สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในรูปของเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

T061792

นางสาวเบญจมาศ บางขะกุล
นางสาวปริณา คันธินทระ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 61792
วัน,เดือน,ปี 21 ก.ค. 2549

b 11603380
.....

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Comparison of Efficiency in Xylitol Production by *Candida tropicalis* TISTR 5045 between Free and Immobilized Cells from Agricultural Wastes

Miss Benchamas Bangkakul

Miss Pareena Khanthintara

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 2004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในรูปของเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

นักศึกษา นางสาวเบญจมาศ บางขะกุล
นางสาวปริณา คันธินทระ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. สุขใจ ชูจันทร์

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ			ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	รศ.ดร.พรรณี	จิตาภิชีต	
กรรมการ	ผศ. ลินจง	สุขล้ำภู	
กรรมการ	รศ. สุขใจ	ชูจันทร์	

.....

(รองศาสตราจารย์นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในรูปของเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

นักศึกษา นางสาวเบญจมาศ บางขะกุล
นางสาวปริณา คันธินทระ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2547

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. สุขใจ ชูจันทร์

บทคัดย่อ

การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง โดยใช้อาหารไฮโดรไลเสทที่ได้จากฟางข้าว ซึ่งได้จากการนำฟางข้าวมาทำการย่อยสลายโดยใช้กรดซัลฟิวริกเจือจาง ที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ อุณหภูมิ 126 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที แล้วนำมาทำการลดความเป็นพิษด้วยวิธีโอเวอร์ไลมิง และการใช้ผงถ่านกัมมันต์ เมื่อนำไฮโดรไลเสทที่ได้มาทำการเลี้ยงเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ทั้งที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง เพื่อผลิตน้ำตาลไซลิทอล พบว่าเชื้อที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระให้ผลผลิตของน้ำตาลไซลิทอลสูงกว่าเชื้อที่อยู่ในรูปเซลล์ตรึง โดยเชื้อที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระจะให้ผลผลิตน้ำตาลไซลิทอลสูงสุด เท่ากับ 0.5872 กรัมน้ำตาลไซลิทอลต่อกรัมน้ำตาลไซโลส ที่ 90 ชั่วโมง ส่วนเชื้อที่อยู่ในรูปเซลล์ตรึงจะให้ผลผลิตน้ำตาลไซลิทอลสูงสุดเท่ากับ 0.4241 กรัมน้ำตาลไซลิทอลต่อกรัมน้ำตาลไซโลสที่ 90 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Comparison of Efficiency in Xylitol Production by *Candida Tropicalis* TISTR 5045 between Free and Immobilized Cells from Agricultural Wastes
Name	Miss Benchamas Bangkakul
	Miss Pareena Khanthintara
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Acadamic Year	2004
Special Project Advisor	Assoc. Prof. Sukjai Choojan

ABSTRACT

The study comparison of efficiency in xylitol production by *Candida trpicalis* TISTR 5045 between free cell and immobilized cell in hydrolysate of rice straw was performed by using the dilute sulfuric acid solution (0.5 M) with a temperature of 126 degrees Celsius and 90 minutes. The hydrolysate was detoxified by the overliming method and with the use of activated charcoal. Hydrolysate was used for xylitol production by *Candida trpicalis* TISTR 5045 from free cell and immobilized cell . The final result showed that the maximum yield of xylitol produced from free cell was greater than the production from the immobilized cell during a 90 hour period. The maximum yield of xylitol produced from free cell was 0.5872 g/g xylose and the that produced from immobilized cell was 0.4721 g /g xylose during the 90 hours .

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้เสร็จสิ้นลงได้ด้วยความกรุณาตลอดทั้งคำแนะนำดีๆ และความช่วยเหลือจาก รศ. สุขใจ ชูจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ คำแนะนำต่างๆ รวมถึงประสบการณ์ที่ได้รับจากโครงงานพิเศษนี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อข้าพเจ้า ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาที่ได้รับจากท่านอาจารย์เป็นอย่างสูง และขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ.ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต ประธานกรรมการสอบโครงงานพิเศษ ผศ. ลินจง สุขลำภู และ รศ. สุขใจ ชูจันทร์ กรรมการสอบโครงงานพิเศษที่กรุณาสละเวลาอันมีค่าเพื่อเป็นกรรมการในการสอบโครงงานพิเศษ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ รวมทั้งเพื่อนๆ นักศึกษาปริญญาตรี และพี่ๆ นักศึกษาปริญญาโททุกท่านสำหรับความช่วยเหลือในทุกๆ เรื่อง และมิตรภาพที่ดีตลอดมาซึ่งข้าพเจ้าจะเก็บเป็นความทรงจำที่ดี

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่สำหรับคำปรึกษาที่ดีและกำลังใจที่ให้กันตลอดมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากโครงงานพิเศษฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

นางสาวเบญจมาศ บางขะกุล

นางสาวปริณา คันธินทระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ขั้นตอนในการดำเนินงาน	2
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1 องค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส	3
2.2 แกนหลักของไซแลน (The backbone of xylan)	9
2.3 ธรรมชาติของโซ่กิ่งในไซแลน	10
2.4 การย่อยสลายไซแลนในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	10
2.5 น้ำตาลไซลิทอล (Xylitol)	11
2.6 คุณสมบัติของน้ำตาลไซลิทอล	12
2.7 คุณสมบัติอื่นๆ ที่น่าสนใจของน้ำตาลไซลิทอล	13
2.8 การใช้น้ำตาลไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหาร	15
2.9 ตัวอย่างของการใช้น้ำตาลไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหารมีดังนี้	15
2.10ข้อจำกัดในการใช้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลไซลิทอล	18
2.11 การผลิตน้ำตาลไซลิทอล	19
2.12 วิธีต่าง ๆ ที่ใช้ในการผลิตไซลิทอล	20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.13 การผลิตด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ	23
2.14 กระบวนการและเมตาบอลิซึมในการผลิตไซลิทอลโดยจุลินทรีย์	25
2.15 ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณผลผลิตไซลิทอลโดยกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์	29
2.16 วิธีการลดความเป็นพิษที่เกิดจากการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	40
2.17 การลดความเป็นพิษโดยวิธีโอเวอร์ไลมิง	40
2.18 การลดความเป็นพิษโดยใช้ถ่านกัมมันต์	41
2.19 ถ่านกัมมันต์ (Charcoal)	41
2.20 สัณฐานวิทยาของยีสต์	46
2.21 การผลิตไซลิทอลโดยใช้การตรึงเซลล์	47
2.22 การตรึงเซลล์	47
2.23 การเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของการตรึงเซลล์กับวิธีอื่นๆ	48
2.24 การพิจารณาคัดเลือกสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์	49
2.25 คุณสมบัติของเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง	49
2.26 เทคนิคการตรึงเซลล์โดยใช้วิธีการดักจับ	51
2.27 ความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับสารพาหะที่ใช้ในการตรึงเซลล์	53
2.28 การนำเซลล์ตรึงไปประยุกต์ใช้งาน	54
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	57
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	57
3.2 เคมีภัณฑ์สำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	58
3.3 เคมีภัณฑ์สำหรับการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร	58
3.4 เคมีภัณฑ์สำหรับการลดความเป็นพิษของไฮโดรไลเสท	58
3.5 เคมีภัณฑ์สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสตามวิธีของ Somogyi Nelson ' s (1952)	58
3.6 เคมีภัณฑ์สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลไซโลสตามวิธีของ Deschatelets and Yu (1986)	58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.7 เคมีภัณฑ์สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลตามวิธีของAlder and Gustafsson (1980) 58

3.8 วัตถุดิบ 59

3.9 เชื้อจุลินทรีย์ในการวิจัย 59

3.10 การเตรียมอาหารไฮโดรไลเสทจากฟางข้าวเพื่อเลี้ยงและผลิตน้ำตาลไซลิทอลของเชื้อจุลินทรีย์ *Candida tropicalis* TISTR 5045 60

3.11 การศึกษาอัตราการเจริญของ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในอาหารไฮโดรไลเสทจากฟางข้าว 62

3.12 การศึกษาการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในอาหารไฮโดรไลเสทจากฟางข้าวในสภาวะเซลล์อิสระ 62

3.13 การศึกษาการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในอาหารไฮโดรไลเสทจากฟางข้าวในสภาวะเซลล์ตรึงที่ถูกห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนต 62

บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล 63

4.1 การศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในอาหารไฮโดรไลเสทที่ได้จากฟางข้าว 63

4.2 การศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตน้ำตาลไซลิทอลระหว่างเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงในอาหารไฮโดรไลเสทที่ได้จากฟางข้าว 65

บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 70

เอกสารอ้างอิง 71

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์ 76

ภาคผนวก ข. สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์ 77

ภาคผนวก ค. การวิเคราะห์ทางสถิติ 83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	องค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งการเกษตรบางชนิด	8
2.2	แสดงคุณสมบัติต่างๆ ของน้ำตาลไซลิทอล	12
2.3	คุณสมบัติของน้ำตาลไซลิทอลเมื่ออยู่ในรูปอสัณฐาน	13
2.4	คุณสมบัติทางกายภาพระหว่างไซลิทอลและน้ำตาลซูโครส	14
2.5	ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลในผักและผลไม้	21
2.6	องค์ประกอบของสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลเสท	22
2.7	องค์ประกอบของสารละลายน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ได้จากกระบวนการไฮโดรจีเนชัน	22
2.8	ผลของความเข้มข้นน้ำตาลไซโลสที่มีผลต่อการผลิตน้ำตาลไซลิทอล	35
2.9	ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่สามารถผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้	38
2.10	ตัวอย่างเซลล์ตรึงที่ใช้ในอุตสาหกรรม	55
4.1	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส ค่าความเป็นกรดด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง และอัตราการเจริญ จากการศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในอาหารไฮโดรไลเสทที่ได้จากฟางข้าว	64
4.2	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลไซลิทอล ค่าความเป็นกรดด่าง และอัตราการเจริญ จากการศึกษาการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในรูปเซลล์อิสระในอาหารไฮโดรไลเสทที่ได้จากฟางข้าวที่มีปริมาณน้ำตาลไซโลส เริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร	66
4.3	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลไซลิทอล ค่าความเป็นกรดด่าง และอัตราการเจริญ จากการศึกษาการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่อยู่ในรูปเซลล์ตรึงในอาหารไฮโดรไลเสทที่ได้จากฟางข้าวที่มีปริมาณน้ำตาลไซโลสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร	68
ค.1	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการผลิตนน้ำตาลไซลิทอลโดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง	85

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 โครงสร้าง glucoronoxylan	4
2.2 โครงสร้างของ glucomannan	4
2.3 โครงสร้างของ galactoglucomannan	5
2.4 โครงสร้างของ arabinoglucuronoxylan	6
2.5 โครงสร้างของ arabinogalactan	7
2.6 โครงสร้างของ O-acetyl-4-O-metylglucuronoxylan) ในพืชล้มลุกและพืชตระกูลหญ้า	7
2.7 โครงสร้างของไซแลน	9
2.8 วิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตน้ำตาลไซลิทอล	20
2.9 วิถีการเกิดน้ำตาลไซลิทอลจากเมตาบอลิซึมของไซโลส	24
2.10 การสร้างและการใช้โคเอนไซม์ ในยีสต์ที่หมักน้ำตาลไซโลสได้	26
2.11 แสดงโครงสร้างของโซเดียมอัลจิเนต	28
2.12 เมตาบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสในยีสต์	52
4.1 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส ค่าความเป็นกรดด่าง และอัตราการเจริญขณะทำการเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในอาหารไฮโดรไลเสทที่ได้จากฟางข้าว	65
4.2 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลไซลิทอล ค่าความเป็นกรดด่าง และอัตราการเจริญ จากการศึกษาการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในรูปเซลล์อิสระในอาหารไฮโดรไลเสทที่ได้จากฟางข้าวที่มีปริมาณน้ำตาลไซโลสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร	67
4.3 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลไซลิทอล ค่าความเป็นกรดด่าง และอัตราการเจริญ จากการศึกษาการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในรูปเซลล์ตรึงในอาหารไฮโดรไลเสทที่มีปริมาณน้ำตาลไซโลส 10 กรัมต่อลิตร	69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
ข.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส	78
ข.2 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลส	80
ข.3 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซลิทอล	82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

น้ำตาลไซลิทอลเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดเพนทะวาเลนต์แอลกอฮอล์ โดยปกติจะพบน้ำตาลไซลิทอลเป็นสารตัวกลางหรือสารมัธยันต์ (intermediate) ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และสามารถพบได้ตามธรรมชาติในผักและผลไม้หลายชนิด แต่จะพบในปริมาณน้อย ปัจจุบันไซลิทอลได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ มากมาย ได้แก่ ในอุตสาหกรรมอาหาร ทางด้านการแพทย์ และทางด้านเภสัชกรรม ทั้งนี้ก็เนื่องมาจากว่าไซลิทอลมีคุณสมบัติที่สำคัญหลายประการ เช่น เป็นสารให้ความหวานที่มีความหวานใกล้เคียงกับน้ำตาลซูโครส โดยน้ำตาลไซลิทอล 1 กรัม ให้พลังงาน 4.06 กิโลแคลอรี ซึ่งเทียบเท่าได้กับพลังงานที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต จึงสามารถใช้เป็นสารให้ความหวานแก่ผู้ป่วยโรคเบาหวานได้ นอกจากนี้น้ำตาลไซลิทอลยังมีรสชาติดี ให้ความรู้สึกเย็นสดชื่นคล้ายเมนทอล ไม่ทำให้ฟันผุ เนื่องจากจุลินทรีย์ในช่องปากโดยเฉพาะ *Streptococus mutans* ไม่สามารถใช้น้ำตาลไซลิทอลได้ และสามารถยืดอายุของผลิตภัณฑ์อาหารที่มีน้ำตาลไซลิทอลเป็นส่วนประกอบ เนื่องจากมีจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่สามารถใช้น้ำตาลไซลิทอล ได้ด้วยคุณสมบัติต่างๆ เหล่านี้จึงทำให้น้ำตาลไซลิทอลเป็นที่ต้องการในอุตสาหกรรมมากมาย

การผลิตน้ำตาลไซลิทอลเพื่อการค้าในปัจจุบันจะใช้กระบวนการผลิตทางเคมี โดยการใช้กรดหรือด่างเจือจางย่อยวัสดุที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ เพื่อให้ได้น้ำตาลไซโลสซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิต แล้วเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นน้ำตาลไซลิทอลด้วยการเติมไฮโดรเจนภายใต้ความดัน และอุณหภูมิสูง โดยมีนิกเกิลเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งกระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่ต้องใช้ต้นทุนในการผลิตค่อนข้างสูง จึงได้มีการศึกษาและพัฒนากระบวนการทางชีวภาพมาใช้ในการผลิตเพื่อลดต้นทุนในการผลิตให้ต่ำลง โดยภายหลังจากการย่อยวัตถุดิบจนได้น้ำตาลไซโลสด้วยวิธีทางเคมีแล้ว น้ำตาลไซโลสที่ได้ก็จะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลไซลิทอลโดยจุลินทรีย์

เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ซึ่งจะมีการใช้ผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรในอุตสาหกรรมต่างๆ มากมาย ทำให้มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก จึงได้มีการทำการศึกษาการนำเอาวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านี้มาเพิ่มมูลค่า ด้วยเหตุที่วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมีไซแลนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ ดังนั้นจึงได้นำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านี้มา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำตาลไซลิทอล เพื่อลดต้นทุนในการผลิตน้ำตาลไซลิทอลในระดับอุตสาหกรรม และเป็นการเพิ่มมูลค่าวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรให้สูงขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045
2. เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างในด้านความสามารถในการผลิตน้ำตาลไซลิทอลระหว่างเซลล์ยีสต์ที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตน้ำตาลไซลิทอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 โดยเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตน้ำตาลไซลิทอลระหว่างเซลล์ยีสต์ที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง

1.4 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

1. ศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045
2. ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตน้ำตาลไซลิทอลโดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในรูปของเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง
3. ทำการรวบรวมผลและการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองเพื่อคำนวณผลได้ของกระบวนการหมัก อัตราผลผลิตตลอดจนความเข้มข้นของน้ำตาลไซลิทอลที่ได้จากกระบวนการหมักภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตไซลิทอลจากเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 โดยการตรึงเซลล์ว่าสามารถผลิตได้มากน้อยเพียงใดเมื่อเทียบกับเซลล์อิสระ
2. เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตน้ำตาลไซลิทอลจากเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในระดับอุตสาหกรรม
3. เพื่อเป็นแนวทางในการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 องค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส

องค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งที่ได้จากอุตสาหกรรมแปรรูปไม้และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจะประกอบด้วยส่วนประกอบหลัก 3 ส่วนได้แก่เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินในอัตราส่วนเฉลี่ย 4 ต่อ 3 ต่อ 3 (Branus and Branus, 1960) โดยทั้งสามส่วนจะมีปริมาณแตกต่างกันตามแต่ชนิดของเนื้อเยื่อ อายุ สภาวะในการเจริญและสภาพทางสรีระวิทยาของพืช เฮมิเซลลูโลสมีมากเป็นอันดับ 2 มีลักษณะเป็นสายยาว (polymer) ในเมล็ด (Taiz and Honigman, 1976) และเป็นส่วนประกอบของโครงสร้างในผนังเซลล์ของไม้ (Eriksson, 1990) โครงสร้างที่เป็นโพลิเมอร์

2.1.1 เซลลูโลส

เป็นโพลีเมอร์ของโมเลกุลน้ำตาลกลูโคสชนิดเดียว (homopolysaccharide) ประมาณ 3,000-10,000 โมเลกุล ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเบต้า-1,4 (ß-1,4) ทำให้เซลลูโลสมีลักษณะเป็นสายยาว น้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งที่มา (วิเชียร, 2532) เซลลูโลสไม่ละลายในสารละลายด่างและกรดที่อุณหภูมิห้อง (Jackson, 1977 ; Marsden and Gray, 1986) แต่ละลายในสารละลายกรดที่ความเข้มข้นสูง (ร้อยละ 8) และที่อุณหภูมิสูงช่วง 120-130 องศาเซลเซียส (Tsao; et al., 1982)

2.1.2 เฮมิเซลลูโลส

เป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลมากกว่าหนึ่งชนิด (heterppolysaccharide) ที่จับกันด้วยพันธะ ß -1,4 ไกลโคซิดิก โมเลกุลของเฮมิเซลลูโลสสั้นและมีกิ่งก้านสาขามากทำให้มีโครงสร้างจับตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบ องค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสคือ ไซแลน (Kirk, 1983)

Schulze (1981) เป็นผู้ริเริ่มใช้คำว่าเฮมิเซลลูโลสสำหรับส่วนที่แยกหรือสกัดได้จากพืชด้วยด่างเจือจาง โดยที่การจำแนกชนิดของเฮมิเซลลูโลสขึ้นกับชนิดของน้ำตาลส่วนใหญ่ที่ปรากฏ น้ำตาลส่วนใหญ่ที่ได้จากเฮมิเซลลูโลสได้แก่ ดีไซโลส (D-xylose) ดีแมนโนส (D-mannose) ดีกาแลคโตส (D-galactose) และแอลอะราบิโนส (L-arabinose) เนื่องจากเฮมิเซลลูโลสประกอบด้วยไซแลน (xylan) แมนแนน (mannan) กาแลคแตน (galactan) และอะราบิแนน (arabinan) เป็นหลัก ไซแลนประกอบด้วยดีไซโลสเป็นโมโนเมอร์ (monomer) หลักและสายของแอลอะราบิโนส กาแลคแตนประกอบด้วยดีกาแลคโตสและแมนแนนก็ประกอบขึ้นด้วยแมนโนส ในขณะเดียวกันอะราบิแนนก็เกิดขึ้นจากแอลอะราบิโนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.1 เฮมิเซลลูโลสในเนื้อไม้แข็ง

glucuronoxylan หรือ O-acetyl-4-O-methylglucurono-ß-D-xylan ในไม้เนื้อแข็งมีอยู่ประมาณร้อยละ 15-30 ของน้ำหนักแห้งของไม้ glucuronoxylan มีโครงสร้างหลักเป็น ß-D-xylopyranose ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ ß-1,4 ไกลโคซิดิก ไซโลสส่วนใหญ่ประกอบด้วยหมู่ อะซิติล (acetyl group) ที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 2 (C- 2) หรือคาร์บอนตัวที่ 3 (C-3) ของน้ำตาลไซโลส ในสายของไซแลนมีหมู่อะซิติล 7 หน่วย ต่อ 10 หน่วยของน้ำตาลไซโลส และมี 4-O-metylglucuronic acid ที่เชื่อมต่อกับน้ำตาลไซโลสด้วยพันธะ 1,2-ไกลโคซิดิก โดยมีกรดยูโรนิก (uronic acid) 1 หน่วย ต่อ 10 หน่วยของน้ำตาลไซโลส (ภาพที่ 2.1) พันธะที่เชื่อมต่อระหว่างน้ำตาลไซโลสสามารถย่อยสลายได้ด้วยกรด ส่วนพันธะที่เชื่อมระหว่างน้ำตาลไซโลสกับหมู่อะซิติล สามารถย่อยสลายได้ด้วยด่าง

glucomannan ในไม้เนื้อแข็งมีอยู่ประมาณร้อยละ 2-5 ซึ่ง glucoronoxylan มีโครงสร้างเป็น ß-D-xylopyranose และ ß-D-mannopyranose เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ ß-1,4 ไกลโคซิดิก (ภาพที่ 2.2) อัตราส่วนกลูโคสต่อแมนโนสในสายของ glucomannan เท่ากับ 1 ต่อ 2 หรือ 1 ต่อ 1 ขึ้นกับชนิดของไม้ โดย glucomannan ถูกย่อยสลายได้ง่ายด้วยกรด

ภาพที่2.1 โครงสร้างของ glucuronoxylan [น้ำตาล ß-D-xylopyranose (Xylp), 4-O-methyl-α-D-glucopyranosyl uronic acid (4-O-Me-α-D-Glc pA) , Rคือ acetyl group (CH_3CO)]

ที่มา : Sjostrom (1981)

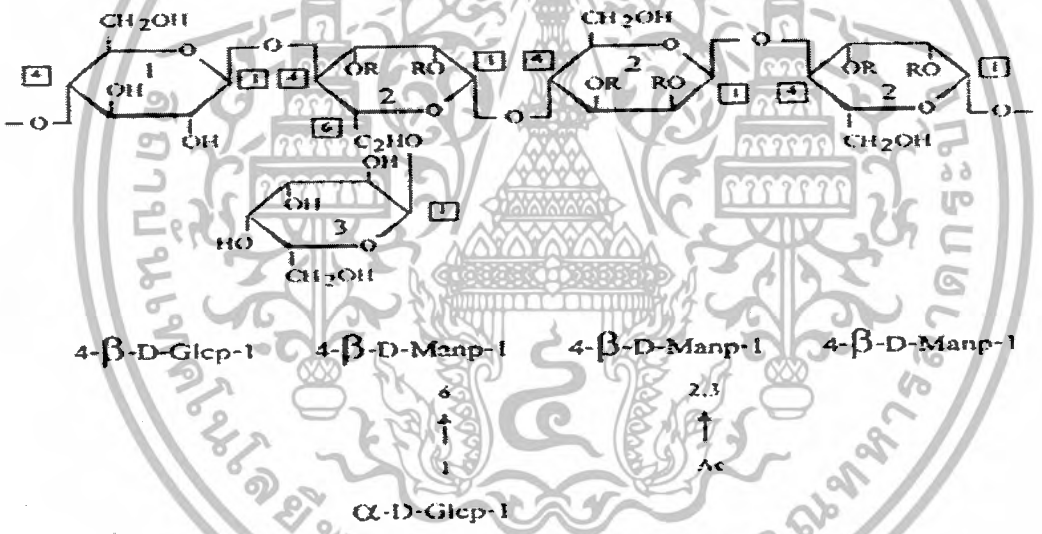
ภาพที่2.2 โครงสร้างของ glucomannan [น้ำตาล ß-D-glucopyranose (Glcp),ß-D-mannopyranose (Manp)]

ที่มา : Sjostrom (1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.2 เฮมิเซลลูโลสในไม้เนื้ออ่อน

ในไม้เนื้ออ่อนจะพบเฮมิเซลลูโลสชนิด galactoglucomannan เป็นจำนวนมาก (ประมาณร้อยละ 20) มีโซ่หลักเป็นพันธะ ß-1,4 ไกลโคซิดิก และมีโซ่กิ่งที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 6 (C-6) ของน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลแมนโนส โดย ß-D-glucopyranose จับกับโครงสร้างหลักด้วยพันธะ1,6-ไกลโคซิดิก (ภาพที่ 2.3) galactoglucomannan สามารถแยกได้เป็น 2 ส่วนขึ้นอยู่กับปริมาณของน้ำตาลกาแลคโตสที่แตกต่างกัน ส่วนที่มีน้ำตาลกาแลคโตสในปริมาณน้อยจะมีอัตราส่วนของน้ำตาลกาแลคโตสต่อน้ำตาลกลูโคสต่อน้ำตาลแมนโนสเท่ากับ 0.1 ต่อ 1 ต่อ 4 และในส่วนที่มีปริมาณน้ำตาลกาแลคโตสสูงจะมีอัตราส่วนเท่ากับ 1 ต่อ 3 ในส่วนคาร์บอนตัวที่ 2 (C-2) หรือคาร์บอนตัวที่ 3 (C-3) ในน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแมนโนสมีหมู่อะซิติลจับอยู่โดยเฉลี่ย 1 หมู่ต่อ 3-4 หน่วยของน้ำตาลเฮกโซสของ galactoglucomannan



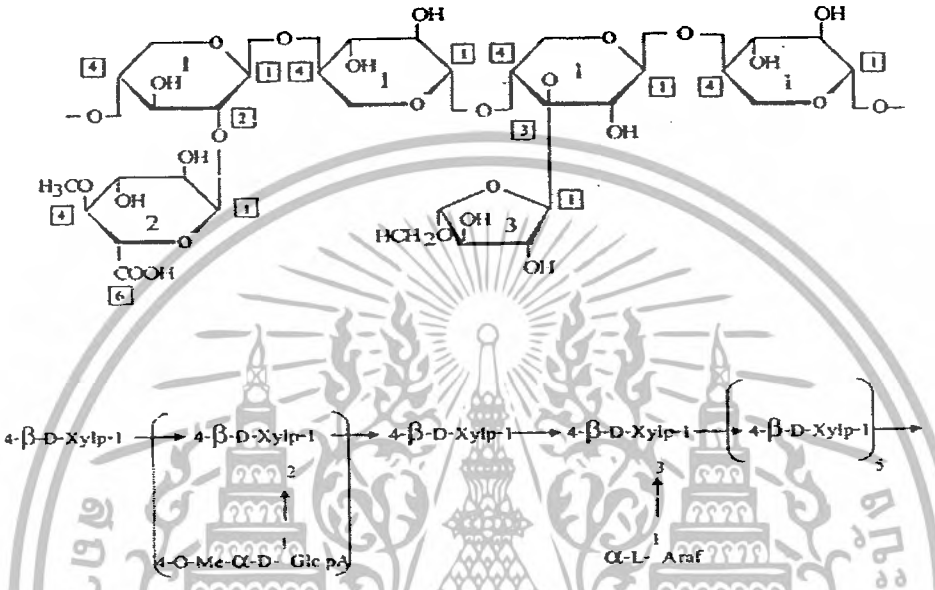
ภาพที่2.3 โครงสร้างของ galactoglucomannan [น้ำตาลตำแหน่งที่ 1, ß-D-glucopyranose(Glcp); ตำแหน่งที่ 2, ß-D-mannopyranose (Manp) ; ตำแหน่งที่ 3, α-D-galactopyranose(Galp) R คือ acetyl group (CH_3CO)หรือ H]

ที่มา : Sjostrom (1981)

arabinoglucuronoxylan เป็นเฮมิเซลลูโลสที่พบในไม้เนื้ออ่อนประมาณร้อยละ 5 ถึง 10 มีโครงสร้างหลักเป็น ß-D-xylopyranose ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ ß-1,4-ไกลโคซิดิก มีสายโซ่เป็น 4-O-methyl-α-D-glucuronic acid เชื่อมที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 2 (C-2) ของน้ำตาลไซโลสและมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

L-arabinofuranose เชื่อมที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 3 (C-3) ของน้ำตาลไซโลสในสายไซแลนโดยเฉลี่ยมี 4-O-methyl-α-D-glucuronic acid ประมาณ 2 หน่วยต่อ 10 หน่วยของน้ำตาลและมี L-arabinofuranose เฉลี่ย 1.3 หน่วยต่อ 10 หน่วยของน้ำตาลไซโลส ดังภาพที่ 2.4



ภาพที่2.4 โครงสร้างของ arabinoglucuronoxylan [น้ำตาลตำแหน่งที่1,ß-D-xylopranose(Xylp); ตำแหน่งที่ 2,4-O-methyl-α-D-glucuronic acid (Glc pA); ตำแหน่งที่ 3,α-L-arabinofuranose(Araf)

ที่มา : Sjostrom (1981)

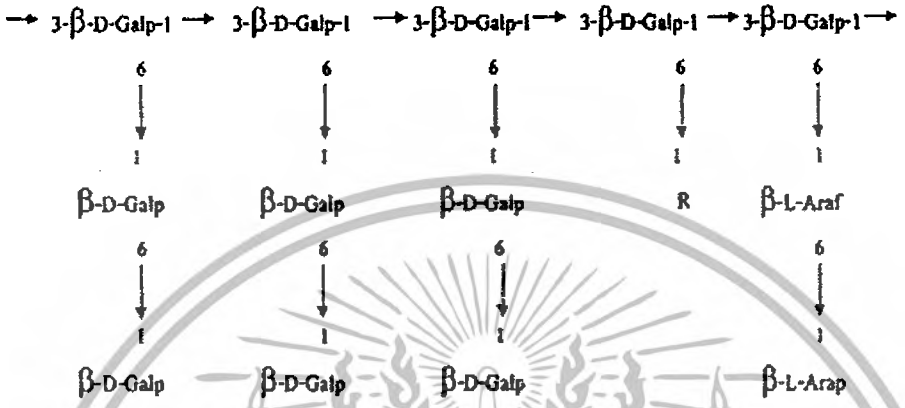
arabinogalactan เป็นเฮมิเซลลูโลสที่สามารถละลายน้ำได้ มีโครงสร้างหลักเป็น D-galactopyranose ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ ß-1,3-ไกลโคซิดิก และมีสายโซ่เป็น L-arabinose เชื่อมต่อกับสายของ D-galactopyranose ด้วยพันธะ ß-1,3-ไกลโคซิดิก ที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 6 (C-6) ดังภาพที่ 2.5

2.1.2.3เฮมิเซลลูโลสในพืชล้มลุกและพืชตระกูลหญ้า

O-acetyl-arabino-4-O-methylglucuronoxylan เป็นโพลิเมอร์ที่พบเป็นส่วนใหญ่ในเฮมิเซลลูโลสของพืชล้มลุกและของพืชตระกูลหญ้า ความแตกต่างระหว่าง O-acetyl-arabino-4-O-methylglucuronoxylan กับ O-acetyl-4-O-methylglucurono-ß-D-xylan ในไม้เนื้อแข็งคือ ในพืชตระกูลหญ้ามีพันธะ1,2-ไกลโคซิดิกที่เชื่อม 4-O-methyl-α-D-glucuronic acid น้อยกว่าในไม้เนื้อแข็ง แต่จะมีปริมาณของ L-arabinofuranosyl side chain ที่เชื่อมบริเวณคาร์บอนตัวที่ 2 (C-2) หรือ

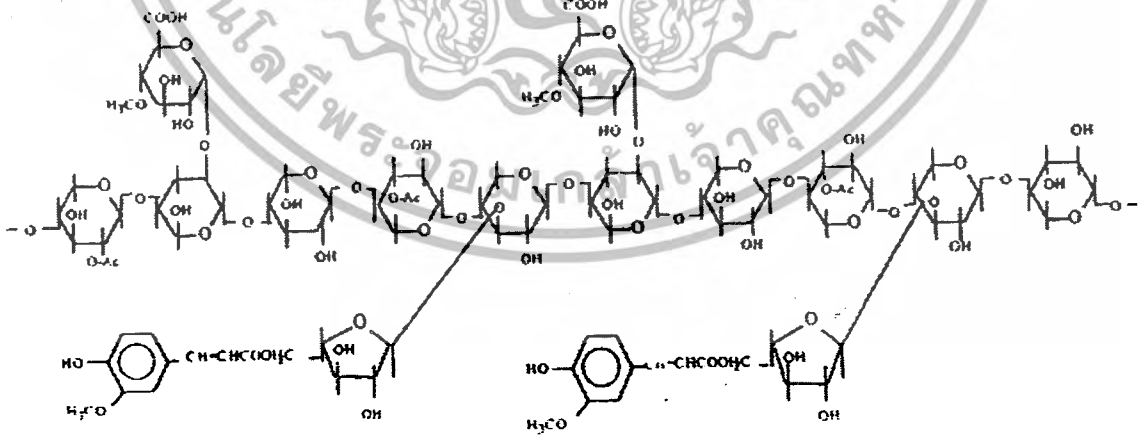
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอนตัวที่ 3 (C-3) หรือทั้งสองตำแหน่งมากกว่าในไม้เนื้อแข็ง และมีหมู่อะซิติลเชื่อมที่ตำแหน่งคาร์บอนตัวที่ 2 (C-2) หรือคาร์บอนตัวที่ 3 (C-3) ในน้ำตาลไซโลสของโครงสร้างหลัก ดังภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของ arabinogalactan [น้ำตาล ß-D-galactopyranose (Galp);ß-L-arabinopyranose(Arap); α-L-arabinofuranose(Araf)และ Rคือß-D-galactopyranose หรือ α-L-arabinofuranose หรือ ß-D-glucopyranosyl uronic acid]

ที่มา : Sjostrom (1981)



ภาพที่ 2.6 โครงสร้างของ O-acetyl-4-O-methylglucu ronoxylan ในพืชล้มลุกและพืชตระกูลหญ้า

ที่มา: Coughlan and Hazlewood (1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 ลิกนิน

เป็นโพลิเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้นได้จากหน่วยฟีนิลโพรพานอล (phenylpropanoid) ซึ่งได้แก่ p-coumaryl alcohol conifetyl alcohol และ sinapyl alcohol (Sjostrom, 1981) หน่วยย่อยเหล่านี้จะจับตัวกันเป็นโครงสร้าง 3 มิติ โดยสร้างพันธะอีเธอร์จับกันเป็นโมเลกุลใหญ่ทำให้โมเลกุลของลิกนินมี ความแข็งแรงทนทานต่อการย่อยสลาย (Evans, 1987) โดยทั่วไปจะพบลิกนินในชั้น ลาเมลลาส่วนกลาง (middle lamella) (Norkrans, 1967; Cowling and Krik, 1976) จึงทำให้เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสถูกห่อหุ้มเอาไว้เป็นเหตุให้การย่อยสลายสารประกอบคาร์โบไฮเดรตเป็นไปได้ช้าและปริมาณต่ำ

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งการเกษตรบางชนิด

ชนิดของวัสดุเหลือทิ้ง	องค์ประกอบ (ร้อยละน้ำหนักแห้ง)		
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน
ฟางข้าวสาลี	50	30	15
ฟางข้าว	35	25	17
ฟางข้างฟ่าง	31	30	11
ฟางข้าวบาร์เล่ย์	44	27	7
ฟางข้าวโอ๊ต	49	25	14-22
ซังข้าวโพด	45	35	15
ตอข้าวโพด	35	25	35
กาบข้าวโพด	32	28	13
รำข้าวสาลี	36	28	20
รำข้าว	34	24	28
ชานอ้อย	33	22	14
ใบอ้อย	36	26	10
เปลือกหุ้มเมล็ดฝ้าย	59	15	13
ต้นสน	41	10	27
แกลบ	36	15	19
ขี้เลื่อย	55	14	21

ที่มา : Barber and Benedito de barder (1974) ; Jackson (1977); Bisaria (1991); Gupta and Madamwar (1997); Kuhad (1999)

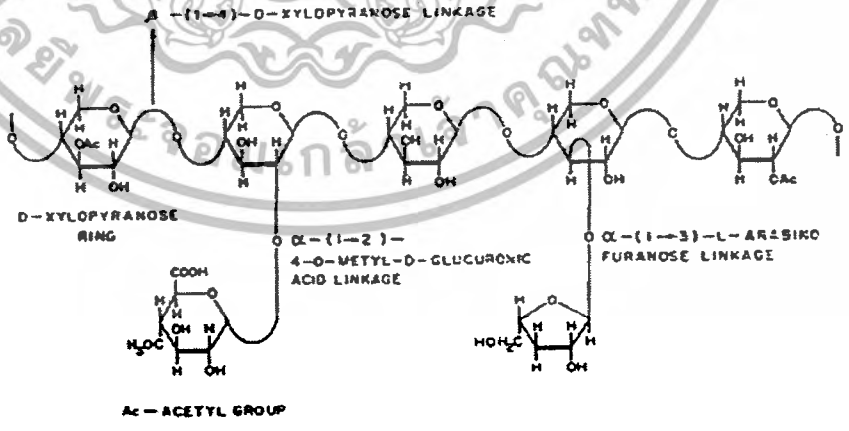
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิกนินละลายได้ดีในสารละลายด่างที่ร้อนที่มีความเข้มข้นสูง (ร้อยละ 5) ที่อุณหภูมิสูง 120-130 องศาเซลเซียส (Avgerinos and Wang, 1983) และสารละลายบางชนิดเช่น เบนซิล-เอธานอล (benzeneethanol) เอธิลลีน ไกลคอล (ethylene glycol) สามารถสกัดลิกนินได้ (Fiechter, 1986) ซึ่งองค์ประกอบของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรบางชนิดแสดงในตารางที่ 2.1

สายโฮโมโพลิเมอร์ (homopolymer) ของไซแลนจะประกอบด้วยหน่วยของไซโลสเพียงอย่างเดียว (พบได้ยาก) โดยปกติไซแลนจะประกอบด้วยน้ำตาลที่แตกต่างกัน 2-4 ชนิด เมื่อเปรียบเทียบเฮมิเซลลูโลสแล้วจะมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า (ประมาณ 20,000 ดาลตัน) Aspinall (1959) รายงานว่าไซแลนมีส่วนของดีไซโลส 85-93% มีแอลอะราบิโนสอยู่จำนวนน้อยและส่วนที่เหลือเป็นสายของกรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) ในต้นหญ้าเอสพาโต (Esparto, ต้นหญ้าที่ใช้สำหรับทำกระดาษ โดยเฉพาะพวก *Stipa tenacissima*) ไซแลนจะต่อกันเป็นสาย D-xylopyranose ด้วยพันธะ ß-1,4 โดยไซแลนจากพืชและต้นหญ้าชนิดต่างๆ จะมีโครงสร้างหลักต่อกันด้วยพันธะ ß -1,4 แต่จะแตกต่างกันในส่วนของโซ่กิ่ง (side chain) ที่จะเป็นกรดดีกลูโคโรนิก แอลอะราบิโนส และ4-O-methylester ของดีกลูคูโรนิก

2.2 แกนหลักของไซแลน (The backbone of xylan)

สายหลักของไซแลนประกอบด้วย ß-xylopyranose เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ ß -1,4 (ภาพที่ 2.7) โดยจะเกิดพันธะ ß -1,4 ระหว่างไซโลส 2 ตัวต่อกันในไซแลนซึ่งรายงานโดย Whistler (1950); Aspanill (1959); Chanda et al. (1950) และได้มีการพิสูจน์ว่ามีพันธะ ß-1,4 ไกลโคซิดิก โดย Jayme and Satree (1942); Whistler (1950)



ภาพที่ 2.7 โครงสร้างของไซแลน

ที่มา : Beily (1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ธรรมชาติของโซ่กิ่งในไซแลน

ไซแลนของไม้เนื้ออ่อนจะมีโซ่กิ่งที่เป็นกรดมากกว่าไซแลนของไม้เนื้อแข็ง โดยปกติจะปรากฏว่ามีหมู่อะซิติล 1 หมู่ ที่ไซโลสหน่วยที่ 2 ในไซแลนของเนื้อไม้เนื้อแข็ง แต่ปฏิกิริยาอะซิติลเลชัน (acetylation) ส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นที่ตำแหน่งออกซิเจนตัวที่ 3 (O-3) แทนที่จะเป็นออกซิเจนตัวที่ 2 (O-2) (Beily, 1985) หมู่อะซิติลของไซแลนในหญ้าจะถูกดึงออกในสภาวะที่เป็นด่าง (Wilkie, 1979) ในกรณีไซแลนของไม้เนื้ออ่อนจะมีกรดอยู่ 1 หนึ่งหน่วยต่อดีไซโลส 9-12 หน่วย ในขณะที่ไซแลนของไม้เนื้อแข็งจะมีดีไซโลส 5-6 หน่วย Dutton and Smith (1956) แสดงให้เห็นถึงส่วนสำคัญของไซแลนในไม้เนื้ออ่อนซึ่งจะประกอบด้วยพันธะ ß-1,4 ซึ่งเป็นพันธะที่เชื่อม ß-D-xylopyranose 13 พันธะ พันธะ α-1,2 ซึ่งเป็นพันธะที่เชื่อม 4-O-methyl-α-D-glucuronic acid 3 พันธะ และพันธะ α-1,3 ซึ่งเป็นพันธะที่เชื่อม α-arabinofuranose 1 พันธะ O'Dwyer (1939) พบว่ามี methyl hexouronic acid อยู่ 1 หน่วยต่อดีไซโลส 11 หน่วยในสายของไซแลน Roudier (1958) สามารถแยกกรดยูโรนิกได้จากไซแลนของต้นสน Maritime ซึ่งพบว่าประกอบด้วยหน่วยของ 2-O-(α-D-glucopyranosyluronic acid)-D-xylose และได้รายงานว่าร้อยละ 95 ของโซ่กิ่งประกอบด้วย4-O-methyl-α-D-glucuronic acid ส่วน Goldschmid and Perlin (1963) พบว่ามีแอลอะราบิโนสหนึ่งหน่วยต่อดีไซโลส 7-11 หน่วย ในขณะที่ Aspinall and McKay (1959); Adams (1965) แสดงให้เห็นว่าไซแลนของไม้เนื้ออ่อนมีแอลอะราบิโนสในโซ่กิ่งหนึ่งหน่วยต่อดีไซโลส 20-40 หน่วย

2.4 การย่อยสลายไซแลนในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

ไซแลนมีคุณสมบัติละลายได้ดีในสารละลายด่างโดยเฉพาะระดับความเข้มข้นสูง (ร้อยละ 4.9-9.8) และอุณหภูมิสูง (70-100 องศาเซลเซียส) (Tsao; et al., 1982) จากคุณสมบัตินี้จึงนิยมสกัดไซแลนจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกรรมด้วยสารละลายด่างที่ร้อน ไซแลนที่ละลายอยู่ในสารละลายด่างสามารถแยกออกได้ โดยทำสารละลายให้เป็นกลางหรือการตกตะกอนด้วยเอธานอล นอกจากนั้นไซแลนยังสามารถละลายได้ในสารละลายกรด

Tsao et al. (1982) กล่าวว่าการย่อยสลายไซแลนมีสองวิธีคือทางเคมีและทางเอนไซม์ ให้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นน้ำตาลไซโลส การย่อยด้วยวิธีทางเคมีสามารถใช้ได้ทั้งกรดและด่างความเข้มข้นระหว่างร้อยละ 4.0-10.0 ที่อุณหภูมิสูงทำให้สูญเสียพลังงานมาก เนื่องจากการทำปฏิกิริยาที่รุนแรงให้เกิดการย่อยสลายทุกองค์ประกอบอย่างไม่จำเพาะ น้ำตาลที่ได้จะถูกทำปฏิกิริยาต่อไปให้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการเช่นเฟอฟูรอล (furfural) อีกทั้งถังปฏิกรณ์ที่ใช้ต้องเป็นถังที่ทนต่อการผุกร่อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การย่อยสลายไซแลนด้วยวิธีทางเอนไซม์เป็นที่นิยมเพราะมีข้อดีกว่าวิธีทางเคมีคือให้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์ปฏิกิริยาการย่อยสลายไม่รุนแรงผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงไม่ทำปฏิกิริยาต่อไป

วิเชียร (2532) ได้ทำการศึกษาปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยฟางข้าวที่ผ่านการแยกลิกนินด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เพื่อผลิตน้ำตาลกลูโคสและไซโลส โดยใช้เอนไซม์ที่ผลิตจาก *Aspergillus fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-1F และเอนไซม์ไซลาเนส (xylanase) จาก *Humicola lanuginose* พบว่าส่วนผสมในปฏิกิริยา 10 มิลลิลิตรของฟางข้าวที่ผ่านการแยกลิกนินด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาณ 0.5 กรัม เอนไซม์จาก *A. fumigatus* Fresenius รหัส 4-45-1F ที่ประกอบด้วยเอนไซม์ เอฟเปส (Fpase) คาร์บอซีเมธิลเซลลูเลส (carboxymetylcellulase) เบต้าไซโลซิเดส (ß-xylosidase) 9.0 19.6 10.8 200 และ 1.5 หน่วย ตามลำดับ และไซลาเนส (xylanase) จาก *H. lanuginose* ปริมาณ 200 หน่วย สามารถย่อยสลายฟางข้าวให้น้ำตาลกลูโคสและไซโลส 180 และ 96.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากบ่มปฏิกิริยาเป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0

วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกรรมประเภทลิกโนเซลลูโลส เมื่อได้รับการแยกและย่อยสลายจนได้เป็นน้ำตาลกลูโคสและไซโลสสามารถนำไปเป็นวัตถุดิบเพื่อการผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยผ่านกระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพเช่นเดียวกับน้ำตาลกลูโคสดังตัวอย่างเช่น นำไปผลิตเอธานอล น้ำตาลไซลิทอล (Barbosa; et al., 1988) กรดอะซิติก 2,3-บิวเทนไดออลอะซิโตน ไอโซโพรพานอลและบิวทานอล

2.5 น้ำตาลไซลิทอล (xylitol)

น้ำตาลไซลิทอลเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ (sugar alcohol) ชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นอนุพันธุ์ของน้ำตาลไซโลส (xylose) โดยปกติแล้วน้ำตาลไซลิทอลเป็นสารมัธยันต์ (intermedite) หรือสารตัวกลางในกระบวนการเมตาบอลิซึมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Hollmann and Touster, 1957) และสามารถพบได้ตามธรรมชาติในผักและผลไม้หลายชนิด (Washuttl; et al., 1973) ส่วนการผลิตน้ำตาลไซลิทอลเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมนั้นสามารถผลิตได้จากน้ำตาลไซโลสโดยกระบวนการไฮโดรจีเนชัน (hydrogenation) หรือการผลิตด้วยกระบวนการหมักจากวัสดุที่มีไซโลสเป็นองค์ประกอบโดยเชื้อจุลินทรีย์ (สาโรจน์, 2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 คุณสมบัติของน้ำตาลไซลิทอล

คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพที่สำคัญของน้ำตาลไซลิทอลรวมถึงคุณสมบัติที่สำคัญทางอาหารแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงคุณสมบัติต่างๆ ของน้ำตาลไซลิทอล

คุณสมบัติ	รายละเอียด
สูตรโมเลกุล	$C_5H_{12}O_5$
น้ำหนักโมเลกุล	152.1
ลักษณะ	ผงผลึกคริสตัล
สี	ขาว
รสชาติ	หวาน
กลิ่น	ไม่มีกลิ่น
ความหวานสัมพัทธ์	มีความหวานโดยประมาณเท่ากับน้ำตาลซูโครส แต่หวานมากกว่าน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลซอร์บิทอล และน้ำตาลแมนนิทอล แต่มีความหวานน้อยกว่าน้ำตาลฟรุกโตส
จุดหลอมเหลว	93.4-94.7 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	216 องศาเซลเซียส
การละลายน้ำ	62.4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
การละลายในเอธานอล	102 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
การละลายในเมทานอล	6.0กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
การดูดความชื้น	ดูดความชื้นได้มากกว่าน้ำตาลซูโครส แต่น้อยกว่า ซอร์บิทอล
สารปนเปื้อน	น้ำตาลแมนนิทอล น้ำตาลซอร์บิทอล น้ำตาลกาแลคติทอลและน้ำตาลอะราบิทอล

ที่มา : สาโรจน์ (2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 คุณสมบัติอื่นๆ ที่น่าสนใจของน้ำตาลไซลิทอล

1. น้ำตาลไซลิทอลสามารถละลายน้ำได้ง่ายและมีความคงตัวสูงแม้จะถูกความร้อนหรือเก็บไว้นานๆก็จะไม่เกิดปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสีน้ำตาล (maillard browning) และการเกิดคาราเมล (caramailization) เหมือนน้ำตาลฟรุกโตสหรือเด็กส์โทรสเมื่อให้ความร้อนสูงกว่า 150 องศาเซลเซียส เนื่องจากน้ำตาลไซลิทอลไม่มีหมู่อัลโดสหรือคีโตส

2. น้ำตาลไซลิทอลให้รสหวานและเย็นสดชื่น (cooling effect) คล้ายเมนทอล เนื่องจากการละลายของน้ำตาลไซลิทอลต้องการความร้อน (endothermic dissolution) เพราะน้ำตาลไซลิทอลมีค่าความร้อนจำเพาะของการละลายเป็นลบ (negative heat of solution) เท่ากับ -34.8 แคลลอรีต่อกรัม ดังตารางที่ 2.3 โดยคุณสมบัติจะเกิดขึ้นเมื่อน้ำตาลไซลิทอลอยู่ในรูปผลึกเท่านั้น แต่เมื่อน้ำตาลไซลิทอลอยู่ในรูปของสารละลายหรืออยู่ในรูปอสัณฐาน (amorphous) จะไม่มีคุณสมบัติข้อนี้

ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติของน้ำตาลไซลิทอลเมื่ออยู่ในรูปอสัณฐาน

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

ที่มา : Arron (1993)

3. น้ำตาลไซลิทอลมีความหวานเช่นเดียวกับน้ำตาลทั่วไป แต่มีความหวานมากกว่าน้ำตาลแมนนิทอลและน้ำตาลซอร์บิทอล 2.5 และ 2.0 เท่าตามลำดับ ความหวานของน้ำตาลไซลิทอลเมื่อเทียบกับน้ำตาลซูโครสจะมีค่าตั้งแต่ 0.85-1.25 เท่า ขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ความเข้มข้นและอุณหภูมิ เป็นต้น ตัวอย่างเช่น ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 สารละลายน้ำตาลไซลิทอลจะมีความหวานเท่ากับสารละลายน้ำตาลซูโครส เมื่อความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 10 สารละลายน้ำตาลไซลิทอลจะหวานมากกว่า แต่ถ้าความเข้มข้นน้อยกว่าร้อยละ 10 สารละลายน้ำตาลซูโครสจะหวานมากกว่า หรือที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 ความหวานของสารละลายน้ำตาลไซลิทอลเทียบกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายน้ำตาลซูโครสจะลดลงจาก 103 เป็น 78 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 5 องศาเซลเซียส เป็น 50 องศาเซลเซียส เป็นต้น

4. น้ำตาลไซลิทอลให้พลังงานต่ำกว่าแต่คงรสชาติเดิมเมื่อผสมกับสารให้ความหวานชนิดอื่น ความหวานและรสชาติจะคงเดิมในขณะที่ลดแคลอรีลงร้อยละ 50- 70 ซึ่งสามารถใช้ในเครื่องดื่มได้หลายชนิดเหมาะกับผู้บริโภคที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก (dietary purpose) โดยมีการเปรียบเทียบคุณสมบัติทางกายภาพต่างๆ ระหว่างน้ำตาลไซลิทอลและน้ำตาลซูโครสแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 คุณสมบัติทางกายภาพระหว่างไซลิทอลและน้ำตาลซูโครส

คุณสมบัติ	น้ำตาลไซลิทอล	น้ำตาลซูโครส
จุดหลอมเหลว (องศาเซลเซียส)	93.5-94.5	179-186
จุดเดือด (องศาเซลเซียส/760 มิลลิเมตรปรอท)	216	สลายตัว
ความหนาแน่น(15 องศาเซลเซียส)	1.5	1.59
พลังงาน (แคลอรีต่อกรัม)	4.06	4.06
การหมักด้วยจุลินทรีย์	ไม่ได้	ได้
การเกิดคาราเมล	ไม่เกิด	เกิด
การดูดความชื้น (ร้อยละ)		
ความชื้นร้อยละ 60	0.05	0.02
ความชื้นร้อยละ 92	90	4
ความหนืด (cP)(20 องศาเซลเซียส)		
ความเข้มข้นร้อยละ 10	1.23	1.31
ความเข้มข้นร้อยละ 60	20.63	58.50

ที่มา : สาโรจน์ (2537)

5. น้ำตาลไซลิทอลไม่ทำให้ฟันผุเนื่องจากจุลินทรีย์ในช่องปากโดยเฉพาะ *Streptococcus mutans* ไม่สามารถใช้น้ำตาลไซลิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ทำให้ค่าความเป็นกรดด่างบนเคลือบฟันไม่ต่ำกว่า 5.7 จึงไม่ทำให้เกิดฟันผุ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. น้ำตาลไซลิทอลสามารถใช้ในผู้ป่วยเบาหวานได้เนื่องจากการเผาผลาญน้ำตาลไซลิทอลไม่ขึ้นกับอินซูลิน ดังนั้นจึงไม่ทำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) และน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia)

7. น้ำตาลไซลิทอลสามารถยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์ต่างๆได้ เนื่องจากมีจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่สามารถใช้น้ำตาลไซลิทอลได้ ผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำตาลไซลิทอลเป็นองค์ประกอบจึงเกิดการหมักโดยจุลินทรีย์ได้ยาก ทำให้มีอายุการเก็บที่นานขึ้น (long shelf-life)

2.8 การใช้น้ำตาลไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหาร

มีแนวโน้มการใช้น้ำตาลไซลิทอลในอุตสาหกรรมอาหารอย่างกว้างขวางในผลิตภัณฑ์อาหารพวกขนมอบ แยม มาร์มาเลดและผลิตภัณฑ์ขนมหวาน เป็นต้น เนื่องจากน้ำตาลไซลิทอลมีคุณสมบัติที่สามารถใช้แทนน้ำตาลธรรมชาติได้ และยังมีข้อดีในแง่ที่ไม่ทำให้เกิดฟันผุ แต่การใช้น้ำตาลไซลิทอลยังมีข้อจำกัดอยู่บ้างโดยเฉพาะในเครื่องดื่มประเภทน้ำอัดลม ผู้บริโภคมีโอกาสจะได้รับน้ำตาลไซลิทอลปริมาณสูงเกินไปทำให้ท้องเสียได้ หรือลักษณะรูปร่างอันหลากหลายของผลึกน้ำตาลไซลิทอล น้ำตาลซูโครสมีผลึกแบบมอนอคลีนิค (monoclinic) แต่น้ำตาลไซลิทอลมีผลึกแบบรอมบิค (rhombic) อาจทำให้เนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์มีลักษณะแข็งกระด้าง อย่างไรก็ตามข้อจำกัดเหล่านี้กล่าวได้ว่าเป็นปัญหารองเมื่อเทียบกับประโยชน์ที่ได้ โดยปกติมักจะให้คุณภาพที่ทัดเทียมกันหรือดีกว่าเช่น รสหวานเย็นสดชื่น ซึ่งช่วยเพิ่มรสชาติของเปปเปอร์มิ้นท์ (peppermint) รสมะนาวและรสต่างๆได้

2.9 ตัวอย่างของการใช้น้ำตาลไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหารมีดังนี้

1. หมากฝรั่ง (chewing gum)

โดยปกติแล้วหมากฝรั่งประกอบด้วยน้ำตาลร้อยละ 50-75 และน้ำร้อยละ 3-5 และมีส่วนผสมของกลูโคสไซรัปเป็นตัวทำให้เนื้อสัมผัสนุ่ม (softener) น้ำตาลไซลิทอลสามารถใช้แทนน้ำตาลซูโครสได้ในอัตราส่วน 1:1 ยกเว้นน้ำตาลซอร์บิทอลและน้ำตาลแมนนิทอลซึ่งมีความหวานน้อยกว่า จะต้องเติมสารให้ความหวานที่ไม่ให้พลังงาน (non-caloric sweetener) ชนิดอื่นแทนเพื่อให้ได้ความหวานเท่าเดิม แต่เนื่องจากน้ำตาลไซลิทอลมีความหนืดน้อยกว่าน้ำตาลซูโครสจึงต้องใช้กัมอะราบิค (gum arabic) เป็นส่วนผสมด้วย ความแตกต่างของหมากฝรั่งชนิดใช้น้ำตาลไซลิทอลกับชนิดใช้น้ำตาลซูโครสคือชนิดที่ใช้น้ำตาลไซลิทอลจะให้ความรู้สึกเย็นเมื่อเริ่มเคี้ยวเนื่องจากอิทธิพลของความเย็น (cool effect) ซึ่งเป็นคุณสมบัติของน้ำตาลไซลิทอล และจากการศึกษาของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Makinen and Scheinin (1975) พบว่าหมากฝรั่งชนิดที่ใช้น้ำตาลไซลิทอลไม่ทำให้เกิดฟันผุซึ่งมักพบในผู้ที่เคี้ยวหมากฝรั่งชนิดที่ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารให้ความหวาน

2. ช็อกโกแล็ต (chocolate)

สามารถใช้น้ำตาลไซลิทอลในการผลิตช็อกโกแล็ตแทนน้ำตาลซูโครสได้ในอัตราส่วน1:1 แต่จำเป็นต้องใส่สารเติมแต่ง เนื่องจากน้ำตาลไซลิทอลให้ความหนืดต่ำกว่า ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลที่ใช้ในช็อกโกแล็ตมีตั้งแต่ร้อยละ 17-42 แต่ไม่พบปัญหาเกี่ยวกับเนื้อสัมผัสและรสชาติของผลิตภัณฑ์แต่อย่างใด

3. ท็อฟฟี่และคาราเมล (toffees and caramels)

เนื่องจากน้ำตาลไซลิทอลไม่มีคุณสมบัติในการเกิดปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสีน้ำตาล (maillard browning) และการเกิดคาราเมล (caramelization) จึงจำเป็นต้องเติมน้ำตาลฟรุกโตสเพื่อคงคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์เอาไว้ หรืออาจเติมหรือกลิ่นดังกล่าวแทนก็ได้ และเพื่อป้องกันการตกผลึกของน้ำตาลไซลิทอลซึ่งจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีเนื้อสัมผัสแข็งกระด้าง ควรหลีกเลี่ยงการใช้มอลโตเด็กซ์ตริน (maltodextrin) และไลเคซีน (lycasien) เป็นส่วนผสม ซึ่งพบว่าอนุพันธ์ของแป้งดังกล่าวมีผลต่อการตกผลึกของน้ำตาลไซลิทอล

4. เจลาติน (gelatin desserts)

การใช้น้ำตาลไซลิทอลในผลิตภัณฑ์เจลาตินมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารให้ความหวาน

5. พุดดิ้ง (pudding)

การผลิตพุดดิ้งไม่มีการเปลี่ยนแปลงสูตรแต่อย่างใดเมื่อใช้น้ำตาลไซลิทอลแทนน้ำตาลซูโครสและไม่มีผลต่อรสชาติของผลิตภัณฑ์

6. แยม เยลลี่ และมาร์มาเลด (jams jellies and marmalades)

กรณีนี้สามารถใช้น้ำตาลไซลิทอลแทนน้ำตาลซูโครสได้เช่นกันในอัตราส่วน 1ต่อ1 แต่ควรหลีกเลี่ยงการใช้น้ำตาลไซลิทอลมากกว่าร้อยละ 40 เพราะจะทำให้เกิดการตกผลึกของน้ำตาลไซลิทอลได้ในระหว่างการเก็บรักษา และไม่มีความจำเป็นต้องเติมสารกันบูดแต่อย่างใด เนื่องจากจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่ทำให้เกิดความเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ไม่สามารถใช้น้ำตาลไซลิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ แต่ควรเพิ่มเพคตินในปริมาณที่มากขึ้นเพราะน้ำตาลไซลิทอลให้ความหนืดต่ำกว่าน้ำตาลซูโครสและมีความจำเป็นต้องเติมเกลือแคลเซียมเพื่อช่วยในการเกิดเจลของแยม นอกจากนี้ยังพบว่าแยมและมาร์มาเลดที่ใช้น้ำตาลไซลิทอลแทนจะให้รสชาติที่ดีกว่าการใช้น้ำตาลซูโครส รวมทั้งความคงตัวของสีอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. ลูกกวาด (hard candy of boiled sweets)

ในการผลิตลูกกวาดโดยการใช้น้ำตาลไซลิทอลอาจมีปัญหาอยู่บ้าง เนื่องจากการตกผลึกโดยใช้น้ำตาลไซลิทอลเกิดขึ้นในขณะที่ทำให้เย็นและความหนืดต่ำ จึงต้องผลิตลูกกวาดโดยการอัดลูกกวาดร้อนเข้าแม่พิมพ์แทน

8. ผลิตภัณฑ์ขนมอบ (bakery goods)

พบว่าการใช้น้ำตาลไซลิทอลในผลิตภัณฑ์ขนมอบนั้น ไม่จำเป็นต้องมีการเปลี่ยนแปลงสูตรขนมแต่อย่างใด แต่อาจต้องเติมน้ำตาลฟรุกโตสเพื่อรักษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องการการเกิดปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสีน้ำตาล (maillard browning) และการเกิดคาราเมล (caramelization) นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการปริมาตรจากการหมักยีสต์และน้ำตาลนั้น อาจไม่เหมาะสมนักสำหรับการใช้น้ำตาลไซลิทอล เพราะผลิตภัณฑ์ขนมอบที่ใช้น้ำตาลไซลิทอลนั้นจะมีปริมาตรที่น้อยกว่าและมีเนื้อสัมผัสที่แน่นกว่าอย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์ขนมอบที่ใช้น้ำตาลไซลิทอล เหมาะสำหรับคนที่เป็นโรคเบาหวานมากกว่า

9. ไอศกรีม (ice cream)

การใช้น้ำตาลไซลิทอลแทนน้ำตาลซูโครส กลูโคสไซรัป หรือน้ำตาลอินเวอร์ต (invert sugar) ในผลิตภัณฑ์แช่แข็งจะทำให้คุณสมบัติการหลอมเหลวของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนไปคือที่อุณหภูมิเดียวกันผลิตภัณฑ์ที่ใช้น้ำตาลไซลิทอลจะมีคุณสมบัติอ่อนกว่าจึงจำเป็นต้องมีการเติมสารที่ช่วยให้แข็ง (thickners) สำหรับไอศกรีมที่ใช้น้ำตาลไซลิทอลนั้น ไม่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -24 องศาเซลเซียส นานถึง 6 เดือนและไม่พบการตกผลึกอีกด้วย

10. ซอสมะเขือเทศและนมข้นหวาน (ketchup and condenced milk)

การใช้น้ำตาลไซลิทอลสามารถปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้คือ ป้องกันการเกิดปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสีน้ำตาล (browing) และการเสื่อมเสียโดยจุลินทรีย์ได้เป็นอย่างดี

11. ซอสและอื่นๆ (marinade sauces an pastes)

เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลต่ำ ฉะนั้นการทดแทนน้ำตาลซูโครสด้วยน้ำตาลไซลิทอลจึงไม่ประสบปัญหาแต่อย่างใด

12. โยเกิร์ต (yoghurt)

จากการศึกษาพบว่าการใช้ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลร้อยละ 8 มีความเหมาะสมมากที่สุดสำหรับการผลิตโยเกิร์ต โดยที่การเติมน้ำตาลไซลิทอลหลังการบ่มจะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างของผลิตภัณฑ์ แต่ถ้าเติมน้ำตาลไซลิทอลก่อนการบ่ม ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีค่าความเป็นกรดด่าง 4.4 สูงกว่ากรณีที่ใช้น้ำตาลซูโครส และผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีความหนืดน้อยกว่าอย่างไรก็ตามจะไม่พบความแตกต่างเกี่ยวกับการยอมรับของผู้บริโภค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
61792

13. เครื่องดื่ม (drinks)

เนื่องจากการได้รับน้ำตาลไซลิทอลในขณะเดียวกันมากเกินไปอาจทำให้เกิดอาการท้องเสียได้ (laxative effect) จึงต้องใช้น้ำตาลไซลิทอลผสมกับสารให้ความหวานชนิดอื่น เช่นเมื่อใช้น้ำตาลไซลิทอลร้อยละ 3.9 และไซคลาเมต (cyclamate) ร้อยละ 0.133 แทนน้ำตาลในผลิตภัณฑ์น้ำอัดลมจะสามารถลดพลังงานที่ร่างกายจะได้รับถึงร้อยละ 60 จึงเหมาะต่อคนที่เป็นโรคเบาหวานและคนที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก ส่วนนมสเตอริไลส์ยูเอชทีชนิดช็อกโกแล็ตเหมาะที่จะใช้น้ำตาลไซลิทอลร้อยละ 4 โดยไม่ทำให้คุณภาพทางฟิสิกส์ เช่นความหนืดและสี เปลี่ยนแปลงไป และยังเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค สำหรับการเก็บรักษามากกว่า 1 เดือนที่อุณหภูมิห้องก็ไม่ทำให้ผลิตภัณฑ์เสื่อมคุณภาพแต่อย่างใด

14. ผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรม (pharmaceutical preparation)

น้ำตาลไซลิทอลมีข้อได้เปรียบคือไม่ทำให้เกิดฟันผุ (non-cariogenicity) และไม่เกิดการหมักโดยจุลินทรีย์ จึงได้ใช้เป็นสารให้ความหวานในการเตรียมผลิตภัณฑ์ชนิดเหลวทางเภสัชกรรม เพราะฉะนั้นการใช้ยาดังกล่าวของคนไข้ที่ไม่ได้ทำความสะอาดช่องปากเป็นเวลานานจึงไม่ทำให้เกิดฟันผุ

2.10 ข้อจำกัดในการใช้ผลิตภัณฑ์น้ำตาลไซลิทอล

1. การบริโภคน้ำตาลไซลิทอลเป็นจำนวนมากในคราวเดียวจะทำให้เกิดอาการท้องเสียได้ เนื่องจากน้ำตาลไซลิทอลมีคุณสมบัติเป็นยาระบาย เพราะน้ำตาลไซลิทอลมีคุณสมบัติเหมือนคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ คือดูดซับน้ำไว้อย่างช้าๆ ดังนั้นเมื่อเริ่มบริโภคเป็นครั้งแรกควรบริโภคในปริมาณต่ำๆก่อน (ราว 30 กรัมต่อวัน) และค่อยๆจะเพิ่มปริมาณขึ้นแต่จะบริโภคได้สูงสุดราว 200-300 กรัมต่อวัน

2. การใช้น้ำตาลไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อให้มีรสชาติเย็นสดชื่นนั้น จะต้องใช้น้ำตาลไซลิทอลที่อยู่ในรูปผลึกเท่านั้น ซึ่งอาจทำให้เกิดลักษณะผิวสัมผัสเปลี่ยนแปลงไปหรือไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคได้

3. น้ำตาลไซลิทอลมีราคาแพงเมื่อเทียบกับสารให้ความหวานชนิดอื่น เนื่องจากต้นทุนที่ใช้ในการผลิตสูงทำให้การใช้น้ำตาลไม่แพร่หลายเท่าที่ควร แต่ว่าน้ำตาลไซลิทอลจะสามารถใช้ในผู้ป่วยโรคเบาหวานได้ แต่ในอาหารสำหรับผู้ป่วยเบาหวานกลับใช้ฟรุกโตสแทนเพราะมีราคาถูกกว่าและไม่เกิดผลข้างเคียงเช่นเดียวกับการใช้น้ำตาลไซลิทอล

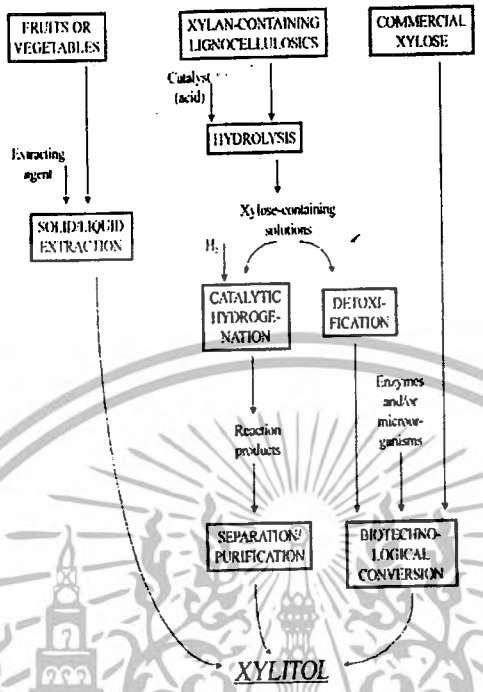
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11 การผลิตน้ำตาลไซลิทอล

น้ำตาลไซลิทอลเริ่มมีการผลิตในระดับอุตสาหกรรมเป็นครั้งแรกในประเทศฟินแลนด์เมื่อปี พ.ศ. 2519 โดยบริษัทฟินนิชซูการ์ มีกำลังการผลิตมากกว่า 3000 ตันต่อปี ต่อมาในปี พ.ศ. 2520 ได้มีการร่วมมือกันระหว่างบริษัทฟินนิชซูการ์และฮอฟมันน์ลาโรชแห่งประเทศสวิตเซอร์แลนด์ ก่อตั้งบริษัทร่วมกันชื่อว่า ไซโรฟิน (Xylofin Co., Ltd.) ขึ้น โดยในปี พ.ศ. 2522 มีการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ทั่วโลกปริมาณถึง 345,000 ตัน ซึ่งในจำนวนนี้เป็นน้ำตาลไซลิทอลและแมนนิทอลประมาณ 6,000 ตัน (สาโรจน์, 2537)

ปัจจุบันมีการในน้ำตาลไซลิทอลในผลิตภัณฑ์อาหารอย่างกว้างขวางทั้งในยุโรปและอเมริกาโดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์ประเภทหมากฝรั่ง และพบว่ามีแนวโน้มที่จะใช้น้ำตาลไซลิทอลมากขึ้นในอุตสาหกรรมประเภทขนมหวาน (confectionary) และขนมขบเคี้ยว (snack products) แต่การใช้น้ำตาลไซลิทอลในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวยังมีข้อจำกัดอยู่ที่การผลิตน้ำตาลไซลิทอลที่มีต้นทุนการผลิตสูง จึงทำให้ราคาของน้ำตาลไซลิทอลแพงกว่าน้ำตาลทั่วไป อย่างไรก็ตามได้มีการค้นคว้าเพื่อลดต้นทุนการผลิตน้ำตาลไซลิทอลโดยกระบวนการหมัก (fermentation) ด้วยจุลินทรีย์ โดยการนำเอาวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลไซโลสเป็นวัตถุดิบ ซึ่งคาดว่าจะทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำกว่ากระบวนการทางเคมี การผลิตไซลิทอลมีหลายวิธีและสามารถใช้วัตถุดิบได้หลายชนิด เช่นผักและผลไม้ ของเสียที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ เช่นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่นฟางข้าว ซังข้าวโพด ชานอ้อย เป็นต้น เศษเหลือจากอุตสาหกรรมไม้และกระดาษ หรืออาจใช้น้ำตาลไซโลสเป็นวัตถุดิบโดยตรงก็ได้ ซึ่งแต่ละวิธีจะมีกระบวนการแตกต่างกันไปดังแสดงในภาพที่ 2.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.8 วิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการผลิตน้ำตาลไซลิทอล

ที่มา : Parajo et al. (1998)

2.12 วิธีต่างๆที่ใช้ในการผลิตไซลิทอล

2.12.1 การสกัดจากผักและผลไม้

การผลิตน้ำตาลไซลิทอลสามารถผลิตได้จากแหล่งธรรมชาติโดยการสกัดจากผักและผลไม้ เช่นกะหล่ำปลี มะเขือยาว ผักโขม สตรอเบอร์รี และราสเบอร์รี โดยปริมาณน้ำตาลไซลิทอลในผักและผลไม้ต่างๆ แสดงในตารางที่ 2.5 ซึ่งสามารถสกัดได้น้ำตาลไซลิทอลในปริมาณที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับปริมาณวัตถุดิบที่ใช้ จึงไม่คุ้มค่าที่จะผลิตในเชิงพาณิชย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลในผักและผลไม้

ผักและผลไม้	ปริมาณน้ำตาลไซลิทอล (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้ง)
Raspberries	268
Strawberries	362
Yellow plums	935
Endivis	258
Lettuce	131
Cauliflower	300
Eggplant	180
Yellow boletus mushroom	128

ที่มา : Emodi (1982)

2.12.2 การผลิตน้ำตาลไซลิทอลโดยกระบวนการทางเคมี

เป็นวิธีการผลิตที่ปัจจุบันใช้ในการผลิตไซลิทอลในระดับอุตสาหกรรม และใช้วัตถุดิบที่เป็นน้ำตาลไซโลส ซึ่งได้จากวัสดุที่มีไซแลนเป็นองค์ประกอบ ประกอบด้วยขั้นต่างๆดังนี้

2.12.2.1 การไฮโดรไลซิส

เป็นการสกัดน้ำตาลไซโลสจากเฮมิเซลลูโลสโดยใช้กรดซัลฟิวริกเจือจาง ซึ่งวิธีที่เป็นที่นิยม คือ อัลตร้าฟาสท์ ไฮโดรไลซิส (ultrafast hydrolysis) ที่ใช้กรดซัลฟิวริกเจือจางร้อยละ 0.5-1.0 อุณหภูมิ 200-210 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วินาที ซึ่งจะได้น้ำตาลไซโลสออกมา

2.12.2.2 การทำน้ำตาลไซโลสให้บริสุทธิ์

เมื่อผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสแล้ว จะได้น้ำตาลไซโลสอยู่ในไฮโดรไลเสท (hydrolysate) ซึ่งสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ 2 วิธี คือ

2.12.2.2.1 แบบแยกน้ำตาลไซโลสวิธีนี้จะกำจัดสารแขวนลอย ตะกอน สี และไอออนอื่นๆ และใช้วิธีโครมาโตกราฟฟี เพื่อแยกเอาน้ำตาลไซโลสออกมาจากน้ำตาลชนิดอื่นๆ เพื่อให้ได้น้ำตาลไซโลสบริสุทธิ์

2.12.2.2.2 แบบไม่แยกน้ำตาลไซโลสวิธีนี้จะแยกเอาสารอื่นๆพวกตะกอน ไอออน และสีออก แต่ไม่แยกเอาน้ำตาลชนิดอื่นออกไป สารละลายที่ได้น้ำตาลหลายชนิด เป็นองค์ประกอบ แต่มีน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบหลักดังแสดงในตารางที่ 2.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 องค์ประกอบของสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลเสท

น้ำตาล	ปริมาณ (ร้อยละ)
อะราบิโนส	6.3
ไซโลส	77.5
แมนโนส	7.8
กาแลคโตส	4.5
กลูโคส	4.5

ที่มา : Hyvoenen et al. (1982)

2.12.3 การไฮโดรจีเนชัน

เป็นการเปลี่ยนน้ำไซโลสให้เป็นน้ำตาลไซลิทอล ภายใต้สภาวะที่มีความดัน 50 บรรยากาศ อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2.5 ชั่วโมง โดยใช้โลหะนิกเกิลเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในขั้นนี้ ซึ่งถ้ามีน้ำตาลอื่นปนอยู่น้ำตาลเหล่านั้นก็จะเปลี่ยนเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ด้วยดังแสดงในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 องค์ประกอบของสารละลายน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ได้จากกระบวนการไฮโดรจีเนชัน

น้ำตาล	ปริมาณ (ร้อยละ)
อาราบิทอล	9
ไซลิทอล	64.5
แมนนิทอล	7.5
กาแลคติทอล	5
ซอร์บิทอล	4.5
อื่นๆ	9.5

ที่มา : Hyvoenen et al. (1982)

2.12.4 การทำไซลิทอลให้บริสุทธิ์

สารละลายน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ได้จะต้องนำมาผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์โดยนำมากรองแยกเอาโลหะนิกเกิลออก แล้วแยกเอาไซลิทอลออกมาโดยวิธีทางโครมาโตกราฟฟี จากนั้นทำการตกผลึกไซลิทอลจะได้ไซลิทอลที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แม้ว่าการผลิตไซลิทอลด้วยวิธีทางเคมี จะเป็นวิธีที่ใช้กันในทางอุตสาหกรรมทั่วไป แต่ต้นทุนในการผลิตก็ยังคงสูงอยู่ เนื่องจากขั้นตอนในการแยก และการทำให้บริสุทธิ์ยังทำได้ยากอยู่ ทำให้ไซลิทอลมีราคาแพง และไซลิทอลที่ได้ก็มีความบริสุทธิ์ต่ำ จึงทำให้มีการคิดค้นวิจัยเพื่อทำการผลิตไซลิทอลด้วยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพขึ้นมาแทนวิธีการทางเคมี

2.13 การผลิตด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ

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

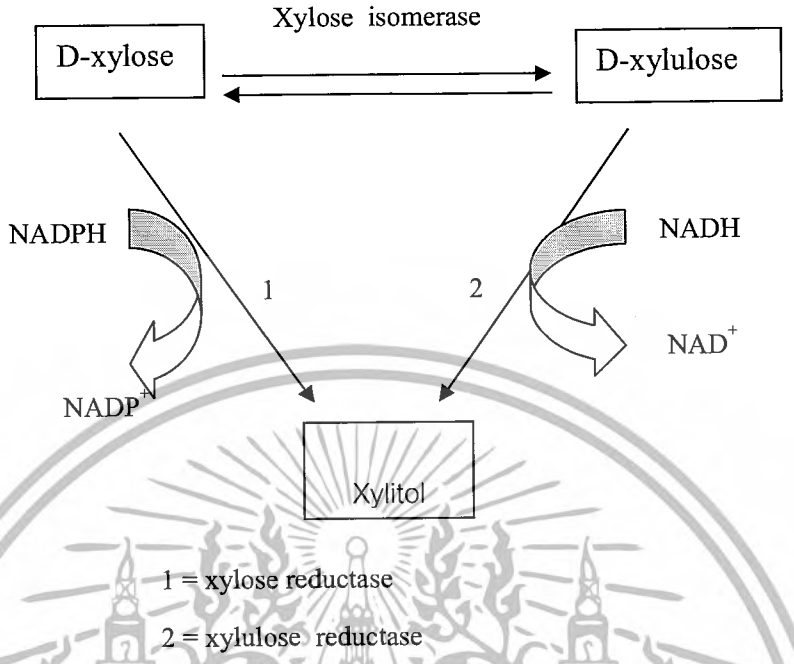
2.13.1 กระบวนการและเมตาบอลิซึมในการผลิตไซลิทอลโดยจุลินทรีย์

Hofer et al. (1971) รายงานว่าการเกิดไซลิทอลจากไซโลสในจุลินทรีย์สามารถเกิดได้ 2 วิธี คือ

1. ไซโลสจะเปลี่ยนไปเป็นไซลิทอลโดยตรง โดยเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสที่มีนิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟตในรูปรีดิวซ์ (NADPH) เป็นโคเอนไซม์

2. ไซโลสถูกเปลี่ยนไอโซเมอร์ไปเป็นไซลูโลสก่อนด้วยเอนไซม์ไอโซเมอเรส จากนั้นก็จะถูกรีดิวซ์ไปเป็นไซลิทอลโดยเอนไซม์ไซลูโลสรีดักเทส โดยมีนิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ในรูปรีดิวซ์ (NADH) เป็นโคเอนไซม์ ดังภาพที่ 2.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.9 วิถีการเกิดน้ำตาลไซลิทอลจากเมตาบอลิซึมของไซโลส
ที่มา : ปิยะมาศ (2547)

Bobsa et al. (1988) ได้ศึกษาเมตาบอลิซึมของไซโลสในยีสต์ เพื่อคำนวณหาผลได้ตามทฤษฎีของการเปลี่ยนไซโลสโดยพิจารณาจาก 4 สภาวะ

1. โคเอนไซม์ 2 ชนิดเข้าไปเกี่ยวข้องกับสองขั้นแรกของกระบวนการสลายไซโลสดังนี้ คือ การรีดิวซ์ไซโลสไปเป็นไซลิทอลด้วยเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสนั้นใช้โคเอนไซม์นิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟตในรูปรีดิวซ์ ส่วนการออกซิไดซ์ไซลิทอลไปเป็น ไซลูโลสด้วยเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสนั้นใช้โคเอนไซม์นิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (NAD^+)

2. ไซโลสทั้งหมดถูกรีดิวซ์ไปเป็นไซลิทอล โดยที่โคเอนไซม์นิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟตในรูปรีดิวซ์นี้สังเคราะห์มาจากวัฏจักรเพนโทส และไซลิทอลถูกออกซิไดซ์ไปเป็นไซลูโลส โดยที่โคเอนไซม์นิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์นี้สังเคราะห์มาจากกระบวนการหายใจ

3. ยีสต์ไม่มีกลไกการเปลี่ยนแปลงไปมาระหว่างนิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ในรูปรีดิวซ์ และนิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟตในรูปรีดิวซ์ ได้เนื่องจากไม่มีกระบวนการเปลี่ยนระหว่างโคเอนไซม์ทั้งสอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ภายใต้สภาวะที่เซลล์ไม่มีการเจริญเติบโต ไซลิทอลจะถูกออกซิไดซ์เพื่อการสังเคราะห์นิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟตในรูปรีดิวซ์เท่านั้น ส่วนไซลิทอลที่เหลือจะถูกปล่อยออกมานอกเซลล์

แต่วิธีโดยทั่วไปที่เป็นวิธีในการเปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลิทอล ก็คือ วิถีออกซิโด-รีดักชัน (oxido-reduction) ซึ่งมีการศึกษาวิถีนี้ในยีสต์หลายชนิด Furian et al. (1994) รายงานว่ากระบวนการดังกล่าวจะเกิดขึ้นได้ ต้องอาศัยโคเอนไซม์จากกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน

2.14 กระบวนการและเมตาบอลิซึมในการผลิตไซลิทอลโดยจุลินทรีย์

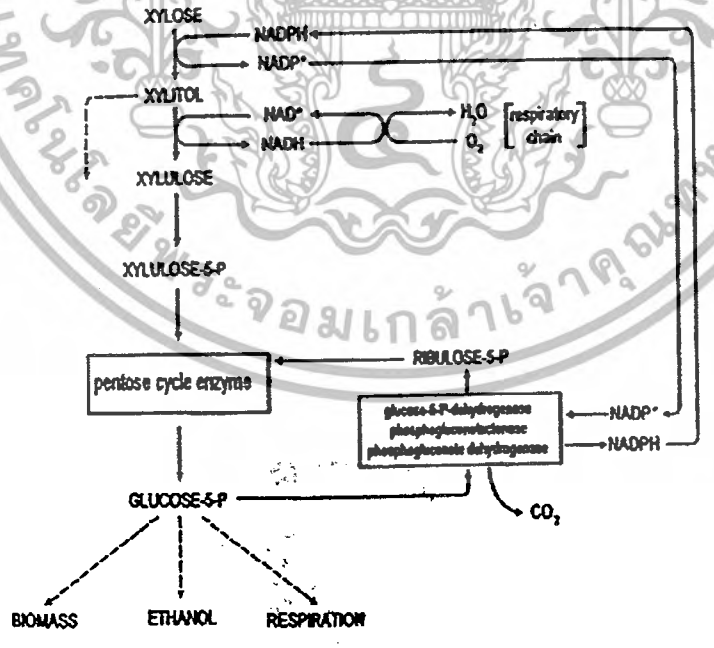
2.14.1. กระบวนการเมตาบอลิซึมของการผลิตไซลิทอลโดยยีสต์

ยีสต์จะใช้น้ำตาลไซโลสมาเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟส (xylulose-5-phosphate) เพื่อเข้าวิถีอื่นต่อไป โดยเมื่อน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ยีสต์จะถูกเปลี่ยนไปเป็นไซลูโลสโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน และรีดักชัน (oxido-reduction) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไซโลสโดยวิธีนี้ จะพบในจุลินทรีย์พวกยูคาริโอต (eucaryote) โดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องสองชนิด คือ เอนไซม์ไซโลสรีดักเทส (xylose reductase : XR) ซึ่งมีโคเอนไซม์นิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟตในรูปรีดิวซ์ร่วมในการทำปฏิกิริยารีดิวซ์ไซโลสไปเป็นไซลิทอลและเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส (xylitol dehydrogenase) ซึ่งใช้นิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต ($NADP^+$) เป็นโคเอนไซม์ที่จะออกซิไดซ์ไซลิทอลที่เกิดขึ้นให้กลาย เป็นไซลูโลส และเมื่อยีสต์เปลี่ยนไซโลสให้เป็นไซลูโลสแล้วไซลูโลสก็จะเปลี่ยนไปเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟตโดยปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชั่น (phosphorylation) โดยเอนไซม์ไซลูโลสไคเนส (xylulose kinase) แล้วไซลูโลส-5-ฟอสเฟตก็จะเข้าสู่วิถีเพนโทสฟอสเฟต ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยตัวเร่งปฏิกิริยาหลัก ๆ 2 ตัว คือนิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต เชื่อมกับกลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (GPDH) และนิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต เชื่อมกับกลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส จะอธิบายการเจริญของยีสต์โดยใช้ไซโลส เปรียบเทียบกับการเจริญโดยใช้กลูโคส และอีกทางหนึ่งเมื่อเข้าสู่วิถีเพนโทสฟอสเฟต ไซลูโลส-5-ฟอสเฟตก็จะเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลฟอสเฟตชนิดต่างๆ เช่น กลีเซอรัลดีไฮด์-5-ฟอสเฟต (G3P) และฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต (F6P) แล้วเข้าสู่วิถีเอมเดน เมเยอร์ฮอฟ (Embden-Meyyerhof-Panas : EMP) เพื่อสร้างไพรูเวทเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ เพื่อสร้างพลังงานและเซลล์ต่อไป อีกวิถีหนึ่งไซลูโลส-5-ฟอสเฟตจะเปลี่ยนเป็นกลีเซอรัลดีไฮด์-5-ฟอสเฟตและอะซิติลฟอสเฟต (acetyl phosphate) โดยเอนไซม์ไซลูโลส-5-ฟอสเฟตฟอสโฟคีโตเลส (xylulose-5-phosphate phosphoketolase) กลีเซอรัลดีไฮด์-5-ฟอสเฟต จะเข้าสู่วิถีเอมเดน เมเยอร์ฮอฟ ส่วนอะซิติลฟอสเฟต จะเปลี่ยนไปเป็นอะซิเตทซึ่งจะเปลี่ยนแปลงได้สองทาง คือ เป็นอะซิติลโคเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(acetal-CoA) เข้าสู่วัฏจักรเครบส์ต่อไป กับการเปลี่ยนแปลงเป็นเอธานอล ส่วนไพรูเวทที่ได้จะเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น เอธานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอินทรีย์ต่าง ๆ เป็นต้น การที่ยีสต์บางสายพันธุ์นั้น เมื่อใช้น้ำตาลไซโลสในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัดจะสามารถสะสมไซลิทอลได้ในปริมาณที่มากนั้น เนื่องจากชนิดของโคเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสคือนิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟตในรูปรีดิวซ์ แต่โคเอนไซม์ในปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสเป็นนิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ ดังนั้นในสภาวะที่ออกซิเจนจำกัด จะเกิดการสะสมของนิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ในรูปรีดิวซ์และนิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟตในรูปรีดิวซ์มากจึงเกิดขึ้นน้อย และไม่สามารถเอานิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟตที่เกิดจากปฏิกิริยาที่เปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอลมาใช้ได้ จึงทำให้เกิดการสะสมไซลิทอลขึ้น

การผลิตไซลิทอลในยีสต์โดยใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงาน ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด หรือไม่มีการเจริญเติบโต ไซลิทอลส่วนใหญ่จะถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ โดยมีบางส่วนถูกออกซิไดซ์ไปเพื่อสังเคราะห์นิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟตในรูปรีดิวซ์เมื่อทำสมดุลย์คาร์บอน และโคเอนไซม์ดังสมการที่ 1-9 แล้ว จะได้ผลทางทฤษฎีของไซลิทอลและไซโลสที่ถูกใช้ (Barbosa; et al., 1988)



ภาพที่ 2.10 การสร้างและการใช้โคเอนไซม์ (coenzyme regeneration) ในยีสต์ที่หมักน้ำตาลไซโลสได้

ที่มา : Barbosa et al. (1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

$$6xylitol + 6NAD^+ \longrightarrow 6xylulose + 6NADPH+H^+ \quad (2)$$

$$6NADPH+H^+ + 3O_2 + 18ADP + 18P_i \longrightarrow 6NAD^+ + 18ATP + 24H_2O \quad (3)$$

$$6xylulose\text{-}5\text{-}phosphate + H_2O \longrightarrow 5glucose\text{-}6\text{-}phosphate + P_i \quad (4)$$

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

จากสมการที่ 1-6

$$6xylose + 54NADP^+ + 12ADP + 12P_i + 12H_2O + 3O_2 \longrightarrow 54NADPH+H^+ + 12ATP + 30CO_2 \quad (7)$$

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

จากสมการที่ 1-6

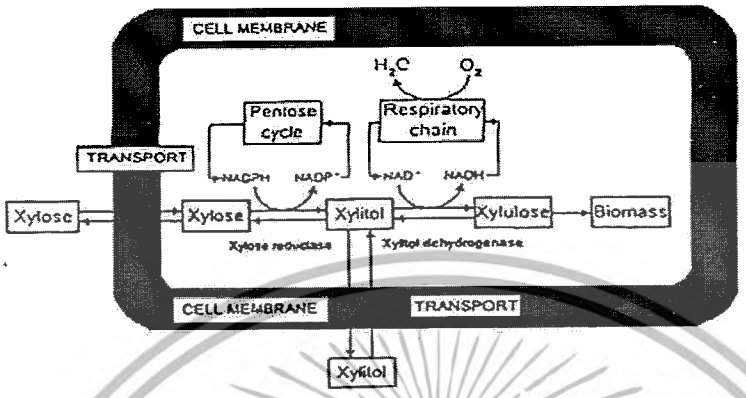
$$60xylose + 12ADP + 12P_i + 12H_2O + 3O_2 \longrightarrow 54xylitol + 12ATP + 30CO_2 \quad (9)$$

ผลได้ของไซลิทอล = 54 : 60 = 0.905 โมลของไซลิทอลต่อโมลของไซโลส

Horitsu et al. (1992) รายงานว่ากระบวนการผลิตน้ำตาลไซลิทอลที่มีประสิทธิภาพนั้นในขั้นตอนแรกต้องเพาะเลี้ยงเซลล์ให้เติบโตสูงสุด โดยการให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอและลดการให้ออกซิเจนในช่วงการผลิตน้ำตาลไซลิทอล เนื่องจากการผลิตน้ำตาลไซลิทอลจะเกิดได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด ถ้ามีการให้ออกซิเจนสูงตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงจะทำให้น้ำตาลไซลิทอลถูกเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลไซลูโลส ดังนั้นการให้ออกซิเจนสูงจึงเหมาะสำหรับช่วงการเจริญเติบโตเท่านั้น

Sirisansaneeyakul et al. (1992) อธิบายถึงการใช้น้ำตาลไซโลสของเซลล์ผ่านวิถีเพนโทสฟอสเฟตซึ่งน้ำตาลไซโลสจะเข้าสู่ภายในเซลล์และถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลไซลิทอลด้วยการทำงานของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสที่มีนิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟตในรูปรีดิวซ์เป็นโคเอนไซม์ จากนั้นน้ำตาลไซลิทอลจะถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลไซลูโลสด้วยการทำงานของเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสที่อาศัยนิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์เป็นโคเอนไซม์ จากนั้นน้ำตาลไซลูโลสที่ได้จะถูกเติมฟอสเฟตก่อนเข้าสู่วิถีเพนโทสฟอสเฟต เพื่อที่จะนำไปสร้างเป็นมวลชีวภาพของเซลล์หรือพลังงานต่อไปดังแสดงในภาพที่ 2.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.11 เมตาบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสในยีสต์

ที่มา : Sirisansaneeyakul et al. (1992)

2.14.2 กระบวนการเมตาบอลิซึมในการผลิตไซลิทอลโดยแบคทีเรีย

แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถสร้างเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอเรส ได้ดังนั้นจึงสามารถเปลี่ยนไซโลสให้เป็นไซลูโลสได้ จากนั้นไซลูโลสก็จะถูกเติมฟอสเฟตกลายเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟตและเข้าสู่วิถีเพนโทส หรืออีกทางหนึ่งไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่ได้จะถูกเอนไซม์ไซลูโลส-5-ฟอสเฟตฟอสโฟคีโตเลส เปลี่ยนเป็นขั้นนี้เป็นการสร้างตัวกลางในวิถีเอมเดน เมเยอร์ฮอฟ โดยไม่มีการสร้างนิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟตในรูปรีดิวซ์เหมือนกับเมตาบอลิซึมในยีสต์

การผลิตไซลิทอลโดยวิธีการหมักนี้ได้มีการศึกษาและวิจัยเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เพื่อให้สามารถแข่งขันกับกระบวนการผลิตโดยวิธีการทางเคมี ซึ่งมีต้นทุนสูงและมีสารปนเปื้อนอยู่มาก ซึ่งจะต้องผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์หลายขั้นตอน นอกจากนี้ยังเป็นการเน้นการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรกรรมที่ไม่มีมูลค่า หรือใช้ประโยชน์ได้ไม่เต็มที่นำมาผลิตเป็นไซลิทอล และผลิตภัณฑ์อื่นๆที่มีมูลค่าซึ่งมีการใช้กันมากในอุตสาหกรรมอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.14.3 กระบวนการเมตาบอลิซึมในการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อรา

เชื้อราสามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้โดยผ่านวิถีออกซิโด-รีดักชัน(oxido-reduction pathway) ให้กลายเป็นน้ำตาลไซลูโลส (Ojamo, 1994) ในช่วงแรก Chiang and Knight (1960) พบปริมาณน้ำตาลไซลิทอลเล็กน้อยเมื่อทำการเพาะเลี้ยงราที่มีเส้นใยในอาหารที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบ Ueng and Gong (1982) ก็รายงานผลที่คล้ายคลึงกันเมื่อทำการหมักไฮโดรไลเสทที่ได้จากชานอ้อยด้วย *Mucor* sp.

2.15 ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณผลผลิตไซลิทอลโดยกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์

การผลิตน้ำตาลไซลิทอลจากจุลินทรีย์เป็นกระบวนการที่มีปัจจัยหลายอย่างซึ่งมีอิทธิพลต่อการผลิต เช่น สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ ชนิดของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ลักษณะของการเพาะเลี้ยง เป็นต้น ปัจจัยต่างๆเหล่านี้ล้วนเป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้การผลิตน้ำตาลไซลิทอลมีประสิทธิภาพ ซึ่งเราสามารถแยกปัจจัยต่างๆนี้ออกเป็นสองอย่าง อย่างแรกเป็นปัจจัยที่ขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ที่ใช้หรือสายพันธุ์ของจุลินทรีย์นั้นเอง ส่วนปัจจัยที่สองที่มีผลต่อกระบวนการผลิตน้ำตาลไซลิทอลมีดังนี้คือ อายุของหัวเชื้อ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ค่าความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ องค์ประกอบของอาหารที่ใช้ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น ปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ น้ำตาลชนิดอื่นในฐานะสารตั้งต้นร่วม

2.15.1.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต

จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการผลิตน้ำตาลไซลิทอลคือยีสต์ ซึ่งมียีสต์หลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้โดยมีการศึกษาถึงการผลิตน้ำตาลไซลิทอลในยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ เพื่อหายีสต์ที่ผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้ดีที่สุด จากการศึกษาพบว่ายีสต์ที่ผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้ดีก็คือยีสต์ในกลุ่ม *Candida* sp. ตัวอย่างเช่น การคัดเลือกยีสต์ 10 สายพันธุ์เพื่อหายีสต์ที่ผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้ดีที่สุดโดย Gong et al. (1981) พบว่า *C. tropicalis* นั้นเป็นยีสต์ที่ให้ผลผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้ดีที่สุด และไม่ผลิตเอธานอลเป็นผลผลิตร่วม นอกจากนี้ Gong et al. (1983) ยังได้ศึกษาความสามารถในการใช้น้ำตาลเพนโทสและการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของยีสต์ต่างๆใน *Candida* sp. *Saccharomyces* sp. และ *Schizosaccharomyces* sp. อีกด้วย Barbosa et al. (1988) ทำการคัดเลือกยีสต์ 44 สายพันธุ์ที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นน้ำตาลไซลิทอลได้ พบว่าในบรรดายีสต์ทั้งหมด *C. tropicalis* และ *C. guilliermondii* สามารถผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้ดีที่สุด Sirisansaneeyakul et al. (1995) ได้เปรียบเทียบสายพันธุ์ต่างๆ 11 สายพันธุ์ พบว่า *C. mogii* สามารถผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบกับสายพันธุ์อื่น ซึ่งเป็นเหตุผลที่ยีสต์ในกลุ่ม *Candidida* sp. ถูกนำมาใช้ในการศึกษาการผลิตน้ำตาลไซลิทอล เช่น Chen and Gong (1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลถึง 250 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำตาลไซโลส 249 กรัมต่อลิตร โดยใช้ยีสต์ *Candida* sp. ที่กลายพันธุ์ Meyriel et al. (1991) ได้ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลสูงถึง 221 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลไซโลส 300 กรัมต่อลิตร

นอกจากยีสต์ในกลุ่ม *Candida* sp. แล้วยังมียีสต์อีกหลายชนิดที่ผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้ Amaral-Collaqco et al. (1990) ได้แยกเอายีสต์จากวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลสมาทำการศึกษาหายีสต์ที่สามารถผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้และพบว่า *D. hansenii* ให้ผลผลิตสูงและมีอัตราการผลิตสูงด้วย และผลการศึกษาของ Vandeska et al. (1997) พบว่า *Debaryomyces hansenii* และ *C. baidinii* เป็นยีสต์ที่ผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้ดีเช่นเดียวกัน ซึ่ง Domiguez et al. (1997) พบว่าได้ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลถึง 106 กรัมต่อลิตร จาก *D. hansenii* นอกจากนี้ยังมียีสต์ที่ให้ผลผลิตน้ำตาลไซลิทอลร่วมกับเอธานอลอีกด้วย ซึ่งพบใน *C. parasilopsis* ในสภาวะที่มีอากาศเล็กน้อย *C. shehatae* และ *P. tannophilus* เป็นยีสต์ที่ให้ผลผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้สูงสุดและมีการผลิตเอธานอลร่วมด้วย ซึ่งการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

2.15.2 อายุของหัวเชื้อที่ใช้ในการผลิตน้ำตาลไซลิทอล

อายุของหัวเชื้อมีผลต่อกิจกรรมของเซลล์ และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตมีผลต่ออัตราการผลิตและปริมาณผลผลิตด้วย (Sreenth; et al., 1986 ; Du Preez, 1994) Sreenarth et al. (1986) พบว่าเมื่อใช้ *C. shehatae* อายุ 24 ชั่วโมงเป็นหัวเชื้อจะผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้ 20 กรัมต่อลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 22 ชั่วโมง (อัตราการผลิต 0.24 กรัมน้ำตาลไซลิทอลต่อกรัมน้ำตาลไซโลส) ขณะที่หัวเชื้ออายุ 72 ชั่วโมงผลิตได้เพียง 9 กรัมต่อลิตร และใช้เวลานานถึง 65 ชั่วโมง (อัตราการผลิต 0.13 กรัมน้ำตาลไซลิทอลต่อกรัมน้ำตาลไซโลส) ผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการทดลองใน *C. guilliermondii* ที่พบว่าอายุของหัวเชื้อมีผลต่อทั้งผลผลิตและการเจริญเติบโตของเชื้อเมื่อใช้หัวเชื้ออายุน้อยกว่า 15 ชั่วโมง และอายุมากกว่า 24 ชั่วโมง (Pfeifer; et al., 1996) นอกจากนี้ Felipe et al. (1997) ก็ได้ศึกษาเชื้อชนิดเดียวกัน พบว่าเมื่อใช้หัวเชื้อที่อายุ 48 ชั่วโมง จะมีอัตราการผลิตต่ำกว่าเมื่อใช้หัวเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง อยู่ถึงร้อยละ 36 ดังนั้นอายุหัวเชื้อที่เหมาะสมมักจะอยู่ในช่วงต้นเพราะพบว่าจะทำให้ผลผลิตน้ำตาลไซลิทอลที่สูงกว่าและมีอัตราการผลิตสูงกว่าหัวเชื้อที่มีอายุมาก แต่อายุที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละชนิดจะแตกต่าง

2.15.3 ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในการผลิตน้ำตาลไซลิทอล

Cao et al. ได้ศึกษาการหมักน้ำตาลไซโลสด้วย *Candida* sp. ที่กลายพันธุ์พบว่ามีการผลิตน้ำตาลไซลิทอลเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณหัวเชื้อเพิ่มขึ้น 3.8 เป็น 14 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับ Dominguez et al. (1997) ทำการศึกษาเชื้อ *D. hansenii* จาก 0.3 ถึง 3 กรัมต่อลิตร พบว่าเพิ่มสูงขึ้น (พิจารณาจากอัตราการผลิต 0.68 ถึง 2.25 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง Vandeska et al. (1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าเมื่อปริมาณชีวมวลเพิ่มมากขึ้น อัตราการผลิตและผลผลิตจะมีแนวโน้มที่สูงขึ้น แต่แนวโน้มของอัตราการผลิตจำเพาะเมื่ออัตราส่วนระหว่างปริมาณเซลล์เริ่มต้นต่อปริมาณสับสเตรทเริ่มต้น (X_0/S_0) เข้าใกล้ 1/10 นั้นจะเป็นไปในทางตรงกันข้าม ดังนั้นปริมาณหัวเชื้อจึงมีผลต่อการผลิตน้ำตาลไซลิทอลด้วย โดยพบว่าถ้ามีความเข้มข้นของหัวเชื้อมาก จำนวนเซลล์ย่อยเพิ่มมากขึ้นทำให้มีอัตราการผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้สูงและรวดเร็วขึ้น

นอกจากการศึกษาการคัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์แล้ว ยังมีการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตน้ำตาลไซลิทอล เช่น อัตราการให้อากาศ ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส และค่าความเป็นกรดด่าง เป็นต้น โดย Gong et al. (1981) รายงานว่าน้ำตาลไซโลสเปลี่ยนเป็นน้ำตาลไซลิทอลได้สูงสุดที่ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 และที่ค่าความเป็นกรดด่างลดลงอยู่ในช่วงที่เป็นกรดจะทำให้การผลิตน้ำตาลไซลิทอลลดลง จากการศึกษาของ Vandeska et al. (1995) พบว่าอัตราการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของ *C. baidinii* สูงสุดเมื่อหมักในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 แต่ผลได้สูงสุดอยู่ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 นอกจากนี้แล้ว Silva and Afschar (1994) ได้รายงานว่า *C. tropicalis* สามารถผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 2.5 และการเพิ่มค่าความเป็นกรดด่างจาก 2.5 เป็น 4.0 ทำให้อัตราการผลิตน้ำตาลไซลิทอลสูงขึ้นแต่ผลได้ของน้ำตาลไซลิทอลกลับลดลง ดังนั้นอัตราการให้อากาศจึงมีความสำคัญต่อการเจริญและการใช้น้ำตาล สำหรับการผลิตน้ำตาลไซลิทอลนั้นการให้อากาศมากเกินไปทำให้เซลล์มีการเจริญอย่างรวดเร็วและมีปฏิกิริยาของเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสสูง ดังนั้นน้ำตาลไซลิทอลที่ผลิตขึ้นจึงถูกออกซิไดซ์ไปเป็นน้ำตาลไซลูโลสพร้อมกับการสังเคราะห์นิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ในรูปรีดิวซ์ (NADH) ทำให้ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลที่เกิดขึ้นลดลง (Furlan; et al., 1991) การลดอัตราการให้อากาศจะทำให้อัตราการใช้น้ำตาลไซโลสและการเจริญลดลงแต่ผลได้ของน้ำตาลไซลิทอลสูงขึ้น

2.15.4 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้

ปริมาณออกซิเจนเป็นปัจจัยที่สำคัญมากปัจจัยหนึ่งในการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นน้ำตาลไซลิทอลโดยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ ความเข้มข้นของปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่มีความสัมพันธ์ค่อนข้างมากกับความเข้มข้นของสารตั้งต้น จึงมักมีการศึกษาควบคู่กันไป เพื่อให้สามารถอธิบายถึงอิทธิพลที่แท้จริงของปัยจัยทั้งสอง การให้อากาศที่เหมาะสมขึ้นกับความเข้มข้นของสารตั้งต้นและลักษณะของการหมัก ซึ่งการให้อากาศจะกระตุ้นการขนส่งน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ในยีสต์บางชนิด เช่น *Candida Hansenula Kluyveromyces* และ *Pichia* ซึ่งต้องการออกซิเจนเพื่อใช้ในการดูดซึมน้ำตาล การให้อากาศกับอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงการหมักจะทำให้การเปลี่ยนน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไซโลสไปเป็นน้ำตาลไซลิทอลมากขึ้น เพราะน้ำตาลไซลิทอลเป็นผลผลิตที่จะเกิดควบคู่กับการเจริญของจุลินทรีย์ซึ่งมีอิทธิพลต่อการเผาผลาญของออกซิเจน (Nigam and Singh, 1995)

Furlan et al. (1991) ; Kim et al. (1997) ทำการศึกษาปัจจัยของอากาศใน *C. parasilopsis* ซึ่งพบว่าการให้อากาศมากเกินไป จะส่งผลให้เซลล์มีการเจริญอย่างรวดเร็ว น้ำตาลไซลิทอลที่ผลิตขึ้นจะเปลี่ยนเป็นนิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ในรูปรีดิวซ์ และน้ำตาลไซลูโลสและปริมาณน้ำตาลไซลิทอลลดลง

Furlan et al. (1994) ได้ทำการทดลองพบว่าเชื้อ *C. tropicalis* สามารถผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้ 30 กรัมต่อลิตร ในเวลา 117 ชั่วโมง เชื้อ *P. tannophilus* และ *C. shehatae* สามารถผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้ 12.5 กรัมต่อลิตร และ 6.0 กรัมต่อลิตร ผลที่ได้นี้เป็นผลมาจากสภาวะที่มีการให้อากาศน้อยและสามารถสรุปได้ว่า อัตราการถ่ายเทออกซิเจนเป็นหลักสำคัญในการผลิตน้ำตาลไซลิทอล

Horitsu et al. (1992) รายงานถึงผลกระทบที่มีต่อน้ำตาลไซลิทอลโดยในขั้นแรกควรพิจารณาถึงความเร็วในการเพิ่มปริมาณเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ อย่างไรก็ตาม การผลิตน้ำตาล ไซลิทอลภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ และเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารในช่วงระหว่างการหมัก จะนำไปสู่การผลิตน้ำตาลไซลูโลสโดยเกิดปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันของน้ำตาลไซลิทอลที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย การเพิ่มระดับการละลายของออกซิเจนที่มีความต้องการเฉพาะขั้นตอนเริ่มต้นในการหมักเท่านั้น แต่หลังจากนั้นควรลดระดับการให้อากาศลง โดยในเชื้อ *C. tropicalis* สามารถเพิ่มการสะสม น้ำตาลไซลิทอลภายใต้ปริมาณออกซิเจนที่จำกัด

Horitsu et al. (1992) ; Nolleau et al. (1993) ; Roseio et al. (1991) พบว่าสภาวะการให้อากาศจะมีผลต่ออัตราการผลิตที่ดีที่สุดขึ้นกับความเข้มข้นของสารตั้งต้นด้วย ถ้าความเข้มข้นสูง อัตรา การให้อากาศควรจะสูงด้วย นอกจากนี้อัตราการให้อากาศยังขึ้นอยู่กับเซลล์ด้วยว่าเซลล์อยู่ในรูปเซลล์อิสระหรือเซลล์ตรึง เนื่องจากอัตราการส่งผ่านออกซิเจนที่ทำให้เกิดสภาวะที่มีอากาศเล็กน้อย (microaerophilic condition) แก่เซลล์อิสระนั้นอาจทำให้เกิดสภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobic condition) ในเซลล์ตรึง เนื่องจากข้อจำกัดในการแพร่ที่เกิดจากการถ่ายเทมวล

Meyrial et al. (1991) ทำการศึกษาความสามารถในการผลิตของเชื้อ *C. guilliermondii* ซึ่งใช้น้ำตาลไซโลสและส่วนที่ไม่ใช่เฮมิเซลลูโลส (non-hemicellulose) ซึ่งทำการย่อยให้ได้น้ำตาล ในสภาวะที่มีอากาศน้อยได้ผลผลิตน้ำตาลไซลิทอล 0.63 กรัมต่อกรัม ได้เอธานอลปริมาณเล็กน้อยจากน้ำตาลไซโลสส่วนน้ำตาลที่ไม่ใช่น้ำตาลไซโลสถูกเปลี่ยนเป็นเอธานอลและเซลล์จุลินทรีย์ การผลิตน้ำตาลไซลิทอลโดย *D. hansenii* ต้องการสภาวะ semi-aerobic โดยเริ่มจากสภาวะที่มีอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อเพิ่มการสะสมนิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ในรูปรีดิวซ์ ให้มีความสมบูรณ์พร้อมจะให้เกิดปฏิกิริยารีออกซิไดซ์ซึ่งจะนำไปสู่การเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นน้ำตาลไซลิทอล

Peschke et al. (1992) ได้ศึกษาการผลิตน้ำตาลไซลิทอลโดย *C. guilliermondii* เมื่อทำการให้อากาศในปริมาณเท่าเดิม (อากาศอิ่มตัวร้อยละ 5) พบว่าเซลล์อิสระให้น้ำตาลไซลิทอล 27.3 กรัมต่อลิตร (อัตราการผลิตน้ำตาลไซลิทอล 0.70 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ของน้ำตาลไซลิทอลเท่ากับ 0.64 กรัมต่อกรัมน้ำตาลไซโลส) แต่เซลล์ตรึงที่ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (Ca-alginate) นั้นให้น้ำตาลไซลิทอลเพียง 18.4 กรัมต่อลิตร (อัตราการผลิตน้ำตาลไซลิทอล 0.43 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ของน้ำตาลไซลิทอลเท่ากับ 0.78 กรัมต่อกรัมน้ำตาลไซโลส) ซึ่งเห็นได้ว่าการให้อากาศที่ต่ำขณะทำการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการตรึงเซลล์จะทำให้การผลิตน้ำตาลไซลิทอลลดลงอย่างมาก ทั้งนี้เนื่องมาจากปริมาณออกซิเจนสามารถแทรกเข้าไปภายในของเจลได้เมื่อทำการหมักที่อัตราการถ่ายเทออกซิเจนสูงเท่านั้น ดังนั้นเมื่อเซลล์อยู่ในรูปเซลล์ตรึงการให้อากาศเมื่อเทียบกับเซลล์อิสระต้องสูงกว่าเพื่อให้เกิดการแพร่ของอากาศเข้าไปในเม็ดเจลได้

ปริมาณอากาศจะมีผลต่อปริมาณของเซลล์ซึ่งจะมีผลต่อเนื่องไปยังผลผลิตที่ได้ ถ้าให้อากาศต่ำเกินไปเซลล์จะเจริญไม่ดีและตายได้ แต่ถ้าให้อากาศสูงตลอดเวลาปริมาณออกซิเจนที่สูงจะเปลี่ยนน้ำตาลไซลิทอลเป็นน้ำตาลไซลูโลสแทน จึงอาจใช้วิธีการให้อากาศสูงในช่วงแรกเพื่อให้เกิดจำนวนเซลล์มากก่อนแล้วลดการให้อากาศลงเพื่อให้เกิดการผลิตน้ำตาลไซลิทอล

Kim S.Y. et al. (1992) ได้ศึกษาถึงผลของการควบคุมปริมาณออกซิเจนโดยเชื้อ *C. parapsilosis* พบว่าการให้อากาศอย่างเต็มที่เพื่อให้เชื้อมีการเจริญเต็มที่ในช่วงระยะเวลาหนึ่งหลังจากนั้นจะทำการลดปริมาณออกซิเจนลงทำให้มีการผลิตน้ำตาลไซลิทอลที่สูงขึ้น

Sirisansaneeyakul et al. (1992) ได้รายงานว่า สภาวะที่ขาดออกซิเจนการสังเคราะห์เอนไซม์ นิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ในรูปรีดิวซ์ ด้วยกระบวนการหายใจนั้นไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสที่จะเปลี่ยนน้ำตาลไซลิทอลต่อไปเป็นน้ำตาลไซลูโลสในวิถีเพนโทสฟอสเฟต จึงเกิดการสะสมน้ำตาลไซลิทอลมากขึ้นและส่งผ่านออกนอกเซลล์เป็นผลทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลเพิ่มมากขึ้น

2.15.5 แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตน้ำตาลไซลิทอล

ถ้าไม่รวมน้ำตาลชนิดต่างๆที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน องค์ประกอบที่มีผลต่อการผลิตน้ำตาลไซลิทอลอย่างมากคือ ไนโตรเจน โดยลักษณะและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตน้ำตาลไซลิทอลขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์ โดยทั่วไปแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ให้ผลผลิตไซลิทอลที่ดีคือแหล่งไนโนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์เพราะให้ผลผลิตน้ำตาล ไซลิทอลสูงกว่าและดีกว่า เช่น การผลิตน้ำตาลไซลิทอลจาก *C. boidinii* เมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนแทนแอมโมเนียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซัลเฟต พบว่าให้ผลผลิตสูงขึ้นกว่าเดิม (Vandeska; et al., 1995) และพบว่าเชื้อชนิดนี้เมื่อใช้ยีสต์สกัดจะให้ผลผลิตสูงสุดเมื่อเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่น (Vongsuvanlert and Tani, 1989) และการศึกษาใน *C. shehatae* พบว่าถ้าใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นสารอินทรีย์จะทำให้เชื้อใช้ไซโลสได้ดีขึ้น (Palnitkar and Lachke, 1990) นอกจากนี้ Sirisansaneeyakul et al. (1995) ซึ่งได้ทำการศึกษาใน *C. mogii* พบว่าอาหารที่เติมยีสต์สกัดและเปปโตนลงไปจะช่วยให้การเจริญและการผลิตน้ำตาลไซลิทอลดีขึ้น แต่บางครั้งแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ก็ให้ผลเป็นลบเมื่อเทียบกับการใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ เช่น *C. guilliermondii* จะมีอัตราการผลิตลดลงเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นสารอินทรีย์ เช่น ยูเรีย เมื่อเทียบกับการใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟตหรือแอมโมเนียคลอไรด์ แต่ปริมาณผลผลิตที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนัก

Barbosa et al. (1988) กล่าวถึงความสำคัญของแหล่งไนโตรเจนและการให้อากาศว่ามีผลต่อการผลิตน้ำตาลไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์บางสายพันธุ์ใน *S. cerevisiae* วิถีเพนโทสฟอสเฟตควบคุมโดยไนโตรเจนและเกลือแอมโมเนียมซึ่งพบว่าสามารถกระตุ้นการออกซิเดทีฟในวิถีเพนโทสฟอสเฟต เพราะเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (D-glucose-6-phosphate dehydrogenase) จะถูกยับยั้งโดยนิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ในรูปรีดิวซ์ ใน *P. tannophilus* เกลือแอมโมเนียมจะลดระดับนิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ในรูปรีดิวซ์ของเอนไซม์กลูโคส-6-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส ภายในเซลล์และเพิ่มกิจกรรมการออกซิเดทีฟในวิถีเพนโทสฟอสเฟต

Dahiya (1991) พบว่า *C. shehatae* สามารถผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้ในปริมาณมากขึ้นอยู่กับแหล่งไนโตรเจนเพราะเป็นการเพิ่มระดับของเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสได้ซึ่งผลกระทบในการผลิตน้ำตาลไซลิทอลจากแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ 8 ชนิด และสารอินทรีย์ 4 ชนิด พบว่าปริมาณน้ำตาลไซลิทอลสูงสุดที่ได้คือ 16.7 กรัมต่อลิตร และ 30.6 กรัมต่อลิตร โดยแอมโมเนียมอะซิเตท และยีสต์สกัดตามลำดับ

Horitsu et al. (1992) ใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 3, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร พบว่าได้ผลผลิตสูงสุด 1.78 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้ยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร ด้วยอัตราการไหล 400 มิลลิลิตรต่อนาที ให้อากาศที่มีออกซิเจนร้อยละ 90 และน้ำตาลไซโลส 100 กรัมต่อลิตร

ดังนั้นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะที่สุดควรจะเป็นสารอินทรีย์แต่บางครั้งเมื่อใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์จะให้ผลผลิตดีกว่าซึ่งต้องเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนโดยขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อว่าเหมาะสมกับการใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์หรืออนินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.15.6 ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส

ความเข้มข้นของสับสเตรทสูงในช่วงเริ่มต้นของการผลิตน้ำตาลไซลิทอลจะเหมาะกับจุลินทรีย์ที่เป็นออสโมฟิลิก (osmophilic) โดยทั่วไปการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลในช่วงแรกของการหมักแบบชั่วคราวจะนำไปสู่การเพิ่มอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ ถ้าจุลินทรีย์สามารถทนต่อความเข้มข้นสูงของน้ำตาลและแรงดันออสโมซิสได้ (Nigam and Singh, 1995)

Sirisansaneeyakul et al. (1992) ได้รายงานว่าเชื้อ *C. mogii* ที่เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด (ความเร็วในการเขย่า 100 รอบต่อนาที) โดยให้มีความแตกต่างของความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 5-35 กรัมต่อลิตร พบว่าอัตราการผลิตน้ำตาลไซลิทอลจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเริ่มต้น

ตารางที่ 2.8 ผลของความเข้มข้นน้ำตาลไซโลสที่มีผลต่อการผลิตน้ำตาลไซลิทอล

ปริมาณน้ำตาลไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณชีวมวล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
5.3	0.46	0.00
10.1	0.29	0.17
19.3	0.18	0.44
28.9	0.16	0.50
35.3	0.12	0.70

ที่มา : Sirisansaneeyakul et al. (1992)

Horitsu et al. (1992) ได้เพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อ *C. tropicalis* เป็น 100-500 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการให้อากาศสูง 400 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้อากาศที่มีออกซิเจนร้อยละ 90 พบว่าอัตราการผลิตน้ำตาลไซลิทอลเพิ่มขึ้นเป็น 2.44 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากเดิม 1.78 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสกับการให้อากาศมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของเซลล์ซึ่งทำให้การผลิตน้ำตาลไซลิทอลสูงตามไปด้วย

Meyrial et al. (1991) ศึกษาความจำเพาะต่อสับสเตรทของ *C. guilliermondii* ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเริ่มต้นจาก 10-300 กรัมต่อลิตร การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณสูงสุดที่ได้เมื่อใช้น้ำตาลไซโลส 300 กรัมต่อลิตร ได้ผลผลิต 0.75 กรัมต่อลิตรน้ำตาลไซโลส ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 82.6 ของปริมาณทั้งหมดทางทฤษฎี ความเข้มข้นของน้ำตาลไซลิทอลต่ำเนื่องจากถูกใช้ไปในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นหลัก อัตราการผลิตน้ำตาลไซลิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทอลเมื่อน้ำตาลไซโลสเป็น 2.4 เท่าจะสูงกว่าปริมาณที่ได้จากน้ำตาลไซโลส 10 กรัมต่อลิตร ในทางตรงกันข้ามกับการผลิตน้ำตาลไซลิทอล การเจริญของจุลินทรีย์ที่ละน้อยจะถูกยับยั้งโดยความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.11 ต่อชั่วโมง ได้จากความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 20 และ 50 กรัมต่อลิตร

2.15.7 การเติมน้ำตาลชนิดอื่นลงในอาหารเลี้ยงเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นร่วม

นรินทร์ (2541) พบว่าการเติมน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการเจริญของเชื้อ *C. mogii* ATCC 18364 และการเกิดน้ำตาลไซลิทอลในสภาวะที่จำกัดออกซิเจนโดยการเติมน้ำตาลกลูโคสลงไปในปริมาณน้อยมากเพื่อไม่ให้เกิดการยับยั้งการใช้น้ำตาลไซโลส ในกรณีนี้น้ำตาลกลูโคสจะช่วยเพิ่มปริมาณนิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟตในรูปรีดิวซ์ ในเมตาบอลิซึมของยีสต์และเพิ่มการใช้น้ำตาลของเชื้อ จึงทำให้น้ำตาลไซโลสเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลไซลิทอลได้มากขึ้น ส่งผลให้น้ำตาลไซลิทอลสูงขึ้นด้วย โดยปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมที่ให้ผลผลิตน้ำตาลไซลิทอลสูง คือ 2.3 กรัมต่อการทดลอง (ทำการทดลองในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร และปริมาณอาหารที่ใช้หมัก คือ 1.5 ลิตร) ทำให้ได้น้ำตาลไซลิทอล 0.854 กรัมต่อกรัมน้ำตาลไซโลส อัตราการผลิตเท่ากับ 0.255 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ค่าผลได้เพิ่มขึ้น 1.24 เท่า และอัตราการผลิตเพิ่มขึ้น 1.36 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันซึ่งไม่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส

Haiao et al. (1982) รายงานว่าการเติมน้ำตาลกลูโคสจะมีผลยับยั้งการใช้น้ำตาลไซโลสใน *Candida* และ *Shizosaccharomyces* น้ำตาลกลูโคสจะยับยั้งการใช้น้ำตาลไซโลสในระยะเวลาอันรวดเร็วและเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสลดต่ำลง ความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสไปเป็นน้ำตาลไซลิทอลจะเพิ่มขึ้น โดยแสดงออกในลักษณะ catabolic repression ซึ่งไม่ใช่การควบคุมที่กลไกการสังเคราะห์ของยีน หลักฐานที่สนับสนุนความคิดนี้ ค่อนข้างจะเป็นการอธิบายถึงการใช้น้ำตาลไซโลสเป็นส่วนใหญ่ว่าไม่แอคทีฟหรือเกิดการยับยั้งในขณะที่มีน้ำตาลกลูโคส

Meyrial et al. (1991) ได้ศึกษาความสามารถในการหมักของเชื้อ *C. guilliermondii* ในน้ำตาลต่างๆโดยไม่ใช้น้ำตาลไซโลส ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลกาแลกโตสและน้ำตาลอาราบิโนส ที่พบในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส จะสามารถทำการหมักได้อย่างรวดเร็ว โดยใช้ประโยชน์สำหรับการเจริญและผลิตเอธานอลเท่านั้น

Sreenath and Jeffries (1996) รายงานว่า เมื่อมีน้ำตาลกลูโคส เชื้อ *C. shehatae* จะใช้น้ำตาลไซโลสได้เร็วขึ้นแต่ให้ผลผลิตลดลงแม้ว่าอัตราการผลิตจะเพิ่มขึ้นก็ตาม

Yahashi et al. (1996) พบว่า เมื่อเติมน้ำตาลกลูโคสลงไปเป็นสารตั้งต้นร่วมนั้น มีผลดีเนื่องจากน้ำตาลไซโลสจะเปลี่ยนเป็นน้ำตาลไซลิทอลได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น เนื่องจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์จะมีการเจริญได้ดีกว่าการใช้น้ำตาลไซโลสเพียงอย่างเดียวจึงสามารถผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้สูงขึ้น และน้ำตาลกลูโคสยังช่วยเพิ่มนิโคทินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟตในรูปรีดิวซ์เมื่อเกิดเมตาบอลิซึมของน้ำตาลกลูโคสในวิถีเพนโทสฟอสเฟตอีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Nolleau et al. (1993) ; Pfeifer et al. (1996) แต่บางครั้งการเติมน้ำตาลกลูโคสอาจทำให้เกิดการยับยั้งเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส ทำให้ได้ผลผลิตไม่ดีเท่าที่ควร

2.15.8 ความเข้มข้นของน้ำตาลไซลิทอล

Kastner et al. (1996) พบว่า มีการยับยั้งการผลิตน้ำตาลไซลิทอลใน *C. shehetae* โดยได้น้ำตาลไซลิทอลเพียง 50 กรัมต่อลิตรเท่านั้น ทั้งนี้น่าจะมาจากความเข้มข้นของน้ำตาลไซลิทอลภายในน้ำหมักสูงขึ้น การขนถ่ายน้ำตาลไซลิทอลออกนอกเซลล์จะเริ่มลดลงและเกิดการสะสมของน้ำตาลไซลิทอลภายในเซลล์และยับยั้งการผลิตได้ นอกจากนี้ Sirisansaneeyakul et al. (1995) ก็ได้พบการยับยั้งแบบนี้เช่นเดียวกันเมื่อทำการผลิตน้ำตาลไซลิทอลโดย *C. mogii* โดยเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซลิทอลในน้ำหมักสูงขึ้นถึง 100 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตจำเพาะและผลผลิตที่ได้จะลดลง ยกเว้นในยีสต์บางชนิด เช่น *D. hansenii* ที่สามารถใช้น้ำตาลไซลิทอลได้ในบางสภาวะ เช่น เมื่อสารตั้งต้นถูกใช้จนหมด (Nolleau; et al., 1993) นอกจากนี้ เชื้อ *P. tannophilus* ที่อยู่ในน้ำหมักที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซลิทอลสูงมากและอยู่ในสภาวะที่มีอากาศจะสามารถนำน้ำตาลไซลิทอลไปใช้ได้และได้ผลผลิตออกมาเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และผลผลิตอื่นที่ไม่สามารถระบุได้ (Xu and Taylor,1993) นอกจากนี้ ยังพบความสัมพันธ์ในการใช้น้ำตาลไซลิทอลและการผลิตไรโบฟลาวิน (riboflavin) ใน *C. guilliermondii* อีกด้วย (Leather and Gupta, 1997)

2.15.9 การเติมเมทานอล

Furlan et al. (1994) รายงานว่า การเติมเมทานอลสามารถเพิ่มการผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้ถึง 39.8 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 8.5 เมื่อใช้อาหารที่มีน้ำตาลไซโลสและมีการเติมด้วยเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 1.0 (โดยปริมาตร) ซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเมทานอลแล้วส่งผลให้ได้ผลผลิตเป็น NADPH ทำให้มีปริมาณมากพอที่จะเกิดปฏิกิริยารีดักชันของน้ำตาลไซโลสและน้ำตาลไซลูโลสทำให้เกิดเป็นน้ำตาลไซลิทอล การผลิตน้ำตาลซอร์บิทอลและน้ำตาลไรบิทอลโดยยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลได้ เช่น *C. boidinii* และการเติมเมทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถเพิ่มการผลิตน้ำตาลไซลิทอลให้มากขึ้นได้

2.15.10 ปริมาณไบโอติน (biotin)

Lee et al. (1987) รายงานว่า ปริมาณเอธานอลและน้ำตาลไซลิทอลที่สะสมในน้ำหมักในการเลี้ยงแบบครั้งคราวของเชื้อ *P. tannophilus* และ *C. guilliermondii* จะขึ้นอยู่กับปริมาณของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไบโอติน โดยอาหารที่มีไบโอตินสูง เชื้อ *P. tannophilus* จะสะสมเอธานอลมากกว่าน้ำตาลไซลิทอลในขณะที่ *C. guilliermondii* จะสะสมน้ำตาลไซลิทอลได้มากกว่าเอธานอล

2.15.11 ค่าความเป็นกรดด่าง

ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลไซลิทอลจะทำให้ยีสต์สามารถเจริญได้ดีและผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้สูงขึ้น ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมของของยีสต์แต่ละชนิดก็จะแตกต่างกันไป ซึ่งมีตัวอย่างแสดงดังตารางที่ 2.9

ตารางที่ 2.9 ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่สามารถผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้

จุลินทรีย์	ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม	เอกสารอ้างอิง
D. hansenii	5.5	Dominguez et al. (1997)
Candida sp.	4.0-6.0	Cao et al. (1996)
C. boidinii	7.0	Vandeska et al. (1995)
		Vonsuvanlert and Tani (1989)
C. parasilopsis	4.5-5.0	Nolleau et al. (1995)
C. guilliermondii	6.0	Nolleau et al. (1995)
C. tropicalis	4.0	Yahashi et al. (1996)

ที่มา : Parajo et al. (1997)

วรสิทธิ์ (2541) ทำการศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของเชื้อ *C. mogii* ATCC 18364 พบว่าค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสำหรับการเจริญและการผลิตน้ำตาลไซลิทอลจะแตกต่างกัน โดยทำการเลี้ยงสองระยะ ระยะแรกเป็นการเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ โดยทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีการให้อากาศเพียงพอ ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในระยะนี้ คือ 4.5 ซึ่งจะทำให้มีอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.046 ต่อชั่วโมง ส่วนระยะที่สองจะเป็นระยะที่มีการจำกัดปริมาณอากาศ พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในระยะนี้ คือ 6.0 และทำให้ได้ผลผลิตน้ำตาลไซลิทอลเป็น 0.71 กรัมต่อกรัมน้ำตาลไซโลส คิดเป็นร้อยละ 77.96 ของผลได้ตามทฤษฎี

Gong et al. (1981) รายงานว่า น้ำตาลไซโลสจะเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลไซลิทอลได้มากที่สุดที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8.0 และเกิดปฏิกิริยารีดักชันของน้ำตาลไซลิทอลเมื่อค่าความเป็นกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด่างเปลี่ยนจากด่างไปเป็นกรด ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลสูงสุดจะเกิดขึ้นในช่วงแรกที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.0-7.0 สำหรับ *P. tannophilus* ที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.0 สำหรับ *C. guilliermondii* และที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.0 สำหรับ *C. tropicalis*

2.15.12 อุณหภูมิ

ยีสต์สามารถผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 24-45 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของเชื้อยีสต์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดจะอยู่ในช่วง 28-30 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้น ผลผลิตที่ได้จะลดลง แต่มียีสต์บางสายพันธุ์ที่มีช่วงอุณหภูมิแตกต่างออกไปจากนี้ และพบว่า *P. tannophilus* สามารถผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยขึ้นกับชนิดของน้ำตาลที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน และพบว่าเมื่อใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน อุณหภูมิที่เหมาะสมก็จะเปลี่ยนไปเป็น 31 องศาเซลเซียส และมีรายงานว่า เมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 30-37 องศาเซลเซียส เชื้อ *P. tannophilus* จะผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้ลดลง (Barbosa; et al., 1988) ส่วน *C. guilliermondii* สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แต่ผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้ความเข้มข้นสูงสุดและให้ผลผลิตสูงสุดในช่วงอุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Cao et al. (1994) ; Dominguez et al. (1997) พบว่า การผลิตน้ำตาลไซลิทอลจะคงที่เมื่ออุณหภูมิเป็น 35-40 องศาเซลเซียส สำหรับ *Candida* sp. และ 28-37 องศาเซลเซียส สำหรับ *D. hansenii*

การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวโดยการเติมน้ำตาลไซโลส น้ำตาลกลูโคสหรือส่วนผสมของน้ำตาลไซโลสและน้ำตาลกลูโคส จะทำให้ผลได้และอัตราการผลิตน้ำตาลไซลิทอลสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ และเมื่อนำระบบนี้ไปใช้กับยีสต์ที่ได้รับการตัดแต่งพันธุกรรม (recombinant yeast) *S. cerevisiae* ที่ได้รับการถ่ายยีน XYL1 ซึ่งเป็นยีนสำหรับการผลิตเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส ทำการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวโดยใช้เอธานอลเป็นสารตั้งต้นร่วม น้ำตาลไซโลสจะถูกเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลไซลิทอลได้สูงถึงร้อยละ 93 ด้วยอัตราการผลิตเฉลี่ย 1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้นร่วม สามารถผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้ 0.19 กรัมต่อกรัมเซลล์ต่อชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบน้ำตาลชนิดต่างๆ และเอธานอลที่ใช้เป็นสารตั้งต้นร่วมในการผลิตน้ำตาลไซลิทอล พบว่า น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแมนโนส และน้ำตาลฟรุกโทสสามารถยับยั้งการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสไปเป็นน้ำตาลไซลิทอลได้สูงกว่า น้ำตาลกาแลกโตสและเอธานอล ส่วนน้ำตาลมอลโทสไม่มีผลในการยับยั้ง นอกจากนี้ยังพบว่า ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของสารตั้งต้นร่วมจำกัด จะทำให้ได้ผลได้ของน้ำตาลไซลิทอลสูงกว่าภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของสารตั้งต้นมากเกินพอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.16 วิธีการลดความเป็นพิษที่เกิดจากการย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเษตร

2.16.1 โอเวอร์ไลมิง (overliming)

สามารถตกตะกอนโลหะหนัก ลดปริมาณกรดอะซิติก สารประกอบฟีโนลิก และเปลี่ยนเฟอฟูรอลไปเป็นกรดเฟอฟูรอล

2.16.2 ซัลฟีเคชัน (sulphication)

สามารถลดปริมาณกรดอะซิติก เฟอฟูรอล และสารประกอบฟีโนลิก

2.16.3 การดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์ (charcoal absorption)

สามารถตกตะกอนโลหะหนัก ลดปริมาณกรดอะซิติกและสารประกอบฟีโนลิก

2.16.4 การทำให้เป็นกลาง (neutralization)

เป็นการปรับค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายที่มีความเป็นกรดสูงให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

2.16.5 การสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์ (extraction with organic solvents)

สารอินทรีย์ที่นิยมใช้ในการสกัดคือ ไตรครอโรเอธานอล (trichloroethylene) , เบนซิน (benzene) , เอธิล อะซิเตต (ethyl acetate) , ไดเอธิลอีเธอร์ (diethyl ether), เฮกเซน (hexane)

2.17 การลดความเป็นพิษโดยวิธีโอเวอร์ไลมิง

วิธีโอเวอร์ไลมิงเป็นวิธีการลดปริมาณสารพิษที่ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางที่สามารถทำได้หลายแนวทาง เช่นการเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (หรือไฮดรอกไซด์ตัวอื่น) ลงไปในอาหารสังเคราะห์เพื่อเพิ่มค่าความเป็นกรดด่างเป็น 10.0-10.5 เมื่อผสมเข้ากันแล้วจะเกิดตะกอนโดยตะกอนส่วนใหญ่จะเป็นเกลือแคลเซียมที่มีความสามารถในการละลายต่ำ ซึ่งสารที่ใช้ในการลดปริมาณสารพิษจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของไฮโดรไลเสทและจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก

การลดปริมาณสารพิษด้วยวิธีโอเวอร์ไลมิงโดยการปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 10.0-10.5 ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($Ca(OH_2)$) , แคลเซียมออกไซด์ (CaO) , โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) หลังจากนั้นนำไปตกตะกอนเกลือที่เกิดขึ้นนำไฮโดรไลเสทที่ได้มาทำการลดค่าความเป็นกรดด่างด้วยกรดซัลฟิวริกเป็น4.0 จะทำให้เกิดการลดปริมาณสารพิษโดยการตกตะกอนอะซิเตทโลหะหนัก เฟอฟูรัล แทนนิน เทอปีน และสารประกอบฟีโนลิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.18 การลดความเป็นพิษโดยใช้ถ่านกัมมันต์

การแยกสารปนเปื้อนในสารละลาย โดยสารจะถูกดูดซับที่ผิวของถ่านกัมมันต์ ซึ่งที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปมีอยู่ 2 ชนิดคือ แบบที่เป็นเม็ด (granular charcoal) แบบที่เป็นผง (powders charcoal) โดยมักเรียกรวมกันว่า activated carbon ซึ่งทำมาจากเมล็ดของ almond , walnut , hulls, coconut , wood หรือถ่านทั่วไป โดยนำมาเผาที่อุณหภูมิสูงเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวของคาร์บอน

1.18.1 การดูดซับโดยผงถ่านกัมมันต์ มีอยู่ 3 ลักษณะ คือ

2.18.1.1 การแลกเปลี่ยนประจุ (exchange absorption) การดูดซับแบบนี้เป็นการดูดซับด้วยไฟฟ้าสถิตที่บริเวณพื้นที่ผิวของถ่านกัมมันต์

2.18.1.2 การดูดซับแบบเคมี (chemical absorption) อาศัยการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีทำให้โมเลกุลของสารที่ถูกดูดซับไม่เกิดการเคลื่อนที่ที่ผิวของถ่านกัมมันต์

2.18.1.3 การดูดซับแบบกายภาพ (physical absorption) การดูดซับแบบนี้เป็นการดูดซับเกิดจากแรง Van der Waals ซึ่งไม่ยึดติดนานเหมือนกับสองแบบแรก มักจะเหมาะกับสภาวะที่อุณหภูมิต่ำๆ

2.19 ถ่านกัมมันต์ (Charcoal)

ถ่านกัมมันต์ คือ วัตถุดิบที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบถูกนำมาผ่านกระบวนการก่อกัมมันต์ ซึ่งทำให้วัตถุดิบนั้นมีโครงสร้างรูพรุนและมีพื้นที่ผิวภายในสูง ซึ่งหากดูพื้นที่หน้าตัดของถ่านกัมมันต์จะมีลักษณะคล้ายรังผึ้ง โดยถ่านกัมมันต์จะมีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลัก (87-90%) และมีธาตุอื่นเป็นองค์ประกอบ คือ ไฮโดรเจน ออกซิเจน ซัลเฟอร์ และไนโตรเจน โดยจะมีปริมาณมากน้อยเท่าใดขึ้นกับปริมาณที่มีในวัตถุดิบและเกิดขึ้นอีกในขั้นตอนการผลิตซึ่งประกอบด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และขั้นตอนการกระตุ้นถ่านชาร์ (ถ่านที่ได้จากการคาร์บอนไนเซชัน)

2.19.1 การคาร์บอนไนเซชัน (Carbonization)

กระบวนการคาร์บอไนเซชันเป็นกระบวนการเผาที่เกิดขึ้นในที่อับอากาศเพื่อเพิ่มสัดส่วนคาร์บอนในสารอินทรีย์ ขณะเดียวกันก็ได้ผลิตภัณฑ์อื่นที่เป็นของเหลวและก๊าซออกมาด้วย โดยโครงสร้างวงแหวนอะโรมาติกที่เหลือกลายเป็นโครงสร้างของถ่านชาร์(Char) ส่วนกลุ่มโครงสร้างโมเลกุล หรือหมู่อนุมูลที่มีขนาดเล็กกว่า จะกลั่นสลายตัวออกมาเป็นโครงสร้างต่างๆ ได้แก่ น้ำ แอมโมเนีย น้ำมันทาร์และก๊าซต่างๆ

ขั้นตอนคาร์บอนไนเซชันจัดว่าเป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญมากที่สุดในการผลิตถ่านกัมมันต์ เนื่องจากในการคาร์บอไนเซชันจะมีการเริ่มสร้างของโครงสร้างรูพรุน โดยในระหว่างการคาร์บอไนเซชันธาตุและองค์ประกอบต่างๆ ที่ไม่ใช่คาร์บอนรวมถึงสารระเหยต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่น ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจนและน้ำ จะถูกกำจัดออกจากโครงสร้างของวัตถุดิบในรูปของก๊าซและน้ำมันทาร์ จากนั้นก็จะได้ถ่านชาร์ที่มีการเรียงตัวของโครงสร้างผลึกที่ไม่เป็นระเบียบ ซึ่งจะมีช่องว่างรูพรุนระหว่างผลึก โดยจะมีสารอินทรีย์ที่เป็นทาร์ไปอุดช่องว่างเหล่านั้น ซึ่งส่วนประกอบของถ่านชาร์ที่ได้จะมีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไฮโดรเจนและคาร์บอนต่อออกซิเจนเพิ่มมากขึ้นจากวัตถุดิบในตอนแรกด้วย วัตถุดิบแต่ละชนิดจะมีภาวะที่เหมาะสมแตกต่างกันในการคาร์บอนไนเซชันโดยถ่านกัมมันต์ จากวัตถุดิบที่ต่างกันอาจใช้วิธีกระตุ้นที่ต่างกัน เพื่อที่จะได้ถ่านกัมมันต์ที่มีคุณภาพดีที่สุด ซึ่งจะเหมาะกับการนำไปใช้ในระบบที่เหมาะสมต่อไป

วัตถุดิบที่นำมาผลิตเป็นถ่านกัมมันต์นั้น จะต้องมีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ โดยวัตถุดิบนั้นอาจเกิดขึ้นโดยธรรมชาติหรือได้จากการสังเคราะห์ขึ้น วัตถุดิบที่นิยมนำมาผลิตถ่านกัมมันต์ในระดับอุตสาหกรรม คือ พีท ถ่านหิน ลิกไนต์ ไม้ และกะลามะพร้าว เนื่องจากสามารถผลิตถ่านกัมมันต์ที่มีความสามารถในการดูดซับสูงและมีรูพรุนขนาดเล็ก ซึ่งวัตถุดิบที่นำมาผลิตเป็นถ่านกัมมันต์ควรมีสมบัติดังต่อไปนี้ มีปริมาณสารระเหยต่ำ มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง มีราคาถูกและหาได้ง่าย มีสมบัติคงที่

ในปัจจุบันของเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้ถูกนำมาผลิตเป็นถ่านกัมมันต์ เป็นจำนวนมาก เนื่องจากหาได้ง่ายและมีราคาถูก อย่างไรก็ตามปัญหาในการผลิตถ่านกัมมันต์จากของเหลือทิ้งทางการเกษตรคือ วัตถุดิบมีสมบัติไม่คงที่แม้ว่าเป็นวัตถุดิบชนิดเดียวกัน ทำให้ยากในการควบคุมการกระจายขนาดของรูพรุนในขั้นตอนการผลิต

2.19.2 การกระตุ้น (การก่อกัมมันต์)

เป็นการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของโครงสร้างคาร์บอนเป็นผลทำให้เกิดการเพิ่มพื้นที่ผิวที่มากขึ้น โดยเป็นการทำให้มีรูพรุนให้มากขึ้นหรือเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการดูดซับสารอื่นๆ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่างการกระตุ้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด เนื่องมาจากวิธีการกระตุ้นนั้น มีมากมายหลายวิธี และประสิทธิภาพของการกระตุ้นขึ้นกับลักษณะและชนิดของวัตถุดิบรวมถึงวิธีการอื่นๆก่อนการกระตุ้นด้วย โดยทั่วไปแล้วมี 2 วิธีในการผลิตถ่านกัมมันต์ คือ

2.19.2.1 นำวัตถุดิบที่ผ่านการคาร์บอไนเซชันแล้วมากระตุ้นโดยใช้สารกระตุ้น เช่น ซิงค์คลอไรด์ ($ZnCl_2$) แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) และกรดฟอสฟอริก (H_3PO_4) วิธีนี้โดยทั่วไปเรียกว่า “ การกระตุ้นทางเคมี” ซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้กันมาก ในการผลิตถ่านกัมมันต์ในทางการค้า โดยปกติแล้ววิธีการกระตุ้นแบบนี้มักใช้กับวัตถุดิบที่เป็นไม้ ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ในการกระตุ้นอยู่ในช่วง 500-900 องศาเซลเซียส สารกระตุ้นที่ใช้กันทั่วไปในทางอุตสาหกรรม คือ ซิงค์คลอไรด์ กรดฟอสฟอริก และด่าง การกระตุ้นทางเคมีจะช่วยลดการเกิดทาร์และสารอื่นๆที่เกิดในกระบวนการ ดังนั้นร้อยละของผลผลิตที่ได้จึงค่อนข้างมีปริมาณสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.19.2.2 นำวัตถุดิบที่ผ่านการคาร์บอไนเซชันแล้วมาทำปฏิกิริยากับก๊าซที่ใช้ในการออกซิเดชัน ซึ่งอาจเป็นน้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ ออกซิเจน วิธีนี้โดยทั่วไปเรียกว่า การกระตุ้นทางกายภาพ เป็นวิธีการเพิ่มปริมาตรรูพรุนและพื้นที่ผิวโดยปฏิกิริยาก๊าซซิฟิเคชัน (gasification) ด้วยการออกซิไดซ์ที่ช่วงอุณหภูมิ 700-1000 องศาเซลเซียส ก๊าซที่ใช้โดยทั่วไป คือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไอน้ำและอากาศ โดยอาจใช้ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือรวมกันก็ได้

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกการคาร์บอไนซ์ยังเป็นตัวดูดซับที่ไม่ดีต้องทำการกระตุ้นให้ได้ถ่านที่มีการดูดซับสูง โดยใช้การกระตุ้นให้ทำปฏิกิริยากับก๊าซที่เป็นตัวออกซิไดซ์ดังตัวอย่าง

$H_2O + C_x \longrightarrow H + CO + C_{x-1}$ (ที่ 800-900 องศาเซลเซียส)

$CO_2 + C_x \longrightarrow 2CO + C_{x-1}$ (ที่ 800-900 องศาเซลเซียส)

$O_2 + C_x \longrightarrow 2CO + C_{x-2}$ (ที่ 800-900 องศาเซลเซียส)

$O_2 + C_x \longrightarrow CO_2 + C_{x-1}$ (ต่ำกว่า 600 องศาเซลเซียส)

ปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะรูพรุนในขั้นตอนการกระตุ้นโครงสร้างของคาร์บอนหรือถ่านชาร์ที่นำมากระตุ้น สารอนินทรีย์ปนเปื้อนที่อยู่ในเนื้อคาร์บอน ชนิดของก๊าซออกซิไดซ์ อุณหภูมิขณะเกิดปฏิกิริยา ความดันของก๊าซ เวลาในการเกิดปฏิกิริยาและขนาดของอนุภาคของถ่านชาร์

ในกระบวนการกระตุ้นคาร์บอนทำปฏิกิริยากับสารออกซิไดซ์เป็นออกไซด์ของคาร์บอนแพร่ออกจากผิวของคาร์บอน เกิดก๊าซซิฟิเคชันบางส่วนของเมล็ดถ่านเป็นรูพรุนขึ้นในโครงสร้างของถ่าน ถ่านจากการคาร์บอไนเซชั่นประกอบด้วยรูพรุนเล็กๆจำนวนมากเกิดจากช่องว่างระหว่างผลึกในการจัดเรียงตัวของคาร์บอนอะตอม รูพรุนนี้มักจะถูกบรรจุไว้ด้วยทาร์ที่เกิดจากการสลายตัวด้วยความร้อน และถูกขวางด้วยคาร์บอนอสัณฐาน การกระตุ้นจึงเป็นทั้งการเปิดรูที่ถูกปิดและการสร้างรูใหม่ขึ้นด้วย โครงสร้างที่เกิดขึ้นเป็นผลึกที่เล็กมาก (microcrystallites) ประกอบด้วยวงหกเหลี่ยมด้านเท่าของอะตอมคาร์บอนผสมกัน เส้นผ่านศูนย์กลางของชั้นคาร์บอนที่สร้างผลึกเล็กๆ มีขนาดประมาณ 150 อังสตรอม และระยะห่างระหว่างผลึกเล็กๆนี้มีค่าอยู่ระหว่าง 20-50 อังสตรอม

2.19.3 โครงสร้างของถ่านกัมมันต์

โดยปกติแล้วถ่านกัมมันต์โดยทั่วไปมีปริมาณความพรุนอยู่ระหว่าง 0.5-1.5 มิลลิลิตรต่อกรัมจากลักษณะและขนาดของรูพรุนสามารถแบ่งรูพรุนได้เป็น 3 ขนาด

2.19.3.1 รูพรุนขนาดใหญ่ (macro pores) ขนาดของรูพรุนขนาดใหญ่ที่พบในถ่านกัมมันต์มีค่าอยู่ระหว่าง 5000-20000 อังสตรอม ปริมาตรความพรุนมีค่าอยู่ ระหว่าง 0.2-0.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิลิตรต่อกรัมส่วนพื้นที่ผิวจำเพาะของรูพรุนขนาดใหญ่นี้มักจะไม่ค่อยสนใจ สามารถตัดทิ้งได้ เนื่องจากมีค่าน้อยกว่า 2 ลูกบาศก์เมตรต่อกรัม

2.19.3.2 รูพรุนขนาดกลาง (transitional pores) มีรัศมีอยู่ระหว่าง 20-1000 อังสตรอม มีปริมาตรความพรุนอยู่ระหว่าง 0.02-0.1 มิลลิลิตรต่อกรัม และมีพื้นที่ผิวจำเพาะอย่างน้อยที่สุดร้อยละ 95 ของพื้นที่ผิวจำเพาะทั้งหมด

2.19.3.3 รูพรุนขนาดเล็ก (micro pores) มีรัศมีน้อยกว่า 20 อังสตรอม ซึ่งมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 6-8 อังสตรอม ปริมาตรความพรุนมีอยู่ระหว่าง 0.15-0.5 มิลลิลิตรต่อกรัม และมีพื้นที่ผิวจำเพาะอย่างน้อยที่สุดร้อยละ 95 ของพื้นที่ผิวจำเพาะทั้งหมด

2.19.4 ถ่านกัมมันต์ในทางการค้า

ถ่านกัมมันต์ที่ใช้ในทางการค้าแบ่งออกเป็น 2 รูปคือ ถ่านกัมมันต์ชนิดผง และ ถ่านกัมมันต์ชนิดเม็ด ซึ่งรายละเอียดของถ่านกัมมันต์ทั้งสองชนิดมีดังนี้

2.19.4.1 ถ่านกัมมันต์ชนิดผง (powdered activated carbon)

ถ่านกัมมันต์ชนิดผงที่ใช้โดยทั่วไปผลิตจากขี้เลื่อยที่ได้จากไม้ ซึ่งมีขนาดโดยเฉลี่ยของอนุภาคในช่วง 15-25 ไมโครเมตร โดยอาจมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของลักษณะทางเรขาคณิตประมาณ 0.15-0.266 โดยในการออกแบบระบบการดูดซับจะคำนึงถึงการเลือกลักษณะของหอดูดซับ ลักษณะการผสมเม็ดถ่านกัมมันต์ผงกับของเหลว ลักษณะการแยกของถ่านกัมมันต์ผงหลังจากที่ดูดซับแล้ว วิธีในการนำกลับมาใช้ใหม่ในทางอุตสาหกรรม ถ่านกัมมันต์ผงโดยส่วนใหญ่จะนำไปใช้ในการกำจัดสีในกระบวนการผลิตอาหารเช่นใช้ในการผลิตน้ำตาล ผลิตน้ำมัน ผลิตโซเดียมกลูตาเมต และผลิตไวน์ ในภาวะปัจจุบันมีการนำถ่านกัมมันต์ชนิดผงมาใช้กันอย่างมาก โดยเฉพาะในการบำบัดน้ำ ทั้งในการผลิตน้ำดื่มและการบำบัดน้ำเสีย

2.19.4.2 ถ่านกัมมันต์ชนิดเม็ด (granular activated carbon)

ถ่านกัมมันต์เม็ดที่ใช้กันทั่วไปนั้นมีหลายขนาดโดยขึ้นกับการนำไปประยุกต์ใช้งาน ในการดูดซับระบบที่เป็นก๊าซมักใช้ถ่านกัมมันต์รูปทรงกระบอกขนาด 4-6 มิลลิเมตร ซึ่งใช้ในการดูดซับระบบที่เป็นก๊าซนั้นคือระบบการนำตัวทำละลายกลับมาใช้ใหม่ การทำอากาศให้บริสุทธิ์ การทำก๊าซให้บริสุทธิ์ การกำจัดกำมะถันออกจากก๊าซและใช้ในการแยกระบบก๊าซอื่นในระบบที่เป็นของเหลวนั้นมีการใช้ถ่านกัมมันต์เม็ดมากเช่นกัน เนื่องจากจัดการระบบได้ง่ายในเครื่องปฏิกรณ์ที่มีความดันลดต่ำ ทำการล้างเม็ดถ่านได้ง่าย ซึ่งในสภาวะของเหลวนิยมใช้ถ่านกัมมันต์เม็ดในการกำจัดสี การผลิตน้ำตาล กำจัดสารอินทรีย์ กำจัดกลิ่นและสิ่งเจือปนในระบบการผลิตน้ำดื่ม และใช้กันอย่างมากที่สุดในการบำบัดน้ำเสีย ถ่านกัมมันต์ชนิดเม็ดมีการใช้งานมากกว่าถ่านกัมมันต์ชนิดผงเนื่องจากสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ โดยนำถ่านกัมมันต์ชนิดเม็ดที่ใช้แล้วผ่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการทางความร้อนหรือกระบวนการนำกลับมาใช้ใหม่แบบอื่นๆ ซึ่งสามารถทำได้ง่ายกว่าถ่านกัมมันต์ชนิดผง

มีการผลิตถ่านกัมมันต์ทุกแบบทั่วโลกประมาณปีละ 300000-400000 ตัน มีถ่านกัมมันต์ชนิดผงประมาณร้อยละ 55 ถ่านกัมมันต์ ชนิดเม็ดประมาณร้อยละ 35 โดยที่เหลือจะเป็นถ่านกัมมันต์ในรูปแบบอื่น ซึ่งร้อยละ 80 ของถ่านกัมมันต์ทั้งหมดใช้กับระบบที่เป็นของเหลวและอีกร้อยละ 20 ใช้ในระบบที่เป็นก๊าซ ซึ่งประเทศที่มีการใช้กันมากที่สุด คือ ญี่ปุ่น และสหรัฐอเมริกา โดยมีอัตราการใช้ถ่านกัมมันต์เพิ่มขึ้นปีละประมาณร้อยละ 7 พบว่าใช้มากในระบบใหม่ๆ ซึ่งเกี่ยวกับระบบการป้องกันมลภาวะจากสิ่งแวดล้อม

2.19.5 ประโยชน์ของถ่านกัมมันต์

2.19.5.1 ประเภทใช้กับของเหลว (liquid phase carbon) อุตสาหกรรมที่นำถ่านกัมมันต์ไปใช้ในสารละลายหรือในของเหลวได้แก่

อุตสาหกรรมน้ำตาล ใช้ถ่านกัมมันต์เพื่อฟอกสีและทำให้น้ำตาลดิบบริสุทธิ์ขึ้น

อุตสาหกรรมน้ำมันและไขมันสำหรับบริโภค นอกจากใช้ในการฟอกสีแล้วยังใช้ในการแยกเอาสบู่และเปอร์ออกไซด์ออกจากน้ำมันและไขมันด้วย

อุตสาหกรรมอาหาร ใช้ถ่านกัมมันต์เพื่อดูดกลิ่นและฟอกสีของผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งดีกว่าการใช้สารเคมีชนิดอื่นเพราะไม่เป็นอันตรายและไม่เกิดปฏิกิริยากับผลิตภัณฑ์อาหาร

อุตสาหกรรมเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น ไวน์ วิสกี้ มักใช้ถ่านกัมมันต์เพื่อดูดกลิ่นที่ไม่ต้องการทำให้เครื่องดื่มที่ได้มีรสชาติดีขึ้น

อุตสาหกรรมเคมีและยา ถ่านกัมมันต์ใช้ในการผลิตสารเคมีและยา เช่น วิตามินและฮอร์โมนหลายชนิด

อุตสาหกรรมการทำน้ำให้บริสุทธิ์ โดยใช้เป็นตัวดูดกลิ่นและฟอกสี

อุตสาหกรรมการแยกสารที่ต้องการ เช่น การแยกทองหลังการสกัดจากแร่ด้วยวิธีไซยาไนด์ การแยกไอโอดีนออกจากน้ำเกลือที่เกิดในหลุมน้ำมัน

กระบวนการที่มีการที่มีการใช้สารเร่ง (catalytic process) ถ่านกัมมันต์จะทำหน้าที่เป็นตัวพาสารเร่ง (catalyst carrier) ในปฏิกิริยาที่มีการใช้สารเร่งหลายชนิด รวมทั้งทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการทำงานของตัวเร่งให้ดีขึ้นด้วย

2.19.5.2 ประเภทที่ใช้ในการดูดก๊าซและไอ (gas phase carbon) ในอุตสาหกรรมต่อไปนี้

อุตสาหกรรมทำหน้ากากป้องกันก๊าซพิษ ทั้งที่ใช้กันในการทหารและที่ใช้กันทั่วไป ทั้งนี้เพราะถ่านกัมมันต์ดูดซับก๊าซพิษและไอของสารอินทรีย์ได้ การนำไอระเหยของตัวทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายที่ใช้แล้วกลับมาใช้ใหม่ ถ่านกัมมันต์จะดูดซับไอระเหยเหล่านั้นที่อุณหภูมิห้องและจะคายออกที่ความดันของไอระเหยต่ำๆ

อุตสาหกรรมปรับอากาศ โดยถ่านกัมมันต์จะดูดก๊าซพิษต่างๆในอากาศ เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจน ไนโตรเจน และอะซิทิลีน

อุตสาหกรรมบุหรี่ โดยใช้ถ่านกัมมันต์เป็นก้นกรองบุหรี่

2.20 สัณฐานวิทยาของยีสต์

เซลล์ยีสต์มีขนาดแตกต่างกันออกไปมีเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 1-5 ไมครอน ยาวตั้งแต่ 5-30 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่เซลล์จะเป็นรูปไข่แต่มีบางชนิดที่ยาวกว่า บางชนิดเป็นรูปทรงกลม แต่ละสายพันธุ์มีลักษณะเฉพาะ อย่างไรก็ตามขาดและรูปร่างอาจแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับอายุและสภาพแวดล้อม ยีสต์ไม่มีโครงสร้างที่ใช้ในการเคลื่อนที่ดังนั้นจึงเคลื่อนที่ไม่ได้

2.20.1 โครงสร้างของยีสต์

2.20.1.1 แคปซูล (capsule) เป็นโครงสร้างที่ห่อหุ้มเซลล์โดยยีสต์บางชนิดจะปล่อยสารที่มีลักษณะเป็นเมือกหรือเหนียวออกมาหุ้มเซลล์ แคปซูลมักเป็นสารพวกโพลีแซคคาไรด์ รวมทั้งเฮทเทอโรโพลีแซคคาไรด์ แมนแนนและสารที่คล้ายแป้ง

2.20.1.2 ผนังเซลล์ (cell wall) ผนังเซลล์จะบางเมื่ออายุเซลล์ยังน้อยแต่จะหนาขึ้นตามอายุความหนาของผนังเซลล์ประมาณ 1 ใน 7 ของเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ ส่วนประกอบส่วนใหญ่ของผนังเซลล์ได้แก่

กลูแคน (glucan) หรือเซลลูโลสของยีสต์ ต่างกับเซลลูโลสที่เป็น β-1,3 linkage หรือ β-1,6 linkage ซึ่งเซลลูโลสเป็น β-1,4 linkage มี ร้อยละ 30-35

แมนแนน (mannan) เป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลแมนโนสมีร้อยละ 30

ไขมัน (lipid) มีร้อยละ 8.5-13.5

โปรตีน (protein) มีร้อยละ 6-8

ไคติน (chitin) มีร้อยละ 1-2

ที่เหลือเป็นสารอินทรีย์ เช่น เกลือฟอสเฟต

2.20.1.3 เยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) องค์ประกอบเหมือนเยื่อหุ้มเซลล์ของสิ่งมีชีวิตอื่นคือ เป็นไลโปโปรตีนและมีหน้าที่ควบคุมการผ่านเข้าออกของสาร

2.20.1.4 ไซโตพลาสซึม (cytoplasm) มีลักษณะกึ่งแข็งกึ่งเหลว ประกอบด้วยสารโพลีแซคคาไรด์ ที่สะสมอยู่คือ ไกลโคเจน นอกจากนี้มี RNA และโปรตีนอยู่มาก มีไรโบโซมและออแกเนล์อื่น เช่น ไมโตคอนเดรีย และมีระบบเยื่อในไซโตพลาสซึม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.20.1.5 นิวเคลียส (nucleus) โครงสร้างทั่วไปเหมือนนิวเคลียสของเซลล์พวกยูคาริโอตทั่วไป จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าโครงสร้างบางอย่างขาดหายไป เช่น ไม่มีการสร้างเส้นใยสปินเดิลเมื่อมีการแตกหน่อ เยื่อหุ้มนิวเคลียสยังคงอยู่ตลอดเวลาขณะมีการแบ่งเซลล์ ขณะมีการแตกหน่อนิวเคลียสจะคอดเข้าและส่วนหนึ่งจะไปยังเซลล์ที่เป็นหน่ออีกส่วนหนึ่งอยู่ที่เซลล์เดิม

2.20.1.6 แวคิวโอล (vacuole) เซลล์ยีสต์อาจมีแวคิวโอลหนึ่งหรือหลายอัน เห็นชัดเจนกว่าโครงสร้างอื่นๆ

2.20.1.7 อินคลูชัน (inclusion) ยีสต์บางชนิดจะมี voltin granule ซึ่งเป็นแกรนูลของโพลีฟอสเฟต บางชนิดมีแกรนูลไขมัน คาร์โบไฮเดรตหรือโปรตีน บางชนิดสะสมไขมันถึงร้อยละ 50 ของน้ำหนักแห้ง นอกจากนี้ก็มีไกลโคเจน เอนไซม์ วิตามิน รงควัตถุซึ่งอาจเป็นสีเหลือง สีส้ม สีชมพูหรือสีน้ำตาล นอกจากนี้ยังอาจพบไซโตโครม ฮีโมโกลบินและฟลาวิน

2.21 การผลิตไซลิทอลโดยใช้การตรึงเซลล์

การผลิตไซลิทอลโดยใช้การตรึงเซลล์ เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการเพิ่มผลผลิตไซลิทอล ซึ่งจะเป็นลักษณะของการเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ในถังหมักนอกจากนี้ยังทำให้เซลล์มีความเสถียรทางพันธุกรรม (genetic stability) และยังสามารถนำเอาเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่

2.22 การตรึงเซลล์

ความหมายและประวัติของจุลินทรีย์ที่ถูกตรึง

เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง หมายถึง เซลล์ที่ถูกจำกัดขอบเขต หรือสถานที่ทางฟิสิกส์ให้อยู่ในบริเวณซึ่งทำให้จุลินทรีย์ไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่ง และสามารถนำมาใช้ซ้ำได้หลายครั้งอย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์ที่ถูกตรึงอาจอยู่ในรูปเซลล์ที่กำลังเจริญ เซลล์ระยะพัก หรือเซลล์ที่ตายแล้ว

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปัจจุบันมีรายงานเกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงในการผลิตสารต่างๆอย่างกว้างขวาง และที่ประสบความสำเร็จในอุตสาหกรรมแล้วเช่น กรดแอลแอสปาร์ติก กรดแอลมาลิก การผลิตฟรุกโตส การผลิต prednisolone เป็นต้น

2.23 การเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของการตรึงเซลล์กับวิธีอื่นๆ

เซลล์ที่ถูกตรึงจัดเป็นตัวเร่งทางชีวเคมีชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญ และมีข้อได้เปรียบหลายอย่าง เมื่อเปรียบเทียบกับตัวเร่งหรือวิธีอื่นๆ คือ

1. การเปรียบเทียบทางเคมี เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับตังเร่งทางเคมีคือ สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะปกติ และใช้พลังงานต่ำ ปฏิกิริยามีความจำเพาะ และเกิดการเปลี่ยนแปลงในอัตราสูง ปัญหาการเกิดมลภาวะมีน้อย แต่เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสียบางประการคือ ต้องการสารประกอบเชิงซ้อนเช่น โคแฟคเตอร์ต่างๆ ในการเกิดปฏิกิริยา และมีความคงทนน้อยกว่าตัวเร่งทางเคมี

2. การเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระหรือเอนไซม์อิสระ เซลล์ที่ถูกตรึงได้เปรียบกว่าเซลล์อิสระหรือเอนไซม์สระคือ สามารถใช้เซลล์จำนวนมากๆศึกษาในถังปฏิกิริยาขนาดเล็กได้ ในการผลิตควบคุมปฏิกิริยาได้ง่าย สามารถแยกผลผลิตออกมาได้สะดวก และไม่มีปัญหาในการปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์อื่น เซลล์ที่ถูกตรึงมีความคงทนสูง สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ทำให้ลดต้นทุนการผลิตมาก แต่การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสียคือ เสียค่าใช้จ่ายในการตรึงเซลล์ และอาจสูญเสียความสามารถระหว่างการตรึงเซลล์ได้

3. การเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ถูกตรึง การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อได้เปรียบกว่าเอนไซม์ที่ถูกตรึง ในกรณีที่กระบวนการผลิตนั้นต้องใช้ระบบเอนไซม์หลายชนิด โคแฟคเตอร์ และสารพลังงานสูงอื่นๆ นอกจากนี้การใช้เซลล์ที่ถูกตรึงยังไม่ต้องใช้กระบวนการสกัด และทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์เป็นผลให้เอนไซม์ยังคงมีประสิทธิภาพสูง ทำให้ผลผลิตสูงขึ้น และยังเป็นการลดค่าใช้จ่ายอีกด้วย แต่การใช้จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงมีข้อเสียคือ เซลล์ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดที่สามารถผลิตสารที่ไม่ต้องการออกมายับยั้งผลผลิตได้ และเซลล์ที่ถูกตรึงยังถูกจำกัดการซึมผ่านเข้าออกของสับสเตรท และผลผลิตโดยที่ใช้เซลล์ตรึง นอกจากนี้ยังอาจพบการปนเปื้อนของผลผลิตจากตัวเซลล์หรือสารที่ถูกขับออกจากเซลล์ที่ถูกตรึง ในกรณีที่ เซลล์เกิดการย่อยสลายตัวเอง เนื่องจากเซลล์ถูกใช้เป็นเวลานาน หรือเซลล์รั่วไหล เนื่องจากเซลล์มีการเจริญเพิ่มจำนวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.24 การพิจารณาคัดเลือกสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์

เนื่องจากการเตรียมเซลล์ที่ถูกตรึงมีหลายวิธี ดังนั้นคุณสมบัติของสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์แต่ละวิธีจึงมีข้อแตกต่างกันไป แต่โดยทั่วไปแล้วปัจจัยที่สำคัญในการพิจารณาจะคล้ายคลึงกัน คือ คุณสมบัติทางกลไก (mechanical properties) คุณสมบัติทางฟิสิกส์ ความทนทานต่อสภาพแวดล้อมทางฟิสิกส์ สารเคมี และการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ ความชอบน้ำ (hydrophilicity) ความซึมซาบ (permeability) ราคาและการยอมรับ

สำหรับสารที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์โดยวิธีการห่อหุ้มนั้น Takata et al. (1977) ได้สรุปไว้ดังนี้

1. คุณสมบัติในการละลายควรจะทำการละลาย และผสมเซลล์ที่ได้มีความคงตัวอยู่ในสภาวะที่เป็นของเหลว

2. คุณสมบัติในการเกิดเจล สารผสมที่ได้ควรจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดเจลด้วยวิธีง่ายภายใต้สภาวะปกติ และไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์หรือเซลล์จุลินทรีย์

3. คุณสมบัติของเจล เจลที่ได้ควรจะมีความแข็งแรง และความคงตัวสูง ขนาดของรูที่อยู่ภายในเจลควรมีขนาดเล็กพอที่จะป้องกันการรั่วไหลของเซลล์ได้ แต่สับสเตรทและผลผลิตที่เกิดขึ้นสามารถซึมผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ

2.25 คุณสมบัติของเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึง

1. ความจำเพาะต่อองค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการผลิตเซลล์ที่ถูกตรึงควรมีความสามารถจำเพาะเจาะจงต่อองค์ประกอบของอาหารและผลผลิต ในกรณีองค์ประกอบของสารอาหารที่ใช้เลี้ยงมีโมเลกุลสูงความสามารถของเอนไซม์ที่ถูกตรึงมักจะต่ำลงด้วย

2. ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึง เมื่อเปรียบเทียบค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึงกับเซลล์อิสระ พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงอาจเปลี่ยนแปลงไปในทางด้านความเป็นกรด ความเป็นด่าง หรือไม่เปลี่ยนแปลงเลย

3. อุณหภูมิที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึง เซลล์ที่ถูกตรึงมักมีความคงตัวต่อความร้อนได้ดีกว่าเซลล์อิสระ ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมของเซลล์ที่ถูกตรึงจึงมักมีค่าสูงกว่าเซลล์อิสระ

อัลจิเนต เป็นสารสกัดที่ได้จากสาหร่ายสีน้ำตาล มีลักษณะทางเคมีเป็นโพลิเมอร์ร่วมของดีแมนนูโรเนท (D – mannuronate ; M) และ แอลกลูคูโรเนท (L – glucuronate ; G) เรซิดิวส์อัลจิเนตสามารถเกิดเจลได้เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีไอออนของโลหะโพลิวาเลนซ์เช่น อลูมิเนียม-ไอออน (Al^{3+}) และ แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) การตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนตทำได้โดยผสมเซลล์ลงในสารละลายโซเดียมอิลจิเนต แล้วหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ จะเกิดการก่อตัวเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจลของแคลเซียมอัลจิเนตขึ้น จะเกิดการก่อตัวเป็นเจลของแคลเซียมอัลจิเนตทันที และหลังจากนั้นควรแช่เจลไว้ในแคลเซียมคลอไรด์อีกอย่างน้อย 20 นาที เพื่อให้เกิดเจลอย่างสมบูรณ์ คุณสมบัติของเจลที่ได้จะขึ้นอยู่กับชนิด และปริมาณของอัลจิเนตที่ใช้ โดยอัลจิเนตที่มี จี – เรซิดิวซ์ (G – residuces) สูง จะทำให้เกิดเจลที่มีความแข็งแรงสูงด้วย นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กัลป์ชนิดและความเข้มข้นของไอออนโลหะ และปริมาณของเจลที่ใช้ด้วย

การใช้แคลเซียมอัลจิเนตมีข้อดีหลายประการคือ ทำได้ง่ายภายใต้สภาวะปกติ และยังรวดเร็ว ดังนั้นจึงนิยมใช้ในการตรึงเซลล์ที่มีชีวิต นอกจากนี้การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนตยังเป็นวิธีที่ปลอดภัย เนื่องจากอัลจิเนตเป็นสารไม่มีพิษ และยอมรับให้ใช้เป็นสารแต่งในอาหาร (food additive) มาเป็นเวลานานแล้ว และเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตยังสามารถแบ่งเซลล์ได้ภายในเจล ทำให้ความสามารถในการเป็นตัวเร่งยังมีอยู่นาน แต่เซลล์บางส่วนอาจหลุดรั่วออกนอกเจลได้ ทำให้เกิดการปนเปื้อนในผลผลิต และในบางสภาวะการใช้แคลเซียมอัลจิเนตอาจทำให้เกิดปัญหาได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีการเกิดคีเลตติ้ง (chealating agent) เช่น สารประกอบฟอสเฟต และอีดีทีเอ (EDTA : ethylene diamine tetraacetic acid) ซึ่งสามารถดึงแคลเซียมไอออนออกจากเจลได้ และธาตุที่มีประจุบวกบางชนิดเช่น แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) และโพแทสเซียมไอออน (K^{+}) ซึ่งสามารถเข้าไปแทนที่แคลเซียมไอออนได้ ทำให้เจลไม่คงตัวเกิดการละลายได้ อย่างไรก็ตามคุณสมบัติข้อนี้ของอัลจิเนต สามารถนำมาใช้ในการศึกษาการตรวจจับการเจริญของเซลล์ภายในเจลได้ สำหรับการแก้ไขปัญหาการละลายของเจล เมื่อมีสารคีเลติ้งทำได้โดยใช้สตรอนเชียม หรือแบเรียม แทนแคลเซียม จะทำให้เกิดเจลที่มีความคงตัวมากกว่า แต่จะไม่เป็นที่ยอมรับในกรณีที่ผลผลิตที่ได้เกี่ยวข้องกับการใช้ในอาหาร

ปัจจุบันแคลเซียมอัลจิเนตถูกนำมาใช้เป็นสารตัวนำในการตรึงเอนไซม์ เซลล์จุลินทรีย์ คลอโรพลาสต์ ไมโตคอนเดรีย และเนื้อเยื่อพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต นิยมใช้ศึกษาประสิทธิภาพของระบบเอนไซม์หลายชนิดในเซลล์กันมาก เช่น การย่อยสลายฟีนอล การผลิตแอลกอฮอล์ สารปฏิชีวนะ สเตอรอยด์ เป็นต้น

การตรึงเซลล์นั้นมีที่มาจากเทคนิคการตรึงเอนไซม์ แต่ทั้งนี้เพื่อที่จะเป็นการลดต้นทุนในส่วนของขั้นตอนการสกัดเอนไซม์ซึ่งจะต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูง จึงได้มีการดัดแปลงการตรึงเอนไซม์มาใช้กับการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ ตลอดจนการตรึงเซลล์สัตว์ และเซลล์พืชที่เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์

การตรึงเซลล์ที่เกิดขึ้นจากแนวความคิดของการสังเกตจากธรรมชาติ แล้วนำมาดัดแปลง เช่น พิจารณาการทำงานของจุลินทรีย์ในดิน แล้วนำมาดัดแปลงใช้ในการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังได้แนวความคิดจากกระบวนการใช้จุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมบางชนิดที่มีเซลล์ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จุลินทรีย์จับอยู่ที่ผิวของของแข็ง หรือสร้างเป็นแผ่นฟิล์มเช่น ในกระบวนการผลิตน้ำส้มสายชู การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เป็นต้น

ได้มีการอธิบายการตรึงเซลล์เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1966 (Mosbach and Mosbach) และหลังจากนั้นเป็นต้นมา งานวิจัยทางด้านนี้ได้มีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และประสบผลสำเร็จจนถึงระดับอุตสาหกรรม เมื่อเร็วๆนี้ แต่ความสำเร็จนี้ยังคงอยู่ในขอบเขตของเซลล์ที่มีปฏิกิริยาขั้นตอนเดียว เอนไซม์ที่พบในเซลล์ซึ่งประสบผลสำเร็จดังกล่าวได้แก่ อะมิโนเอไซเลส (amino acylase) เพนซิลลินเอไซเลส (penicillin acylase) กลูโคสไอโซเมอเรส (glucose isomerase) แอสพาร์เทส (aspartase) ฟูทาเรส (fumarase) แลคเทส (lactase)

แม้ว่าการตรึงเซลล์จะมีความซับซ้อนของปฏิกิริยาต่างๆดังกล่าวมาข้างต้นนี้ การประยุกต์ใช้เซลล์ตรึงเพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้ขยายขอบเขตอย่างกว้างขวางทางเทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnology)

ในหลายๆกรณีของการตรึงเซลล์ด้วยการดักจับ หรือการล้อมรอบจะทำให้เซลล์มีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมเช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง และความเข้มข้นของไอออนในสารละลายปฏิกิริยาได้ดีกว่าเซลล์อิสระ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ตรึงจะได้รับการปกป้องจากสารบางชนิดเช่น ออกซิเจน ไอออนของโลหะบางชนิด ได้ดีกว่าเซลล์อิสระแม้ว่าเซลล์ตรึงจะมีข้อได้เปรียบมากกว่าเซลล์อิสระ แต่ระบบเซลล์ตรึงยังคงมีข้อบกพร่อง 3 ประการดังนี้

1. การรักษาสภาพธรรมชาติให้คงตัว ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ตรึงจะไม่เจริญ และโดยธรรมชาติแล้วเซลล์ที่ไม่เจริญมักจะสูญเสียความสามารถในการทำงาน ดังนั้นในทางปฏิบัติต้องให้อาหารกับเซลล์ตลอดเวลา ทั้งนี้เพื่อทำให้เซลล์มีชีวิตอยู่ได้ และมีประสิทธิภาพในการทำงาน
2. เซลล์ตรึงจะมีปัญหาการแพร่กระจาย และการขนส่งสารละลายอาหารและสารผลิตภัณฑ์ผ่านสารพาหะที่ใช้ตรึง
3. สารละลายอาหาร และสารผลิตภัณฑ์อาจจะทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการขึ้นได้

2.26 เทคนิคการตรึงเซลล์โดยใช้วิธีการดักจับ

วิธีนี้จะเป็นการใช้สารอินทรีย์ที่พบในธรรมชาติเช่น คอลลาเจน เจลาติน อะกาโรส เคปปาร์คาราจีแนน อัลจิเนต ไคโตแซน เซลลูโลส หรือได้จากการสังเคราะห์เช่น โพลิเมอร์บางชนิด : โพลิอะคริลาไมด์ โพลิเมทาตริเลท โพลียูริเทน ซึ่งโพลิเมอร์เหล่านี้ อาจจะได้จากวิธีต่างๆได้แก่ การเชื่อมไขว้ โพลิเมอร์ไรเซชัน โพลิคอนเดนเซชัน

การตรึงเซลล์โดยใช้วิธีดักจับไว้ในสารพาหะที่มีลักษณะเป็นเม็ด สามารถทำได้หลายวิธีดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. เตรียมโพลิเมอร์ให้มีลักษณะเป็นแผ่น แล้วตัดให้มีขนาดเล็กลง วิธีนี้เป็นวิธีที่ทำได้ง่าย แต่จะได้ขนาดของเซลล์ตรึงที่ไม่สม่ำเสมอ ซึ่งทำให้สารละลายอาหารไหลผ่านไม่สะดวกเมื่อบรรจุเซลล์ตรึงลงในคอลัมน์

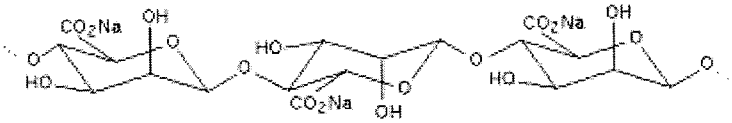
2. ใช้สารผสมของเซลล์กับโพลิเมอร์กดผ่านเข็มฉีดยาลงในสารละลายของเกลือ ซึ่งจะเป็นตัวทำให้โพลิเมอร์คงรูปอยู่ได้วิธีนี้จะทำให้เม็ดของเซลล์ตรึงมีขนาดสม่ำเสมอ แต่วิธีนี้จะไม่เหมาะสมสำหรับการเตรียมในปริมาณมาก และเหมาะที่จะใช้กับสารพาหะบางชนิดเท่านั้น สำหรับสารพาหะที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่ โซเดียมอัลจิเนต และ เคปปาร์ – คาราจีแนน

3. เตรียมโดยใช้ระบบสองเฟส (two – phase system) เซลล์ตรึงที่เตรียมโดยวิธีนี้จะมีลักษณะกลม และปล่อยให้สารละลายอาหารไหลผ่านไปโดยสะดวก นอกจากนี้ยังสามารถเตรียมเป็นจำนวนมากได้ด้วย

ปัญหาที่สำคัญของการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการดักจับคือ ข้อจำกัดในการแพร่กระจายของสารอาหาร โดยปกติเซลล์ตรึงจะได้รับสารอาหารน้อยกว่าเซลล์อิสระ ทั้งนี้เพราะเมื่อเซลล์ถูกจับไว้ด้วยสารพาหะจะทำให้สารอาหารซึมผ่านสารพาหะก่อนที่เซลล์จะได้รับสารอาหาร แต่ในการประยุกต์ใช้ในบางกรณีนั้น ข้อจำกัดนี้จะมีความสำคัญน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับประโยชน์ที่ได้รับจากเซลล์ตรึง ซึ่งจะป้องกันเซลล์จากการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมภายนอกเซลล์ ตัวอย่างเช่น การตรึงเซลล์ด้วยโพลิอะคริลาไมด์จะทำให้ปัญหาเรื่องข้อจำกัดในการแพร่กระจายลดลงได้ เพราะเจลชนิดนี้มีรูพรุนขนาดใหญ่ นอกจากนี้ปัญหาการซึมผ่านผนังเซลล์จะลดลงโดยการทำให้เซลล์แตก (autolysis) การทำให้เซลล์แห้ง หรือแช่เย็น โดยการใช้โทลูอีน หรือสารพวกเซอร์เฟคแทนท์ (surfactant) วิธีการเหล่านี้อาจทำให้เซลล์ตายแต่จะมีเอนไซม์ที่คงที่กัมมันตภาพอยู่

สำหรับโพลิเมอร์ธรรมชาติที่ใช้การตรึงเซลล์ด้วยการดักจับนั้นมีจำนวนมาก การทำให้โพลิเมอร์แต่ละชนิดมีลักษณะเป็นเจลนั้นมีหลายวิธี บางชนิดเป็นวิธีที่นุ่มนวล และทำให้เซลล์ที่ไม่ทนต่อสภาวะต่างๆ สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้หลังจากทำการตรึงเซลล์แล้ว

อัลจิเนตเป็นสารพาหะที่ใช้ดักจับเซลล์ได้ง่าย และสะดวก ดังนั้นในปัจจุบันจึงเป็นวิธีหนึ่งที่นำมาใช้กันมาก เมื่อพิจารณาจากจำนวนงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่จะพบว่า อัลจิเนตเป็นโพลิเมอร์ธรรมชาติที่ใช้กันมากที่สุด อัลจิเนตมีโครงสร้างภาพที่ 2.12



ภาพที่ 2.12 แสดงโครงสร้างของโซเดียมอัลจิเนต

ที่มา : ปิยะมาศ (2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มคาร์บอกซิลในแต่ละหน่วยย่อย (โมโนแซคคาไรด์) ที่จะไปยึดจับกับไอออนของโลหะบางชนิดเช่น แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) แบเรียมไอออน (Ba^{2+}) คอปเปอร์ไอออน (Cu^{2+}), อลูมิเนียมไอออน (Al^{3+})เป็นต้น ทำให้ได้เจลที่มีความเสถียร และการตรึงเซลล์โดยวิธีการดักจับได้ในสภาพที่ไม่รุนแรง เป็นผลให้เซลล์ส่วนมากไม่ตาย ลักษณะรูปร่างของเจลที่ผ่านขั้นตอนการตรึงเซลล์แล้วจะมีลักษณะเป็นเม็ดกลม ซึ่งเตรียมได้โดยการดูดสารละลายผสมของเซลล์ (ร้อยละ 1–2 โดยน้ำหนักเซลล์เปียก) กับโซเดียมอัลจิเนต (ร้อยละ 1–7 โดยน้ำหนัก) ผ่านเข็มฉีดยาแล้วรองรับหยดของสารผสมนี้ด้วยสารละลายของแคลเซียมคลอไรด์ (0.05 – 0.5 โมลาร์) ที่เย็น แล้วปล่อยให้เม็ดเจลอยู่ในสารละลายเป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ทั้งนี้เพื่อให้เม็ดเจลมีความแข็งแรงมากขึ้น เพราะแคลเซียมไอออนจะเข้าไปแทนที่โซเดียมไอออนของโซเดียมอัลจิเนต ความแข็งแรงของเม็ดเจลจะขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต อัตราส่วนของกรดแมนนูโรนิคและกรดกลูคูโรนิค ที่ผลต่อความเสถียรของเจล โดยถ้าหากมีกลูคูโรนิคจำนวนมากจะทำให้ได้เจลที่มีความเสถียรสูง

ข้อบกพร่องในการตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนตคือ เม็ดเจลที่ตรึงเซลล์จะละลายในสารละลายที่มีไอออนหรือ โมเลกุลที่สามารถจับกับแคลเซียมไอออนได้ อย่างเช่น ฟอสเฟตซิเตรท อีดีทีเอ เป็นต้น ในกรณีที่ความเข้มข้นของไอออนเหล่านี้ไม่สูงมาก จะทำให้เม็ดเจลคงรูปอยู่ได้ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน หรือใช้สารประกอบเอมีน (เช่น โพลิเอทิลีนอิมีน , โพลิโพรพิลีนอิมีน) และตามด้วยการเชื่อมไขว้โดยใช้กลูทาราลดีไฮด์ จากการตรึงเซลล์ยีสต์พบว่าเซลล์ตรึงที่ผ่านการเคลือบด้วยโพลีเอมีนและกลูทาราลดีไฮด์ จะผลิตเอธานอลได้ในปริมาณเท่ากับเซลล์ตรึงที่ไม่ผ่านการใช้สารทั้งสอง แต่เม็ดเจลในกรณีแรกจะมีความเสถียรโดยที่จะสามารถอยู่ในสารละลายฟอสเฟตได้เป็นเวลานาน

2.27 ความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์กับสารพาหะที่ใช้ในการตรึงเซลล์

1. พื้นที่ผิวของสารพาหะ และความจุของเซลล์

2. ผลกระทบจากสภาวะแวดล้อมรอบๆเซลล์ตรึง สภาวะแวดล้อมรอบๆ เซลล์ตรึงจะมีผลต่อการทำงานของเซลล์ ผลกระทบนี้อาจน้อยกว่ากรณีของเอนไซม์ตรึง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่เซลล์ตรึงผลิตเอนไซม์ ภายในเซลล์นั้นจะได้รับผลกระทบจากสภาพแวดล้อมรอบๆเซลล์น้อยมาก

ปกติเซลล์ตรึงจะมีความเสถียรสูงขึ้น และอายุยืนนานกว่าเซลล์อิสระ อย่างไรก็ตามจะมีตัวแปรอื่นๆที่ทำให้เซลล์ตรึงมีความเสถียรสูงขึ้นซึ่งได้แก่ ตัวยับยั้ง (inhibitor) ตัวทำละลายอินทรีย์ ความร้อน และกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.28 การนำเซลล์ตรึงไปประยุกต์ใช้งาน

1. การผลิตสารชีวโมเลกุล

จะเห็นว่าเซลล์ตรึงทำให้เกิดปฏิกิริยาต่างๆจำนวนมาก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารอินทรีย์และสับสเตรท ตามตารางที่ 2.10 ได้แสดงการสรุปการใช้เซลล์ตรึง ในอุตสาหกรรมที่รู้จักกันทั่วไป

นอกจากนี้เทคนิคการใช้เซลล์ยีสต์ตรึงยังสามารถใช้ได้กับกระบวนการผลิตแบบต่อเนื่องในระดับอุตสาหกรรมได้ด้วย เนื่องจากกระบวนการเตรียมเซลล์ตรึงจะไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์พิเศษอื่นๆในการตรึงเซลล์เข้ามาเพิ่มเติม โดยเม็ดเจลรูปทรงกลมจะได้จากการเติมสารผสมระหว่างเซลล์ยีสต์กับโซเดียมอัลจิเนต ลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์โดยใช้หัวฉีด (nozzle) ซึ่งถูกติดตั้งอยู่บริเวณส่วนบนของถังหมัก สารผสมดังกล่าวจะค่อยๆ ถูกปล่อยลงมายังสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ในถังหมักอย่างต่อเนื่อง จากนั้นหลังจากสิ้นสุดกระบวนการตรึงเซลล์แล้วอาหารเลี้ยงเชื้อหรือสับสเตรทก็จะถูกป้อนเข้าสู่ถังหมักเพื่อเริ่มต้นกระบวนการหมักครั้งต่อไป เนื่องจากสามารถถูกแยกออกจากน้ำหมักได้โดยง่าย

2. งานด้านวิเคราะห์

ปัจจุบันงานด้านวิเคราะห์จำนวนมากได้ให้ความสนใจในการประยุกต์ใช้เซลล์ตรึง ซึ่งมีทั้งที่ใช้ในรูปของอิเลคโทรด (ค่าความเป็นกรดด่าง ออกซิเจน แอมโมเนีย และคาร์บอนไดออกไซด์) และในรูปแบบเทอร์มิสเตอร์ (thermister)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.10 ตัวอย่างเซลล์ตรึงที่ใช้ในอุตสาหกรรม

จุลินทรีย์	วิธีตรึง	เอนไซม์ที่ใช้	แหล่งผลิต	แหล่งผลิต	เอกสารอ้างอิง
Actinoplanes missouriensis	ดักจับด้วยเจลาตินที่เชื่อมไขว้ด้วยกลูทาราลดีไฮด์	กลูโคสไอโวเมอเรส	กลูโคส เป็น ฟรุคโตส	Gist – Brocades Netherlands	Technical data sheet, Maxazyme®
Bacillus coagulans	เชื่อมไขว้ด้วยกลูทาราลดีไฮด์	กลูโคสไอโวเมอเรส	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	ดักจัยด้วยคาราจีแนน	ฟูมาเรส	ฟูมาเรส เป็น กรดมาลิค	Tanabe Seiyaku Co.Ltd. Japan	Chibata 1979
Escherichia coli	ดักจัยด้วยคาราจีแนน	แอสพาร์เทส	แอมโมเนียมฟูมาเรต เป็น กรดแอสพาร์ติก	Tanabe Seiyaku Co.Ltd. Japan	Chibata 1979
Escherichia coli	ดักจับด้วยโพลิอะครีลาไมด์	เพนิซิลลิน เอไซเลส	เพนิซิลลิน เป็น 6 – เอพีเอ	Tanabe Seiyaku Co.Ltd. Japan	Chibata et al. 1974b
Escherichia coli	ดักจับด้วยเจลาตินที่เชื่อมไขว้ด้สนกลูาราลดีไฮด์	เพนิซิลลิน เอไซเลส	เพนิซิลลิน เป็น 6 – เอพีเอ	Institute of Biotechemistry, Shang , China	Wang et al . 1982

ตารางที่ 2.10 (ต่อ)

จุลินทรีย์	วิธีตรึง	เอนไซม์ที่ใช้	แหล่งผลิต	แหล่งผลิต	เอกสารอ้างอิง
E . coli + *Psudomonas ducunhae*	ดักจับด้วยคาราจีแนน	แอสพาร์เตส + แอล – แอสพาร์เทส , บีตา - ดีคาร์บอกซิเลส	ฟูมาเรต เป็น แอล – อะละนิน	Tanabe Seiyaku Co.Ltd. Japan	Takamastu et al. 1982
Mortierella vinacea	เชื่อมไขว้ด้วยกลูทาราลดีไฮด์	บีตา – กาแลคโตซิเดส	สลาย ราฟฟิโนส	Great Western Sugar Co. USA	Stein Linden 1980
Proteus rettgeri	จับกับไกลซิดิลเมทาคริเลตและกลูทาราลดีไฮด์	เพนิซิลินเอไซเมส	เพนิซิลลิน เป็น 6 – เอพีเอ	Pfizer Inc . USA	Nelson 1976
Streptomyces albus	ใช้ความร้อนและเครื่องปฏิกรณ์ช่วยกรอง	กลูโคสไอโซเมอเรส	กลูโคส เป็น ฟรุคโตส	Clinton Corn Pro.Co. USA	Takasaki et al.1969
S. olivaceus	เชื่อมไขว้ด้วยกลูทาราลดีไฮด์	กลูโคสไอโซเมอเรส	กลูโคส เป็น ฟรุคโตส	Miles Laboratories Inc. USA	Technical data., Taka - Sweet™

ที่มา : พาณิณ และวริยา (2545)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ของ Shimasu รุ่น UV1610
2. ตู้อบลมร้อน (hot air oven) ของ Memmert Model 600
3. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ของ GALLENCAMP
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง Hermle Model Z383K
5. หม้อนึ่งอัดความดันไอ (autoclave) Harvey Model Hydroclave MC10
6. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง SHIMADZU LIBROR EB-4000H
7. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง Metter-toledo Model AG204
8. เครื่องอังน้ำอุ่น (water bath) Memmert
9. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง Dever Instrument Model 215
10. เครื่องปั่นน้ำผลไม้
11. ตู้เย็น SANYO
12. เครื่องแก้ว (ฟลาสก์ หลอดทดลอง กรวย ฯลฯ)
13. อุปกรณ์วัดปริมาตร (ปิเปตต์ ไมโครปิเปตต์ กระบอกตวง ฯลฯ)
14. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และ 4
15. ลวดเขี่ยเชื้อ
16. ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.2 เคมีภัณฑ์สำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ยีสต์สกัด (yeast extract)

มอลต์สกัด (malt extract)

เปปโตน (peptone)

ผงวุ้น (agar)

น้ำตาลกลูโคส (glucose)

น้ำตาลไซโลส (xylose)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 เคมีภัณฑ์สำหรับการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

กรดซัลฟิวริก (sulphuric acid)

3.4 เคมีภัณฑ์สำหรับการลดความเป็นพิษของไฮโดรไลเสท

แคลเซียมออกไซด์ (calcium oxide)

ผงถ่านกัมมันต์ (charcoal)

3.5 เคมีภัณฑ์สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสตามวิธีของ Somogyi Nelson ' s (1952)

คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต (copper sulphate pentahydrate; $CuSO_4.5H_2O$)

โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (sodium hydrogen phosphate; Na_2HPO_4)

โซเดียมโปแตสเซียสทาร์เทรต (sodium potassium tartrate)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide; NaOH)

โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส (sodium sulphate anhydrous; $NaSO_4$)

แอมโมเนียมโมลิบเดต (ammonium molybdate; $(NH_4)_6 Mo_7O_2.4H_2O$)

ไดโซเดียมอาร์ซีเนต (disodium acenate; $Na_2HAsO_4.H_2O$)

3.6 เคมีภัณฑ์สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลไซโลสตามวิธีของ Deschatelets and Yu (1986)

ไทโอยูเรีย (thiourea)

กรดแอซีติก (acetic acid)

4-โบรโมแอนิลีน (4-bromoaniline)

3.7 เคมีภัณฑ์สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลตามวิธีของ Alder and Gustafsson (1980)

โซเดียมเมตาเพอริโอเดต (sodium metaperiodate; $NaIO_4$)

กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid)

แอมโมเนียมแอซีเตต (ammonium acetate)

กรดแอซีติก (acetic acid)

บิวเทน-2,3-ไดออล (butane-2,3-diol)

เพนเทน-2,4-ไดโอน (pentane-2,4-dione)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.8 วัตถุดิบ

ฟางข้าวสามารถเตรียมได้โดยนำฟางข้าวมาตัดเป็นท่อนสั้นๆยาวประมาณ1 เซนติเมตร แล้วนำมาปั่นด้วยเครื่องปั่นน้ำผลไม้เพื่อให้มีขนาดเล็กลง จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วเก็บใส่ถุงปิดผนึกเพื่อเก็บไว้ใช้ศึกษาต่อไป

3.9 เชื้อจุลินทรีย์ในการวิจัย

Candida tropicalis TISTR 5045 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.9.1 การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ในการวิจัย

ใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (loop) เขี่ยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ประมาณ 1 ลูป นำมาลากลงบนอาหารแข็งเพื่อการเก็บรักษาเชื้อ (ภาคผนวก ก) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปิดด้วยพาราฟิล์มและนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยจะต้องทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

3.9.2 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับเซลล์อิสระ

ถ่ายเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเพื่อการเจริญเติบโต (ภาคผนวก ก.) ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ประมาณ 1-2 ลูป โดยจะต้องทำด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ แล้วนำไปเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.5

3.9.3 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับเซลล์ตรึงที่ถูกห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

3.9.3.1 ทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหารแข็งเพื่อการเก็บรักษาเชื้อภายใต้สภาวะที่ปลอดเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง

3.9.3.2 ถ่ายเชื้อที่ได้จากข้อ 1 ลงในอาหารสำหรับการเจริญปริมาตร 300 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลานานประมาณ 6 ชั่วโมง จนกระทั่งค่าการดูดกลืนแสงของสารแขวนลอยของเซลล์มีค่าอยู่ในช่วง 0.5

3.9.3.3 ดูดสารละลายของเซลล์ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงปริมาตรหลอดละ 10 มิลลิลิตรโดยปริมาณหัวเชื้อที่ใช้คิดเป็นร้อยละ 10 ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9.3.4 นำสารละลายของเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที แล้วเทส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อออก ล้างตะกอนเซลล์แขวนลอยด้วยสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยล้างเซลล์ทั้งหมด 2 ครั้ง แล้วจึงเทสารละลายน้ำเกลือทิ้งไป

3.9.3.5 เติมสารละลายน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงที่มีตะกอนเซลล์ แล้วเทผสมลงในสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ความเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นใช้แท่งแก้วคนที่ฆ่าเชื้อแล้วคนสารละลายทั้งสองให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน นานประมาณ 10 นาที แล้วตั้งทิ้งไว้นานประมาณ 30 นาที เพื่อให้ฟองอากาศที่อาจมีอยู่ในสารละลายออกไป

3.9.3.6 เทสารละลายโซเดียมอัลจิเนตที่ผสมเข้ากันดีแล้วกับสารละลายเซลล์ลงในหลอดฉีดยาขนาด 25 มิลลิลิตร แล้วหยดสารละลายผสมลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ด้วยอัตราเร็วคงที่ เพื่อทำให้เกิดเม็ดเจลที่มีขนาดเท่ากันทุกเม็ด จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานอย่างน้อย 2 ชั่วโมง เพื่อให้เม็ดเจลมีความคงตัวมากขึ้น

3.9.3.7 ล้างเม็ดเจลที่ได้ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง ปริมาตรครั้งละ 50 มิลลิลิตร เทน้ำกลั่นที่ใช้ล้างเม็ดเจลออกก็จะได้เม็ดเจลที่พร้อมจะนำไปใช้ในการผลิตน้ำตาลไซลิทอลต่อไป

3.10 การเตรียมอาหารไฮโดรไลเสทจากฟางข้าวเพื่อเลี้ยงและผลิตน้ำตาลไซลิทอลของเชื้อจุลินทรีย์ *Candida tropicalis* TISTR 5045

การเตรียมอาหารไฮโดรไลเสทจากฟางข้าวเพื่อเลี้ยงและผลิตน้ำตาลไซลิทอล ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการย่อยสลายฟางข้าวและการลดความเป็นพิษของไฮโดรไลเสท ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

3.10.1 การเตรียมไฮโดรไลเสทจากการย่อยสลายฟางข้าว (hydrolysis) สามารถทำได้โดย

1). นำฟางข้าวจากข้อ 3.8 มาแช่ในสารละลายกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 0.5 โมลต่อลิตร ในอัตราส่วนฟางข้าวต่อปริมาตรสารละลายกรด เป็น 1 กรัมต่อ 10 มิลลิลิตรเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2). นำไปย่อยสลายที่อุณหภูมิ 126 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 90 นาที แล้วทำให้เย็นลง

3). กรองไฮโดรไลเสทที่ได้โดยเอาเฉพาะส่วนใสเท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.10.2 การลดความเป็นพิษของไฮโดรไลเสท ซึ่งจะมี 2 ขั้นตอน คือ

3.10.2.1 การลดปริมาณสารพิษโดยวิธีโอเวอร์ไลมิง (overliming) สามารถทำได้โดย

1). นำไฮโดรไลเสทที่เตรียมได้จากฟางข้าวมาปรับค่าความเป็นกรดด่างจนได้เป็น 10.5 ด้วยแคลเซียมออกไซด์ (CaO) ขั้นตอนนี้จะมีการกวนอยู่ตลอดเวลาเพื่อให้แคลเซียมออกไซด์แตกตัว (โดยค่อยๆเติมแคลเซียมออกไซด์ลงไปในไฮโดรไลเสททีละน้อย เนื่องจากแคลเซียมออกไซด์แตกตัวได้ค่อนข้างช้า)

2). เมื่อไฮโดรไลเสทมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 10.5 แล้วก็ทำการแยกตะกอนของแคลเซียมออกไซด์ออกโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

3). จากนั้นนำไฮโดรไลเสทที่ได้มาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ลดลงเหลือ 4 โดยใช้สารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 13 โมลต่อลิตร

4). นำไฮโดรไลเสทที่ผ่านการปรับค่าความเป็นกรดด่างแล้วมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 โดยใช้เครื่องกรองสุญญากาศ

5). นำไฮโดรไลเสทที่ได้มาทำการลดความเป็นพิษด้วยผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) ต่อไป

3.10.2.2 การลดปริมาณสารพิษโดยการดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์

1). เติมผงถ่านกัมมันต์ (ภาคผนวก ข.) ลงในไฮโดรไลเสท ในอัตราส่วนผงถ่านกัมมันต์ต่อปริมาตรไฮโดรไลเสทเท่ากับ 1 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

2). ทำการกวนไฮโดรไลเสทที่มีผงถ่านกัมมันต์อยู่เป็นเวลา1ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

3). เมื่อครบเวลา 1 ชั่วโมงแล้วตั้งทิ้งไว้เป็นเวลานานประมาณ 10-15 นาทีแล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 โดยใช้เครื่องกรองสุญญากาศ

4). นำไฮโดรไลเสทที่ได้มาเติมสารอาหาร ประกอบด้วย

เปปโตน	4 กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด	4 กรัมต่อลิตร
มอลท์สกัด	3 กรัมต่อลิตร

5). นำอาหารไฮโดรไลเสทที่เติมสารอาหารแล้วมาปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 4 ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ

6). นำอาหารไฮโดรไลเสทที่ได้บรรจุใส่ฟลาสก์แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.11 การศึกษาอัตราการเจริญของ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในอาหารไฮโดรไลเสทจากฟางข้าว

เลี้ยงเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในอาหารไฮโดรไลเสทจากฟางข้าว โดยนำไฮโดรไลเสทที่ผ่านการลดความเป็นพิษด้วยวิธีโอเวอร์ไลมิงและการดูดซับด้วยผงถ่านกัมมันต์แล้วมาเติมยีสต์สกัด มอลต์สกัดและเปปโตน ความเข้มข้น 4 3 และ4 กรัมต่อไฮโดรไลเสท 1 ลิตร ตามลำดับ ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 4 แล้วแบ่งใส่ฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรฟลาสก์ละ 180 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที จากนั้น เติมหัวเชื้อเริ่มต้นจากข้อ 3.9.1 ลงไปโดยปริมาตรคิดเป็นร้อยละ10 ของปริมาตรอาหารทั้งหมด แล้วนำไปเลี้ยงในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 3 ชั่วโมง จบครบ 36 ชั่วโมง แล้วเก็บต่อทุกๆ 6 ชั่วโมง จนกระทั่งครบ 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างน้ำหมักที่เก็บได้มาวัดอัตราการเจริญของเชื้อ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเป็นกรดด่าง น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลส

3.12 การศึกษาการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของ *Candida tropicalis* TISTR 50455 ในอาหารไฮโดรไลเสทจากฟางข้าวในสภาวะเซลล์อิสระ

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.11 แต่จะเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมงจนกระทั่งครบ 90 ชั่วโมง และลดความเร็วของเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิลงให้เหลือ 120 รอบต่อนาทีเมื่อเชื้อเริ่มเจริญเข้าสู่ระยะกึ่งกลางของการเจริญสูงสุด (mid log pahse)

3.13 การศึกษาการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในอาหารไฮโดรไลเสทจากฟางข้าวในสภาวะเซลล์ตรึงที่ถูกห่อหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับข้อ 3.12 แต่จะใช้เชื้อในการผลิตซึ่งอยู่ในรูปของเซลล์ตรึงที่ถูกห่อหุ้มไว้ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต และจะเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมงจนกระทั่งครบ 90 ชั่วโมง โดยลดความเร็วของเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิลงให้เหลือ 120 รอบต่อนาทีเมื่อเชื้อเริ่มเจริญเข้าสู่ระยะกึ่งกลางของการเจริญสูงสุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในอาหารไฮโดรไลเสทที่ได้จากฟางข้าว

ผลการศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในอาหารไฮโดรไลเสทที่ได้จากฟางข้าว โดยนำมาเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้ในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง ต่อเนื่องจนครบ 72 ชั่วโมง วัดอัตราการเจริญของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พบว่าเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 จะมี อัตราการเจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 12.47 และมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 8.05 กรัมต่อลิตร โดยใช้น้ำตาลกลูโคสไป 18.243 กรัมต่อลิตร และใช้น้ำตาลไซโลสไป 5.581 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และ ภาพที่ 4.1

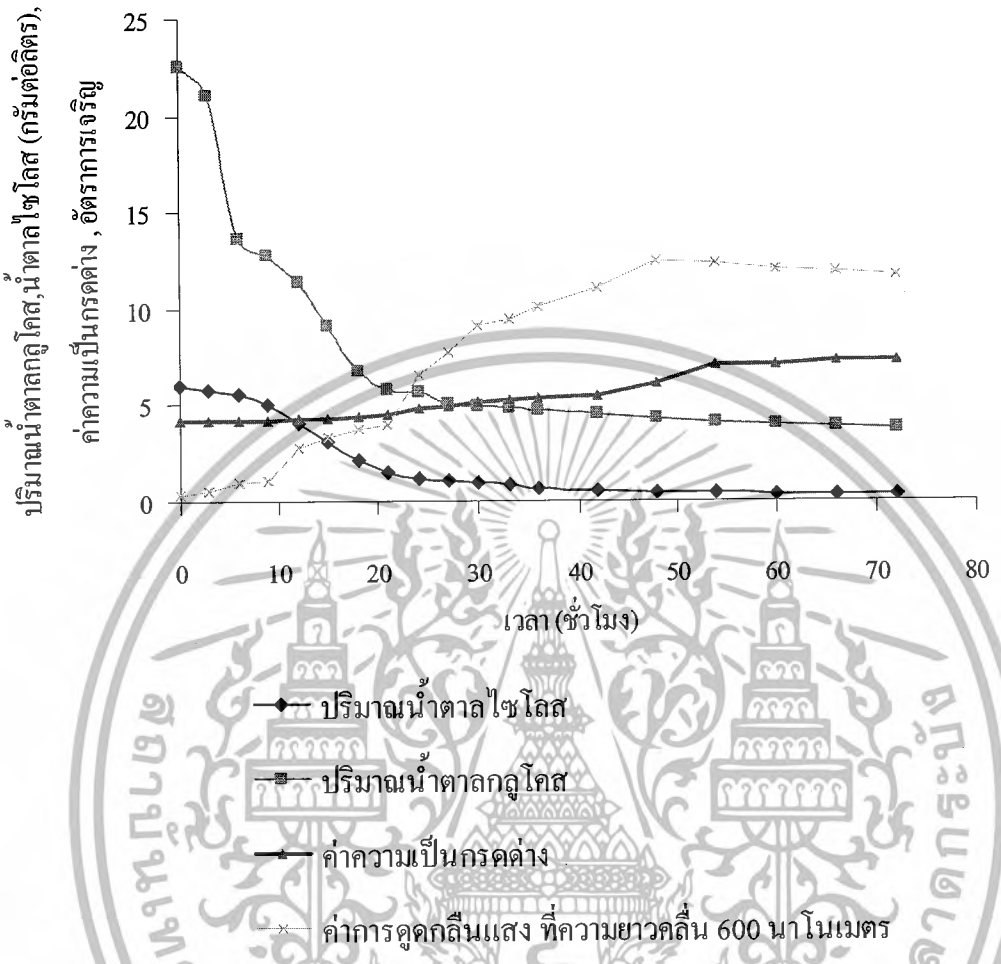
แต่หลังจากชั่วโมงที่ 48 ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้และค่าน้ำหนักเซลล์แห้งจะลดลงเรื่อยๆ โดยที่เชื้อก็ยังคงมีการใช้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส แต่ใช้ในปริมาณที่น้อย ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อยีสต์เจริญเข้าสู่ระยะ dead phase ดังนั้นก็จะมีเชื้อยีสต์บางส่วนตาย ซึ่งเชื้อยีสต์ที่ตายก็จะเกิดการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) ในขณะที่เชื้อยีสต์บางส่วนที่ยังมีชีวิตอยู่ก็จะมีการเจริญต่อไป โดยมีการใช้น้ำตาลทั้ง 2 ชนิดเพื่อการเจริญเติบโต และอาจจะมีการกินชิ้นส่วนของเชื้อยีสต์ที่ตายแล้ว จึงเป็นเหตุที่ทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่วัดได้ลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส ค่าความเป็นกรดด่าง น้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากการศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในอาหารไฮโดรไลเสทที่ได้จากฟางข้าว

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ค่าความเป็นกรดด่าง	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลไซโลส (กรัมต่อลิตร)
0	0.271	0.500	4.14	22.531	6.019
3	0.517	0.800	4.15	20.981	5.800
6	0.924	0.900	4.17	13.596	5.606
9	1.050	1.110	4.21	12.787	5.062
12	2.835	1.800	4.29	11.335	4.056
15	3.310	2.200	4.35	9.124	3.107
18	3.720	2.300	4.44	6.742	2.141
21	3.988	2.800	4.50	5.765	1.509
24	6.505	5.900	4.82	5.645	1.209
27	7.778	6.350	4.93	5.002	1.063
30	9.120	6.880	5.14	4.941	0.921
33	9.460	7.040	5.21	4.836	0.893
36	10.060	7.100	5.33	4.675	0.617
42	11.000	7.140	5.44	4.462	0.560
48	12.470	8.050	6.07	4.288	0.438
54	12.330	7.950	7.04	4.063	0.414
60	12.000	7.780	7.12	3.975	0.357
66	11.960	7.680	7.25	3.915	0.340
72	11.730	7.500	7.29	3.758	0.300

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ขณะทำการเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ในอาหารไฮโดรไลเสทที่ได้จากฟางข้าว

4.2 การศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตน้ำตาลไซลิทอลระหว่างเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระ และเซลล์ตรึงในอาหารไฮโดรไลเสทที่ได้จากฟางข้าว

จากการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตน้ำตาลไซลิทอลระหว่างเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงในอาหารไฮโดรไลเสทที่ได้จากฟางข้าวที่มีปริมาณน้ำตาลไซโลสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12

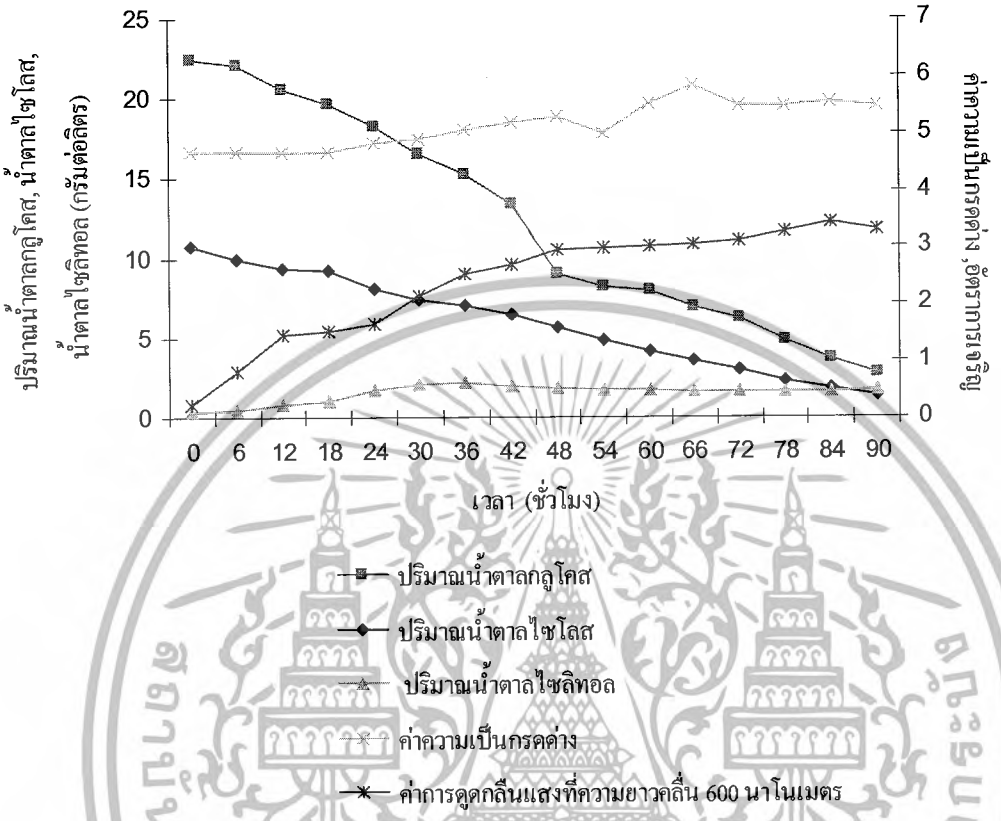
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการลดความเร็วลงเหลือ 120 รอบต่อนาที เพื่อเป็นการจำกัดการให้ออกซิเจน ในระหว่างทำการเพาะเลี้ยงจะทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 90 ชั่วโมง เพื่อนำมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลไซลิทอล น้ำตาลไซโลส น้ำตาลกลูโคส ค่าความเป็นกรดด่าง และอัตราการเจริญ จากผลการศึกษาพบว่าเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระสามารถผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้ปริมาณสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 36 ซึ่งเท่ากับ 2.162 กรัมต่อลิตร โดยใช้น้ำตาลไซโลสไป 3.682 กรัมต่อลิตร (คิดเป็นร้อยละ 34.207) คิดเป็นผลได้เท่ากับ 0.5872 กรัมน้ำตาลไซลิทอลต่อกรัมน้ำตาลไซโลส ดังตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลไซลิทอล ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากการศึกษาการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระในอาหารไฮโดรไลเสทที่ได้จากฟางข้าวที่มีปริมาณน้ำตาลไซโลสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร	ค่าความเป็นกรดด่าง	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
0	0.217	4.66	22.461	10.764	0.400
6	0.818	4.68	22.064	9.929	0.463
12	1.443	4.67	20.580	9.418	0.827
18	1.534	4.68	19.679	9.289	0.992
24	1.653	4.83	18.308	8.104	1.746
30	2.145	4.89	16.589	7.382	2.006
36	2.526	5.06	15.240	7.082	2.162
42	2.687	5.19	13.460	6.482	1.969
48	2.958	5.27	9.038	5.618	1.901
54	2.983	5.00	8.199	4.811	1.788
60	3.018	5.51	7.955	4.210	1.758
66	3.058	5.82	6.949	3.545	1.955
72	3.113	5.48	6.205	3.062	1.616
78	3.283	5.47	4.910	2.259	1.578
84	3.425	5.54	3.756	1.854	1.569
90	3.315	5.48	2.814	1.343	1.693

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลไซลิทอล ค่าความเป็นกรดด่าง และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากการศึกษาการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระในอาหารไฮโดรไลเสทที่ได้จากฟางข้าวที่มีปริมาณน้ำตาลไซโลสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร

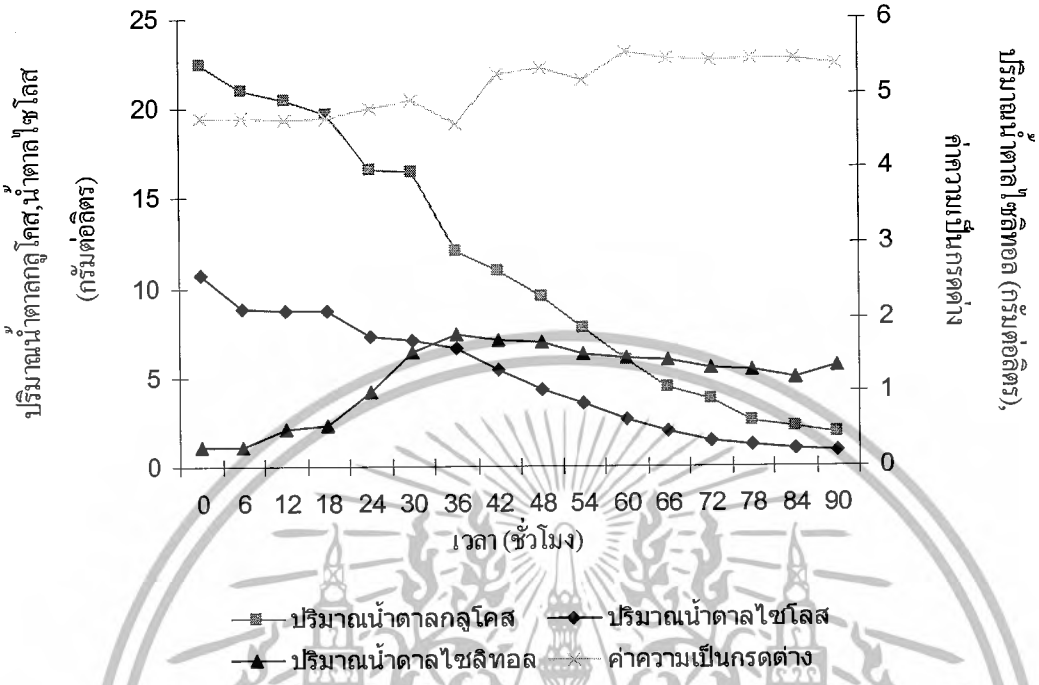
ผลจากการศึกษาการผลิตน้ำตาลไซลิทอลในอาหารไฮโดรไลสทที่ได้จากฟางข้าวเมื่อใช้เชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่อยู่ในรูปเซลล์ตรึง โดยทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะเดียวกับเซลล์อิสระ พบว่าสามารถผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้ปริมาณสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 36 ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 1.766 กรัมต่อลิตร โดยใช้น้ำตาลไซโลสไปเท่ากับ 4.164 กรัมต่อลิตร (คิดเป็นร้อยละ 38.627) คิดเป็นผลได้เท่ากับ 0.4241 กรัมน้ำตาลไซลิทอลต่อกรัมน้ำตาลไซโลส ดังตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลไซลิทอล และค่าความเป็นกรดด่าง จากการศึกษาการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่อยู่ในรูปเซลล์ตรึงในอาหารไฮโดรไลเสทที่ได้จากฟางข้าวที่มีปริมาณน้ำตาลไซโลสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรดด่าง	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
0	4.66	22.500	10.780	0.259
6	4.66	20.987	8.3826	0.276
12	4.65	20.462	8.705	0.510
18	4.66	19.744	8.688	0.561
24	4.81	16.615	7.248	1.001
30	4.90	16.461	7.074	1.553
36	4.60	12.006	6.616	1.766
42	5.25	10.949	5.403	1.705
48	5.34	9.506	4.348	1.683
54	5.19	7.789	3.561	1.505
60	5.54	5.962	2.641	1.462
66	5.46	4.455	1.967	1.431
72	5.44	3.756	1.412	1.323
78	5.48	2.512	1.164	1.306
84	5.48	2.231	0.941	1.204
90	5.38	1.904	0.860	1.355

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลไซลิทอล และค่าความเป็นกรดด่าง จากการศึกษาการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่อยู่ในรูปเซลล์ตรึงในอาหารไฮโดรไลเสทที่มีปริมาณน้ำตาลไซโลส 10 กรัมต่อลิตร

แต่หลังจากชั่วโมงที่ 36 ทั้งเซลล์อิสระและเซลล์ตรึงน้ำตาลไซลิทอลที่ผลิตได้จะลดลงเรื่อยๆ ซึ่งการที่ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลที่วัดได้ลดลง อาจเป็นเพราะว่าน้ำตาลไซลิทอลที่ผลิตได้เกิดการเปลี่ยนกลับไปเป็นน้ำตาลไซโลส เนื่องจากในวิถีการเกิดน้ำตาลไซลิทอลจากเมตาบอลิซึมของยีสต์ เป็นวิถีที่สามารถผันกลับได้ ถ้ามีเอนไซม์ โคเอนไซม์ และมีสภาวะที่เหมาะสม

จากผลการศึกษาถึงความสามารถในการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของเชื้อ *Candida tropcalis* TISTR 5045 ที่อยู่ในรูปของเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง ในอาหารไฮโดรไลเสทที่ได้จากฟางข้าวที่มีปริมาณน้ำตาลไซโลสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อที่อยู่ในรูปของเซลล์อิสระให้ผลผลิตของน้ำตาลไซลิทอลสูงสุดเท่ากับ 0.5872 กรัมน้ำตาลไซลิทอลต่อกรัมน้ำตาลไซโลส ส่วนเชื้อที่อยู่ในรูปเซลล์ตรึงจะให้ผลผลิตน้ำตาลไซลิทอลสูงสุดเท่ากับ 0.4241 กรัมน้ำตาลไซลิทอลต่อกรัมน้ำตาลไซโลส ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง โดยใช้อาหารไฮโดรไลเสทที่ได้จากฟางข้าว พบว่าเมื่อทำการศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 โดยทำการเลี้ยงในสภาวะที่มีการเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 จะมีอัตราการเจริญสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 โดยมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 12.47 และมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 8.05 กรัมต่อลิตร โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 18.243 กรัมต่อลิตร และใช้น้ำตาลไซโลส 5.581 กรัมต่อลิตร และเมื่อทำการศึกษาความสามารถในการผลิตน้ำตาลไซลิทอลของเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 โดยทำการเลี้ยงในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีการเขย่าเพื่อให้อากาศที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะทำการลดความเร็วลงเหลือ 120 รอบต่อนาที จนครบ 90 ชั่วโมง พบว่าเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ที่อยู่ในรูปเซลล์อิสระสามารถผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้ปริมาณที่สูงกว่าเซลล์ตรึง โดยเซลล์อิสระจะให้ผลผลิตของน้ำตาลไซลิทอลสูงสุดเท่ากับ 2.162 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้เท่ากับ 0.5872 กรัมน้ำตาลไซลิทอลต่อกรัมน้ำตาลไซโลส โดยใช้น้ำตาลไซโลส 3.682 กรัมต่อลิตร (คิดเป็นร้อยละ 34.207) ส่วนเซลล์ตรึงให้ผลผลิตของน้ำตาลไซลิทอลสูงสุดเท่ากับ 1.766 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้เท่ากับ 0.4241 กรัมน้ำตาลไซลิทอลต่อกรัมน้ำตาลไซโลส โดยใช้น้ำตาลไซโลส 4.164 กรัมต่อลิตร (คิดเป็นร้อยละ 38.627)

ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองที่ได้ ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลที่ผลิตได้จากเซลล์อิสระจะสูงกว่าที่ได้จากเซลล์ตรึง แต่ถ้าจะนำไปทำการผลิตในระดับอุตสาหกรรมเพื่อเชิงพาณิชย์ การผลิตโดยใช้เซลล์อิสระอาจไม่ดีเท่ากับการใช้เซลล์ตรึงเมื่อพิจารณาในด้านต่างๆ คือ 1. ต้นทุนการผลิต เนื่องจากเซลล์ตรึงสามารถนำกลับมาใช้ได้ใหม่อีก 2. การเก็บเกี่ยวผลผลิตสามารถทำได้ง่ายกว่า ซึ่งทำให้ลดต้นทุนในการเก็บเกี่ยว 3. ปริมาณน้ำตาลไซลิทอล ในการผลิตครั้งแรกปริมาณน้ำตาลไซลิทอลที่ผลิตได้จากเซลล์อิสระสามารถผลิตได้ในปริมาณที่สูงกว่าเซลล์ตรึงก็จริง แต่เมื่อนำเอาเซลล์กลับมาใช้ใหม่เป็นครั้งที่ 2 จะพบว่าเซลล์ตรึงจะสามารถผลิตน้ำตาลไซลิทอลได้สูงขึ้นกว่าครั้งแรกและสูงกว่าเซลล์อิสระ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นรินทร์ เรืองพานิชย์ . 2541 . “ผลของกลูโคสต่อการผลิตไซลิทอลจากไซโลสภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจน” เทคนิคิวิจัย ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พงศธร กิมเฮง . 2547. “ สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อผลิตน้ำตาลไซลิทอลโดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พาณิณ ออมทวีพูนทรัพย์ และ วริยา ทองประสพ . 2545. การผลิตน้ำตาลไซลิทอลด้วยเชื้อ *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155 โดยวิธีการตรึงเซลล์ . **โครงงานพิเศษปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต** คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

วิเชียร สีสุข. 2532. “การย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยเอนไซม์จาก *Aspergillus fumigatus* fresenius รหัส 4-45-1F” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต คณะอุตสาหกรรมเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

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

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล. 2537. “ไซลิทอล.” วารสารจาร์พา. 11 : 18 – 21 .

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล. 2537. “ไซลิทอล.” วารสารจาร์พา. 11 : 23 – 32 .

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล. 2537. “ไซลิทอล.” วารสารอุตสารอุตสาหกรรมเกษตร. 5(3) : 13 – 27.

Adams, G.A. 1965. “Xylan : Arabinoglucuronoxylan, Arabinoxylan and Xylan : Purification Using a Copper Complex and Purification by Precipitation of Acetales.” **Method in Carbohydrate Chemistry.** 5 : 170 – 175.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Alder, L. and Gustafsson, L. 1980. "Polyhydric Alcohol Production and Intracellular Amino Acid Pool in Relation to Halotolerance of the Yeast *Debaryomyces hansenii*." **Arch. Microbiol.** 124 : 123 – 130.

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

Aspinal, G.O. 1959. "Structural Chemistry of Hemicellulose" **Adv. Carbohygr.Chem. Biochem.** 14 : 429-468.

Aspinal, G.O. 1959. " The Degradation of Xylan by Alkai." **J.Chem. Soc.**3,667-3,674.

Aspinal, G.O. and McKay, J.E. 1959. " The Hemicellulose of European Larch (*Laric deciduas*), The Constitution of a Xylan. "**J. Chem. Soc. I.** 1,059-1,066.

Avgerinos, G.C. and Wang, D.I.C. 1983. "Selective Solvent Delignification for Fermentation Enhancement." **Biotech. Bioeng.** 25 : 67-83.

Biely, P. 1985. "Microbial Xylanolytic System." **Trend in Biotechnol.** 3 : 286-290.

Bisaria, B.S. 1991. "Bioprocess of Agro-Residues to Glucose and Chemicals." 187-223. in Martin, A.M. **Bioconversion of Waste Material to Industrial to Products.** London : Elservier. Appl. Science.

Baber, S. and C. Benedito de Barder. 1974. "Basic and Applied Reasearch Needs for Optimizing Utilization of Rice Bran as Food and Feed." Proceedings of the Rice By-Product Utilization International Conference. **Institute of Agrochemistry and Food Technology.** Valencia. 4 : 1-99.

Chiang, C. and Knight, S.G. 1960. "Metabolism of D-Xylose by Molds." **Nature.** 188 : 79-81.

Cowling, E.B. and Kirk, T.K. 1976. "Properties of Cellulose and Lignocellulose Material as Substrate for Enzymatic Conversion Process." **Biotech. Bioeng. Symp.** 6 : 95-123.

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

Du Prezz, J.C. 19940. "Process Parameters and Environmental Factors Affecting D-Xylose Fermentation by Yeastd." **Enzyme Microb. Technol.** 16 : 944-956.

Dutton, G.G.S. and Smith, F. 1956. "The Constitution of the Hemicellulose of Western Hemlocks (*Tsuga helerophyla*) II. Hydrolysis of the Methylated Hemicellulose." **J. Amer. Chem. Soc.** 78 : 3,477-3,748.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Emodi, A. 1982. "Xylose : It's Properties and Food Applications." **Food Technol.** Jan : 28-32.

Evan, C.I. and Ratledge. C. 1984. "Introduction of Xylose-5-hosphate phosphoketolase in a Variety of Yeast Grown on D-Xylose : The key of Efficient Xylose Metabolism." **Arch. Microbial.** 139 : 48-52.

Evan, C. 1987. "Lignin Degradation." **Process Biochem.** 22(4) : 102-105.

Fiechter, A.1986. "Biodegradation of Lignocellulose Material. Microbial Utilization of Renewable Resources." **Biotech. Bioeng.** 28 : 283-290.

Goldschmid, H. and Perlin, A.S. 1963. "Interbranch Sequences in the Wheat Arabino Xylan, Selective Emzymolysis Studies." **Canadian Journal of Chemistry.** 41 : 2,272-2,277.

Hollmann, S. and Touster, O. 1975. "L-Xylose-Xylitol Enzyme and Other Polyoldehydrogenase of Guinea Pig Liver Mitochondria." **J. Biol. Chem.** 225 : 87-102.

Jackson, M.G. 1977. "The Alkali Treatment of Straws." **Animal Feed Science and Technol.** 2(2) : 105-130.

Jayme, G. and Satree, M. 1942. "Oxidation of Xylan with Periodic Acid I. Use of Buttered Periodic Acid." **Berichte der Deulschen Gesellschaft 75B.** 1,840-1,850.

Kirk, K. 1983. "Degradation and Conversion of Lignocellulose." 226-295. in Smith et. al. **The Filamentous Fungi. Fungal Technology.** New York : John Wiley and Sons Inc.

Kuhad, R.C. 1999. "Lignocellulose biotechnology : Current and future prospects." **Critical Rev. in Biotechnol.** 13 : 151-172.

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

Leathers, T.D. and Gupta, S.C. 1997. Xylitol and Riboflavin Accumulation in Xylose-Grown Culture of *Pichia guilliermindii.*" **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 47 : 58-61.

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

Marsden, W.L. and Gray P.P. 1986. "Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Lignocellulosic Material." **Crittical Review in Biotech.** 3(3) : 135-176.

Nigam, P. and Singh, D. 1995. "Process for Fermentative Production of Xylitol a Sugar Substitute." **J. Pro. Biochem.** 30 : 117-124.

Norkran, B. 1967. "Cellulose and Cellulosis." **Adv. Appl. Microbiol.** 9 : 91-130.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ojamo, H. 1994. "Yeast Xylose Metabolism and Xilitol Production." **PhD thesis**, Helsinki University of Technology. Finland.

Palnitkar, S.S. and Lachke, A.H. 1990. "Efficient Simultaneous Saccharification and Fermentation of Agricultural Residues by *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae*. The D-Xylose Fermenting Yeast." **Appl. Biochem. Biotechnol.** 36 : 2,151-2,158.

Roudier, A. 1958. "Composition of Hemicelluloses." **Bulletin Association Technique de Industrie Papetiere.** 4 : 99-121.

Schulze, E. 1891. "In Formation Regarding Chemical Composition of Plant Cell Membrane." **Berichte der Deutschen Chemischem Gesellschaft.** 24 : 2,277-2,287.

S. G. Baldursdóttir, B. Nyström, A.-L. Kjøniksen, J. Roots, H. H. Tønnesen, and J. Karlsen Riboflavin-Sensitized Photochemical Changes in Aqueous Solutions of Alginate. Rheological Studies. **Biomacromolecules.** 4, 429 (2003).

Silva, S.S and Afschar, A.S. 1994. "Microbial Production of Xylitol from D-Xylose Using *Candida tropicalis*." **Biotechnol. Lett.** 3 : 89-92.

Sirisansaneeyakul, S. 1992. "Microbial Production of Xylitol from Wheat Straw Hydrolysates." **DECHEMA Biotechnology cenference** vol. 5(B) : 541-544.

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

Sjostrom, F. 1981. **Wood Chemistry (Fundamentals and Application).** New York : Academic Press.

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

Sreenath, H.K. and Jeffries, T.W. 1996. "Effect of Corn Sreep Liquor on Fermentation of Mixed Sugars by *Candida shehatae* FPL 860402702." **Appl. Biochem Biotechnol.** 57/58 : 551-561.

Ueng, P.P. and Ging, C.S. 1982. "Ethanol Production from Pentoses and Sugar Cane Bagasse Hemicellulose Hydrolysate by *Mucor* and *Fusarium* Species." **Enzyme Microb. Technol.** 4 : 169-172.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vongsuvanlert, V. and Tani, Y. 1989. "Xylitol Production by a Methanol Yeast *Candida biodinii* (*Kloechers* sp.) No. 2201." **J. Ferment. Bioeng.** 80 : 513-516.

Whistler, R.L. 1950. "Xylan." **Adv. Carbohydr. Chem.** 5 : 269-290.

Wilkie, K.C.B. 1979. "The Hemicellulose of Grasses and Cereals." Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 36 : 215-262.

Xu, J. and Taylor, K.B. 1993. Characterization of Ethanol Production from Xylose and Xylitol by a Cell-Free *Pachysolen tannophilus* System." **Appl. Envir. Microb.** 59 : 231-235.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.
อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์

อาหารเพื่อการเก็บรักษาเชื้อ

YM agar มีสูตรดังนี้

ยีสต์สกัด	3	กรัม
มอลท์สกัด	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 4.0

อาหารเพื่อการเจริญเติบโต

ยีสต์สกัด	3	กรัม
มอลท์สกัด	3	กรัม
เปปโตน	5	กรัม
กลูโคส	10	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 4.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กลูโคส) โดยวิธี Somogyi-Nelson 's (1952)

1.) สารละลายคอปเปอร์รีเอเจนต์ (copper reagent) ประกอบด้วย

A : สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตไฟว์ไฮเดรต ($CuSO_4.5H_2O$) เตรียมโดยชั่งคอปเปอร์ซัลเฟตไฟว์ไฮเดรต 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

B : สารละลายฟอสเฟตทาร์เทรต (phosphate-tartrate solution) เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 28 กรัม [หรือโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตทเวลไฮเดรต [($Na_2HPO_4.12H_2O$) 70.5495 กรัม] ในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (เตตระไฮเดรต) [sodium potassium tartrate (tetrahydrate)] 40 กรัม ทำให้ละลายแล้วเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตามด้วยโซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส [Na_2SO_4(anhydrous)] 120 กรัม เมื่อละลายดีแล้วปรับปริมาตรเป็น 900 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 วัน ถ้ามีตะกอนให้กรองเอาตะกอนทิ้งด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4

ผสมสารละลาย A ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และสารละลาย B ปริมาตร 900 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน

2.) สารละลาย Nelson's Arsenomolybdate color reagent ประกอบด้วย

A : สารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต [$(NH_3)_6Mo_7O_2.4H_2O$] เตรียมโดยละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต 25 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร เติมกรดกำมะถัน (sulphuric acid) 21 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

B : สารละลายไดโซเดียมอาร์ซิเนต ($Na_2HAsO_4.7H_2O$) เตรียมโดยละลายไดโซเดียมอาร์ซิเนต 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และสารละลาย B เข้าด้วยกัน ใส่ขวดสีชาแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงแล้วจึงนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้อง

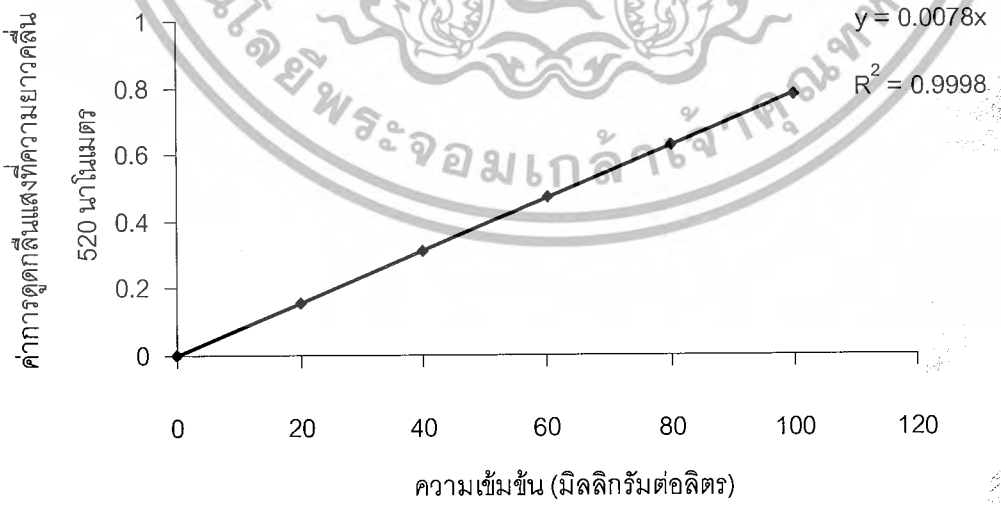
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กลูโคส) โดยวิธี Somogyi-Nelson 's method (1952)

1. เติมตัวอย่างที่ต้องการหาน้ำตาลกลูโคส 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายคอปเปอร์รีเอเจนต์ (copper reagent) 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ควรใช้ลูกแก้วปิดปากหลอดเพื่อลดการระเหยของสาร
2. ทำให้เย็นโดยการแช่ในอ่างน้ำแล้วเติมสารละลายอาร์เซโนโมลิบเดตรีเอเจนต์(arsenomolybdate reagent) ลงไป 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที จะเห็นเป็นสีเขียวหรือสีน้ำเงินเขียวขึ้นกับปริมาณน้ำตาล
3. เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร
4. นำค่าที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสโดยการคำนวณ

ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร) = $\frac{\text{(ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร) x (อัตราการเจือจาง)}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$

การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 20 40 60 80 และ 100 มิลลิลิตรต่อลิตรแทนตัวอย่าง จากนั้นทำการวิเคราะห์ตามข้อ 1-3 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตรที่ได้และความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐานมาสร้างกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส



ภาพที่ ข.1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลไซโลสโดยวิธี Deschatelets and Yu method (1986)

การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลไซโลสอาศัยการเกิดเฟอฟูรัล (furfural) จากน้ำตาลเพนโทสในสารละลายกรดอะซิติกที่มีไทโอยูเรีย (thiourea) อยู่แล้วเติม 4-โบรโมแอนิลีน (4-bromoaniline) เพื่อทำปฏิกิริยากับเฟอฟูรัลได้เป็นสารละลายสีชมพู

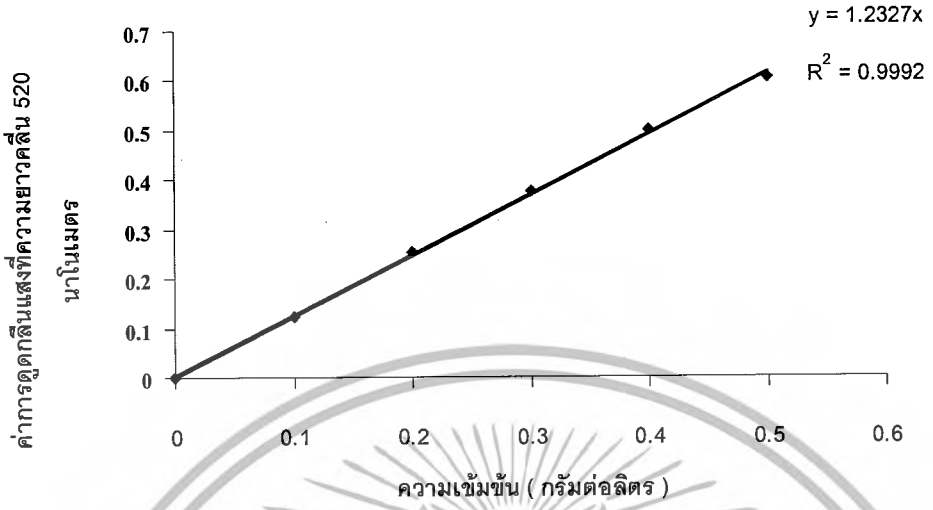
1. สารละลาย 4-โบรโมแอนิลีนรีเอเจนต์ (4-bromoaniline reagent) เตรียมโดยละลายไทโอยูเรีย 4 กรัม ในกรดอะซิติกเข้มข้นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วกรองแยกส่วนใสออกมา (กรดอะซิติกอิ่มตัวด้วยไทโอยูเรีย) จากนั้นละลาย 4-โบรโมแอนีลีนลงในส่วนใสนั้น
2. สารละลายน้ำตาลไซโลสมาตรฐาน เตรียมโดยละลายน้ำตาลไซโลสหนัก 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร) แล้วเจือจางให้ได้สารละลายน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 0.1 0.2 0.3 0.4 และ 0.5 กรัมต่อลิตร

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลไซโลสโดยวิธี Deschatelets and Yu method (1986)

1. ปิเปตต์สารละลายตัวอย่าง หรือสารละลายน้ำตาลไซโลสมาตรฐานปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย 4-โบรโมแอนิลีนรีเอเจนต์ ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงไปแล้วเขย่าให้เข้ากัน
3. นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
4. ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วแล้วบ่มต่อในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 70 นาที
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร
6. นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ในสารละลายตัวอย่างหรือคำนวณ

$$\text{ปริมาณน้ำตาลไซโลส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{(ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร) x (อัตราการเจือจาง)}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซโลส

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลโดยวิธี Adler and Gastafsson (1980)

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลอาศัยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของน้ำตาลไซลิทอลไปเป็นฟอร์มัลดีไฮด์ด้วยเปอร์ไอโอเดตในสารละลายกรดเป็นระยะเวลาสั้นๆแล้วหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายบิวเทน-2,3-ไดออล (butane-2,3-diol) จากนั้นทำการวิเคราะห์ฟอร์มัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นโดยทำปฏิกิริยากับสารละลายเพนเทน-2,4-ไดโอน (pentane-2,4-dione) ได้สารละลายสีเหลือง

1. สารละลายเพอริโอเดตรีเอเจนต์ (periodate reagent ; $NaIO_4$ 0.015 โมลาร์ ใน HCI 0.16 โมลาร์) เตรียมโดยละลายโซเดียมเมตาเพอริโอเดต ($NaIO_4$) 3.2084 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นลงไป 13.3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร
2. บิวเทน-2,3-ไดออลความเข้มข้น 0.002 โมลาร์ เตรียมโดยปิเปตต์ บิวเทน-2,3-ไดออล ปริมาตร 1.8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร
3. สารละลายเพนเทน-2,4-ไดโอน (เตรียมใช้ทันที) เตรียมโดยละลายแอมโมเนียมอะซิเตต 154.16 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติกเข้มข้นปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วเติมเพนเทน-2,4-ไดโอน ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

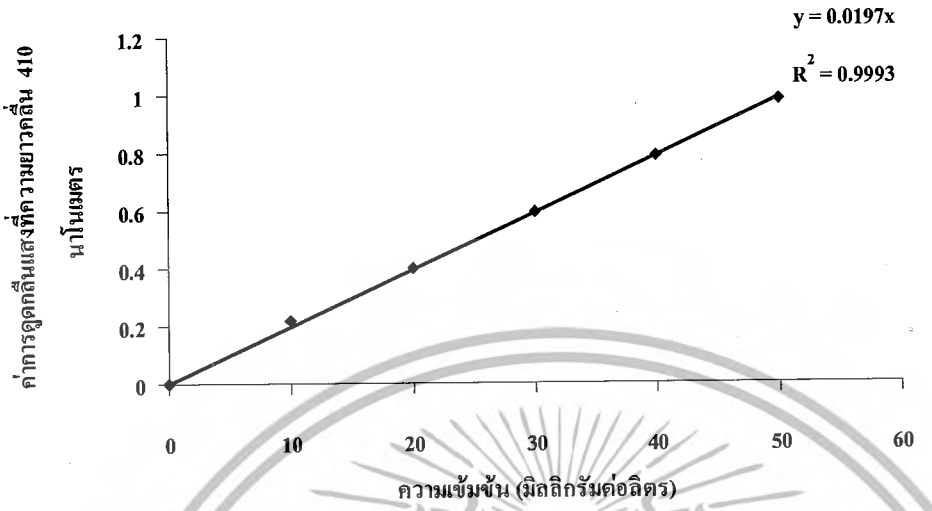
4. สารละลายมาตรฐานน้ำตาลไซลิทอล เตรียมโดยละลายน้ำตาลไซลิทอล 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร) แล้วเจือจางให้ได้สารละลายน้ำตาลไซลิทอล ความเข้มข้น 10 20 30 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลไซลิทอลโดยวิธี Adler and Gastafsson method (1980)

1. ปิเปตต์สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายน้ำตาลไซลิทอลมาตรฐาน (ความเข้มข้นน้ำตาลไซลิทอล 10-50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
2. เติมเพอริโอเดตรีเอเจนต์ลงไป 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที
3. เติมสารละลายบิวเทน-2,3-ไดออล ความเข้มข้น 0.002 โมลต่อลิตร ลงไป 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
4. เติมสารละลายเพนเทน-2,4-ไดโอน ลงไป 2.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
5. นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
6. ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร
7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรและความเข้มข้นของน้ำตาลไซลิทอลไปสร้างกราฟมาตรฐานน้ำตาลไซลิทอล
8. การหาปริมาณของน้ำตาลไซลิทอลในสารละลายตัวอย่าง สามารถคำนวณได้จาก

$$\text{ปริมาณน้ำตาลไซลิทอล (มิลลิกรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{(ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร) x (อัตราการเจือจาง)}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ข.3 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลไซลิทอล

การเตรียมผงถ่านกัมมันต์เพื่อใช้ในการลดปริมาณสารพิษด้วยวิธีการดูดซับ

สามารถเตรียมได้โดยนำผงถ่านกัมมันต์มาแช่ในสารละลายกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 0.4 โมลต่อลิตร เป็นเวลา 1 วัน จึงกรองแยกผงถ่านกัมมันต์ที่อิ่มตัวด้วยกรดออกมา ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปอบให้แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

การวิเคราะห์ทางสถิติ

Complete Randomized Design (CRD)

เป็นแบบแผนการทดลองที่มีการจัดการทดลองทั้งหมดในหน่วยทดลอง (experimental unit) โดยวิธีสุ่ม โดยให้หน่วยทดลองแต่ละหน่วยมีโอกาสได้รับสิ่งทดลองแต่ละชนิดเท่าๆกัน สำหรับ CRD ความแตกต่างระหว่างหน่วยทดลองหลายๆหน่วยที่ได้รับสิ่งทดลองเดียวกันเรียกว่า " ความคลาดเคลื่อนของการทดลอง (experimental error) " ดังนั้น CRD จึงเหมาะสำหรับการทดลองที่มีหน่วยสม่ำเสมอกันทั้งหมด ได้แก่งานทดลองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งสามารถควบคุมสิ่งแวดล้อมให้สม่ำเสมอได้ง่าย

การวิเคราะห์ความแปรปรวน การตรวจดูความแตกต่างระหว่างสิ่งทดลองที่ศึกษากระทำโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of varience) โดยที่แหล่งความแปรปรวนของ CRD แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ ความแปรปรวนของสิ่งทดลอง (treatment variation) และความคลาดเคลื่อนของการทดลอง(experimental error) แสดงเป็นรูปตารางได้ดังนี้

Source of variation	Degree of Freedom	Sum of Squares	Mean of Squares	F Value
Treatment				
Error				
Total				

วิธีคำนวณ

ให้ t คือ จำนวนชนิดของตัวอย่าง และ r คือ จำนวนซ้ำ

1. คำนวณค่า Degree of Freedom (df)

Total df = (t x r)-1

Treatment df = t-1

Error df = by substranction = total df – treatment df

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. คำนวณค่า Sum of Squares (SS) ขั้นแรกคำนวณค่า correction faction (CF) ก่อนดังนี้

$$CF = total^2 / t \times r$$

$$Total\ SS = X1^2 + x2^2 + ... - CF$$

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

$$Error\ SS = total\ SS - treatment$$

3. คำนวณค่า Mean of Squares (MS)

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

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

4. คำนวณค่า F value

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

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

6. นำค่าที่คำนวณได้ทั้งหมดตั้งแต่ 1-5 ใส่ในตารางวิเคราะห์

7. เปรียบเทียบค่า F value ที่คำนวณได้กับค่า F ที่ได้จากตาราง

ถ้า F value น้อยกว่าค่า F จากตารางที่ 5% แสดงว่า treatment ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แสดงโดยเขียนสัญลักษณ์ ns เยื้องบนค่า F value

ถ้า F value มากกว่าค่า F จากตารางที่ 5% แสดงว่า treatment มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงโดยเขียนสัญลักษณ์ * เยื้องบนค่า F value

ถ้า F value มากกว่าค่า F จากตารางที่ 1% แสดงว่า treatment มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงโดยเขียนสัญลักษณ์ ** เยื้องบนค่า F value

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางที่ ค.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของการผลิตน้ำตาลไซลิทอลโดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5045 ระหว่างเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง

Treatment	ซ้ำ		ผลรวม	ค่าเฉลี่ย
	1	2		
เซลล์อิสระ	2.170	2.154	4.324	2.162
เซลล์ตรึง	1.695	1.837	3.532	2.162
		ผลรวม	7.856	1.964

แหล่งความแปรปรวน	Degree of Freedom	Sum of Squares	Mean of Squares	F Value
ลักษณะของเซลล์	1	0.157	0.157	28.545*
ความคลาดเคลื่อน	2	0.011	0.0055	
ผลรวม	3	0.168		

การคำนวณ

1. คำนวณค่า Degree of Freedom (df)

Total df = 4-1 = 3

Treatment df = 1

Error df = 3-1 = 2

2. คำนวณค่า Sum of Squares (SS) ขั้นแรกคำนวณค่า correction faction (CF) ก่อนดังนี้

$CF = (3.532+4.324)^2/4 = 15.429$

$\text{Total SS} = 2.170^2+2.154^2+1.695^2+1.837^2-15.429 = 0.168$

$\text{Treatment SS} = 4.324^2/4 + 3.532^2/4 -15.429 = 0.157$

$\text{Error SS} = 0.168-0.157 = 0.011$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. คำนวณค่า Mean of Squares (MS)

$$\text{Treatment MS} = \frac{\text{Treatment SS}}{\text{Treatment df}} = 0.157/1 = 0.157$$

$$\text{Error MS} = \frac{\text{Error SS}}{\text{Error df}} = 0.011/2 = 0.0055$$

4. คำนวณค่า F value

$$\text{F value} = \frac{\text{Treatment MS}}{\text{Error MS}} = 0.157/0.0055 = 28.545$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้