

การผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสและกลูโคสโดยเชื้อ

Candida tropicalis TISTR 5045



นางสาว ศิริลักษณ์	นามวงศ์
นางสาว ศุภรัตน์	พันธุ์ทอง
นางสาว สุนิสา	พูนพิพัฒน์กุล



รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
 ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
 คณะวิทยาศาสตร์
 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
 ปีการศึกษา 2543

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน.....39900

วัน, เดือน, ปี..... 11 ก.ค. 2544

.b.....
.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารลิขสิทธิ์สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Production of Xylitol from D-Xylose and D-Glucose by
Candida tropicalis TISTR 5045



A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement
For the Degree of Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสและกลูโคสโดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045

Production of xylitol from D-xylose and D-glucose by *Candida tropicalis* TISTR 5045

โดย 1. นางสาวศิริลักษณ์ นามวงษ์
2. นางสาวศุภรัตน์ พันธุ์ทอง
3. นางสาวสุนิสา พูนพิพัฒน์กุล

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. สุขใจ ชูจันทร์
อาจารย์ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติโครงการพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตร์บัณฑิต

หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
(ผศ. ดร. นवलพรรณ ณ ระนอง)

คณะกรรมการโครงการพิเศษ

ประธานกรรมการ
(ผศ. ดร. นवलพรรณ ณ ระนอง)

กรรมการ
(อาจารย์ ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์)

กรรมการ
(รศ. สุขใจ ชูจันทร์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสและกลูโคสโดยเชื้อ <i>Candida tropicalis</i> TISTR 5045
โดย	นางสาว ศิริลักษณ์ นามวงษ์ นางสาว ศุภารัตน์ พันธุ์ทอง นางสาว สุนิสา พูนพิพัฒน์กุล
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. สุขใจ ชูจันทร์ อ.ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2544

บทคัดย่อ

การศึกษการผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสและกลูโคสโดยเชื้อยีสต์ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่เป็นยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวในกระบวนการผลิต นอกจากจะใช้ไซโลสในการผลิตไซลิทอลแล้วยังใช้ในการเจริญและซ่อมแซมเซลล์อีกด้วย ทำให้ปริมาณไซลิทอลที่ผลิตได้ลดลง จึงมีการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมเพื่อช่วยปรับปรุงผลผลิตไซลิทอลให้สูงขึ้น จากการทดลองเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการเจริญเติบโต ซึ่งในสูตรอาหารนี้ได้ทำการศึกษาธาตุอาหารหลักที่เชื้อยีสต์ใช้ในการเติบโต คือ กลูโคสและยีสต์สกัด พบว่าต้องใช้กลูโคส 10.0 กรัม/ลิตร และยีสต์สกัด 5.0 กรัม/ลิตร ทำการเลี้ยงในระดับฟลasks ภายใต้สภาวะการเจริญใช้อัตราการเขย่า 300 รอบ/นาที เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นที่ 4.0 หลังจาก 10 ชั่วโมง เติมน้ำตาลไซโลสลงไป 150.0 กรัม/ลิตร แล้วลดอัตราการเขย่าลงเหลือ 150 รอบ/นาที พบว่าไซลิทอลผลิตได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 99 โดยให้ปริมาณไซลิทอล 97.0 กรัม/ลิตร

Special Project title Production of xylitol from D-xylose and D-glucose by *Candida tropicalis* TISTR 5045

Name Miss Sirilak Namwong
Miss Suparat Phuntong
Miss Sunisa Poonpipatgul

Special Project Advisor Associated Professor Sukjai Choojan
Prasit Dewatthanawong

Department Applied biology

Academic Year 2000

Abstract

Candida tropicalis TISTR 5045, xylose fermentable yeast, can produce xylitol from xylose. When xylose is only carbon source in process. It not only converts to xylitol, but also is used for growth and cell maintenance. Because of this, yield of xylitol was decrease. Usage of glucose as co-substrate and controlling of conditions can improve productivity of xylitol. The optimum concentrations of glucose and yeast extract were 10.0 g/l and 5.0 g/l, respectively. Shake flask cultivation condition is pH 4.0 , 300 rpm at 30 °C and the inoculum size is 4 percent. After 10 hour, xylose 150 g/l was added and shaking rate was decrease to 150 rpm. The maximum yield of xylitol (97 g/l) was collected at 99 hours.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความร่วมมือและความช่วยเหลือของบุคคลดังต่อไปนี้

1. รศ. สุขใจ ชูจันทร์ และอ. ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ผู้ซึ่งให้ความรู้และคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ ตลอดจนช่วยตรวจทานและแก้ไขเอกสารให้
2. อ. สมชาย ไกรรักษ์ ผู้ซึ่งให้ความรู้และคำแนะนำทางด้านต่างๆ อันเป็นประโยชน์
3. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่อนุเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง
4. เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ธุรการภาคทุกท่าน ที่คอยอำนวยความสะดวกต่างๆ

และขอขอบคุณทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำโครงการพิเศษรวมถึงการจัดพิมพ์เอกสารให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	
คุณสมบัติของไซลิทอล	3
การใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหาร	6
เมแทบอลิซึมของไซลิทอลในร่างกายมนุษย์	10
การผลิตไซลิทอล	11
เมแทบอลิซึมในการผลิตไซลิทอลโดยจุลินทรีย์	15
ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไซลิทอลโดยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ	22
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	34
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	38
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	44
เอกสารอ้างอิง	45
ภาคผนวก ก	48
ภาคผนวก ข	54
ภาคผนวก ค	56
ภาคผนวก ง	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 ผลของกลูโคสและไซลิทอลต่อระดับน้ำตาลในเลือด	5
ภาพที่ 2.2 เมแทบอลิซึมของไซลิทอลในร่างกายมนุษย์	10
ภาพที่ 2.3 วิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตไซลิทอล	12
ภาพที่ 2.4 วิธีการเกิดไซลิทอลจากเมแทบอลิซึมของไซโลส	15
ภาพที่ 2.5 เมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสเพื่อสร้างไซลูลอส-5-ฟอสเฟต	17
ภาพที่ 2.6 เมแทบอลิซึมของไซลูลอส-5-ฟอสเฟตของยีสต์ <i>Pachysolen tanophilus</i>	18
ภาพที่ 2.7 เมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์	21
ภาพที่ 2.8 ผลของปริมาณหัวเชื้อ	26
a) อัตราการผลิตไซลิทอล (Q_p)	
b) ผลได้ไซลิทอลจากไซโลส ($Y_{P/S}$)	
c) อัตราการผลิตไซลิทอลจำเพาะ (q_p)	
ภาพที่ 2.9 ผลของความเข้มข้นของสารตั้งต้นเริ่มต้นต่อ	30
a) อัตราการผลิตไซลิทอล (Q_p)	
b) ผลได้ไซลิทอลจากไซโลส ($Y_{P/S}$)	
c) อัตราการผลิตไซลิทอลจำเพาะ (q_p)	
ภาพที่ 4.1 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ <i>C. tropicalis</i> TISTR 5045 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต โดยแปรผันความเข้มข้นของปริมาณหัวเชื้อที่ 4 5 6 7 8 และ 9 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีอัตราการเขย่า 300 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	38
ภาพที่ 4.2 เปรียบเทียบการเติบโตของเชื้อ <i>C. tropicalis</i> TISTR 5045 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต โดยแปรผันความเข้มข้นของปริมาณกลูโคสที่ 1 1.5 2 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีอัตราการเขย่า 300 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	39
ภาพที่ 4.3 เปรียบเทียบการเติบโตของเชื้อ <i>C. tropicalis</i> TISTR 5045 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต โดยแปรผันความเข้มข้นของปริมาณยีสต์สกัดที่ 1 1.5 2 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่มีอัตราการเขย่า 300 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ(ต่อ)

	หน้า
ภาพที่4.4 เปรียบเทียบการเติบโตของเชื้อ <i>C. tropicalis</i> TISTR 5045 ที่เพาะเลี้ยง ในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต โดยแปรผันอัตราการเขย่าเป็น 250 280 300 และ 320 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	41
ภาพที่4.5 เปรียบเทียบปริมาณไซลิทอลและน้ำหนักแห้งของเซลล์ เมื่อทำการศึกษา การผลิตไซลิทอลในระดับฟลasks ที่อัตราการเขย่า 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	42
ภาพที่ค.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส	57
ภาพที่ค.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายไซลิทอล	59
ภาพที่ค.3 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งกับความขุ่นของเซลล์	60



สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของไซลิทอล	3
ตารางที่ 2.2 ค่าความร้อนจำเพาะของการละลายของน้ำตาลชนิดต่างๆ	4
ตารางที่ 2.3 ปริมาณไซลิทอลที่พบทั่วไปตามผักผลไม้ตามธรรมชาติ	13
ตารางที่ 2.4 กิจกรรมของเอนไซม์ XR และ XDH ในยีสต์ที่ใช้น้ำตาลไซโลสได้	16
ตารางที่ 2.5 การผลิตไซลิทอลโดยจุลินทรีย์ต่างๆ	24
ตารางที่ 2.6 ค่าพีเอชที่เหมาะสมของเชื้อจุลินทรีย์	27
ตารางที่ 2.7 ผลของไซโลสในฐานะสารตั้งต้นร่วมในการผลิตไซลิทอล	32
ตารางที่ 4.1 การคำนวณในการผลิตไซลิทอล	43
ตารางที่ ก.1 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ปริมาณหัวเชื้อ 4.0-9.0 เปอร์เซ็นต์ที่เวลาต่างๆ	48
ตารางที่ ก.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสม	48
ตารางที่ ก.3 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ปริมาณกลูโคส 1.0-3.0 เปอร์เซ็นต์ที่เวลาต่างๆ	49
ตารางที่ ก.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกลูโคสที่เหมาะสม	49
ตารางที่ ก.5 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้เมื่อใช้ปริมาณยีสต์สกัด 0.5-3.0 เปอร์เซ็นต์ที่เวลาต่างๆ	50
ตารางที่ ก.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณยีสต์สกัดที่เหมาะสม	50
ตารางที่ ก.7 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้เมื่อใช้อัตราการเขย่า 280-320 รอบต่อนาที ที่เวลาต่างๆ	51
ตารางที่ ก.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของอัตราการเขย่าที่เหมาะสม	51
ตารางที่ ก.9 แสดงผลต่างระหว่างอัตราการเขย่าด้วยวิธี LSD	52
ตารางที่ ก.10 น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาต่างขณะทำการผลิตไซลิทอลในระดับฟลาสก์ในอาหาร ที่ใช้ในการผลิตไซลิทอล พีเอชเริ่มต้น 4.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	52
ตารางที่ ก.11 ปริมาณการผลิตไซลิทอลของ <i>C. tropicalis</i> TISTR 5045 ในระดับฟลาสก์ ที่เวลาต่างๆ ในอาหารที่ใช้ในการผลิตไซลิทอล พีเอชเริ่มต้น 4.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	53

บทที่ 1

บทนำ

ไซลิทอลเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ได้จากน้ำตาลไซโลส มีความหวานใกล้เคียงกับน้ำตาลซูโครส แต่ไซลิทอลยังมีคุณสมบัติที่ดีอีกหลายประการ เช่น มีรสชาติที่ดีและเย็นสดชื่นเหมือนเมนทอลและไม่ทำให้เกิดฟันผุ(non-cariogenicity) เนื่องจากจุลินทรีย์ในช่องปากไม่สามารถใช้ไซลิทอลได้ ผลิตภัณฑ์ที่มีไซลิทอลเป็นองค์ประกอบจะมีอายุการเก็บที่นานขึ้น เนื่องจากไม่เกิดการหมักด้วยจุลินทรีย์(non-fermentability) และเมื่อใช้ไซลิทอลร่วมกับสารให้ความหวานชนิดอื่นจะให้พลังงานที่ต่ำจึงเหมาะกับผู้ควบคุมน้ำหนัก นอกจากนี้ไซลิทอลยังใช้ในผู้ป่วยเบาหวานได้ (Emodi, 1978) จึงเป็นที่สนใจในอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ ในธรรมชาตินั้นสามารถพบไซลิทอลได้ในผักและผลไม้ แต่ปริมาณที่พบนั้นน้อยมากไม่คุ้มค่าที่จะผลิตไซลิทอลด้วยในระดับอุตสาหกรรมด้วยวิธีการสกัดจากผักผลไม้ที่มีไซลิทอลเป็นองค์ประกอบ ปัจจุบันการผลิตไซลิทอลจะใช้กระบวนการทางเคมีโดยใช้น้ำตาลไซโลสที่ได้จากการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ อาทิเช่น วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรพวกซังข้าวโพด ฟางข้าว หรือใช้วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมป่าไม้ เช่น เศษไม้ หรือจะใช้น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมกระดาษ เป็นต้น มาเป็นวัตถุดิบในการทำปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน (hydrogenation) ให้ผลผลิตเป็นน้ำตาลไซลิทอลร่วมกับน้ำตาลแอลกอฮอล์อื่นๆ โดยจะมีไซลิทอลประมาณร้อยละ 50-60 ของทั้งหมด ซึ่งการผลิตโดยวิธีทางเคมีนี้ต้องใช้ต้นทุนที่สูงเพราะต้องเสียค่าใช้จ่ายมากในการทำให้บริสุทธิ์และปริมาณผลผลิตไซลิทอลที่ได้เมื่อเทียบกับวัตถุดิบที่ใช้จัดว่าค่อนข้างต่ำ ทำให้ไซลิทอลมีราคาแพงเมื่อเทียบกับสารให้ความหวานชนิดอื่น ทำให้การใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ ยังไม่แพร่หลายเท่าสารให้ความหวานตัวอื่น ปัจจุบันจึงมีการศึกษากระบวนการผลิตไซลิทอลโดยใช้กระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อนำมาใช้ทดแทนกระบวนการผลิตทางเคมีเพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้นและลดต้นทุนในการผลิตไซลิทอลลง กระบวนการผลิตโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพนั้นสามารถใช้ได้ทั้งจุลินทรีย์หรือเอนไซม์จากจุลินทรีย์มาใช้ในการผลิตไซลิทอล ซึ่งได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเพราะการผลิตไซลิทอลโดยจุลินทรีย์ไม่จำเป็นต้องใช้ไซโลสที่บริสุทธิ์ โดยจะใช้วัตถุดิบที่เป็นน้ำตาลไซโลสบริสุทธิ์หรือน้ำตาลไซโลสที่ได้จากวัสดุเหลือทิ้งที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบก็ได้ จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตไซลิทอลมีทั้ง แบคทีเรีย ราเส้นใยและยีสต์ แต่ที่มี

การศึกษามากที่สุดคือ ยีสต์ เพราะพบว่าผลิตไซลิทอลได้สูงโดยเฉพาะยีสต์ในสกุล *Candida* sp. อาทิเช่น *C. mogii* (Sirisansaneeyakul และคณะ, 1995) , *C. tropicalis* (Horitsu และคณะ, 1992) และ *C. guilliermondii* (Meyrial และคณะ, 1991) เป็นต้น ซึ่งประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตไซลิทอลด้วยจุลินทรีย์เหล่านี้จะขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง คือ อายุของหัวเชื้อ ปริมาณเซลล์เริ่มต้น พีเอช อุณหภูมิ องค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ความเข้มข้นของสารตั้งต้น ปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ (dissolve oxygen, DO) สารตั้งต้นร่วม (co-substrate) ที่เป็นน้ำตาลชนิดอื่น และความเข้มข้นของไซลิทอลที่เป็นผลผลิต เป็นต้น ซึ่งปัจจัยต่างๆเหล่านี้ต้องควบคุมให้เหมาะสมเพื่อให้เกิดกระบวนการที่เหมาะสมในการผลิตไซลิทอล ขึ้นมาทดแทนวิธีเดิมๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการพิเศษ

เพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆเกี่ยวข้องกับการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในระดับการเขย่าฟลาสก์ (shake flask fermentation) โดยใช้ไซโลสและมีกลูโคสเป็นสารตั้งต้นร่วม (co-substrate)

ขอบเขตของโครงการพิเศษ

1. เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซลิทอลในระดับการเขย่าฟลาสก์ (Shake flask fermentation)
2. ศึกษาว่า *Candida tropicalis* TISTR 5045 สามารถผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลส โดยมีกลูโคสเป็นสารตั้งต้นร่วม (co-substrate) ในระดับการเขย่าฟลาสก์ (shake flask fermentation)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นแนวทางในการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตไซลิทอล
2. เป็นแนวทางในการหาความเป็นไปได้สำหรับผลิตไซลิทอลในระดับอุตสาหกรรมต่อไป
3. เพื่อศึกษาการผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสโดยการใช้กระบวนการหมักโดยยีสต์เพื่อแทนการผลิตทางเคมีที่ต้นทุนสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

คุณสมบัติของไซลิทอล

ไซลิทอลมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพตามตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของไซลิทอล

สูตรโมเลกุล	$C_6H_{12}O_6$
โครงสร้าง	$ \begin{array}{ccccccc} & H & OH & H & & & \\ & & & & & & \\ HOCH_2 & -C & -C & -C & -CH_2OH \\ & & & & & & \\ & OH & H & OH & & & \end{array} $
น้ำหนักโมเลกุล	152.1
รูปร่าง	ผงคริสตัล
สี	สีขาว
รสชาติ	รสหวาน
กลิ่น	ไม่มีกลิ่น
ความหวานสัมพัทธ์ (Relative sweetness)	ไซลิทอล (85-120) มีความหวานโดยประมาณเท่ากับน้ำตาลซูโครส (100) แต่หวานมากกว่ากลูโคส (70), ไชโลส (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 ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติอื่นๆ ของไซลิทอล

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

2. ไซลิทอลให้รสชาติดีและเย็นสดชื่น (cooling effect) คล้ายเมนทอล เนื่องจากการละลายของไซลิทอลต้องการความร้อน (endothermic dissolution) เพราะไซลิทอลมีค่าความร้อนจำเพาะของการละลายเป็นลบ (negative heat of solution) เท่ากับ -34.8 แคลอรี/กรัม ดังตารางที่ 2.2 โดยคุณสมบัติจะเกิดขึ้นเมื่อไซลิทอลอยู่ในรูปผลึกเท่านั้น แต่เมื่อไซลิทอลอยู่ในรูปสารละลายหรืออยู่ในรูปอสัณฐาน (amorphous) จะไม่ให้คุณสมบัติข้อนี้ ดังตารางที่ 2.2 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

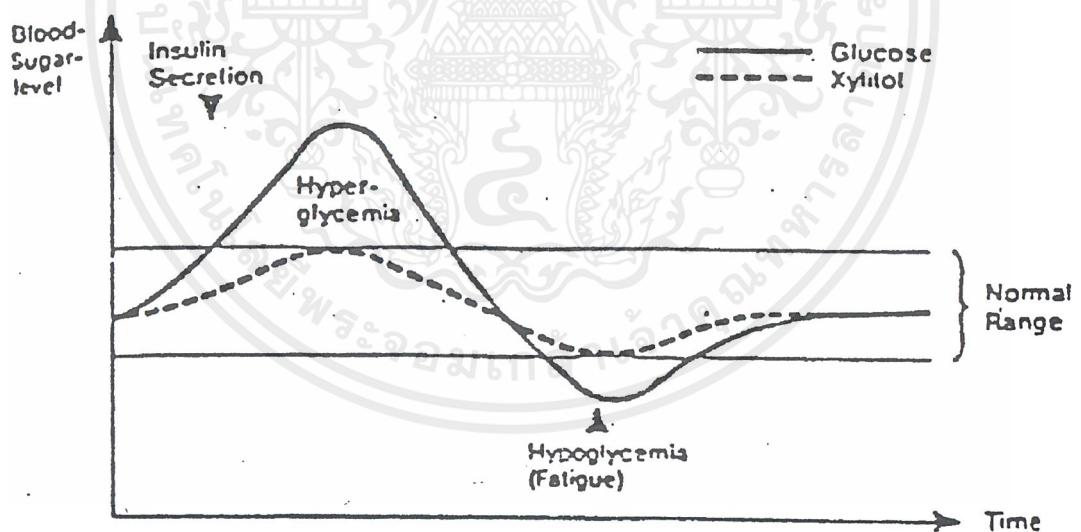
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 ทำให้สภาพพีเอชบนเคลือบฟันไม่ต่ำกว่า 5.7 จึงไม่ทำให้เกิดฟันผุ

6. ไซลิทอลสามารถใช้ในผู้ป่วยเบาหวานได้เนื่องจากการเผาผลาญไซลิทอลไม่ขึ้นกับอินซูลิน ดังนั้นจึงไม่ทำให้เกิดสภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) และน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia) ดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 ผลของกลูโคสและไซลิทอลต่อระดับน้ำตาลในเลือด
ที่มา : Emodi (1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. ไชลิทอลช่วยยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากจุลินทรีย์ไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่สามารถใช้ไชลิทอลได้ผลิตภัณฑ์ที่มีไชลิทอลเป็นองค์ประกอบจึงเกิดการหมักโดยจุลินทรีย์ได้ยาก ทำให้มีอายุการเก็บที่นานขึ้น (long shelf-life)

ข้อจำกัดในการใช้ไชลิทอล

1. การบริโภคไชลิทอลเป็นปริมาณมากในคราวเดียวจะทำให้ท้องเสีย (gastrointestinal distress and osmotic diarrhoea)ได้ เนื่องจากไชลิทอลมีคุณสมบัติเป็นยาระบาย เพราะไชลิทอลมีคุณสมบัติเหมือนคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ คือดูดซับน้ำไว้อย่างช้าๆ ดังนั้นเมื่อบริโภคเป็นครั้งแรกควรบริโภคในปริมาณต่ำก่อน (30 กรัม/วัน) และค่อยๆ เพิ่มปริมาณขึ้น แต่จะบริโภคได้สูงสุดราว 200-300 กรัม/วัน
2. การใช้ไชลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อให้มีรสชาติเย็นสดชื่นนั้น จะต้องใช้ไชลิทอลที่อยู่ในรูปผลึกเท่านั้น ซึ่งอาจจะทำให้เกิดลักษณะผิวสัมผัสที่เปลี่ยนแปลงไปหรือไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคได้
3. ไชลิทอลมีราคาแพงเมื่อเทียบกับสารให้ความหวานชนิดอื่น เนื่องจากต้นทุนที่ใช้ในการผลิตสูง ทำให้การใช้ไชลิทอลไม่แพร่หลายเท่าที่ควร และแม้ว่าไชลิทอลจะสามารถใช้ในผู้ป่วยเบาหวานได้แต่ในอาหารสำหรับผู้ป่วยเบาหวานก็ใช้ฟรุกโทสแทนเพราะมีราคาถูก และไม่เกิดผลข้างเคียงเหมือนกับเมื่อใช้ไชลิทอล

การใช้ไชลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหาร

มีแนวโน้มการใช้ไชลิทอลในอุตสาหกรรมอาหารอย่างกว้างขวางในผลิตภัณฑ์อาหารพวกขนมอบ แยม มาร์มาเลดและผลิตภัณฑ์ขนมหวาน เป็นต้น เนื่องจากไชลิทอลมีคุณสมบัติที่สามารถใช้ทดแทนน้ำตาลธรรมดาได้ และยังมีข้อดีในแง่ไม่ทำให้เกิดฟันผุเมื่อบริโภคเหมือนน้ำตาลทั่วไป แต่ทว่าการใช้ไชลิทอลยังมีข้อจำกัดอยู่บ้าง โดยเฉพาะในเครื่องดื่มประเภทน้ำอัดลม ซึ่งผู้บริโภคมีโอกาสจะได้รับไชลิทอลปริมาณสูงเกินไปทำให้ท้องเสียได้ หรือสภาพอันหลากหลายของผลึกไชลิทอล (น้ำตาลซูโครสมีผลึกแบบ monoclinic แต่ไชลิทอลมีผลึกแบบ rhombic) อาจทำให้เกิดเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์มีลักษณะแข็งกระด้าง อย่างไรก็ตามข้อจำกัดเหล่านี้ก็กล่าวได้ว่าเป็นปัญหาของเมื่อเทียบกับประโยชน์ที่จะได้รับจากการทดแทนน้ำตาลซูโครสด้วยไชลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหารทั้งหลาย ซึ่งโดยปกติมักจะให้คุณภาพที่ทัดเทียมกันหรือดีกว่า เช่น คุณภาพที่เย็นสดชื่น ซึ่งช่วยเพิ่มรสชาติของเปปเปอร์มินท์ รสมะนาว และรสผลไม้ต่างๆ

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 และไม่พบปัญหาเกี่ยวกับเนื้อสัมผัสและรสชาติของผลิตภัณฑ์แต่อย่างใด

3.ท็อฟฟี่และคาราเมล (Toffees and Caramels)

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

4.เจลาติน (Gelatin desserts)

การใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์เจลาตินมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารให้ความหวาน

5.พุดดิ้ง (Pudding)

การผลิตพุดดิ้งไม่มีการเปลี่ยนแปลงสูตรแต่อย่างไรเมื่อใช้ไซลิทอลแทนน้ำตาลซูโครส และไม่มีผลต่อรสชาติผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. แยม เยลลี่ และมาร์มาเลด (Jams Jellies and Marmalades)

กรณีนี้ใช้ไซลิทอลสามารถใช้ทดแทนน้ำตาลซูโครสได้เช่นกันในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 แต่ควรหลีกเลี่ยงการใช้ไซลิทอลมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะทำให้เกิดการตกผลึกของไซลิทอลได้ในระหว่างการเก็บรักษา(storage) และไม่มีความจำเป็นต้องเติมสารกันบูด(preservatives) แต่อย่างไรก็ตาม เพราะจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดการเสีย (spoilage) ของผลิตภัณฑ์ไม่สามารถใช้ไซลิทอลเป็นแหล่งอาหารได้เช่นน้ำตาลอื่นทั่วไป แต่ควรเติมปริมาณของเพคติน (pectin) มากขึ้น เพราะไซลิทอลให้ความหนืดต่ำกว่าน้ำตาลซูโครสและมีความจำเป็นต้องเติมเกลือแคลเซียมเพื่อช่วยในการเกิดเจล (gelatinization) ของแยม (Hyvoenen และ Toemae, 1981) นอกจากนี้ยังพบว่า แยมและมาร์มาเลดที่ใช้ไซลิทอล 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 นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการปริมาณ จากการผลิตของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* กับน้ำตาลนั้น อาจจะไม่เหมาะสมนักสำหรับการใช้ไซลิทอล เพราะผลิตภัณฑ์ขนมอบที่ใช้ไซลิทอลนั้นจะมีปริมาณน้อยกว่าและมีเนื้อสัมผัสที่แน่นกว่า (dense texture) อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ขนมอบที่ใช้ไซลิทอลเหมาะสมมากสำหรับคนที่เป็โรคเบาหวาน และป้องกันฟันผุได้เป็นอย่างดี

9. ไอศกรีม (Icecreams)

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

10. เค็ทซัพและนมข้นหวาน (Ketchup and Condensed Milk)

การใช้ไซลิทอลจะปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ คือ ป้องกันการเกิด browning และการเสียโดยจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี

11. ซอสและอื่นๆ (Marinadae Sauces and Pastes)

เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลต่ำ ฉะนั้นการทดแทนน้ำตาลด้วยไซลิทอลจึงไม่ประสบปัญหาแต่อย่างไร

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) จึงต้องใช้ไซลิทอลในรูปผสมกับสารให้ความหวานตัวอื่น 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 การเก็บรักษาว่าหนึ่งเดือนที่อุณหภูมิห้องก็ไม่ทำให้ผลิตภัณฑ์เสื่อมคุณภาพแต่อย่างไร

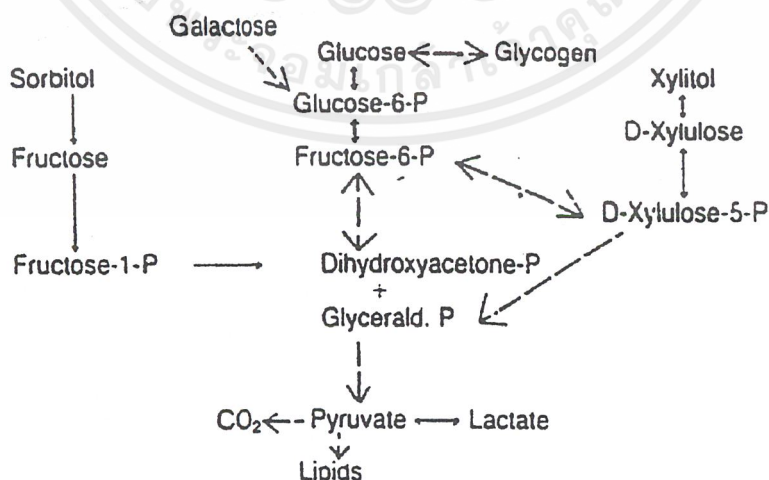
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14. ผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรม (Pharmaceutical Preparations)

ไซลิทอลมีข้อได้เปรียบคือไม่ทำให้เกิดฟันผุ (Non-cariogenicity) และไม่เกิดการหมักด้วยจุลินทรีย์ (non-fermentability) จึงมีการใช้เป็นสารให้ความหวานในการเตรียมผลิตภัณฑ์ชนิดเหลวทางเภสัชกรรม และการใช้ยาดังกล่าวของคนไข้ที่ไม่ได้ทำความสะอาดช่องปากเป็นเวลานานจึงไม่มีผลต่อการทำให้เกิดฟันผุ นอกจากนี้การใช้ไซลิทอลซึ่งไม่มีโครงสร้างของกลุ่มคาร์บอนิล (carbonyl groups) เช่น น้ำตาลรีดิคซ์ทั้งหลาย จึงไม่มีผลต่อปฏิกิริยาทางเคมี ทำให้สารละลายที่เตรียมขึ้นมีความคงตัว

เมตาบอลิซึมของไซลิทอลในร่างกายมนุษย์

เมตาบอลิซึมในร่างกายของไซลิทอลเกิดขึ้นที่สองตำแหน่ง คือ การดูดซึมบริเวณลำไส้ โดยกระบวนการ passive diffusion และเกิดการเผาผลาญโดยตรงที่ตับ (Smith, 1962) การดูดซึมจะเป็นไปอย่างช้าๆ ในกรณีที่ได้รับไซลิทอลในปริมาณมากเกินไป การดูดซึมที่เกิดขึ้นจะไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดอาการท้องร่วงได้ สำหรับปริมาณไซลิทอลที่บริโภคต่อวันที่แนะนำคือไม่เกิน 60 กรัม แต่ถ้าบริโภคติดต่อกันนาน จะสามารถบริโภคไซลิทอลได้มากขึ้นถึง 120 กรัม/วัน ส่วนการเผาผลาญไซลิทอลที่ตับนั้น ไซลิทอลจะถูกออกซิไดส์เป็น ดี-ไซลูโลส (D-xylulose) ซึ่งดี-ไซลูโลส (D-xylulose) จะเปลี่ยนเป็น ดี-ไซลูโลส-5-ฟอสเฟต (D-xylulose-5-phosphate) แล้วเข้าสู่วิถีเพนโทสฟอสเฟตเพื่อเปลี่ยนเป็น ฟรุคโตส-6-ฟอสเฟต (fructose-6-phosphate) แล้วกลายเป็นกลูโคสซึ่งจะถูกนำไปเปลี่ยนเป็นไกลโคเจนสะสมไว้ที่ตับต่อไป ดังภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 เมตาบอลิซึมของไซลิทอลในร่างกายมนุษย์

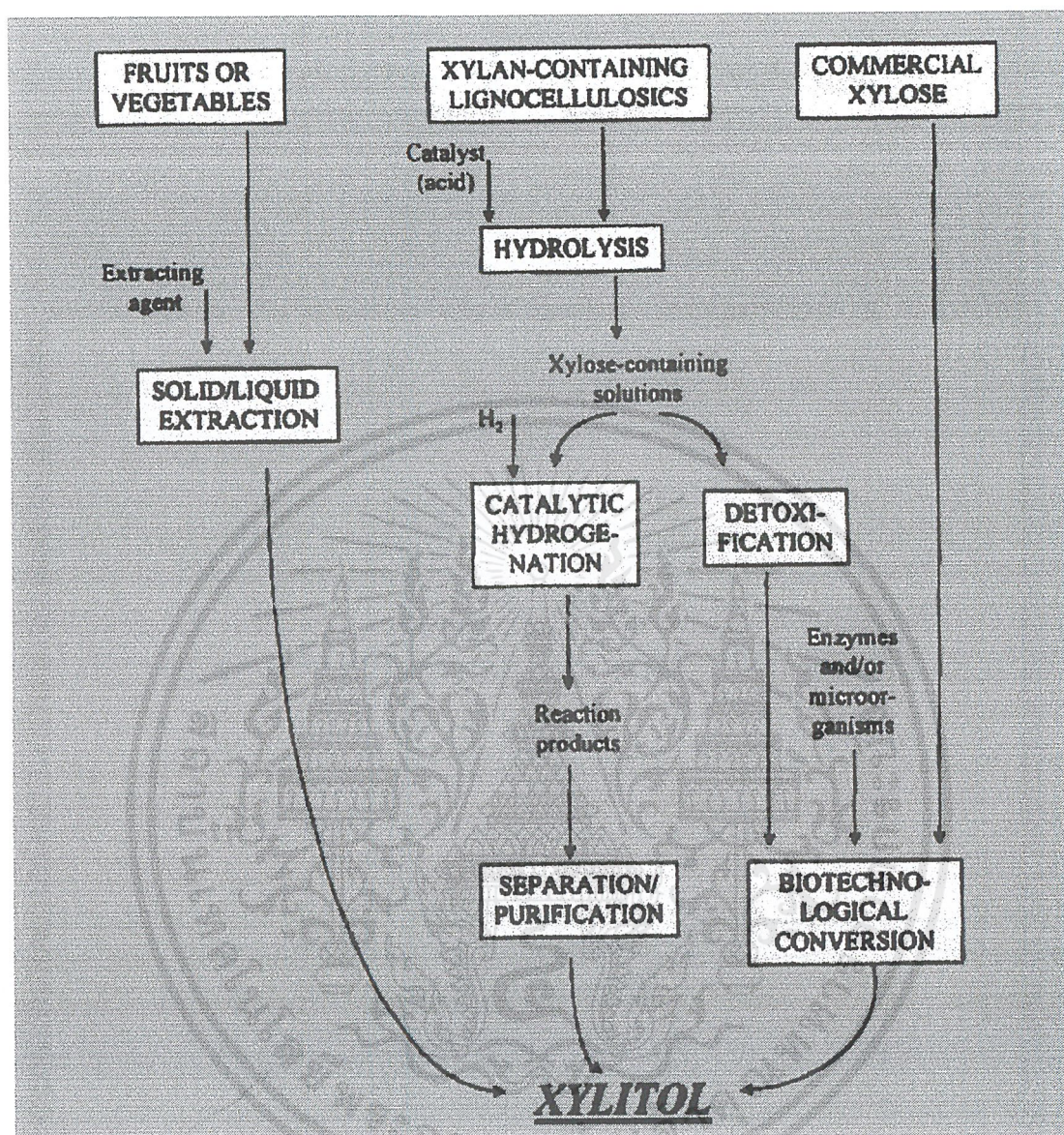
ที่มา : Emodi (1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเนื่องจากการเผาผลาญไซลิทอลไม่ขึ้นกับอินซูลิน ดังนั้นจึงไม่เกิดสภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) หรือน้ำตาลในเลือดต่ำ (Hypoglycemia) และไซลิทอลให้พลังงานเพียง 4 กิโลแคลอรีเท่ากับคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น ทำให้มีผลต่อปริมาณกลูโคสในเลือดเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

การผลิตไซลิทอล

จะเห็นได้ว่า สามารถประยุกต์ใช้ไซลิทอลเป็นสารให้ความหวานทดแทนน้ำตาลในผลิตภัณฑ์อาหารได้อย่างกว้างขวาง ปัจจุบันก็ได้มีการใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหารแพร่หลายมากขึ้นทั้งในทวีปยุโรปและอเมริกา โดยเฉพาะหมากฝรั่ง และพบว่ามีความนิยมที่จะใช้ไซลิทอลมากในอุตสาหกรรมประเภทขนมหวาน (confectionary) และขนมขบเคี้ยว (snack products) แต่การใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวยังมีข้อจำกัดอยู่ที่การผลิตไซลิทอลมีต้นทุนการผลิตสูงกว่ากระบวนการผลิตน้ำตาลเพราะต้องอาศัยการผลิตทางเคมีที่ต้องใช้ต้นทุนสูงในการผลิตและการทำให้ไซลิทอลที่ผลิตได้บริสุทธิ์ จึงทำให้ราคาของไซลิทอลแพงกว่าน้ำตาลทั่วไป อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันได้มีการวิจัยค้นคว้าเพื่อลดต้นทุนการผลิตไซลิทอลโดยวิธีการหมัก โดยการนำเอาวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลไซโลสใช้เป็นวัตถุดิบ ซึ่งคาดว่าจะทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำกว่ากระบวนการผลิตทางเคมี (hydrogenation) ได้ การผลิตไซลิทอลมีหลายวิธีและสามารถใช้วัตถุดิบได้หลายชนิด เช่น ผักและผลไม้ ของเสียที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ เช่น วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชังข้าวโพด ชานอ้อย เป็นต้น เศษเหลือจากอุตสาหกรรมไม้และกระดาษ หรืออาจจะใช้น้ำตาลไซโลสเป็นวัตถุดิบโดยตรงก็ได้ ดังภาพที่ 2.3 ซึ่งแต่ละวิธีจะมีกรรมวิธีแตกต่างกันไป



ภาพที่ 2.3 วิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตไซลิทอล

ที่มา : Parajo และคณะ (1998)

วิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตไซลิทอล

1. การสกัดจากผักและผลไม้

เนื่องจากไซลิทอลพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติในผักและผลไม้ เช่น กะหล่ำปลี มะเขือยาว ผักโขม สตรอว์เบอร์รี่ และราสเบอร์รี่ ดังเช่นในตารางที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 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 อัลตราฟาส ไฮโดรไลซิส (ultrafast hydrolysis) ที่ใช้กรดซัลฟูริกเจือจาง 0.5-1.0 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 200-210 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วินาที ซึ่งจะได้น้ำตาลไซโลสออกมา

2.2. การทำน้ำตาลไซโลสให้บริสุทธิ์

เมื่อไฮโดรไลซิสแล้วจะได้น้ำตาลไซโลสอยู่ในไฮโดรไลเสท (hydrolysate) สามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ 2 วิธี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 แบบแยกน้ำตาลไซโลส วิธีนี้จะกำจัดสารแขวนลอย ตะกอน สีและไอออนอื่นๆ และใช้วิธีทางโครมาโทกราฟีเพื่อแยกเอาน้ำตาลไซโลสออกมาจากน้ำตาลชนิดอื่นๆ เพื่อให้ได้น้ำตาลไซโลสบริสุทธิ์

2.2.2 แบบไม่แยกน้ำตาลไซโลส วิธีนี้จะแยกเอาสารอื่นๆ พวกตะกอน ไอออน และสีออกแต่ไม่แยกเอาน้ำตาลชนิดอื่นออกไป สารละลายที่ได้จะมีน้ำตาลหลายชนิดเป็นองค์ประกอบแต่น้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก

2.3. การไฮโดรจีเนชัน

เป็นการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสให้เป็นไซลิทอลที่สภาวะความดัน 50 บรรยากาศ อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2.5 ชั่วโมงโดยใช้โลหะนิเกิลเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในขั้นนี้ ซึ่งถ้ามีน้ำตาลชนิดอื่นเจือปนอยู่ น้ำตาลเหล่านั้นก็จะเปลี่ยนเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ด้วย

2.4. การทำไซลิทอลให้บริสุทธิ์

สารละลายน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ได้จะต้องทำให้บริสุทธิ์ โดยนำมารองแยกเอาโลหะนิเกิลออก 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

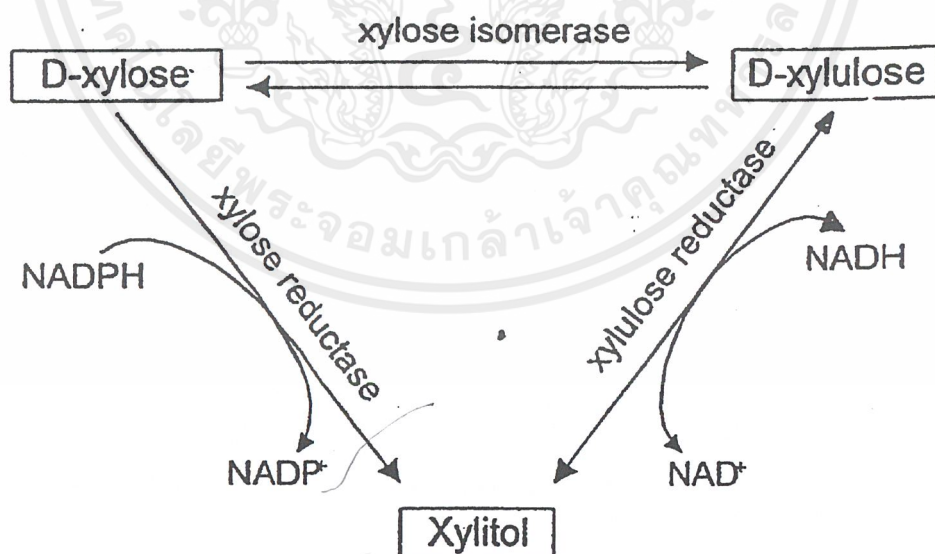
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 วิธีแรกเป็นการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอลโดยตรงโดยอาศัยเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส และโคเอนไซม์ NADPH เปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลิทอล ส่วนทางที่สองไซโลสจะถูกเปลี่ยนเป็นไอโซเมอร์ไปเป็นไซลูโลสก่อนโดยเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอร์เรส (xylose isomerase) จากนั้นไซลูโลสจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นไซลิทอลโดยเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส (xylose reductase, XR) และโคเอนไซม์ NADH ดังในภาพที่ 2.4

แต่วิธีโดยทั่วไปที่เป็นวิถีในการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอล ก็คือวิถี oxido-reduction ซึ่งมีการศึกษาวิธีนี้ในยีสต์หลายชนิด Furlan และคณะ (1994) รายงานว่ากระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นได้ต้องอาศัยโคเอนไซม์จากกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน



ภาพที่ 2.4 วิธีกาเกิดไซลิทอลจากเมแทบอลิซึมของไซโลส

ที่มา : Parajo และคณะ (1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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) ส่วนในจุลินทรีย์พวกโพรคาริโอท (Prokaryotes) นั้นจะเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลูโลสโดยปฏิกิริยาไอโซเมอไรเซชัน (isomerization) โดยมีเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอเรส (xylose isomerase) เข้ามาเกี่ยวข้อง (Yoshitake และคณะ, 1973 ; Yoshitake และคณะ, 1976) สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ ไซโลสรีดักเทส และ ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส ทั้งสองชนิดในยีสต์แต่ละสายพันธุ์จะแตกต่างกันไป ดังตารางที่ 2.4 ทำให้ยีสต์แต่ละสายพันธุ์ใช้ไซลิทอลได้แตกต่างกันไป

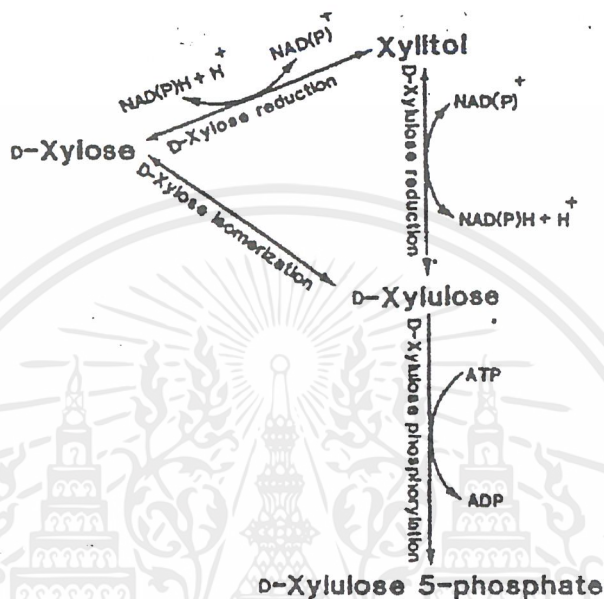
ตารางที่ 2.4 กิจกรรมของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสและไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส ในยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้

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	Malezka et al. (1983)
<i>C. utilis</i> (CBS 621)*	0	75	0	280	0	Bruinenberg et al. (1984)
<i>Pichia stipitis</i> (CBS 5773)*	310	600	0.5	720	75	Bruinenberg et al. (1984)
<i>P. tannophilus</i> (CBS 4044)*	9	220	0.04	910	70	Bruinenberg et al. (1984)
<i>C. tenuis</i> (CBS 615)†	2	130	0.02	—	—	Bruinenberg et al. (1984)
<i>C. tenuis</i> (CBS 2885)†	0	100	0	—	—	Bruinenberg et al. (1984)
<i>C. tenuis</i> (CBS 4285)†	305	670	0.5	—	—	Bruinenberg et al. (1984)
<i>C. shehatae</i> (CBS 5813)†	210	480	0.4	—	—	Bruinenberg et al. (1984)
<i>Pichia segobiensis</i> (CBS 6857)†	365	640	0.6	—	—	Bruinenberg et al. (1984)
<i>C. pelliculosa</i>	—	1.73	—	—	—	Kitprechavanich et al. (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	Girio et al. (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	—	—	Girio et al. (1990)
<i>C. oleophila</i> (DTIA 111)	0	40	0	—	—	Girio et al. (1990)
<i>C. intermedia</i> (DTIA 110)	0	140	0	—	—	Girio et al. (1990)
<i>P. stipitis</i> (DTIA 81)	720	3460	0.21	—	—	Girio et al. (1990)
<i>C. boidinii</i> (NRRL Y17213)	—	—	1.2–2.1	—	—	Vandeska et al. (1995)
<i>P. tannophilus</i> (DSM 70352)	0.03	0.23	0.13	0.060	0.135	Krusc & Schügerl (1996)
<i>C. boidinii</i> <i>Kloeckera</i> 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 et al. (1993)
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 28474)	0.17	0.42	0.405	—	—	Nolleau et al. (1993)
<i>C. guilliermondii</i> (NRC 5578)	0.08	0.62	0.129	1.130	0.011	Nolleau et al. (1995)
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 28474)	0.17	0.42	0.405	0.400	0.02	Nolleau et al. (1995)
<i>C. mogii</i> (ATCC 18364)	0.06	0.16	0.375	0.22	—	Sirisansaneeyakul et al. (1995)
<i>C. guilliermondii</i> (FTI-20037, NRC5578)	—	79.1	—	128.0	—	Lee et al. (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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และเมื่ออีสต์เปลี่ยนไซโลสให้กลายเป็นไซลูโลสแล้ว ไซลูโลสก็จะถูกเปลี่ยนเป็น ไซลูโลส-5-ฟอสเฟต (Xylulose -5- phosphate) โดยปฏิกิริยาฟอสโฟรีเรชั่น (Phosphorylation) ของเอนไซม์ไซลูโลสไคเนส (xylulose kinase) ดังภาพที่ 2.5 (Bennett, 1976 ; Gong, 1983)

