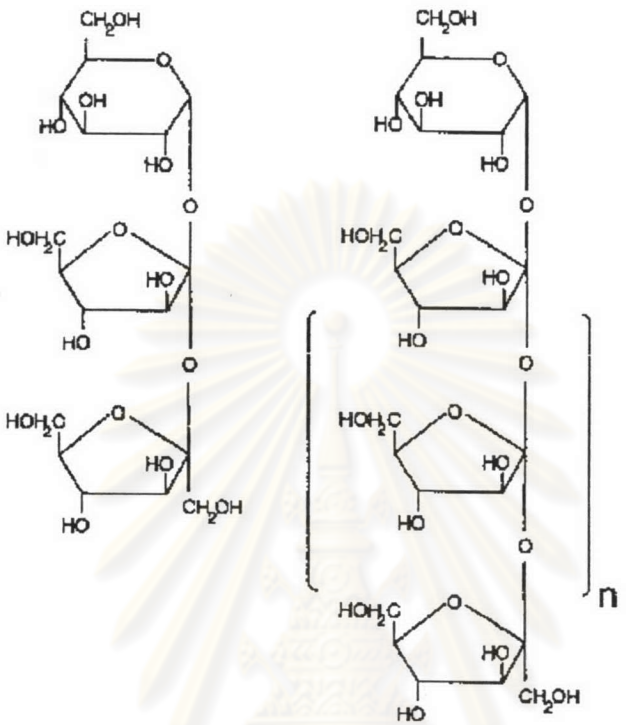
บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ เป็นสารให้ความหวานชนิดหนึ่งที่มีประโยชน์ต่อผู้บริโภคอย่างมากเนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดีบางอย่างเช่น ให้พลังงานต่ำ และกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นโพรไบโอติกในลำไส้ของมนุษย์ได้

ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ เกิดจากน้ำตาลฟรักโตสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ บีต้า-(2-1) (β-(2-1)) โดยมีน้ำตาลกลูโคสต่อที่ส่วนท้ายของอะตอม โดยเขียนสัญลักษณ์ได้เป็น GF_n (G=glucose , F=fructose) ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่รู้จักกันดีได้แก่ เคสโตส (1-kestose, GF_2) , นีสโตส (nystose, GF_3) และ ฟรักโตฟิวแรนโนซิลนีสโตส (fructofuranosyl nystose, GF_4) (Yun, 1996) โดยระดับของความยาวจะขึ้นอยู่กับชนิดของ สิ่งมีชีวิตที่นำมาผลิต รวมถึงความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่ให้

ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ มีรสชาติใกล้เคียงกับน้ำตาลซูโครส แต่จะให้ความหวานเพียง 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลซูโครสเท่านั้นแต่มีความหนืดมากกว่าน้ำตาลซูโครสในตัวทำละลายเดียวกันที่ความเข้มข้นเท่า ๆ กัน มีความเสถียรที่ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) 4.0-7.0 และทนความร้อนได้ถึง 140 องศาเซลเซียส ให้พลังงานประมาณ 2 กิโลแคลอรี่ต่อ 1 กรัม (Bornot, 1994) นอกจากนี้ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ยังสามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหารและการ hydrolysis โดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ได้ (Gibson และ Roberfroid, 1995) และเนื่องจากคงอยู่ในลำไส้ได้ก็สามารถเป็นประโยชน์ต่อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้เช่น Bifidobacteria และ Lactobacilli ซึ่งเป็นโพรไบโอติกและยังสามารถย่อยสลายฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ไปใช้ทำให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายได้ (Wang และ Gibson , 1993)



1-kestose n = 1, nystose

n = 2, 1-fructofuranosyl nystose

รูปที่ 2.1 แสดงโครงสร้างของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Yun, 1996)

ปฏิกิริยาการเกิดฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากน้ำตาลซูโครส (transfructosylation)

เอนไซม์ที่จำเป็นและมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ คือ เอนไซม์บีตาฟรักโตฟูรานโนซิเดส (β-D-fructofuranosidase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสร้าง เคสโตส (GF_2) รวมถึงสามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสร้าง โอลิโกแซ็กคาไรด์ขั้นสูงขึ้น เช่น นีสโตส (GF_3) และ ฟรักโตฟิวแรนโนซิลนีสโตส (GF_4) ได้

ในปี 1971 Singh และ Bhatia ได้เสนอกลไกของปฏิกิริยาทรานฟรักโตซิลเลชั่นของเอนไซม์บีตาฟรักโตฟูรานโนซิเดสที่แยกจากรากของ Chicory ว่าสามารถเร่งปฏิกิริยาการสร้างฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้โดยจะเร่งปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลซูโครสสองโมเลกุลได้เป็นฟรักโตโอลิโก

แซ็กคาไรด์ชนิดเคสโตส จากนั้นเคสโตสที่ผลิตได้ยังสามารถมาทำปฏิกิริยากับน้ำตาลซูโครสต่อไปอีกได้เป็นฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สายที่ยาวขึ้นได้อีก

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

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

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

โดย n = donor molecule , m = acceptor molecule

G = glucose , F = fructose

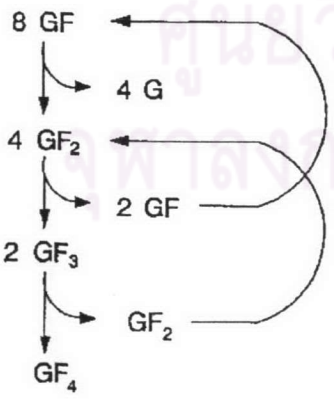
รูปที่ 2.2 แสดงสมการการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กตาไรด์โดย Singh และ Bhatia (1971)

ซึ่งต่อมา Jung และคณะ (1989) ได้นำเสนอปฏิกิริยาการสร้างฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้บีตาฟรักโตฟูรานโนซิเดสจาก *Aspergillus pullulans* โดยเอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลซูโครสสองโมเลกุลได้เป็นน้ำตาลเคสโตส ในช่วงแรกและจะเร่งปฏิกิริยาในการสร้างฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สายที่ยาวขึ้นโดยเร่งปฏิกิริยาระหว่างเคสโตสสองโมเลกุลที่ผลิตได้

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

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

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



โดย G = glucose , F = fructose

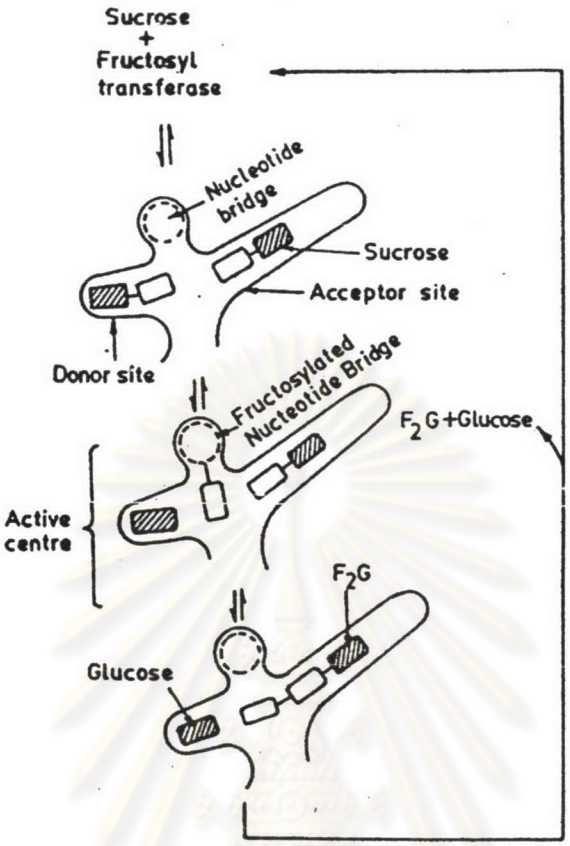
รูปที่ 2.3 แสดงสมการการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดย Jung และคณะ (1989)

จากการนำเสนอกลไกการสังเคราะห์ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในข้างต้นอาจสามารถกล่าวโดยสรุปได้ว่า สารตั้งต้นในการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ก็คือน้ำตาลซูโครส โดยเอนไซม์ฟรักโตฟูรานโนซิเดสจะทำหน้าที่ย่อยน้ำตาลซูโครสได้เป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรักโตสแล้วจะมีการย้ายน้ำตาลฟรักโตสที่ได้ไปเชื่อมต่อกับน้ำตาลซูโครสอีกหนึ่งโมเลกุลทำให้ได้น้ำตาลเคสโตส ต่อจากนั้นเมื่อมีการสังเคราะห์ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีความยาวมากขึ้นจะมีการสลายน้ำตาลซูโครสหรือโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดเดียวกันเพื่อที่จะนำเอาน้ำตาลฟรักโตสมาผลิตให้ได้สายของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ยาวขึ้น

