การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์แบบเฟดแบตช์จาก *Penicillium* sp. H12 โดยใช้ถังหมักชีวภาพแบบหมุน

นาย ชนภัฏฏ์ ลักษณะวิลาศ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

FED BATCH FRUCTOOLIGOSACCHARIDE PRODUCTION FROM *Penicillium* sp. H12 USING ROTARY BIOLOGICAL CONTACTOR FERMENTER

Mr. Chanapatt Luxsanavilas

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์แบบเฟดแบตช์จาก *Penicillium* sp. H12 โดยใช้ถังหมักชีวภาพแบบหมุน
โดย	นายชนภัฏฏ์ ลักษณะวิลาศ
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

……คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

……....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)

……กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

……กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิววรรณ พูลพันธุ์)

ชนภัฏฏ์ ลักษณะวิลาศ : การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์แบบเฟดแบตช์จาก *Penicillium* sp. H12 โดยใช้ถังหมักชีวภาพแบบหมุน (FED BATCH FRUCTOOLIGOSACCHARIDE PRODUCTION FROM *Penicillium* sp. H12 USING ROTARY BIOLOGICAL CONTACTOR FERMENTER), อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์, 135 หน้า.

ทำการศึกษาการงอกของสปอร์ *Penicillium* sp. H12 เพื่อนำไปเป็นหัวเชื้อในการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ พบว่าชั่วโมงที่ 10 มีการงอกของสปอร์ในระยะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการจับตัวบนวัสดุบนแผ่นหมุน และวัสดุที่ใช้ติดบนแผ่นหมุนที่เหมาะสมคือผ้าขาวบาง สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์แบบกะในถังหมักชีวภาพแบบหมุน คือ ใช้หัวเชื้อ *Penicillium* sp. H12 อายุ 10 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของถังหมัก ให้แผ่นหมุนจมลงใต้ระดับอาหาร 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี อัตราการหมุน 2 รอบต่อนาที ให้ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตรควบคุมความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเป่าอากาศปลอดเชื้อ 1.25 ลิตรต่อนาที สามารถผลิตเคสโทสได้สูงที่สุดปริมาณ 124.98 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 20 ผลิตนิสโทสได้สูงสุด 106.75 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 44 และปริมาณของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวมได้สูงสุด 197.83 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 20 ของการผลิต ได้ผลิตภัณฑ์คิดเป็น 79.13 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น และมี productivity 9.89 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากนั้นทำการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์แบบเฟดแบตช์ในถังหมักชีวภาพแบบหมุน พบว่า สามารถผลิตเคสโทสได้สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 12 ปริมาณ 106.75 กรัมต่อลิตร และผลิตนิสโทสได้สูงสุด 18.90 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 12 และปริมาณของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวมได้สูงสุด 123.63 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 12 ของการผลิต ได้ผลิตภัณฑ์คิดเป็น 49.45 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น และมี productivity 10.30 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต…….....

สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม..ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา..2553…….....

5072250823 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: FRUCTOOLIGOSACCHARIDE / *Penicillium* sp. H12/ ROTARY BIOLOGICAL CONTACTOR FERMENTER / FED BATCH

CHANAPATT LUXSANAVILAS : FED BATCH FRUCTOOLIGOSACCHARIDE PRODUCTION FROM *Penicillium* sp. H12 USING ROTARY BIOLOGICAL CONTACTOR FERMENTER. ADVISOR : ASST. PROF. CHARNWIT KOSITANONT, Ph.D., 135 pp.

Penicillium sp. H12 spores germination were studied for using as inoculum for fructooligosaccharide production. The optimal time for spore germination was 10 h. Cheesecloth was the best roller plate cover material for fungal attachment among those studied. In batch production studies, 40% inoculum of the 10 h spore culture, 40% of the roller plate radius submerged, rolling speed of 2 rpm, initial sucrose concentration 250 g/l, pH 5.0, 30^{o}C and aeration rate 1.25 l/min were used for fructooligosaccharide production. The maximum kestose of 124.98 g/l was obtained at 20th hour. While maximum nystose and total fructooligosaccharide were 106.75 and 197.83 g/l at 44th and 20th hour, respectively. The total product yield was 79.13% and productivity was 9.89 g/l/h. In fed batch culture, the kestose of 135.13 g/l was archieved at the 20th hour. Nystose and total fructooligosaccharide of 112.99 g/l and 221.66 g/l were found at 40th and 24th hour respectively. The total product yield was 49.45 % and productivity was 10.30 g/l/h.

Department : .....Microbiology…….....Student's Signature.....

Field of Study : .....Industrial Microbiology.....Advisor's Signature.....

Academic Year : ..2010…….....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้ให้ความรู้ ความรัก ความเมตตา คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ ในการทำวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบ ตลอดจนให้คำแนะนำต่างๆ

กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร .ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิววรรณ พูลพันธุ์ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบตลอดจนให้คำแนะนำต่างๆ และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ คณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และอำนวยความสะดวกต่างๆ แก่ผู้วิจัย รวมถึงอาจารย์ทุกท่านที่ผ่านมาในชีวิต ที่ได้อบรมสั่งสอนมาจนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบพระคุณ ทุน 90 ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รุ่นที่ 12 (2/2553) ภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์แบบเฟดแบตช์จาก *Penicillium* sp. H12 โดยใช้ถังหมักชีวภาพแบบหมุน (FED BATCH FRUCTOOLIGOSACCHARIDE PRODUCTION FROM *Penicillium* sp. H12 USING ROTARY BIOLOGICAL CONTACTOR FERMENTER)

ขอขอบคุณคณะบัณฑิตวิทยาลัย สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ที่ให้ความเอื้อเฟื้อสถานที่ทำงานวิจัย รวมทั้งเครื่องมือทำงานวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านของบัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวกต่างๆ

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ทุกคนในภาคจุลชีววิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งห้องปฏิบัติการ 453 และ 402 สำหรับประสบการณ์ชีวิตที่ดี การแบ่งปันรอยยิ้ม เสียงหัวเราะ ความช่วยเหลือ กำลังใจ และความหวังดีที่มีให้เสมอมา

ท้ายที่สุดขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และน้องสาวที่อยู่เคียงข้าง ให้การสนับสนุน การช่วยเหลือ และแบ่งเบาความกังวลใจ รวมถึงให้กำลังใจเป็นอย่างดีในทุกๆ ด้านแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ญ

สารบัญภาพ..... ฎ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... ฒ

บทที่

1. บทนำ..... 1

1.1 ประวัติความเป็นมา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

1.3 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย..... 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3

2. ปริทัศน์วรรณกรรม..... 4

2.1 คุณสมบัติของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์..... 12

2.2 ความสัมพันธ์ของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ กับจุลินทรีย์ในลำไส้..... 14

2.3 ผลของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ต่อภาวะโภชนาการและจุลินทรย์ในร่างกาย..... 14

2.4 ประโยชน์ของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์..... 16

2.5 การนำฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ไปใช้ในเชิงพาณิชย์..... 19

2.6 ปริมาณของออลิโกแซ็กคาไรด์ที่เหมาะสมและผลข้างเคียงต่อมนุษย์..... 20

2.7 กระบวนการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์..... 21

2.8 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์จากน้ำตาลซูโครส (Transfructosylation)..... 21

2.9 เอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดส (Fructofuranosidase)..... 24

2.10 สมบัติของเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดส (Fructofuranosidase)..... 26

2.11 แหล่งของเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดส..... 28

2.12 การศึกษาการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์..... 32

บทที่ หน้า

2.13 การศึกษาการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในประเทศไทย..... 39
2.14 ระบบบำบัดน้ำเสียแบบแผ่นหมุนชีวภาพ (Rotating Biological Contactor:RBC)..... 41
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินการทดลอง..... 46
3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง..... 46
3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง..... 48
3.3 วิธีการดำเนินการทดลอง..... 49
3.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ..... 49
3.3.2 ถังหมักชีวภาพแบบหมุน (Rotary Biological Contactor Fermenter)..... 50
3.3.3 จุลินทรีย์..... 51
3.3.4 การเก็บรักษาเชื้อรา..... 51
3.3.5 การเตรียมหัวเชื้อจากสปอร์สำหรับผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์.. 51
3.3.6 ศึกษาชนิดของวัสดุที่เหมาะสมต่อการเกาะติดของเชื้อราบนแผ่นหมุน..... 52
3.3.7 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ โดยใช้ถังหมักชีวภาพแบบหมุนที่ประกอบขึ้นแบบกะ..... 53
3.3.8 ผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในถังหมักชีวภาพแบบหมุนที่ประกอบขึ้นแบบเฟดแบตช์..... 55
3.3.9 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล กลูโคส ฟรักโทส ซูโครส และฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)..... 56
4. ผลการทดลอง..... 58
4.1 ถังหมักชีวภาพแบบหมุนสำหรับผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ และศึกษาสมรรถนะของถัง..... 58
4.2 ศึกษาอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการเกาะบนแผ่นหมุน..... 64
4.3 ศึกษาชนิดของวัสดุที่เหมาะสมต่อการเกาะติดของเชื้อราบนแผ่นหมุน..... 69
4.4 ภาวะที่เหมาะสมในการการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์แบบกะในถังหมักชีวภาพแบบหมุน..... 75

บทที่ หน้า

4.5 ผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์แบบเฟดแบตช์..... 94
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 99
รายการอ้างอิง..... 104
ภาคผนวก..... 112
ภาคผนวก ก สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 113
ภาคผนวก ข สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง..... 115
ภาคผนวก ค การเตรียมสารละลายคลอร๊อกซ์ (Clorox)..... 116
ภาคผนวก ง กราฟมาตรฐาน..... 117
ภาคผนวก จ โครมาโตแกรมของน้ำตาลที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐาน..... 122
ภาคผนวก ฉ ค่ารีเทนชั่นไทม์ของน้ำตาลชนิดต่างๆ..... 127
ภาคผนวก ช ขั้นตอนการเก็บเชื้อก่อนและหลังการผลิต..... 128
ภาคผนวก ซ การเกาะของเชื้อ Penicillium sp. H12 บนแผ่นหมุนชีวภาพระหว่างการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์..... 129
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 135

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
2.1	ประเภทของคาร์โบไฮเดรตตามขนาดโครงสร้าง (Degree of Polymerization, DP)...	10
2.2	ผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการอยู่รอดของ *Bifidobacterium infantis, Essherichia coli* และ *Clostridium perfringent*.....	18
2.3	ชนิดและส่วนประกอบของนีโอซูการ์โดยประมาณ.....	20
2.4	ความสัมพันธ์ของน้ำตาลเคสโทส ที่เกิดขึ้นกับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น ที่เวลา 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 5.0.....	27
2.5	ผลของน้ำตาลกลูโคสต่อเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดสเมื่อเติมน้ำตาลกลูโคสหรือ ฟรักโทสลงไปจะทำให้เอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดสลดลง.....	27
2.6	ชนิดของพืชที่สร้างเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดสได้.....	29
2.7	ชนิดของจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดสได้.....	30
2.8	การเปรียบเทียบปริมาณฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากการใช้เอนไซม์ ฟรักโทฟูราโนซิเดสและใช้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสร่วมกับเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดส (Yun และคณะ, 1993).....	36
3.1	ความเข้มข้นต่างๆของน้ำตาลแต่ละชนิดในการทำกราฟมาตรฐาน.....	57
4.1	น้ำหนักแห้งของเชื้อที่ติดที่ผ้าชนิดต่างๆ.....	73
4.2	เปรียเทียบปริมาณการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ระหว่างการผลิตโดยใช้อัตราในการหมุน 2 3 และ 4 รอบต่อนาที.....	80
4.3	เปรียเทียบปริมาณการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ระหว่างการผลิตโดยใช้ระดับการจมตัวของแผ่นหมุนเป็น 20 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์.....	85
4.4	เปรียเทียบปริมาณการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ระหว่างการผลิตโดยใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 30 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของถังหมัก.....	90
4.5	เปรียเทียบปริมาณการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ระหว่างการผลิตโดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นเป็น 250 และ 300 กรัมต่อลิตร.....	94
4.6	เปรียบเทียบปริมาณการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ระหว่างระหว่างการผลิตแบบกะและแบบเฟดแบตช์.....	97
5.1	แสดงปริมาณฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้สูงสุดจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบมีใบกวน (วีระพงษ์ พรประสาทผล, 2545) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิไดซ์เบด (กิติภัทร ลิ้มประเสริฐ, 2548) และ ถังหมักชีวภาพแบบหมุน (ชนภัฏฏ์ ลักษณะวิลาศ, 2553) ในการผลิตแบบกะ.....	102

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	ระบบนิเวศน์ภายในลำไส้ใหญ่มนุษย์ โดยกลุ่มแบคทีเรียสีแดงจะให้โทษแก่สุขภาพมนุษย์ สีเขียวเป็นกลุ่มที่ให้ประโยชน์ และแบคทีเรียทีเรียบางกลุ่มที่มีทั้งประโยชน์และโทษจะอยู่ตรงกลาง……	4
2.2	แบคทีเรียโพรไบโอติกที่นิยมใส่ลงในผลิตภัณฑ์อาหาร……	7
2.3	ออลิโกแซ็กคาไรด์ที่ใช้เป็นพรีไบโอติกที่วางขายกันอยู่ในท้องตลาดทั่วไป……	8
2.4	โครงสร้างของ Galactosylsucrose……	10
2.5	โครงสร้างของน้ำตาลและฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดต่างๆ……	12
2.6	เจริญเติบโตของ *Bifidobacterium intfants Escherichia coli* และ *Clostridium perfringen* เมื่อทำการเลี้ยงรวมกันโดยให้น้ำตาลกลูโคสเป็นอาหารและให้ ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์เป็นอาหาร……	19
2.7	สมการการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดย Edelman และ Jefford……	22
2.8	สมการการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดย Jung และคณะ……	23
2.9	แบบจำลองของเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดสในการสร้างฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์…..	24
2.10	รูปแบบการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดย *Aspergillus japonicus* (Lee และคณะ, 2001)……	31
2.11	รูปของถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดมีใบกวน (ซ้าย) และชนิดฟลูอิไดซ์เบด (ขวา)……	40
2.12	ระบบบำบัดน้ำเสียแบบแผ่นหมุนชีวภาพ (www.pcd.go.th).....	41
2.13	ส่วนประกอบต่างๆของระบบบำบัดน้ำเสียแบบแผ่นหมุนชีวภาพ (www.pcd.go.th).	43
2.14	ระบบบำบัดน้ำเสียแบบแผ่นหมุนชีวภาพของเทศบาลตำบลหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (www.pcd.go.th).....	43
3.1	ถังหมักชีวภาพแบบหมุน ขนาดความจุ 4 ลิตร……	50
3.2	โคโลนีของ *Penicillium* sp. H12 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน……	51
3.3	สปอร์ของ *Penicillium* sp. H12 หลังจากเขี่ยด้วยน้ำปลอดประจุผสมทวีน 80……..	52
3.4	ผ้า ลินิน ผ้าขาวบาง และผ้ายืด ตามลำดับ……	53
3.5	เครื่อง HPLC ยี่ห้อ Agilent รุ่น LC1200……	57
4.1	แผ่นหมุนชีวภาพ……	58
4.2	ถังหมัก……	59

รูปที่ หน้า

4.3 ถังหมักที่รองด้วยแผ่นโฟม..... 59
4.4 ฐานรองถังหมักและมอเตอร์ที่ใช้ปรับความเร็วในการหมุนของแผ่นหมุน..... 60
4.5 แผ่นอะคริลิกครอบ..... 61
4.6 การประกอบถังหมักชีวภาพแบบหมุน..... 61
4.7 แสดงถังหมักชีวภาพแบบหมุนที่ต่อเข้ากับชึดควบคุมต่างๆ..... 63
4.8 ถังหมักชีวภาพแบบหมุนที่ประกอบเสร็จเรียบร้อย..... 63
4.9 ลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องที่กำลังขยาย 40x และแสดงเชื้อราที่ย้อมด้วยสี Lacto phenol cotton blue ตามลำดับ..... 64
4.10 การงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 2 พบว่าไม่มีการงอกของสปอร์..... 65
4.11 การงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 4 พบว่าไม่มีการงอกของสปอร์..... 65
4.12 การงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 6 พบว่าไม่มีการงอกของสปอร์..... 65
4.13 การงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 8 พบว่าเริ่มมีการงอกของสปอร์..... 66
4.14 การงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 10 พบว่าสปอร์มีการงอกในช่วงที่เหมาะสม..... 66
4.15 การงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 12 พบว่าสปอร์มีการงอกเป็นสายใยยาวจนเกินไป..... 66
4.16 การงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 14 พบว่าสปอร์มีการรวมกันเป็นกลุ่มก้อน..... 67
4.17 การงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 16 พบว่าสปอร์มีการรวมกันเป็นกลุ่มก้อน..... 67
4.18 การงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 18 พบว่าสปอร์มีการรวมกันเป็นกลุ่มก้อน..... 67
4.19 การงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 20 พบว่าสปอร์มีการรวมกันเป็นกลุ่มก้อน..... 68
4.20 การงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 22 พบว่าสปอร์มีการรวมกันเป็นกลุ่มก้อน..... 68
4.21 การงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 24 พบว่าสปอร์มีการรวมกันเป็นกลุ่มก้อน..... 68
4.22 ผ้ายืด (1) ผ้ายืดปกติ (2) ผ้ายืดผ่านกล้อง SEM กำลังขยาย 35 เท่า (3) ผ้ายืดผ่านกล้อง SEM กำลังขยาย 500 เท่า..... 69
4.23 ผ้าลินิน (1) ผ้าลินินปกติ (2) ผ้าลินินผ่านกล้อง SEM กำลังขยาย 35 เท่า (3) ผ้าลินินผ่านกล้อง SEM กำลังขยาย 500 เท่า..... 70
4.24 ผ้าขาวบาง (1) ผ้าขาวบางปกติ (2) ผ้าขาวบางผ่านกล้อง SEM กำลังขยาย 35 เท่า (3) ผ้าขาวบางผ่านกล้อง SEM กำลังขยาย 500 เท่า..... 70
4.25 การเลี้ยงเชื้อในถังหมักชีวภาพแบบหมุนโดยแผ่นหมุนชีวภาพแต่ละอันจะติดด้วยผ้ายืด ผ้าขาวบาง และผ้าลินิน ตามลำดับ..... 71
4.26 การเกาะติดของเชื้อบนแผ่นหมุนชีวภาพที่ติดด้วยผ้ายืด..... 71

รูปที่ หน้า

4.27 การเกาะติดของเชื้อบนแผ่นหมุนชีวภาพที่ติดด้วยผ้าขาวบาง..... 72
4.28 การเกาะติดของเชื้อบนแผ่นหมุนชีวภาพที่ติดด้วยผ้าลินิน..... 72
4.29 ชิ้นของผ้าชนิดต่างๆขนาด 1×1 นิ้ว ก่อนนำไปอบแห้ง..... 72
4.30 ชิ้นของผ้าขาวบางที่นำไปส่งตรวจวิเคราะห์..... 73
4.31 ชิ้นของผ้าขาวบางที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด..... 74
4.32 การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำ
การผลิตโดยใช้อัตราการหมุนที่ 2 รอบต่อนาที..... 77
4.33 การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำ
การผลิตโดยใช้อัตราการหมุนที่ 3 รอบต่อนาที..... 78
4.34 การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำ
การผลิตโดยใช้อัตราการหมุนที่ 4 รอบต่อนาที..... 79
4.35 การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำ
การผลิตโดยใช้ระดับการจมลงใต้ระดับอาหาร 20 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี 82
4.36 การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำ
การผลิตโดยใช้ระดับการจมลงใต้ระดับอาหาร 30 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี..... 83
4.37 การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำ
การผลิตโดยใช้ระดับการจมลงใต้ระดับอาหาร 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี..... 84
4.38 การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำ
การผลิตโดยใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 30 เปอร์เซ็นต์..... 86
4.39 การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำ
การผลิตโดยใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 40 เปอร์เซ็นต์..... 88
4.40 การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำ
การผลิตโดยใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์..... 89
4.41 การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำ
การผลิตโดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่ความเข้ม 250 กรัมต่อลิตร... 92
4.42 การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำ
การผลิตโดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่ความเข้ม 300 กรัมต่อลิตร... 93
4.43 การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำ
การผลิตแบบกะโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.3.1..... 95

รูปที่ หน้า

4.44 การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำการผลิตแบบเฟดแบตช์..... 97

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

^{o}c	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซ็นต์
rpm	=	รอบต่อนาที
vvm	=	ปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อปริมาตรอากาศต่อนาที
g/l	=	กรัมต่อลิตร
g/l/h	=	กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง
:	=	อัตราส่วนต่อ
cm.	=	เซนติเมตร
mm.	=	มิลลิเมตร
l/min	=	ลิตรต่อนาที

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันสารให้ความหวานที่จัดอยู่ในกลุ่มของออลิโกแซ็กคาไรด์ได้เข้ามามีบทบาทอย่างมากในอุตสาหกรรมน้ำตาล (Yun และคณะ, 1994) เนื่องจากสารเหล่านี้มีข้อได้เปรียบหลายประการ ได้แก่ คุณสมบัติด้านการป้องกันฟันผุ สามารถใช้ได้กับผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน เป็นสารที่ให้พลังงานต่ำซึ่งเหมาะสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก และยังเป็นสารเร่งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในระบบทางเดินอาหารอีกด้วย (Hidaka และคณะ, 1998) ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์มีรสชาติใกล้เคียงกับน้ำตาลซูโครสที่ใช้กันอยู่ทั่วไปจึงจัดเป็นสารให้ความหวานที่เป็นอีกหนึ่งทางเลือกของอุตสาหกรรมอาหารในอนาคต โดยฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์จะให้ความหวานเพียง 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลซูโครสเท่านั้น และให้พลังงานต่ำประมาณ 0.25 กิโลแคลอรีต่อกรัม (Bornet, 1994) ในขณะที่น้ำตาลซูโครสให้ความหวานถึง 4 กิโลแคลอรีต่อกรัม นอกจากนี้ ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ยังช่วยลดระดับคอเลสเตอรอล ฟอสโฟลิปิด และไตรกลีเซอไรด์ ในเลือดได้ ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ดูดความชื้นเล็กน้อย มีความหนืดมากกว่าน้ำตาลซูโครสในตัวทำละลายเดียวกันที่ความเข้มข้นเท่าๆกัน มีความเสถียรที่ pH 4.0-7.0 และทนความร้อนได้ถึง 140 องศาเซลเซียส ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์สามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหารและการไฮโดรไลซิสโดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ได้ (Hidaka และคณะ, 1998) และเนื่องจากฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ไม่ถูกย่อยในลำไส้ ดังนั้นจึงมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก เป็นประโยชน์ต่อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้เช่น Bifidobacteria และ Lactobacilli ซึ่งเป็นโพรไบโอติก ที่สามารถย่อยสลายฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ไปใช้ทำให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกาย (Wang และ Gibson, 1993) ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์เป็นน้ำตาลที่ไม่ถูกรีดิวซ์ และไม่เกิดปฏิกิริยา Caramelization และ Maillard reaction

ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ (FOS) เป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลฟรักโทสโดยมีความยาวของสายพอลิเมอร์ระหว่าง 2 - 35 หน่วย ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์เกิดจากน้ำตาลซูโครสที่ผ่านกระบวนการ ทรานฟรักโทซิลเลชัน (Transfructosylation) เป็นปฏิกิริยาการย้ายน้ำตาลฟรักโทสมาต่อกับน้ำตาลซูโครสโดยเอนไซม์หลายชนิด เช่น บีตาฟรักโทฟิวราโนซิเดส (β-fructofuranosidase) หรือเรียกโดยทั่วไปว่าฟรักโทซิลทรานเฟอเรส (Fructosyltransferase) และบีตาฟรักโททรานเฟอเรส (β-fructotransferase) เป็นต้น (Hidaka และคณะ, 1998) โดยเอนไซม์เหล่านี้สามารถแยกได้จากพืช เช่น แอสพารากัส (Shiomi และคณะ, 1980) Jerusalem

artichoke (Edelman และ Dickerson, 1966) และแยกได้จากแบคทีเรียหรือเชื้อราบางชนิด เช่น *Arthrobactor* sp. (Fujita และคณะ, 1990) *Bacillus macerans* (Kim และคณะ, 1998) *Aspergillus* sp. (Hidaka และคณะ, 1998) และ *Penicillium* sp. H12 (เสาวนีย์ ศิริรูป, 1996)

$$F - G + F - G \longrightarrow F_2 G + G \quad (1)$$

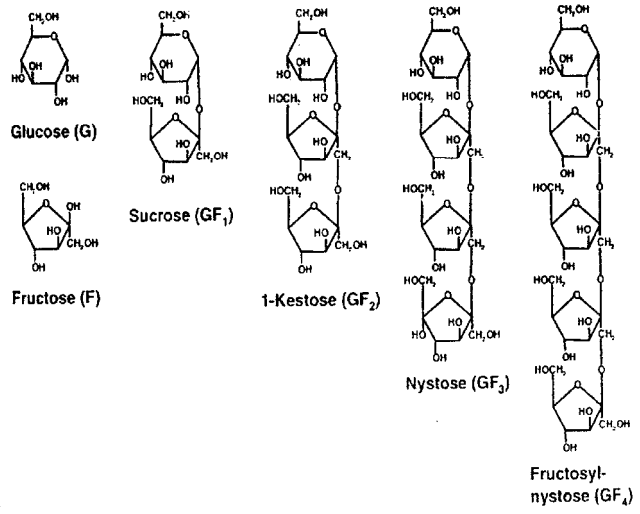
$$F_2 G + F - G \longrightarrow F_3 G + G \quad (2)$$

$$(GF - F_n + GF_m \longrightarrow GF - F_{n-1} + GF_{m+1})$$

โดย n = donor molecule , m = acceptor molecule

<u>รูปที่1</u> แสดงการเกิดปฏิกิริยา ทรานฟรักโทซิลเลชัน (Edelman และ Dickerson, 1966)

ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์มีหลายชนิด เช่น เคสโตส (Kestose) นิสโตส (Nystose) และฟรักโทฟิวแรนโนซิลนิสโตส (Fructofuranosyl nystose) โดยน้ำตาลฟรักโทสแต่ละโมเลกุลจับกันด้วยพันธะบีตา 2-1 (β 2–1) และมีสูตรทั่วไปคือ GF_n เมื่อ n มีค่าตั้งแต่ 2 ถึง 4 โดยที่ G หมายถึงน้ำตาลกลูโคสและ F หมายถึงน้ำตาลฟรักโทส เมื่อ n มีค่าเท่ากับ 2 จะได้ เคสโตส (GF_2) เมื่อ n มีค่าเท่ากับ 3 จะได้ นิสโตส (GF_3) และเมื่อ n มีค่าเท่ากับ 4 จะได้ ฟรักโทฟิวแรนโนซิลนิสโตส (GF_4) (Yun, 1996)



<u>รูปที่2</u> แสดงโครงสร้างของน้ำตาลชนิดต่างๆ และ ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ทั้ง 3 ชนิด (Crittenden และ Playne, 2002)

การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เชื้อรา *Penicillium* sp. H12 ในถังแบบมีใบกวน (Stirred tank reactor) มีข้อเสียคือการเกิดแรงเฉือนจากใบกวนทำให้เซลล์และสายใยของเชื้อราถูกทำลายระหว่างการผลิต และเมื่อเชื้อรามีการเจริญมากขึ้นจะต้องมีการเพิ่มอัตราการให้อากาศและอัตราการหมุนของใบกวนทำให้ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้น โดยปัญหาเรื่องแรงเฉือนที่เกิดจากใบกวนสามารถแก้ได้โดยใช้ถังหมักชนิดแอร์ลิฟต์รีแอคเตอร์ (Air lifted reactor) ซึ่งให้อากาศจากด้านล่างและไม่มีใบกวน จะให้ผลผลิตของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในปริมาณที่สูงขึ้นแต่ต้องเป่าอากาศในปริมาณมาก และเมื่อทำการผลิตเป็นเวลานานทำให้มีสายใยของราจับกันหนาแน่นมากจนเกินไปจนเกิดการอุดตันของถังหมัก ดังนั้นเพื่อลดปัญหาเรื่องการเป่าอากาศในปริมาณมากซึ่งจะทำให้มีต้นทุนในการผลิตสูง และการอุดตันเนื่องจากเส้นใยราจึงใช้ถังหมักชีวภาพแบบหมุนในการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ซึ่งมีข้อดีคือจะช่วยให้อากาศถ่ายเทในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี ช่วยเพิ่มปริมาณออกซิเจนในถังหมัก ใช้พลังงานต่ำในการผลิต และสามารถพัฒนาระบบการผลิตให้มีประสิทธิภาพในระดับอุตสาหกรรมต่อไปได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดย *Penicillium* sp. H12 ในถังหมักชีวภาพแบบหมุน (Rotary Biological Contactor Fermenter)

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. ประกอบถังหมักชีวภาพแบบหมุน สำหรับผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ และศึกษาสมรรถนะของถัง
2. ศึกษาอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการเกาะบนแผ่นหมุน
3. ศึกษาชนิดของวัสดุที่เหมาะสมต่อการเกาะติดของเชื้อราบนแผ่นหมุน
4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้ถังหมักชีวภาพแบบหมุนที่ประกอบขึ้นแบบกะ
5. ผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในถังหมักชีวภาพแบบหมุนที่ประกอบขึ้นแบบเฟดแบตช์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

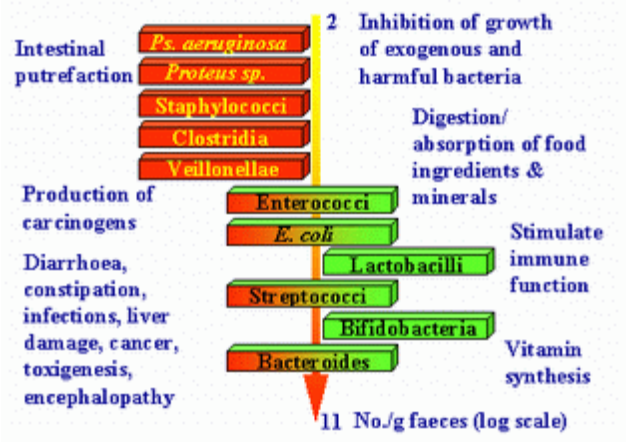
1.ได้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์แบบเฟดแบตช์โดย *Penicillium* sp. H12 ในถังหมักชีวภาพแบบหมุน

2. เป็นประโยชน์ในการพัฒนากระบวนการหมักแบบเฟดแบตช์ต่อไป

บทที่ 2

ปริทรรศน์วรรณกรรม

ในปัจจุบันกระแสความนิยมอาหารสุขภาพ (Functional food) เพิ่มมากขึ้นและผลิตภัณฑ์อาหารประเภทนี้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตามร้านอาหารเพื่อสุขภาพหรือซุปเปอร์มาเก็ตโดยเฉพาะในแถบยุโรปหรือญี่ปุ่นเช่น น้ำอัดลมหรือน้ำผลไม้ที่เติมแคลเซียมหรือวิตามินซีลงไปหรือในผลิตภัณฑ์น้ำมันที่เติมสารไฟโคสเตอรอลเพื่อป้องกันการดูดซึมคอเลสเตอรอลและเติมวิตามินลงไป อาหารสุขภาพเป็นหนึ่งในอาหารเพื่อสุขภาพที่ให้ประโยชน์เฉพาะด้าน เช่น ลดคอเลสเตอรอล เพิ่มแร่ธาตุและวิตามิน อาหารสุขภาพประเภทหนึ่งที่ได้รับความสนใจในขณะนี้คือ อาหารที่ช่วยให้ระบบการย่อยหรือระบบทางเดินอาหารทำงานได้ดีขึ้น ระบบทางเดินอาหารเริ่มจากปากจนถึงทวารหนัก ตลอดระบบทางเดินอาหารจะมีจุลินทรีย์อาศัยอยู่โดยเฉพาะแบคทีเรีย จำนวนแบคทีเรียในแต่ละส่วนจะแตกต่างกันไป แต่ที่พบมากที่สุดคือ ลำไส้ใหญ่ส่วนกลาง (Colon) ซึ่งจะมีอัตราการย่อยสลายอาหารมากกว่าส่วนอื่นๆ ของระบบทางเดินอาหาร อีกทั้งจุลินทรีย์ภายในลำไส้มีทั้งที่ให้ประโยชน์และให้โทษ ถ้าเราดูแลจัดการกับกลุ่มจุลินทรีย์เหล่านี้ไม่ดีจะทำให้เกิดโรคเรื้อรังต่างๆ ได้ เช่น ภาวะลำไส้ใหญ่อักเสบ (Ulcerative colitis) โรคโครห์น (Crohn's disease) และ โรค Irritable Bowel Syndrome (IBS) โดยการปรับเปลี่ยนระบบนิเวศกลุ่มจุลินทรีย์ภายในลำไส้อย่างเหมาะสมจะช่วยให้สุขภาพดีขึ้น



รูปที่ 2.1 แสดงระบบนิเวศน์ภายในลำไส้ใหญ่มนุษย์ โดยกลุ่มแบคทีเรียด้านซ้ายจะให้โทษแก่สุขภาพมนุษย์ ด้านขวาเป็นกลุ่มที่ให้ประโยชน์ และแบคทีเรียทีเรียบางกลุ่มที่มีทั้งประโยชน์และโทษจะอยู่ตรงกลาง (Rastall และ Gibson, 2004)

สารให้ความหวานแทนน้ำตาล ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจที่จะนำมาทำผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ และยังเหมาะกับผู้ที่ควบคุมน้ำหนัก เพราะน้ำตาลซูโครสที่ใช้ใส่ในอาหารทั่วไปนั้นให้พลังงานสูงถึง 4 กิโลแคลอรี่ต่อ 1 กรัม (Bornet, 1994) ดังนั้นจึงได้มีการคิดหาสารให้พลังงานและให้ความหวานเพื่อเป็นทางเลือกใหม่สำหรับผู้บริโภค โดยใช้สารจำพวกออลิโกแซ็กคาไรด์แทนน้ำตาลซูโครสเช่น ไอโซมัลโทออลิโกแซ็กคาไรด์ (Isomaltooligosaccharide) หรือ ฟรักโทออลิ-โกแซ็กคาไรด์ (Fructooligosaccharide) ซึ่งสามารถให้ความหวานได้เช่นเดียวกับน้ำตาลซูโครส ไม่สามารถย่อยสลายได้ด้วยระบบเอนไซม์ของมนุษย์ แต่สามารถย่อยได้โดยจุลินทรีย์บางชนิดในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ เช่น Biffidobacteria และ Lactobacilli (Mitsuoka และคณะ, 1987) จึงแสดงคุณสมบัติเป็นสารพรีไบโอติกอีกด้วย ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์เป็นสารให้ความหวานชนิดหนึ่งที่น่าสนใจเพราะมีวิธีการผลิตที่ไม่ยุ่งยากมากนัก มีคุณสมบัติที่ดีคือไม่สามารถย่อยสลายได้ด้วยระบบย่อยอาหารของมนุษย์ แต่สามารถย่อยสลายได้ด้วยจุลินทรีย์ในลำไส้จึงหลงเหลือลงไปถึงลำไส้ในปริมาณมาก มีรสชาติที่ใกล้เคียงกับน้ำตาลซูโครส แต่ให้พลังงานต่ำกว่าน้ำตาลซูโครสที่ใช้กันอยู่ทั่วไป โดยให้พลังงานเพียง 2 กิโลแคลอรี่ต่อ 1 กรัม (Bornet, 1994) จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ มาใช้เป็น Food additive

ในปัจจุบันมนุษย์เริ่มหันมามองดูสุขภาพตามหลักวิชาการกันมากขึ้น ดังนั้นแนวคิดการบริโภคผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพแบบต่างๆ จึงเข้ามามีบทบาทในชีวิตประจำวัน จนกลายเป็นกระแสนิยมอีกรูปแบบหนึ่ง และแนวคิดการบริโภคที่ว่าก็คือการบริโภค พรีไบโอติก (Prebiotic) โพรไบโอ-ติก (Probiotic) และซินไบโอติก (Synbiotics)

โพรไบโอติก (Probiotic) คือกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีชีวิต ซึ่งเข้าไปอยู่ในระบบของร่างกายมนุษย์และสัตว์ แล้วก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพร่างกายของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ โดยจุลินทรีย์นั้นทำหน้าที่ช่วยปรับสมดุลของสภาพแวดล้อมในระบบลำไส้เนื่องจากในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์มีจุลินทรีย์เป็นจำนวนมากทั้งที่เป็นประโยชน์และโทษ ดังนั้นถ้าหากจุลินทรีย์สุขภาพมีจำนวนมากขึ้นก็สามารถเกาะติดผนังลำไส้ และแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้น เป็นการช่วยป้องกันไม่ให้จุลิน ทรีย์ชนิดก่อโรคมาเกาะติดผนังลำไส้ และหลั่งสารพิษที่มีผลทำให้เยื่อบุลำไส้อักเสบได้ ผลิตภัณฑ์อาหารส่วนใหญ่ (โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์นม) จะใส่แบคทีเรียสกุล Lactobacillus และ Bifidobacterium ลงไป ประโยชน์ของโพรไบโอติกมีมากมายคือ ช่วยการย่อยแลกโทสในคนที่แพ้นม กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เพิ่มความต้านทานเชื้อก่อโรคเช่น โรคท้องร่วง ลดความเสี่ยงการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ บรรเทาอาการผิวหนังอักเสบเหตุภูมิแพ้ (Atopic eczema) บรรเทาอาการแพ้นม และเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้ แต่ประโยชน์ของโพรไบโอติกนี้ที่นักวิทยาศาสตร์ทราบแน่ชัดคือการต่อต้านเชื้อก่อโรค แต่หลายกรณีก็ให้ผลที่ไม่แน่นอนนัก ในปัจจุบันได้มีการ

พัฒนา โพรไบโอติกที่จำเพาะต่อสภาวะโรคหนึ่งและควบคุมปริมาณของแบคทีเรียหนึ่งๆ อีกด้วย ซึ่งจะช่วยลดการเกิดโรคและการต่อต้านยาปฏิชีวนะได้จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าประโยชน์ของ

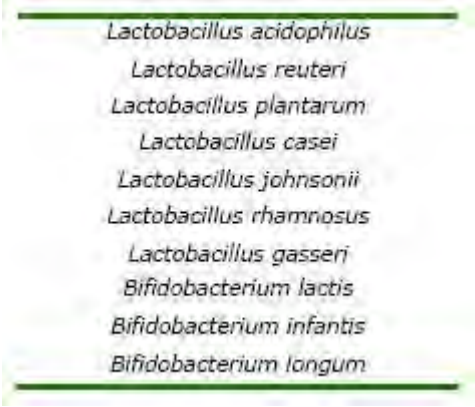
โพรไบโอติกมีหลายอย่างโดยจะแบ่งเป็น 4 หัวข้อ ดังนี้

- การลดภาวะไม่ทนต่อแลกโทส (Lactose intolerance) เป็นผลต่อสุขภาพที่สำคัญของโพรไบโอติก พบว่าประชากรโลกส่วนใหญ่มีปริมาณของเอนไซม์แลกเตส (Lactase) ต่ำ จึงทำให้แลกโทส (Lactose) ไม่สามารถถูกย่อยในทางเดินอาหาร ดังนั้นหลายคนที่ดื่มนมแล้ว เกิดอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ ท้องเดิน ปวดท้อง โพรไบโอติกในอาหารประเภทนมเปรี้ยวหรือโยเกิร์ตสามารถช่วยบรรเทาอาการนี้ได้ เนื่องจากโพรไบโอติกได้ช่วยย่อยแลกโทสไปแล้วในระหว่างการหมัก (Fermentation) จึงทำให้มีแลกโทสเหลือน้อยกว่าหรือไม่มีเลย

- การลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด หลักฐานการทดลองเกี่ยวกับเรื่องนี้ยังไม่สรุปแน่ชัด แต่มีผู้เสนอกลไกที่อาจเป็นไปได้ คือ อาจเนื่องจากคอเลสเตอรอลเป็นสารตั้งต้นในการการสังเคราะห์กรดน้ำดี ดังนั้นถ้าเพิ่มการขับออกของน้ำดีก็จะทำให้มีการกระตุ้นให้มีการนำเอาคอเลสเตอรอลมาใช้ในการสังเคราะห์น้ำดีเพิ่มขึ้น โดยในจุลินทรีย์จะมีเอนไซม์ที่สามารถจับกับกรดน้ำดี และทำให้กรดน้ำดีถูกขับออกทางอุจจาระเพิ่มขึ้นจึงส่งผลให้สามารถลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดได้ นอกจากนี้อาจเนื่องจากการที่จุลินทรีย์สามารถนำเอาคอเลสเตอรอลไปใช้ได้โดยตรงทำให้ปริมาณคอเลสเตอรอลลดลง

- การบรรเทาอาการท้องเดิน เป็นบทบาทหลักของโพรไบโอติก คือ ช่วยลดความรุนแรงของอาการท้องเดิน โดยลดระยะเวลาของโรคและเพิ่มระบบภูมิคุ้มกัน กลไกที่เป็นไปได้ คือ การทำให้ลำไส้ใหญ่มีความเป็นกรด จากการผลิตกรดแลกติก (Lactic acid) และกรดอะซิติก (Acetic acid) ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้ อีกกลไกหนึ่ง คือ ทำให้การตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น

- การป้องกันมะเร็ง ข้อมูลทางระบาดวิทยาพบว่าการเกิดของมะเร็งลำไส้ใหญ่มีความสัมพันธ์กับการกินอาหารไขมันสูง ซึ่งไขมันในอาหารจะกระตุ้นให้มีการหลั่งกรดน้ำดีในลำไส้ใหญ่มากขึ้น ร่วมกับกรดน้ำดีอีกส่วนหนึ่งที่เกิดจากแบคทีเรียเอง ซึ่งทำให้มีส่วนส่งเสริมให้เกิดมะเร็งขึ้นได้ นอกจากนี้เอนไซม์ของแบคทีเรียบางชนิดก็จะเปลี่ยนสารบางอย่างในลำไส้ใหญ่ไปเป็นสารก่อมะเร็งได้ ดังนั้นกลไกในการต้านมะเร็งของโพรไบโอติก ได้แก่ กดการทำงานของสารก่อมะเร็ง ควบคุมหรือเหนี่ยวรั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ในการทำให้เกิดสารก่อมะเร็ง มีผลต่อการเคลื่อนไหวหรือการบีบตัวของลำไส้ทำให้กำจัดสารก่อกลายพันธุ์ออกจากร่างกายได้เร็วขึ้น และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหาร



รูปที่ 2.2 แสดงตัวอย่างแบคทีเรียโพรไบโอติกที่นิยมใส่ลงในผลิตภัณฑ์อาหาร (Rastall และ Gibson, 2004)

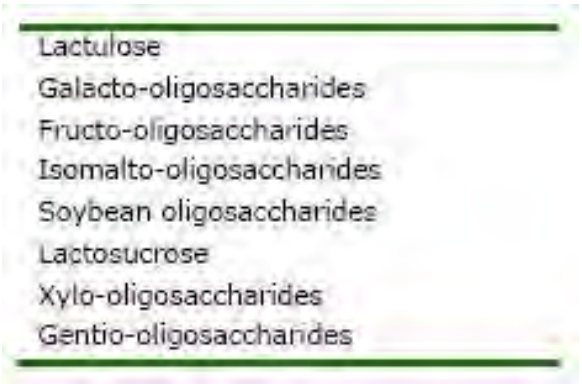
พรีไบโอติก (Prebiotic) คืออาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่มนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ที่เลือกมาให้เป็นอาหารของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในลำไส้มนุษย์เพื่อไปกระตุ้นการเจริญเติบโตโดย อาหารนี้มักจะเป็นพวกออลิโกแซ็กคาไรด์ (Oligosaccharide) ประโยชน์ต่อสุขภาพของพรีไบโอติกมีมากมาย โดยส่วนใหญ่จะคล้ายกับของโพรไบโอติกคือ กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน เพิ่มความต้านทานเชื้อก่อโรคเช่น โรคท้องร่วง อาหารเป็นพิษ ลดความเสี่ยงการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ เพิ่มการดูดซึมแคลเซียมภายในลำไส้ และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของโพรไบโอติกเมื่อบริโภคพรีไบโอติกไปแล้ว ผลที่เกิดขึ้นในหลายกรณีเรายังไม่เข้าใจถึงกลไกการเกิดได้ชัดเจนนัก ในปัจจุบันมีการพัฒนาพรีไบโอติกที่ให้แก๊สไฮโดรเจนเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย เพื่อลดความเสี่ยงการเกิดโรคลำไส้ต่างๆ และช่วยลดผลข้างเคียงของโพรไบโอติกบางชนิดด้วย โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าประโยชน์ของพรีไบโอติกมีหลายอย่าง โดยจะแบ่งเป็น 4 หัวข้อ ดังนี้

- ผลต่อระบบทางเดินอาหาร ที่ลำไส้ใหญ่พรีไบโอติกจะเป็นอาหารให้กับแบคทีเรีย ซึ่งเมื่อแบคทีเรียนำไปใช้ก็จะให้พลังงานและสารบางชนิด เช่น กรดแลกติกและกรดไขมันชนิดสายสั้น (Short-chain fatty acids) ซึ่งเป็นผลิตผลจากกระบวนการหมัก ซึ่งการหมักนี้จะทำให้มีการกระตุ้นการเจริญของกลุ่มจุลินทรีย์สุขภาพ และสภาวะความเป็นกรดที่เกิดขึ้นจะช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียบางชนิดในลำไส้ได้ เช่น *Clostridium perfringens Salmonella* sp. และ *Esherichia coli* เป็นต้น จึงมีผลช่วยป้องกันอาการท้องเดินโดยเฉพาะจากการติดเชื้อได้ นอกจากนี้ด้วยคุณสมบัติเหมือนใยอาหารอื่นๆ ก็จะช่วยบรรเทาอาการท้องผูกได้ด้วย เนื่องจากผลของการเพิ่มน้ำหนักของอุจจาระ และผลต่อการเคลื่อนไหวของลำไส้จึงช่วยให้ขับถ่ายง่ายขึ้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงผลของพรีไบโอติกในการต้านมะเร็งซึ่งก็สามารถนำผลที่มีต่อทางเดินอาหารมาอธิบายได้เช่นกัน

- ผลต่อการดูดซึมแร่ธาตุบางชนิด จากการหมักพรีไบโอติกโดยแบคทีเรียในลำไส้ได้กรดไขมันชนิดสายสั้น ความเป็นกรดก็จะช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุบางชนิดได้ เช่น แคลเซียม เหล็ก แมกนีเซียมและสังกะสี นอกจากนี้อาจด้วยกลไกที่ทำให้มีการดึงน้ำเข้ามาช่วยในการละลายเกลือแร่ต่างๆ ได้ จึงมีการคาดการว่าน่าจะส่งผลช่วยลดความเสี่ยงต่อโรคกระดูกพรุนได้

- ผลต่อการเผาผลาญไขมัน มีการศึกษาเกี่ยวกับการช่วยลดระดับไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) แต่ยังไม่มีข้อมูลมากนัก ส่วนเรื่องของการลดคอเลสเตอรอลก็เช่นกัน อย่างไรก็ตามมีผู้เสนอกลไกที่เป็นไปได้ คือ การที่จุลินทรีย์สุขภาพเจริญจำนวนมากขึ้นก็จะช่วยย่อยสลายคอเลสเตอรอล และยับยั้งการดูดซึมผ่านผนังลำไส้ หรืออาจเนื่องจากผลจากกระบวนการหมักที่ได้กรดไขมันสายสั้นบางชนิด โดยเฉพาะกรดโพรพิโอนิก (Propionic acid) ซึ่งสามารถไปยับยั้งการสังเคราะห์ไขมันรวมทั้งคอเลสเตอรอล ดังนั้นพรีไบโอติกอาจช่วยลดความเสี่ยงต่อโรคหลอดเลือดแข็งซึ่งมีสาเหตุมาจากไขมันได้

- ผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของระบบทางเดินอาหาร พบว่าพรีไบโอติกสามารถช่วยกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยมีผลต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับภูมิต้านทานในลำไส้ มีผลเพิ่มความแข็งแรงของเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้ซึ่งสามารถป้องกันการติดเชื้อได้ดีด้วย รวมถึงมีผลต่อจำนวนและการทำงานของจุลินทรีย์สุขภาพ



รูปที่ 2.3 แสดงออลิโกแซ็กคาไรด์ที่ใช้เป็นพรีไบโอติก
ที่วางขายกันอยู่ในท้องตลาดทั่วไป (Rastall และ Gibson, 2004)

ซินไบโอติกส์ (Synbiotic) คือ สารผสมระหว่างโพรไบโอติกและพรีไบโอติกที่ช่วยให้ผู้บริโภคมีสุขภาพดีโดยการเติมจุลินทรีย์ที่มีชีวิตลงไป เพื่อปรับสมดุลและกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหารให้เหมาะสมตามจุดประสงค์คือ เพื่อเพิ่มอัตราการอยู่รอดของโพรไบโอติกที่ให้ประโยชน์แก่สุขภาพด้วยการเติมพรีไบโอติกลงไป เพื่อให้โพรไบโอติกมีการย่อย

สลายภายในระบบนิเวศน์จุลินทรีย์ที่มีการแข่งขันกัน ในตอนนี้กำลังมีการพัฒนาคัดเลือกพรีไบ-โอติกที่ทำให้การเจริญของโพรไบโอติกได้ดีที่สุด ซึ่งช่วยจะให้โพรไบโอติกไม่ต้องไปแย่งอาหารกับจุลินทรีย์อื่นภายในลำไส้และช่วยให้โพรไบโอติกสร้างออลิโกแซ็กคาไรด์เองได้อีกด้วย

คาร์โบไฮเดรต เป็นสารอาหารที่ให้พลังงานกับคนทุกเชื้อชาติและทุกวัย ตั้งแต่ทารก เด็ก ผู้ใหญ่ และผู้สูงอายุ ตามข้อกำหนดสารอาหารที่แนะนำให้บริโภคประจำวันสำหรับคนไทยอายุตั้งแต่ 6 ปีขึ้นไปของสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กำหนดไว้ว่าควรได้รับคาร์โบไฮเดรต 60 % ของพลังงาน ที่บริโภคอาหารต่อวัน (2,000 กิโลแคลอรี) โดยคาร์โบไฮเดรตให้ประโยชน์กับร่างกายในด้านต่างๆ เช่น

- ให้พลังงานกับร่างกาย (Provision of Energy) โดยทั่วไปคาร์โบไฮเดรตให้พลังงานกับร่างกาย 4 กิโลแคลอรี่ต่อกรัม
- มีผลต่อความรู้สึกอิ่ม (Effects on Satiety)
- การควบคุมกลไกของระดับน้ำตาลและอินสุลิน (Control of Blood Glucose and Insulin Metabolism)
- การควบคุมเมตาโบลิสมของคอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ (Cholesterol and Triglyceride Metabolism)
- การขับถ่ายอุจจาระ (Bowel Habit Laxation) คาร์โบไฮเดรตประเภท Non-Starch Polysaccharides และ Resistant จะมีผลเพิ่มปริมาณกากอุจจาระและเกิดการขับถ่ายได้ง่าย
- ผลต่อแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้ใหญ่ (Effect on Large Bowel Micro flora)

โดยทั่วไปแล้วคาร์โบไฮเดรตสามารถ แบ่งได้ 3 ประเภทใหญ่ตามขนาดโครงสร้าง ดังนี้

ตารางที่ 2.1 แสดงแสดงประเภทของคาร์โบไฮเดรตตามขนาดโครงสร้าง
(Degree of Polymerization, DP) (Gibson และ Roberfroid, 1995)

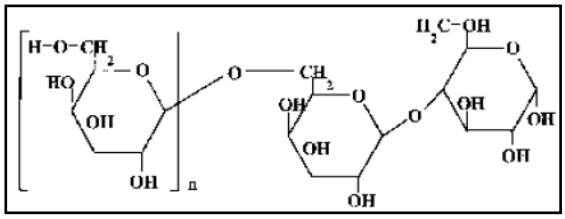
DP	ประเภท	ตัวอย่าง
1- 2	น้ำตาล (Sugars)	1. น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharides) :- กลูโคส ฟรักโทส และ กาแลค-โทส 2. น้ำตาลโมเลกุลคู่ (Disaccharides) :- น้ำตาลทราย (ซูโครส) และ แลคโทส 3. น้ำตาลแอลกอฮอล์ (Polyols) :- ซอร์บิทอล และไซลิทอล
3 - 9	Oligosaccharides	1. Malto-Oligosaccharides :- Maltodextrin 2. Non-Digestible Oligosaccharides :- Raffinose Stachyose และ Fructooligosaccharides
> 9	Polysaccharides	1. แป้ง (Starch) :- Amylose Amylopectin และ Modified starch 2. Non-starch polysaccharides : Cellulose Hemicellulose Pectins และ Hydrocolloids

ออลิโกแซ็กคาไรด์ (Oligosaccharide) มีลักษณะเป็นโพลีแซ็กคาไรด์สายสั้นๆประมาณ 3-10 โมเลกุล อาจเป็นสายตรงหรือมี Side chain โดยส่วนใหญ่จะไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ในทางเดินอาหาร และสามารถถูกหมักย่อยได้โดย Normal flora ในทางเดินอาหารได้ โดยออลิโกแซ็กคาไรด์สามารถแบ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

- Malto - Oligosaccharides เป็นคาร์โบไฮเดรตที่เกิดขึ้นระหว่างการแตกตัว หรือการย่อยแป้ง โดยมาก จะอยู่กับคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น ๆ เช่น น้ำผึ้ง Corn Syrup หรือ มอลโตเด็กซ์ตริน เมื่อแตกตัวหรือถูกย่อยต่อไปในที่สุดจะให้กลูโคส

- Resistant Oligosaccharides (Non - Digestible Oligosaccharides)

- Galactosyl sucrose ประกอบด้วย Raffinose Stachyose และ Verbascose ยังไม่สามารถถูกย่อยโดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ได้ จึงผ่านเข้าสู่ลำไส้เล็ก



รูปที่ 2.4 แสดงโครงสร้างของ Galactosyl sucrose

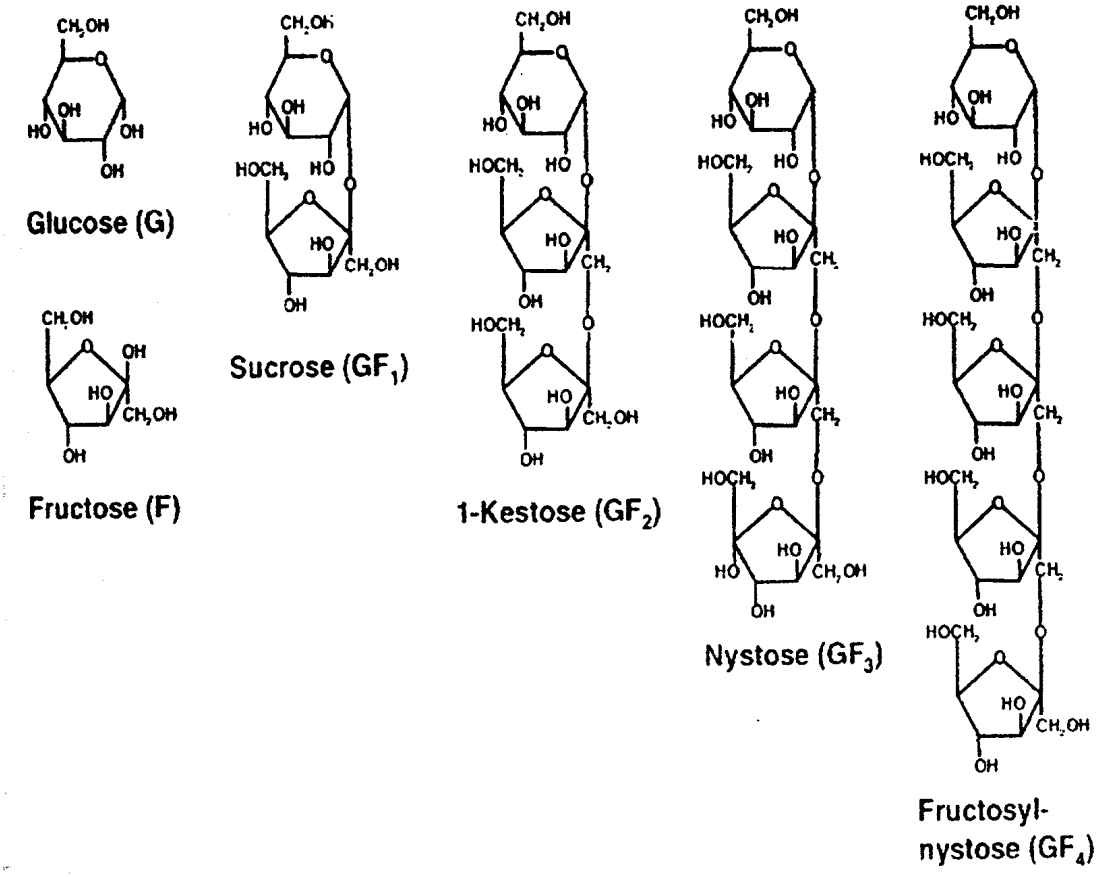
- Fructooligosaccharides พบได้ในอาหารประเภท ข้าวสาลี ข้าวไรย์ หัวหอม แอสปารากัส Artichoke กล้วย ถั่วเหลือง Burdock และพืชประเภทพืชหัว Fructooligosaccharides หรือ Oligofructose มีความหวานประมาณ 30 % ของน้ำตาลทราย ไม่สามารถถูกย่อยโดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ได้แต่ถูกย่อย ที่ลำไส้ใหญ่โดยเชื้อแบคทีเรียซึ่งมีอยู่ตามปกติในลำไส้ใหญ่

ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ (Fructooligosaccharides (FOS)) หรือ ออลิโกฟรักโทส (Oligofructose) เป็นคาร์โบไฮเดรตประเภทออลิโกแซ็กคาไรด์ (Oligosaccharide) บางครั้งเรียกว่านีโอซูการ์ (Neosugar) โดย ออลิโกเป็นภาษากรีกแปลว่าเล็กน้อย (Few) ส่วน Fructo คือ Fructose molecule และ Saccharide แปลว่า น้ำตาล

ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์จะมีมวลโมเลกุลสูงกว่าน้ำตาลซูโครส (Sucrose) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยา ทรานฟรักโทซิลเลชั่น (Tranfructosylation) จากเอนไซม์ของพืช และจุลินทรีย์บางชนิด โดยเกิดการ โพลีเมอร์ไรเซชั่น (Polymerization) โดยจะเป็นการนำน้ำตาล ฟรักโทส มาต่อกับน้ำตาลซูโครส แล้วจะได้เป็น โพลิเมอร์ (Polymer) ของน้ำตาล ฟรักโทสตั้งแต่ 2-35 หน่วย (หากสายโพลีเมอร์ยาวกว่า 30 หน่วย จะมีชื่อเรียกว่า อินนูลิน) (McKellar และ Modler, 1989) ซึ่งฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ (FOS) โดยทั่วไปที่นิยมผลิตนำมาใช้คือชนิด เคสโทส (1-kestose, GF_2) นิสโทส (Nystose, GF_3) และ ฟรักโทฟิวแรนโนซิลนิสโทส (Fructofuranosyl nystose, GF_4) โดย F คือน้ำตาลฟรักโทส และ G คือน้ำตาลกลูโคส (Yun, 1996) โดยน้ำตาลฟรักโทสแต่ละโมเลกุลจะจับกันด้วยพันธะ บีต้า 2-1 (β-(2-1)) โดยเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยานี้คือ เอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิ-เดส (β-D-fructofuranosidase) (EC 3.2.1.26) หรือเรียกโดยทั่วไปว่า ฟรักโทซิลทรานเฟอเรส (Fructosyltransferase) (EC.2.4.1.9) โดยสามารถแยกได้จากพืช เช่น แอสพารากัส (Asparagus) (Shiomi และคณะ, 1979) Jerusalem artichoke (Edelman และ Dickerson, 1966) และแยกได้จากแบคทีเรียและเชื้อราบางชนิดเช่น *Arthrobactor* sp. (Fujita และคณะ, 1990) *Bacillus macerans* (Kim และคณะ, 1998) และ *Aspergillus* sp. (Hiroyama และคณะ, 1989) โดยระดับของความยาวจะขึ้นอยู่กับชนิดของ สิ่งมีชีวิตที่นำมาผลิต รวมถึงความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ใช้ในการผลิต

ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ มีรสชาติใกล้เคียงกับน้ำตาลซูโครส แต่จะให้ความหวานเพียง 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลซูโครสเท่านั้น (Bornet , 1994) มีความหนืดมากกว่าน้ำตาลซูโครสในตัวทำละลายเดียวกันที่ความเข้มข้นเท่า ๆ กัน (Seika และ Kawasaki, 1982) มีความเสถียรที่ pH 4.0 -7.0 และทนความร้อนได้ถึง 140 องศาเซลเซียส ให้พลังงานประมาณ 2 กิโลแคลอรี่ต่อ 1 กรัม (Bornet, 1994) นอกจากนี้ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ยังสามารถทนต่อกรดในกระเพาะ

อาหาร และการ hydrolysis โดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ได้ (Hikada และคณะ, 1990) และเนื่องจากคงอยู่ในลำไส้ได้ก็สามารถเป็นประโยชน์ต่อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้เช่น Bifidobacteria และ Lactobacilli ซึ่งเป็นโพรไบโอติกและยังสามารถย่อยสลายฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ไปใช้ ทำให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายได้ (Wang และ Gibson, 1993)



รูปที่ 2.5 แสดงโครงสร้างของน้ำตาลและฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดต่างๆ

(Crittenden และ Playne, 2002)

2.1 คุณสมบัติของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์

- เป็นผลึกใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น (Ajinomoto Newsletter, 1994)
- รสชาติ กลิ่น จุดเดือด จุดเยือกแข็งและความสามารถในการละลายคล้ายน้ำตาลซูโครส (Ajinomoto Newsletter, 1994)

- มีความหนืดมากกว่าซูโครสที่ความเข้มข้นเดียวกัน และทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมากกว่าซูโครส (Yun, 1996)

- แสดงสมบัติ High degree of polymerization (DP3-13) (Yun, 1996)

- ให้ความหวานประมาณ 30% ของน้ำตาลซูโครส และมีความหนืด (Viscosity) เท่ากับน้ำตาลซูโครส (Francis, 1994)

- มีลักษณะคล้าย Dietary fiber ทำให้ผู้บริโภคไม่เกิดอาการท้องผูก (Randal และคณะ, 1996)

- เป็นสารที่ให้พลังงานต่ำ (Low calories) คือจะให้ค่าพลังงานประมาณ 9.5 กิโลจูลต่อกรัม หรือ ประมาณ 0-2.25 กิโลแคลอรีต่อกรัม (Christine และคณะ, 1996)

- ไม่สามารถย่อยสลายได้โดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ แต่สามารถถูกย่อยสลายได้โดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์บางชนิดในลำไส้ใหญ่ (Francis, 1994)

- สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียพวก *Bifidobacterium* sp. ซึ่งอาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ (Hidaka และคณะ, 1988)

- ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Clostridium perfringens* (Francis, 1994)

- *Streptococcus mutan* ไม่สามารถย่อยและนำไปใช้ได้จึงไม่ก่อให้เกิดฟันผุ (Hosoya และคณะ, 1986, Oku และคณะ, 1984, Yamashita และคณะ, 1984)

- ไม่ทำให้ปริมาณน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น จึงสามารถนำมาใช้เป็นสารให้ความหวาน (Sweetener) สำหรับผู้ป่วยเป็นโรคเบาหวานได้ (Francis, 1994)

- สามารถลดอัตราการเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่ได้ (Randal และคณะ, 1996)

- ทนต่อความเป็นกรด – ด่าง ที่ต่ำกว่า 3 ได้ สามารถทนอุณหภูมิได้มากกว่า 140 องศา-เซลเซียส (Drevon และคณะ, 1992)

- เนื่องจากไม่ใช่น้ำตาลรีดิวซ์ (Non-reducing sugar) จึงไม่เกิดปฏิกิริยา Millard Reaction (คือ การเกิดสีน้ำตาลไหม้เมื่อถูกความร้อนสูงๆซึ่งเกิดจากหมู่คาร์บอนิลของน้ำตาลจับกับกรดอะมิโน ซึ่งหมู่คาร์บอนิลนี้จะพบในน้ำตาลรีดิวซ์) และ Caramelization (Francis, 1994)

- ไม่มีผลข้างเคียงต่อผู้บริโภค ดังนั้นจึงสามารถบริโภคได้อย่างปลอดภัยตามปริมาณที่ต้องการ (Francis, 1994)

- ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอล ฟอสโฟลิปิด และ ไตรกลีเซอไรด์ในเลือดได้ (Hidaka และ Hirayama, 1988)

- Kestose ($C_{18}H_{32}O_{16}$) มีน้ำหนักโมเลกุล 504.44

- Nystose ($C_{24}H_{42}O_{21}$) มีน้ำหนักโมเลกุล 666.58

- Fructofuranosyl nystose ($C_{30}H_{52}O_{26}$) มีน้ำหนักโมเลกุล 828.72
- ดูดความชื้นเล็กน้อย (Bornet, 1994)
- ความหวานของน้ำตาล FOS ชนิด เคสโทส นิสโทส และฟรักโทฟิวแรนโนซิลนิสโทส เมื่อเทียบกับสารละลายน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เท่ากับ 31 22 และ 16 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ (Yun, 1996)

2.2 ความสัมพันธ์ของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ กับจุลินทรีย์ในลำไส้

เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยและนำฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ไปใช้ได้ดี เช่น เชื้อ จุลินทรีย์กลุ่ม *Bifidobacteria* sp. และ *Bacteroides* sp. เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มนี้สามารถย่อย ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ได้ โดยใช้ เอนไซม์บีตาฟรักโทฟูราโนซิเดส (β-fructofuranosidase) หรือ อินนูลิเนส (Inullinase) ในขณะที่เชื้อก่อโรคเช่น *Clostridium perfingens* หรือ *Escherichia coli* ไม่มีเอนไซม์ชนิดนี้ (Bornet, 1994) แบคทีเรียกลุ่มที่สามารถย่อยฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ได้นี้จัดเป็นประโยชน์ต่อร่างกายจึงได้จัดเป็นกลุ่ม โพรไบโอติก (Probiotic) เชื้อจุลินทรีย์ที่รู้จักกันดี เช่น *Lactobacillus acidophilus* และ *Bifidobacterium bifidum* เป็นต้น (McKellar และคณะ, 1989)

2.3 ผลของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ต่อภาวะโภชนาการและจุลินทรีย์ในร่างกาย

Kamejiro และคณะ, 1984 ได้ทดลองให้ผู้ป่วยโรคเบาหวานจำนวน 18 คนรับประทานฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ปริมาณ 8 กรัมต่อวันเป็นเวลา 14 วันติดต่อกัน พบว่าสามารถช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือด คอเลสเตอรอล และ แอลดีแอล คอเลสเตอรอลได้

Oku และคณะ, 1984 ได้ศึกษาการย่อย ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในหลอดทดลอง และในร่างกายของหนู พบว่า ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ซูเครสและมอลเตสในหลอดทดลอง รวมทั้งเอนไซม์จากตับอ่อนและลำไส้เล็กของหนู โดยถูกปล่อยออกมาพร้อมกับปัสสาวะโดยไม่มีการย่อยเลย สามารถสรุปได้ว่า ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ย่อยสลายได้ยาก โดยเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารและอวัยวะภายในทำให้ไม่ถูกใช้เป็นแหล่งพลังงานภายในร่างกาย

Mitsuoka และคณะ, 1987 ได้ทดลองให้ผู้สูงอายุ อายุระหว่าง 64-82 ปี รับประทาน ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ปริมาณ 8 กรัมต่อวันเป็นเวลา 14 วันติดต่อกัน พบว่าสามารถช่วยเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ในกลุ่ม bifidobacteria ในอุจจาระถึง 10 เท่าจากปริมาณปกติ และทำให้ความเป็นกรด-ด่างของอุจจาระลดลงด้วย

McDonough และคณะ, 1987 ได้รายงานว่าฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของ Lactobacillus acidophilus ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้โดยใช้สารตั้งต้นเป็นน้ำตาลแลคโทสในน้ำนมทำให้ลดอาการแพ้น้ำตาลแลคโทสของผู้ป่วยได้

Tanni และ Michael, 1987 ได้รายงานว่าเมื่อคนปกติรับประทาน ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ปริมาณ 5 กรัมต่อวันเป็นเวลา 12 วันติดต่อกันเปรียบเทียบกับคนปกติที่รับประทานน้ำตาลซูโครส พบว่าหลังจาก 12 วัน ปริมาณก๊าซไฮโดรเจนในลมหายใจของคนที่รับประทานฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์จะสูงกว่าคนที่รับประทานน้ำตาลซูโครสประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งก๊าซไฮโดรเจนที่ออกมานั้นเกิดจากกระบวนการย่อยสลายฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ โดยจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร

Gibson และคณะ, 1995 ได้รายงานว่าเมื่อคนรับประทานฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์จะส่งเสริมให้มีการเพิ่มจำนวนของ Bifidobacteria แต่ทำให้แบคทีเรียก่อโรคเช่น *E.coli* และ *Clostridium* sp. ลดจำนวนลง เนื่องจาก Bifidobacteria มีเอนไซม์ในการย่อยฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์นำไปใช้ในการเติบโตได้ ส่วน *E.coli* และ *Clostridium* sp. ไม่สามารถย่อยฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ได้

Bifidobacteria (Gibson และคณะ, 1995)

คือแบคทีเรียที่เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีประโยชน์ในลำไส้มนุษย์ จัดเป็นจุลินทรีย์กลุ่มโพรไบโอติก มีหลายสายพันธุ์ เช่น *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis* และ *Bifidobacterium bifidum* โดยมีอยู่ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ในเด็กแรกเกิดและจะค่อยๆลดจำนวนลงจนเหลือ 25 เปอร์เซ็นต์ในผู้ใหญ่ โดย Bifidobacteria มีประโยชน์มากมาย เช่น

- สามารถย่อยน้ำตาลฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ได้เป็นกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก ซึ่งทำให้ค่า pH ในลำไส้ใหญ่ลดต่ำลงช่วยยังยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค

- สามารถสังเคราะห์วิตามินบี

- สามารถจับกับสารก่อมะเร็ง จึงส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันและป้องกันมะเร็ง โดยองค์ประกอบของเซลล์ Bifidobacteria ทำหน้าที่เป็น Immunomodulator จะช่วยส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรคและเซลล์มะเร็ง

- ช่วยปรับจำนวนจุลินทรีย์อื่นๆที่มีประโยชน์ในลำไส้ให้คงอยู่ได้หลังจากได้รับยาปฏิชีวนะ

Briet และคณะ, 1995 ได้ศึกษาผลของการรับประทานฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในปริมาณต่างๆ พบว่าเมื่อคนปกติ 14 คน รับประทานฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ปริมาณตั้งแต่ 30 40 และ 50 กรัมต่อวัน พบว่าเมื่อรับประทานฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์สูงขึ้นจะทำให้มีปริมาณก๊าซไฮโดรเจนในลมหายใจมากขึ้นด้วย แต่การรับประทานฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์สูงเกิน 30 กรัมต่อวันจะทำให้มีอาการท้องอืด ถ้ารับประทาน 40 กรัมต่อวันจะเกิดอาการลำไส้บวมพอง และเมื่อรับประทาน 50 กรัมต่อวันจะทำให้ท้องเป็นตะคริวและท้องร่วงได้

Roberfroid และคณะ, 1993 ได้รายงานว่าฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์มีส่วนช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุที่จำเป็นต่อร่างกายและลดอาการภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง รวมทั้งช่วยลดการสังเคราะห์กรดไขมันในร่างกายด้วย

Luo และคณะ, 2000 ได้ทดลองให้ผู้ป่วยโรคเบาหวานรับประทานฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ปริมาณ 20 กรัมต่อวันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ติดต่อกัน พบว่าสามารถช่วยลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดได้โดยไม่มีผลต่อปริมาณฮอร์โมนอินซูลินในเลือด

2.4 ประโยชน์ของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์

- ช่วยเพิ่มจำนวนของ Bifidobacteria และ Lactobacilli ซึ่งเป็นนอร์มอล ฟลอร่า (Normal-flora) หรือแบคทีเรียประจำถิ่นที่อาศัยอยู่ในลำไส้

- ช่วยลดจำนวนของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค เพราะ Bifidobacteria จะผลิตสารปฏิชีวนะและกรดไขมันออกมาช่วยควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและควบคุมจำนวนของ normal flora โดยกรดไขมันที่พบส่วนใหญ่จะเป็น กรดอะซิติกและกรดแลคติก ซึ่งกรดเหล่านี้จะช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Clostridium perfringens, Salmonella* sp. และ *E. coli* ในลำไส้ (Gibson และ Roberfroid, 1995)

- ช่วยลดอาการท้องผูก กรดไขมันซึ่งผลิตโดย Bifidobacteria จะช่วยกระตุ้นการบีบตัวของลำไส้และเพิ่มความชื้นของอุจจาระ ซึ่งเป็นผลมาจากแรงดันออสโมติก (Osmotic)

- ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด โดย *Lactobacillus acidophilus* ซึ่งเป็น normal flora อยู่ในลำไส้จะช่วยย่อยสลายคอเลสเตอรอล และยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอลผ่านผนังลำไส้ (Chen และคณะ, 1995)

- ช่วยลดความดันโลหิต ได้มีการศึกษาถึงผลของ ฟรักโทออลิโกแซกคาไรด์ ในผู้ป่วยที่มีระดับไขมันในเลือดสูง ที่บริโภคฟรักโทออลิโกแซกคาไรด์ เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า ความดันโลหิตลดลงโดยเฉลี่ย 6 mmHg และยังพบว่า ความดันโลหิตแปรผกผันกับจำนวนของ Bifidobacteria ในลำไส้อีกด้วย

- ช่วยเพิ่มวิตามินบางชนิด โดยพบว่า Bifidobacteria สามารผลิตวิตามิน B_1 B_2 B_6 B_{12} กรดนิโคทินิก (Nicotinic acid) และ กรดโฟลิก (Folic acid) นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมในระบบย่อยอาหารอีกด้วย (Buddington และคณะ, 1996)

- ช่วยลดปริมาณสารพิษและเอนไซม์ที่เป็นพิษจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย แบคทีเรียที่เจริญอยู่ในร่างกายมนุษย์สามารถจะสร้างสารพิษจากกระบวนการเมตาบอลิสมได้

- ช่วยป้องกันการทำงานของตับ การลดปริมาณของสารพิษจากกระบวนการเมตาบอลิสม เป็นผลให้ปริมาณสารพิษที่เข้าสู่ตับลดลงด้วย

- เป็นสารให้ความหวานพลังงานต่ำจึงเหมาะสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน โรคอ้วนและผู้ที่ต้องการลดน้ำหนัก (Bornet, 1994)

- มีส่วนช่วยลดปริมาณไขมันและน้ำตาลในเลือดเนื่องจากสามารถจับกับไขมันและลดการดูด-ซึมน้ำตาลสู่กระแสเลือดได้

- มีส่วนช่วยลดระดับแอมโมเนีย (NH_3) ในเลือดโดยเปลี่ยนแอมโมเนียให้อยู่ในรูปแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) จึงไม่แพร่ไปในกระแสเลือด (Gibson และ Roberfroid, 1995)

- ช่วยเพิ่มการดูดซึมไอออนต่างๆ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม และเหล็ก (Barthomeuf และคณะ, 1997)

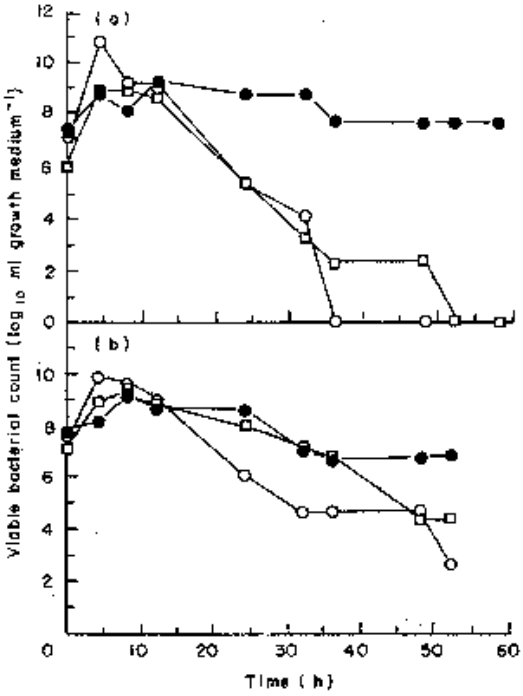
- ใช้ผสมในอาหารสัตว์ทำให้สัตว์มีสุขภาพแข็งแรง เนื่องจากช่วยเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในลำไส้ เพิ่มน้ำหนักตัว และเพิ่มการรับประทานอาหารของสัตว์ (Hidaka และคณะ, 1991)

- ช่วยลดกิจกรรมของเอนไซม์บางชนิด เช่น บีตา-กลูเคอโรนิเดส ไกลโคฮอลิกแอซิด ไฮดรอซิล-เลส และ ไนโตรรีดักเตส ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดโรคมะเร็ง (Buddington และคณะ, 1996)

จากการที่ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์นั้นไม่สามารถย่อยสลายได้ ด้วยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารส่วนต้นและส่วนกลางของมนุษย์ (ปาก, กระเพาะอาหาร) ทำให้สามารถผ่านมาถึงลำไส้ใหญ่ได้ (Nilsson และคณะ, 1998) ซึ่งฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์นี้ก็จะเป็นอาหารให้กับจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์ได้ โดยพบว่าฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์มีคุณสมบัติเป็นสาร พรีไบโอติก (Prebiotic) สามารถช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่มีผลดีต่อสุขภาพที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ได้ เช่น Bifidobacteria และ Lactobacilli ซึ่งแบคทีเรียพวกนี้จะสามารถใช้ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ที่อยู่ในลำไส้ แล้วจะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างในลำไส้ใหญ่ลดลงเป็นผลให้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่เช่น *E. coli* และ *Clostridium perfringent* โดยพบว่าฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของ Bifidobacteria ได้ดีกว่า *E. coli* และ *Clostridium perfringent* และส่งผลให้ปริมาณของ *E. coli* และ *Clostridium perfringent* ในลำไส้ใหญ่ลดลง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (Wang และ Gibson, 1993) นอกจากนี้ Bifidobacteria ยังสามารถสร้างวิตามินที่จำเป็นต่อร่างกายได้หลายชนิด เช่น B_1, B_6, B_{12} ได้ จึงทำให้ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์มีคุณสมบัติเป็น พรีไบโอติก (Prebiotic)

ตารางที่ 2.2 แสดงผลของความเป็นกรด-ด่างต่อการอยู่รอดของ *Bifidobacterium infantis, Essherichia coli* และ *Clostridium perfringent* (Wang และ Gibson, 1993)

	Specific growth rate		
pH	*B. infanis*	*E.coli*	*Cl. perfringent*
7.0	0.170 $\pm$ 0.007	0.199 $\pm$ 0.007	0.169 $\pm$ 0.008
6.5	0.211 $\pm$ 0.008	0.158 $\pm$ 0.009	0.163 $\pm$ 0.008
6.0	0.206 $\pm$ 0.008	0.164 $\pm$ 0.009	0.134 $\pm$ 0.019
5.7	0.175 $\pm$ 0.013	0.164 $\pm$ 0.009	0.149 $\pm$ 0.011
5.5	0.167 $\pm$ 0.006	0.111 $\pm$ 0.017	0.126 $\pm$ 0.013
5.2	0.127 $\pm$ 0.006	0.053 $\pm$ 0.001	0.125 $\pm$ 0.023
5.0	0.082 $\pm$ 0.006	NG	NG
4.5	0.016 $\pm$ 0.001	NG	NG
4.0	NG	NG	NG
3.5	NG	NG	NG



รูปที่ 2.6 แสดงการเจริญเติบโตของ *Bifidobacterium intfants* (●)*Escherichia coli* (o) และ *Clostridium perfringen* (□) เมื่อทำการเลี้ยงรวมกัน โดยให้น้ำตาลกลูโคส เป็นอาหาร (a) และให้ ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์เป็นอาหาร (b) (Wang และ Gibson, 1993)

นอกจากนี้ยังพบว่า ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ สามารถช่วยลด ไขมันและคอเลสเตอรอลในกระแสเลือดได้ประมาณ 19 เปอร์เซ็นต์ ในผู้ที่บริโภคติดต่อกันใน 8 สัปดาห์ (Williams, 1999) และยังสามารถลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสในเลือดของผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานได้ (Yamashita, 1984) โดยได้มีการเสนอว่าฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์จะเข้าไปจับกับสารอาหารที่อยู่ในลำไส้ เช่น คาร์โบไฮเดรต และไขมันทำให้ผนังลำไส้ไม่สามารถที่จะดูดซึมเอาสารอาหารเหล่านั้นไปสู่กระแสเลือดได้ จากนั้นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ก็จะมีการนำสารอาหารรวมทั้ง ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ไปใช้ ทำให้ระดับของน้ำตาลกลูโคส และไขมันในกระแสเลือดลดลง

2.5 การนำฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ไปใช้ในเชิงพาณิชย์

ในปัจจุบันพบว่าการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ไปใช้ในเชิงพาณิชย์นั้นจะผลิตโดยใช้จุลินทรีย์ มีน้ำตาลซูโครสเป็นวัตถุดิบ โดยใช้ทั้งเอนไซม์จากจุลินทรีย์และเซลล์จุลินทรีย์

Oku และคณะ, 1984 รายงานการสังเคราะห์สารให้ความหวานชนิดใหม่ที่ Meiji Seika Co., Ltd. ในประเทศญี่ปุ่น ผลิตภายใต้เครื่องหมายการค้าที่ชื่อ นีโอซูการ์ (Neosugars) ซึ่งเป็นสารประกอบฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดหนึ่งที่ผลิตโดยใช้ เอนไซม์ฟรุกโทซิลทรานสเฟอเรส จากรา *Aspergillus niger* โดยการเติมฟรักโทสเข้าไปในซูโครส โดยมีส่วนประกอบดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 แสดงชนิดและส่วนประกอบของนีโอซูการ์โดยประมาณ (จดหมายข่าวอายิโนะโมะโต๊ะ, 2537)

ส่วนประกอบของนีโอซูการ์	**ปริมาณ (%)**
1-kestose	28
Nystose	60
Fructofuranosyl nystose	10

ต่อมาการผลิตได้ขยายตัวสู่ประเทสเกาหลี โดยบริษัท Cheilfoof and Chemical Co. ผลิตโดยใช้จุลินทรีย์ *Aureobasidium pullulans* โดยการตรึงเซลล์ (Yun, 1996)

นอกจากนี้ยังมีชื่อทางการค้าว่า NutraFlora ที่ผลิตโดยบริษัท Golden Technologies Company, Westminster, Co. (Campbell และคณะ, 1997)

2.6 ปริมาณของออลิโกแซ็กคาไรด์ที่เหมาะสมและผลข้างเคียงต่อมนุษย์

ได้มีการศึกษาถึงปริมาณของออลิโกแซ็กคาไรด์ ที่มีผลต่อร่างกายพบว่าปริมาณที่เหมาะสมคือ

- 3 กรัม ของ ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์
- 2-2.5 กรัม ของ กาแลคโตออลิโกแซ็กคาไรด์
- 2 กรัม ของ ซอยบีนออลิโกแซ็กคาไรด์
- 0.7 กรัม ของ ไซโลออลิโกแซ็กคาไรด์

และพบว่าการบริโภคออลิโกแซ็กคาไรด์ในปริมาณมากอาจทำให้เกิดอาการท้องเสียได้ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาถึงความเป็นพิษของกาแลคโตออลิโกแซ็กคาไรด์ในหนูทดลองพบว่า ค่า LD_{50} มีค่ามากกว่า 15 กรัมต่อกิโลกรัม และไม่พบความเป็นพิษเรื้อรังเมื่อบริโภคติดต่อกันเป็นเวลานาน

2.7 กระบวนการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์

2.7.1 ใช้เอนไซม์เปลี่ยนจากสารตั้งต้นให้เป็นฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์

โดยการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้น และอาศัยกิจกรรมการเคลื่อนย้ายน้ำตาลฟรักโทส (Transfructosylation: Ut) ของเอนไซม์ฟรักโทซิลทรานเฟอเรส (FT หรือ FF) ได้ผลผลิตส่วนใหญ่เป็นน้ำตาล เคสโทส นิสโทส และฟรักโทฟิวราโนซิลนิสโทส (Jung และคณะ, 1989)

2.7.2 ใช้เอนไซม์เพื่อย่อยสลายสารตั้งต้นให้เป็นฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์

โดยใช้อินนูลินเป็นสารตั้งต้นและอาศัยการย่อยสลายอินนูลินด้วยเอนไซม์อินนูลินเนส (EC 3.2.1.7) ได้ผลผลิตเป็นออลิโกแซ็กคาไรด์หลายชนิด เช่น ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ (เคสโทส นิสโทส และฟรักโทฟิวราโนซิลนิสโทส) อินนูโลออลิโกแซ็กคาไรด์ (Inulooligosaccharides) (อินนูโลไบโอส (Inulobiose) อินนูโลไตรโอส (Inulotriose)) และน้ำตาลชนิดอื่นๆ (Roberfroid และคณะ , 1993)

โดยส่วนใหญ่งานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์มักจะใช้เอนไซม์เปลี่ยนจากซูโครสให้เป็นฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดยเอนไซม์ฟรักโทซิลทรานเฟอเรสมากกว่าเพราะการใช้เอนไซม์อินนูลินเนส นั้นจะย่อยสลายอินนูลินแบบสุ่มทำให้ผลผลิตที่ได้มีชนิดและปริมาณของน้ำตาลต่างๆไม่แน่นอน และนอกจากนั้นในระดับอุตสาหกรรมจะผลิตผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์จากน้ำตาลซูโครสโดยใช้เอนไซม์ฟรักโทซิลทรานเฟอเรสจากจุลินทรีย์ ส่วนเอนไซม์อินนูลินเนสที่ใช้ย่อยอินนูลินนั้น แหล่งของอินนูลินส่วนใหญ่จะพบในพืชจึงไม่ค่อยได้รับความนิยม

2.8 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์จากน้ำตาลซูโครส (Transfructosylation)

เอนไซม์ที่จำเป็นและมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ คือ เอนไซม์บีตาฟรักโทฟูราโนซิเดส (β-D-fructofuranosidase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสร้างเคสโทส (GF_2) รวมถึงสามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสร้าง ออลิโกแซ็กคาไรด์ขั้นสูงขึ้น เช่น นิสโทส (GF_3) และ ฟรักโทฟิวแรนโนซิลนิสโทส (GF_4) ได้

ในปี 1968 Edelman และ Jefford ได้เสนอกลไกของปฏิกิริยา ทรานฟรักโทซิลเลชั่น ของเอนไซม์บีตาบีตาฟรักโทฟูราโนซิเดสที่แยกจาก Jerusalem artichoke ว่าสามารถเร่งปฏิกิริยาการสร้าง ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ได้โดยจะเร่งปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลซูโครสสองโมเลกุลได้เป็นฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดเคสโทส (GF_2) จากนั้นเคสโทสที่ผลิตได้ยังสามารถมาทำปฏิกิริยากับน้ำตาลซูโครสต่อไปอีกได้เป็นฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์สายที่ยาวขึ้นได้อีก

$$F-G + F-G \longrightarrow F_2G + G \quad (1)$$

$$F_2G + F-G \longrightarrow F_3G + G \quad (2)$$

$$(GF\text{-}F_n + GF_m \longrightarrow GF\text{-}F_{n-1} + GF_{m+1})$$

โดย n = donor molecule, m = acceptor molecule

G = glucose, F = fructose

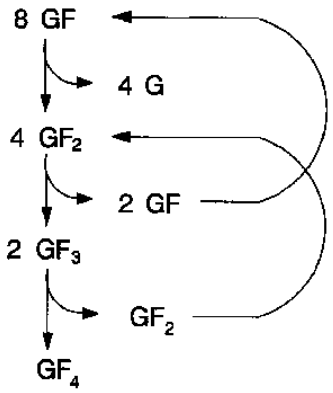
รูปที่ 2.7 แสดงสมการการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดย Edelman และ Jefford (1968)

ซึ่งต่อมา Jung และคณะ ในปี 1989 ได้นำเสนอปฏิกิริยาการสร้างฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดยเอนไซม์ บีตาบีตาฟรักโทฟูราโนซิเดส จาก *Aspergillus pullulans* ไว้ว่าเอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลซูโครสสองโมเลกุลได้เป็นน้ำตาลเคสโทส (GF_2) ในช่วงแรกเช่นเดียวกับทฤษฎีของ Edelman และ Jefford แต่เอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาในการสร้างฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์สายที่ยาวขึ้นโดยเร่งปฏิกิริยาระหว่างเคสโทสสองโมเลกุลที่ผลิตได้

$$F-G + F-G \longrightarrow F_2G + G \quad (1)$$

$$F_2G + F_2G \longrightarrow F_3G + GF \quad (2)$$

$$(GF_n + GF_n \longrightarrow G\,F_{n-1} + G\,F_{n+1})$$

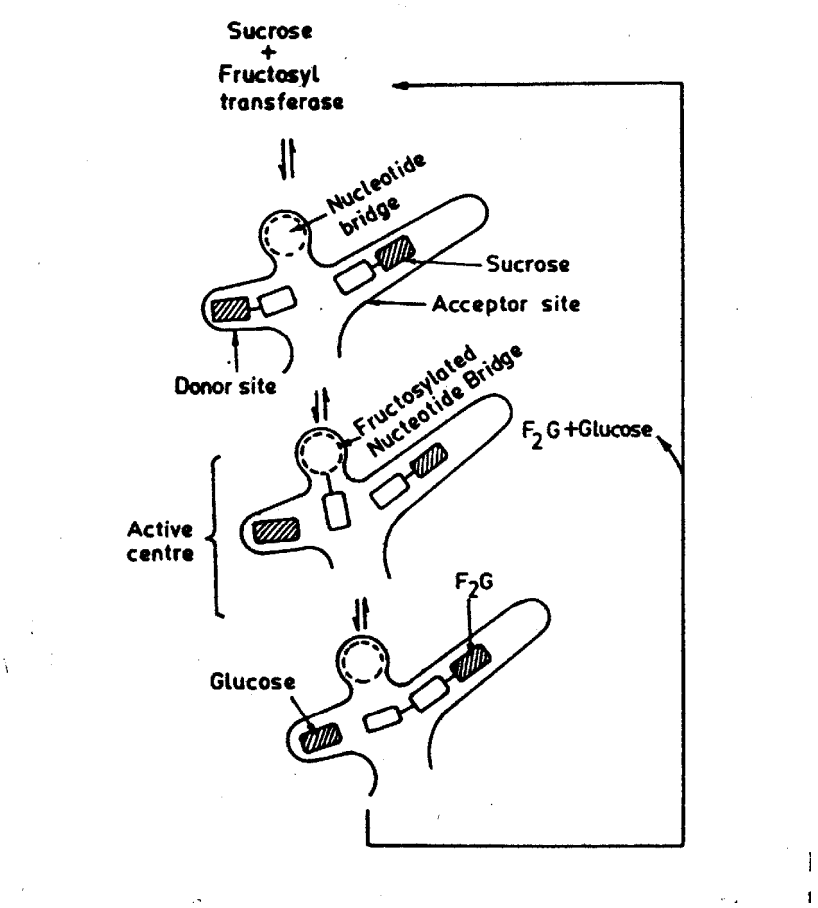


โดย G = glucose, F = fructose

รูปที่ 2.8 แสดงสมการการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดย Jung และคณะ (1989)

จากที่ได้มีการนำเสนอกลไกการสังเคราะห์ ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในข้างต้นอาจสามารถกล่าวโดยสรุปได้ว่า สารตั้งต้นในการผลิต ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ก็คือ น้ำตาลซูโครส โดยเอนไซม์ ฟรักโทฟูราโนซิเดส จะทำหน้าที่ย่อยน้ำตาลซูโครส ได้เป็น น้ำตาล กลูโคสและฟรักโทส แล้วจะมีการย้าย น้ำตาลฟรักโทสที่ได้ ไปเชื่อมต่อกับน้ำตาลฟรักโทส ของน้ำตาลซูโครสอีกโมเลกุล ได้เป็น น้ำตาลเคสโทส (GF_2) ซึ่งต่อจากนั้นเมื่อจะมีการสังเคราะห์ ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ที่มีความยาวมากขึ้นก็จะมีการสลาย น้ำตาลซูโครส (Eelman และ Jefford, 1968) หรือออลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดเดียวกัน (Jung แลคณะ, 1989) เพื่อที่จะนำเอาน้ำตาล ฟรักโทสเข้าไปเพื่อให้ได้สายของ ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ที่ยาวขึ้น

ในปี ค.ศ. 1980 Guptha และ Bhatia ได้อธิบายกลไกการทำงานและเสนอ แบบจำลองของเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดสที่ทำการศึกษาใน *Fusarium oxysporum* ว่าเอนไซม์ชนิดนี้จะมีโครงสร้างที่สำคัญอยู่ 3 ส่วน คือ ส่วนแอคเซพเตอร์ (Acceptor) ส่วนดอเนอร์ (Donor) และส่วนที่เป็นนิวคลีโอไทด์บริดจ์ (Nucleotide bridge) (รูปที่ 2.9) และมีการทำงานโดยการจับน้ำตาลซูโครสเข้ามาที่ส่วน ดอเนอร์ และส่วน แอคเซพเตอร์ ตำแหน่งละ 1 โมเลกุล จากนั้นส่วนนิวคลีโอไทด์บริดจ์ จะทำหน้าที่ตัดและดึงน้ำตาลฟรักโทสออกจากน้ำตาลซูโครสในด้านที่เป็นดอเนอร์เอาไปจับกับน้ำตาลซูโครสในฝั่งที่เป็นแอคเซพเตอร์ได้เป็นน้ำตาลเคสโทส (GF_2) จากนั้นน้ำตาลเคสโทสที่ได้ยังสามารถกลับเข้ามาทำปฏิกิริยาในด้านแอคเซพเตอร์โดยรับน้ำตาลฟรักโทสจาด้านดอเนอร์อีกครั้ง ทำให้ได้ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ที่ยาวขึ้นเป็น นิสโทส และ ฟรักโทฟิวแรนโนซิลนิสโทส ตามลำดับ



รูปที่ 2.9 แสดงแบบจำลองของเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดสในการสร้าง
ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ (Guptha และ Bhatia, 1980)

2.9 **เอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดส** (Fructofuranosidase)

เอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดส (β-D-fructofuranosidase) (EC 3.2.1.26) หรือเรียกโดยทั่วไปว่า ฟรักโทซิลทรานเฟอเรส (Fructosyltransferase) (EC.2.4.1.9) นั้นสามารถพบได้ทั้งในพืชและจุลินทรีย์

2.9.1 **เอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดสที่พบในพืช**

จากการศึกษาในพืชพบว่าเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดสมี 2 ชนิด ได้แก่ (Edelman และคณะ, 1968)

- Sucrose – Sucrose 1-FT (1-SST) เป็นเอนไซม์ที่ย้ายน้ำตาลฟรักโทสจากน้ำตาลซูโครสโมเลกุลหนึ่งไปยังน้ำตาลซูโครสอีกโมเลกุลหนึ่ง เกิดเป็น เคสโทส และน้ำตาลกลูโคส

- Fructan – Fructan 1-FT (1-FFT) เป็นเอนไซม์ที่ย้ายน้ำตาลฟรักโทสจากน้ำตาลซูโครสโมเลกุลหนึ่งไปยังน้ำตาลฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ได้เป็นฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีสายยาวขึ้นและน้ำตาลกลูโคส

2.9.2 **เอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดสที่พบในจุลินทรีย์**

จากการศึกษาในจุลินทรีย์พบว่าเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดสเพียงชนิดเดียวแต่ทำหน้าที่ได้ 2 อย่าง ได้แก่ (Hidaka และคณะ, 1988)

- หน้าที่ในการสร้างฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ เรียกว่า ทรานฟรักโทซิลเลชัน (Ut)

- หน้าที่ในการสลายฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ เรียกว่า ไฮโดรไลซิส (Uh)

โดยการสร้างฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ในปริมาณมากต้องมีอัตราส่วนระหว่าง Ut/ Uh สูง แต่ถ้ามีอัตราส่วน Ut/ Uh ต่ำจะมีการสร้างฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ในปริมาณน้อย ซึ่งการที่จะมีหน้าที่ไหนมากนั้นจะขึ้นอยู่กับ ชนิดของจุลินทรีย์ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง ค่าพีเอช และความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น (Hidaka และคณะ, 1988)

จากงานวิจัยต่างๆสามารถสรุปได้ว่าเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดสที่พบในจุลินทรีย์มี 3 แบบ ได้แก่

- เอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ (Intracellular enzyme) เช่น เอนไซม์ที่พบใน *Aspergillus niger* (Hidaka และคณะ, 1988) *Penicillium roquefortii* (Jang และคณะ, 1996)

- เอนไซม์ที่อยู่ภายนอกเซลล์ (Extracellular enzyme) เช่น เอนไซม์ที่พบใน *Aspergillus foetidus* (Hang และคณะ, 1995) *Penicillium rugulosum* (Barthomeuf และคณะ, 1995) *Aspergillus niger* (Hidaka และคณะ, 1988) *Penicillium roquefortii* (Jang และคณะ, 1996)

- เอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ (Mycelium-bound enzyme) เช่น เอนไซม์ที่พบใน *Aspergillus japonicus* (Cheng และคณะ, 1996) *Aspergillus phoenicis* (Belken และคณะ, 1991)

2.10 สมบัติของเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดส (Fructofuranosidase)

จากการศึกษาของนักวิจัยหลายท่าน (Singh และ Bhatia, 1971, Shiomi และ Izawa, 1980, Duan และคณะ, 1993, Muramatsu และคณะ, 1993, Ishimoto และ Nakamura, 1997) พบว่า สภาวะที่เหมาะสม (Optimal condition) สำหรับการทำงานของเอนไซม์ ฟรักโทฟูราโนซิเดส อยู่ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ประมาณ 5.0 – 6.1 , อุณหภูมิประมาณ 50 – 60 องศาเซลเซียส และถูกยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาได้โดย โลหะหนัก คือ Cu^{2+}, Ag^{+}, Hg^{+} และ Zn^{2+} โดยสามารถเพิ่มประสิทธิภาพได้โดย Mn^{2+}, Mg^{2+}, Ni^{2+} ในการทดลองกับเอนไซม์เอนไซม์จาก Chicory Roots โดย Singh และ Bhatia, 1970

นอกจากนั้นการสังเคราะห์ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดย เอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดสยังขึ้นกับปัจจัยอื่น ๆ อีก เช่น ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส, ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส และความเข้มข้นของเอนไซม์อีกด้วย โดยพบว่าเอนไซม์ที่สกัดได้จาก *Aspergillus foetidus* สามารถผลิตน้ำตาลเคสโทสได้ดีถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 49 ชั่วโมงขึ้นอยู่กับปริมาณของน้ำตาลซูโครสที่ให้ โดยเมื่อให้น้ำตาลซูโครสเริ่มต้นเพิ่มขึ้น ปริมาณของน้ำตาลเคสโทส (GF_2) ที่ได้ก็จะเพิ่มมากขึ้นด้วย (Hang และคณะ, 1995) และยังพบอีกว่า เมื่อเติมน้ำตาลกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากที่เลี้ยงเชื้อ *Fusarium oxysporum* เป็นเวลา 4 วัน จะทำให้การสังเคราะห์ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ลดลง และเมื่อเติมน้ำตาลซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแต่น้ำตาลกลูโคสเท่านั้นก็จะสามารถทำให้ปริมาณของเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดสเพิ่มขึ้น (Gupta และ Bhatia, 1980) แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลกลูโคสนั้นสามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิ-เดสได้และนอกจากนั้นยังพบอีกว่าความเข้มข้นของเอนไซม์มากก็จะสามารถสังเคราะห์ เคสโทส (GF_2) และ ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีฟรักโทสเป็นองค์ประกอบมากกว่า 3 โมเลกุลได้ แต่หากเอนไซม์มีความเข้มข้นน้อย ก็จะสามารถสร้างได้เพียงแค่เคสโทส (GF_2) เท่านั้น (Andrew, 1995) และจากการทดลองของ Fujita และคณะ,1990 พบว่าเอนไซม์เอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดส จาก *Arthrobactor sp.*K-1 สามารถนำสารอื่น (น้ำตาล, แอลกอฮอลล์) มาเป็นรีเซพ-เตอร์ (Receptor) สำหรับการ ทรานฟรักโทซินเลชั่น (Transfructosylation) ได้ โดยใช้สารเหล่านั้นเป็นตัวรับน้ำตาลฟรักโทสแทนซูโครส ซึ่งสารเหล่านั้นมีทั้งโมโนแซ็กคาไรด์ (Monosaccharide) ออลิโกแซ็กคาไรด์ (Oligosaccharide) และ แอลกอฮอล์ (Alchohol) พบว่าจะมีความสามารถในการเป็นรีเซพเตอร์แตกต่างกันไป

ตารางที่ 2.4 แสดงความสัมพันธ์ของน้ำตาลเคสโทส ที่เกิดขึ้นกับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น ที่เวลา 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 5.0 (Hang และคณะ, 1995)

น้ำตาลซูโครสเริ่มต้น (กรัม/ลิตร)	**น้ำตาลเคสโทส (กรัม/ลิตร)**	Efficiency (%)
146	65	45
287	118	41
456	153	34
589	156	26

ตารางที่ 2.5 แสดงผลของน้ำตาลกลูโคสต่อเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดส เมื่อเติมน้ำตาลกลูโคสหรือฟรักโทสลงไปจะทำให้เอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดสลดลง (Gupta และ Bhatia, 1980)

ชนิดของน้ำตาล	**ชนิดของน้ำตาลที่เติมระหว่างผลิต (วันที่ 4)**	**ปริมาณของโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)**	**ปริมาณของเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดส (ยูนิท)**
Glucose	Sucrose	43.2	3264
Sucrose	Glucose	33.6	2108
Sucrose	Fructose	40.2	2940
Sucrose	-	27.1	3584
Glucose	-	-	-

การผลิตน้ำตาลฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในระดับอุตสาหกรรมเป็นกระบวนการผลิตทางเอนไซม์ โดยอาศัยเอนไซม์ fructosyltransferase (EC 2.4.1.9) และ β-fructofuranosidase (EC 3.2.1.26) ที่สามารถผลิตได้จากเชื้อรา *Aspergillus niger* ATCC 20611 (Hidaka และคณะ, 1988) และ *Aureobasidium pullulans* KFCC 10524 (Jung และคณะ, 1989, Yun และ Song, 1993, Yun และคณะ, 1994) สำหรับน้ำตาลฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีจำหน่ายอยู่เป็นสารละลายน้ำตาลผสมที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส ฟรักโทส และซูโครส ประมาณ 40-45 % และมีองค์ประกอบสูงสุดของน้ำตาลฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์อยู่เพียง 55-60% เท่านั้น ปัญหาสำคัญของกระบวนการผลิตคือ ภาวะยับยั้งของน้ำตาลกลูโคสที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ที่

สังเคราะห์ ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ซึ่งทำให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไม่สามารถดำเนินต่อไปได้ จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้น้ำตาลซูโครสหลงเหลืออยู่ประมาณ 10 % (Jung และคณะ, 1989) การศึกษาการผลิตน้ำตาลฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ปริมาณสูง สามารถกระทำได้โดยการลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์ที่สังเคราะห์ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ โดยการเติมเอนไซม์ glucose oxidase หรือ glucose isomerase แต่พบว่าสภาวะการทำงานของเอนไซม์ glucose isomerase ไม่เหมาะกับสภาวะการทำงานของเอนไซม์ fructosyltransferase (ที่ได้จาก *Aureobasidium pullulans* KFCC 10524) (Yun และคณะ, 1993) แต่ในกรณีของเอนไซม์ผสมระหว่าง glucose oxidase และ β-fructofuranosidase (ที่ได้จาก *Aureobasidium pullulans* KFCC10524) นั้น พบว่าภายใต้ภาวะที่เหมาะสมจะสามารถผลิตน้ำตาลฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ปริมาณสูงได้ถึง 98 % (Yun และ Song, 1993, Yun และคณะ, 1994)

Aspergillus niger ATCC 20611 จัดได้ว่าเป็นเชื้อราสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่สังเคราะห์ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณสูง (Hidaka และคณะ, 1988) เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการผลิตน้ำตาลฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ จากปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์นั้น น้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นสารตั้งต้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นสารผสมของ ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีโครงสร้างแบบ 1F (1-β-fructofuranosyl)n-sucrose ที่มีจำนวน n = 1-3 ซึ่งได้แก่ 1-kestose (GF_2), nystose (GF_3) และ fructofuranosyl nystose (GF_4) สารผสมน้ำตาลที่ได้จากปฏิกิริยาเอนไซม์จะถูกทำให้บริสุทธิ์โดยกระบวนการแยกด้วยคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สารผสมน้ำตาลฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ที่มีปริมาณของ 1-kestose (GF_2) และ nystose (GF_3) สูง ก่อนที่จะนำไปผ่านกระบวนการทำให้เข้มข้นในรูปของสารละลายน้ำตาล หรือผ่านกระบวนการทำแห้งให้เป็นผลิตภัณฑ์ผงต่อไป

2.11 แหล่งของเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดส

เอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดสนั้นสามารถพบได้ทั้งในพืชและในจุลินทรีย์ซึ่งมีผู้วิจัยและศึกษามากมาย ดังแสดงในตารางที่ 2.6 และ 2.7

ตารางที่ 2.6 แสดงชนิดของพืชที่สร้างเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดสได้

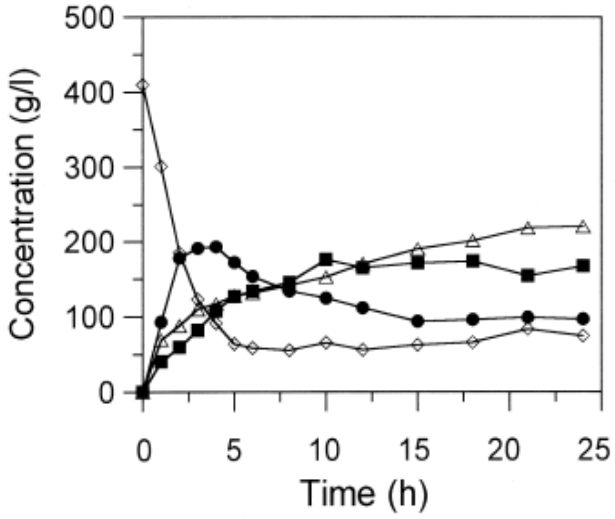
ชนิดของพืช	ผู้วิจัย
Agave americana (agave)	Bhatia และคณะ, (1979) Nandra และ Bhatia, (1980)
Agave vera cruze (agave)	Bhatia และคณะ, (1979, 1995) Satyanarayama, (1976)
Asparagus officinalls (asparagus root)	Shiomi และคณะ, (1976, 1979, 1980, 1981, 1985)
Ailium cepa (onion bulbs)	Darbyshire และคณะ, (1978) Henry และ Darbyshire, (1980)
Cichorrium intybus (chocory)	Singh และ Bhatia, (1971) Chandorkar และ Collins, (1972)
Crinum longifolium	Bhatia และคณะ, (1975)
Sugae-beet leaves	Alen และ Bacon, (1951)
Heliianthus tuberosus (Jerusalem artichoke)	Edelman และ Dickerson, (1966) Scott และคณะ, (1996) Praznik และคณะ, (1992)
Lactuca sativa L. (lettuce)	Chandorkar และ Collins, (1972)
Lycorcis radiata (monocot)	Nagamatsu และคณะ, (1990)
Taraxacum officinale	Chandorkar และ Collins, (1972)

ตารางที่ 2.7 แสดงชนิดของจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดสได้

ชนิดของจุลินทรีย์	ผู้วิจัย
Aureobasidium pullulans	Jung และคณะ, (1987, 1989) Yun และคณะ, (1990, 1992, 1993) Smith และคณะ, (1980)
Aureobasidium sp.	Hayashi และคณะ, (1989, 1990, 1991)
Arthrobacter sp.	Fugita และคณะ, (1990)
Aspergillus japonicus	Duan และคณะ, (1994)
Aspergillus niger	Hidaka และคณะ, (1988, 1991) Bealing และ Bacon, (1953)
Aspergillus oryzae	Pazur, (1952) Kinda และคณะ, (1998) Bealing และ Bacon, (1953)
Aspergillus phoenicis	Balken, (1991)
Aspergillus sydowl	Muramatsu, (1988)
Fusarium oxysporum	Gupta และคณะ, (1980) Maruyama และคณะ, (1979) Patel และคณะ, (1994)
Penicilliun frequentants	Usami และคณะ, (1991)
Penicilliun spinulosum	Hankin และคณะ, (1977)
Phytophthora parasitica	Takeda และคณะ, (1994)
Saccharomyces cerevisiae	Strasthof และคณะ, (1986)

จะเห็นได้ว่ามีพืชและจุลินทรีย์มากมายที่สามารถผลิตเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดสได้ แต่การนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์นั้น เอนไซม์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์นั้นสามารถที่จะนำเอามาใช้ได้ง่ายกว่าเอนไซม์จากพืช เนื่องจากจุลินทรีย์มีการเจริญที่เร็วกว่าพืชทำให้ผลิตเอนไซม์ได้เร็วกว่า อาหารที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อกระตุ้นให้สร้างเอนไซม์ก็หาได้ง่ายและ

ทราบแน่นอนแล้ว รวมถึงจุลินทรีย์ยังสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูงและสิ้นเปลืองเนื้อที่ในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่าพืชอีกด้วยซึ่งเป็นข้อได้เปรียบกว่าในพืชจึงได้มีการทดลองผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้จุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตก็คือ *Aspergillus japonicus* และ *Aspergillus niger* ซึ่งจากการศึกษาการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้ *Aspergillus japonicus* (Chen, 1995, Cruz และคณะ, 1998, Cheng และคณะ, 1996, Lee และคณะ, 2000) และ *Aspergillus niger* (Chiang และ Lee, 1997, Nishizawa และคณะ, 2000) พบว่ารูปแบบการผลิต ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้จุลินทรีย์เป็นดังนี้ เมื่อให้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้นเชื้อราจะมีการนำน้ำตาลซูโครสไปใช้อย่างรวดเร็ว ในช่วงแรกพร้อมทั้งผลิตเคสโทสออกมาก่อน จากนั้นเมื่อเคสโทสเพิ่มขึ้นในปริมาณสูงแล้ว เคสโทสจะลดลงพร้อมทั้งมีการเพิ่มขึ้นของนิสโทสอย่างรวดเร็วและมีการสะสมของกลูโคสเกิดขึ้นในภายหลัง



รูปที่ 2.10 แสดงรูปแบบการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดย *Aspergillus japonicus* (Lee และคณะ, 2001) ซูโครส (◇), ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวม (▲), กลูโคส (△), เคสโทส (●), นิสโทส (□)

2.12 การศึกษาการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์

จากการที่ได้มีการทดลองศึกษากันมาอาจจะสามารถแบ่งการทลองการผลิตฟรักโทออลิ-โกแซ็กคาไรด์ออกได้เป็นดังนี้

2.12.1 แบ่งโดยใช้เอนไซม์

2.12.1.1 การผลิตโดยการใช้เอนไซม์อิสระ

Hidaka และคณะ, 1988 ได้ศึกษาการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ โดยใช้เชื้อ *Aspergillus niger* ATCC 2061 เปรียบเทียบกับ Aspergillus สายพันธุ์อื่น และ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า เอนไซม์ ฟรักโทฟูราโนซิเดสของ *Aspergillus niger* ATCC 2061 มีค่า transfructosylation activity ต่อค่า hydrolysing activity (U_t/U_h) สูงกว่าของชนิดอื่น ๆ โดยสามารถสร้าง เคสโทส (GF_2) และ นิสโทส (GF_3) รวมกันได้ประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด

Patel และ Saunders, 1988 ได้ศึกษาการผลิต ß –fructosidases จากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* โดยพบว่า *F.oxysporum* สามารถผลิตเอนไซม์ fructosyltransferase และ invertase ได้

Hang และคณะ, 1995 ได้ศึกษาการผลิต เคสโทส (GF_2) จากน้ำตาลซูโครสโดยใช้เอนไซม์จาก *Aspergillus foetidus* NRRL 377 พบว่าปริมาณของ เคสโทส (GF_2) ที่ผลิตได้ขึ้นอยู่กับปริมาณของน้ำตาลซูโครส เริ่มต้นที่ให้ โดยยิ่งเพิ่มปริมาณของน้ำตาลซูโครสมากขึ้นก็จะได้ปริมาณเคสโทส (GF_2) มากขึ้นและพบว่าหากให้น้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 467 กรัมต่อลิตร (g/l) เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จะสามารถผลิตเคสโทส (GF_2) ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณน้ำตาลซูโครสที่ให้

Wen Chang Chen, 1995 ได้ศึกษาเปรียบเทียบการผลิต ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ระว่างวิธีการผลิตแบบ batch fermentation และแบบ fed-batch fermentation โดยใช้เชื้อ *Aspergillus japonicus* พบว่าเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดสของ *Aspergillus japonicus* มี activity สูงสุดเมื่อมีน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่ 20 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก และการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคไรด์แบบ fed-

batch fermentation โดยมีการเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 36 เมื่อเลี้ยงเชื้อไปเป็นเวลา 96 ชั่วโมงพบว่ามีปริมาณของเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดสมีมากกว่าการผลิตแบบbatch fermentation ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์

Kim และคณะ, 1998 พบว่าเอนไซม์ ฟรักโทซิลทรานเฟอรเรส (Fructosyltransferase) ที่แยกได้จาก *Bacillus macerans* EG6 สามารถทำให้เกิดการทรานฟรักโทซิลเลชั่น (Transfructosylation) เมื่อมีความ เข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 100 กรัมต่อลิตร (g/l) โดยเมื่อทดลองให้น้ำตาลซูโครส 500 กรัมต่อลิตร (g/l) ที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เอนไซม์นี้สามารถผลิต ฟรักโทฟิวแรนโนซิลนิสโทส (GF_4) ได้โดยไม่มีฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดอื่น ๆ ปะปนมาด้วย

Hayashi และคณะ, 1991 ได้รายงานการผลิตน้ำเชื่อมชนิดใหม่ที่มี neofructo-oligosaccharides ซึ่งผลิตจากแบคทีเรีย *Penicillium citrinum* โดยประกอบด้วย1-kestose 22% nystose 14% และ neo-kestose 11%

Yoshikawa และคณะ, 2006 ได้ศึกษาการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์จาก *Aureobasidium pullulans* DSM2404 โดยราชนิดนี้มีเอนไซม์ β-fructofuranosidases หรือ FFases ทั้งหมด 5 ชนิด คือ I II III IV และ V เอนไซม์เหล่านี้จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยา transfructosylation ของซูโครส ทำให้ได้ผลผลิตคือฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ FFases นั้นมีบทบาทสำคัญในการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ เนื่องจากเมื่อมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า จะพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มี activity มากกว่าเอนไซม์ชนิดอื่นอย่างเห็นได้ชัด

2.12.1.2 การผลิตโดยการตรึงเซลล์

Chin และคณะ, 1996 ได้ทำการศึกษาการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้ *Aspergillus japonicus* โดยการตรึงสายใยด้วย Calcium alginate gel พบว่าเมื่อเลี้ยง immobilized cell ที่ 42 องศาเซลเซียส โดยให้น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สามารถผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ได้มากกว่า 55 เปอร์เซ็นต์ และยังสามารถทำการผลิตได้นานกว่า 1 เดือน (35 วัน) โดยที่เอนไซม์สูญเสีย activity ไปเพียง 17 เปอร์เซ็นต์

Chung และ Lee, 1997 ได้ศึกษากผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ โดยการตรึงเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดส จาก *Aspergillus* sp. ใน Methylacrylamide-based polymeric beads แล้วพบว่าเมื่อทำการผลิตเป็นเวลา 17 ชั่วโมง โดยใช้น้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 10 30 และ 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จะได้ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวม 35 55 และ 61 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับโดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น และแนวโน้มของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จะมีความสัมพันธ์กับ การลดลงของน้ำตาลซูโครส

Cuz และคณะ, 1998 ได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตฟรักโทออลิ-โกแซ็กคาไรด์โดย *Aspergillus japonicus* โดยการตรึงสายใยใน calcium alginate พบว่า สภาวะที่เหมาะสมคือ ที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 65 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และใช้เวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งจะทำให้ได้ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ประมาณ 61-68 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น

Chien และคณะ, 2001 ได้ทำการศึกษาการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์จาก *Aspergillus japonicus* โดยทำการตรึงสายใยใน gluten โดยเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี batch fermentation กับ น้ำตาลซูโครสความเข้มข้นเริ่มต้น 400 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ได้ 61 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณน้ำตาลซูโครสที่เติมลงไป และเมื่อทดลองผลิตแบบ continuous fermentation พบว่า เมื่อให้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 400 กรัมต่อลิตร โดยให้น้ำตาลซูโครส flow rate 0.8 มิลลิตรต่อนาที (ml/min) จะได้ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์สูงสุด คือ 173 กรัมต่อนาทีต่อลิตร แต่พบว่า activity ของการผลิต จะลดลงเหลือ 50 เปอร์เซ็นต์ใน 34 วัน

Jung Soo Lim และคณะ, 2007 ได้ศึกษาการผลิต neo-fructooligosaccharides หรือ neo-FOS ด้วยเอนไซม์ neo-fructosyltransferase ของ *Penicillium citrinum* โดยอาศัยกระบวนการ immobilization ของเอนไซม์ neo-fructosyltransferase และเซลล์ของ *P. citrinum* เรียกกระบวนการนี้ว่า Co-immobilization ซึ่งพบว่า กระบวนการนี้ สามารถผลิต neo-FOS ได้ 108.4 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าการ immobilization เซลล์เพียงอย่างเดียว

2.12.1.3 การผลิตโดยการใช้เอนไซม์ผสม

เนื่องจากการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ โดยการทรานฟรักโทซิลเลชั่น (Transfructosylation) นั้นจะถูกยับยั้งได้โดยน้ำตาลกลูโคสที่เกิดในปฏิกิริยา ดังนั้นจึงมีนักวิจัยที่พยายามแก้ปัญหานี้โดยการกำจัดกลูโคสออกไปจากปฏิกิริยา

Yun และ Song, 1993 ได้ศึกษาการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ โดยใช้ระบบ 2 เอนไซม์ช่วยกำจัดน้ำตาลซูโครสออกจากระบบโดยใช้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (Glusose oxidase) เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดกลูโคนิก (Gluconic acid) โดยเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดสจาก *Aureobasidium pullulans* 10 ยูนิท (unit) และเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 10 ยูนิท (unit) ต่อน้ำตาลซูโครส 1 กรัม โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ,pH 5.5 โดยปริมาณของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 400 กรัมต่อลิตร (g/l) อัตาการกวน 500 รอบต่อนาที (rpm) และอัตราการให้อากาศ 700 มิลลิลิตรต่อนาที (ml/min) พบว่าสามารถผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ได้ 90-98 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลซูโครสที่ให้

Jung และคณะ, 1993 ทดลองการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดยระบบ 2 เอนไซม์ โดยใช้เอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดสจาก *Aspergillus niger* 10 ยูนิท (unit) และเอนไซม์ กลูโคสออกซิเดส 15 ยูนิท (unit) ต่อน้ำตาลซูโครส 1 กรัม ของน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที (rpm) และ pH 6.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสามารถผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ได้ถึง 89 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลซูโครสที่ให้

Yun และคณะ, 1994 ได้ทำการศึกษาการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้ระบบ 2 เอนไซม์เพื่อกำจัดกลูโคสออกจากระบบเช่นกัน โดยศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมมากที่สุดในการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้ระบบนี้ พบว่าสภาวะทีเหมาะสมที่สุดคือ pH 5.5 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส น้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 40 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อัตราการกวน 550 รอบต่อนาที (rpm) อัตราการให้อากาศ 0.7 ลิตรต่อนาที (l/min) และใช้เอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดส 10 ยูนิท (unit) ร่วมกับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 15 ยูนิท (unit) ต่อน้ำตาลซูโครส 1 กรัมโดยภายใต้สภาวะนี้สามารถผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ได้ 98 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลซูโครสที่ให้

ตารางที่ 2.8 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากการใช้เอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดสและใช้เอนไซม์กลูโคสออกซิเดสร่วมกับเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดส (Yun และคณะ, 1993)

Sugar	Fructofuranosidase	Fructofuranosidase and Glucose oxidase
Glucose	27.73	0
Sucrose	14.01	1.68
1-kestose	39.78	43.63
Nystose	58.26	54.69
Total FOS	58.26	98.32

2.12.1.4 การผลิตโดยการนำเชื้อกลับมาใช้ใหม่

Sangeetha และคณะ, 2004 ได้ศึกษาการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์จาก *Aspergillus oryzae CFR 202* โดยการนำเชื้อกลับมาใช้ใหม่ (Recycling culture) ผลจากการศึกษาพบว่าประสิทธิภาพของการผลิต ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์จะมีประสิทธิภาพในการผลิตเท่าเดิมแต่เมื่อผ่านไป 6 ครั้ง จะทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตลดลง ดังนั้นวิธีการนี้จึงเป็นแนวทางใหม่ในการเพิ่มปริมาณของการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในด้านอุตสาหกรรมให้มากขึ้นโดยไม่ต้อง ถ่ายเชื้อเพิ่ม

2.12.2 แบ่งโดยใช้กระบวนการผลิต

2.12.2.1 การผลิตแบบกะ (Batch)

การผลิตแบบกะโดย Lee และ Chiang, 1997 โดยทำการศึกษากากผลิตฟรักโทออลิ-โกแซ็กคาไรด์โดยการตรึงเอนไซม์บีตาฟรักโทฟิวราโนซิเดสที่ได้จาก *Aspergillus japonicus* TIT-JK1 ใน Methylacrylamide-Based Polymeric beads แล้วพบว่าเมื่อทำการผลิตเป็นเวลา 17 ชั่วโมง โดยใช้น้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 10 30 และ 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จะได้ผลผลิตเป็น

ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวมเป็น 35 55 และ 61 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลทั้งหมดที่มีอยู่ภายหลังจากทำการผลิตไป 17 ชั่งโมง โดยปริมาณของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาสซูโครสเริ่มต้น เช่นเดียวกับการทดลองผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์แบบกะโดย Cruz และคณะ, 1998 ทำการทดลองผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดยทำการตรึงสายใยของ *Aspergillus japonicus* บนแคลเซียมอัลจิเนต (Calcium alginate) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือที่ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) 5.0 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และเมื่อทำการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นตั้งแต่ 30 ถึง 70 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นจะทำให้ได้ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้นโดยที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 65 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรจะทำให้ได้ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์สูงที่สุดคือ 61.28 เปอร์เซ็นต์น้ำตาลทั้งหมดที่มีอยู่ภายหลังจากทำการผลิต 4 ชั่วโมง

Sanchez และคณะ, 2008 ได้ทำการศึกษาการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดยเอนไซม์ฟรักโทซิลทรานเฟอเรสจาก *Aspergillus* sp. N74 ในถังหมักแบบ Mechanically agitated airlift reactor ในการเลี้ยงแบบกะ พบว่าที่เชื้อเริ่มต้น 6 และ 9.5 กรัมต่อลิตรโดยน้ำหนักแห้ง ปริมาณความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นที่ 70 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) pH 5.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส การปั่นกวนที่ 350 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.012 เมตรต่อวินาที และ เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 26 ชั่วโมง พบว่าที่เชื้อเริ่มต้น 6 กรัมต่อลิตรของน้ำหนักแห้ง มีค่าการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ (Y_{FOS}) เป็น 69 เปอร์เซ็นต์ (43 เปอร์เซ็นต์ เคสโทส และ 26 เปอร์เซ็นต์ นิสโทส) แต่ในขณะที่เชื้อเริ่มต้นเป็น 9.5 กรัมต่อลิตรของน้ำหนักแห้ง มีค่า Y_{FOS} สูงสุดที่ 70 เปอร์เซ็นต์ (43 เปอร์เซ็นต์ เคสโทส 25 เปอร์เซ็นต์ นิสโทส และ 2 เปอร์เซ็นต์ ฟรักโทฟิวแรนโน-ซิลนิสโทส) หลังจากการเลี้ยงเชื้อไป 4 ชั่วโมงและมีค่า Y_{FOS} เหลือ 57 เปอร์เซ็นต์ (18 เปอร์เซ็นต์ เคสโทส 33 เปอร์เซ็นต์ นิสโทส และ 6 เปอร์เซ็นต์ ฟรักโทฟิวแรนโนซิลนิสโทส) หลังจากสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ

2.12.2.2 **แบบกึ่งกะ** (Fed batch)

Wen Chang Chen, 1995 ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคา-ไรด์โดยใช้วิธีการผลิตแบบ batch fermentation และแบบ fed-batch fermentation โดยใช้เชื้อ *Aspergillus japonicus* และทำการแปรผันค่าน้ำตาสซูโครสเริ่มต้นที่ 5 10 15 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรพบว่าเอนไซม์บีตาฟรักโทฟูราโนซิเดสของ *Aspergillus japonicus* มีค่า

แอคทีวิตี (activity) สูงที่สุดที่ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 20 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการศึกษาการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์แบบ fed-batch fermentation โดยมีการเติมน้ำตาลซูโครสเพิ่มลงไปในชั้วโมงที่ 36 แล้วทำการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ต่อไปจนถึงชั่วโมงที่ 96 พบว่าปริมาณของเอนไซม์บีตาฟรักโทฟูราโนซิเดสมีมากกว่าการผลิตแบบกะประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์

2.12.2.3 **แบบต่อเนื่อง** (Continuous)

Chien และคณะ, 2001 ได้ทำการศึกษาการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์จาก *Aspergillus japonicus* ด้วยวิธีผลิตแบบต่อเนื่องโดย เมื่อทำการตรึงสายใยในกลูเต็น (Gluten) และให้น้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 400 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ได้ 61 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลทั้งหมดเมื่อทำการผลิตไปเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ในการผลิตแบบกะ และเมื่อทำการผลิตแบบต่อเนื่องโดยให้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 400 กรัมต่อลิตร อย่างต่อเนื่องด้วยอัตราการเติม 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที จะได้อัตราการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์สูงสุดคือ 173 กรัมต่อนาที แต่พบว่าความสามารถในการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์จะลดลงเหลือเพียง 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อทำการผลิตแบบต่อเนื่องไปเป็นเวลา 34 วัน

Chin และคณะ, 1996 ได้ทำการศึกษาการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์แบบต่อเนื่องโดยใช้ *Aspergillus japonicus* ด้วยวีธีการตรึงเอนไซม์บีตาฟรักโทฟูราโนซิเดส ในแคลเซียมแอลจิเนต (Calcium alginate gel) พบว่าเมื่อเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราเร็ว 2 มิลลิลิตรต่อนาที โดยรควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 42 องศาเซลเซียส สามารถผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคา-ไรด์อย่างต่อเนื่องได้เป็นเวลา 35 วัน โดยที่เอนไซม์สูญเสียความสามารถไปเพียง 17 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งนอกจากการศึกษาการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้ *Aspergillus* sp. ที่นิยมทำการศึกษาแล้วยังมีการศึกษาการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดยจุลินทรีย์ชนิดอื่นอีกเช่น Kim และคณะ, 1998 ทำการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์บีตาฟรักโทฟูราโนซิเดสที่แยกจาก *Bacillus macerans* EG6 พบว่าสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาทรานฟรักโทซิลเลชั่นได้เมื่อมีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 100 กรัมต่อลิตร และเมื่อทำการทดลองให้น้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 500 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เอนไซม์นี้สามารถผลิต ฟรักโทฟิวแรนโนซิลนิสโทส (GF_4) ได้โดยไม่มีฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดอื่น ๆ ปะปนมาด้วย

Sheu และคณะ, 2002 ได้ทำการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์แบบต่อเนื่อง (Continuous) ในถังหมักแบบใช้ใบกวน โดยใช้ *Aspergillus japonicus* CCRC 93007 และ *Aureobasidium pullulans* ATCC 9348 ที่สร้างเอนไซม์ฟรักโทฟูราโนซิเดสร่วมกับ *Gluconobactor oxydans* ATCC 23771 ที่สร้างเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase) สามารถผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ได้เป็น 80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลทั้งหมดและเหลือน้ำตาลกลูโคสในระบบ 5-7 เปอร์เซ็นต์

2.13 การศึกษาการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในประเทศไทย

ในปี พ.ศ. 2539 เสาวนีย์ ศิริรูป สามารถทำการคัดแยก *Penicillium* sp. ที่สามารถผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์จากน้ำตาลซูโครสได้โดยตั้งชื่อว่า *Penicillium* sp. H12

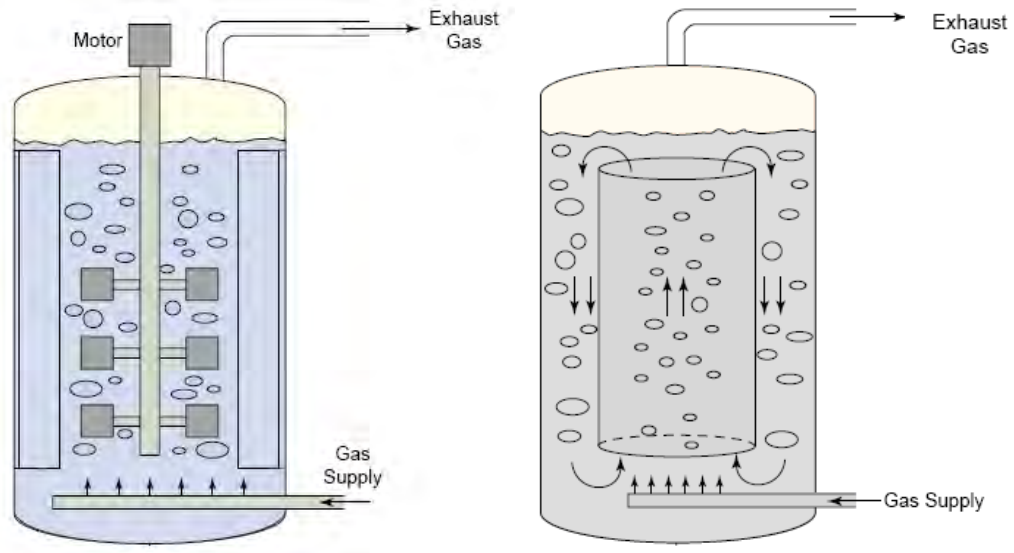
ในปี พ.ศ. 2543 วรรณา ศรีสัจจารักษ์ ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตฟรักโท-ออลิโกแซ็กคาไรด์ โดย *Penicillium* sp. H12 ที่คัดแยกได้ในขวดเขย่าโดย โดยพบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือใช้น้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด
ด่าง 5.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ในปี พ.ศ. 2545 วีระพงษ์ พรประสาทผล ได้ศึกษาการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้ *Penicillium* sp. H12 ในถังปฏิกรชีวภาพแบบมีใบกวน (Stirred tank bioreactor) โดยใช้น้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อใช้หัวเชื้ออายุ 18 ชั่วโมงสามารถผลิตฟรักโทออลิ-โกแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด 165 กรัมต่อลิตรในการผลิตแบบกะ และเมื่อทดลองทำการผลิตแบบกึ่งกะ โดยทำการเพิ่มปริมาณน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 5 0 กรัมต่อลิตร ในระหว่างการผลิตพบว่าการเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 9 และ 12 ของการผลิต เหมาะสมต่อการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ซึ่งสามารถผลิตได้ 182 และ 199 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

และจากการทดลองของวีระพงษ์ พรประสาทผล ก็พบว่าเมื่อทำการผลิตฟรักโทออลิ-โกแซ็กคาไรด์เป็นเวลานานจะประสบปัญหาเกี่ยวกับการที่สายใยของ *Penicillium* sp.H12 ถูกทำลายไปเนื่องจากแรงเฉือนของใบพัดของถังปฏิกรชีวภาพและเมื่อเชื้อรามีการเจริญมากขึ้นก็จะทำให้ต้องมีการเพิ่มอัตราการให้อากาศและอัตราการหมุนของใบกวนมากขึ้นทำให้มีการสิ้นเปลืองพลังงานในปริมาณมาก

ในปี พ.ศ. 2548 กิติภัทร ลิ้มประเสริฐ ได้ศึกษาการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์แบบต่อเนื่องโดยใช้ *Penicillium* sp. H12 ด้วยวิธีการที่จะลดความเสียหายของสายใยของเชื้อรา

และลดความสิ้นเปลืองพลังงานในการให้อากาศในระหว่างการผลิต รวมไปถึงการพัฒนารูปแบบการผลิตจากการผลิตแบบกะ และแบบกึ่งกะไปเป็นการผลิตแบบต่อเนื่องด้วยซึ่งการผลิต แบบต่อ-เนื่อง นี้มีข้อดีกว่าการผลิตแบบกะคือสามารถควบคุมและรักษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไว้ได้เป็นเวลานานทำให้สามารถผลิตสารที่ต้องการได้ในปริมาณสูง และเป็นเวลานานและทำให้คุณภาพของผลผลิตที่ได้นั้นมีคุณภาพอีกด้วย นอกจากนั้นก็ทำการเปลี่ยนชนิดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบมีใบกวน เป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิไดซ์เบด (Fluidized bed reactor) เนื่องจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิไดซ์เบดจะมีลักษณะเป็นคอลัมน์ (Column) และมีท่อให้อากาศจากด้านล่างโดยไม่มีใบกวน อากาศจะถูกปล่อยเข้าไปในคอลัมน์จากด้านล่าง และจะแตกเป็นฟองกระจายขึ้นสู่ด้านบนของคอลัมน์ เป็นผลให้เกิดการไหลวนของของเหลวภายในคอลัมน์ลงสู่ด้านล่าง และจะวนกลับขึ้นสู่ด้านบนอีกครั้งทำให้เกิดการถ่ายเทมวลสารระหว่างจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตและอาหารรวมทั้งอากาศได้โดยที่ไม่ต้องใช้ใบกวน จึงทำให้ไม่ต้องใช้พลังงานสูงเหมือนถังหมักแบบมีใบกวนในการให้อากาศ รวมทั้งไม่เกิดแรงเฉือนจากใบกวนกระทำต่อสายใยของเชื้อราทำให้เหมาะสมสำหรับการใช้ผลิตเป็นเวลานาน



รูปที่ 2.11 แสดงรูปของถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดมีใบกวน (ซ้าย) และชนิดฟลูอิไดซ์เบด (ขวา)

ผลการทดลองในการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในถังหมักแบบแอร์ลิฟต์รีแอคเตอร์โดยใช้น้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 300 กรัมต่อลิตร ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 40 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และอัตรา

การให้อากาศ 0.2 vvm ค่าความเป็นกรด–ด่าง เริ่มต้นเป็น 5.0 สามารถผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคา-ไรด์ได้สูงสุด 194 กรัมต่อลิตร

และจากการทดลองของกิติภัทร ลิ้มประเสริฐ พบว่าเมื่อทำการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคา-ไรด์เป็นเวลานานจะประสบปัญหาเกี่ยวกับการที่สายใยของ *Penicillium* sp.H12 นั้นมารวมกันเป็นกลุ่มก้อนที่หนาแน่นจนเกินไป จนทำให้ต้องมีการเพิ่มอัตราการให้อากาศในปริมาณมากขึ้นทำให้มีการสิ้นเปลืองพลังงานในปริมาณมาก

2.14 **ระบบบำบัดน้ำเสียแบบแผ่นหมุนชีวภาพ** (Rotating Biological Contactor:RBC) (http://www.sri.cmu.ac.th/~srilocal/water/map.htm)

ระบบบำบัดน้ำเสียแบบแผ่นหมุนชีวภาพ เป็นระบบบำบัดน้ำเสียทางชีววิทยาให้น้ำเสียไหลผ่านตัวกลางลักษณะทรงกระบอก ซึ่งวางจุ่มอยู่ในถังบำบัดตัวกลางทรงกระบอกนี้จะหมุนอย่างช้าๆ เมื่อหมุนขึ้นพ้นน้ำและสัมผัสอากาศ จุลินทรีย์ที่อาศัยติดอยู่กับตัวกลางจะใช้ออกซิเจนจากอากาศย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสียที่สัมผัสติดตัวกลางขึ้นมา และเมื่อหมุนจมลงก็จะนำน้ำเสียขึ้นมาบำบัดใหม่สลับกันเช่นนี้ตลอดเวลา

รูปที่ 2.12 แสดงระบบบำบัดน้ำเสียแบบแผ่นหมุนชีวภาพ (www.pcd.go.th)

2.14.1 **หลักการทำงานของระบบ**

กลไกการทำงานของระบบในการบำบัดน้ำเสียอาศัยกลุ่มจุลินทรีย์แบบใช้อากาศจำนวนมากที่ยึดเกาะติดบนแผ่นจานหมุนเป็นเมือกชีวภาพ (Biofilm) ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย โดยการหมุนแผ่นจานผ่านน้ำเสีย ซึ่งเมื่อแผ่นจานหมุนขึ้นมาสัมผัสกับอากาศก็จะพาเอาฟิล์มน้ำเสียขึ้นสู่อากาศ และจะไหลไปตามผิวหน้าของแผ่นจานออกซิเจนจากอากาศจะถ่ายเทเข้าไปในฟิล์มของน้ำเสียทำให้จุลินทรีย์ได้รับทั้งอาหารและออกซิเจนจากอากาศเพื่อใช้ในการย่อยสลายหรือเปลี่ยนรูปสารอินทรีย์เหล่านั้นให้เป็น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และเซลล์จุลินทรีย์

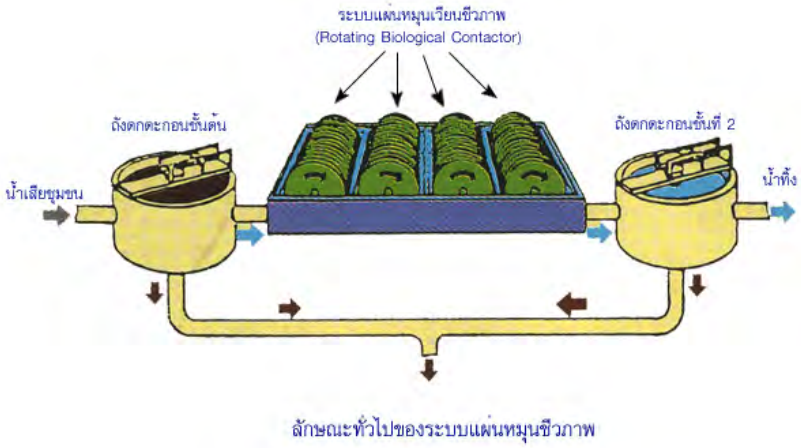
ต่อจากนั้นแผ่นจานจะหมุนลงไปสัมผัสกับน้ำเสียในถังปฏิกิริยาอีกครั้ง ทำให้ออกซิเจนส่วนที่ไม่ถูกใช้ผสมกับน้ำเสียในถังซึ่งเป็นการเติมออกซิเจนให้กับน้ำเสียอีกส่วนหนึ่ง ในขณะเดียวกันความปั่นป่วนที่เกิดขึ้นจากการหมุนของแผ่นจานทำให้เพิ่มการละลายของออกซิเจนในน้ำเสียได้ สลับกันเช่นนี้ตลอดไปเป็นวัฏจักร แต่เมื่อมีจำนวนจุลินทรีย์ยึดเกาะแผ่นจานหมุนหนามากขึ้นจะทำให้มีตะกอนจุลินทรีย์บางส่วนหลุดลอกจากแผ่นจาน เนื่องจากแรงเฉือนของการหมุน (Shear force) ซึ่งจะรักษาความหนาของแผ่นฟิล์มให้ค่อนข้างคงที่โดยอัตโนมัติ ทั้งนี้ตะกอนจุลิน- ทรีย์แขวนลอยที่ไหลออกจากถังปฏิกิริยานี้จะไหลเข้าสู่ถังตกตะกอนเพื่อแยกตะกอนจุลินทรีย์ และ
น้ำทิ้งทำให้น้ำทิ้งที่ออกจากระบบนี้มีคุณภาพดีขึ้น

2.14.2 **ส่วนประกอบของระบบ**

ระบบแผ่นจานหมุนชีวภาพเป็นระบบบำบัดน้ำเสียอีกรูปแบบหนึ่ง ของระบบบำบัดขั้นที่สอง (Secondary Treatment) ซึ่งองค์ประกอบหลักของระบบประกอบด้วย 1) ถังตกตะกอนขั้นต้น (Primary Sedimentation Tank) ทำหน้าที่ในการแยกของแข็งที่มากับน้ำเสีย 2) ถังปฏิกิริยา ทำหน้าที่ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำเสีย และ 3) ถังตกตะกอนขั้นที่สอง (Secondary Sedimentation Tank) ทำหน้าที่ในการแยกตะกอนจุลินทรีย์และน้ำทิ้งที่ผ่านการบำบัดแล้ว โดยในส่วนของถังปฏิกิริยาประกอบด้วย แผ่นจานพลาสติกจำนวนมากที่ทำจาก polyethylene (PE) หรือ high density polyethylene (HDPE) วางเรียงขนานซ้อนกัน โดยติดตั้งฉากกับเพลาแนวนอนตรงจุดศูนย์กลางแผ่น ซึ่งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการบำบัดน้ำเสียจะยึดเกาะติดบนแผ่นจานนี้เป็นแผ่นฟิล์มบางๆ หนาประมาณ 1-4 มิลลิเมตร หรือที่เรียกระบบนี้อีกอย่างว่าเป็นระบบ fixed film ทั้งนี้ชุดแผ่นจานหมุนทั้งหมดวางติดตั้งในถังคอนกรีตเสริมเหล็ก ระดับของเพลาจะอยู่เหนือผิวน้ำเล็กน้อย ทำให้พื้นที่ผิวของแผ่นจานจมอยู่ในน้ำประมาณร้อยละ 35 - 40 ของพื้นที่แผ่นทั้งหมด และในการหมุนของแผ่นจานหมุนชีวภาพอาศัยชุดมอเตอร์ขับเคลื่อนเพลาและเฟืองทดรอบเพื่อหมุนแผ่นจานในอัตราประมาณ 1 - 3 รอบต่อนาที
ระบบแผ่นหมุนชีวภาพ จะประกอบด้วยหน่วยบำบัด ดังนี้
1 บ่อปรับสาภพการไหล (Equalizing Tank)
2. ถังตกตะกอนขั้นต้น (Primary Sedimentation Tank)
3. ระบบแผ่นหมุนชีวภาพ

4. ถังตกตะกอนขั้นที่ 2 (Secondary Sedimentation Tank)

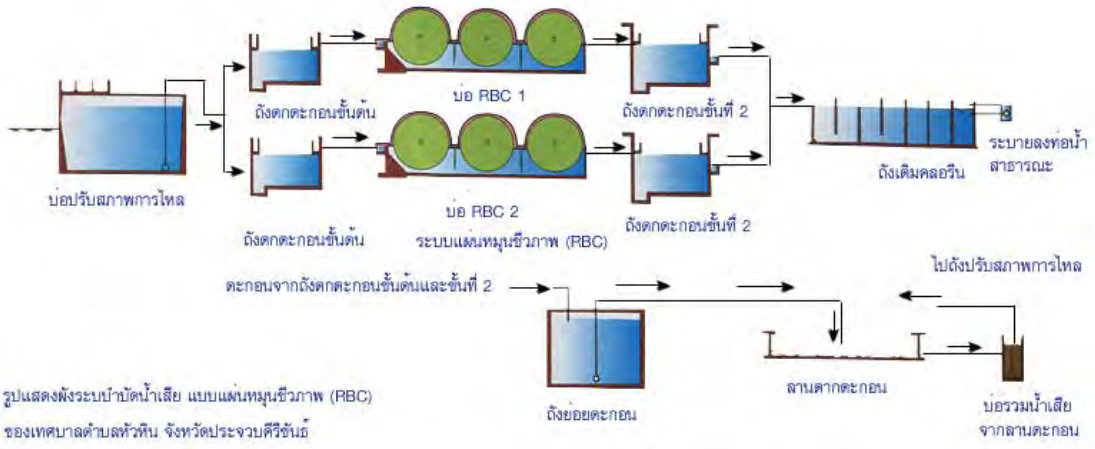
5. บ่อเติมคลอรีน



รูปที่ 2.13 แสดงส่วนประกอบต่างๆของระบบบำบัดน้ำเสียแบบแผ่นหมุนชีวภาพ (www.pcd.go.th)

2.14.3 ตัวอย่างระบบแผ่นจานหมุนชีวภาพที่ใช้ในประเทศไทย

แหล่งชุมชนระดับเทศบาลหลายแห่งใช้ระบบบำบัดน้ำเสียแบบแผนจานหมุนชีวภาพ อาทิเช่น เทศบาลตำบลหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ขนาดของระบบสามารถรองรับน้ำเสียได้ 8,000 ลบ.ม./วัน ใช้พื้นที่ในการก่อสร้างประมาณ 6 ไร่



รูปที่ 2.14 แสดงระบบบำบัดน้ำเสียแบบแผ่นหมุนชีวภาพของเทศบาลตำบลหัวหิน จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (www.pcd.go.th)

2.14.4 ข้อดีและข้อเสียของระบบบำบัดแผ่นหมุนชีวภาพ (สกุลรัตน์ พุกกะวรรณะ, 2548)

ข้อดีของระบบบำบัดแผ่นหมุนชีวภาพ

- การเริ่มเดินระบบ (Start Up) ไม่ยุ่งยาก ซึ่งใช้เวลาเพียง 1 - 2 สัปดาห์
- ระบบบำบัดแผ่นหมุนชีวภาพ ชีวมวลจะเคลื่อนที่ผ่านน้ำทิ้งทำให้จุลินทรีย์ได้รับอาหารเพียงพอไม่ว่าอัตราการไหลของน้ำทิ้งจะมากหรือน้อยจึงไม่มีความจำเป็นต้องเวียนกลับ
- เวลาสัมผัสระหว่างชีวมวลกับน้ำทิ้ง สามารถปรับเปลี่ยนได้โดยการปรับรอบหมุนของแผ่นจาน ทำให้ควบคุมความหนาของแผ่นฟิล์มได้โดยตรง การปรับรอบหมุนสามารถเปลี่ยนอัตราการถ่ายเทออกซิเจน
- ในระบบบำบัดแผ่นหมุนชีวภาพ ไม่ต้องมีการหมุนเวียนตะกอนกลับทำให้เกิดประโยชน์หลายอย่าง เช่น ไม่มีการสะสมของของแข็งเฉื่อยในระบบ และ ตะกอนที่ก้นถังสามารถทำให้เข้มข้นมากกว่ากรณีที่มีการเวียนกลับ
- การดูแลและบำรุงรักษาง่าย ทำให้ไม่จำเป็นต้องใช้บุคลากรที่มีความรู้ความชำนาญมากนัก
- ใช้พลังงานในการเดินระบบน้อยโดยใช้พลังงานไฟฟ้าใช้สำหรับขับเคลื่อนมอเตอร์เท่านั้น เนื่องจากแผ่นจานหมุนมีการลอยตัวและแรงเสียดทานเพลาเกิดน้อยมากกำลังงานส่วนใหญ่ที่ต้องการก็เพื่อหมุนเอาชนะแรงลากระหว่างแผ่นจานกับของเหลวเท่านั้น ส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการดำเนินการและบำรุงรักษาต่ำด้วย
- ระบบสามารถรับภาวะเฉียบพลัน (Shock load) หรือสภาวะที่ไม่คงตัว (Transient state) ได้ดีกว่าระบบอื่นๆ เช่นในการีของสารพิษและภาวะเฉียบพลันทำลาย (Deleterious shock loads) ซึ่งสารพาสามารถไหลผ่านถังปฏิกิริยาอย่างเร็วพอที่ชีวมวลจะไม่ถูกฆ่าทั้งหมด ดังนั้นระบบจึงสามารถฟื้นตัวได้อย่างรวดเร็ว

ข้อเสียของระบบบำบัดแผ่นหมุนชีวภาพ

- ราคาเครื่องจักรอุปกรณ์ที่มีราคาแพง เนื่องจากต้องใช้วัสดุอย่างดีเป็นส่วนประกอบ
- การขาดความจุสำรอง และ ขาดความยืดหยุ่นในการควบคุมการปฏิบัติการโดยเมื่อติดตั้งระบบแล้วจะทำการปรับการทำงานเพื่อให้เหมาะกับการเปลี่ยนคุณสมบัติของกระแสเข้าหรือข้อกำหนดของกระแสออกได้น้อยมาก
- เพลาแกนหมุนที่ต้องรับทั้งแรงอัดและแรงบิดชำรุดบ่อยครั้ง
- อัตราการถ่ายเทออกซิเจนจากการหมุนของแผ่นจานจำกัดอัตราการรับสารอินทรีย์ เช่น กรณีความเข้มข้นของน้ำทิ้งสูง ออกวิเจนที่ได้จากการหมุนอย่างเดียวอาจไม่พอที่จะรักษาสภาพแอโรบิกเต็มที่ของปฏิกิริยาไว้ได้ ทำให้เกิดกลิ่น หรือการเติบโตของจุลินทรีย์ไปรบกวนการใช้ระบบขับเคลื่อนด้วยอากาศ
- แผ่นจานหมุนชีวภาพชำรุดเสียหายง่าย หากสัมผัสรังสีอัลตร้าไวโอเล็ตและสารพิษเป็นเวลานานอย่างต่อเนื่อง

ดังนั้นจุดมุ่งหมายของงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตฟรักโท-ออลิโกแซ็กคาไรด์ในถังหมักชีวภาพแบบหมุน (Rotary Biological Contactor Fermenter) โดยใช้ *Penicillium* sp. H12 ซึ่งจะเปลี่ยนจากการผลิตในถังแบบมีใบกวนซึ่งมีข้อด้อย คือเกิดแรงเฉือนจากใบกวนทำให้เซลล์ถูกทำลายระหว่างการผลิต และให้อากาศในปริมาณสูงมากทำให้ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้น และถังหมักชนิดแอร์ลิฟต์รีแอคเตอร์ซึ่งให้อากาศจากด้านล่างและไม่มีใบกวนซึ่งให้ผลผลิตสูงขึ้นแต่ใช้การเป่าอากาศในปริมาณมาก และเมื่อผลิตเป็นเวลานานทำให้มีสายใยของราหนาแน่นมากจนเกินไป ดังนั้นเพื่อลดปัญหาเรื่องการเป่าอากาศในปริมาณมากซึ่งใช้ต้นทุนในการผลิตสูงจึงใช้ถังหมักชีวภาพแบบหมุนในการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ซึ่งมีข้อดีคือจะช่วยให้อากาศถ่ายเทในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดี ช่วยเพิ่มปริมาณออกซิเจนในถังหมัก ใช้พลังงานต่ำในการผลิต และสามารถพัฒนาระบบการผลิตให้มีประสิทธิภาพในระดับอุตสาหกรรมต่อไปได้

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

1. อุปกรณ์

- เครื่องวัดและควบคุมความเป็นกรด-ด่าง (pH controller) รุ่น FM – 2000 ของบริษัท Eyela Tokyo Rikakikai co.Ltd., Japan
- ปั๊มเติมสาร (Pump box) รุ่น FB – 2000 ของบริษัท Eyela Tokyo Rikakikai co.Ltd., Japan
- ปั๊มเติมสาร (Peristatic pump) รุ่น MP – 1000 – H ของบริษัท Eyela Tokyo Rikakikai co.Ltd., Japan
- อุปกรณ์วัดค่าความเป็นกรด ด่าง (pH probe) รุ่น 405 – DPAS – SC – K8S / 225 ของบริษัท Mettler – Toledo GmbH Schwenzenbach, Swiltzerland
- ปั้มอากาศ (Air pump) รุ่น DOA – P104 - BN ของบริษัท MFG.CORP., USA
- เครื่องควบคุมอัตราการให้อากาศ (Air flow meter) รุ่น FBC – V – S – A – 30 - LM ของบริษัท New – Flow Technologies.Inc., USA
- เครื่องปรับค่ากระแสไฟฟ้า (Step down transformer) Auto – 05 ของบริษัท Tron Advance Technology Transformer., USA
- กล้องจุลทรรศน์ชนิดสองตา (Binocular compound microscope) รุ่น CH30RF200 ของ Olympus optical co.Ltd., Taiwan
- เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น G – 27 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co.Inc., USA
- เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น Innova™ 4300 ของบริษัท New Brunswick Scientific Co.Inc., USA
- เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น VSM – 3 ของบริษัท Shelton scientific MPG.Inc, USA
- เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด ด่าง (pH meter) รุ่น Seven Easy ของบริษัท Mettler – Toledo GmbH Schwenzenbach, Swiltzerland

- ตู้อบความร้อน (Hot air oven) รุ่น Contherm series Five ของบริษัท Contherm Scientific LTD., New Zealand
- ตู้อบความร้อน (Hot air oven) รุ่น UL – 80 ของบริษัท Memmert GmbH, Germany
- เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Seiko, Ltd., Japan, รุ่น MLS 3020 ของบริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25 ของบริษัท Hirayama, Co., Ltd., Japan
- อุปกรณ์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer) ขนาด bright line deep 1/10 มิลลิลิตร ของบริษัท Boeco, Germany
- ไมโครปิเปต (Micropipette) รุ่น P 200 P 1,000 P 5,000 และ P 10,000 ของบริษัท Gilson, France
- กระดาษกรอง (Filter paper) ของบริษัท Advantec, Japan
- กระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตต (Cellulose acetate membrane) รูขนาด 0.45 ไมโครเมตร ของบริษัท Satorius, Germany
- ชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE (Poly tetra fluoro ethylene) รูขนาด 0.2 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan
- กระดาษกรอง (Nylon membrane) ขนาด 47 มิลลิเมตร รูขนาด 0.45 ไมโครเมตร ของบริษัท Whatman, USA
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น 4-15 บริษัท Sigma, Germany
- เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Bench-top centrifuge) รุ่น Sigma 4 – 15 ของบริษัท Scientific Promotion Co.Ltd., USA
- กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan
- เครื่องชั่งหยาบ 2 ตำแหน่ง รุ่น PG 2002-S ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
- เครื่องชั่งหยาบ 2 ตำแหน่ง รุ่น BJ 100 C บริษัท Presica, Switzerland
- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น AG 285 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น AB 204-5 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
- ตู้เขี่ยเชื้อแบบ ISSCO laminar flow รุ่น BVT-124 ของบริษัท International Scientific Supply, USA และ รุ่น Clean model. V4 ของบริษัท LAB Service, Thailand
- เครื่องโครมาโตกราฟชนิดเหลวประสิทธิภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) รุ่น LC1200 ของบริษัท Agilent, USA
- คอลัมน์สำหรับวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรต Prevail Carbohydrate ES column 5 µm ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร ของบริษัท Prevail, Germany

2. เคมีภัณฑ์

- น้ำตาลทรายขาว ของบริษัทมิตรผล, Thailand
- ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA
- แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ของบริษัท HBD Laboratory Chemicals Ltd., England
- โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ของบริษัท May and Baker Ltd., England
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- อะซิโตรไนไตรท์ (Acetronitrile) (CH_3CN) HPLC grade ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- น้ำตาลฟรักโทส (Fructose) HPLC grade ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- น้ำตาลกลูโคส (Glucose) HPLC grade ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- น้ำตาลซูโครส (Sucrose) HPLC grade ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดเคสโทส (Kestose) HPLC grade ของบริษัท Wako Pure Chemical., Japan
- ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดนิสโทส (Nystose) HPLC grade ของบริษัท Wako Pure Chemical., Japan
- กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (Concentration HCl) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- ทวีน 80 (Tween 80) ของบริษัท BDH Laboratory Chemicals Ltd., England
- เมทานอล (Methanol) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany
- เอทานอล (Ethanol) ของบริษัท E.Merk, Dramstadt, Germany

3. วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 อาหารแข็งโปเตโตเด็กซ์โตรส (Potato Dextrose Agar)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

มันฝรั่งหั่น	200	กรัม
เด็กซ์โตรส	20	กรัม
วุ้นผง (Agar)	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยล้างมันฝรั่งให้สะอาด ปอกเปลือกแล้วนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งให้ได้น้ำหนักประมาณ 200 กรัม ต้มให้เดือดนาน 15-20 นาที กรองเอาแต่ส่วนน้ำด้วยผ้าขาวบาง มาเติมส่วนประกอบที่เหลือ ละลายให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20นาที

3.1.2. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่เป็นสายใย

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

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

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 5.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.1.3. อาหารสำหรับผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในถังหมัก

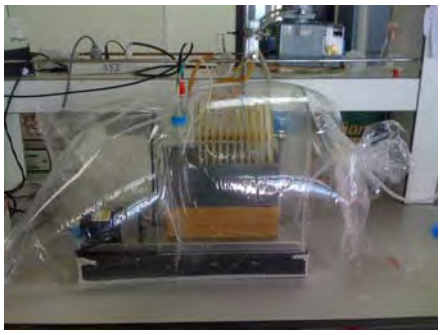
ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

น้ำตาลทราย	250 - 300	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.3	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1	กรัม

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 5.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3.2 **ถังหมักชีวภาพแบบหมุน** (Rotary Biological Contactor Fermenter)

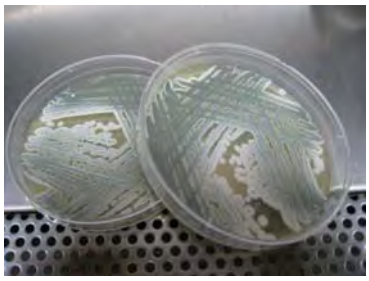
ประกอบถังหมักขนาดความจุ 4 ลิตร โดยแผ่นตัวกลางจะมีลักษณะเป็นแผ่นอะคริลิก (Acrylic) แผ่นกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 16 เซนติเมตร หนา 3 มิลลิเมตร ติดด้วยวัสดุที่เหมาะสมต่อการเกาะติดของเชื้อ เรียงซ้อนกัน 11 แผ่นบนเพลากลาง โดยเพลากลางจะหมุนในแนวนอน ซึ่งอัตราการหมุนของแผ่นหมุน สามารถปรับระดับได้เป็น 2 3 และ 4 รอบต่อนาที และระดับการจมตัวของแผ่นหมุนลงใต้ระดับอาหารสามารถปรับระดับได้เป็น 20 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี ตามลำดับ (สกุลรัตน์ พุกกะวรรณะ, 2548)



รูปที่ 3.1 แสดงถังหมักชีวภาพแบบหมุน ขนาดความจุ 4 ลิตร

3.3 จุลินทรีย์

ทำการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ (FOS) โดยใช้จุลินทรีย์ *Penicillium* sp. H12 ที่คัดแยกได้ในประเทศไทยโดย เสาวนีย์ ศิริรูป พ.ศ. 2539



รูปที่ 3.2 แสดงลักษณะโคโลนีของ *Penicillium* sp. H12 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

3.4 การเก็บรักษาเชื้อรา

การเก็บรักษาเชื้อรา โดยการเขี่ยเชื้อราโดยใช้ลูป (Loop) เขี่ยเชื้อลาก (Streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (Agar slant) สำหรับเก็บรักษาเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาเขี่ยลากเชื้อลงบนอาหารใหม่ทุกๆ 3 เดือน

3.5 การเตรียมหัวเชื้อจากสปอร์สำหรับผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์

3.5.1 การเตรียมสปอร์ของ *Penicillium* sp. H12

เพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง PDA (Potato Drextose Agar) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วันเพื่อให้ได้สปอร์จำนวนมากพอ (สปอร์มีสีเขียวเข้ม) จากนั้นนำน้ำปลอดประจุ (Deionized water) ผสมทวีน 80 (Tween 80) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติมลงในหลอดที่ใช้เลี้ยง *Penicillium* sp. H12 อายุ 4 วัน แล้วทำการขูดสปอร์ให้หลุดออกมาจนหมดจากนั้นทำการนับจำนวนสปอร์ด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ให้ได้สปอร์ความเข้มข้น $2x10^9$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร (กิติภัทร ลิ้มประเสริฐ, 2548)

รูปที่ 3.3 แสดงสปอร์ของ *Penicillium* sp. H12 หลังจากเขี่ยด้วยน้ำปลอดประจุผสมทวีน 80

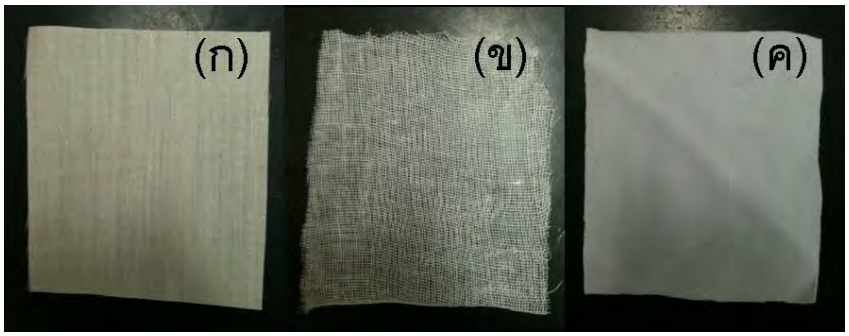
3.5.2 การเตรียมหัวเชื้อจากสปอร์สำหรับทำการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์

นำสปอร์ความเข้มข้น $2x10^9$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่ได้จากข้อ 3.5.1 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารสำหรับเลี้ยงหัวเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5.0 จากนั้นนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บเชื้อทุกๆ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) ทั้งภายนอกและผ่านกล้องจุลทรรศน์โดยย้อมสีสปอร์ราด้วยสี Lacto phenol cotton blue เพื่อหาอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมที่สุดในการนำไปเกาะบนแผ่นหมุนชีวภาพเพื่อผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์

3.6 ศึกษาชนิดของวัสดุที่เหมาะสมต่อการเกาะติดของเชื้อราบนแผ่นหมุน

3.6.1 ศึกษาลักษณะของวัสดุเมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

วัสดุที่ใช้ติดบนแผ่นหมุน เป็นผ้า 3 ชนิด ได้แก่ ผ้ายืด ผ้าลินิน และผ้าขาวบาง ซึ่งลักษณะของเนื้อผ้ามีช่องว่างที่สายใยของราจะมาเกาะติดได้ นำผ้าทั้ง 3 ชนิดไปศึกษาลักษณะโดยทั่วไปผ่านทาง กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เพื่อหาวัสดุที่เหมาะสมกับการเกาะติดของเชื้อ



รูปที่ 3.4 แสดงผ้า ลินิน ผ้าขาวบาง และผ้ายืด ตามลำดับ

3.6.2 ศึกษาการเกาะของเชื้อ *Penicillium* sp. H12 บนวัสดุบนแผ่นหมุนในถังหมักชีวภาพแบบหมุนแบบกะ

ถ่ายหัวเชื้อปริมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) (กิติภัทร ลิ้มประเสริฐ, 2548) ที่มีอายุที่เหมาะสมที่เตรียมไว้ในข้อ 3.5.2 ลงในอาหารสำหรับผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในถังหมักชีวภาพแบบหมุน โดยควบคุมความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 5.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (วีระพงษ์ พรประสาทผล, 2545) โดยใช้ความเร็วรอบของแผ่นหมุนชีวภาพเท่ากับ 4 รอบต่อนาที และระดับการจมตัวของแผ่นหมุนชีวภาพลงใต้ระดับอาหารเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี ติดตามผลโดยทำการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง โดยเมื่อหลังจากทำการทดลองเสร็จสิ้นเป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำแผ่นหมุนทั้งสามแผ่นซึ่งมีวัสดุแต่ละชนิดติดอยู่ไปทำการศึกษาการเกาะติดของเชื้อ โดยทำการตัดผ้าที่แผ่นหมุนขนาด 1x1 นิ้ว ทำการสุ่มตัดตัวอย่างสามตัวอย่างในแต่ละบริเวณของแผ่นหมุนแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยเพื่อหาชนิดของวัสดุที่เหมาะสมต่อการเกาะของหัวเชื้อบนแผ่นหมุน

3.7 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้ถังหมักชีวภาพแบบหมุนที่ประกอบขึ้นแบบกะ

3.7.1 หาอัตราการการหมุนของแผ่นหมุนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์

เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นตามวิธีในข้อ 3.5.2 โดยแปรผันอัตราการหมุนเป็น 2 3 และ 4 รอบต่อนาที ตามลำดับ ทำการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในอาหารสำหรับผลิตฟรัก-

โทออลิโกแซ็กคาไรด์ในถังหมักชีวภาพแบบหมุน โดยควบคุมความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 5.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้การจมตัวของแผ่นหมุนชีวภาพลงใต้ระดับอาหารเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 250 กรัมต่อลิตร และเป่าอากาศปลอดเชื้อ 1.25 ลิตรต่อนาที การติดตามผลการทดลองโดย

- การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อจะทำการวิเคราะห์ระหว่างการทดลองและหลังจากเสร็จสิ้นการทดลองโดยในระหว่างการทดลองจะทำการเก็บเชื้อทุกๆ 4 ชั่วโมง ทำการเก็บน้ำหมัก 10 มิลลิลิตร 3 ซ้ำ มาปั่นแยกเชื้อโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำเชื้อที่ได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 วัน นำมาชั่งหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ ส่วนหลังจากเสร็จสิ้นการทดลองจะทำการขูดเชื้อจากแผ่นหมุนชีวภาพ และนำไปหาน้ำหนักเซลล์แห้งโดยนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วันนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

- น้ำหมักที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงจะนำไปหาปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆโดยใช้วิธีโครมาโตกราฟฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เพื่อหาอัตราการหมุนของแผ่นหมุนที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ปริมาณฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ที่สูงที่สุด

3.7.2 หาระดับการจมตัวของแผ่นหมุนในอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์

เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นตามวิธีในข้อ 3.5.2 โดยแปรผันระดับการจมตัวของแผ่นหมุนในอาหารเป็น 20 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี ตามลำดับ โดยใช้อัตราการหมุนของแผ่นหมุนที่เหมาะสมจากข้อ 3.7.1 ผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ตามข้อ 3.7.1 ติดตามผลการทดลองโดยการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและหาปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆโดยใช้วิธีโครมาโตกราฟฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เพื่อหาระดับการจมของแผ่นหมุนในอาหารที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ปริมาณฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ที่สูงที่สุด

3.7.3 หาปริมาณของหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์

เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นตามวิธีในข้อ 3.5.2 โดยแปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 30 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของถังหมัก โดยใช้อัตราการการหมุนของ

แผ่นหมุนที่เหมาะสมจากข้อ 3.7.1 และระดับการจมตัวของแผ่นหมุนในอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.7.2 ผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ตามข้อ 3.7.1 ติดตามผลการทดลองโดยการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและหาปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆโดยใช้วิธีโครมาโตกราฟฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เพื่อหาปริมาณของหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ปริมาณฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ที่สูงที่สุด

3.7.4 หาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตฟรัก-โทออลิโกแซ็กคาไรด์

เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นตามวิธีในข้อ 3.5.2 โดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่ความเข้ม 250 และ 300 กรัมต่อลิตร โดยใช้อัตราการการหมุนของแผ่นหมุนที่เหมาะสมจากข้อ 3.7.1 ระดับการจมตัวของแผ่นหมุนในอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.7.2 และปริมาณของสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.7.3 ผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ตามข้อ 3.7.1 ติดตามผลการทดลองโดยการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและหาปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆโดยใช้วิธีโครมาโตกราฟฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) เพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ปริมาณฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ที่สูงที่สุด

3.8 ผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในถังหมักชีวภาพแบบหมุนที่ประกอบขึ้นแบบเฟดแบตช์

3.8.1 หาเวลาและอัตราในการเติมน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแบบเฟด-แบตช์

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสม ทำการหาเวลาและอัตราในการเติมน้ำตาลที่เหมาะสม จากการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์แบบกะที่ทำให้ได้ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ที่สูงที่สุด

3.8.2 ผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์แบบเฟดแบตช์

เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นตามวิธีในข้อ 3.5.2 ใช้อัตราการการหมุนของแผ่นหมุนที่เหมาะสมจากข้อ 3.7.1 ระดับการจมตัวของแผ่นหมุนในอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.7.2

และปริมาณของสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.7.3 ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.7.4 ผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ตามข้อ 3.7.1 ทำการเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ โดยการเติมอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมในชั่วโมงที่เหมาะสม ติดตามผลการทดลองโดยการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและหาปริมาณน้ำตาลชนิดต่างๆโดยใช้วิธีโครมาโตกราฟฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

3.9 **การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล กลูโคส ฟรักโทส ซูโครส และ ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง** (HPLC) (Solange **และคณะ**, 2009)

นำตัวอย่างของน้ำหมักที่เก็บ ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ ของการผลิตมากรองด้วยกระดาษกรองที่มีรูขนาด 0.2 ไมโครเมตร แล้วนำมาตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ได้แก่ น้ำตาล ฟรักโทส กลูโคส ซูโครส เคสโทส และ นิสโทส โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ยี่ห้อ Agilent รุ่น LC1200 โดยใช้คอลัมน์สำหรับวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรต Prevail Carbohydrate ES column มีขนาด 5 ไมโครเมตร ยาว 250 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 4.6 มิลลิเมตร วิเคราะห์ตัวอย่างโดยอาศัยการกระจายแสงผ่านเครื่องตรวจสอบชนิด RID (Refractive Index Detector) โดยค่าความเข้มข้นที่วัดได้จะถูกบันทึกและแปรผลโดยผ่านโปรแกรม Chemstation Software ของบริษัท Agilent ใช้ อะซิโตรไนไตรท์ (HPLC Grade) และ 0.04% แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (HPLC Grade) ในน้ำกลั่นปลอดประจุ (Milli Q water) ในอัตราส่วน 70 ต่อ 30 ปริมาตรต่อปริมาตร ตามลำดับ เป็นสารละลายตัวพา โดยให้อัตราการไหลเป็น 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง

ปริมาณของน้ำตาล ฟรักโทส กลูโคส ซูโครส เคสโทส และ นิสโทส สามารถวัดได้โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากสารละลายมาตรฐาน (ภาคผนวก) ที่ทราบค่าความเข้มข้นที่แน่นอน

ตารางที่ 3.1 แสดงความเข้มข้นต่างๆของน้ำตาลแต่ละชนิดในการทำกราฟมาตรฐาน

sugar	Sugar concentration				
	100% (g/l)	80% (g/l)	60% (g/l)	40% (g/l)	20% (g/l)
1.fructose	150	120	90	60	30
2.glucose	150	120	90	60	30
3.sucrose	300	240	180	120	60
4.kestose	100	80	60	40	20
5.nystose	100	80	60	40	20

โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเป็น 100 80 60 40 และ 20% ตามลำดับ โดยความเข้มข้นสูงสุดของน้ำตาลชนิดต่างๆมีดังนี้ ฟรักโทส 150 กรัมต่อลิตร กลูโคส 150 กรัมต่อลิตร ซูโครส 300 กรัมต่อลิตร เคสโทส 100 กรัมต่อลิตร และ นิสโทส 100 กรัมต่อลิตร ทำการเตรียม mix standard ตามความเข้มข้นข้างต้นจะได้ standard ความเข้มข้นต่างๆที่ standard mix 100 80 60 40 และ 20% ตามลำดับ จากนั้นนำผล HPLC ที่ได้ไปใส่ในโปรแกรม HP chem-instrument offline โดยพบว่าคอลัมน์สามารถแยกน้ำตาลทั้งห้าชนิดได้อย่างชัดเจนโดยสามารถแยกน้ำตาล ฟรักโทส กลูโคส ซูโครส เคสโทส และ นิสโทส ได้ตามลำดับ

รูปที่ 3.5 แสดงเครื่อง HPLC ยี่ห้อ Agilent รุ่น LC1200

บทที่ 4

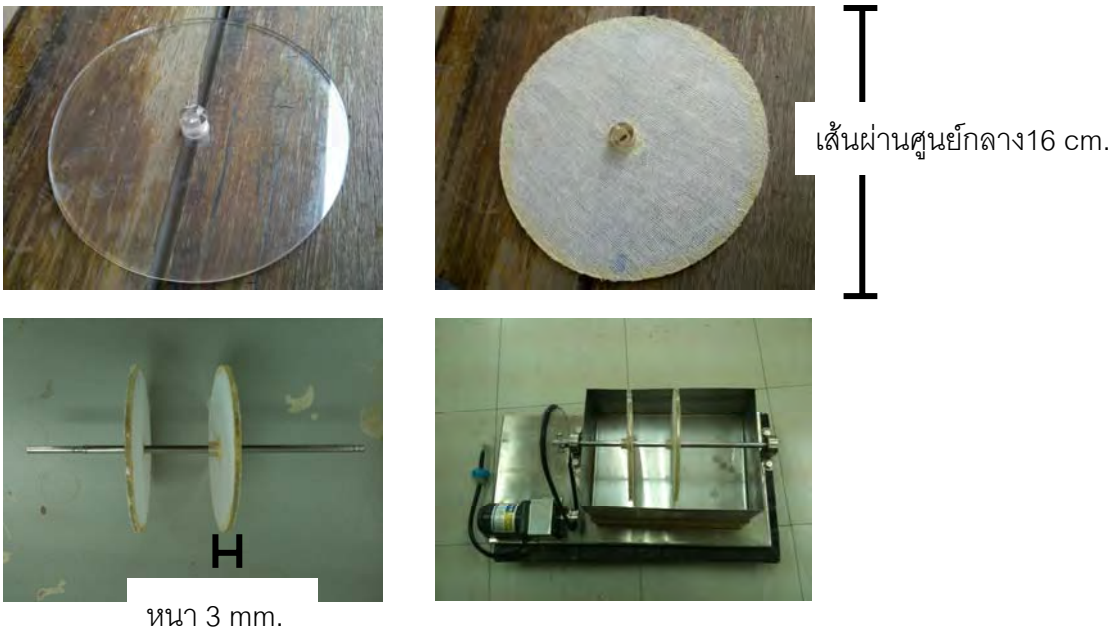
ผลการทดลอง

4.1 ถังหมักชีวภาพแบบหมุนสำหรับผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และศึกษาสมรรถนะของถัง

4.1.1 ส่วนประกอบถังหมักชีวภาพแบบหมุน

ส่วนประกอบถังหมักชีวภาพแบบหมุน (Rotary Biological Contactor Fermenter) มีดังต่อไปนี้

- แผ่นตัวกลางจะมีลักษณะเป็นแผ่นอะคริลิก (Acrylic) แผ่นกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 16 เซนติเมตร หนา 3 มิลลิเมตร ติดด้วยผ้าชนิดที่เหมาะสมต่อการเกาะติดของเชื้อ (ผ้ายืด ผ้าลินิน และผ้าขาวบาง) เรียงซ้อนกัน 11 แผ่นบนเพลากลาง โดยเพลากลางจะหมุนในแนวนอน ซึ่งอัตราการหมุนของแผ่นหมุน สามารถปรับความเร็วได้เป็น 2 3 และ 4 รอบต่อนาที และระดับการจมตัวของแผ่นหมุนลงใต้ระดับอาหารสามารถปรับระดับได้เป็น 20 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมีตามลำดับ

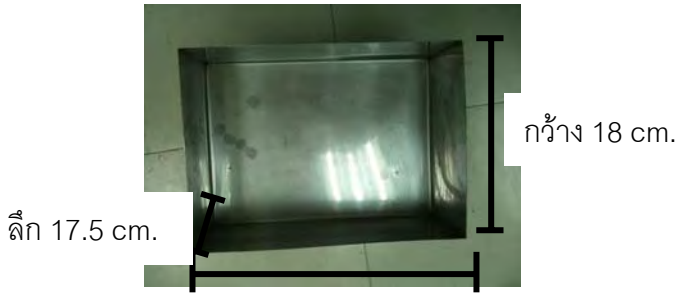


รูปที่ 4.1 แสดงแผ่นหมุนชีวภาพ

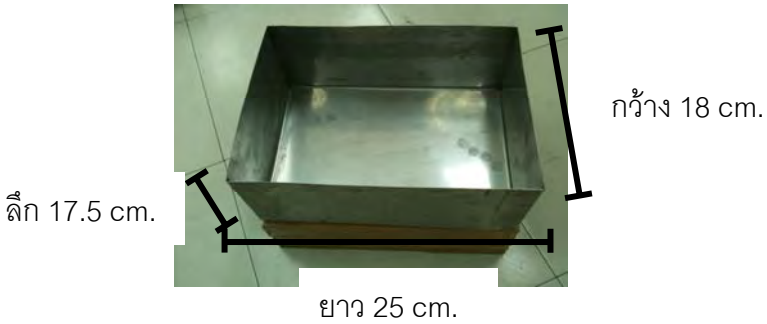
โดยการจมตัวของแผ่นหมุนลงใต้ระดับอาหาร 20 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมีนั้นสามารถคำนวณได้ดังนี้

- 20% ของรัศมี 8 เซนติเมตร = 1.6 เซนติเมตร
- 30% ของรัศมี 8 เซนติเมตร = 2.4 เซนติเมตร
- 40% ของรัศมี 8 เซนติเมตร = 3.2 เซนติเมตร

- ถังหมักเป็นถังสแตนเลสมีขนาดความจุ 4 ลิตร มีขนาด กว้าง 18 ซ.ม. ยาว 25 ซ.ม. ลึก 17.5 ซ.ม. (รูปที่ 4.2) ซึ่งเมื่อบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อจำนวน 4 ลิตร ระดับอาหารจะอยู่ห่างจากขอบถัง 3 เซนติเมตร ด้านล่างของถังหมักจะรองด้วยแผ่นโฟมที่มีขนาด กว้าง 18 ซ.ม. ยาว 25 ซ.ม. ลึก 17.5 ซ.ม. (รูปที่ 4.3) เพื่อปรับระดับความสูงให้เหมาะสม



รูปที่ 4.2 แสดงถังหมัก



รูปที่ 4.3 แสดงถังหมักที่รองด้วยแผ่นโฟม

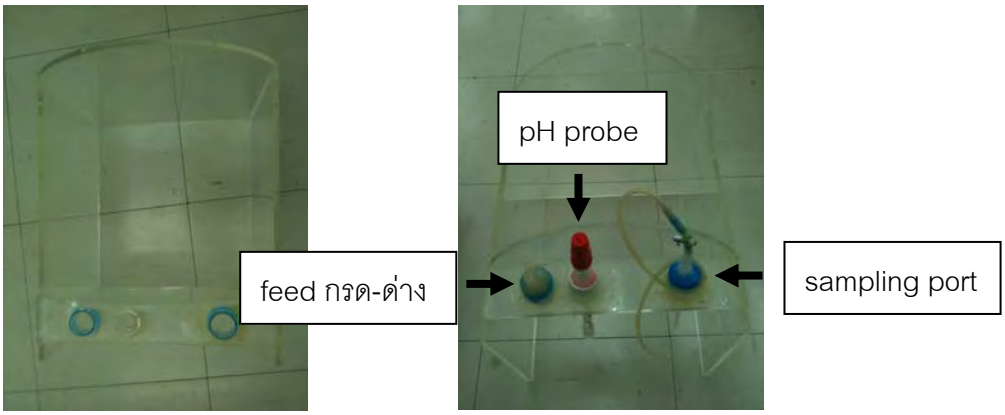
- ฐานรองถังหมักจะมีลักษณะเป็นสแตนเลสมีขนาด กว้าง 25 ซ.ม. ยาว 50 ซ.ม. หนา 3 ซ.ม. ซึ่งรองด้วยไม้อัดที่มีขนาดกว้าง 28 ซ.ม. ยาว 54 ซ.ม. หนา 5 ซ.ม. โดยไม้อัดจะทำหน้าที่อำนวยความสะดวกในการใส่แผ่นรองถังหมักเข้าประกอบกับชิ้นส่วนต่างๆภายในถุงพลาสติก และการที่ไม้อัดมีขนาดใหญ่กว่าแผ่นรองถังหมัก เพื่อที่จะใช้เป็นพื้นที่ในการวางแผ่นอะคริลิกครอบได้อย่างพอดี ซึ่งแผ่นอะคริลิกครอบนั้นจะทำหน้าที่ในการต่อชุดควบคุมต่างๆเข้ากับถังหมัก โดยแผ่นรองถังหมักนั้นจะติดอยู่กับมอเตอร์และมีแท่นสำหรับใส่เพลากลางแผ่นหมุนชีวภาพ โดยมอเตอร์สามารถปรับระดับความเร็วได้เป็น 2 3 และ 4 รอบต่อนาที และบริเวณสายไฟของมอเตอร์จะติดกับฝาขวดพลาสติก เพื่อที่จะป้องกันการเกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ภายนอกถังหมักโดยใช้ฝาขวดและขวดพลาสติกที่พอดีกันโดยมีถุงพลาสติกอยู่กึ่งกลางระหว่างฝากับขวดทำให้เป็นระบบปิดเชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถเข้าไปปนเปื้อนได้ (รูปที่ 4.4)

รูปที่ 4.4 แสดงฐานรองถังหมักและมอเตอร์ที่ใช้ปรับความเร็วในการหมุนของแผ่นหมุน

- แผ่นอะคริลิกครอบ มีลักษะเป็นแผ่นอะคริลิก 5 ชิ้นมาประกอบกันมีความหนา 3 มิลลิเมตร โดยจะทำการเจาะรูแผ่นอะคริลิกแผ่นกลางเพื่อที่จะใช้ติดกับฝาขวดพลาสติกซึ่งตัดไว้ให้มีขนาดพอดีกันกับรู เพื่อที่จะใช้ต่อกับชุดควบคุมต่างๆดังนี้

- ที่เก็บตัวอย่าง (Sampling port)
- pH probe
- และที่ feed กรด-ด่าง

โดยทำการติดด้วยกาวซิลิโคน โดยแผ่นอะคริลิกอีก 4 แผ่นที่เหลือทำหน้าที่เป็นตัวช่วยพยุงแผ่นที่ใช้ติดกับชุดควบคุมต่างๆ (รูปที่ 4.5)



รูปที่ 4.5 แสดงแผ่นอะคริลิกครอบ

จากนั้นทำการประกอบแผ่นหมุนชีวภาพ ถังหมัก แผ่นรองถังหมัก และแผ่นอะคริลิกครอบเข้าด้วยกัน (รูปที่ 4.6)

รูปที่ 4.6 แสดงการประกอบถังหมักชีวภาพแบบหมุน

4.1.2 ทดสอบการทำงานของถังหมัก

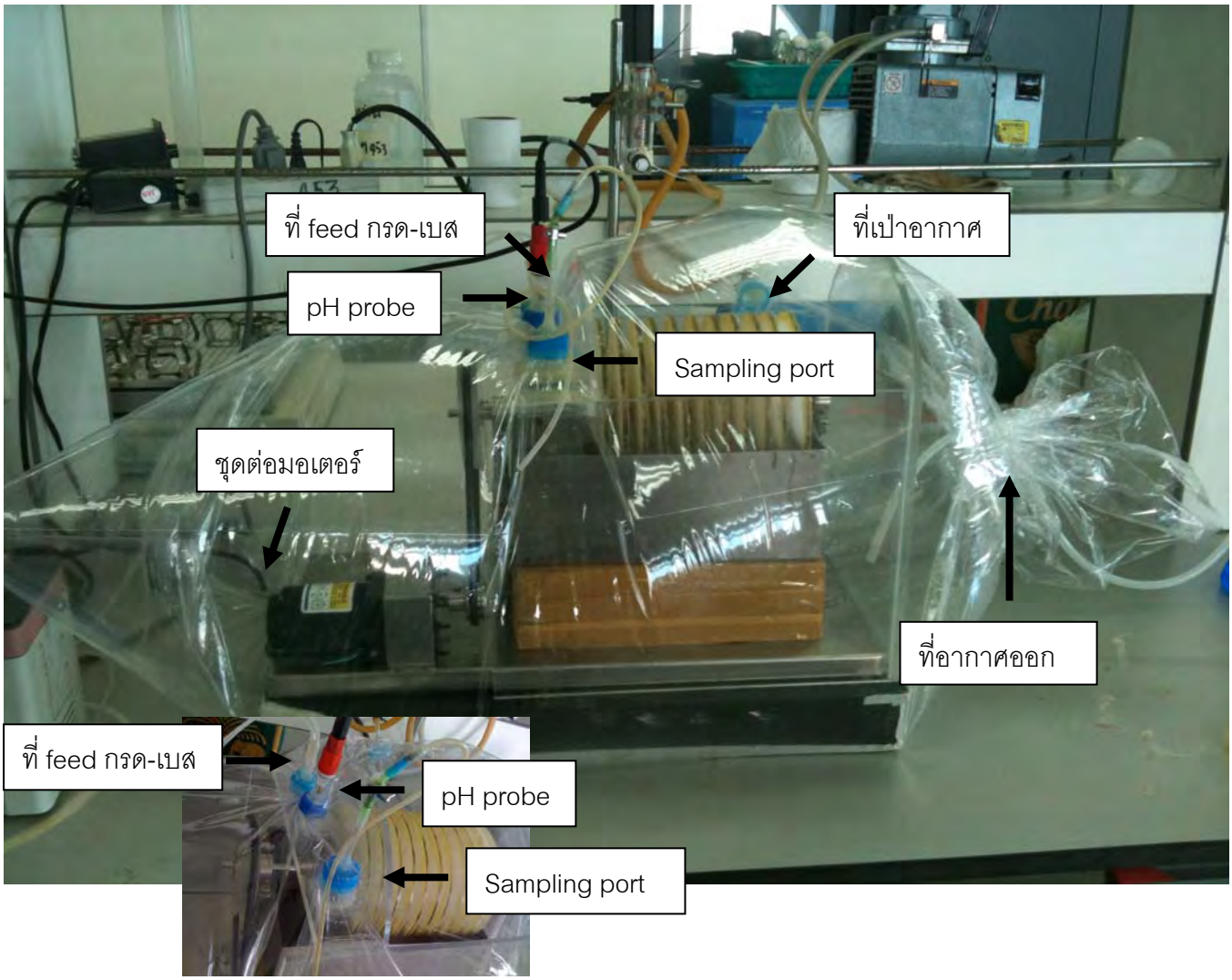
หลังจากประกอบถังหมักชีวภาพแบบหมุนเสร็จแล้วจะทำการศึกษาสมรรถนะของถัง โดยมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

- การทำการฆ่าเชื้อบริเวณผิวหน้าของถังหมักชีวภาพแบบหมุน (Surface sterile) ในส่วนของแผ่นหมุน ถังหมัก แผ่นรอง และแผ่นอะคริลิก โดยจะทำการล้างและนำส่วนต่างๆไปแช่ในสารละลายคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 60 นาที

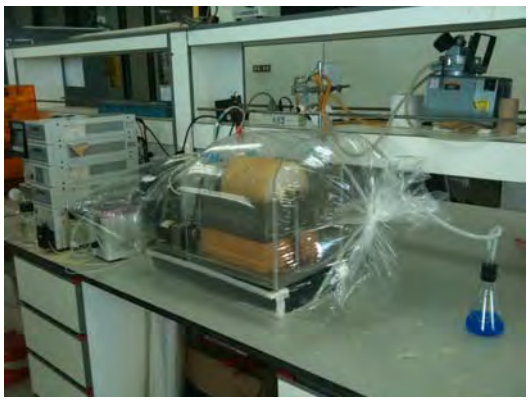
- นำถังหมักชีวภาพแบบหมุนที่ทำทำการ surface sterile เสร็จแล้วไปทำการ ฆ่าเชื้อโดยการ Fumigation ด้วย Potassium permanganate + Formaldehyde 40% m/v โดยใส่ Formaldehyde ให้ท่วม Potassium permanganate ในตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow) ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 วัน

- ประกอบถังหมักโดยกำหนดค่าต่างๆของถังหมักภายในตู้เขี่ยเชื้อ เช่น การจมตัวของแผ่นหมุนลงใต้ระดับอาหาร 20 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี หลังจากประกอบถังหมักเสร็จจะทำการเปิด UV เพื่อฆ่าเชื้ออีกรอบ จากนั้นนำถังหมักชีวภาพแบบหมุนที่ประกอบเสร็จแล้วใส่ลงในถุงพลาสติก ขนาด 30x60 นิ้ว ทำการปิดปากถุง แล้วทำการเปิด UV เพื่อฆ่าเชื้อรอบสุดท้าย

- นำถังหมักที่ประกอบเสร็จและผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ไปประกอบเข้ากับชุดควบคุมต่างๆ ได้แก่ pH probe ที่เป่าอากาศ ชุดต่อมอเตอร์ sampling port ที่ feed กรด-เบส และ ที่อากาศออก โดยที่อากาศออกนั้นจะต่อเข้ากับขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อิ่มตัวด้วย copper (II) sulphate เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ออกมากับอากาศ



รูปที่ 4.7 แสดงถังหมักชีวภาพแบบหมุนที่ต่อเข้ากับชุดควบคุมต่างๆ



รูปที่ 4.8 แสดงถังหมักชีวภาพแบบหมุนที่ประกอบเสร็จเรียบร้อย

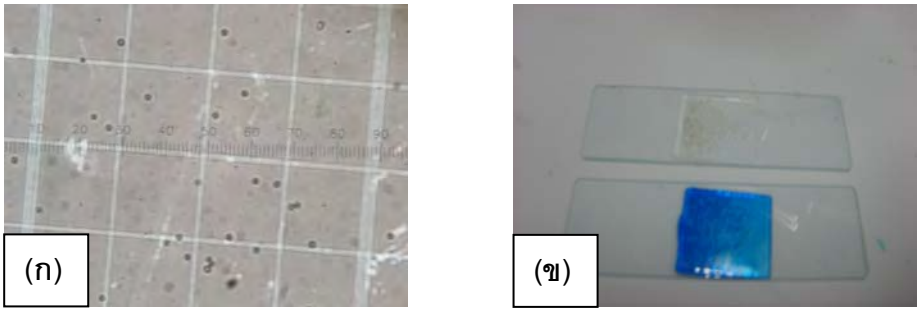
4.2 ศึกษาอายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการเกาะบนแผ่นหมุน

4.2.1 การเตรียมสปอร์ของ *Penicillium* sp. H12

ทำการเพาะเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง PDA เป็นเวลา 4 วันเพื่อให้ได้สปอร์จำนวนมากพอ จะสังเกตเห็นสปอร์มีสีเขียวเข้มจากนั้นนำน้ำปลอดประจุผสมทวีน 80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติมลงในหลอดที่ใช้เลี้ยง *Penicillium* sp. H12 อายุ 4 วัน แล้วทำการขูดสปอร์ให้หลุดออกมาจนหมด จากนั้นทำการนับจำนวนสปอร์ด้วยอุปกรณ์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ให้ได้สปอร์ความเข้มข้น $2x10^9$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

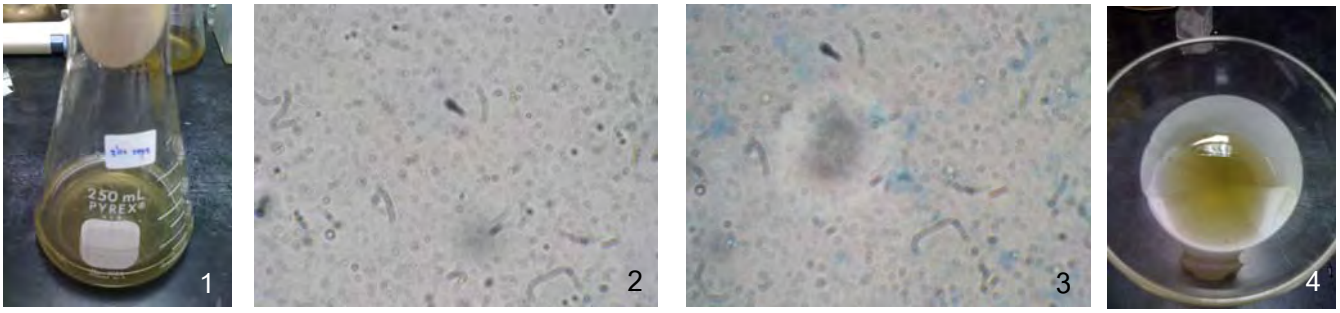
4.2.2 อายุของหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการเกาะบนแผ่นหมุน

นำสปอร์ความเข้มข้น $2x10^9$ สปอร์ต่อมิลลิลิตรปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารสำหรับเลี้ยงหัวเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5.0 จากนั้นนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบโรตารี่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บเชื้อทุกๆ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายนอก และผ่านกล้องจุลทรรศน์โดยย้อมสีสปอร์ราด้วยสี Lacto phenol cotton blue ส่องภายใต้กล้องที่กำลังขยาย 40 เท่า (รูปที่ 4.9)

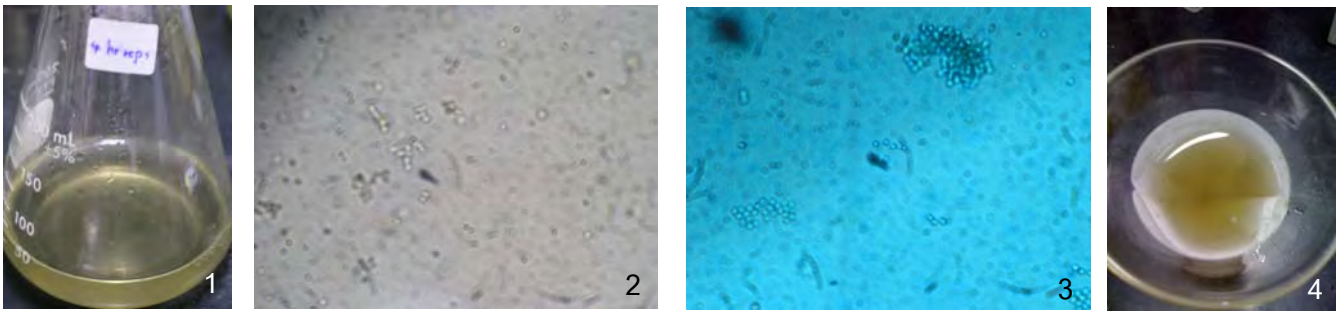


รูปที่ 4.9 แสดงลักษณะของสปอร์ภายใต้กล้องที่กำลังขยาย 40x และแสดงเชื้อราที่ย้อมด้วยสี Lacto phenol cotton blue ตามลำดับ

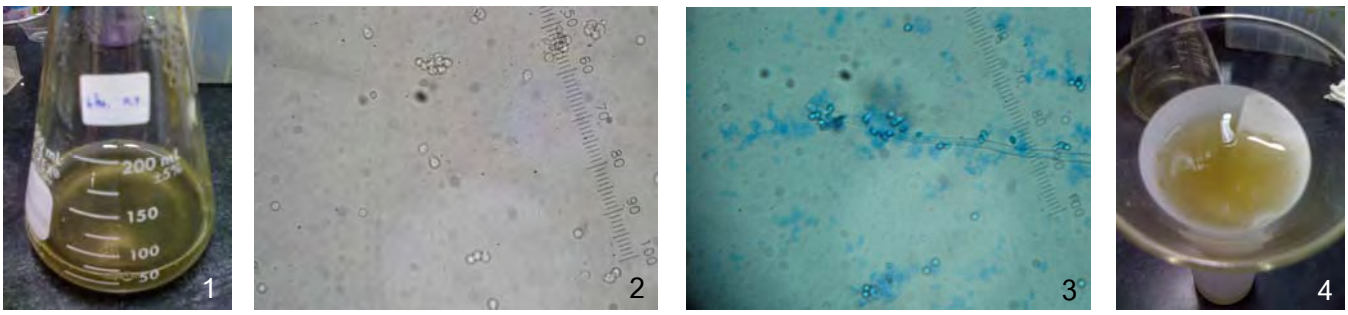
จากการทดลอง (ช่องที่1) แสดงการเจริญของเชื้อราในขวดรูปชมพู่ (ช่องที่ 2-3) แสดง การเจริญของสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ช่องที่4) แสดงลักษณะภายนอกของสปอร์ที่ผ่านการกรองโดยกระดาษกรอง (รูปที่ 4.10-4.21)



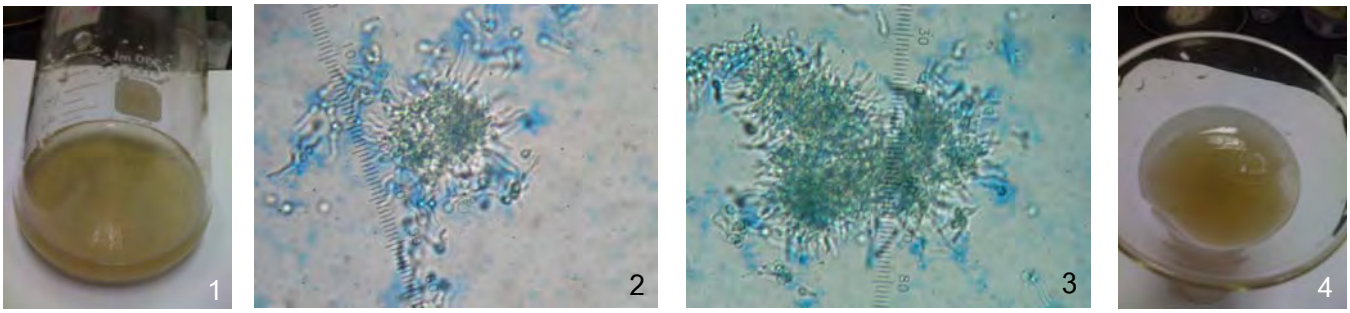
รูปที่ 4.10 แสดงการงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 2 พบว่าไม่มีการงอกของสปอร์



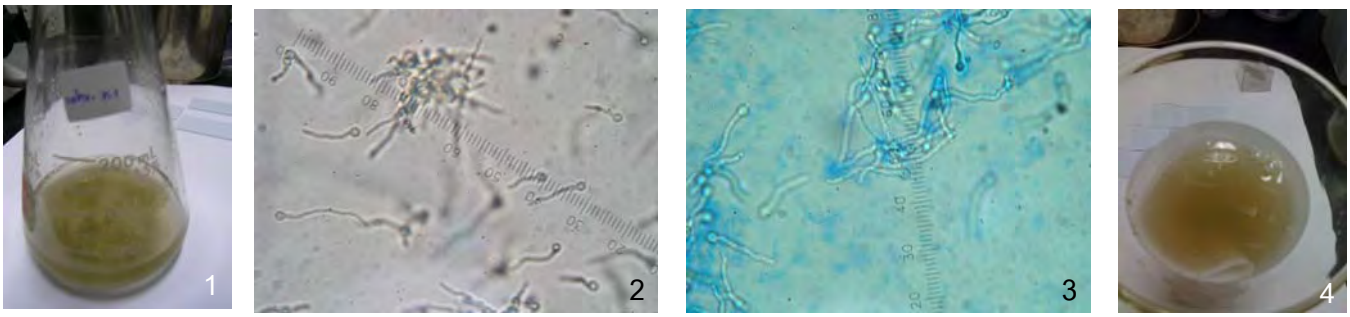
รูปที่ 4.11 แสดงการงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 4 พบว่าไม่มีการงอกของสปอร์



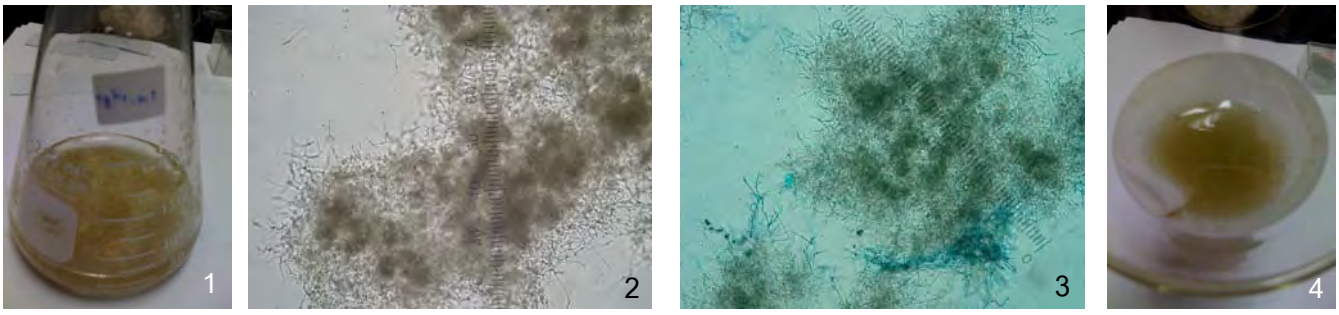
รูปที่ 4.12 แสดงการงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 6 พบว่าไม่มีการงอกของสปอร์



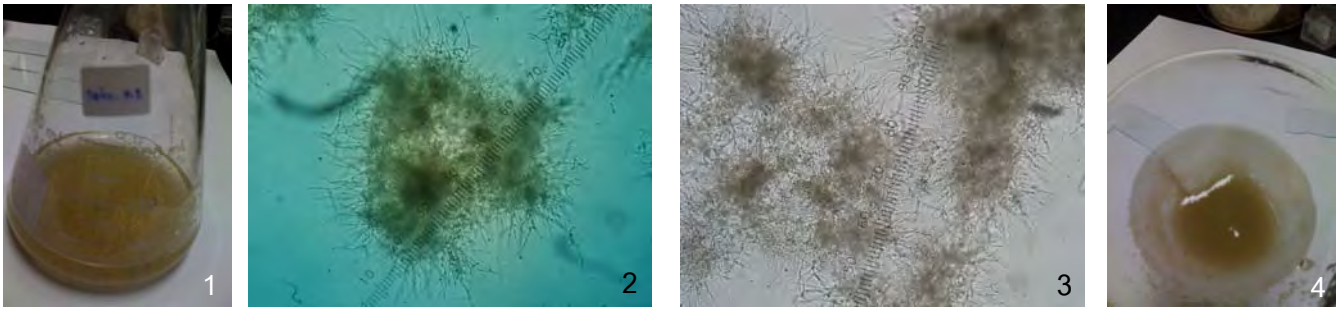
รูปที่ 4.13 แสดงการงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 8 พบว่าเริ่มมีการงอกของสปอร์



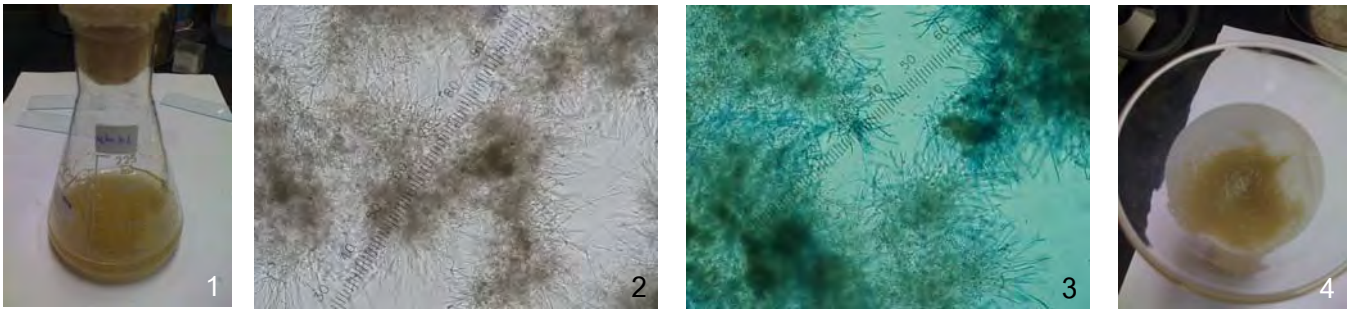
รูปที่ 4.14 แสดงการงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 10 พบว่าสปอร์มีการงอกในช่วงที่เหมาะสม



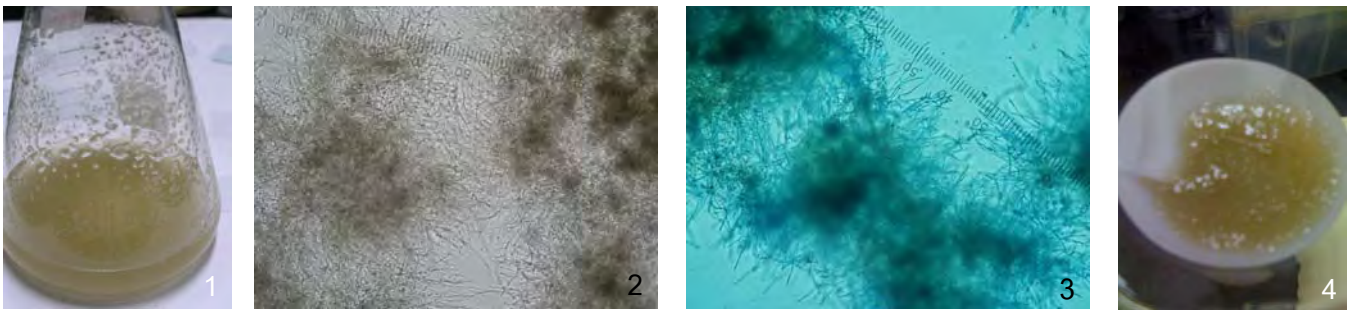
รูปที่ 4.15 แสดงการงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 12 พบว่าสปอร์มีการงอกเป็นสายใยยาวจนเกินไป



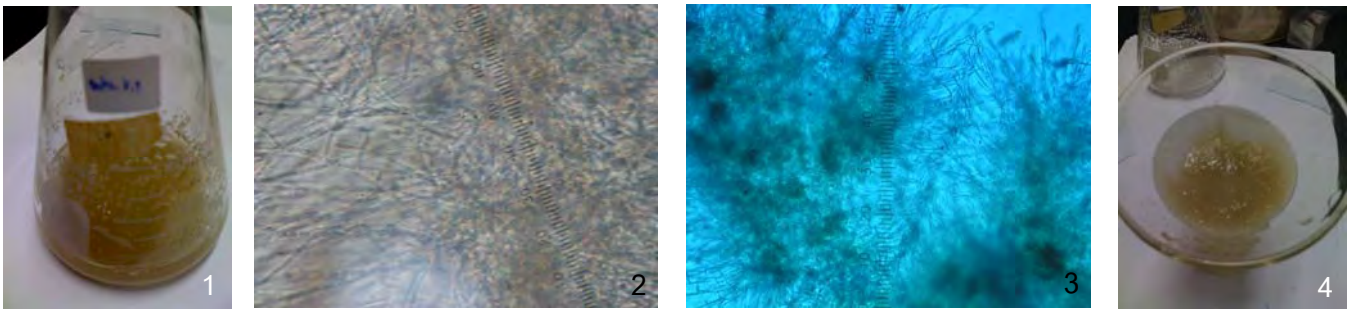
รูปที่ 4.16 แสดงการงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 14 พบว่าสปอร์มีการรวมกันเป็นกลุ่มก้อน



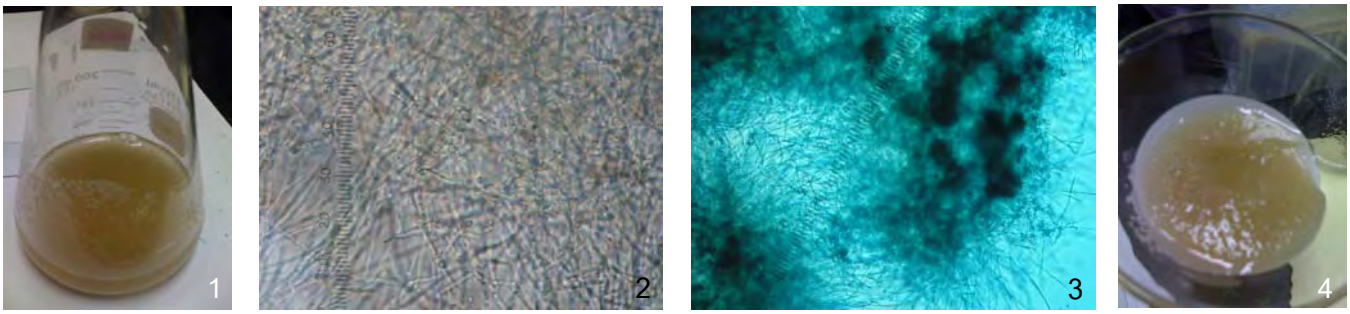
รูปที่ 4.17 แสดงการงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 16 พบว่าสปอร์มีการรวมกันเป็นกลุ่มก้อน



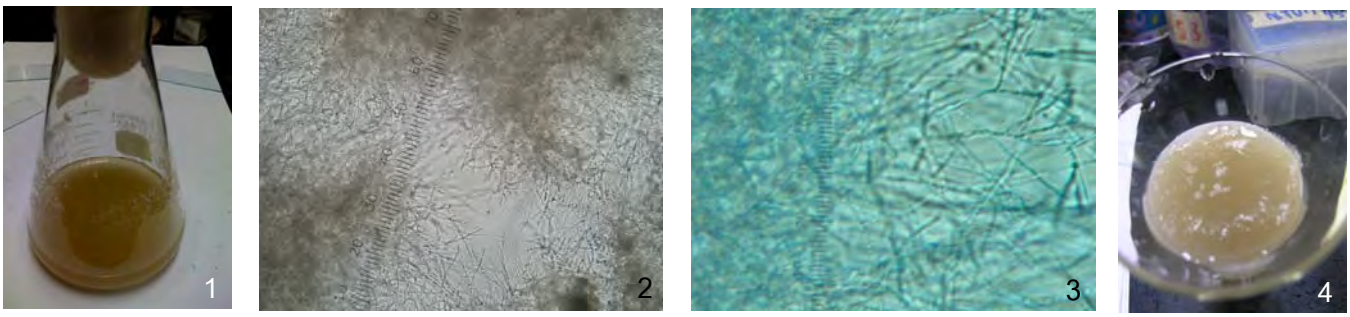
รูปที่ 4.18 แสดงการงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 18 พบว่าสปอร์มีการรวมกันเป็นกลุ่มก้อน



รูปที่ 4.19 แสดงการงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 20 พบว่าสปอร์มีการรวมกันเป็นกลุ่มก้อน



รูปที่ 4.20 แสดงการงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 22 พบว่าสปอร์มีการรวมกันเป็นกลุ่มก้อน



รูปที่ 4.21 แสดงการงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 24 พบว่าสปอร์มีการรวมกันเป็นกลุ่มก้อน

จากการศึกษาการงอกของสปอร์ในช่วงเวลาต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าสปอร์ของเชื้อ *Penicillium* sp.H12 เริ่มมีการงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 8 และพบว่าชั่วโมงที่ 10 มีการสร้างสายใยของราที่ยาวพอประมาณมีการจับตัวของสายใยเป็นกลุ่มก้อนน้อย ดังนั้นจึงเหมาะสมสำหรับการจับตัวบนวัสดุบนแผ่นหมุนชีวภาพมากที่สุด ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึง ชั่วโมงที่ 24 นั้นสายใยของรามีการงอกที่ยาวขึ้นแต่มีการจับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนจนเกินไป ทำให้มีน้ำหนักมากเมื่อถ่ายเชื้อลงไปอาจทำให้ตกอยู่บริเวณก้นถังไม่ติดบนแผ่นหมุน ดังนั้น จึงเลือกเพาะเลี้ยงสปอร์ของ *Penicillium* sp.H12 เป็นเวลา 10 ชั่วโมงก่อนเพื่อที่จะเป็นหัวเชื้อในผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในถังหมักชีวภาพแบบหมุนต่อไป

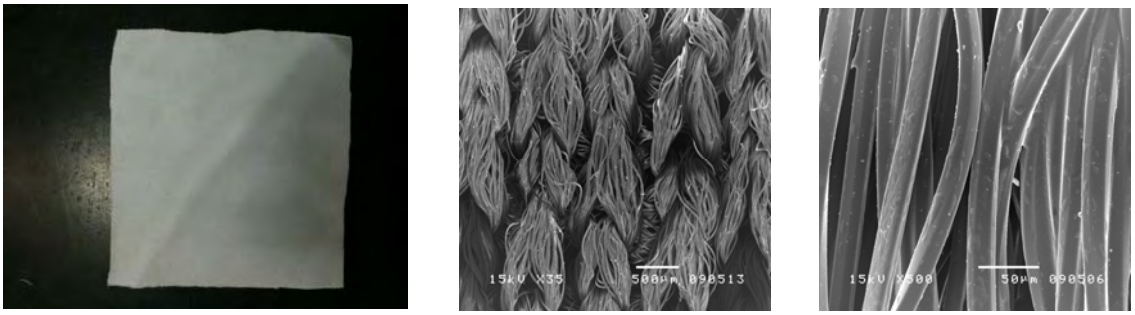
4.3 ศึกษาชนิดของวัสดุที่เหมาะสมต่อการเกาะติดของเชื้อราบนแผ่นหมุน

4.3.1 ลักษณะของผ้าเมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

เนื่องจากต้องการให้ราเกาะอยู่บนแผ่นหมุน แต่แผ่นอะคริลิกมีผิวเรียบลื่นจนเกินไปจึงทำให้ราเกาะติดยาก จึงเลือกผ้า 3 ชนิด ที่มีราคาไม่แพงและเนื้อผ้ามีช่องว่างที่สายใยของราจะมาเกาะติดได้ ได้แก่

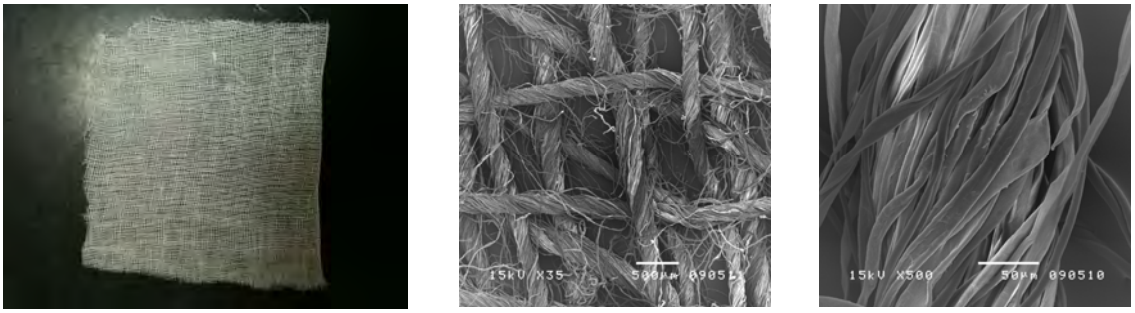
1. ผ้ายืด
2. ผ้าลินิน
3. ผ้าขาวบาง

ผ้าทั้งสามชนิดมีลักษณะทางกายภาพที่แตกต่างกันเมื่อพิจารณาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ที่กำลังขยายต่างๆ (รูปที่ 4.22-4.24)



รูปที่ 4.22 แสดงผ้ายืด (1) ผ้ายืดปกติ (2) ผ้ายืดผ่านกล้อง SEM กำลังขยาย 35 เท่า (3) ผ้ายืดผ่านกล้อง SEM กำลังขยาย 500 เท่า

รูปที่ 4.23 แสดงผ้าลินิน (1) ผ้าลินินปกติ (2) ผ้าลินินผ่านกล้อง SEM กำลังขยาย 35 เท่า (3) ผ้าลินินผ่านกล้อง SEM กำลังขยาย 500 เท่า



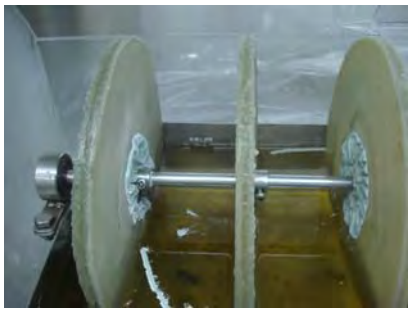
รูปที่ 4.24 แสดงผ้าขาวบาง (1) ผ้าขาวบางปกติ (2) ผ้าขาวบางผ่านกล้อง SEM กำลังขยาย 35 เท่า (3) ผ้าขาวบางผ่านกล้อง SEM กำลังขยาย 500 เท่า

จากการตรวจสอบพบว่าผ้ายืดมีเส้นใยเรียบขนาดสม่ำเสมอแต่ขนาดเส้นใยใหญ่ที่สุด เส้นใยของผ้าลินินมีขนาดรองลงมา และค่อนข้างสม่ำเสมอการปั่นเกลียวของเส้นด้ายของผ้าทั้งสองชนิดจึงแน่นสม่ำเสมอเมื่อเทียบกับผ้าขาวบาง ซึ่งมีเส้นใยฝ้ายที่ไม่สม่ำเสมอเท่าผ้าสองชนิดแรกลักษณะการทอก็ทำให้เกิดช่องว่างกว้างไม่เท่ากันโดยผ้าลินินจะหนาแน่นที่สุดผ้ายืดรองลงมาส่วนผ้าขาวบางมีช่องว่างมากที่สุด ซึ่งลักษณะเหล่านี้อาจส่งผลต่อการเกาะของรา

4.3.2 **ศึกษาการเกาะติดของเชื้อบนวัสดุชนิดต่าง ๆ**

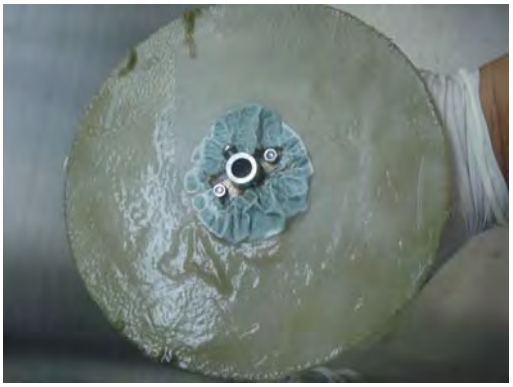
ทำการถ่ายหัวเชื้อ 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) (กิติภัทร ลิ้มประเสริฐ, 2548) ที่มีอายุ 10 ชั่วโมง ลงในอาหารสำหรับผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในถังหมักชีวภาพแบบหมุน โดยควบคุมความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 5.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง (วีระพงษ์ พรประสาทผล, 2545) โดยใช้ความเร็วรอบของแผ่นหมุนชีวภาพเท่ากับ 4 รอบต่อนาที

และระดับการจมตัวของแผ่นหมุนชีวภาพลงใต้ระดับอาหารเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี ติดตามผลการทดลองโดยทำการวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง เมื่อครบ 72 ชั่วโมง ทำการสุ่มตัดตัวอย่างผ้าขนาด 1x1 นิ้ว ชนิดละ 3 ซ้ำ นำไปอบเพื่อหาน้ำหนักแห้งของราที่เกาะอยู่บนผ้าแต่ละชนิด



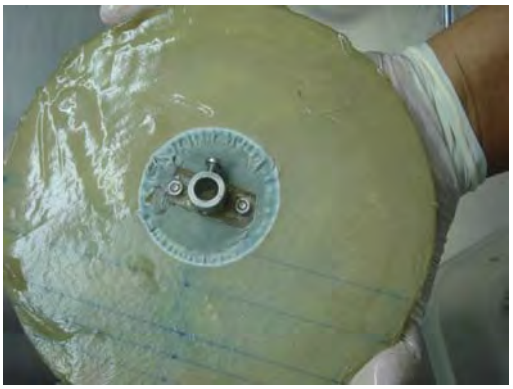
รูปที่ 4.25 แสดงการเลี้ยงเชื้อในถังหมักชีวภาพแบบหมุนโดยแผ่นหมุนชีวภาพแต่ละอันจะติดด้วยผ้ายืด ผ้าขาวบาง และผ้าลินิน ตามลำดับ

หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ราสามารถเกาะผ้าได้ดีทุกชนิดไม่เห็นความแตกต่างระหว่างชนิดผ้า (รูปที่ 4.26-4.29) จึงทำการตัดแผ่นผ้าเพื่อหาน้ำหนักแห้งของราที่เกาะอยู่บนผ้า



รูปที่ 4.26 แสดงการเกาะติดของเชื้อบนแผ่นหมุนชีวภาพที่ติดด้วยผ้ายืด

รูปที่ 4.27 แสดงการเกาะติดของเชื้อบนแผ่นหมุนชีวภาพที่ติดด้วยผ้าขาวบาง



รูปที่ 4.28 แสดงการเกาะติดของเชื้อบนแผ่นหมุนชีวภาพที่ติดด้วยผ้าลินิน

รูปที่ 4.29 แสดงชิ้นของผ้าชนิดต่างๆขนาด 1×1 นิ้ว ก่อนนำไปอบแห้ง

นำผ้าชนิดต่างๆขนาด 1x 1นิ้ว ที่ตัดจากแผ่นหมุนชีวภาพไปอบแห้งใน hot air oven ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำไปชั่งหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ จากการทดลองจะได้ผล ดังนี้

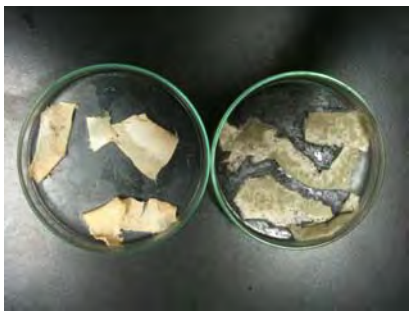
ตารางที่ 4.1 แสดง น้ำหนักแห้งของเชื้อที่ติดที่ผ้าชนิดต่างๆ

ชนิดของผ้า	**น้ำหนักแห้ง (กรัม/ตารางนิ้ว)**
ผ้าลินิน	0.1860 ±0.02
ผ้ายืด	0.2519 ± 0.02
ผ้าขาวบาง	0.2737 ± 0.02

จากผลการทดลองพบว่าแผ่นหมุนชีวภาพที่ติดด้วยผ้าขาวบางนั้นมีความสามารถในการที่จะให้เชื้อ *Penicillium* sp.H 12 มาเกาะติดได้มากที่สุด (ตารางที่ 4.1) ดังนั้นผ้าขาวบางจึงมีความเหมาะสมที่สุดที่จะนำมาติดกับแผ่นหมุนชีวภาพเพื่อเลี้ยง *Penicillium* sp.H 12

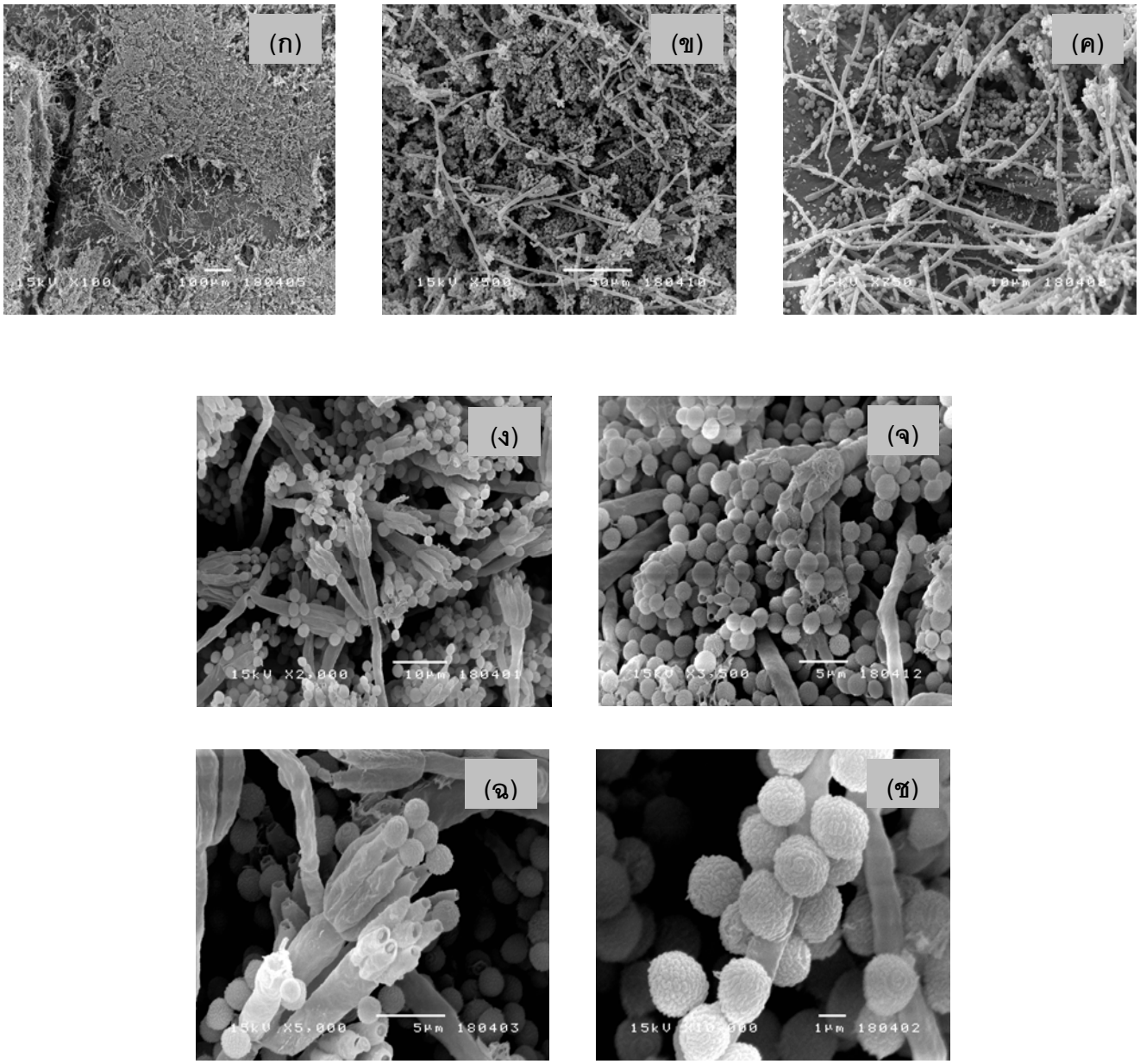
4.3.3 ศึกษาการเกาะของเชื้อ *Penicillium* sp. H12 บนแผ่นหมุนชีวภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดหลังจากเสร็จสิ้นการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์

หลังจากเสร็จสิ้นการเลี้ยงเชื้อ ทำการตัดผ้าขาวบางบริเวณที่มีการเติบโตของเชื้อราให้มีขนาดพอประมาณ จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ส่งไปวิเคราะห์เพื่อดูการติดของเชื้อและลักษณะของเชื้อบนแผ่นหมุนชีวภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด



รูปที่ 4.30 แสดงชิ้นของผ้าขาวบางที่นำไปส่งตรวจวิเคราะห์

จากการทดลอง (รูป ก) แสดงเชื้อ *Penicillium* sp. H12 ที่ติดบนผ้าขาวบางที่กำลังขยาย 100 เท่า (รูป ข) แสดงเชื้อ *Penicillium* sp. H12 ที่ติดบนผ้าขาวบางที่กำลังขยาย 500 เท่า (รูป ค) แสดงเชื้อ *Penicillium* sp. H12 ที่ติดบนผ้าขาวบางที่กำลังขยาย 750 เท่า (รูป ง) แสดงเชื้อ *Penicillium* sp. H12 ที่กำลังขยาย 2,000 เท่า (รูป จ) แสดงเชื้อ *Penicillium* sp. H12 ที่กำลังขยาย 3,500 เท่า (รูป ฉ) แสดงเชื้อ *Penicillium* sp. H12 ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า (รูป ช) แสดงสปอร์ของเชื้อ *Penicillium* sp. H12 ที่กำลังขยาย 10,000 เท่า



รูปที่ 4.31 แสดงชิ้นของผ้าขาวบางที่ผ่านการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

จากการติดตามผลการติดเชื้อ *Penicillium* sp. H12 บนแผ่นหมุนชีวภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด พบว่า รูป (ก) แสดงเชื้อ *Penicillium* sp. H12 ที่ติดบนผ้าขาวบางที่กำลังขยาย 100 เท่า จะเห็นว่ามีการเติบโตของเชื้ออย่างแออัดปิดทับผ้าขาวบางจนหมด โดยพื้นที่ผ้าที่เห็นเกิดจากการหลุดร่วงของเชื้อในการติดตัวอย่างเพื่อส่องตรวจ รูป (ข) แสดงเชื้อ *Penicillium* sp. H12 ที่ติดบนผ้าขาวบางที่กำลังขยาย 500 เท่าจะเห็นเชื้อรวมตัวกันอย่างหนาแน่น รูป (ค) แสดงเชื้อ *Penicillium* sp. H12 ที่ติดบนผ้าขาวบางที่กำลังขยาย 750 เท่าในอีกระนาบแนวตั้งจะเห็นลักษณะการเกาะติดของสายใยของรากับผ้า รูป (ง) แสดงเชื้อ *Penicillium* sp. H12 ที่กำลังขยาย 2,000 เท่า จะเห็นสปอร์ของรามากมาย รูป (จ) แสดงเชื้อ *Penicillium* sp. H12 ที่กำลังขยาย 3,500 เท่าจะเห็นลักษณะของ conidia ของราอย่างชัดเจน รูป (ฉ) แสดงเชื้อ *Penicillium* sp. H12 ที่กำลังขยาย 5,000 เท่าจะเห็นการหลุดร่วงของสปอร์จาก conidiophore รูป (ช) แสดงสปอร์ของเชื้อ *Penicillium* sp. H12 ที่กำลังขยาย 10,000 เท่า พบว่าสปอร์มีลักษะของผิวที่ขรุขระ

4.4 ภาวะที่เหมาะสมในการการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์แบบกะในถังหมักชีวภาพแบบหมุน

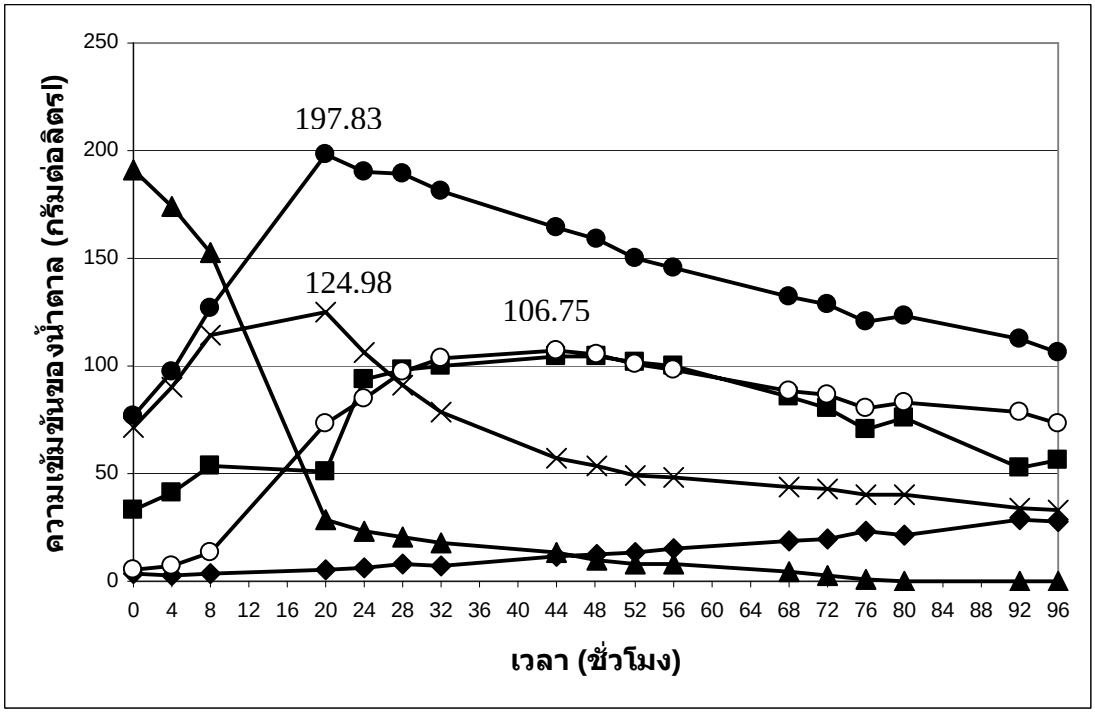
4.4.1 หาอัตราการการหมุนของแผ่นหมุนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตฟรักโทออลิ-โกแซ็กคาไรด์

เตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นอายุ 10 ชั่วโมง ปริมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยทำการแปรผันอัตราการหมุนเป็น 2 3 และ 4 รอบต่อนาที ตามลำดับ ทำการผลิต โดยควบคุมความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 5.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้แผ่นหมุนชีวภาพจมลงใต้ระดับอาหารเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร และเป่าอากาศปลอดเชื้อ 1.25 ลิตรต่อนาที เลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ทุก 4 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงตามอัตราการหมุน ดังนี้

4.4.1.1 อัตราการหมุนที่ 2 รอบต่อนาที

ทำการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในอาหารสำหรับผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในถังหมักชีวภาพแบบหมุนโดยควบคุมภาวะตามข้อ 4.4.1