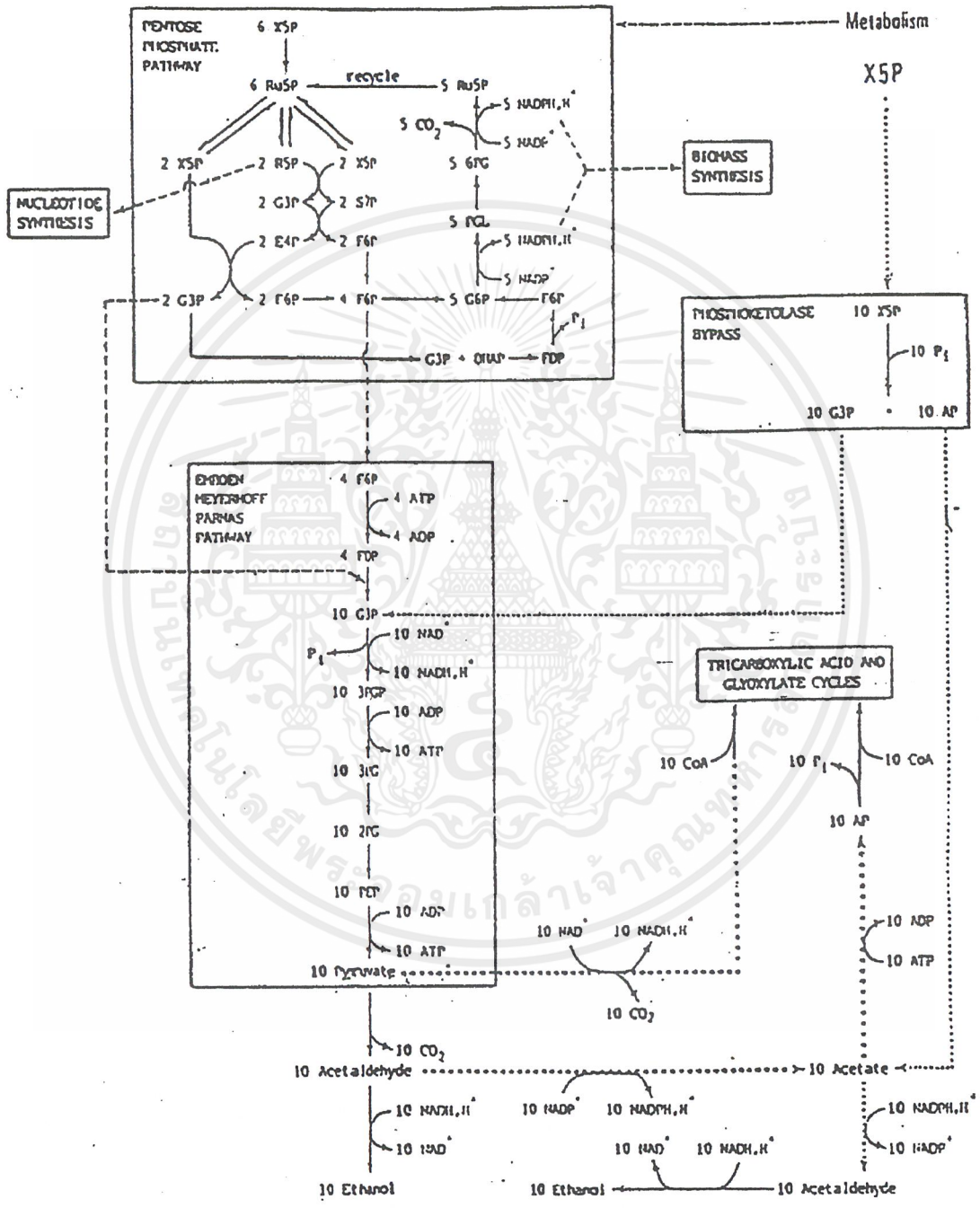


ภาพที่ 2.5 เมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสเพื่อสร้างไซลูโลส-5-ฟอสเฟต
ที่มา : Vongsuvanlert และ Tani (1989)

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) เพื่อสร้าง ไพรูเวทเข้าสู่วัฏจักรเครบส์เพื่อสร้างพลังงานและเซลล์ต่อไปอีกวิถีหนึ่งไซลูโลส-5-ฟอสเฟตจะเปลี่ยนเป็นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต และ อะซิทิล ฟอสเฟต(acetyl phosphate) โดยเอนไซม์ ไซลูโลส-5-ฟอสเฟต ฟอสโฟคีโตเลส(xylulose-5-phosphate phosphoketolase) กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตที่ได้จะเข้าสู่วิถีเอ็มเดน เมเยอร์ฮอฟ-ปานาส(Embden - Meyerhorf - Panas) ส่วน อะซิทิล ฟอสเฟต(acetyl phosphate) จะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิเตท ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงได้ 2 ทาง คือเป็น อะซิทิล โคเอ(acetyl-CoA) เข้าสู่วัฏจักรเครบส์ต่อไปกับเปลี่ยนเป็นเอทานอลดังภาพที่ 2.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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



ภาพที่ 2.6 เมแทบอลิซึมของไซลูลอส-5-ฟอสเฟต ของยีสต์ *Pachysolen tannophilus*
ที่มา : Slinger และคณะ (1987)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การที่ยีสต์บางสายพันธุ์นั้นเมื่อใช้น้ำตาลไซโลสในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดสามารถสะสมไซลิทอลได้ในปริมาณมากนั้นเนื่องจากชนิดของโคเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสและไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสเป็นคนละกลุ่ม ซึ่งก็คือโคเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสคือ 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^+ ในการออกซิโดส์ไซลูโลส ดังนั้นในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดจึงเกิดการสะสมไซลิทอลขึ้น

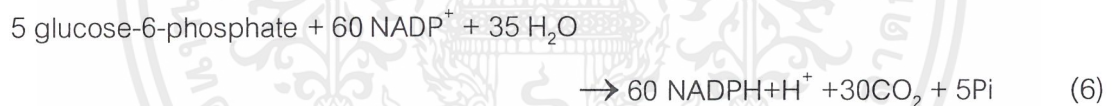
สำหรับยีสต์ที่มีกิจกรรมของของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสที่ต้องการทั้ง NADPH และ NADH เช่นยีสต์ในกลุ่ม *Pachysolen* sp. และ *Pichia* sp. สามารถเจริญและสะสมไซลิทอลได้น้อย เนื่องจากไซลิทอลสามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลไซลูโลส และเข้าสู่วิถีต่างๆ และผลิตเป็นเอทานอลได้ต่อไปในสภาพที่มีออกซิเจนจำกัด (Prior และคณะ, 1989)

การศึกษาเมแทบอลิซึมของไซโลสโดยยีสต์เพื่อหาผลได้ทางทฤษฎีของการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอล ต้องพิจารณา 4 เงื่อนไขดังต่อไปนี้ (Barbosa และคณะ, 1988)

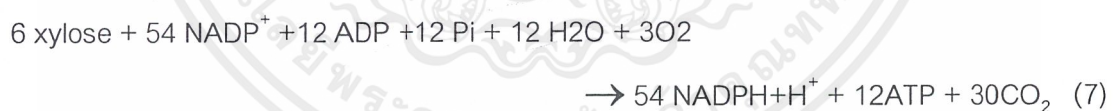
1. ในกระบวนการเมแทบอลิซึมมีโคเอนไซม์ 2 ชนิดเข้าไปเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอล โดยเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสมี NADPH เป็นโคเอนไซม์ และการออกซิโดส์ไซลิทอลเป็นไซลูโลสโดยเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสอาศัย NAD^+ เป็นโคเอนไซม์
2. โคเอนไซม์ NADPH ที่ใช้ในการรีดิวซ์ไซโลสทั้งหมดเป็นไซลิทอลถูกสังเคราะห์ขึ้นในวิถีเพนโทสฟอสเฟต และโคเอนไซม์ NAD^+ ที่ใช้ในกระบวนการออกซิโดส์ไซลิทอลเป็นไซลูโลสได้จากกระบวนการหายใจ

3. ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของยีสต์ไม่สามารถเปลี่ยน NADH เป็น NADPH ได้

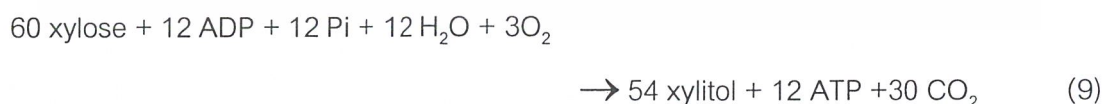
4. ภายใต้สภาวะที่มีการจำกัดออกซิเจนหรือมีการเจริญเติบโต น้อยไซลิทอลจะถูกออกซิไดส์เพื่อสร้าง NADPH เท่านั้น ส่วนไซลิทอลที่เหลือจะสะสมมากขึ้นและปล่อยออกมาออกเซลล์ การผลิตไซลิทอลในยีสต์โดยใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ในสภาวะที่มีการจำกัดออกซิเจนหรือไม่มีการเจริญเติบโต ไซลิทอลส่วนใหญ่จะถูกปล่อยออกมาออกเซลล์ โดยมีส่วนถูกออกซิไดส์ไปเพื่อสังเคราะห์ NADPH เมื่อทำสมดุลคาร์บอนและโคเอนไซม์ดังกล่าว การที่ 1-9 แล้ว จะได้ผลได้ทางทฤษฎีของไซลิทอลต่อโมลของไซโลสที่ถูกใช้ (Barbosa และคณะ, 1988)



จากสมการที่ 1-6



จากสมการที่ 7 และ 8

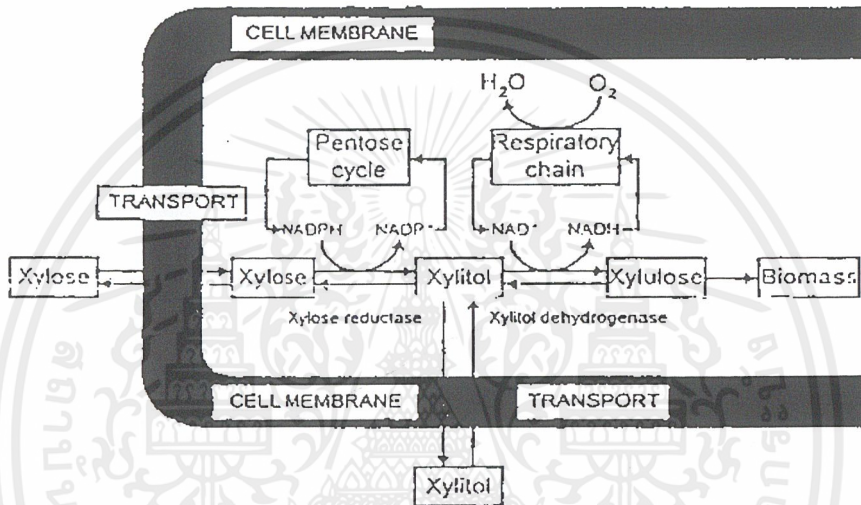


$$\text{ผลได้ของไซลิทอล} = 54/60 = 0.905 \text{ โมลของไซลิทอลต่อโมลของไซโลส}$$

Sirisansaneeyakul และคณะ (1992) อธิบายถึงการใช้น้ำตาลไซโลสของยีสต์ผ่านวิถีเพนโทสฟอสเฟต ซึ่งน้ำตาลไซโลสจะเข้าสู่ภายในเซลล์และถูกเปลี่ยนเป็นไซลิทอลด้วยการทำงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเอนไซม์ xylose reductase ที่มี NADPH เป็นโคเอนไซม์ จากนั้นไซลิตอลจะถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลสด้วยการทำงานของเอนไซม์ xylitol dehydrogenase ที่อาศัย NAD^+ เป็นโคเอนไซม์ จากนั้นไซลูโลสที่ได้จะถูกเติมฟอสเฟตก่อนเข้าสู่วิถีเพนโทสฟอสเฟต เพื่อที่จะนำไปสร้างเป็นมวลชีวภาพของเซลล์หรือพลังงานต่อไป ดังภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 เมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์
ที่มา : Sirisansaneeyakul และคณะ (1992)

2.กระบวนการเมแทบอลิซึมในการผลิตไซลิตอลโดยแบคทีเรีย

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 ขั้นนี้เป็นการสร้างสารตัวกลางในวิถีEmbden - Meyerhorf - Panos โดยไม่มีการสร้าง NADPH เหมือนกับเมแทบอลิซึมของกลูโคสในยีสต์ (Evan และ Retledge, 1984) แต่แบคทีเรียบางสายพันธุ์ เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Corynebacterium sp. หรือ *Enterobacter* sp. สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่ม ออกซิโด-รีดักชัน (oxido-reduction) แทนเอนไซม์ไฮโดรไลสไฮโดรเมอริสได้ ทำให้สามารถรีดิวซ์ไฮโดรไลสเป็นไฮลิตอล และออกซิไดซ์ไฮลิตอลไปเป็นไฮลูโลสได้อีกด้วยในบางสายพันธุ์ เช่น Yoshitake และคณะ (1973) ใช้แบคทีเรีย *Enterobacter* sp. ผลิตไฮลิตอลจากน้ำตาลไฮโดรไลส และผู้แต่งคนเดียว ก็นี้เองพบว่าเมื่อเติมกลูโคเนต (gluconate) ลงไป จะยับยั้งการผลิตไฮลิตอลของ *Corynebacterium* sp.

3. กระบวนการเมแทบอลิซึมในการผลิตไฮลิตอลโดยรา

เราสามารถไฮโดรไลสได้โดยผ่านวิถีออกซิโด-รีดักชัน (oxido-reduction) ให้กลายเป็นไฮลูโลส (Suomalainen และคณะ, 1989; Ojamo, 1994) ในช่วงแรก Chiang และ Knight (1961) พบไฮลิตอลปริมาณเล็กน้อย เมื่อทำการเพาะเลี้ยงราที่มีเส้นใย (*Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Gliocladium* sp., *Byssochlamys* sp., *Myrothecium* sp. และ *Neurospora* sp.) ในอาหารที่มีไฮโดรไลสเป็นองค์ประกอบ Ueng และ Gong (1982) ก็รายงานผลที่คล้ายคลึงกันเมื่อทำการหมักไฮโดรไลสที่มีเฮมิเซลลูโลสจากชานอ้อยเป็นองค์ประกอบด้วย *Mucor* sp.

