วว.

โครงการวิจัยที่ ภ. 52-06 / ย. 3 / รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)

การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ สารให้ความหวานเพื่อสุขภาพ : แลคโตซูโครส

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

โครงการวิจัยที่ ภ.52-06
การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สารให้ความหวานเพื่อสุขภาพ : แลคโตซูโครส

โครงการย่อยที่ 3
การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สารให้ความหวานเพื่อสุขภาพ : แลคโตซูโครส

รายงานฉบับที่ 1 (ฉบับสมบูรณ์)
การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สารให้ความหวานเพื่อสุขภาพ : แลคโตซูโครส

โดย

ราเชนทร์ วิสุทธิแพทย์	**สยาม สินสวัสดิ์**
ศิริธรรม สิงโต	**ประธาน โพธิสวัสดิ์**
ปริยะดา วิสุทธิแพทย์	**สุทธิรักษ์ มีพลอย**
สุภัทร์ คล่องการงาน	**ธนู ทรัพย์ชิต**
กิลิตรา เสือเอก	**รัศมี เขื่อนล้อม**

บรรณาธิการ วว., กรุงเทพฯ 2555
ลิขิต หาญจางสิทธิ์ สงวนลิขสิทธิ์
บุญเรียม น้อยชุมแพ

รายงานฉบับนี้ได้รับการอนุมัติให้พิมพ์โดย
ผู้ว่าการสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

(นายยงวุฒิ เสาวพฤกษ์)
ผู้ว่าการ

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สารให้ความหวานเพื่อสุขภาพ : แลคโตซูโครส มีระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี (2552-2553) เป็นโครงการที่ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี, และทั้งนี้เพื่อให้ชื่อโครงการวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สารให้ความหวานเพื่อสุขภาพ: แลคโตซูโครสได้สอดคล้องกับคำศัพท์ตามราชบัณฑิตยสถานจากการถอดคำศัพท์โรมันเป็นภาษาไทย ดังนี้ แลคโตซูโครส เป็น แลกโทซูโครส ซึ่งจะปรากฏในเนื้อหา และยังคงใช้ชื่อโครงการตามเดิม ซึ่งคณะผู้วิจัยขอขอบคุณที่ได้รับการสนับสนุนโครงการจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, สำนักงบประมาณ และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย.

ในการนี้ คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ดร.สุภาพ อัจฉริยศรีพงศ์ ผู้อำนวยการฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ เป็นอย่างสูงที่ให้คำปรึกษาแนะนำและให้การสนับสนุนให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี, รวมถึงนักวิชาการ, พนักงานปฏิบัติการ, ลูกจ้าง วว. และนักศึกษาฝึกงานจากสถาบันการศึกษาที่มีส่วนร่วมในการสนับสนุนให้เกิดความสำเร็จในการดำเนินงาน.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญตาราง	ค
สารบัญรูป	ง
ABSTRACT	1
บทคัดย่อ	2
1. บทนำ	3
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	19
3. ผลการทดลองและวิจารณ์	24
4. สรุปผลการทดลอง	34
5. ผลการศึกษาเบื้องต้นทางด้านการตลาดและผลกระทบของโครงการ	35
6. ข้อเสนอแนะ	36
7. เอกสารอ้างอิง	37

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1.	ปริมาณ Inulin และ Oligofructose ในอาหารชนิดต่างๆ (%)	14
ตารางที่ 2.	ความสัมพันธ์ระหว่างสารพิษ (toxic metabolites) ที่เกิดจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ และผลกระทบต่อร่างกาย	15
ตารางที่ 3.	ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS Broth	20
ตารางที่ 4.	ค่าความเป็นกรด-เบส และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส ที่แยกจากจุลินทรีย์ 12 สายพันธุ์	27
ตารางที่ 5.	กิจกรรมของการผลิตแลกโทซูโครสในสภาวะที่เหมาะสม	28
ตารางที่ 6.	ผลของแมกเนเซียมซัลเฟตต่อการผลิตเอนไซม์ภายนอกเซลล์/การผลิตเอนไซม์ภายในเซลล์ และรีเลทีฟเอนไซม์แอกทิวิตของเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส โดย *Bacillus subtilis* SM1**2**	30
ตารางที่ 7.	การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส ระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าขวดและแบบการเพาะเลี้ยงแบบ fermenter ของ *Bacillus subtilis* SM12	33

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1.	Oligosaccharide ชนิดต่างๆ	11
รูปที่ 2.	ตัวอย่างอาหารที่ใช้แยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรนโนซิเดส	25
รูปที่ 3.	เชื้อจุลินทรีย์บางส่วนที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารชนิดต่างๆ	25
รูปที่ 4.	เชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* SM12 ที่แยกได้จากนมข้นหวาน	26
รูปที่ 5.	ผลของแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส	29
รูปที่ 6.	การเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนโดยใช้เกลือแอมโมเนียมร่วมกับการเติมสารละลายวิตามินที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Bacillus subtilis* SM 12	31
รูปที่ 7.	การเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนโดยใช้เกลือแอมโมเนียมร่วมกับการเติมสารละลายวิตามินที่มีผลต่อการใช้น้ำตาลซูโครสของ *Bacillus subtilis* SM 12	31
รูปที่ 8.	การเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนโดยใช้เกลือแอมโมเนียมร่วมกับการเติมสารละลายวิตามินที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส	32

RESEARCH AND DEVELOPMENT OF HEALTH SWEETENER PRODUCTION : LACTOSUCROSE

Rachain Visutthipat, Sayam Sinsawat, Pariyada Visutthipat, Siritham Singhtho and Pathan Photisawatd

ABSTRACT

The selection of microorganisms from food was performed in order to investigate the production of beta-fructofurennosidase enzyme. It was found that *Bacillus subtilis* SM 12 strain, isolated from sweetened condensed milk created the highest level of this enzyme. Consequently, this enzyme was extracted from this bacterial strain and used for the study of the optimal conditions in terms of temperature and pH to produce lacto-sucrose which showed that 50°C and pH 6 were the highest efficient conditions for this enzyme to produce lacto-sucrose of 14 g/l/hr. In addition, it was also found that 0.4% was the most suitable magnesium concentration for optimal growth of *Bacillus subtilis* SM 12, and ammonia salt could not be used to substitute yeast extract due to the difference in bacterial growth. The results of microbial fermentation in laboratory showed that the best growth medium was composed of 25% sucrose, 1.5% yeast extract, 0.4% magnesium sulfate, and 0.14% anti-light-time, at pH 6.0, and 28°C., under 1 VVM aeration rate and 600 rpm, resulting in an increased production of beta-fructofurennosidase enzyme compared to that of shaker cultivation.

การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์สารให้ความหวานเพื่อสุขภาพ : แลคโตซูโครส

ราเชนทร์ วิสุทธิแพทย์[1], สยาม สินสวัสดิ์[1], ปริยะดา วิสุทธิแพทย์[2], ศิริธรรม สิงห์โต[1], และประธาน โพธิสวัสดิ์[1]

บทคัดย่อ

ได้ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์จากอาหาร เพื่อศึกษาการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรนโนซิเดส. จากการคัดเลือกพบว่า *Bacillus subtilis* SM 12 ซึ่งแยกได้จากนมข้นหวานมีการสร้างเอนไซม์ดังกล่าวมากที่สุด. ต่อมา จึงสกัดเอมไซม์จากจุลินทรีย์ดังกล่าว เพื่อศึกษาอุณหภูมิ, ความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมเพื่อการผลิตแลกโทซูโครส. พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 50 องศาเซลเซียส และความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมคือ 6. ในสภาวะดังกล่าวทำให้เอนไซม์มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการผลิตแลคโตซูโครส ซึ่งผลิตได้ในระดับ 14 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง. นอกจากนั้น ยังได้ศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของแมกเนเซียมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *Bacillus subtilis* SM 12, พบว่า อัตราที่เหมาะสมคือที่ร้อยละ 0.4. สำหรับการใช้เกลือแอมโมเนียมเพื่อทดแทนยีสต์เอกซ์แทรกต์นั้น พบว่า เกลือแอมโมเนียมไม่สามารถทดแทนยีสต์เอกซ์แทรกต์ได้ เนื่องจากให้ผลการเจริญเติบโตที่แตกต่างกับการใช้ยีสต์เอกซ์แทรกต์. การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า ใช้อาหารที่ประกอบด้วยซูโครสร้อยละ 25, ยีสต์เอ็กแทรกซ์ร้อยละ 1.5, แมกนีเซียมซัลเฟตร้อยละ 0.4 และ แอนติไฟม์ร้อยละ 0.1, ควบคุมความเป็นกรดเบสที่ 6.0, อุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส, ภายใต้สภาวะของการให้อากาศ 1 VVM, อัตราการกวน 600 รอบ/นาที. พบว่าอัตราการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรนโนซิเดสเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบเขย่าขวดเลี้ยงเชื้อ.

---

[1] ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

[2] สำนักยุทธศาสตร์วิสาหกิจ, (วว.)

1. บทนำ

น้ำตาลช่วยแต่งเติมรสชาติอาหารให้ดีขึ้น นอกจากจะให้รสชาติหวานอันเป็นที่ชื่นชอบของคนทั่วไปแล้ว, ยังเป็นสารสำคัญที่ให้พลังงานแก่ร่างกาย. แต่หากบริโภคน้ำตาลมากเกินกว่าที่ร่างกายต้องการหรือเกินกว่าความสามารถในการเผาผลาญสารอาหารและการใช้พลังงานในแต่ละวัน, น้ำตาลส่วนเกินที่บริโภคเข้าไปนั้น จะถูกดูดซึมและเปลี่ยนรูปไปเป็นสารประกอบไขมันที่สะสมอยู่ตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย ไม่สามารถกำจัดออกไปได้, ทำให้เกิดปัญหาสุขภาพตามมาอย่างมากมาย, ทั้งโรคอ้วน, โรคเบาหวาน, โรคทางทันตกรรม, ซึ่งโรคเหล่านี้จะกลายเป็นโรคที่นำไปสู่ความเจ็บป่วยอีกหลายโรค. นับวันปริมาณการบริโภคน้ำตาลเพิ่มขึ้นทุกปี ตามจำนวนประชากรที่เพิ่มขึ้น, รวมถึงการเพิ่มขึ้นของสัดส่วนการบริโภคน้ำตาลต่อคนต่อปีด้วย. ดังนั้น จึงมีความพยายามอย่างมากในการค้นคว้าหาสารให้ความหวานต่างๆ มาใช้แทนน้ำตาลทราย. ในสหรัฐอเมริกา พบว่า ผู้บริโภคสารให้ความหวานที่ไม่ให้พลังงานส่วนใหญ่ เพื่อหลีกเลี่ยงภาวะมีน้ำตาลมากเกินไป และถือว่า การบริโภคสารให้ความหวานที่ไม่ให้พลังงานนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการดำรงชีวิตของคน. มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่บริโภคเพื่อต้องการลดน้ำหนักตัว. ดังนั้น การวิจัยและพัฒนาการผลิตสารให้ความหวานที่ใช้วัตถุดิบธรรมชาติภายในประเทศและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค, รวมถึงมีความเป็นไปได้ในการผลิตเชิงพาณิชย์ สำหรับอุตสาหกรรมอาหาร และการนำมาใช้ทดแทนน้ำตาลในชีวิตประจำวันของคนทั่วไป, จึงเป็นแนวทางที่จะสามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวนี้ได้.

จะเห็นได้ว่า ทั่วโลกเริ่มเห็นความสำคัญของปัญหาสุขภาพจากการบริโภคน้ำตาลเกินความต้องการ, จึงได้มีการคิดค้นสารให้ความหวานที่ให้พลังงานต่ำ หรือไม่ให้พลังงานเพื่อทดแทนน้ำตาล ตัวอย่างเช่น แอสปาแตม, ไซลิทอล, ซอร์บิทอล, สตีวิโอไซด์, ซึ่งสารให้ความหวานเหล่านี้บางชนิดผลิตขึ้นจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี, บางชนิดเป็นสารธรรมชาติที่ได้จากการสกัด. โดยสารให้ความหวานต่างๆ เหล่านี้ ต้องถูกทดสอบความปลอดภัยในการบริโภค, การกำหนดปริมาณการบริโภคต่อวัน, รวมถึงข้อจำกัดของผู้ป่วยบางโรคที่ไม่สามารถบริโภคได้. สำหรับประเทศไทยจัดเป็นประเทศผู้ผลิตน้ำตาลรายใหญ่เป็นอันดับ 5 ของโลก, รองจากประเทศบราซิล, อินเดีย, สหภาพยุโรป, จีน และสหรัฐอเมริกา. ในปี พ.ศ. 2547, ประเทศไทยสามารถผลิตน้ำตาลได้มากถึง 7.58 ล้านตันต่อปี ซึ่งในจำนวนนี้ถูกใช้เพื่อบริโภคภายในประเทศมากถึง 1.92 ล้านตัน (กรมส่งเสริมการส่งออก 2548), คิดเป็นสัดส่วนการบริโภคน้ำตาล 29.5 กิโลกรัมต่อคนต่อปี. แสดงให้เห็นว่า คนไทยส่วนใหญ่นิยมบริโภคอาหารและเครื่องดื่มที่มีรสหวาน ส่งผลให้เกิดปัญหา

สุขภาพเพิ่มมากขึ้น, ซึ่งเห็นได้จากจำนวนผู้ป่วยเบาหวานที่เข้ารับการรักษาในสถานพยาบาลของรัฐเพิ่มขึ้นจาก 179,946 คนในปี พ.ศ. 2539, เป็น 643,522 คนในปี พ.ศ. 2549, ซึ่งเพิ่มขึ้นถึง 463,576 คนในระยะเวลา 10 ปี (กรมควบคุมโรค 2550). ด้วยเหตุนี้ จึงได้มีการนำเอาสารให้ความหวานมาใช้ทดแทนน้ำตาล, ซึ่งสารเหล่านี้ส่วนใหญ่มีราคาสูงและต้องนำเข้าจากต่างประเทศ. ทำให้ผู้ป่วยเบาหวานที่มีรายได้น้อยและประชาชนทั่วไปไม่สามารถนำเอาสารให้ความหวานมาใช้ทดแทนน้ำตาลในชีวิตประจำวันได้, รวมถึงภาคอุตสาหกรรมที่ผลิตอาหารและเครื่องดื่มที่จำเป็นต้องใช้น้ำตาลเป็นส่วนประกอบ. ดังนั้น การวิจัยและพัฒนาการผลิตสารให้ความหวานที่ใช้วัตถุดิบธรรมชาติภายในประเทศและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค, รวมถึงมีความเป็นไปได้ในการผลิตเชิงพาณิชย์สำหรับอุตสาหกรรมอาหารและการนำมาใช้ทดแทนน้ำตาลในชีวิตประจำวันของคนทั่วไป, จึงเป็นแนวทางที่จะสามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวนี้ได้.

ปัจจุบันน้ำตาลแลกโทซูโครสจัดอยู่ในกลุ่มของโอลิโกแซ็กคาไรด์ ได้เข้ามามีบทบาทอย่างมากในอุตสาหกรรมน้ำตาล (Yun *et al.* 1994). เนื่องจากมีข้อได้เปรียบหลายประการ ได้แก่ สามารถใช้ได้กับผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน, เป็นสารที่ให้พลังงานต่ำ, ซึ่งเหมาะสมสำหรับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก และยังเป็นสารเร่งการเติบโตของจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในระบบทางเดินอาหาร (Oku *et al*. 1984, Hidaka *et al*. 1986). โอลิโกแซ็กคาไรด์ที่รู้จักกันแพร่หลายในปัจจุบัน ได้แก่ cyclodextrins (Hara *et al*. 1994), isomalto-oligosaccharides (Kohmoto *et al*. 1991), soybean-oligosaccharides (Wada *et al*. 1992) และ fructo- oligosaccharides (Hidaka *et al*. 1988; Jung *et al*. 1993; Yun and Song 1993) เป็นต้น.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยแห่งประเทศไทย (วว.) โดยฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ จึงทำการศึกษาคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ เพื่อการผลิตแลกโทซูโครส ซึ่งเป็นสารให้ความหวานจากวัตถุดิบธรรมชาติ. แลกโทซูโครสเป็นสารที่มีความสำคัญอย่างมากในการเป็นอาหารสุขภาพ, กระบวนการผลิตแลกโทซูโครสสามารถประยุกต์ได้ในระดับอุตสาหกรรม. โดย เฉพาะอย่างยิ่งแลกโทซูโครสมีความหวานใกล้เคียงน้ำตาลซูโครสที่ใช้กันอยู่, จึงจัดเป็นสารให้ความหวานที่เป็นทางเลือกของอุตสาหกรรมอาหารในอนาคต.

วัตถุประสงค์

1. เพื่อวิจัยและพัฒนาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพ ที่สามารถผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรนโนซิเดส ในปริมาณสูง.
2. เพื่อศึกษาอุณหภูมิและความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรนโนซิเดส.
3. เพื่อศึกษาผลของแมกนีเซียมซัลเฟตและเกลือแอมโมเนียมต่อการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรนโนซิเดส.
4. เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตแลกโทซูโครสในห้องปฏิบัติการ.

1.2 การตรวจเอกสาร

1.2.1 วัตถุเจือปนที่ใช้ให้ความหวานแทนน้ำตาล

วัตถุเจือปนให้ความหวานแทนน้ำตาลหรือสารให้ความหวานเทียม (artificial sweetening agent) ได้แก่ สารที่สังเคราะห์ขึ้นมาโดยกรรมวิธีทางวิทยาศาสตร์และมีคุณสมบัติให้รสหวานคล้ายหรือเหมือนน้ำตาลทรายที่เราบริโภค. มีทั้งชนิดที่มีความหวานใกล้เคียงกับน้ำตาลทราย และมีความหวานนับเป็นร้อยหรือพันเท่าของน้ำตาลทราย. การนำเอาสารให้ความหวานชนิดอื่นมาใช้แทนน้ำตาลในอุตสาหกรรมอาหาร หรือใช้ในการปรุงรสอาหารในครัวเรือนนั้น มีสาเหตุหลายประการ คือ:

1) เพื่อลดปริมาณการบริโภคน้ำตาล ซึ่งเป็นสารพวกคาร์โบไฮเดรต สำหรับผู้ที่ต้องการลด หรือจำกัดปริมาณแคลอรีจากอาหาร, ซึ่งได้แก่ ผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนักหรือใช้กับผู้ป่วยโรคเบาหวาน ที่ต้องการจำกัดปริมาณน้ำตาลในร่างกาย, เนื่องจากสารที่ให้ความหวานเทียมนี้ จะไม่ต้องใช้อินซูลิน (Insulin) ในกระบวนการเมแทบอลิซึมเหมือนกับน้ำตาล.

2) เนื่องจากน้ำตาลทรายในท้องตลาดมีราคาสูงขึ้น และบางครั้ง ในบางประเทศ ปริมาณน้ำตาลทรายไม่พอกับความต้องการของผู้บริโภค. เพื่อลดต้นทุนการผลิต จึงนำสารที่ให้ความหวานเทียมมาใช้แทนน้ำตาล, เนื่องจาก สารเหล่านี้มีราคาต่ำกว่าน้ำตาลมาก เมื่อเทียบกับปริมาณที่ใช้ให้ได้รสหวานเท่าๆ กัน.

3) เนื่องจากอาหารบางชนิดจำเป็นต้องมีรสหวาน แต่ไม่ต้องการส่วนประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรต ซึ่งจะทำให้อาหารนั้นเสื่อมคุณภาพได้ง่าย เช่น น้ำปลา, ซีอิ๊ว, หรือยา, เป็นต้น.

วัตถุเจือปนให้ความหวานแทนน้ำตาล ที่นิยมใช้นั้นมีมากมายหลายชนิด เช่น.

- โซเดียมไซคลาเมต (Sodium cyclamate) มีความหวาน 30 เท่าของน้ำตาลทราย.
- ดัลซิน (Dulcin) หรือซูครอล (Sucrol) มีความหวาน 200 เท่าของน้ำตาลทราย.
- แซ็กคาริน (Saccharin) มีความหวานเป็น 500 เท่าของน้ำตาลทราย ส่วนในรูปของโซเดียมแซ็กคารีน ซึ่งเป็นรูปที่นิยมใช้ มีความหวานประมาณ 300-500 เท่าของน้ำตาลทราย.
- ซอร์บิทอล (Sorbitol) มีความหวานน้อยกว่าน้ำตาลทราย คือประมาณ 1/2 - 2/3 เท่าของน้ำตาลทราย.
- สติวิโอไซด์ (Stevioside) มีความหวานประมาณ 150-300 เท่าของน้ำตาลทราย.
- ไซลิทอล (Xylitol) มีความหวานเท่ากับน้ำตาลทราย.
- ไดโซเดียมกลีซิลริซิเนตและไตรโซเดียมกลีซิลริซิเนต มีความหวาน 4,000 เท่าของน้ำตาลทราย.
- แอสปาร์แทม มีความหวาน 200 เท่าของน้ำตาลทราย.
- Prebiotic หลายชนิด เช่น Fructo-ologosaccharide , Lactosucrose.
- อนุพันธ์ของกลีเซอรอลหลายชนิด เช่น แอลฟา-กลูโคซิลกลีเซอรอล.

สารให้ความหวานดังกล่าวมาแล้วทั้งหมดนั้น มีคุณสมบัติที่แตกต่างกันออกไป จึงมีการนำมาใช้ในวัตถุประสงค์ ที่แตกต่างกันตามความเหมาะสม. อย่างไรก็ตาม สารให้ความหวานแทนน้ำตาลหรือสารให้ความหวานเทียมที่กล่าวมาแล้วนี้ มีบางชนิดที่ก่อให้เกิดพิษภัยต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้. กระทรวงสาธารณสุขจึงได้ประกาศห้ามใช้ใส่ในอาหารทุกชนิด, รวมทั้งห้ามนำเข้าสารเคมีดังกล่าว เข้ามาในราชอาณาจักร. สารดังกล่าว ได้แก่ โซเดียมไซคลาเมต, ดัลซิน และสติวิโอไซด์. นอกจากนี้ ยังมีข้อกำหนดห้ามใช้แซ็กคารีนกับผลิตภัณฑ์อาหารบางประเภท ได้แก่ เครื่องปรุงรสและเครื่องดื่มที่ไม่มีแอลกอฮอล์ทุกชนิด. ด้วยเหตุผลที่ว่า แซ็กคารีนเป็นสารที่ไม่ให้พลังงานแก่ร่างกาย จึงไม่เกิดประโยชน์ต่อผู้บริโภค, โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้บริโภคในวัยเด็ก ซึ่งอยู่ในช่วงที่ต้องการพลังงานสูง. ดังได้กล่าวมาแล้วว่า สารให้ความหวานแทนน้ำตาลนั้น แต่ละชนิดมีข้อดี-ข้อเสีย และความเหมาะสมกับอาหารที่แตกต่างกัน. ดังนั้น การเลือกใช้สารให้ความหวานชนิดใดนั้น ต้องศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติ, วิธีใช้, ข้อดี-ข้อเสีย, รวมทั้งความเหมาะสมกับอาหารและผลิตภัณฑ์อย่างละเอียด, เพื่อป้องกันปัญหาอันตรายจากสารเคมี เนื่องจากการใช้ไม่ถูกต้อง หรือการรู้เท่าไม่ถึงการณ์.

1.2.2 วัตถุให้ความหวานที่ควรรู้จัก

1. แซ็กคารีน เป็นสารประกอบอินทรีย์ ที่ใช้เป็นวัตถุให้ความหวานแทนน้ำตาล มีลักษณะเป็นเกล็ดหรือผลึกสีขาวขุ่น, ละลายน้ำได้เล็กน้อย มีความหวานเป็น 500 เท่าของน้ำตาลทราย. เมื่อบริโภคจะรู้สึกหวานติดลิ้น, หวานปะแล่ม, เป็นสารที่ให้ความหวานโดยไม่ให้พลังงาน, โดยปกติใช้สำหรับผู้ป่วยเบาหวาน.

ปัญหาของแซ็กคารีน ปัจจุบันมีการนำแซ็กคารีนมาเป็นวัตถุให้ความหวานแทนน้ำตาล ในอาหารประเภทหมักดองกันอย่างแพร่หลายและในปริมาณที่มาก, รวมทั้งมีการใช้ในอาหารที่กระทรวงสาธารณสุขห้ามใช้แซ็กคารีน เนื่องจากไม่ให้พลังงานแก่ร่างกาย, ได้แก่ เครื่องปรุงรส, น้ำปลา, ซอส, ซีอิ๊ว, นม และผลิตภัณฑ์นม, เป็นต้น. นอกจากนั้นยังพบว่า ในประเทศแคนาดาห้ามใช้แซ็กคารีนในอาหาร เนื่องจากมีการทดลองพบว่า ก่อให้เกิดมะเร็งของกระเพาะปัสสาวะในหนูทดลอง, ซึ่งในปัจจุบันนี้ยังไม่มีข้อสรุปที่ชัดเจนเกี่ยวกับพิษภัยของแซ็กคารีน จากการที่ปริมาณที่ทดลองในหนู เป็นปริมาณที่ใช้มากเกินกว่าที่จะเป็นจริงได้สำหรับมนุษย์. อย่างไรก็ตาม สำหรับในประเทศไทย กระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดให้แซ็กคารีนเป็นวัตถุที่ให้ความหวานแทนน้ำตาลในเครื่องดื่มไดเอ็ต สำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานและผู้ป่วยโรคอ้วน, รวมทั้งกำหนดประเภทอาหาร, ลักษณะอาหาร และผลิตภัณฑ์อาหารที่ห้ามใช้แซ็กคารีน, เนื่องจากเป็นสารที่ไม่ให้พลังงานแก่ร่างกายไว้ด้วย, เพื่อเป็นการคุ้มครองสิทธิประโยชน์ของผู้บริโภค โดยเฉพาะเด็กเล็กที่อยู่ในช่วงที่ต้องการพลังงานสูง. ฉะนั้น แซ็กคารีนจึงเป็นสารให้ความหวานแทนน้ำตาล ที่ใช้เฉพาะในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ผู้ป่วยโรคอ้วนที่ต้องจำกัดปริมาณ น้ำตาลเท่านั้น ไม่ควรนำมาใช้กับอาหารทั่วไป.

2. แอซีซัลฟาม เค (Acesulfame K)

- สารให้ความหวาน ซึ่งมีความหวานมากกว่าน้ำตาลทรายประมาณ 200 เท่า**.**
- ทนต่อความร้อนได้สูงถึง 230 องศาเซลเซียส.
- ทนต่อความเป็นกรดเบสได้ดี ที่ช่วง pH 3-9.
- ละลายน้ำได้ดี (27% ที่อุณหภูมิ 25 องศาสเซลเซียส).
- ไม่ให้พลังงาน (แคลอรี = 0).
- ไม่ทำให้ฟันผุ.
- เหมาะสมสำหรับผู้ป่วยเบาหวาน.
- ปลอดภัย ไม่ต้องระบุ “phenylketonurics : contains phenylalanine”.

3. ไซลิทอล (Xylitol) เป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอน 5 ตะกอน, ในโครงสร้างเป็นสารให้ความหวานแทนน้ำตาล, เป็นน้ำตาลที่ไม่มีกลิ่น. ให้ความหวานใกล้เคียงกับน้ำตาลทรายและให้ความรู้สึกเย็นลิ้นเล็กน้อย เวลารับประทานอาหาร. แต่ไซลิทอลจะให้พลังงานน้อยกว่าน้ำตาลทั่วไปประมาณร้อยละ 40. ในฉลากโภชนาการที่ใช้ในกลุ่มสหภาพยุโรปและอเมริการะบุไว้ว่า ไซลิทอลมีค่าพลังงานเท่ากับ 2.4 กิโลแคลอรีต่อกรัม. ไซลิทอลเป็นน้ำตาลที่พบได้ในธรรมชาติในผักและผลไม้ เช่น กะหล่ำปลี, มะเขือยาว, สตอเบอรี, เป็นต้น.(www.ist.cmu.ca.th/riseat/nl/2003/12/06.php).

4. แอสปาร์แทม (Aspartame) เป็นสารให้ความหวานอีกชนิดหนึ่ง, มีความหวานประมาณ 180-200 เท่าของน้ำตาลซูโครส, มีลักษณะเป็นผลึกสีขาว, ปราศจากกลิ่น, ละลายได้ในน้ำ, ให้ความหวานคล้ายคลึงน้ำตาลธรรมชาติมาก. เมื่อนำมาใช้แทนน้ำตาล จะลดพลังงานได้ประมาณร้อยละ 95. แอสปาร์แทมจะสลายตัวเมื่อถูกความร้อน, ไม่สามารถเก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิสูงๆ ได้. จึงไม่เหมาะกับอาหารที่ต้องผ่านการให้ความร้อนสูง. แอสปาร์แทมถูกย่อยได้โดยเอนไซม์ต่างๆ ที่มีในร่างกาย เช่น Peptidase, Esterase ได้สาร Aspartic acid และ Phenylalanine. ได้มีผู้ทำการทดลองกับสัตว์ทดลอง โดยให้แอสปาร์แทมในระดับที่สูงประมาณ 100 เท่าของปริมาณที่ใช้บริโภคจริง, ปรากฏว่า ไม่พบสิ่งผิดปกติใดๆ เกิดขึ้นกับสัตว์ทดลอง.

1.2.3 พืชที่ให้ความหวาน

1) Thaumatin เป็นสารจำพวกโปรตีนผ่านการสกัดและทำให้บริสุทธิ์จากผลของพืชทางแอฟริกาตะวันตก มีชื่อว่า *Thaumatococcus daniellii* เจริญอยู่ในแถบแอฟริกากลางและตะวันตกเฉียงใต้ ใช้เป็นสารให้ความหวานและนำมาใช้ทำอาหาร. มีชื่อสารให้ความหวาน คือ Thaumatin ซึ่งได้มาจากเนื้อของเมล็ดที่มีสีขาวอยู่บน aril, ส่วนบนของเมล็ดเป็นสารให้ความหวานพวกโปรตีน. การสกัดจะใช้น้ำ, นำไปทำให้เกิดความเข้มข้นแล้วผ่าน ultrafiltration เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์. โปรตีนจะมี 2 ส่วน คือ Thaumatin T.1 และ Thaumatin T.3. Thaumatin มีความหวานประมาณ 2,000–2,500 เท่าของสารละลายซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 8-10. มีเนื้อเป็นสีครีม, ไม่มีกลิ่น และให้ aftertaste คล้ายกับชะเอม. จากการที่ Thaumatin มีคุณสมบัติในการเพิ่มกลิ่นและรส จึงเป็นที่สนใจที่จะนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ มากกว่าเป็นสารให้ความหวาน. Thaumatin จะละลายได้ในน้ำเย็นและละลายได้มีความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 60 (น้ำหนัก/ปริมาตร), จะให้พลังงานเท่ากับโปรตีน คือ 4 กิโลแคลอรี/กรัม. แต่ใช้ในปริมาณเล็กน้อย จึงถือว่าไม่ให้พลังงาน. Thaumatin เมื่อผ่านกระบวนการ freeze dried หรือ spray-dried ยังคงเสถียรอยู่ได้. ถ้าเก็บในสภาพปกติความหวาน

ยังเสถียรได้ เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย. จากการศึกษาทางพิษวิทยา พบว่าไม่เป็นพิษต่อหนูทดลองและไม่ใช่สารก่อมะเร็ง.

2) Monellin สกัดได้จาก Serendipity Berry, เป็นผลของไม้เลื้อยชนิดหนึ่งในทวีปแอฟริกา มีชื่อว่า *Dioscorephyllum cumminsii.* การสกัดจะใช้เอนไซม์ผสมคือ pectinase กับ bromelain ทำปฏิกิริยากับผล จะได้สารให้ความหวานซึ่งจะอยู่ในน้ำยางที่มีลักษณะคล้าย pectin และจะออกรส ขม. Monellin มีความหวานเป็น 1,500-3,000 เท่าของน้ำตาลซูโครส, จะเริ่มให้ความหวานหลังบริโภค 2-3 วินาที, ความหวานจะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ และเพิ่มจนมีรสหวานมากที่สุด, แล้วจะคงความหวานอยู่นานถึง 1 ชั่วโมง. ส่วนที่ให้รสหวาน คือหมู่ sulfhydryl ของโปรตีน ซึ่งมีอยู่เพียงหมู่เดียว. แต่ถ้าอยู่ในรูปของสารไม่บริสุทธิ์ จะให้กลิ่นรสชะเอม. สภาพความคงตัวจะเสถียรในสภาพสารละลาย(น้ำ). ค่าความเป็นกรดเบสอยู่นอกเหนือช่วงเสถียร, คุณสมบัตินี้จึงเป็นปัญหาสำคัญของ monellin.

3) Stevioside ชาวปารากกวัยได้นำใบแห้งๆ และรากของสมุนไพรพวก Bertoni หรือ *Stevia rebaudiana* มาผสมเครื่องดื่มให้มีรสหวานขึ้น. สารที่ได้มีชื่อว่า Stevioside ซึ่งเป็นผลึกของ glycoside diterpene มีรสหวานมาก และสกัดได้ง่ายโดยใช้ Solvent ความหวาน 250-300 เท่าของน้ำตาลซูโครส, แต่จะมีรสฝาดและขม. เมื่อผ่านความร้อน Stevioside จะยังคงความหวานอยู่ได้. ในประเทศญี่ปุ่นอนุญาตให้ใช้ Stevioside และ FDA ห้ามใช้เป็น “prior use” เมื่อ Stevioside ได้รับความร้อนสูงถึง 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ไม่ปรากฏการเปลี่ยนแปลงใดๆ เกิดขึ้น. นอกจากจะยังคงความหวาน เมื่อได้รับอุณหภูมิสูงแล้ว จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีด้วย เช่นกัน. มีความทนต่อการเปลี่ยนสีได้มากกว่าซูโครส. ควรจะนำเอา Stevioside มาใช้ในการคงรสชาติเดิมในอาหารและมีการนำไปใช้ในอาหารหลายชนิด. ประเด็นนี้เองที่บ่งว่า การใช้ Stevia เป็นการเพิ่มคุณภาพของอาหาร โดยที่ต้นทุนถูกลง. ผลิตภัณฑ์ Stevia ส่วนมากมีการใช้กันมากในประเทศญี่ปุ่น.

4) Glycyrrhizin เป็นสารพวก triterpene glycoside, สกัดได้จากรากชะเอม, ใช้เป็นสารให้ความหวานและเพิ่มกลิ่นรส. พบมากในรากชะเอมประมาณร้อยละ 6-14 ของน้ำหนักแห้ง. มีการเก็บเกี่ยวได้ปีละ 2 ครั้ง. Glycyrrhizin มีความหวานเป็น 50-100 เท่าของน้ำตาลซูโครส, โดยจะให้ความหวานอย่างช้าๆ. ส่วน aftertaste เป็นรสชะเอมและเกิดรสติดทนนานมีการใช้กันมากในอุตสาหกรรมอาหารของญี่ปุ่น, นำไปใช้เพิ่มความหวานในของหวาน, เพิ่มกลิ่นโกโก้และ

ช็อกโกแลต และใช้กับผลิตภัณฑ์ยา จะทำให้มีกลิ่นและรสหอมหวาน และใช้ดับรสขมจากการทำยา.

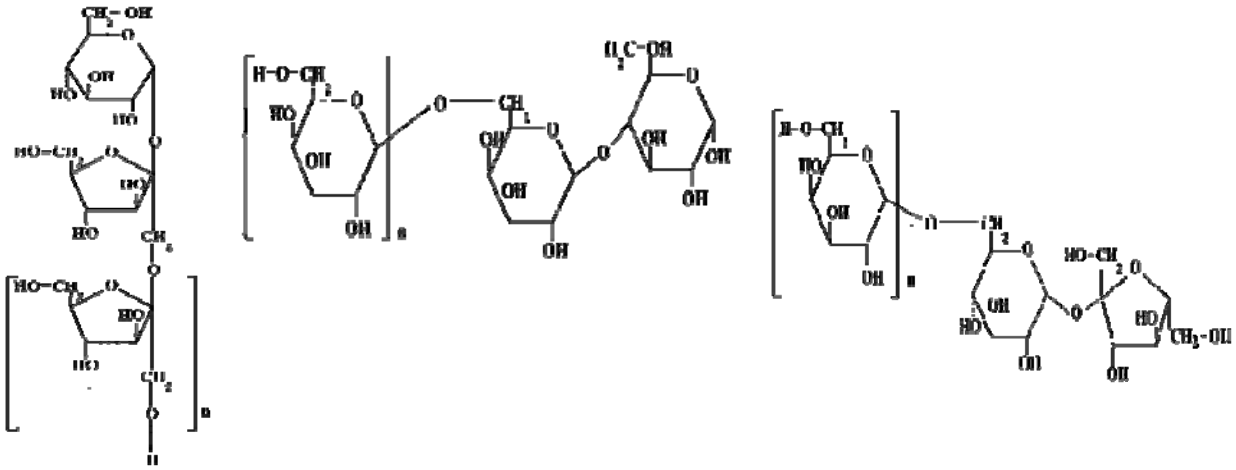
5) Phyllodulcin สารนี้มีความหวาน 200-300 เท่าของน้ำตาลซูโครส, สกัดได้จาก *Hydrangea macrophylla.* รสชาติของ phyllodulcin จะกระจายความหวานได้ช้ากว่า, แต่จะคงอยู่ได้นานและมี aftertaste คล้ายกับชะเอม. มีการใช้ phyllodulcin ในการผลิตภัณฑ์เฉพาะอย่างเท่านั้น เช่น hard candies, confection, chewing gums และยาสีฟัน. แต่ในประเทศไทยห้ามใช้หรือนำเข้า dulcin เป็นส่วนผสมในอาหาร.

1.2.4 พรีไบโอติก (Prebiotics)

พรีไบโอติก คือ สารที่ทนต่อการย่อยในระบบทางเดินอาหาร จะสามารถทำให้คงสภาพอยู่ได้ลงไประบบทางเดินอาหาร คือลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่, ซึ่งมีคุณสมบัติที่ส่งเสริมการเจริญการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เจ้าบ้านที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายหรือจุลินทรีย์โพรไบโอติก. สารที่มีคุณสมบัติพรีไบโอติกเช่นสารกลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์, สารพวกเยื่อใยและน้ำตาลจากผลไม้, เช่นโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Oligosaccharide) ฟรักโทสโอลิโกแซ็กคาไรด์ (Fructo-oligosaccharide) น้ำตาลแลกโทส (Lactose) หรืออินนูลิน (Inulin) เป็นต้น. โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าหรือยับยั้งเชื้อโรค, กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกัน, ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยและดูดซึมอาหารของระบบทางเดินอาหาร. ส่งเสริมให้มีสุขภาพแข็งแรงต้านทานต่อโรค, ลดสภาวะเครียด, ช่วยให้การเจริญเติบโตดี. จากการศึกษาพบว่า จุลินทรีย์กลุ่มโพรไบโอติก ซึ่งได้แก่ *Bacillus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Clostridium butyricum*, *Enterobacter* sp. และ Yeast ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียกลุ่มแล็กติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria, LAB) นั้นสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้. สารที่สร้างขึ้นได้แก่ กรดอินทรีย์, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์, ไดอะซิติล และแบคเทอริโอซิน. โดยสารเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้เช่น *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio* sp. และ *Clostridium* sp. ได้เป็นอย่างดี และไม่เกิดการตกค้างในเนื้อเยื่อ ซึ่งจะไม่เป็นส่งผลเสียต่อผู้บริโภคและทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากโค คือน้ำนมวัวมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค, ไม่มีสารตกค้าง เนื่องมาจากคุณสมบัติของจุลินทรีย์โพรไบโอติก ช่วยส่งเสริมให้สัตว์มีสุขภาพดี, แข็งแรงต้านทานต่อโรค, ช่วยในการย่อยและการดูดซึมอาหาร ทำให้ได้รับสารอาหารที่มีปริมาณสูงขึ้น, มีการเจริญเติบโตที่ดีและมีการพัฒนาการทางร่างกายที่สมบูรณ์.

1.2.4.1 โอลิโกแซ็กคาไรด์ (Oligosaccharide)

Oligosaccharide เป็นพอลิแซ็กคาไรด์สายสั้น ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2-10 โมเลกุล, มีโครงสร้างทางเคมีดังแสดงในรูปที่ 1. โดยมีคุณสมบัติเฉพาะตัว 2 อย่างคือ ไม่สามารถถูกย่อยได้ ด้วยน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร, แต่จะถูกย่อยสลายได้โดยแบคทีเรียในลำไส้ เช่น Bifidobacteria ซึ่งเป็น normal flora ที่มีอยู่ในลำไส้ใหญ่ 1, 2 และด้วยคุณสมบัติเฉพาะตัวของ Oligosaccharide ทำให้มีการนำ Oligosaccharide มาใช้เป็นสารให้ความหวานที่ให้แคลอรี่ต่ำโดยใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารต่าง ๆ เช่น คุกกี้, ลูกกวาด, อาหารขบเคี้ยว, น้ำอัดลม.



n:1-3 n:1-4 n: 1 (raffinose) n: 2 (stachyose)

(a) Fructooligosaccharides (b) Galactooligosaccharides (c) Soybean oligosaccharides

รูปที่ 1. Oligosaccharide ชนิดต่างๆ.

Oligosaccharide แบ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ:

1) Malto - Oligosaccharide เป็นคาร์โบไฮเดรตที่เกิดขึ้นระหว่างการแตกตัวหรือการย่อยแป้ง. โดยมากจะอยู่รวมกับคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นๆ เช่น น้ำผึ้ง, Corn Syrup, มอลโทเด็กซ์ทริน เมื่อแตกตัวหรือถูกย่อยต่อไปในที่สุดจะให้กลูโคส.

2) Resistant Oligosaccharide (Non - Digestible Oligosaccharide)

2.1) Galactosylsucrose ประกอบด้วย Raffinose Stachyose และ Verbascose ยังไม่สามารถถูกย่อยโดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ได้ จึงผ่านเข้าสู่ลำไส้เล็ก.

2.2) Fructo-Oligosaccharide พบได้ในอาหารประเภทข้าวสาลี, ข้าวไรย์, หัวหอม, แอสพารากัส, Artichoke, กล้วย, ถั่วเหลือง Burdock และพืชประเภทพืชหัว. Fructo-oligosaccharides หรือ Oligofructose มีความหวานประมาณร้อยละ 30 ของน้ำตาลทราย, ไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ได้, แต่ถูกย่อยที่ลำไส้ใหญ่โดยเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งมีอยู่ตามปกติในลำไส้ใหญ่.

Oligosaccharide มีอยู่ทั่วไปในพืช, ผัก, ผลไม้ เช่น fructo-oligosaccharide. พบได้ในหัวหอม, กระเทียม, หน่อไม้ฝรั่ง และพืชอื่นๆ. ส่วน soybean oligosaccharide พบได้ในถั่วเหลือง. การบริโภค Oligosaccharide เป็นอาหารเสริม จึงเหมาะสำหรับผู้สูงอายุผู้ที่มีความเครียด หรือผู้ที่มีปัญหาเกี่ยวกับระบบย่อยอาหาร, เนื่องจากอายุและความเครียดมีผลต่อการลดจำนวนของ Bifidobacteria. ปัจจุบันได้มีการผลิต fructo-oligosaccharide เป็นอาหารเสริมในหลายประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา, ญี่ปุ่น.

1.2.4.2 อินนูลิน (Inulin)

เป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่พืชเก็บไว้เป็นอาหาร. พบในพืชมากกว่า 36,000 ชนิด, เช่น Chicory root, เห็ด, หัวหอม, หัวกระเทียม, กล้วย. แต่อินนูลินนี้ย่อยไม่ได้โดยน้ำย่อยในลำไส้, แต่สามารถย่อยได้โดยอาศัยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่. จากการย่อยอินนูลิน จะได้ฟรักโทสตามขนาดของโครงสร้าง. อินนูลินมีค่า DP (Degree of Polymerization) ประมาณ 10 และตามโครงสร้างจะมี Oligofructose ประกอบอยู่เป็นโครงสร้างกลุ่มย่อย. ในพืชต่างชนิดกัน จะมีปริมาณอินนูลินและ Oligofructose ที่ แตกต่างกัน.

1.2.4.3 โอลิโกแซ็กคาไรด์พรีไบโอติก (Oligosaccharide Prebiotic)

คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยและดูดซึมในลำไส้เล็ก จะผ่านเข้ามาที่ลำไส้ใหญ่ และเกิดกระบวนการหมักขึ้น โดยอาศัยแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้ใหญ่, ทำให้เกิดก๊าซไฮโดรเจน, มีเทน และคาร์บอนไดออกไซด์ และได้กรดไขมันสายสั้น (Short chain fatty acid) จำพวก Acetate, Propionate และ Butyrate และกระตุ้นให้แบคทีเรียมีการเจริญเติบโต (Bacterial Growth; Biomass). ก๊าซที่เกิดขึ้นจะถูกดูดซึมและขับออกทางลมหายใจ หรือทางทวารหนัก. กรดไขมันสายสั้น ซึ่งเป็นสารสำคัญที่ได้จากการหมักนี้ จะถูกดูดซึมและเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วในร่างกาย. กรดแอซีเทตจะถูกนำไปใช้โดยตับ, กล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่ออื่นๆ. กรด propionate ถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคสเพื่อนำไปใช้

ต่อไป และกรด Butyrate ถูกนำไปใช้เพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์, การแบ่งเซลล์ และการตายของเซลล์.

คาร์โบไฮเดรตประเภท Non-Starch Polysaccharide และ Resistant จะมีผลเพิ่มปริมาณกากอุจจาระและเกิดการขับถ่ายได้ง่าย. ทั้งนี้ ผลจะรุนแรงมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของ Non-Starch Polysaccharide แต่ละชนิด และถ้ามีกระบวนการหมักเกิดขึ้น จะเป็นการกระตุ้นให้แบคทีเรียมีการเจริญเติบโต (Biomass) มากขึ้น, ทำให้เป็นการเพิ่มปริมาณกากอุจจาระด้วย.

คาร์โบไฮเดรตที่ถูกหมักในลำไส้ใหญ่จะกระตุ้นให้แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตเร็วขึ้น และเป็นการเพิ่ม Biomass. เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญเติบโต แบคทีเรียนั้นจะสังเคราะห์โปรตีนจากกรดแอมิโนและเปปไทด์ และแอมโมเนีย. biomass ที่เพิ่มขึ้นนี้จะถูกขับถ่ายออกทางอุจจาระ, จึงทำให้ร่างกายขับถ่ายไนโตรเจนออกมากขึ้นด้วย. นอกจากนี้ มีการศึกษาพบว่า คาร์โบไฮเดรต Fructo-oligosaccharide สามารถไปเพิ่มแบคทีเรียชนิด Bifidobacteria และ lacto-bacilli ในลำไส้ได้. ขณะเดียวกันช่วยลดปริมาณแบคทีเรียชนิด Clostridium perfringen ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคได้ และยังทำให้การสร้างสารก่อมะเร็ง (Carcinogenesis) ในลำไส้ด้วย, จึงพบว่า ในปัจจุบันมีการบริโภค Fructo-oligosaccharides มากขึ้น. คาร์โบไฮเดรต เป็นอินทรีย์สารประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ($C_nH_{2n}O_n$) แบ่งได้ 3 ประเภทใหญ่ตามขนาดโครงสร้าง (Degree of Polymerization, DP) ดังแสดงในตารางที่ 1.

ตารางที่ 1. ปริมาณ Inulin และ Oligofructose ในอาหารชนิดต่างๆ (%)

อาหารชนิดต่างๆ	ปริมาณ Inulin	ปริมาณ Oligofructose
Onion (หัวหอม)	2 – 6	2 – 6
Jerusalem artichoke	16 – 20	16 – 20
Chicory (ชิโครี)	15 – 20	5 – 10
Asparagus (แอสพารากัส)	1 – 30	1 – 20
Leek (ต้นกระเทียม)	3 – 10	2 – 5
Garlic (กระเทียม)	9 – 16	3 – 6
Artichoke	3 – 10	< 1
Banana (กล้วย)	0.3 - 0.7	0.3 - 0.7
Wheat (ข้าวสาลี)	1 – 4	1 – 4
Rye (ข้าวไรย์)	0.5 – 1	0.5 – 1
Barley (ข้าวบาร์เลย์)	0.5 - 1.5	0.5 - 1.5
Dandelion	12 – 15	NA
Burdock	3.5 – 4	NA

<u>ปริมาณ Oligosaccharide ที่เหมาะสมและผลข้างเคียง</u>

ได้มีการศึกษาถึงปริมาณของ Oligosaccharide ที่มีผลต่อร่างกาย พบว่า ปริมาณที่เหมาะสม คือ 3 กรัมของ fructo-oligosaccharide, 2-2.5 กรัมของ galactooligosaccharide, 2 กรัมของ soybean oligosaccharide และ 0.7 กรัมของ xylo-oligosaccharide และพบว่า การบริโภค Oligosaccharide ในปริมาณมาก อาจทำให้เกิดอาการท้องเสียได้. นอกจากนี้ ยังได้มีการศึกษาถึงความเป็นพิษของ galacto-oligosaccharide ในหนูทดลอง พบว่า ค่า LD_{50} มีค่ามากกว่า 15 กรัม/กิโลกรัม และไม่พบความเป็นพิษเรื้อรัง เมื่อบริโภคติดต่อกันเป็นเวลานาน ดังแสดงในตารางที่ 2.

ตารางที่ 2. ความสัมพันธ์ระหว่างสารพิษ (toxic metabolite) ที่เกิดจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ และผลกระทบต่อร่างกาย

จุลินทรีย์	สารพิษ (toxic metabolites)	ผลกระทบต่อร่างกาย
		</TD< tr>
Escherichia coli และ	Ammonia	สารพิษในตับ
Clostridia	Amine	สารพิษในตับ
	Nitrosoamine	สารก่อมะเร็ง
	Phenol	สารส่งเสริมการเกิดมะเร็ง
	Indole	สารก่อมะเร็ง
	Aglycone	สารก่อกลายพันธุ์
	Secondary bile acid	สารก่อมะเร็งหรือส่งเสริมการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่
Bacteroidacea และ	Nitrosoamine	สารก่อมะเร็ง
Streptococcus faecalis	Aglycones	สารก่อกลายพันธุ์
	Secondary bile acid	สารก่อมะเร็งหรือส่งเสริมการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่
Proteus	Ammonia	สารพิษในตับ
	Amine	สารพิษในตับ
	Indole	สารก่อมะเร็ง

1.2.5 การสังเคราะห์ oligosaccharide โดยเอนไซม์จากจุลินทรีย์

Oligosaccharide เป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีความสำคัญ ซึ่งมีส่วนประกอบหลักเป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ สามารถนำไปใช้ทั้งทางด้านอุตสาหกรรมอาหารและทางด้านการแพทย์. ปัจจุบันมีความพยายามศึกษาและสังเคราะห์ oligosaccharide ชนิดใหม่ๆ เนื่องจาก มีความต้องการนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง. นักวิทยาศาสตร์สามารถสังเคราะห์ oligosaccharide ชนิดใหม่ๆ ได้ด้วยกรรมวิธีทางเคมีและการใช้วิธีทางชีวเคมีด้วยเอนไซม์.

การใช้เอนไซม์ในการสังเคราะห์ oligosaccharide กำลังเป็นที่สนใจอย่างมาก เนื่องจากมีข้อได้เปรียบหลายประการ. เอนไซม์ที่นิยมใช้ชนิดหนึ่ง คือ เอนไซม์จากจุลินทรีย์ เนื่องจากมีความหลากหลาย, ศึกษาได้ง่าย, เพิ่มผลผลิตได้ง่ายและรวดเร็วกว่าเอนไซม์จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น. สามารถทำได้โดยการย้อนกลับปฏิกิริยาของเอนไซม์จำพวกที่ปกติทำหน้าที่ย่อยสลายพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดต่างๆ ออกเป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็กๆ, แต่เมื่อจัดสภาวะพิเศษต่างไปจากปกติ จะสามารถบังคับให้เกิด

การรวมตัวกันของน้ำตาลโมเลกุลเล็กๆ ขึ้นเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีลักษณะแตกต่างออกไป โดยทำให้เกิดปฏิกิริยาในสภาพ low water content system ที่เรียกว่า Equilibrium-controlled synthesis และวิธีการสังเคราะห์แบบ Kinetically-controlled synthesis.

การผลิตน้ำตาลฟรักโท-โอลิโกแซ็กคาไรด์ในระดับอุตสาหกรรมเป็นกระบวนการผลิตทางเอนไซม์ โดยอาศัยเอนไซม์ fructosyltransferase และ β –fructofuranosidase ที่สามารถผลิตได้จากเชื้อรา *Aspergillus niger* ATCC 20611 (Hidaka *et al*. 1988) และ *Aureobasidium pullulans* KFCC 10524 (Jung *et al*. 1987, 1993; Yun and Song 1993; Yun *et al*. 1994). สำหรับน้ำตาลฟรักโท-โอลิโกแซ็กคาไรด์ ที่มีจำหน่ายอยู่ เป็นสารละลายน้ำตาลผสมที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส, ฟรักโทส และซูโครส ประมาณร้อยละ 40-45 และมีองค์ประกอบสูงสุดของน้ำตาลฟรักโท-โอลิโกแซ็กคาไรด์อยู่เพียงร้อยละ 55-60 เท่านั้น. ปัญหาสำคัญของกระบวนการผลิตคือ ภาวะยับยั้งของน้ำตาลกลูโคสที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ที่สังเคราะห์ฟรักโท-โอลิโกแซ็กคาไรด์ ซึ่งทำให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ไม่สามารถดำเนินต่อไปได้, จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้น้ำตาลซูโครสหลงเหลืออยู่ประมาณร้อยละ 10 (Jung *et al*. 1989).

การศึกษาการผลิตน้ำตาลฟรักโท-โอลิโกแซ็กคาไรด์ปริมาณสูง สามารถกระทำได้โดยการลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์ที่สังเคราะห์ฟรักโท-โอลิโกแซ็กคาไรด์, โดยการเติมเอนไซม์ glucose oxidase หรือ glucose isomerase. แต่พบว่า สภาวะการทำงานของเอนไซม์ glucose isomerase ไม่เหมาะกับสภาวะการทำงานของเอนไซม์ fructosyltrasferase (ที่ได้จาก *Aureobasidium pullulans* KFCC 10524) (Yun *et al*. 1993). แต่ในกรณีของเอนไซม์ผสมระหว่าง glucose oxidase และ β –fructofuranosidase (ที่ได้จาก *Aureobasidium pullulans* KFCC 10524) นั้น พบว่า ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจะสามารถผลิตน้ำตาลฟรักโท-โอลิโกแซ็กคาไรด์ปริมาณสูงได้ถึงร้อยละ 98 (Yun and Song 1993; Yun *et al*. 1994). *Aspergillus niger* ATCC 20611 จัดได้ว่าเป็นเชื้อราสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่สังเคราะห์ฟรักโท-โอลิโกแซ็กคาไรด์ในปริมาณสูง (Hidaka *et al*. 1988) เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการผลิตน้ำตาลฟรักโท-โอลิโกแซ็กคาไรด์. จากปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์นั้น น้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นซับสเตรตจะถูกเปลี่ยนเป็นสารผสมของฟรักโท-โอลิโกแซ็กคาไรด์ที่มีโครงสร้างแบบ 1F (1-β–fructofuranosyl)n–sucrose ที่มีจำนวน n = kestonse (GF2), nystone (GF3) และ fructofuranosyl nystone (GF4). สารผสมน้ำตาลที่ได้จากปฏิกิริยาเอนไซม์จะถูกทำให้บริสุทธิ์โดยกระบวนการแยกด้วยคอลัมน์แลกประจุ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สารผสมน้ำตาลฟรักโท-โอลิโกแซ็กคาไรด์ ที่มีปริมาณของ 1- kestonse (GF2) และ nystone (GF3) สูง ก่อนที่จะนำไปผ่านกระบวนการทำให้เข้มข้นในรูปของสารละลายน้ำตาลหรือผ่านกระบวนการทำแห้งให้เป็นผลิตภัณฑ์ผงต่อไป.

1.2.6 ประโยชน์ oligosaccharide

สำหรับประโยชน์โดยตรงของการบริโภค Oligosaccharide คือช่วยเพิ่มจำนวนของ Bifidobacteria และ Lactobacilli ซึ่งเป็น normal flora อยู่ในลำไส้. ส่วนประโยชน์ทางอ้อม ได้แก่.

1. ช่วยลดจำนวนของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค เนื่องจาก Bifidobacteria จะผลิตสารปฏิชีวนะและกรดไขมันออกมาช่วยควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและควบคุมจำนวนของ normal flora โดยกรดไขมันที่พบส่วนใหญ่จะเป็นกรดแอซีติกและกรดแล็กติก ซึ่งกรดเหล่านี้จะช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Clostridium perfringens*, *Salmonella spp.* และ *E. coli* ในลำไส้.

2. ช่วยลดอาการท้องผูก. กรดไขมันซึ่งผลิตโดย Bifidobacteria จะช่วยกระตุ้นการบีบตัวของลำไส้และเพิ่มความชื้นของอุจจาระ ซึ่งเป็นผลมาจากแรงดันออสโมติก.

3. ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด โดย *Lactobacillus acidophilus* ซึ่งเป็น normal flora อยู่ในลำไส้จะช่วยย่อยสลายคอเลสเตอรอล และยับยั้งการดูดซึมคอเลสเตอรอลผ่านผนังลำไส้.

4. ช่วยลดความดันโลหิต ได้มีการศึกษาถึงผลของ fructo-oligosaccharide ในผู้ป่วยที่มีระดับไขมันในเลือดสูง ที่บริโภค fructo-oligosaccharide เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์, พบว่า ความดันโลหิตลดลงโดยเฉลี่ย 6 mmHg และยังพบว่า ความดันโลหิตแปรผกผันกับจำนวนของ Bifidobacteria ในลำไส้อีกด้วย.

5. ช่วยเพิ่มวิตามินบางชนิด โดยพบว่า Bifidobacteria สามารผลิตวิตามิน B1, B2, B6, B12, nicotinic acid และ folic acid. นอกจากนี้ ยังช่วยเพิ่มการดูดซึมแคลเซียมในระบบย่อยอาหารอีกด้วย.

6. ช่วยลดปริมาณสารพิษและเอนไซม์ที่เป็นพิษจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรีย. แบคทีเรียที่เจริญอยู่ในร่างกายมนุษย์สามารถจะสร้างสารพิษจากกระบวนการเมแทบอลิซึมได้ ดังแสดงในตารางที่ 1. ได้มีการศึกษาถึงผลของ Oligosaccharide ทั้งใน *in vivo* และ *in vitro* พบว่า ถ้าใช้ Oligosaccharide เป็นซับสเตรตแก่จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารจะช่วยลดปริมาณสารพิษและเอมไซม์ที่เป็นโทษลงเฉลี่ยประมาณร้อยละ 44.6 และ 40.9.

7. ช่วยป้องกันการทำงานของตับ การลดปริมาณของสารพิษจากกระบวนการเมแทบอลิซึม เป็นผลให้ปริมาณสารพิษที่เข้าสู่ตับลดลงด้วย.

1.2.7 แลกโทซูโครส

แลกโทซูโครสเป็นน้ำตาล 3 โมเลกุล ที่มีหน้าที่เฉพาะ ถูกผลิตจากแลกโทส, ทำหน้าที่เป็นตัวรับ ในขณะที่ซูโครสทำหน้าที่เป็นตัวให้ froctosyl. โดยเซลล์ทั้งหมดเกิดกิจกรรม transfructosylation ของเอนไซม์ levansucrase Levansucrase-induced cells โดยใช้จุลินทรีย์

Paenibacill us polymyxa ซึ่งเป็นสารอาหารประกอบด้วยซูโครสและกิจกรรม transfructosylation ในเซลล์ทั้งหมดถูกทำให้เหมาะสมกับการผลิตแลกโทซูโครส, ความเข้มข้นของเซลล์ที่เหมาะสม, อัตราส่วนของซับสเตรต, อุณหภูมิ และ pH คือ 2.0%, 22.5% lactose 22.5 sucrose, 55 องศา-เซลเซียสและ 6, ตามลำดับ. ภายใต้สภาวะนี้เกิดการผลิตแลกโทซูโครสประมาณร้อยละ 17, ซึ่งใช้เวลาการทำปฏิกิริยา 6 ชั่วโมง มีอัตราการผลิต 2.8 %(w/v) ต่อชั่วโมง. อย่างไรก็ตาม นอกจากจุลิน-ทรีย์ดังกล่าว ยังมี *Bacillus subtilis* ที่มีความสามารถดังกล่าว,โดยใช้สภาวะดังต่อไปนี้ ใช้จุลินทรีย์ 2%, lactose 225 g., อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส, และpH 6, ซึ่งในสภาวะนี้สามารถผลิตน้ำตาลแลกโทซูโครสในปริมาณ 181 กรัม ภายใน 10 ชั่วโมง.

แลกโทซูโครสเป็นน้ำตาลตัวหนึ่งใน Fructo-oligosaccharides มีประโยชน์ต่อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร, โดยเป็นการเพิ่มภูมิคุ้มกันในระบบทางเดินอาหาร, ช่วยป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่, ช่วยในการดูดซึมแคลเซียม และแลกโทซูโครสอาจมี Favorable lipid effect. มีงานวิจัยหลายชิ้นที่แสดงให้เห็นว่าแลกโทซูโครสช่วยปรับปรุงสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหาร และป้องกันจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิด, โดยเฉพาะอย่างยิ่งลำไส้ใหญ่. แลกโทซูโครสกระตุ้นการเจริญเติบโต โดยเฉพาะ bifidobacteria, โดยมีปฏิกิริยามากมายเป็นประโยชน์ในแง่ของ dietary fiber (ใยอาหาร). ผลิตภัณฑ์นมหมักที่มีแลกโทซูโครสเป็นองค์ประกอบนั้น พบว่า ทำให้ LDL-cholesterol ต่ำในเพศชาย. จากการศึกษายังพบอีกว่า แลกโทซูโครสมีผลทำให้คอเลสเตอรอลและ Triglyceride มีระดับต่ำทั้งคู่. แลกโทซูโครสยังแสดงให้เห็นถึงระดับที่ต่ำของ hepatic lipogenesis. จากการศึกษาพบว่า การใช้แลกโทซูโครส 15 กรัม เป็นเวลา 20 วัน ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดและไขมันในเลือดลดลงสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และยังพบอีกว่า แลกโทซูโครสอาจยับยั้งมะเร็งลำไส้ใหญ่ในสัตว์ทดลองทั้ง familial adenomatous polyposis และ sporadic colon.

ปฏิกิริยาตอบสนองต่อการใช้แลกโทซูโครส, ถ้าใช้ในปริมาณมากกว่า 10 กรัม จะเกิดอาการของกระเพาะและลำไส้. ถ้าใช้ในปริมาณมากกว่า 30 กรัม สามารถทำให้เกิดแก๊สในกระเพาะและลำไส้. ถ้ามากกว่า 40 กรัม ทำให้เกิดอาการท้องอืดบวม. ถ้ามากกว่า 50 กรัม ทำให้เกิดท้องเสีย.

ปริมาณและการใช้แลกโทซูโครส มีประโยชน์ในรูปของ nutrition supplement และ functional food. ปริมาณการใช้ 4-10 กรัมต่อวันและบางครั้งอาจสูงกว่านั้น. ถ้าใช้มากกว่า 10 กรัมต่อวัน ดังนั้นจึงต้องคำนึงถึงปริมาณการใช้ด้วย (www.pdrhealth.com/drug_info).

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow)
2. เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อ (Shaker)
3. ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
5. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)
6. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter)
7. เครื่อง HPLC
8. Column แบบ KR 100-10 NH_2, 250 x 4.6 mm., Kromasil Bohus, Sweden
9. ถังหมักขนาดต่างๆ
10. ตู้อบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ
11. ตู้แช่อุณหภูมิต่ำ
12. เครื่องชั่งไฟฟ้า
13. เครื่อง Thermal shaker
14. เครื่อง Evaporator
15. Centrifuge แบบ Refrigerator
16. Sonicator
17. ซูโครส
18. แลกโทซูโครส
19. กลูโคส
20. ฟรักโทส
21. กาแลกโทส
22. ammonium sulfate
23. K_2HPO_4
24. KH_2PO_4
25. $MgSO_4$
26. Phosphate buffer (pH 6)
27. Acetonitrile

2.2 วิธีการ

2.2.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส

ทำการคัดเลือกจุลินทรีย์จากวัตถุดิบธรรมชาติที่คาดว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรนโนซิเดส ได้แก่ นม, นมเปรี้ยว, นมข้นหวาน, ชีส, แหนม, กุ้งจ่อม, เต้าเจี้ยว. โดยมีวิธีการดำเนินการ ดังนี้.

ขั้นที่ 1 ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการ โดยนำเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างวัตถุดิบธรรมชาติมาเลี้ยง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS Broth (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3. ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS Broth

หน่วย : กรัม/ลิตร

ส่วนประกอบ	ปริมาณ
Dextrose	20
Meat peptone	10
Beef extract	10
Yeast extract	5
Sodium acetate	5
Disodium phosphate	2
Ammonium citrate	2
Tween 80	1
Magnesium sulfate	0.1
Manganese sulfate	0.05

ขั้นที่ 2 แยกเชื้อจุลินทรีย์เป็นโคโลนีเดี่ยว โดยแยกเชื้อลงบน MRS agar หลังจากได้โคโลนีเดี่ยวแล้ว นำมาเพิ่มปริมาณเซลล์ในขั้นตอนต่อไป.

ขั้นที่ 3 ขั้นตอนเพิ่มปริมาณเซลล์ โดยใช้สารอาหารสูตร Modified MRS โดยมีเงื่อนไขการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ดังต่อไปนี้:

- เลี้ยงเซลล์จนจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจนถึง 0.8 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร.
- แยกเซลล์กับอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากกันโดยใช้ centrifuge ที่ 10,000 x ก. เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4°ซ.
- ล้างเซลล์ให้สะอาดด้วย phosphate buffer pH 6 จำนวน 2 ครั้ง.
- ทำให้เซลล์ทั้งหมดแตกโดยใช้ sonicator.

- แยกเซลล์ที่แตกแล้วหรือตะกอนเซลล์ โดยใช้ centrifuge ที่ 10,000 x ก. เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4°ซ.
- สารละลายส่วนใสที่ได้คือแหล่งของเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรนโนซิเดส.

2.2.2 ศึกษาอุณหภูมิและความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส (ที่ได้จากขั้นที่ 3)

- ทำการศึกษาความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมโดยใช้อุณหภูมิ 40°ซ. โดยเลือกใช้ความเป็นกรด-เบสดังต่อไปนี้ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 หลังจากที่ได้ทราบข้อมูลว่าความเป็นกรด-เบสใดเหมาะสมที่สุด จึงทำการทดลองเพื่อศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด.

- ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส โดยใช้ค่าความเป็นกรด-เบสจากการทดลองที่ผ่านมาโดยเลือกใช้อุณหภูมิต่างๆ ดังต่อไปนี้ 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 และ 70°ซ.

- ศึกษา Relative activity ของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส โดยศึกษาการผลิตน้ำตาลซูโครสหลังจากใช้อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสม เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยการคำนวณเปอร์เซ็นต์ Relative activity (%) ได้จากจุลินทรีย์ที่ผลิตปริมาณแลกโทซูโครสมากที่สุดให้มีค่าเป็น 100% ส่วนจุลินทรีย์ที่ผลิตได้ปริมาณแลกโทซูโครสน้อยกว่าจะมีค่าสัดส่วนที่น้อยลงแตกต่างกันไป.

- ศึกษาช่วงเวลาการผลิตแลกโทซูโครสของจุลินทรีย์ที่ดีที่สุด ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยศึกษาปริมาณของฟรักโทส กลูโคส แลกโทส ซูโครส และแลกโทซูโครส ทุก 2 ชั่วโมง จนปริมาณต่างๆ ไม่เปลี่ยนแปลง.

2.2.3 ศึกษาผลของแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส

ทำการทดลองโดยการแปรผันความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตที่ 0, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4% (โดยใช้ซูโครส 1.0% ยีสต์ 0.5%).

2.2.4 ศึกษาผลของเกลือแอมโมเนียมต่อการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรนโนซิเดส

การศึกษาผลของเกลือแอมโมเนียม ซึ่งเปรียบเทียบกับยีสต์เอ็กแทร็กต์เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)_2HPO_4$ และ NH_4NO_3, โดยการศึกษาครั้งนี้มีทั้งการเติมและไม่เติมสารละลายวิตามิน 1.0% ซึ่งประกอบด้วย biotin, pyridoxine.HCl, thiamine.HCl, riboflavin, p-aminobenzoic acid อย่างละ 0.01 กรัมในน้ำกลั่น 100 มล. (Atkinson และ Mavitune, 1983). การคำนวณปริมาณใช้ข้อมูลดังต่อไปนี้ *Bacillus subtilis* มีองค์ประกอบของไนโตรเจนเท่ากับ 5.37% แสดงว่าเซลล์หนึ่งกรัมมีส่วนประกอบของไนโตรเจนเท่ากับ 0.0537 กรัม, เมื่อกำหนดให้ผลได้มวลชีวภาพเท่ากับ 0.39 กรัมเซลล์/กรัมซูโครส (จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเบื้องต้นในฟลาสก์). แสดงว่าซูโครสหนึ่งกรัมผลิตมวลชีวภาพได้เท่ากับ 0.39 กรัมเซลล์, ฉะนั้นเมื่อใช้ซูโครสไป C_S กรัม (ในที่นี้ C_S = 2.5%) จะได้มวลชีวภาพเท่ากับ $0.39C_S$ กรัมเซลล์ ซึ่งคิดเป็นส่วนประกอบไนโตรเจนเท่ากับ $0.0209\ C_S$ กรัม ($0.0537 \times 0.39\ C_S$) ซึ่งเป็นปริมาณของไนโตรเจนที่จะต้องได้จากแหล่งไนโตรเจนในอาหารเพาะเชื้อ ได้แก่ ยีสต์เอ็กแทร็กต์ $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)_2HPO_4$ และ NH_4NO_3 ซึ่งมีส่วนประกอไนโตรเจนเท่ากับ 8.20 (Atkinson และ Mavitune, 1983) 19.81 20.72 และ 34.17% ตามลำดับ. ในทางปฏิบัติเพื่อป้องกันภาวะจำกัดของไนโตรเจนที่อาจเกิดขึ้นได้ระหว่างการเพาะเลี้ยง, จึงคำนวณให้ใช้ปริมาณแหล่งไนโตรเจนเพิ่มขึ้นอีก 20% จากปริมาณที่คำนวณได้.

2.2.5 การศึกษาการผลิตจุลินทรีย์ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

การเพาะเลี้ยงในถังหมัก เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์จากอาหารแข็งที่มีอายุ 3-4 วัน ลงในอาหารเหลวปริมาตร 125 มล. (ใช้ฟลาสก์ขนาด 250 มล.), ซึ่งมีองค์ประกอบเช่นเดียวกับอาหารเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อข้างต้น บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 280 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 28 °ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, จากนั้นถ่ายโอนลงในอาหารเพาะเชื้ออย่างเดียวกันที่มีปริมาตรรวมกันเท่ากับ 250 มล. ในฟลาสก์ขนาด 500 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 280 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 28 °ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, จากนั้นถ่ายโอนลงในถังหมักที่มีปริมาตรรวมกันแล้วเท่ากับ 5 ลิตร ซึ่งมีซูโครส 2.5% ยีสต์เอ็กแทร็กต์ 1.5% แมกนีเซียมซัลเฟต 0.2% และแอนติโฟม 0.1% ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต พีเอส 6.0 โดยควบคุมพีเอชคงที่ 6.0 ด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2.0 นอร์แมล และกรดฟอสฟอริก 2.0 โมลาร์ และควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ 28°ซ. ภายใต้ภาวะการให้อากาศ 1vvm และอัตราการกวน 600 รอบ/นาที, เก็บตัวอย่างทุกๆ 1.5-3 ชั่วโมง. ตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยง เพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นเซลล์, ซูโครส, กิจกรรมเอนไซม์ และแหล่งไนโตรเจน.

วิธีวิเคราะห์ค่าต่างๆ จากการทดลอง

1) การวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรต

ความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดต่างๆ (galactose, glucose, fructose, lactose, sucrose และ lactosucrose วัดความเข้มข้นโดย HPLC โดยใช้เครื่องตรวจจับสัญญาณแบบ retractive index, คอลัมน์แบบ Kromasil amine column (KR-100 NH_2 250 x 4.6 mm.) และ eluted ที่ 40 องศา-เซลเซียส ด้วย 80% (ปริมาตร/ปริมาตร) acetonitrile อัตรา 1 มิลลิลิตร/นาที.

2) วิเคราะห์ความเข้มข้นเซลล์ วิเคราะห์เป็นน้ำหนักแห้งเซลล์ โดยวิธีอบที่อุณหภูมิ 105°ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.

3) วิเคราะห์ความเข้นข้นซูโครส วิเคราะห์ด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก (Dobois *et al*. 1956) โดยใช้ซูโครสเป็นน้ำตาลมาตรฐานที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0-100 ไมโครกรัม/มล.

4) วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส สามารถวิเคราะห์ได้จากการนิยามหนึ่งหน่วยเอนไซม์ให้เท่ากับปริมาตรของกลูโคส 1 ไมโครโมลต่อนาที ที่เกิดจากปฏิกิริยาเอนไซม์ภายใต้สภาวะที่กำหนดคือ พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 60 °ซ. ระยะเวลา 10 นาที, หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์โดยการเติมสารละลาย DNS และต้มในน้ำเดือด 100°ซ. เป็นเวลา 5 นาที และวัดปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาเอนไซม์ โดยการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยสารละลาย 3,5 dinitrosalicylic acid (Borel *et al*. 1952) กิจกรรมเอนไซม์นอกเซลล์จะวิเคราะห์เฉพาะส่วนใสของน้ำหมักหลังการกรอง ส่วนกิจกรรมเอนไซม์ในเซลล์จะวิเคราะห์เฉพาะส่วนของเซลล์ที่ผ่านการกรอง โดยนำเซลล์ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ก่อนทำให้เซลล์แตก ด้วยการแช่แข็งและละลายซ้ำจำนวน 2 ครั้ง พร้อมกับใช้ Sonicator.

5) วิเคราะห์ความเข้มข้นไนโตรเจน โดยประยุกต์วิธีการหาแอมโมเนียมของ Weatherburn (1967) โดยใช้ไดแอมโมเนียมซัลเฟต, ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และแอมโมเนียมไน-เทรตเป็นสารมาตรฐาน ซึ่งมีความเข้มข้นตั้งแต่ 0-40 ไมโครกรัม/มล. ส่วนความเข้มข้นไนโตรเจนจากยีสต์เอ็กแทร็กต์วิเคราะห์ด้วยวิธี Ninhydrin (Moore and Stein 1954) โดยใช้ยีสต์เอ็กซ์แทรกต์ (ความเข้มข้น 0-200 มิลลิกรัม/มล.) เป็นสารมาตรฐาน.

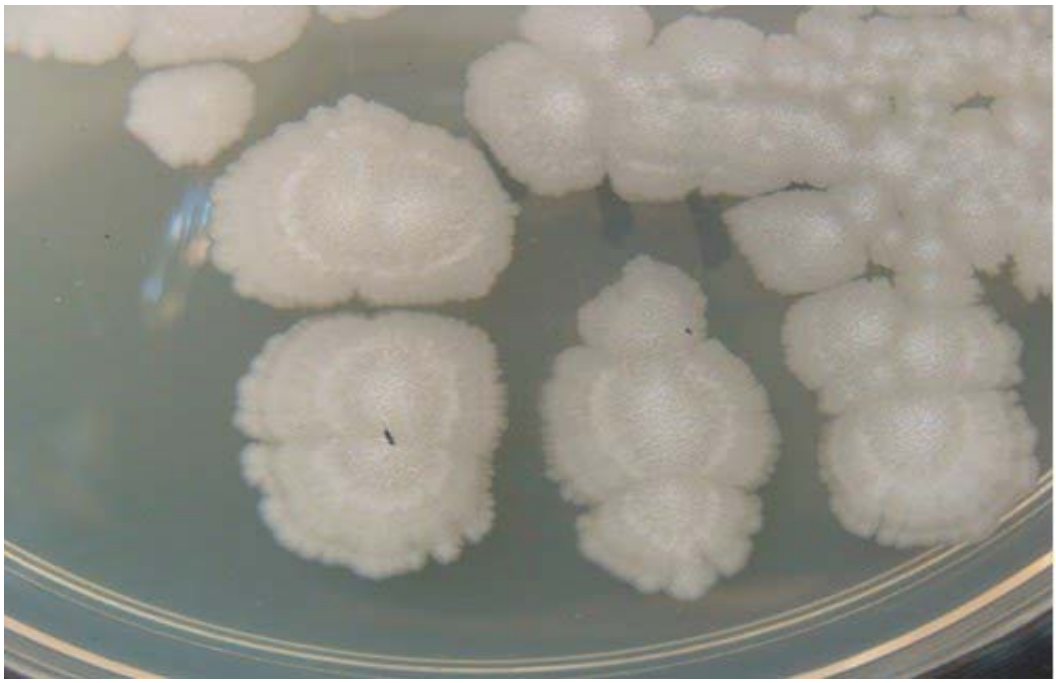
3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส

จากตัวอย่างอาหารทั้งหมด, แยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 148 ไอโซเลต จาก 148 ไอโซเลต. นำมาศึกษาถึงการทดสอบการใช้น้ำตาลแลกโทส พบว่า มีเพียง 12 ไอโซเลตเท่านั้นที่ใช้น้ำตาลแลกโทสได้, ได้ถูกนำมาทดสอบการสร้างเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส พบว่า มีเพียง 9 ไอโซเลตที่มีการสร้างเอนไซม์ดังกล่าว. โดยสารละลายที่ใช้ทดสอบกิจกรรมเอนไซม์บีตา-ฟรักโท-ฟูเรโนซิเดส คือ ซูโครส 0.1 โมลาร์, แลกโทส 0.1 โมลาร์. โดยนำสารละลายจากการทำให้เซลล์แตกมาทดสอบในปริมาณ 2% (w/v) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์. หลังจากนั้นนำเชื้อทั้งหมดมาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ พบว่า *Bacillus subtilis* SM12 เป็นแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ที่สังเคราะห์ฟรักโท-โอลิโกแซ็กคาไรด์คือ แลกโทซูโครส ซึ่งเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสเป็นองค์ประกอบ. สอดคล้องกับรายงานของ Park *et al.* (2005) ที่รายงานว่าสามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการสังเคราะห์แลกโทซูโครสได้. ในขณะที่ก่อนหน้านั้น Hidaka *et al*. (1988) ได้รายงานการค้นพบเชื้อราที่มีความสามารถเดียวกัน ได้แก่ *Aspergillus niger* ATTC 20611 ที่สามารถสังเคราะห์ฟรักโท-โอลิโกแซ็กคาไรด์ได้ดี เมื่อเจริญเติบโตในอาหารที่มีซูโครส, *Bacillus subtilis* SM12 มีอัตราการผลิตเอนไซม์ (productivity) ที่สูงสุดอีกด้วย. นอกจากนี้ ยังพบว่า เอนไซม์ที่สกัดออกมาสามารถ transfructosylation ได้ดีที่สุดที่ความเป็นกรด-เบส ที่ 6.0 และอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 50^{o}ซ. ในขณะที่ เชื้อที่ใช้ในกระบวนการ transfructosylation ได้ดีเป็นอันดับรองลงมา ได้แก่ เชื้อ *Bacillus subtilis* ML 7 ซึ่งแยกได้จากนมที่มีคุณสมบัติในการสร้างเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส แสดงดังรูปที่ 2, 3 และ 4.

รูปที่ 2. ตัวอย่างอาหารที่ใช้แยกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรนโนซิเดส.

รูปที่ 3. เชื้อจุลินทรีย์บางส่วนที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารชนิดต่างๆ.



รูปที่ 4. เชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* SM12 ที่แยกได้จากนมข้นหวาน.

3.2 อุณหภูมิและความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์บีตา-ฟรักโท-ฟูเรโนซิเดสและปริมาณแลกโทซูโครสที่เกิดขึ้น

3.2.1 การศึกษาอุณหภูมิและความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์บีตา-ฟรักโท-ฟูเรโนซิเดส

การผลิตแลกโทซูโครสในสภาวะที่เหมาะสมที่สุดทดสอบได้ โดยการใช้เซลล์ทั้งหมดของจุลินทรีย์ทั้ง 9 ไอโซเลต ดังที่กล่าวมา (ดังตารางที่ 4). การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ จากช่วงความเป็นกรด-เบส 4.0-5.0, โดยมีค่าเพิ่มขึ้นขั้นละ 0.5 และช่วงอุณหภูมิที่ 20-70 ^{o}ซ. โดยมีค่าเพิ่มขึ้นขั้นละ 10 ^{o}ซ. จากจุลินทรีย์ทั้งหมด 9 ไอโซเลต สามารถผลิตแลกโทซูโครสได้ในช่วงค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 6.0 (ตารางที่ 4). ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตแลกโทซูโครสอยู่ในช่วง 40-50 ^{o}ซ.

ตารางที่ 4. ค่าความเป็นกรด-เบส และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์บีตา-ฟรักโท-ฟูเรโนซิเดส ที่แยกจากจุลินทรีย์ 12 สายพันธุ์

ชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์	ค่าความเป็นกรดด่าง	อุณหภูมิ
Bacillus subtilis (SM 12)	6.0	50
Bacillus subtilis (ML 7)	6.0	50
Bacillus subtilis (CH 5)	6.0	40
Bacillus sp. (FP 14)	6.0	50
Padiococcus sp. (FS 28)	6.0	50
Lactobacillus plantarum (DY 2)	6.0	40
*Aspergillus niger (*SC 11)	6.0	40
Aspergillus niger (ML 21)	ไม่พบ	ไม่พบ
Aspergillus niger (CH 9)	6.0	50
Rhizopus sp (SP 2)	ไม่พบ	ไม่พบ
Saceharomyces cerevisiae (Y 90)	ไม่พบ	ไม่พบ
Aspergillus niger (TISTR)	6.0	50

3.2.2 การผลิตแลกโทซูโครส *Bacillus subtilis* SM12 ภายใต้ความเป็นกรด-เบสที่ 6.0 และอุณหภูมิ 50 ^{o}ซ.

แลกโทซูโครสผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์โดยการใช้ซูโครสความเข้มข้น 0.1 โมลาร์และแลกโทสความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ตารางที่ 5). จากจุลินทรีย์ทั้ง 9 ไอโซเลต พบว่า *Bacillus subtilis* SM12 มีการผลิตแลกโทซูโครสมากที่สุดคือ 14 กรัม/ลิตร, ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 6.0 และอุณหภูมิ 50^{o}ซ. Choi *et al*. (2004) ได้รายงานว่า มีการผลิตแลกโทซูโครสที่มากที่สุด ซึ่งผลิตได้จาก *Paenibacillus polymyxa*. โดยสารละลายที่ใช้ทดสอบคือ แลกโทส 225 กรัม/ลิตร ร่วมกับซูโครส 225 กรัม/ลิตร, ซึ่งเป็นความเข้มข้นเดียวกันกับช่วงเวลาของการผลิตแลกโทซูโครส โดยใช้ *Bacillus subtilis* SM12 เลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสมภายใต้สภาวะดังกล่าว สามารถผลิตแลกโทซูโครสได้ 180 กรัม/ลิตร ภายในเวลา 10 ชั่วโมง. ดังนั้น อัตราการผลิตเอนไซม์คือ 18 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง. ถ้าปล่อยปฏิกิริยาให้เกิดขึ้นต่อไปนานกว่านี้ ระดับของแลกโทซูโครสจะยังคงที่. จากผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่า แลกโทซูโครสที่เกิดขึ้นโดยกระบวนการ transglycosylation ของเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดสไม่สารารถแตกสลายพันธะของน้ำตาลซูโครสได้อีก, ดังนั้น ระดับน้ำตาลแลกโทซูโครสจะมีระดับคงที่. ความเข้มข้นของแลกโทซูโครสที่ได้จากการทดลองนี้สูงกว่าในรายงานของ Piligrim *et al*. (2001) ซึ่งรายงานว่า *Arthrobacter sp* K1 มีความสามารถในการผลิตแลกโทซูโครสมากกว่า 100 กรัม/ลิตร.

ตารางที่ 5. กิจกรรมของการผลิตแลกโทซูโครสในสภาวะที่เหมาะสม

ชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์	เอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส
Bacillus subtilis (SM 12)	100
Bacillus subtilis (ML 7)	92
Bacillus subtilis (CH 5)	87
Bacillus sp. (FP 14)	55
Padiococcus sp. (FS 28)	18
Lactobacillus plantarum (DY 2)	41
*Aspergillus niger (*SC 11)	26
Aspergillus niger (ML 21)	ไม่พบ
Aspergillus niger (CH 9)	25
Rhizopus sp (SP 2)	ไม่พบ
Saceharomyces cerevisiae (Y 90)	ไม่พบ
Aspergillus niger (TISTR)	12

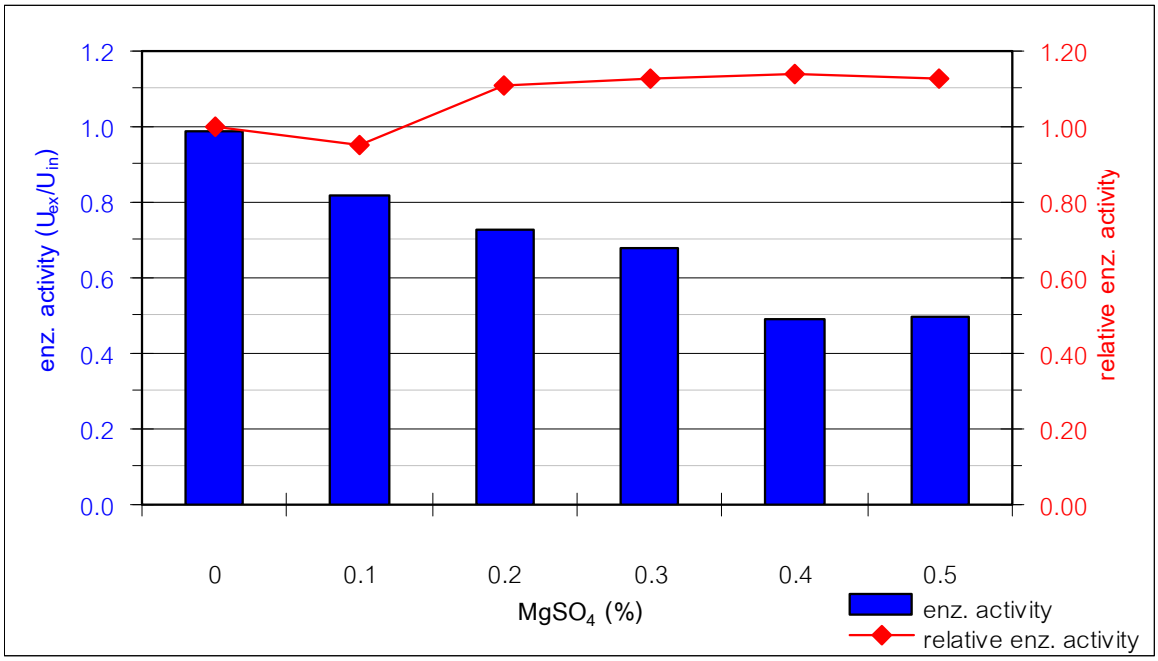
3.3 ผลของแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส

แมกเนเซียมมีผลต่อการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของรา (Burnett and Trinci 1979) ซึ่งมีผลต่อการสร้างเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดสที่อยู่ภายในเซลล์. นอกจากนี้ Jung *et al*. (1987) ยังได้เปรียบเทียบแหล่งของเกลือแร่ต่างๆ พบว่า เกลือแมกเนเซียมซัลเฟตให้ผลดีที่สุดต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ฟรักโทซิลทรานสเฟอเรสใน *Aurebasidium pullulans* KF cc 10245. ดังนั้น จึงหาระดับของแมกเนเซียมที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดสใน *Bacillus subtilis* SM12. ได้ทดลองโดยทำการผันแปรความเข้มข้นของแมกเนเซียมซัลเฟตตั้งแต่ระดับ 0.0–0.5% เพื่อศึกษาความผันแปรของกิจกรรมของเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดสใน *Bacillus subtilis* SM12.

จากผลการศึกษา พบว่า การเพิ่มปริมาณเกลือแมกเนเซียมมีผลให้อัตราของเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดสระหว่างภายนอกเซลล์และภายในเซลล์ลดลงเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของแมกเนเซียมซัลเฟตร้อยละ 0.4. ในขณะที่เอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดสทั้งหมดเพิ่มขึ้นปีน 1.14 เท่า (รูปที่ 5). จากผลการทดลอง พบว่า จุลินทรีย์มีความสามารถในการปลดปล่อยเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดสที่สังเคราะห์ขึ้นภายในเซลล์ออกสู่นอกเซลล์ลดลง, ในขณะที่เอนไซม์ภายในเซลล์สูงขึ้น. นอกจากนี้ เกลือแมกเนเซียมยังช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโท-ฟูเรโนซิเดสทั้งหมดเพิ่มขึ้น. ผลการทดลองของ Jung *et al*. (1987) แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือแมกเนเซียมจากร้อยละ 0.05–0.2 ทำให้เอนไซม์ภายในเซลล์สูงขึ้นร้อยละ 140, แต่

ไม่มีผลกระทบต่อการผลิตเอนไซม์ทั้งหมดในทางลดลง และเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นเกลือแมกเนเซียมเพิ่มขึ้นสูงกว่าร้อยละ 0.4, เอนไซม์ภายในเซลล์กลับมีแนวโน้มคงที่ไม่เปลี่ยนแปลง.

จากการทดลองนี้ จึงได้เลือกปริมาณตวามเข้มข้นของเกลือแมกเนเซียมซัลเฟตเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* SM12 เท่ากับร้อยละ 0.4 เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่ทำให้การผลิตเอนไซม์ทั้งหมดเพิ่มขึ้น 1.13 เท่า และมีผลกระทบต่อการปลดปล่อยเอนไซม์ออกนอกเซลล์ไม่มากนัก (อัตราส่วนลดลงเหลือร้อยละ 49). ดังนั้น จึงได้มีการปรับปรุงสูตรอาหารใหม่โดยมีการเพิ่มแมกเนเซียมซัลเฟตเป็นร้อยละ 0.4 (ดังตารางที่ 6).



รูปที่ 5. ผลของแมกนีเซียมซัลเฟตต่อการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส.

ตารางที่ 6. ผลของแมกเนเซียมซัลเฟตต่อการผลิตเอนไซม์ภายนอกเซลล์/การผลิตเอนไซม์ภายในเซลล์และรีเลทีฟเอนไซม์แอกทิวิตีของเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส โดย *Bacillus subtilis* SM12

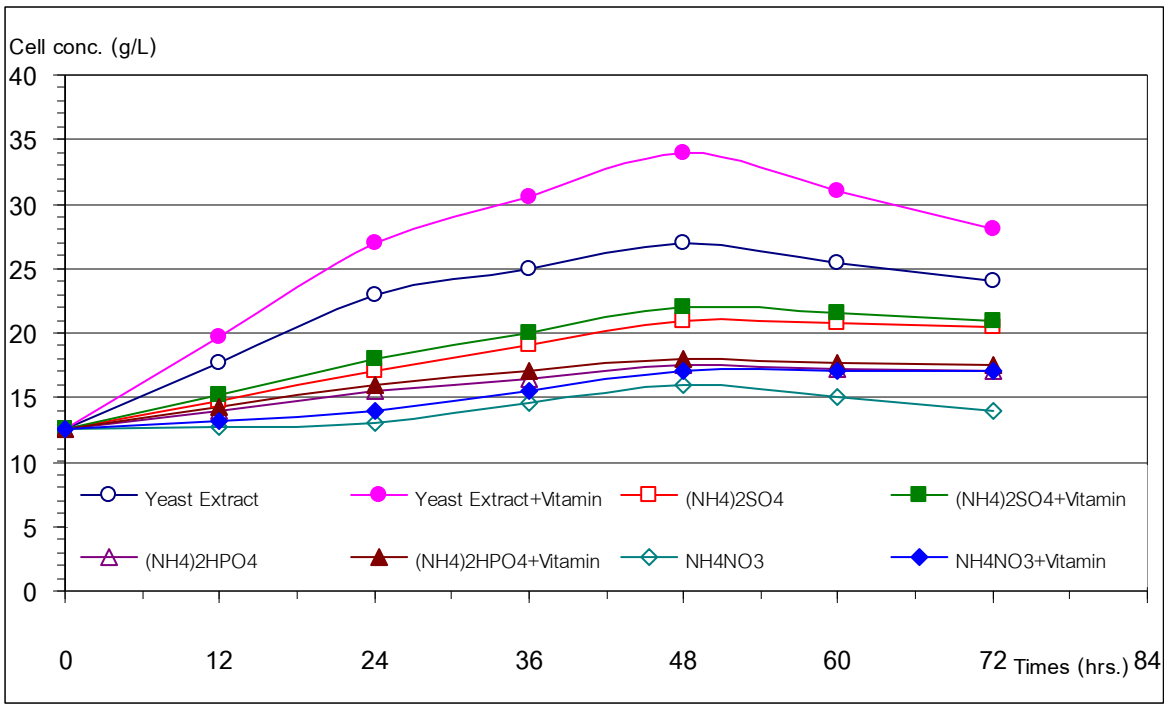
$MgSO_4$ (%)	Enzyme activity	
	Uex/Uin	Relative activity
0	0.99	1.00
0.1	0.82	0.95
0.2	0.73	1.11
0.3	0.68	1.13
0.4	0.49	1.14
0.5	0.5	1.13

หมายเหตุ : Uex คือ การผลิตเอนไซม์ภายนอกเซลล์
Uin คือ การผลิตเอนไซม์ภายในเซลล์

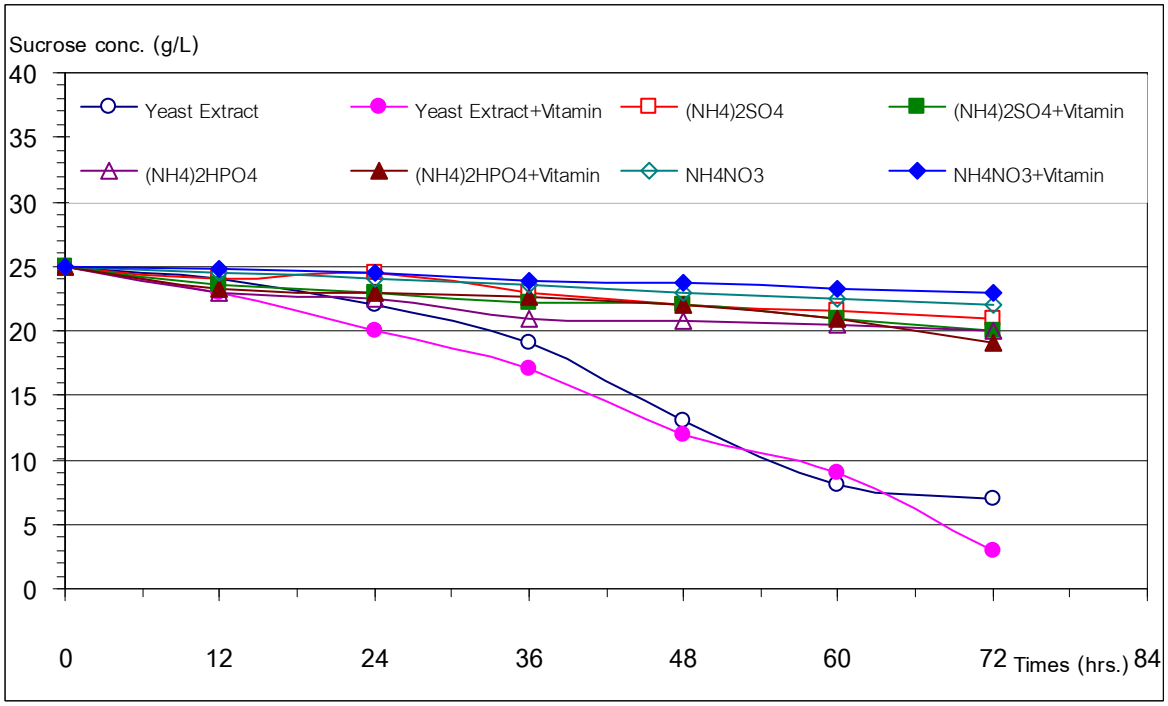
3.4 ผลของเกลือแอมโมเนียมต่อการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรนโนซิเดส

การทดลองนี้เป็นการศึกษาถึงการใช้เกลือแอมโมเนียม 3 ชนิด เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทนยีสต์เอกซ์แทรกต์ ซึ่งปกติแล้วใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และศึกษาผลของเกลือแอมโมนียมชนิดต่างๆ ที่ผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส โดย *Bacillus subtilis* SM12.

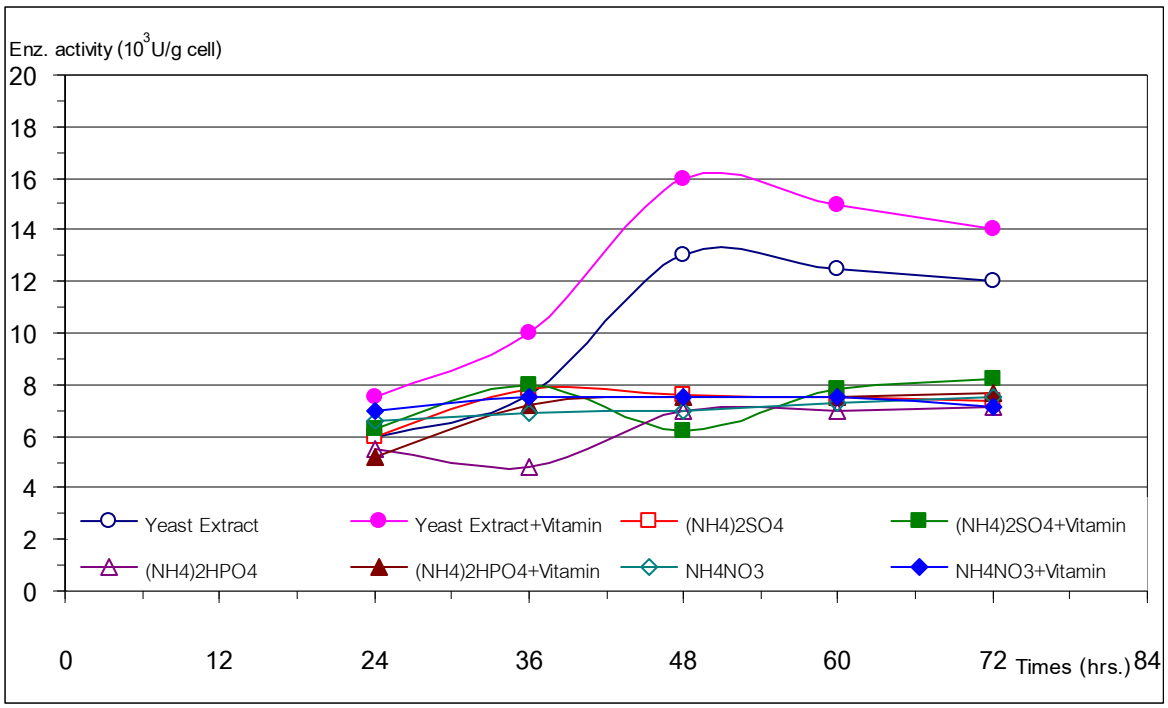
จากผลการทดลอง (รูปที่ 6, รูปที่ 7 และรูปที่ 8) พบว่า เกลือแอมโมเนียมทั้ง 3 ชนิด ที่ใช้ทดสอบไม่เหมาะสมที่จะใช้ทดแทนยีสต์เอกแทรกต์ เนื่องจากจะทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะลดลง, ตลอดจนได้อัตราการผลิตเอนไซม์ต่ำลง. เมื่อใช้ยีสต์แอกแทรกต์และเติมสารละลายวิตามินจะได้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.0267 กรัม/ชั่วโมง, ได้ปริมาณเอนไซม์ $6.22x10^3$ หน่วย/กรัมซูโครส และอัตราการผลิตเอนไซม์ 3.75 หน่วย/กรัมเซลล์/ชั่วโมง สูงสุด. การเติมวิตามินสามารถเพิ่มการเจริญเติบโตและส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ให้ดีขึ้นในทุกกรณีของการศึกษาครั้งนี้.



รูปที่ 6. การเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนโดยใช้เกลือแอมโมเนียมร่วมกับการเติมสารละลายวิตามินที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Bacillus subtilis* SM 12.



รูปที่ 7. การเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนโดยใช้เกลือแอมโมเนียมร่วมกับการเติมสารละลายวิตามินที่มีผลต่อการใช้น้ำตาลซูโครสของ *Bacillus subtilis* SM 12.



รูปที่ 8. การเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนโดยใช้เกลือแอมโมเนียมร่วมกับการเติมสารละลายวิตามินที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส.

3.5 การศึกษาการผลิตจุลินทรีย์ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

การศึกษาการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส ในถังหมักยังคงใช้สูตรอาหารเดิมคือใช้ยีสต์เอกซ์แทรกต์เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่ไม่มีการเติมสารละลายวิตามินเพิ่ม, เนื่องจากอุตสาหกรรมการผลิตเชื้อจุลินทรีย์มีความจำเป็นต้องเติมวิตามิน ซึ่งจะทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น.

จากการศึกษาเบื้องต้นของการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดสในถังหมักขนาด 5 ลิตร เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์ในสภาวะที่สามารถควบคุมปัจจัยต่างๆ ได้อย่างแม่นยำ ภายใต้การควบคุมอย่างต่อเนื่อง, ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-เบส 5.0, ภายใต้การเติมอากาศที่เพียงพอต่อการเพาะเลี้ยงแบบใช้ออกซิเจน เพื่อจะให้ *Bacillus subtilis* SM12 ผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส ทั้งภายในแซลล์และปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์.

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า การเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* SM12 ในถังหมัก ทำให้อัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเป็น 0.0414 กรัม/ชม. ซึ่งสูงกว่าการเลี้ยงในฟลาสก์มาก, รวมทั้งได้เอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส 70.11 หน่วย/กรัมซูโครส และอัตราการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโน

ซิเดส 1.82 x 10^3 หน่วย/กรัมเซลล์/ชม. สูงขึ้น (ตารางที่ 7). จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การควบคุมการเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะดังกล่าวอย่างแม่นยำ จะช่วยให้อัตราการเจริญเติบโตและอัตราการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดสเพิ่มขึ้นได้เป็นอย่างมาก.

ตารางที่ 7. การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส ระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าขวดและแบบการเพาะเลี้ยงแบบ fermenter ของ *Bacillus subtilis* SM12

Parameter	Shaking flask	fermenter
Specific growth rate (g/h)	0.0224	0.0414
Enzyme activity (103 U/g)	6.19	70.11

4. สรุปผลการทดลอง

1. จากการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรนโนซิเดส ในตัวอย่างอาหารทั้งหมดแยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 148 ไอโซเลต พบว่า มีเพียง 9 ไอโซเลต ที่มีการสร้างเอนไซม์ดังกล่าว. หลังจากนั้น นำทั้ง 9 ไอโซเลต มาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ พบว่า *Bacillus subtilis* SM 12 ซึ่งแยกได้จากนมข้นหวาน ตรวจพบการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส ได้มากที่สุด.

2. อุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์บีตา-ฟรักโท-ฟูเรโนซิเดสจาก *Bacillus subtilis* SM 12 คือ ความเป็นกรด-เบสที่ 6.0 และอุณหภูมิ 50°ซ.

3. ระดับของแมกเนเซียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส ทั้งภายนอกและภายในเซลล์ (ปริมาณเอนไซม์รวม) คือ ร้อยละ 0.4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ.

4. ผลของเกลือแอมโมเนียมต่อการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรนโนซิเดส พบว่า จากการศึกษาเกลือแอมโมเนียม 3 ชนิด ทั้ง $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)_2\ HPO_4$ และ NH_4NO_3 ไม่เหมาะสมที่จะใช้ทดแทนยีสต์แอกแทรกซ์.

5. การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ ทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและปริมาณเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดส เพิ่มขึ้น.

5. ผลการศึกษาเบื้องต้นทางด้านตลาดและผลกระทบโครงการ

ผลกระทบด้านเศรษฐกิจ

1. ลดการนำเข้าสารให้ความหวานซึ่งมีราคาแพงจากต่างประเทศ.

2. ถ้าส่งเสริมให้เกิดเป็นอุตสาหกรรมภายในประเทศจะส่งผลให้ผู้บริโภคสารมารถบริโภคสารให้ความหวานในราคาที่ต่ำลง.

3. อุตสาหกรรมที่ผลิตอาหารและเครื่องดื่มสามารถใช้สารให้ความหวาน : แลกโทซูโครสเป็นส่วนประกอบทดแทนน้ำตาลได้.

ผลกระทบด้านสังคม

1. เป็นทางเลือกสำหรับผู้บริโภคสารให้ความหวานที่ไม่ให้พลังงาน เพื่อหลีกเลี่ยงภาวะการมีน้ำตาลมากเกินไป ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอ้วน, โรคทันตกรรม, โรคเบาหวาน, เป็นต้น.

2. เป็นการใช้ทรัพยากรทางชีวภาพของประเทศให้เกิดประโยชน์ทางโภชนาการ.

ผลกระทบด้านสังคม

1. เป็นเทคโนโลยีที่ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม.

6. ข้อเสนอแนะ

1. การพัฒนาจุลินทรีย์ให้สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์บีตา-ฟรักโทฟูเรโนซิเดสได้มากขึ้น ทำได้โดยใช้ใช้เทคโนโลยีทางพันธุวิศวกรรม, ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการผลิตเชิงการค้า.

2. อุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทรายสามารถใช้เทคโนโลยีการผลิตแลกโทซูโครสเป็นสารให้ความหวาน ซึ่งมีมูลค่าสูงกว่าน้ำตาลทราย.

3. อุตสาหกรรมผลิตอาหารและเครื่องดื่มสามารถใช้สารให้ความหวาน : แลกโทซูโครสเป็นส่วนประกอบทดแทนน้ำตาลทราย.

7. เอกสารอ้างอิง

Borel, E., Hostettler F. and Denel, H., 1952. *Helv. Chim. Acta*, **35**, p. 115.

Burnett, J. H. and Trinci, A. P. K., 1979. Fungal walls and hyphal growth. London: Cambridge University Press. Dobois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal. Chem.,* **28**, pp. 350-356.

Hidaka, H., Eida, T., Takizawa, T., Tokunaga, T. and Tashiro, Y., 1986. Effect of fructo-oligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora*. **5**, pp. 37-50.

Hidaka, H., Hirayama, M. and Sumi, N., 1988. A fructo-oligosaccharide producing enzyme from *Aspergillu sniger* ATCC 20611, *Agric. Biol. Chem*, **52**, pp. 1181-1187.

Jung, H. K., Lim, J. Y., Yoo, S. J., Lee, J.. H. and Yoo. M. Y., 1987. Production of fructosyl transferase from Aureobasidum pullulans, *Biotechnol. Lett*., **9**, 703-708.

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

Jung, K. H., Yun, J. W., Kang, K. R., Lim, J. Y. and Lee, J. H., 1989. Mathematial model for enzymatic production of fructo-oligosaccharides from sucrose, *Ezyme Microb. Tehnol*., **11**, pp. 491-494.

Kohmoto, T., Fukui, F., Tanaka, H.and Mitsuoka, T., 1991. Dose-response test of isomalto-oilgosaccharides for increasing fecal Bifidobacteria, *Agric. Biol. Chem.,* **55**, pp. 2157-2459.

Moore, S. and Stein, W. H., 1954. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds, *J. Biol. Chem.*, **211**, pp. 907-913.

Oku, T., Tokunaga, T. and Hosoya, N., 1984. Nondigestibity of a new sweetener “neo sugars” in the rat, *J. Nutr*., **114**, pp. 1574-1581.

Park N. H., Choi, H. J. and Oh, D. K., 2005 Lactosucrose production by various micrcorganisms harboring levansucrase activity. Department of Bioscience and Biotechnology. Seoul, Korea Sejong University, pp. 143-147.

Wada, K., Watanabe, J. Mizutani, J., Tomoda, M., Suzuki, H. and Satoh, Y., 1992. Effect of Soybean oligosaccharides in a beverage on human fecal and metabolites, *Nippon Nogeikagaku Kaishi.*, **66**, pp. 127-135.

Weatherburn, M. W., 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia, *Anal. Chem*., **39**, pp. 971-974.

Yun, J. W. and Song, S. K., 1993. Production of high-content fructo-oligosaccharides by the mixed-enzyme system of fructosyltransferase and glucose oxidase, *Biotechnol. Lett.*, **15**, pp. 573-576.

Yun, J. W., Noh, J. S., Lee, M.G. and Song, S. K., 1993. Production of fructo-oligosaccharides by the mixed-enzyme system of fructosyltransferase and glucose isomerase, *J. Korean Inst. Chem. Eng.,* **31**, pp. 846-851.