โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ	การคัดแยกและคัดกรองยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์
ชื่อนิสิต	นางสาวณิชนันทน์ หนันทุม
เลขประจำตัวนิสิต	5932117323
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
ปีการศึกษา	2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การคัดแยกและคัดกรองยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์

นางสาวณิชนันทน์ หนันทุม

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2562

Isolation and screening of sugar alcohol-producing yeasts

Miss Nitchanun Nuntoom

A Senior Project in Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of Bachelor of Science in Genetics
Department of Botany
Faculty of Science, Chulalongkorn University
Academic Year 2019

ชื่อเรื่อง	การคัดแยกและคัดกรองยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตน้ำตาลอะราบิทอล
ชื่อนิสิต	นางสาวณิชนันทน์ หนันทุม
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.วิชาณี แบนคีรี
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข
ปีการศึกษา	2562

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ อนุมัติให้โครงงานวิทยาศาสตร์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์

คณะกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ ดร.วิชาณี แบนคีรี)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	การคัดแยกและคัดกรองยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์
ชื่อนิสิต	นางสาวณิชนันทน์ หนันทุม
ภาควิชา	พฤกษศาสตร์
สาขาวิชา	พันธุศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร.วิชาณี แบนคีรี
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข
ปีการศึกษา	2562

บทคัดย่อ

อะราบิทอล (arabitol) เป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารและยา เนื่องด้วยคุณสมบัติที่น่าสนใจหลายประการ เช่น เป็นสารให้ความหวานพลังงานต่ำเมื่อเทียบกับน้ำตาลซูโครส ช่วยให้อาหารมีรสสัมผัสนุ่ม และมีความสามารถในการรักษาความชื้นได้ งานวิจัยนี้ได้คัดแยกและคัดกรองยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์จากส่วนเหลือทิ้งของผลไม้ จากเชื้อ 8 ไอโซเลตที่คัดแยกได้พบว่ายีสต์ไอโซเลตที่ 7.3 มีความสามารถในการผลิตอะราบิทอลสูงสุดที่ 2.3±0.03 กรัมต่อลิตร จึงเลือกไอโซเลตที่ 7.3 มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอะราบิทอล พบว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์ไอโซเลตที่ 7.3 สามารถผลิตอะราบิทอลได้ 2.3±0.01 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้แอมโมเนียมออกซาเลตเป็นแหล่งไนโตรเจนจะผลิตอะราบทอลได้เท่ากับ 5.03±0.14 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงขึ้นจากเดิม 2 เท่า และเมื่อนำยีสต์ไอโซเลตที่ 7.3 มาระบุชนิดโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยเริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณของ Internal Transcribed Spacer ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรสโดยใช้ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 เมื่อตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสพบแถบของผลิตภัณฑ์ขนาดระหว่าง 500-600 คู่เบส

คำสำคัญ: ยีสต์, อะราบิทอล, สภาวะที่เหมาะสม

Title	Isolation and screening of sugar alcohol-producing yeasts
Student name	Miss Nitchanun Nuntoom
Program	Genetics
Department	Botany
Advisor	Dr. Wichanee Bankeeree
Co-advisor	Assoc. Prof. Dr. Sehanat Prasongsuk
Acardemic year	2019

Abstract

Arabitol is a sugar alcohol that widely used in food and pharmaceutical industries due to its interesting properties, for example, a low-calorie sweetener compared to sucrose, a food texturing agent and a humectant. In this study, arabitol-producing yeasts were isolated and screened from the fruit wastes. Among 8 isolates, the highest arabitol yield (2.30±0.03 g/L) was obtained from isolate 7.3 Therefore, it was selected for the optimization of arabitol production.When glucose was used as the carbon source, 2.3±0.01 g/L arabitol was obtained. When ammonium oxalate was employed as the nitrogen source, the maximum yield of 5.03±0.14 g/L was achieved which was 2-fold increase compared to culture in standard medium. For molecular identification of isolate 7.3, the DNA extraction was performed and amplified the region of internal transcribed spacer by polymerase chain reaction (PCR) using primer ITS1/ITS4. The PCR product of approximately 500-600 base pairs was visualized by gel electrophoresis.

Keywords: yeast, arabitol, optimal condition

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความกรุณาของผู้ที่เกี่ยวข้องทุกฝ่าย ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.วิชาณี แบนคีรี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน รองศาสตราจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำและคำปรึกษาเกี่ยวกับการทำโครงงานวิทยาศาสตร์ และกรุณาช่วยเหลือเป็นอย่างดีในทุกด้าน

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พงศ์ธาริน โล่ห์ตระกูล ที่กรุณาเสียสละเวลาเป็นกรรมการสอบโครงงานวิทยาศาสตร์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำ ช่วยตรวจสอบและแก้ไขให้โครงงานวิทยาศาสตร์ฉบับนี้มีความถูกต้องและสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อประสบการณ์ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาสนับสนุนงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาเอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่ในการทำโครงงานวิทยาศาสตร์

ขอขอบพระคุณพี่ในห้องปฏิบัติการทุกท่านในห้องปฏิบัติการที่คอยให้คำแนะนำคำปรึกษาและการช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านด้วยดีมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณคณะอาจารย์ทุกท่านและผู้มีส่วนเกี่ยวข้องทุกคนที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และญาติพี่น้อง ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในทุกด้านอย่างเต็มที่

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การตรวจเอกสารที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 อะราบิทอล	3
2.1.1 อะราบิทอลที่พบในธรรมชาติ	3
2.1.2 คุณสมบัติทั่วไปของอะราบิทอล	3
2.2 การผลิตอะราบิทอล	4
2.2.1 การผลิตอะราบิทอลด้วยกระบวนการทางเคมี	4
2.2.1.1 การผลิต D-arabitol	4
2.2.1.2 การผลิต L-arabitol	4
2.2.2 การผลิตอะราบิทอลด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์	4
2.3 จุลินทรีย์ที่ผลิตอะราบิทอล	4
2.3.1 ราเส้นใย (Filamentous fungi)	4
2.3.2 ยีสต์ (Yeasts)	5
2.4 ประโยชน์ของอะราบิทอลที่ผลิตจากจุลินทรีย์และการประยุกต์ในด้านต่าง ๆ	6
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงาน	7
3.1 เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์	7
3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	7
3.3 วิธีการดำเนินงาน	8
3.3.1 การคัดแยกยีสต์และทำให้บริสุทธิ์	8
3.3.2 การคัดกรองยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์	8

3.3.3 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์ที่มีความสามารถสูงสุดในการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ 8
3.3.4 การระบุชนิดของยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ได้สูงสุด 8
3.3.5 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลอะบิทอลจากยีสต์ที่คัดกรอง 9
3.3.5.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม 9
3.3.5.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม 9
3.3.5.3 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม 9
3.3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ 10
บทที่ 4 ผลการทดลอง 11
4.1 การคัดแยกยีสต์และทำให้บริสุทธิ์ 11
4.2 การคัดกรองยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ 11
4.3 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์ที่มีความสามารถสูงสุดในการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ 14
4.4 การระบุชนิดของยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ได้สูงสุด 14
4.5 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลอะราบิทอลจากยีสต์ที่คัดกรอง 15
4.5.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม 15
4.5.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม 15
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลองและสรุปผล 17
อ้างอิง 19
ภาคผนวก ก 25
ภาคผนวก ข 27

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

ตารางที่ 4.1 ความสามารถในการผลิตน้ำตาล แอลกอฮอล์ของยีสต์ที่คัดแยกได้ 11
ตารางที่ 4.2 ไอโซเลตยีสต์ที่มีความสามารถ ในการผลิตอะราบิทอล 12
ตารางที่ 4.2 ปริมาณอะราบิทอลจากยีสต์ไอโซเลต 7.3 ที่แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ 16

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

ภาพที่ 2.1 สูตรโครงสร้าง D-arabitol และ L-arabitol 3
ภาพที่ 2.2 กระบวนการเปลี่ยนกลูโคสเป็นอะราบิทอลในยีสต์ 6
ภาพที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD 13
ภาพที่ 4.2 ยีสต์ไอโซเลต 7.3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD 14
ภาพที่ 4.3 ผลการทำ PCR จากยีสต์ไอโซเลตที่ 7.3 15
ภาพที่ ข1. ผล HPLC จากยีสต์ไอโซเลตที่ 1.2 28
ภาพที่ ข2. ผล HPLC จากยีสต์ไอโซเลตที่ 7.3 29

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

น้ำตาลแอลกอฮอล์เป็นสารให้ความหวานพลังงานต่ำ ซึ่งนิยมใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมยาที่เกี่ยวข้องกับการดูแลรักษาช่องปาก เนื่องจากมีสมบัติทางชีวเคมีที่น่าสนใจ เช่น ทำให้อาหารมีรสสัมผัสนุ่ม มีความสามารถในการรักษาความชื้น ทำให้สีของอาหารคงตัวไม่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาและแปรรูป (Buyken et al., 2001) ให้พลังงานน้อย เนื่องจากดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้ช้าจึงเหมาะกับผู้ป่วยเบาหวาน และแบคทีเรียในช่องปากไม่สามารถนำไปใช้ในการเติบโตได้ (Konganti and Ju, 2013) เป็นต้น อุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ส่วนใหญ่มักใช้กระบวนการทางเคมีด้วยปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจนของน้ำตาลและนิกเกิลเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิและความดันสูงซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นของผสมซึ่งแยกออกจากกันได้ยาก (Monedero, Martínez and Yebra, 2010) ทำให้มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างต่ำและมีสารพิษตกค้างจากสารเคมีที่ใช้จึงจำเป็นต้องนำเข้าสู่กระบวนการที่ทำให้น้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ได้บริสุทธิ์มากขึ้นอีกหลายขั้นตอน ซึ่งกระบวนการเหล่านี้เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้นและทำให้ปริมาณน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ได้ลดลง (Soetaert, Buchholz and Vandamme, 1995) จึงนำไปสู่การศึกษาความสามารถในการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ

เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดมีความสามารถในการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์จากน้ำตาลชนิดอื่นโดยผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่เป็นของผสม จึงมีความบริสุทธิ์มากกว่าการสังเคราะห์จากสารเคมี ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้มีทั้งแบคทีเรีย ราเส้นใย และยีสต์ (Pfyffer, and Rast, 1980; Pfyffer et al., 1990; Grembecka, 2019) แบคทีเรียที่สามารถผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ได้ ได้แก่ แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria; LAB) และไซยาโนแบคทีเรีย (Weymarn, Hujanen and Leisola, 2002; Wisselink et al., 2002; Akinterinwa, Khankal, and Cirino, 2008; Jacobsen, and Frigaard, 2014;) เป็นต้น ราเส้นใยที่สามารถผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ได้มีหลายชนิด *เช่น Sclerotinia sclerotiorum, Penicillium oxalicum* และ *Pyricularia oryzae* (Pfyffer, and Rast, 1980; Pfyffer et al., 1990) เป็นต้น ส่วนยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ได้ก็มีหลายชนิดเช่น *Zygosaccharomyces rouxii* NRRL 27264 (Saha, Sakakibara and Cotta, 2007), *Hansenula polymorpha* (Escalante et al., 1990) และ *Kodamae ohmer* NH-9 (Zhu et al., 2010) เป็นต้น ปริมาณน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ยีสต์ผลิตได้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารตั้งต้นในวิถีเมแทบอลิซึม โดยทั่วไปสารตั้งต้นที่ยีสต์ใช้ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส แมนโนส กาแล็กโทส มอลโทส และกลีเซอรอล

เป็นต้น (Onishi and Suzuki, 1968) จากรายงานของ Saha และ Racine (2011) พบว่าการให้แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ต่างกันมีผลต่อปริมาณน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้น เนื่องจากคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารหลักที่จุลินทรีย์ใช้ในการเติบโตและสร้างสารเมทาบอไลต์ต่าง ๆ นอกจากนี้ผลผลิตพลอยได้บางชนิดที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมสามารถถูกนำกลับมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนให้จุลินทรีย์ได้อีกครั้ง (Fadiloğlu and Erkmen, 2002) ในการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ทางอุตสาหกรรมการใช้ยีสต์ยังมีข้อดีหลายประการ เช่น ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเติบโตได้ในสภาวะที่อุณหภูมิสูง ใช้พื้นที่ในการเลี้ยงน้อยเนื่องจากยีสต์มีขนาดเล็ก และสามารถนำมาปรับปรุงสายพันธุ์ได้ง่าย ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่เป็นที่ต้องการในระดับอุตสาหกรรม ทั้งนี้ยังมียีสต์อีกหลายชนิดที่สามารถผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ได้แต่ยังไม่มีรายงานการทดสอบ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและคัดกรองยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์จากเศษผลไม้ และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ในยีสต์ที่คัดแยก

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

เพื่อคัดแยกและคัดกรองยีสต์ที่มีความสามารถผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์จากเศษผลไม้ รวมทั้งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์จากยีสต์ที่คัดแยก

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่คัดแยกได้ในประเทศไทย
2. ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ของยีสต์ที่คัดแยกได้

บทที่ 2

การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อะราบิทอล

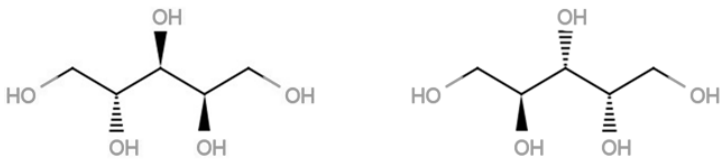
อะราบิทอล เป็น polyhydric alcohol ชนิดหนึ่ง มีโครงสร้างทางเคมีเป็น stereoisomer กับไซลิทอล และเป็นสารให้ความหวานพลังงานต่ำ จึงเป็นที่นิยมในอุตสาหกรรมต่าง ๆ อะราบิทอลสามารถสังเคราะห์ขึ้นได้โดยใช้ปฏิกิริยา catalytic reduction หรือ catalytic hydrogenation จากน้ำตาลชนิดอื่น อุณหภูมิ 90-120 องศาเซลเซียสและความดัน 40-60 บาร์ จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น D-arabitol และ L-arabitol ตามลำดับ (Werpy and Petersen, 2004)

2.1.1 อะราบิทอลที่พบในธรรมชาติ

อะราบิทอลพบได้ทั่วไปในเห็ดและไลเคน แต่จะพบเพียงปริมาณน้อย (Lindberg, Wachtmeister and Wickberg, 1952) ต่างจากน้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดอื่น ๆ ที่สามารถพบได้ทั่วไปในผักและผลไม้ เช่น ฟักทอง เซเลอรี่ หัวหอมใหญ่ และหญ้าต่าง ๆ เป็นต้น (Ikawa, Watanabe, and Nisizawa, 1972) นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่สามารถผลิตอะราบิทอลได้ (Zhu et al., 2010)

2.1.2 คุณสมบัติทั่วไปของอะราบิทอล

อะราบิทอลซึ่งอาจถูกเรียกว่า arabinitol หรือ lyxitol เป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ประกอบด้วยคาร์บอน 5 อะตอม ($C_5H_{12}O_5$) มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 152 พบได้ทั้ง D-arabitol และ L-arabitol (ภาพที่ 2.1) คุณสมบัติทั่วไปของอะราบิทอลคล้ายกับไซลิทอล คือมีรสหวาน ผลึกไม่มีสี มีความสามารถละลายน้ำได้ค่อนข้างสูง และมีจุดเดือดอยู่ที่ 103 องศาเซลเซียส (Tourneau, 1966; Talja and Roos, 2001)



ภาพที่ 2.1 สูตรโครงสร้าง D-arabitol (ซ้าย) และ L-arabitol (ขวา) (National Center for Biotechnology Information, 2019 : online)

2.2 การผลิตอะราบิทอล

2.2.1 การผลิตอะราบิทอลด้วยกระบวนการทางเคมี

2.2.1.1 การผลิต D-arabitol

ส่วนใหญ่การผลิต D-arabitol ด้วยกระบวนการทางเคมีจะทำโดยการนำ D-arabinose หรือ lyxose มาทำปฏิกิริยา catalytic reduction หรือปฏิกิริยาเคมีรีดักชันของแลคโตนจากกรด arabinoic และกรด lyxonic ที่อุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียสและความดัน 40-60 บาร์ นอกจากนี้ D-arabitol ยังสามารถผลิตได้จากปฏิกิริยาเคมีรีดักชันจากน้ำตาล D-arabinose หรือ D-lyxose และโซเดียมอะมัลกัม แต่ด้วยกระบวนการเหล่านี้มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงจึงไม่เป็นที่นิยมมากนัก (Ruff, 1899)

2.2.1.2 การผลิต L-arabitol

การผลิต L-arabitol สามารถทำได้โดยการใช้ปฏิกิริยา catalytic hydrogenation จากน้ำตาล L-arabinose ซึ่งปฏิกิริยานี้จำเป็นต้องใช้เครื่องปฏิกรณ์ที่อุณหภูมิ 90-120 องศาเซลเซียสและความดัน 40-60 บาร์ จึงทำให้กระบวนการผลิตใช้เวลามากและมีค่าใช้จ่ายสูง (Ruff, 1899)

2.2.2 การผลิตอะราบิทอลด้วยกระบวนการทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์

การใช้จุลินทรีย์ในการผลิตอะราบิทอล เป็นทางเลือกที่ดีในการเพิ่มปริมาณอะราบิทอล อีกทั้งยังสามารถลดขั้นตอนที่ใช้เวลามากในปฏิกิริยาเคมีได้ เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดอย่างเช่น รา และยีสต์สามารถใช้สิ่งที่ได้จากกระบวนการแคแทบอลิซึมเป็นโคแฟกเตอร์ทำให้ไม่จำเป็นต้องเติมหรือสร้างสารที่เป็นโคแฟกเตอร์เพิ่มอีก การใช้จุลินทรีย์ในการผลิตอะราบิทอลจึงเป็นทางเลือกที่นิยมมากที่สุดในระดับอุตสาหกรรม

2.3 จุลินทรีย์ที่ผลิตอะราบิทอล

2.3.1 ราเส้นใย (Filamentous fungi)

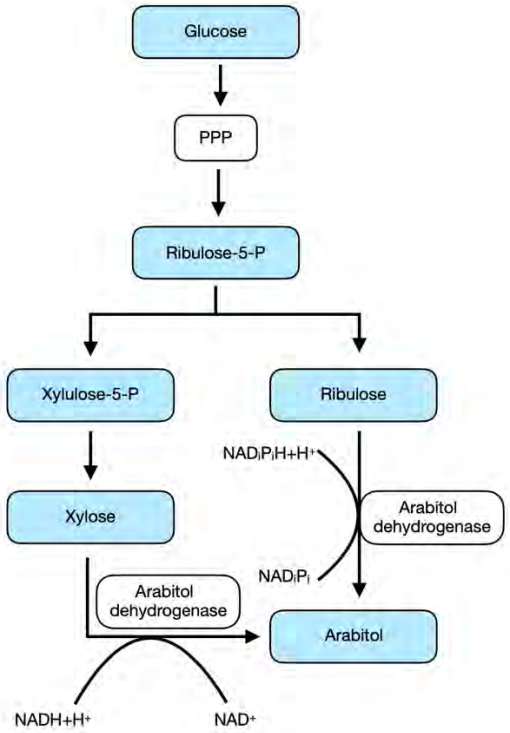
การเพิ่มปริมาณน้ำตาลแอลกอฮอล์เช่น อะราบิทอลหรือกลีเซอรอล นิยมใช้ราในการผลิต เนื่องจากสามารถช่วยลดปัญหาการตายจากภาวะแอคติวิตีของน้ำต่ำได้ อะราบิทอลพบได้ทั่วไปในราชั้นสูง โดยปริมาณของอะราบิทอลจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการสร้างสปอร์หรือเจริญอยู่ใน stationary phase บทบาทส่วนใหญ่ของอะราบิทอลในราคือเป็นแหล่งให้พลังงานและแหล่งคาร์บอนในขณะที่ราสร้างสปอร์ นอกจากนี้ยังพบอะราบิทอลในระหว่างการเจริญของเส้นใย (mycelia) โดยความเข้มข้นของ อะราบิทอลจะแปรผันตามความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสในอาหารที่ใช้เลี้ยง ซึ่งถูกเก็บเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตสำหรับสปอร์ และจะหายไปเมื่อเกิดการงอกของสปอร์ (germination)

นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าใน *Puccinia graminis* พบอะราบิทอลขณะที่สร้างเอนโดสปอร์ เมื่ออยู่ในสภาวะเครียด (Link et al., 2005) ยังมีราอีกหลายชนิดที่มีความสามารถในการผลิตอะราบิทอล เช่น *Geotrichum candidum, Aspergillus oryzae และ Dendryphiella salina* เป็นต้น (Holligan and Jennings, 1972; Costa and Niederpruem, 1982; Rujiter, 2004)

2.3.2 ยีสต์ (Yeasts)

เมื่อยีสต์อยู่ในสภาวะเครียดที่มีผลต่อแรงดันออสโมติก ยีสต์จะผลิตสารบางชนิดเช่น อะราบิทอล กลีเซอรอล ไซลิทอล และแมนนิทอล เพื่อรักษาสมดุลของแรงดันออสโมติกภายนอกและภายในเซลล์ การผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์จากยีสต์เริ่มศึกษาจากการเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ายีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์บางชนิดค่อนข้างดี และนอกจากนี้ยีสต์ยังมีคุณสมบัติในการทนความร้อนจึงเป็นที่นิยมมากในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตอะราบิทอล ได้แก่ ยีตส์กลุ่มออสโมฟิลิก (osmophilic yeast) (Song et al., 2011; Yoshikawa et al., 2014; Kordowska-Wiater, 2015; Qi et al., 2015) เช่น *Endomycopsis chodati* (Hajny, 1964), *Saccharomyces rouxii* (Ingram and Wood, 1956), *Saccharomyces mellis* (Weimberg, 1962), *Zygosaccharomyces* sp. (Saha, Sakakibara, and Cotta, 2007), *Hansenula* sp. (Escalante et al., 1990), *Debaryomyces* sp. (Kumdam, Murthy, and Gummadi, 2013) และ *Pichia* sp. (Saha and Bothast, 1996) โดยส่วนมากยีสต์เหล่านี้มักจะให้ผลผลิตเป็นของผสมระหว่างอะราบิทอลและกลีเซอรอล, เอทานอลหรือน้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดอื่น ๆ

การผลิตอะราบิทอลในยีสต์ (ภาพที่ 2.2) เริ่มต้นจากกลูโคสเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟต (Pentose phosphate pathway) จนกลายเป็น ribulose-5-phosphate แล้วถูกเปลี่ยนเป็น ribulose ด้วยเอนไซม์ ribulokinase จากนั้นจะถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ arabitol dehydrogenase ได้เป็นอะราบิทอล ซึ่งจะเห็นได้ว่า ribulose-5-phosphate สามารถถูกเปลี่ยนเป็น xylulose-5-phosphate จากการทำงานของเอนไซม์ ribulose-5-phosphate epimerase จากนั้นจะเกิด dephosphorylation ทำให้ xylulose-5-phosphate เปลี่ยนเป็น xylose ด้วยเอนไซม์ xylulokinase แล้วถูกรีดิวซ์ด้วยเอนไซม์ arabitol dehydrogenase ได้เป็นอะราบิทอลเช่นกัน (Kumdam et al., 2013)



ภาพที่ 2.2 กระบวนการเปลี่ยนกลูโคสเป็นอะราบิทอลในยีสต์ (Kumdam, Murthy, and Gummadi, 2014)

2.4 ประโยชน์ของอะราบิทอลที่ผลิตจากจุลินทรีย์และการประยุกต์ในด้านต่าง ๆ

อะราบิทอล เป็นสารให้ความหวานพลังงานต่ำโดยจะให้พลังงานเพียง 0.2 กิโลแคลอรีต่อกรัมซึ่งน้อยกว่าน้ำตาลซูโครสที่ให้พลังงานมากถึง 4 กิโลแคลอรีต่อกรัม อะราบิทอลยังเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ร่างกายมนุษย์ดูดซึมได้ค่อนข้างช้า และยังช่วยป้องกันการสะสมไขมันบริเวณทางเดินอาหาร ผู้ป่วยโรคเบาหวานจึงสามารถบริโภคได้อย่างปลอดภัย นอกจากนี้แบคทีเรียในช่องปากไม่สามารถนำอะราบิทอลเข้าสู่กระบวนการเมแทบอลิซึมได้จึงมีการนำมาใช้ร่วมกับสารป้องกันฟันผุ และด้วยคุณสมบัติให้รสสัมผัสหวานเย็นจึงเป็นที่นิยมในอุตสาหกรรมการผลิตสินค้าดูแลรักษาสุขภาพช่องปาก (Mingguo et al., 2011; Kumdam et al., 2013) อะราบิทอลสามารถนำมาเป็นสารตั้งต้นในการเปลี่ยนเป็นสารชนิดอื่น เช่น กรดอะราบิออนิก กรดไลโซนิก เอทิลีนกลีซอล และไซลิทอล เป็นต้น นอกจากนี้อะราบิทอลยังใช้ในการสังเคราะห์สารประกอบสำคัญอย่างสารอิแนนทิโอเมอร์บริสุทธิ์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยา เช่น ยากดภูมิคุ้มกัน ยาป้องกันและกำจัดโรคพืช และยาฆ่าวัชพืช เป็นต้น (Levin et al., 1995; Levin, 2002)

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินนการ

3.1 เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope)	Olympus Optical Co., Ltd, Japan
เครื่องเขย่า	Labcon, The Repulic of South Africa
เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)	Denver Instument Company, USA
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow hood)	ISSOC, Thailand
ตู้อบฆ่าเชื้อ (Autoclave)	REXMED Industries Co., Ltd, Taiwan
ตู้อบแห้ง อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส	Memmert, Germany

3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

-สารเคมีที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Agar	
Antibiotics	Seng Thai Company, Thailand
D(+)glucose	Ajax Finechem, Australia
Peptone	HiMedia Laboratories Pvt, Ltd, India
Yeast extract	HiMedia Laboratories Pvt, Ltd, India

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การคัดแยกยีสต์และทำให้บริสุทธิ์

เก็บตัวอย่างเนื้อผลไม้และเปลือกผลไม้ จากตลาดสามย่าน สามย่านมิตรทาวน์ และตลาดรถไฟรัชดา กรุงเทพมหานคร จำนวน 5 ตัวอย่างแต่ละแหล่ง ใส่ถุงพลาสติก เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่เติม chloramphenicol 200 ppm (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิห้องในสภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เกลี่ยบนอาหารแข็ง YPD บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นแยกโคโลนีเดี่ยวในอาหารชนิดเดิมจนได้โคโลนีบริสุทธิ์

3.3.2 การคัดกรองยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์

นำโคโลนีเดี่ยวจากเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ในสภาวะเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน แล้วนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemacytometer จากนั้นนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงจำนวน 1×10^{8} เซลล์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร Production medium (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณภูมิห้องในสภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้ววัดปริมาณอะราบิทอลด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Waters, alliance 2690, USA) ใช้ Agilent MetaCarb 87H organic acid column (Varian, USA) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และใช้กรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 5.0 mM เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที เพื่อคัดกรองยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ได้สูงสุด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.3.3 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์สูงสุด

นำยีสต์ที่ได้จากข้อ 3.3.2 มาศึกษาลักษณะโคโลนีของยีสต์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD และศึกษารูปร่างและขนาดเซลล์ของยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.3.4 การระบุชนิดของยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ได้สูงสุด

นำยีสต์ที่คัดกรองจากข้อ 3.3.2 มาระบุชนิดโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ของ Internal Transcribed Spacer โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอของยีสต์โดยใช้วิธีของ Lachance et al. (1999) จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดย

ใช้ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 (Kurtzman and Robnette, 1998) แล้วทำการตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้โดยใช้เทคนิค agarose gel electrophoresis ร่วมกับการย้อมด้วย ethidium bromide จากนั้นทำการแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทำ cycle sequencing โดยใช้ BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit version 3.1 (Applied Biosystem) แล้วส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ (Macrogen, Korea)

3.3.5 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลอะราบิทอลจากยีสต์ที่คัดกรอง

3.3.5.1 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Production medium ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลีเซอรอล กลูโคส ซูโครส และฟรุกโตส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นนำยีสต์ที่ได้จากข้อ 3.3.2 เติมลงไปจำนวน 1×10^8 เซลล์ บ่มที่อุณภูมิห้อง ในสภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง แล้ววัดปริมาณอะราบิทอลด้วยเครื่อง HPLC ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คัดกรองแหล่งคาร์บอนที่ทำให้สามารถผลิตน้ำตาลอะราบิทอลได้สูงสุดเพื่อศึกษาต่อไป

3.3.5.2 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Production medium ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลอะราบิทอลจากข้อ 3.3.5.1 โดยแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ โซเดียมไนเตรต แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมออกซาเลต ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อศึกษาผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ต่อปริมาณอะราบิทอลที่ผลิตได้ จากนั้นนำยีสต์ที่ได้จากข้อ 3.3.2 เติมลงไปจำนวน 1×10^8 เซลล์ บ่มที่อุณภูมิห้อง ในภาวะเขย่าที่อัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง แล้ววัดปริมาณอะราบิทอลที่ได้ตามวิธีในข้อ 3.3.5.1 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คัดกรองแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้ได้น้ำตาลอะราบิทอลสูงสุด

3.3.5.3 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

นำยีสต์ที่ได้จากข้อ 3.3.2 เลี้ยงอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมตามผลที่ได้จากข้อ 3.3.5.1 และ 3.3.5.2 แล้วหาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลอะราบิทอล โดยกำหนดความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเป็นร้อยละ 10, ร้อยละ 20 และร้อยละ 30 และแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2, ร้อยละ 0.3 และร้อยละ 0.4 จากนั้นวัดปริมาณอะราบิทอลที่ได้ตามวิธีในข้อ 3.3.5.1 ทำการทดลอง 3 ซ้ำคัดกรองความเข้มข้นของคาร์บอนและไนโตรเจนที่ทำให้ได้น้ำตาลอะราบิทอลสูงสุด

3.3.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณน้ำตาลอะราบิทอลจากยีสต์ที่คัดกรองได้ในสภาวะต่าง ๆ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) ที่ $p \leq 0.05$ และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรม IBM SPSS statistic version 22 (SPSS, USA)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การคัดแยกยีสต์และทำให้บริสุทธิ์

จากการคัดแยกยีสต์จากผลไม้ และเปลือกผลไม้ ที่เก็บจากตลาดสามย่าน สามย่านมิตรทาวน์ และตลาดรถไฟรัชดา กรุงเทพมหานคร ตามข้อที่ 3.3.1 สามารถคัดแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 8 ไอโซเลต คือ 1.2, 2.1, 2.2A, 2.2B, 3.1, 6.1A, 7.2.1 และ 7.3 (ภาพที่ 4.1)

4.2 การคัดกรองยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์

จากการคัดกรองยีสต์ที่คัดแยกได้จากผลไม้ และเปลือกผลไม้ ที่เก็บจากตลาดสามย่าน สามย่านมิตรทาวน์ และตลาดรถไฟรัชดา กรุงเทพมหานคร ตามข้อที่ 3.3.1 สามารถคัดแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 8 ไอโซเลต พบว่ามี 2 ไอโซเลตที่สามารถผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ได้ คือ 1.2 และ 7.3 ซึ่งสารที่ทั้ง 2 ไอโซเลตผลิตได้ ได่แก่ อะราบิทอลและกลีเซอรอล โดยยีสต์ไอโซเลตที่ 7.3 เป็นยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ได้สูงสุด (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.1ความสามารถในการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ของยีสต์ที่คัดแยกได้

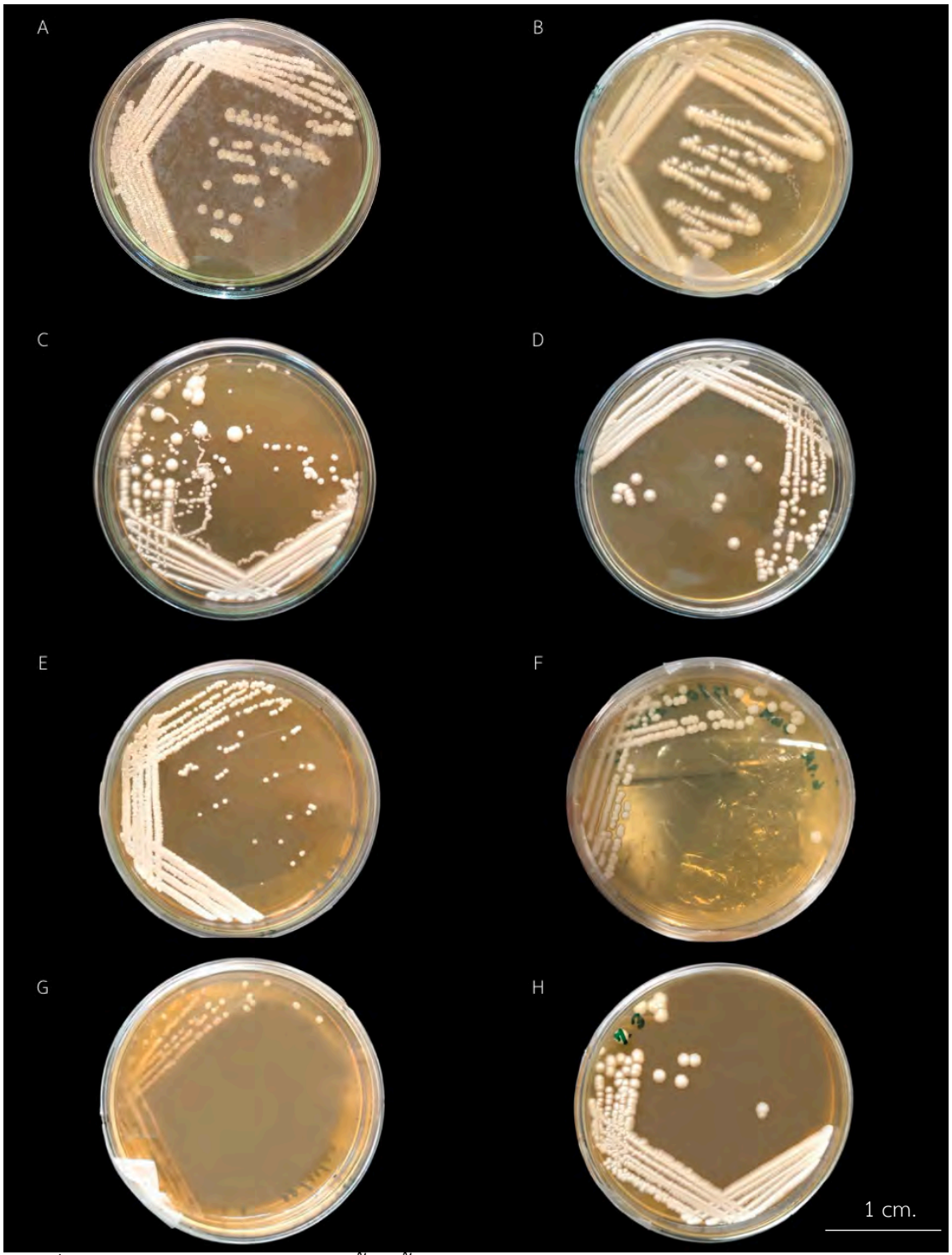
ไอโซเลต	ชนิดตัวอย่างและสถานที่เก็บ	สารที่ผลิตได้	
		อะราบิทอล	กลีเซอรอล
1.2	เงาะ, สามย่านมิตรทาวน์	+	+
2.1	เมล่อน, สามย่านมิตรทาวน์	-	-
2.2A	เมล่อน, สามย่านมิตรทาวน์	-	-
2.2B	เมล่อน, สามย่านมิตรทาวน์	-	-
3.1	เปลือกเมล่อน, ตลาดสามย่าน	-	-
6.1A	เปลือกเมล่อน, ตลาดสามย่าน	-	-
7.2A	เมล่อน, ตลาดรถไฟรัชดา	-	-
7.3	เมล่อน, ตลาดรถไฟรัชดา	+	+

เมื่อวัดปริมาณอะราบิทอลจากยีสต์ทั้ง 2 ไอโซเลตพบว่ายีสต์ไอโซเลตที่ 7.3 เป็นยีสต์ที่ผลิตน้ำตาลอะราบิทอลได้สูงสุด เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าให้อะราบิทอลเฉลี่ย 2.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไอโซเลตที่ 1.2 ให้อะราบิทอลเฉลี่ย 2.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ไอโซเลตยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตอะราบิทอล

ไอโซเลต	**อะราบิทอล (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)**	**ผลผลิต (กรัม/กรัม)***
1.2	2.02±0.06	0.01
7.3	2.30±0.03	0.01

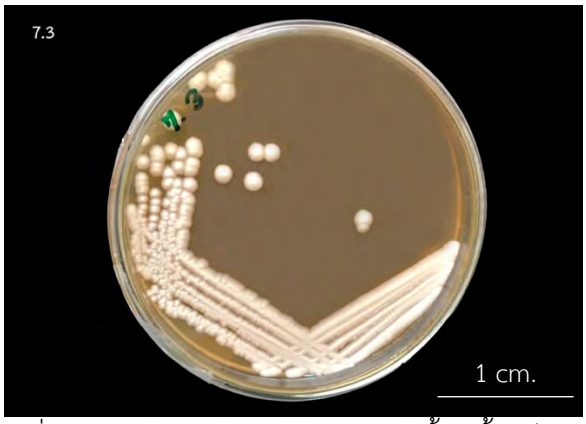
หมายเหตุ *กรัมอะราบิทอลต่อกรัมกลูโคส



ภาพที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD A-1.2, B-2.1, C-2.2A, D-2.2B, E-3.1, F-6.1A, G-7.2A และ H-7.3

4.3 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์ที่มีความสามารถสูงสุดในการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์

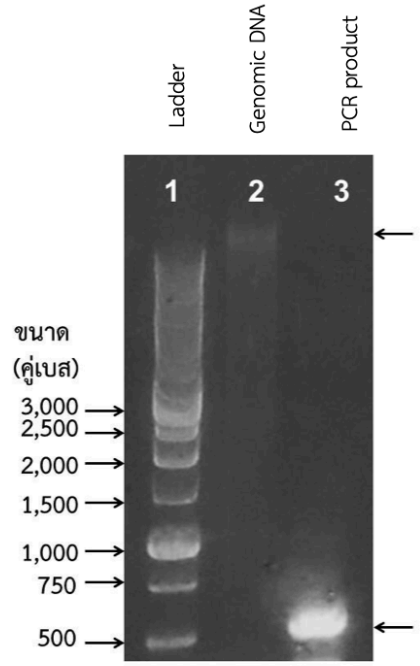
จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ที่มีความสามารถสูงสุดในการผลิตอะราบิทอลที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) พบว่ายีสต์ไอโซเลต 7.3 โคโลนีมีสีขาวขุ่น ผิวหน้าเรียบ นูนตรงกลาง ขอบเรียบและทึบแสง (ภาพที่ 4.2)



ภาพที่ 4.2 ยีสต์ไอโซเลต 7.3 บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD

4.4 การระบุชนิดยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำตาลอะราบิทอลได้สูงสุด

เมื่อได้ยีสต์ไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิตอะราบิทอลได้สูงสุดแล้วจึงมาระบุชนิดโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ เริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอ แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณของ Internal Transcribed Spacer โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1/ITS4 ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส (PCR) จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่ได้ด้วยเทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสพบแถบของผลิตภัณฑ์ขนาดระหว่าง 500-600 คู่เบส (ภาพที่ 4.4)



ภาพที่ 4.3 ผลการทำ PCR จากยีสต์ไอโซเลตที่ 7.3

4.5 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลอะราบิทอลจากยีสต์ที่คัดกรอง

4.5.1 ศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ผลจากการเลี้ยงยีสต์ไอโซเลตที่ 7.3 ใน production medium ที่มีการแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอน ได้แก่ ฟรุกโตส กลีเซอรอล กลูโคส และซูโครส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่ามีแหล่งคาร์บอนเพียง 2 ชนิดที่พบอะราบิทอลคือ กลูโคส และซูโครส เมื่อวัดปริมาณอะราบิทอลและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าได้อะราบิทอลเฉลี่ยเท่ากับ 2.3 และ 1.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2) จึงเลือกกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมและนำไปศึกษาต่อ

4.5.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

เมื่อได้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมแล้วจึงศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม โดยเริ่มจากเลี้ยงยีสต์ไอโซเลตที่ 7.3 ใน production medium ที่กำหนดให้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และแปรผันชนิดของแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนียมออกซาเลต แอมโมเนียมซัลเฟต และโซเดียมไนเตรต ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มโดยกลุ่มที่ 1 คือกำหนดให้แอมโมเนียมออกซาเลตเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยให้ปริมาณอะราบิทอลเฉลี่ยอยู่ที่ 5.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อมาคือกลุ่มของแอมโมเนียมซัลเฟต และโซเดียม

ไนเตรต ซึ่งให้ปริมาณอะราบิทอลเท่ากับ 2.30 และ 2.23 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 4.2) ดังนั้นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตอะราบิทอลมากที่สุดในการศึกษาครั้งนี้คือแอมโมเนียมออกซาเลต

ตารางที่ 4.2 ปริมาณอะราบิทอลจากยีสต์ไอโซเลต 7.3 ที่แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ

สภาวะ	**อะราบิทอล (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)**	**ผลผลิต (กรัม/กรัม)**
1. แหล่งคาร์บอน (ความเข้มข้นร้อยละ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)		
ฟรุกโตส	-	-
กลีเซอรอล	-	-
กลูโคส	2.30±0.01	0.012
ซูโครส	1.18±0.02	0.006
2. แหล่งไนโตรเจน (ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)		
แอมโมเนียมออกซาเลต	5.03±0.14[a]	0.03
แอมโมเนียมซัลเฟต	2.30±0.01[b]	0.01
โซเดียมไนเตรต	2.23±0.75[b]	0.01

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลองและสรุปผล

การออกแบบการทดลองแบบ one factor at a time เป็นการทดสอบทีละหนึ่งปัจจัยทำให้ง่ายต่อการทำการทดลอง ใช้เวลาและจำนวนการทดลองไม่มาก ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาการผลิตน้ำตาลอะราบิทอล เมื่อแปรผันชนิดของแหล่งคาร์บอนและชนิดแหล่งไนโตรเจน แต่การทดลองแบบนี้มีข้อเสียคือไม่สามารถใช้ศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนได้

ตัวอย่างเศษผลไม้ที่เลือกมาเป็นผลไม้ที่มีรสหวาน ได้แก่ เงาะ แตงโม มะละกอ เมล่อน ละมุด องุ่น และแอปเปิ้ล ผลไม้บางชนิดมีรายงานจากการศึกษาเรื่องการคัดแยกยีสต์จากผลไม้ เช่น มะละกอ องุ่น และแอปเปิ้ล เป็นต้น (Chatterjee, Ghosh, and Ray, 2011; Nasreen et al., 2014; Tsegay, 2016) ส่วนผลไม้ชนิดอื่น ๆ เป็นผลไม้ที่พบได้ทั่วไปหรือเป็นผลไม้ตามฤดูกาล สถานที่เก็บตัวอย่าง ได้แก่ สามย่านมิตรทาวน์ ตลาดสามย่าน และตลาดรถไฟรัชดา เนื่องจากเป็นสถานที่มีความหลากหลายของชนิดผลไม้ และแหล่งที่มาของผลไม้ค่อนข้างหลากหลาย นอกจากนี้สถานที่เหล่านี้ไม่ได้ใช้ประโยชน์อื่น ๆ จากเปลือกผลไม้จึงเป็นของเหลือทิ้ง ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกเก็บตัวอย่างผลไม้จากทั้ง 3 สถานที่นี้

จากการศึกษามีรายงานว่าปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตน้ำตาลอะราบิทอลของยีสต์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยด้วยกัน ซึ่งสิ่งแวดล้อมเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อการดูดซึมซับสเตรทหรือการให้สารผลิตภัณฑ์อย่างน้ำตาลอะราบิทอล ตัวอย่างของปัจจัยสิ่งแวดล้อมเช่น อุณหภูมิที่ยีสต์ใช้ในการเจริญ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอน) ค่าความเป็นกรด-เบส การเติมอากาศหรือปริมาณออกซิเจนขณะเลี้ยง อีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญมากในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสสารด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (bioconversion) คือความเร็วของเครื่องเขย่าสารหรือเครื่องคนสาร เนื่องจากปัจจัยเหล่านี้ส่งผลต่อสมดุลของ โคแฟกเตอร์ในปฏิกิริยารีดอกซ์ซึ่งเป็นตัวควบคุมลำดับ ชนิด และความเข้มข้นของสารผลิตภัณฑ์ (Kordowska-Wiater, 2015) จากการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกศึกษาปัจจัยส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยมุ่งเน้นชนิดของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากใช้เวลาไม่มาก ควบคุมได้ง่ายและเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการผลิตน้ำตาลอะราบิทอลของยีสต์ ทำให้เห็นความแตกต่างชัดเจนมากกว่าปัจจัยอื่นๆ (Kumdam et al., 2013)

อาหาร production medium สูตรมาตรฐานกำหนดให้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นร้อยละ 20 และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตอะราบิทอล แล้วศึกษาสภาวะที่เหมาะสมโดยการแปรผันชนิดและ

ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากยีสต์แต่ละสายพันธุ์มีสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอะราบิทอลแตกต่างกัน (Saha and Bothast, 1996; Fonesca, Spencer-Martins, and Hahn-Hägerdal, 2007; Koganti and Ju, 2013)

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตอะราบิทอลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีกว่าซูโครส เนื่องจากกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวจะสามารถเข้าสู่กระบวนการเมแทบอลิซึมได้ทันที แต่ซูโครสที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่เกิดจากการรวมกันของโมเลกุลกลูโคสและฟรุกโตสทำให้ต้องมีการสลายพันธะเพื่อให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการเมแทบอลิซึมได้ สิ่งมีชีวิตจึงนำซูโครสไปใช้ได้ช้ากว่ากลูโคส ด้วยเหตุนี้ยีสต์จึงสามารถผลิตอะราบิทอลจากกลูโคสได้มากกว่าซูโครสในเวลาที่เท่ากัน ทางด้านของแหล่งไนโตรเจนพบว่าแอมโมเนียมออกซาเลตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด เนื่องจากเมื่อแอมโมเนียมออกซาเลตเข้าสู่กระบวนการเมแทบอลิซึมเพื่อสร้างกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเติบโตของยีสต์แล้วออกซาเลตยังสามารถถูกนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานของจุลินทรีย์อย่างแบคทีเรีย รา และยีสต์บางชนิดได้ (Bergey, 2001)

สรุปจากการทดลองการคัดแยกและคัดกรองยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์จากส่วนเหลือทิ้งของผลไม้ สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 8 ไอโซเลต มี 2 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ คือไอโซเลตที่ 1.2 และ 7.3 โดยชนิดของน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้คืออะราบิทอล ซึ่งไอโซเลตที่ 7.3 สามารถผลิตน้ำตาลอะราบิทอลได้สูงกว่าจึงนำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำตาลอะราบิทอล พบว่า แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมคือกลูโคสโดยจะได้อะราบิทอลอยู่ที่ 2.3±0.01 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้แอมโมเนียมออกซาเลตเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่าได้อะราบิทอลได้เท่ากับ 5.03±0.14 กรัมต่อลิตร ผลจากการศึกษาครั้งนี้พบยีสต์ที่สามารถผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดอะราบิทอลที่คัดแยกได้จากส่วนเหลือทิ้งของผลไม้ในประเทศไทย ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการกระบวนผลิตน้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดนี้ในอนาคตต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Akinterinwa, O., Khankal, R., and Cirino, P.C. 2008. Metabolic engineering for bioproduction of sugar alcohols. **Current Opinion in Biotechnology** 19: 461-467

Bergey, D.H. 2001. **Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology.** Germany: Springer Science and Business Media

Buyken, A.E., Toeller, M., Heitkamp, G., and Karamanos, B. 2001. Complications study group glycemic index of the diet of european outpatients with type-1 diabetes: relations to glycated hemoglobin and serum lipids. **American Journal of Clinical Nutrition** 3: 574-81

Chatterjee, S., Ghosh, B., and Ray, R.R. 2011. Isolation and characterization of local yeast strains from waste fruit juices, jaggery and dahi samples. **International Journal of Chemical Science** 9(2): 647-656

Costa, M.S., and Niederpruem, D.J. 1982. Arabitol accumulation in *Geotrichum candidum.* **Archives of Microbiology** 131: 283-286

Escalante, J., Caminal, G., Figueredo, M., and de Mas, C. 1990 Production of arabitol from glucose by *Hansenula polymorpha.* **Journal of Fermentation and Bioengineering** 70(4): 228-231

Fadiloğlu, S., and Erkmen, O. 2002. Effects of carbon and nitrogen sources on lipase production by *Candida rugosa.* **Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences** 26: 249-254

Fonseca, C., Spencer-Martins, I., and Hahn-Hägerdal, B. 2007. L-arabinose metabolism in *Candida arabinofermentans* PYCC 5603T and *Pichia guilliermondii* PYCC 3012: influence of sugar and oxygen on product formation. **Applied Microbiology and Biotechnology** 75: 303-310

Grembecka, M. 2019. Sugar alcohols. **Encyclopedia of food chemistry**, Volume 1. 256-273, Netherlands : Elsevier.

Hajny, G. 1964. D-arabitol production by *Endomycosis chodati.* **Journal of Applied Microbiology** 12: 87-92

Holligan, P.M., and Jennings, D.H. 1972. Carbohydrate metabolism in fungus *Dendryphiella salina.* II. The influence of different carbon and nitrogen sources on the accumulation of mannitol and arabitol. **New Phytologist** 71: 583-594

Ikawa, T.T., Watanabe, T. and Nisizawa, K. 1972. Enzyme involved in the last steps of biosynthesis of mannitol in brown algae. **Plant Cell Physiology** 13: 1017-1027.

Ingram, J.M., and Wood, W. 1965. Enzymatic basis for D-arabitol production by *Saccharomyces rouxii.* **Journal of Bacteriology** 89: 1186-1194

Jacobsen, J.H., and Frigaard, N.U. 2014. Engeneering of photosynthetic mannitol biosynthesis from CO_2 in cyanobacterium. **Metabolic Engineering** 21: 60-70

Konganti, S., and Ju, L.K. 2013. *Debaryomyces hansenii* fermentation for arabitol production. **Biochemical Engineering Journal** 79: 112-9

Kordowska-Wiater, M. 2015. Production of arabitol by yeast: current status and future prospects. **Journal of Applied Microbiology** 119(2): 303-314

Kumdam, H., Murthy, S.N., and Gummadi, S.N. 2013. Production of ethanol and arabitol by *Debaryomyces nepalensis*: influence of process parameters. **AMB Express** 3: 23

Kumdam, H., Murthy, S.N., and Gummadi, S.N. 2014. Arabitol production by microbial fermentation-biosynthesis and future applicatons. **International Journal of Sciences and Applied Research** 1(1): 1-12

Kurtzman, C.P., and Robnett, C.T. 1998. Identification and phylogeny of ascomyceteous yeast from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leewenhoek** 73: 331-371

Lachance, M.A., Bowles, J.M., Starmer, W.T., and Barker, S. 1999. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian *Hibicus* flowers. **Canadian Journal of Microbiology** 45: 172-177

Levin, G.V. 2002. Tagatose, the new GRAS sweetener and health product. **Journal of Medicinal Food** 1: 23-36

Levin, G.V., Zehner, L., Saunders, J., and Beadle, J. 1995. Sugar substitutes: their energy values, bulk characteristics, and potential health benefits. **The American Journal of Clinical Nutrition** 62: 1161S-1168

Lindberg, B., Wachtmeister, C.A., and Wickberg, B. 1952. Studies on the chemistry of lichens. **Acta Chemica Scandinavica** 6: 1052-1055

Link, T., et al. 2005 Characterization of a novel NADP(+)-dependent D-arabitol dehydrogenase from the plant pathogen *Uromyces fabae.* **Biochemical Journal** 398: 289-295

Mingguo, J., Wang, B., Yang, L., Lin, S., and Cheng, H. 2011. Microbiological purification of L-arabitol from xylitol mother liquor. **Journal of Microbiology and Biotechnology** 21: 43-49

Monedero, V.G., Martínez, G.P., and Yebra, M.J. 2010. The perspective of engineering lactic acid bacteria from biotechnological polyol production. **Applied Microbiology and Biotechnology** 86: 1003-15

Nasreen, Z., et al., 2014. Production of alcohol by yeast isolated from apple, orange and banana. **International Journal of Food and Nutrition Sciences** 1(2): 16-19

National Center for Biotechnology Information. **PubChem Database**. [online]. 2019. Available from : https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Arabinitol [2020, June 19]

Onishi, H., and Suzuki, T. 1968. Production of D-mannitol and glycerol by yeasts. **Applied Microbiology** 16: 1847–1852

Pfyffer, G.E. et al. 1990. A further report on the occurrence of acyclic sugar alcohols in fungi. **Mycological Research** 94(2): 219-222

Pfyffer, G.E., and Rast, D.M. 1980. The polyol pattern of some fungi not hitherto investigated for sugar alcohols. **Experimental Mycology** 4: 160-170

Qi, X., et al. 2015. Enhanced D-arabitol production by *Zygosaccharomyces roouxii* M-C46: isolation of strains and process of repeated-batch fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 42(5): 807-812

Ruff, O. 1988. D- and R-Arabinose. **Chemische Berichte** 32: 550-560

Rujiter, G.J.G. 2004. Polyol accumulation by *Aspergillus oryzae* at low water activity in solid-state fermentation. **Microbiology** 150: 1095-1101

Saha, B., and Bothast, R. 1996. Production of L-arabitol from L-arabinose by *Candida Entomaea* and *Pichia guiliermondii.* **Applied Microbiology and Biotechnology** 45(3): 299-306

Saha, B.C., and Racine, F.M. 2011. Biotechnological production of mannitol and its applications. **Applied Microbiology and Biotechnology** 89: 879-891

Saha, B.C., Sakakibara, Y., and Cotta, M.A. 2007 Production of D-arabitol by a newly isolated *Zygosaccharomyces rouxii.* **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 34(7): 519-523

Soetaert, W., Buchholz, K., and Vandamme, E.J. 1995. Production of D-mannitol and D-lactic acid by fermentation with *Leuconostoc mesenteroides*. **Agro Food Industry Hi Tech** 6: 41–44

Song, W., Lin, Y., Hu, H., Xie, Z., and Zhang, J. 2011. Isolation and identification of a novel *Candida* sp. H2 producing D-arabitol and optimization of D- arabitol production. **Acta Microbiologica Sinica** 51: 332-339

Talja, R.A., and Roos, Y.H. 2001. Phase and state transition effects on dielectric, mechanical, and thermal properties of polyols. **Thermochimica Acta** 380: 109-121

Tourneau, D.L. 1996. Trehalose and acyclic polyols in sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum.* **Mycologia** 58: 934-942

Tsegay, Z. 2016. Isolation, identification and characterization of ethanol tolerant yeast species from fruits for production of bio-ethanol. **International Journal of Current Trends in Pharmacobiology and Medical Science** 1(2): 52-59

Weimberg, R. 1962. Mode of formation of D-arabitol by *Saccharomyces mellis.* **Biochemical and Biophysical Research Communications** 8(6): 442-445

Werpy, T. and Peteersen, G. 2004. **Top value added chemicals from biomass**: volume 1-results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. United States : National Renewable Energy Laboratory

Weymarn, N.V., Hujanen, M., and Leisola, M. 2002. Production of D-mannitol by heterofermentative lactic acid bacteria. **Process Biochemistry** 37: 1207-1213

Wisselink, H.W., Weusthuis, R.A., Eggink, G., Hugenholtz, J., and Grobben, G.J. 2002. Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. **International Dairy Journal** 12: 151-161

Yoshikawa, J., et al. 2014. Production of D-arabitol from raw glycerol by *Candida quercitrusa.* **Applied Microbiology and Biotechnology** 98(7): 2947-2953

Zhu, H.-Y., Xu, H., Dai, X.-Y., Zhang, Y., Ying, H.-J., and Ouyang, P.-K. 2010. Production of D-arabitol by a newly isolated *Kodamaea ohmerii.* **Bioprocess and Biosystem Engineering** 33: 565-571

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการคัดกรองยีสต์

Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) selective media ประกอบด้วย

Yeasts extract	10 g/L
Peptone	20 g/L
Glucose	20 g/L
Chloramphenicol	200 ppm

Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) agar plate ประกอบด้วย

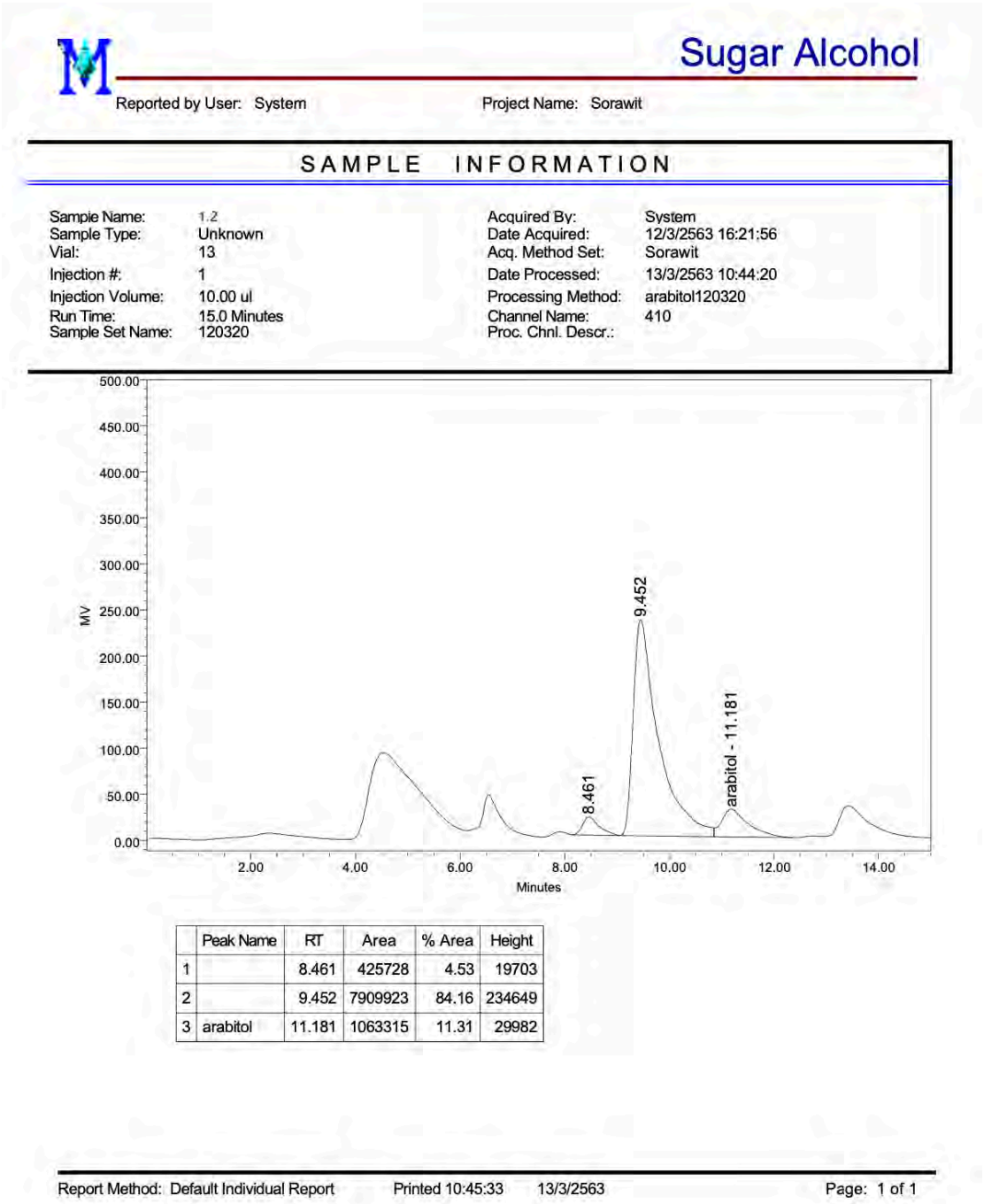
Yeasts extract	10 g/L
Peptone	20 g/L
Glucose	20 g/L
Agar	15 g/L

Production medium ประกอบด้วย

Glucose	200 g/L
Yeasts extract	5 g/L
$(NH_4)_2SO_4$	20 g/L
KH_2PO_4	15 g/L

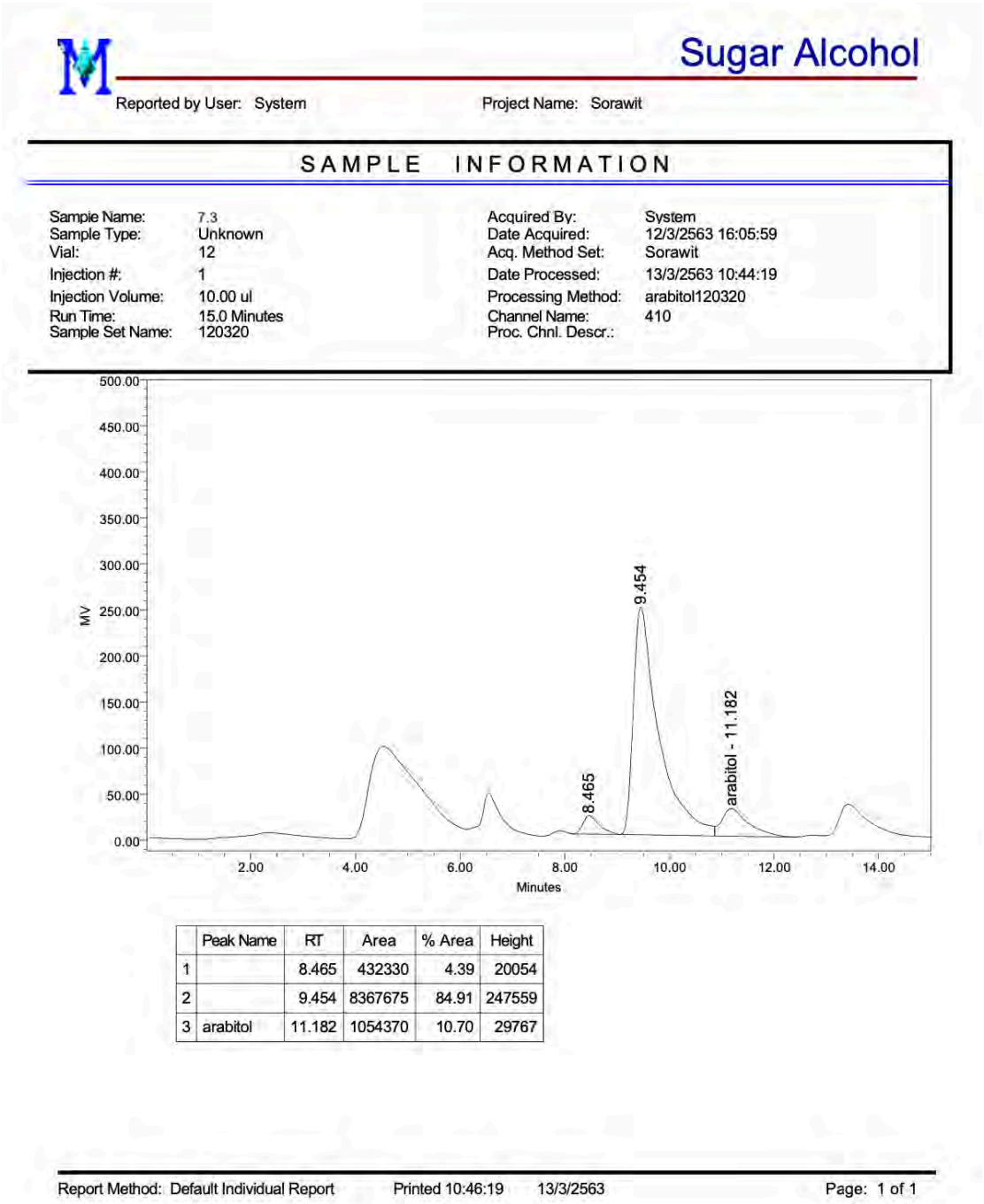
ภาคผนวก ข

ผล HPLC



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1		8.461	425728	4.53	19703
2		9.452	7909923	84.16	234649
3	arabitol	11.181	1063315	11.31	29982

ภาพที่ ข1. ผล HPLC จากยีสต์ไอโซเลตที่ 1.2



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1		8.465	432330	4.39	20054
2		9.454	8367675	84.91	247559
3	arabitol	11.182	1054370	10.70	29767

ภาพที่ ข2. ผล HPLC จากยีสต์ไอโซเลตที่ 7.3