รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : **วิจัยและพัฒนาการเพิ่มมูลค่าผลผลิต**
2. **โครงการวิจัย** : **การผลิตผลิตภัณฑ์ใหม่จากพืช**

   กิจกรรม : **การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์แปรรูปจากพืช**

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : การศึกษาเทคโนโลยีการผลิต Fructooligosaccharide ในน้ำผลไม้โดยเอ็นไซม์จากจุลินทรีย์

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Study of Fructooligosaccharide Production in Fruit Juice by Microbial Enzyme

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง : นางสาววิมลวรรณ วัฒนวิจิตร
กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

ผู้ร่วมงาน : นายโกเมศ สัตยาวุธ
นางสาวอกนิษฐ์ พิศาลวัชรินทร์
นายประยูร เอ็นมาก
กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

5. **บทคัดย่อ**

การศึกษาเทคโนโลยีการผลิต Fructooligosaccharide ในน้ำผลไม้โดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์ ดำเนินการทดลองที่กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร ระหว่างปี 2557 – 2558 มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิต Fructooligosaccharide (FOS) โดยใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์และประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ โดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้เอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานส์เฟอเรสทางการค้าคือ Pectinex ultra SP-L ในการผลิต FOS และการประยุกต์ใช้น้ำเชื่อม FOS จากเอนไซม์ pectinex ultra SP-L ในการผลิตน้ำผลไม้ รวมถึงการประยุกต์ใช้เอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานส์เฟอเรสในการผลิต FOS ในน้ำผลไม้ 100 % ผลจากการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้เอนไซม์ pectinex ultra SP-L ในการผลิต FOS จากน้ำตาลซูโครส คือ ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสมในการใช้เอนไซม์ pectinex ultra SP-L ในการผลิต FOS จากน้ำตาลซูโครสคือ 40 %w/w ปริมาณเอนไซม์ pectinex ultra

SP-L 3.5 U/g sucrose อุณหภูมิในการบ่ม 50 และ 55°C ใช้เวลาในการบ่ม 10 ชั่วโมง และสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium acetate 0.5 M ที่ pH 5.5 และ 6.0 จะได้น้ำเชื่อม FOS ที่มีปริมาณฟรุกแตนประมาณ 34 % w/w การประยุกใช้น้ำเชื่อม FOS ในการผลิตน้ำมะม่วงพร้อมดื่ม โดยมีส่วนผสมดังนี้ สูตรที่ผู้บริโภคยอมรับเท่ากับน้ำมะม่วงสูตรทั่วไปคือ เนื้อมะม่วงบดละเอียด 200 g น้ำเชื่อม FOS 750 g กรดซิตริก 2.1 g และน้ำเปล่า 47.9 g เป็นอัตราส่วนที่ผู้บริโภคให้การยอมรับเท่ากับน้ำมะม่วงสูตรทั่วไป การใช้เอนไซม์ Pectinex Ultra SP-L ในน้ำสับปะรดเทียบและสารละลายน้ำตาลซูโครส 10 % w/w มีปริมาณฟรุกแตนเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ทำให้น้ำผลไม้ 100 % ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสต่ำจึงไม่เหมาะสำหรับใช้ผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานส์เฟอเรส
คำสำคัญ : พรีไบโอติกส์ ฟรุกโต- โอลิโกแซ็กคาไรด์

Study of Fructooligosaccharide Production in Fruit Juice by Microbial Enzyme was performed during 2014 - 2015 at Postharvest and Processing Research and Development Division. The objectives of this study were to study Fructooligosaccharide (FOS) production by Microbial Enzyme and the application of FOS solution in fruit juice. The optimal condition of FOS produce from commercial fructosyltransferase enzyme, Pectinex ultra SP-L, and the usability of FOS solution in fruit juice process were investigated. The results showed that the optimal condition of FOS production from Pectinex ultra SP-L were as follow. The suitable initial sucrose concentration was 40 % w/w, the amount of Pectinex ultra SP-L was 3.5 U/g sucrose, incubation temperature were 55 and 60 °C, 10 hours incubation time, 0.5 M sodium acetate buffer pH 5.5 – 6.0 and the yield solution has fructan content about 34 %w/w. Afterward, The ingredient of high FOS mango juice that customer accept as general mango juice were 200 g mango puree, 750 g high FOS solution, 2.1 g citric acid and 47.9 g water. Finally, The use of Pectinex Ultra SP-L in pineapple juice and 10 %w/w sucrose solution was invest a few amount of fructan content in solution.

Keywords : Pre-biotics, Fructooligosaccharide

6. คำนำ

ในปัจจุบันผู้บริโภคส่วนใหญ่ให้ความสนใจในการรักษาสุขภาพมาก ทำให้อาหารเพื่อสุขภาพ (functional food) หรือ อาหารที่ให้ประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายมากกว่าอาหารปกติ โดยการเติมสารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายลงไป ได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้น ซึ่งการบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพ จะเน้นวัตถุดิบที่มาจากธรรมชาติ และมีผลการค้นคว้าวิจัยทางวิทยาศาสตร์รับรองคุณประโยชน์ (สำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม,

2552) เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคที่ต้องการมีสุขภาพที่ดีขึ้น และอาหารควบคุมแคลอรี่ สารให้ความหวานทางเลือกใหม่หลายตัว เช่น palatinose และโอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharide) ชนิดต่าง ๆ จึงได้รับความสนใจมาตั้งแต่ 1980 สารให้ความหวานเหล่านี้มีคุณสมบัติพิเศษนอกเหนือจากความหวาน FOS จากซูโครสจึงได้รับความสนใจมากและขยายตัวมากในตลาดสารให้ความหวานเนื่องจากการผลิตในประมาณมากทำได้ง่าย ให้รสหวานเหมือนกับซูโครส เช่น และคุณสมบัติที่ดีหลายอย่างเช่น แคลอรี่ต่ำ ไม่เป็นสารก่อมะเร็ง ปลอดภัยต่อผู้ป่วยเบาหวาน (Yun, 1996) ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ให้โทษในลำไส้ (Roberfroid *et al.*, 1998) ป้องกันอาการท้องผูก (Nyman, 2002) เพิ่มอัตราการดูดซึมแคลเซียม (Abrams *et al.*, 2005) ช่วยให้ระบบลำไส้ทำงานได้เป็นปกติ (Kleessen and Blaut, 2005) และยังช่วยลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งลำไส้อีกด้วย (Van Loo *et al.*, 2005)

FOSs เป็นน้ำตาลที่พบในธรรมชาติ พบมากในพืชอาหารหลายชนิดเช่น หน่อไม้ฝรั่ง กล้วย กระเทียม หอมหัวใหญ่ มะเขือเทศ ข้าวสาลี (Park and Pastores, 2003) มีโครงสร้างเป็น fructose oligomer ประกอบด้วยหมู่ fructosyl (F) ในตำแหน่ง β-2 กับ Sucrose (GF) เช่น 1-kestose (GF2), nystose (GF3), 1F-fructofuranosyl nystose (GF4) (Yun, 1996) บางครั้งอาจเรียกรวม oligo และ polysaccharide ของ fructose ซึ่งมี degree of polymerization (DP) ที่แตกต่างกันว่า fructan (Muir et al., 2007) โดยสารที่มีค่า DP อยู่ระหว่าง 2-9 เรียก Fructo-oligosaccharide (FOS) หรือ oligofructose ส่วนที่มีค่า DP ตั้งแต่ 10 ขึ้นไป เรียก inulin

พรีไบโอติกส์ในกลุ่มโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถผลิตได้จาก 3 วิธีการ ดังนี้ คือ การสกัดโอลิโกแซ็กคาไรด์จากพืชโดยตรง การควบคุมการไฮโดรไลซ์ (Hydrolysis) จากโพลิแซ็กคาไรด์ (Grizard and Barthomeuf, 1999) และการสังเคราะห์ด้วยเอนไซด์โดยใช้ Hydrolases และ/หรือ Glycosyl transferases จากพืชหรือแหล่งกำเนิดของจุลินทรีย์ (L'Hocine, Wang, Jiang, & Xu, 2000) การผลิต Oligosaccharide หรือ fructans ชนิดต่าง ๆ มีน้ำหนักโมเลกุลสูง จากกระบวนการ transfructosylation จากพืชหลายชนิดหรือจากจุลินทรีย์ ขึ้นอยู่กับแหล่งเอ็นไซม์และ linkages เช่น fructosyltransferase ได้จาก fungi เช่น Auroobasidium pullalans และ Aspergillus niger สร้างเฉพาะ 1F-type FOS ในขณะที่เอ็นไซม์จาก Claviceps purpurea Asparagus ผลิตทั้งชนิด 1F-type และ 6G-type แหล่งเอ็นไซม์ในการสังเคราะห์ FOS สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ พืช เช่น asparagus sugar beet onion Jerusalem artichoke และจากแบคทีเรียและรา เช่น *Aspergillus sp. Aureobasidium sp. Arthorobacter sp. Fusarium sp*. โดยเอ็นไซม์จากจุลินทรีย์จะมีขนาดใหญ่และความคงทนมากกว่าเอ็นไซม์จากพืช (Yun, 1996) โดย *Aspergillus niger* ATCC 20611 จัดได้ว่าเป็นเชื้อราสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่สังเคราะห์ฟรุกโต-โอลิโกแซ็กคาไรด์ได้

ในปริมาณสูง (Hidaka *et al*., 1988) เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการผลิตน้ำตาลฟรุกโต-โอลิโกแซ็กคาไรด์จากปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์นั้น น้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นสับสเทรตจะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารผสมของ

ฟรุกโต-โอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีโครงสร้างแบบ 1F(1-β-fructofuranosyl)n-sucrose ที่มีจำนวน n = 1-3 ซึ่งได้แก่ 1-kestose (GF2), nystose (GF3) และ fructofuranosyl nystose (GF4) การผสม β-fructofuranosidase ด้วย glucose oxidase ที่อุณหภูมิ 40°C pH 5.5 อัตราการให้อากาศ 1 vvm และอัตราการกวน 550 รอบต่อนาที เป็นเวลา 32 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 400 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของ β-fructofuranosidase 10 หน่วยต่อกรัมซูโครส และความเข้มข้นของ glucose oxidase 15 หน่วยต่อกรัมซูโครส เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Sirisansaneeyakul *et al*., 2000) นอกจากนี้ยังมีการผลิตเอ็นไซม์ fructosyltransferase ในทางการค้าด้วยเช่น PECTINEX ULTRA SP-l (Novozymes A/S) และ RAPIDASE TF (DSM) (Henderson, 2010)

ปัจจุบันธุรกิจน้ำผลไม้ของประเทศไทยมีแนวโน้มอัตราการขยายตัวเพิ่มขึ้นแม้ประเทศไทยจะมีผลไม้สดมากมายหลายชนิด ทำให้ผู้บริโภคสามารถนำผลไม้สดคั้นดื่มได้เอง แต่เนื่องจากภาวะเศรษฐกิจและความเป็นอยู่ที่เปลี่ยนแปลง ทำให้ผู้บริโภคตื่นตัวในด้านสุขภาพพร้อมกับความสะดวกสบายเป็นปัจจัยกระตุ้นธุรกิจน้ำผลไม้พร้อมดื่มเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องและมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ที่มีคุณภาพ (ประภัสสร, 2551) น้ำผลไม้ทั่วไปมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้อยู่ในช่วง 0.1 – 15 % DS และมีปริมาณน้ำตาลซูโครสอยู่ในช่วง 2 – 75 % (Henderson, 2010) ขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำผลไม้ โดยน้ำผลไม้ที่มีขนายในท้องตลาด ทั่วไปสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ น้ำผลไม้เข้มข้นหรือน้ำผลไม้ 100 % และน้ำผลไม้ทั่วไป หรือน้ำผลไม้ต่ำกว่า 100 % การประยุกต์ใช้เอ็นไซม์ fructosyltransferase ในผลิตภัณฑ์อาหารจะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ชนิดของผลิตภัณฑ์อาหาร ปริมาณน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น เวลา (treatment time) อุณหภูมิ เอ็นไซม์ช่วยเร่ง (enzyme catalyst) เช่น glucose isomerase โดยปริมาณเอ็นไซม์ที่ใช้จะแปรผกผันกับเวลา และในผลิตภัณฑ์ที่มีความเป็นกรดสูง จะทำให้ความสามารถในการทำงานของเอ็นไซม์ fructosyltransferase ลดต่ำลง จึงทำให้ต้องเพิ่มปริมาณเอ็นไซม์ที่ใช้ (Henderson, 2010)

การศึกษาเพื่อพัฒนากระบวนการ FOSs ในผลิตภัณฑ์อาหารให้ปริมาณสูงโดยการประยุกต์ใช้เอ็นไซม์จากจุลินทรีย์ซึ่งสามารถผลิตได้ง่าย มีขนาดใหญ่และมีความเสถียรมากกว่าเอ็นไซม์จากพืช (Yun, 1996) จึงมีความสำคัญยิ่งในปัจจุบันทั้งต่อผู้บริโภคและเพื่อเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันโดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำข้อมูลไปใช้ประกอบการสร้างความเชื่อมั่นในการผลิตอาหารเสริมสุขภาพ

7. วิธีดำเนินการ :

อุปกรณ์และสารเคมี

- มะม่วงน้ำดอกไม้สุกซื้อจากตลาดไท
- สับปะรดพันธุ์ศรีราชาซื้อจากตลาดไท
- น้ำตาลทราย (มิตรผล)
- Sodium acetate (บริษัท เคมีภัณฑ์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด, เกรดอาหาร)
- ชุดวิเคราะห์ Fructan Assay kit (Megazyme International Ireland Ltd., Wicklow, Ireland)
- กรดซิตริก (เกรดอาหาร,บริษัท รวมเคมี 1986 จำกัด)
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า Julabo รุ่น SW 21
- สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Shimadsu, UV-2600)

วิธีการ

1. การศึกษาคุณสมบัติของน้ำผลไม้

1.1 การเตรียมน้ำผลไม้

- **การเตรียมเนื้อมะม่วงบดละเอียด** นำมะม่วงนึ่งเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำเย็นทันที จากนั้นปอกเปลือกและฝานเอาเฉพาะส่วนเนื้อ นำมาปั่นละเอียดด้วยเครื่องปั่นแล้วกรองผ่านผ้าขาวบาง เก็บตัวอย่างในตู้แช่แข็ง -20°C

- **การเตรียมน้ำสับปะรด** นำสับปะรดมาล้างปอกเปลือกแล้วคั้นน้ำด้วยเครื่องคั้นน้ำผลไม้แยกกาก เก็บตัวอย่างในตู้แช่แข็ง -20°C

1.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำผลไม้

วิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำผลไม้ โดยวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ด้วยใช้ hand refractometer ค่า pH และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุกโตส ส่งตัวอย่างน้ำมะม่วงและน้ำสับปะรดวิเคราะห์ที่สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3 การวิเคราะห์ปริมาณฟรุกแตนทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณฟรุกแตนทั้งหมด ประยุกต์ใช้วิธี AOAC Method 999.03 และชุดวิเคราะห์ฟรุกแตน ของ Megazyme, Ireland โดยมีวิธีการดังนี้

ชั่งตัวอย่างน้ำผลไม้ 10 g ใส่ในขวดรูปกรวยขนาด 250 ml แล้วเติมน้ำร้อนอุณหภูมิ 80°C ปริมาณ 80 mL นำไปเขย่าในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรเป็น 100

mL ในขวดวัดปริมาตรด้วยน้ำกลั่น แล้วกรองภายใต้สุญญากาศ จะได้สารสกัดสำหรับวิเคราะห์ปริมาณฟรุกแตนทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณฟรุกแตนโดย

- ปิเปตตัวอย่าง 0.2 mL ใส่ในหลอดทดลอง
- เติมสารละลายเอนไซม์ sucrase/amylase ปริมาตร 0.2 ml แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที
- เติมสารละลาย alkaline borohydride ปริมาตร 0.2 mL เขย่าให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที
- เติมสารละลาย acetic acid ความเข้นข้น 200 mM ปริมาตร 0.5 mL เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลาย S
- ปิเปตสารละลาย S ใส่หลอดทดลอง 3 หลอด หลอดละ 0.2 mL จะได้ sample 2 หลอด และ sample blank 1 หลอด
- เติมสารละลายเอนไซม์ fructanase ปริมาตร 0.1 mL ลงในหลอด sample ทั้ง 2 หลอด
- เติมสารละลายบัพเฟอร์ sodium acetate ความเข้นข้น 0.1 M ใน sample blank
- นำ sample และ sample blank บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 30 นาที
- เติมสารละลาย PAHBAH working reagent ปริมาตร 5 mL ในทุกตัวอย่าง ต้มในน้ำเดือด 6 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำเย็น
- วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 nm
- คำนวณปริมาณฟรุกแตน จากสมการ

$$\text{Fructan (\% w/w)} = \Delta A \times F \times 5 \times V \times \frac{1.1}{0.2} \times \frac{100}{W} \times \frac{1}{1000} \times \frac{162}{180}$$

โดย:

ΔA = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง – ค่าการดูดกลืนแสงของแบงค์

F = 54.5 µg D-fructose/ค่าการดูดกลืนแสดงของ 54.5 µg D-fructose

5 = แฟกเตอร์ใช้เปลี่ยนจาก 0.2 mL เป็น 1.0 mL

V = ปริมาตรสุดท้ายของตัวอย่างที่สกัด (50 หรือ 100 mL)

$\frac{1.1}{0.2}$ = เอนไซม์ที่ใช้วิเคราะห์ 0.2 mL จากเอนไซม์ 1.1 mL

W = น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้สกัด (mg)

100 = แฟกเตอร์ที่ใช้เปลี่ยนเป็น %

$\frac{1}{1000}$ = แฟกเตอร์ที่ใช้เปลี่ยนจาก µg เป็น mg

$\frac{162}{180}$ = แฟกเตอร์ที่ใช้เปลี่ยนจาก D-fructose อิสระ เป็น ฟรุกแตน

2. ศึกษาการประยุกต์ใช้เอ็นไซม์ฟรุกโตซิลทรานส์เฟอเรสในการผลิต FOS ในน้ำเชื่อมเพื่อผลิตน้ำผลไม้ต่ำกว่า 100 %

2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้เอ็นไซม์ฟรุกโตซิลทรานส์เฟอเรสในการผลิต FOS

2.1.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นต่อการผลิต FOS

การศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นต่อการผลิต FOS ประยุกต์วิธีการของ Surin (2012) โดยศึกษาระดับความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 6 ระดับ คือ 10 20 30 40 50 และ 60 % w/w วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยมีวิธีการดังนี้

- เตรียมสารละลายน้ำตาลซูโครส แต่ละความเข้มข้น 100 mL ใส่ในขวดรูปชมพู่
- เติมสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium acetate 0.5 M pH 5.5 ปริมาตร 4 mL (40 µL ต่อตัวอย่าง 1 mL)
- เติมเอนไซม์ Pectinex ultra SP-L 3.5 U/g sucrose และ เอนไซม์ glucose oxidase 1022 U/g sucrose
- ปิดปากขวดด้วยพาราฟิล์ม แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 55°C
- เก็บตัวอย่างโดยปิเปตตัวอย่างออกครั้งละ 5 mL ที่เวลาในการบ่ม 5 10 15 20 และ 25 ชั่วโมง ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์โดยการต้ม 10 นาที
- วิเคราะห์ปริมาณฟรุกแตนในตัวอย่าง
- คำนวณอัตราส่วนของฟรุกแตนต่อความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น

2.1.2 การศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ pectinex ultra SP-L ต่อการผลิต FOS

การศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ pectinex ultra SP-L ต่อการผลิต FOS โดยศึกษาระดับของเอนไซม์ pectinex ultra SP-L 5 ระดับ ได้แก่ 1.5 3.5 5.5 7.5 และ 9.5 U/g sucrose วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 4 ซ้ำ โดยมีวิธีการดังนี้

- เตรียมสารละลายน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 40 % w/w ปริมาตร 100 mL ใส่ในขวดรูปชมพู่
- เติมสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium acetate 0.5 M pH 5.5 ปริมาตร 4 mL (40 µL ต่อตัวอย่าง 1 mL)
- เติมเอนไซม์ pectinex ultra SP-L แต่ละระดับ และ เอนไซม์ glucose oxidase 1022 U/g sucrose
- ปิดปากขวดด้วยพาราฟิล์ม แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 10 ชั่วโมง
- ยับยั้งการทำงานเอ็นไซม์โดยการต้ม 10 นาที
- วิเคราะห์ปริมาณฟรุกแตนในตัวอย่าง

2.1.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์ pectinex ultra SP-L

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์ pectinex ultra SP-L โดยศึกษาอุณหภูมิในการบ่ม 5 ระดับคือ 40 45 50 55 และ 60°C วางแผนการทดลองแบบ RCB ทำการทดลอง 4 ซ้ำ โดยมีวิธีการดังนี้

- เตรียมสารละลายน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 40 % w/w ปริมาตร 100 mL ใส่ในขวดรูปชมพู่
- เติมสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium acetate 0.5 M pH 5.5 ปริมาตร 4 mL (40 µL ต่อตัวอย่าง 1 mL)
- ปิดปากขวดด้วยพาราฟิล์ม แล้วบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 10 ชั่วโมง
- เติมเอนไซม์ pectinex ultra SP-L 3.5 U/g sucrose และ เอนไซม์ glucose oxidase 1022 U/g sucrose
- ยับยั้งการทำงานเอ็นไซม์โดยการต้ม 10 นาที
- วิเคราะห์ปริมาณฟรุกแตนในตัวอย่าง

2.1.4 การศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH ต่าง ๆต่อการผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์ pectinex ultra SP-L

การศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ต่อการผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์ pectinex ultra SP-L โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Sodium acetate 0.5 M ที่ pH ต่างกัน 6 ระดับคือ 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 และ 6.5 วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 4 ซ้ำ โดยมีวิธีการดังนี้

- เตรียมสารละลายน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 40 % w/w ปริมาตร 100 mL ใส่ในขวดรูปชมพู่
- เติมสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium acetate 0.5 M ที่ที่ pH ต่างๆ ปริมาตร 4 mL (40 µL ต่อตัวอย่าง 1 mL)
- เติมเอนไซม์ pectinex ultra SP-L 3.5 U/g sucrose และ เอนไซม์ glucose oxidase 1022 U/g sucrose
- ปิดปากขวดด้วยพาราฟิล์ม แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 10 ชั่วโมง
- ยับยั้งการทำงานเอ็นไซม์โดยการต้ม 10 นาที
- วิเคราะห์ปริมาณฟรุกแตนในตัวอย่าง

2.2 การประยุกต์ใช้น้ำเชื่อม FOS จากเอนไซม์ pectinex ultra SP-L ในการผลิตน้ำผลไม้

การประยุกต์ใช้น้ำเชื่อม FOS จากเอนไซม์ pectinex ultra SP-L ในการผลิตน้ำผลไม้ โดยศึกษาสูตรที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำมะม่วงโดยศึกษาอัตราส่วน น้ำเชื่อม FOS จากการใช้เอ็นไซม์ Pectinex Ultra SP-L ในน้ำเชื่อม 40 % ใช้ปริมาณน้ำเชื่อม FOS ต่างกันในสูตรที่ 1 และ สูตรที่ 2 เทียบกับน้ำมะม่วงสูตรทั่วไปของกลุ่มวิจัยและพัฒนาการแปรรูปผลิตผลเกษตร (มปป) โดยมีส่วนผสมดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนผสมน้ำมะม่วงแต่ละสูตร

ส่วนผสม	ปริมาณ (g)		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรทั่วไป
เนื้อมะม่วงบดละเอียด	200	200	200
น้ำเชื่อม FOS	500	750	-
น้ำตาลทราย	-	-	114.10
กรดซิตริก	2.1	2.1	2.1
น้ำเปล่า	297.9	47.9	683.8

เตรียมน้ำมะม่วงโดยนำน้ำเชื่อม FOS นำเปล่า และกรดซิตริก 2 g ใส่หม้อสแตนเลส ต้มให้ร้อน แล้วเติมเนื้อมะม่วงบดละเอียด 200 g ต้มให้ได้อุณหภูมิ 85°Cโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์เป็น 3 นาที ยกลงบรรจุขวดที่ลวกฆ่าเชื้อแล้ว ทำให้เย็นโดยแช่ในน้ำเย็นทันที เก็บรักษาไว้ในตู้เย็น ทดสอบการยอมรับจากผู้บริโภคได้แก่ ลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสหวาน และความชอบโดยรวม โดยใช้ผู้บริโภค 20 คน ด้วยแบบทดสอบแบบ hedonic scale (9-point hedonic) เทียบกับน้ำมะม่วงสูตรทั่วไปของกลุ่มวิจัยและพัฒนาการแปรรูปผลิตผลเกษตร (มปป) แล้วนำน้ำมะม่วงผสมน้ำเชื่อม FOS สูตรที่ผู้บริโภคยอมรับมากที่สุดวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาเทียบกับน้ำมะม่วงสูตรทั่วไป โดยส่งวิเคราะห์ที่บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด

3. ศึกษาการประยุกต์ใช้เอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานส์เฟอเรสในการผลิต FOS ในน้ำผลไม้ 100 %

การศึกษาการประยุกต์ใช้เอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานส์เฟอเรสในการผลิต FOS ในน้ำผลไม้ 100 % จะศึกษา ในน้ำสับปะรดเทียบกับสารละลายน้ำตาลซูโครส 10 % w/w โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ pectinex ultra SP-L 5 ระดับ ได้แก่ 1.5 3.5 5.5 7.5 และ 9.5 U/g sucrose วางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการทดลอง 4 ซ้ำ โดยมีวิธีการดังนี้

- เตรียมน้ำสับปะรดและสารละลายน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 10 % w/w ปริมาตร 100 mL ใส่ในขวดรูปชมพู่

- เติมสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium acetate 0.5 M pH 5.5 ปริมาตร 4 mL (40 µL ต่อตัวอย่าง 1 mL)

- เติมเอนไซม์ pectinex ultra SP-L แต่ละระดับ และ เอนไซม์ glucose oxidase 1022 U/g sucrose

- ปิดปากขวดด้วยพาราฟิล์ม แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

- ยับยั้งการทำงานเอ็นไซม์โดยการต้ม 10 นาที

- วิเคราะห์ปริมาณฟรุกแตนในตัวอย่าง

ระยะเวลาดำเนินการ : ตุลาคม 2555 - กันยายน 2557

สถานที่ดำเนินการ : กองวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาคุณสมบัติของน้ำผลไม้

จากผลการศึกษาคุณสมบัติของน้ำผลไม้ ได้แก่ ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส และปริมาณฟรุกแตนทั้งหมด ในเนื้อมะม่วงบดละเอียดและน้ำสับปะรด ให้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่าเนื้อมะม่วงบดละเอียดมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ 18.5 Brix ค่า pH 4.1 มีปริมาณน้ำตาลซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส และปริมาณฟรุกแตนทั้งหมด 7.21 1.33 3.29 และ 0.213 % w/w ตามลำดับ ส่วนน้ำสับปะรด มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ 19.0 Brix ค่า pH 4.1 มีปริมาณน้ำตาลซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส และปริมาณฟรุกแตนทั้งหมด 7.21 1.33 3.29 และ 0.213 % w/w ตามลำดับ

ตารางที่ 2 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ ค่า pH ปริมาณน้ำตาลซูโครส กลูโคส ฟรุกโตส และฟรุกแตนทั้งหมด ในตัวอย่างเนื้อมะม่วงบดละเอียดและน้ำสับปะรด

ตัวอย่าง	ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้ (brix)	pH	ปริมาณน้ำตาล (% w/w)			
			ซูโครส	กลูโคส	ฟรุกโตส	ฟรุกแตน
เนื้อมะม่วงบดละเอียด	18.5	4.1	7.21	1.33	3.29	0.213
น้ำสับปะรด	19.0	3.7	8.32	2.01	2.04	0.349

2. ศึกษาการประยุกต์ใช้เอ็นไซม์ฟรุกโตซิลทรานส์เฟอเรสในการผลิต FOS ในน้ำเชื่อมเพื่อผลิตน้ำผลไม้ต่ำกว่า 100 %

2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้เอ็นไซม์ฟรุกโตซิลทรานส์เฟอเรสในการผลิต FOS

2.1.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นต่อการผลิต FOS

การศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นต่อการผลิต FOS ประยุกต์วิธีการของ Surin (2012) โดยศึกษาระดับความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 6 ระดับ คือ 10 20 30 40 50 และ 60 % w/w ใช้เอนไซม์ pectinex ultra SP-L 3.5 U/g sucrose และ เอนไซม์ glucose oxidase 1022 U/g sucrose บ่มที่อุณหภูมิ 55°C ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3 จะเห็นได้ว่าในช่วง 5 ชั่วโมงแรก ที่ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 20 – 60 % w/w จะมีปริมาณฟรุกแตนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วโดยมีอัตราส่วนของฟรุกแตนที่เกิดขึ้นต่อปริมาณซูโครสเริ่มต้นสูงกว่า 0.5 หลังจากนั้นการเกิดฟรุกแตนจะเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ ดังจะเห็นได้จากการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยของอัตราส่วนของฟรุกแตนที่เกิดขึ้นต่อปริมาณซูโครสเริ่มต้น โดยที่ความเข้มข้นของซูโครสเริ่ม 40 % w/w จะมีอัตราส่วนของฟรุกแตนที่เกิดขึ้นต่อปริมาณซูโครสเริ่มต้นสูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่น ๆ และมีความอัตราส่วนของฟรุกแตนที่เกิดขึ้นต่อปริมาณซูโครสเริ่มต้นเริ่มคงที่หลังการบ่ม 10 ชั่วโมงขึ้นไป ส่วนที่ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 50 และ 60 % w/w มีอัตราส่วนของฟรุกแตนที่เกิดขึ้นต่อปริมาณซูโครสเริ่มต้นเพิ่มขึ้น และสูงที่ 25 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 20 และ 30 % w/w มีอัตราส่วนของฟรุกแตนที่เกิดขึ้นต่อปริมาณซูโครสเริ่มต้นมีความอัตราส่วนของฟรุกแตนที่เกิดขึ้นต่อปริมาณซูโครสเริ่มต้นเริ่มคงที่หลังการบ่ม 10 ชั่วโมงขึ้นไปเช่นเดียวกับที่ 40 % w/w แต่มีความอัตราส่วนของฟรุกแตนที่เกิดขึ้นต่อปริมาณซูโครสเริ่มต้นที่ต่ำกว่า สำหรับที่ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น 10 % w/w นั้น จะมีอัตราส่วนฟรุกแตนต่อซูโครสเริ่มต้นค่อนข้างต่ำในทุกช่วงการบ่มแสดงให้เห็นว่ามีการเปลี่ยนแปลงเป็นฟรุกแตนในปริมาณต่ำ ดังนั้นความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสมในการใช้เอนไซม์ pectinex ultra SP-L ในการผลิต FOS จากน้ำตาลซูโครสคือ 40 %w/w เนื่องจากมีอัตราส่วนอัตราส่วนฟรุกแตนต่อซูโครสเริ่มต้นสูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่น ๆ และใช้เวลาในการบ่มที่ 55°C เป็นเวลา 10 ชั่วโมง สอดคล้องกับการศึกษาการผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์จาก Aspergillus niger ATCC 20611 และกลูโคสออกซิเดส (สาโรจน์, 2543) และการศึกษาการผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์จาก Aureobasidium pullulans KFCC 10524 ร่วมกับกลูโคสออกซิเดส (Yun *et al.*, 1994) ได้รายงานว่าความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 40 %w/w โดยใช้เอนไซม์ β-fructofuranosidase 10 U/g sucrose ร่วมกันเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 15 U/g sucrose ควบคุมสภาวะที่ 40°C pH 5.5

ตารางที่ 3 อัตราส่วนฟรุกแตนต่อซูโครสเริ่มต้นที่เวลาบ่มต่าง ๆ

ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น (% w/w)	อัตราส่วนฟรุกแตนต่อซูโครส				
	5 ชม.	10 ชม.	15 ชม.	20 ชม.	25 ชม.
10	0.13 d	0.14 d	0.15 c	0.20 e	0.19 c
20	0.51bc	0.65 c	0.68 b	0.67 d	0.66 b
30	0.55 b	0.64 c	0.72 b	0.72 c	0.64 b

40	0.70 a	0.85 a	0.82 a	0.86 a	0.88 a
50	0.50 bc	0.76 b	0.81 a	0.79 b	0.85 a
60	0.48 c	0.62 c	0.67 b	0.75 c	0.84 a

ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2.1.2 การศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ pectinex ultra SP-L ต่อการผลิต FOS

จากการศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ pectinex ultra SP-L ต่อการผลิต FOS โดยศึกษาระดับของเอนไซม์ pectinex ultra SP-L 5 ระดับ ได้แก่ 1.5 3.5 5.5 7.5 และ 9.5 U/g sucrose สารละลายน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 40 % w/w สารละลายบัฟเฟอร์ Sodium acetate 0.5 M pH 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4 จะเห็นได้ว่าที่ระดับเอนไซม์ pectinex ultra SP-L 3.5 5.5 7.5 และ 9.5 U/g sucrose มีปริมาณฟรุกแตนที่เกิดขึ้นไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ดังนั้นปริมาณเอนไซม์ pectinex ultra SP-L ที่เหมาะสมคือ 3.5 U/g sucrose เนื่องจากเป็นปริมาณเอนไซม์ต่ำที่สุดที่ใช้ปริมาณฟรุกแตนในระดับเดียวกับที่ระดับอื่น ๆ ใกล้เคียงกันกับการศึกษาของ Surin (2012) ซึ่งรายงานว่าการผลิต FOS ในน้ำเชื่อมลำไย 60 Brix ระดับเอนไซม์ pectinex ultra SP-L ที่เหมาะสมคือ 3.3 U/g sucrose แต่จากการศึกษาการผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์จาก Aspergillus niger ATCC 20611 และกลูโคสออกซิเดส (สาโรจน์, 2543) และการศึกษาการผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์จาก Aureobasidium pullulans KFCC 10524 ร่วมกับกลูโคสออกซิเดส (Yun *et al.*, 1994) พบว่าระดับเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุดคือ 10 U/g sucrose

ตารางที่ 4 ปริมาณฟรุกแตนที่ได้จากการใช้ปริมาณเอนไซม์ pectinex ultra SP-L ระดับต่าง ๆ

ปริมาณเอนไซม์ pectinex ultra SP-L (U/g sucrose)	ปริมาณฟรุกแตน (% w/w)
1.5	27.49 b
3.5	33.98 a
5.5	33.84 a
7.5	34.96 a
9.5	33.30 a

ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2.1.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์ pectinex ultra SP-L

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์ pectinex ultra SP-L โดยศึกษาอุณหภูมิในการบ่ม 5 ระดับคือ 40 45 50 55 และ 60°C สารละลายซูโครสเริ่มต้นความเข้มข้น 40 % w/w สารละลายบัฟเฟอร์ Sodium acetate 0.5 M pH 5.5 เอนไซม์ pectinex ultra SP-L 3.5 U/g sucrose และเอนไซม์ glucose oxidase 1022 U/g sucrose ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 5 จะเห็นได้ว่าในสารละลายจะมีปริมาณฟรุกแตนต่ำที่อุณหภูมิในการบ่ม 40 และ 45°C แล้วจะมีปริมาณฟรุกแตนมากที่สุดคือ 32.32 และ 34.07 % w/w เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการบ่มเป็น 50 และ 55°C แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการบ่มเป็น 60°C สารละลายจะมีปริมาณฟรุกแตนที่ต่ำลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์เริ่มเสียสภาพจึงทำให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์ pectinex ultra SP-L คือที่อุณหภูมิ 50 และ 55°C

ตารางที่ 5 ปริมาณฟรุกแตนที่ได้จากการใช้เอนไซม์ pectinex ultra SP-L บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิในการบ่ม (°C)	ปริมาณฟรุกแตน (% w/w)
40	15.94 c
45	17.20 c
50	32.32 a
55	34.07 a
60	28.06 b

ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2.1.4 การศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH ต่าง ๆต่อการผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์ pectinex ultra SP-L

จากการศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ต่อการผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์ pectinex ultra SP-L โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Sodium acetate 0.5 M ที่ pH ต่างกัน 6 ระดับคือ 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 และ 6.5 สารละลายซูโครสเริ่มต้นความเข้มข้น 40 % w/w เอนไซม์ pectinex ultra SP-L 3.5 U/g sucrose และเอนไซม์ glucose oxidase 1022 U/g sucrose บ่มที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ให้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 6 จะเห็นได้ว่าที่สารละลายบัฟเฟอร์ในช่วง pH 4.5 – 6.5 การใช้เอนไซม์ pectinex ultra SP-L และ glucose oxidase สามารถผลิตฟรุกแตนได้ โดยสารละลายจะมีปริมาณฟรุกแตนสูงที่สุด คือ 34.06 และ 34.06 % w/w ที่ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ pH 5.5 และ 6.0 ตามลำดับ ส่วนที่สารละลายบัฟเฟอร์ pH 4 สารละลายจะมีปริมาณฟรุกแตนต่ำกว่าที่ pH อื่นนั้น อาจเนื่องจากมาสารละลายจะมีความเป็นกรดมากขึ้น ทำ

ให้การทำงานของเอนไซม์ลดลง ดังนั้น pH ที่เหมาะสมในการผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์ pectinex ultra SP-L คือ 5.5 - 6.0 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์จาก Aspergillus niger ATCC 20611 และกลูโคสออกซิเดส (สาโรจน์, 2543) และการศึกษาการผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์จาก Aureobasidium pullulans KFCC 10524 ร่วมกับกลูโคสออกซิเดส (Yun *et al.*, 1994) พบว่า pH 5.5 สามารถผลิต FOS ได้ดีที่สุด

ตารางที่ 6 ปริมาณฟรุกแตนที่ได้จากการใช้เอนไซม์ pectinex ultra SP-L ที่ค่า pH ของสารละลายบัฟเฟอร์ต่างกัน

ค่า pH ของสารละลายบัฟเฟอร์	ปริมาณฟรุกแตน (% w/w)
4.0	20.17 c
4.5	31.54 b
5.0	32.80 ab
5.5	34.06 a
6.0	34.70 a
6.5	32.02 b

ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้เอนไซม์ pectinex ultra SP-L ในการผลิต FOS จากน้ำตาลซูโครส พบว่า ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสมในการใช้เอนไซม์ pectinex ultra SP-L ในการผลิต FOS จากน้ำตาลซูโครสคือ 40 %w/w ปริมาณเอนไซม์ pectinex ultra SP-L 3.5 U/g sucrose อุณหภูมิ 50 และ 55°C และสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium acetate 0.5 M ที่ pH 5.5 และ 6.0

2.2 การประยุกต์ใช้น้ำเชื่อม FOS จากเอนไซม์ pectinex ultra SP-L ในการผลิตน้ำผลไม้

จากการประยุกต์ใช้น้ำเชื่อม FOS จากเอนไซม์ pectinex ultra SP-L ในการผลิตน้ำผลไม้ โดยศึกษาสูตรที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำมะม่วงโดยศึกษาอัตราส่วน น้ำเชื่อม FOS จากการใช้เอ็นไซม์ Pectinex Ultra SP-L ในน้ำเชื่อม 40 % ใช้ปริมาณน้ำเชื่อม FOS ต่างกันในสูตรที่ 1 และ สูตรที่ 2 เทียบกับน้ำมะม่วงสูตรทั่วไปของกลุ่มวิจัยและพัฒนาการแปรรูปผลิตผลเกษตร (มปป) ผลการศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคในด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ และความชอบโดยรวมแสดงดังตารางที่ 7 จะเห็นได้ว่าน้ำมะม่วงผสมน้ำเชื่อม FOS จากเอนไซม์ pectinex ultra SP-L สูตรที่ 2 ผู้บริโภคให้การยอมรับในด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ และ

ความชอบโดยรวมในระดับที่ไม่ต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % กับน้ำมะม่วงสูตรทั่วไป ส่วนน้ำมะม่วงสูตรที่ 1 ซึ่งเติมน้ำเชื่อม FOS จากเอนไซม์ pectinex ultra SP-L ในระดับที่ต่ำกว่า ผู้บริโภคให้การยอมรับในด้าน กลิ่น และรสชาติ ต่ำกว่าน้ำมะม่วงสูตรทั่วไป เนื่องจากมีระดับความหวานที่ต่ำกว่า ดังนั้นระดับของน้ำเชื่อม FOS จากเอนไซม์ pectinex ultra SP-L ที่เหมาะสมในการผลิตน้ำมะม่วงคือ 750 g ตามสูตรที่ 2

ผลการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของน้ำมะม่วงผสมน้ำเชื่อม FOS จากเอนไซม์ pectinex ultra SP-L และน้ำมะม่วงสูตรทั่วไปแสดงในตารางที่ 8 จะเห็นได้ว่าน้ำมะม่วงทั้ง 2 สูตรมี วิตามินเอ เบต้าแคโรทีนสูง น้ำมะม่วงผสมน้ำเชื่อม FOS จะมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตและปริมาณน้ำตาลสูงกว่าในน้ำมะม่วงสูตรทั่วไป ทั้งนี้เนื่องมาจากการนำน้ำเชื่อม FOS ในการผลิตน้ำมะม่วง ซึ่ง FOS เป็นสารให้ความที่ความหวาน 30 % ของน้ำตาลซูโครส ทำให้น้ำเชื่อมมีความหวานลดลงจากเดิม จึงต้องเติมผสมน้ำเชื่อม FOS ในปริมาณสูง คือ 750 g ในผลิตภัณฑ์ 1000 g ดังในสูตรที่ 2 เพิ่มทำให้ผู้บริโภคยอมรับในด้านรสชาติเท่ากับน้ำมะม่วงสูตรทั่วไป ซึ่งในน้ำเชื่อม FOS จากเอนไซม์ pectinex ultra SP-L จะยังคงมีน้ำตาลซูโครสคงเหลืออยู่ในสารละลาย ดังนั้นการใช้น้ำเชื่อม FOS เพื่อลดการบริโภคน้ำตาลซูโครส และให้ได้ประโยชน์จาก FOS ทั้งในด้านเป็นพรีไบโอติกส์และใยอาหารควรใช้สารทดแทนความหวานเช่น แอสปาแทม น้ำตาลแอลกอฮอล์ หรือสารให้ความหวานที่ไม่ให้แคลอรี่เพื่อเพิ่มรสหวานให้กับผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 7 คุณภาพทางประสาทสัมผัสของน้ำมะม่วงผสมน้ำเชื่อม FOS และน้ำม่วงสูตรทั่วไป

คุณภาพ	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรทั่วไป
ลักษณะปรากฏ	6.55 a	6.90 a	6.55 a
สี	7.35 a	**7.10 a**	7.35 a
กลิ่น	6.15 b	7.30 a	7.05 a
รสชาติ	5.60 b	7.10 a	6.85 a
เนื้อสัมผัส	6.15 a	7.20 a	6.90 a
ความชอบโดยรวม	6.30 a	7.30 a	6.95 a

ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละแถว ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 8 คุณค่าทางโภชนาการของของน้ำมะม่วงผสมน้ำเชื่อม FOS จากเอนไซม์ pectinex ultra SP-L และน้ำมะม่วงสูตรทั่วไปต่อหนึ่งหน่วยบริโภค (180 mL)

รายการ	น้ำมะม่วงผสมน้ำเชื่อม FOS	น้ำมะม่วงสูตรทั่วไป
พลังงานทั้งหมด (kcal)	270	180
พลังงานจากไขมัน (kcal)	0.00	0.00
ไขมันทั้งหมด (g)	0.00	0.00
ไขมันอิ่มตัว (g)	0.00	0.00
โคเลสเตอรอล (mg)	0.00	0.00
โปรตีน (g)	0.00	0.00
คาร์โบไฮเดรต (g)	67.00	45.00
ใยอาหาร (g)	0.00	0.00
น้ำตาล (g)	53.00	45.00
โซเดียม (mg)	10.00	0.00
วิตามินเอ (µg)	116.37	119.16
คำนวณจาก เบต้าแคโรทีน		
เบต้า-แคโรทีน (mg)	698.20	714.94
วิตามีนบี 1 (mg)	0.00	0.00
วิตามีนบี 2 (mg)	0.00	0.00
แคลเซียม (mg)	4.27	3.55
เหล็ก (mg)	0.31	0.00

3. ศึกษาการประยุกต์ใช้เอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานส์เฟอเรสในการผลิต FOS ในน้ำผลไม้ 100 %

จากการศึกษาการใช้เอนไซม์ Pectinex Ultra SP-L ในน้ำสับปะรดเทียบกับสารละลายน้ำตาลซูโครส 10 % w/w โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ pectinex ultra SP-L 5 ระดับ ได้แก่ 1.5 3.5 5.5 7.5 และ 9.5 U/g sucrose ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 9 จะเห็นได้ว่าปริมาณฟรุกแตนในน้ำสับปะรดและสารละลายน้ำตาลซูโครส 10 % w/w มีปริมาณฟรุกแตนทั้งหมดในสารละลายที่ใช้เอนไซม์ pectinex ultra SP-L แต่ละระดับนั้นไม่ต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทั้งในน้ำสับปะรดและสารละลายน้ำตาลซูโครส 10 % w/w มีปริมาณฟรุกแตนเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้นทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นสับสเตรท (substrate) ของเอนไซม์ Pectinex Ultra SP-L ในสารละลายมีปริมาณน้อยทำให้เอนไซม์มีอากาศที่จะทำปฏิริยาได้น้อยทำให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์หรือ FOS น้อย ดังนั้นน้ำผลไม้ 100 % ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสต่ำจึงไม่

เหมาะสำหรับใช้ผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานส์เฟอเรส ควรทำให้น้ำผลไม้นั้นเป็นน้ำผลไม้เข้มข้นที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสูงขึ้นก่อน

ตารางที่ 9 ปริมาณฟรุกแตนที่ได้จากการใช้ปริมาณเอนไซม์ pectinex ultra SP-L ระดับต่าง ๆ ในสารละลายน้ำตาลซูโครส 10 % w/w และน้ำสับปะรด

ปริมาณเอนไซม์ pectinex ultra SP-L (U/g sucrose)	ปริมาณฟรุกแตน (% w/w)	
	ซูโครส 10 % w/w	น้ำสับปะรด
1.5	1.30 a	0.58 a
3.5	1.35 a	0.59 a
5.5	1.33 a	0.52 a
7.5	1.54 a	0.60 a
9.5	1.48 a	0.56 a

ตัวเลขที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละคอลัมน์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ใช้ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สภาวะที่เหมาะสมในการประยุกต์ใช้เอนไซม์ pectinex ultra SP-L ในการผลิต FOS จากน้ำตาลซูโครส คือ ความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสมในการใช้เอนไซม์ pectinex ultra SP-L ในการผลิต FOS จากน้ำตาลซูโครสคือ 40 %w/w ปริมาณเอนไซม์ pectinex ultra SP-L 3.5 U/g sucrose อุณหภูมิในการบ่ม 50 และ 55°C ใช้เวลาในการบ่ม 10 ชั่วโมงและสารละลายบัฟเฟอร์ Sodium acetate 0.5 M ที่ pH 5.5 และ 6.0 จะได้น้ำเชื่อม FOS ที่มีปริมาณฟรุกแตนประมาณ 34 % w/w สามารถนำมาผสมกับเนื้อมะม่วงบดละเอียดเพื่อผลิตน้ำมะม่วงพร้อมดื่ม โดยสูตรที่ผู้บริโภคยอมรับเท่ากับน้ำมะม่วงสูตรทั่วไปคือ เนื้อมะม่วงบดละเอียด 200 g น้ำเชื่อม FOS 750 g กรดซิตริก 2.1 g และน้ำเปล่า 47.9 g แต่น้ำมะม่วงสูตรดังกล่าวจะยังไม่ปริมาณน้ำตาลสูตรเนื่องจาก FOS มีความหวานเพียง 30 % ของน้ำตาลซูโครสจึงทำให้ต้องเติมน้ำเชื่อม FOS ในปริมาณสูง ซึ่งอาจใช้สารทดแทนความหวานชนิดอื่น ๆ เพื่อเพิ่มรสหวานให้กับผลิตภัณฑ์เพิ่มเติม สำหรับการศึกษาการใช้เอนไซม์ Pectinex Ultra SP-L ในน้ำสับปะรดเทียบและสารละลายน้ำตาลซูโครส 10 % w/w มีปริมาณฟรุกแตนเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ดังนั้นน้ำผลไม้ 100 % ที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสต่ำจึงไม่เหมาะสำหรับใช้ผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์ฟรุกโตซิลทรานส์เฟอเรส ควรทำให้น้ำผลไม้นั้นเป็นน้ำผลไม้เข้มข้นที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสูงขึ้นก่อน

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลจากการทดลองนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการในการผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ และสภาวะที่เหมาะสมในการใช้เอนไซม์ pectinex ultra SP-L ในการผลิต FOS และสามารถนำไปประยุกต์ใช้การผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพที่มีคุณประโยชน์จากฟรุกแตนต่อไป

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

-

12. เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิจัยและพัฒนาการแปรรูปผลิตผลเกษตร สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร. มปป. การแปรรูปมะม่วง [แผ่นพับ].

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, ปรีชา ต้นสกุลรัตนชัย, สิทธิวัฒน์ เลิศศิริ, และ ไพโรจน์ หลวงพิทักษ์. 2543. การผลิตฟรุกโต-โอลิโกแซ็กคาไรด์จากซูโครส. ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38. กรุงเทพฯ. 497-506.

สำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม. 2552. รายงานการสำรวจและจัดเก็บข้อมูลตลาดอาหารเพื่อสุขภาพกลุ่ม Functional Food ณ ประเทศเกาหลีใต้.

Abrams, S. A., Griffin, I. J., Hawthorne, K. M., Liang, L., Gunn, S. K., Darlington, G., & Ellis, K. J. 2005. A combination of prebiotic short- and long-chain inulin-type fructans enhances calcium absorption and bone mineralization in young adolescents. *The American Journal of Clinical Nutrition, 82*(2), 471-476.

Grizard, D., & Barthomeuf, C. 1999. Enzymetric Synthesis and Structure Determination of NEO-FOS. *Food Biotechnol, 13*(1), 93-105.

Henderson, W. E. 2010. U.S. Patent No. 2010/0040728 A1.

Hidaka, H., Hirayama, M., & Sumi, N. 1988. A fructo-oligosaccharide producing enzyme from Aspergillus niger ATCC 20611. Agricultural and Biological Chemistry, 52, 1181-1187.

Kleessen, B., and Blaut, M. 2005. Modulation of gut mucosal biofilms. *The British Journal of Nutrition, 93*, S35-S40.

L'Hocine, L., Wang, Z., Jiang, B., and Xu, S. 2000. Purification and Partial Characterization of Fructosyltransferase and Invertase From *Aspergilus niger* AA0023. *Journal of Biotechnology, 81*(1), 73-84.

Muir, J. G., Shepherd, S. J., Rosella, O., Rose, R., Barrett, J. S., and Gibson, P. R. 2000. Fructan and Free Fructose Content of Common Australian Vegetables and Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55*, 6619-6627.

Nyman, M. 2002. Fermentation and bulking capacity of ingestible carbohydrates: the case of inulin and oligofructose. *The British Journal of Nutrition, 87*, S163-S168.

Park, Y. K., and Pastores, G. M. 2003. U.S. Patent No. US 2003/0082750 A1.

Roberfroid, M. B., Van Loo, J. A. B., and Gibson, G. R. 1998. The bifidonenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. *The Journal of Nutrition, 128*(1), 11-19.

Sirisansaneeyakul, S., Lertsiri, S., Tonsagunrathanachai, P., and Luangpituksa, P. 2000. Enzymatic Production of Fructo-Oligosaccharides from Sucrose. *Kasetsart Journal (Natural Science), 34*, 262 - 269.

Surin, S., Seesuriyachan, P., Thakeow, P., and Phimolsiripol, Y. 2012. Optimization of Enzymatic Production of Fructooligosaccharides from Longan Syrup. Journal of Applied Sciences, 12(11), 1118-1123.

Van Loo, J. A. B., Clune, Y., and Collins, J. K. 2005. The SYCAN projects: Goals, setups, first results and settings of the human intervention study. *The British Journal of Nutrition, 93*, S91-S98.

Yun, J. W. 1996. Fructooligosaccharide-Occurrence, Preparation, and Application. *Enzyme and Microbial Technology, 19*, 107-117.

YUN, J. W., LEE, M. G., and SONG, S. K. 1994. Batch Production of High-Content Fructo-Oligosaccharides from Sucrose by the Mixed-Enzyme System of -Fructofuranosidase and Glucose Oxidase. Journal of Fermentation and Bioengineering, 77, 159-163.