ในปี ค.ศ. 1980 Guptha และ Bhatia ได้อธิบายกลไกการทำงานและเสนอแบบจำลองของฟรักโตฟูรานโนซิเดสที่ทำการศึกษาใน *Fusarium oxysporum* ซึ่งมีโครงสร้างที่สำคัญอยู่ 3 ส่วนคือ ส่วนแอคเซพเตอร์ (acceptor) ส่วนดอเนอร์ (donor) และส่วนที่เป็นนิวคลีโอไทด์บริดจ์ (nucleotide bridge) และมีการทำงานโดยการจับน้ำตาลซูโครสเข้ามาที่ส่วน ดอเนอร์ และส่วนแอคเซพเตอร์ ตำแหน่งละ 1 โมเลกุล จากนั้นส่วนนิวคลีโอไทด์บริดจ์ จะทำหน้าที่ตัดและดึงเอาน้ำตาลฟรักโตสออกจากน้ำตาลซูโครสในด้านที่เป็นดอเนอร์เอาไปจับกับน้ำตาลซูโครสในฝั่งที่เป็นแอคเซพเตอร์ได้เป็นน้ำตาลเคสโตส จากนั้นน้ำตาลเคสโตสที่ได้ยังสามารถกลับเข้ามาทำปฏิกิริยาในด้านแอคเซพเตอร์โดยรับน้ำตาลฟรักโตสจากด้านดอเนอร์อีกครั้งทำให้ได้ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ยาวขึ้นได้

สมบัติของเอนไซม์ฟรักโตฟูรานโนซิเดส

จากการศึกษาของนักวิจัยหลายคณะ (Singh และ Bhatia, 1971 , Shiomi และ Izawa , 1980, Duan และคณะ ,1992, Muramatsu และคณะ ,1993 , Ishimoto และ Nakamura , 1996) พบว่า ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ฟรักโตฟูรานโนซิเดสอยู่ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ประมาณ 5.0 – 6.1 อุณหภูมิประมาณ 50 – 60 องศาเซลเซียส และถูกยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาได้โดยโลหะหนักคือ Cu^{2+}, Ag^{+}, Hg^{+} และ Zn^{2+} แต่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพได้ด้วย Mn^{2+}, Mg^{2+}, Ni^{2+}



รูปที่ 2.4 แบบจำลองของเอนไซม์ฟรักโตฟูรานโนซิเดสในการสร้างฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Guptha และ Bhatia,1980)

นอกจากนั้นการสังเคราะห์ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยเอนไซม์ฟรักโตฟูรานโนซิเดสยังขึ้นกับปัจจัยอื่น ๆ อีกเช่น ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส, ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส และความเข้มข้นของเอนไซม์อีกด้วย โดยพบว่าเอนไซม์ที่สกัดได้จาก *Aspergillus foetidus* สามารถผลิตน้ำตาลเคสโตสได้ดีถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 49 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับปริมาณของน้ำตาลซูโครสที่ให้ โดยเมื่อให้น้ำตาลซูโครสเริ่มต้นเพิ่มขึ้น ปริมาณของน้ำตาลเคสโตส ที่ได้ก็จะเพิ่มมากขึ้นด้วย (Hang และคณะ, 1995) และยังพบอีกว่า เมื่อเติมน้ำตาลกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อหลังจากที่เลี้ยงเชื้อ *Fusarium oxysporum* เป็นเวลา 4 วัน จะทำให้การสังเคราะห์ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ลดลงและเมื่อเติมน้ำตาลซูโครสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแต่น้ำตาลกลูโคสเท่านั้นก็จะสามารถทำให้ปริมาณของเอนไซม์ฟรักโตฟูรานโนซิเดสเพิ่มขึ้น (Gupta และ Bhatia ,1981) แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลกลูโคสนั้นสามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์ฟรักโตฟูรานโนซิเดสได้และนอกจากนั้นยังพบอีกว่าความเข้มข้นของเอนไซม์มากก็จะสามารถสังเคราะเคสโตส และฟรักโต

โอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีฟรักโตสเป็นองค์ประกอบมากกว่า 3 โมเลกุลได้ แต่หากเอนไซม์มีความเข้มข้นน้อยก็จะสามารถสร้างได้เพียงแค่เคสโตสเท่านั้น (Andrew, 1995) และจากการทดลองของ Fujita และคณะ (1990) พบว่าเอนไซม์ฟรักโตฟูรานโนซิเดสจาก *Arthrobactor sp.*K-1 สามารถนำสารอื่น (น้ำตาล , แอลกอฮอล์) มาเป็นรีเซพเตอร์ (receptor) สำหรับการ ทรานฟรักโตซิลเลชั่นได้ โดยใช้สารเหล่านั้นเป็นตัวรับน้ำตาล ฟรักโตสแทนซูโครส ซึ่งสารเหล่านั้นมีทั้งโมโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharide), โอลิโกแซ็กคาไรด์ (oligosaccharide) และแอลกอฮอล์ (alchohol) พบว่าจะมีความสามารถในการเป็นรีเซพเตอร์ แตกต่างกันไป

ตารางที่ 2.1 แสดงความสัมพันธ์ของน้ำตาลเคสโตสที่เกิดขึ้นกับความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น ที่เวลา 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส pH 5.0 (Hang และคณะ , 1995)

น้ำตาลซูโครสเริ่มต้น (กรัม/ลิตร)	น้ำตาเคสโตส (กรัม/ลิตร)	ประสิทธิภาพ (%)
146	65	45
287	118	41
456	153	34
589	156	26

ตารางที่ 2.2 แสดงผลของน้ำตาลกลูโคสต่อเอนไซม์ฟรักโตฟูรานโนซิเดสเมื่อเติมน้ำตาลกลูโคสหรือฟรักโตสลงไปจะทำให้เอนไซม์ฟรักโตฟูรานโนซิเดสลดลง (Gupta และ Bhatia , 1981)

ชนิดของน้ำตาล	ชนิดของน้ำตาลที่เติมระหว่างผลิต (วันที่ 4)	ปริมาณของโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัม)	ปริมาณของเอนไซม์ฟรักโตฟูรานโนซิเดส (หน่วย)
กลูโคส	ซูโครส	43.2	3264
ซูโครส	กลูโคส	33.6	2108
ซูโครส	ฟรักโตส	40.2	2940
ซูโครส	-	27.1	3584
กลูโคส	-	-	-

แหล่งของเอนไซม์ฟรักโตฟูรานโนซิเดส

เอนไซม์ฟรักโตฟูรานโนซิเดสนั้นสามารถพบได้ทั้งในพืชและในจุลินทรีย์ซึ่งมีผู้วิจัยและศึกษามากมาย ยกตัวอย่างได้ดังนี้

ตารางที่ 2.3 แสดงชนิดของพืชที่สร้างเอนไซม์ฟรักโตฟูรานโนซิเดสได้

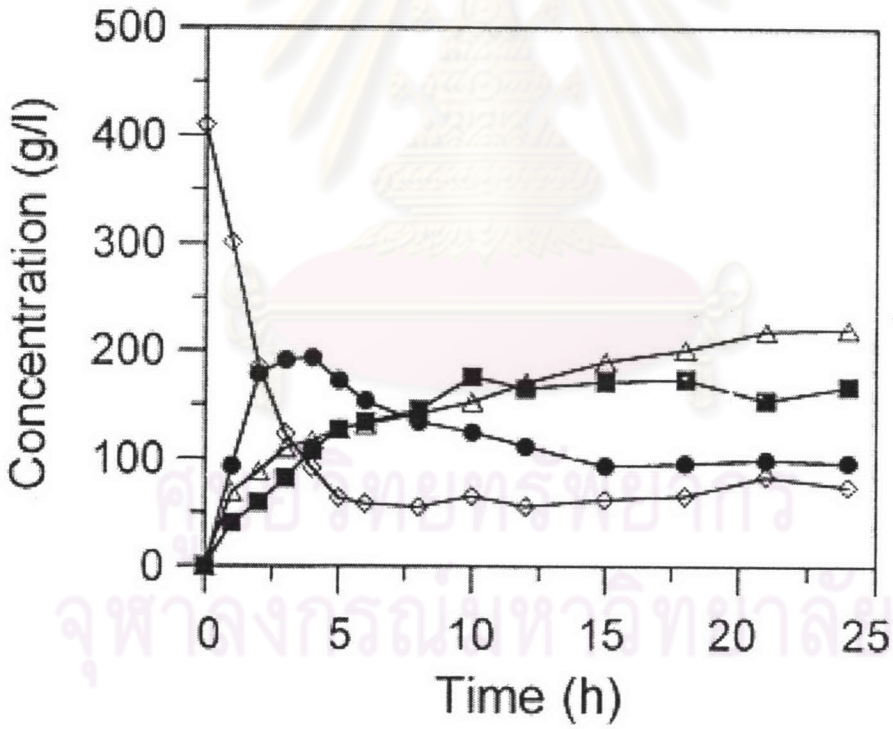
ชนิดของพืช	ผู้วิจัย
Agave americana (agave)	Bhatia et al, (1979); Nandra and Bhatia (1980)
Agave vera cruze (agave)	Bhatia et al, (1979, 1995); Satyanarayama (1976)
Asparagus officinalls (asparagus root)	Shiomi et al,(1976, 1979, 1980, 1981, 1982)
Ailium cepa (onion bulbs)	Darbyshire etal, (1978); Henry and Darbyshire, (1980)
Cichorrium inttybus (chocory)	Singh and Bhatia (1971); Chandorkar and Collins, (1972
Crinum longifolium	Bhatia et al, (1975)
Sugae-beet leaves	Alen and Bacon (1956)
Heliianthus tuberosus (Jerusalem artichoke)	Edelman and Dickerson (1996); Scott et al, (1996) Praznik et al, (1990)
Lactuca sativa L. (lettuce)	Chandorkar and Collins, (1972)
Lycorcis radiata (monocot)	Nagamatsu et al, (1990)
Taraxacum officinale	Chandorkar and Collins, (1972)

