สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตน้ำตาลไซลิทอลด้วยเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 โดยวิธีการตรึงเซลล์

T047321

นาย พาณิณ ออมทวีพูนทรัพย์
นางสาว วริยา ทองประสพ

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2545

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 47321
วัน, เดือน, ปี 27 มิ.ย. 2546

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

การผลิตน้ำตาลไซลิทอลด้วยเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 โดยวิธีการตรึงเซลล์

นาย พาณิณ ออมทวีพูนทรัพย์

นางสาว วริยา ทองประสพ

ปัญหาพิเศษ/โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2545

The xylitol production by immobilized *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155

Mr. Panin Ormtaweepoonsup

Miss Wariya Thongprasop

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

Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2002

โครงงานพิเศษ เรื่อง	การผลิตน้ำตาลไซลิทอลด้วยเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 โดยวิธีการตรึงเซลล์
นักศึกษา	นาย พาณิณ ออมทวีพูนทรัพย์ นางสาว วริยา ทองประสพ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. สุขใจ ชูจันทร์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ปัญหาพิเศษ/โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ. อารี ฤทธิบูรณ์	
กรรมการ รศ. มาลินี ตันติยาภรณ์	
กรรมการ รศ. สุขใจ ชูจันทร์	

....

(..)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

โครงงานพิเศษเรื่อง	**การผลิตน้ำตาลไซลิทอลด้วยเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 โดยวิธีการตรึงเซลล์**
นักศึกษา	นายพาณิณ ออมทวีพูนทรัพย์ นางสาววริยา ทองประสพ
ภาควิชา	**ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์**
สาขาวิชา	**เทคโนโลยีชีวภาพ**
ปีการศึกษา	**2545**
อาจารย์ที่ปรึกษา	**รศ. สุขใจ ชูจันทร์**

บทคัดย่อ

การศึกษากระบวนการผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสโดยวิธีทางชีวภาพ ด้วยเชื้อยีสต์ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 ในระดับฟลาสก์เขย่า โดยนำเอาเทคนิคการตรึงเซลล์เข้ามาใช้ ซึ่งปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่จะนำมาใช้ในกระบวนการตรึงเซลล์มีค่าเท่ากับ 8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักเปียกต่อปริมาตร) หลังจากทำการตรึงเซลล์ จะเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ถูกตรึงภายในเม็ดเจลในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล โดยใช้ความเร็วรอบในการเขย่าเริ่มต้นเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ในเม็ดเจลเท่ากับ 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง พีเอชเริ่มต้นที่ 5.5 เติม Tween80 ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม คือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

หลังจากทำการหมักเป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมง พบว่าอัตราการใช้ไซโลสเท่ากับ 3.408 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ความเข้มข้นของไซลิทอล และอัตราผลผลิตไซลิทอลที่ได้เท่ากับ 5.442 กรัมต่อลิตร และ 0.225 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ อัตราการผลิตไซลิทอลจำเพาะเท่ากับ 0.0028 กรัมไซลิทอลต่อกรัมเซลล์ต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ของไซลิทอลเท่ากับ 0.066 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส

Special Project Title	**The xylitol production by immobilized *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155**
Name	**Mr. Panin Ormtaweepoonsup** **Miss Wariya Thongprasop**
Department	**Applied Biology**
Program	**Biotechnology**
Academic Year	**2545**
Special Project Advisor	**Associated Professor Sukjai Choojan**

ABSTRACT

Studies on the production of xylitol from xylose by the bioconversion process was carried out using the yeast *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 in shaked flask. Cell immobilization technique is used in this process with 8 percent (wet weight/volume) of inoculumn size. After cell immobilization process, grown cell in gel bead with fermentation medium on shaker at initial velocity (for grown cell) 220 rpm at room temperature, initial pH is 5.5, added Tween80 at optimal concentration, 0.1 percentage (v/v)

After 24 hours of the fermentation xylose consumption rate is 3.408 g/l.h, the concentration of xylitol and productivity of xylitol is 5.442 g/l and 0.225 g/l.h respectively. Specific rate of xylitol production is 0.0028 g xylitol/g cell.l.h. Xylitol yield of this process is 0.066 g xylitol/g xylose.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณอาจารย์สุขใจ ชูจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาของพวกเราเป็นอย่างสูง เนื่องจากอาจารย์ได้ให้คำปรึกษาต่างๆมากมาย ทั้งเนื้อหาสาระในทางวิชาการเกี่ยวกับโครงงานพิเศษของพวกเรา และขอบพระคุณท่านคณาจารย์อันประกอบด้วย ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์ และ รศ.มาลินี ตันติยาภรณ์ ที่กรุณาเป็นประธาน คณะกรรมการให้กับพวกเรา ขอบคุณอาจารย์ประสิทธิ์ ดีวัฒนวงศ์ ที่ให้คำปรึกษาในเนื้องาน

ขอขอบคุณพี่ๆเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทั้งพี่ประสิทธิ์ แผ้วบาง และพี่วิทยา เขียวเงิน ที่กรุณาอำนวยความสะดวกให้กับ โครงงานพิเศษของพวกเราในทุกๆเรื่อง ขอบคุณพี่ๆเจ้าหน้าที่ธุรการภาคทุกๆท่าน และขอขอบคุณสำหรับความช่วยเหลือ จากพี่ๆปริญญาโท ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา และความช่วยเหลือในทุกๆด้าน

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

นาย พาณิณ ออมทวีพูนทรัพย์
นางสาว วริยา ทองประสพ

สารบัญ

หน้า

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

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ/ปัญหาพิเศษ 2
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2
1.4 ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีดำเนินงาน 2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ 4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย และอุปกรณ์ 37
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล 46
(ผลการวิจัยและวิจารณ์)
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 52
(สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ)
เอกสารอ้างอิง (บรรณานุกรม) 53
ภาคผนวก ก 55
ภาคผนวก ข 64
ภาคผนวก ค 66
ภาคผนวก ง 71

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ปริมาณไซลิทอลในผัก และผลไม้ชนิดต่างๆ 4

ตารางที่ 2 คุณสมบัติทางเคมี และกายภาพที่สำคัญของไซลิทอล 5

ตารางที่ 3 ค่าความร้อนจำเพาะของการละลายของน้ำตาลชนิดต่างๆ 6

ตารางที่ 4 อัตราการเกิดชีวมวล และไซลิทอลที่ได้จากการใช้ไซโลส ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน 19

ตารางที่ 5 ตัวอย่างเซลล์ตรึงที่ใช้ในอุตสาหกรรม 33

ตารางที่ 6 การคำนวณในการผลิตไซลิทอล 51

ตารางที่ 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ ขณะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เพื่อวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 55

ตารางที่ 8 จำนวนเซลล์ที่นับได้โดยใช้ Haemacytometer ที่ระยะเวลาต่างๆ ขณะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการเจริญเติบโตบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เพื่อวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 56

ตารางที่ 9 ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลที่ถูกผลิตโดยเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่มีการเติม Tween80 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน คือ 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ 58

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเข้มข้นของ Tween80 ที่เหมาะสม 58

ตารางที่ 11 ปริมาณน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ไป โดยเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่มีการเติม Tween80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับฟลาสก์เขย่าที่ระยะเวลาต่างๆกัน 60

ตารางที่ 12 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป โดยเชื้อ *Debaryomyces* 61 *hansenii* TISTR 5155 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่มีการเติม Tween80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1เปอร์เซ็นต์ ในระดับฟลาสก์เขย่าที่ระยะเวลาต่างๆกัน

ตารางที่ 13 ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลที่ถูกผลิตขึ้น และขับออกมาจากเม็ดเจล ลงสู่น้ำหมักโดยเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่มีการเติม Tween80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับฟลาสก์เขย่าที่ระยะเวลาต่างๆกัน 62

ตารางที่ 14 พีเอชที่เปลี่ยนแปลงไประหว่างกระบวนการหมัก เพื่อการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่มีการเติม Tween80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในระดับฟลาสก์เขย่าที่ระยะเวลาต่างๆกัน 63

สารบัญรูป

ภาพที่ 1 เมทาบอลิซึมของไซลิทอลในร่างกายมนุษย์ 8

ภาพที่ 2 แสดงสูตรเคมีของน้ำตาลไซลิทอล 11

ภาพที่ 3 วิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตไซลิทอล 12

ภาพที่ 4 วิถีการเกิดไซลิทอลจากเมตาบอลิซึมของไซโลส 13

ภาพที่ 5 เมตาบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์ *Debaryomyces hansenii* 16

ภาพที่ 6 แสดงลักษณะการตรึงเซลล์แบบห่อหุ้มเซลล์ (Gel entrapment) 23

ภาพที่ 7 โครงสร้างของโซเดียมอัลจิเนต 31

ภาพที่ 8 กระบวนการตรึงเซลล์ 43

ภาพที่ 9 แสดงขนาดของเม็ดเจลที่ได้จากกระบวนการตรึงเซลล์ 43

ภาพที่ 10 แสดงลักษณะของเม็ดเจลที่อยู่ในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล 44

ภาพที่ 11 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเวลาที่ ชั่วโมงต่างๆ ขณะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เพื่อวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 46

ภาพที่ 12 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่นับได้ และเวลาที่ชั่วโมงต่างๆ ขณะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เพื่อวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 47

ภาพที่ 13 เปรียบเทียบความเข้มข้นของไซลิทอลที่ถูกผลิตโดยเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่มีการแปรผันปริมาณ Tween 80 ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆกัน คือ 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ 48

ภาพที่ 14 แสดงปริมาณไซโลส, ไซลิทอล, กลูโคส และพีเอช ที่ 49

เปลี่ยนแปลงไปขณะทำการเพาะ เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่ไม่มีการเติม Tween 80 บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบเริ่มต้น 220 รอบต่อนาที และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 12 ชั่วโมง จะทำการลดความเร็วรอบลงเหลือ 150 รอบต่อนาที เพื่อเป็นการจำกัดปริมาณออกซิเจนดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

ภาพที่ 15 แสดงปริมาณไซโลส, ไซลิทอล, กลูโคส และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงไปขณะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่มีการเติม Tween 80 0.1 เปอร์เซ็นต์บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบเริ่มต้น 220 รอบต่อนาที และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 12 ชั่วโมง จะทำการลดความเร็วรอบลงเหลือ 150 รอบต่อนาที เพื่อเป็นการจำกัดปริมาณออกซิเจนดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น 50

ภาพที่ 16 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส 67

ภาพที่ 17 กราฟมาตรฐานของไซลิทอล 69

ภาพที่ 18 กราฟมาตรฐานของไซโลส 70

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

ไซลิทอล (xylitol) จัดเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดเพนทะวาเลนต์แอลกอฮอล์ของไซโลส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว มีคุณสมบัติเป็นสารให้ความหวานชนิดหนึ่ง ให้รสชาติดี และให้ความรู้สึกเย็นสดชื่นคล้ายเมนทอล และยังให้ความหวานใกล้เคียงกับน้ำตาลซูโครส โดยไซลิทอล 1 กรัม ให้พลังงาน 4.06 กิโลแคลอรี่ ซึ่งเทียบเท่าได้กับพลังงานที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ทั้งนี้จุลินทรีย์หลากหลายชนิดที่อยู่ในช่องปากโดยเฉพาะ *Streptococcus mutans* ไม่สามารถนำ ไซลิทอลไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมได้จึงสามารถลดปัญหาการเกิดฟันผุที่มีสาเหตุมาจากจุลินทรีย์ได้ นอกจากนี้ไซลิทอลยังสามารถช่วยยืดอายุผลิตภัณฑ์ เนื่องมาจากมีจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่สามารถใช้ไซลิทอลได้ จึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่มีไซลิทอลเป็นองค์ประกอบอยู่เกิดการเสื่อมเสียเนื่องจากจุลินทรีย์ได้ยาก ทำให้มีอายุการเก็บรักษายาวนานขึ้น จากคุณสมบัติดังกล่าวมาแล้ว จึงทำให้ไซลิทอลเป็นที่ต้องการในอุตสาหกรรมต่างๆมากมาย เช่น

อุตสาหกรรมอาหาร โดยนำไปเป็นส่วนผสมของหมากฝรั่ง ช็อกโกแล็ต ทอฟฟี่ คาราเมล เจลาติน และเครื่องดื่มต่างๆ เป็นต้น

ในทางเภสัชกรรม ไซลิทอลจะถูกนำมาใช้เป็นสารให้ความหวานในการเตรียมผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลว ซึ่งจะไม่ทำให้เกิดฟันผุ และไม่ทำให้เกิดการหมักของจุลินทรีย์ เหมาะที่จะใช้กับคนไข้ที่ไม่ได้ทำความสะอาดช่องปากเป็นเวลานาน

ทางการแพทย์ จะใช้ไซลิทอลกับผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน เนื่องจากการเผาผลาญไซลิทอลจะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของผู้ป่วย และปริมาณอินซูลินในเลือดก็ไม่เปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกัน สำหรับในด้านความปลอดภัย ยังไม่เคยมีรายงานว่าไซลิทอลเป็นสารก่อมะเร็ง จึงนับได้ว่ามีความปลอดภัยมาก เมื่อเทียบกับสารให้ความหวานชนิดอื่นๆ

ไซลิทอลสามารถพบในธรรมชาติ โดยจะพบในผัก และผลไม้ แต่มีในปริมาณที่น้อยไม่คุ้มค่าที่จะทำการผลิตโดยการสกัดจากผักผลไม้ที่มีไซลิทอลเป็นองค์ประกอบ ปัจจุบันการผลิตไซลิทอลในระดับอุตสาหกรรมสามารถทำได้ 2 ทาง คือกระบวนการทางเคมี โดยการใช้ไซโลสที่ได้จากการย่อยสลายวัสดุที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งจะต้องใช้ต้นทุนในการผลิตที่สูง และผลผลิตที่ได้จะมีสารปนเปื้อนอยู่มาก สำหรับอีกวิธีการหนึ่ง คือกระบวนการผลิตโดยใช้กระบวนการทางชีวภาพ ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจเนื่องจากจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในกระบวนการผลิตมีความ

สามารถในการผลิตไซลิทอลสูง อีกทั้งวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการดังกล่าวเป็นวัสดุที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งประสิทธิภาพนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง คือ ชนิดของเชื้อ อายุของหัวเชื้อ ปริมาณเซลล์เริ่มต้น พีเอช อุณหภูมิ ซึ่งต้องทำการควบคุมให้เหมาะสม เพื่อให้เกิดกระบวนการหมักที่สามารถให้ผลผลิตในปริมาณที่คุ้มค่าในการผลิตต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155
2. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่าง ในด้านความสามารถในการผลิตไซลิทอลของเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึง ด้วยเทคนิคการดักจับด้วยโซเดียมอัลจิเนต ในสภาวะที่มีการเติม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน ลงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล
3. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่าง ในด้านความสามารถในการผลิตไซลิทอลระหว่างเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึง และเซลล์ยีสต์อิสระ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาความสามารถในการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 โดยการตรึงเซลล์ ในสภาวะที่มีการเติม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมลงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล

1.4 ขั้นตอนการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน

1. ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 ในรูปแบบเซลล์อิสระ และในรูปแบบการตรึงเซลล์
2. ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตไซลิทอล โดยเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 ภายใต้สภาวะที่มีการเติม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Tween 80 ที่จะสามารถให้ปริมาณไซลิทอลสูงสุด
3. ทำการรวบรวมผลและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง เพื่อคำนวณผลได้ของกระบวนการหมัก อัตราผลผลิต ตลอดจนความเข้มข้นของไซลิทอลที่ได้จากกระบวนการหมักภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตไซลิทอลของเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 โดยการตรึงเซลล์ว่าสามารถให้ผลผลิตมากน้อยเพียงใด
2. เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตไซลิทอลของเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 โดยการตรึงเซลล์ในระดับอุตสาหกรรม

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

2.1 คุณสมบัติของน้ำตาลไซลิทอล

ไซลิทอล

ไซลิทอลเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่เป็นอนุพันธ์ของไซโลส มีรูปร่างผลึกแบบรอมบิก (สาโรจน์, 2537) และพบได้ตามธรรมชาติในผักผลไม้หลายชนิด (Washuttl และคณะ, 1973) ดังจะมีสูตรทางเคมีในภาพที่ 2 ส่วนการผลิตไซลิทอลเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารนั้น สามารถผลิตได้จากไซโลส โดยกระบวนการเติมไฮโดรเจน หรือผลิตโดยกระบวนการหมักจากวัสดุเหลือทิ้งที่มีไซโลสเป็นองค์ประกอบ (สาโรจน์, 2537)

แหล่งที่พบไซโลสตามธรรมชาติ

ตามปกติไซลิทอลจะเป็นสารตัวกลาง (Intermediate) ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Hollman และ Tonster,1957) รวมทั้งยังพบ ได้ในผักผล ไม้หลายชนิด ดังตารางที่ 1

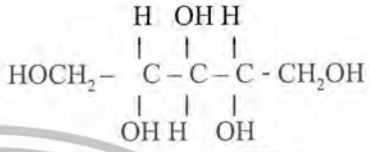
ตารางที่ 1 ปริมาณไซลิทอลในผัก และผลไม้ชนิดต่างๆ

ผักและผลไม้	ปริมาณไซลิทอล(มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง)
Raspberries	268
Stawberries	362
Yellow plums	935
Endivis	258
Lettuce	131
Cauliflower	300
Carrot	87
Banamas	21
Eggplant	180
Onion	89

ที่มา : Emodi (1987)

คุณสมบัติของไซลิทอล (Emodi, 1978) แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 คุณสมบัติทางเคมี และกายภาพที่สำคัญของไซลิทอล

คุณสมบัติ	รายละเอียด
สูตรโมเลกุล	$C_2H_{12}O_5$
โครงสร้าง	 $HOCH_2-\underset{OH}{\overset{H}{C}}-\underset{H}{\overset{OH}{C}}-\underset{OH}{\overset{H}{C}}-CH_2OH$
น้ำหนักโมเลกุล	152.1
รูปร่าง	ผงผลึก
สี	ขาว
กลิ่น	ไม่มี
รสชาติ	หวาน
ความหวานสัมพัทธ์	มีความหวานเทียบเท่ากับซูโครส แต่หวานมากกว่าซอร์บิทอลและแมนนิทอล
จุดเดือด	216 องศาเซลเซียส
จุดหลอมเหลว	93.4-94.7 องศาเซลเซียส
ค่าการเบี่ยงเบนแสงจำเพาะ	ไม่มีคุณสมบัติการเบี่ยงเบนแสง
การดูดความชื้น	ในที่มีความชื้นสูงจะดูดความชื้นได้มากกว่าซูโครส แต่น้อยกว่าซอร์บิทอล
การละลายน้ำ	64.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
การละลายในเอทานอล	1.2 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร
การละลายในเมทานอล	6.0 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร
สารปนเปื้อน	แมนนิทอล ซอร์บิทอล กาแลคติทอล อาราบิทอล

ที่มา : Emodi (1987)

คุณสมบัติอื่นๆ ของไซลิทอล

1. ไซลิทอลละลายน้ำได้ง่าย ได้สารละลายที่มีความคงตัวสูง แม้ว่าจะถูกความร้อนหรือเก็บไว้นานๆก็ไม่เกิดปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสีน้ำตาล (Maillard reaction) และการเกิดคาราเมล

(Caramelization) เหมือนน้ำตาลฟรุคโตส หรือเด๊กซ์โทรส เมื่อใช้ความร้อนสูงกว่า 150 องศาเซลเซียส เนื่องจากไซลิทอลไม่มีหมู่อัลโดส หรือคีโตส

2. ไซลิทอลให้รสชาติดี และเย็นสดชื่น(Cooling effect) คล้ายเมนทอล เนื่องจากการละลายของไซลิทอลต้องการความร้อน (Endothermic dissolution) เพราะไซลิทอลมีค่าความร้อนจำเพาะของการละลายเป็นลบ (Negative heat of solution) เท่ากับ –34.8 แคลอรี่ต่อกรัม ดังตารางที่ 3โดยคุณสมบัติดังกล่าวจะเกิดขึ้นเมื่อไซลิทอลอยู่ในรูปผลึกเท่านั้น แต่เมื่อไซลิทอลอยู่ในรูปสารละลาย หรืออยู่ในรูปสัณฐาน (Amorphous) จะไม่ให้คุณสมบัติข้อนี้

ตารางที่ 3 ค่าความร้อนจำเพาะของการละลายของน้ำตาลชนิดต่างๆ

Polyalcohol	Cooling effect (Cal / gram at 25 °C)
Lsomain	-9.4
Lactitol	
-Monohydrate	-12.7
-Dihydrate	-13.9
Mannitol	-28.9
Sorbitol	-26.5
Xylitol	-34.8

ที่มา : Arron (1993)

3. ไซลิทอลมีความหวานเช่นเดียวกับน้ำตาลทั่วไป แต่มีความหวานมากกว่าแมนนิทอล และซอร์บิทอล 2.5 และ 2 เท่าตามลำดับ ความหวานของไซลิทอลเมื่อเทียบกับซูโครสจะมีตั้งแต่ 0.85-1.25 เท่า ขึ้นอยู่กับค่าพีเอช ความเข้มข้น และอุณหภูมิ เป็นต้น ตัวอย่างเช่น ไซลิทอลที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ สารละลายไซลิทอลจะมีความหวานมากกว่า แต่ถ้าความเข้มข้นน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ สารละลายซูโครสจะหวานมากกว่า หรือความหวานสัมพันธ์ (Relative sweetness) ของไซลิทอล เมื่อเทียบกับซูโครสจะลดลงจาก 103 เป็น 78 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิของสารละลายที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ จาก 5 องศาเซลเซียส เป็น 50 องศาเซลเซียส เป็นต้น

4. ไซลิทอลให้พลังงานต่ำกว่าแต่รสชาติยังคงเดิมเมื่อผสมกับสารให้ความหวานชนิดอื่น แม้ว่าไซลิทอลจะให้พลังงานเท่ากับคาร์โบไฮเดรตทั่วไป (4.06 กิโลแคลอรี่ต่อกรัม) แต่เมื่อใช้ไซลิ

ทอลร่วมกับสารให้ความหวานชนิดอื่นๆความหวานและรสชาติก็จะยังคงเดิม ขณะที่จะลดลงแคลอรี่ลงได้ 50-70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีการใช้ในเครื่องดื่มหลายชนิด เหมาะกับผู้บริโภคที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก

5. ไซลิทอลไม่ทำให้ฟันผุเนื่องจากจุลินทรีย์ในช่องปาก โดยเฉพาะ *Streptococcus mutans* ไม่สามารถใช้ไซลิทอลเป็นแหล่งอาหารได้ ทำให้สภาพพีเอชบนเคลือบฟันไม่ต่ำกว่า 5.7 จึงไม่ทำให้ฟันผุ

6. ไซลิทอลสามารถนำมาใช้ในผู้ป่วยเบาหวานได้ เนื่องจากการเผาผลาญไซลิทอลไม่ขึ้นกับอินซูลิน ดังนั้นจึงไม่ทำให้เกิดสภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (Hyperglycemia) และน้ำตาลในเลือดต่ำ (Hypoglycemia)

7. ไซลิทอลสามารถช่วยยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากมีจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น ที่สามารถใช้ไซลิทอลได้ ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่มีไซลิทอลเป็นองค์ประกอบจึงเกิดการหมักโดยจุลินทรีย์ได้ยาก ทำให้มีอายุการเก็บที่นานขึ้น

ข้อจำกัดในการใช้ไซลิทอล

1. การบริโภคไซลิทอลเป็นปริมาณมากในคราวเดียว จะทำให้ท้องเสียได้ (Gastrointestinal distress and osmotic diarrhea) เนื่องจากไซลิทอลมีคุณสมบัติเป็นยาระบาย เพราะไซลิทอลมีคุณสมบัติเหมือนคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ คือ ดูดซับน้ำไว้อย่างช้าๆ ดังนั้นเมื่อบริโภคเป็นครั้งแรก ควรบริโภคในปริมาณที่ต่ำก่อน (30 กรัมต่อวัน) และค่อยๆเพิ่มปริมาณขึ้น แต่จะบริโภคได้สูงสุดราว 200-300 กรัมต่อวัน

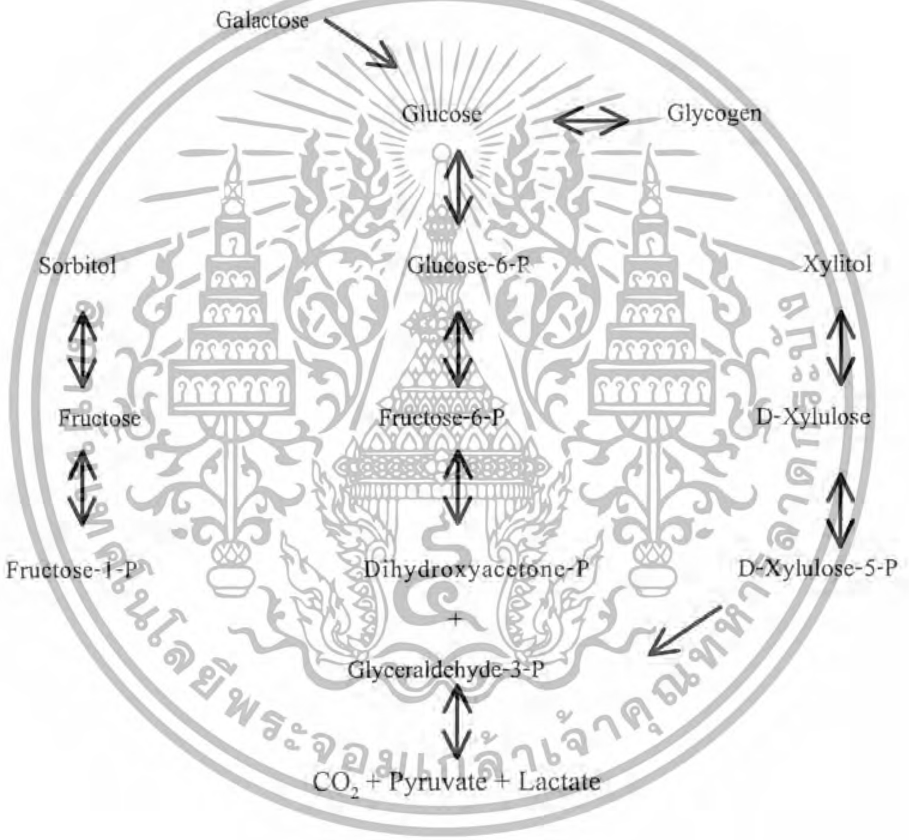
2. การใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อให้มีรสชาติเย็นสดชื่นนั้น จะต้องใช้ไซลิทอลที่อยู่ในรูปผลึกเท่านั้น ซึ่งอาจจะทำให้เกิดลักษณะผิวสัมผัสเปลี่ยนแปลงไปจนไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคได้

3. ไซลิทอลมีราคาแพงเมื่อเทียบกับสารให้ความหวานชนิดอื่น เนื่องจากต้นทุนที่ใช้ในการผลิตสูง ทำให้การใช้ไซลิทอลไม่แพร่หลายเท่าที่ควร และแม้ว่าไซลิทอลจะสามารถใช้ในผู้ป่วยเบาหวานได้ แต่ในอาหารสำหรับผู้ป่วยเบาหวานก็ใช้ฟรุคโตสแทนเพราะมีราคาถูก และไม่เกิดผลข้างเคียงเหมือนกับเมื่อใช้ไซลิทอล

เมทาบอลิซึมของไซลิทอลในร่างกายมนุษย์

เมทาบอลิซึมของไซลิทอลในร่างกายจะเกิดขึ้นที่สองตำแหน่ง คือ การดูดซึมบริเวณลำไส้โดยกระบวนการ Passive diffusion และเกิดการเผาผลาญโดยตรงที่ตับ (Smith, 1962) การดูดซึมจะ

เป็นไปอย่างช้าๆ ในกรณีที่ได้รับไซลิทอลในปริมาณที่มากเกินไป การดูดซึมที่เกิดขึ้นจะไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดอาการท้องร่วงได้ สำหรับปริมาณไซลิทอลที่แนะนำให้บริโภคในแต่ละวัน คือ ไม่เกิน 60 กรัมต่อวัน แต่ถ้าบริโภคติดต่อกันนานจะสามารถบริโภคไซลิทอลได้ในปริมาณมากถึง 120 กรัมต่อวันส่วนการเผาผลาญไซลิทอลที่ตับนั้นไซลิทอลจะถูกออกซิไดซ์เป็น ดี-ไซลูโลส (D-Xylulose) ซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็น ดี-ไซลูโลส-5-ฟอสเฟต (D-Xylulose-5-phosphate) ต่อไป แล้วเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตเพื่อเปลี่ยนเป็นฟรุคโตส-6-ฟอสเฟต(Fructose-6-phosphate) แล้วกลายเป็นกลูโคสซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไกลโคเจนสะสมไว้ที่ตับต่อไป ดังภาพที่ 1


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

ภาพที่ 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 โดยการนำเอาวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีไซโลสเป็นองค์ประกอบมาใช้เป็นวัตถุดิบ ซึ่งคาดว่าจะทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำกว่ากระบวนการผลิตโดยวิธีทางเคมี (Hydrogenation)ได้ การผลิตไซลิทอลมีหลายวิธี และสามารถใช้วัตถุดิบได้หลายชนิด เช่น ฟางข้าว ซังข้าวโพด ชานอ้อย เป็นต้น เศษวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมไม้ และกระดาษ หรืออาจจะใช้น้ำตาลไซโลสเป็นวัตถุดิบโดยตรงก็ได้ ดังภาพที่ 3 ซึ่งวัตถุแต่ละชนิดก็จะมีกรรมวิธีแตกต่างกันออกไป

วิธีต่างๆที่ใช้ในการผลิตไซลิทอล

1. การสกัดจากผัก และผลไม้

เนื่องจากไซลิทอลสามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติในผัก และผลไม้ เช่น มะเขือยาว ผักโขม ราสเบอรี่ และสตรอเบอร์รี่ ดังตารางที่ 1

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 สารละลายที่ได้สีน้ำตาลหลายชนิด เป็นองค์ประกอบ แต่มีน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก

2.3 การไฮโดรจีเนชัน

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

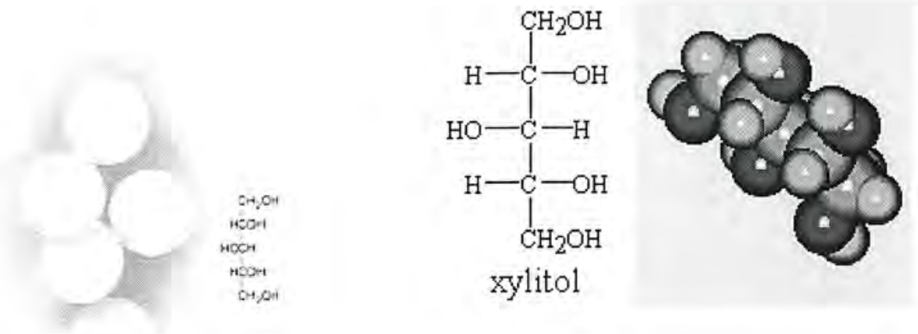
2.4 การทำไซลิทอลให้บริสุทธิ์

สารละลายน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ได้จะต้องนำมาผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ 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 ซึ่งมียีสต์อยู่หลายชนิดที่มีความสามารในการผลิตไซลิทอล เช่น *Candida tropicalis, C. guilliermondii, C. boidmii* และ *Debaryomyces hansenii* เป็นต้น

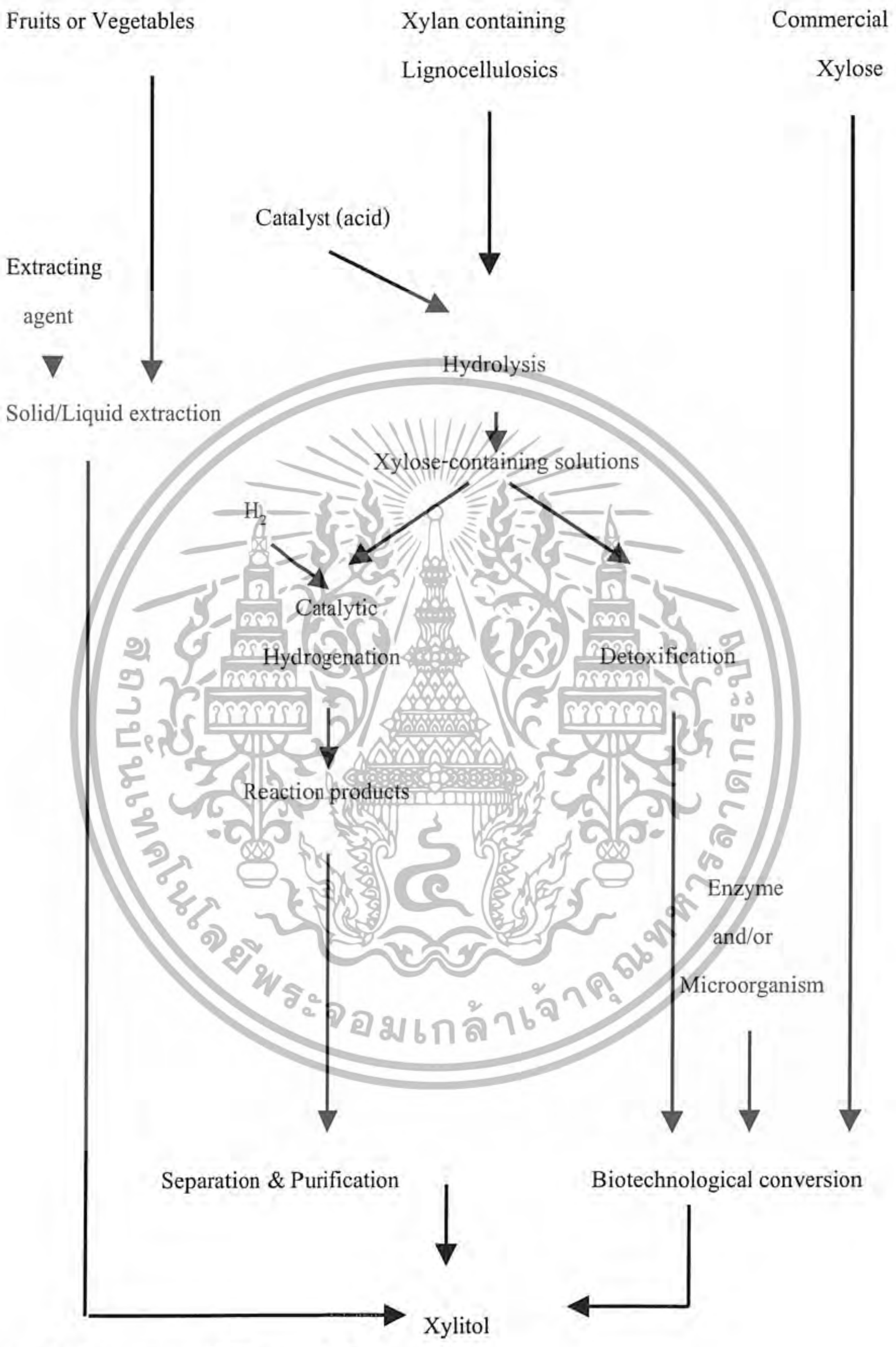

CH2OH
HCOH
HOCH
HCOH
CH2OH
CH2OH
H—C—OH
HO—C—H
H—C—OH
CH2OH
xylitol

ภาพที่ 2 แสดงสูตรเคมีของน้ำตาลไซลิทอล

กระบวนการเมตาบอลิซึมในการผลิตไซลิทอลโดยจุลินทรีย์

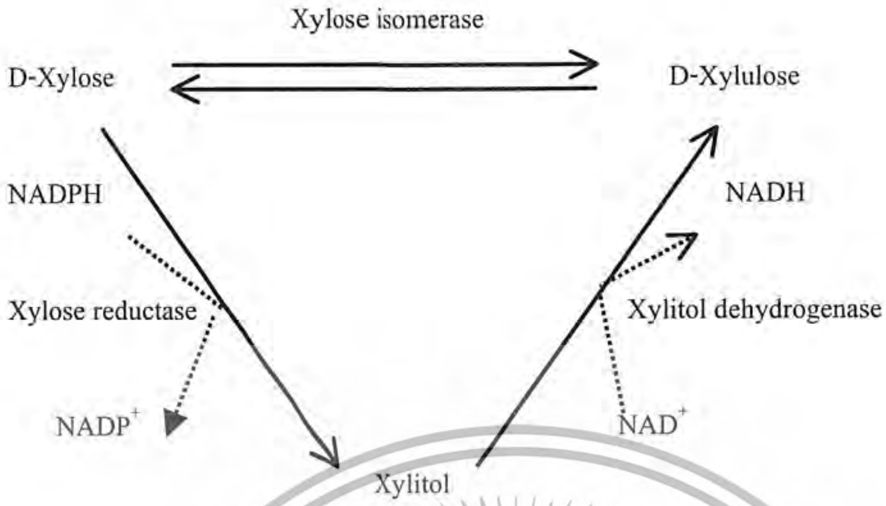
Hofer และคณะ (1971) รายงานว่าการเกิดไซลิทอลจากไซโลสในจุลินทรีย์สามารถเกิดได้ 2 วิธี คือ

1. ไซโลสจะเปลี่ยนไปเป็นไซลิทอลโดยตรง โดยเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส ที่มี NADPH เป็นโคเอนไซม์
2. ไซโลสถูกเปลี่ยนไอโซเมอร์ไปเป็นไซโลสก่อนด้วยเอนไซม์ไอโซเมอเรส จากนั้นจึงจะถูกรีดิวส์ ไปเป็นไซลิทอลโดยเอนไซม์ไซลูโลสรีดักเทส โดยมี NADH เป็นโคเอนไซม์ ดังภาพที่ 4


Fruits or Vegetables
Xylan containing Lignocellulosics
Commercial Xylose
Catalyst (acid)
Extracting agent
Hydrolysis
Solid/Liquid extraction
Xylose-containing solutions
H_2
Catalytic Hydrogenation
Detoxification
Reaction products
Enzyme and/or Microorganism
Separation & Purification
Biotechnological conversion
Xylitol

ภาพที่ 3 วิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตไซลิทอล

ที่มา : Parajo และคณะ (1998)



ภาพที่ 4 วิถีการเกิดไซลิทอลจากเมตาบอลิซึมของไซโลส
ที่มา : Hofer และคณะ (1971)

Bobosa และคณะ (1988) ได้ศึกษาเมทาบอลิซึมของไซโลสในยีสต์ ดังภาพที่ 4 เพื่อคำนวณหาผลได้ทางทฤษฎีของการเปลี่ยนไซโลส โดยพิจารณาจาก 4 สภาวะ คือ

1. โคเอนไซม์ 2 ชนิดเข้าไปเกี่ยวข้องกับสองขั้นตอนแรกของกระบวนการสลายไซโลสดังนี้ คือ การรีดิวส์ไซโลสไปเป็นไซลิทอลด้วยเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสนั้นใช้โคเอนไซม์ 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 Furian และคณะ (1994) รายงานว่ากระบวนการดังกล่าวจะเกิดขึ้นได้ ต้องอาศัยโคเอนไซม์จากกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน

1. กระบวนการเมตาบอลิซึมของการผลิตไซลิทอลในยีสต์

ยีสต์จะใช้น้ำตาลไซโลส มาเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟตเพื่อเข้าสู่วิถีอื่นต่อไป โดยเมื่อน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ยีสต์จะถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลสโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน และรีดักชัน (Oxido-reduction) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไซโลสโดยใช้วิธีนี้ จะพบในจุลินทรีย์พวกยูคาริโอต (Eukaryote) โดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องสองชนิด คือ เอนไซม์ไซโลสรีดักเทส (Xylose reductase : XR) ซึ่งมีโคเอนไซม์ NAD(P)H ร่วมในการทำปฏิกิริยารีดิวซ์ไซโลสไปเป็นไซลิทอล และเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส (Xylitol dehydrogenase : XDH) ซึ่งใช้ NAD(P)$^+$ เป็นโคเอนไซม์ จะออกซิไดซ์ไซลิทอลที่เกิดขึ้นให้กลายเป็นไซลูโลส (Smiley และ Bolen, 1982 ; Maiezka และคณะ, 1983) และเมื่อยีสต์เปลี่ยนไซโลสให้กลายเป็นไซลูโลสแล้ว ไซลูโลสก็จะถูกเปลี่ยนไปเป็นไซลูโลส-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) (ดังภาพที่ 4) จะอธิบายการเจริญของยีสต์โดยใช้ไซโลส เปรียบเทียบกับการเจริญโดยใช้กลูโคส และอีกทางหนึ่งเมื่อเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟต ไซลูโลส-5-ฟอสเฟตก็จะเปลี่ยนเป็นน้ำตาลฟอสเฟตต่างๆ เช่น กลีเซอรัลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (G3P) และ ฟรุคโตส-6-ฟอสเฟต (F6P) แล้วเข้าสู่วิถีเอมเดน เมเยอร์ฮอฟ (Embden-Meyerhof-Panas : EMP) เพื่อสร้างไพรูเวทเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ เพื่อสร้างพลังงานและเซลล์ต่อไป 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 กับการเปลี่ยนเป็นเอทานอลดังภาพที่ 5 ส่วนไพรูเวทที่ได้จะถูกเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ เอทานอล และกรดอินทรีย์ต่างๆ เป็นต้น (Francisco และคณะ 1994) การที่ยีสต์บาวสายพันธุ์นั้น เมื่อใช้น้ำตาลไซโลสในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดจะสามารถสะสมไซลิทอลได้ในปริมาณมากนั้น เนื่องจากชนิดของโคเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส คือ NADPH แต่โคเอนไซม์ในปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสเป็น NAD$^+$ ดังนั้น ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด จะเกิดการสะสมของ NADH และ NADPH มากจึงเกิดขึ้นน้อย และไม่สามารถเอา NAPD$^+$ ที่เกิดจากปฏิกิริยาที่เปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอลมาใช้ได้ จึงทำให้เกิดการสะสมของไซลิทอลขึ้น (Francisco และคณะ)

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

$$6\text{xylose} + 6\text{NADPH+H}^{+} \rightarrow 6\text{xylitol} + 6\text{NADP}^{+} \tag{1}$$

$$6\text{xylitol} + 6\text{NAD}^{+} \rightarrow 6\text{xylulose} + 6\text{NADH+H}^{+} \tag{2}$$

$$6\text{NADH+H}^{+} + 3\text{O}_2 + 18\text{ADP} + 18\text{P}_i \rightarrow 6\text{NAD+} + 18\text{ATP} + 24\text{H}_2\text{O} \tag{3}$$

$$6\text{xylulose} + 6\text{ATP} \rightarrow 6\text{xylulose-5-phosphate} + 6\text{ADP} \tag{4}$$

$$6\text{xylulose-5-phosphate} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 5\text{glucose-6-phosphate} + \text{P}_i \tag{5}$$

$$5\text{glucose-6-phosphate} + 60\text{NADP}^{+} + 35\text{H}_2\text{O} \rightarrow 60\text{NADPH+H}^{+} + 30\text{CO}_2 + 5\text{P}_i \tag{6}$$

จากสมการที่ 1-6

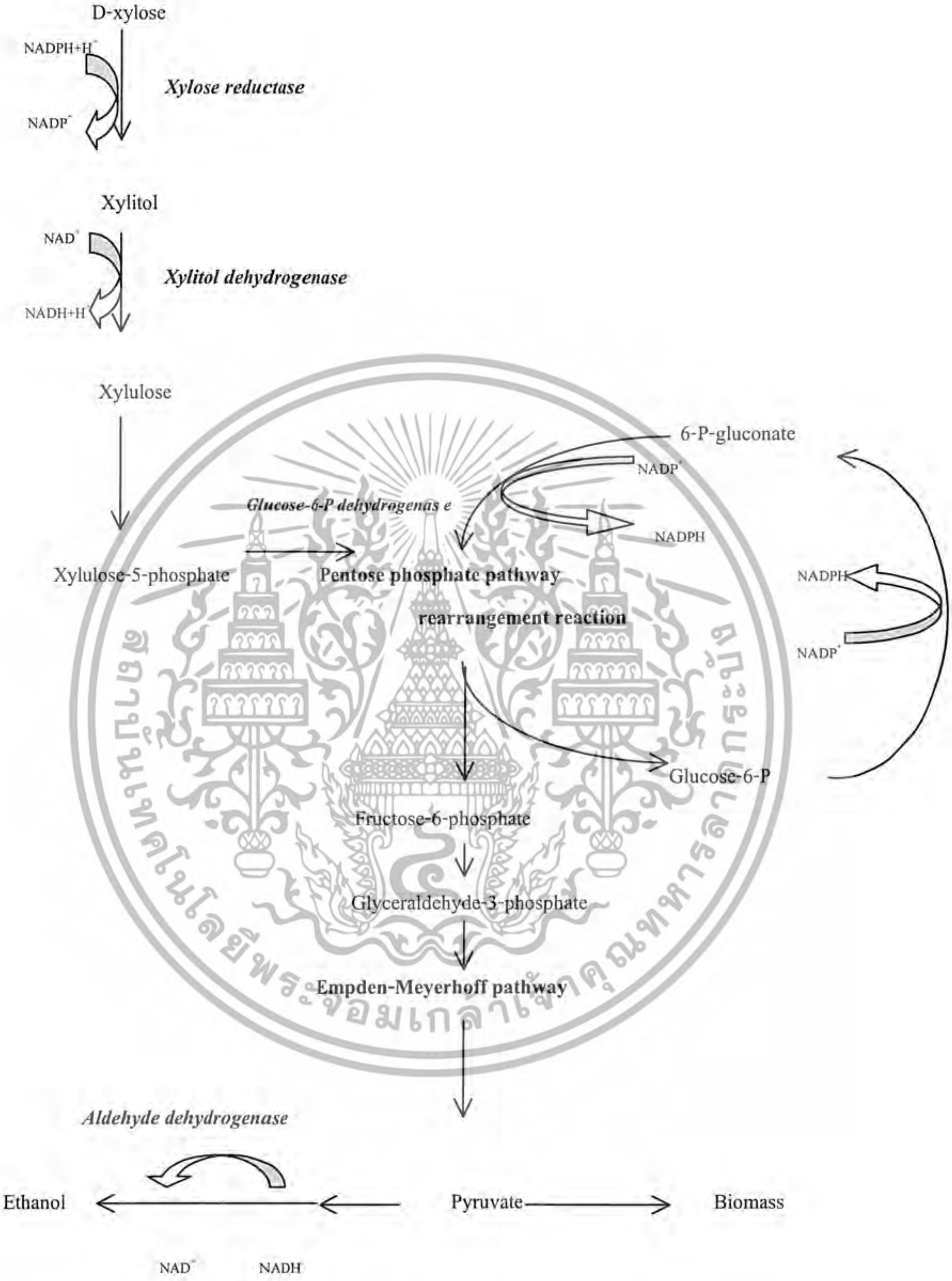
$$6\text{xylose} + 54\ \text{NADP}^{+} + 12\text{ADP} + 12\ \text{P}_i + 12\ \text{H}_2\text{O} + 3\ \text{O}_2 \rightarrow 54\ \text{NADPH+H}^{+} + 12\text{ATP} + 30\text{CO}_2 \tag{7}$$

$$54\ \text{NADPH+H}^{+} + 54\text{xylose} \rightarrow 54\text{xylitol} + 54\ \text{NADP}^{+} \tag{8}$$

จากสมการที่ 7 และ 8

$$60\ \text{xylose} + 12\text{ADP} + 12\ \text{P}_i + 12\ \text{H}_2\text{O} + 3\ \text{O}_2 \rightarrow 54\text{xylitol} + 12\text{ATP} + 30\text{CO}_2 \tag{9}$$

ผลได้ของไซลิทอล = 54 : 60 = 0.905 โมลของไซลิทอลต่อโมลของไซโลส


D-xylose
NADPH+H⁺
NADP⁺
Xylose reductase
Xylitol
NAD⁺
NADH+H⁺
Xylitol dehydrogenase
Xylulose
6-P-gluconate
NADP⁺
NADPH
Glucose-6-P dehydrogenas e
Xylulose-5-phosphate
Pentose phosphate pathway
rearrangement reaction
NADPH
NADP⁺
Glucose-6-P
Fructose-6-phosphate
Glyceraldehyde-3-phosphate
Empden-Meyerhoff pathway
Aldehyde dehydrogenase
Ethanol
Pyruvate
Biomass
NAD⁺
NADH

ภาพที่ 5 เมทาบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์ *Debaryomyces hansenii*

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

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)

การผลิตไซลิทอลโดยวิธีการหมักนี้ได้มีการศึกษา และวิจัยเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เพื่อให้สามารถแข่งขันกับกระบวนการผลิตโดยกระบวนการทางเคมีซึ่งมีต้นทุนสูง และมีสารปนเปื้อน อยู่มาก ซึ่งจะต้องผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์หลายขั้นตอนได้ นอกจากนี้ยังเป็นการเน้นการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งทางภาคเกษตรกรรมที่ไม่มีมูลค่า หรือใช้ประโยชน์ได้ไม่เต็มที่นำมาผลิตเป็นไซลิทอล และผลิตภัณฑ์อื่นๆ ที่มีมูลค่าซึ่งมีการใช้กันมากในอุตสาหกรรมอาหาร

ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณผลผลิตไซลิทอลโดยกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์

1. อัตราการให้อากาศ การให้อากาศกระตุ้นการขนส่งน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ในยีสต์บางชนิดรวมถึงเชื้ออีกหลายชนิด เช่น *Candida, Hansenula, Kluyveromyces* และ *Pichia* ซึ่งต้องการออกซิเจนเพื่อใช้ในการดูดซึมน้ำตาล การให้อากาศแก่อาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงการหมัก จะทำให้เพิ่มการเปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลิทอล เพราะ การผลิตไซลิทอลเป็นผลผลิตที่เกิดควบคู่กับการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ที่มีความหนาแน่น ซึ่งมีอิทธิพลต่อการเผาผลาญโดยใช้ออกซิเจน จุลินทรีย์บางชนิด สามารถผลิตไซลิทอลภายใต้สภาวะที่มีอากาศเล็กน้อย

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

Horitsu และคณะ (1992) รายงานถึงผลกระทบที่มีต่อการผลิตไซลิทอลในขั้นแรกควรพิจารณาถึงความเร็วในการเพิ่มปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ อย่างไรก็ตามไซลิทอลภาย

47321

ใต้สภาวะ Anoxic และการเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในอาหาร ในช่วงระหว่างการหมักจะช่วยนำไปสู่การผลิตไซลูโลสโดยการไฮโดรจีเนชันของไซลิทอลที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นการเพิ่มระดับการละลายของออกซิเจน จะมีความต้องการเฉพาะขั้นตอนแรกของการหมักเท่านั้น แต่หลังจากนั้นควรลดระดับการให้อากาศกับจุลินทรีย์ *Candida tropicalis* เพิ่มการสะสมไซลิทอลภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนในปริมาณจำกัด

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 และการให้อากาศว่ามีผลกับปริมาณการผลิตไซลิทอลจากไซโลสโดยเชื้อยีสต์บางสายพันธุ์ ใน *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 ภายในเซลล์ 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

Horitzu และคณะ (1992) ใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 3 10 และ 20 กรัมต่อลิตร พบว่าจะเกิดผลผลิตสูงสุด 1.78 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้ยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร ด้วยอัตราการไหล 400 มิลลิลิตรต่อนาที ให้อากาศที่มีออกซิเจน 90 เปอร์เซ็นต์ และให้ไซโลส 100 กรัมต่อลิตร (Orishi และคณะ (1980)) พบว่าการผลิตโพลิออลโดย *Pichia* เป็นผลมาจากอัตราส่วน

ของคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ปริมาณโพลิออลจะได้มากกว่าเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นต่ำ

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

ตารางที่ 4 อัตราการเกิดชีวมวล และไซลิทอลที่ได้จากการใช้ไซโลสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน

ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณชีวมวล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณผลผลิต (กรัมต่อลิตร)
53	0.46	0.00
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 (1992) ศึกษาความต้านทานต่อสับสเตรทของ *Candida guilliermondii* ที่ความเข้มข้นของไซโลสเริ่มต้นจาก 100-300 กรัมต่อลิตร การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลนำไปสู่การเพิ่มผลผลิตไซลิทอล และปริมาณไซลิทอลที่เพิ่มขึ้นจากการเพิ่มไซโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณสูงสุดที่ได้เมื่อใช้ไซโลส 300 กรัมต่อลิตร ได้ผลผลิต 0.75 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส ซึ่ง

คิดเป็น 82.6 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณทั้งหมดในทฤษฎี ความเข้มข้นของไซลิทอลต่ำ เนื่องจากถูกใช้ไปในการเพิ่มมวลเซลล์เป็นหลัก อัตราการผลิตไซลิทอลเมื่อไซโลสเป็น 2.4 เท่า จะสูงกว่าปริมาณไซลิทอลที่ได้จากไซโลส 10 กรัมต่อลิตร ในทางตรงข้ามกับการผลิตไซลิทอล การเจริญของจุลินทรีย์ทีละน้อยจะถูกยับยั้งโดยความเข้มข้นของไซโลส อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด 0.11 ต่อชั่วโมง ได้จากความเข้มข้นของไซโลส 20 และ 50 กรัมต่อลิตร

4. การเติมน้ำตาลชนิดอื่นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Haiao 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 และ

ไซลิทอล โดยยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอล เช่น *Candida boidinii* และการเติมเมทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้ได้ไซลิทอลมากขึ้น

6. ปริมาณไบโอติน

Lee และคณะ (1987) รายงานว่าปริมาณเอทานอล และไซลิทอลจะสะสมในน้ำหมักในการเลี้ยงเชื้อแบบชั่วคราวของเชื้อ *Pachysolen tannophilus* และ *Candida guilliermondii* จะขึ้นอยู่กับระดับของไบโอติน 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 ซึ่งจะได้ไซลิทอลที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 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 ส่วนในระบบเซลล์ตรึงจะทำให้อัตราการผลิตไซลิทอลสูงขึ้นเป็น 2.08 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

เป็นการบ่งชี้ให้เห็นว่า การใช้เซลล์ตรึงสามารถนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้ใหม่ โดยไม่ทำให้กิจกรรมของเซลล์ลดลง ซึ่งเป็นการแก้ปัญหาการสูญเสียกิจกรรมของเซลล์ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ที่ทำการหมักเป็นระยะเวลานาน

2.2 การตรึงเซลล์

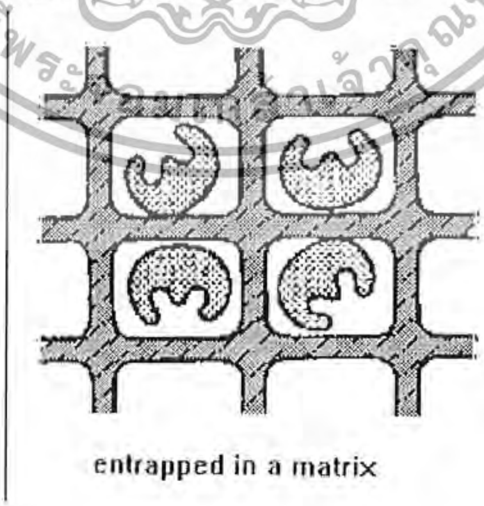
ความหมาย และประวัติของเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง

เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง หมายถึง เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกจำกัดขอบเขต หรือสถานที่ทางฟิสิกส์ให้อยู่ในบริเวณซึ่งทำให้จุลินทรีย์ไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่ง และสามารถนำมาใช้ซ้ำได้หลายครั้งอย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์ที่ถูกตรึงอาจอยู่ในรูปเซลล์ที่กำลังเจริญ เซลล์ระยะพัก หรือเซลล์ที่ตายแล้ว

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

ปี Chibata และ Tosa (1973) ศึกษา และได้รับความสำเร็จในการผลิตกรด แอล-แอสปาร์ติกแบบต่อเนื่องในระดับอุตสาหกรรม โดยใช้เซลล์ *Escherichia coli* ที่ถูกตรึงด้วยสารโพลิอะคริลาไมด์ (Polyacrylamide) นับเป็นอุตสาหกรรมแห่งแรกที่ใช้เซลล์ที่ถูกตรึง

ในปัจจุบัน มีรายงานเกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงในการผลิตสารชนิดต่างๆอย่างกว้างขวาง และที่ประสบความสำเร็จในระดับอุตสาหกรรมแล้ว เช่น กรดแอล-แอสปาร์ติก กรดแอล-มาลิก การผลิตฟรุคโตส และการผลิต prednisolone เป็นต้น



ภาพที่ 6 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 และยังเป็นการลดค่าใช้จ่ายอีกด้วย แต่การใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงมีข้อเสีย คือ เซลล์ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดที่สามารถผลิตสารที่ไม่ต้องการออกมายับยั้งผลผลิตได้ และเซลล์ที่ถูกตรึงยังถูกจำกัดการซึมผ่านเข้าออกของสับเสตรท และผลผลิตโดยสารที่ใช้ตรึงเซลล์ นอกจากนี้อาจพบการปนเปื้อนของผลผลิตจากตัวเซลล์ หรือสารที่ขับออกจากเซลล์ที่ถูกตรึง ในกรณีที่เซลล์เกิดการย่อยสลายตัวเอง เนื่องจากเซลล์ถูกใช้เป็นเวลานาน หรือเซลล์รั่วไหล เนื่องจากเซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวน

การพิจารณาคัดเลือกสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์

เนื่องจากการเตรียมเซลล์ที่ถูกตรึงมีหลายวิธี ดังนั้นคุณสมบัติของสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์แต่ละวิธีจึงมีข้อแตกต่างกันไป แต่โดยทั่วไปแล้วปัจจัยที่สำคัญในการพิจารณาจะคล้ายคลึงกัน คือ คุณสมบัติทางกลไก (mechanical properties) คุณสมบัติทางฟิสิกส์ ความทนทาน

ต่อสภาพแวดล้อมทางฟิสิกส์ สารเคมี และการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ ความชอบน้ำ (hydrophilicity) ความซึมซาบ (permeability) ราคา และการยอมรับ

สำหรับการคัดเลือดสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์โดยวิธีการห่อหุ้มนั้น Takata และคณะ (1977) ได้สรุปหลักในการพิจารณาไว้ดังนี้ คือ

1. คุณสมบัติในการละลาย ควรจะทำการละลาย และผสมเซลล์ที่ได้มีความคงตัวอยู่ในสภาวะที่เป็นของเหลว

2. คุณสมบัติในการเกิดเจล สารผสมที่ได้ควรจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดเจลด้วยวิธีง่ายๆภายใต้สภาวะปกติ และไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ หรือเซลล์จุลินทรีย์

3. คุณสมบัติของเจล เจลที่ได้ควรจะมีความแข็งแรง และความคงตัวสูง ขนาดของรูที่อยู่ภายในเจลควรจะมีขนาดเล็กพอที่จะป้องกันการรั่วไหลของเซลล์ได้ แต่สับสเตรทและผลผลิตที่เกิดขึ้นสามารถซึมผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ

คุณสมบัติของเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง

1. ความจำเพาะต่อองค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการผลิต เซลล์ที่ถูกตรึงจะมีความจำเพาะต่อองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงต่างจากเซลล์อิสระ เนื่องจากสารตัวนำเป็นอุปสรรคต่อการซึมผ่านเข้าออกของสารอาหารและผลผลิต ในกรณีองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงมีโมเลกุลสูง ความสามารของเอนไซม์ที่ถูกตรึงมักจะต่ำลงด้วย

2. ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึง เมื่อเปรียบเทียบความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึงกับเซลล์อิสระ พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงอาจเปลี่ยนแปลงไปในทางด้านความเป็นกรด ความเป็นด่าง หรือไม่เปลี่ยนแปลงเลย

3. อุณหภูมิที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึง เซลล์ที่ถูกตรึงมักมีความคงทนต่อความร้อนได้ดีกว่าเซลล์อิสระ ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึง จึงมักมีค่าสูงกว่าเซลล์อิสระ

4. ความคงตัวของเซลล์ที่ถูกตรึง มีความคงทนในการใช้งานได้ดีกว่าเซลล์อิสระ คือสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงมีความสามารถทนต่อสารเคมี และการเสื่อมสภาพทางฟิสิกส์ได้ดีกว่าเซลล์อิสระ

อัลจิเนต เป็นสารที่สกัดได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล มีลักษณะทางเคมีเป็นโพลิเมอร์ร่วมของ D-mannuronate (M) และ L-glucuronate (G) residues อัลจิเนตสามารถเกิดเป็นเจลได้เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีไอออนของโลหะโพลีวาเลนท์ เช่นอลูมิเนียมอิออน (Al^{3+}) และ แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตทำได้โดย ผสมเซลล์ลงในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต แล้วหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ จะเกิดการก่อตัวเป็นเจลของแคลเซียมอัลจิเนตขึ้นทันที และ

หลังจากนั้นควรแช่เจลไว้ในแคลเซียมคลอไรด์อีกอย่างน้อย 20 นาที เพื่อให้เกิดเจลอย่างสมบูรณ์ (complete gelation) (Buck, 1982) คุณสมบัติของเจลที่ได้จะขึ้นอยู่กับชนิด และปริมาณอัลจิเนตที่ใช้ โดยอัลจิเนตที่มี G-residues สูงจะทำให้เกิดเจลทีมีความแข็งแรงสูงด้วย 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 โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตนิยมใช้ศึกษาประสิทธิภาพของระบบเอนไซม์หลายชนิดในเซลล์กันมาก เช่น การย่อยสลายฟีนอล การผลิตแอลกอฮอล์ สารปฏิชีวนะ สเตอรอยด์ เป็นต้น

การตรึงเซลล์นั้นมีที่มาจากเทคนิคการตรึงเอนไซม์ แต่ทั้งนี้เพื่อที่จะเป็นการลดต้นทุนในส่วนของขั้นตอนการสกัดเอนไซม์ออกซึ่งจะต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูง จึงได้มีการดัดแปลงการตรึงเอนไซม์มาใช้กับการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ ตลอดจนถึงเซลล์สัตว์ และเซลล์พืชที่เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์

การตรึงเซลล์เกิดขึ้นจากแนวความคิดของการสังเกตธรรมชาติ แล้วนำมาดัดแปลง เช่น พิจารณาการทำงานของจุลินทรีย์ในดิน แล้วนำมาดัดแปลงใช้ในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังได้แนวความคิดจากกระบวนการใช้จุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมบางชนิด ที่มีเซลล์ของจุลิ

นทรีย์จับอยู่ที่ผิวของของแข็ง หรือสร้างเป็นแผ่นฟิล์ม เช่น ในกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชู การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นต้น

ได้มีการอธิบายถึงการตรึงเซลล์เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1966 (Mosbach and Mosbach) และหลังจากนั้นเป็นต้นมา งานวิจัยทางด้านนี้ได้มีเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และประสบผลสำเร็จจนถึงระดับอุตสาหกรรม เมื่อเร็วๆนี้ แต่ความสำเร็จนี้ยังคงอยู่ในขอบเขตของเซลล์ที่มีปฏิกิริยาขั้นตอนเดียว เอนไซม์ที่พบในเซลล์ซึ่งประสบผลสำเร็จดังกล่าว 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 ที่จะใช้ในระดับอุตสาหกรรมให้มี

ขนาดเล็กลง และทำงานได้ในเนื้อที่น้อยลง ซึ่งจะส่งผลให้ค่าใช้จ่ายในการลงทุนลดลงตามไปด้วย นอกจากกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องยังมีข้อได้เปรียบอีกหลายประการ ได้แก่ ที่ให้ควบคุมกระบวนการทำงานได้ดีกว่า ลดระยะเวลาของการผลิตสารผลิตภัณฑ์ ได้สารผลิตภัณฑ์ในรูปแบบที่คงที่ตลอดกระบวนการ ใช้สารละลายอาหารที่เจือจางซึ่งจะทำให้ไม่สิ้นเปลือง เพราะสารอาหารจะถูกใช้ไปจนหมด และประการสุดท้ายคือ ทำให้ไม่มีสารที่เป็นอันตรายต่อการทำงานของเซลล์ตกค้างอยู่ในคอลัมน์ เพราะมีการไหลผ่านของสารละลายอาหารตลอดเวลา ดังนั้นจึงช่วยให้ประสิทธิภาพการผลิตสารสูงขึ้น

ในกรณีเซลล์ของเซลล์ตรึงไม่เจริญเติบโต และสามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ต้องการโดยที่ไม่มีปฏิกิริยาอื่นแทรกซ้อน และเป็นผลให้ระบบเซลล์ตรึงผลิตสารผลิตภัณฑ์ได้เร็วกว่าการใช้เซลล์อิสระ ทั้งนี้เพราะเซลล์ตรึง จะมีความหนาแน่นของเซลล์ต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรของสารละลายอาหารมากกว่าเซลล์อิสระ

ในระบบเซลล์ตรึงนั้นสามารถนำเอาเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่ และสามารถควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ด้วยการใช้สารละลายเจือจางของสารอาหาร ซึ่งทำให้มีความสะดวกในการเตรียมสารละลายอาหาร และการใช้งานซึ่งเป็นปัญหาของการหมักแบบเก่า เนื่องจาก เมื่อการใช้สารอาหารความเข้มข้นสูง จะทำให้สารละลายมีความหนืด ซึ่งจะเป็นผลให้อัตราการแพร่กระจายของสารละลายอาหารเข้าไปยังเซลล์ต่ำ

การผลิตสารจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์อาจเกิดขึ้นควบคู่กับการเจริญเติบโต หรือระหว่างการหยุดพักการเจริญของเซลล์ การเจริญเติบโตของเซลล์อิสระจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณสารบางชนิดของเมตาบอไลท์ปฐมภูมิ (Primary metabolite) และเมื่อเซลล์หยุดการเจริญเติบโตจะทำให้เซลล์หยุดการผลิตสารเหล่านี้ด้วย ส่วนการผลิตสารอื่นๆ รวมทั้งเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) จะเกิดขึ้นระหว่างสภาวะที่เซลล์เจริญเติบโตเต็มที่ และเริ่มลดลง นั่นคือ พฤติกรรมการสังเคราะห์สารจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์เกิดขึ้นในช่วงเวลาจำกัด และความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเซลล์ อาจจะถูกยับยั้งได้ด้วยสารผลิตภัณฑ์บางชนิดของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นผลให้สูญเสียเมตาบอไลท์อินเทอร์มีเดียต (Intermediate metabolite) และอาจจะทำให้เอนไซม์ที่สำคัญถูกทำลายกัมมันตภาพไปชั่วคราว หรือโดยตลอดก็ได้ ปัญหาต่างๆเหล่านี้จะไม่เกิดขึ้น เมื่อใช้ระบบเซลล์ตรึง

ดังที่กล่าวมาข้างต้นนี้จะพบว่าระบบเซลล์ตรึงมีความได้เปรียบเซลล์อิสระมากมาย อย่างไรก็ตามการใช้เซลล์ตรึงมีข้อจำกัดที่สำคัญ คือ การแพร่กระจายของสารละลายอาหาร ทำให้เอนไซม์ภายในเซลล์ไม่สามารถทำงานได้เต็มประสิทธิภาพ โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์ในเซลล์ตรึงจะทำงานได้

เต็มที่เฉพาะบริเวณผิวของเซลล์ตรึง จากการศึกษาพบว่าข้อบกพร่องนี้สามารถลดลงได้โดยใช้วิธีการต่างๆเหล่านี้

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

การแก้ไขปัญหาจากข้อบกพร่องด้วยวิธีที่กล่าวข้างต้น จะต้องเลือกให้เหมาะสมกับงานที่ต้องการใช้ นอกจากปัญหาการแพร่กระจายของสารละลายอาหารแล้ว การใช้เซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์จะมีข้อบกพร่องอื่นๆ ซึ่งจะได้กล่าวพร้อมกับวิธีการแก้ไขในแต่ละกรณีดังต่อไปนี้

ในระหว่างการทำงานของระบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ อาจจะทำให้มีการสะสมของสารผลิตภัณฑ์ ปัญหาเช่นนี้สามารแก้ไขได้โดยการทำลายผนังเซลล์ของเซลล์ตรึง แต่การกระทำเช่นนี้จะทำให้เซลล์ตาย และปล่อยสารอื่นๆ เช่น โคเอนไซม์ออกมาด้วย ปรากฏการณ์นี้จะแตกต่างจากผลการทดลองที่ได้จากการใช้เซลล์พืชตรึงโดยที่เซลล์พืชจะถูกทำให้มีการซึมผ่านของสารผลิตภัณฑ์ได้โดยที่ยังคงรักษาเซลล์ให้มีชีวิตอยู่ได้

ในบางกรณีเซลล์ตรึงจะมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วซึ่งทำให้มีการปล่อยเซลล์อิสระออกจากเซลล์ตรึง และบางครั้งจะทำให้โครงสร้างของเซลล์ตรึงถูกทำลาย ซึ่งจะทำให้การแยกสารผลิตภัณฑ์ และมีการอุดตันในส่วนประกอบของเครื่องปฏิกรณ์ วิธีแก้ไขข้อบกพร่องนี้จะทำได้โดยการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ตรึง

เมื่อเซลล์ที่นำมาตรึงต้องอาศัยออกซิเจนเพื่อดำรงชีพ จะต้องคำนึงถึงการแพร่กระจายของออกซิเจนในการพิจารณาวิธีที่เหมาะสมสำหรับการตรึง จากการศึกษาพบว่าการตรึงเซลล์ชนิดนี้ร่วมกับเซลล์ที่สังเคราะห์แสงได้จะช่วยแก้ปัญหานี้ได้ ทั้งนี้เนื่องจาก เซลล์ที่สังเคราะห์แสงจะช่วยผลิตออกซิเจนให้กับเซลล์อีกชนิดหนึ่ง ที่ต้องการออกซิเจนโดยไม่ต้องขนส่งสารพาหะ นอกจากนี้

อาจทำการแก้ไขโดยการตรึงในสภาวะที่เป็นอิมัลชัน กับสารพวกเปอร์ฟลูออไรด์ (Perfluoro compound) ซึ่งจะเป็นสารที่นำออกซิเจนไปให้เซลล์ได้เป็นอย่างดี

นอกจากนี้ยังมีปัญหาอื่นๆ ที่จะพบเสมอในการรักษาชีวิตของเซลล์ตรึง แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันได้มีการปรับปรุงเทคนิคใหม่ๆ ที่ช่วยให้สามารถรักษาชีวิตของเซลล์ตรึงได้มากขึ้น

เทคนิคการตรึงเซลล์โดยใช้วิธีการดักจับ

นอกจากการตรึงเซลล์โดยวิธีต่างๆ ที่ใช้กันทั่วๆไปแล้วยังมีอีกวิธีที่สามารถใช้ในการตรึงเซลล์ได้ดี คือ การดักจับเซลล์ด้วยสารพาหะที่เป็นเจล ซึ่งอาจจะเป็นสารอินทรีย์ที่พบในธรรมชาติ เช่น คอลลาเจน เจลาติน อาการ์ อะกาโรส เคปปาร์คาราจีแนน อัลจิเนต ไคโตแซน เซลลูโลส หรือได้จากการสังเคราะห์ เช่น โพลิเมอร์บางชนิด : โพลิอะคริลาไมด์ โพลิเมทาคริเลท โพลิยูริเทน ซึ่งโพลิเมอร์เหล่านี้ อาจจะได้มาจากวิธีต่างๆ ได้แก่ การเชื่อมไขว้, โพลิเมอร์ไรเซชัน โพลิคอนเดนเซชัน

การตรึงเซลล์โดยใช้วิธีดักจับไว้ในสารพาหะที่จะทำให้ได้เซลล์ตรึงที่มีลักษณะเป็นเม็ด สามารถทำได้หลายวิธีดังนี้

1. เตรียมโพลิเมอร์ให้มีลักษณะเป็นแผ่น แล้วตัดให้มีขนาดเล็กลง วิธีนี้เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย แต่จะได้ขนาดของเซลล์ตรึงที่ไม่สม่ำเสมอ ซึ่งทำให้สารละลายอาหารไหลผ่านไม่สะดวกเมื่อบรรจุเซลล์ตรึงลงในคอลัมน์

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

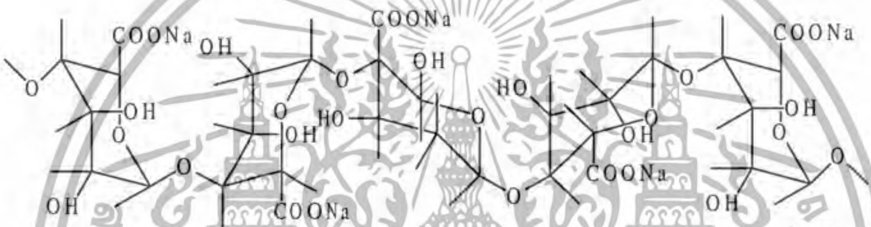
3. เตรียมโดยใช้ระบบสองเฟส (Two-phase system) เซลล์ตรึงที่เตรียมโดยวิธีนี้จะมีลักษณะกลม และปล่อยให้สารละลายอาหารไหลผ่านได้โดยสะดวก นอกจากนี้ยังสามารถเตรียมเป็นจำนวนมากได้ด้วย

ปัญหาที่สำคัญของการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการดักจับ คือ ข้อจำกัดในการแพร่กระจายของสารอาหาร โดยปกติเซลล์ตรึงจะได้รับสารอาหารน้อยกว่าเซลล์อิสระ ทั้งนี้เพราะเมื่อเซลล์ถูกจับไว้ด้วยสารพาหะจะทำให้สารอาหารซึมผ่านสารพาหะก่อนที่เซลล์จะได้รับสารอาหาร แต่ในการประยุกต์ใช้ในบางกรณีนั้น ข้อจำกัดนี้จะมีความสำคัญน้อยลงเมื่อเทียบกับประโยชน์ที่ได้รับจากเซลล์ตรึง ซึ่งจะป้องกันเซลล์จากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมภายนอกเซลล์ ตัวอย่างเช่น การตรึงเซลล์ด้วยโพลิอะคริลาไมด์จะทำให้ปัญหาเรื่องข้อจำกัดในการแพร่กระจายลดลงได้ เพราะเจลชนิดนี้มีรู

พรุนขนาดใหญ่ นอกจากนี้ปัญหาการซึมผ่านผนังเซลล์จะลดลงโดยการทำให้เซลล์แตก (Autolysis) การทำให้เซลล์แห้ง หรือแช่แข็ง หรือโดยการใช้โทลูอีน หรือสารพวกเซอร์แฟคแทนท์ (Surfactant) วิธีการเหล่านี้อาจทำให้เซลล์ตาย แต่จะมีเอนไซม์ที่คงกัมมันตภาพอยู่

สำหรับโพลิเมอร์ธรรมชาติที่ใช้การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการดักจับนั้นมีเป็นจำนวนมาก การทำให้โพลิเมอร์แต่ละชนิดมีลักษณะเป็นเจลนั้นมีหลายวิธี บางวิธีเป็นวิธีที่นุ่มนวล และทำให้เซลล์ที่ไม่ทนต่อสภาวะต่างๆ สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้หลังจากทำการตรึงเซลล์แล้ว

อัลจิเนต เป็นสารพาหะที่ใช้ดักจับเซลล์ได้ง่าย และสะดวก ดังนั้นในปัจจุบันจึงเป็นวิธีหนึ่งที่นำมาใช้กันมาก เมื่อพิจารณาจากจำนวนงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่จะพบว่า อัลจิเนตเป็นโพลิเมอร์ธรรมชาติที่ใช้กันมากที่สุด อัลจิเนตมีโครงสร้างดังรูป



ภาพที่ 7 โครงสร้างของโซเดียมอัลจิเนต

ซึ่งจะประกอบด้วยกลุ่มคาร์บอกซิลในแต่ละหน่วยย่อย (โมโนแซคคาไรด์) ที่จะไปยึดจับกับไอออนของโลหะบางชนิด เช่น Ca^{2+}, Ba^{2+}, Cu^{2+}, Al^{3+} เป็นต้น ทำให้ได้เจลที่มีความเสถียร และการตรึงเซลล์โดยวิธีการดักจับได้ในสภาวะที่ไม่รุนแรง เป็นผลให้เซลล์ส่วนมากไม่ตาย ลักษณะรูปร่างของเจลที่ผ่านขั้นตอนการตรึงเซลล์แล้วจะมีลักษณะเป็นเม็ดกลม ซึ่งเตรียมได้โดยการดูดสารละลายผสมของเซลล์ (1-2% โดยน้ำหนักของเซลล์เปียก) กับโซเดียมอัลจิเนต (1-7% โดยน้ำหนัก) ผ่านเข็มฉีดยา แล้วรองรับหยดของสารผสมนี้ด้วยสารละลายของแคลเซียมคลอไรด์ (0.05-0.5 โมลาร์) ที่เย็น แล้วปล่อยให้เม็ดเจลอยู่ในสารละลาย เป็นเวลานานประมาณ 2 ชั่วโมง ทั้งนี้เพื่อให้เม็ดเจลมีความแข็งมากขึ้น เพราะแคลเซียมไอออนจะเข้าไปแทนที่โซเดียมไอออนของโซเดียมอัลจิเนต ความแข็งของเม็ดเจลจะขึ้นอยู่กับชนิด และความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต อัตราส่วนของกรดแมนนูโรนิค และกรดกลูคูโรนิค มีผลต่อความเสถียรของเจลโดยถ้าหากมีกลูคูโรนิคจำนวนมากจะทำให้ได้เจลที่มีความเสถียรสูง

ข้อบกพร่องในการตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนต คือ เม็ดเจลที่ตรึงเซลล์จะละลายในสารละลายที่มีไอออน หรือโมเลกุลที่สามารถจับกับ Ca^{2+} ได้ ตัวอย่างเช่น ฟอสเฟต ซิเตรต EDTA เป็นต้น ในกรณีที่

ความเข้มข้นของไอออนเหล่านี้ไม่สูงมาก จะทำให้เม็ดเจลคงรูปอยู่ได้ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของ Ca^{2+} หรือใช้สารประกอบเอมีน (เช่น โพลิเอทิลีนอิมีน, โพลิโพรพิลีนอิมีน)และตามด้วยการเชื่อมไขว้โดยใช้กลูทาราลดีไฮด์ จากการตรึงเซลล์ยีสต์พบว่าเซลล์ตรึงที่ผ่านการเคลือบด้วยโพลิเอมีนและกลูทาราลดีไฮด์ จะผลิตเอทานอลได้ในปริมาณเท่ากับเซลล์ตรึงที่ไม่ผ่านการใช้สารทั้งสอง แต่เม็ดเจลในกรณีแรกจะมีความเสถียร โดยที่จะสามารถอยู่ในสารละลายฟอสเฟตได้เป็นเวลานาน

การดักจับเซลล์ด้วยอัลจิเนตนี้ได้ถูกพัฒนาจนเป็นอุตสาหกรรม บริษัท Kyowa Hakko Kogyo ในญี่ปุ่นได้สร้างโรงงานผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์ตรึงที่เตรียมจากการดักจับด้วยอัลจิเนต โดรงงานนี้จะมีถังปฏิกรณ์ขนาด 4000 ลิตร และผลิตเอทานอลบริสุทธิ์ได้ 2600 ลิตรต่อวัน เม็ดอัลจิเนตจะถูกเตรียมโดยตรงในถังปฏิกรณ์ซึ่งไม่ต้องใช้เครื่องมือใดๆ เพิ่มเติม และใช้เวลาในการเตรียมเพียง 3-4 ชั่วโมง โรงงานทดลองนี้ใช้ระบบคอมพิวเตอร์ควบคุมทั้งหมด ระบบการทำงานในกระบวนการผลิตเอทานอลเป็นระบบต่อเนื่องในเวลา 4000 ชั่วโมง (ประมาณ 6 เดือน) มีอัตราการผลิตเอทานอลอย่างคงที่ (8.5-9% ปริมาตรต่อปริมาตร) จากการใช้โมลาสเจือจางเป็นสับสเตรท กระบวนการผลิตเอทานอลด้วยระบบนี้สูงกว่าการใช้ถังหมักแบบแบทช์ โรงงานนี้นับว่าเป็นโรงงานระดับใหญ่โรงงานแรกที่ใช้เซลล์ตรึงในระดับอุตสาหกรรม

ความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับสารพาหะที่ใช้ในการตรึงเซลล์

1. พื้นที่ผิวของสารพาหะ และความจุของเซลล์
2. ผลกระทบจากสภาวะแวดล้อมรอบๆเซลล์ตรึง สภาวะแวดล้อมรอบๆเซลล์ตรึงจะมีผลต่อการทำงานของเซลล์ ผลกระทบนี้อาจจะน้อยกว่ากรณีของเอนไซม์ตรึง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่เซลล์ตรึงผลิตเอนไซม์ภายในเซลล์นั้นจะได้รับผลกระทบจากสภาวะแวดล้อมรอบๆเซลล์น้อยมาก

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

การนำเซลล์ตรึงไปประยุกต์ใช้งาน

1. การผลิตสารชีวโมเลกุล

จะเห็นว่าเซลล์ตรึงทำให้เกิดปฏิกิริยาต่างๆจำนวนมาก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารอินทรีย์ และสับสเตรท ตามตารางที่ 5 ได้แสดงการสรุปการใช้เซลล์ตรึง ในอุตสาหกรรมที่เป็นรู้จักกันทั่วไป

ตารางที่ 5 ตัวอย่างเซลล์ตรึงที่ใช้ในอุตสาหกรรม

จุลินทรีย์	วิธีตรึง	เอนไซม์ที่ใช้	การประยุกต์ใช้งาน	แหล่งผลิต	เอกสารอ้างอิง
Actinoplanes missouriensis	ดักจับด้วยเจลาตินที่เชื่อมไขว้ด้วยกลูทาราลดีไฮด์	กลูโคสไอโซเมอเรส	กลูโคส เป็น ฟรุคโตส	Gist-Brocades. Netherlands	Technical data sheet, Maxazyme®
Bacillus coagulans	เชื่อมไขว้ด้วยกลูทาราลดีไฮด์	กลูโคสไอโซเมอเรส	กลูโคส เป็น ฟรุคโตส	Novo Industry, Denmark	Technical data sheet, Sweetzyme®
Bacillus sp.	เชื่อมไขว้ด้วยกลูทาราลดีไฮด์	บีตา-กาแลคโตซิเดส	สลายแลคโตส	Novo Industry, Denmark	Technical data sheet, Novozyme™ 281
Brevibacterium flavum	ดักจับด้วยคาราจีแนน	ฟูมาเรส	ฟูมาเรต เป็น กรดมาลิก	Tanabe Seiyaku Co. Ltd. Japan	Chibata 1979
Escherichia coli	ดักจับด้วยคาราจีแนน	แอสพาร์เทส	แอมโมเนียมฟูมาเรต เป็น กรดแอสพาร์ทิก	Tanabe Seiyaku Co. Ltd. Japan	Chibata 1979
E. coli	ดักจับด้วยโพลิอะคริลาไมด์	เพนิซิลลิน เอไซเลส	เพนนิซิลลิน เป็น 6-APA	Tanabe Seiyaku Co. Ltd. Japan	Chibata et al.1974 b
E. coli	ดักจับด้วยเจลาตินที่เชื่อมไขว้ด้วยกลูทาราลดีไฮด์	เพนิซิลลิน เอไซเลส	เพนนิซิลลิน เป็น 6-APA	Institute of Biochemistry, Shanghai, China	Wang et al. 1982

จุลินทรีย์	วิธีตรึง	เอนไซม์ที่ใช้	การประยุกต์ใช้งาน	แหล่งผลิต	เอกสารอ้างอิง
E. coli + *Pseudomonas ducunhae*	ดักจับด้วยคาราจีแนน	แอสพาร์เทส + L-aspartate β-decarboxylase	ฟูมาเรต เป็น L-alanine	Tanabe Seiyaku Co. Ltd. Japan	Takamatsu et al. 1982
Mortierella vinacea	เชื่อมไขว้ด้วยกลูทาราลดีไฮด์	β-กาแลคโตซิเดส	สลาย raffinose	Great Western Sugar Co. USA	Stein and Linden 1980
Proteus rettgeri	จับกับไกลซิดิลเมทาคริเลต และกลูทาราลดีไฮด์	เพนิซิลลิน เอไซเลส	เพนนิซิลลิน เป็น 6-APA	Pfizer Inc. USA	Nelson 1976
Streptomyces albus	ใช้ความร้อน และเครื่องปฏิกรณ์ช่วยกรอง	กลูโคสไอโซเมอเรส	กลูโคส เป็น ฟรุคโตส	Clinton Corn Proc. Co. USA	Takasaki et al. 1969
S. olivaceus	เชื่อมไขว้ด้วยกลูทาราลดีไฮด์	กลูโคสไอโซเมอเรส	กลูโคส เป็น ฟรุคโตส	Miles Laboratories Inc. USA	Technical data sheet., Taka-Sweet™

นอกจากนี้เทคนิคการใช้เซลล์ยีสต์ตรึงยังสามารถใช้ได้กับกระบวนการผลิตแบบต่อเนื่องในระดับอุตสาหกรรมได้ด้วย เนื่องจากในกระบวนการเตรียมเซลล์ตรึงจะไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์พิเศษอื่นๆในการตรึงเซลเข้ามาเพิ่มเติม โดยเม็ดเจลรูปทรงกลมจะได้จากการเติมสารผสมระหว่างเซลล์ยีสต์กับโซเดียมอัลจิเนต ลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์โดยใช้หัวฉีด (nozzle) ซึ่งจะถูกติดตั้งอยู่บริเวณส่วนบนของถังหมัก สารผสมดังกล่าวจะค่อยๆถูกปล่อยลงมายังสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ในถังหมักอย่างต่อเนื่อง จากนั้นหลังจากสิ้นสุดกระบวนการตรึงเซลล์แล้ว อาหารเลี้ยงเชื้อหรือสับสเตรทก็จะถูกป้อนเข้าสู่ถังหมัก เพื่อเริ่มต้นกระบวนการหมักภายในถังหมักต่อไป และเม็ดเจลดังกล่าวจะสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ในกระบวนการหมักครั้งต่อไป เนื่องจากสามารถถูกแยกออกจากน้ำหมักได้โดยง่าย

2. งานด้านวิเคราะห์

ปัจจุบันงานด้านวิเคราะห์จำนวนมากที่ได้ให้ความสนใจในการประยุกต์ใช้เซลล์ตรึง ซึ่งมีทั้งที่ใช้ในรูปของอิเลคโทรด (พีเอช, ออกซิเจน, แอมโมเนีย และคาร์บอนไดออกไซด์) และในรูปแบบเทอร์มิสเตอร์ (Thermister)

2.3 ผลของ Tween 80 ที่มีต่อปริมาณไซลิทอลที่ถูกขับออกจากเม็ดเจล

จากการทดลองของ Bhumibhamon (1982) พบว่า Tween 80 0.1 เปอร์เซ็นต์ จะสามารถช่วยเพิ่มการส่งผ่าน Acid protease ซึ่งผลิตจาก *Aspergillus awamori* Yongsmith และ Chutima (1983) พบว่า Tween 80 มีผลต่อการผลิตวิตามินบี 12 ของ *Propionibacterium* Takahashi (1983) ได้ใช้ Tween 80 (Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate) ซึ่งเป็น non-ionic surfactant อีกชนิดหนึ่งที่กระตุ้นการขับ Extracellular protein โดยเชื้อ *Pseudomonas butanovara* sp. nov. พบว่าถ้าใช้ Tween 80 ปริมาณ 0.05 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มการขับ Extracellular protein เพิ่มขึ้น 3 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่ใส่สารนี้ Balabushevich และคณะ (1983) ทดลองใช้ Tween 20, Tween 40 และ Tween 85 จะกระตุ้นการขับออกของ Inosine-5-monophosphate (IMP) เพิ่มขึ้น 2 เท่า อาจเนื่องจากการที่ Tween เกี่ยวข้องกับการทำให้ cell permeability เพิ่มขึ้น เป็นผลให้การเจริญ และการขับสาร IMP เพิ่มขึ้น ในการทดลองจึงเลือกใช้ Tween 80 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการขับสีแดงออกนอกเซลล์

สำหรับ *Monascus sp.* KBI13 อาหารที่เติม Tween 80 $1.33*10^{-1}$ มิลลิลิตรต่อลิตร จะได้ปริมาณสารสีแดงนอกเซลล์น้อยกว่าอาหารที่ไม่เติม Tween 80 ซึ่งมีปริมาณสีแดงนอกเซลล์ 85.5 หน่วย ส่วนอาหารที่เติม Tween 80 $1.33*10^{-2}$ มิลลิลิตรต่อลิตร ได้ปริมาณสีแดงนอกเซลล์สูงสุด คือ

105 หน่วย และเมื่อลดปริมาณ Tween 80 เป็น $1.33*10^{-3}$ – $1.33*10^{-4}$ มิลลิลิตรต่อลิตร จะได้สีแดงนอกเซลล์ลดลง ตามลำดับ แต่ยังคงมีปริมาณสีแดงนอกเซลล์มากกว่าอาหารที่ไม่เติม Tween 80

ได้มีการศึกษาถึงการตรึงเซลล์โดยมีการเติมสารลดแรงตึงผิวชนิด non-ionic surfactant หรือกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว ลงไปในสารผสมระหว่างแคลเซียมอัลจิเนต และเซลยีสต์ ขณะที่กำลังมีการเกิดเจล พบว่าจะเป็นการช่วยเพิ่มความคงตัวของเซล และยังเป็นการช่วยรักษาแอคติวิตี้ของเอนไซม์ (ในกรณีที่เป็นการตรึงเอนไซม์) ด้วย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย และอุปกรณ์

3.1 จุลินทรีย์

Debaryomyces hansenii TISTR 5155 ใช้ในการศึกษาการผลิตไซลิทอล ได้รับจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยทำการเก็บเป็น stock culture ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในอาหาร YM agar

3.2 อุปกรณ์

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

3.3 สารเคมี

1. HCl
2. Sodiumperiodate
3. Butane-2,3-diol
4. Pentane-2,4-dione (acetylacetone)
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. Sodium potassium tartrate (tetrahydrate)
17. Thiourea
18. 4-bromoaniline
19. NaOH
20. Ammonium molybdate
21. H_2SO_4
22. Disodium arsenate
23. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน
24. สารละลายไซลิทอลมาตรฐาน
25. สารละลายไซโลสมาตรฐาน

3.4 วิธีการทดลอง

1. การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155

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

1.2) การสร้างกราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ ซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่นับได้จาก Haemacytometer โดยใช้วิธี Direct microscopic method ซึ่งเป็นปริมาณเซลล์ต่ออาหารเหลวที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง 1 มิลลิลิตร และ ระยะเวลาที่ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที

2. การศึกษาขั้นตอนการตรึงเซลล์ โดยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต (Gel entrapment immobilization)

3. ศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบจากการเติม Tween 80 ลงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้คือ 0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5% ในการผลิตไซลิทอลในสภาวะที่มีการใช้เซลล์ตรึง

4. ศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบจากการเติม Tween 80 ลงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้คือ 0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5% ในการผลิตไซลิทอลในสภาวะที่มีการใช้เซลล์อิสระ

5. ศึกษาถึงปริมาณผลผลิตที่ได้ เช่น ปริมาณไซลิทอล ปริมาณสารตั้งต้นที่ถูกใช้ไปในกระบวนการผลิต เช่น ปริมาณน้ำตาลไซโลส และสภาวะต่างๆ ที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างกระบวนการผลิต เช่น pH ที่เปลี่ยนแปลงไประหว่างการหมัก, ปริมาณน้ำตาลกลูโคส และไซโลสที่ลดลง และปริมาณน้ำตาลไซลิทอลที่ผลิตได้

1. การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155

ทั้งนี้เพื่อศึกษาว่าเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 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 24 ชั่วโมง)

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

1. ทำการถ่ายเชื้อลง slant อาหารใหม่ เพื่อใช้ในการผลิตหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับการเพาะเลี้ยง

ทำการลนปากหลอดอาหารเชื้อเก่า และหลอดอาหารใหม่ให้ร้อน จากนั้นลนลูปให้ร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อแล้วจึงนำมาเขี่ยเชื้อจากหลอดเชื้อเก่ามาทำการเขี่ยลงบนหลอดอาหารใหม่ 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 24 ชั่วโมง)

2. การศึกษาขั้นตอนการตรึงเซลล์โดยวิธีการห่อหุ้มด้วยโซเดียมอัลจิเนต (Gel entrapment immobilization) เป็นการตรึงเซลล์โดยเทคนิคการห่อหุ้ม (Gel entrapment) โดยใช้โซเดียมอัลจิเนตเป็นโพลิเมอร์ที่ใช้เป็นตัวห่อหุ้มเซลล์เอาไว้ภายใน

1. ทำการถ่ายเชื้อลง slant อาหารใหม่ เพื่อใช้ในการผลิตหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับการเพาะเลี้ยง

ทำการลนปากหลอดอาหารเชื้อเก่า และหลอดอาหารใหม่ให้ร้อน จากนั้นลนลูปให้ร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อแล้วจึงนำมาเขี่ยเชื้อจากหลอดเชื้อเก่ามาทำการเขี่ยลงบนหลอดอาหารใหม่ 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 ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าดังกล่าวเป็นระยะเวลานาน 3-4 ชั่วโมง จนกระทั่งค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร มีค่าประมาณ 0.3-0.4 เนื่องจากจะเป็นช่วงที่เชื้อมีการเจริญเติบโต อยู่ในช่วง mid log phase (ช่วงกลางของระยะเอ็กซ์โปเนนเชียล) ซึ่งเป็นระยะที่เหมาะแก่การทำ หัวเชื้อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยง

3. ถ่ายเอาหัวเชื้อจากอาหารเหลวดังกล่าวลงในอาหารเหลวใหม่เป็นปริมาณ 8% ของอาหารเหลวที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์

4. ทำการเพาะเลี้ยง เป็นระยะเวลานาน 14 ชั่วโมง ทั้งนี้เพื่อให้เชื้อมีการเจริญเติบโตอยู่ในช่วง maximum log phase (ช่วงที่มีการเจริญเติบโตสูงสุดของช่วงเอ็กซ์โปเนนเชียล) ทั้งนี้เชื้อที่มีอายุอยู่ในช่วงนี้ จะมีการเจริญเติบโตสูงที่สุด ซึ่งจะให้ผลผลิตสูงที่สุด

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

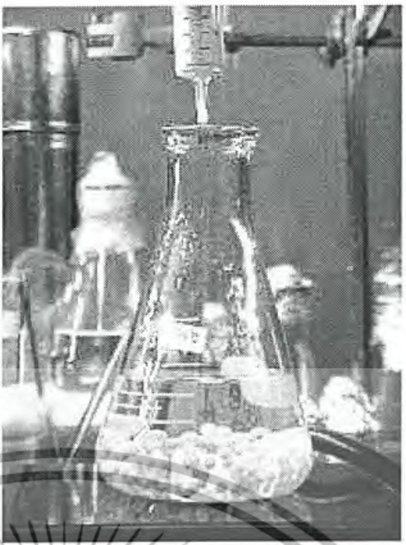
6. รวมเซลล์ที่ได้เป็นปริมาณ 8 กรัม (8% ของอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล(กรัมน้ำหนักเปียกต่อลิตร)) เพื่อนำมาใช้ตรึงในโซเดียมอัลจิเนต

7. นำเอาเซลล์ที่ได้ 8 กรัมดังกล่าว มาเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 %

8. เทสารผสมดังกล่าว ลงในฟลาสก์ที่บรรจุสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ผสมให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียว ทั้งนี้เพื่อให้เม็ดเจลที่ได้ มีเซลล์กระจายตัวอย่างทั่วถึงกันในเม็ดเจลแต่ละเม็ด

โดยโซเดียมอัลจิเนตที่ใช้ในการตรึงเซลจะเกิดการจับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนบริเวณผิวหน้าของของเหลว ดังนั้นจึงควรจะค่อยๆทำการเติมผงโซเดียมอัลจิเนตลงไปทีละน้อยอย่างช้าๆ เพื่อให้สารละลายผสมกันได้ดี โดยควรจะทำการกวนอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานประมาณ 1 ชั่วโมงเป็นอย่างต่ำ หลังจากที่เติมผงโซเดียมอัลจิเนตลงไปจนครบปริมาณแล้ว และหลังจากผสมจนเป็นเนื้อเดียวกันแล้วควรจะตั้งสารละลายดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิห้อง อย่างน้อย 1 ชั่วโมงโดยจะทำการกวนด้วยแท่งแก้วเป็นระยะๆ เพื่อเป็นการไล่ฟองอากาศที่แทรกตัวอยู่ในสารละลายออกก่อนจะนำมาใช้ตรึงเซลล์ (A. Manjon และ L.Iborra)

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

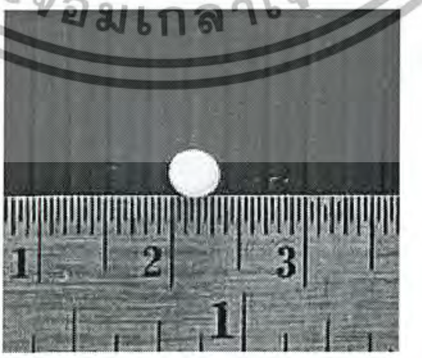


ภาพที่ 8 กระบวนการตรึงเซล

ที่มา : พาณิณ และวริยา (2003)

10. นำเอาเม็ดเจลที่ได้มาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 2 ชั่วโมงเป็นอย่างต่ำ

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



ภาพที่ 9 แสดงขนาดของเม็ดเจลที่ได้จากกระบวนการตรึงเซล

ที่มา : พาณิณ และวริยา (2003)

3. ศึกษาเปรียบเทียบผลกระทบจากการเติม Tween 80 ลงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้คือ 0, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5% ในการผลิตไซลิทอลในสภาวะที่มีการใช้เซลล์ตรึง

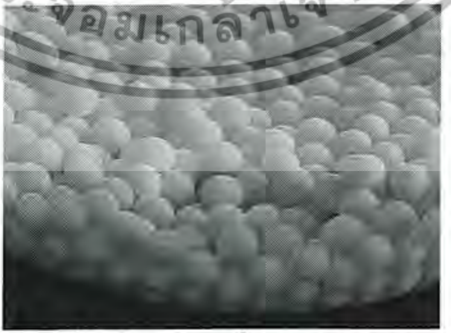
1. ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ และนำเอาเซลล์ที่ได้มาผ่านขั้นตอนในการตรึงเซลล์ตามกรรมวิธีที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น

2. นำเอาเม็ดเจลที่ได้มาถ่ายลงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่มีการเติม Tween 80 ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน ดังนี้คือ 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์

3. ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มไว้ในเม็ดเจลดังกล่าว ในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอลบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลานาน 12 ชั่วโมง ในระยะนี้ เชื้อจะใช้น้ำตาลกลูโคสในอาหารเหลวเพื่อการผลิตไซลิทอลไปเพื่อการเจริญเติบโต และด้วยความเร็วรอบที่สูงนี้ จะทำให้เซลล์ได้รับออกซิเจนมากขึ้น เป็นผลให้เชื้อนำเอาน้ำตาลส่วนใหญ่เข้าสู่ pathway ในการสลายน้ำตาลเพื่อนำไปใช้ในการเจริญเติบโตของตัวเซลล์นั่นเอง

4. ลดความเร็วรอบของเครื่องเขย่าลงเหลือ 150 รอบต่อนาที แล้วทำการเพาะเลี้ยงต่อไปอีกเป็นระยะเวลานาน 6 ชั่วโมง โดยในช่วงนี้เชื้อจะนำเอาน้ำตาลไซโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อไปใช้เข้าสู่ pathway การเปลี่ยนแปลงไปสู่น้ำตาลไซลิทอล ทั้งนี้ในการลดความเร็วรอบเครื่องเขย่านี้จะเป็นผลทำให้เซลล์ได้รับออกซิเจนในปริมาณที่ลดลง ทำให้น้ำตาลไซโลสส่วนใหญ่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถูกใช้ไปในการผลิตไซลิทอล แทนที่จะถูกนำมาใช้ในการเจริญเติบโต

5. ทำการตรวจวัดปริมาณไซลิทอลที่ได้โดยเทคนิคของ Alder & Gustafson's method



ภาพที่ 10 แสดงลักษณะของเม็ดเจลที่อยู่ในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล

ที่มา : พาณิณ และวริยา (2003)

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

1. ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ และนำเอาเซลล์ที่ได้มาผ่านขั้นตอนในการตรึงเซลล์ตามกรรมวิธีที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น

2. ถ่ายเอาเม็ดเจลที่ได้ ลงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอลซึ่งมีการเติม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ลงไป

3. เลี้ยงเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มในเม็ดเจลดังกล่าว บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นาน 12 ชั่วโมง

4. ลดความเร็วรอบของเครื่องเขย่าลงเหลือ 150 รอบต่อนาที โดยทันทีที่ลดความเร็วรอบ ให้ทำการตรวจวัดค่าต่างๆในทันที ซึ่งค่าที่ได้ให้นับเป็นชั่วโมงที่ 0 ของการเพาะเลี้ยง สำหรับค่าต่างๆ ที่ทำการตรวจวัดได้แก่ pH ที่เปลี่ยนแปลงไป ปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ปริมาณกลูโคสที่ลดลง โดยเทคนิคของ Somogyi & Nelson's method ปริมาณไซโลสที่ลดลง โดยเทคนิค Deschatelets & Yu (1985) ปริมาณไซลิทอลที่เพิ่มขึ้น โดยเทคนิคของ Alder & Gustafson's method

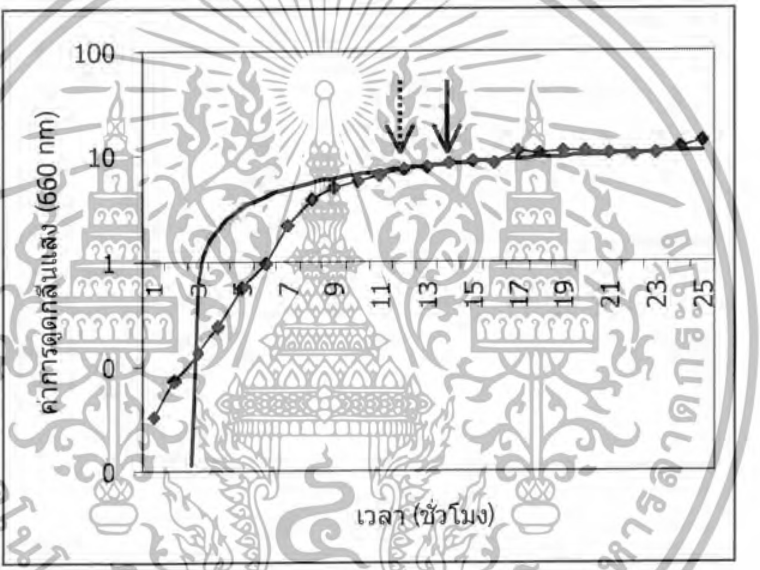
8. ทำการตรวจวัดค่าต่างๆดังกล่าวทุกๆ 1 ชั่วโมงเป็นระยะเวลาทั้งหมด 24 ชั่วโมง

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผล

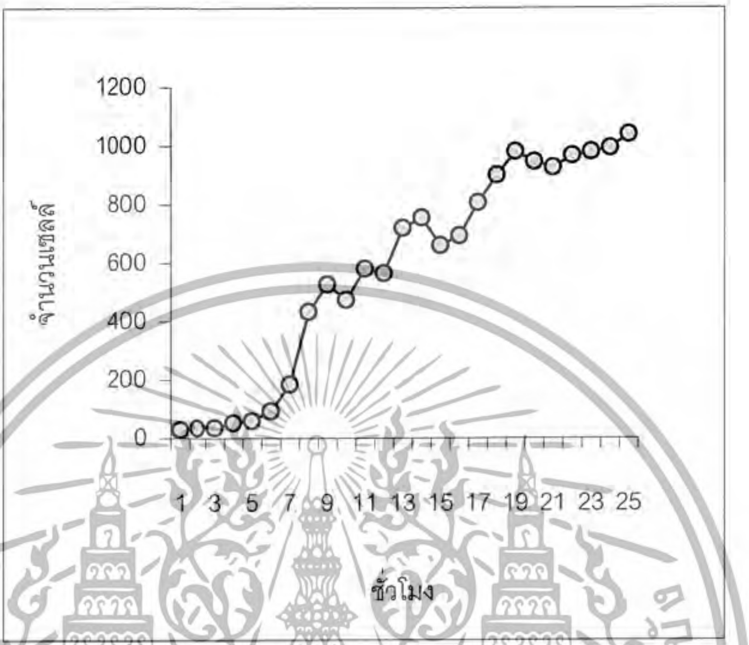
4.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155

4.1.1 โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆเป็นระยะเวลานา 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อจะเจริญเข้าสู่ช่วง max log phase ที่ชั่วโมงที่ 12 และเข้าสู่ช่วง stationary phase ที่ชั่วโมงที่ 14 ดังภาพที่ 11



ภาพที่ 11 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเวลาที่ชั่วโมงต่างๆ ขณะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เพื่อวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 (◆ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น660นาโนเมตร, — คือ เส้นแนวโน้มแบบเอ็กซ์โปเนนเชียล)

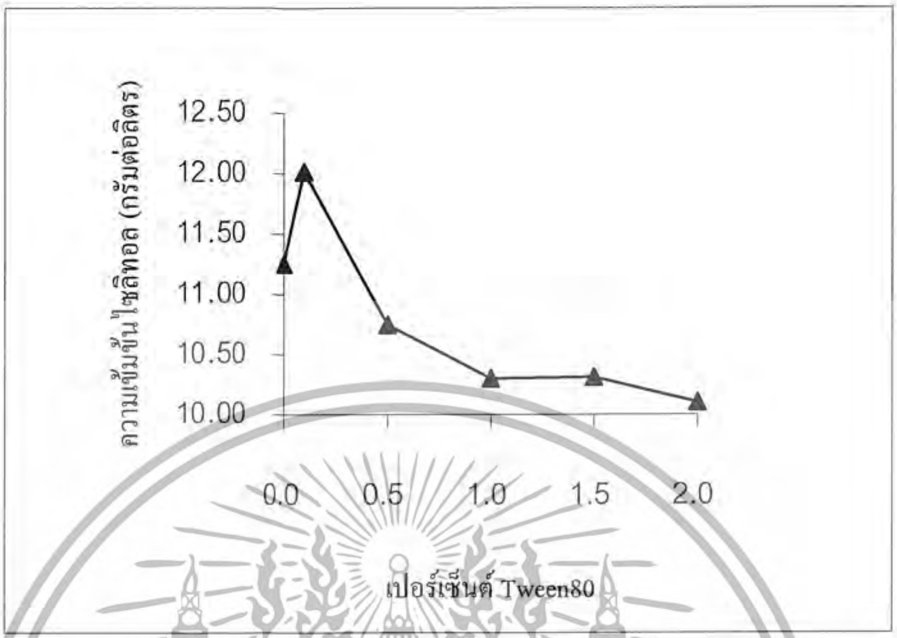
4.1.2 โดยการนับจำนวนเซล โดยใช้ Haemacytometer ที่ระยะเวลาต่างๆเป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมง ซึ่งผลการทดลองที่ได้จะเป็นดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ที่นับได้ และเวลาที่ชั่วโมงต่างๆ ขณะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เพื่อวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155

4.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Tween 80

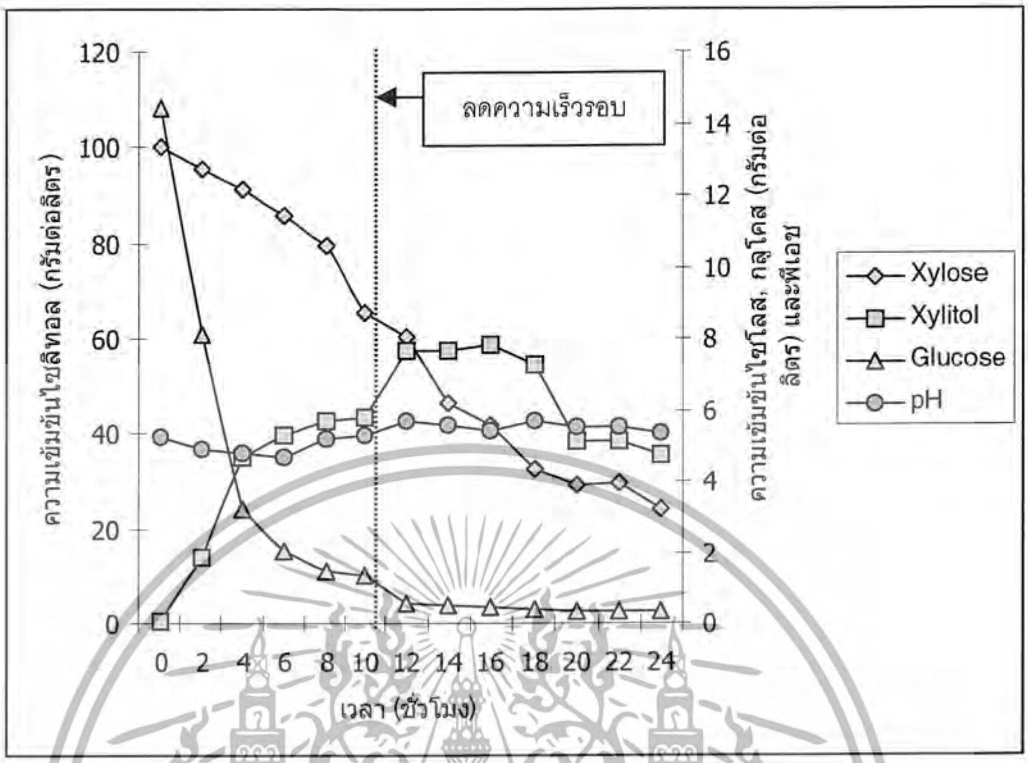
จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 ในอาหารสูตร YM เพื่อการเจริญเติบโต และนำมาผ่านกระบวนการตรึงเซลล์ เพื่อนำมาใช้ในการผลิตไซลิทอล ในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอลทีมีไซโลสเป็นองค์ประกอบ โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของ Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน คือ 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบเริ่มต้น 220 รอบต่อนาที และหลังจากทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 12 ชั่วโมงจึงทำการลดความเร็วรอบลงเหลือ 150 รอบต่อนาที เมื่อทำการเพาะเลี้ยงต่อไปอีก 6 ชั่วโมงจึงทำการวัดปริมาณไซลิทอลที่ผลิตได้ พบว่า ในสภาวะที่มีการเติม Tween 80 ที่ระดับต่างๆกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงเลือกใช้ปริมาณ Tween 80 ที่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากให้ปริมาณไซลิทอลสูงที่สุด คือ 12.02 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลการทดลองจะเป็นดังตารางที่13



ภาพที่ 13 เปรียบเทียบความเข้มข้นของไซลิทอลที่ถูกผลิตโดยเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่มีการแปรผันปริมาณ Tween 80 ที่เปอร์เซ็นต์ต่างๆกัน คือ 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์

4.3 ผลการศึกษาปริมาณไซลิทอลที่เกิดขึ้น ปริมาณไซโลส และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป และพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไป ระหว่างกระบวนการหมักที่ระยะเวลาต่างๆ ในสภาวะที่มีการเติม Tween 80 ที่ 0 เปอร์เซ็นต์

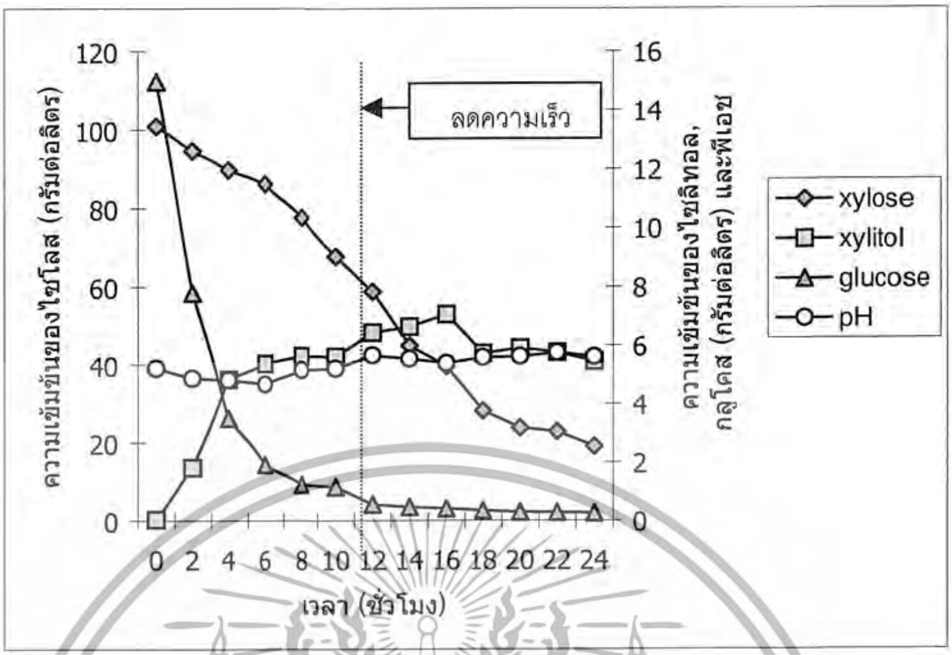
จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 ในอาหารสูตร YM เพื่อการเจริญเติบโต และนำมาผ่านกระบวนการตรึงเซลล์ เพื่อนำมาใช้ในการผลิตไซลิทอล ในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอลที่มีไซโลสเป็นองค์ประกอบ ในสภาวะที่ไม่มีการเติม Tween 80 ผลการทดลองที่ได้เป็นดังภาพที่ 14



ภาพที่ 14 แสดงปริมาณไซโลส ไซลิทอล กลูโคส และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงไปขณะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่ไม่มีการเติม Tween 80 บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็วรอบเริ่มต้น 220 รอบต่อนาที และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 12 ชั่วโมง จะทำการลดความเร็วรอบลงเหลือ 150 รอบต่อนาที เพื่อเป็นการจำกัดปริมาณออกซิเจนดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

4.4 ผลการศึกษาปริมาณไซลิทอลที่เกิดขึ้น ปริมาณไซโลส และปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไปและพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไป ระหว่างกระบวนการหมักที่ระยะเวลาต่างๆ ในสภาวะที่มีการเติม Tween 80 ที่ 0.1 เปอร์เซ็นต์

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 ในอาหารสูตร YM เพื่อการเจริญเติบโต และนำมาผ่านกระบวนการตรึงเซลล์ เพื่อนำมาใช้ในการผลิตไซลิทอล ในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอลทีมีไซโลสเป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีการเติม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 15 แสดงปริมาณไซโลส ไซลิทอล กลูโคส และพีเอช ที่เปลี่ยนแปลงไปขณะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่มีการเติม Tween 80 0.1 เปอร์เซ็นต์บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบเริ่มต้น 220 รอบต่อนาที และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลานาน 12 ชั่วโมง จะทำการลดความเร็วรอบลงเหลือ 150 รอบต่อนาที

จากผลการทดลองในสภาวะที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้ความเข้มข้นของไซโลสเริ่มต้นที่ 100 กรัมต่อลิตร กลูโคสที่ 15 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นที่ 5.5 โดยใช้วิธีการตรึงเซลล์ ที่มีการเติม Tween 80 ที่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบเริ่มต้นเท่ากับ 220 รอบต่อนาที และหลังจากทำการเพาะเลี้ยงนาน 12 ชั่วโมง จึงทำการลดความเร็วรอบลงเหลือ 150 รอบต่อนาที ทั้งนี้เพื่อเป็นการจำกัดปริมาณออกซิเจน เพื่อให้เกิดการสะสมไซลิทอล

หลังจากทำการสิ้นสุดกระบวนการหมักที่เวลา 24 ชั่วโมงพบว่า ความเข้มข้นของไซโลสที่ชั่วโมงที่ 24 มีค่าเท่ากับ 19.01 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของกลูโคสมีค่าเท่ากับ 0.254 กรัมต่อลิตร พีเอชที่ชั่วโมงสุดท้ายนี้จะอยู่ที่ 5.6

ตารางที่ 6 การคำนวณในการผลิตไซลิทอล

เปอร์เซ็นต์ Tween 80	อัตราการใช้ไซโลส (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ความเข้มข้นของไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิตไซลิทอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ผลผลิต (กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส)	อัตราการผลิตไซลิทอลจำเพาะ (กรัมไซลิทอลต่อกรัมเซลล์ต่อลิตรต่อชั่วโมง)
0.0	3.171	4.750	0.196	0.062	0.0025
0.1	3.408	5.442	0.225	0.066	0.0028

เนื่องจากค่าความเข้มข้นของไซลิทอลที่ได้จากการเปรียบเทียบความแตกต่างของ Tween 80 ที่ 0.0 กับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์ จึงได้นำค่าที่มีความเข้มข้นที่มากที่สุด คือ 5.442 กรัมต่อลิตร มาใช้เป็นค่าความเข้มข้นของไซลิทอลที่ได้จากการทดลอง แต่เนื่องจากกระบวนการทดลองในสภาวะเซลล์ตรึงนั้น จำเป็นต้องใช้ระยะเวลาในการหมักเพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์หลายแบทซ์ จึงจะสรุปได้ว่าสภาวะการตรึงเซลล์นั้นมีประสิทธิภาพที่ดีเพียงใด เมื่อนำไปเปรียบเทียบการผลิตโดยใช้เซลล์อิสระ จากการศึกษาเรื่องการผลิตไซลิทอลโดยการใช้เซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงของเชื้อ *Debaryomyces hansenii* (Dominguez, 1998) เมื่อมีการนำเอาเม็ดเจลกลับมาใช้ซ้ำๆกันในหลายๆแบทซ์จะพบว่า ในกรณีของเซลล์อิสระนั้นจะมีอัตราการใช้ไซโลส และอัตราการผลิตไซลิทอลที่รวดเร็วมากในแบทซ์แรกๆ และอัตราดังกล่าวจะค่อยๆช้าลงในแบทซ์ถัดมา ในขณะที่กรณีที่ใช้เซลล์ตรึงจะให้ผลที่ตรงข้ามกัน คือ ในแบทซ์แรกๆจะมีอัตราการใช้ไซโลส และอัตราการผลิตไซลิทอลที่ค่อนข้างช้าในแบทซ์แรกๆ และจะมีอัตราสูงขึ้นในแบทซ์ถัดมา

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของ Tween 80 ที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลในระดับฟลาสก์เขย่า โดยใช้เซลล์ตรึง ของเชื้อยีสต์ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 พบว่าระดับความเข้มข้นของ Tween 80 ที่เหมาะสมซึ่งจะทำให้ไซลิทอลที่เซลล์ผลิตขึ้น ถูกขับออกมาสู่น้ำหมักในปริมาณสูงสุด คือ 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยจะมีอัตราการใช้ไซโลสเท่ากับ 3.408 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และให้ไซลิทอลที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 5.442 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตไซลิทอลเท่ากับ 0.225 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อัตราการผลิตไซลิทอลจำเพาะเท่ากับ 0.0028 กรัมไซลิทอลต่อกรัมเซลต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ของไซลิทอลจากกระบวนการหมักเท่ากับ 0.066 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส หลังจากทำการหมักเป็นระยะเวลานาน 24 ชั่วโมง

เอกสารอ้างอิง

นรินทร์ เรืองพานิช, 2541 ผลของกลูโคสต่อการผลิตไซลิทอลจากไซโลสภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจน เทคนิควิจัย ปัญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต คณะอุตสาหกรรมเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ น.70

บุษบา ยงสมิทธิ์, รายงานการวิจัยเรื่ง การผลิตสีผสมอาหารจากมันสำปะหลัง เพื่ออุตสาหกรรมการหมัก, น.52, 56.

วรสิทธิ์ โทจำปา, 2541การผลิตไซลิทอลโดยการหมุนเวียนเซลล์ด้วย Hollow fiber วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ น.86

ศิริชัย พงษ์วิชัย, 2543 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยคอมพิวเตอร์ พิมพ์ครั้งที่ 10 สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์ น. 196-222.

Cheetham, P. S. J., Blunt,K. W.., and Bucke, C. (1979) Physical studies on cell immobilization using calcium alginate gels. Biotech. Bioeng. 21,2155-2168.

Cruz, Domingez J.M. & Parajo J.C,200. Xylitol production from barley bran hydrolysates by continuous fermentation with *Debaryomyces hansenii.*, Applied and environmental Microbilogy letter 22 : 1895-1898.

Domingez gnez, J.M. 1998. Xylitol production by free and immobilized *Debaryomyces hansenii.* Biotechnol. Lett. 20:53-56

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

Francisco M. Girio, J. Carlos Rosiero, Pascolina Sa-Machado, A. Rita Duarte.Reis and M.T. Ameral-collaco, 1994. Effect of oxygen transfer rate on levels of key enzymes of xylose metabolism in *Debaryomyces hansenii* ., Enzyme Microbial. Technology. 16: 1074-1078.

J.C. Parajo, H. Domingnez, 1997. Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii.* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates, Enzyme and Microbial Tecnology., 21:18-24

Parajo J.C., H. Dominguez, 1997. Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii* Y-7426 fromfrom raw or detoxified wood hydrolysates, Enzyme and Microbial Technology., 21: 18-24.

http://www.esb.ucp.pt/~bungah/immob/entrap.htm

ภาคผนวก ก

ตารางแสดงผลการทดลอง

ตารางที่ 7 แสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ ขณะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เพื่อวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155

ชั่วโมงที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร
0	0.033
1	0.072
2	0.135
3	0.240
4	0.541
5	0.953
6	2.180
7	3.890
8	5.070
9	5.603
10	6.453
11	7.465
12	7.625
13	8.578
14	9.015
15	8.607
16	11.153
17	10.533
18	10.913

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชั่วโมงที่	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร
19	11.287
20	10.700
21	9.967
22	10.613
23	12.273
24	13.853

ตารางที่ 8 จำนวนเซลล์ที่นับได้โดยใช้ Haemacytometer ที่ระยะเวลาต่างๆ ขณะทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเพื่อการเจริญเติบโต บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เพื่อวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155

ชั่วโมงที่	จำนวนเซลล์ที่นับได้ที่ระยะเวลาต่างๆกัน โดยใช้ Haemacytometer (เซลล์/มล.)
0	28
1	34
2	35
3	52
4	58
5	92
6	184
7	433
8	527
9	473
10	580

ชั่วโมงที่	จำนวนเซลล์ที่นับได้ที่ระยะเวลาต่างๆกัน โดยใช้ Haemacytometer
11	565
12	720
13	755
14	660
15	693
16	807
17	900
18	980
19	947
20	927
21	967
22	980
23	993
24	1040

ตารางที่ 9 ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลที่ถูกผลิตโดย เชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่มีการเติม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน คือ 0, 0.1, 0.5, 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์

ความเข้มข้นของ Tween 80 (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณน้ำตาลไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
0	11.25
0.1	12.01
0.5	10.74
1.0	10.29
1.5	10.30

ตารางที่ 10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเข้มข้นของ Tween 80 ที่เหมาะสม

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6.351	4	1.588	4.878	.019
Within Groups	3.255	10	.325		
Total	9.606	14			

Duncan

	N	Subset for alpha = .05	
Tween		B	A
1.0%	3	10.3523	
1.5%	3	10.3650	
0.5%	3	10.8033	
0.0%	3	11.3131	11.3131
0.1%	3		12.0767
Sig.		0.083	0.132

จากตาราง ANOVA และ ตารางวิเคราะห์โดยวิธีของ Duncan พบว่า ปริมาณไซลิทอลที่ได้จากสภาวะที่มีการใช้ Tween 80 ที่ 0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) จะให้ปริมาณไซลิทอลสูงกว่าสภาวะอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ แต่ทั้งสภาวะที่เติม Tween 80 0 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) จะให้ไซลิทอลในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ ซึ่งสภาวะที่เติม Tween 80 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) จะให้ไซลิทอลในปริมาณที่สูงที่สุดคือ 12.01 กรัมต่อลิตร จึงเลือกสภาวะที่มีการเติม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) มาทำการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 11 ปริมาณน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ไป โดยเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่มีการเติม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับฟลาสก์เขย่าที่ระยะเวลาต่างๆกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลไซโลสที่ลดลง (กรัมต่อลิตร)	
	[Tween 80] 0%	[Tween 80] 0.1%
0	100.13	100.81
2	95.56	94.55
4	91.13	89.71
6	85.79	86.12
8	79.36	77.60
10	65.39	67.69
12	60.48	58.69
14	46.31	44.89
16	41.95	39.51
18	32.61	28.14
20	29.29	23.81
22	26.69	22.78
24	24.02	19.01

ตารางที่ 12 ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป โดยเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่มีการเติม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับฟลาสก์เขย่าที่ระยะเวลาต่างๆกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลง (กรัมต่อลิตร)	
	[Tween 80] 0%	[Tween80] 0.1%
0	14.427	14.95
2	8.127	7.780
4	3.214	3.499
6	2.044	1.920
8	1.487	1.227
10	1.339	1.149
12	0.547	0.552
14	0.484	0.466
16	0.423	0.408
18	0.398	0.335
20	0.365	0.284
22	0.331	0.274
24	0.314	0.254

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ 13 ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลที่ถูกผลิตขึ้น และขับออกมาจากเม็ดเจล ลงสู่น้ำหมักโดยเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่มีการเติม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในระดับฟลาสก์เขย่าที่ระยะเวลาต่างๆกัน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลที่เพิ่มขึ้น (กรัมต่อลิตร)	
	[Tween 80] 0%	[Tween 80] 0.1%
0	0.038	0.038
2	1.838	1.815
4	4.654	4.835
6	5.272	5.373
8	5.698	5.634
10	5.793	5.607
12	7.652	6.438
14	7.668	6.635
16	7.812	7.050
18	7.274	5.719
20	5.138	5.895
22	5.122	5.756
24	4.750	5.442

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ตารางที่ 14 พีเอชที่เปลี่ยนแปลงไประหว่างกระบวนการหมัก เพื่อการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 ที่เลี้ยงในอาหารเพื่อการผลิตไซลิทอล ที่มีการเติม Tween 80 ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในระดับฟลาสก์เขย่าที่ระยะเวลาต่างๆกัน

เวลา (ชั่วโมง)	พีเอชที่เปลี่ยนแปลงไป	
	[Tween 80] 0%	[Tween 80] 0.1%
0	5.25	5.21
2	4.91	4.86
4	4.77	4.81
6	4.66	4.67
8	5.19	5.15
10	5.31	5.20
12	5.69	5.65
14	5.58	5.54
16	5.43	5.38
18	5.67	5.58
20	5.51	5.61
22	5.54	5.74
24	5.36	5.60

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเก็บรักษาเชื้อ

อาหารที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อ คือ YM Agar มีสูตรดังนี้

กลูโคส	10	กรัม
เปปโตน (peptone)	5	กรัม
มอลต์สกัด (malt extract)	3	กรัม
ยีสต์สกัด (yeast extract)	3	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เมื่อเตรียมอาหารแล้ว ทำการปรับพีเอชให้เหมาะสม แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

อาหารเพื่อการเจริญเติบโต

ยีสต์สกัด (yeast extract)	4	กรัม
มอลต์สกัด (malt extract)	3	กรัม
เปปโตน (peptone)	4	กรัม
กลูโคส	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

เมื่อเตรียมอาหารแล้ว ทำการปรับพีเอชให้เหมาะสม แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

อาหารเพื่อการผลิตน้ำตาลไซลิทอล

ยีสต์สกัด (yeast extract)	4	กรัม
มอลต์สกัด (malt extract)	3	กรัม
เปปโตน (peptone)	4	กรัม
กลูโคส	15	กรัม
ไซโลส	100	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

พีเอช 5.5

เมื่อเตรียมอาหารแล้ว ทำการปรับพีเอชให้เหมาะสม แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 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 (Phosphate-tartrate solution) เตรียมโดนละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 28 กรัม (หรือโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตทเวลฟ์ไฮเดรต ($Na_2\ HPO_4.12H_2O$) 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 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้อง และเก็บไว้ในขวดสีชา

1.2 วิธีการ

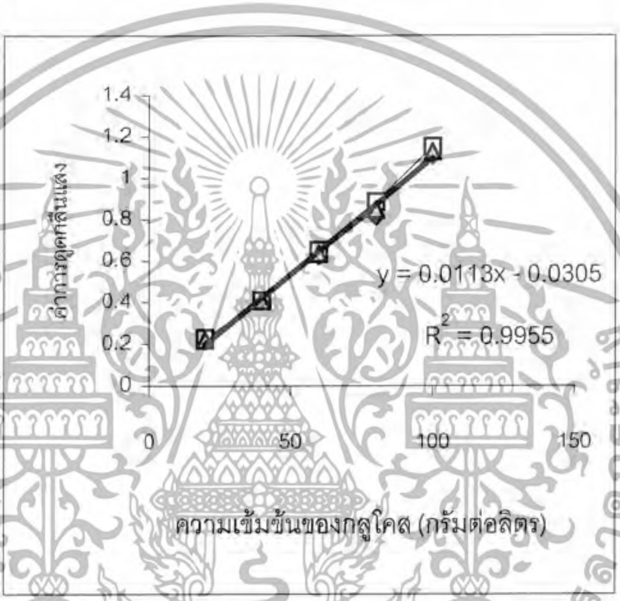
1.2.1 เติมตัวอย่างที่ต้องการหาน้ำตาลรีดิวซ์ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมคอปเปอร์รีเอเจนต์ (Copper reagent) 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ควรใช้ลูกแก้วปิดปากหลอด เพื่อลดการระเหยของน้ำ

1.2.2 ทำให้เย็นโดยแช่ในอ่างน้ำ เติมอาร์เซโนโมลิบเดต รีเอเจนต์ (Arsenomolybdate 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



ภาพที่ 16 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

จากกราฟสามารถหาสมการมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสได้ ดังนี้

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

2. การวิเคราะห์ปริมาณไซลิทอล (Alder และ Gustafson, 1980)

โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของไซลิทอล ไปเป็นฟอร์มัลดีไฮด์ด้วยเปอร์ไอโอเดตในสารละลายกรด เป็นระยะเวลาสั้นๆ แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย บิวเทน-2,3-ไดออล (Butane-2,3-diol) จาก

นั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้น 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 , Acetylacetone) (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

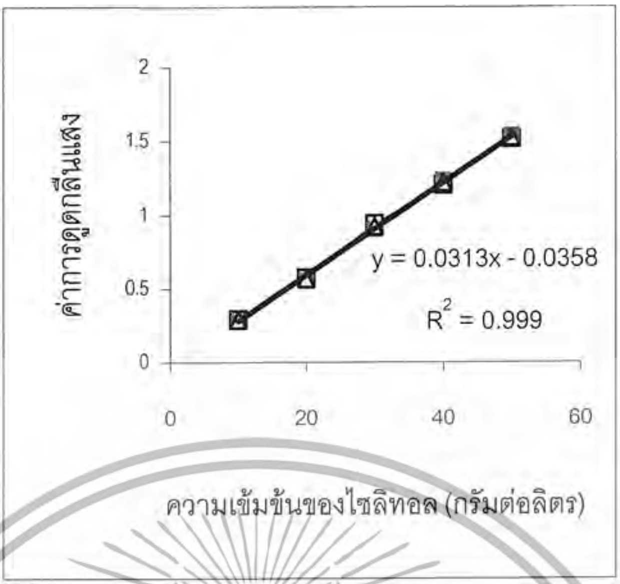
2.2.4 เติมสารละลายเพนเทน-2,4-ไดโอน ลงไป 2.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

2.2.5 นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2.2.6 ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร

2.2.7 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร และความเข้มข้นของไซลิทอลมาตรฐานไปสร้างกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซลิทอล

2.2.8 การหาปริมาณของไซลิทอลในสารละลายตัวอย่าง สามารถคำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซลิทอล



ภาพที่ 17 กราฟมาตรฐานของไซลิทอล

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

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

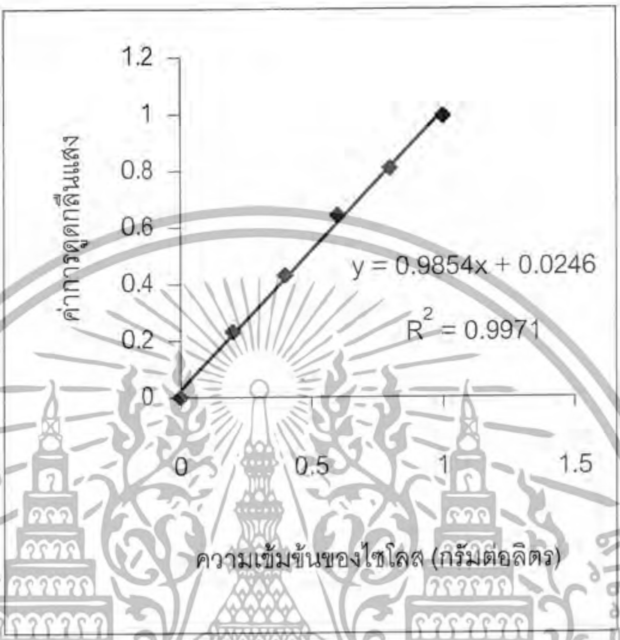
3.2.1 ปิเปตต์สารละลายตัวอย่าง (ความเข้มข้นประมาณ 0.2-1.0 กรัมต่อลิตร) หรือสารละลายไซโลสมาตรฐานปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติม p-Bromoaniline reagent ลงไป 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.2.2 นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.2.3 ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว แล้วบ่มต่อในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 70 นาที

3.2.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

3.2.5 นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของไซโลสในสารละลายตัวอย่าง



ภาพที่ 18 กราฟมาตรฐานของไซโลส

ความเข้มข้นของไซโลส (กรัมต่อลิตร)

$$= \frac{[\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร}) * (\text{อัตราการเจือจาง}) - 0.0246]}{0.9854}$$

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) ซึ่งวิธีนี้จะใช้ในกรณีมีจำนวนสิ่งทดลองไม่เกิน 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