

การผลิตไซลิทอล โดย *Candida guilliermondii* TISTR 5068
จากน้ำตาล D-glucose และ D-xylose



นางสาว ทศนีย์ บุญแล
นางสาว วิณานันท์ สมทรัพย์
นาย ศักดิ์สิทธิ์ เป็งโรจน์

โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2543

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน..... 39897
วัน, เดือน, ปี..... 11 ก.ค. 2544

b.....
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Production of xylitol by *Candida guilliermondii* TISTR 5068
from D-glucose and D-xylose



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 อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ

การผลิตไซลิทอล โดย *Candida guilliermondii* TISTR 5068
จากน้ำตาล D-glucose และ D-xylose

โดย

1. นางสาว ทศนีย์ บุญแล
2. นางสาว วิณานันท์ สมทรัพย์
3. นายศักดิ์สิทธิ์ เป็งโรจน์

ภาควิชา

ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา

รศ. สุขใจ ชูจันทร์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้า
คุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงการพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตร์บัณฑิต

.....หัวหน้าภาควิชา

(ผศ. ดร. นवलพรรณ ณะระนอง)

คณะกรรมการโครงการพิเศษ

.....ประธานกรรมการ

(รศ. ดร. พรรณี ชูตาภิชาติ)

.....กรรมการ

(รศ. มาลินี ตันติยาภรณ์)

.....กรรมการ

(รศ. สุขใจ ชูจันทร์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การผลิตไซลิทอล โดย <i>Candida guilliermondii</i> TISTR 5068 จากน้ำตาล D-glucose และ D-xylose
โดย	1. นางสาว ทศนีย์ บุญแล 2. นางสาว วิณานันท์ สมทรัพย์ 3. นายศักดิ์สิทธิ์ เป็งโรจน์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. สุขใจ ชูจันทร์
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2543

บทคัดย่อ

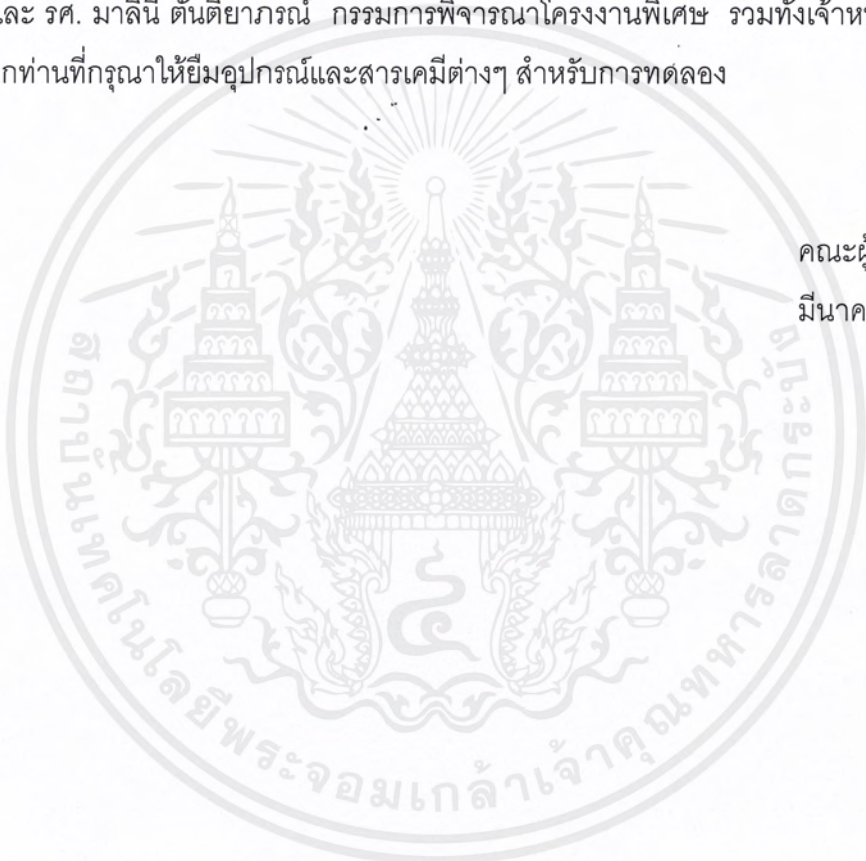
จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไซลิทอล โดยเชื้อ *Candida guilliermondii* TISTR 5068 จากน้ำตาล D-glucose และ D-xylose พบว่าจากการหมักด้วยเชื้อ *Candida guilliermondii* ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 ในอาหาร YM-broth ที่มีส่วนประกอบกลูโคสต่อไซโลสในอัตราส่วน 1:20 กรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ 3 กรัมต่อลิตร เปปโตน 3 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรด-ด่าง 6.0 ปริมาณอาหารที่ใช้ 75 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถให้ผลผลิตไซลิทอลได้สูงถึง 27.5188 กรัมต่อลิตร ที่ซึ่งโม่งที่ 91 ของการหมักในปริมาณของไซโลส 200 กรัมต่อลิตร

กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้ ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ รศ. สุขใจ ชูจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการพิเศษ ที่ให้ความรู้ข้อเสนอแนะ รวมทั้งได้กรุณาตรวจทานแก้ไขทางด้านภาษาและคำแนะนำต่างๆ รศ. ดร. พรรณี รัฐภักขิต ประธานกรรมการ และ รศ. มาลินี ตันติยาภรณ์ กรรมการพิจารณาโครงการพิเศษ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่กรุณาให้ยืมอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ สำหรับการทดลอง

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2544



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	2
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	24
บทที่ 4 ผลการทดลอง	32
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	53
เอกสารอ้างอิง	54
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	56
ภาคผนวก ข โพลีออล (polyol)	59
ภาคผนวก ค การเตรียมสารเคมีและการหามาตรฐาน	62
ภาคผนวก ง ข้อมูลจากการทดลอง	72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบไซลิทอลในผักและผลไม้	2
ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบความหวานของสารให้ความหวานต่างๆ	4
ตารางที่ 2.3 แสดงค่าความสดชื่นของน้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ	5
ตารางที่ 2.4 เปรียบเทียบคุณสมบัติทางกายภาพของไซลิทอลและซูโครส	5
ตารางที่ 2.5 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพที่สำคัญของไซลิทอล	6
ตารางที่ 2.6 การคัดเลือกยีสต์สำหรับผลิตไซลิทอล	17
ตารางที่ 4.1 แสดงค่าวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาหัวเชื้อเริ่มต้น	32
ตารางที่ 4.2 แสดงค่าวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาปริมาณกลูโคส	33
ตารางที่ 4.3 แสดงค่าวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาปริมาณสารสกัดยีสต์	34
ตารางที่ 4.4 แสดงค่าวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาปริมาณเปปโติน	35
ตารางที่ 4.5 แสดงค่าวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต	35
ตารางที่ 4.6 แสดงค่าวิเคราะห์ทางสถิติของการศึกษาความเร็วรอบในการเขย่า	36
ตารางที่ 4.7 แสดงผลผลิตมวลชีวภาพต่อปริมาณเชื้อเริ่มต้นกลูโคส สารสกัดยีสต์ เปปโติน แอมโมเนียมซัลเฟต และความเร็วรอบ	36
ตารางที่ 4.8 ข้อมูลการเพาะเลี้ยง <i>Candida guilliermondii</i> ในความเข้มข้นของ ไซโลสระดับต่างๆ	38
ตารางที่ ข1 คุณสมบัติต่างๆทางกายภาพและทาง organoleptic ของน้ำตาลแอลกอฮอล์	61
ตารางที่ ข2 คุณสมบัติของน้ำตาลชนิดต่างๆ	61
ตารางที่ ข3 คุณสมบัติต่างๆ ของน้ำตาลและแอลกอฮอล์ของน้ำตาลชนิดต่างๆ	62
ตารางที่ ค1 ตัวอย่างผลการทดลองการเลี้ยงเชื้อยีสต์	70
ตารางที่ ง1 แสดงปริมาณของเซลล์ที่กลูโคสความเข้มข้นต่างๆ	72
ตารางที่ ง2 แสดงปริมาณของเซลล์ที่ระดับของเซลล์เริ่มต้นต่างๆ	73
ตารางที่ ง3 แสดงปริมาณของเซลล์ที่เปปโตินความเข้มข้นต่างๆ	74
ตารางที่ ง4 แสดงปริมาณของเซลล์ที่สารสกัดยีสต์ความเข้มข้นต่างๆ	75
ตารางที่ ง5 แสดงปริมาณของเซลล์ที่แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆ	76
ตารางที่ ง6 แสดงปริมาณของเซลล์ที่ระดับความเร็วรอบต่างๆ กัน	77

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ ๗	แสดงปริมาณเซลล์, ค่าพีเอช, ปริมาณไนลิตทอล และปริมาณกลูโคสที่ลดลง ที่ไซโลสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร	78
ตารางที่ ๘	แสดงปริมาณเซลล์, ค่าพีเอช, ปริมาณไนลิตทอล และปริมาณกลูโคสที่ลดลง ที่ไซโลสเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร	80
ตารางที่ ๙	แสดงปริมาณเซลล์, ค่าพีเอช, ปริมาณไนลิตทอล และปริมาณกลูโคสที่ลดลง ที่ไซโลสเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตร	81



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 2.1 ผลึกน้ำตาลไซลิทอล	2
รูปที่ 2.2 วิธีการเกิดไซลิทอลจากเมทาบอลิซึมของไซโลส	10
รูปที่ 2.3 การผลิตโคเอนไซม์ในยีสต์ที่ผลิตไซโลสได้	11
รูปที่ 2.4 เมทาบอลิซึมของไซโลสในยีสต์	14
รูปที่ 3.1 เชื้อ <i>Candida guilliermondii</i> TISTR 5068 ที่อยู่ใน slant	24
รูปที่ 4.1ก กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น	39
รูปที่ 4.1ข กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น	40
รูปที่ 4.2ก กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาณกลูโคส	41
รูปที่ 4.2ข กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาณกลูโคส	42
รูปที่ 4.3ก กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาณสารสกัดยีสต์	43
รูปที่ 4.3ข กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาณสารสกัดยีสต์	44
รูปที่ 4.4ก กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาณเปปโตน	45
รูปที่ 4.4ข กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาณเปปโตน	46
รูปที่ 4.5ก กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต	47
รูปที่ 4.5ข กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต	48
รูปที่ 4.6ก กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อความเร็วรอบในการเขย่า	49
รูปที่ 4.6ข กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อความเร็วรอบในการเขย่า	50
รูปที่ 4.7 กราฟแสดงชีวมวล กลูโคส ไซลิทอล พีเอช (ก) ที่ปริมาณไซโลส 100 กรัมต่อลิตร (ข) ที่ปริมาณไซโลส 200 กรัมต่อลิตร (ค) ที่ปริมาณไซโลส 300 กรัมต่อลิตร	51
รูปที่ ก1 อาหารเลี้ยงเชื้อ	57
รูปที่ ข1 สูตรโครงสร้างของ Polyol ชนิดต่างๆ	59
รูปที่ ข2 แผนผังการผลิตสารให้ความหวานพวกคาร์โบไฮเดรต	60
รูปที่ ค1 กราฟมาตรฐานกลูโคส	64
รูปที่ ค2 กราฟมาตรฐานของไซลิทอล	66

บทที่ 1

บทนำ

ไซลิทอลเป็นสารให้ความหวานที่สามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ จัดเป็นน้ำตาล แอลกอฮอล์ (sugar alcohol) ตัวหนึ่งที่พบตามธรรมชาติในผักและผลไม้ อาทิ กระหล่ำปลี มะเขือยาว สตอเบอร์รี่ เป็นต้น น้ำตาลชนิดนี้ไม่มีกลิ่น ให้ความหวานใกล้เคียงกับน้ำตาลทราย และให้ความรู้สึกเย็นลิ้นนิดๆ เวลารับประทาน

ในอุตสาหกรรมอาหาร พบว่ามีแนวโน้มในการใช้ไซลิทอลได้อย่างกว้างขวางในผลิตภัณฑ์ขนมอบ แยมและมาร์มาเลด และผลิตภัณฑ์ขนมหวาน เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในหมากฝรั่ง เนื่องจากข้อดีของไซลิทอลคือเป็นน้ำตาลที่จุลินทรีย์น้อยชนิดที่สามารถใช้เป็นแหล่งอาหารได้ และเป็นน้ำตาลที่จุลินทรีย์ในช่องปากใช้ไม่ได้ จึงไม่มีปัญหาเรื่องฟันผุเหมือนการรับประทานน้ำตาลทั่วไป และไม่เสื่อมเสียง่าย สามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน ไซลิทอลมีคุณสมบัติที่เฉพาะหลายประการที่เหมาะสมสามารถใช้ทดแทนน้ำตาลได้ แต่การใช้ไซลิทอลมีข้อจำกัดอยู่บ้าง โดยเฉพาะในเครื่องดื่มประเภทน้ำอัดลม ซึ่งผู้บริโภคมีโอกาสได้รับไซลิทอลมากเกินไปจะทำให้ท้องเสียได้ นอกจากนี้ ไซลิทอลไม่เกิดปฏิกิริยา Maillard Browning อาจไม่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการคุณสมบัติคาราเมล ส่วนในทางการแพทย์มีการใช้ไซลิทอลเป็นอาหารทางสายของผู้ป่วยและเป็นอาหารของผู้ป่วยโรคเบาหวาน

สำหรับไซลิทอลที่นำมาใช้ในปัจจุบันโดยมากจะผลิตโดยกระบวนการทางเคมี ที่เรียกว่า Hydrogenation จากน้ำตาลไซโลส ซึ่งวิธีนี้มีข้อเสียในเรื่องของต้นทุนและกระบวนการผลิตที่อาจทำให้มีสารปนเปื้อนออกมาด้วย จึงมีผู้คิดค้นหาวิธีอื่นๆ ในการผลิตไซลิทอล ซึ่งค้นพบว่าวิธีการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์จากน้ำตาลไซโลส หรือจากวัสดุเหลือทิ้งที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นส่วนประกอบ เช่น ฟางข้าว ชังข้าวโพด เป็นต้น เป็นวิธีหนึ่งที่น่าสนใจ

จากเหตุผลดังกล่าวจึงได้มีการทดลองผลิตไซลิทอลโดยการหมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Candida guilliermondii* จากน้ำตาล D-glucose และ D-xylose เพื่อหาสภาวะและปริมาณสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตไซลิทอล

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ไซลิทอล

ไซลิทอลเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่เป็นอนุพันธ์ของไซโลส ปกติไซลิทอลจะเป็นสารมัธยันตร์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Hollmann และ Touster, 1957) และพบได้ตามธรรมชาติในผักและผลไม้หลายชนิด (Washuttl และคณะ, 1973) ส่วนการผลิตไซลิทอลเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารนั้น สามารถผลิตได้จากไซโลส โดยกระบวนการเติมไฮโดรเจน หรือผลิตโดยกระบวนการหมักจากวัสดุเหลือทิ้งที่มีไซโลสเป็นองค์ประกอบ (สาโรจน์, 2537)



รูปที่ 2.1 ผลึกของน้ำตาลไซลิทอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งที่พบไซลิทอลตามธรรมชาติ

ตามปกติไซลิทอลเป็นสารตัวกลาง (intermediate) ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของสตีร์เลียงลูกด้วยนม (Hollmann และ Touster 1957) รวมถึงการพบได้ในผักและผลไม้หลายชนิด ดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบไซลิทอลในผักและผลไม้

ผักและผลไม้	ปริมาณไซลิทอล (มิลลิกรัมต่อ กรัมน้ำหนักแห้ง)
Raspberries	268
Stawberries	362
Yellow plums	935
Endivis	258
Lettuce	131
Cauliflower	300
Spinach	107
Onion	89
Eggplant	180
Yellow boletus mushroom	128
Bananas	21
Carrot	87

ที่มา : Emodi (1978) และ Washuttl (1973)

คุณสมบัติของไซลิทอล (สาโรจน์, 2537; Emodi, 1978)

1. การละลายน้ำและความคงตัว

ไซลิทอลละลายน้ำได้ง่าย ได้สารละลายที่มีความคงตัวสูง ไม่ว่าจะถูกความร้อนหรือเก็บไว้เป็นเวลานาน ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา maillard browning และ Caramelization เหมือนฟรุคโตสและเดกซ์โทส เนื่องจากไซลิทอลไม่มีหมู่คีโตน หรือหมู่อัลโดส จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้ไซลิทอลได้ ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่มีไซลิทอลเป็นส่วนประกอบ จะเก็บไว้ได้นานโดยไม่ถูกทำลายจากจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. รสชาติและความเย็น

ไซลิทอลมีรสชาติที่ดี และให้ความรู้สึกเย็นเหมือนเมนทอล เนื่องจากมีค่าความร้อนจำเพาะในการละลายเท่ากับ -34.8 แคลอรีต่อกรัม แต่ในสภาพที่เป็นสารละลายหรือรูปอสัณฐาน (amorphous form) จะไม่มีคุณสมบัติเย็น (cooling effect) ดังนั้นถ้าต้องการให้มีคุณสมบัติเย็นจะต้องใช้ในรูปของผลึก

3. ความหวาน

ไซลิทอลมีความหวานประมาณเท่ากับน้ำตาลซูโครส โดยจะมีความหวานตั้งแต่ 0.85-1.25 เท่า ขึ้นอยู่กับ พีเอช ความเข้มข้น อุณหภูมิ ความเข้มข้นของเกลือ และปัจจัยอื่น แต่มีความหวานมากกว่าแมนนิทอล 2.5 เท่า และซอร์บิทอลเท่ากับ 2 เท่า ไซลิทอลความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ จะมีความหวานเท่ากับน้ำตาลซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ ถ้าความเข้มข้นมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ สารละลายไซลิทอลจะหวานมากกว่า ถ้าความเข้มข้นน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ สารละลายซูโครสจะหวานมากกว่า หรือความหวานสัมพัทธ์ (Relative sweetness) ของไซลิทอลเมื่อเทียบกับซูโครสจะลดลงจาก 103 เป็น 78 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิของสารละลายไซลิทอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ จาก 5 องศาเซลเซียส เป็น 50 องศาเซลเซียส เป็นต้น

4. พลังงาน

พลังงาน (Caloric value) ที่ได้จากไซลิทอล 1 กรัมเท่ากับ 4.06 กิโลแคลอรี เหมือนกับพลังงานที่ได้จากอาหารคาร์โบไฮเดรตทั่วไป แต่การใช้ไซลิทอลร่วมกับสารให้ความหวานอื่น ความหวานและรสชาติจะคงเดิม ในขณะที่สามารถลดแคลอรีได้ 50-70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีการใช้ในเครื่องดื่มหลายชนิด ทำให้เหมาะสมสำหรับผู้บริโภคที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก (dietary purpose) เป็นอย่างดี

5. การป้องกันฟันผุ

เนื่องจากจุลินทรีย์ในช่องปากเช่น *Streptococci* ไม่สามารถใช้ไซลิทอลเป็นแหล่งอาหารได้ จึงไม่มีการผลิตกรด (Makinen, 1979) ดังนั้นการบริโภคอาหารที่มีไซลิทอลเป็นสารให้ความหวาน เช่น หมากฝรั่ง จะช่วยป้องกันการเกิดฟันผุได้ (Pepper และ Olinger, 1988)

6. ทางการแพทย์

เนื่องจากการใช้ไซลิทอลในร่างกายไม่ต้องใช้อินซูลิน (insulin) และเป็นสารให้ความหวานที่ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณน้ำตาลในเลือด เป็นผลดีต่อผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน

7. ในผลิตภัณฑ์อาหาร

ในอุตสาหกรรมอาหารปัจจุบัน ไซลิทอลถูกใช้เป็นส่วนประกอบอย่างกว้างขวางในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เนื่องจากมีคุณสมบัติหลายประการที่นำมาใช้ทดแทนน้ำตาลกลูโคส ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหาร อาทิเช่น แยม ขนมอบ เครื่องดื่ม มาร์มาเลด และหมากฝรั่ง เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบความหวานของสารให้ความหวานต่างๆ

สารให้ความหวาน	ความหวานสัมพัทธ์
ฟรุกโตส	1.2
ไซลิทอล	1.0
ซูโครส	1.0
เด็กซ์โทรส	0.7
ซอร์บิทอล	0.5
แมนนิทอล	0.5
มอลโตส	0.4
แลกโตส	0.3

ที่มา : สาขาวิชา (2541)

ตารางที่ 2.3 แสดงค่าความสดชื่นของน้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ

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

ที่มา : Arron(1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพที่สำคัญของไซลิทอล

คุณสมบัติ	รายละเอียด
สูตรโมเลกุล	$C_5H_{12}O_5$
	$ \begin{array}{ccccccc} & & H & & OH & & H \\ & & & & & & \\ HOCH_2 & - & C & - & C & - & C & - & CH_2OH \\ & & & & & & \\ & & OH & & H & & OH \end{array} $
น้ำหนักโมเลกุล	152.1
รูปร่าง	ผงผลึก
สี	ขาว
รสชาติ	หวาน
กลิ่น	ไม่มีกลิ่น
ความหวานสัมพัทธ์	มีความหวานเท่ากับซูโครส แต่หวานมากกว่าซอร์บิทอล และแมนนิทอล
จุดหลอมเหลว	93.4-94.7 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	216 องศาเซลเซียส
การละลายในน้ำ(20° C)	64.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
การละลายในเอทานอล	1.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
การละลายในเมทานอล	6.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
การดูดความชื้น	ในที่มีความชื้นสูงจะดูดความชื้นได้มากกว่าซูโครส แต่น้อยกว่าซอร์บิทอล
ค่าเบี่ยงเบนแสงจำเพาะ	ไม่มีคุณสมบัติการเบี่ยงเบนแสง
สารปนเปื้อน	แมนนิทอล ซอร์บิทอล กาแลกทิทอล อะราบิทอล

ที่มา : Emodi (1978)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 เปรียบเทียบคุณสมบัติทางกายภาพของไซลิทอลและซูโครส

คุณสมบัติ	น้ำตาลไซลิทอล	น้ำตาลซูโครส
จุดหลอมเหลว(°C)	93.5-94.5	179.186
จุดเดือด(°C/760 มม.ปรอท)	216	สลายตัว
ความหนาแน่น (15°C)	1.5	1.59
พลังงาน (แคลอรีต่อกรัม)	4.06	4.06
การเกิดคาราเมล	ไม่เกิด	เกิด
การดูดความชื้น (%)		
ความชื้น 60%	0.05	0.02
ความชื้น 92%	90	4
ความหนืด (cP)(20° C)		
ความเข้มข้น 10%	1.23	1.31
ความเข้มข้น 60%	20.63	58.50

ที่มา : สารโจน (2541)

การใช้ประโยชน์จากไซลิทอล

อุตสาหกรรมอาหาร

ในอุตสาหกรรมอาหารพบว่ามีความนิยมการใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหารได้อย่างกว้างขวาง เนื่องจากไซลิทอลมีคุณสมบัติเฉพาะหลายประการที่เหมาะสมต่อการใช้ทดแทนน้ำตาล นอกจากนี้ยังมีข้อดีในการช่วยลดปัญหาฟันผุอันเกิดจากการบริโภคผลิตภัณฑ์ที่ติดเทียมกัน หรือดีกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส อาทิเช่น คุณสมบัติที่เย็นสดชื่น การเพิ่มคุณค่าทางรสชาติจำพวก รสเปเปอร์มินต์ รสมะนาว และรสผลไม้ทั้งหลาย

ตัวอย่างการใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหาร ดังนี้

- หมากฝรั่ง (chewing gum)
- ช็อคโกแลต(chocolate)
- ท็อฟฟี่และคาราเมล (toffees and caramels)
- เจลาติน (Gelatin desserts)
- พุดดิ้ง (pudding)
- แยม เยลลี่ และมาร์มาเลด (jams , jellies and marmalades)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องดื่ม

การใช้ไซลิทอลในเครื่องดื่มจะใช้ร่วมกับการให้ความหวานชนิดอื่น ตัวอย่างการใช้ไซลิทอล 3.9 เปอร์เซ็นต์ และ ไซคลาเมท (cyclamate) 0.133 เปอร์เซ็นต์ แทนน้ำตาลในน้ำอัดลมจะสามารถลดพลังงานในน้ำอัดลมได้ถึง 60 เปอร์เซ็นต์ จึงนับเป็นเครื่องดื่มที่เหมาะสมสำหรับคนที่เป็นโรคเบาหวาน และคนที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก ส่วนนมสเตอริไรส์ยูเอชทีรสช็อคโกแลตเหมาะที่จะใช้ไซลิทอล 4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่ทำให้ลักษณะทางกายภาพ เช่น ความหนืดและสีเปลี่ยนแปลง และยังเป็นที่ยอมรับของ

ผู้บริโภค สำหรับการเก็บรักษานานกว่าหนึ่งเดือนที่อุณหภูมิห้อง พบว่าไม่ทำให้ผลิตภัณฑ์เสื่อมคุณภาพ.

ผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรม

เนื่องจากไซลิทอลมีข้อได้เปรียบ คือ ไม่ทำให้เกิดฟันผุ (non-cariogenicity) และไม่เสื่อมด้วยจุลินทรีย์ (non-fermentability) จึงได้ใช้ให้เป็นสารให้ความหวานในการเตรียมผลิตภัณฑ์ชนิดเหลวทางเภสัชกรรม ฉะนั้นการใช้ยาดังกล่าวในคนที่ไม่ได้ทำความสะอาดช่องปากเป็นเวลานานจึงไม่มีผลต่อการเกิดฟันผุ นอกจากนี้การใช้ไซลิทอลซึ่งไม่มีโครงสร้างของกลุ่มคาร์บอนิล เช่น น้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหลาย จึงไม่มีผลต่อปฏิกิริยาทางเคมี ทำให้สารละลายที่เตรียมมีความคงตัว

การใช้ทางการแพทย์

การใช้ไซลิทอลในทางการแพทย์สามารถจำแนกได้สองลักษณะ คือ เป็นอาหารทางสายของผู้ป่วย (parenteral nutrition) และเป็นอาหารของผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน (diet of diabetics) เนื่องจากไซลิทอลไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยากับกรดอะมิโน ทำให้การเตรียมอาหารเหลว (infusion solution) สำหรับใช้ทางสายอย่างง่ายกว่าการเตรียมโดยใช้น้ำตาลกลูโคส และการใช้ไซลิทอลในร่างกายไม่ขึ้นกับระบบที่เกี่ยวข้องกับสารอินซูลิน ทำให้ไม่มีปัญหาในการใช้น้ำตาลของผู้ป่วย อีกทั้งไซลิทอลยังเป็นสารให้ความหวานที่ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณในเลือด ซึ่งเป็นผลดีต่อผู้ป่วยโรคเบาหวาน และยังลดปัญหาการเกิดฟันผุได้อีกด้วย

นอกจากนี้ผลการทดลองในห้องปฏิบัติการ พบว่าไซลิทอลไม่มีคุณสมบัติที่ก่อให้เกิดการผ่าเหล่า (mutagenicity) ซึ่งเป็นข้อยืนยันได้ในขั้นต้นว่าไม่ก่อให้เกิดมะเร็งโดยตรง (Batzinger และคณะ, 1997)

ข้อจำกัดของการใช้ไซลิทอล

การบริโภคไซลิทอลปริมาณมากๆ ในเวลาเดียวกันจะทำให้เกิดอาการท้องเสีย (Osmotic diarrhea) ได้ เพราะไซลิทอลมีคุณสมบัติเป็นยาระบาย (Laxative properties) จากการศึกษาของ Cclbert และคณะ (1986) ในคนอเมริกันพบว่าปริมาณไซลิทอลปริมาณมากที่สุดที่ไม่ทำให้เกิดอาการข้างเคียงของระบบทางเดินอาหาร คือ 20-30 ในอาหารต่อครั้ง หรือ 60 กรัมต่อวัน

การผลิตไซลิทอลในระดับอุตสาหกรรม

ไซลิทอลมีประวัติการผลิตในระดับอุตสาหกรรมเริ่มเป็นครั้งแรกที่ประเทศฟินด์แลนด์ เมื่อปี พ.ศ. 2519 ดำเนินการโดยบริษัท ฟินนิชซูการ์ ซึ่งมีกำลังการผลิตมากกว่า 3,000 ตันต่อปี ต่อมาในปี พ.ศ. 2520 ได้มีการร่วมมือกันระหว่างบริษัทฟินนิชซูการ์ และบริษัทเฟอพออฟมันนิลาโรซ แห่งประเทศสวีตเซอร์แลนด์ ก่อตั้งบริษัท ไชโรฟิน (Xylofin Co,Ltd) ขึ้นมา ในปี พ.ศ. กำลังการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ทั่วโลกเท่ากับ 345,000 ตัน ซึ่งเป็นส่วนของไซลิทอลและแมนนิทอลถึง 6,000 ตัน

เนื่องจากการสกัดไซลิทอลจากแหล่งธรรมชาติที่มีปริมาณต่ำ ไม่คุ้มค่าในเชิงพาณิชย์ การผลิตในอุตสาหกรรมได้ใช้กระบวนการหมักจากวัสดุเหลือทิ้งที่มีไซโลสเป็นองค์ประกอบ โดยมีขั้นตอนดังนี้ (สาโรจน์,2537)

1.การไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) เป็นขั้นตอนการสกัดน้ำตาลไซโลสจากส่วนของเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) โดยการใช้กรดซัลฟูริกเจือจาง หรือโดยการใช้ด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าด่างแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่พีเอช 10 มีความเหมาะสมในการไฮโดรไลซิสขานอ้อย นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงการใช้กรดไตรฟลูออโรอะซิติกในการไฮโดรไลซิสฟางข้าวสาลี

2.การทำน้ำตาลซูโลสให้บริสุทธิ์ (Xylose purification) หลังจากขั้นตอนการไฮโดรไลซิส จะต้องทำการกำจัดไอออนและสีในไฮโดรไลเสท (Hydrolysate) ซึ่งจะมีการแยกไซโลสให้บริสุทธิ์ในขั้นนี้ หรืออาจจะใช้ไซโลสที่ไม่บริสุทธิ์แล้วไปทำผลิตภัณฑ์ที่ได้ในขั้นสุดท้ายให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนเดียว

3.การไฮโดรจีเนชัน (Hydrogenation) ในขั้นนี้จะทำการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสให้เป็นไซลิทอลภายใต้สภาวะความดัน 50 บรรยากาศ อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง โดยมีโลหะนิกเกิล เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา น้ำตาลทุกตัวจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน เป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ (sugar alcohol) โดยจะมีไซลิทอลเป็นองค์ประกอบประมาณ 64.5เปอร์เซ็นต์

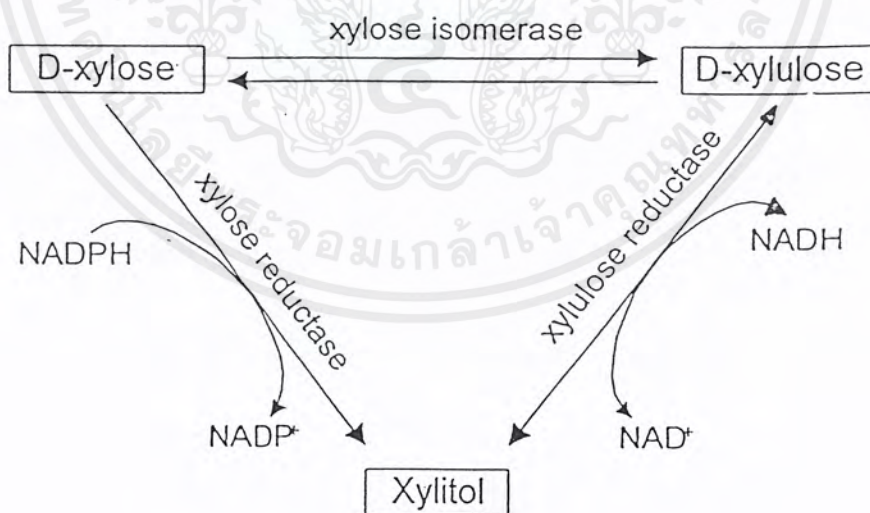
4.การทำไซลิทอลให้บริสุทธิ์ (Xylitol purification) สารละลายน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ได้จากกระบวนการไฮโดรจีเนชันจะต้องนำมากรอง เพื่อแยกโลหะนิกเกิลออก จากนั้นนำไปทำให้สาร

ละลายไซลิทอลมีความบริสุทธิ์สูงขึ้นโดยวิธีทางโครมาโทกราฟีและทำการตกผลึก(Crystallization) เพื่อให้ได้ไซลิทอลที่มีความบริสุทธิ์ 99 เปอร์เซ็นต์ ผลได้ของไซลิทอลเทียบกับไซโลสเริ่มต้นเท่ากับ 68 เปอร์เซ็นต์ การผลิตไซลิทอลโดยกระบวนการทางเคมีจะใช้ค่าใช้จ่ายสูง เนื่องจากขั้นตอนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ทำได้ยาก ดังนั้นการนำจุลินทรีย์มาใช้ในการผลิต จึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจ

กระบวนการเมทาบอลิซึมในการผลิตไซลิทอลโดยจุลินทรีย์

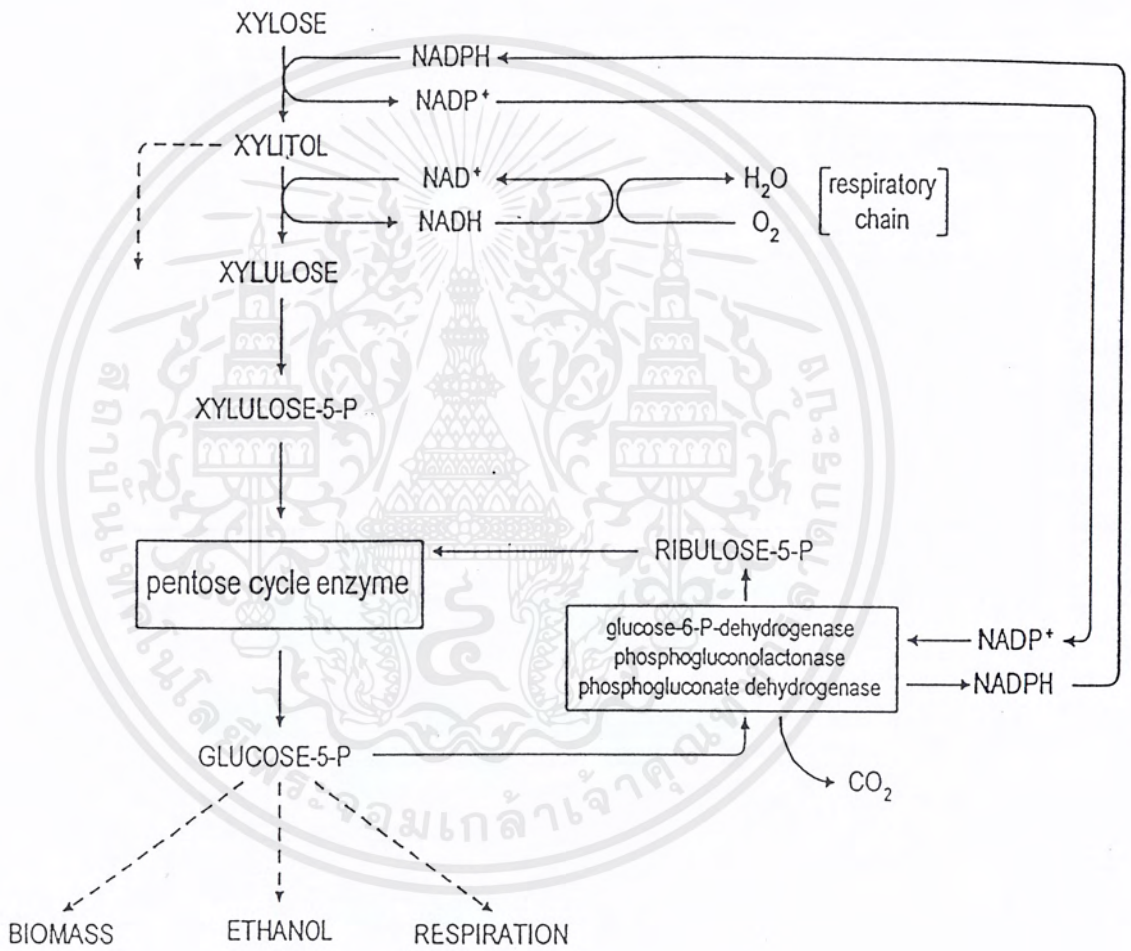
ไซโลสสามารถเปลี่ยนไอโซเมอร์เป็นไซลูลูสโดยเอนไซม์ ไซโลสไอโซเมอร์เลส (Xylose isomerase) หรือถูกรีดิวซ์ไปเป็นไซลิทอลโดยเอนไซม์ ไซโลสรีดักเทส (Xylose reductase) ในขณะที่มี NADPH หรือ NADH ซึ่งไซลิทอลที่ผลิตขึ้นมาสามารถเปลี่ยนรูปไปเป็นไซลูลูสโดยเอนไซม์ ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส (Xylitol dehydrogenase) ในขณะที่มี NADP^+ หรือ NAD^+ ที่ได้จากปฏิกิริยาในตอนต้น(Horitsu และคณะ,1992 ; Nigam และ Singh,1995)

Ofer และคณะ(1971) รายงานในลักษณะใกล้เคียงกันว่า ในจุลินทรีย์ไซลิทอลจะถูกสร้างขึ้นเป็นสารตัวกลางในกระบวนการเมทาบอลิซึมจากไซโลสใน 2 ทาง คือ ทางแรกเป็นการเปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลิทอลโดยตรง อาศัยเอนไซม์ ไซโลสรีดักเทส และ โคเอนไซม์ NADPH ทางที่สองไซโลสจะถูกเปลี่ยนไอโซเมอร์ไปเป็นไซลูลูสในขั้นแรกโดยเอนไซม์ดีไซโลสไอโซเมอร์เลส (D-Xylose isomerase) จากนั้นไซลูลูสจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นไซลิทอลโดยเอนไซม์ ไซลูลูสรีดักเทส และ โคเอนไซม์ NADH แสดงดังภาพที่ 2.2



รูปที่ 2.2 : วิธีการเกิดไซลิทอลจากเมทาบอลิซึมของไซโลส

วิถี Oxido-reduction ของไซลิทอล ซึ่งเป็นสารตัวกลางในกระบวนการเมทาบอลิซึม มีรายงานว่าเป็นวิถีที่ทั่วไปสำหรับการเปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลิทอล ซึ่งมีการศึกษาวิถีนี้ในยีสต์หลายชนิด ในปี 1994 Furlan และคณะ รายงานว่ากระบวนการดังกล่าวจะเกิดขึ้นต้องอาศัยโคเอนไซม์จากการหายใจแบบใช้ออกซิเจน



รูปที่ 2.3 การผลิตโคเอนไซม์ในยีสต์ที่ผลิตไซโลสได้

ที่มา : Barbosa และคณะ (1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในกระบวนการเมทาบอลิซึมของยีสต์ ไชโลสจะถูกรีดิวซ์โดยตรงไปเป็นไซลิทอลโดยอาศัยโคเอนไซม์ NADH สำหรับ *Rhodotorula gracilis* จะใช้ NADPH เป็นตัว Reductant ในปฏิกิริยารีดักชันไชโลสไปเป็นไซลิทอลโดยเอนไซม์ Akloreductase ในกรณีอื่นที่เป็นไปได้ คือ ไชโลสจะถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลสก่อน แล้วถูกรีดิวซ์ต่อไปเป็นไซลิทอลโดยใช้ NADH เป็นโคเอนไซม์ ซึ่งทำการศึกษาในเชื้อ *Pichia stipitis* ในปฏิกิริยารีดักชัน NADPH จะมีความตื่นตัว ทำหน้าที่เป็น Reductant แต่จะพบน้อยกว่า NADH ในยีสต์เช่น *Pachysolen tannophilus* เอนไซม์ไชโลสรีดักเทสจะมีความตื่นตัวโดยทำงานร่วมกับโคเอนไซม์ NADPH หรือ NADH สำหรับปริมาณไซลูโลสที่มีการสะสมในถังหมัก จะเกิดปฏิกิริยาฟอสฟอริเลชัน โดยเอนไซม์ ไชลูโลสโคเนส และสิ้นสุดด้วยวิถีเพนโตสฟอสเฟต ได้เอทานอลเป็นผลพลอยได้ โดยใช้ยีสต์ในการหมัก (Nigam และ Singh, 1995)

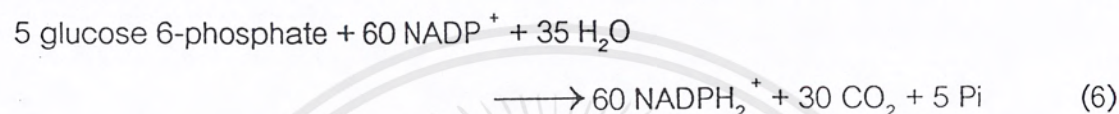
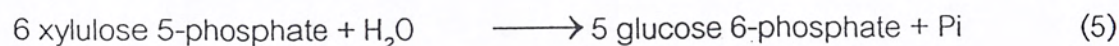
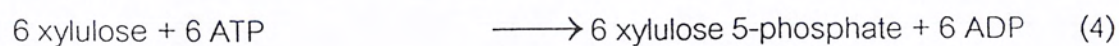
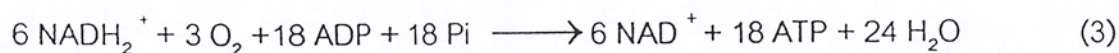
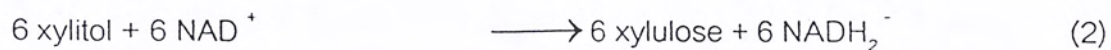
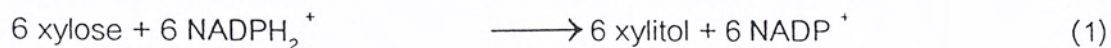
จากภาพที่ 2 เป็นการศึกษามетаบอลิซึมของไชโลสในยีสต์ เพื่อหาผลได้ทางทฤษฎีของการเปลี่ยนไชโลสเป็นไซลิทอล โดยพิจารณา 4 สภาวะ คือ (Barbosa และคณะ, 1988)

1. ในกระบวนการเมทาบอลิซึมมีโคเอนไซม์ 2 ชนิดเข้าไปเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนไชโลสไปเป็นไซลิทอล โดยเอนไซม์ไชโลสรีดักเทส มี NADPH เป็นโคเอนไซม์ และการออกซิไดส์ไซลิทอลไปเป็นไซลูโลส โดยเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส มี NAD^+ เป็นโคเอนไซม์

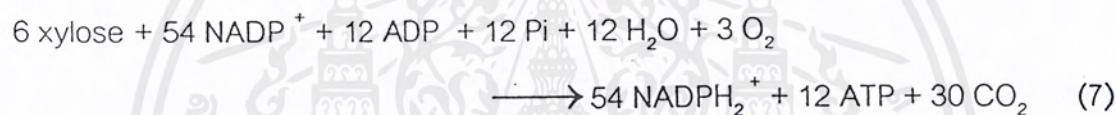
2. โคเอนไซม์ NADPH ที่ใช้ในการรีดิวซ์ไชโลสทั้งหมดไปเป็นไซลิทอล ถูกสังเคราะห์ขึ้นในวัฏจักรเพนโตสและโคเอนไซม์ NAD^+ ที่ใช้ในการออกซิไดส์ไซลิทอลไปเป็นไซลูโลสถูกสังเคราะห์ขึ้นมาจากกระบวนการหายใจ

3. ในกระบวนการเมทาบอลิซึมของยีสต์ไม่สามารถเปลี่ยน NADH ไปเป็น NADPH ได้ ภายใต้สภาวะที่มีการกำจัดออกซิเจนหรือมีการเจริญเติบโตน้อย ไซลิทอลจะถูกออกซิไดส์เพื่อสังเคราะห์ NADPH เท่านั้น ส่วนไซลิทอลที่เหลือจะสะสมมากขึ้นแล้วปล่อยออกมานอกเซลล์

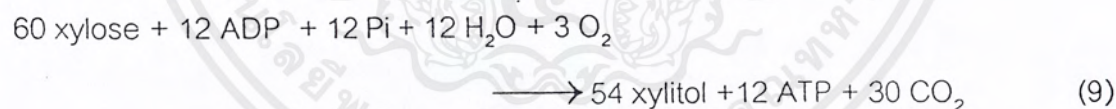
การผลิตไซลิทอลในยีสต์โดยใช้ไชโลสเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ในสภาวะที่เซลล์ไม่มีการเจริญเติบโตนั้น (จำกัดอากาศ) ไซลิทอลส่วนใหญ่จะถูกปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ โดยมีบางส่วนที่ถูกออกซิไดส์ไป เพื่อสังเคราะห์ NADPH เมื่อทำสมดุลคาร์บอนและโคเอนไซม์ดังสมการที่ 1-9 แล้ว จะได้ผลทางทฤษฎีของไซลิทอลต่อโมลของไชโลสที่ถูกใช้ (Barbosa และคณะ, 1988)



จากสมการ 1-6



จากสมการ 7 และ 8

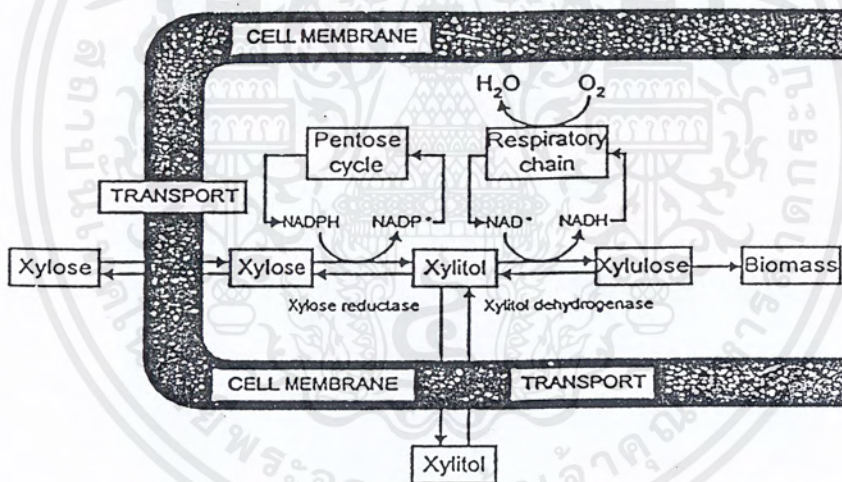


ผลได้ของไซลิทอล = $54/60 = 0.905$ โมลของไซลิทอลต่อโมลของไซโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sirisansaneeyakul และคณะ (1992) อธิบายถึงการใช้น้ำตาลไซโลสของยีสต์ผ่านวิถีเพนโตส ซึ่งน้ำตาลไซโลสถูกนำเข้าสู่เซลล์ และถูกเปลี่ยนเป็นไซลิทอลได้โดยการทำงานของเอนไซม์ไซลิทอลรีดักเทสที่ใช้ โคเอนไซม์ NADPH ต่อจากนั้นไซลิทอลจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นน้ำตาลไซลูโลสด้วยการทำงานของเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสที่ใช้โคเอนไซม์ NAD⁺ ซึ่งจะถูกฟอสโฟรีเลตก่อนที่จะเข้าวัฏจักรเพนโตส เพื่อที่จะสังเคราะห์เป็นสารชีวมวลของเซลล์และพลังงานต่อไป รูปที่ 2.1

นอกจากนี้ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสที่เพิ่มขึ้นยังมีผลต่ออัตราการส่งผ่านน้ำตาลไซโลสเข้าสู่เซลล์ได้สูงขึ้นมีผลทำให้อัตราการผลิตไซลิทอลสูงขึ้น รวมถึงผลได้ของไซลิทอลด้วย



รูปที่ 2.4 เมทาบอลิซึมของไซโลสในยีสต์

ที่มา : Sirisansaneeyakul และคณะ(1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตไซลิทอลโดยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพ

กระบวนการผลิตโดยใช้เอนไซม์

Kitpreechvaich และคณะ (1984) รายงานการผลิตไซลิทอลจากไซโลสโดยใช้เอนไซม์ที่ได้จากปฏิกิริยา D-xylulose reductase ของ *Candida pelliculosa* ควบคู่กับเอนไซม์ในระบบ oxido-reductase ของจุลินทรีย์พวก methanogen ที่สามารถทำให้เกิดการหมุนเวียน NADP(H) ได้ ไซโลสจะถูกเปลี่ยนเป็นไซลิทอลได้ 90เปอร์เซ็นต์ โดยใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และพีเอช 7.5 หลังจากการบ่ม 24 ชั่วโมง และจากการคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ ซึ่งประกอบด้วย *Candida pelliculosa* , *Candida pelliculosa var acetaetherius* , *Candida utilis* , *Debaryomyces platypodus* AM 93 และ *Pichia nakazawae* เพื่อใช้ศึกษาความสามารถของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส และพบว่า *Candida pelliculosa* มีความสามารถของเอนไซม์สูงสุด 1.73 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน

กระบวนการผลิตโดยเชื้อจุลินทรีย์

1. กระบวนการผลิตโดยการหมักโดยเชื้อยีสต์

เป็นครั้งแรกโดยกลุ่มนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นเมื่อราวสามทศวรรษที่ผ่านมา (Orishi และ Suzuki, 1996) โดยค้นพบว่าเชื้อยีสต์ *Candida pollymorpha* ภายใต้สภาวะที่มีอากาศสามารถเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสไปเป็นไซลิทอล โดยมีผลได้ของไซลิทอลประมาณ 30-40 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำตาลที่ถูกใช้ไป

Gong และคณะ (1981) ได้รายงานว่าเชื้อผ้าเหล่า *Candida tropicalis* HPX2 มีความสามารถสูงในการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสไปเป็นไซลิทอลได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และพบว่ายีสต์บางสายพันธุ์ เช่น *Candida* spp. และ *Pachsolon tannophilus* สามารถผลิตไซลิทอลจากไซโลสได้มากกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำตาลเริ่มต้นของการหมัก

Gong และคณะ(1983) ได้ทดสอบความสามารถในการผลิตไซลิทอลจากไซโลสของเชื้อ *Candida* 20 สายพันธุ์จาก 11 สปีชีส์ *Saccharomyces* 21 สายพันธุ์จาก 8 สปีชีส์ และ *Shizosaccharomyces pombe* อีก 8 สายพันธุ์ สามารถผลิตไซลิทอลได้ปานกลาง คือ 10-15 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาณ *Saccharomyces* spp. ใช้ผลิตไซลิทอลได้ไม่ดี แต่สามารถให้ผลผลิตในปริมาณใกล้เคียงกัน

Barbosa และคณะ (1988) ได้ทำการคัดเลือกยีสต์ 44 สายพันธุ์ ที่สามารถเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอลได้ พบว่า *Candida guilliermondii* และ *Candida tropicalis* เป็นสายพันธุ์ที่ผลิต

ไซลิทอลได้ดีที่สุด โดยใช้ความเข้มข้นของเซลล์ในปริมาณที่สูง และทำการเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ภายใต้สภาวะที่ให้อากาศ จะสามารถผลิตไซลิทอลได้ 77.0 กรัมต่อลิตร จากไซโลส 104 กรัมต่อลิตร สำหรับกลไกการผลิตไซลิทอลนั้น Piror และคณะ(1989) พบว่าไซลิทอลจะถูกขับออกนอกเซลล์เหมือนเป็นผลผลิตพลอยได้ ที่ได้จากกระบวนการเมทาบอลิซึมระหว่างการหมักแอลกอฮอล์ ส่วน Barbosa และคณะ (1988) พบว่าไซลิทอลเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการหมักไซโลสโดยตรง

Roseiro และคณะ (1991) ได้รายงานว่ายีสต์ *Candida guilliermondii* สามารถผลิตไซลิทอลได้สูงสุด 0.74 กรัมต่อกรัมน้ำตาลไซโลส และได้มีรายงานว่า *Candida parasitosis* สามารถผลิตได้สูงถึง 0.74 กรัมต่อกรัมน้ำตาลไซโลส โดยผลิตในอัตราเร็ว 0.14 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลิตได้สูงสุด 1.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลิตได้ 0.5 กรัมต่อน้ำตาลไซโลส (Nollean และคณะ, 1993)

Vongsuvanlert และคณะ(1989) ได้รายงานว่ายีสต์ *Candida boidinii* สามารถผลิตไซลิทอลได้ 0.44 ไซลิทอลต่อกรัมไซโลส หรือความสามารถในการผลิตเป็น 0.25 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้ไซโลส 100 กรัมเป็นอาหารเริ่มต้น

Elenora และคณะ (1996) ได้รายงานว่ายีสต์ *Candida boidinii* NRRL Y-17213 ในการผลิตไซลิทอลแบบการหมักแบบครั้งคราว (Fed-batch fermentation) โดยใช้ไซโลสเป็นอาหารเริ่มต้น (50,100 กรัมต่อลิตร) เมื่อมีการให้อากาศอย่างเพียงพอ จะผลิตไซลิทอลได้ 0.57-0.68 กรัมต่อกรัม ในอัตราเร็ว 0.32-0.46 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงเมื่อเทียบกับการหมักแบบชั่วคราว

มีการค้นพบว่า *Candida parasitosis* (Furlan และคณะ,1991) และ *Candida guilliermondii* (Meyrial และคณะ,1991) สามารถผลิตไซลิทอลได้จากน้ำตาลไซโลส โดยมีความเข้มข้นของออกซิเจนเป็นปัจจัยสำคัญต่อการหมัก โดยเชื้อยีสต์ *Candida guilliermondii* สามารถให้ผลได้ของไซลิทอลเท่ากับ 63เปอร์เซ็นต์ และมีผลผลิต 0.19 กรัมไซลิทอลต่อกรัมต่อเซลล์ต่อชั่วโมง

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Sirisaneeyakul และคณะ (1992) ซึ่งให้เห็นว่าเชื้อยีสต์ *Candida mogii* ATCC 18364 สามารถเพิ่มผลได้ของไซลิทอลเมื่อความเข้มข้นของออกซิเจนในน้ำหมักลดลง หรือความเข้มข้นไซโลสเพิ่มขึ้น และสามารถอธิบายปรากฏการณ์ดังกล่าวของการผลิตไซลิทอลโดยอาศัยรูปจำลองของคณิตศาสตร์ได้ ทั้งเทคนิคการหมักแบบชั่วคราว(Batch) แบบครั้งคราว (Fed-batch) สำหรับเหตุผลที่ออกซิเจนเป็นปัจจัยสำคัญ ต่อการผลิตไซลิทอลก็คือในสภาวะที่ขาดแคลนออกซิเจน การสังเคราะห์ (Regeneration) โคเอนไซม์ NADH ด้วยกระบวนการหายใจนั้นไม่เพียงพอ ทำให้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส ที่จะเปลี่ยน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซลิทอลคือน้ำตาลไซลูโลส ในวิถีเพนโตสฟอสเฟต หรือที่เรียกว่า Hexose Monophosphate (HMP) นั่นเอง จึงเกิดการสะสมขึ้นของไซลิทอล และถูกส่งผ่านออกสู่ภายนอกเซลล์เป็นผลทำให้ผลได้ของไซลิทอลเพิ่มขึ้นได้

Sirisaneeyakul และคณะ (1995) ได้รายงานถึงเชื้อยีสต์จาก American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) ที่สามารถผลิตน้ำตาลไซลิทอล และพบว่าจากเชื้อยีสต์ที่ได้ทดสอบ เชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Candida* จะมีความสามารถในการผลิตไซลิทอลจากดีไซโลสได้มากกว่ายีสต์ชนิดอื่น และพบว่าเชื้อ *Candida mogii* ATCC 18364 เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตมากที่สุด ($Y_{p/s}=0.70$)

ตารางที่ 2.6 การคัดเลือกยีสต์สำหรับผลิตไซลิทอล

Microorganism	Biomass yield ($Y_{x/s}$):(g/g)	Xylitol yield ($Y_{p/s}$):(g/g)
<i>Candida mogii</i> ATCC 18364	0.08	0.62
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 7349	0.23	0.40
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 34078	0.10	0.40
<i>Candida kefir</i> Hadmad 21a	0.20	0.29
<i>Kluyveromyces marxianus</i> Hadmad 21b	0.13	0.26
<i>Candida utilis</i> ATCC 22023	0.19	0.18
<i>Hansenula polymorpha</i> Hadmad 35a	0.27	0.15
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 20240	0.47	0.11
<i>Pachsolon stipitis</i> ATCC 7124	0.20	0.0
<i>Saccharomyces diastaticus</i> IFGB 1110	0.19	0.0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 28338	0.07	0.0

ที่มา : Sirisansaneeyakul (1995)

ขั้นตอนการผลิตไซลิทอลจากฟางข้าว สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ช่วง คือ ช่วงการสกัดน้ำตาลไซโลสออกจากฟางข้าว ช่วงการเปลี่ยนไซโลสให้เป็นไซลิทอลโดยใช้เชื้อยีสต์และช่วงการสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการผลิตไซลิทอลจากฟางข้าว สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ช่วง คือ ช่วงการสกัดน้ำตาลไซโลสออกจากฟางข้าว ช่วงการเปลี่ยนไซโลสให้เป็นไซลิทอลโดยใช้เชื้อยีสต์และช่วงการสกัดเอาไซลิทอลออกมา ในช่วงแรกนั้นเริ่มด้วยการนำเอาฟางข้าวมาบดให้ละเอียด แล้วทำการสกัดน้ำตาลไซโลสออกจากฟางข้าวโดยใช้กรดซัลฟิวริกเจือจาง 0.5เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงแยกเอากากหยาบออกโดยใช้โรตารีฟิลเตอร์ (Rotary filter) และแยกกากละเอียดออกโดยใช้ฟิลเตอร์เพลท (Filter plate) อีกครั้ง ต่อมาจะเป็นการกำจัดกรดที่ใช้ในการสกัดไซโลสออกจากฟางข้าว โดยใช้วิธีอิเล็กโตรไดอะไลซิส (Electrodialysis) เมื่อได้น้ำเชื่อมที่เป็นน้ำตาลไซโลสแล้วจึงนำน้ำเชื่อมที่ได้มาทำให้เข้มข้นที่ได้ในช่วงแรกนี้จะนำไปใช้เป็นสารตั้งต้น สำหรับการหมักในช่วงการเปลี่ยนไซโลสให้เป็นไซลิทอลโดยใช้เชื้อยีสต์ต่อไป

ช่วงต่อมาจะเป็นการฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อนมาในน้ำเชื่อม จากนั้นจึงนำน้ำเชื่อมไปเติมในถังหมัก เติมสารอาหารบางอย่างที่จำเป็นสำหรับการหมักลงไป และเติมเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Candida mogii* ATCC 18364 ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลิทอลได้ดี ในสภาวะออกซิเจนถูกจำกัดลงไปเมื่อทำการหมัก หลังจากการหมักโดยใช้เชื้อยีสต์จะให้สารให้ความหวานไซลิทอลเกิดขึ้น เมื่อถึงเวลาที่มีไซลิทอลในปริมาณมากพอแล้วก็จะทำการแยกเอาเชื้อยีสต์ออกจากน้ำหมัก น้ำหมักที่มีไซลิทอลอยู่จะถูกนำไประเหยเอาน้ำออกเพื่อให้น้ำเชื่อมเข้มข้นขึ้น ต่อจากนั้นก็ทำการแยกเอาไซลิทอลออกโดยใช้เรซิน และทำการตกผลึกให้ได้ออกมาเป็นน้ำตาลไซลิทอลในช่วงสุดท้าย

2. กระบวนการหมักโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย

ไซลิทอลสามารถผลิตได้โดยใช้แบคทีเรีย เช่น *Corynebacterium* sp. และ *Mycobacterium smegmatis* พบว่า *Mycobacterium smegmatis* สามารถเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอลในอัตรา 70 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาการผลิตไซลิทอลและไซไซโลสที่ได้มาจากเอนไซม์ไซไซโลสไอโซเมอเรส (D-Xylose isomerase) จากเชื้อ *Bacillus coagulans* และการตรึงเซลล์ *Mycobacterium smegmatis* ได้ไซลิทอล 4 กรัม จากไซโลส 10 กรัม

3. กระบวนการหมักโดยใช้เชื้อรา

การเปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลิทอล ในกระบวนการหมักสามารถทำได้ โดยใช้เชื้อราชนิดต่างๆ เช่น *Petromyces albertensis*

4. กระบวนการหมักโดยใช้เชื้อผสม

Nishio และคณะ (1989) ศึกษาการผลิตไซลิทอลโดยการตรึงเซลล์ของ *Candida pelliculosa* และ *Methanobacterium* spp. ในสภาวะที่เป็น steady-state ใน column reactor ที่บรรจุด้วยเซลล์ที่ถูกตรึง (Co-immobilized cell) สามารถผลิตไซลิทอลได้อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 2 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตไซลิทอลโดยวิธีการหมักนี้ได้มีการศึกษา และวิจัยเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เพื่อให้แข่งขันได้กับการผลิตโดยกระบวนการทางเคมี ซึ่งมีต้นทุนสูงและมีสารปนเปื้อน (Impurities) อยู่มากที่จะต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์หลายขั้นตอน นอกจากนี้ยังเป็นการเน้นการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้ง ทั้งทางภาคเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมที่ไม่มีมูลค่า หรือใช้ประโยชน์ไม่ได้เต็มที่ นำมาผลิตเป็นไซลิทอล และผลิตภัณฑ์อื่นๆ ที่มีมูลค่าสูงซึ่งมีการใช้กันมากในอุตสาหกรรมอาหาร

ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณผลผลิตไซลิทอลโดยกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์

1. อัตราการให้อากาศ

การให้อากาศกระตุ้นการขนส่งน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ในยีสต์บางชนิด รวมถึงเชื้ออีกหลายชนิด เช่น *Candida* , *Hansenula* , *Kluyveromyces* และ *Pichia* ซึ่งต้องการออกซิเจนเพื่อใช้ในการดูดซึมน้ำตาล การให้อากาศกับอาหารเลี้ยงในระหว่างการหมักจะทำให้เพิ่มการเปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลิทอล เพราะการผลิตไซลิทอลเป็นผลผลิตที่เกิดควบคู่กับการเจริญของเซลล์จุลินทรีย์ที่มีความหนาแน่น ซึ่งมีอิทธิพลต่อการเผาผลาญโดยออกซิเจน จุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตไซลิทอลภายใต้สภาวะที่มีอากาศเล็กน้อย (microaerophilic) (Nigam และ Sinsh,1995)

Meyril และคณะ (1991) ทำการศึกษาความสามารถในการผลิตของเชื้อ *Candida guilliermondii* ซึ่งใช้ไซโลส และ Non-hemicellulose ซึ่งทำการย่อยให้ได้น้ำตาลในสภาวะ Microaerophilic ได้ผลผลิตไซลิทอล 0.63 กรัมต่อกรัม และได้เอทานอลประมาณเล็กน้อยจากการใช้ไซโลส ส่วนน้ำตาลที่ไม่ใช่ไซโลสจะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล และเซลล์จุลินทรีย์ การผลิตไซลิทอลโดย *Debaromyces hansenii* ต้องการสภาวะ Semi-aerobic โดยเริ่มจากสภาวะที่มีอากาศ เพื่อเพิ่มการสะสม Reduced-adenine-dinucleotide-coenzyme ให้มีความสมบูรณ์พร้อมที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ไดส์ ซึ่งจะนำไปสู่การเปลี่ยนไซลิทอลเป็นไซลูโลส

Horitsu และคณะ (1992) รายงานถึงผลกระทบที่มีต่อการผลิตไซลิทอลในขั้นตอนแรก ควรพิจารณาถึงความเร็วในการเพิ่มปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ อย่างไรก็ตามไซลิทอลภายใต้สภาวะ Anoxic และการเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในอาหาร ในช่วงระหว่างการหมักจะนำไปสู่การผลิตไซลูโลส โดยการไฮโดรจีเนชันของไซลิทอลที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นการเพิ่มระดับการละลายของออกซิเจนจะมีความต้องการเฉพาะขั้นตอนเริ่มต้นในการหมักเท่านั้น แต่หลังจากนั้นควรลดระดับการให้อากาศกับจุลินทรีย์ *Candida tropicalis* เพิ่มการสะสมไซลิทอลภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนในปริมาณจำกัด

Sirisansaneeyakul และคณะ (1992) ได้รายงานไว้ในสภาวะที่ขาดแคลนออกซิเจน การสังเคราะห์โคเอนไซม์ NADH ด้วยกระบวนการหายใจนั้นไม่เพียงพอทำให้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสที่จะเปลี่ยนไซลิทอลต่อไปเป็นน้ำตาลไซลูโลสในวิถีเพนโตสฟอสเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือที่เรียกว่า Hexose monophosphate นั้นเอง จึงเกิดการสะสมไซลิทอลเพิ่มขึ้น และส่งผ่านออกนอกเซลล์ เป็นผลทำให้ได้ผลได้และผลผลิตของไซลิทอลเพิ่ม

Furlan และคณะ (1991) และ Kim และคณะ (1997) ทำการศึกษาปัจจัยของอากาศใน *Candida parasilosis* ซึ่งพบว่าทำให้อากาศมากเกินไปจะส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ไซลิทอลที่ผลิตขึ้นจะถูกเปลี่ยนเป็น NADH และไซลูโลสทำให้ผลผลิตไซลิทอลลดลง

Furlan และคณะ (1994) ได้ทำการทดลองพบว่า เชื้อ *Candida tropicalis* สามารถผลิตไซลิทอลได้ 30 กรัมต่อลิตร ในเวลา 117 ชั่วโมง เชื้อ *Pichia tannophilus* และ *Candida shehatae* สามารถผลิตไซลิทอลได้ 12.5 กรัมต่อลิตร และ 6.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลที่ได้นี้เป็นผลที่ได้มาจากสภาวะ Microaerobic และสามารถสรุปได้ว่าอัตราการถ่ายเทออกซิเจนเป็นหลักสำคัญในการผลิตไซลิทอล

2. แหล่งไนโตรเจนในการผลิตไซลิทอล

Barbosa และคณะ (1988) กล่าวถึงความสำคัญของแหล่งไนโตรเจนและการให้อากาศว่ามีผลกับปริมาณการผลิตไซลิทอลจากไซลูโลสโดยยีสต์บางสายพันธุ์ ใน *Saccharomyces cerevisiae* วิถีเพนโตสฟอสเฟตควบคุมโดยไนโตรเจนและเกลือแอมโมเนียมซึ่งพบว่าสามารถกระตุ้นการเกิดออกซิเดทีฟในวิถีเพนโตสฟอสเฟต เพราะเอนไซม์ D-glucose-6-phosphate dehydrogenase จะถูกยับยั้งโดย NADH ใน *Pichia tannophilus* เกลือแอมโมเนียมจะกระตุ้นการเจริญและลดระดับ NADH ของเอนไซม์ D-glucose-6-phosphate dehydrogenase ภายในเซลล์และเพิ่มกิจกรรมของการออกซิเดทีฟในวิถีเพนโตสฟอสเฟต

ใน *Candida shehatae* พบว่าสามารถผลิตไซลิทอลในปริมาณมากขึ้นอยู่กับแหล่งไนโตรเจนเพราะเป็นการเพิ่มระดับของเอนไซม์ Xylitol dehydrogenase Dahiya (1991) ได้ศึกษาผลกระทบในการผลิตไซลิทอลจากแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ 8 ชนิด และ สารอินทรีย์ 4 ชนิด พบว่าปริมาณไซลิทอลสูงสุดที่ได้คือ 16.7 กรัมต่อลิตร และ 30.6 กรัมต่อลิตร โดยใช้แอมโมเนียอะซีเตต และยีสต์สกัด ตามลำดับ

Horitsu และคณะ (1992) ใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 3 10 และ 20 กรัมต่อลิตร พบว่าได้รับการเกิดผลผลิตสูงสุด 1.78 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้ยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร ด้วยอัตราการไหล 400 มิลลิลิตรต่อนาที ให้อากาศที่มีออกซิเจน 90 เปอร์เซ็นต์ และให้ไซลูโลส 100 กรัมต่อลิตร Orishi และคณะ (1980) พบว่าการผลิตโพลีออลโดย *Pichia* เป็นผลมาจากอัตราส่วนของคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ปริมาณโพลีออลจะได้มากกว่าเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นต่ำ

Sirisansaneeyakul และคณะ (1992) ได้รายงานว่ เชื้อ *Candida mogii* ที่เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด (ความเร็วรอบในการเขย่า 100 รอบต่อนาที) โดยให้มีความแตกต่างของความเข้มข้นของไซโลส 5-35 กรัมต่อลิตร พบว่าอัตราการผลิตไซลิทอลจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเริ่มต้น ดังตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสที่มีต่อการผลิตไซลิทอล

ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณชีวมวล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณผลผลิต(กรัมต่อกรัม)
5.3	0.46	0
10.1	0.29	0.17
19.3	0.18	0.44
28.9	0.16	0.50
53.3	0.12	0.70

ที่มา : Sirisaneeyakul (1995)

Horitsu และคณะ (1992) ได้เพิ่มความเข้มข้นของไซโลสในการเลี้ยงเชื้อ *Candida tropicalis* เป็น 100-500 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการให้อากาศสูง 400 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้อากาศที่มีออกซิเจน 90 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอัตราการผลิตไซลิทอลเพิ่มขึ้นเป็น 2.44 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากเดิม 1.78 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ความเข้มข้นของไซโลสกับการให้อากาศมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของเซลล์ โดยที่ความเข้มข้นของไซโลสและอัตราการให้อากาศสูง ความเข้มข้นของเซลล์จะสูงและการผลิตไซลิทอลจะสูงตามไปด้วย

Meyrial และคณะ (1991) ศึกษาความต้านทานต่อสัปดาห์ของ *Candida guilliermondii* ที่ความเข้มข้นของไซโลสเริ่มต้นจาก 100-300 กรัมต่อลิตร การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลนำไปสู่การเพิ่มผลผลิตไซลิทอล และปริมาณไซลิทอลที่เพิ่มขึ้นจากการเพิ่มไซโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณสูงสุดที่ได้เมื่อใช้ไซโลส 300 กรัมต่อลิตรได้ผลผลิต 0.75 กรัมต่อกรัมไซโลส ซึ่งคิดเป็น 82.6 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณทั้งหมดในทางทฤษฎี ความเข้มข้นของไซลิทอลต่ำ เนื่องจากถูกใช้ไปในการเพิ่มมวลเซลล์เป็นหลัก อัตราการผลิตไซลิทอลเมื่อไซโลสเป็น 2.4 เท่าจะสูงกว่าปริมาณที่ได้จากไซโลส 10 กรัมต่อลิตร ในทางตรงกันข้ามกับการผลิตไซลิทอล การเจริญของจุลินทรีย์ที่ลดลงจะถูกยับยั้งโดยความเข้มข้นของไซโลส อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.11 ต่อชั่วโมง ได้จากความเข้มข้นของไซโลส 20 และ 50 กรัมต่อลิตร

4. การเติมน้ำตาลชนิดอื่นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Haiao และคณะ (1982) รายงานว่ากลูโคสจะยับยั้งการใช้ไซโลสใน *Candida* และ *Shizosaccharomyces* กลูโคสจะยับยั้งการเผาผลาญไซโลสในระยะเวลาอันรวดเร็ว และเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสลดต่ำลง ความสามารถในการเปลี่ยนไซโลสจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในช่วงสั้นๆ นี้จะทำให้การดูดซึมไซโลสกลับคืนมาอย่างรวดเร็ว โดยแสดงออกในลักษณะ Catabolic repression ไม่ใช่การควบคุมที่กลไกการสังเคราะห์ของยีน หลักฐานที่สนับสนุนความคิดนี้ ค่อนข้างจะเป็นการอธิบายถึงการนำไซโลสส่วนใหญ่ที่ไม่ Active หรือเกิดการยับยั้งในขณะที่มีกลูโคส ในช่วงที่มีการแทนที่น้ำตาลอื่นจะมีการยับยั้งเกิดขึ้นภายในเซลล์เมื่อมีกลูโคสหรือตัวเร่งปฏิกิริยา (Catabolite)

นรินทร์ (2541) การเติมกลูโคสลงไปในการเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการเติบโตของเชื้อ *Candida mogii* ATCC 18364 และการเกิดไซลิทอลในสภาวะที่จำกัดออกซิเจน โดยทำการเติมกลูโคสลงไปเป็นปริมาณน้อยมากเพื่อไม่ให้เกิดการยับยั้งไซโลส (Catabolic repression) ในกรณีนี้ กลูโคสจะช่วยเพิ่มปริมาณ NADPH ในเมทาบอลิซึมของยีสต์และใช้ในการเจริญเติบโตแทนการใช้ไซโลส จึงทำให้ไซโลสถูกใช้ไปในการผลิตไซลิทอลมากขึ้น ส่งผลให้ผลได้ของไซลิทอลสูงขึ้นด้วย โดยปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมที่ให้ผลผลิตไซลิทอลสูงสุดคือ 2.3 กรัมต่อการทดลอง (ทำการทดลองในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร ปริมาตรที่ใช้หมักเท่ากับ 1.5 ลิตร) ทำให้ได้ไซลิทอล 0.854 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส อัตราการผลิตเท่ากับ 0.255 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ค่าผลได้เพิ่มขึ้น 1.24 เท่า และอัตราการผลิตเพิ่มขึ้น 1.36 เท่า เมื่อเทียบกับการเพาะเชื้อในสภาวะเดียวกันซึ่งไม่มีการเติมกลูโคส

5. การเติมเมทานอล (Methanol)

การเติมเมทานอลสามารถเพิ่มการผลิตไซลิทอลได้เป็น 39.8 กรัมต่อลิตร ไซลิทอลที่เพิ่มขึ้นนี้คิดเป็น 8.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้อาหารไซโลสที่มีการเติมด้วยเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ซึ่งจะทำให้เกิดการเกิดออกซิเดชันของเมทานอลให้ผลผลิตเป็น NADH ทำให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นพอที่จะเกิดการรีดักชันของไซโลสและไซลูโลสทำให้เกิดไซลิทอล ในกรณีที่เป็นการผลิตซอร์บิทอล และ ไฮดิทอล โดยยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอล เช่น *Candida boidinii* และการเติมเมทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้ผลิตไซลิทอลได้มากขึ้น

6. ปริมาณไบโอติน (Biotin)

Lee และคณะ (1987) รายงานว่าปริมาณเอทานอลและไซลิทอลจะสะสมในน้ำหมักในการเลี้ยงแบบชั่วคราวของเชื้อ *Pachysolen tannophilus* และ *Candida guilliermondii* จะขึ้นอยู่กับระดับของไบโอติน ในอาหารที่มีไบโอตินสูง *Pachysolen tannophilus* จะสะสมเอทานอลมากกว่าไซลิทอล ในขณะที่ *Candida guilliermondii* จะสะสมไซลิทอลมากกว่าเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และอุณหภูมิ

Gong และคณะ (1981) รายงานว่าปริมาณไซโลสที่จะเปลี่ยนเป็นไซลิทอลมากที่สุด จะเกิดที่พีเอช 8.0 และการเกิดปฏิกิริยารีดักชันของไซลิทอลจะเกิดขึ้นเมื่อพีเอชเปลี่ยนจากเบสเป็นกรด ปริมาณไซลิทอลสูงสุดจะเกิดขึ้นในช่วงแรกที่มีพีเอช 6.0-7.0 โดย *Pachysolen tannophilus* พีเอช 6.0 โดย *Candida guilliermondii* และที่พีเอช 4.0 โดย *Candida tropicalis*

วรสิทธิ์ (2541) ทำการศึกษาผลของพีเอชต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลของเชื้อ *Candida mogii* ATCC 18364 พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและผลิตไซลิทอลแตกต่างกัน โดยทำการเพาะเลี้ยงใน 2 ระยะ ระยะแรกเป็นการเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ จะทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีการให้อากาศอย่างเพียงพอ พีเอชที่เหมาะสมในระยะนี้เท่ากับ 4.5 ทำให้ได้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.046 ต่อชั่วโมง ระยะที่สองเป็นระยะที่ทำการผลิตภายใต้สภาวะที่จำกัดอากาศ พบว่าพีเอชที่เหมาะสมในระยะนี้เท่ากับ 6.0 ทำให้ได้ผลผลิตไซลิทอล 0.71 กรัมต่อกรัมไซโลส คิดเป็น 77.96 เปอร์เซ็นต์ ของผลได้ตามทฤษฎี

การผลิตไซลิทอลโดยใช้เซลล์ตรึง

การผลิตไซลิทอลโดยใช้เซลล์ตรึงเป็นอีกวิธีที่ใช้ในการเพิ่มผลผลิตไซลิทอล ซึ่งเป็นการเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ในการหมัก นอกจากนี้ยังทำให้เซลล์มีความเสถียรทางด้านพันธุกรรม และสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่ได้

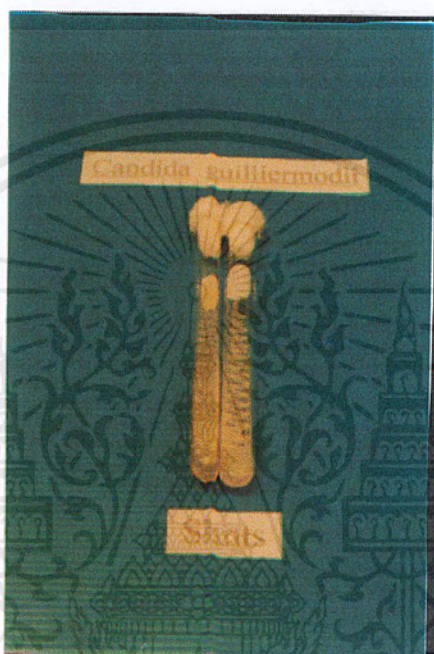
Dominguez (1998) ทำการศึกษาระบวนการผลิตไซลิทอลโดยยีสต์ *D.hansenii* NRRL Y7426 ในระดับฟาสก์เวย์ ได้ความเข้มข้นของไซลิทอลเท่ากับ 106.7 และ 37.6 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงตามลำดับ และอัตราการผลิตไซลิทอลเท่ากับ 1.48 และ 0.31 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง เมื่อใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงตามลำดับ สำหรับการเพาะเลี้ยงครั้งที่ 1 การนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่เป็นครั้งที่ 2 ความเข้มข้นของไซลิทอลและอัตราการผลิตไซลิทอลเมื่อใช้เซลล์อิสระจะมีค่าลดลง (45.6 กรัมต่อลิตร และ 0.38 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงตามลำดับ) ส่วนในระบบเซลล์ตรึงจะทำให้อัตราการผลิตไซลิทอลสูงขึ้นเป็น 2.08 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง เป็นการบ่งชี้ให้เห็นว่าการใช้เซลล์ตรึงสามารถนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่โดยไม่ทำให้กิจกรรมของเซลล์ลดลง ซึ่งเป็นการแก้ปัญหาการสูญเสียกิจกรรมของเซลล์ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่ทำการหมักเป็นระยะเวลาสั้น

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

ใช้เชื้อ *Candida guilliermodii* TISTR 5068 จากสภาวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย



รูปที่ 3.1 รูปเชื้อ *Candida guilliermodii* TISTR 5068 ใน slant

3.2 อุปกรณ์และวิธีการ

3.2.1 อุปกรณ์

- 1) ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 2) บีกเกอร์ขนาด 50,100,500 และ 1000 มิลลิลิตร
- 3) ปิเปตขนาด 1,5 และ 10 มิลลิลิตร
- 4) ไมโครปิเปตขนาด 1-5 มิลลิลิตร และ 100-200 ไมโครลิตร
- 5) แท่งแก้วคน, ข้อนตักสาร
- 6) หลอดทดลองพร้อมแลค
- 7) เครื่อง incubater shaker
- 8) กระบอกตวง 100 และ 1000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 9) ตู้ hot air oven
- 10) ตู้ laminar air flow
- 11) เครื่อง spectrophotometer
- 12) คิวเวตแก้ว
- 13) ตะเกียง, ลูบ
- 14) เครื่อง centrifuge พร้อมหลอด centrifuge
- 15) เครื่อง autoclave

3.2.2 สารเคมี

- 1) กลูโคส (Glucose)
- 2) ไชโลส (Xylose)
- 3) เปปโตน (Paptone)
- 4) สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)
- 5) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)
- 6) แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

3.3 วิธีการ

3.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

- 1) เชื้อเชื้อ *Candida guilliermodii* TISTR 5068 ลงใน slant (YM agar) แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 2) เชื้อเชื้อจาก slant ประมาณ 1-2 ลูบ ลงในพลาสติกที่บรรจุอาหารเหลว (YM medium) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อทำเป็น strater
- 3) นำไปบ่มเขย่าในเครื่อง incubater shaker ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลาประมาณ 4-5 ชั่วโมง
- 4) นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer ให้ได้ค่า 0.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

3.3.2.1 หาปริมาณเชื้อที่เหมาะสม

- 1) ดูดปริมาณเชื้อจาก strater มาใส่ในอาหารเหลว 100 มิลลิตร ในฟลาस्क ขนาด 250 มิลลิตร โดยดูดมา 5,6,7,8,9 และ 10 มิลลิตร ทำ 3 ซ้ำ
- 2) นำไปบ่มเขย่าในเครื่อง incubater shaker ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 rpm
- 3) ตรวจวัดตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง จนถึงซึ่งโมงที่ 24(เข้าช่วง stationary phase) โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer
- 4) นำค่าดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำหนักแห้ง
- 5) หาปริมาณที่เหมาะสมที่สุดจากกราฟที่ได้

3.2.2.2 หาส่วนประกอบของอาหารที่เหมาะสม

การเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสม

- 1) เตรียมอาหารเหลว (YM medium) ในฟลาस्कละ 100 มิลลิตร ในฟลาस्कขนาด 250 มิลลิตร โดยเปลี่ยนสูตรอาหารเปลี่ยนปริมาณกลูโคสเป็น 10,15,20,25,30 กรัมต่อลิตร แล้วใส่เชื้อไปตามที่เราหาได้ในตอนแรก
- 2) นำไปบ่มเขย่าในเครื่อง incubater shaker ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 rpm
- 3) ตรวจวัดตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง จนถึงซึ่งโมงที่ 24(เข้าช่วง stationary phas) โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer
- 4) นำค่าดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำหนักแห้ง
- 5) หาปริมาณที่เหมาะสมที่สุดจากกราฟที่ได้

การเปรียบเทียบหาปริมาณสารสกัดยีสต์ที่เหมาะสม

- 1) เตรียมอาหารเหลว (YM medium) ในฟลasks ละ 100 มิลลิลิตร ในฟลask ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเปลี่ยนสูตรอาหารเปลี่ยนปริมาณสารสกัดยีสต์เป็น 2,3,5,7 และ 10 กรัมต่อลิตร แล้ว เปลี่ยนปริมาณกลูโคสตามที่ได้และใส่เชื้อไปตามที่เราหาได้ในตอนแรก
- 2) นำไปบ่มเขย่าในเครื่อง incubater shaker ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 rpm
- 3) ตรวจวัดตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง จนถึงชั่วโมงที่ 24(เข้าช่วง stationary phase) โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer
- 4) นำค่าดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำหนักแห้ง
- 5) หาปริมาณที่เหมาะสมที่สุดจากกราฟที่ได้

การเปรียบเทียบหาปริมาณเปปไตน์ที่เหมาะสม

- 1) อาหารเหลว (YM medium) ในฟลasks ละ 100 มิลลิลิตร ในฟลask ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเปลี่ยนสูตรอาหารเปลี่ยนปริมาณเปปไตน์เป็น 3,5,7 และ 10 กรัมต่อลิตร แล้ว เปลี่ยนปริมาณกลูโคส สารสกัดยีสต์ ตามที่ได้และใส่เชื้อไปตามที่เราหาได้ในตอนแรก
- 2) นำไปบ่มเขย่าในเครื่อง incubater shaker ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 rpm
- 3) ตรวจวัดตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง จนถึงชั่วโมงที่ 24(เข้าช่วง stationary phase) โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer
- 4) นำค่าดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำหนักแห้ง
- 5) หาปริมาณที่เหมาะสมที่สุดจากกราฟที่ได้

การเปรียบเทียบหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสม

- 1) อาหารเหลว (YM medium) ในฟลาสก์ละ100 มิลลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิตร โดยเปลี่ยนสูตรอาหารเปลี่ยนปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 2, 3,5,7 และ 10 กรัมต่อลิตร แล้ว เปลี่ยนปริมาณ กลูโคส สารสกัดยีสต์ เปปโตน ตามที่ได้และใส่เชื้อไปตามที่เราหาได้ในตอนแรก
- 2) นำไปบ่มเขย่าในเครื่อง incubater shaker ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 rpm
- 3) ตรวจวัดตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง จนถึงซึ่งโมงที่ 24(เข้าช่วง stationary phase) โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer
- 4) นำค่าดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำหนัก
- 5) หาปริมาณที่เหมาะสมที่สุดจากกราฟที่ได้

3.3.2.3 การเปรียบเทียบหาความเร็วรอบ

- 1) อาหารเหลว (YM medium) ในฟลาสก์ละ100 มิลลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิตร โดยเปลี่ยนสูตรอาหารเปลี่ยนปริมาณกลูโคส สารสกัดยีสต์ เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต ตามที่ ส่วนแคลเซียมคลอไรด์คงเดิมได้และใส่เชื้อไปตามที่เราหาได้ในตอนแรก
- 2) นำไปบ่มเขย่าในเครื่อง incubater shaker ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250,280,300,320 rpm
- 3) ตรวจวัดตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง จนถึงซึ่งโมงที่ 24(เข้าช่วง stationary phase) โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer
- 4) นำค่าดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำหนักแห้ง
- 5) หาปริมาณที่เหมาะสมที่สุดจากกราฟที่ได้โดยหาความชัน

3.3.2.4 การเปรียบเทียบหาปริมาณไซโลสที่เหมาะสม

- 1) เตรียมอาหารเหลว (YM medium) ในฟลาสก์ คำนวณให้ได้ตามสัดส่วนวันที่ให้เติมไซโลส โดยมีการเติมไซโลสเป็น 100,200 และ 300 กรัมต่อลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิตร โดยเปลี่ยนสูตรอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปลี่ยนเป็นอาหารสูตรใหม่ที่ได้ในการทดลองก่อนหน้านี้ และใส่เชื้อตามที่ได้คำนวณได้ และใส่ไซโลสไป 5เปอร์เซ็นต์ เพื่อชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์

- 2) นำไปบ่มเขย่าในเครื่อง incubater shaker ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบตามที่ทดลองได้ ตรวจวัดตัวอย่าง วัดความเป็นกรด-ด่างและเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง
- 3) เติมไซโลสจำนวนที่เหลือลงในถังโม่ที่กลูโคสเหลือประมาณ 2-3 กรัมต่อลิตร และลดความเร็วรอบลงเพื่อให้สภาวะเหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอล ลดลงเหลือ 170 rpm
- 4) ตรวจวัดตัวอย่าง วัดความเป็นกรด-ด่างและเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง จนถึงโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer, pH meter ส่วนตัวอย่างที่เก็บนำไปเซนตริฟิวส์ ที่ 8000 rpm เวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อนำไปหาน้ำตาลไซลิทอล
- 5) นำค่าดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำหนักแห้ง
- 6) หาปริมาณที่เหมาะสมที่สุดจากกราฟที่ได้

4. การวิเคราะห์ผล

4.1 การวิเคราะห์หาน้ำหนักแห้ง

- 1) ออบกระทงที่ทำจากกระดาษฟอยด์ และทำให้เย็นในเย็นในเดซิเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนักกระทงทุกอัน
- 2) เลียงเชื้อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.8-0.9 เจือจางใส่หลอดความเข้มข้นต่างกันคือที่ 1,2,3,4,5 เท่า
- 3) ดูดสารละลายเชื้อใส่หลอดเซนติฟิวส์ หลอดละ 10 มิลลิลิตร ทำความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ
- 4) นำไปปั่นในเครื่องเซนติฟิวส์ ที่ความเร็วรอบ 4000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- 5) เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ยีสต์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งจากนั้นก็ใส่น้ำในชั้นตอนสุดท้าย 2-3 มิลลิลิตรรอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- 6) นำเข้าตู้อบความร้อน ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 7) เอาออกจากตู้อบ แล้วใส่ในเดซิเคเตอร์ให้เย็น จากนั้นชั่งน้ำหนัก เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง(กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักเซลล์แห้งและฟลอยด์} - \text{น้ำหนักฟลอยด์}}{10 \times 10^{-3}}$$

4.2 การวิเคราะห์หากกลูโคสที่ลดลง และ น้ำตาลไซลิทอล

6.2.1 การหาน้ำตาลที่ลดลงโดยวิธี Somogyi Nelson's

- 1) เติมตัวอย่างที่ต้องการหาน้ำตาลรีดิวิวซ์ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
- 2) เติม Copper reagent แล้วต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ควรใช้ลูกแก้ว วางบนปากหลอดเพื่อลดการระเหยของน้ำ
- 3) ทำให้เย็นโดยการแช่ในอ่างน้ำ เติม Arsenomolybdate reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที จะเห็นเป็นสีเขียว หรือน้ำเงิน ขึ้นกับปริมาณน้ำตาล
- 4)
- 5) เติมน้ำ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร
- 6) นำค่าที่ได้ไปเทียบกับมาตรฐานกลูโคสคำนวณได้จาก

$$\text{ปริมาณกลูโคสที่ลดลง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 520 นาโนเมตร}) \times (\text{อัตราการใช้จาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}) \times (1000)}$$

4.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณไซลิทอล

- 1) ปิเปตสารละลายตัวอย่าง (ความเข้มข้นไซลิทอล 10-50 มิลลิกรัมต่อลิตร) หรือสารละลายไซลิทอลมาตรฐาน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
- 2) เติม periodate reagent ลงไป 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
- 3) เติม bhtane-2,3-diol 0.002 M ลงไป 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
- 4) เติม pentane-2,4-dione solution ลงไป 2.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- 5) ทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร
- 6) นำค่าการดูดกลืนแสงไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของไซลิทอลในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นของไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร}) \times (\text{อัตราารเงือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}) \times (1000)}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการผลิตไซลิทอล ด้วยกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อยีสต์ *Candida guilliermondii* TISTR 5068 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณกลูโคส สารสกัดยีสต์ แอมโมเนียมซัลเฟต เปปโตน และความเร็วรอบในระดับต่างๆ และคำนวณหาพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ และต่อการผลิตไซลิทอล โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 ให้ผลการทดลองดังนี้

4.1 ผลการศึกษาปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น (Inoculum size) ที่เหมาะสม

