# บทความวิจัย

## คุณสมบัติพรีไบโอติกเบื้องต้นของน้ำตาลสกัดจากเมล็ดถั่วเขียวด้วยสารละลายเอทานอล

## Primary Prebiotic Properties of Ethanolic Sugar Extract from Mung Bean Seeds

ไพโรจน์ วงศ์พุทธิสิน* และ นารินทร์ หล้าสม
Pairote Wongputtisin* and Narin Lahsom

Received: September 14, 2017
Accepted: November 7, 2017

**บทคัดย่อ**

เมล็ดพืชตระกูลถั่วเป็นแหล่งของน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์กลุ่มราฟฟิโนสซึ่งได้รับการยอมรับว่าเป็นสารพรีไบโอติกที่มีประสิทธิภาพ โดยในการศึกษาครั้งนี้ เมล็ดถั่วเขียวผิวมัน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ กำแพงแสน 1 กำแพงแสน 2 ชัยนาท 36 และชัยนาท 72 ได้ถูกนำมาสกัดน้ำตาลที่มีขนาดโมเลกุลเล็กด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 (v/v) จากนั้นวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณน้ำตาลและศึกษาความสามารถของน้ำตาลสกัดในการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียบางสายพันธุ์จากทางเดินอาหารมนุษย์ ผลการทดลองพบว่าน้ำตาลสกัดจากถั่วเขียวทั้ง 4 สายพันธุ์มีขนาดเฉลี่ยในรูปจำนวนหน่วยน้ำตาลอยู่ระหว่าง 3-7 หน่วย โดยพันธุ์กำแพงแสน 2 ชัยนาท 36 และชัยนาท 72 พบน้ำตาลราฟฟิโนสในปริมาณ 1.76-2.29 mg/g dry seed สตาชิโอส 33.95-34.82 mg/g dry seed และเวอบาสโคส 13.59-20.31 mg/g dry seed น้ำตาลสกัดเหล่านี้กระตุ้นการเจริญของแบคทีเรีย *Lactobacillus acidophilus* TISTR1338, *L. plantarum* TISTR541 และ *L. lactis* TISTR1464 ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แต่ไม่สามารถกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรีย *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TISTR292 และ *Escherichia coli* นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญของแบคทีเรีย *S.* Typhimurium สามารถถูกยับยั้งเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับ *Lactobacillus* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ในอาหารที่มีน้ำตาลสกัดจากเมล็ดถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าน้ำตาลสกัดจากเมล็ดถั่วเขียวผิวมันทั้ง 4 สายพันธุ์แสดงคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นสารพรีไบโอติกได้

**คำสำคัญ:** ถั่วเขียวผิวมัน โอลิโกแซคคาไรด์กลุ่มราฟฟิโนส พรีไบโอติก โพรไบโอติก อาหารฟังก์ชัน

**ABSTRACT**

Leguminous seeds are source of raffinose family oligosaccharides which have been accepted as an effective prebiotic substance. In this study, low molecular weight sugars were extracted from 4 cultivars of mung bean seed, i.e. Kampangsan1, Kampangsan2, Chainat36 and Chainat72, using 50% (v/v) ethanol. Subsequently, composition and amount of extracted sugar and their capacity in growth stimulation of some enteric bacteria were investigated. The results showed that the average size of sugars in term of degree of polymerization were 3-7. The cultivar Kampangsan2, Chainat36 and Chinat72 contained high amount of raffinose at 1.76-2.29 mg/g dry seed, stachyose at 33.95-34.82 mg/g dry seed and verbascose at 13.59-20.31 mg/g dry seed. Growth of *Lactobacillus acidophilus* TISTR1338, *L. plantarum* TISTR541 and *L. lactis* TISTR1464 were significantly stimulated by these sugars ($p<0.05$), while that of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TISTR292 and *Escherichia coli* were not stimulated. Moreover, growth of *S.* Typhimurium could be suppressed when was co-cultured with those 3 strains of *Lactobacillus* sp. in media contained extracted sugar from mung beans as a carbon source. Thus, it might be concluded that ethanolic sugar extracted from 4 cultivars of mung bean could exhibit the primary properties of prebiotic substance.

**Keywords:** mung bean, raffinose family oligosaccharides, prebiotic, probiotic, functional food

* Corresponding author e-mail: pairotewong@gmail.com
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo university, T. Nongharn, A. Sansai, Chiang mai 50290

**บทนำ**

ผู้บริโภคในยุคปัจจุบันมีแนวโน้มหันมาบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพมากขึ้น กระแสดังกล่าวนี้ไม่ได้จำกัดเฉพาะกลุ่มผู้สูงอายุหรือวัยทำงานเท่านั้น แต่ยังแผ่ขยายมายังกลุ่มของวัยรุ่นด้วย โดยข้อมูลจากศูนย์วิจัยกสิกรไทยได้รายงานว่ามูลค่าตลาดอาหารและเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพของโลกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นด้วยอัตราเฉลี่ยร้อยละ 6-7 ต่อปี และในปี 2560 นี้มูลค่าตลาดคาดว่าจะสูงถึง 1 ล้านล้านดอลลาร์สหรัฐฯ โดยตลาดในไทยอยู่อันดับที่ 19 ของโลกและมีอาหารฟังก์ชัน (functional foods) หรืออาจเรียกว่า “อาหารเชิงหน้าที่” ครองส่วนแบ่งตลาดสูงสุดที่ร้อยละ 60 [1] ทั้งนี้ หนึ่งในอาหารฟังก์ชันที่ได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก คือ กลุ่มของสารพรีไบโอติก (prebiotics) ซึ่งถูกนำเสนอขึ้นครั้งแรกโดย Gibson และ Roberfroid ในปี ค.ศ.1995 [2] และต่อมาได้มีการปรับปรุงนิยามของคำว่า พรีไบโอติกโดยให้คำนิยามว่าเป็น “สารอาหารที่สามารถถูกหมักได้อย่างเฉพาะเจาะจงที่ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่จำเพาะต่อทั้งจำนวนและกิจกรรมของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร อันเป็นผลให้เจ้าบ้าน (host) มีสุขภาวะที่ดีได้” [3] ซึ่งโดยสรุปแล้วสารที่ถูกยอมรับว่ามีคุณสมบัติพรีไบโอติกนั้นต้องไม่ถูกย่อยหรือดูดซึมในทางเดินอาหารของเจ้าบ้านแล้วไหลผ่านไปยังลำไส้เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางกลุ่มที่ก่อประโยชน์แก่ร่างกายได้ซึ่งก็คือจุลินทรีย์โพรไบโอติก (probiotics) และนอกจากนี้สารพรีไบโอติกที่ดียังต้องมีความคงตัวต่อสภาวะที่ใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหารอีกด้วย [4,5] ปัจจุบันเห็นได้ว่ามีการเสริมสารพรีไบโอติกลงในอาหารที่หลากหลาย เช่น นมหมัก [6] น้ำผลไม้ [7] ช็อกโกแลต [8,9] ขนมอบ [10,11] และไส้กรอก [12] เป็นต้น

น้ำตาลกลุ่มกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (galactooligosaccharide, GOS) เป็นหนึ่งในตัวอย่างของสารพรีไบโอติกที่เป็นที่รู้จักและได้รับการยอมรับ มีการผลิตเชิงการค้าสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหารโดยใช้น้ำตาลแลคโตส (lactose) เป็นสารตั้งต้นและปฏิกิริยาทรานส์กาแลคโตซิเลชัน (transgalactosylation) จากการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส (β-galactosidase) ภายใต้สภาวะที่จำเพาะ แต่ก็มีน้ำตาล GOS กลุ่มหนึ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถสกัดได้มาจากพืชโดยตรง นั่นคือ น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์กลุ่มราฟฟิโนส (raffinose family oligosaccharides; RFOs) ที่มีสมาชิกสำคัญ ได้แก่ น้ำตาลราฟฟิโนส (raffinose) น้ำตาลสตาชิโอส (stachyose) และน้ำตาลเวอบาสโคส (verbascose) น้ำตาลเหล่านี้มีการสะสมและพบมากในเมล็ดพืชตระกูลถั่ว เช่น ถั่วเหลือง (soybean) ถั่วลูปิน (lupin) ถั่วลูกไก่ (chickpea) ถั่วเขียว (mung bean) ถั่วมะแฮะ (pigeon pea) ถั่วพร้า (jack bean) และถั่วเลนทิล (lentil) เป็นต้น [6,13-19] แต่ก็มีปริมาณแตกต่างกันขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ น้ำตาล RFOs เหล่านี้ถูกยืนยันถึงคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติก โดยเฉพาะอย่างยิ่งความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียจีนัส *Bifidobacterium* sp. หรือที่เรียกว่า Bifidogenic effect และมีการผลิตในเชิงการค้าในชื่อ “Soya-oligo” แต่อาจไม่เป็นที่ยอมรับในผู้บริโภคบางรายเพราะกังวลว่าเป็นสาเหตุของอาการท้องอืด [6,20-23]

หลายหน่วยงานในประเทศไทยมีการพัฒนาและปรับปรุงสายพันธุ์พืชตระกูลถั่วชนิดต่างๆ มาเป็นเวลานาน ทั้งนี้เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่เหมาะสมกับการเพาะปลูกในสภาพดินและภูมิอากาศของประเทศไทย จากนั้นจึงแจกจ่ายแก่เกษตรกรสำหรับเพาะปลูกต่อไป ก่อนหน้านี้ มีรายงานการศึกษาปริมาณน้ำตาลกลุ่ม RFOs ในเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 พร้อมทั้งมีการศึกษาคุณสมบัติพรีไบโอติกของน้ำตาลสกัดดังกล่าว ซึ่งก็พบว่าเมล็ดถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 มีการสะสมของน้ำตาลสตาชิโอสในปริมาณสูงมากและสามารถกระตุ้นการเจริญของโพรไบโอติกได้เป็นอย่างดี [19] และในส่วนของการศึกษาครั้งนี้ เมล็ดถั่วเขียวผิวมัน (mung bean หรือ green bean) จำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ กำแพงแสน 1 กำแพงแสน 2 ชัยนาท 36 และชัยนาท 72 ซึ่งได้มีการพัฒนาพันธุ์และเพาะปลูกโดยหน่วยงานภาครัฐของไทยก็ได้ถูกศึกษาถึงองค์ประกอบและปริมาณน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์กลุ่มราฟฟิโนส ตลอดจนคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นสารพรีไบโอติกก็

* Corresponding author e-mail: pairotewong@gmail.com
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo university, T. Nongharn, A. Sansai, Chiang mai 50290

ได้ถูกศึกษาเช่นกัน เพื่อเป็นการนำเสนอคุณประโยชน์เชิงคุณค่าทางอาหารด้านอื่น ของเมล็ดพืชตระกูลถั่วซึ่งมีนอกเหนือจากการใช้เป็นแหล่งของอาหารโปรตีน โดยงานวิจัยชิ้นนี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อศึกษาชนิดและปริมาณของน้ำตาลกลุ่ม RFOs ของเมล็ดถั่วเขียวผิวมันสายพันธุ์ กำแพงแสน 1 กำแพงแสน 2 ชัยนาท 36 และชัยนาท 72 และเพื่อศึกษาคุณสมบัติพรีไบโอติกเบื้องต้นของสารละลายน้ำตาลสกัดที่ได้จากถั่วเขียวทั้ง 4 สายพันธุ์

## วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

### 1. ตัวอย่างเมล็ดถั่วเขียว

เมล็ดถั่วเขียวที่ใช้ในการทดลองเป็นถั่วเขียวผิวมัน (*Vigna radiate* L.) มีทั้งสิ้น 4 สายพันธุ์ ได้แก่ กำแพงแสน 1 กำแพงแสน 2 ชัยนาท 36 และชัยนาท 72 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยพืชไร่ชัยนาท จังหวัดชัยนาท เมล็ดถั่วเขียวได้ถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

### 2. เชื้อแบคทีเรีย

แบคทีเรียโพรไบโอติกที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* TISTR1338, *L. lactis* TISTR1464 และ *L. plantarum* TISTR541 และแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร 1 สายพันธุ์ คือ *Salmonella enterica* serovar Typhimurium TISTR292 ซึ่งจัดซื้อมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และแบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้มนุษย์ 1 สายพันธุ์ คือ *Escherichia coli* จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ แบคทีเรียโพรไบโอติกถูกเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียง de Mann, Rogosa and Sharpe agar (MRS) ในขณะที่ *E. coli* และ *S.* Typhimurium เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียง Nutrient agar (NA) ทั้งหมดถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส

### 3. การเตรียมน้ำตาลสกัดจากเมล็ดถั่วเขียวด้วยสารละลายเอทานอล

บดเมล็ดถั่วเขียวด้วยเครื่องปั่นผสมอาหาร (Philips Blender 600 W, 2 L, HR2118) ให้ละเอียด จากนั้นเติมด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 50 (v/v) ในอัตราส่วนถั่วต่อตัวทำละลาย 3:50 (กรัมน้ำหนักแห้ง: มิลลิลิตร) และเขย่าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าแบบ rotary shaker ความเร็วรอบ 150 rpm แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้ ไประเหยเพื่อกำจัดเอทานอลด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ (BUCHI®รุ่น R-205) และบันทึกปริมาตรสารสกัดที่ได้ เก็บรักษาน้ำตาลสกัดจากเมล็ดถั่วเขียวไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส [17,19]