พบว่ารูปแบบของการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดย *Penicillium* sp. H12 คือ ในช่วง 20 ชั่วโมงแรกของการผลิตน้ำตาลซูโครสจะถูกใช้ไปอย่างรวดเร็วคิดเป็นอัตราการใช้ 8.11 กรัมต่อชั่วโมง พร้อมกับมีการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดเคสโทสขึ้นมาในอัตรา 10.63 กรัมต่อชั่วโมง ในช่วง 0-8 ชั่วโมง จากนั้นอัตราการผลิตเคสโทสเริ่มลดลง ปริมาณของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดนิสโทสก็จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังชั่วโมงที่ 8 พร้อมกับที่น้ำตาลซูโครสหมดลง และจะพบว่าตลอดการผลิตจะมีการสะสมของน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้นโดยมีกลูโคสเกิดขึ้นสูงสุด 56.30 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 และมีน้ำตาลฟรักโทสเกิดขึ้นในปริมาณต่ำและค่อยๆเพิ่มขึ้นในช่วงชั่วโมงท้ายๆ โดยมีฟรักโทสเกิดขึ้นสูงสุด 27.33 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 โดยสามารถผลิตเคสโทสได้สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 20 ปริมาณ 124.98 กรัมต่อลิตร และผลิตนิสโทสได้สูงสุด 106.75 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 44 และพบว่าน้ำตาลซูโครสลดลงและหมดไปในชั่วโมงที่ 80 เมื่อรวมปริมาณของเคสโทสและนิสโทสที่ผลิตได้เป็นปริมาณของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวม พบว่าสามารถผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวมได้สูงสุด 197.83 กรัม ในชั่วโมงที่ 20 ของการผลิต ได้ผลิตภัณฑ์คิดเป็น 79.13 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น มี FOS Productivity 9.89 g/l/h



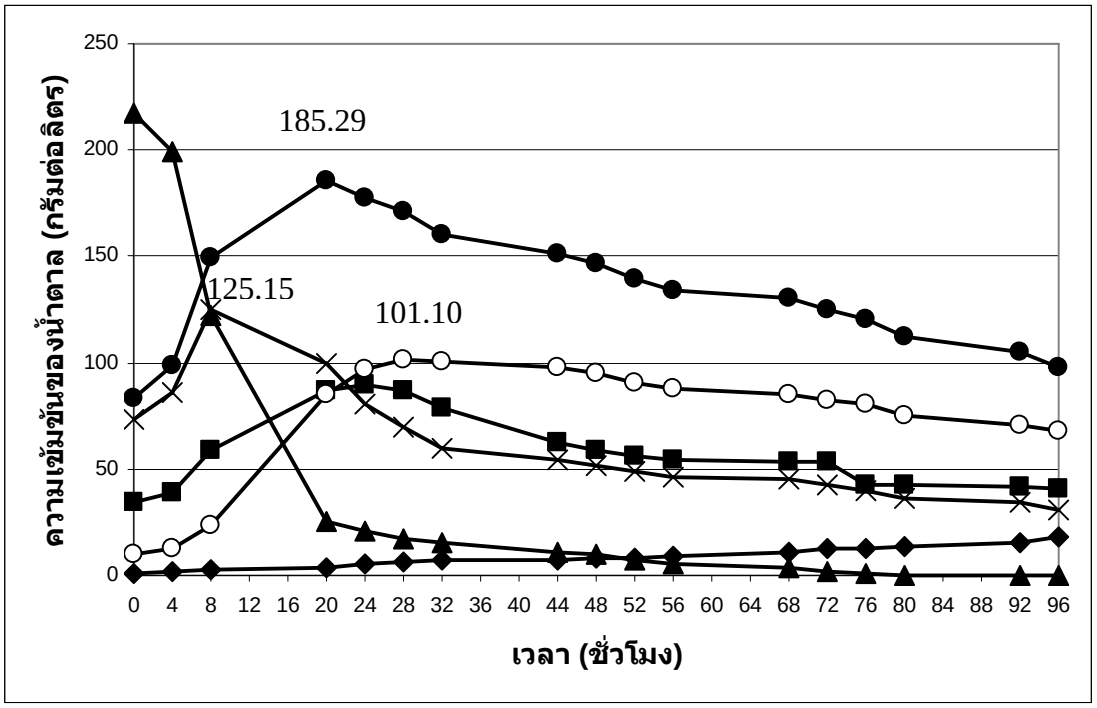
รูปที่ 4.32 แสดง การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำการผลิตโดยใช้อัตราการหมุนที่ 2 รอบต่อนาที (♦ = ฟรักโทส, ■= กลูโคส, ▲ = ซูโครส, ×= เคสโทส, ○= นิสโทส, ●= ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวม)

4.4.1.2 อัตราการหมุนที่ 3 รอบต่อนาที

ทำการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในอาหารสำหรับผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในถังหมักชีวภาพแบบหมุนโดยควบคุมภาวะตามข้อ 4.4.1

รูปแบบของการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์คล้ายกับที่ 2 รอบต่อนาทีคือ ในช่วง 20 ชั่วโมงแรกของการผลิตน้ำตาลซูโครสจะถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว พร้อมกับมีการผลิตฟรักโทออลิ-โกแซ็กคาไรด์ชนิดเคสโทสขึ้นมาอย่างรวดเร็ว อัตราการผลิตเคสโทสใน 28 ชั่วโมงแรก เร็วกว่าที่ 2 รอบต่อนาที การผลิตนิสโทสในช่วงชั่วโมงที่ 8 ถึง 24 ก็เร็วกว่าเช่นกัน และจะพบว่าตลอดการผลิตจะมีการสะสมของน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้นโดยมีกลูโคสเกิดขึ้นสูงสุด 41.19 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 และมีน้ำตาลฟรักโทสเกิดขึ้นในปริมาณต่ำและค่อยๆเพิ่มขึ้นในช่วงชั่วโมงท้ายๆ โดยมีฟรักโทสเกิดขึ้นสูงสุด 18.28 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 โดยสามารถผลิตเคสโทสได้สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 8 ปริมาณ 125.15 กรัมต่อลิตร และผลิตนิสโทสได้สูงสุด 101.10 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 28 และพบว่าน้ำตาลซูโครสลดลงและหมดไปในชั่วโมงที่ 80 เมื่อรวมปริมาณของเคสโทสและนิสโทสที่

ผลิตได้เป็นปริมาณของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวม สามารถผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวมได้สูงสุด 185.29 กรัม ในชั่วโมงที่ 20 ของการผลิต ได้ผลิตภัณฑ์คิดเป็น 74.12 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น มี FOS Productivity 9.26 g/l/h



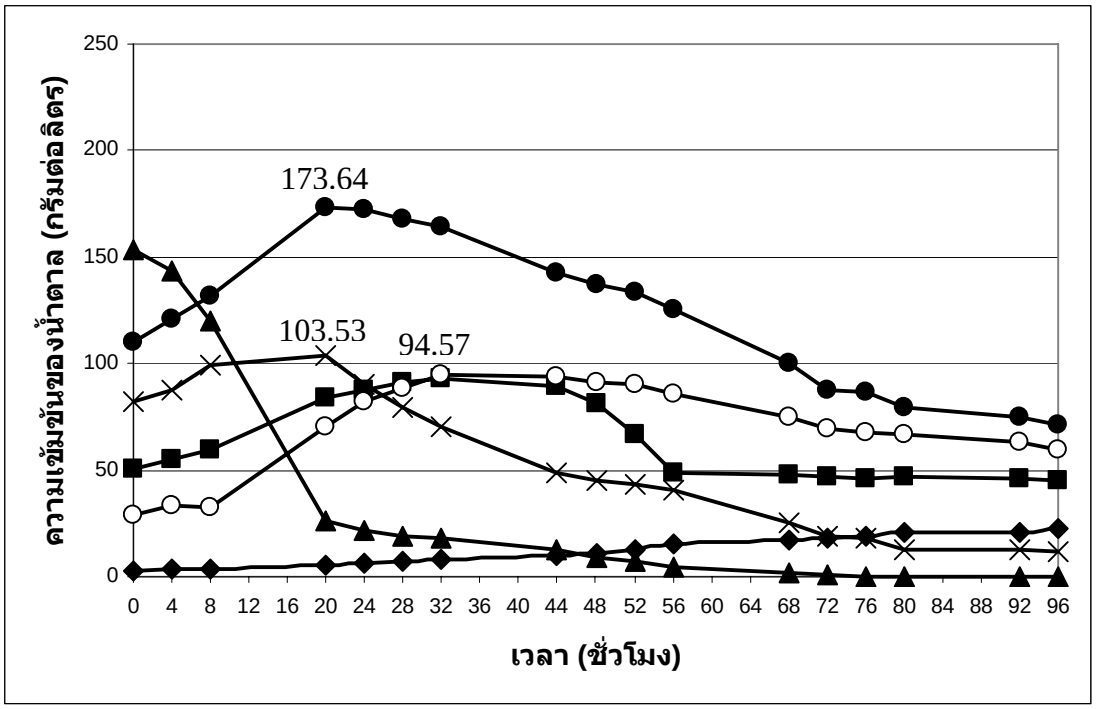
รูปที่ 4.33 แสดง การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำการผลิตโดยใช้อัตราการหมุนที่ 3 รอบต่อนาที (◆ = ฟรักโทส, ■= กลูโคส, ▲ = ซูโครส, ×= เคสโทส, ○= นิสโทส, ●= ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวม)

4.4.1.3 อัตราการหมุนที่ 4 รอบต่อนาที

ทำการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในอาหารสำหรับผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในถังหมักชีวภาพแบบหมุนโดยควบคุมภาวะตามข้อ 4.4.1

รูปแบบของการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์คล้ายกับที่ 2 และ 3 รอบต่อนาที แต่อัตราการผลิตเคสโทสและนิสโทสลดลงอย่างเห็นได้ชัด และจะพบว่าตลอดการผลิตจะมีการสะสมของน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้นโดยมีกลูโคสเกิดขึ้นสูงสุด 45.55 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 และมีน้ำตาลฟรักโทสเกิดขึ้นในปริมาณต่ำและค่อยๆเพิ่มขึ้นในช่วงชั่วโมงท้ายๆ โดยมีฟรักโทสเกิดขึ้นสูงสุด 22.66 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 โดยสามารถผลิตเคสโทสได้สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 20 ปริมาณ

103.53 กรัมต่อลิตร และผลิตนิสโทสได้สูงสุด 94.57 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 32 และพบว่าน้ำตาลซูโครสลดลงและหมดไปในชั่วโมงที่ 76 เมื่อรวมปริมาณของเคสโทสและนิสโทสที่ผลิตได้เป็นปริมาณของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวม สามารถผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวมได้สูงสุด 173.64 กรัม ในชั่วโมงที่ 20 ของการผลิต ได้ผลิตภัณฑ์คิดเป็น 69.46 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น มี FOS Productivity 8.68 g/l/h



รูปที่ 4.34 แสดง การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำการผลิตโดยใช้อัตราการหมุนที่ 4 รอบต่อนาที (◆ = ฟรักโทส, ■= กลูโคส, ▲ = ซูโครส, ×= เคสโทส, ○= นิสโทส, ●= ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวม)

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบปริมาณการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ระหว่างการผลิตโดยใช้อัตราในการหมุน 2 3 และ 4 รอบต่อนาที

ชนิดของน้ำตาล	อัตราการหมุน		
	2 รอบต่อนาที	3 รอบต่อนาที	4 รอบต่อนาที
เคสโทส (กรัมต่อลิตร)	124.98 (ชั่วโมงที่ 20)	125.15 (ชั่วโมงที่ 8)	103.53 (ชั่วโมงที่ 20)
นิสโทส (กรัมต่อลิตร)	106.75 (ชั่วโมงที่ 44)	100.85 (ชั่วโมงที่ 28)	94.57 (ชั่วโมงที่ 32)
ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวม (กรัมต่อลิตร)	197.83 (ชั่วโมงที่ 20)	185.29 (ชั่วโมงที่ 20)	173.64 (ชั่วโมงที่ 20)
% FOS ต่อน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น	79.13 %	74.12 %	69.46 %
productivity	9.89 g/l/h	9.26 g/l/h	8.68 g/l/h
น้ำหนักเซลล์แห้ง/แผ่นหมุน	6.38 ± 0.52 g	3.30 ± 0.23 g	2.87 ± 0.15 g

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดยการทำการแปรผันอัตราการหมุนเป็น 2 3 และ 4 รอบต่อนาที ใช้หัวเชื้อ *Penicillium* sp. H12 อายุ 10 ชั่วโมง ปริมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ควบคุมความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 5.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้การจมตัวของแผ่นหมุนชีวภาพลงใต้ระดับอาหารเท่ากับ 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร และเป้าอากาศปลอดเชื้อ 1.25 ลิตรต่อนาที เลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมงนั้น อัตราการหมุนที่ 2 รอบต่อนาทีเป็นอัตราการหมุนที่เหมาะสมที่สุดโดยให้ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ถึง 197.83 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 20 ของการหมัก ให้ผลิตภัณฑ์ต่อน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 79.13% และ มี productivity 9.89 g/l/h

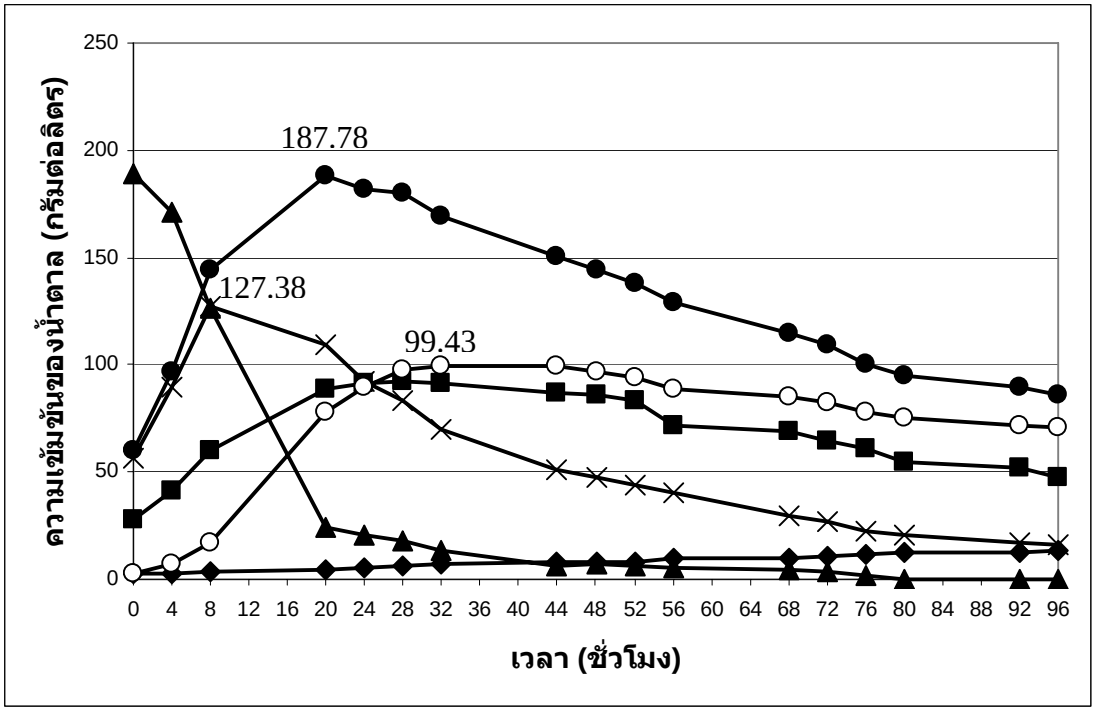
4.4.2 ระดับการจมใต้ระดับอาหารของแผ่นหมุนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์

การจมลงใต้ระดับผิวของอาหารเป็นการให้ *Penicillium* sp. H12 ได้รับอาหารเมื่อแผ่นหมุนลงใต้ผิวอาหารและได้รับอากาศเมื่อหมุนขึ้นมาเหนือผิวอาหาร ดังนั้นหากจมลึกทำให้เชื้อได้รับอาหารมากแต่ถ้าขาดอากาศมากเช่นกัน การหาระดับการจมที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งจำเป็น ในการศึกษาครั้งนี้จะเปรียบเทียบระดับการจมเป็น 20 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมีของแผ่นหมุน

4.4.2.1 แผ่นหมุนจมลงใต้ระดับอาหาร 20 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี

ทำการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในอาหารสำหรับผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ในถังหมักชีวภาพแบบหมุนโดยใช้หัวเชื้อ *Penicillium* sp. H12 อายุ 10 ชั่วโมง ปริมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ควบคุมความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 5.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราการหมุนของแผ่นหมุน 2 รอบต่อนาที ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร และเป่าอากาศปลอดเชื้อ 1.25 ลิตรต่อนาที เลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ทุก 4 ชั่วโมง

พบว่าการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดย *Penicillium* sp. H12 ในช่วง 20 ชั่วโมงแรกของการผลิตน้ำตาลซูโครสจะถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว พบว่าตลอดการผลิตจะมีการสะสมของน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้นโดยมีกลูโคสเกิดขึ้นสูงสุด 47.18 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 และมีน้ำตาลฟรักโทสเกิดขึ้นในปริมาณต่ำและค่อยๆเพิ่มขึ้นในช่วงชั่วโมงท้ายๆ โดยมีฟรักโทสเกิดขึ้นสูงสุด 13.82 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 สามารถผลิตเคสโทสได้สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 8 ปริมาณ 127.38 กรัมต่อลิตร และผลิตนิสโทสได้สูงสุด 99.43 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 32 และพบว่าน้ำตาลซูโครสลดลงและหมดไปในชั่วโมงที่ 80 ปริมาณของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวมสูงสุด 187.78 กรัม ในชั่วโมงที่ 20 ของการผลิต ได้ผลิตภัณฑ์คิดเป็น 75.11 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น มี FOS Productivity 9.39 g/l/h

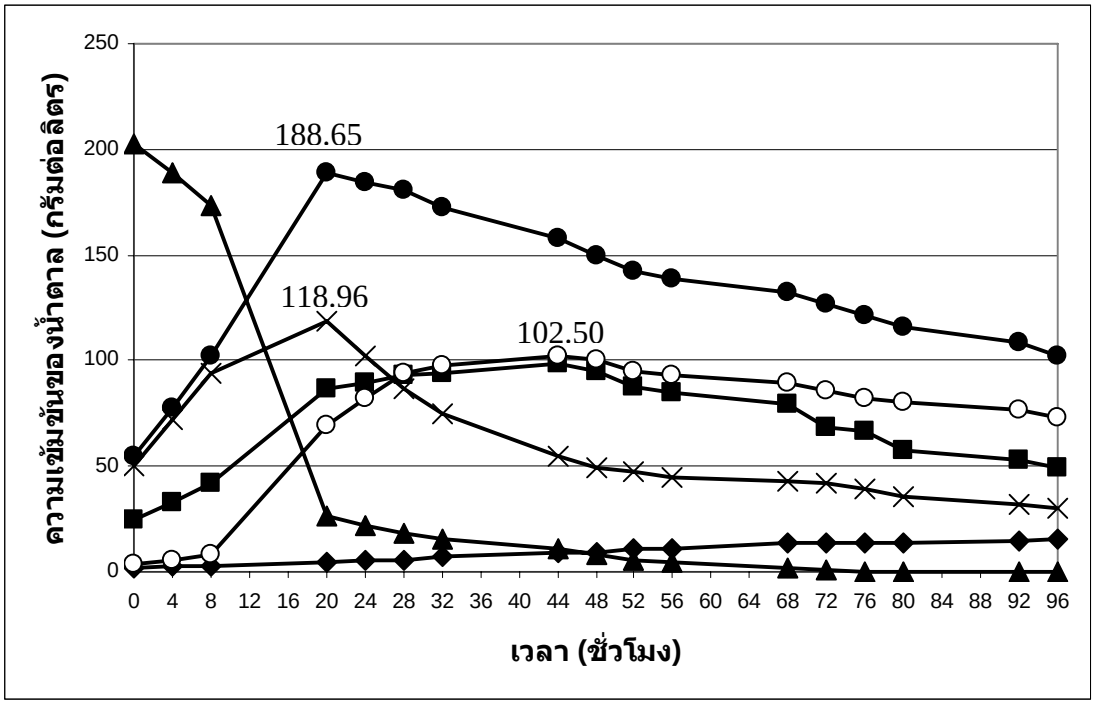


รูปที่ 4.35 แสดง การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำการผลิตโดยใช้ระดับการจมลงใต้ระดับอาหาร 20 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี (♦ = ฟรักโทส, ■= กลูโคส, ▲ = ซูโครส, ×= เคสโทส, ○= นิสโทส, ●= ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวม)

4.4.2.2 แผ่นหมุนจมลงใต้ระดับอาหาร 30 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี

ทำการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในอาหารสำหรับผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ในถังหมักชีวภาพแบบหมุนโดยใช้หัวเชื้อ *Penicillium* sp. H12 อายุ 10 ชั่วโมง ปริมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ควบคุมความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 5.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราการหมุนของแผ่นหมุน 2 รอบต่อนาที ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร และเป่าอากาศปลอดเชื้อ 1.25 ลิตรต่อนาที เลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ทุก 4 ชั่วโมง พบว่าการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดย *Penicillium* sp. H12 ในช่วง 20 ชั่วโมงแรกของการผลิตน้ำตาลซูโครสจะถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว พบว่าตลอดการผลิตจะมีการสะสมของน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้นโดยมีกลูโคสเกิดขึ้นสูงสุด 49.68 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 และมีน้ำตาลฟรักโทสเกิดขึ้นในปริมาณต่ำและค่อยๆเพิ่มขึ้นในช่วงชั่วโมงท้ายๆ โดยมีฟรักโทสเกิดขึ้นสูงสุด 15.16 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 สามารถผลิตเคสโทสได้สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 20 ปริมาณ 118.96 กรัมต่อลิตร และผลิตนิสโทสได้สูงสุด 102.5 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 44 และพบว่าน้ำตาลซูโครสลดลงและหมดไปในชั่วโมงที่ 76 ปริมาณของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวมได้สูงสุด 188.65

กรัม ในชั่วโมงที่ 20 ของการผลิต ได้ผลิตภัณฑ์คิดเป็น 75.46 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น มี FOS Productivity 9.43 g/l/h

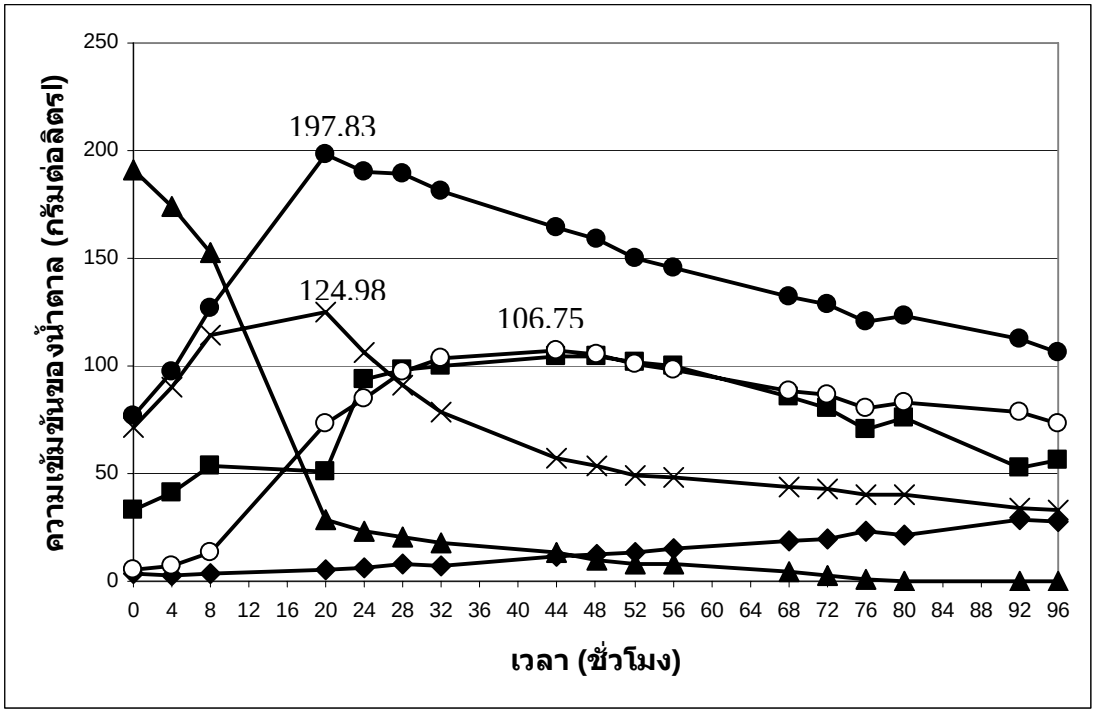


รูปที่ 4.36 แสดง การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำการผลิตโดยใช้ระดับการจมลงใต้ระดับอาหาร 30 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี (♦ = ฟรักโทส, ■= กลูโคส, ▲ = ซูโครส, ×= เคสโทส, ○= นิสโทส, ●= ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวม)

4.4.2.3 แผ่นหมุนจมลงใต้ระดับอาหาร 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี

ทำการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในอาหารสำหรับผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ในถังหมักชีวภาพแบบหมุนโดยใช้หัวเชื้อ *Penicillium* sp. H12 อายุ 10 ชั่วโมง ปริมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ควบคุมความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 5.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราการหมุนของแผ่นหมุน 2 รอบต่อนาที ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร และเป่าอากาศปลอดเชื้อ 1.25 ลิตรต่อนาที เลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ทุก 4 ชั่วโมง พบว่าการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดย *Penicillium* sp. H12 ในช่วง 20 ชั่วโมงแรกของการผลิตน้ำตาลซูโครสจะถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว พบว่าตลอดการผลิตจะมีการสะสมของน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้นโดยมีกลูโคสเกิดขึ้นสูงสุด 56.30 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 และมีน้ำตาลฟรักโทสเกิดขึ้นในปริมาณต่ำและค่อยๆเพิ่มขึ้นในช่วงชั่วโมงท้ายๆ โดยมีฟรักโทสเกิดขึ้น

สูงสุด 27.33 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 สามารถผลิตเคสโทสได้สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 20 ปริมาณ 124.98 กรัมต่อลิตร และผลิตนิสโทสได้สูงสุด 106.75 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 44 และพบว่าน้ำตาลซูโครสลดลงและหมดไปในชั่วโมงที่ 80 ปริมาณของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวมได้สูงสุด 197.83 กรัม ในชั่วโมงที่ 20 ของการผลิต ได้ผลิตภัณฑ์คิดเป็น 79.132 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น มี FOS Productivity 9.89 g/l/h



รูปที่ 4.37 แสดง การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำการผลิตโดยใช้ระดับการจมลงใต้ระดับอาหาร 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี (♦= ฟรักโทส, ■= กลูโคส, ▲= ซูโครส, ×= เคสโทส, ○= นิสโทส, ●= ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวม)

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบปริมาณการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ระหว่างการผลิตโดยใช้ระดับการจมใต้ระดับอาหารของแผ่นหมุน เป็น 20 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี

ชนิดของน้ำตาล	**ระดับการจมใต้ระดับอาหารของแผ่นหมุน**		
	20 เปอร์เซ็นต์	**30 เปอร์เซ็นต์**	**40 เปอร์เซ็นต์**
เคสโทส (กรัมต่อลิตร)	127.38 (ชั่วโมงที่ 8)	118.96 (ชั่วโมงที่ 20)	124.98 (ชั่วโมงที่ 20)
นิสโทส (กรัมต่อลิตร)	99.43 (ชั่วโมงที่ 32)	102.5 (ชั่วโมงที่ 44)	106.75 (ชั่วโมงที่ 44)
ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวม (กรัมต่อลิตร)	187.78 (ชั่วโมงที่ 20)	188.65 (ชั่วโมงที่ 20)	197.83 (ชั่วโมงที่ 20)
% FOS ต่อน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น	75.11 %	75.46 %	79.13 %
productivity	9.39 g/l/h	9.43 g/l/h	9.89 g/l/h
น้ำหนักเซลล์แห้ง/แผ่นหมุน	3.64 ± 0.43 g	4.45 ± 0.69 g	6.38 ± 0.52 g

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่าระดับการจมของแผ่นหมุนเพื่อการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ที่เหมาะสมที่สุดในช่วงที่ศึกษาคือ 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี ให้ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ถึง 197.83 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 20 ของการหมัก ให้ผลิตภัณฑ์ต่อน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 79.13% และ มี productivity 9.89 g/l/h

4.4.3 ปริมาณของหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์

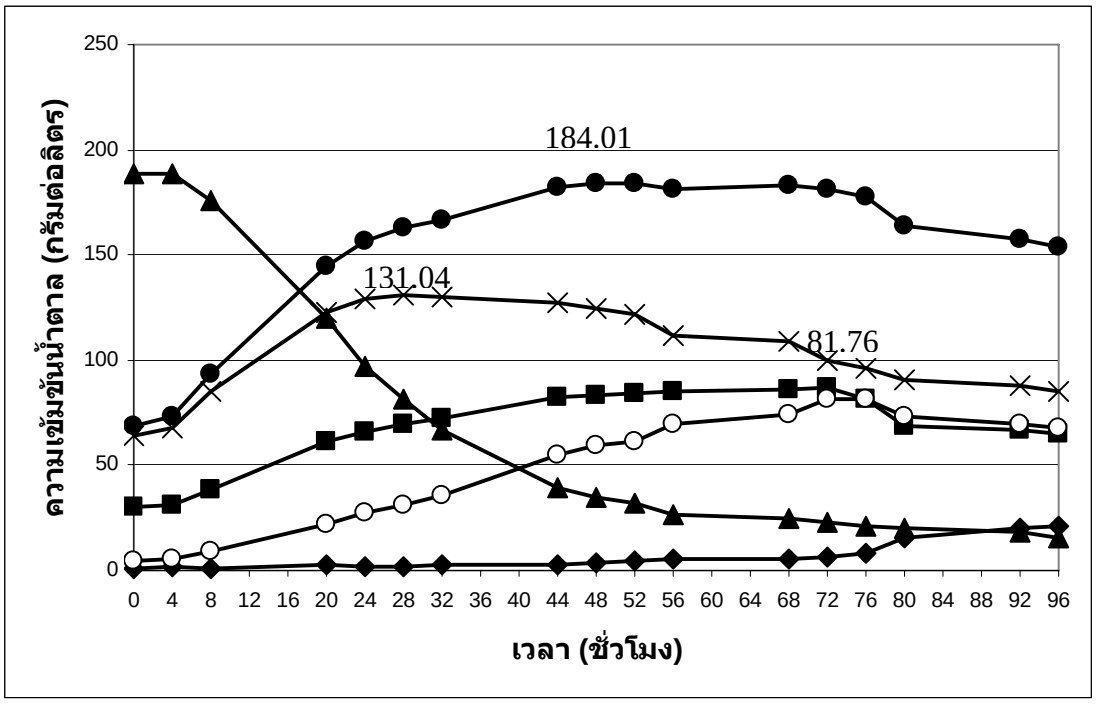
เนื่องจากภาวการณ์เพาะเลี้ยงเปลี่ยนไปตามข้อ 4.4.1 และ 4.4.2 จึงจำเป็นต้องหาปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมที่จะเจริญได้เร็วพอ และให้ผลผลิตของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในปริมาณสูง การศึกษาครั้งนี้จะทำการแปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นในช่วง 30 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของถังหมัก

4.4.3.1 ปริมาณของหัวเชื้อเริ่มต้น 30 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของถังหมัก

ทำการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในอาหารสำหรับผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ในถังหมักชีวภาพแบบหมุนโดยใช้หัวเชื้อ *Penicillium* sp. H12 อายุ 10 ชั่วโมง ควบคุมความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 5.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราการหมุนของแผ่นหมุน 2 รอบต่อ

นาที ระดับการจมตัวของแผ่นหมุนลงใต้ระดับอาหารเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร และเป้าอากาศปลอดเชื้อ 1.25 ลิตรต่อนาที เลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ทุก 4 ชั่วโมง

พบว่าการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดย *Penicillium* sp. H12 ในช่วง 44 ชั่วโมงแรกของการผลิตน้ำตาลซูโครสจะถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว พบว่าตลอดการผลิตจะมีการสะสมของน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้นโดยมีกลูโคสเกิดขึ้นสูงสุด 64.78 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 และมีน้ำตาลฟรักโทสเกิดขึ้นในปริมาณต่ำและค่อยๆเพิ่มขึ้นในช่วงชั่วโมงท้ายๆ โดยมีฟรักโทสเกิดขึ้นสูงสุด 21.35 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 สามารถผลิตเคสโทสได้สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 28 ปริมาณ 131.04 กรัมต่อลิตร และผลิตนิสโทสได้สูงสุด 81.76 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 และพบว่าน้ำตาลซูโครสลดลงและเหลือน้อยที่สุดในชั่วโมงที่ 96 ปริมาณ 15.57 กรัมต่อลิตร และปริมาณของฟรักโทออลิโกแซ็กคา-ไรด์รวมได้สูงสุด 184.01 กรัม ในชั่วโมงที่ 48 ของการผลิต ได้ผลิตภัณฑ์คิดเป็น 73.60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น มี FOS Productivity 3.83 g/l/h

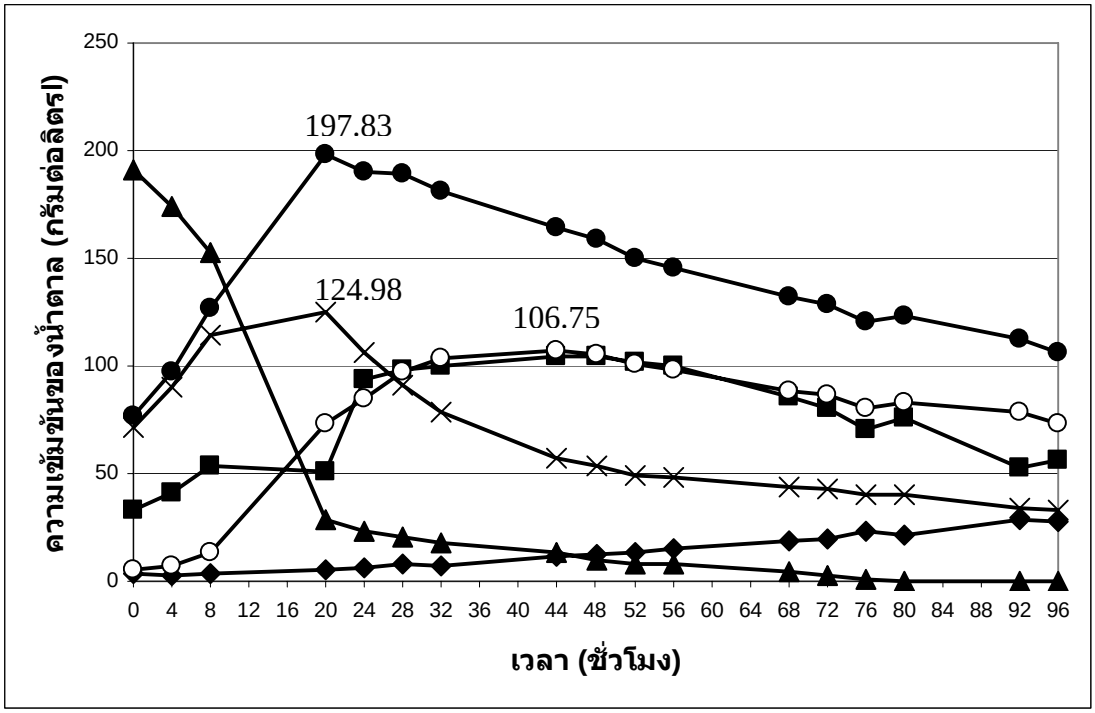


รูปที่ 4.38 แสดง การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำการผลิตโดยใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 30 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของถังหมัก (◆= ฟรักโทส, ■= กลูโคส, ▲= ซูโครส, ×= เคสโทส, ○= นิสโทส, ●= ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวม)

4.4.3.2 ปริมาณของหัวเชื้อเริ่มต้น 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของถังหมัก

ทำการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในอาหารสำหรับผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ในถังหมักชีวภาพแบบหมุนโดยใช้หัวเชื้อ *Penicillium* sp. H12 อายุ 10 ชั่วโมง ควบคุมความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 5.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราการหมุนของแผ่นหมุน 2 รอบต่อนาที ระดับการจมตัวของแผ่นหมุนลงใต้ระดับอาหารเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร และเป่าอากาศปลอดเชื้อ 1.25 ลิตรต่อนาที เลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ทุก 4 ชั่วโมง

พบว่าการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดย *Penicillium* sp. H12 ในช่วง 20 ชั่วโมงแรกของการผลิตน้ำตาลซูโครสจะถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว พบว่าตลอดการผลิตจะมีการสะสมของน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้นโดยมีกลูโคสเกิดขึ้นสูงสุด 56.30 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 และมีน้ำตาลฟรักโทสเกิดขึ้นในปริมาณต่ำและค่อยๆเพิ่มขึ้นในช่วงชั่วโมงท้ายๆ โดยมีฟรักโทสเกิดขึ้นสูงสุด 27.33 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเคสโทสได้สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 20 ปริมาณ 124.98 กรัมต่อลิตร และผลิตนิส-โทสได้สูงสุด 106.75 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 44 และพบว่าน้ำตาลซูโครสลดลงและหมดไปในชั่วโมงที่ 80 และปริมาณของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวมได้สูงสุด 197.83 กรัม ในชั่วโมงที่ 20 ของการผลิต ได้ผลิตภัณฑ์คิดเป็นคิดเป็น 79.13 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น มี FOS Productivity 9.89 g/l/h



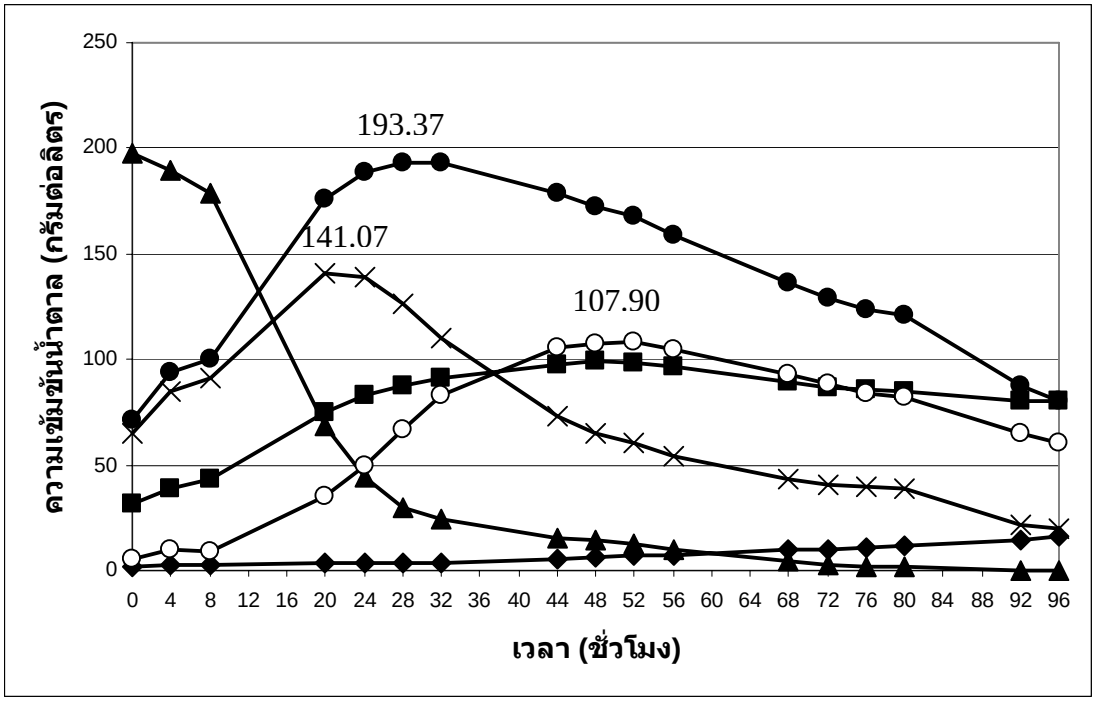
รูปที่ 4.39 แสดง การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำการผลิตโดยใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของถังหมัก (◆= ฟรักโทส, ■= กลูโคส, ▲= ซูโครส, ×= เคสโทส, ○= นิสโทส, ●= ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวม)

4.4.3.3 ปริมาณของหัวเชื้อเริ่มต้น 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของถังหมัก

ทำการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในอาหารสำหรับผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ในถังหมักชีวภาพแบบหมุนโดยใช้หัวเชื้อ *Penicillium* sp. H12 อายุ 10 ชั่วโมง ควบคุมความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 5.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราการหมุนของแผ่นหมุน 2 รอบต่อนาที ระดับการจมตัวของแผ่นหมุนลงใต้ระดับอาหารเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร และเป่าอากาศปลอดเชื้อ 1.25 ลิตรต่อนาที เลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ทุก 4 ชั่วโมง

พบว่าการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดย *Penicillium* sp. H12 ในช่วง 20 ชั่วโมงแรกของการผลิตน้ำตาลซูโครสจะถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว พบว่าตลอดการผลิตจะมีการสะสมของน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้นโดยมีกลูโคสเกิดขึ้นสูงสุด 80.12 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 และมีน้ำตาลฟรักโทสเกิดขึ้นในปริมาณต่ำและค่อยๆเพิ่มขึ้นในช่วงชั่วโมงท้ายๆ โดยมีฟรักโทสเกิดขึ้นสูงสุด 16.68 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 สามารถผลิตเคสโทสได้สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 20 ปริมาณ 141.07 กรัมต่อลิตร

และผลิตนิสโทสได้สูงสุด 107.90 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 52 และพบว่าน้ำตาลซูโครสลดลงและหมดไปในชั่วโมงที่ 80 และปริมาณของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวมได้สูงสุด 193.37 กรัม ในชั่วโมงที่ 28 ของการผลิต ได้ผลิตภัณฑ์คิดเป็น 77.35 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น มี FOS Productivity 6.91 g/l/h



รูปที่ 4.40 แสดง การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำการผลิตโดยใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของถังหมัก (◆= ฟรักโทส, ■= กลูโคส, ▲= ซูโครส, ×= เคสโทส, ○= นิสโทส, ●= ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวม)

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบปริมาณการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ระหว่างการผลิตโดยใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 30 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของถังหมัก

ชนิดของน้ำตาล	**ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น**		
	30 เปอร์เซ็นต์	**40 เปอร์เซ็นต์**	**50 เปอร์เซ็นต์**
เคสโทส (กรัมต่อลิตร)	131.04 (ชั่วโมงที่ 28)	124.98 (ชั่วโมงที่ 20)	141.07 (ชั่วโมงที่ 20)
นิสโทส (กรัมต่อลิตร)	81.76 (ชั่วโมงที่ 72)	106.75 (ชั่วโมงที่ 44)	107.90 (ชั่วโมงที่ 52)
ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวม (กรัมต่อลิตร)	184.01 (ชั่วโมงที่ 48)	197.83 (ชั่วโมงที่ 20)	193.37 (ชั่วโมงที่ 28)
% FOS ต่อน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น	73.60 %	79.13 %	77.35 %
productivity	3.83 g/l/h	9.89 g/l/h	6.91 g/l/h
น้ำหนักเซลล์แห้ง/แผ่นหมุน	1.31 ± 0.21 g	6.38 ± 0.52 g	7.99 ± 0.60 g

ดังนั้นสามารถสรุปได้ว่า ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของถังหมักเป็นปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุดโดยให้ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ถึง 197.83 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 20 ของการหมัก ให้ผลิตภัณฑ์ต่อน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 79.13% และ มี productivity 9.89 g/l/h

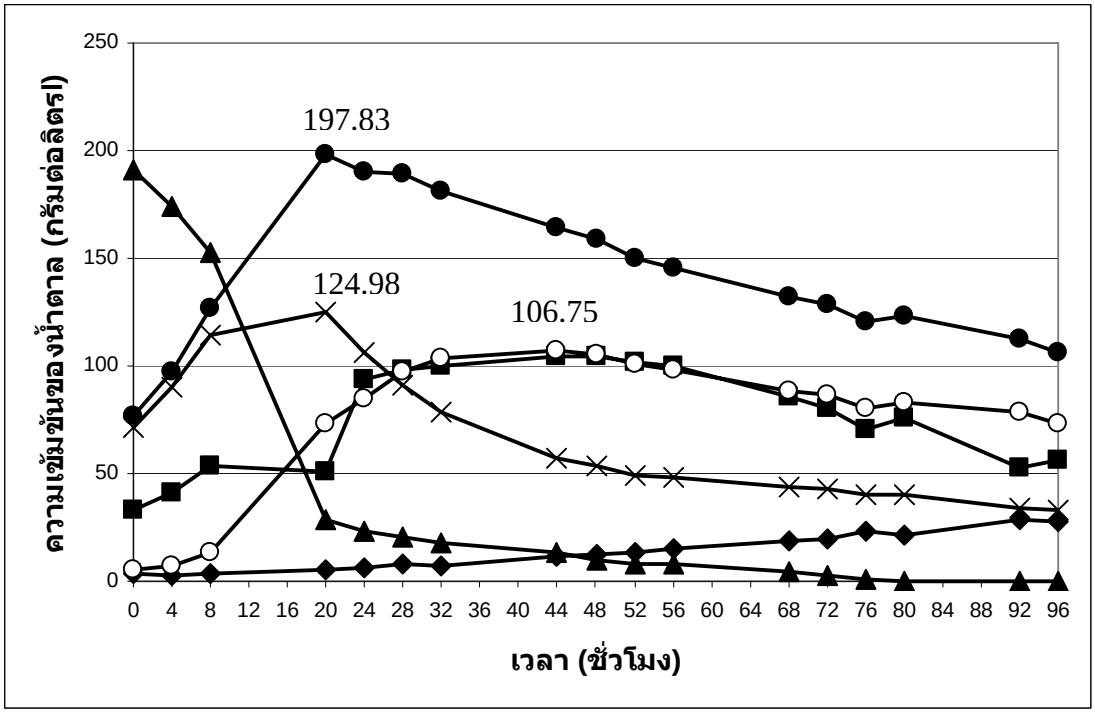
4.4.4 ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตฟรักโท-ออลิโกแซ็กคาไรด์

การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ต้องใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้น ดังนั้นการมีน้ำตาลซูโครสในปริมาณที่พอเหมาะจะทำให้ต้นทุนในการผลิตไม่สูงมากจนเกินไป เนื่องจากใช้น้ำตาลไม่มากเกินสมควรและจะต้องพิจารณาความเข้มข้นของน้ำตาลที่ทำให้ได้ผลผลิตสูง โดยการทดลองนี้จะทำการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 2 ค่า คือ 250 และ 300 กรัมต่อลิตร

4.4.4.1 ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 250 กรัมต่อลิตร

ทำการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ใช้ชนิดอาหารและคุมภาวการณ์ผลิตตามข้อ 4.4.3 แต่ใช้ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นเป็น 250 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ทุก 4 ชั่วโมง

พบว่าการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดย *Penicillium* sp. H12 ในช่วง 20 ชั่วโมงแรกของการผลิตน้ำตาลซูโครสจะถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว พบว่าตลอดการผลิตจะมีการสะสมของน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้นโดยมีกลูโคสเกิดขึ้นสูงสุด 56.30 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 และมีน้ำตาลฟรักโทสเกิดขึ้นในปริมาณต่ำและค่อยๆเพิ่มขึ้นในช่วงชั่วโมงท้ายๆ โดยมีฟรักโทสเกิดขึ้นสูงสุด 27.33 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 สามารถผลิตเคสโทสได้สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 20 ปริมาณ 124.98 กรัมต่อลิตร และผลิตนิสโทสได้สูงสุด 106.75 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 44 และพบว่าน้ำตาลซูโครสลดลงและหมดไปในชั่วโมงที่ 80 ปริมาณของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวมได้สูงสุด 197.83 กรัม ในชั่วโมงที่ 20 ของการผลิต ได้ผลิตภัณฑ์คิดเป็น 79.13 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น มี FOS Productivity 9.89 g/l/h เป็นที่สังเกตว่าความเข้มข้นของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวมเพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอขึ้น



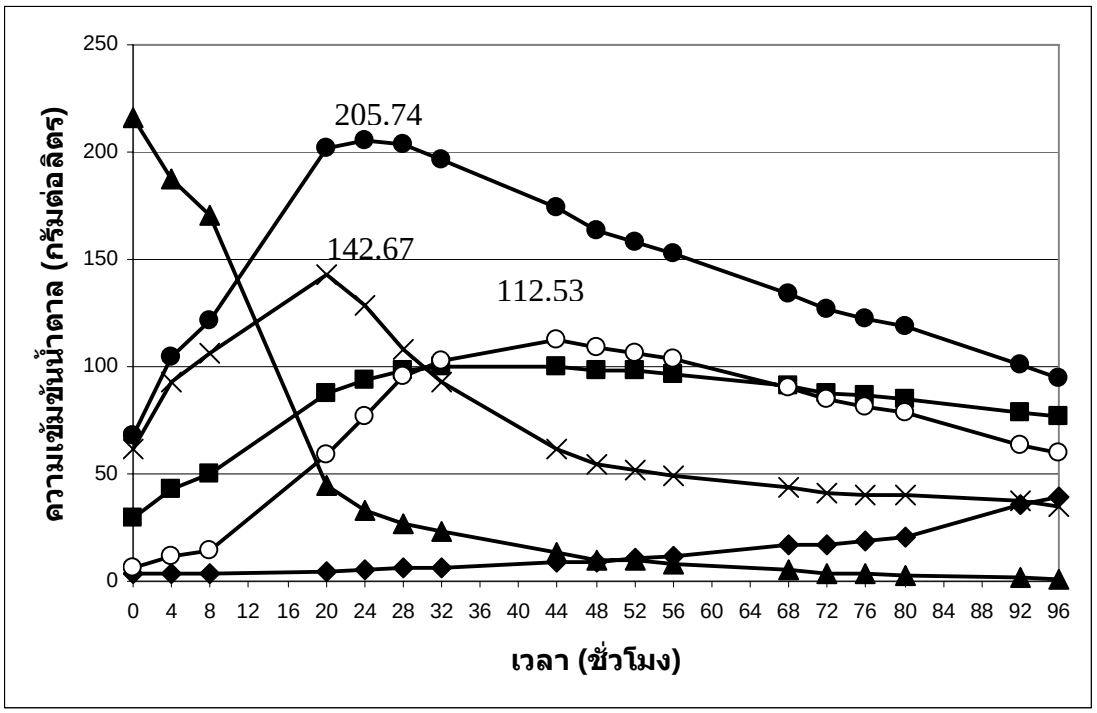
รูปที่ 4.41 แสดง การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำการผลิตโดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่ความเข้ม 250 กรัมต่อลิตร (◆ = ฟรักโทส, ■= กลูโคส, ▲= ซูโครส, ×= เคสโทส, ○= นิสโทส, ●= ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวม)

4.4.3.2 **ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตร**

ทำการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ใช้ชนิดอาหารและคุมภาวการณ์ผลิตตามข้อ 4.4.3 แต่ใช้ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นเป็น 300 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ทุก 4 ชั่วโมง

พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นเป็น 300 กรัมต่อลิตร การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดย *Penicillium* sp. H12 ในช่วง 20 ชั่วโมงแรกของการผลิตน้ำตาลซูโครสจะถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว พบว่าตลอดการผลิตจะมีการสะสมของน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้นโดยมีกลูโคสเกิดขึ้นสูงสุด 76.71 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 และมีน้ำตาลฟรักโทสเกิดขึ้นในปริมาณต่ำและค่อยๆ เพิ่มขึ้นในช่วงชั่วโมงท้ายๆ โดยมีฟรักโทสเกิดขึ้นสูงสุด 39.03 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 สามารถผลิตเคสโทสได้สูงที่สุดในชั่วโมงที่ 20 ปริมาณ 142.67 กรัมต่อลิตร และผลิตนิสโทสได้สูงสุด 112.53 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 44 และพบว่าน้ำตาลซูโครสลดลงและเหลือน้อยที่สุดในชั่วโมงที่

96 ปริมาณ 1.16 กรัมต่อลิตร และปริมาณของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวมได้สูงสุด 205.74 กรัม ในชั่วโมงที่ 24 ของการผลิต ได้ผลิตภัณฑ์คิดเป็น 68.58 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น มี FOS Productivity 8.57 g/l/h



รูปที่ 4.42 แสดง การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำการผลิตโดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่ความเข้ม 300 กรัมต่อลิตร (◆= ฟรักโทส, ■= กลูโคส, ▲= ซูโครส, ×= เคสโทส, ○= นิสโทส, ●= ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวม)

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบปริมาณการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ระหว่างการผลิตโดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นเป็น 250 และ 300 กรัมต่อลิตร

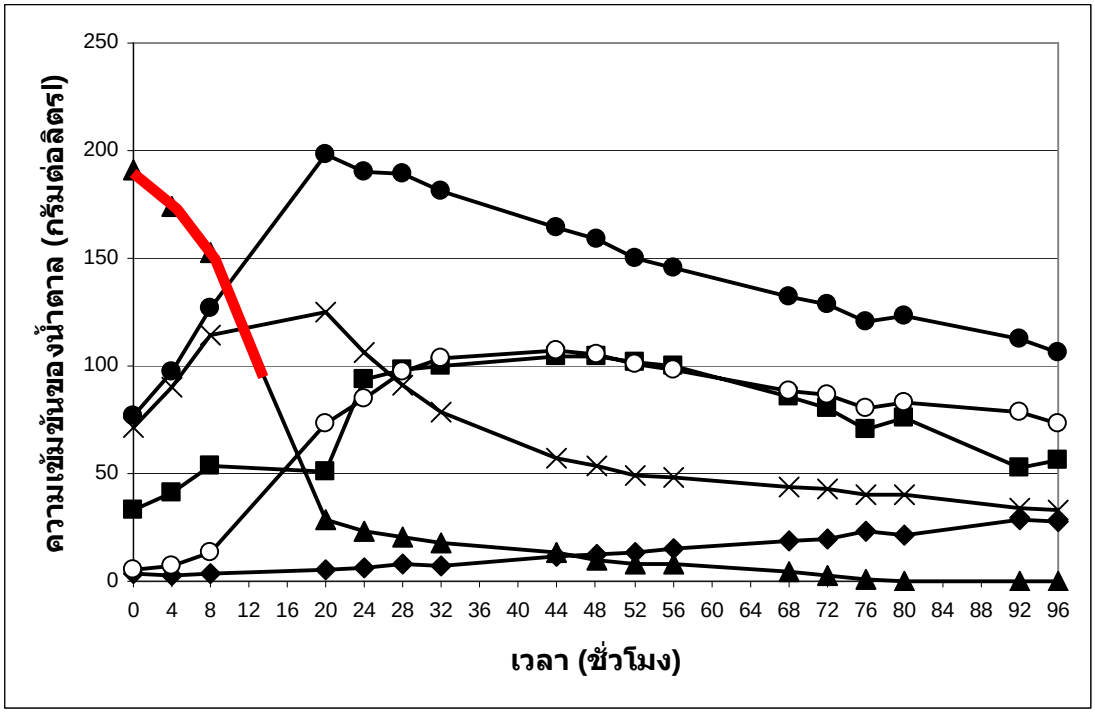
ชนิดของน้ำตาล	**ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น**	
	25 0กรัมต่อลิตร	**3 00กรัมต่อลิตร**
เคสโทส (กรัมต่อลิตร)	124.98 (ชั่วโมงที่ 20)	142.67 (ชั่วโมงที่ 20)
นิสโทส (กรัมต่อลิตร)	106.75 (ชั่วโมงที่ 44)	112.53 (ชั่วโมงที่ 44)
ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวม (กรัมต่อลิตร)	197.83 (ชั่วโมงที่ 20)	205.74 (ชั่วโมงที่ 24)
% FOS ต่อน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น	79.13 %	68.58 %
productivity	9.89 g/l/h	8.57 g/l/h
น้ำหนักเซลล์แห้ง/แผ่นหมุน	6.38 ± 0.52 g	7.47 ± 0.68 g

จากตาราง 4.5 สามารถสรุปได้ว่าปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นเป็น 250 กรัมต่อลิตร เหมาะสมสำหรับการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์มากกว่าปริมาณน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นเป็น 300 กรัมต่อลิตร เนื่องจากให้ผลผลิตและ productivity ที่สูงกว่า

4.5 ผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์แบบเฟดแบตช์

4.5.1 เวลาและอัตราในการเติมน้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแบบเฟดแบตช์

เลี้ยงเชื้อ *Penicillium sp. H12* แบบกะที่ได้ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์สูงที่สุด ตามข้อ 4.4.3.1 โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้นอายุ 10 ชั่วโมง ควบคุมความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 5.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้อัตราการหมุนของแผ่นหมุน 2 รอบต่อนาที ระดับการจมตัวของแผ่นหมุนลงใต้ระดับอาหารเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของถังหมัก ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่ความเข้ม 250 กรัมต่อลิตร และเป่าอากาศปลอดเชื้อ 1.25 ลิตรต่อนาที



รูปที่ 4.43 แสดง การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำการผลิตแบบกะโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4.4.3.1 (♦ = ฟรักโทส, ■= กลูโคส, ▲ = ซูโครส , ×= เคสโทส, ○= นิสโทส, ●= ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวม)

จากการทดลองผลิตแบบกะพบว่า น้ำตาลจะลดลงอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรกของการหมักและช้าลงมากหลังจากนั้น ดังนั้นการทดลองแบบเฟดแบตช์จึงเลี้ยง *Penicillium* sp. H12 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยควบคุมสภาวะ การหมักเหมือนการทดลองที่ 4.4.3.1 ทุกประการแล้วจึงเติมน้ำตาลให้มีความเข้มข้น 250 กรัมต่อลิตร เพื่อให้มีการสร้าง ฟรักโทออลิโกแซ็กคาร์ไรด์ต่อไป การเติมน้ำตาลในการศึกษาครั้งนี้เติมแบบกึ่งกะในปริมาตร 2 ลิตร เติมหลังจากสูบอาหารออกจากถังหมักปริมาณ2 ลิตรเท่ากันทำให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 4 ลิตรเท่าเดิม ทั้งนี้เพื่อให้ จลนศาสตร์การหมักคงเดิม

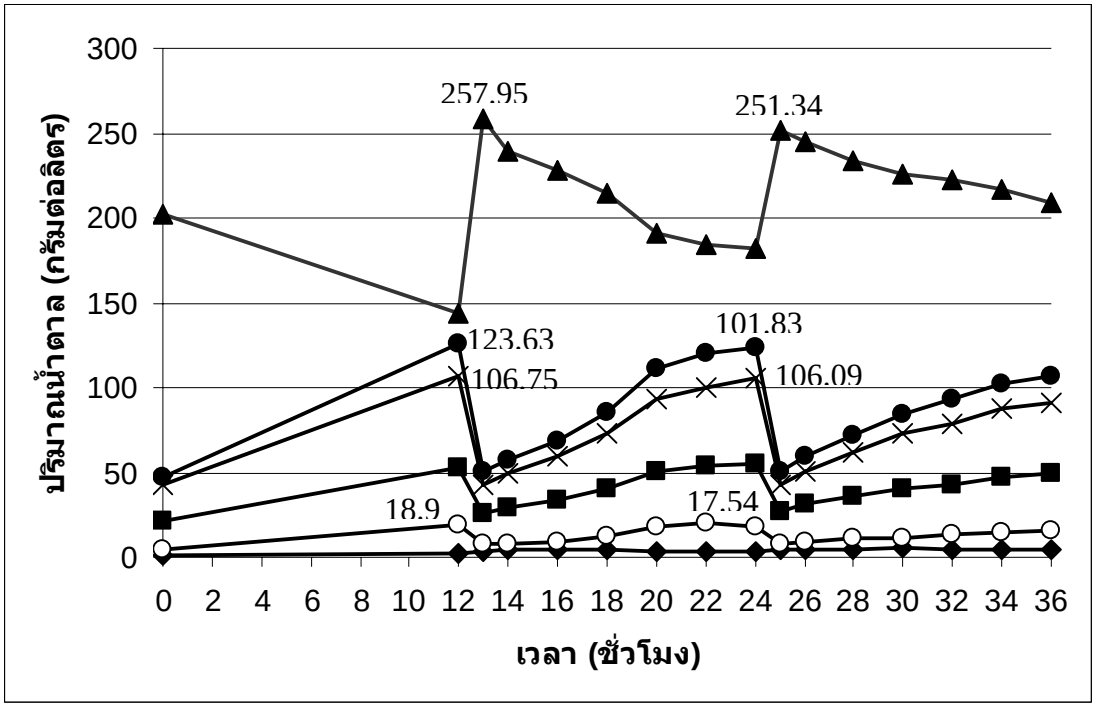
โดยคำนวณการเติมน้ำตาลได้จาก เมื่อพิจารณาการผลิตแบบกะชั่วโมงที่ 12 มีน้ำตาลเหลืออยู่ 100 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในการเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ต้องเอาน้ำตาลออก 2 ลิตรจึงเหลือน้ำตาลในถังหมัก 200 กรัมใน 2 ลิตร ต้องการให้น้ำตาลคงอยู่ในอาหาร 250 กรัมต่อลิตร ในอาหาร 4 ลิตร ต้องมีน้ำตาล 1000 กรัมต่อ 4 ลิตร ดังนั้นในน้ำตาล 2 ลิตรที่จะเติมนั้นต้องมีความเข้มข้นของน้ำตาล (1000-200)/2 = 400 กรัมต่อลิตร โดยทำการเติมอาหารสองรอบที่ชั่วโมงที่ 12 และ ชั่วโมงที่ 24

4.5.2 ผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์แบบเฟดแบตช์

ผลการหมักใน 12 ชั่วโมงแรกรูปแบบใกล้เคียงกับการทดลองที่ผ่านมา ยกเว้นการใช้ซูโครสลดลงเหลือซูโครสอยู่ถึง 143.4 กรัมต่อลิตร หลังจากเติมอาหาร 2 ลิตรโดยปรับให้น้ำตาลเข้มข้นประมาณ 250 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ หลังการเติมอาหารแล้วความเข้มข้นของฟรักโทออลิโกแซ็กคาร์ไรด์ทั้งหมด ค่อยๆเพิ่มขึ้นจนถึง 123.63 กรัมต่อลิตรในเวลา 12 ชั่วโมงซึ่งใกล้เคียงกับการเลี้ยงแบบแบตช์ใน 12 ชั่วโมงแรกซึ่งได้ฟรักโทออลิโกแซ็กคาร์ไรด์ทั้งหมด 125.65 กรัมต่อลิตร เป็นที่สังเกตว่าน้ำตาลนิสโทสเกิดขึ้นสูงสุดแค่ 20.65 กรัมต่อลิตร ซึ่งน้อยกว่าที่เคยเป็นในการผลิตแบบแบตช์ที่สูงถึงเกือบ 100 กรัมต่อลิตรที่ 24 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการเติมอาหารทำให้มีซูโครสจำนวนมากกว่าเคสโทสในอาหาร ฟรักโทสจึงมีโอกาสจับกับซูโครสมากกว่า กรณีนี้น่าจะเป็นผลดีหากต้องการควบคุมการผลิตให้มีนิสโทสน้อยๆ ซูโครสคงเหลือถึง 181.56 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อคิดเปอร์เซนต์การผลิตเทียบกับน้ำตาลที่ใช้ไปก็สูงถึง 95.89%

การเติมอาหารรอบที่สองก็ได้ผลใกล้เคียงกับกับรอบแรกแต่ความเข้มข้นของเคสโทส ลดลง 14% เหลือ 91.10 กรัมต่อลิตรความเข้มข้นของฟรักโทออลิโกแซ็กคาร์ไรด์ทั้งหมดก็ลดลงประมาณ 14% เช่นกัน

เป็นที่สังเกตว่าการเติมน้ำตาลให้สูงเท่าที่ใช้ในการเลี้ยงแบบแบตช์ไม่เหมาะสมเพราะการใช้น้ำตาลลดลง เมื่อเติมครั้งที่สองการใช้น้ำตาลยิ่งลดลง ทั้งนี้อาจเกิดจากการสะสมของเสียกรณีนี้อาจต้องทดลองการเติมอาหารแบบที่เหมาะสมกว่านี้



รูปที่ 4.44 แสดง การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์และปริมาณน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้เมื่อทำการผลิตแบบเฟดแบตช์ (♦ = ฟรักโทส, ■= กลูโคส, ▲ = ซูโครส, ×= เคสโทส, ○= นิสโทส, ●= ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวม)

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบปริมาณการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ระหว่างระหว่างการผลิตแบบกะและแบบเฟดแบตช์

ชนิดของน้ำตาล	**การผลิต**	
	batch	Fed-batch
เคสโทส (กรัมต่อลิตร)	124.98 (ชั่วโมงที่ 20)	106.75 (ชั่วโมงที่ 12)
นิสโทส (กรัมต่อลิตร)	106.75 (ชั่วโมงที่ 44)	18.90 (ชั่วโมงที่ 12)
ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์รวม (กรัมต่อลิตร)	197.83 (ชั่วโมงที่ 20)	123.63 (ชั่วโมงที่ 12)
% FOS ต่อน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น	79.13 %	49.45 %
productivity	9.89 g/l/h	10.30 g/l/h
น้ำหนักเซลล์แห้ง/แผ่นหมุน	6.38 ± 0.52 g	5.47 ± 0.68 g

จากตาราง 4.6 สามารถสรุปได้การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์แบบกะเหมาะสมสำหรับการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์มากกว่าการผลิตแบบเฟดแบตช์ เนื่องจากให้ผลผลิตและ productivity ที่สูงกว่า

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาการงอกของสปอร์ในช่วงเวลาต่างๆ เพื่อนำไปเป็นหัวเชื้อในการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าสปอร์ของเชื้อ *Penicillium* sp.H12 ในช่วงชั่วโมงที่ 2 4 และ 6 ยังไม่มีการงอกของสปอร์และเริ่มมีการงอกของสปอร์ในชั่วโมงที่ 8 และพบว่าชั่วโมงที่ 10 มีการสร้างสายใยของราที่ยาวพอประมาณมีการจับตัวของสายใยเป็นกลุ่มก้อนน้อย ดังนั้นจึงเหมาะสมสำหรับการจับตัวบนวัสดุบนแผ่นหมุนชีวภาพมากที่สุด ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึง ชั่วโมงที่ 24 นั้นสายใยของรามีการงอกที่ยาวขึ้นแต่มีการจับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนจนเกินไป ทำให้มีน้ำหนักมากเมื่อถ่ายเชื้อลงไปอาจทำให้ตกอยู่บริเวณก้นถังไม่ติดบนแผ่นหมุน ดังนั้น จึงเลือกเพาะเลี้ยงสปอร์ของ *Penicillium* sp.H12 เป็นเวลา 10 ชั่วโมงก่อนเพื่อที่จะเป็นหัวเชื้อในผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในถังหมักชีวภาพแบบหมุนต่อไป

ทำการศึกษาเพื่อหาวัสดุที่ใช้ติดบนแผ่นหมุน ที่เหมาะสมสำหรับการเกาะของหัวเชื้อชั่วโมงที่ 10 โดยแผ่นอะคริลิกมีผิวเรียบลื่นจนเกินไปจึงทำให้ราเกาะติดยาก จึงเลือกผ้า 3 ชนิด ที่มีราคาไม่แพงและเนื้อผ้ามีช่องว่างที่สายใยของราจะมาเกาะติดได้ ได้แก่ ผ้ายืด ผ้าลินิน และ ผ้าขาวบาง พบว่าแผ่นหมุนชีวภาพที่ติดด้วยผ้าขาวบางนั้นมีความสามารถในการที่จะให้เชื้อ *Penicillium* sp.H 12 มาเกาะติดได้มากที่สุดโดยที่พื้นที่ผ้า 1 ตารางนิ้ว มีเชื้อติดอยู่ถึง 0.2737 กรัม และเมื่อศึกษาลักษณะของผ้าชนิดต่างๆผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าผ้ายืดมีเส้นใยเรียบขนาดสม่ำเสมอแต่ขนาดเส้นใยใหญ่ที่สุด เส้นใยของผ้าลินินมีขนาดรองลงมา และค่อนข้างสม่ำเสมอการปั่นเกลียวของเส้นด้ายของผ้าทั้งสองชนิดจึงแน่นสม่ำเสมอเมื่อเทียบกับผ้าขาวบาง ซึ่งมีเส้นใยฝ้ายที่ไม่สม่ำเสมอเท่าผ้าสองชนิดแรกลักษณะการทอก็ทำให้เกิดช่องว่างกว้างไม่เท่ากันโดยผ้าลินินจะหนาแน่นที่สุดผ้ายืดรองลงมาส่วนผ้าขาวบางมีช่องว่างมากที่สุด ดังนั้นผ้าขาวบางจึงมีความเหมาะสมที่สุด ที่จะนำมาติดกับแผ่นหมุนชีวภาพในการนำเชื้อ *Penicillium* sp.H 12 ไปผลิตฟรักโทออลิโกแซคคาไรด์ในถังหมักชีวภาพแบบหมุน

ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในถังหมักชีวภาพแบบหมุนแบบกะโดยทำการแปรผันปัจจัยต่างๆที่จะมีผลต่อการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ได้แก่

- อัตราการการหมุนของแผ่นหมุนโดยแปรผันอัตราการหมุนเป็น 2 3 และ 4 รอบต่อนาทีตามลำดับ

- ระดับการจมใต้ระดับอาหารของแผ่นหมุนโดยแปรผันระดับการจมตัวของแผ่นหมุนเป็น 20 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

- ปริมาณของหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมโดยแปรผันปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 30 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของถังหมัก

- ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่เหมาะสมโดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่ความเข้ม 250 และ 300 กรัมต่อลิตร

พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ในถังหมักชีวภาพแบบหมุนด้วยเชื้อ *Penicillium* sp.H12 แบบกะนั้นคือ ใช้หัวเชื้อ *Penicillium* sp. H12 อายุ 10 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของถังหมัก ระดับการจมใต้อาหารของแผ่นหมุน 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี อัตราการหมุน 2 รอบต่อนาที ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นเป็น 250 กรัมต่อลิตร ควบคุมความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 5.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเป่าอากาศปลอดเชื้อ 1.25 ลิตรต่อนาที โดยจะให้ฟรักโทออลิ-โกแซ็กคาไรด์ถึง 197.83 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 20 ของการหมัก ให้ผลิตภัณฑ์ต่อน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 79.13% และ และ มี productivity 9.89 g/l/h

พบว่ารูปแบบของการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดย *Penicillium* sp. H12 นั้น ในช่วงต้นของการผลิต จะมีการสร้างฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดเคสโทสมากกว่าชนิดนิสโทสและหลังจากนั้นปริมาณของเคสโทสจะค่อยๆลดลง พร้อมกับมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณนิสโทส อย่างรวดเร็วซึ่งสอดคล้องกับที่ช่วงแรกน้ำตาลซูโครสจะลดลงอย่างรวดเร็ว นั้นส่วนใหญ่จะถูกนำไปผลิตเคสโทสก่อนและเคสโทสที่ได้นั้น ก็จะถูกนำไปเป็นสารตั้งต้นร่วมกับน้ำตาลซูโครสในการผลิตนิสโทสต่อไปแสดงให้เห็นว่า น้ำตาลซูโครสนั้นเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคา-ไรด์เพราะหากไม่มีน้ำตาลซูโครส หรือน้ำตาลซูโครสหมดไปก็จะไม่สามารถสร้างฟรักโท-ออลิโกแซ็กคาไรด์ทั้งสองชนิดได้เลยซึ่งจะสังเกตได้จาก ปริมาณของเคสโทสและนิสโทสจะไม่มีการเพิ่มขึ้นอีกในช่วงชั่วโมงท้ายๆ ของการทดลองเมื่อน้ำตาลซูโครสที่ให้นั้นถูกใช้ไปหมดซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chiang และ Lee (1997) และ Nishizawa, Nakajima (2001) ดังนั้นหากจะทำการผลิตให้ได้ฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในปริมาณมากขึ้น จะต้องพยายามรักษาปริมาณของน้ำตาลซูโครสให้อยู่ในปริมาณที่มากพอที่จะใช้ในการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ได้ และนอกจากนั้นจะมีการสะสมของน้ำตาลกลูโคสขึ้นเรื่อยๆ ในระหว่างการผลิตเนื่องมาจากกการผลิตฟรักโทออลิโกแว็กคาไรด์นั้นจะมีการสลายโมเลกุลของน้ำตาลซูโครส ซึ่งเป็นน้ำตาลเริ่มต้นในการผลิตโดยจะได้เป็นน้ำตาลกลูโคสกับฟรักโทสโดยฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์นั้น คือการนำเอาน้ำตาล

ฟรักโทสไปเชื่อมต่อกับน้ำตาลซูโครสอีกโมเลกุลหนึ่ง จึงทำให้มีน้ำตาลกลูโคสเหลือออกมาโดยกลูโคสที่ได้นั้นส่วนหนึ่งเชื้อราจะเอาไปใช้ในการเจริญเติบโต และส่วนที่เหลือก็จะเกิดการสะสมในระหว่างการผลิตซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Guptha และ Bhatia (1980)

จากการทดลองการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ ในถังหมักชีวภาพแบบหมุนด้วยเชื้อ *Penicillium* sp.H12 แบบกะนั้นพบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุด คือ ใช้หัวเชื้อ *Penicillium* sp. H12 อายุ 10 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของถังหมัก ระดับการจมใต้อาหารของแผ่นหมุน 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี อัตราการหมุน 2 รอบต่อนาที ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นเป็น 250 กรัมต่อลิตรควบคุมความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 5.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเป่าอากาศปลอดเชื้อ 1.25 ลิตรต่อนาที ซึ่งสภาวะนี้ทำให้การใช้พลังงานที่จะทำการผลิตลดลงเมื่อเทียบกับ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบมีใบกวน (วีระพงษ์ พรประสาทผล, 2545) และ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิไดซ์เบด (กิติภัทร ลิ้มประเสริฐ, 2548) และพบว่าสามารถผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ได้ในปริมาณที่สูงกว่าการผลิตโดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบมีใบกวน และ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิไดซ์เบด เมื่อใช้น้ำตาลเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร เท่ากัน (ตารางที่ 5.1) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในถังปฏิกรชีวภาพแบบมีใบกวนนั้นเมื่อทำการผลิตฟรักโทออ-ลิโกแซ็กคาไรด์เป็นเวลานานจะประสบปัญหาเกี่ยวกับการที่สายใยของ *Penicillium* sp.H12 ถูกทำลายไปเนื่องจากแรงเฉือนของใบพัดของถังปฏิกรชีวภาพ และเมื่อเชื้อรามีการเจริญมากขึ้นก็จะทำให้ต้องมีการเพิ่มอัตราการให้อากาศ และอัตราการหมุนของใบกวนมากขึ้นทำให้มีการสิ้นเปลืองพลังงานในปริมาณมาก และเช่นเดียวกันในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิไดซ์เบดเมื่อทำการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์เป็นเวลานานจะประสบปัญหาเกี่ยวกับการที่สายใยของ *Penicillium* sp.H12 นั้นมารวมกันเป็นกลุ่มก้อนที่หนาแน่นจนเกินไป จนทำให้ต้องมีการเพิ่มอัตราการให้อากาศในปริมาณมากขึ้นทำให้มีการสิ้นเปลืองพลังงานในปริมาณมาก โดยการจับตัวกันของเส้นใยอย่างหนาแน่นนั้นอาจทำให้เชื้อราได้รับอากาศไม่ทั่วถึงได้ และทำให้เกิดการอุดตันของถังขึ้น

ตารางที่ 5.1 แสดงปริมาณฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้สูงสุดจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบมีใบกวน (วีระพงษ์ พรประสาทผล, 2545) ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิไดซ์เบด (กิติภัทร ลิ้มประเสริฐ, 2548) และ ถังหมักชีวภาพแบบหมุน (ชนภัฏฏ์ ลักษณะวิลาศ, 2553) ในการผลิตแบบกะ

ชนิดของน้ำตาล	ถังหมัก		
	ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบมีใบกวน	ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบฟลูอิไดซ์เบด	ถังหมักชีวภาพแบบหมุน
เคสโทส (กรัมต่อลิตร)	106.90	112.84	124.98
นิสโทส (กรัมต่อลิตร)	90.00	112.54	106.75
FOS รวม (กรัมต่อลิตร)	165.10	194.04	197.83

การผลิตฟรักโทออลิแซ็กคาไรด์ในถังหมักชีวภาพแบบหมุนแบบเฟดแบตช์ โดยการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นอายุ 10 ชั่วโมง ทำการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในอาหารสำหรับผลิตฟรักโทออ-ลิโกแซ็กคาไรด์ในถังหมักชีวภาพแบบหมุนปริมาตร 4 ลิตร โดยควบคุมความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 5.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เลี้ยงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง โดยใช้อัตราการหมุนของแผ่นหมุน 2 รอบต่อนาที ระดับการจมตัวในอาหารของแผ่นหมุนเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ของรัศมี ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ของถังหมัก ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่ความเข้ม 250 กรัมต่อลิตร และเป่าอากาศปลอดเชื้อ 1.25 ลิตรต่อนาที ทำการผลิตแบบเฟดแบตช์โดยการป้อนอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 250 กรัมต่อลิตรเพื่อให้มีการสร้าง ฟรักโทออลิโกแซ็กคาร์ไรด์ต่อไป ปริมาตร 2 ลิตร เติมหลังจากสูบอาหารออกจากถังหมักปริมาณ2 ลิตรเท่ากันทำให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 4 ลิตรเท่าเดิม ทั้งนี้เพื่อให้ จลนศาสตร์การหมักคงเดิม

โดยคำนวณการเติมน้ำตาลได้จาก เมื่อพิจารณาการผลิตแบบกะชั่วโมงที่ 12 มีน้ำตาลเหลืออยู่ 100 กรัมต่อลิตร ดังนั้นในการเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ต้องเอาน้ำตาลออก 2 ลิตรจึงเหลือน้ำตาลในถังหมัก 200 กรัมใน 2 ลิตร ต้องการให้น้ำตาลคงอยู่ในอาหาร 250 กรัมต่อลิตร ในอาหาร 4 ลิตร ต้องมีน้ำตาล 1000 กรัมต่อ 4 ลิตร ดังนั้นในน้ำตาล 2 ลิตรที่จะเติมนั้นต้องมีความเข้มข้นของน้ำตาล (1000-200)/2 = 400 กรัมต่อลิตร โดยทำการเติมอาหารสองรอบที่ชั่วโมงที่ 12 และ ชั่วโมงที่ 24

ผลการทดลองใน 12 ชั่วโมงแรกรูปแบบใกล้เคียงกับการเลี้ยงแบบกะยกเว้นการใช้ซูโครสลดลงเหลือซูโครสอยู่ถึง 143.4 กรัมต่อลิตร หลังจากเติมอาหาร 2 ลิตรโดยปรับให้น้ำตาลเข้มข้นประมาณ 250 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของฟรักโทออลิโกแซ็กคาร์ไรด์ทั้งหมด ค่อยๆเพิ่มขึ้นจนถึง 123.63 กรัมต่อลิตรในเวลา 12 ชั่วโมงซึ่งใกล้เคียงกับการเลี้ยงแบบกะใน 12 ชั่วโมงแรกซึ่งได้ฟรักโทออลิโกแซ็กคาร์ไรด์ทั้งหมด 125.65 กรัมต่อลิตร เป็นที่สังเกตว่าน้ำตาลนิสโทสเกิดขึ้นสูงสุดแค่ 20.65 กรัมต่อลิตร ซึ่งน้อยกว่าที่เคยเป็นในการผลิตแบบกะที่สูงถึงเกือบ 100 กรัมต่อลิตรที่ 24 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการเติมอาหารทำให้มีซูโครสจำนวนมากกว่าเคสโทสในอาหาร ฟรักโทสจึงมีโอกาสจับกับซูโครสมากกว่า กรณีนี้น่าจะเป็นผลดีหากต้องการควบคุมการผลิตให้มีนิสโทสน้อยๆ ซูโครสคงเหลือถึง 181.56 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อคิดเปอร์เซนต์การผลิตเทียบกับน้ำตาลที่ใช้ไปก็สูงถึง 95.89%

การเติมอาหารรอบที่สองก็ได้ผลใกล้เคียงกับกับรอบแรกแต่ความเข้มข้นของเคสโทส ลดลง 14% เหลือ 91.10 กรัมต่อลิตรความเข้มข้นของฟรักโทออลิโกแซ็กคาร์ไรด์ทั้งหมดก็ลดลงประมาณ 14% เช่นกัน

เป็นที่สังเกตว่าการเติมน้ำตาลให้สูงเท่าที่ใช้ในการเลี้ยงแบบแบตช์ไม่เหมาะสมเพราะการใช้น้ำตาลลดลง เมื่อเติมครั้งที่สองการใช้น้ำตาลยิ่งลดลง ทั้งนี้อาจเกิดจากการสะสมของเสียกรณีนี้อาจต้องทดลองการเติมอาหารแบบที่เหมาะสมกว่านี้

ข้อเสนอแนะ

1. งานวิจัยนี้เป็นการผลิตฟรักโทออลิแซ็กคาไรด์ ในถังหมักชีวภาพแบบหมุนแบบเฟดแบตช์ซึ่งจะให้ผลผลิตของฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในปริมาณไม่สูงมากเมื่อเทียบกับแบตช์ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปควรจะเปลี่ยนการผลิตเป็นแบบต่อเนื่อง เพื่อเพิ่มปริมาณของฟรักโทออลิ-โกแซ็กคาไรด์

2. ในการทดลองนี้ทำการหาค่า น้ำหนักแห้งของเชื้อพบว่าไม่สามารถนำมาคำนวณใดๆได้เนื่องจากมีปริมาณของเชื้อที่ไม่คงที่ดังนั้นในการทดลองต่อไปควรจะมีการเพิ่มการกวนเพื่อให้เชื้อและอาหารได้เข้ากันและเป็น homogenize มากขึ้น เช่น การใช้ magnetic stirrer

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กิติภัทร ลิ้มประเสริฐ. 2548. การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์แบบต่อเนื่องด้วย *Penicillium* sp. H12 โดยใช้แอร์ลิฟต์รีแอคเตอร์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วรรณา ศรีสัจจารักษ์. 2543. ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการผลิตสารให้ความหวานพลังงานต่ำชนิดฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดย *Penicillium* sp. H12. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วีระพงษ์ พรประสาทผล. 2545. การผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์โดย *Penicillium* sp. H12 ในการเลี้ยงแบบเฟดแบท. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สกุลรัตน์ พุกกะวรรณะ. 2548. การย่อยสลายน้ำมันดิบโดยกลุ่มจุลินทรีย์ที่คัดเลือกไว้ในระบบบำบัดแผ่นหมุนชีวภาพ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เสาวนีย์ ศิริรูป. 2539. การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากน้ำตาลซูโครส. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รศ.พญ.บุษบา วิวัฒน์เวคิน. 2542. หลักของพรีไบโอติก-อาหารเพื่อปรับสภาพจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์. วารสารองค์การเภสัชกรรม. เม.ย.- ก.ย.: 65-66.

ดร.สุภัจฉรา นพจินดา. 2543. กระตุ้นไบฟิโดแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ด้วยโอลิโกฟรุคโตสและอินนูลิน. วารสารอาหารและยา. ม.ค. – เม.ย.: 22-25.

ภาษาอังกฤษ

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

Bacon, J. S. D. and Edelman, J. 1951. The carbohydrates of the Jerusalem artichoke and other compositae. Biochem. J. 48: 114-126.

Balken, J. A. M., Dooren, J. G. M., Tweel, W. J. J., Kamphuis, J. and Meijer, E. M. 1991. Production of 1-kestose eith mycelium of *Asperjilus phoenicis* containing sucrose-1-fructosyltransferase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 35: 216-221.

Barthomeuf, C. and Pourrat, H. 1995. Production of high-content fructooligosaccharides by an enzymatic system from *Penicillium rugulosum*. Biotechnol. Lett. 17(9): 911-916.

Barthomeuf, C., Grizard, D. and Teulade, J. C. 1997. Assay and structural determination of fructooligosaccharides synthesized by an enzymatic system from *Penicillium rugulosum*. Biotechnol. Tech. 11(11): 845-848.

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

Briet, F., Achour, L., Fiourie, B., Beaugerie, L., Pellier, 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.

Buddington, R. K., Williams, C. H., Chen, S. and Witherly, S. A. 1996. Dietary supplement of neosugar alters the fecal flora and decreases activities of some reductive enzymes in human subjects. Am. J. Clin. Nutr. 63: 709-716.

Cairns, A. J. 1995. Effect of enzyme concentration on oligofructan synthesis from sucrose. Phytochemistry. 40(3): 705-708.

Campbell, J. M., Fahey, G. C. and Wolf, B. W. 1997. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short chain fatty acids, pH and microflora in rats. J. Nutr. 127: 130-136.

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

Chen, W. C. and Liu, C. H. 1996. Production of β-fructofuranosidase by *Aspergillus japonicus*. Enz. Microb. Technol. 18: 153-160.

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.

Chien, C. S., Lee, W. C. and Lin, T. J. 2001. Immobilization of *Aspergillus japonicus* by entrapping cell in gluten for production of fructooligosaccharides. Enz. microb. technol. 29: 252-257.

Chieng, C. J., Lee, W. C., Sheu, C. J. and Duan, K. J. 1997. Immobilized of β-fructofuranosidase from *Aspergillus* on methylacrylamide-based polymeric beads for production of fructooligosaccharides. Biotechnol. Prog. 13: 577-582.

Chin, Y. C., Duan, K. J., Shu, 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. Purficattion of food-grade oligosaccharide using immobilized Cells of *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbial. Biotechnol. 58: 297-302.

Cruz, R., Vinicius., Cruz, D., Belini, M. Z., Belote, J. G. and Vieira, C. R. 1998. Production of fructooligosaccharide by the mycelia of *Aspergillus japonicus* immobilized in calcium alginate. Biores. Technol. 65: 139-143.

Duan, K. J., Sheu, D. C. and Chen, J. S. 1993. Purification and Characterization of β-fructofuranosidase From *Aspergillus japonicus* TIT–KJ1. Biosci. Biotech. Biochem. 57(11): 1811-1815.

Edelman, J. and Dickerson, A. G. 1966. The metabolism of fructose polymers in plants: transfructosylation in tubers of *Helianthus tuberosus* L. Biochem. J. 98: 787-794.

Edelman, J. and Jefford, T. G. 1968. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. New. Phytol. 67: 517-531.

Fujita, K., Hara, K. and Hashimoto, H. 1990. Purification and some properties of β-fructofuranosidase I from *Arthobactor* sp.K-1. Agric. Biol. Chem. 54: 913-919.

Fujita, K., Hara, K. and Hashimoto, H. 1990. Transfructosylation catalyzed by β-Fructofuranosidase I from *Arthobactor* sp. K-1. Agric. Biol. Chem. 54(10): 2655-2661.

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

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

Gupta, K. A. and Bhatia, I. S. 1981. Glucofructosan biosynthesis in *Fusarium oxysporum* :regulation and substrate specificity of fructosyltransferase and invertase. Phytochemistry. 21(6): 1249-1253.

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

Hayashi, S., Nonokuchi, M., Imada, K. and Ueno, H. 1990. Production of a fructosyltransferring enzyme by *Aureobasidium* sp. ATCC 20524. J. Indus. Microbiol. 5: 395-400.

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

Hidaka, H., Hirayama, M. and Sumi, N. A. 1988. A fructooligosaccharide-producing enzyme from *Aspergillus niger* ATCC 20611. Agric. Biol. Chem. 52: 1181-1187.

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

Hirayama, M., Sumi, N., and Hidaka, H. 1989. Purification and properties of fructooligosaccharide-producing β-fructofuranosidases from *Aspergillus niger* ATCC 20611. Agric. Biol. Chem. 53(3): 667-673.

Ishimoto, M. and Nakamura, A. 1997. Purification and Properties of β-fructofuranosidase from *Clostridium perfringens*. Biosci. Biotech. Biochem. 61 (4): 599-603.

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

Jung, K. H., Lim, J. Y., Yoo, S. J., Lee, J. H. and Yoo, M. Y. 1987. Production of fructosyltransferase from *Aureobasidium pullulan*. Biotechnol. Lett. 9(10): 703-708.

Jung, K. H., Yun, J. W., Kang, K. R., Lim, J. Y. and Lee, J. H. 1989. Mathematical model for enzymatic production of fructooligosaccharides from sucrose. Enz. Microb. Technol. 11: 191-194.

Jung, K. H., Kim, J. H., Jeon, Y. J. and Lee, J. H. 1993. Production of high fructo oligosaccharides syrup with two enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase. Biotechnol. Lett. 15(1): 65-70.

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

Kaplan, H. and Hutkins, R. W. 2000. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacterium. App. Environ. Microbiol. 66(6): 2682-2684.

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

Kurakake, M., Onoue, T. and Komaki, T. 1996. Effect of pH on transfrutosylation and hydrolysis by β-fructofuranosidase from *Aspergillus oryza*. Appl. Microb. Biotechnol. 45: 236-239.

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 fructooligosaccharides by *Bifidobacterium* spp. Appl. Microb. Biotech. 31: 537-541.

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

Muramatsu, K., Shuichi, O., Masanori, K. and Norio, S. 1993. Purification and some properties of β-fructofuranosidase from *Bifidobacterium aolescentis* G1. Biosci. Biotech. Biochem. 57(10): 1681-1685.

Muramatsu, M., Kainuma, S., Miwa, T. and Nakakuki, T. 1988. Structure of some fructooligosaccharides produce from sucrose by mycelia of *Aspergillus sydowi* IAM 2544. Agric. Biol. Chem. 52(5): 1303-1304.

Nishizawa, k., Nakajima, M. and Nabetani, H. 2000. A force–flow membrane reactor for transfructosylation using ceramic membrane. Biotechnol. Bioeng. 68: 92-97.

Oku, T., Tokunaka, T. and Hosoya, N. 1984. Nondigestibility of a new sweetener "neosugar" in the rat. J. Nutr. 114: 1574-1581.

Pazur, J. H. 1952. Transfructosylation reactions of an enzyme of *Aspergillus oryzae.* J. Biol. Chem. 199: 217-225.

Praznik, W., Spies, T. and Hofinger, A. 1992. Fructooligosaccharides from the stems of *Triticum aestivum.* Carbohydrate Res. 235: 231-238.

Rastall, R. A. and Gibson, G. R. 2004. Functional Foods:Developments in colonic functional foods for improved digestive health. Bioscience-explained journal. 1: 1-7.

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(5): 137-146.

Sanchez, O., Guio, F., Garcia, D., Silva, E. and Caicedo, L. 2008. Fructooligosaccharides production by *Aspergillus* sp. N74 in a mechanically agitated airlift reactor. Food Bioprod. Proc. 86: 109–115.

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.

Shah, N. P. 2001. Functional foods from probiotics and prebiotics. Foodtechnol. 55: 46-53.

Sheu, D. C., Duan, K. J., Chang, C. Y., Bi, J. L. and Chen, J. Y. 2002. Continuous production of high-content fructooligosaccharides by a complex cell system. Biotechnol. Prog. 18: 1282-1286.

Shiomi, N., Yamada, J. and Izawa, M. 1979. Synthesis of several fructooligosaccharide by asparagus fructosyltransferases. Agric. Biol. Chem. 43(11): 2233-2244.

Shiomi, N. and Izawa, M. 1980. Purification and characterization of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase from root of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). Agric. Biol. Chem. 44: 603-614.

Shiomi, N., Kido, H. and Kiriyama, S. 1985. Purification and properties of sucrose: sucrose 1F-β-D-fructosyltransferase in onion seeds. Phytochem. 24(4): 695-698.

Shiomi, N. and Onodera, S. 1991. Separation of fructooligosaccharide isomers by anion-exchange chromatography. Argic. Biol. Chem. 55(5): 1427-1428.

Singh, R. and Bahtia I. S. 1971. Isolation and characterization of fructosyltransferase from chicory root. Phytochem. 10: 495-502.

Solange, I. M., Cristóbal, N. A., Lígia R. R. And José, A. T. 2009. Fructooligosaccharides and β-fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* immobilized on lignocellulosic materials. J. Molecular Catalysis B: Enzymatic. 59: 76–81.

Song, D. D. and Jacques N. A. 1999. Purification and enzymatic properties of the fructosyltransferase of *Streptocuccus salivarius* ATCC 25975. Biochem. J. 34: 285-291.

Takeda, H., Sato, K., Kinoshita, S. and Sasaki, H. 1994. Production of 1-kestose by *Scopulariopsis brevicaulis.* J. Ferment. Bioeng. 77(4): 386-389.

Usami, S., Ishii, T., Kirimura, K., Uehara, K. and Chen, J. 1991. Production of β-fructofuranosidase showing fructose-transferring activity by *Penicillium frequentans* (*P.glabrum*). J. Ferment. Bioeng. 72(4): 303-305.

Vincius, R. C., Cruz, D., Marcia, Z. B., Belote, G. J. and Vieira, C. R. 1998. Production of fructoologosaccharide by the mycelia of *Aspergillus japonicus* immobilized in calcium alginate. Biores. Technol. 65: 139-143.

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

William, C. M. 1999. Effect of inulin on lipid parameters in humans. J. Nutr. 129: 1471-1473.

Yamashita, K., Kawai, K. and Itakura, M. 1984. Effect of fructooligosaccharide on blood glucose and serum lipid in diabetic subject. Nutrition Res. 4: 961-966.

Yun, J. W. 1996. Frutooligosacchride-occurence, preparation and application. Enz. Microb. Technol. 19: 107-117.

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

Yun, J. W. and Song, S. K. 1993. The production of high-content fructooligosaccharides from sucrose by the mixed-enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase. Biotech. Lett. 15(6): 573-576.

Yoshikawa, J., Amachi, S., Shinoyama, H. and Fujii, T. 2006. Multiple β-fructofuranosidases by *Aureobasidium pullulans* DSM2404 and their roles in fructooligosaccharide production. FEMS Microbiol. Lett. 265: 159-163.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็งโปเตโตเด็กซ์โตรส (Potato Dextrose Agar)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

มันฝรั่งหั่น	200	กรัม
เด็กซ์โตรส	20	กรัม
วุ้นผง (Agar)	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยล้างมันฝรั่งให้สะอาด ปอกเปลือกแล้วนำมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งให้ได้น้ำหนักประมาณ 200 กรัม ต้มให้เดือดนาน 15-20 นาที กรองเอาแต่ส่วนน้ำด้วยผ้าขาวบาง มาเติมส่วนประกอบที่เหลือ ละลายให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่เป็นสายใย

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

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

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 5.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารสำหรับผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์ในถังหมัก

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

น้ำตาลทราย	250 - 300	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.3	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1	กรัม

ละลายส่วนประกอบในน้ำกลั่น เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 5.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. **ไฮโดรคลอริกความเข้มข้น** 4 normal

กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น	33	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	67	มิลลิลิตร

เตรียมน้ำกลั่นปริมาตร 67 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วมาเติม กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 33 มิลลิลิตร ภายใต้ตู้ดูดควัน

2. **โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น** 5 normal

โซเดียมไฮดรอกไซด์	20	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

เตรียมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วมาเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 กรัม ภายใต้ตู้ดูดควัน

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารละลายคลอร็อกซ์ (Clorox)

คลอร็อกซ์ (Clorox) เป็นสารเคมีที่นิยมใช้ในการฟอกฆ่าเชื้อ โดยมีส่วนประกอบหลัก คือ โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium hypochlorite; NaOCl) ประมาณ 5.25 % ซึ่งมีคุณสมบัติในการฆ่าหรือยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อได้ดี ให้เปอร์เซ็นต์ความปลอดเชื้อสูง ขณะเดียวกันหาซื้อได้ง่าย ราคาถูก มีวิธีการใช้ง่าย ไม่เป็นอันตรายหรือเป็นอันตรายน้อยมากต่อมนุษย์ ความเข้มข้นที่นิยมใช้ทั่วไปอยู่ในช่วง 5 - 20 % โดยมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาในการฟอกฆ่าเชื้อ ทั่วไปใช้เวลาประมาณ 15 - 30 นาที วิธีการเตรียมสารละลายคลอร็อกซ์ ที่ความเข้มข้น 10 % มีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนการเตรียม

- เตรียมน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว วัดปริมาตรน้ำกลั่นให้ได้ 90 มิลลิลิตร
- ใช้ ปิเปตดูดสาระลายคลอร็อกซ์ จากขวด ให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำสารละลายคลอร๊อกซ์ในปิเปตไปใส่ในขวดน้ำกลั่นที่เตรียมไว้
- หยดน้ำยาล้างจาน หรือสารจับใบ เช่น Tween 20 ประมาณ 2 - 3 หยด แล้วเขย่าให้เข้ากัน
- เป็นการเสร็จขั้นตอนการเตรียมสารละลายคลอร็อกซ์ ความเข้มข้น 10% สำหรับที่ความเข้มข้นอื่นๆ มีขั้นตอนการเตรียมเหมือนกันจะแตกต่างกันที่ปริมาตรของน้ำกลั่นและคลอร็อกซ์ เช่น ถ้าต้องการเตรียมสารละลายคลอร็อกซ์ 15% ปริมาตรน้ำลั่นใช้ คือ 85 มิลลิลิตรและปริมาตรคลอร็อกซ์ 15 มิลลิลิตร เป็นต้น

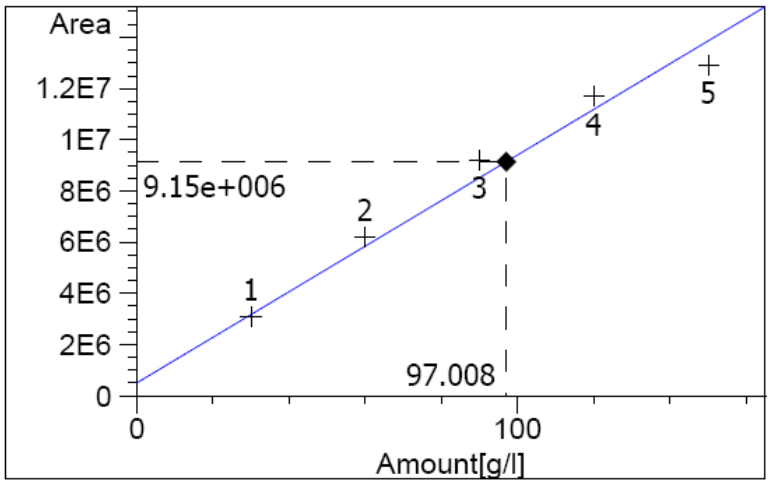
(สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง. 2540. เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเบื้องต้น. สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล, ลำปาง .45 หน้า.)

http://www.lartc.rmutl.ac.th/ptclab/chapter/clorox.html

ภาคผนวก ง

กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลฟรักโตสเมื่อทำการวิเคราะห์ โดยใช้วิธีโครมาโตการฟฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

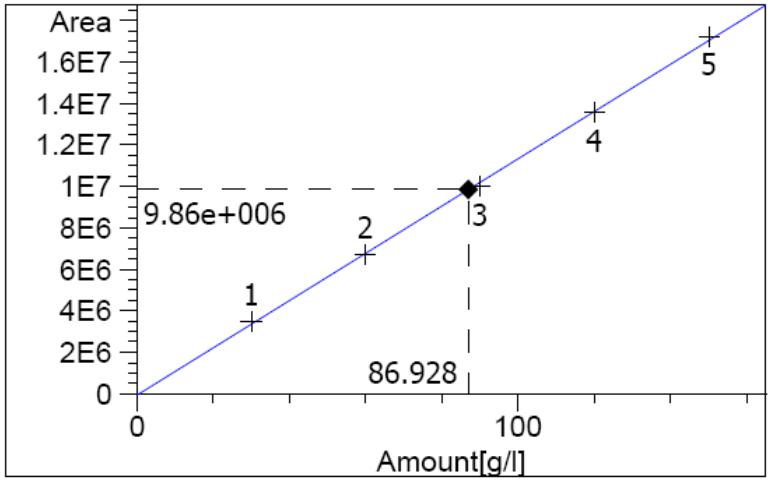



```
Fructose at exp. RT: 5.025
RID1 A, Refractive Index Signal
Correlation:            0.99215
Residual Std. Dev.: 705164.70901
Formula: y = mx + b
      m:  89163.79643
      b: 495867.97619
      x: Amount[g/l]
      y: Area
```

ความชัน = 89163.79643

ค่าความสัมพันธ์ (R^2) = 0.99215

2. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสเมื่อทำการวิเคราะห์ โดยใช้วิธีโครมาโตการฟฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

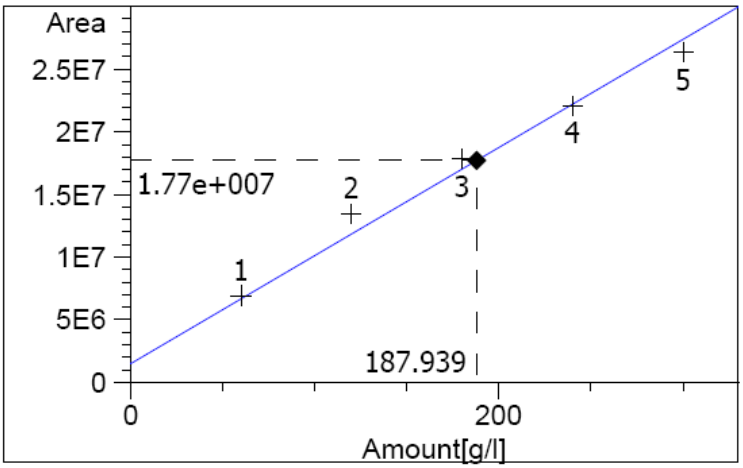



```
Glucose at exp. RT: 5.668
RID1 A, Refractive Index Signal
Correlation:            0.99974
Residual Std. Dev.: 162802.88046
Formula: y = mx + b
      m: 114081.94357
      b: -58789.64286
      x: Amount[g/l]
      y: Area
```

ความชัน = 114081.94357

ค่าความสัมพันธ์ (R^2) = 0.99974

3. **กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครสเมื่อทำการวิเคราะห์ โดยใช้วิธีโครมาโตการฟฟีซนิดของเหลวสมรรถนะสูง** (HPLC)

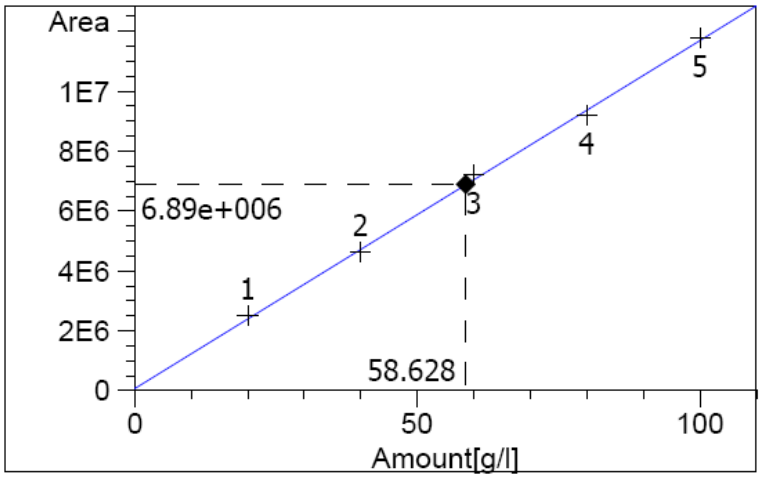



```
Sucrose at exp. RT: 6.426
RID1 A, Refractive Index Signal
Correlation:           0.99286
Residual Std. Dev.: 1302107.44495
Formula: y = mx + b
      m:  86387.46952
      b:      1.48551e6
      x: Amount[g/l]
      y: Area
```

ความชัน = 86387.46952

ค่าความสัมพันธ์ (R^2) = 0.99286

4. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลเคสโตสเมื่อทำการวิเคราะห์ โดยใช้วิธีโครมาโตการฟฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)

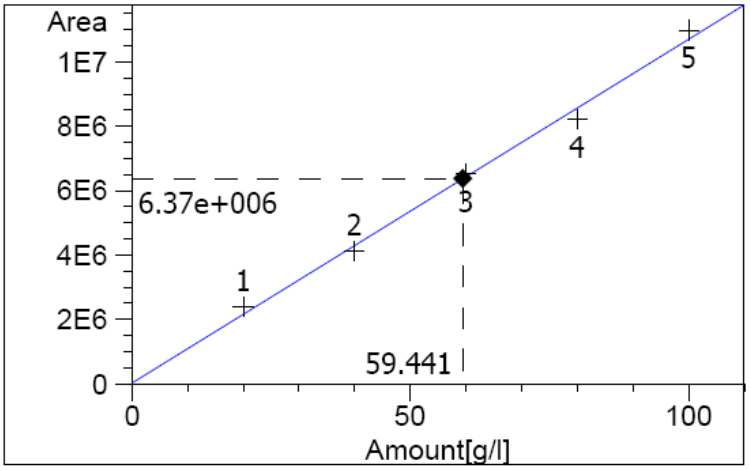



```
Kestose at exp. RT: 8.363
RID1 A, Refractive Index Signal
Correlation:            0.99952
Residual Std. Dev.: 150418.68019
Formula: y = mx + b
      m: 116379.39571
      b:  65845.88095
      x: Amount[g/l]
      y: Area
```

ความชัน = 116379.29571

ค่าความสัมพันธ์ (R^2) = 0.99952

5. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลนิสโตสเมื่อทำการวิเคราะห์ โดยใช้วิธีโครมาโตการฟฟีซนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)




```
Nystose at exp. RT: 10.305
RID1 A, Refractive Index Signal
Correlation:           0.99810
Residual Std. Dev.: 276376.04772
Formula: y = mx + b
      m: 106899.27607
      b:  19457.57143
      x: Amount[g/l]
      y: Area
```

ความชัน = 106899.27607

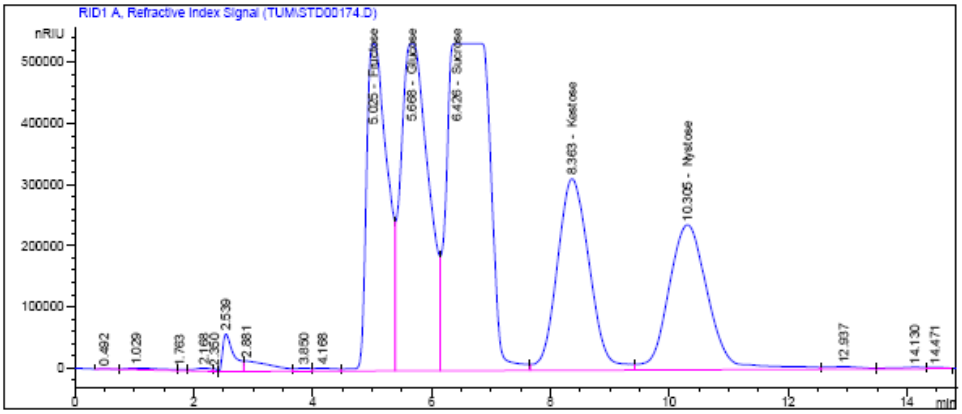
ค่าความสัมพันธ์ (R^2) = 0.99810

ภาคผนวก จ

โครมาโตแกรมของน้ำตาลที่ใช้ในการทำกราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลชนิดต่าง ๆเมื่อทำการวิเคราะห์ โดยใช้วิธีโครมาโตการฟฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 100%

```
Data File D:\HPCHEM\1\DATA\TUM\STD00174.D                                  Sample Name: std mix 100%
    ==================================================================
    Injection Date  : 25/1/2011 14:48:36 PM          Seq. Line :  15
    Sample Name     : std mix 100%                    Location : Vial 5
    Acq. Operator   : Chanapatt                           Inj :  1
    Acq. Instrument : Instrument 1                   Inj Volume : 20 µl
    Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\TUM.M
    Last changed    : 25/1/2011 10:47:06 PM by Chanapatt
    Analysis Method : D:\HPCHEM\1\METHODS\TUMSTD.M
    Last changed    : 24/2/2011 23:06:22 PM
                      (modified after loading)
    TUM453
    ==================================================================
```

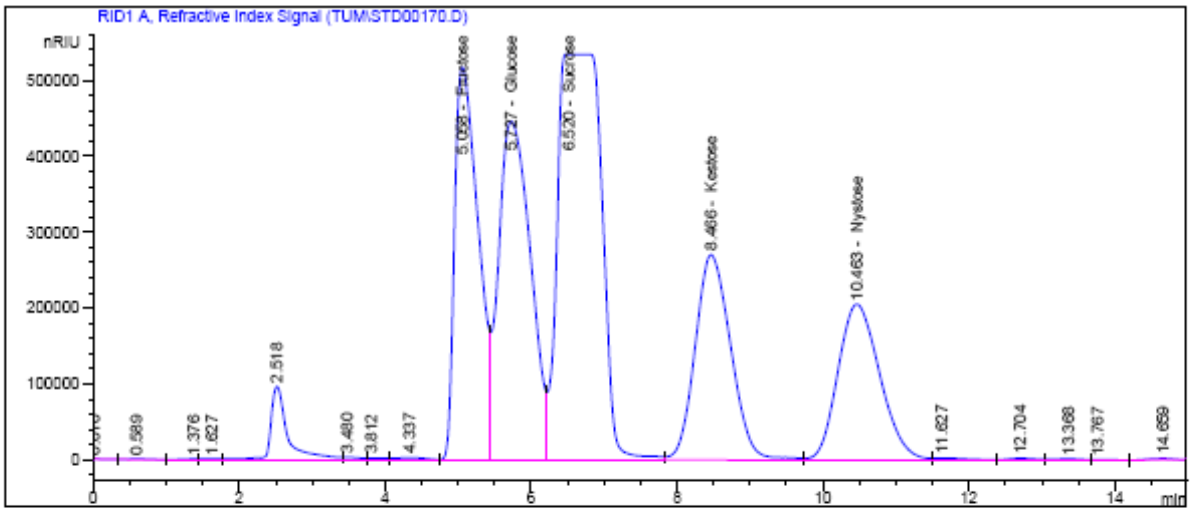



```
    ==================================================================
                          External Standard Report
    ==================================================================

    Sorted By             :      Signal
    Calib. Data Modified  :      24/2/2011 13:40:42 PM
    Multiplier            :      1.0000
    Dilution              :      1.0000
    Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

    Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

    RetTime  Type     Area      Amt/Area    Amount   Grp   Name
     [min]          [nRIU*s]                [g/l]
    -------|------|----------|----------|----------|--|------------------
      5.025 VV     1.29325e7  1.07853e-5  139.48130    Fructose
      5.668 VV     1.72414e7  8.79852e-6  151.64664    Glucose
      6.426 VV     2.63212e7  1.09224e-5  287.49196    Sucrose
      8.363 VV     1.17688e7  8.54451e-6  100.55872    Kestose
     10.305 VV     1.09853e7  9.33803e-6  102.58132    Nystose

    Totals :                               781.75994

     Results obtained with enhanced integrator!
    ==================================================================
                              Summed Peaks Report
    ==================================================================

    Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal
    ==================================================================
                          Final Summed Peaks Report
    ==================================================================

    Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

Instrument 1 24/2/2011 23:12:17 PM
```

2. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลชนิดต่าง ๆเมื่อทำการวิเคราะห์ โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 80%

Data File D:\HPCHEM\1\DATA\TUM\STD00170.D Sample Name: std mix 80%

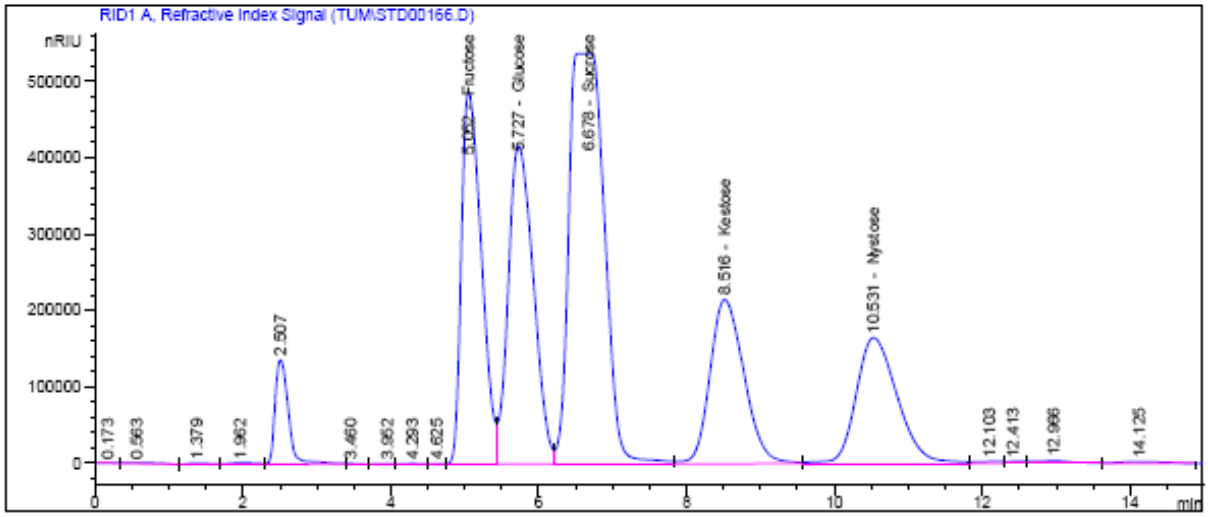
```
Injection Date  : 25/1/2011 13:40:10 PM          Seq. Line :  11
Sample Name     : std mix 80%                    Location : Vial 4
Acq. Operator   : Chanapatt                          Inj :   1
Acq. Instrument : Instrument 1                  Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\TUM.M
Last changed    : 25/1/2011 10:47:06 PM by Chanapatt
Analysis Method : D:\HPCHEM\1\METHODS\TUMSTD.M
Last changed    : 24/2/2011 23:06:22 PM
                  (modified after loading)
TUM453
```




```
                        External Standard Report

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      24/2/2011 13:40:42 PM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime  Type     Area      Amt/Area    Amount    Grp   Name
 [min]          [nRIU*s]                 [g/l]
-------|------|----------|----------|----------|--|------------------
  5.058 VV     1.17080e7  1.07403e-5  125.74719    Fructose
  5.727 VV     1.35694e7  8.80361e-6  119.45966    Glucose
  6.520 VV     2.20877e7  1.07972e-5  238.48610    Sucrose
  8.466 VV     9.17836e6  8.53094e-6   78.30005    Kestose
 10.463 VV     8.19870e6  9.33240e-6   76.51357    Nystose

Totals :                               638.50657

 Results obtained with enhanced integrator!
                          Summed Peaks Report

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal
                        Final Summed Peaks Report

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

Instrument 1 24/2/2011 23:11:30 PM
```

3. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลชนิดต่าง ๆเมื่อทำการวิเคราะห์ โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 60%

```
Data File D:\HPCHEM\1\DATA\TUM\STD00166.D                                  Sample Name: std mix 60%
    ======================================================================
    Injection Date  : 25/1/2011 12:31:52 PM          Seq. Line :   7
    Sample Name     : std mix 60%                     Location : Vial 3
    Acq. Operator   : Chanapatt                           Inj :   1
    Acq. Instrument : Instrument 1                  Inj Volume : 20 µl
    Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\TUM.M
    Last changed    : 25/1/2011 10:47:06 PM by Chanapatt
    Analysis Method : D:\HPCHEM\1\METHODS\TUMSTD.M
    Last changed    : 24/2/2011 23:06:22 PM
                      (modified after loading)
    TUM453
    ======================================================================
```

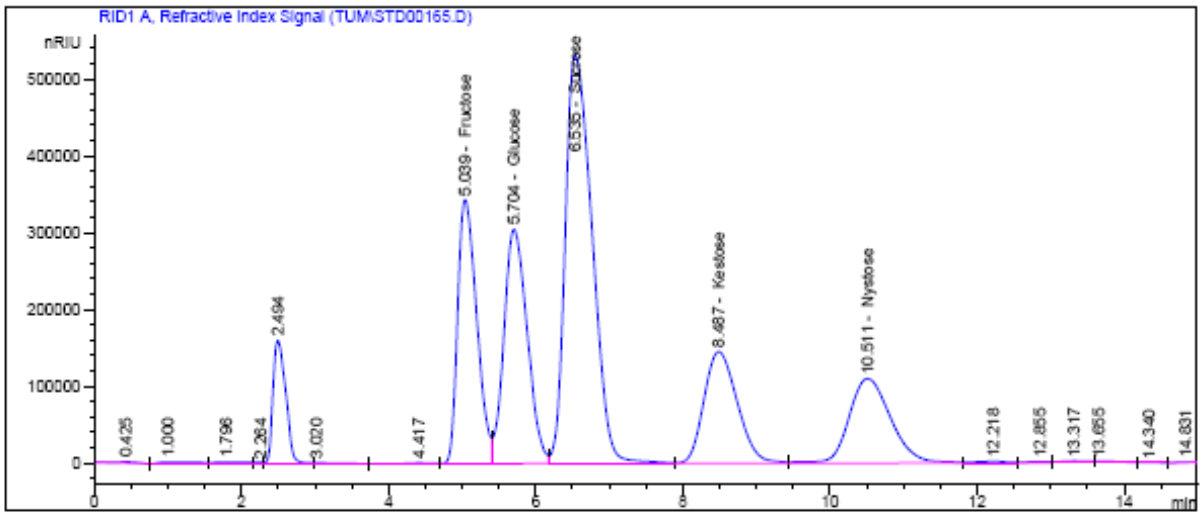



```
    ======================================================================
                          External Standard Report
    ======================================================================

    Sorted By             :      Signal
    Calib. Data Modified  :      24/2/2011 13:40:42 PM
    Multiplier            :      1.0000
    Dilution              :      1.0000
    Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

    Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

    RetTime  Type     Area      Amt/Area    Amount    Grp   Name
     [min]          [nRIU*s]                 [g/l]
    -------|------|----------|----------|----------|--|------------------
      5.052 VV     9.14542e6  1.06072e-5   97.00750    Fructose
      5.727 VV     9.85810e6  8.81790e-6   86.92779    Glucose
      6.678 VV     1.77211e7  1.06054e-5  187.93935    Sucrose
      8.516 VV     6.88895e6  8.51046e-6   58.62812    Kestose
     10.531 VV     6.37362e6  9.32604e-6   59.44062    Nystose

    Totals :                               489.94338

     Results obtained with enhanced integrator!
    ======================================================================
                            Summed Peaks Report
    ======================================================================

    Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal
    ======================================================================
                          Final Summed Peaks Report
    ======================================================================

    Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

Instrument 1 24/2/2011 23:10:17 PM
```

4. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลชนิดต่าง ๆเมื่อทำการวิเคราะห์ โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 40%

Data File D:\HPCHEM\1\DATA\TUM\STD00165.D Sample Name: std mix 40%

```
Injection Date  : 25/1/2011 12:14:47 PM          Seq. Line :   6
Sample Name     : std mix 40%                    Location : Vial 2
Acq. Operator   : Chanapatt                         Inj :   1
Acq. Instrument : Instrument 1                  Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\TUM.M
Last changed    : 25/1/2011 10:47:06 PM by Chanapatt
Analysis Method : D:\HPCHEM\1\METHODS\TUMSTD.M
Last changed    : 24/2/2011 23:06:22 PM
                  (modified after loading)
TUM453
```

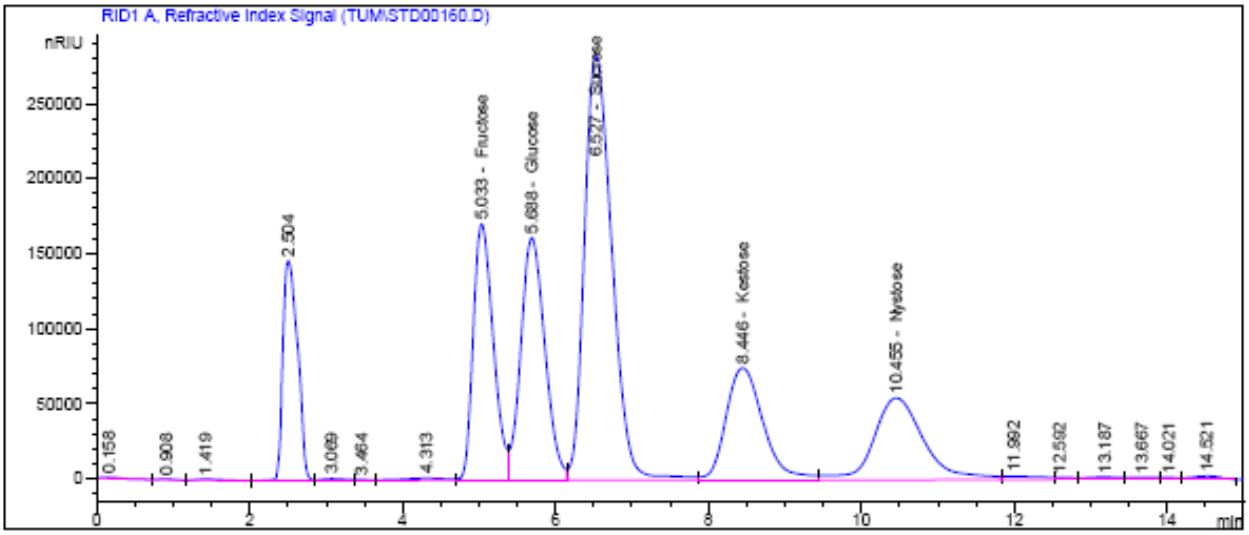



```
                        External Standard Report

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      24/2/2011 13:40:42 PM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime  Type     Area      Amt/Area    Amount    Grp   Name
 [min]          [nRIU*s]                [g/l]
-------|------|----------|----------|----------|--|-------------------
  5.039 VV     6.16525e6  1.03133e-5   63.58396     Fructose
  5.704 VV     6.70367e6  8.84250e-6   59.27718     Glucose
  6.535 VV     1.34546e7  1.02977e-5  138.55092     Sucrose
  8.487 VV     4.57824e6  8.46900e-6   38.77315     Kestose
 10.511 VV     4.32822e6  9.31255e-6   40.30671     Nystose

Totals :                               340.49192

 Results obtained with enhanced integrator!

                          Summed Peaks Report

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

                       Final Summed Peaks Report

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

Instrument 1 24/2/2011 23:06:43 PM
```

5. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลชนิดต่าง ๆเมื่อทำการวิเคราะห์ โดยใช้วิธีโครมาโตกราฟฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC) ที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 20%

Data File D:\HPCHEM\1\DATA\TUM\STD00160.D Sample Name: std mix 20%

```
Injection Date  : 25/1/2011 10:49:15 PM          Seq. Line :   1
Sample Name     : std mix 20%                    Location : Vial 1
Acq. Operator   : Chanapatt                         Inj :   1
Acq. Instrument : Instrument 1                  Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\TUM.M
Last changed    : 25/1/2011 10:47:06 PM by Chanapatt
Analysis Method : D:\HPCHEM\1\METHODS\TUMSTD.M
Last changed    : 24/2/2011 23:06:22 PM
                  (modified after loading)
TUM453
```




```
                        External Standard Report

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      24/2/2011 13:40:42 PM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime  Type      Area      Amt/Area    Amount    Grp   Name
 [min]           [nRIU*s]                 [g/l]
-------|------|----------|----------|----------|--|------------------
  5.033 VV     3.10376e6  9.42352e-6   29.24837     Fructose
  5.688 VV     3.53552e6  8.91139e-6   31.50642     Glucose
  6.527 VV     7.06830e6  9.14294e-6   64.62501     Sucrose
  8.446 VV     2.52186e6  8.36823e-6   21.10355     Kestose
 10.455 VV     2.46987e6  9.28090e-6   22.92261     Nystose

Totals :                               169.40595

 Results obtained with enhanced integrator!

                          Summed Peaks Report

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

                       Final Summed Peaks Report

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

Instrument 1 24/2/2011 23:09:21 PM
```

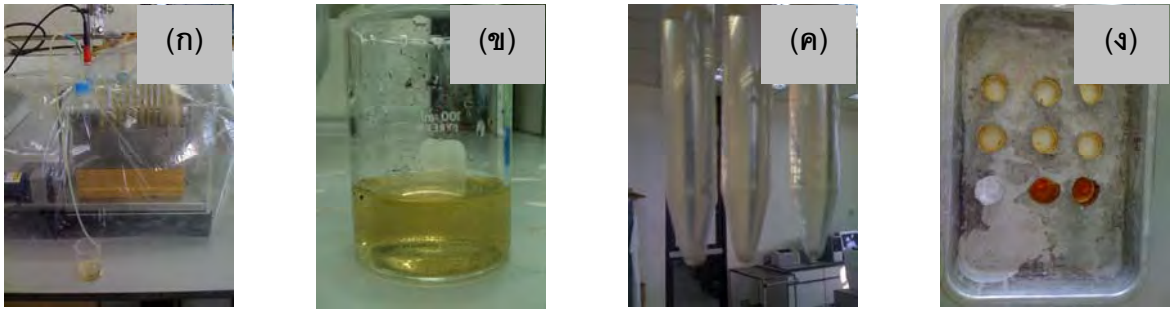
ภาคผนวก ฉ

ค่ารีเทนชั่นไทม์ของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ

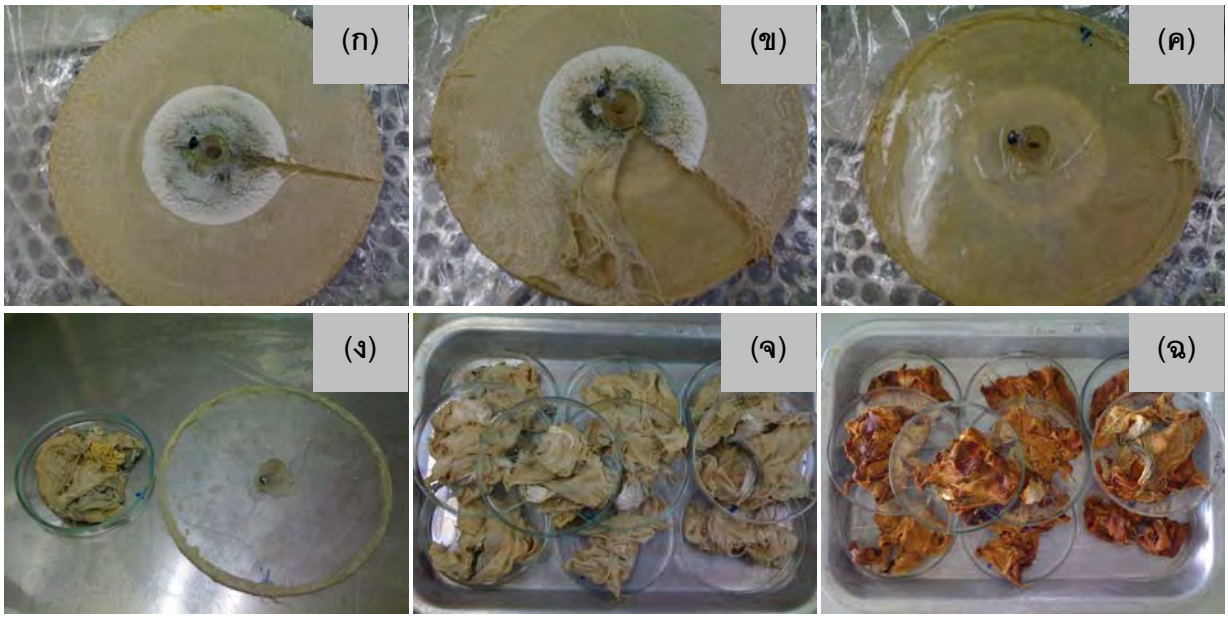
ชนิดของน้ำตาล	รีเทนชั่นไทม์
น้ำตาลฟรักโตส	5.033
น้ำตาลกลูโคส	5.688
น้ำตาลซูโครส	6.527
น้ำตาลเคสโตส	8.446
น้ำตาลนิสโตส	10.455

ภาคผนวก ช

ขั้นตอนการเก็บเชื้อก่อนและหลังการผลิต



ขั้นตอนการเก็บเชื้อทุกๆ 4 ชั่วโมงเพื่อนำไปวิเคราะห์ผลโดยนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเชื้อกับน้ำหมักโดยเชื้อนำไปหาค่าน้ำหนักแห้งและน้ำหมักนำไปหาปริมาณน้ำตาล ตามลำดับ



ขั้นตอนการเก็บเชื้อหลังจากเสร็จสิ้นการผลิต ตัดผ้าขาวบางออกจากแผ่นหมุนชีวภาพแล้วนำไปหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ

ภาคผนวก ซ

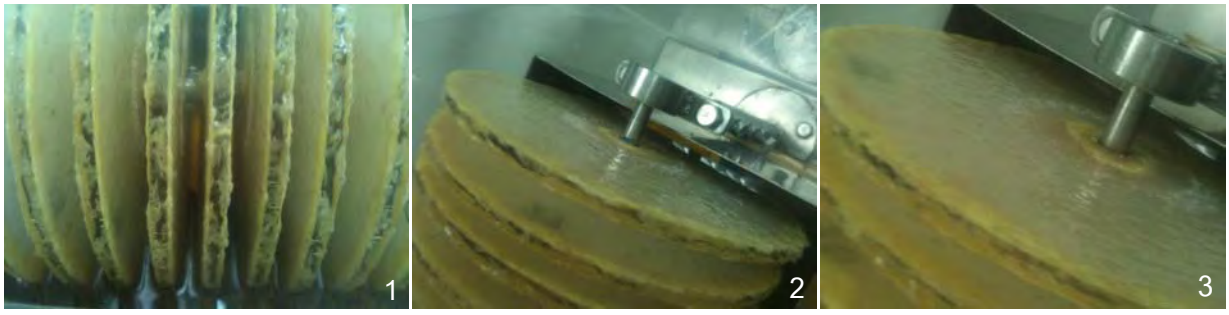
การเกาะของเชื้อ *Penicillium* sp. H12 บนแผ่นหมุนชีวภาพระหว่างการผลิตฟรักโทออลิโกแซ็กคาไรด์

การติดของเชื้อ *Penicillium* sp. H12 บนแผ่นหมุนชีวภาพในระหว่างการผลิตจะทำการเก็บเชื้อทุกๆ 4 ชั่วโมง (รูปที่1) แสดงการเจริญของเชื้อราบนแผ่นหมุนชีวภาพทั้ง 11 แผ่น (รูปที่ 2) แสดงการเกาะติดของเชื้อบริเวณแผ่นหมุน ณ ช่วงเวลาต่างๆ (รูปที่3) แสดงการเจริญของเชื้อบริเวณน้ำหมัก

แสดงการติดและการเจริญของเชื้อบนแผ่นหมุนในชั่วโมงที่ 0

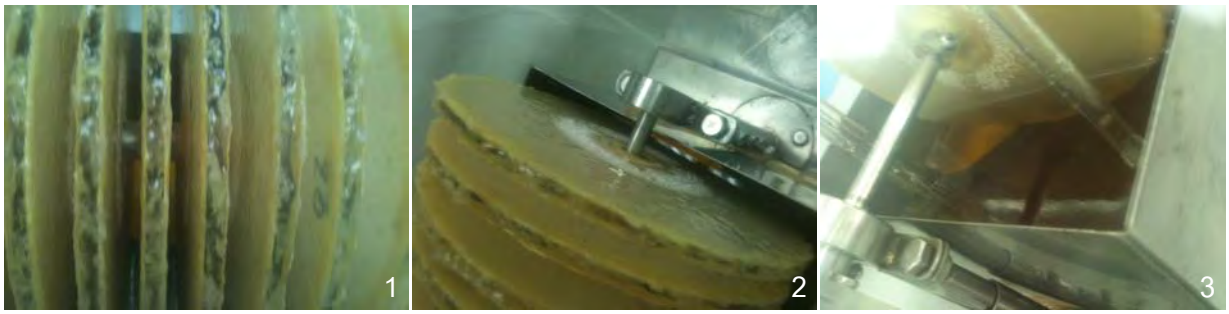
แสดงการติดและการเจริญของเชื้อบนแผ่นหมุนในชั่วโมงที่ 4

แสดงการติดและการเจริญของเชื้อบนแผ่นหมุนในชั่วโมงที่ 8

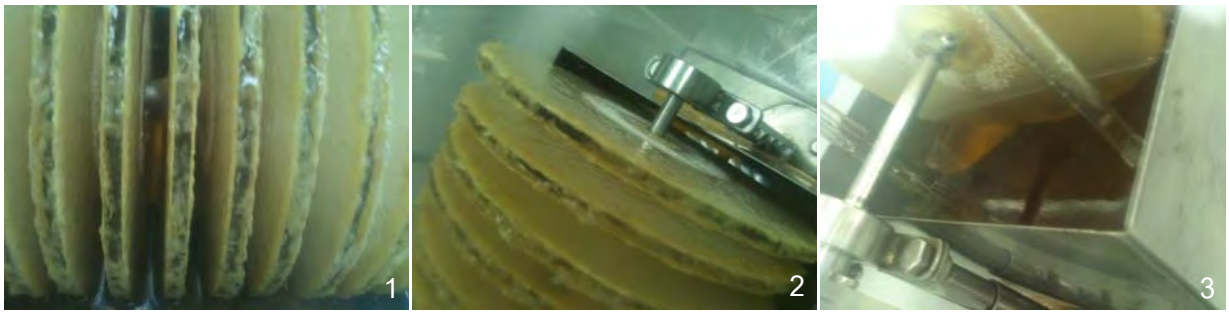


แสดงการติดและการเจริญของเชื้อบนแผ่นหมุนในชั่วโมงที่ 20

แสดงการติดและการเจริญของเชื้อบนแผ่นหมุนในชั่วโมงที่ 24



แสดงการติดและการเจริญของเชื้อบนแผ่นหมุนในชั่วโมงที่ 28



แสดงการติดและการเจริญของเชื้อบนแผ่นหมุนในชั่วโมงที่ 32

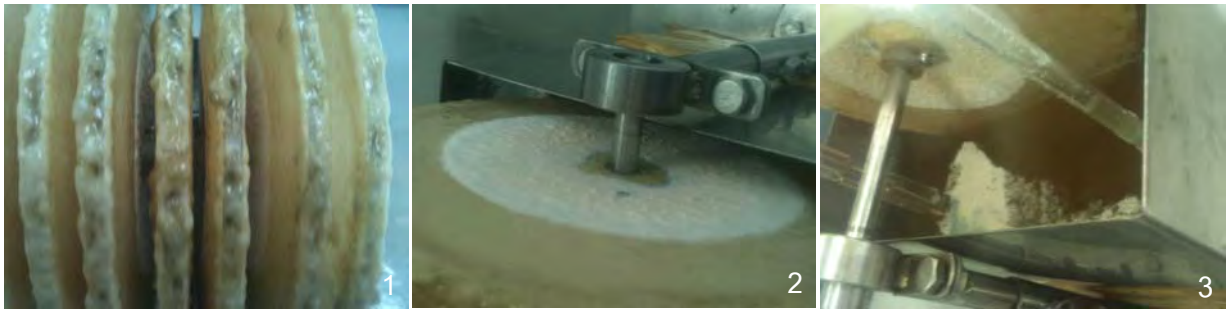
แสดงการติดและการเจริญของเชื้อบนแผ่นหมุนในชั่วโมงที่ 44

แสดงการติดและการเจริญของเชื้อบนแผ่นหมุนในชั่วโมงที่ 48

แสดงการติดและการเจริญของเชื้อบนแผ่นหมุนในชั่วโมงที่ 52

แสดงการติดและการเจริญของเชื้อบนแผ่นหมุนในชั่วโมงที่ 56

แสดงการติดและการเจริญของเชื้อบนแผ่นหมุนในชั่วโมงที่ 68



แสดงการติดและการเจริญของเชื้อบนแผ่นหมุนในชั่วโมงที่ 72

รูปที่ 4.26 แสดงการติดและการเจริญของเชื้อบนแผ่นหมุนในชั่วโมงที่ 76

แสดงการติดและการเจริญของเชื้อบนแผ่นหมุนในชั่วโมงที่ 80

แสดงการติดและการเจริญของเชื้อบนแผ่นหมุนในชั่วโมงที่ 92

แสดการติดและการเจริญของเชื้อบนแผ่นหมุนในชั่วโมงที่ 96

แสดงการติดและการเจริญของเชื้อหลังจากเสร็จสิ้นการทดลอง

หัวเชื้อในชั่วโมงที่ 0 สปอร์ได้ตกลงที่ก้นถังหมักและเกาะติดบริเวณแผ่นหมุนชีวภาพโดยจะเห็นเป็นจุด ดำๆ เกาะติดบริเวณแผ่นหมุนชีวภาพ ในชั่วโมงที่ 4 และ 8 ยังไม่เห็นการเจริญของเชื้อโดยสายตาโดยจะเห็นเป็นจุดดำๆบริเวณแผ่นหมุนเช่นเดิมจากนั้นในชั่วโมงที่ 20 เชื้อราเริ่มมี

การสร้างสปอร์บริเวณตรงกลางแผ่นหมุนโดยจะสังเกตเห็นเป็นจุดขาวๆเกาะติดอยู่ ในชั่วโมง 28 และ 32 เชื้อราเริ่มมีการสร้างสปอร์มากขึ้นโดยจะเริ่มเห็นการสร้างเป็นแผ่นวงกลมสีขาว ชั่วโมงที่ 44 เชื้อราเริ่มมีการสร้างสปอร์บริเวณผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อและมีการสร้างสายใยเพิ่มขึ้นโดยจะเห็นได้จากความหนาที่เพิ่มขึ้นบริเวณผ้าขาวบาง ชั่วโมงที่ 48 ถึง ชั่วโมงที่ 56 เชื้อรามีการสร้างสปอร์ในวงที่ใหญ่ขึ้นเรื่อยๆและบริเวณอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มเป็นเด่นชัดขึ้น ในชั่วโมงที่ 56 สปอร์ของเชื้อราเริ่มแก่ขึ้นโดยจะเห็นเป็นสีเขียวทั้งบริเวณแผ่นหมุนและเชื้อราที่ลอยบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ และชั่วโมงที่ 68 ถึงชั่วโมงที่ 96 เชื้อรามีการสร้างวงของสปอร์ที่ใหญ่ขึ้นเรื่อยๆบริเวณแผ่นหมุนและเชื้อราบริเวณผิวอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มมีการสร้างครอบคลุมจนทั่วและนอกจานั้นจะเห็นผ้าขาวบางหนาขึ้นเรื่อยๆและเชื้อรามีการสร้างสายใยบางส่วนบริเวณความหนาของแผ่นหมุนโดยมีสายใยปกคลุมเต็มแผ่นหมุน

สังเกตสีของอาหารเลี้ยงเชื้อในการเก็บผลการทดลองทุก 4 ชั่วโมงพบว่าตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 40 อาหารเลี้ยงเชื้อจะมีลักษณะเป็นสีใสแต่หลังจากชั่วโมงที่ 44 อาหารเลี้ยงเชื้อจะมีความขุ่น

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย ชนภัฏฏ์ ลักษณะวิลาศ เกิดเมื่อวันที่ 27 พฤษภาคม พ.ศ .2527 ที่จังหวัดนครศรีธรรมราช สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีการศึกษา 2549 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550 ที่อยู่ปัจจุบัน 36/1 หมู่ 2 ถนน นคร-นพพิตำ ต. บ้านเกาะ อ.พรหมคีรี จ.นครศรีธรรมราช 80320

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ ได้เข้าร่วมเสนอผลงานการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติในงาน 3rd BMB International Conference 2010 ระหว่างวันที่ 6-8 เมษายน 2554 ณ จังหวัดเชียงใหม่ ในหัวข้อเรื่อง “Fructoligosaccharide Production from *Penicillium* sp. H12 using Rotary Biological Contactor Fermenter”