

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
เมทิลโลโทรฟิเคียสต์	3
การแยกเมทิลโลโทรฟิเคียสต์	3
อนุกรมวิธานของเมทิลโลโทรฟิเคียสต์	5
เมแทบอลิซึมของเมทานอลในเมทิลโลโทรฟิเคียสต์	6
ประโยชน์ของเมทิลโลโทรฟิเคียสต์	11
ไซลิทอล	20
วิธีการผลิตไซลิทอล	23
การผลิตไซลิทอลโดยยีสต์	26
อุณหภูมิสำหรับการผลิตไซลิทอลโดยยีสต์	30
ยีสต์ทนอุณหภูมิสูง	31
อุปกรณ์และวิธีการ	35
ผลและวิจารณ์	45
สรุป	101
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	103
ภาคผนวก	120
ภาคผนวก ก	121
ภาคผนวก ข	125
ภาคผนวก ค	129
ภาคผนวก ง	131

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การแยกเมทิลโลโทรฟิเคียส์ที่สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญได้ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนอาหารแข็ง 0.5% methanol เมื่อบ่ม นาน 5 วัน	45
2	การเจริญของเมทิลโลโทรฟิเคียส์ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว 1% methanol ปริมาตร 50 มล. ในพลาสติกขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน	49
3	ค่าความขุ่นสูงสุดของเซลล์แขวนลอย (OD_{610} max) และอัตราการเจริญจำเพาะ สูงสุด (μ max) ของเมทิลโลโทรฟิเคียส์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว 1% methanol ปริมาตร 50 มล. ในพลาสติกขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ ความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส	53
4	ความสามารถในการผลิตไซลิทอลของเมทิลโลโทรฟิเคียส์ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 5 มล. ที่มี ไซโลส 30 กรัมต่อลิตร และเมทานอล 2% (โดยปริมาตร) ในหลอดทดลอง ขนาด 16.5 x 165 มม. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบรีซิโพรคัล (reciprocal) ที่ ความเร็ว 170 รอบต่อนาที ระยะเวลา 3 วัน	57
5	การเจริญ การใช้ไซโลส การผลิตไซลิทอล และค่าผลได้ของไซลิทอลโดย เมทิลโลโทรฟิเคียส์รหัส N22 ในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 100 มล. ในพลาสติกขนาด 250 มล. ที่มีเมทานอล 1.5% (โดยปริมาตร) casamino acids 5 กรัมต่อลิตร และไซโลสความเข้มข้นต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที	80
6	สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลโดยเมทิลโลโทรฟิเคียส์รหัส N22 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	96

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ง1 ค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอย (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิเคียสตรัส N13, N18, N20 และ N22 ที่ระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว 1% methanol ปริมาตร 50 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที	132
ง2 ค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอย (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิเคียสตรัส C1, C2, C3, C4, C5 และ P3 ที่ระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว 1% methanol ปริมาตร 50 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที	133
ง3 ค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอย (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิเคียสตรัส N13, N18, N20 และ N22 ที่ระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว 1% methanol ปริมาตร 50 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที	134
ง4 ค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอย (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิเคียสตรัส C1, C2, C3, C4, C5 และ P3 ที่ระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว 1% methanol ปริมาตร 50 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที	135
ง5 ค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอย (OD_{610}) ของเมทิลโลโทรฟิเคียสตรัส N13, N18, N20 และ N22 ที่ระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว 1% methanol ปริมาตร 50 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที	136
ง6 การผลิตไซลิทอลโดยเมทิลโลโทรฟิเคียสที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 50 มล. ที่มีไซโลส 100 กรัมต่อลิตร และเมทานอล 1% (โดยปริมาตร) ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที	137

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ง7 การเจริญ ปริมาณไซโลส และปริมาณไซลิทอล ของเมทิลโลโทรฟิเคซิสต์ รหัส N22 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 100 มล. ในพลาสติก ขนาด 250 มล. ที่มีไซโลส 100 กรัมต่อลิตร และเมทานอลความเข้มข้น ต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที	138
ง8 การเจริญ ปริมาณไซโลส และปริมาณไซลิทอล ของเมทิลโลโทรฟิเคซิสต์ รหัส N22 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 100 มล. ในพลาสติก ขนาด 250 มล. ที่มีไซโลส 100 กรัมต่อลิตร เมทานอล 1.5% (โดยปริมาตร) และแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที	139
ง9 การเจริญ ปริมาณไซโลส และปริมาณไซลิทอล ของเมทิลโลโทรฟิเคซิสต์ รหัส N22 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 100 มล. ในพลาสติก ขนาด 250 มล. ที่มีไซโลส 100 กรัมต่อลิตร เมทานอล 1.5% (โดยปริมาตร) และ casamino acids ความเข้มข้นต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที	140
ง10 การเจริญ ปริมาณไซโลส และปริมาณไซลิทอล ของเมทิลโลโทรฟิเคซิสต์ รหัส N22 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 100 มล. ในพลาสติก ขนาด 250 มล. ที่มีเมทานอล 1.5% (โดยปริมาตร) casamino acids 5 กรัมต่อลิตร และไซโลสความเข้มข้นต่าง ๆ บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที	141
ง11 การเจริญ ปริมาณไซโลส และปริมาณไซลิทอล ของเมทิลโลโทรฟิเคซิสต์ รหัส N22 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 100 มล. ในพลาสติก ขนาด 250 มล. ที่มีเมทานอล 1.5% (โดยปริมาตร) ไซโลส 100 กรัมต่อลิตร casamino acids 5 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ความเข้มข้นต่าง ๆ บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที	142

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ง12 การเจริญ ปริมาณไซโลส และปริมาณไซลิทอล ของเมทิลโลโทรฟิไกยีสต์ รหัส N22 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 100 มล. ในพลาสติกขนาด 250 มล. ที่มีเมทานอล 1.5% (โดยปริมาตร) ไซโลส 100 กรัมต่อลิตร casamino acids 5 กรัมต่อลิตร และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 กรัมต่อลิตร ที่พีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ กัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที	143
ง13 การเจริญ ปริมาณไซโลส และปริมาณไซลิทอล ของเมทิลโลโทรฟิไกยีสต์ รหัส N22 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 1 ลิตร ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร (Biostat B) ที่มีเมทานอล 1.5% (โดยปริมาตร) ไซโลส 100 กรัมต่อลิตร casamino acids 5 กรัมต่อลิตร และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที โดยใช้อัตราการให้อากาศที่แตกต่างกัน	144
ง14 การเจริญ ปริมาณไซโลส และปริมาณไซลิทอล ของเมทิลโลโทรฟิไกยีสต์ รหัส N22 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 1 ลิตร ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร (Biostat B) ที่มีเมทานอล 1.5% (โดยปริมาตร) ไซโลส 100 กรัมต่อลิตร casamino acids 5 กรัมต่อลิตร และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 ควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 1.75 vvm อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	145

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	วิธีดิสคิมิเลชันของการเปลี่ยนแปลงเมทานอลโดยเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ เอนไซม์: (1) alcohol oxidase, (2) catalase, (3) glutathione - dependent formaldehyde dehydrogenase, (4) S-formylglutathione hydrolase, (5) formate dehydrogenase, (6) methylformate synthase, (7) Pmp 20 คำย่อ: S - HMG, S-hydroxymethylglutathione; S-FG, S-formylglutathione ; GSH, รูปรีดิวซ์ของกลูตาไทโอน; GS - SG, รูปออกซิไดซ์ของกลูตาไทโอน	7
2	วิธีแอสคิมิเลชันของการเปลี่ยนแปลงเมทอล โดยเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ เอนไซม์: (1) alcohol oxidase, (2) dihydroxyacetone synthase, (3) dihydroxyacetone kinase, (4) fructose biphosphatase คำย่อ: DHA, dihydroxyacetone; GAP, glyceraldehyde -3 - phosphate; DHAP, dihydroxyacetone phosphate; Xu 5P, xylulose - 5 - phosphate	10
3	ลำดับปฏิบัติการผลิต ATP ในยีสต์ <i>Kloeckera</i> sp. No. 2201	14
4	โครงสร้างทางเคมีของซอร์บิทอล อีริทริทอล และไซลิทอล	17
5	โครงสร้างทางเคมีของไซลิทอล	20
6	เมแทบอลิซึมของน้ำตาลดี-ไซโลสในยีสต์	27
7	โครมาโตแกรมแสดงผลการตรวจสอบการผลิตไซลิทอลของเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธี two-step development โดยใช้แผ่นTLC แบบ Silica gel 60 plate ขนาด 20x20 ซม. (Merck, Germany) และใช้ n-butanol-acetone- water อัตราส่วน 40: 50: 10 (โดยปริมาตร) เป็นตัวทำละลาย แล้วสเปรย์ด้วยน้ำยาตรวจสอบสารประกอบโพลิออล (ภาคผนวก ข ข้อ 1)	56
8	การผลิตไซลิทอลโดยเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ก) และ 40 องศาเซลเซียส (ข) ในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 50 มล. ที่มีไซโลส 100 กรัมต่อลิตร และเมทานอล 1% (โดยปริมาตร) ในพลาสติก ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที	61

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
9 การเจริญ (ก) ปริมาณไซโลส (ข) และปริมาณไซลิทอล (ค) ของ เมทิลโลโทรฟิเคียสตรัทส์ N22 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 100 มล. ในพลาสติกขนาด 250 มล. ที่มีไซโลส 100 กรัมต่อลิตร และเมทานอลความเข้มข้นต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที	65
10 การเจริญ (ก) ปริมาณไซโลส (ข) และปริมาณไซลิทอล (ค) ของ เมทิลโลโทรฟิเคียสตรัทส์ N 22 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 100 มล. ในพลาสติกขนาด 250 มล. ที่มีไซโลส 100 กรัมต่อลิตร เมทานอล 1.5% (โดยปริมาตร) และแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที	70
11 การเจริญ (ก) ปริมาณไซโลส (ข) และปริมาณไซลิทอล (ค) ของ เมทิลโลโทรฟิเคียสตรัทส์ N22 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 100 มล. ในพลาสติกขนาด 250 มล. ที่มีเมทานอล 1.5% (โดยปริมาตร) ไซโลส 100 กรัมต่อลิตร และ casamino acids ความเข้มข้น ต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที	74
12 การเจริญ (ก) ปริมาณไซโลส (ข) และปริมาณไซลิทอล ของ เมทิลโลโทรฟิเคียสตรัทส์ N22 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 100 มล. ในพลาสติกขนาด 250 มล. ที่มีเมทานอล 1.5% (โดยปริมาตร) casamino acids 5 กรัมต่อลิตร และไซโลสความเข้มข้นต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที	78

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
13 การเจริญ (ก) ปริมาณไซโลส (ข) และปริมาณไซลิทอล ของเมทิลโลโทร-ฟิกลีสต์รหัส N22 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 100 มล. ในฟลาस्कขนาด 250 มล. ที่มีเมทานอล 1.5% (โดยปริมาตร) ไซโลส 100 กรัมต่อลิตร casamino acids 5 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ความเข้มข้นต่าง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที	83
14 การเจริญ (ก) ปริมาณไซโลส (ข) ปริมาณไซลิทอล (ค) และการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช (ง) เมื่อผลิตไซลิทอลโดยเมทิลโลโทรฟิกลีสต์รหัส N22 ในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 100 มล. ในฟลาस्कขนาด 250 มล. ที่มีเมทานอล 1.5% (โดยปริมาตร) ไซโลส 100 กรัมต่อลิตร casamino acids 5 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร ที่พีเอชเริ่มต้นต่าง ๆ กัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที	87
15 Biostat B fermenter (Braun Biotech International, Germany) ที่ใช้ทดลองผลิตไซลิทอลจากไซโลส	91
16 การเจริญ (ก) ปริมาณไซโลส (ข) และปริมาณไซลิทอล (ค) ของเมทิลโล-โทรฟิกลีสต์รหัส N22 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 1 ลิตร ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร (Biostat B) ที่มีเมทานอล 1.5% (โดยปริมาตร) ไซโลส 100 กรัมต่อลิตร casamino acids 5 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที โดยใช้อัตราการให้อากาศที่แตกต่างกัน	92

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
17	การเจริญ ปริมาณไซโลส และปริมาณไซลิทอล ของเมทิลโลโทรฟิกลีซิสต์ รหัส N22 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 1 ลิตร ในถังหมัก ขนาด 2.5 ลิตร (Biostat B) ที่มีเมทานอล 1.5% (โดยปริมาตร) ไซโลส 100 กรัมต่อลิตร casamino acids 5 กรัมต่อลิตร และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 กรัมต่อลิตร พี่เอสเริ่มต้นเท่ากับ 7 ควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 1.75 vvm อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	99
ภาพผนวกที่		
ข1	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นของเซลล์แขวนลอยกับความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร (OD_{610}) กับน้ำหนักแห้งของเมทิลโลโทรฟิกลีซิสต์รหัส N22	127