บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันมีความต้องการบริโภคสารให้ความหวานพลังงานต่ำที่สามารถทดแทนน้ำตาลซูโครสซึ่งให้พลังงานสูง เพราะผู้บริโภคประสบปัญหาจากการได้รับพลังงานมากเกินไปเนื่องจากมนุษย์ใช้พลังงานน้อยลงเพราะมีเครื่องทุ่นแรง ก่อให้เกิดปัญหาด้านสุขภาพ เช่นโรคอ้วน โรคเบาหวาน โรคหัวใจ เป็นต้น ซึ่งฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นสารให้ความหวานพลังงานต่ำชนิดใหม่ที่น่าสนใจเนื่องจากให้รสชาติใกล้เคียงกับน้ำตาลซูโครสและมีโครงสร้างไม่ซับซ้อน โดยมีการเปิดเผยให้เป็นที่รู้จักในด้านการเป็นอาหารควบคุมระดับแคลอรี่ตั้งแต่ปี 1980 (อ้างถึงใน Yun,1996) นอกจากสมบัติที่ให้ความหวานเหมือนน้ำตาลซูโครสแล้ว ยังมีสมบัติเป็นสารพรีไบโอติก (prebiotic) อีกด้วย ทำให้ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์มีความน่าสนใจกว่าสารให้ความหวานพลังงานต่ำชนิดอื่น

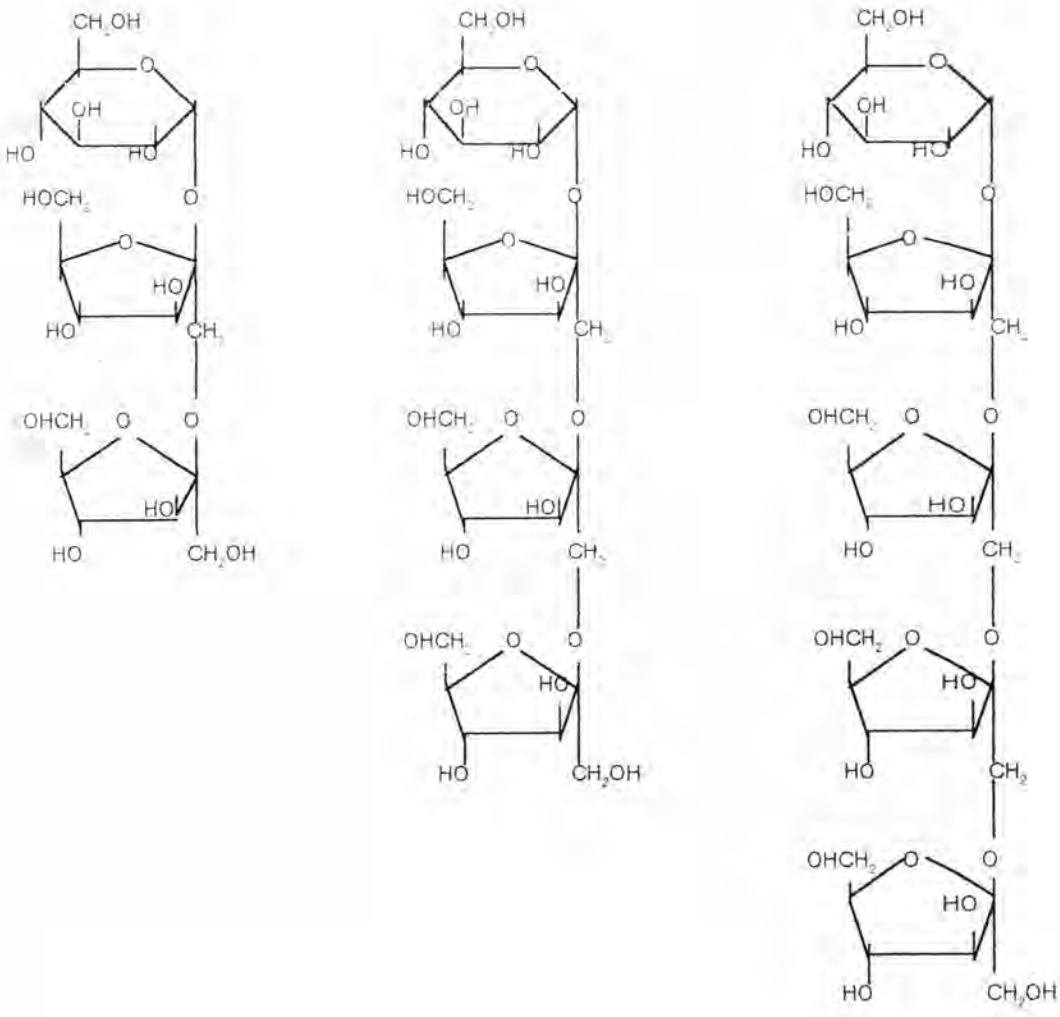
ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (FOS) เป็นโอลิโกเมอร์ของน้ำตาลฟรักโตส ที่ไม่ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น แต่ถูกย่อยได้โดยจุลินทรีย์บางชนิดในลำไส้ใหญ่ FOS มีหลายชนิดเช่นเคสโตส นีสโตส และฟรักโตฟิวแรนโนซิล-นีสโตส(FFN) โดยในโมเลกุลของ FOS ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสเชื่อมต่อกับน้ำตาลฟรักโตส 1-3 โมเลกุล ด้วยพันธะบีตา (2→1) [1^{F}-(1-β-fructofuranosyl)$_{n-1}$ sucrose] ; GFn เมื่อ n เท่ากับ 2-4

โดยเมื่อ n เท่ากับ 2 จะได้ FOS ชนิดเคสโตส (GF2)

n เท่ากับ 3 จะได้ FOS ชนิดนีสโตส (GF3)

n เท่ากับ 4 จะได้ FOS ชนิดฟรักโตฟิวแรนโนซิลนีสโตส (GF4)

โดยให้ G หมายถึงน้ำตาลกลูโคส F หมายถึงน้ำตาลฟรักโตส (อ้างถึงใน Jungและคณะ ,1989; อ้างถึงใน Hidaka และคณะ,1991; อ้างถึงใน Duan และคณะ,1994; อ้างถึงใน Takeda และคณะ,1994) ดังแสดงโครงสร้างทางเคมีของ FOS ไว้ในรูปที่ 1



n = 2

1-Kestose(GF_2)

n = 3

Nystose(GF_3)

n = 4

1^F-Fructofuranosylnystose(GF_4)

รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Oku และคณะ ,1984)
โดยให้ G หมายถึงน้ำตาลกลูโคส F หมายถึง น้ำตาลฟรักโตส

การค้นพบ FOS เกิดขึ้นโดยบังเอิญในปี 1950 โดย Baconและคณะ (1950) โดยสังเกตพบว่าในปฏิกริยาการย่อยน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูงด้วยเอนไซม์อินเวอเทสจากยีสต์ มีผลิตภัณฑ์อื่นเกิดขึ้นนอกจากน้ำตาลกลูโคสและฟรักโตส ต่อมาเมื่อทำการวิเคราะห์จึงพบว่าสารนี้คือ 1-เคสโตส (Grossและคณะ ,1954)

พบ FOS ได้ตามธรรมชาติในพืชหลายชนิด เช่น หัวหอม กระเทียม หน่อไม้ฝรั่ง Jerusalem artichoke เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์ผลิต FOS ได้ เช่น *Scopulariopsis brevicaulis* , *Aspergillus sydowi* และ *Fusarium oxysporum* เป็นต้น การผลิต FOS โดยจุลินทรีย์ผลิตได้จากกิจกรรมการเคลื่อนย้ายน้ำตาลฟรักโตส (transfructosylation activity) โดยการทำงานของเอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรส (FT) ที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้น (อ้างถึงใน Yun, 1996)

ประวัติการค้นคว้าเกี่ยวกับฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

ในปี ค.ศ. 1950 Bacon และคณะ ได้ทดลองย่อยน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 45.5 เปอร์เซ็นต์ด้วยเอนไซม์อินเวอเทสจากยีสต์ในหลอดทดลอง แล้วทำโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ พบว่าในช่วงแรกของการย่อยจะมีการย่อยน้ำตาลซูโครสไม่สมบูรณ์ คือ นอกจากได้น้ำตาลกลูโคสและฟรักโตสแล้วยังมีผลผลิตอื่นอีก 3 ชนิด ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าน้ำตาลซูโครส แต่ถ้าย่อยเป็นเวลานานจะได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรักโตสเท่านั้น จากผลการทดลองนี้แสดงว่าเอนไซม์อินเวอเทสน่าจะมีการทำงานที่เกี่ยวกับน้ำตาลซูโครสซึ่งซับซ้อนอีกมากกว่าที่รู้จักในปัจจุบัน และยังพบปรากฏการณ์แบบนี้ในการศึกษาเอนไซม์อินเวอเทสในยีสต์โดย Blanchard และ Albon ในปีเดียวกัน (อ้างถึงใน Pazur, 1952)

ในปี ค.ศ.1951 Bacon และคณะ ศึกษาคาร์โบไฮเดรตจากของพืช Jerusalem artichoke พบว่ามีสารที่ในโมเลกุลประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและฟรักโตสเป็นองค์ประกอบหลัก โดยมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าน้ำตาลซูโครส ซึ่งคาดว่าเป็นอินนูลินและฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยพบทั้งในส่วนลำต้น ราก และหัว

ในปี 1951 Edelman และคณะ พบว่าเอนไซม์จากพืช Jerusalem artichoke สามารถผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากน้ำตาลซูโครสและอินนูลิน โดยกิจกรรมของเอนไซม์มี 2 ส่วน คือ เอนไซม์ที่ทำหน้าที่เคลื่อนย้ายน้ำตาลฟรักโตสเหมือนเอนไซม์ทรานฟรักโตซิเดส อีกส่วนคือ เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายน้ำตาลฟรักโตสซึ่งอาจเป็นเอนไซม์อินเวอเทส (อ้างถึงใน Pazur, 1952)

ในปี ค.ศ. 1952 Pazur ค้นพบเอนไซม์ทรานฟรักโตซิเดสจากรา *A. oryzae* ที่สามารถเคลื่อนย้ายน้ำตาลฟรักโตสได้ โดยเคลื่อนย้ายน้ำตาลฟรักโตสของน้ำตาลซูโครสหรือน้ำตาล

ราฟฟิโนสไปรวมกับสารตั้งต้นร่วมที่มีน้ำตาลฟรักโตสอยู่ ทำให้ได้โอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดใหม่ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ฟรักโตสหรือกาแล็กโตส โดยขึ้นกับธรรมชาติทางเคมีของสารตั้งต้นร่วม แล้วทำการศึกษาถึงกลไกการทำงานของเอนไซม์ ความจำเพาะต่อสารตั้งต้น พบว่าการเคลื่อนย้ายน้ำตาลฟรักโตสจากน้ำตาลซูโครสไปยังสารตั้งต้นร่วม(น้ำตาลราฟฟิโนส) กลายเป็นฟรักโตซิลราฟฟิโนส ส่วนการเคลื่อนย้ายน้ำตาลฟรักโตสจากน้ำตาลซูโครสไปยังน้ำตาลซูโครสอีกตัวหนึ่ง ได้ผลผลิตเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดใหม่ 2 ตัว คือไตรแซ็กคาไรด์ชื่อ 1-อินนูโลไบโอซิล-กลูโคส (GF2) และเตตระแซ็กคาไรด์ชื่อ อินนูโลไตรโอซิล-กลูโคส(GF3) โดยไตรแซ็กคาไรด์ถูกสร้างเป็นตัวแรก เตตระแซ็กคาไรด์จะถูกสร้างภายหลังเมื่อมีความเข้มข้นของไตรแซ็กคาไรด์สูงพอที่จะเป็นสารตั้งต้นร่วมกับน้ำตาลซูโครสได้ และการเคลื่อนย้ายน้ำตาลฟรักโตสจากน้ำตาลราฟฟิโนสไปยังน้ำตาลราฟฟิโนสอีกตัวหนึ่งจะได้น้ำตาลเตตระแซ็กคาไรด์ชื่อ ฟรักโตซิลราฟฟิโนส และเพนตะแซ็กคาไรด์ที่ไม่รู้องค์ประกอบ เมื่อใช้อินนูลินเป็นสารตั้งต้นจะไม่มีการทำงานของเอนไซม์ แสดงว่าเอนไซม์จะเคลื่อนย้ายน้ำตาลฟรักโตสเฉพาะตัวที่อยู่ริมสุดของสารประกอบที่โมเลกุลของน้ำตาลซูโครส ซึ่งต่างกับเอนไซม์ในพืช

ในปี ค.ศ.1953 Albonและคณะ ก็ได้ทำการทดลองย่อยน้ำตาลซูโครส 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเอนไซม์อินเวอเทสและพบโอลิโกแซ็กคาไรด์ 3 ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่าน้ำตาลซูโครส และเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีเมทิลเลชั่นและพิสูจน์ยืนยันได้ว่าโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดที่ 3 คือ 6-เคสโตส ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสต่อกับน้ำตาลฟรักโตสด้วยพันธะบีตา(2→6) (G1- 2F6 ← 2F)

ในปี ค.ศ.1954 Gross และคณะ ได้วิเคราะห์โอลิโกแซ็กคาไรด์อีกสองชนิดที่เหลือจากการทดลองของ Albon และคณะ(1953) พบว่า โอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดที่ 2 คือ นีโอเคสโตส ซึ่งมีน้ำตาลฟรักโตสต่อกับน้ำตาลซูโครสที่ตำแหน่งเกาะกับน้ำตาลกลูโคสด้วยพันธะบีตา(2→6) (F2→6G1- 2F) ส่วนโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดที่ 1 คือ 1-เคสโตส ซึ่งมีน้ำตาลซูโครสต่อกับน้ำตาลฟรักโตสด้วยพันธะบีตา(2→1) (G1- 2F1← 2F)

