สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตไซลิทอลโดย *Candida guilliermondii* TISTR 5206 ซึ่งเจริญบนอาหารที่ประกอบด้วย D-xylose และ D-glucose

นางสาวปทุมมา หิมะคุณ รหัส 41053037
นางสาวมนภัสร์ วัชราชันย์ รหัส 41053055
นางสาววลัยพร เตียประสิทธิ์ รหัส 41053070

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 43962
วัน, เดือน, ปี 18 ต.ค. 2545

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

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Xylitol production by *Candida guiliiermondii* TISTR 5206 grown on medium containing D-xylose and D-glucose

Miss Patumma Himakun 41053037

Miss Monpat Watcharachun 41053055

Miss Walaiporn Tiaprasit 41053070

A special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirment

For Degree Bachelor of Science Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut Institute of Technology Ladkrabang

Academic year 2001

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตไซลิทอลโดย *Candida guilliermondii* TISTR 5206 ซึ่งเจริญบนอาหารที่ประกอบด้วย D-xylose และ D-glucose

โดย นางสาวปทุมมา หิมะคุณ รหัส 41053037

นางสาวมนภัสร์ วัชราชันย์ รหัส 41053055

นางสาววลัยพร เตียประสิทธิ์ รหัส 41053070

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์สุขใจ ชูจันทร์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

_____

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง) หัวหน้าภาควิชา

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

_____

(อาจารย์พนา โลหะทรัพย์ทวี) ประธานกรรมการ

_____

(อาจารย์ลินจง สุขลำภู) กรรมการ

_____

(รศ.สุขใจ ชูจันทร์) กรรมการ

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบัน เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตไซลิทอลโดย *Candida guilliermondii* TISTR 5206 ซึ่งเจริญบนอาหารที่ประกอบด้วย D-xylose และD-glucose

นักศึกษา นางสาวปทุมมา หิมะคุณ
นางสาวมนภัสร์ วัชราชันย์
นางสาววลัยพร เตียประสิทธิ์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์สุขใจ ชูจันทร์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา ๒๕๔๔

บทคัดย่อ

การศึกษาการผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสและกลูโคส โดยเชื้อยีสต์ *Candida guilliermondii* TISTR 5206 ซึ่งเป็นยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวในกระบวนการผลิต เชื้อยีสต์ยังใช้ไซโลสในการเจริญเติบโตและซ่อมแซมเซลล์อีกด้วย ทำให้ปริมาณไซลิทอลที่ผลิตได้ลดลง จึงมีการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนร่วม เพื่อช่วยปรับปรุงผลผลิตไซลิทอลให้สูงขึ้น จากการทดลองเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการเจริญเติบโต ซึ่งในสูตรอาหารนี้ได้ทำการศึกษาธาตุอาหารหลักที่เชื้อยีสต์ใช้ในการเจริญเติบโต พบว่าต้องใช้กลูโคส 10.0 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 1.0 กรัมต่อลิตร เปปโตน 6 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 4 กรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงเชื้อในระดับฟลาสก์ ภายใต้สภาวะการเจริญใช้อัตราการเขย่า 270 รอบต่อนาที เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พี-เอช เริ่มต้นที่ 6.0 ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 4 หลังจาก 20 ชั่วโมงเติมน้ำตาลไซโลสลงไป 150 กรัมต่อลิตร แล้วลดอัตราการเขย่าลงเหลือ 180 รอบต่อนาที พบว่าไซลิทอลผลิตได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 60 โดยให้ปริมาณไซลิทอล 17.683 กรัมต่อลิตร หรือ 0.254 กรัมไซลิทอล ต่อกรัมไซโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Xylitol production by *Candida guilliermondii* TISTR 5206 grown on medium containing D-xylose and D-glucose

Name MissPatumma Himakun

MissMonpat Watcharachun

MissWalaiporn Tiarprasit

Special Project Advisor Associate Professor Sukjai Choojan

Department Biotechnology

Acadamic Year 2544

Abstract

Candida guilliermondii TISTR 5206,xylose fermentable yeast,can produce xylitol from xylose, when xylose is the only carbon source in the process. Xylose not only convert to xylitol but also are used for growth and cell maintenance. There fore, the yield of xylitol is decreased. The use of glucose as co-substrate, and controlling of conditions can improve productivity of xylitol. The results showed that the optimum concentrations of glucose , yeast extract , peptone and ammonium sulfate were 10.0 g/l, 1.0 g/l, 6.0 g/l and 4.0 g/l ,respectively,and cultured by shaking flask at 270 rpm , 30 ^{0} c with 4 % initial inoculum size. After 20 hours , 150 g/l xylose was added and shaking rate was decreased to 180 rpm. The maximun yield of xylitol (17.683 g/l or 0.254 g.xylitol/ g.xylose) was collected at the 60 hours of the cultivation.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานฉบับนี้ ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ รศ. สุขใจ ชูจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่ให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ รวมทั้งได้กรุณาตรวจทานแก้ไขทางด้านภาษาและคำแนะนำต่างๆ อาจารย์พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการ และ อาจารย์ลินจง สุขลำภู กรรมการพิจารณาโครงงานพิเศษ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่กรุณาให้ยืมอุปกรณ์และสารเคมีต่างๆ ระหว่างการทดลอง

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย	ก
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์	1
ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	1
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	3
แหล่งที่พบไซลิทอลตามธรรมชาติ	3
คุณสมบัติของไซลิทอล	4
การใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหาร	8
เมแทบอลิซึมของไซลิทอลในร่างกายมนุษย์	11
การผลิตไซลิทอลด้วยวิธีต่างๆ	12
กระบวนการเมแทบอลิซึมในการผลิตไซลิทอลโดยจุลินทรีย์	13
ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไซลิทอลด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยี	21
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	26
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	34
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	45
เอกสารอ้างอิง	46
ภาคผนวก ก	48
ภาคผนวก ข	53
ภาคผนวก ค	54
ภาคผนวก ง	59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ปริมาณของไซลิทอลในผักและผลไม้	3
ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของไซลิทอล	4
ตารางที่ 2.3 ค่าความร้อนจำเพาะของการละลายของน้ำตาลชนิดต่างๆ	5
ตารางที่ 2.4 เปรียบเทียบความหวานของสารให้ความหวานต่างๆ	6
ตารางที่ 2.5 เปรียบเทียบคุณสมบัติทางกายภาพของไซลิทอลและซูโครส	7
ตารางที่ 2.6 กิจกรรมของเอนไซม์ XR และ XDH ในยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้	15
ตารางที่ 4.1ก แสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ที่ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นต่างๆ	35
ตารางที่ 4.1ข แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของการศึกษาปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น	35
ตารางที่ 4.2ก แสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ที่ปริมาณกลูโคส	36
ตารางที่ 4.2ข แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของการศึกษาปริมาณกลูโคส	37
ตารางที่ 4.3ก แสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ที่ปริมาณสารสกัดยีสต์ต่างๆ	38
ตารางที่ 4.3ข แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของการศึกษาปริมาณสารสกัดยีสต์	38
ตารางที่ 4.4ก แสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ที่ปริมาณเปปโตนต่างๆ	39
ตารางที่ 4.4ข แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของการศึกษาปริมาณเปปโตน	39
ตารางที่ 4.5ก แสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ที่ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต	41
ตารางที่ 4.5ข แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของการศึกษาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต	41
ตารางที่ 4.6ก แสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ที่ความเร็วรอบในการเขย่าต่างๆ	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง(ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 4.6ข แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของการศึกษาความเร็วรอบในการเขย่า	43
ตารางที่ 4.7 แสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ ปริมาณน้ำตาลไซลิทอล อัตราการผลิตไซลิทอล	43
ตารางที่ 4.8 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์ ปริมาณน้ำตาลไซลิทอล อัตราการใช้ไซโลส และ Yield ที่ได้จากการผลิต	44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 วิถีการเกิดไซลิทอลจากเมแทบอลิซึมของไซโลส 14
รูปที่ 2.2 เมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสเพื่อสร้างไซลูโลส-5-ฟอสเฟต 16
รูปที่ 2.3 เมแทบอลิซึมของไซลูโลส-5-ฟอสเฟตของยีสต์ *Pachysolen tannophilus* 17
รูปที่ 2.4 เมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์ 20
รูปที่ 4.1 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาณเชื้อเริ่มต้น 34
รูปที่ 4.2 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ต่อปริมาณกลูโคส 36
รูปที่ 4.3 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 37
รูปที่ 4.4 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาณเปปโตน 39
รูปที่ 4.5 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์
ต่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 40
รูปที่ 4.6 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อความเร็วรอบในการเขย่า 42
รูปที่ ค1 กราฟมาตรฐานกลูโคส 49
รูปที่ ค2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซลิทอล 51
รูปที่ ค3 กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส 52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ไซลิทอลเป็นสารให้ความหวานเช่นเดียวกับน้ำตาลซูโครส พบได้ในผักและผลไม้ในธรรมชาติ เช่น ราสเบอร์รี่ , สตรอเบอร์รี่ เป็นต้น ในอุตสาหกรรมอาหารในปัจจุบันนิยมใช้ไซลิทอลเป็นส่วนประกอบในการผลิตอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีคุณสมบัติที่สามารถทดแทนน้ำตาลธรรมดาได้ และยังมีข้อดีอื่นๆ อีกเช่น ให้รสชาติที่ดี เย็นสดชื่น ไม่ทำให้ฟันผุ เนื่องจากจุลินทรีย์ในช่องปากไม่สามารถใช้ไซลิทอลเป็นแหล่งอาหารได้เหมาะกับผู้ที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก เพราะไซลิทอลให้พลังงานต่ำและในทางการแพทย์ยังเหมาะแก่ผู้ป่วยโรคเบาหวานเนื่องจากการเผาผลาญไซลิทอลไม่ขึ้นกับอินซูลิน จึงไม่ทำให้เกิดสภาวะน้ำตาลในเลือดสูง แต่ไซลิทอลก็มีข้อจำกัดในการใช้คือ ถ้าใช้ในประมาณมากๆ จะทำให้เกิดอาการท้องเสียได้ เพราะมีคุณสมบัติเป็นยาระบาย การผลิตไซลิทอลในปัจจุบันโดยมากจะผลิตโดยกระบวนการทางเคมีโดยวิธี Hydrogenation จากน้ำตาลไซโลส แต่มีข้อเสียคือ ใช้ต้นทุนในการผลิตสูงและทำให้บริสุทธิ์ได้ยาก การผลิตไซลิทอลจากการหมักโดยใช้เชื้อยีสต์และพวกราเส้นใยจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพราะเป็นกระบวนการที่ประหยัดและยังสามารถใช้น้ำตาลไซโลสที่ได้จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้ ถ้าการผลิดไซลิทอลโดยการหมักให้ผลที่ดีก็อาจจะทำให้ลดต้นทุนในการผลิตไซลิทอลให้มีราคาต่ำลงได้ ซึ่งเป็นผลดีต่อการผลิตไซลิทอลในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

จากเหตุผลดังกล่าว จึงได้มีการผลิตน้ำตาลไซลิทอลโดยอาศัยเชื้อ *Candida guilliermondii* TISTR 5206 จากน้ำตาล D-glucose และD-xylose เพื่อหาปริมาณสารอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลไซลิทอล

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

เพื่อศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมในการผลิตไซลิทอลให้ได้ผลผลิตสูงสุดโดยการหมักของยีสต์ *Candida guilliermondii* สายพันธุ์ TISTR 5206 ในน้ำตาล D-glucose และ D-xylose

ขอบเขตของโครงงาน

เพื่อศึกษาถึงกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อยีสต์ *Candida guilliermondii* สายพันธุ์ TISTR 5206 ในการหมักน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสเป็นน้ำตาลไซลิทอลได้ปริมาณสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตไซลิทอล
2. ลดต้นทุนในการผลิตไซลิทอลโดยอาศัยวิธีการหมักแทนวิธีทางเคมี
3. เพื่อเป็นแนวทางในการหาความเป็นไปได้สำหรับการผลิตไซลิทอลในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ไซลิทอลเป็นน้ำตาลแอกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่เป็นอนุพันธ์ของไซโลส ปกติไซลิทอลจะเป็นสารตัวกลางในกระบวนการเมแทบอลิซึมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Hollmann และ Touster,1957) และพบได้ตามธรรมชาติในผักและผลไม้หลายชนิด (Washuttl และคณะ,1973) ส่วนการผลิตไซลิทอลเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารนั้น สามารถผลิตได้จากไซโลส โดยกระบวนการเติมไฮโดรเจนหรือการผลิตโดยกระบวนการหมักจากวัสดุเหลือทิ้งที่มีไซโลสเป็นองค์ประกอบ (สาโรจน์,2537)

แหล่งที่พบไซลิทอลตามธรรมชาติ

ตามปกติไซลิทอลเป็นสารตัวกลาง (intermediate) ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรวมถึงการพบได้ในผักและผลไม้หลายชนิด ดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 2.1 ปริมาณไซลิทอลในผักและผลไม้

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

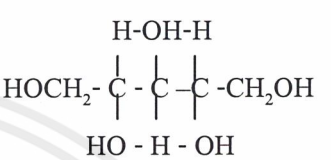
ที่มา : Emodi(1978)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติของไซลิทอล

ไซลิทอลมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพตามตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของไซลิทอล

สูตรโมเลกุล	$C_5H_{12}O_5$
โครงสร้าง	
น้ำหนักโมเลกุล	152.1
รูปร่าง	ผงคริสตัล
สี	สีขาว
รสชาติ	รสหวาน
กลิ่น	ไม่มีกลิ่น
ความหวานสัมพัทธ์ (Relative sweetness)	ไซลิทอล(85-120) มีความหวานโดยประมาณเท่ากับน้ำตาลซูโครส(100) แต่หวานมากกว่ากลูโคส(70), ไซโลส(67), ซอบิทอล(50) และแมนนิทอล(40) แต่มีความหวานน้อยกว่าฟรุกโตส (150)
จุดหลอมเหลว	93.4-94.7 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	216 องศาเซลเซียส
การละลายในน้ำ	64.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
การละลายในเอธานอล	102 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
การละลายในเมธานอล	6.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
การดูดความชื้น	ในที่ที่มีความชื้นสูง จะดูดความชื้นได้มากกว่าน้ำตาลซูโครส แต่ดูดความชื้นได้น้อยกว่าซอร์บิทอล
สารปนเปื้อน	แมนนิทอล, ซอร์บิทอล, กาแลคทิทอล อาราบิทอล

ที่มา : Emodi (1982)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติอื่นๆ ที่น่าสนใจของไซลิทอล

1. ไซลิทอลละลายน้ำได้ง่าย สารละลายที่ได้มีความคงตัวสูง แม้ว่าจะถูกความร้อนหรือเก็บไวนานๆ ก็ไม่เกิดปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสีน้ำตาล (Maillard browning) และการเกิดคาราเมล (Caramelization) เหมือนน้ำตาลฟรุกโตสหรือเด็กซ์โตส เมื่อใช้ความร้อนสูงกว่า 150 องศาเซลเซียส เนื่องมาจากไซลิทอลไม่มีหมูอัลโดสหรือคีโตส

2. ไซลิทอลให้รสชาติดีและเย็นสดชื่น (cooling effect) คล้ายเมนทอล เนื่องจากการละลายของไซลิทอลต้องการความร้อน (Endothermic dissolution) เพราะไซลิทอลมีค่าความร้อนจำเพาะของการละลายเป็นลบ (Negative heat of solution) เท่ากับ –34.8 แคลอรีต่อกรัม ดังตารางที่ 2.3 โดยคุณสมบัติจะเกิดขึ้นเมื่อไซลิทอลอยู่ในรูปผลึกเท่านั้น แต่เมื่อไซลิทอลอยู่ในรูปของสารละลายหรืออยู่ในรูปอสัณฐาน (Amorphous) จะไม่ให้คุณสมบัติข้อนี้

ตารางที่ 2.3 ค่าความร้อนจำเพาะของการละลายของน้ำตาลชนิดต่างๆ

Polyalcohol	Cooling effect (cal/g at 25 ^{0}C
Isomalt	-9.4
Lactitol	
- Monohydrate	-12.7
- Dihydrate	-13.9
Mannitol	-28.9
Sorbitol	-26.5
Xylitol	-34.8

ที่มา : Arron (1993)

3. ไซลิทอลมีความหวานเช่นเดียวกับน้ำตาลทั่วไป แต่มีความหวานมากกว่าแมนนิทอลและซอร์บิทอล 2.5 และ 2 เท่าตามลำดับ ความหวานของไซลิทอลเมื่อเทียบกับซูโครสจะมีตั้งแต่ 0.85-1.25 เท่า ขึ้นอยู่กับค่าพีเอช ความเข้มข้นและอุณหภูมิ เป็นต้น ตัวอย่างเช่น ไซลิทอลที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ จะมีความหวานเท่ากับน้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อความเข้มข้นมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์สารละลายไซลิทอลจะหวานมากกว่า แต่ถ้าความเข้มข้นน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ สารละลายซูโครสจะหวานมากกว่า หรือความหวานสัมพันธ์ของไซลิทอล เมื่อเทียบกับซูโครสจะลดลงจาก 103 เป็น 78 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสารละลายไซลิทอลที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ จาก 5 องศาเซลเซียส เป็น 50 องศาเซลเซียส เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

5. ไซลิทอลไม่ทำให้ฟันผุ เนื่องจากจุลินทรีย์ในช่องปากโดยเฉพาะ *Streptococcus mutans* ไม่สามารถใช้ไซลิทอลเป็นแหล่งอาหารได้ ทำให้สภาพพีเอชบนเคลือบฟันไม่ต่ำกว่า 5.7 จึงไม่ทำให้ฟันผุ

6. ไซลิทอลสามารถใช้ในผู้ป่วยเบาหวานได้เนื่องจากการเผาผลาญไซลิทอลไม่ขึ้นกับอินซูลิน ดังนั้นจึงไม่ทำให้เกิดสภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (Hyperglycemia) และน้ำตาลในเลือดต่ำ (Hypoglycemia)

7. ไซลิทอลช่วยยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากจุลินทรีย์ไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่สามารถใช้ไซลิทอลได้ ผลิตภัณฑ์ที่มีไซลิทอลเป็นองค์ประกอบจึงเกิดการหมักโดยจุลินทรีย์ได้ยาก ทำให้มีอายุการเก็บที่นานขึ้น (long shelf-life)

ตารางที่ 2.4 เปรียบเทียบความหวานของสารให้ความหวานต่างๆ

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

ที่มา : สาโรจน์ (2541)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 เปรียบเทียบคุณสมบัติทางกายภาพของไซลิทอลและซูโครส

คุณสมบัติ	น้ำตาลไซลิทอล	น้ำตาลซูโครส
จุดหลอมเหลม (^{0}C)	93.5-94.5	179.186
จุดเดือด (^{0}C/760 มม. ปรอท)	216	สลายตัว
ความหนาแน่น (15 ^{0}C)	1.5	1.59
พลังงาน (แคลอรีต่อกรัม)	4.06	4.06
การเกิดคาราเมล	ไม่เกิด	เกิด
การดูดความชื้น (%)		
ความชื้น 60 %	0.05	0.02
ความชื้น 92 %	90	4
ความหนืด (cP)(20 ^{0}C)		
ความเข้มข้น 10 %	1.23	1.31
ความเข้มข้น 60 %	20.63	58.50

ที่มา : สาโรจน์ (2541)

ข้อจำกัดในการใช้ไซลิทอล

1. การบริโภคไซลิทอลเป็นจำนวนมากในคราวเดียวจะทำให้ท้องเสีย (gastrointestinal distress and osmotic diarrhae) เนื่องจากไซลิทอลมีคุณสมบัติเป็นยาระบาย เพราะไซลิทอลมีคุณสมบัติเหมือนคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ คือดูดซับน้ำไว้อย่างช้าๆ ดังนั้นเมื่อเริ่มบริโภคเป็นครั้งแรกควรบริโภคในปริมาณต่ำก่อน (ราว 30 กรัมต่อวัน) และค่อยๆ เพิ่มปริมาณขึ้น แต่จะบริโภคได้สูงสุดราว 200-300 กรัมต่อวัน

2. การใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อให้มีรสชาติเย็นสดชื่นนั้น จะต้องใช้ไซลิทอลที่อยู่ในรูปผลึกเท่านั้น ซึ่งอาจทำให้เกิดลักษณะผิวสัมผัสที่เปลี่ยนแปลงไปหรือไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคได้

3. ไซลิทอลมีราคาแพงเมื่อเทียบกับสารให้ความหวานชนิดอื่น เนื่องจากต้นทุนที่ใช้ในการผลิตสูง ทำให้การใช้ไซลิทอลไม่แพร่หลายเท่าที่ควร และแม้ว่าไซลิทอลจะสามารถใช้ในผู้ป่วยโรคเบาหวานได้ แต่ในอาหารสำหรับผู้ป่วยเบาหวานกลับใช้ฟรุกโตสแทนเพราะมีราคาถูก และไม่เกิดผลข้างเคียงเหมือนกับเมื่อใช้ไซลิทอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหาร

มีแนวโน้มการใช้ไซลิทอลในอุตสาหกรรมอาหาร อย่างกว้างขวางในผลิตภัณฑ์อาหารพวกขนมอบ แยม มาร์มาเลดและผลิตภัณฑ์ขนมหวาน เป็นต้น เนื่องจากไซลิทอลมีคุณสมบัติที่สามารถใช้ทดแทนน้ำตาลธรรมดาได้ และยังมีข้อดีในแง่ไม่ทำให้เกิดฟันผุเมื่อบริโภคเหมือนน้ำตาลทั่วไป แต่ทว่าการใช้ไซลิทอลยังมีข้อจำกัดอยู่บ้าง โดยเฉพาะในเครื่องดื่มประเภทน้ำอัดลม ซึ่งผู้บริโภคมีโอกาสจะได้รับไซลิทอลปริมาณสูงเกินไปทำให้ท้องเสียได้ หรือสภาพอันหลากหลายของผลึกไซลิทอล (น้ำตาลซูโครสมีผลึกแบบ monoclinic แต่ไซลิทอลมีผลึกแบบ rhombic) อาจทำให้เนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์มีลักษณะแข็งกระด้าง อย่างไรก็ตามข้อจำกัดเหล่านี้กล่าวได้ว่าเป็นปัญหารองเมื่อเทียบกับประโยชน์ที่ได้รับจากการทดแทนน้ำตาลซูโครสด้วยไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหารทั้งหลาย ซึ่งโดยปกติมักจะให้คุณภาพที่ทัดเทียมกันหรือดีกว่า เช่น คุณภาพเย็นที่สดชื่น ซึ่งช่วยเพิ่มรสชาติของเปปเปอร์มิ้นท์ รสมะนาว และรสผลไม้ต่างๆ

ตัวอย่างของการใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหาร มีดังนี้

1. หมากฝรั่ง (Chewing gum)

ปกติหมากฝรั่งประกอบด้วยน้ำตาล 50-75 เปอร์เซ็นต์ และน้ำ 3-5 เปอร์เซ็นต์ และมีส่วนผสมของกลูโคสไซรัปเป็นตัวทำให้เนื้อสัมผัสนุ่ม (Softenner) ไซลิทอลสามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ในอัตรา 1:1 ยกเว้นซอร์บิทอลและแมนนิทอลซึ่งมีความหวานน้อยกว่า จะต้องเติมสารให้ความหวานที่ไม่ให้พลังงาน (non-caloric sweetener) ชนิดอื่นแทนเพื่อให้ได้ความหวานเท่าเดิม แต่เนื่องจากไซลิทอลมีความหนืด (Viscosity) น้อยกว่าน้ำตาลซูโครสจึงต้องใช้กัมอาราบิก (Gum arabic) เป็นส่วนผสมด้วย (Kracher,1975) ความแตกต่างของหมากฝรั่งชนิดใช้น้ำตาลไซลิทอลกับชนิดใช้น้ำตาลซูโครส คือชนิดไซลิทอลจะให้ความรู้สึกเย็นเมื่อเริ่มเคี้ยวเท่านั้นเอง เนื่องจากอิทธิพลของ Cooling effect ซึ่งเป็นคุณสมบัติของไซลิทอล และจากการศึกษาของ Scheinin และคณะ (1975) พบว่าหมากฝรั่งชนิดใช้ไซลิทอลสามารถป้องกันการเกิดฟันผุได้ ซึ่งมักพบกับผู้เคี้ยวหมากฝรั่งชนิดใช้น้ำตาลเป็นสารให้ความหวาน

2. ช็อคโกแล็ต (Chocolate)

สามารถใช้ไซลิทอลในการผลิตช็อคโกแล็ตทดแทนน้ำตาลซูโครสได้ในอัตรา 1:1 แต่จำเป็นต้องใช้สารเติมแต่ง (Additives) ช่วยเนื่องจากไซลิทอลให้ความหนืดต่ำกว่า ปริมาณไซลิทอลที่ใช้ในช็อคโกแล็ตมีตั้งแต่ 17-42 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบปัญหาเกี่ยวกับเนื้อสัมผัสและรสชาติของผลิตภัณฑ์แต่อย่างไร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ท็อฟฟี่และคาราเมล (Toffees and caramels)

เนื่องจากไซลิทอลไม่มีคุณสมบัติทาง Maillard browning และ Caramelization จึงจำเป็นต้องเติมน้ำตาลฟรุกโตสเพื่อคงคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์เอาไว้ หรืออาจเติมสีและกลิ่นดังกล่าวทดแทนก็ได้ และเพื่อป้องกันการเกิดการตกผลึกของไซลิทอล ซึ่งจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีเนื้อสัมผัสแข็งกระด้าง ควรหลีกเลี่ยงการใช้มอลโตเด็กซ์ตริน (Maltodextrin) และไลเคซีน (Lycasien) เป็นส่วนผสมด้วย ซึ่งพบว่าอนุพันธ์ของแป้งดังกล่าวมีผลต่อการตกผลึกของไซลิทอลได้

4. เจลาติน (Gelatin desserts)

การใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์เจลาติน มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารให้ความหวาน

5. พุดดิ้ง (Pudding)

การผลิตพุดดิ้งไม่มีการเปลี่ยนแปลงสูตรแต่อย่างไรเมื่อใช้ไซลิทอลแทนน้ำตาลซูโครสและไม่มีผลต่อรสชาติผลิตภัณฑ์

6. แยม เยลลี่ และมาร์มาเลด (Jams jellies and marmalades)

กรณีนี้ไซลิทอลสามารถใช้ทดแทนน้ำตาลซูโครสได้เช่นกันในอัตราส่วน 1:1 แต่ควรหลีกเลี่ยงการใช้ไซลิทอลมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะทำให้เกิดการตกผลึกของไซลิทอลได้ในระหว่างการเก็บรักษา และไม่มีความจำเป็นต้องเติมสารกันบูด แต่อย่างไรเพราะจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสีย ของผลิตภัณฑ์ไม่สามารถใช้ไซลิทอลเป็นแหล่งอาหารได้เช่นน้ำตาลอื่นทั่วไป แต่ควรเติมเพคตินในปริมาณที่มากขึ้น เพราะไซลิทอลให้ความหนืดต่ำกว่าน้ำตาลซูโครส และมีความจำเป็นต้องเติมเกลือแคลเซี่ยมเพื่อช่วยในการเกิดเจล (Gelatinization) ของแยม (Hyvoenen และ Toeemae,1981) นอกจากนี้ยังพบว่าแยมและมาร์มาเลดที่ใช้ไซลิทอลจะให้รสชาติที่ดีกว่าน้ำตาลซูโครสรวมทั้งความคงตัวของสีอีกด้วย (Manz และคณะ,1973)

7. ลูกกวาด (Hard candy or boiled sweets)

ในการผลิตลูกกวาดชนิดไซลิทอลอาจมีปัญหาอยู่บ้าง เนื่องจากการตกผลึกของไซลิทอลเกิดในขณะที่ทำให้เย็นและความหนืดที่ต่ำ จึงต้องผลิตลูกกวาดโดยการอัดลูกกวาดร้อนเข้าแม่พิมพ์ (Depositing) แทน

8. ผลิตภัณฑ์ขนมอบ (Bakery goods)

พบว่าใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์ขนมอบนั้นไม่จำเป็นต้องมีการเปลี่ยนแปลงสูตรขนมแต่อย่างไร แต่อาจจะต้องเติมน้ำตาลฟรุกโตสเพื่อรักษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องการ Maillard brownig และ Caramelization นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ที่ยังต้องการปริมาตรจากการหมักของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีสต์กับน้ำตาลนั้น อาจจะไม่เหมาะสมนักสำหรับการใช้ไซลิทอล เพราะผลิตภัณฑ์ขนมอบที่ใช้ไซลิทอลนั้นจะมีปริมาตรน้อยกว่าและมีเนื้อสัมผัสที่แน่นกว่า อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ขนมอบที่ใช้ไซลิทอลเหมาะสมมากสำหรับคนที่เป็นโรคเบาหวานและป้องกันฟันผุได้เป็นอย่างดี

9. ไอศกรีม (Icecreams)

การใช้ไซลิทอลแทนน้ำตาลซูโครส กลูโคสไซรัป หรือน้ำตาลอินเวอร์ต (Invert sugar) ในผลิตภัณฑ์แช่แข็ง จะทำให้คุณสมบัติหลอมเหลวของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนไป คือ ณ อุณหภูมิเดียวกันผลิตภัณฑ์ที่ใช้ไซลิทอลจะมีคุณสมบัติอ่อนกว่าจึงจำเป็นต้องมีการเติมสารช่วยทำให้แข็ง (Thickners) สำหรับไอศกรีมที่ใช้ไซลิทอลนั้นไม่พบว่าการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –24 องศาเซลเซียส นานถึง 6 เดือน และไม่พบการเกิดการตกผลึกขึ้นอีกด้วย (Kracher,1975)

10. เค็ทชัปและนมข้นหวาน (Ketchup and condenced milk)

การใช้ไซลิทอลจะปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ คือ ป้องกันการเกิด browning และการเสื่อมเสียโดยจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี

11. ซอสและอื่นๆ (Marinadae sauces and pastes)

เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลต่ำ ฉะนั้นการทดแทนน้ำตาลด้วยไซลิทอลจึงไม่ประสบปัญหาแต่อย่างไร

12. โยเกิร์ต (Yoghurt)

จากการศึกษาพบว่าปริมาณไซลิทอลที่ใช้ 8 เปอร์เซ็นต์ จะเหมาะสมที่สุดสำหรับการทำโยเกิร์ต (Salminemn และ Branen,1978;Hyvoenen และ Slott,1981) โดยที่การเติมไซลิทอลหลังการบ่มจะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์ แต่ถ้าเติมไซลิทอลก่อนการบ่มผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีค่าพีเอช (4.4) สูงกว่ากรณีที่ใช้น้ำตาลซูโครส (4.0) และผลิตภัณฑ์จะมีลักษณะหนืดน้อยกว่า อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างเกี่ยวกับการยอมรับของผู้บริโภค (Sensory evaluation)

13. เครื่องดื่ม (Drinks)

เนื่องจากการได้รับไซลิทอลในขณะเดียวกันมากเกินไปจะทำให้ท้องเสียได้ (Laxative effect) จึงต้องใช้ไซลิทอลในรูปผสมกับสารให้ความหวานตัวอื่นๆ เช่น เมื่อใช้ไซลิทอล 3.9 เปอร์เซ็นต์และไซคลาเมต (Cyclamate) 0.133 เปอร์เซ็นต์ แทนน้ำตาลในผลิตภัณฑ์น้ำอัดลมจะสามารถลดพลังงานที่ร่างกายจะได้รับถึง 60 เปอร์เซ็นต์ (Hyvoenen และ Sipilae,1977) จึงนับเป็นเครื่องดื่มที่เหมาะสมต่อคนที่เป็นโรคเบาหวานและคนที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก ส่วนนม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สเตอริไรซ์ยูเอชทีชนิดช็อคโกแล็ต เหมาะที่จะใช้ไซลิทอล 4 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ทำให้คุณภาพทางฟิสิกส์ เช่น ความหนืดและสีเปลี่ยนแปลงไป และยังเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค สำหรับการเก็บรักษากว่าหนึ่งเดือนที่อุณหภูมิห้องก็ไม่ทำให้ผลิตภัณฑ์เสื่อมคุณภาพแต่อย่างไร

14. ผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรม (Pharmaceutical preparations)

ไซลิทอลมีข้อได้เปรียบคือไม่ทำให้เกิดฟันผุ (Non-cariogenicity) และไม่เกิดการหมักด้วยจุลินทรีย์ (Non-fermentability) จึงได้ใช้เป็นสารให้ความหวานในการเตรียมผลิตภัณฑ์ชนิดเหลวทางเภสัชกรรม ฉะนั้นการใช้ยาดังกล่าวของคนไข้ที่ไม่ได้ทำความสะอาดช่องปากเป็นเวลานาน จึงไม่มีผลต่อการทำให้เกิดฟันผุ

ปัจจุบันได้มีการใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหารอย่างกว้างขวางขึ้นทั้งในทวีปยุโรปและอเมริกา โดยเฉพาะหมากฝรั่งและพบว่ามีแนวโน้มที่จะใช้ไซลิทอลมากขึ้นในอุตสาหกรรมประเภทขนมหวานและขนมขบเคี้ยว แต่การใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวยังมีข้อจำกัดอยู่ที่การผลิตไซลิทอลมีต้นทุนการผลิตสูงกว่าการกระบวนการผลิตน้ำตาล จึงทำให้ราคาของไซลิทอลแพงกว่าน้ำตาลทั่วไป อย่างไรก็ตามปัจจุบันได้มีการวิจัยค้นคว้าเพื่อลดต้นทุนการผลิตไซลิทอลโดยวิธีการหมัก (Fermentation) โดยการนำเอาวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลไซโลสใช้เป็นวัตถุดิบ ซึ่งคาดว่าจะทำให้ต้นทุนการผลิตถูกกว่ากระบวนการผลิตทางเคมี (Hydrogenation)ได้

เมแทบอลิซึมของไซลิทอลในร่างกายมนุษย์

เมแทบอลิซึมในร่างกายของไซลิทอลเกิดขึ้นที่สองตำแหน่ง คือ การดูดซึมบริเวณลำไส้โดยกระบวนการ passive diffusion และเกิดการเผาผลาญโดยตรงที่ตับ (Smith,1962) การดูดซึมจะเป็นไปอย่างช้าๆ ในกรณีที่ได้รับไซลิทอลในปริมาณมากเกินไป การดูดซึมที่เกิดขึ้นจะไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดอาการท้องร่วงได้ สำหรับปริมาณไซลิทอลที่บริโภคต่อวันที่แนะนำคือไม่เกิน 60 กรัม แต่ถ้าบริโภคติดต่อกันนานจะสามารถบริโภคไซลิทอลได้มากขึ้นถึง 120 กรัมต่อวัน ส่วนการเผาผลาญไซลิทอลที่ตับนั้น ไซลิทอลจะถูกออกซิไดส์เป็น D-xylulose ซึ่ง D-xylulose จะเปลี่ยนเป็น D-xylulose-5-phosphate แล้วเข้าสู่วิถีเพนโทสฟอสเฟตเพื่อเปลี่ยนเป็น fructose-6-phosphate แล้วกลายเป็นกลูโคสซึ่งจะถูกนำไปเปลี่ยนเป็นไกลโคเจนสะสมไว้ที่ตับต่อไป และเนื่องจากการเผาผลาญไซลิทอลไม่ขึ้นกับอินซูลิน ดังนั้นจึงไม่เกิดสภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (Hyperglycemia) หรือน้ำตาลในเลือดต่ำ (Hypoglycemia) และไซลิทอลให้พลังงานเพียง 4 กิโลแคลอรีเท่ากับคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น ทำให้มีผลต่อปริมาณกลูโคสในเลือดเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตไซลิทอลด้วยวิธีต่างๆ

การผลิตไซลิทอลมีหลายวิธีและสามารถรักษาใช้วัตถุดิบได้หลายชนิด เช่น ผักและผลไม้ ของเสียที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ เช่น วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เศษเหลือจากอุตสาหกรรม ไม้และกระดาษ หรืออาจจะใช้น้ำตาลไซโลสเป็นวัตถุดิบโดยตรงก็ได้ แต่ละวิธีจะมีกรรมวิธีที่แตกต่างกันไป ดังนี้

การสกัดจากผักและผลไม้

เนื่องจากไซลิทอลพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติในผักและผลไม้ เช่นกะหล่ำปลี มะเขือยาว ผักโขม สตรอเบอร์รี่ และราสเบอร์รี่ จึงสามารถสกัดไซลิทอลจากผักและผลไม้ได้ แต่ปริมาณไซลิทอลที่ได้จะต่ำมากเมื่อเทียบกับปริมาณวัตถุดิบที่ใช้ จึงไม่คุ้มค่าที่จะผลิตเป็นเชิงพาณิชย์

การผลิตด้วยวิธีทางเคมี

เป็นการผลิตที่ปัจจุบันใช้ผลิตไซลิทอลทางอุตสาหกรรม และใช้วัตถุดิบที่เป็นน้ำตาลไซโลสที่ได้จากวัสดุที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบมาผลิต ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. การไฮโดรไลซิส

เป็นการสกัดน้ำตาลไซโลสจากเฮมิเซลลูโลสโดยใช้กรดซัลฟูริกเจือจาง วิธีที่เป็นที่นิยมคือ “ultrafast hydrolysis” ที่ใช้กรดซัลฟูริกเจือจาง 0.5-1.0 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 200-210 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วินาที ซึ่งจะได้น้ำตาลไซโลสออกมา

2. การทำน้ำตาลไซโลสให้บริสุทธิ์

เมื่อไฮโดรไลส์แล้วจะได้น้ำตาลไซโลสอยู่ในไฮโดรไลเสท (hydrolysate) ซึ่งสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ 2 วิธี

2.1 แบบแยกน้ำตาลไซโลส

วิธีนี้จะกำจัดสารแขวนลอย ตะกอน สีและไอออนอื่นๆ และใช้วิธีทางโครมาโตกราฟฟีเพื่อแยกเอาน้ำตาลไซโลสออกมาจากน้ำตาลชนิดอื่นๆ เพื่อให้ได้น้ำตาลไซโลสบริสุทธิ์

2.2 แบบไม่แยกน้ำตาลไซโลส

วิธีนี้จะแยกเอาสารอื่นๆ พวกตะกอน ไอออน และสีออกแต่ไม่แยกเอาน้ำตาลชนิดอื่นๆ ออกไป สารละลายที่ได้จะมีน้ำตาลหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ แต่มีน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก

3. การไฮโดรจีเนชัน

เป็นการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นไซลิทอล ที่สภาวะความดัน 50 บรรยากาศ อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมงโดยใช้โลหะนิกเกิลเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในขั้นนี้ถ้ามีน้ำตาลชนิดอื่นเจือปนอยู่ น้ำตาลเหล่านี้จะเปลี่ยนเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ด้วย

4. การทำไซลิทอลให้บริสุทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ได้จะต้องทำให้บริสุทธิ์ โดยนำมากรองแยกเอาโลหะนิกเกิลออก แล้วแยกไซลิทอลออกมาโดยวิธีโครมาโตกราฟฟี จากนั้นทำการตกผลึกไซลิทอลซึ่งจะได้ไซลิทอลที่มีความบริสุทธิ์ 99 เปอร์เซ็นต์

แม้ว่าการผลิตไซลิทอลโดยวิธีทางเคมีจะเป็นวิธีที่ใช้กันในทางอุตสาหกรรมทั่วไปแต่ต้นทุนการผลิตยังสูงอยู่ เนื่องจากขั้นตอนในการแยกและทำให้บริสุทธิ์ยังทำได้ยาก ทำให้ไซลิทอลมีราคาแพง และปริมาณไซลิทอลที่ได้ยังค่อนข้างต่ำ จึงทำให้มีการคิดค้นวิธีการผลิตด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพขึ้นมาเพื่อทดแทนการผลิตทางเคมี

การผลิตด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ

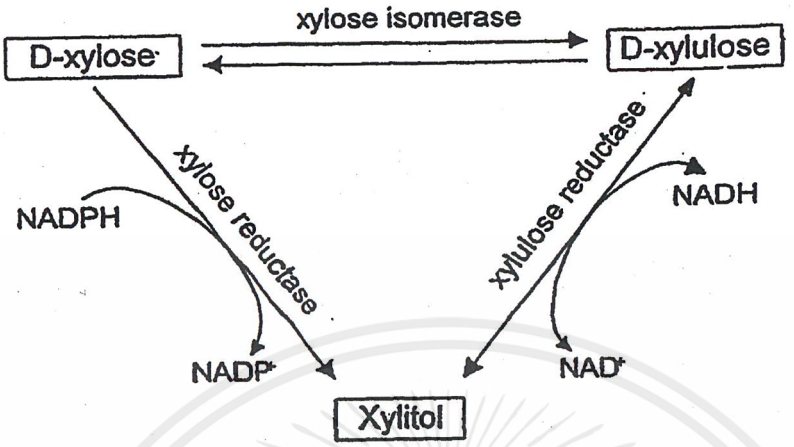
การผลิตไซลิทอลโดยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ เริ่มเป็นที่สนใจเนื่องจากมีแนวโน้มที่จะสามารถนำมาทดแทนวิธีการผลิตทางเคมีที่ต้นทุนสูงได้ การผลิตไซลิทอลด้วยวิธีนี้จะใช้เอนไซม์หรือจุลินทรีย์ในการผลิตไซลิทอล แต่กระบวนการผลิตโดยเอนไซม์นั้นค่อนข้างยุ่งยากและไม่เป็นที่นิยมเท่ากระบวนการผลิตโดยใช้จุลนทรีย์ มีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้หลายชนิด ตัวอย่างเช่น *Corynebacterium sp.*หรือ *Mycobacterium smegmatis* หรือรา เช่น *Petromyces albertensis* แต่จุลินทรีย์ที่นิยมที่สุดในการผลิตไซลิทอลด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ คือ ยีสต์ ซึ่งมีหลายชนิดที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ เช่น *C. tropicalis, C. guilliermondii, C.parasilopsis, C. boidinii* และ *Debaryomyces hansenii* เป็นต้น

กระบวนการเมแทบอลิซึมในการผลิตไซลิทอลโดยจุลินทรีย์

ไซโลสสามารถเปลี่ยนไอโซเมอร์เป็นไซลูโลสได้โดยเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอร์เรส (Xylose isomerase) หรือถูกรีดิวส์ไปเป็นไซลิทอลโดยเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส (Xylose reductase, XR) โดยมีโคเอนไซม์คือ NADPH หรือ NADH ซึ่งไซลิทอลที่ผลิตขึ้นสามารถเปลี่ยนรูปไปเป็นไซลูโลสโดยเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส (Xylitol dehydrogenes,XDH) ในขณะที่มี $NADP^+$ หรือ NAD^+ ที่ได้จากปฏิกิริยาตอนต้น (Horitsu และคณะ,1992 ; Nigam และ Singh,1995)

Hofer และคณะ(1979) รายงานในลักษณะที่ใกล้เคียงกันว่า ในจุลินทรีย์ไซลิทอลจะถูกสร้างขึ้นเป็นสารตัวกลางในกระบวนการเมแทบอลิซึมของไซโลสได้ 2 วิธี วิธีแรกเป็นการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอลโดยอาศัยเอนไซม์ XR และโคเอนไซม์ NADPH เปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอล ส่วนทางที่สองไซโลสจะถูกเปลี่ยนไอโซเมอร์ไปเป็นไซลูโลสก่อนโดยเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอร์เรส (Xylose isomerase) จากนั้นไซลูโลสจะถูกรีดิวส์ไปเป็นไซลิทอลโดยเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส (Xylose reductase, XR) และโคเอนไซม์ NADH ดังในรูปที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 วิถีการเกิดไซลิทอลจากเมแทบอลิซึมของไซโลส

ที่มา : Parajo และคณะ(1998)

แต่วิถีโดยทั่วไปเป็นวิถีในการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอล ก็คือวิถี Oxido-reduction ซึ่งมีการศึกษาวิถีนี้ในยีสต์หลายชนิด Furlan และคณะ(1994) รายงานว่ากระบวนการดังกล่าวเกิดขึ้นได้ต้องอาศัยโคเอนไซม์จากกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน

1. กระบวนการเมแทบอลิซึมของการผลิตไซลิทอลในยีสต์

ยีสต์จะใช้น้ำตาลไซโลส มาเปลี่ยนเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต เพื่อเข้าสู่วิถีอื่นต่อไป โดยเมื่อน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ยีสต์จะถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลสโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชัน (Oxido-reduction)ซึ่งการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไซโลสโดยวิธีนี้จะพบในจุลินทรีย์พวกยูคาริโอท (Eukaryotes) โดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง 2 ชนิด คือ เอนไซม์ไซโลสรีดักเทส (Xylose reductase, XR) ซึ่งมีโคเอนไซม์ NAD(P)H ร่วมในการทำปฏิกิริยา รีดิวส์ไซโลสเป็นไซลิทอล และเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส (Xylitol dehydrogenase, XDH) ซึ่งใช้ $NAD(P)^+$ เป็นโคเอนไซม์จะออกซิไดซ์ไซลิทอลที่เกิดขึ้นให้กลายเป็นไซลูโลส (Smiley และ Bolen,1982 ; Malezka และคณะ,1983) ส่วนในจุลินทรีย์พวกโปรคาริโอท (Prokaryotes) นั้นจะเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลูโลสโดยปฏิกิริยาไอโซเมอร์ไรเซชัน (isomerization) โดยมีเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอเรส (Xylose isomerase) เข้ามาเกี่ยวข้อง (Yoshitaka และคณะ,1973 ; Yoshitaka และคณะ,1976) สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ XR และ XDH ทั้งสองชนิดในยีสต์แต่ละสายพันธุ์จะแตกต่างกันไป ดังตารางที่ 2.4 ทำให้ยีสต์แต่ละสายพันธุ์ใช้ไซลิทอลแตกต่างกันไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

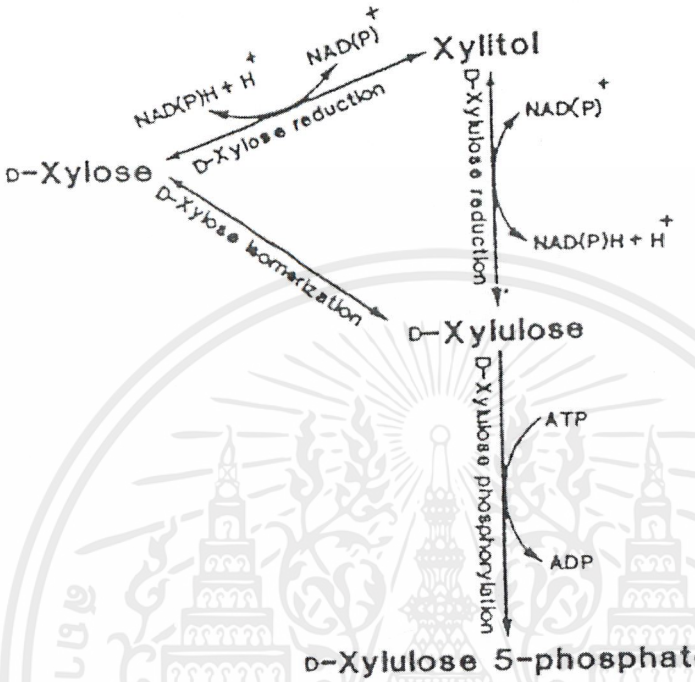
ตารางที่ 2.6 กิจกรรมของเอนไซม์ XR และ XDH ในยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้

Microorganism	XR activity [μmol (min mg)⁻¹]		NADH/NADPH ratio	XDH activity [μmol (min mg)⁻¹]		Reference
	NADH	NADPH		NAD⁺	NADP⁺	
P. tannophilus (NRRL Y-2460)	44	151	0·29	114	8	Maleszka *et al.* (1983)
C. utilis (CBS 621)*	0	75	0	280	0	Bruinenberg *et al.* (1984)
Pichia stipitis (CBS 5773)*	310	600	0·5	720	75	Bruinenberg *et al.* (1984)
P. tannophilus (CBS 4044)*	9	220	0·04	910	70	Bruinenberg *et al.* (1984)
C. tenuis (CBS 615)†	2	130	0·02	—	—	Bruinenberg *et al.* (1984)
C. tenuis (CBS 2885)†	0	100	0	—	–	Bruinenberg *et al.* (1984)
C. tenuis (CBS 4285)†	305	670	0·5	—	–	Bruinenberg *et al.* (1984)
C. shehatae (CBS 5813)†	210	480	0·4	—	–	Bruinenberg *et al.* (1984)
Pichia segobiensis (CBS 6857)†	365	640	0·6	—	–	Bruinenberg *et al.* (1984)
C. pelliculosa	—	1·73	—	–	—	Kitpreechavanich *et al.* (1984)
P. tannophilus (ATCC 326 91)	—	36‡	—	–	36	Gómez (1987)
C. shehatae (ATCC 22984)§	0·11	0·21	0·53	0·08	0·011	Girio *et al.* (1989)
P. stipitis (CBS 7126)¶	180–340	300–570	0·55–0·60	650–770	7–30	du Preez (1989)
C. shehatae (CBS 2779)¶	280–370	510–580	0·52–0·64	740–1270	25–30	du Preez (1989)
C. tenuis (CBS 2883)¶	120–200	220–350	0·54–0·57	80–310	7–17	du Preez (1989)
D. hansenii (DTIA 77)	0	60	0	—	–	Girio *et al.* (1990)
C. oleophila (DTIA 111)	0	40	0	—	–	Girio *et al.* (1990)
C. intermedia (DTIA 110)	0	140	0	—	–	Girio *et al.* (1990)
P. stipitis (DTIA 81)	720	3460	0·21	—	–	Girio *et al.* (1990)
C. boidinii (NRRL Y17213)	—	–	1·2–2·1	—	–	Vandeska *et al.* (1995)
P. tannophilus (DSM 70352)‖	0·03	0·23	0·13	0·060	0·135	Krusc & Schügerl (1996)
C. boidinii. Kloeckera sp. (no. 2201)	0·288	0·055	5·23	0·272	0·096	Vongsuvanlert & Tani (1989)
C. guilliermondii (NRC 5578)	0·08	0·62	0·129	—	–	Nolleau *et al.* (1993)
C. parapsilosis (ATCC 28474)	0·17	0·42	0·405	—	–	Nolleau *et al.* (1993)
C. guilliermondii (NRC 5578)	0·08	0·62	0·129	1·130	0·011	Nolleau *et al.* (1995)
C. parapsilosis (ATCC 28474)	0·17	0·42	0·405	0·400	0·02	Nolleau *et al.* (1995)
C. mogii (ATCC 18364)	0·06	0·16	0·375	0·22	—	Sirisansaneeyakul *et al.* (1995)
C. guilliermondii (FTI-20037, NRC5578)	—	79·1	—	128·0	—	Lee *et al.* (1996)
C. shehatae (ATCC 22984)	0·04–0·07	0·26–0·34	0·15–0·21	0·14–0·18	—	Palnitkar & Lachke (1992)

ที่มา : Parajo และคณะ (1998)

เมื่อยีสต์เปลี่ยนไซโลสให้เป็นไซลูโลสแล้ว ไซลูโลสจะถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต (Xylulose-5-phosphate) โดยปฏิกิริยาเฟสโฟรีเรชัน (Phosphorylation) ของเอนไซม์ไซลูโลสไคเนส (Xylose kinase) ดังรูปที่ 2.2 (Bernett,1976 ; Gong,1983)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



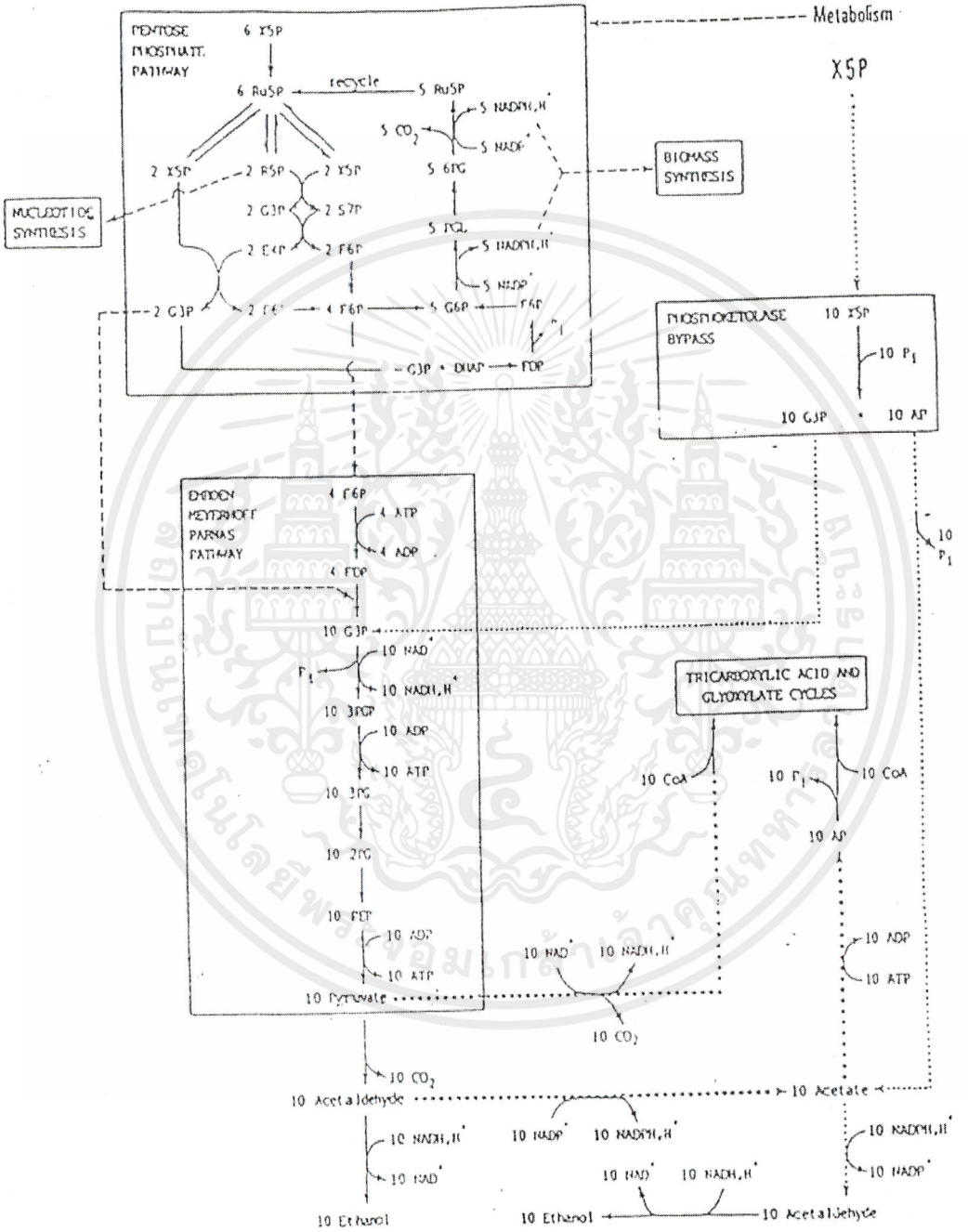
รูปที่ 2.2 เมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสเพื่อสร้างไซลูโลส-5-ฟอสเฟต

ที่มา : Vongsuvanlert และ Tani (1989)

เมื่อไซลูโลส-5-ฟอสเฟต เข้าสู่วิถีเพนโทสฟอสเฟต หรือ Phosphoketolase pathway อย่างใดอย่างหนึ่ง ถ้าเข้าสู่วิถีเพนโทสฟอสเฟต เซลลูโลส-5-ฟอสเฟต จะเปลี่ยนเป็นน้ำตาลฟอสเฟตต่างๆ Glyceraldehyde-3-phosphate (G3P) และ fructose-6-phosphate แล้วเข้าสู่วิถี Embden-Meyerhorf-Panas (EMP) เพื่อสร้างไพรูเวทเข้าสู่ TCA cycle เพื่อสร้างพลังงานและเซลล์ต่อไป อีกวิถีหนึ่งไซลูโลส-5-ฟอสเฟตจะถูกเปลี่ยนเป็น G3P และ acetyl phosphate โดยเอนไซม์ Xylulose-5-phosphate phosphoketolase G3P ที่ได้จะเข้าสู่ EMP ส่วน acetyl phosphate จะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิเตท ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงได้ 2 ทาง คือ เป็น acetyl CoA เข้าสู่ TCA cycle ต่อไป กับเปลี่ยนเป็นเอธานอล ดังรูปที่ 2.3 ส่วนไพรูเวทที่ได้จะถูกเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ เอธานอล และกรดอินทรีย์ต่างๆ เป็นต้น (Gong,1983 ; Jeffries,1983 ; Evan และ Ratledge,1984)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



รูปที่ 2.3 เมแทบอลิซึมของไซลูโลส-5-ฟอสเฟต ของยีสต์ *Pachysolen tannophilus*

ที่มา : Slininger และคณะ (1987)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

43962

การที่ยีสต์บางสายพันธุ์เมื่อใช้น้ำตาลไซโลสในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดสามารถสะสมไซลิทอลได้ในปริมาณมากนั้นเนื่องจากชนิดของโคเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาของเอนไซม์ XR และ XDH เป็นคนละกลุ่ม ซึ่งก็คือเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ XR คือ NADPH แต่โคเอนไซม์ในปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ XDH เป็น NAD^+ ดังนั้นในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดจะเกิดการสะสมของ NADHและ NADPH มากจึงเกิดการเร่งการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอลโดยอาศัยโคเอนไซม์ NADPH อย่างมาก แต่เนื่องจากเกิดการสะสมของ NADH ทำให้ขาดแคลน NAD^+ จึงทำให้การเปลี่ยนไซลิทอลที่ได้เป็นไซลูโลสจึงเกิดขึ้นน้อยและไม่สามารถนำเอา $NAPD^+$ ที่เกิดจากปฏิกิริยาที่เปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอลมาใช้ได้ จึงทำให้เกิดการสะสมของไซลิทอลขึ้น Horitsu และคณะ (1992) ได้ยืนยันข้อเท็จจริงนี้โดยทำการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ XR และ XDH ของยีสต์ *Candida tropicalis* IFO 0618 ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ พบว่ายีสต์นี้มีเอนไซม์ NADH-linked xylose reductase และ $NADP^+$-linked xylitol dehydrogenes ต่ำมากจนเกือบไม่มีเลย ดังนั้นการสร้าง NAD^+ จากเอนไซม์ NADH-linked xylose reductase จึงไม่เกิดขึ้น ทำให้เกิดสภาวะขาดแคลน NAD^+ ในการออกซิไดซ์เป็นไซลูโลส ดังนั้นในสภาวะที่มีออกซิเจนจำนวนจำกัดจึงเกิดการสะสมไซลิทอลขึ้น

สำหรับยีสต์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ xylose reductase ที่ต้องการทั้ง NADPH และ NADH เช่น ยีสต์ในกลุ่ม *Pachysolen sp.* และ *Pichia sp.* สามารถเจริญและสะสมไซลิทอลได้น้อย เนื่องจากไซลิทอลสามารถเปลี่ยนเป็นน้ำตาลไซลูโลสและเข้าสู่วิถีต่างๆ และผลิตเป็นเอธานอลได้ต่อไปในสภาพที่มีออกซิเจนจำกัด (Prior และคณะ,1989)

การศึกษาเมแทบอลิซึมของไซโลสโดยยีสต์เพื่อหาผลได้ทางทฤษฎีของการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอล ต้องพิจารณา 4 เงื่อนไขดังต่อไปนี้ (Barbosa และคณะ,1988)

1. ในกระบวนการเมแทบอลิซึมมีโคเอนไซม์ 2 ชนิดเข้าไปเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอล โดยเอนไซม์ xylose reductase มี NADPH เป็นโคเอนไซม์ และการออกซิไดส์ไซลิทอลเป็นไซลูโลสโดยเอนไซม์ xylitol dehydrogenes อาศัย NAD^+ เป็นโคเอนไซม์
2. โคเอนไซม์ NADPH ที่ใช้ในการรีดิวซ์ไซโลสทั้งหมดเป็นไซลิทอลถูกสังเคราะห์ขึ้นในวิถีเพนโทสฟอสเฟต และโคเอนไซม์ NAD^+ ที่ใช้ในกระบวนการออกซิไดส์ไซลิทอลเป็นไซลูโลสได้จากกระบวนการหายใจ
3. ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของยีสต์ไม่สามารถเปลี่ยน NADH เป็น NADPH ได้
4. ภายใต้สภาวะที่มีการจำกัดออกซิเจนหรือมีการเจริญเติบโตน้อย ไซลิทอลจะถูกออกซิไดส์เพื่อสร้าง NADPH เท่านั้น ส่วนไซลิทอลที่เหลือจะสะสมมากขึ้นและปล่อยออกมาภายนอกเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตไซลิทอลในยีสต์โดยใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ในสภาวะที่มีการจำกัดออกซิเจนหรือไม่มีการเจริญเติบโต ไซลิทอลส่วนใหญ่จะถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ โดยมีบางส่วนถูกออกซิไดส์ไปเพื่อสังเคราะห์ NADPH เมื่อทำสมดุลคาร์บอนและโคเอนไซม์ดังสมการที่ 1-9 แล้ว จะได้ผลทางทฤษฎีของไซลิทอลต่อโมลของไซโลสที่ถูกใช้ (Barbosa และคณะ,1988)

$$6\ \text{xylose} + 6\ \text{NADPH} + \text{H}^+ \longrightarrow 6\ \text{xylitol} + 6\ \text{NADP}^+ \quad (1)$$

$$6\ \text{xylitol} + 6\ \text{NAD+} \longrightarrow 6\ \text{xylulose} + 6\ \text{NADH} + \text{H}^+ \quad (2)$$

$$6\ \text{NADH} + \text{H}^+ + 3\text{O}_2 + 18\ \text{ADP} + 18\ \text{Pi} \longrightarrow 6\ \text{NAD}^+ + 18\ \text{ATP} + 24\ \text{H}_2\text{O} \quad (3)$$

$$6\ \text{xylulose} + 6\ \text{ATP} \longrightarrow 6\ \text{xylulose-5-phosphate} + 6\ \text{ADP} \quad (4)$$

$$6\ \text{xylulose-5-phosphate} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 5\ \text{glucose-6-phosphate} + \text{Pi} \quad (5)$$

$$5\ \text{glucose-6-phosphate} + 60\ \text{NADP}^+ + 35\ \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 60\ \text{NADPH} + \text{H}^+ + 30\ \text{CO}_2 + 5\ \text{Pi} \quad (6)$$

จากสมการที่ 1-6

$$6\ \text{xylose} + 54\ \text{NADP}^+ + 12\ \text{ADP} + 12\ \text{Pi} + 12\ \text{H}_2\text{O} + 3\ \text{O}_2 \longrightarrow 54\ \text{NADPH} + \text{H}^+ + 12\ \text{ATP} + 30\text{CO}_2 \quad (7)$$

$$54\ \text{NADPH} + \text{H}^+ + 54\ \text{xylose} \longrightarrow 54\ \text{xylitol} + 54\ \text{NADP}^+ \quad (8)$$

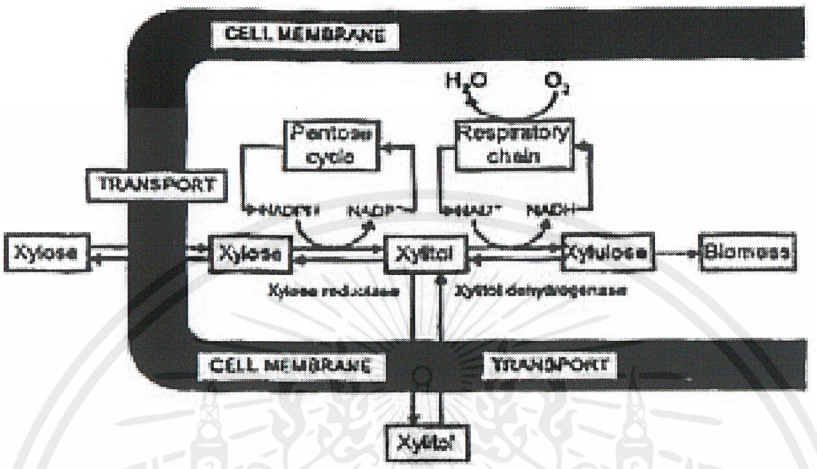
จากสมการที่ 7 และ 8

$$60\ \text{xylose} + 12\ \text{ADP} + 12\ \text{Pi} + 12\ \text{H}_2\text{O} + 3\text{O}_2 \longrightarrow 54\ \text{xylitol} + 12\ \text{ATP} + 30\ \text{CO}_2 \quad (9)$$

ผลได้ของไซลิทอล = 54/60 = 0.905 โมลของไซลิทอลต่อโมลของไซโลส

Sirisansaneeyakul และคณะ(1992) อธิบายถึงการใช้น้ำตาลไซโลสของยีสต์ผ่านวิถีเพนโทสฟอสเฟต ซึ่งน้ำตาลไซโลสจะเข้าสู่ภายในเซลล์และถูกเปลี่ยนเป็นไซลิทอลด้วยการทำงานของเอนไซม์ xylose reductase ที่มี NADPH เป็นโคเอนไซม์ จากนั้นไซลิทอลจะถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลสด้วยการทำงานของเอนไซม์ xylitol dehydrogenes ที่อาศัย NAD^+ เป็นโคเอนไซม์ จากนั้นไซลูโลสที่ได้จะถูกเติมฟอสเฟตก่อนเข้าสู่วิถีเพนโทสฟอสเฟต เพื่อที่จะนำไปสร้างเป็นมวลชีวภาพของเซลล์หรือพลังงานต่อไป ดังรูปที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 เมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์

ที่มา : Sirisansaneeyakul และคณะ(1992)

2. กระบวนการเมแทบอลิซึมในการผลิตไซลิทอลโดยแบคทีเรีย

แบคทีเรียส่วนมากสามารถสร้างเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอเรส (xylose isomerase) ได้ ดังนั้นจึงสามารถเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลูโลสได้ จากนั้นไซลูโลสก็จะถูกเติมฟอสเฟตกลายเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต และเข้าสู่วิถีเพนโทสฟอสเฟต หรืออีกทางหนึ่งไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่ได้อาจจะถูกเอนไซม์ xylulose-5-phosphate phosphoketolase เปลี่ยนเป็น G3P และ acetyl phosphate โดยเอนไซม์ xylulose-5-phosphate phosphoketolase ขั้นนี้เป็นการสร้างสารตัวกลางใน EMP โดยไม่มีการสร้าง NADPH เหมือนกับเมแทบอลิซึมของกลูโคสในยีสต์ (Evan และ Retledge,1984) แต่แบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถผลิตเอนไซม์ในกลุ่ม Oxido-reduction แทน xylose isomerase ได้ทำให้สามารถรีดิวส์ไซโลสเป็นไซลิทอลได้ และออกซิไดซ์ไซลิทอลไปเป็นไซลูโลสได้อีกด้วยในบางสายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. กระบวนการเมแทบอลิซึมในการผลิตไซลิทอลโดยรา

ราสามารถใช้ไซโลสได้โดยผ่านวิถีออกซิโด-รีดักชัน (Oxido-reduction Pathway) ให้กลายเป็นไซลูโลส (Suomalainen และคณะ,1989 ;Ojamo,1994) ในช่วงแรก Chiang และ Knight (1961) พบปริมาณไซลิทอลเล็กน้อย เมื่อทำการเพาะเลี้ยงราที่มีเส้นใยในอาหารที่มีไซโลสเป็นองค์ประกอบ Ueng และ Gong (1982) ก็รายงานผลที่คล้ายคลึงกันเมื่อทำการหมักไฮโดรไลเสทที่มีเฮมิเซลลูโลสจากชานอ้อยเป็นองค์ประกอบ ด้วย *Mucor sp.*

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไซลิทอลด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยี

1. อัตราการให้อากาศ

การให้อากาศกระตุ้นการขนส่งน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ในยีสต์บางชนิด รวมถึงเชื้ออีกหลายชนิด เช่น *Candida , Hensenula , Kluyveromyces* และ *Pichia* ซึ่งต้องการออกซิเจนเพื่อใช้ในการดูดซึมน้ำตาล การให้อากาศกับอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงการหมักจะทำให้ช่วยเพิ่มการเปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลิทอล เพราะการผลิตไซลิทอลเป็นผลผลิตที่เกิดควบคู่กับการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีความหนาแน่น ซึ่งมีอิทธิพลต่อการเผาผลาญโดยออกซิเจน จุลินทรีย์บางชนิดสามารถผลิตไซลิทอลภายใต้สภาวะที่มีอากาศเล็กน้อย (microaerophilic) (Nigam และ Sinch,1995)

Meyril และคณะ(1991) ทำการศึกษาความสามารถในการผลิตของเชื้อ *Candida guilliermondii* ซึ่งใช้ไซโลส และ non-hemicellulose ซึ่งทำการย่อยให้ได้น้ำตาลในสภาวะ Microaerophillic ได้ผลผลิตไซลิทอล 0.63 กรัมต่อกรัมได้เอทานอลปริมาณเล็กน้อยจากไซโลส ส่วนน้ำตาลที่ไม่ใช่ไซโลสจะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลและเซลล์จุลินทรีย์ การผลิตไซลิทอลโดย *Debaromyces hanseni* ต้องการสภาวะ Semi-aerobic โดยเริ่มจากสภาวะที่มีอากาศ เพื่อเพิ่มการสะสม Reduced-adenine-dinucleotide-coenzyme ให้มีความสมบูรณ์พร้อมจะให้เกิดปฏิกิริยารีออกซิไดส์ ซึ่งจะนำไปสู่การเปลี่ยนไซลิทอลเป็นไซลูโลส

Horitsu และคณะ(1992) รายงานถึงผลกระทบที่มีต่อไซลิทอลในตอนแรกควรพิจารณาถึงความเร็วในการเพิ่มปริมาณเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ อย่างไรก็ตามไซลิทอล ใต้สภาวะ Anoxic และเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหาร ในช่วงระหว่างการหมักจะนำไปสู่การผลิตไซลูโลส โดยการไฮโดรจีเน ชันของไซลิทอลที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อดังการเพิ่มระดับการละลายออกซิเจนที่มีความต้องการเฉพาะขั้นตอนเริ่มต้นในการหมักเท่านั้น แต่หลังจากนั้นควรลดละดับการให้อากาศในจุลินทรีย์ *Candida tropicalis* เพิ่มการสะสมไซลิทอล ภายใต้ออกซิเจนในปริมาณที่จำกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sirisansaneeyakul และคณะ(1992) ได้รายงานว่าสภาวะขาดออกซิเจนการสังเคราะห์โคเอนไซม์ NADH ด้วยกระบวนการหายใจนั้นไม่เพียงพอทำให้การทำงานของเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสที่จะเปลี่ยนไซลิทอลต่อไปเป็นน้ำตาลไซลูโลสในวิถีเพนโตสฟอสเฟตหรือเรียกว่า Hexose monophophate นั้นเอง จึงเกิดการสะสมไซลิทอล มากขึ้น จะส่งผ่านออกนอกเซลล์เป็นผล ทำให้ได้ผลผลิตไซลิทอล เพิ่ม

Furlan และคณะ (1991) และ Kim และคณะ (1997) ทำการศึกษาปัจจัยของอากาศใน *Candida parasilosis* ซึ่งพบว่าการให้อากาศมากเกินไปจะส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ไซลิทอล ที่ผลิตขึ้นจะเปลี่ยน NADH และไซลูโลสและไซลิทอลลดลง

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

2. แหล่งไนโตรเจนในการผลิตไซลิทอล

Barbosa และคณะ (1988) กล่าวถึงความสำคัญของแหล่งไนโตรเจนและการให้อากาศว่ามีผลกับการผลิตไซลิทอลจากไซลูโลสโดยยีสต์บางสายพันธุ์ ใน *Saccharamyces cerevisiae* วิธีเพนโตสฟอสเฟตควบคุมโดยไนโตรเจนและเกลือแอมโมเนียมซึ่งพบว่าสามารถกระตุ้นการเกิดออกซิเดทีฟในวิธีเพนโตสฟอสเฟต เพราะเอนไซม์ D-glucose-6-phosphate dehydrogenase จะถูกยับยั้งโดย NADH ใน *Pichia tannophilus* เกลือแอมโมเนียมจะลดละดับ NADH ของเอนไซม์ D-glucose-6-phosphate dehydrogenase ภายในเซลล์และเพิ่มกิจกรรมของการออกซิเดทีฟในวิธีเพนโตสฟอสเฟต

Candida shehatae พบว่าสามารถผลิตไซลิทอลในปริมาณมากขึ้นอยู่กับแหล่งไนโตรเจน เพราะเป็นการเพิ่มระดับของเอนไซม์ Xylitol dehydrogenase (Dahiya,(1991) ได้ซึ่งผลกระทบในการผลิตไซลิทอลจากแหล่งไนโตรเจนที่อนินทรีย์ 8 ชนิด และ สารอินทรีย์ 4 ชนิด พบว่าปริมาณไซลิทอลสูงสุดที่ได้คือ 16.7 กรัมต่อลิตร และ 30.6 กรัมต่อลิตร โดยใช้แอมโมเนียมอะซีเตตและยีสต์สกัด ตามลำดับ

Horitsu และคณะ (1992) ใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 3 10 และ 20 กรัมต่อลิตร พบได้ว่าได้รับการเกิดผลิตผลสูงสุด 1.78 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้ยีสต์ 20 กรัมต่อลิตรด้วยอัตราการไหล 400 มิลลิลิตรต่อนาทีให้อากาศที่มีออกซิเจน 90% และไซโลส 100 ต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Orishi และคณะ (1980) พบว่าการผลิตโพลิออล *Pichia* เป็นผลมาจากอัตราส่วนของคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ปริมาณโพลิออลจะได้มากกว่าเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นต่ำ

Sirisansaneeyakul และคณะ (1992) ได้รายงานว่าเชื้อ *Candida mogii* ที่เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด (ความเร็วรอบในการเขย่า 100 รอบต่อนาที) โดยให้มีความแตกต่างของความเข้มข้นของไซโลส 5-35 กรัมต่อลิตรพบว่า อัตราการผลิตไซลิทอลจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเริ่มต้น

Horitsu และคณะ (1992) ได้เพิ่มความเข้มข้นของไซโลสในการเลี้ยงเชื้อ *Candida tropicalis* เป็น 100-500 กรัมต่อลิตรและมีอัตราการให้อากาศสูง 400 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้อากาศที่มีออกซิเจน 90% พบว่าอัตราการผลิตไซลิทอลเพิ่มขึ้นเป็น 2.44 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงจากเดิม 1.78 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ความเข้มข้นของไซโลสกับการให้อากาศมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของเซลล์จะสูงและการผลิตไซลิทอลจะสูงตามไปด้วย

Meyrial และคณะ (1991) ศึกษาความต่อซับสเตรต ของ *Canida guilliermondii* ที่ความเข้มข้นของไซโลสเริ่มต้นจาก 100-300 กรัมต่อลิตรการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลนำไปสู่การเพิ่มผลผลิตไซลิทอล และปริมาณไซลิทอลที่เพิ่มขึ้นจากไซโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณสูงสุดที่ได้เมื่อใช้ไซโลส 300 กรัมต่อลิตร ได้ผลผลิต 0.75 กรัมต่อกรัม ไซโลสซึ่งคิดเป็น 82.6%ของปริมาณทั้งหมดในทางทฤษฎี ความเข้มข้นของไซลิทอลต่ำเนื่องจากถูกใช้ไปในการเพิ่มมวลเซลล์เป็นหลัก อัตราการผลิตไซลิทอลเมื่อไซโลสเป็น 2.4 เท่าจะสูงกว่าปริมาณที่ได้จากไซโลส 10 กรัมต่อลิตร ในทางตรงกันข้ามกับการผลิตไซลิทอลการเจริญของจุลินทรีย์ทีละน้อยจะถูกยับยั้งโดยความเข้มข้นของไซโลสอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.11 ต่อชั่วโมงได้จากความเข้มข้นของไซโลส 20 และ 50 กรัมต่อลิตร

3. การเติมน้ำตาลชนิดอื่นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Haiao และคณะ (1982) รายงานว่ากลูโคสจะยับยังการใช้ไซโลสใน *Candida* และ *Shizosaccharo myces* กลูโคสจะยับยังการเผาผลาญไซโลสในระยะเวลาอันรวดเร็วและเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสลดต่ำลง ความสามารถในการเปลี่ยนไซโลสจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ในช่วงสั้นๆนี้จะทำให้การดูดซึมไซโลสกลับคืนมาอย่างรวดเร็ว โดยแสดงออกโดยลักษณะ Catabolic repression ไม่ใช่การควบคุมที่กลไกลการสังเคราะห์ของยีน หลักฐานที่สนับสนุนความคิดนี้ ค่อนข้างจะเป็นการอธิบายถึงการนำไซโลสส่วนใหญ่ว่าไม่ Active หรือเกิดการยับยั้งในขณะที่มีกลูโคสในช่วงที่มีการแทนที่น้ำตาลอื่นจะมีการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์เมื่อมีกลูโคสหรือตัวเร่งปฏิกิริยา(Catabolite) นรินทร์ (2541) พบว่า การเติมกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลการเจริญเติบโตของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Candida mogii ATCC 18364 และการเกิดไซลิทอลในสภาวะที่จำกัดออกซิเจนโดยการเติมกลูโคสลงไปในปริมาณน้อยมากเพื่อไม่ให้เกิดการยับยั้งไซโลส (Catabolic repression)ในกรณีนี้กลูโคสจะช่วยเพิ่มปริมาณ NADPH ในเมทาบอลิซึมของยีสต์และการเจริญเติบโตแทนการใช้ไซโลสจึงทำให้กลูโคสเปลี่ยนไปเป็นไซลิทอลมากขึ้นส่งผลที่ได้ของไซลิทอลสูงขึ้นด้วยโดยปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมที่ให้ผลผลิตไซลิทอลสูงถึง 2.3 กรัมต่อการทดลอง (ทำการทดลองในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร ปริมาณที่ใช้หมักเท่ากับ 1.5 ลิตร) ทำให้ได้ไซลิทอล 0.854 กรัม ไซลิทอลต่อกรัมไซโลส อัตราการผลิตเท่ากับ 0.255 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ค่าผลได้เพิ่มขึ้น 1.24 เท่า และอัตราการผลิตเพิ่มขึ้น 1.36 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเชื้อเดียวกันซึ่งไม่มีการเติมกลูโคส

4. การเติมเมทานอล (Methanol)

การเติมเมทานอลสามารถเพิ่มการผลิตไซลิทอลได้ 39.8 กรัมต่อลิตร ไซลิทอลที่เพิ่มขึ้นคิดเป็น 8.5 % เมื่อใช้อาหารไซโลสที่มีการเติมด้วยเมทานอล 1 % (ปริมาตรต่อปริมาตร) ซึ่งทำให้เกิดออกซิเดชันของเมทานอลส่งผลให้ผลผลิตเป็น NADH ทำให้มีปริมาณมากขึ้นพอที่จะรีดักชันของไซโลสและไซลูโลสทำให้เกิดไซลิทอล ในกรณีที่เป็นการผลิต ซอร์บิทอล และ ไอดิทอล โดยยีสต์สามารถใช้เมทานอล เช่น *Candida boidinii* และการเติมเมทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้สามารถผลิตไซลิทอลมากขึ้น

5. ปริมาณไบโอติน (Biotin)

Lee และคณะ (1987) รายงานว่าปริมาณเอทานอลและไซลิทอลจะสะสมในน้ำหมักในการเลี้ยงแบบครั้งคราวของเชื้อ *Pachysolen tannophilus* และ *Candida guilliermondii* ซึ่งจะขึ้นอยู่กับปริมาณของไบโอติน โดยในอาหารที่มีไบโอตินสูง *Pachysolen tannophilus* จะสะสมเอทานอลมากกว่าไซลิทอล ในขณะที่ *Candida guilliermondii* จะสะสมไซลิทอลได้มากกว่าเอทานอล

6. ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และอุณหภูมิ

Gong และคณะ (1981) รายงานว่าปริมาณไซโลสที่เปลี่ยนเป็นไซลิทอลมากที่สุด จะเกิด pH 8.0 และเกิดปฏิกิริยารีดักชันของไซลิทอลจะเกิดขึ้นเมื่อ pH เปลี่ยนจากเบสเป็นกรด ปริมาณไซลิทอลสูงสดจะเกิดขึ้นในช่วงแรกที่มี pH 6.0-7.0 โดย *Pachysolen tannophilus* pH 6.0 โดย *Candida guilliermondii* และที่ pH 4.0 โดย *Candida tropicalis*

วรสิทธิ์ (2541) ทำการศึกษาผล pH ต่อการเจริญเติบโตของไซลิทอลของเชื้อ *Candida mogii* ATCC 18364 พบว่า pH ที่เหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของไซลิทอลแตกต่างกัน โดยทำการเลี้ยง 2 ระยะ ระยะแรกเปลี่ยนการเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ จะทำให้การเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีการให้อากาศเพียงพอ pH ที่เหมาะสมในระยะนี้คือ 4.5 ทำให้ได้อัตราการเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำเพาะเท่ากับ 0.046 ต่อชั่วโมง ระยะที่ 2 เป็นระยะการจำกัดปริมาณอากาศ พบว่า pH ที่เหมาะสมในระยะนี้เท่ากับ 6.0 ทำให้ได้ผลผลิตไซลิทอลได้ 0.71 กรัมต่อไซลูโลส คิดเป็น 77.96 %ของผลได้ตามทฤษฎี

การผลิตไซลิทอลโดยใช้เซลล์ตรึง

การผลิตไซลิทอลโดยใช้เซลล์ตรึงเป็นอีกวิธีหนึ่งในการเพิ่มผลผลิตไซลิทอล ซึ่งเป็นการเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ในการหมัก นอกจากนี้ยังทำให้เซลล์มีเสถียรภาพทางพันธุ์กรรม และสามารถนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่ได้

Dominguez (1998) ทำการศึกษากระบวนการผลิตไซลิทอลโดยยีสต์ *D.hensenii* NRRLY7426 ในระดับฟาสก์เขย่า ได้ความเข้มข้นของไซลิทอลเท่ากับ 106.7 และ 37.6 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กับเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงตามลำดับ สำหรับการเพาะเลี้ยงครั้งที่ 1 การนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่เป็นครั้งที่ 2 ความเข้มข้นของไซลิทอลและอัตราการผลิตไซลิทอลเมื่อใช้กับเซลล์อิสระมีค่าลดลง (45.6 กรัมต่อลิตร และ 0.38 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงตามลำดับ) ส่วนระบบเซลล์ตรึงจะทำให้อัตราการผลิตไซลิทอลสูงขึ้นเป็น 2.08 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง เป็นการบ่งชี้ให้เห็นว่าการใช้เซลล์ตรึงสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ไม่ทำให้กิจกรรมของเซลล์ลดลง ซึ่งเป็นการแก้ปัญหาการสูญเสียกิจกรรมของเซลล์ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องทำการหมักเป็นระยะเวลานาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่3
อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

ใช้เชื้อ *Candida guilliermodii* TISTR 5206 จากสภาวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.2 อุปกรณ์และวิธีการ

3.2.1อุปกรณ์

1) ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร
2) บิกเกอร์ขนาด 50,100,500 และ1000 มิลลิลิตร
3) ปิเปตขนาด 1,5 และ 10 มิลิลิตร
4) ไมรโครปิเปตขนาด 1-5 มิลลิลิตร และ 100-200 ไมรโครลิตร
5) แท่งแก้วคน,ช้อนตักสาร
6) หลอดทดลองพร้อมแลค
7) เครื่อง incubater shaker
8) กระบอกตวง 100 และ 1000 มิลลิลิตร
9) ตู้ hot air over
10) ตู้ laminar air flow
11) เครื่อง spectrophotometer
12) คิวเวตแก้ว
13) ตะเกียง,ลูป
14) เครื่อง centrifuge พร้อมหลอด centrifuge
15) เครื่อง autoclave

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2สารเคมี

1) กลูโคส (Glucose)
2) ไซโลส (Xylose)
3) เปปโตน (Paptone)
4) สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)
5) แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 2H_2O$)

3.3 วิธีการ

3.3.1การเตรียมกล้าเชื้อ

1) เขี่ยเชื้อ *Candida guilliermodii* TISTR 5206 ลงใน slant (YM agar) แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2) เขี่ยเชื้อจาก slant ประมาณ 1-2 ลูป ลงในฟลาสก์ที่บรรจุอาหารเหลว (YM medium) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อทำเป็น starter
3) นำไปบ่มเขย่าในเครื่อง incubater shaker ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 rpm เป็นเวลาประมาณ 4-5 ชั่วโมง
4) นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร โดนใช้เครื่อง spectrophotometer ให้ได้ค่า 0.5

<u>การทดลองความสามารถในการผลิตไซลิทอล ของเชื้อ *Candida guilliermodii* TISTR 5206</u>

วิเคราะห์ปริมาณไซลิทอล ในสารละลายตามวิธีของ Adler และ Gustafssonn (1980) โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของไซลิทอลไปเป็นฟอร์มัลดีไฮด์ด้วย เปอร์ไอโอเดตในสารละลายกรดในระยะเวลาสั้นๆ แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย butane-2,3-diol แล้ววิเคราะห์ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์เกิดขึ้นโดยทำปฏิกิริยากับสารละลาย pentane-2,4-dione ได้สารละลายสีเหลือง

<u>วิธีการ</u>

1) ปีเปตสารละลายความเข้มข้นไซลิทอล 10-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรหรือสารละลายไซลิทอล มาตรฐาน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง
2) เติม periodate reagent ลงไป 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
3) นำไปบ่มไว่ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
4) เติม bitane-2,3-diol 0.002 M ลงไป 0.1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
5) เติม pentane-2, 4-dione solution ลงไป 2.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
6) นำไปบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7) ทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร
8) นำค่าการดูดกลืนแสงไป เปรียบเทียบกราฟมาตรฐานในภาพผนวก ก เพื่อหาความเข้มข้นของไซลิทอลในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

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

3.3.2ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์

3.3.2.1 หาปริมาณเชื้อที่เหมาะสม

1) ดูดปริมาณเชื้อจาก starter มาใส่ในอาหารเหลว 75 มิลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลิลิตร โดยดูดมา 5 6 7 8 9 และ 10 มิลลิลิตร ทำ 3 ซ้ำ
2) นำไปบ่มเขย่าในเครื่อง incubater shaker ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสความเร็วรอบ 250 rpm
3) ตรวจวัดตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง จนถึงชั่วโมงที่ 24 (เข้าช่วง stationary phase) โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer
4) นำค่าดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตราฐานน้ำหนักแห้ง
5) หาปริมาณเชื้อที่เหมาะสมที่สุดจากกราฟที่ได้

3.3.2.2หาส่วนประกอบของอาหารที่เหมาะสม

(1) การเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสม

1) เตรียมอาหารเหลว (YM medium) ในฟลาสก์ละ 75 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยการเปลี่ยนสูตรอาหารโดยใช้ปริมาณกลูโคสเป็น 5 10 15 20 และ25 กรัมต่อลิตร แล้วใส่เชื้อตามที่หาได้จากข้อ 3.3.2.1
2) นำไปบ่มเขย่าในเครื่อง incubater shaker ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 rpm
3) ตรวจวัดตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมงจนถึงชั่วโมงที่ 24 (เข้าช่วง stationary phase) โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer
4) นำค่าดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำหนักแห้ง
5) หาปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมที่สุดจากกราฟที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2) การเปรียบเทียบหาปริมาณสารสกัดยีสต์ที่เหมาะสม

1) เตรียมสารอาหารเหลว(YM medium) ในฟลาสก์ละ 75 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเปลี่ยนสูตรอาหารเปลี่ยนปริมาณสารสกัดยีสต์เป็น 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร แล้วเปลี่ยนปริมาณกลูโคสที่ได้จากข้อ 3.3.2.2 (1) และใส่เชื้อตามที่หาได้จากข้อ 3.3.2.1
2) นำไปบ่มเขย่าในเครื่อง incubater shaker ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 rpm
3) ตรวจวัดตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมงจนถึงชั่วโมงที่ 24 (เข้าช่วง stationary phase) โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer
4) นำค่าดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำหนักแห้ง
5) หาปริมาณสารสกัดยีสต์ที่เหมาะสมที่สุดจากกราฟที่ได้

(3) การเปรียบเทียบหาปริมาณ เปปโตนที่เหมาะสม

1) เตรียมสารอาหารเหลว(YM medium) ในฟลาสก์ละ 75 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเปลี่ยนสูตรอาหารเปลี่ยนปริมาณ เปปโตนเป็น 3 4 5 6 และ 7 กรัมต่อลิตร แล้วเปลี่ยนปริมาณกลูโคส(3.3.2.2 (1)) สารสกัดยีสต์(3.3.2.2 (2)) ตามที่ได้และใส่เชื้อไปตามที่เราหาได้จากข้อ 3.3.2.1
2) นำไปบ่มเขย่าในเครื่อง incubater shaker ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 rpm
3) ตรวจวัดตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมงจนถึงชั่วโมงที่ 24 (เข้าช่วง stationary phase) โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer
4) นำค่าดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำหนักแห้ง
5) หาปริมาณเปปโตนที่เหมาะสมที่สุดจากกราฟที่ได้

(4) การเปรียบเทียบหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสม

1) เตรียมสารอาหารเหลว(YM medium) ในฟลาสก์ละ 75 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเปลี่ยนสูตรอาหารเปลี่ยนปริมาณแอมโมเนียมเป็น 2,3,4,5 และ 6 กรัมต่อลิตร แล้วเปลี่ยนปริมาณกลูโคส สารสกัดยีสต์ เปปโตน ตามที่ได้จากข้อ 3.3.2.2(1) , (2) และ (3) และใส่เชื้อไปตามที่เราหาได้จากข้อ 3.3.2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) นำไปบ่มเขย่าในเครื่อง incubater shaker ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 rpm
3) ตรวจวัดตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมงจนถึงชั่วโมงที่ 24 (เข้าช่วง stationary phase) โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer
4) นำค่าดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำหนัก
5) หาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมที่สุดจากกราฟที่ได้

(5) การเปรียบเทียบหาความเร็วรอบที่เหมาะสม

1) เตรียมสารอาหารเหลว(YM medium) ในฟลาสก์ละ 75 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเปลี่ยนสูตรอาหารเปลี่ยนปริมาณกลูโคส สารสกัดยีสต์ เปปโตน แอมโมเนียมซัลเฟตตามที่ได้จากข้อ 3.3.2.2 (1) (2) (3) และ (4) ส่วนแคลเซียมคลอไรด์คงเดิม (0.1 กรัม) และใส่เชื้อไปตามที่เราหาได้จากข้อ 3.3.2.1
2) นำไปบ่มเขย่าในเครื่อง incubater shaker ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 250 280 300 320 rpm
3) ตรวจวัดตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมงจนถึงชั่วโมงที่ 24 (เข้าช่วง stationary phase) โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer
4) นำค่าดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำหนักแห้ง
5) หาความเร็วรอบที่เหมาะสมโดยดูจากการเจริญเติบโตของเชื้อ (น้ำหนักแห้ง)

(6) การเปรียบเทียบหาปริมาณไซโลสที่เหมาะสมในระดับฟลาสก์

1) เตรียมอาหารเหลว (YM medium) ในฟลาสก์ คำนวณให้ได้ตามสัดส่วนเว้นที่ให้เติมไซโลส โดยมีการเติมไซโลสเป็น 100 200 และ 300 กรัมต่อลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเปลี่ยนสูตรอาหาร เปลี่ยนเป็นสูตรอาหารใหม่ที่หาได้ในการทดลองในข้อ 3.3.2.2 และใส่เชื้อตามที่คำนวณได้ และใส่ไซโลสไป 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์
2) นำไปบ่มเขย่าในเครื่อง incubater shaker ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบตามที่ได้จากข้อ 3.3.2.2 (5) ตรวจวัดตัวอย่าง วัดความเป็นกรด-ด่างและเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง
3) เติมไซโลสจำนวนที่เหลือลงไปในชั่วโมงที่กูลโคส เหลือประมาณ 2-3 กรัมต่อลิตร และลดความเร็วรอบลงเพื่อให้สภาวะเหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอล ลดลงเหลือ 180 rpm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) ตรวจวัดตัวอย่างโดย วัดความเป็นกรด-ด่างและเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมงจนถึงโดยวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ 600 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer , pH meter ส่วนตัวอย่างที่เก็บนำไปเซนตริฟิวส์ที่ 10000 rpm เวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อนำไปหาน้ำตาลไซลิทอล
5) นำค่าดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำหนักแห้ง
6) หาปริมาณไซโลสที่เหมาะสมที่สุดจากกราฟที่ได้

3.3.3 การศึกษาการผลิตไซลิทอลในระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร

1) เตรียมอาหารเหลว (YM medium) ปริมาณ 1.5 ลิตร โดยใช้สูตรอาหารที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.3.2.2 (1) (2) (3) (4) (5) และ (6) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ส่วนไซโลสแยกฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที
2) นำอาหาร YM medium ที่เตรียมไว้ใส่ลงในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยวิธีปลอดเชื้อ เติมหัวเชื้อในปริมาณที่ได้จากข้อ 3.3.2.1 แล้วใส่ไซโลสลงไป 5 เปอร์เซ็นต์เพื่อชักนำให้เกิดการผลิตไซลิทอล
3) ทำการเพาะเลี้ยงแบบ batch ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเร็วรอบที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.2.2 (5) เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชั่วโมง
4) เติมไซโลสจำนวนที่เหลือลงไปในชั่วโมงที่กลูโคสเหลือประมาณ 2-3 กรัมต่อลิตร และลดความเร็วรอบลงเพื่อให้เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอล ลดลงเหลือ 180 rpm
5) ตรวจวัดตัวอย่างโดย วัดความเป็นกรด-ด่างและเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมงจนถึงโดยวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ 600 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer , pH meter ส่วนตัวอย่างที่เก็บนำไปเซนตริฟิวส์ที่ 10000 rpm เวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นเพื่อนำไปหาน้ำตาลไซลิทอลโดยวิธีของ Adler และ Gustafssonn (1980)

3.3.4 การวิเคราะห์ผล

<u>การวิเคราะห์ผลหาน้ำหนักแห้ง</u>

1) อบกระทงที่ทำจากกระดาษฟลอยด์ และทำให้เย็นในเย็นในเดซิเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนักกระทงทุกอัน
2) เลี้ยงเชื้อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.8-0.9 เจือจางใส่หลอดความเข้มข้นต่างกันคือที่ 1 2 3 4 และ 5 เท่า
3) ดูดสารละลายเชื้อใส่หลอดเซนติฟิวส์ หลอดละ 10 มิลลิลิตร ทำความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) นำไปปั่นในเครื่องเซนติฟิวส์ ที่ความเร็วรอบ 10000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
5) เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนเซลล์ยีสต์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งจากนั้นก็ใส่น้ำในขั้นตอนสุดท้าย 2-3 มิลลิลิตร
6) นำเข้าตู้อบความร้อน ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
7) เอาออกจากตู้อบแล้วใส่ในเดซิเคเตอร์ให้เย็นจากนั้นชั่งน้ำหนักเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง(กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักเซลล์แห้งและฟลอยด์} - \text{น้ำหนักฟลอยด์}}{10\times10^{-3}}$$

<u>การวิเคราะห์หากลูโคสที่ลดลง</u>

<u>การหาน้ำตาลที่ลดลงโดยวิธี Somogyi Nelson's</u>

1) เติมตัวอย่างที่ต้องการหาน้ำตาลรีดิวซ์ 1 มิลลิลิตร ลงในหลองทดลอง
2) เติม Copper reagent แล้วต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ควรใช้ลูกแก้ววางบนปากหลอดเพื่อลดการระเหยของน้ำ
3) ทำให้เย็นโดยการแช่อ่างน้ำ เติม Arsenomolydate reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที จะเห็นเป็นสีเขียว หรือน้ำเงิน ขึ้นกับปริมาณน้ำตาล
4) เติมน้ำ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร
5) นำค่า ที่ได้ไปเทียบกับมาตรฐานกลูโคสคำนวณได้จาก

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

<u>การวิเคราะห์หาปริมาณไซลิทอลโดยวิธีของ Adler และ Gustafsson (1980)</u>

1) ปิเปตสารละลายตัวอย่าง(ความเข้มข้นไซลิทอล 10-50 มิลลิกรัมต่อลิตร)หรือสารละลายไซลิทอลมาตรฐาน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
2) เติม periodate reagent ลงไป 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
3) เติม bltane-2, 3-diol 0.002 M ลงไป 1.0มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
4) เติม pentane-2,4-dione solution ลงไป 2.0 มิลลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
5) ทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้องแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลืน 410 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6) นำค่าการดูดกลืนแสงไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของไซลิทอลในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวนได้จาก

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

การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลไซโลส (วรสิทธิ์,2541)

วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลไซโลสในสารละลายตามวิธีของ Deschatelets และ Yu (1985) โดยอาศัยการเกิดเฟอฟูรัล (furfural) จากเพนโตส ในสารละลายกรดแอซิติกที่มี thioureaอยู่ แล้วเติม p-bromoaniline acetate เพื่อทำปฏิกิริยากับเฟอฟูรัลได้เป็นสารละลายสีชมพู

สารเคมี

1. p-bromoaniline reagent เตรียมโดยละลาย thiourea ประมาณ 4 กรัม ในกรดแอซิติกเข้มข้นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วแยกส่วนใสออกมา (กรดแอซิติกอิ่มตัวด้วย thiourea)จากนั้นละลาย p-bromoaniline 2 กรัม ลงในส่วนใสนั้น
2. สารละลายไซโลสมาตรฐาน เตรียมโดยละลายไซโลส 0.10 กรัม ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร) แล้วเจือจางให้ได้สารละลายไซโลสเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 กรัมต่อลิตร

วิธีการ

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง(ความเข้มข้นประมาณ 0.2-1.0 กรัมต่อลิตร)หรือสารละลายไซโลสมาตรฐาน ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง
2. เติม p-bromoaniline reagent 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
3. นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
4. ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว แล้วบ่มต่อในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 70 นาที
5. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร
6. นำค่าดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานในภาคผนวก เพื่อหาความเข้มข้นของไซโลสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นของไซโลส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร}) * (\text{อัตราการเจือจาง})}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

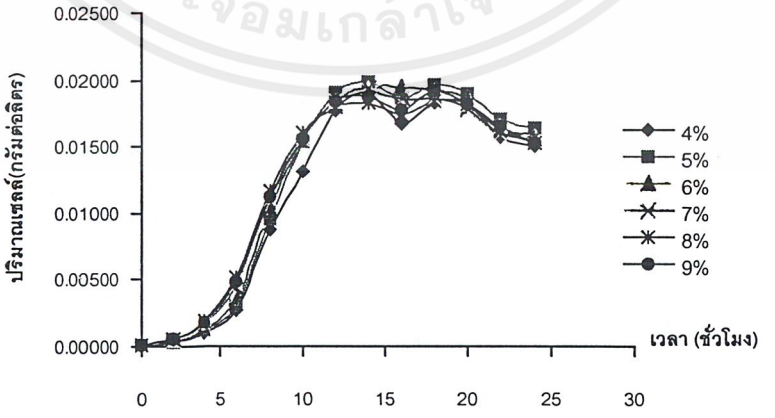
บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการผลิตไซลิทอล ด้วยกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อยีสต์ *Candida guilliermondii* TISTR 5206 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณกลูโคส สารสกัดยีสต์ แอมโมเนียมซัลเฟต เปปโตน และใช้ความเร็วรอบในระดับต่างๆ และคำนวณตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของเชื้อ และต่อการผลิตไซลิทอล โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 ให้ผลการทดลองดังนี้

4.1 ผลการศึกษาหาปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม

ผลการทดลองเพาะเลี้ยง *Candida guilliermondii* TISTR 5206 ในอาหารสูตร YM ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 4 5 6 7 8และ9 แสดงไว้ในรูปที่ 4.1 จากผลการทดลองเปรียบเทียบปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมโดยการวิเคราะห์แบบสุ่มตลอด(CRD) ด้วยโปรแกรม SPSS

จากการเปรียบเทียบผลการทดลองพบว่าปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นทั้ง 6 ระดับไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 4.1ข และเมื่อเปรียบเทียบค่าอัตราการเจริญจำเพาะพบว่าที่ร้อยละ 4 มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดดังตารางที่ 4.1ก จึงเลือกใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ร้อยละ 4 ในการทำการทดลองต่อไป



รูปที่4.1 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาณเชื้อเริ่มต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1ก แสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ที่ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นต่างๆ

ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ
ร้อยละ 4	0.5319
ร้อยละ 5	0.5205
ร้อยละ 6	0.4936
ร้อยละ 7	0.4769
ร้อยละ 8	0.4603
ร้อยละ 9	0.4632

ตารางที่ 4.1ข แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของการศึกษาหัวเชื้อเริ่มต้น

ANOVA

OD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.455	5	.291	.088	.994
Within Groups	754.267	228	3.308		
Total	755.722	233			

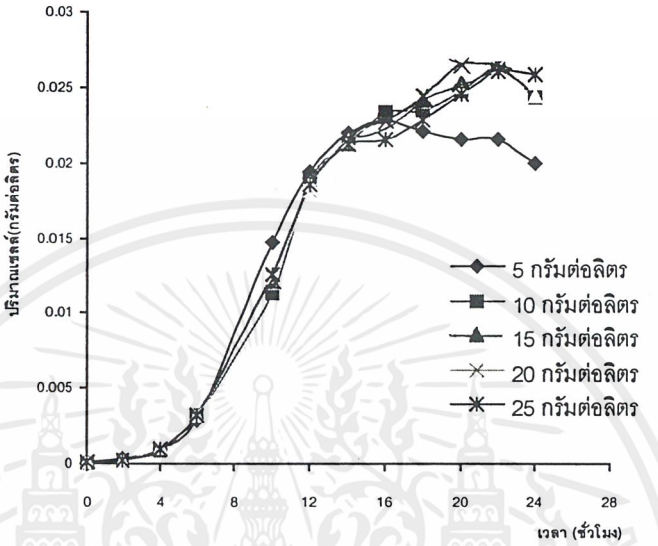
4.2 ผลการศึกษาหาปริมาณกลูโคสเริ่มต้น

ผลการทดลองโดยการเพาะเลี้ยง *Candida guilliermondii* TISTR 5206 ในอาหารสูตร YM มีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น ร้อยละ 4 ที่ได้จากการทดลองที่ 4.1 ซึ่งทำการทดลองโดยใช้ปริมาณกลูโคสที่ 5 10 15 20และ25 กรัมต่อลิตร แสดงดังรูปที่ 4.2 เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อมีกลูโคส เชื้อจึงใช้กลูโคสในการเจริญเติบโตและสร้างมวลชีวภาพ ซึ่งอัตราการเจริญเติบโตขึ้นอยู่กับปริมาณกลูโคสที่ลดลง ตามสมการของโมนอด (Monod equation) ที่อัตราการเจริญเติบโตขึ้นอยู่กับสารตั้งต้น (สาโรจน์,2536) แต่ถ้าหากมีปริมาณกลูโคสมากเกินไป จะส่งผลให้อัตราการผลิตไซลิทอลลดลง เนื่องจากปริมาณกลูโคสที่มีความเข้มข้นสูงจะยับยั้งการดูดซึมไซโลสเข้าสู่เซลล์ยีสต์ (Nolleau และคณะ, 1995)

จากการทดลองนำค่ามาวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมโดยวิเคราะห์แบบสุ่มตลอด (CRD) ด้วยโปรแกรม SPSS ซึ่งจากการเปรียบเทียบกลูโคสทั้ง 5 ระดับที่ใช้ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 4.2ข และเมื่อเปรียบเทียบค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะพบว่า ที่ปริมาณกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร มีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดดังตาราง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ 4.2ก ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ ผลการทดลองของ Yuuichi และคณะ (1996) และ D-K.Oh. และ S-Y.Kim (1998) จึงใช้ปริมาณกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ในการทดลองต่อไป



รูปที่4.2 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ต่อปริมาณกลูโคส

ตารางที่ 4.2ก แสดงค่าอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์ที่ปริมาณกลูโคสต่างๆ

ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ
5	0.5471
10	0.7096
15	0.6101
20	0.5626
25	0.5985

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2ข แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของการศึกษาปริมาณกลูโคส

ANOVA

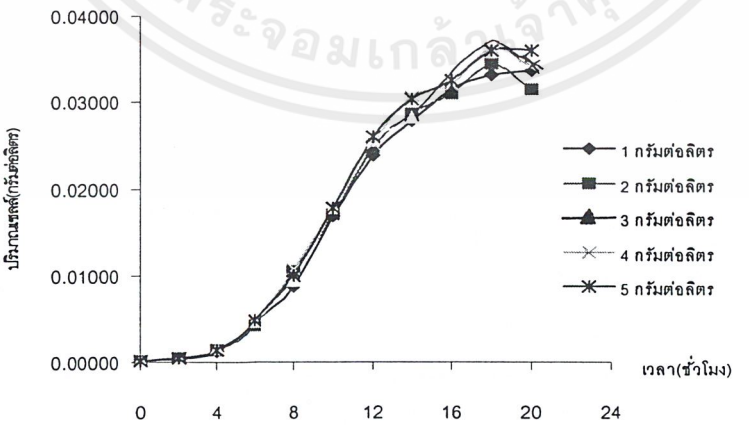
OD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.618	4	.405	.064	.992
Within Groups	1106.276	175	6.322		
Total	1107.895	179			

4.3 ผลการศึกษาปริมาณสารสกัดยีสต์ที่เหมาะสม

ผลการทดลองเพาะเลี้ยง *Candida guilliermondii* TISTR 5206 ในอาหารสูตร YM ที่มีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 4 และใช้ปริมาณกลูโคสเป็น 10 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองในข้อ 4.2 และทำการทดลองโดยใช้ปริมาณสารสกัดยีสต์ที่ 1 2 3 4และ5 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 4.3

จากผลการทดลองนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณสารสกัดยีสต์ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและเพิ่มมวลชีวภาพ โดยการวิเคราะห์แบบสุ่มตลอด(CRD) ด้วยโปรแกรม SPSS พบว่าปริมาณสารสกัดยีสต์ทั้ง 5 ระดับ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการเจริญเติบโตของเชื้อ ดังตารางที่ 4.3ข เพราะฉะนั้น จึงเลือกใช้ปริมาณสารสกัดยีสต์ที่ 1 กรัมต่อลิตร เนื่องจากมีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดดังตารางที่ 4.3ก ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Babosa และคณะ (1988) ที่ได้รายงานว่าสารสกัดยีสต์และกรดคาสอะมิโนมีผลเพียงเล็กน้อยต่อการผลิตไซลิทอลของเชื้อ *Candida guilliermondii* FTI 20037



รูปที่4.3 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาณสารสกัดยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3ก แสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ที่ปริมาณสารสกัดยีสต์ต่างๆ

ปริมาณสารสกัดยีสต์ (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ
1	0.7214
2	0.5878
3	0.6236
4	0.6127
5	0.607

ตารางที่ 4.3ข แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของการศึกษาปริมาณสารสกัดยีสต์

ANOVA

OD

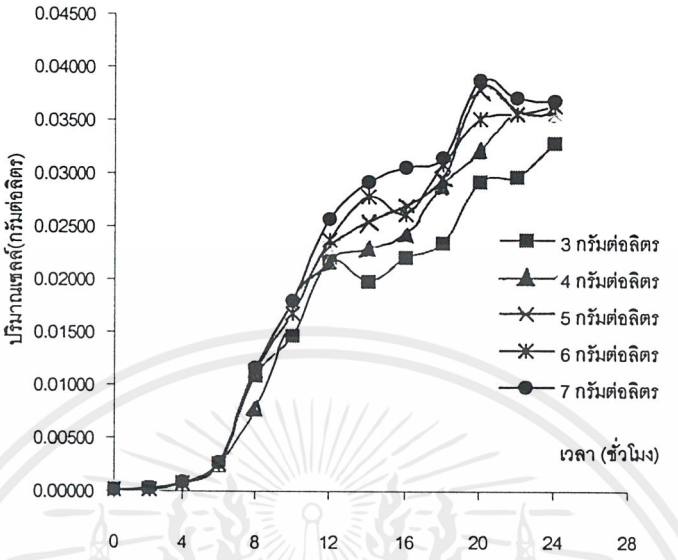
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.473	4	.618	.054	.995
Within Groups	1832.232	160	11.451		
Total	1834.705	164			

4.4 ผลการศึกษาปริมาณเปปโตนที่เหมาะสม

ผลการทดลองโดยการเพาะเลี้ยง *Candida guilliermondii* TISTR 5206 ในอาหารสูตร YM ที่มีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 4 ใช้ปริมาณกลูโคสเป็น 10 กรัมต่อลิตรจากผลการทดลองในข้อ 4.2และใช้ปริมาณสารสกัดยีสต์เป็น 1 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองในข้อ 4.3 และทำการทดลองใช้ปริมาณเปปโตนที่ 3 4 5 6และ 7 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 4.4

จากผลการทดลองนำค่ามาวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณเปปโตนที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและเพิ่มมวลชีวภาพ โดยการวิเคราะห์แบบสุ่มตลอด(CRD) ด้วยโปรแกรม SPSS พบว่าปริมาณเปปโตนทั้ง 5 ระดับไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการส่งเสริมการเจริญเติบโต ดังตารางที่ 4.4ข เพราะฉะนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณเปปโตนที่ 6 กรัม/ลิตร เนื่องจากมีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดดังตารางที่4.4 ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่4.4 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาณเปปโตน

ตารางที่ 4.4ก แสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ที่ปริมาณเปปโตนต่างๆ

ปริมาณเปปโตน (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ
3	0.5838
4	0.5797
5	0.5815
6	0.6298
7	0.6181

ตารางที่ 4.4ข แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของการศึกษาปริมาณเปปโตน

ANOVA

OD

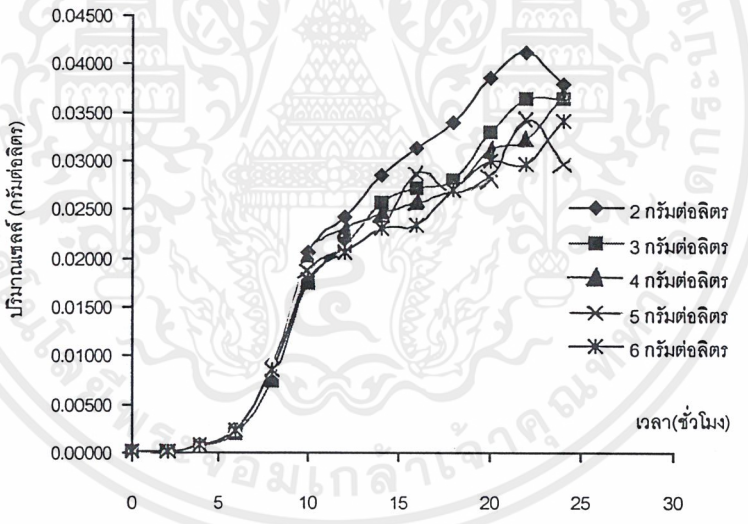
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	23.995	4	5.999	.544	.703
Within Groups	2093.435	190	11.018		
Total	2117.429	194			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลการศึกษาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสม

ผลการทดลองเพาะเลี้ยง *Candida guilliermondii* TISTR 5206 ในอาหารสูตร YM ที่มีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 4 และใช้ปริมาณกลูโคสเป็น 10 กรัมต่อลิตรที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 4.2 สารสกัดยีสต์ 1 กรัมต่อลิตรจากผลการทดลองในข้อ 4.3 เปปโตน 6 กรัมต่อลิตรจากผลการทดลองในข้อ 4.4 และทำการทดลองใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 2 3 4 5และ6 กรัมต่อลิตร ดังรูปที่ 4.5

จากผลการทดลองนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและเพิ่มชีวมวล โดยการวิเคราะห์แบบสุ่มตลอด(CRD) พบว่าปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตทั้ง 5 ระดับ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติดังตารางที่ 4.5ข เพราะฉะนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 4 กรัมต่อลิตร เนื่องจากมีค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด ดังตารางที่ 4.5ก



รูปที่4.5 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ต่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5ก แสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ที่ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตต่างๆ

ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ
2	0.5806
3	0.5538
4	0.6546
5	0.6357
6	0.5664

ตารางที่ 4.5ข แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของการศึกษาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต

ANOVA

OD

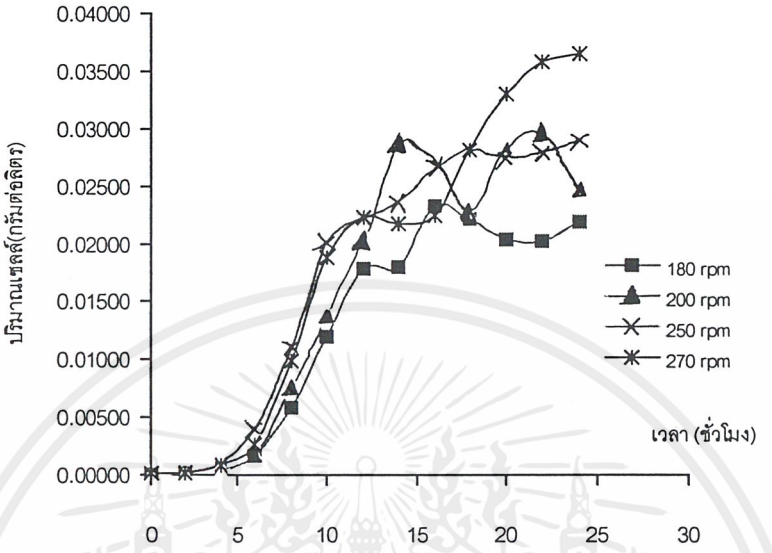
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	552485.5	4	138121.384	.940	.442
Within Groups	27920198	190	146948.411		
Total	28472684	194			

4.6 ผลการศึกษาความเร็วรอบในการเขย่าที่เหมาะสม

ผลการทดลองเพาะเลี้ยง *Candida guilliermondii* TISTR 5206 ในอาหารสูตร YM ที่มีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 4 และใช้ปริมาณกลูโคสเป็น 10 กรัมต่อลิตรที่ได้จากผลการทดลองในข้อ 4.2 สารสกัดยีสต์ 1 กรัมต่อลิตรจากผลการทดลองในข้อ 4.3 เปปโตน 6 กรัมต่อลิตรจากผลการทดลองในข้อ 4.4 แอมโมเนียมซัลเฟต 4 กรัมต่อลิตร จากผลกรทดลองในข้อที่ 4.5 และทำการทดลองโดยใช้ความเร็วรอบในการเขย่าที่ 180 200 250และ270 รอบต่อนาที ดังรูปที่ 4.6

จากผลการทดลองนำค่ามาวิเคราะห์เปรียบเทียบความเร็วรอบ พบว่าความเร็วรอบ แต่ละระดับไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 4.6ข จึงเลือกใช้ความเร็วรอบที่ 270 รอบต่อนาทีเพราะมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด ดังตารางที่ 4.6ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่4.6 กราฟแสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ต่อความเร็วรอบในการเขย่า

ตารางที่ 4.6ก แสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ที่ความเร็วรอบต่างๆ

ความเร็วรอบ(รอบต่อนาที)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ
180	0.6107
200	0.6082
250	0.6283
270	0.6802

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6ข แสดงการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของการศึกษาความเร็วรอบในการเขย่า

ANOVA

OD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	36.691	3	12.230	1.545	.205
Within Groups	1203.041	152	7.915		
Total	1239.732	155			

4.7 ผลการศึกษาการผลิตไซลิทอลโดยใช้ไซโลสในปริมาณต่างๆกันในระดับฟลาสก์

ผลการทดลองเพาะเลี้ยง *Candida guilliermondii* TISTR 5206 ในอาหารสูตร YM ที่มีปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลอง คือ ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 4 ปริมาณกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ 1 กรัมต่อลิตร เปปโตน 6 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 4 กรัมต่อลิตร และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 เพื่อให้มีการผลิตไซลิทอล จึงมีการใช้ไซโลสเพื่อเป็นสารตั้งต้น จึงได้ทำการทดลองใช้ปริมาณไซโลส 100 150และ200 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.7 เราจึงเลือกใช้ปริมาณไซโลส 150 กรัมต่อลิตรเพราะให้ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลสูงที่สุดคือ 6.119 กรัมต่อลิตรและมีอัตราการผลิตไซลิทอลสูงที่สุดคือ 0.381 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงในชั่วโมงที่ 24

ตารางที่4.7 แสดงค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ ปริมาณน้ำตาลไซลิทอล อัตราการผลิตไซลิทอล

ปริมาณน้ำตาลไซโลส (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ	ปริมาณน้ำตาลไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิตไซลิทอล(กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
100	0.5524	5.624	0.350
150	0.5672	6.119	0.381
200	0.6039	5.892	0.367

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.8 ผลการศึกษาการผลิตไซลิทอลในระดับถังหมัก

ผลการทดลองเพาะเลี้ยง *Candida guilliermondii* TISTR 5206 ในอาหารสูตร YM ที่มีปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลอง คือ ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 4 ปริมาณกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ 1 กรัมต่อลิตร เปปโตน 6 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 4 กรัมต่อลิตร และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 เพื่อให้มีการผลิตไซลิทอล จึงมีการใช้ไซโลสเพื่อเป็นสารตั้งต้น ในปริมาณ 150 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้จากการทดลอง 4.7

จากการทดลองพบว่าในระดับถังหมักเมื่อใช้ปริมาณไซโลส 150 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตไซลิทอลได้สูงสุดที่ 17.683 กรัมต่อลิตร หรือ 0.254 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ในชั่วโมงที่ 60 ผลดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 แสดงอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์ ปริมาณน้ำตาลไซลิทอล อัตราการผลิตไซลิทอล อัตราการใช้ไซโลส และYieldที่ได้จากการผลิต

ปริมาณน้ำตาลไซโลส (กรัมต่อลิตร)	อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ	ปริมาณน้ำตาลไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิตไซลิทอล(กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	อัตราการใช้ไซโลส (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	Yield (กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส)
150	0.5524	17.683	0.400	1.713	0.254

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองใช้ปริมาณเชื้อที่ระดับต่างๆในอาหารสูตร YM และความเร็วรอบที่ระดับต่างๆ พบว่า *Candida guilliermondii* TISTR 5206 สามารถเจริญเติบโตได้ดี ในปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 4 กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ 1 กรัมต่อลิตร เปปโตน 6 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 4 กรัมต่อลิตร ที่ความเร็วรอบ 270รอบต่อนาที และควบคุมความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 และปริมาณไซโลสที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ปริมาณสูงสุดคือ 150 กรัมต่อลิตร ในระดับถังหมักผลิตได้ 17.683 กรัมต่อลิตร หรือ 0.254 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ในชั่วโมงที่ 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นรินทร์ เรืองพานิช. 2541. ผลของกลูโคสต่อการผลิตไซลิทอลจากไซโลสภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจน. เทคนิควิจัย ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะอุตสาหกรรมเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 70 น.

วรสิทธ์ โทจำปา. 2541. การผลิตไซลิทอลโดยการหมุนเวียนเซลล์ Hollow fiber. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะอุตสาหกรรมเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 86 น.

Arron,M. A. 1993. Low Caloric Foods Handbooks. Georgetown University School of Medicine Washinston DC.,USA.

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

Dahiya, J.S. 1991. Xylitol production by *Petromyces albertensis* grown on medium containing D-xylose. Can. J. Microbiol. 37: 14-18.

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

Furlan,S. A., P. Bouillouds, and H.F. de Castro. 1994. Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts. Process Biochem. Left. 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 tropicarlis* HXP2. Biotechnol. Bioeng. 25:85-102.

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

Hollmann , S. and O. Touster. 1957. L – xylulose – xylitol enzyme and other polyoldehydrogenase 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

xylitol from D - xylose by *Candida tropicarlis* : 1992 optimization of production rate . Bitechnol.Bioeng. 40:1085-1091.

Hsiao, H. Y., C.I. Chiang., P.P. Ueng., and G.t. Tsao. 1982. Sequential utilization of mixed monosaccharide by yeast. App. Environ. Microbial. 43:840-845.

Lee, C.W. and H.W. Chang. 1987. Kinetics of ethanol fermentations in membrane cell recycle fermentors. Biotechnol. Bioeng. 29:1,150-1,112.

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

Onishi, H. and T. Suzuki. 1966. The production of xylitol, L-arabinitol and ribitol by Yeasts. Agr.Biol. Chem.30:1139-1144.

Onishi, H., T. Suzuki. 1980. Mechanism of fermentation convension from polyalcohol fermentation to ethanol by *Pichia miso*. Agr. Biol. Chem. 44 : 1829-1834.

Prior, B.A., S.G. Kilian. And J.C. Du Preeze. 1989. Fermentation of D-xylose by the yeast *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. Pro. Biochem. 24:2-32.

Sirisansaneetakul, S., M. Rizzi and M. Reuss. 1992. Microbial Production of Xylitol from wheat straw hydrolysates. DECHEMA Biotechnology conference vol. 5(B) : 541-544.

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

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

Washuttl, J., P.Riederer and E. Bancher. 1973. A qualitative and quantitative study of sugaralcohol in several foods. J. Food Sci. 38: 1262-1263.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารเคมีและการหามาตรฐาน

1. การหาน้ำตาลที่ลดลงโดยวิธี Somogyi Nelson's

เตรียมสารละลาย

สารละลาย Copper reagent ประกอบด้วย

1.) 10% $CuSO_4 5H_2O$ 100 มิลลิลิตร (100 กรัมต่อ100มิลลิลิตร)

2.) Phosphate-tartrate solution เตรียมโดยสารละลาย Na_2HPO_4 28 กรัม หรือ $Na_2HPO_4.12H2O$ 70.5495 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติม sodium potassiumtartrate (Tetrahydrate) 40 กรัม ทำให้ละลายแล้วเติม 1 N NaOH 100 มิลลิลิตร ตามด้วย $NaSo_4$ (Anhydrous) 120 กรัม เมื่อละลายดีแล้ว ปรับปริมาตรเป็น 900 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ให้กรองเอาตะกอนทิ้งด้วยกระดาษ Watman No.4

3.) ผสมสารละลายในข้อ 1 (100 มิลลิลิตร)และข้อ 2 (900 มิลลิลิตร) เข้าด้วยกัน

สารละลาย Nelson's Arsennomolybdate color reagent ประกอบด้วย

1.) ละลาย Ammoniummolybdate $[(NH_4)6Mo_7O_2.4H_2O]$ 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติมกรดกำมะถัน 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

2.) Disodium arsenate $(Na_2HasO_4.H_2O)$ 25 กรัมในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

3.) ผสมสารละลายในข้อ 1 และข้อ 2 เข้าด้วยกัน เก็บไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้อง และควรเก็บในขวดสีชา

การหาน้ำตาลที่ลดลงโดยวิธี Somogyi Nelson's

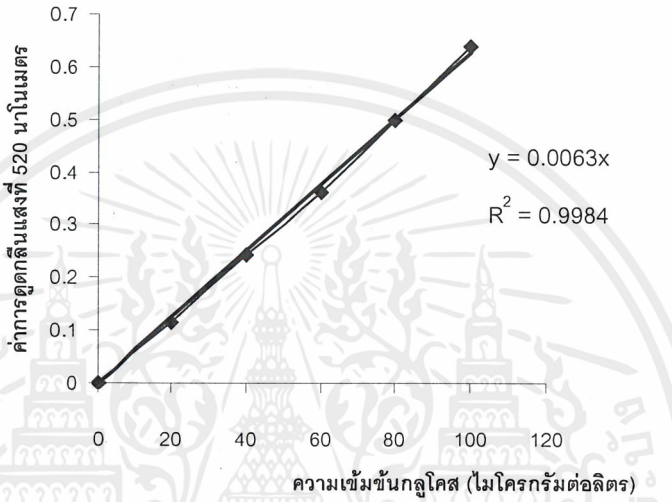
1) เติมตัวอย่างที่ต้องการหาน้ำตาลรีดิวซ์ 1 มิลลิลิตร ลงในหลองทดลอง
2) เติม Copper reagent แล้วต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ควรใช้ลูกแก้ววางบนปากหลอดเพื่อลดการระเหยของน้ำ
3) ทำให้เย็นโดยการแช่อ่างน้ำ เติม Arsenomolydate reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที จะเห็นเป็นสีเขียว หรือน้ำเงิน ขึ้นกับปริมาณน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) เติมน้ำ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร

5) นำค่า ที่ได้ไปเทียบกับมาตรฐานกลูโคสคำนวณได้จาก

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



รูปที่ ค1. กราฟมาตรฐานกลูโคส

2.การวิเคราะห์ปริมาณไซลิทอล

วิเคราะห์ปริมาณไซลิทอลในสารละลายตามวิธีของ Adler และ Gustafssonn (1980) โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไซลิทอลไปเป็นฟอร์มัลดีไฮด์ด้วยเปอร์ไอโอเดตในสารละลายกรดในระยะเวลาสั้นๆแล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย butane-2,3-diol แล้ววิเคราะห์ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นโดยทำปฏิกิริยากับสารละลาย pentane-2,4-diome ได้สารละลายสีเหลือง

สารเคมี

1.) periodate reagent (NaIO4 0.015 M ใน HCl 0.16 M) เตรียมโดยสารละลาย NaIO4 3.2084 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นลงไป 13.3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยนำกลั่นเป็น 1000 มิลลิลิตร

2.) Butane-2,3-diol เตรียมโดยปิเปต Butane-2,3-diol มา 1.8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

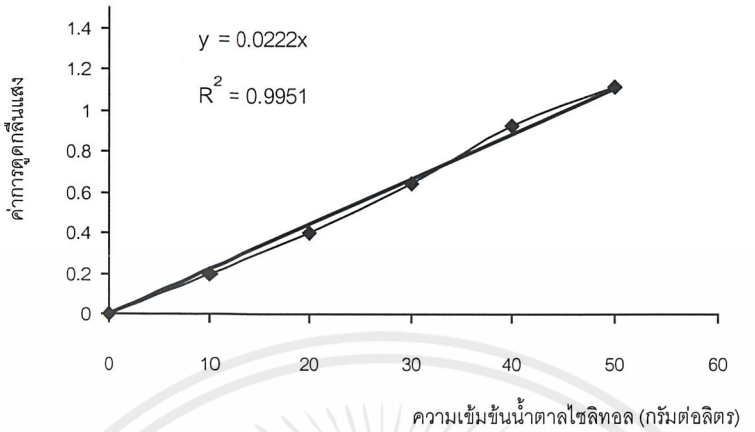
3.) Pentane-2,4-dione solution (เตรียมใช้ทันที) เตรียมโดยสารละลายแอมโมเนียมอะซีเทต 154.16 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติกเข้มข้นปริมาตร 40 มิลลิลิตร เติม pentane-2,4-dione ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์หาปริมาณไซลิทอล

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง(ความเข้มข้นไซลิทอล 10-50 มิลลิกรัมต่อลิตร)หรือสารละลายไซลิทอลมาตรฐาน ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
2. เติม periodate reagent ลงไป 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
3. เติม bltane-2, 3-diol 0.002 M ลงไป 1.0มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
4. เติม pentane-2,4-dione solution ลงไป 2.0 มิลลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
5. ทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้องแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร
6. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของไซลิทอลในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวนได้จาก

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ค2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซลิทอล

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลไซโลส (วรสิทธิ์,2541)

วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลไซโลสในสารละลายตามวิธีของ Deschatelets และ Yu (1985) โดยอาศัยการเกิดเฟอฟูรัล (furfural) จากเพนโตส ในสารละลายกรดแอซิติกที่มี thioureaอยู่ แล้วเติม p-bromoaniline acetate เพื่อทำปฏิกิริยากับเฟอฟูรัลได้เป็นสารละลายสีชมพู

สารเคมี

1. p-bromoaniline reagent เตรียมโดยละลาย thiourea ประมาณ 4 กรัม ในกรดแอซิติกเข้มข้น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วแยกส่วนใสออกมา (กรดแอซิติกอิ่มตัวด้วย thiourea)จากนั้น ละลาย p-bromoaniline 2 กรัม ลงในส่วนใสนั้น
2. สารละลายไซโลสมาตรฐาน เตรียมโดยละลายไซโลส 0.10 กรัม ในน้ำกลั่นปรับปริมาตร เป็น 100 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร) แล้วเจือจางให้ได้สารละลายไซโลสเข้ม ข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 กรัมต่อลิตร

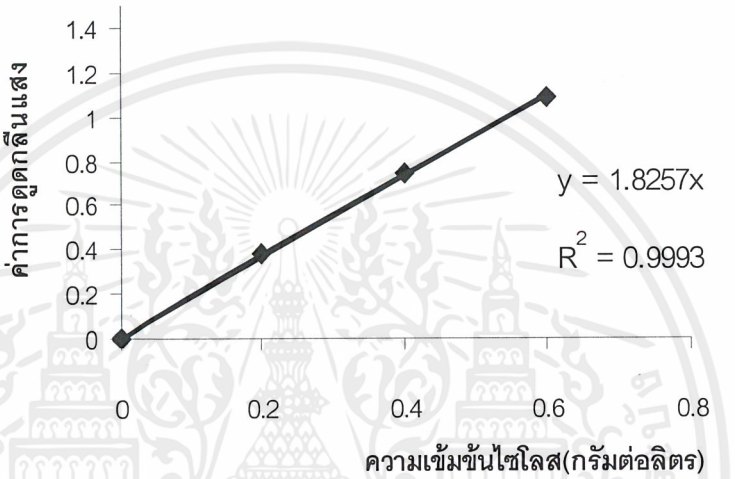
วิธีการ

1. ปิเปตสารละลายตัวอย่าง(ความเข้มข้นประมาณ 0.2-1.0 กรัมต่อลิตร)หรือสาร ละลายไซโลส มาตรฐาน ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง
2. เติม p-bromoaniline reagent 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
3. นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
4. ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว แล้วบ่มต่อในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 70 นาที
5. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. นำค่าดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานในภาคผนวก เพื่อหาความเข้มข้นของไซโลสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นของไซโลส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{(ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร) * (อัตราการเจือจาง)}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$



รูปที่ ค3 กราฟมาตรฐานน้ำตาลไซโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. **Yeast Malt Extract Agar (YM agar) ใช้ทำเป็นสแลนสำหรับเขี่ยเชื้อ**

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

2. **Yeast Malt Extract Broth (YM Broth) จะใช้สำหรับหาส่วนประกอบและสภาวะที่เหมาะสม**

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	3 กรัม
เปปโตน (Peptone)	5 กรัม
กลูโคส (Glucose)	10 กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$ $2H_2O$)	0.1 กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	5 กรัม
น้ำกลั่น	1000 กรัม
พีเอช 6.0	

3. **Yeast Malt Extract Broth (YM Broth) ที่หาได้จากการหาส่วนประกอบที่เหมาะสมและใช้ในการหาปริมาณไซโลสที่เหมาะสมและใช้ในการหาปริมาณไซลิทอล**

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	1 กรัม
เปปโตน (Peptone)	6 กรัม
กลูโคส (Glucose)	10 กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$ $2H_2O$)	0.1 กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	4 กรัม
ไซโลส (Xylose)	100 150 200 กรัม
น้ำกลั่น	1000 กรัม
พีเอช 6.0	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
วิธีวิเคราะห์ทางสถิติ

Complete Randomized Design (CRD)

เป็นแบบแผนการทดลองที่มีการจัดสิ่งทดลองทั้งหมดในหน่วยทดลอง (experimental unit) โดยวิธีสุ่ม โดยให้หน่วยทดลองแต่ละหน่วยมีโอกาสได้รับสิ่งทดลองแต่ละชนิดเท่าๆ กัน สำหรับ CRD ความแตกต่างระหว่างหน่วยทดลองหลายๆ หน่วยที่ได้รับสิ่งทดลองเดียวกัน เรียกว่า "ความคลาดเคลื่อนของการทดลอง (experimental error)" ดังนั้น CRD จึงเหมาะสำหรับงานทดลองที่มีหน่วยทดลองสม่ำเสมอกันทั้งหมด ได้แก่งานทดลองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถควบคุมสิ่งแวดล้อมให้สม่ำเสมอได้ง่าย

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

Source of Variation	Degree of Freedom	Sum of Squares	Mean of Squares	F Value	Tabular	
					5%	1%
Treatment						
Error						
Total						

วิธีคำนวณ

ให้ t คือ จำนวนชนิดของตัวอย่าง และ r คือจำนวนซ้ำ

. คำนวณค่า Degree of Freedom (df)

Total df = (t*r)-1

Treatment df = t-1

Error df = by substraction = total df – treatment df

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข. คำนวณค่า Sum of Squares (SS) ขั้นแรกคำนวณค่า correction factor (CF) ก่อนดังนี้

$CF = total^2 / t*r$

Total SS = $X1^2 + X2^2 +$ .....- CF

Treatment SS = total treatment 1^2 + total treatment 2^2 + ...- CF

Error SS = total SS – treatment SS

ค.คำนวณค่า Mean of Squares (MS)

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

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

ง. คำนวณค่า F value

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

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

ฉ.นำค่าที่คำนวณได้ทั้งหมดตั้งแต่ ก – จ ใส่ในตารางวิเคราะห์

ช.เปรียบเทียบค่า F value ที่คำนวณได้กับค่า F ที่ได้จากตาราง

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

Lest significant difference test (LSD)

เป็นวิธีความแตกต่างที่น้อยที่สุดค่าหนึ่ง เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองคู่ใดคู่หนึ่ง มีหลักการดังนี้

1. ใช้ LSD เมื่อ F-value ในตาราง analysis of variance แสดงความแตกต่างระหว่างสิ่งทดลอง
2. ใช้ LSD เมื่อสิ่งของทดลองไม่เกิน 5
3. กรณีที่สิ่งทดลองเกิน 5ให้ใช้ LSD เปรียบเทียบสิ่งทดลองอื่นๆกับ Control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรการคำนวณหาค่า LSD มีดังนี้

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

เมื่อ S^2 คือ Error MS

R คือจำนวนซ้ำ

t_{∞} ค่าที่ได้รับจากตาราง t ที่นัยสำคัญ ∞ และการทดสอบสมมติฐานแบบ 2 ทาง เพื่อตัดสินใจว่า สิ่งที่ทดลองคู่ใดคู่หนึ่งมีความแตกต่างกันจริงหรือไม่ ให้หาค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของสิ่งทดลองนั้นให้สมมติเป็น d เปรียบเทียบ d กับค่า LSD ที่คำนวณได้แสดงว่าสิ่งทดลองไม่มีความแตกต่างกัน

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์

จลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สามารถอธิบายได้ดีด้วยสมการของโมนอด (Monod equation) ดังนี้

$$r_x = \frac{\mu_m C_s C_x}{K_s + C_s}$$

เมื่อ Rs คืออัตรารวดเร็วของการใช้สับสเตรท (kg carbon source/ m3h)

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

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

R_s เป็นตัวแปลส่วนที่เหลืออีก 2 ตัว คือ Yx/s และ Ms เป็นพารามิเตอร์ และสำหรับอัตราเร็วของการใช้ไนโตรเจนของจุลินทรีย์ ก็สามารถอธิบายได้ด้วยสมการดั้งนี้

$$r_n = \frac{r_x}{Y_{x/n}}$$

ในสมการที่ 3 rn เป็นตัวแปล และ yx/n เป็นพารามิเตอร์ที่จะได้จากการวิเคราะห์ จากข้อมูล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การประมาณหาค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

วิธีที่ 1 Numberical Differentuiation method

จากสมการที่ (1)-(3) มีตัวแปลอยู่ 3 ตัว ที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างของการทดลองการหมักได้แก่ cx cs และ cn ซึ่งเป็นความเข้มข้นของเซลล์ สับสเตรท และไนโตเจน ตามลำดับส่วนอัตราเร็วของการเจริญเติบโต (r_x) การให้สับสเตรท (r_s) การใช้ไนโตรเจน (rn) สามารถคำนวณได้จากการทำสมดุลดังนี้

Rate of accumlation or depletion the syserm = Rate of growth or consumption

โดยที่อัตราเร็วของการสะสมหรือการลดลงทางด้านซ้ายมือ เป็นค่าของสัดส่วนระหว่างความเข้มข้นที่เปลี่ยนแปลงไปกับช่วงเวลา ดังนี้คือ

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

ตัวอย่างเช่น ในกรณีของเซลล์จะได้ว่า

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

ดังแสดงวิธีคำนวณ (Numberical Defferentiation method) เอาไว้ข้างล่าง ตัวอย่างการคำนวณอัตราเร็วของการเจริญเติบโต ที่เวลา 14 ชม

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

จากตัวอย่างการคำนวณด้านบน เราจะได้อัตราเร็วของการเจริญเติบโต (r_x) การใช้สับสเตรท (r_s) การใช้ไนโตรเจน (r_n) ที่เวลาต่าง ๆ ที่ได้แสดงเอาไว้ในตารางที่ 1 ในคอลัมน์ที่ 5 , 6 และ 7 ตามลำดับ

ตารางที่ ค1 ตัวอย่างผลการทดลองจาการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ (yeast fermentation)

T (h)	c_x (kg/ m^3)	c_s (kg/ m^3)	c_n (kg/ m^3 h)	r_x (kg/ m^3 h)	r_s (kg/ m^3 h)	r_n (kg/ m^3 h)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1 การประมาณค่า μ_m และ K_s

จากสมการที่ (1) จะได้ว่า

$$\mu = \frac{r_x}{c_x} = \frac{\mu m\, Cs}{K_s + C_s}$$

จัดรูปสมการ (1a) เสียใหม่ โดยกลับเศษเป็นส่วนทั้งสองข้าง ก็จะได้สมการเส้นตรง (สมการ 1b) ที่มี Slope เท่ากับ $\frac{K_s}{\mu_m}$ และจุดตัดแกน Y เท่ากับ $\frac{1}{\mu_m}$ โดยทำการเขียนรูป

กราฟที่ได้ความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{1}{C_s}$ (แกนx) และ $\frac{1}{\mu}$ $(= \frac{C_x}{R_x})$ (แกน Y)

ซึ่งเรียกสมการในรูปนี้ว่า Lineweaver – Burk plot

$$\frac{1}{\mu} = \frac{C_x}{r_x} = \frac{K_s}{\mu_m}\frac{1}{Cs} + \frac{1}{\mu_m}$$

รูปที่ 1 แสดงผลการเขียนรูปกราฟตามสมการ (1b) ซึ่งจะได้ว่า

$$\text{Y-intercept} = \frac{1}{\mu_m}$$

$$\text{Slope} = \frac{K_s}{\mu_m}$$

1.2 การประมาณ

จากสมการที่ 2 จะได้ว่า

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

จะเห็นได้ว่าสมการ เป็นสมการเส้นตรงที่มี Slope เท่ากับ $1/Y_{x/s}$ และจุดตัดแกน เท่ากับ m_s โดยการเขียนกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง r_x/Cx $(=\mu)$ (แกนY) ผลการเขียนรูปกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ตามสมการ

Y-int ercept = m_s

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

ค่าต่างที่ได้ จะได้จากการนำตารางที่ได้และคำนวณนั้นไป Plot กราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ข้อมูลจาการทดลอง

ตารางที่1 แสดงปริมาณของเซลล์ที่กลูโคสความเข้มข้นต่างๆ

ชั่วโมงที่	ปริมาณกลูโคส				
	5 g/l	10 g/l	15g/l	20g/l	25g/l
0	0.00011	0.00005	0.00009	0.00013	0.00010
2	0.00029	0.00022	0.00024	0.00022	0.00022
4	0.00101	0.00087	0.00105	0.00105	0.00099
6	0.00290	0.00324	0.00324	0.00326	0.00321
10	0.01472	0.01137	0.01209	0.01240	0.01260
12	0.01943	0.01892	0.01855	0.01812	0.01859
14	0.02201	0.02126	0.02144	0.02165	0.02120
16	0.02282	0.02343	0.02219	0.02271	0.02155
18	0.02210	0.02351	0.02417	0.02447	0.02282
20	0.02157	0.02482	0.02510	0.02646	0.02459
22	0.02153	0.02625	0.02606	0.02642	0.02607
24	0.02000	0.02430	0.02443	0.02589	0.02583

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง2 แสดงปริมาณเซลล์ที่ปริมาณหัวเชื้อต่างๆ

ชั่วโมงที่	ปริมาณเชื้อเริ่มต้น					
	4%	5%	6%	7%	8%	9%
0	0.00005	0.00006	0.00008	0.00009	0.00011	0.00012
2	0.00030	0.00036	0.00039	0.00050	0.00058	0.00059
4	0.00104	0.00119	0.00141	0.00163	0.00185	0.00176
6	0.00274	0.00302	0.00354	0.00445	0.00511	0.00486
8	0.00871	0.00955	0.01016	0.01096	0.01169	0.01123
10	0.01310	0.01534	0.01570	0.01550	0.01605	0.01553
12	0.01767	0.01910	0.01838	0.01850	0.01790	0.01842
14	0.01906	0.01987	0.01943	0.01931	0.01831	0.01867
16	0.01674	0.01860	0.01937	0.01842	0.01743	0.01769
18	0.01823	0.01964	0.01916	0.01860	0.01840	0.01916
20	0.01831	0.01894	0.01871	0.01784	0.01821	0.01811
22	0.01573	0.01701	0.01645	0.01588	0.01621	0.01643
24	0.01502	0.01633	0.01581	0.01534	0.01521	0.01530

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง3 แสดงปริมาณเซลล์ที่เปปโตนความเข้มข้นต่างๆ (กรัมต่อลิตร)

ชั่วโมงที่	ปริมาณเปปโตน				
	3 g/l	4 g/l	5g/l	6 g/l	7 g/l
0	0.00015	0.00011	0.00011	0.00008	0.00011
2	0.00024	0.00025	0.00026	0.00021	0.00023
4	0.00073	0.00083	0.00086	0.00082	0.00085
6	0.00248	0.00259	0.00264	0.00258	0.00271
8	0.01095	0.00774	0.01144	0.01135	0.01164
10	0.01471	0.01685	0.01773	0.01689	0.01797
12	0.02186	0.02176	0.02297	0.02384	0.02570
14	0.01983	0.02293	0.02548	0.02784	0.02924
16	0.02216	0.02427	0.02691	0.02625	0.03057
18	0.02352	0.02890	0.02962	0.03086	0.03156
20	0.02917	0.03208	0.03795	0.03508	0.03878
22	0.02964	0.03591	0.03593	0.03555	0.03719
24	0.03281	0.03520	0.03562	0.03630	0.03680

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง4 แสดงปริมาณเซลล์ที่สารสกัดยีสต์ความเข้มข้นต่างๆ

ชั่วโมงที่	ปริมาณสารสกัดยีสต์				
	1 g/l	2 g/l	3g/l	4g/l	5g/l
0	0.00016	0.00013	0.00018	0.00017	0.00013
2	0.00025	0.00040	0.00039	0.00040	0.00042
4	0.00125	0.00139	0.00149	0.00144	0.00135
6	0.00449	0.00419	0.00471	0.00460	0.00481
8	0.00876	0.01039	0.00936	0.01072	0.01001
10	0.01683	0.01694	0.01778	0.01778	0.01768
12	0.02385	0.02479	0.02548	0.02527	0.02600
14	0.02784	0.02857	0.02822	0.03062	0.03037
16	0.03146	0.03097	0.03345	0.03202	0.03247
18	0.03307	0.03446	0.03694	0.03634	0.03597
20	0.03363	0.03140	0.03458	0.03413	0.03601

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่5 แสดงปริมาณเซลล์ที่แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นต่างๆ

ชั่วโมงที่	ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต				
	2 g/l	3 g/l	4g/l	5g/l	6g/l
0	0.00010	0.00011	0.00005	0.00005	0.00010
2	0.00021	0.00016	0.00022	0.00022	0.00021
4	0.00077	0.00061	0.00078	0.00078	0.00078
6	0.00249	0.00206	0.00251	0.00240	0.00239
8	0.00930	0.00745	0.00942	0.00834	0.00859
10	0.02066	0.01747	0.02041	0.01856	0.01774
12	0.02421	0.02132	0.02296	0.02095	0.02056
14	0.02857	0.02573	0.02443	0.02322	0.02307
16	0.03126	0.02724	0.02563	0.02869	0.02346
18	0.03396	0.02795	0.02696	0.02679	0.02696
20	0.03857	0.03303	0.03119	0.02826	0.02995
22	0.04124	0.03636	0.03219	0.03429	0.02960
24	0.03791	0.03640	0.03686	0.02973	0.03409

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง6 แสดงปริมาณเซลล์ที่ระดับความเร็วรอบต่างๆ

ชั่วโมงที่	ความเร็วรอบ			
	180 rpm	200 rpm	250 rpm	270 rpm
0	0.00002	0.00007	0.00016	0.00009
2	0.00015	0.00021	0.00026	0.00016
4	0.00051	0.00050	0.00111	0.00080
6	0.00166	0.00192	0.00404	0.00267
8	0.00587	0.00768	0.01106	0.00996
10	0.01193	0.01382	0.02009	0.01884
12	0.01778	0.02015	0.02198	0.02224
14	0.01803	0.02867	0.02361	0.02173
16	0.02323	0.02718	0.02668	0.02248
18	0.02221	0.02266	0.02815	0.02810
20	0.02030	0.02832	0.02742	0.03299
22	0.02024	0.02952	0.02795	0.03584
24	0.02183	0.02468	0.02893	0.03646

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่7 แสดงปริมาณเซลล์,ปริมาณไซลิทอลและปริมาณกลูโคสที่เหลือที่ไซโลสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร

ชั่วโมงที่	ปริมาณเซลล์	ปริมาณไซลิทอล	กลูโคสที่คงเหลือ
0	0.00007	0.000	10.616
2	0.00022	0.000	9.9692
4	0.00079	0.000	9.5525
6	0.00173	0.000	7.3662
8	0.00512	0.000	5.9496
10	0.00953	0.026	2.9251
12	0.01601	1.039	-
14	0.01705	2.253	-
16	0.01687	4.017	-
18	0.02056	3.895	-
20	0.01839	4.448	-
22	0.02037	5.211	-
24	0.02130	5.624	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่8 แสดงปริมาณเซลล์,ปริมาณไซลิทอลและปริมาณกลูโคสที่เหลือที่ไซโลสเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร

ชั่วโมงที่	ปริมาณเซลล์	ปริมาณไซลิทอล	กลูโคสที่คงเหลือ
0	0.00007	0.000	10.5917
2	0.00024	0.000	9.9054
4	0.00081	0.000	9.38094
6	0.00170	0.000	7.2486
8	0.00517	0.000	6.0721
10	0.01019	0.020	3.0917
12	0.01636	1.465	-
14	0.01595	2.480	-
16	0.01851	4.361	-
18	0.01905	4.180	-
20	0.01860	4.640	-
22	0.01889	5.793	-
24	0.02059	6.119	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่9 แสดงปริมาณเซลล์,ปริมาณไซลิทอลและปริมาณกลูโคสที่เหลือที่ไซโลสเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร

ชั่วโมงที่	ปริมาณเซลล์	ปริมาณไซลิทอล	กลูโคสที่คงเหลือ
0	0.00007	0.000	10.0254
2	0.00024	0.000	9.827
4	0.00080	0.000	9.7486
6	0.00171	0.000	7.626
8	0.00519	0.000	5.7388
10	0.01012	0.017	3.1162
12	0.01564	1.205	-
14	0.01632	2.376	-
16	0.01783	4.087	-
18	0.01878	4.378	-
20	0.01700	4.611	-
22	0.01939	5.525	-
24	0.01881	5.892	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ง10 แสดงปริมาณเซลล์,ปริมาณกลูโคส,ปริมาณไซโลส,ปริมาณไซลิทอล ในระดับถังหมัก (กรัมต่อลิตร)

เวลา	เซลล์	ปริมาณกลูโคส	ปริมาณไซโลส	ปริมาณไซลิทอล
0	0.00011	17.5406	0.0000	0.0000
2	0.00043	15.6625	0.0000	0.0000
4	0.00077	15.3500	0.0000	0.0000
6	0.00239	15.2406	0.0000	0.0000
8	0.00463	14.3344	0.0000	0.0000
10	0.00889	12.9281	0.0000	0.0000
12	0.01131	10.2250	0.0000	0.0000
14	0.02133	8.1156	0.0000	0.0000
16	0.02437	6.6625	0.0000	0.0000
18	0.02642	3.1516	0.0000	0.0000
20	0.02419	2.9172	148.9093	1.6747
22	0.02108	0.0000	147.8020	1.9258
24	0.02679	0.0000	144.4857	3.0786
26	0.02908	0.0000	143.0406	4.3581
28	0.02766	0.0000	141.6621	5.6135
30	0.02766	0.0000	138.0080	5.6266
32	0.02549	0.0000	137.5927	5.8100
34	0.02815	0.0000	135.2896	5.8297
36	0.02642	0.0000	134.8466	6.5961
38	0.02586	0.0000	130.1185	7.2773
40	0.02710	0.0000	127.1288	8.3843
42	0.02760	0.0000	126.7135	8.7860
44	0.02983	0.0000	124.5543	10.5852
48	0.02840	0.0000	118.9901	11.4061
50	0.02536	0.0000	112.6786	11.4301
52	0.02660	0.0000	110.3532	12.4454
54	0.02648	0.0000	108.9414	12.5655
56	0.02474	0.0000	103.1281	14.1157
58	0.02952	0.0000	96.4013	15.5109
60	0.03014	0.0000	80.3732	17.6834

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้