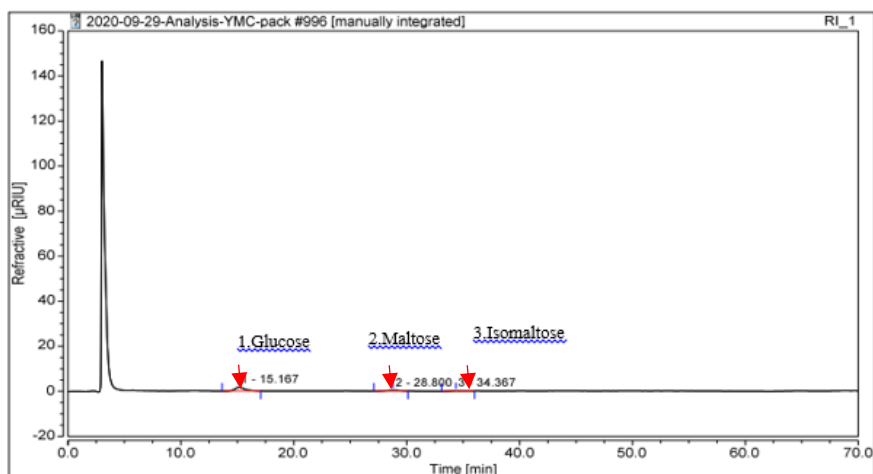


ภาพที่ 69 Chromatogram ของสารมาตรฐานกลูโคส มอลโตส และไอโซมอลโตสที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC)

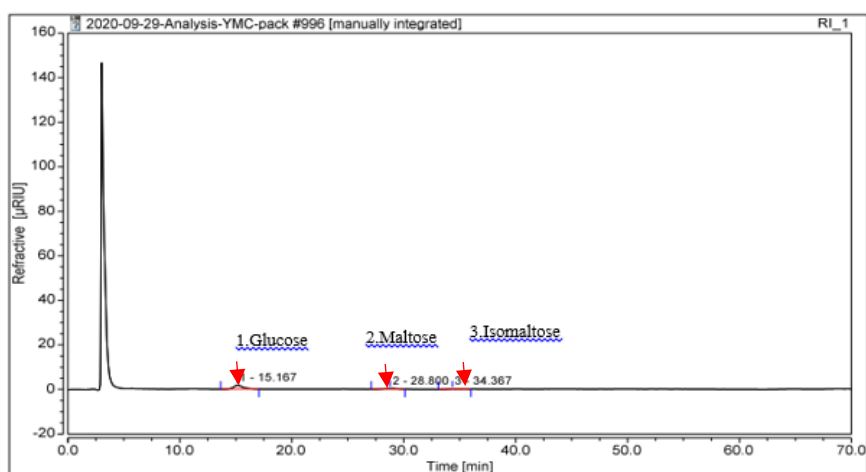


ภาพที่ 70 Chromatogram สารมาตรฐานของไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ประเภทต่าง ๆ ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (Ultra High Performance Liquid Chromatography: UHPLC)

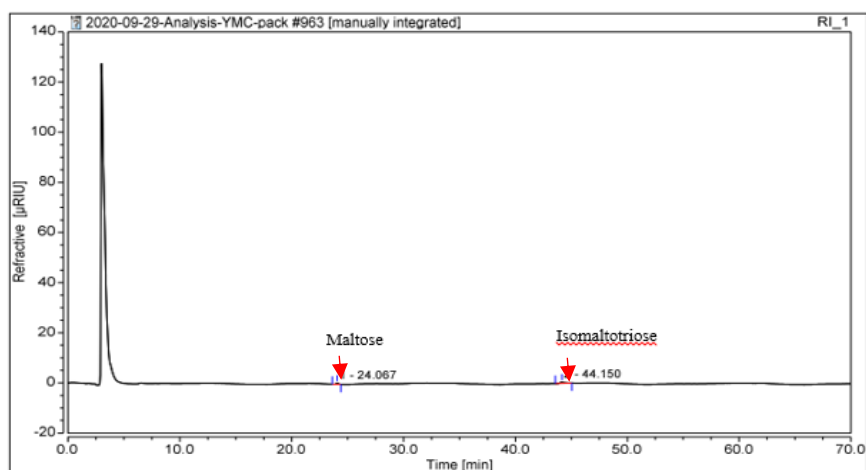
จากการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลและไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ในผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่าและระยะสุกแก่หลังจากการทำแห้งแบบพ่นฝอย และ IMOs เชิงการค้า ดังแสดงใน Chromatogram (ภาพที่ 71) พบกลูโคส มอลโตส ไอโซมอลโตส และ ไอโซมอลโทไตรออส ซึ่งมี Retention Time คือ 15.41 29.43 35.15 และ 44.510 นาที ตามลำดับจากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลของผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่าและแป้งข้าวระยะสุกแก่หลังจากการทำแห้งแบบพ่นฝอย ดังแสดงในตารางที่ 20 พบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเม่าและข้าวระยะสุกแก่ก่อนนำไปทำแห้งแบบพ่นฝอย คือ 84.49 ± 0.17 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 84.92 ± 0.97 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ($P > 0.05$) และในส่วนของปริมาณน้ำตาลกลูโคสของผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่าและระยะสุกแก่หลังจากการทำแห้งแบบพ่นฝอย คือ 84.92 ± 0.97 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 84.82 ± 0.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเปรียบเทียบกันระหว่างก่อนและหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอยของน้ำเชื่อมข้าวระยะเม่าและระยะสุกแก่ พบว่าการทำแห้งแบบพ่นฝอยไม่ทำให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)



(ก)



(ข)



(ค)

ภาพที่ 71 Chromatogram ของการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลและไอโซมอลโตลิโกแซ็กคาร์ไรด์ ของผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่า (ก) แป้งข้าวระยะสุกแก่ (ข) และ IMOs เชิงการค้า (ค)

สำหรับปริมาณน้ำตาลมอลโตสของ IMOs จากแป้งข้าวระยะเมื่อก่อนการนำไปทำแห้งแบบพ่นฝอย มีปริมาณ 40.47 ± 21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบปริมาณน้ำตาลมอลโตสของ IMOs จากแป้งข้าวระยะเมื่อก่อนการนำไปทำแห้งแบบพ่นฝอย คือ 39.56 ± 0.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลมอลโตสกันระหว่างก่อนและหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่าการทำแห้งแบบพ่นฝอยไม่ทำให้ปริมาณน้ำตาลมอลโตสลดลง ($P > 0.05$) ส่วนปริมาณน้ำตาลมอลโตส IMOs จากแป้งข้าวระยะสุกก่อนการนำไปทำแห้งแบบพ่นฝอย คือ 43.20 ± 0.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบปริมาณน้ำตาลมอลโตสของ IMOs จากแป้งข้าวระยะสุกแก่ คือ 40.95 ± 0.80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกัน ($P \leq 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลมอลโตสของ IMOs จากแป้งข้าวระยะเมื่อก่อนและแป้งข้าวระยะสุกแก่หลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่าความแตกต่างกัน ($P \leq 0.05$)

สำหรับปริมาณไอโซมอลโตสของ IMOs จากแป้งข้าวระยะเมื่อก่อนและหลังจากการทำแห้งแบบพ่นฝอย คือ 40.37 ± 0.64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 40.42 ± 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) สำหรับปริมาณไอโซมอลโตสของ IMOs จากแป้งข้าวระยะสุกแก่ คือ 40.42 ± 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 40.54 ± 0.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไอโซมอลโตสของ IMOs จากแป้งข้าวระยะเมื่อก่อนและระยะสุกแก่หลังจากการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่าไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นได้ว่าการทำแห้งแบบพ่นฝอยทำให้ปริมาณของไอโซมอลโตสหลงเหลืออยู่

ตารางที่ 20 ปริมาณน้ำตาลและไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ของน้ำเชื่อมข้าวระยะเมื่อก่อนและระยะสุกแก่ ก่อนและหลังจากการทำแห้งแบบพ่นฝอย

ตัวอย่างแป้งข้าว	ปริมาณกลูโคส (มก/มล) ^(ns)	ปริมาณมอลโตส (มก/มล)	ปริมาณไอโซมอลโตส (มก/มล) ^(ns)
ระยะเมื่อก่อน (ก่อนทำแห้ง)	84.49 ± 0.17	$40.47 \pm 21b^{bc}$	40.37 ± 0.64
ระยะเมื่อก่อน (หลังทำแห้ง)	84.83 ± 1.07	39.56 ± 0.30^c	40.42 ± 0.50
ระยะสุกแก่ (ก่อนทำแห้ง)	84.92 ± 0.97	43.20 ± 0.58^a	40.43 ± 0.40
ระยะสุกแก่ (หลังทำแห้ง)	84.82 ± 0.31	40.95 ± 0.80^b	40.54 ± 0.09

หมายเหตุ: ^{a-c} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

^(ns) ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

องค์ประกอบของ IMOs จากแป้งข้าวระยะเฝ้าและระยะสุกแก่ที่ผ่านการการทำแห้งแบบพ่นฝอย ซึ่งจะประกอบไปด้วย น้ำตาลกลูโคส มอลโตส และไอโซมอลโตส จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของ IMOs จากแป้งข้าวระยะเฝ้าและระยะสุกแก่ที่ผ่านการการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบน้ำตาลกลูโคสเป็น องค์ประกอบมากที่สุด และพบว่าน้ำตาลมอลโตสและไอโซมอลโตสมีปริมาณใกล้เคียงกัน โดยมี รายละเอียดของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดดังนี้ ปริมาณร้อยละของกลูโคสของ IMOs จากแป้งข้าวระยะเฝ้าและระยะสุกแก่ คือ 51.10 ± 0.10 และ 50.38 ± 0.28 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณร้อยละของน้ำตาลกลูโคสระหว่างผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเฝ้าและระยะสุกแก่ พบว่าปริมาณร้อยละน้ำตาลกลูโคสในผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเฝ้าและผง IMOs จากแป้งข้าวระยะสุกแก่ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) สำหรับปริมาณน้ำตาลมอลโตสของผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเฝ้าและระยะสุกแก่ คือ ร้อยละ 24.24 ± 0.41 และ 23.99 ± 0.15 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณของน้ำตาลมอลโตสระหว่างผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเฝ้าและระยะสุกแก่ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ในส่วนของปริมาณไอโซมอลโตสของ IMOs จากแป้งข้าวระยะเฝ้าและระยะสุกแก่ คือ ร้อยละ 24.42 ± 0.08 และ 23.99 ± 0.54 ตามลำดับและเมื่อเปรียบเทียบร้อยละไอโซมอลโตสระหว่างผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเฝ้าและระยะสุกแก่ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตารางที่ 21 องค์ประกอบน้ำตาลและไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ของผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเฝ้าและระยะสุกแก่

ตัวอย่าง IMOs แป้งข้าวระยะต่าง ๆ	น้ำตาลกลูโคส (%)	น้ำตาลมอลโตส ^(ns) (%)	ไอโซมอลโตส ^(ns) (%)
ข้าวระยะเฝ้า	51.10 ± 0.10^a	24.24 ± 0.41	24.42 ± 0.08
ข้าวระยะสุกแก่	50.38 ± 0.28^b	23.99 ± 0.15	23.99 ± 0.54

หมายเหตุ: ^{a-b} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

^(ns) ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากการวิเคราะห์ปริมาณของ IMOs จากแป้งข้าวระยะเฝ้า แป้งข้าวระยะสุกแก่และ IMOs เชิงการค้า พบว่าผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเฝ้าและระยะสุกแก่ ซึ่งประกอบ น้ำตาลกลูโคส มอลโตส และไอโซมอลโตส แต่ IMOs เชิงการค้า พบ มอลโตสและไอโซมอลโทไตรออส สำหรับผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเฝ้าและระยะสุกแก่ที่ผ่านการการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบน้ำตาลกลูโคสเป็น

องค์ประกอบมากที่สุด คือ 117.85 ± 0.29 และ 108.35 ± 0.41 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 22) เมื่อเปรียบเทียบกัน พบว่า ผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่า พบว่ามีปริมาณกลูโคสมากกว่าในผง IMOs จากแป้งข้าวระยะสุกแก่ ($P \leq 0.05$) แต่จะไม่พบไอโซมอลโตสในผง IMOs เจริญการค้า

ส่วนน้ำตาลมอลโตส พบว่าผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่า แป้งระยะสุกแก่ที่และ IMOs เจริญการค้า คือ 53.51 ± 0.19 มิลลิกรัมต่อกรัม 55.12 ± 0.45 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 54.95 ± 0.80 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบ พบว่าผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่าจะมีปริมาณมอลโตสต่ำกว่าในผง IMOs จากแป้งข้าวระยะสุกแก่และ IMOs เจริญการค้า ($P \leq 0.05$) แต่พบว่าผง IMOs จากแป้งข้าวระยะสุกแก่และ IMOs เจริญการค้า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) และ พบว่าผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่าและระยะสุกแก่ที่ผ่านการการทำแห้งแบบพ่นฝอย มีปริมาณไอโซมอลโตสเท่ากับ 53.37 ± 0.07 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 52.58 ± 0.64 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่พบว่าไม่พบ IMOs ชนิดไอโซมอลโตสในในผง IMOs เจริญการค้า โดย IMOs ทางการค้าพบ IMOs ชนิด ไอโซมอลโทไโดส ซึ่งมีปริมาณ 59.95 ± 0.80 มิลลิกรัมต่อกรัม อาจจะเนื่องมาจากวิธีการผลิตที่แตกต่างกันโดย IMOs เจริญการค้าอาจใช้เอนไซม์ในการผลิตจึงทำให้ได้ IMOs ชนิดที่ต่างกับการทดลองนี้ที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการผลิต นอกจากนี้ วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต IMOs ก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ทำให้ได้ IMOs ที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 22 ปริมาณน้ำตาลและไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์ของ IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่า แป้งข้าวระยะสุกแก่ และ IMOs เจริญการค้า

ตัวอย่าง IMOs	ปริมาณ กลูโคส (มก/ก)	ปริมาณ มอลโตส (มก/ก)	ปริมาณ ไอโซมอลโตส (มก/ก) ^(ns)	ปริมาณไอโซ มอลโทไโดส (มก/ก)
ข้าวระยะเม่า	117.85 ± 0.29^a	53.51 ± 0.19^b	53.37 ± 0.07	-
ข้าวระยะสุกแก่	108.35 ± 0.41^b	55.12 ± 0.45^a	52.58 ± 0.64	-
เจริญการค้า	-	54.95 ± 0.80^a	-	59.95 ± 0.80

หมายเหตุ: ^{a-b} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึงค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

^(ns) ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

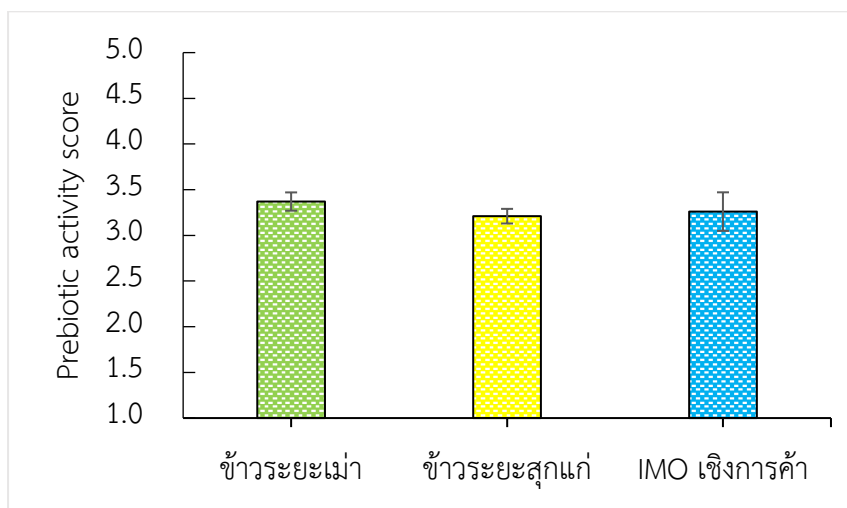
4.5.1 การทดสอบคุณสมบัติพรีไบโอติก

การวิเคราะห์คุณสมบัติพรีไบโอติกจะใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติก (probiotics) ซึ่งโพรไบโอติก คือ จุลินทรีย์ที่มีชีวิตมีหลายร้อยสายพันธุ์ทั้งแบคทีเรียและยีสต์ เช่น แลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus*) ไบฟิโดแบคทีเรียม (*Bifidobacterium*) และแซ็กคาโรไมซีส (*Saccharomyces*) ซึ่งแต่ละสายพันธุ์มีประโยชน์ที่แตกต่างกันไป พวกมันมักถูกเรียกว่าจุลินทรีย์ชนิดดีมีประโยชน์ในการลดปริมาณจุลินทรีย์ชนิดไม่ดีช่วยกำจัดเชื้อโรคและเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อเป็นการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่เป็นโทษต่อร่างกาย (Thammarutwasik et al., 2009)

จากการทดสอบวัดเป็นคะแนนกิจกรรมพรีไบโอติก (prebiotic activity score) จากการดำเนินการโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย คือ *L. acidophilus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ (Barthow et al., 2016) โดยจะทำการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อในลำไส้ ซึ่งในการทดลองนี้จะทำการเปรียบเทียบกับเชื้อก่อโรค คือ *Escherichia coli* หรือ *E. coli* เป็นเชื้อแบคทีเรียประจำถิ่น (Normal flora) ที่พบได้ในลำไส้ของคนและสัตว์เลื้อยคลาน โดยปกติจะไม่ทำอันตรายหรือก่อโรคร้ายแรง เมื่ออยู่ในลำไส้จะช่วยย่อยอาหารที่เรารับประทานเข้าไป แต่หากเชื้อ *E. coli* ลุกล้ำ เข้าสู่ระบบต่าง ๆ ของร่างกายก็จะทำให้เกิดโรคติดเชื้อรุนแรง เช่น โรคติดเชื้อระบบทางเดินปัสสาวะ โรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ และการติดเชื้อในกระแสเลือด เป็นต้น (Johnson and Russo, 2002) การเลือกใช้เชื้อแบคทีเรีย *L. acidophilus* เนื่องจากมีความสามารถในการอยู่รอด (viability) บริเวณที่ยึดเกาะในระบบทางเดินอาหาร มีความปลอดภัยไม่ก่อให้เกิดโรค ไม่สร้างสารพิษ และมีความสามารถในการสร้างสารต่าง ๆ เช่น กรดอะซิติก กรดแลคติก ซึ่งสารดังกล่าวมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม เอนเทอริกแบคทีเรีย (enteric bacteria) เช่น *E. coli* และ *Salmonella* spp. (Lin et al., 2005)

การทดสอบกิจกรรมพรีไบโอติกจะใช้เชื้อ *L. acidophilus* กับเชื้อ *E. coli* เพื่อเปรียบเทียบการเจริญในอาหารพรีไบโอติก โดยใช้ได้แก่ ผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่าและผง IMOs จากแป้งข้าวระยะสุกแก่ เปรียบเทียบกับ IMOs เเชิงการค้า ที่ซึ่งทำการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อยืนยันคุณสมบัติทางพรีไบโอติก โดยเชื้อ *L. acidophilus* (ภาพที่ 72) จากการทดสอบกิจกรรมพรีไบโอติกโดยเชื้อ *L. acidophilus* ของผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่า ผง IMOs จากแป้งข้าวระยะสุกแก่ และ IMOs เเชิงการค้า มีค่าคะแนนกิจกรรมพรีไบโอติก (prebiotic activity score) คือ 3.26 ± 0.21 , 3.35 ± 0.10 และ 3.21 ± 0.08 ตามลำดับ และเมื่อทำการเปรียบเทียบกันระหว่างผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่าและผง IMOs จากแป้งข้าวระยะสุกแก่ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) นอกจากนี้ เมื่อทำการเปรียบเทียบผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่า ผง IMOs จากแป้งข้าวระยะสุกแก่ กับ IMOs เเชิงการค้า พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้ผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่าและแป้งข้าวระยะสุกแก่มีคุณสมบัติพรีไบโอติกเทียบเท่ากับ IMOs เเชิงการค้า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *L. acidophilus* สามารถใช้ผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่า

ผง IMOs จากแป้งข้าวระยะสุกแก่ที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยเป็นแหล่งพลังงานหรือมาใช้เป็นอาหารในการเจริญและกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *L. acidophilus* ได้ดี



ภาพที่ 72 คะแนนกิจกรรมพรีไบโอติกของผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเม่า แป้งข้าวข้าวระยะสุกแก่เปรียบเทียบกับผง IMOs เจริญการค้าที่ทดสอบโดยใช้เชื้อ *L. acidophilus*

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การประเมินวิธีทางเลือกในการผลิต IMOs ในรูปแบบที่ไม่ซับซ้อนด้วยวิธีทางจุลินทรีย์โดยใช้เชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3102 และ *A. niger* TISTR. 3012 โดยใช้ข้าวระยะเมาเป็นสารตั้งต้น และทำหมักแบบระบบของแข็ง และเตรียมจุลินทรีย์ในรูปแบบของแข็ง พบว่าเชื้อราทั้งสองชนิด สามารถผลิต IMOs ชนิด ไอโซมอลโตส ได้ในการหมักแบบขั้นตอนเดียว และพบว่าเมื่อใช้ระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ได้ปริมาณ IMOs มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และพบสูงสุดในวันที่ 7 ของการหมักของราทั้งสองชนิด ซึ่งปริมาณ ไอโซมอลโตสที่ได้ของราทั้งสองไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) แต่พบว่าหมักด้วยสปอร์ของเชื้อรา *A. oryzae* ได้ ปริมาณน้ำเชื่อมที่สูงกว่าการหมักด้วยสปอร์ของเชื้อรา *A. niger* ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อรา *A. oryzae* ไปใช้ในการทดลองต่อไป

การใช้แป้งข้าวระยะเมาและระยะสุกแก่เป็นสารตั้งต้นในการผลิต IMOs โดยใช้สปอร์ของเชื้อราที่ผ่านการคัดเลือกคือ *A. oryzae* และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 7 วัน พบน้ำตาล กลูโคส มอลโตสและ IMOs ชนิด ไอโซมอลโตสที่หมักด้วยสปอร์ของเชื้อราในข้าวทั้งสองระยะที่ได้ผลผลิตของกลูโคส มอลโตส และไอโซมอลโตสมากที่สุด และพบว่ากลูโคส มอลโตส และ IMOs ชนิด ไอโซมอลโตสในแป้งข้าวระยะเมาและระยะสุกแก่ที่ได้ไม่แตกต่างกัน

การขยายกำลังการผลิตน้ำเชื่อม IMOs จากแป้งข้าวระยะเมาและระยะสุกแก่ ที่ระดับกำลังการผลิต 2 กิโลกรัม และใช้สปอร์ของเชื้อรา *A. oryzae* พบ น้ำตาลกลูโคส คือ ร้อยละ 89.86 และ 89.28 ตามลำดับ น้ำตาลมอลโตส คือ ร้อยละ 5.56 และ 5.24 และไอโซมอลโตส คือ ร้อยละ 5.24 และ 5.26 สำหรับแป้งข้าวระยะเมาและระยะสุกแก่ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าปริมาณร้อยละผลผลิตที่ได้ของไอโซมอลโตสที่ได้ลดลง หลังจากกระบวนการกำจัดกลูโคสด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* พบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสของน้ำเชื่อมจากแป้งข้าวระยะเมาและระยะสุกแก่ลดลงร้อยละ 75.50 และ 76.08 ตามลำดับ เช่นเดียวกับปริมาณน้ำตาลมอลโตสลดลงเป็นร้อยละ 11.37 และ 10.06 ตามลำดับ ส่วนปริมาณไอโซมอลโตสพบว่าไม่เปลี่ยนแปลงในขั้นตอนการกำจัดกลูโคส เมื่อผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย พบว่าปริมาณขององค์ประกอบของน้ำตาลและโอลิโกแซคคาไรด์ไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งองค์ประกอบของผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเมาและระยะสุกแก่ประกอบไปด้วย น้ำตาลกลูโคส มอลโตสและไอโซมอลโตส ซึ่งมีปริมาณไม่แตกต่างกันทางสถิติระหว่างแป้งข้าวสองระยะ ($P>0.05$) ส่วน IMOs ทางการค้าที่พบ คือ น้ำตาลมอลโตสและไอโซมอลโทไโดส นอกจากนี้พบว่าปริมาณความชื้นและค่า Water activity ของ IMOs จากแป้งข้าวระยะเมา แป้งข้าวระยะสุกแก่

และ IMO เจริญการค้าอยู่ในช่วงที่ปลอดภัยจากการเจริญของจุลินทรีย์ เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการละลายระหว่างผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเฒ่าและระยะสุกแก่ กับ IMOs เจริญการค้าพบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) และพบว่าผง IMOs จากแป้งข้าวระยะเฒ่าและแป้งข้าวระยะสุกแก่ ที่ได้จากการทดลองมีคะแนนกิจกรรมพรีไบโอติก ที่ไม่แตกต่างกับ IMOs เจริญการค้า และสามารถนำไปใช้เป็นผงขงดื่มได้

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

- กองวิจัยและพัฒนาข้าว. (2559). “ข้าว”,
<http://www.ricethailand.go.th/rkb3/title-index.php>
 file=content.php&id=112.htm. 29 เมษายน, 2562.
- กวิตา แก้วชูเชิด และคณะ. “การศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและระยะเวลาการเติมซูโครสที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเดกซ์แทรนจากแบคทีเรียแลคติก”, **วารสารวิจัยราชภัฏพระนคร**. 15(2): 47-62; กรกฎาคม – ธันวาคม, 2563.
- กล้าณรงค์ ศรีรอด และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. **เทคโนโลยีของแป้ง**. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2546.
- เดชาวุฒิ วานิชสรรพ และคณะ. “ขั้นตอนวิธีนับจำนวนเชือบนแผ่นฮีโมซีโตมิเตอร์ด้วยเทคนิคประมวลผลภาพ และดีพีสแกน”, **วารสารเทคโนโลยีสารสนเทศ**. 11(2): 56-61; กรกฎาคม - ธันวาคม, 2558.
- จิรนาถ บุญคง, ทิพวรรณ บุญมี และพัชรวรรณ เรือนแก้ว. “การใช้แป้งกล้วยหอมทองดิบที่มีสมบัติต้านทานการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในผลิตภัณฑ์พาสต้า”, **วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม**. 10(1): 19-29; ตุลาคม – กันยายน, 2558.
- จุฬาลักษณ์ จวนสง. **ผลของสภาวะในการเกิดเจลาตินในเซชันต่อปริมาณ Slowly digestible starch และ Resistant starch ของแป้งพุทธรักษาที่ผ่านการดัดแปรทางกายภาพและเคมี**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, 2553.
- ณัชชชี รัชปภาส์มณ, สันทณีย์ ปัญจอนันท์ และดุขฎิ อุดภาพ. “ผลของการดัดแปรแป้งด้วยวิธีการใช้ความร้อนขึ้นต่อสมบัติและโครงสร้างของแป้งที่มีโครงสร้างผลึกแบบ A และ B”, **วารสารวิจัยและพัฒนา มจร**. 39(2): 257-270; เมษายน – มิถุนายน, 2559.
- ธรรมนวรรณ ปั่นแก้ว, กนกกาญจน์ หนองขุนสาร และศศิธร ใบผ่อง. “ปริมาณมอลโตเด็กซ์ทรินที่เหมาะสมในการผลิตเครื่องดื่มเยื่อฟักข้าวชนิดผง”, **วารสารวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร**. 1(1): 1-11; มกราคม - เมษายน, 2559.
- ธาดา สืบหลินวงศ์ และนวลทิพย์ กลมลอวารินทร์. **ชีวะเคมีทางการแพทย์**. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2537.
- ประกานต์ ฤทธิกุลธำรง และ จารุณี ควรพิบูลย์. “ฟรีโอบีโอติกออาหารส่งเสริมสุขภาพ”, **วารสารธรรมศาสตร์เวชสาร**. 12(2): 362-369; พฤษภาคม - สิงหาคม, 2555.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- กระทรวงสาธารณสุข. “สารเจือปนในอาหาร”, ประกาศกระทรวงสาธารณสุข. (2559).
http://food.fda.moph.go.th/law/announ_fda.php. 14 พฤศจิกายน, 2564.
- ปาริตา ขุนแอ. ผลของการดัดแปรด้วยวิธีความร้อนขึ้นต่อสมบัติทางรีโอโลยีและการ
 เกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ชข้าวที่มีปริมาณอะไมโลสแตกต่างกัน. วิทยานิพนธ์
 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2550.
- พิไลรัก อินธิปัญญา และธนกิจ ถาหมี่. “ผลของกระบวนการอบแห้งแบบพ่นฝอยต่อคุณภาพ
 ของน้ำหม่อนผสมน้ำผึ้งชนิดผง”, วารสารการเกษตร. 32(2): 139-153;
 พฤษภาคม - สิงหาคม, 2557.
- เพชรดา ทองเงิน และคณะ. “การลดต้นทุนการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสในกระบวนการผลิต
 เอทานอลจากมันสำปะหลังด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* MGT1/1”,
 วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. 22(2): 35-46;
 พฤษภาคม - สิงหาคม, 2564.
- ภักธีมา สุขพันธ์. การพัฒนาผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองเสริมโปรไบโอติกสำหรับผู้บริโภคสูงอายุ.
 วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2552.
- ยุทธชัย เพชรรัตน์ไพศาล. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาร์ไรด์จากแป้ง
 มันสำปะหลัง. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี,
 2557.
- รัชฎา แก่นสาร. ชีวเคมี. นนทบุรี: พิมพ์ลักษณ์โครงการสวัสดิการวิชาการสถาบันพระบรมราชชนก,
 2551.
- สันทนต์ วิเชียรโชติ. การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร
 จากรำข้าว. สงขลา: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2561.
- สันทณีย์ ปัญจอนันท์, วิทวัส จิรนนท์กุล และดุขฎิ อุตภาพ. “สมบัติทางเคมีกายภาพและ
 โครงสร้างโมเลกุลของแป้งกลอย (*Dioscorea hispida* Dennst.) และแป้งมันมือเสือ
 (*Dioscorea esculenta* (Lour.) Burkill)”, วารสารวิจัยและพัฒนา มจร. 37(2):
 185-198; เมษายน- มิถุนายน, 2557.
- สมาคมผู้ส่งออกข้าวไทย. (2561). “ราคาข้าว”, http://www.thairiceexporters.or.th/default_th.htm. 18 พฤษภาคม, 2562.
- วัชรเกียรติ อินธิเดช. การศึกษาการผลิตแป้งที่ย่อยได้จากข้าวสองระยะ. คณะเกษตรศาสตร์:
 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2559.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- วิจิตร เทลียวตระกูล และวชิรญา เทลียวตระกูล. "ผลของวิธีการตัดแปรรูปด้วยกรดและ
พรีเจลาตินในเซชันต่อสมบัติทางเคมีกายภาพของแป้งกระเจี๊ยบ", **วารสารเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยสยาม**. 15(2): 82-95; กรกฎาคม – ธันวาคม, 2563.
- ศิริพร สอนสมบูรณ์สุข. **การพัฒนาผลิตภัณฑ์มะตูมผงสำเร็จรูปด้วยการทำแห้งแบบพ่นฝอย**.
วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, 2561.
- สุธรรมา พิสุทธิโสพน. **สถานะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำตาลสดผงโดยใช้เครื่องอบแห้ง
แบบพ่นฝอย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต: มหาวิทยาลัยนเรศวร,
2547.
- สุวิมล โชคชัยสวัสดิ์. **การผลิตไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์จากแป้งกล้วยและการประยุกต์ใช้ใน
ผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต**. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, 2552.
- สโรบล สโรชวิสิต. **การทำสับประรดผงโดยการอบแห้งแบบพ่นฝอย**. คณะวิศวกรรมศาสตร์:
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, 2549.
- อรอนงค์ นัยวิกุล. **ข้าว**. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2550.
- อริญา ลากโคกสูง. **ผลของปริมาณอะไมโลสและโครงสร้างอะไมโลเพคตินในสตาร์ช พันธุ์ต่าง ๆ
ต่อการเกิดแป้งทนต่อการย่อยของเอนไซม์ชนิดที่ 3**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร
มหาบัณฑิต: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, 2555.
- อาทิตย์ ภาณุมา และคณะ. “การประเมินปริมาณอะไมโลสเนื้อสัมผัสและคุณภาพการหุงต้มของข้าว
เหนียวพันธุ์คัดเลือกบางสายพันธุ์”, **วารสารแก่นเกษตร**. 48(3): 597-606; ตุลาคม –
ธันวาคม, 2562.
- Andreola A and et al. “Agglomeration process of rice protein Concentrate using
glucomannan as binder In-line monitoring of particle size”, **Chemical
Engineering Research and Design**. 135(15): 37-51; July, 2018.
- Alcázar-Alay, Sylvia Carolina and Maria Angela Almeida Meireles. “Physicochemical
properties, modifications and applications of starches from different
botanical sources”, **Food Science and Technology**. 35(2): 215-236; June,
2015
- AOAC. **Official Methods of Analysis of Analytical chemists**. 17th ed. Maryland:
The Association of Official Analytical. Chemists, 2000.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- ARAI, Eiko, and Tomio ITANI. “Effects of harvesting time on sweetness of cooked rice and activity of starch-degradation enzymes of rice grains”, **Food science and technology research**. 10(3): 282-289; November, 2003 - March, 2004.
- Barkouti, A. and et al. “Influence of Physicochemical Binder Properties on Agglomeration of Wheat Powder in Couscous Grain”, **Journal of Food Engineering**. 111(2): 234-240; July, 2012.
- Barthow, Christine and et al. “The Probiotics in Pregnancy Study (PiP Study): rationale and design of a double-blind randomised controlled trial to improve maternal health during pregnancy and prevent infant eczema and allergy”, **BMC pregnancy and childbirth**. 133(1): 1-14; June, 2016.
- Bello-Perez and et al. **Some structural, physicochemical and functional studies of banana starches isolated from two varieties growing in Guerrero, Mexico**. Germany: Wiley-VCH GmbH, 2000.
- Beck, E. and Ziegler, P. “Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. Annu Rev”, **Plant Physiol**. 40(1): 95–117; June, 1989.
- BeMiller, James N. **Carbohydrate chemistry for food scientists**. New York: Elsevier, 2018.
- Blazek, J. and Les, C. “Amylolysis of wheat starches. II. Degradation patterns of native starch granules with varying functional properties”, **Journal of cereal science**. 52(2): 295-302; September, 2015.
- Capozzi, B. and et al. “Single-molecule diodes with high rectification ratios through environmental control”, **Nature nanotechnology**. 10(6): 522-527; May, 2015.
- Chaovanalikit, A. and Itthisoponkul, T. **Natural colorants from mangosteen rinds**. Bangkok: Srinakharinwirot University, 2011.
- Ali, S. and et al. **Application Of Microbial Alpha Amylase In Sugar**. Institute of Industrial Biotechnology Govt: College University Lahore, 2017.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Chockchaisawasdee, S and Poosaran, N. “Production of isomaltooligosaccharides from banana flour”, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 93: 180-186; June, 2013.
- Cui, Jie and et al. “Production, purification and analysis of the isomaltooligosaccharides from Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume) and the prebiotics effects of them on proliferation of *Lactobacillus*”, **Food and Bioproducts Processing**. 106(1): 75-81; November, 2017.
- Das, D. and Pal, S. **Modified biopolymer-dextrin based crosslinked hydrogel: Application in controlled drug delivery**. Dhanbad India: Indian School of Mines, 2015.
- Dubois, Michel and et al. “Colorimetric method for determination of sugars and related substances”, **Analytical chemistry**. 28(3): 350-356; April, 1956.
- European Food Safety Authority. (2010). “Isomaltooligosaccharides related health Claims”, <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1801>. 16 May, 2019.
- Fischer, R. A., Derek Byerlee and Greg Edmeades. **Crop yields and global food Security**. Canberra: Australian Center for International Agricultural Research, 2014.
- Frankel, Edwin N. “Lipid oxidation: mechanisms, products and biological significance”, **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 61(12): 1908-1917; Desember, 1984.
- Food Standards Australia New Zealand (FSANZ). (2017). “Isomaltooligosaccharide as a novel food”, <http://www.foodstandards.gov.au/code/applications/Pages/A1123IMOasaNovelFood.aspx/>. 16 May, 2019.
- Fuchs, F.M. and et al. “Directed freeze-fracturing of *Bacillus subtilis* biofilms for conventional scanning electron microscopy”, **Journal of Microbiological Method**. 152(1): 165-172; September, 2018.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Fujimoto, Z. and et al. “Isomaltooligosaccharide-binding structure of *Paenibacillus* sp. 598K cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase”, **Bioscience Reports**. 33(2): 1-11; April, 2017.
- Funane, K. and et al. “A novel cyclic isomaltooligosaccharide cycloisomaltodecaose, CI-10) produced by *Bacillus circulans* T-3040 displays remarkable inclusion ability compared with cyclodextrins”, **Journal of Biotechnology**. 130(2): 188-192; June, 2007.
- Ghanbarzadeh, B. and Almasi, H. **Biodegradable Polymers. Biodegradation Life of Science**. London: INTECH open science, 2013.
- Ghoddusi, H. and et al. “In vitro study on gasgeneration and prebiotic effects of some carbohydrates and their mixtures”, **Anaerobe**. 13(5-6): 193-199; October – Desember, 2007.
- Gibson, G.R. **Food Science and Technology Bulletin**. Reading: IFIS Publishing, 2006.
- Goto, C.E. and et al. “Production of amylase by *Aspergillus fumigatus* utilizing alpha-methyl-D-glycoside, a synthetic analogue of maltose, as substrate”, **FEMS Microbiology Letters**. 167(1): 139-143; October, 1998.
- Gourineni, V. and et al. “Gastrointestinal tolerance and glycemic response of isomaltooligosaccharides in healthy adult”, **Nutrients**. 301(10): 1-10; March, 2018.
- Grandview Research. (2017). “Prebiotics market size, share & trend analysis report By ingredients (FOS, Inulin, GOS, MOS), by application (food and beverages, dietary supplements, animal feed), and segment forecasts, 2018 – 2024”, <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/prebiotics-market/>. 16 May, 2019.
- Goula, A M. and Konstantinos G.A. “Stability of lycopene during spray drying of tomato pulp”, **LWT-Food Science and Technology**. 38(5): 479-487; August, 2005.
- Gupta, R. and et al. “Microbial amylases: a biotechnological perspective”, **Process Biochemistry**, 38(11): 1599-1616; July, 2003.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Guzmán-Maldonado and et al. “Amylolytic enzymes and products derived from starch”, **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**. 35(5): 373-403; September, 1995.
- Jenkins, P. J. and A. M. Donald. “The influence of amylose on starch granule structure”, **International Journal of Biological Macromolecules**. 17(6): 315-321; January, 1995.
- Johnson, J.R. and Thomas A. R. “Extraintestinal pathogenic Escherichia coli: “the other bad E coli”, **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. 139(3): 155-162; March, 2002.
- Juliano, B. O. “A simplified assay for milled rice amylose”, **International Journal of Biological Cereal Macromolecules**. 17(6): 334-360; September, 1971.
- Justin, L. and et al. **Health Effects and Sources of Prebiotic Dietary Fiber**. Minnesota: University of Minnesota, 2018.
- Kaneko, T. and et al. “Effects Of isomaltooligosaccharides with different degrees of polymerization on human fecal bifidobacteria”, **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. 58(12): 2288-2290; June, 1994.
- Kasemsuwan, T. and et al. “Effects of Amylopectin Branch Chain Length and Amylose Content on the Gelatinization and Pasting Properties of Starch”, **Cereal Chem**. 76(5): 629-637; June, 1999.
- Kaulpiboon, J. and et al. “Synthesis of long-chain isomaltooligosaccharides from tapioca starch and an in vitro investigation of their prebiotic properties”, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 120(1): 127-135; October, 2015.
- Kaur, M. and et al. “Physicochemical Morphological thermal and rheological properties of starches separate from kernels of some Indian mango cultivars (Mangifera Indica L)”, **Food Chemistry**. 85(1): 131-140; March, 2004.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Kim H.H. and et al. “Production of a fermented organic Rice syrup with higher isomaltoligosaccharide using *Lactobacillus plantarum*”, **Food Science and Biotechnology**. 26(5): 1343-1347; August, 2017.
- Kim, Go-Eun and et al. "Glucosylation of the flavonoid, astragalin by *Leuconostoc mesenteroides* B-512FMCM dextranucrase acceptor reactions and characterization of the products", **Enzyme and microbial technology**. 50(1): 50-56; January, 2012.
- Kobayashi, M., Funane, K. and Oguma. T. “Inhibition of dextran and mutan synthesis by cycloisomaltoligosaccharides”. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 59(10): 1861-1865; January, 1995.
- Konlam, P. and et al. “Role of *Aspergillus oryzae* M-01 in the production of amylase and protease enzymes on soybean Koji prepared for brine fermentation of Tamari soy sauce”, In **The 55th Kasetsart University Annual Conference**. p.720-728. Bangkok: Kasetsart University, 2017.
- Kwak, S. H. **Nano- and microencapsulation for foods**. Hoboken: WILEY Blackwell, 2014.
- Lin, J., Christoph, H. and Bruce M. Spiegelman. “Metabolic control through the PGC-1 Family of transcription coactivators”, **Cell metabolism**. 1(6): 361-370; June, 2005.
- Lin, Q. and et al. “Production of Maltose Syrup by Enzymatic Conversion of Rice Starch”, **Food Bioprocess Technology**. 6(1): 242-248; September, 2013.
- Nielsen J.E. and Borchert T.V. “Protein engineering of bacterial α -amylases”, **Biochim Biophys Acta**. 1543(2): 253-274; December, 2000.
- Niu, D. and et al. “Highly efficient enzymatic preparation of isomaltoligosaccharides from starch using an enzyme cocktail”, **Electronic Journal of Biotechnology**. 26(1): 46-51; March, 2017.
- MacGregor, A. W. and et al. “Modelling the contribution of α -Amylase, β -amylase and limit dextrinase to starch degradation during mashing”, **Journal of Cereal Science**. 29(2): 161-169; March, 1999.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Mahdi S and et al. "Influence of spray drying on water solubility index, apparent density, and anthocyanin content of pomegranate juice powder", **Powder Technology**. 331(1): 59-65; April, 2017.
- Martins, S. and et al. "A review of Maillard reaction in food and implications to Kinetic modeling", **Trends in food science & technology**. 11(9-10): 364-373; September, 2000.
- Miller, G.L. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar", **Analytical chemistry**. 31(3): 426-428; June, 1959.
- Mohsin, S.A.Z, Shamsheer, N. And Khan F.S. "**Application of Microbial alpha amylase in sugar, baking, textile and industries.**Institute of Industrial **Biotechnology Govt.** Lahore: College University of Lahore, 2017.
- Pan, Y.C., and Lee, W.C. "Production of High-Purity Isomalto-Oligosaccharides Syrup by the Enzymatic Conversion of Transglucosidase and Fermentation of Yeast Cells", **Biotechnoligy and Bioengineering**. 89(7): 797-804; February, 2005.
- Patil, V., Anil, K.C. and Rav,P.S. "Optimization of the spray drying process for developing guava powder using response surface methodology", **Powder Technology**. 253(1): 230-236; February, 2014.
- Poonm, M., Sanjay, M. and Charu, L.M. "Effect of maltodextrin concentration and Inlet temperature during spray drying on physicochemical and Antioxidant properties of amla (*Emblica officinalis*) juice powder", **Food and Bioproduct Prosescing**. 92(2): 252-258; July, 2014.
- Puncha-arnon, S and et al. "Changes in physicochemical property and morphology of canna starches during rhizomal development", **Carbohydrate Polymers**. 70(2): 206-217; Sebtember, 2007.
- Rudeekulthamrong, P., Sawasdee, K. and Kaulpiboon. J. "Production 521 of long-Chain isomaltooligosaccharides from maltotriose using the thermostable amylomaltase and transglucosidase enzymes", **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. 18(4): 778-786; April, 2013.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Roberfroid, M. and Slavin, J. “Nondigestible oligosaccharides”, **Critical Reviews In Food Science and Nutrition**. 40(6): 461–480; June, 2000.
- Sánchez J and Adlercreutz P. (2015). “Enzymatic preparation of oligosaccharides by transglycosylation: A comparative study of glucosidases”, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 12(2): 51-55; December, 2015.
- Saman, P. and et al. “Prebiotic isomalto-oligosaccharide production from economic crops of Thailand”, **Asia-Pacific Journal of science and Technology**. 17(5): 794-799; April, 2012.
- Sawangwan, T. and Saman, P. “Prebiotic synthesis from rice using *Aspergillus oryzae* with solid state fermentation”, **Agriculture and Natural Resources**. 50(4): 227-231; July, 2016a.
- _____. “Shelf life enhancement of isomalto- Oligosaccharide from glutinous rice syrup with prebiotic properties”, **International Journal of Probiotics and Prebiotics**. 11(2): 77-84; May, 2016b.
- Scholz-Ahrens, K.E and et al. **Effect of prebiotics on mineral metabolism**. Rockville: American J. Nutr, 2001.
- Seneviratne, H. D. and C. G. Biliaderis. “Action of α -amylases on amylose-lipid complex superstructures”, **Journal of Cereal Science**. 13(2) 129-143; March, 1991.
- Sheu, D.C. and et al. “Production of isomaltooligosaccharides by intracellular α -glucosidase from *Aspergillus niger* ATCC 42418”, **Journal Chinese Agricultural Chemical Society**. 31(1): 740-51; January, 1993.
- Singla, V and Chakkaravarthi, S. “Applications of prebiotics in food industry: A Review”, **Food Science and Technology International**. 23(8): 649–667; August, 2017.
- Sivaramakrishnan, S. and et al. “Alpha amylase production by *Aspergillus oryzae* employing solid-state fermentation”, **Journal of Scientific and Industrial Research**. 66(1): 621-626; August, 2007.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Sorndech. W., Tongta,. S. and Blennow, A. “Combination of amylase and Transferase catalysis to improve IMO compositions and productivity”, **LWT - Food Science and Technology**. 79(1):479-486; June, 2017.
- Sorndech, W. and et al. “Isomalto-oligosaccharides: recent insights in production technology and their use for food and medical applications”, **LWT Food Science and Technology**. 95(1): 135-142; September, 2018.
- Sree, N.K. and et al. “Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production”, **Bioresource Technology**. 72(1): 43-46; March, 2000.
- Sriroth, K. and Piyachomkwan, K. “Cassava starch Technology”, **Starch/Starke**. 1(1): 195-197; March, 2005.
- Srisuvor, Nutthaya, et al. “Use of banana purée from three indigenous Thai cultivars as food matrices for probiotics and application in bio-set-type yoghurt production”, **International journal of food science & technology**. 48(8): 1640-1648; April, 2013.
- Stephen, A. M. and Glyn O. P. **Food polysaccharides and their applications**. Boca Raton, U.S.A.: CRC press, 2016.
- Stephen, Duncan WS. and Derek J. Jamieson. “Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, **FEMS microbiology letters**. 141(2-3): 207-212; August, 1996.
- Thammarutwasik, P. and et al. “Prebiotics-A Review”, **Songklanakarin Journal of Science & Technology**. 31(4): 401-408; July, 2009.
- Thiranusornkij, L. and et al. “Comparative studies on physicochemical properties, starch hydrolysis, predicted glycemic index of Hom Mali rice and Riceberry rice flour and their applications in bread”, **Food chemistry**. 283(1): 224-231; June, 2019.
- Tontul, I. and Ayhan T. “Spray-drying of fruit and vegetable juices: Effect of drying conditions on the product yield and physical properties”, **Trends in Food Science & Technology**. 63(1): 91-102; May, 2017.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Torre-Gutierrez, A.L. and Betancur-Ancoma, C.D. “Functional properties of square Banana (*Musa balbisiana*)”, **Food Chemistry**. 106(3): 1138-1144; February, 2008.
- Uhling, H. **Industrial Enzymes and Their Applications**. New York, U.S.A.: John Wiley and sons, 1998.
- Van der Zaal P.H and et al. “Isomalto/malto-polysaccharide structure in relation to the structural properties of starch substrates”, **Carbohydrate Polymer**. 185(1): 179-186; April, 2019.
- Vandenberghe, Luciana P. S. and et al. “Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*”, **Bioresource Technology**. 74(2): 175-178; September, 2000.
- Vieille, C. and Zeikus, G.J. “Hyper thermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability”, **Microbiology and. Molecular biology reviews**. 65(1): 1-43; Desember, 2001.
- Visakh P.M. **STARCH-BASED BIONANOCOMPOSITES: PROCESSING AND PROPERTIES Polysaccharide Building Blocks: A Sustainable Approach to the Development of Renewable Biomaterials, First Edition**. New York, U.S.A.: John Wiley and sons, 2012.
- Yanfang, Z, Iijuan, W. and Wenyi, T. “Biochemical changes in low-salt fermentation of solidstate soy sauce”, **African Journal of Biotechnology**. 8(24): 7028-7034; Desember, 2019.
- Yen, C.-H and et al. “Long-term supplementation of isomalto-oligosaccharides improved colonic microflora profile, bowel function, and blood cholesterol levels in constipated elderly people—a placebo-controlled, diet-controlled trial”, **Nutrition**. 27(4): 445–450; April, 2011.
- Yoshizaki Y and et al. “Analysis of Volatile Compounds in Shochu Koji, Sake Koji, and Steamed Rice by Gas Chromatography-Mass Spectrometry”, **Journal of the Institute of Brewing**. 116(1): 49-55; January., 2010.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Zambare, V. "Solid state fermentation of *Aspergillus oryzae* for glucoamylase production on agro residues", **International Journal of life sciences**. 4(1): 16-25; March, 2010.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
วิธีการวิเคราะห์ทางกายภาพ

ก.1 การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (Total Soluble Solid, TSS) ด้วยเครื่อง Hand Refractometer (A.O.A.C, 2000)

1 วิธีการ

1. ใช้น้ำกลั่นปรับปริมาตรฐานของเครื่องก่อนแล้วอ่านค่าที่เครื่อง Hand Refractometer ให้อ่านค่าไปที่เลขศูนย์
2. นำตัวอย่างที่เตรียมไว้ที่เป็นของเหลวหยดลงไปยังที่เครื่องวัด Hand Refractometer เพื่อวัดปริมาณของแข็งที่ละลายแล้วทำการอ่านค่าที่ให้หน่วยของปริมาณของแข็งที่ละลายในตัวอย่างโดยมีหน่วยเป็นองศาบริกซ์
3. บันทึกผลที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ก.2 การวิเคราะห์ปริมาตร (Volume) โดยใช้กระบอกตวงขนาด 500 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. นำตัวอย่างที่ได้ใส่ในกระบอกตวงขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วอ่านระดับปริมาตรของตัวอย่าง
2. บันทึกผลที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ก.3 ปริมาณน้ำหนักรสชาติที่ได้จากกระบวนการผลิต (% yield) ตามวิธีของ Fischer et al. (2019)

วิธีการ

คำนวณจากสูตร

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{Syrup dw}_{\text{powder}}}{\text{Syrup dw}_{\text{feed}}} \times 100 \quad (1)$$

โดยที่ Yield คือ ปริมาณผลผลิตทั้งหมดที่ได้ (%)
 Syrup dw_{powder} คือ น้ำหนักผงทั้งหมดที่ได้ (kg)
 Syrup dw_{feed} คือ ปริมาณน้ำผลไม้ทั้งหมดก่อนทำแห้ง (kg)

ก.4 ค่าความหนาแน่นรวม (bulk density) ดัดแปลงจาก Goula and Adamopoulos (2005)

วิธีการ

1. ชั่งผงตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ในกระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร
2. อ่านปริมาตรรวมของตัวอย่าง แล้วคำนวณค่าจากสูตร ค่าความหนาแน่น

$$\rho = \frac{M}{V} \quad (2)$$

โดยที่ ρ คือ ความหนาแน่นของวัตถุ (กรัม/มิลลิกรัม)

M คือ มวลรวมของวัตถุ (กรัม)

V คือ ปริมาตรรวมของวัตถุ (มิลลิลิตร)

ก.5 สมบัติการละลาย (solubility) ตามวิธีของ Cano-Chauca et al. (2005)

วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนักหลอด centrifuge และ moisture can จดบันทึกน้ำหนักของหลอด
2. ชั่งตัวอย่างผง 3 กรัม ลงในหลอด centrifuge เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. นำไป centrifuge ที่ความเร็วรอบ 8000 rpm เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
4. เทส่วนลงใน moisture can และนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง
5. นำหลอดเซนต์ปีฟที่มีส่วนของตะกอนไปชั่งน้ำหนักและจดบันทึกน้ำหนักไว้
6. เมื่อครบเวลา 6 ชั่วโมง นำ moisture can ที่มีส่วนใสออกมาและชั่งน้ำหนัก และนำไปคำนวณ

ในสูตร

$$(\%) \text{ Solubility} = \frac{\text{น้ำหนักของส่วนใส}}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง}} \times 100 \quad (3)$$

ก.6 การวิเคราะห์ค่าสี (L * a * b *) โดยวิธี Hunter Lab (A.O.A.C, 2000)

เป็นการวิเคราะห์ค่าสีของตัวอย่างด้วยเครื่องวัดสี Hunter Lab โดยค่าสี L* เป็นค่าความสว่าง (Lightness) a* เป็นค่าสีที่บ่งบอกความเป็นสีแดงและสีเขียว (Redness / Greenness) และ b* เป็นค่าสีที่บ่งบอกความเป็นสีเหลืองและสีน้ำเงิน (Yellowness / Blueness)

เมื่อ L* คือค่าความสว่างมีค่าอยู่ในช่วง 0 ถึง 100

a* คือค่าสีแดงและสีเขียว เมื่อ a มีค่าเป็นบวก เป็นสีแดง

เมื่อ a มีค่าเป็นลบ เป็นสีเขียว

b* คือค่าสีเหลืองและสีน้ำเงิน

เมื่อ b มีค่าเป็นบวก เป็นสีเหลือง

เมื่อ b มีค่าเป็นลบ เป็นสีน้ำเงิน

ก่อนทำการวัดค่าสีของตัวอย่างทุกครั้งต้องทำการปรับมาตรฐาน (Calibration) ของเครื่องวัดสีก่อนทุกครั้งจึงทำการวัดสีของตัวอย่างโดยทำการวัด 3 ซ้ำแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยเลือกแสดงผลการวัดค่าสีเป็น L*, a*, b *

วิธีการ

1. เปิดเครื่องคอมพิวเตอร์

2. เข้าโปรแกรมไปที่ Universe จากนั้นกดปุ่ม Standard เลือกขนาด Port Size แล้วเครื่องจะให้เราใส่กระจกเพื่อเทียบค่ามาตรฐาน
3. กด Read standard จากนั้นเลือก Active view เพื่อเลือกกระบวนการที่เราต้องการ
4. ใส่ตัวอย่างที่ต้องการวัด
5. กดที่ปุ่ม Read sample จากนั้นใส่ชื่อตัวอย่างแล้วกด OK

ก.7 ลักษณะทางกายภาพของแป้งข้าวด้วยกล้องจุลทรรศน์ตามวิธีของณัชชชี ณัฏฐภาสัณณ และคณะ (2559)

วิธีการ

1. เตรียมตัวอย่างโดยการตักแป้งลงแผ่น Slide ปริมาณ 0.001 g
2. หยดน้ำกลั่นลงบนแป้ง 3 หยด ปิดด้วย cover slip
3. นำตัวอย่างไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40x

ก.8 ลักษณะโครงสร้างผลึกของแป้งข้าวด้วยเทคนิค X-Ray Diffractometer (XRD) ตามวิธีของณัชชชี ณัฏฐภาสัณณ และคณะ (2559)

วิธีการ

การใช้งานเครื่อง X-Ray Diffractometer

1. เปิดประตูและเช็คปริมาณน้ำในเครื่อง Cooling
2. เปิดเมนสวิตช์ของเครื่อง Cooling รออุณหภูมิลดจนถึง 20 องศาเซลเซียส
3. เปิดเครื่อง คอมพิวเตอร์ โดยเข้าโปรแกรม Diffrac Plus และเครื่อง XRD หมุนกุญแจเปิดเครื่อง > กดปุ่มสีเขียว > ดึงปุ่ม High voltage มาทางซ้ายมือให้สังเกตว่าไฟเตือนรังสีบนหลังคาตู้ทั้งสองข้างสว่างขึ้น
4. ขั้นตอนการวอร์มเครื่องโดยเพิ่ม Voltage และ Current โดยเริ่มต้นจาก 20 kv และ 5 mV เพิ่มครั้งละ 5 step ไปจนถึง 40 kv และ 40 mV ตามลำดับ

ขั้นตอนการวัดตัวอย่างและวิเคราะห์ข้อมูล

- 4.1 ทำการเตรียมตัวอย่างโดยการนำสารที่มีลักษณะผงละเอียดหรือแผ่นฟิล์ม นำมาใส่แท่นวัด โดยทำให้ผิวด้านเรียบ
- 4.2 เปิดประตูเครื่องโดยกดปุ่ม open door แล้วสามารถนำตัวอย่างใส่

- 4.3 ตั้งค่ามุมที่ต้องการวัดตัวอย่างที่สภาวะที่ใช้ทดสอบในสภาพบรรยากาศปกติ ที่ 40 KV 30 mA เป็นรังสีเอกซ์ของทองแดงที่มีความยาวคลื่น 0.154 นาโนเมตร step angle 0.02 count time 0.5 วินาที Divergence slit 1, Receiving slit 1/2 , Scattering slit 1/4 แล้วกด start ได้
- 4.4 สั่งให้เครื่องมือวัดสารตัวอย่างและจัดเก็บข้อมูลไว้ในแฟ้มข้อมูลที่กำหนด
- 4.5 วิเคราะห์ข้อมูลการเลี้ยวเบนรังสีเอกซ์ของสารตัวอย่าง

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี

ข.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น ตามวิธี (AOAC, 2000)

วิธีการ

1. อบถั่วอะลูมิเนียมในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ชั่งน้ำหนัก และบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 3.0000 กรัม ลงในถั่วอะลูมิเนียมที่อบแล้ว บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน
3. นำเข้าตู้อบ Hot air oven ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
4. เมื่อครบเวลา นำออกจากตู้อบ ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ และนำไปชั่งน้ำหนัก บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน คำนวณหาปริมาณความชื้น จากสูตร

วิธีคำนวณ

$$\text{ความชื้น (\%)} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ})}{\text{น้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100 \quad (4)$$

ข.2 การวิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH Meter

อุปกรณ์

1. เครื่อง pH Meter
2. ปีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร
3. น้ำกลั่น
4. กระดาษชำระ
5. กระบอกตวง 100 มิลลิลิตร
6. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการ

1. นำตัวอย่างที่จะวัดค่าลงในปีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร
2. เปิดเครื่อง pH Meter จากนั้นทำการ Calibrate ด้วยสารละลาย Buffer เสียก่อน
3. ทำการวัดค่า pH ของตัวอย่างที่เตรียมไว้และจดบันทึกค่าที่ได้
4. หลังจากเปลี่ยนตัวอย่างให้ทำการล้าง Electrode ด้วยน้ำกลั่นและซับให้แห้งด้วย กระดาษชำระ ก่อนที่จะทำการวัดตัวอย่างถัดไป
5. ทำการปิดเครื่องให้นำจุกที่มีน้ำยา Electrolyte หรือน้ำยาที่มีอยู่ในจุกมาปิดให้สนิท แล้วค่อยเปิดเครื่อง

ข.3 การวิเคราะห์ค่า Water activity (Aw) โดยใช้เครื่อง Novasina

วิธีการ

1. เสียบปลั๊กเครื่อง Water activity จากนั้นกดสวิตช์ด้านข้างของเครื่อง แล้ววอร์มเครื่องทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที
2. ทำการ calibration เครื่อง
3. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่ผ่านการบดหรือสับให้ละเอียดประมาณ 3 กรัม โดยต้องให้ตัวอย่างปิดพื้นที่ก้นภาชนะ และให้ปริมาณตัวอย่างอยู่สูงระดับครึ่งของภาชนะที่ใส่ตัวอย่าง
4. เปิดฝาครอบเครื่องวัด water activity โดยเลื่อนคันโยกไปทางขวามือ
5. นำตัวอย่างมาวางในเครื่องวัด water activity
6. ปิดฝาเครื่องวัด water activity แล้วเลื่อนคันโยกไปทางซ้ายมือ
7. เครื่องจะทำการวิเคราะห์ค่าให้อัตโนมัติ
8. เครื่องจะส่งสัญญาณดังขึ้นมา แสดงว่าเครื่องได้วิเคราะห์ค่าเสร็จสมบูรณ์
9. บันทึกข้อมูล

ข.4 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (Proximate analysis) ตามวิธีของ (AOAC, 2005)

ข.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (Crude lipid)

วิธีการ

1. ตีehmตัวอย่างโดยบดละเอียดประมาณ 3-5 กรัม
2. ชั่งน้ำหนัก Thimble ที่อบแห้งแล้ว ตักตัวอย่างเตรียมไว้ใส่ใน Thimble ประมาณ 3-5 กรัม บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน
3. ใช้สาลิปิด Thimble เพื่อป้องกันตัวอย่างล่อย
4. ชั่งและบันทึกน้ำหนักของกระบอกแก้วที่อบแห้งแล้ว (ในโถดูดความชื้น) เท Petroleum ether ลงในกระบอกแก้ว 60 มิลลิลิตร
5. นำ thimble และกระบอกแก้วไปประกอบใส่เครื่องสกัดไขมัน Soxhlet แล้วเปิดน้ำเข้าระบบ condenser เดินเครื่องเพิ่มสกัดไขมัน เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เพื่อให้ไขมันสกัดออกหมด
6. หยุดสกัดโดยการกดปุ่ม recovery เพื่อให้ ether ระเหยออกจากกระบอกแก้ว ควบแน่นและหยดลงในถังเก็บจนเหลือในกระบอกแก้ว 2-3 มิลลิลิตร (อย่าให้แห้งเพราะจะไหม้)
7. นำกระบอกแก้วพร้อมไขมันเข้าอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้ Petroleum ether ระเหยออกหมด

8. นำกระบอกแก้วพร้อมไขมันมาใส่ใถ่ดูความขึ้น ปล่อยให้เย็น ชั่งและบันทึกน้ำหนัก คำนวณปริมาณน้ำหนักได้ดังนี้

การคำนวณ

ไขมัน (ร้อยละ)

$$= \frac{\text{น้ำหนักกระบอกแก้วและไขมันทั้งหมด (กรัม)} - \text{น้ำหนักกระบอกแก้ว (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100 \quad (5)$$

ข.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Crude protein) ตามวิธี Kjeldahl method

วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนักตามตัวอย่างให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอนใส่กระดาศที่ปราศจากไนโตรเจน ประมาณ 0.5-2.2 กรัม
2. พับกระดาศเพื่อห่อตัวอย่างลงใน Kjeldahl Digestion flask เตรียม Blank ควบคู่ไปด้วย โดยใส่กระดาศซึ่งสารแต่ไม่ต้องใส่ตัวอย่าง
3. เติม Catalyst mixture (anh. CuSO_4 1 ส่วน และ anh. K_2SO_4 20 ส่วนโดยน้ำหนัก) จำนวน 2 กรัม
4. เทกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตรโดย ค่อยๆ เทลงตัวอย่างที่ติดข้างฟลาสก์ลงไปด้วย เขย่าอย่างระมัดระวังให้ผสมเข้ากัน
5. นำไปย่อยโดยเครื่องสำหรับย่อยโดยวาง Kjeldahl flask ให้เอียงเล็กน้อย พร้อมทั้งปิด ระบบดูดไอรกรดให้เรียบร้อยก่อนจึงเปิด สวิตซ์ให้ความร้อนต้มให้เดือดเบาๆ จนกระทั่งไม่มีฟองจึงเพิ่มความร้อนให้สูงขึ้น เขย่าเป็นครั้งคราวย่อยจนส่วนผสมใส (ประมาณ 2 ชั่วโมง)
6. จากนั้นหยุดให้ความร้อนและปล่อยให้เย็นเพื่อรอการกลั่นต่อไป
7. เตรียมขวดบรรจุกรดบอริก โดยบีบอัดสารละลายกรดบอริกร้อยละ 4 (w/v) ประมาณ 75 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติม Screen Methyl Red Indicator 4 หยด
8. นำไปต่อเข้ากับเครื่องกลั่นโปรตีน โดยให้ปลายด้าน Condenser จุ่มลงในขวดรูปชมพู่ และอยู่ใต้ระดับสารละลายกรดบอริก เปิดน้ำไหลผ่าน Condenser ในชุดเครื่องปั่นโปรตีนให้เย็น
9. เติมน้ำกลั่นลงในฟลาสก์ จำนวน 400 มิลลิลิตร อย่างระมัดระวัง พยายามชะล้างสารที่อยู่ข้างหลอดให้ไหลลง เติมร้อยละ 50 (w/v) NaOH 80 มิลลิลิตร แล้วต่อเข้ากับฟลาสก์ Condenser
10. เปิดสวิตซ์ให้ความร้อน ทำการกลั่นให้ได้ distillate ประมาณ 300 มิลลิลิตร แล้วจึงหยุด ให้ความร้อน เลื่อนฟลาสก์ออกมาเล็กน้อย
11. ปล่อยให้เย็นสักครู่เพื่อปล่อยให้ตัวอย่างที่ตกค้างในท่อปลายไหลออกมาให้หมด ฉีดน้ำ กลั่นล้างออกมาให้หมดแล้วฉีดน้ำกลั่นล้างปลายท่อก่อนนำฟลาสก์ออกมา

12. นำไปไตเตรทหาปริมาณไนโตรเจนกับกรดซัลฟูริก 0.1 N จะได้จุดยุติสีชมพู (ใช้ Blank เป็นตัวเทียบสี) คำนวณปริมาณโปรตีนได้โดยคำนวณหาไนโตรเจน

การคำนวณ

$$\text{ไนโตรเจน (ร้อยละ)} = \frac{(S-B) \times 0.014 \times N \times 100}{W} \quad (6)$$

เมื่อ S = ปริมาณกรดที่ใช้ไตเตรทงานตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
 B = ปริมาณกรดที่ใช้ไตเตรท Blank (มิลลิลิตร)
 N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดมาตรฐาน (Normal)
 W = น้ำหนักตัวอย่างแห้ง (กรัม)
 โปรตีน (ร้อยละ) = ไนโตรเจน (ร้อยละ) × ค่าคงที่ (5.95)

ข.4.3 การวิเคราะห์เยื่อใย (Crude fiber)

วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนัก fiber bag ที่ผ่านกรอบแห้งแล้ว ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 1 กรัม ลงในถุง fiber bag ที่มี spacer
2. นำถุง fiber bag ดังกล่าวลงใน carousel และใส่ลงในกระบอกแก้วเติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 1.25% (w/v) ปริมาณ 360 มิลลิลิตร ลงในกระบอกแก้ว
3. ต้มย่อยตัวอย่าง 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำร้อน 3 ครั้ง เพื่อกำจัดสารละลายกรดซัลฟูริกให้หมด
4. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.25% (w/v) ปริมาณ 360 มิลลิลิตรลงในกระบอกแก้ว ต้มย่อยตัวอย่างนาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำร้อน 3 ครั้ง เพื่อล้างโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้หมด ล้างด้วยแอลกอฮอล์ 95% (v/v)
5. นำตัวอย่างใส่ถ้วย crucible ที่อบและทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้วนำ crucible ไปอบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หรือ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
6. ทิ้งให้เย็นในตู้ความชื้นและชั่งน้ำหนัก (A) นำไปเผาในเตาอุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้เถ้าสีขาว ทิ้งให้เย็นในตู้ความชื้น (B) คำนวณหาปริมาณเยื่อใย (Total Crude Fiber) ได้ดังนี้

การคำนวณ

$$\text{เยื่อใย (ร้อยละ)} = \frac{(A-B) \times 100}{W} \quad (7)$$

เมื่อ A = น้ำหนักถ้วยกระเป๋อง + น้ำหนักกากหลังอบแห้งแล้ว

B = น้ำหนักถ้วยกระเบื้อง + น้ำหนักกากหลังเผาแล้ว

W = น้ำหนักตัวอย่างแห้งเริ่มต้น

ข.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (Crude ash)

วิธีการ

1. นำถ้วยกระเบื้องไปเผาในเตาเผาอุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมง แล้วทิ้งเย็นในโถดูดความชื้น
2. แล้วชั่งน้ำหนักชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของตัวอย่างประมาณ 2-5 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน
3. นำตัวอย่างไปเผาบน hot plate จนหมดควันดำ แล้วจึงนำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้เถ้าสีขาว (ใช้เวลา 5-8 ชั่วโมง) ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนัก
4. นำไปเผาต่ออีก 30 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนักอีกครั้ง หากน้ำหนักลดลงให้เผาซ้ำจนน้ำหนักคงที่คำนวณเพื่อหาเถ้า (Ash)

$$\text{เถ้า (ร้อยละ)} = \frac{(A-B) \times 100}{W} \quad (8)$$

เมื่อ A = น้ำหนักถ้วยกระเบื้องและเถ้าทั้งหมด

B = น้ำหนักถ้วยกระเบื้อง

W = น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น

ข.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต

การคำนวณ

$$\text{คาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ)} = 100 - (\text{โปรตีน} + \text{ไขมัน} + \text{เยื่อใย} + \text{เถ้า} + \text{ความชื้น}) \quad (9)$$

ข.5 การวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลส (ร้อยละ) ตามวิธีของ Juliano (1971)

วิธีการ

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

1. ชั่ง Potato amylose 0.04 กรัม ใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร
2. ปิเปต 95% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และปิเปต 2N (NaOH) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ลงไป

3. กวนให้ Potato amylose ละลาย เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้เครื่อง Stirrer ความเร็ว 300 rpm

4. ปรับปริมาตรให้เป็น 100 ด้วยน้ำกลั่น

การทำกราฟมาตรฐาน

1. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 70 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวน 5 ขวด

2. ปิเปต 1N Acetic acid ปริมาตร 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 และ 2 มิลลิลิตรลงไป ตามลำดับ

3. ปิเปตสารละลาย Iodine ลงไปขวดละ 2 มิลลิลิตร

4. ปิเปตสารละลายมาตรฐานปริมาตร 1,2,3,4 และ 5 มิลลิลิตร ลงในขวดที่ 1-5 ตามลำดับ

5. เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

การเตรียมสารละลายตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่างแบ่งปริมาณ 0.1 กรัม ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

2. ปิเปต 95% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3. ปิเปต 2N NaOH ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ลงไป

4. กวนให้ตัวอย่างละลายเป็นเวลา 10 นาที โดยใช้เครื่อง Stirrer ความเร็ว 300 rpm ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

1. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 70 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร

2. ปิเปต 1N Acetic acid ปริมาตร 2 มิลลิลิตรและ สารละลาย Iodine 2 มิลลิลิตรลงไป

3. ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงไปปริมาตร 5 มิลลิลิตร

4. เขย่าให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

5. เขียนกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายอะไมโลสมาตรฐาน (แกน X) และ ค่าการดูดกลืนแสง (แกน Y) เพื่อหาความเข้มข้นของอะไมโลสจากกราฟมาตรฐาน แล้วนำค่าที่ได้มา คำนวณหาปริมาณอะไมโลสโดย

คำนวณ ปริมาณอะไมโลส (ร้อยละ)

$$= \frac{\text{ความเข้มข้นที่อ่านได้จากสารละลายอะไมโลสมาตรฐาน (มิลลิกรัม)} \times 100 \times 20}{\text{น้ำหนักแบ่งแห้ง (กรัม)}} \quad (10)$$

ข.6 การวิเคราะห์ปริมาณอะไมโลเพคติน (ร้อยละ)

การคำนวณ

$$\text{อะไมโลเพคติน (ร้อยละ)} = 100 - (\text{ปริมาณอะไมโลส}) \quad (11)$$

ข.7 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธี DNS method (Dinitrosalicylic acid method) ตามวิธีของ Miller (1959)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. สารละลายตัวอย่างสูตรต่างๆ เข้มข้น 0.1%
2. Spectrophotometer
3. สารละลาย 3,5- dinitrosalicylic acid
4. ปิเปต
5. ขวดปรับปริมาตรขนาด 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร
6. บีกเกอร์ขนาด 50 100 และ 250 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียมสารละลาย

1. ละลาย 3,5- dinitrosalicylic acid 10 กรัม ในสารละลาย 2 โมลต่อลิตรของ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ปริมาณ 200 มิลลิลิตร
2. ละลายโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต 300 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร
3. สารละลาย 1 และ 2 มาผสมกันแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร

วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างที่กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 เจือจางสารละลายตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 2 เท่า หรือให้อยู่ในช่วงที่สามารถวิเคราะห์ได้
2. ดูดสารละลายที่เจือจางแล้วใส่หลอด จำนวน 0.5 มิลลิลิตร
3. ดูดสารละลาย 3,5- dinitrosalicylic acid ผสมลงไปจำนวน 0.5 มิลลิลิตร
4. นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที
5. หยุดปฏิกิริยาการแช่ในน้ำเย็น แล้วเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร โดยใช้ blank เป็นสารละลาย เปรียบเทียบและบันทึกผล สารละลายน้ำตาลชนิดใดที่มีคุณลักษณะเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ จะให้สีแดงน้ำตาล
7. คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน

ข.8 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol sulfuric method ตามวิธีของ Doboist et al. (1956)

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริก (reagent grade 95.5%, specific gravity 1.84)
2. ฟีนอลร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เตรียมโดยการชั่งฟีนอล 5 กรัม ผสมน้ำกลั่น 95 กรัม
3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยการชั่งกลูโคส 0.04 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ ข.1 การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol sulfuric

หลอดที่	สารละลาย กลูโคส (μl)	น้ำกลั่น (μl)	ความเข้มข้นของกลูโคส (μg/ml)
1	0	100	0
2	25	975	10
3	50	950	20
4	100	900	40
5	125	875	50
6	200	800	80

วิธีการ

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง หรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-80 μg/ml) ปริมาตร 1.0 ml ใส่ในหลอดทดลอง แล้วเติมฟีนอล 5% ลงไป 1.0 ml แล้วเขย่า
2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 ml ลงไปอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยลงบนผิวหน้าของของเหลวโดยตรงจะทำให้การผสมเกิดขึ้นได้ดีกว่าการค่อยปล่อยที่ข้างหลอด
3. ตั้งหลอดทดลองของสารนี้ไว้เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเขย่าแล้วรออีก 30 นาที
4. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง โดยใช้ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

ข.9 การวิเคราะห์ค่าสมมูลเดกโตรส (DE value) ตามวิธีของกล้าณรงค์และเกื้อกุล (2550)

วิธีการ

1. นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์
2. นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณของแข็งทั้งหมด

การคำนวณ

$$\text{ค่าสมมูลเดกโตรส} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาณของแข็งทั้งหมด (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)}} \times 100 \quad (12)$$

ข.10 การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด ตามวิธี (AOAC, 2000)

วิธีการ

1. อบถั่วอะลูมิเนียมในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ชั่งน้ำหนัก และบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง 3.0000 กรัม ลงในถั่วอะลูมิเนียมที่อบแล้ว บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน
3. นำเข้าตู้อบ Hot air oven ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
4. เมื่อครบเวลา นำออกจากตู้อบ ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ และนำไปชั่งน้ำหนัก บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน คำนวณหาปริมาณของแข็งทั้งหมดจากสูตร

วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณของแข็งทั้งหมด (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}}{\text{น้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100 \quad (13)$$

ข.11 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาล โดยเครื่อง Ultra-High-Performance liquid Chromatography (UHPLC) ตามวิธีของ Pan and Lee. (2004)

อุปกรณ์

1. เครื่อง Ultra-High-Performance liquid Chromatography (UHPLC) (DIONEX, Ultimate 3000, Sunnyvale, CA, USA)
2. คอลัมน์ YMC-Pack Polyamine II column (4.6×250 mm) (YMC japan)
3. LDC 4100 spectrophotometer monitor
4. Shimadzu LC-3A High Performance Liquid Chromatography
5. ตัวตรวจวัดชนิด RID (Refractive index detector)

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. สารละลายมาตรฐานกลูโคสและมอลโตส เตรียมที่ความเข้มข้น 5, 10, 25, 50 และ 100 ppm ในน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) กรองด้วยกระดาษกรอง (membrane filter) ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน
2. วัฏภาคเคลื่อนที่เตรียมโดยสารละลายอะซิโตนไนไตรท์ (Acetonitrile) และน้ำปราศจากไอออนอัตราส่วน 75 ต่อ 25 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) กรองด้วยกระดาษกรอง ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน ทำการไล่อากาศออกด้วยเครื่องอัลตราโซนิกเป็นเวลา 15 นาที

วิธีการวิเคราะห์

1. ตั้งค่าตัวแปรต่างๆของเครื่องควบคุมระบบ (system controller) Shimadzu LC3A อัตราการไหล (flow rate) 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ oven 30 องศาเซลเซียส
2. ตั้งค่าความยาวคลื่นของ LDC 4100 spectrophotometer monitor ให้เท่ากับ 254 นาโนเมตร
3. ฉีดสารละลายมาตรฐานปริมาตร 100 ไมโครลิตร ตัวอย่างจะเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ ด้วยแรงดันสูงจากปั๊ม เมื่อสารตัวอย่างเคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์จะเกิดการดูดกลืนแสงของสารที่เคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์และส่งสัญญาณไปเครื่องรวบรวมสัญญาณ (Refractive index detector) แสดงผลออกมาเป็นโครมาโทแกรม ซึ่งแสดงเวลาที่ตัวอย่างสารละลายน้ำตาลถูกหน่วงอยู่ในคอลัมน์ (retention time) และพื้นที่ใต้กราฟโครมาโทแกรมของสารละลายน้ำตาลโดยเวลาที่ถูกหน่วงในคอลัมน์ของสารชนิดเดียวกันจะเท่ากัน ดังนั้นจึงใช้เวลาที่ถูกหน่วงในคอลัมน์เป็นตัวบ่งบอกสารละลายน้ำตาลในตัวอย่างเปรียบเทียบกับเวลาของสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน นำพื้นที่ใต้โครมาโทแกรมของสารละลายมาตรฐานที่ทำการฉีดที่ความเข้มข้นต่างๆ มาเขียนกราฟมาตรฐานเพื่อใช้หาความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลในตัวอย่าง
4. ฉีดสารตัวอย่างที่ได้เจือจางให้เหมาะสมที่ให้พื้นที่ใต้กราฟอยู่ในช่วงของกราฟมาตรฐาน เปรียบเทียบระยะเวลาที่ถูกหน่วง (retention time) เพื่อหาชนิดของน้ำตาลกับเวลาที่ถูกหน่วงของสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน และนำพื้นที่ใต้โครมาโทแกรมที่ได้มาทำการคำนวณความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลในตัวอย่าง

วิธีการคำนวณ

$$\text{ความเข้มข้นของน้ำตาล (มก./มล.)} = \frac{\text{พื้นที่ใต้โครมาโทแกรม} \times (\text{การเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน})} \quad (14)$$

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ของแป้ง

ค.1 การวิเคราะห์สมบัติทางความร้อน (Thermal properties) โดยใช้เครื่อง Differential Scanning Calorimetry (DSC)

วิธีการ

1. เตรียมแป้งข้าวยะเยมาและระยะแก่ 5 มิลลิกรัม ใส่เข้าไปใน Aluminium pan แล้วเติมน้ำมันกลั่น
2. จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน หรือการดูดน้ำสมบูรณ์
3. เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำตัวอย่างไปวิเคราะห์โดยตั้งโปรแกรมให้ความร้อนแก่ตัวอย่างด้วยอัตราเร็ว 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และใช้อุณหภูมิตั้งแต่ 30-110 องศาเซลเซียส แล้ววิเคราะห์ค่าสมบัติทางความร้อนของแป้ง คือ ค่าอุณหภูมิเริ่มการเปลี่ยนแปลง (Onset Temperature: T_o) ค่าอุณหภูมิเปลี่ยนแปลงสูงสุด (Peak temperature: T_p) และค่าอุณหภูมิการเปลี่ยนแปลงสุดท้าย (End temperature: T_e) และค่าเอนทาลปี (Enthalpy: ΔH)

ค.2 การวิเคราะห์สมบัติของการเกิดเพส (Pasting properties) ของแป้งเมื่อได้รับความร้อนโดยใช้เครื่อง Rapid Visco Analyzer (RVA)

วิธีการ

1. ชั่งน้ำหนักแป้งข้าว 3 กรัม (ความชื้นร้อยละ 14) ละลายในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
2. ควบคุมการให้ความร้อนและการให้ความเย็นภายใต้แรงเฉือนคงที่ โดยเริ่มต้นคงอุณหภูมิไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส นานที่ 1 นาที และเพิ่มความร้อนจาก 50-95 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็ว 12 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงไว้ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 2.7 นาที ทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสด้วยอัตราเร็ว 12 องศาเซลเซียสต่อนาที และคงไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที โดยให้อัตราการหมุนของใบพาย (Paddle) ครั้งแรกที่เริ่มหมุนให้ใบหมุนอย่างรวดเร็วด้วยอัตรา 960 rpm เป็นเวลา 10 วินาที เพื่อกระจายตัวอย่าง ต่อมาหมุนด้วย เร็วคงที่ 160 rpm ตลอดการวิเคราะห์
3. บันทึกค่า Pasting temperature Peak viscosity Final viscosity Breakdown และ Setback ของแป้งข้าว

ภาคผนวก ง
การวิเคราะห์ด้านจุลินทรีย์

ง.1 การวิเคราะห์คุณสมบัติฟรีไบโอติก

ง.1.1 เลี้ยงฟรีไบโอติก

วิธีการ

1. เติมฟรีไบโอติก โดยใช้เชื้อ *L. acidophilus* ในอาหาร MRS broth 10 มิลลิลิตร บ่ม 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง
2. วัด optical density (OD) ที่ 600 nm และเปรียบเทียบกับ standard curve สำหรับเตรียม fresh culture โดยให้เชื้อเริ่มต้นประมาณ $8 \log \text{CFU mL}^{-1}$

ง.1.2 การเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* TISTR 780

วิธีการ

1. เติมเชื้อ *Escherichia coli* TISTR 780 ในอาหาร Tryptic soy broth (TSB) 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 150 rpm เวลา 18 ชั่วโมง
2. หลังจากนั้นเติม Tryptic soy broth (TSB) ร้อยละ 1 (v/v) ลงใน M9 minimal medium 10 มิลลิลิตร
3. นำไปบ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 150 rpm เวลา 18 ชั่วโมง โดยให้เชื้อเริ่มต้นประมาณ $8 \log \text{CFU mL}^{-1}$

ง.1.3 การทดสอบกิจกรรมฟรีไบโอติก

1. เติม 1% (w/v) ของกลูโคส IMO เชิงการค้า และตัวอย่าง IMO ผลิตเองในอาหารอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และ M9 broths 10 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที
2. เติมเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 0.1 (v/v) ของเชื้อ *L. acidophilus* และเชื้อ *E. coli* TISTR 780 ในอาหาร MRS และ M9 broth ตามลำดับ ($6 \log \text{CFU mL}^{-1}$ ของเซลล์เริ่มต้น)
2. วัดจำนวน *L. acidophilus* และ *E. coli* strains เริ่มต้น ที่ 0 ชั่วโมง โดยวิธี Total Plate Count
3. เชื้อ *L. paracasei* ใน MRS broth 10 มิลลิลิตร บ่ม 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง สภาวะปกติ
4. เชื้อในอาหาร M9 cultures บ่มที่ ambient atmosphere เวลา 24 ชั่วโมง (ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ)
5. การนับจำนวนของ *L. paracasei* และ *E. coli*

Prebiotic activity

$$\text{Prebiotic activity score} : \frac{[(A-B)/(C-D)]}{[(E-F)/(G-H)]} \quad (15)$$

- เมื่อ
- A = log CFU mL⁻¹ ของเชื้อ *L. acidophilus* ในพรีไบโอติกที่บ่ม 24 ชั่วโมง
- B = log CFU mL⁻¹ ของเชื้อ *L. acidophilus* ในพรีไบโอติกที่บ่ม 0 ชั่วโมง
- C = log CFU mL⁻¹ ของเชื้อ *L. acidophilus* ในกลูโคสที่บ่ม 24 ชั่วโมง
- D = log CFU mL⁻¹ ของเชื้อ *L. acidophilus* ในกลูโคสที่บ่ม 0 ชั่วโมง
- E = log CFU mL⁻¹ ของเชื้อ *E. coli* ในพรีไบโอติกที่บ่ม 24 ชั่วโมง
- F = log CFU mL⁻¹ ของเชื้อ *E. coli* ในพรีไบโอติกที่บ่ม 0 ชั่วโมง
- G = log CFU mL⁻¹ ของเชื้อ *E. coli* ในกลูโคสที่บ่ม 24 ชั่วโมง
- H = log CFU mL⁻¹ ของเชื้อ *E. coli* ในกลูโคสที่บ่ม 0 ชั่วโมง

ง.2 ความเข้มข้นของสปอร์ โดยใช้ Haemocytometer ตามวิธีของ Wanichsan et al. (2015)

1. ชั่งน้ำหนักโคจิม่า 1 กรัม เติมลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่เตรียมปริมาตร 9 ml
2. ดูดตัวอย่างจากหลอดที่ 1 มา 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดที่ 2 ของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้นร้อยละ 0.85
3. ดูดตัวอย่างจากหลอดที่ 2 มา 1 ml ใส่ในหลอดที่ 3 ของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้นร้อยละ 0.85
4. ดูดตัวอย่างจากหลอดที่ 3 มา 0.1 ml ใส่แผ่น haemocytometer
5. นับจำนวนสปอร์ โดยนับจำนวน 5 ช่อง แต่ละช่องจะมี 16 ช่องเล็ก

การคำนวณ

ความเข้มข้นของเชื้อรา = ค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์ $\times$ ค่าคงที่ 2.5×10^5 $\times$ ระดับการเจือจาง (16)

นับจำนวนสปอร์ได้ = $3+5+3+1+3/5=2.4$

โดยนับที่ระดับความเข้มข้น = 10^3 สปอร์/มิลลิลิตร

ความเข้มข้นของเชื้อรา = $2.4 \times 50 \times 10^3$ สปอร์/มิลลิลิตร

= 2.4×10^5 สปอร์/มิลลิลิตร

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นายชัยณรงค์ ช่วยจำ
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2557-2561 มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการอาหาร
ผลงานทางวิชาการ	Chuayjum, C., Onsaard, W., & Prakitchaiwattana, C. (2020). SugarConversion of Immature Green Rice Syrup under Solid State Fermentation. <i>Science Technology and Engineering Journal (STEJ)</i> , 6(1), 46-56. ประมวลบทความในการประชุมวิชาการระดับชาติ มอบ. วิจัย ครั้งที่ 15 ผลงานนำเสนอแบบบรรยาย เรื่อง การเปรียบเทียบระยะของข้าวเหนียวต่อการผลิตน้ำตาลโดยใช้กระบวนการหมักแบบของแข็ง