อุปกรณ์และวิธีการ

1. <u>ยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง</u>

1.1 เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่แยกจากธรรมชาติ

1.2 เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่ได้จากการรวบรวมของ รศ.ดร.สาวิตรี ลิ่มทอง จำนวน 39 ไอโซเลท

เมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทุกไอโซเลทเลี้ยงในอาหารแข็ง YPD agar (ภาคผนวก ก ข้อ 1) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. <u>การแยกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเพื่อการเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส</u>

2.1 นำตัวอย่างจากแหล่งธรรมชาติ เช่น ดิน ดอกไม้ ยางไม้ ใส่ลงในอาหารเหลว 0.5% methanol (ภาคผนวก ก ข้อ 2) ปริมาตร 50 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

2.2 ถ่ายเชื้อปริมาตร 5 มล. จากข้อ 2.1 ลงในอาหารเหลว 0.5% methanol ปริมาตร 50 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน

2.3 ทำตามวิธีในข้อ 2.2 อีกครั้ง

2.4 ใช้ลูปปลอดเชื้อเขี่ยเชื้อจากฟลาสก์ แล้ว streak บนอาหารแข็ง 0.5% methanol (ภาคผนวก ก ข้อ 3) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

2.5 ใช้ลูปปลอดเชื้อเขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหาร ไปตรวจดูลักษณะเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยเตรียมตัวอย่างด้วยวิธี wet mount แล้วเลือกโคโลนีที่เป็นยีสต์ไป streak ให้

ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง 0.5% methanol บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน

2.6 เมื่อแยกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ได้แล้ว จึงเพาะเชื้อบนอาหาร YPD slant agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง แล้วเก็บหลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

3. <u>การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ซึ่งเจริญได้ในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส</u>

3.1 การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ ซึ่งเจริญได้ในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.1.1 ใช้ลูปปลอดเชื้อเพาะเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่แยกได้จากข้อ 1 ลงบนอาหาร YPD agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.1.2 ถ่ายเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ลงในอาหารเหลว 1% methanol (ภาคผนวก ก ข้อ 4) ปริมาตร 50 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนความเร็ว 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.1.3 เก็บเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง แล้วเตรียมเซลล์แขวนลอยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพื่อเป็นกล้าเชื้อ

3.1.4 เพาะกล้าเชื้อจากข้อ 3.1.3 ลงในอาหารเหลว 1% methanol ปริมาตร 50 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. โดยให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีเซลล์เริ่มต้นวัดเป็นค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร (OD_{610}) เท่ากับ 0.1 ซึ่งปริมาตรกล้าเชื้อที่ต้องใช้ คำนวณโดยใช้สูตรในภาคผนวก ค ข้อ 1

3.1.5 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

3.1.6 คัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ซึ่งเจริญได้ (โดยพิจารณาจากค่า OD_{610})ไว้ศึกษาต่อไป

3.2 การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ ซึ่งเจริญได้ในอาหารเหลวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

นำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1 มาทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 ถึง 3.1.5 แต่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่เจริญได้ไว้ศึกษาต่อไป

4. <u>การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทนอุณหภูมิสูง</u>

4.1 นำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่เจริญได้ในอาหารเหลว 1% methanol ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากข้อ 3.1 มาทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 ถึง 3.1.5 แล้ววัดการเจริญที่เวลาต่าง ๆ ในรูป OD_{610} เพื่อศึกษาอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยสูตรการคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะแสดงในภาคผนวก ค ข้อ 2

4.2 นำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่เจริญได้ในอาหารเหลว 1% methanol ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากข้อ 3.2 มาทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 ถึง 3.1.5 แต่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส วัดการเจริญที่เวลาต่าง ๆ ในรูป OD_{610} เพื่อศึกษาอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

4.3 นำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่เจริญได้ในอาหารเหลว 1% methanol ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส จากข้อ 3 มาทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1 ถึง 3.1.5 แต่บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วัดการเจริญที่เวลาต่าง ๆ ในรูป OD_{610} เพื่อศึกษาอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.4 วิเคราะห์ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส เพื่อคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทนอุณหภูมิสูงไว้ศึกษาต่อไป

5. <u>การเตรียมกล้าเชื้อและการเพาะเมทิลโลโทรฟิกยีสต์สำหรับการผลิตไซลิทอล</u>

5.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

5.1.1 เพาะเมทิลโลโทรฟิกยีสต์บนอาหารแข็ง YPD agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 หรือ 40 องศาเซลเซียสตามที่กำหนด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.1.2 ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว basal medium (ภาคผนวก ก ข้อ 5) ที่เติมกลูโคสเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัดเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 หรือ 40 องศาเซลเซียสตามที่กำหนด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.1.3 ถ่ายเชื้อจากข้อ 5.1.2 ปริมาตร 5 มล. ลงในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 50 มล. ที่เติมกลูโคสเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัดเข้มข้น 4 กรัมต่อลิตร และเมทานอลเข้มข้น 1% (โดยปริมาตร) ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 หรือ 40 องศาเซลเซียสตามที่กำหนด เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

5.1.4 เก็บเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ครั้ง แล้วเตรียมเซลล์แขวนลอยในน้ำกลั่นปลอดเชื้อเพื่อเป็นกล้าเชื้อ

5.2 การเพาะเชื้อ

เพาะกล้าเชื้อจากข้อ 5.1.4 ลงในอาหารเหลว basal medium เพื่อผลิตไซลิทอล โดยให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีเซลล์เริ่มต้น วัดเป็นค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร (OD_{610}) เท่ากับ 0.3 (เซลล์เริ่มต้นคิดเป็นน้ำหนักแห้งเท่ากับ 0.24 กรัมต่อลิตร) ซึ่งปริมาตรกล้าเชื้อที่ต้องใช้ คำนวณโดยใช้สูตรในภาคผนวก ค ข้อ 1

6. <u>การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส</u>

6.1 การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

6.1.1 นำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่เจริญได้ในอาหารเหลว 1% methanol ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งแยกได้จากธรรมชาติและได้รับจาก รศ.ดร.สาวิตรี ลิ่มทอง มาเตรียมกล้าเชื้อตามวิธีในข้อ 5.1 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

6.1.2 เพาะเชื้อตามวิธีในข้อ 5.2 ลงในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 5 มล. ที่มีไซโลสเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร และเมทานอลเข้มข้น 2% (โดยปริมาตร) ในหลอดทดลองขนาด 16.5 x 165 มม.

6.1.3 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบรีซิโพรคาล (reciprocal) ที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

6.1.4 เก็บตัวอย่างจากข้อ 6.1.3 ปริมาตร 1 มล. มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ แล้วเก็บแต่น้ำหมักไว้เพื่อนำไปตรวจสอบไซลิทอล

6.1.5 ตรวจสอบไซลิทอลที่ยีสต์ผลิตขึ้นในน้ำหมักโดยใช้ Thin Layer Chromatography (TLC) แบบ Silica gel 60 plate (Merck, Germany) และใช้สารละลาย n- butanol – acetone – water อัตราส่วน 40: 50: 10 (โดยปริมาตร) เป็นตัวทำละลาย โดยใช้วิธี two – step development แล้วสเปรย์ด้วยน้ำยาตรวจสอบสารประกอบโพลีออล (ภาคผนวก ข ข้อ 1) ซึ่งตัวอย่างที่มีไซลิทอล จะปรากฏไซลิทอลเป็นจุดสีขาวบนพื้นสีฟ้า ตรงกับสารละลายไซลิทอลมาตรฐาน

6.1.6 คัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสไว้ศึกษาต่อไป

6.2 การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

นำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 6.1 มาทำการทดลองโดยใช้วิธีเดียวกับข้อ 6.1.1 ถึง 6.1.5 แต่เตรียมกล้าเชื้อและบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสตลอดการทดลอง แล้วคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสไว้ศึกษาต่อไป

7. <u>การคัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ดีที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส</u>

7.1 นำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส จากข้อ 6 มาตรวจสอบการผลิตไซลิทอลในเชิงปริมาณ โดยเตรียมกล้าเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 5.1 และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส

7.2 เพาะเชื้อตามวิธีในข้อ 5.2 ลงในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 50 มล. ที่มีไซโลสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร และเมทานอลเข้มข้น 1% (โดยปริมาตร) ในฟลาสก์ขนาด 250 มล.

7.3 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส

7.4 เก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มล. จากข้อ 7.3 ทุกวัน มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ แล้วเก็บน้ำหมักไปวิเคราะห์ปริมาณไซลิทอลด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (ภาคผนวก ข ข้อ 3)

7.5 คัดเลือกเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลต่อไป

8. <u>การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสของเมทิลโล-โทรฟิกยีสต์ทนอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกได้</u>

นำเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทนอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกไว้จากข้อ 7 มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเตรียมกล้าเชื้อดังเช่นวิธีในข้อ 5.1 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และใช้วิธีในข้อ 5.2 เพาะเชื้อที่เตรียมได้ลงในอาหารเหลว basal medium ตามการทดลองดังต่อไปนี้

8.1 ความเข้มข้นของเมทานอล

เพาะเชื้อลงในอาหารเหลว basal medium ปริมาตร 100 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่มีไซโลสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร และเมทานอลความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 และ 4% (โดยปริมาตร) บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์การเจริญ ปริมาณไซโลสและไซลิทอล ซึ่งการคำนวณค่าผลได้ (Yp/s) ของไซลิทอล ใช้สูตรคำนวณในภาคผนวก ค ข้อ 3 แล้วเลือกความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซลิทอล เพื่อนำไปศึกษาสภาวะอื่นต่อไป

8.2 ชนิดของแหล่งไนโตรเจน

เพาะเชื้อลงในอาหารเหลว basal medium (ที่ไม่มีแอมโมเนียมคลอไรด์) ปริมาตร 100 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่มีไซโลสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร และเมทานอลความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 8.1 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ยูเรีย, แอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโมเนียมไนเตรต, แอมโมเนียมคลอไรด์, ยีสต์สกัด, casamino acids และ yeast nitrogen base (with amino acid) ซึ่งคำนวณให้มีธาตุไนโตรเจนเท่ากับยูเรียเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์การเจริญ ปริมาณไซโลสและไซลิทอล แล้วเลือกชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซลิทอล เพื่อนำไปศึกษาสภาวะอื่นต่อไป

8.3 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

เพาะเชื้อลงในอาหารเหลว basal medium (ที่ไม่มีแอมโมเนียมคลอไรด์) ปริมาตร 100 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่มีไซโลสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของเมทานอลและชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 8.1 และ 8.2 ตามลำดับ แต่ใช้แหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ได้แก่ 1, 5, 11.6, 24.4, 36.1 และ 50 กรัมต่อลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์การเจริญ ปริมาณไซโลสและไซลิทอล แล้วเลือกความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซลิทอล เพื่อนำไปศึกษาสภาวะอื่นต่อไป

8.4 ความเข้มข้นของไซโลส

เพาะเชื้อลงในอาหารเหลว basal medium (ที่ไม่มีแอมโมเนียมคลอไรด์) ปริมาตร 100 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่มีความเข้มข้นของเมทานอล แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 8.1, 8.2 และ 8.3 ตามลำดับ โดยใช้ไซโลสเริ่มต้นความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ได้แก่ 50, 100, 150, 200, 250 และ 300 กรัมต่อลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์การเจริญ ปริมาณไซโลสและไซลิทอล แล้วเลือกความเข้มข้นของไซโลสเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซลิทอล เพื่อนำไปศึกษาสภาวะอื่นต่อไป

8.5 ความเข้มข้นของ $MgSO_4.7H_2O$

เพาะเชื้อลงในอาหารเหลว basal medium (ที่ไม่มีแอมโมเนียมคลอไรด์) ปริมาตร 100 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่มีความเข้มข้นของเมทานอล แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน และความเข้มข้นของไซโลสที่เหมาะสมจากข้อ 8.1, 8.2, 8.3 และ 8.4 ตามลำดับ โดยใช้ $MgSO_4.7H_2O$ ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ได้แก่ 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5 กรัมต่อลิตร บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์การเจริญ ปริมาณไซโลสและไซลิทอล แล้วเลือกความเข้มข้นของ $MgSO_4.7H_2O$ ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซลิทอล เพื่อนำไปศึกษาสภาวะอื่นต่อไป

8.6 พีเอชเริ่มต้น

เพาะเชื้อลงในอาหารเหลว basal medium (ที่ไม่มีแอมโมเนียมคลอไรด์) ปริมาตร 100 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่มีความเข้มข้นของเมทานอล แหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นของไซโลสเริ่มต้น และความเข้มข้นของ $MgSO_4.7H_2O$ ที่เหมาะสมจากข้อ 8.1 ถึง 8.5 ตามลำดับ โดยปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าแบบหมุนที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์การเจริญ ปริมาณไซโลสและไซลิทอล แล้วเลือกพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซลิทอล เพื่อนำไปศึกษาสภาวะอื่นต่อไป

8.7 อัตราการให้อากาศ

เพาะเชื้อลงในอาหารเหลว basal medium (ที่ไม่มีแอมโมเนียมคลอไรด์) ปริมาตร 1 ลิตร ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร (Biostat B fermenter, Braun Biotech International, Germany) ซึ่งส่วนประกอบของอาหารและพีเอชเริ่มต้นเป็นไปตามสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 8.1 ถึง 8.6 ปรับอัตราการให้อากาศแตกต่างกัน เท่ากับ 0.75, 1.5, 1.75 และ 2 vvm (ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารในถังหมักต่อนาที) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์การเจริญ ปริมาณไซโลสและไซลิทอล แล้วเลือกอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทนอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกได้

9. <u>การผลิตไซลิทอลโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์ทนอุณหภูมิสูงที่คัดเลือกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส</u>

ทำการทดลองในถังหมักเช่นเดียวกับข้อ 8.7 โดยส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ พีเอชเริ่มต้น และอัตราการให้อากาศเป็นไปตามสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองในข้อ 8.1 ถึง 8.7 แต่เพาะเลี้ยงกล้าเชื้อและควบคุมอุณหภูมิถังหมักที่ 40 องศาเซลเซียสตลอดการทดลอง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์การเจริญ ปริมาณไซโลสและไซลิทอล

10. <u>วิธีวิเคราะห์</u>

10.1 การวิเคราะห์การเจริญ

วิเคราะห์การเจริญ โดยการวัดความขุ่นของเซลล์แขวนลอยด้วยเครื่อง spectrophotometer (Jenway 640 UV/vis, U.K.) ที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร (OD_{610}) แล้วเปรียบเทียบเป็นน้ำหนักแห้ง (ภาคผนวก ข ข้อ 2)

10.2 การวิเคราะห์ปริมาณไซโลสและไซลิทอล

วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC series 1100, Hewlett Packard, Germany) โดยมีสภาวะที่ใช้วิเคราะห์ดังภาคผนวก ข ข้อ 3