ตารางที่ 2.4 แสดงชนิดของจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ฟรักโตฟูรานโนซิเดสได้

ชนิดของจุลินทรีย์	ผู้วิจัย
Aureobasidium pullulans	Jung et al, (1987, 1989); Yun et al, (1990,1992,1993); Smith et al, (1980)
Aureobasidium sp.	Hayashi et al, (1989,1990,1991)
Arthrobacter sp.	Fugita et al, (1990)
Aspergillus japonicus	Duan et al, (1994)
Aspergillus niger	Hidaka et al, (1988, 1999); Bealing and Bacon, (1953)
Aspergillus oryzae	Pazur, (1987); Kinda et al, (1998); Bealing and Bacon, (1953)
Aspergillus phoenicis	Balken, (1991)
Aspergillus sydowl	Muramatsu, (1988)
Fusarium oxysporum	Gupta etal (1982); Maruyama et al, (1979) Patel et al, (1994)
Penicilliun frequentants	Usami et al, (1994)
Penicilliun spinulosum	Hankin and Meintype, (1977)
Phytophthora parasitica	Takeda et al, (1994)
Saccharomyces cerevisiae	Strasthof et al, (1986)

จะเห็นได้ว่ามีพืชและจุลินทรีย์มากมายที่สามารถผลิตเอนไซม์ฟรักโตฟูรานโนซิเดสได้ แต่การนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์นั้นเอนไซม์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์นั้นสามารถที่จะนำเอามาใช้ได้ง่ายกว่าเอนไซม์จากพืชเนื่องจากจุลินทรีย์มีการเจริญที่เร็วกว่าพืชทำให้

ผลิตเอนไซม์ได้เร็วกว่า อาหารที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อกระตุ้นให้สร้างเอนไซม์ก็หาได้ง่ายและทราบแน่นอนแล้วรวมถึงจุลินทรีย์ยังสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณสูงและสิ้นเปลืองเนื้อที่ในการเพาะเลี้ยงน้อยกว่าพืชอีกด้วยซึ่งเป็นข้อได้เปรียบกว่าในพืชจึงได้มีการทดลองผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้จุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตก็คือ *Aspergillus japonicus* และ *Aspergillus niger* และจากการศึกษาการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้ *Aspergillus japonicus* (Chen. 1995, Cruz et al.1998, Cheng et al. 1996, Lee et al. 2001) และ *Aspergillus niger* (Chiang และ Lee. 1997, Nishizawa et al. 2001) พบว่ารูปแบบการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้จุลินทรีย์เป็นดังนี้คือ เมื่อให้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้นเชื้อราจะมีการนำน้ำตาลซูโครสไปใช้อย่างรวดเร็วในช่วงแรกพร้อมทั้งผลิตเคสโตสออกมาก่อนจากนั้นเมื่อเคสโตสเพิ่มขึ้นในปริมาณสูงแล้วเคสโตสจะลดลงพร้อมทั้งมีการเพิ่มขึ้นของนีสโตสอย่างรวดเร็วและมีการสะสมของกลูโคสเกิดขึ้นตลอดการผลิต



รูปที่ 2.5 **แสดงรูปแบบการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดย** *Aspergillus japonicus* (Lee **และคณะ**, 2001) **ซูโครส** (◇), **กลูโคส** (△), **เคสโตส** (●), **นีสโตส** (■)

การศึกษาการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

วิธีการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีการทำการศึกษานั้นมีทั้งแบบแบทช์ (batch), แบบป้อนอาหาร (fed batch) และแบบต่อเนื่อง (continuous) ซึ่งการผลิตแบบแบทช์โดย Chiang และ Lee (1997) โดยทำการศึกษาการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยการตรึงเอนไซม์บีตาฟรักโตฟิวรานโนซิเดสที่ได้จาก *Aspergillus japonicus* TIT-JK1 ใน Methylacrylamide-Based Polymeric beads แล้วพบว่าเมื่อทำการผลิตเป็นเวลา 17 ชั่วโมง โดยใช้น้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 10, 30 และ 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จะได้ผลผลิตเป็นฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์รวมเป็น 35, 55, และ 61 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลทั้งหมดที่มีอยู่ภายหลังจากทำการผลิตไป 17 ชั่วโมง โดยปริมาณของฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น เช่นเดียวกับการทดลองผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์แบบแบทช์โดย Cruz และคณะ (1998) ทำการทดลองผลิต ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ โดยทำการตรึงสายใยของ *Aspergillus japonicus* บนแคลเซียมอัลจิเนต (calcium alginate) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือที่ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และเมื่อทำการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นตั้งแต่ 30 ถึง 70 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นจะทำให้ได้ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้นโดยที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 65 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จะทำให้ได้ฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สูงที่สุดคือ 61.28 เปอร์เซ็นต์น้ำตาลทั้งหมดที่มีอยู่ภายหลังจากทำการผลิต 4 ชั่วโมง

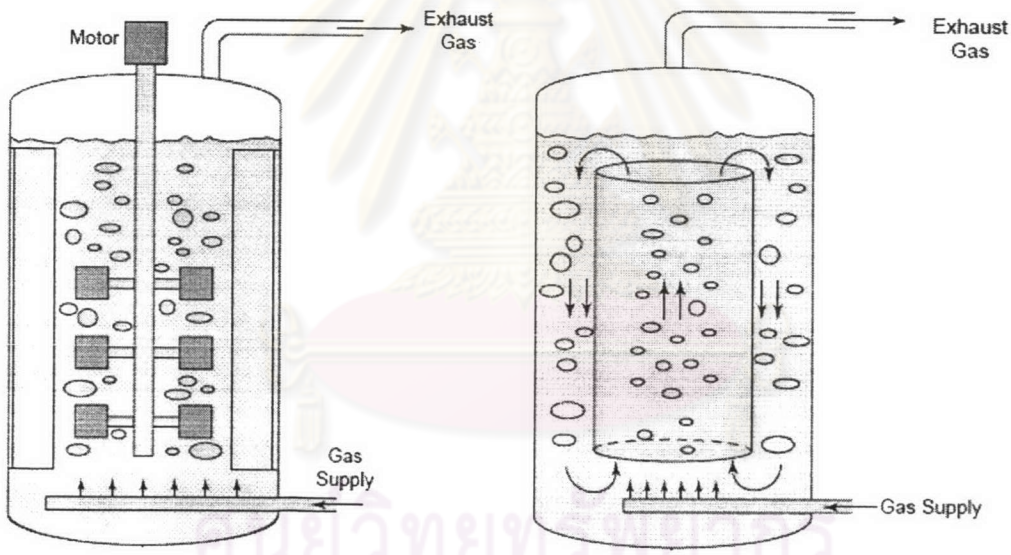
ส่วนการทดลองผลิตแบบป้อนอาหารนั้น Wen Chang Chen (1995) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้วิธีการผลิตแบบแบทช์และแบบป้อนอาหารโดยใช้เชื้อ *Aspergillus japonicus* และทำการแปรผันค่าน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่ 5, 10, 15, 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรพบว่าเอนไซม์บีตาฟรักโตฟูรานโนซิเดสของ *Aspergillus japonicus* มีค่าแอคทีวิตี (activity) สูงที่สุดที่ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 20 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการศึกษาการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์แบบป้อนอาหารโดยมีการเติมน้ำตาลซูโครสเพิ่มลงไปในชั่วโมงที่ 36 แล้วทำการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ต่อไปจนถึงชั่วโมงที่ 96 พบว่าปริมาณของเอนไซม์บีตาฟรักโตฟูรานโนซิเดสมีมากกว่าการผลิตแบบแบทช์ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์

และการศึกษาการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จาก *Aspergillus japonicus* ด้วยวิธีผลิตแบบต่อเนื่องโดย Chien และคณะ (2001) เมื่อทำการตรึงสายใยในกลูเต็น (gluten) และให้น้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 400 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ 61 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลทั้งหมดเมื่อทำการผลิตไปเป็นเวลา 5 ชั่วโมง ในการผลิตแบบแบทช์ และเมื่อทำการผลิต

แบบต่อเนื่องโดยให้น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 400 กรัมต่อลิตร อย่างต่อเนื่องด้วยอัตราการเติม 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที จะได้อัตราการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์สูงสุดคือ 173 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แต่พบว่าความสามารถในการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จะลดลงเหลือเพียง 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อทำการผลิตแบบต่อเนื่องไปเป็นเวลา 34 วัน ส่วน Chen และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษาการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์แบบต่อเนื่องโดยใช้ *Aspergillus japonicus* ด้วยวิธีการตรึงเอนไซม์บีตาฟรักโตฟูรานโนซิเดสในแคลเซียมอัลจิเนต (calcium alginate gel) พบว่าเมื่อเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อย่างต่อเนื่องด้วยอัตราเร็ว 2 มิลลิลิตรต่อนาที โดยควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 42 องศาเซลเซียส สามารถผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์อย่างต่อเนื่องได้เป็นเวลา 35 วัน โดยที่เอนไซม์สูญเสียความสามารถไปเพียง 17 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งนอกจากการศึกษาการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้ *Aspergillus* sp. ที่นิยมทำการศึกษาแล้วยังมีการศึกษาการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยจุลินทรีย์ชนิดอื่นอีกเช่น Kim และคณะ (1998) ทำการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้เอนไซม์บีตาฟรักโตฟูรานโนซิเดสที่แยกจาก *Bacillus macerans* EG6 พบว่าสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาทรานฟรักโตซิลเลชั่นได้เมื่อมีความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 100 กรัมต่อลิตร และเมื่อทำการทดลองให้น้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 500 กรัมต่อลิตร ที่ค่าความเป็นกรด ด่าง 6.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เอนไซม์นี้สามารถผลิตฟรักโตฟิวแรนโนซิลนีสโตส (GF_4) ได้โดยไม่มีฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ชนิดอื่น ๆ ปะปนมาด้วย

ส่วนการศึกษาการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ในประเทศไทยนั้นเสาวนีย์ ศิริรูป (2539) สามารถทำการคัดแยก *Penicillium* sp. ที่สามารถผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์จากน้ำตาลซูโครสได้โดยตั้งชื่อว่า *Penicillium* sp. H12 และมีการทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดย *Penicillium* sp.H12 ที่คัดแยกได้ในขวดเขย่าโดย วรรณา ศรีสัจจารักษ์ (2543) โดยพบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ ใช้น้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ค่าความเป็นกรด ด่าง 5.0 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และต่อมา วีระพงษ์ พรประสาทผล (2545) ศึกษาการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดยใช้ *Penicillium* sp. H12 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบมีใบกวน (Stirred tank bioreactor) โดยใช้น้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อใช้หัวเชื้อของ *Penicillium* sp.H12 อายุ 18 ชั่วโมง สามารถผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด 165 กรัมต่อลิตร ในการผลิตแบบแบทช์และเมื่อทดลองทำการผลิตแบบป้อนอาหารโดยทำการเพิ่มปริมาณน้ำตาลซูโครสเข้มข้นอีก 50 กรัมต่อลิตร ในระหว่างการผลิตพบว่าการเติมน้ำตาลซูโครสในชั่วโมงที่ 9 และ 12 ของการผลิตนั้นเหมาะสมต่อการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์

และจากการทดลองของวีระพงษ์ พรประสาทผล (2545) พบว่าเมื่อทำการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์เป็นเวลานานจะประสบปัญหาเกี่ยวกับการที่สายใยของ *Penicillium* sp.H12 ถูกทำลายไปเนื่องจากแรงเฉือนของใบพัดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพและเมื่อเชื้อรามีการเจริญมากขึ้นก็จะทำให้ต้องมีการเพิ่มอัตราการให้อากาศและอัตราการหมุนของใบกวนมากขึ้นทำให้มีการสิ้นเปลืองพลังงานในปริมาณมาก ซึ่งหากมีการเปลี่ยนรูปแบบของถังปฏิกรณ์ชีวภาพจากถังแบบมีใบกวนมาเป็นแอร์ลิฟท์รีแอคเตอร์ (airlift reactor) ซึ่งไม่มีใบกวนและใช้วิธีการผสมมวลสารโดยการให้อากาศจากด้านล่างให้เกิดการหมุนวนเองก็จะสามารถป้องกันการเกิดความเสียหายของสายใยราเนื่องจากการกวนได้และถังปฏิกรณ์ชนิดนี้มีลักษะเป็นท่อยาวจึงทำให้การถ่ายเทอากาศในถังปฏิกรณ์เกิดได้ดีจึงไม่ต้องใช้อัตราการให้อากาศสูงประกอบกับถังปฏิกรณ์ชนิดนี้ไม่มีใบกวนก็จะทำให้ใช้พลังงานขณะผลิตในปริมาณต่ำได้



รูปที่ 2.6 **แสดงรูปของถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดมีใบกวน (ซ้าย) และแอร์ลิฟท์รีแอคเตอร์ (ขวา)** (Williams, 2002)

ได้มีผู้ใช้แอร์ลิฟท์รีแอคเตอร์ในการผลิตสารจากจุลชีพหลายคณะ เช่น Sarra และคณะ (1997) ได้ทำการผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotic) โดยการตรึงเซลล์ *Streptomyces lividans* TK21 ในถังหมักแบบฟลูอิไดซ์เบดรีแอคเตอร์ (fluidized bed reactor) พบว่าเมื่อให้อาหารในระหว่างการผลิตด้วย dilution rate 0.021 ต่อชั่วโมง สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้อย่างต่อเนื่องและคงที่เป็นเวลา 60 วัน และสามารถเลี้ยงเชื้อได้เป็นเวลา 85 วัน ส่วน Zhang และคณะ (1998) ได้

ศึกษาการฟอกขาวใยฝ้ายโดยใช้เชื้อราในถังหมักแบบฟลูอิไดซ์เบดรีแอคเตอร์ โดยมีการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นอาหารร่วม (co substrate) พบว่าภายใต้สภาวะเหมาะสมที่ใช้ในการฟอกสีสามารถฟอกสีได้ประมาณ 70 – 80 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เวลาสามวัน Shim และ Kawamoto (2002) ก็ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดส (lignin peroxidase) จาก white rot fungus เพื่อใช้ในการสลาย pentachlorophenol โดยศึกษาในฟลูอิไดซ์เบดรีแอคเตอร์ พบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ลิกนินเปอร์ออกซิเดสได้ 8.1 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในการเลี้ยงแบบแบทช์และเมื่อนำไปใช้ในการย่อยสลาย pentachlorophenol พบว่าสามารถย่อยสลาย pentachlorophenol ได้ 80 เปอร์เซ็นต์

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์โดย *Penicillium* sp.H12 ด้วยวิธีการเพื่อลดความเสียหายของสายใยของเชื้อราและลดความสิ้นเปลืองพลังงานในการให้อากาศในระหว่างการผลิตรวมไปถึงการพัฒนารูปแบบการผลิตจากการผลิตแบบแบทช์และแบบป้อนอาหารไปเป็นการผลิตแบบต่อเนื่องด้วย ซึ่งการผลิตแบบต่อเนื่องนี้มีข้อดีกว่าการผลิตแบบแบทช์คือสามารถควบคุมและรักษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไว้ได้เป็นเวลานานทำให้สามารถผลิตสารที่ต้องการได้ในปริมาณสูงและเป็นเวลานานและทำให้คุณภาพของผลผลิตที่ได้นั้นมีคุณภาพอีกด้วย นอกจากนั้นก็ทำการเปลี่ยนชนิดของถังปฏิกรณ์ชีวภาพจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบมีใบกวนเป็นแอร์ลิฟทรีแอคเตอร์เนื่องจากแอร์ลิฟทรีแอคเตอร์จะมีลักษณะเป็นคอลัมน์ (column) และมีท่อให้อากาศจากด้านล่างโดยไม่มีใบกวนอากาศจะถูกปล่อยเข้าไปในคอลัมน์จากด้านล่างและจะแตกเป็นฟองกระจายขึ้นสู่ด้านบนของคอลัมน์เป็นผลให้เกิดการไหลวนของของเหลวภายในคอลัมน์ลงสู่ด้านล่างและจะวนกลับขึ้นสู่ด้านบนอีกครั้งทำให้เกิดการถ่ายเทมวลสารระหว่างจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตและอาหารรวมทั้งอากาศได้โดยที่ไม่ต้องใช้ใบกวนจึงทำให้ไม่ต้องใช้พลังงานสูงเหมือนถังหมักแบบมีใบกวนในการให้อากาศรวมทั้งไม่เกิดแรงเฉือนจากใบกวนกระทำต่อสายใยของเชื้อราทำให้เหมาะสมสำหรับการใช้ผลิตเป็นเวลานาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย