สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตน้ำตาลซอร์บิทอลโดยเชื้อ *Zymomonas mobilis* TISTR 551 จากน้ำตาลเชิงพาณิชย์

นายบำรุงศักดิ์ ปุริโส
นางสาวบุณฑริก ภูมิรา
นางสาวปรารถนา เหล็กนุช

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2543

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....39883
วัน, เดือน, ปี.....11 ก.ค. 2544
.b.....
.i.....
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Production of Sorbitol by *Zymomonas mobilis* TISTR 551 from Commercial Sugar

Mr. Bumrungsak Puriso

Miss Boondarick Pumira

Miss Pratthana Leaknuch

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

2000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตซอร์บิทอลโดยเชื้อ *Zymomonas mobilis* TISTR 551 จากน้ำตาลเชิงพาณิชย์

Production of sorbitol by *Zymomonas mobilis* TISTR 551 from commercial sugar

โดย นายบำรุงศักดิ์ ปุริโส

นางสาวบุณฑริก ภูมิรา

นางสาวปรารถนา เหล็กนุช

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์

รศ. สุขใจ ชูจันทร์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

---------- หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

(ผศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

---------- ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ลินจง สุขลำภู)

---------- กรรมการ

(อาจารย์ ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์)

---------- กรรมการ

(รศ. สุขใจ ชูจันทร์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตซอร์บิทอลโดยเชื้อ *Zymomonas mobilis* TISTR 551 จากน้ำตาลเชิงพาณิชย์

โดย นายบำรุงศักดิ์ ปุริโส
นางสาวบุณฑริก ภูมิรา
นางสาวปรารถนา เหล็กนุช

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์
รศ. สุขใจ ชูจันทร์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา 2543

บทคัดย่อ

การศึกษาการผลิตซอร์บิทอลโดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* TISTR 551 ซึ่งซอร์บิทอลสามารถผลิตโดยใช้เอนไซม์กลูโคสฟรุกโตสออกซิโดรีดักเทส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการผลิตซอร์บิทอลจากฟรุกโตส พบว่าการหมักด้วยเชื้อนี้ที่ปริมาณหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ ในอาหาร Z-broth ที่มีน้ำตาลกลูโคสกับฟรุกโตสในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ความเข้มข้นน้ำตาล 15 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณอาหาร 100 มิลลิลิตร ในฟลาส์กขนาด 125 มิลลิลิตร พีเอช 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยการทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ไม่มีการเขย่า มีอัตราการใช้ฟรุกโตส 15.7632 กรัมต่อลิตรชั่วโมงกรัมเซลล์ ณ ชั่วโมงที่ 29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Production of sorbitol by *Zymomonas molilis* TISTR 551 from commercial sugar

Name Mr. Bumrungsak Puriso
Miss. Boondarick Pumira
Miss. Prattana Leknuch

Special Project Advisor Mr. Prasit Deewatthanawong
Associate Professor Sukjai Choojan

Department Applied Biology

Academic Year 2000

Abstract

Studying for sorbitol production by *Zymomnas mobilis* TISTR 551. Sorbitol can be produces by glucose-fructose oxidoreductase that is important enzyme for producing sorbitol from fructose. This fermentation used 5 % inoculum size in z-broth medium containing glucose : fructose (1 : 1) that we used these sugar 15 % of 100 ml medium in 125 ml flask pH 6 at 30 ^{o}C . The cultivation of unshaking condition and rate maximum fructose 15.7632 g/l hr g_{cell} at 29 hrs.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งทำสำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์สุขใจ ชูจันทร์ และอาจารย์ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่กรุณาให้คำปรึกษาระหว่างการค้นคว้าวิจัย ให้ความอนุเคราะห์อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง รวมถึงการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ลินจง สุขลำภู ประธานกรรมการในโครงงานพิเศษ และช่วยในการตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษให้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ สำหรับใช้ในการทดลอง

ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความเคารพยิ่ง ขอขอบคุณเพื่อน ๆ โดยเฉพาะสมาชิกภายในกลุ่มที่สร้างความแข็งแกร่งให้และทุกท่านที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษามาตลอด รวมถึงมีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

นายบำรุงศักดิ์ ปุริโส
นางสาวบุณฑริก ภูมิรา
นางสาวปรารถนา เหล็กนุช

คณะผู้จัดทำ
มีนาคม 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	10
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	14
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	28
เอกสารอ้างอิง	29
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	31
ภาคผนวก ข ข้อมูลผลการทดลอง	32
ภาคผนวก ค วิธีวิเคราะห์น้ำตาลและกราฟมาตรฐานของน้ำตาล	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบปริมาณหัวเชื้อที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ กับอัตราการเจริญจำเพาะ	14
ตารางที่ 4.2 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของปริมาณหัวเชื้อที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ	15
ตารางที่ 4.3 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของอัตราการเติบโตจำเพาะเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ	16
ตารางที่ 4.4 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของอัตราการใช้ฟรุกโตสเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ	16
ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบอัตราการเติบโตจำเพาะ อัตราการใช้กลูโคสและอัตราการใช้ฟรุกโตสเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ	17
ตารางที่ 4.6 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของอัตราการเติบโตจำเพาะเมื่อใช้อุณหภูมิต่างๆ	20
ตารางที่ 4.7 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของอัตราการใช้ฟรุกโตสเมื่อใช้อุณหภูมิต่าง ๆ	20
ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบอัตราการเติบโตจำเพาะ อัตราการใช้กลูโคสและอัตราการใช้ฟรุกโตสเมื่อใช้อุณหภูมิต่าง ๆ	21
ตารางที่ 4.9 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของอัตราการเติบโตจำเพาะเมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ	23
ตารางที่ 4.10 วิเคราะห์ความแตกต่างของอัตราการใช้ฟรุกโตสเมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ	23
ตารางที่ 4.11 เปรียบเทียบอัตราการเติบโตจำเพาะ อัตราการใช้กลูโคสและอัตราการใช้ฟรุกโตสเมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลต่าง ๆ	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางภาคผนวกที่ ข1 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อในปริมาณหัวเชื้อหัวเชื้อที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ 32
ตารางภาคผนวกที่ ข2 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อในแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ 33
ตารางภาคผนวกที่ ข3 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลงเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ 33
ตารางภาคผนวกที่ ข4 ปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสที่ลดลงเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ 34
ตารางภาคผนวกที่ ข5 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อเมื่อใช้อุณหภูมิต่าง ๆ 34
ตารางภาคผนวกที่ ข6 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลงเมื่อใช้อุณหภูมิต่าง ๆ 35
ตารางภาคผนวกที่ ข7 ปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสที่ลดลงเมื่อใช้อุณหภูมิต่าง ๆ 35
ตารางภาคผนวกที่ ข8 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อในความเข้มข้นน้ำตาลที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ 36
ตารางภาคผนวกที่ ข9 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ 37
ตารางภาคผนวกที่ ข10 ปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสที่ลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของซอร์บิทอล 3
ภาพที่ 2.2 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยเอนไซม์กลูโคสออกซิโดรีดักเทส (glucose-fructose oxidoreductase) 9
ภาพที่ 4.1 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ 15
ภาพที่ 4.2 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ 18
ภาพที่ 4.3 เปรียบเทียบการใช้กลูโคสเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ 18
ภาพที่ 4.4 เปรียบเทียบการใช้ฟรุกโตสเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ 19
ภาพที่ 4.5 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อใช้อุณหภูมิต่าง ๆ 21
ภาพที่ 4.6 เปรียบเทียบการใช้กลูโคสเมื่อใช้อุณหภูมิต่าง ๆ 22
ภาพที่ 4.7 เปรียบเทียบการใช้ฟรุกโตสเมื่อใช้อุณหภูมิต่าง ๆ 22
ภาพที่ 4.8 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลต่าง ๆ 25
ภาพที่ 4.9 เปรียบเทียบการใช้กลูโคสเมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลต่าง ๆ 25
ภาพที่ 4.10 เปรียบเทียบการใช้ฟรุกโตสเมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลต่าง ๆ 26
ภาพที่ ค1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส 40
ภาพที่ ค2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลฟรุกโตส 42
ภาพที่ ค3 กราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้ง 44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

สารให้ความหวานพลังงานต่ำ (Sugarless syrup) เป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์สูตรต่าง ๆ ที่ผลิตขึ้นเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติพิเศษ คือ ให้พลังงานต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลที่ใช้บริโภคกันอยู่ทั่วไป นอกจากนี้ยังให้ความหวานน้อยกว่า และช่วยป้องกันฟันผุ ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวจึงทำให้เป็นที่นิยมบริโภคในหมู่บุคคลทั่วไปรวมทั้งผู้ป่วยโรคเบาหวาน ผลิตภัณฑ์ประเภทนี้ใช้ผสมใน ลูกอม แฮม แยม ไส้กรอก และซอสบาร์บีคิว เป็นต้น (นิราม, 2532)

ซอร์บิทอลพบครั้งแรกในปี คศ. 1872 ในผลไม้สดมีประมาณ 5 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ พวกพลัม แอปเปิ้ล องุ่น พีช ลูกแพร์ แอปปริคอท และผลนัท นอกจากนี้ยังพบในสาหร่ายและในใบยาสูบด้วย ซอร์บิทอล แต่ปริมาณที่พบในอาหารตามธรรมชาติไม่มากเพียงพอที่จะนำมาใช้ในอุตสาหกรรมได้ จึงต้องมีการสังเคราะห์ขึ้นมา ปัจจุบันซอร์บิทอลที่ใช้กันอยู่สังเคราะห์มาจากกระบวนการแคททาไลติกไฮโดรจีเนชัน (catalytic hydrogenation) จากเดกซ์โตสโดยใช้นิเกิลเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ภายใต้อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส ความดัน 100-150 บรรยากาศ ซึ่งเป็นภาวะที่รุนแรง อาจก่อให้เกิดอันตรายและก่อปัญหาทางสภาวะแวดล้อมจากการกำจัดนิเกิล อีกทั้งยังใช้ต้นทุนผลิตค่อนข้างสูง (ลดาวัลย์, 2526)

ซอร์บิทอลใช้มากในการสังเคราะห์วิตามินซี และมีการใช้ซอร์บิทอลแทนน้ำตาลในผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน และผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก นอกจากนี้ยังใช้เป็นส่วนผสมของยา เครื่องสำอาง เส้นใย โพลีเมอร์ และในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารอีกมากมาย (วิจิตรา, 2541)

ในการทดลองนี้จะเป็นศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตซอร์บิทอลของเชื้อ *Zymomonas mobilis* TISTR 551 ได้แก่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น อัตราส่วนระหว่างน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโทส ความเข้มข้นของน้ำตาล ตรวจสอบสภาวะต่างๆเหล่านี้จะนำมาใช้เป็นข้อมูลในการผลิต และการนำไปขยายขนาดการผลิตเพื่อให้ได้ผลผลิตมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาการปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Zymomonas mobilis* TISTR 551
2. เพื่อศึกษาสารตั้งต้นที่เหมาะสมการเจริญของเชื้อ *Zymomonas mobilis* TISTR 551 และสารตั้งต้นที่เชื้อสามารถผลิตน้ำตาลซอร์บิทอลได้มากที่สุด
3. เพื่อศึกษาปัจจัยอื่น ๆ ที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลซอร์บิทอล

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

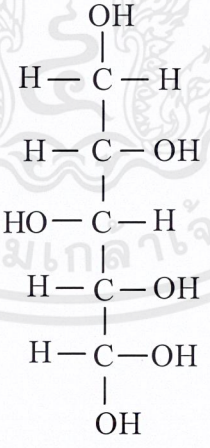
1. ทำให้ทราบถึงปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้นและสารตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Zymomonas mobilis* TISTR 551 ในการผลิตน้ำตาลซอร์บิทอล
2. ทำให้ทราบถึงสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลซอร์บิทอล เพื่อประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

ซอร์บิทอล (Sorbitol) หรือเรียกอีกชื่อว่าดี-กลูซิทอล (D-glucitol) หมายถึงสารอินทรีย์จำพวกเฮกซะไฮดริกแอลกอฮอล์ (hexahydric alcohol) หรือที่เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า เฮกซิทอล (hexitol) มีสูตรเคมี $C_6H_8(OH)_6$ (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2538)

โพลิไฮดริกแอลกอฮอล์ (polyhydric alcohol) หรือที่เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า โพลิออล (polyol) หมายถึง สารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยกลุ่มไฮดรอกซิล 3 กลุ่ม เรียกว่า กลีเซอรอล หรือมากกว่า 3 กลุ่ม เรียกว่า น้ำตาลแอลกอฮอล์ มีสูตรเคมี $CH_2OH(CHOH)_nCH_2OH$ เมื่อ n มีค่า 2 ถึง 5 (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2538)



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของซอร์บิทอล

ที่มา : กระทรวงอุตสาหกรรม (2538)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติทางกายภาพ (กุลยา, 2523)

1. ซอร์บิทอลมีลักษณะเป็นผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น
2. มีความหวานประมาณ 60 เปอร์เซ็นของน้ำตาลซูโครส
3. ให้พลังงาน 3 แคลอรีต่อกรัม
4. เมื่อรับประทานซอร์บิทอลในรูปผลึกจะรู้สึกเย็นลิ้นและมีรสซ่าคล้ายเมนทอลเนื่องจากมีค่าความร้อนของการละลายเป็นลบ (-110 กิโลจูลต่อกรัม)
5. ละลายน้ำได้อย่างสมบูรณ์ ในของเหลวใส ไม่มีสี มีความหนืดน้อยกว่าสารละลายของน้ำตาลเมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นเดียวกัน นอกจากนี้ซอร์บิทอลยังสามารถละลายได้เล็กน้อยในเมทานอล เอทานอล และกรดน้ำส้ม
6. ดูดซับความชื้นได้ดี ช่วยลดการสูญเสียน้ำในอาหาร
7. มีจุดหลอมเหลวประมาณ 92.7 ถึง 97.2 องศาเซลเซียส

คุณสมบัติทางเคมี (นิรนาม, 2532)

1. ซอร์บิทอลมีความคงตัวแม้ในที่มีอุณหภูมิสูงหรือในสภาวะที่เป็นกรดด่างเพราะมีหมู่คาร์บอนีล (C=O) ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งว่องไวในการทำปฏิกิริยาถูกรีดิวซ์ด้วยไฮโดรเจน
2. ซอร์บิทอลไม่เกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ซึ่งทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลไหม้

การเปลี่ยนแปลงทางเคมีในทางโภชนาการ (Metabolism) (นิรนาม, 2532)

ซอร์บิทอล เป็นสารอาหารในร่างกายซึ่งให้พลังงาน 4.1 กิโลแคลอรีต่อกรัม (เท่ากับพลังงานจากน้ำตาล) ซอร์บิทอลจะถูกดูดซึมช้า ๆ ผ่านลำไส้ และจะถูกเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วในตับให้เป็นฟรุกโตสโดยไม่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมนอินซูลินซึ่งเป็นตัวควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด เนื่องจากซอร์บิทอลถูกดูดซึมได้ช้า จึงมีฤทธิ์เป็นยาถ่ายถ้ารับประทานมากเกินไป ปริมาณบริโภคสำหรับผู้ใหญ่ไม่ควรเกิน 60 ถึง 80 กรัมต่อวัน ในเด็กอายุ 5 ถึง 16 ปีไม่ควรเกิน 30 ถึง 40 กรัมต่อวัน ปริมาณบริโภคในแต่ละครั้งสำหรับผู้ใหญ่ ไม่ควรเกิน 20 กรัมต่อวัน และในเด็ก ไม่ควรเกิน 10 กรัมต่อวัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์ต่อฟัน (นิราม, 2532)

โดยปกติเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปากจะย่อยน้ำตาลและคาร์โบไฮเดรตให้เป็นกรด ซึ่งจะไปทำลายแคลเซียของฟัน ทำให้ฟันผุ กรดส่วนใหญ่จะเป็นกรดแลคติก จากการศึกษาพบว่า กรดแลคติกจากการย่อยซอร์บิทอลจะมีปริมาณต่ำกว่ากรดแลคติกจากการย่อยน้ำตาลมาก ค่าพีเอชจึงไม่ต่ำจนทำให้ฟันเริ่มผุได้

การประยุกต์ใช้ซอร์บิทอลในอุตสาหกรรมอาหาร (นิรนาม, 2532)

1.อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ขนมอบ ขนมเค้ก ท็อฟฟี่ ลูกอม ลูกกวาด แยม มัสตาร์ด มายองเนส น้ำสลัด (นิรนาม, 2532)

- เป็นสารให้ความหวานแทนน้ำตาลในอาหารหรือเครื่องดื่ม สำหรับผู้เป็นโรคเบาหวานและผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก
- ช่วยการคงรูปของสี กลิ่น และลักษณะของเครื่องดื่ม
- ช่วยให้เนื้อขนมมีความเนียนนุ่ม ไม่แห้งกระด้าง
- ในท็อฟฟี่ที่ผสมถั่ว เม็ดอัลมอนด์ ซอร์บิทอลจะช่วยให้ไขมันเหม็นหืนช้าลง
- ในลูกกวาด ซอร์บิทอลจะช่วยไม่ให้เกิดผลึกน้ำตาล ผิวของลูกกวาดจึงดูใสเรียบและไม่เหนียวเหนอะหนะ
- ช่วยให้แยมมีสี กลิ่น รสดีขึ้น เก็บรักษาได้นาน
- ถ้าใส่ซอร์บิทอลในปริมาณที่เหมาะสม จะช่วยลดค่าน้ำอิสระ (water activity) ของของเหลว จุลินทรีย์จึงเจริญเติบโตไม่ได้ อาหารไม่เสียเร็ว เก็บอาหารได้นานขึ้น

2.อุตสาหกรรรมยาและเภสัชกรรม (นิรนาม, 2532)

- ใช้เป็นยาถ่าย
- เป็นตัวพา (carrier) ในการเตรียมเภสัชภัณฑ์และช่วยแต่งกลิ่นรส
- ใช้ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจน (antioxidant) ของสารที่ถูกออกซิไดส์ได้ง่าย
- ใช้ในการสังเคราะห์กรดแอสคอบิก (วิตามินซี) และการคงตัวของวิตามิน
- ในเภสัชภัณฑ์ที่เป็นครีม ของเหลวแขวนลอยและอีมัลชัน (ของเหลวสองชนิดที่ไม่ละลายเข้ากัน) ซอร์บิทอลจะช่วยให้การแยกชั้น (phase separation) ช้าลง ไม่แยกให้เห็นเป็นชั้นไขมัน และยังช่วยรักษาความชุ่มชื้น
- ใช้เป็นยาขับปัสสาวะ โดยให้ทางหลอดเลือดดำ เพื่อลดอาการบวม
- ใช้ลดความดันในซีโรโบสไพนอล (cerebrospinal)
- ใช้ลดความดันภายในลูกตา จึงใช้เป็นยารักษาโรคต้อหิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ใช้เป็นตัวทำละลายในยาเตรียมต่างๆ และแทนกลีเซอรีนได้ในการเป็นตัวดูดความชื้นในยาเตรียม ซึ่งในยาเตรียมมักใช้ความเข้มข้นประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อน้ำหนักของสารละลาย

3.อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ยาสีฟัน น้ำยาบ้วนปาก (นิรนาม, 2532)

- ในครีม โลชัน ซอร์บิทอลจะช่วยให้ความชุ่มชื้น เนื้อครีมไม่แห้งหรือข้นจนเหนอะหนะเวลาใช้
- ให้รสหวาน เย็นลิ้น ชุ่มปาก ไม่ระคายเคืองต่อเยื่อบุช่องปาก ไม่ทำให้ฟันผุ เนื่องจากกรดแลคติกจากการย่อยซอร์บิทอลโดยจุลินทรีย์ในช่องปาก จะมีปริมาณต่ำกว่ากรดแลคติกจากการย่อยน้ำตาลมาก ค่าพีเอช จึงไม่ต่ำจนทำให้ฟันเริ่มผุได้

4.อุตสาหกรรมเครื่องหนัง สิ่งทอ กาว เครื่องแก้ว พลาสติก หมึกพิมพ์ (นิรนาม, 2532)

- ช่วยเพิ่มสีสันและความเงางามของหนัง
- ผสมกับสารอื่นเพื่อเคลือบเส้นด้าย ช่วยให้เส้นด้ายเป็นเงา ทอง่าย เส้นด้ายไม่รุ่ยไม่ติดเครื่องทอผ้า
- ช่วยให้กาวติดแน่น ทนความร้อน
- ซอร์บิทอลจะเป็นตัวให้ความชื้น (humectant) เป็นพลาสติไซเซอร์ (plasticiser) และสเตบิไลเซอร์ (stabilizer) ในผลิตภัณฑ์เหล่านี้

การผลิตซอล์บิทอลในระดับอุตสาหกรรม (อนุมนตรี, 2535)

เนื่องจากการสกัดซอล์บิทอลจากแหล่งธรรมชาติในผลไม้สดมีปริมาณซอล์บิทอล 5 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณต่ำมากทำให้ไม่คุ้มทุนในเชิงพาณิชย์ จึงได้หันมาใช้กระบวนการผลิตทางเคมีมีชื่อว่า รีดักชัน(reduction) แบบแคททะไลติกดีไฮโดรจีเนชัน (catalytic dehydrohenation) จากสารพวกน้ำตาล เช่น ดีกลูโคส เป็นต้น ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

การผลิตซอร์บิทอลโดยวิธีรีดักชันแบบแคททาไลติก ไฮโดรจีเนชัน (catalytic hydrogenation) จากสารพวกน้ำตาล เช่น น้ำตาลดีกลูโคส (D(+)glucose) ภายใต้อุณหภูมิและความดันที่เหมาะสม น้ำตาลก็จะถูกเปลี่ยนให้เป็นซอร์บิทอล ตามแต่สภาวะแวดล้อมที่กำหนดไว้ที่แตกต่างกัน เช่น ความดันอากาศ อุณหภูมิและพีเอช

รายละเอียดและสิ่งที่จำเป็นสำหรับวิธีแคททาไลติก ไฮโดรจีเนชัน

- ก๊าซไฮโดรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) เป็นพวกตัวคะตาลิสต์ (base metal reducing catalyst) เช่นนิกเกิล คอปเปอร์ โคบอลต์ อะลูมิเนียม โดยปกติมักนิยมใช้นิกเกิลซึ่งควรจะใช้นิกเกิลฟอสเฟต (nickel phosphate) เพื่อช่วยมิให้นิกเกิลถูกสลายเร็วเกินไป
- ตัวช่วยตัวเร่งปฏิกิริยาให้เริ่มทำงานและทำงานได้ดีขึ้น (activator) ได้แก่ ออกไซด์ของอะลูมิเนียม
- ความดันอากาศประมาณ 10 ถึง 20 บรรยากาศ หรืออาจถึง 200 บรรยากาศ โดยใช้ไฮโดรเจนเป็นตัวเพิ่มความดัน
- พีเอช อยู่ในช่วง 7 ถึง 12 พีเอชที่เหมาะสมคือ 9 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นตัวควบคุมพีเอช
- อุณหภูมิประมาณ 150 องศาเซลเซียส หรืออาจมากกว่าหรือน้อยกว่าโดยขึ้นอยู่กับความดันอากาศที่ใช้

การผลิตซอร์บิทอลทางการค้า (อนุมนตรี, 2535)

ซอร์บิทอลถูกเตรียมได้โดยวิธีรีดักชันของน้ำตาลกลูโคส โดยมีวิธีทำดำเนินตามขั้นตอนดังนี้ คือ

1) ละลายน้ำตาลกลูโคสที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้วลงในน้ำ และใส่นิเกิลผสมลงไปด้วยเพื่อช่วยเร่งปฏิกิริยา
2) ใช้ก๊าซไฮโดรเจนที่มีความกดดันสูงๆ เป็นตัวรีดิวซ์น้ำตาลแล้วจะได้ซอร์บิทอลออกมา
3) กรองเอาตัวเร่งปฏิกิริยาออกจากสารละลาย
4) ทำสารละลายให้บริสุทธิ์ โดยวิธีไอออน เอกเช้นต์ (ion exchange) และฟอกสีสารละลายโดยใช้แหล่งคาร์บอน
5) ทำสารละลายที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้วให้เข้มข้นขึ้น โดยระเหยน้ำออกในสูญญากาศ และปรับให้เป็นปริมาตรและความเข้มข้นที่ต้องการด้วยน้ำซึ่งสะอาดปราศจากเกลือแร่ต่างๆ

การผลิตซอร์บิทอลที่บริสุทธิ์ (อนุมนตรี, 2535)

ใช้น้ำตาลกลูโคส 100 กรัม ใส่ในเอริลแอลกอฮอล์ (Aryl alcohol) 500 มิลลิลิตร โดยใช้ตัวเร่งปฏิกิริยาเช่น นิกเกิล โคบอลต์และโครเมียม น้ำตาลกลูโคสจะถูกรีดิวซ์ เป็นเวลา 1 ถึง 2 ชั่วโมงที่ภายใต้ความดัน 150 บรรยากาศ แล้วจะได้ซอร์บิทอลต่อจากนั้นทำซอร์บิทอลให้บริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยเปลี่ยนเป็นโมโนเบนซาลซอร์บิทอล (monobenzal sorbital) แล้วทำโมโนเบนซาลซอร์บิทอลให้เป็นซอร์บิทอลที่บริสุทธิ์โดยวิธี ไฮโดรไลซิส (hydrolysis)

การผลิตซอร์บิทอลจากสารละลายของน้ำตาล (อนุมนตรี, 2535)

สารละลายของน้ำตาลซึ่งปราศจากเกลือ ประกอบด้วยดี-ไซโลส (D-xylose) 35 เปอร์เซ็นต์ ดี-กลูโคส (D-glucose) 27 เปอร์เซ็นต์ ดี-แมนโนส (D-mannose) 22 เปอร์เซ็นต์ ดี-กาแลคโตส (D-galactose) 5 เปอร์เซ็นต์ และสารพวกโพรีเมอร์ 7 เปอร์เซ็นต์ ถูกปรับให้มีปริมาณน้ำตาลประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ สารละลายนี้จะถูกรีดิวซ์โดยวิธีแคททาไลติกไฮโดรจีเนชัน (catalytic hydrogenation) ภายใต้ความดัน 300 บรรยากาศ อุณหภูมิ 70 ถึง 120 องศาเซลเซียส และมีตัวเร่งปฏิกิริยาคือซิลิกอนไดออกไซด์ (SiO_2) 80 เปอร์เซ็นต์ นิกเกิล 14 เปอร์เซ็นต์ คอปเปอร์ 5 เปอร์เซ็นต์ แมงกานีส 0.5 เปอร์เซ็นต์ โครเมียม 0.5 เปอร์เซ็นต์ ทำการเตรียมไปจนกระทั่งการดูดซึมของไฮโดรเจนหมด นำของเหลวที่เข้มข้นมาผสมกับคาร์บอนจะได้ซอร์บิทอล 75 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกากนำมาผสมน้ำแล้วฟอกสีด้วยเรซินและทำให้เข้มข้นจะได้แมนนิทอล ส่วนที่เหลือจะเป็นแอลกอฮอล์

การผลิตซอร์บิทอลทางชีวภาพ

ในปีค.ศ. 1984 Vikari และ Barrow (1984) รายงานว่า *Z.. mobilis* (Zymomnas) สามารถสังเคราะห์ซอร์บิทอลได้ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสหรือมีส่วนผสมของกลูโคสและฟรุกโตส เป็นส่วนประกอบ

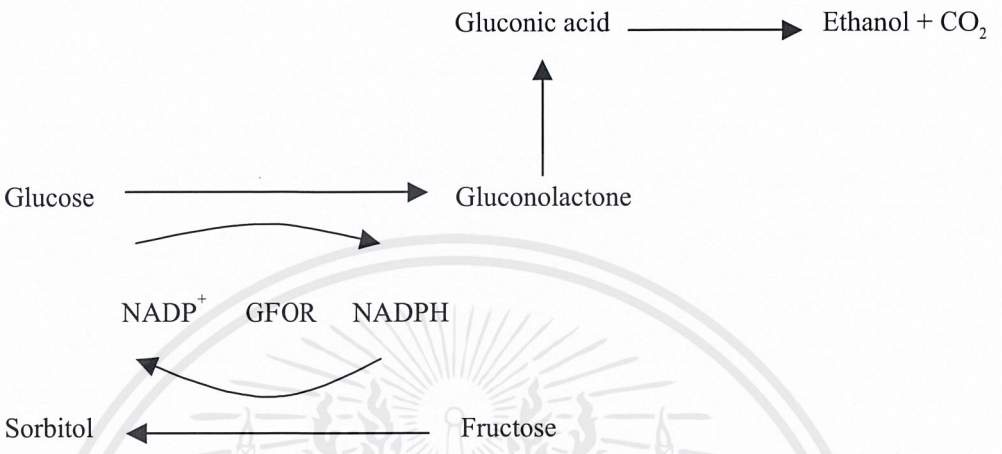
Z . mobilis เป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างเป็นแท่งมน มีความยาว 2 ถึง 6 ไมโครเมตร ความกว้าง 1 ถึง 1.4 ไมโครเมตร เมื่อนำไปย้อมสีแบบแกรมจะติดสีแดง เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โคโลนีจะมีรูปร่างนูนคล้ายเลนส์ ผิวหน้าและขอบเรียบ สีขาวคล้ายเนย เป็น strictly fermentative และ ethanogenic bacterium ที่สามารถทนทานแอลกอฮอล์ได้สูงและยังเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic bacteria) หรือสภาวะที่มีออกซิเจนในปริมาณเล็กน้อย (วีรวรรณ, 2540)

การผลิตซอร์บิทอลของเชื้อ *Z. mobilis*

Z. mobilis สามารถผลิตซอร์บิทอลได้โดยใช้มีเอนไซม์กลูโคสฟรุกโตสออกซิโดรีดักเทส (glucose fructose oxidoreductase ; GFOR) ในการรีดิวซ์ฟรุกโตสและจะเกิดควบคู่ไปกับปฏิกิริยาการออกซิไดซ์กลูโคสเป็นกลูโคโนแลคโตน โดยอาศัย NADP เป็นโคแฟคเตอร์ ซอร์บิทอลที่สร้างได้มีประมาณ 11 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณซูโครสเริ่มต้น ผลผลิตสุดท้ายที่ได้ส่วนใหญ่เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอทานอลโดยผ่านวิถีเอดเนอร์ดูโดรอฟ (entner-doudoroff phthway) (Spernger, G.A. , 1992)



ภาพที่ 2.2 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นโดยเอนไซม์กลูโคสฟรุกโตสออกซิโดรีดักเทส (glucose-fructose oxidoreductase ; GFOR)
ที่มา : Ro, H.S. และ KIM, H.S. (1991)

หนึ่งฤทัย (2539) ทำการศึกษาเกี่ยวกับการทดลองเลี้ยง *Z. mobilis* TISTR 405 ในอาหารที่มีกลูโคสและฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตซอร์บิทอล พบว่าการเลี้ยงเซลล์แบบไม่ถูกตรึง (free cell) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอช 6.5 ใน 4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลฟรุกโตส อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสจะทำให้เชื้อสามารถผลิตซอร์บิทอลออกมาสูงสุด จากนั้นทำการศึกษาถึงผลของกระบวนการตรึงเซลล์ (immobilized cell) ที่มีผลต่อการผลิตซอร์บิทอลของ *Z. .mobilis* พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึงในสภาวะข้างต้นจะได้ปริมาณซอร์บิทอลต่ำกว่าการเลี้ยงแบบไม่ตรึงเซลล์ในสภาวะเดียวกัน ทำให้ทราบว่าการตรึงเซลล์โดยปราศจากขั้นตอนการเปอร์มีอะบิไลซ์เซลล์ (permeabilize cell) ก่อนนั้นทำให้ได้ผลผลิตต่ำลงกว่าการใช้การตรึงเซลล์

Silveira และคณะ (1999) มีรายงานว่า *Z. mobilis* สามารถเปลี่ยนกลูโคสและฟรุกโตสไปเป็นซอร์บิทอลและกรดกลูโคนิคโดยใช้เอนไซม์กลูโคสฟรุกโตสออกซิโดรีดักเตส (glucose-fructose oxidoreductase) หรือเรียกว่า GFOR และกลูโคนิคแลคโตเนส (gluconolactonase) จากเชื้อดังกล่าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Zymomnas mobilis* TISTR 551 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.2 อปุกรณ์และสารเคมี

1. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave TOMY Model SS-325)
2. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centifuge HERMLE Model Z383k)
3. เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer SHIMADSU Model UV-1601)
4. ตู้อบ (Hot air oven MEMMERT Model 600)
5. อ่างน้ำร้อน (Water bath)
6. ตู้บ่ม (Incubator MEMMERT Model 600)
7. เครื่องวัดพีเอช (pH meter)
8. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow ISSCO Model HS-123)
9. เครื่องชั่งสาร
10. ไมโครปิเปต
11. เครื่องแก้ววิทยาศาสตร์
12. โถดูดความชื้น
13. เครื่องผสม (Vortex)
14. แบคโตเปบโตน
15. ยีสต์สกัด
16. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต
17. แมกนีเซียมซัลเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

18. แอมโมเนียมซัลเฟต
19. กลูโคส
20. ฟรุกโตส
21. ซูโครส
22. กรดซัลฟูริก
23. ซีสเตอีนไฮโดรคลอไรด์
24. กรดซัลฟูริก
25. ซีสเตอีนไฮโดรคลอไรด์
26. อัลกอฮอร์ลิกคาร์บาโซล
27. วุ้นผง

3.3 วิธีการทดลอง

1. การเตรียมหัวเชื้อ

1.1 ถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* TISTR 551 จากหลอดอาหารเอียงลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรของอาหาร Z. broth อยู่ 100 มิลลิลิตร

1.2 ทำการเลี้ยงเชื้อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 โดยวัดที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

2. ศึกษาปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ

2.1 เตรียมหัวเชื้อตามวิธีการทดลองข้อ 1.

2.2 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Z-broth โดยมีปริมาณกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร

2.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยอาหารเหลวนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ส่วนน้ำตาลนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หลัง จากนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจึงนำมารวมกัน

2.4 เติมหัวเชื้อปริมาณ 5-10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด

2.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในตู้บ่ม

2.6 ทำการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อทุก 2 ชั่วโมงเพื่อวิเคราะห์ปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมในการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตซอร์บิทอลของเชื้อ

3.1 เตรียมหัวเชื้อตามวิธีการทดลองข้อ 1.

3.2 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Z-broth โดยใช้ปริมาณน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ชนิดของน้ำตาลมีดังนี้

น้ำตาลซูโครส

น้ำตาลกลูโคสต่อน้ำตาลฟรุกโตส อัตราส่วน 1 ต่อ 1

น้ำตาลกลูโคสต่อน้ำตาลฟรุกโตส อัตราส่วน 1 ต่อ 2

น้ำตาลกลูโคสต่อน้ำตาลฟรุกโตส อัตราส่วน 1 ต่อ 3

3.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยอาหารเหลวนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ส่วนน้ำตาลนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หลังจากฆ่าเชื้อแล้วจึงนำมารวมกัน

3.4 เติมหัวเชื้อปริมาณที่เหมาะสมตามวิธีการทดลองข้อ 2.

3.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในตู้บ่ม

3.6 ทำการวัดการเจริญของเชื้อและเก็บตัวอย่างเป็นระยะทุก ๆ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสโดยวิธี Somogyi Nelson's Method และน้ำตาลฟรุกโตสโดยวิธีของ Marshall และ Kool ดังภาคผนวก ค

4. ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตซอร์บิทอลของเชื้อ

4.1 เตรียมหัวเชื้อตามวิธีการทดลองข้อ 1.

4.2 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Z-broth เลือกชนิดน้ำตาลจากที่ศึกษามาข้างต้น โดยใช้ปริมาณน้ำตาล 100 กรัมต่อลิตร

4.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยอาหารเหลวนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ส่วนน้ำตาลนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจึงนำมารวมกัน

4.4 เติมปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมตามผลการทดลองที่ได้จากข้อ 2.

4.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 30 และ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่ม

4.6 ทำการวัดการเจริญของเชื้อและเก็บตัวอย่างเป็นระยะทุก ๆ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสโดยวิธี Somogyi Nelson's Method และน้ำตาลฟรุกโตสโดยวิธีของ Marshall และ Kool ดังภาคผนวก ค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ศึกษาความเข้มข้นน้ำตาลต่อการผลิตซอร์บิทอล

5.1 เตรียมหัวเชื้อตามวิธีการทดลองข้อ 1.

5.2 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Z-broth เลือกชนิดน้ำตาลจากที่ศึกษามาแล้วข้างต้น ซึ่งมีความเข้มข้นน้ำตาล 15 เปอร์เซ็นต์ 20 เปอร์เซ็นต์ และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

5.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยอาหารเหลวนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ส่วนน้ำตาลนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้วจึงนำมารวมกัน

5.4 เติมปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมตามผลการทดลองที่ได้จากข้อ 2.

5.5 เลือกอุณหภูมิในการบ่มที่ศึกษามาแล้วข้างต้น

5.6 ทำการวัดการเจริญของเชื้อและเก็บตัวอย่างเป็นระยะทุก ๆ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสโดยวิธี Somogyi Nelson's Method และน้ำตาลฟรุกโตสโดยวิธีของ Marshall และ Kool ดังภาคผนวก ค.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 ผลของศึกษาปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *Z. mobilis* TISTR 551

ผลการทดลองจากการหมัก *Z. mobilis* TISTR 551 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Z-broth ที่มีน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร ในฟลาส์กขนาด 125 มิลลิลิตร พีเอช 6 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่า โดยใช้เชื้อที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ดังนี้ 5 6 7 8 9 และ 10 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการเปรียบเทียบปริมาณหัวเชื้อที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ และทำการวิเคราะห์โดยวิธีทางสถิติแบบสุ่มตลอดดังตารางที่ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบปริมาณหัวเชื้อที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ กับอัตราการเติบโตจำเพาะ

ปริมาณหัวเชื้อ (เปอร์เซ็นต์)	อัตราการเติบโตจำเพาะ (1 ต่อ ชั่วโมง)
5	0.2073
6	0.2109
7	0.1987
8	0.204
9	0.2041
10	0.1919

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

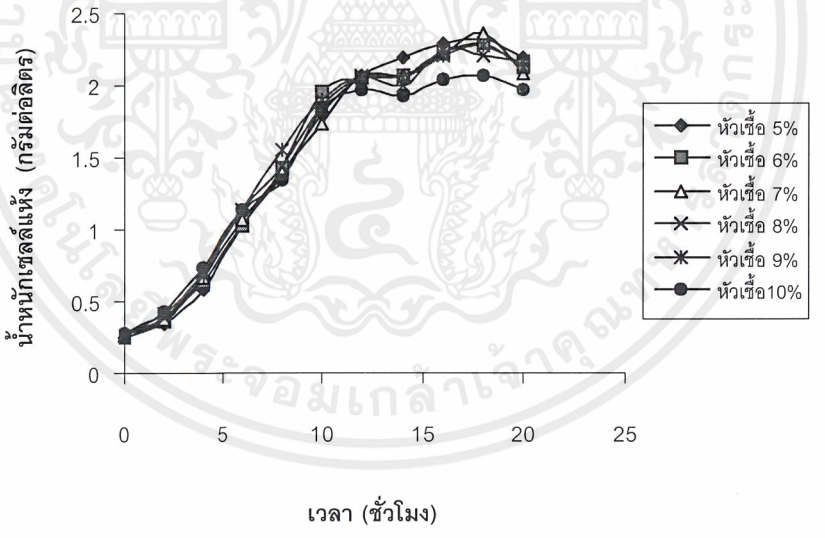
ตารางที่ 4.2 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติแบบสุ่มตลอดของปริมาณหัวเชื้อที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ

ANOVA

Source of variance	Degree of freedom	Sum square	Mean square	F-value	F-table 5%	F-table 1%
Treatment	5	0.009	0.0018	2.168^{ns}	3.11	5.06
Error	12	0.001	$8.3x10^{4}$			
total	17	0.01				

ns คือ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

เมื่อทำการแปรผันปริมาณหัวเชื้อ 6 ความเข้มข้น พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณหัวเชื้อที่ 5 เปอร์เซ็นต์ในการทดลอง



ภาพที่ 4.1 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 551 เมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อ ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลของการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลซอร์บิทอล

ผลการทดลองการหมัก *Z.. mobilis* TISTR 551 ในอาหาร Z-broth ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลต่าง ๆ คือ น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคสกับฟรุกโตสในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 น้ำตาลกลูโคสกับฟรุกโตสในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 และน้ำตาลกลูโคสกับฟรุกโตสในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 โดยปริมาณน้ำตาลกำหนดที่ความเข้มข้นน้ำตาล 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณอาหาร 100 มิลลิลิตร ในฟลาส์กขนาด 125 มิลลิลิตร พีเอช 6 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้หัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ ทำการเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่า โดยวัดการเติบโตของเชื้อ การใช้กลูโคส และการใช้ฟรุกโตส จากนั้นทำการวิเคราะห์อัตรากรเติบโตจำเพาะและอัตราการใช้ฟรุกโตสในแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ดังตารางที่ 4.3 และที่ 4.4

ตารางที่ 4.3 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติแบบสุ่มตลอดของอัตราการเติบโตจำเพาะในแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ

ANOVA

Source of variance	Degree of freedom	Sum square	Mean square	F-value	F-table 5%	F-table 1%
Treatment	3	0.001	$3.33x10^{-4}$	1.22^{ns}	4.67	7.59
Error	8	$2.18x10^{-3}$	$2.725x10^{-4}$			
total	11	$3.18x10^{-3}$				

ns คือ ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 4.4 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติแบบสุ่มตลอดของอัตราการใช้ฟรุกโตสเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ

ANOVA

Source of variance	Degree of freedom	Sum square	Mean square	F-value	F-table 5%	F-table 1%
Treatment	3	0.2282	0.076	22.686**	4.07	7.59
Error	8	$0.02682.18x10^{-3}$	0.00335			
total	11	0.225				

** คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

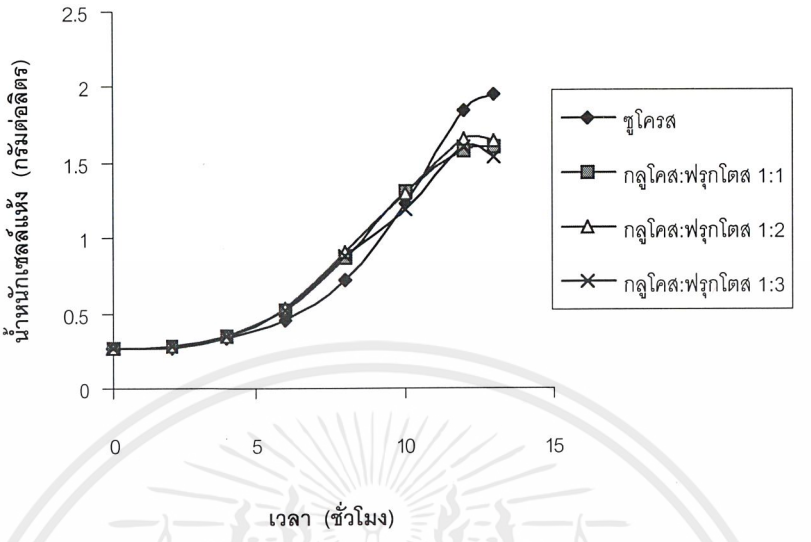
อัตราการเติบโตจำเพาะของเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 551 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติและอัตราการใช้ฟรุกโตสในแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยน้ำตาลกลูโคสต่อฟรุกโตส 1 ต่อ 1 มีอัตราการใช้ฟรุกโตสสูงกว่าแหล่งคาร์บอนอื่น ๆ ดังนั้นจึงเลือกใช้กลูโคสต่อฟรุกโตสในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ในการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Silveira และคณะ (1999) ซึ่งทำการทดลองศึกษาความเข้มข้นของสารตั้นต้นเริ่มแรกด้วยความเข้มข้นกลูโคสและฟรุกโตสที่มีโมลาร์เท่ากัน

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบอัตราการเติบโตจำเพาะ อัตราการใช้กลูโคสและอัตราการใช้ฟรุกโตส เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ

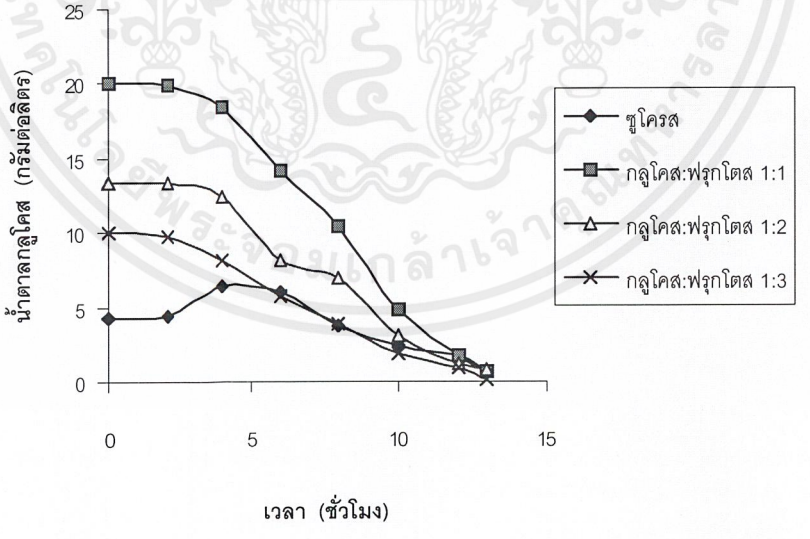
แหล่งคาร์บอน	อัตราการเติบโตจำเพาะ (1 ต่อ ชั่วโมง)	อัตราการใช้กลูโคส (กรัมต่อลิตรชั่วโมงกรัมเซลล์)	อัตราการใช้ฟรุกโตส (กรัมต่อลิตรชั่วโมงกรัมเซลล์)
ซูโครส	0.1725	3.2370	3.3187
กลูโคส:ฟรุกโตส 1:1	0.1786	8.1171	10.1800
กลูโคส:ฟรุกโตส 1:2	0.171	7.1789	8.2252
กลูโคส:ฟรุกโตส 1:3	0.166	5.2903	8.0175

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

39883

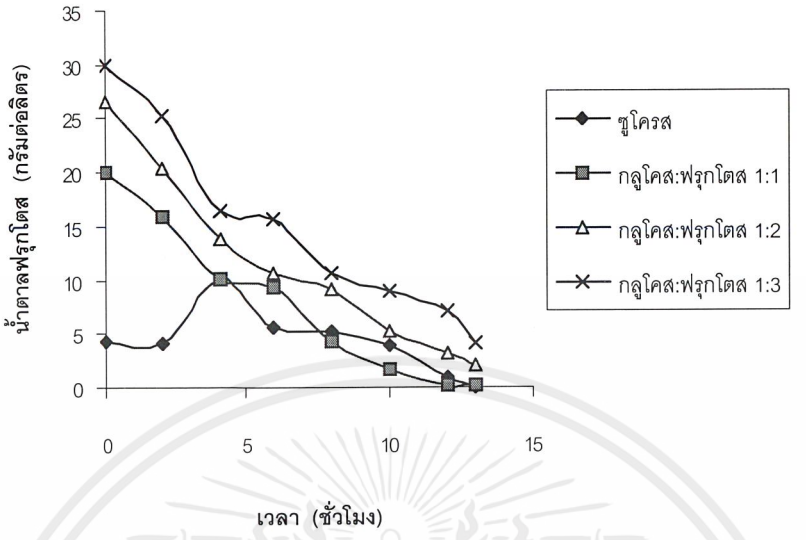


ภาพที่ 4.2 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 551 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ



ภาพที่ 4.3 เปรียบเทียบการใช้กลูโคสของเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 551 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 เปรียบเทียบการใช้ฟรุกโตสของเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 551 เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ

4.3 ผลของศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลซอร์บิทอล

ผลการทดลองการหมัก *Z. mobilis* TISTR 551 ในอาหาร Z-broth ที่มีน้ำตาลกลูโคสกับฟรุกโตสในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน ที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร ในฟลาส์กขนาด 125 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาณเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ พีเอชอาหาร 6 อุณหภูมิ 25 30 และ 37 องศาเซลเซียส ทำการเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่า โดยวัดอัตราการเติบโตของเชื้อ การใช้กลูโคสและการใช้ฟรุกโตส จากนั้นทำการวิเคราะห์อัตราการเติบโตจำเพาะและอัตราการใช้ฟรุกโตสในแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังตารางที่ 4.6 และ 4.7 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติแบบสุ่มตลอดของอัตราการเติบโตจำเพาะเมื่อใช้อุณหภูมิต่าง ๆ

ANOVA

Source of variance	Degree of freedom	Sum square	Mean square	F-value	F-table 5%	F-table 1%
Treatment	2	0.0026	0.0013	13^{ns}	5.14	10.92
Error	6	0.0006	0.0001			
total	8	0.0032				

ns คือ ไม่แตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 4.7 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติแบบสุ่มตลอดของอัตราการใช้ฟรุกโตสเมื่อใช้อุณหภูมิต่าง ๆ

ANOVA

Source of variance	Degree of freedom	Sum square	Mean square	F-value	F-table 5%	F-table 1%
Treatment	2	8.442	4.22	17.016**	5.14	10.92
Error	86	1.489	0.248			
total	8	9.931				

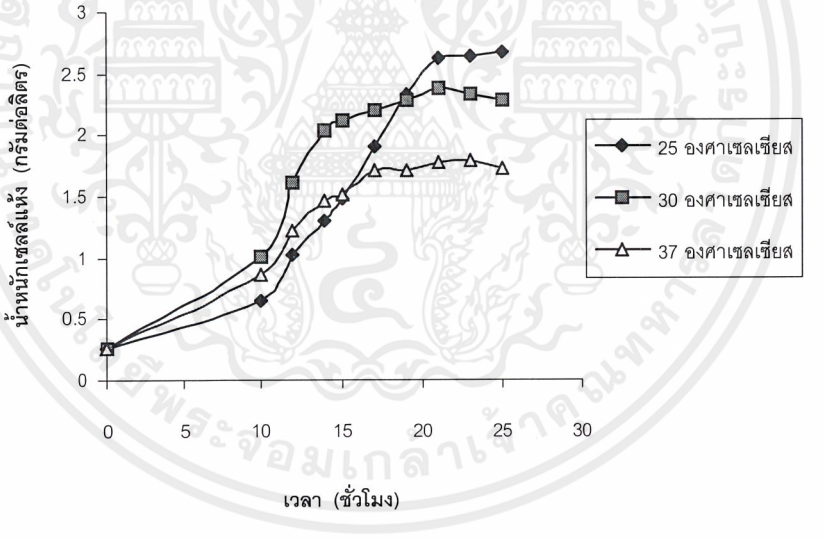
** คือ แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและ 37 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติและเมื่อนำค่าอัตราการเจริญจำเพาะมาเปรียบเทียบพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงกว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ จึงเลือกใช้อุณหภูมิที่ 30 องศาเซียลเซียสในการทดลอง ซึ่งการทดลองนี้สอดคล้องกับการผลการทดลองของ หนึ่งฤทัย (2539) โดยพบว่าการเลี้ยง *Z. mobilis* TISTR 405 ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะทำให้เชื้อสามารถผลิตซอร์บิทอลออกมามากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

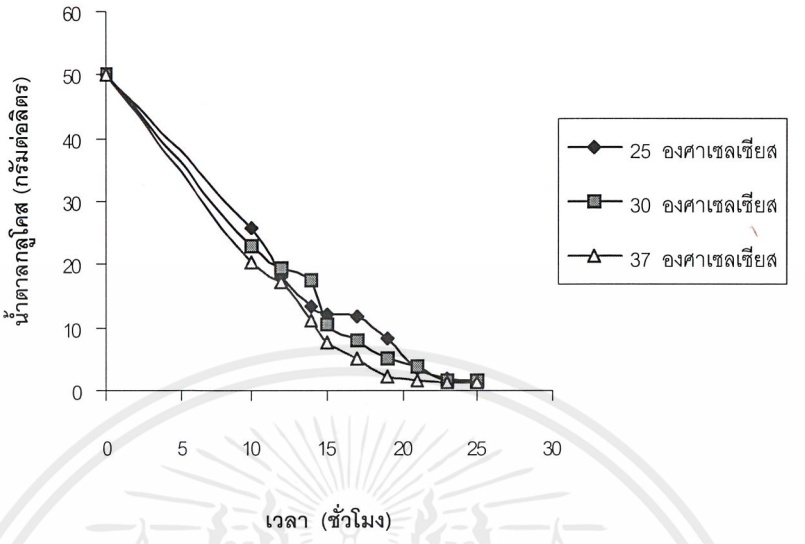
ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบอัตราการเติบโตจำเพาะ อัตราการใช้กลูโคสและอัตราการใช้ฟรุกโตส เมื่อใช้อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อัตราการเติบโตจำเพาะ (1 ต่อ ชั่วโมง)	อัตราการใช้กลูโคส (กรัมต่อลิตรชั่วโมงกรัมเซลล์)	อัตราการใช้ฟรุกโตส (กรัมต่อลิตรชั่วโมงกรัมเซลล์)
25	0.1127	7.5764	9.4884
30	0.1472	9.1712	11.0879
37	0.1248	8.2892	12.0764

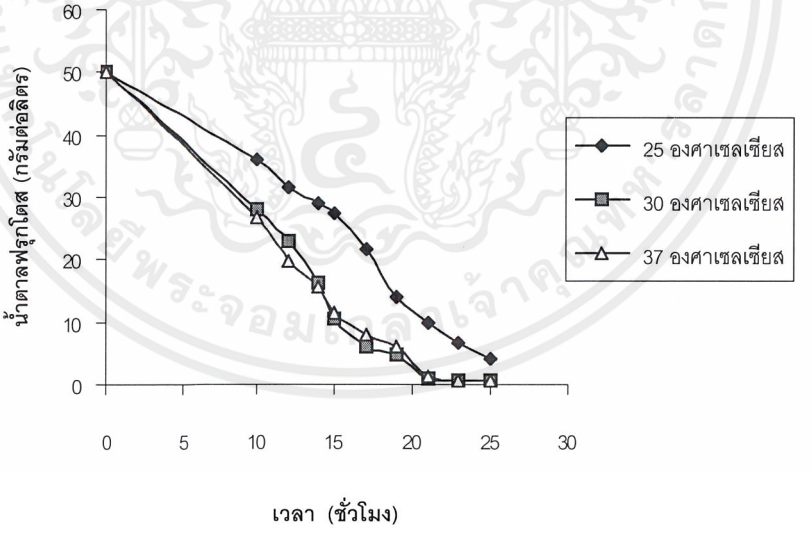


ภาพที่ 4.5 เปรียบเทียบการเติบโตของเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 551 เมื่อใช้อุณหภูมิต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 เปรียบเทียบการใช้กลูโคสของเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 551 เมื่อใช้อุณหภูมิต่าง ๆ



ภาพที่ 4.7 เปรียบเทียบการใช้ฟรุกโตสของเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 551 เมื่อใช้อุณหภูมิต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลของการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในการผลิตซอร์บิทอล

ผลการทดลองจากการหมัก *Z. mobilis* TISTR 551 ในอาหาร Z-broth ที่ปริมาณหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร ในฟลาส์กขนาด 125 มิลลิลิตร พีเอช 6 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสกับฟรุกโตส อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 15 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ทำการเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่า การเติบโตของเชื้อ การใช้กลูโคสและการใช้ฟรุกโตส แสดงดังภาพที่ 4.8 4.9 และ 4.10 ตามลำดับ จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติแบบสุ่มตลอดของอัตราการเติบโตจำเพาะและอัตราการใช้ฟรุกโตสในควาวเข้มข้นน้ำตาลที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ ดังตารางที่ 4.9 และ 4.10

ตารางที่ 4.9 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติแบบสุ่มตลอดของอัตราการเติบโตจำเพาะ เมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ

ANOVA

Source of variance	Degree of freedom	Sum square	Mean square	F-value	F-table 5%	F-table 1%
Treatment	2	0.0007	0.0035	2.333^{ns}	5.14	10.92
Error	6	0.0009	0.0015			
total	8	0.0016				

ns คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 4.10 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติแบบสุ่มตลอดของอัตราการใช้ฟรุกโตส เมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ

ANOVA

Source of variance	Degree of freedom	Sum square	Mean square	F-value	F-table 5%	F-table 1%
Treatment	2	10.99	5.495	22.13**	5.14	10.92
Error	86	1.56	0.26			
total	8	12.55				

** คือ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

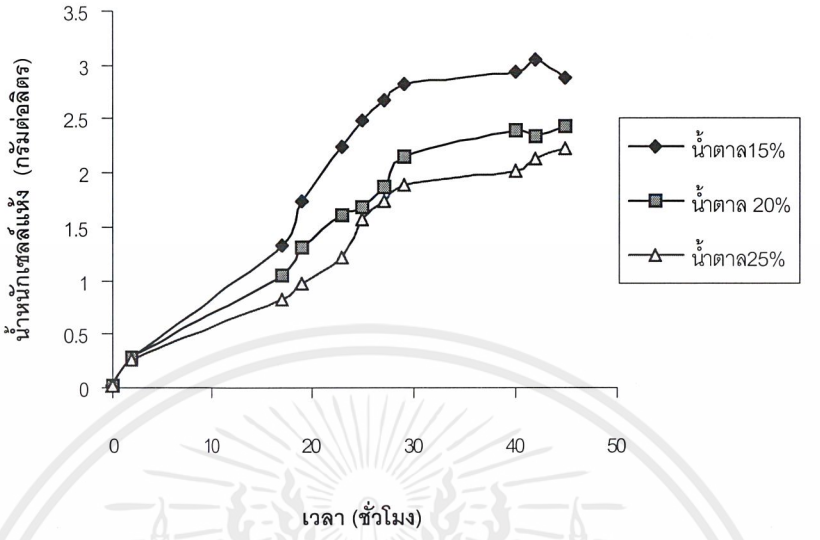
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราการเติบโตของ *Z. mobilis* TISTR 551 ในความเข้มข้นน้ำตาลที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติและอัตราการใช้งฟรุกโตสมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่งโดยความเข้มข้นของน้ำตาลที่ 15 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการเติบโตจำเพาะและอัตราการใช้ฟรุกโตสสูงกว่าที่ความเข้มข้นน้ำตาล 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับ Sahm และคณะ (1995) รายงานว่าการเพิ่มผลผลิตซอร์บิทอลในการเปลี่ยบแปลงทางชีวภาพด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของสารตั้งต้นจะมีผลกระทบ 2 อย่างคือ การสูญเสียเซลล์ตัวอ่อนเนื่องจากแรงดันออสโมติกและการยั้บยั้งเมตาบอลิสมของคาร์โบไฮเดรตของเชื้อ *Z. mobilis* และ Silveira และคณะ (1999) รายงานว่าเชื้อ *Z. mobilis* ATCC 29191 ที่ใช้ในการหมักแบบเบ็ดเสร็จด้วยความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสตั้งแต่ 100 จนถึง 750 กรัมต่อลิตรในอัตราส่วนเท่ากัน เมื่อความเข้มข้นของสารตั้งต้นเพิ่มขึ้นจนถึง 650 กรัมต่อลิตร ปริมาณผลผลิตที่ได้สูงสุดถึง 91 เปอร์เซ็นต์ เมื่อความเข้มข้นของสารตั้งต้นมากกว่า 750 กรัมต่อลิตรพบว่าผลผลิตที่ได้จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใด ๆ แต่ค่าการผลิตจะลดลง เมื่อกระบวนการหมักดำเนินไปเป็นเวลานาน ปริมาณผลิตที่ได้จากการหมักที่ความเข้มข้นของสารตั้งต้นมากกว่าหรือเท่ากับ 650 กรัมต่อลิตรซึ่งมีปริมาณมากจะทำให้เกิดการยั้บยั้งเมตาบอลิสมของเชื้อ *Z. mobilis* โดยสารตั้งต้นและผลิตภัณฑ์ที่ได้มีผลเนื่องจากระบบของเอนไซม์กลูโคสฟรุกโตสออกซิโดรีดักเทสและกลูโคโตแลคโตน

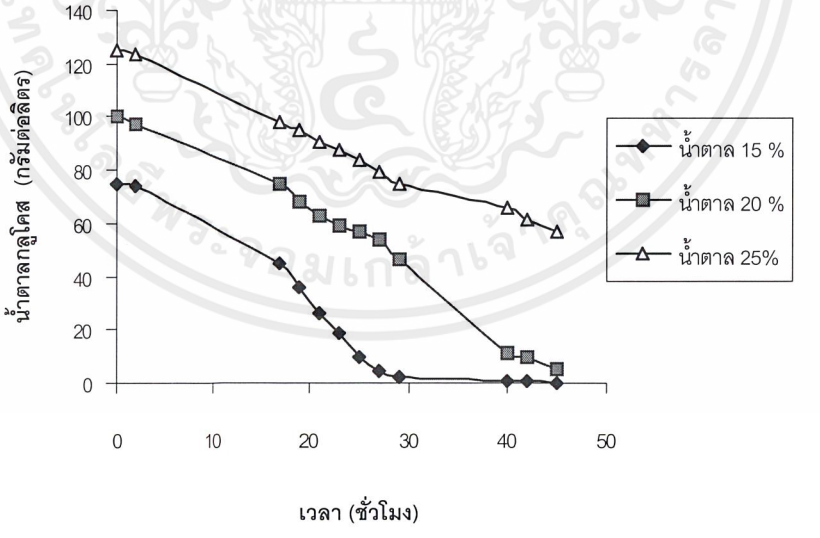
ตารางที่ 4.11 เปรียบเทียบอัตราการเติบโตจำเพาะ อัตราการใช้กลูโคสและอัตราการใช้ฟรุกโตสในความเข้มข้นน้ำตาลที่เปอร์เซ็นต์ต่าง ๆ

ความเข้มข้นน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)	อัตราการเติบโตจำเพาะ (1 ต่อ ชั่วโมง)	อัตราการใช้กลูโคส (กรัมต่อลิตรชั่วโมงกรัมเซลล์)	อัตราการใช้ฟรุกโตส (กรัมต่อลิตรชั่วโมงกรัมเซลล์)
15	0.1365	15.7889	15.7635
20	0.1239	14.8757	13.5094
25	0.1192	13.4858	11.3495

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

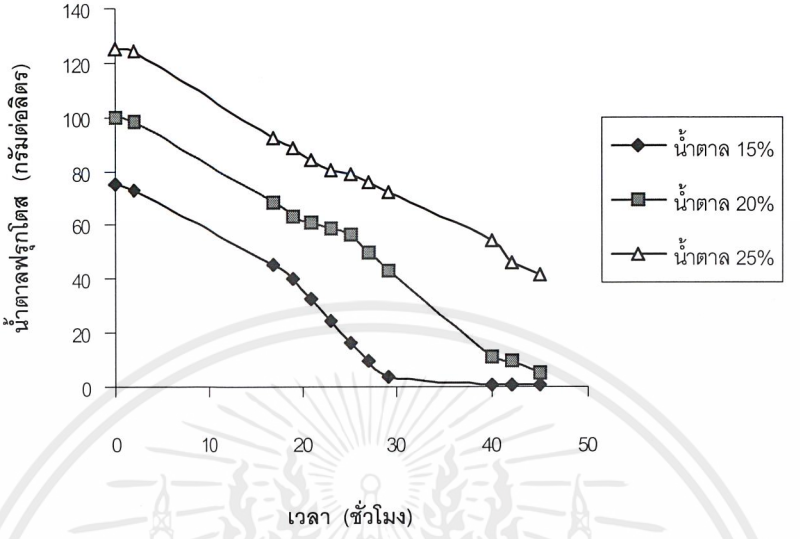


ภาพที่ 4.8 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 551 เมื่อใช้น้ำตาลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



ภาพที่ 4.9 เปรียบเทียบการใช้กลูโคสของเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 551 เมื่อใช้น้ำตาลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.10 เปรียบเทียบการใช้ฟรุกโตสของเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 551 เมื่อใช้น้ำตาลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตซอร์บิทอลของเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 551 พบว่าเมื่อการหมักเชื้อที่ปริมาณหัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Z-broth ที่มีแหล่งคาร์บอนคือน้ำตาลกลูโคสกับฟรุกโทสในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 มีความเข้มข้นของน้ำตาล 150 กรัมต่อลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร ในฟลาส์กขนาด 125 มิลลิลิตร พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะไม่มีการเขย่า มีอัตราการใช้ฟรุกโตสสูงถึง 15.7632 กรัมต่อลิตรชั่วโมงกรัมเซลล์ในชั่วโมงที่ 29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กุลยา จันทร์อรุณ. 2533. เคมีอาหาร. ตำรา-เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 35 ภาคพัฒนาตำราและเอกสารวิชาการหน่วยศึกษานิเทศน์ กรมฝึกหัดครู, กรุงเทพ. น. 1-4

กระทรวงอุตสาหกรรม. 2538. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมสารละลายซอร์บิทอล. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, กรุงเทพ. น. 1-6

นิรนาม. 2532. ซอร์บิทอล. บริษัท อูเอโน ไฟน์ เคมิคัลส์อินดัสตรี(ประเทศไทย) จำกัด, สมุทรปราการ. น. 1-17

วิจิตรา ปรมรัตนไพศาล. 2541. การหาอินดิเคเตอร์ในการตรวจสอบหาน้ำตาลซอร์บิทอลที่ผลิตโดย *Zymomonas mobilis*. โครงงานพิเศษ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพ. น. 1-5

วีรวรรณ ชื่ออารมณ์. 2540. การใช้อินดิเคเตอร์ในการตรวจสอบน้ำตาลซอร์บิทอลที่ผลิตโดย *Zymomonas mobilis*. โครงงานพิเศษ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพ. น. 1-5

ลดาวัลย์ พัดสืบกุล และ วรรณี บูรณะประภพ. 2526. ซอร์บิทอลจากแป้งมันสำปะหลัง. โครงงานพิเศษ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพ. น. 1-3

หนึ่งฤทัย มีสุข. 2543. การศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตซอร์บิทอลของ *Zymomonas mobilis*. โครงงานพิเศษ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพ. 1. น.

อนุมนตรี วัฒนาศิริ. 2535. การผลิตซอร์บิทอลโดยวิธีรีดักชันแบบแคททาไลติกไฮโดรจีเนชัน. วิทยานิพนธ์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพ. น. 1-17

Erzinger, G.S. 1996. Influencia da concentracao de glicose e de etanol sobre a atividate de glicose fructose oxidoreductase en *Zymomonas mobilis* ATCC 29191. Master thesis. Faculty of Pharmaceutical Science. University of Soa Paulo. Brazil, 99 p.

Ro, H.S. and H.S. Kim. 1991. Continuous production of gluconic acid and sorbitol from sucrose using invertase and an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. Enzyme Microbiotechnol. 13 : 920-924

Sahm, H. , H. Loos, B. Rehr and G. Springer 1995. Production of sorbitol and gluconic acid by *Zymomonas mobilis*. Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. 59 : 2403-2410

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Silveira, M.M. , E. Wisbeck, C. Lemmel, G. Erzinger, J.P.L. da Costa, M. Bertasso and R. Jonas. 1999. Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cell of *Zymomonas mobilis*. J. Biotechnol. 75 : 99-103

Sprenge, G.A. 1992. Carbohydrate metabolism in Zymomnas mobilis : A catabolic highway with some science routes FEMS-Micobiol, LETT, 145 (3) : 301-307

Viikari, L. 1984. Fromation of sorbitol by *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20 : 118-123.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็ง Z medium (Z medium Agar)

แบคโตเปปโตน (bacto peptone)	10	กรัม
ยีสต์สกัด (yeast extract)	10	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Z-broth

แบคโตเปปโตน (bacto peptone)	10	กรัม
ยีสต์สกัด (yeast extract)	10	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($KH_2PO_4.7H_2O$)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)	2	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

หมายเหตุ ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อให้แยกนึ่งฆ่าเชื้อน้ำตาลกับสารอาหารต่าง ๆ เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล (Browning reaction) โดยอาหารให้นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ส่วนน้ำตาลกลูโคสให้นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อทั้ง 2 เสร็จแล้วให้นำมารวมกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ ข1 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 551 ในปริมาณหัวเชื้อที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)					
	หัวเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์	หัวเชื้อ 6 เปอร์เซ็นต์	หัวเชื้อ 7 เปอร์เซ็นต์	หัวเชื้อ 8 เปอร์เซ็นต์	หัวเชื้อ 9 เปอร์เซ็นต์	หัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์
0	0.2538	0.2551	0.259	0.2617	0.2683	0.2714
2	0.3514	0.3655	0.38	0.3858	0.4122	0.4355
4	0.5772	0.6436	0.6616	0.6924	0.6867	0.7298
6	1.0266	1.0312	1.0682	1.143	1.1408	1.1377
8	1.3819	1.425	1.3995	1.447	1.561	1.35
10	1.8107	1.9647	1.738	1.8633	1.8998	1.8481
12	2.0714	2.05512	2.0762	2.0502	2.063	1.9706
14	2.1902	2.0639	2.0714	2.004	2.0534	1.924
16	2.2945	2.239	2.2219	2.2505	2.2135	2.0419
18	2.3165	2.2927	2.3578	2.2021	2.2804	2.0714
20	2.1902	2.137	2.078	2.1625	2.1317	1.9654

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข2 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 551 ที่ใแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร)			
	ซูโครส	กลูโคสต่อฟรุกโตส 1 : 1	กลูโคสต่อฟรุกโตส 1 : 2	กลูโคสต่อฟรุกโตส 1 : 3
0	0.2538	0.2538	0.2538	0.2538
2	0.2731	0.2771	0.278	0.2771
4	0.3286	0.3466	0.3468	0.3479
6	0.4553	0.5252	0.5294	0.5191
8	0.7219	0.8745	0.9116	0.8816
10	1.2288	1.3054	1.2992	1.1945
12	1.8501	1.5839	1.6512	1.6072
13	1.9579	1.5984	1.638	1.5381

ตารางภาคผนวกที่ ข3 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลงเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)			
	ซูโครส	กลูโคสต่อฟรุกโตส 1 :1	กลูโคสต่อฟรุกโตส 1 : 2	กลูโคสต่อฟรุกโตส 1 : 3
0	3.25	20	13.33	10
2	4.4615	19.92308	13.30769	9.76923
4	6.3623	18.4615	12.4615	8.1539
6	5.96415	14.2307	8.1923	5.7692
8	3.79423	10.423	6.9231	3.9231
10	2.38462	4.8654	3.1346	1.8346
12	1.769231	1.7096	1.1856	0.9029
13	0.6038	0.6404	0.7933	0.1542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข4 ปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสที่ลดลงเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลฟรุกโตส (กรัมต่อลิตร)			
	ซูโครส	กลูโคสต่อฟรุกโตส 1 : 1	กลูโคสต่อฟรุกโตส 1 : 2	กลูโคสต่อฟรุกโตส 1 : 3
0	4.2588	20	26.67	30
2	6.062	17.906	22.359	26.343
4	8.062	15.031	16.937	18.531
6	6.554	7.265	13.625	14.656
8	4.218	4.218	8.125	10.656
10	3.984	1.742	6.25	8.953
12	2.919	1.131	3.18	4.2
13	1.0176	0.096	1.091	4.089

ตารางภาคผนวกที่ ข5 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 551 ที่อุณหภูมิต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร) อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		
	25	30	37
0	0.2538	0.2538	0.2538
10	0.6491	1.0167	0.8623
12	1.0319	1.6169	1.2257
14	1.3102	2.034	1.4752
15	1.4829	2.1211	1.5223
17	1.9119	2.2012	1.7071
19	2.3301	2.2795	1.7198
21	2.6232	2.3829	1.7779
23	2.6478	2.3336	1.7872
25	2.6771	2.2861	1.733

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข6 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลงเมื่อใช้อุณหภูมิต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)		
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		
	25	30	37
0	50	50	50
10	25.88462	22.96154	16.5
12	18.05769	19.53846	14.30769
14	13.53846	10.39615	7.321154
15	12.11538	7.661538	5.755769
17	11.88462	3.125	4.134615
19	8.23077	2.059615	2.244231
21	3.64615	1.907692	1.730769
23	1.91538	1.618269	1.309615
25	1.7545	1.592308	1.23269

ตารางภาคผนวกที่ ข7 ปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสที่ลดลงเมื่อใช้อุณหภูมิต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลฟรุกโตส (กรัมต่อลิตร)		
	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		
	25	30	37
0	50	50	50
10	36.187	28.031	26.765
12	31.718	22.968	19.843
15	27.578	10.656	11.468
17	21.562	4.945	8.031
19	14.078	2.756	5.996
21	9.867	1.064	1.214
23	6.809	0.631	0.617
25	4.134	0.542	0.63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข8 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 551 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร)		
	น้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)		
	15	20	25
0	0.2538	0.2538	0.2538
2	0.275	0.2717	0.2648
17	1.3366	1.044	0.8328
19	1.7374	1.3115	0.9648
23	2.2434	1.6182	1.2174
25	2.4863	1.6855	1.5707
27	2.6777	1.8752	1.7339
29	2.8198	2.1496	1.8844
40	2.9309	2.3984	2.0303
42	3.0439	2.3326	2.1392
45	2.8744	2.4245	2.2258

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข9 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)		
	น้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)		
	15	20	25
0	75	100	125
2	73.94	97.109	123.175
17	44.832	74.707	98.125
19	35.917	68.125	95
21	25.996	62.828	90.894
23	18.662	59.468	87.945
25	10.031	56.82	83.640
27	4.445	53.812	79.546
29	2.554	46.135	74.742
40	0.907	10.871	65.656
42	0.566	9.796	61.406
45	0.3324	5.449	57.031

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข10 ปริมาณน้ำตาลฟรุกโตสที่ลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลฟรุกโตส (กรัมต่อลิตร)		
	น้ำตาล (เปอร์เซ็นต์)		
	15	20	25
0	75	100	125
2	73.214	88.426	124.317
17	45.638	68.445	92.125
19	40.535	63.215	88.431
21	32.662	60.820	84.114
23	24.382	58.724	80.326
25	16.331	56.322	78.948
27	9.539	49.548	75.751
29	3.428	43.112	72.446
40	1.113	10.871	54.656
42	1.066	9.796	46.406
45	0.907	5.449	42.031

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
วิธีวิเคราะห์น้ำตาลและกราฟมาตรฐานของน้ำตาล

วิธีวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลกลูโคส โดยวิธีของ Somogyi Nelson's method (1952)

สารเคมี

1. A: 10 เปอร์เซ็นต์ $CuSO_4 5H_2O$ 100 มิลลิลิตร (10 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร)

B: phosphate-tartrate solution เตรียมโดยสารละลาย Na_2HPO_4 28 กรัม (หรือ $Na_2HPO_4 .12H_2O$ 70.5495 กรัม) ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติม Sodium potassium tartrate (tetrahydrate) 40 กรัม ทำให้ละลายแล้วเติม NAOH ความเข้มข้น 1 โมลาร์ 100 มิลลิลิตร ตามด้วย NA_2SO_4 (anhydrous) 120 กรัม เมื่อละลายดีแล้วปรับปริมาตรเป็น 900 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ถ้ามีตะกอนให้กรองเอาตะกอนทิ้งด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน

2. สารละลาย Nelson's arseomolybdate color reagent ประกอบด้วย

A : ละลาย ammonium molybdate $[(NH_4)_6 Mo_7O_{24} .4 H_2O]$ 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติมกรดกำมะถัน 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

B : Disodium arsenate ($Na_2H_9SO_4.7H_2O$) 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิตร

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกันเก็บไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและควรเก็บในขวดสีชา

1. วิธีวิเคราะห์

1.1 เติมตัวอย่างที่ต้องการหาน้ำตาลกลูโคส 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดแก้วเติม copper reagent 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ควรใช้ลูกแก้วปิดปากหลอดแก้วเพื่อลดการระเหยของน้ำ

1.2 ทำให้เย็นโดยแช่ในอ่างน้ำ เติม arsenomolybdate reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที จะเห็นเป็นสีเขียวหรือสีน้ำเงินเขียวขึ้นกับปริมาณน้ำตาล

1.3 เติมน้ำ 5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร

1.4 นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกับกราฟมาตราฐานกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

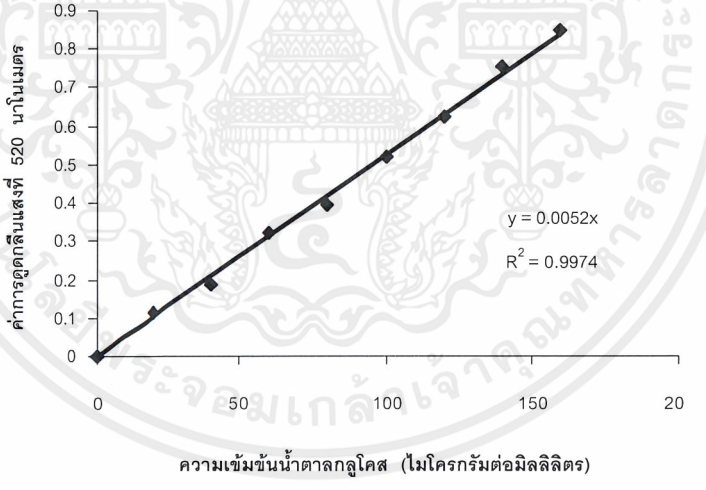
2.1 นำผลึกน้ำตาลกลูโคสไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่งโมง

2.2 เตรียมสารละลายกลูโคสความเข้มข้น 20 40 60 80 100 120 140 และ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองต่อจากนั้นนำไปวิเคราะห์ตามข้อ 1.1-1.3

กลูโคสและค่าการดูดกลืนแสง

3. คำนวณปริมาณน้ำตาลกลูโคส

ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส = $\frac{\text{ค่าดูดกลืนแสง}}{0.0052}$ X 1000 (กรัมต่อลิตร)



ภาพที่ ค1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลฟรุกโตส โดยวิธีของ Marshall และ Kool (1975)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริก 70 เปอร์เซ็นต์
2. ซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ 1.5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมได้โดยละลายซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ 1.5 กรัมในน้ำกลั่น ทำการปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร
3. แอลกอฮอล์ริกคาร์บาโซล 0.12 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยละลาย 0.12 กรัมในแอลกอฮอล์ ทำการปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1. วิธีการวิเคราะห์

1.1 เติมตัวอย่างที่ต้องการหาน้ำตาลฟรุกโตส 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

1.2 เติม 3 มิลลิลิตร ของ 70 เปอร์เซ็นต์ กรดซัลฟูริกเกรดวิเคราะห์ที่แช่เย็น เติม 0.1 มิลลิลิตร ของ 1.5 เปอร์เซ็นต์ ซีสเทอีนไฮโดรคลอไรด์ และ 0.1 มิลลิลิตรของ 0.12 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ริกคาร์บาโซทันที แล้วผสมให้เข้ากัน

1.3 นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

1.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร

1.5 นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกับกราฟมาตราฐานฟรุกโตส

2. การทำกราฟมาตราฐานของน้ำตาลฟรุกโตส

2.1 นำผลึกน้ำตาลฟรุกโตสไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่งโมง

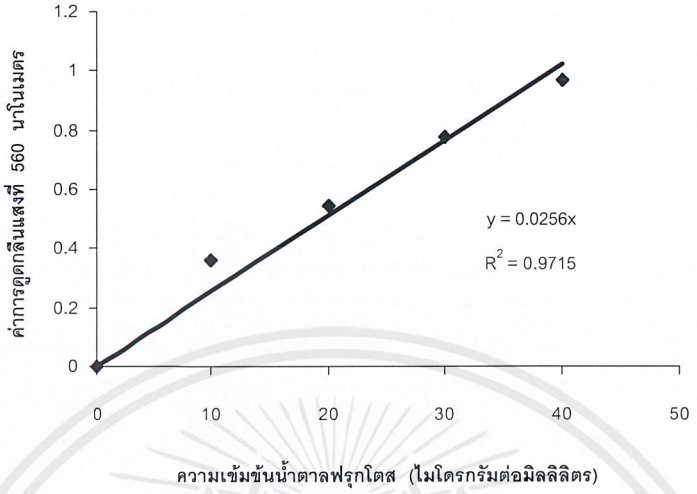
2.2 เตรียมสารละลายฟรุกโตสความเข้มข้น 10 20 30 และ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นอย่างละ 0.5 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองต่อจากนั้นนำไปวิเคราะห์ตามข้อ 1.1-1.4

2.3 เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมารน้ำตาลฟรุกโตสและค่าการดูดกลืนแสง

3. คำนวณปริมาณน้ำตาลฟรุกโตส

$$\text{ความเข้มข้นน้ำตาลฟรุกโตส} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง}}{0.256} \times 1000 \text{ (กรัมต่อลิตร)}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ค2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลฟรุกโตส

การวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งทางอ้อมโดยการเทียบกับค่าการดูดกลืนแสง ตามวิธีของ Miller Method

1. การทำกราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้ง

1.1 เตรียมหัวเชื้อ โดยถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว 1-2 ลูป บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

1.2 ทำการเลี้ยงเชื้อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.8-0.9

1.3 นำไปหัวเชื้อไปเจือจางกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ในอัตราส่วน 1:1 1:2 1:3 1:4 และ 1:5 เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร

1.4 ใช้ปิเปตดูดเซลล์แขวนลอยแต่ละความเข้มข้นใส่หลอดเซนติฟิวก์หลอดละ 10 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.5 เทของเหลวส่วนใส (supernatant) ทิ้งไป ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์เป็นจำนวน 2-3 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.6 เติมน้ำกลั่นปริมาณ 3-5 มิลลิลิตรลงไปในตะกอนเซลล์แล้วเขย่าให้เข้ากัน เทใส่กระทงฟลอย์ที่อบแห้งและชั่งน้ำหนักแล้ว นำเข้าตู้อบร้อน อบที่อุณหภูมิ 70-90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

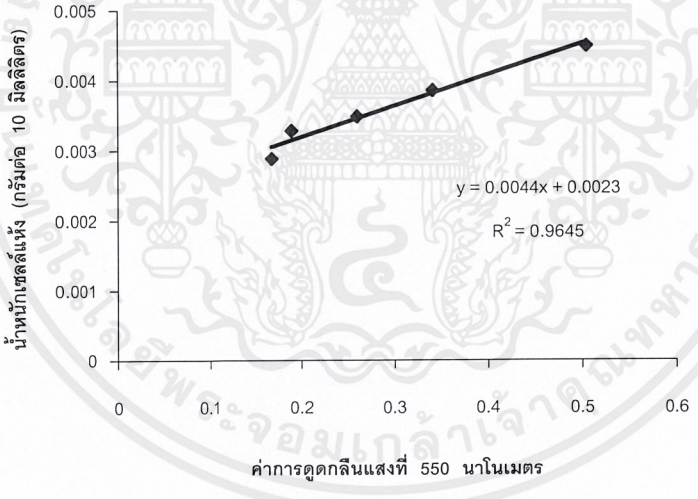
1.7 ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งน้ำหนักเซลล์

1.8 คำนวณหาน้ำหนักเซลล์ที่แท้จริง

1.9 นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งกับค่าการดูดกลืนแสง

2. คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

น้ำหนักเซลล์แห้ง = {(0.0044 X ค่าการดูดกลืนแสง) + 0.0023} X 100 (กรัมต่อลิตร)



ภาพที่ ค3 กราฟมาตรฐานน้ำหนักเซลล์แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้