ในปี ค.ศ.1956 Allen และคณะ พบกิจกรรมการเคลื่อนย้ายน้ำตาลฟรักโตสจากเอนไซม์ที่ได้จากหัวบีทและนำมาสู่การสรุปว่าเมื่อมีน้ำตาลซูโครสผลผลิตหลังจากการเคลื่อนย้ายน้ำตาลฟรักโตส คือ1-เคสโตส และมีนีโอเคสโตสปริมาณเล็กน้อย (อ้างถึงใน Yun ,1996)

ในปี 1959 Bacon พบว่าการผลิตไตรแซ็กคาไรด์จากพืชใบเลี้ยงเดี่ยวบางชนิด ได้แก่ หัวหอมใหญ่ หัวหอมแดง ข้าวไรน์ ข้าวโอ๊ต โดยผลิตไตรแซ็กคาไรด์ 2 ชนิด คือ 1^F-β-fructosylsucrose (1-เคสโตส) และ 6^G-β-fructosylsucrose (นีโอเคสโตส)

ในปี 1968 Edelman และคณะ ศึกษากลไกเมตาโบลิซึมของFOSในพืช Jerusalem artichoke โดยพบว่าทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำรองไว้ โดยมี 1^F-ฟรักโตฟิวแรนโนซิลซูโครส(1-เคสโตส) เป็นสารมัธยันต์ที่สำคัญ และเอนไซม์ซึ่งเป็นตัวสร้างสารชนิดนี้จากน้ำตาล

ซูโครสเป็นปัจจัยควบคุมทางชีวเคมี โดยมีน้ำตาลซูโครสเป็นทั้งสารตั้งต้นและไปมีผลต่อเอนไซม์อื่น

ในปี ค.ศ. 1973 Kawai และคณะ ศึกษาลักษณะโพลิเมอร์ของน้ำตาลฟรักโตส ที่ต่อกันด้วยพันธะบีตา(2→1) จากน้ำตาลซูโครส ซึ่งผลิตได้จาก *A. sydowi* IAM2544 เนื่องจากพบว่ามีลักษณะไม่เหมือนกับที่เคยรู้จัก ซึ่งพบว่ามีลักษณะเฉพาะเป็นเอกลักษณ์ต่างจากที่พบมา คือมีโครงสร้างเหมือนอินนูลินที่พบในพืชทั่วไป แต่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า นอกจากนี้ยังได้ค้นพบว่าสายพันธุ์นี้ยังผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยซึ่งได้รับการพิสูจน์แล้วพบว่าเป็น 1-เคสโตส

ในปี ค.ศ. 1980 Gupta และคณะ ศึกษาการสร้าง FOS และเอนไซม์ FT ที่ใช้สร้าง FOS ใน *Fusarium oxysporum* พบว่าหลัง 6 วันของการเพาะเลี้ยงตรวจพบ FOS ในอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อวิเคราะห์แล้วพบว่าเป็นFOSชนิดเคสโตส นีสโตสและ ฟรักโตฟิวแรนโนซิลนีสโตส(FFN)

จากประวัติการค้นคว้าที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าการค้นคว้าในช่วงแรก(ปี ค.ศ. 1950-1959) มีการค้นพบเอนไซม์ทั้งในจุลินทรีย์และพืชที่มีกิจกรรมการเคลื่อนย้ายน้ำตาลฟรักโตส และพบ FOS ในพืช และได้มีการศึกษากลไกการสร้าง FOS ในพืชในปี 1968 (Edelmanและคณะ,1968) ต่อมา ค.ศ. 1973 จึงได้ค้นพบผลผลิต FOS ในจุลินทรีย์ ซึ่งพบว่าในจุลินทรีย์ก็สร้างเอนไซม์และผลผลิต FOS ได้เหมือนในพืช (Kawaiและคณะ,1973)

สมบัติของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Hidaka และคณะ,1991; Bomet ,1994; Gibson และคณะ , 1995; Yun, 1996)

1.เคสโตส มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{18}H_{32}O_{16}$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 504.44 นีสโตสมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{24}H_{42}O_{21}$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 666.58 และฟรักโตฟิวแรนโนซิลนีสโตส มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{30}H_{52}O_{26}$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 828.72

2.เป็นสารให้ความหวานที่มีรสชาติและความหนืดเหมือนน้ำตาลซูโครส

3.ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น

4.มีความหวานประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลซูโครส

5.สามารถเก็บรักษาน้ำได้สูงกว่าน้ำตาลซูโครส

6.เป็นน้ำตาลที่ไม่ถูกรีดิวซ์

7.เอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมไม่สามารถย่อยสลายFOSได้

8.ไม่เกิดปฏิกริยา maillard (คือ การเกิดสีน้ำตาลไหม้ เมื่อถูกความร้อนสูงๆ)ซึ่งเกิดจากหมู่คาร์บอนิลของน้ำตาลจับกับกรดอะมิโน ซึ่งหมู่คาร์บอนิลนี้จะมีอยู่ในน้ำตาลรีดิวซ์

9.เสถียรที่ความเป็นกรดด่างสูงกว่า 3 และ อุณหภูมิมากกว่า 140 องศาเซลเซียส ซึ่งเสถียรที่อุณหภูมิสูงกว่าน้ำตาลซูโครส (Bornet, 1994) ส่วน Hidaka และคณะ (1991) รายงานว่ามีความเสถียรสูงมากในช่วงความเป็นกรดด่างปกติของอาหาร (4.0-7.0) และที่อุณหภูมิตู้เย็นมากกว่า 1 ปี

10.มีความสามารถในการดูดความชื้นเล็กน้อย (Bornet, 1994) แต่ Yun (1996) รายงานว่ามีการดูดความชื้นสูง

11.ความหวานของ FOSชนิดเคสโตส นีสโตสและฟรักโตฟิวแรนโนซิลนีสโตส เมื่อเทียบกับสารละลายน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เท่ากับ 31 22 และ 16 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ(อ้างถึงใน Yun,1996)

12.ยากที่จะเก็บรักษาในสภาพแห้งแข็ง (lyophilize) ให้คงทนเป็นเวลานานภายใต้ความดันบรรยากาศ

13.มีความหนืดของสารละลายฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สูงกว่าสารละลายน้ำตาลซูโครสเมื่อมีความเข้มข้นเท่ากัน

14.ให้พลังงานแค่ประมาณครึ่งหนึ่งของพลังงานที่ได้จากน้ำตาลซูโครส คือ 2 กิโลแคลอรี่ต่อกรัม (Bornet,1994) แต่รายงานของ Gibson และคณะ(1995) รายงานว่าให้พลังงานแค่ 1-1.5 กิโลแคลอรี่ต่อกรัม ส่วน Hidaka และคณะ(1991) รายงานว่าให้พลังงาน 1.5-2.0 กิโลแคลอรี่ต่อกรัม

15. เป็นสารพรีไบโอติก

ตัวอย่างงานวิจัยที่เกี่ยวกับผลของ FOS ต่อภาวะโภชนาการและเชื้อจุลินทรีย์ในร่างกาย

Oku และคณะ (1984) ได้ศึกษาการย่อย FOS ในหลอดทดลองและในร่างกายของหนู โดยพบว่า FOS ไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ซูเครสและมอลเตสในหลอดทดลอง รวมทั้งเอนไซม์จากตับอ่อนและในลำไส้เล็กในร่างกายของหนู โดยถูกปล่อยออกพร้อมกับปัสสาวะโดยไม่มีการย่อยสลาย แสดงว่า FOS ย่อยสลายได้ยากโดยเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารและอวัยวะภายใน ทำให้ไม่ถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานในร่างกาย

Gibson และคณะ (1995) รายงานว่าเมื่อคนรับประทาน FOS จะส่งเสริมให้มีการเพิ่มจำนวนของ Bifidobacteria แต่ทำให้แบคทีเรียก่อโรคเช่น *E.coli* และ *Clostridium* sp. ลดจำนวนลง เนื่องจาก Bifidobacteria นี้มีเอนไซม์ในการย่อยFOS นำไปใช้ในการเติบโตได้ ซึ่ง Bifidobacteria เป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ ดังนั้นจึงเรียก FOS ว่าเป็นพรีไบโอติก นั่นคือ เป็นสารอาหารที่ไม่ถูกย่อยสลายในร่างกายคนหรือสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่มีประโยชน์ต่อคนคือไปกระตุ้น

การเจริญจำเพาะ และ/หรือ กระตุ้นกิจกรรมของแบคทีเรียน้อยชนิดที่เป็นประโยชน์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ ซึ่งได้แก่ Bifidobacteria

Bifidobacteria (Gibson และคณะ ,1995)

คือแบคทีเรียที่เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีประโยชน์ในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ จัดเป็นจุลินทรีย์สุขภาพ มีอยู่ประมาณร้อยละ 95 ในเด็กแรกเกิดและค่อยๆลดจำนวนลงในผู้ใหญ่ซึ่งมีอยู่ร้อยละ 25 โดยอาศัยอาหารโดยเฉพาะคาร์โบไฮเดรตที่เหลือจากการย่อยและดูดซึมของมนุษย์ รวมทั้ง FOS ซึ่งหลังจากย่อยอาหารเหล่านี้จะสร้างสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์มากมาย ได้แก่

1.ผลิตกรดไขมันสายสั้นๆ เช่น อะซิเตต แลคเตต ซึ่งทำให้ค่าพีเอชในลำไส้ใหญ่ต่ำลง ช่วยยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค

2.และไม่เพิ่มระดับแอมโมเนียในเลือดเนื่องจากแอมโมเนียมไอออนซึ่งละลายน้ำได้ยากกว่าจะถูกขับถ่ายออกมา

3.ผลิตวิตามินบีและเอนไซม์บางชนิดที่มีประโยชน์

4.องค์ประกอบของเซล Bifidobacteria ทำหน้าที่เป็น immunomodulator คือ ช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรคและเซลมะเร็ง

5.ช่วยปรับจำนวนจุลินทรีย์อื่นๆที่มีประโยชน์ในลำไส้ให้คงอยู่ได้หลังจากได้รับยาปฏิชีวนะ

นอกจากนั้นยังผลิตก๊าซต่างๆเช่น คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจน เป็นต้น

Briet และคณะ (1995) ศึกษาอาการที่เกิดขึ้นจากการรับประทาน FOS ในระดับต่างๆ ของอาสาสมัครจำนวน 14 คน โดยรับประทาน FOS ทุกวันและเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆ พบว่าถ้ารับประทานน้อยกว่า 30 กรัมต่อวัน ไม่พบความผิดปกติ แต่ถ้ารับประทานมากกว่า 30 กรัมต่อวัน ทำให้เกิดอาการท้องอืด รับประทานมากกว่า 40 กรัมต่อวันทำให้เกิดก๊าซในลำไส้และลำไส้บวมพอง ถ้ารับประทานถึง 50 กรัมต่อวันทำให้ท้องเป็นตะคริวและท้องร่วง

Ohta และคณะ (1998) เปรียบเทียบผลของ FOS แต่ละชนิด ซึ่งมีความยาวของโมเลกุลน้ำตาลต่างๆกันที่มีต่อภาวะโภชนาการของหนู โดยให้หนูกินอาหารที่ผสม FOSชนิดเคสโตส หรือ FOSชนิดนีสโตส ผลการทดลองพบว่า ไม่ว่าจะกิน FOSชนิดเคสโตส หรือ FOSชนิดนีสโตส ก็ไม่ได้ให้ผลทางโภชนาการแตกต่างกันเลย โดยทั้งสองชนิดช่วยเพิ่มการดูดซึมธาตุแคลเซี่ยมและแมกนีเซียม และเพิ่มการขับถ่ายธาตุไนโตรเจน

จากงานวิจัยเกี่ยวกับสมบัติของ FOS ที่มีต่อผู้ได้รับเหล่านี้ ทำให้มีการนำ FOS มาใช้ประโยชน์ในด้านการเป็นสารพรีไบโอติกอีกด้วย

ประโยชน์ของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

ส่วนใหญ่จะนำไปใช้ประโยชน์เกี่ยวกับด้านสุขภาพ

1.ใช้เป็นสารให้ความหวานพลังงานต่ำ จึงเหมาะกับผู้ป่วยโรคเบาหวาน โรคอ้วนและผู้ที่ต้องการลดน้ำหนัก เนื่องจากไม่ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารและไม่ถูกดูดซึม ดังนั้นจึงไม่ถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานในร่างกาย จึงไม่เพิ่มระดับน้ำตาลกลูโคสและฟรักโตสในเลือด (อ้างถึงใน Bornet,1994)

2.ไม่ทำให้เกิดฟันผุ เนื่องจากไม่ถูกย่อยสลายโดย *Streptococcus mutans* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในปากโดยจะสร้างกรดและบีตากลูแคนที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งเป็นตัวการให้เกิดฟันผุ (อ้างถึงใน Chang และคณะ,1994 ; อ้างถึงใน Yun,1996)

3.มีผลต่อเมตาโบลิซึมของคาร์โบไฮเดรตและไขมันเหมือนกับอาหารพวกไฟเบอร์อื่นๆ (อ้างถึงใน Chalsson และคณะ,1992) โดยช่วยลดระดับน้ำตาลกลูโคส โคเลสเตอรอลและไขมันในเลือด (Yamashita และคณะ,1984 ; อ้างถึงใน Chen และคณะ,1996)

4.บรรเทาอาการท้องผูก เนื่องจากกรดไขมันสายสั้นๆที่ผลิตได้โดยแบคทีเรียที่ย่อยฟรักโต-โอลิโกแซ็กคาไรด์ทำให้มีแรงดันออสโมติกมากขึ้น ลำไส้มีการเคลื่อนไหวดี (Hidaka และคณะ ,1991 ;อ้างถึงใน Bornet,1994; อ้างถึงใน Chen และคณะ, 1996)

5.กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย (อ้างถึงใน Barthomeuf และคณะ,1997)

6.ปรับปรุงการดูดซึมไอออนต่างๆ เช่น แคลเซี่ยม แมกนีเซียม และเหล็ก (อ้างถึงใน Barthomeuf และคณะ,1997)

7.เนื่องจากไม่ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ในทางเดินอาหาร คือ จะผ่านเข้าสู่ลำไส้เล็กโดยไม่ย่อยและดูดซึมเลย จนมาถึงลำไส้ใหญ่ซึ่งจะถูกใช้เป็นสารพรีไบโอติก นั่นคือ เป็นอาหารที่ไปกระตุ้นการเติบโตของ Bifidobacteria ทำให้ร่างกายได้รับประโยชน์จากผลิตภัณฑ์ที่ Bifidobacteria ผลิตได้ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น (Hidaka และคณะ, 1991; Bornet, 1994; Gibson และคณะ,1995)

8.ใช้ผสมในอาหารสัตว์ทำให้สัตว์มีสุขภาพแข็งแรง เนื่องจากช่วยเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้ ช่วยเพิ่มน้ำหนักตัว เพิ่มการรับประทานอาหาร (Hidaka และคณะ,1991)

9.ช่วยลดกิจกรรมของเอนไซม์บางชนิด เช่น บีตา-กลูเคอโรนิเดส ไกลโคฮอลิกแอซิด ไฮดรอกซิลเลส ไนโตรรีดักเตส ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดโรคมะเร็ง (Buddington และคณะ ,1996)

จุลินทรีย์และพืชที่สามารถผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

จากที่กล่าวมาข้างต้นว่า FOS พบได้ในพืชและยังผลิตได้โดยจุลินทรีย์ ดังนั้นจะขอสรุปแยกประเภทของ FOS ที่ผลิตโดย จุลินทรีย์และที่พบในพืชไว้ดังตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

FOS ผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งรา แบคทีเรียและยีสต์ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ผลิตFOSและจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์สำหรับผลิต FOS

ชนิดจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
<u>จุลินทรีย์ที่ตรวจพบเอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรส</u>	
Fusarium oxysporum	Gupta และคณะ ,1980
Aspergillus niger	Hidaka และคณะ,1988
Aureobasidium pullulans	Jung และคณะ , 1989
Aureobasidium sp.	Hayashi และคณะ ,1990
Arthrobacter sp.	Fujita และคณะ ,1990
Aspergillus phoenicis	Balken และคณะ ,1991
Penicillium frequentan	Usami และคณะ ,1991
Aspergillus oryzae	Chang และคณะ,1994 ; Kurakakeและคณะ,1996
Penicillium rugulosum	Barthomeuf และคณะ ,1995
Aspergillus foetidus	Hang และคณะ ,1995
Aspergillus japonicus	Cheng และคณะ ,1996
Penicillium roquefortii	Jang และคณะ ,1996
Penicillium oxalicum	อ้างถึงใน Kurakakeและคณะ ,1996
Penicillium sp.K25	
Penicillium spinulosum	อ้างถึงใน Yun , 1996
Clavicep purpurea	อ้างถึงใน Yun ,1996
Saccharomyces cerevisiae	อ้างถึงใน Yun ,1996

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิดจุลินทรีย์	เอกสารอ้างอิง
<u>จุลินทรีย์ที่ผลิต FOS</u>	
Aspergillus sydowi	Kawai และคณะ , 1973
Phytophthora parasitica	Hankin และคณะ , 1977
Fusarium oxysporum	Gupta และคณะ , 1980
Aureobasidium pullulans	Yun และคณะ , 1990
Scopulariopsis brevicaulis	Takeda และคณะ , 1994
Aspergillus niger	Novakและคณะ, 1996

นอกจากจุลินทรีย์แล้ว FOS ยังสามารถผลิตได้โดยพืชหลายชนิด ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตัวอย่างพืชที่พบ FOS และเอนไซม์สำหรับผลิต FOS

ชนิดของพืช	เอกสารอ้างอิง
<u>พืชที่ตรวจพบเอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรส</u>	
Helianthus tuberosus (Jerusalem artichoke)	Edelman และคณะ , 1966
Asparagus officinatis (asparagus root)	Shiomi และคณะ , 1979
Allium cepa (onion bulb)	Shiomi และคณะ , 1985
Hordeum vulgare L. (barley leaves)	Simmen และคณะ , 1993
Cichorium intybus (chicory)	อ้างถึงใน Yun , 1996
Lactuca sativa L. (lettuce)	อ้างถึงใน Yun , 1996
<u>พืชที่ตรวจพบ FOS</u>	
Helianthus tuberosus (Jerusalem artichoke)	Bacon และคณะ , 1951
Arrhenatherum elatius (tall oat grass)	Bacon , 1959
Allium cepa (onion bulb)	

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชนิดของพืช	เอกสารอ้างอิง
Allium porrum (leek) *Lolium multiflorum* (italian rye grass)	Bacon , 1959
Triticum aestivum (wheat)	Prazik และคณะ ,1992
Hordeum vulgare L. (barley leaves)	Simmen และคณะ ,1993
Cichorium intybus (chicory)	Loo และคณะ ,1995
Allium sativum (garlic)	Loo และคณะ ,1995

แต่การผลิต FOS โดยใช้พืชหรือเอนไซม์จากพืชมีข้อเสีย คือ ผลิตได้ช้า ปริมาณผลผลิตไม่แน่นอน มีข้อจำกัดเนื่องจากฤดูกาล(อ้างถึงใน Yun,1996) แต่การผลิตโดยใช้จุลินทรีย์จะมีข้อดีกว่า คือ เพาะเลี้ยงง่าย ให้ผลผลิตเร็ว ดังนั้นจึงใช้ตัวจุลินทรีย์หรือเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในการผลิตในอุตสาหกรรม

เนื่องจาก FOS มีประโยชน์มากมายดังที่กล่าวมาแล้ว จึงได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับ FOS ทั้งในแง่กระบวนการผลิตและการใช้ประโยชน์แล้วได้จดสิทธิบัตรมากมาย ดังแสดงตัวอย่างในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตัวอย่างสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

ผู้จดสิทธิบัตร	หมายเลขสิทธิบัตร	สิทธิบัตรเรื่อง
<u>สิทธิบัตรเกี่ยวกับกระบวนการผลิต</u>		
Sayama และคณะ ,1984	Jpn. Pat. 59,227,269	Production of slightly carious sweetening agent from beet molasses
Nakamura และคณะ,1986	Jpn. Pat. 61,268,191	Production of sugar containing fructooligosacharise
Nakajima และคณะ, 1990	Jpn. Pat. 2,150,289	Production of high-purity fructooligosaccharide

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ผู้จดสิทธิบัตร	หมายเลขสิทธิบัตร	สิทธิบัตรเรื่อง
Kono และคณะ , 1994	U.S. Pat. 5,314,810	Fructose transferring enzyme absorbed on a granular carrier for production
Hidano และคณะ , 1995	U.S. Pat. 5,463,038	Method of producing kestose crystals
<u>สิทธิบัตรเกี่ยวกับประโยชน์</u>		
Adachi และคณะ, 1987	U.S. Pat. 4,681,771	Sweetener
Yamamura , 1988	Jpn. Pat. 63,063,366	Healthy food for promoting control of intestinal function
Yatka และคณะ , 1995	U.S. Pat. 5,425,961	Chewing gum products using fructooligosaccharides
Garleb และคณะ ,1997	U.S. Pat. 5,688,777	Inhibition of *C.difficile* infections by indigestible oligosaccharides
Dohnalek และคณะ ,1998	U.S. Pat. 5,827,526	Use of indigestible oligosaccharides to prevent gastrointestinal infections and reduce duration of diarrhea in humans
Ohta และคณะ , 2000	U.S. Pat. 6,087,345	Material inhibiting lipid peroxide increase

การผลิต FOS ในเชิงพาณิชย์

ในปัจจุบันผลิตโดยใช้จุลินทรีย์ มีน้ำตาลซูโครสเป็นวัตถุดิบ โดยใช้ทั้งเอนไซม์จากจุลินทรีย์หรือเซลจุลินทรีย์ ได้แก่

บริษัท Meiji Seika Co. ในประเทศญี่ปุ่น เป็นผู้ประสบความสำเร็จในการผลิต FOS เป็นการค้าครั้งแรก ในปี ค.ศ. 1984 ใช้เอนไซม์จาก *Aspergillus niger* (อ้างถึงใน Yun ,1996)

ต่อมาการผลิตได้ขยายตัวสู่ประเทศเกาหลี โดยบริษัท Cheilfood and Chemical Co. ผลิตโดยใช้จุลินทรีย์ *Aureobasidium pullulans* โดยการตรึงเซล (อ้างถึงใน Yun ,1996)

นอกจากนี้ยังผลิตโดยการตรึงเซลของ *Aspergillus niger* (อ้างถึงใน Takeda และคณะ ,1994) โดยการตรึงเอนไซม์ที่ได้จาก *Aspergillus niger* (อ้างถึงใน Hidaka และคณะ,1991)

ในการผลิตเป็นการค้าจะมีชื่อทางการค้าต่างๆกัน เช่น ใช้ชื่อว่า "Neosugar" โดยมีจำหน่าย 2 แบบให้เลือก ใช้ คือ Neosugar G และ Neosugar P โดยจะมีส่วนผสมของน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรักโตส น้ำตาลซูโครส และ FOS ในสัดส่วนที่แตกต่างกัน ขึ้นกับความต้องการของผู้บริโภคที่จะเลือกใช้ คือ Neosugar G ประกอบด้วย (ร้อยละ น้ำหนักต่อน้ำหนัก) น้ำตาลกลูโคสและฟรักโตสร้อยละ 35 น้ำตาลซูโครสร้อยละ 10 และ FOS ร้อยละ 55 (GF2 GF3 และ GF4 เท่ากับ 25 25 และ 5 ส่วน ตามลำดับ) ส่วน Neosugar P ประกอบด้วย FOS ร้อยละ 95 (GF2 GF3 และ GF4 เท่ากับ 40 45 และ 10 ส่วน ตามลำดับ) และน้ำตาลอื่นๆร้อยละ 5 (Hidaka และคณะ ,1991) จะเห็นได้ว่าผู้ที่ต้องการได้พลังงานน้อยเพื่อควบคุมน้ำหนักหรือผู้ป่วยโรคเบาหวานควรเลือกรับประทาน Neosugar P

นอกจากนี้ยังมีชื่อทางค้าว่า "NutraFlora" ที่ผลิตโดยบริษัท Golden Technologies Company ,Westminster,Co. (อ้างถึงใน Campbell และคณะ ,1997)

กระบวนการผลิต FOS

ผลิตได้โดย 2 วิธีการ ได้แก่

1.ใช้เอนไซม์เปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็น FOS

โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้น และอาศัยกิจกรรมการเคลื่อนย้ายน้ำตาลฟรักโตส (transfructosylation ; Ut) ของเอนไซม์ FT (หรือเรียกว่าเอนไซม์ FF) ได้ผลผลิตส่วนใหญ่เป็นเคสโตส นีสโตสและ ฟรักโตฟิวแรนโนซิลนีสโตส (อ้างถึงใน Jung และคณะ,1989; Hidaka และคณะ, 1991)

2.ใช้เอนไซม์เพื่อย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็น FOS

โดยใช้อินนูลินเป็นสารตั้งต้น(เป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลฟรักโตสที่ตรงปลายมีน้ำตาลซูโครสต่ออยู่ 1 โมเลกุล ต่อกันด้วยพันธะบีตา(2→1) และอาศัยการย่อยสลายอินนูลินด้วยเอนไซม์เอนโดอินนูลินเนส (EC 3.2.1.7 ; β-fructan-fructano hydrolase) ได้ผลผลิตเป็นโอลิโก-แซ็กคาไรด์หลายชนิด เช่น FOS (GF2 ,GF3 ,GF4) inulooligosaccharides เช่น inulobiose (F2) inulotriose (F3) รวมทั้ง Fn และ GFn อื่นๆ (เมื่อ n =2 - 20) (Roberfroid และคณะ , 1993 ; อ้างถึงใน Loo และคณะ,1995; Kim และคณะ ,1997)

แต่โดยส่วนใหญ่งานวิจัยจะเกี่ยวกับการผลิตจากน้ำตาลซูโครสโดยเอนไซม์ FT มากกว่า (อาจเนื่องจากการใช้เอนไซม์เอนโด-อินนูลินเนสนั้นเป็นการย่อยสลายแบบสุ่มทำให้ผลผลิตที่ได้อาจมีทั้งชนิดและปริมาณที่ไม่แน่นอนและได้ผลผลิตหลายชนิดจึงไม่ค่อยนิยมผลิต) และในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมก็เป็นการผลิตจากน้ำตาลซูโครสโดยการทำงานของเอนไซม์ FT จากจุลินทรีย์ ส่วนการใช้เอนไซม์อินนูลินเนสย่อยอินนูลินนั้น แหล่งของอินนูลินส่วนใหญ่พบในพืช (อ้างถึงใน Molisและคณะ,1996) ดังนั้นจะขอกล่าวถึงเฉพาะการผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์ FT ในงานวิจัยครั้งนี้

เอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรส

เนื่องจากเอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรส (FT) พบได้ทั้งในพืชและจุลินทรีย์ดังที่กล่าวมาแล้ว ดังนั้นจะขอกล่าวถึงหน้าที่ของเอนไซม์ FT ในพืชและจุลินทรีย์

เอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรสที่พบในพืช

จากการศึกษาการสร้างFOS ในพืช พบว่าเอนไซม์ FT ยังแบ่งได้เป็นเอนไซม์อีก 2 ชนิดที่เกี่ยวข้องร่วมกันในการผลิต FOS (Edelmanและคณะ ,1968 ; อ้างถึงใน Yun,1996)

1. 1-SST (Sucrose - Sucrose 1- FT) ทำหน้าที่ในการสร้างน้ำตาลไตรแซ็กคาไรด์จากน้ำตาลซูโครส โดยการเคลื่อนย้ายน้ำตาลฟรักโตสจากน้ำตาลซูโครสโมเลกุลหนึ่ง (เรียกว่าผู้ให้) ไปยังน้ำตาลซูโครสอีกโมเลกุลหนึ่ง (ผู้รับ) เกิดเป็น 1-เคสโตส และน้ำตาลกลูโคส โดยเอนไซม์นี้ไม่สามารถผลิต FOS ชนิดอื่นที่มีจำนวนโมเลกุลสูงกว่าไตรแซ็กคาไรด์ ดังสมการ

$$GF + GF \rightarrow GF\text{-}F + G$$

2. 1-FFT (fructan – fructan 1-FT) ทำหน้าที่ในการสร้าง FOS ที่มีสายยาวขึ้น โดยเคลื่อนย้ายน้ำตาลฟรักโตสตัวสุดท้ายของผู้ให้ (อาจเป็นน้ำตาลซูโครสหรือ FOS) ไปยังผู้รับ (อาจเป็น FOS อีกโมเลกุลหนึ่ง) ดังสมการ

$$GF\text{-}F_n + GF\text{-}F_m \rightarrow GF\text{-}F_{n-1} + GF\text{-}F_{m+1}$$

โดย GF หมายถึง น้ำตาลซูโครส F หมายถึง น้ำตาลฟรักโตส G หมายถึง น้ำตาลกลูโคส

n คือ จำนวนของน้ำตาลฟรักโตสที่มาต่อกับน้ำตาลซูโครสของโมเลกุลผู้ให้

m คือ จำนวนของน้ำตาลฟรักโตสที่มาต่อกับน้ำตาลซูโครสของโมเลกุลผู้รับ

โดยจะมีน้ำตาลชนิดใดทำหน้าที่เป็นผู้ให้หรือผู้รับหรือมีเอนไซม์ชนิดใดขึ้นกับแหล่งของเอนไซม์ เช่นในพืชส่วนใหญ่และจุลินทรีย์บางชนิดจะมีเอนไซม์ทั้งสองชนิด (อ้างถึงใน Yun, 1996)

เอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรสที่พบในจุลินทรีย์

เนื่องจากการผลิต FOS โดยจุลินทรีย์มีข้อดีกว่าการผลิตจากพืชดังที่กล่าวมาแล้วและในการผลิต FOS ในเชิงพาณิชย์ก็ผลิตได้จากจุลินทรีย์ ดังนั้นจะขอกล่าวถึงเอนไซม์ FT จากจุลินทรีย์ซึ่งเป็นตัวการหลักที่สำคัญในการสร้าง FOS ในด้านต่างๆ เท่าที่มีรายงานมา

หน้าที่การทำงานของเอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรส

เอนไซม์ FT ในจุลินทรีย์ (EC 2.4.1.9) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า เอนไซม์ฟรักโตฟิว-แรนโนซิเดส (FF ; EC 3.2.1.26) จะมีหน้าที่การทำงานแตกต่างจากเอนไซม์ FT ที่พบในพืช คือ มีเอนไซม์ในการผลิตเพียงชนิดเดียวแต่ทำหน้าที่ได้ 2 อย่าง (Hidaka และคณะ , 1988; Hidaka และคณะ, 1991) คือ

1.หน้าที่ในการสร้าง FOS เรียกว่า กิจกรรมทรานฟรักโตซิลเลชั่น (Ut)

2.หน้าที่ในการสลาย FOS เรียกว่า กิจกรรมไฮโดรไลซิส (Uh)

การสร้าง FOS ได้มากต้องมีอัตราส่วนระหว่าง Ut/Uh สูง คือ มีกิจกรรมการเคลื่อนย้ายน้ำตาลฟรักโตสสูง ถ้า Ut/Uh ต่ำจะมีแนวโน้มในการสร้าง FOS ได้น้อย ซึ่งการที่จะมีหน้าที่ไหนมากขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ค่าพีเอช และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นสารตั้งต้น ดังเช่นงานวิจัยของ Hidaka และคณะ (1988) ทำการทดลองกับจุลินทรีย์ 11 สายพันธุ์ พบว่าทุกสายพันธุ์จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์ FT ที่ทำหน้าที่ Ut และ Uh โดย *Aspergillus niger* ATCC 20611 ผลิตเอนไซม์ FT ที่ทำหน้าที่ Ut มากกว่า Uh และมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆอีก 10 สายพันธุ์ ส่วน *Aspergillus awamori* และ *S. cerevisiae* ผลิตเอนไซม์ FT ที่ทำหน้าที่ Uh มากกว่า Ut และในจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มีอัตราส่วนของ Ut/Uh สูงสุดในช่วงวันแรกของการเพาะเลี้ยง และลดลงในวันที่สาม ยกเว้น *Aspergillus niger* ATCC 20611 มีอัตราส่วนเท่ากันตลอดการเพาะเลี้ยง ส่วนการเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสจะช่วยเพิ่มอัตราส่วนของ Ut/Uh นั่นคือผลิต FOS ได้มากขึ้น นอกจากนี้ Kurakake และคณะ (1996) พบว่าค่าพีเอชเท่ากับ 8.0 เหมาะกับหน้าที่ Ut ของเอนไซม์ FT จาก *Aspergillus oryzae* ส่วนค่าพีเอช 5.0 เหมาะกับหน้าที่ Uh

และยังมีรายงานว่าเอนไซม์อินเวอเทส (ซึ่งมี EC number เหมือนกับเอนไซม์ FF) จากรามีกิจกรรม Ut เกิดขึ้นเมื่อมีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสสูง (Edelman และคณะ ,1968)

จะเห็นได้ว่าการให้ชื่อของเอนไซม์ที่ผลิต FOS ยังคงมีการโต้เถียงกันอยู่ บางนักวิจัยเรียกเอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรส (FT ; EC 2.4.1.9) โดยเน้นหน้าที่ในการนำโมเลกุลของน้ำตาลฟรักโตสเข้าไปเชื่อมกับสารตั้งต้นเพื่อให้ได้ผลผลิตเป็นFOS ขณะที่บางท่านเรียกเอนไซม์บีตาฟรักโตฟิวแรนโนซิเดส (β-FF ; EC 3.2.1.26 ซึ่งมี EC เหมือนเอนไซม์อินเวอเทส) ซึ่งการที่เรียกว่าฟรักโตฟิวแรนโนซิเดส (FF) ซึ่งเป็นชื่อเกี่ยวกับการสลายน้ำตาลฟรักโตสออกจากสารตั้งต้น เนื่องจาก พบว่ามีกิจกรรมการเคลื่อนย้ายน้ำตาลฟรักโตสจากสารตั้งต้น(น้ำตาลซูโครส)และผลิตFOS ขึ้น ในขณะที่เอนไซม์อินเวอเทสกำลังย่อยสลายน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูงๆ ออกเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรักโตส นั่นคือพบกิจกรรมการเคลื่อนย้ายน้ำตาลฟรักโตสจากสารตั้งต้นเป็นปฏิกริยาข้างเคียงของการเตรียมเอนไซม์อินเวอเทส ดังนั้นจึงให้ชื่อตามเอนไซม์ที่ย่อยสลายน้ำตาลซูโครส คือ ฟรักโตฟิวแรนโนซิเดส(FF) แต่ส่วนใหญ่นิยมเรียกเอนไซม์ที่ผลิตFOS ว่าเอนไซม์ FT เพราะเป็นชื่อที่บ่งบอกถึงการเชื่อมต่อน้ำตาลฟรักโตสกับสารตั้งต้นเพื่อผลิตFOS มากกว่าที่เรียกว่าเอนไซม์ FF ซึ่งเป็นชื่อที่เกี่ยวกับการสลายน้ำตาลฟรักโตสออกจากสารตั้งต้น (อ้างถึงใน Yun ,1996)

เท่าที่มีงานวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์ FT ในจุลินทรีย์ สามารถจัดแบ่งเอนไซม์ FT ได้เป็น 3 แบบ ตามตำแหน่งที่พบ คือ

1.เอนไซม์ที่อยู่ภายในเซล (Intracellular enzyme) เป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นแล้วเก็บอยู่ภายในเซล เช่น เอนไซม์ที่พบใน *Scopulariopsis brevicaulis* (Takeda และคณะ,1994) *Aspergillus niger* (Hidaka และคณะ,1988) *Penicillium roquefortii* (Jang และคณะ,1996) *Aureobasidium* sp.(Hayashi และคณะ,1990)

2.เอนไซม์ที่อยู่นอกเซล (Extracellular enzyme) เป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นแล้วปล่อยออกมานอกเซล เช่นพบใน *Aspergillus foetidus* (Hangและคณะ,1995) *Penicillium rugulosum* (Barthomeufและคณะ,1995) *Penicillium roquefortii* (Jang และคณะ,1996) *Aspergillus niger* (Hidaka และคณะ,1988) *Aureobasidium* sp.(Hayashi และคณะ,1990)

3.เอนไซม์ที่อยู่ติดกับผนังเซล (mycelium-bound enzyme) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ติดกับผิวของสายใยบริเวณผนังเซล เช่นพบใน *Aspergillus japonicus* (Chengและคณะ,1996) *Aspergillus phoenicis* (Balkenและคณะ,1991)

กลไกการทำงานของเอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรสในจุลินทรีย์

การสร้าง FOS จะเกิดขึ้นได้ต้องมีสารตั้งต้นและเอนไซม์ โดยที่การเกิดปฏิกริยาจะเป็น ปฏิกริยาแบบไม่ได้สัดส่วน (disproportionation reaction) ดังสมการ (Jung และคณะ,1989)

$$GFn + GFn \rightarrow GFn-1 + GFn+1$$

นั่นคือ สารตั้งต้นจะทำหน้าที่เป็นทั้งผู้ให้และผู้รับโมเลกุลของน้ำตาลฟรักโตส เช่น เมื่อน้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้นจะได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลกลูโคสและFOSชนิดเคสโตส ซึ่งมีอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เท่ากัน ชี้ให้เห็นถึงความไม่ได้สัดส่วนของปฏิกริยา คือ น้ำตาลซูโครสเป็นทั้งผู้ให้และรับน้ำตาลฟรักโตส ดังนั้น 1 โมลของน้ำตาลกลูโคสและ 1 โมลของเคสโตสจะได้มาจาก 2 โมลของน้ำตาลซูโครส

และจะพบรูปแบบของปฏิกริยานี้เหมือนกันเมื่อใช้สารตั้งต้นชนิดอื่น เช่น 1-เคสโตส นีสโตส ดังสมการข้างล่าง โดยเคสโตสเป็นสารตั้งต้นจะผลิตน้ำตาลซูโครสและนีสโตส ขณะที่เมื่อนีสโตสเป็นสารตั้งต้นจะผลิตเคสโตสและ ฟรักโตฟิวแรนโนซิลนีสโตส

	GFn	+	GFn	→	GFn-1	+	GFn+1
n=1	GF	+	GF	→	G	+	GF2
n=2	GF2	+	GF2	→	GF	+	GF3
n=3	GF3	+	GF3	→	GF2	+	GF4

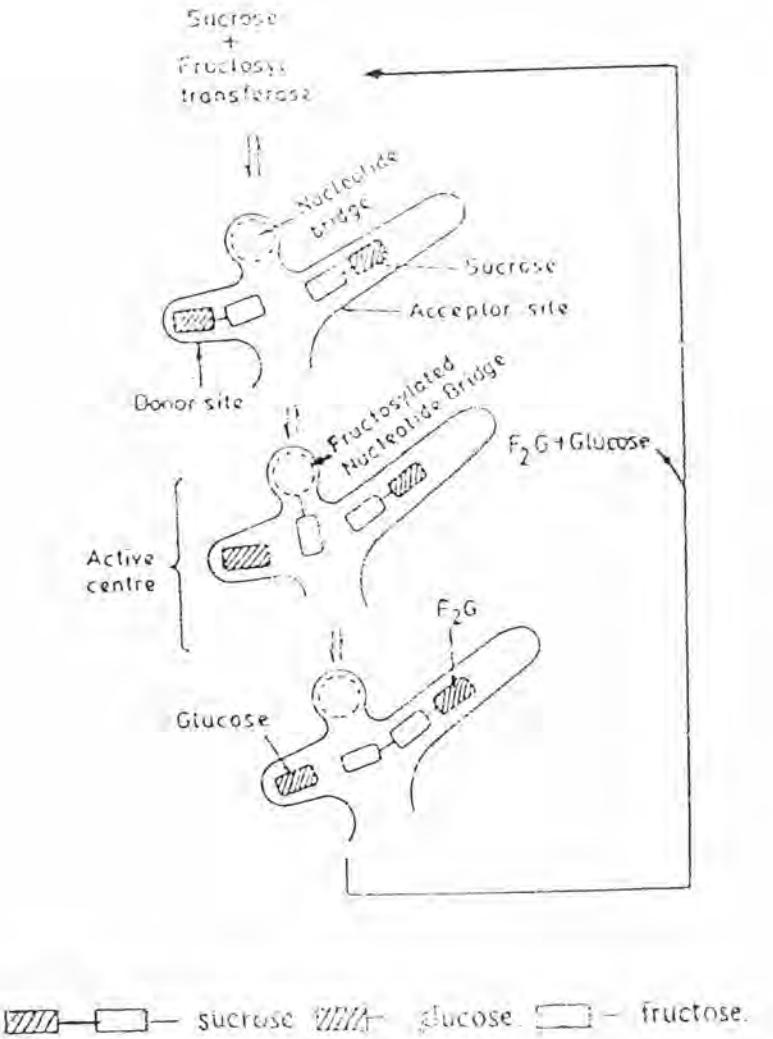
โดย G หมายถึงน้ำตาลกลูโคส F หมายถึงน้ำตาลฟรักโตส GF หมายถึงน้ำตาลซูโครส GF2 หมายถึง FOSชนิดเคสโตส GF3 หมายถึง FOSชนิดนีสโตส และ GF4 หมายถึง FOSชนิดฟรักโตฟิวแรนโนซิลนีสโตส

เรียกการที่สารตั้งต้นเหมือนกันเป็นทั้งผู้ให้และผู้รับว่าการเคลื่อนย้ายตัวเอง(self-transfer)

และในการทำงานของเอนไซม์ FT ในจุลินทรีย์นี้เอนไซม์จะทำหน้าที่เป็นทั้งผู้ให้และผู้รับโมเลกุลของน้ำตาลฟรักโตส โดยแบ่งการทำงานของเอนไซม์ FT เป็น 2 ส่วน คือ (Gupta และ Bhatia,1980)

1.ตำแหน่งให้ (donor site) เป็นส่วนที่ให้น้ำตาลที่เป็นสารตั้งต้นตัวที่ 1 มาเกาะ

2.ตำแหน่งรับ (acceptor site) เป็นส่วนที่ให้น้ำตาลที่เป็นสารตั้งต้นตัวที่ 2 มาเกาะ ซึ่งจะเป็นน้ำตาลที่ทำหน้าที่รับน้ำตาลฟรักโตสจากน้ำตาลผู้ให้ และมีนิวคลีโอไทด์บริดจ์เชื่อมระหว่างสองส่วนนี้ โดยเอนไซม์ทำหน้าที่ในการย้ายน้ำตาลฟรักโตสจากน้ำตาลโมเลกุลหนึ่ง (ผู้ให้) ไปยังน้ำตาลอีกโมเลกุลหนึ่ง(ผู้รับ) ดังแสดงแบบจำลองการทำงานของเอนไซม์ FT ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 การทำงานของเอนไซม์ FT ในการสร้าง FOS (Gupta และ Bhatia,1980)

จากรูปที่ 2 เป็นตัวอย่างการทำงานของเอนไซม์ในการสร้าง FOS จากน้ำตาลซูโครส โดยมีขั้นตอนดังนี้

1.น้ำตาลฟรักโตสจะถูกย้ายจากตำแหน่งให้ของเอนไซม์ซึ่งมีน้ำตาลซูโครสมาเกาะอยู่ (เรียกว่าน้ำตาลซูโครสตัวที่ 1 ซึ่งเป็นผู้ให้น้ำตาลฟรักโตส) ไปยังบริเวณนิวคลีโอไทด์บริดจ์กลายเป็นฟรักโตซิล-นิวคลีโอไทด์

2.ย้ายน้ำตาลฟรักโตสจากนิวคลีโอไทด์บริดจ์ไปยังตำแหน่งรับที่มีน้ำตาลซูโครสอีกโมเลกุลหนึ่งเกาะอยู่ (เรียกว่าน้ำตาลซูโครสตัวที่ 2 ซึ่งเป็นผู้รับน้ำตาลฟรักโตส) ได้ GF2 และ G เป็นผลผลิต

3.เอนไซม์เป็นอิสระ คือไม่มีน้ำตาลใดเกาะที่แขนทั้งสองข้าง และย้อนกลับไปจับกับสารตั้งต้น (น้ำตาลซูโครส) ได้ใหม่อีก โดยที่น้ำตาลฟรักโตสจากน้ำตาลซูโครสผู้ให้ตัวใหม่(ตัวที่ 3) จะถูกย้ายไปยังตำแหน่งรับของน้ำตาลซูโครสตัวใหม่อีกตัว(ตัวที่ 4) เกิดผลผลิตเป็น GF2 ได้อีก หรือถูกย้ายไปยัง GF2 ที่ได้ในครั้งแรก (ในกรณีที่มี GF2 มาเป็นส่วนผู้รับ) เกิดผลผลิตเป็น GF3 ขึ้น

ซึ่งสรุปการสร้าง FOS ชนิดต่างๆได้เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้นโดยทำหน้าที่เป็นผู้ให้น้ำตาลฟรักโตสและใช้น้ำตาลที่จะเป็นผู้รับน้ำตาลฟรักโตสแตกต่างกันหลายชนิด ดังรูปที่ 3

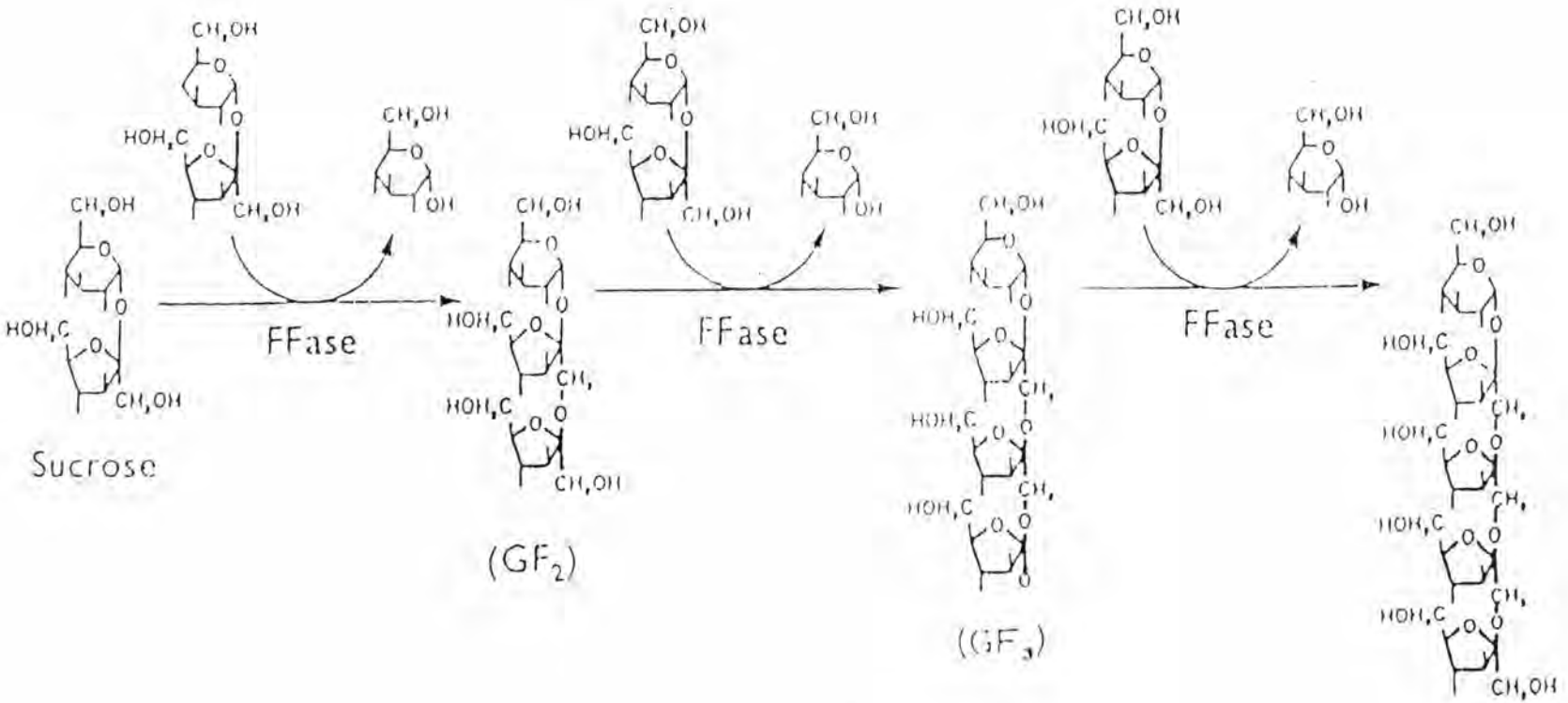
เมื่อพิจารณาสมการเกี่ยวกับการผลิต FOSชนิดนีสโตส โดยใช้สารตั้งต้นที่เหมือนกันและต่างกัน จะเห็นได้ว่าเกิดได้จาก 2 ปฏิกิริยา คือ

แบบที่ 1 GF2 + GF2 $\rightarrow$ GF + GF3

แบบที่ 2 GF2 + GF $\rightarrow$ G + GF3

โดยมักจะเกิดปฏิกิริยาแบบที่ 2 มากกว่า เนื่องจากในการศึกษาทางจนศาสตร์ของเอนไซม์พบว่ายิ่งใช้สารตั้งต้นที่มีจำนวนโมเลกุลของน้ำตาลฟรักโตสเพิ่มขึ้น ค่า Vmax จะลดลง (ค่า Km เพิ่มขึ้น) หมายถึง เอนไซม์ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาได้ไม่ดีกับสารตั้งต้นนี้ นั่นคือในการผลิตนีสโตสการใช้สารตั้งต้นที่เหมือนกันทั้งคู่ (แบบที่ 1) จะเกิดได้น้อยกว่าแบบที่ 2 ซึ่งใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้นตัวที่ 2 ซึ่งมีค่า Vmax มากกว่าเคสโตส เพราะเอนไซม์ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาบนน้ำตาลซูโครสได้มากกว่า FOSชนิดเคสโตส

ซึ่งในการผลิต FFN ก็เป็นไปในทำนองเดียวกับการผลิต FOSชนิดนีสโตส



รูปที่ 3 การสร้างFOS เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้น (Hidakaและคณะ,1991)

สรุปเป็นสมการได้ดังนี้ คือ

1. GF + GF → G + GFF (1-เคสโตส)
2. GFF + GF → G + GFFF (นีสโตส)
3. GFFF + GF → G + GFFFF (ฟรักโตฟิวแรนโนซิลนีสโตส)

งานวิจัยเกี่ยวกับฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตจากเซล สายใย หรือเอนไซม์จากจุลินทรีย์

ในช่วงแรกของการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับ FOS ส่วนใหญ่จะเป็นการนำเอนไซม์จากจุลินทรีย์มาศึกษาถึงสมบัติ ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตและการทำงานของเอนไซม์ และการใช้เอนไซม์ในการผลิต FOS ต่อมาจึงเริ่มนำเซลจุลินทรีย์มาผลิต FOS ซึ่งมีรายงานการผลิตโดยใช้เซลจุลินทรีย์ไม่มากนัก

Jung และคณะ (1987) ศึกษาเอนไซม์ FT จาก *Aureobasidium pullulans* KFCC10245 โดยศึกษาสภาวะในการผลิตเอนไซม์จาก *A. pullulans* และผลขององค์ประกอบต่างๆที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ เมื่อส่วนน้ำหมักและเซลมาวัดกิจกรรมของเอนไซม์ที่อยู่นอกเซลและในเซล พบว่าน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ทำให้เกิดการผลิตเอนไซม์มากที่สุดอย่างเห็นได้ชัด และที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์มีการเติบโตมากที่สุดถ้าความเข้มข้นมากกว่านี้การเติบโตจะลดลง แต่ที่ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ทั้งภายนอกและภายในเซลสูงขึ้น แสดงว่าปัจจัยสำคัญอีกอย่างหนึ่งในการผลิตเอนไซม์คือความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน นั่นคือเอนไซม์ผลิตได้มากขึ้นถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสสูงขึ้นถึงแม้จะไม่ใช่ภาวะที่ให้การเติบโตที่ดีที่สุด ส่วนผลของฟอสเฟตและไนเตรตต่อการผลิตเอนไซม์พบว่า 0.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ของฟอสเฟตและโซเดียมไนเตรตตามลำดับ ให้ผลดีต่อการผลิตเอนไซม์ คือ กิจกรรมของเอนไซม์ภายนอกและในเซลสูงสุด และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ภายนอกและภายในสูงกว่าแมกนีเซียมคลอไรด์ แมงกานีสซัลเฟต ฯลฯ และความเข้มข้นของแมกนีเซียมเพิ่มขึ้น (0.2 เปอร์เซ็นต์) จะเพิ่มการผลิตเอนไซม์ภายในเซลขึ้นด้วยแต่ถ้าความเข้มข้นมากเกินกว่านี้ก็ไม่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น

Hidaka และคณะ (1988) ศึกษากิจกรรมทรานฟรักโตซิลเลชั่น (Ut) และกิจกรรมไฮโดร-ไลซิส (Uh) ของเอนไซม์ FT ที่อยู่ภายในเซลจากจุลินทรีย์ 11 ชนิด พบว่าทุกสายพันธุ์มีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งการสร้าง(Ut) และการสลาย FOS (Uh) โดย *A. niger* ATCC20611 ผลิตเอนไซม์ที่มีกิจกรรมการเคลื่อนย้ายน้ำตาลฟรักโตสได้มากที่สุดและคงอยู่นานที่สุดกว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นที่ใช้ในการทดลอง และการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสจะเพิ่มกิจกรรมการสร้าง FOS (Ut) ทำให้ผลิต FOS ได้มากขึ้น และเมื่อลองผลิต FOS โดยเพาะเลี้ยง *A. niger* ที่มีน้ำตาลซูโครส 50 เปอร์เซ็นต์ ควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าน้ำตาลซูโครสลดลงอย่างรวดเร็วโดยนำไปสร้างเป็น FOS (เคสโตสและนีสโตส) โดยให้ผลผลิต 60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลทั้งหมดใน 24 ชั่วโมง หลังจาก 24 ชั่วโมงน้ำตาลซูโครสมีปริมาณคงที่ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์และเคสโตสลดลงขณะที่นีสโตสและ FFN ค่อยๆเพิ่มขึ้น

Jung และคณะ (1989) ศึกษารูปแบบทางคณิตศาสตร์และจนศาสตร์ของเอนไซม์ FT จาก *A. pullulans* พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 5.5 เมื่อศึกษาทางจนศาสตร์โดยใช้สารตั้งต้นหลายชนิด ได้แก่ น้ำตาลซูโครส FOSชนิดเคสโตส และ FOSชนิดFFN พบว่ายิ่งสารตั้งต้นมีจำนวนน้ำตาลฟรักโตสในโมเลกุลมาก ค่า Vmax ยิ่งลดลง (Km เพิ่มขึ้น) นั่นคือ Vmax ต่ำ เอนไซม์ทำงานได้ไม่ดีใช้สารตั้งต้นชนิดนั้นในการผลิต FOSได้น้อย เมื่อศึกษากลไกการเกิดปฏิกริยา พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสกับฟรักโตสเป็นสารตั้งต้นจะไม่มีปฏิกริยาเกิดขึ้น เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้นเกิดปฏิกริยาของเอนไซม์ได้ให้ผลผลิตเป็นเคสโตสและกลูโคสในสัดส่วน 1 ต่อ 1 แสดงว่ามีการเกิดปฏิกริยาแบบไม่ได้สัดส่วน (disproportionation) คือน้ำตาลซูโครสเป็นได้ทั้งผู้ให้และรับน้ำตาลฟรักโตส ดังนั้น 1 โมลของน้ำตาลกลูโคส และ 1 โมลของเคสโตสเกิดจาก 2 โมลของน้ำตาลซูโครส และพบรูปแบบเดียวกันของปฏิกริยานี้ เมื่อใช้เคสโตสและนีสโตสเป็นสารตั้งต้น โดยเมื่อเคสโตสเป็นสารตั้งต้นจะผลิตน้ำตาลซูโครสและนีสโตส ขณะที่นีสโตสเป็นสารตั้งต้นจะผลิตเคสโตสและฟรักโตฟิวแรนโนซิล-นีสโตส (FFN) แต่มีปริมาณน้อยกว่าการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้นมาก

Hirayama และคณะ (1989) ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ FT ภายในเซลจาก *A. niger* ATCC 20611 ที่เคยพบใน Hidaka และคณะ(1988) พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 340,000 ดาลตัน โดยใช้เจลฟิลเตชั่น ค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ 5.0 – 6.0 และ 50 - 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ถูกยับยั้งการทำงานเมื่อมี 1 มิลลิโมลาร์ของเมอคิวรี่ไอออน มีค่า Km สำหรับน้ำตาลซูโครส 0.29 โมลาร์

Hayashi และคณะ (1990) ศึกษาเอนไซม์ FT จาก *Aureobasidium* sp. ATCC 20524 พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด 103.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ภายในเซล คือ 5.0 – 6.0 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

Yun และคณะ (1990) ศึกษาการผลิต FOS จากน้ำตาลซูโครสด้วยวิธีการผลิตแบบกะในถังหมักด้วยเซลตรึงของ *A. pullulans* เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตโดยใช้เซลอิสระ พบว่าปริมาณ FOSรวม ของเซลตรึงจะเท่ากับเซลอิสระ แต่องค์ประกอบของ FOS ในเซลตรึงจะต่างกับเซลอิสระตรงที่มีการผลิต GF5 เพิ่มขึ้นมา นอกจากนี้ยังใช้เซลตรึงมาผลิตFOSแบบ semibatch พบว่าใช้สายใยผลิตซ้ำได้ 60 ครั้ง ใช้อุณหภูมิในการผลิตเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาความเสถียรของเซล โดยมีผลิต FOSรวม ได้เท่ากับการผลิตแบบ batch และเมื่อใช้เซลตรึงผลิต FOS แบบต่อเนื่องซึ่งมีการเติมอาหารด้วยอัตราการเจือจาง 0.05 ต่อชั่วโมง พบว่าให้ผลผลิตต่ำกว่าแบบ semibatch เพราะจะมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสอยู่คงที่ในถังหมักเป็นเวลานานซึ่งน้ำตาลกลูโคสนี้จะเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในการผลิต FOS

Balkenและคณะ (1991) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการทำงานเอนไซม์และการผลิต FOS ด้วยเอนไซม์ซูโครส-1-FT (SFT) ที่ได้จาก *Aspergillus phoenicis* ที่คัดเลือกได้ โดยเอนไซม์นี้เป็นแบบเกาะติดที่ผิวสายใย พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ คือ 8.0 ผลิต FOS ได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมคือ 750 กรัมต่อลิตร กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อมีผลผลิตเกิดขึ้น 40 เปอร์เซ็นต์

Usami และคณะ (1991) ศึกษาถึงการผลิตเอนไซม์ FF ซึ่งมีกิจกรรมการเคลื่อนย้ายน้ำตาลฟรักโตส จาก *Penicillium frequentans* ที่คัดเลือกได้ พบว่าจุลินทรีย์สามารถใช้น้ำตาลซูโครสและราฟฟิโนสแต่ไม่สามารถใช้อินนูลินเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอนไซม์ได้ โดยน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุด เมื่อเพาะเลี้ยงไป 4 วันในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 15 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอชเริ่มต้น 5.0) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 5.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และพบว่าเป็นเอนไซม์ชนิดที่อยู่ในเซล

Hayashiและคณะ(1991) ผลิตFOSชนิดเคสโตสโดยการตรึงเอนไซม์จาก *Aureobasidium* sp.ATCC20524 บน shirasu porous glass (SPG) ในการผลิตแบบต่อเนื่อง พบว่าจากน้ำตาลซูโครส 40 เปอร์เซ็นต์ ถูกปล่อยให้ไหลอย่างรวดเร็วไปในคอลัมน์ที่มีเอนไซม์ตรึงอยู่ พบว่าได้ความเข้มข้นของเคสโตสสูงสุด 210 มิลลิกรัมต่อลูกบาศเซนติเมตรเมื่อใช้อัตราการไหล 5 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อชั่วโมง แต่มีการผลิตเคสโตสสูงสุด 1.8 กรัมต่อชั่วโมงที่อัตราการไหล 20 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อชั่วโมง โดยไม่มีการผลิต FOSชนิดนีสโตส ดังนั้นในการผลิตเคสโตสจะใช้อัตราการไหล 20 ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นน้ำตาลเคสโตสที่ออกมาจากคอลัมน์ยังคงที่ที่ 80-90 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรใน 7 วัน นั่นคือในการผลิตแบบต่อเนื่องที่มีอัตราการไหลอย่างรวดเร็วจะทำให้มีการผลิตแต่เคสโตสเท่านั้นและการตรึงด้วย SPG มีความเหมาะสมต่อการเกิดปฏิกริยาในภาวะที่มีการไหลของสารตั้งต้นเร็ว

Muramatsu และคณะ (1992) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ FF จาก Bifidobacteria สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *B. longum* A1 , *B. adolescentis* G1 และสายพันธุ์อื่นอีก 4 สายพันธุ์ โดยใช้ FOS เป็นแหล่งคาร์บอนในการเติบโต พบว่าทุกสายพันธุ์เจริญได้ในอาหารที่มีเฉพาะ FOS เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีการสลาย FOSชนิดเคสโตส น้ำตาลซูโครสและอินนูลินเกิดขึ้นภายในเซล และมีกิจกรรมของเอนไซม์ FF สูงสุดเมื่อมีเคสโตสเป็นแหล่งคาร์บอน รองลงมาคือนีสโตส ฟรักโตฟิวแรนโนซิลนีสโตส (FFN) น้ำตาลซูโครสและอินนูลิน ตามลำดับ

Takeda และคณะ (1994) ค้นพบรา *Scopuliopsis brevicaulis* ที่แยกได้ ว่าผลิต FOS ชนิดเคสโตสได้และศึกษาการผลิต FOS โดยใช้สายใย โดยศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเคสโตส โดยเพาะเลี้ยงในขวดเขย่า พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการผลิต คือ ค่าพีเอชตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 15

กรัมต่อลิตร ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 25 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการผลิตเคสโตสโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร การกวน 500 รอบต่อนาที การให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อนาที ให้ผลผลิตเคสโตสได้ 95.6 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 64 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นยังมีผลผลิตอื่นด้วย (กรัมต่อลิตร) คือนีสโตส 4.5 น้ำตาลฟรักโตส 12.8 น้ำตาลกลูโคส 2.7 และน้ำตาลซูโครส 6.8 โดยใช้เวลาในการผลิตนาน 3 วันและพบว่าเอนไซม์เป็นแบบอยู่ภายในเซล

Hayashi และคณะ (1994) ได้ตรึงเอนไซม์ FT จาก *Aureobasidium* sp.ATCC20524 ด้วยอัลจีเนตเจลและทำการผลิต FOS แบบต่อเนื่อง โดยใช้ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสสูงถึง 500 กรัมต่อลิตร พบว่าผลิตFOS ได้มากกว่า 178 กรัมต่อลิตรใน 220 วัน โดยเป็น FOSชนิดเคสโตส 142 กรัมต่อลิตร อีก 36 กรัมต่อลิตรเป็น FOSชนิดนีสโตส โดยพบว่าการตรึงเอนไซม์ในอัลจีเนตนี้มีความเหมาะสมต่อการผลิต FOS เพราะใช้ผลิตแบบต่อเนื่องได้นาน

Chang และคณะ (1994) ศึกษาสมบัติของเอนไซม์ FF จาก *Aspergillus oryzae* ATCC 76080 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ขับออกนอกเซล พบว่ามีค่าพีเอชที่เหมาะสม คือ 5.0 - 6.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 50 องศาเซลเซียส ค่า Km ของการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้น เท่ากับ 0.53 โมลาร์ น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์เท่ากับ 87 กิโลดาลตันโดยการทำเจลฟิลเตชั่น ตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้แก่ เมอคิวรี่ไอออน 0.25 มิลลิโมลาร์ พารา-ไฮดรอกซีเมอคิวริเบนโซเอท 0.25 มิลลิโมลาร์และโบรโมซัคซินิไมด์ 0.5 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์มีทั้งกิจกรรม Ut และ Uh ต่อน้ำตาลซูโครส 0.5-50 เปอร์เซ็นต์ และกิจกรรม Ut จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้น ผลผลิตส่วนใหญ่ได้แก่ FOS ชนิดเคสโตสและนีสโตส

Yun และคณะ (1995) ผลิต FOS จากน้ำตาลซูโครสโดยการตรึงเอนไซม์ FT จาก *Aureobasidium pullulans* KFCC10524 ด้วยไอออนเอกเซนเรซินที่มีรูพรุน ทำการผลิตแบบต่อเนื่องโดยใช้น้ำตาลซูโครส 600 กรัมต่อลิตร อัตราการไหล 2.7 ต่อชั่วโมง อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่ากิจกรรมเริ่มต้นของเอนไซม์ตรึงเสียไป 8 เปอร์เซ็นต์หลังจาก 30 วันของการผลิต และได้อัตราการผลิต FOS สูงเท่ากับ 1174 กรัมต่อลิตร-ชั่วโมง

Hang และคณะ (1995) ศึกษาเอนไซม์ FT ชนิดผลิตออกนอกเซล จาก *Aspergillus foetidus* NRRL337 พบว่าให้ปริมาณมากกว่า 1140 ยูนิตหลัง 120 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง มีการทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 5.0 - 6.0 มีกิจกรรมต่อน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นสารตั้งต้นสูงสุด แต่ไม่มีกิจกรรมต่อน้ำตาลมอลโตสหรือแลกโตส ค่า Kmของน้ำตาลซูโครสเท่ากับ 253 มิลลิโมลาร์ มีการผลิตเคสโตสได้รวดเร็วในช่วง 8-24 ชั่วโมงและสูงสุดใน 49 ชั่วโมง โดยมีปริมาณมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลทั้งหมด และมีปริมาณน้ำตาลซูโครส น้ำตาล

กลูโคส น้ำตาลฟรักโตสและนีสโตส เท่ากับ 32 9 2 และ 7 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลทั้งหมด ตามลำดับ

Barthomeuf และคณะ (1995) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานและการผลิต FOS จากเอนไซม์ซึ่งได้จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Penicillium rugulosum* พบว่าเอนไซม์ในน้ำหมักนี้เป็นเอนไซม์ผสมของ FT และ glycosidase โดยเริ่มสร้างเอนไซม์ FT ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงและเพิ่มขึ้นเรื่อยๆประมาณ 32 ชั่วโมง โดยมีความเข้มข้นของเอนไซม์สูงสุดที่ 40 ชั่วโมง และค่อยๆลดลงจนหมดไปใน 48 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์ FT จะน้อยมากถ้าขาดแอมโมเนียมไอออน และเสื่อมลงถ้าในอาหารมีผลิตภัณฑ์จากสัตว์ เช่น เคซีน หรือมีทเปปโตน แต่ถ้าเติมเปปโตนจากพืช เช่น เปปโตนถั่วเหลือง จะเพิ่มการผลิตเอนไซม์ ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ในการสร้าง FOS คือ ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 775 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นเอนไซม์ 5 ยูนิตต่อกรัมของน้ำตาลซูโครส ค่าพีเอช 5.5 และเมื่อใช้เอนไซม์ผลิต FOS ให้ผลผลิต FOS ได้ถึง 83.8 เปอร์เซ็นต์ใน 10 ชั่วโมง

Chen (1995) เปรียบเทียบการผลิตเอนไซม์ FF (หรือเอนไซม์ FT) โดยเพาะเลี้ยง *Aspergillus japonicus* แบบ batch และ fed-batch ในขวดเขย่า พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch ซึ่งมีการเติมน้ำตาลซูโครสเป็นระยะ จะทำให้ผลิตเอนไซม์ FF ได้สูงสุดถึง 910 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณเอนไซม์มากกว่าการผลิตแบบ batch 20 เปอร์เซ็นต์

Kurakake และคณะ (1996) ศึกษาผลของค่าพีเอชที่มีต่อกิจกรรมทรานฟรักโตซิลเลชัน (สร้างFOS ;Ut) และไฮโดรไลซิส (สลายFOS ;Uh) ของเอนไซม์ FT จาก *A. oryzae* พบว่าเอนไซม์มีทั้งกิจกรรม Ut และ Uh โดยค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อ Ut คือ 8.0 ส่วน Uh จะอยู่ในช่วงที่เป็นกรด คือ 5.0 ซึ่งที่ค่าพีเอช 8.0 นี้มีการผลิตเคสโตสและนีสโตสเป็นผลผลิตส่วนใหญ่และปริมาณลดลงที่ความเป็นกรดด่าง 5.0 เนื่องจากมีการย่อยสลาย

Novak และคณะ (1996) พบว่าในขณะที่เพาะเลี้ยง *A. niger* เพื่อผลิตกรดกลูโคนิกจากน้ำตาลซูโครสนั้นมีการผลิตFOS เกิดขึ้นโดยผลิตขึ้นในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยงซึ่งมีการผลิตกรดกลูโคนิกน้อยมาก และ FOSค่อยๆลดลงและหมดไปก่อนมีการผลิตกรดกลูโคนิกสูงสุด นั่นคือปกติกรดกลูโคนิกผลิตจากการออกซิเดชั่นของน้ำตาลกลูโคส ดังนั้นจะต้องมีน้ำตาลฟรักโตสเหลืออยู่ครึ่งหนึ่งของน้ำตาลซูโครสที่ถูกใช้ไป แต่ได้พบว่าน้ำตาลฟรักโตสเหลืออยู่น้อยกว่าที่ควรเป็น จึงได้ทำการวิเคราะห์การใช้น้ำตาล จึงพบว่าขณะที่มีการผลิตกรด น้ำตาลฟรักโตสถูกเคลื่อนย้ายไปเชื่อมกับน้ำตาลซูโครสเกิดเป็น FOS ซึ่งพิสูจน์แล้วพบว่าเป็นเคสโตส นีสโตสและ FFN ในช่วงท้ายของการเพาะเลี้ยง FOS เหล่านี้จะสลายไปเหลือแต่น้ำตาลฟรักโตสและกรดกลูโคนิกซึ่งยังคงผลิตเพิ่มขึ้นเรื่อย นั่นคือ FOS เป็นผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นในช่วงแรกของการเติบโต โดยให้ผลผลิตเคสโตสและนีสโตสได้สูงสุด 40 และ 8 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลซูโครสที่ใช้ไป ตามลำดับ

Jang และคณะ (1996) รายงานถึงกิจกรรม Ut ของเอนไซม์ FT ที่ได้จาก *Penicillium roquefortii* พบว่าเอนไซม์ผลิตควบคู่กับการเติบโต มีทั้งเอนไซม์ภายในและภายนอกเซล หลัง 96 ชั่วโมงกิจกรรมของเอนไซม์ FTรวม เท่ากับ 16.41 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยมีเอนไซม์ภายในเซลถึง 88 เปอร์เซ็นต์ของเอนไซม์ FTรวมทั้งหมด อุณหภูมิและค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 30-50 องศาเซลเซียสและ 5.0-6.0 ตามลำดับ ผลิต FOSได้ 60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลทั้งหมด หลังจาก 4 ชั่วโมงของปฏิกริยา และมีน้ำตาลซูโครส กลูโคสและฟรักโตส เท่ากับ 11.56 27.77 และ 1.17 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลทั้งหมด ตามลำดับ

Cheng และคณะ (1996) ตรึงสายใยของ *A. japonicus* ซึ่งสร้างเอนไซม์ FT แบบเกาะติดสายใย ด้วยแคลเซี่ยมอัลจีเนตเจล และศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตFOS แบบต่อเนื่อง พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสม คือ 4 - 5.5 แต่เหมาะสมที่สุดที่ 5.4 และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 60 องศาเซลเซียสซึ่งการตรึงเซลทำให้เอนไซม์ทนต่ออุณหภูมิสูงได้นานขึ้น และในการใช้สายใยตรึงมาผลิต FOS ปริมาณของ FOS ที่ได้จากเอนไซม์ตรึงจะเท่ากับการผลิตโดยใช้เอนไซม์อิสระ เมื่อนำเอนไซม์ตรึงมาผลิต FOS แบบต่อเนื่องเป็นเวลานานๆ พบว่าจะมีกิจกรรมยาวนานถึง 35 วัน (เมื่อใช้อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส) และมีการสูญเสียกิจกรรมไป 17 เปอร์เซ็นต์ระหว่างการผลิตเป็นเวลา 35 วัน

Chen และคณะ (1996) ศึกษาผลของค่าพีเอชและอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ FF และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ FF จาก *A. japonicus* TIT90076 ที่คัดเลือกได้ว่ามีกิจกรรม Ut สูง โดยมีภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรม Ut คือค่าพีเอช 5.0 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และค่าพีเอชที่ต่ำกว่า 3.0 หรือสูงกว่า 10.0 จะไม่เกิดกิจกรรม Ut ส่วนกิจกรรม Uh มีมากที่สุดที่ค่าพีเอช 4.0 แต่ถ้าค่าพีเอชสูงกว่า 5.0 จะไม่เกิดกิจกรรม Uh และพบว่าน้ำตาลซูโครสและสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตเอนไซม์

จะเห็นได้ว่ามีงานวิจัยเกี่ยวกับ FOS จากจุลินทรีย์หรือเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในแง่มุมต่างๆ มากมายดังที่กล่าวมาข้างต้น โดยสามารถสรุปงานวิจัยเฉพาะที่เกี่ยวกับการผลิต FOS ดังตารางที่ 4 และ 5 ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการใช้เอนไซม์ในการผลิต มีการใช้เซลจุลินทรีย์ในการผลิตน้อยมาก

ตารางที่ 4 การใช้เอนไซม์ในรูปแบบต่างๆจากจุลินทรีย์ ในการผลิต FOS

แหล่งเอนไซม์	รูปแบบของเอนไซม์	วิธีการผลิต	เอกสารอ้างอิง
Aspergillus phoenicis	อิสระ	Batch	Balken และคณะ ,1991
Aureobasidium sp.	ตรึง	Continuous	Hayashi และคณะ ,1991
Aureobasidium sp.	ตรึง	Continuous	Hayashi และคณะ ,1994
Penicillium rugulosum	อิสระ	Batch	Barthomeuf และคณะ,1995
Aspergillus foetidus	อิสระ	Batch	Hang และคณะ,1995
Aureobasidium pullulans	ตรึง	Continuous	Yunและคณะ,1995
Penicillium roquefortii	อิสระ	Batch	Jangและคณะ ,1996

ตารางที่ 5 การใช้เซลจุลินทรีย์รูปแบบต่างๆ ในการผลิต FOS

จุลินทรีย์	รูปแบบเซลที่ใช้	วิธีการผลิต	เอกสารอ้างอิง
Aureobasidium pullulans	อิสระ	Batch	Yun และคณะ ,1990
	ตรึง	Batch	
	ตรึง	Semi-batch	
	ตรึง	Continuous	
Scopulariopsis brevicaulis	อิสระ	Batch	Takeda และคณะ, 1994
Aspergillus japonicus	ตรึง	Continuous	Cheng และคณะ , 1996
Aspergillus niger	อิสระ	Batch	Novak และคณะ , 1996

แต่อย่างไรก็ตามเป็นที่ทราบกันอยู่แล้วว่าการใช้เอนไซม์ในการผลิตFOS ซึ่งมีการใช้ทั้งเอนไซม์อิสระและตรึงจะมีความยุ่งยากมากกว่าการใช้เซลหรือสายใยจุลินทรีย์ เนื่องจาก

1.ต้องสกัดออกมาแล้วทำให้บริสุทธิ์และยังต้องมีการจัดภาวะต่างๆ และควบคุมให้เหมาะกับการทำงาน ซึ่งทำให้มีความยุ่งยากในการผลิตและมีต้นสูง

2.ถึงแม้การตรึงเอนไซม์เพื่อที่จะนำมาใช้ซ้ำได้อีก แต่ก็จะมีการสูญเสียกิจกรรมบางส่วนไป จึงต้องเลือกวัสดุตรึงให้เหมาะสมและยังต้องผ่านขั้นตอนที่ 1

ดังนั้นการผลิตโดยใช้เซลจุลินทรีย์จะง่ายในการปฏิบัติมากกว่าการใช้เอนไซม์ คือเพียงแค่จัดภาวะให้จุลินทรีย์เติบโตได้ก็เพียงพอแล้ว เพราะฉะนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกผลิต FOS โดยใช้เซลจุลินทรีย์ คือ *Penicillium* sp.H12 และจากการค้นคว้าเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวกับการผลิต FOS ด้วยกระบวนการหมักโดยใช้สายใยของ *Penicillium* sp. ไม่เคยมีรายงานมาก่อน มีแต่การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์ FT ได้สูงสุด ภาวะที่ทำให้เอนไซม์ FT ทำงานได้ดี ตลอดจนการนำเอนไซม์มาใช้ในการผลิตFOS ดังนั้นขอบเขตงานวิจัยนี้คาดว่าเป็นผลงานแรกที่มุ่งศึกษาการผลิต FOS โดยใช้สายใยของ *Penicillium* sp. H12

ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิต FOS โดยการหมักด้วยจุลินทรีย์

1.สายพันธ์ของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ต้องสามารถผลิต FOS ได้ในปริมาณสูง เติบโตเร็ว ให้ผลผลิตสม่ำเสมอและไม่กลายพันธุ์ง่าย โดยจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตFOSในอุตสาหกรรม ได้แก่ *A. niger* และ *A. pullulans* (อ้างถึงในTakeda และคณะ, 1994 ; อ้างถึงใน Yun ,1996)

2.แหล่งคาร์บอน

เป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ในการผลิต FOS ซึ่งต้องคำนึงถึงทั้งชนิดและปริมาณเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุด ใช้เวลาในการผลิตน้อยที่สุด แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตFOS คือ น้ำตาลซูโครส เนื่องจากเป็นสารตั้งต้นโดยตรงของเอนไซม์ FT ในการสร้าง FOS ซึ่งในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในการผลิตFOS จะใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ (Yun และคณะ,1990; Takedaและคณะ,1994) โดยได้มีการทดลองใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ FT ของ *Aureobasidium pullulans* (Jung และคณะ,1987) โดยพบว่าน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตเอนไซม์และมีการเติบโตดี ขณะที่น้ำตาลกลูโคส ฟรักโตส กาแล็กโตสหรือมอลโตสให้การเติบโตมากแต่กลับผลิตเอนไซม์ได้น้อยมาก ส่วนน้ำตาลแล็กโตส กลีเซอรอลหรือแป้งที่ละลายน้ำได้ จะให้การเติบโตต่ำและแทบไม่ผลิตเอนไซม์เลย ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Chenและคณะ(1996) ก็พบว่าน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ทำให้ผลิตเอนไซม์ FT มากที่สุด การเติบโตปานกลาง ขณะที่แป้งข้าวโพด น้ำตาลมอลโตส ฟรักโตส กลูโคส กาแล็กโตสและซอบิทอล มีการเติบโตอย่างเดียวแต่ผลิตเอนไซม์ได้น้อย ส่วนน้ำตาลแล็กโตส แป้งที่ละลายน้ำได้หรืออินโนซิทอล มีการเติบโตไม่ดีการผลิตเอนไซม์ก็ต่ำ นอกจากชนิดแล้วยังต้องคำนึงถึงปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมด้วย ถ้าปริมาณของน้ำตาลซูโครสมีมากจะทำให้กิจกรรมทรานฟรักโตซิลเล-

ชั่น (Ut) ยิ่งเพิ่มมากขึ้น (Jung และคณะ,1987; Hidaka และคณะ,1988) ปริมาณที่ใช้ในการผลิต FOS จะขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ เช่น *Scopulariopsis brevicaulis* ผลิต FOS ได้ดีที่น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ FT ได้สูงสุดกับปริมาณที่ใช้สำหรับการเติบโตสูงสุดอาจไม่เท่ากัน เช่น Jung และคณะ (1987) รายงานว่าน้ำตาลซูโครสที่ทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุด คือ 25 เปอร์เซ็นต์ แต่ปริมาณที่มีการเติบโตดีที่สุดคือ 10 เปอร์เซ็นต์ ถ้าใช้ 25 เปอร์เซ็นต์การเติบโตจะลดลง

3.แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากที่ได้มีรายงานจะเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะต่อการผลิตเอนไซม์และการเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งจากงานวิจัยของ Chenและคณะ (1996) ได้แปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ FF และการเติบโตของ *A. japonicus* พบว่าสารสกัดจากยีสต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้มีการเติบโตดีและมีปริมาณเอนไซม์สูงที่สุด ส่วนโพลีเปปโตนหรือเจลาตินจะทำให้การเติบโตดีแต่ปริมาณเอนไซม์ FF ต่ำ ส่วนน้ำเวย์หรือสารสกัดจากมอลท์จะให้การเติบโตน้อยมากการผลิตเอนไซม์ยิ่งต่ำ นอกจากนี้ Barthomeuf และคณะ (1995) ศึกษาถึงชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ FT จาก *Penicillium rugulosum* พบว่าแอมโมเนียมคลอไรด์ เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์มากที่สุด ซึ่งถ้าขาดแอมโมเนียมไอออนจะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์น้อยมาก และถ้ามีเปปโตนจากพืช เช่นถั่วเหลือง จะเพิ่มการผลิตเอนไซม์ FT แต่ถ้ามีเปปโตนจากสัตว์ เช่นโพลีเปปโตนจะทำให้ผลิตเอนไซม์ FT น้อยลง และปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมในการผลิตเคสโตสโดย *Scopulariopsis brevicaulis* คือ 15 กรัมต่อลิตร (Takeda และคณะ, 1994)

4.อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน

อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต้องเหมาะสม หากปริมาณไนโตรเจนน้อยเกินไปไม่ได้สัดส่วนกับปริมาณคาร์บอนที่มีอยู่จะทำให้ไม่เพียงพอต่อการเติบโตของจุลินทรีย์ ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ การผลิต FOS หากมีไนโตรเจนมากเกินไปทำให้มีแนวโน้มในการเติบโตมากกว่าการผลิต ผลผลิตFOS จะลดลง เช่นงานวิจัยของ Takeda และคณะ (1994) แปรผันปริมาณสารสกัดจากยีสต์ซึ่งเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเคสโตสและการเติบโตของ *Scopulariopsis brevicaulis* เมื่อมีน้ำตาลซูโครส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าถ้ามีปริมาณสารสกัดจากยีสต์มากขึ้น มีการเติบโตมากขึ้นแต่ผลิตเคสโตสได้น้อยลง โดยปริมาณสารสกัดจากยีสต์ที่ให้การเติบโตพอเหมาะและผลิตเคสโตสสูงสุด คือ 10 กรัมต่อลิตร แต่ถ้าเพิ่มปริมาณน้ำตาลซูโครสในการผลิตเป็น 150 กรัมต่อลิตร จะมีปริมาณสารสกัดจากยีสต์เพิ่มขึ้นเป็น 15 กรัมต่อลิตร

5.แร่ธาตุ

แร่ธาตุเป็นอีกปัจจัยที่สำคัญในการผลิต FOS เพราะจุลินทรีย์ต้องการแร่ธาตุเพื่อการเติบโตและการผลิต FOS Chen และคณะ (1996) ศึกษาเกลืออนินทรีย์ชนิดต่างๆที่มีต่อการผลิตเอนไซม์ FF พบว่าโซเดียมไนเตรต โพแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และแมกนีเซียมซัลเฟต ทำให้มีการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ FF สูงที่สุด นอกจากนี้พบว่าแมกนีเซียมมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ FT จาก *Aureobasidium pullulans* มากที่สุด และแมกนีเซียมซัลเฟตมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ FT มากกว่าแมกนีเซียมคลอไรด์ (Jung และคณะ, 1987) ส่วนแร่ธาตุที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ FT จาก *Aureobasidium* sp. ซึ่งทำให้ไม่สร้าง FOS ได้แก่ เงิน ตะกั่ว ปรอท และทองแดง (อ้างถึงใน Yun,1996) ส่วนเอนไซม์ FTจาก *A. oryzae* ถูกยับยั้งการทำงานโดยเมอคิวรี่ไอออน (Chang และคณะ, 1994)

6.อุณหภูมิ

จุลินทรีย์มีความต้องการอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการทำกิจกรรมใดๆแตกต่างกันตามสายพันธุ์จุลินทรีย์ จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับแต่ละสายพันธุ์ โดยพบว่าการผลิตเคสโตสจาก *Scopulariopsis brevicaulis* ด้วยวิธีการหมักต้องการอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงประมาณ 30 องศาเซลเซียส (Takedaและคณะ,1994) การเพาะเลี้ยง *A. niger* เพื่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ FT ใช้อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 28 องศาเซลเซียส (Hidaka และคณะ, 1988) ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *A. pullulans* เพื่อผลิต FOS (โดยเซลอิสระและเซลตรึง) ประมาณ 55 องศาเซลเซียส แต่ถ้าในการเพาะเลี้ยงเพื่อการเติบโตจะใช้อุณหภูมิประมาณ 28 องศาเซลเซียส (Yun และคณะ,1990) แต่ถ้าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ FT โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ คือ 50-60 องศาเซลเซียส(อ้างถึงใน Yun,1996) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ FF จาก *A. japonicus* คือ 55 องศาเซลเซียส (Chen และคณะ,1996)

7.ค่าพีเอช

ค่าพีเอชส่งผลต่อการผลิต FOS โดยการหมักด้วยเซลจุลินทรีย์ซึ่งต้องเหมาะสมต่อทั้งการเติบโตและการทำงานของเอนไซม์ FT ตัวอย่างเช่น ค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเติบโตและผลิต FOS โดย *Aureobasidium sp.* และ *Aspergillus niger* คือ ค่าพีเอชคงที่มากกว่า 5.5 (อ้างถึงใน Yun,1996) ส่วนงานวิจัยของ Takeda และคณะ (1994) พบว่าค่าพีเอชตั้งต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตFOS โดย *Scopulariopsis brevicaulis* เท่ากับ 7.0 สำหรับค่าพีเอชที่ใช้ในการผลิตFOS โดย *A. pullulans* (เซลอิสระและเซลตรึง) คือ 5.5 (Yunและคณะ,1990) แต่ในงานวิจัยของ Chenและคณะ(1996) พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ FF จาก *A. oryzae* คือ 5.0 - 6.0 ถ้าค่าพีเอชน้อยกว่า3.0 หรือมากกว่า 10.0 ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์เลย และ

ค่าพีเอช 4.0 เอนไซม์ทำหน้าที่สลาย FOS ได้ดีที่สุด ถ้าค่าพีเอชมากกว่า 5.0 ไม่มีหน้าที่ในการสลาย FOS เลย จากรายงานของ Jungและคณะ (1989) พบว่าเอนไซม์ FT จาก *A. pullulans* มีการสร้าง FOS ได้ดีที่ค่าพีเอชมากกว่า 5.0 ขึ้นไปแต่ดีที่สุดที่ 5.0 และมีการสลาย FOS ได้ที่ค่าพีเอชต่ำกว่า 4.0 - 4.5 และเอนไซม์ FT จาก *Penicillium roquefortii* มีกิจกรรมทรานฟรักโต-ซิลเลชั่นได้ดีในช่วงพีเอช 5.0 – 6.0 (Jang และคณะ, 1996)

8.ปริมาณอากาศ

ปริมาณอากาศจำเป็นต่อการผลิต FOS เนื่องจาก FOS เป็นผลผลิตที่ผลิตควบคู่กับการเติบโต ถ้ามีปริมาณอากาศมากการเติบโตก็มากส่งผลให้มีการผลิตได้ดี โดยปริมาณอากาศอาจรายงานเป็นปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือเป็นอัตราการให้อากาศและการกวนก็ได้ โดยการให้อากาศจะทำให้มีการผสมผสานระหว่างจุลินทรีย์ ออกซิเจนและอาหาร เพื่อที่จุลินทรีย์จะนำออกซิเจนและสารอาหารไปใช้ในการเติบโตและผลิต FOS ปริมาณการให้อากาศที่เหมาะสมขึ้นกับชนิดของเครื่องปฏิกรณ์ด้วย โดย Takeda และคณะ (1994) ได้ทำการผลิตเคสโตสโดย *Scopulariopsis brevicaulis* ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร มีปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 1.5 ลิตร โดยมีการให้อากาศและการกวนที่เหมาะสมเท่ากับ 500 รอบต่อนาทีและ 1.5 ลิตรต่อนาที ตามลำดับ

9.ขนาดของหัวเชื้อ

ขนาดหัวเชื้อมีผลต่อการผลิต เนื่องจากถ้าขนาดหัวเชื้อมาก ปริมาณเอนไซม์ในการผลิต FOS ย่อมมากตามด้วย ส่งผลต่อการผลิต FOS โดยอาจมีผลต่อปริมาณและระยะเวลาในการผลิต Takeda และคณะ (1994) ได้รายงานว่าการผลิตเคสโตสโดย *Scopulariopsis brevicaulis* จะใช้หัวเชื้อประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) จึงจะเหมาะสม

การพัฒนาการผลิต FOS

จากงานวิจัยข้างต้นที่พบว่าน้ำตาลกลูโคสที่สะสมอยู่ในระบบเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ FT ทำให้ผลผลิต FOS ต่ำ ดังนั้นจึงมีการปรับปรุงการผลิตเพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิต

Jung และคณะ (1993) ผลิต FOS โดยมีการกำจัดน้ำตาลกลูโคสออกจากระบบ โดยใช้เอนไซม์ 2 ชนิดร่วมกันในการผลิต ได้แก่ เอนไซม์ FT และกลูโคสออกซิเดส(GO) พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณการผลิต FOS ได้ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเดิมในการผลิตเป็นการค้าจะผลิต FOS ได้แค่ 55-60 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นเนื่องจากมีการสะสมของน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ FT การเติมเอนไซม์ GO ลงไปจะช่วยเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดกลูโคนิกทำให้ไม่เกิดการยับยั้งการผลิตและยังได้ผลิตภัณฑ์อีกชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าซึ่งแยกออกจากระบบได้ง่าย

Takeda และคณะ(1995) ผลิต FOS จาก *Scopulariopsis brevicaulis* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเคสโตส โดยใช้แหล่งคาร์บอน 2 ชนิดในการเพาะเลี้ยง คือน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลไซโลส พบว่านอกจากจะผลิตเคสโตสแล้ว ยังได้โอลิโกแซ็กคาไรด์ใหม่อีก 2 ชนิดที่มีประโยชน์ คือ ฟรักโตซิลไซโลไซด์ (FX) และฟรักโตซิลฟรักโตซิลไซโลไซด์ (FFX) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการสร้างกลูแคนโดยเอนไซม์กลูโคซิลทรานเฟอเรสจาก *Streptococcus mutans* ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดฟันผุ

Tanniseven และคณะ (1999) ผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์ 2 ชนิด คือเอนไซม์ FT และเดร็กแตรนซูเครส ทำให้ได้ไอโซมอลโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (IMO) เกิดขึ้นด้วย ทำโดยใช้เอนไซม์ FT มาผลิต FOS ก่อนเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ซึ่งได้เคสโตส นีสโตส FFN น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครสที่ไม่ได้นำไปสร้าง FOS เท่ากับ 38.5 13.3 5.7 20.9 และ 26.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นเติมเอนไซม์เดร็กแตนซูเครสลงไป ทำให้น้ำตาลซูโครสที่เหลืออยู่ถูกเปลี่ยนเป็น IMO เมื่อเสร็จสิ้นจึงทำให้ได้ผลผลิต 2 ชนิด คือ FOS และ IMO ซึ่งมีประโยชน์ในการกระตุ้นการเติบโตของไบฟิโดแบคทีเรียและป้องกันฟันผุได้

Nishizawa และคณะ (2000) ได้ผลิต FOS จากเอนไซม์ตรึงของ *A. niger* โดยการผลิตแบบต่อเนื่องในเครื่องปฏิกรณ์แบบใหม่ซึ่งทำให้ผลิต FOS ได้อย่างรวดเร็ว โดยใช้ Forced - flow membrane reactor (FFMER) ซึ่งเป็นเครื่องปฏิกรณ์แบบเมมเบรนอีกชนิดหนึ่งที่เป็นเทคโนโลยีใหม่อีกด้านหนึ่งในการผลิตแบบต่อเนื่องและมีอัตราการผลิตสูง โดยมีวิธีการคือ ให้สารตั้งต้นไหลผ่านเอนไซม์ที่ตรึงอยู่บนแผ่นเมมเบรนโดยการใช้แรงดัน และเอนไซม์กับสารตั้งต้นจะทำปฏิกริยากันระหว่างที่มีการแพร่ผ่านเมมเบรน พบว่ามีปริมาตรอัตราการผลิต (Volumetric productivity) เท่ากับ 3.87 กิโลกรัมต่อลูกบาศเมตรต่อนาที ซึ่งสูงกว่าการผลิตในระบบ Batch 560 เท่า ด้วยระยะเวลาที่อยู่ในเครื่องปฏิกรณ์เพียง 11 วินาที

ตัวอย่างเว็บไซต์ที่เกี่ยวกับ FOS

ปัจจุบันความน่าสนใจเกี่ยวกับ FOS มีเพิ่มมากขึ้นและมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านต่างๆ มากมายรวมทั้งมีประกาศขายทางอินเตอร์เน็ตในรูปของอาหารเสริมเพื่อสุขภาพและสารให้ความหวานพลังงานต่ำ ซึ่งสามารถหาดูได้จากเว็บไซต์ต่างๆ เช่น

1.เว็บไซต์ในด้านความรู้และงานวิจัยต่างๆ เกี่ยวกับ FOS เช่น www.bioho.tacgu.ac.kr , www.uastabs.com , www.sdk.co.jp , www.speedyvet.com/catalog/health/ เป็นต้น

2. เว็บไซต์ที่โฆษณาหรือประกาศขาย FOS ในด้านสารส่งเสริมสุขภาพ เช่น www.kampoyki.com /general /nutrice/ , www.viaweb.com /vitanet/fosfrucolsac.htm , www.bnatural.com /uas.htm เป็นต้น

3.เว็บไซต์ที่ขายสารให้ความหวานพลังงานต่ำชนิด FOS เช่น www.search.shopping.yahoo.com/search?P=all&P=fructooligosaccharide&pf=&pt=&x=

เนื่องจาก FOS มีประโยชน์มากมายดังกล่าวข้างต้น แต่ยังไม่มีการผลิตใช้ในประเทศไทย และยังไม่มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิต FOS จาก *Penicillium* sp. สายพันธุ์ใดๆ โดยใช้สายใยในกระบวนการหมักมาก่อน งานวิจัยนี้จึงเป็นงานวิจัยแรกที่จะศึกษาวิจัยการผลิต FOS จาก *Penicillium* sp. โดยเฉพาะ *Penicillium* sp. H12 ซึ่งแยกและคัดเลือกได้โดยเสาวนีย์ ศิริรูป (2539) ซึ่งพบว่าเป็นสายพันธุ์ที่ผลิต FOS ได้สูงเป็นที่น่าพอใจ เติบโตเร็ว ดังนั้นงานวิจัยนี้จะผลิต FOS ด้วยกระบวนการหมัก *Penicillium* sp. H12 โดยมุ่งที่จะศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิต FOS เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต FOS และนำไปสู่การขยายส่วนผลิตต่อไป รวมทั้งใช้เป็นแนวทางในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมเพื่อใช้ในประเทศต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อชนิดและปริมาณของสารให้ความหวานพลังงานต่ำชนิดฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Penicillium* sp. H12

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1.ผลิต FOS ในอาหารเหลวด้วยวิธีการผลิตที่แตกต่างกัน คือให้จุลินทรีย์เติบโตในขวดเขย่าและบนผิวหน้าอาหารเหลวโดยไม่มีการเขย่า

2.ผลิต FOS โดยเปรียบเทียบชนิด อายุและปริมาณหัวเชื้อ *Penicillium* sp. H12

3.หาผลของปริมาณแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

4.หาผลของค่าพีเอชที่มีต่อการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

5.หาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

6.หาผลของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

7.หาผลของการเพิ่มอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการผลิตต่อปริมาณฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์