### 4. การวิเคราะห์น้ำตาลที่สกัดจากเมล็ดถั่วเขียว

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) ของสารละลายน้ำตาลที่เตรียมได้จากถั่วเขียวแต่ละสายพันธุ์ด้วยวิธี DNS method และ Phenol sulfuric method ตามลำดับ [24,25] จากนั้นคำนวณค่าจำนวนหน่วยเฉลี่ยของน้ำตาล ในรูปค่า degree of polymerization (DP) จากสัดส่วนของปริมาณน้ำตาลทั้งหมดกับน้ำตาลรีดิวซ์ [19] นอกจากนี้วิเคราะห์น้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์กลุ่มราฟฟิโนสด้วยเทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC) โดยปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm 4 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นกรองสารละลายส่วนใสผ่านแผ่นกรอง nylon membrane ขนาด pore size 0.45 ไมครอน ฉีดตัวอย่างปริมาณ 20 ไมโครลิตร ผ่านคอลัมน์ 5 µm Previal Amino column (Alltech®, Illinois, USA) และอุปกรณ์ตรวจวัดชนิด Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) (Alltech®) สารละลาย mobile phase ที่ใช้ คือ สารละลายผสมระหว่าง acetonitrile: น้ำกลั่น อัตราส่วน 75: 25 ที่อัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส อุปกรณ์ตรวจวัด คือ ELSD2000 (Alltech®) น้ำตาลมาตรฐานที่ใช้ ได้แก่ กลูโคส (Fluka®, Saint Louis, MO, USA) ซูโครส (Fluka®) ราฟฟิโนส (MERCK®, Darmstadt, Germany) สตาชิโอส (SIGMA-ALDRICH®, Saint Louis, MO, USA) และเวอบาสโคส (Fluka®) ความบริสุทธิ์ระดับ HPLC grade [19]

* Corresponding author e-mail: pairotewong@gmail.com
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo university, T. Nongharn, A. Sansai, Chiang mai 50290

**5. การทดสอบคุณสมบัติพรีไบโอติกเบื้องต้นของสารละลายน้ำตาลสกัดจากเมล็ดถั่วเขียว**

ทดสอบการกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ในลำไส้ โดยเพาะเลี้ยงแบบเชื้อเดี่ยว (single culture test) ของแบคทีเรีย *L. acidophilus* TISTR1338 *L. lactis* TISTR1464 *L. plantarum* TISTR541 *S.* Typhimurium TISTR292 และ *E. coli* ลงในอาหารเหลวสูตร Basal medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (กรัม/ลิตร: $MgSO_4$ 0.2 กรัม $KH_2PO_4$ 1.0 กรัม $K_2HPO_4$ 1.0 กรัม $CaCl_2$ 0.02 กรัมและ $FeCl_2$ 0.05 กรัม และปรับค่า pH เป็น 7.0) จากนั้นเติมน้ำตาลสกัดจากเมล็ดถั่วเขียวลงไปเป็นแหล่งคาร์บอนในปริมาณร้อยละ 1 (w/v) ภายหลังกระบวนการฆ่าเชื้อ ทำการถ่ายหัวเชื้อแต่ละชนิดปริมาณ $10^7$-$10^8$ CFU/ml ลงไปในอาหารแต่ละสูตร เพาะเลี้ยงโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงที่ 0 และ 24 เพื่อนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิค total plate count โดยทำการนับจำนวนแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. *E. coli* และ *S.* Typhimurium บนอาหารแข็งสูตร MRS สูตร EMB (Eosin Methylene Blue Agar) และสูตร SS (*Salmonella-Shigella* agar) ตามลำดับ ทั้งนี้มีชุดการทดลองควบคุมจำนวนสองชุด ได้แก่ ชุดทดลองที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และชุดทดลองที่ไม่มีแหล่งคาร์บอน [19,26]

ส่วนการทดสอบผลของน้ำตาลสกัดต่อการเจริญของเชื้อผสม (Defined-Mixed culture) ทำโดยออกแบบการทดลองเช่นเดิม จากนั้นทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ ปริมาณรวมประมาณ $10^8$ CFU/ml เชื้อ *E. coli* ปริมาณ $10^8$ CFU/ml และ *S.* Typhimurium ปริมาณ $10^8$ CFU/ml ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อขวดเดียวกัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยไม่เขย่า เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0 และ 24 เพื่อนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกโดยรวม *E. coli* และกลุ่ม *Salmonella-Shigella* โดยแบคทีเรียแลคติกได้ทำการนับบนอาหาร MRS agar ในขณะที่แบคทีเรีย *E. coli* และแบคทีเรียกลุ่ม *Salmonella-Shigella* จะทำการนับบนอาหาร EMB agar และ SS agar ตามลำดับ

**6. การประมวลผลทางสถิติ**

ทำการทดลองสามซ้ำ จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้โปรแกรมทางสถิติ STATISTIX© โดยใช้ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$)

**ผลการทดลองและวิจารณ์**

**1. การศึกษาน้ำตาลในเมล็ดถั่วเขียว**

จากการทดลองพบว่าสารละลายน้ำตาลสกัดจากเมล็ดถั่วเขียวทั้ง 4 สายพันธุ์มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ในช่วงประมาณ 27 - 37 และ 5 - 7 mg/g dry seeds ตามลำดับ (Figure 1) โดยสายพันธุ์ชัยนาท 72 มีน้ำตาลทั้งหมดสูงที่สุด แต่มีน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำที่สุด ดังนั้น จึงพบว่าน้ำตาลจากถั่วเขียวพันธุ์นี้มีค่าเฉลี่ยของ DP มากที่สุด คือประมาณ 7 หน่วย ส่วนสายพันธุ์ที่มีน้ำตาลขนาดเล็กสุดคือพันธุ์กำแพงแสน 1 และ 2 (DP 3-4) ซึ่งจากค่า DP ที่คำนวณได้นี้ ทำให้สามารถอนุมานได้ว่าน้ำตาลที่สกัดได้ส่วนใหญ่มีขนาดอยู่ในช่วงของโอลิโกแซคคาไรด์ ทั้งนี้ความยาวและลักษณะของสายโซ่โพลิเมอร์น้ำตาลอาจมีผลต่อประสิทธิภาพการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกได้ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกรณีของน้ำตาลฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructooligosaccharides, FOS) พบว่าน้ำตาล FOS สายสั้นสามารถกระตุ้นการเจริญได้ดีกว่าอินูลินและน้ำตาล FOS ที่มีโครงสร้างเป็นสายยาวและมีกิ่งก้าน [27, 28] เมื่อนำสารละลายน้ำตาลสกัดจากเมล็ดถั่วเขียวมาวิเคราะห์ถึงองค์ประกอบน้ำตาลด้วยเทคนิค HPLC ผลการทดลองแสดงดัง Table 1 และ Figure 2 ที่พบน้ำตาลกลูโคสเล็กน้อยในสายพันธุ์ชัยนาท 72 แต่ไม่สามารถตรวจวัดได้ในอีกสามสายพันธุ์ที่เหลือ พบน้ำตาลซูโครสค่อนข้างสูง (10.94 mg/g dry seeds) ในสายพันธุ์กำแพงแสน 1 ซึ่งแตกต่างชัดเจนจากสายพันธุ์อื่นๆ อย่างไรก็ตามน้ำตาลทั้งสองชนิดนี้ไม่

* Corresponding author e-mail: pairotewong@gmail.com
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo university, T. Nongharn, A. Sansai, Chiang mai 50290

