สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลของ *Hansenula polymorpha* TISTR 5140

นายนพดล รังแก้ว
นางสาวรุจิรินทร์ อู่แก้ว
นางสาวรุ่งจิตร ยอดดี

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 43981
วัน, เดือน, ปี 18 ต.ค. 2545

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

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

The study of growth and production of xylitol by *Hansenula polymorpha* TISTR 5140

Mr. Nopadon Rungkeaw
Miss Rujirin Aukaw
Miss Rungjit Yoddee

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
2001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลของ *Hansenula polymorpha* TISTR 5140

โดย นายนพดล รังแก้ว

นางสาวรุจิรินทร์ อู่แก้ว

นางสาวรุ่งจิตร ยอดดี

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. มาลินี ตันติยาภรณ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

(รศ. ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง) หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

(ดร.สมชาย ไกรรักษ์) ประธานกรรมการ

(รศ.สุขใจ ชูจันทร์) กรรมการ

(รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์) กรรมการ

(อาจารย์ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลของ *Hansenula polymorpha* TISTR 5140

โดย นายนพดล รังแก้ว
นางสาวรุจิรินทร์ อู่แก้ว
นางสาวรุ่งจิตร ยอดดี

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. มาลินี ตันติยาภรณ์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา 2544

บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง *Hansenula polymorpha* TISTR 5140 พบว่า อายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมคือ 3 ชั่วโมงในอาหาร Modified medium ที่มีปริมาณกลูโคส 5.0 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 2.0 กรัมต่อลิตรภายใต้สภาวะการเจริญโดยใช้อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชอาหารเพาะเลี้ยงเริ่มต้นที่ 5.6 ให้อัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.500 ต่อชั่วโมง เมื่อผลิตไซลิทอลในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยการหมักแบบครั้งคราว โดยใช้อายุกล้าเชื้อและสภาวะการเพาะเลี้ยงเหมือนในการทดลองระดับฟลาสก์ ใช้อัตราการกวน 1,000 รอบต่อนาที เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ ภายหลังจากการหมัก 6 ชั่วโมง เติมน้ำตาลไซโลส 20 กรัมต่อลิตร ลดอัตราการกวนเป็น 125 รอบต่อนาที ผลการทดลองพบว่า เชื้อยีสต์สามารถผลิตไซลิทอลปริมาณ 8.267 กรัมต่อลิตร ผลได้ของเซลล์จากไซโลส 0.257 กรัมเซลล์ต่อกรัมไซโลส ผลได้ของไซลิทอลจากไซโลส 0.838 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส อัตราการผลิตไซลิทอล 0.204 กรัมไซลิทอลต่อชั่วโมง และอัตราการผลิตไซลิทอลจำเพาะ 0.037 กรัมไซลิทอลต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	The study of growth and production of xylitol by *Hansenula polymorpha* TISTR 5140
Name	Mr. Nopadon Rungkeaw
	Miss Rungjirin Aukaw
	Miss Rungjit Yoddee
Special Project Advisor	Associated Professor Malinee Tuntiyaporn
Special Project Co-Advisor	Prasit Dewatthanawong
Department	Applied biology
Acedemic Year	2001

Abstract

Studies on the optimum growth condition in *Hansenula polymorpha* TISTR 5140 revealed that the inoculum 3 hours culture in a modified medium compose of 5 g/l of glucose and 2 g/l of yeast extract were suitable for growth in the shake flask cultivation. The specific growth rate is 0.500 h^{-1} at initial pH 5.6, temperature at 30°C and 250 rpm/min of shaking. In fed batch culture, xylitol can be produced fermentation, using inoculum age, condition as in the shake flask and stiring velocity at 1,000 rpm was determining biomass production. After 6 hours of growth in 2 litres fermenter, xylose 20 g/l was added and the stir rate was decreased to 125 rpm. The experimental results showed that the maximum yield of xylitol was 8.267 g. of xylitol/l, the yield of biomass from xylose ($Y_{x/s}$) was 0.257 g.of cell/g. of xylose, the yield of xylitol from xylose ($Y_{p/s}$) was 0.838 g. of xylitol/g. of xylose, the rate of xylitol formation (Q_p) was 0.204 g. of xylitol/hour and the specific xylitol formation rate (q_p) was 0.037 g. of xylitol/g. of cell/hour.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ. มาลินี ตันติยาภรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ และอาจารย์ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมปัญหาพิเศษ ผู้ซึ่งให้ความรู้ คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ กำลังใจ ตลอดจนความช่วยเหลือด้านต่าง ๆ ด้วยดีตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. สมชาย ไกรรักษ์ ประธานกรรมการ และ รศ. สุขใจ ชูจันทร์ คณะกรมการ ซึ่งให้ความช่วยเหลือและคำปรึกษาที่ดีตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ผู้ซึ่งได้ให้ชีวิต การศึกษาและทุกสิ่งทุกอย่างแก่ข้าพเจ้า อีกทั้งเป็นแบบอย่างที่ดีในการดำเนินชีวิตและการทำงานตลอดมา

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ธุรการภาคทุกท่านที่คอยอำนวยความสะดวกต่าง ๆ

และขอขอบคุณทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษ รวมถึงการจัดพิมพ์เอกสารให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

5 มีนาคม 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	3
คุณสมบัติไซลิทอล	3
ข้อจำกัดในการใช้ไซลิทอล	4
เมแทบอลิซึมของไซลิทอล	6
แหล่งที่พบไซลิทอล	7
วิถีการผลิตไซลิทอลโดยจุลินทรีย์	8
การผลิตไซลิทอลโดยจุลินทรีย์	10
เมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์	11
ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์	14
การผลิตไซลิทอลทางเคมี	16
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	18
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	22
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	34
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก ก ผลการทดลอง	39
ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงเชื้อ	51
ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์	53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	เมแทบอลิซึมของ polyols ในร่างกายมนุษย์	6
ภาพที่ 2	ผลของกลูโคสและไซลิทอลต่อปริมาณน้ำตาลในเลือด	7
ภาพที่ 3	วิถีการเกิดไซลิทอลจากเมแทบอลิซึมของไซโลส	8
ภาพที่ 4	การสร้างและใช้โคเอนไซม์ (coenzyme regeneration) ในยีสต์ที่หมักไซโลสได้	9
ภาพที่ 5	เมแทบอลิซึมของไซโลสในยีสต์	10
ภาพที่ 6	เมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลส-5-ฟอสเฟต	11
ภาพที่ 7	เมแทบอลิซึมของ xylulose-5-phosphate ของยีสต์ *Pachysolen tannophilus*	13
ภาพที่ 8	การผลิตไซโลสและไซลิทอลโดยวิธีทางเคมี	17
ภาพที่ 9	ผลการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง 2 ชนิด คือ YM medium และ Modified medium ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที	23
ภาพที่ 10	ผลการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium โดยแปรผันอายุกล้าเชื้อที่ 3 9 และ 15 ชั่วโมง ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที	25
ภาพที่ 11	ผลการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium โดยแปรผันปริมาณกลูโคส 5 10 และ 15 กรัมต่อลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที	27
ภาพที่ 12	ผลการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium โดยแปรผันปริมาณยีสต์สกัด 2 4 และ 6 กรัมต่อลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที	29
ภาพที่ 13	ผลการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 1,000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm และพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยง 5.6	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

ภาพที่ 14 ผลการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 1,000 รอบต่อนาที เมื่อถึงชั่วโมงที่ 6 ทำการเติมไซโลสและลดอัตราเร็วการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm และพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยง 5.6 31

ภาพที่ 15 ผลการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 1,000 รอบต่อนาที เมื่อถึงชั่วโมงที่ 6 ทำการเติมไซโลสและลดอัตราเร็วการกวนเป็น 125 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm และพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยง 5.6 32

ภาพภาคผนวกที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งและค่าความขุ่นเซลล์ 54

ภาพภาคผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานของกลูโคส 56

ภาพภาคผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานของไซโลส 57

ภาพภาคผนวกที่ 4 กราฟมาตรฐานของไซลิทอล 59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพที่สำคัญของไซลิทอล 5

ตารางที่ 2 ปริมาณไซลิทอลในผักผลไม้ต่าง ๆ 7

ตารางที่ 3 สายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลส 14

ตารางที่ 4 ผลของอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) และผลได้ของเซลล์จากกลูโคส ($Y_{x/s}$) ในอาหารเพาะเลี้ยงระหว่าง YM medium กับ Modified medium 24

ตารางที่ 5 ผลของอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) และผลได้ของเซลล์จากกลูโคส ($Y_{x/s}$) ในการศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมที่ 3 9 และ 15 ชั่วโมง 26

ตารางที่ 6 ผลของอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) และผลได้ของเซลล์จากกลูโคส ($Y_{x/s}$) ในการศึกษาปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมที่ 5 10 และ 15 กรัมต่อลิตร 26

ตารางที่ 7 ผลของอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) ในการศึกษาปริมาณยีสต์สกัดที่เหมาะสมที่ 2 4 และ 6 กรัมต่อลิตร 28

ตารางที่ 8 ผลการเพาะเลี้ยง H. polymorpha TISTR 5140 ในสูตรอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล โดยแปรผันปริมาณอัตราการกวนหลังจากเติมไซโลส 32

ตารางผนวกที่ 1 ผลการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง 2 ชนิดคือ YM medium และ Modified medium ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที 39

ตารางผนวกที่ 2 ผลการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium โดยแปรผันอายุกล้าเชื้อที่ 3 9 และ 15 ชั่วโมง ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที 40

ตารางผนวกที่ 3 ผลการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium โดยแปรผันปริมาณกลูโคส 5 10 และ 15 กรัมต่อลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที 41

ตารางผนวกที่ 4 ผลการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium โดยแปรผันปริมาณยีสต์สกัด 2 4 และ 6 กรัมต่อลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที

ตารางผนวกที่ 5 ผลการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราเร็วการกวน 1,000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm และพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยง 5.6 43

ตารางผนวกที่ 6 ผลการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราเร็วการกวน 1,000 รอบต่อนาที เมื่อถึงชั่วโมงที่ 6 ทำการเติมไซโลสและลดอัตราเร็วการกวนเป็น 125 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm และพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยง 5.6 45

ตารางผนวกที่ 7 ผลการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราเร็วการกวน 1,000 รอบต่อนาที เมื่อถึงชั่วโมงที่ 6 ทำการเติมไซโลสและลดอัตราเร็วการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm และพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยง 5.6 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลสมีปริมาณมาก ซึ่งองค์ประกอบหลักของวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้ ได้แก่ เซลลูโลส ไซแลน และลิกนิน ในปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีทางชีวภาพเพื่อใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งประเภทลิกโนเซลลูโลส ซึ่งรวมถึงการเปลี่ยนวัสดุที่มีปริมาณไซแลนสูงให้เป็นผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เช่น เอทานอล โปรตีนเซลล์เดียวและสารเคมีชนิดต่าง ๆ การเปลี่ยนลิกโนเซลลูโลสในวัสดุเหลือทิ้งให้เป็นน้ำตาล เพื่อใช้เป็นวัสดุหมักสำหรับกระบวนการหมักอื่น ๆ นั้น ยังไม่เป็นจุดน่าสนใจในเชิงเศรษฐกิจ เนื่องจากมีน้ำตาลจากแหล่งอื่นที่ได้จากแป้งและน้ำตาลซูโครส ยกเว้นการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตไซลิทอล ทั้งนี้เพราะไซลิทอลสามารถผลิตได้จากน้ำตาลไซโลสเท่านั้น

ไซลิทอลเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดเพนทาเวเลนท์แอลกอฮอล์ที่ได้จากน้ำตาลไซโลส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว มีความหวานใกล้เคียงกับน้ำตาลซูโครส แต่ไซลิทอลยังมีคุณสมบัติที่ดีอีกหลายประการ เช่น มีรสชาติดีและเย็นสดชื่นเหมือนเมนทอล และไม่ทำให้ฟันผุ (non-cariogenicity) เนื่องจากจุลินทรีย์ในช่องปากไม่สามารถใช้ไซลิทอลได้ โดยเฉพาะ *Streptococci mutans* ไม่สามารถนำไซลิทอลไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมได้ จึงสามารถลดปัญหาฟันผุที่เกิดจากจุลินทรีย์ได้ ผลิตภัณฑ์ที่มีไซลิทอลเป็นองค์ประกอบทำให้อายุการเก็บรักษานานขึ้น เนื่องจากสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด และเมื่อใช้ไซลิทอลร่วมกับสารให้ความหวานชนิดอื่นจะให้พลังงานที่ต่ำ จึงเหมาะกับผู้ที่ควบคุมน้ำหนัก นอกจากนี้ไซลิทอลสามารถใช้ในผู้ป่วยโรคเบาหวานได้ (Emodi, 1978) เพราะการเผาผลาญไซลิทอลไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของผู้ป่วย และปริมาณอินซูลินในเลือดก็จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกัน ความปลอดภัยในการใช้ไซลิทอลในอาหารนั้นยังไม่มีรายงานว่าเป็นสารก่อมะเร็ง จึงนับได้ว่ามีความปลอดภัยมากเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารให้ความหวานชนิดอื่น ๆ และไซลิทอลยังได้รับอนุญาตให้ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารทั่วไป ทำให้ไซลิทอลเป็นสารที่น่าสนใจในอุตสาหกรรมอาหารหลายชนิด

ในธรรมชาติไซลิทอลพบในผักและผลไม้ ปริมาณน้อยมากซึ่งไม่คุ้มต่อการผลิตในระดับอุตสาหกรรมด้วยวิธีการสกัดจากผักผลไม้ที่มีไซลิทอลเป็นองค์ประกอบ ปัจจุบันการผลิตไซลิทอลในระดับอุตสาหกรรม 2 กระบวนการ ได้แก่ กระบวนการทางเคมี โดยใช้น้ำตาลไซโลสที่ได้จากการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีเซมิเซลลูโลส หรือไซแลนเป็นองค์ประกอบ (Hyvonen และ Koivistoinen, 1983) เช่น ซังข้าวโพด ฟางข้าว เศษไม้ หรือน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมกระดาษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นต้น มาเป็นวัตถุดิบในการทำปฏิกริยาไฮโดรจีเนชัน (hydrogenation) ซึ่งวิธีการนี้ใช้ต้นทุนการผลิตสูง ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นไซลิทอลค่อนข้างต่ำ และผลิตผลที่ได้มีสารปนเปื้อนอยู่มาก ซึ่งทำให้ขั้นตอนการผลิตไซลิทอลให้บริสุทธิ์ยุ่งยากขึ้น วิธีการผลิตโดยการใช้กระบวนการหมักทางเทคโนโลยีชีวภาพ จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เพื่อใช้ทดแทนกระบวนการผลิตทางเคมี ให้ผลผลิตที่สูงขึ้นและลดต้นทุนในการผลิตไซลิทอลลง จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตไซลิทอลมีทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ แต่ยีสต์มีการศึกษามากที่สุด เพราะว่าผลิตไซลิทอลได้สูง โดยเฉพาะยีสต์ในสกุล *Candida* sp. เช่น *C. mogii* (Sirisansaneeyakul และคณะ, 1995) *C. tropicalis* (Horitsu และคณะ, 1992) *C. guilliermondii* (Meyrial และคณะ, 1991) เป็นต้น การผลิตทางชีวภาพไม่จำเป็นต้องอาศัยวัตถุดิบคุณภาพสูง โดยสามารถใช้น้ำตาลไซโลสที่จากวัสดุเหลือทิ้งที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ ประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง คือ อายุกล้าเชื้อ ปริมาณเซลล์เริ่มต้น พีเอชของอาหารอุณหภูมิ องค์ประกอบของอาหาร ความเข้มข้นของสับสเทรต ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ สับสเทรต่ร่วมที่เป็นน้ำตาลชนิดอื่น และความเข้มข้นของไซลิทอลผลิตได้ เป็นต้น

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาช่วงของอายุกล้าเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140 ที่มีผลต่อการเติบโตของเชื้อ
2. ศึกษาการเติบโตของ *H. polymorpha* TISTR 5140 โดยการแปรผันปริมาณน้ำตาลกลูโคส และยีสต์สกัด
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* TISTR 5140 ในถังหมักเพื่อผลิตไซลิทอล

ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ทำการศึกษาถึงการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* TISTR 5140 โดยใช้น้ำตาลกลูโคสและไซโลส เพื่อผลิตน้ำตาลไซลิทอล

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเป็นแนวทางการศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140
2. เป็นแนวทางสำหรับการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140 ในระดับอุตสาหกรรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

ไซลิทอล

ไซลิทอลเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นอนุพันธุ์ของไซโลสที่พบในธรรมชาติในผักผลไม้ปกติไซลิทอลจะเป็นสารมัธยันต์ (intermediate) ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Hollmann และ Touster, 1957) การผลิตไซลิทอลเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารนั้นสามารถผลิตได้จากไซโลส โดยกระบวนการทางเคมี หรือผลิตโดยการหมักจากวัสดุเหลือทิ้งที่มีไซโลสเป็นองค์ประกอบ (สาโรจน์, 2537)

ในปี ค.ศ. 1983 FAO/WHO กำหนดให้ไซลิทอลเป็นสารผสมในอาหารได้ โดยปัจจุบันมีมากกว่า 40 ประเทศ ที่ใช้ไซลิทอลในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น ประเทศฝรั่งเศสจะใช้ไซลิทอลเป็นยาส่วนประเทศสวิสเซอร์แลนด์ เยอรมัน และประเทศในแถบสแกนดิเนเวียใช้ไซลิทอลเป็นสารเคลือบ และสารให้ความหวานในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ เช่นหมากฝรั่ง ช็อกโกแลต และผลิตภัณฑ์ขนมปัง (Barbosa และคณะ, 1988 ; Baer, 1991)

คุณสมบัติไซลิทอล

คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพที่สำคัญของไซลิทอลสรุปดังตารางที่ 1 และคุณสมบัติอื่น ๆ ที่มีความสำคัญทางอาหาร (สาโรจน์, 2537 ;Emodi, 1978)

1. ไซลิทอลละลายน้ำได้ง่าย ได้สารละลายที่มีความคงตัวสูง ไม่ว่าจะถูกความร้อนหรือเก็บรักษาไว้เป็นเวลานาน ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา Maillard Browning และ Caramelization เหมือนฟรุกโทสและเด็กซ์โทส เนื่องจากไซลิทอลไม่มีหมู่คีโตนหรือหมู่อัลโดส จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้ไซลิทอลได้ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่มีไซลิทอลเป็นส่วนประกอบเก็บรักษาไว้ได้นานโดยไม่ถูกทำลาย

2. ไซลิทอลมีรสชาติดี ให้ความรู้สึกเย็นเหมือนเมนทอล เนื่องจากมีค่าความร้อนจำเพาะในการละลายเท่ากับ –34.8 แคลอรีต่อกรัม แต่ในสภาพที่เป็นสารละลายหรือรูปอสัณฐาน (amorphous form) จะไม่มีคุณสมบัติเย็น (cooling effect) ดังนั้นถ้าต้องการให้มีคุณสมบัติเย็นต้องใช้ในรูปของผลึก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ไซลิทอลมีความหวานเช่นเดียวกับน้ำตาลทั่วไป แต่หวานมากกว่าแมนนิทอล และซอร์บิทอล 2.5 และ 2 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับน้ำตาลซูโครสจะมีความหวานตั้งแต่ 0.85 ถึง 1.25 เท่าขึ้นอยู่กับค่าพีเอช ความเข้มข้น อุณหภูมิ และความเข้มข้นของเกลือ ถ้ากำหนดให้น้ำตาลซูโครสมีความหวานเป็น 100 สารให้ความหวานชนิดอื่นจะมีความหวานสัมพันธ์ดังนี้ ฟรุกโทส 150 ไซลิทอล 85-120 กลูโคส 70 ไซโลส 67 ซอร์บิทอล 50 และแมนนิทอล 40

4. ไซลิทอลเป็นแหล่งของพลังงานที่ดี เมื่อดูดซึมเข้าร่างกายแล้วจะให้พลังงาน 4.06 กิโลแคลอรีต่อกรัม (16.7 กิโลจูลต่อกรัม) เหมือนกับคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น

5. การป้องกันฟันผุ เนื่องจากจุลินทรีย์ในช่องปาก เช่น *Streptococci* ไม่สามารถใช้ไซลิทอลเป็นแหล่งอาหารได้จึงไม่มีการผลิตกรด (Makinen, 1979) ดังนั้นการบริโภคอาหารที่มีไซลิทอลเป็นสารให้ความหวาน เช่น หมากฝรั่ง จะช่วยป้องกันการเกิดฟันผุได้ (Pepper และ Olinger, 1988)

ข้อจำกัดในการใช้ไซลิทอล

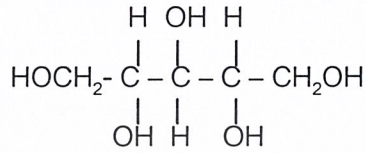
1. การบริโภคไซลิทอลเป็นปริมาณมากในคราวเดียวจะทำให้ท้องเสีย (gastrointestinal distress and osmotic diarrhea) เนื่องจากไซลิทอลมีคุณสมบัติเป็นยาระบาย เพราะไซลิทอลมีคุณสมบัติเหมือนคาร์โบไฮเดรตอื่น ๆ คือดูดซับน้ำไว้อย่างช้า ๆ ดังนั้นเมื่อบริโภคเป็นครั้งแรกควรบริโภคในปริมาณต่ำก่อน (30 กรัมต่อวัน) และค่อย ๆ เพิ่มปริมาณขึ้น แต่จะบริโภคได้สูงสุดราว 200-300 กรัมต่อวัน

2. การใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อให้มีรสชาติเย็นสดชื่นนั้น จะต้องใช้ไซลิทอลที่อยู่ในรูปผลึกเท่านั้น ซึ่งอาจจะทำเกิดลักษณะผิวสัมผัสที่เปลี่ยนแปลงไป และต้องเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

3. ไซลิทอลจะมีราคาแพงเมื่อเทียบกับสารให้ความหวานชนิดอื่น เนื่องมาจากต้นทุนที่ใช้ในการผลิตสูง ทำให้การใช้ไซลิทอลไม่แพร่หลาย ถึงแม้ว่าไซลิทอลสามารถใช้กับผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานได้ แต่อาหารสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานใช้ฟรุกโทสแทนเนื่องจากราคาถูก และไม่เกิดผลข้างเคียงเช่นเดียวกับการใช้ไซลิทอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่1 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพที่สำคัญของไซลิทอล

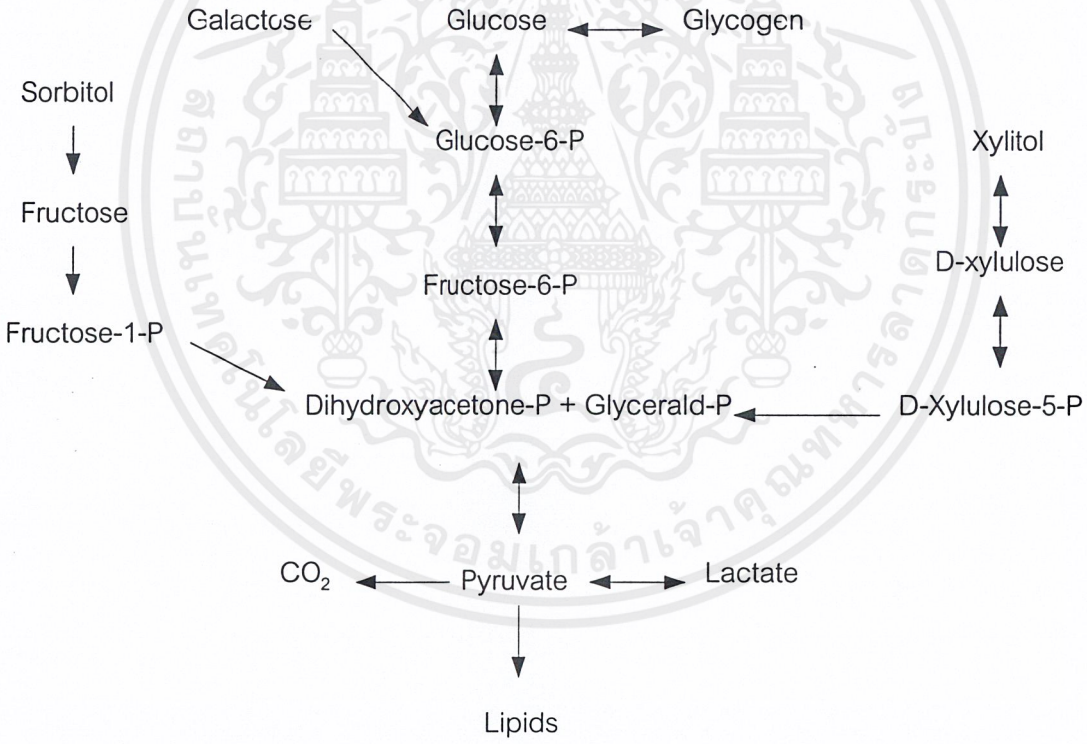
คุณสมบัติ	รายละเอียด
สูตรโมเลกุล	$C_5H_{12}O_5$
โครงสร้าง	
น้ำหนักโมเลกุล	152.1
รูปร่าง	ผงผลึก
สี	ขาว
รสชาติ	หวาน
กลิ่น	ไม่มีกลิ่น
ความหวานเปรียบเทียบ	มีความหวานมากกว่าซูโครส แต่หวานมากกว่าซอร์บิทอล และแมนนิทอล
จุดหลอมเหลว	93.4 – 94.7 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	216 องศาเซลเซียส
การละลายในน้ำ (25 องศาเซลเซียส)	64.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
การละลายในเอทานอล	1.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
การละลายในเมทานอล	6.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
การดูดความชื้น	ในที่มีความชื้นสูงจะดูดความชื้นได้มากกว่าซูโครสแต่น้อยกว่าซอร์บิทอล
ค่าเบี่ยงเบนแสงจำเพาะ	ไม่มีคุณสมบัติการเบี่ยงเบนแสง
สารปนเปื้อน	แมนนิทอล, ซอร์บิทอล, กาแลกติทอล, อะราบิทอล
พลังงาน	4 กิโลแคลอรีต่อกรัม

ที่มา : Emodi (1978)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมแทบอลิซึมของไซลิทอล

กระบวนการเผาผลาญไซลิทอลในร่างกาย เมื่อนำไปใช้เกิดขึ้นได้ 2 ตำแหน่ง คือ การดูดซึมที่บริเวณลำไส้ โดยกระบวนการ passive diffusion และการเผาผลาญโดยตรงที่ตับ (Smith, 1962 ; Bassler และคณะ, 1966) การดูดซึมจะเป็นไปอย่างช้า ๆ ถ้าร่างกายได้รับไซลิทอลปริมาณมากเกินไป ทำให้การดูดซึมไม่สมบูรณ์ ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดอาการท้องร่วงได้ ร่างกายสามารถรับไซลิทอลได้ 100 ถึง 300 กรัมต่อวัน ในตับนั้นไซลิทอลถูกออกซิไดซ์ไปเป็น D-xylulose จากนั้น D-xylulose จะเปลี่ยนเป็น D-xylulose-5-phosphate ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็น fructose-6-phosphate โดยผ่านวิถีเพนโตสฟอสเฟต fructose-6-phosphate จะเมทาบอไลซ์ไปเป็นกลูโคส ไกลโคเจน ไพรูเวท หรือแลคเตต ต่อไป แสดงในภาพที่ 1

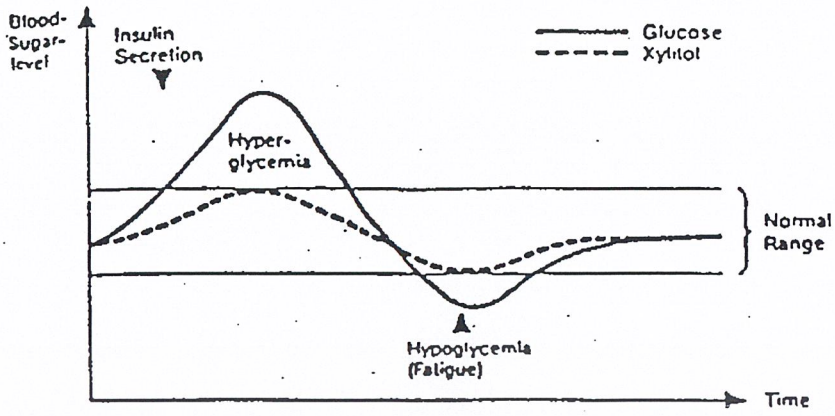


ภาพที่ 1 เมแทบอลิซึมของ polyols ในร่างกายมนุษย์

ที่มา : Emodi (1982)

การเผาผลาญไซลิทอลไม่ขึ้นกับอินซูลินดังนั้นจึงไม่เกิดสภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) หรือน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia) และการที่ไซลิทอลให้พลังงาน 4 กิโลแคลอรี่ต่อกรัมเช่นเดียวกับคาร์โบไฮเดรตอื่น ๆ ทำให้มีผลต่อปริมาณกลูโคสในเลือดเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังในภาพที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 ผลของกลูโคสและไซลิทอลต่อปริมาณน้ำตาลในเลือด

ที่มา : Emodi (1982)

แหล่งที่พบไซลิทอล

ในธรรมชาตินั้นไซลิทอลพบใน ผักและผลไม้หลายชนิด ดังตารางที่ 2 ความเข้มข้นของไซลิทอลในพืชนั้นต่ำมาก ดังนั้น การสกัดไซลิทอลจากผัก หรือผลไม้จึงไม่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ

ตารางที่ 2 ปริมาณไซลิทอลในผักผลไม้ต่าง ๆ

ชนิด	ปริมาณไซลิทอล (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้ง)
Cauliflower	300
Endives	258
Eggplant	180
Lettuce	131
Raspberries	268
Spinash	107
Strawberries	362
Yellow boletus mushroom	128
Yellow plums	935

ที่มา : Emodi (1978)

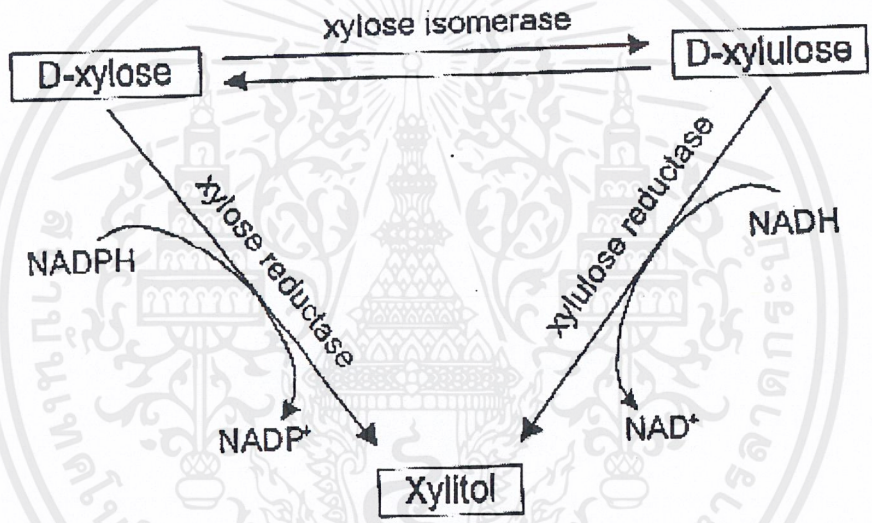
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิถีการผลิตไซลิทอลโดยจุลินทรีย์

Hofer และคณะ (1971) รายงานว่าการผลิตไซลิทอลจากไซโลสโดยจุลินทรีย์อาศัยการเปลี่ยนแปลง 2 วิถี คือ

1. ไซโลสจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไซลิทอลโดยตรงด้วยเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสโดยอาศัย NADPH เป็นโคเอนไซม์

2. ไซโลสเปลี่ยนเป็นไอโซเมอร์ไปเป็นไซลูโลสก่อนด้วยเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอเรส จากนั้นจึงถูกรีดิวซ์ไปเป็นไซลิทอลโดยเอนไซม์ไซลูโลสรีดักเทส โดยมี NADH เป็นโคเอนไซม์ ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 วิถีการเกิดไซลิทอลจากเมแทบอลิซึมของไซโลส

ที่มา : Hofer และคณะ (1971)

Barbosa และคณะ (1988) ได้ทำการศึกษาเมแทบอลิซึมของไซโลสในยีสต์ดังภาพที่ 4 เพื่อคำนวณหาผลได้ทางทฤษฎีของการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอลโดยพิจารณาจาก 4 ภาวะคือ

1. มีโคเอนไซม์ 2 ชนิดเข้าไปเกี่ยวข้องกับสองขั้นตอนแรก ของกระบวนการสลายไซโลสดังนี้ คือการรีดิวซ์ไซโลสไปเป็นไซลิทอลด้วยเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสนั้นใช้โคเอนไซม์ NADPH ส่วนการออกซิไดส์ไซลิทอลไปเป็นไซลูโลสด้วยเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสนั้นใช้โคเอนไซม์ NAD^+

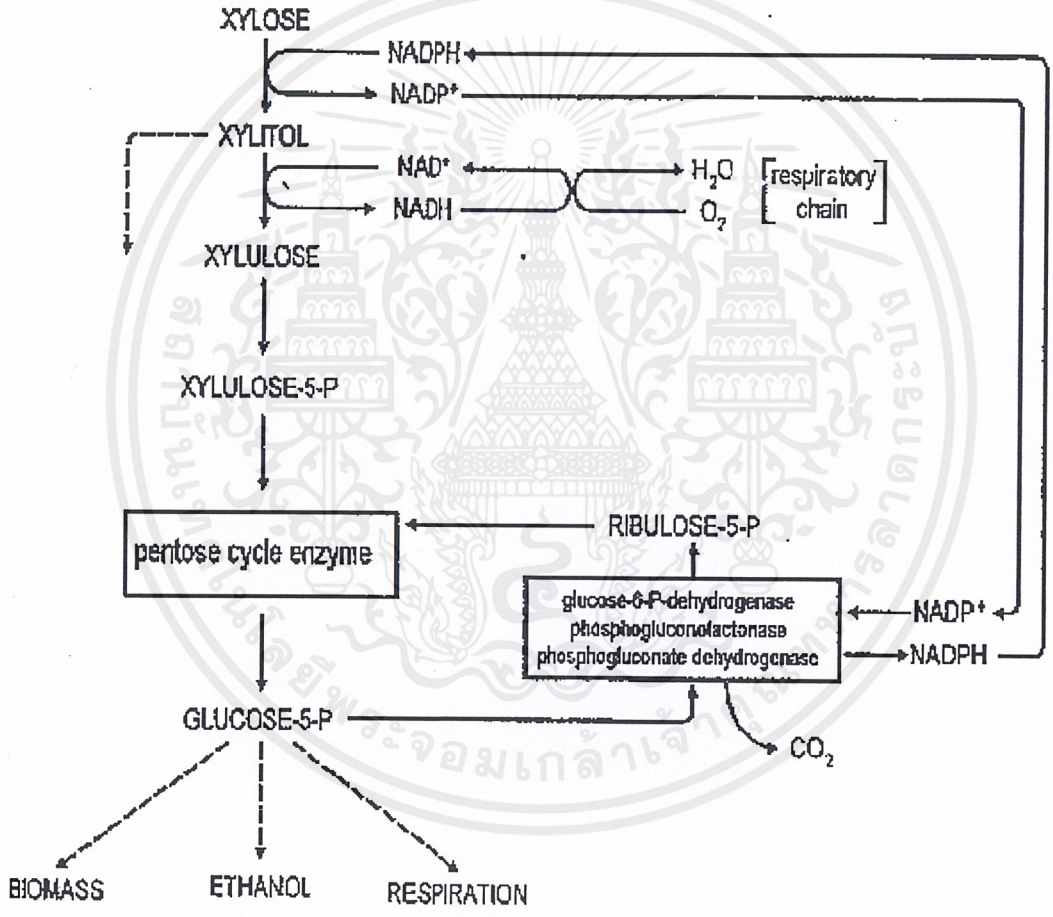
2. ไซโลสทั้งหมดถูกรีดิวซ์ไปเป็นไซลิทอลโดยที่โคเอนไซม์ NADPH นี้สังเคราะห์มาจากวัฏจักรเพนโทส และไซลิทอลทั้งหมดถูกออกซิไดส์ไปเป็นไซลูโลส โดยที่โคเอนไซม์ NAD^+ นี้สังเคราะห์มาจากกระบวนการหายใจ

3. ยีสต์ไม่มีกลไกการเปลี่ยนไปมาระหว่าง NADH และ NADPH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ภายใต้ภาวะที่เซลล์ไม่มีการเติบโต ไซลิทอลจะถูกออกซิไดส์เพื่อการสังเคราะห์ NADPH เท่านั้น ส่วนไซลิทอลที่เหลือจะถูกปล่อยออกมานอกเซลล์

การผลิตไซลิทอลในยีสต์โดยใช้ไซโลสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนและพลังงาน ในภาวะที่เซลล์ไม่มีการเติบโตนั้น ไซลิทอลส่วนใหญ่จะถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ โดยมีบางส่วนที่ถูกออกซิไดส์ไปเพื่อสังเคราะห์ NADPH (ดังภาพที่ 4) เมื่อทำสมดุลคาร์บอนและโคเอนไซม์ให้ค่าผลได้ทางทฤษฎีเท่ากับ 0.90 โมลของไซลิทอลต่อโมลของไซโลสที่ถูกใช้ (Barbosa และคณะ, 1988)



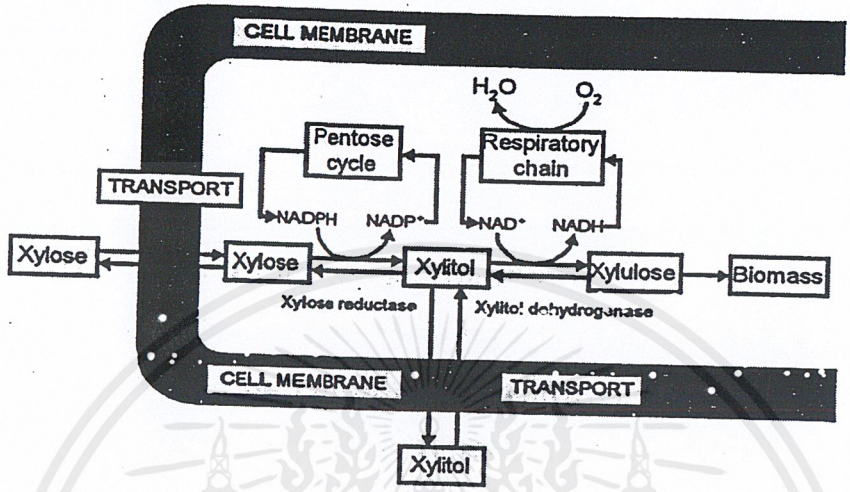
ภาพที่4 การสร้างและใช้โคเอนไซม์(coenzyme regeneration)ในยีสต์ที่หมักไซโลสได้

ที่มา : Barbosa และคณะ (1988)

Sirisaneeyakul และคณะ (1992) อธิบายถึงเมแทบอลิซึมของไซโลสในยีสต์ *C. mogii* โดยพิจารณาถึงไซโลสและไซลิทอลที่อยู่ในเซลล์และนอกเซลล์ (ดังภาพที่ 5) ไซโลสที่อยู่นอกเซลล์จะถูกส่งผ่านเข้าไปในเซลล์ และถูกเปลี่ยนเป็นไซลิทอลโดยเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส ไซลิทอลส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นจะถูกส่งออกนอกเซลล์ อีกส่วนหนึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไซลูโลสโดย เอนไซม์ไซลิทอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีไฮโดรจีเนสเพื่อใช้สังเคราะห์เป็นมวลชีวภาพต่อไป กระบวนการดังกล่าวสามารถอธิบายด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เชิงโครงสร้าง



ภาพที่ 5 เมแทบอลิซึมของไซโลสในยีสต์

ที่มา : Sirisaneeyakul และคณะ(1992)

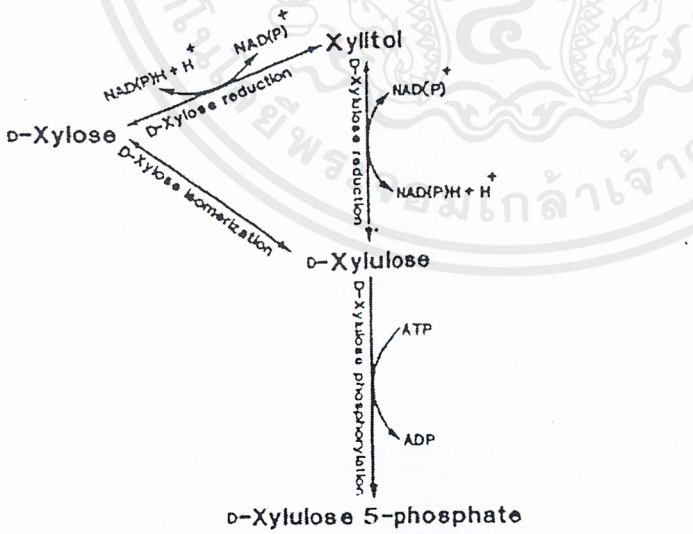
การผลิตไซลิทอลโดยจุลินทรีย์

Onishi และ Suzuki (1966) รายงานว่ายีสต์บางสายพันธุ์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ ทำให้มีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับการผลิตไซลิทอลกันอย่างกว้างขวาง มีการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้สูงสุด (วิเชียร และคณะ, 2538; Barbosa และคณะ, 1988; Gong และคณะ, 1981; Sirisaneeyakul และคณะ, 1995) ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นยีสต์ในสกุล *Candida* Gong และคณะ (1981) รายงานว่าไซโลสเปลี่ยนไปเป็นไซลิทอลได้สูงสุดที่พีเอช 8.0 และเมื่อพีเอชลดลงอยู่ในช่วงที่เป็นกรดจะทำให้การผลิตไซลิทอลลดลง ส่วนการเพาะเลี้ยง*Petromyces albertensis* จะได้ไซลิทอลและเซลล์สูงสุดที่พีเอชเริ่มต้น 6.0 – 7.0 (Dahiya, 1991) Vongsuvantert และ Tani (1989) รายงานว่า *Candida boidinii* สามารถเติบโตได้ดีที่สุดที่พีเอช 7.0 และ Vandeska และคณะ (1995) พบว่าอัตราการผลิตไซลิทอลของ *C. boidinii* สูงสุดที่พีเอช 7.0 แต่ผลได้สูงสุดอยู่ที่พีเอช 8.0 นอกจากนี้ Silva และ Afschar (1994) รายงานว่า *Candida tropicalis* สามารถผลิตไซลิทอลได้ผลได้สูงสุดที่พีเอช 2.5 และการเพิ่มค่าพีเอชจาก 2.5 เป็น 4.0 ทำให้อัตราการผลิตไซลิทอลสูงขึ้น แต่ได้ไซลิทอลลดน้อยลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์

ยีสต์ใช้น้ำตาลไซโลส เป็นไซโลส-5-ฟอสเฟตเพื่อเข้าสู่วิถีทางอื่นต่อไป น้ำตาลไซโลสเมื่อเข้าสู่เซลล์ยีสต์จะถูกเปลี่ยนไปเป็นไซลูโลส ซึ่งการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสไปเป็นไซลูโลสจะมีความแตกต่างกันในจุลินทรีย์พวก prokaryote และ eukaryote กล่าวคือใน prokaryote น้ำตาลไซโลสจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไซลูโลสด้วยปฏิกิริยา isomerization โดย เอนไซม์ xylose isomerase (Yoshitake และคณะ,1973 ;Yoshitake และคณะ,1976) ส่วนใน eukaryote น้ำตาลไซโลสจะถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลสด้วยปฏิกิริยา oxidation และ reduction โดยน้ำตาลจะถูกรีดิวซ์ ไปเป็นไซลิทอล ด้วยเอนไซม์ xylose reductase ซึ่งต้องการ NADPH เป็นโคเอนไซม์ และไซลิทอลจะถูกออกซิไดซ์ได้เป็นไซลูโลสโดยเอนไซม์ xylitol dehydrogenase ซึ่งต้องการ NADPH เป็นโคเอนไซม์ (Smilry และ Bolen, 1982 ; Maleszka และคณะ, 1983) คุณสมบัติของเอนไซม์ทั้งสองจะแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ของยีสต์ ทำให้มีความสำคัญต่อกลไกเมตาบอลิซึมของน้ำตาลไซโลส จึงเป็นผลให้ยีสต์บางสายพันธุ์สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้เฉพาะในการเจริญแบบให้อากาศ(Bruinenberg และคณะ, 1983) จากนั้นเอนไซม์ xylulose kinase จะเปลี่ยนไซลูโลสเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต โดยปฏิกิริยาฟอสโฟรีเรชั่น ดังแสดงในภาพที่ 6 (Barnett , 1976 ; Gong, 1983)



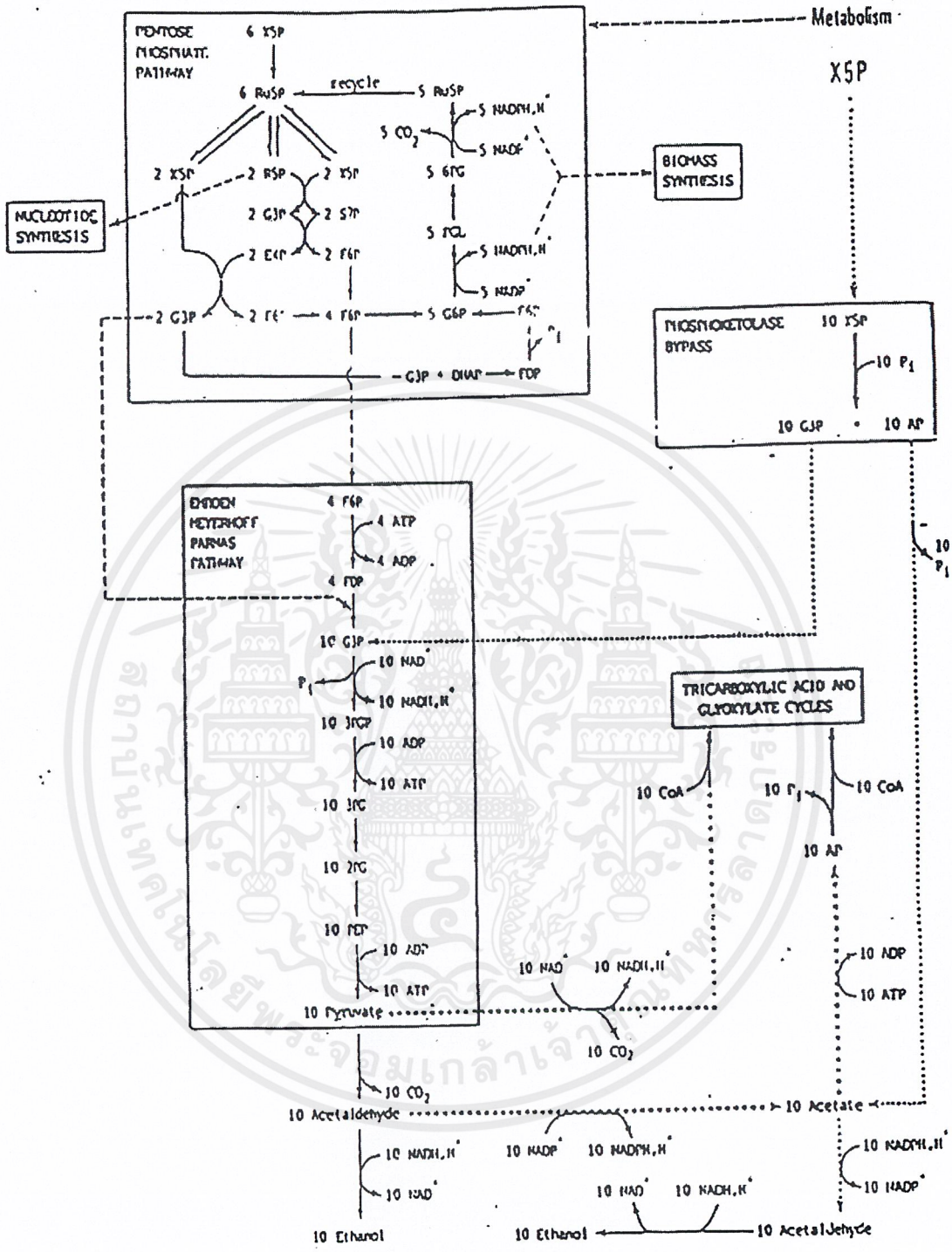
<u>ภาพที่6</u> เมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลส-5-ฟอสเฟต

ที่มา : Vongsuvanlert และ Tani (1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยไซลูโลส-5-ฟอสเฟต จะเข้าสู่วิถีเมแทบอลิซึมต่อไป 2 วิธีคือ วิถีเพนโตสฟอสเฟต หรือ phosphoketolase bypass อย่างใดอย่างหนึ่ง กรณีที่เข้าวิถีเพนโตสฟอสเฟต ไซลูโลส-5-ฟอสเฟต จะเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลฟอสเฟตที่มีจำนวนคาร์บอนต่างๆ glyceraldehydes-3-phosphate (G-3-P) และ fructose-6-phosphate นี้เป็นผลผลิตจากวิถีเพนโตสฟอสเฟตที่สามารถเข้าสู่วิถี Embden Meyerhof Pathway (EMP) เพื่อสร้างไพรูเวท และเข้าสู่ TCA cycle เพื่อจะสร้างพลังงานและเซลล์ อีกวิถีทางหนึ่งไซลูโลส-5-ฟอสเฟตจะเปลี่ยนเป็น G-3-P และ acetyl phosphate phosphoketolase ซึ่ง G-3-P ที่ได้จะเข้าสู่ EMP ต่อไป ส่วน acetyl phosphate จะถูกเมแทบอลิซึมต่อ ได้อะซิเตทซึ่งจะเปลี่ยนได้ 2 ทางคือ เป็น acetyl CoA เข้าสู่ TCA cycle หรือเป็นเอธานอล (ภาพที่ 7) ส่วนไพรูเวทที่ได้สามารถเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ เอธานอล และกรดอินทรีย์ต่าง ๆ (Gong, 1983; Jeffries, 1983; Evans และ Ratledge, 1984)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



<u>ภาพที่7</u> เมแทบอลิซึมของ xylulose-5-phosphate ของยีสต์ *Pachysolen tannophilus*

ที่มา : Slininger และคณะ (1987)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 สายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลส

สายพันธุ์	น้ำตาลไซโลสเริ่มต้น (กรัม/ลิตร)	ไซลิทอล (กรัม/ลิตร)	เอกสารอ้างอิง
Candida tropicalis	10	2.08	Gong และคณะ (1981)
Candida tropicalis HXP1	10	4.39	Gong และคณะ (1981)
Candida tropicalis HXP2	10	4.8	Gong และคณะ (1981)
Candida tropicalis 1004	20	17.0	Barbosa และคณะ (1988)
Candida guilliermondii FIT20039	104	77.2	Barbosa และคณะ (1988)
Candida boidinii NO 2210	100	48.5	Vongsavanlert และ Tani (1989)
Candida parapsilosa	10	3.1	Furlan และคณะ (1991)
Candida tropicalis IFO 0618	100	57.0	Horitsu และคณะ (1992)
Candida mogii ATCC 18364	93.5	55.14	Sirisansaneeyakul และคณะ (1992)

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์

1. องค์ประกอบอาหาร

1.1 ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเริ่มต้น

ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเริ่มต้น จะมีผลต่อการผลิตไซลิทอลของยีสต์โดย Gong และคณะ (1981) ศึกษาถึงการผลิตไซลิทอลของเชื้อ *Candida tropicalis* HXP2 โดยใช้น้ำตาลไซโลสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 5.0 10.0 20.0 และ 30.0 เปอร์เซ็นต์ ภายใต้สภาวะการให้อากาศ พบว่าน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นระหว่าง 5.0 ถึง 20.0 เปอร์เซ็นต์ จะให้อัตราการผลิตไซลิทอลคล้ายกัน และตั้งแต่ 30.0 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป อัตราการผลิตไซลิทอลต่ำลง ส่วน Chen และ Gong (1985) พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสสูง ๆ จะไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของการใช้ไซโลสและเปลี่ยนเป็นไซลิทอล โดยที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสสูง ๆ นี้ จะไปมีผลยับยั้งอัตราการเจริญของยีสต์ *Candida* sp. B-22 แต่จะมีผลเล็กน้อยต่ออัตราการผลิตไซลิทอล ส่วนในเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

C. guilliermondii FTI 20037 สามารถผลิตไซลิทอลได้ 72.2 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลไซโลสเริ่มต้น 104 กรัมต่อลิตร Meyrial และคณะ (1991) ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลไซโลสเริ่มต้นตั้งแต่ 1 ถึง 30 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสทำให้ผลผลิตของไซลิทอลสูงขึ้น แต่ให้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 0.75 กรัมต่อกรัม โดยใช้น้ำตาลไซโลสเริ่มต้นเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ซึ่งคิดเป็น 82.6 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี

1.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนเป็นอีกปัจจัยหนึ่ง ซึ่งมีผลต่อการผลิตไซลิทอลของยีสต์ Barbosa และคณะ (1988) ได้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตไซลิทอลเชื้อ *C. guilliermondii* FTI 20037 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย พบว่าเมื่อใช้ ยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อยีสต์สามารถผลิตไซลิทอลมากกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และเมื่อเติม yeast extract หรือ casamino acid ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลทำให้ปริมาณไซลิทอลมากกว่าการใช้ยูเรียเพียงอย่างเดียว ส่วนเชื้อ *C. bodinii* No. 2201 จะผลิตไซลิทอลได้ดีเมื่อใช้แอมโมเนียมอะซิเตตเป็นแหล่งไนโตรเจน (Vongsuvanlert และ Tani, 1989) Palnitkar และ Lachke (1992) ได้ทำการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไซลิทอลและเอธานอลของเชื้อ *C. shehatae* (ATCC 22984) โดยเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ (ยูเรีย แอสพาราจีน และเปปโตน) กับสารอนินทรีย์ (แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมซัลเฟต และโปแตสเซียมไนเตรท) พบว่า เชื้อจะผลิตไซลิทอลได้สูงเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นสารอินทรีย์และการใช้ไซโลสก็เป็นไปได้รวดเร็วกว่าใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์

2. สภาพแวดล้อม

2.1 ระดับการให้อากาศ

ระดับการให้อากาศจะมีผลต่อการใช้น้ำตาลไซโลส การเติบโต และการผลิตไซลิทอล ซึ่งขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อด้วย Du Preez และ Van der Walt (1983) พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ*C. shehatae* ในสภาวะที่จำกัดออกซิเจน (oxygen-limited) ไซลิทอลจะถูกสร้างขึ้นภายหลังจากการเกิดเอธานอลแล้ว และเพิ่มปริมาณเชื้ออย่างรวดเร็วคือ 17.6 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในสภาพกึ่งให้อากาศ (semi-aerobic) ผลิตไซลิทอลได้ 1.4 กรัมต่อลิตร และเมื่อเลี้ยง *C. shehatae* ในสภาพให้ออกซิเจน (aerobic) ไม่พบไซลิทอลเกิดขึ้นเลย Barbosa และคณะ (1989) ศึกษาระดับการให้อากาศที่มีผลต่อการผลิตไซลิทอลของเชื้อ *C. guilliermondii* FTI 20037 โดยการเพิ่มปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 50, 100, 200 และ 300 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร พบว่า*C. guilliermondii* FTI 20037 ให้ผลผลิตไซลิทอลมากขึ้น เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาพที่มีปริมาณออกซิเจนจำกัด การให้อากาศสามารถช่วยกระตุ้นการส่งผ่านน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ยีสต์บางสายพันธุ์ได้ (Scheffer, 1966) ดังนั้นการให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อากาศจึงมีความสำคัญต่อการเติบโตและการใช้น้ำตาล แต่การผลิตไซลิทอลนั้นการให้อากาศมากเกินไปทำให้เซลล์มีการเติบโตอย่างรวดเร็วและมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสสูง ดังนั้นไซลิทอลที่ผลิตขึ้นจึงถูกออกซิไดซ์ไปเป็นไซลูโลสพร้อมกับการสังเคราะห์ NADH ทำให้ปริมาณไซลิทอลที่เกิดขึ้นลดลง (Furlan และคณะ, 1991; Kim และคณะ, 1997) การลดอัตราการการให้อากาศจะทำให้อัตราการใช้ไซโลสและการเติบโตลดลงแต่ผลได้ของไซลิทอลจะสูงขึ้น (Silva และ Afschar, 1994; Silva และคณะ, 1996; Sirisaneeyakul และคณะ, 1992; Vandeska และคณะ, 1995) Horitsu และคณะ (1992) รายงานว่ากระบวนการผลิตไซลิทอลที่มีประสิทธิภาพนั้นในขั้นตอนแรกต้องเพาะเลี้ยงเซลล์ให้เติบโตสูงสุด โดยการให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอและลดปริมาณการให้ออกซิเจนลงในช่วงของการผลิตไซลิทอล เนื่องจากการผลิตไซลิทอลจะเกิดได้ดีในสภาวะที่จำกัดออกซิเจน ถ้ามีการให้ออกซิเจนสูงตลอดการเพาะเลี้ยงจะทำให้ไซลิทอลถูกเปลี่ยนไปเป็นไซลูโลส ดังนั้นการให้ออกซิเจนสูงจะเหมาะสำหรับช่วงการเติบโตเท่านั้น

2.2 พีเอช

ในการผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสของยีสต์ ค่า พีเอช ของอาหารเลี้ยงเชื้อ จัดเป็นสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการผลิตไซลิทอลของยีสต์ รวมทั้งการเจริญของยีสต์ด้วย Vongsuvanlert และ Tani (1989) พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. boidinii* No. 2201 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชต่าง ๆ กัน ในช่วงพีเอช 4.0 ถึง 8.0 พบว่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลของเชื้อ *C. boidinii* No. 2201 คือ 7.0 ในขณะที่การเติบโตของเชื้อจะดีที่สุดที่ พีเอช 6.5

2.3 อุณหภูมิ

ความแตกต่างของอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสของยีสต์มีผลต่อปริมาณไซลิทอลที่ยีสต์สามารถผลิตได้ ทั้งนี้ขึ้นกับสายพันธุ์ของยีสต์ด้วย Barbosa และคณะ (1988) แสดงให้เห็นว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *C. guilliermondii* FTI 20037 ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ กัน พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลของเชื้ออยู่ในช่วง 30 ถึง 35 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นพบว่าเมื่อใช้อุณหภูมิเริ่มต้นในการบ่มเชื้อสูงขึ้นความเข้มข้นของไซลิทอลที่ผลิตได้จะมีค่าลดลง

การผลิตไซลิทอลทางเคมี

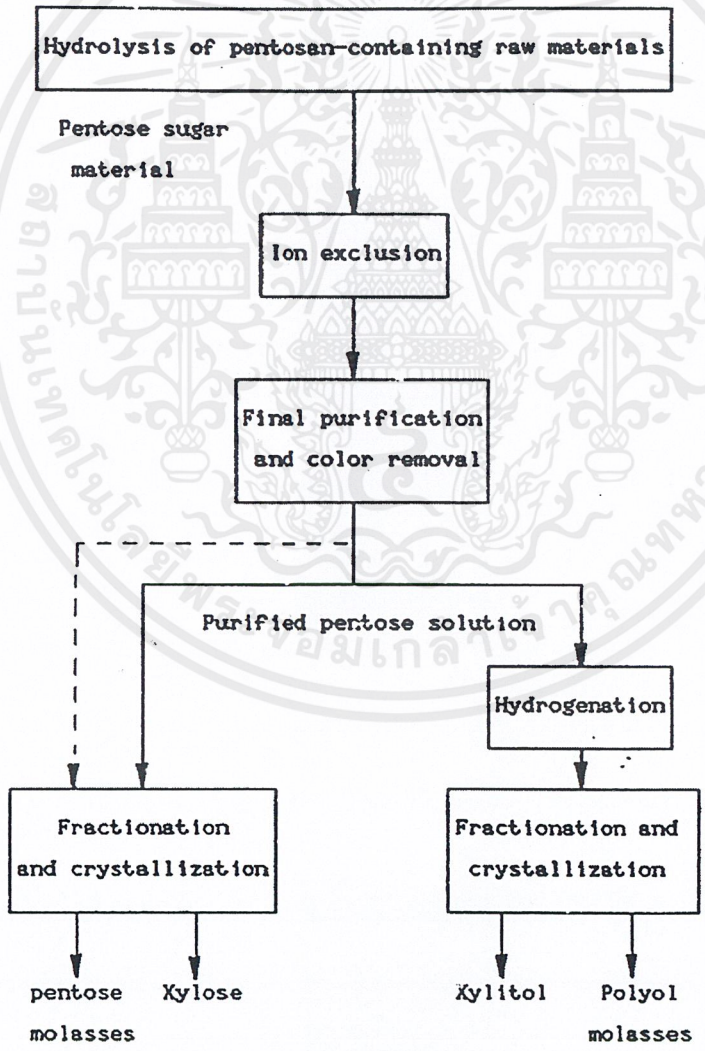
การผลิตไซลิทอลโดยวิธีทางเคมีนั้นทำได้โดยใช้น้ำตาลไซโลสมาเติมไฮโดรเจนเข้าไปในโมเลกุล (hydrogenation) จากนั้นทำให้ไซลิทอลบริสุทธิ์แล้วนำไปทำให้ตกผลึก การผลิตไซลิทอลในอุตสาหกรรมมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

นำวัตถุดิบที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบปริมาณมากมาย่อยด้วยสารละลายกรดเจือจางภายใต้ความร้อน และความดันสูง ซึ่งทำให้เฮมิเซลลูโลสถูกย่อยสลาย และจะได้น้ำตาลเพนโตสอยู่ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สารละลาย จากนั้นนำสารละลายที่มีน้ำตาลเพนโตสผสมอยู่นั้นไปแยกน้ำตาลชนิดอื่นออกเพื่อให้ได้น้ำตาลไซโลสบริสุทธิ์ โดยวิธีการ mechanical filtration และทำการแยกอิออนออก(ion-exclusion) เพื่อกำจัดสี และเกลือออกไป ดังนั้นในสารละลายจะมีแต่น้ำตาลไซโลสที่มีความบริสุทธิ์สูง (Malaja และ Hamalainen, 1977) จากนั้นทำการเติมไฮโดรเจนเข้าไปในโมเลกุลของน้ำตาลไซโลส ภายใต้ความดันและอุณหภูมิ 80 ถึง 140 องศาเซลเซียส โดยมีโลหะนิเกิลเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะได้ไซลิทอลออกมา นำสารละลายที่ผ่านการเติมไฮโดรเจนไปกรองโลหะที่ใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาออก และนำไปผ่าน ion exchange อีกครั้งนำไปทำให้มีความเข้มข้นมากขึ้น และกำจัดสีแล้วจึงแยกผลึกไซลิทอลออกมา (Wisniak และคณะ, 1974 ;Hyvonen และ Koivistoinen, 1982) ดังในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 การผลิตไซโลสและไซลิทอลโดยวิธีทางเคมี

ที่มา : Hyvoven และ Koivistoinen (1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
43981

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. เครื่องมือ

1.1 ถังหมัก (Fermenter) ขนาด 2 ลิตร Biostat ® B

1.2 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) JENWAY

1.3 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) New Brunswick Scientific Phycrometer

1.4 เครื่องชั่งสาร (Balance)

1.5 เครื่องวัดความเป็น กรด-ด่าง (pH Meter)

1.6 ตู้อบความร้อน (Hot air oven)

1.7 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

1.8 เครื่องแก้ว

2. จุลินทรีย์

Hansenula polymorpha TISTR 5140

3. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

- อาหารเก็บรักษาเชื้อ (YM broth ภาคผนวก ข)
- อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (MOD broth ภาคผนวก ข)

4. วิธีการทดลอง

4.1 ศึกษาสภาวะของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140 ในระดับฟลาสก์

4.1.1 ทำการเปรียบเทียบสูตรอาหารระหว่าง YM broth กับ MOD broth

เตรียมกล้าเชื้อในฟลาสก์ โดยเขี่ยเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140 ลงใน YM broth ปริมาตร 75 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาโนเมตร มีค่าประมาณ 0.5) แล้วถ่ายกล้าเชื้อ 10 เปอร์เซนต์ลงใน YM broth ปริมาตร 135 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ทำการถ่ายกล้าเชื้อเช่นเดียวกัน ลงในอาหาร MOD broth เพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หา

- ความขุ่นของเซลล์ที่ 600 นาโนเมตร (ภาคผนวก ก)
- ปริมาณกลูโคสตามวิธี somogyi Nelson (1952) (ภาคผนวก ก)
- น้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ก)

4.1.2 ศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมต่อการเติบโตของเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140

เตรียมกล้าเชื้อในฟลาสก์ โดยเขี่ยเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140 ลงใน YM broth ปริมาตร 75 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้อายุกล้าเชื้อในแต่ละการทดลองมีอายุครบ 3 9 และ 15 ชั่วโมงตามลำดับแล้วทำการถ่ายกล้าเชื้อ 10 เปอร์เซนต์ลงในอาหารสูตรที่ได้จากการทำการทดลองในข้อที่ 4.1.1 ปริมาตร 135 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 ชั่วโมงจนถึง 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หา

- ความขุ่นของเซลล์ที่ 600 นาโนเมตร
- ปริมาณกลูโคสตามวิธี Somogyi Nelson (1952)
- น้ำหนักเซลล์แห้ง

4.1.3 ทำการหาปริมาณกลูโคสที่เหมาะสม

เตรียมกล้าเชื้อในฟลาสก์ โดยเขี่ยเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140 ลงใน YM broth ปริมาตร 75 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ถ่ายกล้าเชื้อ 10 เปอร์เซนต์ที่มีอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 4.1.2 ลงในอาหารสูตรที่ได้จากการทำการทดลองในข้อที่ 4.1.1 ปริมาตร 135 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 5 10 และ 15 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 ชั่วโมงจนถึง 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หา

- ความขุ่นของเซลล์ที่ 600 นาโนเมตร
- ปริมาณกลูโคสที่ตามวิธี Somogyi Nelson (1952)
- น้ำหนักเซลล์แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.4 ทำการหาปริมาณยีสต์สกัดที่เหมาะสม

เตรียมกล้าเชื้อในฟลาสก์ โดยเขี่ยเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140 ลงใน YM broth ปริมาตร 75 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ถ่ายกล้าเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่มีอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมจากการทดลอง ข้อ 4.1.2 ลงในอาหารสูตรที่ได้จากการทำการทดลองในข้อที่ 4.1.1 ปริมาตร 135 มิลลิลิตร โดยแปรผันความเข้มข้นยีสต์สกัด 2 4 และ 6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 2 ชั่วโมงจนถึง 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หา

- ความขุ่นของเซลล์ที่ 600 นาโนเมตร
- ปริมาณกลูโคสตามวิธี Somogyi Nelson (1952)
- น้ำหนักเซลล์แห้ง

4.2 ศึกษาสภาวะของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140 ในระดับถังหมัก

4.2.1 ศึกษาการเติบโตของ *H. polymorpha* TISTR 5140

เพาะเลี้ยง *Hansenula polymorpha* TISTR 5140 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร (Biostat® B) ในสูตรอาหารที่เหมาะสม ที่ได้จากการทดลองในระดับฟลาสก์ปริมาณอาหาร 1,350 มิลลิลิตร เติมกล้าเชื้อปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่มีอายุที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 4.1.2 ควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงที่อัตราการกวน 1,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพีเอชของอาหารเท่ากับ 5.6 โดยการเติม NaOH หรือ H_3PO_4 ความเข้มข้น 1.0 นอร์มอล อัตราการให้อากาศ 1 vvm ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ ครึ่งชั่วโมงจนถึง 14 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หา

- ค่าความขุ่นของเซลล์ที่ 600 นาโนเมตร
- ปริมาณกลูโคสตามวิธี Somogyi Nelson (1952)
- น้ำหนักเซลล์แห้ง

4.2.2 ศึกษาผลของอัตราการกวนที่มีผลต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140

เพาะเลี้ยง *Hansenula polymorpha* TISTR 5140 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร (Biostat® B) ขนาด 2 ลิตร ในสูตรอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในระดับฟลาสก์ที่ปริมาณอาหาร 1,350 มิลลิลิตร เติมกล้าเชื้อปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่มีอายุที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 4.1.2 ควบคุมสภาวะการเพาะเลี้ยงที่อัตราการกวน 1,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพีเอชของอาหารเท่ากับ 5.6 โดยการเติม NaOH หรือ H_3PO_4 ความเข้มข้น 1.0 นอร์มอล

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราการให้อากาศ 1 vvm เพื่อผลิตเซลล์ เก็บตัวอย่างทุก ๆ ครึ่งชั่วโมง จนปริมาณน้ำตาลกลูโคสเหลือ 2 กรัมต่อลิตร จากนั้นเติมน้ำตาลไซโลสให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร และลดอัตราการกวนของแต่ละการทดลองให้เท่ากับ 125 และ 500 รอบต่อนาที ตามลำดับ ทำเก็บตัวอย่างทุก ๆ 1-4 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หา

- ความขุ่นของเซลล์ที่ 600 นาโนเมตร
- ปริมาณกลูโคสตามวิธี Somogyi Nelson (1952)
- น้ำหนักเซลล์แห้ง
- ปริมาณน้ำตาลไซโลสตามวิธี Deschatelet และ Yu (1986) (ภาคผนวก ก)
- ปริมาณไซลิทอลตามวิธี Alder และ Gustafsson (1980) (ภาคผนวก ก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ศึกษาสภาวะของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140 ในระดับฟลาสก์

1.1 การศึกษาการเติบโตของเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง 2 ชนิด

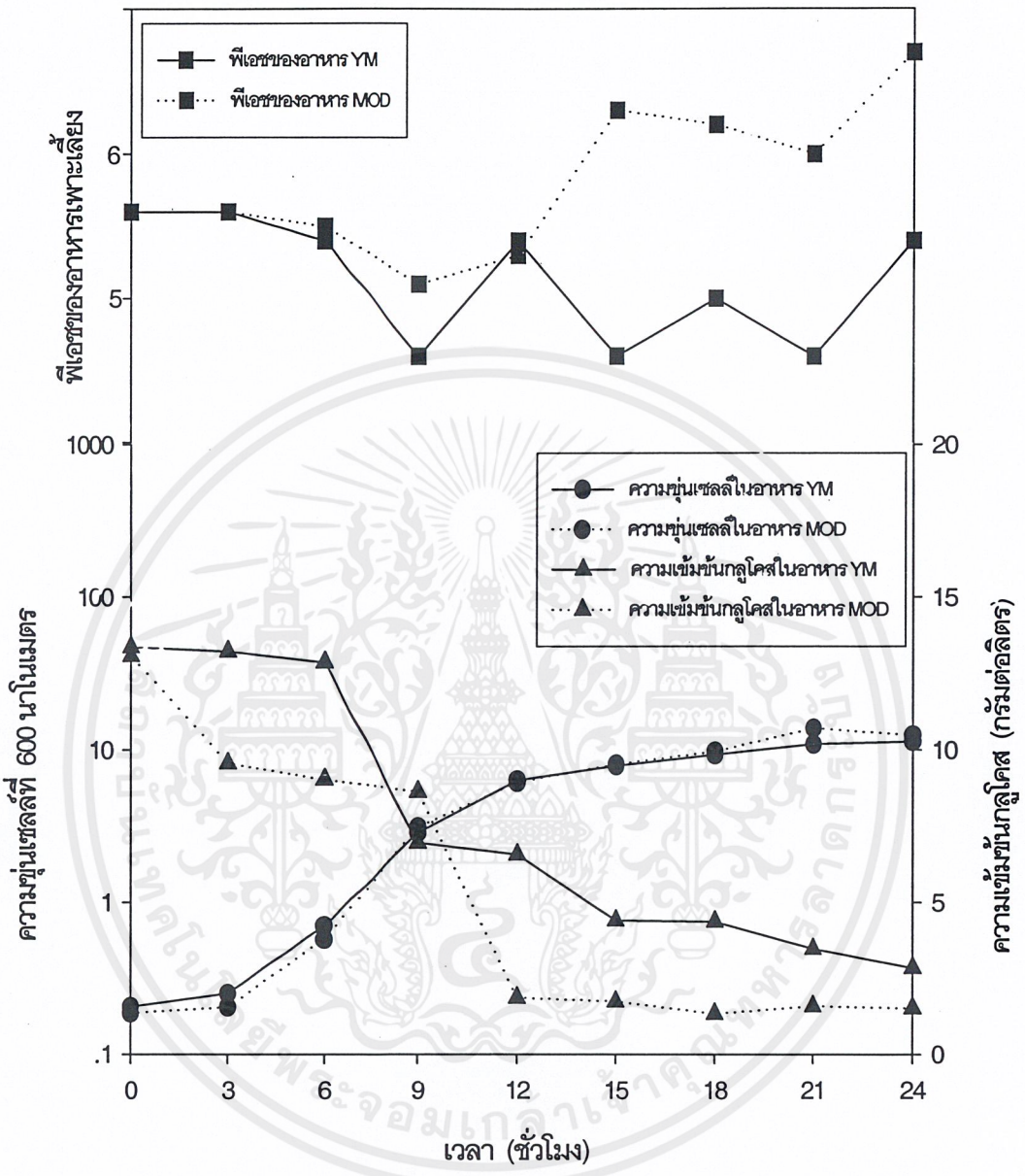
การเติบโตของเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง 2 ชนิดคือ YM medium และ Modified medium พบว่าอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium ให้อัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) ของเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140 0.324 ต่อชั่วโมง และค่าผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต ($Y_{x/s}$) 1.025 กรัมเซลล์ต่อกรัมกลูโคส ซึ่งมากกว่าในอาหาร YM medium ซึ่งให้อัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) 0.303 ต่อชั่วโมง และค่าผลได้ของเซลล์จากกลูโคส ($Y_{x/s}$) 1.002 กรัมเซลล์ต่อกรัมกลูโคส (ตารางที่ 4) เมื่อพิจารณาปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของเชื้อคือแหล่งไนโตรเจน โดยอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium มีแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิดคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ยีสต์สกัด เปปโตน ซึ่งมีมากกว่าในอาหารเพาะเลี้ยง YM medium

สอดคล้องกับการทดลองของ Sirisansaneeyakul และคณะ (1995) ซึ่งทำการศึกษาใน *Candida mogii* พบว่าอาหารที่มีการเติมยีสต์สกัดและเปปโตน จะช่วยให้การเจริญเติบโตของเชื้อและการผลิตไซลิทอลดีขึ้น

การเปลี่ยนแปลงพีเอชในระหว่างการเพาะเลี้ยงของอาหารทั้ง 2 ชนิด พบว่าเป็นไปในแนวเดียวกัน คือมีค่าเข้าใกล้ 7.0 ณ ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ กัญญา (1994) ที่ทำการเพาะเลี้ยง *Candida* sp. ณ ชั่วโมงที่ 12 มีค่าพีเอชเข้าใกล้ 7.0 แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงไปถึงชั่วโมงที่ 96 พีเอชมีค่าเป็นกรด (2.0 – 3.0)

ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหารเพาะเลี้ยง Modified medium ในการศึกษาปัจจัยอื่นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 9 ผลการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง 2 ชนิดคือ YM medium และ Modified medium ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 ผลของอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) และผลได้ของเซลล์จากกลูโคส ($Y_{x/s}$) ในอาหารเพาะเลี้ยงระหว่าง YM mediumกับ Modified medium

สูตรอาหาร	μ (h^{-1})	$Y_{x/s}$ ($g.g^{-1}$)
YM medium	0.303	1.002
Modified medium	0.324	1.025

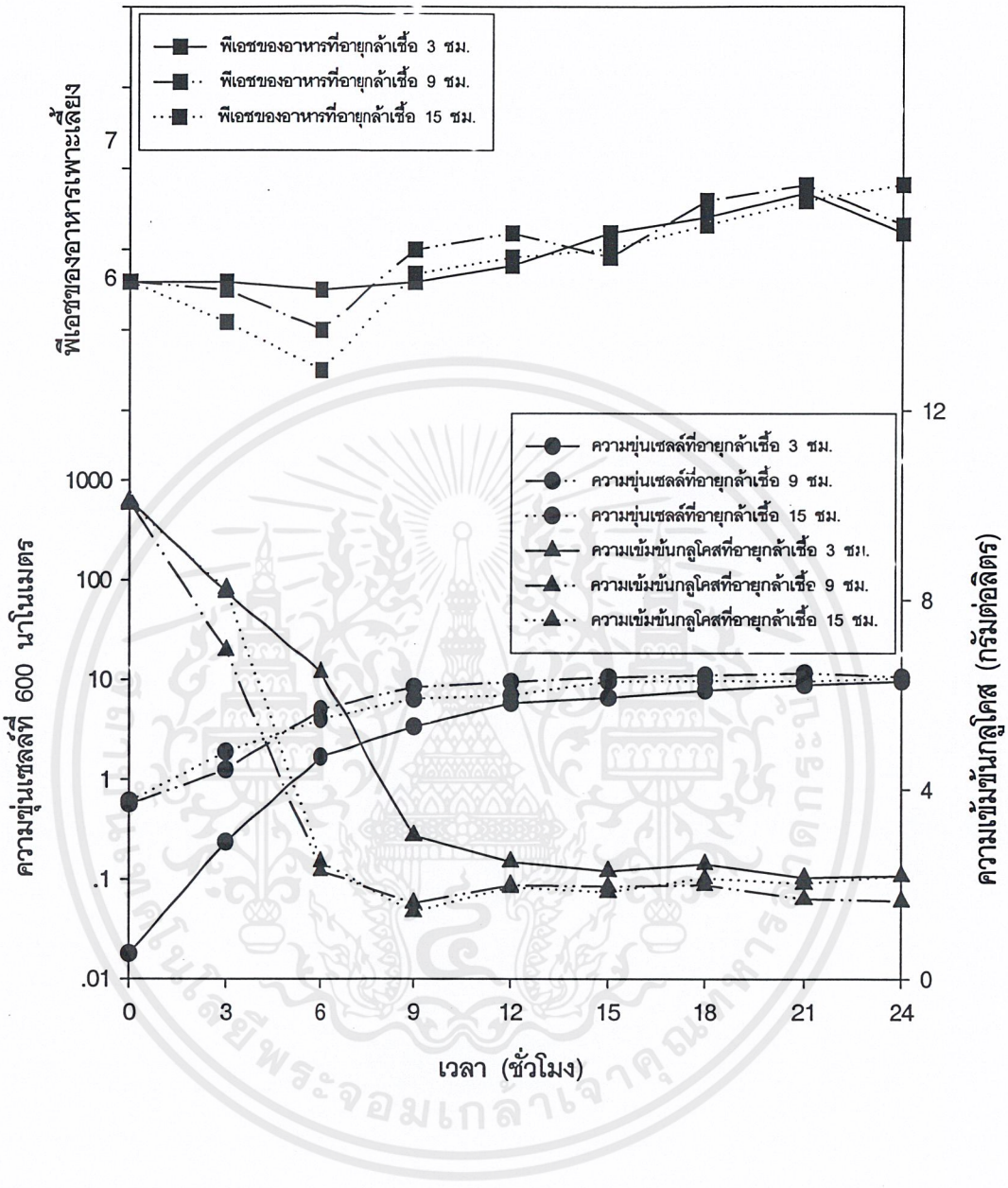
1.2 การศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมของ *H. polymorpha* TISTR 5140

การศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *H. polymorpha* TISTR 5140 โดยทดสอบอายุกล้าเชื้อในช่วงต้น log phase (3 ชั่วโมง) กลาง log phase (9 ชั่วโมง) และปลาย log phase (15 ชั่วโมง) ตามลำดับ พบว่า ผลการใช้อายุกล้าเชื้อที่ 3 ชั่วโมงทำให้ *H. polymorpha* TISTR 5140 มีค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) และผลได้ของเซลล์จากกลูโคสสูงสุด ($Y_{x/s}$) โดยวัดได้เท่ากับ 0.589 ต่อชั่วโมง และ 1.230 กรัมเซลล์ต่อกรัมกลูโคส ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Pfeifer และคณะ (1996) ซึ่งทำการศึกษา *C. guilliermondii* พบว่าอายุของหัวเชื้อมีผลต่อผลผลิต และการเติบโตของเซลล์เมื่อใช้กล้าเชื้ออายุน้อยกว่า 15 ชั่วโมง หรืออายุมากกว่า 24 ชั่วโมง และสอดคล้องกับการทดลองของ Sreenath และคณะ (1986) และ Du Preez (1994) ซึ่งทำการศึกษาอายุกล้าเชื้อ ซึ่งมีผลต่อกิจกรรมเซลล์และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตทำให้มีผลต่ออัตราการผลิตและปริมาณผลผลิตด้วย

การเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงเป็นไปในทางเดียวกัน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ชั่วโมงที่ 6 พบว่าพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงมีค่าลดลง อาจเนื่องจากในอาหารเพาะเลี้ยงมีแอมโมเนียมซัลเฟตเมื่ออยู่ในสารละลายจะอยู่ในรูป NH_4^+ เมื่อนำเข้าสู่เซลล์จะอยู่ในรูป $R\text{-}NH_3^+$ แล้วปลดปล่อย H^+ ออกสู่อาหารเพาะเลี้ยง ทำให้ค่าพีเอชมีค่าลดลง

ดังนั้นจึงเลือกใช้อายุกล้าเชื้อ 3 ชั่วโมง ในการศึกษาปัจจัยอื่นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 10 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium โดยแปรผันอายุกล้าเชื้อที่ 3 9 และ 15 ชั่วโมงใน ฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ผลของอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) และผลได้ของเซลล์จากกลูโคส ($Y_{x/s}$) ในการศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสม ที่ 3 9 และ 15 ชั่วโมง

อายุกล้าเชื้อ (h.)	μ (h^{-1})	$Y_{x/s}$ ($g.g^{-1}$)
3	0.589	1.230
9	0.316	1.169
15	0.261	0.960

1.3 การศึกษาการเติบโตของเชื้อ *H. polymorpha* TIST R 5140 โดยการแปรผันความเข้มข้นกลูโคสดังนี้ 5 10 และ 15 กรัมต่อลิตร

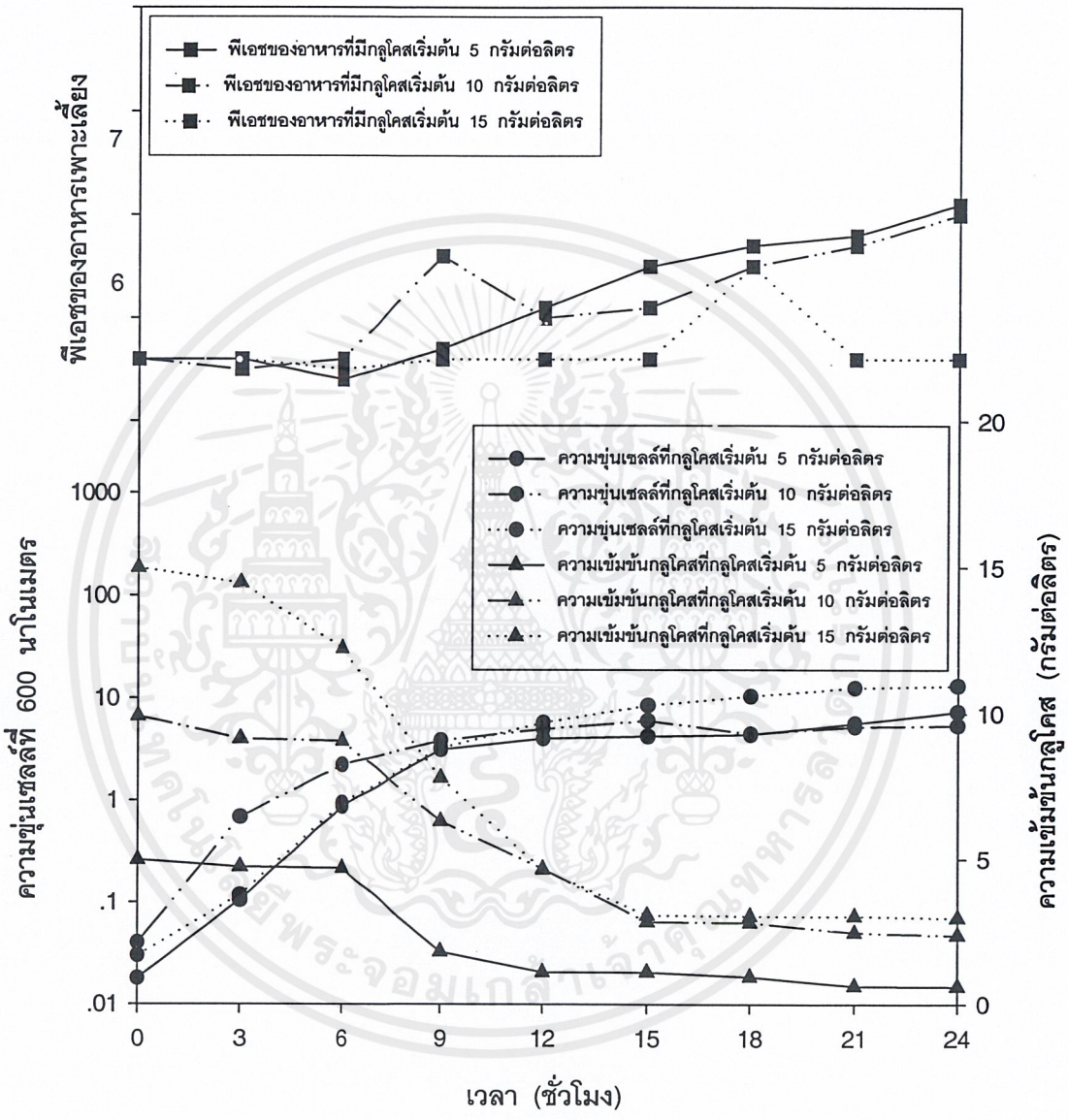
จากผลการทดลอง เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* TISTR 5140 โดยการแปรผันความเข้มข้นกลูโคสที่ 5 10 และ 15 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นกลูโคส 5 กรัมต่อลิตรมีค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) และค่าผลได้ของเซลล์จากกลูโคสสูงสุด ($Y_{x/s}$) โดยวัดได้เท่ากับ 0.474 ต่อชั่วโมง และ 1.2458 กรัมเซลล์ต่อกรัมกลูโคส ตามลำดับ (ตารางที่ 6)

การเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยง มีทิศทางไปในทางเดียวกันคือมีค่าเข้าใกล้ 7.0 ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณกลูโคสที่ 5 กรัมต่อลิตร ในการศึกษาปัจจัยอื่นต่อไป

ตารางที่ 6 ผลของอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) และผลได้ของเซลล์จากกลูโคส ($Y_{x/s}$) ในการศึกษาปริมาณกลูโคสที่เหมาะสม ที่ 5 10 และ 15 กรัมต่อลิตร

ปริมาณกลูโคส ($g.l^{-1}$)	μ (h^{-1})	Yx/s ($g.g^{-1}$)
5	0.474	1.2458
10	0.380	0.6462
15	0.461	0.9436

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 11 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium โดยทำแปรผันปริมาณกลูโคสที่ 5 10 และ 15 กรัมต่อลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 การศึกษาการเติบโตของเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140 โดยการแปรผันความเข้มข้นยีสต์สกัดดังนี้ 2 4 และ 6 กรัมต่อลิตร

จากการทดลอง เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* TISTR 5140 โดยการแปรผันความเข้มข้นยีสต์สกัดที่ 2 4 และ 6 กรัมต่อลิตร พบว่าอัตราการเติบโตจำเพาะของเชื้อมีค่าใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 7) เมื่อนำไปวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่าทั้งสามความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Horitsu และคณะ (1992) Yuuichi และคณะ (1996) Oh. และ Kim (1998) และ Barbosa และคณะ (1988) รายงานว่ายีสต์สกัดมีผลเพียงเล็กน้อยในการเติบโตของเชื้อ *C. guilliermondii* FTI 20037 แต่ให้ผลขัดแย้งกับผลการทดลองของ Horitsu และคณะ (1992) ที่รายงานว่ายีสต์สกัดมีความสำคัญต่อการเติบโตของเชื้อ *C. tropicalis* ซึ่งยีสต์สกัดจะมีความสำคัญหรือไม่ ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อที่ทำการทดลองด้วย

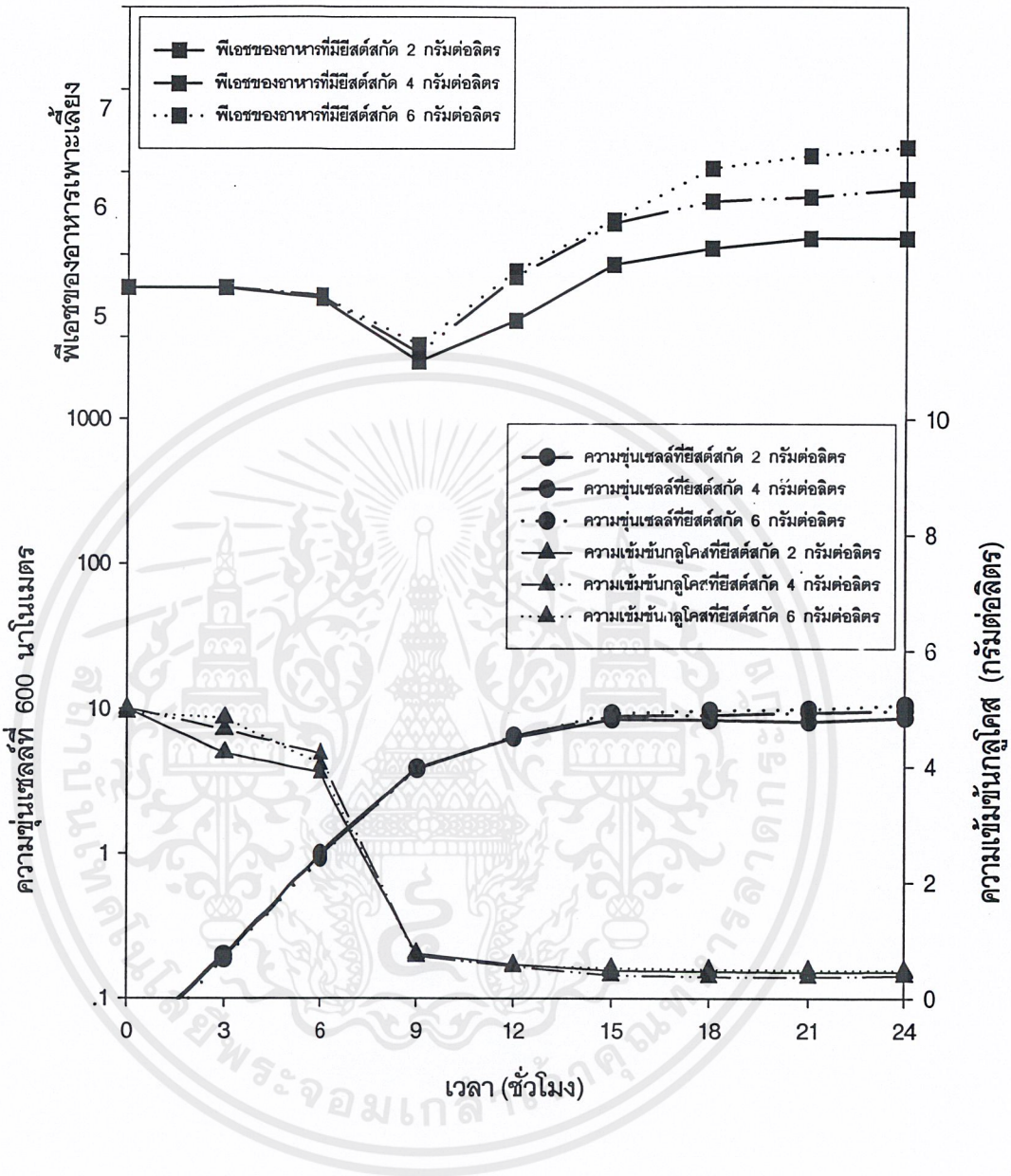
การเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงมีทิศทางไปในทางเดียวกัน คือมีค่าเข้าใกล้ 7.0 เป็นกลาง

จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของยีสต์สกัด มีผลต่อการเจริญเติบโตไม่มากนัก ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงเลือกปริมาณยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตรในการศึกษาในระดับถังหมัก

ตารางที่ 7 ผลของอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) ในการศึกษาปริมาณยีสต์สกัดที่เหมาะสม ที่ 2 4 และ 6 กรัมต่อลิตร

ปริมาณยีสต์สกัด ($g.l^{-1}$)	μ (h^{-1})
2	0.500
4	0.500
6	0.528

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



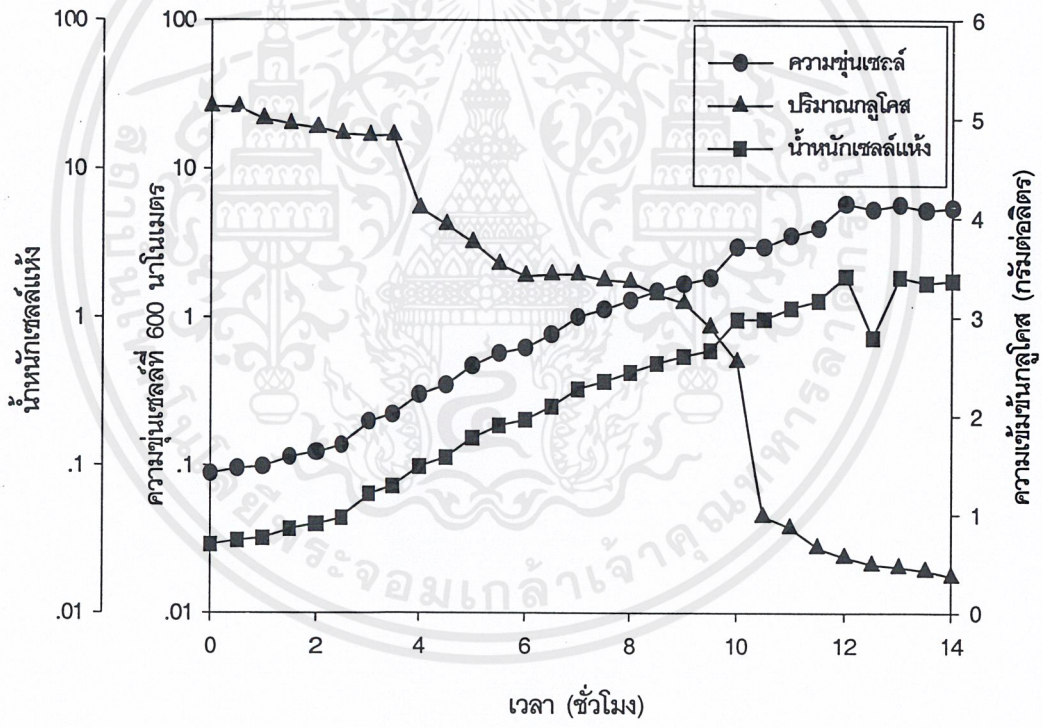
ภาพที่ 12 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium โดยแปรผันปริมาณยีสต์สกัด 2 4 และ 6 กรัมต่อลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ศึกษาสภาวะของการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140 ในระดับถังหมัก

2.1 ศึกษาการเติบโตของ *H. polymorpha* TISTR 5140

การศึกษาสภาวะการเติบโตของ *H. polymorpha* TISTR 5140 ในระดับถังหมัก เพื่อหาเวลาที่เหมาะสมสำหรับเติมไซโลส ในการผลิตไซลิทอล พบว่า *H. polymorpha* TISTR 5140 ณ ชั่วโมงที่ 6 ใช้น้ำตาลเหลือประมาณ 2 กรัมต่อลิตร จึงเติมไซโลส ณ ชั่วโมงที่ 6 เพื่อทำการศึกษาปัจจัยอื่นต่อไป

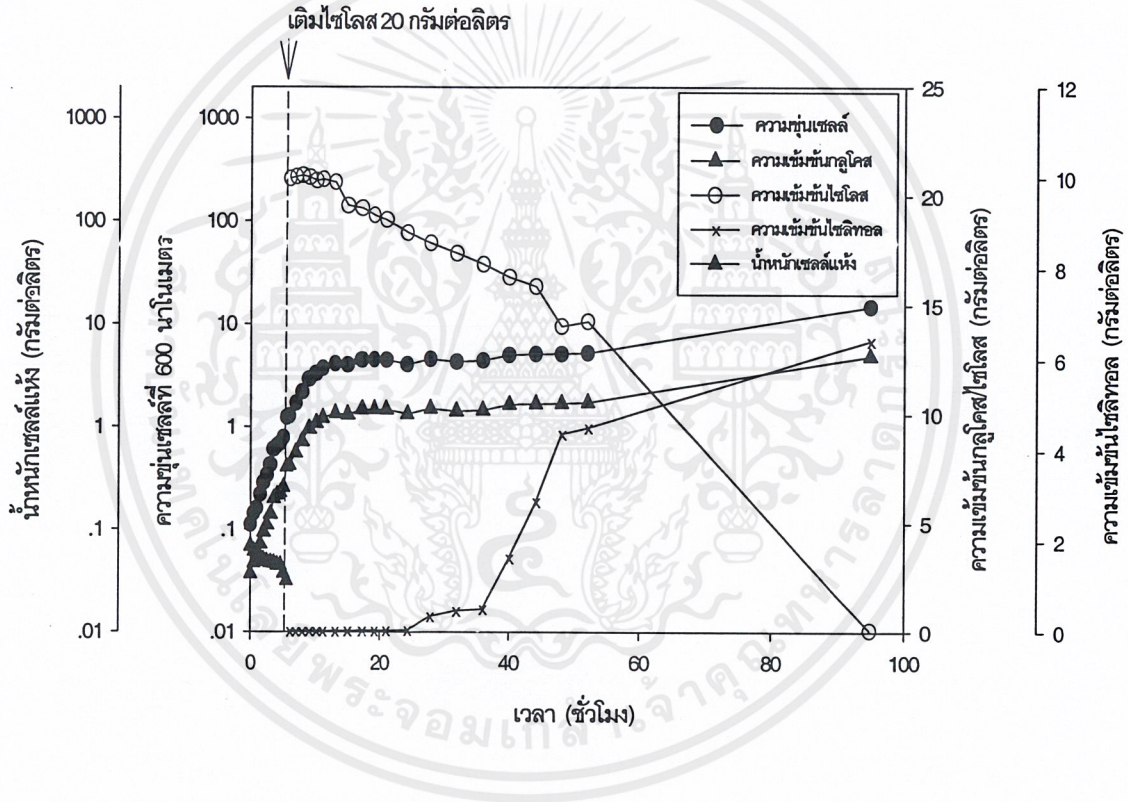


ภาพที่ 13 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140 ใ นอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราเร็วการกวน 1,000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm พีเอชของอาหารเพาะเลี้ยง 5.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

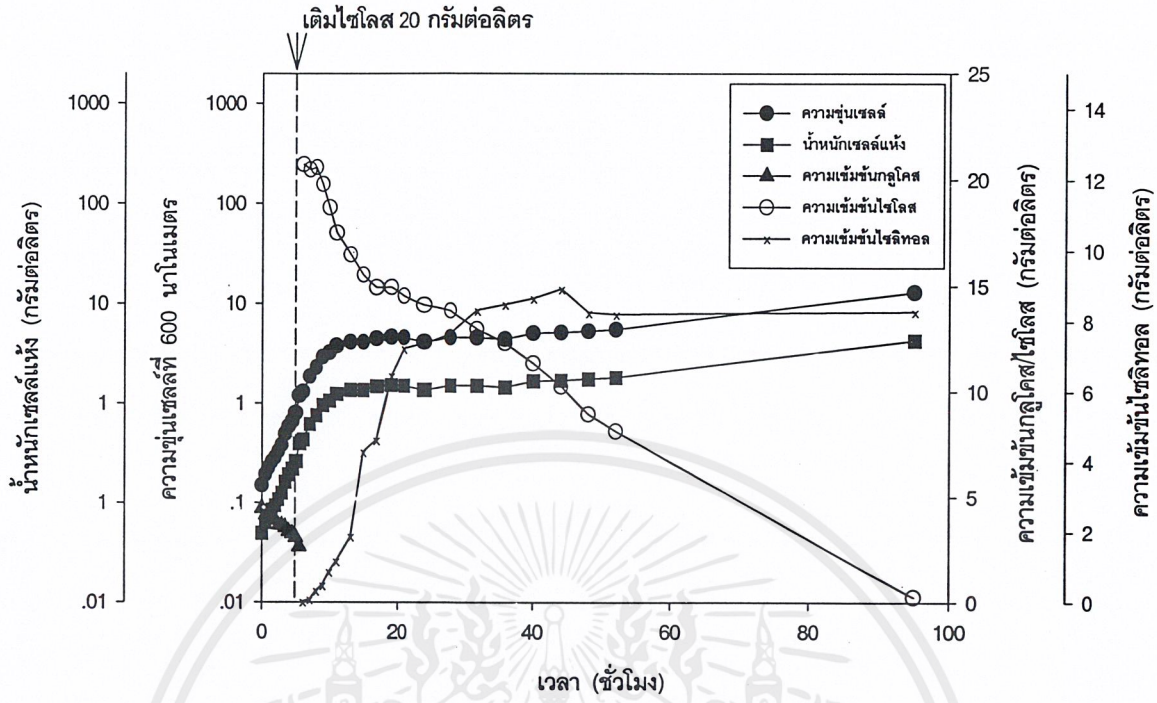
2.2 ศึกษาอัตราการกวนที่มีผลต่อการผลิตไซลิทอลของ *H. polymorpha* TISTR 5140

ผลการทดลองในชั่วโมงที่ 0 – 6.0 ในอาหาร Modified medium อัตราการกวน 1,000 รอบต่อนาที เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ เมื่อถึงชั่วโมงที่ 6.0 เติมไซโลสความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และทำการแปรผันอัตราการกวนที่ 500 และ 125 รอบต่อนาที ตามลำดับ ได้ผลการทดลองดังนี้



ภาพที่ 14 ผลการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* TiSTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราเร็วการกวน 1,000 รอบต่อนาที เมื่อถึงชั่วโมงที่ 6 ทำการเติมไซโลสและลดอัตราเร็วการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm และพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงที่ 5.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 15 ผลการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราเร็วการกวน 1,000 รอบต่อนาที เมื่อถึงชั่วโมงที่ 6 ทำการเติมไซโลสและลดอัตราเร็วการกวนเป็น 125 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm และพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงที่ 5.6

นำผลการทดลองมาคำนวณอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) ผลได้ของเซลล์จากไซโลส ($Y_{x/s}$) ผลได้ของไซลิทอลจากไซโลส ($Y_{p/s}$) อัตราการผลิตไซลิทอล (Q_p) และอัตราการผลิตไซลิทอลจำเพาะ (q_p)

ตารางที่ 8 พารามิเตอร์ที่คำนวณได้จากการเจริญของ *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหาร Modified medium ที่มีการเติมไซโลส โดยแปรผันอัตราการกวนหลังจากเติมไซโลส

อัตราเร็วการกวน (rpm)	μ (h^{-1})	$Y_{x/s}$ ($g.g^{-1}$)	$Y_{p/s}$ ($g\ g^{-1}$)	Q_p ($g.h^{-1}$)	q_p ($g.g^{-1}.h^{-1}$)
500	0.404	0.344	0.580	0.088	0.023
125	0.393	0.257	0.838	0.204	0.037

*หมายเหตุ μ = อัตราการเติบโตจำเพาะก่อนเติมไซโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พิจารณาอัตราเร็วการกวน 125 รอบต่อนาที ในช่วงการผลิตไซลิทอล พบว่าผลได้ของเซลล์จากไซโลส ($Y_{x/s}$) 0.257 กรัมเซลล์ต่อกรัมไซโลส ซึ่งมีค่าน้อยกว่าที่อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที มีค่าผลได้ของเซลล์จากไซโลส ($Y_{x/s}$) 0.344 กรัมเซลล์ต่อกรัมไซโลส

สำหรับค่าผลได้ของไซลิทอลจากไซโลสพบว่าที่ อัตราการกวน 125 รอบต่อนาที มีค่ามากกว่าที่อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที คือ 0.838 และ 0.580 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ตามลำดับ แสดงว่าเมื่อมีการจำกัดอากาศมีการผลิตไซลิทอลมากขึ้น ทั้งนี้เป็นเพราะการให้อากาศหรือออกซิเจน จึงทำให้เกิดการทำงานของลูกโซ่ขนส่งอิเลคตรอนที่มีการออกซิไดส์ NADH เป็น NAD^+ ดังนั้นปฏิกริยาการเปลี่ยนไซลิทอลเป็นไซลูโลสที่ต้องการโคเอนไซม์ NAD^+ จึงสามารถดำเนินไปได้ เป็นผลให้เกิดการใช้น้ำตาลไซโลส เพื่อการเติบโตเพิ่มขึ้นและทำให้การสะสมของไซลิทอลลดลง แต่เมื่ออยู่ในสภาพที่มีการจำกัดออกซิเจน ออกซิเจนจะไม่เพียงพอทำให้เกิดการสะสม $NADH^+$ ซึ่งทำให้เกิดการสะสมไซลิทอล และการเติบโตลดต่ำลง (Bruenenberg และคณะ, 1983)

ซึ่งมีความสอดคล้องกับการทดลองของ กัญญา (1994) ทำการศึกษาพบว่า ยีสต์บางสายพันธุ์ผลิตไซลิทอลได้สูง และได้มวลเซลล์สูงด้วย หรือบางสายพันธุ์ผลิตไซลิทอลได้ต่ำแต่มีมวลเซลล์สูง ซึ่ง *H. polymorpha* TISTR 5140 เป็นประเภทผลิตไซลิทอลได้ปริมาณสูง แต่มีมวลเซลล์ต่ำ เพราะค่าผลได้ของเซลล์จากซับสเทรตมีค่าน้อยแสดงว่าเซลล์ใช้ไซโลสในการผลิตไซลิทอลมากกว่าการสร้างเซลล์ และสอดคล้องกับการทดลองของ Horitsu และคณะ (1992) ศึกษาผลของการให้อากาศต่อการเจริญและการผลิตไซลิทอล โดยเลี้ยงเชื้อยีสต์ *C. tropicalis* ที่น้ำตาลไซโลสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อลดอัตราการให้อากาศ ผลผลิตไซลิทอลจะเพิ่มขึ้น ในขณะที่เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศ ทำให้อัตราการเติบโตเพิ่มขึ้น แต่ทำให้การผลิตไซลิทอลและประสิทธิภาพการผลิตไซลิทอลลดลง

สำหรับอัตราการสร้างไซลิทอล (Q_p) พบว่าที่อัตราการกวน 125 รอบต่อนาทีมีค่าอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์มากกว่าที่อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที คือ 0.204 และ 0.088 กรัมไซลิทอลต่อชั่วโมง ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าที่อัตราการกวน 125 รอบต่อนาที สามารถผลิตไซลิทอลได้ดีกว่าที่อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที สำหรับอัตราการสร้างไซลิทอลจำเพาะ (q_p) พบว่าอัตราการกวน 125 รอบต่อนาทีมีค่ามากกว่าที่อัตรากวน 500 รอบต่อนาที คือ 0.037 และ 0.023 กรัมไซลิทอลต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาทั้ง $Y_{p/s}$ Q_p และ q_p (ตารางที่ 8) แสดงให้เห็นว่าการผลิตไซลิทอลของ *H. polymorpha* TISTR 5140 ให้ความสัมพันธ์ในแนวเดียวกัน จึงเลือกใช้อัตราการกวนที่ 125 รอบต่อนาทีในช่วงการผลิตผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสโดยใช้เชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140 พบว่าเชื้อเติบโตได้ดีในอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium พีเอชอาหารเพาะเลี้ยงเริ่มต้น 5.6 ปริมาณกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร และปริมาณยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร โดยใช้อายุกล้าเชื้อเริ่มต้นที่ 3 ชั่วโมง อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร อัตราการให้อากาศ 1 vvm ที่อัตราการกวน 1,000 รอบต่อนาที ควบคุมพีเอชตลอดการเพาะเลี้ยงที่ 5.6 โดยจะเริ่มช่วงการผลิตไซลิทอลเมื่อปริมาณกลูโคสเหลือประมาณ 2 กรัมต่อลิตร หรือประมาณชั่วโมงที่ 6 ทำการเติมไซโลสให้มีความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และลดอัตราการกวนเป็น 125 รอบต่อนาที เมื่อเพาะเลี้ยง 92 ชั่วโมง พบว่าเชื้อยีสต์สามารถผลิตไซลิทอลปริมาณ 8.267 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตผลผลิตคือ 0.41 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลได้ของเซลล์จากไซโลส ($Y_{x/s}$) 0.257 กรัมเซลล์ต่อกรัมไซโลส ผลได้ของไซลิทอลจากไซโลส ($Y_{p/s}$) 0.838 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส อัตราการสร้างไซลิทอล (Q_p) 0.204 กรัมไซลิทอลต่อชั่วโมง และอัตราการสร้างไซลิทอลจำเพาะ (q_p) 0.037 กรัมไซลิทอลต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กัญญา สอนสนิท. 2537. การผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 104น.

วรสิทธิ์ โทจำปา. 2541. การผลิตไซลิทอลโดยการหมุนเวียบเซลล์ด้วย hollow fiber. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะอุตสาหกรรมเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 86 น.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล. 2537. สารให้ความหวานจากฟางข้าว รายงานการประชุมทางวิชาการ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิริลักษณ์ นามวงษ์ ศุภารัตน์ พันธุ์ทอง และสุนิสา พูนพิพัฒนกุล. 2543. การผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสและกลูโคสโดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 63 น.

Baer, Albert. 1991. Sugar alcohols in the diabetic, pp. 134-136. In N. Kretchmer and C. B. Hollenbeck. Sugars and Sweeteners. CRC Press, Boca Raton.

Barbosa, M. F. S., M. B. de Medeiros, I. M. de Mancilha, H. Schneider and H. Lee.. 1988. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which effect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. J. Ind. Microbial. 3 : 241-251.

Barnett, J.A. 1976. The utilization of sugars by yeast. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 32 : 125-234.

Barnett, J.A., R.W. Payne and D. Yarrow. 1979. A Guide to Identifying and Classifying Yeasts. Cambridge University Press, Cambridge, England. 650 p.

Bassler, K.H., G. Stein and W. Belzer. 1996. Xylitol metabolism and xylitol absorption, metabolic adaptation as the cause of accelerated absorption. Biochemistry. 2 : 346.

Batzinger, R. P. Ou S-Y and Bueding E.. 1977. Saccharine and other sweetener, Mutagenic properties. 198 : 944-946.

Bruinenberg, P.M., P.H.M. de Bot, J.P. van Dijken and W.A. Scheffers. 1983. The role of redox balances in the anaerobic fermentation of xylose by yeasts. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18 : 287-292.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bruinenberg, P.M., J.P. van Dijken and W.A. Scheffers. 1983. Theoretical analysis of NADPH production and consumption in yeast. J. General Microbiol. 129 : 953-964.

Chen, L.F. and C.S. Gong. 1985. Fermentation of sugarcane baggase hemicellulose hydrolysate to xylitol by a hydrolysate-acclimalized yeast. J. Food Science 50 : 226-228.

Du Preez, J.C. and B.A. Prior. 1985. A quantitative Screening of some xylose-fermentation by yeast : Comparison of *Pachysolen tannophilus* and *Pichai stipitis.* Biotechnol. Lett. 6(6) : 395-400.

Emodi, A. 1978. Xylose : its properties and food applications. Food Technol. 32 : 28-31.

Evans, C.T. and C. Ratledge. 1984. Induction of xylulose-5-phosphate phosphoketolase in a variety of yeasts grown on D-xyiose : the key to efficient xylose metabolism. Arch. Microbiol. 139 : 48-52.

Furlan, S. A., P. Bouillouds, and H. F. de Castro. 1994. Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts. Process Biochem. Lett. 3 : 203-206.

Gong, C. S., L. F. Chen. And G. t. Tsao. 1981. Quantitative production of xylitol from D-xylose by high – xylitol producing yeasts mutant *Candida tropicalis* HXP2. Biotechnol Bioeng. 25 : 85-102.

Gong, C.S. 1983. Recent advances in D-xylose conversion by yeasys. Annual reports on fermentation processes 6 : 253-296.

Hofer, M., A. Betz. And A. Ktyk. 1971. Metabolism of the obligatory aerobic yeast *Rhodotorular gracilis* : introduction of an enzyme necessary for D-xylose catabolism. Biochem. Biophys. Acta. 252 : 1-12.

Hollmann, S. and O. Touster. 1957. L-xylulose-xylitol enzyme and other polyol dehydrogenase of guinea pig liver mitochondria. J. Biol. Chem. 225 : 87-102.

Horitsu, H., Y. Yahashi, K. Takamizawa, K. Kswai, T. Suzuki and N. Watanabe. Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis* : 1992 optimization of production rate. Biiotechnol. Bioeng. 40 : 1,085-1,091.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hyvonen, L. and P. Koivistoinen. 1982. Food technological evaluation of xylitol, pp. 373-403. In C.O. Chechester (ed.). Advances in food research. Vol. 280. Academic Press, Inc., New York.

Jeffries, T.W. 1983. Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi. Adv. Biochem. Bioeng. 27 : 1-32.

Makinen, K.K. and E. Soderling. 1981. Effect of xylitol on some food-spoilage microorganisms. J. Food Science 46 : 950-951.

Maleszka, R., L.G. Neirinck, A.P. James, H. Rutten, H. Schneider. 1983. Xylitol dehydrogenase mutants of *Pachysolen tannophilus* and the role of xylitol in D-xylose catabolism. FEMS. Microbiol. Lett. 17 : 227-229.

Malaja, A. and L. Hamalainen. 1977. Process for making xylitol. U.S. Patent. 4,008,285.

Meyrial, V., J. P. Delgines, R. Moletta and J. M. Navarro. 1991. Nigam, P. and D. Singh., 1995. Process for fermentative production of xylitol a sugar substitute. J. Pro. Biochem. 30 : 117-124.

Palnitkar, S. and A. Lachke. 1992. Effect of nitrogen sources on oxidoreductive enzymes and ethanol production during D-xylose fermentation by *Candida shehatae*. Can. J. Microbiol. 38 : 258-260.

Pepper, T. and P.M. Olinger. 1988. Xylitol in sugar-free confections. Food Technol. 10 : 98-106.

Onishi, H. and T. Suzuki. 1966. The production of xylitol, L-arabinitol and ribitol by Yeasts. Agr. Biol. Chem. 30 : 1,139-1,144.

Sirisansaneeyakul, S., M. staniszewski and M. Rizzi. 1992. Microbial production of xylitol from wheat straw hydrolyoates. DECHEMA Biotechnology Conferrence 5 : 541-544.

Sirisansaneeyakul, S., M. staniszewski and M. Rizzi. 1995. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose. J. Ferment. Bioeng. 80 : 565-570.

Slininger, P.J., P.L. Bolen and C.P. Kurtaman. 1987. *Pachysolen tannophilus* : properties and process considerations for ethanol production from D-xylose. Enzyme Microb. Technol. 9 : 5-15.

Smiley, K.L. and P.L. Bolen. 1982. Demonstration of D-xylose reductase and D-xylitol dehydrogenase in *Pachysolen tannophilus*. Biotechnol. Lett. 4 : 607-610.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Smith, M.G. 1962. Polyol dehydrogenase. Biochem. J. 83 : 135.

Vongsuvanlert, V. and Y. Tani. 1989. Xylitol production by a methanol yeast, *Candida boidinii* (*Kloeckers* sp.). No. 2201. J. Ferment. Bioeng. 67 : 35-39.

Wisniak, J., M. Hershkowitz and S. Stein. 1974. Hydrogenation of xylose over platinum group catalysis. Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev. 13 : 232-236.

Yoshitake, J., H. Ishisaki, M. Shimamura and T. Imai. 1973. Xylitol production by an *Enterobacter* sp. Agr. Biol. Chem. 37(10) : 2,261-2,267.

Yoshitake, J., H. Ishisaki, M. Shimamura and Y. Irie. 1976. Xylitol production by *Enterobacter liquefaciens*. Agr. Biol. Chem. 40(8) : 1,493-1,503.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
ผลการทดลอง

ตารางผนวกที่ 1 ผลการเพาะเลี้ยง *H. polomorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง 2 ชนิดคือ YM medium และ Modified medium ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที

เวลา	ความขุ่นเซลล์ที่ 600 นาโนเมตร		ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร)		พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ	
(ชม.)	YM	MOD	YM	MOD	YM	MOD
0	0.206	0.187	13.364	13.074	5.6	5.6
3	0.252	0.205	13.220	9.556	5.6	5.6
6	0.701	0.572	12.858	9.026	5.4	5.5
9	2.877	3.129	6.959	8.634	4.6	5.1
12	6.330	6.129	6.570	1.866	5.4	5.3
15	7.871	8.053	4.410	1.741	4.6	6.3
18	9.292	9.763	4.370	1.337	5.0	6.2
21	10.920	13.840	3.473	1.593	4.6	6.0
24	11.360	12.480	2.851	1.522	5.4	6.7

YM = YM medium

MOD = Modified medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium โดยแปรผันอายุกล้าเชื้อที่ 3 9 และ 15 ชั่วโมง ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที

เวลา (ชม.)	ความขุ่นเซลล์ที่ 600 นาโนเมตร อายุกล้าเชื้อ (ชม.)			ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร) อายุกล้าเชื้อ (ชม.)			พีเอชของอาหารเพาะเลี้ยง อายุกล้าเชื้อ (ชม.)		
	3	9	15	3	9	15	3	9	15
0	0.018	0.567	0.609	10.095	10.055	10.015	5.3	5.6	5.6
3	0.236	1.253	1.893	8.162	6.935	8.234	5.6	5.5	5.1
6	1.685	5.027	4.023	6.473	2.290	2.477	5.5	5.0	4.5
9	3.390	8.440	6.460	3.030	1.598	1.418	5.6	6.0	5.7
12	5.827	9.453	6.992	2.476	1.982	1.940	5.8	6.2	5.9
15	6.613	10.580	9.573	2.279	1.954	1.834	6.2	5.9	6.0
18	7.830	11.075	9.773	2.435	1.988	2.137	6.4	6.6	6.3
21	8.865	11.642	9.790	2.142	1.694	2.018	6.7	6.8	6.6
24	9.647	10.633	10.353	2.181	1.649	2.186	6.2	6.3	6.8

ตารางผนวกที่ 3 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium โดยแปรผันปริมาณกลูโคส 5 10 และ 15 กรัมต่อลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที

เวลา (ชม.)	ความขุ่นเซลล์ที่ 600 นาโนเมตร ปริมาณกลูโคสที่แปรผัน (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร) ปริมาณกลูโคสที่แปรผัน (กรัมต่อลิตร)			พีเอชของอาหารเพาะเลี้ยง ปริมาณกลูโคสที่แปรผัน (กรัมต่อลิตร)		
	5	10	15	5	10	15	5	10	15
0	0.018	0.040	0.030	4.978	9.906	14.985	5.6	5.6	5.6
3	0.105	0.686	0.118	4.733	9.130	14.455	5.6	5.5	5.6
6	0.870	2.215	0.937	4.687	9.055	12.226	5.4	5.6	5.5
9	3.143	3.860	3.257	1.812	6.308	7.799	5.7	6.6	5.6
12	4.040	5.023	5.807	1.107	4.672	4.644	6.1	6.0	5.6
15	4.255	6.025	8.525	1.106	2.841	3.072	6.5	6.1	5.6
18	4.415	4.475	10.435	0.950	2.815	3.042	6.7	6.5	6.5
21	5.663	5.243	12.593	0.622	2.474	3.038	6.8	6.7	5.6
24	7.330	5.400	13.190	0.602	2.370	2.967	7.1	7.0	5.6

ตารางผนวกที่ 4 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium โดยแปรผันปริมาณยีสต์สกัด 2 4 และ 6 กรัมต่อลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที

เวลา (ชม.)	ความขุ่นเซลล์ที่ 600 นาโนเมตร ปริมาณยีสต์สกัดที่แปรผัน (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร) ปริมาณยีสต์สกัดที่แปรผัน (กรัมต่อลิตร)			พีเอชของอาหารเพาะเลี้ยง ปริมาณยีสต์สกัดที่แปรผัน (กรัมต่อลิตร)		
	2	4	6	2	4	6	2	4	6
0	0.045	0.044	0.337	4.995	5.006	4.931	5.6	5.6	5.6
3	0.200	0.195	0.187	4.235	4.636	4.838	5.6	5.6	5.6
6	1.003	0.963	0.930	3.893	4.216	4.035	5.5	5.5	5.5
9	3.898	3.828	3.862	0.777	0.728	0.721	4.7	4.8	4.9
12	6.323	6.513	6.447	0.584	0.549	0.563	5.2	5.8	5.8
15	8.475	8.905	9.310	0.480	0.398	0.525	5.9	6.4	6.4
18	8.393	3.010	9.753	0.464	0.371	0.502	6.0	6.7	7.0
21	8.150	3.408	9.925	0.449	0.365	0.485	6.2	6.7	7.2
24	8.680	3.960	10.620	0.458	0.389	0.483	6.2	6.8	7.3

ตารางผนวกที่ 5 ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราเร็วการกวน 1,000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm และพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยง 5.6

เวลา (ชม.)	ความขุ่นเซลล์ที่ 600 นาโนเมตร	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร)
0	0.088	0.029	5.124
0.5	0.095	0.031	5.114
1.0	0.098	0.032	4.996
1.5	0.114	0.037	4.947
2.0	0.123	0.040	4.908
2.5	0.137	0.044	4.849
3.0	0.198	0.064	4.830
3.5	0.221	0.072	4.836
4.0	0.300	0.098	4.099
4.5	0.349	0.113	3.934
5.0	0.471	0.153	3.754
5.5	0.572	0.186	3.534
6.0	0.623	0.203	3.416
6.5	0.767	0.250	3.432

vvm = ปริมาตรอากาศในถังหมักต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงต่อนาที

ตารางภาคผนวกที่ 5 (ต่อ)

เวลา (ชม.)	ความขุ่นเซลล์ที่ 600 นาโนเมตร	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร)
7.0	1.004	0.327	3.433
7.5	1.132	0.368	3.374
8.0	1.302	0.423	3.356
8.5	1.500	0.488	3.233
9.0	1.676	0.545	3.145
9.5	1.840	0.598	2.900
10.0	2.972	0.966	2.552
10.5	2.980	0.969	0.979
11.0	3.540	1.151	0.866
11.5	3.980	1.294	0.664
12.0	5.800	1.885	0.566
12.5	5.310	0.726	0.490
13.0	5.715	1.857	0.464
13.5	5.235	1.701	0.427
14.0	5.430	1.765	0.370

ตารางภาคผนวกที่ 6 ผลการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง Modified medium ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราเร็วการกวน 1,000 รอบต่อนาที เมื่อถึงชั่วโมงที่ 6 ทำการเติมไซโลสและลดอัตราเร็วการกวนเป็น 125 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm และพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยง 5.6

เวลา (ชม.)	ความขุ่นเซลล์ที่ 600 นาโนเมตร	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
0	0 150	0.050	4.447	-	-
0.5	0.195	0.063	4.129	-	-
1.0	0.224	0.074	4.055	-	-
1.5	0.258	0.085	3.923	-	-
2.0	0.285	0.094	3.893	-	-
2.5	0.328	0.108	3.658	-	-
3.0	0.380	0.125	3.638	-	-
3.5	0.489	0.161	3.545	-	-
4.0	0.583	0.192	3.354	-	-
4.5	0.663	0.219	3.256	-	-
5.0	0.794	0.262	3.065	-	-
5.5	1.198	0.395	2.623	-	-

vvm = ปริมาตรอากาศในถังหมักต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงต่อนาที

ตารางภาคผนวกที่ 6 (ต่อ)

เวลา (ชม.)	ความขุ่นเซลล์ที่ 600 นาโนเมตร	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
6.0*	1.314	0.433	20.700	0.021
7.0	1.868	0.616	20.450	0.075
8.0	2.284	0.753	20.560	0.325
9.0	2.905	0.958	19.770	0.485
10.0	3.230	1.065	18.660	0.867
11.0	3.766	1.242	17.480	1.166
13.0	4.130	1.362	16.460	1.869
15.0	4.130	1.362	15.510	4.282
17.0	4.500	1.484	14.910	4.622
19.0	4.640	1.530	14.930	6.450
21.0	4.580	1.510	14.510	7.217
24.0	4.160	1.372	14.090	7.366
28.0	4.600	1.517	13.830	8.313
32.0	4.610	1.520	12.970	8.483

* เริ่มเติมไซโลสและลดอัตราการกวนเป็น 125 รอบต่อนาที

ตารางภาคผนวกที่ 6 (ต่อ)

เวลา (ชม.)	ความขุ่นเซลล์ที่ 600 นาโนเมตร	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
36.0	4.430	1.461	12.310	8.483
40.0	5.130	1.692	11.350	8.657
44.0	5.200	1.715	10.250	8.919
48.0	5.370	1.771	8.930	8.249
52.0	5.550	1.830	8.120	8.196

ตารางภาคผนวกที่ 7 ผลการเพาะเลี้ยง *H. polymorpha* TISTR 5140 ในอาหารเพาะเลี้ยง Modified mediu ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราเร็วการกวน 1,000 รอบต่อนาที เมื่อถึงชั่วโมงที่ 6 ทำการเติมไซโลสและลดอัตราเร็วการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 vvm และพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยง 5.6

เวลา (ชม.)	ความขุ่นเซลล์ที่ 600 นาโนเมตร	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
0	0.112	0.037	3.942	-	-
0.5	0.143	0.047	3.732	-	-
1.0	0.161	0.053	3.580	-	-
1.5	0.219	0.072	3.447	-	-
2.0	0.286	0.094	3.329	-	-
2.5	0.338	0.112	3.242	-	-
3.0	0.427	0.141	3.186	-	-
3.5	0.607	0.200	3.158	-	-
4.0	0.658	0.217	3.072	-	-
4.5	0.696	0.229	3.060	-	-
5.0	0.784	0.259	2.711	-	-
5.5	1.234	0.401	2.368	-	-

vvm = ปริมาตรอากาศในถังหมักต่อปริมาตรอาหารเพาะเลี้ยงต่อนาที

ตารางภาคผนวกที่ 7 (ต่อ)

เวลา (ชม.)	ความขุ่นเซลล์ที่ 600 นาโนเมตร	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
6.0*	1.280	0.422	20.800	0.019
7.0	1.698	0.560	20.890	0.020
8.0	2.184	0.720	20.940	0.020
9.0	2.899	0.956	20.850	0.021
10.0	3.300	1.088	20.710	0.023
11.0	3.697	1.219	20.770	0.024
13.0	4.096	1.351	20.640	0.027
15.0	4.000	1.319	19.570	0.028
17.0	4.475	1.476	19.440	0.032
19.0	4.510	1.487	19.120	0.033
21.0	4.482	1.478	18.910	0.036
24.0	4.030	1.329	18.320	0.047
28.0	4.572	1.508	17.850	0.349
32.0	4.315	1.423	17.390	0.470

* เริ่มเติมไซโลสและลดอัตราการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที

ตารางภาคผนวกที่ 7 (ต่อ)

เวลา (ชม.)	ความขุ่นเซลล์ที่ 600 นาโนเมตร	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
36.0	4.426	1.460	16.890	0.509
40.0	5.006	1.651	16.290	1.637
44.0	5.106	1.684	15.870	2.878
48.0	5.126	1.691	14.050	4.370
52.0	5.234	1.726	14.270	4.512

ภาคผนวก ข
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. **อาหารเก็บรักษาเชื้อ**

อาหารที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อคือ YM Agar มีสูตรดังนี้

ยีสต์สกัด (yeast extract)	3 กรัม
มอลต์สกัด (malt extract)	3 กรัม
เปปโตน (peptone)	5 กรัม
กลูโคส (glucose)	10 กรัม
วุ้น (agar)	15 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันสูงที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. **อาหารสูตร YM medium (YM)**

ยีสต์สกัด (yeast extract)	3 กรัม
มอลต์สกัด (malt extract)	3 กรัม
เปปโตน (peptone)	5 กรัม
กลูโคส (glucose)	10 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันสูงที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. **อาหารสูตร Modified medium (MOD ในระดับเขย่าฟลาสก์)**

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)	1 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2 กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	3 กรัม
เปปโตน (peptone)	3.6 กรัม
ยีสต์สกัด (yeast extract)	4 กรัม
กลูโคส (glucose)	10 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 5.6 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อหม้อนึ่งความดันสูงที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. อาหาร Modified medium **ที่มีการเติมไซโลส**

แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)	1 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2 กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	3 กรัม
เปปโตน (peptone)	3.6 กรัม
ยีสต์สกัด (yeast extract)	2 กรัม
กลูโคส (glucose)	5 กรัม

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 5.6 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันสูงที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที สำหรับอาหารในถังหมักฆ่าเชื้อนาน 30 นาที เมื่อต้องการผลิตไซลิทอล เติมไซโลส (xylose) ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
วิธีการวิเคราะห์

วิธีการหาน้ำหนักแห้ง

1. เติมหัวเชื้อ *H. polymorpha* TISTR 5140 ที่มีค่าความขุ่นเซลล์เท่ากับ 0.5 โดยเติมหัวเชื้อประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ลงในฟลาสก์ที่บรรจุอาหารเพื่อการเจริญเติบโต 75 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 2 ฟลาสก์

2. เลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ ที่มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนได้ปริมาณเซลล์สูงสุด

3. อบกระดาษกรองเบอร์ 5 ที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำไปใส่ในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนักเมื่อกระดาษกรองเย็นลง พร้อมจดบันทึก

4. เจือจางสารละลายเซลล์ให้มีค่าความขุ่นเซลล์ต่าง ๆ กันอยู่ในช่วง 0.1-0.8 ช่วงละ 5 ค่า

5. ปิเปตสารละลายจากข้อ 4 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาทำการกรอง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นทำ 2 ซ้ำ

6. นำกระดาษกรองไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

7. นำไปใส่ในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งน้ำหนักเมื่อกระดาษกรองเย็นลงพร้อมจดบันทึก

คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) $= \frac{(A - B) \times 1000}{5}$

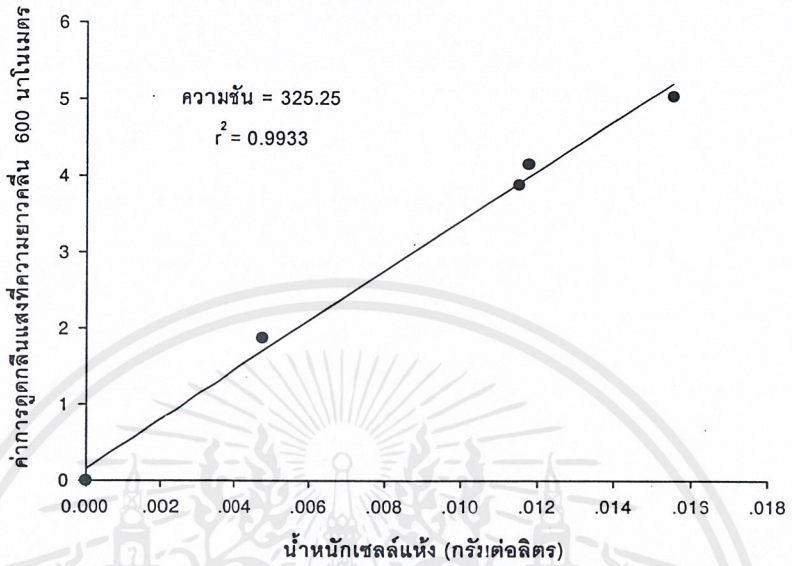
โดย

A คือ น้ำหนักกระดาษหลังกรอง

B คือ น้ำหนักกระดาษก่อนกรอง

8. นำน้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าความขุ่นเซลล์มาเขียนกราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพภาคผนวกที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักแห้งและค่าความขุ่นเซลล์

การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสวิธี Somogyi Nelson's method ดัดแปลงวิธีการของ Somogyi (1952)

1. สารเคมี

1.1 สารละลายคอปเปอร์รีเอเจนต์ (Copper reagent) ประกอบด้วย

A : 10% $CuSO_4.5H_2O$ 100 มิลลิลิตร เตรียมโดยชั่งคอปเปอร์ซัลเฟตไฟไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) 10 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

B : สารละลายฟอสเฟตทาร์เทรต (Phosphate-tartrate solution) เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 28 กรัม หรือโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตทเวลไฮเดรต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) 70.5495 กรัม) ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (Sodium potassium tartrate) 40 กรัม ทำให้ละลาย แล้วเติม 1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 100 มิลลิลิตร ตามด้วยโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (Na_2SO_4 (Annydrous) 120 กรัม เมื่อละลายดีแล้วปรับปริมาตรเป็น 900 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ถ้ามีตะกอนให้กรองเอาตะกอนทิ้งด้วยกระดาษกรอง Whatmam เบอร์ 4

ผสมสารละลาย (100 มิลลิลิตร) และ (900 มิลลิลิตร) เข้าด้วยกัน

1.2 สารละลาย Nelson's Arsenomolybdate color reagent ประกอบด้วย

A : ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$] 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตร เติมกรดกำมะถัน 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

B : ไดโซเดียมอาร์ซิเนต ($Na_2HAsO_4.7H_2O$) 3 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร เก็บไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้องควรเก็บในขวดสีชา

2. วิธีการวิเคราะห์

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

2.2 ทำให้เย็นโดยแช่ในอ่างน้ำ เติมอาร์เซโนโมลิบเดต รีเอเจนต์ (Arsenomolybdate reagent) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที สารละลายจะเป็นสีเขียว หรือสีน้ำเงินเขียวขึ้นกับปริมาณน้ำตาล

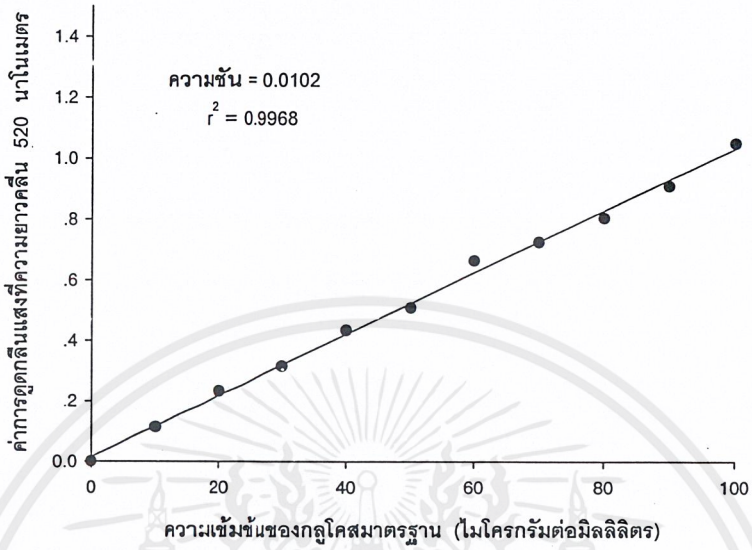
2.3 เติมน้ำ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร

2.3 นำค่าที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

3. การทำกราฟมาตรฐานของกลูโคส

เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแทนตัวอย่าง จากนั้นทำการวิเคราะห์ตามข้อ 2.1-2.3 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตรที่ได้และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานมาสร้างกราฟมาตรฐานของกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพภาคผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานของกลูโคส

การวิเคราะห์หาปริมาณไซโลสวิธีการของ Deschatelets และ Yu (1985)

วิเคราะห์ปริมาณไซโลสโดยอาศัยการเกิดเฟอฟูรัส (furfural) จากเพนโตส ในสารละลายกรดแอซีติกที่มี thiourea อยู่ แล้วเติม p-bromoaniline acetate เพื่อทำปฏิกิริยากับเฟอฟูรัลได้เป็นสารละลายสีชมพู

1. สารเคมี

1.1 p-bromoaniline reagent เตรียมโดยละลาย thiourea ประมาณ 4 กรัม ในกรดแอซีติกเข้มข้นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วแยกส่วนใสออกมา (กรดแอซีติกอิ่มตัวด้วยthiourea) จากนั้นละลาย p-bromoaniline 2 กรัมลงในส่วนใสนั้น

1.2 สารละลายไซโลสมาตรฐาน เตรียมโดยละลายไซโลส 0.1000 กรัม ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร) แล้วเจือจางให้ได้สารละลายไซโลสเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 กรัมต่อลิตร

2. วิธีการวิเคราะห์

2.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง (ความเข้มข้นประมาณ 0.2-1.0 กรัมต่อลิตร) หรือสารละลายไซโลสมาตรฐาน ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง

2.2 เติม p-bromoaniline reagent ลงไป 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2.3 บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว แล้วบ่มต่อในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง นาน 70 นาที

2.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

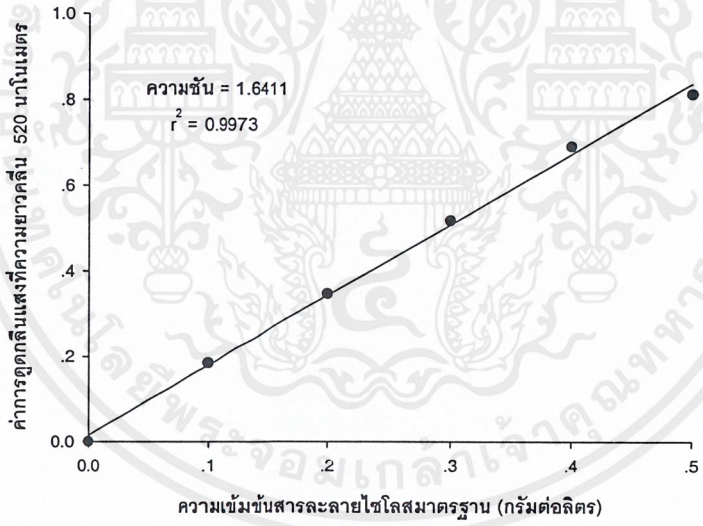
2.6 นำค่าการดูดกลืนแสงเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของไซโลสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นของไซโลส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{C \times D}{E}$$

C คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร

D คือ อัตราการเจือจาง

E คือ ความชันของกราฟมาตรฐาน



ภาพภาคผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานของไซโลส

การวิเคราะห์หาปริมาณไซลิทอลวิธีการของ Alder และ Gustafsson (1980)

โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของไซลิทอลไปเป็นฟอร์มัลดีไฮด์ด้วยเปอร์ไอโอเดตในสารละลายกรดเป็นระยะเวลาสั้น ๆ แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยบิวเทน-2,3-ไดออล (butane-2,3-diol) จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นโดยทำปฏิกิริยากับสารละลายเพนเทน-2,3-ไดโอน (pentane-2,4-dione) ได้สารละลายสีเหลือง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. สารเคมี

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

1.2 บิวเทน-2,3-ไดออล (butane-2,3-diol) 0.02 M เตรียมโดยปิเปตต์บิวเทน-2,3-ไดออล (butane-2,3-diol) 1.8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร

1.3 สารละลายเพนเทน-2,4-ไดโอน (pentane-2,4-dione solution)(เตรียมใช้ทันที) เตรียมโดยละลายแอมโมเนียมแอซีเทต 154.16 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมกรดแอซีติกเข้มข้นปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วเติมเพนเทน-2,4-ไดโอน (pentane-2,4-dione) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร

1.4 สารละลายมาตรฐานไซลิทอล เตรียมโดยละลายไซลิทอล 0.1000 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร) เจือจางให้ได้สารละลายไซลิทอล ความเข้มข้น 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. วิธีการวิเคราะห์

2.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง หรือสารละลายไซลิทอลมาตรฐาน (ความเข้มข้นไซลิทอล 10-50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง

2.2 เติม periodate reagent ลงไป 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที

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

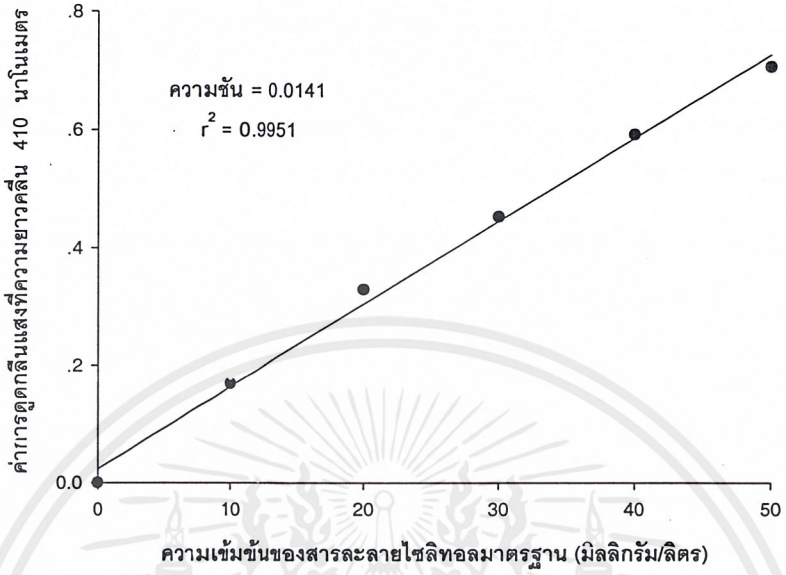
2.4 เติมสารละลายเพนเทน-2,4-ไดโอน 2.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2.5 บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที

2.6 ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร

2.7 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรและความเข้มข้นของไซลิทอลไปเขียนกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซลิทอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพภาคผนวกที่ 4 กราฟมาตรฐานของไซลิทอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้