การผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดย *Penicillium* sp. H12 ในการเลี้ยงแบบเฟดแบท

นาย วีระพงษ์ พรประสาทผล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2545

ISBN 974-17-1418-1

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

FRUCTOOLIGOSACCHARIDES PRODUCTION BY *Penicillium* sp. H12 IN FED-BATCH CULTURE

Mr Verapong Pornprasartpon

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2002
ISBN 974-17-1418-1

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดย *Penicillium* sp. H12 ในการเลี้ยงแบบเฟดแบท
โดย	นาย วีระพงษ์ พรประสาทผล
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วีระพงษ์ พรประสาทผล : การผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดย *Penicillium* sp. H12 ในการเลี้ยงแบบเฟดแบท (FRUCTOOLIGOSACCHARIDES PRODUCTION BY *Penicillium* sp. H12 IN FED-BATCH CULTURE.) อ. ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์, 147 หน้า, ISBN 974-17-1418-1.

ศึกษาการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Fructooligosaccharides, FOS) ในการเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในขวดเขย่าภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิต พบว่าหัวเชื้อที่มีอายุต่างกันสามารถผลิต FOS ได้ใกล้เคียงกัน และหัวเชื้ออายุ 18 ชั่วโมงมีประสิทธิภาพในการผลิต FOS ได้ดีที่สุดในถังหมัก เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลซูโครสเข้มข้นอีก 50 กรัมต่อลิตรในระหว่างการผลิต พบว่าการเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 9 และ 12 ของการผลิตเหมาะสมต่อการผลิต FOS และเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลซูโครสสูงมากเป็น 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตร พบว่ากลับทำให้การผลิตลดลง และเมื่อเติมน้ำตาลซูโครสอย่างต่อเนื่อง (ใช้น้ำตาลซูโครส 200, 300 และ 400 กรัมต่อ 600 มิลลิลิตร) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ของการผลิตด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 10 ชั่วโมง พบว่าทำให้การผลิต FOS เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และผลผลิตใกล้เคียงกัน จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต FOS เป็นเอนไซม์ที่ถูกขับออกนอกเซลล์ มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุด ณ ชั่วโมงที่ 12 - 15 การศึกษาการแยกน้ำตาลในน้ำหมักโดยใช้คอลัมน์ผงถ่านกัมมันต์ที่อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที พบว่าสามารถแยกน้ำตาลกลูโคสกับน้ำตาลฟรักโตสออกได้โดยการชะด้วยน้ำกลั่น และแยกน้ำตาลซูโครสออกได้โดยการชะด้วยเอทานอลเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และเก็บเกี่ยว FOS ออกมาด้วยเอทานอลเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ โดยมีประสิทธิภาพในการเก็บเกี่ยว 95% และสามารถใช้คอลัมน์ซ้ำได้อย่างน้อย 4 ครั้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2545	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

##4372419623 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: FRUCTOOLIGOSACCHARIDES/ KESTOSE/ FRUCTOSYLTRANSFERASE/ *Penicillium* sp. VERAPONG PORNPRASARTPON : FRUCTOOLIGOSACCHARIDES PRODUCTION BY *Penicillium* sp. H12 IN FED-BATCH CULTURE. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. DR. CHARNWIT KOSITANONT, 147 pp. ISBN 974-17-1418-1

Age of seed culture for fructooligosaccharides (FOS) production using *Penicillium* sp. H12 at optimal conditions for shaked flask culture was found non significant for FOS yield. But in fermentor, the seed age of 18th hour yield the highest FOS. Addition of 50 g/l sucrose at the 9th and 12th hour gave the best yield of FOS. But addition of sucrose at 100, 150 and 200 g/l sucrose reduced FOS yield significantly. Sucrose addition continuously at 1 ml/min could overcome the concentration effect. With continuous addition, even total addition of 400 g of sucrose still increased FOS yield as compared to the non added one. Enzyme response for FOS production was found mainly as an extracellular enzyme. The highest enzyme activity was detected at the 12th – 15th hour of culture. FOS purification was done successfully by using activated carbon column eluted with 15% ethanol. The recover of more than 95% was achieved with at least 4 repeating usage.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department Microbiology Student's signature……...
Field of study Industrial Microbiology Advisor's signature……
Academic year 2002 Co-advisor's signature…….

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลงได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเป็นที่ปรึกษาให้คำแนะนำและแนวทางในการทำงานวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจทานแก้ไขและสนับสนุนในด้านต่าง ๆ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ จึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ กรรณิกา จันทรสอาด ที่กรุณาให้คำแนะนำเบื้องต้น รวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์ และอุปกรณ์บางส่วนในการทำงานวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณประธานกรรมการและคณะกรรมการทุกท่านที่กรุณาตรวจสอบและแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและทบวงมหาวิทยาลัยที่ให้ความอนุเคราะทุนอุดหนุนงานวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่อบรมสั่งสอนมา รวมทั้งเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเพื่อน ๆ ทุกท่านที่ให้คำแนะนำและอำนวยความสะดวกในงานวิจัยนี้

คุณความดีของงานวิจัยนี้ ขอมอบให้แด่คุณพ่อและคุณแม่ที่ให้การสนับสนุนทางด้านกำลังใจและกำลังทรัพย์ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญตาราง..... ซ
สารบัญรูป..... ฌ
คำอธิบายย่อ..... ฒ
บทที่
1.บทนำ..... 1
2.ปริทัศน์วรรณกรรม..... 16
3.อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย..... 24
4.ผลการวิจัย..... 32
5.สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย..... 118
รายการอ้างอิง..... 124
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก สูตรอาหารและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 133
ภาคผนวก ข วิธีเตรียมสารเคมีที่สำคัญที่ใช้ในการทดลอง..... 135
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน..... 137
ภาคผนวก ง วิธีคำนวณ..... 144
ภาคผนวก จ ชุดเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง..... 145
ประวัติผู้เขียน..... 147

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1.คุณสมบัติทางกายภาพบางประการของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เปรียบเทียบกับน้ำตาลแอลกอฮอลล์บางชนิด..... 6

2.เปรียบเทียบคุณสมบัติบางประการของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์กับไฟเบอร์... 11

3.เปรียบเทียบการผลิต FOS เมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้ออายุต่าง ๆ..... 34

4.แสดงค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ในการผลิตตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 – 12 35

5.เปรียบเทียบการผลิต FOS ในถังหมักโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์กับหัวเชื้อที่เป็นสายใยที่มอายุ 16 และ 18 ชั่วโมง..... 50

6.เปรียบเทียบการผลิต FOS จากการเติมน้ำตาลซูโครสในเวลาต่าง ๆ ของการผลิต 64

7.แสดงปริมาณน้ำตาลซูโครสและ FOS ในการผลิตแบบเติมน้ำตาลซูโครส 65

8.ปรียบเทียบการผลิต FOS จากการเติมน้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการผลิต..... 76

9. แสดงปริมาณน้ำตาลซูโครสและ FOS ในการผลิตแบบเติมน้ำตาลซูโครส 50, 100 และ150 กรัมต่อลิตร……. 77

10.เปรียบเทียบการผลิต FOS เมื่อมีการเติมน้ำตาลซูโครสแบบต่อเนื่อง..... 94

11. แสดงปริมาณน้ำตาลซูโครสและ FOS ในการผลิตแบบเติมน้ำตาลซูโครสต่อเนื่อง 96

12.แสดงกิจกรรมของฟรักโตซิลทรานเฟอเรสเปรียบเทียบระหว่างการผลิตในขวดเขย่าและถังหมัก…….. 97

13.แสดงกิจกรรมของฟรักโตซิลทรานเฟอเรสต่อน้ำหนักแห้งและโปรตีนในน้ำหมัก…….. 102

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1.โครงสร้างทางเคมีของน้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลฟรักโตส, น้ำตาลซูโครสและฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดต่าง ๆ.....	1
2.แสดงโครงสร้างการทำงานของฟรักโตซิลทรานเฟอเรส.....	13
3.ปริมาณ FOS และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในอาหารเหลวโดยใช้หัวเชื้อสปอร์.....	36
4.ปริมาณ FOS และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในอาหารเหลวโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 14 ชั่วโมง.....	37
5.ปริมาณ FOS และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในอาหารเหลวโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 16 ชั่วโมง.....	38
6.ปริมาณ FOS และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในอาหารเหลวโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 18 ชั่วโมง.....	39
7.ปริมาณ FOS และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในอาหารเหลวโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 20 ชั่วโมง.....	40
8.ปริมาณเคสโตสเมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในอาหารเหลวโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ และหัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุต่าง ๆ	41
9.ปริมาณนีสโตสเมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในอาหารเหลวโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ และหัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุต่าง ๆ	42
10.ปริมาณ FOS รวมเมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในอาหารเหลวโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ และหัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุต่าง ๆ	43
11.ปริมาณ FOS รวมและน้ำตาลซูโครสเมื่ออเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในอาหารเหลวโดยใช้หัวเชื้ออายุต่าง ๆ	44
12.น้ำหนักสายใยแห้งเมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในอาหารเหลวโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ และหัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุต่าง ๆ	45
13.ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในอาหารเหลวโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ และหัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุต่าง ๆ	46

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ **หน้า**

14.กราฟการกระจายเชิงเส้นเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของการผลิต FOS รวม และปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ลดลง (ณ ชั่วโมงเดียวกัน) ในระหว่างการผลิต เมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในอาหารเหลวโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ และหัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุต่าง ๆ..... 47
15.ปริมาณ FOS และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในถังหมักโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ 51
16.ปริมาณ FOS และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในถังหมักโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 16 ชั่วโมง..... 52
17.ปริมาณ FOS และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในถังหมักโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 18 ชั่วโมง 53
18.น้ำหนักสายใยแห้งเมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในถังหมักโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 16 และ 18 ชั่วโมง..... 54
19.ปริมาณเคสโตสเมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในถังหมักโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 16 และ 18 ชั่วโมง..... 55
20.ปริมาณนีสโตสเมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในถังหมักโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 16 และ 18 ชั่วโมง..... 56
21.ปริมาณ FOS รวมเมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในถังหมักโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 16 และ 18 ชั่วโมง..... 57
22.ปริมาณ FOS และน้ำตาลซูโครสเมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในถังหมักโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 16 และ 18 ชั่วโมง..... 58
23.ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในถังหมักโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 16 และ 18 ชั่วโมง..... 59
24.แสดงภาพเส้นใย ณ ชั่วโมงต่าง ๆ ของการเพาะเลี้ยงในถังหมัก โดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 18 ชั่วโมง (ถ่ายด้วยกล้องดิจิตอล)..... 61
25.แสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อมีการเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 9 ของการผลิตปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร..... 66

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

26.แสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อมีการเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 12 ของการผลิตปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร..... 67

27.แสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อมีการเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 15 ของการผลิตปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร..... 68

28.แสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อมีการเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 18 ของการผลิตปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร..... 69

29.แสดงปริมาณเคสโตสเมื่อมีการเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงต่าง ๆ ของการผลิตปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร..... 70

30.แสดงปริมาณนีสโตสเมื่อมีการเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงต่าง ๆ ของการผลิตปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร..... 71

31.แสดงปริมาณ FOS รวมเมื่อมีการเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงต่าง ๆ ของการผลิตปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร..... 72

32.แสดงน้ำหนักสายใยแห้งเมื่อมีการเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงต่าง ๆ ของการผลิตปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร..... 73

33.แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสเมื่อมีการเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงต่าง ๆ ของการผลิตปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร..... 74

34.แสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อมีการเพิ่มน้ำตาลซูโครส 100 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการผลิต..... 78

35.แสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อมีการเพิ่มน้ำตาลซูโครส 150 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการผลิต..... 79

36.แสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อมีการเพิ่มน้ำตาลซูโครส 200 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการผลิต..... 80

37.แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสเมื่อมีการเพิ่มน้ำตาลซูโครส 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการผลิต..... 81

38.แสดงปริมาณเคสโตส เมื่อมีการเพิ่มน้ำตาลซูโครส 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการผลิต..... 82

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

39.แสดงปริมาณนีสโตส เมื่อมีการเพิ่มน้ำตาลซูโครส 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการผลิต..... 83

40.แสดงน้ำหนักสายใยแห้ง เมื่อมีการเพิ่มน้ำตาลซูโครส 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการผลิต..... 84

41.แสดงปริมาณ FOS รวม เมื่อมีการเพิ่มน้ำตาลซูโครส 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการผลิต..... 85

42.แสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อมีการเติมซูโครสต่อเนื่อง (ความเข้มข้น 200 กรัมต่อ 600 มิลลิลิตร) อัตราการเติม 1 มิลลิลิตรต่อนาทีตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 – 22 ของการผลิต..... 86

43.แสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อมีการเติมซูโครสต่อเนื่อง (ความเข้มข้น 300 กรัมต่อ 600 มิลลิลิตร) อัตราการเติม 1 มิลลิลิตรต่อนาทีตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 – 22 ของการผลิต..... 87

44.แสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อมีการเติมซูโครสต่อเนื่อง (ความเข้มข้น 400 กรัมต่อ 600 มิลลิลิตร) อัตราการเติม 1 มิลลิลิตรต่อนาทีตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 – 22 ของการผลิต..... 88

45.แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคสเมื่อมีการเติมซูโครสต่อเนื่อง 200, 300 และ 400 กรัมต่อ 600 มิลลิลิตร อัตราการเติม 1 มิลลิลิตรต่อนาทีตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 – 22 ของการผลิต..... 89

46.แสดงปริมาณน้ำตาลซูโครสเมื่อมีการเติมซูโครสต่อเนื่อง 200, 300 และ 400 กรัมต่อ 600 มิลลิลิตร อัตราการเติม 1 มิลลิลิตรต่อนาทีตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 – 22 ของการผลิต..... 90

47.แสดงปริมาณเคสโตส เมื่อมีการเติมซูโครสต่อเนื่อง 200, 300 และ 400 กรัมต่อ 600 มิลลิลิตร อัตราการเติม 1 มิลลิลิตรต่อนาทีตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 – 22 ของการผลิต..... 91

48.แสดงปริมาณนีสโตส เมื่อมีการเติมซูโครสต่อเนื่อง 200, 300 และ 400 กรัมต่อ 600 มิลลิลิตร อัตราการเติม 1 มิลลิลิตรต่อนาทีตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 – 22 ของการผลิต..... 92

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

49.แสดงน้ำหนักสายใยแห้ง เมื่อมีการเติมซูโครสต่อเนื่อง 200, 300 และ 400 กรัมต่อ 600 มิลลิลิตร อัตราการเติม 1 มิลลิลิตรต่อนาทีตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 – 22 ของการผลิต..... 93

50.แสดงกิจกรรมของเอนไซม์และน้ำหนักแห้งในการผลิตระดับขวดเขย่า..... 98

51.แสดงกิจกรรมของเอนไซม์และน้ำหนักแห้งในการผลิตระดับถังหมัก..... 99

52.แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ กับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสและเคสโตสในการผลิตระดับขวดเขย่า..... 100

53.แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์จำเพาะ กับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสและเคสโตสในการผลิตระดับถังหมัก..... 101

54.แสดงการชะน้ำตาลกลูโคสโดยน้ำปลอดประจุ..... 104

55.แสดงการชะน้ำตาลฟรักโตสโดยน้ำปลอดประจุ..... 104

56.แสดงการชะน้ำตาลซูโครสโดยเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์..... 105

57.แสดงการชะเคสโตสโดยเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์..... 105

58.แสดงการชะนีสโตสโดยเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์..... 106

59.แสดงการชะน้ำตาลชนิดต่าง ๆ กลูโคสและฟรักโตสชะด้วยน้ำปลอดประจุ ซูโครสชะด้วยเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เคสโตสและนีสโตสชะด้วยเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์..... 106

60.แสดงการชะน้ำตาลชนิดต่าง ๆ กลูโคสและฟรักโตสชะด้วยน้ำปลอดประจุ ซูโครสชะด้วยเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เคสโตสและนีสโตสชะด้วยเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ใช้ตัวอย่างน้ำหมักจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง..... 107

61.แสดงผลการวิเคราะห์ HPLC ของสารละลายที่ผ่านการชะด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ออกจากคอลัมน์ผงถ่านกัมมันต์ที่อัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที.....108

62.แสดงประสิทธิภาพในการเก็บเกี่ยวน้ำตาลซูโครสเมื่อใช้ติดต่อกัน 4 ครั้ง.....109

63.แสดงประสิทธิภาพในการเก็บเกี่ยวน้ำตาลซูโครสเมื่อใช้ติดต่อกัน 4 ครั้ง.....110

64.แสดงการชะน้ำตาลซูโครส 0.09 กรัมต่อ 3 มิลลิลิตรด้วยเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์.....111

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

65.แสดงการชะน้ำตาลซูโครส 0.12 กรัมต่อ 3 มิลลิลิตรด้วยเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์.....112

66.แสดงการชะน้ำตาลซูโครส 0.15 กรัมต่อ 3 มิลลิลิตรด้วยเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์.....112

67.แสดงปริมาณน้ำตาลซูโครสกับอัตราส่วนน้ำตาลซูโครสต่อผงถ่านกัมมันต์.....113

68.แสดงความสัมพันธ์ระหว่างการดูดซับกลูโคสและซูโครสที่ความเข้มข้นสูงสุด..... 114

69.ตัวอย่างโครมาโตแกรมของ FOS และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในน้ำหมัก ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 และสารละลายมาตรฐานน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อวิเคราะห์โดยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)..... 117

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายย่อ

คำย่อ	คำเต็ม
ก/ล	กรัมต่อลิตร
ก/ล/ชม.	กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง
ชม.	ชั่วโมง
FOS	ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์
HPLC	High performance liquid chromatography (โครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง)
G	น้ำตาลกลูโคส
F	น้ำตาลฟรักโตส
GF	น้ำตาลซูโครส
GF2	FOS ชนิดเคสโตส
GF3	FOS ชนิดนีสโตส
GF4	FOS ชนิดฟรักโตฟูแรนโนซิลนีสโตส
Yp/x	ประสิทธิภาพของสายใยในการผลิต FOS
FT	เอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรส
FF	เอนไซม์ฟรักโตฟิวแรนโนซิเดส
Ut	กิจกรรมทรานฟรักโตซิลเลชั่น (การย้ายน้ำตาลฟรักโตสเพื่อสร้าง FOS)
Uh	กิจกรรมไฮโดรไลซิส (การสลาย FOS)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันน้ำตาลเป็นสารให้ความหวานที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย น้ำตาลซูโครสเป็นที่นิยมใช้ในการประกอบอาหารทั่วไปเนื่องจากมีราคาไม่แพง แต่สำหรับผู้บริโภคที่ต้องการควบคุมน้ำหนักหรือประสบปัญหาจากการได้รับพลังงานมากเกินไป ไม่นิยมบริโภคน้ำตาลซูโครสเพราะน้ำตาลซูโครสให้พลังงานสูง จึงได้มีความต้องการบริโภคสารให้ความหวานชนิดอื่นที่ให้พลังงานต่ำกว่า เช่น น้ำตาลแอลกอฮอลล์, โพลีเดกโตรส หรือ ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ เป็นต้น (Bornet, 1994)

ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นสารให้ความหวานพลังงานต่ำชนิดใหม่ที่น่าสนใจ เนื่องจากให้รสชาติใกล้เคียงกับน้ำตาลซูโครสและมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก (prebiotic) ด้วย ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (FOS) เป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลฟรักโตส โดยมีความยาวของสายโพลีเมอร์ระหว่าง 2-35 หน่วย (กรณีที่มีสายยาวกว่า 30 หน่วย จะมีชื่อเรียกว่า อินนูลิน) (McKellar และ Modler, 1989) พบ FOS ได้ทั่วไปในพืชหลายชนิด เกิดจากน้ำตาลซูโครสผ่านกระบวนการทรานฟรักโตซิลเลชั่น ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการย้ายน้ำตาลฟรักโตส โดยเอนไซม์หลายชนิด เช่น บีตาฟรักโตฟูรานโนซิเดส (EC 3.2.1.26) และ บีตาฟรักโตซิลทรานเฟอเรส (EC 2.4.1.9) เป็นต้น (Hidaka และคณะ, 1988)

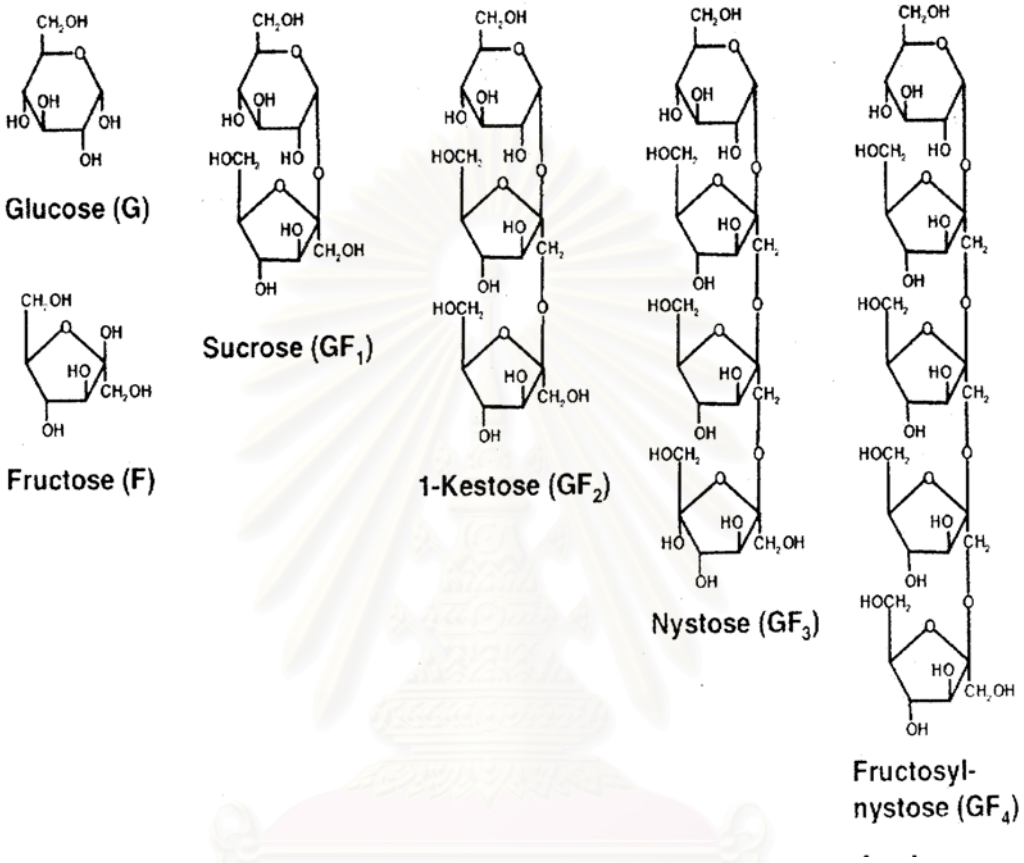
ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ เป็นสารที่ไม่สามารถย่อยได้โดยเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิดอื่น แต่จะถูกย่อยโดยจุลินทรีย์บางชนิดในลำไส้ใหญ่ เช่น จุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria และ Lactobacilli เป็นต้น (อ้างถึงใน Mitsuoka และคณะ, 1987) ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ มีหลายชนิด เช่น เคสโตส (kestose; GF_2) นีสโตส (nystose; GF_3) และฟรักโตฟิวแรนโนซิลนีสโตส (fructofuranosyl nystose; GF_4) โดยในโมเลกุลของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสเชื่อมต่อกับน้ำตาลฟรักโตสตั้งแต่ 1-3 โมเลกุล ด้วยพันธะบีตา (2-1) [1F-(1-(-fructofuranosyl)n-1sucrose] ; GFn เมื่อ n เท่ากับ 2-4

โดยเมื่อ n เท่ากับ 2 จะได้ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ชนิดเคสโตส (GF2)

n เท่ากับ 3 จะได้ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ชนิดนีสโตส (GF3)

n เท่ากับ 4 จะได้ ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ชนิดฟรักโตฟิวแรนโนซิลนีสโตส (GF4)

โดยให้ G หมายถึงน้ำตาลกลูโคส F หมายถึงน้ำตาลฟรักโตส (Jung และคณะ, 1989) ดังแสดงโครงสร้างทางเคมีของ FOS ไว้ในรูปที่ 1



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของน้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลฟรักโตส, น้ำตาลซูโครส และฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดต่าง ๆ (Crittenden และ Playne,2002)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ความสัมพันธ์ระหว่างฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์กับจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่

ในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ประกอบไปด้วยจุลินทรีย์หลายชนิด ที่มีความสำคัญต่อสุขภาพ จุลินทรีย์ชนิด anaerobe จะช่วยให้เกิดพลังงานแก่ร่างกายได้โดยการหมัก ได้กรดไขมันสายสั้น ๆ (short chain fatty acid) สามารถดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ และจุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตวิตามินบางชนิดได้ รวมทั้งผลิตกรดอินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้ด้วย

จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ได้ดี เช่น *Bifidobacteria* spp. และ *Bacteroides* sp. จุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถย่อย ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ได้โดยใช้เอนไซม์บีตาฟรักโตซิเดส หรืออีกชื่อหนึ่งคือ อินนูลิเนส (Bornet, 1994) จุลินทรีย์กลุ่มนี้จัดเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เรียกว่า โพรไบโอติก (probiotic) ที่รู้จักกันเป็นอย่างดี เช่น *Lactobacillus acidophilus* และ *Bifidobacterium bifidum* เป็นต้น (McKellar และ Modler, 1989) เมื่อจุลินทรีย์เหล่านี้ย่อยสลายฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จะได้ผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น กรดอินทรีย์, กรดไขมันบางชนิด, คาร์บอนไดออกไซด์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น (Cummings และคณะ, 2001)

จุลินทรีย์กลุ่มโพรไบโอติกสามารถพบได้ทั่วไปในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น โยเกิร์ตและผักดอง เมื่อบริโภคเข้าไปบางส่วนจะถูกขับถ่ายออกนอกร่างกายไปพร้อมกับอุจจาระ ดังนั้นจุลินทรีย์กลุ่มโพรไบโอติคจึงต้องการอาหารประเภทพรีไบโอติกเพื่อเพิ่มจำนวนและดำรงชีวิตอยู่ได้ ดังนั้นการบริโภค ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ จึงเป็นการเพิ่มจำนวนโพรไบโอติกด้วย โพรไบโอติกมีส่วนช่วยควบคุมจำนวนจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ โดยสามารถผลิตกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก และกรดอะซิติก ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างในลำไส้ใหญ่ลดลง (อ้างถึงใน Kawese, 1982 และ Rasic, 1983)

ในประเทศแถบยุโรปจัดให้ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ เป็นกลุ่มอาหารที่มาจากธรรมชาติ (natural food) นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์กลุ่มกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ที่ผลิตได้จากน้ำตาลแลคโตสด้วย (อ้างถึงใน Roberfroid, 1997)

พบฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ทั่วไปในพืชหลายชนิด เช่น หัวหอม กระเทียม หน่อไม้ฝรั่ง ข้าวไรน์ ต้นหอม และกล้วย เป็นต้น (Roberfroid และคณะ, 1993) นอกจากนี้ยังพบว่ามีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ได้ด้วย เช่น *Fusarium oxysporum, Aspergillus sydowi* และ *Aspergillus niger* เป็นต้น โดยการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์อาศัยเอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรส (FT) โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้น (อ้างถึงใน Yun, 1996)

การค้นคว้าเกี่ยวกับฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในพืช

ในปี ค.ศ.1966 Edelman และ Dickerson ได้ศึกษาปฏิกิริยาทรานฟรักโตซิลเลชั่นในต้น Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) พบว่าเอนไซม์ทรานฟรักโตซิลเลส (transfructosylase) ที่สกัดได้สามารถเกิดปฏิกิริยาย้ายน้ำตาลฟรักโตสจากโมเลกุลของน้ำตาลซูโครส ไปต่อกับน้ำตาลซูโครสอีกโมเลกุลหนึ่งได้ ทำให้เกิดเป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์มี 2 ส่วน คือ ปฏิกิริยาทรานฟรักโตซิลเลชั่น ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการสร้างฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์และปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสซึ่งเป็นปฏิกิริยาการย่อยสลายฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Edelman และ Dickerson, 1966)

ในปี ค.ศ. 1971 Randhir และ Bhatia ได้ศึกษาฟรักโตซิลทรานเฟอเรสจาก *Chicorium intybus* L. พบว่าสามารถสังเคราะห์ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้จากน้ำตาลซูโครส ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ 37 องศาเซลเซียสและค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.6 และพบว่า Ag^{+} และ Hg^{2+} สามารถยับยั้งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ได้ ในขณะที่ Mn^{2+}, Mg^{2+}, Co^{2+} และ Ni^{2+} เป็น co-factor ของเอนไซม์ (Randhir และ Bhatia, 1971)

ในปี ค.ศ. 1976 Shiomi และคณะได้ศึกษาฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในรากของต้นแอสพารากัส (*Asparagus officinatis* L.) พบว่ามีฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ 11 ชนิด ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาการสังเคราะห์ของเอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรส 3 ชนิด ได้แก่ sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase, 6G-fructosyltransferase และ 1F-fructosyltransferase (อ้างถึงใน Shiomi และคณะ, 1976,1979,1980,1982)

ในปี ค.ศ. 1976 Satyanarayana ได้พบว่าการสังเคราะห์ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ใน Agrave vera cruz ไม่ได้เกิดจากปฏิกิริยาทรานฟรักโตซิลเลชั่น เพียงอย่างเดียวแต่อาจเกิดจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของอินนูลิน (hydrolysis) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการย่อยอินนูลินให้เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์สายสั้นลง ได้เป็นฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วย (อ้างถึงใน Satyanarayana , 1976)

ในปี ค.ศ. 1980 Norio และ Izawa ได้ศึกษาฟรักโตซิลทรานเฟอเรสจากรากของต้นแอสฟารากัส (*Asparagus officinalis* L.) พบว่าเมื่อทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์สามารถเกิดปฏิกิริยาทรานฟรักโตซิลเลชั่น เปลี่ยนน้ำตาลซูโครสเป็นเคสโตสและน้ำตาลกลูโคสได้ โดยเอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสที่ค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 4.0-8.0 และสามารถถูกยับยั้งได้โดย Hg^{2+}, Mn^{2+}, Ag^{+} และ *p*-chloromercuribenzoate ได้ (Norio และ Izawa, 1980)

ในปี ค.ศ. 1980 Robert และ Ben ได้ศึกษาซูโครส-ซูโครส ฟรักโตซิลทรานเฟอเรสและฟรักแทน-ฟรักแทน ฟรักโตซิลทรานเฟอเรส จาก *Allium cepa* โดยทำให้บริสุทธิ์ด้วย วิธีเจลฟิวเตชั่น จากการศึกษาพบว่า เอนไซม์ซูโครส-ซูโครส ฟรักโตซิลทรานเฟอเรส จะสามารถสังเคราะห์ได้เฉพาะน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ขนาด 3 โมเลกุลเท่านั้น ขณะที่เอนไซม์ฟรักแทน-ฟรักแทน ฟรักโตซิลทรานเฟอเรสจะสามารถสังเคราะห์ให้เกิดน้ำตาลโอลิโกแซ็กคาไรด์ขนาด 4 โมเลกุลขึ้นไป (Robert และ Ben,1980)

ในปี ค.ศ. 1995 Andrew ได้ศึกษาพบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรสมีผลต่อการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดต่าง ๆ โดยได้ศึกษาเอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรสบริสุทธิ์ที่สกัดจาก *Helianthus tuberosus* พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้นต่ำจะทำให้เกิดการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ขนาด 3 โมเลกุลและเมื่อใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นจะทำให้ผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีจำนวนโมเลกุลสูงกว่า (Andrew, 1995)

คุณสมบัติของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Hidaka และ Hirayama, 1991;อ้างถึงใน Hayashi และคณะ, 1993; Bornet, 1994; Gibson และ Roberfroid, 1995; Yun, 1996 และ Henryk และ Roberfroid, 2000)

1.มีความหวานเป็น 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลซูโครส จึงสามารถนำมาผสมอาหารได้หลายชนิด เนื่องจากให้ความหวานสูง

2.ให้พลังงานต่ำ เนื่องจากไม่สามารถย่อยได้ด้วยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร

3.ไม่ถูกใช้โดย *Streptococcus mutan* (เป็นจุลินทรีย์ในช่องปากที่ผลิตกลูแคนที่ไม่ละลายน้ำ เป็นสาเหตุให้เกิดโรคฟันผุ)

4.ช่วยกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม bifidobacteria ที่มีประโยชน์และป้องกันโรคอุจจาระร่วง

5.ช่วยลดระดับคอเรสเตอรอล ฟอสโฟลิปิด และไตรกลีเซอไรด์ในเลือดได้

6.ไม่มีสีและกลิ่น

7.เคสโตสมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{18}H_{32}O_{16}$ น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 504.44 นีสโตสมีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{24}H_{42}O_{21}$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 666.58 และฟรักโตฟูแรนโนซิลนีสโตส มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{30}H_{52}O_{26}$ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 828.72

8.เป็นน้ำตาลที่ไม่ถูกรีดิวซ์ และไม่เกิดปฏิกิริยา maillard (สีน้ำตาลไหม้เมื่อน้ำตาลรีดิวซ์ทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน เมื่อมีความร้อนสูง)

9.มีความคงตัวสูง (ค่ากรด-ด่างมากกว่า 3) และทนต่ออุณหภูมิไม่เกิน 140 องศาเซลเซียส

10.ให้พลังงานประมาณ 0-2.5 กิโลแคลอรี่ต่อกรัม

11.ป้องกันโรคมะเร็ง เป็นสารพรีไบโอติก

12.ดูดความชื้นเล็กน้อย

แคลอรี่ที่ได้รับจากฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

โดยปกติน้ำตาลซูโครสจะให้พลังงานประมาณ 3.9 กิโลแคลอรี่ต่อกรัม หรือประมาณ 16.3 กิโลจูลต่อกรัม เมื่อผ่านกระบวนการย่อยสลายจะได้เป็นพลังงานออกมา 38 โมล ATP ต่อ โมล สำหรับฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จะไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ในลำไส้เล็กของมนุษย์ จึงให้พลังงานเพียง 0 ถึง 2.5 กิโลแคลอรี่ต่อกรัมเท่านั้น (อ้างถึงใน Roberfroid, 1999) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลแอลกอฮอลล์ ซึ่งเป็นสารให้ความหวานพลังงานต่ำเช่นกัน พบว่ามีคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์กับน้ำตาลแอลกอฮอลล์บางชนิดแตกต่างกันดังตารางที่ 1 (Bornet, 1994)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางกายภาพบางประการของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เปรียบเทียบกับน้ำตาลแอลกอฮอลล์บางชนิด

น้ำตาล	ความหวานเทียบต่อน้ำตาลซูโครส	ความสามารถทนความร้อน (เซลเซียส)	ความคงตัวในกรด-ด่าง
ซอร์บิทอล	0.70	น้อยกว่า 160	2-10
ไซลิทอล	0.90	น้อยกว่า 160	2-10
แมนนิทอล	0.50	น้อยกว่า 160	2-10
อิริไทรออล	0.65	น้อยกว่า 160	2-10
มอลนิทอล	0.75	น้อยกว่า 160	2-10
ไอโซมอล	0.60	น้อยกว่า 160	2-10
แลคซิทอล	0.40	น้อยกว่า 160	2-10
ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์	0.30	น้อยกว่า 140	สูงกว่า 3

พบว่าฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ มีความหวานใกล้เคียงกับน้ำตาลซูโครสมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลแอลกอฮอลล์ ขณะที่คุณสมบัติทนความร้อนและความคงตัวในกรด-ด่าง มีความใกล้เคียงกับน้ำตาลแอลกอฮอลล์ (Bornet,1994)

ผลของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อภาวะโภชนาการและจุลินทรีย์ในร่างกาย

เนื่องจากฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์มีประโยชน์ต่อร่างกาย จึงได้มีการศึกษาถึงประโยชน์ของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ต่อภาวะโภชนาการและผลต่อจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ เช่น

Kamejiro และคณะ (1984) ได้ทดลองให้ผู้ป่วยโรคเบาหวานจำนวน 18 คนรับประทานฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ปริมาณ 8 กรัมต่อวันเป็นเวลาติดต่อกัน 14 วัน พบว่าสามารถช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดโคเลสเตอรอล และแอลดีแอล โคเลสเตอรอลได้ เนื่องจาก ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ จะจับกับไขมันและคาร์โบไฮเดรตและมีส่วนช่วยเกาะที่ผนังลำไส้เล็กได้ทำให้ลดการดูดซึมคาร์โบไฮเดรตและไขมันได้ นอกจากนี้ยังกระตุ้นให้ Bifidobacteria ย่อยสลายไขมันและน้ำตาลกลูโคสให้หมดไปได้ด้วย

Oku และคณะ (1984) ได้ศึกษาการย่อยสลายฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในระบบทางเดินอาหารของหนูทดลอง พบว่าเอนไซม์ในลำไส้เล็ก เช่น เอนไซม์ซูเครส, ไอโซมอลเทสและอะไมเลสของหนูทดลองไม่สามารถย่อยฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ และเมื่อทดลองฉีดฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิต พบว่าฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จะถูกขับออกมาทางปัสสาวะโดยไม่มีการย่อยสลายในกระแสเลือด

Mitsuoka และคณะ (1987) รายงานว่าเมื่อให้ผู้สูงอายุอายุระหว่าง 64-82 ปี รับประทานฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ปริมาณ 8 กรัมต่อวันเป็นเวลา 14 วันติดต่อกัน จะช่วยเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์กลุ่ม bifidobacteria ในอุจจาระเพิ่มขึ้น 10 เท่าและทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอุจจาระลดลงประมาณ 0.3 ด้วย

McDonough และคณะ (1987) ได้รายงานว่าฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus acidophilus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้ดี โดยจะใช้น้ำตาลแลคโตสในน้ำนมทำให้ลดอาการแพ้น้ำตาลแลคโตสของผู้ป่วยได้

Tanni และ Michael (1987) ได้รายงานว่าเมื่อให้คนปกติรับประทานฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ 5 กรัมต่อวันติดต่อกับ 12 วันเปรียบเทียบกับคนปกติที่รับประทานน้ำตาลซูโครสแทน พบว่าหลังจาก 12 วัน ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนในลมหายใจของคนที่รับประทานฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จะสูงกว่าคนที่รับประทานน้ำตาลซูโครสประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งก๊าซไฮโดรเจนที่ออกมาเกิดจากกระบวนการย่อยสลายฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร

Johannes และคณะ (1990) ได้รายงานว่าฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จาก *Helianthus tuberosus* เมื่อศึกษาในคนปกติพบว่าหลังจากรับประทานฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ตั้งแต่ 5-20 กรัม สามารถวัดปริมาณก๊าซไฮโดรเจนทางลมหายใจได้ โดยวัดได้สูงสุดเมื่อรับประทานฟรักโตโอลิโกแซ็ก

คาไรด์ 20 กรัม ที่ชั่วโมงที่ 5 หลังจากรับประทาน จึงสรุปได้ว่าการรับประทานฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ปริมาณมากขึ้นจะทำให้มีการขับก๊าซไฮโดรเจนออกมาทางลมหายใจได้มากขึ้นด้วย

Gibson และ Wang (1993) ได้ศึกษาผลของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อการเจริญเติบโตของ Bifidobacteria ซึ่งเป็นจุลินทรีย์กลุ่มโพรไบโอติก พบว่าสามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ เมื่อย่อยสลายจะได้ก๊าซไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ขณะที่เมื่อศึกษาการเลี้ยง *E.coli* และ *Clostridium perfringens* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ พบว่าจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดนี้ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดี เนื่องจากไม่สามารถย่อยฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้

Briet และคณะ (1995) ได้ศึกษาผลของการรับประทานฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ในปริมาณต่าง ๆ พบว่าเมื่อให้คนปกติ 14 คนรับประทานฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ เป็นปริมาณตั้งแต่ 30, 40 และ 50 กรัมต่อวัน พบว่าเมื่อรับประทานฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ สูงขึ้นจะทำให้มีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนออกมากับลมหายใจสูงด้วย แต่การรับประทานฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สูงเกิน 30 กรัมต่อวันจะทำให้มีอาหารท้องอืด ถ้ารับประทาน 40 กรัมต่อวันจะมีอาหารเกิดก๊าซและลำไส้บวมพอง และเมื่อรับประทานวันละ 50 กรัมจะทำให้ท้องเป็นตะคริวและท้องร่วงได้ ขณะที่เมื่อทดลองให้รับประทานฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ทีละน้อยเพิ่มขึ้น พบว่าจะช่วยให้ร่างกายสามารถปรับสภาพและลดอาการท้องอืดได้

Hartemink และคณะ (1995) ได้รายงานว่า oral streptococci เช่น *Streptococcus mutans* และ *Streptococcus mitis* สามารถย่อยสลายฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ เนื่องจากมีฟรักแทนเนส (fructanase) ได้กรดแลกติกและกรดอะซิติก

Roberfroid (1997) ได้รายงานว่าฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ มีส่วนช่วยในการเพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุที่จำเป็นต่อร่างกาย และลดอาการภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง รวมทั้งช่วยลดการสังเคราะห์กรดไขมันในร่างกายด้วย

Ellen และคณะ (1998) ได้ศึกษาผลของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อการดูดซึมธาตุเหล็กและแคลเซียม ได้รายงานว่าเมื่อให้คนปกติ 12 คนที่มีอายุระหว่าง 20 – 30 ปีรับประทานฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์, อินนูลินและกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ปริมาณ 15 กรัมต่อวันเป็นเวลา 21 วันเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับประทาน พบว่าการรับประทานฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์, อินนูลินและกาแลคโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ จะไม่มีผลรบกวนการดูดซึมแคลเซียมและเหล็กแต่อย่างใด

Greger (1999) ได้รายงานว่าคาร์โบไฮเดรตที่ร่างกายไม่สามารถย่อยได้ เช่น เพคติน, ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ และอินนูลิน จะช่วยเพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุต่าง ๆ เช่น แคลเซียม, แมกนีเซียม, สังกะสี และแมงกานีส เป็นต้น

Nathalie และ Nadine (1999) ได้รายงานว่าฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถลดปริมาณไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) ในหนูทดลองได้ เมื่อให้หนูทดลองกินในปริมาณต่าง ๆ วันละ 10 กรัมถึง 100 กรัม ซึ่งพบว่าฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ มีผลให้การสังเคราะห์กรดไขมันในหนูทดลองมีปริมาณลดลง และยังลดปริมาณฮอร์โมนอินซูลินและน้ำตาลกลูโคสในเลือดของหนูทดลองด้วย

Williams และคณะ (1999) ได้ศึกษาผลของปริมาณฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไขมันในร่างกาย พบว่าเมื่อให้คนปกติรับประทานฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ปริมาณ 30 กรัมต่อวันจะมีผลต่อการลดปริมาณไตรกลีเซอไรด์, แอลดีแอล และเอชดีแอลคลอเรสเตอรอลในเลือด ซึ่งให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับรายงานที่ได้มีการศึกษาในสัตว์ทดลอง

Handan และ Robert (2000) ได้ศึกษาการย่อยสลายของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยจุลินทรีย์กลุ่มโพรไบโอติกต่าง ๆ ที่ใช้ในทางการค้า พบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถย่อยฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ดี เช่น *Lactobacillus casei* 685, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Bifidobacterium infantis* 25962 และ *Bifidobacterium adolescentis* 15706 เป็นต้น

Henryk และ Roberfroid (2000) ได้รายงานว่า จากการศึกษาในหนูทดลองที่เป็นเนื้องอกโดยเปรียบเทียบการรักษาเนื้องอกโดยสารเคมีบำบัดกับการให้กินฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ พบว่าเมื่อให้การรักษาโดยใช้ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ร่วมกับเคมีบำบัดจะให้ประสิทธิภาพการลดการขยายตัวของเนื้องอกได้ดีกว่าการใช้เคมีบำบัดหรือฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เพียงอย่างเดียว เนื่องมาจากฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จะช่วยลดปริมาณน้ำตาลกลูโคส, ฟอสโฟลิปิดและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดทำให้การเจริญเติบโตของเนื้องอกลดลง

Luo และคณะ (2000) ได้รายงานว่าเมื่อให้คนป่วยโรคเบาหวานรับประทานฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ปริมาณ 20 กรัมต่อวันเป็นเวลาติดต่อกัน 4 สัปดาห์พบว่า สามารถช่วยลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสในเลือดได้ โดยไม่มีผลต่อปริมาณฮอร์โมนอินซูลินในเลือด

Perrin และคณะ (2000) ได้ศึกษาผลของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีของ *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 และ *Bifidobacterium animalis* ATCC 25527 พบว่าจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์มีความสามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้สูงขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

Perrin และคณะ (2001) ได้ศึกษาการย่อยฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดย *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 เปรียบเทียบกับน้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลฟรักโตส และน้ำตาลซูโครส พบว่าการย่อยสลายน้ำตาลฟรักโตสและฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จะให้กรดแลคติกและกรดอะซิติกออกมามากที่สุด ในขณะที่การใช้น้ำตาลกลูโคสจะทำให้มีการเจริญสูงสุด

Sakai และคณะ (2001) ได้ศึกษาผลของการบริโภคฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ต่อจำนวนจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ของหนูทดลอง พบว่าเมื่อทดลองให้หนูทดลองเพศผู้ที่มีอายุ 4 สัปดาห์กินฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผสมในอาหารปกติเพิ่มขึ้น 7.5 เปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าหนูทดลองที่กินฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จะมีปริมาณของ *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ในอุจจาระเพิ่มขึ้นขณะที่ปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae และ Bacteroideaceae ในอุจจาระมีจำนวนลดลง

Bifidobacteria (Gibson และ Roberfroid, 1995)

Bifidobacteria เป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ เป็นจุลินทรีย์กลุ่มโพรไบโอติก มีหลายสายพันธุ์ เช่น *Bifidobacterium infantis, Bifidobacterium adolescentis, Bifidobacterium bifidum* เป็นต้น

คุณสมบัติที่มีประโยชน์ของ Bifidobacteria ได้แก่

1. สามารถย่อยน้ำตาลฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ได้กรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก และกรดอะซิติก
2. สามารถสังเคราะห์วิตามินบี
3. สามารถจับกับสารก่อมะเร็ง จึงส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันและป้องกันมะเร็ง

จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้ Bifidobacteria เป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ ช่วยลด

จำนวนจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในลำไส้ใหญ่ได้ เนื่องจากกรดอินทรีย์ที่ผลิตขึ้นทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง และยังส่งเสริมสุขภาพเนื่องจากช่วยป้องกันมะเร็งและผลิตวิตามินบีบางชนิดให้ร่างกายดูดซึมไปใช้ได้

ความแตกต่างระหว่างฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์และไฟเบอร์

จากคุณสมบัติของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีคุณสมบัติคล้ายกับไฟเบอร์ (dietary fiber) ซึ่งมีประโยชน์คล้ายกัน เช่น การลดปริมาณคลอเรสเตอรอลในเลือด และสามารถถูกย่อยได้ด้วยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ได้ ซึ่งได้มีการนำไฟเบอร์มาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหลายชนิด (Dennis,2002) จึงได้มีการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์และไฟเบอร์ โดยในปี ค.ศ. 1999 Barbara ได้ศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์และไฟเบอร์ โดยสรุปดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบคุณสมบัติบางประการของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์กับไฟเบอร์

คุณสมบัติ	Dietary fiber (ไฟเบอร์)	ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์
ความสามารถในการละลายน้ำ	ไม่ละลายน้ำ	ละลายน้ำได้ดี
การย่อยสลายในลำไส้เล็ก	ไม่ย่อยสลายในลำไส้เล็ก	ไม่ย่อยสลายในลำไส้เล็ก
การดูดซับกับกรดน้ำดี	บางส่วนสามารถดูดซับกรดน้ำดีได้	ไม่มีการดูดซับกับกรดน้ำดี
การหมัก	สามารถถูกย่อยได้โดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่	สามารถถูกย่อยได้โดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่

จากการเปรียบเทียบพบว่าข้อแตกต่างที่สำคัญ คือ ไฟเบอร์สามารถดูดซับกับกรดน้ำดีได้ เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นโพลีแซ็กคาไรด์สายยาว และไม่ละลายน้ำ ขณะที่คุณสมบัติอื่นมีความใกล้เคียงกัน คือ สามารถย่อยสลายได้โดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ และไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ในลำไส้เล็ก (Barbara, 1999)

การนำฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์มาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์

เนื่องจากฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์มีประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ จึงได้มีความสนใจนำฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์มาเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ โดยเฉพาะสุนัขและแมว (Hussein และคณะ, 1999) เนื่องจากในลำไส้ใหญ่ของสุนัขและแมวมีจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria และ Lactobacilli เช่นกัน ซึ่งพบว่าฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ สามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ทั้ง 2 กลุ่มและช่วยลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ก่อโรค รวมทั้งลดปริมาณแอมโมเนียและเอมีนในอุจจาระของสุนัขและแมวได้ด้วย (Hussein และคณะ, 1999)

นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารที่เป็นธัญพืชที่ใช้ในการเลี้ยงปศุสัตว์ ก็มีส่วนประกอบของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ตามธรรมชาติอยู่แล้ว เช่น ข้าวบาร์เล่ย์, ข้าวโอต และข้าวสาลี มีฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์รวม 1.92, 0.36 และ 1.36 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัมตามลำดับ เป็นต้น(Hussein และคณะ,1998)

ประโยชน์โดยรวมของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

จากการศึกษาประโยชน์ของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ดังกล่าวมาแล้ว จึงอาจสรุปถึงประโยชน์ของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อสุขภาพได้ดังนี้

1. เป็นสารให้ความหวานพลังงานต่ำ สามารถใช้ได้กับผู้ป่วยโรคเบาหวาน และผู้ที่ต้องการลดน้ำหนัก
2. มีส่วนช่วยลดปริมาณไขมันและน้ำตาลในเลือด เนื่องจากฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถจับกับไขมันและลดการดูดซึมไขมันและน้ำตาลเข้าสู่กระแสเลือดได้
3. มีคุณสมบัติเป็นสารพรีไบโอติก จึงส่งเสริมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ จึงช่วยลดปริมาณของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้
4. ป้องกันโรคมะเร็ง
5. ช่วยเพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุบางชนิดที่มีประโยชน์เข้าสู่ร่างกาย เช่น แคลเซียมและเหล็ก

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากน้ำตาลซูโครส (Bornet , 1994)

ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถสังเคราะห์ได้จากน้ำตาลซูโครสโดยเอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรสทั้งในพืชและจุลินทรีย์ การสังเคราะห์ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถแสดงได้เป็นปฏิกิริยาได้ตามขั้นตอนดังนี้

<u>ปฏิกิริยาขั้นที่ 1</u>

น้ำตาลซูโครสจะถูกย่อยเป็นกลูโคสและฟรักโตส จากนั้นฟรักโตสจะถูกส่งไปยังน้ำตาลซูโครสอีกโมเลกุลหนึ่ง ซึ่งจะเชื่อมต่อกันด้วย ((1-2)glycosidic bond เกิดเป็นเคสโตส (กลูโคส 1 โมเลกุลต่อกับฟรักโตส 2 โมเลกุล)

<u>ปฏิกิริยาขั้นที่ 2</u>

น้ำตาลซูโครสอีกโมเลกุลหนึ่งจะถูกย่อยเช่นเดียวกับปฏิกิริยาที่ 1 ได้กลูโคสและฟรักโตส ฟรักโตสจะถูกส่งไปเชื่อมกับเคสโตสได้เป็นนีสโตส (กลูโคส 1 โมเลกุลต่อกันฟรักโตส 3 โมเลกุล)

<u>ปฏิกิริยาขั้นที่ 3</u>

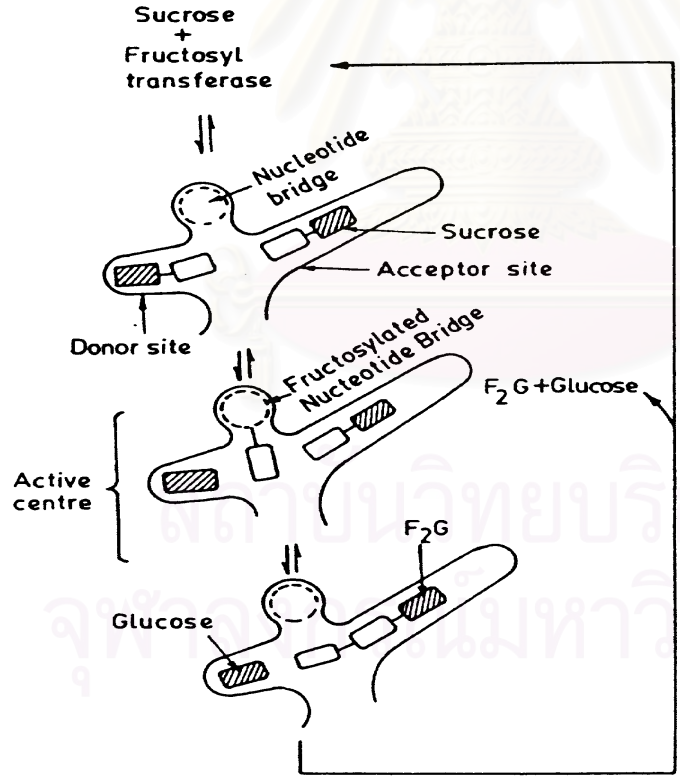
น้ำตาลซูโครสอีกโมเลกุลหนึ่งจะถูกย่อยเช่นเดียวกับปฏิกิริยาที่ 1 ได้กลูโคสและฟรักโตส ฟรักโตสจะถูกส่งไปเชื่อมกันนีสโตสได้เป็นฟรักโตฟูแรนโนซิลนีสโตส (กลูโคส 1 โมเลกุลต่อกับฟรักโตส 4 โมเลกุล) จากปฏิกิริยาสามารถเขียนเป็นสมการทางคณิตศาสตร์ได้ว่า

$$GF_n + GF_n \longrightarrow GF_{n+1} + GF_{n-1}$$

เมื่อ G หมายถึงกลูโคส F หมายถึงฟรักโตส และ n หมายถึงจำนวนโมเลกุลของฟรักโตสที่มีค่าเท่ากับ 1 – 3 (Jung และคณะ, 1989)

ในปี ค.ศ. 1980 Gupta และ Bhatia ได้อธิบายกลไกการทำงานของเอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรส ของ *Fusarium oxysporum* ว่าเอนไซม์จะมีโครงสร้างสำคัญ 3 ส่วนได้แก่ ส่วน donor, ส่วน receptor และส่วน fructosylated nucleotide bridge โดยการทำงานเกิดจากน้ำตาลซูโครสจะเข้าจับที่ส่วน donor และ receptor ตำแหน่งละ 1 โมเลกุลจากนั้น fructosylated nucleotide bridge จะดึงฟรักโตสของน้ำตาลซูโครสจากโมเลกุลหนึ่งไปจับยังอีกโมเลกุลหนึ่ง เกิดเป็นเคสโตส แสดงดังรูปที่ 2 (Gupta และ Bhatia, 1980)

นอกจากนั้นเมื่อใช้สารตั้งต้นที่แตกต่างกันก็สามารถเกิดฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่แตกต่างกันด้วย ดังเช่น เมื่อปี ค.ศ. 1952 Pazur ได้อธิบายการสังเคราะห์ฟรักโตซิล ราฟฟิโนส โดยใช้ราฟฟิโนสเป็นสารตั้งต้น โดยกาแลคโตสของราฟฟิโนสจะถูกนำไปต่อกับน้ำตาลเคสโตส เกิดเป็นฟรักโตซิล ราฟฟิโนส (กลูโคส 1 โมเลกุลต่อกับฟรักโตส 2 โมเลกุลและต่อกับราฟฟิโนส 1 โมเลกุล) (Pazur, 1952)



รูปที่ 2 โครงสร้างการทำงานของฟรักโตซิลทรานเฟอเรส (Gupta และ Bhatia, 1980)

ฟรักโตซิลทรานเฟอเรส

ฟรักโตซิลทรานเฟอเรส (FT) สามารถพบได้ทั้งในพืชและจุลินทรีย์หลายชนิด

1. ฟรักโตซิลทรานเฟอเรสที่พบในพืช

จากการศึกษาในพืชพบว่าเอนไซม์ FT มี 2 ชนิด (Edelman , 1968) ได้แก่

1.1 Sucrose – Sucrose 1-FT (1-SST) เป็นเอนไซม์ที่ย้ายน้ำตาลฟรักโตสจากน้ำตาลซูโครสโมเลกุลหนึ่งไปยังน้ำตาลซูโครสอีกโมเลกุลหนึ่ง เกิดเป็น 1-เคสโตส และน้ำตาลกลูโคส

1.2 Fructan – fructan 1-FT (1-FFT) เป็นเอนไซม์ที่ย้ายน้ำตาลฟรักโตสจากน้ำตาลซูโครสไปยังฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้เป็นฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีโมเลกุลยาวขึ้น

2. เอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรสที่พบในจุลินทรีย์

เอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรสที่พบในจุลินทรีย์สามารถเกิดปฏิกิริยาได้ 2 แบบ (Hidaka และคณะ , 1988 และ Hidaka และ Hirayama, 1991) คือ ปฏิกิริยาทรานฟรักโตซิลเลชั่น (Ut) เป็นการสร้างฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์และ ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Uh) ซึ่งเป็นการสลายฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยในปี 1988 Hidaka และคณะ ได้ทำการศึกษาเอนไซม์จาก *Aspergillus niger* ATCC 20611 เพื่อผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ และได้พบปฏิกิริยาทั้ง 2 แบบ พบว่าชนิดของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส โดยได้ทำการทดลองโดยใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *A. awamori, Aureobasidium pillulans A. niger* ATCC 20611 และ *A. niger* อีก 3 สายพันธุ์ พบว่าให้อัตราการเกิดปฏิกิริยาทั้ง 2 แบบแตกต่างกัน และเมื่อทดลองเพิ่มน้ำตาลซูโครสที่เป็นสารตั้งต้น พบว่าปฏิกิริยาทรานฟรักโตซิลเลชั่นจะเพิ่มขึ้น และเมื่อทดลองให้ปริมาณน้ำตาลซูโครสลดลงจะพบว่าเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชั่นสูงขึ้น ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าการสร้างฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ให้ได้ปริมาณสูงจะต้องมีอัตราส่วนระหว่าง Ut/Uh สูง ถ้ามีอัตราส่วนระหว่าง Ut/Uh ต่ำจะมีการสร้างฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่ำด้วย

จากการวิจัยต่าง ๆ สามารถสรุปได้ว่าฟรักโตซิลทรานเฟอเรสที่พบในจุลินทรีย์มี 3 แบบ ได้แก่

1. เอนไซม์ที่อยู่ภายในเซล (Intracellular enzyme) เช่น เอนไซม์ที่พบใน *Scopulariopsis brevicaulis* (Takeda และคณะ, 1994), *Aspergillus niger* (Hidaka และคณะ, 1988)

2. เอนไซม์ที่อยู่นอกเซล (Extracellular enzyme) เช่น *Penicillium roquefortii* (Jang และ Hang, 1996)

3. เอนไซม์ที่อยู่ติดกับผนังเซล (mycelium-bound enzyme) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ติดกับผิวของสายใยบริเวณผนังเซล เช่น *Aspergillus japonicus* (Cheng และคณะ, 1996)

ในปัจจุบันการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สามารถผลิตได้ 2 แบบ คือ

1. การผลิตโดยใช้เอนไซม์ย่อยอินนูลิน
   โดยการใช้เอนไซม์อินนูลินเนส ได้เป็นโอลิโกแซ็กคาไรด์หลายชนิด เช่น อินนูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ หรือ ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์
2. การผลิตจากน้ำตาลซูโครส
   โดยการใช้เอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรส เปลี่ยนน้ำตาลซูโครสเป็นฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดต่าง ๆ เช่น เคสโตส, นีสโตส และฟรักโตฟูแรนโนซิลนีสโตส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ และฟรักโตซิลทรานเฟอเรสในจุลินทรีย์

เนื่องจากการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาทรานฟรักโตซิลเลชั่น โดยเอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรส จึงได้มีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับฟรักโตซิลทรานเฟอเรสและการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เช่น

ในปี ค.ศ. 1952 Pazur และคณะได้ศึกษาปฏิกิริยาทรานฟรักโตซิลเลชั่นของฟรักโตซิลทรานเฟอเรสจาก *Aspergillus oryzae* พบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยาการย้ายน้ำตาลฟรักโตสจากน้ำตาลซูโครสไปยังน้ำตาลราฟฟิโนสได้ เกิดเป็นฟรักโตซิลราฟฟิโนส ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลฟรักโตสและน้ำตาลกาแลคโตสต่อกัน

ในปี ค.ศ. 1980 Gupta และ Bhatia ได้ศึกษาการสร้างฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จาก *Fusarium oxysporum* พบว่าหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อ 6 วันจะสามารถตรวจพบฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ชนิด เคสโตส นีสโตส และ ฟรักโตฟูแรนโนซิลนีสโตส

ในปี ค.ศ. 1988 Hidaka และคณะได้ศึกษาฟรักโตซิลทรานเฟอเรสจาก *Aspergillus niger* ATCC 20611 พบว่าสามารถเกิดทั้งปฏิกิริยาทรานฟรักโตซิลเลชั่นและไฮโดรไลซิสได้ โดยชนิดของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นกับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส เมื่อมีน้ำตาลซูโครสสูงจะทำให้เกิดปฏิกิริยา ทรานฟรักโตซิลเลชั่นได้สูงกว่าปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชั่น

ในปี ค.ศ. 1990 Fujita และคณะได้ศึกษาเบตาฟรักโตฟูแรนโนซิเดส จาก *Arthrobacter* sp. K-1 ซึ่งแยกได้จากดิน เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์พบว่ามีมวลโมเลกุลเท่ากับ 52,000 และเอนไซม์มีสภาวะเหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาที่ค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 5.5 ถึง 10.0 ที่ 55องศาเซลเซียส และเอนไซม์จะมีความเสถียรสูงสุดที่สภาวะความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.5 โดยเอนไซม์สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้กับน้ำตาลซูโครส, น้ำตาลราฟฟิโนสและฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ด้วย

ในปี ค.ศ. 1990 Fujita และคณะได้ศึกษาต่อเนื่องถึงปฏิกิริยาทรานฟรักโตซิลเลชั่นของเบตาฟรักโตฟูแรนโนซิเดส จาก *Arthrobacter* sp. K-1 พบว่าเอนไซม์สามารถเกิดปฏิกิริยาทั้งไฮโดรไลซิสและ ทรานฟรักโตซิลเลชั่นได้ และพบว่านอกจากน้ำตาลซูโครสแล้วเอนไซม์สามารถเกิดปฏิกิริยาทั้งสองชนิดได้กับน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น ไซโลส, กาแลคโตส, ซอร์โบส, ฟูโคส, อะราบิโนส, แรมโนส, แมนโนสได้ด้วย

ในปี ค.ศ. 1991 Balken และคณะได้ศึกษาฟรักโตซิลทรานเฟอเรสของ *Aspergillus phoenicis* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในเซล พบว่าสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เมื่อทดลองในการผลิตจะได้เคสโตส 300 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำตาลซูโครส 750 กรัมต่อลิตรในระยะเวลา 8 ชั่วโมง และเอนไซม์มีกิจกรรมลดลงเมื่อมีผลผลิตเพิ่มขึ้น 40 เปอร์เซ็นต์

ในปี ค.ศ. 1991 Hayashi และคณะได้ศึกษาการทำให้เบตาฟรักโตฟูแรนโนซิเดส จาก *Aureobasidium* sp. ATCC 20524 ให้บริสุทธิ์ได้เอนไซม์ 2 ชนิด โดยพบว่าเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 318,000 และ 346,000 ตามลำดับ โดยมีองค์ประกอบเป็นไกลโคโปรตีนประมาณ 30 และ 53 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเอนไซม์มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50 ถึง 55 องศาเซลเซียส มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาเท่ากับ 4.5 – 5.5 และ 4.5 – 6 ตามลำดับซึ่งเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีความเสถียรที่ค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 4 – 9 และเอนไซม์จะถูกยับยั้งโดย *p-chloromercuribenzoate*

ในปี ค.ศ. 1993 Duan และคณะได้ศึกษาเบตาฟรักโตฟูแรนโนซิเดส จาก *Aspergillus japonicus* TIT-KJ1 ที่ทำให้บริสุทธิ์ พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่ทำให้เอนไซม์มีความเสถียรอยู่ระหว่าง 7.0 -8.4 และเอนไซม์จะมีปฏิกิริยาทรานฟรักโตซิลเลชั่นที่ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.4 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากการศึกษาพบว่าเอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 236,000 และจะถูกยับยั้งโดย Hg^{2+}และ Ag^{+} โดยเอนไซม์สามารถผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ 55 เปอร์เซ็นต์เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ในปี ค.ศ. 1993 Muramatsu และคณะได้ศึกษาเบตาฟรักโตฟูแรนโนซิเดสจาก *Bifidobacterium adolescentis* G1 เมื่อทำให้บริสุทธิ์พบว่ามีมวลโมเลกุลเท่ากับ 74 กิโลดาลตัน มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาเท่ากับ 6.1 มีความเสถียรที่ค่าความเป็นกรดด่างระหว่าง 6.5 – 10.0 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แต่เอนไซม์สามารถเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้สูง

ในปี ค.ศ. 1995 Chen ได้ศึกษาผลิตเบตาฟรักโตฟูแรนโนซิเดสจาก *Aspergillus japonicus* ในระดับขวดเขย่า โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 910 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสให้สูงขึ้น 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรพบว่าจะทำให้การผลิตเอนไซม์สูงขึ้น แต่เมื่อใช้น้ำตาลซูโครสสูงขึ้นอีกกลับพบว่าจะทำให้การผลิตเอนไซม์ลดลง และอัตราการเจริญเติบโตของสายใยลดลงด้วย

ในปี ค.ศ. 1995 Hang และคณะได้ศึกษาฟรักโตซิลทรานเฟอเรสที่ผลิตออกนอกเซลของ *Aspergillus foetidus* NRRL 337 พบว่าสามารถผลิตเคสโตสได้ 50 เปอร์เซ็นต์จากน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที โดยมีความแปรผันของการผลิตอยู่ระหว่าง 29 – 47 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอัตราการผลิตขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ใช้และระยะเวลาที่ใช้ในการผลิต

ในปี ค.ศ. 1996 Kurakake และคณะได้ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อ ปฏิกิริยาทรานฟรักโตซิลเลชั่นของเอนไซม์เบตาฟรักโตฟูแรนโนซิเดสจาก *Aspergillus oryzae* พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาทรานฟรักโตซิลเลชั่นเท่ากับ 8 และเมื่อค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 จะทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และเมื่อค่าความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 4-5 จะมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้ใกล้เคียงกับการเกิดปฏิกิริยาทรานฟรักโตซิลเลชั่น โดยพบว่าที่ภาวะเหมาะสมต่อการผลิตจะได้ผลผลิตหลักเป็นเคสโตสและนีสโตส

ในปี ค.ศ. 1997 Chiang และ Lee ได้ศึกษาการตรึงเอนไซม์เบตาฟรักโตฟูแรนโนซิเดสจาก *Aspergillus japonicus* TIT-KJ1 ในเมตาคีลาไมด์ โพลีเมอร์ พบว่าสามารถผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ 35, 55 และ 61 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาณน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 10, 30 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 60 องศาเซลเซียส

ในปี ค.ศ. 1997 Ishimoto และ Nakamura ได้ศึกษาเอนไซม์เบตาฟรักโตฟูแรนโนซิเดสจาก *Clostridium perfringens* พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 37,000 และสามารถถูกยับยั้งได้โดย Hg^{2+}, Cu^{2+} และ Ag^{+}

ในปี ค.ศ. 1998 Jochen และคณะได้ศึกษาการผลิตเคสโตสจากยีสต์ที่มีการถ่ายทอดยีนของเอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรสจาก *Aspergillus foetidus* พบว่ายีสต์มีการแสดงออกของยีนและเมื่อทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์จะมีขนาด 180 กิโลดาลตัน และเมื่อนำมาใช้ในการผลิต พบว่าผลผลิตหลักที่ได้คือ 1-เคสโตส โดยจะมีการผลิต นีโอเคสโตสและ 6-เคสโตสด้วย

ในปี ค.ศ. 1998 Kim และคณะได้ศึกษาฟรักโตซิลทรานเฟอเรสจาก *Bacillus macerans* EG-6 พบว่าสามารถผลิตฟรักโตฟูแรนโนซิลนีสโตสได้ 42 เปอร์เซ็นต์เมื่อใช้น้ำตาลซูโครส 500 กรัมต่อลิตรและพบว่าเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นต่ำกว่า 10 กรัมต่อลิตรจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและเมื่อใช้น้ำตาลซูโครส 100 กรัมต่อลิตรจะมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสเท่ากับปฏิกิริยาทรานฟรักโตซิลเลชั่น โดยภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต คือ ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6 และอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส

ในปี ค.ศ. 1999 Song และ Jacques ได้ศึกษาฟรักโตซิลทรานเฟอเรสจาก *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 บริสุทธิ์ที่ได้จากการโคลนยีนเข้าใน *E.coli* NM 522 โดยใช้ phagemid pKRK 1969 พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมี Ca^{2+} เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาขณะที่ Cu^{2+} , Zn^{2+}, Hg^{2+} และ Fe^{3+} เป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์

การผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในอุตสาหกรรม

ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ในอุตสาหกรรม ประกอบด้วย 1-เคสโตส, นีสโตส และฟรักโตฟูแรนโนซิลนีสโตส โดยเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาโดยเอนไซม์บีตาฟรักโตฟูรานโนซิเดส (EC 3.2.1.26) และบีตาฟรักโตซิลทรานเฟอเรส (EC 2.4.1.9) (Hikada และคณะ, 1988)

ในปี ค.ศ. 1984 บริษัท Meiji Seika ประเทศญี่ปุ่นได้ประสบความสำเร็จครั้งแรกในการผลิต ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นการค้า โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า neosugar โดยผลิตจากเอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรสจาก *Aspergillus niger* (อ้างถึง Hidaka และ Hirayama, 1991) และต่อมาในปี ค.ศ. 1988 Hidaka และคณะได้ใช้เอนไซม์จาก *Aspergillus niger* ผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีความเข้มข้นสูงประมาณ 55-60 เปอร์เซ็นต์ จึงเป็นจุดเริ่มต้นการพัฒนาการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ในระดับอุตสาหกรรม

จากการศึกษาการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ สามารถแบ่งการพัฒนาการผลิตโดยจุลินทรีย์หรือเอนไซม์ของจุลินทรีย์ได้ในหลายรูปแบบ เช่น

1. การผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากการใช้สายใยอิสระ

Balken และคณะ (1991) ได้ศึกษาการผลิต 1-เคสโตส โดยไมซีเลียมของ *Aspergillus phoenicis* CBS 294.80 สามารถผลิต 1-เคสโตสได้ 300 กรัมต่อลิตร ในเวลา 8 ชั่วโมง เมื่อใช้น้ำตาลซูโครส 750 กรัมต่อลิตร ที่ภาวะเหมาะสมค่ากรด-ด่าง 8.0 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

2. การผลิต FOS จากการตรึงสายใย

Chih และคณะ (1996) ได้ศึกษาการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยการตรึงสายใยของ *Aspergillus japonicus* ในแคลเซียมอัลจิเนต พบว่าสามารถผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ใกล้เคียงกับการผลิตโดยใช้เซลอิสระ ที่อุณหภูมิเหมาะสม 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 ชั่วโมงได้ 1-เคสโตสสูงสุด 150 กรัมต่อลิตรที่เวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้น้ำตาลซูโครส 400 กรัมต่อลิตร

Chiang และ Lee (1997) ได้ศึกษาการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยการตรึงเบตาฟรักโตฟูแรนโนซิเดสจาก *Aspergillus japonicus* TIT-KJI ใน methacrylamide based polymeric beads และศึกษาการผลิตแบบ batch fermentation ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่า

ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.4โดยใช้น้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 10, 30 และ 50 เปอร์เซ็นต์สามารถผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์รวมได้ 35, 55 และ 61 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลซูโครสที่ใช้ทั้งหมดในเวลา 17 ชั่วโมง โดยแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ จะสัมพันธ์กับการลดลงของน้ำตาลซูโครส ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 2,360 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน แต่เมื่อผ่านการตรึงเอนไซม์จะมีกิจกรรมลดลงเหลือเพียง 14 เปอร์เซ็นต์

3. การผลิต FOS จากการใช้เอนไซม์ผสม

Jung และคณะ (1993) ได้ศึกษาการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์ผสมระหว่างฟรักโตซิลทรานเฟอเรส 10 หน่วยต่อกรัมของน้ำตาลซูโครสจาก *Aureobasidium pullulans* กับกลูโคสออกซิเดสจาก *Aspergillus niger* 5 หน่วยต่อกรัมของน้ำตาลซูโครส โดยผลิตในถังหมักขนาด 2 ลิตรภายใต้ภาวะการผลิต อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่ากรด-ด่างเท่ากับ 6.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 400 กรัมต่อลิตร การกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการไหลของออกซิเจน 1 vvm ได้ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ 55 - 60 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำตาลซูโครสที่ใช้

Yun และ Song (1993) ได้ศึกษาการใช้เอนไซม์ผสมระหว่างเบตาฟรักโตซิลทรานเฟอเรสจาก *Aureobasidium pullulans* KFCC 10524 10 หน่วยต่อกรัมของน้ำตาลซูโครสร่วมกับกลูโคสออกซิเดสจาก *Aspergillus niger* 15 หน่วยต่อกรัมของน้ำตาลซูโครสเพื่อกำจัดน้ำตาลกลูโคสออกนอกระบบการผลิต เนื่องจากได้เคยมีการศึกษาพบว่าน้ำตาลกลูโคสสามารถยับยั้งปฏิกิริยาทรานฟรักโตซิลเลชั่นได้ โดยผลิตในถังหมักภายใต้ภาวะการผลิต อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่ากรด-ด่างเท่ากับ 5.5 ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 400 กรัมต่อลิตร การกวน 550 รอบต่อนาที อัตราการไหลของออกซิเจน 0.7 ลิตรต่อนาทีได้ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ 90 และ 98 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำตาลซูโครสที่ใช้

4. การผลิต FOS ในระบบแรงดันสูง

Koji และคณะ (1999) ได้ศึกษาการตรึงเบตาฟรักโตฟูแรนโนซิเดส ของ *Aspergillus niger* ATCC 20611 ในเยื่อเซรามิกและอัดน้ำตาลซูโครสผ่านเยื่อเซรามิกโดยใช้แรงดัน พบว่าเอนไซม์มีอายุการใช้งาน 70 วันและให้ปริมาณการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ใกล้เคียงกับการผลิตแบบใช้เอนไซม์อิสระ เท่ากับ 54.4-57.4 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ใช้

นอกจากนี้ Jong และคณะ (1997) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

โดยวิธีต่าง ๆ จากการใช้ฟรักโตซิลทรานเฟอเรส ของ *Aureobasidium pullulans* KFCC 10254 โดยเปรียบเทียบการผลิตแบบใช้เอนไซม์อิสระ, การตรึงเอนไซม์, การใช้เซลอิสระและการตรึงเซล ในการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (continuous system) และแบบไม่ต่อเนื่อง (batch system) พบว่าการผลิตแบบต่อเนื่องจะให้ผลผลิตสูงกว่าแบบไม่ต่อเนื่อง และการผลิตแบบต่าง ๆ ให้ผลผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ใกล้เคียงกัน

การศึกษาการทำให้ผลผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์มีการปนเปื้อนลดลง

จากการที่ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและระดับอุตสาหกรรม จะมีส่วนผสมของน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลกลูโคสอยู่ในระดับหนึ่ง เนื่องจากเป็นน้ำตาลที่เกิดขึ้นจากการผลิต จึงได้มีงานวิจัยที่ศึกษาการทำให้ผลผลิตที่ได้มีปริมาณของน้ำตาลชนิดอื่นที่ปนเปื้อนอยู่ลดลง เช่น

ในปี ค.ศ. 1991 Shiomi และคณะ ได้ศึกษาการแยกฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่รวมอยู่กับน้ำตาลชนิดต่าง ๆ โดย วิธีโครมาโตรกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ โดยใช้คอลัมน์ Dionex และใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และโซเดียมอะซิเตตที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นสารละลายชะ พบว่าสามารถชะน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ออกจากคอลัมน์ในเวลาต่าง ๆ กัน โดยน้ำตาลที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะถูกชะออกจากคอลัมน์ก่อนตามด้วยน้ำตาลที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า

ในปี ค.ศ. 2000 Hogarth และคณะ ได้ศึกษาการแยกเคสโตส, นีสโตสและฟรักโตฟูแรนโนซิลนีสโตสออกจากกันโดยใช้ วิธีโครมาโตรกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ โดยใช้คอลัมน์ Dionex โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์, โซเดียมอะซิเตตและน้ำกลั่นเป็นสารละลายชะ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ สามารถชะฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ออกมาได้ที่เวลาต่าง ๆ กัน

ในปี ค.ศ. 2002 Crittenden และ Playne ได้ศึกษาการทำให้ neosugar มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลฟรักโตสและน้ำตาลซูโครสที่รวมอยู่ลดลง โดยใช้ *Zymomonas mobilis* ACM 2716 ที่ตรึงไว้ในอะคริลาไมด์เจล เลี้ยงในสารละลาย neosugar ชนิดต่าง ๆ ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 300 กรัมต่อลิตร โดยไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าสามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลฟรักโตสและน้ำตาลซูโครสให้กลายเป็นน้ำตาลซอร์บิทอล, เอทานอลและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้ โดยคงเหลือน้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลฟรักโตสประมาณ 9 เปอร์เซ็นต์จากเริ่มต้น โดยไม่มีผลต่อการย่อยสลายฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

ปัจจุบันได้มีการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในรูปแบบผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ในหลายยี่ห้อ โดยเฉพาะในประเทศแถบยุโรป เช่น ผลิตภัณฑ์ Thiriet จากประเทศฝรั่งเศส (เป็นผลิตภัณฑ์ให้ความหวาน

พลังงานต่ำ), ผลิตภัณฑ์ Vivis จากประเทศฝรั่งเศส (เป็นผลิตภัณฑ์ลดความอ้วน) และ ผลิตภัณฑ์ Vamdermoorlele จากประเทศเบลเยี่ยม (เป็นผลิตภัณฑ์แยมทาแซนวิช) เป็นต้น (Young, 1998) และสำหรับฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่รู้จักกันในทางการค้าโดยทั่วไป ได้แก่ neosugar ซึ่งมี 2 ชนิด คือ neosugar G และ neosugar P แตกต่างกันตามสัดส่วนของ ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผสมอยู่ (อ้างถึงใน Hidaka และ Hirayama, 1991)

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในด้านต่าง ๆ อีกมากมายและด้วยเทคโนโลยีสารสนเทศทำให้สามารถหาข้อมูลได้ทางเว็บไซด์ต่าง ๆ เช่น

http://www.uastabs.com

http://www.medicinalfoodnews.com

http://www.chiro.org

http://www.kampoyki.com

http://www.broste.com

http://www.nestle.co.th

งานวิจัยเกี่ยวกับฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นที่น่าสนใจและยังไม่มีการศึกษาอย่างกว้างขวางในประเทศไทยและจากการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดย *Penicillium* sp. H12 ซึ่งได้จากการคัดแยกโดยเสาวนีย์ ศิริรูป (2539) พบว่าสามารถผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ได้ปริมาณมากภายใต้ภาวะการผลิตที่เหมาะสมศึกษาโดยวรรณา ศรัสัจจารักษ์ (2543) จึงมีความน่าสนใจในการพัฒนาการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ให้ได้ปริมาณมากขึ้น โดยจะศึกษาการผลิตโดยการเลี้ยงแบบเฟดแบท ซึ่งจากการค้นคว้ายังไม่พบการศึกษาการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยเซลล์ของจุลินทรีย์ ในการเลี้ยงแบบเฟดแบท และยังไม่มีงานวิจัยศึกษาการผลิตแบบเฟดแบทโดย *Penicillium* sp. H12 มาก่อน รวมทั้งงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาการทำให้ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้มีส่วนผสมของ น้ำตาล ชนิดอื่นลดลง ทั้งนี้เพื่อให้มีแนวโน้มในการนำไปผลิตในระดับขยายส่วนและพัฒนาการผลิตให้ดีขึ้นต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ให้ได้ผลผลิตสูงโดย *Penicillium* sp. H12 ในการเลี้ยงแบบเฟดแบท

ขั้นตอนดำเนินงาน

1.ศึกษาอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในขวดเขย่า และถังหมัก

2.ศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเพิ่มน้ำตาลซูโครสในระหว่างการผลิต

3.ศึกษาผลของการเพิ่มน้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นในช่วงเวลาที่เหมาะสม

4.ศึกษาการเพิ่มน้ำตาลซูโครสแบบต่อเนื่อง

5.ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เบื้องต้นในการผลิตเคสโตส

6.ศึกษาการแยกน้ำตาลโดยคอลัมน์ผงถ่านกัมมันต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

เคมีภัณฑ์และอุปกรณ์

1.เคมีภัณฑ์

1.1เคมีภัณฑ์สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

น้ำตาลทรายขาว ของบริษัทมิตรผล, ประเทศไทย

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco laboratories, U.S.A.

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany

โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท May and Baker Ltd., England

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ของบริษัท BDH Laboratory Chemicals Ltd., England

1.2เคมีภัณฑ์สำหรับวิเคราะห์ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์และน้ำตาลชนิดอื่น ๆ ด้วยเครื่องโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (High pressure liquid chromatrography ; HPLC)

อะซีโตรไนไตร (CH_3CN) ของบริษัท Scharlau, Spain

น้ำตาลฟรักโตส (fructose) ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany

น้ำตาลกลูโคส (glucose) ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany

น้ำตาลซูโครส (sucrose) ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany

น้ำตาลราฟฟิโนส (raffinose) ของบริษัท Difco laboratories, U.S.A.

ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดเคสโตส (kestose) ของบริษัท TCI, Japan

ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดนีสโตส (nystose) ของบริษัท TCI, Japan

1.3เคมีภัณฑ์อื่น ๆ

โซเดียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) .$7H_2O$ ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany

กรดซิตริก ของบริษัท Riedel-deHaen, Germany

กรดไฮโดรคลอริค (HCl) ของบริษัท Riedel – dehaen, Germany

ทวีน 80 ของบริษัท BDH Laboratory Chemicals Ltd., England

โซเดียมโปตัสเซียมทาร์เทรต ($C_4H_4KnaO_6.H_2O$) ของบริษัท May and Baker Ltd.England

กรดไดไนโตรซาลิซิลิก (3,5- Dinitro salicylic acid) ของบริษัท E.Merck Darmstadt, Germany

ฟีนอล (C_6H_5OH) ของบริษัท Riedel – dehaen, Germany

2.เครื่องมือสำคัญที่ใช้ในงานวิจัย

ถังหมัก (fermenter) รุ่น MD-300 ของบริษัท L.E.Marubishi Co.Ltd., Japan

เครื่องควบคุมและวัดค่าออกซิเจนละลาย (DO coltroller) รุ่น FM – 2000 ของบริษัท Eyela Tokyo Rikakikai co.Ltd., Japan

เครื่องควบคุมและวัดค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH coltroller) รุ่น FM – 2000 ของบริษัท Eyela Tokyo Rikakikai co.Ltd., Japan

เครื่องควบคุมอุณหภูมิพร้อมปั๊ม (Circulation type handy cooler) รุ่น TRL-108 ของบริษัท Thomas scientific Co.Ltd., USA

ปั๊มเติมสาร (pump box) รุ่น FB-2000 ของบริษัท Eyela Tokyo Rikakikai Co.Ltd., Japan

อุปกรณ์วัดค่าออกซิเจนละลาย (DO probe) รุ่น FC-2000 ของบริษัท Eyela Tokyo Rikakikai Co.Ltd., Japan

อุปกรณ์วัดค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH probe) รุ่น FC – 2000 ของบริษัท Eyela Tokyo Rikakikai Co.Ltd., Japan

ปั๊มอากาศ (Aeration unit) รุ่น MAU – 1 ของบริษัท Eyela tokyo Rikakikai Co.Ltd., Japan

เครื่องปรับกระแสไฟฟ้า (Step down transformer) Auto-05 ของบริษัท Tron Advance Technology Transformer., USA

กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) CHK ของ Olympus optical co.Ltd.,Taiwan

เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น G-27 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co.,Inc.,U.S.A.

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 401 ของบริษัท Milton Roy, U.S.A.

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น Cyberbean 2000 ของบริษัท Beckman, U.S.A.

ตู้อบแห้ง (hot air oven) รุ่น UL-80 ของบริษัท Memmert GmbH, Germany

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing cooporation, Japan

อ่างปรับอุณหภูมิ (water bath) ของบริษัท Tokyo Rikakikai Co.ltd., Japan

อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) ขนาด bright line deep 1/10 มิลลิลิตร ของบริษัท Boeco, Germany

ชุดควบคุมสภาวะในถังหมัก รุ่น EC 2000 บริษัท Eyela, Japan

เครื่องวัดปริมาณอากาศ (Rotameter) ของบริษัท Kofloc รุ่น RK 1400, Japan

เครื่องเก็บสารตัวอย่าง (fraction collector) รุ่น FRAC-100 ของบริษัท Pharmacia, USA

วิธีดำเนินการทดลอง

1.จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้เพื่อการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Fructooligosaccharides ; FOS) ในงานวิจัย คือ *Penicillium* sp. H12 ที่คัดแยกได้จากดินในประเทศไทย (เสาวนีย์ ศิริรูป, 2539)

2.การเก็บรักษาจุลินทรีย์

เพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 บนอาหารแข็งเอียง (slant agar) โปเตโตเด็กซ์โตรสเอการ์ (potato dextrose agar) บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แปรผันไม่เกิน 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5-7 วัน จึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.การเตรียมหัวเชื้อ

3.1 การเตรียมหัวเชื้อสปอร์

เพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 บนอาหารแข็งเอียงโปเตโตเด็กซ์โตรสเอการ์ บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (อุณหภูมิ 30 แปรผันไม่เกิน 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5-7 วัน เพื่อให้ได้สปอร์จำนวนมาก เติมน้ำปลอดประจุผสมทวีน 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในหลอดเลี้ยงเชื้อ เขี่ยสปอร์ให้หลุดกระจายในน้ำ นับจำนวนสปอร์โดยใช้อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ให้ได้ประมาณ $2X10^9$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร หรือตามที่ระบุไว้ในแต่ละการทดลอง ใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลองต่อไป

3.2 การเตรียมหัวเชื้อที่เป็นสายใย

ปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 3.1 แต่ปรับจำนวนสปอร์ให้ได้ประมาณ $10X10^{10}$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นถ่ายสปอร์ที่เตรียมได้ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่เป็นสายใย (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (แปรผันไม่เกิน 2 องศาเซลเซียส) ตามเวลาที่ระบุไว้ในแต่ละการทดลอง ซึ่งจะทำให้มีความหนาแน่นของสปอร์งอกประมาณ $2X10^{9}$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร และใช้เป็นหัวเชื้อที่เป็นสายใยต่อไป

4.การผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่า

ถ่ายหัวเชื้อสปอร์หรือสปอร์งอกที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 3.1 และ 3.2 ตามที่ระบุไว้ในแต่ละการทดลอง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.การผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในถังหมัก

ถ่ายหัวเชื้อสปอร์หรือสปอร์งอกที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 3.2 ตามที่ระบุไว้ในการทดลอง ปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในถังหมัก จัดปริมาณออกซิเจนละลาย (dissolve oxygen) เท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ของค่าอากาศอิ่มตัว (ควบคุมโดยปรับอัตราเร็วการกวน) และค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 ตลอดการเพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6.การเก็บเกี่ยวฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

กรองแยกสายใยของ *Penicillium* sp. H12 จากอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ด้วยกระดาษกรองวอทแมน เบอร์ 1 นำส่วนใสที่ได้จากการกรองไปตรวจหาปริมาณ FOS และน้ำตาลชนิดอื่น ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีในข้อ 8 ส่วนสายใยที่กรองได้นำไปวัดการเติบโตตามวิธีการทดลองในข้อ 7

7.การหาการเจริญเติบโตของ *Penicillium* sp. H12

นำสายใยที่กรองและผ่านการล้างด้วยน้ำปลอดประจุอย่างน้อย 2 ครั้ง อบในตู้อบแห้งอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ นำค่าน้ำหนักแห้งที่ชั่งได้ทั้งหมดลบด้วยค่าน้ำหนักแห้งของกระดาษกรอง

8. การวิเคราะห์ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์และน้ำตาลชนิดอื่น ๆ โดยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง

นำน้ำหมักที่ได้จากการเก็บเกี่ยวตามวิธีการทดลองในข้อ 6 ที่เจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม มาตรวจสอบด้วยเครื่องโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง ยี่ห้อ Waters โดยใช้คอลัมน์สำหรับวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรต (Amino propyl Column) ปั๊มรุ่น Waters 515 และ Refractive Index Detector รุ่น Waters 410 และใช้อะซิโตรไนไตรเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่นปริมาตรต่อปริมาตร เป็นสารละลายตัวพา อัตราการไหลเท่ากับ 1.4 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิคอลัมน์เท่ากับอุณหภูมิห้อง โดยมีฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดเคสโตส และนีสโตสเป็นสารมาตรฐาน และน้ำตาลราฟฟิโนสเป็นสารมาตรฐานภายใน (internal standard) คำนวนหาปริมาณฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ตามวิธีในภาคผนวก ง 1 โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานภายในภาคผนวก ค 1- ค 5

9. **การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีของ** Bernfeld (Dinitrosalicylic colourimetric method)

นำสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้นปริมาตร 20 ไมโครลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5 นอร์มอล ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิค (DNSA reagent) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลายโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรตเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำแข็ง นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

10. **ศึกษาอายุของหัวเชื้อในการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์**

10.1 ศึกษาอายุของหัวเชื้อในการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในขวดเขย่า

ถ่ายหัวเชื้อสปอร์และสายใยที่มีอายุ 14, 16, 18 และ 20 ชั่วโมง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เตรียมได้จากวิธีการทดลองในข้อ 3.1 และ 3.2 ลงในอาหารเหลวสำหรับการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่วัดได้ วิเคราะห์โดยวิธี HPLC ในข้อ 8

10.2 ศึกษาอายุของหัวเชื้อในการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในถังหมัก

ถ่ายหัวเชื้อสปอร์และหัวเชื้อที่เป็นสายใยที่มีอายุ 16 และ 18 ชั่วโมงที่เตรียมได้จากวิธีในข้อ 3.2 ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 ลิตรในถังหมักขนาด 2.6 ลิตร ควบคุมค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ของค่าอากาศอิ่มตัวตลอดการ

เพาะเลี้ยง ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างตลอดการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 5 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ และการเจริญเติบโตของรา

11. ศึกษาการเติมน้ำตาลซูโครสที่ชั่วโมงต่าง ๆ ระหว่างการผลิต

จากการทดลองในข้อ 10 ทำให้ทราบอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ จึงได้ศึกษาการเพิ่มน้ำตาลซูโครสในระหว่างการผลิตให้สูงขึ้น 50 กรัมต่อลิตร โดยเปรียบเทียบการเพิ่มน้ำตาลซูโครส ณ ชั่วโมงที่ 9, 12, 15 และ 18 ของการผลิต เพื่อเปรียบเทียบแนวโน้มการผลิต เมื่อมีน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้น ณ ชั่วโมงต่าง ๆ เปรียบเทียบกับการผลิตโดยไม่มีการเติมน้ำตาลซูโครสให้เพิ่มขึ้นระหว่างการผลิต (จากการทดลองในข้อ 10)

12. ศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เติมในระหว่างการผลิต

จากการทดลองในข้อ 11 พิจารณาผลการเติมน้ำตาลซูโครส ณ ชั่วโมงต่าง ๆ ในระหว่างการผลิต จึงทดลองเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เติมเป็น 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่มีความเหมาะสมในการเพิ่มน้ำตาลซูโครส จากการทดลองในข้อ 11 นำมาเปรียบเทียบแนวโน้มการผลิตเมื่อมีการเพิ่มน้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น

13. ศึกษาการเติมน้ำตาลซูโครสแบบต่อเนื่องตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ของการผลิต

เนื่องจากการเพิ่มน้ำตาลซูโครสในระหว่างการผลิตอาจทำให้มีแรงดันออสโมติคสูงขึ้น ซึ่งอาจมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ จึงได้ศึกษาการเติมน้ำตาลซูโครสแบบต่อเนื่อง เพื่อให้มีน้ำตาลซูโครสในระบบค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ โดยเริ่มต้นเติม ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการผลิตเนื่องจากเป็นช่วงที่เริ่มต้นมีการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สูงและมีแนวโน้มของปริมาณน้ำตาลซูโครสลดลง โดยทดลองเติมน้ำตาลซูโครสแบบต่อเนื่องโดยเตรียมความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เริ่มต้นเติมเท่ากับ 200, 300 และ 400 กรัมต่อ 600 มิลลิลิตรตามลำดับ เติมติดต่อกันเป็นเวลา 10 ชั่วโมงด้วยอัตราการเติม 1 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นนำมาเปรียบเทียบแนวโน้มการผลิต

14. การหากิจกรรมเบื้องต้นของฟรักโตซิลทรานเฟอเรส

ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกสายใยออกจากน้ำหมักที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ล้างสายใยด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง บดสายใยให้ละเอียดในสารละลายซิเตรท ฟอสเฟต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 ปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายส่วนใส และน้ำหมักอย่างละ 1 มิลลิลิตรเพื่อไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โดยเติมลงในสารละลายซิเตรท ฟอสเฟต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่างเท่า

กับ 5.0 (Chen, 1995) ที่มีส่วนผสมของน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลฟรักโตสเข้มข้นชนิดละ 50 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าเป็นครั้งคราว เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาที่ 0 และ 2 ชั่วโมงโดยต้มในน้ำเดือด นำไปวิเคราะห์ผลต่างของปริมาณเคสโตสที่สูงขึ้นที่เวลา 0 และ 2 ชั่วโมง (โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่สามารถผลิตเคสโตสได้ 1 กรัมในเวลา 2 ชั่วโมง)

14.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry

นำน้ำหมัก 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย lowry A ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที เติมสารละลาย lowry B ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้นาน 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยใช้กราฟมาตรฐานจากสารละลาย BSA (Bovine serum albumin)

15. ศึกษาการทำฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากน้ำหมักให้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้น

15.1 ศึกษาการดูดซับน้ำตาลชนิดต่าง ๆ โดยผงถ่านกัมมันต์

เตรียมสารละลายน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ได้แก่ สารละลายน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 0.025 กรัมต่อน้ำปลอดประจุ 3 มิลลิลิตร สารละลายน้ำตาลฟรักโตสเข้มข้น 0.025 กรัมต่อน้ำปลอดประจุ 3 มิลลิลิตร สารละลายน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.025 กรัมต่อน้ำปลอดประจุ 3 มิลลิลิตร สารละลายน้ำตาลเคสโตสเข้มข้น 0.01 กรัมต่อน้ำปลอดประจุ 3 มิลลิลิตร สารละลายน้ำตาลนีสโตสเข้มข้น 0.01 กรัมต่อน้ำปลอดประจุ 3 มิลลิลิตร เติมเข้าคอลัมน์ที่บรรจุผงถ่านกัมมันต์ ด้วยอัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ชะด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ได้แก่ น้ำปลอดประจุ (สำหรับชะน้ำตาลฟรักโตสและน้ำตาลกลูโคส) เอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (สำหรับชะน้ำตาลซูโครส) และ เอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ (สำหรับชะเคสโตสและนีสโตส) เก็บสารละลายที่ออกจากคอลัมน์ในหลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตรโดยเครื่องเก็บตัวอย่างสารละลาย (fraction collector) นำไปวิเคราะห์ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรโดยวิธีของ Bernfeld

15.2 ศึกษาการดูดซับน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผสมกันโดยผงถ่านกัมมันต์

เตรียมสารละลายน้ำตาลผสม ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลฟรักโตสและน้ำตาลซูโครส เข้มข้นชนิดละ 0.025 กรัมต่อ 3 มิลลิลิตร และน้ำตาลเคสโตสกับน้ำตาลนีสโตสเข้มข้นชนิดละ 0.01 กรัมต่อ 3 มิลลิลิตร รวมมีน้ำตาล 5 ชนิดในน้ำปลอดประจุปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติมเข้าคอลัมน์และชะด้วยสารละลายเช่นเดียวกับการทดลองในข้อ 13.1 นำไปวิเคราะห์ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรโดยวิธีของ Bernfeld

15.3 ศึกษาการดูดซับน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ในน้ำหมักโดยผงถ่านกัมมันต์

นำน้ำหมักที่ได้จากการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติมเข้าในคอลัมน์และชะด้วยสารละลายเช่นเดียวกันการทดลองในข้อ 3.2 นำไปวิเคราะห์ค่าดูดกลืนแสงที่

540 นาโนเมตรโดยวิธีของ Bernfeld และเก็บรวมสารละลายตัวอย่างที่ชะออกมานำไปประเหยในอ่างน้ำเดือดให้มีปริมาตรคงเหลือประมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปวิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของสารละลายน้ำตาลที่แยกได้โดย HPLC ในข้อ 8

15.4 ศึกษาประสิทธิภาพของคอลัมน์เมื่อใช้คอลัมน์ติดต่อกัน

เตรียมคอลัมน์ใหม่โดยบรรจุผงถ่านกัมมันต์ปริมาตร 0.5 กรัมในพาสเจอร์ปิเปตแก้ว ทดลองเติมน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.005 กรัมต่อปริมาตร 3 มิลลิลิตร ชะด้วยสารละลายเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครสโดยวิธีของ Bernfeld ทำซ้ำติดต่อกัน 4 ครั้ง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ชะออกมาในแต่ละครั้งเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเก็บเกี่ยวน้ำตาลซูโครสคืนจากคอลัมน์เมื่อใช้คอลัมน์ติดต่อกัน

15.5 ศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสสูงสุดที่คอลัมน์สามารถดูดซับได้

เพื่อศึกษาอัตราส่วนของการดูดซับของคอลัมน์กับน้ำตาลซูโครส โดยเตรียมสารละลายน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.09, 0.12 และ 0.05 กรัมต่อ 3 มิลลิลิตร เติมเข้าในคอลัมน์และชะโดยน้ำกลั่นและสารละลายเช่นเดียวกับข้อ 13.1 นำไปวิเคราะห์ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธีของ Bernfeld

15.6 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการดูดซับน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลกลูโคส

เพื่อศึกษาผลการรบกวนของน้ำตาลกลูโคสที่ผสมกับน้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นสูงสุดที่คอลัมน์สามารถดูดซับได้ โดยเตรียมสารละลายน้ำตาลซูโครสเข้มข้นมากที่สุดที่คอลัมน์สามารถดูดซับได้จากผลการทดลองในข้อ 13.5 ผสมกับน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 0.12 กรัม เติมเข้าในคอลัมน์และชะโดยสารละลายเช่นเดียวกับข้อ 13.1 นำไปวิเคราะห์ค่าดูดกลืนแสงโดยวิธีของ Bernfeld

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. ผลการศึกษาปัจจัยเบื้องต้นที่มีผลต่อการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดย *Penicillium* sp.H12

1.1 ผลของอายุหัวเชื้อต่อการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

1.1.1 ผลการทดลองในขวดเขย่า

จากการเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ตามวิธีการทดลองในข้อ 4 โดยใช้หัวเชื้อชนิดที่เป็นสปอร์และสายใยที่มีอายุ 14, 16, 18 และ 20 ชั่วโมงพบว่า สามารถผลิต FOS ได้ใกล้เคียงกัน แต่ระยะเวลาที่มีการผลิตเคสโตสสูงสุดแตกต่างกัน (ตารางที่ 3) ในกรณีที่ใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์สามารถผลิตเคสโตสได้สูงสุดที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ได้เคสโตส 65 กรัมต่อลิตร ขณะที่การเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยที่มีอายุ 14, 16, 18 และ 20 ชั่วโมงจะสามารถผลิตเคสโตสสูงสุดได้เท่ากับ 73.77, 75.7, 75 และ 72.93 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ระยะเวลาใกล้เคียงกันในช่วง 12 – 18 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง เมื่อเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงจะมีการใช้น้ำตาลซูโครสอย่างรวดเร็วและมีการผลิต FOS สูงขึ้นโดยมีการผลิตเคสโตสสูงกว่านีสโตส (รูปที่ 3 – 7) การเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์พบว่าในระยะเวลา 9 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยงมีการใช้น้ำตาลซูโครสไปอย่างรวดเร็วที่สุด (ซึ่งน่าจะเกิดจากสปอร์เริ่มงอกจึงมีการใช้น้ำตาลซูโครสอย่างรวดเร็ว) หลังจากชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง พบว่าการผลิตเคสโตสจะเริ่มคงที่ แต่การผลิตนีสโตสยังคงเพิ่มขึ้น (รูปที่ 8 และ 9) (เนื่องจากการสร้างนีสโตสเกิดจากการนำน้ำตาลฟรักโตส 1 โมเลกุลเข้าเชื่อมกับเคสโตส 1 โมเลกุล)

ขณะที่การผลิตนีสโตสการเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ สามารถผลิตนีสโตสได้สูงสุดเท่ากับ 49 กรัมต่อลิตรที่ระยะเวลา 21 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ขณะที่การเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยที่มีอายุ 14, 16, 18 และ 20 ชั่วโมงสามารถผลิตนีสโตสได้สูงสุดเท่ากับ 46.72, 39, 46 และ 39 กรัมต่อลิตรที่ระยะเวลาระหว่าง 18 – 24 ชั่วโมง และการผลิตนีสโตสมีปริมาณใกล้เคียงกัน (เช่นเดียวกับการผลิตเคสโตส) เมื่อพิจารณาปริมาณ FOS โดยรวมพบว่าการเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์และหัวเชื้อที่เป็นสายใยที่มีอายุ 14,16,18 และ 20 ชั่วโมงสามารถผลิต FOS รวมสูงสุดได้เท่ากับ 97, 110.8, 110, 115 และ 83.93 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าหัวเชื้อที่เป็นสายใยที่มีอายุ 14, 16 และ 18 ชั่วโมงผลิต FOS รวมสูงสุดปริมาณใกล้เคียงกันในช่วง 110 – 115 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาการเกิดน้ำตาลกลูโคส (รูปที่ 13) พบว่าน้ำตาลกลูโคสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในระยะเวลา 12 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นจะมีระดับค่อนข้างคงที่ แม้ว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสจะลดลง ซึ่งน่าจะเกิดจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มขึ้นจากการผลิตเคสโตสและนีสโตสใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไปในการเจริญเติบโตของสายใย เนื่องจากน้ำหนักแห้งของสายใยมีปริมาณเพิ่มขึ้น (รูปที่ 12) ซึ่งการผลิตโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์และหัวเชื้อ

ที่เป็นสายใยที่มีอายุ 14, 16, 18 และ 20 ชั่วโมงจะได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุดเท่ากับ 48, 52.01, 51.2, 50 และ 41.08 กรัมต่อลิตรที่เวลา 21, 24, 24, 24 และ 21 ชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งระดับของน้ำตาลกลูโคสที่คงที่เนื่องมาจากปริมาณน้ำตาลซูโครสลดลง ทำให้การผลิต FOS ลดลง จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในระบบคงที่ด้วย

นอกจากนี้พบว่าน้ำตาลฟรักโตสมีปริมาณน้อยมาก โดยเฉลี่ยพบว่ามีความเข้มข้นประมาณ 2 กรัมต่อลิตรและค่อนข้างคงที่ ซึ่งสอดคล้องกับกลไกการเกิดปฏิกิริยา เมื่อน้ำตาลซูโครสถูกแยกออกเป็นน้ำตาลฟรักโตสและน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรักโตสจะถูกนำไปต่อกับน้ำตาลซูโครสหรือเคสโตส (Jung และคณะ,1989) ดังนั้นในระบบจึงพบปริมาณของน้ำตาลฟรักโตสน้อยมาก จากการพิจารณาแนวโน้มการผลิต FOS โดยรวมของการเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่มีอายุต่าง ๆ พบว่ามีแนวโน้มการผลิตเป็นไปในทิศทางเดียวกันโดยเมื่อวิเคราะห์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) ของการผลิต FOS เฉลี่ยตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงซึ่งเป็นช่วงที่มีการผลิต FOS อย่างรวดเร็วพบว่าการผลิต FOS รวมเมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์และหัวเชื้อที่เป็นสายใยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4) โดยค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของการผลิต FOS รวมเฉลี่ยเท่ากับ 0.9824 แสดงว่าการผลิต FOS รวมในช่วง 0 – 12 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่มีอายุที่แตกต่างกันมีแนวโน้มสัมพันธ์กัน เมื่อพิจารณาการผลิตเคสโตสและนีสโตสของการเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่มีอายุ 18 ชั่วโมงพบว่าจะสามารถผลิต FOS รวมในระยะเวลาหลังจาก 15 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงได้สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับหัวเชื้ออายุอื่น (115, 108 และ 111 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 18, 21 และ 24) ขณะที่การเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่มีอายุ 14 ชั่วโมงจะมีปริมาณเคสโตสและนีสโตสเริ่มต้นสูงที่สุด ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าในการเตรียมหัวเชื้อเมื่อเพาะเลี้ยงในระยะเวลา 14 ชั่วโมงของการเตรียมหัวเชื้อจะเป็นช่วงที่มีการผลิต FOS ทั้งชนิดเคสโตสและนีสโตสได้สูงจึงทำให้ปริมาณเคสโตสและนีสโตสเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงมีปริมาณสูงด้วย เช่นเดียวกับในการเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยที่มีอายุ 16 ชั่วโมงก็มีปริมาณเคสโตสและนีสโตสเริ่มต้นสูง แต่น้อยกว่าการเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้ออายุ 14 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาอัตราการผลิตเคสโตสพบว่าเมื่อพิจารณาในระยะเวลาที่ให้การผลิตสูงสุด พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่มีอายุต่าง ๆ กันมีอัตราการผลิตใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 3) แม้ว่าจะแตกต่างกันตามชั่วโมงที่ให้การผลิตสูงสุด

ในกรณีที่การผลิตนีสโตสซึ่งสูงขึ้นในช่วงหลังของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 9) พบว่าในช่วงหลังของการเพาะเลี้ยงปริมาณน้ำตาลเคสโตสโดยรวมจะค่อนข้างคงที่หรือลดลงเล็กน้อย (รูปที่ 8) ซึ่งน่าจะเกิดจากการสร้างเคสโตสมีอัตราเร็วใกล้เคียงกับการสร้างนีสโตส ดังนั้นปริมาณเคสโตสที่หมดไปกับการสร้างนีสโตส จึงน่าจะถูกทดแทนโดยการสร้างเคสโตสจากน้ำตาลซูโครส เมื่อพิจารณาจากกราฟการกระจายเชิงเส้น (รูปที่ 14) ซึ่งแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ FOS รวมขณะ

เพาะเลี้ยงจะสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ลดลง พบว่าเมื่อปริมาณน้ำตาลซูโครสคงเหลือในระบบต่ำกว่า 20 กรัมต่อลิตรจะทำให้การผลิต FOS รวมค่อนข้างคงที่ และเมื่อพิจารณาความชันของการกระจายเชิงเส้นของการผลิตโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์และหัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 14,16,18 และ 20 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.6375, 0.5901, 0.7285, 0.8159 และ 0.5437 ตามลำดับ พบว่าการผลิต FOS รวมโดยหัวเชื้อที่เป็นสายใยที่มีอายุ 18 ชั่วโมงมีค่าความชันสูงสุด ขณะที่การผลิตโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์, หัวเชื้อที่เป็นสายใยที่มีอายุ 14 และ 20 ชั่วโมงจะมีความชันใกล้เคียงกัน จึงมีความเป็นไปได้ว่าการผลิตโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยที่มีอายุ 16 และ 18 ชั่วโมงมีอัตราการผลิตตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงชั่วโมงที่ 24 เพิ่มขึ้นสูงกว่าการผลิตโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ และหัวเชื้อที่เป็นสายใยที่มีอายุ 14 และ 20 ชั่วโมง

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบการผลิต FOS เมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้ออายุต่าง ๆ

เปรียบเทียบการผลิต FOS	หัวเชื้อที่เป็นสปอร์	หัวเชื้อที่เป็นสายใย อายุต่าง ๆ (ชม.)			
		14	16	18	20
ชั่วโมงที่ผลิตเคสโตสได้สูงสุด	12	12	15	18	12
ชั่วโมงที่ผลิตนีสโตสได้สูงสุด	21	24	21	24	21
ชั่วโมงที่ผลิต FOS รวมได้สูงสุด	21	18	18	18	12
ปริมาณ FOS รวมสูงสุด (ก/ล)*	97	110	110	115	84
ปริมาณเคสโตสสูงสุด (ก/ล)*	65	74	76	75	73
ปริมาณนีสโตสสูงสุด (ก/ล)*	49	47	39	46	39
อัตราการผลิตเคสโตส (ก/ล/ชม)*	5.4	6.2	5.1	4.2	6.1
อัตราการผลิตนีสโตส (ก/ล/ชม)*	2.3	1.9	1.8	1.9	1.9
อัตราการผลิต FOS รวม (ก/ล/ชม)*	4.6	6.1	6.1	6.4	7
FOS รวมต่อน้ำหนักแห้ง (Yp/x)*	38.8	20.8	19.6	15.5	14.5

หมายเหตุ * คิดจากชั่วโมงที่ได้ผลผลิตสูงสุด

เมื่อพิจารณาถึงน้ำหนักสายใยแห้ง เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักสายใยแห้งเริ่มต้นและแนวโน้มการเจริญเติบโตของสายใยระหว่างการเพาะเลี้ยงของหัวเชื้อที่มีอายุ 14, 16, 18 และ 20 ชั่วโมง พบว่าน้ำหนักสายใยแห้งเริ่มต้นของหัวเชื้อที่เป็นสายใยที่มีอายุ 18 และ 20 ชั่วโมงมีความใกล้เคียงกัน ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่า เซลล์มีการเจริญเติบโตช้าลงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 18 ชั่วโมงขึ้นไป อาจเนื่องมาจากปริมาณน้ำตาลต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง ขณะที่การเจริญเติบโตของสายใยจะมีสูงในระยะเวลาก่อน 18 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเพราะในระบบยังคงมีปริมาณน้ำตาลสูงทำให้เซลล์สามารถนำน้ำตาลไปใช้ได้ (รูปที่ 12) และอัตราส่วนปริมาณ FOS รวมกับน้ำหนักแห้ง ณ ชั่วโมงที่ให้การผลิตสูงสุด (Yp/x) ของการเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์และหัวเชื้อที่เป็นสายใย (ตารางที่

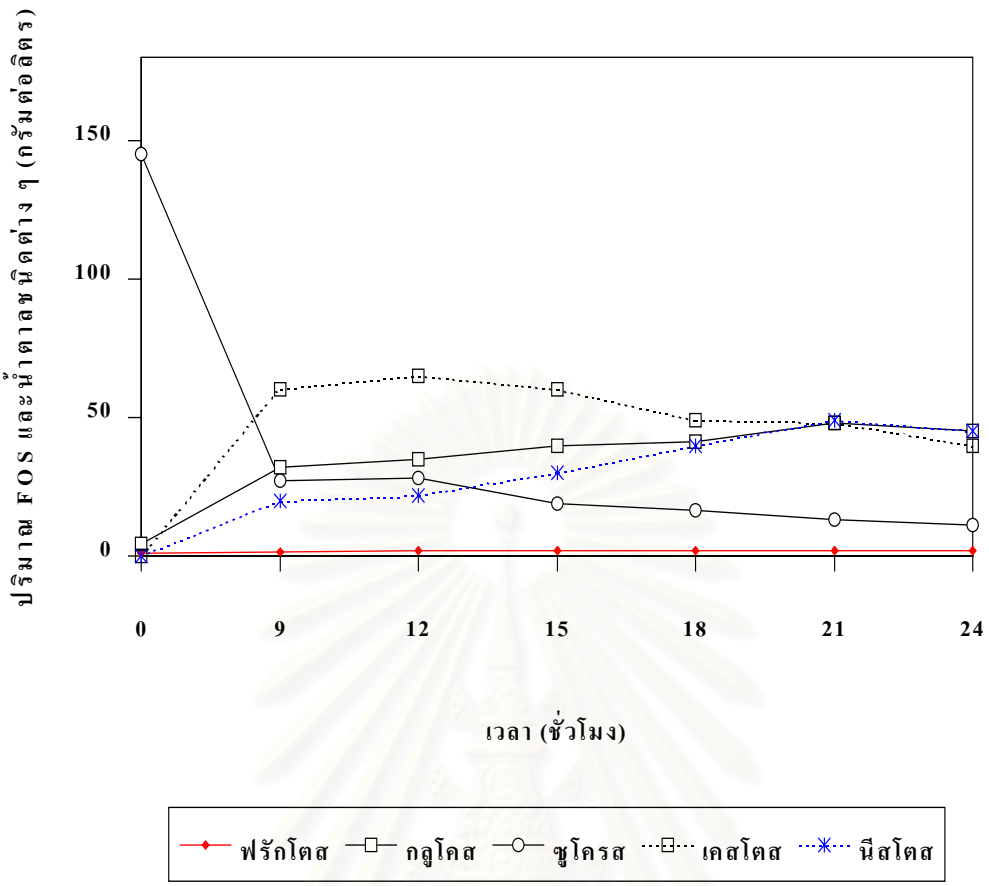
3) พบว่าลดลงเมื่อสายใยมีอายุมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องมาจากมีการผลิต FOS ใกล้เคียงกัน จากการพิจารณาทั้งหมดดังกล่าวในการทดลองในระดับขวดเขย่าข้างต้น พบว่ายังไม่สามารถระบุได้อย่างชัดเจนถึงอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมที่สุดในการผลิต FOS จึงจะทำการทดลองในการเพาะเลี้ยงในถังหมัก เนื่องจากมีการควบคุมสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงได้แก่ ความเป็นกรดด่าง และปริมาณออกซิเจนละลาย จึงน่าจะเห็นผลความแตกต่างของการเพาะเลี้ยงได้ชัดเจนกว่าการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่า โดยการเพาะเลี้ยงจะใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์และหัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 16 และ 18 ชั่วโมง ซึ่งมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของอัตราการผลิตที่สูง (พิจารณาจากการกระจายเชิงเส้น) มาทำการทดลองเปรียบเทียบต่อไป

ตารางที่ 4 แสดงผลค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ในการผลิตตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 - 12

หัวเชื้อ	สปอร์	อายุ 14 ชม.	อายุ 16 ชม.	อายุ 18 ชม.	อายุ 20 ชม.
สปอร์	-	0.9985	0.9869	0.9431	0.9972
อายุ 14 ชม.	0.9985	-	0.9941	0.9596	0.9997
อายุ 16 ชม.	0.9869	0.9941	-	0.9843	0.9961
อายุ 18 ชม.	0.9431	0.9596	0.9843	-	0.9651
อายุ 20 ชม.	0.9972	0.9997	0.9961	0.9651	-

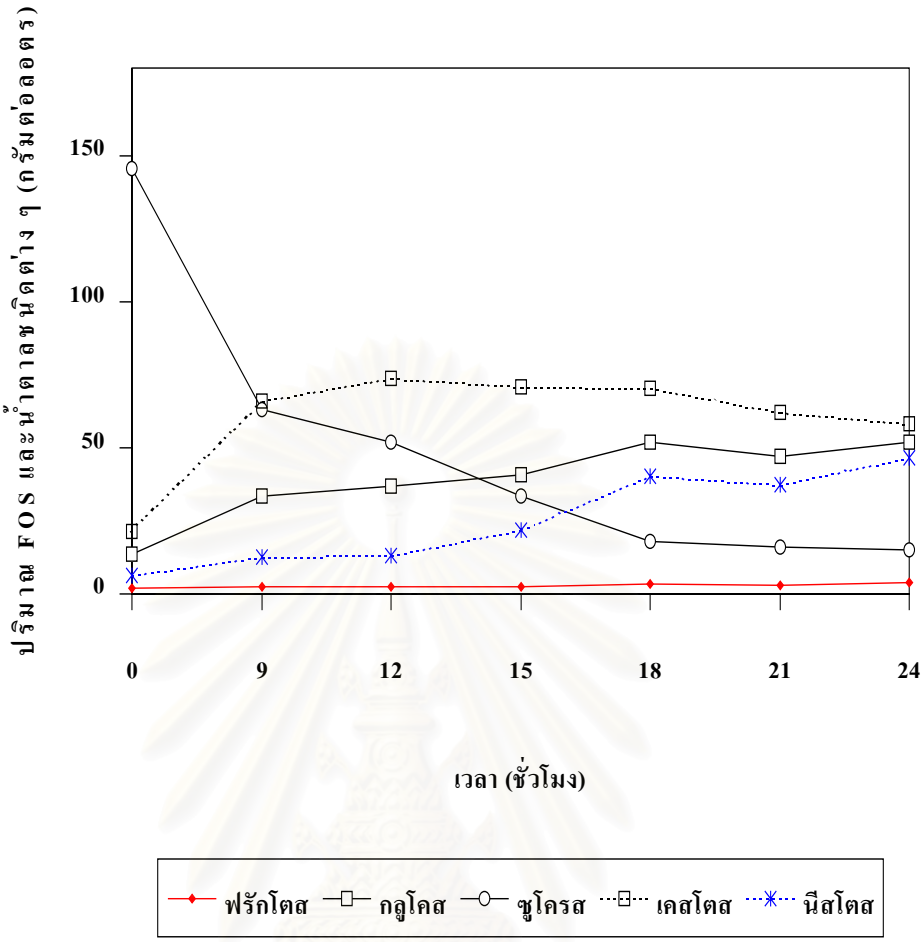
หมายเหตุ สัมประสิทธ์สหสัมพันธ์แสดงความสัมพันธ์ของข้อมูล 2 กลุ่ม (เมื่อค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เข้าใกล้ 1.00 แสดงว่าข้อมูล 2 กลุ่มมีความสัมพันธ์ในทิศทางเดียวกัน และพบว่าการเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 16 และ 18 ชั่วโมงมีความสัมพันธ์กัน แต่มีความสัมพันธ์กับหัวเชื้อแบบอื่นน้อยกว่า ทั้งนี้สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ในการผลิต 12 ชั่วโมงแรกของการใช้หัวเชื้อที่มีอายุต่างกันมีความใกล้เคียงกัน)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



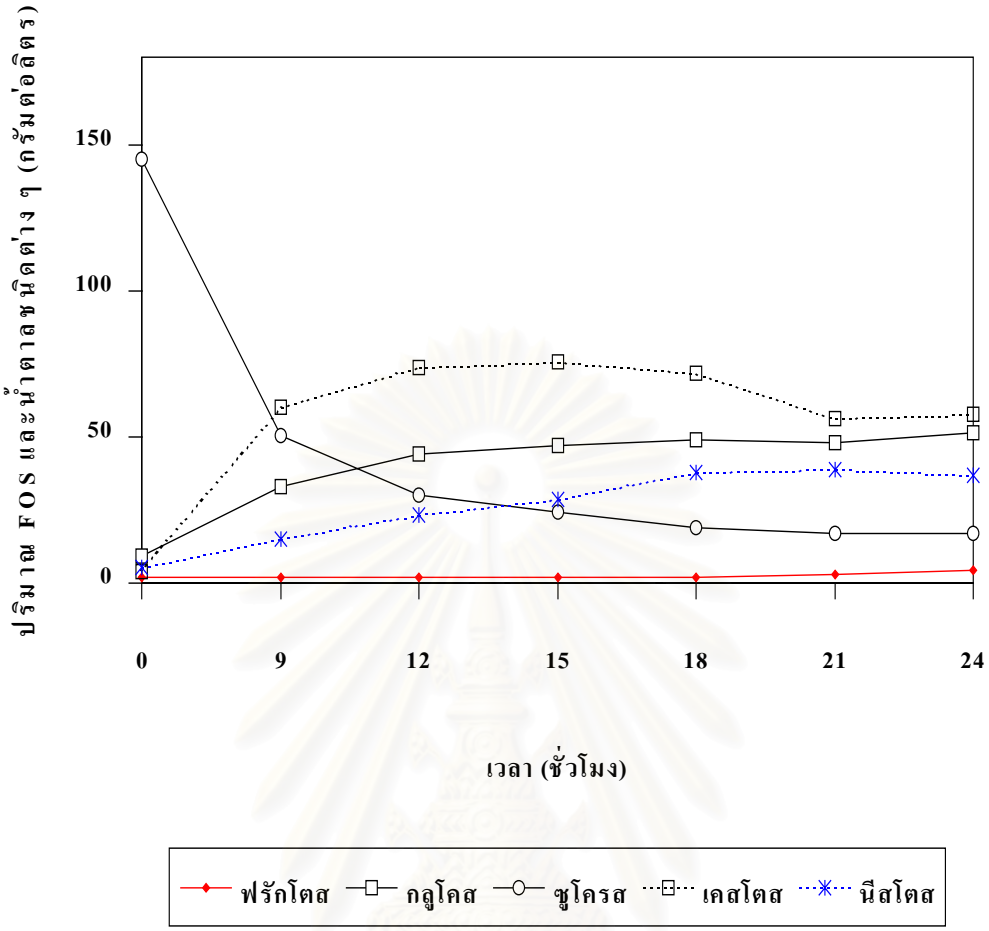
รูปที่ 3 ปริมาณ FOS และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในอาหารเหลว โดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



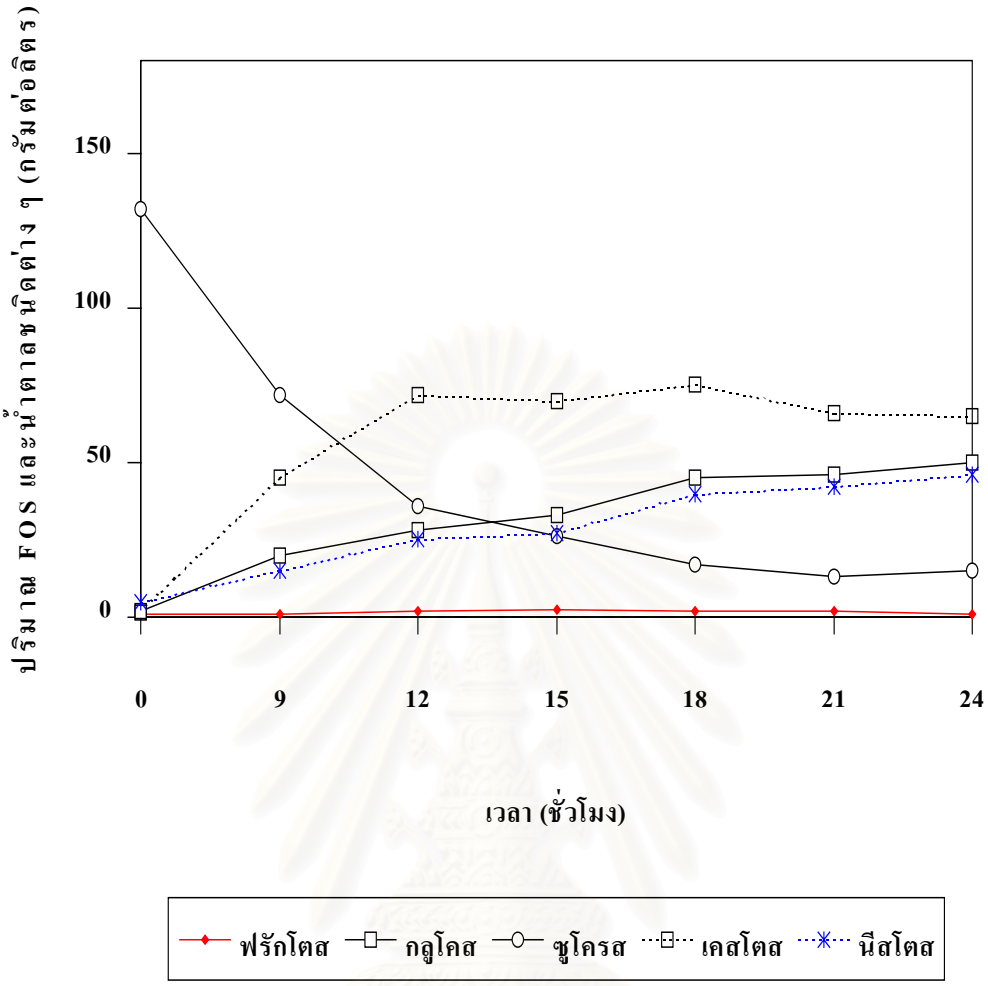
รูปที่ 4 ปริมาณ FOS และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในอาหารเหลว โดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 14 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



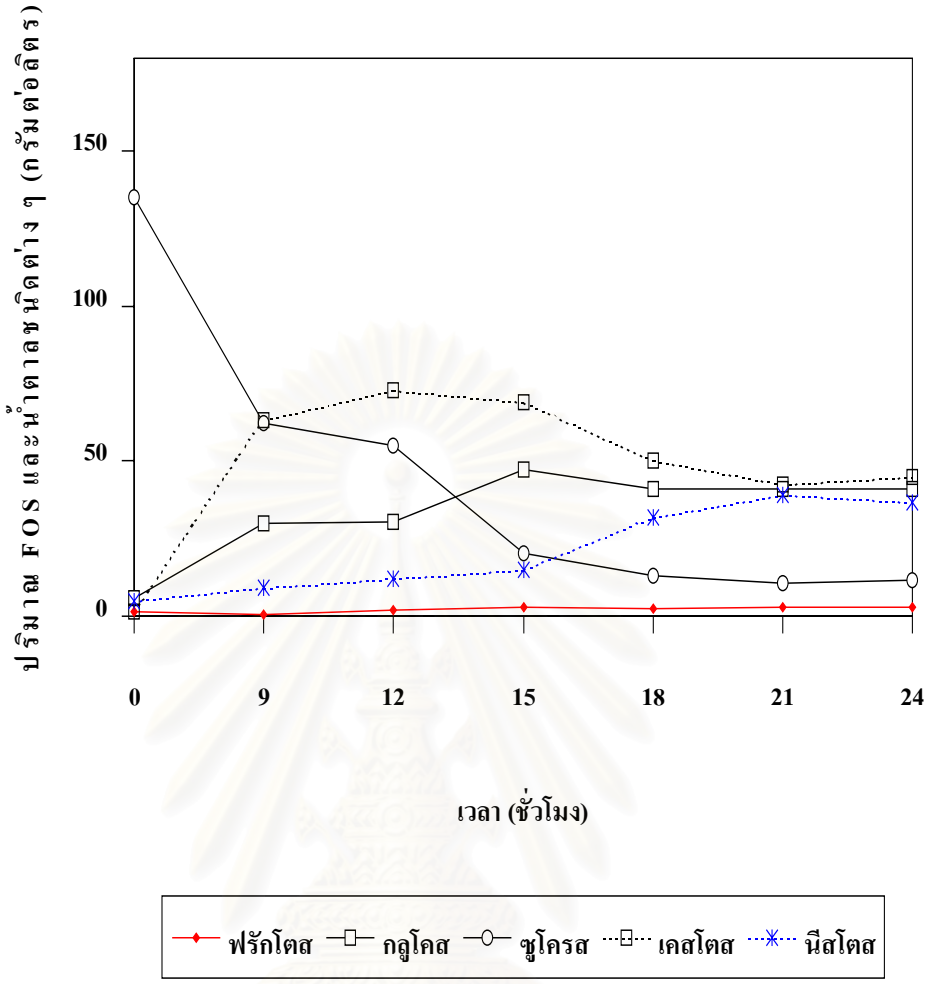
รูปที่ 5 ปริมาณ FOS และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในอาหารเหลว โดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 16 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



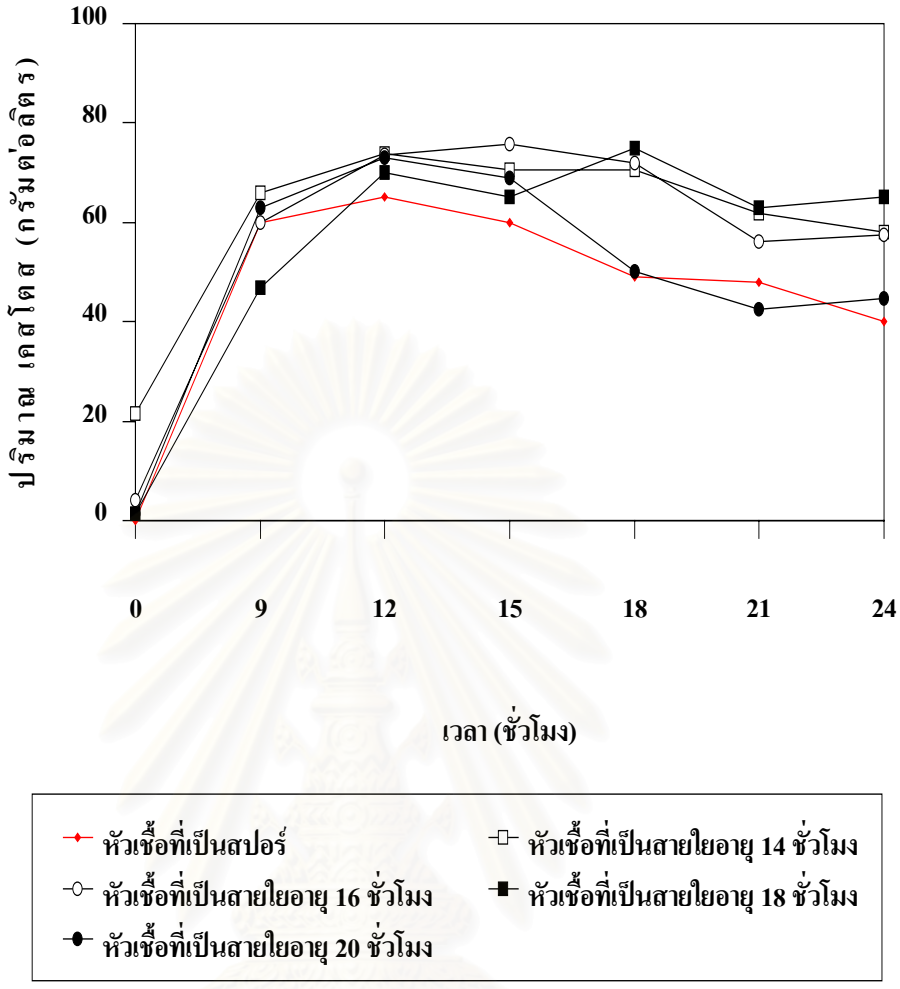
รูปที่ 6 ปริมาณ FOS และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในอาหารเหลว โดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 18 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



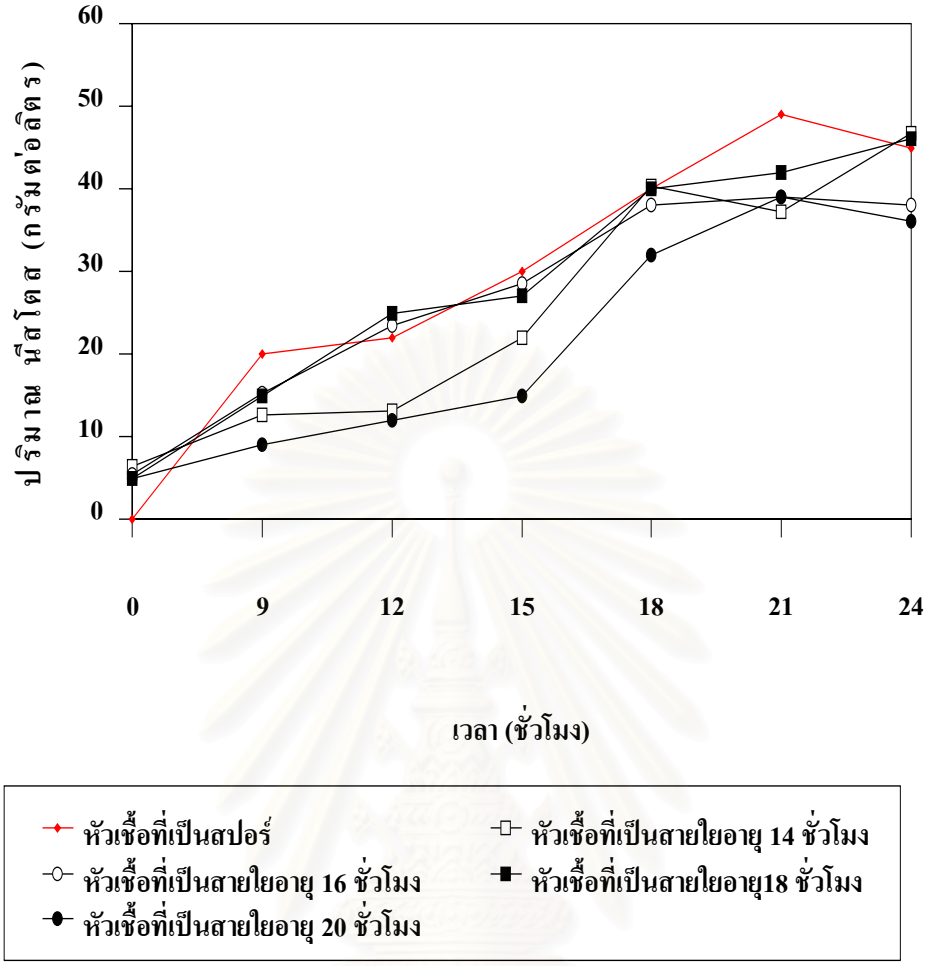
รูปที่ 7 ปริมาณ FOS และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในอาหารเหลว โดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 20 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



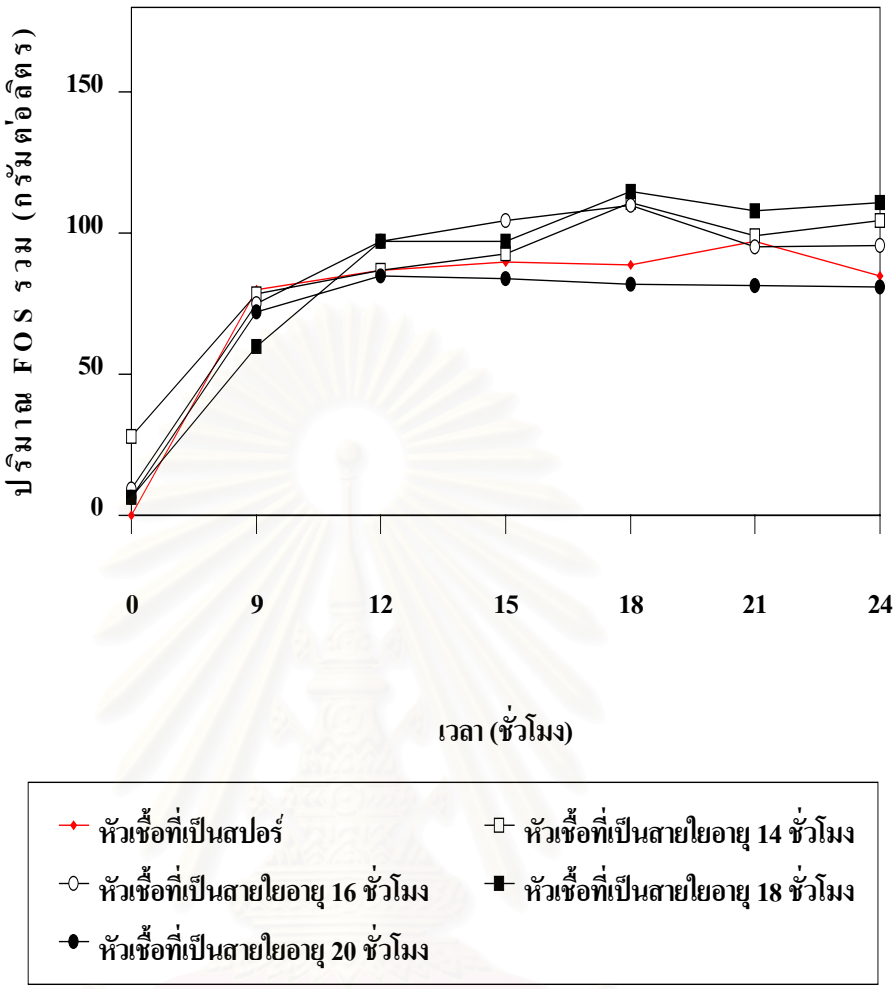
รูปที่ 8 ปริมาณเคสโตสเมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในอาหารเหลว โดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ และหัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุต่าง ๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



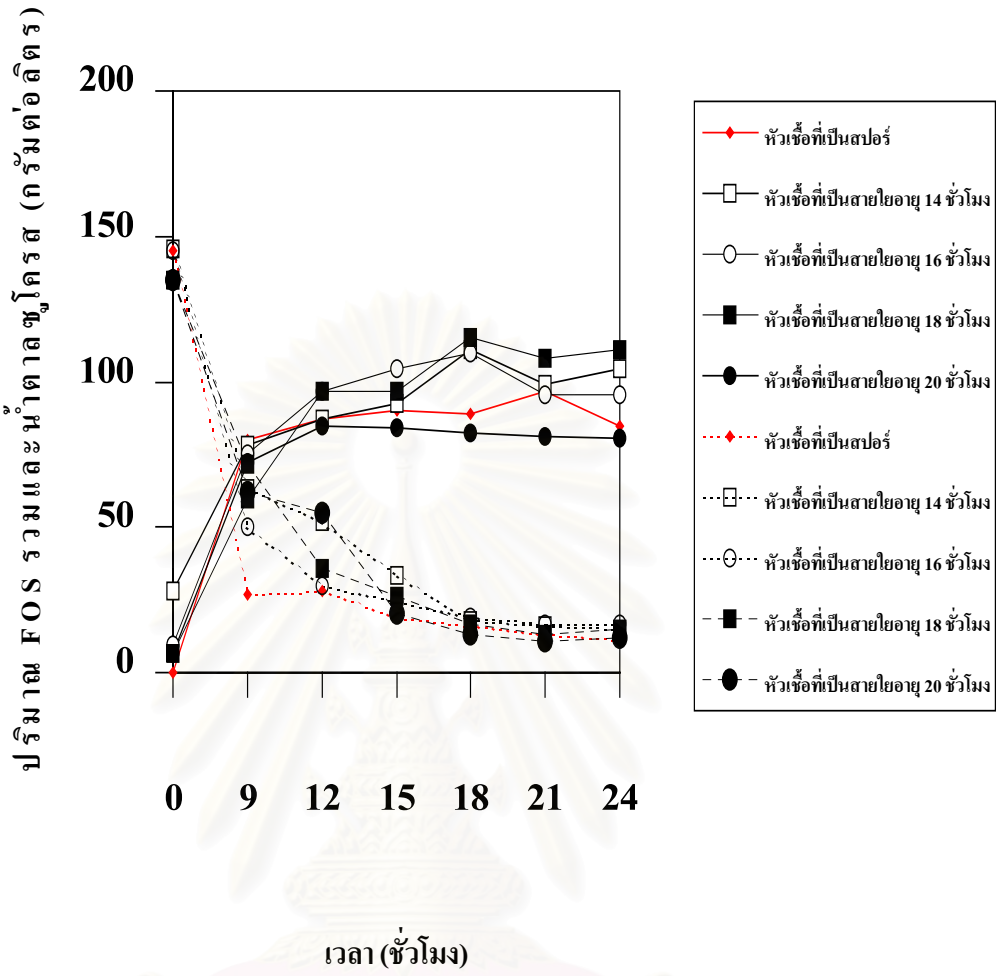
รูปที่ 9 ปริมาณนีสโตสเมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในอาหารเหลว โดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์และหัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุต่าง ๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



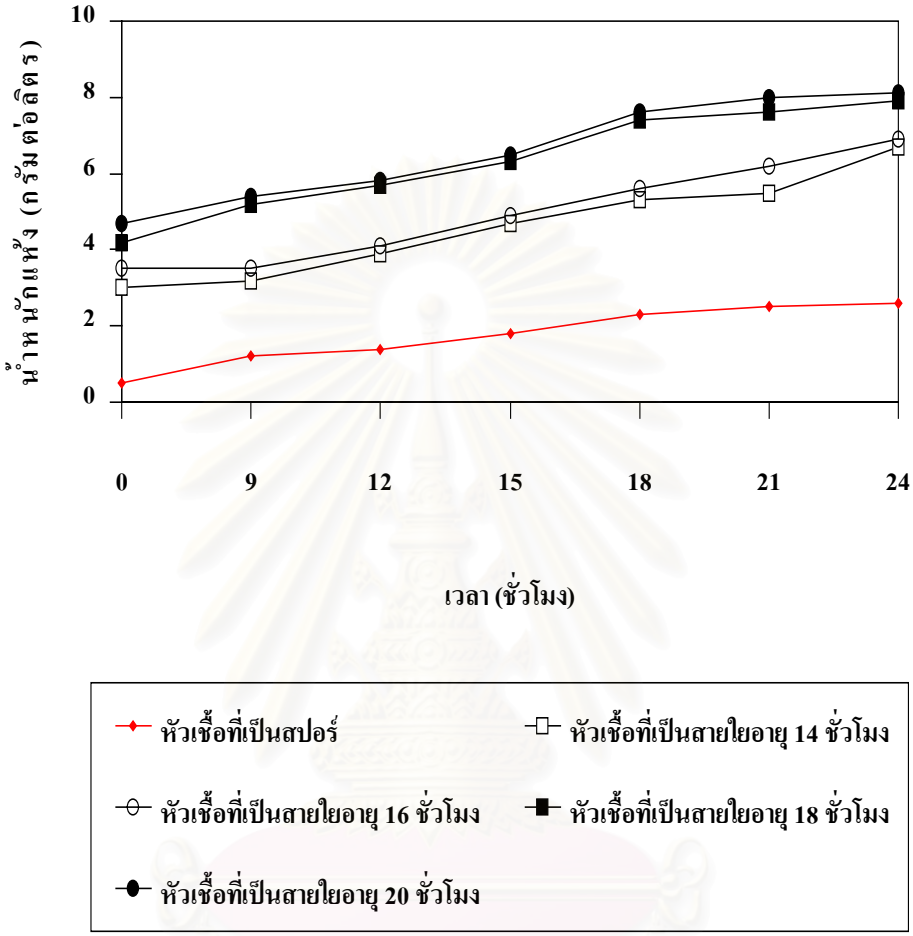
รูปที่ 10 ปริมาณ FOS รวมเมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในอาหารเหลว โดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์และหัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุต่าง ๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



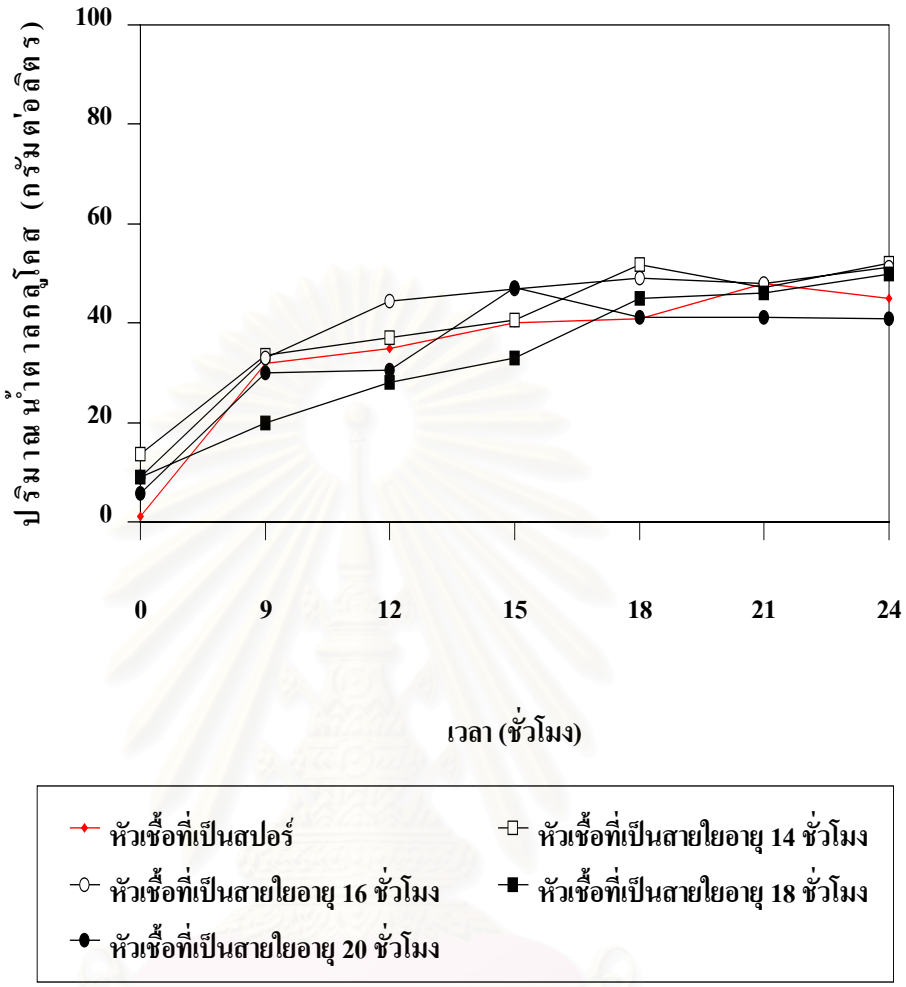
รูปที่ 11 ปริมาณ FOS รวมและน้ำตาลซูโครส เมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในอาหารเหลว โดยใช้หัวเชื้ออายุต่าง ๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



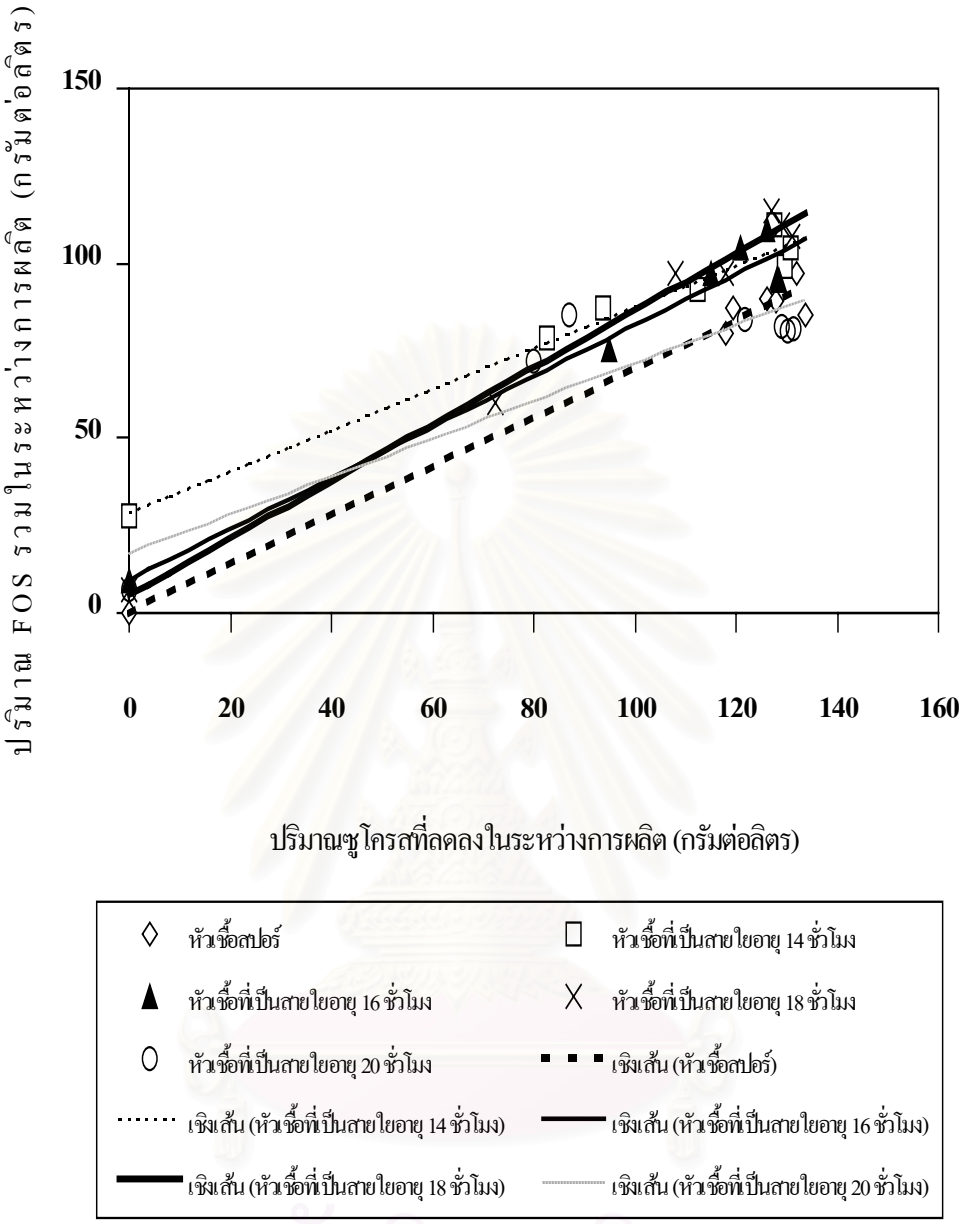
รูปที่ 12 น้ำหนักสายใยแห้ง เมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในอาหารเหลว โดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ และหัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุต่าง ๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 13 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส เมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในอาหารเหลว โดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ และหัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุต่าง ๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 14 กราฟการกระจายเชิงเส้นเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของการผลิต FOS รวม และปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ลดลง (ณ ชั่วโมงเดียวกัน) ในระหว่างการผลิตเมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในอาหารเหลว โดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ และหัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ ต่าง ๆ

1.2 ศึกษาอายุของหัวเชื้อในการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในถังหมัก

จากการทดลองในข้อ 1.1 พบว่าการเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในระดับขวดเขย่าโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นที่มีอายุต่าง ๆ ได้ผลเปรียบเทียบความแตกต่างของการผลิต FOS โดยรวมไม่ชัดเจน ซึ่งอาจเกิดจากในการผลิตไม่ได้มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างและปริมาณออกซิเจนละลายตลอดการเพาะเลี้ยง ในการทดลองนี้จึงเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต FOS ปริมาตร 1 ลิตรในถังหมักขนาด 2.6 ลิตร ควบคุมค่าการละลายของออกซิเจนเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว (โดยปรับอัตราเร็วของการกวน) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (แปรผันไม่เกิน 2 องศาเซลเซียส) ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 ตลอดการเพาะเลี้ยง เพื่อให้มีปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิต FOS ตามที่ได้มีการศึกษามาแล้วโดย วรรณา ศรีสัจจารักษ์ (2543) โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นของการผลิต คือ หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ และหัวเชื้อที่เป็นสายใยที่มีอายุ 16 และ 18 ชั่วโมง (รูปที่ 15 –17) จากการทดลองพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 16 และ 18 ชั่วโมงสามารถให้ผลผลิตเคสโตสสูงสุดใกล้เคียงกันคือ 97.58 และ 106.9 กรัมต่อลิตรที่ระยะเวลา 18 และ 12 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 5) ขณะที่การเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์จะสามารถผลิตได้เคสโตสสูงสุดเท่ากับ 82.59 กรัมต่อลิตรที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง

การเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 18 ชั่วโมงสามารถผลิตเคสโตส, นีสโตส และ FOS รวมได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์และหัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 16 ชั่วโมง (รูปที่ 19 - 21) ซึ่งอาจจะเกิดจากหัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 18 ชั่วโมงการผลิตเอนไซม์ได้มากกว่า เมื่อพิจารณาจากการผลิตเคสโตส (รูปที่ 19) พบว่าการเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 18 ชั่วโมงจะมีการผลิตเคสโตสในระดับคงที่ระหว่างชั่วโมงที่ 12 – 18 ของการเพาะเลี้ยง แม้ว่าการผลิตนีสโตสจะสูงขึ้น (รูปที่ 20) ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าในช่วงเวลานี้ของการเพาะเลี้ยง การผลิตเคสโตสน่าจะมีอัตราเร็วใกล้เคียงกับการผลิตนีสโตส (ซึ่งเกิดจากเคสโตสต่อกับน้ำตาลฟรักโตส) เนื่องจากสังเกตได้ว่าน้ำตาลซูโครสยังคงมีปริมาณลดลง และมีระดับของน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้น แสดงว่าหัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 18 ชั่วโมงอาจมีการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเคสโตสและนีสโตสออกมาได้มาก โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต FOS ทั้งสองชนิดอาจมีปฏิกิริยาการทำงานในอัตราเร็วใกล้เคียงกัน เมื่อเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ลดลงในช่วงเวลา 12 – 18 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงจะพบว่าการเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 18 ชั่วโมงสามารถเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้เป็น FOS และน้ำตาลกลูโคสได้อย่างรวดเร็ว ทำให้การผลิตเคสโตสมีสูงด้วย เมื่อพิจารณาปริมาณนีสโตสพบว่าการเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 18 ชั่วโมงสามารถผลิตนีสโตสได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์และหัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 16 ชั่วโมง เนื่องมาจากปริมาณเคสโตสในระบบของการเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 18 ชั่วโมงมีสูงกว่า จึงมีความเป็นไปได้ว่าถ้าในระบบมีปริมาณเคสโตสสูงเพียงพอ จะสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตนีสโตสออกมาได้มากด้วย

เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลกลูโคส (รูปที่ 23) พบว่า ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มขึ้นในการผลิตโดยใช้หัวเชื้อทั้ง 3 แบบมีแนวโน้มใกล้เคียงกัน เนื่องมาจากแม้ว่าจะมีการผลิต FOS ได้ในปริมาณแตกต่างกัน แต่เซลล์สามารถนำน้ำตาลกลูโคสไปใช้ได้จึงอาจจะทำให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสในระบบไม่สูงจนเกินไป เพราะเมื่อพิจารณาจากน้ำหนักสายใยแห้ง (รูปที่ 18) พบว่าแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสายใยแห้งมีทิศทางเดียวกัน คือ เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงระยะเวลา 9 –15 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง และจากการทดลองพบว่าน้ำหนักสายใยแห้งมีแนวโน้มลดลงหลังจากการเพาะเลี้ยงไปเป็นเวลา 18 ชั่วโมง เนื่องจากว่ามีการเพิ่มอัตราเร็วของการกวนในถังหมัก (เพื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายให้เท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ของค่าอากาศอิ่มตัว) ทำให้เซลล์ที่มีขนาดใหญ่ และสายใยส่วนปลายบางส่วนเกิดการฉีกขาดได้ (รูปที่ 24) ซึ่งจะพบว่าการเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์จะยังคงมีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสายใยแห้ง และค่อนข้างคงที่ในช่วงท้ายของการผลิต เนื่องจากว่าขนาดของกลุ่มสายใยยังมีขนาดเล็ก ทำให้เซลล์ยังไม่ถูกทำลายโดยแรงเฉือนจากการเพิ่มขึ้นของอัตราเร็วของการกวน แต่จากการผลิตพบว่าแม้ว่าเซลล์จะมีปริมาณน้ำหนักสายใยแห้งลดลง แต่อัตราการผลิตยังคงมีต่อไป เช่นในการเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 16 และ18 ชั่วโมง ทั้งนี้น่าจะเกิดจากยังคงมีปริมาณเซลล์เหลือเพียงพอที่จะสามารถสร้างเอนไซม์เพื่อใช้ในการผลิต FOS ได้ โดยสังเกตได้จากรูปถ่ายเส้นใย ณ ชั่วโมงต่าง ๆ ของการเพาะเลี้ยงในถังหมัก (รูปที่ 24)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

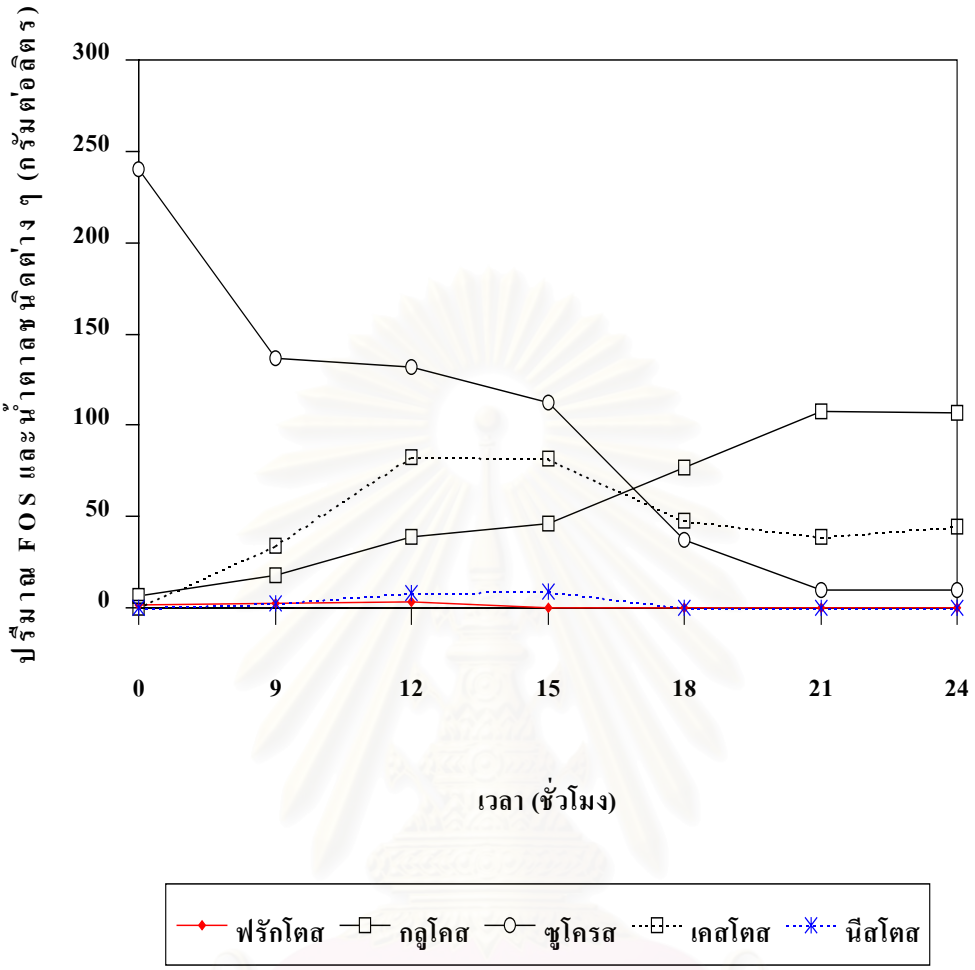
ตารางที่ 5 เปรียบเทียบการผลิต FOS ในถังหมักโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ กับหัวเชื้อที่เป็นสายใย อายุ 16 และ 18 ชั่วโมง

เปรียบเทียบ	หัวเชื้อที่เป็นสปอร์	หัวเชื้อที่เป็นสายใย อายุ 16 ชั่วโมง	หัวเชื้อที่เป็นสายใย อายุ 18 ชั่วโมง
ชั่วโมงที่ผลิตเคสโตสสูงสุด	12	18	12
ชั่วโมงที่ผลิตนีสโตสสูงสุด	15	21	24
ชั่วโมงที่ผลิต FOS รวมสูงสุด	15	18	18
เคสโตสสูงสุด (ก/ล)*	82.59	97.58	106.9
นีสโตสสูงสุด (ก/ล)*	9.06	22.03	90
FOS รวมสูงสุด (ก/ล)*	90.55	111.99	165.1
อัตราการผลิตเคสโตส ** (ก/ล/ชม.)	6.88	5.42	9.39
อัตราการผลิตนีสโตส ** (ก/ล/ชม.)	0.6	1.05	3.84
อัตราการผลิต FOS รวม** (ก/ล/ชม.)	6.04	6.22	9.7
น้ำหนักสายใยแห้ง (ก/ล)***	8.56	5.53	2.34
อัตราผลิตเคสโตส/สายใย**	3.93	0.98	2.51
อัตราผลิตนีสโตส/สายใย**	0.07	0.3	1.64
อัตราผลิต FOS รวม/สายใย**	0.7	1.12	4.15

หมายเหตุ * เทียบร้อยละกับปริมาณน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น คิดจากชั่วโมงที่ได้ผลผลิตสูงสุด

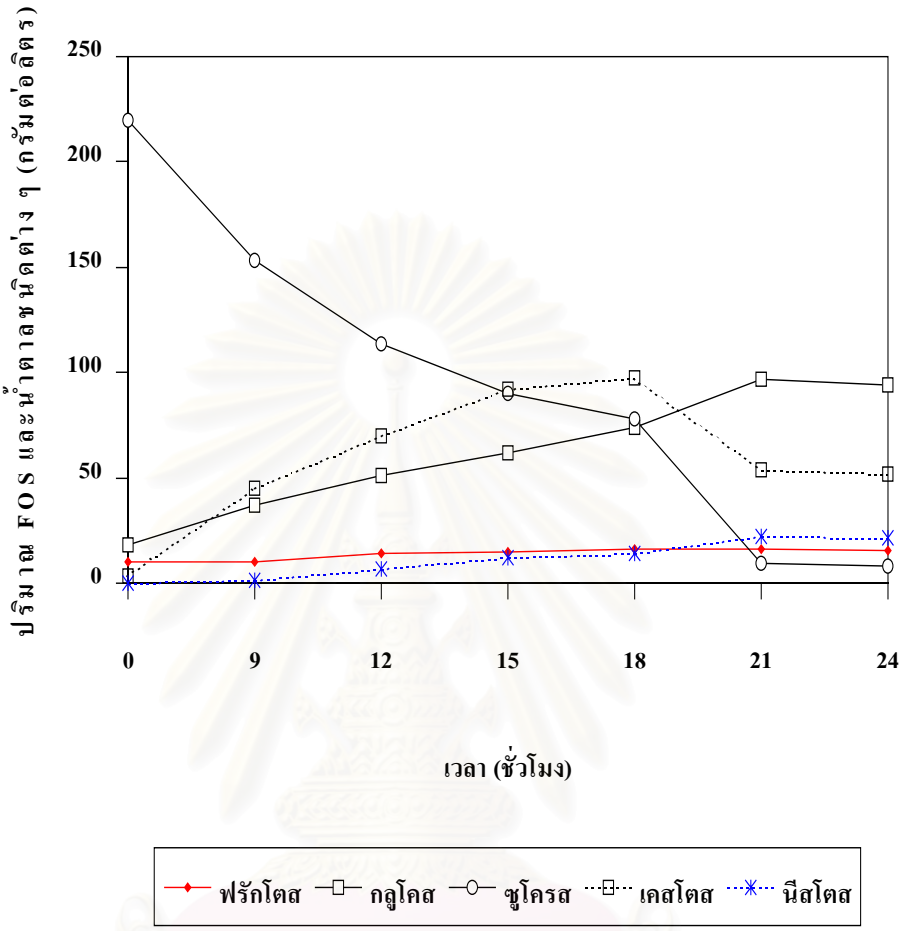
** คิดจากชั่วโมงที่ได้ผลผลิตสูงสุด *** คิดจากชั่วโมงที่ให้ FOS รวมสูงสุด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



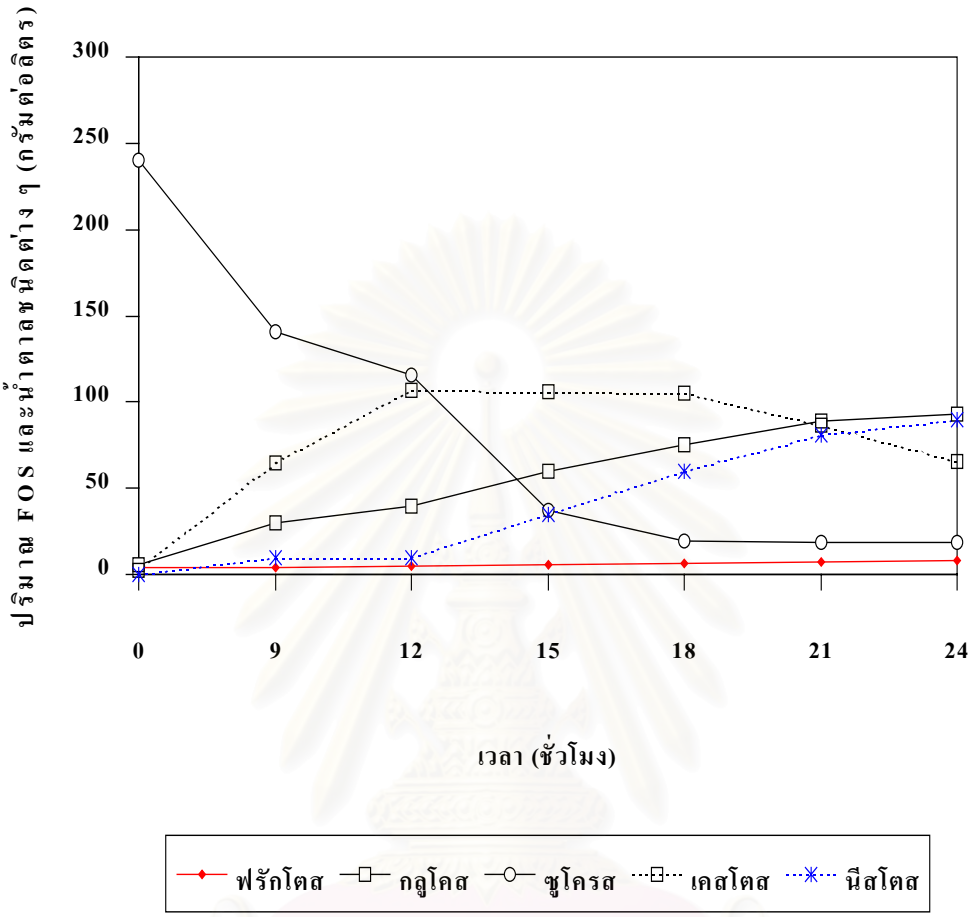
รูปที่ 15 ปริมาณ FOS และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในถังหมักโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



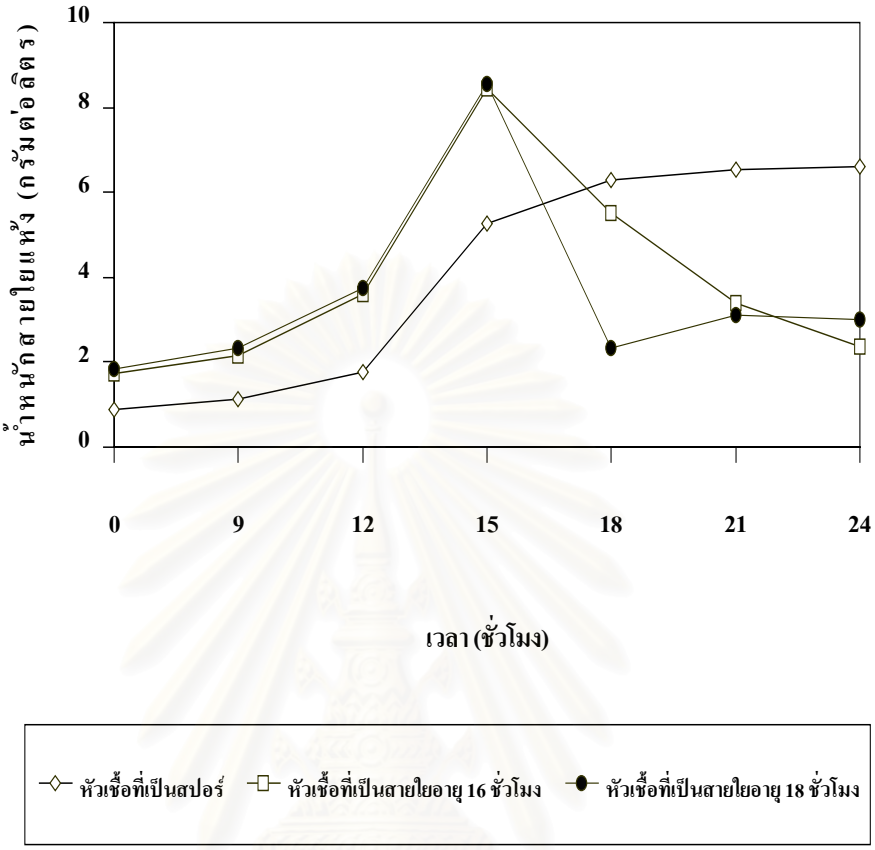
รูปที่ 16 ปริมาณ FOS และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในถังหมักโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 16 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



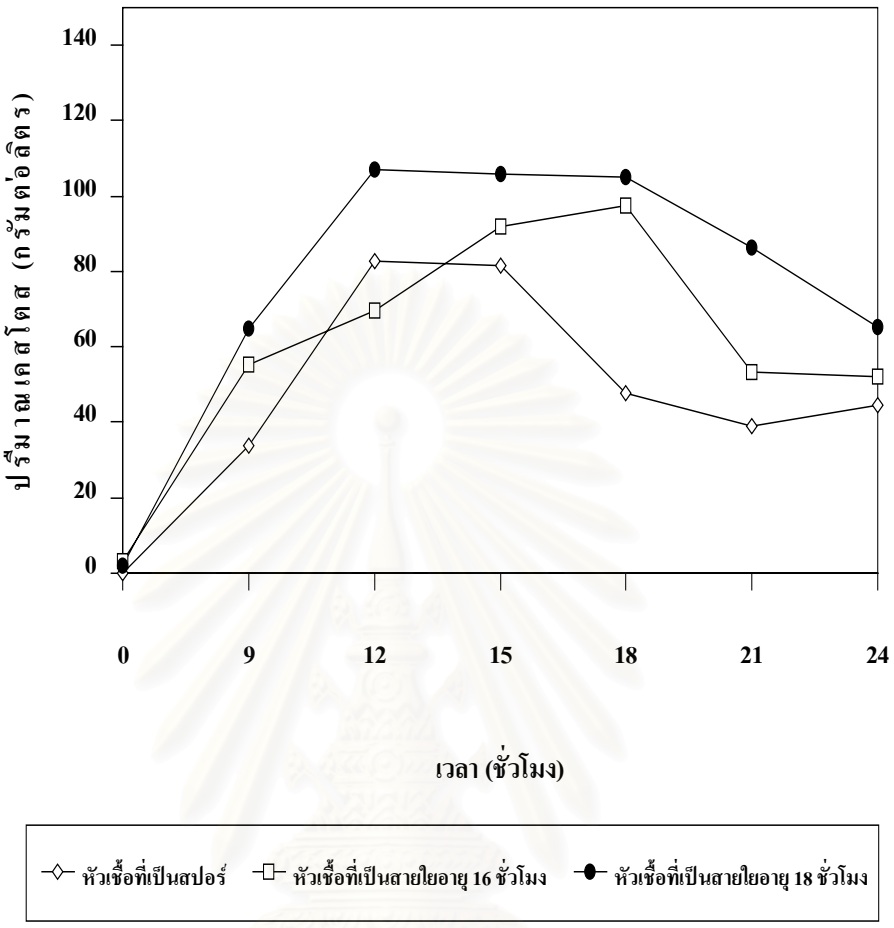
รูปที่ 17 ปริมาณ FOS และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในถังหมักโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 18 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



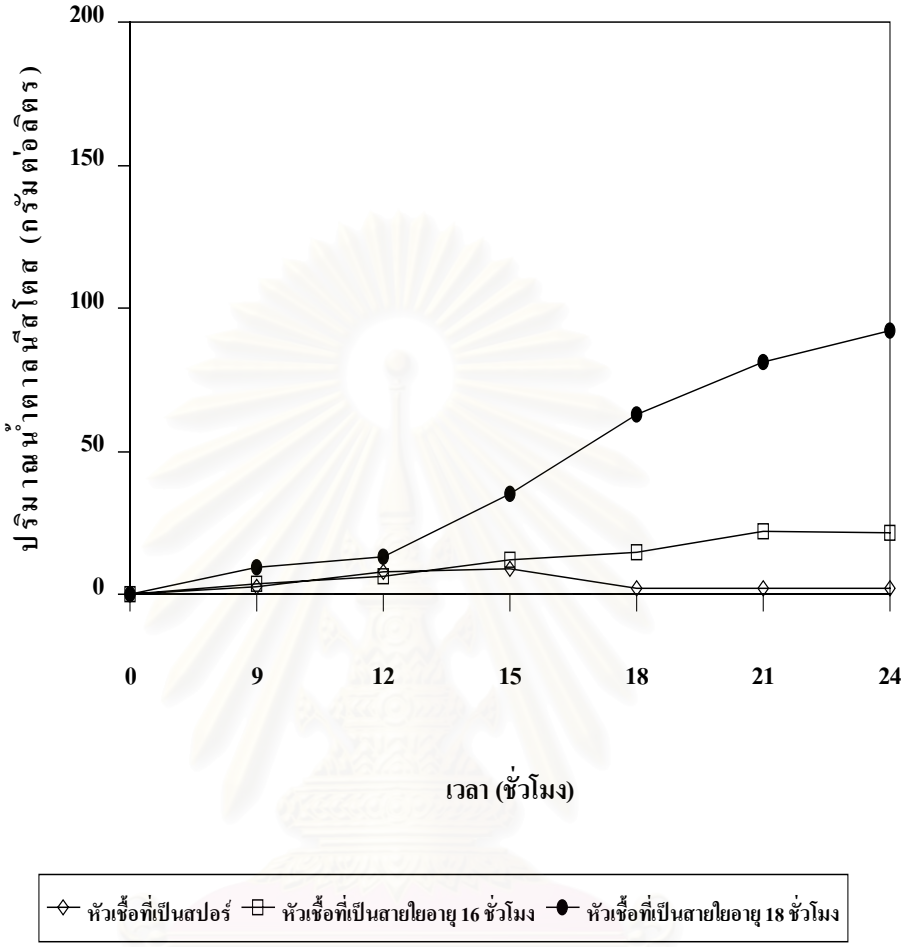
รูปที่ 18 น้ำหนักสายใยแห้งเมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในถังหมัก โดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 16 และ 18 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



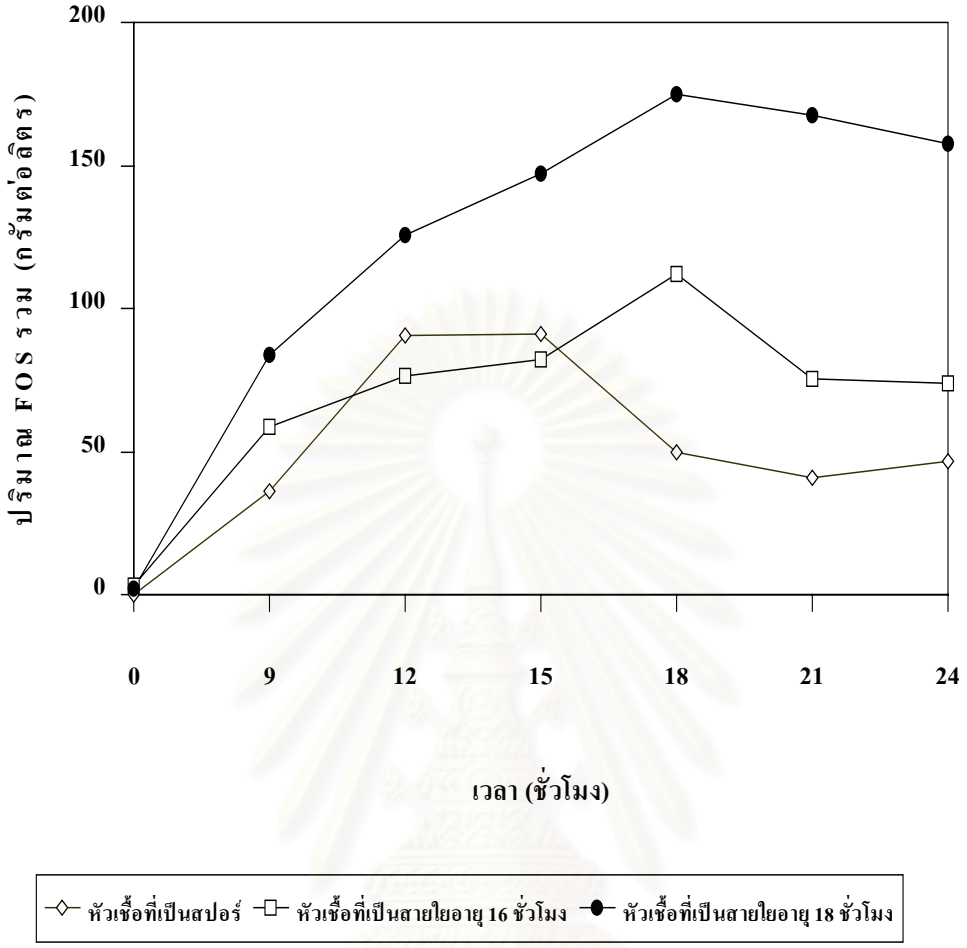
รูปที่ 19 ปริมาณเคสโตส เมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในถังหมัก โดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 16 และ 18 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



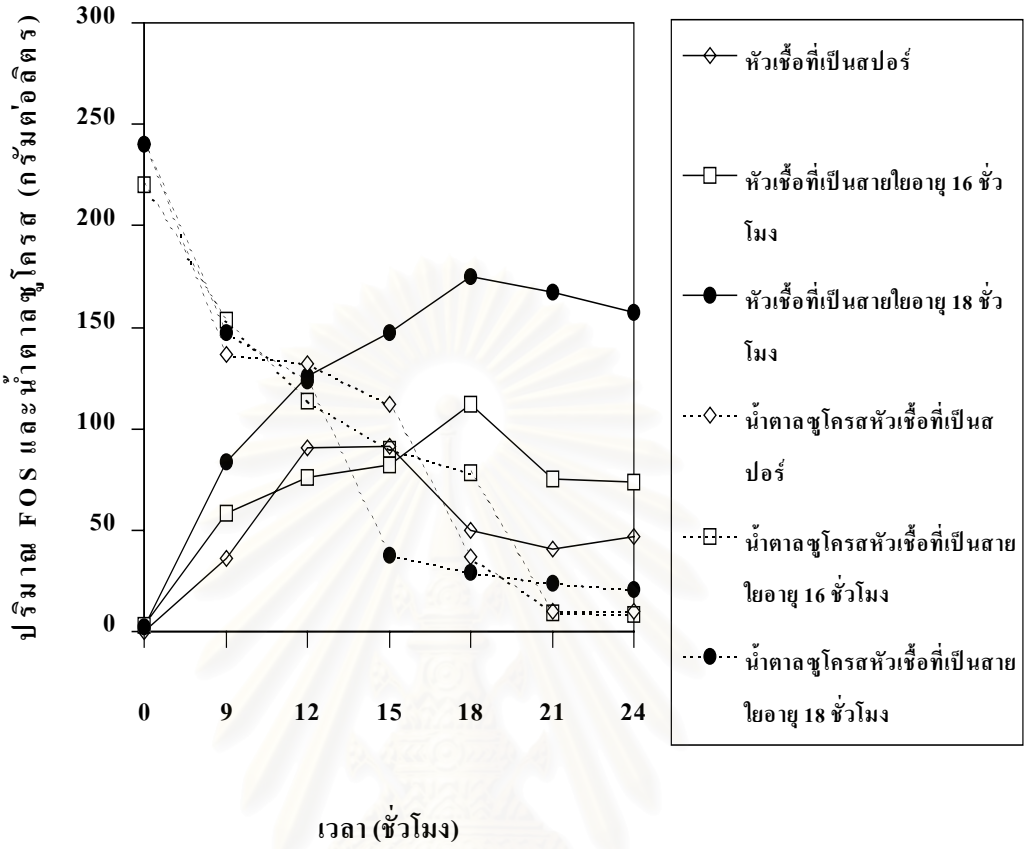
รูปที่ 20 ปริมาณนีสโตสเมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในถังหมักโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 16 และ 18 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



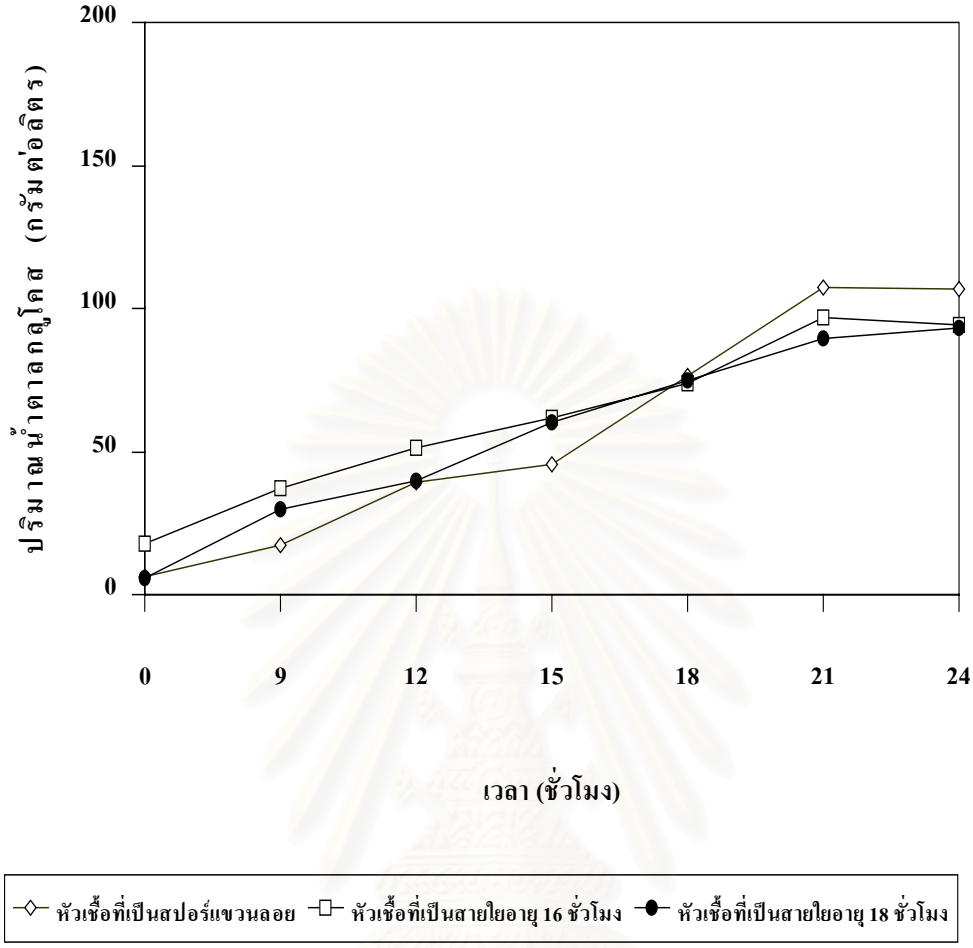
รูปที่ 21 ปริมาณ FOS รวมเมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในถังหมัก โดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 16 และ 18 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 22 ปริมาณ FOS และน้ำตาลซูโครสเมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในถังหมักโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ และหัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 16 และ 18 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 23 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในถังหมักโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ และหัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 16 และ 18 ชั่วโมง

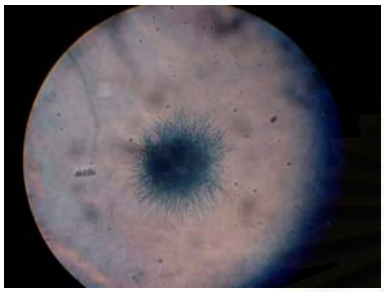
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการทดลองสามารถสรุปพิจารณาผลของอายุของหัวเชื้อต่อการผลิต FOS ในถังหมักขนาด 2.6 ลิตร (ที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 ตลอดการเพาะเลี้ยงและควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ของค่าอากาศอิ่มตัว) พบว่าหัวเชื้อที่เป็นสายใยที่มีอายุ 16 และ 18 ชั่วโมง สามารถผลิตเคสโตส ณ ชั่วโมงที่ได้สูงสุดได้ใกล้เคียงกัน เท่ากับ 47.94% และ 49.29% ของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นตามลำดับ ขณะที่หัวเชื้อที่เป็นสปอร์สามารถผลิตเคสโตสได้ 38.98% ของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น จากผลการทดลองการผลิตเคสโตสและนีสโตสของการใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ หัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 16 ชั่วโมงและ 18 ชั่วโมงจะได้ผลผลิตสูงสุดในระยะเวลาที่แตกต่างกัน จากการผลิตพบว่าการเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยที่มีอายุ 18 ชั่วโมงในถังหมักจะสามารถผลิตเคสโตส นีสโตสและ FOS รวมสูงสุด รวมทั้งมีอัตราการผลิต เคสโตส นีสโตสและ FOS รวมสูงที่สุดเท่ากับ 9.39, 3.84 และ 9.39 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และสังเกตได้ว่าแนวโน้มการผลิตสูงขึ้นเมื่อหัวเชื้อมีอายุมากขึ้นด้วย

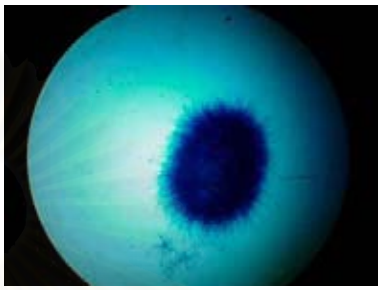
เมื่อพิจารณาจากน้ำหนักสายใยแห้ง พบว่าหัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 18 ชั่วโมงมีอัตราการผลิต FOS รวมต่อน้ำหนักแห้งสายใย ณ ระยะเวลาที่ผลิตสูงสุดสูงกว่าการผลิตโดยใช้หัวเชื้อสปอร์และหัวเชื้อที่มีอายุ 16 ชั่วโมง แม้ว่าจะมีน้ำหนักแห้งของสายใย ณ เวลาที่ผลิต FOS รวมสูงสุดต่ำกว่าและมีโอกาสที่น้ำหนักสายใยแห้งจะลดลงเนื่องจากถูกทำลายโดยแรงเฉือนจากการเพิ่มอัตราการกวน จึงอาจเป็นไปได้ว่าหัวเชื้อที่มีอายุตั้งแต่ 18 ชั่วโมงขึ้นไปสามารถให้ผลผลิตที่สูงกว่าอย่างชัดเจน เนื่องจากหัวเชื้อที่มีอายุมากขึ้น จะให้ผลผลิต FOS สูงขึ้นเนื่องจากอาจจะมีการผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต FOS ได้สูง และน่าสังเกตว่าหัวเชื้อที่มีอายุ 18 ชั่วโมงสามารถผลิตนีสโตสได้สูง ทั้งนี้เนื่องมาจากว่ามีการผลิตเคสโตสได้สูงจึงทำให้การผลิตนีสโตสสูงขึ้นด้วย แต่ขณะเดียวกันเมื่อสายใยมีปริมาณมากขึ้นจะมีโอกาสที่เส้นใยจะถูกทำลายจากการกวนในถังหมักได้มากขึ้นด้วย (ดังรูปที่ 24 แสดงเส้นใย ณ ชั่วโมงต่าง ๆ ของการเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้ออายุ 18 ชั่วโมง)

เมื่อพิจารณาการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลกลูโคส (รูปที่ 23) พบว่าการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลกลูโคสเป็นในแนวทางเดียวกัน โดยเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลกลูโคสแสดงให้เห็นว่ามีการผลิต FOS อย่างต่อเนื่อง และขณะเดียวกันเซลล์ก็มีการนำน้ำตาลกลูโคสไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ การผลิตเคสโตสจะลดลงในช่วงท้ายของการผลิต เพราะเคสโตสถูกนำไปใช้ในการผลิตนีสโตส ขณะที่น้ำตาลซูโครสมีความเข้มข้นลดลง ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะเป็นการเติมน้ำตาลซูโครสเพื่อเพิ่มผลผลิต โดยจะทดลองเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงต่าง ๆ ของการผลิต เพื่อศึกษากรณีที่มีน้ำตาลซูโครสเพิ่มสูงขึ้นจะมีผลอย่างไรในการผลิต FOS และจะใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยที่มีอายุ 18 ชั่วโมงมาใช้ในการทดลองต่อไป

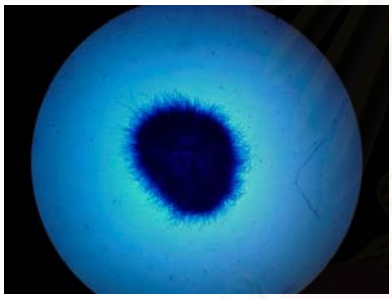
รูปที่ 24 แสดงภาพเส้นใย ณ ชั่วโมงต่าง ๆ ของการเพาะเลี้ยงในถังหมัก โดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใย อายุ 18 ชั่วโมง (ถ่ายด้วยกล้องดิจิตอล Sony Model) (ขยาย 400 เท่า)



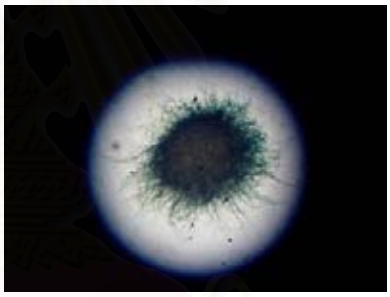
เส้นใย ณ ชั่วโมงที่ 0



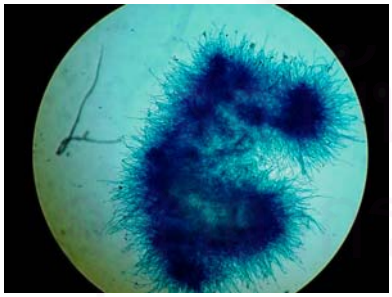
เส้นใย ณ ชั่วโมงที่ 9



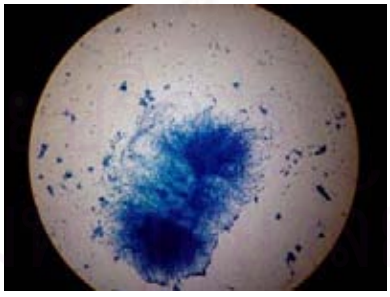
เส้นใย ณ ชั่วโมงที่ 12



เส้นใย ณ ชั่วโมงที่ 15



เส้นใย ณ ชั่วโมงที่ 18



เส้นใย ณ ชั่วโมงที่ 21

2. การศึกษาการเติมน้ำตาลซูโครสลงในถังหมักที่เวลาต่าง ๆ ในระหว่างการผลิต

จากการทดลองในข้อ 1 เมื่อทราบอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมในการผลิต FOS ให้ได้ปริมาณมากในถังหมัก (หัวเชื้ออายุ 18 ชั่วโมง) และจากปฏิกิริยาการผลิต FOS ที่มีรายงานว่าเกิดจากการนำน้ำตาลฟรักโตสมาต่อกับน้ำตาลซูโครส ดังนั้นการเพิ่มปริมาณน้ำตาลซูโครสให้สูงขึ้นในระหว่างการผลิตจึงน่าจะสามารถเพิ่มผลผลิตเคสโตสได้ เมื่อเคสโตสสูงขึ้นก็น่าจะทำให้มีการผลิตนีสโตสสูงขึ้นด้วย การทดลองนี้จะเป็นการหาเวลาที่เหมาะสมในการเติมน้ำตาลซูโครสโดยเติมน้ำตาลซูโครสลงในถังหมักให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 50 กรัมต่อลิตร (จากน้ำตาลซูโครสเดิมที่คงเหลือในระบบขณะนั้น) ที่ชั่วโมงที่ 9 , 12, 15 และ 18 ของการผลิต

จากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบการผลิตโดยไม่เพิ่มน้ำตาลซูโครส (ผลิตแบบกะ) กับเติมน้ำตาลซูโครส พบว่าการเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 9 จะได้เคสโตสเพิ่มขึ้นที่ชั่วโมงที่ 12 เมื่อเติมในชั่วโมงที่ 12 จะได้เคสโตสเพิ่มขึ้นที่ชั่วโมงที่ 15 เมื่อเติมในชั่วโมงที่ 15 และ 18 จะได้เคสโตสเพิ่มขึ้นที่ชั่วโมงที่ 21 และ 24 (รูปที่ 25 – 28) แสดงว่าการเพิ่มน้ำตาลซูโครสทำให้มีแนวโน้มการผลิตเคสโตสเพิ่มขึ้นหลังจากที่มีการเติมลงไป โดยเมื่อเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 9 ของการผลิตจะทำให้ได้เคสโตสสูงสุด 135 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 12 ของการผลิต คิดเป็นอัตราการผลิต 11.17 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ขณะที่การผลิตนีสโตสได้สูงสุด 47 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเท่ากับ 2.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงที่ชั่วโมงที่ 18 ของการผลิต โดยมีการผลิต FOS รวมสูงสุดเท่ากับ 135 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิต 10.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตแบบเติมน้ำตาลซูโครสที่ชั่วโมงที่ 12 ของการผลิต ได้การผลิตเคสโตสสูงสุดเท่ากับ 133 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 15 ของการผลิต เทียบเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 8.86 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อพิจารณาการผลิตนีสโตสพบว่าสามารถผลิตนีสโตสสูงสุดเท่ากับ 105 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 4.38 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ชั่วโมงที่ 24 ของการผลิต ในขณะที่การเติมน้ำตาลซูโครสที่ชั่วโมงที่ 15 และ 18 ให้การอัตราการผลิตเคสโตสและนีสโตสลดลง (มีการผลิตเคสโตสสูงขึ้นกว่าแบบกะ แต่ชม.ที่ผลิตได้สูงสุดนานกว่า) จากการทดลองพบว่าการเติมน้ำตาลซูโครสจะให้เคสโตสสูงขึ้นมากที่สุดเมื่อเติมในชั่วโมงที่ 9 ของการผลิต (รูปที่ 29) เนื่องจากเป็นช่วงแรกของการผลิตมีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเดิมสูงที่สุดทำให้มีการผลิตเคสโตสสูงสุด ขณะที่การเติมน้ำตาลซูโครสที่ชั่วโมงที่ 12 จะให้นีสโตสสูงสุด (รูปที่ 30) เนื่องจากเป็นช่วงเริ่มต้นของการผลิตนีสโตส เมื่อนีสโตสมีการผลิตสูงจึงทำให้มีผลรวมของ FOS สูงสุดด้วย (รูปที่ 31) ขณะที่การเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 15 และ 18 ไม่ช่วยให้มีการผลิต FOS สูงขึ้นมากนัก เนื่องจากเป็นช่วงที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสต่ำ และเป็นช่วงที่เคสโตสมีแนวโน้มจะเปลี่ยนเป็นนีสโตส (น่าจะเป็นช่วงที่มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตนีสโตสสูง) ดังนั้นเมื่อเติมน้ำตาลซูโครสลงไปจึงอาจไม่มีความเข้มข้นมากพอที่จะทำให้มีการเพิ่มอัตราการผลิตเคสโตส และน้ำตาลซูโครสที่เติมลงไปอาจจะต้องไปเหนี่ยวนำให้มีการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเคสโตสก่อนด้วย และในการเติม ณ ชั่วโมงที่ 9 พบว่าผลิตนีสโตสได้ต่ำกว่าการผลิตแบบกะ ซึ่งอาจเกิดจากน้ำตาลซูโครสที่

เติมทำให้มีน้ำตาลซูโครสในระบบสูง อาจทำให้ปฏิกิริยามีแนวโน้วการผลิตเคสโตสมากกว่านีสโตส และอาจทำให้ลดอัตราการเปลี่ยนเคสโตสไปเป็นนีสโตสด้วย ดังนั้นการเติมน้ำตาลซูโครสเพื่อให้เพิ่มผลผลิตสูงขึ้น น่าจะเป็นการเติมในช่วงระยะแรกของการผลิต (ชั่วโมงที่ 9 หรือ 12) ในกรณีที่ต้องการเน้นการผลิตเคสโตสสูงจึงควรเติมในชั่วโมงที่ 9 ของการผลิต เนื่องจากการเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 9 ของการผลิตจะทำให้น้ำตาลซูโครสในระบบมีสูง (ปริมาณน้ำตาลซูโครสเดิมในระบบยังมีสูง) จึงน่าจะไปเหนี่ยวนำให้มีการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเคสโตสได้มาก ในขณะที่การเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 12 ของการผลิตน่าจะทำให้มีการผลิต FOS โดยรวมสูง เนื่องมาจากเป็นช่วงเวลาที่เซลล์มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตทั้งเคสโตสและนีสโตส (ชม.ที่ 12 เป็นช่วงที่เริ่มมีการผลิตนีสโตสได้สูงในการผลิตแบบกะ) ทำให้การผลิต FOS โดยรวมสูงขึ้น ดังนั้นกรณีที่จะเน้นการผลิตนีสโตสหรือต้องการ FOS รวมสูงควรเติมน้ำตาลซูโครสในช่วงเวลา 12 ชั่วโมงของการผลิต เมื่อพิจารณาการผลิตแบบเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 9 ของการผลิต พบว่าแนวโน้มการผลิตใกล้เคียงกับการผลิตแบบกะ (ไม่ได้เติมน้ำตาลซูโครสระหว่างการผลิต) คือ มีระดับน้ำตาลเคสโตสคงที่ในชั่วโมงที่ 12 – 18 แสดงว่าการเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 9 ของการผลิตน่าจะมีรูปแบบการผลิตเคสโตสใกล้เคียงกับการผลิตแบบกะมากที่สุด เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลกลูโคสในระบบ (รูปที่ 33) พบว่าการผลิตแบบเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงต่าง ๆ มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลกลูโคสใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกับการการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักสายใยแห้ง (รูปที่ 32) ซึ่งมีแนวโน้มเช่นเดียวกับการผลิตแบบกะ ซึ่งอาจเกิดจากการเติมน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้นเพียง 50 กรัมต่อลิตร ไม่ได้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการผลิตมากนัก เมื่อพิจารณาแนวโน้มของการผลิตแบบกะและแบบเติมน้ำตาลซูโครส พบว่าโดยรวมการผลิตแบบกะและแบบเติมน้ำตาลซูโครส 50 กรัมต่อลิตรให้ผลการผลิตไม่แตกต่างกันมากนัก

เมื่อพิจารณาจากน้ำตาลซูโครสที่อยู่ในระบบ (ตารางที่ 7) พบว่าการเพิ่มน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 9 และ 12 ทำให้ได้ปริมาณ FOS รวมสูงสุด เท่ากับ 273 และ 299 กรัม แต่ก็เป็นการใช้ปริมาณซูโครสสูงกว่าด้วย (375 และ 362 กรัม) และเมื่อพิจารณาเป็นอัตราส่วนของน้ำตาลซูโครสที่ใช้ทั้งหมดต่อ FOS ที่ได้ พบว่า การผลิตโดยเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 12 มีอัตราส่วนต่ำสุด (ใกล้เคียงกับการผลิตโดยเติม ณ ชั่วโมงที่ 9 และ 18) แสดงว่าการผลิตโดยเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 12 มีความคุ้มทุนค่อนข้างมากที่สุด (แสดงว่าการใช้น้ำตาลซูโครสน้อยแต่มีการผลิต FOS ได้มาก) ขณะที่การปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นอยู่ในระดับความเข้มข้นใกล้เคียงกัน (ประมาณ 50 กรัมต่อลิตร) เนื่องจากน้ำตาลซูโครสที่เติมเป็นน้ำตาลทรายขาว (ซึ่งไม่ใช่น้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์)

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบการผลิต FOS จากการเติมน้ำตาลซูโครสในเวลาต่าง ๆ ของการผลิต

เปรียบเทียบ	แบบกะ	เติมที่ ชม. 9	เติมที่ ชม. 12	เติมที่ ชม. 15	เติมที่ ชม. 18
ชม. ที่ได้เคสโตสสูงสุด	12	12	15	21	24
ชม. ที่ได้นีสโตสสูงสุด	24	18	24	24	24
ชม. ที่ได้ FOS สูงสุด	18	18	18	21	24
ร้อยละการผลิตเคสโตส*	49.29	77.3	74.78	61.18	71.36
ร้อยละการผลิตนีสโตส*	40.33	20	44.87	15.6	19
ร้อยละการผลิต FOS *	76.38	77.31	85.04	61.18	71.36
อัตราการผลิตเคสโตส (ก/ล/ชม.)**	9.39	11.17	8.86	5.67	5.25
อัตราการผลิตนีสโตส (ก/ล/ชม.)**	3.84	2.6	4.38	1.54	1.92
อัตราการผลิต FOS (ก/ล/ชม.)**	9.7	10.11	11.06	6.9	7.17
เคสโตสสูงสุด (ก/ล)**	112.7	135	133	119	126
นีสโตสสูงสุด (ก/ล)**	92.22	47	105	37	46
FOS สูงสุด (ก/ล)**	174.65	182	199	145	172

หมายเหตุ * เทียบร้อยละกับปริมาณน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น คิดจากชม.ที่ได้ผลผลิตสูงสุด

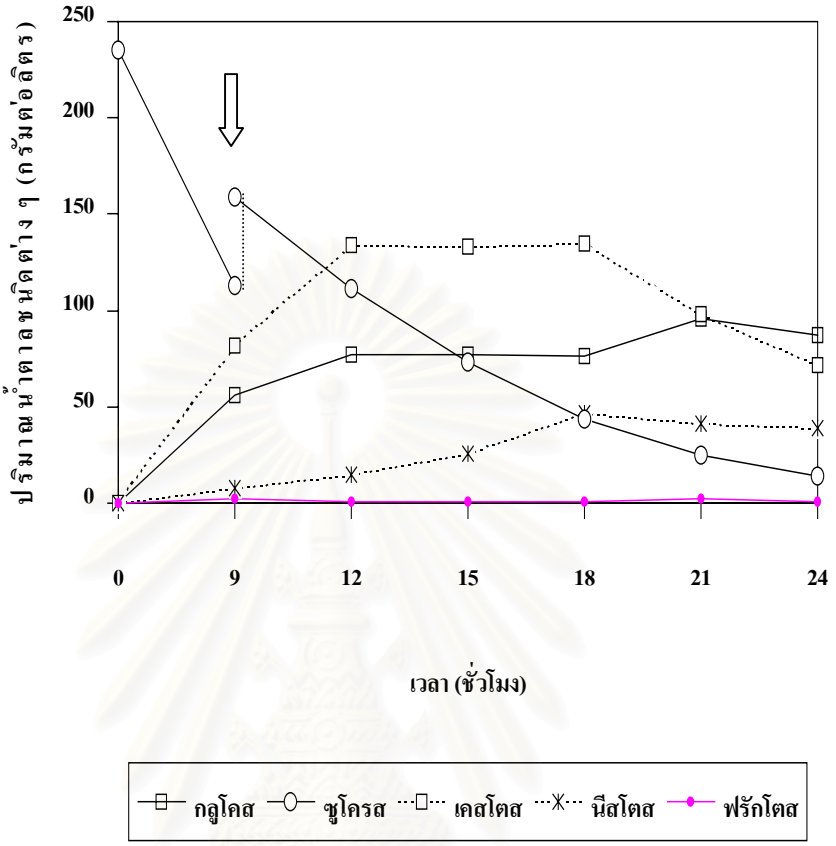
** คิดจากชม.ที่ได้ผลผลิตสูงสุด

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณน้ำตาลซูโครสและ FOS ในระบบ ในการผลิตแบบเติมน้ำตาลซูโครส

การผลิต	ปริมาณซูโครสก่อนเติม (กรัม)*	ปริมาณซูโครสหลังเติม (กรัม)*	ปริมาณซูโครสที่เพิ่มขึ้น (กรัม)*	ความเข้มข้นของซูโครสที่เพิ่มขึ้น (กรัมต่อลิตร)*	ปริมาณซูโครสทั้งหมดที่ใช้ในการผลิต (กรัม)	ปริมาตรน้ำหมักหลังเติม (ลิตร)	ปริมาณ FOS สูงสุด (กรัม) ณ ชม.ที่ผลิตได้สูงสุด
เติมที่ ชม.9	113	238	125	46	375	1.5	273
เติมที่ ชม.12	88	200	112	45	362	1.5	299
เติมที่ ชม.15	70	172	100	44	350	1.5	218
เติมที่ ชม.18	20	106	86	51	336	1.5	258

หมายเหตุ * คิด ณ ชม.ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครส

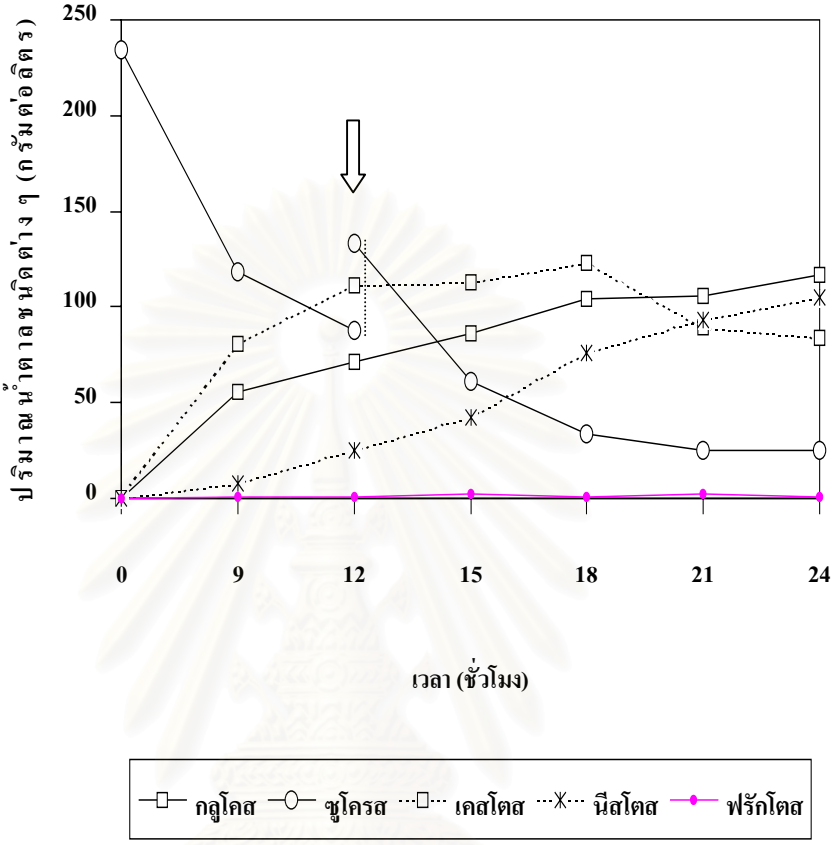
ในการทดลองนี้เป็นการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสอีก 50 กรัมต่อลิตรในระหว่างการผลิต ซึ่งจะทำการทดลองเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เติมลงไป เพื่อศึกษาแนวโน้มการผลิตเมื่อเพิ่มน้ำตาลซูโครสให้สูงขึ้นไปอีก โดยจะเพิ่มน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 9 ของการผลิต เพื่อศึกษาแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของเคสโตส เนื่องจากการเติมซูโครสในชั่วโมงที่ 9 จะให้ผลผลิตเคสโตสและ FOS รวม สูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 12 เท่ากับการผลิตแบบไม่เติมซูโครส (และมีรูปแบบการผลิตเคสโตสใกล้เคียงกับการผลิตแบบกะ) ซึ่งทำให้ใช้ระยะเวลาการผลิตเคสโตสสูงสุดน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการเติมซูโครสในชั่วโมงที่ 12 (ในการเติมน้ำตาลซูโครส ณ ชั่วโมงที่ 12 จะผลิตเคสโตสสูงสุดในชั่วโมงที่ 15)



รูปที่ 25 แสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อมีการเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 9 ของการผลิต ปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร (ปริมาตรน้ำหมักเดิม 1 ลิตรเป็น 1.5 ลิตร)

(หมายเหตุ ⇩ หมายถึง การเติมน้ำตาลซูโครส)

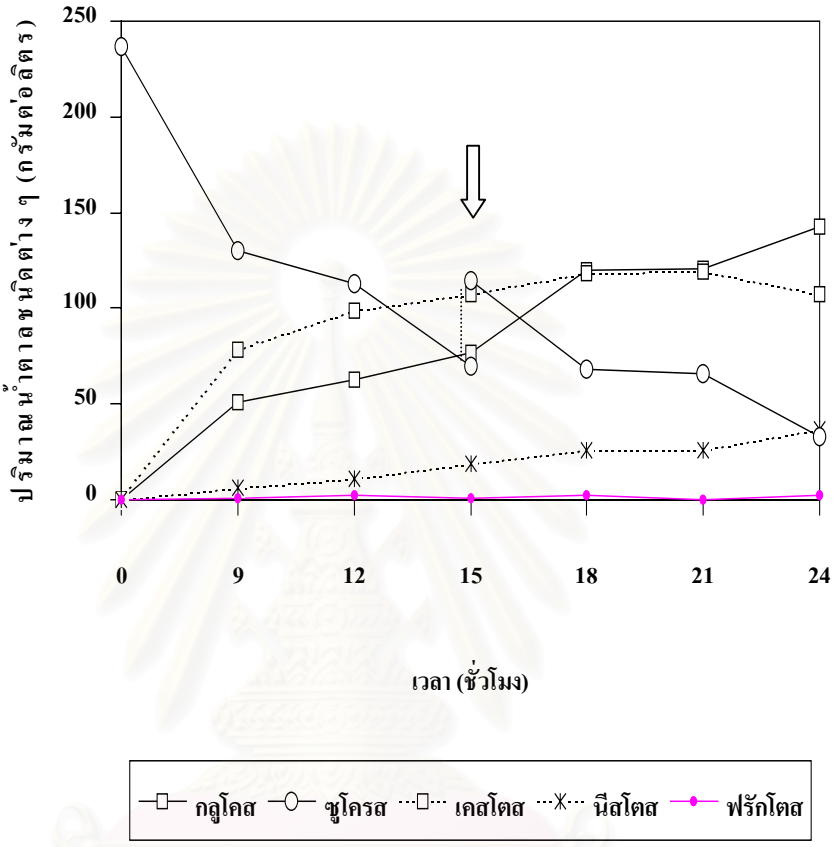
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 26 แสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อมีการเติมซูโครสในชั่วโมงที่ 12 ของการผลิตปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร (ปริมาตรน้ำหมักเดิม 1 ลิตรเป็น 1.5 ลิตร)

(หมายเหตุ ⇩ หมายถึง การเติมน้ำตาลซูโครส)

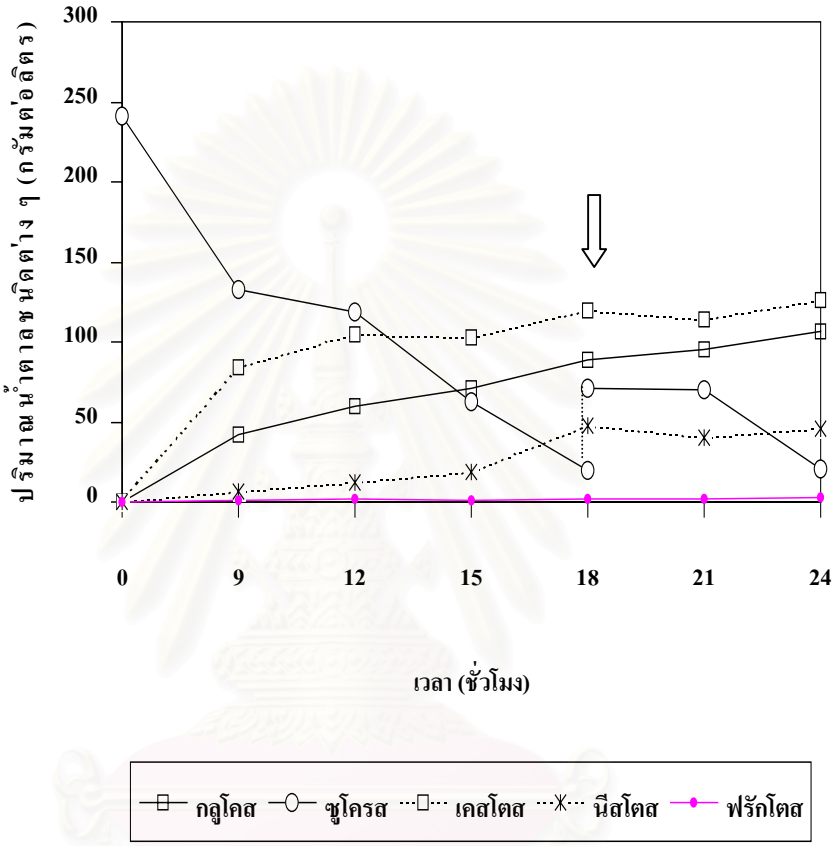
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 27 แสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อมีการเติมซูโครสในชั่วโมงที่ 15 ของการผลิตปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร (ปริมาตรน้ำหมักเดิม 1 ลิตรเป็น 1.5 ลิตร)

(หมายเหตุ ⇩ หมายถึง การเติมน้ำตาลซูโครส)

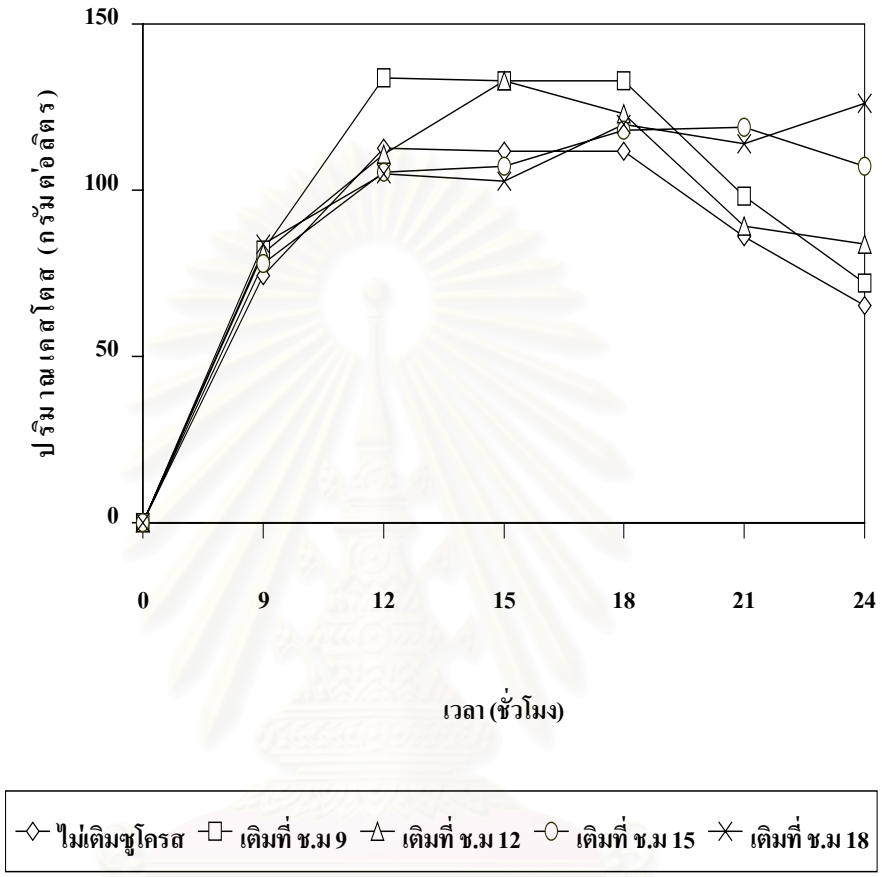
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 28 แสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อมีการเติมซูโครสในชั่วโมงที่ 18 ของการผลิตปริมาณ 50 กรัมต่อลิตร (ปริมาตรน้ำหมักเดิม 1 ลิตรเป็น 1.5 ลิตร)

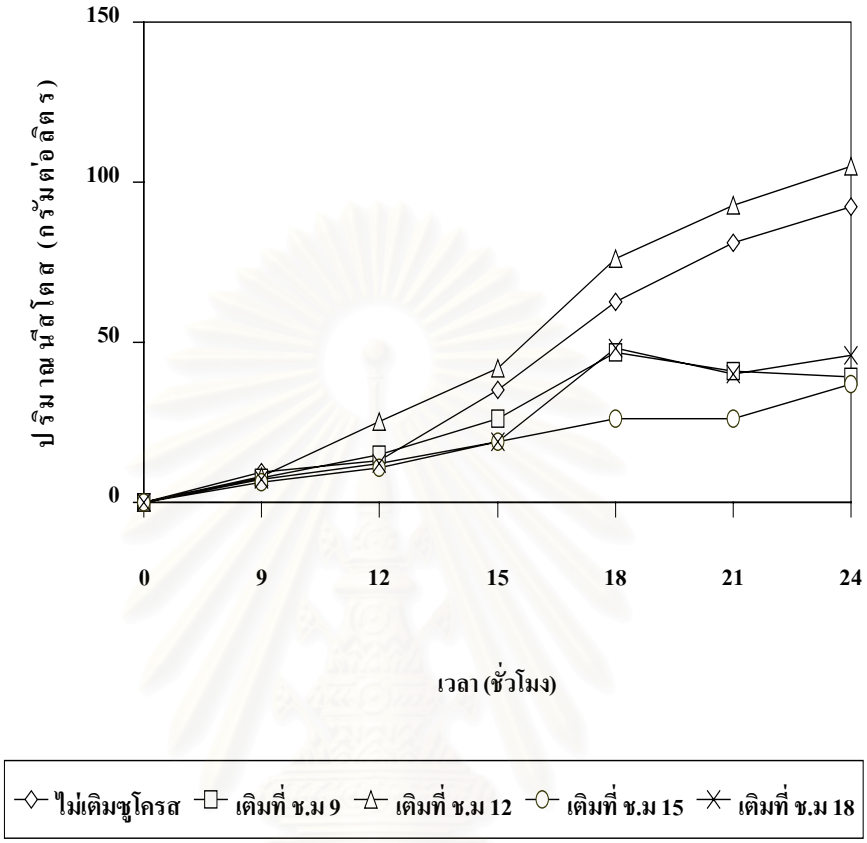
(หมายเหตุ ⇩ หมายถึง การเติมน้ำตาลซูโครส)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



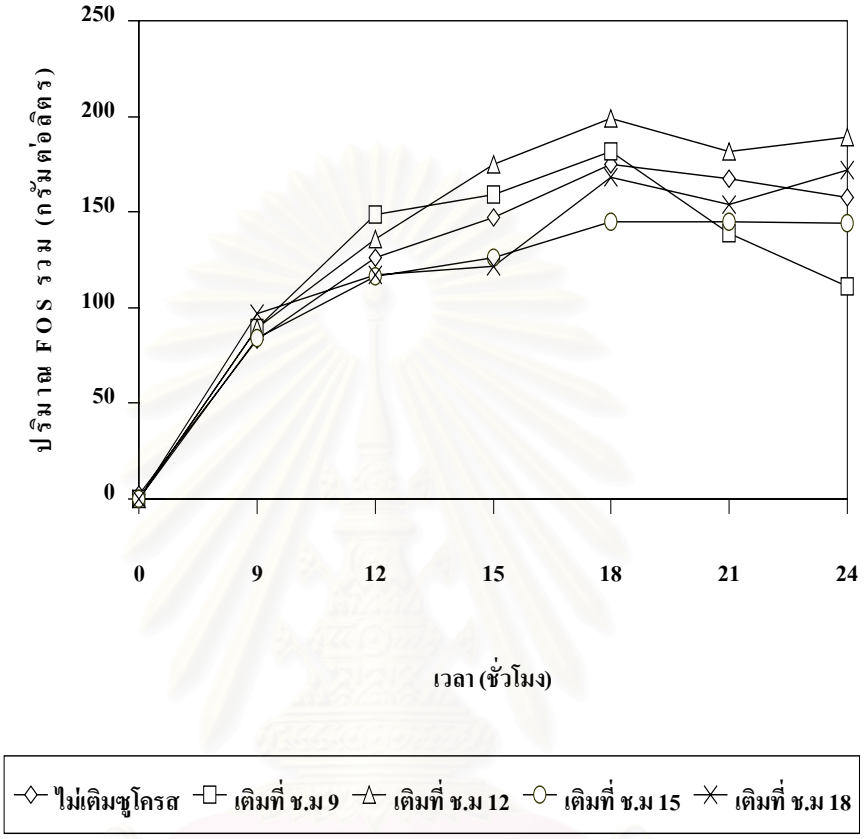
รูปที่ 29 แสดงปริมาณเคสโตส เมื่อมีการเติมซูโครสในชั่วโมงต่าง ๆ ของการผลิตปริมาณ 50 กรัมต่อลิตรเทียบกับไม่ได้เติมซูโครสระหว่างการผลิต (ปริมาตรน้ำหมักเดิม 1 ลิตรเป็น 1.5 ลิตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



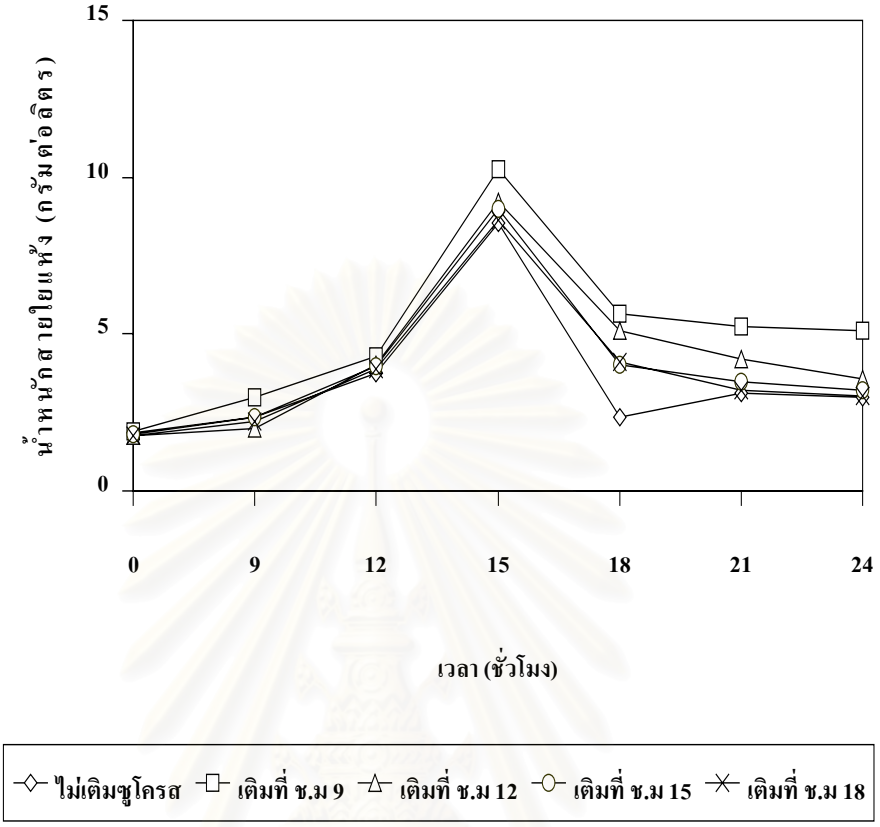
รูปที่ 30 แสดงปริมาณน้ำตาลนีสโตส เมื่อมีการเติมซูโครสในชั่วโมงต่าง ๆ ของการผลิตปริมาณ 50 กรัมต่อลิตรเทียบกับไม่ได้เติมซูโครสระหว่างการผลิต (ปริมาตรน้ำหมักเดิม 1 ลิตรเป็น 1.5 ลิตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



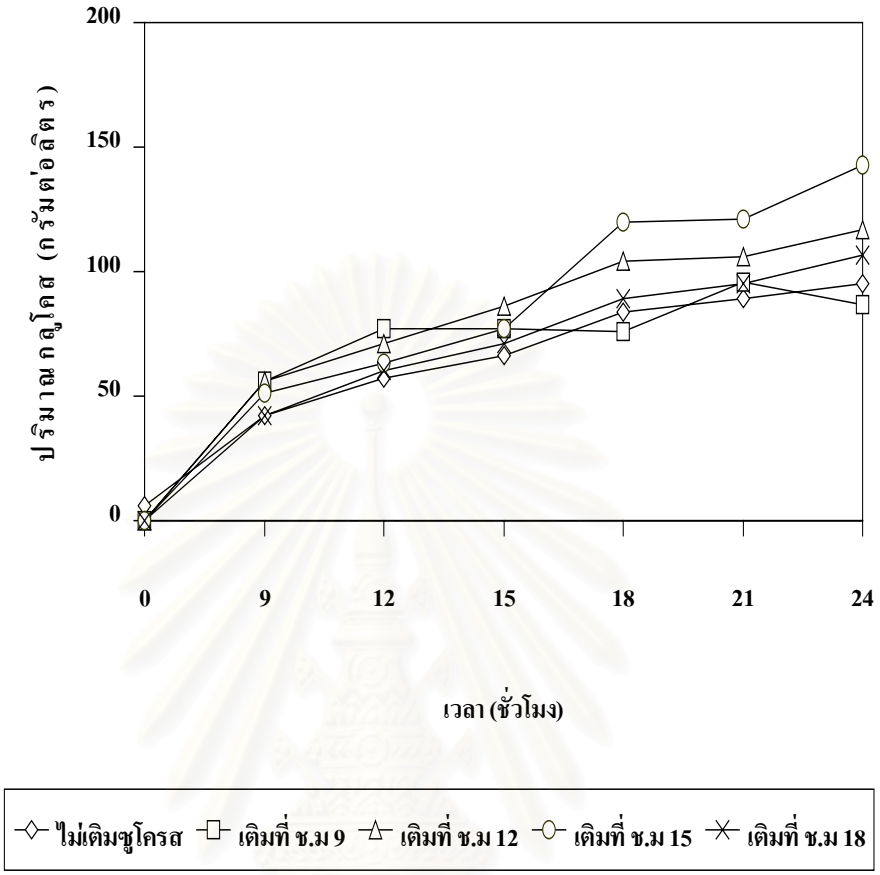
รูปที่ 31 แสดงปริมาณ FOS รวม เมื่อมีการเติมซูโครสในชั่วโมงต่าง ๆ ของการผลิตปริมาณ 50 กรัมต่อลิตรเทียบกับไม่ได้เติมซูโครสระหว่างการผลิต (ปริมาตรน้ำหมักเดิม 1 ลิตรเป็น 1.5 ลิตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 32 แสดงน้ำหนักสายใยแห้ง เมื่อมีการเติมซูโครสในชั่วโมงต่าง ๆ ของการผลิตปริมาณ 50 กรัมต่อลิตรเทียบกับไม่ได้เติมซูโครสระหว่างการผลิต (ปริมาตรน้ำหมักเดิม 1 ลิตรเป็น 1.5 ลิตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 33 แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคส เมื่อมีการเติมซูโครสในชั่วโมงต่าง ๆ ของการผลิตปริมาณ 50 กรัมต่อลิตรเทียบกับไม่ได้เติมซูโครสระหว่างการผลิต (ปริมาตรน้ำหมักเดิม 1 ลิตรเป็น 1.5 ลิตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เติมในระหว่างการผลิต

จากการทดลองในข้อที่ 2 ที่มีการเพิ่มน้ำตาลซูโครส ณ ชั่วโมงต่าง ๆ ของการผลิตให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น 50 กรัมต่อลิตร พบว่าการเพิ่มน้ำตาลซูโครส ณ ชั่วโมงที่ 9 และ 12 จะทำให้มีการผลิตเคสโตส, นีสโตส และ FOS รวมเพิ่มสูงขึ้น ในการทดลองนี้จึงเป็นการเพิ่มน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 9 ของการผลิตให้มีความเข้มข้นสูงขึ้นอีก 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

จากผลการทดลอง (ตารางที่ 8) พบว่า หลังจากที่มีการเพิ่มน้ำตาลซูโครสให้มีความเข้มข้นสูงขึ้นอีก 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตรแล้ว จะทำให้ได้ปริมาณเคสโตสสูงสุดเท่ากับ 128, 108 และ 195 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 18, 18 และ 24 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับ (รูปที่ 34 – 36 และ 38) ขณะที่ปริมาณนีสโตสสูงสุดที่ผลิตได้เท่ากับ 23, 40 และ 47 กรัมต่อลิตรตามลำดับ (รูปที่ 34 – 36 และ 39) และเมื่อพิจารณาปริมาณ FOS รวมสูงสุดที่ผลิตได้ พบว่าสามารถผลิตเท่ากับ 151, 148 และ 242 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 18, 24 และ 24 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับ (รูปที่ 41) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตโดยเติมน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้นอีก 50 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการผลิตในการทดลองที่ 2 (รูปที่ 25) จะพบว่าการผลิตโดยเพิ่มน้ำตาลซูโครส อีก 100 และ150 กรัมต่อลิตร จะได้ผลผลิตเคสโตส และนีสโตส รวมทั้งปริมาณ FOS น้อยกว่า (ตารางที่ 7) ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากน้ำตาลซูโครสที่เติมเข้าไปสูงขึ้นทำให้เกิดแรงดันออสโมติกสูง ส่งผลให้การผลิตเอนไซม์น้อยลง ทำให้การผลิต FOS ลดลงด้วย ขณะที่การผลิตโดยเพิ่มน้ำตาลซูโครสให้สูงขึ้นอีก 200 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตเคสโตส, นีสโตส และ FOS รวมสูงกว่าการผลิตโดยเพิ่มน้ำตาลซูโครสให้สูงขึ้นอีก 50, 100 และ 150 กรัมต่อลิตร แต่จะให้ผลผลิตสูงสุดในระยะเวลานานกว่า (ที่ชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง) ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากในช่วงแรกเมื่อมีการเพิ่มน้ำตาลซูโครสในปริมาณสูงมาก เซลล์จะใช้ระยะเวลาในการปรับตัวต่อแรงดันออสโมติกที่เพิ่มขึ้น จนกระทั่งเมื่อปริมาณของน้ำตาลซูโครสลดลง (แต่ยังมีความเข้มข้นในระดับที่เหมาะสมต่อการผลิต) จึงทำให้มีการผลิตเคสโตสและนีสโตสเพิ่มสูงขึ้นในช่วงท้ายของการเพาะเลี้ยง ดังนั้นจึงใช้ระยะเวลาในการผลิตนานกว่ามาก

จากการพิจารณาน้ำหนักสายใยแห้ง พบว่าน้ำหนักสายใยแห้งเมื่อผลิตโดยเติมน้ำตาลซูโครสเพิ่มอีก 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีน้ำหนักแห้งใกล้เคียงกัน (รูปที่ 40) แต่จะมีน้ำหนักสายใยแห้งหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมงสูงกว่าการผลิตโดยเติมน้ำตาลซูโครสให้มีความเข้มข้นสูงขึ้นอีก 50 กรัมต่อลิตร (ในการทดลองที่ 2) ทั้งนี้น่าจะเกิดจาก การเพิ่มน้ำตาลซูโครสให้มีความเข้มข้นสูงขึ้นอีก 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตรในชม.ที่ 9 ของการผลิต ทำให้มีปริมาณน้ำตาลในระบบมาก น่าจะทำให้ความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อมีสูงกว่า ดังนั้นเมื่อเพิ่มความเร็วรอบของการกวน (เพื่อควบคุมค่าออกซิเจนละลาย) ให้สูงขึ้น โอกาสที่สายใยจะฉีกขาด เช่น กรณีการเพาะเลี้ยงแบบกะ และการผลิตแบบเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสอีก 50 กรัมต่อลิตรจึงอาจเกิดได้ยากกว่า

เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มขึ้นพบว่า ในการผลิตโดยเติมน้ำตาลซูโครสให้มีความเข้มข้นสูงขึ้นอีก 100, 150 และ 200 กรัมมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกัน (รูปที่ 37) และสังเกตได้ว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มขึ้นจากการผลิตแบบเติมน้ำตาลซูโครสอีก 100 และ 150 กรัมต่อลิตรมีน้ำตาลกลูโคสสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่ปริมาณ FOS ในช่วงนั้นกลับไม่เพิ่มสูงขึ้นมากนัก ซึ่งน่าจะเกิดจากการทำงานของเอนไซม์อินเวอเทส ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสในขณะนั้น

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบการผลิต FOS จากการเติมน้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ณ ชั่วโมงที่ 9 ของการผลิต

เปรียบเทียบ	เติม 50 ก/ล	เติม 100 ก/ล	เติม 150 ก/ล	เติม 200 ก/ล
ชม.ที่ได้เคสโตสสูงสุด	12	18	18	24
ชม. ที่ได้นีสโตสสูงสุด	18	18	21	24
ชม.ที่ได้ FOS สูงสุด	18	18	24	24
อัตราการผลิตเคสโตส (ก/ล/ชม.)*	11.17	7.11	6	8.13
อัตราการผลิตนีสโตส (ก/ล/ชม.)*	2.6	1.3	2.22	1.96
อัตราการผลิต FOS (ก/ล/ชม.)*	10.11	8.39	6.17	10.08
เคสโตสสูงสุด (ก/ล)*	135	128	108	195
นีสโตสสูงสุด (ก/ล)*	47	23	40	47
FOS รวมสูงสุด (ก/ล)*	182	151	148	242

หมายเหตุ * คิดจากชม. ที่ให้ผลผลิตสูงสุด

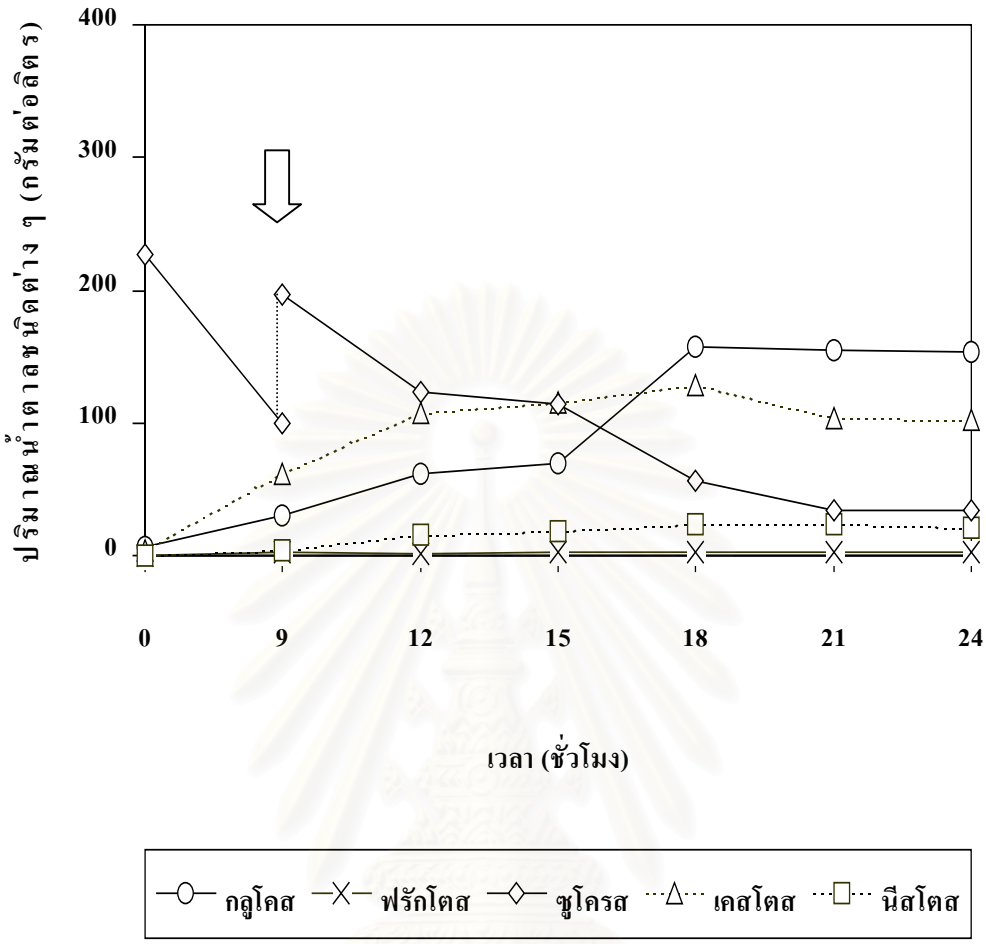
จากตารางที่ 9 พบว่าการเพิ่มน้ำตาลซูโครสให้มีความเข้มข้นสูงขึ้นอีก กลับทำให้มีการผลิต FOS ได้น้อยลง (ยกเว้นกรณีผลิตโดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้นประมาณ 200 กรัมต่อลิตร) เมื่อคิดเป็นอัตราส่วนระหว่างน้ำตาลซูโครสที่ใช้ทั้งหมดต่อปริมาณ FOS รวมที่ผลิตได้ซึ่งเท่ากับ 1.3, 1.9, 2.3 และ 1.6 ตามลำดับ แสดงว่าการใช้น้ำตาลซูโครสมากเกินไปทำให้ความคุ้มทุนลดลงอย่างชัดเจน แต่การเพิ่ม 354 กรัม กลับทำให้มีความคุ้มทุนดีกว่าการเพิ่ม 200 และ 262 กรัม เนื่องจากมีการผลิต FOS สูงในช่วงท้ายของการเพาะเลี้ยง (แต่ใช้เวลาผลิต FOS สูงสุดนานที่สุด ดังตารางที่ 8) ดังนั้นการเพิ่มน้ำตาลซูโครส เพียง 125 กรัมทำให้มีการผลิต FOS คุ้มทุนที่สุด

ตารางที่ 9 แสดงปริมาณน้ำตาลซูโครสและ FOS ในระบบ ในการผลิตแบบเติมน้ำตาลซูโครส 50, 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตร

การผลิต	ปริมาณซูโครสก่อนเติม (กรัม)*	ปริมาณซูโครสหลังเติม (กรัม)*	ปริมาณซูโครสที่เพิ่มขึ้น (กรัม)*	ความเข้มข้นของซูโครสที่เพิ่มขึ้น (กรัมต่อลิตร)*	ปริมาณซูโครสทั้งหมดที่ใช้ในการผลิต (กรัม)	ปริมาตรน้ำหมักหลังเติม (ลิตร)	ปริมาณ FOS สูงสุด (กรัม) ณ ชม.ที่ผลิตได้สูงสุด
เพิ่ม 50 ก/ล	113	238	125	46	375	1.5	273
เพิ่ม 100 ก/ล	100	300	200	97	450	1.5	226
เพิ่ม 150 ก/ล	85	347	262	146	512	1.5	222
เพิ่ม 200 ก/ล	111	465	354	199	604	1.5	363

หมายเหตุ * คิด ณ ชม.ที่มีการเติมน้ำตาลซูโครส

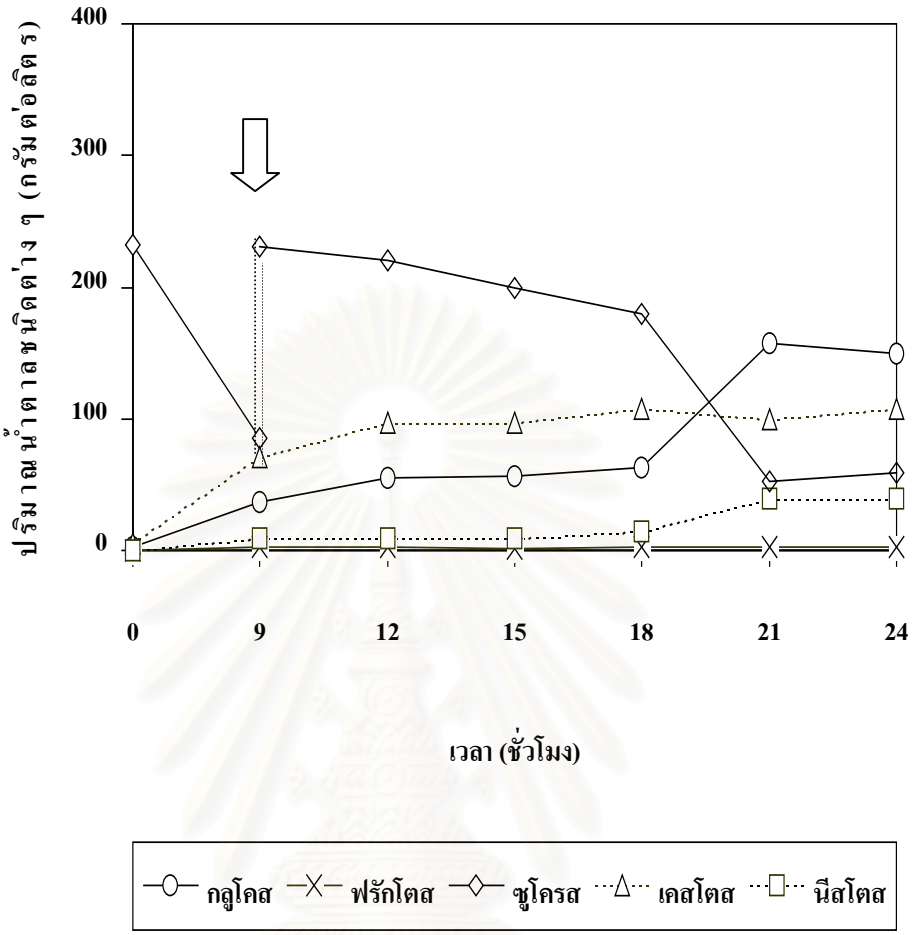
จากการทดลองนี้อาจกล่าวได้ว่าการทำงาน และการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต FOS น่าจะมีความสัมพันธ์กับแรงดันออสโมติกในระบบด้วย โดยการเพิ่มน้ำตาลซูโครสที่สูงมากในระดับหนึ่ง อาจมีผลทำให้การเหนี่ยวนำให้สร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต FOS เช่น เอนไซม์อินเวอเทส และเอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรสเกิดได้ช้าลง ดังนั้นเมื่อในระบบมีปริมาณน้ำตาลซูโครสมากเกินไปจึงทำให้การผลิต FOS ช้าลงไปด้วย ดังนั้นความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมน่าจะมีผลต่อการผลิต FOS ในการทดลองต่อไปจึงเป็นการศึกษาการผลิตโดยเติมน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้นช้า ๆ อย่างต่อเนื่อง ซึ่งน่าจะทำให้มีการผลิต FOS ได้สูงขึ้น



รูปที่ 34 แสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อมีการเพิ่มซูโครส 100 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 9 ของการผลิต (ปริมาตรน้ำหมักเดิม 1 ลิตรเป็น 1.5 ลิตร)

(⇩ หมายถึงการเติมน้ำตาลซูโครส)

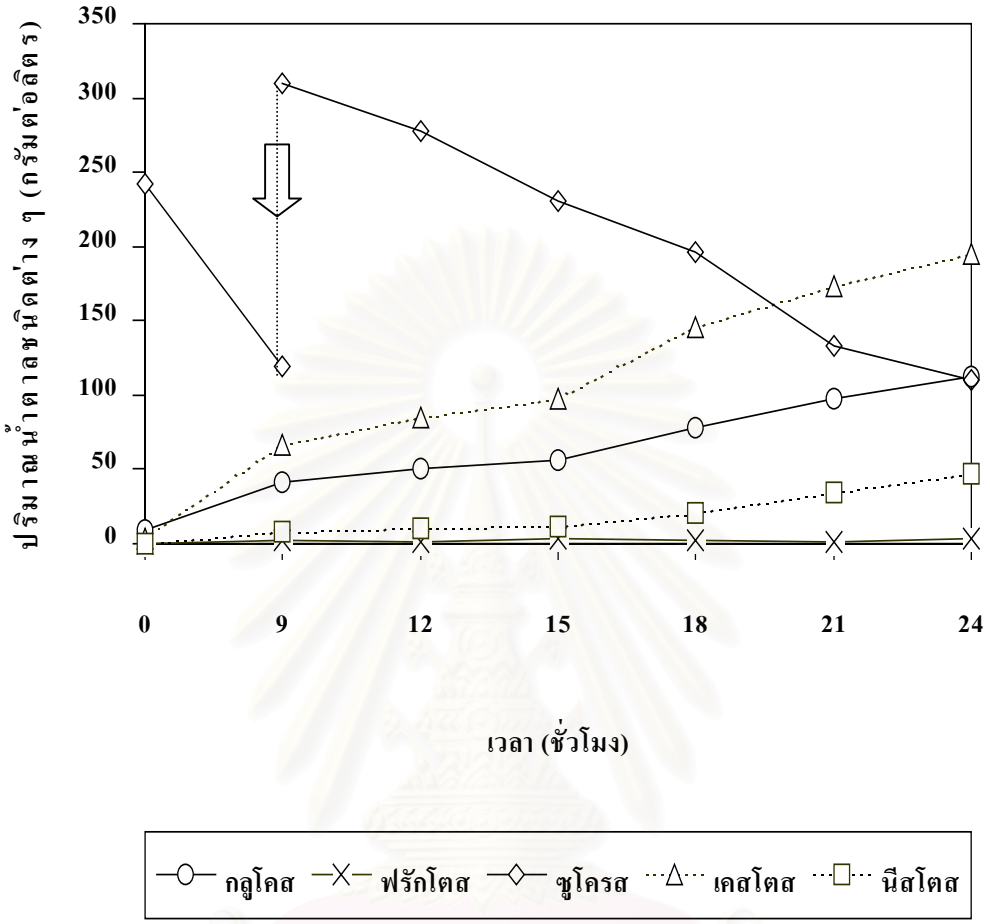
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 35 แสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อมีการเพิ่มซูโครส 150 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 9 ของการผลิต (ปริมาตรน้ำหมักเดิม 1 ลิตรเป็น 1.5 ลิตร)

(⇩ หมายถึงการเติมน้ำตาลซูโครส)

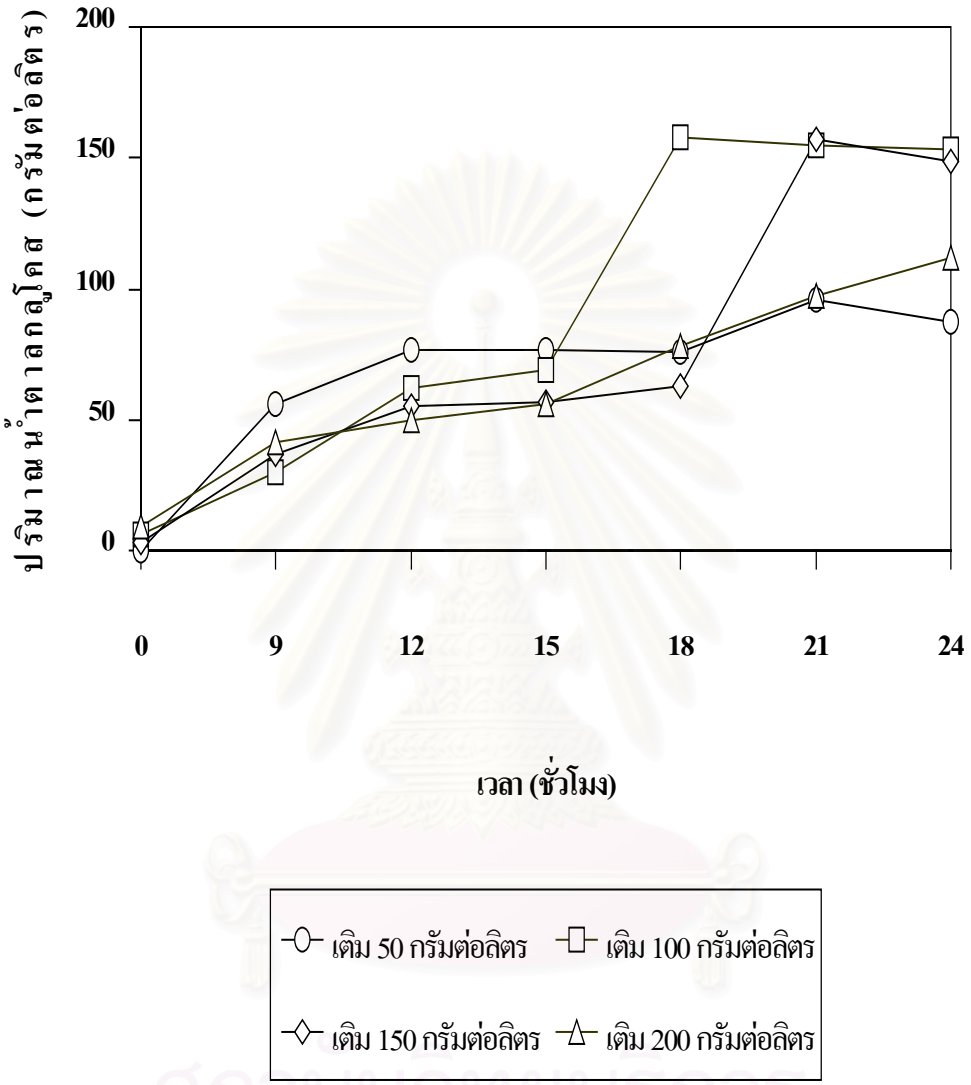
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



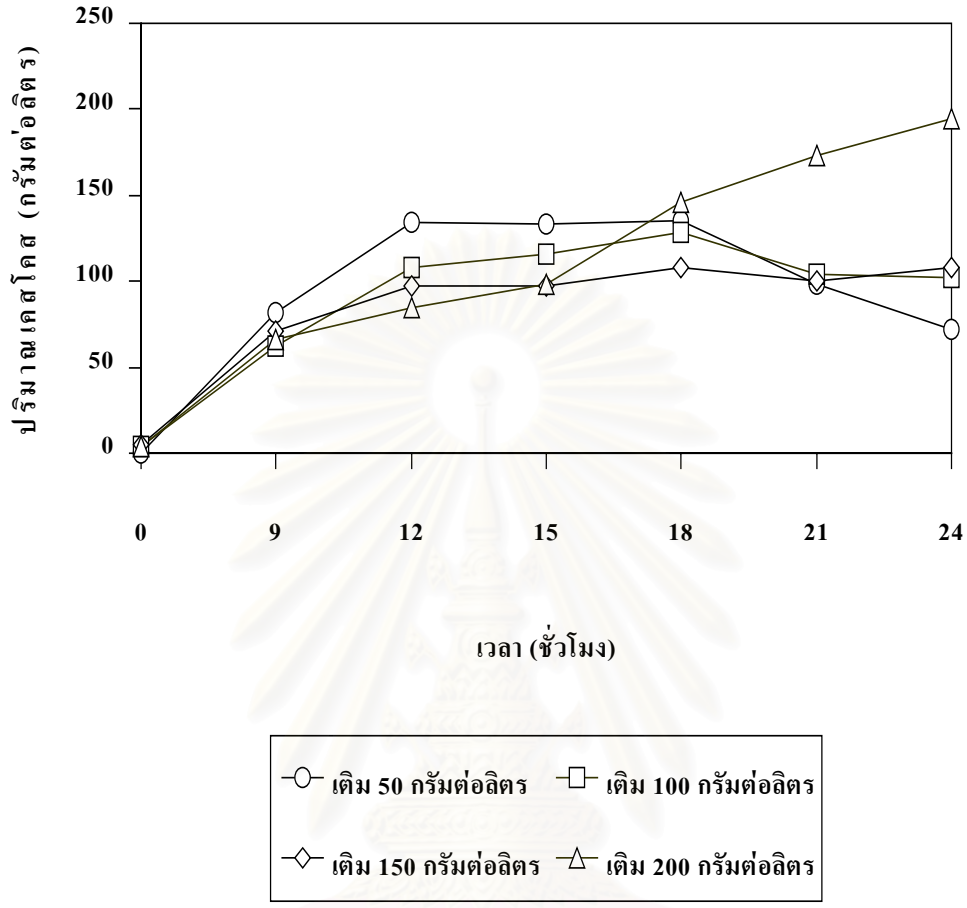
รูปที่ 36 แสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อมีการเพิ่มซูโครส 200 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 9 ของการผลิต (ปริมาตรน้ำหมักเดิม 1 ลิตรเป็น 1.5 ลิตร)

(⇩ หมายถึงการเติมน้ำตาลซูโครส)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

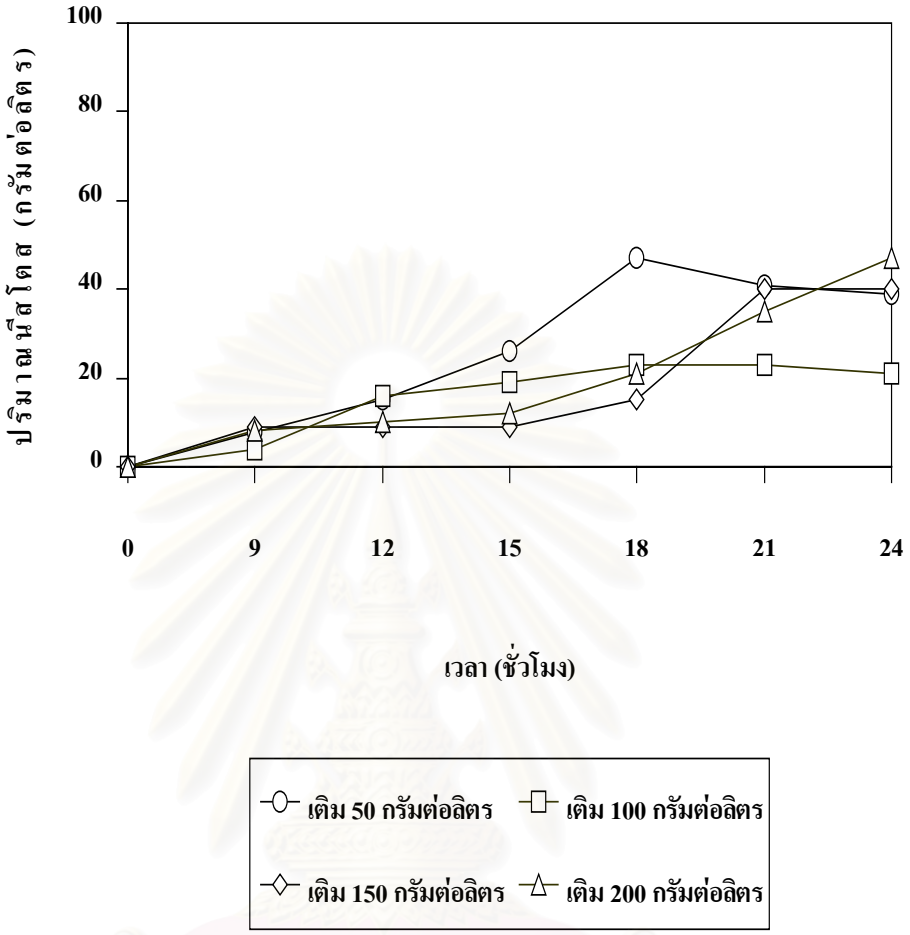


รูปที่ 37 แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคส เมื่อมีการเพิ่มซูโครส 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 9 ของการผลิต (ปริมาตรน้ำหมักเดิม 1 ลิตรเป็น 1.5 ลิตร)



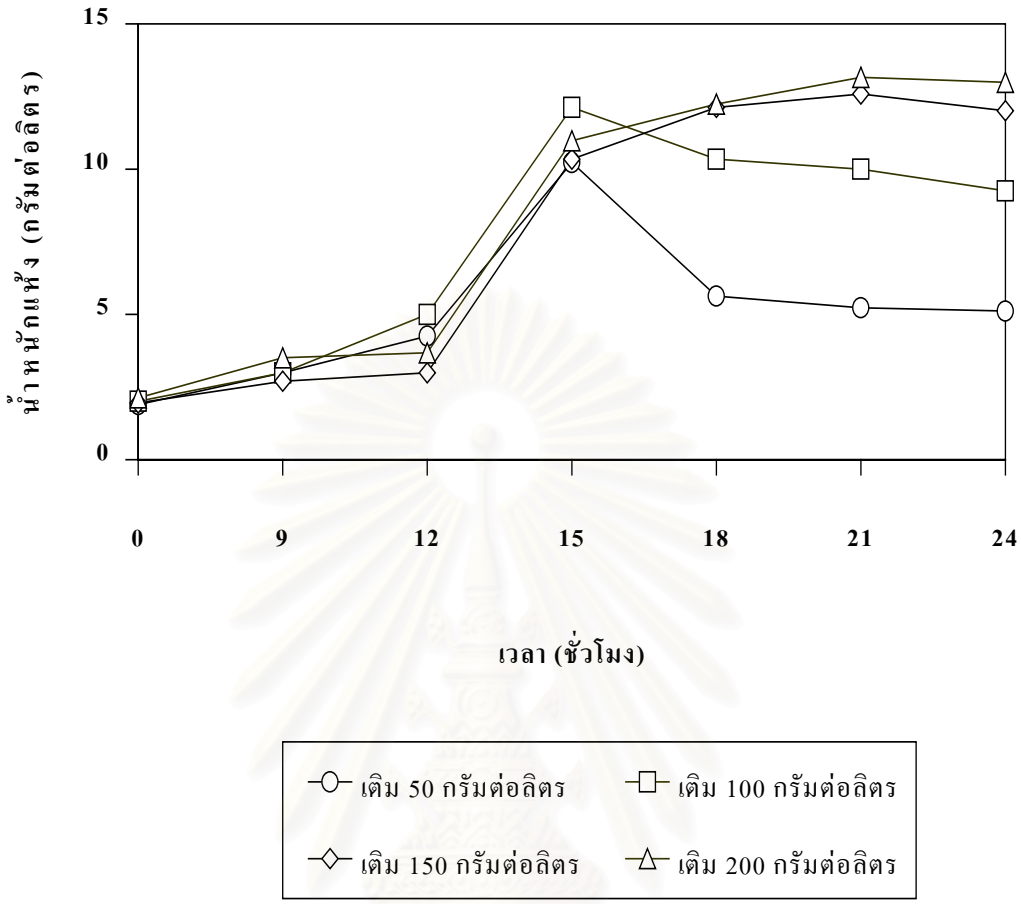
รูปที่ 38 แสดงปริมาณน้ำตาลเคสโตส เมื่อมีการเพิ่มซูโครส 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 9 ของการผลิต (ปริมาตรน้ำหมักเดิม 1 ลิตรเป็น 1.5 ลิตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



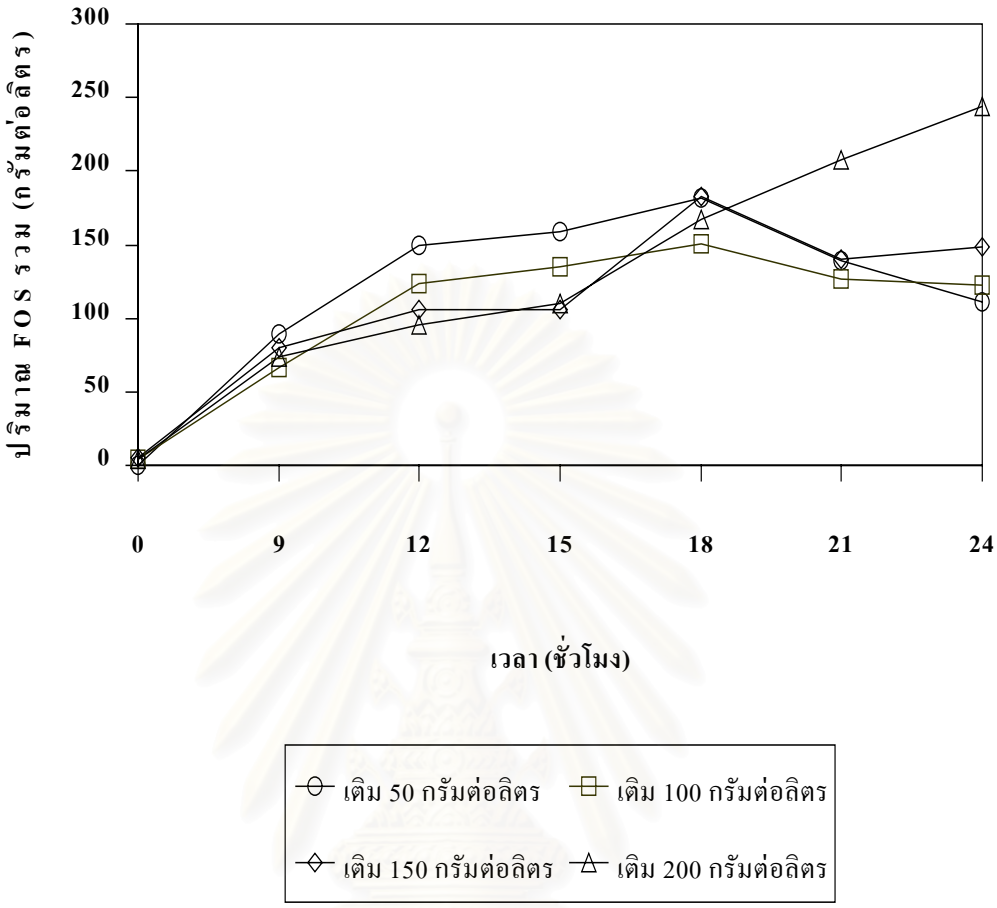
รูปที่ 39 แสดงปริมาณน้ำตาลนีสโตส เมื่อมีการเพิ่มซูโครส 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 9 ของการผลิต (ปริมาตรน้ำหมักเดิม 1 ลิตรเป็น 1.5 ลิตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 40 แสดงน้ำหนักสายใยแห้ง เมื่อมีการเติมซูโครส 100, 150 และ 200 กรัมในชั่วโมงที่ 9 ของการผลิต (ปริมาตรน้ำหมักเดิม 1 ลิตรเป็น 1.5 ลิตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

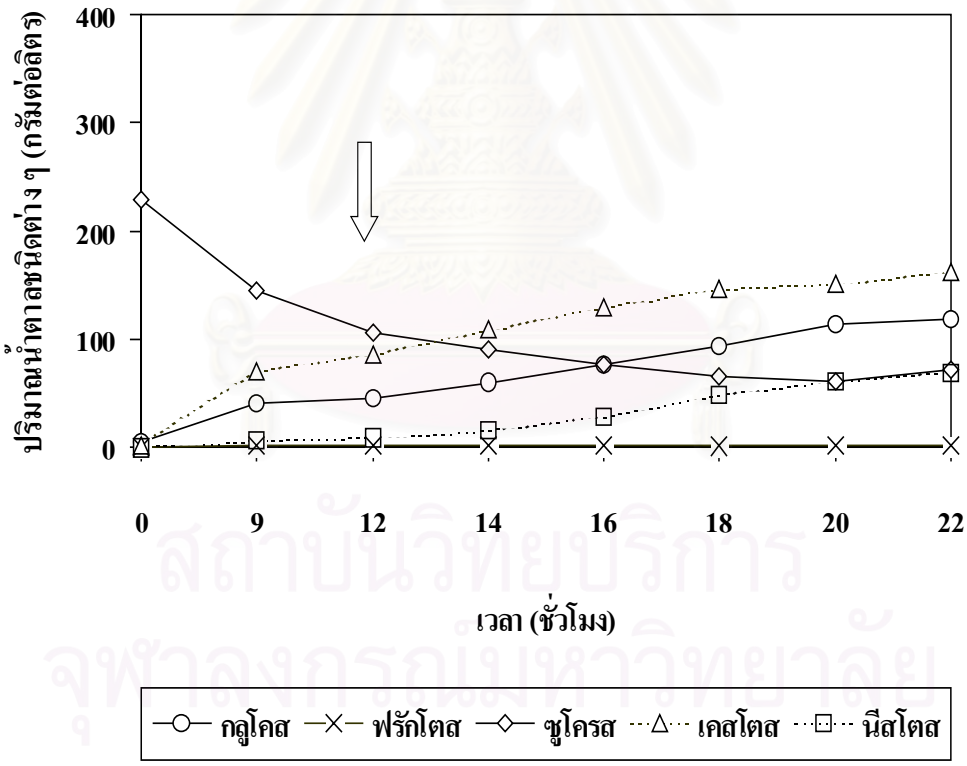


รูปที่ 41 แสดงปริมาณ FOS รวม เมื่อมีการเติมซูโครส 50, 100, 150 และ 200 กรัมในชั่วโมงที่ 9 ของการผลิต (ปริมาตรน้ำหมักเดิม 1 ลิตรเป็น 1.5 ลิตร)

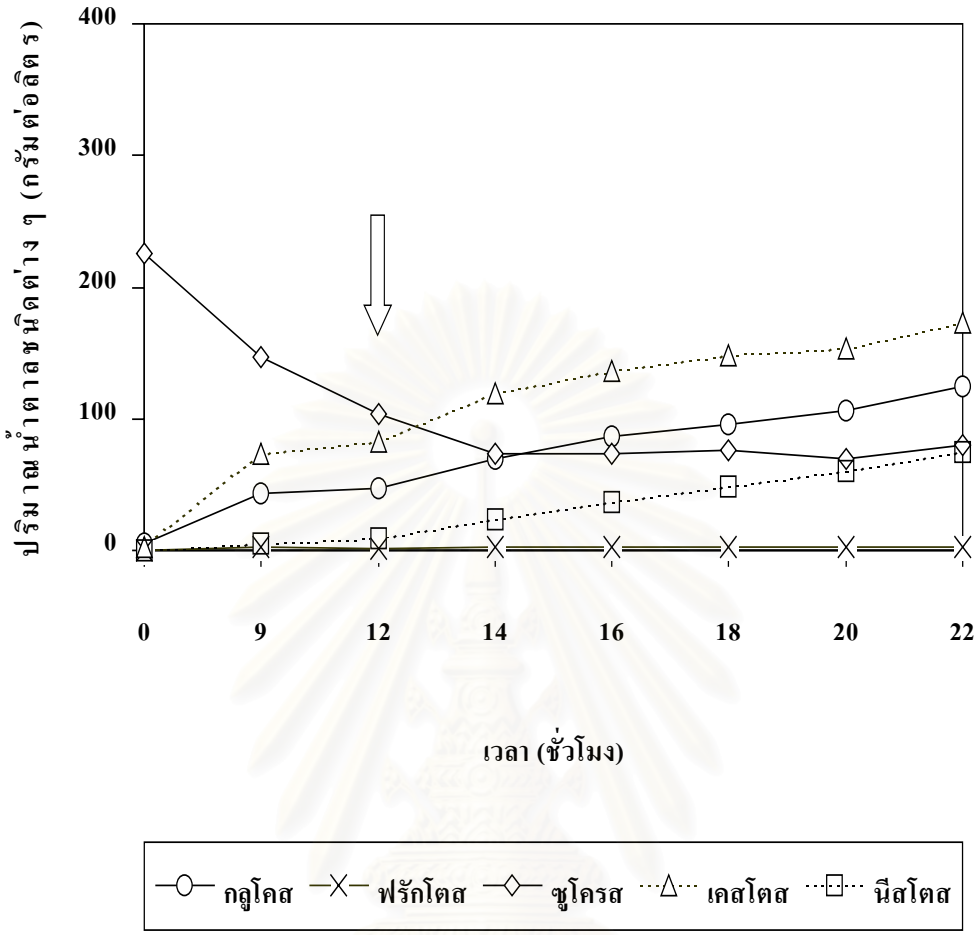
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. **การศึกษาการเติมน้ำตาลซูโครสอย่างต่อเนื่องในระหว่างการผลิต**

จากการทดลองในข้อ 3 พบว่าการเติมน้ำตาลซูโครสในระหว่างการผลิต ต้องควบคุมไม่ให้ปริมาณน้ำตาลซูโครสสูงเกินไปจนทำให้การผลิต FOS ลดลง ในการทดลองข้อ 4 จะได้มีการศึกษาการเพิ่มน้ำตาลซูดครสลงในถังหมักอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 10 ชั่วโมงในอัตราการเติม 1 มิลลิลิตรต่อนาที เนื่องจากในช่วงการเพาะเลี้ยง ณ ชั่วโมงที่ 12 – 15 ในการผลิตแบบกะมีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสลดลงในอัตราเร็ว 0.48 กรัมต่อลิตรต่อนาที จึงมีการควบคุมให้การทดลองนี้มีอัตราการเติมน้ำตาลซูโครสนาทีละ 0.33, 0.50 และ 0.67 กรัม โดยเตรียมน้ำตาลซูโครสที่จะเติมที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 200, 300 และ 400 กรัมต่อ 600 มิลลิลิตร (จะทำให้ได้ปริมาตรสุดท้ายในระบบเท่ากับ 1.6 ลิตร) โดยเริ่มต้นเติมตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ของการผลิต (ซึ่งจากการทดลองในข้อ 2 พบว่าเป็นช่วงที่เหมาะสมต่อการเพิ่มน้ำตาลซูโครส และปริมาณน้ำตาลซูโครส ณ ชั่วโมงที่ 12 ลดลงจากเริ่มต้นไปมาก) ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 42 -44



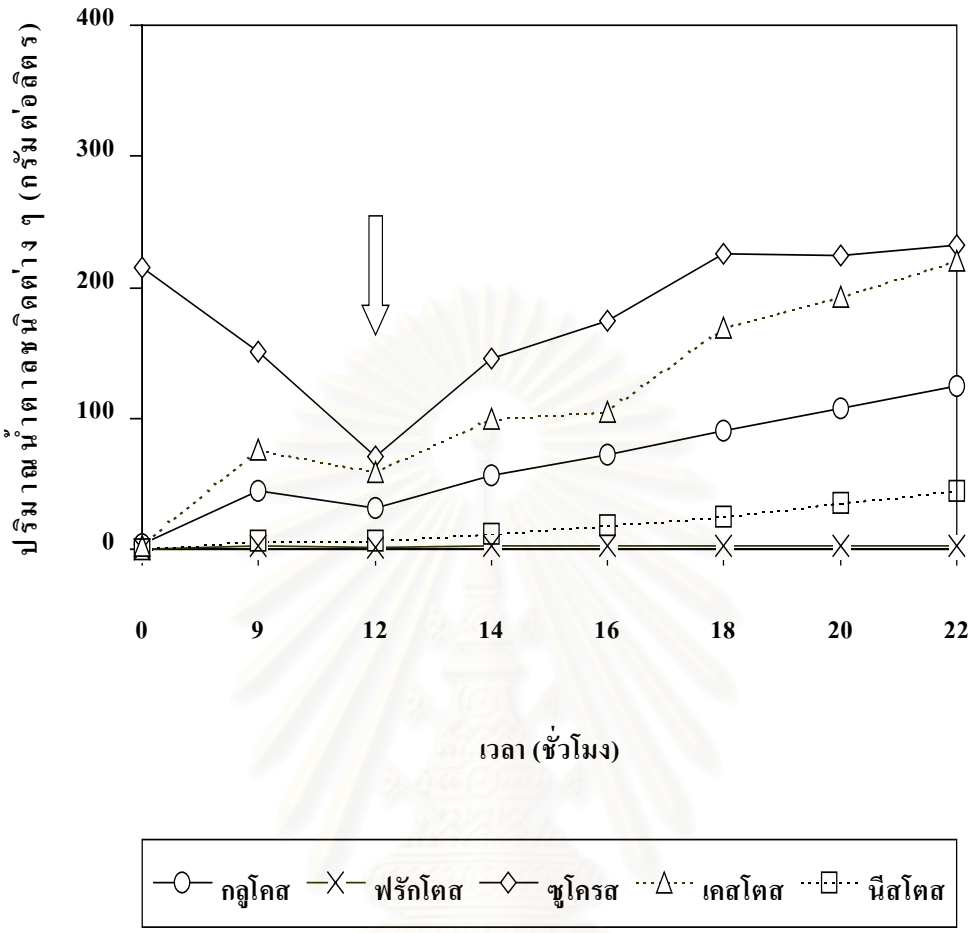
รูปที่ 42 แสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อมีการเติมซูโครสต่อเนื่อง (ความเข้มข้น 200 กรัมต่อ 600 มิลลิลิตร) อัตราการเติม 1 มิลลิลิตรต่อนาทีตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 – 22 ของการผลิต
(⇩ หมายถึงการเติมน้ำตาลซูโครส) (ปริมาตรน้ำหมักเดิม 1 ลิตรเป็น 1.6 ลิตร)



รูปที่ 43 แสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อมีการเติมซูโครสต่อเนื่อง (ความเข้มข้น 300 กรัมต่อ 600 มิลลิลิตร) อัตราการเติม 1 มิลลิลิตรต่อนาทีตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 – 22 ของการผลิต

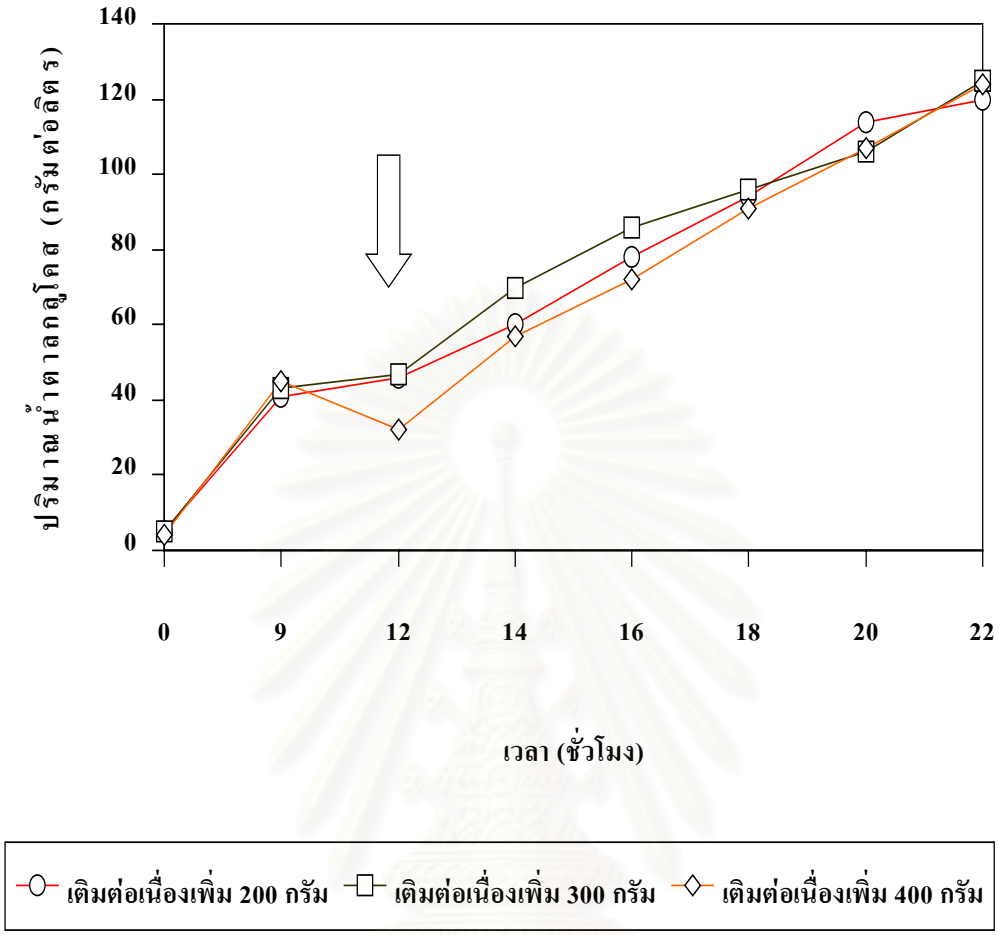
(⇩ หมายถึงการเติมน้ำตาลซูโครส) (ปริมาตรน้ำหมักเดิม 1 ลิตรเป็น 1.6 ลิตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



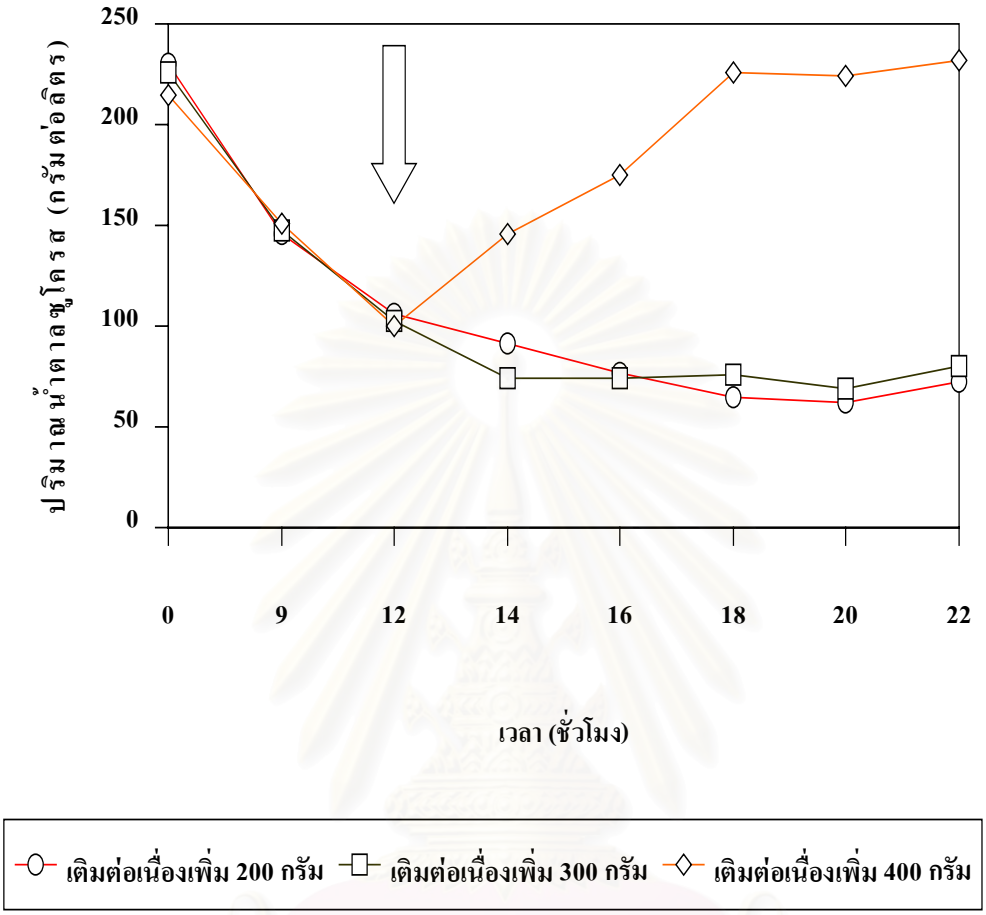
รูปที่ 44 แสดงปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อมีการเติมซูโครสต่อเนื่อง (ความเข้มข้น 400 กรัมต่อ 600 มิลลิลิตร) อัตราการเติม 1 มิลลิลิตรต่อนาทีตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 - 22 ของการผลิต
(⇩ หมายถึงการเติมน้ำตาลซูโครส) (ปริมาตรน้ำหมักเดิม 1 ลิตรเป็น 1.6 ลิตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



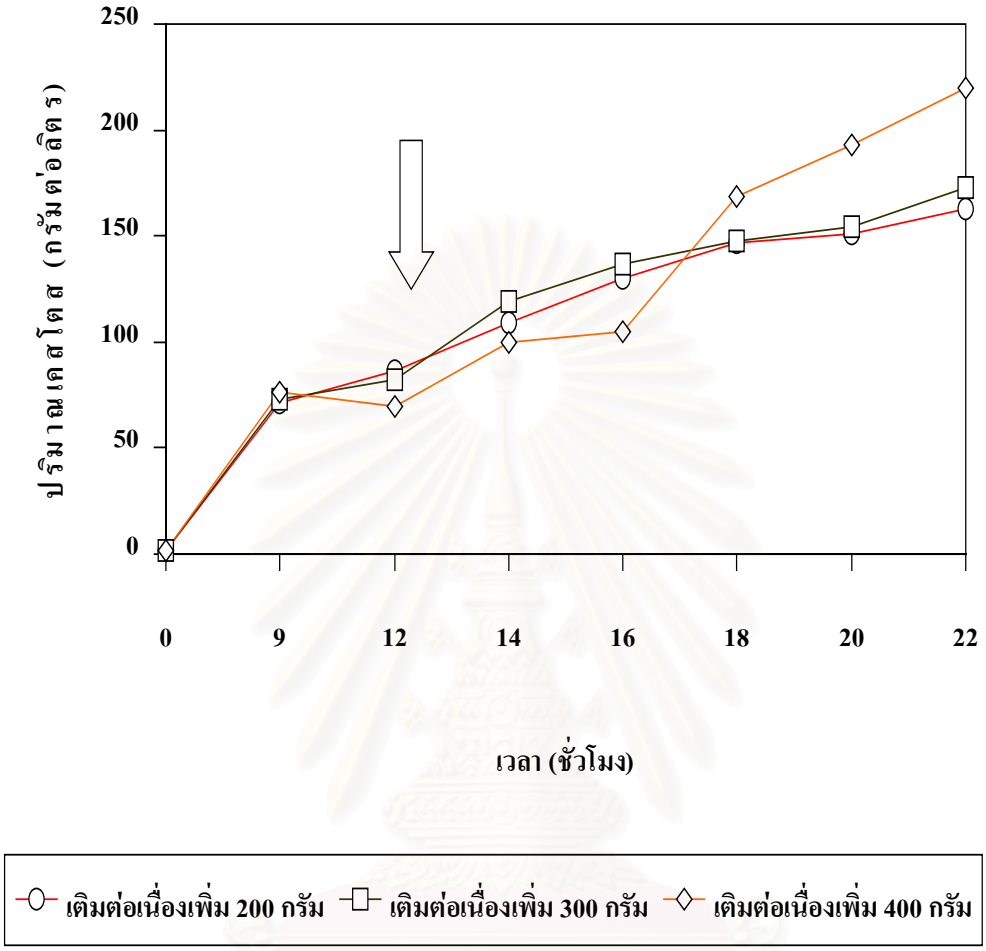
รูปที่ 45 แสดงปริมาณน้ำตาลกลูโคส เมื่อมีการเติมซูโครสต่อเนื่อง 200, 300 และ 400 กรัมต่อ 600 มิลลิลิตร อัตราการเติม 1 มิลลิลิตรต่อนาทีตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 – 22 ของการผลิต (⇩ หมายถึงการเติมน้ำตาลซูโครส) (ปริมาตรน้ำหมักเดิม 1 ลิตรเป็น 1.6 ลิตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



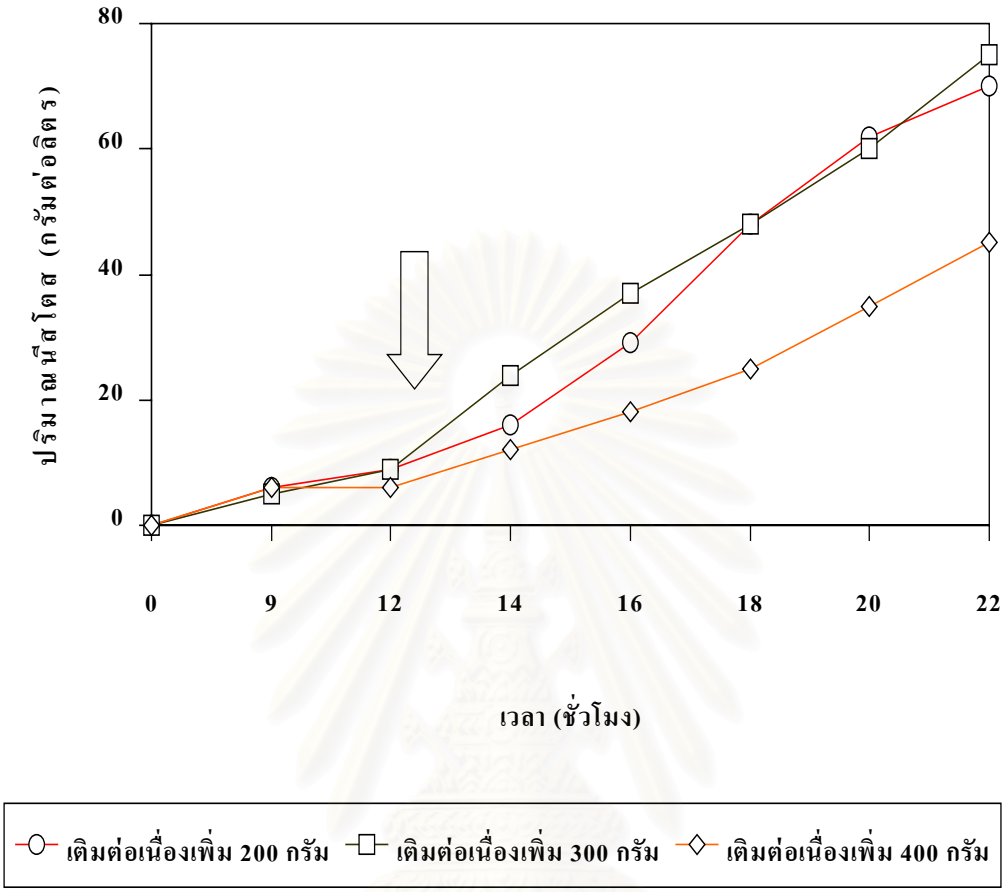
รูปที่ 46 แสดงปริมาณน้ำตาลซูโครส เมื่อมีการเติมซูโครสต่อเนื่อง 200, 300 และ 400 กรัมต่อ 600 มิลลิลิตร อัตราการเติม 1 มิลลิลิตรต่อนาทีตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 – 22 ของการผลิต (⇩ หมายถึงการเติมน้ำตาลซูโครส) (ปริมาตรน้ำหมักเดิม 1 ลิตรเป็น 1.6 ลิตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



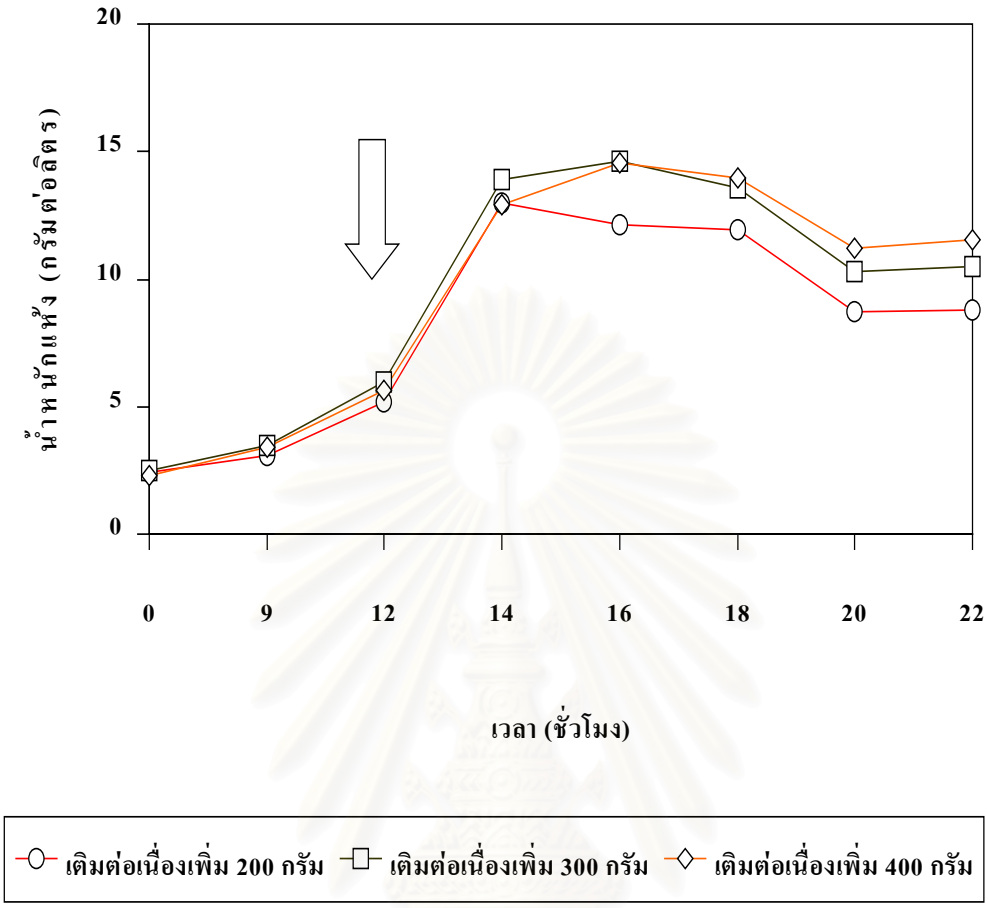
รูปที่ 47 แสดงปริมาณเคสโตส เมื่อมีการเติมซูโครสต่อเนื่อง 200, 300 และ 400 กรัมต่อ 600 มิลลิลิตร อัตราการเติม 1 มิลลิลิตรต่อนาทีตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 - 22 ของการผลิต (⇩ หมายถึงการเติมน้ำตาลซูโครส) (ปริมาตรน้ำหมักเดิม 1 ลิตรเป็น 1.6 ลิตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 48 แสดงปริมาณน้ำตาลนีสโตส เมื่อมีการเติมซูโครสต่อเนื่อง 200, 300 และ 400 กรัมต่อ 600 มิลลิลิตร อัตราการเติม 1 มิลลิลิตรต่อนาทีตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 - 22 ของการผลิต (⇩ หมายถึงการเติมน้ำตาลซูโครส) (ปริมาตรน้ำหมักเดิม 1 ลิตรเป็น 1.6 ลิตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 49 แสดงน้ำหนักสายใยแห้ง เมื่อมีการเติมซูโครสต่อเนื่อง 200, 300 และ 400 กรัมต่อ 600 มิลลิลิตร อัตราการเติม 1 มิลลิลิตรต่อนาทีตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 - 22 ของการผลิต (⇩ หมายถึงการเติมน้ำตาลซูโครส) (ปริมาตรน้ำหมักเดิม 1 ลิตรเป็น 1.6 ลิตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบการผลิต FOS เมื่อมีการเติมน้ำตาลซูโครสแบบต่อเนื่อง

เปรียบเทียบ	เติม 200 กรัม	เติม 300 กรัม	เติม 400 กรัม
ชม. ที่ได้เคสโตสสูงสุด	22	22	22
ชม. ที่ได้นีสโตสสูงสุด	22	22	22
ชม.ที่ได้ FOS สูงสุด	22	22	22
อัตราการผลิตเคสโตส (ก/ล/ชม.)*	7.4	7.86	10
อัตราการผลิตนีสโตส (ก/ล/ชม.)*	3.18	3.4	2.04
อัตราการผลิต FOS (ก/ล/ชม.)*	10.59	11.27	12.04
เคสโตสสูงสุด (ก/ล)*	163	173	220
นีสโตสสูงสุด (ก/ล)*	70	75	45
FOS รวมสูงสุด (ก/ล)*	233	248	265

หมายเหตุ * คิดจากชั่วโมงที่ได้ผลผลิตสูงสุด

จากการทดลองเติมซูโครสอย่างต่อเนื่องพบว่า อัตราการผลิต FOS เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ใช้ เมื่อเติมซูโครสที่ความเข้มข้น 400 กรัมต่อ 600 มิลลิลิตร ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที จะทำให้มีซูโครสคงเหลือในถังหมักมากกว่าอัตราการเปลี่ยนซูโครสเป็น FOS(รูปที่ 46) และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณเคสโตสที่ได้พบว่า ได้ปริมาณเคสโตสสูงสุด และมีปริมาณนีสโตสต่ำกว่า ทั้งนี้เนื่องจากมีซูโครสมากจึงเกิดการเปลี่ยนซูโครสไปเป็นเคสโตสได้มาก ขณะที่การเติมซูโครสที่ความเข้มข้น 200 และ 300 กรัมต่อ 600 มิลลิลิตรที่อัตราเร็วเดียวกันให้ผลการผลิตเคสโตสและนีสโตสใกล้เคียงกัน (รูปที่ 47 และ 48) เมื่อเติมน้ำตาลซูโครสอย่างต่อเนื่อง 200, 400 และ 600 กรัมต่อ 600 มิลลิลิตรจะผลิตเคสโตสได้ 51.77, 45 และ 40.77 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ใช้ตามลำดับ แม้ว่าปริมาณเคสโตสสูงสุดจะสูงขึ้นตามปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เติม คือ ได้เคสโตสสูงสุดเท่ากับ 163, 173 และ 220 กรัมต่อลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 10) แสดงว่าอัตราการผลิตมีความคุ้มทุนลดลง แม้ว่าแนวโน้มการผลิตจะสูงขึ้น เมื่อพิจารณาจากการผลิตนีสโตส พบว่าการผลิตแบบเติมน้ำตาลซูโครสแบบต่อเนื่อง 200 และ 300 กรัมให้ปริมาณนีสโตสสูงสุดเท่ากับ 70 และ 75 กรัมต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกัน ขณะที่การผลิตแบบเติมน้ำตาลซูโครสแบบต่อเนื่องได้นีสโตสสูงสุด 45 กรัม แสดงว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สูงเกินพอมีผลต่ออัตราการผลิตนีสโตส อาจเกิดจากเมื่อเติมน้ำตาลซูโครสมีความเข้มข้นสูงเกินพออย่างต่อเนื่อง เซลล์จะสร้างเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนน้ำตางซูโครสเป็นเคสโตสได้สูง ทำให้แนวโน้มการผลิตเป็นไปทางการผลิตเคสโตสมากกว่านีสโตส ขณะที่เมื่อพิจารณาปริมาณ

FOS รวมสูงสุด พบว่าการผลิต FOS รวมสูงสุดเพิ่มขึ้นตามปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นในการเติมแบบต่อเนื่อง (ตารางที่ 10) จากการทดลองสังเกตได้ว่าอัตราการผลิต FOS ในการเติมน้ำตาลซูโครสแบบต่อเนื่องให้แนวโน้มการผลิตสูงขึ้นเรื่อย ๆ อย่างต่อเนื่องและมีสัดส่วนการเพิ่มขึ้นของเคสโตส นีสโตสและน้ำตาลกลูโคสเป็นไปในแนวทางเดียวกัน นั่นคือเคสโตสสูงกว่าน้ำตาลกลูโคสและสูงกว่านีสโตสตามลำดับ (รูปที่ 42 – 44)

เมื่อพิจารณาการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลกลูโคส (รูปที่ 45) พบว่าการผลิตแบบเติมน้ำตาลซูโครสต่อเนื่องมีการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลกลูโคสใกล้เคียงกัน แม้ว่าการเติมน้ำตาลซูโครสต่อเนื่อง 200 และ 300 กรัมให้ผลผลิตเคสโตสและนีสโตสใกล้เคียงกัน ขณะที่การเติมน้ำตาลซูโครสต่อเนื่อง 400 กรัมให้การผลิตเคสโตสสูงกว่า แต่นีสโตสต่ำกว่า (รูปที่ 47 และ 48) และมีน้ำตาลซูโครสมากเกินพอ คาดว่าปริมาณเอนไซม์ที่เซลล์สร้างขึ้นมาอยู่ในระดับหนึ่ง แม้ว่ามีน้ำตาลซูโครสเพิ่มขึ้นอีกก็ไม่ได้ทำให้การผลิตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตามปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นมากนัก จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มขึ้นมีปริมาณใกล้เคียงกัน แม้ว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสในระบบจะแตกต่างกัน เช่นเดียวกับการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักแห้งของการผลิตแบบเติมน้ำตาลซูโครสแบบต่อเนื่อง ก็มีความใกล้เคียงกัน (รูปที่ 49) ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นมากเกินพอ (จากการเติมต่อเนื่อง 400 กรัม) ไม่มีผลเพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ให้มากขึ้น

จากตารางที่ 11 พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสมากขึ้น (450, 550, 650 กรัม) สามารถทำให้มีการผลิต FOS ได้มากขึ้นตามลำดับ เท่ากับ 373, 397 และ 424 กรัมตามลำดับ เมื่อพิจารณาเป็นอัตราส่วนระหว่างน้ำตาลซูโครสที่ใช้ทั้งหมดต่อ FOS ที่ผลิตได้ เท่ากับ 1.2, 1.3 และ 1.5 ตามลำดับ แสดงว่าการเพิ่มน้ำตาลซูโครสแบบต่อเนื่องมากขึ้นมีความคุ้มทุนลดลง (สังเกตจากเพิ่มต่อเนื่อง 400 กรัมทำให้มีน้ำตาลซูโครสมากเกินพอ) แสดงว่าปฏิกิริยาการผลิต FOS มีสูงสุดได้ระดับหนึ่งแม้ว่าจะมีน้ำตาลซูโครสมากเกินพอก็ไม่ส่งผลให้มีการผลิต FOS มากเกินพอด้วย

เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตโดยเติมน้ำตาลซูโครสแบบครั้งเดียว (รูปที่ 36) กับเติมแบบต่อเนื่อง โดยการเติมแบบครั้งเดียวควรเติมในช่วงแรกของการผลิต เช่นเดียวกับการเติมแบบต่อเนื่องโดยการเติมน้ำตาลซูโครสทั้งสองแบบควรจะสามารถรักษาระดับของน้ำตาลซูโครสในระบบให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสามต่อการผลิต FOS และจากการทดลองผลิตโดยเพิ่มน้ำตาลซูโครสในระหว่างการผลิตทั้งแบบเติมครั้งเดียว และเติมแบบต่อเนื่อง พบว่าการผลิตเคสโตสจะมีสูงในช่วงแรกของการผลิต (ชั่วโมงที่ 9 – 12) เท่านั้น และจะเริ่มคงที่ (ยกเว้นกรณีผลิตแบบเติมน้ำตาลซูโครสต่อเนื่อง ซึ่งทำให้เคสโตสผลิตสูงต่อเนื่องได้) จึงคาดว่าเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเคสโตสน่าจะสร้างในช่วงแรกที่เซลล์มีการเจริญเติบโต และในระบบมีน้ำตาลซูโครสสูง (เนื่องจากน้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้นของการสร้างเคสโตส) ในการทดลองต่อไปจึงเป็นการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเคสโตส

ตารางที่ 11 แสดงปริมาณน้ำตาลซูโครสและ FOS ในระบบ ในการผลิตแบบเติมน้ำตาลซูโครสต่อเนื่อง

การผลิต	ปริมาณซูโครสก่อนเติม ณ ชม.ที่ 12 (กรัม)	ปริมาณซูโครสหลังเติม ณ ชม.ที่ 22 (กรัม)	ผลต่างปริมาณซูโครสก่อนและหลัง (กรัม)	ปริมาณซูโครสทั้งหมดที่ใช้ในการผลิต (กรัม)	ปริมาตรน้ำหมักหลังเติม (ลิตร)	ปริมาณ FOS สูงสุด (กรัม) ณ ชม. ที่ผลิตได้สูงสุด
เพิ่ม 200 กรัม	106	115	9	450	1.6	373
เพิ่ม 300 กรัม	103	128	25	550	1.6	397
เพิ่ม 400 กรัม	95	371	276	650	1.6	424

5. ศึกษากิจกรรมเบื้องต้นของฟรักโตซิลทรานเฟอเรส

จากการทดลองผลิต FOS จึงได้ทำการศึกษากิจกรรมของฟรักโตซิลทรานเฟอเรสในแต่ละช่วงเวลาของการผลิตทั้งในระดับขวดเขย่าถังหมัก โดยวิธีการทดลองข้อ 12 โดยเพาะเลี้ยง *Penicillium sp.*H12 ในถังหมักและขวดเขย่าขนาด 500 มิลลิลิตร ในสภาวะการผลิต FOS ใช้สปอร์ที่มีความเข้มข้น $4x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพื่อให้มีการผลิตเคสโตสเป็นหลัก เก็บน้ำหมักและเซลล์เพื่อหากิจกรรมของเอนไซม์ โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์เท่ากับ ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนซูโครส 1 กรัมไปเป็นเคสโตส 1 กรัมได้ในเวลา 2 ชั่วโมง โดยปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกสายใยออกจากน้ำหมักที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ล้างสายใยด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง บดสายใยให้ละเอียดในสารละลายซิเตรท ฟอสเฟต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 ปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายส่วนใส และน้ำหมักอย่างละ 1 มิลลิลิตรเพื่อไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โดยเติมลงในสารละลายซิเตรท ฟอสเฟต บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 (Chen, 1995) ที่มีส่วนผสมของน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลฟรักโตสเข้มข้นชนิดละ 50 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มในอ่างน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เขย่าเป็นครั้งคราว เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาที่ 0 และ 2 ชั่วโมงโดยต้มในน้ำเดือด นำไปวิเคราะห์ผลต่างของปริมาณเคสโตสที่สูงขึ้นที่เวลา 0 และ 2 ชั่วโมง จากการทดลองได้ผลหน่วยของเอนไซม์ต่อมล. (Unit/ml) ดังตารางที่ 12 โดยคำนวณจาก

หน่วย/มล. = ปริมาณเคสโตสที่ 2 ชม. – ปริมาณเคสโตสที่ 0 ชม. (ในการบ่ม) X ค่าความเจือจาง

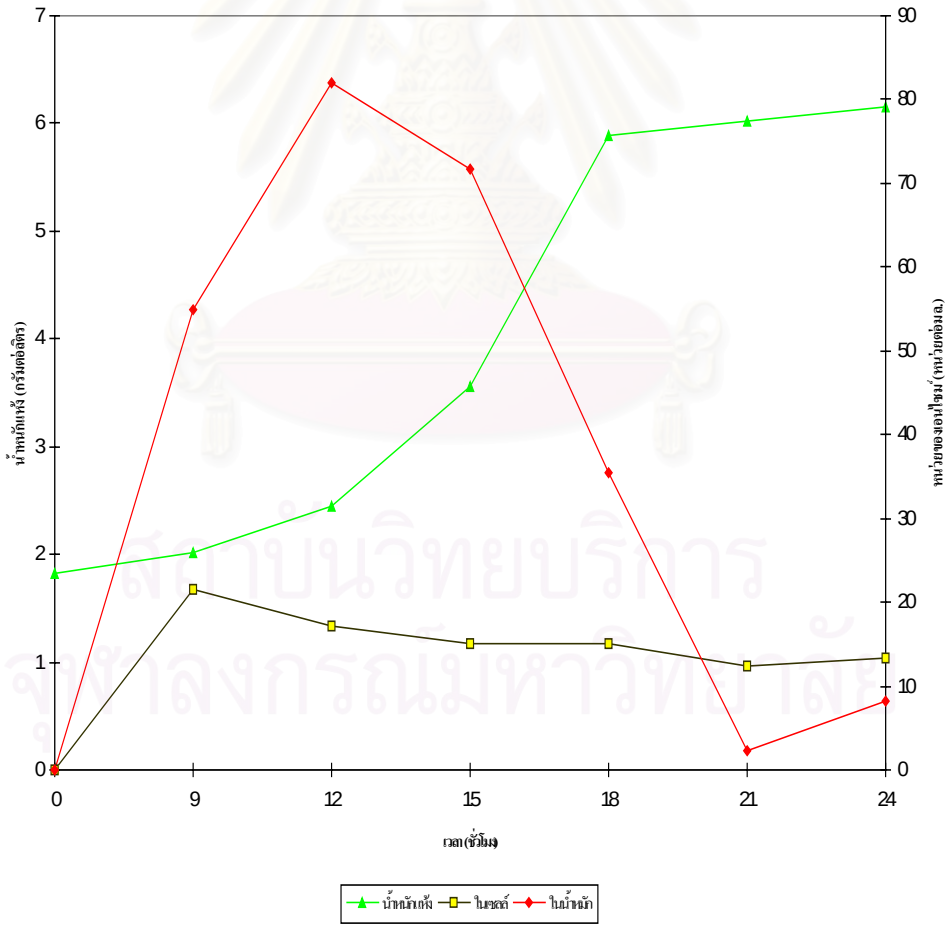
ตารางที่ 12 แสดงกิจกรรมของฟรักโตซิลทรานเฟอเรสเปรียบเทียบระหว่างการผลิตในขวดเขย่าและถังหมัก

เวลา (ชั่วโมง)	ระดับขวดเขย่า (unit/ml)		ถังหมัก (unit/ml)	
	ในเซลล์	ในน้ำหมัก	ในเซลล์	ในน้ำหมัก
0	0	0	0	0
9	21.5	54.9	61.08	106.58
12	17.2	81.94	20.32	125.96
15	15.02	71.6	14.34	107.22
18	15.08	35.46	17.66	57.62
21	12.3	2.38	7.46	24.24
24	13.42	8.14	5.24	2

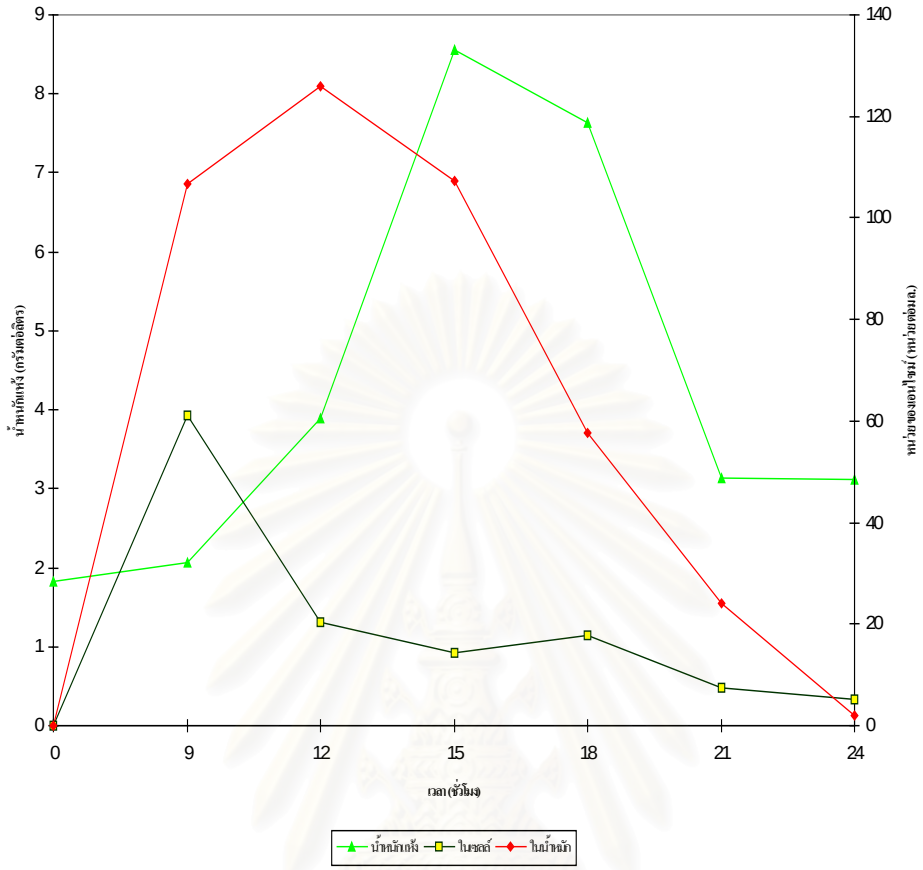
จากตารางที่ 12 เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกิจกรรมของฟรักโตซิลทรานเฟอเรสในการผลิตแบบขวดเขย่าและในถังหมัก พบว่าฟรักโตซิลทรานเฟอเรสมีกิจกรรมจะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 ของการผลิต ทั้งการผลิตแบบขวดเขย่าและแบบถังหมัก เนื่องจากมีปริมาณน้ำตาลซูโครสสูง ซึ่งน้ำตาลซูโครสน่าจะเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการสร้างฟรักโตซิลทรานเฟอเรสออกมาในปริมาณมาก และกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงชัดเจนเมื่อผ่านชั่วโมงที่ 15 ของการผลิตเป็นต้นไป (รูปที่ 52 และ 53) อาจเกิดจากน้ำตาลซูโครสมีปริมาณลดลงมาก ทำให้เซลล์สร้างฟรักโตซิลทรานเฟอเรสลดลงไปด้วย จากการศึกษาพบว่าฟรักโตซิลทรานเฟอเรสที่ผลิตโดย *Penicillium* sp. H12 เป็นเอนไซม์ที่ขับออกนอกเซลล์ เนื่องจากในน้ำหมักมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าในเซลล์อย่างเห็นได้ชัด เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์กับปริมาณน้ำหนักแห้งของเซลล์ (รูปที่ 50 และ 51) ทั้งในการผลิตแบบขวดเขย่าและถังหมัก พบว่าในช่วงแรกของการเจริญเติบโต แม้ว่าสปอร์จะเริ่มงอกแต่ก็สามารถสร้างฟรักโตซิลทรานเฟอเรสออกมาได้ในปริมาณมาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ วรรณา ศรีสัจจารักษ์ (2543) ที่พบว่าเคสโตสสามารถถูกสร้างได้ตั้งแต่สปอร์เริ่มงอก และจากการทดลองสังเกตว่า แม้ว่าในช่วงระยะเวลา 12 – 18 ชั่วโมงของการผลิต เซลล์จะมีการเจริญเติบโตสูงขึ้น แต่ฟรักโตซิลทรานเฟอเรสกลับลดลง แสดงว่าฟรักโตซิลทรานเฟอเรสไม่ได้เพิ่มขึ้นตามการเจริญเติบโตของเซลล์ ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ภายในเซลล์สอดคล้องกับเอนไซม์ที่ขับออกนอกเซลล์ โดยที่เซลล์จะสร้างเอนไซม์จากในเซลล์ก่อนและใช้ระยะเวลาหนึ่งจึงขับเอนไซม์ออกสู่ภายนอก เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ในการผลิตในถังหมัก พบว่ามีความใกล้เคียงกันกับการผลิตในขวดเขย่า แสดงว่าการผลิตฟรักโตซิลทรานเฟอเรสในการผลิตระดับขวดเขย่าและในถังหมักมีแนวโน้มในทิศทางเดียวกัน เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์กับการผลิตเคสโตสและปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ลดลงในการผลิตในระดับขวดเขย่า

และในถังหมัก พบว่าเซลล์มีการผลิตเอนไซม์ออกมามากในช่วงแรก ระหว่าง 12 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ลดลง แสดงว่าเมื่อน้ำตาลซูโครสมีปริมาณลดลงจะทำให้เซลล์ผลิตฟรักโตซิลทรานเฟอเรสได้ลดลงด้วย และแม้ว่าฟรักโตซิลทรานเฟอเรสจะลดลงในช่วงท้ายของการเพาะเลี้ยงแต่ยังคงมีการผลิตเคสโตส และมีการใช้น้ำตาลซูโครสไป ซึ่งเกิดจากในระบบยังคงมีน้ำตาลซูโครสอยู่ จึงทำให้ยังคงมีการผลิตเคสโตสอยู่ แม้ว่าจะผลิตได้น้อยลง รวมทั้งในระบบยังคงมีฟรักโตซิลทรานเฟอเรสเหลืออยู่

เมื่อวิเคราะห์เป็นกิจกรรมของฟรักโตซิลทรานเฟอเรสในน้ำหมักต่อน้ำหนักสายใยแห้งจะได้ผลการทดลองดังตารางที่ 13 พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่า และชั่วโมงที่ 9 ของการเพาะเลี้ยงในถังหมัก เนื่องจากการเพาะเลี้ยงในถังหมักมีการควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายและค่าความเป็นกรดด่าง จึงอาจทำให้มีการสร้างฟรักโตซิลทรานเฟอเรสได้สูงและรวดเร็วกว่าในการเพาะเลี้ยงระดับขวดเขย่า

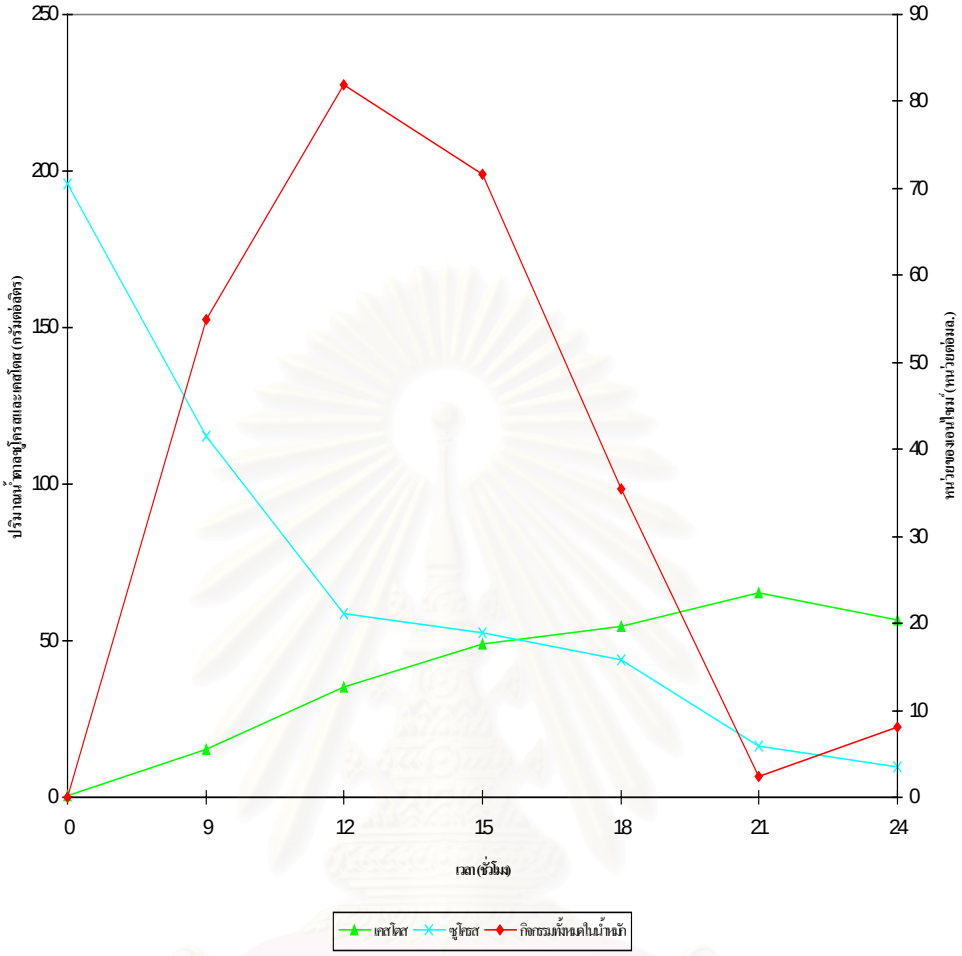


รูปที่ 50 กิจกรรมของทั้งหมดของฟรักโตซิลทรานเฟอเรสและน้ำหนักแห้งในการผลิตระดับขวดเขย่า



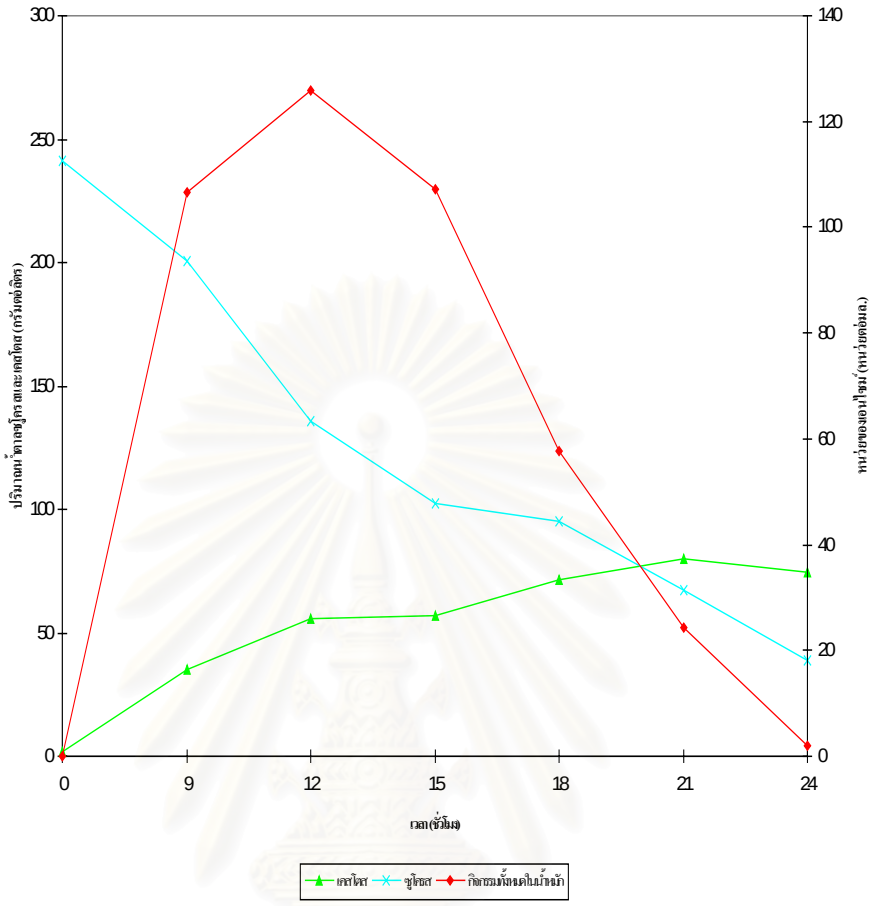
รูปที่ 51 กิจกรรมของฟรักโตซิลทรานเฟอเรสและน้ำหนักแห้งในการผลิตระดับถังหมัก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 52 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมทั้งหมดของฟรักโตซิลทรานเฟอเรสในน้ำหมักกับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสและเคสโตสในการผลิตระดับขวดเขย่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 53 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมทั้งหมดของฟรักโตซิลทรานเฟอเรสในน้ำหมักกับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสและเคสโตสในการผลิตในถังหมัก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 แสดงกิจกรรมของฟรักโตซิลทรานเฟอเรสต่อน้ำหนักสายใยแห้ง และปริมาณโปรตีนในน้ำหมัก

เวลา (ชั่วโมง)	ระดับขวดเขย่า		ถังหมัก	
	โปรตีนในน้ำหมัก (มก./มล.)	(หน่วย/มล.)/ น้ำหนักแห้ง (ก/ล)	โปรตีนในน้ำหมัก (มก./มล.)	(หน่วย/มล.)/ น้ำหนักแห้ง (ก/ล)
0	5.6	0	5.2	0
9	6.8	1.66	7.4	51.48
12	7.2	33.44	8.2	32.38
15	7.5	20.11	9.5	12.52
18	7.7	6.02	10.2	7.55
21	9.9	0.39	11.1	7.74
24	10	1.32	11.2	0.64

จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า ฟรักโตซิลทรานเฟอเรสที่ผลิตโดย *Penicillium* sp. H12 เป็นเอนไซม์ที่สร้างและขับออกนอกเซลล์ ซึ่งเอนไซม์จะมีกิจกรรมสูงในช่วงแรกของการผลิต ระหว่างชั่วโมงที่ 9 – 15 ซึ่งเป็นช่วงที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสูงและเป็นช่วงที่มีแนวโน้มของการผลิต เคสโตสสูงด้วย จึงเป็นไปได้ว่าน้ำตาลซูโครสจะเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เซลล์มีการสร้างฟรักโตซิลทรานเฟอเรส และเมื่อน้ำตาลซูโครสลดลงทำให้สังเกตได้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงด้วย แต่เนื่องจากในระบบยังคงมีน้ำตางซูโครสอยู่จึงยังคงมีการผลิตเคสโตสต่อไปอีก เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ในการเพาะเลี้ยงในระดับขวดเขย่าและถังหมัก พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์มีแนวโน้มใกล้เคียงกัน คือ มีกิจกรรมสูงในช่วงแรกของการผลิต และจะลดลงในช่วงหลังของการผลิต แต่ในการผลิตในถังหมักจะพบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมสูงกว่าในการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่า ซึ่งเกิดจากการเพาะเลี้ยงในถังหมักมีการควบคุมสภาวะในการผลิตอย่างเหมาะสมกว่า แต่ข้อแตกต่างของการผลิตทั้งสองแบบ คือ ในการผลิตแบบขวดเขย่าจะไม่ทำให้เซลล์แตก เนื่องจากไม่มีการกวนอย่างรุนแรง (เพื่อควบคุมค่าออกซิเจนละลายให้คงที่เท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่การผลิตในถังหมักจะมีการกวนอย่างรุนแรงเพื่อควบคุมปริมาณออกซิเจนละลาย ทำให้ในช่วงหลังของการผลิตสายใยบางส่วนเกิดการฉีกขาดได้ แต่จากการเปรียบเทียบการผลิตในสองแบบ จึงอาจกล่าวได้การสร้างฟรักโตซิลทรานเฟอเรสน่าจะเกี่ยวข้องกับปริมาณน้ำตาลซูโครสในระบบ เนื่องจากในการเพาะเลี้ยงในขวดเขย่าไม่ได้ทำให้เซลล์แตกหรือฉีกขาด แต่พบว่าฟรักโตซิลทรานเฟอเรสลดลงเช่นกัน จากการพิจารณาในน้ำหมักพบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานานขึ้นจะมีปริมาณโปรตีนสูงขึ้น และมีฟรักโตซิลทรานเฟอเรสสูงที่สุด ณ ชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งจากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าฟรักโตซิลทรานเฟอเรสมีกิจกรรมสูงในช่วงแรกของการผลิตและการสร้างเอนไซม์จากเซลล์น่าจะขึ้นอยู่กับปริมาณของน้ำตาลซูโครสในระบบด้วย

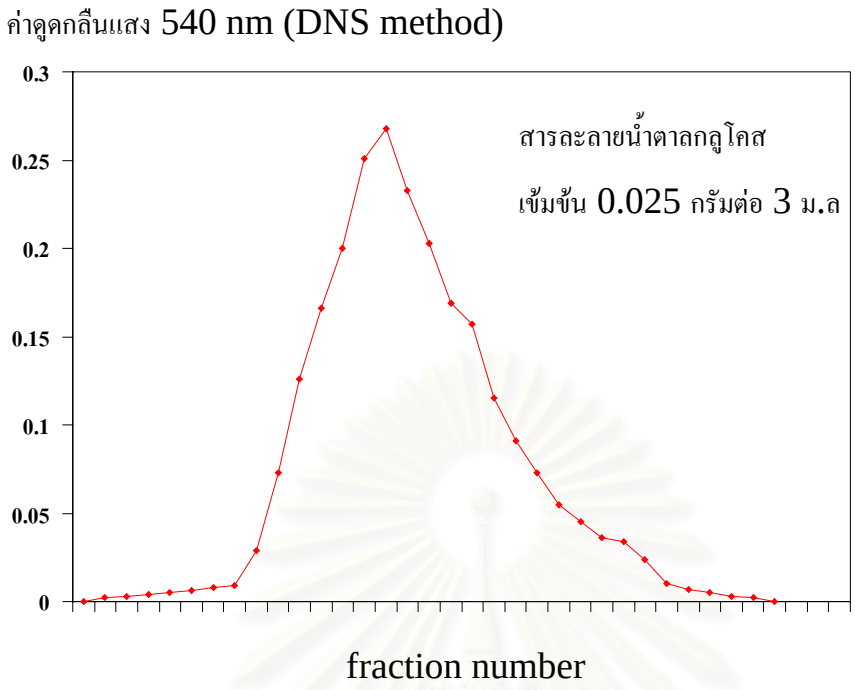
6. ศึกษาการเก็บเกี่ยวฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

เนื่องจากฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้ละลายอยู่ในน้ำหมัก และปะปนอยู่กันน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาวิธีการแยกฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ออกจากน้ำหมักและน้ำตาลชนิดต่าง ๆ โดยใช้ผงถ่านกัมมันต์ เป็นตัวดูดซับ ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวชะน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรักโตสและใช้สารละลายเอทิลแอลกอฮอลล์ความเข้มข้น 5 และ 15 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวชะน้ำตาลซูโครสและฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ตามลำดับ ด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายหลอดละ 5 มิลลิลิตร

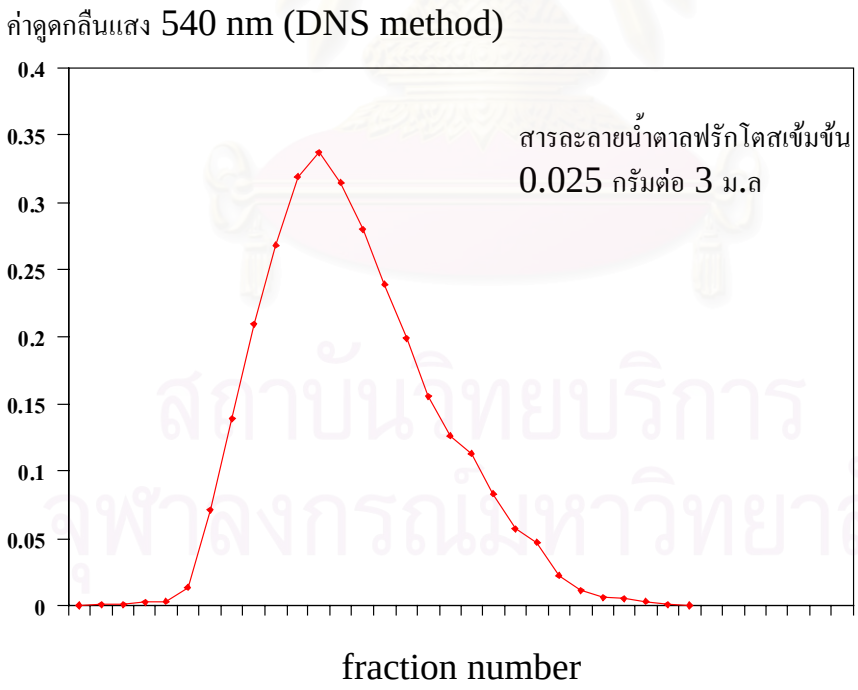
6.1 ศึกษาการดูดซับน้ำตาลชนิดต่าง ๆ

จากผลการทดลองโดยใช้น้ำตาลแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น ต่าง ๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรักโตส และน้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นชนิดละ 0.025 กรัมต่อ 3 มิลลิลิตร และเคสโตสและนีสโตสที่มีความเข้มข้นชนิดละ 0.01 กรัมต่อ 3 มิลลิลิตรและสารละลายน้ำตาลผสม ซึ่งชะออกโดยใช้ตัวทำละลายดังกล่าวข้างต้นได้ผลการชะเมื่อวิเคราะห์ค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรโดยวิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี DNSA colourimetric method ได้ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 54 - 60 ซึ่งพบว่า แนวโน้มการชะจะสูงขึ้นในช่วงกลางของการชะ คล้ายคลึงกับการแยกสารโดยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) แต่กราฟยังไม่มีแนวโน้มสม่ำเสมอ เนื่องมาจากน้ำตาลเมื่อถูกชะหลุดออกจากการจับของผงถ่านกัมมันต์ ในระหว่างการชะในคอลัมน์สามารถจับกับกับผงถ่านกัมมันต์ได้อีก จึงทำให้เส้นกราฟที่ได้ไม่เรียบ เนื่องจากผงถ่านกัมมันต์สามารถจับกับน้ำตาลได้โดยหลักการดูดซับ (Adsorption) โดยใช้แรงดึงดูดโดยแรงแวนเดอวาลล์ ซึ่งการดูดซับจะมีประสิทธิภาพสูงขึ้นเมื่อสารที่ถูกดูดซับมีโมเลกุลขนาดใหญ่ขึ้น (จิราวรรณ โตธนาคม, 2536)

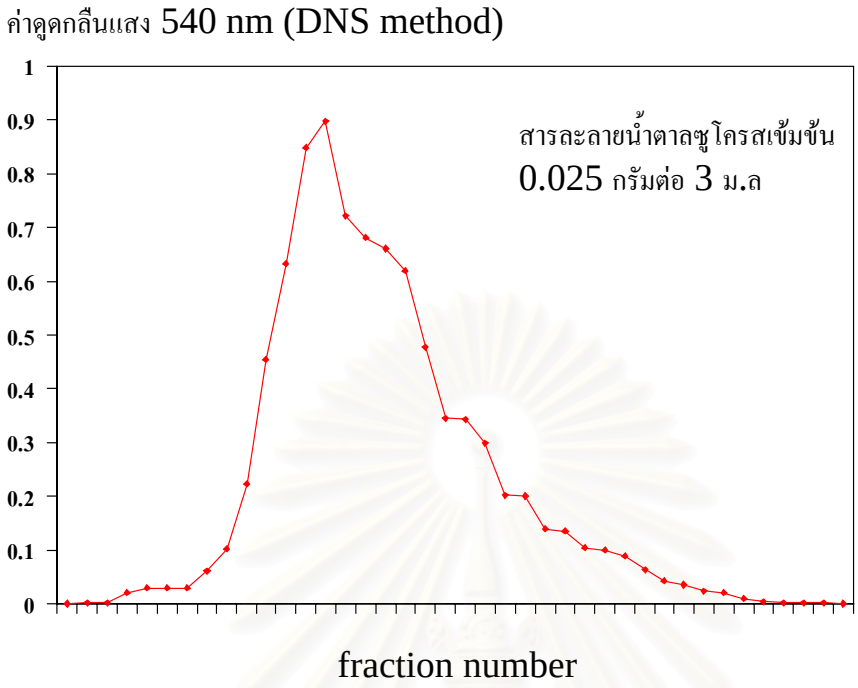
เมื่อพิจารณาจากกราฟการชะน้ำตาลผสมชนิดต่าง ๆ พบว่า น้ำตาลซูโครสมีแนวโน้มการชะออกได้ยากกว่าน้ำตาลชนิดอื่น เนื่องมาจากเมื่อสังเกตกราฟการชะของน้ำตาลซูโครสจะมีความกว้างใต้กราฟมากกว่าและกราฟไม่เรียบ ซึ่งน่าจะเกิดจากน้ำตาลซูโครสมีความหนืดสูงและในน้ำหมักมีสารชนิดอื่นปนเปื้อนอยู่ด้วย เช่น สารสกัดจากยีสต์ และเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ในน้ำหมัก ซึ่งอาจไปรบกวนการชะได้ จากสารละลายที่ชะออกมาจากคอลัมน์ได้นำไปวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่ออกมากับการชะโดยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เปรียบเทียบกับสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลซูโครส, FOS ชนิดเคสโตส และนีสโตส ได้ผลการทดลองวิเคราะห์ดังรูปที่ 61



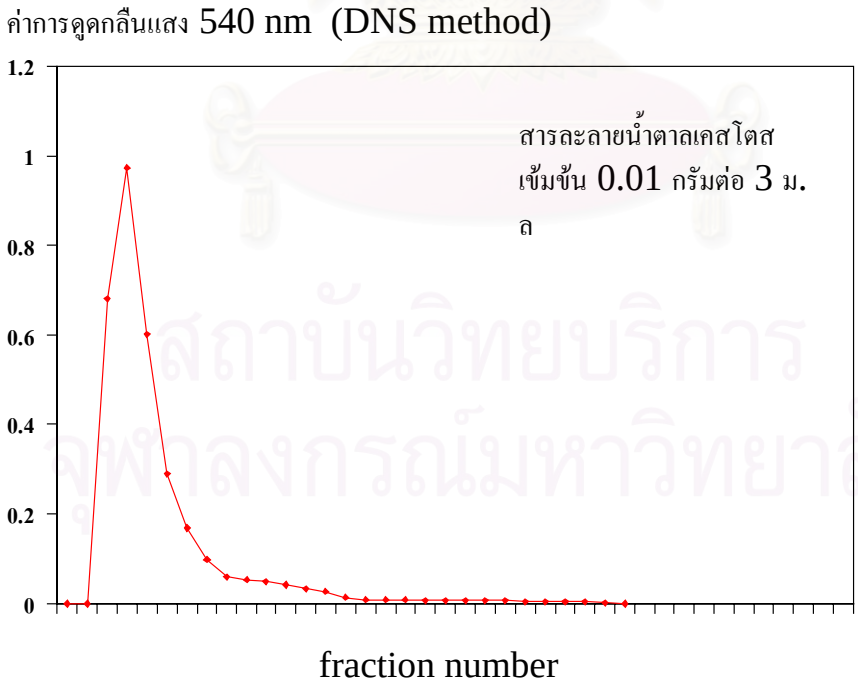
รูปที่ 54 แสดงการชะน้ำตาลกลูโคสออกจากคอลัมน์โดยน้ำปลอดประจุ (น้ำกลั่น)



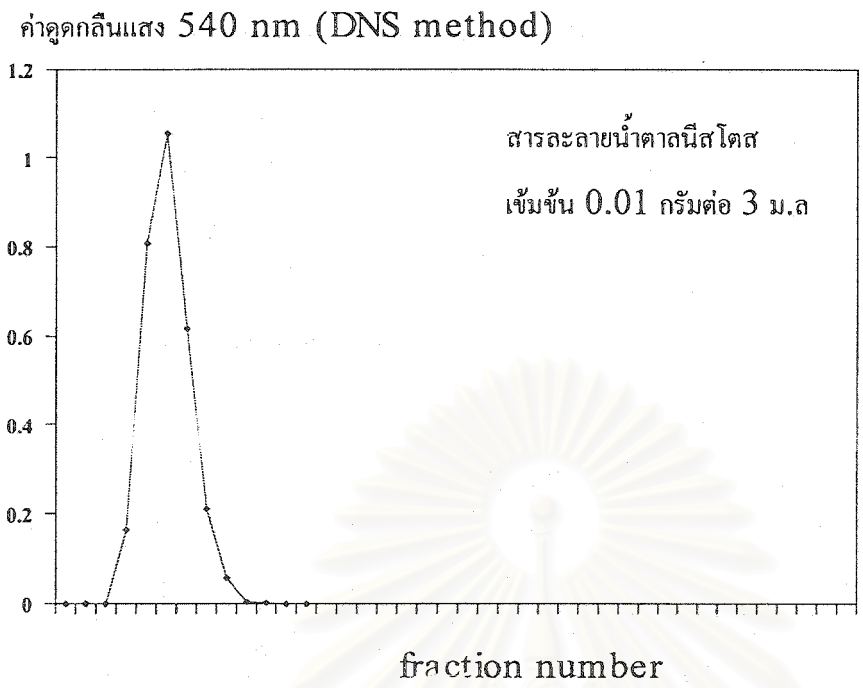
รูปที่ 55 แสดงการชะน้ำตาลฟรักโตสออกจากคอลัมน์โดยน้ำปลอดประจุ (น้ำกลั่น)



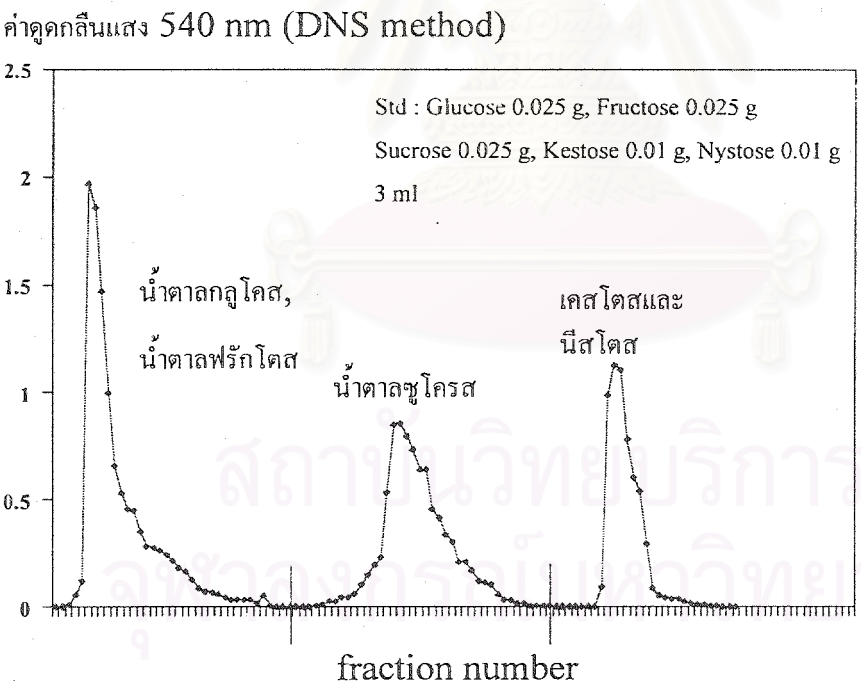
รูปที่ 56 แสดงการชะน้ำตาลซูโครสออกจากคอลัมน์โดยเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์



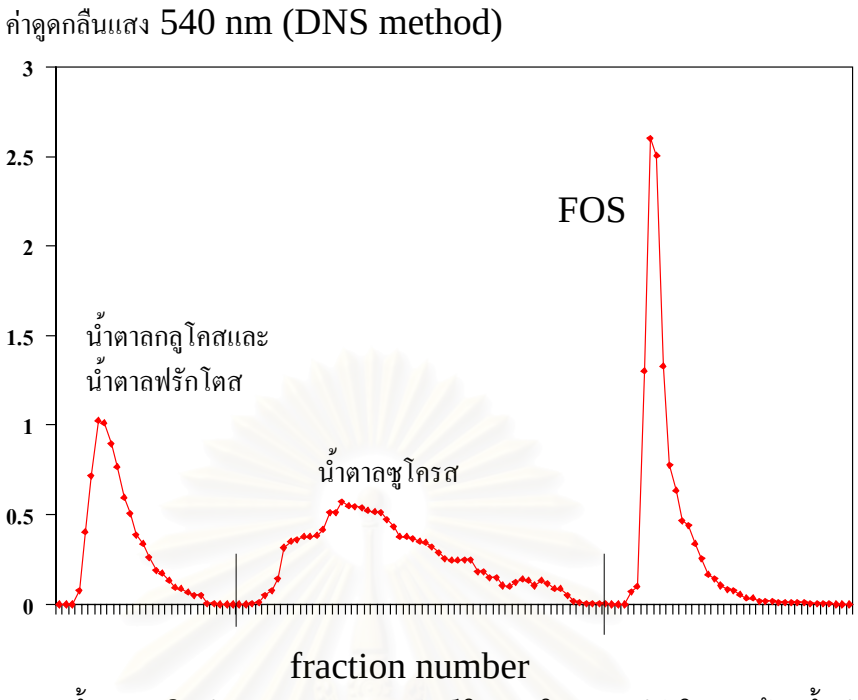
รูปที่ 57 แสดงการชะเคสโตสออกจากคอลัมน์โดยเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 58 แสดงการชะนีสโตสออกจากคอลัมน์โดยเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์

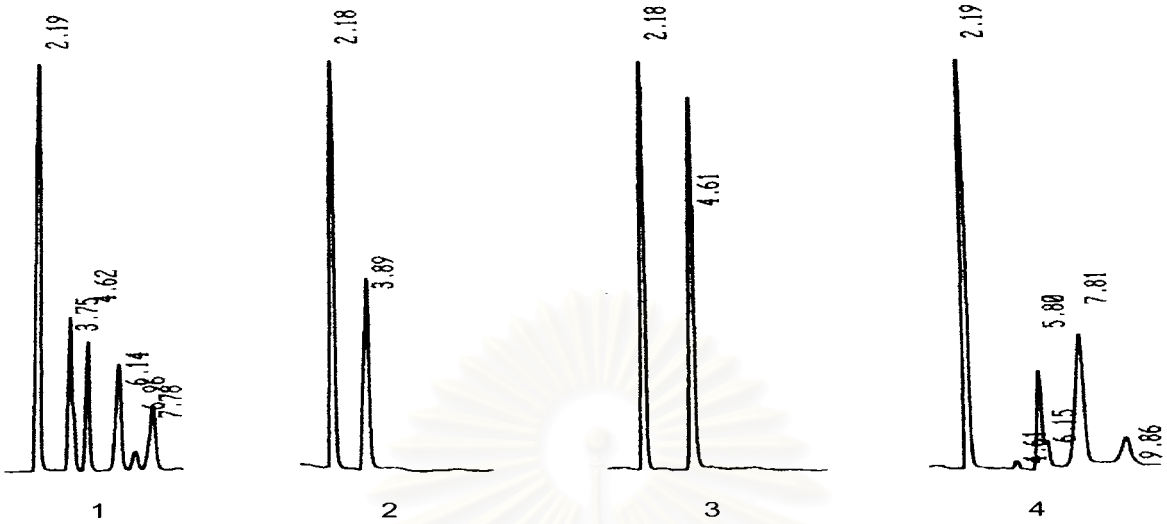


รูปที่ 59 แสดงการชะน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ออกจากคอลัมน์ โดยกลูโคสและฟรักโตสชะด้วยน้ำปลอด ประจุซูโครสชะด้วยเอทิลแอลกอฮอลล์ 5 เปอร์เซ็นต์ เคสโตสและนีสโตสชะด้วยเอทิลแอลกอฮอลล์ 15 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 60 แสดงการชะน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ออกจากคอลัมน์ โดยกลูโคสและฟรักโตสชะด้วยน้ำปลอด ประจุซูโครสชะด้วยเอทิลแอลกอฮอลล์ 5 เปอร์เซ็นต์ เคสโตสและนีสโตสชะด้วยเอทิลแอลกอฮอลล์ 15 เปอร์เซ็นต์ ใช้ตัวอย่างน้ำหมักจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 61 แสดงผลการวิเคราะห์ HPLC ของสารละลายที่ผ่านการชะด้วยตัวทำละลายชนิดต่าง ๆ ออกจากคอลัมน์ผงถ่านกัมมันต์ที่อัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที (นำสารละลายจากทุกหลอดตัวอย่างรวมกันและระเหยให้มีปริมาตรประมาณ 200 – 1000 ไมโครลิตร)

1 คือ สารละลายมาตรฐานน้ำตาลประกอบด้วย

น้ำตาลกลูโคส ระยะเวลาในคอลัมน์ = 3.75 นาที

น้ำตาลซูโครส ระยะเวลาในคอลัมน์ = 4.62 นาที

น้ำตาลเคสโตส ระยะเวลาในคอลัมน์ = 6.14 นาที

น้ำตาลนีสโตส ระยะเวลาในคอลัมน์ = 7.78 นาที

2 คือ สารละลายที่ผ่านการชะด้วยน้ำกลั่น ระยะเวลาในคอลัมน์ = 3.89 นาที (เป็นน้ำตาลกลูโคส)

3 คือ สารละลายที่ผ่านการชะด้วยเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในคอลัมน์ = 4.61 นาที (เป็นน้ำตาลซูโครส)

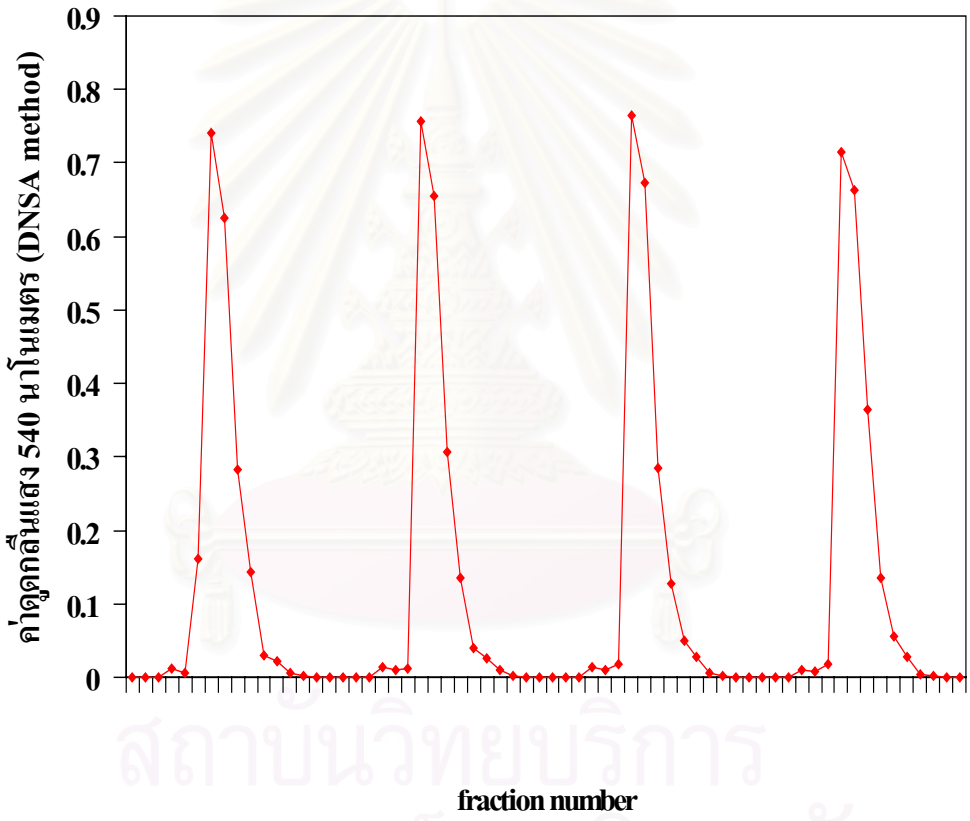
4 คือ สารละลายที่ผ่านการชะด้วยเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในคอลัมน์ = 4.61 นาที (เป็นน้ำตาลซูโครสที่ตกค้างอยู่) 5.80 และ 6.15 นาที (เป็นเคสโตส) 7.81 นาที (เป็นนีสโตส) และ 9.86 นาที (คาดว่าเป็นฟรักโตฟูแรนโนซิล นีสโตส)

จากการทดลองพบว่าคอลัมน์ที่บรรจุผงถ่านกัมมันต์สามารถแยกน้ำตาลกลุ่มต่าง ๆ ออกจากกันได้ ซึ่งสามารถสรุปเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรักโตส, กลุ่มน้ำตาลสองโมเลกุล ได้แก่ น้ำตาลซูโครส และกลุ่มโอลิโกแซ็กคาไรด์ ได้แก่ เคสโตส และนีสโตส โดยอาศัยการใช้สารละลายแอลกอฮอลล์ที่มีความเข้มข้นไม่เท่ากันเป็นตัวชะจากตัวอย่างที่ได้เมื่อนำไปวิเคราะห์ HPLC พบว่าสามารถแยกน้ำตาลได้ แต่พบว่ามีน้ำตาลซูโครสบางส่วนตกค้างอยู่ ซึ่งชะออกมาพร้อมกับฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 15

เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าอาจมีปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการแยกโดยคอลัมน์ผงถ่านกัมมันต์ ซึ่งจะได้ศึกษาในข้อต่อไป

6.2 **ศึกษาประสิทธิภาพของคอลัมน์**

ทดลองศึกษาประสิทธิภาพของคอลัมน์ โดยคำนวณปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ผ่านการชะออกจากคอลัมน์เทียบกับปริมาณซูโครสเริ่มต้นที่เติมเข้าไป เมื่อได้ศึกษาการใช้คอลัมน์ติดต่อกัน โดยเตรียมคอลัมน์ด้วย pastuer pipette บรรจุผงถ่านกัมมันต์ปริมาตร 0.5 กรัม มีความจุของสารละลายในคอลัมน์ประมาณ 60 ไมโครลิตร ใช้น้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 0.005 กรัม ชะออกด้วยเอทานอลเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ทำซ้ำ 4 ครั้งติดต่อกัน ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 62



รูปที่ 62 แสดงประสิทธิภาพของคอลัมน์ในการเก็บเกี่ยวน้ำตาลซูโครส เมื่อใช้ติดต่อกัน 4 ครั้ง

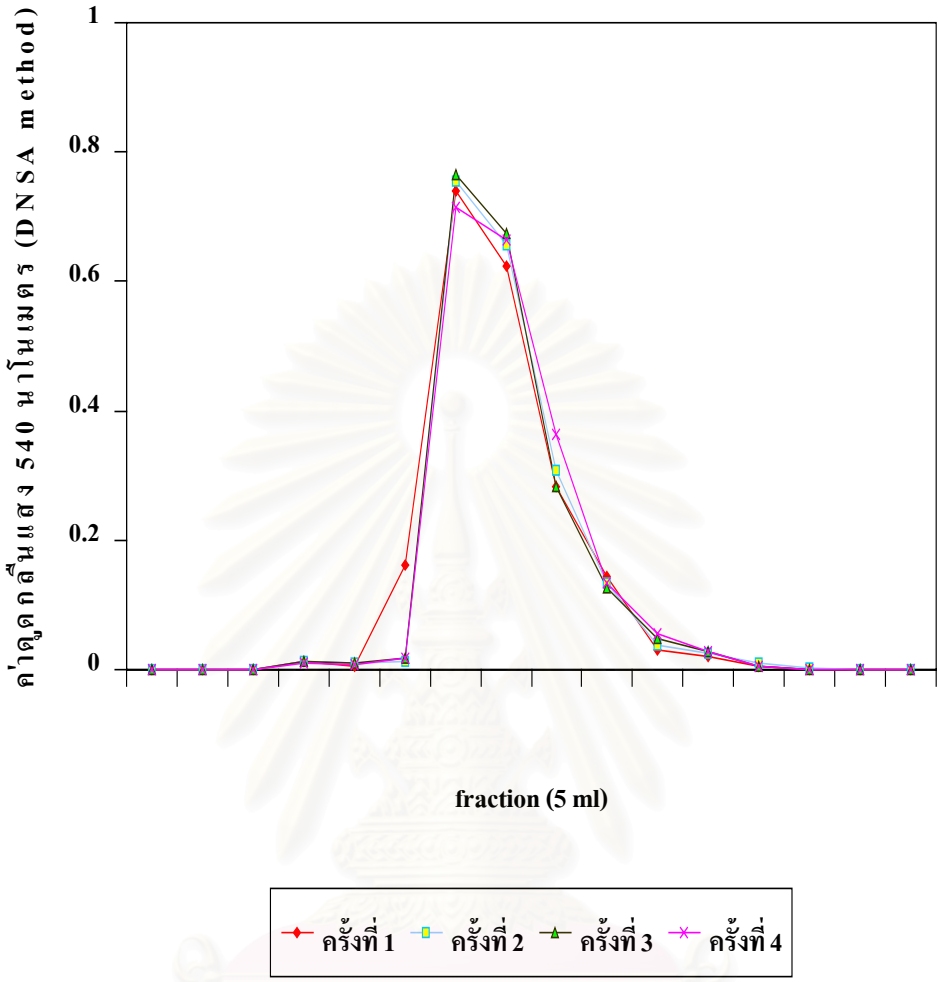
ครั้งที่ 1 เก็บเกี่ยวได้ 97.296 เปอร์เซ็นต์

ครั้งที่ 2 เก็บเกี่ยวได้ 94.224 เปอร์เซ็นต์

ครั้งที่ 3 เก็บเกี่ยวได้ 94.560 เปอร์เซ็นต์

ครั้งที่ 5 เก็บเกี่ยวได้ 96.048 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 63 แสดงเปรียบเทียบประสิทธิภาพของคอลัมน์ในการเก็บเกี่ยวน้ำตาลซูโครส เมื่อใช้ติดต่อกัน 4 ครั้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการทดลองศึกษาประสิทธิภาพในการใช้คอลัมน์ซ้ำติดต่อกัน พบว่าการเก็บเกี่ยวผลผลิตน้ำตาลซูโครสกลับคืนได้สูง แต่มีน้ำตาลซูโครสบางส่วนตกค้างในคอลัมน์ เนื่องจากไม่สามารถเก็บเกี่ยวออกมาได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจเกิดจากคุณสมบัติบางประการของน้ำตาลซูโครส เช่น ความหนืดสูง จึงเป็นสาเหตุในการชะออกจากคอลัมน์ได้ยาก และพบว่าการใช้ซ้ำ 4 ครั้งไม่มีผลต่อการเก็บเกี่ยวผลผลิตคืน แต่ขึ้นอยู่กับการชะแต่ละครั้งซึ่งแนวโน้มการชะแต่ละครั้งเป็นไปในทิศทางเดียวกันและใกล้เคียงกันมาก โดยเปรียบเทียบจากค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ของการชะได้ดังนี้

ครั้งที่ 1 เทียบกับครั้งที่ 2 มีค่าเท่ากับ 0.9847

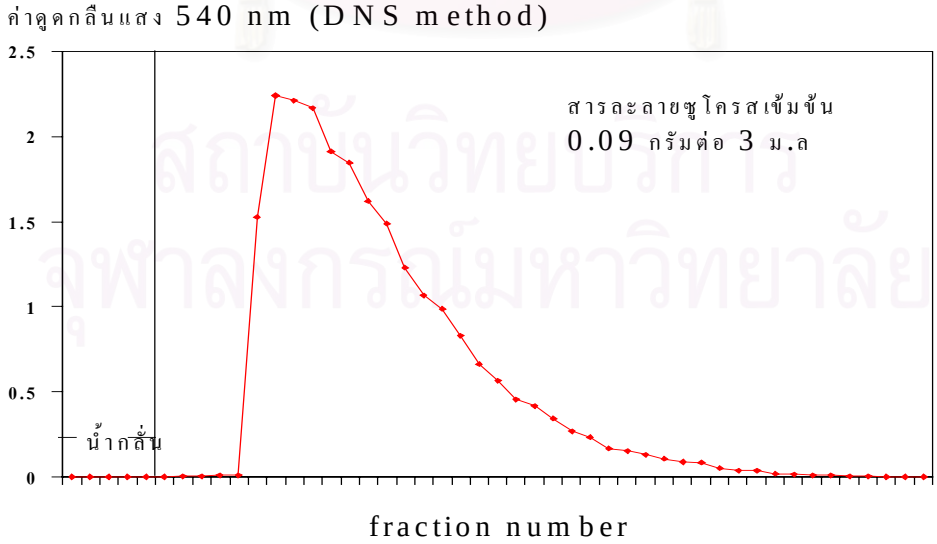
ครั้งที่ 2 เทียบกับครั้งที่ 3 มีค่าเท่ากับ 0.9994

ครั้งที่ 3 เทียบกับครั้งที่ 4 มีค่าเท่ากับ 0.9945

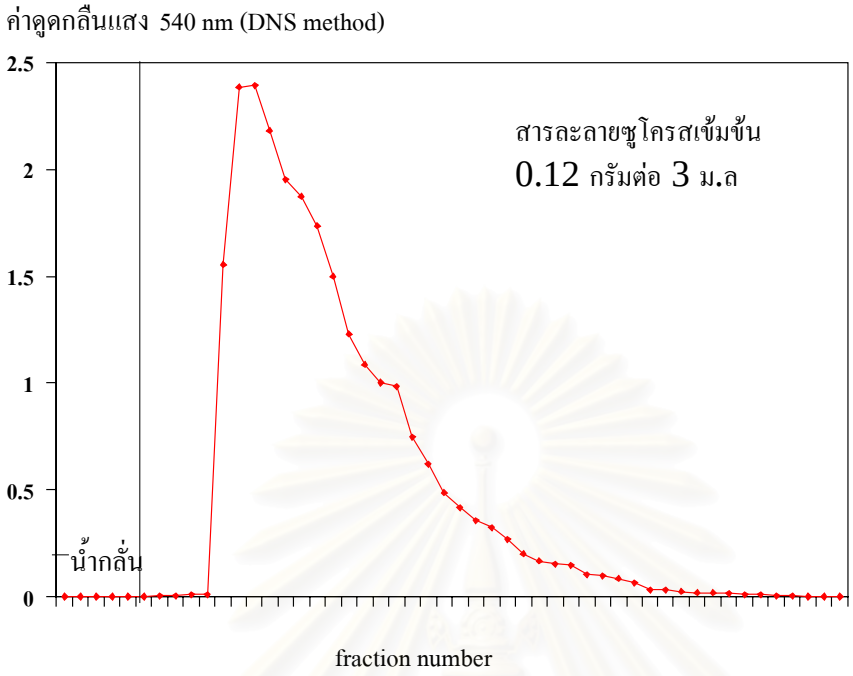
แสดงว่าในการชะแต่ละครั้งมีแนวโน้มใกล้เคียงกันมาก

6.3 ศึกษาความเข้มข้นที่มากที่สุดของน้ำตาลซูโครสที่คอลัมน์สามารถดูดซับได้

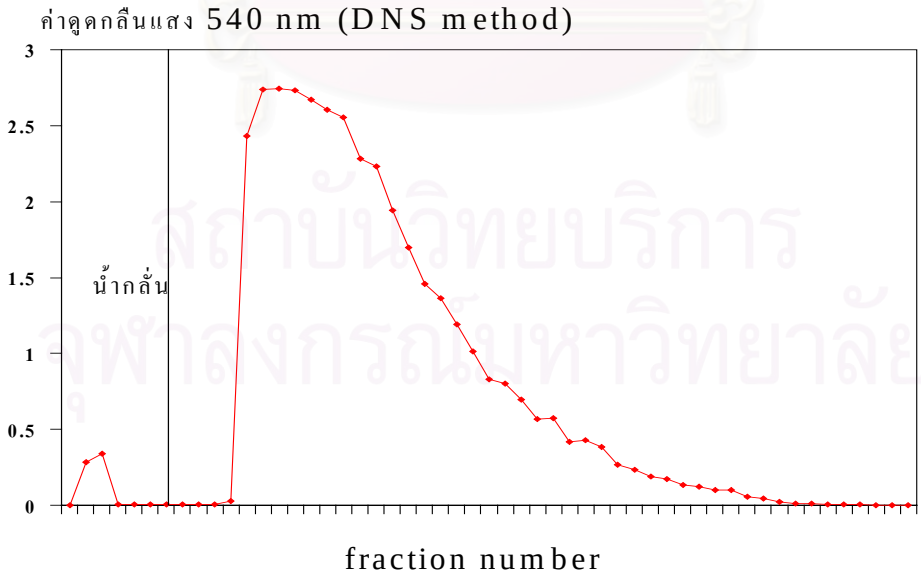
เนื่องจากการดูดซับระหว่างน้ำตาลและผงถ่านกัมมันต์ขึ้นอยู่กับปริมาตรต่อปริมาตร จึงทำการทดลองเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาล โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นตัวศึกษา โดยเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเป็น 0.09, 0.12 และ 0.15 กรัมต่อ 3 มิลลิลิตรพบว่าคอลัมน์สามารถดูดซับน้ำตาลซูโครสได้หมดที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเท่ากับ 0.09 และ 0.12 กรัมต่อ 3 มิลลิลิตร ขณะที่ปริมาณน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 0.15 กรัมต่อ 3 มิลลิลิตร คอลัมน์ไม่สามารถดูดซับได้หมด เนื่องจากมีน้ำตาลซูโครสบางส่วนถูกชะออกมาโดยน้ำกลั่น แสดงว่าคอลัมน์สามารถดูดซับน้ำตาลซูโครสได้มากที่สุด 0.12 กรัมต่อ 3 มิลลิลิตร (40 กรัมต่อลิตร) เทียบเป็นสัดส่วนการดูดซับระหว่างผงถ่านกัมมันต์และน้ำตาลซูโครสเท่ากับ 0.015 กรัมต่อผงถ่านกัมมันต์ 1 กรัม (คอลัมน์บรรจุผงถ่านกัมมันต์ 7.95 กรัม มีความจุของสารละลายในคอลัมน์เท่ากับ 2.5 มิลลิลิตร) แสดงดังรูปที่ 64 - 67



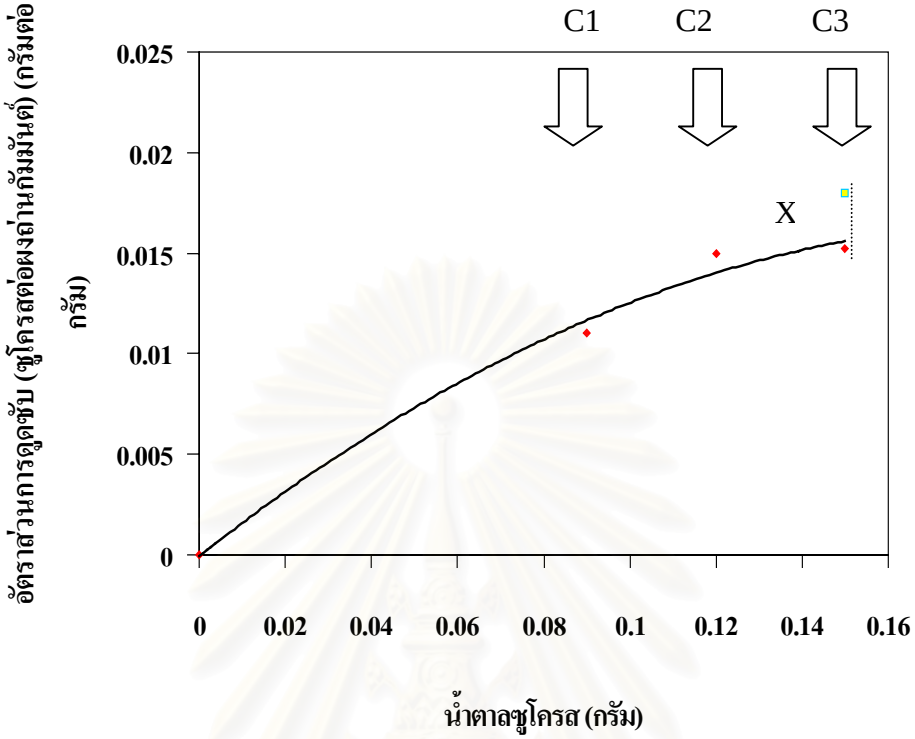
รูปที่ 64 แสดงการชะซูโครส 0.09 กรัมต่อ 3 มล. ออกจากคอลัมน์ด้วยเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 65 แสดงการชะซูโครส 0.12 กรัมต่อ 3 มล. ออกจากคอลัมน์ด้วยเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 66 แสดงการชะซูโครส 0.15 กรัมต่อ 3 มล. ออกจากคอลัมน์ด้วยเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 67 แสดงปริมาณน้ำตาลซูโครสกับอัตราส่วนการดูดซับระหว่างน้ำตาลซูโครสกับผงถ่านกัมมันต์ X หมายถึง อัตราส่วนของน้ำตาลซูโครสต่อผงถ่านกัมมันต์ที่คอลัมน์ไม่สามารถดูดซับไว้ได้ (ถูกชะออกโดยน้ำกลั่น)

C1 = น้ำตาลซูโครส 0.09 กรัม

C2 = น้ำตาลซูโครส 0.12 กรัม

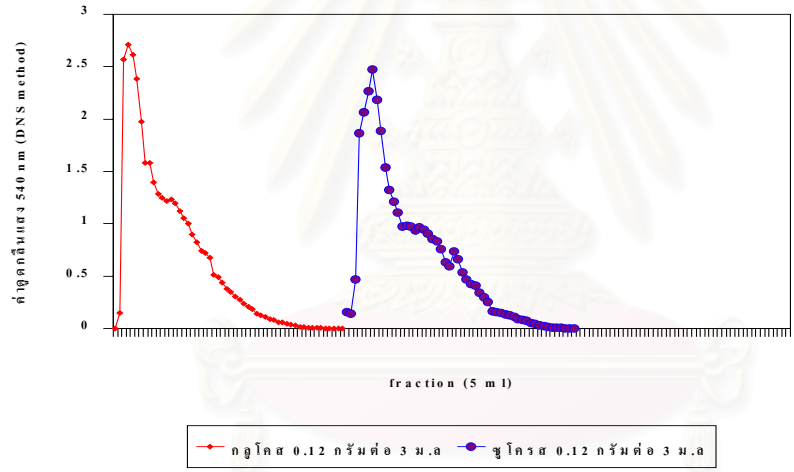
C3 = น้ำตาลซูโครส 0.15 กรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการทดลองเมื่อใช้น้ำตาลซูโครส 0.15 กรัมพบว่าน้ำกลั่นสามารถชะน้ำตาลซูโครสบางส่วนออกมาก่อนได้ แสดงว่าน้ำตาลซูโครสมีส่วนเกินที่คอลัมน์ไม่สามารถดูดซับไว้ได้ จึงพบว่าคอลัมน์สามารถดูดซับน้ำตาลซูโครสได้มากที่สุด 0.12 กรัม ซึ่งเป็นสัดส่วนเท่ากับ น้ำตาลซูโครส 0.015 กรัมต่อผงถ่านกัมมันต์ 1 กรัม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการดูดซับน้ำตาลโดยใช้ผงถ่านกัมมันต์ขึ้นอยู่กับสัดส่วนปริมาณผงถ่านกัมมันต์และน้ำตาล แต่ในการทดลองนี้ได้ศึกษาการดูดซับน้ำตาลซูโครสเพียงชนิดเดียว จึงจะทำการทดลองเพื่อศึกษาการดูดซับในกรณีที่มีน้ำตาลชนิดอื่นร่วมด้วย

6.4 ศึกษาความสัมพันธ์ของการดูดซับระหว่างน้ำตาล 2 ชนิด

การทดลองโดยใช้น้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นมากที่สุดที่สามารถดูดซับได้ผสมกับน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 0.12 กรัมต่อ 3 มิลลิลิตร เพื่อศึกษาว่าน้ำตาลกลูโคสจะมีผลรบกวนการดูดซับของน้ำตาลซูโครสหรือไม่ พบว่าจากการทดลองเมื่อชะน้ำตาลกลูโคสออกมาด้วยน้ำกลั่นแล้ว จึงเริ่มต้นชะน้ำตาลซูโครสออกพบว่ากลูโคสไม่มีผลรบกวนการจับของน้ำตาลซูโครส เนื่องมาจากกลไกการดูดซับที่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงได้ดังรูปที่ 68



รูปที่ 68 แสดงการชะน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครส ซึ่งเป็นความสัมพันธ์ของการดูดซับกลูโคสและซูโครสที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ดูดซับได้

จากการทดลองเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้น 0.12 กรัมต่อ 3 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นที่มากที่สุดที่คอลัมน์จะสามารถดูดซับได้หมด) รวมกับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0.12 กรัมต่อ 3 มิลลิลิตร พบว่าน้ำกลั่นสามารถชะน้ำตาลกลูโคสออกมาได้ ขณะที่น้ำตาลซูโครสสามารถถูกชะออกมาโดยเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยรูปที่ 68 พบว่าสามารถชะออกมาได้ 2 กราฟ แสดงว่าน้ำตาลกลูโคสไม่ได้มีผลในการดูดซับของน้ำตาลซูโครส ซึ่งสอดคล้องกับหลักการดูดซับของผงถ่านกัมมันต์ ที่สารโมเลกุลเล็กจะถูกดูดซับในรูพรุนที่มีขนาดเล็กของผลถ่านกัมมันต์ ขณะที่สารที่มีโมเลกุลใหญ่จะถูกดูดซับเข้าไปในรูพรุนที่มีขนาดใหญ่

จากการศึกษาโดยใช้สารละลายชนิดต่าง ๆ ในการชะน้ำตาลแต่ละชนิดออกมาจากคอลัมน์ แสดงว่าสารละลายแต่ละชนิดสามารถลดแรงดูดระหว่างผิวคาร์บอนกับน้ำตาลแต่ละชนิดได้ รวมทั้งประสิทธิภาพการชะขึ้นอยู่กับอัตราการไหลของสารละลายด้วย เนื่องจากถ้าใช้อัตราการไหลสูงขึ้นน่าจะทำให้สามารถชะน้ำตาลออกมาได้เร็วขึ้นด้วย จากการศึกษาการเก็บเกี่ยวฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้คอลัมน์ผงถ่านกัมมันต์ จึงน่าสนใจที่จะนำไปใช้ในการทำให้การเก็บเกี่ยวฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ได้จากการผลิตจากกระบวนการหมัก ที่มีการปนเปื้อนของสี, กลิ่น และน้ำตาลชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ต้องการได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีขึ้น

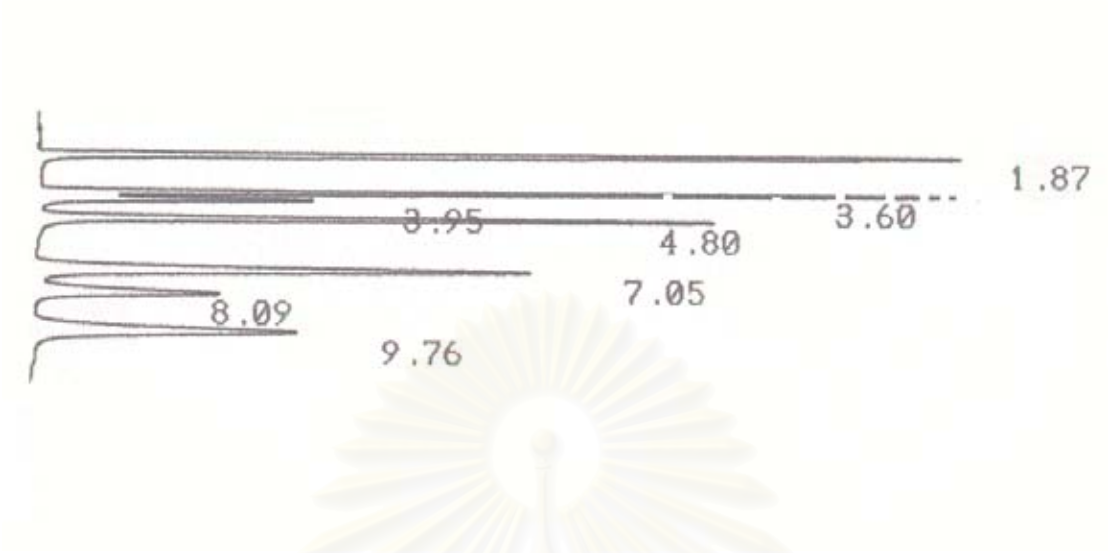
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

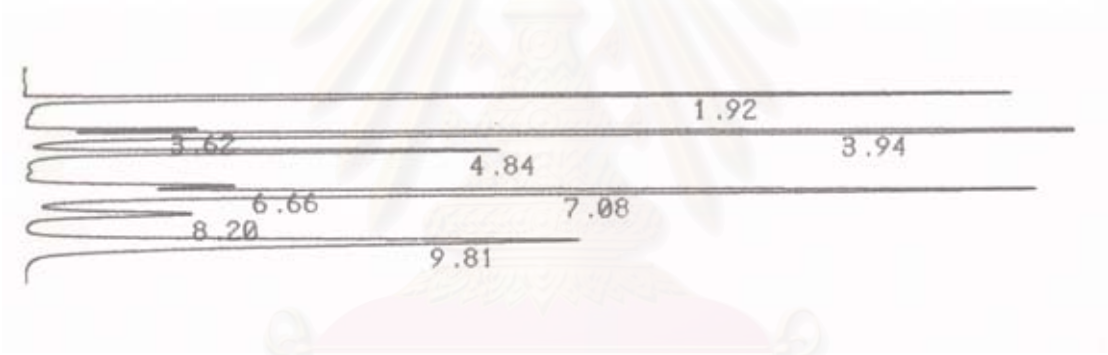
เมื่อนำตัวอย่างน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในถังหมัก ณ ชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะเลี้ยง โดยใช้หัวเชื้ออายุ 18 ชั่วโมง โดยจัดค่าปริมาณออกซิเจนละลายเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว และควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 ตลอดการเพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส มากรองแยกสายใยออกด้วยกระดาษกรองวอทแมน เบอร์ 1 มาวิเคราะห์ปริมาณ FOS และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานในภาคผนวก ค และใช้วิธีคำนวณในภาคผนวก ง โดยพบว่ามีผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้แก่ น้ำตาลฟรักโตส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส เคสโตส และนีสโตส เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ดังรูป กล่าวคือน้ำตาลชนิดต่างๆ มีระยะเวลาอยู่ในคอลัมน์เรียงจากน้อยไปมากตามลำดับได้แก่ น้ำตาลฟรักโตส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส FOS ชนิด เคสโตส และนีสโตส ตามลำดับ (โดยมีน้ำตาลราฟฟิโนสเป็นสารมาตรฐานภายในปรากฏกราฟอยู่ระหว่างเคสโตสและนีสโตส) นอกจากนี้ยังมีกราฟที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ คือ กราฟที่เวลา 6.66 นาที ปรากฏอยู่ใกล้กับเคสโตส คาดว่าจะเป็น 6-เคสโตส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ (นาที)



ก



ข

รูปที่ 69 ตัวอย่างโครมาโตแกรมของ FOS และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในน้ำหมัก ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 และสารมาตรฐานน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

ก. สารมาตรฐานน้ำตาลชนิดต่าง ๆ และน้ำตาลราฟฟิโนสเป็นสารมาตรฐานภายใน

ข. น้ำหมักผสมกับน้ำตาลราฟฟิโนสมาตรฐาน

จาก ก. น้ำตาลฟรักโตส 3.60 นาที

น้ำตาลกลูโคส 3.95 นาที

น้ำตาลซูโครส 4.80 นาที

FOS ชนิดเคสโตส 7.05 นาที

น้ำตาลราฟฟิโนส 8.09 นาที (สารมาตรฐานภายใน)

FOS ชนิดนีสโตส 9.76 นาที

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

สรุปผลการวิจัย

1. เมื่อเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 ในถังหมักที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 และค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว ตลอดการเพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้หัวเชื้อที่มีอายุแตกต่างกัน จะสามารถผลิต FOS ได้สูงที่สุดเมื่อใช้หัวเชื้อที่มีอายุ 18 ชั่วโมงขึ้นไป ดังนั้นการผลิต FOS โดย *Penicillium* sp. H12 ควรใช้หัวเชื้อที่มีอายุ 18 ชั่วโมงขึ้นไป

2. ในการผลิต FOS โดยการเติมน้ำตาลซูโครสระหว่างการผลิต พบว่าการเติมน้ำตาลซูโครสในระหว่างการผลิตควรเติมในชั่วโมงที่ 9 หรือ 12 ซึ่งเป็นระยะเริ่มต้นของการผลิต

3. ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เติมในช่วงต้นของการผลิต มีผลต่อการผลิต FOS โดยควรเติมน้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นเหมาะสม เนื่องจากน้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปจะทำให้เกิดความหนืดและแรงดันออสโมติกได้

4. การผลิต FOS โดยการเติมน้ำตาลซูโครสแบบต่อเนื่องตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ของการผลิตด้วยอัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที ทำให้แนวโน้มการผลิต FOS สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง และน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 400 กรัมต่อ 600 มิลลิลิตรจะทำให้อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลซูโครสสูงกว่าการใช้น้ำตาลซูโครส

5. เมื่อศึกษากิจกรรมของฟรักโตซิลทรานเฟอเรส ในการผลิตเคสโตสพบว่าเอนไซม์ที่เซลล์ผลิตออกมาถูกขับออกนอกเซลล์ และเอนไซม์มีกิจกรรมสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง

6. การศึกษาการเก็บเกี่ยว FOS และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ โดยคอลัมน์ผงถ่านกัมมันต์ พบว่าผงถ่านกัมมันต์สามารถดูดซับน้ำตาลแต่ละชนิดได้ และสามารถชะน้ำตาลแต่ละชนิดออกมาได้ โดย น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรักโตสชะด้วยน้ำกลั่น, น้ำตาลซูโครสชะด้วยสารละลายเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และ FOS ถูกชะด้วยสารละลายเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์

7. ประสิทธิภาพการใช้คอลัมน์มีสูงสามารถใช้ติดต่อกันได้หลายครั้ง โดยลักษณะการชะแต่ละครั้งใกล้เคียงกัน แต่การเก็บเกี่ยวน้ำตาลซูโครสออกจากคอลัมน์ไม่สามารถเก็บเกี่ยวได้ 100 เปอร์เซ็นต์ และการดูดซับน้ำตาลซูโครสกับผงถ่านกัมมันต์เป็นสัดส่วนกันกับ 0.015 กรัมต่อผงถ่านกัมมันต์ 1 กรัม รวมทั้งน้ำตาลกลูโคสไม่รบกวนการดูดซับของน้ำตาลซูโครส

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบการผลิต FOS โดยใช้หัวเชื้อที่มีอายุแตกต่างกันพบว่าหัวเชื้อที่เป็นสายใยอายุ 18 ชั่วโมง สามารถผลิต FOS ได้สูงสุดในการผลิตในถังหมักที่มีการควบคุมปัจจัยแวดล้อมที่เกี่ยวข้องกับการผลิต ขณะที่การเปรียบเทียบผลิตในขวดเขย่า พบว่าการเพาะเลี้ยงโดยใช้หัวเชื้อที่มีอายุแตกต่างกันสามารถผลิต FOS ได้ในปริมาณใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของวรรณา ศรีสัจจารักษ์ (2543) ที่ทำการทดลองเปรียบเทียบการผลิต FOS ในขวดเขย่าระหว่างการใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์ และหัวเชื้อที่เป็นสปอร์งอก (อายุ 12 ชม.) ซึ่งพบว่าสามารถผลิต FOS ได้ในปริมาณใกล้เคียงกัน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการผลิต FOS ในถังหมักที่มีสภาวะเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง จะทำให้เซลล์สามารถสร้างเอนไซม์และการเจริญเติบโตได้ดีกว่าการผลิตในขวดเขย่า จึงทำให้สายใยที่มีขนาดใหญ่กว่าสามารถผลิต FOS ได้ในปริมาณมากกว่าด้วย โดยเคสโตสจะถูกสร้างขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง ทำให้มีการสลายน้ำตาลซูโครสอย่างรวดเร็ว และเมื่อเคสโตสมีความเข้มข้นมากพอ ก็จะทำให้มีการสร้างนีสโตสเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงท้ายของการเพาะเลี้ยง ดังนั้นการผลิตเคสโตสสูงจึงน่าจะเกิดขึ้นในช่วงแรกของการเพาะเลี้ยง ขณะที่เมื่อเคสโตสมีปริมาณสูงขึ้น จึงทำให้มีการเริ่มต้นสร้างนีสโตสได้ ดังนั้นการผลิต FOS โดยใช้หัวเชื้อที่มีอายุ 18 ชั่วโมงในถังหมัก ซึ่งพบว่ามีปริมาณทั้งเคสโตสและนีสโตสสูง น่าจะเป็นเพราะหัวเชื้อที่มีอายุ 18 ชั่วโมงการสร้างมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตทั้งเคสโตสและนีสโตสได้สูง

สำหรับกลไกการสร้าง FOS จากน้ำตาลซูโครสนั้น ขั้นแรกของปฏิกิริยาจะมีเอนไซม์อินเวอเทสมาเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรักโตส และจึงมีเอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรสมาย้ายน้ำตาลฟรักโตสไปเชื่อมกับน้ำตาลซูโครสอีกโมเลกุลหนึ่ง ได้เคสโตส และจึงนำน้ำตาลฟรักโตสอีกโมเลกุลหนึ่งไปเชื่อมกับเคสโตสได้เป็นนีสโตส ได้น้ำตาลกลูโคสเหลือในระบบ (Jung และคณะ, 1989)

จากการทดลองพบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มขึ้นส่วนใหญ่จะมีระดับคงที่ แม้ว่าในช่วงท้ายของการผลิตจะมีการสร้างนีสโตส เนื่องจากเซลล์สามารถนำน้ำตาลกลูโคสไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ ขณะที่เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลฟรักโตสพบว่าน้ำตาลฟรักโตสจะมีปริมาณต่ำมากในระบบ ซึ่งสอดคล้องกับกลไกการเกิดปฏิกิริยาที่การผลิต FOS ซึ่งเกิดจากการนำน้ำตาลฟรักโตสไปต่อกับน้ำตาลซูโครสหรือเคสโตส แต่ปริมาณน้ำตาลฟรักโตสที่ตรวจพบได้เล็กน้อยอาจเกิดจากการสลาย FOS โดยปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชั่นก็ได้ จากการทดลองการผลิต FOS ในถังหมักพบว่าช่วงท้ายของการผลิตโดยใช้หัวเชื้อที่เป็นสายใยมีปริมาณน้ำหนักแห้งของสายใยลดลง เนื่องจากมีการการควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายให้เท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ของอากาศอิ่มตัว (ซึ่งต้องใช้อัตราการกวนรุนแรง) ส่งผลให้สายใยบางส่วนฉีกขาดไปได้ แต่พบว่าการใช้หัวเชื้อที่เป็นสปอร์จะมี

ปริมาณน้ำหนักสายใยแห้งในช่วงท้ายของการผลิตค่อนข้างคงที่ น่าจะเกิดจากสายใยยังคงมีขนาดเล็กกว่าการใช้สายใยเป็นหัวเชื้อทำให้สายใยมีโอกาสฉีกขาดน้อยกว่า

ในการปรับปรุงการผลิต FOS โดยการเติมน้ำตาลซูโครสระหว่างการผลิต พบว่าสามารถเพิ่มการผลิต FOS ให้สูงขึ้นได้ เนื่องจากน้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้นของการผลิต FOS ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hidaka และคณะ (1988) ซึ่งรายงานว่า น้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นสูงจะทำให้เอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรสทำงานได้สูง จึงเกิดปฏิกิริยาทรานฟรักโตซิลเลชั่นได้สูง ซึ่งมากกว่าการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชั่น จากการศึกษาผลของการเติมน้ำตาลซูโครสในระหว่างการผลิตให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นอีก 50 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 9, 12, 15 และ 18 ของการผลิต พบว่าการเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 9 และ 12 ของการผลิตทำให้มีแนวโน้มการผลิต FOS สูงขึ้น เนื่องมาจากช่วงแรกของการผลิตน่าจะมีการสร้างเอนไซม์ และมีอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์สูง จึงทำให้อัตราการผลิต FOS สูงไปด้วย ในขณะที่ช่วงท้ายของการผลิตมีปริมาณน้ำตาลซูโครสต่ำลง ทำให้เมื่อเติมน้ำตาลซูโครสลงไปอาจทำให้ไม่มีความเข้มข้นมากพอที่จะทำให้มีอัตราการผลิต (เทียบต่อ ชม.ที่ได้ผลผลิตสูงสุด) สูงขึ้น (แม้ว่าจะได้ปริมาณ FOS สูงขึ้นมากกว่าการผลิตแบบกะ) โดยพบว่าการเติมน้ำตาลซูโครสที่ชั่วโมงที่ 12 ของการผลิตทำให้มีการผลิตนีสโตสได้สูงกว่าการเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 9 ของการผลิต อาจเนื่องมาจากในชั่วโมงที่ 12 ของการผลิต มีความเข้มข้นของเคสโตสสูง ซึ่งน่าจะทำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตนีสโตสแล้วดังนั้นเมื่อปริมาณน้ำตาลซูโครสสูงขึ้นทำให้มีการผลิตเคสโตสสูงขึ้น ก็ส่งผลให้มีการผลิตนีสโตสสูงขึ้นด้วย เมื่อทดลองเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เติมระหว่างการผลิตในชั่วโมงที่ 9 ให้สูงขึ้นอีกเป็น 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อน้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นมาก จะทำให้แรงดันออสโมติกสูงขึ้น ทำให้การผลิต FOS ไม่ดี สอดคล้องกับงานวิจัยของวรรณา ศรีสัจจารักษ์ (2543) ที่พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลทราย 300 กรัมต่อลิตรทำให้การเจริญเติบโตของ *Penicillium* sp. H12 ต่ำกว่าการผลิตโดยใช้น้ำตาลทราย 250 กรัมต่อลิตร และยังทำให้การผลิต FOS ไม่ดีเท่าที่ควร เนื่องจากเมื่อมีแรงดันออสโมติกสูงจุลินทรีย์จะมีการปรับตัวเพื่อให้ทนต่อแรงดันออสโมติกได้ จึงทำให้การผลิต FOS ช้าลง ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุที่ทำให้การเติมน้ำตาลซูโครสให้มีความเข้มข้นสูงขึ้นอีก 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตร จะมีการผลิต FOS ได้ไม่ดีเท่าที่ควร และพบว่าการเติมน้ำตาลซูโครสให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นอีก 200 กรัมต่อลิตรจะทำให้มีการผลิต FOS สูงขึ้นได้ในช่วงท้ายของการผลิต แสดงว่าเซลล์อาจมีการปรับตัวต่อแรงดันออสโมติกในช่วงแรกและเมื่อปริมาณน้ำตาลซูโครสในระบบมีความเข้มข้นลดลงก็ทำให้เริ่มต้นมีการผลิต FOS สูงขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Balken ในปี ค.ศ.1991 ที่รายงานว่า เมื่อผลิต FOS จากสายใยของ *Aspergillus phoenicis* โดยใช้น้ำตาลซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 825 กรัมต่อลิตร จะทำให้ได้ผลผลิตต่ำกว่าการผลิตโดยใช้น้ำตาลซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 750 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้จากงานวิจัยใน

ปี ค.ศ. 1995 ของ Andrew ได้รายงานว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสที่สูงมากสามารถยับยั้งการสร้างฟรักโตซิลทรานเฟอเรสของ *Aspergillus japonicus* ได้ด้วย

จากการศึกษาผลการเติมน้ำตาลซูโครสแบบต่อเนื่องเป็นเวลาติดต่อกัน 10 ชั่วโมง พบว่าการเติมน้ำตาลซูโครสแบบต่อเนื่องจะทำให้การผลิต FOS เกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอและมีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง อาจเนื่องมาจากการเติมน้ำตาลซูโครสให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ทำให้จุลินทรีย์สามารถปรับตัวต่อแรงดันออสโมติกที่เพิ่มขึ้นได้และปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้การเพิ่มขึ้นของเคสโตส น้ำตาลกลูโคส และนีสโตสเป็นไปอย่างมีสัดส่วน แสดงว่าน้ำตาลซูโครสเป็นปัจจัยหนึ่งที่ควบคุมปฏิกิริยาทรานฟรักโตซิลเลชั่น เช่น ในปี 1987 Jung และคณะ ได้รายงานว่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสม ต่อการผลิตเอนไซม์ฟรักโตซิลทรานเฟอเรสของ *Aureobasidium pullulans* เท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าปัจจัยสำคัญสำหรับการผลิต FOS คือความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส และจากรายงานของ Kim และคณะในปี 1998 ได้ศึกษาการผลิต FOS โดยเอนไซม์จาก *Bacillus macerans* EG-6 พบว่าถ้าน้ำตาลซูโครสมีความเข้มข้นสูงถึง 500 กรัมต่อลิตร จะเร่งปฏิกิริยาทรานฟรักโตซิเลชั่น เมื่อน้ำตาลซูโครสต่ำเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตรจะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชั่น แต่พบว่าถ้าน้ำตาลซูโครสมีระดับความเข้มข้นปานกลางเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตรจะทำให้เกิดปฏิกิริยาทั้งสองแบบเสมอกัน ทำให้การผลิต FOS มีระดับคงที่ได้

จากการศึกษากิจกรรมของฟรักโตซิลทรานเฟอเรส พบว่าฟรักโตซิลทรานเฟอเรสที่ *Penicillium* sp. H12 สร้างขึ้นเป็นเอนไซม์ที่ขับออกนอกเซลล์ (Extracellular enzyme) โดยเซลล์มีการผลิตเอนไซม์มีปริมาณสูงในชั่วโมงที่ 9 – 15 ของการผลิต ซึ่งเป็นช่วงที่มีปริมาณน้ำตาลซูโครสสูงและเซลล์มีการเจริญเติบโตมาก แต่เมื่อหลังจาก 15 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงพบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมลดลง อาจเนื่องจากปริมาณน้ำตาลซูโครสลดลง (ทำให้มีการสร้างฟรักโตซิลทรานเฟอเรสน้อยลง) หรืออาจเกิดจากการย่อยสลายโปรตีเอสที่เซลล์สร้างออกมา สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen (1995) พบว่าปริมาณของน้ำตาลซูโครสมีผลต่อการผลิตฟรักโตซิลทรานเฟอเรสของ *Aspergillus japonicus* TIT-90076 โดยพบว่าฟรักโตซิลทรานเฟอเรสจะผลิตได้สูงขึ้นเมื่อมีน้ำตาลซูโครสในระบบเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ และจะลดลงเมื่อปริมาณน้ำตาลซูโครสลดลง แต่ในขณะเดียวกันปริมาณน้ำตาลซูโครสที่มากเกินไปกลับทำให้การผลิตเอนไซม์ลดลงด้วย

ในการศึกษาการเก็บเกี่ยว FOS จากน้ำหมักโดยใช้คอลัมน์ผงถ่านกัมมันต์ พบว่าสามารถดูดซับน้ำตาลชนิดต่าง ๆ และชะน้ำตาลออกจากคอลัมน์ได้โดยสารละลายชะชนิดต่าง ๆ ได้แก่ น้ำกลั่นสำหรับชะน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรักโตส สารละลายเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์สำหรับชะน้ำตาลซูโครส และสารละลายเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์สำหรับชะเคสโตสและนีสโตส โดยพบว่าน้ำตาลซูโครสจะคงเหลือจากการชะออกอยู่ในคอลัมน์เล็กน้อย อาจเนื่องมาจากน้ำตาลซูโครสสามารถจับกับผงถ่านกัมมันต์ได้ดี และในน้ำหมักมี

ปริมาณโปรตีนและสารปนเปื้อนชนิดอื่น ซึ่งอาจรบกวนการชะได้ จากการศึกษาคุณสมบัติการดูดซับของผงถ่านกัมมันต์โดย จิราวรรณ โตธนาคม (2536), วรติกร อิสระเสนีย์ (2539) และธนพร ล้อทอง (2541) พบว่าประสิทธิภาพการดูดซับจะสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิต่ำลงและค่าความเป็นกรดด่างลดลง โดยหลักการดูดซับเกิดจากการจับกับระหว่างน้ำตาลและผงถ่านกัมมันต์ได้โดยแรงแวนเดอวาล ซึ่งเป็นแรงชนิดอ่อน และการเปลี่ยนแปลงค่าดัชนีความมีขั้วของตัวชะ (Polarity index) สามารถลดแรงดแวนเดอวาลและทำให้สารหลุดออกจากการดูดซับได้ ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้ผงถ่านกัมมันต์ชนิดที่เป็นแป้งฝุ่น (Powder activated carbon) ซึ่งมีขนาดอนุภาคเล็กกว่า 0.18 มิลลิเมตร ดังนั้นจึงสามารถดูดซับอนุภาคต่าง ๆ ได้ดีเนื่องจากมีพื้นที่ผิวมาก โดยประสิทธิภาพการดูดซับขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุล หมู่ต่าง ๆ ของสารประกอบที่ถูกดูดซับ ซึ่งจากการทดลองศึกษาประสิทธิภาพการดูดซับน้ำตาลซูโครสโดยผงถ่านกัมมันต์พบว่า การดูดซับน้ำตาลซูโครสเป็นสัดส่วนกับปริมาณของผงถ่านกัมมันต์ เท่ากับน้ำตาลซูโครส 0.015 กรัมต่อผงถ่านกัมมันต์ 1 กรัม นอกจากนี้ในการทดลองได้ศึกษาการดูดซับน้ำตาลซูโครสโดยผงถ่านกัมมันต์ในรูปแบบของคอลัมน์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบการดูดซับน้ำตาลซูโครสติดต่อกัน 4 ครั้ง พบว่าประสิทธิภาพของการใช้คอลัมน์แต่ละครั้งให้ประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน และสามารถเก็บเกี่ยวน้ำตาลซูโครสคืนได้ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อศึกษาการดูดซับน้ำตาลกลูโคส ร่วมกับน้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้นที่มากที่สุดที่คอลัมน์สามารถดูดซับได้ พบว่าน้ำตาลกลูโคสไม่รบกวนการดูดซับของน้ำตาลซูโครส สอดคล้องกับหลักการดูดซับของเบื้องต้นของผงถ่านกัมมันต์

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาการเก็บเกี่ยว FOS ด้วยคอลัมน์ผงถ่านกัมมันต์ พบว่าไม่สามารถแยก FOS ชนิดเคสโตสและนีสโตสออกจากกันได้เนื่องจาก FOS ทั้งสองชนิดสามารถถูกชะออกมาได้ด้วยสารละลายเอทิลแอลกอฮอลล์เข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์เหมือนกัน ซึ่งคาดว่าน่าจะมีการศึกษาการใช้วิธีโครมาโตรกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ หรือโครมาโตรกราฟีแบบเจลฟิวเตชั่นเพื่อแยกเคสโตสและนีสโตสออกจากกันต่อไป

จากการทดลองผลิต FOS โดย *Penicillium* sp. H12 พบว่าจะมีการผลิตเคสโตสก่อนนีสโตสเสมอและนีสโตสจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อมีปริมาณเคสโตสมากพอ ซึ่งน่าจะเกิดจากเอนไซม์ที่ได้จาก *Penicillium* sp. H12 เป็นเอนไซม์หลายชนิด เช่น อินเวอเทส และฟรักโตซิลทรานเฟอเรส เนื่องจากในการทดลองศึกษากิจกรรมของฟรักโตซิลทรานเฟอเรส พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมลดลงในช่วงท้ายของการผลิต แต่ในช่วงท้ายของการผลิตทั่วไปทั้งในขวดเขย่าและถังหมักจะมีการผลิตนีสโตสสูงขึ้น จึงมีความเป็นไปได้ว่าอาจมีเอนไซม์มากกว่า 2 ชนิดที่เกี่ยวข้องกับการผลิต FOS โดย *Penicillium* sp. H12 ซึ่งน่าจะได้มีการศึกษาต่อไป

อนึ่งในปี 1989 Jung และคณะได้รายงานว่า น้ำตาลกลูโคสที่เกิดจากกระบวนการผลิตอาจมีผลยับยั้งปฏิกิริยาทรานฟรักโตซิลเลชั่นได้ แต่ในทุกการทดลองพบว่าในช่วงท้ายของการ

ผลิตจะมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงขึ้นจนเริ่มคงที่ แต่การผลิต FOS ก็ยังคงดำเนินต่อไป แสดงว่าเซลล์สามารถนำน้ำตาลกลูโคสไปใช้ได้ ขณะเดียวกันก็ยังคงมีการผลิต FOS ต่อไป เนื่องจากยังคงมีปริมาณน้ำตาลซูโครสเหลือในระบบ ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นอาจไม่ส่งผลในการยับยั้งการผลิต FOS จากการเพาะเลี้ยงโดย *Penicillium* sp. H12 ก็ได้

ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาเพื่อปรับปรุงการผลิต FOS โดย *Penicillium* sp. H12 น่าจะมีการศึกษาการนำเอนไซม์มาใช้ในการผลิต เนื่องจากเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต FOS โดย *Penicillium* sp. H12 เป็นเอนไซม์ที่อยู่นอกเซลล์ จึงน่าสนใจที่จะนำมาใช้ในการผลิตได้

2. น่าจะมีการศึกษาการผลิตโดยนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ หรือการตรึงเซลล์ เพื่อลดต้นทุนในการเตรียมหัวเชื้อ และอาจสามารถผลิต FOS ได้อย่างต่อเนื่อง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จิราวรรณ โตธนาคม และวิจารณ์ ศรีรัตนาลัย. 2536. การศึกษาคุณสมบัติการดูดซับของผงถ่านกัมมันต์. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วรติกร อิสระเสนีย์. 2539. การผลิตถ่านกัมมันต์จากยางรถยนต์ใช้แล้วโดยการกระตุ้นด้วยไอน้ำร้อนยิ่งยวด. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วรรณา ศรีสัจจารักษ์. 2543. ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิตสารให้ความหวานพลังงานต่ำชนิดฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดย *Penicillium* sp.H12 วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธนพร ล้อทอง. 2541. การผลิตถ่านกัมมันต์จากยางรถยนต์ใช้แล้ว โดยการกระตุ้นด้วยไอน้ำร้อนยวดยิ่ง และคาร์บอนไดออกไซด์ในเครื่องปฏิกรณ์แบบเบนนิ่ง วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เสาวนีย์ ศิริรูป. 2539. การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากน้ำตาลซูโครส. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Andrew, J.C. 1995. Effect of enzyme concentration on oligofructan synthesis from sucrose. Phytochemistry. 40:705-708.

Babara, O.S. 1999. Fiber, inulin and oligofructose: Similarities and differences. J.Nutr. 129: 1424S-1427S.

Balken, J.A., Van, J.G., Van, J.J., Kampuis, J. amd Meijer, E.M. 1991. Production of 1-kestose with intact mycelium of *Aspergillus phoenicis* containing sucrose-1^F-fructosyltransferase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35:216-221.

Bornet, F.R. 1994. Undigestible sugars in food product. Am. J. Clin.Nutr. 59:763S-769S.

Briet,F. Anchour, L.,Flourie, B., Beaugerie, L., Pallier,P., Franchisseur, C., Bornet,F. and Rambaud, J.C. 1995. Symptomatic response to varying levels of fructooligosaccharides consumed occasionally or regularly. Eur. J. Clin. Nutr. 49:501-507.

Chen, W.C. 1995. Production of beta-fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus* in batch and fed-batch cultures. Biotechnol. Lett. 17: 1291-1294.

Cheng, C.U., Duan, K.J., Sheu, D.C., Lin, C.T. and Li,S.Y. 1996. Production of fructooligosaccharides by immobilized mycelium of *Aspergillus japonicus*. J. Chem. Tech. Biotechnol. 66:135-138.

Chieng, C.J. and Lee, W.C. 1997. Immobilization of beta-fructofuranosidases from *Aspergillus* on methacrylamide-based polymeric beads for production of fructooligosaccharides. Biotechnol. Prog. 13:577-582.

Chih, Y.C., Duan, K.J., Sheu, D.C., Lin, C.T. and Li, S.Y. 1996. Production of fructooligosaccharides by immobilized mycelium of *Aspergillus japonicus*. J. Chem. Tech. Biotechnol. 66:135-138.

Crittenden, R.G. and Playne, M.J. 2002. Purification of food-grade oligosaccharides using immobilized cells of *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58:297-302.

Cumming, J.H.,Macfarlane, G.T. and Englyst, H.N. 2001. Prebiotic digestion and fermentation. Am. J. Clin. Nutr. 73:415 S-420 S.

Dennis, T.G. 2002. Intestinal health through dietary fiber,prebiotics and probiotics. Food Technology. 56: 23.

Duan, K.J., Sheu, D.C. and Chen, J.S. 1993. Purification and characterization of beta-fructofuranosidase from *Aspergillus japonicus*TIT-KJI. Biosci. Biotec. Biochem. 57:1811-1815.

Edelman, B.J. 1966. The metabolism of fructose polymer in plants. Biochem. J. 98:787-794.

Edelman, B.J. 1968. The mechanism of fructosan metabolism in higher plant as exemplified in *Helianthus tuberosus*. New. Phytol. 67:517-531.

Ellen, G.H.M., Gertjan, S., Theo, M. and Wim,V.D. 1998. Nondigestible oligosaccharides do not interfere with calcium and nonheme-iron absorption in young, healthy men. Am. J. Clin. Nutr. 67:445-451.

Fujita, K., Hara, K., Hasimoto, H. and Kitahata, S. 1990. Transfructosylation catalyzed by beta-fructofuranosidase I from *Arthrobacter* sp,K-1. Agric.Biol. Chem. 54:2655-2661.

Fujita, K., Hara, K., Hasimoto, H. and Kitahata, S. 1990. Purification and some properties of beta-fructofuranosidase I from *Arthrobacter* sp,K-1. Agric. Biol. Chem. 54:913-919.

Gibson, G.R. and Wang, X. 1993. Effect of the *in vitro* fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. Appl. Bacteriology. 75:373-380.

Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. J. Nutr. 125:1401-1412.

Greger, J.L. 1999. Nondigestible carbohydrates and mineral bioavailability. J. Nutr. 129:1434S-1435S.

Gupta, A.K. and Bhatia, I.S. 1980. Glucofructosan biosynthesis in *Fusarium oxysporum.* Phytochemistry. 19:2557-2563.

Gupta, A.K. and Bhatia, I.S. 1982. Glucofructosan biosynthesis in *Fusarium oxysporum*: Regulation and subtstrate specificity from fructosyl transferase and invertase . Phytochemistry. 21:1249-1253.

Handan,K. and Robert, W.H. 2000. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifodobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 66:2682-2684.

Hang, Y.D., Woodams, E.E. and Jang. K.Y. 1995. Enzymatic conversion of sucrose to kestose by fungal extracellular fructosyltransferase. Biotechnol. Lett. 17:295-298.

Hartemink, R., Quataert, M.C.J., Van Laere, K.M.J., Nout, M.J.R. and Rombouts, F.M. 1995. Degradation and fermentation of fructo-oligosaccharides by oral streptococci. J. Applied. Bact. 79:551-557.

Hayashi, S., Nonoguchi, M., Takasaki, Y., Ueno, H. and Imada, K. 1991. Purification and properties of beta-fructofuranosidase from *Aureobasidium* sp. ATCC 20524. J. Indus. Microbiol. 7:251-256.

Hayashi, S.,Shinokawa, Y., Nogoguchi, M., Tasasaki, Y., Ueno,H. and Imada,K. 1993. Nutritional status of *Aureobasidium* sp.ATCC 20524 for the production of fructofuranosidase. World. J. Microbiol. Biotechnol. 9:216-220.

Henryk, S.T. and Roberfroid, M.B. 2000. Nontoxic potential of cancer chemotherapy by dietary oligofructose or inulin. Nutrition and cancer. 38: 1-5.

Hidaka, H., Hirayama, M. and Sumi, N. 1988. A fructooligosaccharide producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. Agric. Biol. Chem. 52:1187-1187.

Hidaka, H. and Hirayama, M. 1991. Useful characteristics and commercial application of fructooligosaccharides. Biochem. Soc. Trans. 19:561-565.

Hogarth, A.J.C.L, Hunter, D.E., Jacobs, W.A., Garleb, K.A. and Wolf, B.W. 2000. Ion chromatrographic determination of three fructooligosaccharide oligomers in prepared and preserved foods. J. Agric. Food. Chem. 48:5326-5330.

Hussein, S.H., Campbell, J.M., Bauer, L.L., Fahey, G.C., Hogarth, A.J.C.L., Wolf, B.W. and Hunter, D. 1998. Selected fructooligosaccharide composition of pet-food ingredients. J. Nutr. 128:2803S-2805S.

Hussein, S.H., Flickinger, E.A. and George, C.F. 1999. Petfood applications of inulin and oligofructose. J. Nutr. 129:1454S-1456S.

Ishimoto, M. and Nakamura, A. 1997. Purification and properties of beta-fructofuranosidase from *Clostridium perfringens*. Biosci. Biotech. Biochem. 61: 599-603.

Jang, K.Y. and Hang, Y.D. 1996. Transfructoysylating enzyme activity of *Penicillium roquefertii.* Lett. Appl. Microbiol. 22:397-399.

Jochen, R., Willmitzer, L. and Heyer, A. 1998. Production of 1-kestose in transgenic yeast expressing a fructosyltransferase from *Aspergillus foetidus*. J.Bacteriology. 180:1305-1310.

Johannes, J.R., Susan, B., Hamberg, O. and Eivind, G.H. 1990. Fructans of Jerusalem artichokes: intestinal transport, adsorption, fermentation, and influence on blood glucose, insulin and C-peptide responses in healthy jubjects. Am. J. Clin. Nutr. 52:675-681.

Jong, W.Y., Dong, H.K., Byung, W.K. and Seung, K.S. 1997. Comparison of sugar composition between inulo-and fructo- oligosaccharides produced by different enzyme froms. Biotech. Lett. 19:553-556.

Jung, K.H., Yun, J.W., Kang, K.R., Lim, J.Y. and Lee, J.H. 1989. Mathematical model for enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose. Enzyme. Micro. Technol. 11:491-494.

Jung, K.H., Kim, K.H., Jeon,J.Y. and Lee.J.H. 1993. Production of high fructo-oligosaccharide syrup with two enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase. Biotech. Lett. 15:65-70.

Kamejiro, Y., Kawai, K. and Itakura, M. 1984. Effect of fructo-oligosaccharides on blood glucose and serum lipids in diabetic subject. Nutr. Res. 4:961-966.

Kawai, G., Tanikushi, H. and Nakamura, M. 1973. Polyfructan and oligofructans synthesized from sucrose by conidia of *Aspergillus sydiwii* IAM 2544. Agric. Biol. Chem. 37: 2111-2119.

Kawase, K. 1982. Effects of nutrients on the intestinal microflora of infants. Jpn. J. Dairy. Food. Sci. 31:A241-A243.

Kim, B.W., Choi, J.W. and Yun, J.W. 1998. Selective production of GF_4 fructooligosaccharide from sucrose by a new transfeructosylaing enzyme. Biotech. Lett. 20:1031-1034.

Koji, N., Mitsutoshi, N. and Hiroshi, N. 1999. A forced flow membrane reactor for transfructosylation using ceramic membrane. Biotech. Bioeng. 68:92-97.

Kurakake, M., Onoue, T. and Komaki, T. 1996. Effect of pH on transfructosylation and hydrolysis by beta-fructofuranosidase from *Aspergillus oryzae.* Applied. Microbiol. Biotechnol. 45:236-239.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurment with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265 – 275.

Luo, J.,Yperselle, M.V.,Rizkalla, S.W., Rossi, F., Bornet,F.R. and Siama, G. 2000. Chronic consumption of short-chain fructooligosaccharides does not affect basal hepatic glucose production or insulin resistance in type 2 diabetics. J. Nutr. 130:1572-1577.

McDonough, F.E., Hitchin, A.D. and Wong, N.P. 1987. Modification of sweet acidophilus milk to improve utilization by Lactose-intolerant persons. Am. J. Clin. Nutr. 45:570-574.

McKellar,R.C. and Modler, H.W. 1989. Metabolism of fructo-oligosaccharides by *Bifidobacterium* spp. Appl. Microbiol. Biotech. 31:537-541.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determenation of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-428.

Mitsuoka, T.,Hikada,H. and Eida,T. 1987. Effect of fructooligosaccharides on intestinal microflora. Nahrung. 31:427-436.

Muramatsu, M., Kainuma, S., Miwa, T. and Nakakuki, T. 1988. Structures of some fructooligosaccharides produced from sucrose by mycelia of *Aspergillus sydowi* IAM 2544. Agric. Biol. Chem. 52:1303-1304.

Muramatsu, K., Shuichi, O., Masanori, K. and Norio, S. 1993. Purification and some properties of beta-fructofuranosidase from *Bifidobacterium adolescentis* G1. Biosci. Biotec. Biochem. 57:1681-1685.

Nathalie, M.D. and Nadine, N.K. 1999. Biochemical basis of oligofructose-induced hypodemia in animal models. J. Nutr. 129: 1467S-1470S.

Norio, S. and Izawa, M. 1980. Purification and characterization of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase from the roots of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). Agri. Biol. Chem. 44:603-614.

Oku, T., Tokunaga, T. and Hosoya, N. 1984. Nondigestibility of a new sweetener, “Neosugar”, in the rat. J. Nutr. 114:1574-1581.

Pazur, J.H. 1952. Transfructosidation reaction of an enzyme of *Aspergillus oryzae*. J. Biological. Chem. 199: 217-225.

Perrin, S., Grill, J.P. and Schneider, F. 2000. Effect of fructooligosaccharides and their monomeric components on bile salt resistance in three species of bifidobacteria. J. Applied. Microbiol. 88:968-974.

Perrin, S., Warchol, M., Grill, J.P. and Schneider, F. 2001. Fermentations of fructooligosaccharides and their components by *bifidobacterium infantis* ATCC 15697 on batch culture in semi-synthetic medium. J. Applied. Microbiol. 90:859-865.

Randhir, S. and Bhatia, I.S. 1971. Isolation and characterization of fructosyltransferase from chicory roots. Phytochemistry. 10: 495-502.

Rasic,J.L. 1983. The role of dairy foods containing Bifido and Acidophilus bacteria in nutrition and health. N. Eur. Dairy.J. 4:80-88.

Robert, J.H. and Ben, D. 1980. Sucrose:Sucrose fructosyltransferase and fructan:fructan fructosyltransferase from *Allium cepa.* Phytochemistry. 19:1017-1020.

Roberfroid, M.B., Gibson, G.R. and Delzenne, N. 1993. The biochemistry of oligofructose, a non digestible fiber: an approach to calculate its caloric value. Nutr. Rev. 51:137-146.

Roberfroid, M.B. 1997. Health and benefit of non-digestible oligosaccharides. Adv. Exp. Med. Biol. 437:311-319.

Roberfroid, M.B. 1999. Carolic value of inulin and oligofructose. J. Nutr. 129:1436S-1437S.

Sakai, K., Aramaki, K., Takasaki, M. and Inaba, H. 2001. Effect of dietary short-chain fructooligosaccharides on the cecal microflora in gastrectomized rats. Biosci. Biotec. Biochem. 65:264-269.

Satyanarayana, M.N. 1976. Biosynthesis of oligosaccharides and fructans in *Agave vera cruz* :Part 1-properties of a partially purified transylase. Indian. J. Biochem. Biophys. 13:261-266.

Satyanarayana, M.N. 1976. Biosynthesis of oligosaccharides and fructans in *Agave vera cruz* :Part 2-properties of a partially purified transylase. Indian. J. Biochem. Biophys. 13:398-407.

Shiomi, N., Yamada, J. and Izawa, M. 1976. Isolation and Identification of Asparagus fructooligosaccharides in root of *Asparagus officinalis*L. Agric. Biol. Chem. 40:567-575.

Shiomi, N., Onodera, S., Chatterton, N.J. and Harrison, P.A. 1991. Separation of fructooligosaccharide isomers by anion-exchange chromatography. Agric.Biol.Chem. 55: 1427-1428.

Song, D.D. and Jacques, N.A. 1999. Purification and enzymic properties of the fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. Biochem. J. 341:285-291.

Stoll, V.S. and Blanchard, J.S. 1990. Buffer: principle and practice. In.J.N. Abelson and M.I. Simon (eds.), Methods in enzymology Volumn 182: Guide to Protein Purification. Pp.24 – 37. New York: Academic Press.

Takeda, H., Sato, K., Kinoshita, S. and Sasaki, H. 1994. Production of 1-kestose by *Scopulariopsis brevicaulis*. J. Ferment. Bioeng. 77:386-389.

Tanni, S.D. and Michael. D.L. 1987. Gaseous response to ingestion of a poorly absorbed fructooligosaccharide sweetener. Am. J. Clin. Nutr. 46:61-65.

Williams, C.M. 1999. Effects of inulin on lipid parameters in humans. J. Nutr. 129:1471S-1473S.

Yong, J. 1998. European marketing developments in prebiotic- and probiotic-containing foodstuffs. British. J. Nutr. 2:S231-S233.

Yun, J.W. and Song, S.K. 1993. The production of high-content fructo-oligosaccharides from sucrose by the mixed-enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase. Biotech. Lett. 15:573-576.

Yun, J.W., Lee, M.G. and Song, S.K. 1994. Batch production of high content fructooligosaccharides from sucrose by the mixed enzyme system of beta fructofuraosidase and glucose oxidase. J. Ferment. Bioeng. 77:159-163.

Yun, J.W. 1996. Fructooligosaccharides-occurrence, preparation and application. Enz. Microbial. Technol. 19:107-117.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็งโปเตโตเด็กซ์โตรส (Potato Dextrose Agar)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

มันฝรั่งหั่น	200	กรัม
เด็กซ์โตรส	20	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม

เตรียมโดยนำมันฝรั่งมาล้างให้สะอาด ปอกเปลือกแล้วนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ชั่งให้ได้น้ำหนักประมาณ 200 กรัม ต้มในน้ำเดือดนาน 15-20 นาที กรองเอาแต่ส่วนน้ำด้วยผ้าขาวบาง มาเติมส่วนประกอบที่เหลือ ละลายให้เข้ากันในอ่างน้ำร้อน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่เป็นสายใย

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำตาลทราย	80	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	2	กรัม
โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.3	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.4	กรัม

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในขวดเขย่า

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

น้ำตาลทราย	150	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.3	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1	กรัม

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0

4. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในถังหมัก

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

น้ำตาลทราย	250	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.3	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1	กรัม

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข
วิธีเตรียมสารเคมีที่สำคัญที่ใช้ในการทดลอง

1. สารละลายอะซิโตรไนไตรเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

เตรียมโดยตวงอะซิโตรไนไตร ปริมาตร 70 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร

2. สารละลายกรดไดไนโตรซาลิซิลิค เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (Miller, 1959)

ในสารละลาย 1 ลิตรประกอบด้วย

กรดไดไนโตรซาลิซิลิค	10	กรัม
ฟีนอล	2	กรัม
โซเดียมซัลไฟด์	0.5	กรัม
โซเดียมไฮดรอกไซด์	10	กรัม

เก็บในขวดแก้วสีชาที่อุณหภูมิห้อง

3. สารละลายโซเดียมโพแตสเซียสทาร์เทรตเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ชั่งโซเดียมโพแตสเซียสทาร์เทรต 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 5 นอร์มอล

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บในภาชนะพลาสติก ที่อุณหภูมิห้อง

5. สารละลายซิเตรตฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Stoll, V.S. and Blanchard, J.S. , 1990)

5.1 กรดซิตริก เข้มข้น 0.1 โมลาร์

ชั่งกรดซิตริก 19.21 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

5.2 โซเดียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต เข้มข้น 0.2 โมลาร์

ชั่งโซเดียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟตเฮปตะไฮเดรต 53.65 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายข้อ 5.1 ปริมาตร 486 มิลลิลิตรและข้อ 5.2 ปริมาตร 514 มิลลิลิตรให้เข้ากันจะได้ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0

6. สารละลายวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry (Lowry, O.H. และคณะ, 1951)

6.1 สารละลาย Lowry A

6.1.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร

ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 8 กรัมละลายน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

6.1.2 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 4 กรัมละลายน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

6.1.3 สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต 1 กรัมละลายน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

6.1.4 สารละลายโซเดียมโพแตสเซียมทาร์เทรตเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

ชั่งโซเดียมโพแตสเซียมทาร์เทรต 2 กรัมละลายน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.2 โมลต่อลิตร ปริมาตร 49 มิลลิลิตร กับสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)ปริมาตร 49 มิลลิลิตรและเติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมโพแตสเซียมทาร์เทรตเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

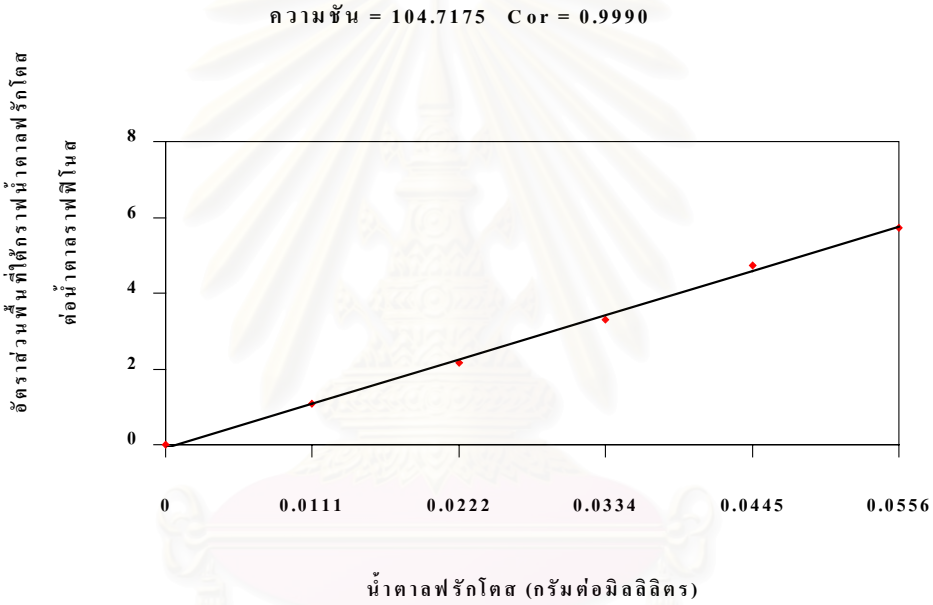
6.2 สารละลาย Lowry B

ผสม Folin-Ciocalteau reagent ในน้ำกลั่น อัตราส่วน 1 ต่อ 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

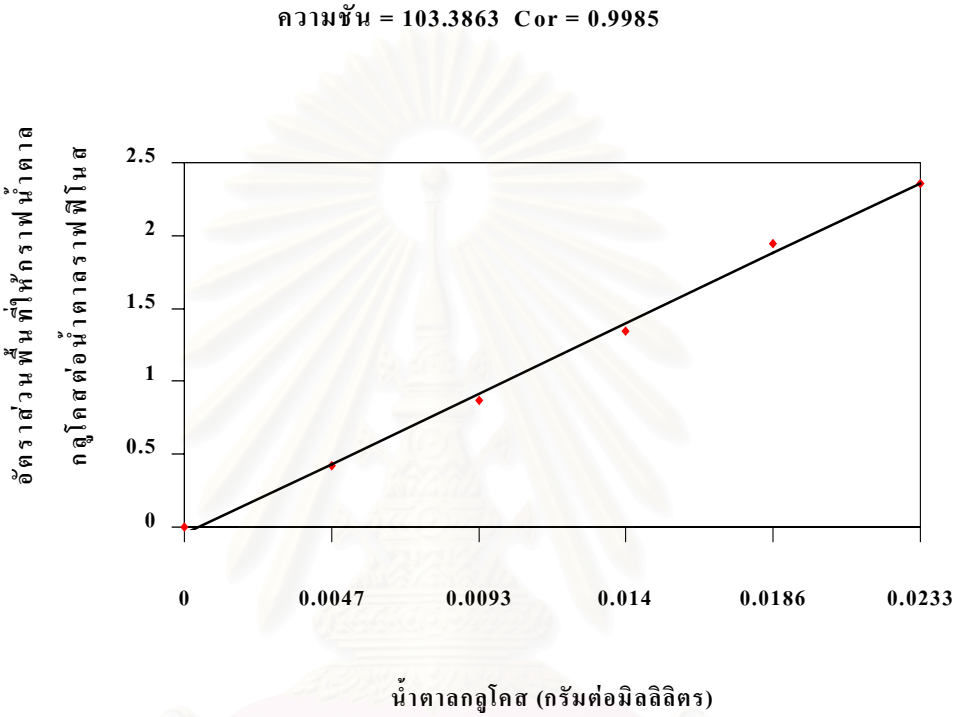
ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลฟรักโตส เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)



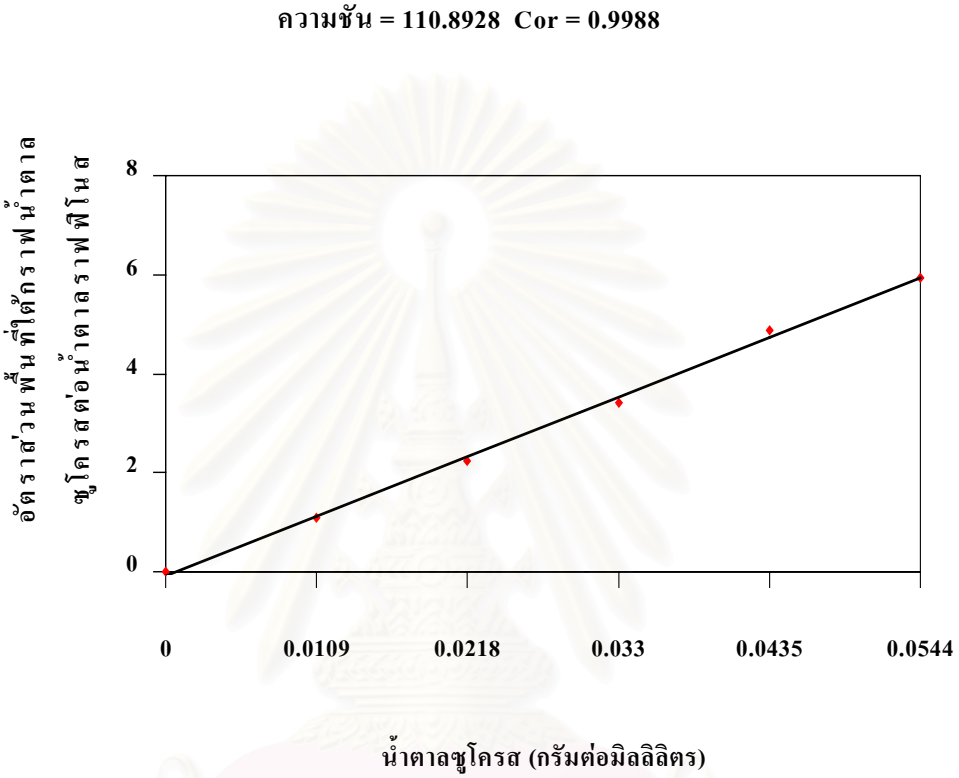
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส เมื่อวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)



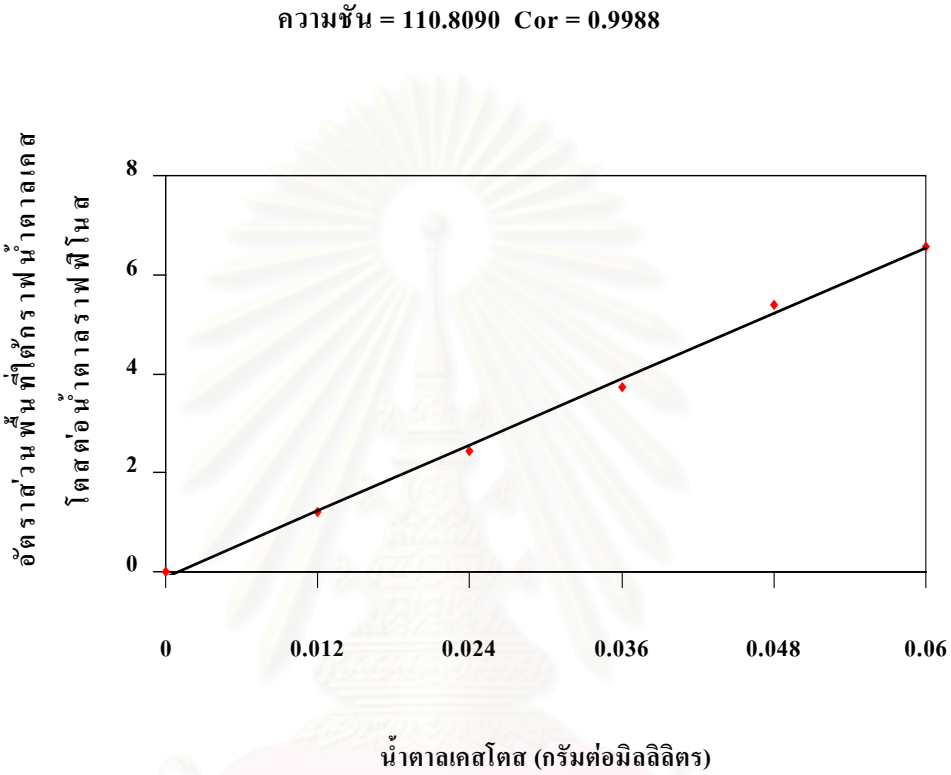
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครส เมื่อวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)



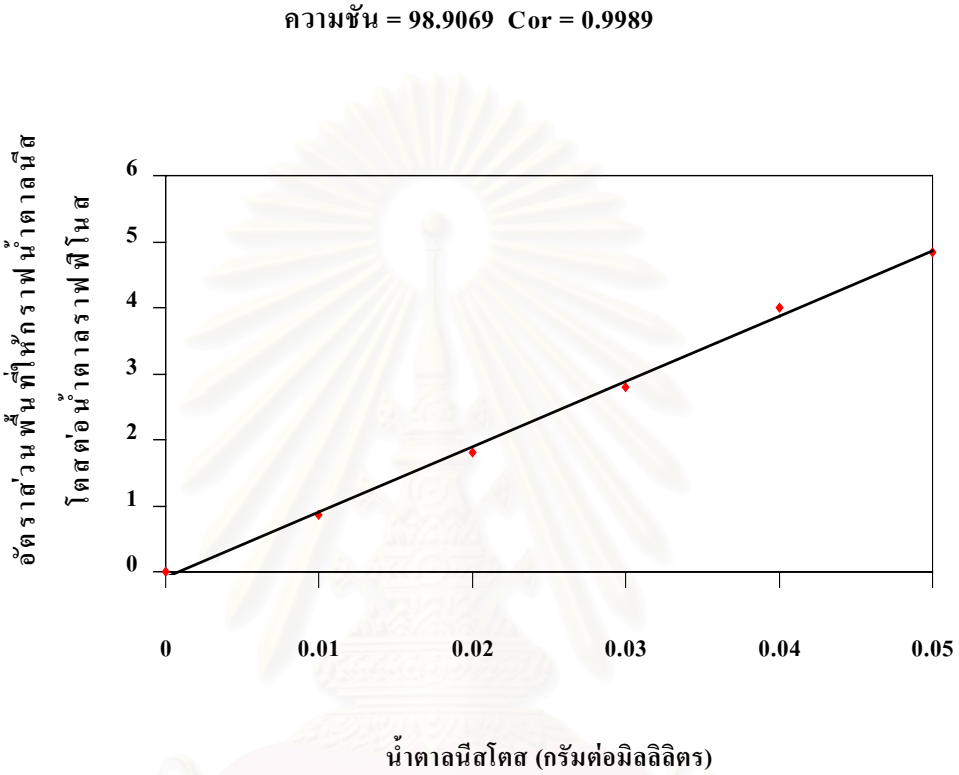
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลเคสโตส เมื่อวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)



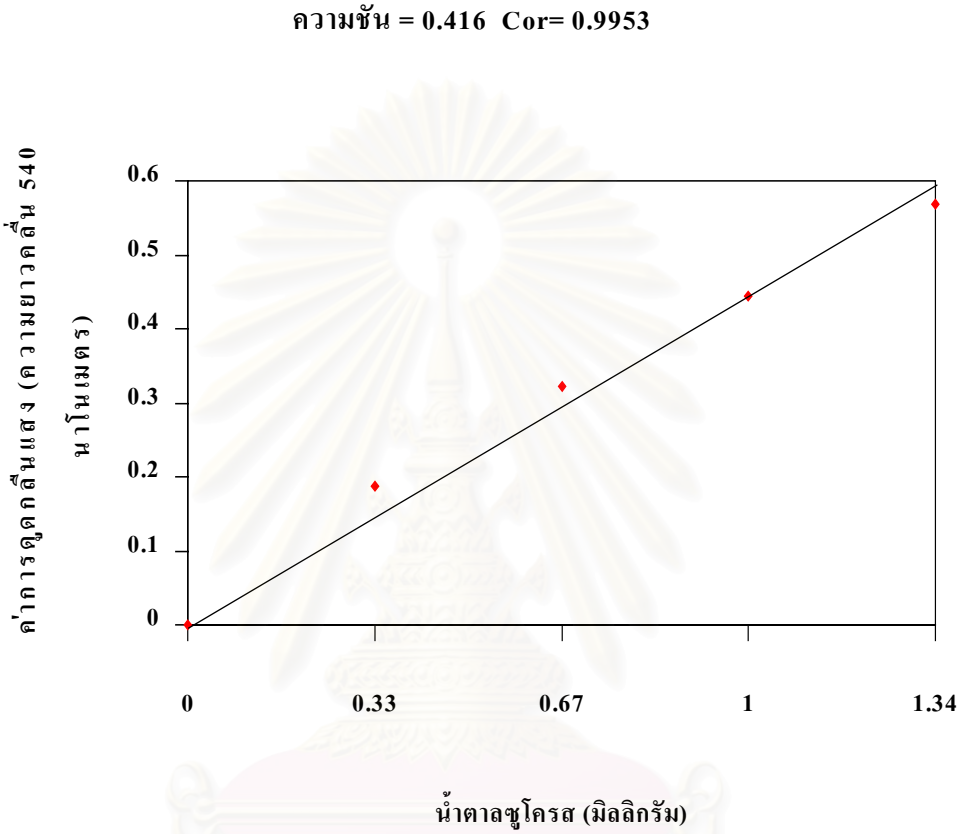
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลนีสโตส เมื่อวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)



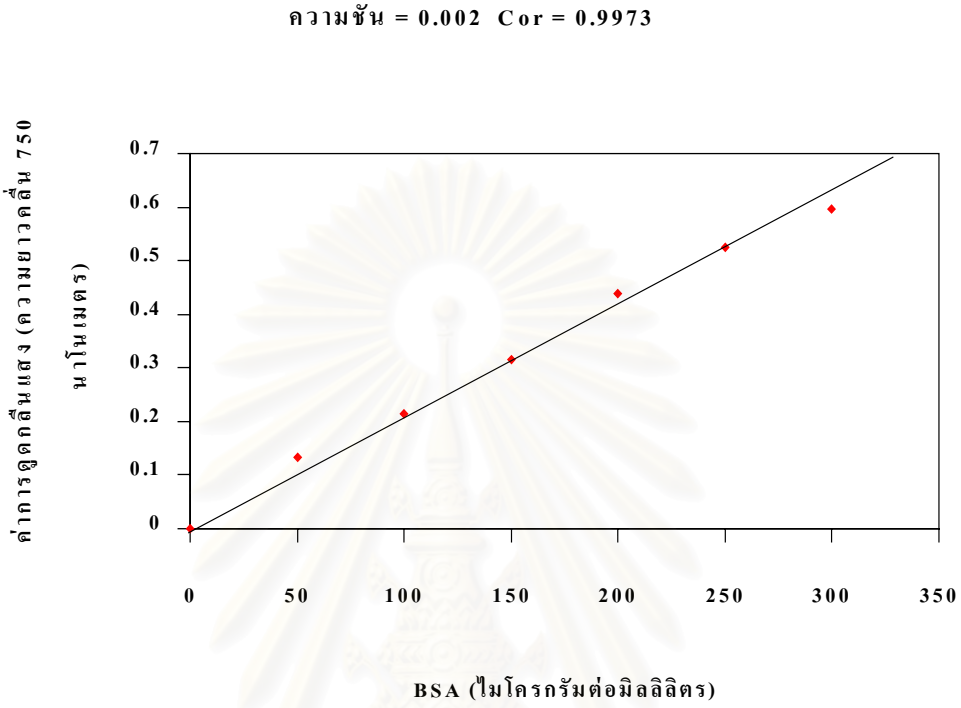
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครส เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีของ Bernfeld (Miller, 1959)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. กราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin (BSA) โดยวิธีของ Lowry



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง
วิธีการคำนวณ

1.การคำนวนปริมาณ FOS และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ โดยวิธีโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลฟรักโตส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลเคสโตส และน้ำตาลนีสโตส เมื่อวิเคราะห์โดยโครมาโตรกราฟีแบบของเหลวสมรรถนะสูง โดยมีน้ำตาลราฟฟิโนสเป็นสารมาตรฐานภายใน (ภาคผนวก ค 1-5 ตามลำดับ) สามารถคำนวนหาค่าความชันได้ นำค่าความชันที่ได้มาคำนวนหาปริมาณเคสโตส นีสโตสและน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ได้ดังตัวอย่าง

$$\text{FOS ชนิดเคสโตส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{อัตราส่วนพื้นที่ให้กราฟของเคสโตสต่อน้ำตาลราฟฟิโนส x ค่าความเจือจาง}}{\text{ความชัน}}$$

สำหรับน้ำตาลชนิดอื่น ๆ ใช้วิธีการคำนวนแบบเดียวกันโดยใช้ค่าความชัน จากภาคผนวก ค

2.การคำนวนปริมาณน้ำตาลน้ำตาลซูโครสโดยวีธีของ Bernfeld

จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครส เมื่อวิเคราะห์โดยวิธีของ Bernfeld (ภาคผนวก ค 6) สามารถคำนวนหาค่าความชันได้ นำค่าความชันที่ได้มาคำนวนหาปริมาณน้ำตาลซูโครสได้

$$\text{น้ำตาลซูโครส (กรัมต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง x ค่าความเจือจาง}}{\text{ความชัน}}$$

3.การคำนวนปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry

จากกราฟมาตรฐานของ BSA เมื่อวิเคราะห์โดยวิธีของ Lowry (ภาคผนวก ค 7) สามารถคำนวนหาค่าความชันได้ นำค่าความชันที่ได้มาคำนวนหาปริมาณโปรตีนได้

$$\text{ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง x ค่าความเจือจาง}}{\text{ความชัน}}$$

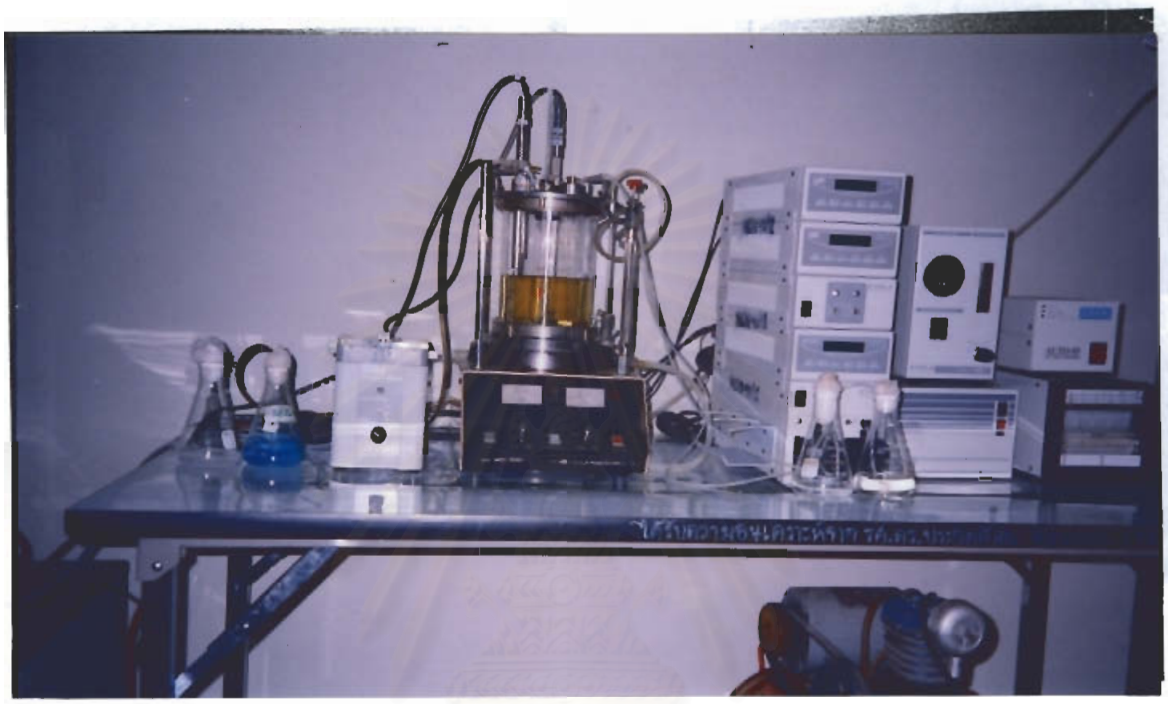
4.การคำนวณปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เติมในการเลี้ยงแบบเฟดแบท

น้ำตาลซูโครสที่เพิ่มขึ้น (ก/ล) = ซูโครสหลังเติม (ก/ล) (A) – ซูโครสก่อนเติม (ก/ล)

$$\text{เมื่อ } A = \frac{\text{ซูโครสทั้งหมดหลังเติม (กรัม)}}{\text{ปริมาตรน้ำหมักหลังเติม (ลิตร)}}$$

ภาคผนวก จ
ชุดเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. ถังหมักและชุดควบคุมสภาวะการหมัก



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ชุดศึกษาการแยกน้ำตาลโดยคอลัมน์ผงถ่านกัมมันต์ ประกอบด้วย คอลัมน์, เครื่องเก็บตัวอย่าง (Fraction collector) และเครื่องควบคุมการเติมสารละลาย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นายวีระพงษ์ พรประสาทผล เกิดวันที่ 4 ธันวาคม พ.ศ. 2520 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนอัสสัมชัญธนบุรี กรุงเทพมหานคร เมื่อปี พ.ศ. 2536 ต่อมาสำเร็จการศึกษาปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขตประสานมิตร เมื่อปีการศึกษา 2540 เข้าทำงานในตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปี พ.ศ. 2541 ถึง 2543 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ. 2543

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย