

มฤตติ เชาวรัตน์ 2549. การเจริญเติบโตและอัตราการผลิตไซลิทอล จากสารสกัดขานอ้อย โดยยีสต์ที่สามารถผลิต
ไซลิทอลที่ได้รับการตกแต่งยีน. วิทยานิพนธ์ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชา
เทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัย ขอนแก่น. [ISBN 974-626-609-8]

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: อาจารย์ ดร.ไพบุลย์ คำนววิรุทัย,
ศาสตราจารย์ เอียน แฟรงค์ คอนเนอร์ตัน,
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิชัย ลีลาวัชรมาศ

บทคัดย่อ

ทำการย่อยสลายขานอ้อยในสารละลายกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ภายใต้สภาวะหมักหนึ่งความดันไอที่แรงดัน 1.5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร (126.7 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 60 นาที ภายหลังจากทำสารสกัดที่ได้ให้เข้มข้นขึ้น เดิมผงถ่านกัมมันต์ ปริมาณ 2.4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงในสารสกัดเพื่อกำจัดสารพิษที่ขัดขวางการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ สารสกัดจากขานอ้อยที่ได้กำจัดสารพิษ บางส่วนนี้นำมาใช้เป็นอาหาร ในการเลี้ยงยีสต์ ทำการคัดเลือกยีสต์ที่หมักน้ำตาลไซโลส และมีความสามารถสูงในการผลิตไซลิทอลจากสารสกัดที่ได้จากขานอ้อย ที่เคยมีรายงานมาก่อนหน้านี้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Candida guilliermondii* 5068, *Kluyveromyces marxianus* 5057 และ *Hansenula anomala* 5302

ทำการแยกยีนไซโลสรีดักเตส จาก *K. marxianus* 5057 เพื่อทำการศึกษา และตรวจวิเคราะห์การแสดงออกของยีน พบว่าชิ้นส่วนของ DNA ที่มียีนไซโลสรีดักเตสมีขนาด 4.5 kb ทำการส่งถ่ายชิ้นส่วนของยีนไซโลสรีดักเตสของ *K. marxianus* 5057 ขนาด 4.5 kb กลับเข้าไปใน *K. marxianus* 5057 สายพันธุ์ดั้งเดิม คัดเลือกเชื้อ *K.marxianus* 5057 ที่ทำการตกแต่งยีนนี้ จำนวน 6 โคลน ได้แก่ rKm1, rKm2, rKm3, rKm4, rKm5 และ rKm6 เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโต และความสามารถในการผลิตไซลิทอลในอาหารที่ได้จากสารสกัดจากขานอ้อย ขณะเดียวกันทำการศึกษากการแสดงออกของยีน และตรวจวิเคราะห์หาลำดับของกรดอะมิโน ใน *Pichia pastoris* ผลการวิเคราะห์พบว่าไซโลสรีดักเตส มีน้ำหนักโปรตีนเท่ากับ 37.5 kDa และมีสายยาวของโพลีเปปไทด์ที่ประกอบด้วย 329 กรดอะมิโน

จากการเปรียบเทียบการเจริญเติบโต และการผลิตไซลิทอลในสารสกัดจากขานอ้อยของเชื้อดั้งเดิม ได้แก่ *C. guilliermondii* 5068, *K. marxianus* 5057 และ *H. anomala* 5302 และเชื้อที่ทำการตกแต่งยีน จำนวน 6 โคลน ได้แก่ rKm1, rKm2, rKm3, rKm4, rKm5 และ rKm6 ในฟาสก์ที่มีการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า rKm6 มีการผลิตไซลิทอลปริมาณสูงสุดที่สุด คือ 15.64 กรัมต่อลิตร มีอัตราการผลิตเป็น 0.13 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ปริมาณเซลล์สูงสุดเป็น 5.30 กรัมต่อลิตร

ท้ายที่สุดเชื้อ *K. marxianus* 5057 ที่ทำการตกแต่งยีน คือ rKm6 โดยมียีนไซโลสรีดักเตส จาก *K. marxianus* 5057 สายพันธุ์ดั้งเดิม ถูกคัดเลือกเพื่อนำมาพัฒนาในการเพิ่มผลผลิตไซลิทอล โดยใช้สารสกัดจากขานอ้อย ซึ่งทำการศึกษาในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ที่บรรจุอาหารสารสกัดจากขานอ้อย ปริมาตร 1.2 ลิตร ผลการศึกษาพบว่าเชื้อที่เลี้ยงในสภาวะการให้อากาศ 1.5 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที (vvm) และมีการกวนใน

อัตรา 200 รอบต่อนาที ให้ผลผลิตไซลิทอลสูงสุด เท่ากับ 45.38 กรัมต่อลิตร หรืออัตราการผลิตเป็น 0.27 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง หลังการเลี้ยงนาน 168 ชั่วโมง ซึ่งให้อัตราการผลิตมากกว่าการเลี้ยงในฟาส์กที่มีการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที