บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

สรุปผลการวิจัย

1.เมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในขวดเขย่า มีการผลิต FOS การเติบโตและการใช้น้ำตาลเร็วกว่าการผลิตโดยไม่มีการเขย่า แต่ให้ผลผลิต FOSรวม ในปริมาณไล่เลี่ยกัน คือ 41.61 และ 38.69 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่การผลิตแบบมีการเขย่าใช้เวลาในการผลิตเร็วกว่าถึง 2 เท่าคือชั่วโมงที่ 24 ขณะที่การผลิตโดยไม่มีการเขย่าใช้เวลานานถึง 48 ชั่วโมง ดังนั้นการผลิตโดยมีการให้อากาศด้วยการเขย่าจึงเหมาะสมกว่า

2.สปอร์ของ *Penicillium* sp. H12 ใช้เวลาในการงอก 12 ชั่วโมง โดยให้การงอกร้อยละ 88.11

3.FOS เป็นผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิที่มีการสร้างขึ้นในทันทีที่สปอร์เริ่มงอก

4.ชนิดหัวเชื้อไม่มีผลต่อระยะเวลาและปริมาณในการผลิต FOS โดยหัวเชื้อชนิดสปอร์งอกและชนิดสปอร์แขวนลอย ให้ผลผลิต FOS และระยะเวลาในการผลิตไล่เลี่ยกัน แต่การใช้หัวเชื้อปริมาณมาก จะให้การผลิต FOS ได้เร็วกว่าปริมาณหัวเชื้อน้อย และหัวเชื้อชนิดสปอร์แขวนลอยปริมาณ ~2 x 10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ให้การเติบโตดี ผลิต FOS ได้มากและเร็วกว่าชนิดและปริมาณหัวเชื้ออื่น คือ ผลิต FOSรวม ได้ 53.9 กรัมต่อลิตร ใน 12 ชั่วโมง

5.อัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนมีผลต่อทั้งการเติบโตและการผลิต FOS โดยอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีค่าต่ำ จะให้การเติบโตที่ดีกว่า แต่การผลิตต้องการอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนค่าที่เหมาะสม คือ 145 : 1.0 ซึ่งผลิต FOS ได้มากและเร็วที่สุด เนื่องจากมีความสมดุลระหว่างการเติบโตและการผลิต

6.ความเข้มข้นของน้ำตาลทรายมีผลต่อการผลิต FOS และการเติบโต โดยการทดลองที่ใช้น้ำตาลทรายสูงถึง 250 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิต FOS สูงเท่ากับ 138.81 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง คิดเป็นร้อยละ 55.52 เมื่อเทียบกับน้ำตาลทรายตั้งต้น ซึ่งมีความคุ้มค่ากับปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปมากที่สุด

7.ค่าพีเอชมีผลต่อทั้งการเติบโตและการผลิต FOS โดยการจัดค่าพีเอชตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อและการควบคุมค่าพีเอชตลอดการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 5.0 ช่วยส่งเสริมให้ผลิต FOS มากและเร็วที่สุดคือ 154.44 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 16 และ 157.44 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 20 ตามลำดับ และยังมีอัตราการผลิตสูงที่สุดเท่ากับ 9.65 และ 7.87 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

8.อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงมีผลต่อการเติบโตและการผลิต FOS โดยอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้การเติบโตดีที่สุด ผลิต FOSรวม สูงที่สุด เท่ากับ 154.95 กรัมต่อลิตร ให้อัตราการผลิตและ Yp/s สูงที่สุดคือ 7.74 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.69 ตามลำดับ

9.ค่าออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเติบโตและการผลิตFOS โดยปริมาณออกซิเจนละลายมาก ให้การเติบโตดี ส่งผลให้ผลิต FOS อย่างรวดเร็ว และค่าออกซิเจนละลาย 80 เปอร์เซ็นต์ของค่าอากาศอิ่มตัว ให้การเติบโตสูงทำให้ผลิต FOSรวม ได้เร็วที่สุด คือ 139.2 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 14 อัตราการผลิตเท่ากับ 9.94 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และให้ค่า Yp/s และ Yp/x สูงที่สุด คือ 0.61 และ 81.88 ตามลำดับ

10.เมื่อปรับปรุงกระบวนการผลิต FOS ด้วยการเพิ่มอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิต ทำให้สามารถเพิ่มปริมาณสารตั้งต้นที่ใช้ในการผลิตและให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นอย่างคุ้มค่า คือให้ผลผลิต FOSรวม เพิ่มขึ้นถึง 35 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้น 50 กรัมต่อลิตร

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการทดลองเปรียบเทียบการผลิต FOS ในขวดเขย่าและขวดที่ไม่มีการเขย่า พบว่าให้ปริมาณ FOSรวม ไล่เลี่ยกัน แต่การผลิตโดยมีการเขย่าใช้ระยะเวลาในการผลิตเร็วกว่ามาก เนื่องจากการเขย่าทำให้มีการเติบโตดีและรวดเร็ว ดังนั้น FOS ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิจึงมีการสร้างได้เร็วตามการเติบโตไปด้วย โดยการผลิตที่มีการเขย่าให้ผลผลิตสูงสุดในเวลาเพียง 24 ชั่วโมง ซึ่งเร็วมากเมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์อื่นที่ผลิตโดยราซึ่งมักใช้เวลาอย่างน้อย 3 วันขึ้นไป ดังตัวอย่างเช่นการผลิตซิตาโคนิกในถังหมักจาก *Aspergillus terreus* โดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าให้ผลผลิตกรดสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง (Okabeและคณะ ,1993) อีกประการหนึ่งคือในการผลิตโดยไม่มีการเขย่า สายใยมีการเจริญที่ผิวหน้าอาหารโดยไม่มีการสร้างสปอร์ จึงไม่สูญเสียอาหารไปกับการสร้างสปอร์ อีกทั้งการสร้างผลิตภัณฑ์ใดๆโดยราก็สร้างจากส่วนสายใย ดังนั้นเมื่อมีสายใยมากก็ทำให้ผลิต FOS ได้มากด้วย ทำให้สามารถผลิต FOSรวม ได้ในปริมาณสูงไล่เลี่ยกับการผลิตโดยมีการเขย่า นอกจากนี้จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอาหารสูตรนี้มีความเหมาะสมต่อการผลิต FOS ภายใต้ภาวะที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง ตรวจไม่พบน้ำตาลฟรักโตสจากการผลิตทั้งสองวิธี แต่ตรวจพบได้ในช่วงหลังโดยเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆตามเวลาการเพาะเลี้ยง เนื่องจากในช่วงแรกมีการผลิต FOS มาก น้ำตาลฟรักโตสจึงถูกใช้ไปเพื่อต่อเชื่อมกับโมเลกุลของน้ำตาลซูโครสหรือ FOS ชนิดเคสโตสจนหมด ได้ผลผลิตเป็น FOS ชนิดเคสโตสหรือนีสโตส ตามลำดับ และการที่ตรวจพบน้ำตาลฟรักโตสได้ในช่วงหลังของการเพาะเลี้ยง เนื่องจากมีการสร้าง FOS น้อยลง ประกอบกับอาจมีการสลาย FOS ด้วย ส่วนปริมาณน้ำตาลกลูโคสจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามเวลาการเพาะ

เลี้ยง เนื่องจากได้มาจากการสลายน้ำตาลซูโครสและไม่ได้ถูกใช้ไปเพื่อการผลิต FOS ซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงที่มีการสร้าง FOS มาก ถึงแม้ว่าจะมีบางส่วนถูกนำไปใช้ในการเติบโต ดังนั้นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลืออยู่จึงขึ้นกับการเติบโต การสลายน้ำตาลซูโครสและปริมาณ FOS ที่ผลิตขึ้น ถ้าการเติบโตมาก มีการใช้น้ำตาลกลูโคสมาก ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจะลดลง แต่ถ้าน้ำตาลกลูโคสที่เหลือมีมากกว่าที่นำไปใช้ในการเติบโตก็จะทำให้มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การที่ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีการผลิตเคสโตสก่อนนีสโตสเพราะในกลไกการสร้าง FOS จากน้ำตาลซูโครสนั้น ขั้นแรกจะมีเอนไซม์อินเวอเทสมาเร่งปฏิกิริยาการย่อยน้ำตาลซูโครสออกเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรักโตส และต่อมามีเอนไซม์ FT มาทำหน้าที่เคลื่อนย้ายน้ำตาลฟรักโตสไปเชื่อมกับน้ำตาลซูโครสอีกโมเลกุลหนึ่งเกิดเป็น FOS ชนิดเคสโตส และมีน้ำตาลกลูโคสเหลือในระบบ และต่อมามีการนำน้ำตาลฟรักโตส (จากการย่อยน้ำตาลซูโครสอีกโมเลกุลหนึ่งหรือจากการย่อย FOS ชนิดเคสโตส โมเลกุลอื่น) มาเชื่อมกับเคสโตสเกิดเป็น FOSชนิดนีสโตสและน้ำตาลกลูโคส นั่นคือในการสร้าง FOS จะต้องเกิดเป็นลำดับขั้นคือน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นสารตั้งต้นเริ่มแรกในการผลิตเชื่อมกับน้ำตาลฟรักโตสทีละ 1 โมเลกุล จึงทำให้มีการสร้าง FOS ชนิดเคสโตสก่อนนีสโตสเสมอ (Jung และคณะ,1989)

จากผลการหาการเติบโตเมื่อมีน้ำตาลซูโครส 50 และ 80 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าไม่พบระยะการเติบโตคงที่ ทั้งๆที่มีน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนเหลือน้อยมาก อาจเนื่องจากยังมีแหล่งไนโตรเจนเหลืออยู่ในระบบซึ่งอาจมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อหรือได้จากการที่เซลที่มีอายุมากตายและแตกสลายจึงปล่อยองค์ประกอบต่างๆในเซลออกมาซึ่งใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้อีก และมีการสลาย FOS โดยเอนไซม์ FT ที่ทำหน้าที่สลาย FOS (หน้าที่ Uh) ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรักโตส ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเติบโตต่อไปได้

จากการทดลองศึกษาผลของชนิดและปริมาณหัวเชื้อที่มีต่อการผลิต FOS โดยแปรผันปริมาณหัวเชื้อต่างๆ ของหัวเชื้อ 2 ชนิดคือหัวเชื้อชนิดสปอร์งอกและสปอร์แขวนลอย พบว่าหัวเชื้อสปอร์แขวนลอยปริมาณ ~2 x 10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ผลิต FOS ได้มากและเร็วกว่าชนิดและปริมาณหัวเชื้ออื่น ดังนั้นจึงเป็นข้อดีของจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้ที่ผลิต FOSได้ตั้งแต่สปอร์เริ่มงอก

ในการผลิต FOS โดยใช้หัวเชื้อ 2 ชนิดดังกล่าว พบว่ามีขนาดของเพลเล็ทต่างกัน คือหัวเชื้อชนิดสปอร์งอกมีขนาดของเพลเล็ทใหญ่กว่าหัวเชื้อสปอร์แขวนลอย และจะเห็นได้ว่าสำหรับหัวเชื้อชนิดสปอร์งอก เมื่อปริมาณหัวเชื้อมากขึ้น ประสิทธิภาพของสายใยในการผลิต FOS รวม (Yp/x) ไม่ได้เพิ่มตาม ปริมาณหัวเชื้อน้อยสายใยกลับมีประสิทธิภาพดีกว่า อาจเนื่องจากปริมาณหัวเชื้อมาก เพลเล็ทยิ่งมีขนาดใหญ่ทำให้มีพื้นผิวสัมผัสระหว่างสารอาหารและอากาศไม่ดีเท่าเพลเล็ทขนาดเล็ก จึงน่าจะผลิตเอนไซม์ FT ได้ไม่ดีเท่าที่ควร ย่อมผลิต FOS ได้น้อย ทำให้ประสิทธิภาพสายใยในการผลิต FOS ต่ำ ขณะที่หัวเชื้อสปอร์แขวนลอย ถึงแม้ปริมาณหัวเชื้อ

มาก แต่มีขนาดของเพลเล็ทเล็กกว่าหัวเชื้อสปอร์งอกมาก จึงมีพื้นผิวสัมผัสกันของสารอาหารและอากาศอย่างทั่วถึง ทำให้ผลิตเอนไซม์มากเป็นเหตุให้หัวเชื้อสปอร์แขวนลอย ปริมาณหัวเชื้อมากยิ่งมีค่า Yp/x มาก

จากการศึกษาผลของอัตราส่วนระหว่างแหล่งคาร์บอนต่อไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิต FOS โดยแปรผันอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 145 : 0.5 145 : 1.0 145 : 1.5 และ 145 : 2.0 พบว่าถ้ามีปริมาณไนโตรเจนมาก มีแนวโน้มในการเติบโตมากกว่าการผลิต ส่งผลให้ได้ผลผลิตต่ำ แต่ถ้าปริมาณไนโตรเจนน้อย คืออัตราส่วน 145 : 0.5 ให้การเติบโตน้อย อาจทำให้สร้างเอนไซม์ FT สำหรับผลิต FOS น้อยตามไปด้วย ส่งผลให้ผลิต FOSช้า โดยให้ปริมาณ FOSรวม ไล่เลี่ยกับอัตราส่วน 145 : 1.5 และ 145 : 2.0 ดังนั้นอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่มีปริมาณไนโตรเจนมากหรือน้อยเกินไปไม่เหมาะต่อการผลิต เพราะฉะนั้นในการผลิต FOS ให้ได้ปริมาณมาก จำเป็นต้องจัดอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนให้เกิดความสมดุลระหว่างการเติบโตและการผลิต ซึ่งพบว่าอัตราส่วน 145 : 1.0 เป็นอัตราส่วนที่มีความเหมาะสมในการผลิต FOS มากที่สุด โดยมีการเติบโตพอเหมาะ ทำให้ผลิต FOSรวม มากและเร็วที่สุด ทำให้มีการใช้อาหารอย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้พบว่าอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจนต่ำ (ปริมาณไนโตรเจนมาก) ซึ่งให้การเติบโตมากนั้นค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็ว โดยมีค่าพีเอชต่ำกว่าอัตราส่วนให้การเติบโตน้อย คาดว่าเนื่องจากสารเมตาโบไลต์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นในระหว่างการเติบโตซึ่งมีปริมาณมากและมีความเป็นกรด จึงให้ค่าพีเอชลดลง (Riviere, 1977)

ในงานวิจัยนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งวิตามินและปัจจัยเสริมการเติบโตซึ่งน่าจะมีความจำเป็นต่อการเติบโตและการผลิต FOS โดยพบเหตุการณ์แบบเดียวกันนี้จากงานวิจัยของ Chen และคณะ (1996) ซึ่งพบว่าในการเพาะเลี้ยง *A. japonicus* ให้ผลิตเอนไซม์ฟรักโตฟิวแรนโนซิเดส (เอนไซม์ FF) ได้มากที่สุดนอกจากแหล่งไนโตรเจนคือโซเดียมไนเตรตที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วยังจำเป็นต้องมีสารสกัดจากยีสต์เป็นองค์ประกอบด้วย นอกจากนี้จากงานวิจัยของ มาริสา กรแก้ว (2543) ซึ่งผลิต FOS จาก *Penicillium* sp. H12 โดยเติมและไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าถ้าไม่มีสารสกัดจากยีสต์ จะให้ผลผลิต FOS ต่ำมาก ดังนั้นจึงมีความสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ซึ่งผลิต FOS โดยมีสารสกัดจากยีสต์เป็นองค์ประกอบหนึ่งในอาหารเลี้ยงเชื้อนอกจากแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน ดังนั้นจึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ช่วยทำให้ส่งเสริมให้ผลิต FOS ได้ดี เนื่องจากมีวิตามินและปัจจัยเสริมการเติบโตเพียงพอ

การศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลทรายที่มีต่อการผลิต FOS พบว่าการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 300 กรัมต่อลิตร มีการเติบโตต่ำกว่าการทดลองที่ใช้น้ำตาล

ทราย 250 กรัมต่อลิตร อาจเนื่องจากความเข้มข้นของน้ำตาลทรายสูงเกินไป มีแรงดันออสโมติกสูง จุลินทรีย์มีการสูญเสียน้ำออกจากเซล กระบวนการเมตาโบลิซึมลดลง ทำให้มีการเติบโตลดลง (Tortoraและคณะ, 1992) จึงผลิต FOS ได้ไม่ดีเท่าที่ควร และที่ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 300 กรัมต่อลิตรนี้ มีการใช้น้ำตาลซูโครสมากกว่าแต่มีร้อยละ FOSรวม ต่ำกว่าการทดลองที่ใช้น้ำตาลทราย 250 กรัมต่อลิตร คือให้ผลผลิตไม่คุ้มค่ากับน้ำตาลที่เพิ่มขึ้น โดยมีค่า Yp/s ต่ำ เนื่องจากการที่มีแรงดันออสโมติกสูง จุลินทรีย์ต้องมีการปรับตัวเพื่อให้ทนต่อแรงดันออสโมติกได้ โดยการนำน้ำตาลซูโครสไปผลิตผลิตภัณฑ์อื่น เพื่อลดความเข้มข้นของน้ำตาลลง เช่นผลิตกลีเซอรอลเพื่อเป็นตัวควบคุมแรงดันออสโมติกภายในเซล (Griffinและคณะ ,1994) การทดลองที่ใช้น้ำตาลทรายตั้งต้น 100 กรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพในการผลิต FOSรวม (Yp/x) สูงกว่าการทดลองที่ใช้น้ำตาลทราย 250 และ 300 กรัมต่อลิตร อาจเนื่องจากการทดลองที่ใช้น้ำตาลทราย 100 กรัมต่อลิตร มีการเติบโตน้อย ไม่มีความแออัดของสายใย ทำให้ได้รับอาหารและปริมาณออกซิเจนอย่างทั่วถึง จึงผลิต FOS อย่างมีประสิทธิภาพ แต่มีร้อยละผลผลิต FOSรวม ต่ำกว่าการทดลองที่ใช้น้ำตาลทราย 250 และ 300 กรัมต่อลิตร เนื่องจากมีปริมาณแหล่งคาร์บอนในการผลิตน้อย

สำหรับการผลิตเคสโตส จากการทดลองที่ใช้น้ำตาลทราย 300 กรัมต่อลิตร ผลิตเคสโตสมากที่สุด ทั้งๆที่มีการเติบโตไม่ได้มากที่สุดอาจเนื่องจากการเติบโตดังกล่าวเพียงพอต่อการผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในการผลิต FOS ดังนั้นเมื่อมีน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นสารตั้งต้นโดยตรงในการผลิตเคสโตสมาก ก็ย่อมผลิตเคสโตสได้มากขึ้น อีกประการหนึ่งคือความเข้มข้นน้ำตาลทรายที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิต FOS อาจไม่ใช่ความเข้มข้นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jung และคณะ (1987) โดยศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ FT จาก *Aureobasidium pullulans* ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ จุลินทรีย์มีการเติบโตดีที่สุด แต่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ทำให้มีการผลิตเอนไซม์ FT มากที่สุดคือ 25 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าปัจจัยสำคัญในการผลิตเอนไซม์คือความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน นั่นคือผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น ถ้าความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสสูงขึ้น ถึงแม้จะไม่ใช่ภาวะที่ให้การเติบโตดีที่สุด ซึ่งในงานวิจัยนี้ความเข้มข้นของน้ำตาลทรายที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิต FOS ก็ไม่ใช่ความเข้มข้นเดียวกันเช่นกัน และเนื่องจากการผลิตเคสโตสขึ้นกับปริมาณน้ำตาลซูโครสตั้งต้นโดยตรง ทั้งในแง่ปริมาณและการสลายน้ำตาลซูโครส ถ้ามีปริมาณน้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเคสโตสมากและมีการสลายน้ำตาลซูโครสมากพอที่จะมีน้ำตาลฟรักโตสมาเชื่อมกับน้ำตาลซูโครสเพื่อผลิตเคสโตสมากด้วย ดังเช่นการทดลองที่ใช้น้ำตาลทราย 300 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นน้ำตาลมากที่สุด ก็ให้ผลผลิตเคสโตสได้มากที่สุดด้วย การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารตั้งต้นมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ ดังเช่นกรณีการผลิตเคสโตสนั้น น้ำตาลซูโครสถือเป็นสารตั้งต้นโดยตรง ถ้ามี

ปริมาณน้ำตาลซูโครสมากย่อมให้ผลผลิตได้สูงตามด้วยและต้องมีเอนไซม์ FT เพียงพอ แต่ FOS รวม เป็นผลรวมของเคสโตสและนีสโตส ดังนั้นผลกระทบของน้ำตาลทรายต่อการผลิต FOSรวม และเคสโตสจึงต่างกันได้ ในงานวิจัยนี้ความเข้มข้นน้ำตาลทราย 250 กรัมต่อลิตรให้ผลผลิต FOSรวม สูงถึง 138.81 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 16 ซึ่งคุ้มค่ากับน้ำตาลซูโครสที่ใช้ไปมากที่สุด คิดเป็นผลผลิต FOSรวม ต่อการผลิต 1 ครั้ง เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสตั้งต้น 100 กรัมต่อลิตรในเวลา 1 ชั่วโมง เท่ากับ 3.47 กรัม

จากงานวิจัยของ Takeda และคณะ (1994) ผลิต FOS ชนิดเคสโตสได้ 95.6 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 จากการเพาะเลี้ยง *Scopulariopsis brevicaulis* โดยใช้น้ำตาลซูโครส 150 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน (คิดเป็นผลผลิตเคสโตสต่อการผลิต 1 ครั้งเมื่อใช้น้ำตาลซูโครส 100 กรัมต่อลิตรในเวลา 1 ชั่วโมงเท่ากับ 0.89 กรัม) และเมื่อเปรียบเทียบการผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์ ตัวอย่างเช่นงานวิจัยของ Balken และคณะ (1991) ใช้เอนไซม์ FT จาก *Aspergillus phoenicis* ทำปฏิกริยากับน้ำตาลซูโครส 750 กรัมต่อลิตร ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าผลิตเคสโตสเป็นผลผลิตหลัก 300 กรัมต่อลิตรหลังจากชั่วโมงที่ 18 (คิดเป็นผลผลิตเคสโตสต่อการผลิต 1 ครั้ง เมื่อใช้น้ำตาลซูโครส 100 กรัมต่อลิตรในเวลา 1 ชั่วโมง เท่ากับ 2.22 กรัม) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยนี้พบว่า *Penicillium* sp. H12 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ให้ผลผลิต FOS เป็นที่น่าพอใจ เนื่องจากผลิต FOS ได้ในระยะเวลารวดเร็วที่สุด (16 ชั่วโมง) รวมทั้งใช้สารตั้งต้นในแต่ละครั้งของการผลิตได้สูงกว่างานวิจัยอื่นๆ จึงทำให้ผลผลิต FOSรวม ต่อการผลิต 1 ครั้งสูงกว่างานวิจัยอื่นด้วย ซึ่งทำให้สามารถลดต้นทุนการผลิตได้มากกว่าทั้งในแง่พลังงาน การสึกหรอของเครื่องมือ และประหยัดเวลาในการผลิต จึงให้ผลกำไรได้เร็วกว่า

จากการศึกษาผลของค่าพีเอชตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการผลิต FOS เมื่อแปรผันค่าพีเอชตั้งต้นต่างๆ เท่ากับ 4.0 5.0 6.0 และ 7.0 พบว่าการทดลองที่จัดค่าพีเอชตั้งต้น 5.0 ผลิตเคสโตส นีสโตสและ FOSรวม ได้มากและเร็วที่สุด ซึ่งหมายถึงพีเอชตั้งต้น 5.0 เป็นค่าพีเอชที่เหมาะสมระหว่างการเติบโตและการผลิต FOS ถึงแม้ในระหว่างการเติบโตค่าพีเอชลดลงเรื่อยๆ แต่การลดลงของค่าพีเอชจากพีเอชตั้งต้นที่จัดไว้ ทำให้เกิดสมดุลต่อทั้งการเติบโตและการทำงานของเอนไซม์ FT คือค่าพีเอช 5.0 ให้การเติบโตเพียงพอที่จะผลิตเอนไซม์และเป็นค่าพีเอชที่เอนไซม์ FT ยังสามารถทำงานได้ การจัดค่าพีเอชตั้งต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากสามารถควบคุมปริมาณและระยะเวลาในการผลิต FOS แล้วยังสามารถกำหนดสัดส่วนของ FOS ที่ผลิตขึ้นได้อีกด้วย โดยการจัดค่าพีเอชตั้งต้น 5.0 ผลิต FOSรวม ได้สูงและใช้ระยะเวลาในการผลิตเร็ว แต่ถ้าจัดค่าพีเอชตั้งต้น 4.0 จะได้ FOS ที่มีสัดส่วนของเคสโตสสูง แต่จากงานวิจัยของ Takeda และคณะ (1994) พบว่า ค่าพีเอชตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเคสโตส โดยเพาะเลี้ยง

Scopulariopsis brevicaulis คือ 7.0 ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยนี้อาจเนื่องจากจุลินทรีย์ต่างสายพันธุ์กัน

จากผลของการควบคุมค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดการทดลอง พบว่าการคุมค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 ให้ผลผลิต FOS สูงที่สุด ดังนั้นค่าพีเอชนี้น่าจะมีความเหมาะสมต่อผลรวมของการเติบโต การทำงานของเอนไซม์อินเวอเทสและ FT มากที่สุด จึงให้ผลผลิต FOSรวมมากที่สุด ซึ่งใกล้เคียงกับค่าพีเอชที่มีผู้รายงานว่าเหมาะต่อการผลิต FOS ดังเช่นจากงานวิจัยของ Yun และคณะ (1990) ผลิต FOS โดยการใช้สายใยตรึงของ *Aureobasidium pullulans* โดยควบคุมค่าพีเอชตลอดการทดลองเท่ากับ 5.5 ซึ่งเป็นค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิต FOS จากงานวิจัยของ Barthomeuf และคณะ (1995) ผลิต FOS โดยใช้เอนไซม์ FT จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์จาก *Penicillium rugulosum* โดยควบคุมพีเอชเท่ากับ 5.5 ซึ่งเหมาะสม และ Jang และคณะ (1996) พบว่าปฏิกริยาทรานฟรักโตซิลเลชั่นของเอนไซม์ FT จาก *Penicillium roquefortii* เกิดได้ดีที่พีเอช 5.0 - 6.0 แต่ Kurakake และคณะ (1996) รายงานว่าค่าพีเอชที่เกิดปฏิกริยาทรานฟรักโตซิลเลชั่นของเอนไซม์ FT จาก *A. oryzae* ได้ดีที่สุดคือ 8.0 และค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำหน้าที่สลาย FOS คือ 5.0 ซึ่งค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ FT น่าจะขึ้นกับว่าเอนไซม์นั้นมาจากแหล่งจุลินทรีย์ต่างๆกัน ย่อมต้องการค่าพีเอชที่แตกต่างกันด้วย

จากผลการทดลองคุมค่าพีเอชตั้งต้นและการควบคุมค่าพีเอชตลอดการทดลอง พบว่าค่าพีเอชตั้งต้น 7.0 เหมาะต่อการเติบโตของ *Penicillium* sp. H12 โดยให้การเติบโตดีที่สุด แต่ผลิต FOSรวม ได้ดีที่สุดที่พีเอช 5.0 เพราะมีความสมดุลระหว่างการเติบโตและการผลิต ส่วนการควบคุมค่าพีเอชมีผลต่อการเติบโตไม่แตกต่างกัน โดยทุกการทดลองให้การเติบโตไล่เลี่ยกัน แต่การควบคุมค่าพีเอช 5.0 ผลิต FOS ได้ดีที่สุด เพราะน่าจะเหมาะสมต่อผลรวมของการเติบโต การทำงานของเอนไซม์อินเวอเทสและ FT

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิต FOS พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการเติบโตและการผลิต FOS โดยการทดลองเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้การเติบโตดีที่สุด ส่งผลให้ผลิต FOSรวม ได้สูงที่สุด จึงน่าจะเป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์ FT ทำงานได้ดีด้วย ส่วนการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ไม่สามารถเติบโตได้ ที่อุณหภูมิ 35 และ 25 องศาเซลเซียส ให้การเติบโตรองลงมาตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าความต้องการอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อทั้งการเติบโตและการผลิต FOS มีความจำเพาะเจาะจงสำหรับแต่ละสายพันธุ์ จำเป็นต้องมีการศึกษาให้ทราบ ดังเช่นงานวิจัยของ Takeda และคณะ (1994) พบว่าในการเพาะเลี้ยง *Scopulariopsis brevicaulis* อุณหภูมิที่ทำให้ผลิตเคสโตสสูงที่สุด คือ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับในงานวิจัยนี้ แต่จากงานวิจัย

ของ Yun และคณะ (1990) ใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในการผลิต FOS ด้วยเซลตรึงของ *Aureobasidium pullulans* และสำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ FT ในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์จาก *Penicillium rugulosum* คือ 55 องศาเซลเซียส (Barthomeuf และคณะ ,1995) ส่วน Jang และคณะ (1996) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมทรานฟรักโตซิลเลชั่นของเอนไซม์ FT จาก *Penicillium roquefortii* คืออุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาผลของออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิต FOS โดยแปรผันออกซิเจนละลาย 100 80 60 และ 40 เปอร์เซ็นต์ของค่าอากาศอิ่มตัว พบว่าไม่สามารถแสดงผลการทดลองที่ถูกต้องได้โดยใช้ปริมาณออกซิเจนละลาย 100 เปอร์เซ็นต์ของค่าอากาศอิ่มตัวได้ เนื่องจากมีการกวนและให้อากาศรุนแรงทำให้มีการกระเด็นของสายใยมาติดที่ข้างถังมาก ตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์หาการเติบโต การผลิต FOS จึงไม่ใช่ค่าที่แท้จริง และการที่ภายในถังมีความพลุ่งพล่านมากอาจทำให้อากาศผ่านออกไปอย่างรวดเร็ว โดยที่จุลินทรีย์ไม่สามารถนำอากาศไปใช้ได้ทัน โดยจะเห็นได้ว่ามีค่าออกซิเจนละลายลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากถังหมักนี้มีระยะเวลาในการที่อากาศอยู่ในถัง (holding time) สั้น ดังนั้นจึงไม่สามารถผลิต FOS ได้โดยจัดปริมาณออกซิเจนละลายเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ของค่าอากาศอิ่มตัวกับถังหมักนี้ได้

ปริมาณออกซิเจนละลาย 80 เปอร์เซ็นต์ของค่าอากาศอิ่มตัว ให้ผลผลิต FOS รวดเร็วที่สุด และมีอัตราการผลิตสูงที่สุด เนื่องจาก FOS เป็นผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นทันทีที่มีการเติบโต ดังนั้นปริมาณออกซิเจนละลาย 80 เปอร์เซ็นต์ของค่าอากาศอิ่มตัว ซึ่งให้การเติบโตสูง ปริมาณเอนไซม์ในการผลิตมากจึงทำให้ผลิต FOS เร็วที่สุด

จากผลการศึกษาปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิต FOS โดย *Penicillium* sp. H12 จะเห็นได้ว่าทุกปัจจัยที่เลือกมาศึกษาในงานวิจัยนี้มีความสำคัญต่อการผลิต FOS ทั้งสิ้น และถ้าจัดค่าต่างๆ เหล่านั้นให้เหมาะสมก็สามารถเพิ่มผลผลิตได้ ดังสรุปผลของปัจจัยต่างๆที่มีต่อการผลิต FOS ในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 สรุปผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีต่อการผลิต FOS โดย *Penicillium* sp. H12

ปัจจัย	ผลกระทบของปัจจัย		ค่าที่เหมาะสม	ผลผลิต FOSรวม		
	ทางตรง	ทางอ้อม		ปริมาณ (ก/ล)	เวลา* (ชม.)	อัตราการผลิต (ก/ล/ชม.)
<u>ก่อนจัดปัจจัย</u>						
ผลิตในขวดที่มีการเขย่า	การเติบโต	การผลิต	-	41.61	24	1.73

ตารางที่ 13 (ต่อ)

ปัจจัย	ผลกระทบของปัจจัย		ค่าที่เหมาะสม	ผลผลิต FOSรวม		
	ทางตรง	ทางอ้อม		ปริมาณ (ก/ล)	เวลา * (ชม.)	อัตราการผลิต (ก/ล/ชม.)
หลังจัดปัจจัย ใช้ภาวะข้างต้นในการผลิต FOS และจัดอัตราส่วนระหว่างคาร์บอนต่อไนโตรเจน	การเติบโต	การผลิต	145 : 1.0	53.9	12	4.49
ใช้ภาวะข้างต้นและจัดความเข้มข้นของน้ำตาลทราย (ก/ล)	การผลิตและการเติบโต	-	250	138.81	16	8.68
ใช้ภาวะข้างต้นและจัดค่าพีเอชตั้งต้น	การผลิตและการเติบโต	-	5.0	154.44	16	9.65
ใช้ภาวะข้างต้นและจัดค่าพีเอชที่ควบคุมตลอดการทดลอง **	การผลิตและการเติบโต	-	5.0	157.44	20	7.87
ใช้ภาวะข้างต้นและจัดอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง (±2 องศาเซลเซียส)	การเติบโตและการผลิต	-	30	154.95	20	7.74
ใช้ภาวะข้างต้นและจัดออกซิเจนละลาย *** (เปอร์เซ็นต์ของค่าอากาศอิ่มตัว)	การเติบโต	การผลิต	80	139.2	14	9.94

หมายเหตุ * หมายถึงชั่วโมงที่ให้ผลผลิต FOSรวม สูงสุด

** ใช้อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 30 ± 2 องศาเซลเซียส

*** ผลิต FOS ในถังหมัก

จากตารางที่ 13 เมื่อจัดปัจจัยต่างให้เหมาะสมแล้ว พบว่าให้ผลผลิต FOSรวม เพิ่มขึ้นเป็นที่น่าพอใจ โดยก่อนจัดปัจจัยใช้น้ำตาลซูโครส 100 กรัมต่อลิตรเป็นสารตั้งต้นในการผลิต FOS ให้ผลผลิตเพียง 41.61 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 แต่หลังจัดปัจจัยต่างๆให้เหมาะสมแล้วสามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้สูงถึง 250 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด คือ

139.2 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 14 รวมทั้งมีอัตราการผลิตเพิ่มขึ้นเท่ากับ 9.94 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง นั่นคือใช้น้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้นอีก 150 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นถึง 97.59 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ทำให้สามารถรู้ค่าที่เหมาะสมของปัจจัยต่างๆซึ่งใช้เป็นแนวทางในการจัดค่าต่างๆ สำหรับการขยายส่วนผลิตต่อไปได้

แต่อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลทรายที่มีต่อการผลิต FOS ชี้ให้เห็นว่าถ้าเพิ่มน้ำตาลทรายสูงกว่า 250 กรัมต่อลิตรเป็น 300 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นแต่ไม่คุ้มค่ากับปริมาณน้ำตาลทรายที่เพิ่มขึ้น จึงมีแนวคิดว่าน่าจะมีการปรับปรุงการผลิตโดยค่อยๆเพิ่มปริมาณน้ำตาลทรายในระหว่างการผลิต ซึ่งอาจช่วยเพิ่มผลผลิต FOS ได้ ดังนั้นจึงได้มีการทดลองเพิ่มเติมนอกเหนือจากโครงร่างวิทยานิพนธ์ที่เสนอไว้ คือการปรับปรุงการผลิต FOS ด้วยการเพิ่มอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการผลิต เพื่อดูว่ามีผลต่อปริมาณ FOS อย่างไร ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นวิธีหนึ่งที่ช่วยให้ผลิต FOS ได้มากขึ้นเพื่อลดต้นทุนการผลิต

จากการทดลองปรับปรุงการผลิต FOS ในอาหารเหลวด้วยการเพิ่มอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการผลิต พบว่านอกจากจะช่วยทำให้สามารถเพิ่มปริมาณสารตั้งต้นต่อการผลิตแต่ละครั้งได้แล้ว ยังทำให้ได้ผลผลิต FOS ต่อการผลิตแต่ละครั้งเพิ่มขึ้นอย่างคุ้มค่าอีกด้วย ซึ่งทำให้ลดต้นทุนการผลิตได้ เหตุที่เป็นเช่นนี้เพราะการเพิ่มอาหารเป็นการเพิ่มแหล่งคาร์บอน คือน้ำตาลซูโครส ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเคสโตส จึงทำให้ผลิตเคสโตสได้เพิ่มขึ้น เมื่อมีเคสโตสมากก็ทำให้ผลิตนีสโตสได้มากด้วย ดังนั้นผลผลิต FOSรวม จึงสูงขึ้นเช่นกัน ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hidaka และคณะ (1988) พบว่าเมื่อมีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้นสูง เอนไซม์ FT จะทำหน้าที่นำน้ำตาลฟรักโตสมาเชื่อมกับน้ำตาลซูโครสเพื่อผลิต FOS ได้มากกว่าการสลายจึงทำให้ FOS เพิ่มขึ้น และมีผู้รายงานว่าเอนไซม์ FT ในข้าวบาเล่ย์เป็นเอนไซม์เหนี่ยวนำได้ คือ ต้องมีสารตั้งต้นมากระตุ้นให้เกิดการสร้างเอนไซม์ (อ้างถึง Simmen และคณะ, 1993) จากงานวิจัยของ Chen ในปี ค.ศ.1995 มีแนวคิดว่าการที่จะรักษาให้ *A. japonicus* ยังคงผลิตเอนไซม์ FF ในปริมาณมากจะต้องมีตัวเหนี่ยวนำที่เพียงพอ จึงเติมน้ำตาลซูโครสลงไปในระหว่างการเพาะเลี้ยง พบว่าการเติมน้ำตาลซูโครสลงไปจนมีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสรวม 26.6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทำให้ผลิตเอนไซม์ FF เพิ่มขึ้นกว่าการทดลองที่ไม่เพิ่มน้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการเติมน้ำตาลซูโครส ช่วยลดผลของความเข้มข้นของน้ำตาลสูงเกินไปจนยับยั้งการเติบโต อีกทั้งยังเป็นการเจือจางสารต่างๆ จึงช่วยลดความหนืดของสารในระบบ รวมทั้งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายเทมวลสารได้ ซึ่งน่าจะสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ ที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสขึ้นด้วยการเพิ่มอาหารเลี้ยงเชื้อก็ทำให้ผลผลิต FOS เพิ่มขึ้นเช่นกัน

จากตัวอย่างโครมาโตแกรมแสดงชนิดของผลิตภัณฑ์ต่างๆที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) พบ

ว่ามีพีคของผลิตภัณฑ์ที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ 2 พีค โดยพีคแรกปรากฏอยู่ระหว่างน้ำตาลซูโครส และ FOS ชนิดเคสโตส (1-เคสโตส) ซึ่งคาดว่าเป็น 6-เคสโตส ซึ่งเป็นเคสโตสอีกชนิดหนึ่งที่ภายในโมเลกุลต่อเชื่อมด้วยพันธะบีตา (2→6) ซึ่งจากรายงานของ Barthomeuf และคณะในปี ค.ศ. 1997 ได้รายงานถึงโครมาโตแกรมและระยะเวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของสารต่างๆ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง โดยคอลัมน์ Capcell pack ขนาดความยาว 25 เซนติเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 3.9 มิลลิเมตร โดยมีน้ำเป็นสารละลายตัวพา อุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง ตรวจผลโดย 168 diod array detector ความยาวคลื่น 190 นาโนเมตร โดยรายงานว่า 6 - เคสโตส และ 1 – เคสโตส มีระยะเวลาอยู่ในคอลัมน์นาน 3.42 นาที และ 5.45 นาทีตามลำดับ จะเห็นได้ว่า 1- เคสโตสมีระยะเวลาอยู่ในคอลัมน์นานกว่า นอกจากนี้พีคที่ไม่สามารถระบุชนิดได้พีคที่ 2 ปรากฏอยู่หลังพีคของ FOS ชนิดนีสโตส มีเวลาอยู่ในคอลัมน์นานกว่านีสโตส คาดว่าเป็น FOS ชนิดฟรักโตฟิวแรนโนซิลนีสโตส (FFN) ซึ่งเป็น FOS ชนิดหนึ่งที่มีดีกรีของการโพลีเมอไรเซชั่นสูงกว่า FOS ชนิดนีสโตส ซึ่งจากรายงานของ Barthomeuf พบว่ามีระยะเวลาอยู่ในคอลัมน์นาน 23.32 นาที ซึ่งนานกว่า FOS ชนิดนีสโตสซึ่งมีเวลาอยู่ในคอลัมน์เพียง 10.02 นาที ซึ่งน่าจะสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ แต่จะเห็นได้ว่าเมื่อมาวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้ระยะเวลาที่อยู่ในคอลัมน์อาจคลาดเคลื่อนไปเพราะใช้สภาวะในการวิเคราะห์ต่างกัน แต่ลำดับของพีคที่ปรากฏเป็นไปในแนวทางเดียวกัน

จากผลการทดลองทุกๆ การทดลอง จะมีรูปแบบในการผลิตเคสโตสและนีสโตสคล้ายคลึงกัน คือมีการผลิต FOS ชนิดเคสโตสขึ้นเป็นอันดับแรก ต่อมาจึงตรวจพบ FOS ชนิดนีสโตสและปริมาณนีสโตสที่ผลิตได้น้อยกว่าปริมาณเคสโตสเสมอ โดยค่อยๆผลิตขึ้นทีละน้อยไม่ผลิตเร็วเหมือนการผลิตเคสโตส อาจเป็นเพราะเอนไซม์ FT จาก *Penicillium* sp. H12 ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ มีเอนไซม์ย่อยอีก 2 ชนิด คือเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกริยาการสร้างเคสโตส และเอนไซม์ที่เร่งปฏิกริยาการสร้างนีสโตส ดังเช่นเอนไซม์ FT ที่พบในพืช ซึ่งมีเอนไซม์ SST (sucrose – sucrose fructosyltransferase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกริยาการสร้างเคสโตส และเอนไซม์ FFT (fructan – fructan fructosyltransferase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกริยาการสร้างนีสโตส (อ้างถึงใน Simmenและคณะ ,1993) โดยเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกริยาในการสร้างนีสโตส อาจมีความเร็วในการนำน้ำตาลฟรักโตสเข้ามาเชื่อมกับเคสโตสได้ช้ากว่าเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกริยาการสร้างเคสโตสที่นำน้ำตาลฟรักโตสเข้ามาเชื่อมกับน้ำตาลซูโครสได้ดีกว่า หรืออาจเนื่องจากเอนไซม์ FFT อาจเป็นเอนไซม์เหนี่ยวนำ คือ จะสร้างเอนไซม์ได้ต่อเมื่อมีเคสโตสปริมาณหนึ่งไปกระตุ้นให้สร้างเอนไซม์ขึ้น จึงทำให้นีสโตสถูกสร้างขึ้นทีหลังเคสโตส อีกทั้งมีรายงานว่าเอนไซม์ FFT ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกริยาการสร้างนีสโตสนั้นเป็นเอนไซม์ที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นตัวยับยั้งการทำงาน (อ้างถึงใน Caims ,1995) นั่นคือที่ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสสูง มีการผลิตนีสโตสน้อย และจากงานวิจัย

ของ Jung และคณะ (1989) ศึกษาจนศาสตร์ของเอนไซม์ FT จาก *Aureobasidium pullulans* โดยแปรผันสารตั้งต้นชนิดต่างๆ ว่ามีผลต่อการผลิต FOS อย่างไร พบว่าน้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้นที่ดีที่สุดเพราะผลิต FOS ได้มากที่สุด และเมื่อใช้สารตั้งต้นซึ่งมีโมเลกุลของน้ำตาลฟรักโตสในโมเลกุลสารตั้งต้นมากขึ้น ได้แก่ FOS ชนิดเคสโตส หรือ FOS ชนิดนีสโตส การผลิต FOS ยิ่งลดลงนั่นคือเอนไซม์ FT ทำหน้าที่เร่งปฏิกริยาได้ดีเมื่อสารตั้งต้นมีน้ำตาลฟรักโตสในโมเลกุลน้อย

และสังเกตได้ว่าในทุกการทดลองมีการผลิต FOS ตั้งแต่ช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง คือตั้งแต่สปอร์เริ่มงอก และมีปริมาณลดลง (ทั้ง FOSรวม FOSชนิดเคสโตส และ FOSชนิดนีสโตส) เมื่อเพาะเลี้ยงนานขึ้น อาจเนื่องจาก FOS เป็นผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นได้ในช่วงแรกของการเติบโตเท่านั้น หลังจากนั้นจะสลายไป และสำหรับราสายพันธุ์นี้ต้องตรวจเฉพาะในช่วง 0 - 30 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยงเท่านั้น หลังจากนั้นจะตรวจไม่พบ ซึ่งพบเหตุการณ์แบบนี้เหมือนกับงานวิจัยของ Novak และคณะ (1996) โดยเพาะเลี้ยง *Aspergillus niger* เพื่อผลิตกรดกลูโคนิกโดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน กรดกลูโคนิกเกิดจากปฏิกริยาออกซิเดชั่นของน้ำตาลกลูโคส ดังนั้นจะต้องมีการสลายน้ำตาลซูโครสออกเป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรักโตสก่อน และต้องมีน้ำตาลฟรักโตสเหลืออยู่ในระบบอยู่ครึ่งหนึ่งของน้ำตาลซูโครสที่ใช้ไป แต่จากการทดลองพบว่าใน 18 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง น้ำตาลฟรักโตสเหลืออยู่น้อยมากในขณะที่กรดกลูโคนิกแทบไม่มีการผลิตเลย ประกอบกับน้ำตาลซูโครสลดลงมาก เนื่องจากจุลินทรีย์นำน้ำตาลฟรักโตสและน้ำตาลซูโครสไปผลิต FOS และในช่วงท้ายของการเพาะเลี้ยง FOS จะสลายตัวไปมีเฉพาะกรดกลูโคนิกและน้ำตาลฟรักโตสในระบบ ซึ่งกรดกลูโคนิกยังคงผลิตได้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งงานวิจัยดังกล่าวสอดคล้องกับในงานวิจัยนี้ที่ FOS เป็นผลิตภัณฑ์ที่จะสร้างขึ้นในช่วงแรกๆ ของการเติบโต

ได้มีรายงานว่าน้ำตาลกลูโคสเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ FT (Jung และคณะ, 1989) แต่สำหรับงานวิจัยนี้ยังไม่พบบทบาทของน้ำตาลกลูโคสในแง่ยับยั้งการผลิต FOS เนื่องจากช่วงที่มีน้ำตาลกลูโคสสูงเป็นช่วงท้ายของการผลิต ซึ่งเป็นช่วงที่น้ำตาลซูโครสลดลงต่ำมากจนเกือบหมด ดังนั้นการที่มีการผลิตเคสโตสลดลงน่าจะมาจากการที่น้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตมีน้อยมากประกอบกับนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นต่อไปในการผลิตนีสโตส และในกรณีของการผลิตนีสโตส พบว่าในช่วงที่มีการผลิตนีสโตสอย่างรวดเร็วก็เป็นช่วงที่มีน้ำตาลกลูโคสในระบบสูงมากแต่การผลิตนีสโตสก็เป็นไปอย่างรวดเร็ว และในช่วงที่นีสโตสลดลงก็เป็นช่วงที่มีเคสโตสน้อย ทำให้การผลิตนีสโตสน้อยด้วย รวมทั้งเชื่อว่ามีการนำนีสโตสไปผลิตเป็นฟรักโตฟิว-แรนโนซิลนีสโตส (FFN) ต่อไป (ซึ่งมิได้ตรวจวัดเนื่องจากไม่มีสารมาตรฐาน FFN) การที่ไม่พบการยับยั้งการผลิต FOS อาจเป็นเพราะปริมาณน้ำตาลกลูโคสขนาดที่พบในระบบไม่มากพอที่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ FT ที่ผลิตโดย *Penicillium* sp.H12 สายพันธุ์นี้ก็ได้ ซึ่งสาเหตุหนึ่ง

อาจมาจากการที่จุลินทรีย์นำน้ำตาลกลูโคสไปใช้ในการเติบโตส่วนหนึ่งทำให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสไม่สูงพอที่จะยับยั้งการผลิต และถ้าเป็นเช่นนั้นก็ถือว่าเป็นสิ่งที่ดีเพราะทำให้มีการผลิต FOS โดยใช้น้ำตาลซูโครสตั้งต้นสูงได้ ซึ่งย่อมจะได้น้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ร่วมให้เหลือสูงด้วย แต่การที่น้ำตาลกลูโคสมีปริมาณมากก็ยังไม่ยับยั้งระบบในการผลิต FOS จึงทำให้ผลิต FOS เพิ่มมากขึ้น

ข้อเสนอแนะ

1.ในการศึกษาเพื่อปรับปรุงการผลิต FOS โดย *Penicillium* sp. H12 ด้วยการเพิ่มอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการผลิต น่าจะมีการศึกษาในแง่มุมต่างๆต่อไป เช่น ศึกษาถึงปริมาณน้ำตาลซูโครสและช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเติม รวมทั้งจำนวนครั้งที่เหมาะสมในการเติมอาหาร อันจะเป็นการประหยัดเวลาและช่วยลดต้นทุนและในการผลิตลงได้อีก

2. จากข้อเสนอแนะข้อ 1 ถ้าพบว่าการเพิ่มน้ำตาลซูโครสมากขึ้นจากการเพิ่มอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเป็นเหตุทำให้น้ำตาลกลูโคสเพิ่มมากจนแสดงผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ FT ก็ควรมีการทดลองแยกน้ำตาลกลูโคสออกจากระบบ ซึ่งอาจทำให้มีการผลิต FOS เพิ่มมากขึ้น โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟี หรืออาจเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ FT เช่น เติมเอนไซม์ที่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้นในการสร้างผลิตภัณฑ์อื่นที่แยกออกจากระบบได้ง่าย หรือใช้ จุลินทรีย์อีกสายพันธุ์เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Penicillium* sp.H12 โดยจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ควรจะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณค่าเพื่อความคุ้มค่าในการผลิตและไม่ส่งผลรบกวนต่อการผลิตFOS ซึ่งจะต้องมีการศึกษาถึงภาวะต่างๆให้เหมาะต่อการเพาะเลี้ยงร่วมกันต่อไป