

วิธีการที่เหมาะสมในการผลิตแมนแนนโอลิโกแซ็กคาไรด์จากกากเนื้อในปาล์มและทดสอบคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกส์

Optimization of Mannan-oligosaccharide production from palm kernel cake and its prebiotic property

พิทยุตม์ เพ็ชรพินิจ¹ นันทพร พึงสังวร^{1*} และ นิภาพร ก้านทอง¹
Pittayut Petpinit¹ Nuntaporn Pungsungvorn^{1*} and Nipaporn Kanthong¹

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาวิธีการสกัดแมนแนนโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Mannan-oligosaccharide: MOS) จากกากเนื้อในปาล์ม (palm kernel cake: PKC) และประเมินคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกส์ โดยเปรียบเทียบ 3 วิธีการสกัด ได้แก่ การสกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (S1), เอทานอล 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (S2) และเอนไซม์ Bio-ase 10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (S3) จากการวิเคราะห์ไฮโดรไลสด้วย HPLC พบว่า S3 ให้ผลดีที่สุด จากนั้นศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ในการสกัด (10, 15 และ 20 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) พบว่าความเข้มข้นที่ 15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (S3-2) เหมาะสมที่สุดโดยให้ไฮโดรไลสที่มีปริมาณ MOS ทั้งหมด 3.48 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วยแมนโนไบโอส แมนโนไตรโอส และแมนโนเตตระโอส ทดสอบคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกส์ของไฮโดรไลสจาก PKC ด้วยการทดสอบการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียแลคติก *Enterococcus faecalis* SHI-1 ที่คัดแยกได้จากสุนัขสายพันธุ์ปอมเมอเรเนียน อายุ 1 ปี พบว่าไฮโดรไลสที่มีความเข้มข้น 125 และ 250ppm ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียแลคติกได้ดีกว่าฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (FOS) และยังทนต่อการย่อยด้วยน้ำย่อยกระเพาะอาหารสุนัขเทียมและเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสได้ถึง 98.86 และ 99.19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าการใช้เอนไซม์ Bio-ase ที่ผลิตในประเทศไทยเป็นวิธีการที่สามารถผลิตไฮโดรไลสจาก PKC ที่มีส่วนประกอบของ MOS ได้โดยลดเวลา ขั้นตอนและการใช้สารเคมีในการผลิต แสดงถึงศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์เลี้ยงได้ต่อไป

คำสำคัญ: กากเนื้อในปาล์ม พรีไบโอติกส์ แมนแนนโอลิโกแซ็กคาไรด์

Abstract

This study examined techniques for extracting mannan oligosaccharides (MOS) from palm kernel cake (PKC) and assessed their prebiotic characteristics. Three extraction procedures were evaluated: 1) 2%(w/v) sodium hydroxide extract (S1), 2) 10%(v/v) ethanol extract (S2), and 3) Bio-ase enzyme at 10unit/milliliter (S3). Analysis of hydrolysates by HPLC revealed that S3 provided the most effective extraction. The effect of enzyme concentration (10, 15, and 20unit/milliliter) was examined, and 15unit/milliliter (S3-2) was identified as the optimal concentration, yielding a hydrolysate containing a total MOS content of 3.48gram/liter, including mannobiose, mannotriose, and mannotetraose. The prebiotic characteristics of the PKC hydrolysate were assessed by determining their ability to stimulate the growth of Lactic Acid Bacteria *Enterococcus faecalis* SHI-1 isolated from a 1-year-old Pomeranian dog. At 125 and 250ppm concentrations, the hydrolysate outperformed fructo-oligosaccharides (FOS) in terms of probiotic growth. Furthermore, it demonstrated high resistant to digestion by simulated gastric juice and alpha-amylase, with resistant rates of 98.86 and 99.19% respectively. In conclusion, using the Bio-ase enzyme, which is made in Thailand, proved to be an efficient approach for generating MOS-rich hydrolysate from PKC. This approach minimizes processing time, procedural complexity, and chemical usage, indicating its potential for further application in the pet food industry.

Keywords: palm kernel cake, prebiotics, Mannan-oligosaccharide

¹ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก

¹ Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Tawan-ok

* Corresponding author. E-mail: nuntaporn_pu@rmutto.ac.th

บทนำ

พรีไบโอติกส์ (prebiotics) เป็นสารอาหารที่ร่างกายสัตว์ไม่สามารถย่อยและดูดซึมได้ที่กระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก แต่จะถูกย่อยโดยจุลินทรีย์โปรไบโอติกในลำไส้ใหญ่ และช่วยส่งเสริมการเจริญและกระตุ้นการทำงานของจุลินทรีย์โปรไบโอติก (Strompfová et al., 2004) ตัวอย่างของสารกลุ่มนี้ เช่น ฟรุคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (fructo-oligosaccharide: FOS) กาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (galacto-oligosaccharide: GOS) และอินนูลิน โดยทั่วไปพรีไบโอติกส์พบในแหล่งอาหารต่าง ๆ เช่น ธัญพืช มันเทศ รากชิโครี และหัวเห็ด (Bello et al., 2018) นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในกากเนื้อในปาล์ม (palm kernel cake: PKC) ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์ม PKC ประกอบไปด้วยแมนแนน (linear mannan) กลูโคแมนแนน (glucomannan) กาแลคโตแมนแนน (galactomannan) และกาแลคโตกลูโคแมนแนน (galactoglucomannan) โดยแมนแนนจัดเป็นพอลิแซ็กคาไรด์สายยาวและเป็นองค์ประกอบหลักในการสกัดแมนแนนโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Mannan-oligosaccharide: MOS) ที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกส์ประเภทโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถส่งเสริมการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* ได้ดีกว่า FOS และ GOS และส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน ในส่วนของสัตว์เลี้ยงพบว่าสุนัขที่ได้รับอาหารผสม MOS มีปริมาณลิพิดเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Perini et al., 2023) จากการพิจารณาโครงสร้างของ PKC ซึ่งมี MOS เป็นองค์ประกอบสำคัญ จึงเลือกใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการวิจัยครั้งนี้ วิธีการสกัด MOS ที่นิยมใช้มากที่สุดมีสามวิธี ได้แก่ สกัดด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้ผลผลิต 8.73 ± 0.40 เปอร์เซ็นต์ (Bello et al., 2018) การสกัดด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ได้ปริมาณผลผลิต 6.29 ± 0.03 เปอร์เซ็นต์ (Jahromi et al., 2016) และการสกัดโดยใช้เอนไซม์แมนนาเนสจากแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ความเข้มข้น 10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถผลิตแมนโนส (mannose), แมนโนไบโอส (mannobiose), แมนโนไตรโอส (mannotriose), แมนโนเตตระโอส (mannotetraose) และแมนโนเพนตะโอส (mannopentaoise) (Zhang et al., 2021) แต่ยังไม่มีการยืนยันว่าวิธีการใดให้ผลดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับต้นทุนและระยะเวลาการผลิต งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัด MOS จาก PKC และประเมินคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกส์ เพื่อการประยุกต์ใช้ในการผลิตอาหารสุนัขเสริมพรีไบโอติกส์ที่มีแนวโน้มการขยายตัวและได้รับความนิยมมากขึ้น

วิธีการศึกษา

1. การสกัดไฮโดรไลสจาก PKC

PKC (ได้รับการสนับสนุนจากบริษัท สุขสมบูรณ์น้ำมันปาล์ม จำกัด) ถูกร่อนผ่านตะแกรงความถี่ 600 เมช และปรับสภาพโดยการกำจัดไขมันออก ดัดแปลงจากวิธีการของ Zhang et al., (2021) ทำโดยแช่ PKC 10 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, 125 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ 20 นาที จากนั้นนำ PKC มาล้างจน pH เป็นกลาง อบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส เก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องเพื่อนำมาสกัดด้วยวิธีต่าง ๆ ดังนี้

1.1 การสกัดไฮโดรไลสจาก PKC ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์

ดัดแปลงจากวิธีของ Bello et al., (2018) นำ PKC 10 กรัม แช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร, 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง กรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกตะกอนและส่วนใส เก็บรักษาตัวอย่างที่ -20 องศาเซลเซียส ทำการสกัดทั้งหมด 3 ครั้ง

1.2 การสกัดไฮโดรไลสจาก PKC ด้วยเอทานอล

ดัดแปลงจากวิธีของ Jahromi et al., (2016) นำ PKC 10 กรัม แช่ในสารละลายเอทานอล 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร, 50 มิลลิลิตร นำไปแช่แบบควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เพื่อแยกตะกอนและส่วนใส เก็บรักษาตัวอย่างที่ -20 องศาเซลเซียส ทำการสกัดทั้งหมด 3 ครั้ง

1.3 การสกัดไฮโดรไลสจาก PKC ด้วยเอนไซม์ Bio-ase

ดัดแปลงจากวิธีของ Zhang et al., (2021) นำ PKC 10 กรัม แช่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 และเตรียมเอนไซม์ Bio-ase (เอเซีย สตาร์ แอนนิมัล เฮลท์ จำกัด, ประเทศไทย) ซึ่งเป็นเอนไซม์ผสม นำมาใช้งานโดยพิจารณาจากค่ากิจกรรมเอนไซม์แมนนาเนสและคำนวณเทียบเป็นปริมาณการใช้งานจริงที่ 10 หน่วยต่อมิลลิลิตร ผสม PKC กับเอนไซม์ที่เตรียมไว้ อัตราส่วน PKC : เอนไซม์ เท่ากับ 1:5 นำไปแช่แบบควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส 10 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 12,860×g, 4 องศาเซลเซียส 15 นาที เพื่อแยกตะกอนและส่วนใส เก็บรักษาตัวอย่างที่ -20 องศาเซลเซียส ทำการสกัดทั้งหมด 3 ครั้ง

2. การวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ในไฮโดรไลสจาก PKC

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมด

วิเคราะห์ด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (phenol-sulfuric acid method) ดัดแปลงจากวิธีการของ Bello et al., (2018) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวอย่างควบคุม นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณเป็นปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมดโดยเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานกลูโคส ช่วงความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

วิเคราะห์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (dinitrosalicylic acid method: DNS) ดัดแปลงจาก Bello et al., (2018) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวอย่างควบคุม นำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณเป็นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐานกลูโคส ช่วงความเข้มข้น 0-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3. วิเคราะห์น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในไฮโดรไลสจาก PKC ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography: HPLC)

ตรวจสอบชนิดและปริมาณของน้ำตาลในไฮโดรไลสจากการสกัดทั้ง 3 วิธี ด้วยเครื่อง HPLC โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Zhang et al., (2021) ทำการฉีดตัวอย่างผ่านคอลัมน์ Aminex HPX-42C (bio-rad) ซึ่งเป็นคอลัมน์ประเภท ion exclusion มีคุณสมบัติในการแยกโอลิโกแซ็กคาไรด์และมอนแซ็กคาไรด์ได้ดี ใช้น้ำบริสุทธิ์สูงเป็นเฟสเคลื่อนที่ กำหนดอัตราการไหล 0.40 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ใช้ตัวตรวจวัดสารด้วยการหักเหของแสง (RI detector) เปรียบเทียบโครมาโตแกรมของสารตัวอย่างกับสารละลายมาตรฐาน 6 ชนิด คือ แมนโนส (mannose: M1) แมนโนไบโอส (mannobiose: M2) แมนโนไตรโอส (mannotriose: M3) แมนโนเตตระโอส (mannotetraose: M4) แมนโนเพนตะโอส (mannopentaose: M5) และแมนโนเฮกซะโอส (mannohexaose: M6) จากนั้นเลือกวิธีการที่เหมาะสมจากผลการวิเคราะห์ไปทำแท่งแบบแช่เยือกแข็ง โดยเตรียมตัวอย่าง 40 มิลลิลิตร และนำไปทำแท่งที่ -90 องศาเซลเซียส ความดัน 0.100 มิลลิบาร์ เป็นเวลา 25 ชั่วโมง เก็บรักษาตัวอย่างในโถดูดความชื้น

4. การทดสอบความสามารถของไฮโดรไลสจาก PKC ในการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียแลคติก

ดัดแปลงจากวิธีของ Azmi et al., (2012) โดยทำการทดสอบการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียแลคติกด้วยไฮโดรไลสที่สกัดได้จาก PKC เปรียบเทียบกับ FOS (fructo-oligosaccharides from chicory, sigma) โดยเตรียมอาหารเหลว De man Rogosa and sharpe (MRS) 3 ชุดการทดลอง ดังนี้ 1) MRS (ชุดควบคุม) 2) MRS+FOS 125 และ 250ppm

3) MRS+ไฮโดรไลเซส 125 และ 250ppm นำอาหารทั้ง 3 ชุด ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อทดสอบเป็นแบคทีเรียแลคติกโอโซเลท SHI-1 ที่คัดแยกได้จากอุจจาระของสุนัขสายพันธุ์ปอมเมอเรเนียน อายุ 1 ปี โดยมีการเจริญและพบโซนไฮรอปโคโลนีในอาหารแข็ง MRS ซึ่งมีแคลเซียมคาร์บอเนตเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และมีผลการย้อมแกรมเป็นบวก เซลล์เป็นทรงกลม จำแนกสายพันธุ์ด้วยเทคนิค 16S rRNA sequencing โดยการสกัด DNA จากเซลล์แบคทีเรียที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ในอาหารเหลว MRS ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำ DNA ที่ได้ไปเพิ่มปริมาณยีนช่วงที่เป็นตำแหน่งอนุรักษ์ของ 16S rRNA ด้วย primer 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') และ 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') และหาลำดับยีน ด้วย primer 785F (5'-GGA TTA GAT ACC CTG GTA-3') และ 907R (5'-CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT-3') วิเคราะห์ลำดับ DNA ที่ได้ด้วยการทำ nucleotide BLAST ในฐานพันธุกรรมของ NCBI ผลการวิเคราะห์ได้ลำดับ DNA ที่มีความยาว 1,481 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งมีความเหมือนกับ *Enterococcus faecalis*, strain: JCM 8726 ที่ 99.72 เปอร์เซ็นต์ โดย *Enterococcus* เป็นสกุลของแบคทีเรียแลคติกในไฟลัม firmicutes (Panthee et al., 2021) *E. faecalis* พบได้ในบริเวณลำไส้ใหญ่ของสุนัขและมีผลการทดสอบที่แสดงถึงคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่ดี (Strompfová et al., 2004) การทดสอบทำโดยนำหัวเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เติมนลงในอาหารเหลว MRS ที่เตรียมไว้ทั้ง 3 ชุด โดยให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 1×10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างน้ำหมักที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญของเชื้อด้วยการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ใช้อาหารเหลว MRS ที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวอย่งควบคุม ในงานทดลองนี้ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5. การประเมินคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกส์ของไฮโดรไลเซสจาก PKC