ผลการทดลองเพาะเลี้ยง *Candida guilliermondii* ในอาหารสูตร YM ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 เปอร์เซ็นต์ แสดงไว้ในรูปที่ 4.1 ก, ข จากผลการทดลองเปรียบเทียบปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมโดยการวิเคราะห์แบบสุ่มตลอด (CRD)

จากการเปรียบเทียบผลการทดลองพบว่าปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นทั้ง 6 ระดับไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ดังตารางที่ 4.1 และเมื่อเปรียบเทียบค่าอัตราการเจริญจำเพาะพบว่าที่ 5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดจึงเลือกใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 5 เปอร์เซ็นต์ ในการทำการทดลองต่อไป

ตาราง 4.1 แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของการศึกษาหัวเชื้อเริ่มต้น

Source of variation	Dree gree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Table F	
					5%	1%
Treatment	5	0.0643	0.1286	7.654 ^{ns}	4.39	8.75
Error	6	0.101	0.0168			
Total	11	0.744				

ns คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

4.2 ผลการศึกษาปริมาณกลูโคสที่เหมาะสม

ผลการทดลองโดยการเพาะเลี้ยง *Candida guilliermondii* ในอาหารสูตร YM ที่มีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ได้จากการทดลองในข้อที่ 4.1 ซึ่งทำการทดลองโดยใช้ปริมาณสารสกัดยีสต์ ที่ 10, 15, 20, 25 และ 30 กรัม/ลิตร แสดงดังรูปที่ 4.2 ก, ข ซึ่งมวลเพิ่มขึ้นจนเกือบคงที่ในช่วงเวลาที่ 21 เนื่องจากการมีกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้เชื้อใช้น้ำตาลกลูโคสในการเจริญเติบโต และสร้างมวลชีวภาพ ซึ่งอัตราการเจริญเติบโตขึ้นอยู่กับการเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณกลูโคสลงไป ตามสมการของโมนอด (Monod equation) ที่อัตราการเจริญเติบโตขึ้นอยู่กับสับสเตรท (สารอาหาร, 2536) แต่ถ้าหากมีปริมาณกลูโคสมากเกินไป จะส่งผลให้อัตราการผลิตไซลิทอลลดลง เนื่องจากปริมาณกลูโคสที่มีความเข้มข้นสูง จะไปยับยั้งการดูดซึมไซลิทอลเข้าเซลล์ยีสต์

จากผลการทดลองนำค่ามาวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณ น้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมโดยการวิเคราะห์แบบสุ่มตลอด (CRD) ซึ่งจากการเปรียบเทียบปริมาณกลูโคสทั้ง 5 ระดับ ที่ใช้ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ในการส่งเสริมการเจริญเติบโต ดังตารางที่ 4.2 แต่เมื่อวิเคราะห์ LSD แล้ว 10 กรัม/ลิตร และ 15 กรัม/ลิตร ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เพราะฉะนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณกลูโคสที่ 10 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ (S.-Y.KIM) จะใช้กลูโคส 10 กรัมต่อลิตรในการทดลอง

ตาราง 4.2 แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของการศึกษาปริมาณกลูโคส

Source of variation	Dree gree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Table F	
					5%	1%
Treatment	4	1.11	0.2775	16.92**	5.19	
Error	5	0.082	0.0164			11.39
Total	9	1.192				

** คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

4.3 ผลการศึกษาปริมาณสารสกัดยีสต์ที่เหมาะสม

ผลการทดลองโดยการเพาะเลี้ยง *Candida guilliermondii* ในอาหารสูตร YM ที่มีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์และใช้ปริมาณกลูโคสเป็น 10 กรัม/ลิตรจากผลการทดลองในข้อที่ 4.2 และทำการทดลองใช้ปริมาณสารสกัดยีสต์ที่ 2, 3, 5, 7, 10 กรัม/ลิตร จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้นสูงสุดจนเกือบคงที่ในช่วงเวลาที่ 22 ดังรูปที่ 4.3 ก, ข

จากผลการทดลองนำค่ามาวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณสารสกัดยีสต์ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและเพิ่มชีวมวล โดยการวิเคราะห์แบบ CRD พบว่าปริมาณสารสกัดยีสต์ทั้ง 4 ระดับ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ในการส่งเสริมการเจริญเติบโต ดังตารางที่ 4.3 เพราะฉะนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณสารสกัดยีสต์ที่ปริมาณ 3 กรัมต่อลิตร เนื่องจากมีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 4.3 แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของการศึกษาปริมาณสารสกัดยีสต์

Source of variation	Dree gree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Table F	
					5%	1%
Treatment	3	0.11	0.0366	0.827 ^{ns}	6.59	16.69
Error	4	0.177	0.04425			
Total	7	0.287				

ns คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

4.4 ผลของการใช้ปริมาณเปปโติน

ผลการทดลองโดยการเพาะเลี้ยง *Candida guilliermondii* ในอาหารสูตร YM ที่มีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์และใช้ปริมาณกลูโคสเป็น 10 กรัม/ลิตรจากผลการทดลองในข้อที่ 4.2 สารสกัดยีสต์ 3 กรัม/ลิตรจากผลการทดลองในข้อ 4.3 และทำการทดลองใช้ปริมาณเปปโตินที่ 3 ,5, 7,10 กรัม/ลิตร จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้นสูงสุดจนเกือบคงที่ในช่วงเวลาที่ 22 ดังรูปที่ 4.4ก,ข

จากผลการทดลองนำค่ามาวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณเปปโตินที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและเพิ่มชีวมวล โดยการวิเคราะห์แบบ CRD พบว่าปริมาณเปปโตินทั้ง 4 ระดับไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการส่งเสริมการเจริญเติบโต ดังตารางที่ 4.4 เพราะฉะนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณเปปโตินที่ปริมาณ 3 กรัมต่อลิตร เนื่องจากมีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด

ตาราง 4.4 แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของการศึกษาปริมาณเปปโติน

Source of variation	Dree gree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Table F	
					5%	1%
Treatment	3	0.096	0.032	1.174 ^{ns}	6.59	16.69
Error	4	0.109	0.02725			
Total	7	0.205				

ns คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการศึกษาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสม

ผลการทดลองโดยการเพาะเลี้ยง *Candida guilliermondii* ในอาหารสูตร YM ที่มีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์และใช้ปริมาณกลูโคสเป็น 10 กรัม/ลิตรจากผลการทดลองในข้อที่ 4.2 สารสกัดยีสต์ 3 กรัม/ลิตรจากผลการทดลองในข้อ 4.3 เปปโติน 3 กรัม/ลิตรจากการทดลองในข้อที่ 4.4 และทำการทดลองใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 3 ,5,7,10 กรัม/ลิตร จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้นสูงสุดจนเกือบคงที่ในช่วงเวลาที่ 22 ดังรูปที่ 4.5ก,

จากผลการทดลองนำค่ามาวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและเพิ่มชีวมวล โดยการวิเคราะห์แบบ CRD พบว่าปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตทั้ง 4 ระดับมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ในการส่งเสริมการเจริญเติบโต ดังตารางที่ 4.5 แต่เมื่อวิเคราะห์ LSD แล้ว 3กรัม/ลิตร 5กรัม/ลิตร และ 7 กรัม/ลิตร ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ เพราะฉะนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ปริมาณ 3 กรัมต่อลิตร เนื่องจากมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด

ตาราง 4.5 แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของการศึกษาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต

Source of variation	Dree gree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Table F	
					5%	1%
Treatment	3	2.1482	0.716	32.995**	6.59	16.69
Error	4	0.0868	0.0217			
Total	7	2.235	32.995			

** คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

4.6 ผลการศึกษาคความเร็วจรอบในการเขย่ำที่เหมะสม

ผลการทดลองโดยการเพาะเลี้ยง *Candida guilliermondii* ในอาหารสูตร YM ที่มีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์และใช้ปริมาณกลูโคสเป็น 10 กรัม/ลิตรจากผลการทดลองในข้อที่ 4.2 สารสกัดยีสต์ 3 กรัม/ลิตรจากผลการทดลองในข้อ 4.3 เปปโติน 3 กรัม/ลิตรจากการทดลองในข้อที่ 4.4 แอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองในข้อที่ 4.5 และทำการทดลองโดยให้ความเร็วจรอบในการเขย่ำที่ 250, 280, 300 และ 320 รอบต่อนาที จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้นสูงสุดจนเกือบคงที่ในช่วงเวลาที่ 22 ดังรูปที่ 4.6ก,ข

จากผลการทดลองนำค่ามาวิเคราะห์เปรียบเทียบความเร็วรอบ พบว่าความเร็วรอบ แต่ละระดับมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 4.5 แต่เมื่อวิเคราะห์ LSD แล้วพบว่าที่ 250 รอบ/นาที และ 280 รอบ/นาทีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 4.6 เพราะฉะนั้นจึงเลือกใช้ความเร็วรอบที่ 280 รอบต่อนาที ในการเลี้ยงเพื่อหาปริมาณไข่ลิทอลต่อไป

ตาราง 4.6 แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของการศึกษาความเร็วรอบในการเขย่า

Source of variation	Dree gree of freedom	Sum of square	Mean square	F value	Table F	
					5%	1%
Treatment	3	1.265	0.42166	80.317**	6.59	16.69
Error	4	0.021	0.00525			
Total	7	1.286				

** คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

ตาราง 4.7 แสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปริมาณเชื้อเริ่มต้น กลูโคส สารสกัดยีสต์ เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต และความเร็วรอบ

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์)	μ	กลูโคส (กรัม/ลิตร)	μ
5	7.452	10	4.4074
6	7.2288	15	4.388
7	7.2072	20	3.53
8	6.912	25	4.044
9	7.308	30	3.821
10	6.7752		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารสกัดยีสต์ (กรัม/ลิตร)	μ	เปปโตน (กรัม/ลิตร)	μ
3	6.3843	3	4.949
5	6.171	5	4.638
7	6.0585	7	4.805
10	6.242	10	4.793

แอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)	μ	ความเร็วรอบ (รอบ/นาที)	μ
3	5.3695	250	5.2805
5	5.298	280	5.3215
7	5.239	300	5.0425
10	4.11	320	4.3295

การศึกษาการผลิตไซลิทอลโดยใช้ปริมาณไซโลสที่ระดับต่างๆ กันในระดับฟลาสก์

ผลการทดลองโดยการเพาะเลี้ยง *Candida guilliermondii* ในอาหารสูตร YM ที่มีการปริมาณธาตุอาหารที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลอง คือมีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณกลูโคส 10 กรัม/ลิตร สารสกัดยีสต์ 3 กรัม/ลิตร เปปโตน 3 กรัม/ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัม/ลิตร และความเร็วรอบในเขย่า 250 รอบต่อนาทีเป็นการให้อากาศและปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างเป็น 6.0 นำมาใช้เป็นสภาวะที่ผลิตไซลิทอล โดยมีสารตั้งต้นเป็นไซโลส เนื่องจากกลไกที่เป็นไปได้ที่จะนำไปสู่การผลิตไซลิทอล คือการใช้ไซโลส หรือไซลูโลสเป็นสารตั้งต้น จึงมีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นส่วนประกอบ จึงทำการทดลองใช้ปริมาณไซโลส ที่ 100 , 200 และ 300 กรัมต่อลิตร มาใช้ในการทดลอง ซึ่งได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.7

ปริมาณไซโลส 10 เปอร์เซ็นต์(100 กรัมต่อลิตร) ผลิตไซลิทอลได้สูงสุดคือ 24.4812 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 91 ส่วนปริมาณไซโลส 20 เปอร์เซ็นต์ (200 กรัมต่อลิตร) ผลิตไซลิทอลได้สูงสุดคือ 27.5188 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 91 และปริมาณไซโลส 30 เปอร์เซ็นต์ (300 กรัมต่อลิตร) ผลิตไซลิทอลได้สูงสุด 21.9548 ในช่วงเวลาที่ 91 แต่ทั้งนี้ที่ 30 เปอร์เซ็นต์ จะมีความเข้มข้นสูงเกินไป จึงมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อและการผลิตไซลิทอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ข้อมูลจากการเพาะเลี้ยง *Candida guilliermondii* ในความเข้มข้นของไซโลสระดับ ต่างๆที่ ชั่วโมงที่ 91

ความเข้มข้นของไซโลส (กรัม/ลิตร)	ความเข้มข้นของ เซลล์(กรัม/ลิตร)	ความเข้มข้นของ ไซลิทอล(กรัม/ลิตร)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ(μ)	$Y_{p/s}$	Q_p
100	5.8428	24.4812	0.3756	0.2448	0.2690
200	3.6572	27.5188	0.3232	0.13759	0.3240
300	1.2776	21.9548	0.2259	0.07318	0.2410

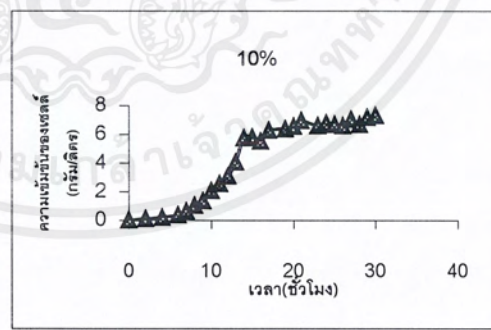
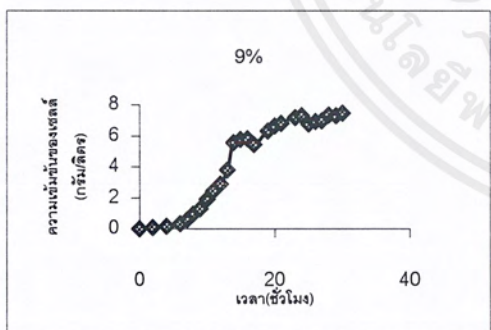
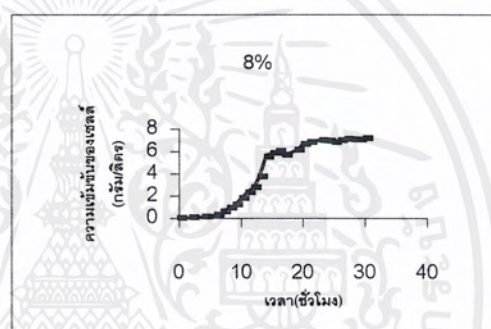
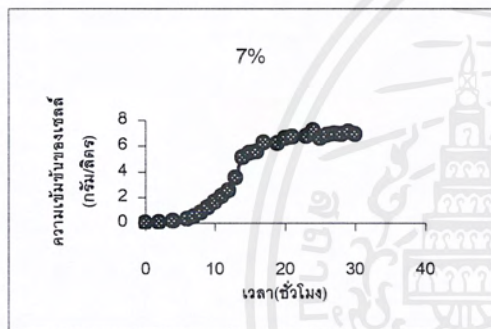
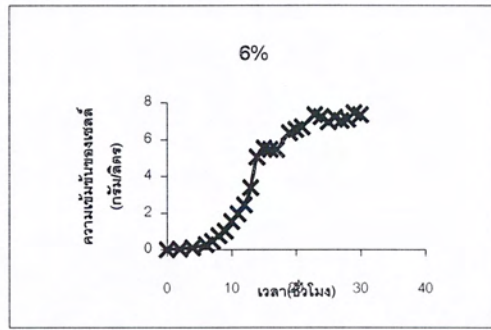
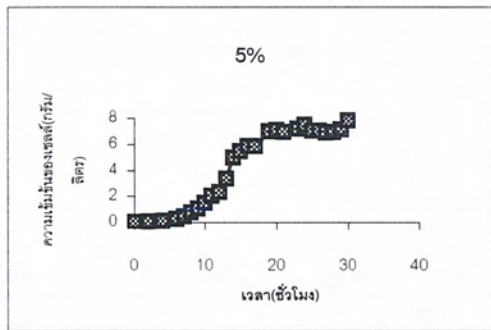


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



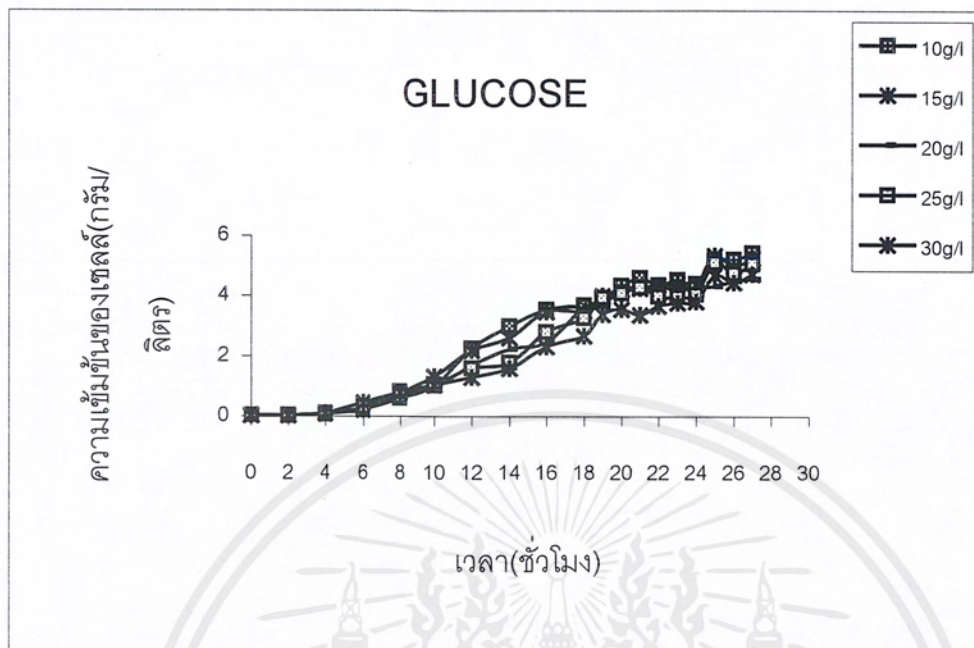
รูปที่4.1ก. กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ในปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1x. กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ในปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างๆ

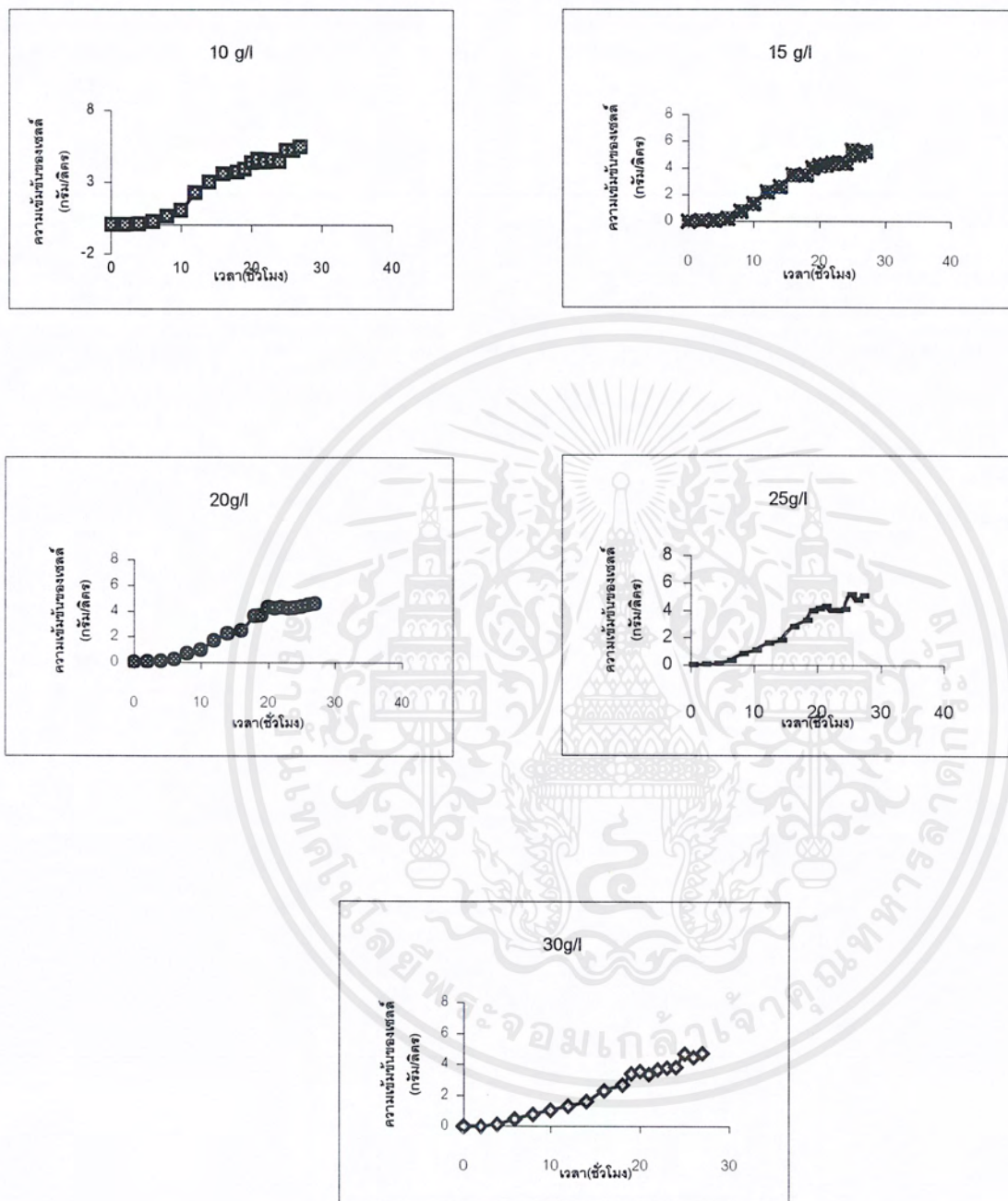
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2ก. กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาณกลูโคส

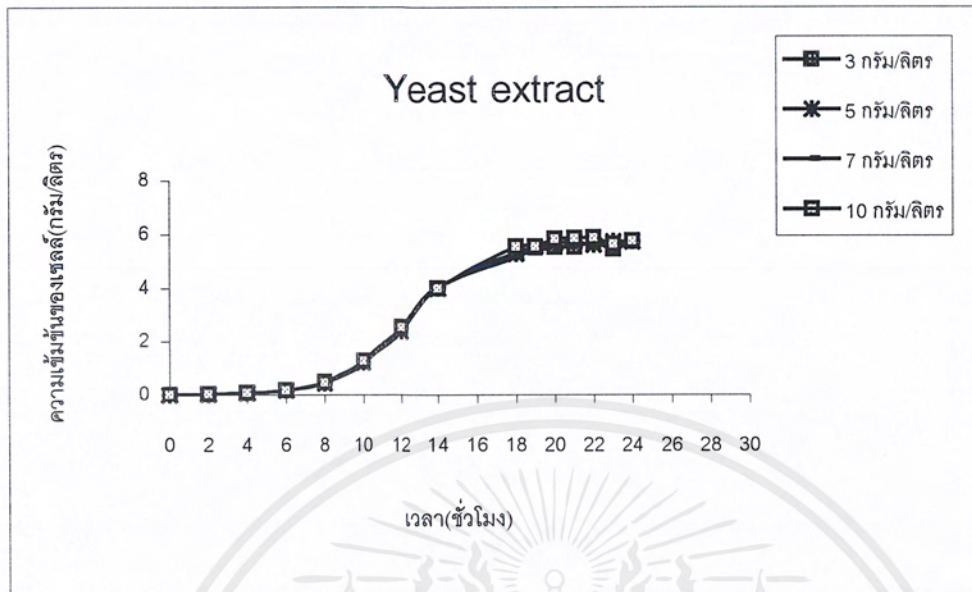
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

g



รูปที่ 4.2ข. กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาณกลูโคส

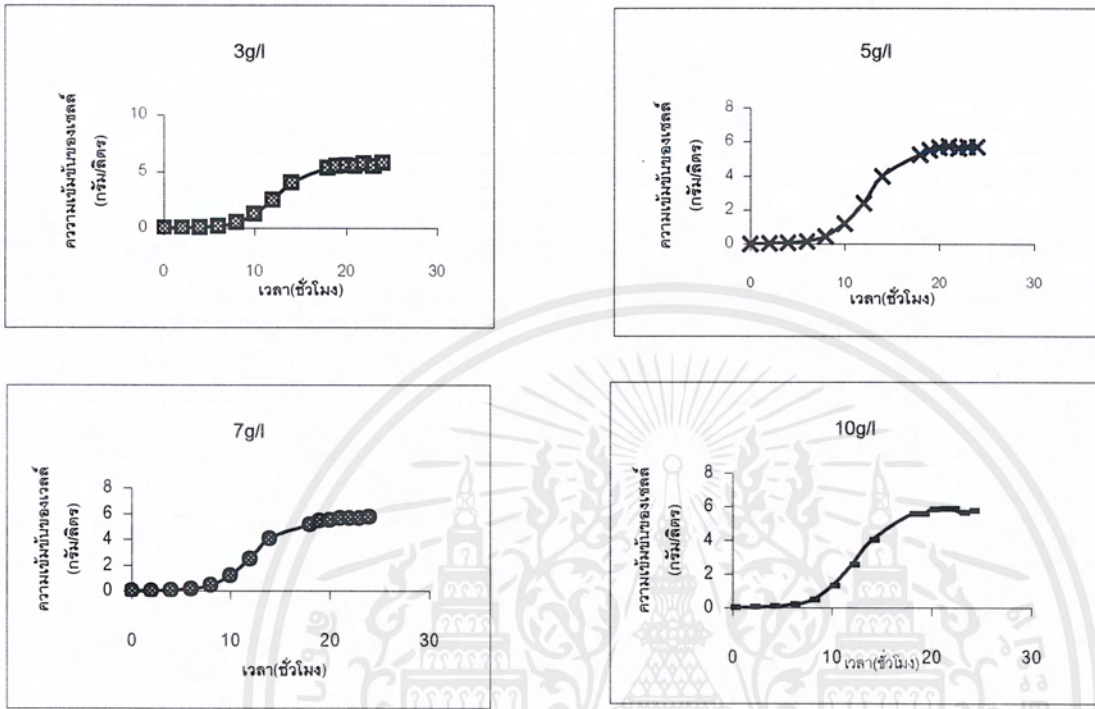
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่4.3ก. กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาณสารสกัดยีสต์

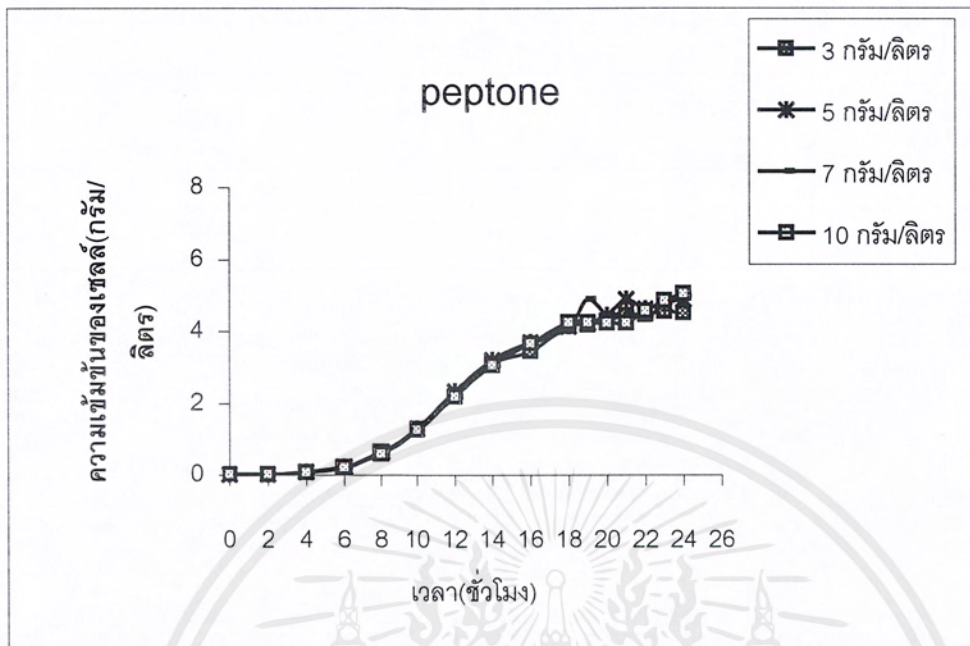
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

y



รูปที่ 4.3ข. กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาณสารสกัดยีสต์

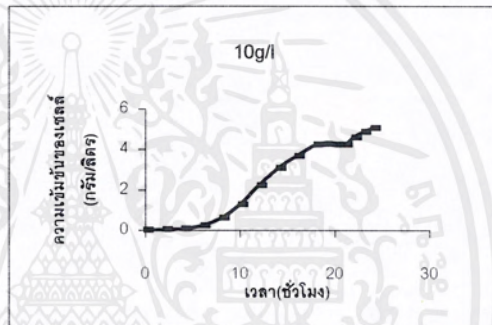
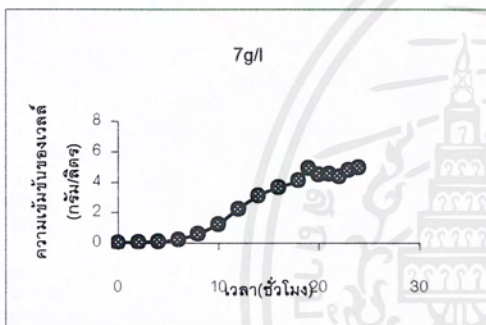
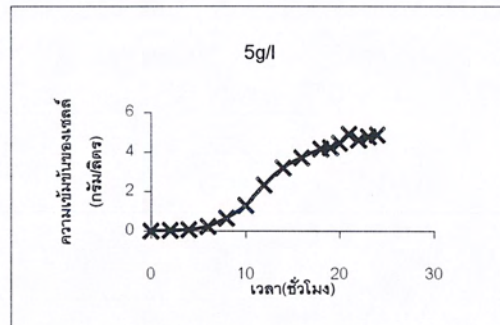
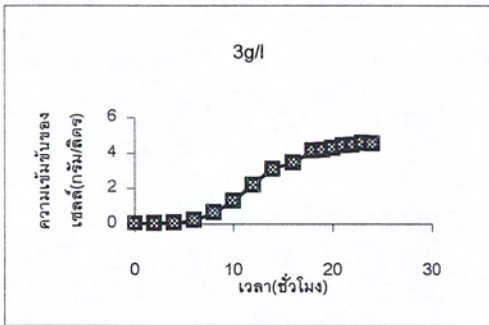
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4ก. กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาณเปปโตเน

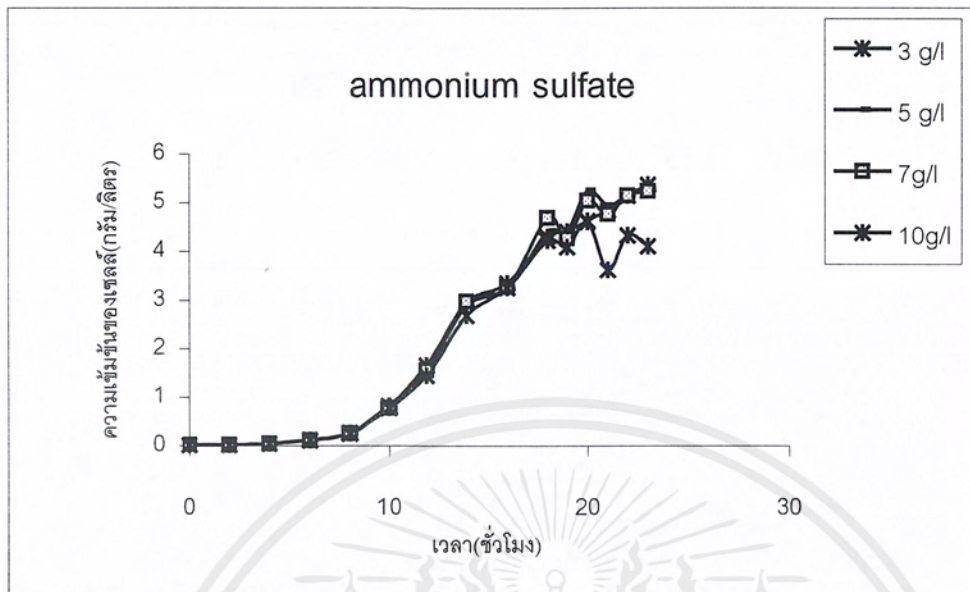
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

p



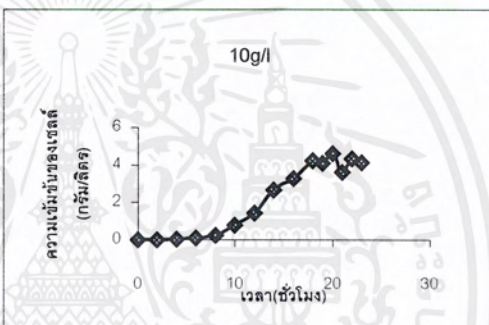
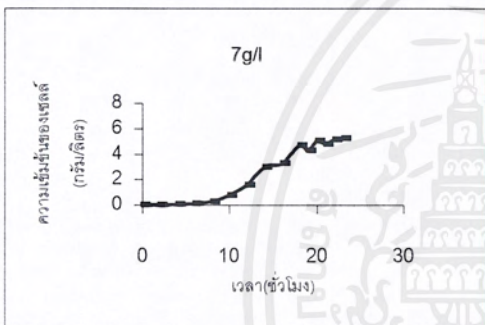
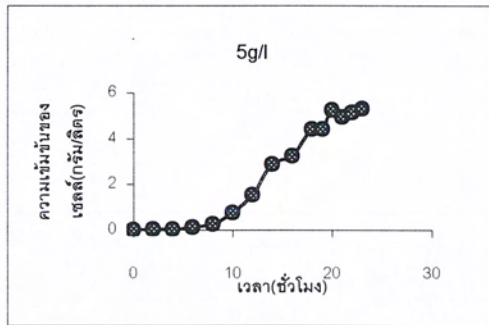
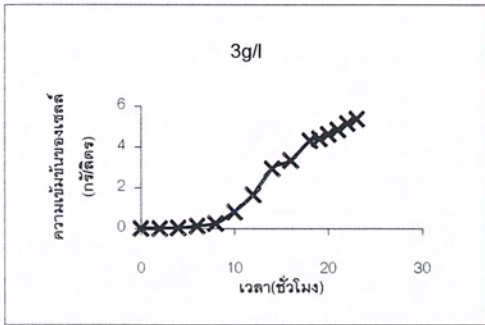
รูปที่ 4.4 ข. กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลลูโลสต่อปริมาณเปปโติน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



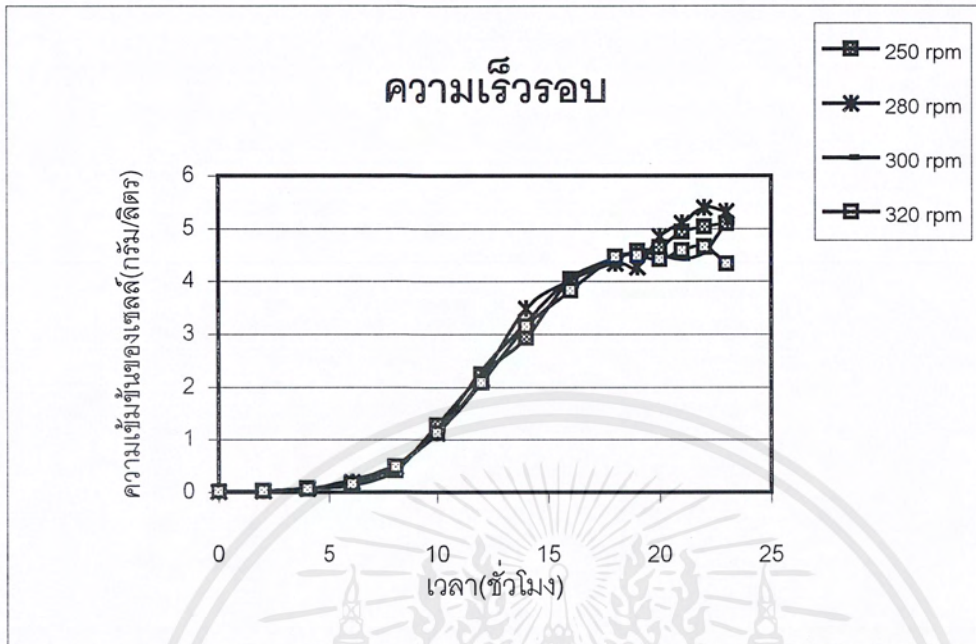
รูปที่ 4.6ก. กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของซัลเฟตต่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



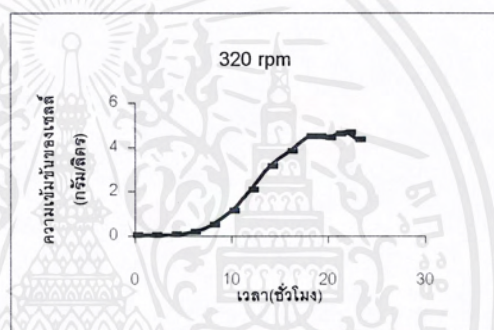
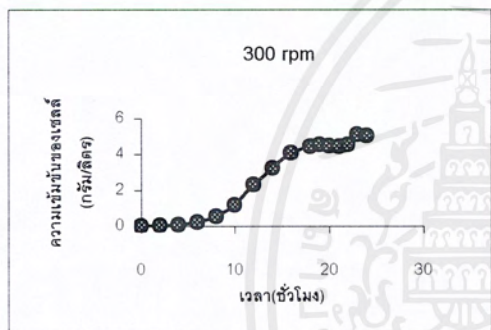
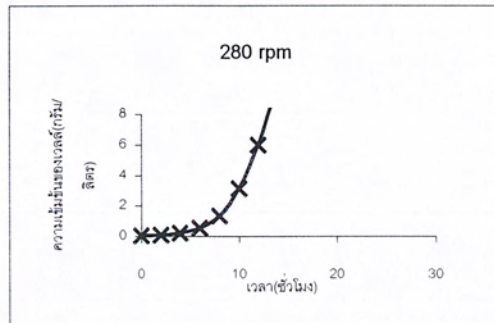
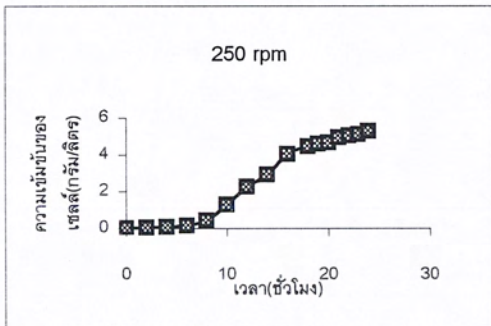
รูปที่ 4.6 ข. กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลลูล์ซต่อปริมาณ แอมโมเนียมซัลเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

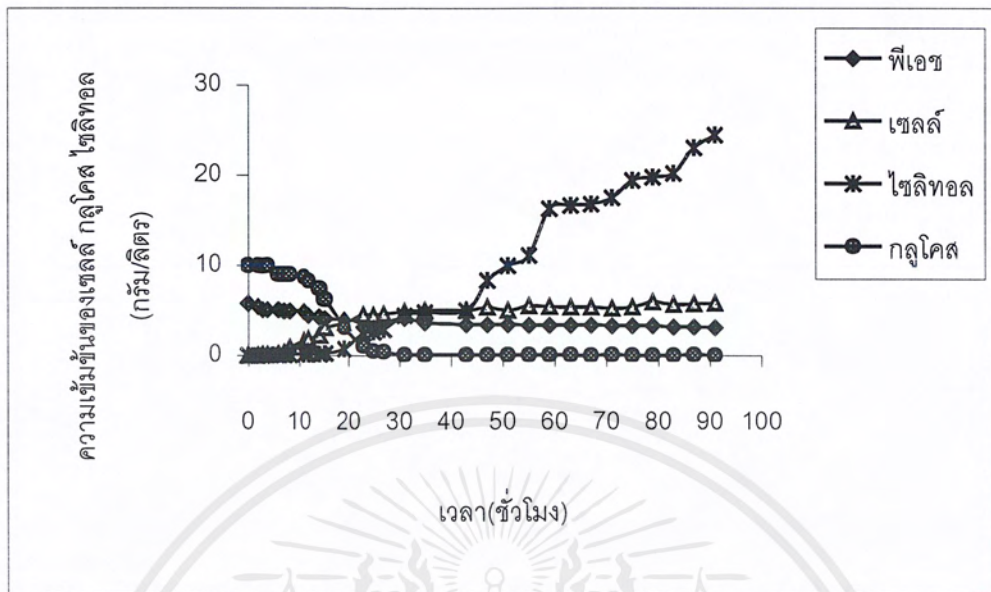


รูปที่ 4.6 ข. กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเชลล์ต่อความเร็วรอบในการเขย่า

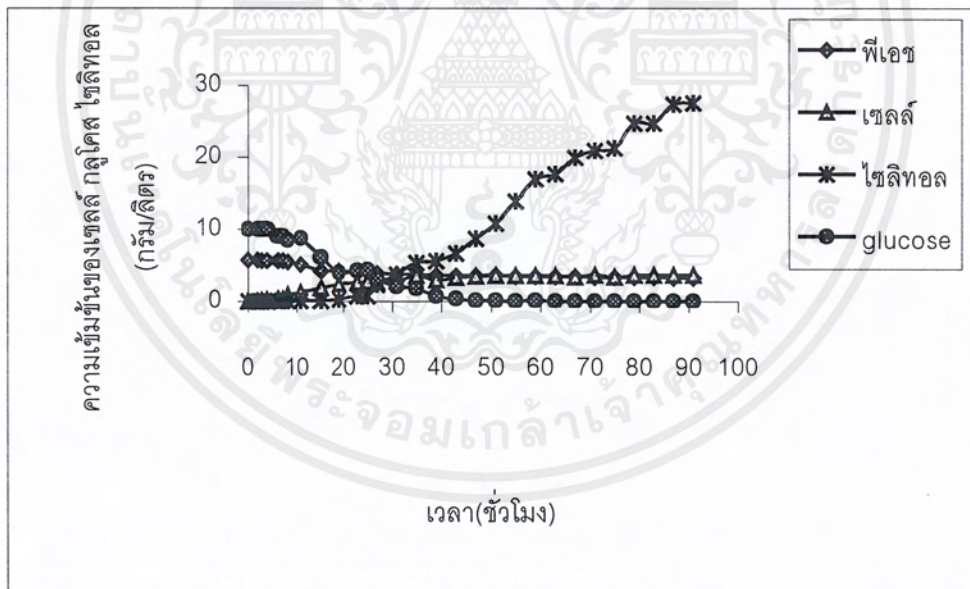
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ข. กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อความเร็วรอบในการเขย่า

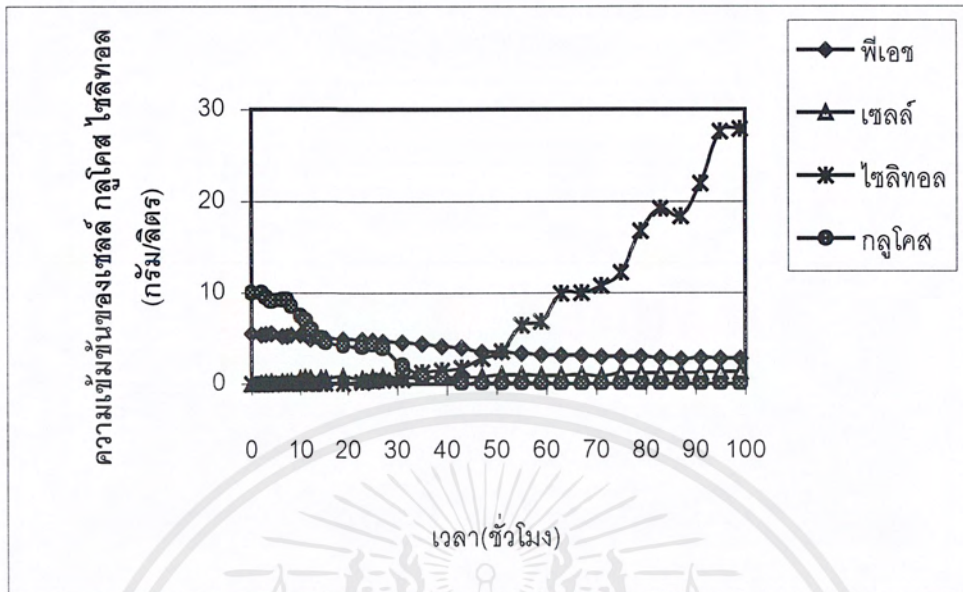


(ก)



(ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ค)

รูปที่ 4.7 กราฟแสดงชีวมวล กูลโคส ไซลิตอล พีเอช (ก) ที่ปริมาณไซโลส 100 กรัม/ลิตร (ข) ที่ปริมาณไซโลส 200 กรัม/ลิตร (ค) ที่ปริมาณไซโลส 300 กรัม/ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

บทสรุป

จากการทดลองใช้ปริมาณเชื้อที่ระดับต่างๆใช้ปริมาณสารอาหารคือ กลูโคส สารสกัดยีสต์ เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต และความเร็วรอบที่ระดับต่างๆพบว่า *Candida quilliermondii* TISTR 5068 สามารถเจริญเติบโตได้ดี ในปริมาณเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์กลูโคส 3 กรัม / ลิตร สารสกัดยีสต์ 3 กรัม/ลิตร เปปโตน 3 กรัม /ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัม/ลิตร ให้อากาศบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที และควบคุมความเป็นกรดต่างเป็น 6 และพบว่าที่ปริมาณไซโลสที่ส่งผลให้มีการผลิตไซลิทอลให้มีประสิทธิภาพอยู่ที่ประมาณ 100 กรัมต่อลิตร จะทำให้อัตราระยะเวลาในการผลิต และสามารถผลิตไซลิทอลได้ พบว่าที่ชั่วโมงที่ 91 สามารถผลิตได้สูงสุดคือ 27.5188กรัมต่อลิตร



เอกสารอ้างอิง

- เทพปัญญา เจริญรัตน์. 2541. การผลิตไซลิทอลแบบต่อเนื่องด้วยเซลล์รีคอมบิแนนท์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ถูกตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Packed-bed. สัมมนาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต(เทคโนโลยีชีวภาพ). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 43 หน้า
- นรินทร์ เรืองพานิช. 2541. ผลของกลูโคสต่อการผลิตไซลิทอลจากไซโลสภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจน. เทคนิควิจัย ปรินญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 70 หน้า
- วรสิทธิ์ โทจำปา. 2541. การผลิตไซลิทอลโดยการหมักเยื่อเซลล์ด้วย Hollow fiber. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต(เทคโนโลยีชีวภาพ). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 86 หน้า
- สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล. 2537 ไซลิทอล. วารสารอุตสาหกรรมเกษตร. 5(3) : 13-27.
- สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล. 2537. ไซลิทอล. วารสารจารย์พา. 11 : 18-21.
- สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล. 2537. สารให้ความหวานจากฟางข้าว. ว. วิทย. . กษ. 27(3-4) : 71-81.
- สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล. 2537. ไซลิทอล. วารสารจารย์พา. 12 : 28-32.
- Barbosa, M. F. S., M. B. de Medeiros, I. M. de Mancilha, H. Schneider and H. Lee. 1988. Screening of yeast for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. J. Ind. Microbiol. 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 condition of recombinant *E. coli* in carrageenan 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.
- Furlan, S. A., P. Bouilloud, and H. F. de Castro. 1994. Influence of oxygen on ethanol
- เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- and xylitol production by xylose fermenting yeasts. *Process Biochem.* 29 : 657-662.
- Furlan, S. A., P. Bouilloud, P. Strehaiano. And J. P. Riba. 1991. Study of xylitol formation from xylose under oxygen limiting conditions. *Biotechnol. Lett.* 3 : 203-206.
- Gong, C. S., L. F. Chen. And G. T. Tsao. 1981. Quantitative production of xylitol from D-xylose by a high-xylitol producing yeast mutant *Candida tropicalis* HXP2. *Biotechnol. Lett* 3 :130-135
- Gong, C. S., T. A. Claypool., L. D. Mc. Cracken., Maun., P. P. Ueng., and G. T. Tsao. 1983. Conversion of pentoses by yeasts. *Biotechnol. Bioeng.* 25 : 85-102.
- 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. kawai, T. Suzuki and N. Watanabe. 1992. Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis* : optimization of production rate. *Biotechnol. Bioeng.* 40 :1085-1091.
- Onishi, H. and T. Suzuki. 1966. The production of xylitol, L-alabinol and ribitol by yeasts. *Agr. Biol. Chem.* 30 : 1139-1144.
- Sirisansaneeyakul, S., M. Rizzi and M. Reuss. 1992. Microbiol production of xylitol from wheat straw hydrolysates. *DECHEMA Biotechnology conference vol. 5(B)* :
- Sirisansaneeyakul, S., M. Staniszewski and M. Rizzi . 1995. Screening of yeasts for Production of xylitol from D-xylose . *J. Ferment. Bioeng.* 80 : 565-570.

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Yeast Malt Extract Agar (YM Agar) ใช้ทำเป็นสแลนสำหรับเชื้อเชื้อ

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3 กรัม
สารสกัดจากมอลต์ (Malt extract)	3 กรัม
เปปโตน (Peptone)	5 กรัม
กลูโคส (Glucose)	10 กรัม
ผงวุ้น (Agar)	20 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร
พีเอช 6.0	

2. Yeast Malt Extract Broth (YM Broth) จะใช้สำหรับหาส่วนประกอบและสภาวะที่เหมาะสม

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3 กรัม
เปปโตน (Peptone)	5 กรัม
กลูโคส (Glucose)	10 กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.1 กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 กรัม
น้ำกลั่น	1000 มิลลิลิตร
พีเอช 6.0	

3. Yeast Malt Extract Broth (YM Broth) ที่หาได้จากการหาส่วนผสมที่เหมาะสม

และใช้ในการหาไซโลสที่เหมาะสมและใช้ในการหาปริมาณไซลิตอล

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3	กรัม
เปปโตน (Peptone)	3	กรัม
กลูโคส (Glucose)	10	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.1	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	3	กรัม
ไซโลส (Xylose)	100,200,300	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
พีเอช 6.0		



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

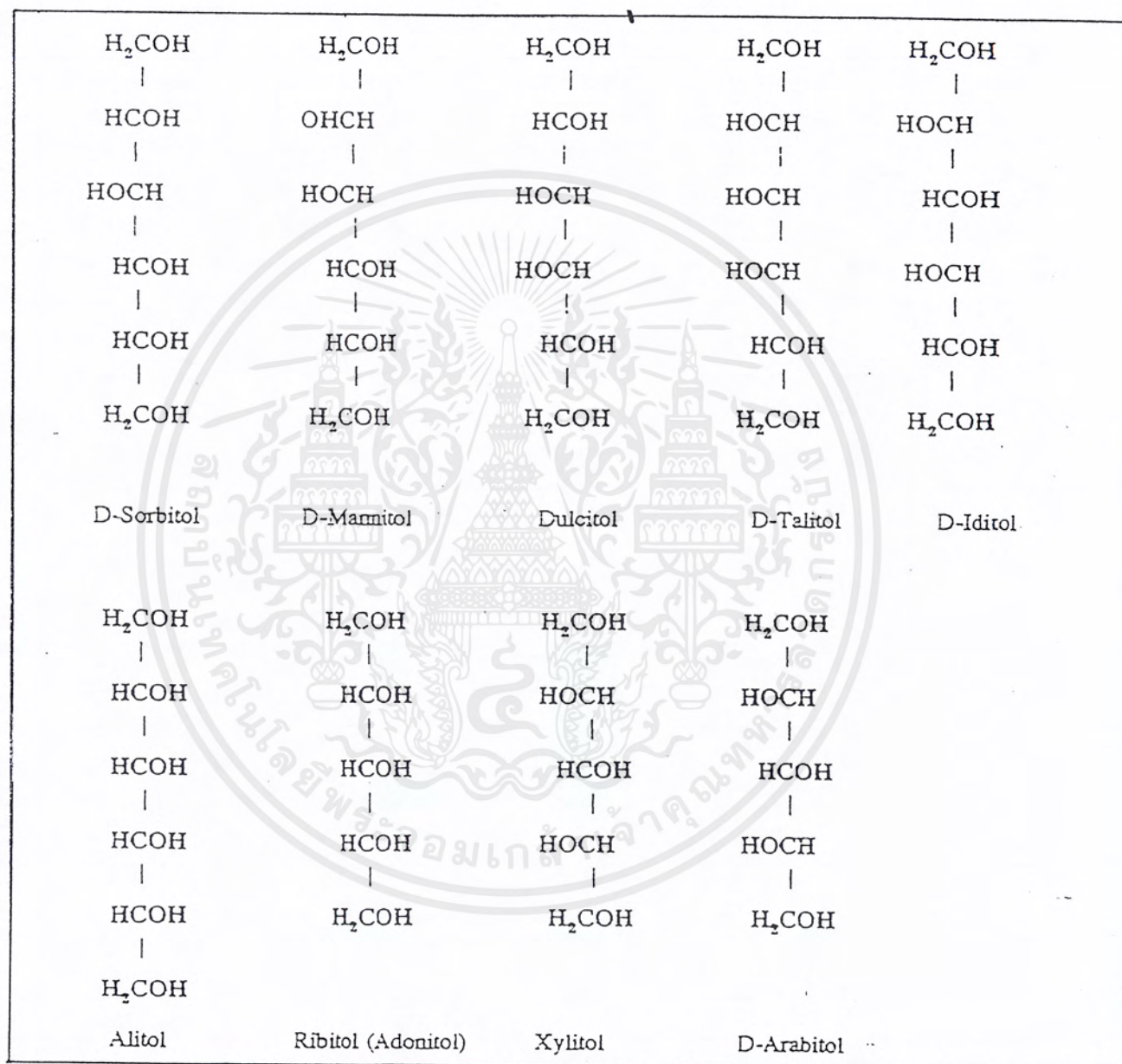


รูปที่ ก1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

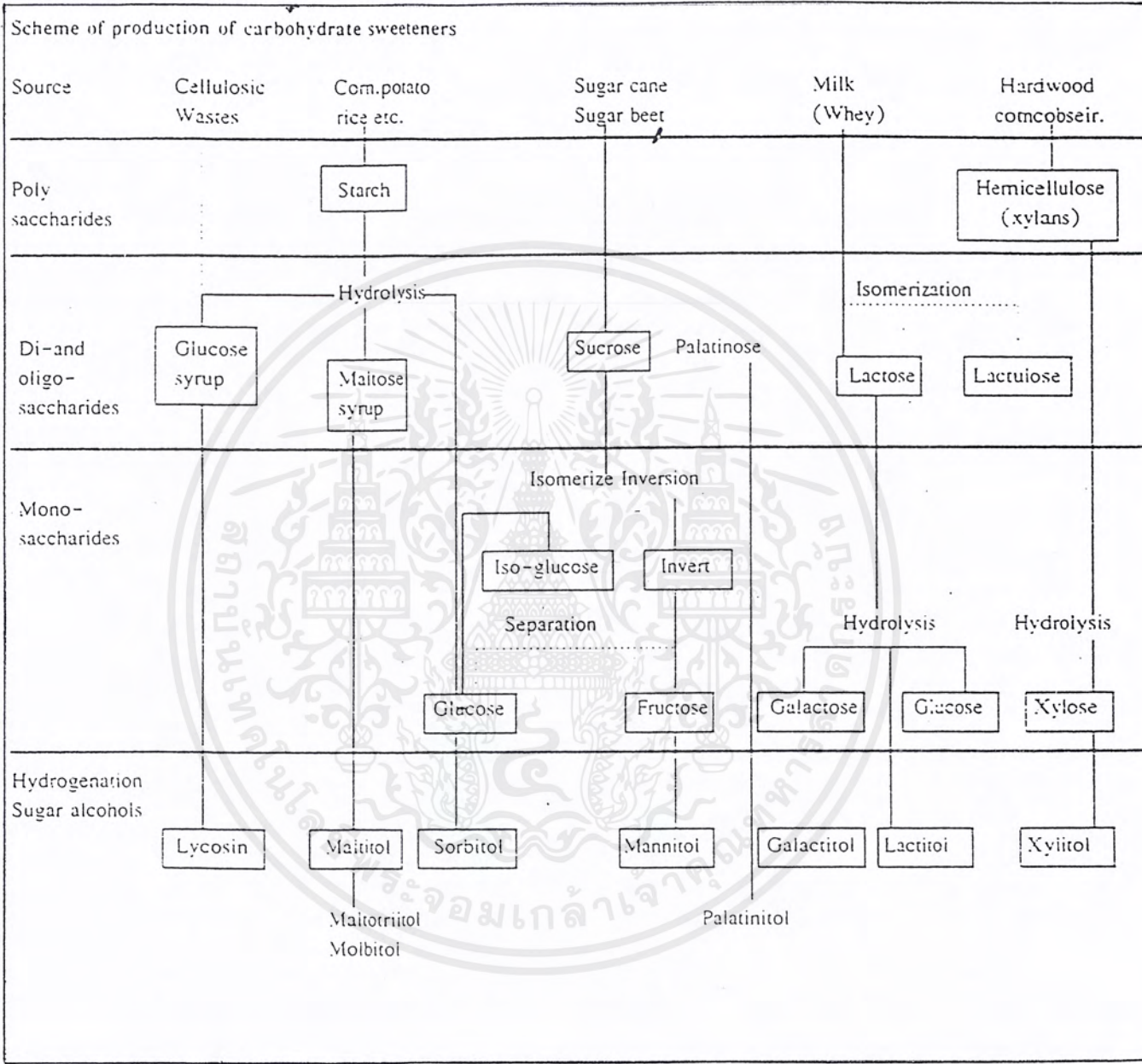
ภาคผนวก ข

Polyols



รูปที่ ข1 สูตรโครงสร้างของสาร Polyol ชนิดต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ข2 แผนผังการผลิตสารให้ความหวานพวกคาร์โบไฮเดรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข1 คุณสมบัติต่างๆ ทางกายภาพและทาง organoleptical ของ sugaralcohol

Sugaralcohol	Melting point (°C)	$[\alpha]_D^{25}$	ความหวาน*	Solubility 25°C (g/100 g)
D-Sorbitol				
Stabile form	96.4-97.2	2.0	0.48	235
instabile form	90.4-91.8			
D-Mannitol	166-167	-4.0	0.45	22
L-Iditol	73.5	-3.5	หาค่าไม่ได้	ละลายได้น้อยม
Dulcitol	188.5	ไม่เบี่ยงเบน	0.41	~3
Xylitol	93-95	ไม่เบี่ยงเบน	-1	64

ตารางที่ ข2 คุณสมบัติของน้ำตาลชนิดต่าง

ชนิด	การจับตัว	สารประกอบ	จุดหลอมเหลว (°C)	$[\alpha]_D^{20}$	Solubility ในน้ำที่ 20 °C (g/100g.)	ความหวาน
L-sorbose	-	-	159-165	-42.7-43.4	44	0.9
Maltitol	α -1,4	D-Glucose	?	+90		0.75
Maltotritol	α -1,4	D-Sorbose	?	+95		0.75
	α -1,6					
Lactitol	α -1,4	D-Galactose	165(ehtanol)	+14		0.5
		D-Sorbose	ประมาณ 72			
Isomaltitol	α -1,6	D-Glucose	168	+90.5	58	0.45
		D-Sorbose				
Glucopyranosido	α -1,6	D-Glucose	173.5	+90.5	18	0.45
-1,6-mannitol		D-Mannose				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ๓3 คุณสมบัติต่างของน้ำตาลและแอลกอฮอล์ของน้ำตาลชนิดต่าง

คุณสมบัติ	Sorbitol	Fructose	Mannitol	Xylitol	Maltitol	Sorbose	Glucose syrup	Lactitol	
การละลายในน้ำ (g/100ml) ที่ 20°C	C220	375	15.6	64	ละลายได้	-	ไม่จำกัด	-	
การละลายจนอิ่มตัวที่ 20°C	70%	30%	20%	31%	ง่าย	45%	ไม่จำกัด	-	
จุดหลอมเหลว	93-97	102-104	165-169	93-94.5	-	159-165	-	-	
ความแข็งของผลึก	ปานกลาง	ปานกลาง	มาก	-	-	-	-	-	
การทนความร้อน	ทนได้ดี	ทนได้ต่ำ (น้อย)	ทนได้ดี	ทนได้ดี	ทนได้ดี	ทนได้น้อย (น้อยกว่า)	ทนได้ดี	ทนได้ดี	
ความหวานที่ 20°C	5%	55-60	110	50	36-115	85	90	75	ต่ำ
	20%	77	-	-	104	-	-	-	-
พลังงาน/g	KJ	17.1	17.1	8.6	17.0	8.6	17.1	17.1	ไม่มี
	Kcal	4.10	4.10	2.06(?)	4.06	2.06	4.10	4.10	บันทึก
ปริมาณที่	ผู้ใหญ่	30-60	50-80	10-20	30-50	ไม่ใส่	30	ไม่ใส่	ไม่ใส่
ใช้บริโภค(g)	เด็ก	20	-	3	9-15	บันทึก	-	บันทึก	บันทึก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารเคมีและการหามาตรฐาน

1. การหาน้ำตาลที่ลดลงโดยวิธี Somogyi Nelson's เตรียมสารละลาย

สารละลาย Copper reagent ประกอบด้วย

- 1.) 10% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 100 มล. (100 กรัมต่อ 100 มล.)
- 2) Phosphate-tartrate solution เตรียมโดยสารละลาย Na_2HPO_4 28 กรัม (หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 70.5495 กรัม) ในน้ำกลั่น 700 มล. เติม sodium potassiumtartrate (Tetrahydrate) 40 กรัม ทำให้ละลาย แล้วเติม 1 N NaOH 100 มล.ตามด้วย Na_2SO_4 (Anhydrous) 120 กรัม เมื่อละลายดีแล้ว ปรับปริมาตรเป็น 900 มล.ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วันให้กรองเอาตะกอนทิ้งด้วยกระดาษ Whatman no.4
- 3) ผสมสารละลายในข้อ 1 (100 มล.) และข้อ 2 (900 มล.) เข้าด้วยกัน

Nelson's Arsenomolybdate color reagent ประกอบด้วย

- 1) ละลาย Ammoniummolybdate $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}]$ 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มล. เติม กรดกำมะถัน 21 มล.ผสมให้เข้ากัน
- 2) Disodium arsenate $(\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O})$ 25 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มล.
- 3) ผสมสารละลายในข้อ 1 และข้อ 2 เข้าด้วยกัน เก็บไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้อง และควรเก็บในขวดสีชา

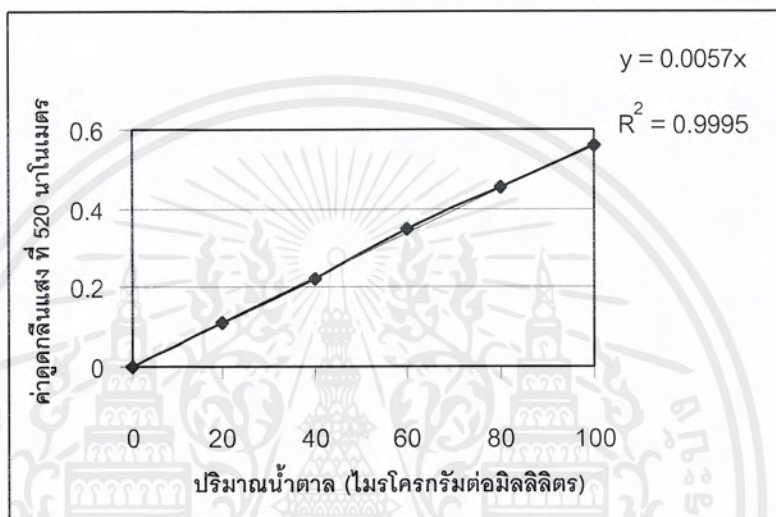
วิธีการ

- 1) เติมสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ (20,40,60,80,100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)เพื่อหาน้ำตาลรีดิวซ์ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
- 2) เติม Copper reagent แล้วต็มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ควรใช้ลูกแก้ววางบนปากหลอดเพื่อลดการระเหยของน้ำ
- 3) ทำให้เย็นโดยการแช่ในอ่างน้ำ เติม Arsenomolybdate reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที จะเห็นเป็นสีเขียว หรือน้ำเงินขึ้นกับปริมาณน้ำตาล
- 4) เติมน้ำ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5) นำค่าที่ได้ไปเทียบกับมาตรฐานกลูโคสคำนวณได้จาก

$$\text{ปริมาณกลูโคสที่ลดลง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 520 นาโนเมตร}) \times (\text{อัตราการใช้ของ})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}) \times (1000)}$$



รูปที่ ค1 กราฟมาตรฐานกลูโคส

2. การวิเคราะห์ปริมาณไซลิทอล

วิเคราะห์ปริมาณไซลิทอลในสารละลายตามวิธีของ Adler และ Gustafsson (1980)

โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของไซลิทอลไปเป็นฟอร์มัลดีไฮด์ด้วยเปอร์ไอโอดेटในสารละลายกรดในระยะเวลาสั้นๆ แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย butane-2,3-diol แล้ววิเคราะห์ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นโดยทำปฏิกิริยากับสารละลาย pentane-2,4-dione ได้สารละลายสีเหลือง

สารเคมี

- 1) periodate reagent (NaIO_4 0.015 M ใน HCl 0.16 M) เตรียมโดยสารละลาย NaIO_4 3.2084 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร เดิมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นลงไป 13.3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 มิลลิลิตร
- 2) Butane-2,3-diol M เตรียมโดยบีบอัด butane-2,3-diol มา 1.8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

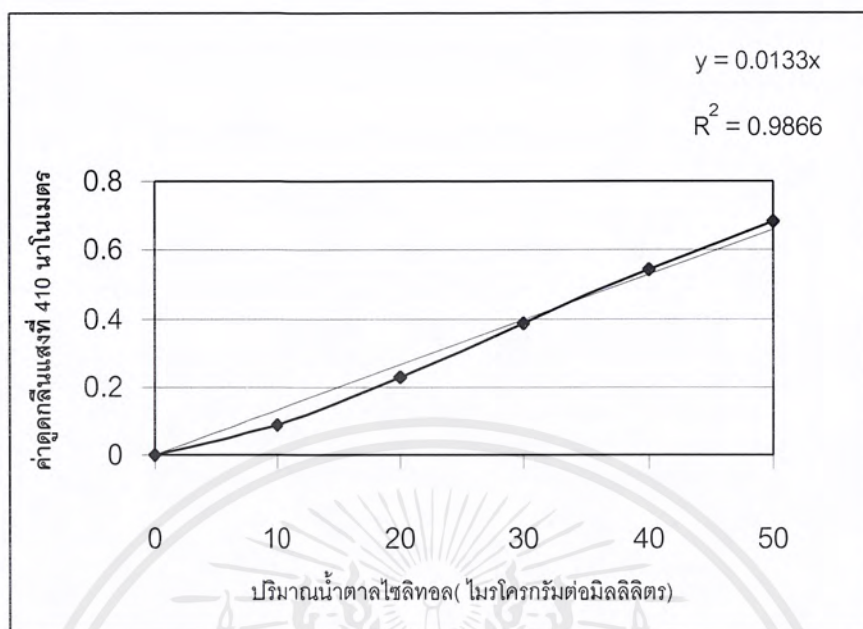
- 3) Pentane-2,4-diol solution(เตรียมใช้ทันที)เตรียมโดยสารละลายแอมโมเนียมอะซีเตต 154.16 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมกรดอะซีติกเข้มข้น ปริมาตร 40 มิลลิลิตร เติม pentane-2,4-dione ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับ ปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร

วิธีการ

- 1) ปิเปตสารละลายความเข้มข้นไซลิทอล 10-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือสารละลายไซลิทอลมาตรฐาน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
- 2) เติม periodate reagent ลงไป 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
- 3) นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
- 4) เติม bltane-2,3-diol 0.002 M ลงไป 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
- 5) เติม pentane-2,4-dione solution ลงไป 2.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
- 6) นำไปบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
- 7) ทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร
- 8) นำค่าการดูดกลืนแสงไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานในภาพผนวกที่ เพื่อหาความเข้มข้นของไซลิทอลในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นของไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 410 นาโนเมตร} \times (\text{อัตราการเจือจาง})}{(\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}) \times (1000)}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลซูโครส

Complete Randomized Design (CRD)

เป็นแบบแผนการทดลองที่มีการจัดสิ่งทดลอง ทั้งหมดลงในหน่วยทดลอง(expermental units) โดยวิธีสุ่ม โดยให้หน่วยทดลองแต่ละหน่วยมีโอกาสได้รับสิ่งทดลองแต่ละชนิดเท่าๆกัน สำหรับ CRD ความแตกต่างระหว่างหน่วยทดลองหลายๆ หน่วยที่ได้รับสิ่งทดลองเดียวกัน เรียกว่า " ความคลาดเคลื่อนของการทดลอง(experimental error) " ดังนั้น CRD จึงเหมาะสำหรับงานทดลองที่มีหน่วยทดลองสม่ำเสมอทั้งหมด ได้แก่ งานทดลองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถควบคุมสิ่งแวดล้อมให้สม่ำเสมอได้ง่าย

การวิเคราะห์ความแปรปรวน การตรวจหาความแตกต่างระหว่างสิ่งทดลองที่ศึกษากระทำโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of varience) โดยที่แหล่งความแปรปรวนของ CRD แบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ ความแปรปรวนของสิ่งทดลอง (treatment variation) และ ความคลาดเคลื่อนของการทดลอง (experimental error) แสดงเป็นรูปตารางได้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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)

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

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

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

- ข. คำนวณค่า Sum of Squares (SS) ขั้นแรกคำนวณค่า correction factor (CF) ก่อน ดังนี้

$$CF = \frac{\text{Total}^2}{t \times r}$$

$$\text{Total SS} = X_1^2 + X_2^2 + \dots - CF$$

$$\text{Treatment SS} = \text{Total treatment}_1^2 + \text{Total Treatment}_2^2 + \dots - CF$$

$$\text{Error SS} = \text{Total SS} - \text{Treatment SS}$$

- ค. คำนวณค่า Mean Square (MS)

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

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

- ง. คำนวณค่า F-value

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

- จ. เปิดตาราง F ที่ Treatment df และ Error df ที่นัยสำคัญ 5% และ 1%
- ฉ. นำค่าที่คำนวณได้ทั้งหมดตั้งแต่ ก-จ ใส่ในตารางวิเคราะห์
- ช. เปรียบเทียบค่า F-value ที่คำนวณได้กับค่า F ที่ได้จากรายการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Least significant difference test (LSD)

เป็นวิธีหาความแตกต่างที่น้อยที่สุดค่าหนึ่ง เพื่อใช้เปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองคู่ใดคู่หนึ่ง มีหลักการใช้ดังนี้

1. ใช้ LSD เมื่อ F-value ในตาราง analysis of variance แสดงค่าความแตกต่างระหว่างสิ่งทดลอง
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 ให้หาค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองคู่ที่นั้นสมมติให้เป็น d เปรียบเทียบค่า d กับค่า LSD ที่คำนวณได้แสดงว่าสิ่งทดลองไม่มีความแตกต่างกัน

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์

จลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สามารถอธิบายได้ดีด้วยสมการของโมนอด (Monod equation) ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$r_x = \frac{\mu_m C_s C_x}{K_s + C_s} \quad (1)$$

เมื่อ r_x คือ อัตราเร็วของการเจริญเติบโตของเซลล์ (kg cells/m³h)

C_s คือ ความเข้มข้นของสับสเตรท (kg carbon source/ m³)

C_x คือ ความเข้มข้นของเซลล์ (kg cells/m³)

ตัวแปรทั้งสามข้างต้นสามารถได้จากข้อมูลของการทดลอง แต่อัตราจำเพาะของการ

เจริญเติบโต (μ_m ; kg cells/kg cells h) และค่าคงที่ของโมนอด (K_s ; kg carbon source/ m³) เป็นพารามิเตอร์ที่ได้จากการวิเคราะห์ข้อมูลของการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาพที่ได้กำหนดเอาไว้ ส่วนอัตราเร็วของการใช้สับสเตรทสามารถอธิบายได้ด้วยสมการต่อไปนี้

$$r_s = \frac{r_x}{Y_{x/s}} + m_s C_x \quad (2)$$

เมื่อ r_s คือ อัตราเร็วของการใช้สับสเตรท (kg carbon source/ m³h)

$Y_{x/s}$ คือ ผลได้ของเซลล์จากสับสเตรท (kg cells/ kg carbon source)

m_s คือ ค่าคงที่บำรุงรักษาเซลล์ (kg carbon source/kg cells h)

r_s เป็นตัวแปร ส่วนที่เหลืออีก 2 ตัว คือ $Y_{x/s}$ และ m_s เป็นพารามิเตอร์ และสำหรับอัตราเร็วของการใช้ในโตรเจนของจุลินทรีย์ ก็สามารถอธิบายได้ด้วยสมการดังนี้

$$r_n = \frac{r_x}{Y_{x/n}} \quad (3)$$

ในสมการที่ 3 r_n เป็นตัวแปร และ $Y_{x/n}$ เป็นพารามิเตอร์ที่จะได้จากการวิเคราะห์จากข้อมูล

การประมาณค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

วิธีที่ 1 Numerical Differentiation method

จากสมการที่ (1)-(3) มีตัวแปรอยู่ 3 ตัว ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างของการทดลองการหมัก ได้แก่ C_x , C_s และ C_n ซึ่งเป็นความเข้มข้นของเซลล์ สับสเตรท และไนโตรเจน ตามลำดับ ส่วนอัตราเร็วของการเจริญเติบโต (r_x) การใช้สับสเตรท (r_s) การใช้ไนโตรเจน (r_n) สามารถคำนวณได้จากการทำสมมูลดังนี้

Rate of accumulation or depletion the system = Rate of growth or consumption

โดยที่อัตราเร็วของการสะสมหรือการลดลงทางด้านซ้ายมือ เป็นค่าของสัดส่วนระหว่างความเข้มข้นที่เปลี่ยนแปลงไปกับช่วงเวลา ดังนี้คือ

$$\frac{\text{Concentration}_2 - \text{Concentration}_1}{\text{Time}_2 - \text{Time}_1}$$

ตัวอย่างเช่น ในกรณีของเซลล์จะได้ว่า

$$\frac{C_{x2} - C_{x1}}{t_2 - t_1} = \frac{\Delta C_x}{\Delta t} = \frac{dC_x}{dt} \quad (\text{as } t \text{ become small})$$

ดังแสดงวิธีการคำนวณ (Numerical Differentiation method) เอาไว้ข้างล่าง

ตัวอย่างการคำนวณอัตราเร็วของการเจริญเติบโต ที่เวลา 14 ชม

$$\frac{dC_x}{dt} = \frac{8.0 - 4.49}{2} = 1.755 \text{ kg/m}^3\text{h}$$

จากตัวอย่างการคำนวณข้างบน เราจะได้อัตราเร็วของการเจริญเติบโต (r_x) การใช้สับสเตรท (r_s) การใช้ไนโตรเจน (r_n) ที่เวลาต่างๆ ซึ่งได้แสดงเอาไว้ในตารางที่ 1 ในคอลัมน์ที่ 5, 6 และ 7 ตามลำดับ

ตารางที่ ๑1 ตัวอย่างผลการทดลองจากการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ (yeast fermentation)

t (h)	C_x (kg/m ³)	C_s (kg/m ³)	C_n (kg/m ³)	r_x (kg/m ³ h)	r_s (kg/m ³ h)	r_n (kg/m ³ h)

1.1 การประมาณค่า μ_m และ K_s
จากสมการที่ (1) จะได้ว่า

$$\mu = \frac{r_x}{C_x} = \frac{\mu_m C_s}{K_s + C_s} \quad (1a)$$

จัดรูปสมการ (1a) เสียใหม่ โดยกลับเศษเป็นส่วนทั้งสองข้าง ก็จะได้สมการเส้นตรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(สมการ 1b) ที่มี Slope เท่ากับ K_s และจุดตัดแกน Y เท่ากับ 1 โดยทำการเขียนรูป

$$\text{กราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง } \frac{\mu^m}{C_s} \text{ (แกน X) และ } \frac{1}{\mu} (= \frac{C_x}{r_x}) \text{ (แกน Y)}$$

ซึ่งเรียกสมการในรูปนี้ว่า Lineweaver-Burk plot

$$\frac{1}{\mu} = \frac{C_x}{r_x} = \frac{K_s}{\mu^m} \frac{1}{C_s} + \frac{1}{\mu^m} \tag{1b}$$

รูปที่ 1 แสดงผลการเขียนรูปกราฟตามสมการ (1b) ซึ่งจะได้ว่า

Y-intercept = $\frac{1}{\mu^m}$

Slope = $\frac{K_s}{\mu^m}$

1.2 การประมาณ

จากสมการที่ 2 จะได้ว่า

$$q_s = \frac{r_s}{C_x} = \frac{1}{Y_{x/s}} r_x + m_s$$

จะเห็นได้ว่าสมการ เป็นสมการเส้นตรงที่มี Slope เท่ากับ $1/Y_{x/s}$ และจุดตัดแกน Y เท่ากับ m_s โดยการเขียนกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $r_x/C_x (= \mu)$ (แกน X) และ $q (= r_s/C_x)$ (แกน Y) ผลการเขียนรูปกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ตามสมการ

Y- intercept = m_s

Slope = $1/Y_{x/s}$

ค่าต่างที่ได้ จะได้จากการนำตารางที่ได้และคำนวณได้นั้นไป plot กราฟ

ภาคผนวก ง
ข้อมูลจากการทดลอง

ตารางที่ ง1 แสดงปริมาณของเซลล์ที่กลูโคสความเข้มข้นต่างๆ

ชั่วโมงที่	ปริมาณกลูโคส				
	10 g/l	15 g/l	20 g/l	25 g/l	30 g/l
0	0.0147	0.0144	0.01224	0.0129	0.0136
2	0.0216	0.02952	0.02304	0.023	0.0183
4	0.0666	0.0874	0.0928	0.08136	1047
6	0.2116	0.2113	0.2235	0.2988	4449
8	0.5904	0.7574	0.6948	0.8028	7797
10	1.0184	1.3089	0.959	1.0702	1.0378
12	2.2374	2.192	1.6963	1.5908	1.3024
14	2.9818	2.6056	2.2334	107899	1.5879
16	3.5499	3.4866	2.4616	2.8011	2.3025
18	3.691	3.5074	3.6288	3.2644	2.6676
19	3.8908	4.0057	3.3391	3.5352	3.4027
20	4.3401	4.2202	4.2786	4.0971	3.5604
21	4.604	4.2602	4.2073	402789	3.3645
22	4.3718	4.3761	4.3056	3.987	3.6673
23	4.5284	4.4038	4.226	3.969	3.7839
24	4.4074	4.3887	4.2638	4.0446	3.8217
25	5.1861	5.3337	4.3282	5.1181	4.6796
26	5.2124	4.9744	4.4946	4.7476	4.4564
27	5.4356	5.2617	4.5511	5.0576	4.7289

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง2 แสดงปริมาณเซลล์ที่ระดับของเซลล์เริ่มต้นต่างๆ

ชั่วโมง	ปริมาณเชื้อที่เติมลงไปเริ่มต้น					
	5%	6%	7%	8%	9%	10%
0	0.005	0.0072	0.0093	0.0115	0.0133	0.01548
2	0.028	0.0388	0.046	0.0619	0.0784	0.0792
4	0.0885	0.1098	0.1288	0.1404	0.1483	0.1616
6	0.2404	0.2728	0.2851	0.3002	0.3193	0.3499
7	0.4296	0.4478	0.4906	0.5461	0.567	0.6307
8	0.7398	0.7678	0.81	0.8877	0.9595	1.0033
9	1.054	0.9936	1.1692	1.2261	1.288	1.3312
10	1.4612	1.5465	1.6318	1.7539	1.9051	2.0347
11	1.9877	1.944	2.106	2.3117	2.4381	2.5288
12	2.3245	2.4235	2.5581	2.7403	2.8749	3.0828
13	3.31578	3.3813	3.531	3.7299	3.8118	4.0388
14	4.9455	5.0535	5.1345	5.4891	5.5845	5.715
15	5.434	5.5175	5.4837	5.8516	5.7628	5.7889
16	5.859	5.446	5.5744	5.9929	5.7976	5.5297
17	5.8627	5.4648	6.273	5.637	5.441	6.2845
19	6.9552	6.3756	6.2307	6.0921	6.3	6.3504
20	7.0696	6.5512	6.6031	6.642	6.6549	6.5188
21	6.933	6.6798	6.7199	6.7865	6.8198	6.9264
23	7.1463	7.3429	6.7602	6.9849	7.1955	6.5988
24	7.452	7.2288	7.2072	6.912	7.308	6.7752
25	7.0036	6.9593	6.6272	6.8117	6.07453	6.6567
26	6.9962	7.1881	6.8594	6.9508	6.9372	6.5903
27	6.8929	7.011	6.9445	7.1069	6.9667	7.0257
28	6.9445	7.0995	6.9298	7.0257	7.3209	6.6641
29	7.0921	7.439	7.0995	7.0405	7.2988	7.1733
30	7.8006	7.3283	6.915	7.1217	7.4833	7.3062

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณเซลล์ที่เปปโตความเข้มข้นต่างๆ (กรัมต่อลิตร)

ชั่วโมงที่	ปริมาณเปปโต			
	3 g/l	5g/l	7g/l	10g/l
0	0.009	0.0104	0.01	0.0104
2	0.0219	0.0248	0.0244	0.0244
4	0.0741	0.0802	0.0759	0.0741
6	0.2196	0.2235	1983	0.2062
8	0.6375	0.6361	6033	0.5882
10	1.2844	1.297	1.2286	1.2546
12	2.1884	2.331	2.2111	2.1949
14	3.0913	3.1993	3.105	3.0589
16	3.447	3.6943	3.645	3.6583
18	4.014	4.1461	4.0986	4.2411
19	4.1698	4.2292	4.8884	4.2483
20	4.2768	4.4431	4.4668	4.2292
21	4.437	4.8884	4.5201	4.2368
22	4.455	4.627	4.3362	4.5676
23	4.558	4.7757	4.7757	4.8528
24	4.95	4.615	4.805	4.793

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงปริมาณเซลล์ที่ความเข้มข้นสารสกัดยีสต์ที่ปริมาณต่างๆ (กรัมต่อลิ

ชั่วโมงที่	ปริมาณสารสกัดยีสต์			
	3g/l	5g/l	7g/l	10g/l
0	0.0111	0.01	0.0108	0.01
2	0.0237	0.023	0.0237	0.0248
4	0.0673	0.0648	0.0676	0.0691
6	0.1767	0.1674	0.1699	0.1731
8	0.4892	0.4399	0.4311	0.4507
10	1.243	1.2114	1.171	1.2682
12	2.5131	2.3947	2.485	2.5354
14	3.996	3.9934	4.0366	3.9852
18	5.3283	5.2689	5.1264	5.5303
19	5.5004	5.536	5.4115	5.5303
20	5.5123	5.6667	5.4766	5.8165
21	5.5065	5.7322	5.643	5.8392
22	5.6905	5.6192	5.6192	5.8629
23	5.4529	5.72	5.6253	5.6253
24	6.3847	5.7236	5.7124	5.7463

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณเซลล์ที่แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆ

ชั่วโมงที่	ปริมาณ ammonium sulfate				
	2 g/l	3 g/l	5 g/l	7 g/l	10 g/l
0	0.0108	0.01	0.0097	0.0097	0.01
2	0.0295	0.0151	0.0162	0.0158	0.0165
4	0.0853	0.0439	0.0403	0.0399	0.0417
6	0.2192	0.1108	0.108	0.1054	0.1126
8	0.5598	0.2606	0.2509	0.2451	0.2498
10	1.3183	0.8136	0.7632	0.7711	0.7722
12	2.3619	1.6538	1.5422	1.5469	1.445
14	3.4963	2.9455	2.8728	2.9646	2.673
16	3.996	3.348	3.2446	3.2716	3.258
18	4.4488	4.3005	4.4074	4.6926	4.2339
19	4.0867	4.4132	4.4074	4.2681	4.0986
20	4.7876	4.6389	5.2572	5.0371	4.6033
21	4.06983	4.847	4.9478	4.7638	3.6176
22	4.7401	5.144	5.144	5.144	4.3362
23	4.9716	5.3697	5.2984	5.239	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณเซลล์ที่ระดับความเร็วรอบต่างๆกัน

ชั่วโมงที่	ความเร็วรอบ (rpm)			
	250 rpm	280 rpm	300 rpm	320 rpm
0	0.0111	0.0111	0.009	0.0162
2	0.0255	0.0255	0.0223	0.0216
4	0.0705	0.0741	0.0658	0.0572
6	0.1378	0.1908	0.2296	0.163
8	0.4122	0.4888	0.5202	0.4845
10	1.2697	1.1275	1.1754	1.1293
12	2.37	2.1528	2.3068	2.08
14	2.9293	3.4783	3.2184	3.1428
16	4.0363	4.0183	4.068	3.8203
18	4.4251	4.3408	4.437	4.4668
19	4.5676	4.2649	4.5619	4.4906
20	4.6508	4.8528	4.4906	4.4132
21	4.9359	5.1084	4.4312	4.5799
22	5.0313	5.3992	4.55	4.6569
23	5.0907	5.322	5.1084	4.33
24	5.2804	5.3341	5.04288	4.3329

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 ปริมาณเซลล์,ค่าพีเอช,ปริมาณไนตริกออกไซด์ และปริมาณกลูโคสที่ลดลงที่ไซโลสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร

ชั่วโมงที่	ค่าพีเอช	ปริมาณเซลล์ (g/l)	ปริมาณไนตริกออกไซด์ (g/l)	กลูโคสที่ลดลง (g/l)
0	5.84	0.0108	0.0143	10
2	5.43	0.0324	0.0146	10
3	5.11	0.0468	0.0153	9.95
4	5.09	0.1044	0.038	10
6	5.11	0.0165	0.066	9
7	5	0.2966	0.0906	9
8	4.95	0.8496	0.0981	9
11	4.9	1.6156	0.1186	8.75
12	4.5	1.8288	0.1357	8.33
14	4.36	2.1852	0.1432	7.45
15	4.11	3.033	0.1915	6.21
19	4	3.6226	0.6894	3.09
23	3.86	4.5205	2.4631	1.08
25	3.72	4.4488	2.6333	0.5
27	3.78	4.6353	2.9142	0.425
31	4.16	4.8859	4.439	0.098
35	3.72	5.0456	4.8045	0.097
43	3.5	5.0407	5.015	0.096
47	3.47	5.4219	8.3909	0.089
51	3.46	5.0472	10.015	0.053
55	3.43	5.5296	11.1278	0.058
59	3.43	504352	16.3308	0.042

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมงที่	ค่าพีเอช	ปริมาณเซลล์ (g/l)	ปริมาณไซลิทอล (g/l)	กลูโคสที่ลดลง (g/l)
63	3.43	5.3956	16.6842	0.039
67	3.42	5.4082	16.8421	0.032
71	3.33	5.2272	17.5037	0.056
75	3.3	5.4129	19.4285	0.03
79	3.31	5.9616	19.7894	0.029
83	3.2	5.706	20.2105	0.03
87	3.16	5.7355	23.0375	0.036
91	3.15	5.8428	24.4812	0.034

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 ปริมาณเซลล์,ค่าพีเอช,ปริมาณไนลิตทอล และปริมาณกลูโคสที่ลดลงที่ไซโลสเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร

ชั่วโมงที่	pH	ปริมาณเซลล์ (g/l)	ปริมาณไนลิตทอล (g/l)	กลูโคส (g/l)
0	5.73	0.0248	0.0124	10
2	5.7	0.0342	0.0127	10
3	5.69	0.0446	0.0127	10
4	5.69	0.0172	0.0319	10
6	5.67	0.2235	0.0461	9
7	5.68	0.2577	0.0604	9
8	5.45	0.9144	0.0745	8.5
11	5.14	1.2632	0.0843	8.75
15	4.25	1.836	0.1279	6.09
19	4.2	2.3698	0.2556	4.01
23	4.01	2.5786	0.662	4.2
25	4.02	2.6114	0.6804	4.35
27	3.84	2.683	2.3278	3.09
31	3.77	2.7039	3.6857	1.992
35	3.72	3.4869	5.3233	1.762
39	3.6	2.9016	5.5563	0.723
43	3.55	3.216	6.5936	0.321
47	3.52	3.4441	8.6165	0.099
51	3.65	3.488	10.7894	0.056
55	3.46	3.5121	13.8496	0.043
59	3.45	3.5215	16.9022	0.048
63	3.43	3.5683	17.6616	0.042
67	3.41	3.3156	19.9248	0.039
71	3.39	3.5802	20.9022	0.025
75	3.35	3.3933	21.2782	0.021
79	3.32	3.5964	24.7218	0.028
83	3.32	3.6234	24.7218	0.023
87	3.3	3.6082	27.3383	0.021
91	3.28	3.6572	27.5188	0.016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 ปริมาณเซลล์,ค่าพีเอช,ปริมาณไนลิทอลและปริมาณกลูโคสที่ลดลงที่ไซโลสเข้มข้น 300 กรัมต่อลิ

ชั่วโมงที่	ค่าพีเอช	ปริมาณเซลล์ (g/l)	ปริมาณไนลิทอล(g/l)	กลูโคสที่ลดลง(g/l)
0	5.52	0.0154	0.0123	10
2	5.41	0.0306	0.0121	10
3	5.46	0.0388	0.0124	9.5
4	5.5	0.1101	0.0154	9.1
6	5.24	0.1443	0.038	9.2
7	5.21	0.1584	0.0487	9.23
8	5.35	0.2192	0.0466	8.56
10	5.41	0.594	0.0557	7.45
11	5.43	0.6375	0.06	7.01
12	5	0.5616	0.0602	6.02
14	4.99	0.5796	0.0669	5.01
15	4.96	0.576	0.0711	4.52
19	4.88	0.7725	0.1045	4.21
23	4.8	0.4698	0.2447	4.03
25	4.75	0.6487	0.327	4.35
27	4.64	0.7725	0.4015	3.92
31	4.54	0.6994	0.4646	2.06
35	4.4	0.6994	1.2443	0.91
39	4.1	0.7192	1.4819	0.63
43	4	0.6969	1.7503	0.06
47	3.47	0.7642	2.8308	0.059
51	3.5	0.9928	3.5639	0.048
55	3.35	0.9554	6.4511	0.039
59	3.21	0.9223	6.827	0.038

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมงที่	ค่าพีเอช	ปริมาณเซลล์ (g/l)	ปริมาณไซลิทอล(g/l)	กลูโคสที่ลดลง(g/l)
63	3.18	0.932	9.9624	0.029
67	3.12	0.9554	9.9699	0.021
71	3.02	0.8337	10.7894	0.0199
75	3	1.157	12.2105	0.0197
87	2.7	1.1754	18.421	0.0197
91	2.84	1.2776	21.9548	0.0182



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้