จัดว่าเป็นน้ำตาลกลุ่ม RFOs แต่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กที่ละลายน้ำได้และสามารถถูกสกัดด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 (v/v) เช่นกัน น้ำตาลราฟฟิโนสซึ่งเป็นน้ำตาลโอลิโกแซคคาไรด์ขนาดเล็กสุดในกลุ่มน้ำตาล RFOs พบได้สูงสุดในสายพันธุ์กำแพงแสน 1 เช่นกัน (6.02 mg/g dry seeds) และพบในปริมาณใกล้เคียงกันในถั่วเขียวอีกสามสายพันธุ์ที่เหลือ แต่กลับพบว่าสายพันธุ์กำแพงแสน 1 แทบไม่พบน้ำตาลชนิดสตาชิโอสและเวอบาสโคส โดยน้ำตาลสตาชิโอสพบสูงสุดในสายพันธุ์ชัยนาท 36 (46.1 mg/g dry seeds) ส่วนน้ำตาลเวอบาสโคสพบสูงสุดในสายพันธุ์กำแพงแสน 2 (20.3 mg/g dry seeds) ทั้งนี้ เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลปริมาณน้ำตาลกลุ่ม RFOs จากถั่วเขียวในการศึกษาครั้งนี้กับเมล็ดถั่วเหลืองสายพันธุ์เชียงใหม่ 60 [19] พบว่าเมล็ดถั่วเขียวมีความโดดเด่นของน้ำตาลเวอบาสโคสซึ่งมีปริมาณสูงกว่าประมาณ 8.5-12.5 เท่า แต่มีน้ำตาลสตาชิโอสที่น้อยกว่าประมาณ 3-4 เท่า แม้กับถั่วเขียวสายพันธุ์อื่นๆ ที่ได้ถูกรายงานไว้ก่อนหน้านี้นั้นก็พบว่ามีความแตกต่างดังแสดงใน Table 2 [29-34] ซึ่งอาจเกิดจากกระบวนการสกัดที่แตกต่างกัน โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกกระบวนการสกัดด้วยสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 50 (v/v) ซึ่งเป็นชนิดตัวทำละลายและเป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการสกัดน้ำตาล RFOs จากเมล็ดพืช [17, 35] อีกทั้งเอทานอลยังช่วยลดความความเสียหายของน้ำตาล RFOs จากกิจกรรมของเอนไซม์กลุ่ม α-galactosidase ในเมล็ดพืชอีกด้วย [15,17] อีกหนึ่งปัจจัยที่น่าจะส่งผลต่อปริมาณน้ำตาล RFOs ที่สะสมในเมล็ดถั่วเขียวคือพันธุกรรม อายุการเก็บเกี่ยว และสภาวะแวดล้อมในการเก็บรักษา [36] อย่างไรก็ตาม จะเห็นได้ว่าถั่วเขียวสายพันธุ์จากประเทศไทยนั้น มีปริมาณน้ำตาลสตาชิโอส ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับถั่วเขียวสายพันธุ์จากต่างประเทศ

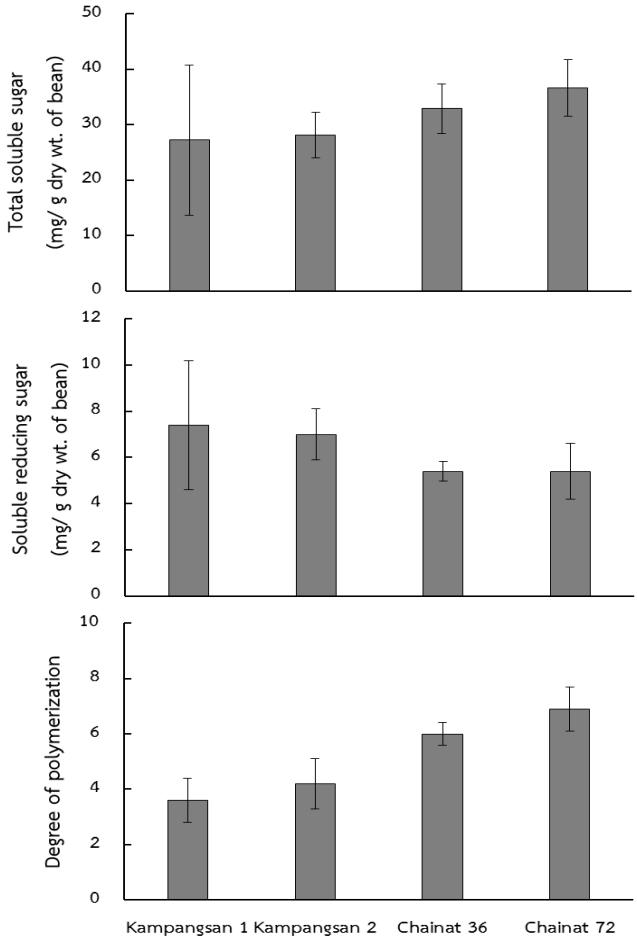


**Figure 1** Total sugar, reducing sugar and degree of polymerization (DP) of ethanolic sugar extracts obtained from 4 cultivars of mung bean

* Corresponding author e-mail: pairotewong@gmail.com
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo university, T. Nongharn, A. Sansai, Chiang mai 50290

**Table 1** The amount of raffinose family oligosaccharides (RFOs) and some other small extractable sugars obtained from 4 cultivars of mung bean

| Cultivars | Concentration (mg/ g dry wt. of bean) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | glucose | sucrose | raffinose | stachyose | verbascose |
| Kampangsan 1 | ND | 10.94±1.04 | 6.02±0.35 | ND | ND |
| Kampangsan 2 | ND | 3.60±0.79 | 2.29±1.44 | 34.82±8.86 | 20.31±6.40 |
| Chainat 36 | ND | 4.55±0.53 | 2.18±0.11 | 46.09±4.86 | 17.56±1.67 |
| Chainat 72 | 0.21±0.29 | 3.47±0.29 | 1.76±0.13 | 33.95±3.10 | 13.59±1.29 |

Note: ND is “not detected”.

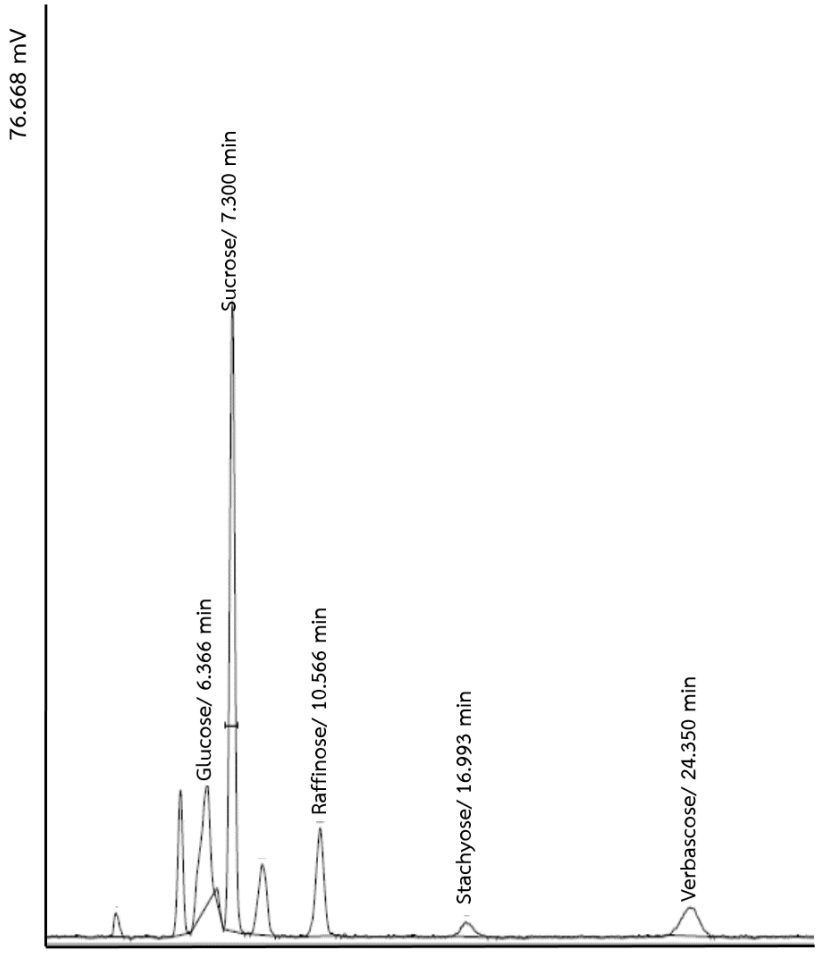


**Figure 2** The chromatogram profile and retention times of standard sugars analyzed by high-performance liquid chromatography

* Corresponding author e-mail: pairotewong@gmail.com
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo university, T. Nongharn, A. Sansai, Chiang mai 50290

**Table 2** Raffinose family oligosaccharides contents in various varieties of mung bean

| Cultivars | Content | | | Unit | References |
|---|---|---|---|---|---|
| | raffinose | stachyose | verbascose | | |
| *V. radiata* L. | 16.5 | 27.5 | not reported | mg/g dry wt. | [29] |
| *V. radiata* L. | | | | | [30] |
| cultivar ALM-1 | 6.5 | 22.5 | not reported | mg/g dry wt. | |
| cultivar ALM-2 | 9.7 | 27.5 | not reported | mg/g dry wt. | |
| cultivar GMBLN-2 | 8.1 | 22.1 | not reported | mg/g dry wt. | |
| *Phaseolus aureus* Roxb. | 3 | 15 | 27 | mg/g seed | [31] |
| *P. aureus* cv. Berken | 26.6 | 16.7 | 3.9 | mg/g defatted meal | [32] |
| *P. aureus* variety V.C.2010 | 4.31 | 14.86 | not reported | mg/g flour | [33] |
| *P. aureus* variety Giza-1 (V.C.2010) | 4.1 | 14.9 | not reported | mg/g dry wt. | [34] |

Note: *Phaseolus aureus* was the synonym of *Vigna radiata*.

**2. คุณสมบัติกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียจากทางเดินอาหาร**

น้ำตาลสกัดจากเมล็ดถั่วเขียวทั้ง 4 สายพันธุ์ซึ่งมีน้ำตาล RFOs เป็นองค์ประกอบในปริมาณสูงนี้พบว่าสามารถกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่นำมาทดสอบครั้งนี้ได้ (Figure 3) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *L. lactis* TISTR 1464 ที่เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างชัดเจนภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่ในทางตรงกันข้าม แทบไม่พบการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli* และ *S.* Typhimurium TISTR 292 ซึ่งเป็นแบคทีเรียเจ้าบ้าน (normal flora) และแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารคนและสัตว์ ยกเว้นน้ำตาลสกัดจากสายพันธุ์ชัยนาท 36 ที่สามารถกระตุ้นการเจริญของ *E. coli* และสายพันธุ์ชัยนาท 72 ที่กระตุ้นการเจริญของ *S.* Typhimurium TISTR292 ได้ แต่เป็นการเจริญเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำตาลสกัดจากเมล็ดถั่วเขียวทั้ง 4 สายพันธุ์นี้สามารถกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกได้ดีกว่าน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนอย่างมาก น้ำตาลสกัดจากถั่วเขียวทุกสายพันธุ์กระตุ้นการเจริญของ *L. acidophilus* TISTR 1338 และ *L. plantarum* TISTR 541 ได้ในระดับที่ใกล้เคียงกัน แต่กรณีของ *L. lactis* TISTR 1464 นั้น พบว่าน้ำตาลสกัดจากสายพันธุ์ชัยนาท 72 สามารถกระตุ้นการเจริญได้สูงที่สุดอย่างชัดเจน คุณสมบัติการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกแต่ไม่กระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียก่อโรคนี้ นับเป็นคุณสมบัติเบื้องต้นที่สำคัญอย่างมากของสารพรีไบโอติก

* Corresponding author e-mail: pairotewong@gmail.com
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo university, T. Nongharn, A. Sansai, Chiang mai 50290

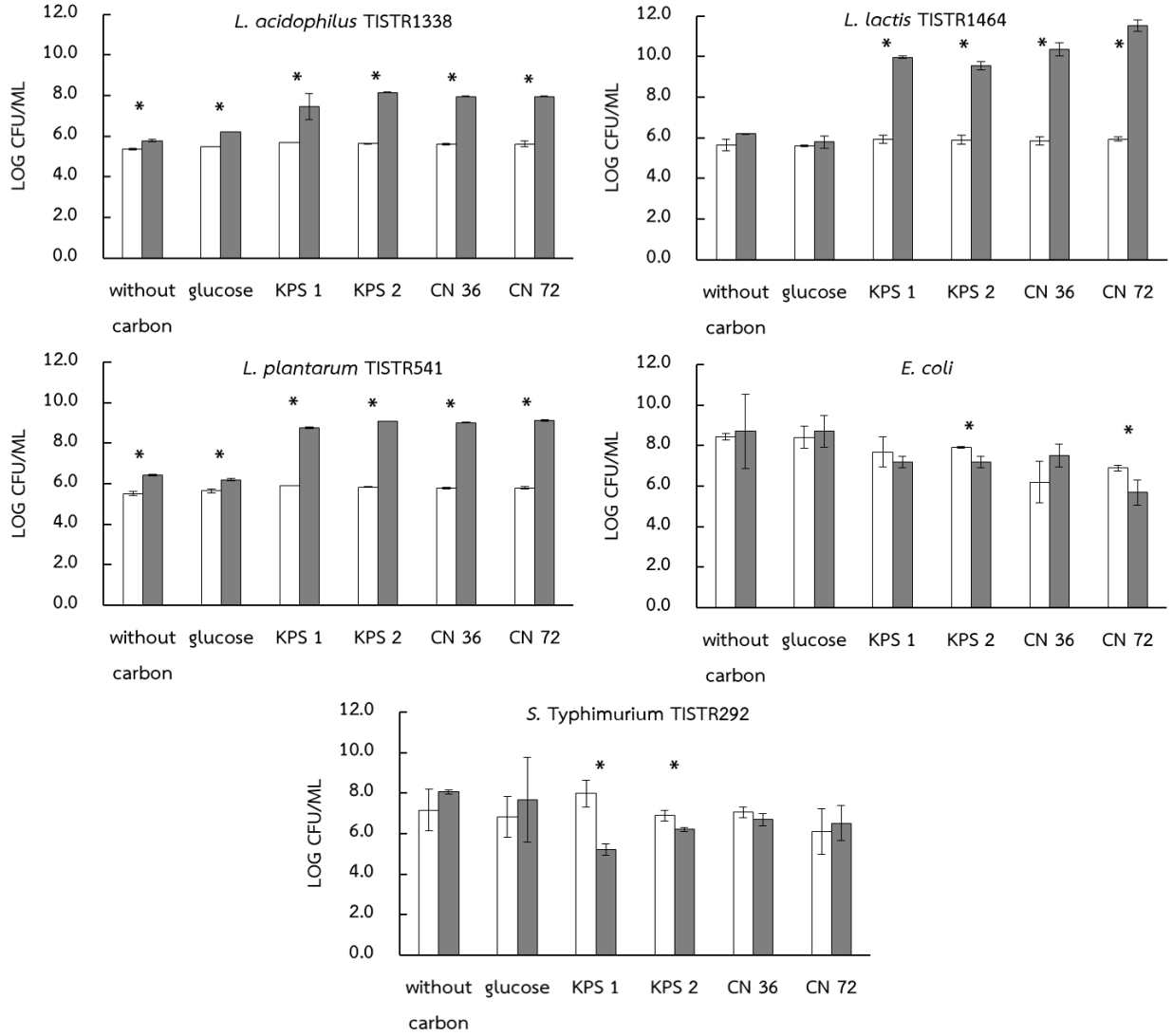


**Figure 3** Growth of single tested strains in the basal medium supplemented with different carbon source when cultivating for 0 h (□) and 24 h (■). The (*) indicates significant difference between 0 h and 24 h at $p < 0.05$.

**Note:** KPS1, KPS2, CN36 and CN72 represent Kampangsan1, Kampangsan2, Chainat36 and Chainat72, respectively.

ต่อมาภายหลังได้ทำการทดสอบเพาะเลี้ยงเชื้อแบบผสมระหว่างโพรไบโอติกทั้งสาม 3 สายพันธุ์ *E. coli* และ *S.* Typhimurium TISTR292 เมื่อมีน้ำตาลสกัดจากเมล็ดถั่วเขียวเป็นแหล่งคาร์บอน ผลการทดลองแสดงดัง Figure 4 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้น้ำตาลสกัดจากเมล็ดถั่วเขียวและน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแล้ว ล้วนสามารถกระตุ้นให้ประชากรโดยรวมของโพรไบโอติกเพิ่มขึ้นได้ ในขณะที่แบคทีเรีย *E. coli* มีจำนวนเพิ่มขึ้นในชุดการทดลองที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ไม่พบการเพิ่มขึ้นในชุดการทดลองที่เติมแหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลสกัดจากเมล็ดถั่วเขียว และเช่นเดียวกับ *E. coli* จำนวนของเชื้อ *S.* Typhimurium TISTR292 ไม่มีการเพิ่มขึ้นในทุกชุดการทดลองที่ได้รับน้ำตาลสกัดจากเมล็ดถั่วเขียว โดยเฉพาะอย่างยิ่งชุดทดลองที่ใช้น้ำตาลสกัดจากสายพันธุ์ชัยนาท 36 และชัยนาท 72 เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีจำนวนลดลงอย่างชัดเจน ($p<0.05$) จากข้อมูลเหล่านี้ แสดงให้เห็นว่ามีการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกโดย

* Corresponding author e-mail: pairotewong@gmail.com
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo university, T. Nongharn, A. Sansai, Chiang mai 50290

น้ำตาลสกัดจากเมล็ดถั่วเขียวทั้ง 4 สายพันธุ์ และคาดว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกเหล่านี้มีการผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค ยกตัวอย่างเช่น กรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid, SCFAs) เช่น กรดอะซิติก (acetic acid) กรดโพรพิโอนิก (propionic acid) และกรดบิวทิริก (butyric acid) และสารกลุ่มแบคทิริโอซิน (bacteriocins) เช่น lactacin B lactacin F acidocin CH5 nisin และ lactocin S [37] อย่างไรก็ตาม การเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกจากการทดลองนี้ อาจไม่ได้อันเนื่องมาจากน้ำตาล RFOs ในสารละลายน้ำตาลสกัดเท่านั้น แต่อาจเกิดได้จากน้ำตาลโมเลกุลเล็กชนิดอื่นๆ ที่ปนเปื้อนมาด้วย เช่น น้ำตาลกลูโคสและซูโครส ร่วมด้วย แต่เนื่องจากสารละลายน้ำตาลสกัดจากถั่วเขียวทุกสายพันธุ์ในครั้งนี้มีสัดส่วนของน้ำตาลโมเลกุลเล็กเหล่านี้น้อยมาก ดังนั้นมีความเป็นไปได้สูงที่ผลการกระตุ้นการเจริญของโพรไบโอติกที่เกิดขึ้นอย่างชัดเจนนี้น่าจะเกิดจากน้ำตาลกลุ่ม RFOs เสียส่วนใหญ่ เชื้อ *Lactobacillus* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์นี้สามารถใช้น้ำตาลกลุ่ม RFOs เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญได้ โดยผลิตเอนไซม์แอลฟา-กาแลคโตซิเดส (α-galactosidase) สำหรับย่อยน้ำตาลเหล่านี้ [38-41] แต่ในขณะที่ไม่พบรายงานการผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ใน *E. coli* และ *S.* Typhimurium อีกทั้งยังพบว่าแบคทีเรีย *E. coli* ไม่มีระบบการขนถ่ายน้ำตาลราฟฟิโนสเข้ามาภายในเซลล์ [42]

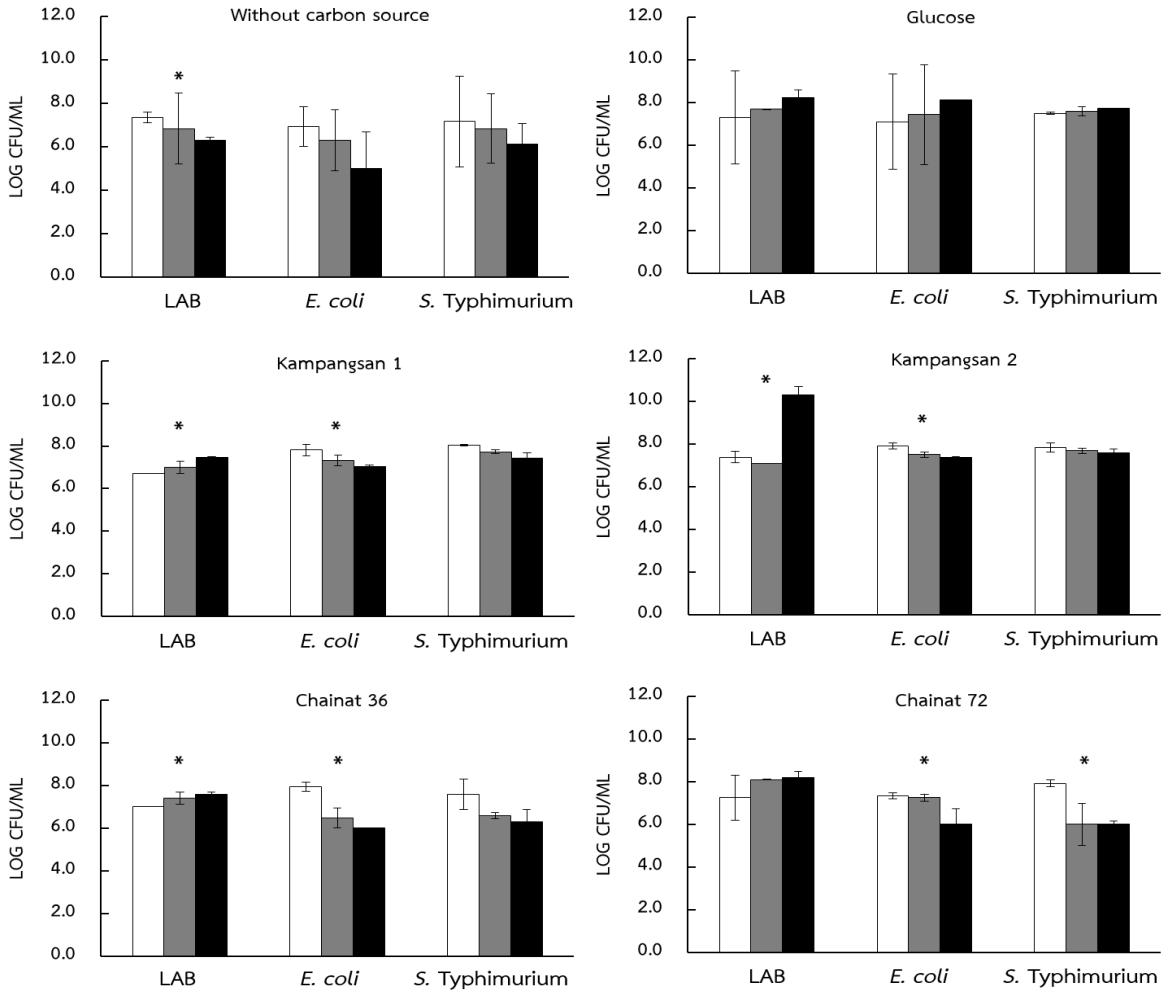


**Figure 4** Dynamic of the bacterial population in defined mixed culture supplemented with different carbon source after 0 h (□), 12 h (■) and 24 h (■) of cultivation. The (*) indicates significant difference between 0 h and 24 h at $p < 0.05$.

* Corresponding author e-mail: pairotewong@gmail.com
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo university, T. Nongharn, A. Sansai, Chiang mai 50290

**สรุปผล**

เมล็ดถั่วเขียวทั้ง 4 สายพันธุ์ มีน้ำตาลพรีไบโอติกชนิดโอลิโกแซคคาไรด์กลุ่มราฟฟิโนสเป็นองค์ประกอบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์กำแพงแสน 2 ชัยนาท 36 และชัยนาท 72 ที่พบน้ำตาลสตาชิโอสและเวอบาสโคสในปริมาณสูงมาก น้ำตาลจากเมล็ดถั่วเขียวที่สกัดด้วยเอทานอลในการศึกษาครั้งนี้ แสดงคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นสารพรีไบโอติกได้โดยสามารถกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกบางสายพันธุ์ในจีนัส *Lactobacillus* sp. และส่งผลให้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคที่นำมาศึกษาครั้งนี้ ดังนั้น การบริโภคถั่วเขียวอาจมีส่วนช่วยให้เกิดสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้และก่อให้เกิดสุขภาวะที่ดีแก่ผู้บริโภคได้ นับเป็นคุณประโยชน์อีกด้านของถั่วเขียวนอกเหนือจากการเป็นแหล่งอาหารโปรตีน

**กิตติกรรมประกาศ**

ผู้วิจัยขอขอบคุณการสนับสนุนงบประมาณวิจัยจากมหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

**เอกสารอ้างอิง**

[1] Eakpanyasakul, S. and Tantiwipavin, P. (2016). Development model of Thai health food industry towards SEAN economic community. Journal of Rangsit Graduate Studies in Business and Social Sciences. 1(2): 36-48.

[2] Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. The Journal of Nutrition. 125(6): 1401-1412.

[3] Gibson, G.R., Probert, H.M., Loo, J.V., Rastall, R.A. and Roberfroid, M.B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. Nutrition Research Reviews. 17(2): 259–275.

[4] Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. The Journal of Nutrition. 137: 830S – 837S.

[5] Wang, Y. (2009). Prebiotic: Present and future in food science and technology. Food Research International. 42(1): 8-12.

[6] Martínez-Villaluenga, C., Frías, J. and Vidal-Valvrde, C. (2005). Raffinose family oligosaccharides and sucrose contents in 13 Spanish lupin cultivars. Food Chemistry. 91(4): 645-649.

[7] Renuka, B., Kulkarni, S.G, Vijayanand, P. and Prapulla, S.G. (2009). Fructooligosaccharide fortification of selected fruit juice beverages: Effect on the quality characteristics. LWT - Food Science and Technology. 42(5):1031–1033.

[8] Konar, N., Toker, O.S., Oba, S. and Sagdic, O. (2016). Improving functionality of chocolate: A review on probiotic, prebiotic, and/or synbiotic characteristics. Trends in Food Science & Technology. 49: 35-44.

[9] Valencia, M.S., Salgado, S.M., Andrade, S.A.C., Padilha, V.M., Livera, A.V.S. and Stamford, T.L.M. (2016). Development of creamy milk chocolate dessert added with fructooligosaccharide and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LBC 81. LWT-Food Science and Technology. 69: 104-109.

[10] Morris, C. and Morris, G.A. (2012). The effect of inulin and fructooligosaccharide supplementation on the textural, rheological and sensory properties of

* Corresponding author e-mail: pairotewong@gmail.com
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo university, T. Nongharn, A. Sansai, Chiang mai 50290

bread and their role in weight management: A review. Food Chemistry. 133(2): 237-248.

[11] Ishwarya, S.P. and Prabhasankar, P. (2013). Fructooligosaccharide – retention during baking and its influence on biscuit quality. Food Bioscience. 4: 68-80.

[12] Caceres, E., Garcia, M.L., Toro, J. and Selgas, M.D. (2004). The effect of fructooligosaccharides on the sensory characteristics of cooked sausages. Meat Science. 68: 87–96.

[13] Silva, H.C., Braga, G.L., Bianchi, M.L.P. and Rossi, E.A. (1990). Effect of germination on oligosaccharide and reducing sugar contents of Brazilian soybean cultivars. Alimentos e Nutrição. 2: 13-19.