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไฮลิตอลจากกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ

การผลิตไฮลิตอลจากจุลินทรีย์เป็นกระบวนการที่มีปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตหลายอย่าง อย่างเช่น สายพันธุ์ ชนิดของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ลักษณะการเพาะเลี้ยง เป็นต้น ปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ล้วนเป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้การผลิตไฮลิตอลมีประสิทธิภาพ เราสามารถแยกปัจจัยต่างๆ นี้ออกเป็นสองอย่าง อย่างแรกนั้นเป็นปัจจัยที่ขึ้นกับจุลินทรีย์ที่ใช้หรือสายพันธุ์ของจุลินทรีย์นั่นเอง ส่วนปัจจัยอย่างที่สองเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อกระบวนการผลิตไฮลิตอลโดยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพต่างๆ ซึ่งมีดังนี้ อายุของหัวเชื้อ ปริมาณเซลล์เริ่มต้น พีเอช อุณหภูมิ ส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น ปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำตาลชนิดอื่นในฐานะสารตั้งต้นร่วม ปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่และความเข้มข้นของไฮลิตอล

การคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อผลิตไฮลิตอล

จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการผลิตไฮลิตอลคือ ยีสต์ ซึ่งมียีสต์หลายสายพันธุ์ที่ผลิตไฮลิตอลได้ ซึ่งได้มีการศึกษาถึงการผลิตไฮลิตอลโดยยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ เพื่อหายีสต์ที่ผลิตไฮลิตอลได้ดีหรือดีที่สุด ดังในตารางที่ 2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษา พบว่ายีสต์ที่ผลิตไซลิทอลได้ดีก็คือยีสต์ในกลุ่ม *Candida* sp. ตัวอย่างเช่น 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 และพบว่าในบรรดา ยีสต์ทั้งหมด *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) ได้แยกเอายีสต์จากวัสดุจำพวกกลีโคเซลลูโลสมาทำการคัดเลือกหายีสต์ที่ผลิตไซลิทอลและพบว่า *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 2.5 การผลิตไซลิทอลโดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

Microorganism	Time (h)	S ₀ (g l ⁻¹)	S _s (g l ⁻¹)	% S cons.	P (g l ⁻¹)	Q _p (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	248	100	40	1.67	0.80	—	—	Gong <i>et al.</i> (1981)
<i>Pachysolet tannophilus</i> IFGB 0101	33.5-41	25-27	0.66-0.75	100	22.9-35.5	0.46-0.56	0.61-0.85	—	—	Debus <i>et al.</i> (1983)
<i>P. tannophilus</i> ATCC32691; <i>P. tannophilus</i> FT15; <i>S. cerevisiae</i> SC138; <i>Candida sp.</i> ; <i>Candida sp.</i> XF217	24-72	65-100	0.90-2.71	53.8-100	32-86	0.63-2.17	0.88-0.60	—	—	Gong <i>et al.</i> (1983)
<i>C. pelliculosa</i> + <i>Methanobacterium HU</i>	24	8.5	0.31	88.2	7.8	0.32	1	—	—	Kitpreechavanich <i>et al.</i> (1984)
<i>Candida sp.</i> 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	92	2.28	89	28	0.78	0.34	—	—	Sreenath <i>et al.</i> (1986)
<i>P. tannophilus</i> ATCC 32691	—	15-60	—	18.2	9.4-15	0.09	—	—	—	Thonart <i>et al.</i> (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 <i>et al.</i> (1988)
<i>C. guilliermondii</i> FTI-20037	78	104	1.33	100	77.2	0.99	0.74	0.048	—	Barbosa <i>et al.</i> (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 <i>et al.</i> (1988)
<i>C. boidinii</i> n&z.ousco: 2201	144-120	100	0.53-0.68	77-82	35-48.5	0.24-0.40	0.45-0.59	—	—	Vongsuvanlert & Tani (1989)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> Y-164	44	60	1.34	98.3	7	0.16	0.12	—	—	Lastick <i>et al.</i> (1989)
<i>C. pelliculosa</i> + <i>Methanobacterium sp.</i> HU	33	4.5	0.14	100	2	0.06	0.43	—	—	Nishio <i>et al.</i> (1989)
<i>Debaryomyces hansenii</i> DTIA 77	28	90	—	—	62.6	2.24	0.70	—	—	Girio <i>et al.</i> (1990)
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 28474	—	10	0.28	44.2	1.37	0.087	0.31	0.32	—	Furlan <i>et al.</i> (1991)
<i>D. hansenii</i> DTIA-77	48	90	1.56	81	40.3	0.84	0.54	0.13	—	Rosciro <i>et al.</i> (1991)
<i>C. guilliermondii</i> NRC 5578	406	300	0.74	100	221	0.54	0.75	0.02	0.01	Meyrial <i>et al.</i> (1991)
<i>C. sheatae</i> ATCC 22984	120	75	0.63	100	4.8	0.04	0.64	—	—	Palnitkar & Lachke (1992)
<i>C. tropicalis</i> IFO 0618	—	172	—	—	—	2.67	0.64	—	—	Horitsu <i>et al.</i> (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	—	Peschke <i>et al.</i> (1992)
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	—	54.4	—	—	37	—	0.73	—	—	Felipe <i>et al.</i> (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 <i>et al.</i> (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 <i>et al.</i> (1994)
<i>Candida sp.</i> B-22	100	260	2.6	100	215	2.15	0.83	—	—	Cao <i>et al.</i> (1994)
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	48	43	0.66	74	23.5	0.49	0.74	—	—	Silva <i>et al.</i> (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	3-0	0.03-0.26	0.16-0.61	—	—	Furlan <i>et al.</i> (1994)
<i>C. mogii</i> ATCC 18364	—	53	—	—	—	—	0.70	0.12	0.003	Sirisansaneeyakul <i>et al.</i> (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	0.05-0.003	0.01-0.025	Nolleau <i>et al.</i> (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 <i>et al.</i> (1995a)
<i>Candida sp.</i> L-102	65.5	114	1.74	99.91	100.1	0.46	0.88	0.025	—	Lu <i>et al.</i> (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	—	Hinfay <i>et al.</i> (1995)
<i>C. guilliermondii</i> FTI-20037	—	70	—	—	—	0.57	0.82	—	—	Felipe <i>et al.</i> (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 <i>et al.</i> (1996a)
<i>C. tropicalis</i> IFO 0618	36-56	170	—	—	86.2-101.6	1.81-2.71	0.50-0.69	—	—	Yahashi <i>et al.</i> (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 <i>et al.</i> (1996)
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	30	40	1.25	—	21.5	0.66	0.53	0.47	—	Pfeifer <i>et al.</i> (1996)
<i>C. entomae</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 & Bothast (1996)
<i>C. sheatae</i> ATCC 22984	95	119	1.25	99.6	22	0.23	0.19	—	—	Kastner <i>et al.</i> (1996a)
<i>C. sheatae</i> ATCC 22984	507	115	—	35.5	—	—	0.21	—	—	Kastner <i>et al.</i> (1996b)
<i>C. boidinii</i> NRRL Y-17213	—	100	—	—	—	—	0.2	—	—	Winkelhausen <i>et al.</i> (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 <i>et al.</i> (1996)
<i>P. tannophilus</i> DSM 70352	—	—	—	—	5	0.24	0.26	—	—	Kruse & Schügerl (1996)
<i>D. hansenii</i> NRRL Y-7426	8	14.7	1.72	93.7	5.8	0.67	0.39	—	—	Parajó <i>et al.</i> (1996)
<i>C. parapsilosis</i> KFCC 10875	66	300	—	—	210	3.18	0.70	0.10	—	Kim <i>et al.</i> (1997)
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i> ATCC 24228	73	42	0.58	100	22	0.30	0.52	0.17	—	Parajó <i>et al.</i> (1997)
<i>D. hansenii</i> NRRL Y-7426	48	279	5.81	100	221	4.60	0.79	—	—	Dominguez <i>et al.</i> (1997)

ที่มา : Parajo และคณะ (1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

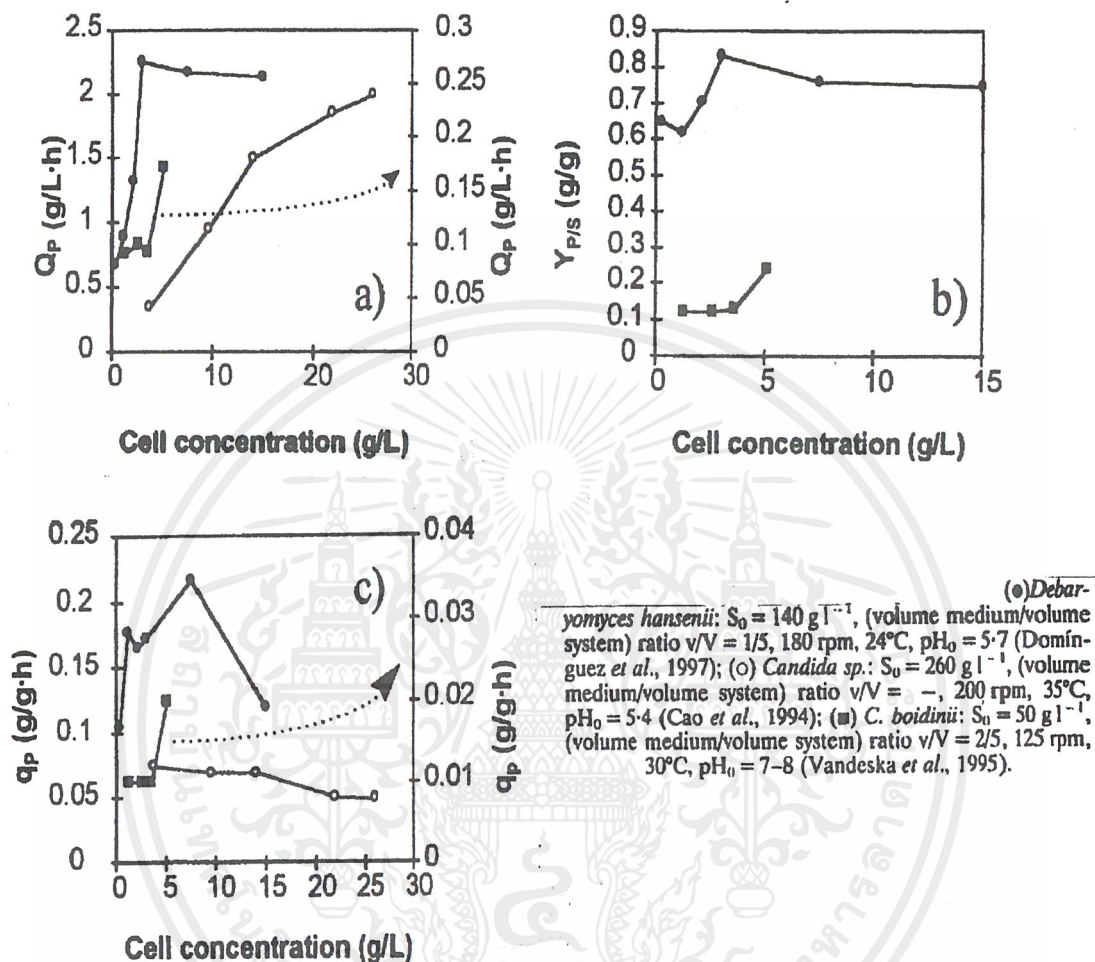
ดังนั้น อายุหัวเชื้อที่เหมาะสมมักจะอยู่ในช่วงต้น เพราะพบว่าจะทำให้ได้ผลผลิตไซลิทอลที่สูงกว่าและมีอัตราการผลิตสูงกว่าหัวเชื้อที่มีอายุมาก แต่อายุที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไปตามเชื้อนั้น

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 จำนวนเซลล์ย้อมเพิ่มมากขึ้น ทำให้มีอัตราการผลิตไซลิทอลได้สูงและรวดเร็วขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.8 ผลของปริมาณหัวเชื้อ

- อัตราการผลิตไซลิทอล (Q_p)
- ผลได้ไซลิทอลจากไซลอส ($Y_{p/s}$)
- อัตราการผลิตไซลิทอลจำเพาะ (q_p)

ที่มา :Parajo และคณะ (1997)

พีเอช

ค่าพีเอชที่เหมาะสมที่ใช้นั้นขึ้นกับชนิดของยีสต์ พีเอชที่เหมาะสมจะช่วยให้ยีสต์เจริญได้ดี และผลิตไซลิทอลได้สูงขึ้น แต่พีเอชที่เหมาะสมของยีสต์แต่ละชนิดก็แตกต่างกันด้วยดังตารางที่ 2.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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* เมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนแทนแอมโมเนียมซัลเฟตพบว่าให้ผลผลิตสูงชันกว่าเดิม (Vandeska และคณะ, 1995) และพบว่าเชื้อชนิดนี้เมื่อใช้สารสกัดยีสต์ (yeast extract) จะให้ผลผลิตสูงสุดเมื่อเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่น (Vonsuvanlert และ Tani, 1989) และการศึกษาใน *C. shehatae* พบว่าถ้าใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์จะทำให้เชื้อใช้ไซโลสได้ดีขึ้น (Palnitkar และ Lachke, 1992) นอกจากนี้ Sirisansaneeyakul และคณะ (1995) ซึ่งทำการศึกษานใน *C. mogii* พบว่าอาหารที่มีการเติมยีสต์สกัดและเปปโตเนลงไปจะช่วยให้การเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลดีขึ้น

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

Schneider และคณะ (1985) ได้ทำการวิเคราะห์สารอาหารต่างๆ โดยไม่พิจารณาแหล่งคาร์บอน ในฐานะที่เป็นตัวจำกัดการเจริญเติบโต ก็พบว่าการลดลงของ 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

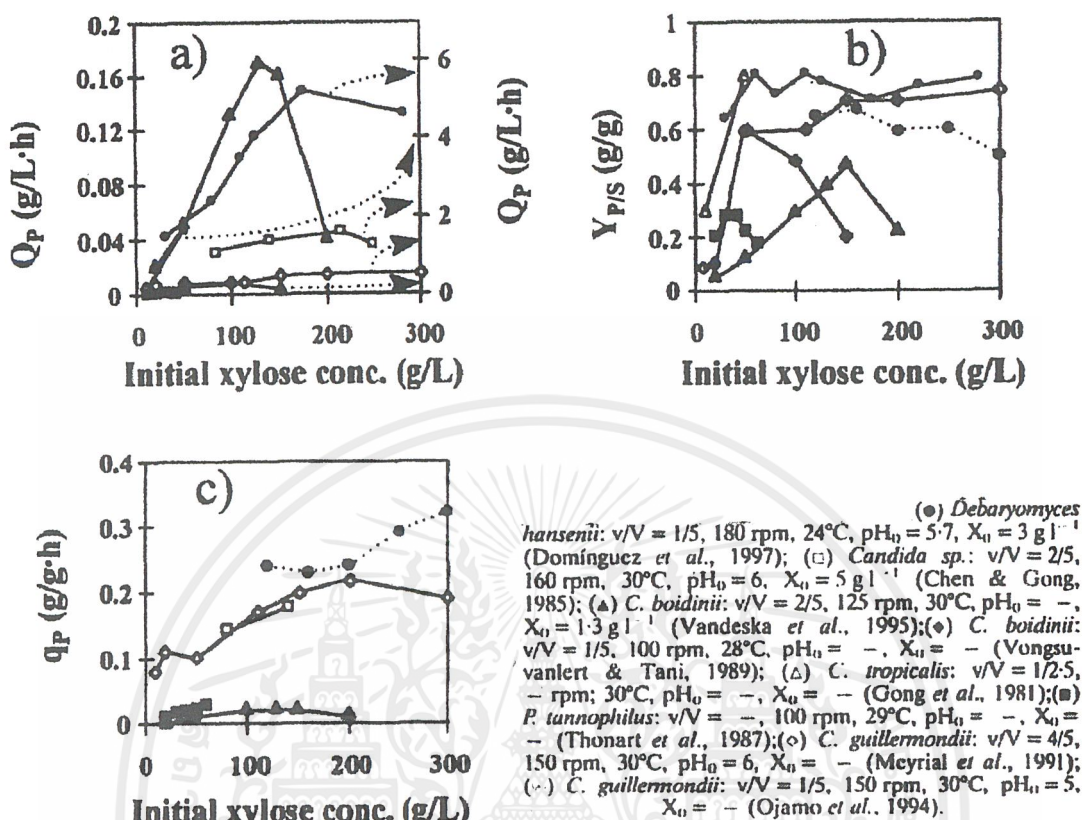
นอกจากนี้ยังมีสารบางตัวที่มีผลยับยั้งหรือชะลอการผลิตไซลิทอลเช่น โพลีเอทิลีนไกลคอล (polyethyleneglycol) และโซเดียมเอไซด์ (sodiumazide) เป็นต้น

