สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตน้ำตาลไซลิทอลด้วยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 โดยวิธีการตรึงเซลล์

T047305

นายพรรณยศ ภู่เจริญ
นางสาวสิริกันยา รื่นวงศา

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2545

เลขหมู่..............................
เลขทะเบียน 47305
วัน, เดือน, ปี 27 มิ.ย. 2546

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

The xylitol production by immobilized *Candida tropicalis* TISTR 5045

Mr. Panyos Poocharoen
Miss Sirikanya Ruenvongsa

A Special Project Submitted in Partial Fulfiliment of the Requirement for the Degree of
Bachelor of Science
Department of Applied Biology
Faculty of Science
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang
Academic Year 2002

โครงงานพิเศษ เรื่อง การผลิตน้ำตาลไซลิทอลด้วยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 โดยวิธีการตรึงเซลล์

นักศึกษา นายพรรณยศ ภู่เจริญ
นางสาวสิริกันยา รื่นวงศา

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. สุขใจ ชูจันทร์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์คณะวิทยาศาสตร์สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ปัญหาพิเศษ/โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	รศ.ดร.พรรณี ฐิตาภิชิต	
กรรมการ	อ.ลินจง สุขลำภู	
กรรมการ	รศ. สุขใจ ชูจันทร์	

....
(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)
หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษเรื่อง	การผลิตน้ำตาลไซลิทอลด้วยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 โดยวิธีการตรึงเซลล์
นักศึกษา	นายพรรณยศ ภู่เจริญ นางสาวสิริกันยา รื่นวงศา
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2545
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. สุขใจ ชูจันทร์

บทคัดย่อ

การศึกษากระบวนการผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสโดยวิธีทางชีวภาพ ด้วยเชื้อยีสต์ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในระดับฟลาสก์เขย่า โดยนำเอาเทคนิคการตรึงเซลล์เข้ามาใช้ ซึ่งปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ถูกนำมาใช้ในกระบวนการตรึงเซลล์มีค่าเท่ากับ 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักเปียกต่อปริมาตร) หลังจากทำการตรึงเซลล์แล้วทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึงไว้ในเม็ดเจลในอาหารเพื่อการผลิตรไซลิทอลโดยใช้ความเร็วรอบในการเขย่าเริ่มต้นเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ในเม็ดเจลเท่ากับ 220 รอบต่อนาที ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม คือ ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง พีเอชเริ่มต้น 4.0 แล้วเติม Tween80 ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 0 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเหลว

หลังจากทำการหมักเป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าจะได้อัตราการใช้ไซโลส 4.921 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ความเข้มข้นไซลิทอล 7.756 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตไซลิทอล 0.322 กรัมไซลิทอลต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการผลิตไซลิทอลจำเพาะ 0.00825 กรัมไซลิทอลต่อกรัมเซลล์ต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนผลผลิตของไซลิทอลที่ได้เท่ากับ 0.168 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส

Special Project Title	**The xylitol production by immobilized *Candida tropicalis* TISTR 5045**
Name	Mr. Panyos Poocharoen Miss Sirikanya Ruenvongsa
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2545
Special Project Advisor	Associated Professor Sukjai Choojan

ABSTRACT

The aim of this study was to produce xylitol from xylose by the yeast, *Candida tropicalis* TISTR 5045, in shaking flask culture and using the technique of cell immobilization. The initial amount of cells used in the immobilized process was 4%. After the cell immobilization, the immobilized cells were then cultured in "fermentation medium" at 220 rpm/min and under the following optimal culture conditions: room temperature, initial pH=4 and tween 80 was added at the optimal condition, i.e. 0% (v/v). After 24 hours fermentation , The results were as follows : the xylose consumption rate was 4.921 g / l / hr, the concentration and the productivity of the xylitol were 7.756 g / l and 0.322 g . xylitol / l / hr, respectively, the specific rate of xylitol production was 0.00825 g . xylitol / g . cell / l / hr while xylitol yield of this study was 0.168 g . xylitol / g. xylose

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความร่วมมือและความช่วยเหลือของบุคคลต่างๆหลายท่าน ต้องขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ.ที่นี้

คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ รศ. สุขใจ ชูจันทร์ อย่างสูงสำหรับทุกสิ่งทุกอย่างที่อาจารย์มอบให้ ทั้งโอกาส คำปรึกษา และคำแนะนำต่างๆที่มีประโยชน์อย่างยิ่ง รวมทั้ง รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต, อาจารย์ ลินจง สุขลำภู และ อาจารย์ทุกท่านที่ให้คำปรึกษา อีกทั้ง พี่วิทย์ และ พี่ประสิทธิ์ สำหรับอุปกรณ์วิทยาศาสตร์ดีๆ ที่ใช้ในโครงงานพิเศษ เจ้าหน้าที่ทุกท่าน และ แม่บ้าน ที่คอยอำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ พี่เต้ย และ พี่นก สำหรับคำปรึกษาและกำลังใจเสมอมา เพื่อน ๆ ทุกคนที่รอคอยโครงงานพิเศษอันยอดเยี่ยมนี้

บุ๊ง ขอบคุณ : ป๊าและม๊า ที่ให้สมองและความรัก ความห่วงใยอันบริสุทธิ์มาตลอดชีวิต เจ๊น้อยที่คอยเป็นกำลังใจและปัจจัยที่ 5 ครอบครัวภู่เจริญสำหรับทุกสิ่งทุกอย่าง เพื่อนรักทุกๆคนเราจะเป็นเพื่อนกันตลอดไป รศ. สุขใจ ชูจันทร์ ที่เป็นแรงผลักดันในใจ และทุกๆคนที่ผมลืมชื่อไป

อ้อ ขอบคุณ : พ่อกับแม่ที่มีความเป็นห่วงเป็นใยในตัวลูก นอกจากนี้ยังคอยให้ปัจจัยสนับสนุนในด้านต่างๆ นุ้ย หนิง จอยเพื่อนที่คอยเอื้อเฟื้อที่พักอาศัยยามที่ต้องค้างคืนโปรเจค และที่ขาดไม่ได้คือพี่ตั๋มที่คอยช่วยให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆทุกๆด้านและ ทุกๆคนที่มีส่วนช่วยให้โปรเจคชิ้นนี้สำเร็จไปได้ด้วยดีค่ะ

นาย พรรณยศ ภู่เจริญ
นางสาว สิริกันยา รื่นวงศา
มีนาคม 2546

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ข
กิตติกรรมประกาศ ค
สารบัญ ง
สารบัญตาราง ฉ
สารบัญรูป ซ

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2
1.4 ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน 2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ 3

บทที่ 2 การตรวจเอกสาร

2.1 คุณสมบัติของน้ำตาลไซลิทอล 4
    การใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหาร 8
    เมทาบอลิซึมของไซลิทอลในในร่างกายมนุษย์ 11
    การผลิตไซลิทอล 12
    กระบวนการเมทาบอลิซึมในการผลิตไซลิทอลโดยจุลินทรีย์ 14
    การผลิตไซลิทอลโดยใช้เซลล์ตรึง 24
2.2 การตรึงเซลล์ 25
    การเปรียบเทียบการหมักด้วยการใช้เซลล์ตรึงและการหมักแบบเก่า 30
    เทคนิคการตรึงเซลล์โดยใช้วิธีการดักจับ 32
2.3 ผลของ Tween 80 ที่มีต่อปริมาณไซลิทอลที่ถูกขับออกจากเม็ดเจล 35
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัยและอุปกรณ์ 36
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล 44
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 53

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

เอกสารอ้างอิง 54

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก 57
ภาคผนวก ข 65
ภาคผนวก ค 67
ภาคผนวก ง 72

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบไซลิทอลในผักและผลไม้ 4

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของไซลิทอล 5

ตารางที่ 2.3 ค่าความร้อนจำเพาะของการละลายของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ 6

ตารางที่ 2.4 แสดงอัตราการผลิตไซลิทอลตามความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 22

ตารางที่ 4.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความเข้มข้นของ Tween 80 ที่เหมาะสม 47

ตารางที่ 4.2 การคำนวณในการผลิตไซลิทอล 52

ตารางที่ ก-1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรที่เวลาต่าง ๆ ขณะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เพื่อวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 57

ตารางที่ ก-2 จำนวนเซลล์ที่นับได้โดยใช้ Haemacytometer ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กันขณะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เพื่อวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 58

ตารางที่ ก-3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำตาลไซลิทอลที่ถูกผลิตโดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอลที่มีการเติม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0 0.1 0.5 1.0และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ 60

ตารางที่ ก-4 ปริมาณน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ไปโดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอลที่มีการเติม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในระดับฟลาสก์เขย่าที่ระยะเวลาต่างๆ กัน 61

ตารางที่ ก-5 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปโดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอลที่มีการเติม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในระดับฟลาสก์เขย่าที่ระยะเวลาต่างๆ กัน 62

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ ก-6 ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลที่ถูกผลิตขึ้นและขับออกมาจากเม็ดเจลลงสู่น้ำหมักโดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอลที่มีการเติม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในระดับฟลาสก์เขย่าที่ระยะเวลาต่างๆ กัน 63

ตารางที่ ก-7 พีเอชที่เปลี่ยนแปลงไประหว่างกระบวนการหมัก เพื่อการผลิตไซลิทอล โดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิต ไซลิทอล ที่มีการเติม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในระดับฟลาสก์เขย่าที่ระยะเวลาต่างๆ กัน 64

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 เมทาบอลิซึมของไซลิทอลในร่างกายมนุษย์ 12

รูปที่ 2.2 วิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตไซลิทอล 15

รูปที่ 2.3 วิถีการเกิดไซลิทอลจากเมทาบอลิซึมของไซโลส 16

รูปที่ 2.4 กรรมวิธีการผลิตไซลิทอลและไซโลส 17

รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะการตรึงเซลล์แบบห่อหุ้มเซลล์ (Gel entrapment) 26

รูปที่ 2.6 โครงสร้างของโซเดียมอัลจิเนต 33

รูปที่ 4.1 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ซึ่งมีความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเวลาที่ชั่วโมงต่างๆ ขณะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบที่ 250 รอบต่อนาที 44

รูปที่ 4.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่นับได้ และเวลาที่ชั่วโมงต่างๆ ขณะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เพื่อวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 45

รูปที่ 4.3 เปรียบเทียบความเข้มข้นของไซลิทอลที่ถูกผลิตโดยเชื้อ *Candida – tropicalis* TISTR 5045 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่มีการแปรผันปริมาณ Tween 80 ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆ กัน คือ 0 0.1 0.5 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ 46

รูปที่ 4.4 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างกระบวนการหมักโดยที่ในอาหารหมักมีการเติม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงระยะเวลาต่างๆ 48

รูปที่ 4.5 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูโคสในระหว่างกระบวนการหมักโดยที่ในอาหารหมักมีการเติม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงระยะเวลาต่างๆ 49

รูปที่ 4.6 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณไซโลสในระหว่างกระบวนการหมักโดยที่ในอาหารหมักมีการเติม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงระยะเวลาต่างๆ 50

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.7 แสดงการผลิตปริมาณไซลิทอลที่ได้ในระหว่างกระบวนการหมัก ในสภาวะการหมักที่มีการเติม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในช่วงระยะเวลาต่างๆ 51

รูปที่ ค-1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส 68

รูปที่ ค-2 กราฟมาตรฐานของไซลิทอล 70

รูปที่ ค-3 กราฟมาตรฐานของไซโลส 71

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

ไซลิทอล (xylitol) จัดเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดเพนทะวาเลนต์แอลกอฮอล์ของไซโลส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมีคุณสมบัติเป็นสารให้ความหวานชนิดหนึ่ง ให้รสชาติดี และให้ความรู้สึกเย็นสดชื่นคล้ายเมนทอล และยังให้ความหวานใกล้เคียงกับน้ำตาลซูโครส โดยไซลิทอล 1 กรัม ให้พลังงาน 4.06 กิโลแคลอรี่ ซึ่งเทียบเท่าได้กับพลังงานที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ทั้งนี้จุลินทรีย์หลากหลายชนิดที่อยู่ในช่องปากโดยเฉพาะ *Streptococcus mutans* ไม่สามารถนำไซลิทอลไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมได้จึงสามารถลดปัญหาการเกิดฟันผุที่มีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์ได้นอกจากนี้ไซลิทอลยังสามารถช่วยยืดอายุผลิตภัณฑ์เนื่องมาจากมีจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่สามารถใช้ไซลิทอล ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่มีไซลิทอลเป็นองค์ประกอบอยู่เกิดการเสื่อมเสียเนื่องจากจุลินทรีย์ได้ยาก ทำให้มีอายุการเก็บรักษายาวนานขึ้น จากคุณสมบัติดังกล่าวมาแล้ว จึงทำให้ไซลิทอลเป็นที่ต้องการในอุตสาหกรรมต่างๆมากมาย เช่น

อุตสาหกรรมอาหาร โดยนำไปเป็นส่วนผสมของหมากฝรั่ง ช็อกโกแล็ต ท็อฟฟี่ คาราเมล เจลาติน และเครื่องดื่มต่างๆ เป็นต้น

ในทางเภสัชกรรม ไซลิทอลจะถูกนำมาใช้เป็นสารให้ความหวานในการเตรียมผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลว ซึ่งจะไม่ทำให้เกิดฟันผุ และไม่ทำให้เกิดการหมักของจุลินทรีย์ เหมาะที่จะใช้กับคนไข้ที่ไม่ได้ทำความสะอาดช่องปากเป็นเวลานาน

ทางการแพทย์ จะใช้ไซลิทอลกับผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน เนื่องจากการเผาผลาญไซลิทอลจะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของผู้ป่วย และปริมาณอินซูลินในเลือดก็ไม่เปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกัน สำหรับในด้านความปลอดภัย ยังไม่เคยมีรายงานว่าไซลิทอลเป็นสารก่อมะเร็ง จึงนับได้ว่ามีความปลอดภัยมาก เมื่อเทียบกับสารให้ความหวานชนิดอื่นๆ

ไซลิทอลสามารถพบในธรรมชาติ โดยจะพบในผัก และผลไม้ แต่มีในปริมาณที่น้อยไม่คุ้มค่าที่จะทำการผลิตโดยการสกัดจากผักผลไม้ที่มีไซลิทอลเป็นองค์ประกอบ ปัจจุบันการผลิตไซลิทอลในระดับอุตสาหกรรมสามารถทำได้ 2 ทาง คือ กระบวนการทางเคมี โดยการใช้ไซโลสที่ได้จากการย่อยสลายวัสดุที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งจะต้องใช้ต้นทุนในการผลิตที่สูง และผลผลิตที่ได้จะมีสารปนเปื้อนอยู่มาก สำหรับอีกวิธีการหนึ่ง คือ กระบวนการผลิตโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจาก จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในกระบวนการผลิตมี

ความสามารถในการผลิตไซลิทอลสูง อีกทั้งวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการดังกล่าวเป็นวัสดุที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งประสิทธิภาพนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง คือ ชนิดของเชื้อ อายุของหัวเชื้อ ปริมาณเซลเริ่มต้น พีเอช อุณหภูมิ ซึ่งต้องทำการควบคุมให้เหมาะสม เพื่อให้เกิดกระบวนการหมักที่สามารถให้ผลผลิตในปริมาณที่คุ้มค่าในการผลิตต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045
2. เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตน้ำตาลไซลิทอลโดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่ถูกตรึงด้วยเทคนิคการดักจับด้วยโซเดียมอัลจิเนต ในสภาวะที่มีการเติม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆกันลงในอาหารเพื่อการผลิตน้ำตาลไซลิทอล
3. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตน้ำตาลไซลิทอล โดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในรูปเซลล์อิสระกับเซลล์ตรึง ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี การเติม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

เน้นความสามารถในการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 โดยการตรึงเซลล์ ในสภาวะที่มีการเติม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมลงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

1. ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในรูปแบบเซลล์อิสระ และในรูปแบบการตรึงเซลล์

2. ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตไซลิทอล โดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ภายใต้สภาวะที่มีการเติม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Tween 80 ที่จะสามารถให้ปริมาณไซลิทอลสูงสุด

3. ทำการรวบรวมผล และวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง เพื่อคำนวณผลได้ของกระบวนการหมัก อัตราผลผลิต ตลอดจนความเข้มข้นของไซลิทอลที่ได้จากกระบวนการหมักภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตไซลิทอลของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 โดยการตรึงเซลล์ว่าสามารถให้ผลผลิตมากน้อยเพียงใด

2. เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตไซลิทอลของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 โดยการตรึงเซลล์ในระดับอุตสาหกรรม

3. เพื่อให้ทราบถึงผลกระทบที่มีต่อการผลิตน้ำตาลไซลิทอล อันเนื่องมาจากการเติม Tween 80 ลงในอาหารเพื่อการผลิตน้ำตาลไซลิทอล

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

2.1 คุณสมบัติของน้ำตาลไซลิทอล

ไซลิทอล

ไซลิทอลเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่เป็นอนุพันธ์ของไซโลส มีรูปร่างผลึกแบบรอมบิก (สาโรจน์, 2537) และพบได้ตามธรรมชาติในผักผลไม้หลายชนิด (Washuttl และคณะ, 1973) ส่วนการผลิตไซลิทอลเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารนั้น สามารถผลิตได้จากไซโลส โดยกระบวนการเติมไฮโดรเจน หรือผลิตโดยกระบวนการหมักจากวัสดุเหลือทิ้งที่มีไซโลสเป็นองค์ประกอบ (สาโรจน์, 2537)

แหล่งที่พบไซโลสตามธรรมชาติ

ตามปกติไซลิทอลจะเป็นสารตัวกลาง (Intermediate) ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Hollman และ Tonster, 1957) รวมทั้งยังพบได้ในผักผลไม้หลายชนิด ดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบไซลิทอลในผักและผลไม้

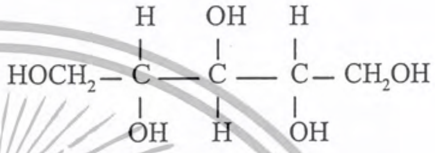
ผักและผลไม้	ปริมาณไซลิทอล (มก./100 กรัม น.น. แห้ง)
Raspberries	268
Strarberries	362
Yellow plums	935
Endives	258
Lettuce	131
Cauliflower	300
Spinach	107
Eggplant	180
Yellow boletus mushroom	128

ที่มา : Emodi (1978)

คุณสมบัติของไซลิทอล

ไซลิทอลมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ ดังนี้

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของไซลิทอล

สูตรโมเลกุล	$C_6H_{12}O_6$
โครงสร้าง	 $\mathrm{HOCH_2 - \underset{OH}{\overset{H}{\overset{\mid}{\underset{\mid}{C}}}} - \underset{H}{\overset{OH}{\overset{\mid}{\underset{\mid}{C}}}} - \underset{OH}{\overset{H}{\overset{\mid}{\underset{\mid}{C}}}} - CH_2OH}$
น้ำหนักโมเลกุล	152.1
รูปร่าง	ผงคริสตัล
สี	สีขาว
รสชาติ	รสหวาน
กลิ่น	ไม่มีกลิ่น
ความหวานสัมพัทธ์ (Relative sweetness)	ไซลิทอล (85-120) มีความหวานโดยประมาณเท่ากับ น้ำตาลซูโครส (100)แต่หวานมากกว่ากลูโคส(70), ไซโลส (67),ซอบิทอล (50) และแมนนิทอล (40) แต่มีความหวานน้อยกว่าฟรุคโตส(150)
จุดหลอมเหลว	93.4 – 94.7 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	216 องศาเซลเซียส
การละลายในน้ำ	64.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
การละลายในเอทธานอล	102 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
การละลายในเมทธานอล	6.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
การดูดความชื้น	ในที่ที่มีความชื้นสูง จะดูดความชื้นได้มากกว่าน้ำตาลซูโครส แต่ดูดความชื้นได้น้อยกว่าซอร์บิทอล
สารปนเปื้อน	แมนนิทอล, ซอร์บิทอล, กาแลคทิทอล, อาราบิทอล

ที่มา : Emodi (1982)

คุณสมบัติอื่น ๆ ของไซลิทอล

1. ไซลิทอลละลายน้ำได้ง่าย ได้สารละลายที่มีความคงตัวสูง แม้ว่าจะถูกความร้อนหรือเก็บไว้นานๆ ก็ไม่เกิดปฏิกริยาที่ทำให้เกิดสีน้ำตาล (maillard browning) และการเกิดคาราเมล (caramelization) เหมือนน้ำตาลฟรุกโทสหรือเด็กซ์โทรส เมื่อใช้ความร้อนสูงกว่า 150 องศาเซลเซียส เนื่องจากไซลิทอลไม่มีหมู่อัลโดสหรือคีโตส

2. ไซลิทอลให้รสชาติดีและเย็นสดชื่น (cooling effect) คล้ายเมนทอลเนื่องจากการ ละลายของไซลิทอลต้องการความร้อน (endothermic dissolution) เพราะไซลิทอลมีค่าความร้อนจำเพาะของการละลายเป็นลบ (negative heat of solution) เท่ากับ –34.8 แคลอรี่ / กรัมดัง ตารางที่ 3 โดยคุณสมบัติจะเกิดขึ้นเมื่อไซลิทอลอยู่ในรูปผลึกเท่านั้น แต่เมื่อไซลิทอลอยู่ในรูปสารละลายหรืออยู่ในรูปอสันฐาน (amorphous) จะไม่ให้คุณสมบัติข้อนี้

ตารางที่ 2.3 ค่าความร้อนจำเพาะของการละลายของน้ำตาลชนิดต่างๆ

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

ที่มา : Arron (1993)

3. ไซลิทอลมีความหวานเช่นเดียวกับน้ำตาลทั่วไป แต่มีความหวานมากกว่าแมนนิทอลและซอร์บิทอล 2.5 และ 2 เท่าตามลำดับ ความหวานของ ไซลิทอล เมื่อเทียบกับซูโครสจะมีตั้งแต่ 0.85-1.25 เท่า ขึ้นอยู่กับค่าพีเอช ความเข้มข้นและอุณหภูมิ เป็นต้น ตัวอย่างเช่น ไซลิทอลที่มีความเข้มข้น 10เปอร์เซ็นต์จะมีความหวานเท่ากับน้ำตาลซูโครสที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อความเข้มข้นมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์สารละลายไซลิทอลจะหวานมากกว่าแต่ถ้าความเข้มข้นน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์สารละลายซูโครสจะหวานมากกว่า หรือความหวานสัมพัทธ์ (Relative sweetness) ของไซลิทอล เมื่อเทียบกับซูโครสจะลดลงจาก 103 เป็น 78

เมื่อเพิ่มอุณหภูมิของสารละลายไซลิทอลที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ จาก 5 องศาเซลเซียส เป็น 50 องศาเซลเซียส เป็นต้น

4. ไซลิทอลให้พลังงานต่ำกว่าแต่คงรสชาติเดิมเมื่อผสมกับสารให้ความหวานชนิดอื่น แม้ว่าไซลิทอลจะให้พลังงานเท่ากับคาร์โบไฮเดรตทั่วไป (4.06 กิโลแคลอรี/กรัม) แต่เมื่อใช้ไซลิทอลร่วมกับสารให้ความหวานชนิดอื่นๆ ความหวานและรสชาติก็จะคงเดิมขณะที่ลดแคลอรีลงได้ 50-70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีการใช้ในเครื่องดื่มหลายชนิด เหมาะกับผู้บริโภคที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก (dietary purpose)

5. ไซลิทอลไม่ทำให้ฟันผุเนื่องจากจุลินทรีย์ในช่องปากโดยเฉพาะ *Streptococcus mutans* ไม่สามารถใช้ไซลิทอลเป็นแหล่งอาหารได้ ทำให้สภาพพีเอชบนเคลือบฟันไม่ต่ำกว่า 5.7 จึงไม่ทำให้เกิดฟันผุ

6. ไซลิทอลสามารถใช้ในผู้ป่วยเบาหวานได้ เนื่องจากการเผาผลาญไซลิทอลไม่ขึ้นกับอินซูลิน ดังนั้นจึงไม่ทำให้เกิดสภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) และ น้ำตาลในเลือดต่ำ (hyperglycemia)

7. ไซลิทอลช่วยยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากจุลินทรีย์ไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่สามารถใช้ไซลิทอลได้ผลิตภัณฑ์ที่มี ไซลิทอลเป็นองค์ประกอบจึงเกิดการหมักโดยจุลินทรีย์ได้ยากทำให้มีอายุการเก็บที่นานขึ้น (long shelf-life)

ข้อจำกัดในการใช้ไซลิทอล

1. การบริโภคไซลิทอลเป็นปริมาณมากในคราวเดียวจะทำให้ท้องเสีย (gastrointestinal distress and osmotic diarrhea)ได้ เนื่องจากไซลิทอลมีคุณสมบัติเป็นยาระบาย เพราะไซลิทอลมีคุณสมบัติเหมือนคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ คือดูดซับน้ำไว้อย่างช้าๆ ดังนั้นเมื่อบริโภคเป็นครั้งแรกควรบริโภคในปริมาณต่ำก่อน (30 กรัม / วัน) และค่อยๆ เพิ่มปริมาณขึ้น แต่จะบริโภคได้ สูงสุดราว 200-300 กรัม/วัน

2. การใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อให้มีรสชาติเย็นสดชื่นนั้น จะต้องใช้ ไซลิทอลที่อยู่ในรูปผลึกเท่านั้น ซึ่งอาจจะทำให้เกิดลักษณะผิวสัมผัสที่เปลี่ยนแปลงไป หรือไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคได้

3. ไซลิทอลมีราคาแพงเมื่อเทียบกับสารให้ความหวานชนิดอื่น เนื่องจากต้นทุนที่ใช้ในการผลิตสูง ทำให้การใช้ไซลิทอลไม่แพร่หลายเท่าที่ควร และแม้ว่าไซลิทอลจะสามารถใช้ในผู้ป่วยเบาหวานได้แต่ในอาหารสำหรับผู้ป่วยเบาหวานก็ใช้ฟรุกโทสแทนเพราะมีราคาถูก และไม่เกิดผลข้างเคียงเหมือนกับเมื่อใช้ไซลิทอล

การใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหาร

มีแนวโน้มการใช้ไซลิทอลในอุตสาหกรรมอาหารอย่างกว้างขวาง ในผลิตภัณฑ์อาหารพวกขนมอบ แยม มาร์มาเลด และ ผลิตภัณฑ์ขนมหวาน เป็นต้น เนื่องจาก ไซลิทอลมีคุณสมบัติที่สามารถใช้ทดแทนน้ำตาลธรรมดาได้ และยังมีข้อดีในแง่ไม่ทำให้เกิดฟันผุเมื่อบริโภคเหมือนน้ำตาลทั่วไป แต่ทว่าการใช้ไซลิทอลยังมีข้อจำกัดอยู่บ้าง โดยเฉพาะในเครื่องดื่มประเภทน้ำอัดลม ซึ่งผู้บริโภคมีโอกาสจะได้รับไซลิทอลปริมาณสูงเกินไปทำให้ท้องเสียได้ หรือสภาพอันหลากหลายของผลึกไซลิทอล (น้ำตาลซูโครสมีผลึกแบบ monoclinic แต่ไซลิทอลมีผลึกแบบ rhombic) อาจทำให้เนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์มีลักษณะแข็งกระด้าง อย่างไรก็ตามข้อจำกัดเหล่านี้กล่าวได้ว่าเป็นปัญหารองเมื่อเทียบกับประโยชน์ที่ได้รับจากการทดแทนน้ำตาลซูโครสด้วยไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหารทั้งหลาย ซึ่งโดยปกติมักจะให้คุณภาพที่ทัดเทียมกันหรือดีกว่า เช่น คุณภาพที่เย็นสดชื่น ซึ่งช่วยเพิ่มรสชาติของเปปเปอร์มินท์ รสมะนาว และรสผลไม้ต่างๆ

ตัวอย่างของการใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหารมีดังนี้

1. ท๊อฟฟี่และคาราเมล(Toffees and Caramels)

เนื่องจากไซลิทอล ไม่มีคุณสมบัติทาง maillard browning และ caramelization จึงจำเป็นต้องเติมน้ำตาลฟรุคโทสเพื่อคงคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์เอาไว้ หรืออาจเติมสีและกลิ่นดังกล่าวทดแทนก็ได้ และเพื่อป้องกันการเกิดการตกผลึกของไซลิทอลซึ่งจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีเนื้อสัมผัสแข็งกระด้าง ควรหลีกเลี่ยงการใช้มอลโตเด็กซ์ตริน (maltodextrin) และ ไลเคซีน (lycasein) เป็นส่วนผสมด้วย ซึ่งพบว่าอนุพันธ์ของแป้งดังกล่าวมีผลต่อการตกผลึกของไซลิทอลได้

2. ช็อคโกแลต (Chocolate)

สามารถใช้ไซลิทอลในการผลิตช็อคโกแลตทดแทน น้ำตาลซูโครสได้ในอัตรา 1 ต่อ1 แต่จำเป็นต้องใช้สารเติมแต่ง (additives) ช่วยเนื่องจากไซลิทอลให้ความหนืดต่ำกว่าปริมาณไซลิทอลที่ใช้ในช็อคโกแลตมีตั้งแต่ 17-42 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบปัญหาเกี่ยวกับเนื้อสัมผัสและรสชาติของผลิตภัณฑ์แต่อย่างไร

3. หมากฝรั่ง(Chewing gum)

ปกติหมากฝรั่งจะประกอบด้วยน้ำตาล 50-75 เปอร์เซนต์และน้ำ 3-5 เปอร์เซ็นต์ และมีส่วนผสมของกลูโคสไซรัปเป็นตัวทำให้เนื้อสัมผัสนุ่ม (softenner) ไซลิทอลสามารถใช้แทนน้ำตาลซูโครสได้ในอัตรา1ต่อ1 ยกเว้นซอร์บิทอลและแมนนิทอลซึ่งมีความหวานน้อยกว่า จะต้องเติมสารให้ความหวานที่ไม่ให้พลังงาน(non-caloric sweetener) ชนิดอื่นแทนเพื่อให้ได้ความหวานเท่าเดิม แต่เนื่องจากไซลิทอลมีความหนืด (viscosity) น้อยกว่าน้ำตาลซูโครสจึงต้องใช้กัมอาราบิค

(gum arabic) เป็นส่วนผสมด้วย ความแตกต่างของหมากฝรั่งชนิดใช้ไซลิทอลกับชนิดใช้น้ำตาลซูโครส คือ ชนิดไซลิทอลจะให้ความรู้สึกเย็นเมื่อเริ่มเคี้ยวเท่านั้นเองเนื่องจากอิทธิพลของ cooling effect ซึ่งเป็นคุณสมบัติของไซลิทอล และจากการศึกษาของ Scheinin และคณะ (1975) พบว่าหมากฝรั่งชนิดใช้ไซลิทอลสามารถป้องกันการเกิดฟันผุซึ่งมักพบกับผู้เคี้ยวหมากฝรั่งชนิดใช้น้ำตาลธรรมดาเป็นสารให้ความหวานได้

4. พุดดิ้ง (Pudding)

การผลิตพุดดิ้งไม่มีการเปลี่ยนแปลงสูตร แต่อย่างไรเมื่อใช้แทนไซลิทอลน้ำตาลซูโครส และไม่มีผลต่อรสชาติผลิตภัณฑ์

5. เจลาติน (Gelatin desserts)

การใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์เจลาตินมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารให้ความหวาน

6. ผลิตภัณฑ์ขนมอบ (Bakery Goods)

พบว่าการใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์ขนมอบนั้น ไม่จำเป็นต้องมีการเปลี่ยนแปลงสูตรขนม แต่อย่างไร แต่อาจจะต้องเติมน้ำตาลฟรุตโทส เพื่อรักษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการการเกิด millard browning และ caramelization นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการปริมาตร จากการหมักของยีสต์ *Saccharomyces cerevissiae* กับน้ำตาลนั้น อาจจะไม่เหมาะสมนักสำหรับการใช้ไซลิทอล เพราะผลิตภัณฑ์ขนมอบที่ใช้ไซลิทอลนั้นจะมีปริมาตรน้อยกว่าและมีเนื้อสัมผัสที่แน่นกว่า (dense texture) อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ขนมอบที่ใช้ไซลิทอลเหมาะสมมากสำหรับคนที่เป็นโรคเบาหวาน และป้องกันฟันผุได้เป็นอย่างดี

7. แยม เยลลี่ และมาร์มาเลด (Jams Jellies and Marmalades)

กรณีนี้ไซลิทอลสามารถใช้ทดแทนน้ำตาลซูโครสได้เช่นกันในอัตราส่วน1ต่อ1 แต่ควรหลีกเลี่ยงการใช้ไซลิทอลมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะทำให้เกิดการตกผลึกของไซลิทอลได้ในระหว่างการเก็บรักษา(storage) และไม่มีความจำเป็นต้องเติมสารกันบูด(preservatives) แต่อย่างใด เพราะจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดการเสีย (spoilage) ของผลิตภัณฑ์ไม่สามารถใช้ไซลิทอลเป็นแหล่งอาหารได้เช่นน้ำตาลอื่นทั่วไป แต่ควรเติมปริมาณของเพคติน (pectin) มากขึ้น เพราะไซลิทอลให้ความหนืดต่ำกว่าน้ำตาลซูโครส และมีความจำเป็นต้องเติมเกลือแคลเซียม เพื่อช่วยในการเกิดเจล (gelatinization) ของแยม (Hyvoenen, 1982) นอกจากนี้ยังพบว่าแยมและมาร์มาเลดที่ใช้ไซลิทอล จะให้รสชาติที่ดีกว่าน้ำตาลซูโครสรวมทั้งให้ความคงตัวของสีที่ดีกว่าอีกด้วย (Manz และคณะ, 1973)

8. ลูกกวาด (Hard Candy or Boiled Sweets)

ลูกกวาดจัดเป็นผลิตภัณฑ์อีกชนิดหนึ่งที่เด็ก ๆ ชอบและเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดฟัน-ผุ การใช้ไซลิทอลเป็นสารให้ความหวานแทนน้ำตาลจึงมีเหตุที่ควรสนับสนุน พร้อมทั้ง cooling effect ของไซลิทอลยังช่วยทำให้คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ดีขึ้นและรสชาติที่ยอมรับ การใช้ซอร์บิทอลแทนซึ่งมีความหวานน้อยกว่าไซลิทอลจะต้องใช้ปริมาณที่มากว่าหรืออาจต้องเติมสารให้ความหวานชนิดอื่นทดแทนด้วย ในการผลิตลูกกวาดชนิดไซลิทอลอาจมีปัญหาอยู่บ้างเนื่องจากการตกผลึกของไซลิทอลเกิดในขณะทำให้เย็นและความหนืดที่ต่ำ จึงต้องผลิตลูกกวาดโดยการอัดลูกกวาดร้อนเข้าแม่พิมพ์ (depositing) แทน

9. เค็ทชัปและนมข้นหวาน (Ketchup and Condensed Milk)

การใช้ไซลิทอลจะปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ คือ ป้องกันการเกิด browning และการเสียโดยจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี

10.ซอสและอื่นๆ (Marinade Sauces and Pastes)

เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลต่ำ ฉะนั้นการทดแทนน้ำตาลด้วยไซลิทอลจึงไม่ประสบปัญหาแต่อย่างไร

11. โยเกิร์ต (Yoghurt)

จากการศึกษาว่าปริมาณไซลิทอลที่ใช้ 8 เปอร์เซ็นต์ จะเหมาะสมที่สุดสำหรับการทำโยเกิร์ต (Hyvoenen และคณะ, 1982) โดยที่การเติมไซลิทอลหลังการบ่มจะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์ แต่ถ้าเติมไซลิทอลก่อนการบ่ม ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีค่าพีเอช 4.4 สูงกว่ากรณีที่ใช้น้ำตาลซูโครส ซึ่งมีค่าพีเอช 4 และผลิตภัณฑ์จะมีลักษณะหนืดน้อยกว่า อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างเกี่ยวกับการยอมรับของผู้บริโภค (Sensory evaluation)

12.เครื่องดื่ม (Drinks)

เนื่องจากการได้รับ ไซลิทอล ในขณะเดียวกันมากเกินไปจะทำให้ ท้องเสียได้ (laxative effect) จึงต้องใช้ไซลิทอลในรูปผสมกับสารให้ความหวานตัวอื่น ๆ ตัวอย่างเช่น เมื่อใช้ไซลิทอล 3.9 เปอร์เซ็นต์และไซคลาเมท (cyclamate) 0.133 เปอร์เซ็นต์ แทนน้ำตาลในผลิตภัณฑ์น้ำอัดลมจะสามารถลดพลังงานที่ร่างกายจะได้รับถึง 60 เปอร์เซ็นต์ (Hyvoenenและคณะ, 1982) จึงนับเป็นเครื่องดื่มที่เหมาะสมต่อคนเป็นโรคเบาหวานและคนที่ต้องการควบคุมน้ำหนักส่วนนมสเตอริไรซ์ยูเอชทีรสช็อคโกแลตเหมาะที่จะใช้ไซลิทอล 4 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่ทำให้คุณสมบัติทางกายภาพ เช่น ความหนืดและสีเปลี่ยนไป และยังเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค การเก็บรักษากว่าหนึ่งเดือนที่อุณหภูมิห้องก็ไม่ทำให้ผลิตภัณฑ์เสื่อมคุณภาพแต่อย่างไร

13.ไอศกรีม (Icecreams)

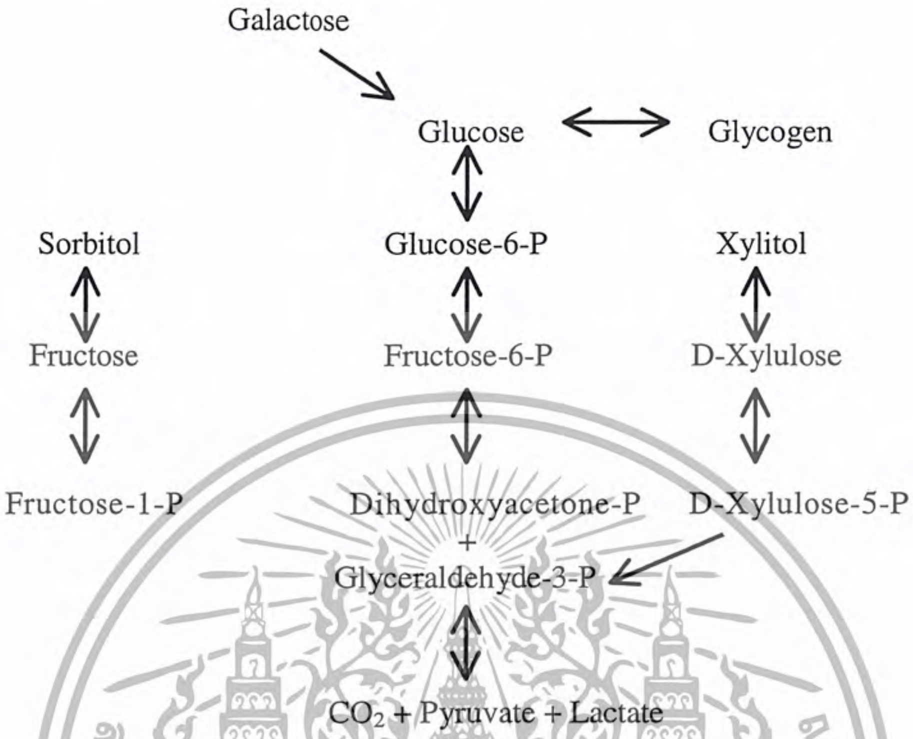
การใช้ไซลิทอลแทนน้ำตาลซูโครส กลูโคสไซรัป หรือน้ำตาลอินเวอร์ต (invert -sugars) ในผลิตภัณฑ์แช่แข็งจะทำให้คุณสมบัติทางการหลอมเหลว (melting properties) ของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนไป คือ ที่อุณหภูมิเดียวกัน ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ไซลิทอลจะมีคุณลักษณะอ่อนตัวกว่า จึงจำเป็นต้องมีการเติมสารช่วยทำให้แข็ง (Thickeners) สำหรับไอศกรีมที่ใช้ไซลิทอลนั้นไม่พบว่าการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติเมื่อเก็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

14.ผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรม (Pharmaceutical Preparations)

ไซลิทอลมีข้อได้เปรียบคือไม่ทำให้เกิดฟันผุ (Non-canogenicity) และไม่เกิดการหมักด้วยจุลินทรีย์ (Non-fermentability)จึงมีการใช้เป็นสารให้ความหวานในการเตรียมผลิตภัณฑ์ชนิดเหลวทางเภสัชกรรม และการใช้ยาดังกล่าวของคนไข้ที่ไม่ได้ทำความสะอาดช่องปากเป็นเวลานานจึงไม่มีผลต่อการทำให้ เกิดฟันผุนอกจากนี้การใช้ ไซลิทอลซึ่งไม่มีโครงสร้างของกลุ่มคาร์บอนิล(carbonyl groups) เช่น น้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหลาย จึงไม่มีผลต่อปฏิกิริยาทางเคมี ทำให้สารละลายที่เตรียมขึ้นมีความคงตัว

เมทาบอลิซึมของไซลิทอลในร่างกายมนุษย์

เมทาบอลิซึมของไซลิทอลในร่างกายจะเกิดขึ้นที่สองตำแหน่ง คือ การดูดซึมบริเวณลำไส้โดยกระบวนการ Passive diffusion และเกิดการเผาผลาญโดยตรงที่ตับ (Smith, 1962) การดูดซึมจะเป็นไปอย่างช้าๆ ในกรณีที่ได้รับไซลิทอลในปริมาณที่มากเกินไป การดูดซึมที่เกิดขึ้นจะไม่สมบูรณ์ทำให้เกิดอาการท้องร่วงได้ สำหรับปริมาณไซลิทอลที่แนะนำให้บริโภคในแต่ละวัน คือ ไม่เกิน 60 กรัมต่อวัน แต่ถ้าบริโภคติดต่อกันนานจะสามารถบริโภคไซลิทอลได้มนปริมาณมากถึง 120 กรัมต่อวันส่วนการเผาผลาญไซลิทอลที่ตับนั้น ไซลิทอลจะถูกออกซิไดซ์เป็น ดี-ไซลูโลส (D-Xylulose) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็น ดี-ไซลูโลส-5-ฟอสเฟต (D-Xylulose-5-phosphate) ต่อไป แล้วเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตเพื่อเปลี่ยนเป็นฟรุคโตส-6-ฟอสเฟต(Fructose-6-phosphate) แล้วกลายเป็นกลูโคสซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไกลโคเจนสะสมไว้ที่ตับต่อไป ดังภาพที่ 2.1


Galactose
Glucose
Glycogen
Sorbitol
Glucose-6-P
Xylitol
Fructose
Fructose-6-P
D-Xylulose
Fructose-1-P
Dihydroxyacetone-P
+
Glyceraldehyde-3-P
D-Xylulose-5-P
CO_2 + Pyruvate + Lactate

ภาพที่ 2.1 : เมทาบอลิซึมของไซลิทอลในร่างกายมนุษย์
ที่มา : Emodi (1982)

และเนื่องจากการเผาผลาญไซลิทอลไม่ขึ้นกับอินซูลิน ดังนั้นจึงไม่เกิดสภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (Hyperglycemia) หรือน้ำตาลในเลือดต่ำ (Hypoglycemia) และไซลิทอลให้พลังงานเพียง 4 กิโลแคลอรี่ เท่ากับคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น ทำให้มีผลต่อปริมาณกลูโคสในเลือดเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

การผลิตไซลิทอล

จากที่กล่าวมาสามารถประยุกต์ใช้ไซลิทอลเป็นสารให้ความหวานแทนน้ำตาลในผลิตภัณฑ์อาหารได้อย่างกว้างขวาง ปัจจุบันก็ได้มีการใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหารแพร่หลายมากขึ้น โดยเฉพาะหมากฝรั่ง และพบว่ามีแนวโน้มที่จะใช้ไซลิทอลมากในอุตสาหกรรมประเภทขนมหวาน (Confectionary) และขนมขบเคี้ยว (Snack products) แต่การใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวยังมีข้อจำกัดอยู่ที่การผลิตไซลิทอลมีต้นทุนการผลิตสูงกว่ากระบวนการผลิตน้ำตาล เพราะต้องอาศัยการผลิตทางเคมี ที่ต้องใช้ต้นทุนในการผลิต สูง และค่าใช้จ่ายในการทำให้บริสุทธิ์ก็ค่อนข้างสูงมาก จึงทำให้ราคาของไซลิทอลแพงกว่าน้ำตาลทั่วไป อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้มีการทำการค้นคว้าวิจัยเพื่อลดต้นทุนการผลิตไซลิทอลโดยวิธีการหมัก โดยการนำเอาวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มี

ไซโลสเป็นองค์ประกอบมาใช้เป็นวัตถุดิบ ซึ่งคาดว่าจะทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำกว่ากระบวนการผลิตโดยวิธีทางเคมี (Hydrogenation) ได้ การผลิตไซลิทอลมีหลายวิธี และสามารถใช้วัตถุดิบได้หลายชนิด เช่น ฟางข้าว ซังข้าวโพด ชานอ้อย เป็นต้น เศษวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมไม้ และกระดาษ หรืออาจจะใช้น้ำตาลไซโลสเป็นวัตถุดิบโดยตรงก็ได้ ซึ่งวัตถุแต่ละชนิดก็จะมีกรรมวิธีแตกต่างกันออกไป ดังภาพที่ 2.2

วิธีต่างๆที่ใช้ในการผลิตไซลิทอล

1. การสกัดจากผัก และผลไม้

เนื่องจากไซลิทอลสามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติในผัก และผลไม้ เช่น มะเขือยาว ผักโขม ราสเบอรี่ และสตรอว์เบอรี่

2. การผลิตด้วยวิธีทางเคมี

เป็นการผลิตที่ปัจจุบันใช้ผลิตไซลิทอลในระดับอุตสาหกรรม และใช้วัตถุดิบที่เป็นน้ำตาลไซโลส ซึ่งได้จากวัสดุที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ ประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

2.1 การไฮโดรไลซิส

เป็นการสกัดน้ำตาลไซโลส จากเฮมิเซลลูโลสโดยใช้กรดซัลฟูริกเจือจาง ซึ่งวิธีที่เป็นที่นิยม คือ อัลตร้าฟาสท์ ไฮโดรไลซิส (Ultrafast hydrolysis) ที่ใช้กรดซัลฟูริกเจือจาง 0.5-1.0 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 200-210 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วินาที ซึ่งจะได้น้ำตาลไซโลสออกมา

2.2 การทำน้ำตาลไซโลสให้บริสุทธิ์

เมื่อผ่านกระบานการไฮโดรไลซิสแล้ว จะได้น้ำตาลไซโลสอยู่ในไฮโดรไลเซท (Hydrolysate) ซึ่งสามารถทำให้บริสุทธิ์ ได้ 2 วิธี คือ

2.2.1 แบบแยกน้ำตาลไซโลส วิธีนี้จะกำจัดสารแขวนลอย ตะกอน สี และไอออนอื่นๆ และใช้วิธีทางโครมาโตกราฟฟี เพื่อแยกเอาน้ำตาลไซโลสออกมาจากน้ำตาลชนิดอื่นๆ เพื่อให้ได้น้ำตาลไซโลสบริสุทธิ์

2.2.2 แบบไม่แยกน้ำตาลไซโลส วิธีนี้จะแยกเอาสารอื่นๆ พวกตะกอน ไอออน และสีออก แต่ไม่แยกเอาน้ำตาลชนิดอื่นออกไป สารละลายที่ได้จึน้ำตาลหลายชนิด เป็นองค์ประกอบ แต่มีน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก

2.3 การไฮโดรจีเนชัน

เป็นการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสให้เป็นไซลิทอล ภายใต้สภาวะที่มีความดัน 50 บรรยากาศ อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2.5 ชั่วโมง โดยใช้โลหะนิกเกิลเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในขั้นนี้ ซึ่งถ้ามีน้ำตาลอื่นเจือปนอยู่น้ำตาลเหล่านั้นก็จะเปลี่ยนเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ด้วย

2.4 การทำไซลิทอลให้บริสุทธิ์

สารละลายน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ได้ จะต้องนำมาผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ โดยนำมากรองแยกเอาโลหะนิกเกิลออก แล้วแยกเอาไซลิทอลออกมาโดยวิธีทางโครมาโตกราฟฟี จากนั้นทำการตกผลึกไซลิทอลจะได้ไซลิทอลที่มีความบริสุทธิ์ 99 เปอร์เซ็นต์

แม้ว่าการผลิตไซลิทอลด้วยวิธีทางเคมี จะเป็นวิธีที่ใช้กันในทางอุตสาหกรรมทั่วไป แต่ต้นทุนในการผลิตก็ยังคงสูงอยู่ เนื่องจากขั้นตอนในการแยก และการทำให้บริสุทธิ์ยังทำได้ยาก ทำให้ไซลิทอลมีราคาแพง และไซลิทอลที่ได้ก็มีความบริสุทธิ์ต่ำ จึงทำให้มีการคิดค้นวิจัยเพื่อทำการผลิตไซลิทอล ด้วยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพขึ้นมาทดแทนวิธีการผลิตทางเคมี

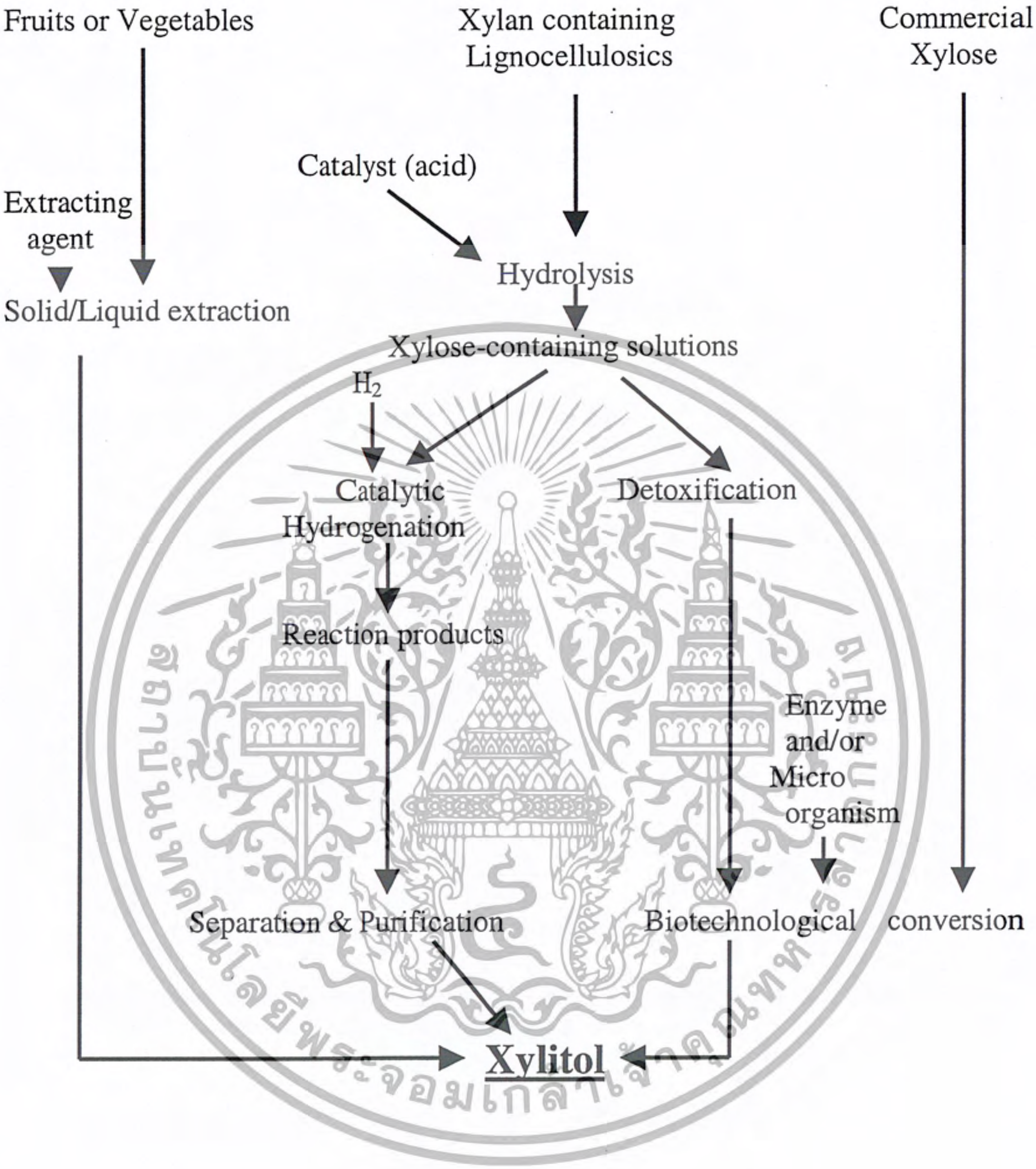
3. การผลิตด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ

การผลิตไซลิทอลโดยใช้กระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ เป็นที่สนใจเนื่องจากมีแนวโน้มที่จะสามารถนำมาทดแทนการผลิตโดยวิธีทางเคมีที่มีต้นทุนสูงได้ การผลิตไซลิทอลโดยวิธีนี้จะใช้เอนไซม์ หรือจุลินทรีย์ในการผลิตไซลิทอล แต่กระบวนการผลิตโดยใช้เอนไซม์นั้นค่อนข้างยุ่งยาก และไม่เป็นที่นิยมเท่ากระบวนการผลิตโดยใช้จุลินทรีย์ มีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้หลายชนิด ตัวอย่างเช่น แบคทีเรีย ได้แก่ *Corynebacterium sp., Mycobacterium smegmatis* รา ได้แก่ *Petromyces albertensis* แต่จุลินทรีย์ที่นิยมที่สุดในการผลิตไซลิทอล คือ ยีสต์ ซึ่งมียีสต์อยู่หลายชนิดที่มีความสามารถในการผลิตไซลิทอล เช่น *Candida tropicalis, C. guilliermondii, C. boidmii* และ *Debaryomyces hansenii* เป็นต้น

กระบวนการเมตาบอลิซึมในการผลิตไซลิทอลโดยจุลินทรีย์

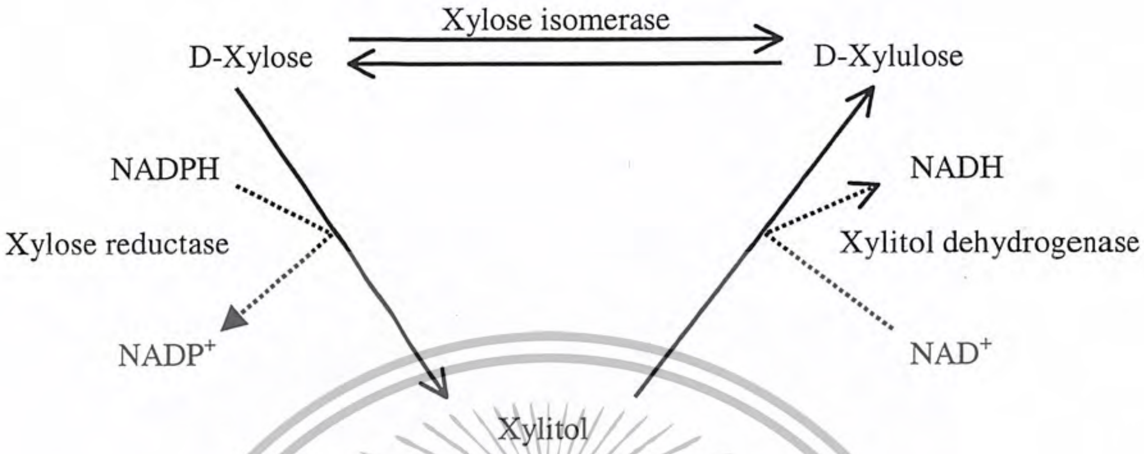
Hofer และคณะ (1971) รายงานว่าการเกิดไซลิทอลจากไซโลสในจุลินทรีย์สามารถเกิดได้ 2 วิธี คือ

1. ไซโลสจะเปลี่ยนไปเป็นไซลิทอลโดยตรง โดยเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส ที่มี NADPH เป็นโคเอนไซม์
2. ไซโลสถูกเปลี่ยนไอโซเมอร์ไปเป็นไซโลสก่อนด้วยเอนไซม์ไอโซเมอเรส จากนั้นจึงจะถูกรีดิวส์ ไปเป็นไซลิทอลโดยเอนไซม์ไซลูโลสรีดักเทส โดยมี NADH เป็นโคเอนไซม์ ดังภาพที่ 3


Fruits or Vegetables
Xylan containing Lignocellulosics
Commercial Xylose
Catalyst (acid)
Extracting agent
Hydrolysis
Solid/Liquid extraction
Xylose-containing solutions
H2
Catalytic Hydrogenation
Detoxification
Reaction products
Enzyme and/or Micro organism
Separation & Purification
Biotechnological conversion
Xylitol

ภาพที่ 2.2 วิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตไซลิทอล

ที่มา : Parajo และคณะ (1998)



ภาพที่ 2.3 วิถีการเกิดไซลิทอลจากเมตาบอลิซึมของไซโลส
ที่มา : Hofer และคณะ (1971)

Bobosa และคณะ (1988) ได้ศึกษาเมทาบอลิซึมของไซโลสในยีสต์ ดังภาพที่ 2.3 เพื่อคำนวณหาผลได้ทางทฤษฎีของการเปลี่ยนไซโลสโดยพิจารณาจาก 4 สภาวะ คือ

1. โคเอนไซม์ 2 ชนิดเข้าไปเกี่ยวข้องกับสองขั้นตอนแรกของกระบวนการสลายไซโลสดังนี้ คือ การรีดิวซ์ไซโลสไปเป็นไซลิทอลด้วยเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสนั้นใช้โคเอนไซม์ NADPH ส่วนการออกซิไดซ์ไซลิทอลไปเป็นไซลูโลสด้วยเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสนั้นใช้โคเอนไซม์ NAD$^+$

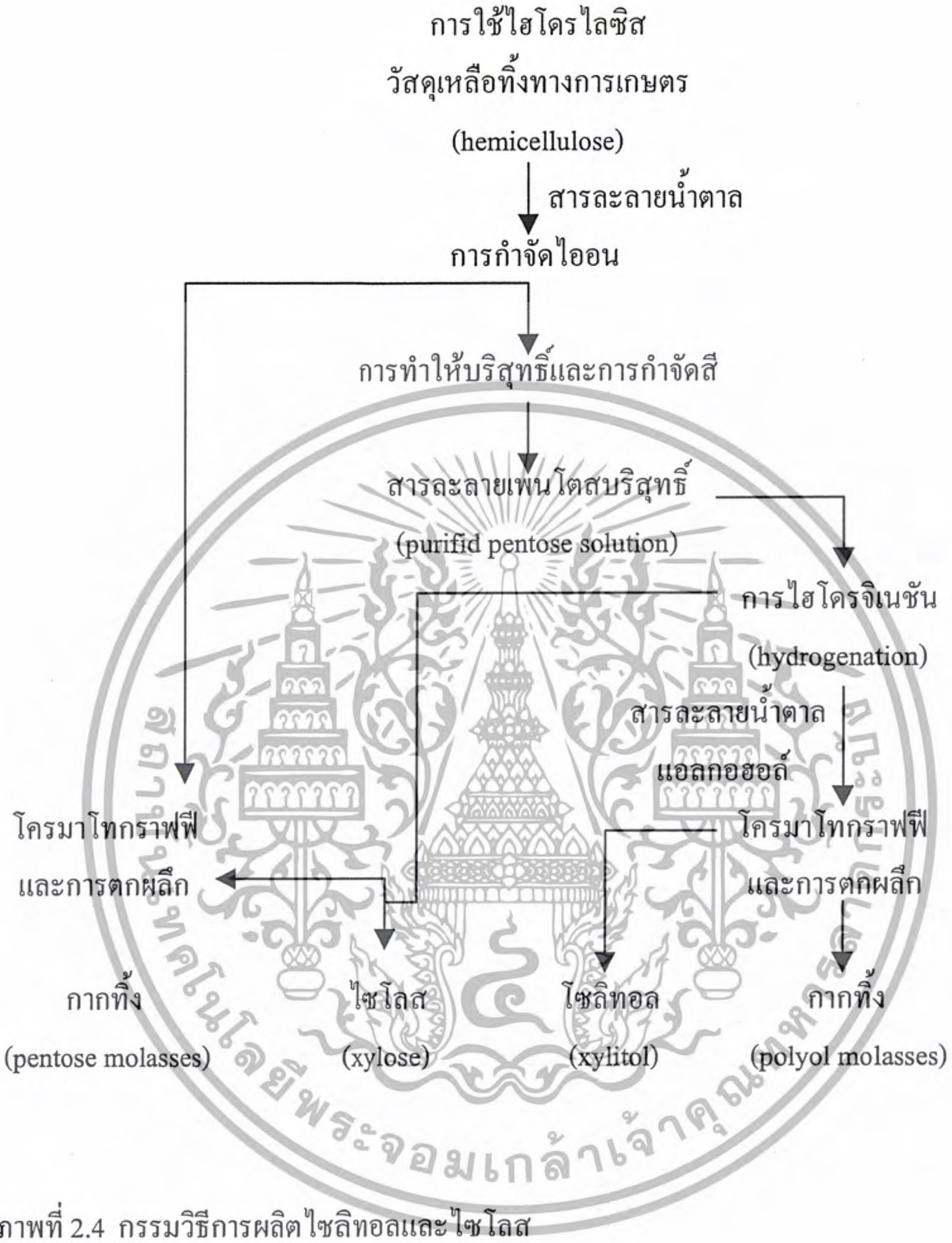
2. ไซโลสทั้งหมดถูกรีดิวซ์ไปเป็นไซลิทอล โดยที่โคเอนไซม์ NADPH นี้สังเคราะห์มาจากวัฏจักรเพนโตส และไซลิทอลทั้งหมดถูกออกซิไดซ์ไปเป็นไซลูโลส โดยที่โคเอนไซม์ NAD$^+$ นี้สังเคราะห์มาจากกระบวนการหายใจ

3. ยีสต์ไม่มีกลไกการเปลี่ยนไปมาระหว่าง NADH และ NADPH ได้เนื่องจากไม่มีกระบวนการเปลี่ยนระหว่างโคเอนไซม์ทั้งสอง

4. ภายใต้สภาวะที่เซลล์ไม่มีการเจริญเติบโต ไซลิทอลจะถูกออกซิไดซ์เพื่อการสังเคราะห์ NADPH เท่านั้น ส่วนไซลิทอลที่เหลือจะถูกปล่อยออกมานอกเซลล์

แต่วิธีโดยทั่วไปที่เป็นวิถีในการเปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลิทอล ก็คือ วิถี Oxido-reduction ซึ่งมีการศึกษาวิถีนี้ในยีสต์หลายชนิด Furlan และคณะ (1994) รายงานว่ากระบวนการดังกล่าวจะเกิดขึ้นได้ ต้องอาศัยโคเอนไซม์จากกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง


การใช้ไฮโดรไลซิส
วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร
(hemicellulose)
สารละลายน้ำตาล
การกำจัดไอออน
การทำให้บริสุทธิ์และการกำจัดสี
สารละลายเพนโตสบริสุทธิ์
(purifid pentose solution)
การไฮโดรจิเนชัน
(hydrogenation)
สารละลายน้ำตาล
แอลกอฮอล์
โครมาโทกราฟฟี
และการตกผลึก
โครมาโทกราฟฟี
และการตกผลึก
กากทิ้ง
(pentose molasses)
ไซโลส
(xylose)
ไซลิทอล
(xylitol)
กากทิ้ง
(polyol molasses)

ภาพที่ 2.4 กรรมวิธีการผลิตไซลิทอลและไซโลส

ที่มา : Melaja และ Haemaelaeine (1977)

47305

1. กระบวนการเมตาบอลิซึมของการผลิตไซลิทอลในยีสต์

ยีสต์จะใช้น้ำตาลไซโลส มาเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟตเพื่อเข้าสู่วิถีอื่นต่อไป โดยเมื่อน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ ยีสต์จะถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลสโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชัน(Oxido-reduction) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไซโลสโดยใช้วิธีนี้ จะพบในจุลินทรีย์พวกยูคาริโอต (Eukaryote) โดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องสองชนิด คือ เอนไซม์ไซโลสรีดักเทส (Xylose reductase : XR) ซึ่งมีโคเอนไซม์ NADPH ร่วมในการทำปฏิกิริยารีดิวซ์ไซโลสไปเป็นไซลิทอล และเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส (Xylitol dehydrogenase : XDH) ซึ่งใช้ $NAD(P)^+$ เป็นโคเอนไซม์ จะออกซิไดซ์ไซลิทอลที่เกิดขึ้นให้กลายเป็นไซลูโลส (Smiley และ Bolen, 1982) และเมื่อยีสต์เปลี่ยนไซโลสให้กลายเป็นไซลูโลสแล้ว ไซลูโลสก็จะถูกเปลี่ยนไปเป็น ไซลูโลส-5-ฟอสเฟต (Xylulose-5-phosphate)โดยปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชั่น(Phosphorylation) โดยเอนไซม์ไซลูโลสไคเนส (Xylulose kinase) แล้วไซลูโลส-5-ฟอสเฟต จะเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟต ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยมีตัวเร่งปฏิกิริยาหลักๆ 2 ตัว คือ $NADP^+$ เชื่อมกับกลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (GPDH) และ $NADP^+$ เชื่อมกับกลูโคส-6-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (PGDH) จะอธิบายการเจริญของยีสต์โดยใช้ไซโลส เปรียบเทียบกับการเจริญโดยใช้กลูโคส และอีกทางหนึ่งเมื่อเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟต ไซลูโลส-5-ฟอสเฟตก็จะเปลี่ยนเป็นน้ำตาลฟอสเฟตต่างๆ เช่น กลีเซอรัลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (G3P) และฟรุคโตส-6-ฟอสเฟต (F6P) แล้วเข้าสู่วิถีเอมเดน เมเยอร์ฮอฟ (Embden-Meyerhof-Panas : EMP) เพื่อสร้างไพรูเวทเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ เพื่อสร้างพลังงานและเซลต่อไป อีกวิถีหนึ่งไซลูโลส-5-ฟอสเฟตจะเปลี่ยนเป็นกลีเซอรัลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต และอะเซทิลฟอสเฟต (Acetyl phosphate) โดยเอนไซม์ไซลูโลส-5-ฟอสเฟตฟอสโฟคีโตเลส (Xylulose-5-phosphate phosphoketolase) กลีเซอรัลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต จะเข้าสู่วิถี เอมเดน เมเยอร์ฮอฟ (Embden-Meyerhof-Panas : EMP) ส่วนอะเซทิลฟอสเฟต (Acetyl phosphate) จะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิเตท ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงได้สองทาง คือ เป็นอะเซทิลโคเอ (Acetyl-CoA) เข้าสู่วัฏจักรเครบส์ต่อไป กับการเปลี่ยนเป็นเอทธานอล ส่วนไพรูเวทที่ได้จะถูกเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ เอทธานอล และกรดอินทรีย์ต่างๆ เป็นต้น การที่ยีสต์บางสายพันธุ์นั้นเมื่อใช้น้ำตาลไซโลสในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดจะสามารถสะสมไซลิทอลได้ในปริมาณมากนั้น เนื่องจากชนิดของโคเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส คือ NADPH แต่โคเอนไซม์ในปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสเป็น NAD^+ ดังนั้นในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด จะเกิดการสะสมของ NADH และ NADPH มากจึงเกิดขึ้นน้อย และไม่สามารนะเอา $NADP^+$ ที่เกิดจากปฏิกิริยาที่เปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอลมาใช้ได้ จึงทำให้เกิดการสะสมของไซลิทอลขึ้น

การผลิตไซลิทอลในยีสต์โดยใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด หรือไม่มีการเจริญเติบโต ไซลิทอลส่วนใหญ่จะถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ โดยมีบางส่วนถูกออกซิไดซ์ไปเพื่อสังเคราะห์ NADPH เมื่อทำสมดุลย์คาร์บอน และโคเอนไซม์ดังสมการที่ 1-9 แล้ว จะได้ผลได้ทางทฤษฎีของไซลิทอล และไซโลสที่ถูกใช้ (Barbosa และคณะ, 1988)

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

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

$$\text{6NADH+H}^{+} + 3O_2 + \text{18ADP} + 18P_i \rightarrow \text{6NAD+} + \text{18ATP} + 24H_2O \qquad (3)$$

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

$$\text{6xylulose-5-phosphate} + H_2O \rightarrow \text{5glucose-6-phosphate} + P_i \qquad (5)$$

$$\text{5glucose-6-phosphate} + \text{60NADP}^{+} + 35H_2O \rightarrow \text{60NADPH+H}^{+} + 30CO_2 + 5P_i \qquad (6)$$

จากสมการที่ 1-6

$$\text{6xylose} + \text{54 NADP}^{+} + \text{12ADP} + 12\ P_i + 12\ H_2O + 3\ O_2 \rightarrow \text{54 NADPH+H}^{+} + \text{12ATP} + 30CO_2 \qquad (7)$$

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

จากสมการที่ 7 และ 8

$$\text{60 xylose} + \text{12ADP} + 12\ P_i + 12\ H_2O + 3\ O_2 \rightarrow \text{54xylitol} + \text{12ATP} + 30CO_2 \qquad (9)$$

ผลได้ของไซลิทอล = 54 : 60 = 0.905 โมลของไซลิทอลต่อโมลของไซโลส

2. กระบวนการเมตาบอลิซึมในการผลิตไซลิทอลโดยแบคทีเรีย

แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถสร้างเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอเรส(Xylose isomerase) ได้ ดังนั้นจึงสามารถเปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลูโลสได้ จากนั้นไซลูโลสก็จะถูกเติมฟอสเฟตกลายเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟตและเข้าสู่วิถีเพนโตส หรืออีกทางหนึ่งไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่ได้อาจจะถูกเอนไซม์ไซลูโลส-5-ฟอสเฟต ฟอสโฟคีโตเลส (Xylulose-5-phosphate phosphoketolase) เปลี่ยนเป็นขั้นนี้เป็นการสร้างสารตัวกลางในวิถี Embden-Meyerhof-Panas โดยไม่มีการสร้าง NADPH เหมือนกับกับเมตามอลิซึมของกลูโคสในยีสต์ (Evan และ Retledge, 1984)

3. การผลิตไซลิทอลโดยวิธีการหมักนี้ได้มีการศึกษา และวิจัยเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เพื่อให้สามารถแข่งขันกับกระบวนการผลิตโดยกระบวนการทางเคมีซึ่งมีต้นทุนสูง และมีสารปนเปื้อน (Impurities) อยู่มาก ซึ่งจะต้องผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์หลายขั้นตอนได้ นอกจากนี้ยังเป็นการเน้นการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งทางภาคเกษตรกรรมที่ไม่มีมูลค่า หรือใช้ประโยชน์ได้ไม่เต็มที่นำมาผลิตเป็นไซลิทอล และผลิตภัณฑ์อื่นๆ ที่มีมูลค่าซึ่งมีการใช้กันมากในอุตสาหกรรมอาหาร

ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณผลผลิตไซลิทอลโดยกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์

1. อัตราการให้อากาศ การให้อากาศกระตุ้นการขนส่งน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ในยีสต์บางชนิด รวมถึงเชื้ออีกหลายชนิด เช่น *Candida, Hansenula, Kluyveromyces* และ *Pichia* ซึ่งต้องการออกซิเจนเพื่อใช้ในการดูดซึมน้ำตาล การให้อากาศแก่อาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงการหมัก จะทำให้เพิ่มการเปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลิทอล เพราะ การผลิตไซลิทอลเป็นผลผลิตที่เกิดควบคู่กับการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ที่มีความหนาแน่นซึ่งมีอิทธิพลต่อการเผาผลาญโดยใช้ออกซิเจน จุลินทรีย์บางชนิด สามารถผลิตไซลิทอลภายใต้สภาวะที่มีอากาศเล็กน้อย

Meyril และคณะ (1991) ทำการศึกษาความสามารถในการผลิตของเชื้อ *Candida guilliermondii* ซึ่งใช้ไซโลส และ Non-hemicellulose ซึ่งทำการย่อยให้ได้น้ำตาลในสภาวะ Microaerophilic ได้ผลผลิตไซลิทอล 0.63 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส และได้เอทานอลปริมาณเล็กน้อยจากการใช้ไซโลสส่วนน้ำตาลที่ไม่ใช่ไซโลสจะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล และเซลล์จุลินทรีย์ การผลิตไซลิทอลโดย *Debaryomyces hansenii* ต้องการสภาวะ Semi-aerobic โดยเริ่มจากสภาวะที่มีอากาศ เพื่อเพิ่มการสะสม reduce-adenine-dinucleotide coenzyme ให้มีความสมบูรณ์พร้อมที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยารีออกซิไดซ์ ซึ่งจะนำไปสู่การเปลี่ยนไซลิทอลไปเป็นไซลูโลส

Horitsu และคณะ (1992) รายงานถึงผลกระทบที่มีต่อการผลิตไซลิทอลในขั้นแรกควรพิจารณาถึงความเร็วในการเพิ่มปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ อย่างไรก็ตามไซลิทอลภาย

ใต้สภาวะ Anoxic และการเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในอาหาร ในช่วงระหว่างการหมักจะช่วยนำไปสู่การผลิตไซลูโลสโดยการไฮโดรจีเนชันของไซลิทอลที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้น การเพิ่มระดับการละลายของออกซิเจน จะมีความต้องการเฉพาะขั้นตอนแรกของการหมักเท่านั้น แต่หลังจากนั้นควรลดระดับการให้อากาศกับจุลินทรีย์ *Candida tropicalis* เพิ่มการสะสมไซลิทอล ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนในปริมาณจำกัด

Sirisananeeyakul และคณะ (1992) ได้รายงานว่าในสภาวะที่ขาดแคลนออกซิเจน การสังเคราะห์โคเอนไซม์ NADH ด้วยกระบวนการหายใจนั้นไม่เพียงพอทำให้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส ที่จะเปลี่ยนต่อไปเป็นไซลูโลสในวิถีเพนโตสฟอสเฟต หรือที่เรียกว่า Hexose monophosphate นั่นเอง จึงเกิดการสะสมไซลิทอลเพิ่มขึ้น และส่งผ่านออกนอกเซลล์ เป็นผลทำให้ได้ผลได้และผลผลิตของไซลิทอลเพิ่มขึ้น

Furlan และคณะ (1991) และ Kim และคณะ (1997) ทำการศึกษาปัจจัยของการให้อากาศใน *Candida parasilosis* ซึ่งพบว่าการให้อากาศมากเกินไปจะส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ไซลิทอลที่ถูกผลิตขึ้นจะถูกเปลี่ยนเป็น NADH และไซลูโลสทำให้ผลผลิตไซลิทอลลดลง

2. แหล่งไนโตรเจนในการผลิตไซลิทอล

Barbosa และคณะ (1988) กล่าวถึงความสำคัญของแหล่งไนโตรเจน และการให้อากาศว่ามีผลกับปริมาณการผลิตไซลิทอลจากไซโลสโดยเชื้อยีสต์บางสายพันธุ์ใน *Saccharomyces cerevisiae* วิถีเพนโตสฟอสเฟตถูกควบคุมโดยไนโตรเจน และเกลือแอมโมเนียม ซึ่งพบว่าสามารถกระตุ้นการเกิดออกซิเดทีฟในวิถีเพนโตสฟอสเฟต เพราะเอนไซม์ D-glucose-6-phosphate dehydrogenase จะถูกยับยั้งโดย NADH ใน *Pichia tannophilus* เกลือแอมโมเนียมจะกระตุ้นการเจริญ และลดระดับ NADH ของเอนไซม์ D-glucose-6-phosphate dehydrogenase ภายในเซล และลดกิจกรรมการออกซิเดทีฟในวิถีเพนโตสฟอสเฟต

ใน *Candida shehatae* พบว่าสามารถผลิตไซลิทอลในปริมาณมาก ขึ้นอยู่กับแหล่งของไนโตรเจน เนื่องจากเป็นการเพิ่มระดับของเอนไซม์ Xylitol dehydrogenase (Dahiya, 1991)ได้ศึกษาผลกระทบในการผลิตไซลิทอลจากแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ 8 ชนิด และสารอินทรีย์ 4 ชนิด พบว่าปริมาณไซลิทอลสูงสุดที่ได้คือ 16.7 กรัมต่อลิตร และ 30.6 กรัมต่อลิตร โดยใช้แอมโมเนียมอะซิเตต และยีสต์สกัดตามลำดับ

Horitsu และคณะ (1992) ใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 3 10 และ 20 กรัมต่อลิตร พบว่าจะเกิดผลผลิตสูงสุด 1.78 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้ยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร ด้วยอัตราการไหล 400 มิลลิลิตรต่อนาที ให้อากาศที่มีออกซิเจน 90 เปอร์เซ็นต์ และให้ไซโลส 100

กรัมต่อลิตร (Onishi และคณะ, 1980) พบว่าการผลิตโพลิออลโดย *Pichia* เป็นผลมาจากอัตราส่วนของคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ปริมาณโพลิออลจะได้มากกว่าเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นต่ำ

Sirisananeeyakul และคณะ (1992) ได้รายงานว่าเชื้อ *Candida mogii* ที่เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด (ความเร็วรอบที่ใช้ในการเขย่า 100 รอบต่อนาที) โดยให้มีความแตกต่างกันของความเข้มข้นของไซโลส 5-35 กรัมต่อลิตร พบว่าอัตราการผลิตไซลิทอลจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเริ่มต้น

ตารางที่ 2.4 แสดงอัตราการผลิตไซลิทอลตามความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส

ไซโลส กรัมต่อลิตร	ปริมาณชีวมวล กรัมต่อลิตร	ปริมาณผลผลิต กรัมต่อลิตร
53	0.46	0
10.1	0.29	0.17
19.3	0.18	0.44
28.9	0.16	0.50
53.3	0.12	0.70

ที่มา : Sirisasaneeyakul (1995)

Horitzu และคณะ (1992) ได้เพิ่มความเข้มข้นของไซโลสในการเลี้ยงเชื้อ *Candida tropicalis* เป็น 100-500 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการให้อากาศสูงถึง 400 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้อากาศที่มีออกซิเจน 90 เปอร์เซ็นต์ พบว่าอัตราการผลิตไซลิทอลเพิ่มขึ้นเป็น 2.44 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากเดิม 1.78 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ความเข้มข้นของไซโลสกับการให้อากาศมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของเซลล์ โดยในสภาวะที่ความเข้มข้นของไซโลส และอัตราการให้อากาศสูง ความเข้มข้นของเซลล์จะสูง และอัตราการผลิตไซลิทอลจะสูงตามไปด้วย

Meyrial และคณะ (1991) ศึกษาความต้านทานต่อสับสเตรทของ *Candida guilliermondii* ที่ความเข้มข้นของไซโลสเริ่มต้นจาก 100-300 กรัมต่อลิตร การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลนำไปสู่การเพิ่มผลผลิตไซลิทอล และปริมาณไซลิทอลที่เพิ่มขึ้นจากการเพิ่มไซโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณสูงสุดที่ได้เมื่อใช้ไซโลส 300 กรัมต่อลิตร ได้ผลผลิต 0.75 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ซึ่งคิดเป็น 82.6 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณทั้งหมดในทฤษฎี ความเข้มข้นของไซลิทอลต่ำ เนื่องจากถูกใช้ไปในการเพิ่มมวลเซลล์เป็นหลัก อัตราการผลิตไซลิทอลเมื่อไซโลสเป็น 2.4 เท่า จะสูงกว่าปริมาณ

ไซลิทอลที่ได้จากไซโลส 10 กรัมต่อลิตร ในทางตรงข้ามกับการผลิตไซลิทอล การเจริญของจุลินทรีย์ทีละน้อยจะถูกยับยั้งโดยความเข้มข้นของไซโลส อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด 0.11 ต่อชั่วโมง ได้จากความเข้มข้นของไซโลส 20 และ 50 กรัมต่อลิตร

4. การเติมน้ำตาลชนิดอื่นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Hsiao และคณะ (1982) รายงานว่ากลูโคสจะยับยั้งการใช้ไซโลสใน *Candida* และ *Schizosaccharomyces* กลูโคสจะยับยั้งการเผาผลาญไซโลสในระยะเวลาอันรวดเร็ว และเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสลดต่ำลง ความสามารถในการเปลี่ยนไซโลสจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในช่วงสั้นๆ นี้จะทำให้การดูดซึมไซโลส กลับคืนมาอย่างรวดเร็ว โดยแสดงออกในลักษณะของ Catabolic repression ไม่ใช่การควบคุมที่กลไกการสังเคราะห์ของยีน หลักฐานที่สนับสนุนความคิดนี้ ค่อนข้างจะเป็นการอธิบายถึงการนำไซโลสส่วนใหญ่ไปใช้ว่าไม่ Active หรือเกิดการยับยั้งในขณะที่มีกลูโคส ในช่วงที่มีการแทนที่น้ำตาลอื่นจะมีการยับยั้งเกิดขึ้นภายในเซลล์เมื่อมีกลูโคส หรือตัวเร่งปฏิกิริยา (Catabolite)

นรินทร์ (2541) การเติมกลูโคสลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเติบโตของเชื้อ *Candida guilliermondii* ATCC 18364 และการเกิดไซลิทอลในสภาวะที่จำกัดออกซิเจน โดยทำการเติมกลูโคสในปริมาณน้อยมากเพื่อไม่ให้เกิดการยับยั้งไซโลส (catabolic repression) ในกรณีนี้กลูโคสจะช่วยเพิ่มปริมาณ NADPH ในเมทาบอลิซึมของยีสต์ และใช้ในการเจริญเติบโตแทนการใช้ไซโลส จึงทำให้ไซโลสถูกใช้ไปในการผลิตไซลิทอลมากขึ้น ส่งผลให้ผลได้ของไซลิทอลมากขึ้นด้วย โดยปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมที่ให้ผลผลิตสูงสุด คือ 2.3 กรัมต่อการทดลอง (ทำการทดลองในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร ปริมาณที่ใช้หมักเท่ากับ 1.5 ลิตร) ทำให้ได้ไซลิทอล 0.854 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส อัตราการผลิตเท่ากับ 0.255 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ค่าผลได้เพิ่มขึ้น 1.24 เท่า และอัตราการผลิตเพิ่มขึ้น 1.36 เท่า เมื่อเทียบกับการเพาะเชื้อในสภาวะเดียวกัน ซึ่งไม่มีการเติมกลูโคส

5. การเติมเมทานอล

การเติมเมทานอลสามารถเพิ่มการผลิตไซลิทอลได้เป็น 39.8 กรัมต่อลิตร ไซลิทอลที่เพิ่มขึ้นนี้คิดเป็น 8.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้อาหารไซโลสที่มีการเติมเมทานอล 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ซึ่งจะทำให้เกิดการออกซิเดชั่นของเมทานอลให้ผลผลิตเป็น NADH ทำให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นมากพอที่จะเกิดการรีดักชั่นของไซโลสเกิดเป็นไซลิทอล ในกรณีที่เป็นการผลิตซอร์บิทอล และไซลิทอล โดยยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอล เช่น *Candida boidinii* และการเติมเมทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้ได้ไซลิทอลมากขึ้น

6. ปริมาณไบโอติน

Lee และคณะ (1987) รายงานว่าปริมาณเอทานอล และไซลิทอลจะสะสมในน้ำหมักในการเลี้ยงเชื้อแบบชั่วคราวของเชื้อ *Pachysolen tannophilus* และ *Candida guilliermondii* จะขึ้นอยู่กับระดับของไปโอติน ในอาหารที่มีไบโอตินสูง *Pachysolen tannophilus* จะสะสมเอทานอลมากกว่าไซลิทอลในขณะที่ *Candida guilliermondii* จะสะสมไซลิทอลมากกว่าเอทานอล

7. ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และอุณหภูมิ

Gong และคณะ (1981) รายงานว่าปริมาณไซโลสที่จะเปลี่ยนเป็นไซลิทอลมากที่สุด จะเกิดขึ้นที่พีเอช 8.0 และการเกิดปฏิกิริยารีดักชั่นของไซลิทอลจะเกิดขึ้น เมื่อพีเอชเปลี่ยนจากเบสเป็นกรด ปริมาณไซลิทอลสูงสุดจะเกิดขึ้นในช่วงแรกที่มีพีเอช 6.0 โดย *Candida guilliermondii* และพีเอช 4.0 โดย *Candida tropicalis*

วรสิทธิ์ (2541) ทำการศึกษาผลของพีเอชต่อการเจริญเติบโต และการผลิตไซลิทอลแตกต่างกัน โดยทำการเพาะเลี้ยงใน 2 ระยะ ระยะแรกเป็นการเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ จะทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีการให้อากาศอย่างเพียงพอ พีเอชที่เหมาะสมในระยะนี้มีค่าเท่ากับ 4.5 ทำให้ได้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.046 ต่อชั่วโมง ระยะที่สองเป็นระยะที่ทำการผลิตภายใต้สภาวะที่จำกัดอากาศ พบว่าพีเอชที่เหมาะสมในระยะนี้เท่ากับ 6.0 ทำให้ได้ผลผลิตไซลิทอล 0.71 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส คิดเป็น 77.96 เปอร์เซ็นต์ ของผลได้ตามทฤษฎี

การผลิตไซลิทอลโดยใช้เซลล์ตรึง

การผลิตไซลิทอลโดยใช้เซลล์ตรึง เป็นอีกวิธีที่ใช้ในการเพิ่มผลผลิตไซลิทอล ซึ่งจะเป็นลักษณะของการเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ในถังหมัก นอกจากนี้ยังทำให้เซลล์มีความเสถียรทางพันธุกรรม (Genetic stability) และยังสามารถนำเอาเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่ได้

Dominguez (1998) ทำการศึกษากระบวนการผลิตไซลิทอลโดยยีสต์ *Debaryomyces hansenii* NRRL Y7462 ในระดับฟลาสก์เขย่า ซึงจะได้ไซลิทอลที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 106.7 และ 37.6 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้เซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงตามลำดับ และอัตราการผลิตไซลิทอลเท่ากับ 1.48 และ 0.31 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้เซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงตามลำดับ สำหรับการเพาะเลี้ยงครั้งที่ 1 การนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่เป็นครั้งที่ 2 ความเข้มข้นของไซลิทอล และอัตราการไซลิทอลเมื่อใช้เซลล์อิสระจะมีค่าลดลง (45.6 กรัมต่อลิตร และ 0.38 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ)ส่วนในระบบเซลล์ตรึงจะทำให้อัตราการผลิตไซลิทอลสูงขึ้นเป็น2.08 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เป็นการบ่งชี้ให้เห็นว่า การใช้เซลล์ตรึงสามารถนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้ใหม่โดยไม่ทำให้กิจกรรม

ของเซลล์ลดลง ซึ่งเป็นการแก้ปัญหาการสูญเสียกิจกรมของเซลในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ที่ทำการหมักเป็นระยะเวลานาน

2.2 การตรึงเซลล์

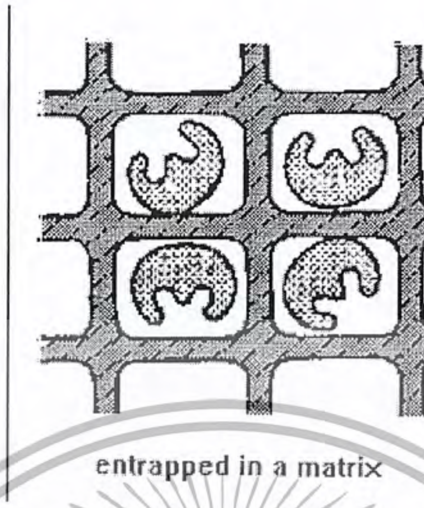
ความหมาย และประวัติของเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง

เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง หมายถึง เซลจุลินทรีย์ที่ถูกจำกัดขอบเขต หรือสถานที่ทางฟิสิกส์ให้อยู่ในบริเวณซึ่งทำให้จุลินทรีย์ไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่ง และสามารถนำมาใช้ซ้ำได้หลายครั้งอย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์ที่ถูกตรึงอาจอยู่ในรูปเซลล์ที่กำลังเจริญ เซลล์ระยะพัก หรือเซลล์ที่ตายแล้ว

การใช้เซลล์จุลินทรีย์ได้มีการศึกษามานานแล้ว โดยในปีค.ศ.1823 Schuetzenbach ได้ทำการผลิตน้ำส้มสายชูแบบรวดเร็ว โดยใช้ฟิล์มจุลินทรีย์ที่ติดอยู่บนเศษไม้เลื่อย หลังจากนั้นไม่มีผู้สนใจ จนกระทั่งประมาณปี ค.ศ.1971 จึงได้เริ่มมีการสนใจอย่างจริงจังอีกครั้งหนึ่ง จนสามารถนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรม เช่น การกำจัดน้ำเสียแบบ activated sludge และ trickling filter นอกจากนี้ยังนำมาใช้ในการกำจัดแร่ที่มีคุณภาพต่ำในเหมืองแร่

ปี ค.ศ.1973 Chibata และ Tosa ศึกษา และได้รับความสำเร็จในการผลิตกรด แอล-แอสปาร์ติกแบบต่อเนื่องในระดับอุตสาหกรรม โดยใช้เซล *Escherichia coli* ที่ถูกตรึงด้วยสารโพลิอะคริลาไมด์ (Polyacrylamide) นับเป็นอุตสาหกรรมแห่งแรกที่ใช้เซลล์ที่ถูกตรึง

ในปัจจุบัน มีรายงานเกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงในการผลิตสารชนิดต่างๆอย่างกว้างขวาง และที่ประสบความสำเร็จในระดับอุตสาหกรรมแล้ว เช่น กรดแอล-แอสปาร์ติกม กรดแอล-มาลิกม การผลิตฟรุคโตส และการผลิต prednisolone เป็นต้น



ภาพที่ 2.5 แสดงลักษณะการตรึงเซลล์แบบห่อหุ้มเซลล์ (Gel entrapment)
ที่มา : Chibata และคณะ (1978)

การเปรียบเทียบข้อดี และข้อเสียของการตรึงเซลล์กับวิธีอื่นๆ

เซลล์ที่ถูกตรึงจัดเป็นตัวเร่งทางชีวเคมีชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญ และมีข้อได้เปรียบหลายอย่าง เมื่อเทียบกับตัวเร่งหรือวิธีอื่นๆ คือ

1. การเปรียบเทียบทางเคมี เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับตัวเร่งทางเคมี คือ สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะปกติ และใช้พลังงานต่ำ ปฏิกิริยามีความจำเพาะ และเกิดการเปลี่ยนแปลงในอัตราสูง ปัญหาการเกิดมลภาวะมีน้อย แต่เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสียบางประการ คือ ต้องการสารประกอบเชิงซ้อน เช่น โคแฟคเตอร์ต่างๆในการเกิดปฏิกิริยา และมีความคงทนน้อยกว่าตัวเร่งทางเคมี

2. การเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ หรือเอนไซม์อิสระ เซลล์ที่ถูกตรึงได้เปรียบกว่าเซลล์อิสระ หรือเอนไซม์อิสระ คือ สามารถใช้เซลล์จำนวนมากๆ ศึกษาในถังปฏิกิริยาขนาดเล็กได้ ในการผลิตควบคุมปฏิกิริยาได้ง่าย สามารถแยกผลผลิตออกได้สะดวก และไม่มีปัญหาการปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์อื่น เซลล์ที่ถูกตรึงมีความคงทนสูง สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ทำให้ลดต้นทุนการผลิตได้มาก แต่การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสีย คือ เสียค่าใช้จ่ายในการตรึงเซลล์ และอาจสูญเสียความสามารระหว่างการตรึงเซลล์ได้

3. การเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ถูกตรึง การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อได้เปรียบกว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึง ในกรณีที่กระบวนการผลิตนั้นต้องใช้ระบบเอนไซม์หลายชนิด โคแฟคเตอร์ และสารพลังงานสูงอื่นๆ นอกจากนี้การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงยังไม่ต้องใช้กระบวนการสกัด และทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์ เป็นผลให้เอนไซม์ยังคงมีประสิทธิภาพสูง ทำให้ผลผลิตเพิ่มสูงขึ้น และยังเป็นการลดค่าใช้

จ่ายอีกด้วย แต่การใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงมีข้อเสีย คือ เซลล์ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดที่สามารถผลิตสารที่ไม่ต้องการออกมายับยั้งผลผลิตได้ และเซลล์ที่ถูกตรึงยังถูกจำกัดการซึมผ่านเข้าออกของสับสเตรท และผลผลิตโดยสารที่ใช้ตรึงเซลล์ นอกจากนี้อาจพบการปนเปื้อนของผลผลิตจากตัวเซลล์ หรือสารที่ขับออกจากเซลล์ที่ถูกตรึง ในกรณีที่เซลล์เกิดการย่อยสลายตัวเอง เนื่องจากเซลล์ถูกใช้เป็นเวลานาน หรือเซลล์รั่วไหล เนื่องจากเซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวน

การพิจารณาคัดเลือกสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์

เนื่องจากการเตรียมเซลล์ที่ถูกตรึงมีหลายวิธี ดังนั้นคุณสมบัติของสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์แต่ละวิธีจึงมีข้อแตกต่างกันไปแต่โดยทั่วไปแล้วปัจจัยที่สำคัญในการพิจารณาจะคล้ายคลึงกัน คือ คุณสมบัติทางกลไก (mechanical properties) คุณสมบัติทางฟิสิกส์ ความทนทานต่อสภาพแวดล้อมทางฟิสิกส์ สารเคมี และการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ ความชอบน้ำ (hydrophilicity) ความซึมซาบ (permeability) ราคา และการยอมรับ

สำหรับการคัดเลือกสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์โดยวิธีการห่อหุ้มนั้น Takata และคณะ (1977) ได้สรุปหลักในการพิจารณาไว้ดังนี้ คือ

1. คุณสมบัติในการละลาย ควรจะทำการละลาย และผสมเซลล์ที่ได้มีความคงตัวอยู่ในสภาวะที่เป็นของเหลว

2. คุณสมบัติในการเกิดเจล สารผสมที่ได้ควรจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดเจลด้วยวิธีง่ายๆภายใต้สภาวะปกติ และไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ หรือเซลจุลินทรีย์

3. คุณสมบัติของเจล เจลที่ได้ควรจะมีความแข็งแรง และความคงตัวสูง ขนาดของรูที่อยู่ภายในเจลควรจะมีขนาดเล็กพอที่จะป้องกันการรั่วไหลของเซลล์ได้ แต่สับสเตรทและผลผลิตที่เกิดขึ้นสามารถซึมผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ

คุณสมบัติของเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง

1. ความจำเพาะต่อองค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการผลิต เซลล์ที่ถูกตรึงจะมีความจำเพาะต่อองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงต่างจากเซลล์อิสระ เนื่องจากสารตัวนำเป็นอุปสรรคต่อการซึมผ่านเข้าออกของสารอาหารและผลผลิต ในกรณีองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงมีโมเลกุลสูง ความสามารถของเอนไซม์ที่ถูกตรึงมักจะต่ำลงด้วย

2. ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึง เมื่อเปรียบเทียบความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึงกับเซลล์อิสระ พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงอาจเปลี่ยนแปลงไปในทางด้านความเป็นกรด ความเป็นด่าง หรือไม่เปลี่ยนแปลงเลย

3. อุณหภูมิที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึง เซลล์ที่ถูกตรึงมักมีความคงทนต่อความร้อนได้ดีกว่าเซลล์อิสระ ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึง จึงมักมีค่าสูงกว่าเซลล์อิสระ

4. ความคงตัวของเซลล์ที่ถูกตรึง มีความคงทนในการใช้งานได้ดีกว่าเซลล์อิสระ คือ สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงมีความสามารถทนต่อสารเคมี และการเสื่อมสภาพทางฟิสิกส์ได้ดีกว่าเซลล์อิสระ

อัลจิเนต เป็นสารที่สกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล มีลักษณะทางเคมีเป็นโพลิเมอร์ร่วมของ D-mannuronate (M) และ L-guluronate (G) residues อัลจิเนตสามารถเกิดเป็นเจลได้เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีไอออนของโลหะโพลีวาเลนท์ เช่นอลูมิเนียมอิออน (Al^{3+}) และ แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตทำได้โดย ผสมเซลล์ลงในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต แล้วหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ จะเกิดการก่อตัวเป็นเจลของแคลเซียมอัลจิเนตขึ้นทันที และหลังจากนั้นควรแช่เจลไว้ในแคลเซียมคลอไรด์อีกอย่างน้อย 20 นาที เพื่อให้เกิดเจลอย่างสมบูรณ์ (complete gelation) คุณสมบัติของเจลที่ได้จะขึ้นอยู่กับชนิด และปริมาณอัลจิเนตที่ใช้ โดยอัลจิเนตที่มี G-residues สูงจะทำให้เกิดเจลที่มีความแข็งแรงสูงด้วย นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิด และความเข้มข้นของไอออนของโลหะ และปริมาณเซลล์ที่ใช้ด้วย

การใช้แคลเซียมอัลจิเนตมีข้อดีหลายประการ คือ ทำได้ง่ายภายใต้สภาวะปกติ สะดวก และรวดเร็ว ดังนั้นจึงนิยมใช้ในการตรึงเซลล์ที่มีชีวิต นอกจากนี้การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตยังเป็นวิธีที่ปลอดภัย เนื่องจากอัลจิเนตเป็นสารที่ไม่เป็นพิษ และยอมรับให้ใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหาร (Food additive) มาเป็นเวลานานแล้ว และเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตยังสามารถแบ่งเซลล์ได้ภายในเจล ทำให้ความสามารถในการเป็นตัวเร่งมีอยู่นาน แต่เซลล์บางส่วนอาจหลุดรั่วออกนอกเจลได้ ทำให้เกิดการปนเปื้อนในผลผลิต และในบางสภาวะการใช้แคลเซียมอัลจิเนตอาจทำให้เกิดปัญหาได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่สารคีเลตติ้ง (Chealating agent) เช่น สารประกอบฟอสเฟต และ อีดีทีเอ (EDTA ; Ethylene diamine tetraacetic acid) ซึ่งสามารถดึง Ca^{2+} ออกจากเจลได้ทำให้เจลไม่คงตัวเกิดการละลายได้ และธาตุที่มีประจุบวก (cations) บางชนิด เช่น Mg^{2+} และ K^{+} ซึ่งสามารถเข้าไปแทนที่ Ca^{2+} ได้ ทำให้เจลไม่คงตัวเกิดการละลายได้ อย่างไรก็ตามคุณสมบัติข้อนี้ของอัลจิเนต สามารถนำมาใช้ในการศึกษาตรวจนับ การเจริญของเซลล์ภายในเจลได้ สำหรับการแก้ไขปัญหาการละลายของเจล เมื่อมีสารคีเลตติ้งนั้นทำได้โดย ใช้สตรอนเชียม หรือ แบเรียมแทนแคลเซียม จะทำให้เกิดเจลที่มีความคงตัวมากกว่า แต่จะไม่เป็นที่ยอมรับในกรณีที่ผลผลิตที่ได้เกี่ยวข้องกับการใช้ในอาหาร

ปัจจุบันแคลเซียมอัลจิเนตถูกนำมาใช้เป็นสารตัวนำในการตรึงเอนไซม์ เซลล์จุลินทรีย์ คลอโรพลาสต์ ไมโทคอนเดรีย และเนื้อเยื่อพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงด้วย

แคลเซียมอัลจอเนตนิยมใช้ศึกษาประสิทธิภาพของระบบเอนไซม์หลายชนิดในเซลล์กันมาก เช่น การย่อยสลายฟีนอล การผลิตแอลกอฮอล์ สารปฏิชีวนะ เสตอรอยด์ เป็นต้น

การตรึงเซลล์นั้นมีที่มาจากเทคนิคการตรึงเอนไซม์ แต่ทั้งนี้เพื่อที่จะเป็นการลดต้นทุนในส่วนของขั้นตอนการสกัดเอนไซม์ออกซึ่งจะต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูง จึงได้มีการดัดแปลงการตรึงเอนไซม์มาใช้กับการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ ตลอดจนถึงเซลล์สัตว์ และเซลล์พืชที่เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์

การตรึงเซลล์เกิดขึ้นจากแนวความคิดของการสังเกตธรรมชาติ แล้วนำมาดัดแปลง เช่น พิจารณาการทำงานของจุลินทรีย์ในดิน แล้วนำมาดัดแปลงใช้ในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังได้แนวความคิดจากกระบวนการใช้จุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมบางชนิด ที่มีเซลล์ของจุลินทรีย์จับอยู่ที่ผิวของของแข็ง หรือสร้างเป็นแผ่นฟิล์ม เช่น ในกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชู การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นต้น

ได้มีการอธิบายถึงการตรึงเซลล์เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1966และหลังจากนั้นเป็นต้นมา งานวิจัยทางด้านนี้ได้มีเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และประสบผลสำเร็จจนถึงระดับอุตสาหกรรม เมื่อเร็วๆนี้ แต่ความสำเร็จนี้ยังคงอยู่ในขอบเขตของเซลล์ที่มีปฏิกิริยาขั้นตอนเดียว เอนไซม์ที่พบในเซลล์ ซึ่งประสบผลสำเร็จดังกล่าว ได้แก่ อะมิโนเอไซเลส (Amino acylase) เพนิซิลลินเอไซเลส (Penicillin acylase) กลูโคสไอโซเมอเรส (Glucose isomerase) แอสพาร์เทส (Aspartase) ฟูมาเรส (Fumerase) แลคเทส (Lactase)

แม้ว่าการตรึงเซลล์จะมีความซับซ้อนของปฏิกิริยาต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นนี้ การประยุกต์ใช้เซลล์ตรึงเพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้ขยายขอบเขตอย่างกว้างขวางในทางเทคโนโลยีชีวภาพ (Biotechnology)

ในหลายๆกรณีของการตรึงเซลล์ด้วยการดักจับ หรือการล้อมรอบจะทำให้เซลล์มีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ, พีเอช และความเข้มข้นของไอออนในสารละลายปฏิกิริยา ได้ดีกว่าเซลล์อิสระ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ตรึงจะได้รับการป้องจากสารบางชนิด เช่น ออกซิเจน, ไอออนของโลหะบางชนิด ได้ดีกว่าอิสระ แม้ว่าเซลล์ตรึงจะมีข้อเปรียบมากกว่าเอนไซม์ตรึง แต่ระบบเซลล์ตรึงยังคงมีข้อบกพร่อง 3 ประการดังนี้

1. การรักษาสภาพธรรมชาติให้คงตัว ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ตรึงจะไม่เจริญเติบโต และโดยธรรมชาติแล้วเซลล์ที่ไม่เจริญเติบโตมักจะสูญเสียความสามารถในการทำงาน ดังนั้นในทางปฏิบัติต้องให้อาหารกับเซลล์ตรึงตลอดเวลา ทั้งนี้เพื่อทำให้เซลล์มีชีวิตอยู่ได้ และมีประสิทธิภาพในการทำงาน

2. เซลล์ตรึงจะมีปัญหาการแพร่กระจาย และการขนส่งสารละลายอาหาร และสารผลิตภัณฑ์ผ่านสารพาหะที่ใช้ตรึง

3. สารละลายอาหาร และสารผลิตภัณฑ์อาจจะทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการเกิดขึ้นได้

การเปรียบเทียบการหมักด้วยการใช้เซลล์ตรึง และการหมักแบบเก่า

การหมักแบบเก่านั้น จะเป็นการเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ในสารละลายอาหาร ซึ่งจะต้องใช้ถังหมักแบบแบทช์ (Batch fermentor) การหมักวิธีนี้มีข้อเสียหลายประการ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาเซลล์ตรึงขึ้นมาใช้ การใช้เซลล์ตรึงมีความได้เปรียบมากกว่าการใช้เซลล์อิสระ เพราะเซลล์ตรึงจะสามารถใช้กับถังหมักแบบต่อเนื่องซึ่งมีลักษณะเป็นคอลัมน์ (Continuous column reactor) ถังหมักแบบคอลัมน์นี้ทำให้สามารถช่วยลดขนาดของเครื่องมือต่างๆ ที่จะใช้ในระดับอุตสาหกรรมให้มีขนาดเล็กลง และทำงานได้ในเนื้อที่น้อยลง ซึ่งจะส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการลงทุนลดลงตามไปด้วย นอกจากกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องยังมีข้อได้เปรียบอีกหลายประการ ได้แก่ ทำให้ควบคุมกระบวนการทำงานได้ดีกว่า ลดระยะเวลาของการผลิตสารผลิตภัณฑ์ ได้สารผลิตภัณฑ์ในรูปแบบที่คงที่ตลอดกระบวนการ ใช้สารละลายอาหารที่เจือจางซึ่งจะทำให้ไม่สิ้นเปลือง เพราะสารอาหารจะถูกใช้ไปจนหมด และประการสุดท้ายคือ ทำให้ไม่มีสารที่เป็นอันตรายต่อการทำงานของเซลล์ตกค้างอยู่ในคอลัมน์ เพราะมีการไหลผ่านของสารละลายอาหารตลอดเวลา ดังนั้นจึงช่วยให้ประสิทธิภาพการผลิตสารสูงขึ้น

ในกรณีเซลล์ของเซลล์ตรึงไม่เจริญเติบโต และสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ต้องการ โดยที่ไม่มีปฏิกิริยาอื่นแทรกซ้อน และเป็นผลให้ระบบเซลล์ตรึงผลิตสารผลิตภัณฑ์ได้เร็วกว่าการใช้เซลล์อิสระ ทั้งนี้เพราะเซลล์ตรึง จะมีความหนาแน่นของเซลล์ต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรของสารละลายอาหารมากกว่าเซลล์อิสระ

ในระบบเซลล์ตรึงนั้นสามารถนำเอาเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่ และสามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ด้วยการใช้สารละลายเจือจางของสารอาหาร ซึ่งทำให้มีความสะดวกในการเตรียมสารละลายอาหาร และการใช้งานซึ่งเป็นปัญหาของการหมักแบบเก่า เนื่องจาก เมื่อการใช้สารอาหารความเข้มข้นสูง จะทำให้สารละลายมีความหนืด ซึ่งจะเป็นผลให้อัตราการแพร่กระจายของสารละลายอาหารเข้าไปยังเซลล์ต่ำ

การผลิตสารจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์อาจเกิดขึ้นควบคู่กับการเจริญเติบโต หรือระหว่างการหยุดพักการเจริญของเซลล์ การเจริญเติบโตของเซลล์อิสระจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณสารบางชนิดของเมตาบอไลท์ปฐมภูมิ (Primary metabolite) และเมื่อเซลล์หยุดการเจริญเติบโตจะทำให้เซลล์หยุดการผลิตสารเหล่านี้ด้วย ส่วนการผลิตสารอื่นๆ รวมทั้งเมตาบอไลท์

ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) จะเกิดขึ้นระหว่างสภาวะที่เซลล์เจริญเติบโตเต็มที่ และเริ่มลดลง นั่นคือ พฤติกรรมการสังเคราะห์สารจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์เกิดขึ้นในช่วงเวลาจำกัด และความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเซลล์ อาจจะถูกยับยั้งได้ด้วยสารผลิตภัณฑ์บางชนิดของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นผลให้สูญเสียเมตาบอไลท์อินเทอร์มีเดียต (Intermediate metabolite) และอาจจะทำให้เอนไซม์ที่สำคัญถูกทำลายกัมมันตภาพไปชั่วคราว หรือโดยตลอดก็ได้ ปัญหาต่างๆเหล่านี้จะไม่เกิดขึ้น เมื่อใช้ระบบเซลล์ตรึง

ดังที่กล่าวมาข้างต้นนี้จะพบว่าระบบเซลล์ตรึงมีความได้เปรียบเซลล์อิสระมากมาย อย่างไรก็ตามการใช้เซลล์ตรึงมีข้อจำกัดที่สำคัญ คือ การแพร่กระจายของสารละลายอาหาร ทำให้เอนไซม์ภายในเซลล์ไม่สามารถทำงานได้เต็มประสิทธิภาพ โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์ในเซลล์ตรึงจะทำงานได้เต็มที่เฉพาะบริเวณผิวของเซลล์ตรึง จากการศึกษาพบว่าข้อบกพร่องนี้สามารถลดลงได้โดยใช้วิธีการต่างๆเหล่านี้

1. ทำการตรึงเซลล์ให้มีเซลล์อยู่ที่บริเวณพื้นผิวมากที่สุด
2. ลดขนาดเซลล์ตรึงซึ่งจะทำให้มีพื้นที่ผิวสัมผัสกับสารละลายอาหาร ได้มากขึ้นได้มากขึ้นแต่จะต้องไม่ทำให้มีขนาดเล็กจนเกินไป เพราะจะทำให้เกิดความยุ่งยากในการไหลผ่านของสารละลายอาหาร
3. เพิ่มความเข้มข้นของสารอาหาร แต่วิธีนี้จะต้องระวังไม่ให้ความเข้มข้นสูงจนเกินไป เพราะจะทำให้มีปัญหาในขั้นตอนการแยกผลิตภัณฑ์ และทำให้ไม่สามารถหมุนเวียนสารละลายอาหารกลับคืนมาใช้ใหม่ เพราะสารละลายอาหารจะมีความหนืดสูงขึ้น
4. เพิ่มขนาดรูพรุนของพาหะที่ใช้ตรึง ซึ่งจะช่วยเพิ่มอัตราการแพร่กระจาย แต่กรณีนี้จะใช้ได้เฉพาะกับเซลล์ที่มีขนาดใหญ่
5. ลดปริมาณของเซลล์ที่นำมาตรึงต่อหนึ่งหน่วยน้ำหนักของสารพาหะ แต่ลักษณะเช่นนี้จะทำให้ความจุของเซลล์ภายในถังปฏิกรณ์มีปริมาณลดลง

การแก้ไขปัญหาจากข้อบกพร่องด้วยวิธีที่กล่าวข้างต้น จะต้องเลือกให้เหมาะสมกับงานที่ต้องการใช้ นอกจากปัญหาการแพร่กระจายของสารละลายอาหารแล้ว การใช้เซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์จะมีข้อบกพร่องอื่นๆ ซึ่งจะได้กล่าวพร้อมกับวิธีการแก้ไขในแต่ละกรณีดังต่อไปนี้

ในระหว่างการทำงานของระบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ อาจจะทำให้มีการสะสมของสารผลิตภัณฑ์ ปัญหาเช่นนี้สามารถแก้ไขได้โดยการทำลายผนังเซลล์ของเซลล์ตรึง แต่การกระทำเช่นนี้จะทำให้เซลล์ตาย และปล่อยสารอื่นๆ เช่น โคเอนไซม์ออกมาด้วย ปรากฏการณ์นี้จะแตกต่างจากผลการทดลองที่ได้จากการใช้เซลล์พืชตรึง โดยที่เซลล์พืชจะถูกทำให้มีการซึมผ่านของสารผลิตภัณฑ์ได้โดยที่ยังคงรักษาเซลล์ให้มีชีวิตอยู่ได้

ในบางกรณีเซลล์ตรึงจะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วซึ่งทำให้มีการปล่อยเซลล์อิสระออกจากเซลล์ตรึง และบางครั้งจะทำให้โครงสร้างของเซลล์ตรึงถูกทำลาย ซึ่งจะทำให้การแยกสารผลิตภัณฑ์ และมีการอุดตันในส่วนประกอบของเครื่องปฏิกรณ์ วิธีแก้ไขข้อบกพร่องนี้จะทำได้โดยการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ตรึง

เมื่อเซลล์ที่นำมาตรึงต้องอาศัยออกซิเจนเพื่อดำรงชีพ จะต้องคำนึงถึงการแพร่กระจายของออกซิเจนในการพิจารณาวิธีที่เหมาะสมสำหรับการตรึง จากการศึกษาพบว่าการตรึงเซลล์ชนิดนี้ร่วมกับเซลล์ที่สังเคราะห์แสงได้จะช่วยแก้ปัญหานีได้ ทั้งนี้เนื่องจาก เซลล์ที่สังเคราะห์แสงจะช่วยผลิตออกซิเจนให้กับเซลล์อีกชนิดหนึ่ง ที่ต้องการออกซิเจนโดยไม่ต้องขนส่งสารพาหะ นอกจากนี้อาจทำการแก้ไขโดยการตรึงในสภาวะที่เป็นอิมัลชัน กับ สารพวกเปอร์ฟลูออไรด์(Perfluoro compound) ซึ่งจะเป็นสารที่นำออกซิเจนไปให้เซลล์ได้เป็นอย่างดี

นอกจากนี้ยังมีปัญหาอื่นๆ ที่จะพบเสมอในการรักษาชีวิตของเซลล์ตรึง แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้มีการปรับปรุงเทคนิคใหม่ๆ ที่ช่วยให้สามารถรักษาชีวิตของเซลล์ตรึงได้มากขึ้น

เทคนิคการตรึงเซลล์โดยใช้วิธีการดักจับ

นอกจากการตรึงเซลล์โดยวิธีต่างๆ ที่ใช้กันทั่วๆไปแล้วยังมีอีกวิธีที่สามารถใช้ในการตรึงเซลล์ได้ดี คือ การดักจับเซลล์ด้วยสารพาหะที่เป็นเจล ซึ่งอาจจะเป็นสารอินทรีย์ที่พบในธรรมชาติ เช่น คอลลาเจน , เจลาติน , อาการ์ , อะกาโรส, เคปปาร์คาราจีแนน, อัลจิเนต, ไคโตแซน, เซลลูโลสหรือได้จากการสังเคราะห์ เช่น โพลิเมอร์บางชนิด : โพลิอะคริลาไมด์, โพลิเมทาตริเลท, โพลิยูริเทน ซึ่งโพลิเมอร์เหล่านี้ อาจจะได้มาจากวิธีต่าง ๆ ได้แก่ การเชื่อมไขว้,โพลิเมอไรเซชัน, โพลิคอนเดนเซชัน

การตรึงเซลล์โดยใช้วิธีดักจับไว้ในสารพาหะ ที่จะทำให้ได้เซลล์ตรึงที่มีลักษณะเป็นเม็ดสามารถทำได้หลายวิธีดังนี้

1. เตรียมโพลิเมอร์ให้มีลักษณะเป็นแผ่น แล้วตัดให้มีขนาดเล็กลง วิธีนี้เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย แต่จะได้ขนาดของเซลล์ตรึงที่ไม่สม่ำเสมอ ซึ่งทำให้สารละลายอาหารไหลผ่านไม่สะดวกเมื่อบรรจุเซลล์ตรึงลงในคอลัมน์

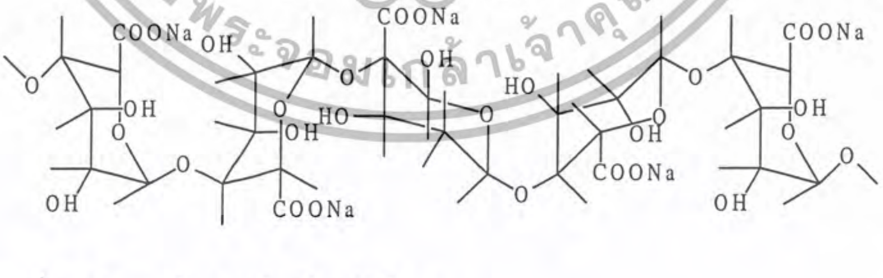
2. ใช้สารผสมของเซลล์กับโพลิเมอร์กดผ่านเข็มฉีดยาลงในสารละลายของเกลือ ซึ่งจะเป็นตัวทำให้โพลิเมอร์คงรูปอยู่ได้ วิธีนี้จะทำให้เม็ดของเซลล์ตรึงมีขนาดสม่ำเสมอ แต่วิธีนี้จะไม่เหมาะสำหรับการเตรียมในปริมาณมาก และเหมาะที่จะใช้กับสารพาหะบางชนิดเท่านั้น สำหรับสารพาหะที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่ โซเดียมอัลจิเนต และเคปปาร์-คาราจีแนน

3. เตรียมโดยใช้ระบบสองเฟส (Two-phase system) เซลตรึงที่เตรียมโดยวิธีนี้จะมีลักษณะกลม และปล่อยให้สารละลายอาหารไหลผ่านได้โดยสะดวก นอกจากนี้ยังสามารถเตรียมเป็นจำนวนมากได้ด้วย

ปัญหาที่สำคัญของการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการดักจับ คือ ข้อจำกัดในการแพร่กระจายของสารอาหาร โดยปกติเซลล์ตรึงจะได้รับสารอาหารน้อยกว่าเซลล์อิสระ ทั้งนี้เพราะเมื่อเซลล์ถูกจับไว้ด้วยสารพาหะจะทำให้สารอาหารซึมผ่านสารพาหะก่อนที่เซลล์จะได้รับสารอาหาร แต่ในการประยุกต์ใช้ในบางกรณีนั้น ข้อจำกัดนี้จะมีความสำคัญน้อยลงเมื่อเทียบกับประโยชน์ที่ได้รับจากเซลล์ตรึง ซึ่งจะป้องกันเซลล์จากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมภายนอกเซลล์ ตัวอย่างเช่น การตรึงเซลล์ด้วยโพลิอะคริลาไมด์จะทำให้ปัญหาเรื่องข้อจำกัดในการแพร่กระจายลดลงได้ เพราะเจลชนิดนี้มีรูพรุนขนาดใหญ่ นอกจากนี้ปัญหาการซึมผ่านผนังเซลล์จะลดลงโดยการทำให้เซลล์แตก (Autolysis) การทำให้เซลล์แห้ง หรือแช่แข็ง หรือโดยการใช้โทลูอีน หรือสารพวกเซอร์แฟคแทนท์ (Surfactant) วิธีการเหล่านี้อาจทำให้เซลล์ตาย แต่จะมีเอนไซม์ที่คงกัมมันตภาพอยู่

สำหรับโพลิเมอร์ธรรมชาติที่ใช้การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการดักจับนั้นมีเป็นจำนวนมาก การทำให้โพลิเมอร์แต่ละชนิดมีลักษณะเป็นเจลนั้นมีหลายวิธี บางวิธีเป็นวิธีที่นุ่มนวล และทำให้เซลล์ที่ไม่ทนต่อสภาวะต่างๆ สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้หลังจากทำการตรึงเซลล์แล้ว

อัลจิเนต เป็นสารพาหะที่ใช้ดักจับเซลล์ได้ง่าย และสะดวก ดังนั้นในปัจจุบันจึงเป็นวิธีหนึ่งที่นำมาใช้กันมาก เมื่อพิจารณาจากจำนวนงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่จะพบว่า อัลจิเนตเป็นโพลิเมอร์ธรรมชาติที่ใช้กันมากที่สุด อัลจิเนตมีโครงสร้างดังรูป



ภาพที่ 2.6 โครงสร้างของโซเดียมอัลจิเนต

ที่มา : Dominguez และคณะ (1998)

ซึ่งจะประกอบด้วยกลุ่มคาร์บอกซิลในแต่ละหน่วยย่อย (โมโนแซคคาไรด์) ที่จะไปยึดจับกับไอออนของโลหะบางชนิด เช่น Ca^{2+}, Ba^{2+}, Cu^{2+}, Al^{3+} เป็นต้น ทำให้ได้เจลที่มีความเสถียร และการตรึงเซลล์โดยวิธีการดักจับได้ในสภาวะที่ไม่รุนแรง เป็นผลให้เซลล์ส่วนมากไม่ตาย ลักษณะรูปร่างของเจลที่ผ่านขั้นตอนการตรึงเซลล์แล้วจะมีลักษณะเป็นเม็ดกลม ซึ่งเตรียมได้โดยการดูดสาร

ละลายผสมของเซลล์ (1-2% โดยน้ำหนักของเซลล์เปียก) กับโซเดียมอัลจิเนต (1-7% โดยน้ำหนัก) ผ่านเข็มฉีดยา แล้วรองรับหยดของสารผสมนี้ ด้วยสารละลายของแคลเซียมคลอไรด์ (0.05-0.5 โมลาร์) ที่เย็น แล้วปล่อยให้เม็ดเจลอยู่ในสารละลาย เป็นเวลานานประมาณ 2 ชั่วโมง ทั้งนี้ก็เพื่อให้เม็ดเจลมีความแข็งมากขึ้น เพราะแคลเซียมไอออนจะเข้าไปแทนที่โซเดียมไอออนของโซเดียมอัลจิเนต ความแข็งของเม็ดเจลจะขึ้นอยู่กับชนิด และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต อัตราส่วนของกรดแมนนูโรนิค และกรดกลูคูโรนิค มีผลต่อความเสถียรของเจล โดยถ้าหากมีกลูคูโรนิคจำนวนมากจะทำให้ได้เจลที่มีความเสถียรสูง

ข้อบกพร่องในการตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนต คือ เม็ดเจลที่ตรึงเซลล์จะละลายในสารละลายทีมไอออน หรือโมเลกุลที่สามารถจับกับ Ca^{2+} ได้ ตัวอย่างเช่น ฟอสเฟต ซิเตรต EDTA เป็นต้น ในกรณีที่ความเข้มข้นของไอออนเหล่านี้ไม่สูงมาก จะทำให้เม็ดเจลคงรูปอยู่ได้ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของ Ca^{2+} หรือใช้สารประกอบเอมีน (เช่น โพลิเอทิลีนอิมีน, โพลิโพรพิลีนอิมีน)และตามด้วยการเชื่อมไขว้โดยใช้กลูทาราลดีไฮด์ จากการตรึงเซลยีสต์พบว่าเซลล์ตรึงที่ผ่านการเคลือบด้วยโพลิเอมีน และกลูทาราลดีไฮด์ จะผลิตเอทธานอลได้ในปริมาณเท่ากับเซลล์ตรึงที่ไม่ผ่านการใช้สารทั้งสอง แต่เม็ดเจลในกรณีแรกจะมีความเสถียร โดยที่จะสามารถอยู่ในสารละลายฟอสเฟตได้เป็นเวลานาน

การดักจับเซลล์ด้วยอัลจิเนตนี้ได้ถูกพัฒนาจนเป็นอุตสาหกรรม บริษัท Kyowa Hakko Kogyo ในญี่ปุ่นได้สร้างโรงงานผลิตเอทธานอลโดยใช้ยีสต์ตรึงที่เตรียมจากการดักจับด้วยอัลจิเนต โดรงงานนี้จะมีถังปฏิกรณ์ขนาด 4000 ลิตร และผลิตเอทธานอลบริสุทธิ์ได้ 2600 ลิตรต่อวัน เม็ดอัลจิเนตจะถูกเตรียมโดยตรงในถังปฏิกรณ์ซึ่งไม่ต้องใช้เครื่องมือใดๆ เพิ่มเติม และใช้เวลาในการเตรียมเพียง 3-4 ชั่วโมง โรงงานทดลองนี้ใช้ระบบคอมพิวเตอร์ควบคุมทั้งหมด ระบบการทำงานในกระบวนการผลิตเอทธานอลเป็นระบบต่อเนื่องในเวลา 4000 ชั่วโมง (ประมาณ 6 เดือน) มีอัตราการผลิตเอทธานอลอย่างคงที่ (8.5-9% ปริมาตรต่อปริมาตร) จากการใช้โมลาสเจือจางเป็นสับสเตรท กระบวนการผลิตเอทธานอลด้วยระบบนี้สูงกว่าการใช้ถังหมักแบบแบทช์ โรงงานนี้นับว่าเป็นโรงงานระดับใหญ่โรงงานแรกที่ใช้เซลล์ตรึงในระดับอุตสาหกรรม

ความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับสารพาหะที่ใช้ในการตรึงเซลล์

1. พื้นที่ผิวของสารพาหะ และความจุของเซลล์
2. ผลกระทบจากสภาวะแวดล้อมรอบๆเซลล์ตรึง สภาวะแวดล้อมรอบๆเซลล์ตรึงจะมีผลต่อการทำงานของเซลล์ ผลกระทบนี้อาจจะน้อยกว่ากรณีของเอนไซม์ตรึง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่เซลล์ตรึงผลิตเอนไซม์ ภายในเซลล์นั้นจะได้รับผลกระทบจากสภาวะแวดล้อมรอบๆเซลล์น้อยมาก

ปกติเซลล์ตรึงจะมีความเสถียรสูงขึ้น และอายุยืนนานกว่าเซลล์อิสระ อย่างไรก็ตามจะมีตัวแปรอื่นๆ ที่จะทำให้เซลล์ตรึงมีความเสถียรสูงขึ้น ซึ่งได้แก่ ตัวยับยั้ง (Inhibitor), ตัวทำละลายอินทรีย์, ความร้อน และกรด

2.3 ผลของ Tween80 ที่มีต่อปริมาณไซลิทอลที่ถูกขับออกจากเม็ดเจล

จากการทดลองของ Bhumibhamon (1982) พบว่า Tween80 0.1 เปอร์เซ็นต์ จะสามารถช่วยเพิ่มการส่งผ่าน Acid protease ซึ่งผลิตจาก *Aspergillus awmori* Yongsmith และ Chutima (1983) พบว่า Tween80 มีผลต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ *Propionibacterium* Takahashi (1983) ได้ใช้ Tween80 (Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate) ซึ่งเป็น non-ionic surfactant อีกชนิดหนึ่งที่กระตุ้นการขับ Extracellular protein โดยเชื้อ *Pseudomonas butanovara* sp. nov. พบว่าถ้าใช้ Tween80 ปริมาณ 0.05 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มการขับ Extracellular protein เพิ่มขึ้น 3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่ใส่สารนี้ Balabushevich และคณะ (1983) ทดลองใช้ Tween 20, Tween40 และ Tween85 จะกระตุ้นการขับออกของ Inosine-5-monophosphate (IMP) เพิ่มขึ้น 2 เท่า อาจเนื่องจากการที่ Tweens เกี่ยวข้องกับการทำให้ cell permeability เพิ่มขึ้น เป็นผลให้การเจริญและการขับสาร IMP เพิ่มขึ้น ในการทดลองจึงเลือกใช้ Tween80 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการขับสีแดงออกนอกเซลล์

สำหรับ *Monascus sp.* KBI13 อาหารที่เติม Tween80 1.33×10^{-1} มิลลิลิตรต่อลิตร จะได้ปริมาณสารสีแดงนอกเซลล์น้อยกว่าอาหารที่ไม่เติม Tween80 ซึ่งมีปริมาณสีแดงนอกเซลล์ 85.5 หน่วย ส่วนอาหารที่เติม Tween80 1.33×10^{-2} มิลลิลิตรต่อลิตร ได้ปริมาณสีแดงนอกเซลล์สูงสุด คือ 105 หน่วย และเมื่อลดปริมาณ Tween80 เป็น 1.33×10^{-3} – 1.33×10^{-4} มิลลิลิตรต่อลิตร จะได้สีแดงนอกเซลล์ลดลง ตามลำดับ แต่ยังคงมีปริมาณสีแดงนอกเซลล์มากกว่าอาหารที่ไม่เติม Tween80

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย และอุปกรณ์

1.1 จุลินทรีย์

Candida tropicalis TISTR 5045 ใช้ในการศึกษาการผลิตไซลิทอล ได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยทำการเก็บเป็น stock culture ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลล์เซียส ในอาหาร YM agar

1.2 อุปกรณ์

1. สเปคโตรโฟโตมิเตอร์
2. เครื่องเขย่าแบบไม่ควบคุมอุณหภูมิ (open shaker)
3. เครื่องชั่งสาร 4 ตำแหน่ง และ 2 ตำแหน่ง
4. เครื่องวัดพีเอช
5. ตู้อบ
6. เครื่องแก้ว
7. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง
9. ตู้ยูวี

1.3 สารเคมี

1. HCl
2. Sodiumperiodate
3. Butane-2,3-diol
4. Pentane-2,4-dione
5. Ammonium acetate
6. Acetic acid
7. Xylose
8. Xylitol
9. Glucose

10. ยีสต์สกัด
11. มอลต์สกัด
12. เปปโตน
13. $CuSO_4.5H_2O$
14. $NaH_2PO_4.12H_2O$
15. Na_2SO_4 (anhydrous)
16. $NaIO_4$
17. Sodium potassium tartrate (tetrahydrate)
18. Thiourea
19. p-bromoaniline
20. NaOH
21. Ammonium molybdate
22. H_2SO_4
23. Disodium arsenate
24. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน
25. สารละลายไซลิทอลมาตรฐาน
26. สารละลายไซโลสมาตรฐาน
27. Tween80

1.4 วิธีการทดลอง

1. การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 โดยเทคนิค

1.1 การสร้างกราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ ซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Optical density ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และ ระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

1.2 การสร้างกราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ ซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่นับได้จาก Haemacytometer ซึ่งเป็นปริมาณเซลล์ต่ออาหารเหลวที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง 1 มิลลิลิตร และ ระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

2. การศึกษาขั้นตอนการตรึงเซลล์ โดยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต (Gel entrapment immobilization)

3. ศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบจากการเติม Tween80 ลงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้คือ 0 0.1 0.5 1.0 และ 1.5% ในการผลิตไซลิทอลในสภาวะที่มีการใช้เซลล์ตรึง

4. ศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบจากการเติม Tween80 ลงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้คือ 0 0.1 0.5 1.0 และ 1.5% ในการผลิตไซลิทอลในสภาวะที่มีการใช้ เซลล์อิสระ

5. ศึกษาถึงปริมาณผลผลิตที่ได้ เช่น ปริมาณไซลิทอล ปริมาณสารตั้งต้นที่ถูกใช้ไปในกระบวนการผลิต เช่น ปริมาณน้ำตาลไซโลส และสภาวะต่างๆ ที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างกระบวนการผลิต เช่น พีเอช ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมัก, ปริมาณค่ากลูโคสและไซโลสที่ลดลง, ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลที่ผลิตได้

1. การศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ*Candida tropicalis* TISTR 5045

ทั้งนี้เพื่อศึกษาว่าเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่ทำการเพาะเลี้ยงนั้น ใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโต เข้าสู่ระยะต่างๆเป็นระยะเวลานานเท่าไร ดังนี้

1.1 การสร้างกราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ ซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Optical density ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และ ระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที มีขั้นตอนดังนี้

1. ทำการถ่ายเชื้อลง slant อาหารใหม่ เพื่อใช้ในการผลิตหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับการเพาะเลี้ยง

- ทำการลนปากหลอดอาหารเชื้อเก่า และหลอดอาหารใหม่ให้ร้อน
- จากนั้นลนลูปให้ร้อนแดง เพื่อฆ่าเชื้อแล้วจึงนำมาเขี่ยเชื้อจากหลอดเชื้อเก่ามาทำการเขี่ยลงบนหลอดอาหารใหม่
- ลนปากหลอดทั้งสองด้วยเปลวไฟ เพื่อทำการฆ่าเชื้ออีกครั้ง แล้วปิดปากหลอดด้วยจุกสำลี
- บ่มหลอดเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมง

2. นำเอาหลอดเชื้อดังกล่าวมาถ่ายลงในอาหารเหลว YM medium ซึ่งเป็นอาหารเหลวเพื่อการเจริญเติบโตซึ่งมีอาหารบรรจุอยู่ 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

- เขี่ยเชื้อจาก slant ดังกล่าวมา 2 ลูป เพื่อถ่ายลงในอาหารเหลว YM medium โดยทุกขั้นตอนจะต้องกระทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

- นำหัวเชื้อในอาหารเหลวดังกล่าวมาทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

3. ทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ทันทีหลังจากที่ถ่ายเชื้อจาก slant ลงในอาหารเหลว YM medium โดยค่าที่ได้ จะค่าการดูดกลืนแสง ณ ชั่วโมงที่ 0

4. ทำการตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นระยะเวลานานทั้งสิ้น 24 ชั่วโมง

5. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ มาทำการพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ชั่วโมงต่างๆ

6. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร กับน้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาต่างๆกัน (ตรวจวัดทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 1 ชั่วโมง)

1.2 การสร้างกราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ ซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่นับได้จาก Haemacytometer ซึ่งเป็นปริมาณเซลล์ต่ออาหารเหลวที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง 1 มิลลิลิตร และ ระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

1. ทำการถ่ายเชื้อลง slant อาหารใหม่ เพื่อใช้ในการผลิตหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับการเพาะเลี้ยง

- ทำการลนปากหลอดอาหารเชื้อเก่า และหลอดอาหารใหม่ให้ร้อน
- จากนั้นลนลูปให้ร้อนแดง เพื่อฆ่าเชื้อแล้วจึงนำมาเขี่ยเชื้อจากหลอดเชื้อเก่ามาทำการเขี่ยลงบนหลอดอาหารใหม่
- ลนปากหลอดทั้งสองด้วยเปลวไฟ เพื่อทำการฆ่าเชื้ออีกครั้ง แล้วปิดปากหลอดด้วยจุกสำลี
- บ่มหลอดเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมง

2. นำเอาหลอดเชื้อดังกล่าวมาถ่ายลงในอาหารเหลว YM medium ซึ่งเป็นอาหารเหลวเพื่อการเจริญเติบโตซึ่งมีอาหารบรรจุอยู่ 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

- เขี่ยเชื้อจาก slant ดังกล่าวมา 2 ลูป เพื่อถ่ายลงในอาหารเหลว YM medium โดยทุกขั้นตอนจะต้องกระทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ
- นำหัวเชื้อในอาหารเหลวดังกล่าวมาทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

3. ทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ โดยใช้ Haemacytometer เพื่อหาจำนวนเซลล์ทั้งหมดต่ออาหารเหลว 1 มิลลิลิตร เริ่มทำการนับทันทีหลังจากที่ถ่ายเชื้อจาก slant ลงในอาหารเหลว YM medium โดยค่าที่ได้ จะเป็นจำนวนเซลล์ต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร ณ ชั่วโมงที่ 0

4. ทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ ทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นระยะเวลานานทั้งสิ้น 24 ชั่วโมง

5. นำจำนวนเซลล์ที่นับได้ มาทำการพล็อตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่นับได้ กับระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยง

6. สร้างกราฟมาตรฐาน ซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร กับจำนวนเซลล์ที่นับได้ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

7. นำจำนวนเซลล์ที่นับได้ มาเทียบกับกราฟมาตรฐานการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่นับได้ กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาต่างๆกัน (ตรวจวัดทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 1 ชั่วโมง)

2. การศึกษาขั้นตอนการตรึงเซลล์ โดยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต (Gel entrapment immobilization) เป็นการตรึงเซลล์โดยเทคนิคการห่อหุ้ม (Gel entrapment) โดยใช้โซเดียมอัลจิเนต เป็นโพลิเมอร์ที่ใช้เป็นตัวห่อหุ้มเซลล์เอาไว้ภายใน

1. ทำการถ่ายเชื้อลง slant อาหารใหม่ เพื่อใช้ในการผลิตหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับการเพาะเลี้ยง

2. นำเอาหลอดเชื้อดังกล่าวมาถ่ายลงในอาหารเหลว YM medium ซึ่งเป็นอาหารเหลวเพื่อการเจริญเติบโตซึ่งมีอาหารบรรจุอยู่ 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

- เขี่ยเชื้อจาก slant ดังกล่าวมา 2 ลูป เพื่อถ่ายลงในอาหารเหลว YM medium โดยทุกขั้นตอนจะต้องกระทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

- นำหัวเชื้อในอาหารเหลวดังกล่าวมาทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที
- ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าดังกล่าวเป็นระยะเวลานาน 3-4 ชั่วโมง จนกระทั่งค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร มีค่าประมาณ 0.3-0.4 เนื่องจากจะเป็นช่วงที่เชื้อมีการเจริญเติบโต อยู่ในช่วง Mid log พีเอชase ซึ่งเป็นระยะที่เหมาะแก่การทำ หัวเชื้อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยง

3. ถ่ายเอาหัวเชื้อจากอาหารเหลวดังกล่าวลงในอาหารเหลวใหม่เป็นปริมาณ 4% ของอาหารเหลวที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์

4. ทำการเพาะเลี้ยง เป็นระยะเวลานาน 14 ชั่วโมง ทั้งนี้เพื่อให้เชื้อมีการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง Max log พีเอชase ทั้งนี้เชื้อที่มีอายุอยู่ในช่วงนี้ จะมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด ซึ่งจะให้ผลผลิตสูงที่สุด

5. นำเอาเซลล์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงดังกล่าว มาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลล์เซียส เป็นระยะเวลานาน 10 นาที เพื่อแยกเอาตัวเซลล์ออกจากน้ำหมัก

6. รวมเซลล์ที่ได้เป็นปริมาณ 4 กรัม (4% ของอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล) เพื่อนำมาใช้ตรึงในโซเดียมอัลจิเนต

7. นำเอาเซลล์ที่ได้ 4 กรัมดังกล่าว มาเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % โดยเซลล์น้ำหนัก 5 กรัม จะเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เป็นปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียว

8. เทสารผสมดังกล่าว ลงในฟลาสก์ที่บรรจุสารละลายโซเดียมอัลจิเนต โดยเซลล์ 5 กรัม จะเติม สารละลายโซเดียมอัลจิเนต 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียว ทั้งนี้เพื่อให้เม็ดเจลที่ได้ มีเซลล์กระจายตัวอย่างทั่วถึงกันในเม็ดเจลแต่ละเม็ด

9. เทสารผสมที่ได้ลงในหลอดฉีดยา เพื่อหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.01 M ปริมาตร 115 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเม็ดเจลที่ได้จะมีลักษณะเป็นเม็ดกลมห่อหุ้มเอาเซลล์ไว้ภายใน ทั้งนี้เนื่องจากแคลเซียมอัลจิเนต เกิดการฟอร์มตัวเป็นโพลิเมอร์ห่อหุ้มเอาตัวเซลล์ไว้ในร่างแหของโพลิเมอร์ดังกล่าว

10. นำเอาเม็ดเจลที่ได้มาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลล์เซียส เป็นระยะเวลานาน 2 ชั่วโมงเป็นอย่างต่ำ

11. ทำการล้างเม็ดเจลที่ได้ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 3 ครั้ง ครั้งละ 50 มิลลิลิตร โดยในการล้าง จะค่อยๆตักเม็ดเจลที่ได้ใส่ลงในฟลาสก์ที่บรรจุน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วเขย่าขวดเป็นรูปลงกลมในแนวราบแรงๆ หลายๆรอบ เพื่อล้างเอาแคลเซียมคลอไรด์ที่เกาะอยู่ที่เม็ดเจลออก ก่อนที่จะนำเอาเม็ดเจลมาถ่ายลงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล

3. ศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบจากการเติม Tween80 ลงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้คือ 0 0.1 0.5 1.0 และ 1.5% ในการผลิตไซลิทอลในสภาวะที่มีการใช้เซลล์ตรึง

1. ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ และนำเอาเซลล์ที่ได้มาผ่านขั้นตอนในการตรึงเซลล์ตามกรรมวิธีที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น

2. นำเอาเม็ดเจลที่ได้มาถ่ายลงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่มีการเติม Tween80 ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ดังนี้คือ 0 0.1 0.5 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์

3. ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มไว้ในเม็ดเจลดังกล่าว ในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอลบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลานาน 9 ชั่วโมง

4. ลดความเร็วรอบของเครื่องเขย่าลงเหลือ 150 รอบต่อนาที แล้วทำการเพาะเลี้ยงต่อไปอีกเป็นระยะเวลานาน 6 ชั่วโมง

5. ทำการตรวจวัดปริมาณไซลิทอลที่ได้โดยเทคนิคของ Alder & Gustafson's method

4. ศึกษาถึงปริมาณผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมัก เช่น ปริมาณไซลิทอล ปริมาณสารตั้งต้นที่ถูกใช้ไปในกระบวนการผลิต เช่น ปริมาณน้ำตาลไซโลส และสภาวะต่างๆ ที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างกระบวนการผลิต เช่น พีเอช, ปริมาณเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไป ในสภาวะการผลิตที่ใช้เซลล์ตรึง

1. ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ และนำเอาเซลล์ที่ได้มาผ่านขั้นตอนในการตรึงเซลล์ตามกรรมวิธีที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น

2. ถ่ายเอาเม็ดเจลที่ได้ ลงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอลซึ่งมีการเติม Tween80 ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ลงไป

3. เลี้ยงเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในเม็ดเจลดังกล่าว บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 9 ชั่วโมง ให้ทำการตรวจวัดค่าต่างๆในทันที ซึ่งค่าที่ได้ให้นับเป็นชั่วโมงที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง สำหรับค่าต่างๆ ที่ทำการตรวจวัดได้แก่

- พีเอช ที่เปลี่ยนแปลงไป
- ปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร
- ปริมาณกลูโคสที่ลดลง โดยเทคนิคของ Somogyi & Nelson’s method
- ปริมาณไซโลสที่ลดลง โดยเทคนิค Deschatelets & Yu (1985)

ปริมาณไซลิทอลที่เพิ่มขึ้น โดยเทคนิคของ Alder & Gustafson’s method

4. ลดความเร็วรอบของเครื่องเขย่าลงเหลือ 150 รอบต่อนาที

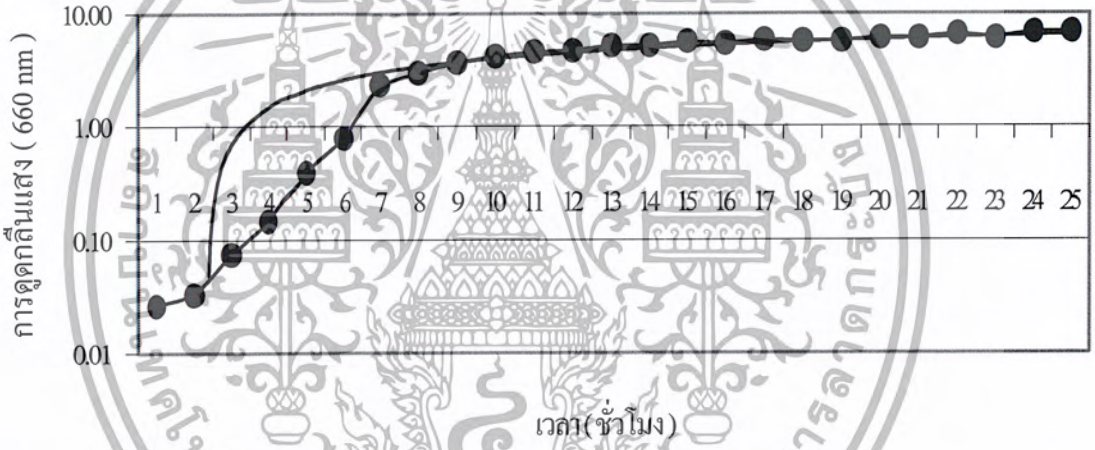
5.ทำการตรวจวัดค่าดังกล่าวทุกๆ 2 ชั่วโมงเป็นระยะเวลาทั้งหมด 24 ชั่วโมง

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

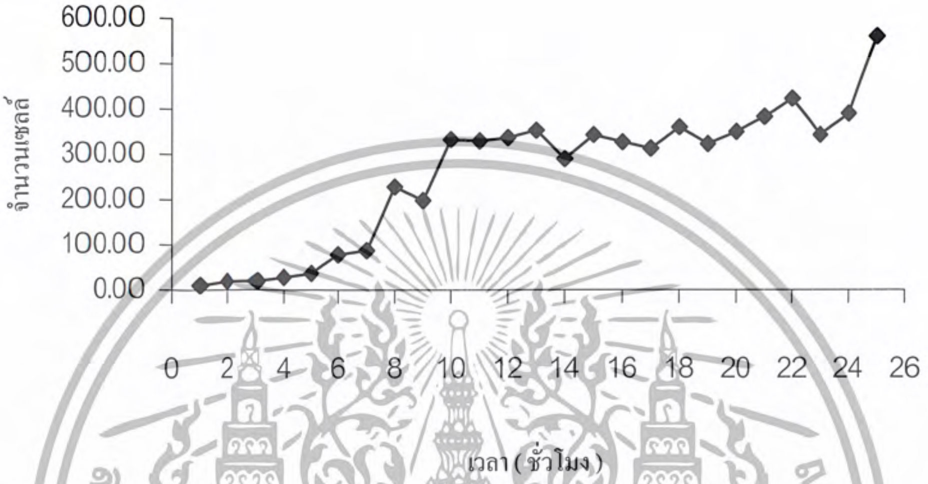
1. ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045

1.1 โดยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ที่ระยะเวลาต่างๆ เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากรูปที่ 4.1 พบว่าเชื้อจะเจริญเข้าสู่ช่วง max log phase ที่ชั่วโมงที่ 9 และเข้าสู่ช่วง stationary phase ที่ชั่วโมงที่ 11



รูปที่ 4.1 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ซึ่งมีความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเวลาที่ชั่วโมงต่างๆ ขณะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต บนเครื่องเขย่าที่อุณภูมิห้องด้วยความเร็วรอบที่ 250 รอบต่อนาที

1.2 โดยการนับจำนวนเซลล์โดยใช้ Haemacytometer ที่ระยะเวลาต่างๆเป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมง

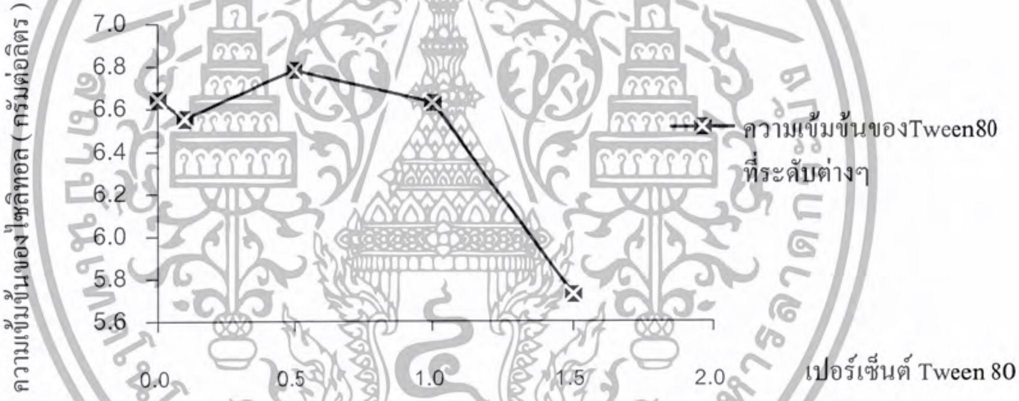


รูปที่ 4.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่นับได้ และเวลาที่ชั่วโมงต่างๆ ขณะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เพื่อวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045

จากการศึกษาผลการเจริญเติบโตของเชื้อดังที่แสดงในรูปที่ 4.1 และ 4.2 แสดงให้เห็นถึงช่วงที่เชื้อมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด (max log phase) คือในช่วงชั่วโมงที่ 9 ถึง 10 ก่อนที่เชื้อจะเข้าสู่ช่วงการเจริญเติบโตที่คงที่ (stationary phase) เพื่อนำไปหาช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตไซลิทอล และหลังจากนั้นจึงทำการจำกัดปริมาณออกซิเจนโดยลดความเร็วรอบลงเหลือ 150 รอบต่อนาทีในขั้นตอนต่อไป

2. ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Tween80

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในอาหารสูตร YM เพื่อการเจริญเติบโต และนำมาผ่านกระบวนการตรึงเซลล์ เพื่อนำมาใช้ในการผลิตไซลิทอลในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอลทีมีไซโลสเป็นองค์ประกอบ โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของ Tween80 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน คือ 0 0.1 0.5 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องด้วยความรีวรอบเริ่มต้น 220 รอบต่อนาทีเป็นระยะเวลานาน 12 ชั่วโมง และหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 9 ชั่วโมงจึงทำการลดความเร็วรอบลงเหลือ 150 รอบต่อนาที เมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปอีก 6 ชั่วโมงจึงทำการวัดปริมาณไซลิทอลที่ผลิตได้



รูปที่ 4.3 เปรียบเทียบความเข้มข้นของไซลิทอลที่ถูกผลิตโดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่มีการแปรผันปริมาณ Tween80 ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆกัน คือ 0 0.1 0.5 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนความเข้มข้นของ Tween80 ที่เหมาะสม

ความเข้มข้นของ Tween80 (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณน้ำตาลไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
0	6.688 ^{a}
0.1	6.596 ^{a}
0.5	6.826 ^{a}
1.0	6.671 ^{a}
1.5	5.765 ^{a}

a ค่าเฉลี่ยตามแนวตั้งที่เป็นอักษรเดียวกันแสดงถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 95 %

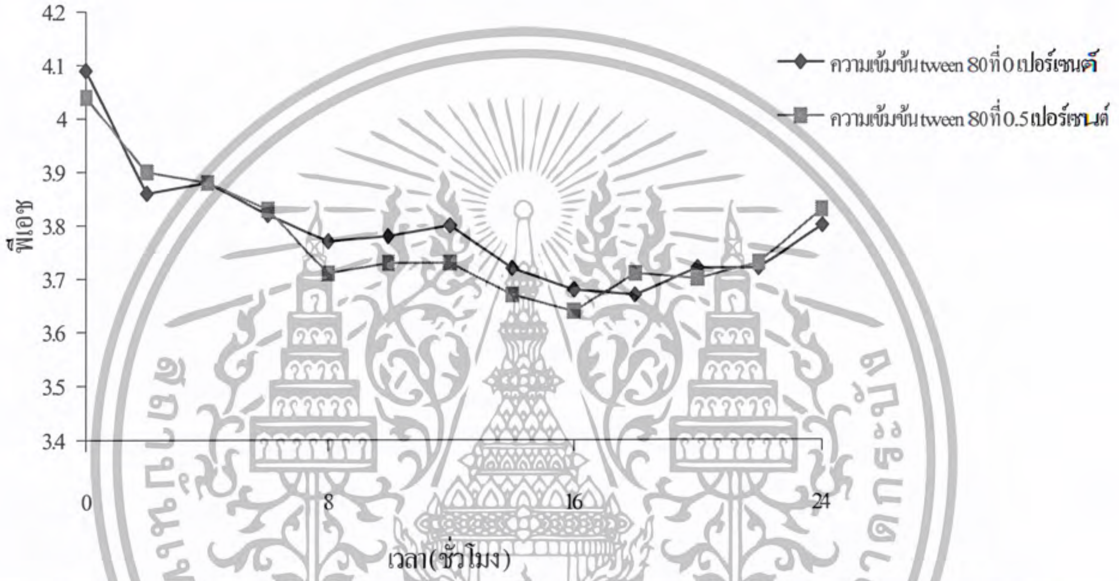
จากตารางการวิเคราะห์โดยวิธีทางด้านสถิติ พบว่าปริมาณไซลิทอลที่ได้จากสภาวะที่มีการใช้ Tween80 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆคือ 0 0.1 0.5 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ระดับความเข้มข้นของ Tween80 ที่ 0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) จะให้ปริมาณไซลิทอลสูงกว่าสภาวะอื่นๆ ซึ่งสภาวะที่มีการเติม Tween80 ที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) จะให้ปริมาณไซลิทอล 6.826 กรัมต่อลิตรและ ในสภาวะที่ ไม่มี การเติม Tween80 จะให้ไซลิทอลในปริมาณที่ใกล้เคียงกันคือ 6.688 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเลือกทั้งสองสภาวะที่มีการเติม Tween80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 0 เปอร์เซ็นต์ (v/v) มาทำการศึกษาเปรียบเทียบหาค่าต่างๆที่เปลี่ยนแปลงไปในขณะทำการหมักต่อไป

3. ผลการศึกษาค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไป ปริมาณกลูโคสและปริมาณไซโลส ที่ถูกใช้ไป และปริมาณของไซลิทอลที่เกิดขึ้น ระหว่างกระบวนการหมักที่ระยะเวลาต่างๆ ในสภาวะที่มีการเติม Tween80 ที่ 0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในอาหารสูตร YM เพื่อการเจริญเติบโต และนำมาผ่านกระบวนการตรึงเซลล์ เพื่อนำมาใช้ในการผลิตไซลิทอล ในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอลทีมีไซโลสเป็นองค์ประกอบ ในสภาวะที่ไม่มีการเติม Tween80

3.1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของพีเอชในระหว่างกระบวนการหมักที่ระยะเวลาต่างๆ ในสภาวะที่มีการเติม Tween80 ที่ 0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์

โดยการวัดค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไปขณะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอลที่มีการเติม Tween80 ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบเริ่มต้น 220 รอบต่อนาที และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 9 ชั่วโมง จะทำการลดความเร็วรอบลงเหลือ 150 รอบต่อนาที ดังที่แสดงในรูปที่ 4.4

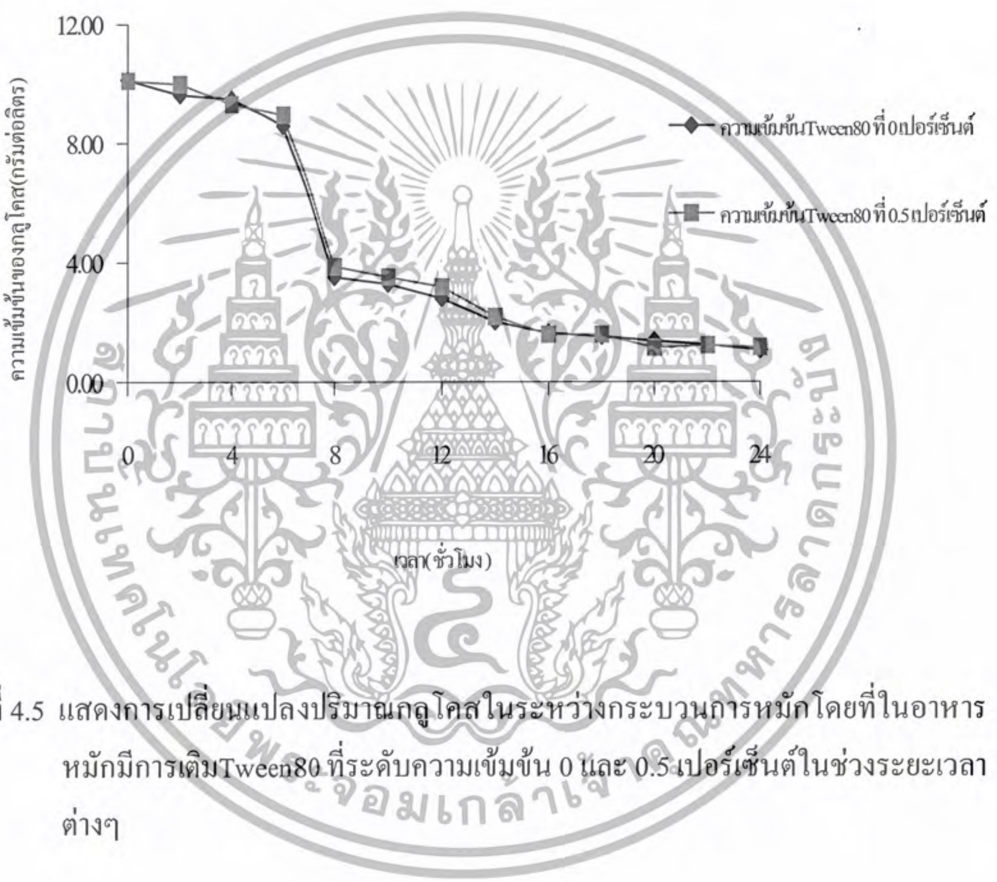


รูปที่ 4.4 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในระหว่างกระบวนการหมักโดยที่ในอาหารหมักมีการเติมTween80 ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ0.5 เปอร์เซ็นต์ในช่วงระยะเวลาต่างๆ

เนื่องจากในกระบวนการหมักทุกชนิดจะต้องทำการวัดค่าพีเอชเพื่อให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมกับการผลิตผลิตภัณฑ์ โดยที่ถ้าในกระบวนการหมักมีความเป็นกรดสูงเซลล์จุลินทรีย์จะตายและทำให้ผลผลิตลดต่ำลงและในกระบวนการหมักนี้จากการศึกษาพบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลจะอยู่ในช่วงระหว่าง 3.5-4 และจากภาพที่ 4.4 จะเห็นว่าถึงแม้ค่าพีเอชที่ต่ำที่สุดคือ 3.64 ยังคงอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการหมักซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่มีผลกระทบต่อเซลล์จุลิทรีย์ในการผลิตไซลิทอลและเป็นการยืนยันการทดลองว่าการเปลี่ยนแปลงของพีเอชไม่มีผลต่อการผลิตไซลิทอล เนื่องจากพีเอชยังคงไม่ลดลงต่ำไปกว่า 3.5 และจากการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของพีเอชในระหว่างกระบวนการหมักพบว่าพีเอชมีค่าใกล้เคียงกันและจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีสำคัญที่ 95 เปอร์เซ็นต์

3.2 การศึกษาปริมาณของกลูโคสที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างกระบวนการหมักที่ระยะเวลาต่างๆ ในสภาวะที่มีการเติม Tween80 ที่ 0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์

โดยการวัดค่าปริมาณกลูโคสที่ผลิตได้ในขณะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอลที่มีการเติม Tween80 ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็วรอบเริ่มต้น 220 รอบต่อนาที และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 9 ชั่วโมง จะทำการลดความเร็วรอบลงเหลือ150 รอบต่อนาที ดังที่แสดงในรูปที่ 4.5

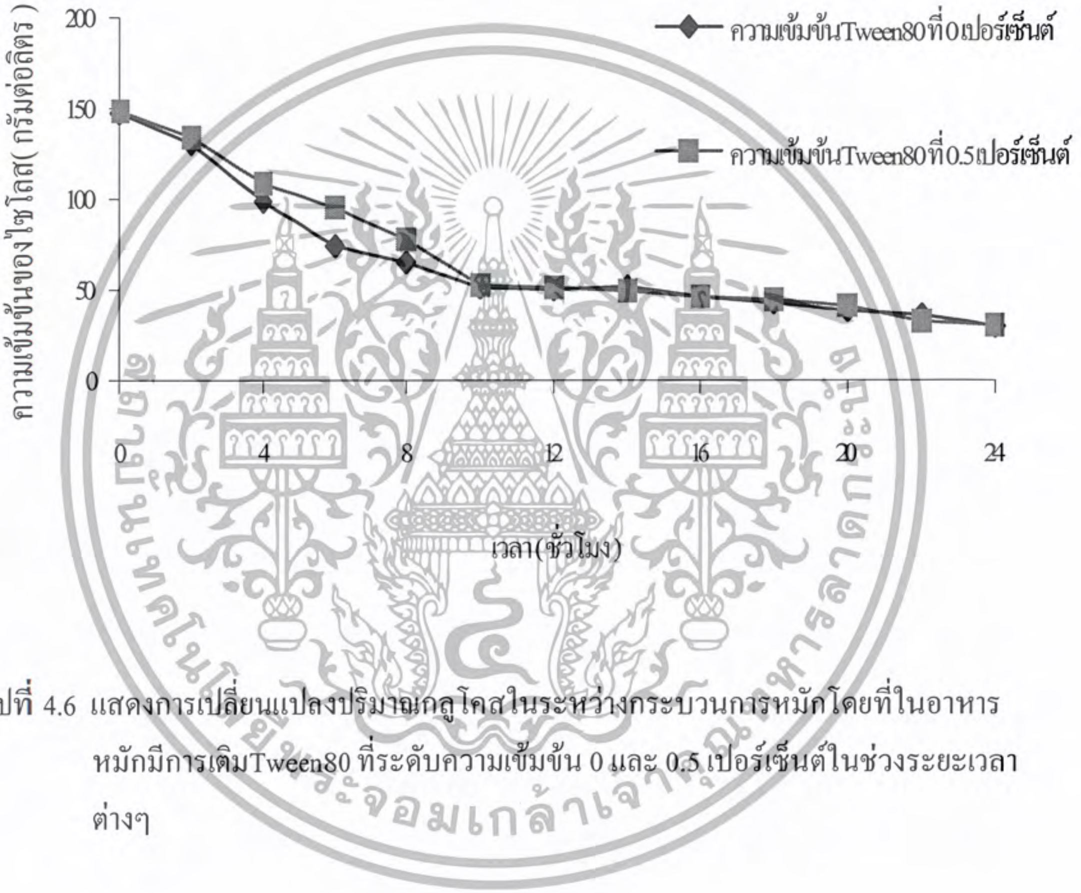


รูปที่ 4.5 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูโคสในระหว่างกระบวนการหมักโดยที่ในอาหารหมักมีการเติมTween80 ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ในช่วงระยะเวลาต่างๆ

จากรูปที่ 4.5 จะเห็นว่าในช่วงระยะเวลา 9 ชั่วโมงแรกก่อนการลดความเร็วรอบกลูโคสจะถูกใช้ไปอย่างรวดเร็วจนลดลงเหลือประมาณ 3.4 กรัมต่อลิตร และ 3.7 กรัมต่อลิตร ในสภาวะที่มีการเติมTween80 ที่ 0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและหลังจากนั้นกลูโคสจะค่อยๆลดลงอย่างสม่ำเสมอจนกระทั่งครบ 24 ชั่งโมง ซึ่งแสดงว่าเชื้อจะใช้น้ำตาลกลูโคสในอาหารเหลวเพื่อการผลิตไซลิทอลที่มีความเข้มข้น Tween80 ที่ 0 เปอร์เซ็นต์ ไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้สูงกว่าที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และด้วยความเร็วรอบที่สูงนี้จะทำให้เซลล์ได้รับออกซิเจนมากขึ้นเป็นผลให้เชื้อนำเอา น้ำตาลส่วนใหญ่เข้าสู่ วิถีในการสลายน้ำตาลเพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตของตัวเซลล์นั่นเอง

3.3 การศึกษาปริมาณของไซโลสที่เปลี่ยนแปลงไประหว่างกระบวนการหมักที่ระยะเวลาต่างๆ ในสภาวะที่มีการเติม Tween80 ที่0.0 และ0.5 เปอร์เซ็นต์

โดยการวัดค่าปริมาณที่ผลิตไซโลสได้ในขณะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอลที่มีการเติม Tween80 ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็วรอบเริ่มต้น 220 รอบต่อนาที และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 9 ชั่วโมง จะทำการลดความเร็วรอบลงเหลือ150 รอบต่อนาที ดังที่แสดงในรูปที่ 4.6



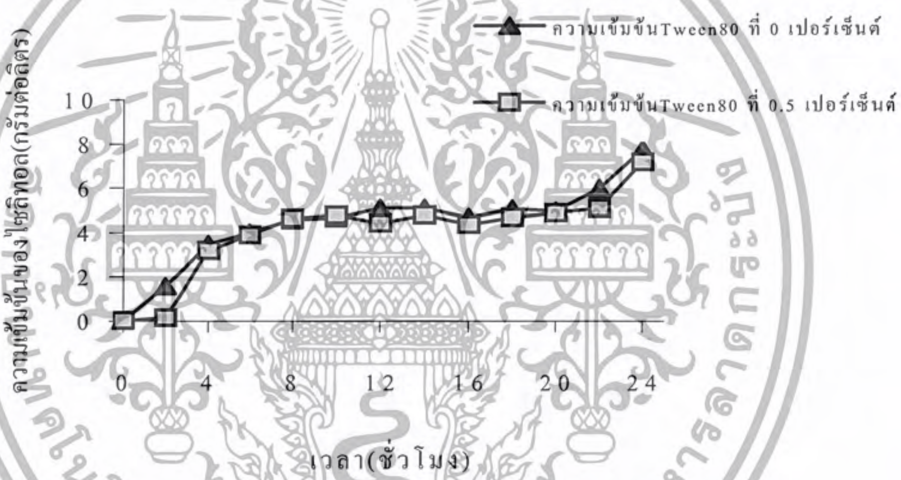
รูปที่ 4.6 แสดงการเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูโคสในระหว่างกระบวนการหมักโดยที่ในอาหารหมักมีการเติมTween80 ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ในช่วงระยะเวลาต่างๆ

จากผลการทดลองในสภาวะที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้ความเข้มข้นของไซโลสเริ่มต้นที่ 150 กรัมต่อลิตร กลูโคสที่ 10 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นที่ 4.0 โดยใช้วิธีการตรึงเซลล์ ที่มีการเติม Tween80 ที่ 0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบเริ่มต้นเท่ากับ 220 รอบต่อนาที และหลังจากทำการเพาะเลี้ยงนาน 9 ชั่วโมง พบว่าไซโลสลดลงจาก 150 กรัมต่อลิตร เหลือประมาณ 65 กรัมต่อลิตร และ 58 กรัมต่อลิตร ตามลำดับแล้วจึงทำการลดความเร็วรอบลงเหลือ 150 รอบต่อนาที โดยที่ไซโลสจากทั้งสองสภาวะจะค่อยๆลดต่ำลงอย่างสม่ำเสมออย่างใกล้เคียงกันจนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมัก 24 ชั่วโมง เซลล์ได้รับปริมาณ

ออกซิเจนที่ลดลงทำให้ปริมาณไซโลสส่วนใหญ่ในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกใช้ไปในการผลิตไซลิทอล แทนที่จะถูกนำมาใช้ในการเจริญเติบโต

3.4 การศึกษาปริมาณของไซลิทอลที่ผลิตได้ในระหว่างกระบวนการหมักที่ระยะเวลาต่างๆ ในสภาวะที่มีการเติม Tween80 ที่ 0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์

โดยการวัดค่าปริมาณไซลิทอลที่ผลิตได้ในขณะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอลที่มีการเติม Tween80 ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบเริ่มต้น 220 รอบต่อนาที และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 9 ชั่วโมง จะทำการลดความเร็วรอบลงเหลือ150 รอบต่อนาที ดังที่แสดงในรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 แสดงการผลิตปริมาณไซลิทอลที่ได้ในระหว่างกระบวนการหมักในสภาวะการหมักมีการเติมTween80 ที่ระดับความเข้มข้น 0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ในช่วงระยะเวลาต่างๆ

จากรูปพบว่าความเข้มข้นของTween80 ที่ 0 เปอร์เซ็นต์จะให้ปริมาณไซลิทอลสูงกว่าที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ คือ 7.756 และ 7.188 กรัมต่อลิตร ตามลำดับโดยทำการวัดค่าปริมาณไซลิทอลที่ผลิตได้หลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วซึ่งจะเห็นว่าปริมาณการผลิตไซลิทอล จะมีความสอดคล้องกับภาพที่ 4.5 และ 4.6 โดยในช่วงที่มีการใช้ความเร็วรอบเริ่มต้นที่ 220 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นช่วงที่จะใช้กลูโคสในการเจริญเติบโตและหลังจากลดความเร็วรอบลงเหลือ 150 รอบต่อนาที ในชั่วโมงที่ 9 โดยในช่วงนี้เชื้อจะนำเอาไซโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อไปใช้เพื่อเข้าสู่ วิถีการ

เปลี่ยนแปลงไปสู่การผลิตไซลิทอล ซึ่งจากรูปจะเห็นว่าไซลิทอลจะเริ่มมีการผลิตที่ค่อยๆสูงขึ้นตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9 เป็นต้นไปและเนื่องจากอัตราการผลิตไซลิทอลที่มีความสม่ำเสมอจึงทำให้คาดการณ์ได้ว่าการหมักหลังจากชั่วโมงที่ 24 ไปแล้วอัตราการผลิตของไซลิทอลจะมีค่าเพิ่มมากขึ้นจนถึงค่าในระดับหนึ่งและจากการแสดงค่าเปรียบเทียบการผลิตปริมาณไซลิทอลในระหว่างกระบวนการหมักพบว่าไซลิทอลมีค่าใกล้เคียงกันและจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีสำคัญที่ 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.2 การคำนวณในการผลิตไซลิทอล

	Tween80 ที่ระดับ 0 เปอร์เซ็นต์	Tween80 ที่ระดับ 0.5 เปอร์เซ็นต์
อัตราการใช้ไซโลส (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	4.921	4.897
ความเข้มข้นไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)	7.756	7.188
อัตราการผลิตไซลิทอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.322	0.298
อัตราการผลิตไซลิทอลจำเพาะ (กรัมไซลิทอลต่อกรัมเซลล์ต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.00805	0.00745
ผลผลิตไซลิทอล (กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส)	0.168	0.133

หลังจากนำค่าที่ได้จากการศึกษากระบวนการหมักมาทำการคำนวณเพื่อหาค่าต่างๆ ในการผลิตไซลิทอลดังที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 4.2 ซึ่งจากผลจะให้อัตราการผลิตไซลิทอลเท่ากับ 0.322 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลได้ของไซลิทอลจากกระบวนการหมักเท่ากับ 0.168 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส และอัตราการใช้ไซโลสเท่ากับ 4.921 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง หลังจากทำการหมักเป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมง และจากการวิเคราะห์ทางสถิติแสดงค่าเปรียบเทียบอัตราการใช้ไซโลสในระหว่างกระบวนการหมักพบว่ามีอัตราการใช้ไซโลสจากทั้งสองสภาวะที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ 95 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของTween80 ที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลไซลิทอล ในระดับฟลาสก์เขย่า โดยใช้เซลล์ตรึงของเชื้อยีสต์ *Candida tropicalis* TISTR 5045 โดยแปรความเข้มข้นของTween80 เป็น 0 0.1 0.5 1 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์พบว่าการเติม Tween80 หรือไม่เติมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงนำความเข้มข้นของTween80 ที่ระดับ 0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มาทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของพีเอชและปริมาณน้ำตาลไซโลสและกลูโคสและการผลิตน้ำตาลไซลิทอล ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของ Tween80 ที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์มีค่าความเข้มข้นของไซโลส ณ ชั่วโมงที่ 24 มีค่าเท่ากับ 30.04 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกลูโคสมีค่าเท่ากับ 1.16 กรัมต่อลิตร พีเอชที่ชั่วโมงสุดท้ายจะอยู่ที่ 3.83 และความเข้มข้นของไซลิทอลคือ 7.188 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นของ Tween80 ที่ 0 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความเข้มข้นของไซโลสเทากับ 30.43 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกลูโคสมีค่าเท่ากับ 1.06 กรัมต่อลิตร พีเอชเท่ากับ 3.8 และความเข้มข้นของไซลิทอลคือ 7.756 กรัมต่อลิตร

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในกระบวนการหมักเพื่อผลิตไซลิทอลได้แก่สภาวะกระบวนการหมักที่ไม่มีการเติมTween80ทั้งเนื่องจากหลังสิ้นสุดกระบวนการหมักที่เวลา 24 ชั่วโมงแล้วจะให้ความเข้มข้นของไซลิทอลที่มากกว่าเมื่อเมื่อเทียบกับระดับความเข้มข้นของ Tween80 ที่ 0 เปอร์เซ็นต์ และนอกจากนี้ถ้ามีการขยายขนาดการผลิตไปในระดับโรงงานแล้วยังเป็นการลดต้นทุนการผลิตให้ต่ำลงอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

นรินทร์ เรืองพานิชย์. 2541. “ผลของกลูโคสต่อการผลิตไซลิทอลจากไซโลสภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจน.” เทคนิควิจัย ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะอุตสาหกรรมเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรสิทธิ์ โทจำปา. 2541. “การผลิตไซลิทอลโดยการหมุนเวียนเซลล์ Hollow fiber.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะอุตสาหกรรมเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล. 2537. “สารให้ความหวานจากฟางข้าว.” รายงานการประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 32 สาขาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Arron, M.A. 1993. **Low Caloric Food Handbooks**. Georgetown Univercity School of Medicine Washinston DC. USA.

Barbosa, M.F.S *et. al.* 1988. “Screening of Yeasts For Production of Xylitol from D-Xylose and Some Factors which Effect Xylitol Yield in *Candida guilliermondii*.” **J. Ind. Microbial. Biotechnol.** 3 : 241-251.

Dahiya, J.S. 1991. “Xylitol Production by *Petromyces albertensis* Grown on Medium Containing D-Xylose.” **Can. J. Microb.** 37 : 14-18.

Dominguez, J. M. 1998. “Xylitol Production by Free and Immobilized *Debaryomyces hensenii*.” **Biotechnol. Lett.** 20 : 53-56.

Emodi, A. 1978. “Xylose : It’s Properties and Food Applications.” **Food Technol**. Jan : 28-32.

Evan, C.T. and Ratledge, C. 1984. “Induction of Xylulose-5-phosphate phosphoketolase in a Variety of Yeast Grown on D-Xylose : The key of Efficient Xylose Metabolism.” **Arch. Microbial.** 139 : 48-52.

Furlan, S.A. *et. al.* 1994. “Study of Xylitol Formation under Oxygen Limited Condition.” **Biotechnol. Lett.** 13 : 203-206.

Furlan, S.A. *et. al.* 1994. “Influence of Oxygen on Ethanol and Xylitol Production by Xylose Fermenting Yeasts. **Process Biochem.** 29 : 657-662.

Gong, C.S. *et. al.* 1981. "Quantitative Production of Xylitol from D-Xylose by Hegh-Xylitol Producing Yeasts Mutant *Candida tropicalis* HXP2." **Biotechnol. Bioeng.** 25 : 85-102.

Hofer, M.A. *et. al.* 1971. "Metabolism of Obligatory Aerobic Yeast *Rhodotorular gracilis* : Introduction of an Enzyme Necessary for D-Xylose Catabolism." **Biochem. Biophys. Acta.** 252 : 1-12.

Hollmann, S. and Touster, O. 1957. "L-Xylulose-Xylitol Enzyme and Other Polyoldehydrogenase of Guinea Pig Liver Mitochondria." **J. Biol. Chem.** 225 : 87-102.

Horitsu, H. *et. al.*1992. "Production of Xylitol from D-Xylose by *Candida tropicalis* : Optimization of Production Rate." **Biotechnol. Bioeng.** 40 : 1,085-1,091.

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.

Hyvoenen, L. *et. al.* 1982. "Food Technological Evaluation of Xylitol." **Adv. Food Res.** 18 : 373-403.

Kim, S.Y. *et. al.* 1997. "Improvement of Xylitol Production by Controlling Oxygen Supply in *Candida parapsilosis*." **J. Ferment and Bioeng.** 83 : 267-270.

Lee, C.W. and Chang, H.W. 1987. "Kinetics of Ethanol Fermentation in Membrane Cell Recycle Fermentors." **Biotechnol. Bioeng.** 29: 1,150-1,112.

Makinen, K.K. and Scheinin, A. 1975. "Turku Sugar Studies VI : The Administration of the Trial and the Control of the Dietary Regimen. **Acta. Odont. Scand. 33 Suppl.** 70 : 105-127.

Manz, U. *et. al.* 1973. "Xylitol : Its Properties and Use as a Sugar Substitute in Foods." Food Symposium on Sugar and Sugar Replacements. London.

Meyrial, V. *et. al.* 1991. "Xylitol Production from D-Xylose by *Candida guilliermondii* : Fermentation Behaviour." **Biotech. Lett.** 13 : 281-286.

Onishi, H. and Suzuki, T. 1980. "Mechanism of Fermentation Convension from Polyalcohol Fermentation to Ethanol by *Pichia miso*." **Agr. Biol. Chem.** 44 : 1,829-1,834.

Parajo, J.C. *et. al.* 1998. "Biotechnological Production of Xylitol. Part 1 : Interest of Xylitol and Fundamentals of Its Biosynthesis." **Biores. Technol.** 65(3) : 191-201.

Parajo, J.C. *et. al.* 1998. "Biotechnological Production of Xylitol. Part 2 : Operation in Culture Media Made with Commercial Sugar." **Biores. Technol.** 65(3) : 203-212.

Parajo, J.C. *et. al.* 1998. “Biotechnological Production of Xylitol. Part 3 : Operation in Culture Media Made from Lignocellulose Hydrolysates.” **Biores. Technol.** 66(1) : 25-40.

Sirisansaneeyakul, S. *et. al.* 1992. “Microbial Production of Xylitol from Wheat Straw Hydrolysates.” **DECHEMA Biotechnology conference** vol. 5(B) : 541-544.

Sirisansaneeyakul, S. *et. al.* 1995. “Screening of Yeasts for Production of Xylitol from D-Xylose.” **J. Ferment. Bioeng.** 80 : 565-570.

Smiley, K.L. and Bolen, P.L. 1982. “Demonstration of D-Xylose Reductase and D-Xylitol Dehydrogenase in *Pachysolen tannophilus*.” **Biotechnol. Lett.** 4 : 607-610.

Smith, M.G. 1962. “Polyol Dehydrogenases. 4. Crystallization of the L-Iditol Dehydrogenase of Sheep Liver.” **J. Biochem.** 83 : 135-144.

Washuttl, J. *et. al.* 1973. “A Qualitative and Quantitative Study of Sugar-alcohol in Several Foods.” **J. Food Sci.** 38 : 1,262-1,263.

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ภาคผนวก ก

ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางที่ ก-1 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ ขณะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เพื่อวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045

ชั่วโมงที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร
0	0.03
1	0.03
2	0.08
3	0.15
4	0.39
5	0.78
6	2.35
7	3.00
8	3.70
9	4.13
10	4.59
11	4.70
12	5.23
13	5.19
14	5.64
15	5.43
16	5.87
17	5.74
18	5.74

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ ก-1 (ต่อ)

ชั่วโมงที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร
19	6.09
20	6.10
21	6.67
22	6.11
23	6.84
24	6.89

ตารางที่ ก-2 จำนวนเซลล์ที่นับได้โดยใช้ Haemacytometer ที่ระยะเวลาต่างๆ ขณะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เพื่อวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045

ชั่วโมงที่	จำนวนเซลล์ที่นับได้ที่ระยะเวลาต่างๆกัน โดยใช้ Haemacytometer (เซลล์)
0	10
1	20
2	21
3	29
4	37
5	79
6	88
7	229
8	199
9	334
10	330

ตารางที่ ก-2 (ต่อ)

ชั่วโมงที่	จำนวนเซลล์ที่นับได้ที่ระยะเวลาต่างๆกัน โดยใช้ Haemacytometer (เซลล์)
11	337
12	354
13	290
14	344
15	327
16	314
17	360
18	324
19	350
20	384
21	424
22	344
23	390
24	560

ตารางที่ ก-3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณน้ำตาลไซลิทอลที่ถูกผลิตโดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอลที่มีการเติม Tween80 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน คือ 0 0.1 0.5 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์

Duncan

		ค่าความน่าเชื่อถือที่ 95%
Tween	จำนวน	a
1.50	3	5.7657
0.10	3	6.5967
1.00	3	6.6717
0	3	6.6880
0.50	3	6.8267
Sig.		0.157

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ ก-4 ปริมาณน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ไปโดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอลที่มีการเติม Tween80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 และ0.5 เปอร์เซ็นต์ ในระดับฟลาสก์เขย่าที่ระยะเวลาต่างๆกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลไซโลสที่ลดลง (กรัมต่อลิตร) ระดับเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของ Tween80	
	0.0	0.5
0	148.54	147.57
2	134.08	130.59
4	108.67	98.61
6	95.37	74.25
8	78.03	65.28
10	52.49	51.78
12	51.33	51.20
14	49.44	50.04
16	46.17	45.97
18	44.36	42.83
20	41.16	38.41
22	32.70	36.01
24	30.43	30.04

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ ก-5 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป โดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอลที่มีการเติม Tween80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในระดับฟลาสก์เขย่าที่ระยะเวลาต่างๆกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลง(กรัมต่อลิตร) ระดับเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของ Tween80	
	0.0	0.5
0	10.14	10.11
2	9.60	9.99
4	9.51	9.31
6	8.60	8.97
8	3.52	3.87
10	3.28	3.52
12	2.81	3.19
14	2.02	2.19
16	1.65	1.59
18	1.52	1.58
20	1.38	1.15
22	1.24	1.22
24	1.06	1.16

ตารางที่ ก-6 ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลที่ถูกผลิตขึ้น และขับออกมาจากเม็ดเจล ลงสู่น้ำหมักโดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่มีการเติม Tween80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในระดับ ฟลาสก์เขย่าที่ระยะเวลาต่างๆกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลที่เพิ่มขึ้น(กรัมต่อลิตร) ระดับเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของ Tween80	
	0.0	0.5
0	0.026	0.027
2	1.583	0.158
4	3.490	3.211
6	4.010	3.906
8	4.585	4.649
10	4.681	4.808
12	5.104	4.433
14	5.104	4.808
16	4.696	4.385
18	5.072	4.688
20	4.968	4.896
22	5.987	5.096
24	7.756	7.188

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ ก-7 พีเอชที่เปลี่ยนแปลงไประหว่างกระบวนการหมัก เพื่อการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่มีการเติม Tween80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.0 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในระดับฟลาสก์เขย่าที่ระยะเวลาต่างๆกัน

เวลา (ชั่วโมง)	**พีเอชที่เปลี่ยนแปลงไป** ระดับเปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของ Tween80	
	0.0	0.5
0	4.09	4.04
2	3.86	3.90
4	3.88	3.88
6	3.82	3.83
8	3.77	3.71
10	3.78	3.73
12	3.80	3.73
14	3.72	3.67
16	3.68	3.64
18	3.67	3.71
20	3.72	3.70
22	3.72	3.73
24	3.8	3.83

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเก็บรักษาเชื้อ

อาหารที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อ คือ YM Agar มีสูตรดังนี้

ยีสต์สกัด (yeast extract)	3	กรัม
มอลต์สกัด (malt extract)	3	กรัม
เปปโตน (peptone)	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

เตรียมอาหารทำการปรับพีเอชให้เหมาะสม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที

2. อาหารเพื่อการเจริญเติบโต

ยีสต์สกัด (yeast extract)	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
KH_2PO_4	15	กรัม
$(NH_4)_2HPO_4$	3	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 4.0

เตรียมอาหารเหลวทำการปรับพีเอชให้เหมาะสม นำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที

3. อาหารเพื่อการผลิต

ยีสต์สกัด (yeast extract)	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
ไซโลส	150	กรัม
KH_2PO_4	15	กรัม
$(NH_4)_2HPO_4$	3	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	1	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชเป็น 4.0

เตรียมอาหารเหลวทำการปรับพีเอชให้เหมาะสม นำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ภาคผนวก ค

สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี Somogyi Nelson's method (ดัดแปลงจาก Somogyi, 1952)

1.1 สารเคมี

1.1.1 สารละลายคอปเปอร์รีเอเจนต์ (Copper reagent) ประกอบด้วย

A : 10 เปอร์เซ็นต์ $CuSO_4.5H_2O$ 100 มิลลิลิตร เตรียมโดยชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต เพนตะไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) 10 กรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

B : สารละลายฟอสเฟตทาเทรต (พีเอชosพีเอชate-tartrate solution) เตรียมโดนละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 28 กรัม (หรือโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตทเวลฟ์ไฮเดรต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) 70.5495 กรัม ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต เตตระไฮเดรต (Sodium potassium tartrate tetrahydrate) 40 กรัม ทำให้ละลาย แล้วเติม 1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 100 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ถ้ามีตะกอนให้กรองเอาตะกอนทิ้งด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ผสมสารละลาย A (100 มิลลิลิตร) และ B (900 มิลลิลิตร) เข้าด้วยกัน

1.1.2 สารละลาย Nelson's Arsenomolybdate color reagent ประกอบด้วย

A : ละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต $[(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O]$ 25 กรัม ในน้ำกลั่น 45 มิลลิลิตร เติมกรดกำมะถัน 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

B : ไดโซเดียมอาร์ซิเนต ($Na_2HAsO_4.7H_2O$) 3 กรัม ละลายในน้ำกลั่นที่ปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน เก็บไว้ที่ 37 องศาเซลล์เซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้อง และเก็บไว้ในขวดสีชา

1.2 วิธีการ

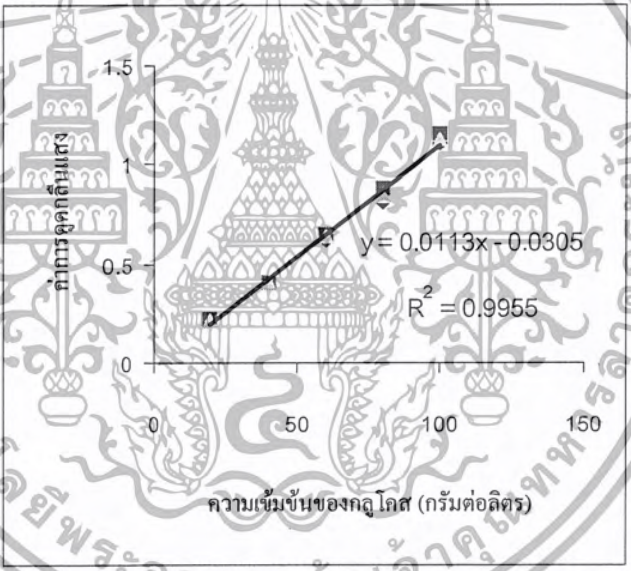
1.2.1 เติมตัวอย่างที่ต้องการหาน้ำตาลรีดิวซ์ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมคอปเปอร์รีเอเจนต์ (Copper reagent) 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ควรใช้ลูกแก้วปิดปากหลอด เพื่อลดการระเหยของน้ำ

1.2.2 ทำให้เย็นโดยแช่ในอ่างน้ำ เติมอาร์เซโนโมลิบเดต รีเอเจนต์ (Arsenomo;ybdate reagent) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที จะเห็นเป็นสีขาว หรือสีน้ำเงินเขียวขึ้นกับปริมาณน้ำตาล

1.2.3 เติมน้ำ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

1.2.4 นำค่าที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

การทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส จะใช้สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแทนตัวอย่าง จากนั้นทำการวิเคราะห์ตามข้อ 2.1-2.3 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร ที่ได้ และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสมาสร้างกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส



รูปที่ ค-1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

จากกราฟสามารถหาสมการมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสได้ ดังนี้

$$\text{ปริมาณกลูโคส} = \frac{[(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร}) * (\text{ค่าความเจือจาง}) + 0.0305]}{0.0113 * 1000}$$

2. การวิเคราะห์ปริมาณไซลิทอล (Alder และ Gustafson, 1980)

โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของไซลิทอล ไปเป็นฟอร์มัลดีไฮด์ด้วยเปอร์ไอโอเดตในสารละลายกรด เป็นระยะเวลาสั้นๆ แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย บิวเทน-2,3-ไดออล (Butane-2,3-diol) จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้น โดยทำปฏิกิริยากับสารละลายเพนเทน-2,3-ไดโอน (Pentane-2,3-dione) ได้สารละลายสีเหลือง

2.1 สารเคมี

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

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

2.1.2 สารละลายเพนเทน-2,4-ไดโอน (Pentane-2,4-dione solution) (เตรียมใช้ทันที) เตรียมโดยละลายแอมโมเนียมอะซิเทต 154.16 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติกเข้มข้นปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วเติมเพนเทน-2,4-ไดโอน (Pentane-2,4-dione) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร

2.1.3 สารละลายไซลิทอลมาตรฐาน เตรียมโดยละลายไซลิทอล 0.1000 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร) แล้วเจือจางให้ได้สารละลายไซลิทอลความเข้มข้น 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2 วิธีการ

2.2.1 ปิเปตต์สารละลายตัวอย่าง หรือสารละลายไซลิทอลมาตรฐาน (ความเข้มข้นไซลิทอล 10-50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

2.2.2 เติม Periodate reagent ลงไป 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที

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

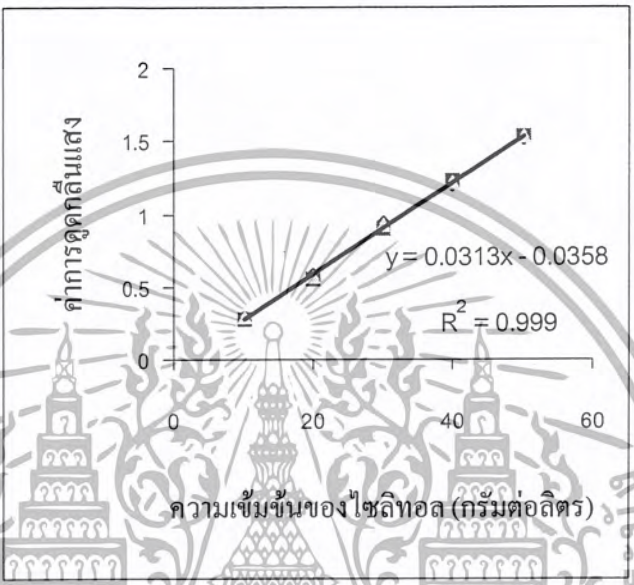
2.2.4 เติมสารละลายเพนเทน-2,4-ไดโอน ลงไป 2.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2.2.5 นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลล์เซียส เป็นเวลา 20 นาที

2.2.6 ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร

2.2.7 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร และความเข้มข้นของไซลิทอลมาตรฐานไปสร้างกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซลิทอล

2.2.8 การหาปริมาณของไซลิทอลในสารละลายตัวอย่าง สามารถคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซลิทอล



รูปที่ ค-2 กราฟมาตรฐานของไซลิทอล

$$\text{ปริมาณไซลิทอล} = \frac{[(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร}) * (\text{อัตราการเจือจาง}) - 0.0358]}{0.0313 * 1000}$$

3. การวิเคราะห์ปริมาณไซโลส (วรสิทธิ์, 2541)

3.1 สารเคมี

3.1.1 p-Bromoaniline reagent เตรียมโดยละลาย thiourea ประมาณ 4 กรัม ในกรดอะซิติกเข้มข้นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วแยกส่วนใสออกมา จะได้กรดอะซิติกที่อิ่มตัวด้วย thiourea จากนั้นละลาย p-Bromoaniline 2 กรัมลงในส่วนใสนั้น

3.1.2 สารละลายไซโลสมาตรฐาน เตรียมโดยละลายไซโลสมาตรฐาน เตรียมโดยละลายไซโลส 0.100 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร) แล้วเจือจางให้ได้สารละลายไซโลสเข้มข้น 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 กรัมต่อลิตร

3.2 วิธีการ

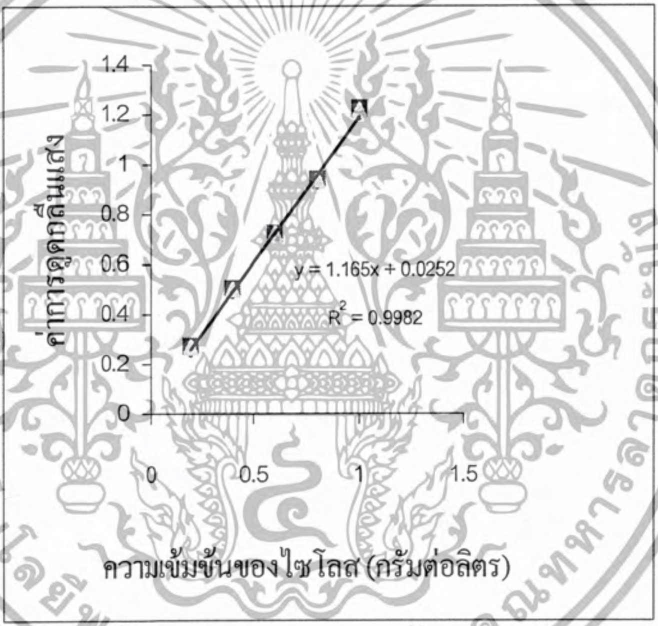
3.2.1 ปิเปตต์สารละลายตัวอย่าง (ความเข้มข้นประมาณ 0.2-1.0 กรัมต่อลิตร) หรือสารละลายไซโลสมาตรฐานปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติม p-Bromoaniline reagent ลงไป 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.2.2 นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 70 องศาเซลล์เซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.2.3 ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว แล้วบ่มต่อในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 70 นาที

3.2.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

3.2.5 นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของไซโลสในสารละลายตัวอย่าง



รูปที่ ค-3 กราฟมาตรฐานของไซโลส

ความเข้มข้นของไซโลส (กรัมต่อลิตร)

$$= \frac{\underline{[\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร) * (อัตราการเจือจาง)} - 0.0252]}}{0.9982 * 1000}$$

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ภาคผนวก ง

วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SPSS 10.0 สำหรับวินโดวส์

1. การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (Hypothesis Testing of Means for k samples by One-Way Analysis of Variance)

เป็นการทดสอบค่าเฉลี่ยที่ได้จากกลุ่มตัวอย่างหลายๆกลุ่ม ที่แบ่งกลุ่มโดยหลักเกณฑ์แบบเดียว หรือปัจจัยเดียวเพื่อศึกษาเปรียบเทียบ และตรวจสอบว่าคุณลักษณะใดคุณลักษณะหนึ่งของข้อมูลตั้งแต่สามกลุ่มขึ้นไป ว่ามีความแตกต่างกันหรือไม่ และถ้าแตกต่างกันแตกต่างกันอย่างไร โดยพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของคุณลักษณะนั้นๆ อาจเรียกแผนการทดลองนี้ว่าแผนการทดลองแบบสุ่มโดยสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) วิธีที่ใช้สำหรับทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยสำหรับหลายกลุ่มตัวอย่าง คือ การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance : ANOVA) โดยตัวสถิติ F-test ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง หรือจากตัวอย่างที่เก็บได้จากการวางแผนการทดลอง (Eeperimental Design) เพื่อหาความสัสพันธ์ระหว่างสองตัวแปร 2 ประเภท คือ ตัวแปรตาม (Dependent) และตัวแปรอิสระ (Independent) โดยตัวแปรอิสระจะเป็นตัวแบ่งกลุ่มข้อมูลเป็นกลุ่มๆเพื่อทดสอบว่าในแต่ละกลุ่มที่แตกต่างกันนั้น ค่าเฉลี่ยของตัวแปรตามนั้นแตกต่างกันหรือไม่

วิธีทำ - ขั้นที่ 1 เลือกเมนู และคำสั่งตามลำดับดังนี้

Analyze → Compare Means → One-Way ANOVA…

- ขั้นที่ 2 เลือกตัวแปร OD ไปไว้ในบ็อกซ์ของ Dependent List
- ขั้นที่ 3 เลือกตัวแปรของ treatment ไปไว้ในบ็อกซ์ของ Factor
- ขั้นที่ 4 คลิกปุ่ม OK จะแสดงผลลัพธ์ในวินโดวส์ Output

โดยมีสมมติฐานที่ใช้ในการทดสอบ คือ

H_0 : ค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกัน ($\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \ldots = \mu_k$)

H_a : มีอย่างน้อย 2 กลุ่มที่มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกัน ($\mu_i \neq \mu_j$ ($i \neq j$))

การจะยอมรับ หรือปฏิเสธสมมติฐาน H_0 นั้นพิจารณาจากค่า F ซึ่งจะปฏิเสธสมมติฐาน H_0 เมื่อ

- ค่า F ที่คำนวณได้จากตาราง ANOVA มีค่ามากกว่าค่า F ที่ได้จากตารางมาตรฐาน (การเปิดตาราง F จะต้องอาศัยค่า α ที่กำหนดไว้ และค่าของ n-1 และ n-k)
- ค่าที่ Sig. โปรแกรมคำนวณได้น้อยกว่าค่าที่กำหนด α

2. การทดสอบค่าเฉลี่ยภายหลังการปฏิเสธสมมติฐานโดยใช้วิธีของ LSD

เป็นวิธีที่ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย 2 กลุ่ม โดยการเปรียบเทียบค่าของผลต่างค่าเฉลี่ย กับค่าสถิติ LSD ที่เรียกว่าผลต่างนัยสำคัญน้อยที่สุด (Least Significant Difference) **ซึ่งวิธีนี้จะ**ใช้ในกรณีมีจำนวนสิ่งทดลองไม่เกิน 5

ค่าทางสถิติ LSD คำนวณได้จากสูตรต่อไปนี้

$$LSD(\alpha) = t_{\alpha,r} * S_d \text{ และ } r = n-k$$

เมื่อ $S_d = \sqrt{MSE[1/n_i + 1/n_j]} \quad n_i \neq n_j$

LSD (α)	แทน	ค่าผลต่างนัยสำคัญที่คำนวณสำหรับการทดสอบประชากรกลุ่มที่ i และ j
MSE	คือ	ค่า Mean Square Error ที่ได้จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน
k	คือ	ค่าที่แสดงจำนวนกลุ่มทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบ
n	คือ	ค่าจำนวนข้อมูลตัวอย่างทั้งหมด
$t_{\alpha,r}$	คือ	ค่าสถิติจากตารางมาตรฐาน t โดยใช้ค่าของ df = n – k

ภายใต้สมมติฐานทางสถิติ ดังนี้ H_0 : ค่าเฉลี่ยของประชากร 2 กลุ่มไม่แตกต่างกัน

H_a : ค่าเฉลี่ยของประชากร 2 กลุ่มแตกต่างกัน

โดยจะปฏิเสธสมมติฐานหลัก (H_0) เมื่อผลต่างของค่าเฉลี่ย 2 กลุ่ม มีค่ามากกว่าค่าของ LSD (α)ที่คำนวณจากข้อมูลตัวอย่างกลุ่มที่ i และ j

วิธีทำ - กดปุ่ม Post Hoc… ในวินโดวส์ของ One-Way ANOVA …

- จะปรากฏส่วนที่แสดงค่าสถิติ สำหรับทดสอบความแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05