[14] Muzquiz, M., Burbano, C., Pedrosa, M.M., Folkman, W. and Gulewicz, K. (1999). Lupins as a potential source of raffinose family oligosaccharides preparative method for their isolation and purification. Industrial Crops and Products. 19: 183-188.

[15] Kadlec, P. (2001). Carbohydrates in grain legume seeds: Improving nutritional quality and agronomic characteristics. Biddles Ltd., UK.

[16] Giannoccaro, E., Wang, Y. and Chen, P. (2006). Effects of solvent, temperature, time, solvent-to-sample ratio, sample size and defatting on the extraction of soluble sugars in soybean. Journal of Food Science. 71(1): c59-c64.

[17] Xiaoli, X., Liyi, Y., Shuang, H., Wei, Li., Yi, S., Hao, M., Jusong, Z. and Xiaoxiong, Z. (2008). Determination of oligosaccharide contents in 19 cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) seeds by high performance liquid chromatography. Food Chemistry. 111(1): 215-219.

[18] Kumar, V.L. and Singhal, A. (2009). Germinating seeds of the mung bean, *Vigna radiata* (Fabaceae), as a model for the preliminary evaluation of cytotoxic effects of drugs. Biocell. 33(1): 19-24.

[19] Wongputtisin, P., Ramaraj, R., Unpaprom, Y., Kawaree, R. and Pongtrakul, N. (2015). Raffinose family oligosaccharides in seed of *Glycine max* cv. Chiang Mai60 and potential source of prebiotic substances. International Journal of Food Science and Technology. 50(8): 1750-1756.

[20] Hayakawa, K., Mizutani, J., Wada, K., Masai, T., Yoshihara, I. and Mitsuoka, T. (1990). Effects of soybean oligosaccharides on human faecal flora. Microbial Ecology in Health and Disease. 3: 293-303.

[21] Crittenden, R.G. and Playne, M.J. (1996). Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. Trends in Food Science & Technology. 7(11): 353-361.

[22] Mussatto, S.I. and Mancilha, I.M. (2007). Non-digestible oligosaccharides: a review. Carbohydrate Polymers. 68(3): 587-597.

[23] Hernandez-Hernandez, O., Côte, G.L., Kolida, S., Rastall, R.A. and Sanz, M.L. (2011). *In vitro* fermentation of alternansucrase raffinose-derived oligo-saccharides by human gut bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 59(20): 10901-10906.

* Corresponding author e-mail: pairotewong@gmail.com
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo university, T. Nongharn, A. Sansai, Chiang mai 50290

[24] DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry. 28(3): 350-356.

[25] Miller, G.L. (1972) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31(3): 426-428.

[26] Wongputtisin, P. and Khanongnuch, C. (2015). Prebiotic properties of crude oligosaccharide prepared from enzymatic hydrolysis of basil seed gum. Food Science and Biotechnology. 24(5): 1767-1773.

[27] Gibson, G.R. and Wang, X. (1994). Bifidogenic properties of different types of fructo-oligosaccharides. Food Microbiology. 11(6): 491-498.

[28] Biedrzycka, E. and Bielecka, M. (2004). Prebiotic effectiveness of fructans of different degree of polymerization. Trends in Food Science and Technology. 15(3): 170-175.

[29] Anisha, G.S. and Prema, P. (2008). Reduction of non-digestible oligosaccharides in horse gram and green gram flours using crude α-galactosidase from *Streptomyces griseoloalbus*. Food Chemistry. 106(3): 1175-1179.

[30] Tajoddin, M., Shinde, M. and Junna, L. (2010). Raffinose, stachyose and sucrose contents of mung bean cultivars differing in seed coat color from Hyderabad-Karnataka region of India: effect of soaking and germination. The Bioscan. 5(3): 343-346.

[31] Åman, P. (1979). Carbohydrates in raw and germinated seeds from mung bean and chick pea. Journal of the Science of Food and Agriculture. 30(9): 869-875.

[32] Kuo, T.M., VanMiddlesworth, J.F. and Wolf, W.J. (1988). Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 36(1): 32-36.

[33] El-Adawy, T.A., Rahma, E.H., El-Bedawey, A.A. and El-Beltagy, A.E. (2003). Nutritional potential and functional properties of germinated mung bean, pea and lentil seeds. Plant Foods for Human Nutrition. 58(3): 1-13.

[34] Mubarak, A.E. (2005). Nutritional composition and antinutritional factors of mung bean seeds (*Phaseolus aureus*) as affected by some home traditional processes. Food Chemistry. 89(4): 489-495.

[35] Ekvall, J., Stegmark, R. and Nyman, M. (2007). Optimization of extraction methods for determination of the raffinose family oligosaccharides in leguminous vine peas (*Pisum sativum* L.) and effects of blanching. Journal of Food Composition and Analysis. 20(1): 13-18.

[36] Trugo, L.C., Almeida, D.C.F. and Gross, R. (1988). Oligosaccharide contents in the seeds of cultivated lupins. Journal of the Science of Food and Agriculture. 45(1): 21-24.

[37] Nanti, S., Wongputtisin, P., Chomsri, N., Deejing, S. and Niamsup, P. (2017). Primary prebiotic properties of Thai

* Corresponding author e-mail: pairotewong@gmail.com
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo university, T. Nongharn, A. Sansai, Chiang mai 50290

white pork sausage (Moo- yor) supplemented with fructooligosaccharide extracted from onion (*Allium cepa*) and chicory root. Journal of Agriculture. 33(2): 277-290.

[38] LeBlanc, L.G., Piard, J., Sesma, F. and Giori, G.S.D. (2005). *Lactobacillus fermentum* CRL 722 is able to deliver active α-galactosidase activity in the small intestine of rats. FEMS Microbiology Letters. 248: 177-182.

[39] Donkor, O.N., Henrikson, A., Vasiljevic, T. and Shah, N.P. (2007). α-galactosidase and proteolytic activities of selected probiotic and dairy cultures in fermented soymilk. Food Chemistry. 104(1): 10-20.

[40] Sumarna. (2008). Change of raffinose and stachyose in soy milk fermentation by lactic acid bacteria from local fermented foods of Indonesian. Malaysian Journal of Microbiology. 4(2): 26-34.

[41] Fredslund, F., Hachem, A., Larsen, R.J., Sorensen, P.G., Coutinho, P.M., Leggio, L.L and Svensson, B. (2011). Crystal structure of α-galactosidase from *Lactobacillus acidophilus* NCFM: insight into tetramer formation and substrate binding. Journal of Molecular Biology. 412(3): 466-480.

[42] Schmid, K., Schupfner, M. and Schmitt, R. (1982). Plasmid-mediated uptake and metabolism of sucrose by *Escherichia coli* K-12. Journal of Bacteriology. 151(1): 68-76.

* Corresponding author e-mail: pairotewong@gmail.com
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ต.หนองหาร อ.สันทราย จ.เชียงใหม่ 50290
Program in Biotechnology, Faculty of Science, Maejo university, T. Nongharn, A. Sansai, Chiang mai 50290