ความเข้มข้นของสารตั้งต้น

เป็นปัจจัยที่มีผลอย่างมากต่อการผลิตไซลิทอล ความเข้มข้นของสารตั้งต้นเกี่ยวข้องกับ การให้อากาศในขณะทำการหมัก และมีผลต่อการเจริญของเชื้อและมีผลต่อเนื่องไปยังปริมาณ 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 ดังนั้นการเพิ่มความเข้มข้นของไซโลสจะช่วยเพิ่มผลผลิตของไซลิทอลแต่ต้องไม่มากเกินไปจนเกิดการยับยั้ง นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มข้นของไซโลส ยังจะช่วยเพิ่มอัตราการผลิตไซลิทอล และอัตราการผลิตไซลิทอล อีกด้วย ดังภาพที่ 2.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.9 ผลของความเข้มข้นของสารตั้งต้นเริ่มต้นต่อ

- อัตราการผลิตไซลิทอล (Q_p)
- ผลได้ไซลิทอลจากไซโลส ($Y_{p/S}$)
- อัตราจำเพาะของการใช้สารตั้งต้นและการเกิดผลิตภัณฑ์ก็เพิ่มขึ้นตามไปด้วย แต่โดยปกติเมื่อ

ที่มา : Parajo และคณะ (1997)

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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)

ปริมาณออกซิเจนที่ให้ เป็นปัจจัยที่สำคัญมากปัจจัยหนึ่งในการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสให้เป็นไซลิทอลโดยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ ความเข้มข้นของปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ มีความสัมพันธ์ค่อนข้างมากกับความเข้มข้นของสารตั้งต้นจึงมักศึกษาควบคู่กันไป เพื่อให้สามารถอธิบายถึงอิทธิพลที่แท้จริงของปัจจัยทั้งสอง การให้อากาศที่เหมาะสมจะขึ้นกับความเข้มข้นของสารตั้งต้นและลักษณะของการหมัก Horitsu และคณะ (1992) Roseiro และคณะ (1991) Nollean และคณะ (1993) พบว่าสภาวะการให้อากาศจะมีผลต่ออัตราการผลิต ที่ดีที่สุดขึ้นกับความเข้มข้นของสารตั้งต้นด้วย ถ้าความเข้มข้นสูงอัตราการให้อากาศควรจะสูงด้วย นอกจากนี้การให้อากาศยังขึ้นอยู่กับการเคลือบด้วยว่าเซลล์อยู่ในรูปเซลล์อิสระหรือเซลล์ตรึง เนื่องจากอัตราการส่งผ่านออกซิเจนที่ทำให้เกิดสภาวะที่มีอากาศเล็กน้อย (microaerophilic condition) แก่เซลล์อิสระนั้นอาจทำให้เกิดสภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobic condition) เนื่องจากข้อจำกัดในการแพร่ที่เกิดจากการถ่ายเทมวล Peschke และคณะ (1992) ได้ศึกษาการผลิตไซลิทอลโดย *C. guilliermondii* เมื่อทำการให้อากาศในปริมาณเท่าเดิม (อากาศอิ่มตัว 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 (oxygen เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

transfer rate) สูงเท่านั้น ดังนั้นเมื่อเซลล์อยู่ในรูปเซลล์ตรึง การให้อากาศเมื่อเทียบกับเซลล์แบบอิสระต้องสูงกว่าเพื่อให้เกิดการแพร่ของอากาศเข้าไปในเม็ดเจลได้

ปริมาณอากาศจะมีผลต่อปริมาณเซลล์ซึ่งจะมีผลต่อเนื่องไปยังผลผลิตที่ได้ ถ้าให้อากาศต่ำไปเซลล์จะเจริญเติบโตไม่ดีและตายได้ แต่ถ้าให้อากาศสูงตลอดเวลาปริมาณออกซิเจนที่สูงก็จะมีผลทำให้ไซลิทอลถูกเปลี่ยนเป็นเซลลูโลสแทน จึงอาจจะใช้วิธีให้อากาศสูงในช่วงแรกเพื่อให้เกิดเซลล์มากแล้วลดการให้อากาศลง เพื่อให้เกิดการผลิตไซลิทอล

ผลของการใช้น้ำตาลชนิดอื่นเป็นสารตั้งต้นร่วม

มีการศึกษาการใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นร่วมในการผลิตไซลิทอล ดังเช่นในตารางที่ 2.7 ตารางที่ 2.7 การใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้นร่วมในการผลิตไซลิทอล

Microorganism	Operational conditions	Xylose (g l^{-1})	Glucose (g l^{-1})	Time (h)	P (g l^{-1})	Q_p ($\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$)	$Y_{P/S}$ (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 <i>et al.</i> (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 <i>et al.</i> (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 <i>et al.</i> (1995)
		10	0	10	-	-	-	-	-	
<i>C. tropicalis</i>	Column reactor with 200 ml working volume	10	9	40	2-5	0-062	1	-	-	Yahashi <i>et al.</i> (1996a)
		150	0*	42	84-5	2-01	0-56	23-1	-	
		150	5*	36	94-0	2-61	0-63	34-8	-	
	3 l batch reactor with 2 l working volume	150	10*	42	102-2	2-43	0-68	37	-	
		150	15*	42	98	2-33	0-65	38	-	
		150	20*	42	100	2-38	0-74	42	-	
		150	0	32	93-9	2-94	0-63	22-7	-	
<i>C. guilliermondii</i>	Batch/300 rpm/ 0-46 vvm/30°C	150	10*	32	104-5	3-26	0-70	40-1	-	Silva <i>et al.</i> (1996)
		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 <i>et al.</i> (1996)
		1†	0	-	-	46-50	0-34	0-64	20-98	
		1†	0-1†		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) พบว่าการเติมกลูโคสลงไปเป็นสารตั้งต้นร่วมนั้นมีผลดีเนื่องจากไซโลสจะเปลี่ยนเป็นไซลิทอลได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น เพราะเซลล์จะมีการเจริญได้ดีกว่าใช้ไซโลสเพียงอย่างเดียวจึงผลิตไซลิทอลได้สูง และกลูโคสยังช่วยเพิ่ม NADPH เมื่อเกิดเมแทบอลิซึม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เมื่อมีกลูโคสในอาหาร กลูโคสจะยับยั้งการใช้ไซโลสของยีสต์ และจะใช้กลูโคสในการเจริญอย่างรวดเร็ว เมื่อความเข้มข้นของกลูโคสลดความสามารถในการใช้ไซโลสของยีสต์จะกลับคืนมาตามปกติ (Nolleau และคณะ, 1995) Pfeifer และคณะ (1996) พบว่าผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เมื่อเติมกลูโคสและอัตราการผลิต 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 ทั้งนี้ น่าจะมาจากความเข้มข้นของไซลิทอลภายในน้ำหมักสูงขึ้น 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 Millis, 1985 ; Xu และ Taylor, 1983) นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ในการใช้ไซลิทอลและการผลิตไรโบฟลาวิน (riboflavin) ใน *C. guilliermondii* อีกด้วย (Leather และ Gupta, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

จุลินทรีย์

Candida tropicalis TISTR 5045 ใช้ศึกษาการผลิตไซลิทอลได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ทำการเก็บเป็น stock culture ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใน YM agar (ภาคผนวก ข)

อุปกรณ์

เครื่องมือ

1. สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ model DENWAY 6405 UV /VIS
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. ไซโลส
8. ไซลิทอล
9. กลูโคส
10. ยีสต์สกัด (yeast extract)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11. มอลต์สกัด (malt extract)
12. เปปโตน (peptone)
13. KH_2PO_4
14. $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
15. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
16. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
17. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
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 บรรจุพลาสติกขนาด 250.0 มิลลิลิตร ขนาด 75.0 มิลลิลิตร ใส่เชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 ถ่ายเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 จากหลอดทดลองลงใน พลาสติก ที่มี อาหารเพื่อการเจริญเติบโต ในข้อ 1.1

1.3 นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

1.4 นำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์โดยเครื่อง สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ 600 นาโน-เมตร

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 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 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 บรรจุฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 12 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3.3 เติมหหัวเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2

3.4 เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์โดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ 600 นาโนเมตร

4. การศึกษาปริมาณยีสต์สกัดที่เหมาะสม

4.1 ทำการเตรียมหัวเชื้อตามข้อ 1

4.2 เตรียมอาหารเพื่อการเจริญเติบโต 75.0 มิลลิลิตร ให้มีปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3 และแปรผันปริมาณยีสต์สกัดเป็น 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ บรรจุฟลาสก์ขนาด 250.0 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

4.3 เติมหหัวเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2

4.4 นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์โดยเครื่อง สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ 600 นาโนเมตร และหาค่าเฉลี่ยในเวลาที่เหมาะสม

4.5 นำไปวัดค่าความขุ่นของเซลล์โดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ที่ 600 นาโน-เมตร

5. ศึกษาหาความเร็วรอบที่เหมาะสม

5.1 ทำการเตรียมหัวเชื้อตามข้อ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 เตรียมอาหารเพื่อการเจริญเติบโต 75.0 มิลลิลิตร ให้มีปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3 และมีปริมาณยีสต์สกัดที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 4 บรรจุพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

5.3 เติมห้วเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2

5.4 นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบเป็น 250 280 300 และ 320 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 1 ชั่วโมง นำไปวัดค่าความขุ่นเซลล์โดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ 600 นาโนเมตร

6. ศึกษาการผลิตไซลิทอลโดยใช้น้ำตาลกลูโคสและไซโลสในระดับพลาสติก

6.1 ทำการเตรียมหัวเชื้อตามข้อ 1

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

6.3 เติมห้วเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2

6.4 นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเป็นระยะๆ ทุกๆ 2 ชั่วโมง และนำมาวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี Somogyi Nelson's method (1952) ซึ่งแสดงในภาคผนวก ค

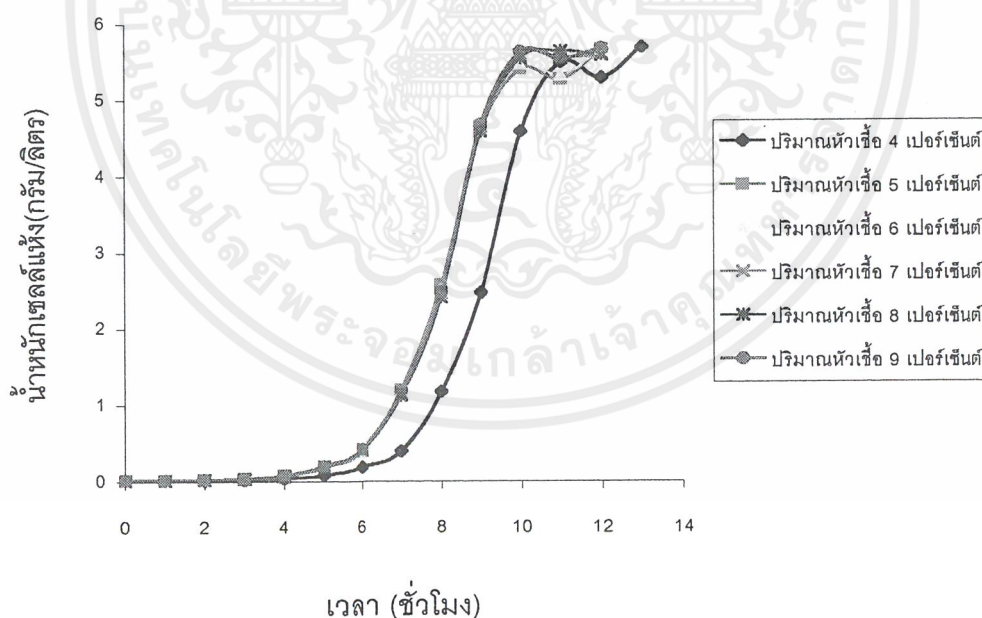
6.5 เมื่อปริมาณกลูโคสเหลือ 2 กรัมต่อลิตร เติมไซโลสลงไปให้มีความเข้มข้นเป็น 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ลดความเร็วรอบลงเป็น 150 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชั่วโมง และนำไปหาปริมาณไซลิทอลโดยใช้วิธีของ Adler และ Gustafsson (1980) และหาหน้าหนักเซลล์แห้งดังแสดงในภาคผนวก ค

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสม

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. tropicalis* TISTR 5045 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

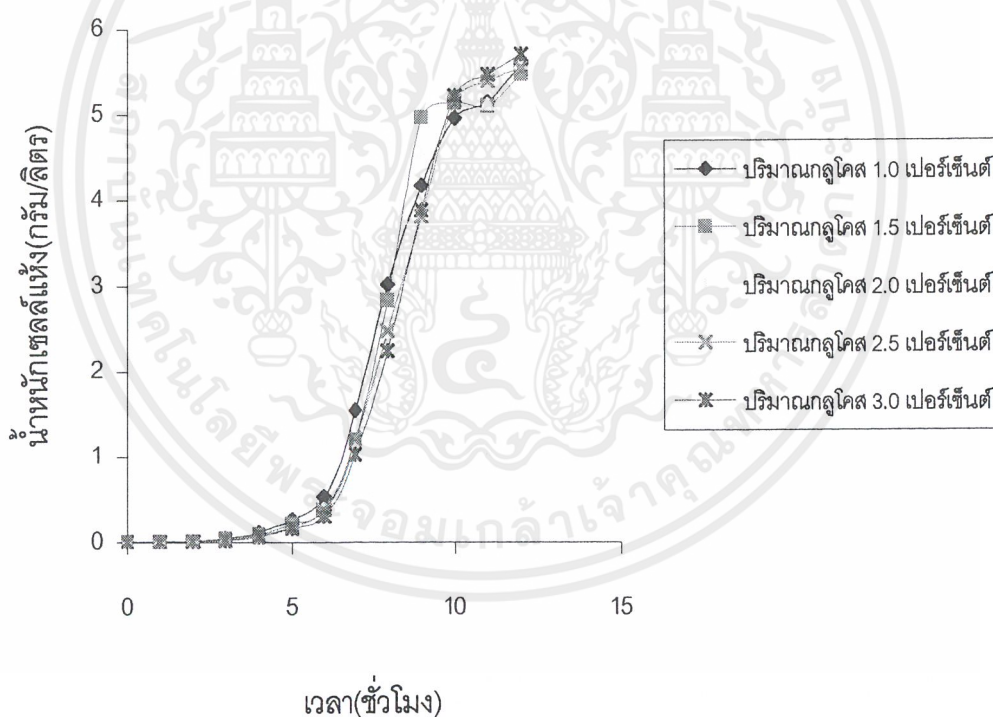


ภาพที่ 4.1 เปรียบเทียบการเติบโตของเชื้อ *C. tropicalis* TISTR 5045 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต โดยแปรผันความเข้มข้นของปริมาณหัวเชื้อที่ 4 5 6 7 8 และ 9 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การศึกษาปริมาณกลูโคสที่เหมาะสม

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. tropicalis* TISTR 5045 ในอาหารเพื่อการเจริญเติบโตโดยแปรผันปริมาณกลูโคสที่ 1 1.5 2 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าทุกความเข้มข้นที่แปรผันให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดที่ใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังตารางที่ 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

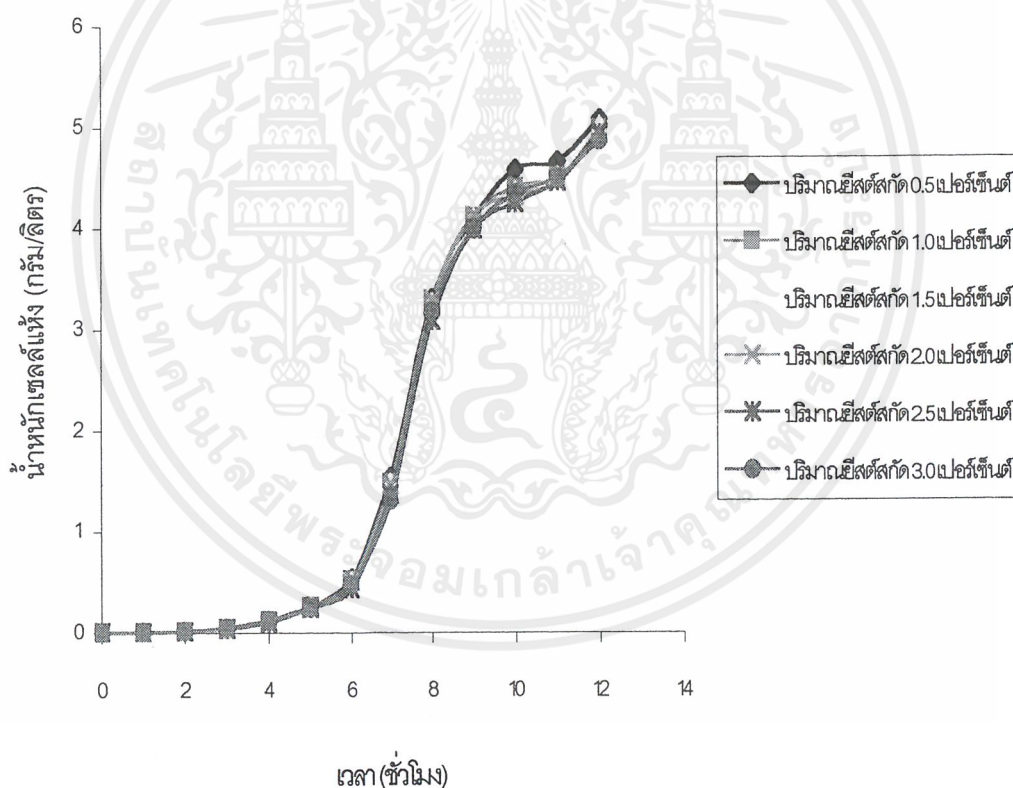


ภาพที่ 4.2 เปรียบเทียบการเติบโตของเชื้อ *C. tropicalis* TISTR 5045 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต โดยแปรผันความเข้มข้นของปริมาณกลูโคสที่ 1 1.5 2 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การศึกษาปริมาณยีสต์สกัดที่เหมาะสม

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. tropicalis* TISTR 5045 ในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต โดยแปรผันปริมาณความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่ 0.5 1 1.5 2 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์พบว่า ทุกความเข้มข้นของยีสต์สกัด อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติดังตารางที่ ก.6 (ภาคผนวก ก) ดังนั้นปริมาณยีสต์สกัดที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.5 เปอร์เซ็นต์ซึ่งให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Horitsu และคณะ (1992), Yuuichi และคณะ (1996) และ D-K.Oh. และ S-Y. Kim (1998) โดยสูตรอาหารที่ใช้ในการศึกษาใช้ยีสต์สกัดปริมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต

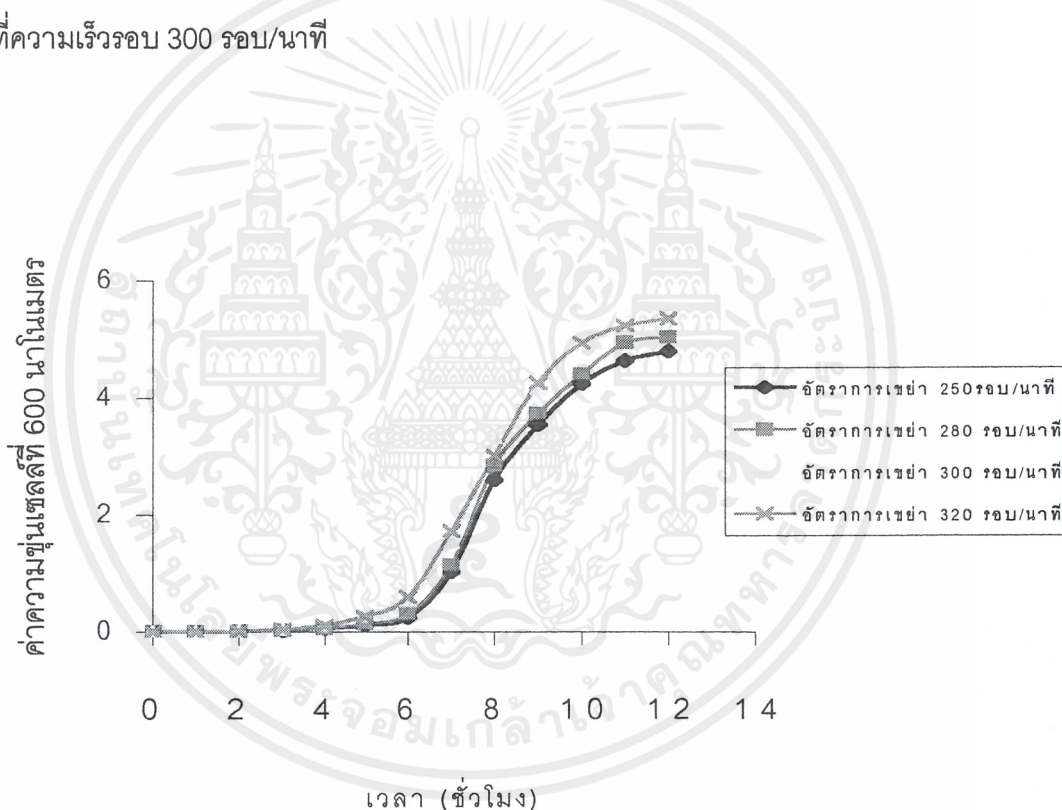


ภาพที่ 4.3 เปรียบเทียบการเติบโตของเชื้อ *C. tropicalis* TISTR 5045 ในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต แปรผันความเข้มข้นของปริมาณยีสต์สกัดที่ 0.5 1 1.5 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อัตราการเขย่า 300 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสม

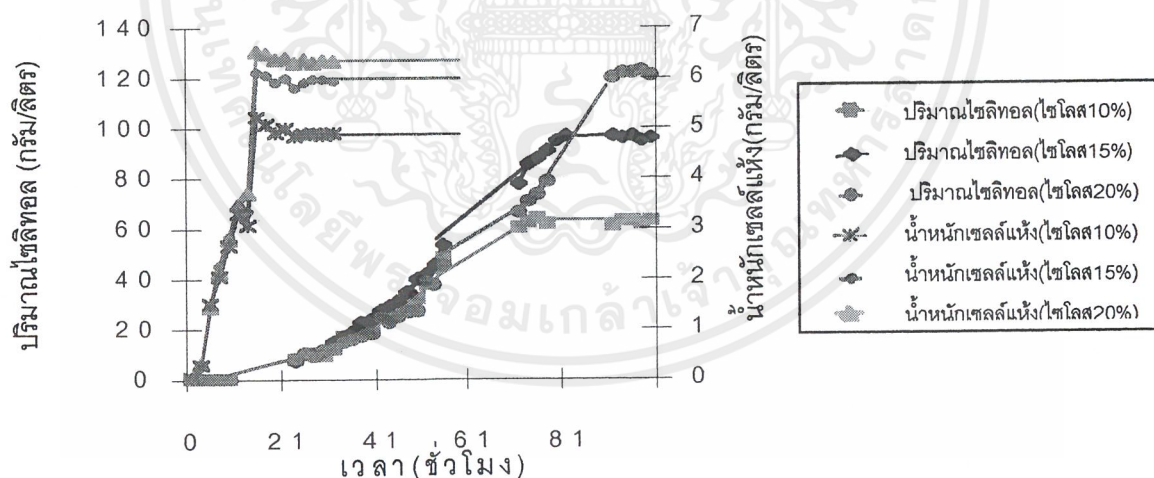
จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. tropicalis* TISTR 5045 ในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต โดยแปรผันอัตราการเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 280 300 และ 320 รอบ/นาที พบว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดของเชื้อในอาหารที่มีแปรผันอัตราการเขย่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติดังตารางที่ก.8 (ภาคผนวก ก) จึงทำการวิเคราะห์ความแตกต่างแบบ LSD (ภาคผนวก ก) พบว่าที่อัตราการเขย่า 300 รอบ/นาทีซึ่งให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะมากที่สุดมีความแตกต่างกับอัตราการเขย่าที่ 250 และ 280 รอบ/นาทีอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง อัตราการเขย่า 300 ไม่มีความแตกต่างกับอัตราการเขย่าที่ 320 รอบ/นาที อัตราการเขย่าที่ให้ผลดีที่สุด คือ อัตราการเขย่าที่ความเร็วรอบ 300 รอบ/นาที



ภาพที่ 4.4 เปรียบเทียบการเติบโตของเชื้อ *C. tropicalis* TISTR 5045 ในอาหารเพื่อการเจริญเติบโตโดยแปรผันอัตราการเขย่าที่มีความเร็วรอบที่ 250 280 300 และ 320 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

5. การศึกษาปริมาณไซโลสที่เหมาะสมในการผลิตไซลิทอลในระดับฟลอสก์

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อ *C. tropicalis* TISTR 5045 ในอาหารเพื่อการผลิต โดยแปรผันปริมาณความเข้มข้นของไซโลสที่ 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเติมไซโลสเมื่อปริมาณกลูโคสในอาหารเพาะเลี้ยงเหลือ 2 กรัม/ลิตร จากการศึกษพบว่าเมื่อเติมความเข้มข้นของไซโลสทั้ง 3 ความเข้มข้น ชั่วโมงที่ 1 ภายหลังจากเติมไซโลส ปริมาณไซลิทอลที่ผลิตได้คือ 0.2 กรัม/ลิตร เพราะต้องใช้เวลาให้ไซโลสที่ใส่ลงไปเหนียวทำให้เกิดการสร้างเอ็นไซม์ไซโลสรีดักเทส ซึ่งจะเกิดการสร้างเมื่อกลูโคสหมดอย่างสมบูรณ์ และเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 10 ชั่วโมง อัตราการผลิตไซลิทอลจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วคือ เพิ่มจาก 0.2 กรัม/ลิตรไปเป็น 8.2 กรัม/ลิตร และอัตราการผลิตจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อเวลาผ่านไป โดยการใช้ความเข้มข้นของไซโลสต่างกันจะทำให้ใช้เวลาในการหมักต่างกันโดยขึ้นกับความเข้มข้นของไซโลส ถ้าความเข้มข้นมากจะใช้เวลาในการหมักจากกราฟ พบว่าปริมาณไซโลสที่ 20 เปอร์เซ็นต์ให้ปริมาณไซลิทอลสูงสุดคือ 121 กรัม/ลิตรในชั่วโมงที่ 90 ปริมาณไซโลสที่ 15 เปอร์เซ็นต์ผลิตไซลิทอลได้ 97 กรัม/ลิตรที่ชั่วโมงที่ 81 และปริมาณไซโลสที่ 10 เปอร์เซ็นต์ผลิตไซลิทอลได้ 62 กรัม/ลิตรที่ชั่วโมงที่ 77



ภาพที่ 4.5 เปรียบเทียบปริมาณไซลิทอลและน้ำหนักรวมของเซลล์ เมื่อทำการศึกษาในระดับฟลอสก์ ที่ความเร็วรอบ 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.1 การคำนวณในการผลิตไซลิทอล

ไซโลส (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ไซลิทอล (กรัม/ลิตร)	อัตราการเจริญ จำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	อัตราการผลิตไซลิทอล (กรัม/ลิตร/ลิตร)	เวลา (ชั่วโมง)
100	6.33	63	0.477	0.81	77
150	5.94	97	0.514	1.2	81
200	4.84	121	0.491	1.22	99

จากตารางที่ 4.1 เป็นการแปรผันปริมาณไซโลสที่ใช้ในการศึกษา คือ 100 150 และ 200 กรัม/ลิตร พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 6.33 5.94 และ 4.84 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ปริมาณไซลิทอลที่ผลิตได้เป็น 63 97 และ 121 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และสามารถหาอัตราการเจริญจำเพาะได้คือ 0.477 0.514 และ 0.491 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ และหาอัตราการผลิตไซลิทอลได้ที่ชั่วโมงที่ 77 ชั่วโมงที่ 81 และชั่วโมงที่ 99 คือ 0.81 1.2 และ 1.22 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ตามลำดับ จากผลการทดลองที่ได้จึงทำการเลือกปริมาณไซโลสที่เหมาะสม คือ 150 กรัม/ลิตร

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสโดยใช้เชื้อ *C. tropicalis* TISTR 5045 พบว่าในการเจริญของเชื้อต้องใช้ปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสม 4.0 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกลูโคสที่เหมาะสม 10.0 กรัม/ลิตร ปริมาณยีสต์สกัดที่เหมาะสม 5.0 กรัม/ลิตร โดยใช้อัตราการเขย่าที่ 300 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 4.0 และทำการลดความเร็วรอบของการเขย่าลงเป็น 150 รอบต่อนาที ในการผลิตปริมาณไซลิทอลในระดับฟลasks พบว่าปริมาณน้ำตาลไซโลสที่ให้ผลผลิตไซลิทอลสูงสุดคือ 150.0 กรัม/ลิตร เมื่อคิดเป็นอัตราการผลิตได้ผลผลิตคือ 0.98 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ที่เวลา 99 ชั่วโมง

เอกสารอ้างอิง

- นรินทร์ เรืองพานิช. 2541. ผลของกลูโคสต่อการผลิตไซลิทอลจากไซโลสภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจน. เทคนิควิจัย วิทยาลัยวิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะอุตสาหกรรมเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 70 น.
- วรสิทธิ์ โทจำปา. 2541. การผลิตไซลิทอลโดยการหมักบนเยื่อเซลลูโลสด้วย Hollow fiber. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต 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. Biotechnol. 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 . Biotechnol. 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. Kilian. 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. Aamaral - 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

ตารางที่ก.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

ตารางที่ก.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสม

Source of Variation	Degree of Freedom	Sum of Squares	Mean of Squares	F value	tabular F	
					5เปอร์เซ็นต์	1เปอร์เซ็นต์
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 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ก.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

ตารางที่ก.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 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ก.5 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้เมื่อใช้ปริมาณยีสต์สกัด 0.5-3.0 เปอร์เซ็นต์ที่เวลาต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้เมื่อใช้ปริมาณยีสต์สกัด (กรัม/น้ำหนักเซลล์แห้ง/ลิตร)					
	0.5เปอร์เซ็นต์	1 เปอร์เซ็นต์	1.5เปอร์เซ็นต์	2 เปอร์เซ็นต์	2.5เปอร์เซ็นต์	3 เปอร์เซ็นต์
0	0.0086	0.0076	0.0080	0.0098	0.0086	0.0092
1	0.0097	0.0082	0.0083	0.0091	0.0092	0.0100
2	0.0202	0.0192	0.0195	0.0183	0.0172	0.0172
3	0.0522	0.0477	0.0473	0.0502	0.0461	0.0489
4	0.1225	0.1195	0.1142	0.1092	0.1026	0.1219
5	0.2692	0.2661	0.2675	0.2646	0.2497	0.2497
6	0.5415	0.5291	0.5143	0.5143	0.4444	0.4727
7	1.5394	1.4863	1.4908	1.4626	1.3674	1.3080
8	3.3102	3.2699	3.2789	3.2937	3.0916	3.1659
9	4.1027	4.1127	4.1142	4.1305	3.9982	3.9982
10	4.7429	4.4040	4.3743	4.3252	4.2509	4.3401
11	4.6656	4.5185	4.5274	4.4590	4.4739	4.5036
12	5.0807	4.9941	5.0313	4.9495	4.9346	4.8719

ตารางที่ก.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณยีสต์สกัดที่เหมาะสม

Source of Variation	Degree of Freedom	Sum of Squares	Mean of Squares	F value	tabular F	
					5เปอร์เซ็นต์	1เปอร์เซ็นต์
treatment	5	0.0827	0.0165	1.6252 ^{ns}	3.11	5.06
error	12	0.1222	0.0102			
total	17	0.2050				

ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 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 8 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				

** = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 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

ตารางที่ 10 น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาต่างๆ ขณะทำการผลิตไซลิทอลในระดับฟลอสก์ ในอาหารที่ใช้ในการผลิตไซลิทอลที่พีเอช 4.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นไซโลส(กรัม/ลิตร)			เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นไซโลส(กรัม/ลิตร)		
	100	150	200		100	150	200
	น้ำหนักเซลล์ (แห้งกรัม/ลิตร)				น้ำหนักเซลล์ (แห้งกรัม/ลิตร)		
0	0.037	0.033	0.037	17	6.49	6.06	5.08
3	0.317	0.29	0.29	19	6.37	5.91	4.91
5	1.44	1.47	1.5	21	6.40	6.00	5.00
7	2.14	2.27	2.07	23	6.30	5.80	4.85
9	2.79	2.84	2.67	25	6.38	5.92	4.89
11	3.48	3.46	3.31	27	6.30	5.98	4.90
13	3.7	3.35	3.07	29	6.34	5.97	4.87
15	6.53	6.12	2.22	31	6.33	5.94	4.90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ก.11 ปริมาณการผลิตไซลิทอลของ *C. tropicalis* TISTR 5045 ในระดับฟลาจก์ ที่ เวลาต่างๆ ในอาหารที่ใช้ในการผลิตไซลิทอลที่พีเอช 4.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณไซโลส (กรัม/ลิตร)			เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณไซโลส (กรัม/ลิตร)		
	100	150	200		100	150	200
	ไซลิทอลกรัม/ลิตร				ไซลิทอลกรัม/ลิตร		
0-10	0	0	0	45	27.5	31.1	24.7
11	0.163	0.112	0.071	47	30.2	24.7	26.8
13	0.198	0.149	0.104	49	32.3	40	27.1
15	0.203	0.158	0.12	51	38	42	39
19	0.315	0.267	0.19	53	44	45.5	37.5
23	8.2	7.3	8.1	55	48.4	53.4	45
25	9.4	8.6	8.2	71	60.2	77.8	66.5
27	10.4	9.8	9.3	73	62.5	85.5	70.8
29	9.6	11.5	11.7	75	64	87.9	73.5
31	12.3	15.1	12.3	77	62	91	78.9
33	17	17	14.8	91	61	97	120
35	17	18.9	16	93	63	96	122
37	20.3	22.8	17.1	95	63	95	123
39	21.2	23.8	18.3	97	62	95	123
41	24.2	27.5	24.7	99	63	96	121
43	26.7	29.3	22.5				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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
วุ้น	15 กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0 มิลลิลิตร

เตรียมอาหารทำการปรับพีเอชให้เหมาะสม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส 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

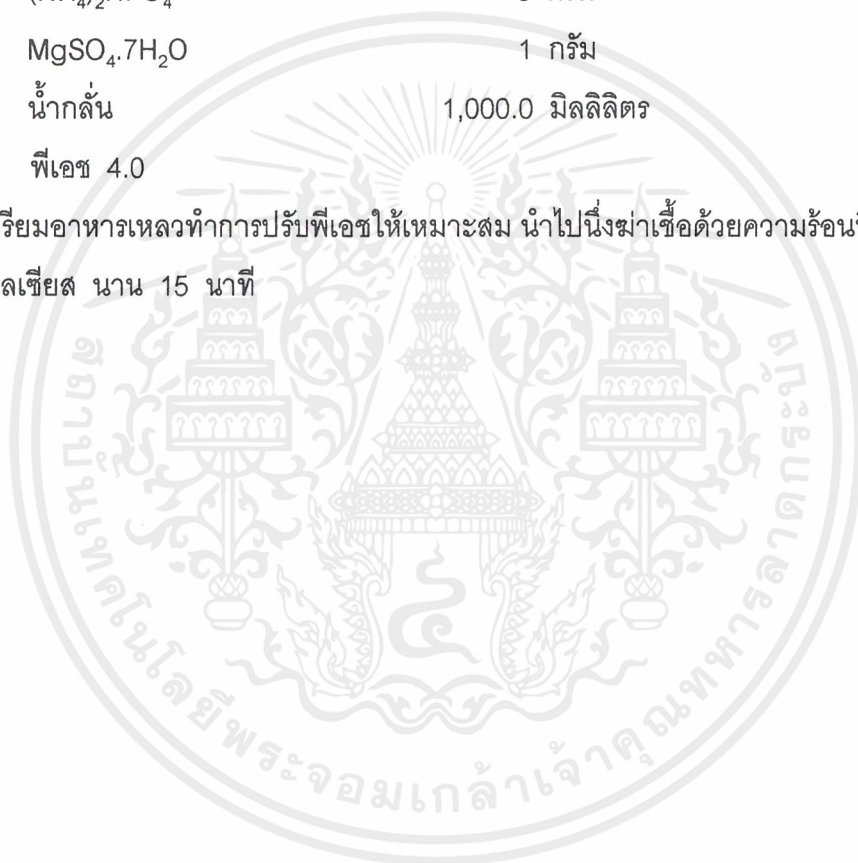
ปรับพีเอชเป็น 4.0

เตรียมอาหารเหลวทำการปรับพีเอชให้เหมาะสม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส 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($\text{Na}_2\text{SO}_4(\text{Anhydrous})$) 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

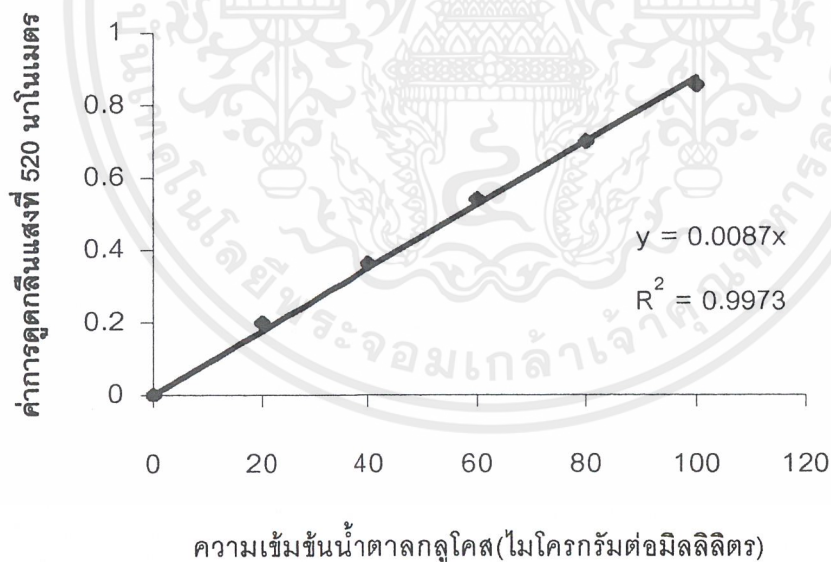
2.1 เติมตัวอย่างที่ต้องการหาน้ำตาลรีดิวซ์ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมคอปเปอร์รีเอเจนต์(Copper reagent) 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ควรใช้ลูกแก้วปิดปากหลอดแก้วเพื่อลดการระเหยของน้ำ

2.2 ทำให้เย็นโดยแช่ในอ่างน้ำ เติมอาร์เซนโมลิบเดต 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 ใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแทนตัวอย่างจากนั้นทำการวิเคราะห์ตามข้อ 2.1-2.3 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตรที่ได้และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานมาสร้างกราฟมาตรฐานของกลูโคส



ภาพที่ค.1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

จากกราฟสามารถหาสมการมาตรฐานของกลูโคสได้ ดังนี้

$$\text{ปริมาณกลูโคส} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่} 520 \text{ นาโนเมตร}) \times (\text{ค่าความเจือจาง})}{0.008}$$

3. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไซลิทอล (Adler และ Gustafsson, 1980)

โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของไซลิทอลไปเป็นฟอร์มัลดีไฮด์ด้วยเปอร์ไอโอเดตในสารละลายกรดเป็นระยะเวลาสั้นๆ แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยบิวเทน-2,3-ไดออล(butane-2,3-diol) จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นโดยทำปฏิกิริยากับสารละลาย เพนเทน-2,3-ไดโอน(pentane-2,4-dione) ได้สารละลายสีเหลือง

3.1 periodate reagent (NaIO_4 0.015 M ใน HCl 0.16 M) เตรียมโดยละลาย NaIO_4 3.2084 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นลงไป 13.3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร

3.2 บิวเทน-2,3-ไดออล(Butane-2,3-diol) 0.02 M เตรียมโดยปิเปตต์ บิวเทน-2,3-ไดออล (Butane-2,3-diol) 1.8 มิลลิลิตรปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร

3.3 สารละลายเพนเทน-2,4-ไดโอน(Pentane-2,4-dione solution)(เตรียมใช้ทันที) เตรียมโดยละลายแอมโมเนียมแอสซิเตต 154.16 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมกรดแอสซิติคเข้มข้นปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วเติม เพนเทน-2,4-ไดโอน(pentane-2,4-dione) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร

3.4 สารละลายมาตรฐานไซลิทอล เตรียมโดยละลายไซลิทอล 0.1000 กรัม ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร) แล้วเจือจางให้ได้สารละลายไซลิทอลความเข้มข้น 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

4. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณไซลิทอล

4.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายไซลิทอลมาตรฐาน (ความเข้มข้นไซลิทอล 10 -50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

4.2 เติม periodate reagent ลงไป 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที

4.3 เติมสารละลาย 0.002 M บิวเทน-2,3-ไดออล ลงไป 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

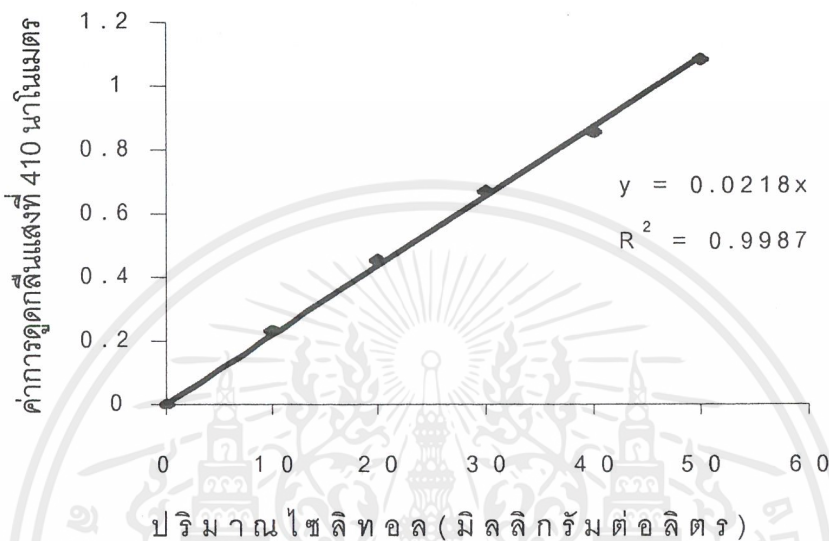
4.4 เติมสารละลาย เพนเทน-2,4- ไดโอน ลงไป 2.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

4.5 นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร

4.7 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรและความเข้มข้นของไซลิทอลไปสร้างกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซลิทอล



ภาพที่ค.2 กราฟมาตรฐานของไซลิทอล

4.8 การหาปริมาณของไซลิทอลในสารละลายตัวอย่าง สามารถคำนวณได้จาก

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

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 เขียนหมายเลขที่กระดาษกรองเบอร์ 5 และนำไปอบ 105 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมงนำไปใส่ในโถดูดความชื้นและนำไปชั่งน้ำหนักเมื่อกระดาษกรองเย็นลงแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.4 เมื่อได้ปริมาณเซลล์สูงสุดให้เจือจางให้มีค่าความขุ่นเซลล์ต่างๆ กันอยู่ในช่วง 0.1-0.8 ประมาณ 5 ค่า

5.5 ทำการต่อชุดกรอง และนำกระดาษกรองไปวางบนกรวยกรอง นำน้ำกลั่นชนิดให้ทั่วกระดาษกรอง

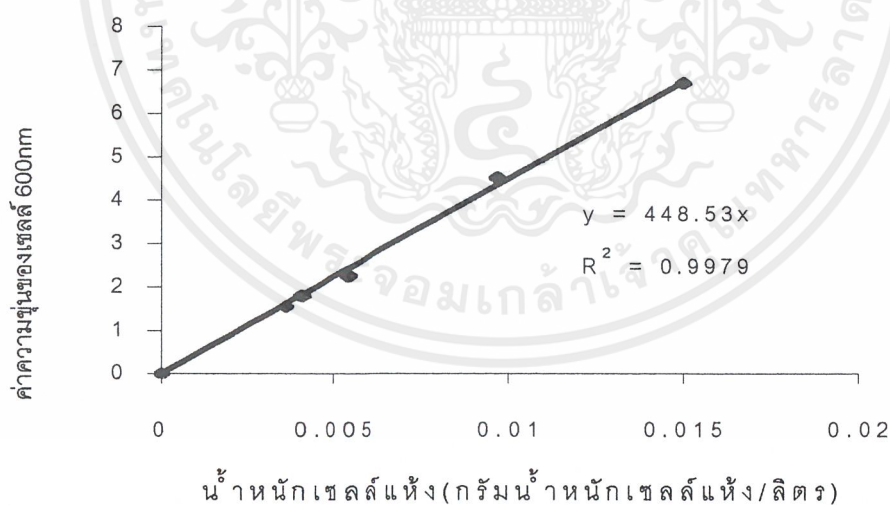
5.6 บีบเปิดสารละลายจากข้อ 5.4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรมาทำการกรอง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ทำ 3 ครั้ง

5.7 นำกระดาษกรองไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง

5.8 นำไปใส่ในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งน้ำหนักเมื่อกระดาษกรองเย็นลงแล้ว

คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง = น้ำหนักกระดาษหลังกรอง - น้ำหนักกระดาษก่อนกรอง

5.9 นำน้ำหนักเซลล์แห้งและเวลาไปสร้างกราฟ



ภาพที่ค.3 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งกับค่าความขุ่นเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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)

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

$$\text{treatment df} = t - 1$$

$$\text{error df} = \text{by subtraction} = \text{total df} - \text{treatment df}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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)

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

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

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

$$\text{Error df}$$

ง. คำนวณค่า F-value

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

$$\text{Error MS}$$

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ใช้ LSD เมื่อจำนวนสิ่งทดลองไม่เกิน 5
3. กรณีที่จำนวนสิ่งทดลองเกิน 5 ให้ใช้ LSD ได้เฉพาะการเปรียบเทียบสิ่งทดลองอื่นๆกับ 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 ∞ และที่และเมื่อใช้การทดสอบสมมติฐานแบบ 2 ทาง

เพื่อตัดสินใจว่า สิ่งทดลองคู่ใดคู่หนึ่งมีความแตกต่างกันจริงหรือไม่ ให้หาค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองคู่นั้น สมมติให้เป็น d เปรียบเทียบค่า d กับค่า LSD ที่คำนวณได้แสดงว่าสิ่งทดลองไม่มีความแตกต่างกัน