5.1 การทดสอบการทนต่อน้ำย่อยกระเพาะอาหารสุนัขเทียม

ดัดแปลงจากวิธีการของ Bello et al., (2018) โดยเตรียมน้ำย่อยสุนัขเทียม ประกอบด้วย โซเดียมคลอไรด์ 2 กรัมต่อลิตร, เอนไซม์เปปซิน 3.2 กรัมต่อลิตร และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มัล, 24 มิลลิลิตร (Okamoto et al., 2001) ปรับค่า pH เป็น 2 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 โมลาร์ จากนั้นผสมไฮโดรไลเซสกับน้ำย่อยที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 1 ชั่วโมง เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยด้วยน้ำย่อยกระเพาะอาหารสุนัขเทียม (%hydrolysis) ดังสมการ (1) จากนั้นนำค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การทนต่อการย่อยด้วยน้ำย่อยกระเพาะอาหารสุนัขเทียม (%resistance hydrolysis) ดังสมการ (2)

5.2 การทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส

ดัดแปลงจากวิธีการของ Bello et al., (2018) การเตรียมสารสำหรับทดสอบ แบ่งเป็น 2 ส่วน ดังนี้ ส่วนที่ 1) เตรียมโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 ซึ่งเป็นสภาวะความเป็นกรดต่างที่ใกล้เคียงกับลำไส้เล็กส่วนบนของสุนัขมากที่สุด (Jana & Kango, 2020) ผสมกับไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ส่วนที่ 2) เตรียมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 6.7 มิลลิโมลาร์ ผสมกับเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส ความเข้มข้น 2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำส่วนที่ 2 ผสมกับส่วนที่ 1 ที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 1 ชั่วโมง เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ และคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยด้วยเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส (%hydrolysis) ดังสมการ (1) จากนั้นนำค่าเปอร์เซ็นต์การย่อยมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส (%resistance hydrolysis) ดังสมการ (2)

$$\% \text{hydrolysis} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ณ เวลาที่เก็บตัวอย่าง}}{\text{ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมดเริ่มต้น} - \text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น}} \times 100 \quad (1)$$

$$\% \text{resistance hydrolysis} = 100\% - \% \text{hydrolysis} \quad (2)$$

6. การทดสอบทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนำมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม Microsoft excel เพื่อหาค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation: SD) ของแต่ละชุดข้อมูล เพื่อแสดงแนวโน้มและการกระจายของข้อมูลในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง โดยนำเสนอในรูปแบบของตารางและกราฟประกอบ วิเคราะห์ผลการทดลองด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) และทดสอบความแตกต่างด้วยวิธี Tukey's HSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

1. การสกัดไฮโดรไลเสทจาก PKC

1.1 การเตรียม PKC

นำ PKC มาร่อนผ่านตะแกรงความถี่ 600 เมช เพื่อกำจัดเศษไม้ เศษหิน และเศษดิน ที่ปะปนมาจากการบีบอัดน้ำมัน พบว่าตัวอย่าง PKC มีปริมาณของผงหยาบและผงละเอียดอยู่ที่ 50.69 และ 49.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือก PKC ผงละเอียดมาใช้ในการศึกษา เนื่องจากมีความละเอียดและง่ายต่อการปรับสภาพตัวอย่างและการย่อย ดัง (Figure 1)



Figure 1 Palm kernel cake (PKC).

PKC ที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว มีลักษณะแห้งและเบาวก่อนปรับสภาพ และจับกันเป็นก้อนขนาดไม่สม่ำเสมอ ทั้งนี้ เกิดจากการปรับสภาพตัวอย่างด้วยไฮโดรอกไซด์ ที่ทำให้เซลลูโลสละลายตัว และวัตถุดิบมีความเป็นร่วนมากขึ้น (Premchit & Premchit, 2016) ซึ่งจะส่งผลต่อประสิทธิภาพของการย่อยในขั้นตอนถัดไป ดัง (Figure 2)



Figure 2 PKC before (left) and after (right) pretreatment.

1.2 การสกัดไฮโดรไลสจาก PKC ด้วยวิธีสกัดที่แตกต่างกัน 3 วิธี

PKC ถูกสกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 3 วิธี ดังนี้ 1) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ต่อปริมาตร 2) เอทานอล 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และ 3) เอนไซม์ Bio-ase 10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร พบว่าการสกัดด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุดอยู่ที่ 616.03 ± 61.820^a และ 19.37 ± 0.002^a กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการสกัดด้วยเอทานอล และเอนไซม์ Bio-ase ดัง (Table 1) เนื่องจากโซเดียมไฮดรอกไซด์สามารถเข้าไปทำลายโครงสร้างของลิกนินทำให้เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสแยกออกจากกัน ส่งผลให้เกิดการย่อยได้ดีขึ้น (Yu et al., 2015) ขณะที่การสกัดด้วยเอทานอลเหมาะสำหรับการสกัดไขมันและสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) มากกว่าการนำมาใช้สกัดพอลิแซ็กคาไรด์จึงสกัดออกมาได้ในปริมาณน้อย (Rabemanolontsoa & Saka, 2016) สำหรับการใช้น้ำเอนไซม์ Bio-ase พบว่าสามารถย่อยโครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์บางส่วนได้ แต่ความเข้มข้นอาจไม่เพียงพอจึงทำให้การสกัดมีประสิทธิภาพต่ำกว่าการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ ทั้งนี้การวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ ช่วยประเมินประสิทธิภาพเบื้องต้นของการสกัดแต่ละวิธี และคาดการณ์ความสามารถในการผลิตไฮโดรไลสที่มีส่วนผสมของ MOS ได้ โดยพิจารณาจากปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมด ซึ่งใช้เป็นตัวชี้วัดเบื้องต้นของการพบ MOS ในไฮโดรไลส

Table 1 Total polysaccharide and reducing sugar contents in the supernatant and precipitate of PKC hydrolysates obtained by the three extraction methods.

treatments	total polysaccharide (gram/liter)		reducing sugar (gram/liter)	
	supernatant	precipitate	supernatant	precipitate
2%(w/v) NaOH	616.03 ± 61.820^a	620.95 ± 12.767^a	19.37 ± 0.002^a	0.87 ± 0.003^c
10%(v/v) ethanol	15.56 ± 0.718^b	54.92 ± 3.094^b	0.80 ± 0.001^c	0.10 ± 0.002^d
Bio-ase 10unit/milliliter	96.01 ± 6.264^b	9.76 ± 1.576^b	2.61 ± 0.003^b	0.13 ± 0.002^d

means with small letters superscript among solvent extract down the column are significantly different from each other ($p < 0.05$)

1.3 การวิเคราะห์น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของไฮโดรไลสจาก PKC ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography: HPLC)

วิเคราะห์องค์ประกอบในไฮโดรไลสจาก PKC จากวิธีการสกัดทั้ง 3 วิธี ด้วยเทคนิค HPLC เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน 6 ชนิด ปริมาณ MOS ในไฮโดรไลสจาก PKC ดัง (Table 2)

Table 2 MOS content in PKC hydrolysates analyzed by HPLC.

treatment	M1 (gram/liter)	M2 (gram/liter)	M3 (gram/liter)	M4 (gram/liter)	M5 (gram/liter)	M6 (gram/liter)	total MOS ^{1/} (gram/liter)
S1 ^{3/}	ND ^{2/}	ND	ND	ND	ND	ND	0.000
S2 ^{4/}	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.000
S3 ^{5/}	<0.016	ND	0.109	ND	ND	ND	0.109
S4 ^{6/}	ND	ND	<0.021	ND	ND	ND	0.021
S5 ^{7/}	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.000
S6 ^{8/}	ND	<0.021	<0.021	<0.012	ND	ND	0.054

^{1/} total MOS = M2+M3+M4+M5+M6

^{2/} ND = not detected

^{3/ 4/ 5/} supernatant of hydrolysate from PKC extracted with 2%(w/v) NaOH, 10%(v/v) ethanol and Bio-ase enzyme at a concentration of 10unit/milliliter, respectively.

^{6/ 7/ 8/} solution obtained from the dissolved precipitate of hydrolysate from PKC extracted with 2%(w/v) NaOH, 10%(v/v) ethanol and Bio-ase enzyme at a concentration of 10unit/milliliter, respectively.

จาก (Table 2) การวิเคราะห์ไฮโดรไลส สามารถพบ MOS ในตัวอย่าง S3, S4 และ S6 โดย S3 มีแมนโนไตรออส อยู่ที่ 0.109 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณสูงมากเมื่อเทียบกับการศึกษาของ Ayimbila & Keawsompong (2022) ที่สกัดแมนโนไตรออสจากของเหลือทิ้งทางการเกษตรได้เพียง 0.013 กรัมต่อลิตร ในรูปแบบของเหลว ขณะที่ S4 และ S6 มีปริมาณ MOS น้อยกว่า เมื่อเทียบกับ S3 เมื่อพิจารณาถึงความคุ้มค่าในการผลิต จึงคัดเลือกตัวอย่าง S3 เพื่อนำไปทดลองขั้นตอนถัดไป ผลการวิเคราะห์นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Zhang et al., (2021) ที่ใช้เอนไซม์แมนนาเนสย่อยโกลด์บีนกัม และ PKC พบว่าชนิดของ MOS ในไฮโดรไลสที่ได้จากการย่อย PKC ประกอบไปด้วย แมนโนไบออส แมนโนไตรออส และ แมนโนเตตระออส

สำหรับตัวอย่าง S1 แม้ว่าวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริกจะพบปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ทั้งหมดสูงที่สุด แต่เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค HPLC กลับไม่พบ MOS ในองค์ประกอบ ทั้งนี้ อาจมีสาเหตุมาจากการสลายพันธะไกลโคซิดิกในโครงสร้าง MOS ภายใต้อิทธิพลของอุณหภูมิและเปลี่ยนเป็นมอนอแซ็กคาไรด์ (Yu et al., 2015) ดังนั้น พอลิแซ็กคาไรด์ที่พบใน S1 อาจเป็นชนิดอื่น นอกจากนี้ Chen et al., (2015) ได้รายงานไว้ว่าการสกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์อาจดึงสารอินทรีย์ชนิดอื่น เช่น โปรตีน ลิพิด หรือสารประกอบฟีนอลิก ออกมาด้วย ซึ่งสารเหล่านี้ทำให้เกิดการปนเปื้อนในไฮโดรไลสส่งผลให้ไม่สามารถตรวจพบ MOS ในตัวอย่าง S1 ได้

2. การสกัดไฮโดรไลเสทจาก PKC ด้วยเอนไซม์ Bio-ase ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ

2.1 การศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ Bio-ase ที่เหมาะสมในการสกัดไฮโดรไลเสทจาก PKC

จากผลการวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในไฮโดรไลเสทจาก PKC พบว่าการสกัดด้วยเอนไซม์ Bio-ase เข้มข้น 10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มีความเหมาะสมมากที่สุด จึงนำวิธีการนี้มาศึกษาต่อโดยการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อความสามารถในการสกัด MOS เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการสกัด ดัง (Table 3)

Table 3 MOS content in PKC hydrolysates extracted using three different enzyme concentrations.

treatment	M1 (gram/liter)	M2 (gram/liter)	M3 (gram/liter)	M4 (gram/liter)	M5 (gram/liter)	M6 (gram/liter)	total MOS ^{1/} (gram/liter)
S3-1 ^{3/}	0.07	0.09	0.15	0.14	ND ^{2/}	ND	0.38
S3-2 ^{4/}	0.12	0.15	0.15	0.12	ND	ND	0.42
S3-3 ^{5/}	0.12	0.17	0.16	0.12	ND	ND	0.45

^{1/} total MOS = M2+M3+M4+M5+M6

^{2/} ND = not detected

^{3/ 4/ 5/} hydrolysate from PKC extracted using Bio-ase enzyme at a concentration of 10, 15 and 20unit/milliliter, respectively.

จาก (Table 3) พบว่าปริมาณ MOS ทั้งหมด ของตัวอย่าง S3-1 ถึง S3-3 เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของโอลิโกแซ็กคาไรด์แต่ละชนิด (M2-M6) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ Bio-ase จาก 10 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็น 15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ทำให้แมนโนไบโอส (M2) เพิ่มขึ้นจาก 0.09 กรัมต่อลิตร เป็น 0.15 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 66.67 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณ MOS ทั้งหมดเพิ่มขึ้นเป็น 0.42 กรัมต่อลิตร จากเดิม 0.38 กรัมต่อลิตร แสดงถึงความสามารถในการย่อยของเอนไซม์ที่มากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 20 ยูนิตต่อมิลลิลิตร กลับให้ผลผลิต M2 และปริมาณ MOS ทั้งหมดเพิ่มขึ้นเพียง 13.33 เปอร์เซ็นต์ และ 0.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อย PKC และผลิต MOS อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามปริมาณเอนไซม์ที่มากขึ้นอาจเข้าไปย่อย MOS จนเปลี่ยนเป็นมอโนแซ็กคาไรด์ สังเกตได้จากการเพิ่มขึ้นของแมนโนส (M1) ซึ่งเป็นมอโนแซ็กคาไรด์ สอดคล้องกับศึกษาของ Murillo-Franco et al., (2024) ที่พบว่าการใช้เอนไซม์ความเข้มข้นสูงทำให้ปริมาณโอลิโกแซ็กคาไรด์ลดลงและเพิ่มปริมาณมอโนแซ็กคาไรด์ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย จึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ 15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด นอกจากนี้เอนไซม์ Bio-ase ประกอบด้วย อะไมเลส (amylase) ไกลโคไซด์เลส (xyloxydase) เบตาไกลูคาเนส (β -glucanase) ไลเปส (lipase) เซลลูเลส (cellulase) แมนนานเนส (mannanase) ฟอสเฟส (phosphatase) และเพกตินเนส (pectinase) ซึ่งเอนไซม์หลายชนิดช่วยย่อยโครงสร้างภายนอกที่ซับซ้อนของ PKC ก่อนที่แมนนานเนสจะเข้ามาย่อยแมนแนนในเฮมิเซลลูโลส ส่งผลให้การผลิต MOS มีประสิทธิภาพมากกว่าเมื่อใช้แมนนานเนสบริสุทธิ์เพียงอย่างเดียว สอดคล้องกับการศึกษาของ Chen et al., (2015) ที่กล่าวถึงการใช้เอนไซม์ผสมที่ผลิตจาก *Aspergillus terreus* ซึ่งประกอบด้วย เอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) แมนนานเนส (mannanase) และ ไกลโคไซด์เลส (xyloxydase) โดยเอนโดกลูคาเนสและไกลโคไซด์เลสจะย่อยโครงสร้างส่วน NSP (non-starch polysaccharides) ของ PKC ให้คลายตัวออกทำให้แมนนานเนสสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

2.2 การวิเคราะห์น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่างไฮโดรไลเสทจาก PKC ที่ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

นำตัวอย่าง S3-2 หลังจากทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ไปละลายน้ำก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC ได้ผลผลิต MOS ทั้งหมด 3.48 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นเดิม พบว่าได้ MOS เพิ่มขึ้นเพิ่มขึ้น 8.29 เท่า ดัง (Table 4) เมื่อพิจารณาโครมาโตแกรมของไฮโดรไลเสทก่อนและหลังทำแห้ง พบว่ามีองค์ประกอบของ M2-M6 เหมือนกัน แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างและองค์ประกอบของ MOS ในไฮโดรไลเสทไม่ถูกทำลายระหว่างกระบวนการ อย่างไรก็ตาม การเจือจางเพียง 3 เท่า ทำให้เกิดการซ้อนทับกันของโครมาโตแกรมส่งผลให้ไม่สามารถแยกองค์ประกอบได้อย่างชัดเจน ขณะที่เมื่อเพิ่มการเจือจางเป็น 15 เท่า สามารถแยกองค์ประกอบได้ชัดเจนยิ่งขึ้น ดัง (Figure 3) จึงสามารถกล่าวได้ว่าการปรับระดับการเจือจางมีผลโดยตรงต่อความสามารถในการแยกองค์ประกอบด้วย HPLC ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานของ Maisl et al., (2023) ที่กล่าวว่า การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งสามารถรักษาโครงสร้างและความคงตัวของสารชีวโมเลกุลได้ดี เนื่องจากเป็นกระบวนการที่ใช้อุณหภูมิและความดันต่ำ จึงลดการสลายตัวของสารสำคัญต่าง ๆ เช่น โอลิโกแซ็กคาไรด์ และสารพฤษเคมีได้ นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการยังมีลักษณะพูน ทำให้สามารถละลายได้ดีและเสถียรกว่าการทำแห้งด้วยการให้ความร้อน (Krakowska-Sieprawska et al., 2022)

Table 4 Comparison of MOS content in sample S3-2 before and after freeze-drying.

treatment	M1 (gram/liter)	M2 (gram/liter)	M3 (gram/liter)	M4 (gram/liter)	M5 (gram/liter)	M6 (gram/liter)	total MOS ^{1/} (gram/liter)
S3-2 before freeze-drying	0.12	0.15	0.15	0.12	ND	ND	0.42
S3-2 after freeze-drying	0.49	0.84	2.14	0.50	ND	ND	3.48

^{1/} total MOS = M2+M3+M4+M5+M6

3. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกส์

3.1 การทดสอบการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียแลคติก

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *E. faecalis* SHI-1 พบโซนใสรอบโคโลนีในอาหารแข็ง MRS ซึ่งมีแคลเซียมคาร์บอเนตเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และมีผลการย้อมแกรมเป็นบวก เซลล์เป็นรูปกลม ดัง (Figure 4) เมื่อพิจารณาการเปรียบเทียบความสามารถของไฮโดรไลเสทที่สกัดได้จาก PKC กับ FOS ในการส่งเสริมการเจริญของ *E. faecalis* SHI-1 โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ดัง (Figure 5) พบว่าไฮโดรไลเสทจาก PKC ที่ระดับความเข้มข้น 125 และ 250ppm มีค่าการเจริญของไฮโดรไลเสท SHI-1 สูงกว่ากลุ่มควบคุมและ FOS ในช่วงเวลา 24-72 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าไฮโดรไลเสทจาก PKC มีศักยภาพสูงในการเป็นพรีไบโอติกส์ แม้จะใช้ในปริมาณน้อย ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Perini et al., (2023) ที่รายงานว่า MOS มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* ในสุนัขได้ดีกว่า FOS และ GOS ซึ่งสังเกตได้จากการเพิ่มขึ้นของจำนวนจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์และการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสุนัขที่เพิ่มขึ้น

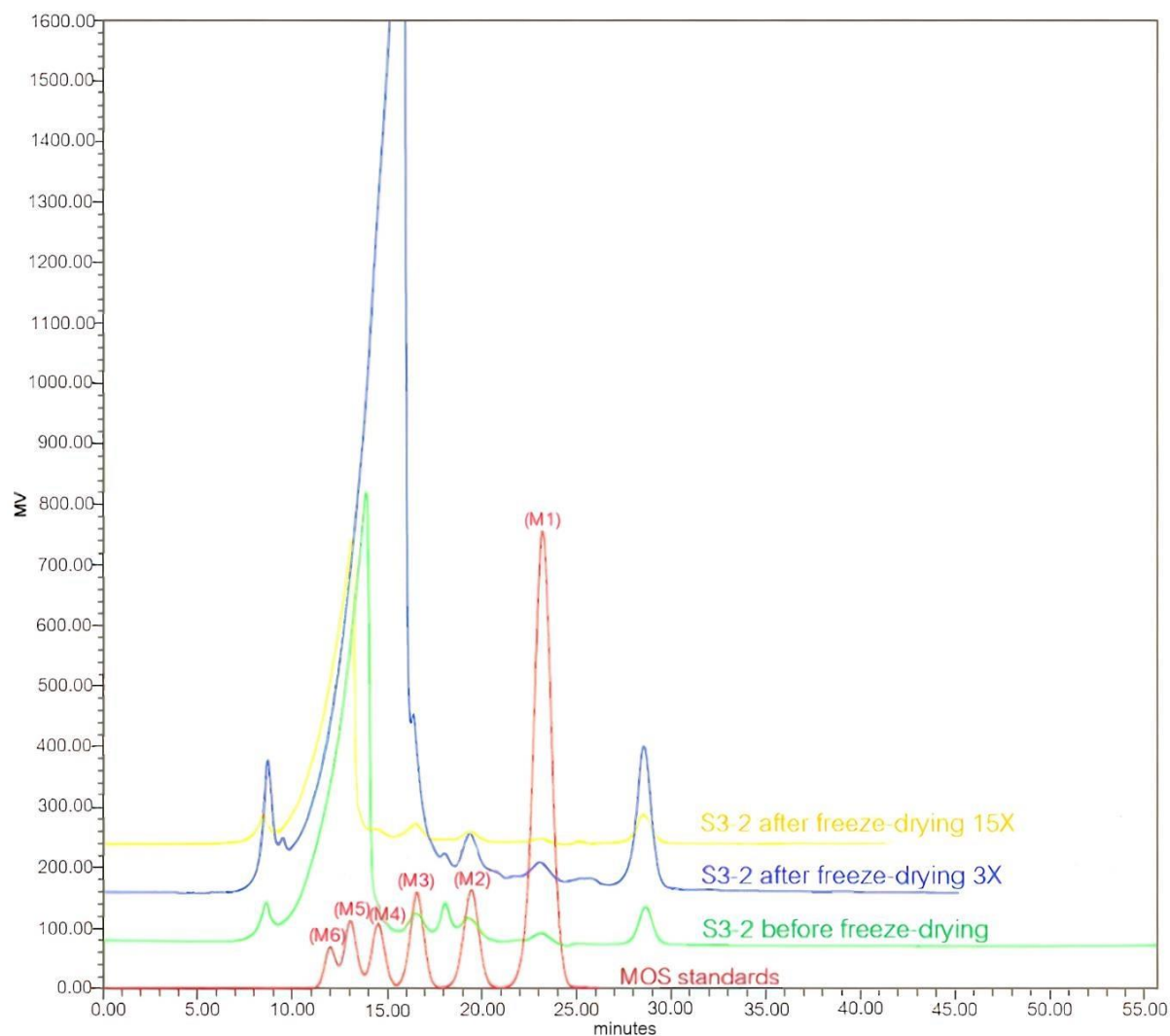


Figure 3 Chromatograms of oligosaccharides in sample S3-2 before and after freeze-drying, analyzed using a Biorad HPX-42C column and compared with standard solutions M1-M6.

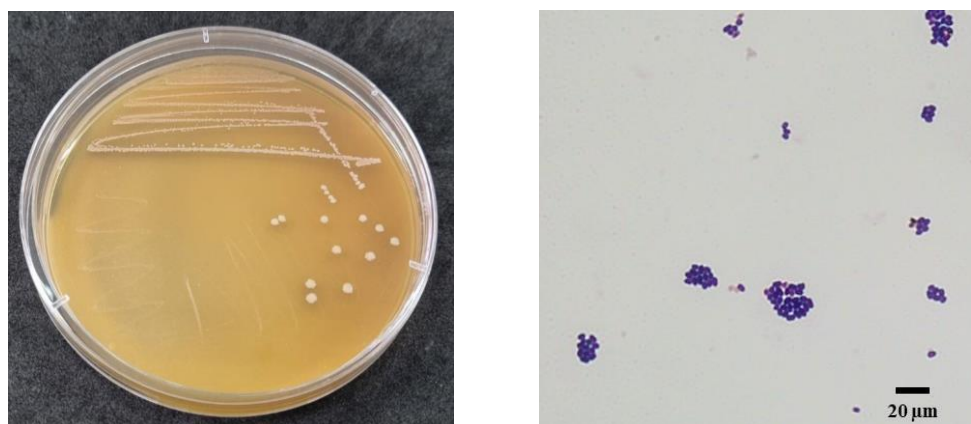


Figure 4 Morphological characteristics of *E. faecalis* SHI-1 from a 1-year-old Pomeranian dog observed at 100X magnification.

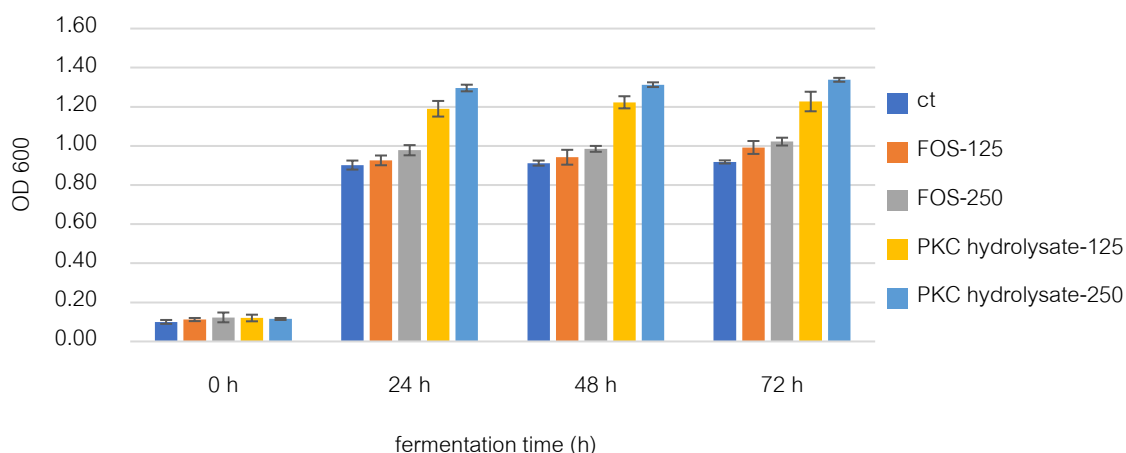


Figure 5 Comparison of the growth-promoting effects of PKC hydrolysate and FOS on *E. faecalis* SHI-1.

3.2 การทดสอบการทนต่อน้ำย่อยกระเพาะอาหารสุนัขเทียม

พบว่าไฮโดรไลสจาก PKC สามารถทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินในสภาวะความเป็นกรดได้ถึง 98.86 เปอร์เซ็นต์ แม้การย่อยจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่กระเพาะอาหารสุนัขใช้ในการย่อยอาหาร และถูกส่งต่อไปยังลำไส้เล็กส่วนต้น ดัง (Figure 6) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Bello et al., (2018) ที่นำ MOS บริสุทธิ์ มาทดสอบความสามารถในการทนต่อน้ำย่อยกระเพาะอาหารมนุษย์จำลองที่ pH 2 พบว่า MOS สามารถทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์และสภาวะความเป็นกรดได้ 98.62 เปอร์เซ็นต์

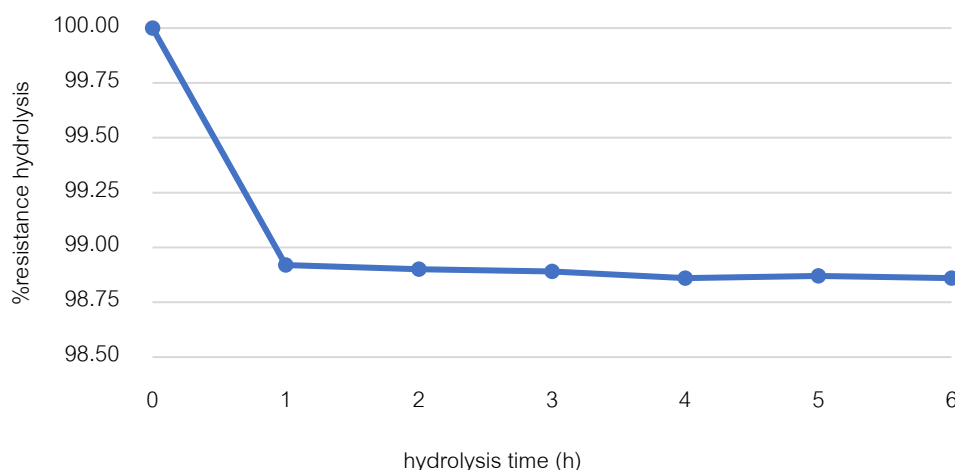


Figure 6 Percentage of resistance hydrolysis of PKC hydrolysate by pepsin under acidic conditions.

3.3 การทดสอบการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส

พบว่าไฮโดรไลสจาก PKC สามารถทนต่อการย่อยได้สูงถึง 99.19 เปอร์เซ็นต์ โดยระดับการย่อยเพิ่มขึ้นในช่วง 3 ชั่วโมงแรกและมีแนวโน้มคงที่ในชั่วโมงที่ 4 ซึ่งบ่งชี้ถึงคุณสมบัติของพรีไบโอติกส์คือการไม่ถูกย่อยในระบบทางเดินอาหารส่วนต้น ดัง (Figure 7) ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาการทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสของ MOS บริสุทธิ์ที่สามารถทนได้ถึง 98.32 เปอร์เซ็นต์ (Bello et al., 2018)

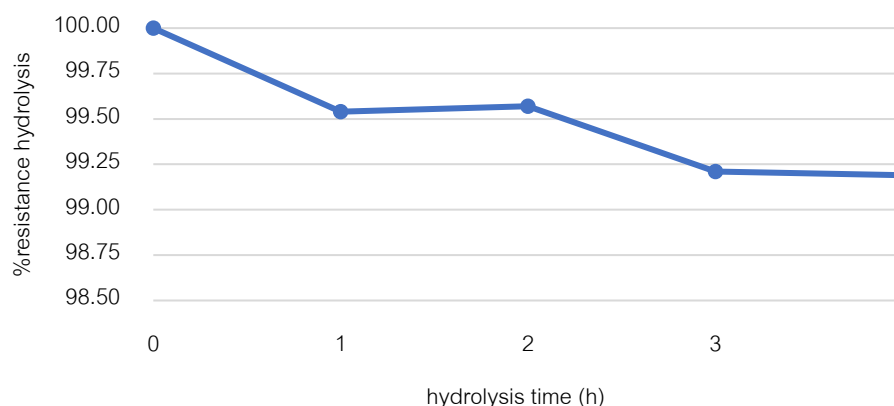


Figure 7 Percentage of resistance hydrolysis of PKC hydrolysate by α -amylase.

4. ภาพรวมของการผลิตไฮโดรไลเสทจาก PKC ด้วยเอนไซม์ Bio-ase

การผลิตไฮโดรไลเสทจาก PKC ด้วยเอนไซม์ Bio-ase เข้มข้น 15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ประกอบด้วย 4 ขั้นตอนหลักดัง (Figure 8) ซึ่งจะได้ไฮโดรไลเสทในรูปแบบผงปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ หรือ 0.266 กรัม หรือคิดเป็นผลผลิต 2.66 กรัม ไฮโดรไลเสทต่อกิโลกรัม PKC นอกจากนี้ขั้นตอนการผลิตยังใช้ระยะเวลาเพียง 34 ชั่วโมง ซึ่งสามารถลดขั้นตอนการผลิตได้เมื่อเทียบกับการศึกษาของ Bello et al., (2018) ที่ทำการสกัด MOS จาก PKC โดยใช้ไซโตลิมไฮดรอกไซด์ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยม โดยมีขั้นตอนการผลิต 10 ขั้นตอน และใช้ระยะเวลาผลิตถึง 72 ชั่วโมง แสดงให้เห็นถึงศักยภาพการผลิตไฮโดรไลเสทจาก PKC ที่มีองค์ประกอบเป็น MOS ได้ด้วยกระบวนการที่สามารถลดขั้นตอนและระยะเวลาการผลิต และสามารถให้เอนไซม์ Bio-ase ที่ผลิตในประเทศไทยย่อย PKC ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังเป็นการลดการใช้สารเคมีในการผลิต สามารถทดแทนการนำเข้าเอนไซม์บริสุทธิ์จากต่างประเทศได้เป็นอย่างดี ส่งเสริมให้สามารถพัฒนาไปสู่การนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ได้ต่อไป ทั้งนี้ควรศึกษาต่อในด้านการปรับขั้นตอนการผลิตให้ได้ปริมาณผลผลิตที่สูงขึ้นและคุ้มค่าต่อการผลิตมากยิ่งขึ้น

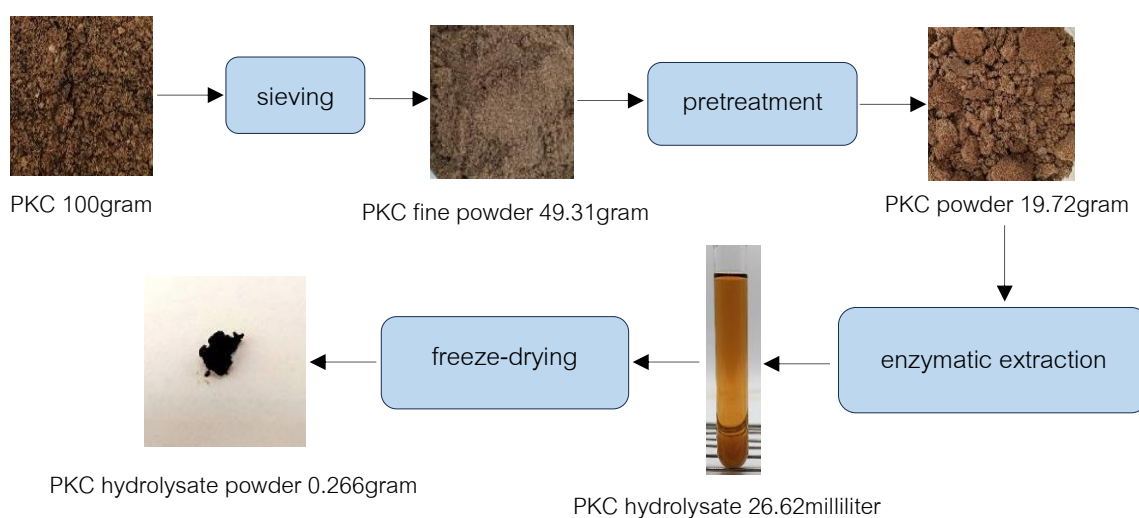


Figure 8 Overview of the PKC hydrolysate production.

สรุป

PKC ซึ่งได้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันปาล์ม สามารถนำมาสกัดไฮโดรไลเซตที่มีส่วนประกอบของ MOS ได้ด้วย เอนไซม์ Bio-ase ความเข้มข้น 15 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยให้ผลผลิต MOS ทั้งหมด 3.48 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วย แมนโนโบไอส แมนโนไตรโอส และแมนโนเตตระโอส เมื่อทดสอบคุณสมบัติในการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียแลคติก พบว่าไฮโดรไลเซตจาก PKC ที่ระดับความเข้มข้น 125 และ 250ppm สามารถส่งเสริมการเจริญของ *E. faecalis* SHI-1 ได้ดีกว่า FOS โดยไม่เกิดการยับยั้งการเจริญ สามารถทนต่อการย่อยของน้ำย่อยกระเพาะอาหารสุนัขเทียมและเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสได้ถึง 98.86 และ 99.19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้การผลิตไฮโดรไลเซตจาก PKC ในการศึกษานี้ยังสามารถลดขั้นตอนและระยะเวลาการผลิตได้ จากผลการศึกษานี้สรุปได้ว่าการผลิตไฮโดรไลเซตจาก PKC ที่เป็นวัตถุดิบเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มด้วยเอนไซม์ Bio-ase ที่ผลิตในประเทศไทยเป็นวิธีการผลิตที่เหมาะสม สามารถลดการใช้สารเคมีในการผลิต และทดแทนการใช้เอนไซม์บริสุทธิ์จากต่างประเทศ ใช้เวลาและขั้นตอนน้อย แสดงถึงศักยภาพในการนำไปใช้ผลิตไฮโดรไลเซตจาก PKC ที่มี MOS เป็นส่วนประกอบ และสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์เลี้ยงได้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Ayimbila, F., & Keawsompong, S. (2022). Characteristics and bioactive properties of agro-waste and yeast derived manno-oligosaccharides. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 45, 102522. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102522>
- Azmi, A. F. M. N., Mustafa, S., Hashim, D. M., & Manap, Y. A. (2012). Prebiotic activity of polysaccharides extracted from *Gigantochloa levis* (Buluh beting) shoots. *Molecules*, 17(2), 1635-1651. <https://doi.org/10.3390/molecules17021635>
- Bello, B., Mustafa, S., Tan, J. S., Ibrahim, T. A. T., Tam, Y. J., Ariff, A. B., Manap, M. Y., & Abbasiliasi, S. (2018). Evaluation of the effect of soluble polysaccharides of palm kernel cake as a potential prebiotic on the growth of probiotics. 3 *Biotech*, 8, 346. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1362-4>
- Chen, W. L., Liang, J. B., Jahromi, M. F., Abdullah, N., Wan, H. Y., & Tufarelli, V. (2015). Enzyme treatment enhances release of prebiotic oligosaccharides from palm kernel expeller. *BioResources*, 10(1), 196-209. <https://bioresources.cnr.ncsu.edu/resources/enzyme-treatment-enhances-release-of-prebiotic-oligosaccharides-from-palm-kernel-expeller>
- Jahromi, M. F., Liang, J. B., Abdullah, N., Goh, Y. M., Ebrahimi, R., & Shokryazdan, P. (2016). Extraction and characterization of oligosaccharides from palm kernel cake as prebiotic. *BioResources*, 11(1), 674-695. <https://bioresources.cnr.ncsu.edu/resources/extraction-and-characterization-of-oligosaccharides-from-palm-kernel-cake-as-prebiotic>
- Jana, U. K., & Kango, N. (2020). Characteristics and bioactive properties of mannooligosaccharides derived from agro-waste mannans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 149, 931-940. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.304>
- Krakowska-Sieprawska, A., Kietbasa, A., Rafinska, K., Ligor, M., & Buszewski, B. (2022). Modern methods of pre-treatment of plant material for the extraction of bioactive compounds. *Molecules*, 27(3), 730. <https://doi.org/10.3390/molecules27030730>

- Maisl, C., Doppler, M., Seidl, B., Bueschl, C., & Schuhmacher, R. (2023). Untargeted plant metabolomics: Evaluation of lyophilization as a sample preparation technique. *Metabolites*, 13(6), 686. <https://doi.org/10.3390/metabo13060686>
- Murillo-Franco, S. L., Galvis-Nieto, J. D., & Orrego, C. E. (2024). Mannooligosaccharide production from açai seeds by enzymatic hydrolysis: Optimization through response surface methodology. *Environmental Science and Pollution Research*. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-33540-2>
- Okamoto, Y., Nose, M., Miyatake, K., Sekine, J., Oura, R., Shigemasa, Y., & Minami, S. (2001). Physical changes of chitin and chitosan in canine gastrointestinal tract. *Carbohydrate Polymers*, 44(3), 211-215. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00229-0](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00229-0)
- Panthee, S., Paudel, A., Hamamoto, H., Ogasawara, A. A., Iwasa, T., Blom, J., & Sekimizu, K. (2021). Complete genome sequence and comparative genomic analysis of *Enterococcus faecalis* EF-2001, a probiotic bacterium. *Genomics*, 113(3), 1534-1542. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.12.014>
- Perini, M. P., Pedrinelli, V., Marchi, P. H., Henriquez, L. B. F., Zafalon, R. V. A., Vendramini, T. H. A., Balieiro, J. C. D. C., & Brunetto, M. A. (2023). Potential effects of prebiotics on gastrointestinal and immunological modulation in the feeding of healthy dogs: A review. *Fermentation*, 9(7), 693. <https://doi.org/10.3390/fermentation9070693>
- Premchit, S., & Premchit, D. (2016). *Pretreatment of weed biomass with sodium hydroxide* (Research report). Naresuan University. NU Intellectual Repository. <https://nuir.lib.nu.ac.th/dspace/handle/123456789/4031> (in Thai)
- Rabemanolontsoa, H., & Saka, S. (2016). Various pretreatments of lignocellulosics. *Bioresource Technology*, 199, 83-91. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.029>
- Strompfová, V., Lauková, A., & Ouwehand, A. C. (2004). Selection of enterococci for potential canine probiotic additives. *Veterinary Microbiology*, 100(1-2), 107-114. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.02.002>
- Yu, H., You, Y., Lei, F., Liu, Z., Zhang, W., & Jiang, J. (2015). Comparative study of alkaline hydrogen peroxide and organosolv pretreatments of sugarcane bagasse to improve the overall sugar yield. *Bioresource Technology*, 187, 161-166. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.123>
- Zhang, R., Li, X. Y., Cen, X. L., Gao, Q. H., Zhang, M., Li, K. Y., Wu, Q., Mu, Y. L., Tang, X. H., Zhou, J. P., & Huang, Z. X. (2021). Enzymatic preparation of manno-oligosaccharides from locust bean gum and palm kernel cake, and investigations into its prebiotic activity. *Electronic Journal of Biotechnology*, 49, 64-71. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.11.001>