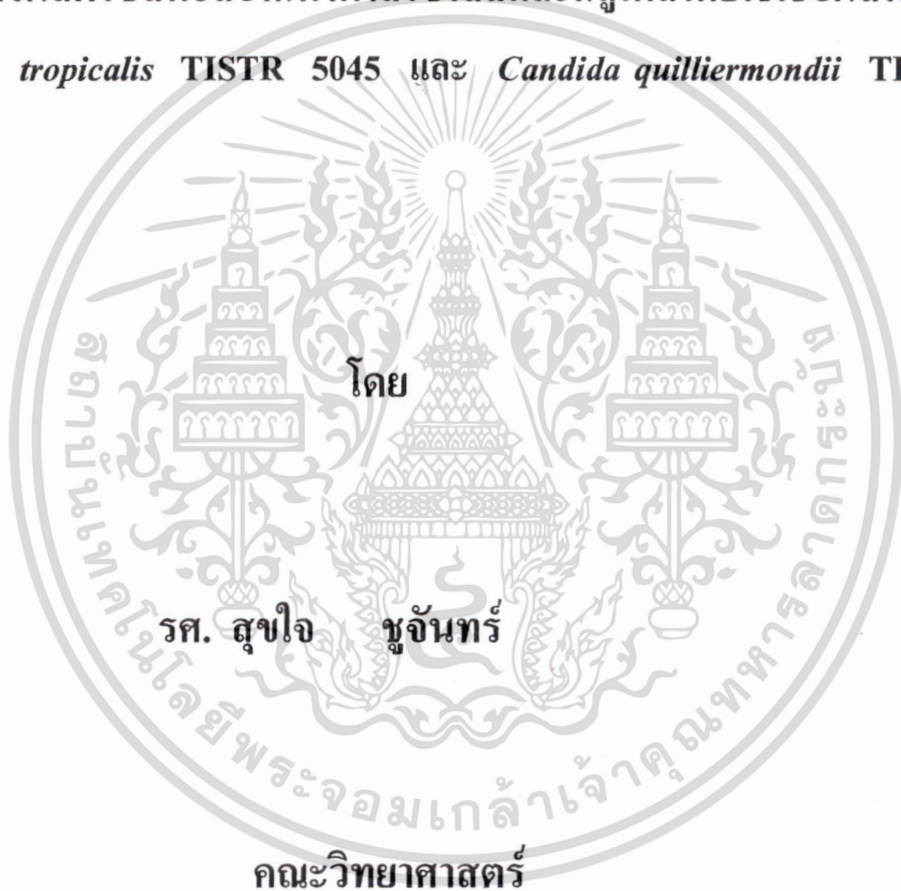


สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานผลโครงการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2545

เรื่อง

การผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสและกลูโคสโดยใช้เชื้อผสมของ
Candida tropicalis TISTR 5045 และ *Candida quilliermondii* TISTR
5026



สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RC4
OP
408
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 54578
วัน,เดือน,ปี 21 ส.ค. 2548

b. 113A7536
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

บทคัดย่อ	หน้า ก
Abstract	๗
ตรวจเอกสาร	3-33
อุปกรณ์และวิธีการ	34-37
ผลการทดลองและวิจารณ์	38-42
สรุปผลการทดลอง	43
เอกสารอ้างอิง	44-46
ภาคผนวก	47-60



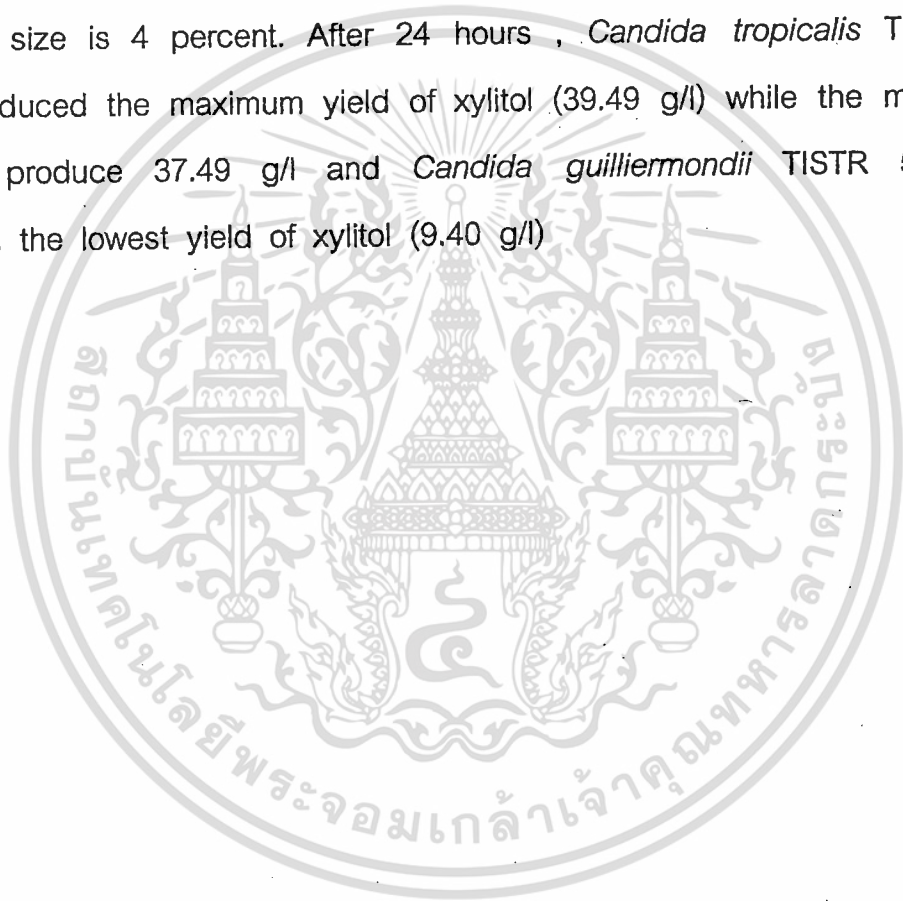
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

การศึกษา การผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสและกลูโคสโดยใช้เชื้อผสมของ *Candida tropicalis* TISTR 5045 และ *Candida quilliermondii* TISTR 5026 พบว่าการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไซลิทอลของเชื้อผสมเมื่อใช้สารอาหารของแต่ละเชื้อในอัตราส่วน 1:1 พบว่าต้องใช้กลูโคสต่อไซโลสในอัตราส่วน 1:10 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นที่ 4.5–5.5 ทำการเลี้ยงในระดับ...ภายใต้สภาวะการเจริญใช้อัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่ 4 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อผสมผลิตไซลิทอลได้ 37.79 กรัมต่อลิตร ใกล้เคียงกับเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 คือผลิตไซลิทอลได้ 39.47 กรัมต่อลิตรขณะที่ *Candida quilliermondii* TISTR 5026 ผลิตไซลิทอลได้ประมาณต่ำสุดคือได้ 9.40 กรัมต่อลิตร ที่ 24 ชั่วโมง

Abstract

This research was studied concern xylitol production from xylose and glucose by mixed cultures of *Candida tropicalis* TISTR 5045 and *Candida guilliermondii* TISTR 5206. The optimum concentration of glucose and xylose were 1:10 g/l in 1:1 ratio of each medium. Shake flask cultivation condition is pH 4.5-5.5 , 300 rpm at 30°C and inoculum size is 4 percent. After 24 hours , *Candida tropicalis* TISTR 5045 produced the maximum yield of xylitol (39.49 g/l) while the mixed cultures produce 37.49 g/l and *Candida guilliermondii* TISTR 5206 produced the lowest yield of xylitol (9.40 g/l)



ตรวจเอกสาร

คุณสมบัติของไซลิทอล

ไซลิทอลมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพตามตารางที่ ๕.1

ตารางที่ ๕.1 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของไซลิทอล

สูตรโมเลกุล	$C_6H_{12}O_6$
โครงสร้าง	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \text{OH} \quad \text{H} \\ \quad \quad \\ \text{HOCH}_2\text{-C} - \text{C} - \text{C-CH}_2\text{OH} \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \text{H} \quad \text{OH} \end{array} $
น้ำหนักโมเลกุล	152.1
รูปร่าง	ผงคริสตัล
สี	สีขาว
รสชาติ	รสหวาน
กลิ่น	ไม่มีกลิ่น
ความหวานสัมพัทธ์ (Relative sweetness)	ไซลิทอล (85-120) มีความหวานโดยประมาณเท่ากับน้ำตาลซูโครส (100) แต่หวานมากกว่ากลูโคส (70), ไทโลส (67), ซอร์บิทอล (50) และแมนนิทอล (40) แต่มีความหวานน้อยกว่าฟรุคโตส (150)
จุดหลอมเหลว	93.4 - 94.7 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	216 องศาเซลเซียส
การละลายในน้ำ	64.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
การละลายในเอทานอล	102 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
การละลายในเมทานอล	6.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
การดูดความชื้น	ในที่ที่มีความชื้นสูง จะดูดความชื้นได้มากกว่าน้ำตาลซูโครส แต่ดูดความชื้นได้น้อยกว่าซอร์บิทอล
สารปนเปื้อน	แมนนิทอล, ซอร์บิทอล, กาแลคทิทอล, อาราบิทอล

ที่มา : Emodi (1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติอื่นๆ ของไซลิทอล

1. ไซลิทอลละลายน้ำได้ง่าย ได้สารละลายที่มีความคงตัวสูง แม้ว่าจะถูกความร้อนหรือเก็บไว้นานๆ ก็ไม่เกิดปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสีน้ำตาล (maillard browning) และการเกิดคาราเมล (caramelization) เหมือนน้ำตาลฟรุกโทสหรือเดกซ์โทรส เมื่อใช้ความร้อนสูงกว่า 150 องศาเซลเซียส เนื่องจากไซลิทอลไม่มีหมู่อัลโดสหรือคีโตส

2. ไซลิทอลให้รสชาติดีและเป็นสลดชื่น (cooling effect) คล้ายเมนทอล เนื่องจากการละลายของไซลิทอลต้องการความร้อน (endothermic dissolution) เพราะไซลิทอลมีค่าความร้อนจำเพาะของการละลายเป็นลบ (negative heat of solution) เท่ากับ -34.8 แคลอรี/กรัม ดังตารางที่ 1.9. โดยคุณสมบัติจะเกิดขึ้นเมื่อไซลิทอลอยู่ในรูปผลึกเท่านั้น แต่เมื่อไซลิทอลอยู่ในรูปสารละลายหรืออยู่ในรูปอสัณฐาน (amorphous) จะไม่ให้คุณสมบัติข้อนี้ ตารางที่ 1.9. ค่าความร้อนจำเพาะของการละลายของน้ำตาลชนิดต่างๆ

Polyalcohol	Cooling effect (cal / g at 25°C)
Isomalt	-9.4
Lactitol	
- Monohydrate	-12.7
- Dihydrate	-13.9
Mannitol	-28.9
Sorbitol	-26.5
Xylitol	-34.8

ที่มา : Arron (1993)

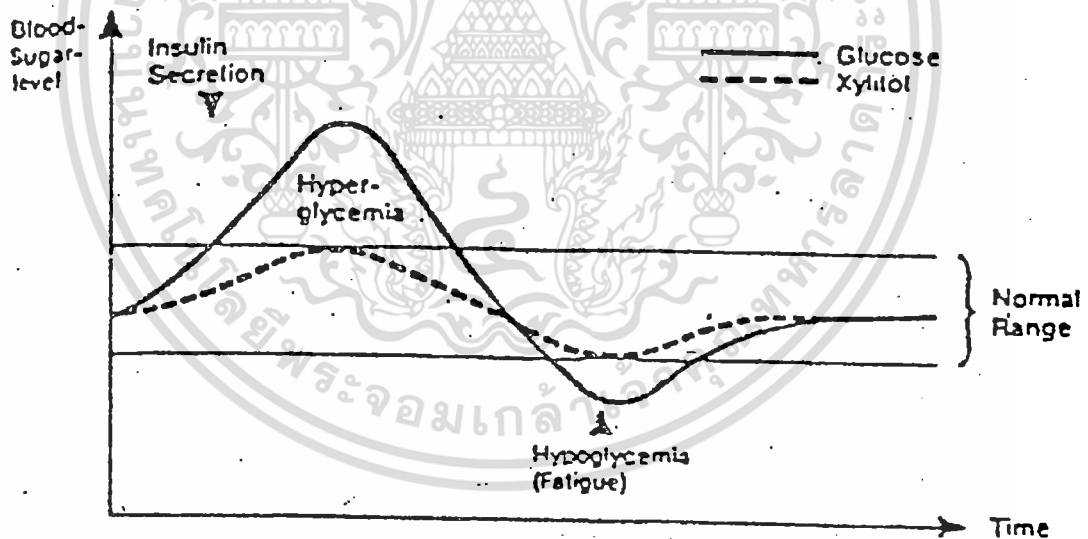
3. ไซลิทอลมีความหวานเช่นเดียวกับน้ำตาลทั่วไป แต่มีความหวานมากกว่าแมนนิทอล และซอร์บิทอล 2.5 และ 2 เท่าตามลำดับ ความหวานของไซลิทอลเมื่อเทียบกับซูโครสจะมีตั้งแต่ 0.85-1.25 เท่า ขึ้นอยู่กับค่าพีเอช ความเข้มข้นและอุณหภูมิ เป็นต้น ตัวอย่างเช่น ไซลิทอลที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์จะมีความหวานเท่ากับน้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อความเข้มข้นมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์สารละลายไซลิทอลจะหวานมากกว่า แต่ถ้าความเข้มข้นน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์สารละลายซูโครสจะหวานมากกว่า หรือความหวานสัมพัทธ์ (relative sweetness) ของไซลิทอล เมื่อเทียบกับซูโครสจะลดลงจาก 103 เป็น 78

เมื่อเพิ่มอุณหภูมิของสารละลายไซลิทอลที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ จาก 5 องศาเซลเซียสเป็น 50 องศาเซลเซียส เป็นต้น

4. ไซลิทอลให้พลังงานต่ำกว่าแต่คงรสชาติเดิมเมื่อผสมกับสารให้ความหวานชนิดอื่น แม้ว่าไซลิทอลจะให้พลังงานเท่ากับคาร์โบไฮเดรตทั่วไป (4.06 กิโลแคลอรี/กรัม) แต่เมื่อใช้ไซลิทอลร่วมกับสารให้ความหวานชนิดอื่นๆ ความหวานและรสชาติก็จะคงเดิมขณะที่ลดแคลอรีลงได้ 50-70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีการใช้ในเครื่องดื่มหลายชนิด เหมาะกับผู้บริโภคที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก (dietary purpose)

5. ไซลิทอลไม่ทำให้ฟันผุเนื่องจากจุลินทรีย์ในช่องปากโดยเฉพาะ *Streptococcus mutans* ไม่สามารถใช้ไซลิทอลเป็นแหล่งอาหารได้ ทำให้สภาพที่เอชบนเคลือบฟันไม่ต่ำกว่า 5.7 จึงไม่ทำให้เกิดฟันผุ

6. ไซลิทอลสามารถใช้ในผู้ป่วยเบาหวานได้เนื่องจากการเผาผลาญไซลิทอลไม่ขึ้นกับอินซูลิน ดังนั้นจึงไม่ทำให้เกิดสภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) และน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia) ดังภาพที่ 1.1



ภาพที่ 1.1 ผลของกลูโคสและไซลิทอลต่อระดับน้ำตาลในเลือด

ที่มา : Emodi (1982)

7. ไซลิทอลช่วยยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากจุลินทรีย์ไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่สามารถใช้ไซลิทอลได้ผลิตภัณฑ์ที่มีไซลิทอลเป็นองค์ประกอบจึงเกิดการหมักโดยจุลินทรีย์ได้ยาก ทำให้มีอายุการเก็บที่นานขึ้น (long shelf-life)

ข้อจำกัดในการใช้ไซลิทอล

1. การบริโภคไซลิทอลเป็นปริมาณมากในคราวเดียวจะทำให้ท้องเสีย (gastrointestinal distress and osmotic diarrhoea) ได้ เนื่องจากไซลิทอลมีคุณสมบัติเป็นยาระบาย เพราะไซลิทอลมีคุณสมบัติเหมือนคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ คือดูดซับน้ำไว้อย่างช้าๆ ดังนั้นเมื่อบริโภคเป็นครั้งแรกควรบริโภคในปริมาณต่ำกว่าก่อน (30 กรัม/วัน) และค่อยๆ เพิ่มปริมาณขึ้น แต่จะบริโภคได้สูงสุดราว 200-300 กรัม/วัน
2. การใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อให้มีรสชาติเย็นสดชื่นนั้น จะต้องใช้ไซลิทอลที่อยู่ในรูปผลึกเท่านั้น ซึ่งอาจจะทำให้เกิดลักษณะผิวสัมผัสที่เปลี่ยนแปลงไปหรือไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคได้
3. ไซลิทอลมีราคาแพงเมื่อเทียบกับสารให้ความหวานชนิดอื่น เนื่องจากต้นทุนที่ใช้ในการผลิตสูง ทำให้การใช้ไซลิทอลไม่แพร่หลายเท่าที่ควร และแม้ว่าไซลิทอลจะสามารถใช้ในผู้ป่วยเบาหวานได้แต่ในอาหารสำหรับผู้ป่วยเบาหวานก็ใช้ฟรุคโทสแทนเพราะมีราคาถูก และไม่เกิดผลข้างเคียงเหมือนกับเมื่อใช้ไซลิทอล

การใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหาร

มีแนวโน้มการใช้ไซลิทอลในอุตสาหกรรมอาหารอย่างกว้างขวางในผลิตภัณฑ์อาหารพวกขนมอบ แยม มาร์มาเลดและผลิตภัณฑ์ขนมหวาน เป็นต้น เนื่องจากไซลิทอลมีคุณสมบัติที่สามารถใช้ทดแทนน้ำตาลธรรมชาติได้ และยังมีข้อดีในแง่ไม่ทำให้เกิดฟันผุเมื่อบริโภคเหมือนน้ำตาลทั่วไป แต่ทว่าการใช้ไซลิทอลยังมีข้อจำกัดอยู่บ้าง โดยเฉพาะในเครื่องดื่มประเภทน้ำอัดลม ซึ่งผู้บริโภคมีโอกาสจะได้รับไซลิทอลปริมาณสูงเกินไปทำให้ท้องเสียได้ หรือสภาพอันหลากหลายของผลึกไซลิทอล (น้ำตาลซูโครสมีผลึกแบบ monoclinic แต่ไซลิทอลมีผลึกแบบ rhombic) อาจทำให้เนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์มีลักษณะแข็งกระด้าง อย่างไรก็ตามข้อจำกัดเหล่านี้กล่าวได้ว่าเป็นปัญหาของเมื่อเทียบกับประโยชน์ที่จะได้รับจากการทดแทนน้ำตาลซูโครสด้วยไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหารทั้งหลาย ซึ่งโดยปกติมักจะให้คุณภาพที่ทัดเทียมกันหรือดีกว่า เช่น คุณภาพที่เย็นสดชื่น ซึ่งช่วยเพิ่มรสชาติของเปปเปอร์มินท์ รสมะนาว และรสผลไม้ต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างของการใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหารมีดังนี้

1.หมากฝรั่ง(Chewing gum)

ปกติหมากฝรั่งจะประกอบด้วยน้ำตาล 50-75 เปอร์เซ็นต์และน้ำ 3-5 เปอร์เซ็นต์ และมีส่วนผสมของกลูโคสไซรัปเป็นตัวทำให้เนื้อสัมผัสนุ่ม (softener) ไซลิทอลสามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ในอัตรา 1 ต่อ 1 ยกเว้นซอร์บิทอลและแมนนิทอลซึ่งมีความหวานน้อยกว่า จะต้องเติมสารให้ความหวานที่ไม่ให้พลังงาน(non-caloric sweetener) ชนิดอื่นแทนเพื่อให้ได้ความหวานเท่าเดิม แต่เนื่องจากไซลิทอลมีความหนืด (viscosity) น้อยกว่าน้ำตาลซูโครสจึงต้องใช้กัมอาราบิก (gum arabic) เป็นส่วนผสมด้วย (Kracher, 1975) ความแตกต่างของหมากฝรั่งชนิดใช้ไซลิทอลกับชนิดใช้น้ำตาลซูโครส คือชนิดไซลิทอลจะให้ความรู้สึกเย็นเมื่อเริ่มเคี้ยวเท่านั้นเอง เนื่องจากอิทธิพลของ cooling effect ซึ่งเป็นคุณสมบัติของไซลิทอล และจากการศึกษาของ Scheinin และคณะ (1975) พบว่าหมากฝรั่งชนิดใช้ไซลิทอลสามารถป้องกันการเกิดฟันผุซึ่งมักพบกับผู้เคี้ยวหมากฝรั่งชนิดใช้น้ำตาลธรรมดาเป็นสารให้ความหวานได้

2.ช็อคโกแลต (Chocolate)

สามารถใช้ไซลิทอลในการผลิตช็อคโกแลตทดแทนน้ำตาลซูโครสได้ในอัตรา 1 ต่อ 1 แต่จำเป็นต้องใช้สารเติมแต่ง (additives) (Dracher, 1975) ช่วยเนื่องจากไซลิทอลให้ความหนืดต่ำกว่า ปริมาณไซลิทอลที่ใช้ในช็อคโกแลตมีตั้งแต่ 17-42 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบปัญหาเกี่ยวกับเนื้อสัมผัสและรสชาติของผลิตภัณฑ์แต่อย่างไร

3.ท็อฟฟี่และคาราเมล (Toffees and Caramels)

เนื่องจากไซลิทอลไม่มีคุณสมบัติทาง maillard browning และ caramelization จึงจำเป็นต้องเติมน้ำตาลฟรุคโทสเพื่อคงคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์เอาไว้ หรืออาจเติมสีและกลิ่นดังกล่าวทดแทนก็ได้ และเพื่อป้องกันการเกิดการตกผลึกของไซลิทอลซึ่งจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีเนื้อสัมผัสแข็งกระด้าง ควรหลีกเลี่ยงการใช้มอลโตเด็คซ์ตริน (maltodextrin) และไลเคซีน (lycasein) เป็นส่วนผสมด้วย ซึ่งพบว่าอนุพันธ์ของแป้งดังกล่าวมีผลต่อการตกผลึกของไซลิทอลได้

4.เจลาติน (Gelatin desserts)

การใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์เจลาตินมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารให้ความหวาน

5.พุดดิ้ง (Pudding)

การผลิตพุดดิ้งไม่มีการเปลี่ยนแปลงสูตรแต่อย่างไรเมื่อใช้ไซลิทอลแทนน้ำตาลซูโครส และไม่มีผลต่อรสชาติผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. แยม เยลลี่ และมาร์มาเลด (Jams Jellies and Marmalades)

กรณีนี้ไซลิทอลสามารถใช้ทดแทนน้ำตาลซูโครสได้เช่นกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 แต่ควรหลีกเลี่ยงการใช้ไซลิทอลมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะทำให้เกิดการตกผลึกของไซลิทอลได้ในระหว่างการเก็บรักษา (storage) และไม่มีควมจำเป็นต้องเติมสารกันบูด (preservatives) แต่อย่างใด เพราะจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดการเสีย (spoilage) ของผลิตภัณฑ์ไม่สามารถใช้ไซลิทอลเป็นแหล่งอาหารได้เช่นน้ำตาลอื่นทั่วไป แต่ควรเติมปริมาณของเพคติน (pectin) มากขึ้น เพราะไซลิทอลให้ความหนืดต่ำกว่าน้ำตาลซูโครสและมีความจำเป็นต้องเติมเกลือแคลเซียมเพื่อช่วยในการเกิดเจล (gelatinization) ของแยม (Hyvoenen และ Toemae, 1981) นอกจากนี้ยังพบว่าแยมและมาร์มาเลดที่ใช้ไซลิทอล จะให้รสชาติที่ดีกว่าน้ำตาลซูโครสรวมทั้งให้ความคงตัวของสีที่ดีกว่าอีกด้วย (Manz และคณะ, 1973)

7. ลูกกวาด (Hard Candy or Boiled Sweets)

ลูกกวาดจัดเป็นผลิตภัณฑ์อีกชนิดหนึ่งที่เด็กๆ ชอบและเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดฟันผุ การใช้ไซลิทอลเป็นสารให้ความหวานแทนน้ำตาลจึงมีเหตุที่ควรสนับสนุน พร้อมทั้ง cooling effect ของไซลิทอลยังช่วยทำให้คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ดีขึ้นและรสชาติที่ยอมรับ การใช้ไซลิทอลแทนซึ่งมีความหวานน้อยกว่าไซลิทอลจะต้องใช้ปริมาณที่มากกว่าหรืออาจต้องเติมสารให้ความหวานชนิดอื่นทดแทนด้วย ในการผลิตลูกกวาดชนิดไซลิทอลอาจมีปัญหาอยู่บ้างเนื่องจากการตกผลึกของไซลิทอลเกิดในขณะที่ทำให้เย็นและความหนืดที่ต่ำ จึงต้องผลิตลูกกวาดโดยการอัดลูกกวาดร้อนเข้าแม่พิมพ์ (depositing) แทน

8. ผลิตภัณฑ์ขนมอบ (Bakery Goods)

พบว่าการใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์ขนมอบนั้นไม่จำเป็นต้องมีการเปลี่ยนแปลงสูตรขนม แต่อย่างไรก็ตาม อาจจะต้องเติมน้ำตาลฟรุคโทสเพื่อรักษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการการเกิด millard browning และ caramelization นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการปริมาตร จากการหมักของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* กับน้ำตาลนั้น อาจจะไม่เหมาะสมนักสำหรับการใช้ไซลิทอล เพราะผลิตภัณฑ์ขนมอบที่ใช้ไซลิทอลนั้นจะมีปริมาตรน้อยกว่าและมีเนื้อสัมผัสที่แน่นกว่า (dense texture) อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ขนมอบที่ใช้ไซลิทอลเหมาะสมมากสำหรับคนที่ เป็นโรคเบาหวาน และป้องกันฟันผุได้เป็นอย่างดี

9. ไอศกรีม (Icecreams)

การใช้ไซลิทอลแทนน้ำตาลซูโครส กลูโคสไซรัป หรือน้ำตาลอินเวอร์ต (invert - sugars) ในผลิตภัณฑ์แช่แข็งจะทำให้คุณสมบัติทางการหลอมเหลว (melting properties) ของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนไป คือ ที่อุณหภูมิเดียวกัน ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ไซลิทอลจะมีคุณลักษณะอ่อนตัวกว่า จึงจำเป็นต้องมีการเติมสารช่วยให้แข็ง (Thickeners) สำหรับไอศกรีมที่ใช้ไซลิทอลนั้นไม่พบว่าการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -24 องศาเซลเซียส นานถึง 6 เดือน และไม่พบการเกิดการตกผลึกขึ้นอีกด้วย (Kracher, 1975)

10. เค็ทซัปและนมข้นหวาน (Ketchup and Condensed Milk)

การใช้ไซลิทอลจะปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ คือ ป้องกันการเกิด browning และการเสียโดยจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี

11. ซอสและอื่นๆ (Marinadae Sauces and Pastes)

เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลต่ำ ฉะนั้นการทดแทนน้ำตาลด้วยไซลิทอลจึงไม่ประสบปัญหาแต่อย่างใด

12. โยเกิร์ต (Yoghurt)

จากการศึกษาว่าปริมาณไซลิทอลที่ใช้ 8 เปอร์เซ็นต์ จะเหมาะสมที่สุดสำหรับการทำโยเกิร์ต (Salminen และ Branen, 1978; Hyvoenen และ Slott, 1981) โดยที่การเติมไซลิทอลหลังการบ่มจะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์ แต่ถ้าเติมไซลิทอลก่อนการบ่ม ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีค่าพีเอช 4.4 สูงกว่ากรณีที่ใช้ น้ำตาลซูโครส ซึ่งมีค่าพีเอช 4 และผลิตภัณฑ์จะมีลักษณะหนืดน้อยกว่า อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างเกี่ยวกับการยอมรับของผู้บริโภค (sensory evaluation)

13. เครื่องดื่ม (Drinks)

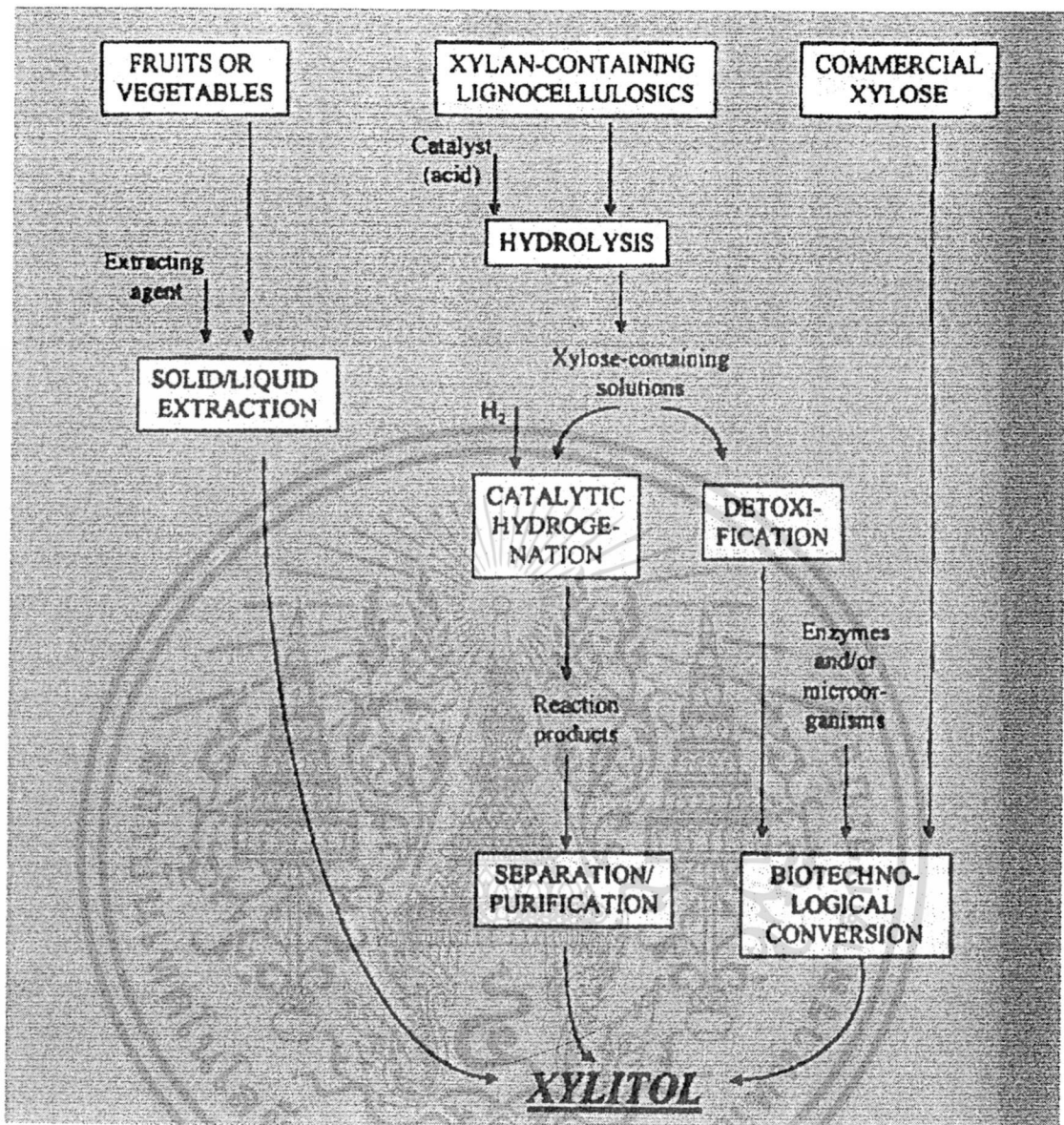
เนื่องจากการได้รับไซลิทอลในขณะเดียวกันมากเกินไปจะทำให้ท้องเสียได้ (laxative effect) จึงต้องใช้ไซลิทอลในรูปแบบผสมกับสารให้ความหวานตัวอื่น ๆ ตัวอย่างเช่น เมื่อใช้ไซลิทอล 3.9 เปอร์เซ็นต์และไซคลาเมท (cyclamate) 0.133 เปอร์เซ็นต์ แทนน้ำตาลในผลิตภัณฑ์ น้ำอัดลมจะสามารถลดพลังงานที่ร่างกายจะได้รับถึง 60 เปอร์เซ็นต์ (Hyvoenen และ Sipilae, 1977) จึงนับเป็นเครื่องดื่มที่เหมาะสมต่อคนที่เป็นโรคเบาหวานและคนที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก ส่วนนมสเตอริไรซ์ยูเอชทีรสช็อคโกแลตเหมาะที่จะใช้ไซลิทอล 4 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ทำให้คุณสมบัติทางกายภาพ เช่น ความหนืดและสีเปลี่ยนไป และยังเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค การเก็บรักษาว่าหนึ่งเดือนที่อุณหภูมิห้องก็ไม่ทำให้ผลิตภัณฑ์เสื่อมคุณภาพแต่อย่างใด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่จำกัดอายุทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเนื่องจากการเผาผลาญไขมันไม่ขึ้นกับอินซูลิน ดังนั้นจึงไม่เกิดสภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) หรือน้ำตาลในเลือดต่ำ (Hypoglycemia) และไขมันให้พลังงานเพียง 4 กิโลแคลอรีเท่ากับคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น ทำให้มีผลต่อปริมาณกลูโคสในเลือดเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

การผลิตไขมัน

จะเห็นได้ว่า สามารถประยุกต์ใช้ไขมันเป็นสารให้ความหวานทดแทนน้ำตาลในผลิตภัณฑ์อาหารได้อย่างกว้างขวาง ปัจจุบันก็ได้มีการใช้ไขมันในผลิตภัณฑ์อาหารแพร่หลายมากขึ้นทั้งในทวีปยุโรปและอเมริกา โดยเฉพาะหมากฝรั่ง และพบว่ามีความนิยมที่จะใช้ไขมันมากในอุตสาหกรรมประเภทขนมหวาน (confectionary) และขนมขบเคี้ยว (snack products) แต่การใช้ไขมันในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวยังมีข้อจำกัดอยู่ที่การผลิตไขมันมีต้นทุนการผลิตสูงกว่ากระบวนการผลิตน้ำตาลเพราะต้องอาศัยการผลิตทางเคมีที่ต้องใช้ต้นทุนสูงในการผลิตและการทำให้ไขมันที่ผลิตได้บริสุทธิ์ จึงทำให้ราคาของไขมันแพงกว่าน้ำตาลทั่วไป อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันได้มีการวิจัยค้นคว้าเพื่อลดต้นทุนการผลิตไขมันโดยวิธีการหมัก โดยการนำเอาวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลไซโลสใช้เป็นวัตถุดิบ ซึ่งคาดว่าจะทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำกว่ากระบวนการผลิตทางเคมี (hydrogenation) ได้ การผลิตไขมันมีหลายวิธีและสามารถใช้วัตถุดิบได้หลายชนิด เช่น ผักและผลไม้ ของเสียที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ เช่น วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชังข้าวโพด ชานอ้อย เป็นต้น เศษเหลือจากอุตสาหกรรมไม้และกระดาษ หรืออาจใช้น้ำตาลไซโลสเป็นวัตถุดิบโดยตรงก็ได้ ดังภาพที่ 1.3 ซึ่งแต่ละวิธีจะมีกรรมวิธีแตกต่างกันไป



ภาพที่ 1.3 วิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตไซลิตอล

ที่มา : Parajo และคณะ (1998)

วิธีการต่างๆที่ใช้ในการผลิตไซลิตอล

1. การสกัดจากผักและผลไม้

เนื่องจากไซลิตอลพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติในผักและผลไม้ เช่น กะหล่ำปลี มะเขือยาว ผักโขม สตรอว์เบอร์รี่ และราสเบอร์รี่ ดังเช่นในตารางที่ 1.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1.3 ปริมาณไซลิทอลที่พบทั่วไปตามผักผลไม้ในธรรมชาติ

ผักและผลไม้	ปริมาณไซลิทอล (มก./100 กรัม น.น.แห้ง)
Raspberries	268
Strawberries	362
Yellow plums	935
Endives	258
Lettuce	131
Cauliflower	300
Spinach	107
Eggplant	180
Yellow boletus mushroom	128

ที่มา : Emodi (1987)

สามารถสกัดไซลิทอลจากผักและผลไม้ได้ แต่ปริมาณไซลิทอลที่ได้จะต่ำมากเมื่อเทียบกับปริมาณวัตถุดิบที่ใช้ จึงไม่คุ้มค่าที่จะผลิตในเชิงพาณิชย์

2. การผลิตด้วยวิธีทางเคมี

เป็นการผลิตที่ปัจจุบันใช้ผลิตไซลิทอลทางอุตสาหกรรมและใช้วัตถุดิบที่เป็นน้ำตาลไซโลสที่ได้จากวัสดุที่มีเซลลูลอสเป็นองค์ประกอบ ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

2.1. การไฮโดรไลซิส

เป็นการสกัดน้ำตาลไซโลสจากเฮมิเซลลูโลสโดยใช้กรดซัลฟูริกเจือจาง วิธีที่เป็นที่นิยม คือ อัลตราฟาสต์ ไฮโดรไลซิส (ultrafast hydrolysis) ที่ใช้กรดซัลฟูริกเจือจาง 0.5-1.0 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 200-210 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วินาที ซึ่งจะได้น้ำตาลไซโลสออกมา

2.2. การทำน้ำตาลไซโลสให้บริสุทธิ์

เมื่อไฮโดรไลซิสแล้วจะได้น้ำตาลไซโลสอยู่ในไฮโดรไลเสท (hydrolysate) สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ 2 วิธี

2.2.1 แบบแยกน้ำตาลไซโลส วิธีนี้จะกำจัดสารแขวนลอย ตะกอน สีและไอออนอื่นๆ และใช้วิธีทางโครมาโทกราฟีเพื่อแยกเอาน้ำตาลไซโลสออกมาน้ำตาลชนิดอื่นๆ เพื่อให้ได้น้ำตาลไซโลสบริสุทธิ์

2.2.2 แบบไม่แยกน้ำตาลไซโลส วิธีนี้จะแยกเอาสารอื่นๆ พวกตะกอน ไอออน และสีออกแต่ไม่แยกเอาน้ำตาลชนิดอื่นออกไป สารละลายที่ได้จะมีน้ำตาลหลายชนิดเป็นองค์ประกอบแต่น้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก

2.3. การไฮโดรจีเนชัน

เป็นการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสให้เป็นไซลิทอลที่สภาวะความดัน 50 บรรยากาศ อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2.5 ชั่วโมงโดยให้โลหะนิกเกิลเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในขั้นนี้ ซึ่งถ้ามีน้ำตาลชนิดอื่นเจือปนอยู่ น้ำตาลเหล่านั้นก็จะเปลี่ยนเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ด้วย

2.4. การทำไซลิทอลให้บริสุทธิ์

สารละลายน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ได้จะต้องทำให้บริสุทธิ์ โดยนำมากรองแยกเอาโลหะนิกเกิลออก แล้วแยกเอาไซลิทอลออกมาโดยวิธีทางโครมาโทกราฟี จากนั้นทำการตกผลึก ไซลิทอลจะได้ไซลิทอลที่มีความบริสุทธิ์ 99 เปอร์เซ็นต์

แม้ว่าการผลิตไซลิทอลด้วยวิธีทางเคมีจะเป็นวิธีที่ใช้กันในทางอุตสาหกรรมทั่วไป แต่ต้นทุนในการผลิตยังสูงอยู่ เนื่องจากขั้นตอนในการแยกและทำให้บริสุทธิ์ยังทำได้ยาก ทำให้ไซลิทอลมีราคาแพง และปริมาณไซลิทอลที่ได้มีความบริสุทธิ์ต่ำ จึงทำให้มีการคิดค้นวิธีการผลิตด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพขึ้นมาเพื่อทดแทนวิธีการผลิตทางเคมี

3. การผลิตด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ

การผลิตไซลิทอลโดยใช้กระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ เป็นที่สนใจเนื่องจากมีแนวโน้มที่จะสามารถนำมาทดแทนวิธีการผลิตทางเคมีที่ต้นทุนสูงได้ การผลิตไซลิทอลด้วยวิธีนี้จะใช้เอนไซม์หรือจุลินทรีย์ในการผลิตไซลิทอล แต่กระบวนการผลิตโดยเอนไซม์นั้นค่อนข้างยุ่งยากและไม่เป็นที่นิยมเท่ากระบวนการผลิตโดยใช้จุลินทรีย์ มีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้หลายชนิด ตัวอย่างเช่น แบคทีเรีย เช่น *Corynebacterium* sp., *Mycobacterium smegmatis* รา เช่น *Petromyces albertensis* แต่จุลินทรีย์ที่นิยมที่สุดในการผลิตไซลิทอลด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพคือ ยีสต์ ซึ่งมีหลายชนิดที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ เช่น *Candida tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parasitopsis*, *C. boidinii* และ *Debaryomyces hansenii* เป็นต้น

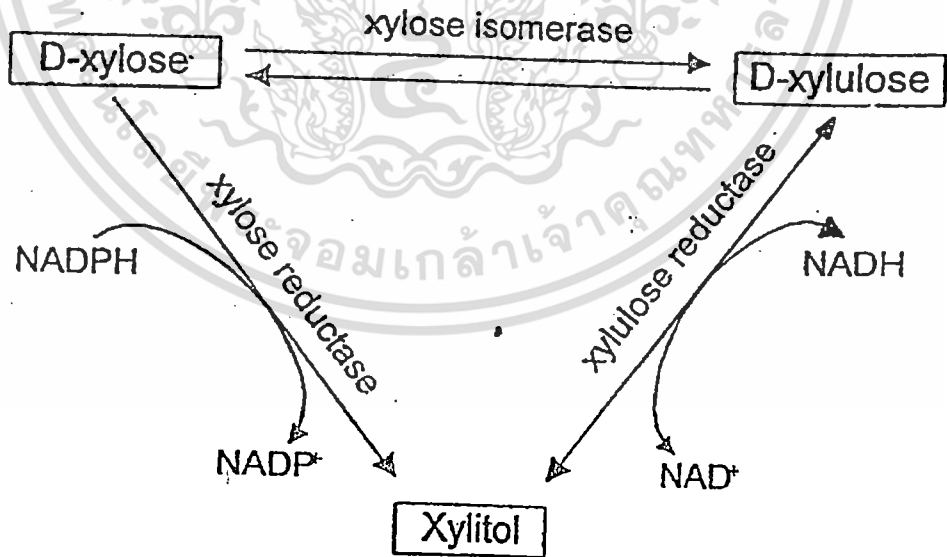
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการเมแทบอลิซึมในการผลิตไซลิทอลโดยจุลินทรีย์

ไซโลสสามารถเปลี่ยนไอโซเมอร์ไปเป็นไซลูโลสโดยเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอร์เรส (xylose isomerase) หรือถูกรีดิวซ์ไปเป็นไซลิทอลโดยเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส (xylose reductase, XR) โดยมีโคเอนไซม์คือ NADPH หรือ NADH ซึ่งไซลิทอลที่ผลิตขึ้นสามารถเปลี่ยนรูปไปเป็นไซลูโลสโดยเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส (xylitol dehydrogenase, XDH) ในขณะที่มี NADP⁺ หรือ NAD⁺ ที่ได้จากปฏิกิริยาตอนต้น (Horitsu และคณะ, 1992 ; Nigam และ Singh, 1995)

Hofer และคณะ (1979) รายงานในลักษณะที่ใกล้เคียงกันว่า ในจุลินทรีย์ไซลิทอลจะถูกสร้างขึ้นเป็นสารตัวกลางในกระบวนการเมแทบอลิซึมของไซโลสได้สองวิธี วิธีแรกเป็นการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอลโดยตรงโดยอาศัยเอนไซม์ ไซโลสรีดักเทส และโคเอนไซม์ NADPH เปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลิทอล ส่วนทางที่สองไซโลสจะถูกเปลี่ยนเป็นไอโซเมอร์ไปเป็นไซลูโลสก่อนโดยเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอร์เรส (xylose isomerase) จากนั้นไซลูโลสจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นไซลิทอลโดยเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส (xylose reductase, XR) และโคเอนไซม์ NADH ดังในภาพที่ 1.4

แต่วิถีโดยทั่วไปที่เป็นวิถีในการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอล ก็คือวิถี oxido-reduction ซึ่งมีการศึกษาวิถีนี้ในยีสต์หลายชนิด Furlan และคณะ (1994) รายงานว่ากระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นได้ต้องอาศัยโคเอนไซม์จากกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน



ภาพที่ 1.4 วิธีการเกิดไซลิทอลจากเมแทบอลิซึมของไซโลส

ที่มา : Parajo และคณะ (1998)

1. กระบวนการเมแทบอลิซึมของการผลิตไซลิทอลในยีสต์

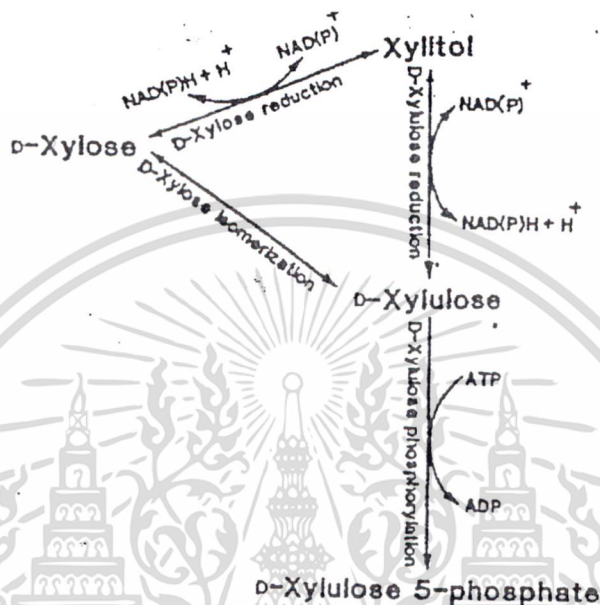
ยีสต์จะใช้น้ำตาลไซโลส มาเปลี่ยนเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟตเพื่อเข้าสู่วิถีอื่นต่อไป โดยเมื่อน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ยีสต์จะถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลสโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชัน (oxido-reduction) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไซโลสโดยวิธีนี้จะพบในจุลินทรีย์พวกยูคาริโอท (eukaryotes) โดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องสองชนิดคือ เอนไซม์ไซโลสรีดักเทส (xylose reductase, XR) ซึ่งมีโคเอนไซม์ NAD(P)H ร่วมในการทำปฏิกิริยา รีดิวซ์ไซโลสเป็นไซลิทอล และเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส (xylitol dehydrogenase, XDH) ซึ่งใช้ NAD(P)⁺ เป็นโคเอนไซม์จะออกซิไดส์ไซลิทอลที่เกิดขึ้นให้กลายเป็นไซลูโลส (Smiley และ Bolen, 1982 ; Malezka และคณะ, 1983) ส่วนในจุลินทรีย์พวกโปรคาริโอท (Prokaryotes) นั้นจะเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลูโลสโดยปฏิกิริยาไอโซเมอไรเซชัน (isomerization) โดยมีเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอเรส (xylose isomerase) เข้ามาเกี่ยวข้อง (Yoshitake และคณะ, 1973 ; Yoshitake และคณะ, 1976) สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ ไซโลสรีดักเทส และ ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส ทั้งสองชนิดในยีสต์แต่ละสายพันธุ์จะแตกต่างกันไป ดังตารางที่ 4.4 ทำให้ยีสต์แต่ละสายพันธุ์ใช้ไซลิทอลได้แตกต่างกันไป

ตารางที่ 4.4 กิจกรรมของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสและไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส ในยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้

Microorganism	XR activity [$\mu\text{mol (min mg)}^{-1}$]		NADH/ NADPH ratio	XDH activity [$\mu\text{mol (min mg)}^{-1}$]		Reference
	NADH	NADPH		NAD ⁺	NADP ⁺	
<i>P. tannophilus</i> (NRRL Y-2460)	44	151	0.29	114	8	Malczka <i>et al.</i> (1983)
<i>C. utilis</i> (CBS 621)*	0	75	0	280	0	Bruinenberg <i>et al.</i> (1984)
<i>Pichia stipitis</i> (CBS 5773)*	310	600	0.5	720	75	Bruinenberg <i>et al.</i> (1984)
<i>P. tannophilus</i> (CBS 4044)*	9	220	0.04	910	70	Bruinenberg <i>et al.</i> (1984)
<i>C. tenuis</i> (CBS 615)†	2	130	0.02	—	—	Bruinenberg <i>et al.</i> (1984)
<i>C. tenuis</i> (CBS 2885)†	0	100	0	—	—	Bruinenberg <i>et al.</i> (1984)
<i>C. tenuis</i> (CBS 4285)†	305	670	0.5	—	—	Bruinenberg <i>et al.</i> (1984)
<i>C. shehatae</i> (CBS 5813)†	210	480	0.4	—	—	Bruinenberg <i>et al.</i> (1984)
<i>Pichia segobiensis</i> (CBS 6857)†	365	640	0.6	—	—	Bruinenberg <i>et al.</i> (1984)
<i>C. pelliculosa</i>	—	1.73	—	—	—	Kitpruechavanich <i>et al.</i> (1984)
<i>P. tannophilus</i> (ATCC 326 91)	—	36†	—	—	36	Gómez (1987)
<i>C. shehatae</i> (ATCC 22984)‡	0.11	0.21	0.53	0.08	0.011	Giurio <i>et al.</i> (1989)
<i>P. stipitis</i> (CBS 7126)‡	180-340	300-570	0.55-0.60	650-770	7-30	du Preez (1989)
<i>C. shehatae</i> (CBS 2779)‡	280-370	510-580	0.52-0.64	740-1270	25-30	du Preez (1989)
<i>C. tenuis</i> (CBS 2883)‡	120-200	220-350	0.54-0.57	80-310	7-17	du Preez (1989)
<i>D. hansenii</i> (DTIA 77)	0	60	0	—	—	Giurio <i>et al.</i> (1990)
<i>C. oleophila</i> (DTIA 111)	0	40	0	—	—	Giurio <i>et al.</i> (1990)
<i>C. intermedia</i> (DTIA 110)	0	140	0	—	—	Giurio <i>et al.</i> (1990)
<i>P. stipitis</i> (DTIA 81)	720	3460	0.21	—	—	Giurio <i>et al.</i> (1990)
<i>C. boidinii</i> (NRRL Y17213)	—	—	1.2-2.1	—	—	Vandeska <i>et al.</i> (1995)
<i>P. tannophilus</i> (DSM 70352)	0.03	0.23	0.13	0.060	0.135	Krusc & Schügerl (1996)
<i>C. boidinii</i> Kloeckera sp. (no. 2201)	0.288	0.055	5.23	0.272	0.096	Vongsuvanlert & Tani (1989)
<i>C. guilliermondii</i> (NRC 5578)	0.08	0.62	0.129	—	—	Nolleau <i>et al.</i> (1993)
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 28474)	0.17	0.42	0.405	—	—	Nolleau <i>et al.</i> (1993)
<i>C. guilliermondii</i> (NRC 5578)	0.08	0.62	0.129	1.130	0.011	Nolleau <i>et al.</i> (1995)
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 28474)	0.17	0.42	0.405	0.400	0.02	Nolleau <i>et al.</i> (1995)
<i>C. mogii</i> (ATCC 18364)	0.06	0.16	0.375	0.22	—	Sirisansaneeyakul <i>et al.</i> (1995)
<i>C. guilliermondii</i> (FTI-20037, NRC5578)	—	79.1	—	128.0	—	Lee <i>et al.</i> (1996)
<i>C. shehatae</i> (ATCC 22984)	0.04-0.07	0.26-0.34	0.15-0.21	0.14-0.18	—	Palnitkar & Lachke (1992)

ที่มา : Parajo และคณะ (1998)

และเมื่ออีสต์เปลี่ยนไซโลสให้กลายเป็นไซลูโลสแล้ว ไซลูโลสก็จะถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต (Xylulose -5- phosphate) โดยปฏิกิริยาฟอสโฟรีเรชัน (Phosphorylation) ของเอนไซม์ไซลูโลสไคเนส (xylulose kinase) ดังภาพที่ 1.5 (Bennett, 1976 ; Gong, 1983)

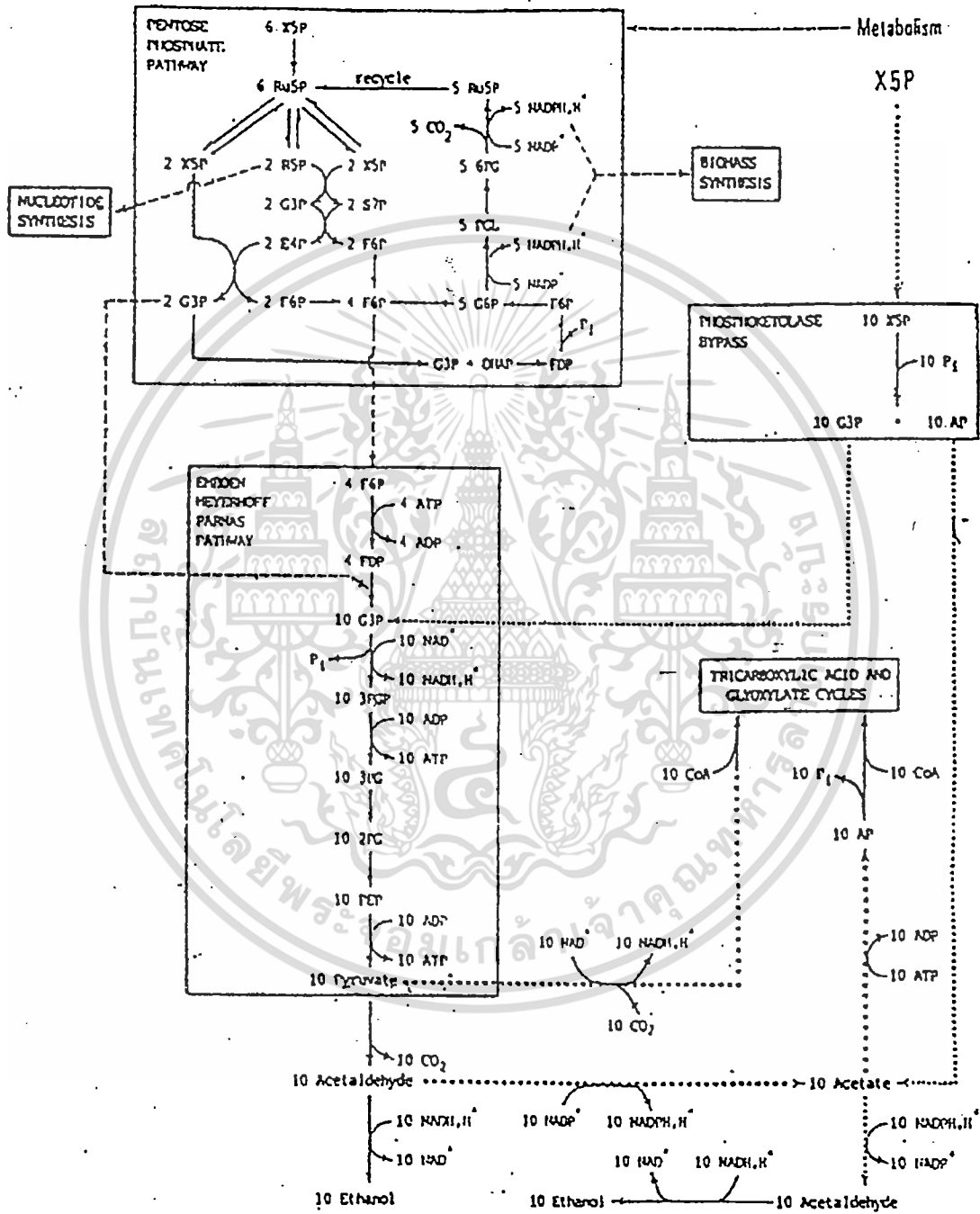


ภาพที่ 1.5 เมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสเพื่อสร้างไซลูโลส-5-ฟอสเฟต
ที่มา : Vongsuvanlert และ Tani (1989)

แล้วไซลูโลส-5-ฟอสเฟตก็จะเข้าสู่วิถีเพนโทสฟอสเฟต หรือวิถีฟอสโฟคีโตเลส (Phosphoketolase) อย่างใดอย่างหนึ่ง ถ้าเข้าสู่วิถีเพนโทสฟอสเฟต ไซลูโลส-5-ฟอสเฟตก็จะเปลี่ยนเป็นน้ำตาลฟอสเฟตต่างๆ เช่น กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (G3P) และ ฟรุกโทส-6-ฟอสเฟต แล้วเข้าสู่วิถี เอ็มเดน เมเยอร์ฮอฟ-ปานาส (Embden - Meyerhorf - Panas) (EMP) เพื่อสร้างไพรูเวทเข้าสู่วัฏจักรเครบส์เพื่อสร้างพลังงานและเซลล์ต่อไปอีกวิถีหนึ่งไซลูโลส-5-ฟอสเฟตจะเปลี่ยนเป็นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต และ อะซิทิล ฟอสเฟต(acetyl phosphate) โดยเอนไซม์ไซลูโลส-5-ฟอสเฟต ฟอสโฟคีโตเลส(xylulose-5-phosphate phosphoketolase) กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตที่ได้จะเข้าสู่วิถีเอ็มเดน เมเยอร์ฮอฟ-ปานาส(Embden - Meyerhorf - Panas) ส่วนอะซิทิล ฟอสเฟต(acetyl phosphate) จะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิเตท ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงได้ 2 ทาง คือเป็น อะซิทิล โคเอ(acetyl-CoA) เข้าสู่วัฏจักรเครบส์ต่อไปกับเปลี่ยนเป็นเอทานอลดังภาพที่ 1.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนโพรเททที่ได้จะถูกเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ เอทานอลและกรดอินทรีย์ต่างๆ เป็นต้น (Gong, 1983; Jeffries, 1983; Evan และ Ratledge, 1984)



ภาพที่ 1.6 เมแทบอลิซึมของไซลูลอส-5-ฟอสเฟต ของยีสต์ *Pachysolen tannophilus*
ที่มา : Slinger และคณะ (1987)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในการเรียนการสอนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านธุรกิจ
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การที่ยีสต์บางสายพันธุ์นั้นเมื่อนำน้ำตาลไซโลสในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดสามารถสะสมไซลิทอลได้ในปริมาณมากนั้นเนื่องจากชนิดของโคเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสและไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสเป็นเอนไซม์กลุ่มเดียวกันซึ่งก็คือโคเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสคือ NADPH แต่โคเอนไซม์ในปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสเป็น NAD^+ ดังนั้นในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด จะเกิดการสะสมของ NADH และ NADPH มาก จึงเกิดการเร่งการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอลโดยอาศัยโคเอนไซม์ NADPH อย่างมาก แต่เนื่องจากเกิดการสะสมของ NADH ทำให้ขาดแคลน NAD^+ จึงทำให้การเปลี่ยนไซลิทอลที่ได้เป็นไซลูโลสจึงเกิดขึ้นน้อย และไม่สามารถนำเอา NAD^+ ที่เกิดจากปฏิกิริยาที่เปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอลมาใช้ได้ จึงทำให้เกิดการสะสมของไซลิทอลขึ้น Horitsu และคณะ(1992) ได้ยืนยันข้อเท็จจริงนี้โดยทำการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสและไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส ของยีสต์ *Candida tropicalis* IFO 0618 ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ พบว่ายีสต์นี้มีเอนไซม์ NADPH-linked xylose reductase และเอนไซม์ NAD^+ -linked xylitol dehydrogenase และมีกิจกรรมของเอนไซม์ NADH-linked xylose reductase และ $NADP^+$ -linked xylitol dehydrogenase ต่ำมากจนเกือบไม่มีเลย ดังนั้นการสร้าง NAD^+ จากเอนไซม์ NADH-linked xylose reductase จึงไม่เกิดขึ้น ทำให้เกิดภาวะขาดแคลน NAD^+ ในการออกซิโดสเป็นไซลูโลส ดังนั้นในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดจึงเกิดการสะสมไซลิทอลขึ้น

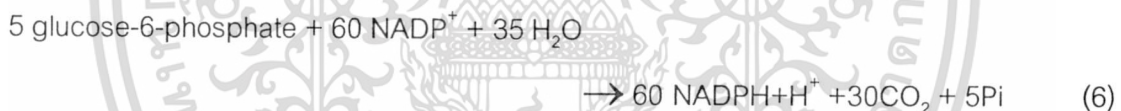
สำหรับยีสต์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสที่ต้องการทั้ง NADPH และ NADH เช่นยีสต์ในกลุ่ม *Pachysolen* sp. และ *Pichia* sp. สามารถเจริญและสะสมไซลิทอลได้น้อยเนื่องจากไซลิทอลสามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลไซลูโลส และเข้าสู่วิถีต่างๆ และผลิตเป็นเอทานอลได้ต่อไปในสภาพที่มีออกซิเจนจำกัด (Prior และคณะ, 1989)

การศึกษาเมแทบอลิซึมของไซโลสโดยยีสต์เพื่อหาผลได้ทางทฤษฎีของการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอล ต้องพิจารณา 4 เงื่อนไขดังต่อไปนี้ (Barbosa และคณะ, 1988)

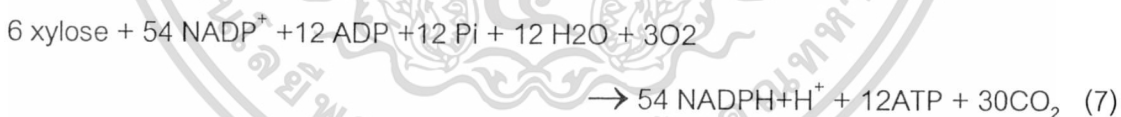
1. ในกระบวนการเมแทบอลิซึมมีโคเอนไซม์ 2 ชนิดเข้าไปเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอล โดยเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสมี NADPH เป็นโคเอนไซม์ และการออกซิโดสไซลิทอลเป็นไซลูโลสโดยเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสอาศัย NAD^+ เป็นโคเอนไซม์
2. โคเอนไซม์ NADPH ที่ใช้ในการรีดิวซ์ไซโลสทั้งหมดเป็นไซลิทอลถูกสังเคราะห์ขึ้นในวิถีเพนโทสฟอสเฟต และโคเอนไซม์ NAD^+ ที่ใช้ในกระบวนการออกซิโดสไซลิทอลเป็นไซลูโลสได้จากกระบวนการหายใจ

3. ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของยีสต์ไม่สามารถเปลี่ยน NADH เป็น NADPH ได้

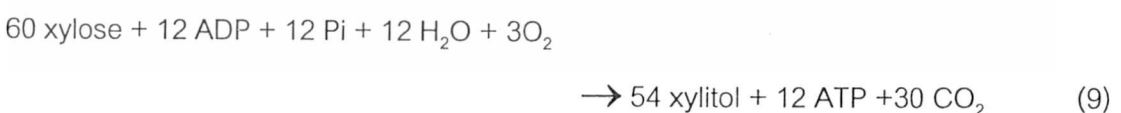
4. ภายใต้สภาวะที่มีการจำกัดออกซิเจนหรือมีการเจริญเติบโต น้อยไซลิทอลจะถูกออกซิไดส์เพื่อสร้าง NADPH เท่านั้น ส่วนไซลิทอลที่เหลือจะสะสมมากขึ้นและปล่อยออกมานอกเซลล์ การผลิตไซลิทอลในยีสต์โดยใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ในสภาวะที่มีการจำกัดออกซิเจนหรือไม่มีการเจริญเติบโต ไซลิทอลส่วนใหญ่จะถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ โดยมีบางส่วนถูกออกซิไดส์ไปเพื่อสังเคราะห์ NADPH เมื่อทำสมดุลคาร์บอนและโคเอนไซม์ดังกล่าวที่ 1-9 แล้ว จะได้ผลได้ทางทฤษฎีของไซลิทอลต่อโมลของไซโลสที่ถูกใช้ (Barbosa และคณะ, 1988)



จากสมการที่ 1-6



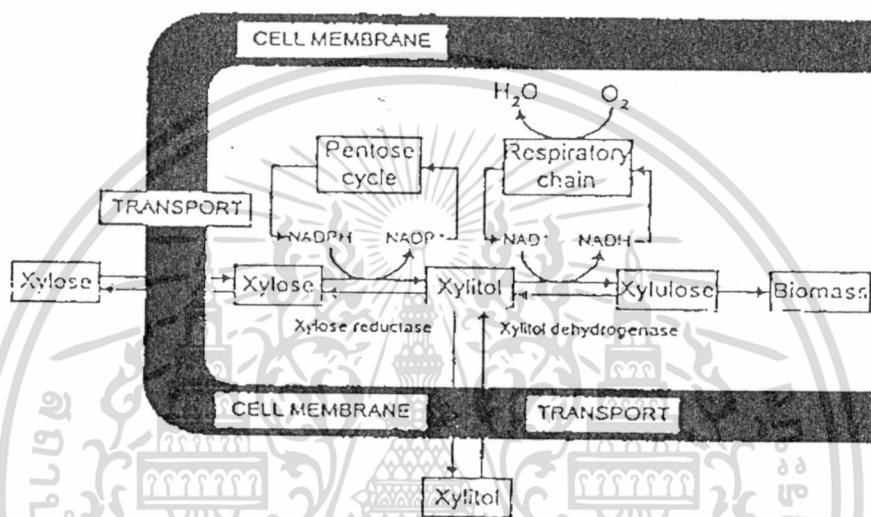
จากสมการที่ 7 และ 8



ผลได้ของไซลิทอล = $54/60 = 0.905$ โมลของไซลิทอลต่อโมลของไซโลส

Sirisansaneeyakul และคณะ (1992) อธิบายถึงการใช้น้ำตาลไซโลสของยีสต์ผ่านวิถีเพนโทสฟอสเฟต ซึ่งน้ำตาลไซโลสจะเข้าสู่ภายในเซลล์และถูกเปลี่ยนเป็นไซลิทอลด้วยการทำงานเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเอนไซม์ xylose reductase ที่มี NADPH เป็นโคเอนไซม์ จากนั้นไซลิทอลจะถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลสด้วยการทำงานของเอนไซม์ xylitol dehydrogenase ที่อาศัย NAD^+ เป็นโคเอนไซม์ จากนั้นไซลูโลสที่ได้จะถูกเติมฟอสเฟตก่อนเข้าสู่วิถีเพนโทสฟอสเฟต เพื่อที่จะนำไปสร้างเป็นมวลชีวภาพของเซลล์หรือพลังงานต่อไป ดังภาพที่ 1.7



ภาพที่ 1.7 เมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์

ที่มา : Sirisansaneeyakul และคณะ (1992)

2. กระบวนการเมแทบอลิซึมในการผลิตไซลิทอลโดยแบคทีเรีย

แบคทีเรียส่วนมากสามารถสร้างเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอเรส (xylose isomerase) ได้ ดังนั้นจึงสามารถเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลูโลสได้ จากนั้นไซลูโลสก็จะถูกเติมฟอสเฟตกลายเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟตและเข้าสู่วิถีเพนโทสฟอสเฟต หรืออีกทางหนึ่งไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่ได้อาจจะถูกเอนไซม์ไซลูโลส-5-ฟอสเฟต ฟอสโฟคีโทเลส เปลี่ยนเป็น กลีเซอรัลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต และ acetyl phosphate โดยเอนไซม์ไซลูโลส-5-ฟอสเฟต ฟอสโฟคีโทเลส ขั้นนี้เป็นการสร้างสารตัวกลางในวิถี Embden - Meyerhorf - Panos โดยไม่มีการสร้าง NADPH เหมือนกับเมแทบอลิซึมของกลูโคสในยีสต์ (Evan และ Retledge, 1984) แต่แบคทีเรียบางสายพันธุ์ เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Corynebacterium sp. หรือ *Enterobacter* sp. สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่ม ออกซิโด-รีดักชัน (oxido-reduction) แทนเอนไซม์ไซโลสไฮเมอเรสได้ ทำให้สามารถรีดิวซ์ไซโลสเป็นไซลิทอล และออกซิโดซ์ไซลิทอลไปเป็นไซลูโลสได้อีกด้วยในบางสายพันธุ์ เช่น Yoshitake และคณะ (1973) ใช้แบคทีเรีย *Enterobacter* sp. ผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลส และผู้แต่งคนเดียวกันนี้เองพบว่าเมื่อเติมกลูโคเนต (gluconate) ลงไป จะยับยั้งการผลิตไซลิทอลของ *Corynebacterium* sp.

3. กระบวนการเมแทบอลิซึมในการผลิตไซลิทอลโดยรา

เราสามารถไซโลสได้โดยผ่านวิถีออกซิโด-รีดักชัน (oxido-reduction) ให้กลายเป็นไซลูโลส (Suomalainen และคณะ, 1989; Ojamo, 1994) ในช่วงแรก Chiang และ Knight (1961) พบไซลิทอลปริมาณเล็กน้อย เมื่อทำการเพาะเลี้ยงราที่มีเส้นใย (*Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Gliocladium* sp., *Byssochlamys* sp., *Myrothecium* sp. และ *Neurospora* sp.) ในอาหารที่มีไซโลสเป็นองค์ประกอบ Ueng และ Gong (1982) ก็รายงานผลที่คล้ายคลึงกันเมื่อทำการหมักไฮโดรไลสที่มีเยมิเซลลูโลสจากขานอ้อยเป็นองค์ประกอบด้วย *Mucor* sp.

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไซลิทอลจากกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ

การผลิตไซลิทอลจากจุลินทรีย์เป็นกระบวนการที่มีปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตหลายอย่าง อย่างเช่น สายพันธุ์ ชนิดของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ลักษณะการเพาะเลี้ยง เป็นต้น ปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ล้วนเป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้การผลิตไซลิทอลมีประสิทธิภาพ เราสามารถแยกปัจจัยต่างๆ นี้ออกเป็นสองอย่าง อย่างแรกนั้นเป็นปัจจัยที่ขึ้นกับจุลินทรีย์ที่ใช้หรือสายพันธุ์ของจุลินทรีย์นั่นเอง ส่วนปัจจัยอย่างที่สองเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อกระบวนการผลิตไซลิทอลโดยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพต่างๆ ซึ่งมีดังนี้ อายุของหัวเชื้อ ปริมาณเซลล์เริ่มต้น พีเอช อุณหภูมิ ส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น ปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำตาลชนิดอื่นในฐานะสารตั้งต้นรวม ปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่และความเข้มข้นของไซลิทอล

การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อผลิตไซลิทอล

จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการผลิตไซลิทอลคือ ยีสต์ ซึ่งมียีสต์หลายสายพันธุ์ที่ผลิตไซลิทอลได้ ซึ่งได้มีการศึกษาถึงการผลิตไซลิทอลโดยยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ เพื่อหาชนิดที่ผลิตไซลิทอลได้ดีหรือดีที่สุด ดังในตารางที่ 2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนลิขสิทธิ์สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษา พบว่ายีสต์ที่ผลิตไซลิทอลได้ดีก็คือยีสต์ในกลุ่ม *Candida* sp. ตัวอย่าง เช่น การคัดเลือกยีสต์ 10 สายพันธุ์เพื่อหายีสต์ที่ผลิตไซลิทอลได้ดีที่สุด โดย Gong และคณะ (1981a) ซึ่งพบว่า *Candida tropicalis* นั้นเป็นยีสต์ที่ให้ผลผลิตไซลิทอลได้ดีที่สุด และไม่ผลิตเอทานอลเป็นผลผลิตร่วม นอกจากนี้ Gong และคณะ (1983) ยังได้ศึกษาความสามารถในการใช้น้ำตาลเพนโทสและผลิตไซลิทอลของยีสต์ต่างๆใน *Candida* sp. *Saccharomyces* sp. และ *Schizosaccharomyces* sp. อีกด้วย Barbosa และคณะ (1988) ได้ทำการคัดเลือกยีสต์ 44 สายพันธุ์ที่สามารถเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอลได้ และพบว่าในบรรดาอียีสต์ทั้งหมด *C. tropicalis* และ *C. guilliermondii* สามารถผลิตไซลิทอลได้ดีที่สุด และในปี 1995 Sirisansaneeyakul และคณะได้ทำการเปรียบเทียบยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ 11 สายพันธุ์และพบว่า *C. mogii* สามารถผลิตไซลิทอลได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น ซึ่งเป็นเหตุผลที่ยีสต์ในกลุ่ม *Candida* sp. ถูกนำมาใช้ในการศึกษาการผลิตไซลิทอลเนื่องจากในการศึกษาต่างๆ พบว่ายีสต์ในกลุ่ม *Candida* sp. ให้ผลผลิตไซลิทอลที่สูงเมื่อเทียบกับยีสต์หรือจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น Chen และ Gong (1985) ได้ไซลิทอลถึง 250 กรัม/ลิตร เมื่อใช้ไซโลส 249 กรัม/ลิตร เมื่อใช้ยีสต์ *Candida* sp. ที่กลายพันธุ์ Meyriel และคณะ (1991) ได้ไซลิทอลสูงถึง 221 กรัม/ลิตร จากไซโลส 300 กรัม/ลิตรของไซโลส

นอกจากยีสต์ในกลุ่ม *Candida* sp. แล้วยังมียีสต์อีกหลายชนิดที่ผลิตไซลิทอลได้ Amaral-Collaco และคณะ (1989) ได้แยกเอายีสต์จากวัสดุจำพวกกลีโคไลสมาทำการคัดเลือกหายีสต์ที่ผลิตไซลิทอลและพบว่า *Debrayomyces hunsenii* ให้ผลผลิตสูงและมีอัตราการผลิตที่สูงด้วย และผลการศึกษาของ Vandeska และคณะ (1995) ก็พบว่า *D. hunsenii* และ *C. boidini* เป็นยีสต์ที่ผลิตไซลิทอลได้ดีเช่นเดียวกัน ซึ่ง Domiguez และคณะ (1996) พบว่าจะไซลิทอลถึง 106 กรัม/ลิตร จาก *D. hunsenii* นอกจากนี้ยังมียีสต์ที่ให้ผลผลิตไซลิทอลร่วมกับเอทานอลอีกด้วย ซึ่งพบว่า *C. parasitopsis* ในสภาวะที่มีอากาศเล็กน้อย *C. shehatae* และ *Pachysolen tannophilus* เป็นยีสต์ที่ให้ผลผลิตไซลิทอลสูงสุด และมีการผลิตเอทานอลร่วมด้วย

ตารางที่ 1.5 การผลิตไซลิทอลโดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

Microorganism	Time (h)	So (g l ⁻¹)	Os (g l ⁻¹ h ⁻¹)	% S cons.	P (g l ⁻¹)	Or (g l ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{PS} (g g ⁻¹)	Y _{X/S} (g g ⁻¹)	μ _{max} (h ⁻¹)	Reference
<i>Candida tropicalis</i> HPX2	24	51	2.08	100	40	1.67	0.80	—	—	Gong et al. (1981)
<i>Pachyotlen tannophilus</i> IGB 0101	33.5-41	25-27	0.66-0.75	100	22.9-35.5	0.46-0.56	0.61-0.85	—	—	Debus et al. (1983)
<i>P. tannophilus</i> ATCC32691; <i>P. tannophilus</i> PT15; <i>S. cerevisiae</i> SC138; <i>Candida</i> sp.; <i>Candida</i> sp. XF217	24-72	65-100	0.90-2.71	53.8-100	32-86	0.63-2.17	0.88-0.60	—	—	Gong et al. (1983)
<i>C. pelliculosa</i> + <i>Methanobacterium</i> HU	24	8.5	0.31	88.2	7.8	0.32	1	—	—	Kitpreechavanich et al. (1984)
<i>Candida</i> sp. B-22	168	250	1.49	100	210	1.25	0.84	—	—	Chen & Gong (1985)
<i>P. tannophilus</i> RL 171	—	50	—	—	13.0	—	—	—	—	Woods & Millis (1985)
<i>C. sheatae</i> ATCC 22984	36	—	2.28	89	28	0.78	0.34	—	—	Sreenath et al. (1986)
<i>P. tannophilus</i> ATCC 32691	—	15-60	—	18.2	9.4-15	0.09	—	—	—	Thonart et al. (1987)
<i>P. tannophilus</i> NRRL 2460; <i>C. guilliermondii</i> FTI-20037	137.5-62.5	4-4.2	0.008-0.06	12.5-88.1	0.01-2.75	0.002-0.04	0.01-0.73	—	—	Lee et al. (1988)
<i>C. guilliermondii</i> FTI-20037	78	104	1.33	100	77.2	0.99	0.74	0.048	—	Barbosa et al. (1988)
<i>P. tannophilus</i> NRRL Y-2460; <i>C. sheatae</i> CSIR Y-492; <i>Pichia stipitis</i> CSIR Y-633	75-190	34-36	0.18-0.40	83.3-100	2-10	0.01-0.05	0.06-0.30	0.012-0.058	—	Lighthelm et al. (1988)
<i>C. boidinii</i> n.d.z.ouseco; 2201	144-120	100	0.53-0.68	77-82	35-48.5	0.24-0.40	0.45-0.59	—	—	Vongsuvanlert & Tanl (1989)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> Y-164	44	60	1.34	98.3	7	0.16	0.12	—	—	Lastick et al. (1989)
<i>C. pelliculosa</i> + <i>Methanobacterium</i> sp. HU	33	4.5	0.14	100	2	0.06	0.43	—	—	Nishio et al. (1989)
<i>Debaryomyces hansenii</i> DTIA 77	28	90	—	—	62.6	2.24	0.70	—	—	Girio et al. (1990)
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 28474	—	10	0.28	44.2	137	0.087	0.31	0.32	—	Furlan et al. (1991)
<i>D. hansenii</i> DTIA-77	48	90	1.56	81	40.3	0.84	0.54	0.13	—	Roseiro et al. (1991)
<i>C. guilliermondii</i> NRC 5578	406	300	0.74	100	221	0.54	0.75	0.02	0.01	Meyrial et al. (1991)
<i>C. sheatae</i> ATCC 22984	120	75	0.63	100	4.8	0.04	0.64	—	—	Palnitkar & Lechke (1992)
<i>C. tropicalis</i> IFO 0618	—	172	—	—	—	2.67	0.64	—	—	Horitsu et al. (1992)
<i>C. guilliermondii</i> NRC 5578	49.0-59.5	50-52	0.84-0.98	92.3-99.8	18.4-27.3	0.31-0.56	0.37-0.57	0.03	—	Feschke et al. (1992)
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	—	54.4	—	37	—	0.73	—	—	—	Felipe et al. (1993)
<i>C. guilliermondii</i> NRC 5578; <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 28474	168.7-528.6	300-100	1.78-0.19	100	207-74	1.23-0.14	0.69-0.74	—	0.035-0.034	Nolleau et al. (1993)
<i>C. tropicalis</i> DSM 7524	70-800	155-300	0.34-0.5	91.5-100	95-220	0.28-1.35	0.50-0.74	—	—	da Silva & Afschar (1994)
<i>D. hansenii</i> DTIA 77	—	50	0.26-0.33	—	—	0.033-0.372	0.38-1.43	—	0.033-0.201	Girio et al. (1994)
<i>Candida</i> sp B-22	100	260	2.6	100	215	2.15	0.83	—	—	Cau et al. (1994)
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	48	43	0.66	74	23.5	0.49	0.74	—	—	Silva et al. (1994)
<i>P. tannophilus</i> ATCC 32691; <i>C. sheatae</i> NRRL Y17024; <i>C. parapsilosis</i> ATCC 28474	200-117	50	0.43	100	3-11	0.03-0.26	0.16-0.61	—	—	Furlan et al. (1994)
<i>C. mogii</i> ATCC 18364	—	53	—	—	—	—	0.70	0.12	0.003	Sirisansaneyakul et al. (1995)
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 28474; <i>C. guilliermondii</i> NRC 5578	—	100-300	0.23-0.67	—	—	0.17-0.44	0.75-0.66	0.05-0.03	0.01-0.025	Nolleau et al. (1995)
<i>C. boidinii</i> NRRL-Y17213	245.4-331.9	130-150	0.34-0.5	74.7-92	53.1-58.9	0.16-0.24	0.47-0.48	0.07-0.11	—	Vandeska et al. (1995a)
<i>Candida</i> sp L-102	65.5	114	1.74	99.91	100.1	0.46	0.88	0.025	—	Lu et al. (1995)
<i>C. sheatae</i> ATCC 22984	120-145	50	0.05-0.4	14-96	8.5-1.4	0.01-0.07	0.18-0.21	0.03	—	Hinfray et al. (1995)
<i>C. guilliermondii</i> FTI-20037	—	—	0.70	—	—	0.57	0.82	—	—	Felipe et al. (1995)
<i>C. tropicalis</i> IFO 0618	32-42	150	3.59-4.67	100	84.5-104.5	2.01-3.26	0.56-0.70	0.15-0.26	—	Yahashi et al. (1996a)
<i>C. tropicalis</i> IFO 0618	36-56	170	—	—	85.2-101.6	1.81-2.71	0.50-0.69	—	—	Yahashi et al. (1996b)
<i>C. boidinii</i> NRRL Y-17213	129-242.5	100-130	0.5-0.68	87.7-93	58.2-59.3	0.24-0.46	0.48-0.68	—	0.013-0.020	Vandeska et al. (1996)
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	30	40	1.25	—	21.5	0.66	0.53	0.47	—	Pfeifer et al. (1996)
<i>C. entomazea</i> NRRL Y-7785; <i>Pichia guilliermondii</i> NRRL Y-2075; <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	70-96	50-68	0.49-0.93	80.9-100	21-39.1	0.22-0.55	0.41-0.60	—	—	Saha & Bohast (1996)
<i>C. sheatae</i> ATCC 22984	95	119	1.25	99.6	22	0.23	0.19	—	—	Kastner et al. (1996a)
<i>C. sheatae</i> ATCC 22984	507	115	—	35.5	—	—	0.21	—	—	Kastner et al. (1996b)
<i>C. boidinii</i> NRRL Y-17123	—	100	—	—	—	—	0.2	—	—	Winkelhausen et al. (1996)
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	56-74	19-21	0.28-0.34	100	4-9	0.07-0.16	0.20-0.47	—	—	Lee et al. (1996)
<i>P. tannophilus</i> DSM 70352	—	—	—	—	5	0.24	0.26	—	—	Kruze & Schögerl (1996)
<i>D. hansenii</i> NRRL Y-7426	8	14.7	1.72	93.7	5.8	0.67	0.39	—	—	Parajo et al. (1996)
<i>C. parapsilosis</i> KFCC 10875	66	300	—	—	210	3.18	0.70	0.10	—	Kim et al. (1997)
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> ATCC 24228	73	42	0.58	100	72	0.50	0.52	0.17	—	Parajo et al. (1997)
<i>D. hansenii</i> NRRL Y-7426	48	279	5.81	100	221	4.60	0.79	—	—	Domínguez et al. (1997)

ที่มา : Parajo และคณะ (1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อกระบวนการผลิตไซลิทอลโดยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ

นอกจากสายพันธุ์จะมีผลต่อการผลิตไซลิทอลแล้ว ยังมีปัจจัยอื่นๆอีกที่ยังมีผลต่อการผลิตไซลิทอลด้วย ซึ่งปัจจัยต่างๆ นั้นมีดังนี้

อายุของหัวเชื้อ

มีผลต่อกิจกรรมของเซลล์และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต ทำให้มีผลต่ออัตราการผลิต และปริมาณผลผลิตด้วย (Sreenarth และคณะ, 1986 ; dupreez, 1994) Sreenarth และคณะ(1986) พบว่าเมื่อใช้ *C. shehatae* อายุ 24 ชั่วโมงเป็นหัวเชื้อจะผลิตไซลิทอล 20 กรัม/ลิตรเมื่อเวลาผ่านไป 22 ชั่วโมง (อัตราการผลิตไซลิทอลจากไซโลส = 0.24 กรัมไซลิทอล/กรัมไซโลส) ขณะที่เชื้ออายุ 72 ชั่วโมงผลิตได้เพียง 9 กรัม/ลิตร และใช้เวลานานถึง 65 ชั่วโมง (อัตราการผลิตไซลิทอลจากไซโลส = 0.13 กรัมไซลิทอล/กรัมไซโลส) ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการทดลองใน *C. guilliermondii* ที่พบว่าอายุของหัวเชื้อมีผลต่อทั้งผลผลิตและการเจริญเติบโตของเซลล์เมื่อใช้หัวเชื้ออายุน้อยกว่า 15 ชั่วโมง และอายุมากกว่า 24 ชั่วโมง (Pfeifer และคณะ, 1996) นอกจากนี้ Filipe และคณะ (1997) ก็ได้ศึกษาเชื้อชนิดเดียวกัน พบว่าเมื่อใช้หัวเชื้อที่อายุ 48 ชั่วโมง จะมีอัตราการผลิตต่ำกว่าเมื่อใช้หัวเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง 36 เปอร์เซ็นต์

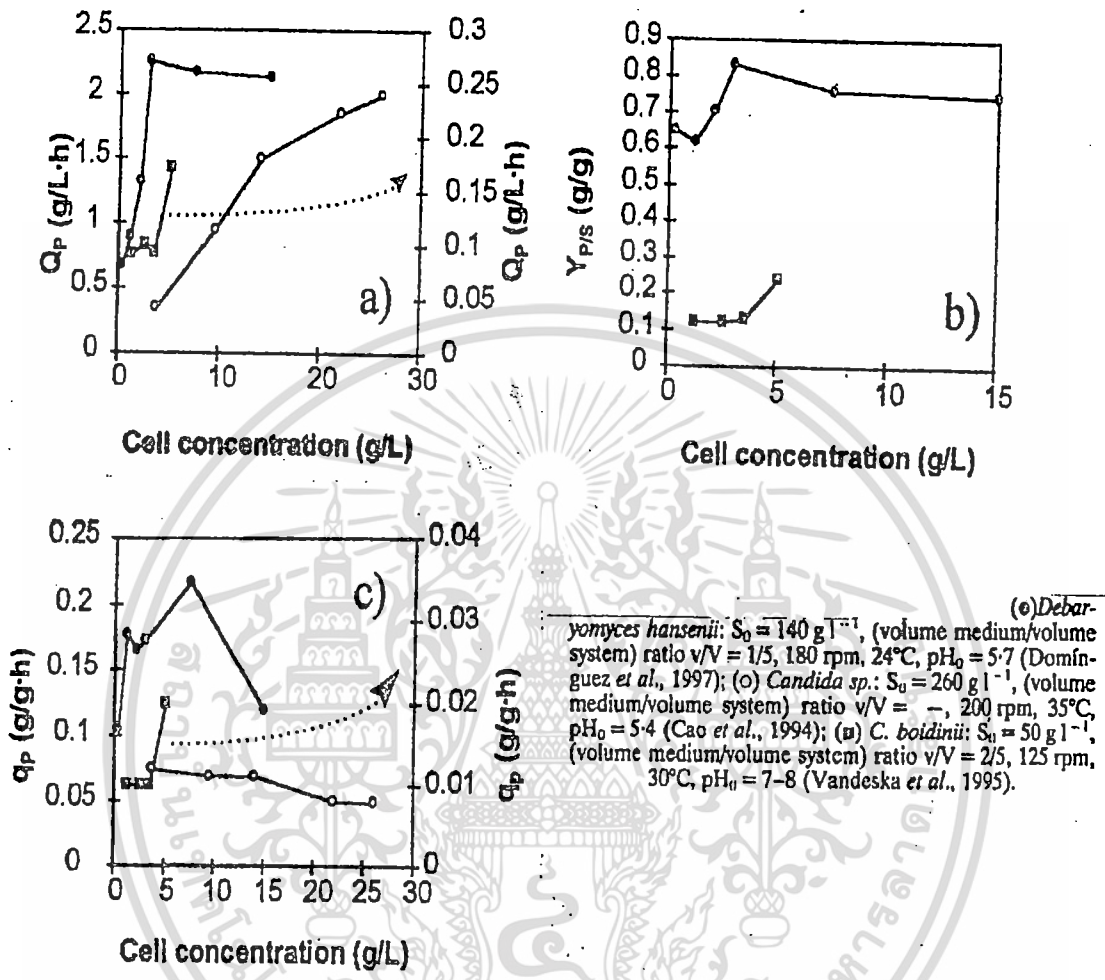
ดังนั้น อายุหัวเชื้อที่เหมาะสมมักจะอยู่ในช่วงต้น เพราะพบว่าจะทำให้ได้ผลผลิตไซลิทอลที่สูงกว่าและมีอัตราการผลิตสูงกว่าหัวเชื้อที่มีอายุมาก แต่อายุที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไปตามเชื้อนั้น

ปริมาณหัวเชื้อ

ภาพที่ 2.8 แสดงอิทธิพลของปริมาณหัวเชื้อต่อผลผลิตและอัตราการผลิตไซลิทอล Cao และคณะ (1994) ได้ศึกษาการหมักน้ำตาลไซโลส ด้วย *Candida* sp. ที่กลายพันธุ์ พบว่ามีการผลิตไซลิทอลเพิ่มขึ้น เมื่อปริมาณมวลชีวภาพเพิ่มขึ้นจาก 3.8 ถึง 14 กรัม/ลิตร เช่นเดียวกับ Dominguez และคณะ (1997) ที่ทำการศึกษาในเชื้อ *Debraryomyces hansenii* จาก 0.3 ถึง 3 กรัม/ลิตร พบว่าเพิ่มสูงขึ้น (พิจารณาจากค่า อัตราการผลิต จาก 0.68 ถึง 2.25 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง) Vandeska และคณะ (1995) พบว่าเมื่อปริมาณมวลชีวภาพเพิ่มมากขึ้น อัตราการผลิตและผลผลิตจะมีแนวโน้มที่สูงขึ้น แต่แนวโน้มของอัตราการผลิตจำเพาะเมื่ออัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์เริ่มต้น/ปริมาณสับสเตรทเริ่มต้น (X_0/S_0) เข้าใกล้ $1/10$ นั้นจะเป็นไปในทางตรงกันข้าม

เนื่องจากปริมาณไซลิทอลที่ผลิตได้และอัตราการผลิต จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีจำนวนเซลล์มากขึ้น ดังนั้นปริมาณหัวเชื้อจึงมีผลต่อการผลิตไซลิทอลด้วย โดยพบว่าถ้ามีความเข้มข้นของหัวเชื้อมาก จำนวนเซลล์ย่อมเพิ่มมากขึ้น ทำให้มีอัตราการผลิตไซลิทอลได้สูงและรวดเร็วขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตเห็นาเบไซบระโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 1.8 ผลของปริมาณหัวเชื้อ
 a) อัตราการผลิตไซลิทอล (Q_p)
 b) ผลได้ไซลิทอลจากไซลอส ($Y_{P/S}$)
 c) อัตราการผลิตไซลิทอลจำเพาะ (q_p)
 ที่มา :Parajo และคณะ (1997)

พีเอช

ค่าพีเอชที่เหมาะสมที่ใช้นั้นขึ้นกับชนิดของยีสต์ พีเอชที่เหมาะสมจะช่วยให้ยีสต์เจริญได้ดี และผลิตไซลิทอลได้สูงขึ้น แต่พีเอชที่เหมาะสมของยีสต์แต่ละชนิดก็แตกต่างกันด้วยดังตารางที่ 1.6

ตารางที่ 1.6 ค่าพีเอชที่เหมาะสมของเชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์	พีเอชที่เหมาะสม	เอกสารอ้างอิง
<i>Debaryomyces hasenii</i>	5.5	Dominguez และคณะ (1997)
<i>Candida</i> sp.	4-6	Cao และคณะ (1996)
<i>C. boidinii</i>	7.0	Vandeska และคณะ (1995) Vonsuvanlert และTani (1989)
<i>C. parasilopsis</i>	4.5-5	Nolleauและคณะ (1995)
<i>C. guilliermondii</i>	6.0	Nolleau และคณะ (1995)
<i>C. tropicalis</i>	4.0	Yahashi และคณะ (1996)

ที่มา : Parajo และคณะ (1997)

นอกจากนี้พีเอชยังมีผลต่อชนิดของผลิตภัณฑ์ที่เกิดด้วย ดังที่พบใน *Candida shehatae* ซึ่งพบว่า เมื่อพีเอชเป็น 2.5 จะให้ผลผลิตเป็นไซลิทอลเพียงอย่างเดียวและผลผลิตไซลิทอลที่ได้ที่พีเอชนี้จะเป็นพีเอชสูงสุดแต่เมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นพบว่าผลผลิตที่ได้เป็นไซลิทอลผสมกับเอทานอล และนอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อทำการหมักโดยไม่มีการควบคุมพีเอช พีเอชจะลดลงเสมอ (Girio และคณะ, 1990 ; Schneider และคณะ, 1985)

อุณหภูมิ

ยีสต์สามารถผลิตไซลิทอลได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ คือ 24-45 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตไซลิทอลของยีสต์จึงแตกต่างกันไปตามชนิดของยีสต์ แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดอยู่ในช่วง 28 - 30 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นผลผลิตที่ได้ก็จะลดลง แต่มียีสต์บางชนิดช่วงอุณหภูมิที่แตกต่างไปจากนี้ ซึ่ง Debus และคณะ (1983) พบว่า *Pachysolen tannophilus* สามารถผลิตไซลิทอลได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยขึ้นกับว่าใช้น้ำตาลชนิดไหนเป็นแหล่งคาร์บอน และพบว่าเมื่อใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน อุณหภูมิที่เหมาะสมก็จะเปลี่ยนไปเป็น 31 องศาเซลเซียสและมีรายงานว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 30 - 37 องศาเซลเซียส *P. tannophilus* จะผลิตไซลิทอลได้ลดลง (Barbasa และคณะ, 1990) ส่วน *C. guilliermondii* สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แต่ผลิตไซลิทอลได้ในความเข้มข้นที่สูงที่สุดและให้ผลผลิตสูงสุดในช่วงอุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส (Barbosa, 1998)

นอกจากนี้ Cao และคณะ (1994) และ Dominguez และคณะ (1997) พบว่าการผลิตไซลิทอลจะคงที่เมื่ออุณหภูมิเป็น 35-40 องศาเซลเซียสสำหรับ *Candida* sp. และ 28-37 องศาเซลเซียสสำหรับ *D. hansenii* ตามลำดับ

องค์ประกอบของอาหารที่ใช้

ถ้าไม่รวมน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน องค์ประกอบที่มีผลต่อการผลิตไซลิทอลอย่างมากคือแหล่งไนโตรเจน โดยลักษณะและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน มีผลต่อการผลิตโดยขึ้นกับชนิดของยีสต์ โดยทั่วไปแหล่งไนโตรเจนที่ให้ผลผลิตไซลิทอลได้ดีคือแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์เพราะให้ผลผลิตไซลิทอลสูงกว่าและผลิตได้ดีกว่าเช่น การผลิตไซลิทอลจาก *Candida boidinii* เมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนแทนแอมโมเนียมซัลเฟตพบว่าให้ผลผลิตสูงกว่าเดิม (Vandeska และคณะ, 1995) และพบว่าเชื้อชนิดนี้เมื่อใช้สารสกัดยีสต์ (yeast extract) จะให้ผลผลิตสูงสุดเมื่อเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่น (Vonsuvanlerit และ Tani, 1989) และการศึกษาใน *C. shehatae* พบว่าถ้าใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์จะทำให้เชื้อใช้ไซโลสได้ดีขึ้น (Palnitkar และ Lachke, 1992) นอกจากนี้ Sirisansaneeyakul และคณะ (1995) ซึ่งทำการศึกษาใน *C. mogii* พบว่าอาหารที่มีการเติมยีสต์สกัดและเปปโตเนลงไปจะช่วยให้การเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลดีขึ้น

แต่บางครั้งแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ก็ให้ผลลบเมื่อเทียบกับเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ เช่น *C. guilliermondii* จะมีอัตราการผลิตลดลงเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น ยูเรีย เมื่อเทียบกับแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟตหรือแอมโมเนียมคลอไรด์ แต่ปริมาณผลผลิตที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก (Silva และคณะ, 1994)

Schneider และคณะ (1985) ได้ทำการวิเคราะห์สารอาหารต่างๆ โดยไม่พิจารณาแหล่งคาร์บอน ในฐานะที่เป็นตัวจำกัดการเจริญเติบโต ก็พบว่ามีการลดลงของ doubling time เมื่อใช้อาหาร YNB ที่ไม่เติมกรดอะมิโน นอกจากนี้ Barbosa และคณะ, 1990 รายงานว่าการผลิตไซลิทอลของยีสต์ชนิดเดียวกันลดลงเมื่อมีการเติมยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร ลงในอาหาร แต่อัตราการใช้ไซโลสจะเพิ่มสูงขึ้น

ดังนั้นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดควรจะเป็นสารอินทรีย์แต่บางกรณีเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์จะให้ผลผลิตดีกว่า ดังนั้นต้องเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนโดยขึ้นกับชนิดของเชื้อด้วยว่าเหมาะกับการใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์หรืออนินทรีย์

นอกจากแหล่งไนโตรเจนแล้วยีสต์ยังต้องการวิตามินและสารบางชนิดเพื่อการเจริญเติบโต และเพิ่มอัตราการผลิตไซลิทอลด้วย เช่น

ไบโอติน

พบว่าไบโอตินเพียงเล็กน้อย ทำให้อัตราการผลิตไซลิทอลของ *C. guilliermondii* เพิ่มขึ้นจาก 0.002 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง เป็น 0.009-0.044 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง (Lee และคณะ, 1988)

แมกนีเซียมไอออน

ช่วยให้เกิดการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอลโดยตรงใน *Pichia stipitis* (Mahler และ Guebel, 1994)

เมทานอล

ช่วยให้ผลิตไซลิทอลได้สูงขึ้น เนื่องจากการออกซิเดชันของเมทานอลนั้นจะช่วยเพิ่ม NADH ซึ่งเป็นโคเอนไซม์ของเอนไซม์ที่ผลิตไซลิทอลในยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลได้ Vonsuvanlert และ Tani (1989) รายงานว่าเมื่อเติม 1เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เมทานอลลงไปจะช่วยเพิ่มอัตราการผลิตไซลิทอล

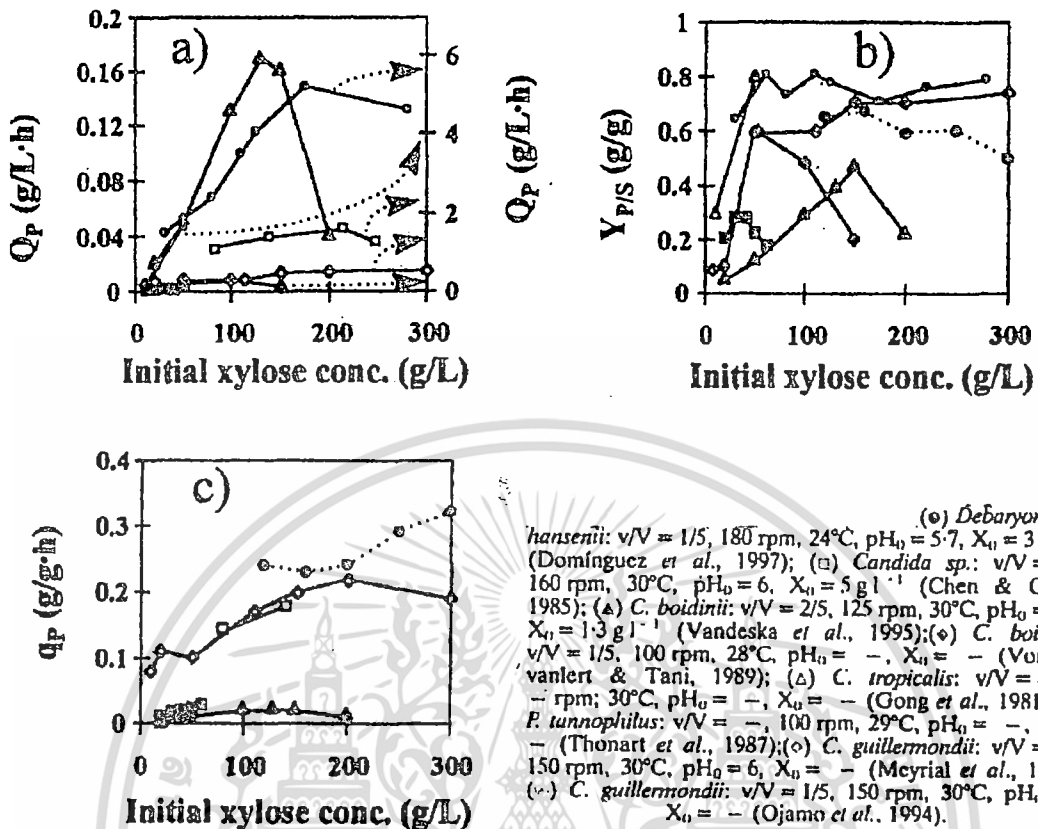
นอกจากนี้ยังมีสารบางตัวที่มีผลยับยั้งหรือชะลอการผลิตไซลิทอลเช่น โพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethyleneglycol) และโซเดียมเอไซด์ (sodiumazide) เป็นต้น

ความเข้มข้นของสารตั้งต้น

เป็นปัจจัยที่มีผลอย่างมากต่อการผลิตไซลิทอล ความเข้มข้นของสารตั้งต้นเกี่ยวข้องกับ การให้อากาศในขณะทำการหมัก และมีผลต่อการเจริญของเชื้อและมีผลต่อเนื้องไปยังปริมาณ ผลผลิต ถ้าความเข้มข้นของไซโลสที่เป็นสารตั้งต้นสูงและมีอัตราการให้อากาศที่สูง เซลล์จะ เจริญได้ดีทำให้ความเข้มข้นของเซลล์มากทำให้การผลิตไซลิทอลสูงตามไปด้วย (Nolleau และ คณะ, 1993)

ความเข้มข้นสารตั้งต้นสูงเกินไปจะยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. guilliermondii* เมื่อใช้น้ำตาลไซโลส 20-50 กรัมต่อลิตร จะให้ (da Silva และ Afschar, 1994) อัตราการเจริญสูงสุด (Meyriel และคณะ, 1991) ถ้าความเข้มข้นของสารตั้งต้นน้อยเกินไปผลผลิตที่ได้จะลดลง เนื่องจากสารตั้งต้นส่วนหนึ่งถูกใช้ในการเจริญของเซลล์ ดังนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของไซโลสจะช่วยเพิ่มผลผลิตของไซลิทอลแต่ต้องไม่มากจนเกิดการยับยั้ง นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มข้นของไซโลส ยังจะช่วยเพิ่มอัตราการผลิตไซลิทอล และอัตราการผลิตไซลิทอล อีกด้วย ดังภาพที่ 2.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 1.9 ผลของความเข้มข้นของสารตั้งต้นเริ่มต้นต่อ

- a) อัตราการผลิตไซลิทอล (Q_p)
 b) ผลได้ไซลิทอลจากไซโลส ($Y_{p/s}$)
 c) อัตราการผลิตไซลิทอลจำเพาะ (q_p)
 ที่มา : Parajo และคณะ (1997)

สำหรับความเข้มข้นที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์และสภาวะในการหมัก เช่น ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *P. tannophilus* (Thonart และคณะ, 1987) *C. tropicalis* (Gong และคณะ, 1981) *C. guilliermondii* (Meyriat และคณะ, 1991) เป็น 100 200 และ 100 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่ง Sirisansaneeyakul และคณะ (1995) พบว่าผลผลิตไซลิทอลจะเพิ่มขึ้นถึง 5.5 เท่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไซโลสจากเดิมเป็น 5 เท่าและอัตราจำเพาะของการใช้สารตั้งต้นและการเกิดผลิตภัณฑ์ก็เพิ่มขึ้นตามไปด้วย แต่โดยปกติเมื่อความเข้มข้นเริ่มสูงถึงช่วง 150-200 กรัมต่อลิตร จะเริ่มเกิดการยับยั้งการเจริญ

Meyriat และคณะ, 1991 รายงานผลว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไซโลสจนถึง 150 กรัม/ลิตร จะเกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *C. guilliermondii* และยังมีเกิดในยีสต์ชนิดต่างๆ

เช่น *Candida* sp. B-22 ผลิตไซลิทอลได้ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเป็น 249 กรัม/ลิตร (Chen และ Gong, 1985) *C. boidini* (vandeska และคณะ, 1995 ; Dominguez และคณะ, 1997) *D. hansenii* (Vongsuvanlert และ Tani, 1989 เป็นต้น ผลที่เกิดขึ้นนี้อาจเนื่องมาจาก osmophilic effect หรือ substrate repression ของเอนไซม์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของไซโลส หรือเกิดการยับยั้งในช่วงต้นๆ ของความเข้มข้นซึ่งจะมีผลต่ออัตราการผลิตและมีผลต่อเนื่องไปยังผลผลิตอีกด้วยเกิดเนื่องจากการยับยั้งโดยสารตั้งต้น (substrate inhibition) ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ในช่วงต้นมากกว่าจะมีผลยับยั้งการผลิตไซลิทอล (Thonart และคณะ, 1987 ; Meyriel และคณะ, 1991 ; Vandeska และคณะ, 1995) ซึ่งความเข้มข้นของสารตั้งต้นนี้จะมีอิทธิพลต่อระดับการให้อากาศและการเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ด้วย

ปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ (Dissolved Oxygen, DO)

ปริมาณออกซิเจนที่ให้เป็นปัจจัยที่สำคัญมากปัจจัยหนึ่งในการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสให้เป็นไซลิทอลโดยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ ความเข้มข้นของปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ มีความสัมพันธ์ค่อนข้างมากกับความเข้มข้นของสารตั้งต้นจึงมักศึกษาควบคู่กันไป เพื่อให้สามารถอธิบายถึงอิทธิพลที่แท้จริงของปัจจัยทั้งสอง การให้อากาศที่เหมาะสมจะขึ้นกับความเข้มข้นของสารตั้งต้นและลักษณะของการหมัก Horitsu และคณะ (1992) Roseiro และคณะ (1991) Nollean และคณะ (1993) พบว่าสภาวะการให้อากาศจะมีผลต่ออัตราการผลิต ที่ดีที่สุดขึ้นกับความเข้มข้นของสารตั้งต้นด้วย ถ้าความเข้มข้นสูงอัตราการให้อากาศควรจะสูงด้วย นอกจากนี้การให้อากาศยังขึ้นอยู่กับเซลล์ด้วยว่าเซลล์อยู่ในรูปเซลล์อิสระหรือเซลล์ตรึง เนื่องจากอัตราการส่งผ่านออกซิเจนที่ทำให้เกิดสภาวะที่มีอากาศเล็กน้อย (microaerophilic condition) แก่เซลล์อิสระนั้นอาจทำให้เกิดสภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobic condition) เนื่องจากข้อจำกัดในการแพร่ที่เกิดจากการถ่ายเทมวล Peschke และคณะ (1992) ได้ศึกษาการผลิตไซลิทอลโดย *C. guilliermondii* เมื่อทำการให้อากาศในปริมาณเท่าเดิม (อากาศอิมตัว 5 เปอร์เซ็นต์) พบว่าเซลล์อิสระให้ไซลิทอล 27.3 กรัมต่อลิตร (อัตราการผลิตไซลิทอล = 0.70 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง และ ผลได้ของไซลิทอลจากไซโลส = 0.64 กรัมไซลิทอล/กรัมไซโลส) แต่เซลล์ตรึงที่ตรึงด้วยแคลเซียมแอลจีเนต (Ca-alginate) นั้นให้ไซลิทอลเพียง 18.4 กรัมต่อลิตร (อัตราการผลิตไซลิทอล = 0.43 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง และผลได้ของไซลิทอลจากไซโลส = 0.78 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส) เห็นได้ว่าการให้อากาศที่ต่ำขณะทำการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการตรึงเซลล์จะทำให้การผลิตไซลิทอลลดลงอย่างมาก ซึ่งสาเหตุนี้เนื่องมาจากความแตกต่างของความเข้มข้นของสารตั้งต้นในเมทริกซ์ ออกซิเจนจะสามารถแทรกเข้าไปภายในของเจลได้เมื่อทำการหมักที่อัตราการถ่ายเทออกซิเจน

transfer rate) สูงเท่านั้น ดังนั้นเมื่อเซลล์อยู่ในรูปเซลล์ตรึง การให้อากาศเมื่อเทียบกับเซลล์แบบอิสระต้องสูงกว่าเพื่อให้เกิดการแพร่ของอากาศเข้าไปในเม็ดเจลได้

ปริมาณอากาศจะมีผลต่อปริมาณเซลล์ซึ่งจะมีผลต่อเนื่องไปยังผลผลิตที่ได้ ถ้าให้อากาศต่ำไปเซลล์จะเจริญเติบโตไม่ดีและตายได้ แต่ถ้าให้อากาศสูงตลอดเวลาปริมาณออกซิเจนที่สูงก็จะมีผลทำให้ไซลิทอลถูกเปลี่ยนเป็นเซลลูโลสแทน จึงอาจจะใช้วิธีให้อากาศสูงในช่วงแรกเพื่อให้เกิดเซลล์มากแล้วลดการให้อากาศลง เพื่อให้เกิดการผลิตไซลิทอล

ผลของการใช้น้ำตาลชนิดอื่นเป็นสารตั้งต้นร่วม

มีการศึกษาการใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นร่วมในการผลิตไซลิทอล ดังเช่นในตารางที่ 1:7 ตารางที่ 1:7 การใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นร่วมในการผลิตไซลิทอล

Microorganism	Operational conditions	Xylose (g l ⁻¹)	Glucose (g l ⁻¹)	Time (h)	P (g l ⁻¹)	Q _p (g l ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{PS} (g g ⁻¹)	Cells (g l ⁻¹)	Y _{X/S} (g g ⁻¹)	Reference
<i>C. guilliermondii</i>	v/V = 1/2-5/200 rpm/30°C	54-43	0		37-01		0-73			Felipe et al. (1993)
		56-78	2-60		35-39		0-77			
		60-53	6-86		25-31		0-69			
		57-27	12-32		18-14		0-66			
		60-66	21-87		12-92		0-44			
<i>C. guilliermondii</i>	Anaerobiosis (N ₂)/ pH = 6/30°C	59-55	33-16		9-42		0-37			Nolleau et al. (1995)
		14	0	20	1	0-05	-	-	-	
<i>C. parapsilosis</i>	Anaerobiosis pH = 6/30°C	14	16	8	1-5	0-19	0-75	2	1	Nolleau et al. (1995)
<i>C. tropicalis</i>	Column reactor with 200 ml working volume	10	0	10	-	-	-	-	-	Yahashi et al. (1996a)
		10	9	40	2-5	0-062	1	-	-	
		150	0*	42	84-5	2-01	0-56	23-1	-	
		150	5*	36	94-0	2-61	0-63	34-8	-	
		150	10*	42	102-2	2-43	0-68	37	-	
		150	15*	42	98	2-33	0-65	38	-	
<i>C. guilliermondii</i>	Batch/300 rpm/ 0-46 vvm/30°C	150	20*	42	100	2-38	0-74	42	-	Silva et al. (1996)
		150	0	32	93-9	2-94	0-63	22-7	-	
		65	0	-	-	0-55	0-60	-	0-06	
<i>C. boidinii</i>	Fed-batch/0-75 vvm/ 150 rpm	65	15	-	-	0-31	0-41	-	0-06	Vandeska et al. (1996)
		14	0	-	46-50	0-34	0-64	20-98	-	
		14	0-14	-	39-41	0-33	0-57	20-20	-	

ที่มา : Parajo และคณะ (1997)

Yahashi และคณะ (1996a) พบว่า *C. tropicalis* ผลิตไซลิทอล 84.5 กรัม/ลิตรและใช้กลูโคสในการเจริญเติบโตและซ่อมแซมเซลล์ และใช้ไซโลสในการผลิตไซลิทอล การใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นร่วมกับไซโลสจะช่วยปรับปรุงการผลิตแต่การเติมให้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเสริมจะทำให้การใช้ไซโลสลดลงและเกิดผลผลิตอื่นๆ ที่ไม่ต้องการเช่น กลีเซอรอล และไรบิทอล แต่ Yahashi และคณะ (1996) พบว่าการเติมกลูโคสลงไปเป็นสารตั้งต้นร่วมนั้นให้ผลดีเนื่องจากไซโลสจะเปลี่ยนเป็นไซลิทอลได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น เพราะว่าเซลล์จะมีการเจริญได้ดีกว่าใช้ไซโลสเพียงอย่างเดียวจึงผลิตไซลิทอลได้สูง และกลูโคสยังช่วยเพิ่ม NADPH เมื่อเกิดเมแทบอลิซึม

ของกลูโคสในวิถีเพนโทสฟอสเฟตอีกด้วย Sreenart และ Jeffries (1996) รายงานว่าเมื่อมีกลูโคส *C. shehatae* จะใช้ไซโลสได้เร็วขึ้น แต่ให้ผลผลิตลดลงแม้ว่า อัตราการผลิต จะเพิ่มขึ้นก็ตาม

เมื่อมีกลูโคสในอาหาร กลูโคสจะยับยั้งการใช้ไซโลสของยีสต์ และจะใช้กลูโคสในการเจริญอย่างรวดเร็ว เมื่อความเข้มข้นของกลูโคสลดลงความสามารถในการใช้ไซโลสของยีสต์จะกลับคืนมาตามปกติ (Nolleau และคณะ, 1995) Pfeifer และคณะ (1996) พบว่าผลกระทบต่อการใช้ไซโลสของยีสต์เมื่อเติมกลูโคสและอัตราการผลิต เพิ่มขึ้นเล็กน้อยน่าจะมาจากการที่กลูโคสเพิ่ม NADPH เมื่อมีการเติมกลูโคสลงไป ในอาหารที่มีไซโลส กลูโคสถูกนำไปใช้ในการเจริญแทนไซโลส ทำให้มีไซโลสเหลืออยู่มากจึงผลิตไซลิทอลได้มากขึ้น แต่บางครั้งการเติมกลูโคสอาจทำให้เกิดการยับยั้งเอนไซม์ xylose reductase ทำให้ได้ผลผลิตได้ไม่ดีเท่าที่ควร (Filipe และคณะ, 1993 ; Lee และคณะ, 1996 ; Vandeska และคณะ, 1996)

ความเข้มข้นของไซลิทอล

Kastner และคณะ (1996) พบว่ามีการยับยั้งการผลิตไซลิทอลใน *C. shehatae* โดยได้ไซลิทอลเพียง 50 กรัมต่อลิตรเท่านั้น ทั้งนี้น่าจะมาจากความเข้มข้นของไซลิทอลภายในน้ำหมักสูงขึ้น การขนถ่ายไซลิทอลมานอกเซลล์จะเริ่มลดลงเกิดการสะสมของไซลิทอลภายในเซลล์และยับยั้งการผลิตได้ และไซลิทอลถูกยีสต์นำไปใช้ได้ยากจึงเกิดการสะสมได้ง่าย (Hagerdal และคณะ, 1994) และมีผลต่อการยับยั้งการผลิตได้ นอกจากนี้ Sirisunsaneeyakul และคณะ (1995) ก็ได้พบการยับยั้งแบบนี้เช่นเดียวกันเมื่อทำการผลิตไซลิทอลโดย *C. mogii* โดยเมื่อความเข้มข้นของไซลิทอลในน้ำหมักสูงถึง 100 กรัม/ลิตร อัตราการผลิตจำเพาะและผลผลิตที่ได้จะลดลง ยกเว้นในยีสต์บางชนิด เช่น *D. hansenii* ที่สามารถใช้ไซลิทอลได้ในบางสภาวะ เช่นเมื่อสารตั้งต้นถูกใช้จนหมด (Nolleau และคณะ, 1993) นอกจากนี้เชื้อ *P. tannophilus* ที่อยู่ในน้ำหมักที่มีความเข้มข้นของไซลิทอลสูงมากและอยู่ในสภาวะที่มีอากาศจะสามารถนำไซลิทอลไปใช้ได้ และได้ผลผลิตออกมาเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และผลผลิตอื่นที่ไม่สามารถระบุได้ (Wood และ Milis, 1985 ; Xu และ Taylor, 1983) นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ในการใช้ไซลิทอลและการผลิตไรโบฟลาวิน (riboflavin) ใน *C. guilliermondii* อีกด้วย (Leather และ Gupta, 1997)

อุปกรณ์และวิธีการ

จุลินทรีย์

Candida tropicalis TISTR 5045 และ *Candida guilliermondii* TISTR 5206 ได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ทำการเก็บเป็น Stock culture ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

อุปกรณ์

เครื่องมือ

1. สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ model DENWAY 6405 UVMIS
2. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubater shaker) model NO.INNOVA-Y230
3. เครื่องชั่งสาร
4. เครื่องวัดพีเอช
5. ตู้อบ
6. เครื่องแก้ว
7. อ่างควบคุมอุณหภูมิ

สารเคมี

1. HCl
2. Sodiumperiodate
3. Butane-2,3-diol
4. Pentane-2,4-diol
5. Ammonium acetate
6. acetic acid
7. ไส้โลหะ
8. ไส้ลิทอล
9. กลูโคส
10. ยีสต์สกัด (yeast extract)
11. มอลต์สกัด (malt extract)
12. เปปโตน (peptone)
13. KH_2PO_4
14. $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15. $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
16. $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
17. $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$
18. Na_2SO_4 (anhydrous)
19. Sodium potassium tartrate (tetrahydrate)
20. โซเดียมไฮดรอกไซด์
21. แอมโมเนียมโมลิบเดต (Ammonium molybdate)
22. กรดซัลฟูริก
23. ไดโซเดียมอาร์เซเนต (Disodium arsenate)

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมหัวเชื้อ

1.1 เตรียมอาหารเพื่อการเจริญเติบโต (ในสัดส่วน 1:1 ของสูตรอาหารแต่ละเชื้อ) บรรจุพลาสติกขนาด 250.0 มิลลิลิตร พลาสติกละ 100 มิลลิลิตร ซ้ำเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 ถ่ายเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 และ *Candida quilliermondii* TISTR 5206 จากหลอดทดลองลงในพลาสติกที่มีอาหารเพื่อการเจริญเติบโต ในข้อ 1.1

1.3 นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

1.4 นำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์โดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ 600 นาโนเมตร

2. การศึกษาปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสม

2.1 ทำการเตรียมหัวเชื้อตามข้อ 1

2.2 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อ 1.1

2.3 เติมหหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 และ 9.0 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก ๆ 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าความขุ่นเซลล์โดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ 600 นาโนเมตร

3. การศึกษาปริมาณกลูโคสที่เหมาะสม

3.1 ทำการเตรียมหัวเชื้อตามข้อ 1

3.2 เตรียมอาหารเพื่อการเจริญเติบโต 75.0 มิลลิลิตร ให้มีปริมาณกลูโคสเป็น 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ บรรจุพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ผ่านเชื้อที่ 12 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3.3 เติมหัวเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2

3.4 เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อ นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก ๆ 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าความขุ่นของ เซลล์โดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ 600 นาโนเมตร

4. ศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสม

4.1 ทำการเตรียมหัวเชื้อตามข้อ 1

4.2 เตรียมอาหารเพื่อการเจริญเติบโต 75.0 มิลลิลิตร ให้มีปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3 และมีปริมาณอีสต์สกัดที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4 บรรจุพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ผ่านเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

4.3 เติมหัวเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2

4.4 นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบเป็น 250 280 300 และ 320 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก ๆ 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าความขุ่นเซลล์โดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ 600 นาโนเมตร

5. ศึกษาการผลิตไซโทลโดยใช้น้ำตาลกลูโคสและไซโลสในระดับพลาสติก

5.1 ทำการเตรียมหัวเชื้อตามข้อ 1

5.2 เตรียมอาหารเพื่อการผลิตที่ไม่มีไซโลสโดยนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ส่วนไซโลสแยกฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

5.3 เติมหัวเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2

5.4 นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเป็นระยะทุก ๆ 2 ชั่วโมง และนำมา วัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี Somogyi Nelson's method (1952) ซึ่งแสดงในภาคผนวก ค

5.5 เมื่อปริมาณกลูโคสเหลือ 2 กรัมต่อลิตร เต็มไซโลสลงไปให้มีความเข้มข้น เป็น 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ลดความเร็วรอบลงเป็น 150 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่าง ทุก ๆ 2 ชั่วโมง และนำไปหาปริมาณไซลิทอลโดยใช้วิธีของ Adler และ Gustafsson (1980)

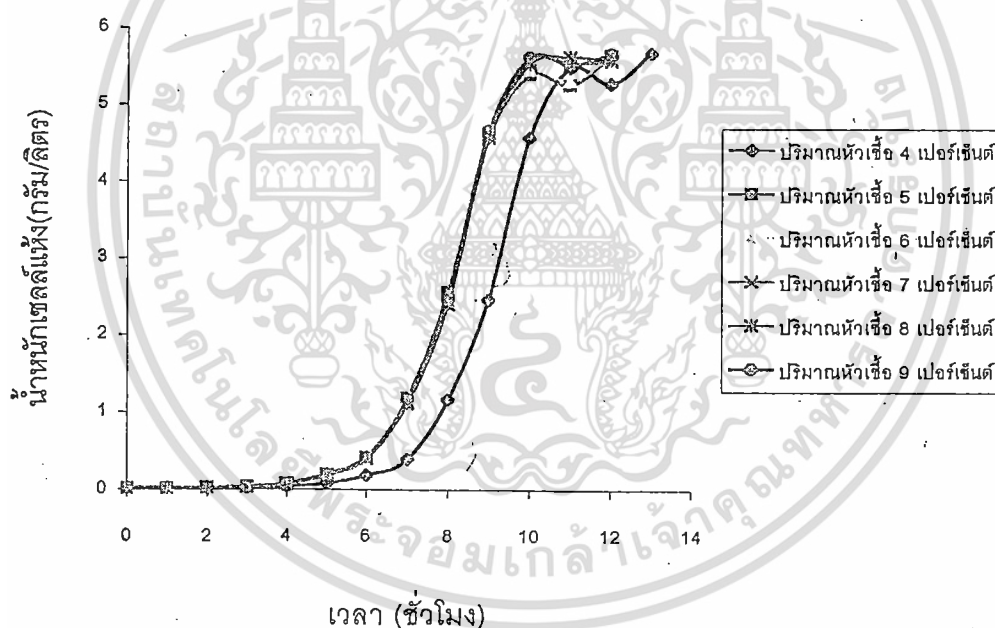


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสม

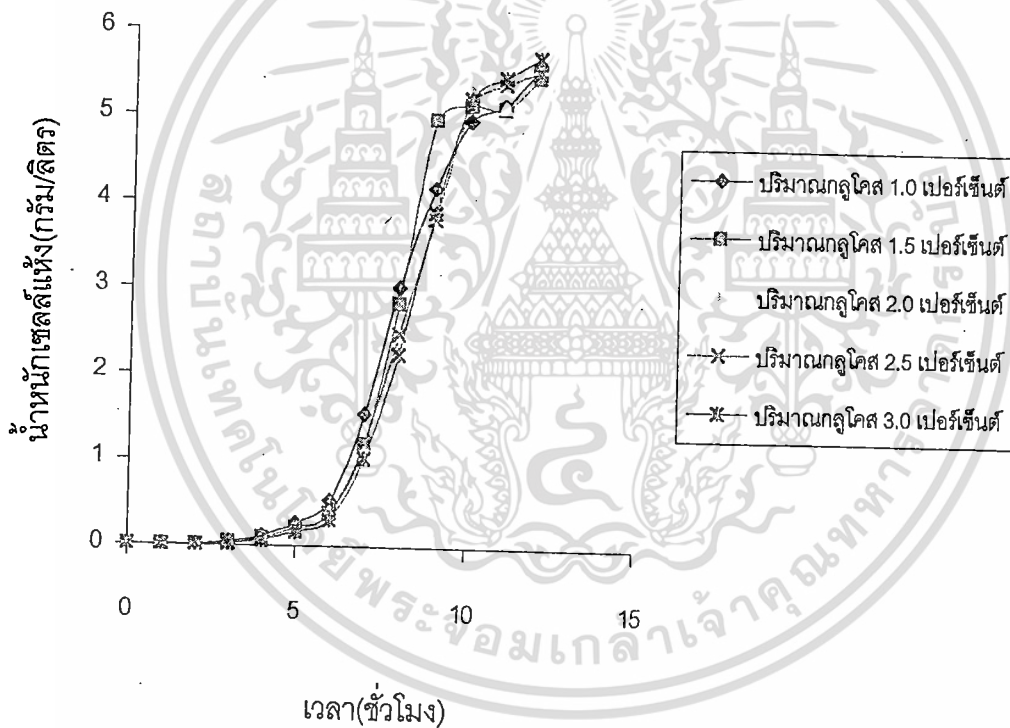
จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *บสผ.ก.๑* 2 ชนิด ในอาหารเพื่อการเจริญเติบโตโดยแปรผันปริมาณหัวเชื้อที่ 4 5 6 7 8 และ 9 เปอร์เซ็นต์ พบว่าทุกความเข้มข้นที่แปรผันมีการเติบโตสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 10 ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบกับอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) พบว่าทุกความเข้มข้นให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดที่ใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติดังตารางที่ ก.2 (ภาคผนวก ก) ดังนั้นจึงใช้ปริมาณหัวเชื้อที่ 4 เปอร์เซ็นต์ซึ่งให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเป็น 0.8095 ต่อชั่วโมง เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 1.10 เปรียบเทียบการเติบโตของเชื้อ *บสผ.ก.๑* 2 ชนิด ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต โดยแปรผันความเข้มข้นของปริมาณหัวเชื้อที่ 4 5 6 7 8 และ 9 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2. การศึกษาปริมาณกลูโคสที่เหมาะสม

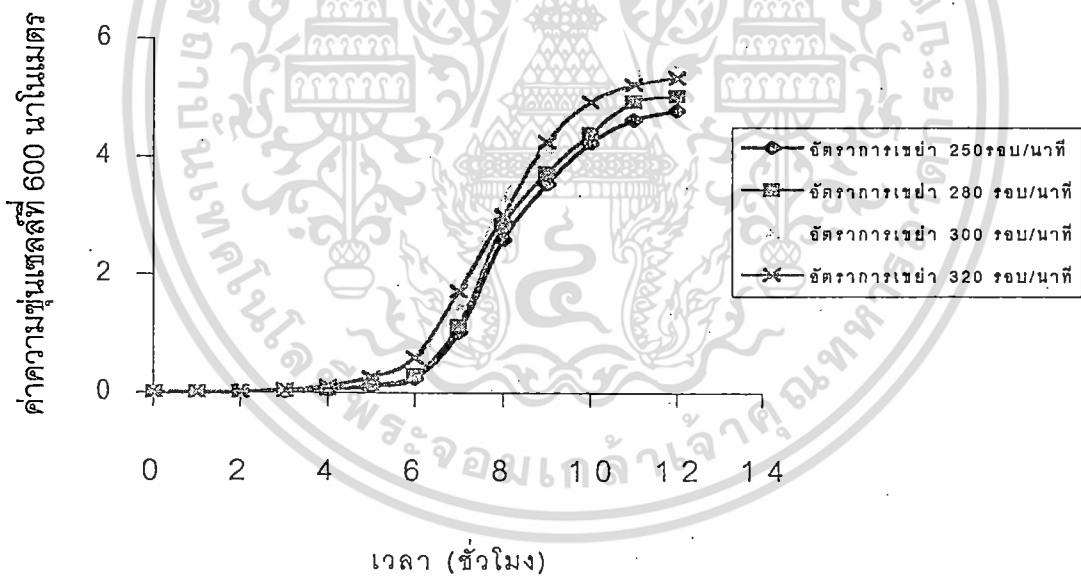
จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *ยีสต์* ในอาหารเพื่อการเจริญเติบโตโดยแปรผันปริมาณกลูโคสที่ 1 1.5 2 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าทุกความเข้มข้นที่แปรผันให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดที่ใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติดังตารางที่ ก.4 (ภาคผนวก ก) ดังนั้นปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมที่สุด คือ 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเป็น 0.8406 ต่อชั่วโมง ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Yuuichi และคณะ (1996) และ D-K.Oh. และ S-Y. Kim (1998) โดยได้ทำการศึกษาปริมาณกลูโคสที่ใช้ในอาหารเพื่อการเจริญเติบโตโดยใช้ความเข้มข้นของกลูโคส 1-3 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาณกลูโคสที่ทำให้ได้น้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุดคือ 1 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 1.71 เปรียบเทียบการเติบโตของเชื้อ *ยีสต์* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต โดยแปรผันความเข้มข้นของปริมาณกลูโคสที่ 1 1.5 2 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3 การศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสม

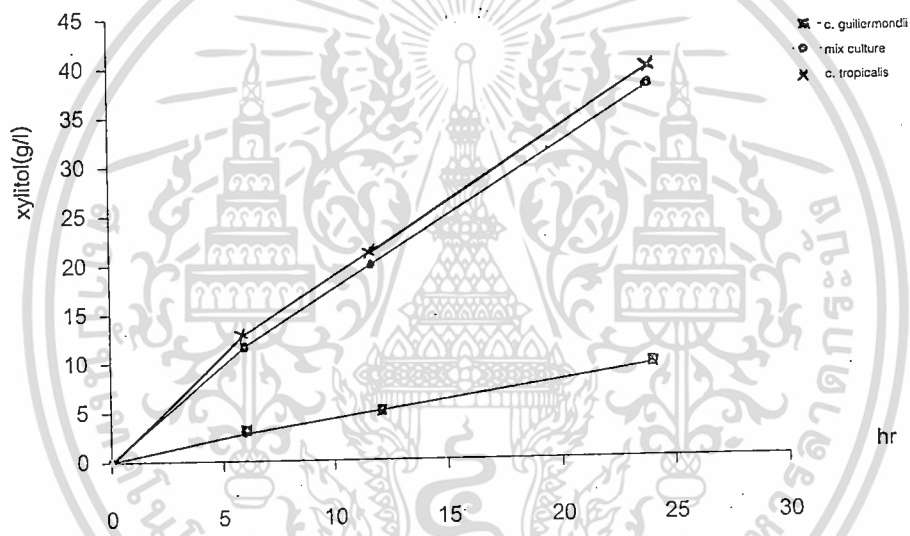
จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *แบคทีเรีย* ในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต โดยแปรผันอัตราการเขย่าที่มีความเร็วรอบ 250 280 300 และ 320 รอบ/นาที พบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดของเชื้อในอาหารที่มีแปรผันอัตราการเขย่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติดังตารางที่ก.๒ (ภาคผนวก ก) จึงทำการวิเคราะห์ความแตกต่างแบบ LSD (ภาคผนวก ก) พบว่าที่อัตราการเขย่า 300 รอบ/นาทีซึ่งให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะมากที่สุดมีความแตกต่างกับอัตราการเขย่าที่ 250 และ 280 รอบ/นาทีอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง อัตราการเขย่า 300 ไม่มีมีความแตกต่างกับอัตราการเขย่าที่ 320 รอบ/นาที อัตราการเขย่าที่ให้ผลดีที่สุด คือ อัตราการเขย่าที่มีความเร็วรอบ 300 รอบ/นาที



ภาพที่ 1.2 เปรียบเทียบการเติบโตของเชื้อ *แบคทีเรีย* ในอาหารเพื่อการเจริญเติบโตโดยแปรผันอัตราการเขย่าที่มีความเร็วรอบที่ 250 280 300 และ 320 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4. การศึกษาความสามารถในการผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสโดยมีกลูโคส เป็นสารตั้งต้นร่วมของเชื้อผสมเปรียบเทียบกับเชื้อเดี่ยว

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อผสมทั้ง 2 ชนิดในอาหารเพื่อการผลิตโดยใช้อัตราส่วนของกลูโคสต่อไซโลสที่ 1:10 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับเชื้อเดี่ยว พบว่า หลังจากเพาะเลี้ยงไปได้ประมาณชั่วโมงที่ 6 ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงชั่วโมงที่ 24 เชื้อผสมจะสามารถผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้ 37.97 กรัมต่อลิตร ส่วนเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 สามารถผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้ 39.47 กรัมต่อลิตร และเชื้อ *Candida guilliermondii* TISTR 5206 สามารถผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้ต่ำที่สุดคือ ผลิตได้ 9.40 กรัมต่อลิตร ดังภาพที่ 1.13 และตารางที่ 1.10 ส่วนภาพที่ 1.14 และตารางที่ 1.11แสดงปริมาณของน้ำตาลไซโลสที่ลดลง เพื่อนำไปใช้ในการผลิตน้ำตาลไซลิทอล

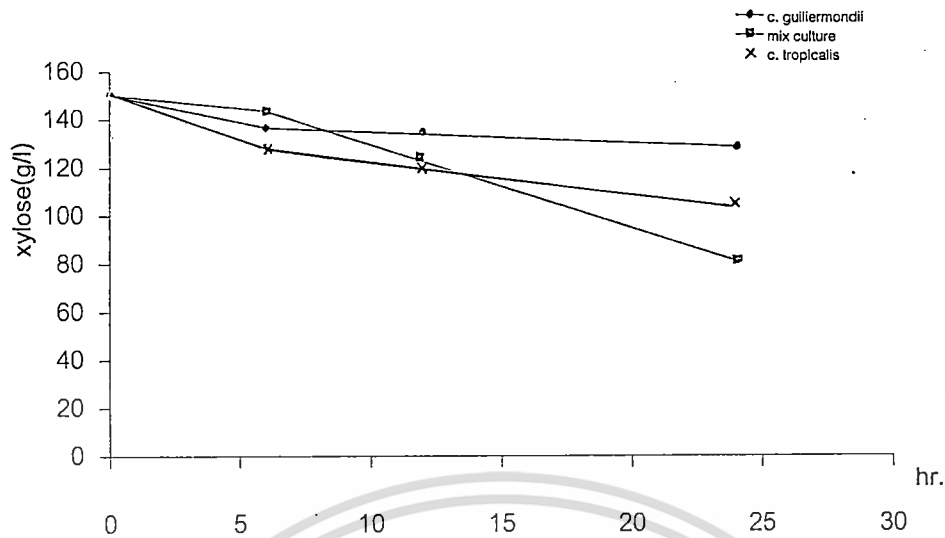


ภาพที่ 1.13 แสดงการผลิตน้ำตาลไซลิทอล โดยเชื้อผสมทั้ง 2 ชนิด เปรียบเทียบกับเชื้อเดี่ยวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 1.10 แสดงปริมาณน้ำตาลไซลิทอลที่ผลิตได้ (g/l) โดยเชื้อผสมทั้ง 2 ชนิด เปรียบเทียบกับ เชื้อเดี่ยวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เวลา (hour)	<i>C. guilliermondii</i>	Mix culture	<i>C. tropicalis</i>
0	0	0	0
6	2.77	11.62	12.79
12	4.20	16.89	21.68
24	9.40	37.79	39.47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 1.14 แสดงการใช้น้ำตาลไซโลสเพื่อผลิตน้ำตาลไซลิทอลโดยเชื้อผสมทั้ง 2 ชนิดเปรียบเทียบกับเชื้อเดี่ยว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 1.11 แสดงการใช้ปริมาณน้ำตาลไซโลส (g/l) เพื่อผลิตน้ำตาลไซลิทอลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เวลา (hour)	<i>C. guiliermondii</i>	Mix culture	<i>C. tropicalis</i>
0	150	150	150
6	136.40	143.31	128.06
12	129.67	124.96	121.37
24	128.35	80.80	103.83

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสและกลูโคสโดยใช้เชื้อผสมของ *Candida tropicalis* TISTR 5045 และ *Candida guilliermondii* TISTR 5206 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของการเจริญเติบโตของเชื้อผสม เพื่อผลิตน้ำตาลไซลิทอลเมื่อใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อของแต่ละเชื้อในอัตราส่วน 1:1 พบว่าต้องใช้กลูโคสต่อไซโลสในอัตราส่วน 1:10 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นที่ 4.5-5.5 ทำการเลี้ยงในระดับฟลasks ภายใต้สภาวะการเจริญใช้อัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่ 4 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เชื้อผสมผลิตไซลิทอลได้ 37.79 กรัมต่อลิตร ใกล้เคียงกับเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 คือผลิตไซลิทอลได้ 39.47 กรัมต่อลิตร ขณะที่ *Candida guilliermondii* TISTR 5206 ผลิตไซลิทอลได้ปริมาณต่ำสุดคือ 9.40 กรัมต่อลิตรที่ 24 ชั่วโมง



เอกสารอ้างอิง

- นรินทร์ เรืองพานิช. 2541. ผลของกลูโคสต่อการผลิตไซลิทอลจากไซโลสภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจน. เทคนิควิจัย ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะอุตสาหกรรมเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 70 น.
- วรสิทธิ์ ไทจำปา. 2541. การผลิตไซลิทอลโดยการหมักบนเยื่อเซลล์ด้วย Hollow fiber. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต คณะอุตสาหกรรมเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 86 น.
- Arron, M. A.. 1993. Low Caloric Foods Handbooks. Georgetown University School of Medicine Washinston DC., USA.
- Barbosa, M. F. S., M. B. de Medeiros, I. M. de Mancilha, H. Schneider and H. Lee.. 1988. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which effect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. J. Ind. Microbial. 3 : 241-251.
- Batzinger, R.P. Ou S-Y and Bueding E.. 1977. Saccharine and other sweetener, Mutagenic properties. 198 : 944-946.
- Berry, F., Sayadi, S., nasri, M., Barbotin, J.N., Thomas, D. 1988. Effect of growing conditions of recombinant *E. coli* in carragenan gel beads upon biomass production and plasmid stability. Bitecnol. Lett. 10 : 619-624.
- Culbert, S.J. Wang, Y.M., Frische, H.A. Carr, D. Lantin, E. and Van Eyes. 1986. Oral xylitol in american adults. Nutrition Res., 198 : 913-922.
- Dahiya, J. S. 1991. Xylitol production by *Petromyces albertensis* grown on medium containing D - xylose. Can. J. Microbiol. 37 : 14-18.
- Dominguez, J.M. 1998. Xylitol production by free and immobilized *Debaryomyces hansenii*. Biotechnol. Lett. 20 : 53-56.

- Eleonora Vandeska, S. Amatey, Slobodanka and T.W. Jeffries. 1996. Fed – batch culture for xylitol production by *Candida boidinii*. Pro. Biochem. 31 : 265–270.
- Emodi, A. 1978. Xylose : its properties and food applications. Food Technol. Jan : 28–32.
- Furlan, S.A., P. Bouillouds, and H.F. de Castro. 1994. Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts. Process Biochem. Lett. 3 : 203–206.
- Gong, C.S., L.F. Chen. And G.t. Tsao. 1981. Quantitative production of xylitol form D – xylose by high – xylitol producing yeasts mutant *Candida tropicalis* HXP2. Biotechnol. Bioeng. 25 : 85–102.
- Hofer, M., A. Betz. and A. Ktyk. 1971. Metabolism of the obligatory aerobic yeast *Rhodotorular gracilis* : introduction of an enzyme necessary for D – xylose catabolism. Biochem. Biophys. Acta. 252 : 1–12.
- Hollmann, S. and O. Touster. 1957. L – xylulose – xylitol enzyme and other polyol dehydrogenase of guinea pig liver mitochondria. J. Biol. Chem. 225 : 87–102.
- Horitsu, H., Y. Yahashi, K. Takamizawa, K. Kswai, T. Suzuki and N. Watanabe. Production of xylitol form D – xylose by *Candida tropicalis* : 1992 optimization of production rate . Bitech. Bioeng. 40:1085-1091.
- Hsiao, H.Y., C.I. Chiang., P.P. Ueng., and G.T. Tsao. 1982. Sequential utilization of mixed monosaccharide by yeast. App. Environ. Microbial. 43 : 840–845.
- Kitpreechavanich, V., M. Hayashi, N. Nishio and S. Nagai. 1984. Conversion of D– Xylose into xylitol by xylose reductase form *Candida pelliculosa* coupled with oxidoreductase system of mutagen stain HU. Biotechnol. Lett. 6 : 651–656.
- Lee, C.W. and H.N. Chang. 1987. Kinetics of ethanol fermentations in membrane cell recycle fermentors. Biotechnol. Bioeng. 29 : 1,150–1,112.
- Meyrial, V., J. P. Delgines, R. Moletta and J.M. Navarro. 1991. Nigam, P. and D. Singh., 1995. Process for fermentative production of xylitol a sugar substitute. J. Pro. Biochem. 30 : 117-124

- Nishio, N., K. Sugawa, N. Hayase and S. Nagai. 1989. Conversion of D-xylose into xylitol by immobilized cell of form *Candida pelliculosa* and *Methanobacterium* sp.. HU. J. Ferment. Bioeng. 67 : 356-360.
- Nolleau, V., L. Preziosi-Belloy, J.P. Delgeges and J.M. Navarr. 1993. Xylitol production form xylose by two yeast strains : sugar tolerance. Curr. Microbiol. 27 : 191-197.
- Onishi, H. and T. Suzuki. 1966. The production of xylitol, L-arabinitol and ribitol by Yeasts. Agr.Biol. Chem.30 : 1139-1144.
- Onishi, H., T. Suzuki. and T. Onchi. 1980. Mechanism of fermentation conversion from polyalcohol fermentation to ethanol by *Pichia miso*. Agr. Biol. Chem. 44 : 1829-1834.
- Prior, B.A., S.G. Killian. and J.C. Du Preeze. 1989. Fermentation of D-xylose by the yeast *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. Pro. Biochem. 24 : 2-32.
- Poca, E., N. Meinander and B. Hahn-Hagerdel. 1996. Xylitol production by immobilized recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in a continuous packed-bed reactor. Biotechnol. Bioeng. 51 : 317-326.
- Roseio, J.C., M.A. Peito., F.M. Girio. and M.T. Amaral - Collaeo. 1991. The effect of oxygen transfer coefficient and substrate concentration on the xylose fermentation by *Debaryomyces hansenii*. Arc. Microbiol. 156 : 484-490.
- Sirisansaneeyakul, S., M. Rizzi and M. Reuss. 1992. Microbial Production of Xylitol from wheat straw hydrolysates. DECHEMA Biotechnology conference vol. 5(B) : 541-544.
- Sirisansaneeyakul, S., M. staniszewski and M. Rizzi. 1995. Screening of yeasts for production of xylitol form D-xylose. J. Ferment. Bioeng. 80 : 565-570.
- Vongsuvanlert, V. and Y. Tani. 1989. Xylitol production by a methanol yeast, *Candida boidinii*(*Kloeckers* sp.) No. 2201. J. Ferment. Bioeng. 67 : 35-39.
- Washuttl, J., P. Riederer and E. Bancher. 1973. A qualitative and quantitative study of sugaralcohol in several foods. J. Food Sci. 38 : 1262-1263.

ภาคผนวก ก

ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางที่ ก.1 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ปริมาณหัวเชื้อ 4.0-9.0 เปอร์เซ็นต์ที่เวลาต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้งที่ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น (กรัม/น้ำหนักเซลล์แห้ง/ลิตร)					
	4 เปอร์เซ็นต์	5 เปอร์เซ็นต์	6 เปอร์เซ็นต์	7 เปอร์เซ็นต์	8 เปอร์เซ็นต์	9 เปอร์เซ็นต์
0	0.0086	0.0101	0.0103	0.0097	0.0100	0.0107
1	0.0095	0.0122	0.0110	0.0109	0.0092	0.0114
2	0.0175	0.0177	0.0184	0.0171	0.0202	0.0199
3	0.0360	0.0388	0.0381	0.0381	0.0324	0.0336
4	0.0776	0.0785	0.0810	0.0780	0.0638	0.0730
5	0.1848	0.1908	0.1949	0.2004	0.1975	0.1855
6	0.3946	0.3988	0.3864	0.4059	0.4183	0.4128
7	1.1755	1.1959	1.1751	1.1430	1.1237	1.1787
8	2.4718	2.5740	2.5165	2.4608	2.4036	2.4771
9	4.5868	4.5891	4.5886	4.6445	4.5819	4.6727
10	5.4892	5.4045	5.4663	6.0313	5.5454	5.6888
11	5.1383	5.2689	5.3181	5.6176	5.6320	5.5365
12	5.6852	5.6522	5.6516	5.5831	5.5931	5.6713

ตารางที่ ก.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสม

Source of Variation	Degree of Freedom	Sum of Squares	Mean of Squares	F value	tabular F	
					5 เปอร์เซ็นต์	1 เปอร์เซ็นต์
treatment	5	0.0262	0.0052	0.7273 ^{ns}	3.11	5.06
error	12	0.0865	0.0072			
total	17	0.1127				

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ปริมาณกลูโคส 1.0-3.0 เปอร์เซ็นต์ที่เวลาต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้งที่ปริมาณกลูโคส (กรัม/น้ำหนักเซลล์แห้ง/ลิตร)				
	1 เปอร์เซ็นต์	1.5 เปอร์เซ็นต์	2. เปอร์เซ็นต์	2.5 เปอร์เซ็นต์	3 เปอร์เซ็นต์
0	0.0086	0.0082	0.0086	0.0079	0.0079
1	0.0088	0.0103	0.0095	0.0098	0.0079
2	0.0195	0.0207	0.0175	0.0165	0.0135
3	0.0519	0.0443	0.0360	0.0315	0.0263
4	0.1201	0.0925	0.0776	0.0822	0.0706
5	0.2690	0.2203	0.1848	0.1853	0.1653
6	0.5349	0.3841	0.3946	0.3924	0.3161
7	1.5491	1.1974	1.1755	1.2200	1.0314
8	3.2884	2.8389	2.4718	2.4822	2.2432
9	4.1799	4.9780	4.5868	3.8136	3.8927
10	4.7057	5.1441	5.4892	5.1606	5.6768
11	5.0626	5.0714	5.1383	5.6961	5.9236
12	5.5981	5.4856	5.6109	5.5531	5.7105

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณกลูโคสที่เหมาะสม

Source of Variation	Degree of Freedom	Sum of Squares	Mean of Squares	F value	tabular F	
					5 เปอร์เซ็นต์	1 เปอร์เซ็นต์
treatment	4	0.0818	0.0204	1.0207 ^{ns}	3.48	5.99
error	10	0.2003	0.0200			
total	14	0.2821				

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก. 5 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้เมื่อใช้อัตราการเขย่า 280 – 320 รอบ/นาที ที่เวลาต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)			
	250 รอบ/นาที	280 รอบ/นาที	300 รอบ/นาที	320 รอบ/นาที
0	0.006	0.006	0.009	0.01
1	0.006	0.007	0.01	0.008
2	0.013	0.013	0.021	0.019
3	0.028	0.032	0.052	0.048
4	0.059	0.063	0.122	0.111
5	0.115	0.14	0.276	0.246
6	0.245	0.304	0.542	0.602
7	1.033	1.144	1.534	1.729
8	2.603	2.841	3.324	3.016
9	3.544	3.734	4.157	4.261
10	4.244	4.404	5.306	4.939
11	4.633	4.947	5.479	5.424
12	4.797	5.04	5.502	5.432

ตารางที่ ก. 6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการผลิตที่เหมาะสม

Source of Variance	Degree of Freedom	Sum of Square	Mean of Square	F value	tabular F	
					5เปอร์เซ็นต์	1เปอร์เซ็นต์
treatment	3	0.457	0.152	34**	3.11	5.06
error	9	0.04	0.004			
total	11	0.497				

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ ๗ แสดงผลต่างระหว่างอัตราการใช้ยาด้วยวิธี LSD

อัตราการใช้ยา	ผลต่างอัตราการใช้ยา จำเพาะสูงสุด	LSD _{0.05}	LSD _{0.01}
300และ320	0.0023 ^{ns}	0.0117	0.0168
300และ280	0.0022 ^{**}		
300และ250	0.0017 ^{**}		

LSD_{0.05} = ความแตกต่างที่นัยสำคัญ 95 เปอร์เซ็นต์

LSD_{0.01} = ความแตกต่างที่นัยสำคัญ 99 เปอร์เซ็นต์

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

** = มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเก็บรักษาเชื้อ

อาหารที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อ คือ YM Agar มีสูตรดังนี้

ยีสต์สกัด (yeast extract)	3 กรัม
มอลต์สกัด (malt extract)	3 กรัม
เปปโตน (peptone)	5 กรัม
กลูโคส	10 กรัม
ยูน	15 กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0 มิลลิลิตร

เตรียมอาหารทำการปรับพีเอชให้เหมาะสม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่ 121 องศา

เซลเซียส นาน 15 นาที

2. อาหารเพื่อการเจริญเติบโต

ยีสต์สกัด (Yeast extract)	5 กรัม
กลูโคส	10 กรัม
KH_2PO_4	15 กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3 กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0 มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 4.0

เตรียมอาหารเหลวทำการปรับพีเอชให้เหมาะสม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่ 121 องศา

เซลเซียส นาน 15 นาที

3. อาหารเพื่อการผลิต

ยีสต์สกัด (Yeast extract)	5 กรัม
กลูโคส	10 กรัม
ไซโลส	150 กรัม
KH_2PO_4	15 กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3 กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0 มิลลิลิตร
พีเอช 4.0	

เตรียมอาหารเหลวทำการปรับพีเอชให้เหมาะสม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ภาคผนวก ค

สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี Somogyi Nelson's method (ดัดแปลงจาก Somogyi, 1952)

1.1 สารละลายคอปเปอร์รีเอเจนต์ (Copper reagent) ประกอบด้วย

A : 10% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 100 มิลลิลิตร เตรียมโดยชั่งคอปเปอร์ซัลเฟตไฟไฮเดรต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 10 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร)

B : สารละลายฟอสเฟตทาร์เทรต(Phosphate-tartrate solution) เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(Na_2HPO_4) 28 กรัม (หรือโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตทเวลดไฮเดรต($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 70.5495 กรัม)ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต(เตตระไฮเดรต) (Sodium potassium tartrate(Tetrahydrate)) 40 กรัม ทำให้ละลาย แล้วเติม 1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH) 100 มิลลิลิตร ตามด้วย โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส(Na_2SO_4 (Anhydrous)) 120 กรัม เมื่อละลายดีแล้วปรับปริมาตรเป็น 900 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ถ้ามีตะกอนให้กรองเอาตะกอนทิ้งด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4

ผสมสารละลาย A(100 มิลลิลิตร) และ B(900 มิลลิลิตร) เข้าด้วยกัน

1.2 สารละลาย Nelson's Arsenomolybdate color reagent ประกอบด้วย

A : ละลาย แอมโมเนียมโมลิบเดต [$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] 25 กรัม ในน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร เติมกรดกำมะถัน 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

B : ไดโซเดียมอาร์ซิเนต ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 3 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน เก็บไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้องและควรเก็บในขวดสีชา

2.วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสโดยวิธี Somogyi Nelson's method

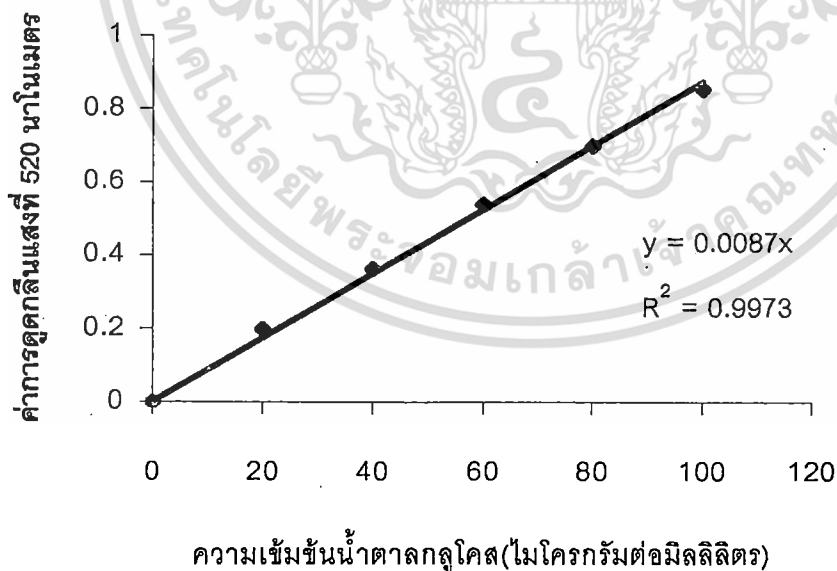
2.1 เติมหตัวอย่างที่ต้องการหาน้ำตาลรีดิวซ์ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมหคอปเปอร์รีเอเจนต์(Copper reagent) 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ควรใช้ลูกแก้วปิดปากหลอดแก้วเพื่อลดการระเหยของน้ำ

2.2 ทำให้เย็นโดยแช่ในอ่างน้ำ เติมหา์เซนโมลิบเดต รีเอเจนต์ (Arsenomolybdate reagent) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที จะเห็นเป็นสีเขียว หรือสีน้ำเงินเขียว ขึ้นกับปริมาณน้ำตาล

2.3 เติมน้ำ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร

2.4 นำค่าที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

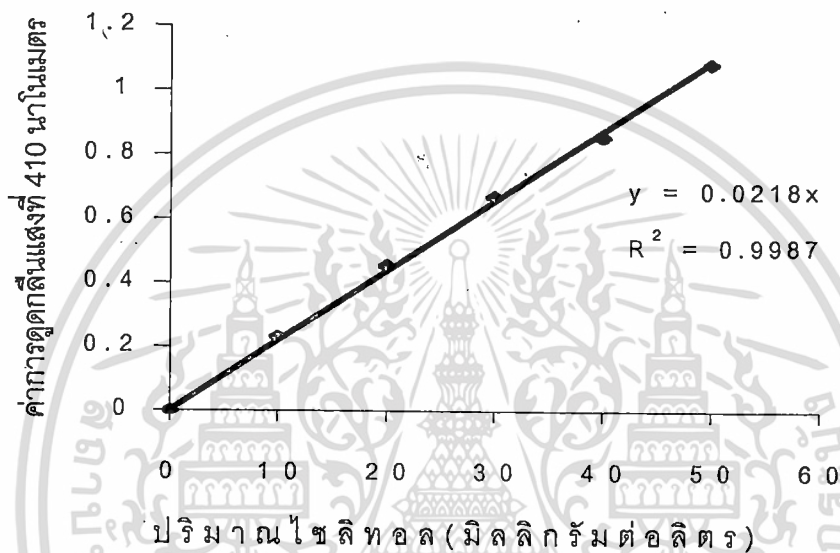
การทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ให้สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแทนตัวอย่างจากนั้นทำการวิเคราะห์ตามข้อ 2.1-2.3 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตรที่ได้และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานมาสร้างกราฟมาตรฐานของกลูโคส



ภาพที่ค.1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

4.6 ทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร

4.7 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรและความเข้มข้นของไซลิทอลไปสร้างกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซลิทอล



ภาพที่ค.2 กราฟมาตรฐานของไซลิทอล

4.8 การหาปริมาณของไซลิทอลในสารละลายตัวอย่าง สามารถคำนวณได้จาก

$$\text{ปริมาณไซลิทอล} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร}) \times (\text{อัตราการเจือจาง})}{0.0218}$$

5. วิธีการหาน้ำหนักแห้ง (Cell Dry Weight)

5.1 เติมหิวเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่มีค่าความขุ่นเซลล์เท่ากับ 0.5 โดยเติมหิวเชื้อประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ลงในพลาสติกที่บรรจุอาหารเพื่อการเจริญเติบโต 75 มิลลิลิตรในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 2 พลาสติก

5.2 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนได้ปริมาณเซลล์สูงสุด (ชั่วโมงที่ 12)

5.3 เติยหมายเลขที่กระดาศกรองเบอร์ 5 และนำไปอบ 105 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับภายในงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
นำไปใช้ในใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.4 เมื่อได้ปริมาณเซลล์สูงสุดให้เจือจางให้มีค่าความขุ่นเซลล์ต่างๆ กันอยู่ในช่วง 0.1-0.8 ประมาณ 5 ค่า

5.5 ทำการต่อชุดกรอง และนำกระดาษกรองไปวางบนกรวยกรอง นำน้ำกลั่นฉีดให้ทั่วกระดาษกรอง

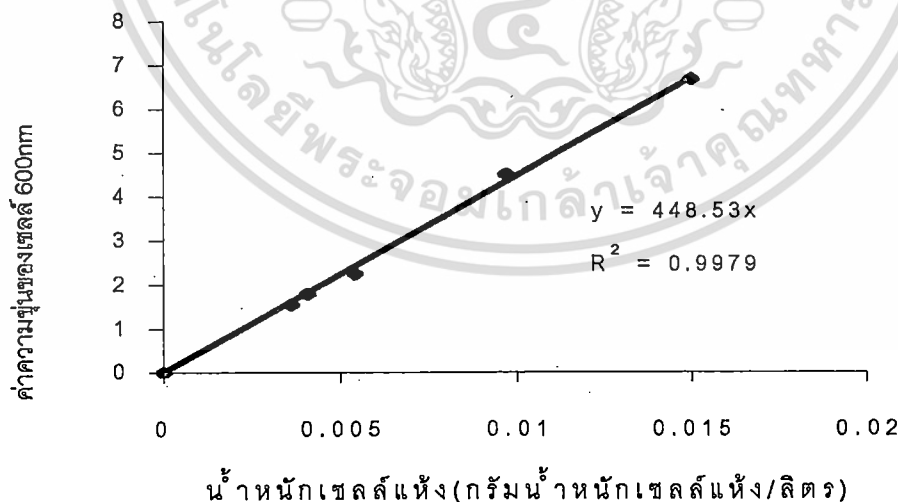
5.6 บีบเปิดสารละลายจากข้อ 5.4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรมาทำการกรอง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ทำ 3 ครั้ง

5.7 นำกระดาษกรองไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง

5.8 นำไปใส่ในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งน้ำหนักเมื่อกระดาษกรองเย็นลงแล้ว

คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง = น้ำหนักกระดาษหลังกรอง - น้ำหนักกระดาษก่อนกรอง

5.9 นำน้ำหนักเซลล์แห้งและเวลาไปสร้างกราฟ



ภาพที่ 3.3 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งกับค่าความขุ่นเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

วิธีวิเคราะห์ทางสถิติ

1. Complete Randomized Design (CRD)

เป็นแบบแผนการทดลองที่มีการจัดสิ่งทดลอง ทั้งหมดลงในหน่วยทดลอง (experimental units) โดยวิธีสุ่ม โดยให้หน่วยทดลองแต่ละหน่วยมีโอกาสได้รับสิ่งทดลองแต่ละชนิดเท่าๆ กัน สำหรับ CRD ความแตกต่างระหว่างหน่วยทดลองหลายๆ หน่วยที่ได้รับสิ่งทดลองเดียวกัน เรียกว่า "ความคลาดเคลื่อนของการทดลอง (experimental error)" ดังนั้น CRD จึงเหมาะสำหรับงานทดลองที่มีหน่วยทดลองสม่ำเสมอทั้งหมดอย่างงานทดลองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถควบคุมสิ่งแวดล้อมให้สม่ำเสมอได้ง่าย

การวิเคราะห์ความแปรปรวน การตรวจหาความแตกต่างระหว่างสิ่งทดลองที่ศึกษากระทำโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) โดยที่แหล่งความแปรปรวนของ CRD แบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ ความแปรปรวนของสิ่งทดลอง (treatment variation) และความคลาดเคลื่อนของการทดลอง (experimental error) แสดงเป็นรูปตารางได้ดังนี้

Source of variation	Degree of Freedom	Sum of Squares	Mean of Squares	F value	Tabular F	
					5%	1%
Treatment						
Error						
Total						

วิธีคำนวณ

ให้ t คือ จำนวนชนิดของตัวอย่าง และ r คือ จำนวนซ้ำ

ก. คำนวณค่า degree of freedom (df)

$$\text{total df} = (t \times r) - 1$$

เอกสารนี้เป็นเอกสาร treatment df = $t - 1$ ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น error df = by subtraction = total df - treatment df เอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข. คำนวณค่า Sum of Squares (SS) ขั้นแรกคำนวณค่า correction factor (CF) ก่อน จากนั้นก็ใช้ค่า correction factor คำนวณหาค่า Total SS และ Treatment SS และทำการหา Error SS โดย $\text{Error SS} = \text{Total SS} - \text{Treatment SS}$

ค. คำนวณค่า Mean Square (MS)

$$\text{Treatment MS} = \frac{\text{Treatment SS}}{\text{Treatment df}}$$

$$\text{Error MS} = \frac{\text{Error SS}}{\text{Error df}}$$

ง. คำนวณค่า F-value

$$\text{F-value} = \frac{\text{Treatment MS}}{\text{Error MS}}$$

จ. เปิดตาราง F ที่ Treatment df และ Error df ที่นัยสำคัญ 5 เปอร์เซ็นต์ และ 1 เปอร์เซ็นต์

ฉ. นำค่าที่คำนวณได้ทั้งหมดตั้งแต่ ก-จ ใส่ในตารางวิเคราะห์

ช. เปรียบเทียบค่า F-value ที่คำนวณได้กับค่า F ที่ได้จากรายการ

1. ถ้า F-value น้อยกว่าค่า F จากรายการที่ 5 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่า treatment ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แสดงโดยเขียนสัญลักษณ์ ns เยื้องบนค่า F-value
2. ถ้า F-value มากกว่าค่า F จากรายการที่ 5 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่า treatment มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงโดยเขียนสัญลักษณ์ * เยื้องบนค่า F-value
3. ถ้า F-value มากกว่าค่า F จากรายการที่ 1 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่า treatment มีความแตกต่างกันมากทางสถิติ แสดงโดยเขียนสัญลักษณ์ ** เยื้องบนค่า F-value

2. Least significant difference test (LSD)

เป็นวิธีหาความแตกต่างที่น้อยที่สุดค่าหนึ่ง เพื่อใช้เปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองคู่ใดคู่หนึ่ง มีหลักการใช้ดังนี้

1. ใช้ LSD เมื่อ F-value ในตาราง analysis of variance แสดงค่าความแตกต่างระหว่างสิ่งทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับอาจารย์ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ใช้ LSD เมื่อจำนวนสิ่งทดลองไม่เกิน 5
3. กรณีที่จำนวนสิ่งทดลองเกิน 5 ให้ใช้ LSD ได้เฉพาะการเปรียบเทียบสิ่งทดลอง
อื่นๆกับ control

สูตรการคำนวณหาค่า LSD มีดังนี้

$$LSD_{\infty} = t_{\infty} \sqrt{(2S^2/r)}$$

เมื่อ S^2 คือ Error MS

r คือ จำนวนซ้ำ

t_{∞} คือ เป็นค่าที่ได้รับจากตาราง t ที่นัยสำคัญ ∞ และที่แต่ละเมื่อใช้การ
ทดสอบสมมติฐานแบบ 2 ทาง

เพื่อตัดสินใจว่า สิ่งทดลองคู่ใดคู่หนึ่งมีความแตกต่างกันจริงหรือไม่ ให้หาค่า
ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองคู่หนึ่ง สมมติให้เป็น d เปรียบเทียบค่า
 d กับค่า LSD ที่คำนวณได้แสดงว่าสิ่งทดลองไม่มีความแตกต่างกัน