

การเพิ่มคุณสมบัติพรีไบโอติกของกากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์ที่เหมาะสม Enhancement of prebiotic properties of soybean residue using appropriate enzymes

เปรมสุตา สมาน*, นันทิดา คำกองแก้ว

Premasuda Saman*, Nanthida Khamkongkaew

ศูนย์ความหลากหลายทางชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

Biodiversity Research Center, Thailand Institute of Scientific and Technological Research

*Corresponding author: e-mail premsuda@tistr.or.th

Received: 22 April, 2025; Revised: 16 June, 2025; Accepted: 19 June, 2025

Abstract

This research aimed to study the prebiotic properties of dietary fiber obtained from soybean residue hydrolyzed with appropriate enzymes. Soybean meal was treated using five commercial enzymes: alpha-amylase, cellulase, hemicellulase, mannanase, and xylanase. The results showed that the digestion of soybean residue with cellulase yielded the highest amount of reducing sugar. When studying the composition of the sugars produced using the thin layer chromatography (TLC) technique, it was found that the color bands that appeared on TLC plate had a distance similar to that of glucose, fructose, arabinose and sucrose. The prebiotic activity of cellulase-treated soybean residue solutions was investigated using two probiotic strains, *Bifidobacterium animalis* TISTR 2194 and *B. bifidum* TISTR 2195 while *Escherichia coli* TISTR 887 was tested as a comparative inoculum. Results showed that the solution obtained from cellulase-treated soybean residue could promote the growth of *B. animalis* and *B. bifidum*. As a result, the prebiotic activity score of the cellulase-treated soybean residue solution was positive and significantly higher than those of the untreated soybean residue solution.

Keywords: soybean residue; enzyme; prebiotic; probiotic

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของใยอาหารที่ได้จากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ที่เหมาะสม โดยจะทำการย่อยกากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์ 5 ชนิด ได้แก่ แอลฟา-อะไมเลส เซลลูเลส เฮมิเซลลูเลส แมนนาเนส และไซลาลเนส ซึ่งผลการทดลองพบว่า การย่อยกากถั่วเหลืองด้วยเซลลูเลส ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุด เมื่อศึกษาองค์ประกอบของน้ำตาลที่เกิดขึ้น

ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (Thin layer chromatography : TLC) พบว่ามีแถบสีที่เกิดขึ้น มีระยะทางใกล้เคียงกับน้ำตาล กลูโคส ฟรุคโตส อะราบิโนส และ ซูโครส เมื่อตรวจสอบกิจกรรมฟรีไบโอติกของสารละลายกากถั่วเหลืองในการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bifidobacterium animalis* TISTR 2194 และ *B. bifidum* TISTR 2195 โดยเปรียบเทียบกับ *Escherichia coli* TISTR 887 ผลการทดลองพบว่าสารละลายที่ได้จากการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยเซลล์สามารถส่งเสริมการเจริญของ *B. animalis* และ *B. bifidum* เป็นผลให้ค่ากิจกรรมฟรีไบโอติกของสารละลายที่ได้การย่อยกากถั่วเหลืองด้วยเซลล์สูงมีค่าเป็นบวก และมีค่ามากกว่าสารละลายกากถั่วเหลืองที่ไม่ได้ผ่านการย่อยอย่างชัดเจน

คำสำคัญ: กากถั่วเหลือง; เอนไซม์; ฟรีไบโอติก; โพรไบโอติก

บทนำ

กากถั่วเหลือง (soybean residue) หรือที่รู้จักกันในชื่อ โอการะ (okara) เป็นผลพลอยได้จากการผลิตเต้าหู้และนมถั่วเหลืองซึ่งมีการผลิตอย่างแพร่หลาย ในกากถั่วเหลืองแห้งประกอบด้วยเส้นใยอาหารประมาณ 57-59% โปรตีน 15-34% ไขมัน 6-16% รวมถึงแร่ธาตุจำนวนมาก เช่น แคลเซียม สารโพแทสเซียม เหล็ก และสารต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงไอโซฟลาโวน (Lu et al., 2013; Santos et al., 2019; Suzuki and Banna, 2020) กากถั่วเหลืองมีใยอาหารในปริมาณสูงประกอบไปด้วยเส้นใยอาหารทั้งประเภทละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ จึงมีประโยชน์ต่อสุขภาพมากมาย เช่น ช่วยป้องกันโรคเบาหวาน โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคอ้วน รวมทั้งทำให้สุขภาพของลำไส้ดีขึ้น (Pérez-López et al., 2018; Swallah et al., 2021) การบริโภคใยอาหารในปริมาณที่เพียงพออาจช่วยลดความเสี่ยงของโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ด้วย (Ben et al., 2014) โดยมีรายงานวิจัยว่าการบริโภคเส้นใยอาหารนอกจากจะมีประโยชน์ต่อระบบลำไส้แล้วยังอาจขยายไปสู่สุขภาพสมองที่ดีขึ้น (Bourassa et al., 2016)

กากถั่วเหลืองมีส่วนประกอบหลักที่สำคัญเป็นเส้นใยอาหารในปริมาณสูง เป็นของเหลือทิ้งที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ประโยชน์เพื่อผลิตเป็นเส้นใยอาหารเพื่อสุขภาพ แต่กากถั่วเหลืองมีข้อจำกัดในเรื่องปริมาณความชื้น มีไขมัน และมีสารต้านโภชนาการ (Santos et al., 2019) ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีกระบวนการในการปรับสภาพกากถั่วเหลืองให้เหมาะสมก่อนนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหาร โดยมีการใช้เทคโนโลยีทางชีวภาพมาปรับโครงสร้างของเส้นใย เพื่อเพิ่มคุณสมบัติที่ดีและให้ละลายน้ำได้มากขึ้น เส้นใยอาหารเหล่านี้บางชนิดอาจมีคุณสมบัติเป็นสารฟรีไบโอติกที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย (Swallah et al., 2021) เนื่องจากสารฟรีไบโอติกเป็นแหล่งอาหารที่ดีสำหรับจุลินทรีย์โพรไบโอติกในลำไส้ ช่วยส่งเสริมการเจริญและเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ให้มากขึ้น และช่วยปรับสมดุลระบบทางเดินอาหาร (Kamble & Rani, 2020)

สารฟรีไบโอติกเป็นส่วนประกอบของอาหารที่ไม่ถูกย่อยในระบบทางเดินอาหารส่วนบนของร่างกายและสามารถเหลือเข้าไปถึงในส่วนของลำไส้ ซึ่งจะเป็นแหล่งอาหารให้กับจุลินทรีย์โพรไบโอติกในลำไส้ ช่วยส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกให้เจริญและเพิ่มปริมาณมากขึ้น ตลอดจนช่วยส่งเสริมสุขภาพของร่างกายให้แข็งแรง ส่วนโพรไบโอติก (probiotic) เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์

ช่วยป้องกันหรือทำลายจุลินทรีย์ที่จะทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร ช่วยปรับสภาพสมดุลของ
กลุ่มจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยอาหารและการดูดซึมอาหาร
ให้ดีขึ้น (Markowiak & Slizewska, 2017)

เนื่องจากขนาดโมเลกุลของใยอาหารมีความสัมพันธ์ที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยมีรายงานว่า
ใยอาหารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะสามารถผ่านเข้าไปถึงส่วนปลายของลำไส้ใหญ่โดยที่ไม่ถูกย่อยสลาย
ทำให้เกิดอัตราการหมักที่ช้าลง จึงเป็นสารพรีไบโอติกที่มีประสิทธิภาพสูง (He et al., 2016) ดังนั้น จึง
ได้มีการพัฒนาวิธีการลดขนาดโมเลกุลของใยอาหารเพื่อให้ละลายน้ำได้มากขึ้น เช่น การหมักด้วย
จุลินทรีย์ การอัดขึ้นรูป (extrusion treatment) การใช้แรงดันสูง (high pressure) การย่อยด้วย
สารเคมี และการย่อยด้วยเอนไซม์ (Pérez-López et al., 2016; Wang et al., 2020)

การใช้เอนไซม์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยเส้นใยอาหารให้มีขนาดที่เล็กลง โดย
กระบวนการย่อยมีความเรียบง่ายและไม่รุนแรง อย่างไรก็ตาม การใช้เอนไซม์จำเป็นต้องเลือกใช้เอนไซม์
ให้เหมาะสมกับวัตถุดิบ และต้องควบคุมสภาวะการย่อยให้เหมาะสม งานวิจัยนี้จึงได้คัดเลือกเอนไซม์
ทางการค้าที่เหมาะสมเพื่อนำมาย่อยกากถั่วเหลือง ทำให้ได้เส้นใยอาหารที่มีขนาดเล็กลงสามารถละลาย
น้ำได้มากขึ้น และนำไปทดสอบประสิทธิภาพความเป็นพรีไบโอติกในการส่งเสริมการเจริญของเชื้อ
โพรไบโอติกที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมกากถั่วเหลือง

กากถั่วเหลืองที่ใช้ในการทำวิจัยเป็นผลพลอยได้จากการทำเต้าหู้ได้รับความอนุเคราะห์ จาก
บริษัท อินท์ชนกร จำกัด นำกากถั่วเหลืองสดมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48
ชั่วโมง จากนั้นนำผงกากถั่วเหลืองไปสกัดแยกน้ำมันด้วยเครื่องสกัดซอกซ์เลต (Soxhlet extraction)
โดยใช้ตัวทำละลายเฮกเซน (Hexane, RCI Labscan, ประเทศไทย) สกัดที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส
เป็นเวลา 6 ชั่วโมง นำกากถั่วเหลืองที่สกัดน้ำมันแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา
ประมาณ 24 ชั่วโมง เพื่อให้เฮกเซนระเหยหมด เก็บผงกากถั่วเหลืองในถุงพลาสติกที่ปิดปากถุงด้วย
เครื่องปิดผนึกสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป (Yoshida
& Prudencio, 2020)

การย่อยกากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์

ทำการย่อยกากถั่วเหลืองโดยเปรียบเทียบการย่อยด้วยเอนไซม์ 5 ชนิด ได้แก่ แอลฟา- อะไมเลส
(α -amylase) เซลลูเลส (Cellulase, Reach Biotechnology, ไทย) เฮมิเซลลูเลส (hemicellulase,
Amano Enzyme, ญี่ปุ่น) แมนนาเนส (mananase, Amano Enzyme, ญี่ปุ่น) และไซลานเนส
(xylanase, BASF, เยอรมัน) ดัดแปลงจากวิธีการของ Villanueva et al. (2016) โดยชั่งกากถั่วเหลือง
ที่ผ่านการสกัดน้ำมันออกแล้ว 2 กรัม เติมน้ำละลายโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ พีเอช 5 ความเข้มข้น 0.1
โมลาร์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อ
ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เพื่อใช้ความร้อนทำให้โครงสร้างกากถั่วเหลืองพองตัว ทั้งไว้ให้เย็น จากนั้น
เติมเอนไซม์แต่ละชนิดปริมาณ 500 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยทำการทดสอบ 3 ซ้ำในการย่อยด้วยเอนไซม์

แต่ละชนิด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10-15 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid method (DNS) (Miller, 1959) และวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลและโอลิโกแซคคาไรด์ที่เกิดขึ้นด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง (Thin layer chromatography, TLC) (Moreno & Sanz, 2014) เปรียบเทียบแถบสีกับระยะทางที่เคลื่อนที่กับสารมาตรฐาน ได้แก่ glucose xylose mannose fructose galactose arabinose และ sucrose

ศึกษาคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

การเตรียมอาหารทดสอบ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Basal medium ที่เติมสารทดสอบ 3 ชนิด ได้แก่ กากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ กากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยเซลลูเลส และ น้ำตาลกลูโคส ปริมาณร้อยละ 1 (w/v) ใส่ขวดทดสอบให้ได้ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อหม้อนึ่งแรงดันที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ

เตรียมแบคทีเรียโพรไบโอติก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. animalis* TISTR 2194 และ *B. bifidum* TISTR 2195 เลี้ยงในอาหาร MRS broth (Merck เยอรมัน) เชื้อโพรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์นี้ เป็นเชื้อที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ ช่วยปรับสมดุลลำไส้ และปลอดภัยต่อการบริโภค (GRAS หรือ Generally recognized as safe) (Picard et al., 2005) ส่วนแบคทีเรียที่ใช้เปรียบเทียบกับคือ *E. coli* โดยนำมาเลี้ยงในอาหาร Nutrient broth (Merck เยอรมัน) เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกและล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.85 เปอร์เซ็นต์) 2 ครั้ง แล้วนำไปปรับความขุ่น (Optical density, OD) ที่ 600 nm ให้ได้ค่าเท่ากับ 1 เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อในการทดสอบการเจริญและหาค่ากิจกรรมพรีไบโอติก

การทดสอบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

ถ่ายหัวเชื้อ *Bifidobacterium* sp. 2 สายพันธุ์ และ *E. coli* ลงในอาหารทดสอบแต่ละชนิด ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน ตรวจวัดการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิด ทุก ๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้วิธี drop plate ลงบนอาหาร MRS agar ส่วนเชื้อ *E. coli* ทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร EMB agar (Merck เยอรมัน) แล้วบ่มเลี้ยงเชื้อให้เจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้ออกซิเจน เลือกนับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นแต่ละชนิดในระดับการเจือจางที่เหมาะสม (2-30 โคโลนี) บันทึกผลของปริมาณเชื้อที่ได้แล้วนำมาคำนวณหาค่ากิจกรรมพรีไบโอติก (Prebiotic activity, PA) (Lee et al., 2021) ดังนี้

PA = $\frac{\text{probiotic log CFU/mL on the sample at specific time} - \text{probiotic log CFU/mL on the sample at 0 h}}{\text{probiotic log CFU/mL on glucose at specific time} - \text{probiotic log CFU/mL on glucose at 0 h}}$

$= \frac{E. coli \text{ log CFU/mL on the sample at specific time} - E. coli \text{ log CFU/mL on the sample at 0 h}}{E. coli \text{ log CFU/mL on glucose at specific time} - E. coli \text{ log CFU/mL on glucose at 0 h}}$

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ผลการใช้เอนไซม์ในการย่อยกากถั่วเหลือง

จากการทดสอบการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ทางการค้า 5 ชนิด ได้แก่ อะไมเลส เซลลูเลส เฮมิเซลลูเลส แมนนาเนส และไซลันเนส ภายใต้สภาวะควบคุมที่เหมาะสม เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างสารละลายที่ได้แต่ละชนิดเพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ผลการทดลองแสดงใน Figure 1

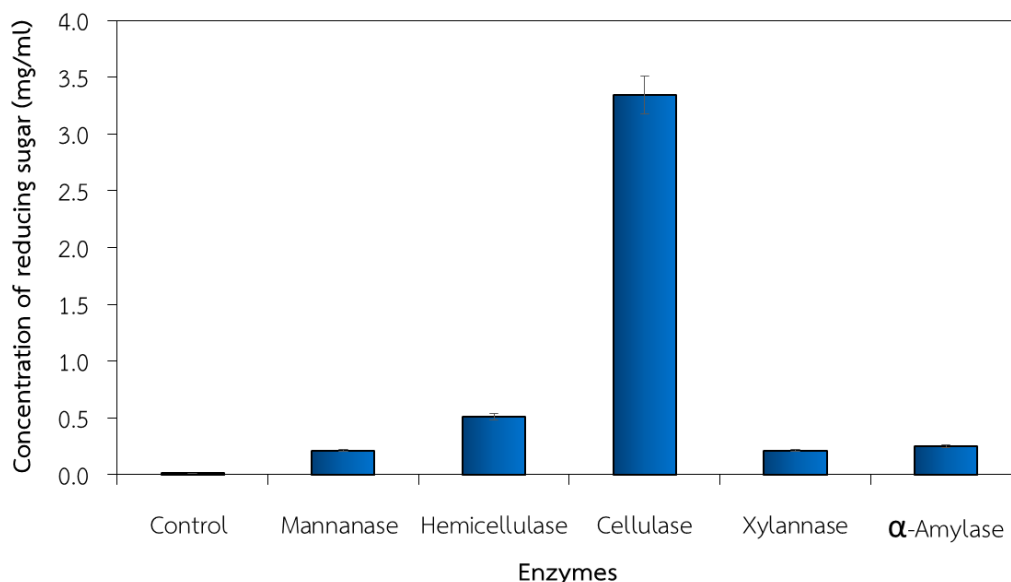


Figure 1 Comparison of reducing sugar content between untreated soybean solution and enzyme treated soybean solution

ในกากถั่วเหลืองส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยเส้นใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ โดยมี total dietary fiber 58.60 เปอร์เซ็นต์, insoluble dietary fiber 55.63 เปอร์เซ็นต์ และ soluble dietary fiber 1.91 เปอร์เซ็นต์ และมี monosaccharides และ oligosaccharides ประมาณ 3.5 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย glucose, fructose, galactose, arabinose, sucrose, stachyose และ raffinose รวมทั้งแบ่งปริมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (Kamble and Rani, 2020) ดังนั้นเมื่อวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในกากถั่วเหลืองจึงมีปริมาณน้อยมาก

โครงสร้างของ insoluble dietary fiber ในกากถั่วเหลืองค่อนข้างซับซ้อน ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (Fan et al., 2022) ดังนั้น ในการศึกษาจึงใช้เอนไซม์หลายชนิดเพื่อวิเคราะห์ผลของเอนไซม์ในการย่อยกากถั่วเหลือง หลังจากที่ย่อยกากถั่วเหลืองผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นแตกต่างกัน โดยในสารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วย

เซลลูเลส มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด เนื่องจากในกากถั่วเหลืองประกอบไปด้วยเซลลูโลสเป็นจำนวนมาก เซลลูเลสจึงย่อยเซลลูโลสที่ตำแหน่งพันธะ β -1,4 ไกลโคซิดิก ให้กลายเป็นโมเลกุลที่เล็กลง เกิดผลผลิตเป็นเซลโลไบโอส และกลูโคส ทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น (Sher et al., 2021) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการวิจัยของ Villanueva-Suárez et al. (2016) ที่ได้ทำการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ Ultraflo® L ที่มีส่วนประกอบของเซลลูเลส ทำให้สามารถย่อยสลายเส้นใยเซลลูโลสในกากถั่วเหลืองได้น้ำตาลและสารโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก

แอลฟา-อะไมเลส เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง เมื่อนำไปใช้ย่อยกากถั่วเหลือง พบว่ามีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เกิดขึ้นน้อย เนื่องจากในกากถั่วเหลืองมีส่วนที่เป็นแป้งเหลืออยู่น้อย ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ Kamble & Rani (2020) ที่รายงานว่าปริมาณแป้งและน้ำตาลในกากถั่วเหลืองมีเพียง 0.5 เปอร์เซ็นต์

แมนนาเนสเป็นเอนไซม์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยวัตถุดิบที่มีแมนแนน (Mannan) ซึ่งเป็นโพลีแซคคาไรด์ชนิดหนึ่งที่พบได้ในพืช เช่น กากปาล์ม กากมะพร้าว และกากถั่วเหลือง ได้ผลผลิตเป็นแมนโนโอลิโกแซคคาไรด์และแมนโนส (Ibrahim et al., 2022) เมื่อย่อยกากถั่วเหลืองด้วยแมนนาเนสพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นมีปริมาณน้อย เอนไซม์นี้จึงยังไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นเอนไซม์เดียวในการใช้ย่อยกากถั่วเหลือง

เฮมิเซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยสลายเส้นใยเฮมิเซลลูโลสที่ได้จากพืช เช่น xylans xyloglucans arabinoxylans และ glucomannans (Pramasari et al., 2023) เมื่อย่อยกากถั่วเหลือง ด้วยเฮมิเซลลูเลสพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นมีปริมาณน้อย ดังนั้นเอนไซม์นี้จึงยังไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นเอนไซม์เดียวในการใช้ย่อยกากถั่วเหลือง

ไซลานเนสเป็นเอนไซม์ย่อยสลายไซแลน (xylan) ได้ผลผลิตเป็นไซโลโอลิโกแซคคาไรด์และน้ำตาลไซโลส (Ratnadewi et al., 2016) เมื่อย่อยกากถั่วเหลืองด้วยไซลานเนส พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มีปริมาณน้อย เอนไซม์นี้จึงยังไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นเอนไซม์เดียวในการใช้ย่อยกากถั่วเหลือง

จากผลการทดลองเบื้องต้นที่แสดงใน Figure 1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์พบมากที่สุดในสารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยเซลลูเลส ดังนั้น ในการทดลองขั้นต่อไปจึงได้เลือกใช้เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยกากถั่วเหลือง

เมื่อนำสารละลายกากถั่วเหลืองที่ย่อยด้วยเซลลูเลสมาวิเคราะห์ชนิดของโอลิโกแซคคาไรด์และน้ำตาลต่าง ๆ ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบผิวบาง โดยเปรียบเทียบกับกากถั่วเหลืองที่ไม่ได้ผ่านการย่อย ผลการทดลองพบว่ากากถั่วเหลืองที่ไม่ได้ผ่านการย่อยจะมีความเข้มของแถบสีบนแผ่น TLC น้อยมาก โดยเปรียบเทียบระยะทางได้ใกล้เคียงได้กับสารมาตรฐานคือ glucose fructose และ arabinose ส่วนกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเซลลูเลส จะมีความเข้มของแถบสีบนแผ่น TLC มากขึ้น โดยเปรียบเทียบระยะทางได้ใกล้เคียงได้กับ glucose fructose และ arabinose เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบแถบสีจางๆ ซึ่งอาจจะเป็นโมเลกุลของโอลิโกแซคคาไรด์ หรือน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ ดังแสดงใน Figure 2



Figure 2 Thin-

layer

chromatography

chromatogram of standard sugars and soybean residue samples. a : glucose, b : xylose, c : mannose, d : fructose, e : galactose, f : arabinose, g : sucrose, h : untreated soybean residue solution, i : cellulase-treated soybean residue solution

ผลการศึกษาคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

จากการติดตามการเจริญของแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์ คือ *B. animalis*, *B. bifidum* และ *E. coli* ในสารละลายกากั่วเหลืองที่ย่อยด้วยด้วยเซลล์เลสและกากั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการย่อย โดยเปรียบเทียบกับกรใช้น้ำตาลกลูโคส เก็บตัวอย่างน้ำหมักเพื่อติดตามปริมาณแบคทีเรียทุก ๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำค่าปริมาณแบคทีเรียที่ได้มาคำนวณหาค่า PA ผลการทดลองแสดงใน Figure 3-4

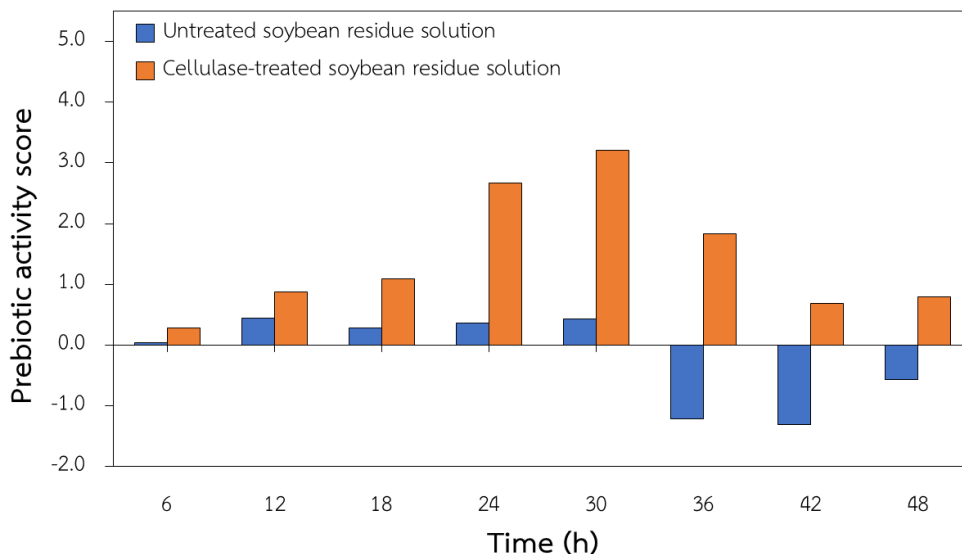


Figure 3 Prebiotic activity of untreated soybean solution and cellulase treated soybean solution tested by *B. animalis* and *E. coli*

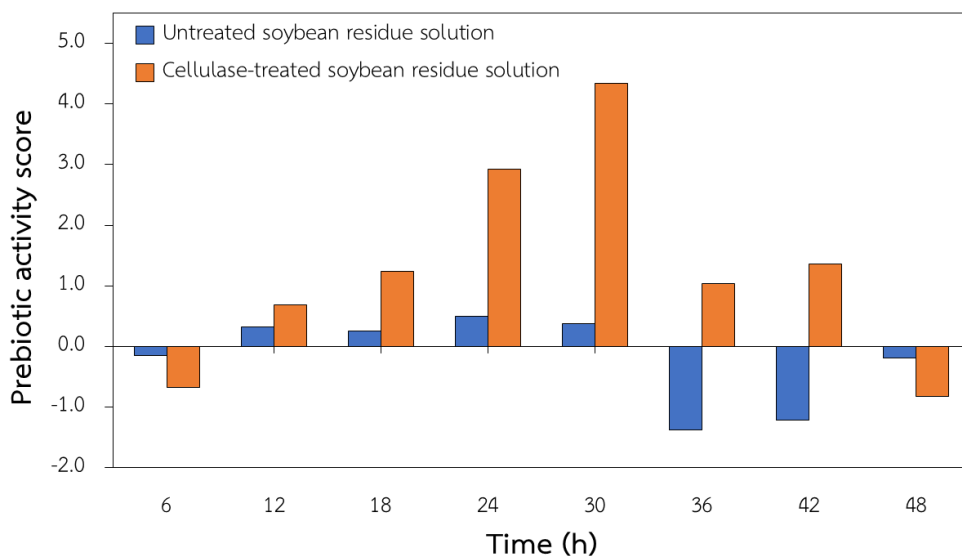


Figure 4 Prebiotic activity of untreated soybean solution and cellulase treated soybean solution tested by *B. bifidum* and *E. coli*

Figure 3 แสดงค่า PA ของสารละลายกากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการย่อยและสารละลายกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเซลลูเลส โดยใช้เชื้อทดสอบคือ *B. animalis* และ *E. coli* ผลการทดลอง

พบว่า *B. animalis* สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเซลลูเลส ค่า PA จึงเป็นบวกโดยมีค่าสูงสุดที่ 30 ชั่วโมง หลังจากนั้นค่า PA จะเริ่มลดน้อยลง การที่ค่า PA เริ่มลดลงนี้อาจเป็นเพราะสารอาหารที่เป็นพรีไบโอติกถูกใช้ไปโดย *B. animalis* ทำให้การเจริญและปริมาณเชื้อ *B. animalis* เริ่มลดลง เมื่อนำมาคำนวณค่า PA จึงลดลงด้วย ในขณะที่ค่า PA ของสารละลายกากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์จะมีค่าเป็นบวกเพียงเล็กน้อย เนื่องจากในกากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการย่อยมีสารอาหารที่เป็นพรีไบโอติกเพียงเล็กน้อย จึงส่งเสริมการเจริญของ *B. animalis* ให้มีปริมาณเซลล์มากกว่า *E.coli* เพียงเล็กน้อย ทำให้ได้ค่า PA ต่ำกว่าค่า PA ของสารละลายกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเซลลูเลส ภายหลัง 30 ชั่วโมง *E. coli* สามารถเจริญในอาหารที่มีกากถั่วเหลืองได้ดีกว่า *B. animalis* เมื่อคำนวณค่า PA จึงมีค่าเป็นลบ

สำหรับ Figure 4 แสดงค่า PA ของสารละลายกากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการย่อยและสารละลายกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเซลลูเลส โดยใช้เชื้อทดสอบคือ *B. bifidum* และ *E. coli* ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าค่า PA สารละลายกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเซลลูเลส จะสูงกว่าค่า PA ของสารละลายกากถั่วเหลืองที่ยังไม่ย่อยอย่างชัดเจน โดยมีค่าสูงสุดที่ 30 ชั่วโมง หลังจากนั้นค่า PA จะเริ่มลดน้อยลง อาจเป็นเพราะสารอาหารที่เป็นพรีไบโอติกถูกใช้ไปโดย *B. bifidum* ทำให้การเจริญและปริมาณ *B. bifidum* ลดลง มีผลให้ค่า PA ลดลงด้วยเช่นกัน ส่วนค่า PA ของสารละลายกากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการย่อยจะมีค่าเป็นบวกเพียงเล็กน้อย อาจเนื่องจากในกากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการย่อยมีสารอาหารที่เป็นพรีไบโอติกเพียงเล็กน้อยจึงถูกใช้หมดไปอย่างรวดเร็วโดย *B. bifidum* และภายหลังจาก 30 ชั่วโมง *E. coli* สามารถเจริญในอาหารที่มีกากถั่วเหลืองได้ดีกว่า *B. bifidum* ทำให้ปริมาณเซลล์ของ *E. coli* มีมากกว่า *B. bifidum* เมื่อนำมาคำนวณค่า PA จึงมีค่าติดลบ

เมื่อพิจารณาค่า PA ในสารละลายกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเซลลูเลส จะสังเกตได้ว่าพรีไบโอติกแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ *B. animalis* และ *B. bifidum* สามารถเจริญได้ดีในอาหารทดสอบที่มีกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเซลลูเลส จึงมีค่า PA มากกว่าสารละลายกากถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเซลลูเลส ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Le et al. (2020) ที่ได้ทดสอบคุณสมบัติทางพรีไบโอติกของสารละลายกากถั่วเหลืองที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ pectinase: cellulase ในอัตราส่วน 1:1 จากงานวิจัยนี้พบว่าสารที่ได้เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ ช่วยกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ได้แก่ *Lactobacillus rhamnosus* GG *L. plantarum* และ *L. brevis* ได้ดี นอกจากนี้ยังม้งานวิจัยของ Pérez-López et al. (2016) ได้ทำการย่อยกากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ Ultraflo® L ได้เส้นใยอาหารที่สามารถส่งเสริมการเจริญของ Bifidobacterium และยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค เช่น Clostridia และ Bacteroides ดังนั้น จากผลการวิจัยและข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ากากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส มีสารที่มีศักยภาพสามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ และไม่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อก่อโรคเช่น *E. coli* ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของสารพรีไบโอติก

สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัยสามารถสรุปได้ว่า กากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยด้วยเซลลูเลส จะได้กากถั่วเหลืองที่มีศักยภาพเป็นพรีไบโอติกเพิ่มขึ้น ช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อโปรไบโอติกที่มีประโยชน์ ได้แก่ *B. animalis* และ *B. bifidum* อย่างไรก็ตาม ควรที่จะทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยศึกษาถึงการใช้น้ำมันหลายชนิดร่วมกันในการย่อยกากถั่วเหลือง รวมทั้งศึกษาส่วนประกอบของน้ำตาลและโอลิโกแซคคาไรด์ในกากถั่วเหลืองที่ได้ผ่านย่อยด้วยเอนไซม์ ศึกษาประสิทธิภาพของกากถั่วเหลืองในรูปแบบจำลองลำไส้เพื่อการศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ รวมทั้งการผลิตสารเมตาบอไลต์และกรดไขมันสายสั้นต่างๆ

เอกสารอ้างอิง

- Ben, Q., Sun, Y., Chai, R., Qian, A., Xu, B., & Yuan, Y. (2014). Dietary fiber intake reduces risk for colorectal adenoma: a meta-analysis. *Gastroenterology*, 146(3), 689-699. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.11.003>
- Bourassa, M.W., Alim, I., Bultman, S.J. & Ratan, R.R. (2016). Butyrate, neuroepigenetics and the gut microbiome: Can a high fiber diet improve brain health?. *Neuroscience letters*, 625, 56-63. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.02.009>
- Fan, H., Zhang, Y., Swallah, M. S., Wang, S., Zhang, J., Fang, J., Lu, J., & Yu, H. (2022). Structural Characteristics of Insoluble Dietary Fiber from Okara with Different Particle Sizes and Their Prebiotic Effects in Rats Fed High-Fat Diet. *Foods*, 11(9), 1298. <https://doi.org/10.3390/foods11091298>
- He, S., Wang, X., Zhang, Y., Wang, J., Sun, H., Wang, J., Cao, X., & Ye, Y. (2016). Isolation and prebiotic activity of water-soluble polysaccharides fractions from the bamboo shoots (*Phyllostachys praecox*). *Carbohydrate Polymers*, 151, 295-304. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.072>
- Ibrahim, S. N. M. M., Bankeeree, W., Prasongsuk, S., Punnapayak, H., & Lotrakul, P. (2022). Production and characterization of thermostable acidophilic β -mannanase from *Aureobasidium pullulans* NRRL 58524 and its potential in mannooligosaccharide production from spent coffee ground galactomannan. *Biotech*, 12(9), 237. <https://doi.org/10.1007/s13205-022-03301-4>
- Kamble, D. B., & Rani, S. (2020). Bioactive components, in vitro digestibility, microstructure and application of soybean residue (okara): a review. *Legume Science*, 2(1), e32. <https://doi.org/10.1002/leg3.32>
- Le, B., Pham, T. N. A., & Yang, S. H. (2020). Prebiotic Potential and Anti-Inflammatory Activity of Soluble Polysaccharides Obtained from Soybean Residue. *Foods*, 9(12), 1808. <https://doi.org/10.3390/foods9121808>

- Lee, H.B., Son, S.U., Lee, J.E., Lee, S.H., Kang, C.H., Kim, Y.S., Shin, K.S., & Park, H.Y. (2021). Characterization, prebiotic and immune-enhancing activities of rhamnogalacturonan-I-rich polysaccharide fraction from molokhia leaves. *International journal of biological macromolecules*, 175, 443–450.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.019>
- Lu, F., Liu, Y., & Li, B. (2013). Okara dietary fiber and hypoglycemic effect of okara foods. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 2(2), 126-132.
<https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2013.10.002>
- Markowiak, P., & Śliżewska, K. (2017). Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients*, 9(9), 1021. <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, 426- 428. <http://dx.doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Moreno, F.A., & Sanz, M.L. (2014). *Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity* (19th ed.). Wiley & Sons.
<https://doi.org/10.1002/9781118817360.ch19>
- Pérez-López, E., Cela, D., Costabile, A., Mateos-Aparicio, I., & Rupérez, P. (2016). In vitro fermentability and prebiotic potential of soyabean Okara by human faecal microbiota. *British Journal of Nutrition*, 116(6), 1116–1124.
<https://doi.org/10.1017/S0007114516002816>
- Pérez-López, E., Veses, A.; Redondo, N., Tenorio-Sanz, M., Villanueva, M., Redondo-Cuenca, A., Marcos, A.; Nova, E., Mateos-Aparicio, I., & Rupérez, P. (2018). Soybean okara modulates gut microbiota in rats fed a high-fat diet. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 16, 100–107.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcdf.2018.09.002>
- Picard, C., Fioramonti, J., Francois, A., Robinson, T., Neant, F., & Matuchansky, C. (2005). Review article: bifidobacteria as probiotic agents -- physiological effects and clinical benefits. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 22(6), 495–512.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2005.02615.x>
- Pramasari, D. A., Oktaviani, M., Thontowi, A., Purnawan, A., Ermawar, R. A., Sondari, D., Ningrum, R. S., Laksana, R. P. B., Lianawati, A., Fahrezi, M. Z. M., Salsabila, Q., & Hermiati, E. 2023. The use of hemicellulose acid hydrolysate for hydrolysis of sugarcane trash and its fermentation for producing xylitol. *Industrial Crops and Products*, 193, 116163. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.116163>
- Ratnadewi, A. A. I., Handayani, W., Oktavianawati, I., Santoso, A. B., & Puspaningsih, N. N. T. 2016. Isolation and Hydrolysis Xylan from Soybean Waste with Endo-β-1,4-D-

- Xilanase of *Bacillus* sp. From Soil Termite Abdomen. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 9, 371-377.
<https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.02.152>
- Santos, D.C.D., Oliveira Filho, J.G.D., Silva, J.D.S., Sousa, M.F., Vilela, M.D.S., Silva, M.A.P., Lemes, A.C., & Egea, M.B. (2019). Okara flour: its physicochemical, microscopical and functional properties. *Food Science & Nutrition*, 49(6), 1252-1264.
<https://doi.org/10.1108/NFS-11-2018-0317>
- Sher, H., Zeb, N., Zeb, S., Ali, A., B, A., F, I., Su, R., & Mh, R. 2021. Microbial Cellulases: A Review on Strain Development, Purification, Characterization and their Industrial Applications. *Journal of Bacteriology and Mycology*, 8(5).
<http://dx.doi.org/10.26420/jbacteriolmycol.2021.1180>
- Suzuki, A., & Banna, J. (2020). Improving diet quality for chronic disease prevention with okara "Food Waste". *American Journal of Lifestyle Medicine*, 15(1), 14-18.
<https://doi.org/10.1177/1559827620960099>
- Swallah, M.S., Fan, H., Wang, S., Yu, H., & Piao, C. (2021). Prebiotic Impacts of soybean residue (okara) on eubiosis/dysbiosis condition of the gut and the possible effects on liver and kidney functions. *Molecules*, 26, 326.
<https://doi.org/10.3390/molecules26020326>
- Villanueva-Suárez, M. J., Pérez-Cózar, M. L., Mateos-Aparicio, I., & Redondo-Cuenca, A. (2016). Potential fat-lowering and prebiotic effects of enzymatically treated okara in high-cholesterol-fed Wistar rats. *International journal of food sciences and nutrition*, 67(7), 828–833. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1200016>
- Wang, X., Zhang, Y., Li, Y., Yu, H., Wang, Y., & Piao, C. 2020. Insoluble dietary fibre from okara (soybean residue) modified by yeast *Kluyveromyces marxianus*. *LWT*, 134, 110252. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110252>
- Yoshida, B. Y. & Prudencio, S. H. 2020. Physical, chemical, and technofunctional properties of okara modified by a carbohydrase mixture. *LWT*, 134, 110141.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110141>