การผลิตซอร์บิทอลโดย *Zymomonas mobilis* TISTR 548 ด้วยการเลี้ยงแบบเฟดแบตช์

นาย พาคินทร์ เจริญทิพย์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF SORBITOL BY *Zymomonas mobilis* TISTR 548 IN FED-BATCH CULTURE

Mr. Pakin Charoentip

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตซอร์บิทอล โดยการเลี้ยง *Zymomonas mobilis* TISTR 548 แบบกึ่งกะ
โดย	นาย พาคินทร์ เจริญทิพย์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สีรุ้ง ปรีชานนท์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พาคินทร์ เจริญทิพย์ : การผลิตซอร์บิทอลโดย *Zymomonas mobilis* TISTR 548 ด้วยการเลี้ยงแบบเฟดแบตช์(PRODUCTION OF SORBITOL BY *Zymomonas mobilis* TISTR 548 IN FED-BATCH CULTURE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ. ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์; 74 หน้า.

งานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตซอร์บิทอลในกระบวนการหมักแบบกะและกึ่งกะ โดย ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Zymomonas mobilis* TISTR 548 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอุดม ใช้น้ำตาลซูโครส 20 เปอร์เซนต์เป็นแหล่งคาร์บอนจากการทดลองด้วยเทคนิคแฟคตอเรียลพบว่า ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตซอร์บิทอลคือ ความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเวลา 48 ชั่วโมง การทดลองกระบวนการหมักแบบกะใน ฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำตาลเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร พบว่าได้ ซอร์บิทอล และอัตราการผลิต (productivity) ซอร์บิทอล เท่ากับ 18.56 กรัมต่อลิตร และ 0.45 กรัม ต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อขยายขนาดการผลิตซอร์บิทอลเป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร โดยมีปริมาตรทำการ 1.0 ลิตรภายใต้ภาวะเหมาะสมที่กล่าวมาแล้วได้ซอร์บิทอลและอัตราการผลิตซอร์บิทอลเท่ากับ 24.54 กรัมและ 0.501 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ เมื่อผลิตซอร์บิทอลด้วยกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นซูโครสเป็น 100 กรัมต่อลิตรเพื่อความเหมาะสมในการเพิ่มจำนวนเซลล์ เมื่อเชื้อเข้าสู่ช่วงปลายระยะเอ็กซ์โปเนนเชียล ซึ่งเป็นชั่วโมงที่ 18-22 จึงเติมน้ำตาลเพิ่มลงไป 200 กรัม ผลที่ดีที่สุดคือได้ซอร์บิทอลและอัตราการผลิตซอร์บิทอล เท่ากับ 50.1 กรัม และ 0.678 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต พาคินทร์ เจริญทิพย์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2551

4872387623 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : Sorbitol/ *Zymomonas mobilis*./ Fed-batch fermentation

PAKIN CHAROENTIP : PRODUCTION OF SORBITOL BY *Zymomonas mobilis* TISTR 548 IN FED-BATCH CULTURE : THESIS ADVISOR : ASST. PROF. CHARNWIT KOSITANONT, Ph.D., 74 pp.

In this research sorbitol productions were carried out both in batch and fed-batch fermentations using *Zymomonas mobilis* TISTR 548 with 20% sucrose as a C-source in the rich culture medium. From factorial design experiments, the optimal conditions for sorbitol production were initial pH of 6.5, 30 °C and 48 h. In 250 ml Erlenmeyer flask under the optimal conditions, sorbitol yield and productivity of 18.56 g l^{-1} and 0.45 g l^{-1} h^{-1} were obtained. Scaling up to a 2 l bioreactor with the working volume of 1.0 l, the sorbitol yield and productivity were 24.54 g l^{-1} and 0.501 g l^{-1} h^{-1}, respectively. In fed-batch production, initial sugar concentration of 100 g l^{-1} was used for cells production in the batch phase. At late-exponential phase which was reached at 18^{th}-22^{th} h, 200 g l^{-1} of sucrose was added. The best sorbitol yield and productivity were 50.1 g l^{-1} and 0.678 g l^{-1} h^{-1} respectively.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department : Microbiology Student's Signature Pakin Charoentip

Field of Study : Industrial Microbiology Advisor's Signature C. Kositanont

Academic Year : 2008

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดต่างๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น รวมถึงกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นประธาน ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ และรองศาสตราจารย์ ดร. สีรุ้ง ปรีชานนท์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้ คำปรึกษา-คำแนะนำ และกำลังใจ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกและเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์และทุนผู้ช่วยวิจัยสำหรับผู้บริหาร ที่ให้การสนับสนุนด้านค่าใช้จ่ายในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ห้อง 453 ที่คอยให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือ

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนบนภาควิชาจุลชีววิทยาแห่งนี้ที่คอยช่วยเหลือ และให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่น้อง ญาติๆ ทุกคนและเพื่อนๆ รุ่นพี่ที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจในการทำงานวิจัยตลอดมาจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่

1. บทนำ..... 1

2. ปริทัศน์วรรณกรรม..... 4

2.1ชีววิทยาของ *Zymomonas mobilis* 4

2.2ซอร์บิทอลและคุณสมบัติของซอร์บิทอล..... 7

2.3ประโยชน์ของซอร์บิทอลในทางอุตสาหกรรม..... 8

2.4การผลิตซอร์บิทอล 10

2.5 ชนิดของกระบวนการหมัก..... 15

3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย..... 22

3.1อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์..... 22

3.1.1 อุปกรณ์..... 22

3.1.2 เคมีภัณฑ์..... 23

3.2 จุลินทรีย์..... 24

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ..... 24

3.4 วิธีเตรียมหัวเชื้อ..... 24

3.5 วิธีทดลองแบบ 2^n factorial design..... 24

3.6 การผลิตซอร์บิทอลในขวดทดลองรูปชมพู่..... 25

3.7 การผลิตซอร์บิทอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ..... 25

3.8 วิธีเติมน้ำตาลในการผลิตซอร์บิทอลแบบ fed-batchในถังปฏิกรณ์..... 25

หน้า

3.9 วิธีวิเคราะห์ต่างๆ 26

4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 27

4.1ชนิดน้ำตาลที่เหมาะสำหรับใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการผลิตซอร์บิทอล..... 27

4.2 ช่วงการเจริญที่เหมาะสมสำหรับใช้ทำหัวเชื้อ..... 29

4.3ภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตซอร์บิทอลในขวดทดลอง..... 30

4.4 การหาค่า Osmolarity ของน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างๆ..... 37

4.5 การผลิตซอร์บิทอลโดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน..... 38

4.6 การผลิตซอร์บิทอลในขวดรูปชมพู่ด้วยน้ำตาลซูโครส 200-400 กรัมต่อลิตร 39

4.7 เพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรด้วยการเลี้ยงแบบกะ..... 40

4.8 เพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตรด้วยการเลี้ยงแบบกึ่งกะ..... 45

5. สรุปผลการทดลอง..... 52

รายการอ้างอิง..... 54

ภาคผนวก..... 58

ภาคผนวก ก..... 59

ภาคผนวก ข..... 60

ภาคผนวก ค..... 61

ภาคผนวก ง..... 62

ภาคผนวก จ..... 65

ภาคผนวก ฉ..... 66

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 74

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
1	องค์ประกอบภายในเซลล์ของ *Zymomonas mobilis*.....	5
2	ภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Zymomonas mobilis*.....	5
3	คุณสมบัติทางเคมีของซอร์บิทอล.....	8
4	คุณสมบัติของสารให้ความหวาน.....	9
5	เปรียบเทียบผลวิเคราะห์น้ำตาลซอร์บิทอลจากการหมักน้ำตาลกลูโคสผสมฟรุคโตส	32
6	ปริมาณซอร์บิทอลในขวดทดลองที่เวลา 48 ชั่วโมง.....	40
7	การผลิตซอร์บิทอลในถังหมักแบบกะที่เวลา 48 ชั่วโมง.....	41
8	เปรียบเทียบการผลิตซอร์บิทอลในขวดทดลองกับในถังหมัก.....	42

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
1	ภาพถ่าย *Zymomonas mobilis* จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน……	4
2	การลำเลียงกลูโคสและฟรุคโตสเข้าสู่ periplasm ของเซลล์.....	6
3	โครงสร้างซอร์บิทอล.....	7
4	การดึงน้ำออกจากซอร์บิทอล……....	9
5	กระบวนการเติมไฮโดรเจนให้กับน้ำตาลกลูโคส.....	10
6	วิถีการใช้น้ำตาลซูโครสของ *Zymomonas mobilis*……	11
7	การผลิตซอร์บิทอลจากกลูโคสผสมฟรุคโตสโดยใช้หัวเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน	27
8	การผลิตซอร์บิทอลจากกลูโคสผสมฟรุคโตสโดยใช้หัวเชื้อที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน	28
9	การผลิตซอร์บิทอลจากซูโครสโดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นหัวเชื้อตั้งต้น.....	28
10	การผลิตซอร์บิทอลจากซูโครสโดยใช้หัวเชื้อที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน	28
11	ช่วงการเจริญที่เหมาะสมสำหรับใช้ทำหัวเชื้อเริ่มต้น.....	29
12	น้ำหนักเซลล์แห้งที่ช่วงเวลาต่างๆ.....	30
13	กราฟแสดงอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลกับค่าความเป็นกรด-ด่าง.....	31
14	กราฟแสดงความหมายของอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลกับเวลา.....	31
15	เปรียบเทียบซอร์บิทอลจากการหมักน้ำตาลกลูโคสผสมฟรุคโตส.....	33
16	อิทธิพลและปฏิสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยที่มีต่อการผลิตซอร์บิทอล.....	34
17	17.1กราฟแสดงอิทธิพลร่วมระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่างกับเวลา.....	34
	17.2กราฟแสดงอิทธิพลร่วมระหว่างอุณหภูมิกับค่าความเป็นกรด-ด่าง.....	35
18	ค่า Osmolarity ของน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตสและซูโครส.....	37
19	การผลิตซอร์บิทอลจากน้ำตาลซูโครสตั้งต้น 200 กรัมต่อลิตร.....	38
20	การผลิตซอร์บิทอลในขวดทดลอง.....	39
21	การผลิตซอร์บิทอลแบบกะในถังหมัก.....	41
22	เปรียบเทียบปริมาณซอร์บิทอลในขวดทดลอง.....	43
23	เปรียบเทียบปริมาณซอร์บิทอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ.....	43
24	การผลิตซอร์บิทอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร โดยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ Fed-batch โดยใช้ซูโครสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร	44

25 น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาต่างๆจากการใช้ซูโครสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร..... 44
26 การผลิตซอร์บิทอลในถังหมักแบบกึ่งกะที่1..... 45
27 น้ำหนักเซลล์แห้งและค่าความเป็นกรด-ด่างในถังหมักแบบกึ่งกะที่1..... 46
28 การผลิตซอร์บิทอลในถังหมักแบบกึ่งกะที่2..... 47
29 น้ำหนักเซลล์แห้งและค่าความเป็นกรด-ด่างในถังหมักแบบกึ่งกะที่2..... 47
30 การผลิตซอร์บิทอลในถังหมักแบบกึ่งกะที่3..... 48
31 น้ำหนักเซลล์แห้งและค่าความเป็นกรด-ด่างในถังหมักแบบกึ่งกะที่3..... 48
32 การผลิตซอร์บิทอลในถังหมักแบบกึ่งกะที่4..... 49
33 น้ำหนักเซลล์แห้งและค่าความเป็นกรด-ด่างในถังหมักแบบกึ่งกะที่4..... 50
34 การผลิตซอร์บิทอลในถังหมักแบบกะและกึ่งกะ..... 51
35 ค่า Osmolarity ของกลีเซอรอล..... 53

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่1

บทนำ

ปัจจุบันผู้คนทั่วโลกหันมาใส่ใจกับคุณภาพทางโภชนาการเพื่อสุขภาพที่ดีมากขึ้น สารให้ความหวาน (Sweeteners) เป็นสิ่งหนึ่งที่คนให้ความสนใจเนื่องจากต้องการควบคุมน้ำหนักหรือผู้ป่วยโรคเบาหวาน สารให้ความหวานที่ดีนอกจากมีรสชาติที่ดีใกล้เคียงกับน้ำตาลแล้วยังให้พลังงานต่ำกว่าอีกด้วย ปัจจุบันมีสารให้ความหวานแทนน้ำตาลในท้องตลาดอยู่หลายชนิด แต่ละชนิดจะมีข้อดี-ข้อด้อยแตกต่างกันไป

น้ำตาลแอลกอฮอล์ หรือที่เรียกว่า Polyol เป็นสารให้ความหวานที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ มีอยู่ในอาหาร และในพืชบางชนิด ในฐานะที่เป็นน้ำตาลชนิดหนึ่งที่ให้แคลอรี่ต่ำกว่าน้ำตาลปกติ และไม่ทำให้เกิดการเพิ่มน้ำตาลในเลือดอย่างฉับพลัน ทั้งนี้เพราะน้ำตาลแอลกอฮอล์สามารถเปลี่ยนไปเป็นกลูโคสได้ช้ามากและไม่ต้องการอินซูลิน ดังนั้นจึงใช้ในกลุ่มผู้ป่วยเบาหวาน และเริ่มใช้มากขึ้นในคนทั่วไป ได้แก่ แมนนิทอล ซอบิทอล ไซลีทอล แลคติทอล ไอโซมอลท์ แม้น้ำตาลแอลกอฮอล์จะไม่ได้ใช้ในครัวเรือนทั่วไปแต่ก็มีการใช้ในอาหารบางอย่างที่ระบุในฉลากว่าปราศจากน้ำตาล หรือ “Sugar-free” เช่น ในลูกกวาด คุกกี้ หมากฝรั่ง เครื่องดื่ม ยาอม โดยเฉพาะอย่างยิ่งใช้มากในผลิตภัณฑ์ช่องปาก เช่น ยาสีฟัน และยาอมบ้วนปาก ซอร์บิทอล เป็นสารอินทรีย์จำพวกพอลิไฮดริกแอลกอฮอล์ (Polyhydric alcohol) หรือพอลิออลส์ (Polyols) เป็นน้ำตาลแอลกอฮอลล์ที่พบได้ในผลไม้ประเภทเบอร์รี่ สาหร่าย ผลนัท ใบยาสูบ ลูกแพร แอปเปิ้ล เชอรี่ พลัม พีช แอปปริคอท องุ่น รวมทั้งผลไม้อื่นๆ และพืชทะเลอีกหลายชนิด มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารอย่างแพร่หลายเนื่องจากมีคุณสมบัติเด่นหลายประการ เช่น มีความหวานประมาณ 60 % ของน้ำตาลทราย ซึ่งใกล้เคียงกับกลูโคส (75 %) ในขณะที่ให้พลังงานเพียงหนึ่งในสามของน้ำตาลทราย (2.6 แคลอรีต่อกรัม) (http://www.caloriecontrol.org/sorbitol.html) แต่ไม่ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงเนื่องจากเมตาบอลิสมไม่เกี่ยวกับกลูโคสและอินซูลิน (Erzinger และคณะ 2003, Silveira and Jonas, 2002) ซอร์บิทอลจะถูกเปลี่ยนเป็นฟรุคโตสที่ตับ (Kretchmer and Hollenbeck, 1991) จึงสามารถใช้ในอาหารผู้เป็นเบาหวานและผู้ต้องการควบคุมน้ำหนักได้ USFDA และEU ให้การยอมรับซอร์บิทอลว่าเป็นสารแต่งเติมอาหารกลุ่ม GRAS (Generally Recognized As Safe) 10 เปอร์เซ็นต์ของซอร์บิทอล สามารถเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์โดยไม่มีผลต่อระดับน้ำตาลในเลือดจึงนิยมใช้เป็นส่วนและร่างกายสามารถย่อยสลายซอร์บิทอลได้ดีประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของส่วนที่ได้รับทั้งหมด แม้บางส่วนจะเปลี่ยนไปเป็นกลูโคสได้บ้างแต่อัตราเร็วในการดูดซึมผ่านลำไส้ช้ากว่ากลูโคสมากมีการนำซอร์บิทอลไปผสมในผลิตภัณฑ์อาหาร

เช่น ช็อคโกแลต ผลไม้กระป๋อง ผลิตภัณฑ์ขนมหวาน โดยเฉพาะขนมหวานชนิดแช่เยือกแข็ง ซึ่งให้ผลดีด้านการเก็บรักษา รสชาติและเนื้อสัมผัส และผลิตภัณฑ์เนื้อประเภทไส้กรอกเป็นต้น อาจใช้เป็นส่วนผสมของยาสีฟันเพื่อให้เป็นเนื้อเดียวกัน อีกทั้งจุลินทรีย์ในช่องปากยังไม่สามารถนำไปใช้ได้จึงไม่ทำให้เกิดกรดซึ่งเป็นสาเหตุให้ฟันผุ หรือใช้เป็นสารให้ความหวานร่วมกับสารตัวอื่นในเครื่องดื่มพลังงานต่ำ ทางด้านยาและการแพทย์มีการนำมาใช้ในรูปไซรัปเพื่อป้องกันการตกผลึกของน้ำตาลหรือใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมวิตามินบี 12 วิตามินซี และแอสไพริน ทางด้านเครื่องสำอาง เนื่องจากซอร์บิทอลมีคุณสมบัติดูดน้ำได้ดีจึงใช้เป็นตัวปรับลักษณะเนื้อสารผสม (texture)ให้ดูชุ่มและนุ่ม ใช้เป็นสารรักษาความชื้น (Humectant) เนื่องจากซอร์บิทอลมีสมบัติเป็นสารรักษาความชื้น หรืออาจใช้ในอุตสาหกรรมทำกาว ใช้ในการป้องกันการแข็งตัวของน้ำหมึก

Zymomonas mobilis เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง ไม่สร้างสปอร์ ชอบอยู่ในที่มีออกซิเจนจำกัด ทนความเข้มข้นน้ำตาลสูงได้ดีสามารถสร้างเอทานอลจากน้ำตาลซูโครส หรือกลูโคสผสมฟรุคโตสได้ (Viikari, 1984 ; Barrow, 1984) มีการศึกษาเพิ่มเติมพบว่า ซอร์บิทอลที่เกิดขึ้นได้มาจากฟรุคโตสเท่านั้น ในขณะเกิดกระบวนการรีดักชั่นเปลี่ยนฟรุคโตสเป็นซอร์บิทอลจะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นเปลี่ยนกลูโคสเป็นกลูโคโนแลคโตน โดยใช้ Glucose-Fructose Oxidoreductase. (GFOR) และ NADP เป็นโคแฟคเตอร์ เร่งปฏิกิริยาทั้งสองระหว่างการเกิดกระบวนการสร้างเอทานอล (Cazetta และคณะ 2005)

การเลี้ยงเชื้อในถังหมักนั้นสามารถทำได้หลายแบบขึ้นกับการเติมวัตถุดิบ เช่น การเลี้ยงเชื้อแบบแบตช์ แบบเฟดแบตช์และแบบต่อเนื่อง แต่การเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องนั้นไม่สามารถรักษาแรงดันออสโมติกให้กับระบบได้อย่างสม่ำเสมอและการเก็บเกี่ยวผลผลิตทำได้ยากและเสียค่าใช้จ่ายสูงเนื่องจากผลผลิตมีความเข้มข้นต่ำ ส่วนการเลี้ยงเชื้อแบบแบตช์นั้นการที่มีแรงดันออสโมติกที่สูงแต่แรกนั้นจะทำให้เชื้อมีการเจริญเจริญที่ไม่ดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งเน้น การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตซอร์บิทอลแบบเฟดแบตช์ในถังหมัก โดยใช้ *Zymomonas mobilis* TISTR 548

วัตถุประสงค์

หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตซอร์บิทอลโดยการเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งกะ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตซอร์บิทอลภายในถังหมักเพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูง

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

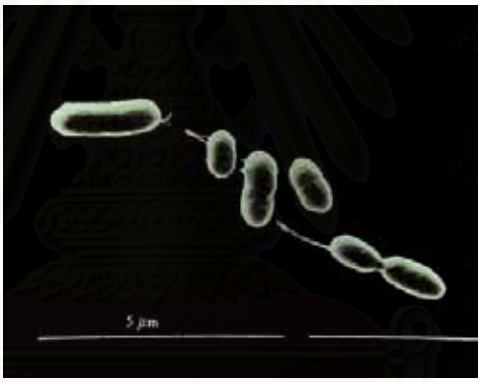
1. หาช่วงที่เชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุด เพื่อใช้ทำหัวเชื้อเริ่มต้น
2. หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตซอร์บิทอลในขวดทดลอง
3. ศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเติมน้ำตาลในระหว่างกระบวนการผลิตซอร์บิทอล
4. ขยายขนาดเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร และหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตซอร์บิทอล

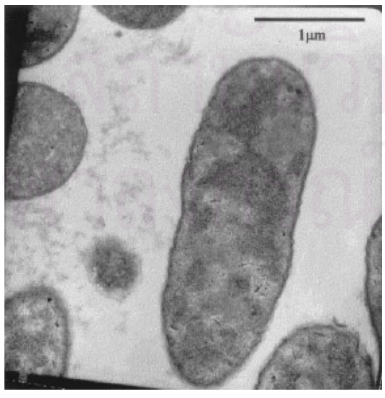
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

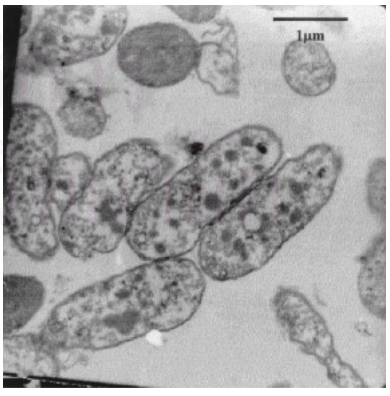
บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรม

ชีววิทยาของ *Zymomonas mobilis*

Z. mobilis เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อมีรูปร่างนูนคล้ายเลนส์ ผิวหน้าและขอบเรียบ มีสีขาวคล้ายเนย มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 มม. เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่ง มีความยาวประมาณ 2-6 ไมโครเมตร และความกว้างประมาณ 1-1.4 ไมโครเมตร (Gibbs และ Demoss, 1951)สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง มีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ มีความทนทานต่อปริมาณแอลกอฮอล์ได้สูง และเจริญได้ในภาวะไร้อากาศหรือภาวะที่มีออกซิเจนในปริมาณเล็กน้อย (Swings และ De Ley,1972)







รูปที่1. ภาพถ่าย *Zymomonas mobilis* จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Gibbs และ Demoss, 1951)

ตารางที่1. องค์ประกอบภายในเซลล์ของ *Zymomonas mobilis* (Swings และ DeLey1977)

Cellular constituents of Zymomonas

Component	Content (dry wt)
Proteins	
Growth phase	65–69%
Stationary phase	54%
RNA	17–22%
DNA	2.7%
Carbohydrates	4–5%
Poly-β-hydroxybutyrate	0%
Polyphosphate	0%
Sulfur	0.5%
Ammonia	0.1–0.5 μmol/mg
Amino acids	0.02–0.2 μmol/mg
ATP	
Exponential phase	1–5 μg/mg
Starvation	0–0.4 μg/mg

ตารางที่2 ภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Z. mobilis* (Swings และ De Ley1977)

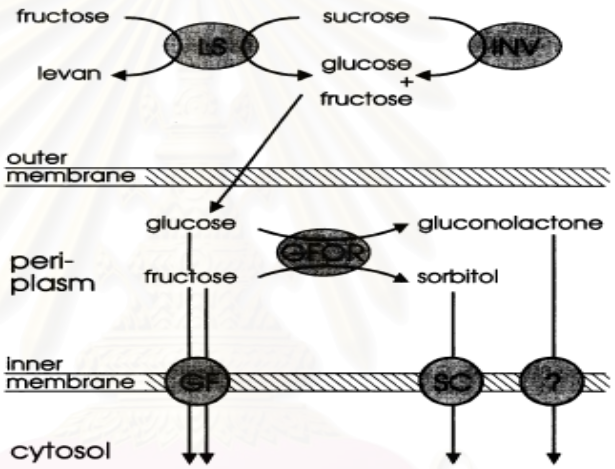
Growth of Zymomonas strains in liquid standard medium at different pH values

Initial pH	% of strains growing
3.05	0
3.5	43
3.7	71
3.85	90
5–7	100
7.50	87
8.0	0

Growth of Zymomonas strains in liquid standard medium at different temperatures

Incubation temp (°C)	% of strains growing
30	100
34	97
36	97
38	74
40	5

Z. mobilis ใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอทานอล Zachariou และคณะ (1986) รายงานว่าเอนไซม์ที่ *Z. mobilis* ใช้ ในการย่อยซูโครส คือ Levansucrase และ Invertase โดยย่อยที่บริเวณ outer membrane ได้ กลูโคสและฟรุคโตส จากนั้นจะลำเลียงเข้าสู่ periplasm ของเซลล์ (รูปที่ 2) จากนั้น ฟรุคโตสจะใช้พลังงาน 1 ATP เพื่อเปลี่ยนเป็น Fructose-6-phosphate โดยเอนไซม์ fructokinase และเปลี่ยนจาก fructose-6-phosphate เป็น gluose-6-phosphate โดย เอนไซม์ phosphohexose-isomerase (Swing และ De Ley 1977) glucose จะเกิดปฏิกิริยาเป็นซอร์บิทอล โดย aldoreductase อีกส่วนหนึ่งใช้พลังงาน 1 ATP เพื่อเปลี่ยนเป็นเป็น gluose-6-phosphate และเข้าสู่ glycolysis pathway เพื่อเปลี่ยนเป็นเทานอล



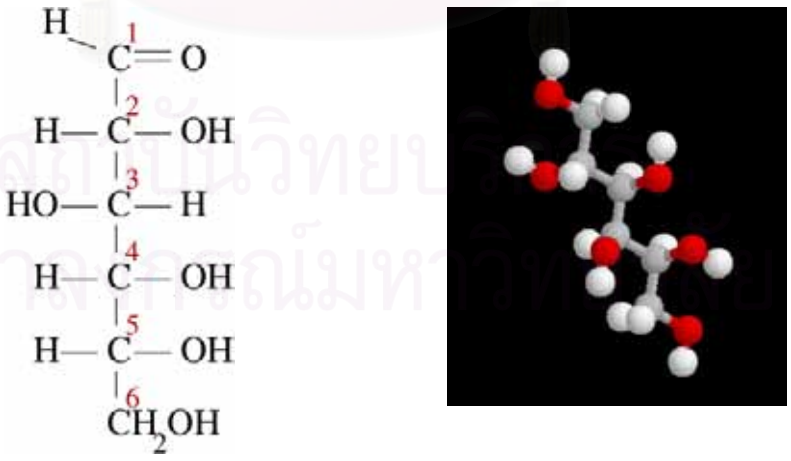
รูปที่2.การลำเลียงกลูโคสและฟรุคโตสเข้าสู่ periplasm ของเซลล์(Swing และ De Ley 1977)

Zymomonas mobilis สร้างซอร์บิทอล เป็น Byproduct ในกระบวนการผลิตเอทานอล (Villard 1984 a, b, Barrow 1984, Bringer-Meyer 1985) มีการศึกษาเพิ่มเติมพบว่า ซอร์บิทอลที่เกิดขึ้นได้มาจาก ฟรุคโตสเท่านั้น กลูโคสสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ fructokinase ได้ ทำให้มีการสะสมฟรุคโตสภายในเซลล์ (Doelle1982a, Barrow และคณะ 1984, Parker และคณะ 1997) กลไกการควบคุมกลูโคสและ ฟรุคโตสของเซลล์ใช้ระบบที่แตกต่างกันคือ กลูโคสถูกควบคุมด้วยสมดุลพลังงาน (energy balance) แต่ฟรุคโตสถูกควบคุมโดยกลูโคส ซึ่งกลูโคส 0.18 กรัม/ลิตร(1มิลลิโมล) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ fructokinase ได้ประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ของค่าตั้งต้น ฟรุคโตสที่สะสมอยู่ในเซลล์จะถูกเปลี่ยนไปเป็นซอร์บิทอล (Barrow และคณะ 1984) ด้วยกระบวนการออกซิเดชั่น-รีดักชั่น ฟรุคโตสถูกรีดิวส์เป็นซอร์บิทอลควบกันกับปฏิกิริยา ออกซิ

เดชั่น เปลี่ยนกลูโคสเป็น กลูโคโนแลคโตน (Leigh, 1984) โดยใช้เอนไซม์ Glucose-Fructose Oxidoreductase. (GFOR) ที่มี NADP เป็นโคแฟคเตอร์ (Zachariou and Scopes, 1985) เร่งปฏิกิริยาทั้งสองระหว่างการเกิดกระบวนการสร้างเอทานอล (Erzinger และคณะ 2003, Cazetta และคณะ 2005) แต่ไม่พบการสะสมกลูโคโนแลคโตนเลย เนื่องจากกรดกลูโคนิก ที่สร้างขึ้นถูกฟอสโฟรีเลทโดยเอนไซม์ กลูโคเนทไคเนส และถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลใน Entner Doudoroff pathway (Zachariou and Scopes 1985, Strohdeicher, 1998) ในระหว่างการผลิตเอทานอล *Z. mobilis* สามารถสร้างซอร์บิทอลได้ประมาณ 11 เปอร์เซ็นต์ ของ Carbon source (vilkari 1984b) ในปี พ.ศ. 2539 หนึ่งฤทัย มีสุข รายงานว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหาร pH 6.5 เชื้อสร้าง ซอร์บิทอลได้สูงที่สุด ซึ่งใกล้เคียงกับสมบัติของ GFOR ที่มี ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมประมาณ 6.2 (Zachariou และ Scopes 1986, Ferraz และคณะ 2001)

ซอร์บิทอล

ซอร์บิทอล (Sorbitolหรือ D-glucitol) เป็นสารอินทรีย์ จำพวก พอลิไฮดริกแอลกอฮอล์ (Polyhydric alcohol) หรือ พอลิออลล์ (Polyols) มีลักษณะทางกายภาพ เป็นผงสีขาว ไม่มีกลิ่น เป็นน้ำตาลแอลกอฮอลล์ ที่พบได้ในผลไม้ ประเภทเบอร์รี่ สาหร่าย ผลนัท ใบยาสูบ ลูกแพร แอปเปิ้ล เชอรี่ พลัม พีช แอปปริคอท องุ่น รวมทั้งผลไม้อื่นๆและ พืชทะเล อีกหลายชนิด ซึ่งมีการศึกษาครั้งแรกโดย Joseph Boussingault ในปี 1872



รูปที่3.โครงสร้างทางเคมีของซอร์บิทอล

สมบัติของซอร์บิทอล

ตารางที่3. คุณสมบัติทางเคมีของซอร์บิทอล

IUPAC name	(2R,3S,4S,5S)-Hexol
Molecular formula	$C_6H_{14}O_6$
Molecular weight	182.17 g/mol
Density	0.68 g/cm^3
Melting point	95 °C
Boiling point	296 °C

ประโยชน์ของซอร์บิทอลในทางอุตสาหกรรม

จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้มีการนำซอร์บิทอลมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น

- ใช้ในอุตสาหกรรมเคมี

ผลิตสารเคมีเช่น ซอร์โบส, วิตามินซี, โพรพิลีนไกลคอลและเรซินเมลามีน

ใช้ป้องกันการแข็งตัวของน้ำตาลเพื่อยืดอายุของลูกกวาด

ใช้ในเครื่องสำอาง เป็นตัวเก็บความชื้นของครีมและโลชั่น และเป็นสารที่ทำให้ส่วนประกอบต่างๆของยาสีฟันรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกัน และอยู่ตัวเวลาบีบจากหลอด

ใช้ในการป้องกันการแข็งตัวของน้ำหมึก

ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องหนัง

ใช้ในอุตสาหกรรมพอลิเมอร์และเส้นใย

- ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ยาและเวชภัณฑ์เช่น

ผสมในผลไม้แช่แข็งและผลไม้กระป๋อง

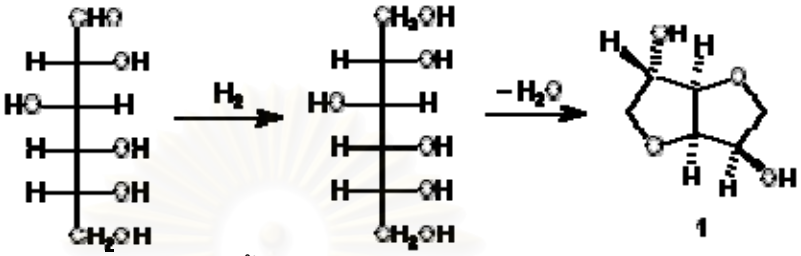
ใช้เป็นยาระบายอ่อนๆในความดูแลของแพทย์

ใช้เป็นสารให้ความหวานในอาหารและเครื่องดื่มพลังงานต่ำสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวาน

ใช้เป็นส่วนผสมยาเพื่อช่วยเพิ่มอัตราการดูดซึมวิตามินและสารอาหารอื่นๆ

นอกจากนั้นยังมีรายงานการทดลองที่แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการฟอกขาวของ sorbitol peracetate ที่ใส่ลงในผงซักฟอก (Johns และคณะ, 1991)

การนำซอร์บิทอลไปใช้จะมีการดึงเอาน้ำออกจาก ซอร์บิทอลให้โครงสร้างอยู่ในรูป cyclic (รูปที่ 4) เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติต่างๆ เช่น การทนความร้อน



รูปที่4. การดึงน้ำออกจากซอร์บิทอล

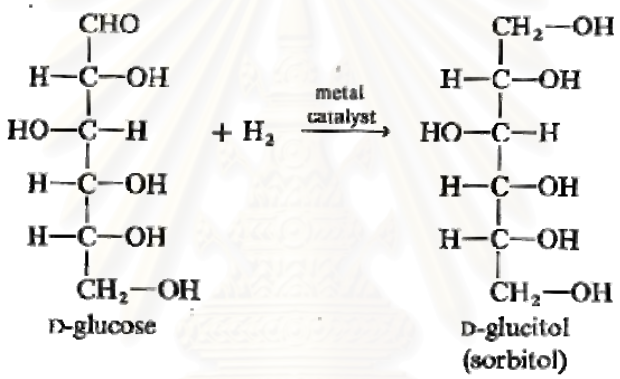
ตารางที่ 4 คุณสมบัติของสารให้ความหวาน(Use of Nutritive and Nonnutritive Sweeteners [pdf]; Journal of THE AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION; Feb 2004; Vol.104 No.2)

สารให้ความหวาน	รสชาติ	ให้พลังงาน (แคลอรี/กรัม)	ทำให้ฟันผุ	หมายเหตุ
ฟรุกโทส	อร่อย	4	ฟันผุ	มีมากในน้ำผลไม้
แลกโทส	ปานกลาง	4	ฟันผุ	มีมากในน้ำนม
มอลทิทอล ซอร์บิทอล ไซลิทอล	อร่อย	2.6	ไม่ผุ	ถ้าบริโภคมากๆ อาจทำให้ท้องเสีย
อีริไธทอล	อร่อย	น้อยกว่า 0.2	ไม่ผุ	ราคาสูงมาก
ซูคราโลส	อร่อย	0	ไม่ผุ	ราคาสูง
สตีเวีย หรือสารสกัดจากหญ้าหวาน	แย่ ถึง ปานกลาง	0	ไม่ผุ	มีปนรสขมของหญ้า
แอสปาร์แตม	ปานกลาง	0 (พลังงานจริงคือ 4 แคลอรี่ แต่เนื่องจากใช้ในปริมาณน้อยมากจึงถือว่าเป็น 0)	ไม่ผุ	ห้ามใช้ปรุงอาหารร้อนบนเตา, ห้ามใช้ในผู้ป่วยโรคฟีนิลคีโตนูเรีย
อะซิซัลแฟม-เค และ แซคคารีน	แย่	0	ไม่ผุ	มีปนรสขมของโลหะ

การผลิตซอร์บิทอล สามารถทำได้หลายวิธี เช่น

วิธีทางเคมี

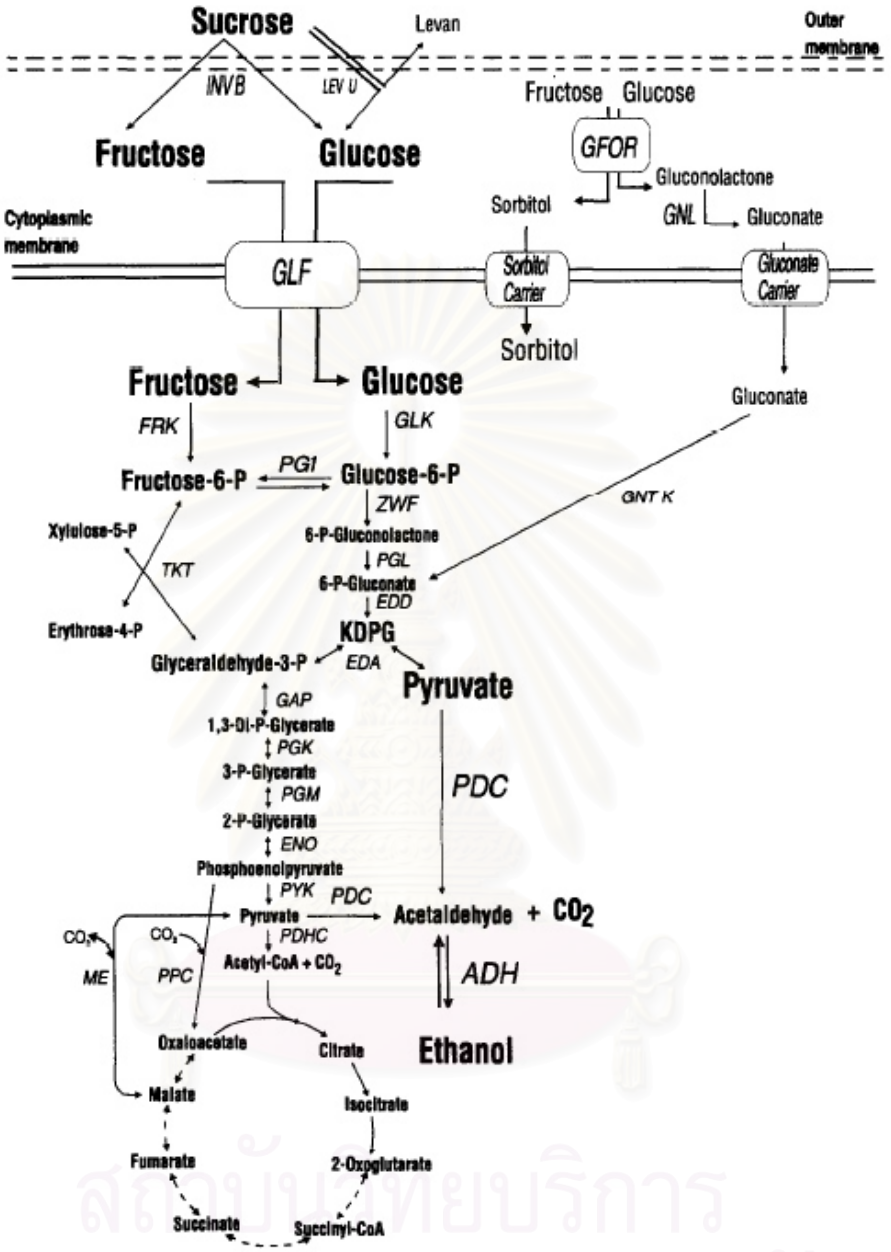
ใช้กระบวนการเติมไฮโดรเจนให้กับน้ำตาลกลูโคส (Hydrogenation) ภายใต้อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส ความดันไอสูง 40-50 บรรยากาศ โดยใช้นิเกิล เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา(Gorp และคณะ, 1999) แต่พบว่ากระบวนการนี้อันตรายและปัญหาสิ่งแวดล้อมจากการกำจัดนิเกิล (Phillips, 1963) อีกทั้งเสียค่าใช้จ่ายสูงในการแยกผลพลอยได้อื่นๆ เพื่อทำให้ซอร์บิทอลบริสุทธิ์ (Kim และ Kim, 1991, Barros และ Celligio, 2006))และสารประกอบนิเกิลบางรูปอาจก่อมะเร็งได้ (http://en.wikipedia.org/wiki/nikle)



รูปที่5. กระบวนการเติมไฮโดรเจนให้กับน้ำตาลกลูโคส

กระบวนการทางชีวภาพ

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในกระบวนการทางชีวภาพเป็นภาวะที่ไม่มีอันตราย ปฏิกิริยามีความจำเพาะสูง และไม่ก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสภาวะแวดล้อม พบว่าจุลินทรีย์บางชนิด เช่น แบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* และยีสต์ *Candida boidini* สามารถที่จะผลิตซอร์บิทอลได้ โดยใช้ฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ *Zymomonas mobilis* สามารถดูดดึงน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้อย่างรวดเร็วและผลิตแอลกอฮอล์ได้เร็วกว่ายีสต์ (Rogers และคณะ1982)



รูปที่6.วิถีการใช้น้ำตาลซูโครสของ *Zymomonas mobilis* (Sprenger, 1996)
(INVB, invertase B; LEV U, levan sucrase; GFOR, glucose-fructose oxidoreductase; GNL, gluconolactonase GNT K, gluconate kinase; GLF, glucose facilitator; FRK, fructokinase; GLK, glucokinase;; KDPG, 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate; PDC, pyruvate decarboxylase; ADH, alcohol dehydrogenase)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การผลิตซอร์บิทอลโดย *Zymomonas mobilis* อาจใช้วิธี ต่างๆกันดังนี้คือ

1. การใช้เซลล์

1.1 การใช้เซลล์อิสระ เป็นการเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์แล้วให้เซลล์ผลิตสารที่เราต้องการ เป็นวิธีที่สะดวกต้นทุนต่ำควบคุมการผลิตง่าย แต่ผลผลิตค่อนข้างต่ำเนื่องมาจากความสามารถของเซลล์มีจำกัด

1.2 การตรึงเซลล์ (Immobilized cells) หมายถึง เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกจำกัดขอบเขตให้อยู่ในบริเวณที่ทำให้จุลินทรีย์ไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่ง และสามารถนำกลับมาใช้ได้หลายครั้งหรือใช้ได้อย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์ที่ถูกตรึงอาจอยู่ในสภาพเซลล์ที่กำลังเจริญ เซลล์ระยะพัก หรือเซลล์ที่ตายแล้วก็ได้ สารที่ใช้ในการตรึงเซลล์มีหลายชนิดการนำมาใช้ก็ขึ้นกับสมบัติของสารเช่น คาร์ราจีแนน เจลมีความแข็งแรงแต่ความคงตัวต่ำ เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่มี gel-inducing agent เซลล์จะรั่วออกมาจากเจลได้ แต่การเติม gel-inducing agent ก็อาจทำให้เกิดการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่ต้องการได้ เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อดี คือ สามารถใช้ซ้ำในระบบกะ หรือระบบต่อเนื่องได้ง่ายกว่า มีโอกาสปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นได้น้อยลง การแยกผลผลิตทำได้ง่ายกว่า เซลล์ที่ถูกตรึงซึ่งเป็นเซลล์ในระยะพักต้องการพลังงานน้อยเพียงเพื่อรักษาสภาพความอยู่รอดทำให้ได้ผลผลิตสูงกว่าการใช้เซลล์อิสระแต่ มีข้อเสีย คือ เซลล์อาจสูญเสียความสามารถบางส่วนในระหว่างการตรึง

1.3 การทำให้ผนังเซลล์มีรูพรุน (Permeabilized cells) อาจใช้วิธีทางกายภาพ เช่น freeze thaw หรือใช้สารเคมีช่วยเช่น toluene วิธีนี้จะทำให้สารตั้งต้นเข้าสู่เซลล์ได้ง่ายขึ้นทำให้ผลิตสารที่ต้องการได้ในเวลาที่เร็วกว่าการใช้เซลล์ปกติแต่วิธีนี้จะทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการเจริญไปเนื่องจากสารที่จำเป็นในการเจริญบางอย่างอาจสูญเสียออกนอกเซลล์ในระหว่างที่มีการทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพแต่ก็อาจใช้สารบางอย่างช่วยลดการสูญเสียสารที่สำคัญภายในเซลล์ได้

2. การใช้เอนไซม์

2.1การใช้เอนไซม์อิสระ วิธีนี้จะทำให้สารตั้งต้นเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้อย่างจำเพาะและรวดเร็วมากที่สุดทำให้ได้ผลผลิตในปริมาณมากและรวดเร็วโดยไม่ต้องสูญเสียไปกับการเจริญของเซลล์เลย แต่การแยกเอนไซม์ออกจากผลผลิตทำได้ยากทำให้การนำกลับมาใช้ซ้ำหรือการใช้อย่างต่อเนื่องทำได้ยากด้วยและวิธีนี้มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับการใช้เซลล์ปกติ

2.2 การตรึงเอนไซม์ วิธีนี้จะทำให้เอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้นและนำกลับมาใช้ใหม่ได้ง่ายกว่าการใช้เอนไซม์อิสระแต่วิธีนี้ต้องสกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์และต้องทำให้บริสุทธิ์เพื่อช่วยลดการสูญเสียความสามารถของเอนไซม์ โดยเฉพาะเอนไซม์ที่เชื่อมติดกับเยื่อหุ้มเซลล์หรือเอนไซม์ที่เมื่อสกัดออกจากเซลล์แล้วไม่คงตัว (สมใจ ศิริโภค, 2547)

การศึกษาการผลิตซอร์บิทอล

- การผลิตซอร์บิทอลโดยใช้น้ำตาลซูโครส

Doelle และ Greenfields (1985) พบว่าซอร์บิทอลเกิดขึ้นเมื่อเลี้ยง *Z. mobilis* ในถังหมักที่ใช้น้ำตาลซูโครสเข้มข้น 20-40% โดยเลี้ยงที่ pH 6.5, 35°C ยิ่งน้ำตาลเข้มข้นขึ้นแบคทีเรียจะใช้เวลาในการหมักนานขึ้นและใช้น้ำตาลได้น้อยลง ปริมาณซอร์บิทอลที่เกิดขึ้นไม่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของน้ำตาลตั้งต้น

โดยปกติซอร์บิทอลสะสมอยู่ในเซลล์เป็นตัวช่วยดึงน้ำไว้ภายในเซลล์เมื่อเซลล์เผชิญกับภาวะออสโมติกสูงๆ ดังนั้นการทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีรูพรุนอาจมีส่วนช่วยทำให้การผลิตซอร์บิทอลง่ายและมากขึ้นเนื่องจากเป็นการเปิดช่องให้ซอร์บิทอลทะลักออกมาจากเซลล์ได้ Vignoli และคณะ(2006) ทดลองใช้ Cetylmethyl ammoniumbromide(CTAB) ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ทะลุ แล้วตรึงเซลล์ไว้ด้วยไคโตซานปริมาณ 10 mg/g cell เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในซูโครสเข้มข้น 30% ที่ 30°C พบว่าการทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ทะลุไม่ช่วยให้การผลิตซอร์บิทอลดีขึ้น แต่การตรึงเซลล์และใช้เวลาเลี้ยง 36 ชม. ให้ผลดีกว่าการเลี้ยงเซลล์อิสระ 12 ชม. อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้ไม่สอดคล้องกับการทดลองของ Chun และ Roger (1988) และ Rehr และคณะ (1991) ซึ่งทดลองใช้ toluene และ detergents ตามลำดับ เพื่อทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ทะลุ พบว่าผลิตซอร์บิทอลได้ถึง 94 และ 98% ปริมาณผลผลิตตามลำดับ

การเติมสารเพิ่มแรงดันออสโมติกเช่น NaCl 0.16 M ซึ่งคิดเป็น Osmolarity ประมาณ 1.9 osmolar/kg พบว่าช่วยทำให้ได้ซอร์บิทอลมากขึ้นกว่าที่ไม่เติมถึง 6.4 เท่า แต่เมื่อเพิ่มขึ้นถึง 0.34 M จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Beckers และคณะ, 2000, Swings และ De Ley, 1977)

เมื่อเติมซอร์บิทอลลงในอาหารที่มีกลูโคสเข้มข้น มากกว่าหรือเท่ากับ 25% Loos และคณะ (1994) พบว่าแบคทีเรียเจริญได้ดีกว่าเมื่อไม่เติม หลังจากการเติมซอร์บิทอล *Z. mobilis* ลำเลียงซอร์บิทอลเข้าสู่เซลล์ตาม Michaelis-Menten kinetics โดยมีค่า Km = 34 mM และ Vmax = 11.2 n mol/min-mg drymass

- การผลิตโดยใช้กลูโคสและฟรุคโตส

จากการศึกษาเอนไซม์กลูโคส-ฟรุคโตส ออกซิโดรีดัคเตส (Glucose-fructose oxidoreductase, GFOR) ทำให้ทราบว่าซอร์บิทอลเกิดจากโมเลกุลฟรุคโตสและการเกิดปฏิกิริยาจะต้องเกิดควบคู่ไปกับการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดกลูโคนิก (Zachariou และ Scopes, 1986) ทำให้ทราบว่าหากนำกลูโคสผสมกับฟรุคโตสแทนซูโครส *Zymomonas* ก็สามารถผลิตซอร์บิทอลได้เลยโดยไม่ต้องย่อยซูโครสก่อน

เมื่อนำเซลล์ *Z. mobilis* ATCC 29191 ไปเลี้ยงในอาหารที่ใช้กลูโคสและฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนซูโครสโดยควบคุมภาวะการเลี้ยงที่ pH 6.5, 30°C Silveira และคณะ (1999) พบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างซอร์บิทอลได้ถึง 91% ปริมาณผลผลิต ในเวลา 6 ชั่วโมง จากน้ำตาลตั้งต้น 650 g/l แต่หากลดน้ำตาลตั้งต้นลงเหลือ 300 g/l จะสามารถผลิตซอร์บิทอลได้ 40% ปริมาณผลผลิตใน 48 นาที การมีซอร์บิทอลสูง 14% w/v พบว่าจะยับยั้งการใช้กลูโคสของแบคทีเรียได้ถึง 80%

เมื่อเลี้ยง *Z. mobilis* ด้วยเทคนิค Fed-batch จากการทดลองของ Shene และ Bravo (2001) พบว่าได้ปริมาณผลผลิตซอร์บิทอล 0.148 g/g คิดเป็นอัตราการเปลี่ยนฟรุคโตสเป็นซอร์บิทอล 71% ที่น้ำตาลตั้งต้น 200 g/l การมีกลูโคสและฟรุคโตสอยู่รวมกันนั้นพบว่ากลูโคสมีการยับยั้งเอนไซม์ฟรุคโตไคเนส ทำให้การใช้กลูโคสเร็วกว่าการใช้ฟรุคโตสถึง 66% (Roger และคณะ, 1982) การยับยั้งนั้นมีค่า K = 0.14 mM (Scope และคณะ, 1985) นอกจากมีผลต่อเอนไซม์แล้วกลูโคสยังมีผลยับยั้งการลำเลียงฟรุคโตสเข้าสู่เซลล์ด้วยเนื่องจากการลำเลียงกลูโคสและฟรุคโตสใช้ระบบลำเลียงเดียวกันโดยระบบลำเลียงแบบ Facilitated diffusion แต่ค่า Km ของกลูโคส = 13 mM ในขณะที่ Km ของฟรุคโตสเท่ากับ 200 mM ทำให้ฟรุคโตสสะสมอยู่นอกเซลล์ (Parker และคณะ, 1997)

- การผลิตซอร์บิทอลโดยใช้กากน้ำตาล

กากน้ำตาลจัดว่าเป็นของเหลือจากอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาลซูโครส ปกติจะใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักแอลกอฮอล์โดยใช้ยีสต์ เมื่อใช้ในการผลิตซอร์บิทอลพบว่าสามารถทำได้ดีที่ความเข้มข้นน้ำตาล 300 g/l, 35 °C และใช้เวลา 36 ชั่วโมง ได้ซอร์บิทอลสูงที่สุดคือ 13.87 g/l (Cazetta และคณะ, 2005) ในขณะที่ผลิตแอลกอฮอล์ได้ 55.37 g/l ที่ 30 °C โดยใช้เวลา 48 ชั่วโมง (Cazetta และคณะ, 2007)

กระบวนการหมักแบบกะ (batch)

กระบวนการหมักแบบ batch เป็นกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้เจริญในระบบปิด ซึ่งส่วนใหญ่ทำในขวดเขย่าหรือถังหมักที่มีสารอาหารเหมาะสมต่อการเจริญ และเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะที่เหมาะสม กระบวนการหมักแบบนี้ไม่มีการเติมสารอาหาร เซลล์จะเจริญจนกระทั่งองค์ประกอบของสารอาหารที่จำเป็นหมดไป หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม เนื่องจากสะสมสารพิษหรือ pH เปลี่ยนแปลง เป็นต้น การเจริญของเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ batch แบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ ดังนี้

1. ระยะฟักตัว (lag phase) ระยะนี้เริ่มต้นเมื่อใส่จุลินทรีย์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นระยะที่เซลล์ยังไม่มีการเจริญ เนื่องจากเป็นระยะที่จุลินทรีย์กำลังปรับตัว เพื่อให้สามารถเจริญได้ในสิ่งแวดล้อมใหม่ ระยะนี้จะใช้เวลานานเท่าใดขึ้นกับลักษณะการเจริญของกล้าเชื้อ ในอุตสาหกรรมต้องทำให้สั้นที่สุดเพื่อลดต้นทุนการผลิต

2. ระยะการเจริญแบบทวีคูณ (log หรือ exponential phase) เป็นระยะที่เซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้นตามลำดับจนกระทั่งคงที่ ระยะนี้เซลล์มีอัตราการเจริญแบบทวีคูณ

3. ระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) เมื่อสิ้นสุดระยะการเจริญแบบทวีคูณ อัตราการเจริญจะลดลงจนกระทั่งเป็นศูนย์ ระยะนี้ความหนาแน่นของเซลล์ค่อนข้างคงที่ และไม่มีการเจริญของเซลล์ ซึ่งถึงแม้ว่าเซลล์จะมีการเจริญ แต่อัตราการเจริญเท่ากับอัตราการตาย การที่เซลล์หยุดการเจริญเนื่องจากสารอาหารจำเป็นหมดไป การสะสมสารพิษ หรือสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนแปลง เช่น ค่า pH เซลล์ที่ดำรงชีพได้ระยะนี้ เนื่องจากเหตุผลหลายประการ คือ ภายในเซลล์มีพอลิเมอร์บางประเภทสะสมอยู่ ซึ่งเซลล์สามารถนำมาใช้เป็นซับสเตรทได้ หรือมีการพัฒนารูปแบบเซลล์ให้ทนต่อสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น การสร้างสปอร์

4. ระยะการเจริญแบบลดลง (decline หรือ death phase) เป็นระยะที่จุลินทรีย์มีอัตราการตายมากกว่าอัตราการเจริญ (Scragg,1991; Snape และคณะ,1995; Asenjo และ Merchuk,1995)

การเจริญของจุลินทรีย์ในระยะ log phase สามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

เซลล์ที่สะสม = เซลล์เจริญ-เซลล์ออก-เซลล์ตาย

$$dX/dt = \mu X - (F/V)X - aX \qquad (1)$$

เมื่อเซลล์ไม่ถูกนำออกจากระบบ และ a น้อยกว่า μ มาก เขียนสมการ (1) ใหม่ได้

$$dX/dt = \mu X \quad (2)$$

เมื่อ X = ความเข้มข้นมวลชีวภาพ (g/l)

t = เวลา (h)

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) (h^{-1})

F = อัตราการป้อนอาหารเข้า (l/h)

V = ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ (l)

a = อัตราการตายจำเพาะ (h^{-1})

เมื่ออินทิเกรตสมการ (2) จะได้

$$X_t = X_o e^{\mu t} \quad (3)$$

เมื่อ X_o = ความเข้มข้นมวลชีวภาพเริ่มต้น (g/l)

X_t = ความเข้มข้นมวลชีวภาพหลังการเพาะเลี้ยงเชื้อ ณ เวลา t ชั่วโมง (g/l)

e = ฐานของ natural logarithm

เมื่อใส่ natural logarithm ในสมการ (3) จะได้

$$\mu = [\ln (X_t/X_o)]/t \quad (4)$$

$Y_{p/s}$ คือผลผลิตผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อซับสเตรทที่ใช้ไป เป็นพารามิเตอร์สำคัญที่แสดงถึงประสิทธิภาพการเปลี่ยนซับสเตรทไปเป็นผลิตภัณฑ์ $Y_{p/s}$ สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$Y_{p/s} = \Delta P/\Delta S$$

เมื่อ ΔP = ผลต่างของผลิตภัณฑ์

ΔS = ผลต่างของซับสเตรทที่ถูกใช้ไป

อัตราการผลิต (productivity) ของกระบวนการหมักแบบ batch แสดงค่าในเทอมของกรัมผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นต่อหน่วยปริมาตรต่อหน่วยเวลา หรือ กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch)

กระบวนการหมักแบบ fed-batch คือกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ โดยมีการเติมสารอาหาร 1 ครั้ง หรือมากกว่าลงภาชนะที่ใช้ในการหมักในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ แต่ไม่มีการนำของเหลวที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อออกจากระบบจนสิ้นสุดการหมัก ปริมาตรของของเหลวในกระบวนการหมักแบบนี้จะเพิ่มขึ้น ในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้กระบวนการหมักแบบนี้ความเข้มข้นของสารอาหารป้อนเข้าในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถควบคุมได้โดยการเปลี่ยนอัตราการป้อนเข้า ดังนั้นกระบวนการหมักแบบ fed-batch จึงได้เปรียบกว่ากระบวนการหมักแบบ batch

เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของสารอาหารเปลี่ยนแปลงมีผลทำให้ผลผลิตที่ได้หรืออัตราการผลิตของเมตาบอไลท์ที่ต้องการให้เพิ่มสูงขึ้น

ปัจจัยที่ส่งผลให้กระบวนการหมักแบบ fed-batch มีประสิทธิภาพมากกว่าการเพาะเลี้ยงแบบ batch

1. กระบวนการหมักแบบ fed-batch สามารถลดผลการยับยั้งได้โดยการเติบสารอาหารดังกล่าวครั้งละน้อยๆ ซึ่งทำให้ความเข้มข้นของสารอาหารไม่สูงเกินไป

2. สามารถเพาะเลี้ยงแบบให้ความหนาแน่นของเซลล์สูง เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแบบ batch ที่มีความเข้มข้นของซับสเตรทสูง อาจจะไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ ทำให้ได้ความเข้มข้นเซลล์ต่ำ

3. เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ด้วยแหล่งคาร์บอนที่ให้พลังงานอย่างรวดเร็ว เช่น กลูโคส อาจจะเกิดการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ เป็นสาเหตุให้เมตาบอลิซึมของแหล่งพลังงานเกิดขึ้นได้ช้าลง ซึ่งเรียกว่าการยับยั้งแบบนี้ว่า catabolite repression ดังนั้นกระบวนการหมักแบบ fed-batch สามารถควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารให้ต่ำได้โดยการควบคุมการป้อนเข้า มีผลให้กระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ไม่ถูกยับยั้ง

4. สามารถเพาะเลี้ยงจุลินทรย์สายพันธุ์กลายไม่สามารถสังเคราะห์สารจำเป็นบางชนิดได้ (autotrophic mutants) ให้เจริญภายใต้การควบคุมการป้อนสารอาหารที่จำเป็น เพื่อให้สามารถสะสมเมตาบอไลท์ที่ต้องการในปริมาณมากได้ ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ดังกล่าววนี้การให้สารอาหารที่จำเป็นในปริมาณมากเกินไปส่งผลให้มีการเจริญสูงแต่การสะสมผลิตภัณฑ์ต่ำเนื่องจากการยับยั้งแบบ feedback inhibition และ /หรือ end-product repression

5. สามารถเพาะเลี้ยงจุลินทรย์เพื่อผลิตสารที่ต้องการเมื่อเปลี่ยนภาวะการเลี้ยงเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้กระบวนการหมักแบบ fed-batch 2 ขั้นตอน

การจัดจำแนกกระบวนการหมักแบบ fed-batch โดยอาศัยเทคนิคการป้อนสารอาหาร

จุดประสงค์หลักของการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch คือการควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นวิธีการป้อนสารอาหารให้เหมาะสมจะมีผลต่อประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงสามารถแบ่งกระบวนการหมักแบบนี้ออกเป็น 2 ประเภท คือแบบ with feedback control และ without feedback control

1. แบบ without feedback control

กระบวนการหมักแบบนี้อัตราการป้อนเข้าจะเปลี่ยนแปลงระหว่างการเพาะเลี้ยงตามข้อมูลที่ได้มีการศึกษามาก่อน ส่วนใหญ่การเพาะเลี้ยงแบบนี้ในยุคเริ่มต้นจะมีการป้อนสารอาหารเป็นช่วง ๆ เนื่องจากเป็นวิธีการง่าย การป้อนสารอาหารเป็นช่วงที่มีความถี่ให้ผลที่มีลักษณะใกล้เคียงกับการป้อนสารอาหารแบบต่อเนื่อง

2. แบบ with feedback control

กระบวนการหมักแบบ fed-bacth ที่ใช้เทคนิคแบบนี้ แบ่งได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

2.1 with indirect feedback control

กระบวนการหมักแบบนี้ ใช้พารามิเตอร์ที่สามารถสังเกตได้ซึ่งมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับลักษณะของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากจุลินทรีย์ พารามิเตอร์ที่ใช้เช่น ค่าออกซิเจนละลาย ค่า pH ความเข้มข้นเมตาบอไลท์ และความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ในกรณีของ pH แบ่งออกได้เป็น 2 วิธีการคือ low limit เมื่อ pH มีแนวโน้มลดลงระหว่างการเพาะเลี้ยงและ high limit เมื่อ pH มีแนวโน้มสูงขึ้นในระหว่างการหมัก จะมีการป้อนสารอาหารเข้าสู่ระบบ

2.2 with direct feedback control

ความเข้มข้นของสารอาหารป้อนเข้าในอาหารเลี้ยเงชื้อจะถูกวัดแบบต่อเนื่องหรือแบบเป็นช่วง ๆ ซึ่งข้อมูลที่ได้ใช้เป็น feedback parameter โดยตรง กระบวนการหมักแบบนี้จำเป็นต้องมีการตรวจวัดความเข้มข้นของสารป้อนเข้าที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยระบบการวัดด้วยเซนเซอร์ (sensor detector system) ซึ่งมีการวิจัยและคิดค้นไบโอเซนเซอร์หลายชนิดเพื่อนำมาประยุกต์ใช้กับระบบดังกล่าว ถ้าสารอาหารที่ใช้เป็นสารป้อนเข้าเป็นสารระเหย เช่น แอลกอฮอล์ สามารถใช้ tubing sensor ได้ดี

การขยายส่วนการผลิต (scale-up of production scale)

เนื่องจากปัจจุบันความต้องการสารทางชีวภาพมีมากขึ้น ทำให้ต้องมีการเพิ่มผลผลิตซึ่งทำได้โดยการขยายส่วนกำลังการผลิตการผลิตที่ได้จากกระบวนการหมัก ในการขยายส่วนกำลังการผลิตต้องอาศัยความรู้ เทคนิค และข้อมูลจากการทำงานในระดับห้องปฏิบัติการที่ได้ผลผลิตในระดับที่น่าพอใจ อย่างไรก็ตามการนำข้อมูลจากห้องปฏิบัติการไปใช้ในการขยายส่วนการผลิตนั้นพบว่าเกิดปัญหาหลายอย่าง แต่ปัญหาหนึ่งที่สำคัญคือ ผลผลิตที่ได้ในระดับขยายส่วนนั้นมักไม่ดีเท่ากับในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งสาเหตุเกิดจากความแตกต่างในด้านต่างๆได้แก่ เทคนิคการให้อากาศและการกวน การทำให้อาหารปลอดเชื้อ การเตรียมหัวเชื้อ การกำจัดฟอง ชนิดของวัสดุและวัตถุดิบที่ใช้ โดยปัจจัยที่มีผลต่อการขยายส่วนมี 3 ปัจจัย คือ ปัจจัยทางกายภาพ ปัจจัยทางเคมี และปัจจัยทางชีวภาพ

ปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ ลักษณะทางเรขาคณิตของถังหมัก การให้อากาศ การปั่นกวน การทำให้อาหารปลอดเชื้อ การควบคุมอุณหภูมิ ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ สารเคมีที่ใช้ในการควบคุม pH (ชนิดและความเข้มข้นของกรดและเบส) คุณภาพของอาหารและน้ำที่ใช้ ปัจจัยทางชีวภาพ ได้แก่ การเตรียมกล้าเชื้อ (inoculum development) เนื่องจากในระดับการผลิตขนาดใหญ่มีขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อหลายขั้นจึงอาจเกิดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ชนิดอื่นและการกลายพันธุ์

โดยทั่วไปแล้วลำดับขั้นในการขยายขนาดควรจะน้อยที่สุดเท่าที่เป็นไปได้ อย่างไรก็ตามถ้าทำเช่นนี้จะเป็นการขยายขนาดโดยที่ปริมาตรต่างกันมากเกินไปซึ่งอาจทำให้การขยายส่วนการผลิตผิดพลาดได้มาก โดยทั่วไปแล้วจำนวนลำดับขั้นที่เหมาะสมควรเป็น 4 ขั้นตอนดังนี้ ขวดเขย่า (shake flask) ปริมาตรระหว่าง 50-1000 มิลลิลิตร ถังหมักแบบกวนในระดับห้องปฏิบัติการ (Lab stirred fermentor) ปริมาตรระหว่าง 5-20 ลิตร ถังหมักขนาดต้นแบบ (Pilot-scale fermentor) ปริมาตรระหว่าง 50-5000 ลิตร ถังหมักขนาดเพื่อการผลิต (Production fermentor) ปริมาตรระหว่าง 25-1000 ลิตร ลูกบาศก์เมตร โดยจะต้องทำการขยายขนาดจากระดับห้องปฏิบัติการไปสู่ระดับเพื่อการผลิตเพียง 3 ครั้งเท่านั้น ได้แก่

1. ขวดเขย่า (shake flask)

ในการเริ่มต้นงานวิจัยจะเริ่มจากขวดเขย่าเสมอเพราะจะสามารถทราบตัวแปรในการทดลองมากมายในเวลาอันสั้น โดยสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายน้อยและสามารถหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตผลิตภัณฑ์ได้ในการทดลองระดับนี้

2. ถังหมักแบบกวนในระดับห้องปฏิบัติการ (lab stirred fermentor)

การขยายขนาดการผลิตจากระดับขวดเขย่าไปสู่ระดับโรงงานต้นแบบหรือระดับเพื่อการผลิตโดยตรงในขั้นตอนเดียวนั้นไม่เป็นที่ยอมรับเนื่องจากมีความแตกต่างกันมากเกินไปในส่วนของกล้าเชื้อ การฆ่าเชื้ออาหาร การให้อากาศ และการกวน และมีเหตุผล 2 อย่างที่สนับสนุนการขยายขนาดการผลิตจากระดับขวดเขย่าไปสู่ระดับถังหมักแบบกวนในระดับห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ถังหมักขนาดเล็กในระดับห้องปฏิบัติการใช้กล้าเชื้อแบบเดียวกับที่ใช้ในระดับขวดเขย่า ดังนั้นตัวแปรหลักในการทดลองจะถูกกำจัดไปได้ 1 ตัว และมีพารามิเตอร์บางตัวที่เราไม่สามารถหาได้ในระดับขวดเขย่า เช่น ผลของ pH การให้อากาศและการกวน และผลของการป้อนสารอาหาร ต่อการเจริญของเซลล์และการสร้างผลิตภัณฑ์ ซึ่งผลของพารามิเตอร์เหล่านี้สามารหาได้จากการทดลองในถังหมักขนาดเล็กในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งสะดวกกว่าการทำการทดลองในถังหมักขนาดต้นแบบ ทั้งทางปฏิบัติและดีกว่าในแง่เศรษฐศาสตร์ด้วย

3. ถังหมักระดับโรงงานต้นแบบ (pilot-scale fermentor)

การทดลองในถังหมักระดับนี้เป็นขั้นตอนหนึ่งในกระบวนการขยายขนาด ในขั้นตอนนี้จะศึกษาการเตรียมกล้าเชื้อที่เหมาสม และหาภาวะในการฆ่าเชื้อใหม่ที่พอเหมาะก่อนที่จะเริ่มทำการหมักในระดับต้นแบบเพื่อการผลิตต่อไป

Factorial design

การทดลองแบบแฟคตอเรียล (Factorial experiment) เป็นการทดลองหลายปัจจัยประเภทหนึ่ง ซึ่งนอกจากจะทำให้สามารถศึกษาอิทธิพลของแต่ละปัจจัยตามต้องการได้แล้ว ยังทำให้ทราบข้อความรู้ที่สำคัญที่ไม่สามารถจะหาได้จากการทดลองปัจจัยเดียว นั่นคือข้อความรู้เกี่ยวกับอิทธิพลร่วมหรือปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างปัจจัย

ทรีทเมนต์ ที่ใช้ในการทดลองแบบแฟคตอเรียลเกิดจากการนำระดับ (levels) ของปัจจัยตั้งแต่สองปัจจัยขึ้นไปมาใช้ร่วมกันทำให้เกิดเป็นทรีทเมนต์คอมบิเนชั่น(treatment combinations) ดังนั้นการทดลองแบบแฟคตอเรียลจึงเป็นเพียงการจัดรูปของทรีทเมนต์ที่ใช้ทดลองใหม่เท่านั้น แผนการทดลองที่ใช้ในการจัดทรีทเมนต์ให้แก่หน่วยทดลอง ยังคงอาศัยแผนการทดลองพื้นฐานแบบใดแบบหนึ่งดังกล่าวแล้ว กล่าวคือถ้าหน่วยทดลองที่ใช้ทดลองมีความสม่ำเสมอกันจะจัดทรีทเมนต์คอมบิเนชั่นให้กับหน่วยทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด ถ้าหน่วยทดลองมีสาเหตุที่ทำให้เกิดความผันแปรสองสาเหตุ จะต้องจัดกลุ่มหน่วยทดลองในสองทิศทางและจัดทรีทเมนต์คอมบิเนชั่นให้กับหน่วยทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบลาตินสแควร์

1. สัญลักษณ์ที่ใช้ในการทดลองแบบแฟคตอเรียล

การทดลองแบบแฟคตอเรียลเป็นการทดลองที่มีปัจจัยที่ต้องการศึกษาตั้งแต่ 2 ปัจจัยขึ้นโดยแต่ละปัจจัยจะมีจำนวนระดับตั้งแต่ 2 ระดับ สัญลักษณ์ที่ใช้ในการทดลองแบบแฟคตอเรียลที่นิยมใช้โดยทั่วไปอาจกำหนดได้ดังนี้

1.ใช้อักษรตัวใหญ่ (A, B, C, …) แทนชื่อของปัจจัย (factor) เช่นใช้ A แทนปัจจัยเกี่ยวกับสายพันธุ์ และใช้ B แทนปัจจัยเกี่ยวกับระยะปลูก ในบางกรณีผู้ทดลองอาจใช้ตัวอักษรที่สื่อความหมายของปัจจัยนั้นๆแทน เช่นใช้ V แทนปัจจัยเกี่ยวกับสายพันธุ์ (variety) และใช้ S แทนปัจจัยเกี่ยวกับระยะปลูก (spacing)

2.ใช้อักษรตัวเล็กพร้อมทั้งมีตัวเลขเป็นตัวห้อย (subscript) แทนระดับของปัจจัยเช่น ใช้ a1 และ a2 แทนระดับที่1 และ 2 ของปัจจัย A และใช้ b1 และ b2 แทนระดับที่ 1 และ 2 ของปัจจัย B

3. ถ้ากำหนดให้ปัจจัย A มีจำนวนระดับเท่ากับ a และปัจจัย B มีจำนวนระดับ b จะเรียกชื่อการทดลองเป็น a*b แฟคตอเรียล ดังนั้นการทดลองแบบ 2*3 แฟคตอเรียลจึงหมายถึงการทดลองที่มี 2 ปัจจัย โดยปัจจัยแรกมี 2 ระดับและปัจจัยที่สองมี 3 ระดับ โดยมีทรีทเมนต์คอม

บิเนชั่นทั้งหมดเท่ากับ 2*3 = 6 ทรีทเมนต์ ได้แก่ a1b1 a1b2 a1b3 a2b1 a2b2 a2b3 ถ้าเป็นการทดลองที่มี 3 ปัจจัยจะเขียนได้เป็น a*b*c แฟคตอเรียล เช่น 4*3*2 แฟคตอเรียล จะหมายถึงการทดลองที่มีปัจจัย A 4 ระดับ ปัจจัย B 3 ระดับ และปัจจัย C 2 ระดับ ซึ่งจะมีจำนวนทรีทเมนต์คอมบิเนชั่นที่ใช้ทดลองเท่ากับ 4*3*2 = 24 ทรีทเมนต์

ในกรณีที่ปัจจัยแต่ละปัจจัยมีจำนวนระดับเท่ากัน เช่น การทดลองแบบแฟคตอเรียลที่มี 3 ปัจจัย โดยแต่ละปัจจัยมี 2 ระดับ อาจเขียนเป็น 2^3 แฟคตอเรียล ดังนั้นการทดลองแบบ 2^k แฟคตอเรียล และ 3^k แฟคตอเรียลจึงเป็นการทดลองที่มี k ปัจจัย โดยแต่ละปัจจัยมี 2 ระดับ และ 3 ระดับตามลำดับ

2. **อิทธิพลหลักและอิทธิพลร่วม**

อิทธิพลของทรีทเมนต์ที่เกิดขึ้นในการทดลองแบบแฟคตอเรียลที่เรียกว่า อิทธิพลของแฟคตอเรียล (factorial effects) อาจแยกได้เป็น 2 ประเภทคือ

1. อิทธิพลหลัก (main effects) ซึ่งเป็นอิทธิพลของปัจจัยแต่ละปัจจัย เช่น อิทธิพลหลักของปัจจัย A (A effect) จะหมายถึงความแตกต่างระหว่างระดับของปัจจัย A

2. อิทธิพลร่วม (interactions) ซึ่งเป็นอิทธิพลของปัจจัยตั้งแต่ 2 ปัจจัยขึ้นไป ซึ่งเกิดร่วมกันหรือมีปฏิสัมพันธ์ต่อกัน เช่น อิทธิพลร่วมของ 2 ปัจจัย (two-factor interaction หรือ first-order interactions) อิทธิพลร่วมของ 3 ปัจจัย (three-factor interactions หรือ second-order interactions) เป็นต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์สารเคมีและวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 อุปกรณ์

- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) รุ่น BE600 บริษัท Memmert, Germany
- ตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) CLEAN รุ่น V3-4 บริษัท Triwork Ltd., Thailand
- หม้อนึ่งความดัน (autoclave) TOMY รุ่น SS-325 บริษัท Tommy Seiko Co., Ltd. Tokyo, Japan
- ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 บริษัท Memmert, Germany
- ตู้อบความร้อนแห้ง (hot air oven) รุ่น UE600 บริษัท Memmert, Germany
- Column HPLC รุ่น All Tech Carbohydrate ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร
- เครื่องชั่งน้ำหนักหยาบ (Laboratory Balance) รุ่น PB3002 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
- เครื่องชั่งน้ำหนักละเอียด (Analytical Balance) รุ่น L2200p บริษัท Sartorius, Germany
- กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) Olympus รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus optical Co.,Ltd. Japan
- เครื่องเขย่าแบบหมุน (shaker) รุ่น innova 2100 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Inc.Edison, USA
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเบส (pH meter) รุ่น SevenEasy บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
- เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (micro centrifuge) รุ่น Spectrafuge บริษัท National Labnet, Co., Edison, USA
- เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (micro refrigerated centrifuge) Kubota รุ่น 6500 บริษัท Kubota Corp., Tokyo Japan
- เครื่องไมโครเวฟ (microwave oven) Turbora รุ่น MW-2020
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Genesys 20 บริษัท Spectronic Unicam, USA

- ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) Sharp อุณหภูมิ -20°C
- เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น G560-E บริษัท Scientific Industries, Inc., NewYork, USA
- ไมโครปิเปต (automatic adjustable micropipette) P2 (0.1-2µl), P10 (0.5-10µl), P20 (2-20µl), P100 (20-100µl), P1000 (0.2-1ml) บริษัท Gilson, France
- ปิเปตต์ทิป (pipette tip) ขนาด 1-200 µl และ 1 ml บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
- หลอดไมโครทิวป์ (microtubes) ขนาด 1.5 ml บริษัท Axygen Scientific, Inc. USA
- กระบอกฉีดยา (syringe) ขนาด 1 ml บริษัท Nipro(Thailand) Corp., LTD., Thailand
- กระดาษกรอง (Nylon membrane syringe filter) ขนาด 0.45 µm บริษัท Sartorius, Germany
- ถังหมักขนาด 2 ลิตร บริษัท Marubishi, Japan

1.2 **สารเคมี**

- สารสกัดจากเปปโทน (Bacto peptone) บริษัท Difco Laboratories, USA
- สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) บริษัท Difco Laboratories, USA
- แอมโมเนียมซัลเฟต บริษัท Merck, Germany
- โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต บริษัท Merck, Germany
- แมกนีเซียมซัลเฟต บริษัท Merck, Germany
- น้ำตาลกลูโคส บริษัท Merck, Germany
- น้ำตาลฟรุคโตส บริษัท Merck, Germany
- น้ำตาลซูโครส บริษัท Merck, Germany
- น้ำตาลซอร์บิทอล บริษัท Merck, Germany
- กรดไฮโดรคลอริก บริษัท Merck. Germany
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ บริษัท Merck. Germany
- อะซิโตไนไตรด์ (HPLC grade) บริษัท Merck, Germany

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 จุลินทรีย์

Zymomonas mobilis TISTR 548 จากศูนย์รวมพันธุ์จุลินทรีย์สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (Bangkok MIRCEN) เก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อ Z ที่มีน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการถ่ายเชื้อทุก 3 สัปดาห์

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ Z ประกอบด้วย KH_2PO_4 2 g. l^{-1}, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g. l^{-1}, $MgSO_4$ 2 g. l^{-1}, yeast extract 2 g. l^{-1}, peptone 5 g. l^{-1} และ ซูโครส 200 g. l^{-1}

3.4 วิธีเตรียมหัวเชื้อ

เขี่ยเชื้อจาก stock culture ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอุดมที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการเขย่าให้อากาศ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับค่าการดูดกลืนแสง ที่ 550 นาโนเมตร ให้มีค่า 0.3 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีมีแหล่งคาร์บอน เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในการทดลองต่อไป

3.5 วิธีทดลองแบบ 2^n factorial design

ศึกษาผลของปัจจัยร่วมต่างๆที่มีต่อการผลิตซอร์บิทอลทดลองโดยวิธี 2^n factorial analysis (Cazetta และคณะ 2005) โดยปัจจัยที่ทำการศึกษามี4ปัจจัยคือ ความเข้มข้นของน้ำตาล ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และระยะเวลาในการผลิต

- ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสผสมฟรุคโตส 300-650 กรัมต่อลิตร
- ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.5-6.5
- อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส
- เวลาในการเลี้ยงเชื้อ 24-48 ชม.

เลี้ยงเชื้อโดยการแปรผันปัจจัยต่างๆดังที่กล่าวมาแล้ว โดยปิเปตหัวเชื้อตั้งต้นปริมาตร 15% (v/v) ลงในอาหารที่เราจะทำการทดลองให้มีปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 125 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่ภาวะต่างๆ ตามตารางการทดลองที่ออกแบบโดยใช้ 2^n factorial analysis (ภาคผนวก จ.)

3.6 การผลิตซอร์บิทอลในขวดทดลองรูปชมพู่

ปิเปตเชื้อจากหัวเชื้อตั้งต้นปริมาตร 15% (v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอุดมที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน(น้ำตาลกลูโคส,ฟรุคโตสผสมกลูโคส, ซูโครส ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร) ให้มีปริมาตรรวมเป็น 50 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 125 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างเป็นระยะ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.7 การผลิตซอร์บิทอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ปิเปตเชื้อจากหัวเชื้อตั้งต้นปริมาตร 15% (v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอุดมที่มีน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนให้มีปริมาตรรวมเป็น 1 ลิตรในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ เลี้ยงด้วยภาวะ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 ไม่มีการกวนให้อากาศ แต่จะกวน 80 รอบต่อนาทีเมื่อมีการเก็บตัวอย่างหรือควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ทำการเก็บตัวอย่างเป็นระยะจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก

3.8 วิธีเติมน้ำตาลในการผลิตซอร์บิทอลแบบ fed-batch ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

เมื่อเชื้อเจริญเข้าสู่ช่วงปลายของ log phase จึงทำการเติมน้ำตาลซูโครส 200 กรัมลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพและกวนด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาทีจนน้ำตาลละลายเป็นเนื้อเดียวกับน้ำหมักและปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 5.5 จึงหยุดกวนแล้วทำการเลี้ยงเซลล์ต่อไปเมื่อเชื้อเจริญเข้าสู่ช่วงปลาย log phase อีกครั้งจึงทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.2 แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อไป เก็บตัวอย่างเป็นระยะจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก

3.9 วิธีวิเคราะห์

3.9.1 วิธีวิเคราะห์ กลูโคส ฟรุคโตส ซูโครสและซอร์บิทอล

โดยการนำน้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตรมาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสไปกรองด้วย Nylon membrane filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร (ใช้สำหรับกรองสารละลาย) นำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล กลูโคส,ฟรุคโตส, ซูโครส และซอร์บิทอล ด้วยวิธี HPLC ด้วย Prevail Carbohydrate ES column flow 1ml/min ACN : water 80:20

3.9.2 วิธีวิเคราะห์การเจริญและน้ำหนักแห้งของเซลล์

- วิเคราะห์ปริมาณเซลล์แบคทีเรียโดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

- นำน้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์ โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปใส่ในถ้วยอลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว อบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักถ้วยที่มีเซลล์อบแห้ง คำนวณปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ค.) ในหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

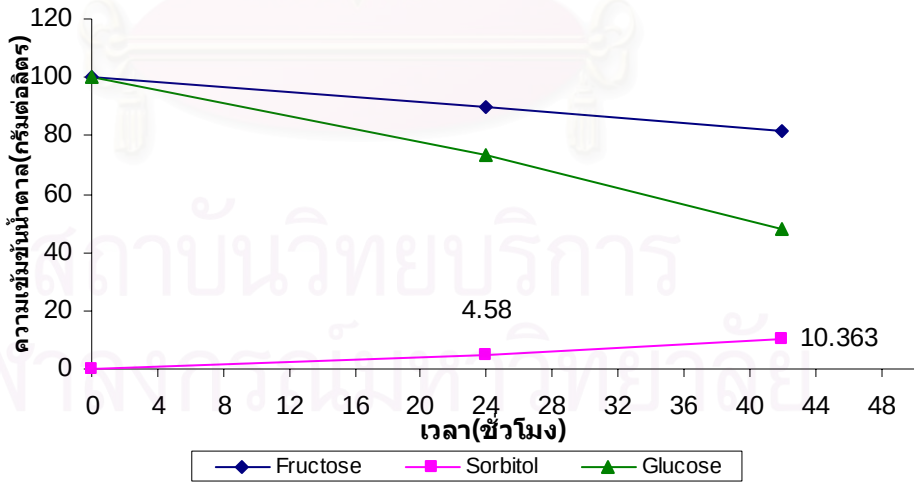
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

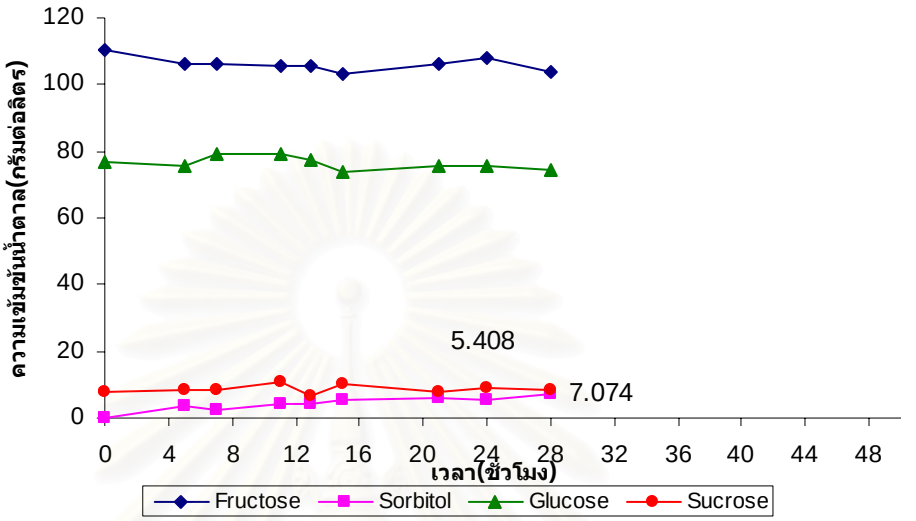
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

4.1 การหาชนิดน้ำตาลที่เหมาะสำหรับใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการผลิตซอร์บิทอล

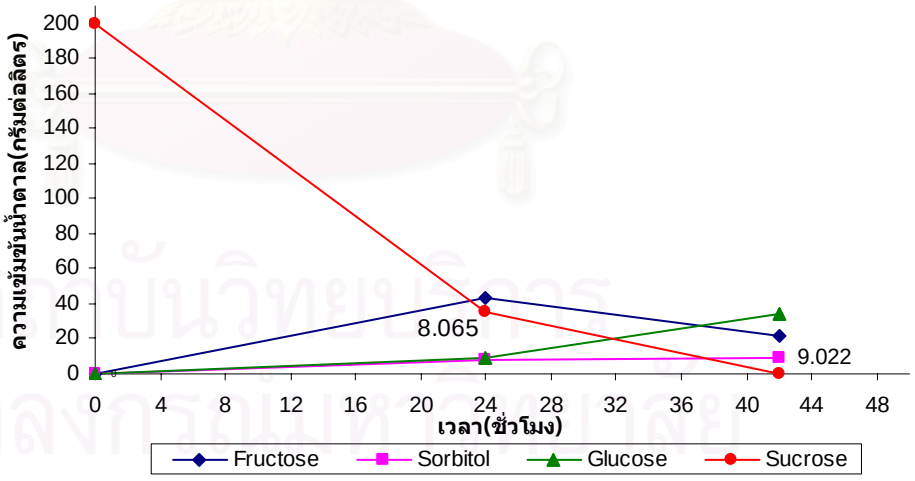
การทดลองนี้ต้องการหาชนิดน้ำตาลที่จะใช้ทำเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นระหว่างน้ำตาลกลูโคสและซูโครส ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร เนื่องจากต้องการกระตุ้นให้เชื้อได้เจอกับภาวะแรงออสโมติกสูงเกือบตลอดเวลาพบว่าหัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้น้ำตาลซูโครสให้ผลผลิตซอร์บิทอลใกล้เคียงกับหัวเชื้อเริ่มต้นจากน้ำตาลกลูโคสคือ 7.07 กรัมต่อลิตร (รูปที่8) และ 10.36 กรัมต่อลิตร (รูปที่7) อีกทั้งยังใช้เวลาในการเจริญน้อยกว่าด้วย แต่เมื่อผลิตซอร์บิทอลโดยมีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนนั้นหัวเชื้อเริ่มต้นจากน้ำตาลซูโครสให้ผลผลิตซอร์บิทอลสูงกว่าหัวเชื้อเริ่มต้นจากน้ำตาลกลูโคสคือ 15.13 กรัมต่อลิตร (รูปที่10) และ 9.02 กรัมต่อลิตร (รูปที่9) อีกทั้งยังใช้เวลาในการเจริญน้อยกว่าด้วย จากการทดลองดังกล่าวจึงสรุปได้ว่าควรใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนในหัวเชื้อเริ่มต้นนอกจากนี้ซูโครสยังมีราคาถูกกว่าน้ำตาลกลูโคส



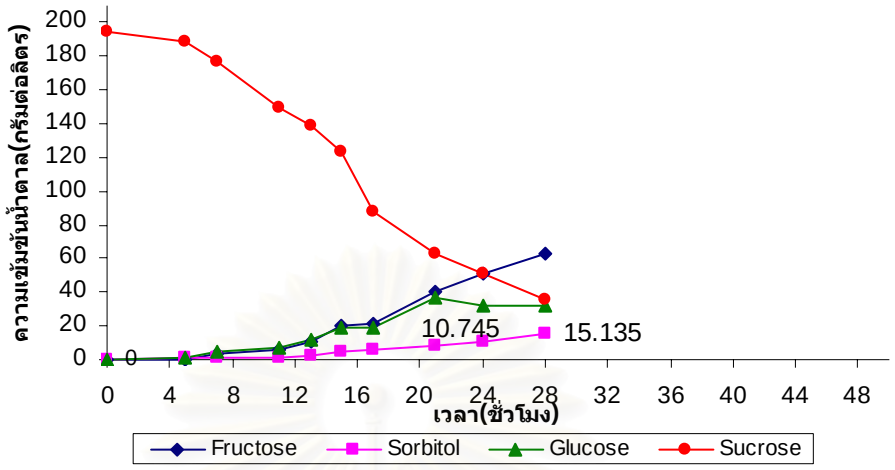
รูปที่7. การผลิตซอร์บิทอลจากกลูโคสผสมฟรุคโตสโดยใช้หัวเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน



รูปที่8. การผลิตซอร์บิทอลจากกลูโคสผสมฟรุคโตสโดยใช้หัวเชื้อที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน



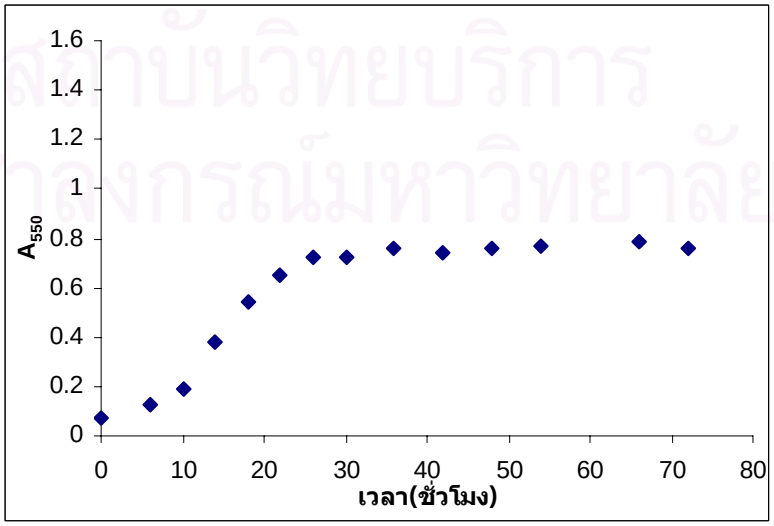
รูปที่9. การผลิตซอร์บิทอลจากซูโครสโดยใช้หัวเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน



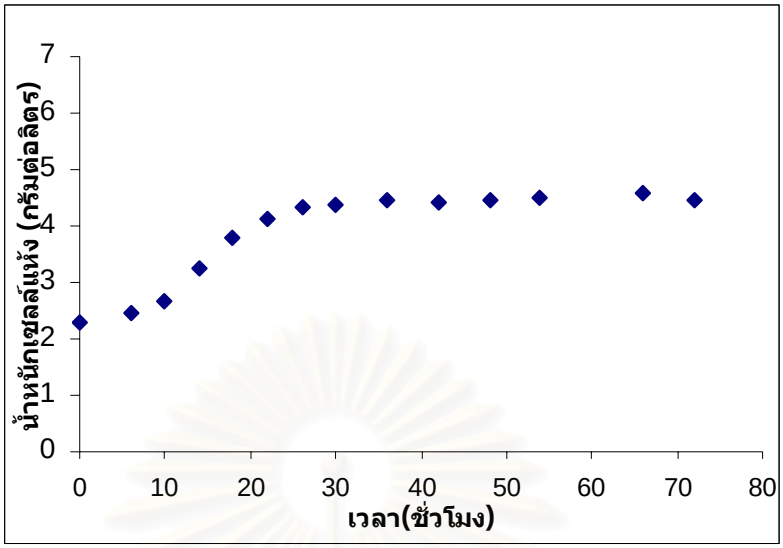
รูปที่10 การผลิตซอร์บิทอลจากซูโครสโดยใช้หัวเชื้อที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

4.2 ช่วงการเจริญที่เหมาะสมสำหรับใช้ทำหัวเชื้อ

การหาช่วงการเจริญสูงสุดของเชื้อโดยใช้น้ำตาลซูโครส 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนพบว่าเชื้อมีความขุ่นสูงสุดที่เวลาประมาณ 18-22 ชั่วโมง ซึ่งเป็นรอยต่อระหว่าง late logphase และ stationary phase (รูปที่11) ซึ่งมีรายงานว่าเชื้อจะมีการปล่อย Invertase และ Levansucrase ออกมาช่วงปลาย logphase ดังนั้นจึงใช้หัวเชื้อเริ่มต้นจากการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 18-22 ชั่วโมง เพื่อลดเวลาช่วง lag phase ในการผลิตซอร์บิทอลโดยมีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน



รูปที่ 11 ช่วงการเจริญที่เหมาะสมสำหรับใช้ทำหัวเชื้อเริ่มต้น



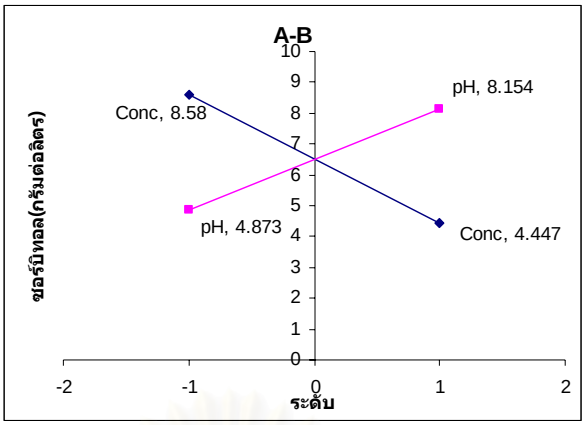
รูปที่ 12 น้ำหนักเซลล์แห้งที่ช่วงเวลาต่างๆ

4.3 ภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตซอร์บิทอลในขวดทดลอง

เมื่อนำปัจจัย 4 ชนิดคือความเข้มข้นกลูโคสผสมฟรุคโตส, ค่าความเป็นกรด-ด่าง, อุณหภูมิ และเวลา มาหาภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ 2^4 central composite factorial design ตาม Cazettea และคณะ (2007) การทดลองชุดแรกแปรผันที่ความเข้มข้นน้ำตาล 300-600 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อไม่เจริญทั้งหมดอาจเนื่องมาจากแรงดันออสโมติกสูงเกินไปจึงทำการทดลองอีกครั้งโดยลดความเข้มข้นของน้ำตาลลงมาเป็น 100-200 กรัมต่อลิตร

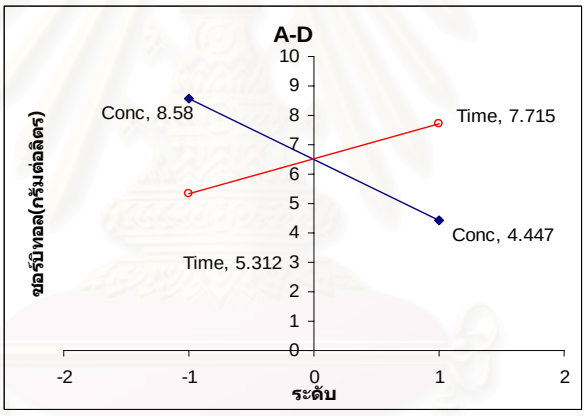
จากตารางที่ 5 เมื่อพิจารณาซอร์บิทอลที่ได้จากผลของปัจจัยทีละปัจจัยจะพบว่าการใช้น้ำตาลตั้งต้นเป็นกลูโคสผสมฟรุคโตสเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร ทำให้การผลิตซอร์บิทอลน้อยกว่าความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ถึง 48 เปอร์เซนต์, pH 6.5 ให้ผลดีกว่า pH 5.5 40 เปอร์เซนต์ อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส ให้ผลไม่แตกต่างกัน ในขณะที่เพิ่มเวลาในการหมักจาก 24 เป็น 48 ชั่วโมงจะให้ซอร์บิทอลเพิ่มขึ้น 45เปอร์เซนต์ ดังนั้นเบื้องต้นสรุปได้ว่า น้ำตาลความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร pH 6.5 และเวลาหมัก 48 ชั่วโมงเป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดในขอบเขตที่ทำการศึกษา

เมื่อพิจารณาผลกระทบระหว่าง 2 ปัจจัย (ตารางที่5) จะเห็นว่าการเพิ่ม pH จาก 5.5 เป็น 6.5 จะทำให้การผลิตซอร์บิทอลเพิ่มขึ้นไม่ว่าน้ำตาลจะเพิ่มขึ้น 100 หรือ 200 กรัมต่อลิตร ก็ตามแต่ที่ 100 กรัมต่อลิตร จะเห็นการเพิ่มขึ้นมากกว่าโดยเพิ่มขึ้นถึง 83 เปอร์เซนต์ ในขณะที่ที่ 200 กรัมต่อลิตร จะมีการเพิ่มซอร์บิทอลขึ้น 41 เปอร์เซนต์ และมีความเข้มข้นซอร์บิทอลน้อยกว่า แสดงว่าความเข้มข้นของน้ำตาลมีผลกระทบต่อผลจาก pH แต่เป็นผลค้านกัน (รูปที่13) และการที่กราฟของทั้ง2ปัจจัยตัดกันแสดงให้เห็นว่าปัจจัยทั้ง2มีปฏิสัมพันธ์ต่อกันในการผลิตซอร์บิทอล



รูปที่13.กราฟแสดงอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลกับค่าความเป็นกรด-ด่าง

ในทำนองเดียวกันความเข้มข้นกับเวลาหมักและเวลาหมักกับอุณหภูมิก็มีผลเช่นเดียวกัน โดยที่น้ำตาลเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร เพิ่มเวลาหมักขึ้น 24 ชั่วโมง จะมีซอร์บิทอลเพิ่มขึ้น 50 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพิ่มเวลาหมักขึ้น 24 ชั่วโมง ซอร์บิทอลเพิ่มขึ้นถึง 96 เปอร์เซ็นต์ (รูปที่14)



รูปที่14. กราฟแสดงความหมายของอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นน้ำตาลกับเวลา

เมื่อพิจารณาทีละ 3 ปัจจัย จะเห็นได้ชัดว่า pH อุณหภูมิ และเวลาหมักเสริมกันกล่าวคือ เมื่อเพิ่ม pH อุณหภูมิ และเวลาหมักจะทำให้ซอร์บิทอลเพิ่มขึ้นโดยที่น้ำตาล 100 กรัมต่อลิตร จะได้ผลดีกว่า 200 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจาณา 4 ปัจจัยพร้อมๆกัน (ตารางที่ 5) ผลยืนยันว่าการใช้ภาวะ pH 6.5 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เวลาหมัก 48 ชั่วโมง จะให้ผลเสริมกันทำให้ได้ซอร์บิทอล 14.68 กรัมต่อลิตร (รูปที่15)ค่ากลางถึง 3 เท่า จากผลการทดลองดังกล่าวจึงสรุปได้ว่า pH 6.5, อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เวลาหมัก 48 ชั่วโมงและความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสผสมฟรุคโตส 100 กรัมต่อลิตร เป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับผลิตซอร์บิทอล และปัจจัยเหล่านี้มีผลเสริมกันยกเว้นความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสผสม ฟรุคโตส

เป็นที่ทราบว่ากลูโคสจะยับยั้งการลำเลียงและการใช้ฟรุคโตส (Doelle 1982a) ดังนั้นเมื่อยังมีกลูโคสในอาหารการใช้ฟรุคโตสสำหรับเมตาบอลิสมจะช้าทำให้มี ฟรุคโตสสะสมไว้สร้างซอร์บิทอล ด้วยภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ GFOR คือ pH 6.5 , อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสซึ่งตรงกับการรายงานของ Zachariou และ Scopes, 1986 รวมทั้งเวลาที่นานกว่าด้วย ดังนั้นจึงทำให้แบคทีเรียสร้างซอร์บิทอลได้มากแต่ถ้าน้ำตาลเข้มข้นขึ้นมากเกินจะทำให้การเจริญของแบคทีเรีย
และการใช้น้ำตาลช้าลง การผลิตซอร์บิทอลจึงช้าลงด้วย (Doelle และ Green field, 1987, Loos และคณะ 1994, Barros และ Celligio 2006)

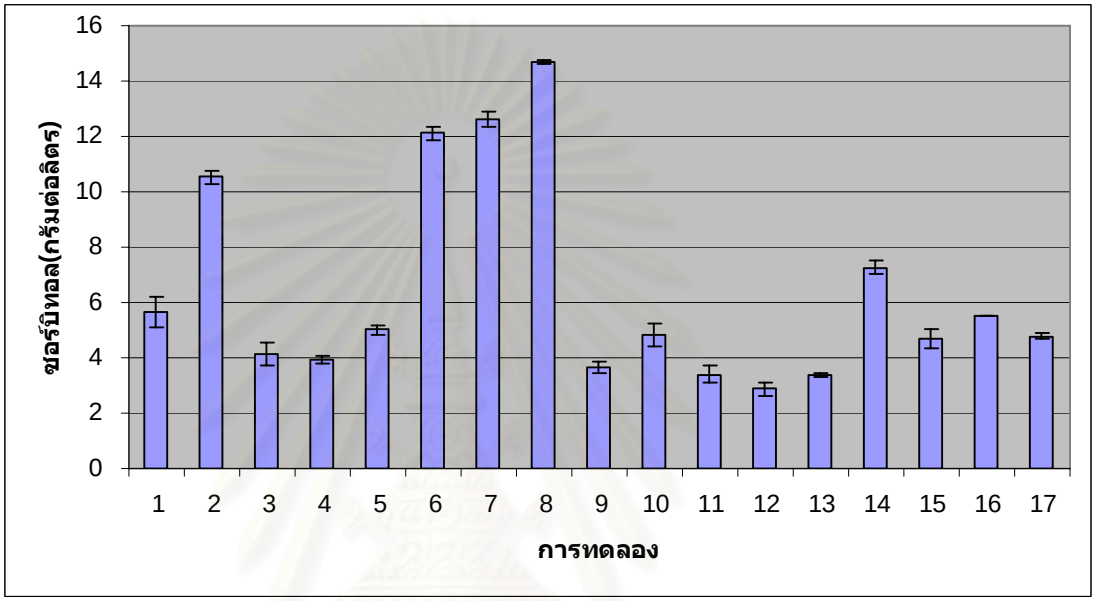
กำหนดให้

A = 100-200 กรัมต่อลิตร, B = pH 5.5-6.5, C = อุณหภูมิ 25-35° ซ, D = เวลา24-48ชั่วโมง

ตารางที่5เปรียบเทียบผลวิเคราะห์น้ำตาลซอร์บิทอลจากการหมักน้ำตาลกลูโคสผสมฟรุคโตส

4 Factors

Factor	Run	Sorbitol(g/l)
A-/B-/C-/D-	1	5.627
A-/B-/C-/D+	2	10.524
A-/B-/C+/D-	3	4.137
A-/B-/C+/D+	4	3.931
A-/B+/C-/D-	5	5.021
A-/B+/C-/D+	6	12.111
A-/B+/C+/D-	7	12.606
A-/B+/C+/D+	8	**14.686**
A+/B-/C-/D-	9	3.655
A+/B-/C-/D+	10	4.843
A+/B-/C+/D-	11	3.407
A+/B-/C+/D+	12	2.864
A+/B+/C-/D-	13	3.366
A+/B+/C-/D+	14	7.244
A+/B+/C+/D-	15	4.679
A+/B+/C+/D+	16	5.524
$(ABCD)^0$	17,18,19	**4.786**



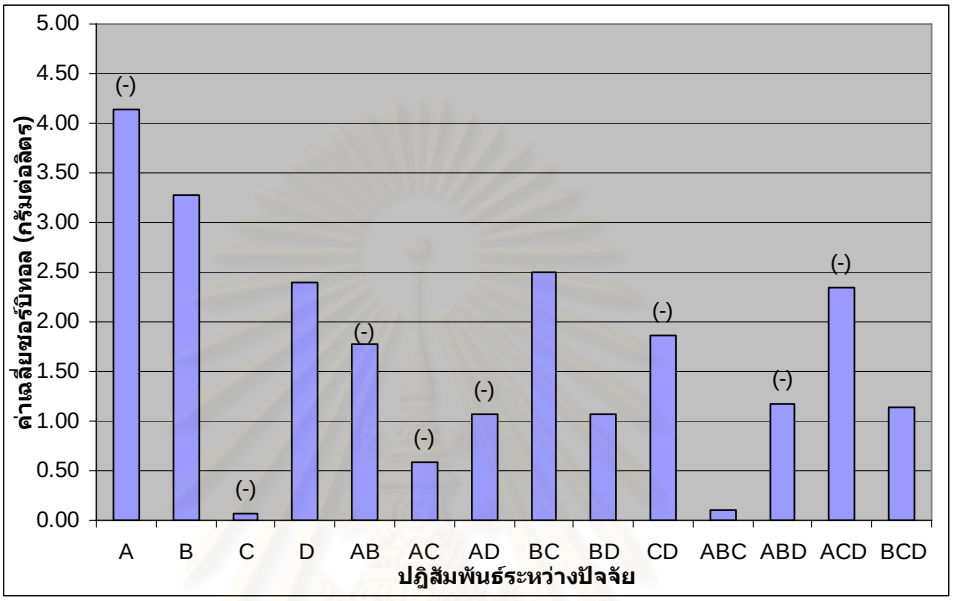
รูปที่15. เปรียบเทียบซอร์บิทอลจากการหมักน้ำตาลกลูโคสผสมฟรุคโตส

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบผลวิเคราะห์น้ำตาลซอร์บิทอลจากการหมักน้ำตาลกลูโคสผสมฟรุคโตส

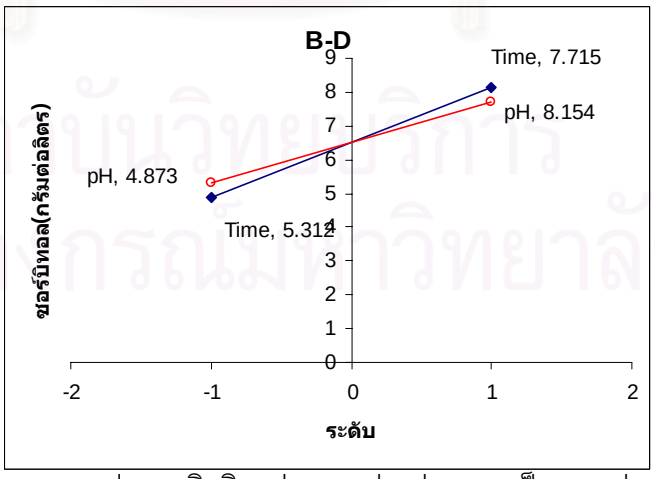
1 Factor

Factor	Run	Sorbitol(g/l)
A -	1-8	8.580
A +	9-16	4.447
B -	1-4, 9-12	4.873
B +	5-8, 13-16	8.154
C –	1,2,5,6,9,10,13,14	6.548
C +	3,4,7,8,11,12,15,16	6.479
D -	1,3,5,7,9,11,13,15	5.312
D +	2,4,6,810,12,14,16	7.715

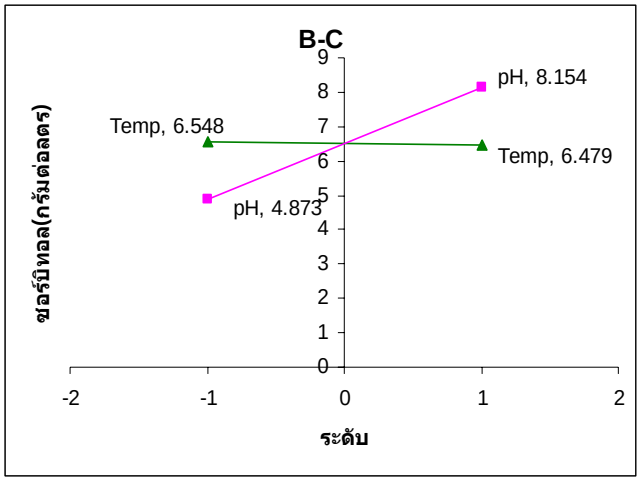
จากการศึกษาอิทธิพลและปฏิสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยพบว่า ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตซอร์บิทอลมากที่สุดคือ ความเข้มข้นน้ำตาล รองลงมาคือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เวลา และอุณหภูมิ ตามลำดับ (รูปที่16)และพบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลเสริมกันกับเวลา (รูปที่17.1) และอุณหภูมิแทบจะไม่มีผลต่อการผลิตซอร์บิทอลเลย (รูปที่17.2)



รูปที่16. อิทธิพลและปฏิสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยที่มีต่อการผลิตซอร์บิทอล
(A = ความเข้มข้นน้ำตาล, B = pH, C = อุณหภูมิ, D = เวลา)



รูปที่17.1 กราฟแสดงอิทธิพลร่วมระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่างกับเวลา



รูปที่17.2 กราฟแสดงอิทธิพลร่วมระหว่างอุณหภูมิกับค่าความเป็นกรด-ด่าง

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบผลวิเคราะห์น้ำตาลซอร์บิทอลจากการหมักน้ำตาลกลูโคสผสมฟรุคโตส

2 Factors

Factor	Run	Sorbitol(g/l)
A-/B-	1-4	6.054
A-/B+	5-8	11.106
A+/B-	9-12	3.692
A+/B+	13-16	5.203
A-/C-	1,2,5,6	8.320
A-/C+	3,4,7,8	8.840
A+/C-	9,10,13,14	4.777
A+/C+	11,12,15,16	4.118
A-/D-	1,3,5,7	6.847
A-/D+	2,4,6,8	10.313
A+/D-	9,11,13,15	3.776
A+/D+	10,12,14,16	5.118
B-/C-	1,2,9,10	6.162
B-/C+	3,4,11,12	3.584
B+/C-	5,6,13,14	6.935
B+/C+	7,8,15,16	9.373
B-/D-	1,3,9,11	4.206
B-/D+	2,4,10,12	5.540
B+/D-	5,7,13,15	6.418
B+/D+	6,8,14,16	9.891
C-/D-	1,5,9,13	4.417
C-/D+	2,6,10,14	8.680
C+/D-	3,7,11,15	6.207
C+/D+	4,8,12,16	6.751

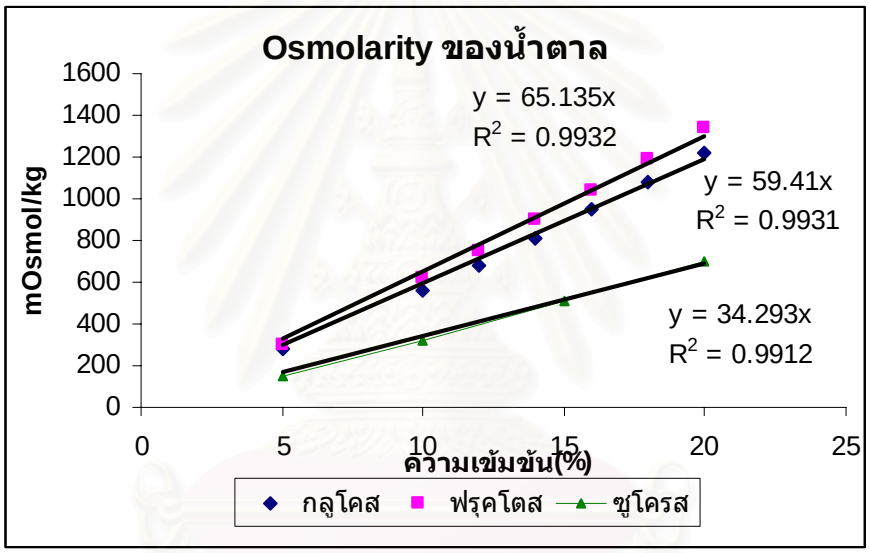
ตารางที่ 5 เปรียบเทียบผลวิเคราะห์น้ำตาลซอร์บิทอลจากการหมักน้ำตาลกลูโคสผสมฟรุคโตส

3 Factors

Factor	Run	Sorbitol(g/l)
A-/B-/C-	1,2	8.075
A-/B-/C+	3,4	4.034
A-/B+/C-	5,6	8.566
A-/B+/C+	7,8	13.646
A+/B-/C-	9,10	4.249
A+/B-/C+	11,12	3.135
A+/B+/C-	13,14	5.305
A+/B+/C+	15,16	5.101
B-/C-/D-	1,9	4.641
B-/C-/D+	2,10	7.683
B-/C+/D-	3,11	3.772
B-/C+/D+	4,12	3.397
B+/C-/D-	5,13	4.193
B+/C-/D+	6,14	9.677
B+/C+/D-	7,15	8.642
B+/C+/D+	8,16	10.105
A-/C-/D-	1,5	5.324
A-/C-/D+	2,6	11.317
A-/C+/D-	3,7	8.371
A-/C+/D+	4,8	9.308
A+/C-/D-	9,13	3.510
A+/C-/D+	10,14	6.043
A+/C+/D-	11,15	4.043
A+/C+/D+	12,16	4.194
A-/B-/D-	1,3	4.882
A-/B-/D+	2,4	7.227
A-/B+/D-	5,7	8.813
A-/B+/D+	6,8	13.398
A+/B-/D-	9,11	3.531
A+/B-/D+	10,12	3.853
A+/B+/D-	13,15	4.022
A+/B+/D+	14,16	6.384

4.4 การหาค่า Osmolarity ของน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

จากการวิเคราะห์หาค่า Osmolarity ของน้ำตาลกลูโคสผสมฟรุคโตส ความเข้มข้น 10% พบว่ามีค่าอยู่ที่ประมาณ 600 mOsmol/kg ซึ่งการที่เชื้อจะสามารถสร้างซอร์บิทอลได้มากหรือน้อยนั้นขึ้นกับความดันออสโมติกด้วยจึงลองเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนมาเป็นซูโครสซึ่งเทียบแล้วได้ความเข้มข้นประมาณ 15% แต่จากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าการใช้น้ำตาลความเข้มข้นต่ำกว่า 15% จะได้ซอร์บิทอลในปริมาณน้อยมาก จึงได้นำภาวะที่ได้จากข้อ 4.4 มาทดลองผลิตซอร์บิทอลโดยใช้ซูโครสความเข้มข้น 20% เป็นแหล่งคาร์บอนในการทดลองต่อไป



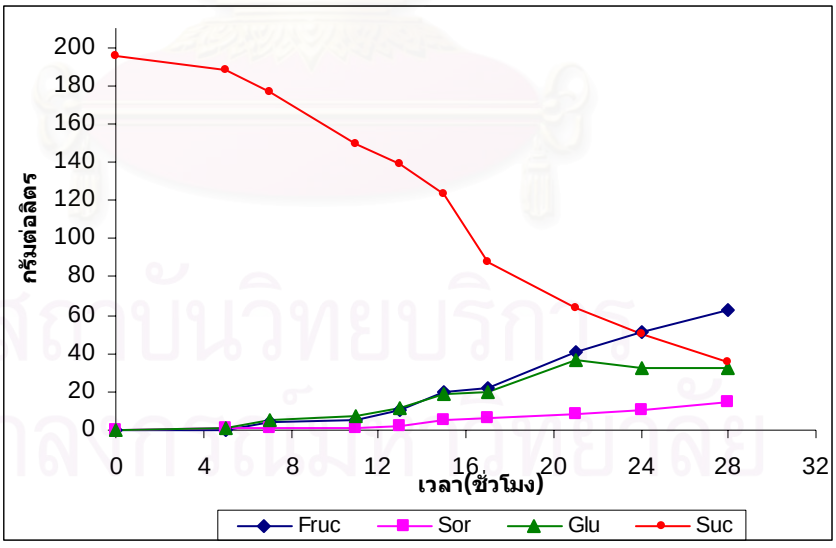
รูปที่18. ค่า Osmolarity ของน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตสและซูโครส

การผลิตซอร์บิทอลของ *Z. mobilis* ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารโดยความเข้มข้นของน้ำตาลจะมีผลโดยตรงต่อ osmolarity และ osmotic pressure (Doelle และ Greenfield, 1985) ดังนั้นการวัด osmolarity ของน้ำตาลเพื่อใช้ควบคุมการผลิตซอร์บิทอลจึงเป็นเรื่องสำคัญ จากการทดลองพบว่าน้ำตาลซูโครสมีผลเพิ่ม osmolarity ของสารละลายน้อยกว่ากลูโคสและฟรุคโตสตามลำดับ (รูปที่18) ดังนั้น *Z. mobilis* จึงควรจะเจริญในซูโครสที่ความเข้มข้นสูงกว่ากลูโคสและฟรุคโตสดังนั้นการทดลองต่อไปจะใช้น้ำตาลซูโครสแทนสารละลายผสมกลูโคสและฟรุคโตสโดยเลือกความเข้มข้นที่ให้ osmolarity เท่ากัน

4.5 การผลิตซอร์บิทอลโดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

จากการทดลองด้วย factorial design ได้นำมาทดลองผลิต ซอร์บิทอลแต่ใช้ซูโครส 20% เหตุที่ใช้ซูโครส 20% คือ *Zymomonas mobilis* จะต้องย่อยซูโครสก่อนและน้ำตาลกลูโคสสูงสุดที่เป็นไปได้คือ 10% เท่านั้นและ osmolarity ของซูโครส 20% คือ 685.8 mOsmol/kg ในขณะที่กลูโคส 10% และฟรุคโตส 10% มีค่า osmolarity เท่ากับ 594+651 = 1245 mOsmol/kg ดังนั้นซูโครสจึงมีค่า osmolarity ต่ำกว่ากลูโคสผสมฟรุคโตสถึง 2 เท่า เมื่อซูโครสถูกย่อยเป็นกลูโคสและฟรุคโตสจะทำให้ osmolarity ของสารละลายยังคงสูงอยู่เป็นการบังคับให้ *Z. mobilis* สร้างซอร์บิทอลเพิ่มขึ้นและต้นทุนต่ำ เนื่องจากราคาซูโครสต่ำกว่ากลูโคสและฟรุคโตส

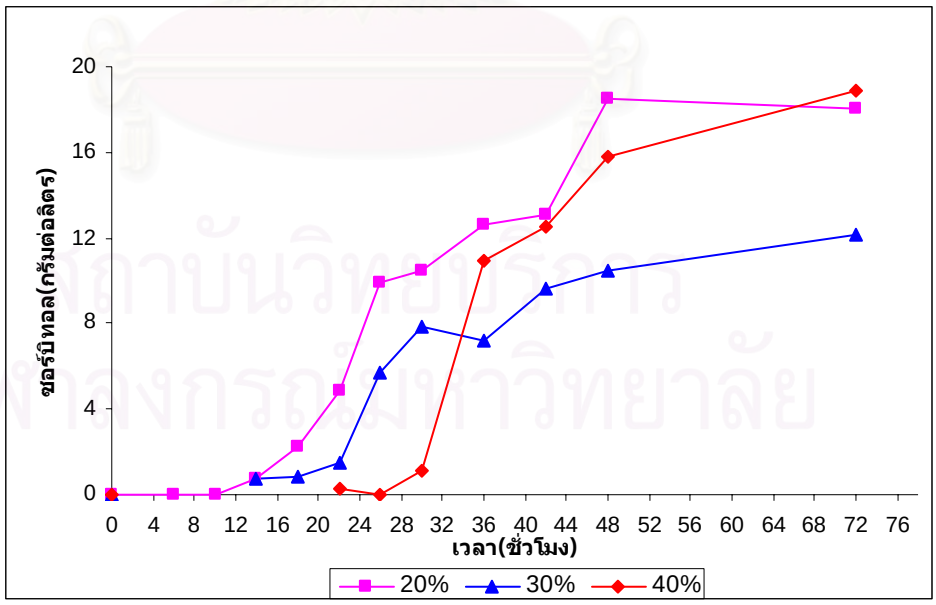
จากการทดลอง ซึ่งใช้น้ำตาลซูโครส 200 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้น้ำตาลซูโครสเป็นอาหารเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นพบว่าน้ำตาลซูโครสลดลงอย่างรวดเร็วด้วยอัตราค่อนข้างสม่ำเสมอนับตั้งแต่ชั่วโมงที่ 5 ไปจนถึงชั่วโมงที่ 28 (รูปที่19) ซอร์บิทอลที่ได้คือ 15.13 กรัมต่อลิตร (0.54 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) จากน้ำตาลที่วิเคราะห์ได้ 194.86 กรัมต่อลิตร ตามทฤษฎีน่าจะมีฟรุคโตส 102.6 กรัมต่อลิตร และจากการที่มีฟรุคโตสเหลือในอาหาร 62.92 กรัมต่อลิตร ดังนั้นฟรุคโตสจึงถูกใช้ไป 39.67 กรัมต่อลิตร เมื่อคิดเป็นปริมาณผลผลิตซอร์บิทอลจึงเท่ากับ 0.38 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 19. การผลิตซอร์บิทอลจากน้ำตาลซูโครสตั้งต้น 200 กรัมต่อลิตร

4.6 ผลิตซอร์บิทอลในขวดรูปชมพู่ด้วยน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 200-400 กรัมต่อลิตร

พบว่าการใช้น้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่ 200 กรัมต่อลิตร ให้ซอร์บิทอลมากที่สุดคือ 18.52 กรัมต่อลิตรเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งมากกว่าการใช้น้ำตาล 400 และ 300 กรัมต่อลิตร ซึ่งได้ซอร์บิทอล 15.82 และ 10.46 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นั่นคือน้ำตาลเข้มข้นมากขึ้นทำให้ระยะเวลาที่เริ่มสร้างซอร์บิทอลนานขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Loos และคณะ (1994) ที่พบว่าการเจริญของ *Z. mobilis* จะมี log phase ยาวขึ้น เมื่อเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นและจะมีการสะสมซอร์บิทอลเพื่อต่อต้านแรงดันออสโมติกที่เกิดจากความเข้มข้นของน้ำตาลภายนอกเซลล์ (Sprenger,1996. ; Silveira และคณะ1999)นั่นคือเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลจะทำให้มีการสร้างซอร์บิทอลในปริมาณสูงขึ้นด้วย (Bekers และคณะ 2000. ; Erzinger และคณะ 2003. ; Vignoli และคณะ, 2006) จึงสรุปได้ว่าการเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำตาลซูโครส 200 กรัมต่อลิตร จะทำให้ได้ปริมาณซอร์บิทอลสูงสุดและยังใช้เวลาน้อยอีกด้วย คิดเป็น อัตราการผลิตสูงสุดคือ 0.386 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามตารางที่6 อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้น 400 กรัมต่อลิตร หากเพิ่มเวลาการเลี้ยงไปจน 72 ชั่วโมง แม้ว่าจะได้ซอร์บิทอลเพิ่มขึ้นเป็น 18.91 กรัมต่อลิตร แต่ก็ต้องใช้เวลานานเพิ่มขึ้นอีกถึง 24 ชั่วโมงหรือ 79.17 เปอร์เซนต์ (รูปที่20)



รูปที่20. การผลิตซอร์บิทอลในขวดทดลอง

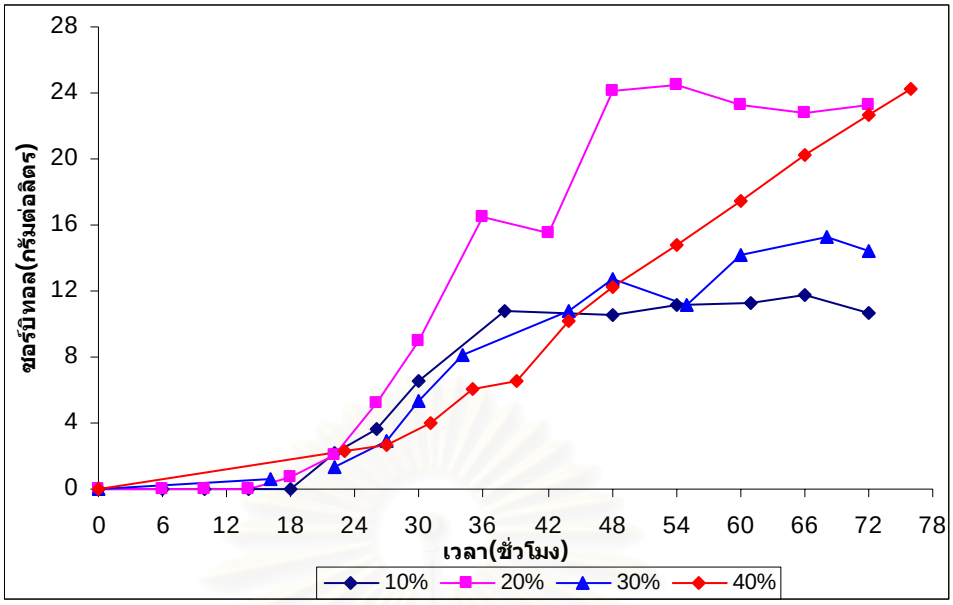
ตารางที่6 ปริมาณซอร์บิทอลที่เวลา 48 ชั่วโมง (คิดจากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นภายหลังเติมหัวเชื้อเริ่มต้น)

ความเข้มข้น (%)	ปริมาณซอร์บิทอล (g/l)	อัตราการผลิต (g/l-h)	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	Q_P (h^{-1})
20	18.521	0.386	0.45	8.410	0.37
30	10.463	0.218	0.29	6.381	0.19
40	15.828	0.330	0.24	14.465	0.22

4.7 เพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 2 ลิตร และหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตซอร์บิทอลแบบกะ

จากผลการทดลอง 4.4 ได้ทำการขยายขนาดโดยทำการผลิตซอร์บิทอลในถังหมักพบว่าเลี้ยงเชื้อที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้น 6.5 โดยมีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 100, 200, 300 และ 400 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นที่ให้ค่าซอร์บิทอลสูงสุดคือ 200 รองลงไปคือ 300, 400 และ 100 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยได้ผลผลิต 24.069, 12.726, 12.22 และ 10.605 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (รูปที่21และตารางที่ 7) และแม้ว่าความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 400 กรัมต่อลิตรจะให้ค่าซอร์บิทอลสูงสุดคือ 24.282 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 76 ชั่วโมง แต่ก็ต้องใช้เวลาเพิ่มขึ้นถึง 28 ชั่วโมง ดังนั้นความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 200 กรัมต่อลิตร จึงน่าจะเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตซอร์บิทอล ซึ่งผลการทดลองก็สอดคล้องกับการทดลองในขวดรูปชมพู่ก่อนหน้านี้และยังสอดคล้องกับ บุญรัตน์ และคณะ (2534) ซึ่งพบว่าการเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำตาลซูโครสตั้งต้น 200-250 กรัมต่อลิตร ให้ค่าการผลิตซอร์บิทอลสูงสุด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่21. การผลิตซอร์บิทอลแบบกะในถังหมัก

ตารางที่7. การผลิตซอร์บิทอลในถังหมักแบบกะที่เวลา48ชั่วโมง (คิดจากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นภายหลังเติมหัวเชื้อ)

ความเข้มข้น (%)	ปริมาณซอร์บิทอล (g/l)	อัตราการผลิต (g/l-h)	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	Q_P (h^{-1})
10	10.605	0.221	0.134	2.658	0.134
20	24.069	0.501	0.244	10.977	0.404
30	12.726	0.265	0.138	4.940	0.118
40	12.22	0.255	0.106	11.017	0.323

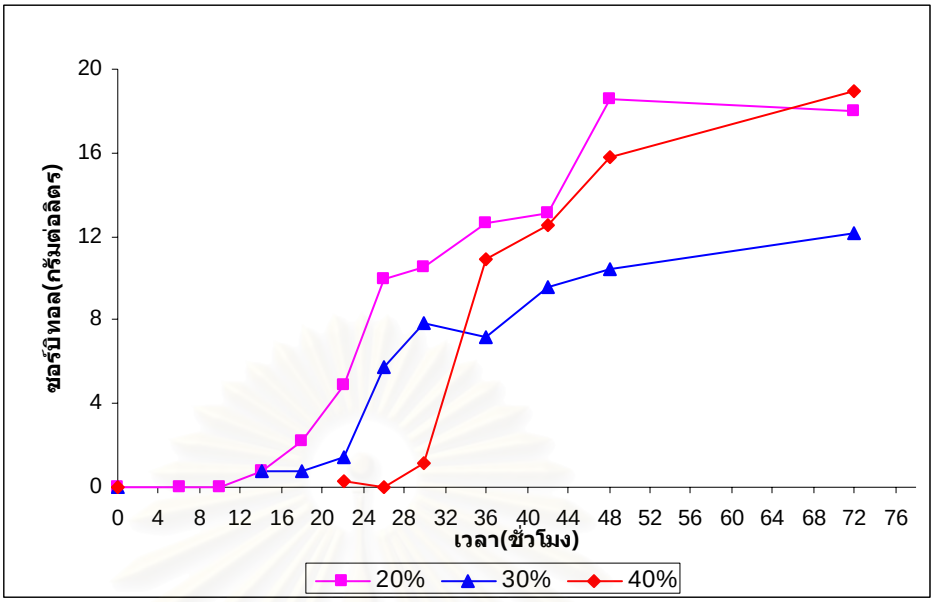
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากการผลิตซอร์บิทอลในขวดรูปชมพู่และในถังหมักที่เวลา 48 ชั่วโมงได้ผลสรุปดังนี้คือ

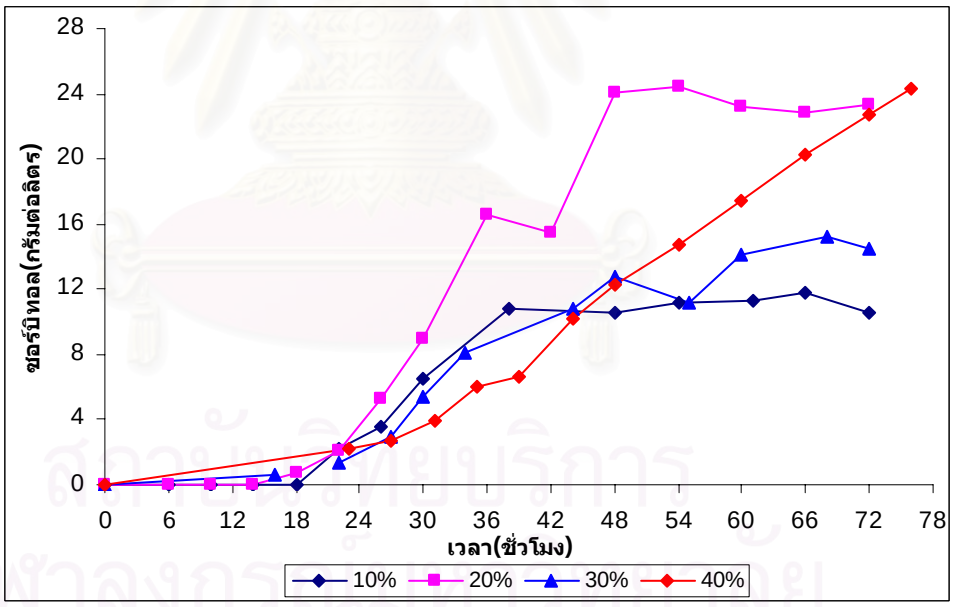
ตารางที่8 เปรียบเทียบการผลิตซอร์บิทอลในขวดทดลองกับในถังหมัก (คิดจากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นภายหลังเติมหัวเชื้อเริ่มต้น)

ความเข้มข้น (%)	อัตราการผลิตซอร์บิทอล (g/l-h)		$Y_{P/S}$		$Y_{P/X}$		Q_P (h^{-1})	
	ขวดรูปชมพู่	ถังหมัก	ขวดรูปชมพู่	ถังหมัก	ขวดรูปชมพู่	ถังหมัก	ขวดรูปชมพู่	ถังหมัก
10	-	0.221	-	0.134	-	2.658	-	0.134
20	0.386	0.501	0.45	0.244	8.410	10.977	0.37	0.404
30	0.218	0.265	0.29	0.138	6.381	4.940	0.19	0.118
40	0.330	0.255	0.24	0.106	14.465	11.017	0.22	0.323

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการทดลองในขวดรูปชมพู่และในถังหมักพบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร จะให้ค่าการผลิตและอัตราการผลิตซอร์บิทอลสูงที่สุด แม้ว่าที่เวลาผ่านไปความเข้มข้น 400 กรัมต่อลิตรจะมีอัตราการผลิตซอร์บิทอลสูงขึ้นและได้ผลผลิตมากขึ้นจนเท่ากับความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตรแต่ก็ต้องใช้เวลาที่มากกว่าทั้งนี้เนื่องมากจากการที่เชื้อต้องเผชิญกับภาวะที่มีความดันออสโมติกสูงกว่าจึงต้องใช้พลังงานบางส่วนไปในการรักษาสภาพเซลล์ก่อนจึงทำให้ช่วง lag phase ยาวนานกว่าและยังได้มวลชีวภาพน้อยกว่าด้วยซึ่งตรงกับรายงานของ Barros และ Celligio (2006) แต่เมื่อมีการสร้างเอนไซม์แล้วจะมีอัตราการผลิตซอร์บิทอลใกล้เคียงกันทั้งนี้เพราะเอนไซม์เมื่อสร้างแล้วจะอยู่ที่บริเวณ periplasmic membrane ซึ่งการทำงานจะไม่เกี่ยวกับเมตาบอลิสมภายในเซลล์อีกแล้วและที่ความเข้มข้น 400 กรัมต่อลิตรยังคงมีสารตั้งต้นเหลืออยู่มากจึงผลิตซอร์บิทอลได้อย่างต่อเนื่อง

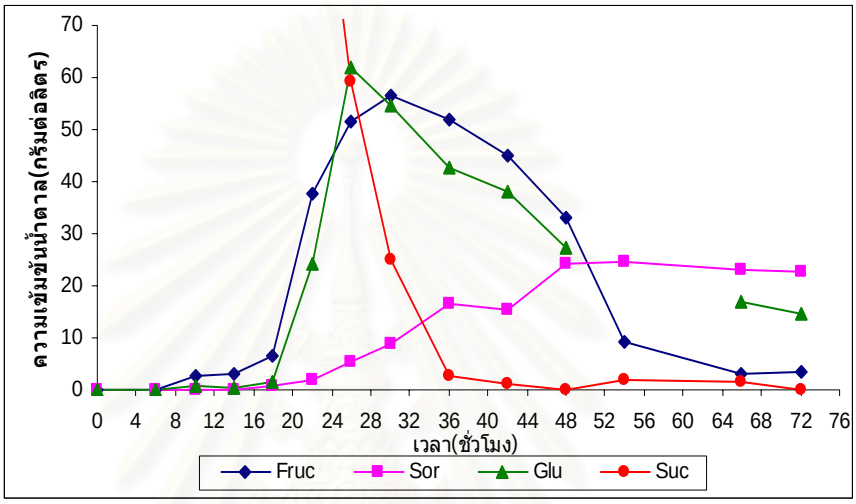


รูปที่22. เปรียบเทียบปริมาณซอร์บิทอลในขวดทดลอง

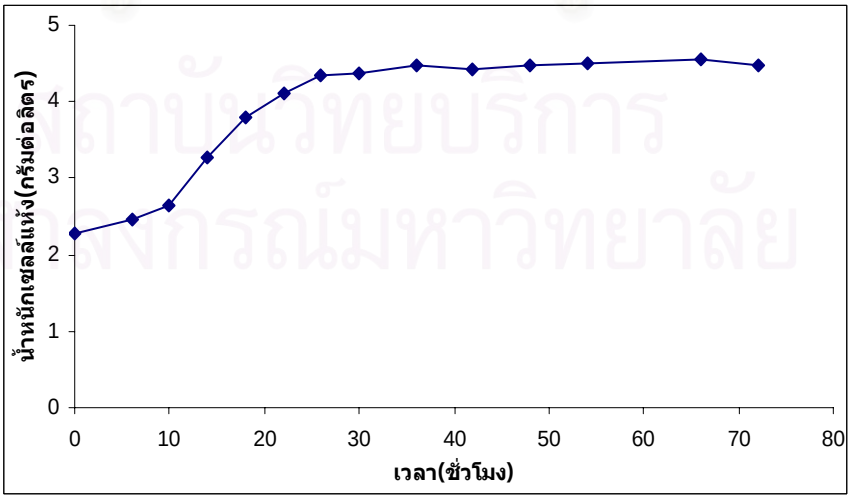


รูปที่23.เปรียบเทียบปริมาณซอร์บิทอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

เมื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตซอร์บิทอลกับการเจริญของเซลล์พบว่าเซลล์จะเริ่มมีการผลิตซอร์บิทอลเมื่อเซลล์เข้าสู่ช่วง late log phase คือชั่วโมงที่ 18-22 (รูปที่24-25) ซึ่งตรงกับการทดลองที่ 4.1 และงานวิจัยของ Edye และคณะ(1989) จากผลการทดลองสรุปได้ว่าความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 200 กรัมต่อลิตรเหมาะสมสำหรับการผลิตซอร์บิทอลมากที่สุดทั้งในแง่ของเวลาและผลผลิตจึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป



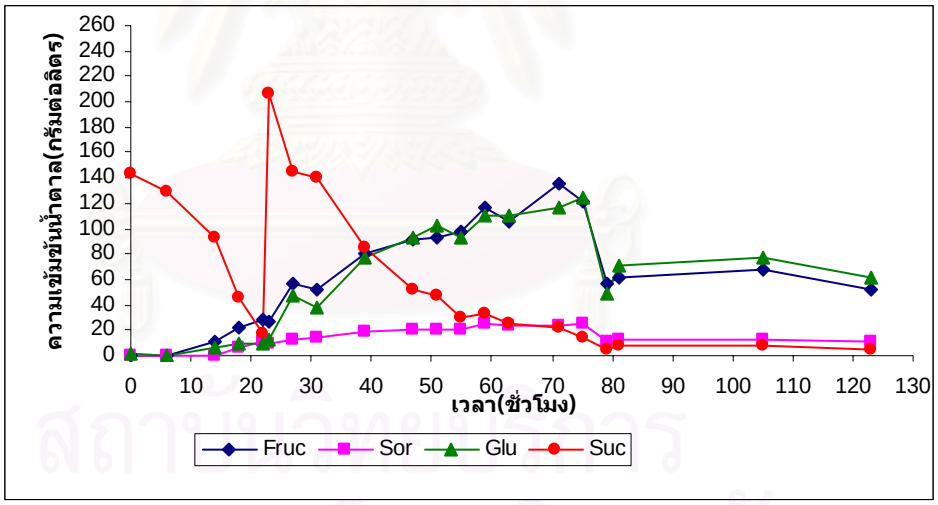
รูปที่24.การผลิตซอร์บิทอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร โดยวิธีการเพาะเลี้ยงแบบ Fed-batch โดยใช้ซูโครสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร



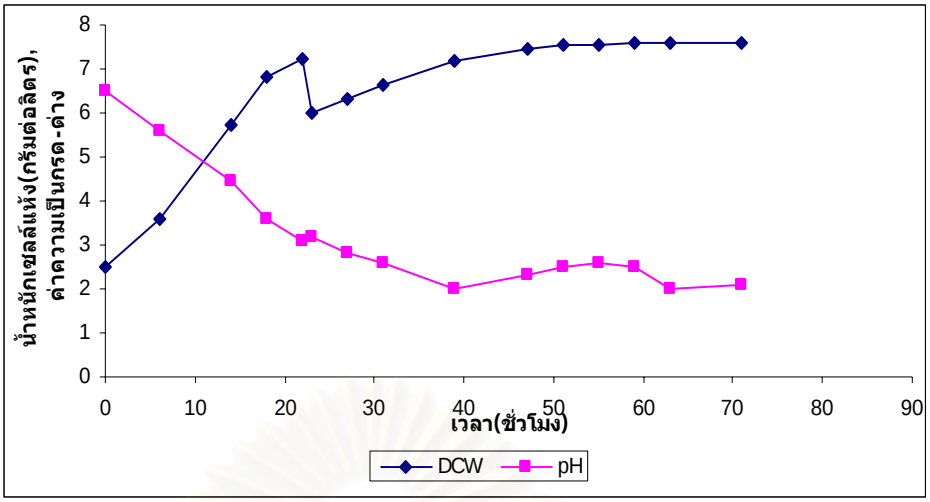
รูปที่25.น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาต่างๆจากการใช้ซูโครสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร

4.8 การผลิตซอร์บิทอลในถังหมักขนาด 2 ลิตรด้วยการเลี้ยงแบบกึ่งกะ

จากการทดลองผลิตซอร์บิทอลแบบกะในถังหมักสรุปว่าความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้นควรเป็น 200 กรัมต่อลิตร แต่พบว่าที่ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตรเชื้อจะใช้เวลาในช่วง lag phase น้อยกว่าอีกทั้งยังให้มวลชีวภาพสูงกว่าด้วย ดังนั้นการทดลองนี้จะเริ่มต้นด้วยการเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำตาลซูโครส 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเมื่อเชื้อเข้าสู่ช่วงปลายของ log phase จึงทำการเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตรลงไปเพื่อกระตุ้นให้มีความดันออสโมติกที่มากจนเซลล์สร้างเอนไซม์GFORมากขึ้นแล้วทำการเลี้ยงต่อไปจนสิ้นสุดกระบวนการทดลองโดยไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง แต่มีการกวนทุกครั้งที่มีการเก็บตัวอย่าง พบว่าน้ำตาลซูโครสถูกเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสเกือบหมดแต่น้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสถูกใช้ไปน้อยมากและซอร์บิทอลก็น้อยตามไปด้วย (รูปที่26) เมื่อทำการตรวจสอบค่าความเป็นกรด-ด่างจึงพบว่ามีค่าอยู่ที่ 2-2.5 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 40 (รูปที่27) อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ภาวะไม่เหมาะกับการผลิตซอร์บิทอล

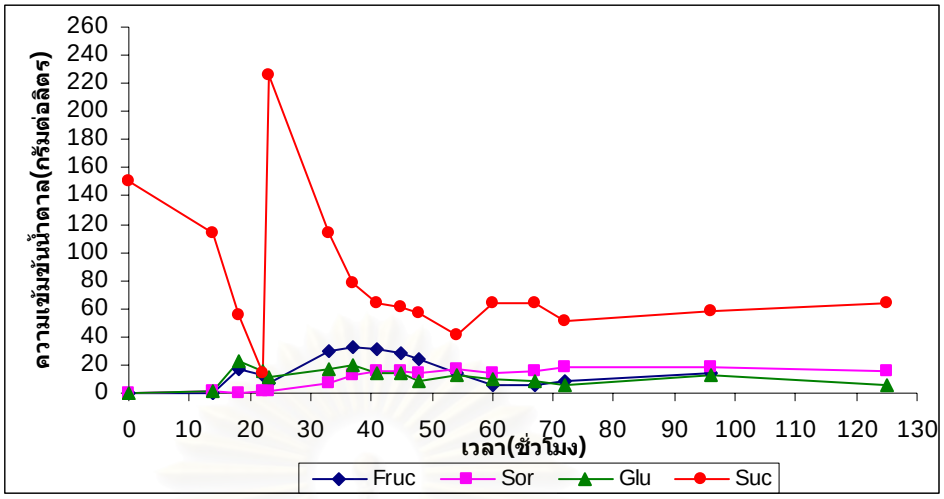


รูปที่26. การผลิตซอร์บิทอลในถังหมักแบบกึ่งกะที่1

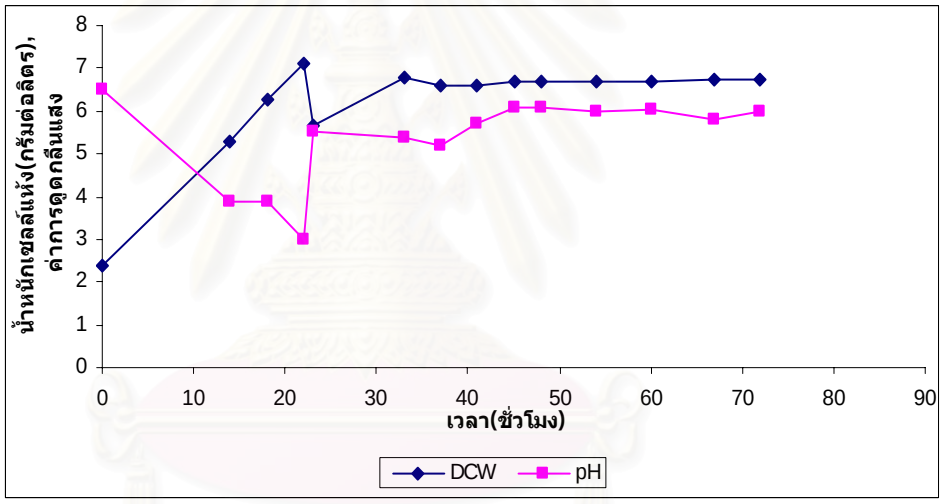


รูปที่27. น้ำหนักเซลล์แห้งและค่าความเป็นกรด-ด่างในถังหมักแบบกึ่งกะที่1

การทดลองต่อมาได้ทำการแก้ปัญหาโดยการเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อด้วยความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเมื่อเชื้อเข้าสู่ช่วงปลายของ log phase จึงเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตรแล้วทำการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.5 พร้อมกับการกวนด้วยอัตราเร็ว 80 รอบต่อนาที(เพื่อให้อาหารสัมผัสกับเชื้ออย่างทั่วถึงและช่วยในการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างให้คงที่) ผลคือน้ำตาลซูโครสถูกใช้ไปเพียง 71.392 เปอร์เซ็นต์ และยังมีน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสเหลืออยู่เล็กน้อย แต่ปริมาณซอร์บิทอลสูงสุดที่ได้เพียงแค่ 18.98 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 80 (รูปที่28) พบว่ามีผลึกเกลือตกตะกอนออกมาจำนวนมากซึ่งคาดว่ามาจากการที่มีการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเพราะช่วงที่เชื้อมีการเจริญมีการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดกลูโคนิกออกมามากอีกทั้งยังมีการสร้างกรดแลคติกและกรดซัคซินิค (SwingและDolle 1977, Rogers และคณะ 2007) ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงอย่างรวดเร็วปริมาณด่างที่ใช้จึงมากจนไปเปลี่ยนให้เกิดเกลือจำนวนมาก ซึ่งเกลือที่เพิ่มขึ้นมากเกินนั้นมีผลต่อการผลิตซอร์บิทอลและการเจริญของเชื้อ *Z.mobilis* ทำให้ซอร์บิทอลที่ได้น้อยลง (Dolle และคณะ 1990) แต่ถ้าปล่อยทิ้งไว้กรดกลูโคนิกที่สร้างขึ้นจะถูกฟอสโฟรีเลทโดยเอนไซม์ กลูโคเนทไคเนส และถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลใน Entner Doudoroff pathway (Zachariou and Scopes, 1985; Strohdeicher, 1998) ในระหว่างการผลิตเอทานอล ซึ่งทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้นเองทั้งนี้สีของน้ำหมักยังคล้ำออกน้ำตาลและยังมีเมือกเป็นก้อนๆเกิดขึ้นซึ่งคาดว่าเมือกที่เกิดขึ้นนี้น่าจะเป็นสารพวกโอลิโกแซคคาไรด์ซึ่งเกิดจากการที่เซลล์ได้สัมผัสกับภาวะที่มีเกลือสูงทำให้ไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสได้อย่างมีประสิทธิภาพอีกทั้งการย่อยสลายน้ำตาลซูโครสก็เป็นไปได้ช้าอีกด้วยทำให้เอนไซม์ลีแวนซูเครสเปลี่ยนซูโครสให้กลายเป็นลีแวนมากกว่ายิ่งทำให้ผลผลิตซอร์บิทอลน้อยลง (Dolle และคณะ 1990, Vigants และคณะ 1998, Oliveira และคณะ 2007)



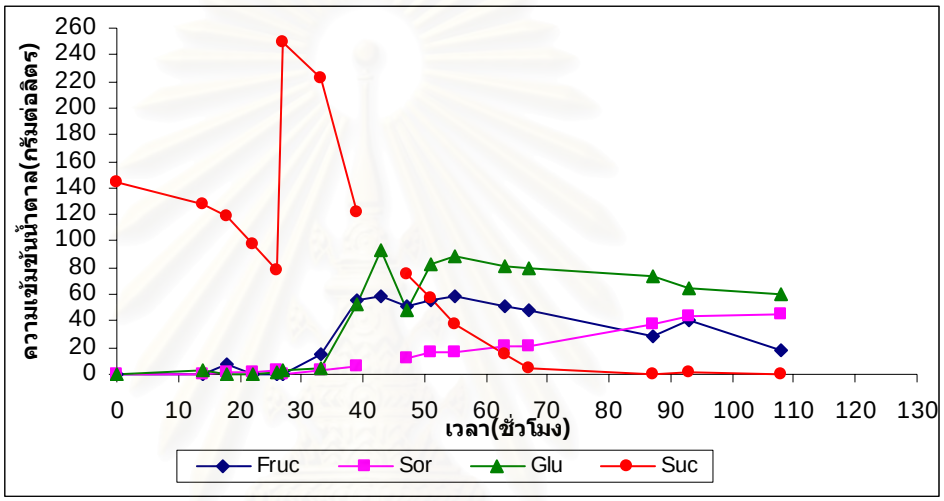
รูปที่28. การผลิตซอร์บิทอลในถังหมักแบบกึ่งกะที่2



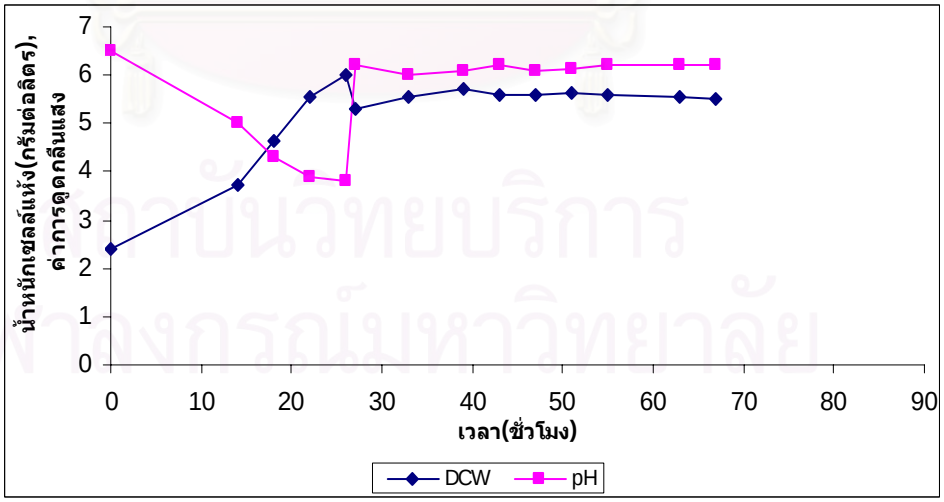
รูปที่29. น้ำหนักเซลล์แห้งและค่าความเป็นกรด-ด่างในถังหมักแบบกึ่งกะที่2

การทดลองต่อมาได้ทำการแก้ปัญหาโดยการเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อด้วยความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสโดยไม่มีการกวนเมื่อเชื้อเข้าสู่ช่วงปลายของ log phase จึงเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร แล้วทำการกวนด้วยความเร็ว 80 รอบต่อนาที และควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.2 ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของ GFOR ตามการทดลองของ Zachariou และ Scopes,1986. ; Ferraz และคณะ 2001 อีกทั้งยังไม่เกิดการตกตะกอนของเกลืออีกด้วยผลคือได้ซอร์บิทอลสูงสุด 43.41 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 93 (รูปที่30) แต่ยังคงมีน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสเหลืออยู่ซึ่งถ้าในขั้นการทำให้น้ำตาลบริสุทธิ์ถ้ามีสารหลายชนิดจะทำให้กระบวนการยุ่งยากมากขึ้นและยังเพิ่มค่าใช้จ่าย ซึ่งถ้าทำให้เชื้อสามารถใช้น้ำตาลได้หมดจึงน่าจะได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นอีกทั้งทำให้บริสุทธิ์ในภายหลัง

ได้ง่ายขึ้นอีก จากการทดลองที่ผ่านมาทำให้เราสามารถสรุปได้ว่าการกวนไม่มีผลต่อการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตส แต่อาจมีผลต่อการใช้ น้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสของเซลล์ เพราะการกวนนั้นจะทำให้มีอากาศละลายในอาหารมากขึ้นซึ่งมีผลต่อการทำงานของเชื้อ และการย่อยสลายซูโครสไม่สัมพันธ์กับการใช้น้ำตาลกลูโคสของเซลล์ซึ่งตรงกับรายงานของ Lyness และ Doelle (1981), Abateและคณะ(1996) จากเหตุผลข้างต้นนั้นเราจึงคิดว่าน่าจะมีการแบ่งการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 2 ช่วง โดยช่วงแรกควบคุมภาวะให้เหมาะต่อการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสเป็นกลูโคสและฟรุคโตส ช่วงที่สองเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนฟรุคโตสเป็นซอร์บิทอลและช่วงผลิตซอร์บิทอลไม่ควรกวนอาหารเลี้ยงเชื้อจึงทำการทดลองในขั้นต่อไป



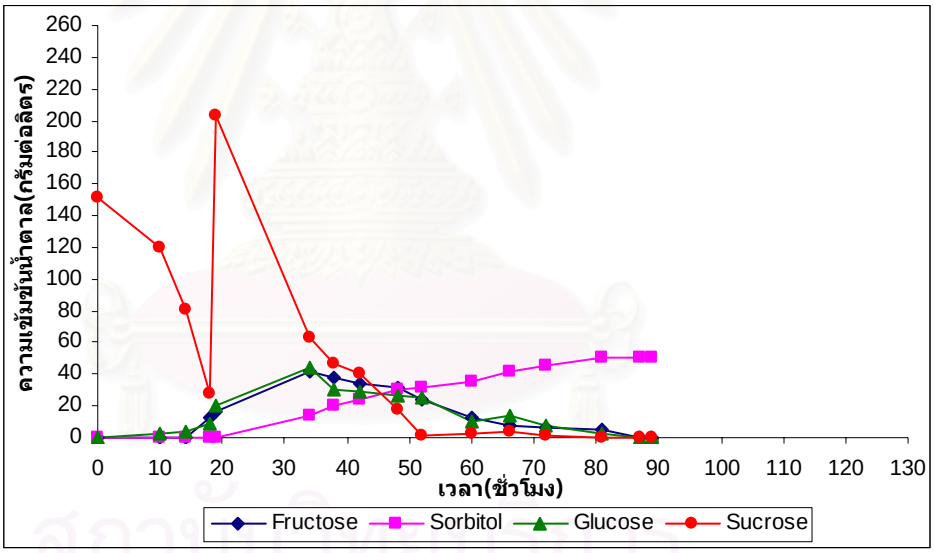
รูปที่30. การผลิตซอร์บิทอลในถังหมักแบบกึ่งกะที่3



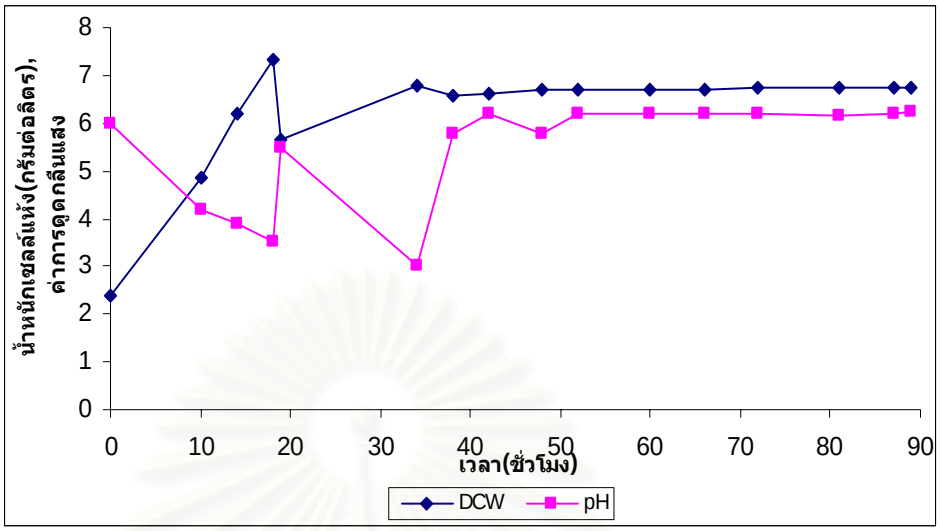
รูปที่31. น้ำหนักเซลล์แห้งและค่าความเป็นกรด-ด่างในถังหมักแบบกึ่งกะที่3

การทดลองต่อมาเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อด้วยความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเมื่อเชื้อเข้าสู่ช่วงปลายของ log phase จึงเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตรแล้ว

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างขึ้นมาให้เป็น 5.5 เพื่อให้เหมาะต่อการทำงานของ invertase และกวน 80 รอบต่อนาทีเมื่อเก็บตัวอย่างเท่านั้นหลังจากนั้นไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อเชื้อเข้าสู่ช่วงปลาย log phase อีกรอบจึงทำการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 6.2 จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก และกวน 80 รอบต่อนาทีเมื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่างและเก็บตัวอย่างเท่านั้น ซึ่งพบว่าเมื่อเชื้อเข้าสู่ช่วงคงที่ภายหลังชั่วโมงที่ 52 ไปแล้วการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างน้อยมากแทบจะไม่ต้องมีการเติมกรด-ด่าง เลย ผลปรากฏว่าได้ปริมาณซอร์บิทอลสูงสุด 50.328 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 87 คิดเป็นอัตราการการผลิตซอร์บิทอลต่อชั่วโมงคือ 0.578 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อีกทั้งแทบจะไม่มีน้ำตาลซูโครสกลูโคสและ ฟรุคโตสเหลืออยู่เลย แต่อัตราการผลิตสูงสุดจริงๆอยู่ที่ชั่วโมงที่ 66 ได้ซอร์บิทอล 41.946 คิดเป็น 0.636 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แต่ยังคงมีน้ำตาลอื่นเหลืออยู่เล็กน้อย (รูปที่32)

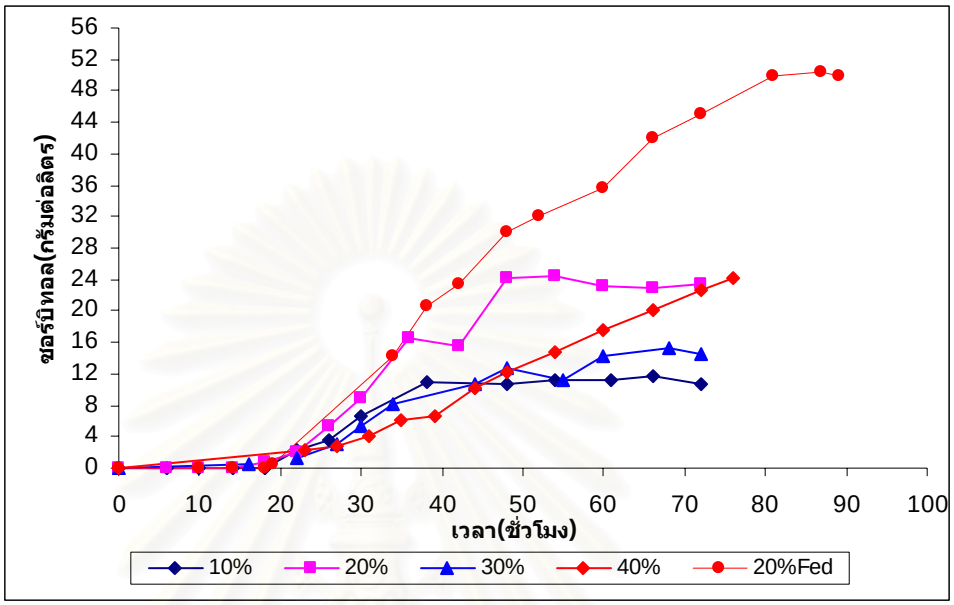


รูปที่32. การผลิตซอร์บิทอลในถังหมักแบบกึ่งกะที่4



รูปที่33. น้ำหนักเซลล์แห้งและค่าความเป็นกรด-ด่างในถังหมักแบบกึ่งกะที่4

จากการทดลองในถังหมักทั้งแบบกะและกึ่งกะสามารถสรุปผลได้ดังนี้คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 200 กรัมต่อลิตร เหมาะสมในการผลิตซอร์บิทอลทั้งในแง่ของเวลาและผลผลิต เมื่อเปลี่ยนกระบวนการหมักเป็นแบบกึ่งกะสามารถเพิ่มอัตราการผลิตและผลผลิตรวมได้คือจากการหมักแบบกะมีค่าผลผลิตรวมและอัตราการผลิตคือ 24.069 กรัมต่อลิตร และ 0.501 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ แต่เมื่อหมักแบบกึ่งกะให้ค่าผลผลิตรวมและผลผลิตต่อเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 50.328 กรัมต่อลิตร และ 0.636 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ทั้งนี้ในการหมักแบบกะใช้น้ำตาลซูโครสรวม 200 กรัมต่อลิตร ในขณะที่แบบกึ่งกะใช้น้ำตาลซูโครสรวม 300 กรัมต่อลิตร เพิ่มปริมาณน้ำตาลตั้งต้นอีก 100 กรัมต่อลิตรแต่ให้ผลผลิตเพิ่มขึ้นถึงเท่าตัว (รูปที่34) จึงสรุปได้ว่าความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสประมาณ 25 % เป็นช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตซอร์บิทอลโดยใช้เซลล์อิสระ ซึ่งถ้าความเข้มข้นน้อยกว่านี้จะมีความดันออสโมติกไม่เพียงพอจึงทำให้เซลล์นำไปใช้ในการผลิตเอทานอลมากกว่าแต่ถ้าความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสมากกว่านี้จะทำให้มีความดันออสโมติกมากเกินไปทำให้เซลล์ต้องสูญเสียพลังงานในการรักษาสภาพภายในเซลล์มากขึ้นจึงเหลือพลังงานในการสร้างซอร์บิทอลน้อยลงอีกทั้งยังใช้เวลาในการสร้างซอร์บิทอลนานกว่าด้วย



รูปที่34. การผลิตซอร์บิทอลในถังหมักแบบกะและกึ่งกะ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่5
สรุปผลการทดลอง

จากการทำการหาช่วงการเจริญสูงสุดของเชื้อโดยใช้น้ำตาลซูโครส 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนพบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุดที่ 18 ชั่วโมง เมื่อทดสอบผลของปัจจัยโดยใช้ 2^4 central composite factorial design ผลคือภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตซอร์บิทอลคือ pH 6.5, อุณหภูมิ 35 °C เวลาหมัก 48 ชั่วโมงและความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสผสมฟรุคโตส 10% เหมาะสมที่สุด การทดลองหาชนิดน้ำตาลที่จะใช้ทำเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นสรุปได้ว่าควรใช้น้ำตาซูโครสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนในหัวเชื้อเริ่มต้นเนื่องจากมีราคาถูกกว่าน้ำตาลกลูโคสและจากการผลิตซอร์บิทอลในขวดรูปชมพู่ด้วยน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 200-400 กรัมต่อลิตรพบว่าการใช้น้ำตาลซูโครสเริ่มต้นที่ 20% ให้ซอร์บิทอลมากที่สุดคือ 18.521 กรัมต่อลิตรเมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งมากกว่าการใช้น้ำตาล 40% และ 30% ซึ่งได้ซอร์บิทอล 15.828 และ 10.463 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ความเข้มข้น 40% หากเพิ่มเวลาการเลี้ยงไปจน 72 ชั่วโมง ได้ ซอร์บิทอลเพิ่มขึ้นเป็น 18.91 กรัมต่อลิตร แต่ก็ต้องใช้เวลานานเพิ่มขึ้นอีกถึง 38 ชั่วโมงหรือ 79.17% จากผลการทดลองผลิตซอร์บิทอลในถังหมัก โดยมีความเข้มข้นน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น 100-400 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง ความเข้มข้นที่ให้ค่าซอร์บิทอลสูงสุดคือ 200, 300, 400 และ 100 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยได้ผลผลิตคือ 24.069, 12.726, 12.22 และ 10.605 กรัมต่อลิตร และแม้ว่าความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 400 กรัมต่อลิตรจะให้ค่าซอร์บิทอลสูงสุดคือ 24.282 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 76 ชั่วโมง แต่ก็ต้องใช้เวลาเพิ่มขึ้นถึง 28 ชั่วโมงเลยทีเดียว ดังนั้นความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 200 กรัมต่อลิตรจึงน่าจะเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตซอร์บิทอล ซึ่งผลการทดลองก็สอดคล้องกับการทดลองในขวดรูปชมพู่ก่อนหน้านี้ จากการทดลองผลิตซอร์บิทอลแบบกึ่งกะในถังหมักโดยเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำตาลซูโครส 100 กรัมต่อลิตร เมื่อเชื้อเข้าสู่ช่วงปลายของ log phase จึงได้ทำการเติมน้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตรลงไป แล้วปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 5.5 เพื่อให้เหมาะต่อการทำงานของ invertase และ Levansucrase เมื่อเชื้อเข้าสู่ช่วงปลาย log phase อีกรอบจึงทำการปรับค่าความเป็นกรดด่างขึ้นมาเป็น 6.2 จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก ผลปรากฏว่าได้ปริมาณซอร์บิทอลสูงสุด 50.328 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงที่ 87 คิดเป็นอัตราการการผลิตซอร์บิทอลต่อชั่วโมงคือ 0.578 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อีกทั้งแทบจะไม่มีน้ำตาลซูโครสกลูโคสและฟรุคโตสเหลืออยู่เลย

จากการทดลองในถังหมักทั้งแบบกะและกึ่งกะสามารถสรุปผลได้ดังนี้คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 200 กรัมต่อลิตร เหมาะสมในการผลิตซอร์บิทอลทั้งในแง่ของเวลาและผลผลิตและเมื่อเปลี่ยนกระบวนการหมักเป็นแบบกึ่งกะสามารถเพิ่มผลผลิตต่อเวลาและผลผลิตรวมได้คือจากการหมักแบบกะมีค่าผลผลิตรวมและผลผลิตต่อเวลาคือ 24.069 กรัมต่อลิตร และ 0.501 กรัมต่อ

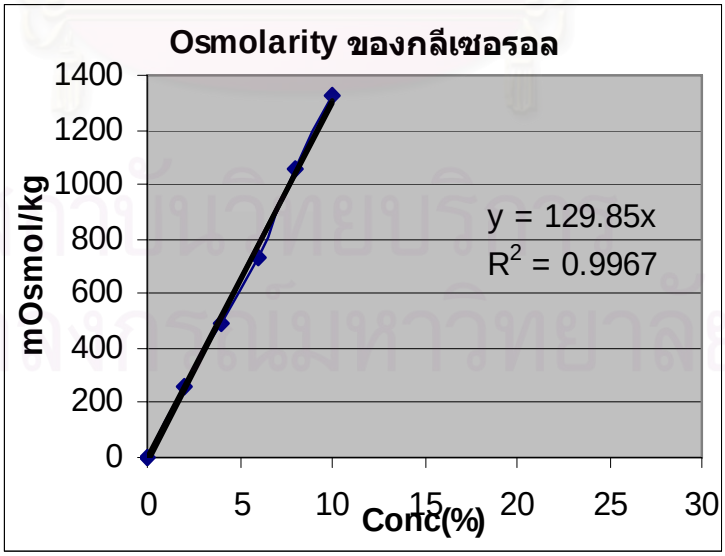
ลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ แต่เมื่อหมักแบบกึ่งกะให้ค่าผลผลิตรวมและผลผลิตต่อเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 50.328 กรัมต่อลิตร และ 0.636 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองในการเลี้ยงแบบกึ่งกะที่4หลังจากชั่วโมงที่ 87 พบว่าปริมาณซอร์บิทอลเริ่มคงที่อีกทั้งปริมาณน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสก็มีปริมาณน้อยมากซึ่งการทดลองต่อไปน่าจะทดลองทำ repeat fed-batch ดูเพื่อหาจุดสมดุลในการเพิ่มผลผลิตให้ได้มากที่สุด

การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลแล้วมีผลต่อการเจริญและการผลิตซอร์บิทอลของเชื้อไม่ว่าจะเป็นซูโครส กลูโคส หรือฟรุคโตสนั้น น่าจะเป็นผลจากความดันออสโมติกมากกว่าจะเป็นจากชนิดของน้ำตาล แต่เนื่องจากน้ำตาลแต่ละชนิดมีค่าความดันออสโมติกต่างกันจึงทำให้มีผลต่างกัน ดังที่ได้ทดสอบแล้วพบว่าที่ความเข้มข้นเท่ากันฟรุคโตสจะให้ค่าความดันออสโมติกสูงสุดรองลงมาคือกลูโคสและซูโครส ตามลำดับ

จากการทดลองในขวดรูปชมพู่และในถังหมัก ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 200 กรัมต่อลิตร มีค่าความดันออสโมติกเป็น 685.8 mOsm/kg (รูปที่18) ซึ่งถ้าเราสามารถหาสารที่เชื้อไม่สามารถใช้ได้และเพิ่มความดันออสโมติกได้มาใช้ร่วมด้วยน่าจะทำให้การผลิตซอร์บิทอลสูงขึ้นและน่าจะประหยัดปริมาณสารตั้งต้นได้ด้วยซึ่งคิดว่าน่าจะเป็นกลีเซอรอลเพราะเชื้อไม่สามารถนำไปใช้ได้ซึ่งที่ค่า ความเข้มข้นน้ำตาลซูโครส 200 กรัมต่อลิตรนั้นมีค่าแรงดันออสโมติกเทียบเท่ากับกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 5.43% (รูปที่35)



รูปที่35. ค่า Osmolarity ของกลีเซอรอล

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

หนึ่งฤทัย มีสุข. (2539). การศึกษาประสิทธิภาพในการผลิต Sorbitol ของ *Zymomonas mobilis* โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

สมใจ ศิริโภค. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพ : สำนักพิมพ์ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ, 2547.

ภาษาอังกฤษ

Adcock, L. H. 1957. Determination of sorbitol. *Analyst*., 82 : 427-435.

Barros, M. and Celligio, M.A.P.C. 2006. Synthesis of sorbitol by *Zymomonas mobilis* under high osmotic pressure. *Braz. J. Microbiol*., 37: 324-328.

Barrow, K.D., Collins, J.G., Leigh, D.A., Rogers, P.L. and Warr, R.G. 1984. Sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., 20 : 225-232.

Bekers, M., Vigants, A., Laukevics, J., Toma, M., Rapoports, A. and Zikmanis, P. 2000. The effect of osmo-induced stress on product formation by *Zymomonas mobilis* on sucrose. *Int. J. food Microbiol*., 55 : 147-150.

Bringer - Meyer, S., Scollar, M. and Sahm, H. 1985. *Zymomonas mobilis* mutants blocked in fructose utilization. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., 23 : 134-139.

Chun, U.H. and Rogers, P.L. 1988. The simultaneous production of sorbitol and gluconic acid by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., 29: 19-24.

Cazetta, M.L., Celligoi, M.A.P.C., Buzato, J.B., Scarmino, I.S. and Da Silva, R.S.F. 2005. Optimization study for sorbitol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses. *Proc Biochem*., 40(2) : 747-751.

Cazetta, M.L., Celligoi, M.A.P.C., Buzato, J.B. and Scarmino, I.S. 2007. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effect of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Bioresource Technology*., 98(15): 2824-2828.

Doelle, H.W. 1982. The existence of two separate constitutive enzymes for glucose and fructose in *Zymomonas mobilis*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol*., 15: 20-24.

Doelle, H.W. and Greenfield, P.F. 1985. Fermentation pattern of *Zymomonas mobilis* at high sucrose concentrations. *Appl. Microbiol. Biotechnol*., 22: 411-415.

Doelle, M.B., Greenfield, P.F. and Doelle, H. W. 1990. The relationship between

sucrose hydrolysis, sorbitol formation and mineral ion concentration during bioethanol formation using *Zymomonas mobilis* 2716. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34: 160–167.

Edye, L.A., Johns, M.R. and Ewings, K.N. 1989. Fructose production by *Zymomonas mobilis* in fed-batch culture with minimal sorbitol formation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31: 129–133.

Edye, L. A., Kositanont, C., and Doelle, H.W. 1990. Fructose phosphorylation by *Zymomonas mobilis* glucokinase. *Acta Biotechnol.*, 10: 119–131.

Erzinger, G.S., Silveira, M.M., Costa, J.P.C.L., Vitolo, M. and Jonas, R. 2003. Activity of Glucose Fructose oxidoreductase in fresh and permeabilised cells of *Zymomonas mobilis* grown in different glucose concentration. *Braz. J. Microbiol.*, 34: 329-333.

Ferraz, H.C., Alves, T.L.M. and Borges, C.P. 2001. Coupling of an electrodialysis unit to a hollow fiber bioreactor for separation of gluconic acid from sorbitol produced by *Zymomonas mobilis* permeabilized cells. *J. Membrane Sci.*, 191 : 43-51.

Gorp, V.K., Boerman, E., Cavenaghi, C.V. and Berben, P.H. 1999. Catalytic hydrogenation of fine chemicals; sorbitol production. *Catalysis Today*., 52: 349-361.

Gibbs, M. and De Moss, R.D. 1951. Ethanol formation in *Pseudomonas lindneri*. *Arch. Biochem Biophys*., 34: 478-479.

Kim, D.M. and Kim, H.S. 1991. Continuous production of gluconic acid and sorbitol from Jerusalem artichoke and glucose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis* and inulinase. *Biotechnol. Bioeng*., 9(3): 336-342.

Kretchmer, N. and Hollenbeck, C.B. 1991. Sugars and sweeteners. Florida: CRC Press Inc.

Leigh, D., Scopes, R.K. and Rogers, P.L. 1984. A proposed pathway for sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 413–415.

Lyness, E.W. and Doelle, H.W. 1981. Fermentation pattern of sucrose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Bioeng*., 27: 121–128.

Loos, H., Kramer, R., Sahm, H. and Sprenger, G.A. 1994. Sorbitol promotes growth of

Zymomonas mobilis in environments with high concentrations of sugar: evidence for a physiological function of glucose-fructose oxidoreductase in osmoprotection. *J. Bacteriol.*, 176(24) : 7688-93.

Parker, C., Peekhaus, N., Zhang, X. and Conway, T. 1997. Kinetics of sugar transport and phosphorylation influence glucose and fructose co-metabolism by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 3519–25.

Phillips, M.A. 1963. Catalytic hydrogenation of glucose to sorbitol using a highly active catalyst. *Br. Chem. Eng.*, 8: 767–769.

Rehr, B., Wilhelm, C. and Sahm, H. 1991. Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35: 144-148.

Rogers, P.L., Lee, K.J., Skotnicki, M.L. and Tribe, D.E. 1982. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Adv. Biochem.* Eng., 23: 37–84.

Rogers, P.L., Jeon, Y.J., Lee, K.J. and Lawford, H.G. 2007. *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 108: 263-88.

Scopes, R.K., Testolin, V., Stoter, A., Griffiths-Smith, K., and Algar, E.M. 1985. Simultaneous purification and characterization of glucokinase, fructokinase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. *Biochem. J.,* 228: 627–634.

Shene, C. and Bravo, S. 2001. *Zymomonas mobilis* CP4 fed-batch fermentations of glucose-fructose mixtures to ethanol and sorbitol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 57: 323-328.

Silveira, M.M., Wisbeck, E., Lemmel, C., Erzinger, G., Da Costa, J.P.L., Bertasso, M. and Jonas, R. 1999. Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cells of *Zymomonas mobilis*. *J. Biotechnol.*, 75: 99-103.

Silveira, M.M. and Jonas, R. 2002. The biotechnological production of sorbitol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59: 400-408.

Strohdeicher, M., Schmitz, B., Bringer-Meyer, S. and Sahm, H. 1988. Formation and degradation of gluconate by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.,* 27: 278–382.

Sprenger, G.A. 1996. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic

highway with some scenic routes. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 145: 301–307.

Sookkheo, B., Phutrakul, S. and Kanasawud, P. 1991. Production of sorbitol and ethanol from sucrose by *Zymomonas mobilis*: sugar fermentation. *J. Sci. Soc.* Thailand., 17: 123-135.

Swings, J. and De Ley, J. 1977. The biology of Zymomonas. *Bacteriol.* 41(1): 1–46

Vignoli, J.A., Celligoi, M.A.P.C. and Silva, R.S.F. 2006. Development of statistical model for sorbitol production by free and immobilized *Zymomonas mobilis* in loofa sponge Luffa cylindrical. *Proc. Biochem.*, 41(1): 240-243.

Viikari, L. 1984. Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19: 252–255.

Viikari, L. 1984. Formation of sorbitol by *Zymomonas mobilis. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20: 118–123.

Vigants, A., Kruce, R., Bekers, M. and Zikmanis, P. 1998. Response of *Zymomonas mobilis* levansucrase activity to sodium chloride addition. *Biotechnol. Lett.*. 20: 1017–1019.

Zachariou, M. and Scopes, R.K. 1985. Gluconate kinase from *Zymomonas mobilis*: Isolation and characteristics. *Biochem Int.*, 10: 367–371.

Zachariou, M. and Scopes, R.K. 1986. Glucose-Fructose Oxidoreductase, a New enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is Responsible for sorbitol production. *J Bacteriol.*, 167(3): 863-869.

http://www.caloriecontrol.org/sorbitol.html (2/1/2008).

http://en.wikipedia.org/wiki/nikle (2/1/2008).

Use of Nutritive and Nonnutritive Sweeteners [pdf]; *J. of The American Dietetic Association*; Feb 2004; Vol.104 No.2 (15/3/2009)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Z-medium

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส (KH_2PO_4)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)	2	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	2	กรัม
Bacto peptone	5	กรัม
กลูโคส, ฟรุคโตส, ซูโครส	200	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร โดยแยกนึ่งฆ่าเชื้อน้ำตาลด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ส่วน mineral นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำมาผสมกันภายหลัง

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Z-medium

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส (KH_2PO_4)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)	2	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	2	กรัม
Bacto peptone	5	กรัม
กลูโคส, ฟรุคโตส, ซูโครส	200	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 มิลลิลิตร โดยแยกนึ่งฆ่าเชื้อน้ำตาลด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ส่วน mineral นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำมาผสมกันภายหลัง

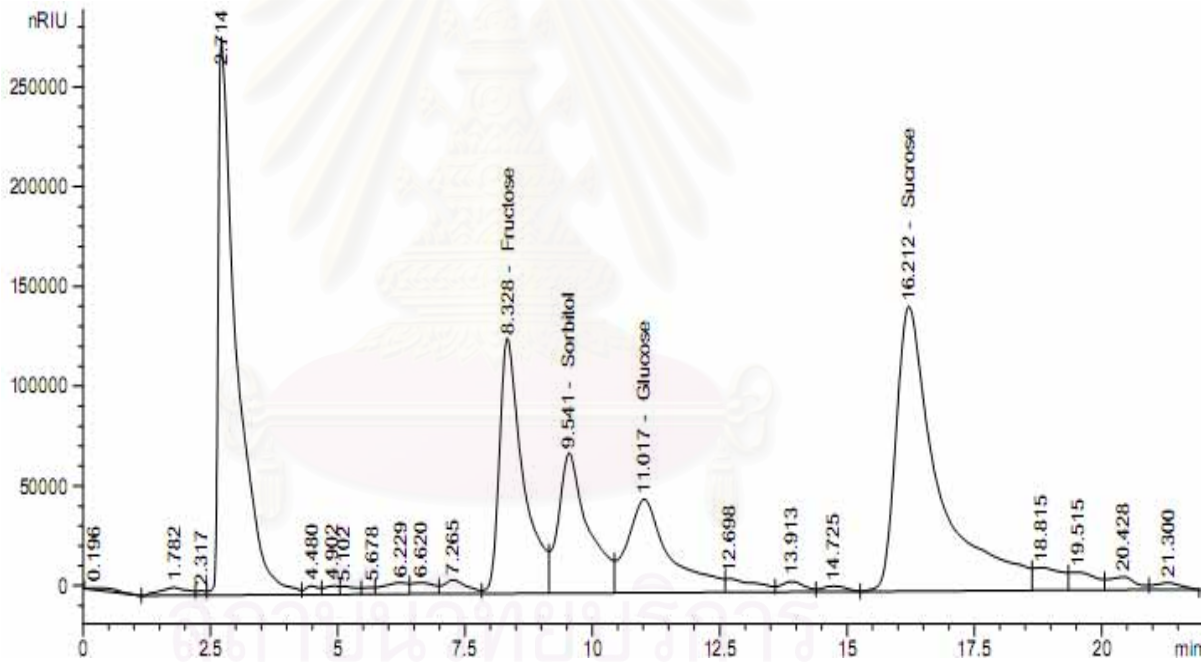
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

HPLC โครมาโตแกรม

จากการทดสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลด้วยเครื่องโครมาโตกราฟี เพื่อหาปริมาณ น้ำตาล 4 ชนิด พบว่าเวลาที่ฟรุคโตส, ซอร์บิทอล, กลูโคส และซูโรส ค้างในคอลัมน์ (retention time) เป็น 8.3, 9.5, 11.0 และ 16.2 นาที ตามลำดับ

โครมาโทแกรม HPLC จากการวิเคราะห์ฟรุคโตส, ซอร์บิทอล, กลูโคส และซูโครส



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

สูตรคำนวณ

1. การคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง

น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) = $\frac{\text{น้ำหนักถ้วยที่มีเซลล์ - น้ำหนักถ้วยเปล่า}}{5} \times 1000$

2. การคำนวณหา μ $Y_{X/S}$ $Y_{P/S}$ และ Productivity

$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_o}{t}$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S_t}$$

$$Y_{P/S} = \frac{P_t - P_0}{S_0 - S_t}$$

$$\text{Productivity} = \frac{P_t - P_0}{t}$$

$Y_{X/S}$ = ผลของเซลล์ที่ได้ต่อหน่วยสารตั้งต้นที่ใช้ไป

$Y_{P/S}$ = ผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อหน่วยสารตั้งต้นที่ใช้ไป

$Y_{P/X}$ = ผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อหนึ่งหน่วยเซลล์

V_o = ปริมาตรเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (l)

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})

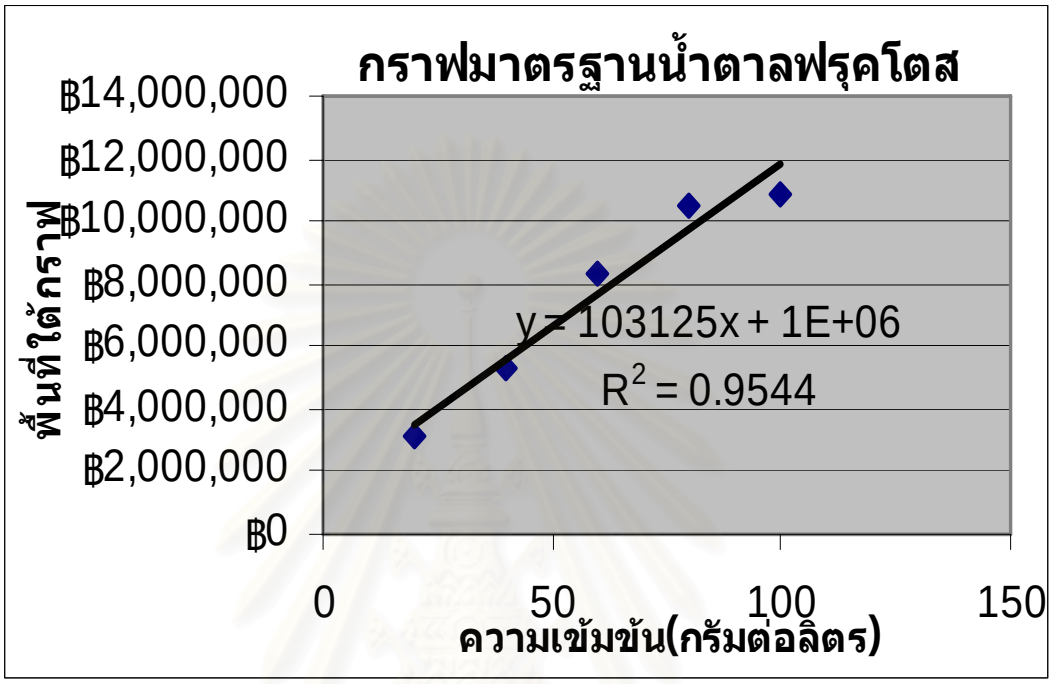
X_o = ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น (g/l

S_F = ความเข้มข้นของน้ำตาลในสารอาหารป้อนเข้า (g/l)

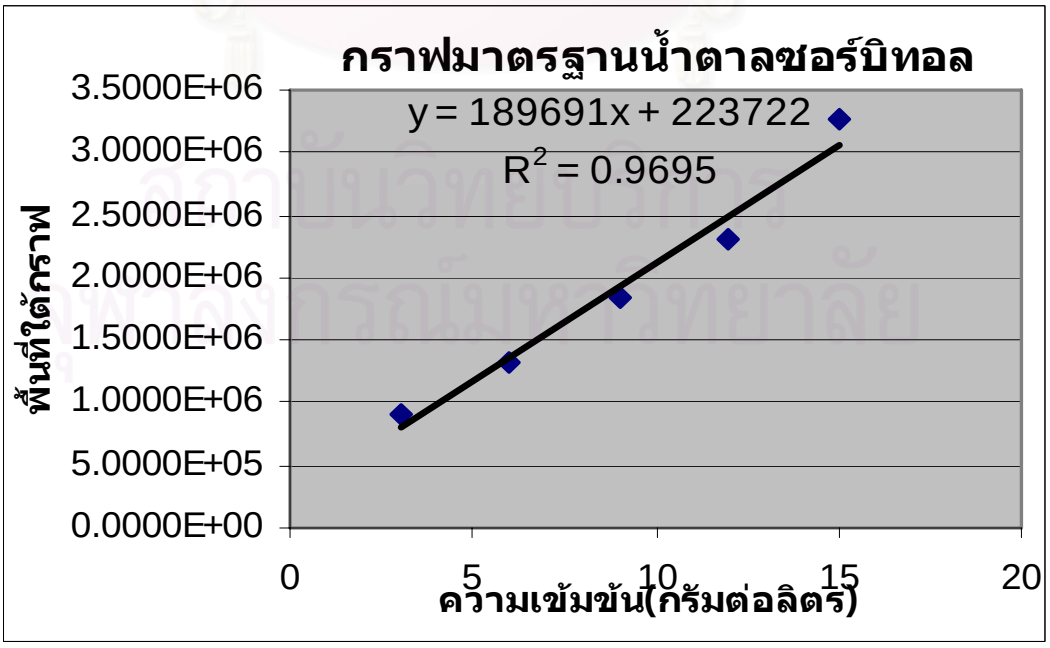
t = เวลา (h)

ภาคผนวก ง.
กราฟมาตรฐาน

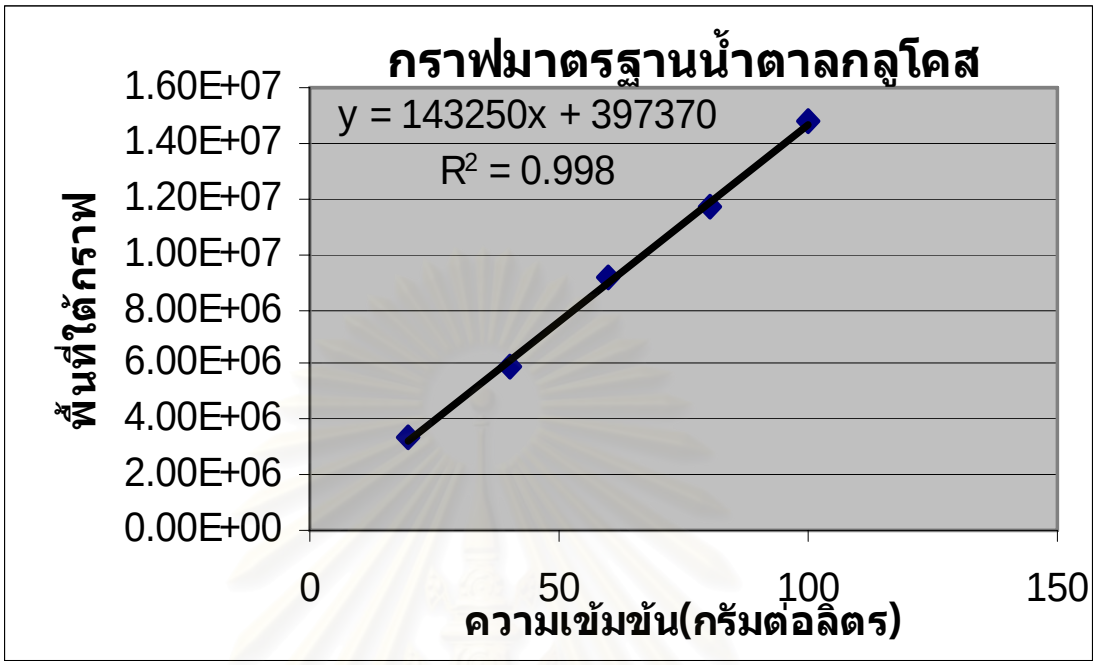
กราฟมาตรฐานน้ำตาลฟรุคโตส



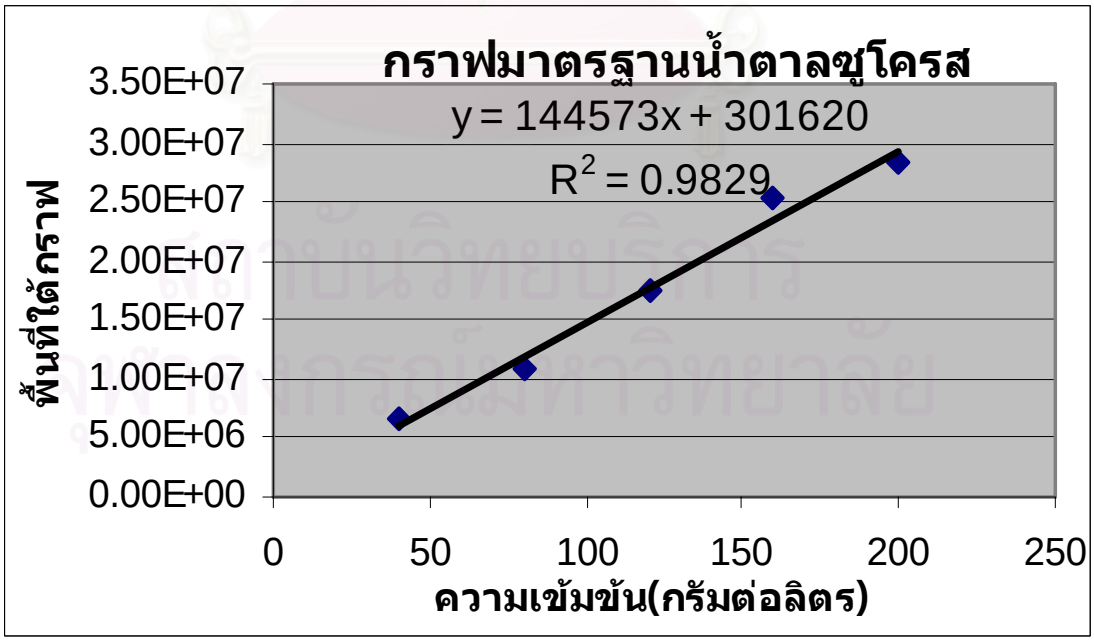
กราฟมาตรฐานน้ำตาลซอร์บิทอล



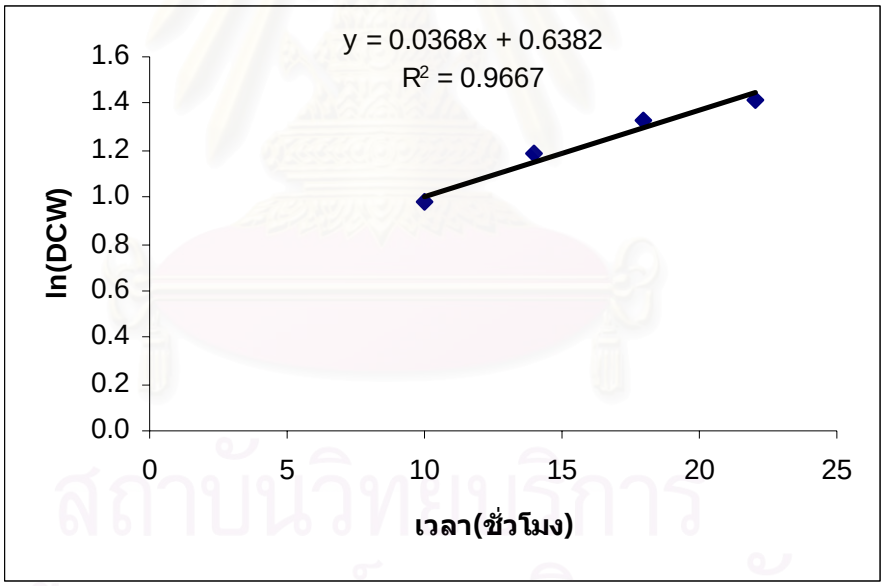
กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส



กราฟมาตรฐานน้ำตาลซูโครส



กราฟอัตราการเจริญจำเพาะของ *Zymomonas mobilis* TISTR 548



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ.

ตารางที่ 2 2^4 central composite factorial design experiment เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างซอร์บิทอล

Run	Variables in coded levels				Measured responses
	X_1	X_2	X_3	X_4	Sorbitol (g L^{-1})
1	-	-	-	-	5.627
2	-	-	-	+	10.524
3	-	-	+	-	4.137
4	-	-	+	+	3.931
5	-	+	-	-	5.021
6	-	+	-	+	12.111
7	-	+	+	-	12.606
8	-	+	+	+	14.686
9	-	-	-	-	3.655
10	+	-	-	+	4.843
11	+	-	+	-	3.407
12	+	-	+	+	2.864
13	+	+	-	-	3.366
14	+	+	-	+	7.244
15	+	+	+	-	4.679
16	+	+	+	+	5.524
17	0	0	0	0	4.786
18	0	0	0	0	
19	0	0	0	0	

	Factors	Real levels		
		-1	0	+1
X_1	Concentration (gL^{-1})	10	15	20
X_2	pH	5.5	6	6.5
X_3	Temperature (°C)	25	30	35
X_4	Time of cultivation (h)	24	36	48

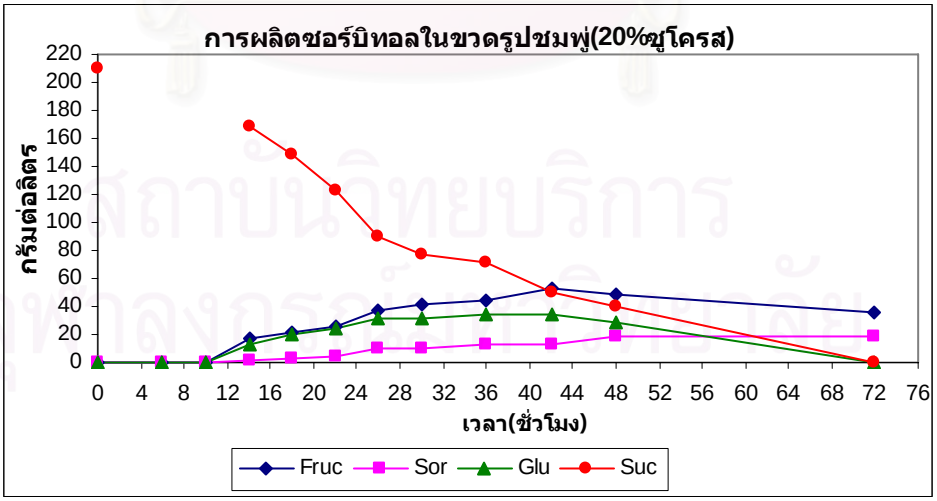
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ฉ.

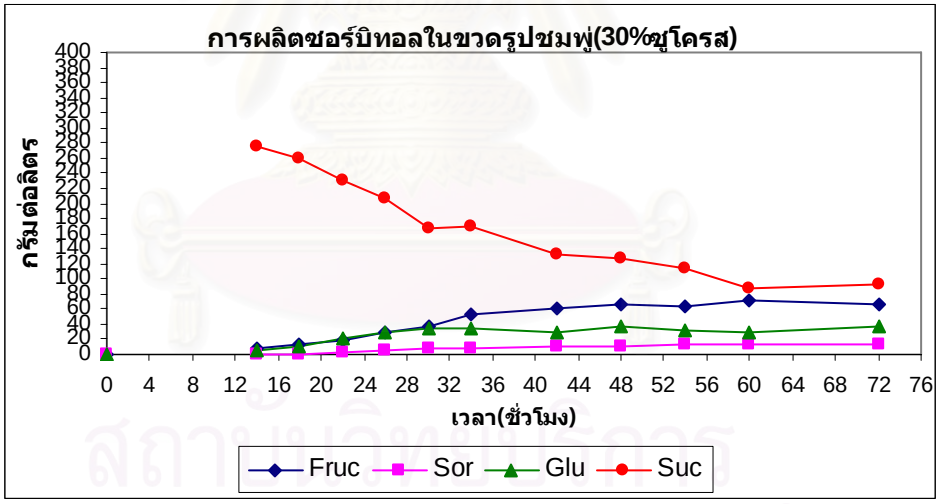
ข้อมูลดิบการวิเคราะห์น้ำตาล

ในขวดทดลอง

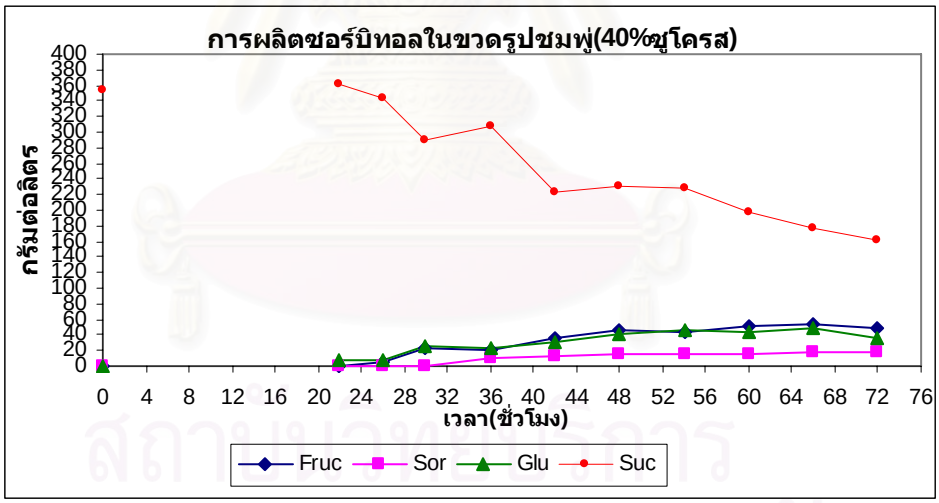
Flask	20%			
Time(h)	Fruc(g/l)	Sor(g/l)	Glu(g/l)	Suc(g/l)
0	0	0	0	210.6
6	0	0	0	
10	0	0	0	
14	17.344	0.743	12.255	168.454
18	21.081	2.22	20.236	148.516
22	25.957	4.855	23.882	122.57
26	36.747	9.906	31.533	90.214
30	42.065	10.512	31.89	77.757
36	44.659	12.64	34.257	71.213
42	53.249	13.127	34.421	49.809
48	48.789	18.521	28.237	39.452
72	35.782	18.034	0	0



Flask	30%			
Time(h)	Fruc(g/l)	Sor(g/l)	Glu(g/l)	Suc(g/l)
0	0	0	0	312.14
6				
10				
14	7.273	0.756	6.01	276.445
18	14.468	0.8	11.238	260.353
22	17.378	1.449	21.523	229.739
26	29.278	5.728	29.44	206.888
30	36.204	7.87	35.575	166.349
34	52.952	7.19	34.229	169.614
42	62.018	9.589	28.24	132.413
48	65.039	10.463	38.094	126.352
54	63.184	12.648	30.723	115.084
60	70.87	13.441	30.415	88.482
72	66.003	12.14	36.729	92.552



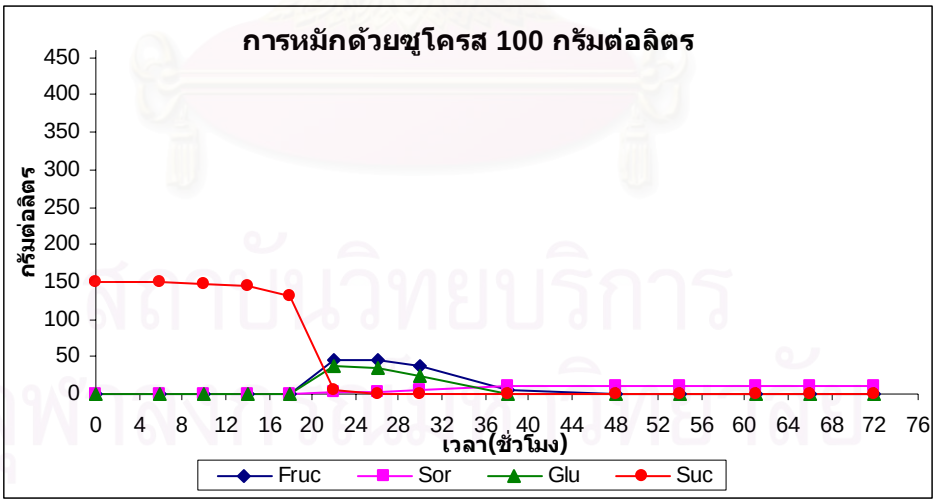
Flask	40%			
Time(h)	Fruc(g/l)	Sor(g/l)	Glu(g/l)	Suc(g/l)
0	0	0	0	405.65
6				
10				
14				
18				
22	1.018	0.274	8.932	361.327
26	4.508	0	8.763	343.243
30	24.084	1.129	25.1	289.867
36	20.694	10.95	22.243	307.999
42	36.168	12.543	30.762	224.211
48	46.836	15.828	41.566	230.11
54	43.923	14.632	45.295	228.023
60	51.172	15.242	44.779	197.037
66	54.589	17.357	49.624	177.08
72	49.666	18.91	35.392	162.34



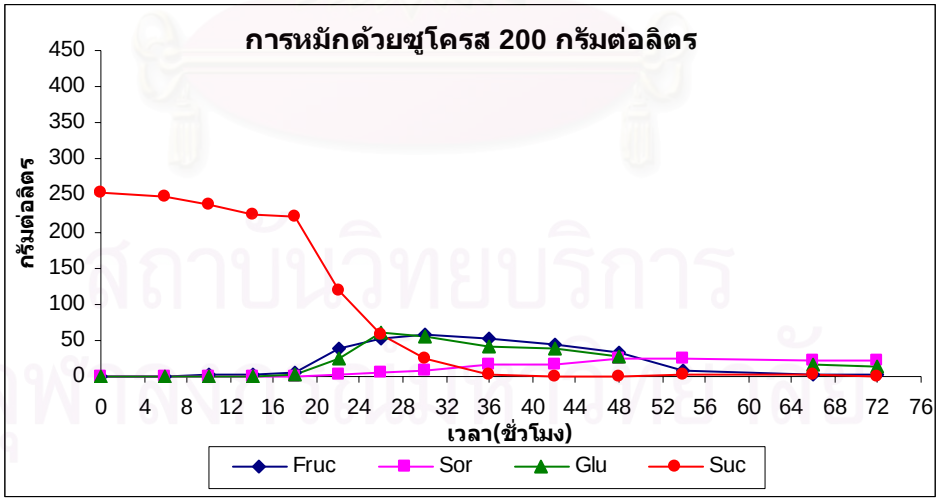
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

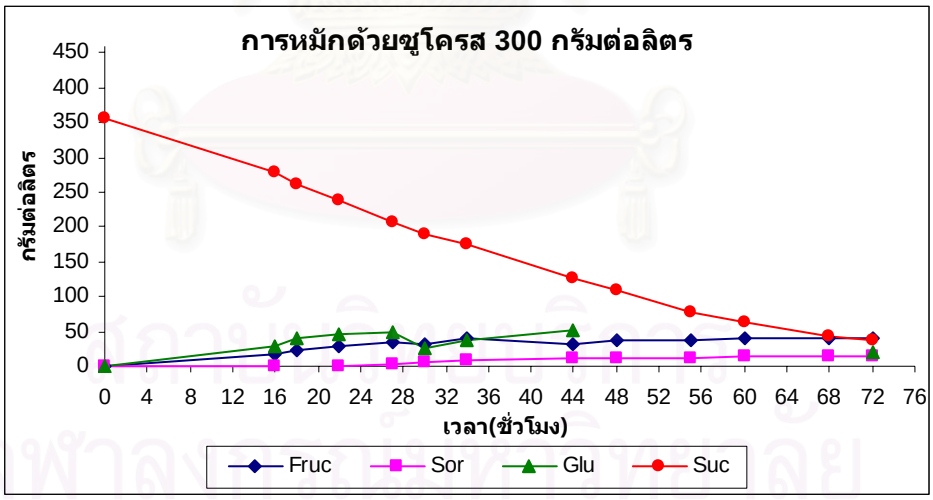
Fermenter	10%			
Time(h)	Fruc(g/l)	Sor(g/l)	Glu(g/l)	Suc(g/l)
0	0	0	0	150.643
6	0	0	0	150.389
10	0	0	0	146.103
14	0	0	0	144.972
18	0	0	0.92	131.543
22	45.939	2.242	36.354	4.981
26	45.931	3.594	34.457	0.729
30	36.816	6.53	22.875	0
38	5.804	10.824	0.741	0
48	0	10.605	0	0
54	0	11.139	0	0
61	0	11.274	0	0
66	0	11.729	0	0
72	0	10.616	0	0



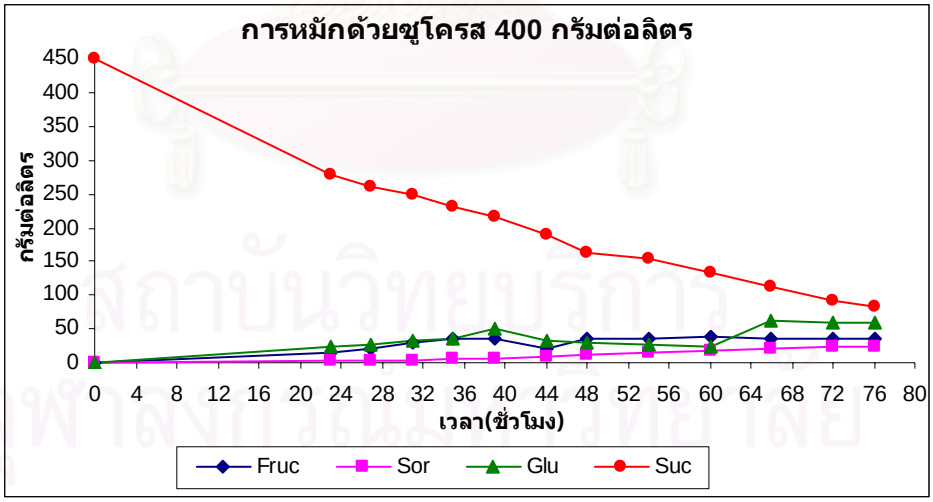
Fermenter	20%			
Time(h)	Fruc(g/l)	Sor(g/l)	Glu(g/l)	Suc(g/l)
0	0	0	0	252.776
6	0	0	0	247.888
10	2.847	0	0.6	236.71
14	3.236	0	0.404	223.549
18	6.532	0.7	1.714	221.782
22	37.56	2.106	24.285	118.829
26	51.586	5.232	61.766	59.126
30	56.599	8.979	54.714	25.043
36	51.827	16.518	42.514	2.784
42	44.914	15.52	38.054	1.254
48	33.263	24.069	27.434	0
54	9.22	24.471		1.834
66	2.895	23.229	16.921	1.414
72	3.64	22.804	14.693	0.101



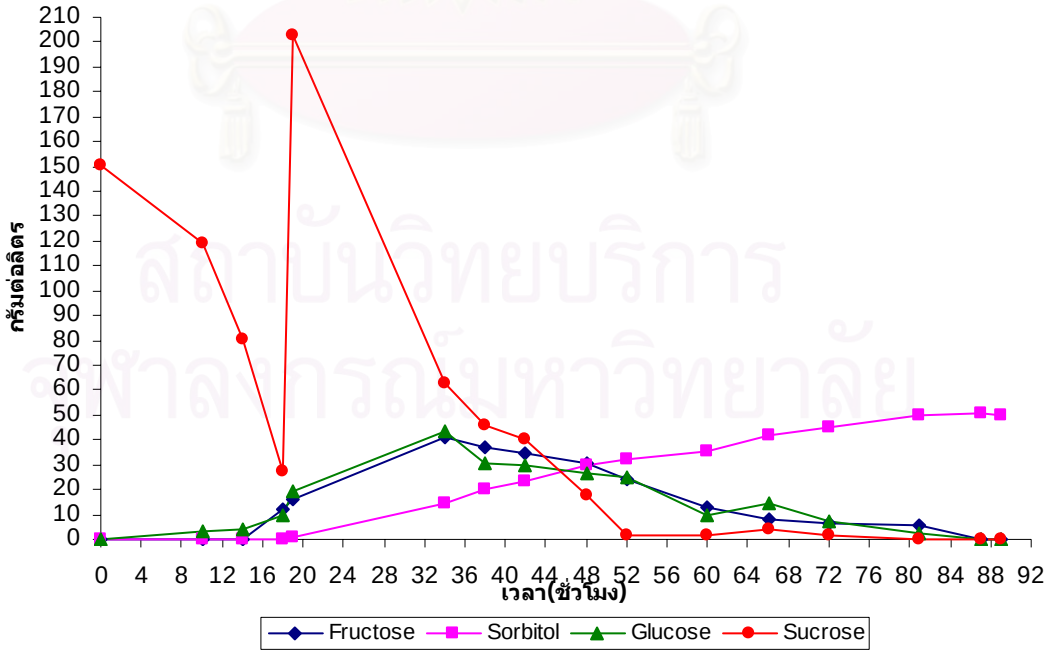
Fermenter	30%			
Time(h)	Fruc(g/l)	Sor(g/l)	Glu(g/l)	Suc(g/l)
0	0	0	0	355.609
16	18.214	0.556	27.55	278.48
18	24.297		39.33	261.503
22	28.915	1.374	45.403	239.805
27	35.722	2.949	48.445	207.76
30	31.342	5.386	24.492	191
34	38.948	8.062	37.404	175.772
44	32.062	10.812	52.806	125.712
48	37.396	12.726		109.377
55	38.242	11.151		76.696
60	40.69	14.17		61.981
68	38.917	15.228		43.141
72	41.469	14.463	20.631	36.615



Fermenter	40%			
Time(h)	Fruc(g/l)	Sor(g/l)	Glu(g/l)	Suc(g/l)
0	0	0	0	450.121
23	15.812	2.269	23.497	279.128
27	21.418	2.695	27.881	260.72
31	29.989	3.974	33.338	248.218
35	35.673	6.01	35.651	230.28
39	35.293	6.591	51.049	217.214
44	21.634	10.213	31.602	188.835
48	35.59	12.22	28.552	164.31
54	34.6	14.76	26.929	153.501
60	37.283	17.485	24.344	134.182
66	36.664	20.208	62.904	111.473
72	36.064	22.713	58.271	92.079
76	36.484	24.282	59.894	82.322



Fed batch				
Time (h)	Fruc(g/l)	Sor(g/l)	Glu(g/l)	Suc(g/l)
0	0	0	0	150.851
10	0.06	0	2.867	119.364
14	0	0	4.243	80.859
18	12.197	0	9.428	27.274
19	16.373	0.594	19.653	202.804
34	41.043	14.269	43.557	62.504
38	37.24	20.491	30.681	46.256
42	34.598	23.537	29.655	40.191
48	30.946	30.043	26.761	18.035
52	24.471	32.031	24.66	1.656
60	12.903	35.556	9.852	1.956
66	8.115	41.946	14.463	4.335
72	6.521	45.121	7.256	1.314
81	5.316	49.964	2.196	0
87	0	50.328	0	0
89	0	49.912	0	0



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย พาคินทร์ เจริญทิพย์ เกิดเมื่อวันพุธ ที่ 15 กันยายน พ.ศ. 2525 ที่จังหวัดกรุงเทพ ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ในปีการศึกษา 2547 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548 ปัจจุบันอาศัยอยู่ที่บ้านเลขที่ 55/2 หมู่4 หมู่บ้านช่อชัยพฤกษ์ ถนน สวนผัก-ชัยพฤกษ์ อ.ตลิ่งชัน จ. กรุงเทพ 10170

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย