



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การสร้างมูลค่าเพิ่มแก่ขนอ้อยด้วย วิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ”

โดย

รศ.ดร.ภาคมน จิตประเสริฐ

รศ.ดร.มังกร โรจน์ประภากร

พฤษภาคม 2561

สัญญาเลขที่ RDG 5950081

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การสร้างมูลค่าเพิ่มแก่ขนอ้อยด้วย วิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ”

โดย

รศ.ดร.ภาคมน จิตประเสริฐ

รศ.ดร.มังกร โรจน์ประภากร

พฤษภาคม 2561

บทสรุปย่อโครงการสำหรับผู้บริหาร

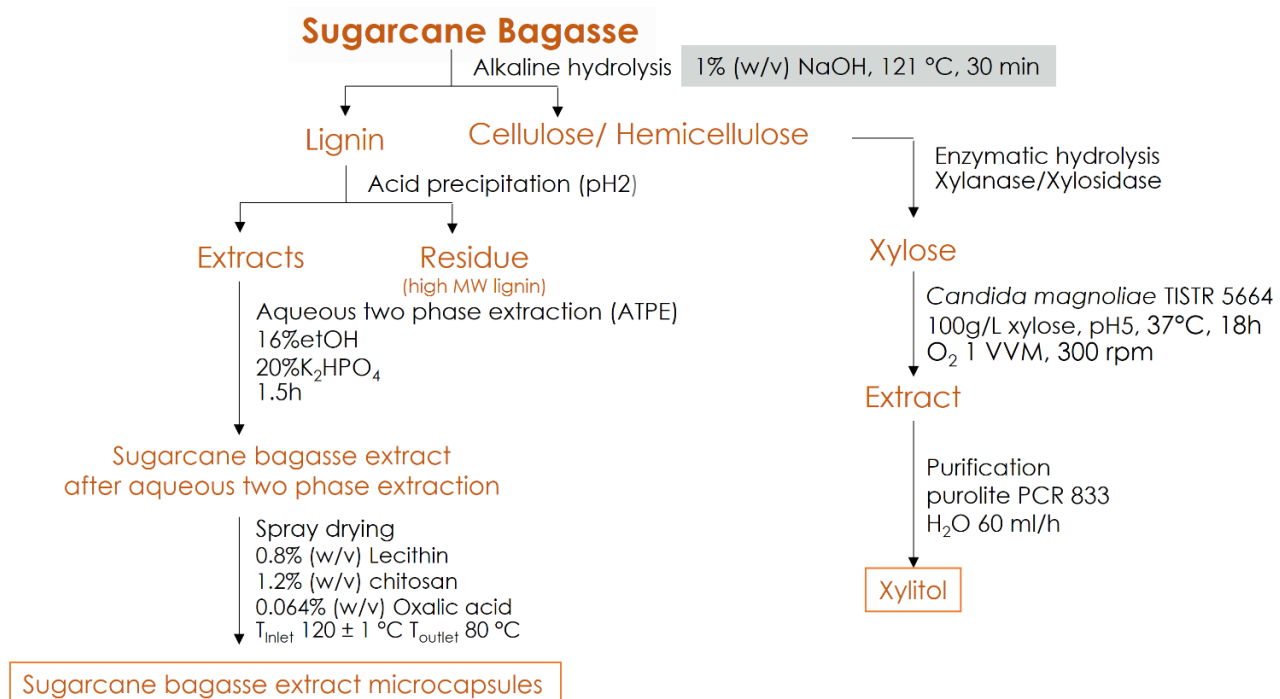
โครงการวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเรื่องการใช้ประโยชน์จากขานอ้อยเพื่อเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันของกลุ่มอุตสาหกรรมน้ำตาล เมื่อพิจารณาจากองค์ประกอบทางเคมีของขานอ้อย พบว่าประกอบด้วย เซลลูโลส 50% เฮมิเซลลูโลส 25% และลิกนิน 25% ดังนั้นโครงการย่อยที่ 1 จึงมีแนวคิดในการสร้างมูลค่าเพิ่มแก่ขานอ้อยโดยการสกัดลิกนินออกจากเส้นใยเพื่อผลิตเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) และสารต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial) ส่วนโครงการย่อยที่ 2 ทำการศึกษาและพัฒนากระบวนการย่อยสลายเส้นใยที่ประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลสซึ่งมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นไซแลน (xylan) ด้วยเอนไซม์ไซลานเนส (xylanase) และไซโลซิเดส (xylosidase) ให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลไซโลส และพัฒนากระบวนการใช้น้ำตาลไซโลสที่ย่อยสลายได้เพื่อเป็นสารตั้งต้นการผลิตไซลิตอล (xylitol) ด้วยยีสต์ โดยภาพรวมของการดำเนินงานแสดงดังแผนภาพที่ 1

ผลลัพธ์งานวิจัยที่ได้จากโครงการย่อยที่ 1 คือ เทคโนโลยีการสกัด และการทำบริสุทธิ์ พร้อมการสร้างผลิตภัณฑ์สารประกอบฟีนอลที่ได้จากการสลายตัวของลิกนินในขานอ้อยเพื่อใช้เป็นอาหารฟังก์ชัน ผลการสกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิและความดันสูง และการทำบริสุทธิ์ด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ทำให้ได้สารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูง โดยมีค่ามากกว่า Butylated hydroxytoluene (BHT) และ vitamin E ประมาณ 2 และ 4 เท่า ตามลำดับ พร้อมไม่แสดงความเป็นพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity) ต่อหนูทดสอบ ก่อนเปลี่ยนสารสกัดเป็นผลิตภัณฑ์ผงแห้งโดยใช้กระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยที่มีเลซิธินและโคโคซานเป็นสารห่อหุ้ม โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้มีประสิทธิภาพการกักเก็บสารประกอบฟีนอลสูง มีความคงตัวภายใต้สภาวะน้ำย่อยกระเพาะอาหารจำลอง รวมถึงสมรรถนะการเก็บรักษาที่ดีกว่าสารสกัดขานอ้อยที่ไม่ผ่านการห่อหุ้ม โครงการวิจัยทำการบรรจุโมโครแคปซูลสารสกัดขานอ้อยลงในแคปซูลเจลลาติน เพื่อความสะดวกต่อการบริโภค เน้นประโยชน์ของสารอาหารที่ได้รับ และตอบโจทยวิถีชีวิตของคนปัจจุบันที่สนใจเรื่องสุขภาพแต่มีพฤติกรรมการใช้ชีวิตที่เร่งรีบ

ขณะที่โครงการย่อยที่ 2 ได้สภาวะที่เหมาะสมของการย่อยไซแลนในขานอ้อยด้วยเอนไซม์ไซลานเนส และไซโลซิเดส โดยแปรผันการเตรียมขานอ้อย ปริมาณขานอ้อย ความเป็นกรดต่างที่ใช้ในระบบ ส่งผลให้ได้ปริมาณไซโลสสูงสุด เท่ากับ 12.90 g/L ขึ้นต่อมาเป็นการหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไซลิตอลจากไซโลสด้วยยีสต์ *Candida magnoliae* ในระดับฟลาสก์เขย่า ก่อนการขยายขนาดการผลิตไปสู่ระดับถังหมัก 10 L เริ่มต้นแปรผันความเข้มข้นไซโลส ความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ ความเร็วรอบ ซึ่งทำให้มีปริมาณผลได้น้ำตาลไซลิตอล เท่ากับ 83.35 g/L ที่เวลา 36 h ผลการขยายขนาดการผลิตไซลิตอลจากระดับฟลาสก์เขย่าไปสู่ระดับถังหมัก 10 L ได้ทดลองปรับเปลี่ยนความเข้มข้นน้ำตาลไซโลส และอัตราการให้อากาศ ส่งผลให้ได้ปริมาณไซลิตอลสูงสุด เท่ากับ 75.75 g/L ภายในเวลา 18 h ขึ้นต่อมาจึงทำบริสุทธิ์ไซลิตอลที่ได้ด้วยระบบ

โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ โดยผลิตภัณฑ์ไซลิทอลบริสุทธิที่ได้ไม่แสดงความเป็นพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity) ต่อหนูทดสอบ

จากผลลัพธ์ที่ได้จากการทำงานวิจัยของโครงการทั้งสองจึงเป็นแนวทางการสร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่ขานอ้อยซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำตาลทราย ช่วยลดปริมาณขานอ้อยเหลือทิ้งที่มีปริมาณมหาศาล โดยเพิ่มแนวทางการใช้ประโยชน์ของขานอ้อยให้มากกว่าการผลิตเยื่อกระดาษ หรือใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับการผลิตไอน้ำที่ยังมีมูลค่าต่ำ ให้เป็นอาหารเสริมหรือไซลิทอลบริสุทธิที่มีมูลค่าสูง



แผนภาพที่ 1 แผนการดำเนินงานทั้งหมดของโครงการการสร้างมูลค่าเพิ่มแก่ขานอ้อยด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ

บทคัดย่อ

ลิกนินในขานอ้อยเป็นส่วนเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตน้ำตาล และเอทานอล โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดและแยกโครงสร้างลิกนิน ผลการแปรรูปสภาวะการสกัดสารฟลูเคมิจากขานอ้อยด้วยวิธีการต่าง ๆ พบว่า การใช้ด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.25 M ร่วมกับหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 30 min ทำให้สารสกัดมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับการสกัดด้วยคลื่นเหนือเสียงความถี่สูง และการแช่เย็น โดยแสดงกิจกรรมการต้านสารอนุมูลอิสระเท่ากับ 98.86 ± 1.77 , 69.20 ± 7.11 และ 67.12 ± 2.47 mg Trolox (TE) /g sugarcane bagasse (SB) ตามลำดับ จากนั้นจึงทำบริสุทธิ์สารสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีความเข้มข้นของไดโพลเทสเซียมฟอสเฟตและเอทานอลเท่ากับ 20 และ 16% (w/w) ตามลำดับ ซึ่งช่วยลดปริมาณน้ำตาลในสารสกัดได้ประมาณ 5.6 เท่า สารสกัดที่ได้มีปริมาณสารประกอบฟีนอลและกิจกรรมการต้านสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น 1.8 และ 1.7 เท่า ตามลำดับ ซึ่งมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า Butylated hydroxytoluene และ vitamin E ประมาณ 2 และ 4 เท่า ตามลำดับ พร้อมไม่แสดงความเป็นพิษเฉียบพลันต่อหนูทดสอบ ผลการหาสภาวะสารห่อหุ้มที่เหมาะสมโดยใช้ระเบียบวิธีวิจัยพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology) ร่วมกับแผนการทดลองแบบ Box-Behnken design พบว่า การใช้เลซิธิน ไคโตซาน และกรดออกซาลิกที่ความเข้มข้น 0.8, 1.2 และ 0.064% (w/v) ตามลำดับ ส่งผลให้ไมโครแคปซูลมีประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสกัดขานอ้อย และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด เท่ากับ $83.50 \pm 2.98\%$ และ 0.65 ± 0.08 mgTE/gSB ผลการทดสอบความคงตัวของสารสกัดและไมโครแคปซูลภายใต้สภาวะน้ำย่อยกระเพาะอาหารจำลองที่สภาวะกรดต่างเท่ากับ 2 ให้กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในรูปค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) ที่ไม่แตกต่างกันตลอดระยะเวลาทดสอบ ส่วนการเก็บรักษาสารสกัดขานอ้อยและไมโครแคปซูลที่อุณหภูมิ 4 ± 1 °C เป็นเวลา 60 วัน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงค่า TEAC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่การเก็บรักษาที่ 37 ± 1 °C เป็นเวลา 60 วัน พบว่า สารสกัดขานอ้อยมีแนวโน้มค่า TEAC ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยในวันที่ 60 พบว่าไมโครแคปซูลมีค่า TEAC คงเหลือมากกว่าสารสกัดเท่ากับ 87.23 และ 76.22% ตามลำดับ ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นประสิทธิภาพของไมโครแคปซูลเลซิธินและไคโตซานที่สามารถปกป้องสารสกัดขานอ้อยที่อยู่ภายในจากสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลเสียต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารระหว่างการเก็บรักษา จึงเหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารฟังก์ชัน เพื่อตอบโจทยวิถีชีวิตของคนปัจจุบันที่สนใจเรื่องสุขภาพแต่มีพฤติกรรมการใช้ชีวิตที่เร่งรีบ

Abstract

Lignin from sugarcane bagasse was discarded as agricultural waste from sugar and ethanol industries. The purpose of present work was to extract and depolymerize lignin. Sugarcane bagasse extracts (SBE) obtained from alkaline pretreatment (0.25 M NaOH at 121 °C for 30 min) showed the highest antioxidant activity compared to those obtained from ultrasonic-assisted extraction and maceration (98.86 ± 1.77 , 69.20 ± 7.11 and 67.12 ± 2.47 mg Trolox (TE) /g sugarcane bagasse (SB), respectively). Then, aqueous two-phase separation was carried out using 20% (w/w) K₂HPO₄ and 16% (w/w) ethanol for purification of the phenolic compounds in SBE. Total carbohydrate contents of SBE reduced 5.6 times compared to the control, whereas total phenolic contents and its antioxidant activities increased 1.8 and 1.7 times, respectively. The purified SBE exhibited higher antioxidant activity than Butylated hydroxytoluene and vitamin E (2 and 4 times, respectively). No sign of acute toxicity in whistar rats was observed. The optimal concentrations of encapsulated materials for the SBE were evaluated using response surface methodology (RSM) and Box-Behnken design. Desirable encapsulation efficiency ($83.50 \pm 2.98\%$) and antioxidant activity (0.65 ± 0.08 mgTE/gSB) of the SBE were obtained from lecithin, chitosan and oxalic acid at 0.8, 1.2, and 0.064% (w/v), respectively. No significant change in Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) between the SBE and microcapsules under the simulated gastric fluids of human at pH 2. The shelf life stability study showed that TEAC of both samples were constant during storage at 4 ± 1 °C for 60 days, whereas TEAC of the SBE at 37 ± 1 °C significantly decreased. At day 60th, the remaining TEAC values of microcapsules and the SBE were 87.23 and 76.22%, respectively. The findings showed the potential of microcapsules to protect the antioxidant activity of extracts from deterioration factors during storage. The SBE microcapsules could be considered as novel natural antioxidants in functional foods for people with hectic lifestyles to approach good health.

สารบัญ

	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	
สารบัญ	ก
สารบัญตาราง	ค
สารบัญภาพ	ง
โครงการย่อยที่ 1	
บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	5
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	6
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	7
บทที่ 2 ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	21
บทที่ 4 ผลการศึกษาและอภิปรายผล	29
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	51
ภาคผนวก	53
ผลการทดลอง	49
ข้อมูลการวิจัยแบบ 5 บรรทัด	61
สรุปผลงานวิจัยเพื่อเผยแพร่	63
การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์อย่างเป็นรูปธรรม	65
รายงานการทดสอบความเป็นพิษ	
โครงการย่อยที่ 2	
บทสรุปผู้บริหาร	
สารบัญ	ก
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการ	2
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 2 ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	12
บทที่ 4 ผลการศึกษาและอภิปรายผล	14
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	40

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลที่คาดว่าจะได้รับเมื่อการดำเนินงานเสร็จสิ้น	7
2	ผลของวิธีการปรับสภาพแบบต่างๆ ต่อโครงสร้างทางเคมีและกายภาพของ ลิกโนเซลลูโลส	12
3	การแบ่งประเภทของสารประกอบฟีนอลที่พบในพืชตาม จำนวนอะตอมของคาร์บอน	15
4	ตัวแปรอิสระ และระดับของตัวแปรอิสระสำหรับกระบวนการทำแห้ง สารสกัดจากชานอ้อยแบบพ่นฝอย	24
5	ผลความเข้มข้นของสารห่อหุ้มชนิดต่างๆ ต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้ม (Encapsulation efficiency, EE) และกิจกรรมต้านอนุมูลเทียบเท่า สารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) ของไมโครแคปซูลสารสกัดชานอ้อย จากการใช้ระเบียบ วิธีวิจัยพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology, RSM) ร่วมกับการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken design (BBD)	37
6	ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสกัด ชานอ้อย (EE) และกิจกรรม การต้านอนุมูลอิสระ (TEAC) ของไมโครแคปซูล	39
7	ประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสกัดชานอ้อย (EE) และกิจกรรมการต้าน อนุมูลอิสระ (TEAC) ของไมโครแคปซูลที่ได้จากการทำนายและการทดลอง ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม	42

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของชานอ้อย ได้แก่ เซลลูโลส (ก) เฮมิเซลลูโลส (ข) และลิกนิน (ค)	8
2	โครงสร้างของลิกนิน	9
3	โครงสร้างสารโมเลกุลเดี่ยวสามชนิดที่ใช้สำหรับการสังเคราะห์ลิกนิน	9
4	การแตกโครงสร้างเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน	11
5	การสลายตัวขององค์ประกอบลิกนิน-phenol-เซลลูโลส/เฮมิเซลลูโลสภายใต้สภาวะการระเบิดไอหม้อ A และ B คือ พันธะ glycosidic C คือ พันธะ ether และ D คือ พันธะ ester	16
6	สารประกอบฟีนอลที่ได้จากการแตกโครงสร้างของลิกนิน (ก) <i>p</i> -coumaric acid (ข) sinapic acid (ค) ferulic acid	16
7	กลไกการดักจับและความคงตัวของอนุมูล hydroxyl โดยลิกนิน	18
8	ปฏิกิริยาของอนุมูล ABTS ⁺ ในสภาวะที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ ตามการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารทดสอบโดยวิธี ABTS assays	20
9	แผนผังการดำเนินโครงการ	28
10	กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด (TEAC) ของสารสกัดชานอ้อยที่สกัดโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60 °C เป็นเวลา 6 h	29
11	สมบัติของสารสกัดชานอ้อย; ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (ก) ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (ข) และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าสารมาตรฐาน trolox (ค) หลังการสกัดโดยต่างความเข้มข้น และเวลาต่างๆ ด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C	31
12	แผนผังวัฏภาค (phase diagram) ระหว่างไดโพลแทสเซียมฟอสเฟตและเอทานอล	32
13	สมบัติของสารสกัดชานอ้อย; ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (ก) ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (ข) และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าสารมาตรฐาน trolox (ค) หลังผ่านระบบสารละลายนี้สองวัฏภาคที่ไดโพลแทสเซียมฟอสเฟตความเข้มข้นต่างๆ	33

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	สมบัติของสารสกัดขานอ้อย; ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (ก) ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (ข) และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าสารมาตรฐาน trolox (ค) หลังผ่านระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่เอทานอลความเข้มข้นต่างๆ	35
15	สมบัติของสารสกัดขานอ้อย; ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (TCC) ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (TPC) และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าสารมาตรฐาน trolox (TEAC) ทั้งก่อนและหลังผ่านระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่สภาวะต่างๆ	36
16	กิจกรรมการต้านสารอนุมูลอิสระเทียบเท่าสารมาตรฐาน trolox (TEAC) ของวิตามินซี BHT, Syringic acid, Coumaric acid, Ferulic acid สารสกัดขานอ้อยหลังการตกตะกอนลิกนิน (delinified-SBE) และสารสกัดขานอ้อยหลังผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์ด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (ATPE-	37
17	แผนผังการทดสอบความเป็นพิษของสัตว์ทดลองตามวิธีการ OECD 423	38
18	อิทธิพลของความเข้มข้นเลซิตินและโคโคซานต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้ม (Encapsulation efficiency, EE) (ก) และกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าสารละลาย มาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) (ข) ของไมโครแคปซูลสารสกัดขานอ้อย	43
19	ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของไมโครแคปซูลที่มีส่วนประกอบของสารห่อหุ้ม; (A) 0.8% เลซิติน 1.2% โคโคซาน และ 0.064% กรดออกซาลิก และ B 0.1% เลซิติน 0.65% โคโคซาน	45
20	โครงสร้างทางเคมีของสารห่อหุ้ม และไมโครแคปซูลแบบต่างๆ (ตัวเลขในกราฟแสดง %เลซิติน/%โคโคซาน/%กรดออกซาลิก)	46
21	ความคงตัวของสารสกัดขานอ้อยและไมโครแคปซูล 0.8/1.2/0.064 ภายใต้สภาวะน้ำย่อยกระเพาะอาหารจำลองที่มีกรดต่างเท่ากับ 2 เป็นเวลา 120 นาที (ตัวเลขในกราฟแสดง %เลซิติน/%โคโคซาน/%กรดออกซาลิก)	47
22	กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (TEAC) ที่เหลืออยู่ของสารสกัดขานอ้อยและไมโครแคปซูล 0.8/1.2/0.064 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ± 1 °C เป็นเวลา 60 วัน (ตัวเลขในกราฟแสดง %เลซิติน/%โคโคซาน/%กรดออกซาลิก)	48

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
23	กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (TEAC) ที่เหลืออยู่ของสารสกัดชานอ้อยและ ไมโครแคปซูล 0.8/1.2/0.064 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 ± 1 °C เป็นเวลา 60 วัน (ตัวเลขในกราฟแสดง %เลซิทิน/%โคโคธาน/%กรดออกซาลิก)	49
24	แคปซูลสารสกัดชานอ้อย	50

โครงการย่อยที่ 1 บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary)

โครงการวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเรื่องการใช้ประโยชน์จากขานอ้อยเพื่อเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันของกลุ่มอุตสาหกรรมน้ำตาล โดยพัฒนาวิธีการสกัด ทำบริสุทธิ์ และสร้างผลิตภัณฑ์สารประกอบฟีนอลที่ได้จากการสลายตัวของลิกนินในขานอ้อยเพื่อใช้เป็นอาหารฟังก์ชัน ผลการสกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิและความดันสูงทำให้ได้สารสกัดที่มีปริมาณสารประกอบฟีนอลและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อเทียบกับการสกัดด้วยคลื่นเหนือเสียงความถี่สูง และการแช่เยว่อย่างใดก็ตามสารสกัดที่ได้ยังไม่มีควมบริสุทธิ์มากพอ จึงเป็นที่มาของการทำบริสุทธิ์สารสกัดด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ซึ่งผลการทำบริสุทธิ์ทำให้สารสกัดมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น โดยมีค่ามากกว่า Butylated hydroxytoluene (BHT) และ ascorbic acid (vitamin E) ประมาณ 2 และ 4 เท่าตามลำดับ พร้อมไม่แสดงความเป็นพิษเฉียบพลันต่อหนูทดสอบ จากนั้นเป็นขั้นตอนการเปลี่ยนสารสกัดเป็นผลิตภัณฑ์ผงแห้งโดยใช้กระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยที่มีเลซิตินและโคโคซานเป็นสารห่อหุ้ม ซึ่งใช้ระเบียบวิธีวิจัยพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology) ร่วมกับการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken design ในการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารแต่ละชนิด ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีประสิทธิภาพการกักเก็บสารประกอบฟีนอลสูงสุด ผลทดสอบยังพบว่าไมโครแคปซูลมีความคงตัวภายใต้สภาวะน้ำย่อยกระเพาะอาหารจำลอง รวมถึงสภาวะการเก็บรักษาที่ดีกว่าสารสกัดขานอ้อยที่ไม่ผ่านการห่อหุ้ม การรายงานข้างต้นแสดงให้เห็นประสิทธิภาพของไมโครแคปซูลเลซิตินและโคโคซานที่เหมาะสมต่อการพัฒนาเป็นอาหารฟังก์ชัน โดยหลักเกณฑ์ของกระทรวงเกษตรสหรัฐอเมริกา (United States Department of Agriculture, USDA) มีข้อเสนอแนะให้บุคคลทั่วไปควรบริโภคอาหาร หรืออาหารเสริมที่มีค่า Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) ประมาณ 3000 – 5000 $\mu\text{M TE/mg materials}$ ต่อวัน ดังนั้นโครงการวิจัยได้วิเคราะห์ค่า ORAC ของไมโครแคปซูลสารสกัดขานอ้อย พบว่า มีค่าเท่ากับ $23.69 \pm 0.60 \mu\text{mTE/mg microcapsule}$ จึงได้ทำการบรรจุไมโครแคปซูลสารสกัดขานอ้อยลงในแคปซูลเจลาตินที่ปริมาณ $300 \pm 50 \text{ mg}$ ต่อเม็ด เพื่อสะดวกต่อการบริโภค เน้นประโยชน์ของสารอาหารที่ได้รับ และตอบโจทยวิถีชีวิตของคนปัจจุบันที่สนใจเรื่องสุขภาพแต่มีพฤติกรรมการใช้ชีวิตที่เร่งรีบ

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการ

อ้อยและน้ำตาลจัดเป็น 1 ใน 25 กลุ่มเรื่องวิจัยที่ได้รับการส่งเสริมและสนับสนุนในการทำวิจัยมุ่งเป้าเพื่อตอบสนองความต้องการในการพัฒนาประเทศ เนื่องจากอุตสาหกรรมการผลิตอ้อยและน้ำตาลทรายเป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจของประเทศเป็นอย่างมาก โดยในช่วงที่ผ่านมารัฐบาลได้อนุญาตให้จัดตั้งโรงงานน้ำตาลใหม่ขึ้นอีกหลายโรงในพื้นที่ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พร้อมกับมีนโยบายปรับเปลี่ยนพื้นที่การปลูกข้าวในเขตที่ไม่เหมาะสมส่วนหนึ่งเป็นการปลูกอ้อยเพิ่มเติม ซึ่งส่งผลให้พื้นที่เพาะปลูกอ้อยในปีการผลิต 2557/2558 มีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็น 10,530,927 ไร่ และสร้างผลผลิตอ้อย 116,712,776 ตัน (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2558) โดยสามารถนํารายได้เข้าประเทศในปี 2557 สูงเกือบ 9 หมื่นล้านบาท (กรมการค้าต่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์, 2558) ทั้งนี้มีการคาดการณ์ว่าพื้นที่เพาะปลูกอ้อยในปีการผลิต 2558/2559 จะยังคงเพิ่มขึ้นต่อเนื่องเป็น 11,033,736 ไร่ (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2558)

การผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยก่อให้เกิดวัตถุเหลือทิ้งหลายชนิด ซึ่งก่อให้เกิดอุตสาหกรรมต่อเนื่อง เช่น พลังงาน อาหาร กระดาษ และผลิตภัณฑ์ชีวเคมี เป็นต้น ทั้งนี้วัตถุเหลือทิ้งหลักจากการผลิตน้ำตาลทราย คือ ขานอ้อย ซึ่งคือ ส่วนของลำต้นอ้อยที่ถูกหีบน้ำอ้อยออกแล้ว โดยคิดเป็นปริมาณ 27 – 29% ของอ้อยที่เข้าหีบ (เครื่องมือตรผล, 2554) ดังนั้นจากข้อมูลปริมาณการผลิตน้ำตาลทรายข้างต้นจึงแสดงให้เห็นว่ามีขานอ้อยเหลือจากการหีบในปริมาณมากกว่า 30 ล้านตันต่อปี ซึ่งปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์จากขานอ้อยในกระบวนการผลิตต่างๆ ได้แก่ ใบน้ำและกระแสไฟฟ้าภายในโรงงานผลิตน้ำตาลทราย วัสดุก่อสร้าง เยื่อกระดาษ ปุ๋ยหมัก และวัตถุดิบดินเพื่อรักษาความชื้นของดิน และป้องกันวัชพืช (นิรนาม, ม.ป.ป.) แต่การใช้ประโยชน์เหล่านี้ยังมีมูลค่าต่ำ และยังคงเหลือขานอ้อยที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์อีกเป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงควรหาแนวทางการใช้ประโยชน์จากขานอ้อยในด้านอื่นๆ ที่ก่อให้เกิดมูลค่าเพิ่มจากวัตถุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีมูลค่าต่ำ

องค์ประกอบของขานอ้อยเป็นตัวกำหนดรูปแบบการใช้ประโยชน์ ขานอ้อยจัดเป็นวัสดุลิกโน-เซลลูโลสที่ประกอบด้วยเซลลูโลส 43.6% เฮมิเซลลูโลส 33.5% ลิกนิน 19.6% เถ้า 2.3% แวกซ์ 0.26% และองค์ประกอบอื่นๆ 0.74% (Li *et al.*, 2012) ปัจจุบันมีการศึกษาการใช้ประโยชน์ในส่วน of เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสสำหรับการผลิตไบโอเอทานอลเป็นจำนวนมาก (Eliana *et al.*, 2014; Rocha *et al.*, 2012; Sakamoto *et al.*, 2012; Sarkar *et al.*, 2012) ซึ่งเทคโนโลยีที่ได้จากการศึกษา

ก่อให้เกิดโรงงานผลิตไบโอเอทานอลจากชานอ้อยในบางประเทศ โดยขั้นตอนเบื้องต้นที่สำคัญในการผลิตไบโอเอทานอลจากชานอ้อย คือ การกำจัดลิกนินออกจากชานอ้อย ซึ่งมีการรายงานว่าปริมาณลิกนินที่สร้างพันธะกับคาร์โบไฮเดรตส่งผลเชิงลบต่อปริมาณน้ำตาลและผลได้ของเอทานอลในที่สุด (Mandelli *et al.*, 2014) ดังนั้นลิกนิน คือ ส่วนที่เหลือทิ้ง แต่การศึกษาการใช้ประโยชน์จากลิกนิน เพื่อสร้างเป็นผลิตภัณฑ์ยังมีเป็นจำนวนน้อยและเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าไม่สูงนัก ตัวอย่างเช่น กาวไม้ (Moubarik *et al.*, 2013) เรซิน (Hoareau *et al.*, 2006; Piccolo *et al.*, 1997) อิมัลซิไฟเออร์ (Boeriu *et al.*, 2004) ตัวดูดซับ (Mohan *et al.*, 2006) สารเคลือบสำหรับจับโลหะหนัก (Sena-Martins *et al.*, 2008) และปุ๋ย (Meier *et al.* 1994) เป็นต้น

ลิกนินเป็นพอลิเมอร์ที่มีโครงสร้างซับซ้อนประกอบด้วยโมโนเมอร์ประเภทอะโรมาติกต่างชนิดกัน (aromatic heteropolymer) ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาควบคู่ชนิดออกซิเดชัน (oxidative coupling) ของสารหลัก 3 ชนิด ได้แก่ *p*-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol และ sinapyl alcohol โดยทั้งหมดจัดเป็น *p*-hydroxycinnamyl alcohol ที่มีปริมาณของหมู่เมทอกซิลที่ต่างกัน (Boerjan *et al.*, 2003) สารเหล่านี้จัดเป็นฟลักเคมี (phytochemical) ที่มีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลและจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) (Graf, 1992; González *et al.*, 2004; Re *et al.*, 1999) ฟลักเคมีเป็นสารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ มีการศึกษาเป็นจำนวนมากถึงบทบาทของฟลักเคมีในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งสามารถลดการเกิดโรคสำคัญที่เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของคนทั่วโลกในปัจจุบัน เช่น โรคมะเร็ง และโรคหัวใจ (Hudson *et al.*, 2000; Hollman, 2001) เป็นต้น

การศึกษากัดฟลักเคมีที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากชานอ้อยเริ่มเกิดขึ้นในช่วง 1 – 2 ปีที่ผ่านมาในประเทศจีนโดย Li และคณะ (2013; 2014) กระบวนการผลิตเริ่มจากการนำชานอ้อยไปผ่านกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำ (steam-explosion) แล้วสกัดด้วย anhydrous ethanol, ethyl acetate หรือ deionized water โดยวิธี soxhlet extraction และใช้เวลาสกัด 60 min พบว่าสารที่สกัดได้ทั้งหมดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะสารที่สกัดด้วย ethyl acetate มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเป็นครึ่งหนึ่งของวิตามินซี แต่งานวิจัยนี้ยังมีข้อด้อยของการสกัด คือ การสกัดสารที่ใช้เวลานาน การสิ้นเปลืองตัวทำละลาย และผลได้ต่ำ ซึ่งปัญหานี้เป็นปัญหาที่พบโดย Li และ Ge (2012) เช่นกัน ที่ได้รายงานการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระจากชานอ้อยด้วยต่างโดยใช้เวลาในการสกัดถึง 10 h ที่อุณหภูมิ 140 °C

จากปัญหาของการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบดั้งเดิมดังที่กล่าวมาแล้ว การสกัดโดยใช้คลื่นเหนือเสียงช่วยสกัด (Ultrasonic-assisted extraction) ในช่วงความถี่ 20 kHz – 100 MHz จึงเป็นวิธีที่ได้รับการพัฒนาเมื่อไม่นานมานี้เพื่อใช้ในการสกัดสารจากธรรมชาติ (Azmir *et al.*, 2013) การสกัดด้วยวิธีนี้มีข้อดีกว่าการสกัดแบบดั้งเดิมเช่น maceration, heat reflux และ soxhlet extraction

ในด้านการเพิ่มปริมาณสารที่สกัดได้ การเพิ่มอัตราการสกัด และการลดเวลาในการสกัด (Wang and Weller, 2006; Vilku *et al.*, 2008) จากผลการทดลอง 6 เดือนที่ได้จากโครงการวิจัยเรื่องการใช้คลิ่นเหนือเสียงช่วยสกัดสารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านจุลินทรีย์จากขานอ้อยที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำ ภายใต้แผนงานวิจัยการสร้างมูลค่าเพิ่มแก่ขานอ้อยด้วยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพที่ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2558 ที่ผ่านมา ซึ่งดำเนินการโดยคณะผู้วิจัยนั้นพบว่า สารสกัดที่ได้จากขานอ้อยที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่มีคลิ่นเหนือเสียงช่วยสกัดมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าวิตามินอี (α -tocopherol) และใกล้เคียงกับ butylated hydroxytoluene (BHT) แต่เนื่องด้วยการศึกษาสถานะในการสกัดที่เหมาะสมยังดำเนินการไม่เสร็จสิ้น ผู้วิจัยจึงคาดหวังว่าสารสกัดที่ได้จากสถานะการสกัดที่จากผลงานนี้คณะผู้วิจัยจึงเห็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์พอกษเคมีที่มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระจากขานอ้อยดังกล่าวต่อเนื่องเพื่อมุ่งเน้นการใช้ประโยชน์ในการเป็นอาหารเชิงหน้าที่หรืออาหารฟังก์ชัน (functional food) ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพและสอดคล้องกับความต้องการของตลาดในปัจจุบัน พร้อมกันนี้ยังมุ่งหวังในการสร้างเทคโนโลยีต้นแบบที่สามารถยกระดับสู่การผลิตในเชิงพาณิชย์ต่อไป

การศึกษาวิจัยของโครงการนี้เป็นการขยายขนาดการสกัดสารพอกษเคมีจากขานอ้อย โดยใช้วิธีการแช่เยล (maceration) ในการสกัดแทนการใช้คลิ่นเหนือเสียง ตามด้วยการใช้เทคโนโลยีการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) ในการสร้างไมโครแคปซูลของผลิตภัณฑ์พอกษเคมีจากขานอ้อย โดยเทคโนโลยีการทำแห้งแบบพ่นฝอยนั้นเป็นเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการผลิตระดับอุตสาหกรรมเนื่องจากเครื่องมือหาได้ง่ายสามารถผลิตได้อย่างต่อเนื่องและในปริมาณมาก อีกทั้งยังมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำ (Schutyser *et al.*, 2012Z; Zuidam and Shimon, 2010) วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาถึงอิทธิพลของสารห่อหุ้ม (encapsulating material) ต่อสมบัติของไมโครแคปซูลโดยสารห่อหุ้มที่เลือกใช้ ได้แก่ เลซิธิน ไคโตซานที่เชื่อมไขว้ด้วยกรดออกซาลิก และมอลโตเด็คซ์ทริน สารสกัดจากขานอ้อยจะถูกผสมกับเลซิธินในขั้นตอนแรกโดยเลซิธิน คือ สารผสมของฟอสโฟลิปิด เช่น phosphatidyl inositol และ phosphatidyl choline สามารถใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง และเป็นสารปกป้องการเกิดออกซิเดชันของวิตามินเอและอี (Meyers, 1990) จากนั้นห่อหุ้มสารสกัดด้วยไคโตซานซึ่งเป็นพอลิอะมิโนแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วย β -(1-4)-linked N-acetyl-D-glucosamine และ D-glucosamine ซึ่งได้จากปฏิกิริยาดีอะเซทิลเลชันบางส่วนของไคติน (Wangpradit and Chitprasert, 2014) ทั้งนี้เพื่อเพิ่มความแข็งแรงของโครงสร้างของไคโตซานจึงเชื่อมไขว้ไคโตซานโดยการสร้างพันธะโควาเลนต์กับกรดออกซาลิก (Mi *et al.*, 2015) ใช้ระเบียบวิธีวิจัยพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology) ในการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตไมโครแคปซูลสารสกัดจากขานอ้อยโดยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย รวมถึงตรวจสอบสมบัติทางกายภาพและเคมีของไมโครแคปซูลของสารสกัดจากขานอ้อยที่ได้ รวมถึงการปลดปล่อยสารสกัดจากไมโครแคปซูลในระบบทางเดินอาหารมนุษย์จำลอง และความเป็นพิษเพื่อประเมินความเป็นไปได้ใน

การประยุกต์ใช้เป็นอาหารฟังก์ชัน ทั้งนี้งานวิจัยนี้สอดคล้องกับนโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ ฉบับที่ 8 (พ.ศ. 2555 – 2559) ใน 2 ด้านเหมาะสมในอนาคตน่าจะมีกิจกรรมการด้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าสารสกัดที่ได้ในปัจจุบัน ได้แก่ 1) เกษตรเพื่อความยั่งยืน โดยเป็นการวิจัยเกี่ยวกับการเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตรเพื่อพัฒนาศักยภาพการส่งออกในกลุ่มสินค้าที่สร้างรายได้หลักจากการส่งออกและสร้างรายได้ให้กับชุมชน เพิ่มมูลค่าสินค้าและสร้างขีดความสามารถในการแข่งขัน เสริมสร้างความเข้มแข็งให้กับเศรษฐกิจชุมชน สร้างรายได้ให้กับประเทศ ก่อให้เกิดการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมโดยรวม และสามารถสร้างให้เกิดอำนาจการต่อรองให้กับประเทศได้ และ 2) เทคโนโลยีใหม่และเทคโนโลยีที่สำคัญเพื่ออุตสาหกรรม โดยเป็นการวิจัยและพัฒนาเพื่อเสริมสร้างเทคโนโลยีใหม่ที่เป็นนวัตกรรมสู่เชิงพาณิชย์ โดยมี เป้าประสงค์เพื่อเสริมสร้างขีดความสามารถในการแข่งขัน

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดพฤษเคมีจากขานอ้อยโดยวิธีการแช่เย็น โดยตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆ ของพฤษเคมีสารสกัดขานอ้อย ซึ่งได้แก่ ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (TPC) กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และองค์ประกอบทางเคมี โดยมุ่งหวังว่าสารสกัดมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่า alpha-tocopherol (vitamin E) และ butylated hydroxytoluene (BHT)
2. เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆ ของอิมัลชันพฤษเคมีสารสกัดขานอ้อย ซึ่งได้แก่ ขนาดอนุภาค และซีตาโพเทนเชียล โดยมุ่งหวังว่าอิมัลชันนี้มีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำไปทำแห้งแบบพ่นฝอย
3. เพื่อประเมินความเข้มข้นที่เหมาะสมของเลซิติน ไคโตซาน และกรดออกซาลิกในการสร้างไมโครแคปซูลพฤษเคมีจากขานอ้อยโดยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยไมโครแคปซูลที่ได้มีคุณสมบัติทางกายภาพ ซึ่งได้แก่ ขนาด และลักษณะพื้นผิว และคุณสมบัติทางเคมี ซึ่งได้แก่ ประสิทธิภาพการห่อหุ้ม กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ การปลดปล่อยในระบบทางเดินอาหารมนุษย์จำลอง และความเป็นพิษ ซึ่งเป็นครรชนีชีวิตในการประยุกต์ใช้เป็นอาหารฟังก์ชัน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ขอบเขตของงานวิจัยนี้แบ่งเป็นด้านต่างๆ ดังนี้

- 1) ขานอ้อยที่ใช้มาจากบริษัทเกษตรไทย อินเตอร์เนชั่นแนล ชูการ์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด
- 2) ขานอ้อยที่ได้ผ่านขั้นตอนการเตรียมสำหรับสกัด ซึ่งใช้วิธีการลดขนาด อบให้แห้ง และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20°C
- 3) การสกัดขานอ้อยแปรรูป 3 วิธี ได้แก่ การสกัดด้วยคลื่นเสียงร่วมกับเมทานอล (สภาวะที่เหมาะสมจากโครงการวิจัยที่ผ่านมา) การแช่เย็น (แปรรูปเวลาและอุณหภูมิ) และการสกัดโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อุณหภูมิและความดันสูง (แปรรูปความเข้มข้นโซเดียมไฮดรอกไซด์และเวลา)
- 4) การแยกน้ำตาลออกจากสารสกัดใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค
- 5) สมบัติของสารสกัดที่วิเคราะห์ ได้แก่ Trolox equivalent antioxidant capacity, total phenolic content และ total carbohydrate content
- 6) การเตรียมไมโครแคปซูลของสารสกัดใช้วิธีอิมัลชันและการทำแห้งแบบพ่นฝอย

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

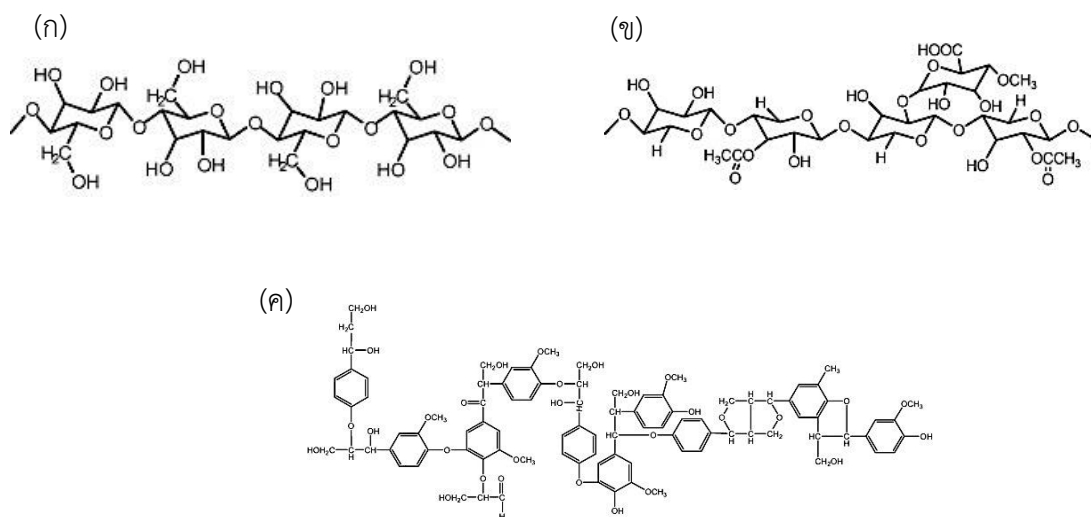
ตารางที่ 1 ผลที่คาดว่าจะได้รับเมื่อการดำเนินงานเสร็จสิ้น

ผลผลิต	ตัวชี้วัด		
	เชิงปริมาณ	เชิงคุณภาพ	เวลา
1. ผลิตภัณฑ์/ เทคโนโลยี	1 ชนิด/ เทคโนโลยี	ผลิตภัณฑ์พอกเคมีสารสกัดจากขานอ้อยในรูปแคปซูล จำนวน 1,000 เม็ดๆ ละ 250 mg ที่ประกอบด้วยสาร สกัดจากขานอ้อย 50 mg และสารหล่อหุ้ม 200 mg ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงอย่างน้อย เทียบเท่ากับวิตามินอีพร้อมเทคโนโลยีในการผลิตที่มี ศักยภาพในการขยายสู่การผลิตระดับอุตสาหกรรม	1 ปี
2. บทความใน วารสารวิชาการ	1 ฉบับ	บทความในวารสารวิชาการระดับนานาชาติใน ฐานข้อมูล ISI ระดับ Q1 หรือ Q2	1 ปี 6 เดือน
3. องค์ความรู้ที่ใช้ ในการเรียนการ สอน	2 วิชา	องค์ความรู้ที่สามารถใช้ในการเรียนการสอนวิชา Unit operation in agro-industry III และ non-food biotechnology ของหลักสูตรปริญญาตรี ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร	1 ปี
4. การพัฒนา บุคลากรวิจัย	2 คน	ผู้ช่วยนักวิจัยในระดับปริญญาโท	1 ปี
5. ต้นแบบ กระบวนการ	1 กระบวนการ	ต้นแบบกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์พอกเคมีจากขาน อ้อยซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงอย่าง น้อยเทียบเท่ากับวิตามินอีพร้อมเทคโนโลยีในการผลิต ที่มีศักยภาพในการขยายสู่การผลิตระดับอุตสาหกรรม	1 ปี

บทที่ 2 ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ขานอ้อยและการใช้ประโยชน์จากขานอ้อย

ขานอ้อย (bagasses) คือ ส่วนของลำต้นอ้อยที่หีบเอาน้ำอ้อยหรือน้ำตาลออกแล้ว (มิตรผล, 2554) ซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรภายหลังจากกระบวนการผลิตน้ำตาล โดยองค์ประกอบทางเคมีของขานอ้อยนั้นประกอบด้วยลิกนิน 19.6% เซลลูโลส 43.6% เฮมิเซลลูโลส 33.5% เถ้า 2.3% แวกซ์ 0.26% และองค์ประกอบอื่นๆ 0.7% (Li *et al.*, 2012) ซึ่งเห็นได้ว่าองค์ประกอบหลักของขานอ้อยเป็นสารจำพวกพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส (ภาพที่ 1)



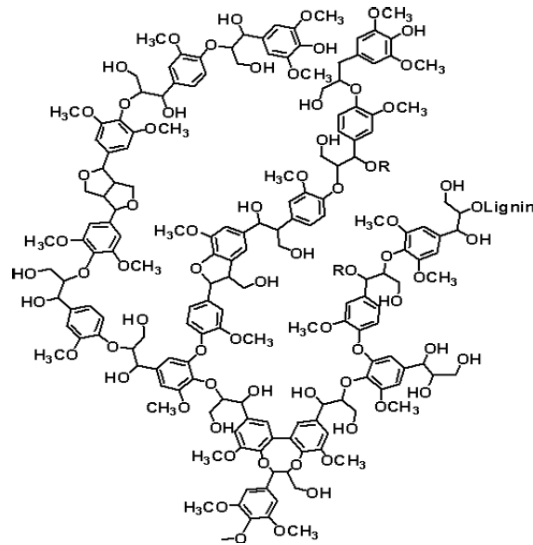
ภาพที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของขานอ้อย ได้แก่ เซลลูโลส (ก) เฮมิเซลลูโลส (ข) และลิกนิน (ค)

ที่มา: Park *et al.* (2008)

จากองค์ประกอบของขานอ้อยดังกล่าวเป็นเหตุให้ในปัจจุบันมีการนำขานอ้อยมาเพิ่มมูลค่าโดยใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในอุตสาหกรรมการผลิตไบโอเอทานอลเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน แต่ภายหลังเสร็จสิ้นกระบวนการผลิตยังคงเหลือลิกนินซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ต้องการในกระบวนการผลิตไบโอเอทานอลออกมา ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจในการเลือกวัตถุดิบที่เป็นของเหลือทิ้งในอุตสาหกรรมนี้มาใช้ประโยชน์ทางด้านอื่น เพราะนอกจากเป็นการลดปริมาณขานอ้อยที่เหลือทิ้งแล้ว ยังเป็นการใช้ประโยชน์จากขานอ้อยมากยิ่งขึ้นอีกด้วย

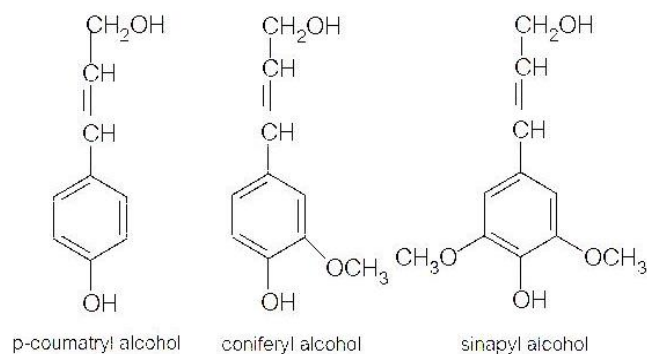
ลิกนินเป็นพอลิเมอร์ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูงเรียงสลับซับซ้อน ดังแสดงในภาพที่ 2 ประกอบด้วยหน่วยพื้นฐานที่เป็นวงแหวนของฟีนิลโพรเพน (phenyl propane) และสามารถแบ่งได้สามชนิด คือ

p-coumaryl alcohol (H), coniferyl alcohol (G) และ sinapyl alcohol (S) ดังแสดงในภาพที่ 3 โดยในพืชแต่ละชนิด เช่น พืชเนื้ออ่อน พืชเนื้อแข็ง มีสัดส่วนของ H:G:S ที่แตกต่างกัน อย่างในกรณีของ ลิกนินในขานอ้อยจะมีสัดส่วนเป็น 2:38:60 ส่วนลิกนินจากฟางข้าวจะมีสัดส่วน กับ 4:68:28 เป็นต้น (Río et al., 2015) อย่างไรก็ตามการได้มาซึ่งสารประกอบเหล่านี้จำเป็นต้องเลือกใช้วิธีการสกัดที่มี ประสิทธิภาพ



ภาพที่ 2 โครงสร้างของลิกนิน

ที่มา: lignoworks (2014)



ภาพที่ 3 การแบ่งประเภทของสารประกอบฟีนอลที่พบในพืชตามจำนวนอะตอมคาร์บอน

ที่มา: Crawford (1981)

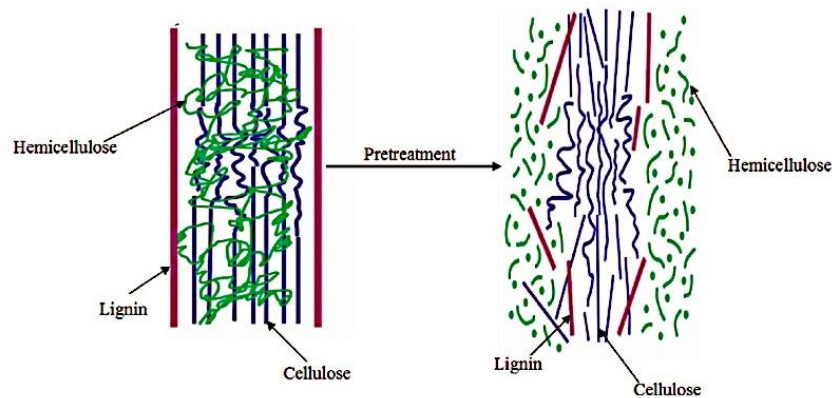
สาเหตุที่ลิกนินเป็นส่วนที่ไม่ต้องการในกระบวนการผลิตไบโอเอทานอลนั้น (Cruz et al., 2001) เนื่องจากลิกนินมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ (Garrote et al., 2004) และสามารถยับยั้งเอนไซม์ เซลลูเลสได้ (Ximenes et al., 2010) ทำให้ในระหว่างกระบวนการผลิตไบโอเอทานอลต้องมีการจำกัด

ลิกนินออกก่อนและจากข้อเสียในอุตสาหกรรมการผลิตไบโอเอทานอลนี้สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นข้อดีได้ในอีกอุตสาหกรรม นั่นคืออุตสาหกรรมการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ (Puupponen–Pimiä *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2007)

นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์ถึงโครงสร้างทางเคมีของลิกนิน พบว่ามีองค์ประกอบหลักเป็น สารประกอบฟีนอล ได้แก่ *p*-coumaryl alcohol (*p*-hydroxyphenyl propanol), coniferyl alcohol (guaiacyl propanol) และ sinapyl alcohol (syringyl alcohol) (Graf, 1992; Re *et al.*, 1999; González *et al.*, 2004) ซึ่งมีโครงสร้างแสดงดังภาพที่ 3 สารประกอบฟีนอลนี้มีความสัมพันธ์กับกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากสามารถให้ไฮโดรเจนอะตอม หรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ โดยที่ตัวเองยังคงอยู่ในรูปที่เสถียรได้ (Rice-Evans *et al.*, 1996; Barclay *et al.*, 1997) ทำให้สามารถใช้ลิกนินในกระบวนการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระได้เช่นเดียวกัน อีกทั้งปัจจุบันมีความต้องการใช้สารจากธรรมชาติเพื่อทดแทนการใช้สารสังเคราะห์ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ เช่น butylatedhydroxytoluene (BHT) และ butylatedhydroxyanisole (BHA) ซึ่งมีผลข้างเคียง คือทำให้เกิดเนื้องอกและมะเร็งในสิ่งมีชีวิต (Kahl and Kappus, 1993) สารต้านจุลินทรีย์สังเคราะห์ เช่น bambamycin, streptogramins และ bacitracin ซึ่งสหภาพยุโรปได้ห้ามใช้ผสมในอาหารสัตว์ ในเนื่องจากพบว่าทำให้มีสารเคมีตกค้างในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ทำให้ผู้บริโภคต้องอา (Dibner and Richards, 2005; European Commission, 2005) ด้วยเหตุนี้ทำให้ชาวอ้อยมีความน่าสนใจในการใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นในกระบวนการสกัดสารต้านจุลินทรีย์ และสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้อีกประการหนึ่ง

2. การปรับสภาพ (Pretreatment) วัตถุดิบลิกโนเซลลูโลส

เนื่องจากองค์ประกอบหลักของชาวอ้อยเป็นสารจำพวกลิกโนเซลลูโลส ซึ่งประกอบด้วย ลิกนิน เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ดังนั้นการปรับสภาพวัตถุดิบจึงเป็นกระบวนการที่สำคัญ เพื่อให้โครงสร้างเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินที่ยึดกันในโครงสร้างลิกโนเซลลูโลสแตกตัว (ภาพที่ 4) ส่งผลให้วัตถุดิบมีพื้นที่ผิวมากขึ้น และเอนไซม์หรือจุลินทรีย์สามารถเข้าถึงและย่อยวัสดุได้ง่ายขึ้น



ภาพที่ 4 การแตกโครงสร้างเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

ที่มา: Kumar *et al.* (2009)

การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสมีหลายวิธี ได้แก่ การระเบิดด้วยไอน้ำ (steam explosion), liquid hot water, green solvent, Ammonia Fiber Explosion (AFEX), Ammonia Recycle Percolation (ARP), Lime และ Supercritical fluid ซึ่งวิธีการปรับสภาพที่ต่างกันส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส ที่ต่างกันดังตารางที่ 2 ทั้งนี้วิธีที่เป็นที่นิยมในการปรับสภาพวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลมากที่สุด คือ การสกัดด้วยด่าง โดยกลไกการทำงานของด่างในการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลส คือ การเกิดปฏิกิริยาพอนนิเฟเคชันที่ทำให้พันธะเอสเทอร์ระหว่างโมเลกุลลิกนินและองค์ประกอบอื่น เช่น เฮมิเซลลูโลส เกิดการสลายตัว (Arni *et al.*, 2007) อีกทั้งการใช้หม้อนึ่งความดันสูงมีแนวโน้มในการสลายโครงสร้างของลิกนินได้เป็นผลิตภัณฑ์สารประกอบฟีนอล สำหรับปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสด้วยด่างร่วมกับหม้อนึ่งความดันสูงมีรายงานดังต่อไปนี้

ตารางที่ 2 ผลของวิธีการปรับสภาพแบบต่างๆ ต่อโครงสร้างทางเคมีและกายภาพของลิกโน-เซลลูโลส (H คือ มีผลมาก L คือ มีผลน้อย และ ND คือ ไม่ได้ทำการวิเคราะห์)

วิธีการปรับสภาพ	การเพิ่มพื้นที่ผิวของวัตถุดิบ	การสลายโครงสร้างผลึกของเซลลูโลส	การกำจัดเฮมิเซลลูโลส	การกำจัดลิกนิน	การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างลิกนิน
การระเปิดไอน้ำ	H		H		L
Liquid hot water	H	ND	H		L
Dilute acid	H		H		H
AFEX	H	H	L	H	H
ARP	H	H	L	H	H
Lime	H	ND	L	H	H
Green solvents	H	H	L	ขึ้นกับตัวทำละลายที่ใช้	L
Supercritical fluid	H	H	H		L

ที่มา: Brodeur *et al.* (2011)

Arni *et al.* (2007) แปรผันความเข้มข้นของ NaOH (0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 M) และอัตราส่วนของของแข็งต่อของเหลว (100, 50, 33 และ 20) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดลิกนินออกจากขานอ้อยด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 1 h ผลการทดลองพบว่า การใช้ NaOH ที่ความเข้มข้น 4.0 M ร่วมกับอัตราส่วนของของแข็งต่อของเหลวเท่ากับ 50 สามารถสกัดองค์ประกอบหลักอย่าง syringic acid, vanillin, p-coumaric acid และ ferulic acid ได้สูงที่สุด เท่ากับ 2.2, 3.1, 78 และ 19 mg/ml ตามลำดับ

Asgher *et al.* (2013) เปรียบเทียบการสกัดลิกนิน (Delignification) ออกจากตัวอย่างขานอ้อยด้วยการใช้ NaOH ความเข้มข้นต่างๆ หรือการย่อยด้วยเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโอไลติก (Ligninolytic enzyme) ที่ผลิตจาก *Pleurotus ostreatus* IBL-02 ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อการผลิตเอทานอล ผลการทดลองพบว่า การแช่ขานอ้อยใน NaOH ความเข้มข้น 4% (w/v) ร่วมกับการใช้หม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 30 min สามารถสกัดลิกนินได้สูงถึง 48.7%

ในขณะที่การย่อยชานอ้อยด้วยเอนไซม์ในกลุ่มลิกนินโกลติกปริมาณ 25 ml สามารถสกัดลิกนินได้ 33.5%

Panphan *et al.* (2014) เปรียบเทียบวิธีการเตรียมตัวอย่างเบื้องต้น (Pretreatment) ของหน่อและใบอ้อยเบื้องต้น โดยใช้หม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 1 h ก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อผลิตไบโอเอทานอล พบว่า การแช่ตัวอย่างใน NaOH ความเข้มข้น 2% (w/v) สามารถสกัดลิกนินออกจากตัวอย่างได้มากกว่า 3.68 เท่า เมื่อเทียบกับการแช่ใน H₂SO₄ ความเข้มข้น 2% (w/v) อีกทั้งยังแสดงประสิทธิภาพการเปลี่ยนโครงสร้างของเซลลูโลสให้กลายเป็นกลูโคสโดยเอนไซม์ได้เท่ากับ 79.06 และ 41.69% ตามลำดับ

Boonruangrod *et al.* (2016) ศึกษาประสิทธิภาพการสกัดลิกนินจากชานอ้อยด้วย NaOH ความเข้มข้น 1% (w/v) ด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 110 °C เป็นเวลา 1 h ผลการทดลองพบว่า อัตราส่วนของของแข็งต่อของเหลวที่เพิ่มขึ้นจาก 1 ต่อ 6 เป็น 1 ต่อ 12 ทำให้ปริมาณผลได้ของลิกนินมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยตัวอย่างชานอ้อยที่ไม่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำก่อนการสกัดให้ผลได้ของลิกนินมากกว่าชานอ้อยที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำ เท่ากับ 26.1 และ 22.1% (w/w น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ

ผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการปรับสภาพวัตถุดิบโดยใช้ต่างร่วมกับหม้อนึ่งความดันสูงพบว่า ประกอบด้วย 2 ปัจจัยที่สำคัญ คือ ความเข้มข้นต่าง และเวลาในการสกัด ซึ่งเป็นปัจจัยที่ทำการศึกษาในขั้นต่อไป

2.3. องค์ประกอบและสมบัติของสารสกัดจากชานอ้อย

สารประกอบฟีนอลเป็นพฤษเคมีกลุ่มสำคัญที่พบได้ในพืชทั่วไป ผัก ผลไม้ และเครื่องดื่มต่างๆ ได้แก่ ชา ไวน์แดง และโกโก้ (Cocoa) (Heim *et al.*, 2002; Balasundram *et al.*, 2006) โดยสารประกอบฟีนอลในพืชมีบทบาทในการเจริญ และแพร่พันธุ์ของพืช รวมถึงป้องกันจุลินทรีย์ก่อโรค และศัตรูพืชให้แก่พืช (Bravo, 1998) นอกจากนี้ยังส่งผลต่อสีและรสชาติของพืชอีกด้วย (Alasalvar *et al.*, 2001)

สารประกอบฟีนอลสามารถแบ่งได้หลายประเภทตามโครงสร้างทางเคมี แต่มีโครงสร้างพื้นฐานเป็นวงแหวนอะโรมาติก (Aromatic ring) จำนวนหนึ่งวงหรือมากกว่า และมีหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) อย่างน้อยหนึ่งหมู่ (อนุชิตา, 2555; Bravo, 1998) ซึ่งสารประกอบฟีนอลส่วนใหญ่ที่พบในพืชได้แสดงตามตารางที่ 3 โดยทำการจัดประเภทตามจำนวนอะตอมคาร์บอนของโครงสร้างพื้นฐาน ทั้งนี้

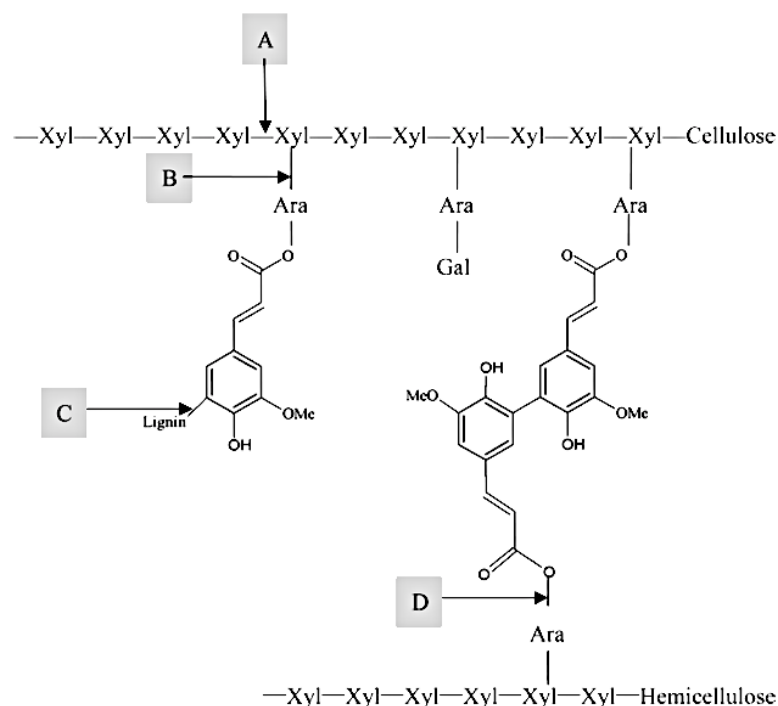
ลำดับ ตำแหน่ง และชนิดของหมู่แทนที่ (Substitution) มีอิทธิพลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (Radical scavenging activity) และกิจกรรมการแย่งจับกับโลหะ (Chelating activity) (Robard *et al.*, 1999; Beecher, 2003) ซึ่งสารประกอบฟีนอลที่พบได้ในธรรมชาติส่วนมากอยู่ในรูปไกลโคไซด์ (Glycoside) คือ มีน้ำตาลจับกับโมเลกุล ทำให้เพิ่มความสามารถการละลายน้ำ และก่อให้เกิดอนุพันธ์ เอสเทอร์ ซึ่งส่งผลให้กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระลดลง (Shahidi and Naczki, 1995; Harborne *et al.*, 1999) (อนุชิตา, 2555) นอกจากนี้ประเภทของสารประกอบฟีนอลที่เป็นกลุ่มหลักในอาหาร ได้แก่ กรดฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ (King and Young, 1999)

จากที่กล่าวมาข้างต้น เนื่องด้วยสารประกอบฟีนอลเป็นสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีหลายกลุ่ม ทำให้พบได้ในพืชทั่วไป ทั้งเมื่อวิเคราะห์โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลแล้ว พบว่ามีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่ส่งผลดีต่อสุขภาพ และป้องกันโรคต่างๆในมนุษย์ ดังนั้นปัจจุบันจึงมีการศึกษาพืชที่เป็นแหล่งของสารประกอบฟีนอลอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะส่วนของพืชที่เป็นผลพลอยได้ และวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตร เช่น เปลือกถั่วพิสตาชิโอ (Goli *et al.*, 2005) กากแอปเปิ้ล (Schieber *et al.*, 2003) เมล็ดองุ่น (Shrinkhande, 2000) ใบมัลเบอร์รี่ (Chen and Li, 2007) ใบไผ่ (Lu *et al.*, 2011) และใบอ้อย (Lee *et al.*, 2012) เป็นต้น เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัตถุดิบเหล่านั้น และสอดคล้องกับอุตสาหกรรมที่สำคัญในประเทศไทย พบว่า ปริมาณขานอ้อยเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ได้จากอุตสาหกรรมผลิตน้ำตาล ซึ่งแต่ละปีมีขานอ้อยเหลือทิ้งสูงถึง 30 ล้านตันต่อปี (วิวัฒน์ และนิคม, ม.ป.ป.) ซึ่งเมื่อพิจารณาโครงสร้างลิโนเซลลูโลสของขานอ้อย พบว่า เมื่อผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำจะเกิดการแตกตัวเนื่องมาจากปฏิกิริยา hydrolysis ของพันธะ glycosidic ของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส และปฏิกิริยา depolymerization ของลิกนิน ที่พันธะ β -O-4 ether และพันธะที่เชื่อมโยงกรดอื่นๆ ดังที่แสดงในภาพที่ 5 การแตกตัวของลิกนินทำให้ได้สารประกอบฟีนอลหลักๆ เช่น *p*-coumaric acid, sinapic acid และ ferulic acid เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 6 (Gong *et al.*, 2012)

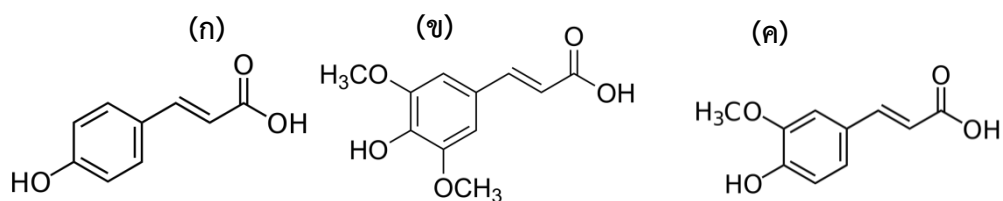
ตารางที่ 3 การแบ่งประเภทของสารประกอบฟีนอลที่พบในพืชตามจำนวนอะตอมของคาร์บอน

Number of carbon atoms	Basic skeleton	Class	Example
6	C ₆	Simple phenols Benzoquinones	Catechol, hydroquinone 2,6-Dimethoxybenzoquinone
7	C ₆ -C ₁	Phenolic acids	Gallic acid, salicylic
8	C ₆ -C ₂	Acetophenones Tyrosine derivatives Phenylacetic acids	3-Acetyl-6-methoxybenzaldehyde Tyrosol p-Hydroxyphenylacetic
9	C ₆ -C ₃	Hydroxycinnamic acids Phenylpropenes Coumarins Isocoumarins Chromones	Caffeic, ferulic Myristicin, eugenol Umbelliferone, aesculetin Bergenon Eugenin
10	C ₆ -C ₄	Naphthoquinones	Juglone, plumbagin
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xanthones	Mangiferin
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbenes Anthraquinones	Resveratrol Emodin
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoids Isoflavonoids	Quercetin, cyaniding Genistein
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignans Neolignans	Pinoresinol Eusiderin
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoids	Amentoflavone
N	(C ₆ -C ₃) _n	ลิกนิน	
	(C ₆) _n	Catechol melanins	
	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Flavolans(Condensed tannins)	

ที่มา : ดัดแปลงจาก Harborne (1980)



ภาพที่ 5 การสลายตัวขององค์ประกอบลิกนิน-phenol-เซลลูโลส/เฮมิเซลลูโลส ภายใต้สภาวะการ
ระเบิดไอน้ำ A และ B คือ พันธะ glycosidic C คือ พันธะ ether และ D คือ พันธะ ester
ที่มา : Gong *et al.* (2012)



ภาพที่ 6 สารประกอบฟีนอลที่ได้จากการแตกโครงสร้างของลิกนิน (ก) *p*-coumaric acid (ข) sinapic
acid (ค) ferulic acid
ที่มา: Wikipidea (2016)

ทั้งนี้มีการศึกษาที่พบว่าอ้อยเป็นแหล่งของกรดฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ในกลุ่มฟลาโวนส์ (Smith and Paton, 1985) ซึ่งจากงานวิจัยของ Xu และคณะ (2005) ทำการศึกษาและวิเคราะห์องค์ประกอบสารประกอบฟีนอลในผนังเซลล์ของชานอ้อยที่ได้จากการสกัดด้วย NaOH ความเข้มข้น 1 M ที่อุณหภูมิ 20 – 40 °C เป็นเวลา 18 h พบว่า สารสกัดที่ได้เป็น ester-linked *p*-coumaric acid ปริมาณ 48.8% และ esterified ferulic acid ปริมาณ 43.8%

Zhao และคณะ (2015) ทำการสกัดขานอ้อยด้วยวิธี maceration โดยใช้ ethanol ความเข้มข้น 70% (v/v) พบว่าสารสกัดที่ได้มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหาร ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* และ *Salomonella Typhimurium* และเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบด้วย HPLC พบว่ามีสารประกอบฟีนอลหลายชนิด ได้แก่ gallic acid, protocatechic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, vanillic acid, chlorogenic acid, coumaric acid, ferulic acid และ sinapic acid

Koolen และคณะ (2013) พบว่า ในขานอ้อยมีสารในกลุ่มของฟลาโวนอยด์ที่เป็น glycoside เช่น tricin-4'-O-(erythro)ether-7O-glucopyranoside และ tricin-4'-O-(threoguai-acylglyceryl) ether-7O-glucopyranoside เป็นต้น (Colombo *et al.*, 2006) ซึ่งสารเหล่านี้มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระและต้านจุลินทรีย์

2.4.2. สมบัติของสารสกัดจากขานอ้อย

ดังที่ได้กล่าวมาเบื้องต้น พบว่า องค์ประกอบของขานอ้อยเป็นแหล่งของสารประกอบฟีนอล ซึ่งสารประกอบฟีนอลสามารถเสริมสุขภาพของคน โดยมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระสามารถแข่งกับ โลหะ (Heim *et al.*, 2002) ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมัน LDL (Low-density lipoprotein) (Mazur *et al.*, 1999) ยับยั้งการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งตัว (Manarch *et al.*, 2005) ยับยั้งการเกิดโรคหัวใจ (Yochum *et al.*, 1999) และยับยั้งการเจริญของเนื้องอก (Kandaswami *et al.*, 2005) รวมถึงด้านการอักเสบ (Middleton *et al.*, 2000) ด้านการกลายพันธุ์ ด้านมะเร็ง และลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ (Patel, 2008) ด้วยคุณสมบัติเหล่านี้จึงเป็นสาเหตุให้มีการใช้สารประกอบฟีนอลเป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ยา และเครื่องสำอางในปัจจุบัน โดยในงานวิจัยนี้สนใจคุณสมบัติของสารสกัดจากขานอ้อย 2 ด้าน คือ คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ และต้านจุลินทรีย์

2.4.2.1 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

อนุมูลอิสระ (free radical) คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนไม่เป็นคู่อยู่ในวงอิเล็กตรอนวงนอกสุด (outer orbital) ทำให้โมเลกุลไม่เสถียร อนุมูลอิสระจึงเป็นสารที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก โดยอนุมูลอิสระสามารถไปแย่งจับหรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมสารที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระชนิดใหม่ ซึ่งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นใหม่นี้สามารถทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลอื่นต่อไป เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ต่อกันไปเรื่อยๆ (Halliwell, 1991) ดังนั้นอนุมูลอิสระจึงเป็นสาเหตุของโรคต่างๆ มากมาย เช่น โรคทางระบบหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular

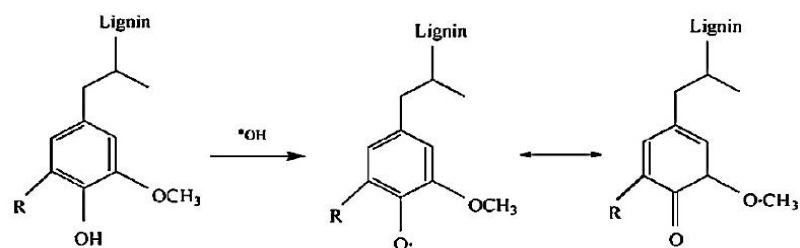
diseases) โรคมะเร็ง (cancer) โรคทางระบบภูมิคุ้มกัน (immune diseases) และภาวะชราภาพ (aging process) เป็นต้น (พรทิพย์, ม.ป.ป.) เป็นเหตุให้นักวิจัยหลายรายทำการการศึกษาเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ ซึ่งในปัจจุบันมีความต้องการสารเหล่านี้จากธรรมชาติเพื่อใช้ทดแทนสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์

สารต้านอนุมูลอิสระ หรือสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) คือสารที่สามารถยับยั้งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) เช่น การเกิดออกซิเดชันของลิพิด (lipid oxidation) และปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (enzymatic browning reaction) เป็นต้น โดยมีการศึกษาว่าสารประกอบฟีนอลิกนั้นมีความสามารถต้านออกซิเดชันได้ (Green, 2007) ซึ่งสอดคล้องกับองค์ประกอบทางเคมีของลิกนินที่ต้องการศึกษาความสามารถต้านออกซิเดชันของสารประกอบฟีนอลมีกลไกการเกิดปฏิกิริยาอยู่ 3 กลไก ดังนี้

1. ความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระ (scavenging free radical) สารที่สามารถจับกับอนุมูลอิสระของสารประกอบฟีนอลเกี่ยวกับการที่สารประกอบฟีนอลสามารถให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระแล้วสารประกอบฟีนอลก็จะเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลฟีนอล (phenol radicals) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีความคงตัวเนื่องจากอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวเกิดการ resonance-stabilized delocalization ภายในวงอะโรมาติกดังนั้นอนุมูลฟีนอลจึงเกิดปฏิกิริยาต่อยอดซึ่งเป็นการชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งแสดงดังภาพที่ 7

2. ความสามารถในการจับกับโลหะ (chelating transition-metals) สารประกอบฟีนอลสามารถจับกับโลหะซึ่งเป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยกรดฟีนอลและฟลาโวนอยด์สามารถเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับเหล็กและคอปเปอร์ไอออนได้

3. ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เป็นตัวเร่งให้เกิดอนุมูลอิสระได้เช่นไนตริกออกไซด์ซินเทส ไทโรซีนไคเนสและแซนทีนออกซิเดส



ภาพที่ 7 กลไกการดักจับและความคงตัวของอนุมูล hydroxyl โดยลิกนิน

ที่มา: Li and Ge (2012)

การวัดกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับกลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระต่ออนุมูลอิสระ ซึ่งงานวิจัยนี้ใช้การทดสอบ 2 วิธี คือ

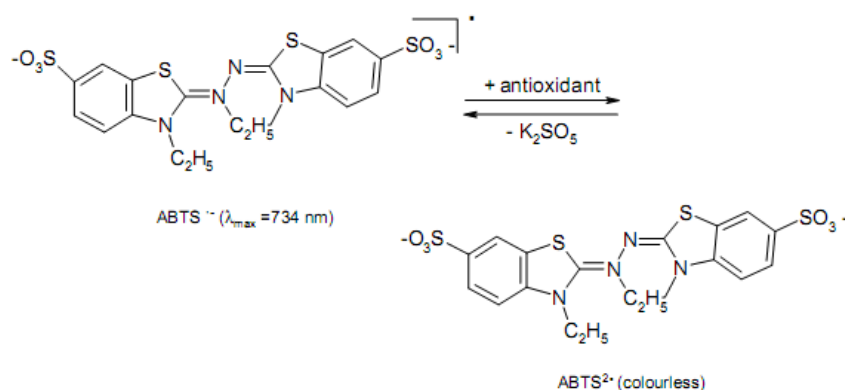
1. ปริมาณฟีนอลโดยรวม (Total phenol content) ตามวิธีของ Folin and Ciocalteu

การวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดวิธีการนี้เป็นการวัดความสามารถในการรีดิวซ์ของสารหลักการคือสารประกอบฟีนอลสามารถเกิดปฏิกิริยากับโพลินซีโอเคาเทล (Folin-Ciocalteu reagent; FCR) ภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง (เมื่อเติมด้วยโซเดียมคาร์บอเนตซึ่งมีความเป็นกรด-ด่างประมาณ 10) สารประกอบฟีนอลจะเกิดการแตกตัวได้เป็นฟีนอเลทแอนไอออน (phenolate anion) สามารถรีดิวซ์โพลินซีโอเคาเทลทำให้เกิดสารประกอบที่ให้สีน้ำเงินทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลโดยรวม แต่อย่างไรก็ตามสารต้านอนุมูลอิสระไม่จำเป็นต้องเป็นต้องเป็นสารประกอบฟีนอลทั้งหมด ดังนั้นจึงต้องมีการวิเคราะห์โดยวิธีอื่นควบคู่ไปด้วย

2. วิธี Scavenging activity of ABTS radical (โอภา, 2549; Re *et al.*, 1999)

วิธีนี้เป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระโดยรวม (total antioxidant activity) โดยอาศัยกลไกในการส่งผ่านอิเล็กตรอนไปรีดิวซ์สารอื่น ซึ่งเป็นวิธีทางอ้อมในการวัดความสามารถในการขจัดอนุมูล $ABTS^{+•}$ (2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthi-azoline-6-sulphonic acid)) ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารขึ้นอยู่กับความสามารถของตัวอย่างทดสอบในการขจัดอนุมูล $ABTS^{+•}$ ดังภาพที่ 8

ข้อดีของวิธีนี้ คือ ความไม่ซับซ้อนและทำได้ง่าย โดยอนุมูล $ABTS^{+•}$ ทำปฏิกิริยาอย่างรวดเร็วกับสารต้านอนุมูลอิสระ การวิเคราะห์ทำได้ในช่วงพีเอชกว้าง ทำให้สามารถศึกษาผลได้โดยละเอียด นอกจากนั้นอนุมูล $ABTS^{+•}$ ยังสามารถละลายได้ทั้งในน้ำและสารทำละลายอินทรีย์ได้อีกด้วย จึงทำให้ง่ายต่อการศึกษา ส่วนข้อเสียของวิธีนี้คือ ABTS ไม่เป็นสารตามธรรมชาติที่ก่อให้เกิดอนุมูลในเซลล์หรือร่างกาย ดังนั้นฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ *in vitro* โดยวิธีนี้ อาจไม่สะท้อนถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แท้จริงทั้งหมดของสารทดสอบ เมื่อสารทดสอบนี้อยู่ในร่างกายคน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียดังกล่าวแล้ว พบว่าการทดสอบโดยวิธี ABTS assays มีความเหมาะสมในการใช้ทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากพืชจากชาอู่ยง



ภาพที่ 8 ปฏิกิริยาของอนุมูล $ABTS^{\cdot+}$ ในสถานะที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ ในการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารทดสอบโดยวิธี ABTS assays
ที่มา : Zulueta *et al.* (2009)

กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากธรรมชาติโดยทั่วไปเกิดจากโครงสร้างของส่วนที่เป็นสารประกอบฟีนอลและสารประกอบฟลาโวนอยด์ (Katalinic *et al.*, 2006) เนื่องจากสารเหล่านี้มีความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระทำให้อนุมูลอิสระอยู่ในรูปที่เสถียร (Rice-Evans *et al.*, 1996) ซึ่งคลื่นเหนือเสียงมีบทบาทในการช่วยสกัดสารประกอบฟีนอลในด้านการเพิ่มประสิทธิภาพของการสกัดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีแบบดั้งเดิมอื่นๆ (Vilkhu *et al.*, 2008) จากการสืบค้นข้อมูลพบว่า ในลิกนินซึ่งเป็นองค์ประกอบในขานอ้อยนั้นเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติของฟีนอลิก (natural phenolic polymer) ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่มีคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ (Fengel and Wegener, 1989) อย่างไรก็ตามคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระนั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ สภาพการปลูก และกรรมวิธีในการสกัด เป็นต้น (Li and Ge, 2012) นอกจากนี้มีงานวิจัยจำนวนมากศึกษาถึงความเป็นไปได้ที่นำลิกนินที่สกัดได้จากวัตถุดิบทางธรรมชาติ อาทิเช่น ชังข้าวโพด (Dong *et al.*, 2011) ต้นป๊อปลาร์สายพันธุ์ผสม (Hybrid poplar) (Pan *et al.*, 2006) ชาเขียว (Toh *et al.*, 2010) แกลบ (Salanti *et al.*, 2010) และ น้ำดำจากอุตสาหกรรมการผลิตกระดาษ (Black liquor) (Faustino *et al.*, 2010) เพื่อใช้ประโยชน์ทางด้านกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ แต่ข้อมูลสำหรับการใช้ประโยชน์ของลิกนินจากขานอ้อยยังมีอยู่น้อย จึงทำให้งานวิจัยนี้สนใจที่หาสถานะที่เหมาะสมต่อการสกัดสารที่มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระจากขานอ้อย

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างขานอ้อย

นำขานอ้อยที่ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทเกษตรไทย อินเตอร์เนชั่นแนล ชูการ์ คอร์ปอเรชั่น จำกัด มาล้างสิ่งสกปรกด้วยน้ำ ตากแดดเป็นเวลา 3 h ก่อนอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C จนมีความชื้นไม่เกิน 2% จากนั้นลดขนาดขานอ้อยจนมีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 0.125 mm จัดเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

2. การสกัดขานอ้อยในสภาวะต่างด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave)

สกัดสารพฤษเคมีจากขานอ้อยในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่อัตราส่วนของแข็งต่อของเหลวเท่ากับ 1 ต่อ 50 ด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 lb_f/in² ความเข้มข้นต่าง 0.25 M เป็นเวลา 30 min จากนั้นกรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรองไนลอนขนาดรูพรุน 0.45 µm ปรับความเป็นกรดต่างของสารสกัดให้เท่ากับ 2 เพื่อตกตะกอนลิพิด กรองสารสกัดที่ได้ด้วยกระดาษกรองไนลอนขนาดรูพรุน 0.45 µm เก็บสารสกัดในขวดสีชาที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อรอการวิเคราะห์สมบัติทางเคมี

3. การแยกสารประกอบฟีนอลด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

แยกสารประกอบฟีนอลออกจากสารสกัดหยาบด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคตามวิธีการของ Chetana และคณะ (2007) ที่มีการดัดแปลงเล็กน้อย เริ่มจากศึกษาความเข้มข้นของเอทานอล (14 – 22% (w/w)) และไดโพลแทสเซียมฟอสเฟต (18 – 26 % (w/w)) ที่ทำให้สารละลายแบ่งเป็น 2 ส่วน ก่อนเติมสารสกัดขานอ้อย และผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนสารละลายเป็นเวลา 1.5 h แยกสารละลายแต่ละวัฏภาค และวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของสารละลายที่ได้ในแต่ละชั้น

4. การวิเคราะห์สมบัติทางเคมีของสารพฤกษเคมีจากชานอ้อย

4.1 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (TCC)

วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid โดยดัดแปลงจาก Dubois และคณะ (1956) ทำการทดลองโดยผสมสารเจือจางของตัวอย่างที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมในปริมาณ 1 ml กับ สารละลายฟีนอล 5% (w/v) ปริมาตร 0.5 ml ผสมให้เข้ากัน เติม Sulfuric acid ปริมาตร 5 ml ผสมให้เข้ากันอีกครั้ง บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 95 °C เป็นเวลา 10 min เพื่อให้ทำปฏิกิริยาสมบูรณ์ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 485 nm คำนวณปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดในหน่วย mg glucose equivalents (GE)/g ชานอ้อย โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของ Glucose

4.2 การวิเคราะห์กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี ABTS radical scavenging activities

วิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) ที่ดัดแปลงจากวิธีของ Re และคณะ (1999) เริ่มจากเตรียม ABTS radical stock solution โดยใช้ ABTS ความเข้มข้น 7 mM และโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 2.45 mM ผสมกันในส่วน 1 ต่อ 0.5 โดยปริมาตร บ่มในที่มืดเป็นเวลา 16 h จนได้เป็น ABTS^{•+} solution ซึ่งมีสีน้ำเงินเขียว เมื่อใช้งานเจือจางด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer saline, PBS) จนได้ค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.700 ± 0.020 ที่ความยาวคลื่น 734 nm ผสมตัวอย่างปริมาตร 20 μ m กับสารละลาย ABTS^{•+} ปริมาตร 2 ml ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้เป็นเวลา 6 min ในที่มืด แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง คำนวณค่ากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดในหน่วย mg Trolox equivalents (TE)/g ชานอ้อย โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของ Trolox

4.3 การวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Oxygen radical absorption capacity (ORAC)

ตรวจสอบความสามารถของตัวอย่างในการยับยั้งอนุมูลอิสระเปอร์ออกไซด์ที่สร้างโดย 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH) ตามวิธีของ Huang et al. (2002) เริ่มจากการเติมตัวอย่างปริมาณ 25 μ l ลงในไมโครเวลเพลท (microwell plate) ที่มี 50 μ M Trolox และ 75 mM phosphate buffer pH 7.4 เป็นสารมาตรฐานและสารควบคุม ตามลำดับ เติม 150 μ l fluorescein (FL) และบ่มไมโครเวลเพลทที่อุณหภูมิ 37 ± 1 °C เป็นเวลา 10 นาที ในเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในไมโครเพลท (Microplate Reader, Synergy HTX, Biotek, USA) จากนั้นเติม 25 μ l AAPH ก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 และ 538 nm โดยมีช่วงรังสีตกกระทบที่

485 nm ทุกๆ 1 นาที จนครบ 90 นาที คำนวณค่า oxygen radical absorption capacity (ORAC) จากพื้นที่ใต้กราฟระหว่างค่า FL และเวลา เพื่อเทียบกับความเข้มข้นมาตรฐาน Trolox ได้ค่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในหน่วยของ $\mu\text{mol Trolox Equivalent (TE)}/\text{g extracts}$

4.4 การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (Total phenolic content, TPC)

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric ตามวิธีของ Slinkard และ Singleton (1977) เริ่มจากผสมสารละลายตัวอย่างปริมาณ 0.2 ml กับ Folin-Ciocalteu reagent ความเข้มข้น 0.2 N ปริมาตร 0.8 ml บ่มในที่มืดเป็นเวลา 20 min เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 8.5% (w/v) ปริมาตร 1 ml บ่มเป็นเวลา 90 min วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 nm คำนวณปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในหน่วย mg Gallic acid equivalents (GAE)/g ขานอ้อย โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของ Gallic acid

4.5 วิเคราะห์ความเป็นพิษของไมโครแคปซูลพฤษเคมีสารสกัดจากขานอ้อยที่ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ

ทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน (acute oral toxicity) ของสารสกัดขานอ้อยระบบหลังผ่านระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลเข้ม ตามวิธีมาตรฐานสากลของ Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) 423 ที่ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ (National laboratory animal center) มหาวิทยาลัยมหิดล เริ่มจากแบ่งกลุ่มหนูขาว (*Rattus norvegicus*) เพศเมีย อายุ 6 - 8 สัปดาห์ น้ำหนัก 195 - 208 กรัม เป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว กลุ่มแรกป้อนสารสกัดขานอ้อยปริมาณ 300 mg/kg body weight ติดตามอัตราการตายของหนูเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในกรณีที่ไม่มีหนูตายจึงป้อนสารสกัดให้หนูกลุ่มที่ 2 ที่ความเข้มข้น 300 mg/kg body weight และหากยังไม่พบการตายของหนูทดสอบจึงเพิ่มปริมาณสารสกัดในกลุ่มที่ 3 และ 4 ให้เป็น 2000 และ 2000 mg/kg body weight ตามลำดับ ดังแผนภาพการทดลองที่ 17 จากนั้นเฝ้าติดตามอาการหนูทดสอบทุกกลุ่มหลังป้อนสารเป็นเวลา 14 วัน ผลการทดลองไม่พบหนูตายตลอดระยะเวลาทดสอบ

5. การออกแบบการผลิตไมโครแคปซูลพฤษเคมีจากขานอ้อยโดยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย

การออกแบบการทดลองใช้ระเบียบวิธีวิจัยพหุคูณตอบสนองร่วมกับการวางแผนการทดลองแบบบ็อกซ์-เบห์นเคน (Box-Behnken design) โดยแปรผัน 3 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของเลซิติน ไคโตซาน และกรดออกซาลิก ปัจจัยละ 3 ระดับ รายละเอียดแสดงในตารางที่ 4 ซึ่งทำให้ได้จำนวนการทดลอง

ทั้งหมด 17 การทดลอง ที่ประกอบด้วย 12 factorial points และ 5 central points กำหนดค่าตอบสนองเป็นประสิทธิภาพการห่อหุ้มพฤษภาคม และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในรูปของค่า IC₅₀ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรและค่าตอบสนองในรูปสมการถดถอยตามแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ดังสมการที่ 1

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (1)$$

เมื่อ Y_i คือ ตัวแปรตอบสนอง β_0 คือ ค่าคงที่ β_1, β_2 และ β_3 คือ ค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้นตรง β_{11}, β_{22} และ β_{33} คือ ค่าสัมประสิทธิ์เชิงเส้นโค้ง และ β_{12}, β_{13} และ β_{23} คือ ค่าสัมประสิทธิ์เชิงปฏิสัมพันธ์ ค่าคงที่เหล่านี้คำนวณโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Minitab 16 (Minitab Inc., USA)

ตารางที่ 4 ตัวแปรอิสระ และระดับของตัวแปรอิสระ สำหรับกระบวนการทำแห้งสารสกัดจากชานอ้อยแบบพ่นฝอย

ตัวแปรอิสระ	ระดับของตัวแปรอิสระ		
	-1	0	+1
เลซิติน (%w/w)	0.10	0.45	0.80
ไคโตซาน (%w/w)	0.10	0.65	1.20
กรดออกซาลิก (%w/w)	0.00	0.10	0.20

6. การเตรียมอิมัลชันของสารสกัดจากชานอ้อยสำหรับการทำแห้งแบบพ่นฝอย

6.1 การเตรียมสารละลายเลซิตินและไคโตซานสำหรับการทำอิมัลชัน เลซิตินไคโตซาน

เตรียมสารละลายดัดแปลงจากวิธีของ Klinkesorn และคณะ (2006) เริ่มจากการเตรียมตัวทำละลาย ซึ่งได้แก่ สารละลายบัฟเฟอร์ระหว่างโซเดียมอะซิเตตและกรดแอซิดิก ความเข้มข้น 100 mM (pH 3) จากนั้นเตรียมสารละลายเลซิตินในตัวทำละลายดังกล่าว โดยเติมผงเลซิตินความเข้มข้นต่างๆ ลงในตัวทำละลาย กวนผสมด้วยเครื่องปั่นผสม (T18, IKA, Germany) ที่ความเร็ว 15,000 rpm เป็นเวลา 3 min จำนวน 3 รอบ ส่วนสารละลายไคโตซานเตรียมโดยละลายไคโตซานที่แปรผันความเข้มข้นต่างๆ ลงในตัวทำละลายดังกล่าว กวนผสมเป็นเวลา 30 min ขณะที่การเตรียมสารละลายมอลโตเดกซ์ตรินทำได้โดยละลายมอลโตเดกซ์ตรินความเข้มข้น 20 % (w/w) ลงในตัวทำละลาย กวนผสมที่ความเร็ว 600 rpm เป็นเวลา 30 min สารละลายทั้งสามชนิดถูกทำให้ปลอดเชื้อโดยการนิ่งในหม้อนึ่งความดันอุณหภูมิ 110 °C ความดัน 15 lb/in² เป็นเวลา 10 min

6.2 การเตรียมอิมัลชันของสารสกัดจากขานอ้อย

เริ่มจากการเตรียมอิมัลชันปฐมภูมิระหว่างเลซิติน (Ultralec P, Archer Daniels Midland, USA) และโคโตซาน (degree of deacetylation = 95%) กวนผสมด้วยความเร็ว 15000 rpm เป็นเวลา 3 min จำนวน 3 รอบ เชื่อมไขว้โคโตซานด้วยกรดออกซาลิก ปั่นผสมด้วยความเร็วรอบ 600 rpm เป็นเวลา 30 min ภายหลังการเติมน้ำตาลลง ทำให้ได้อิมัลชันทุติยภูมิ จากนั้นทำการผสมอิมัลชันทุติยภูมิกับสารละลายมอลโตเดกซ์ตรินความเข้มข้น 20% (w/v) ปั่นผสมด้วยความเร็ว 600 rpm เป็นเวลา 30 min ก่อนเติมสารสกัดขานอ้อยเพื่อให้ได้อิมัลชันสุดท้ายก่อนเข้าสู่กระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย

7. การผลิตไมโครแคปซูลของสารสกัดจากขานอ้อยด้วยการทำแห้งแบบพ่นฝอย

อิมัลชันของสารสกัดจากขานอ้อยที่เตรียมโดยวิธีในข้อ 6 ถูกทำให้เป็นไมโครแคปซูลที่มีลักษณะเป็นผงแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (Buchi-290, Buchi, Zwi terzerland) โดยใช้หัวฉีดแบบของไหลสองกระแส (two-fluid nozzle) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 ml กำหนดอุณหภูมิอากาศขาเข้า เท่ากับ 120 ± 2 °C อุณหภูมิอากาศขาออก เท่ากับ 70 ± 2 °C อัตราการป้อนอิมัลชัน 6 ml/min โดยอากาศและอิมัลชันไหลเข้าทิศทางเดียวกัน (co-current flow) เก็บไมโครแคปซูลของสารสกัดจากขานอ้อยที่ได้ในถุงอะลูมิเนียมโพลีเอทิลีน (aluminium-polyethylene bags) ที่อุณหภูมิ 4 ± 1 °C ก่อนวิเคราะห์ตัวอย่างในส่วนถัดไป

8. การวิเคราะห์สมบัติของไมโครแคปซูลสารสกัดจากขานอ้อย

8.1 ผลได้ (Yield)

ผลได้ของไมโครแคปซูลของสารสกัดจากขานอ้อยที่เตรียมจากกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย คำนวณจากสมการที่ (2)

$$\text{Yield (\%)} = \frac{W_P}{W_{TS}} \times 100 \quad (2)$$

เมื่อ W_P คือ น้ำหนักไมโครแคปซูลของสารสกัดจากขานอ้อย (g) W_{TS} คือ น้ำหนักของของแข็งทั้งหมดในอิมัลชันก่อนการทำแห้งแบบพ่นฝอย (g)

8.2 ประสิทธิภาพการห่อหุ้ม (Encapsulation efficiency)

ปลดปล่อยสารสกัดจากเนื้อเยื่อออกจากไมโครแคปซูล โดยปั่นผสมในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 3.0 เป็นเวลา 10 นาที ใช้อัตราส่วนระหว่างไมโครแคปซูลต่อสารละลาย เท่ากับ 1:10 w/v จากนั้นกรองแยกสารสกัดด้วยหัวกรองในลอนขนาดรูกรอง 0.22 μm วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลด้วยเทคนิค High-performance liquid chromatography จากนั้นคำนวณประสิทธิภาพการห่อหุ้มตามสมการ (3)

$$\text{Encapsulation efficiency (\%)} = \frac{P_F}{P_I} \times 100 \quad (3)$$

เมื่อ P_F คือ ปริมาณสารประกอบฟีนอลในอิมัลชัน (mg) และ P_I คือ ปริมาณสารประกอบฟีนอลในไมโครแคปซูล (mg)

8.3 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

วิเคราะห์ปริมาณความชื้นโดยวิธีคาร์ล ฟิชเชอร์ (Karl Fischer) ซึ่งอาศัยการทำปฏิกิริยาในการไทเทรชันระหว่างน้ำในตัวอย่างกับไฮดรานอล คอมโพสิต 5 โดยเมื่อปฏิกิริยาถึงจุดยุติจะสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลายตัวอย่างเป็นสีเดียวกับไอโอดีนอิสระที่เป็นองค์ประกอบของไฮดรานอล คอมโพสิต 5

8.4 ลักษณะพื้นผิวของไมโครแคปซูลและขนาด

วิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวของไมโครแคปซูลด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) ตามวิธีของ Sutaphanit และ Chitprasert (2014)

8.7 โครงสร้างทางเคมี

วิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของหมู่ฟังก์ชันที่เป็นองค์ประกอบของผงน้ำมันหอมระเหยด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) ดัดแปลงจากวิธีของ Altiok และคณะ (2010) โดยผสมผงตัวอย่างกับโพแทสเซียมโบรไมด์ วิเคราะห์ในช่วงเลขคลื่น 4,000 - 400 cm^{-1}

8.8 ทดสอบความคงตัวของสารสกัดขานอ้อยและไมโครแคปซูลภายใต้สภาวะภายใต้สภาวะ น้ำย่อยกระเพาะอาหารจำลอง

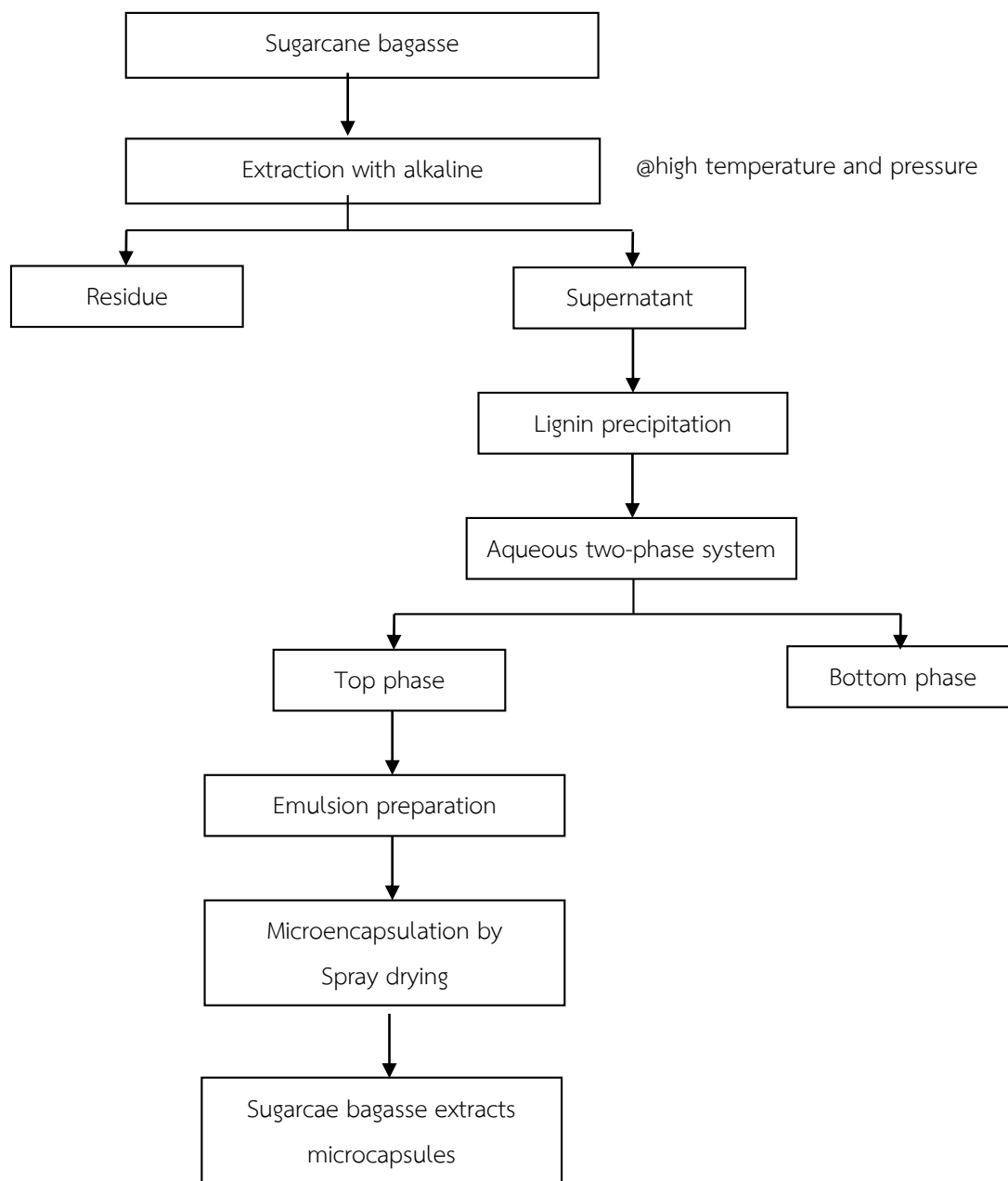
ตรวจสอบการปลดปล่อยสารสกัดขานอ้อยจากไมโครแคปซูลในระบบทางเดินอาหารมนุษย์
จำลองทั้งส่วนกระเพาะอาหารและลำไส้ตามวิธีของ Rajam และคณะ (2012) โดยน้ำย่อย 1 ลิตร
ประกอบไปด้วยโซเดียมคลอไรด์ 2 g และ ไฮโดรคลอริก 7 mL ปรับ pH ของระบบให้เท่ากับ 2 เก็บ
ตัวอย่างส่วนใสที่เวลา 0, 5, 15, 30, 60 และ 120 นาที เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

8.9 ตรวจสอบความคงตัวของผลิตภัณฑ์ไมโครแคปซูลพฤษเคมีสารสกัดจากขานอ้อย

ทำการเก็บรักษาไมโครแคปซูลพฤษเคมีสารสกัดจากขานอ้อยในถุงอะลูมิเนียมลามิเนต
(aluminium-polyethylene bags) ที่อุณหภูมิ $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ เป็นระยะเวลา 2 เดือน สุ่มตัวอย่างระหว่าง
การเก็บรักษามาวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

8. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

หาสภาวะการสกัดขานอ้อยด้วยต่างร่วมกับการใช้หม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ดีที่สุดผ่าน
การวางแผนแบบแฟคทอเรียล (Factorial design) และการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely
Randomized Design) ขึ้นต่อไป คือ การหาสภาวะการแยกสารประกอบฟีนอลด้วยระบบสารละลาย
น้ำสองวัฏภาคด้วยการวางแผนแบบทดลองทีละปัจจัย (One factor one time) โดยศึกษาความเข้มข้น
ของไดโพลเฮกซามีนฟอสเฟต (18 – 26 % (w/w)) และเอทานอล (14 – 22% (w/w)) ในขั้นสุดท้ายของ
งานวิจัยเพื่อขึ้นรูปผลิตภัณฑ์ไมโครแคปซูลโดยการทำให้แห้งแบบพ่นฝอยใช้การออกแบบด้วยวิธีระเบียบ
พินผิวตอบสนอง ทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ แสดงผลในรูปแบบของค่าเฉลี่ย (Mean) $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบน
มาตรฐาน (Standard deviation) วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) ที่
ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95% และความแตกต่างของข้อมูลแบบ Duncan's multiple range test
(DMRT) ด้วยโปรแกรม Statistics Package for the Social Sciences 17 (SPSS, SPSS Inc.)

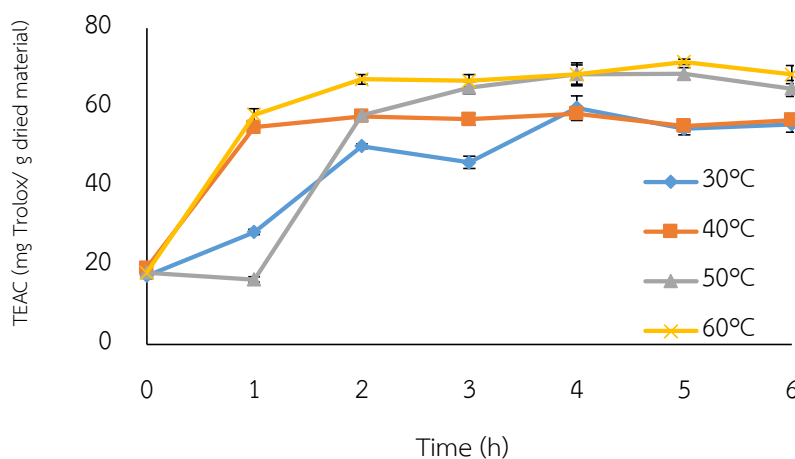


ภาพที่ 9 แผนผังการดำเนินโครงการ

บทที่ 4 ผลการศึกษาและอภิปรายผล

1. สารสกัดขานอ้อยที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดด้วยตัวทำละลายโดยการแช่เย็น (maceration)

จากโครงการวิจัยเรื่องการใช้คลื่นเหนือเสียงช่วยสกัดสารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านจุลินทรีย์จากขานอ้อยที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำ ภายใต้แผนงานวิจัยการสร้างมูลค่าเพิ่มแก่ขานอ้อยด้วยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2558 ที่ผ่านมา พบว่า สารสกัดพฤษเคมีจากขานอ้อยที่ผ่านการระเบิดด้วยไอน้ำและสกัดโดยใช้ตัวทำละลายที่มีคลื่นเหนือเสียงช่วยสกัดมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าวิตามินอี (α -tocopherol) และใกล้เคียงกับ butylated hydroxytoluene (BHT) แต่เนื่องจากแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์พฤษเคมีจากขานอ้อยดังกล่าวมีวัตถุประสงค์เพื่อมุ่งหวังในการสร้างเทคโนโลยีต้นแบบที่สามารถยกระดับสู่การผลิตในเชิงพาณิชย์ ดังนั้นโครงการวิจัยในปี 2559 จึงมีแนวทางขยายขนาดการผลิตสารสกัดสารพฤษเคมีจากขานอ้อยโดยใช้วิธีแช่เย็น (maceration) แทนการใช้คลื่นเหนือเสียงความถี่สูง โดยแปรผันเวลาและอุณหภูมิของการสกัดต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ผลการทดลองพบว่า สภาวะของการสกัดแบบแช่เย็นในเอทานอลที่ทำให้สารสกัดขานอ้อยมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด (TEAC) สูงที่สุด คือ การสกัดที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ภาพที่ 10) โดยการเพิ่มอุณหภูมิของการแช่เย็นส่งผลให้กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดขานอ้อยมีค่าเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เวลาการสกัดที่มากกว่า 2 ชั่วโมง ที่ทุกอุณหภูมิของการสกัดไม่ส่งผลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตลอดระยะเวลาการทดสอบ

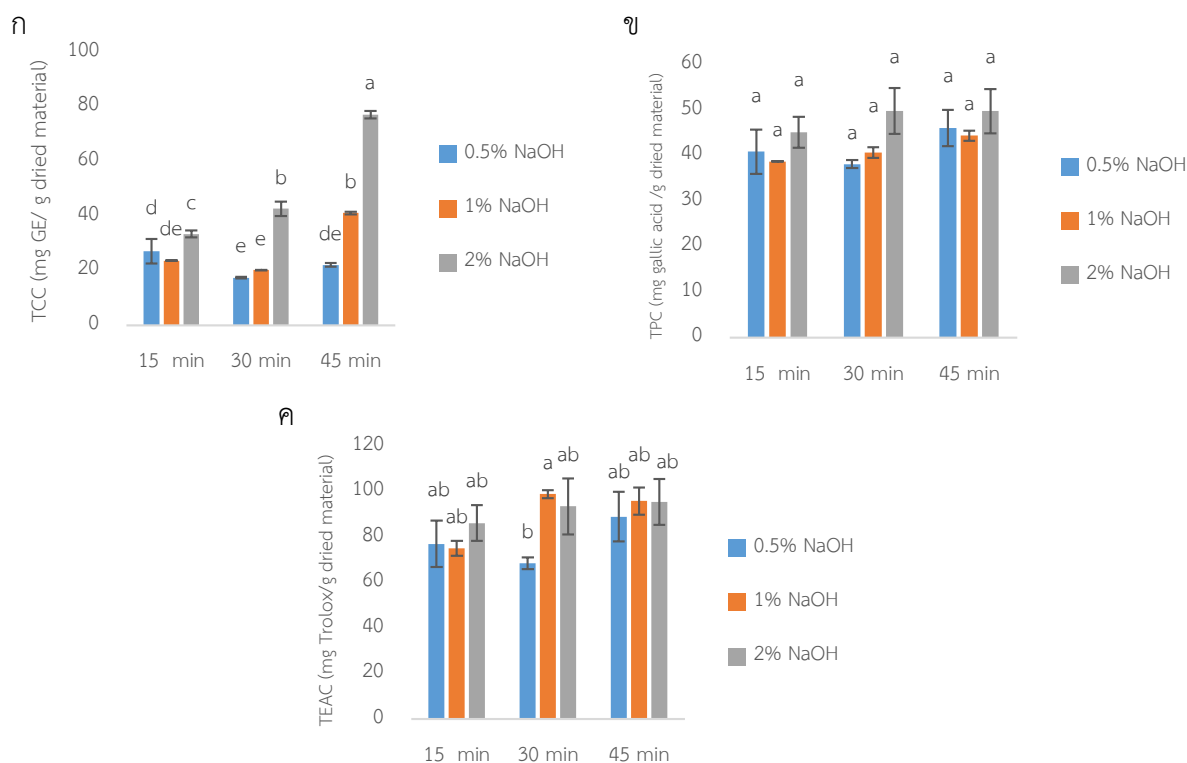


ภาพที่ 10 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด (TEAC) ของสารสกัดขานอ้อยที่สกัดโดยวิธีแช่เย็นที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60 °C เป็นเวลา 6 h

ผลกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด (TEAC) ของสารสกัดขานอ้อยที่สกัดด้วยคลีนเนื้อเสียงความถี่สูง และการแช่เย็น มีค่าเท่ากับ 69.20 ± 7.11 และ 67.12 ± 2.47 mg Trolox/g dried material ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังนั้นผลการทดลองดังกล่าวจึงสรุปได้ว่ากระบวนการสกัดพฤษเคมีจากขานอ้อยด้วยวิธีการแช่เย็นสามารถใช้ทดแทนการสกัดด้วยคลีนเนื้อเสียงความถี่สูงได้ แต่อย่างไรก็ตามวิธีการแช่เย็นมีข้อเสียที่ใช้เวลาการสกัดนาน ดังนั้นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการสกัดสารพฤษเคมีจากขานอ้อยที่สามารถประยุกต์ใช้ได้ในระดับอุตสาหกรรม คือ วิธีการใช้ต่างร่วมกับหม้อนึ่งความดัน ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้แรงดันและพลังงานสูงที่สามารถช่วยแตกโครงสร้างของลิกนินในขานอ้อย (Arni *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008; Maryana *et al.*, 2014)

2. การสกัดขานอ้อยในสถานะต่างด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave)

การสกัดขานอ้อยโดยใช้ต่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับหม้อนึ่งความดันสามารถแยกลิกนินออกจากโครงสร้างลิโนเซลลูโลสได้ผ่านทางปฏิกิริยาซาฟอนิฟิเคชัน (saponification) (Arni *et al.*, 2007; Karp *et al.*, 2013) อีกทั้งเป็นวิธีที่นิยมในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล เนื่องจากมีแนวทางปฏิบัติที่ง่าย ไม่ซับซ้อน และสามารถแยกลิกนินได้ในปริมาณสูง (Rocha *et al.*, 2012; Boonruangrod *et al.*, 2016) งานวิจัยนี้แปรผันความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ร่วมกับเวลาการสกัดในหม้อนึ่งความดัน ผลการทดลองพบว่า ณ เวลาของการสกัดที่เท่ากัน สารสกัดขานอ้อยมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของต่างที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 11) ส่วนปริมาณสารประกอบฟีนอลและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระมีแนวโน้มที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่ทุกสถานะของการทดสอบ อย่างไรก็ตามสถานะที่เหมาะสมของการสกัด คือ การใช้ต่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1% (w/v) ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 30 min ซึ่งเป็นสถานะที่ทำให้สารสกัดมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตน้อยที่สุด และสามารถแสดงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุด



ภาพที่ 11 สมบัติของสารสกัดขาน้อย; ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (ก) ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (ข) และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าสารมาตรฐาน trolox (ค) หลังการสกัดโดยต่างความเข้มข้น และเวลาต่าง ๆ ด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 °C

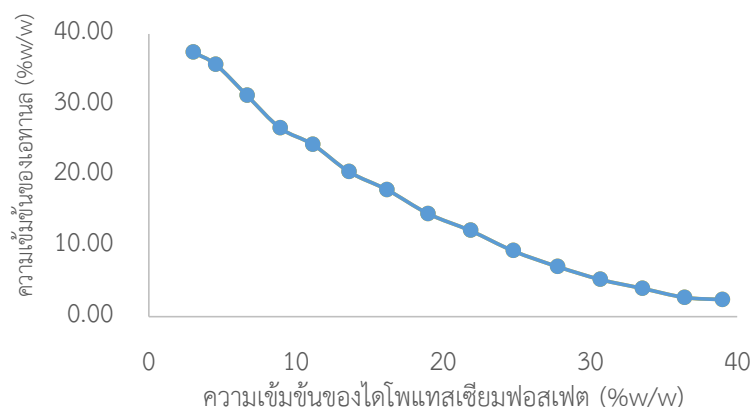
จากสถานะของการสกัดพืชเคมีจากขาน้อยด้วยต่างในหม้อนึ่งความดันที่ก่อให้เกิดปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่เป็นผลเสียต่อสมบัติทางเคมีของสารสกัด และการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์ไมโครแคปซูล ดังนั้นจึงเป็นที่มาของขั้นตอนการทำบริสุทธิ์สารสกัด โดยระบบการทำบริสุทธิ์สารสกัดด้วยสารละลายน้ำสองวัฏภาค (aqueous two phase extraction) เป็นวิธีง่าย ไม่ซับซ้อนเหมาะสมสำหรับการผลิตระดับอุตสาหกรรม มีประสิทธิภาพการทำบริสุทธิ์สูง ผลิตได้อย่างต่อเนื่องและในปริมาณมาก อีกทั้งยังมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำ (Xavier *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2015)

3. การแยกสารประกอบฟีนอลออกจากสิ่งเจือปนในสารสกัดขาน้อยด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคเป็นเทคนิคหนึ่ง que พัฒนา มาจากการสกัดของเหลวด้วยของเหลว (Liquid-liquid extraction) มีการใช้อย่างกว้างขวางในการแยก และทำบริสุทธิ์สารชีวโมเลกุล เนื่องจากสามารถสกัดและทำบริสุทธิ์สารสกัดได้ในขั้นตอนเดียว ไม่ซับซ้อนเหมาะสมสำหรับการผลิต

ระดับอุตสาหกรรม มีประสิทธิภาพการทำบริสุทธิ์สูง ผลิตได้อย่างต่อเนื่องและในปริมาณมาก อีกทั้งยังมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำ (Xavier *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2015) โดยงานวิจัยนี้ใช้ไดโพลเทสเซียมฟอสเฟตและเอทานอลเป็นระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคเพื่อแยกสารประกอบฟีนอลจากสารพิษเคมีขานอ้อยที่ผ่านการสกัดด้วยตัวทำละลายร่วมกับหม้อนึ่งความดัน ซึ่งสารประกอบฟีนอลที่ต้องการสามารถละลายอยู่ในชั้นของเอทานอลซึ่งเป็นวัฏภาคบน ส่วนสารปนเปื้อนอื่นๆ ที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ (Hydrophilic) เช่น น้ำตาล จะปรากฏในส่วนวัฏภาคล่างซึ่งเป็นชั้นของไดโพลเทสเซียมฟอสเฟต (Guo *et al.*, 2012)

แผนผังวัฏภาค (phase diagram) เป็นแผนผังที่ใช้ในการตัดสินใจเลือกความเข้มข้นของตัวทำละลายในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค เนื่องจากสาร 2 ชนิดสามารถแยกเป็น 2 วัฏภาคได้ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมเท่านั้น สำหรับการสร้างแผนผังวัฏภาคทำได้ด้วยวิธี Turbidity titration โดยแอลกอฮอล์สายสั้น เช่น เอทานอล สามารถทำให้สารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นต่างๆ เกิดความขุ่น (Zhang *et al.*, 2015) ผลการสร้างแผนผังวัฏภาค พบว่า การใช้สารละลายที่มีความเข้มข้นเหนือเส้นกราฟส่งผลให้เกิดระบบสารละลายสองวัฏภาค (ภาพที่ 12) ซึ่งวัฏภาคบนเป็นส่วนของเอทานอลมีความเข้มข้นสูงสุดประมาณ 37 % (w/w) และวัฏภาคล่างเป็นวัฏภาคของไดโพลเทสเซียมฟอสเฟตซึ่งมีความเข้มข้นสูงสุดประมาณ 39 % (w/w)

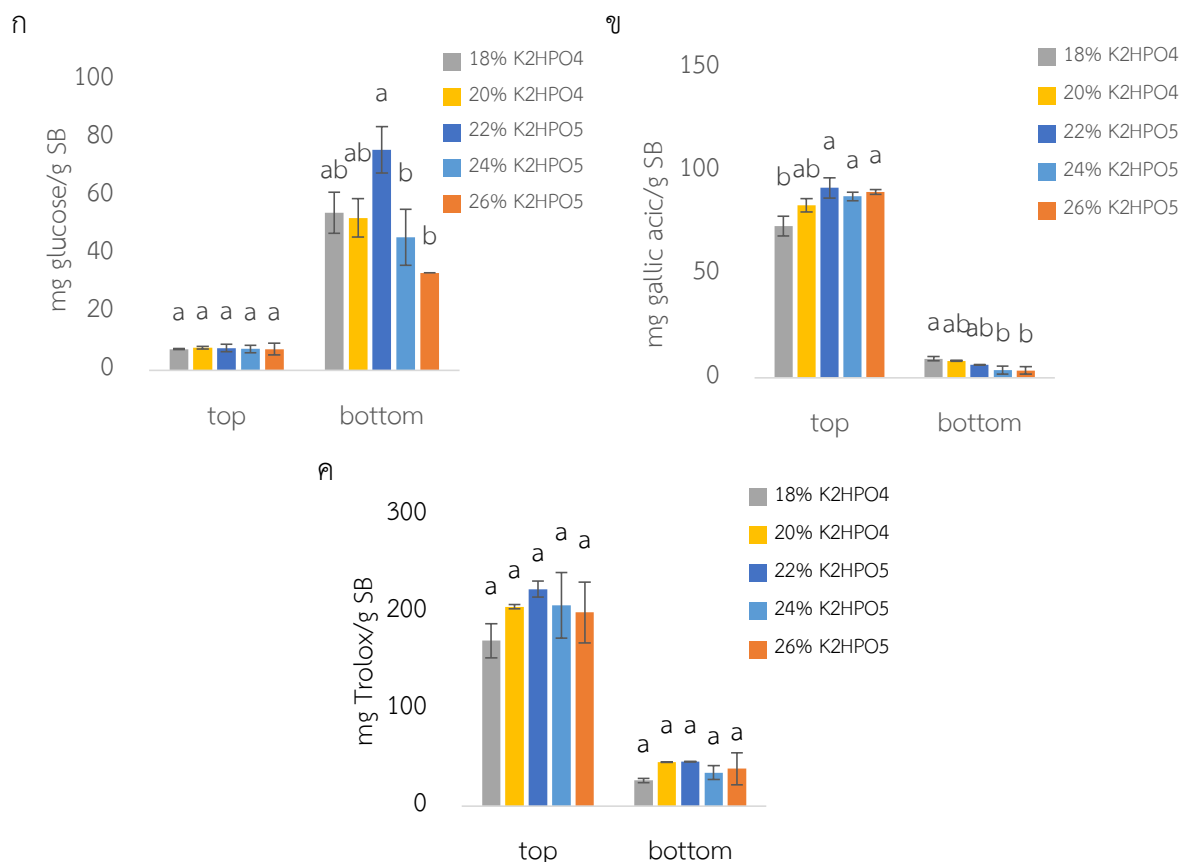


ภาพที่ 12 แผนผังวัฏภาค (phase diagram) ระหว่างไดโพลเทสเซียมฟอสเฟตและเอทานอล

การหาสภาวะในการแยกสารประกอบฟีนอลด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคใช้แผนการทดสอบทีละปัจจัย (One factor one time) เพื่อศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นตัวทำละลายที่เหมาะสม 2 ชนิด ได้แก่ ไดโพลเทสเซียมฟอสเฟตและเอทานอล ต่อประสิทธิภาพการทำบริสุทธิ์สารสกัด และการแยกสารประกอบฟีนอล โดยมุ่งหวังให้สารสกัดที่ได้มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดที่ไม่ผ่านระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค

3.1 ความเข้มข้นของไดโพลแซียมฟอสเฟตในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

ศึกษาอิทธิพลของไดโพลแซียมฟอสเฟตที่ความเข้มข้น 18, 20, 22, 24 และ 26 % (w/w) ซึ่งเป็นวัฏภาคล่าง และกำหนดให้ความเข้มข้นของเอทานอลมีค่าเท่ากับ 21 % (w/w) โดยมุ่งหวังให้สารประกอบฟีนอลจากชานอ้อยที่ต้องการสามารถละลายอยู่ในชั้นของเอทานอลให้มากที่สุด และมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตปนเปื้อนน้อยที่สุด ผลการทดลอง พบว่า การใช้ไดโพลแซียมฟอสเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ ไม่ส่งผลต่อปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดที่ปรากฏในวัฏภาคบนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีค่าประมาณ 7 – 8 mg glucose/ g dried material (ภาพที่ 13ก) ซึ่งลดลงจากสารสกัดเริ่มต้นที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดเท่ากับ 50.11 ± 3.61 glucose/ g dried material ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ทำให้สารสกัดส่วนบนที่ต้องการมีปริมาณสิ่งเจือปนลดลง

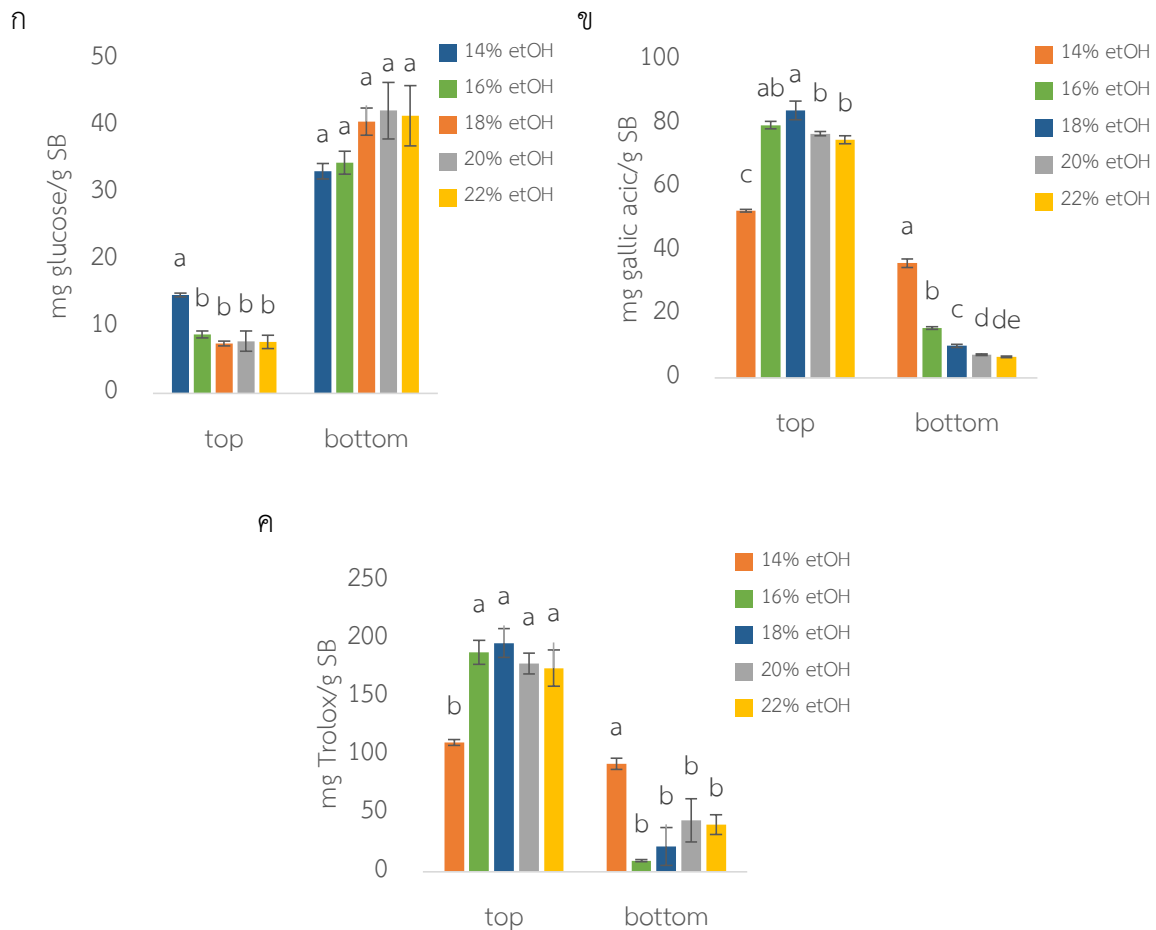


ภาพที่ 13 สมบัติของสารสกัดชานอ้อย; ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (ก) ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (ข) และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าสารมาตรฐาน trolox (ค) หลังผ่านระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ไดโพลแซียมฟอสเฟตความเข้มข้นต่างๆ

อย่างไรก็ตามการใช้ไดโพลีแซ็กคาไรด์โพสเฟตความเข้มข้นมากกว่า 20% (w/w) ส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดในวัฏภาคบนมีค่ามากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ประมาณ 83 – 90 mg gallic acid/g dried material (ภาพที่ 13ข) เนื่องจากความเข้มข้นของเกลือที่เพิ่มขึ้นส่งผลต่อการเกิดปรากฏการณ์ salting out และทำให้ความเข้มข้นของเอทานอลในระบบเพิ่มขึ้น ดังนั้นสารประกอบฟีนอลจึงสามารถแพร่ขึ้นไปยังวัฏภาคบนที่เป็นส่วนของเอทานอลได้ดี (Guo *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2017) ส่วนกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระมีแนวโน้มที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่ทุกสภาวะของการทดสอบ (ภาพที่ 13ค) ผลการทดลองข้างต้นสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของไดโพลีแซ็กคาไรด์โพสเฟตที่เหมาะสมสำหรับระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค คือ 20 % (w/w) ซึ่งเป็นสภาวะที่มีองค์ประกอบของสารประกอบฟีนอลสูงสุด มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตน้อยที่สุด และสามารถแสดงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระได้สูงสุด

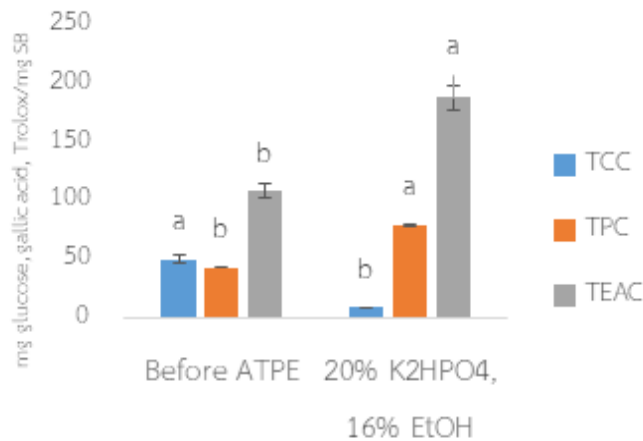
3.2 ความเข้มข้นของเอทานอลในระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ต่อปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

การทดลองนี้แปรผันความเข้มข้นของเอทานอลที่ 14, 16, 18, 20 และ 22% (w/w) ต่อประสิทธิภาพการแยกสารประกอบฟีนอลด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค โดยควบคุมความเข้มข้นของไดโพลีแซ็กคาไรด์โพสเฟต เท่ากับ 20% (w/v) ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมจากการทดลองก่อนหน้านี้ ผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของเอทานอลที่น้อยเกินไป (14% (w/w)) ส่งผลต่อปริมาณของตัวทำละลายในส่วนวัฏภาคบนและทำให้ความสามารถในการแยกสารของระบบจึงลดลง กล่าวคือ วัฏภาคบนจึงมีปริมาณน้ำตาลมากขึ้น (Wu *et al.*, 2011) โดยความเข้มข้นของเอทานอลที่ 18% (w/w) ส่งผลให้วัฏภาคบนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลสูงสุด ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับการใช้เอทานอลความเข้มข้น 16% (w/w) ที่มีปริมาณฟีนอลทั้งหมดในวัฏภาคบน เท่ากับ 84.35 ± 2.96 และ 79.66 ± 1.17 mg gallic acid/g dried material ตามลำดับ (ภาพที่ 14) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดในวัฏภาคบนที่ได้จากระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคสภาวะต่างๆ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่เหมาะสมต่อการแยกสารประกอบฟีนอลจากสารสกัดขานอ้อย คือ การใช้ไดโพลีแซ็กคาไรด์โพสเฟตและเอทานอลที่ความเข้มข้น 20 และ 16% (w/w) ตามลำดับ



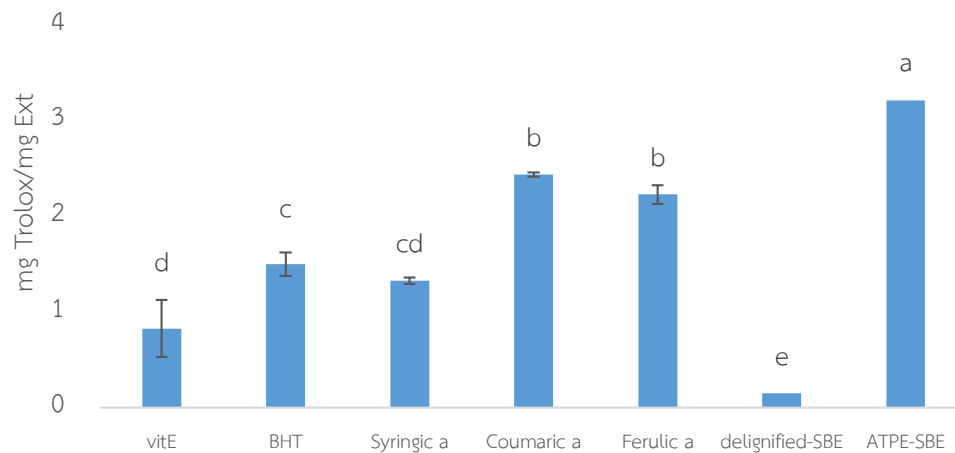
ภาพที่ 14 สมบัติของสารสกัดชานอ้อย; ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (ก) ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (ข) และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าสารมาตรฐาน trolox (ค) หลังผ่านระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่เอทานอลความเข้มข้นต่างๆ

ผลการใช้ระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่มีความเข้มข้นของไดโพลเฮกซามีนฟอสเฟตและเอทานอลเท่ากับ 20 และ 16% (w/w) ทำให้สารสกัดชานอ้อยที่ต้องการซึ่งอยู่ในวัฏภาคบนมีปริมาณสิ่งปนเปื้อนอย่างน้อยน้ำตาลลดลง (ภาพที่ 15) ปริมาณสารประกอบฟีนอลและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบสารสกัดชานอ้อยที่ไม่ผ่านระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค ซึ่งเป็นไปตามวัตถุประสงค์ของการทดลอง



ภาพที่ 15 สมบัติของสารสกัดขานอ้อย; ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (TCC) ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (TPC) และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าสารมาตรฐาน trolox (TEAC) ทั้งก่อนและหลังผ่านระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่สภาวะต่างๆ

วัตถุประสงค์หลักอย่างหนึ่งของงานวิจัย คือ มุ่งหวังให้สารสกัดพืชเคมีจากขานอ้อยที่ได้สามารถแสดงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าวิตามินอี และใกล้เคียงกับ butylated hydroxytoluene (BHT) ผลของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด (TEAC) พบว่า สารสกัดขานอ้อยที่สกัดด้วยต่างและผ่านการตกตะกอนลิกนิน (delinified-SBE) มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำกว่าสารมาตรฐานทั้ง 5 ชนิด (ภาพที่ 16) เนื่องจากการสกัดพืชเคมีจากขานอ้อยด้วยต่างในหม้อหนึ่งความดันก่อให้เกิดปริมาณคาร์โบไฮเดรตเป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นสิ่งเจือปนที่ผลเสียต่อสมบัติทางเคมีของสารสกัดและการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์ไมโครแคปซูล อย่างไรก็ตามกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดขานอ้อยมีค่าสูงขึ้นหลังการทำบริสุทธิ์ด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาค (ATPE-SBE) ส่งผลให้สารสกัดดังกล่าวมีค่า TEAC มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับสารมาตรฐานทั้งหมดและ delinified-SBE ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นความจำเป็นของการทำบริสุทธิ์สารสกัด โดยเมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดขานอ้อยด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) พบสารประกอบฟีนอลหลัก 3 ชนิด ได้แก่ Coumaric acid, Ferulic acid และ Syringic acid ซึ่งมีปริมาณ 0.85, 0.13 และ 0.01 mg/ml ตามลำดับ ทั้งนี้จากผล TEAC ของสารมาตรฐานสารประกอบฟีนอลทั้ง 3 ชนิด ทำให้สรุปได้ว่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของ ATPE-SBE มีอิทธิพลหลักมาจาก Coumaric acid

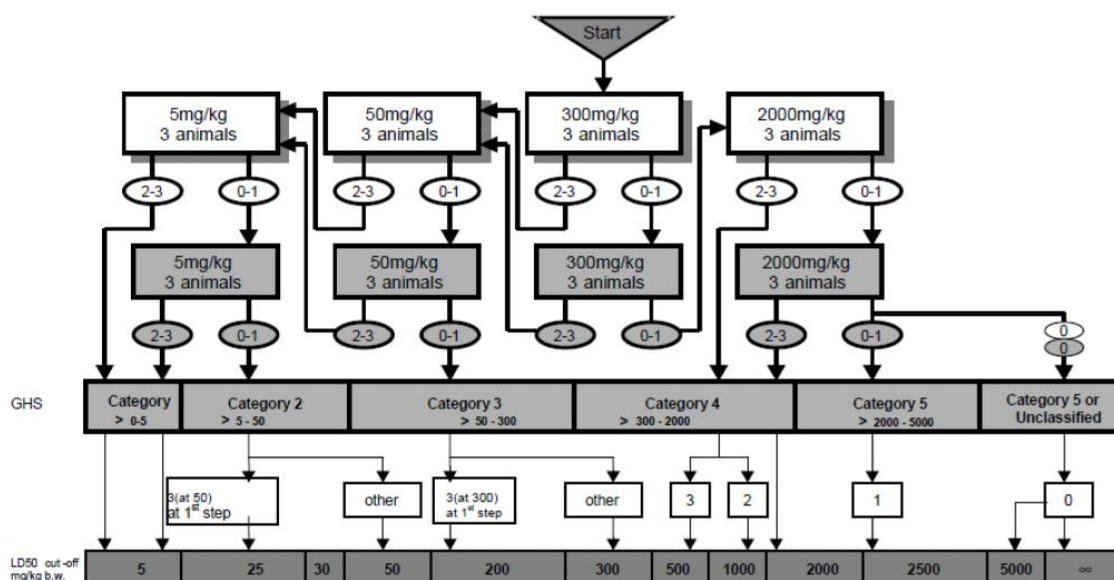


ภาพที่ 16 กิจกรรมการต้านสารอนุมูลอิสระเทียบเท่าสารมาตรฐาน trolox (TEAC) ของวิตามินอี BHT, Syringic acid, Coumaric acid, Ferulic acid สารสกัดชานอ้อยหลังการตกตะกอน ลิกนิน (delignified-SBE) และสารสกัดชานอ้อยหลังผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์ด้วยระบบ สารละลายน้ำสองวัฏภาค (ATPE-SBE)

4. การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดชานอ้อย

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดมีความสำคัญอย่างมากต่อการประเมินความเป็นไปได้ เพื่อประยุกต์ใช้สารในรูปแบบอาหารฟังก์ชัน (Matsuo *et al.*, 2012; Traesel *et al.*, 2014) งานวิจัยนี้ทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน (acute oral toxicity) ของสารสกัดชานอ้อยตามวิธี มาตรฐานสากลของ Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) 423 ที่ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ (National laboratory animal center) มหาวิทยาลัยมหิดล เริ่มจากแบ่งกลุ่มหนูขาว (*Rattus norvegicus*) เพศเมีย อายุ 6 - 8 สัปดาห์ น้ำหนัก 195 – 208 กรัม เป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว กลุ่มแรกป้อนสารสกัดชานอ้อยที่มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลเข้มในปริมาณ 300 mg/kg body weight ติดตามอัตราการตายของหนูเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในกรณีที่ไม่มีหนูตายจึง ป้อนสารสกัดให้หนูกลุ่มที่ 2 ที่ความเข้มข้น 300 mg/kg body weight และหากยังไม่พบการตายของ หนูทดสอบจึงเพิ่มปริมาณสารสกัดในกลุ่มที่ 3 และ 4 ให้เป็น 2000 และ 2000 mg/kg body weight ตามลำดับ ดังแผนภาพการทดลองที่ 17 จากนั้นเฝ้าติดตามอาการหนูทดสอบทุกกลุ่มหลังป้อนสาร เป็นเวลา 14 วัน ผลการทดลองไม่พบหนูตายตลอดระยะเวลาทดสอบ โดยสัตว์ทุกตัวไม่มีการ เปลี่ยนแปลงทางด้านพฤติกรรม เช่น การวิ่งวนซ้ำ (repetitive circling) และการทำร้ายตัวเอง (self-mutilation) เป็นต้น อีกทั้งไม่พบการเปลี่ยนแปลงของผิวหนัง ตา ขนตา การหายใจ รวมถึงการหลัง เยื่อเมือกและการชันสูตรในส่วนผลการผ่าซากหนูหลังการทดสอบ (necropsy examination) พบ เลือดออกในเนื้อเยื่อไทรอยด์และถุงน้ำในรังไข่ด้านขวาถุงน้ำซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.3×0.3

เซนติเมตร ในหนู 1 ตัว ที่ได้รับปริมาณขานอ้อย 300 mg/kg body weight แต่กลับไม่พบความผิดปกติในกลุ่มของหนูที่ได้รับ 2000 mg/kg body weight ดังนั้นสรุปได้ว่าสารสกัดขานอ้อยไม่มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่อหนูทดสอบ ส่วนการพบเลือดออกในเนื้อเยื่อและถุงน้ำเป็นเรื่องปกติสำหรับหนูทดลองตัวเมีย (Hobbie and Elmore, 2015; Kang *et al.*, 2016) ผลการทดลองนี้สามารถจัดให้สารสกัดขานอ้อยอยู่ในระบบการจำแนกความเป็นอันตรายของสารเคมีทั่วโลก Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS) ลำดับที่ 5 คือกลุ่มของสารที่มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่ำ (low acute toxicity hazard) หรืออาจส่งผลอันตรายต่อกลุ่มทดสอบที่ไม่แข็งแรง (vulnerable populations) (OECD 423, 2001) โดยแสดงค่าความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันทางปากที่ทำให้สัตว์ทดลองตายไปร้อยละ 50 ภายใน 14 วัน (LD₅₀ cut off) เท่ากับ 5,000 – ∞ mg/kg body weight



ภาพที่ 17 แผนผังการทดสอบความเป็นพิษของสัตว์ทดลองตามวิธีการมาตรฐาน OECD 423

5. การผลิตไมโครแคปซูลพฤษเคมีจากขานอ้อยโดยวิธีการทำแห้งแบบพ่นฝอย

หลังจากการศึกษาสภาวะการสกัดและการทำบริสุทธิ์สารพฤษเคมีจากขานอ้อยที่เหมาะสม ขั้นตอนต่อมา คือ การขึ้นรูปผลิตภัณฑ์ไมโครแคปซูลด้วยเทคนิคทำแห้งแบบพ่นฝอย งานวิจัยนี้เลือกใช้สารหล่อหุ้มผสมเลซิติน-โคโคซาน ซึ่งนิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา (Klinkesorn *et al.*, 2010; Gültekin-Özgüven *et al.*, 2016) การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเลซิติน โคโคซาน และกรดออกซาลิกในการผลิตไมโครแคปซูลสารสกัดจากขานอ้อยด้วยการทำแห้งแบบพ่นฝอยใช้ระเบียบวิธีวิจัยพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology, RSM) ร่วมกับการออกแบบการ

ทดลองแบบ Box-Behnken design (BBD) ดังแสดงในตารางที่ 5 ผลการตรวจสอบการละลายของเลซิทินและโคโคซานในสารละลายกรดพีเอช 3 มีค่า เท่ากับ 0.8 และ 1.2% (w/v) ตามลำดับ ในส่วนของกรดออกซาลิกกำหนดช่วงความเข้มข้นจากผลการทดลองที่ส่งผลให้ไมโครแคปซูลแสดงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด ผลข้างต้นจึงเป็นที่มาของการกำหนดขอบเขตการวางแผนการทดลองทางสถิติของ 3 ตัวแปรดังกล่าว ที่มีจำนวน 15 การทดลอง โดยมีค่าตอบสนอง 2 ค่า ได้แก่ ประสิทธิภาพการห่อหุ้ม (Encapsulation efficiency, EE) และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC)

ตารางที่ 5 ผลความเข้มข้นของสารห่อหุ้มชนิดต่าง ๆ ต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้ม (Encapsulation efficiency, EE) และกิจกรรมต้านอนุมูลเทียบเท่าสารละลายมาตรฐานโทรลอกซ์ (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) ของไมโครแคปซูลสารสกัดขาน้อย จากการใช้ระเบียบวิธีวิจัยพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology, RSM) ร่วมกับการออกแบบการทดลองแบบ Box-Behnken design (BBD)

การทดลอง	เลซิทิน (%w/v)	โคโคซาน (%w/ v)	กรดออกซาลิก (%w/ v)	EE (%)	TEAC (mg Trolox / g microcapsules)
1	0.10	0.65	0.00	52.14	0.52
2	0.45	0.10	0.00	57.01	0.42
3	0.45	1.20	0.00	62.04	0.43
4	0.80	0.65	0.00	80.40	0.55
5	0.10	0.10	0.10	61.20	0.55
6	0.10	1.20	0.10	61.67	0.71
7	0.45	0.65	0.10	58.55	0.38
8	0.45	0.65	0.10	63.43	0.45
9	0.45	0.65	0.10	54.24	0.41
10	0.80	0.10	0.10	53.98	0.58
11	0.80	1.20	0.10	81.59	0.70
12	0.10	0.65	0.20	76.48	0.58
13	0.45	0.10	0.20	59.60	0.40
14	0.45	1.20	0.20	70.48	0.44
15	0.80	0.65	0.20	76.62	0.46

จากการแปรผันชนิดและปริมาณของสารห่อหุ้มตามแผนการทดลองทางสถิติ พบว่า ไมโครแคปซูลมีประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสกัดชานอ้อย (Encapsulation efficiency, EE) เท่ากับ 52.14 – 81.59% โดยแสดงกิจกรรมต้านอนุมูลเทียบเท่าสารละลายมาตรฐานโทรลอคซ์ (TEAC) ระหว่าง 0.40 – 0.71 mg Trolox/g microcapsules (ตารางที่ 5) โดยสารห่อหุ้มควบคุมที่ไม่มีสารสกัดชานอ้อยไม่แสดงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติชี้ให้เห็นว่าสมบัติทั้งสองของไมโครแคปซูลแสดงความสัมพันธ์ตามแบบจำลองของสมการกำลังสอง (Quadratic model) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (Coefficient of determination, R^2) และค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจปรับแก้ (Adjusted coefficient of determination, $ADJ-R^2$) ในระดับสูง (80%) (ตารางที่ 6) ที่ยืนยันถึงความเหมาะสมของแบบจำลองรวมถึงจำนวนของตัวแปรทำนายที่ใช้เพื่ออธิบายความผันแปรของค่าตัวแปรตอบสนองต่างๆ โดยหากค่า $ADJ-R^2$ ของค่าตอบสนองใดมีค่าน้อยแสดงให้เห็นว่าค่าตอบสนองนั้นไม่เหมาะสำหรับการทำนายแบบจำลอง (Chen *et al.*, 2017) ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อพิจารณาค่าการขาดความเหมาะสมของสมการ (lack of fit) พบว่าแบบจำลองทั้งสองแสดงค่า p -value มากกว่า 0.05 ซึ่งช่วยสนับสนุนความเหมาะสมของแบบจำลองที่ได้จากการวิเคราะห์ข้างต้น (Anuar *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2017)

ตารางที่ 6 ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสกัดชานอ้อย (EE) และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (TEAC) ของไมโครแคปซูล

Independent variable	EE (%)		TEAC (mg Trolox /g microcapsules)	
	Regression coefficient	Significance Level (<i>p</i>)	Regression coefficient	Significance Level (<i>p</i>)
Model		0.0239		0.0214
X_0	58.74		0.41	
X_1 : Lecithin	5.14	0.0239	-7.913E-003	0.0214
X_2 : Chitosan	5.50	0.0187	0.042	0.6546
X_3 : Oxalic	3.95	0.0572	-4.645E-003	0.0524
X_1X_2	6.78	0.0305	-0.011	0.7914
X_1X_3	-7.03	0.0269	-0.038	0.6730
X_2X_3	1.46	0.5483	8.258E-003	0.1678
X_1^2	7.50	0.0247	0.16	0.7401
X_2^2	-1.63	0.5212	0.059	0.0011
X_3^2	5.17	0.0801	-0.048	0.0618
Lack of fit		0.5502		0.3512
R^2	0.9247		0.9282	
ADJ- R^2	0.7892		0.7989	

ผลการวิเคราะห์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นน้อยกว่า 95% ($p < 0.05$) โดย X_0 , X_1 , X_2 และ X_3 คือ จุดตัดสมการ ความเข้มข้นเลซิติน ไคโตซาน และกรดออกซาลิก (%w/v) ตามลำดับ

จากแบบจำลองข้างต้นสามารถสร้างสมการกำลังสองที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเลซิติน ไคโตซาน และกรดออกซาลิกต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสกัดชานอ้อย และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระได้ดังสมการที่ 2 และ 3

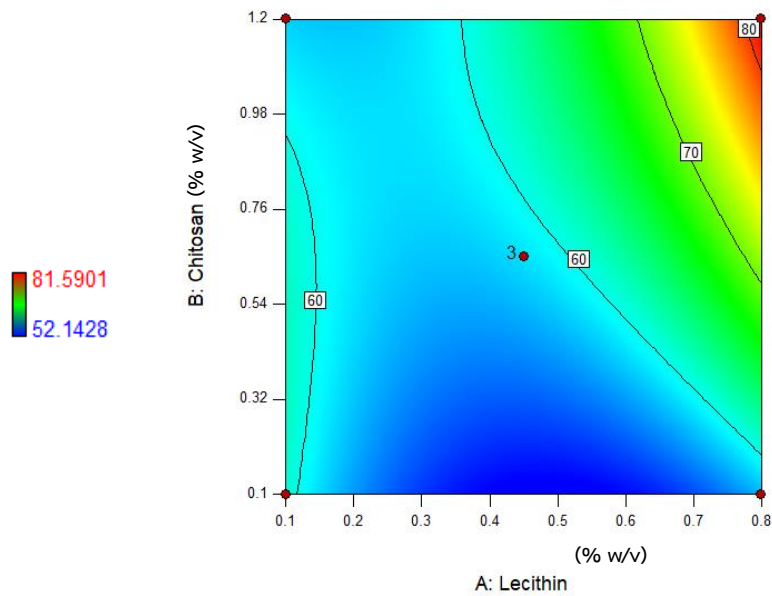
$$EE (\%) = 58.7393 + 5.13842X_1 + 5.49784X_2 + 3.94776X_3 + 6.78273X_1X_2 - 7.02976 X_1X_3 + 1.46019X_2X_3 + 7.50008X_1^2 - 1.62871X_2^2 + 5.17298X_3^2 \quad (2)$$

$$TEAC (\text{mg Trolox/g microcapsules}) = 0.41 - 7.913 \times 10^{-3}X_1 + 0.042X_2 - 4.645 \times 10^{-3}X_3 - 0.011X_1X_2 - 0.038X_1X_3 + 8.258 \times 10^{-3}X_2X_3 + 0.16X_1^2 + 0.059X_2^2 - 0.048X_3^2 \quad (3)$$

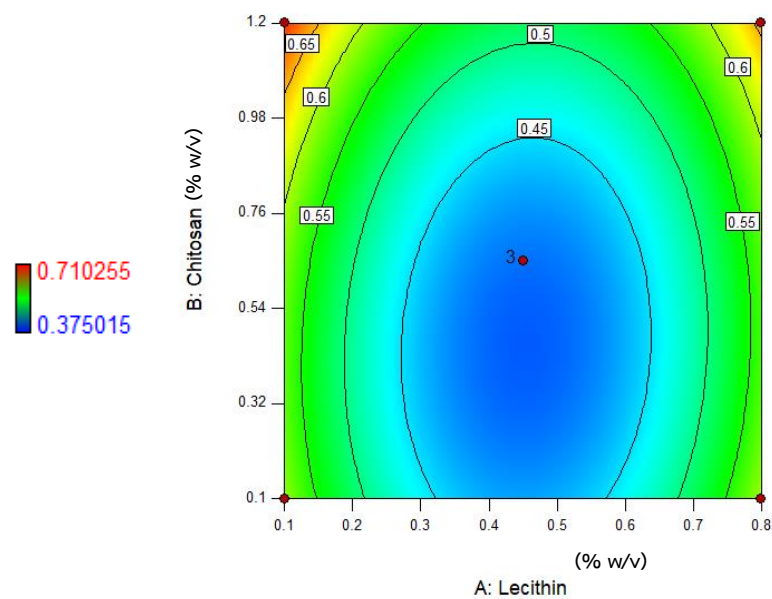
เมื่อ X_1 , X_2 และ X_3 คือ ความเข้มข้นเลซิติน ไคโตซาน และกรดออกซาลิก (%w/v) ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์สมการทำนายกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสามารถสร้างโครงร่างพื้นผิว (contour plot) ของประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสกัดชานอ้อย และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของไมโครแคปซูล (ภาพที่ 18) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของเลซิตินและไคโตซานที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้สมบัติทั้งสองของไมโครแคปซูลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยเมื่อวิเคราะห์สัมประสิทธิ์การถดถอยของตัวแปรต่างๆ ในแบบจำลอง พบว่า ความเข้มข้นของไคโตซาน (X_2) มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกแบบเส้นตรง (Linear term) มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสกัดชานอ้อยของไมโครแคปซูล รองลงมา คือ ความเข้มข้นของเลซิติน (X_1) ส่วนกรดออกซาลิกต่อไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ทั้งนี้เมื่อพิจารณาในส่วนของอิทธิพลร่วมระหว่างตัวแปร พบว่า ความเข้มข้นของเลซิตินและไคโตซานมีอิทธิพลร่วมกัน (X_1X_2) ในเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสกัดชานอ้อย แสดงให้เห็นถึงข้อดีของการห่อหุ้มสารสกัดชานอ้อยโดยอาศัยการเกิดแรงดึงดูดไฟฟ้าสถิต (electrostatic attraction) ระหว่างประจุบวกบนโครงสร้างไคโตซานและประจุลบของโครงสร้างเลซิติน (Sonvico *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2014) แต่ความเข้มข้นของเลซิตินและกรดออกซาลิก (X_1X_3) มีอิทธิพลร่วมเชิงลบมีนัยสำคัญ เนื่องจากการเติมกรดออกซาลิกทำให้ในระบบสารห่อหุ้มมีปริมาณประจุลบมากเกินไป จึงขัดขวางการเกิดปฏิกิริยาระหว่างประจุของเลซิตินและไคโตซานเป็นผลให้ต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสกัดลดลง ในส่วนของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระมีเพียงความเข้มข้นของไคโตซานที่ส่งผลเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญทั้งในพจน์กำลังหนึ่ง (X_2) และกำลังสอง (X_2^2) ซึ่งให้ผลไปในทิศทางเดียวกับประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสกัดชานอ้อย

(ก)



(ข)



ภาพที่ 18 อิทธิพลของความเข้มข้นเลซิทินและไคโตซานต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้ม (Encapsulation efficiency, EE) (ก) และกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ (Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC) (ข) ของไมโครแคปซูลสารสกัดชาอู่ยี้

การวิเคราะห์หาสภาวะการห่อหุ้มที่เหมาะสมโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่พัฒนาขึ้นจากการกำหนดให้ไมโครแคปซูลมีประสิทธิภาพการห่อหุ้มและกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระสูงสุด พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ การใช้เลซิทิน ไคโตซาน และกรดออกซาลิกที่ความเข้มข้น 0.8, 1.2 และ 0.064% (w/v) ตามลำดับ ซึ่งให้คำตอบสอดคล้องดังแสดงในตารางที่ 7 จากนั้นจึงทวนสอบความถูกต้องของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์โดยการทดลองที่สภาวะเหมาะสมจำนวน 3 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าจากการทำนายตามสมการถดถอยและค่าที่ได้จากการทดลอง

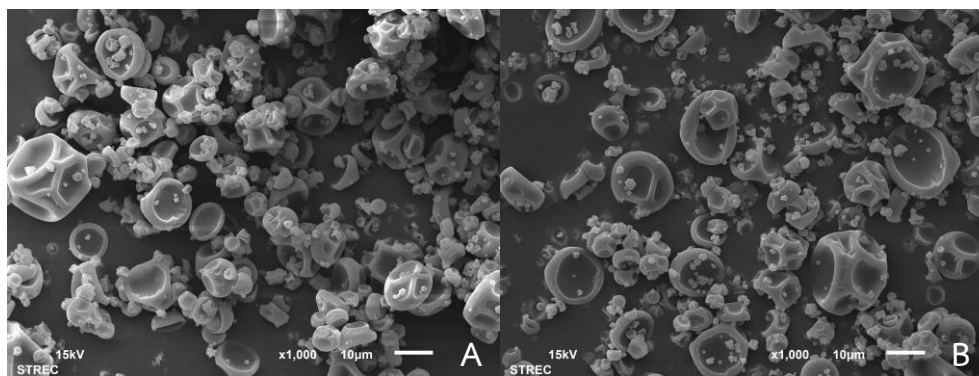
ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสกัดชานอ้อย (EE) และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (TEAC) ของไมโครแคปซูลที่ได้จากการทำนายและการทดลองภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

	Predicted value	Experimental value
EE (%)	83.11	83.50 ± 2.98
TEAC (mg Trolox/g microcapsules)	0.67	0.65 ± 0.08

ผลการเปรียบเทียบค่าจากการทำนายและค่าที่จากการทดลอง พบว่า แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่พัฒนาขึ้นมีความน่าเชื่อถือ สามารถยืนยันผลการทดสอบจากการวิเคราะห์การทดสอบสมมติฐาน t (t-test) พบว่า ค่าที่ได้จากการทดลองไม่มีความแตกต่างจากสมการทำนายค่า ($p > 0.05$) ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้ในสมการที่ 2 และ 3 มีความเหมาะสมสำหรับใช้ทำนายสภาวะเหมาะสมของการห่อหุ้มสารสกัดชานอ้อยที่ส่งผลให้ไมโครแคปซูลมีประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสกัดชานอ้อย (EE) และกิจกรรมการต้านอนุมูล (TEAC) สูงสุด

6. ลักษณะพื้นผิวและขนาดของไมโครแคปซูล

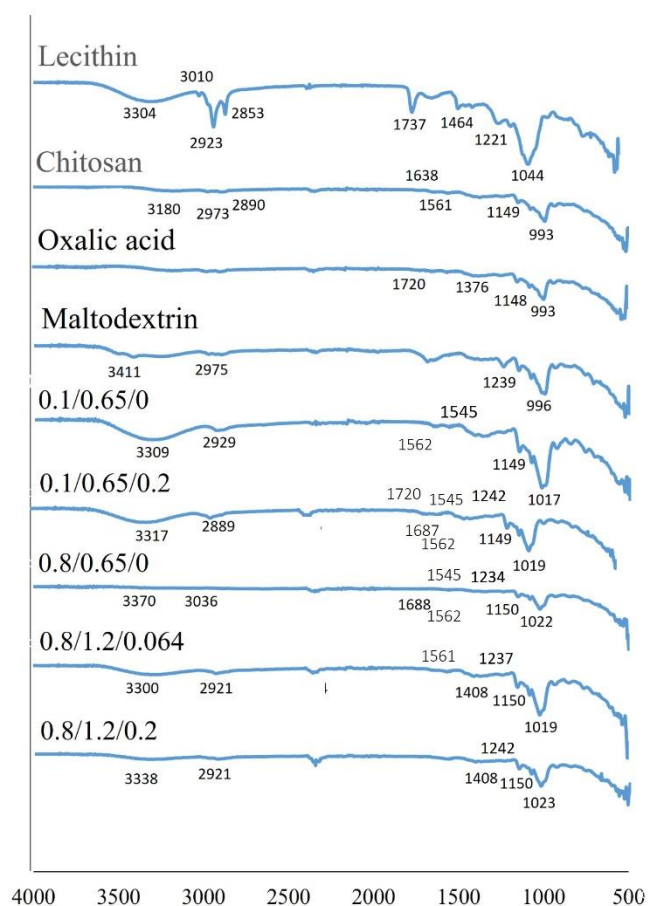
วิเคราะห์ลักษณะของไมโครแคปซูลภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด โดยเปรียบลักษณะของไมโครแคปซูลที่เหมาะสมซึ่งแสดงค่า EE ที่สูงสุด (0.8% เลซิติน 1.2% ไคโตซาน และ 0.064% กรดออกซาลิก) กับไมโครแคปซูลที่มีค่า EE และ TEAC ต่ำสุด (0.1% เลซิติน 0.65% ไคโตซาน) พบว่า ไมโครแคปซูลทั้งสองมีขนาดเฉลี่ยภายใต้กล้องไม่ต่างกัน คือประมาณ 20 μm (ภาพที่ 19) โดยไมโครแคปซูลที่ได้มีลักษณะกลม สำหรับรอยบุ๋มบนไมโครแคปซูลนั้นเกิดจากการระเหยน้ำอย่างรวดเร็วในกระบวนการทำแห้งที่อุณหภูมิ 120 °C ร่วมกับอิทธิพลของปริมาณสารห่อหุ้มที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 19 ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของไมโครแคปซูลที่มีส่วนประกอบของสารห่อหุ้ม; (A) 0.8% เลซิติน 1.2% ไคโตซาน และ 0.064% กรดออกซาลิก และ B 0.1% เลซิติน 0.65% ไคโตซาน

7. โครงสร้างทางเคมีของไมโครแคปซูล

ตรวจสอบโครงสร้างทางเคมีของไมโครแคปซูลแบบต่างๆ ที่แสดงประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสกัดขานอ้อย (EE) ที่แตกต่างกัน ด้วยเทคนิค Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) ทำการติดตามช่วงการดูดกลืนคลื่นแสงอินฟราเรดร่วมกับเปอร์เซ็นต์ความเข้มของแสงที่ทะลุผ่านสารตัวอย่าง (transmittance, %) โดยภาพที่ 20 แสดงโครงสร้างเลซิตินที่มีการสั่นของ C – H stretching ($3300 - 2900 \text{ cm}^{-1}$), C – H bending (1464 cm^{-1}) และ phosphate group (P = O stretching) ที่บริเวณ 1221 cm^{-1} (Liu *et al.*, 2016) ส่วนโครงสร้างไคโตซานพบการสั่นของหมู่ amide ใน glucosamine ได้แก่ 1638 cm^{-1} (C = O stretching) และ 1561 cm^{-1} (N- H bending) (Fadzallah *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2014) ซึ่งการสั่นของสารห่อหุ้มทั้งสองชนิดสามารถตรวจพบในไมโครแคปซูลที่ห่อหุ้มด้วย 0.1% เลซิติน 0.65% ไคโตซาน ที่ไม่เชื่อมไขว้ด้วยกรดออกซาลิก (0.1/0.65/0) และตัวอย่าง 0.8/0.65/0 นอกจากนี้ตัวอย่างทั้งสองยังพบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างพีกของ N- H bending บริเวณตำแหน่ง 1545 cm^{-1} ที่แสดงถึงหมู่ NH_3^+ โดยตัวอย่าง 0.8/0.65/0 ที่มีปริมาณเลซิตินสูง ส่งผลให้พีกดังกล่าวมีความเข้มข้นลดลงชัดเจน ผลดังกล่าวช่วยสนับสนุนทฤษฎีการเกิดแรงดึงดูดไฟฟ้าสถิต (electrostatic attraction) ระหว่างสารห่อหุ้มเลซิตินและไคโตซาน (Mi *et al.*, 2015)

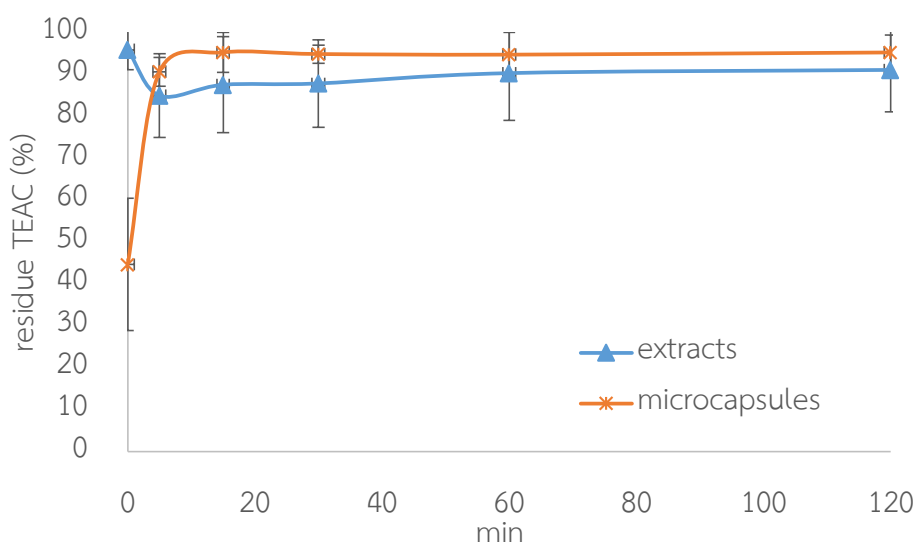


ภาพที่ 20 โครงสร้างทางเคมีของสารห่อหุ้ม และไมโครแคปซูลแบบต่างๆ (ตัวเลขในกราฟแสดง %เลซิติน/%ไคโตซาน/%กรดออกซาลิก)

เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีของตัวอย่างไมโครแคปซูลที่มีส่วนประกอบของ 0.1% เลซิติน 0.65% ไคโตซาน และเชื่อมไขด้วย 0.2% กรดออกซาลิก (0.1/0.65/0.2) พบการสั่นที่มากกว่า ไมโครแคปซูลข้างต้นบริเวณ 1720 cm^{-1} ซึ่งสื่อถึงหมู่ COOH ในโครงสร้างของกรดออกซาลิก โดยผลการเชื่อมไขไมโครแคปซูลส่งผลให้เกิดการเคลื่อนของพีคไปยังบริเวณ 1687 cm^{-1} ที่แสดงถึงหมู่ COO^- (Fadzallah *et al.*, 2014) พร้อมการเปลี่ยนแปลงความเข้มของพีค 1545 cm^{-1} (NH_3^+) ที่ลดลง ซึ่งสนับสนุนการเชื่อมไขระหว่างโครงสร้างไคโตซานและกรดออกซาลิก ผลการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไมโครแคปซูลทั้งสองแบบแสดงให้เห็นว่าการเชื่อมไขส่งผลดีต่อประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสกัดชาอู่ยี้ (EE) ของไมโครแคปซูล โดย 0.1/0.65/0.2 มีค่า EE ที่สูงกว่า 0.1/0.65/0 คือ 76.48 และ 52.14% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการเติมกรดออกซาลิกเพื่อการเชื่อมไขส่งผลให้ตรวจพบการสั่นของ $\text{P}=\text{O}$ stretching (1242 cm^{-1}) ที่สื่อให้เห็นว่ากรดออกซาลิกสามารถแย่งจับกับไคโตซานแทนการจับกับโครงสร้างของเลซิติน โดยปริมาณของกรดออกซาลิกที่มากเกินไปส่งผลเสียโครงสร้างสารห่อหุ้มดังแสดงค่า EE ในตัวอย่าง 0.8/1.2/0.064 EE ที่สูงกว่า 0.8/1.2/0.2 เท่ากับ 83.50 และ 81.59% ตามลำดับ

8. ความคงตัวของสารสกัดขานอ้อยและไมโครแคปซูล

ติดตามความคงตัวของสารสกัดขานอ้อยเปรียบเทียบกับสารสกัดที่ถูกห่อหุ้มในไมโครแคปซูล ภายใต้สภาวะน้ำย่อยกระเพาะอาหารจำลองที่มีกรดต่างเท่ากับ 2 ต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในรูปแบบค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) ที่เหลืออยู่ในระบบ ผลการทดลองพบว่า สารสกัดขานอ้อยมีความคงตัวในสภาวะกรด โดยแสดงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ตลอดระยะเวลาการทดสอบ (ภาพที่ 21) เนื่องจากองค์ประกอบหลักที่พบในสารสกัดขานอ้อย ได้แก่ *p*-coumaric acid ferulic acid และ syringic acid มีค่า pKa เท่ากับ 4.7, 4.5 และ 4.7 ตามลำดับ (Beltrán *et al.*, 2003) ดังนั้นในสภาวะทดสอบที่มีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 2 สารดังกล่าวจึงไม่แตกตัว และไม่สูญเสียกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chethan *et al.* (2007) สกัดสารประกอบฟีนอลจากข้าวป้างสามง่าม (Finger Millet) ได้แก่ galic acid, *p*-coumaric acid ferulic acid และ syringic acid เป็นต้น ที่สภาวะความเป็นกรดต่างตั้งแต่ 1 – 10 ผลการทดลองพบว่า ปริมาณของสารประกอบฟีนอลที่สกัดได้มีความคงตัวในสภาวะกรด (pH 1 – 6) ก่อนมีแนวโน้มที่ลดลงในสภาวะกลาง (pH 7) และลดลงประมาณ 64% เมื่อสกัดในสภาวะต่าง (pH 10) โดย syringic acid มีความคงตัวในสภาวะต่างที่ pH 10 น้อยที่สุดซึ่งมีปริมาณลดลงไป 42% เมื่อเทียบกับปริมาณที่มีอยู่ใน pH 3

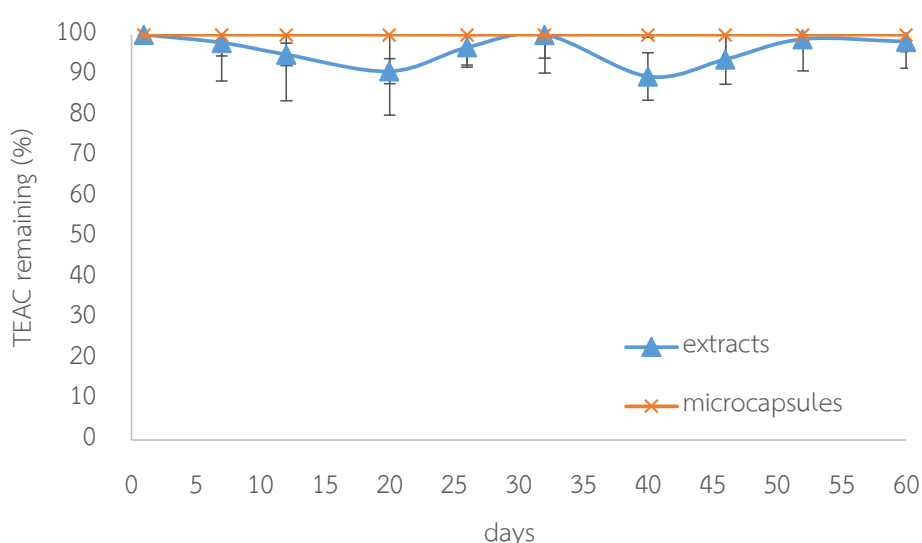


ภาพที่ 21 ความคงตัวของสารสกัดขานอ้อยและไมโครแคปซูล 0.8/1.2/0.064 ภายใต้สภาวะน้ำย่อยกระเพาะอาหารที่มีค่ากรดต่างเท่ากับ 2 เป็นเวลา 120 นาที (ตัวเลขในกราฟแสดง %เลซิติน/%โคไต์-ซาน/%กรดออกซาลิก)

ผลการทดสอบความคงตัวของไมโครแคปซูล 0.8/1.2/0.064 ให้ผลเช่นเดียวกับสารสกัดขานอ้อยที่สามารถแสดงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ตลอดระยะเวลาการทดสอบ โดยช่วง 10 นาทีแรกของการทดสอบ พบว่า สารสกัดมีแนวโน้มค่า TEAC ที่เพิ่มสูงขึ้น เนื่องด้วยการชะลอปลดปล่อยสารสกัดออกจากโครงสร้างไมโครแคปซูล ทั้งนี้ตัวอย่างทดสอบทั้งสองชนิดมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตัวอย่างทดสอบตลอด 120 นาที

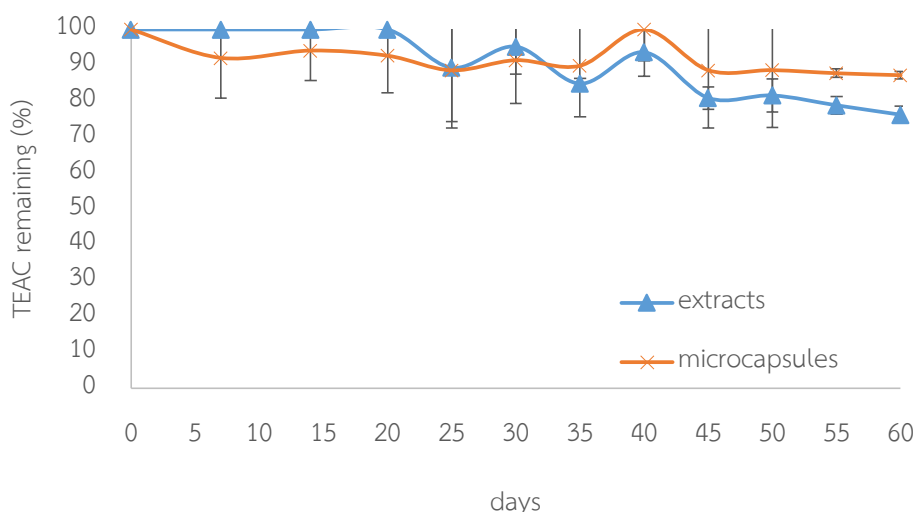
8. อายุการเก็บรักษาไมโครแคปซูลพฤษเคมีจากขานอ้อย

กระบวนการห่อหุ้ม (encapsulation) มีเป้าหมายเพื่อการปกป้องสารภายในจากสภาวะแวดล้อม และยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ (Nori *et al.*, 2011; Ranveer *et al.*, 2015) งานวิจัยนี้ทดสอบความคงตัวของสารสกัดขานอ้อยภายในไมโครแคปซูลเลซิตินและโคโคซานที่เก็บรักษา ณ อุณหภูมิ 4 ± 1 °C และ 37 ± 1 °C เป็นเวลา 60 วัน โดยมีตัวอย่างควบคุมเป็นสารสกัดขานอ้อยที่ไม่ห่อหุ้ม (sugarcane bagasse extract, SBE) ผลการทดลอง พบว่า การเก็บรักษาสารสกัดขานอ้อยและไมโครแคปซูล 0.8/1.2/0.064 ที่อุณหภูมิ 4 ± 1 °C เป็นเวลา 60 วัน ไม่ส่งผลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด (TEAC) อย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) โดยแสดงกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระคงเหลือประมาณ 98 และ 93% ตามลำดับ (ภาพที่ 22) ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความคงตัวขององค์ประกอบในสารสกัดขานอ้อย



ภาพที่ 22 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (TEAC) ที่เหลืออยู่ของสารสกัดขานอ้อยและไมโครแคปซูล 0.8/1.2/0.064 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ± 1 °C เป็นเวลา 60 วัน (ตัวเลขในกราฟแสดง %เลซิติน/%โคโคซาน/%กรดออกซาลิก)

อย่างไรก็ตามผลการเก็บรักษาสารสกัดขานอ้อยที่อุณหภูมิ 37 ± 1 °C เป็นเวลา 60 วัน พบการลดลงของค่า TEAC ในตัวอย่างสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ณ วันที่ 35 ของการทดสอบ อย่างไรก็ตามไมโครแคปซูล 0.8/1.2/0.064 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่า TEAC ตลอดระยะเวลาการทดสอบ (ภาพที่ 23) โดยไมโครแคปซูลมีค่า TEAC คงเหลือในวันที่ 60 มากกว่าสารสกัดขานอ้อยอย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของไมโครแคปซูลเลซิดินและโคโตซานที่สามารถป้องกันสารสกัดขานอ้อยที่อยู่ภายในจากสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลเสียต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของสารระหว่างการเก็บรักษา



ภาพที่ 23 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (TEAC) ที่เหลืออยู่ของสารสกัดขานอ้อยและไมโครแคปซูล 0.8/1.2/0.064 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 ± 1 °C เป็นเวลา 60 วัน (ตัวเลขในกราฟแสดง %เลซิดิน/%โคโตซาน/%กรดออกซาลิก)

9. การผลิตแคปซูลสารสกัดพฤษเคมีจากขานอ้อย

เนื่องด้วยวัตถุประสงค์ของโครงการที่มุ่งเน้นการพัฒนาและประยุกต์ใช้ประโยชน์จากสารสกัดขานอ้อยในรูปแบบอาหารฟังก์ชัน (functional food) ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพสอดคล้องกับความต้องการของตลาดในปัจจุบัน โดยหลักเกณฑ์ของกระทรวงเกษตรสหรัฐอเมริกา (United States Department of Agriculture, USDA) มีข้อเสนอแนะให้บุคคลทั่วไปควรบริโภคอาหาร หรืออาหารเสริมที่มีค่า Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) ต่อวัน ประมาณ 3000 – 5000 $\mu\text{M TE/mg materials}$ ซึ่งส่งผลต่ออย่างมีนัยสำคัญต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระในเนื้อเยื่อ (tissue antioxidant capacity) (Feeney, 2004; Tangkanakul and Trakoontivakorn, 2014) ในส่วนผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการมาตรฐาน Oxygen radical absorbance

capacity (ORAC) พบว่า ไมโครแคปซูลสารสกัดชานอ้อยมีค่า ORAC เท่ากับ 23.69 ± 0.60 umTE/mg microcapsule ดังนั้นจึงเป็นที่มาของปริมาณไมโครแคปซูลที่บรรจุในแคปซูลเจลลาติน คือ 300 ± 5 mg ดังแสดงในภาพที่ 24



ภาพที่ 24 แคปซูลสารสกัดชานอ้อย

สำหรับประโยชน์ของผลิตภัณฑ์ไมโครแคปซูลสารสกัดชานอ้อยเป็นผลมาจากสารประกอบฟีนอล โดยผลการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบด้วยเทคนิค High-performance liquid chromatography พบสารประกอบฟีนอลหลัก 3 ชนิด ได้แก่ coumaric acid, syringic acid และ ferulic acid ซึ่งมีการวิจัยมากมายที่กล่าวถึงข้อดีของสารประกอบฟีนอลข้างต้น เช่น Amalan et al. (2016) ทำการป้อน coumaric acid แก่หนูทดลอง เป็นเวลา 30 วัน ที่ปริมาณ 100 mg/kg หนูทดสอบ พบว่าสามารถลดปริมาณน้ำตาลในเลือด รวมถึงปริมาณคอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ทั้งในพลาสมาและเนื้อเยื่อ ส่วนงานวิจัยของ Balasubashini et al. (2003) หนูที่ได้รับ ferulic acid ที่ความเข้มข้น 10 mg/kg หนู เป็นเวลา 45 วัน มีปริมาณของไขมันในพลาสมาและระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลง จากผลงานวิจัยข้างต้นชี้ให้เห็นประโยชน์ของสารประกอบฟีนอลที่สามารถพบได้ในสารสกัดชานอ้อย ซึ่งมีประโยชน์ในการรักษาโรคเบาหวาน และความดันโลหิตสูง

บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการศึกษา

ผลการแปรรูปสภาวะการสกัดและแตกโครงสร้างลิกนินด้วยวิธีการต่างๆ พบว่า การใช้ตัวทำละลายไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.25 M ร่วมกับหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 30 min ทำให้สารสกัดมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับการสกัดด้วยคลื่นเหนือเสียงความถี่สูง และการแช่เย็น ซึ่งเป็นคุณสมบัติหนึ่งที่สำคัญต่อการประยุกต์ใช้เป็นอาหารฟังก์ชัน โดยสารสกัดหลังผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคระหว่างไดโพลเทสเซียมฟอสเฟตและเอทานอลสามารถลดปริมาณน้ำตาลในสารสกัดได้ประมาณ 5.6 เท่า ส่งผลให้ปริมาณสารประกอบฟีนอลและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น 1.8 และ 1.7 เท่าตามลำดับ เมื่อเทียบสารสกัดขานอ้อยก่อนทำบริสุทธิ์ โดยสารสกัดที่ได้แสดงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า vitE และ BHT และยังไม่แสดงความเป็นพิษเฉียบพลันต่อหนูทดสอบ (Acute oral toxicity) สามารถจำแนกให้สารสกัดขานอ้อยอยู่ในระบบการจำแนกความเป็นอันตราย (Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals, GHS) ลำดับที่ 5 หรือกลุ่มที่มีค่าความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันทางปากที่ทำให้สัตว์ทดลองตายไปร้อยละ 50 ภายใน 14 วัน (LD_{50} cut off) เท่ากับ 5,000 – ∞ mg/kg body weight

การวิเคราะห์สภาวะของสารห่อหุ้มไมโครแคปซูลที่เหมาะสมโดยใช้โดยใช้ระเบียบวิธีวิจัยพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology) ร่วมกับแผนการทดลองแบบ Box-Behnken design (BBD) พบว่า การใช้เลซิติน ไคโตซาน และกรดออกซาลิกที่ความเข้มข้น 0.8, 1.2 และ 0.064% (w/v) ตามลำดับ ส่งผลให้ไมโครแคปซูลมีประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสกัดขานอ้อย (EE) และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด อีกทั้งยังให้ผลการทดสอบความคงตัวของตัวอย่างได้สภาวะน้ำย่อยกระเพาะอาหารจำลอง และการเก็บรักษาทั้งที่ 4 และ 37 °C เป็นเวลา 60 วัน ที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ตลอดระยะเวลาทดสอบ แสดงให้เห็นประสิทธิภาพการห่อหุ้มสารสกัดขานอ้อยภายในไมโครแคปซูลเลซิตินและไคโตซานที่ช่วยปกป้องสารสกัดภายในจากสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลเสียต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

ข้อเสนอแนะ

เพื่อพัฒนาการใช้สารสกัดขานอ้อยในรูปแบบอาหารฟังก์ชัน ควรทดสอบเพิ่มเติมเรื่องความเป็นพิษต่อคน เช่น ความเป็นพิษเรื้อรังทางปาก (Chronic oral toxicity)

การคำนวณค่าทางเศรษฐศาสตร์ สำหรับการพัฒนาไมโครแคปซูลสารสกัดขาน้อยต่อในระดับอุตสาหกรรม

1. ราคาต้นทุนของผลิตภัณฑ์ไมโครแคปซูลสารสกัดขาน้อยหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย

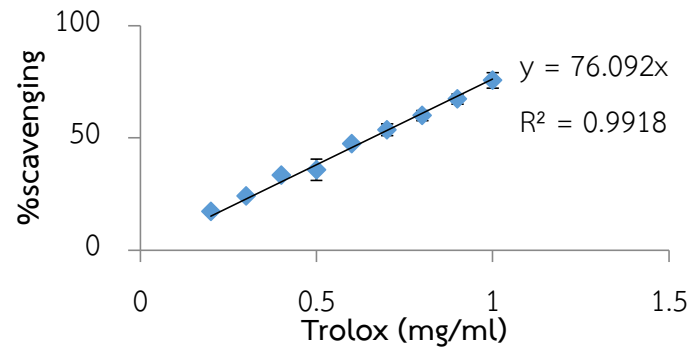
รายละเอียด	ราคา (บาท)
วัสดุตั้งต้น: ปริมาณขาน้อย 1 ตัน	400
ผลิตภัณฑ์: ผงสารสกัดขาน้อยจากขาน้อย	148,400
ผลิตภัณฑ์: ไมโครแคปซูลสารสกัดขาน้อย	113,888,888
จำนวน 1,140,000,000 เม็ด	
ราคาต้นทุนรวมส่วนผลิตภัณฑ์	160,831,262
ราคาต้นทุนของผลิตภัณฑ์ไมโครแคปซูลต่อเม็ด	0.14

2. ต้นทุนการก่อตั้งโรงงาน

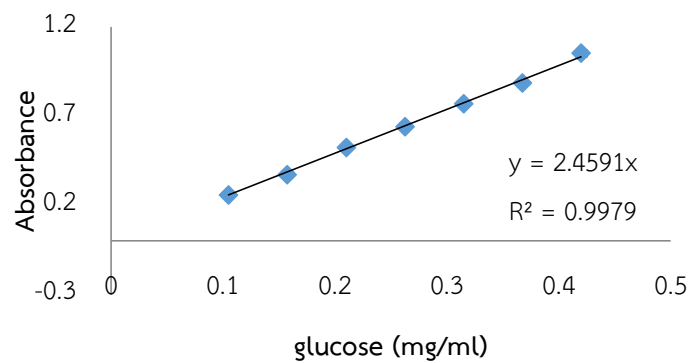
1. วัสดุ-อุปกรณ์	สัดส่วนต้นทุน (ร้อยละ)	ราคา (บาท)
เครื่องจักร	22.9	23000000
การติดตั้งเครื่องจักร	8.3	8336244.541
ระบบควบคุม	9.2	9240174.672
ระบบท่อ	7.3	7331877.729
ระบบไฟฟ้า	4.6	4620087.336
อาคาร	4.6	4620087.336
ที่ดิน	1.8	1807860.262
สิ่งอำนวยความสะดวก	13.8	13860262.01
2. แรงงานคน	สัดส่วนต้นทุน (ร้อยละ)	ราคา (บาท)
วิศวกร หัวหน้างาน	7.3	7331877.729
ค่าก่อสร้าง	9.2	9240174.672
ดำเนินงานทางกฎหมาย	1.8	1807860.262
ผู้รับเหมา	1.8	1807860.262
เงินทุนสำรอง	7.9	7934497.817
รวมต้นทุนการจัดตั้งโรงงาน		100,938,864.63

หมายเหตุ อ้างอิงราคาเบื้องต้น เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (กำลังการระเหยน้ำที่ 150 kg/h) และถังสกัดความดันที่ปริมาตร 100 L

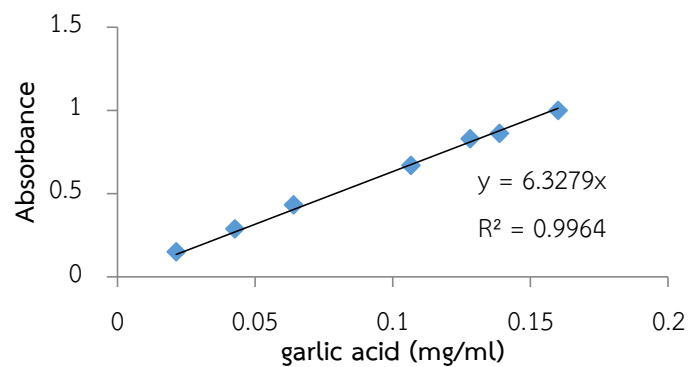
ภาคผนวก
ผลการทดลอง



ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานระหว่างกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและความเข้มข้นของสารโทรลอกซ์



ภาพผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 485 nm และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส



ภาพผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 765 nm และความเข้มข้นของกรดแกลลิก

ตารางผนวกที่ 1 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระทั้งหมด (TEAC, mg Trolox/g SB) ของสารสกัดขานอ้อยที่สกัดโดยวิธีแช่เย็นที่ อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60 °C เป็นเวลา 6 h

เวลา (h)	อุณหภูมิ (°C)											
	30			40			50			60		
0	17.47	17.18	17.32 ± 0.10	19.44	19.18	19.31 ± 0.09	19.27	17.06	18.17 ± 0.78	18.72	17.41	18.06 ± 0.46
1	32.40	24.45	28.43 ± 2.81	54.69	55.24	54.97 ± 0.19	15.52	17.31	16.42 ± 0.63	55.84	60.35	58.09 ± 1.59
2	48.34	51.99	50.16 ± 1.29	57.69	57.70	57.70 ± 0.01	66.86	65.08	57.97 ± 0.63	58.64	67.59	67.12 ± 1.24
3	35.22	36.88	46.05 ± 0.59	59.09	54.87	56.98 ± 1.49	62.74	67.23	64.98 ± 1.59	38.56	42.90	66.73 ± 1.54
4	61.37	58.43	59.90 ± 1.04	46.97	41.86	58.42 ± 1.81	72.54	64.20	68.37 ± 2.95	58.78	65.80	68.29 ± 2.48
5	54.52	54.51	54.52 ± 0.01	43.32	39.23	55.28 ± 1.44	66.26	70.64	68.45 ± 1.55	46.41	44.60	71.50 ± 0.64
6	56.94	54.45	55.70 ± 0.88	52.29	53.30	56.80 ± 0.36	67.62	61.91	64.76 ± 2.02	71.60	65.08	68.34 ± 2.30

ตารางภาคผนวกที่ 2 สมบัติของสารสกัดชานอ้อย; ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (TCC) ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (TPC) และกิจกรรมการต้านอนุมูล-
อิสระเทียบเท่าสารมาตรฐาน trolox (TEAC) หลังการสกัดโดยต่างความเข้มข้น และเวลาต่าง ๆ ด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave)
ที่อุณหภูมิ 121 °C

Time (min)	NaOH (%w/v)	TCC (mg glucose/g SB)			TPC (mg gallic acid/g SB)			TEAC (mg Trolox/g SB)		
15	0.5	31.66	22.66	27.16 ± 4.50	35.98	45.78	40.88 ± 4.90	66.81	87.21	77.01 ± 10.20
	1.0	23.50	23.71	23.61 ± 0.11	38.76	38.74	38.75 ± 0.01	71.70	78.24	74.97 ± 3.27
	2.0	34.73	32.07	33.40 ± 1.33	41.73	48.60	45.16 ± 3.43	78.27	94.03	86.15 ± 7.88
30	0.5	17.12	17.65	17.38 ± 0.27	39.02	37.23	38.13 ± 0.89	71.05	65.83	68.44 ± 2.61
	1.0	20.33	19.99	20.16 ± 0.17	41.88	39.47	40.68 ± 1.20	97.09	100.63	98.86 ± 1.77
	2.0	39.93	45.31	42.62 ± 2.69	44.80	54.91	49.85 ± 5.06	81.24	105.76	93.50 ± 12.26
45	0.5	22.70	21.31	22.01 ± 0.70	42.05	50.09	46.07 ± 4.02	78.02	99.95	88.98 ± 10.96
	1.0	41.55	40.65	41.10 ± 0.45	45.51	43.29	44.40 ± 1.11	89.93	101.90	95.91 ± 5.99
	2.0	78.52	75.71	77.12 ± 1.40	54.69	44.90	49.79 ± 4.89	85.43	105.44	95.43 ± 10.01

ตารางภาคผนวกที่ 3 สมบัติของสารสกัดชานอ้อย; ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (TCC) ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (TPC) และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ เทียบเท่าสารมาตรฐาน trolox (TEAC) หลังผ่านระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่ไดโพลเฮกซีเมทิลเฟสเฟตความเข้มข้นต่างๆ

K ₂ HPO ₄ (%w/v)	TCC (mg glucose/g SB)			TPC (mg gallic acid/g SB)			TEAC (mg Trolox/g SB)		
18	7.60	7.14	7.37 ± 0.23	78.28	68.69	73.49 ± 4.80	187.99	152.97	170.48 ± 17.51
20	8.7	7.34	7.85 ± 0.51	86.80	80.25	83.52 ± 3.28	203.55	207.77	205.66 ± 2.11
22	9.02	6.47	7.74 ± 1.27	96.88	87.02	91.95 ± 4.93	232.08	215.56	223.82 ± 8.26
24	8.69	6.15	7.42 ± 1.27	89.88	85.74	87.81 ± 2.07	241.05	173.45	207.25 ± 33.80
26	9.39	5.34	7.37 ± 2.03	91.05	88.83	89.94 ± 1.11	231.15	168.17	199.66 ± 31.49

ตารางภาคผนวกที่ 4 สมบัติของสารสกัดชานอ้อย; ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (TCC) ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (TPC) และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ เทียบเท่าสารมาตรฐาน trolox (TEAC) หลังผ่านระบบสารละลายน้ำสองวัฏภาคที่เอทานอลความเข้มข้นต่างๆ

EtOH (%w/v)	TCC (mg glucose/g SB)			TPC (mg gallic acid/g SB)			TEAC (mg Trolox/g SB)		
14	15.00	14.49	14.75 ± 0.26	53.08	52.37	52.73 ± 0.35	113.56	108.79	111.17 ± 2.39
16	8.35	9.37	8.86 ± 0.51	78.49	80.84	79.66 ± 1.17	198.81	178.29	188.55 ± 10.26
18	7.15	7.86	7.51 ± 0.36	81.38	87.32	84.35 ± 2.97	209.02	184.17	196.59 ± 12.43
20	6.33	9.34	7.84 ± 1.50	77.68	76.37	77.02 ± 0.65	188.20	169.90	179.05 ± 9.15
22	6.71	8.69	7.70 ± 0.99	76.41	73.81	75.11 ± 1.30	159.42	193.91	175.03 ± 15.62

ตารางภาคผนวกที่ 5 ความคงตัวของสารสกัดขานอ้อยภายใต้สภาวะน้ำย่อยกระเพาะอาหารที่มีค่ากรดต่างเท่ากับ 2 เป็นเวลา 120 นาที

เวลา (นาที)	กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระในระบบ (%)			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	100.00	90.59	97.04	95.87 ± 4.81
5	73.51	89.41	91.91	84.94 ± 9.98
15	75.00	90.00	97.57	87.52 ± 11.49
30	76.12	91.18	96.23	87.84 ± 10.46
60	77.99	92.94	100.00	90.31 ± 11.24
120	80.22	100.00	92.99	91.07 ± 10.03

ตารางภาคผนวกที่ 6 ความคงตัวของไมโครแคปซูล 0.8% เลซิธิน 1.2% ไคโตซาน และ 0.064% กรดออกซาลิก ภายใต้สภาวะน้ำย่อยกระเพาะอาหารที่มีค่ากรดต่างเท่ากับ 2 เป็นเวลา 120 นาที

เวลา (นาที)	กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระในระบบ (%)			
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	เฉลี่ย
0	59.21	46.81	27.91	44.64 ± 15.76
5	86.84	91.49	93.60	90.65 ± 3.46
15	100.00	90.43	95.35	95.26 ± 4.79
30	97.37	93.62	93.60	94.86 ± 2.17
60	89.47	94.68	100.00	94.72 ± 5.26
120	92.11	100.00	93.60	95.24 ± 4.19

ตารางภาคผนวกที่ 7 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (TEAC) ของสารสกัดขานอ้อย เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ± 1 °C เป็นเวลา 60 วัน

เวลา (วัน)	กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ (%)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย
0	100.00	100.00	100.00 $\pm$ 0.00
7	95.69	100.35	98.02 $\pm$ 3.30
14	93.15	97.04	95.10 $\pm$ 2.75
21	88.78	93.12	90.95 $\pm$ 3.07
28	93.45	100.27	96.86 $\pm$ 4.82
35	95.39	108.75	100.00 $\pm$ 9.45
42	93.87	85.52	89.69 $\pm$ 5.90
49	89.55	98.30	93.92 $\pm$ 6.19
56	97.49	100.34	98.91 $\pm$ 2.01
60	100.00	96.57	98.28 $\pm$ 2.43

ตารางภาคผนวกที่ 8 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (TEAC) ของไมโครแคปซูล 0.8% เลซิติน 1.2% ไคโตซานและ 0.064% กรดออกซาลิก เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ± 1 °C เป็นเวลา 60 วัน

เวลา (วัน)	กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ (%)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย
0	100.00	100.00	100.00 $\pm$ 0.00
7	100.00	116.25	100.00 $\pm$ 11.49
14	104.28	127.34	100.00 $\pm$ 16.30
21	95.52	123.62	100.00 $\pm$ 19.88
28	98.26	108.89	100.00 $\pm$ 7.52
35	106.86	114.96	100.00 $\pm$ 5.73
42	107.80	108.66	100.00 $\pm$ 0.61
49	103.58	112.94	100.00 $\pm$ 6.62
56	115.80	103.19	100.00 $\pm$ 8.91
60	108.82	120.56	100.00 $\pm$ 8.30

ตารางภาคผนวกที่ 9 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (TEAC) ของสารสกัดขานอ้อย เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ $37 \pm 1^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 60 วัน

เวลา (วัน)	กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ (%)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย
0	100.00	100.00	100.00 $\pm$ 0.00
7	105.77	107.95	100.00 $\pm$ 1.55
14	102.59	103.13	100.00 $\pm$ 0.38
21	110.02	112.36	100.00 $\pm$ 1.65
28	78.68	100.00	89.34 $\pm$ 15.08
35	89.81	100.60	95.21 $\pm$ 7.63
42	83.87	85.91	84.89 $\pm$ 1.44
49	88.92	98.36	93.64 $\pm$ 6.67
56	78.70	83.10	80.90 $\pm$ 3.11
60	78.33	84.87	81.60 $\pm$ 4.63

ตารางภาคผนวกที่ 10 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (TEAC) ของไมโครแคปซูล 0.8% เลซิติน 1.2% ไซโตซาน และ 0.064% กรดออกซาลิก ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ $37 \pm 1^\circ\text{C}$ เป็นเวลา 60 วัน

เวลา (วัน)	กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ (%)		
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	เฉลี่ย
0	100.00	100.00	100.00 $\pm$ 0.00
7	84.15	100.00	92.08 $\pm$ 11.21
14	88.23	100.00	94.11 $\pm$ 8.32
21	85.36	100.00	92.68 $\pm$ 10.35
28	77.20	100.00	88.60 $\pm$ 16.12
35	82.87	100.00	91.43 $\pm$ 12.11
42	79.76	100.00	89.88 $\pm$ 14.31
49	87.73	100.00	100.00 $\pm$ 8.68
56	77.27	100.00	88.63 $\pm$ 16.07
60	77.32	100.00	88.66 $\pm$ 16.04

ภาคผนวก

ข้อมูลการวิจัยแบบ 5 บรรทัด

แบบการจัดทำข้อมูลการวิจัย แบบ 5 บรรทัด

ชื่อโครงการ การประเมินกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของไมโครแคปซูลพฤษเคมีจากชานอ้อยที่ได้จากการทำแห้งแบบพ่นฝอยและความเป็นไปได้ในการใช้เป็นอาหารฟังก์ชัน

(สรุปผลงานวิจัยในภาพรวม งานวิจัยทำอะไร ได้ผลลัพธ์อะไร นำไปใช้ประโยชน์อย่างไร)

งานวิจัยมีแนวคิดการพัฒนาผลิตภัณฑ์พฤษเคมีจากชานอ้อยในรูปแบบไมโครแคปซูล เริ่มจากสกัดลิกลินิน แดกโครงสร้าง และการทำบริสุทธิ์ เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีสารประกอบฟีนอลสูงที่สุด สามารถแสดงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า vitamin E และ BHT และไม่เป็นพิษเฉียบพลันต่อหนูทดสอบ จากนั้นจึงขึ้นรูปผลิตภัณฑ์ด้วยการทำแห้งแบบพ่นฝอย มุ่งเน้นการใช้ประโยชน์ในการเป็นอาหารเชิงหน้าที่หรืออาหารฟังก์ชัน (functional food) ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพและสอดคล้องกับความต้องการของตลาดในปัจจุบัน

ภาคผนวก
สรุปผลงานวิจัยเพื่อเผยแพร่
(รายละเอียด 1 หน้ากระดาษ A4)

ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) การประเมินกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของไมโครแคปซูลฟลิกซ์เคมีจากขานอ้อย
ที่ได้จากการทำแห้งแบบพ่นฝอยและความเป็นไปได้ในการใช้เป็นอาหารฟังก์ชัน

(ภาษาอังกฤษ) Evaluation of antioxidant activities of spray-dried phytochemical microcapsules from sugarcane and their potential uses as functional foods

โดย (ชื่อนักวิจัย) ร.ศ. ดร.ภคมน จิตประเสริฐ

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตรมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

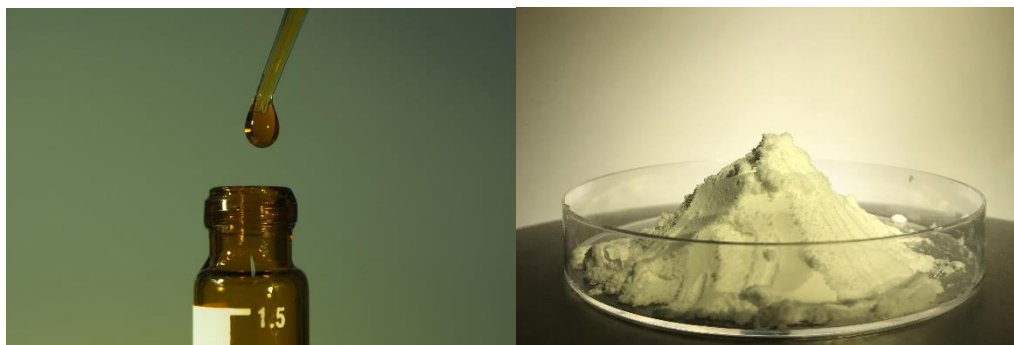
ประเด็นปัญหาการวิจัย

อุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทรายก่อให้เกิดขานอ้อยเหลือทิ้งในปริมาณมากกว่า 30 ล้านตันต่อปี โดยบางส่วนถูกใช้เพื่อการผลิตกระแสไฟฟ้าภายในโรงงานผลิตน้ำตาลทราย การผลิตวัสดุก่อสร้าง รวมไปถึงเยื่อกระดาษ แต่การใช้ประโยชน์เหล่านี้ยังมีมูลค่าต่ำ และคงเหลือขานอ้อยที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์อีกเป็นจำนวนมาก ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงเสนอแนวทางการใช้ประโยชน์จากขานอ้อย โดยมุ่งเน้นการใช้ลิกนินซึ่งเป็นส่วนที่มีถูกกำจัดทิ้ง เพื่อผลิตอาหารฟังก์ชันที่ก่อให้เกิดมูลค่าเพิ่มจากวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีมูลค่าต่ำ

การแก้ไขปัญหโดยใช้ผลงานวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีแนวคิดพัฒนาผลิตภัณฑ์ฟลิกซ์เคมีจากขานอ้อยที่มีกิจกรรมการต้านอนุมูล ขั้นแรกคือการหาสภาวะการสกัดพร้อมแตกโครงสร้างของลิกนินในขานอ้อยด้วยการใช้ความร้อนร่วมกับหม้อนึ่งความดันสูง ทำให้สารสกัดที่ได้แสดงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่สูงที่สุด จากนั้นจึงใช้เทคโนโลยีการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) ในการสร้างผลิตภัณฑ์ไมโครแคปซูลฟลิกซ์เคมีจากขานอ้อย โดยใช้ระเบียบวิธีวิจัยพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology) เพื่อหาความเข้มข้นของสารห่อหุ้มที่ทำให้ประสิทธิภาพการกักเก็บสาร และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด รวมถึงสามารถป้องกันการเสื่อมเสียของสารระหว่างเก็บรักษา ซึ่งเทคโนโลยีการทำแห้งแบบพ่นฝอยนั้นเป็นเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการผลิตระดับอุตสาหกรรม สามารถผลิตได้ต่อเนื่อง และมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำ เพื่อมุ่งเน้นการใช้ประโยชน์ในการเป็นอาหารฟังก์ชัน (functional food) ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพและสอดคล้องกับความต้องการของตลาดในปัจจุบัน

รูปภาพประกอบ



สารสกัดขานอ้อย

ไมโครแคปซูลสารสกัดขานอ้อย

ภาคผนวก

การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์อย่างเป็นรูปธรรม

รหัส โครงการ	R	D	G	5	9	5	0	0	8	1
-----------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

การรายงานการนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์อย่างเป็นรูปธรรม

๑. ชื่อโครงการ / กิจกรรมที่ได้รับการสนับสนุน

การประเมินกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของโมโคโรแคปซูลพฤษภูมิจากชานอ้อยที่ได้จากการทำแห้งแบบพ่นฝอยและความเป็นไปได้ในการใช้เป็นอาหารฟังก์ชัน

๒. ชื่อนักวิจัย ร.ศ.ภคมนจิตประเสริฐ

๓. งบประมาณที่ได้รับการสนับสนุน 880,910 บาท

๔. ปีงบประมาณที่ดำเนินการ 2558-25561

๕. การนำผลผลิตจากงานวิจัยไปสู่การใช้ประโยชน์

☒ มีการนำไปใช้ประโยชน์ ☐ ยังไม่มีการนำไปใช้ประโยชน์

๖. ช่วงเวลาทำงานวิจัยได้นำไปสู่การใช้ประโยชน์ ตั้งแต่ปี 2558 จนถึงปัจจุบัน

๗. เป้าหมายดำเนินการ

เผยแพร่ความรู้ เช่น การบรรยาย จัดแสดงโปสเตอร์วิชาการ และตีพิมพ์ผลงานในวารสารระดับนานาชาติ

๘. พื้นที่การใช้ประโยชน์

งานประชุมวิชาการ, สถาบันการศึกษา (ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)

๙. รูปแบบการใช้ประโยชน์จากงานวิจัยตามข้อ ๗ และ ๘ (สามารถเลือกได้มากกว่า ๑ รูปแบบ เนื่องจากถ้าเป็นเรื่องเดียวกันสามารถนำไปใช้มากกว่า ๑ มิติได้)

☐ ๙.๑. การใช้ประโยชน์มีนโยบาย ได้แก่ การนำข้อมูลไปประกอบการตัดสินใจในการบริหาร / กำหนดนโยบาย โดย

- ☐ ได้รับหนังสือขอข้อมูลเพื่อใช้ประกอบการตัดสินใจในเรื่องใดเรื่องหนึ่ง
- ☐ ได้รับหนังสือเรียนเชิญให้ข้อมูลประกอบการตัดสินใจ / กำหนดนโยบาย
- ☐ อื่นๆ(โปรดระบุ).....

☐ ๙.๒. การใช้ประโยชน์มีเศรษฐกิจ / พาณิชยกรรม โดย

- ☐ ได้รับหนังสือหรือหลักฐานอื่น แสดงความสนใจเพื่อเจรจาธุรกิจ
- ☐ มีการซื้อ - ขาย เทคโนโลยีระหว่างนักวิจัยและผู้นำไปใช้ประโยชน์
- ☐ อื่นๆ(โปรดระบุ)

☒ ๙.๓. การใช้ประโยชน์จากการพัฒนาสังคม / ชุมชน / ท้องถิ่น โดย

- ☒ การถ่ายทอดเทคโนโลยีที่ได้รับจากงานวิจัยในชุมชน / ท้องถิ่น (อบรม , คู่มือ , แผ่นพับ , โปสเตอร์, เว็บไซต์ ฯลฯ)
- ☒ ได้รับหนังสือเรียนเชิญให้ความรู้จากชุมชน / องค์กร / หน่วยงานในพื้นที่ต่างๆ
- ☐ อื่นๆ(โปรดระบุ)

☒ ๙.๔. การใช้ประโยชน์มิติวิชาการ โดย

- ☐ ได้มีการอ้างอิงผลงานที่ตีพิมพ์วารสารวิชาการระดับประเทศ / ระดับนานาชาติ
- ☐ ได้รับหนังสือเรียนเชิญเป็นวิทยากรเพื่อให้ความรู้ในกรอบของผลงานวิจัยจากหน่วยงานต่างๆ
- ☒ อื่นๆ(โปรดระบุ) กำลังดำเนินการร่างผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

๑๐. รายละเอียดผลการดำเนินงานตามข้อ ๙ เกิดการเปลี่ยนแปลงจากการนำผลผลิตจากงานวิจัยไปใช้อย่างไร

การดำเนินงานของโครงการสามารถสร้างองค์ความรู้ใหม่ โดยมีแผนการนำผลงานที่เกิดขึ้นไปบรรยายให้ความรู้ในงานประชุมวิชาการ หรือตีพิมพ์ลงในวารสารนานาชาติ (International journal paper) พร้อมทั้งผลิตบุคคลากรที่มีความเชี่ยวชาญเพื่อมุ่งหวังให้เกิดการใช้ความรู้ดังกล่าวไปติดต่อ ยอดในระดับอุตสาหกรรม

๑๑. รูปภาพประกอบกิจกรรมหรือ รูปภาพแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบกับก่อน – หลัง การนำผลผลิตจากงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (พร้อมคำบรรยายกิจกรรมโดยย่อ ที่แสดงถึงวัน เดือน ปี ที่จัดกิจกรรม)

- จัดทำเอกสารอิเล็กทรอนิกส์ในรูปแบบของอินโฟกราฟิกส์ (Infographics) เผยแพร่ให้ความรู้เมื่อวันที่ 5 ตุลาคม 2559 ในเว็บไซต์

<https://www.facebook.com/BBBSpecialResearchUnit/photos/a.831987243517648.1073741844.676064859109888/1040734302642940/?type=3&theater>



- จัดแสดงโปสเตอร์วิชาการ ติดแสดงบริเวณที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อาคารอุตสาหกรรมเกษตร 3 ชั้นที่ 6



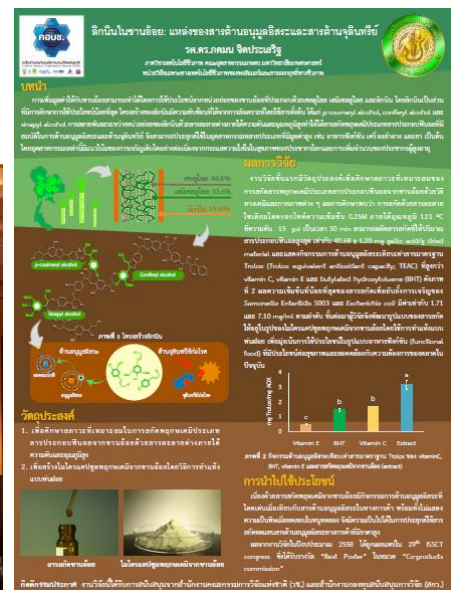
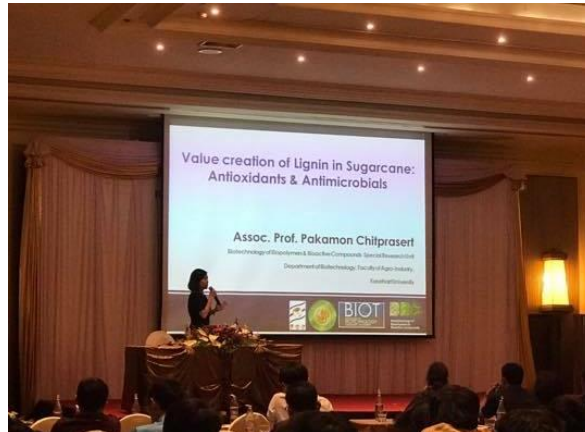
- สิ่งพิมพ์ทางวิชาการ

ชื่อผลงาน ”Ultrasonic-assisted extraction of antioxidants and antimicrobial from sugarcane bagasse”

เผยแพร่ที่งานประชุมนักวิชาการอ้อยและน้ำตาลนานาชาติ ครั้งที่ 29 (International Society of Sugar Cane Technologists , ISSCT) ที่จัดขึ้นระหว่างวันที่ 5-8 ธันวาคม 2559 ณ ศูนย์ประชุมและแสดงสินค้านานาชาติ จังหวัดเชียงใหม่ โดยได้รับรางวัลการนำเสนอผลงานในรูปแบบโปสเตอร์ดีเด่น (best posters award)



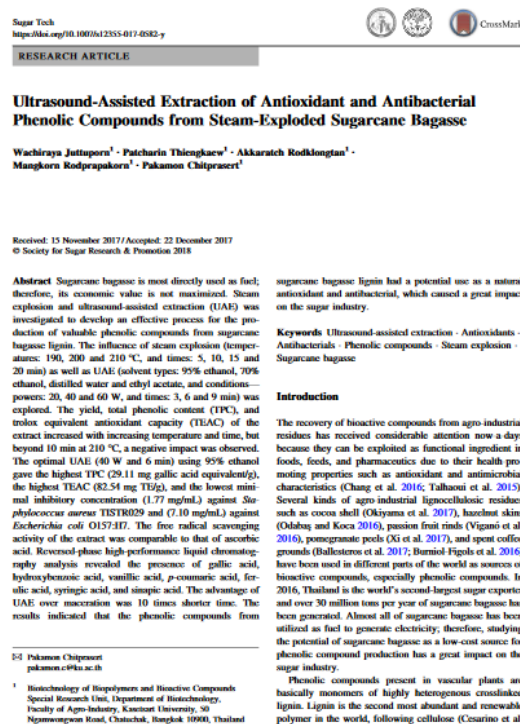
- ได้รับเชิญเข้าบรรยายงานประชุมวิชาการที่จัดขึ้นโดยโครงการน้ำตาลในวันที่ 14 กันยายน. 60 นำเสนอผลงานปากเปล่าพร้อมเผยแพร่ในรูปแบบโปสเตอร์วิชาการ



- ตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารนานาชาติ

Juttuporn, W., P. Thiengkaew, A. Rodklongtan, M. Rodprapakorn and P.

Chitprasert. 2018. Ultrasound-assisted extraction of antioxidant and antibacterial phenolic compounds from steam-exploded sugarcane bagasse. **Sugar Tech**: 1 – 10.



ภาคผนวก

รายงานการทดสอบความเป็นพิษ

โครงการย่อยที่ 2

โครงการย่อยที่ 2

บทสรุปผู้บริหาร (Executive Summary)

คณะผู้วิจัยมุ่งสร้างมูลค่าเพิ่มแก่ขานอ้อยซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำตาลทรายและมีปริมาณมหาศาล โดยในอดีตขานอ้อยจะถูกใช้เป็นเพียงวัตถุดิบสำหรับผลิตเยื่อกระดาษหรือเป็นเชื้อเพลิงสำหรับผลิตไอน้ำซึ่งเป็นการใช้ประโยชน์ที่มีมูลค่าต่ำ แต่เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของขานอ้อยจะมีเซลลูโลส 50% เฮมิเซลลูโลสและลิกนินชนิดละ 25% โดยเฉพาะอย่างยิ่งการสร้างมูลค่าเพิ่มโดยการสกัดลิกนินในขานอ้อยเพื่อผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) และสารต้านจุลินทรีย์ (Antimicrobial) ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงสนใจจะพัฒนากระบวนการสกัดแยกลิกนินออกจากเส้นใยเพื่อการผลิตสารต้านอนุมูลอิสระ (โครงการย่อยที่ 1) ก่อน แล้วโครงการย่อยที่ 2 นี้จึงมุ่งพัฒนากระบวนการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสซึ่งมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นไซแลน (xylan) ด้วยเอนไซม์ไซลานเนส (xylanase) และไซโลซิเดส (xylosidase) ให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลไซโลสเพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตไซลิทอลด้วยยีสต์ต่อไป

สภาวะที่เหมาะสมของการย่อยไซแลนในขานอ้อยด้วยเอนไซม์ไซลานเนสคือ ขานอ้อย 10% (w/v) นาน 24 ชั่วโมง และค่าพีเอช 6.0 แต่การย่อยไซแลนในขานอ้อยด้วยเอนไซม์ไซโลซิเดสได้ไซโลสต่ำมาก ดังนั้นจึงใช้เอนไซม์ไซลานเนสและไซโลซิเดสทำงานร่วมกันในการย่อยไซแลนในขานอ้อยให้เป็นไซโลส และพบว่าสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยสลายไซแลนในขานอ้อยด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดคือ ขานอ้อย 10% (w/v) และค่าพีเอช 6.0

ผลการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Candida magnoliae* TISTR 5664 เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมของการผลิตไซลิทอลในอาหารเหลว YNB ในระดับฟลask ขยายที่ 170 rpm พบว่าไซลิทอลเพิ่มสูงขึ้นตามความเข้มข้นของไซโลสที่เพิ่มสูงขึ้น และอาหารเหลว YNB ซึ่งมีความเข้มข้นของไซโลส 100 g/L ผลิตไซลิทอลได้สูงสุด 14.935 g/L ที่ 72 ชั่วโมง ดังนั้นจึงเลือกอาหารเหลว YNB ซึ่งมีความเข้มข้นของไซโลส 100 g/L เพื่อใช้ศึกษาในลำดับต่อไป

การศึกษามหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลด้วยยีสต์ พบว่า *C. magnoliae* TISTR 5664 ผลิตไซลิทอลสูงสุด 16.62 g/L ที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 5.0 ที่ 72 ชั่วโมง จึงใช้ค่าพีเอชเริ่มต้น 5.0 ในการศึกษาขั้นต่อไป และการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลด้วยยีสต์ พบว่าเนื่องจากยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5664 เป็น mesophilic yeast จึงสามารถผลิตไซลิทอลได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30-37°C และผลิตไซลิทอลสูงสุด 17.77 g/L ที่อุณหภูมิ 37°C

ผลการศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลไซโลสต่อการผลิตไซลิทอลโดยยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5664 ในระดับฟลask ขยาย พบว่า ระหว่างน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100, 200 และ 300 g/L น้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 g/L ให้ผลผลิตไซลิทอลสูงสุด (90.52 g/L) และให้ผลผลิตสูงสุดเร็วที่สุด (24 ชั่วโมง)

สำหรับการศึกษาการขยายขนาดการผลิตไปสู่ระดับถังหมักโดยใช้ถังหมักขนาด 10 ลิตร (Working Volume 6 ลิตร) พบว่า การเลี้ยง *C. magnoliae* TISTR 5664 ในอาหารเหลว YNB ซึ่งมีน้ำตาลไซโลส

ความเข้มข้น 100 g/L พีเอชเริ่มต้น 5.0 ความเร็วรอบ 300 rpm ให้อากาศ 1 VVM อุณหภูมิ 37°C นาน 18 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซลิทอล โดยให้ผลผลิตไซลิทอลในปริมาณสูงสุด (70.25 – 75.70 g/L) และใช้ระยะเวลาผลิตสั้นที่สุด (ระยะเวลา 18 ชั่วโมง)

ผลการศึกษากระบวนการทำให้ไซลิทอลบริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ ผ่านคอลัมน์เรซิน Purolite PCR833 ซึ่งอยู่ในรูปของแคลเซียม กำหนดอัตราส่วนปริมาตรบรรจุเรซินต่อปริมาตรสารตัวอย่าง 120 : 30 โดยใช้ น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวชะล้างที่อุณหภูมิห้องด้วยอัตราการไหล 60 ml/h พบว่า สามารถแยกไซลิทอลออกจากน้ำหมักได้อย่างสมบูรณ์เมื่อสัดส่วนระหว่างปริมาตรของน้ำล้างกับปริมาตรของเรซินทั้งหมด (V_e / V_t) สูงกว่า 0.4 เป็นต้นไป และค่า % Recovery คิดเป็นเท่ากับ 57.21%

และผลการทดสอบความเป็นพิษของไซลิทอลที่ผลิตได้โดยการป้อนพร้อมอาหารให้แก่หนูทดลองในอัตรา 2,000 mg/kg พบว่าไม่มีการตายของหนูทดลอง และไม่พบอาการหรือสัญญาณแสดงความเป็นพิษตลอดการสังเกตนาน 14 วัน

บทคัดย่อ

โครงการย่อยที่ 2 “การผลิตไซลิทอลจากขานอ้อย” ภายใต้แผนงานวิจัย “การสร้างมูลค่าเพิ่มแก่ขานอ้อยด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ” เพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มแก่ขานอ้อยโดยการใช้ประโยชน์ไซแลนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสในขานอ้อย โดยการศึกษากระบวนการผลิตไซลิทอลจากขานอ้อย ซึ่งเริ่มต้นจากการย่อยไซแลนในขานอ้อยด้วยเอนไซม์ไซลาเนสให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลไซโลสสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตไซลิทอลด้วยยีสต์ *Candida magnoliae* TISTR 5664 แต่พบว่าการใช้เอนไซม์ไซลาเนสเพียงชนิดเดียวให้ผลผลิตน้ำตาลไซโลสต่ำมาก ดังนั้นจึงศึกษาการย่อยไซแลนโดยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ไซลาเนสและเบต้าไซโลซิเดส อย่างไรก็ตามเนื่องจากในขานอ้อยมีไซแลนเพียงประมาณ 25% แม้ย่อยขานอ้อยในสภาวะที่เหมาะสม (ขานอ้อย 10% w/v) ด้วยเอนไซม์สองชนิดแล้วก็ยังมีปริมาณของน้ำตาลไซโลสต่ำเพียง 12.96 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะให้ผลผลิตไซลิทอลต่ำมาก จึงจำเป็นต้องศึกษาการผลิตไซลิทอลด้วยยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5664 โดยใช้น้ำตาลไซโลสเป็นวัตถุดิบแทน ผลการศึกษาในระดับฟลask เช้าพบว่าสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไซลิทอลด้วยยีสต์สายพันธุ์นี้ในอาหารเหลว YNB คือ น้ำตาลไซโลส 100 g/L พีเอชเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 37°C เช้า 250 rpm ซึ่งให้ผลผลิตไซลิทอลสูงสุด 90.52 g/L ณ ชั่วโมงที่ 24 และเมื่อศึกษาการขยายขนาดการผลิตสู่ถังหมักขนาด 10 ลิตร พบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซลิทอลในถังหมักคือ น้ำตาลไซโลส 100 g/L พีเอชเริ่มต้น 5.0 กวน 300 rpm ให้อากาศ 1 VVM อุณหภูมิ 37°C นาน 18 ชั่วโมง โดยให้ผลผลิตไซลิทอล 70.25-75.70 g/L และใช้เวลาสั้นที่สุด (18 ชั่วโมง) นอกจากนี้ยังศึกษาการทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุผ่านคอลัมน์เรซิน Purolite PCR833 ใช้อัตราส่วนปริมาตรเรซินต่อปริมาตรสารตัวอย่าง 120 : 30 ใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวชะล้างที่อุณหภูมิห้องด้วยอัตราการไหล 60 mL/h พบว่าสามารถแยกไซลิทอลออกจากน้ำหมักได้อย่างสมบูรณ์เมื่อสัดส่วนระหว่างปริมาตรของน้ำล้างกับปริมาตรเรซินทั้งหมด (V_e / V_f) สูงกว่า 0.4 เป็นต้นไป และค่า % Recovery เท่ากับ 57.21% และผลการทดสอบความเป็นพิษของไซลิทอลที่ผลิตได้โดยการป้อนพร้อมอาหารให้แก่หนูทดลองในอัตรา 2,000 mg/kg พบว่าไม่มีการตายของหนูทดลอง และไม่พบอาการหรือสัญญาณแสดงความเป็นพิษตลอดการสังเกตนาน 14 วัน

สารบัญ

	หน้า
บทสรุปผู้บริหาร	
บทคัดย่อ	
สารบัญ	ก
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของโครงการ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	12
บทที่ 4 ผลการศึกษาและอภิปรายผล	15
บทที่ 5 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	42
ภาคผนวก	

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 คุณสมบัติทางด้านฟิสิกส์และทางเคมีที่สำคัญของไซลิทอล	5
2 การแยกไซลิทอลซึ่งผลิตได้จากยีสต์ <i>Candida magnolia</i> TISTR 5664 โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ ผ่านคอลัมน์เรซิน Purolite PCR833 (กำหนดอัตราส่วนปริมาตรบรรจุเรซินต่อปริมาตรสารตัวอย่าง 120 : 30 โดยใช้น้ำเป็นตัวชะล้างที่อุณหภูมิห้องด้วยอัตราการไหล 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง)	40

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่		หน้า
1	วิธีการเกิดไซลิทอลจากเมทาบอลิซึมของไซโลสโดยยีสต์	9
2	กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลไซโลสของการแช่น้ำและไม่แช่น้ำของชานอ้อยก่อนการผลิตไซโลสจากชานอ้อยที่ย่อยด้วยเอนไซม์ไซลานเนส ในละลายไซเดียมซิทเรทไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0 นาน 48 ชั่วโมง	16
3	กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลไซโลสซึ่งเกิดจากการใช้ปริมาณชานอ้อยต่อปริมาณเอนไซม์ไซลานเนส โดยใช้ปริมาณชานอ้อยที่แตกต่างกันคือ 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ในละลายไซเดียมซิทเรทไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0 นาน 24 ชั่วโมง	17
4	กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลไซโลสซึ่งเกิดจากการใช้เอนไซม์ไซลานเนสละลายในไซเดียมซิทเรทไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ในพีเอชที่แตกต่างกันคือพีเอช 5.5, 6.0 และ 6.5 นาน 24 ชั่วโมง	18
5	กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลไซโลสของการแช่น้ำและไม่แช่น้ำของชานอ้อยก่อนการผลิตไซโลสจากชานอ้อยที่ย่อยด้วยเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส ในละลายไซเดียมซิทเรทไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0 นาน 48 ชั่วโมง	19
6	กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลไซโลสระหว่างปริมาตรชานอ้อยต่อปริมาตรเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์ไซโลซิเดสในอัตราส่วน 1:1 และปริมาณชานอ้อยที่แตกต่างกันคือ 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ในละลายไซเดียมซิทเรทไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0 นาน 48 ชั่วโมง	20
7	กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลไซโลสซึ่งเกิดจากการใช้เอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์ไซโลซิเดส ละลายในไซเดียมซิทเรทไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ในพีเอชที่แตกต่างกันคือพีเอช 5.5 และ 6.0 นาน 24 ชั่วโมง	21
8	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักเซลล์แห้ง ต่อการผลิตไซลิทอลโดย <i>Candida magnoliae</i> TISTR 5664 ที่ความเข้มข้นของไซโลส 15 กรัมต่อลิตร	23
9	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักเซลล์แห้ง ต่อการผลิตไซลิทอลโดย <i>Candida magnoliae</i> TISTR 5664 ที่ความเข้มข้นของไซโลส 25 กรัมต่อลิตร	23

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
10	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักรเซลล์แห้ง ต่อการผลิตไซลิทอลโดย <i>Candida magnoliae</i> TISTR 5664 ที่ความเข้มข้นของไซโลส 50 กรัมต่อลิตร	24
11	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักรเซลล์แห้ง ต่อการผลิตไซลิทอลโดย <i>Candida magnoliae</i> TISTR 5664 ที่ความเข้มข้นของไซโลส 75 กรัมต่อลิตร	24
12	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักรเซลล์แห้ง ต่อการผลิตไซลิทอลโดย <i>Candida magnoliae</i> TISTR 5664 ที่ความเข้มข้นของไซโลส 100 กรัมต่อลิตร	25
13	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักรเซลล์แห้งในการผลิตไซลิทอลโดย <i>Candida magnoliae</i> TISTR 5664 ที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 4.0	26
14	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักรเซลล์แห้งในการผลิตไซลิทอลโดย <i>Candida magnoliae</i> TISTR 5664 ที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 5.0	26
15	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักรเซลล์แห้งในการผลิตไซลิทอลโดย <i>Candida magnoliae</i> TISTR 5664 ที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 6.0	27
16	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักรเซลล์แห้งในการผลิตไซลิทอลโดย <i>Candida magnoliae</i> TISTR 5664 ที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 7.0	27
17	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักรเซลล์แห้งในการผลิตไซลิทอลโดย <i>Candida magnoliae</i> TISTR 5664 ที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 8.0	28
18	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักรเซลล์แห้งในการผลิตไซลิทอลโดย <i>Candida magnoliae</i> TISTR 5664 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	29

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
19	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักเซลล์แห้งในการผลิตไซลิทอลโดย <i>Candida magnoliae</i> TISTR 5664 ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส	29
20	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักเซลล์แห้งในการผลิตไซลิทอลโดย <i>Candida magnoliae</i> TISTR 5664 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	30
21	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักเซลล์แห้งในการผลิตไซลิทอลโดย <i>Candida magnoliae</i> TISTR 5664 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	30
22	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักเซลล์แห้งในการผลิตไซลิทอลโดย <i>Candida magnoliae</i> TISTR 5664 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	31
23	กราฟแสดงความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส และปริมาณผลผลิตไซลิทอลในการผลิตไซลิทอลในระดับฟลาสก์โดยเชื้อ <i>Candida magnoliae</i> TISTR 5664 ในอาหารเหลว YNB ซึ่งมีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 5.0 บ่มบนเครื่องเขย่า 170 และ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง	32
24	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักเซลล์แห้ง ในการผลิตไซลิทอลในระดับฟลาสก์โดย <i>Candida magnoliae</i> TISTR 5664 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลไซโลส 100 กรัมต่อลิตร บ่มบนเครื่องเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง	33
25	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักเซลล์แห้ง ในการผลิตไซลิทอลในระดับฟลาสก์โดย <i>Candida magnoliae</i> TISTR 5664 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลไซโลส 200 กรัมต่อลิตร บ่มบนเครื่องเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง	33

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
26	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักเซลล์แห้ง ในการผลิตไซลิทอลในระดับฟลาสก์โดย <i>Candida magnoliae</i> TISTR 5664 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลไซโลส 300 กรัมต่อลิตร บ่มบนเครื่องเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง	34
27	กราฟแสดงความสัมพันธ์ผลระหว่างความเข้มข้นของไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักเซลล์แห้ง ในการผลิตไซลิทอลในระดับถังหมักโดย <i>Candida magnoliae</i> TISTR 5664 ในอาหาร YNB ซึ่งมีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร พีเอช เริ่มต้น 5.0 ความเร็วรอบ 300 rpm ให้อากาศ 1 VVM อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง	35
28	กราฟแสดงความสัมพันธ์ผลระหว่างความเข้มข้นของไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักเซลล์แห้ง ในการผลิตไซลิทอลในระดับถังหมักโดย <i>Candida magnoliae</i> TISTR 5664 ในอาหาร YNB ซึ่งมีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร พีเอช เริ่มต้น 5.0 ความเร็วรอบ 300 rpm ให้อากาศ 1 VVM อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง	36
29	กราฟแสดงความสัมพันธ์ผลระหว่างความเข้มข้นของไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักเซลล์แห้ง ในการผลิตไซลิทอลในระดับถังหมักโดย <i>Candida magnoliae</i> TISTR 5664 ในอาหาร YNB ซึ่งมีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร พีเอช เริ่มต้น 5.0 ความเร็วรอบ 300 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง	37
30	กราฟแสดงความสัมพันธ์ผลระหว่างความเข้มข้นของไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักเซลล์แห้ง ในการผลิตไซลิทอลในระดับถังหมักโดย <i>Candida magnoliae</i> TISTR 5664 ในอาหาร YNB ซึ่งมีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร พีเอช เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ความเร็วรอบ 300 rpm ให้อากาศ 0.8 VVM อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง	38
31	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนระหว่างปริมาตรของสารชะกับปริมาตรของเรซินทั้งหมด (V_e / V_t) กับความเข้มข้นน้ำตาลภายหลังจากการชะล้างน้ำหมักที่ได้จาก <i>Candida magnolia</i> TISTR 5664 ผ่านคอลัมน์เรซิน Purolite PCR833	39

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของเรื่อง

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โดยมีเนื้อที่ปลูกอ้อยทั่วประเทศในปี พ.ศ.2556 ทั้งหมด 9,487,320 ไร่ (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2557ก) การปลูกอ้อยมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทราย ซึ่งประเทศไทยส่งออกน้ำตาลเป็นอันดับต้นๆ ของโลก ในปี พ.ศ.2556 สามารถผลิตน้ำตาลทรายได้ 6,266,825 ตัน จากโรงงานน้ำตาลทรายทั่วประเทศ 51 โรง (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2557ข) การผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยก่อให้เกิดวัตถุดิบเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ กากตะกอน (filter cakes) กากน้ำตาล (molasses) และขานอ้อย (bagasses) ในปริมาณมาก

ขานอ้อย คือ ส่วนของลำต้นอ้อยที่หีบเอาน้ำอ้อยออกแล้ว คิดเป็นปริมาณ 27.0-29.0% ของอ้อยที่เข้าหีบ (มิตรผล, 2554) ดังนั้นจากการผลิตน้ำตาลทรายจึงเหลือขานอ้อยจากการหีบในปริมาณหลายล้านตันต่อปี ในปัจจุบันได้มีการนำขานอ้อยไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้แก่ ใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับผลิตไอน้ำและกระแสไฟฟ้าภายในโรงงานผลิตน้ำตาลทราย ใช้ผลิตวัสดุก่อสร้าง ใช้ผลิตกระดาษ ใช้ทำปุ๋ยหมัก และใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อรักษาความชื้นของดินและป้องกันวัชพืช (นิรนาม, ม.ป.ป.) ซึ่งการใช้ประโยชน์เหล่านี้มีมูลค่าต่ำ ทั้งยังคงเหลือขานอ้อยที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์อีกเป็นจำนวนมาก

ดังนั้นโครงการย่อยที่ 2 จึงมุ่งศึกษากระบวนการย่อยสลายไซแลน (Xylan) ซึ่งเป็นองค์ประกอบภายในเส้นใยของขานอ้อยด้วยเอนไซม์ไซลานเนส (Xylanase) และไซโลซิเดส (Xylosidase) ให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลไซโลส (Xylose) สำหรับใช้เป็นสารตั้งต้นของการผลิตไซลิทอล (Xylitol) ด้วยยีสต์ซึ่งมีความสามารถในการผลิตไซลิทอลได้สูง และจะทำให้ไซลิทอลที่ผลิตขึ้นนี้มีความบริสุทธิ์จนสามารถนำไปใช้งานได้ต่อไป ดังนั้นจึงนับว่าเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่ขานอ้อยที่มีปริมาณมหาศาลได้อย่างมาก

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1) เพื่อสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับชานอ้อยและพัฒนาองค์ความรู้ด้านการผลิตไซลิทอลจากการย่อยสลายชานอ้อยด้วยเอนไซม์
- 2) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยสลายไซแลนภายในเส้นใยของชานอ้อยด้วยเอนไซม์ไซลานเนสและไซโลซิเดสเพื่อให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลไซโลส
- 3) เพื่อศึกษากระบวนการผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสที่ย่อยสลายได้จากไซแลนภายในเส้นใยของชานอ้อยโดยยีสต์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้สูงในระดับฟลาสก์เขย่า
- 4) เพื่อศึกษาผลกระทบของการขยายขนาดการผลิตไซลิทอลจากระดับฟลาสก์เขย่าไปสู่ระดับถังหมัก
- 5) เพื่อศึกษากระบวนการทำให้ไซลิทอลที่ผลิตได้มีความบริสุทธิ์
- 6) เพื่อตรวจวิเคราะห์ความเป็นพิษของไซลิทอลที่ผลิตได้และผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในสัตว์ทดลอง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยนี้จะศึกษาสภาวะการย่อยชานอ้อยด้วยเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์ไซโลซิเดสเพื่อเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลไซโลสสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไซลิทอลด้วยจุลินทรีย์ และทำให้ไซลิทอลที่ผลิตได้บริสุทธิ์ต่อไป

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

โครงการย่อยที่ 2

เดือนที่	กิจกรรม (activities)	ผลงานที่คาดว่าจะได้รับ (outputs)
6 เดือนที่ 1	1. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยสลายไคเลนภายในขานอ้อยด้วยเอนไซม์ไคลานเนสและไซโลซิเดส 2. การศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณขานอ้อยต่อเอนไซม์ไคลานเนสและไซโลซิเดส 3. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไคลิทอลจากน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์ 4. การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมของการผลิตไคลิทอลจากน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์	1. ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยสลายไคเลนภายในขานอ้อยด้วยเอนไซม์ไคลานเนสและไซโลซิเดส 2. ทราบอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณขานอ้อยต่อเอนไซม์ไคลานเนสและไซโลซิเดส 3. ทราบสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไคลิทอลจากน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์ 4. ทราบสูตรอาหารที่เหมาะสมของการผลิตไคลิทอลจากน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์
6 เดือนที่ 2	1. การศึกษาการขยายขนาดการผลิตไคลิทอลจากระดับพลาสก์เขย่าไปสู่ระดับถังหมัก 2. การศึกษาผลกระทบของการขยายขนาดการผลิตจากระดับพลาสก์เขย่าไปสู่ระดับถังหมัก 3. การศึกษาหากระบวนการทำให้ไคลิทอลบริสุทธิ์ 4. การทดสอบความเป็นพิษของไคลิทอลที่ผลิตได้และผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในสัตว์ทดลอง 5. สรุปผลการวิจัย และจัดทำรายงาน	1. ทราบสภาวะการผลิตไคลิทอลในระดับถังหมัก 2. ทราบผลกระทบของการขยายขนาดการผลิตไคลิทอลจากระดับพลาสก์เขย่าไปสู่ระดับถังหมัก 3. ทราบกระบวนการทำให้ไคลิทอลบริสุทธิ์ 4. ทราบผลการทดสอบความเป็นพิษของไคลิทอลที่ผลิตได้และผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในสัตว์ทดลอง 5. รายงานสรุปผลการวิจัย

บทที่ 2

ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Xylitol Production

ไซลิทอล (Xylitol) เป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ประกอบด้วยคาร์บอน 5 อะตอม ซึ่งจัดเป็นสารให้ความหวานชนิดหนึ่งและมีความหวานคล้ายคลึงกับน้ำตาลซูโครส ไซลิทอลมีคุณสมบัติเฉพาะตัวที่ดี เช่น ไซลิทอลสามารถช่วยป้องกันฟันผุได้เพราะเป็นน้ำตาลที่จุลินทรีย์ในช่องปากไม่สามารถใช้ในการเจริญได้ และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Streptococcus mutans* ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของฟันผุ นอกจากนี้สารไซลิทอลยังมีคุณสมบัติในการช่วยกระตุ้นการหลั่งของน้ำลายโดยน้ำลายยังเป็นตัวกลางในการนำแร่ธาตุที่มีประโยชน์มาหล่อเลี้ยงฟันจึงเท่ากับช่วยลดโอกาสของการเกิดฟันผุลงอีกทางหนึ่งด้วย (Pepper and Olinger , 1987) รสชาติของไซลิทอลเมื่อละลายในปากแล้วให้ความรู้สึกที่เย็นสดชื่น คล้ายเมนทอล จากคุณสมบัติเฉพาะตัวที่ดีของไซลิทอลนี้ ทำให้นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น หมากฝรั่ง และลูกอม เป็นต้น นอกจากนี้สามารถใช้ไซลิทอลในยาและเวชภัณฑ์ทางการแพทย์ได้อีกด้วย

ไซลิทอล (Xylitol)

ไซลิทอล (Xylitol: $C_5H_{12}O_5$) จัดเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ (Sugar alcohol) มีรูปผลึกสีขาว รสชาติคล้ายน้ำตาล ประกอบด้วยคาร์บอนห้าอะตอมเป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลไซโลส (xylose : $C_5H_{10}O_5$) พบได้ในธรรมชาติ เช่น ผักและผลไม้ (Parajo et al., 1998)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางด้านฟิสิกส์และทางเคมีที่สำคัญของไซลิทอล

คุณสมบัติ	รายละเอียด
โครงสร้าง	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{HOCH} \\ \\ \text{HCOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array} $
สูตรโมเลกุล	$\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_5$
น้ำหนักโมเลกุล	152.1
รสชาติและกลิ่น	รสหวาน ไม่มีกลิ่น
สี	สีขาว
ความหวานสัมพัทธ์	ไซลิทอล(85-120) มีความหวานโดยประมาณเท่ากับน้ำตาลซูโครส(100)แต่หวานมากกว่ากลูโคส(70), โซโลส(67), ซอร์บิทอล(50)และแมนนิทอล(40)แต่มีความหวานน้อยกว่าฟรุคโทส(150)
จุดหลอมเหลว	93.4 – 94.7 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	216 องศาเซลเซียส
การละลายในน้ำ	64.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร

คุณสมบัติและข้อดีอื่นๆ ของไซลิทอลที่น่าสนใจ (สารโจน, 2537)

1. ไซลิทอลละลายได้ง่ายในน้ำ เป็นสารละลายที่มีความคงตัวสูง แม้ว่าจะถูกความร้อนหรือเก็บทิ้งไว้นานและไม่เกิดปฏิกิริยา Maillard Browning และ Caramelization อย่างน้ำตาลฟรุคโทสหรือเดกซ์โทรส เมื่อใช้ความร้อนสูงกว่า 150 องศาเซลเซียส เป็นข้อเสียในการใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์ที่ต้องการคุณสมบัติดังกล่าว และเนื่องจากมีจุลินทรีย์ไม่มากนักที่สามารถใช้ไซลิทอลได้จึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของไซลิทอลเก็บรักษาไว้ได้นานไม่เสียง่าย
2. ไซลิทอลให้รสชาติดี เย็นและสดชื่น (cooling effect) คล้ายกับเมนทอล เนื่องจากการละลายของไซลิทอลต้องการความร้อน (endothermic dissolution) คือมีค่าความร้อนจำเพาะในการละลายเป็นลบ (-34.8 แคลอรีต่อกรัม) ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวซอร์บิทอล (-26.5 แคลอรีต่อกรัม

3. โซลิตอลมีความหวานเท่ากับน้ำตาลทั่วไป แต่มีความหวานมากกว่าแมนนิทอล และซอร์บิทอล 2.5 และ 2 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับน้ำตาลซูโครสจะมีค่าความหวานตั้งแต่ 0.85 ถึง 1.25 เท่า ซึ่งขึ้นอยู่กับค่าพีเอช ความเข้มข้น และอุณหภูมิ เป็นต้น
4. พลังงาน (caloric value) ที่ได้จากโซลิตอล 1 กรัม เท่ากับ 4.06 กิโลแคลอรี ซึ่งเหมือนกับพลังงานที่ได้จากอาหารคาร์โบไฮเดรตทั่วไป แต่การใช้โซลิตอลผสมกับน้ำตาลหรือสารให้ความหวานชนิดอื่นสามารถคงความหวานและรสชาติของผลิตภัณฑ์ได้เช่นเดิม แต่สามารถลดแคลอรีได้ 50 ถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้มีการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มประเภท กาแฟ น้ำผลไม้ น้ำอัดลม จึงเหมาะสมแก่ผู้บริโภคที่ต้องการลดน้ำหนัก
5. โซลิตอลป้องกันฟันผุ (non-cariogenicity) เนื่องจากจุลินทรีย์ในช่องปากไม่สามารถใช้โซลิตอลเป็นแหล่งอาหารได้ ทำให้สภาพพีเอชบนเคลือบฟันไม่ต่ำกว่า 5.7 จึงไม่มีการผลิตกรดเกิดขึ้น จึงทำให้ลดการเกิดฟันผุได้

ประโยชน์ของโซลิตอล (สารโชน, 2537ก)

1. การนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

พบว่ามีการใช้โซลิตอลในผลิตภัณฑ์อาหารอย่างแพร่หลาย เช่น ขนมอบ แยม มาร์มาเลด เป็นต้น เนื่องจากโซลิตอลมีคุณสมบัติเฉพาะหลายประการที่ทดแทนน้ำตาลได้ และยังมีข้อดี คือ แก้ปัญหาฟันผุ ที่เกิดจากการบริโภคผลิตภัณฑ์ทั้งหลายที่มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบ โซลิตอลจะให้คุณภาพที่ทัดเทียมหรือดีกว่าน้ำตาลซูโครส อาทิ คุณสมบัติที่เย็นสดชื่น การเพิ่มคุณค่าทางรสชาติจำพวกรสเปปเปอร์มินต์ และรสผลไม้ต่างๆ

2. การนำไปใช้ทางการแพทย์

มีการนำโซลิตอลไปใช้เป็นอาหารของผู้ป่วย เนื่องจากโซลิตอลไม่เกิดปฏิกิริยากับกรดอะมิโน ทำให้การเตรียมอาหารเหลวใช้ทางสายยางง่ายกว่าการเตรียมโดยใช้น้ำตาลกลูโคส และ การใช้โซลิตอลในร่างกายจะไม่ขึ้นกับอินซูลิน จึงทำให้ปัญหาในการใช้น้ำตาลกลูโคสของผู้ป่วยหมดไป ผู้ป่วยโรคเบาหวานก็เหมาะที่จะนำโซลิตอลเป็นสารให้ความหวานในอาหารของผู้ป่วยแทนน้ำตาลกลูโคสเพราะจะไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณน้ำตาลในเลือด และยังลดปัญหาฟันผุอีกด้วย ทำให้มีผลดีต่อผู้ป่วยที่ต้องบริโภคน้ำเป็นเวลานาน

การผลิตไซลิทอล

ไซลิทอลสามารถพบได้ในผักและผลไม้หลายชนิด เช่น ต้นเบิร์ช สโตเบอร์รี่ แครอท ชังข้าวโพด ฟาง รำข้าว ผลไม้เปลือกแข็งจำพวกถั่วต่างๆ เป็นต้น ปัจจุบันการผลิตไซลิทอลในอุตสาหกรรมใช้วิธีการทางเคมี กระบวนการไฮโดรจีเนชัน (Hydrogenation) ปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันที่ทำให้ได้ไซลิทอลนั้นมีความอันตราย เพราะต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ภายใต้ภาวะอุณหภูมิสูงและความดันสูง มีต้นทุนในการผลิตที่สูง มีสารปนเปื้อนมาก และยากต่อการทำบริสุทธิ์ ดังนั้นการช่วยลดต้นทุนการผลิตไซลิทอล สามารถทำได้โดยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพที่ต้องอาศัยกระบวนการหมักจากน้ำตาลไซโลสด้วยจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ เชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์ โดยเฉพาะยีสต์ในสกุล *Candida* sp. (Ylikabari, 1979) โดยแบคทีเรียสามารถเปลี่ยน D-Xylose เป็น D-Xylulose ผ่านกระบวนการ Catalyzed ด้วยเอนไซม์ Xylose isomerase ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถพบในยีสต์และราบางชนิดได้เช่นกัน เช่น *C. boidinii*, *Malbranchea pulchella*, and *Neurospora crassa* ดังนั้นการผลิตไซลิทอลโดยการหมักด้วยยีสต์และราเป็นหลักจากน้ำตาลไซโลสจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถพัฒนาไปสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรม

ส่วนใหญ่แล้วการเปลี่ยนแปลง D-xylose เป็น D-xylulose ของราและยีสต์นั้นใช้ 2 กระบวนการ กระบวนการแรกจะใช้เอนไซม์ xylose reductase เป็น D-xylose เป็น D-xylitol โดยใช้กระบวนการ Reduction และกระบวนการที่ 2 จะเปลี่ยน D-xylitol เป็น D-xylulose โดยเอนไซม์ xylitol dehydrogenase ซึ่งเป็นกระบวนการ Oxidation ทั้งสองกระบวนการนี้จะถูกนำมาพิจารณาเพื่อศึกษาการผลิตไซลิทอล โดยปกติแล้วราและยีสต์จะนำ D-xylulose ไปใช้ต่อ โดยใช้เอนไซม์ xylulokinase เปลี่ยน D-xylulose เป็น xylulose-5-phosphate เพื่อเข้าสู่วงจร pentose phosphate pathway นอกจากนี้ *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. and *Petromyces albertensis* สามารถผลิตเอนไซม์ xylolytic ที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสในวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส เป็นไซลิทอลได้ ในการศึกษาส่วนมากจะใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชังข้าวโพด ขานอ้อย นำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตไซลิทอลด้วยกระบวนการทางชีวภาพ (Mudaliyar et al., 2011) ซึ่งมีการศึกษาเพิ่มเติมว่ายีสต์สายพันธุ์ *Candida* สามารถผลิตไซลิทอลได้สูงที่สุด

การผลิตไซลิทอลโดยวิธีการทางเคมี

เนื่องจากการสกัดไซลิทอลจากแหล่งธรรมชาติที่มีปริมาณไซลิทอลที่ต่ำ ไม่คุ้มค่าในเชิงพาณิชย์ การผลิตในได้ใช้ในอุตสาหกรรมได้ใช้ในกระบวนการไฮโดรจีเนชัน (Hydrogenation) โดยใช้น้ำตาลไซโลสเป็นสารตั้งต้น หรือใช้แหล่งของน้ำตาลจากวัสดุอื่น เช่น วัสดุเหลือทิ้งที่มีไซโลส เป็นองค์ประกอบ โดยมีขั้นตอนดังนี้

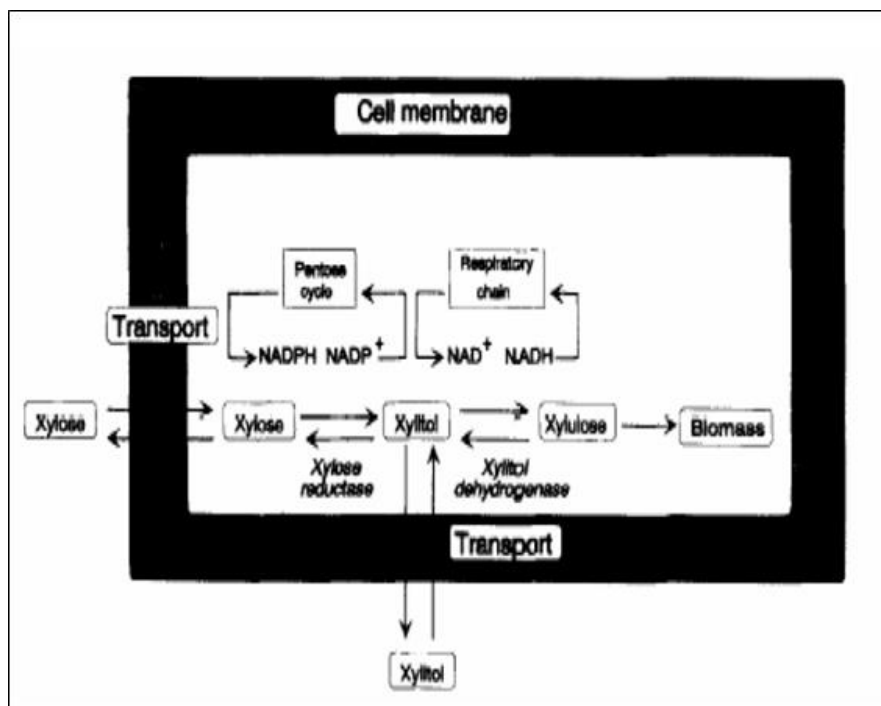
1. การไฮโดรไลซิส เป็นขั้นตอนการสกัดน้ำตาลไซโลสจากส่วนเฮมิเซลลูโลส โดยการใช้กรดซัลฟูริกเจือจาง หรือโดยการใช้ด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์
2. การทำน้ำตาลไซโลสให้บริสุทธิ์
3. การทำดีไฮโดรจีเนชัน ขั้นตอนนี้ทำเพื่อเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสให้เป็นไซลิทอล ภายใต้สภาวะความดัน 50 บรรยากาศ อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง โดยมีโลหะนิกเกิลเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะได้เป็น น้ำตาลแอลกอฮอล์ออกมา
4. การทำไซลิทอลให้บริสุทธิ์ สารละลายน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ได้จากกระบวนการไฮโดรจีเนชันจะต้องนำมา กรองเพื่อแยกโลหะนิกเกิลออก จากนั้นทำสารละลายไซลิทอลให้มีความบริสุทธิ์สูงขึ้นโดยวิธีการโครมาโตกราฟี แล้วทำการตกผลึกเพื่อให้ได้ไซลิทอลที่มีความบริสุทธิ์ ตามธรรมดาแล้วจะผลิตไซลิทอลด้วยวิธีทางเคมี ปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชันที่จะทำให้ได้ไซลิทอลนั้นมีความอันตรายเพราะต้องใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ภายใต้ภาวะ อุณหภูมิสูงและความดันสูง และการทำให้บริสุทธิ์จากสารผสมนั้นทำได้ยาก

การผลิตไซลิทอลโดยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพ

จากข้อเสียและต้นทุนที่ค่อนข้างสูงของวิธีการผลิตไซลิทอลทางเคมี จึงมีความพยายามที่จะหาวิธีผลิต ไซลิทอลที่ใช้ต้นทุนต่ำคือการผลิตไซลิทอลโดยวิธีการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์แทน ซึ่งใช้สภาวะในการผลิตที่ไม่ รุนแรงและขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ไม่ยุ่งยาก (Branco et al., 2007)

กระบวนการผลิตไซลิทอลโดยใช้ยีสต์

เมแทบอลิซึมของไซโลสในเซลล์ยีสต์ ดังภาพที่ 1 ไซโลสที่อยู่นอกเซลล์จะถูกส่งผ่านเข้ามาในเซลล์ และถูกเปลี่ยนเป็นไซลิทอลโดยเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส ไซลิทอลส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นจะถูกส่งออกนอกเซลล์ อีกส่วนหนึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็นไซลูลูโลสโดยเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสเพื่อใช้สังเคราะห์ชีวมวลต่อไป (Sirisansaneeyakul et al., 1992)



ภาพที่ 1 : วิธีการเกิดไซลิทอลจากเมแทบอลิซึมของไซโลสโดยยีสต์

ที่มา: Sirisansaneeyakul et al. (1992)

ยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตไซลิทอล

ยีสต์หลายสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตไซลิทอลจากไซโลส ซึ่งส่วนใหญ่จัดอยู่ในนามสกุล *Candida* อาทิเช่น *C. blankii*, *C. boidinii*, *C. guilliermondii*, *C. mogii*, *C. tropicalis* และ *C. utilis* เป็นต้น นอกจากนี้มีรายงานการผลิตไซลิทอลโดยยีสต์สกุลอื่นๆ เช่น *Pachysolen tannophilus*, *Debaryomyces hansenii* และ *Pichia anomala* เป็นต้น (Kim et al., 1997)

ปัจจัยบางประการที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไซลิทอลโดยยีสต์

ยีสต์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มากหรือน้อยแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์และปัจจัยต่างๆ เช่น ปริมาณออกซิเจน พีเอช อุณหภูมิ ความเข้มข้นของไซโลส ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น และตัวยับยั้ง เช่น furfuran กรดอะซิติก สารประกอบฟีนอล และอนุมูลโลหะหนัก เป็นต้น (Converti et al., 2000)

Vanzyl et al. (1991) พบว่ากรดอะซิติกเป็นตัวยับยั้ง โดยความสามารถในการยับยั้งจะขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นที่อยู่ในรูปไม่แตกตัว ในสภาวะพีเอชเป็นกรด กรดอะซิติกสามารถแพร่เข้าสู่เซลล์ไซโตพลาสและเกิดการแตกตัวทำให้ภายในเซลล์มีพีเอชต่ำกว่าภายนอกเซลล์ เป็นผลทำให้ไม่สามารถเกิดการควบคู่ของพลังงาน เกิดความต้องการของ ATP มากขึ้นในการขนส่งสารอาหาร

Weigert et al. (1998) พบว่า เพอร์ฟูลและ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟูลเป็นสารที่มีผลต่อการเติบโตของจุลินทรีย์ให้มีการปรับตัวอย่างช้าๆ หรือเป็นสาเหตุทำให้เซลล์ตาย สารพิษเพอร์ฟูลมีผลต่อกระบวนการหายใจและกระบวนการ oxidation phosphorylation และเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ furfural alcohol ทำให้มีผลต่อการเติบโตของเซลล์

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องในการพัฒนาการผลิตไซลิทอลจากแหล่งอื่นที่ไม่ใช่น้ำตาล D-xylose หรือพัฒนาการผลิตโดยใช้จุลินทรีย์ที่ดัดแต่งพันธุกรรม และใช้จุลินทรีย์หลายตัวในการผลิตเพื่อให้สามารถผลิตไซลิทอลได้ในปริมาณสูงสุด หนึ่งในวิธีดังกล่าว คือ การผลิตไซลิทอลจาก Xylose mother liquor ซึ่งมีน้ำตาล xylose เป็นส่วนประกอบถึง 35%-40% และมีส่วนประกอบอื่น เช่น L-arabinose (10%-15%), galactose (8%-10%), glucose (8%-10%) และน้ำตาลอื่นๆอีกเล็กน้อย แต่การนำ Xylose mother liquor มาใช้นั้นมีปัญหาเรื่องการทำบริสุทธิ์ Xylose mother liquor ให้เป็นน้ำตาล xylose เพราะใน Xylose mother liquor มี furfural และ 5-hydromethylfurfural (HMF) ซึ่งเป็นสายยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิด ในการทดลองนี้ใช้ยีสต์ *C. maltose* ในการบำบัด furfural, 5-hydromethylfurfural (HMF) และน้ำตาล glucose ออกจาก Xylose mother liquor จากนั้นใช้ *B. subtilis* ที่มีการดัดแปลงพันธุกรรม ซึ่งจะสามารถเปลี่ยน L-arabinose และ galactose ให้เป็น xylose ขึ้นตอนนี้จะทำให้มี xylose เพิ่มมากขึ้น และสุดท้ายจะใช้ *C. maltose* อีกครั้งเพื่อสังเคราะห์ xylitol จาก xylose (Cheng et al., 2011)

ไซลิทอลยังสามารถผลิตได้จาก glucose ใน process glucose D-arabitol D-xylullose xylitol โดยในการทดลองนี้ใช้ยีสต์ 3 ชนิด แยกเป็นกลุ่ม 1, 2 และ 3 : กลุ่มที่ 1 ผลิต xylitol ได้อย่างเดียว, กลุ่มที่ 2 ผลิต D-arabitol ได้อย่างเดียว และกลุ่มที่ 3 ผลิตได้ทั้ง xylitol และ D-arabitol ซึ่งการทดลองนี้จะให้ความสามารถของยีสต์ 3 กลุ่มนี้ในการผลิต xylitol แยกยีสต์ที่ 3 กลุ่มจากธรรมชาติ *C. guilliermondii* var.

soya (ATCC 20216) เป็นยีสต์กลุ่ม 1 ที่ผลิต xylitol ได้มากที่สุดจากน้ำตาล (55% yields on the sugar used), *D. hansenii* (ATCC 20212) เป็นยีสต์กลุ่มที่ 2 สามารถผลิต D-arabitol (50% yields) และยีสต์กลุ่ม 3 *Candida guilliermondii* 3529 สามารถผลิต xylitol และ D-arabitol ได้ในปริมาณที่เท่ากัน (50% yields) ในการผลิตไซลิทอลจะใช้การทำงานร่วมกันของยีสต์ ขั้นแรกเปลี่ยน glucose เป็น D- arabitol โดยใช้ยีสต์ ขั้นที่สองจะเปลี่ยน D-arabitol เป็น D-xylulose โดยใช้ *Acetobacter* และสุดท้ายเปลี่ยน D-xylulose เป็น xylitol โดยยีสต์ (Noda-shi and Chiba-ken, 1969)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยสลายไซแลนภายในขานอ้อยด้วยเอนไซม์ไคลาเนสและไซโลซิเดส

ศึกษาวิธีการเตรียมขานอ้อยซึ่งได้รับมาจากโรงงานน้ำตาลสำหรับการย่อยขานอ้อยด้วยเอนไซม์ โดยศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายไซแลนภายในขานอ้อยด้วยเอนไซม์ไคลาเนสและไซโลซิเดส เพื่อเตรียมให้เป็นสารละลายน้ำตาลไซโลสสำหรับการผลิตไซลิทอลโดยจุลินทรีย์ต่อไป โดยศึกษาผลของการทรีทเมนต์ขานอ้อยก่อนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เพื่อให้ทราบว่าจำเป็นต้องทำการทรีทเมนต์ขานอ้อยหรือไม่ และศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยสลาย

3.2. การศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณขานอ้อยต่อเอนไซม์ไคลาเนสและไซโลซิเดส

เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายไซแลนในขานอ้อยโดยคำนึงถึงปริมาณน้ำตาลไซโลสที่ได้รับและต้นทุนของการย่อยสลาย ดังนั้นจึงศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณขานอ้อยต่อปริมาณเอนไซม์ไคลาเนสและไซโลซิเดส

3.3. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์

เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์ ทดลองเลี้ยงยีสต์ซึ่งสามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้และสามารถผลิตไซลิทอลได้ในอาหารเหลวซึ่งได้จากการย่อยสลายขานอ้อยด้วยเอนไซม์ไคลาเนสและไซโลซิเดสในระดับพลาสติกเย้า โดยทดลองปรับเปลี่ยนสภาวะต่างๆ ซึ่งอาจจะมีผลต่อการผลิตไซลิทอล ได้แก่ ค่าพีเอช อุณหภูมิ ความเร็วของการเขย่า ฯลฯ

3.4. การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมของการผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์

ภายหลังทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลแล้ว จะศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสที่เตรียมได้จากการย่อยสลายไซแลนในขานอ้อยโดยใช้ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ทำหน้าที่เปลี่ยนไซโลสให้เป็นไซลิทอล โดยจะทดลองปรับสูตรอาหารให้เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลผลิตไซลิทอลสูงสุด

3.5. การศึกษาการขยายขนาดการผลิตจากระดับพลาสก์เขย่าไปสู่ระดับถังหมัก

ภายหลังทราบสถานะและสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซลิทอลในระดับพลาสก์เขย่าแล้ว จะทดลองศึกษาการขยายขนาดการผลิตจากระดับพลาสก์เขย่าขึ้นไปสู่การผลิตระดับถังหมัก เพื่อศึกษาหาสถานะที่เหมาะสมในขนาดการผลิตระดับถังหมักและระดับขนาดที่ใหญ่ขึ้นต่อไป ได้แก่ ค่าพีเอช อุณหภูมิ ปริมาณการให้อากาศ ฯลฯ

3.6. การศึกษาผลกระทบของการขยายขนาดการผลิตจากระดับพลาสก์เขย่าไปสู่ระดับถังหมัก

เพื่อป้องกันปัญหาการขยายขนาดการผลิตไปสู่ขนาดการผลิตระดับที่ใหญ่มากขึ้นในอนาคตไว้ล่วงหน้า ดังนั้นจึงศึกษาผลกระทบของการขยายขนาดการผลิตจากระดับพลาสก์เขย่าไปสู่ระดับถังหมัก ได้แก่ ปัญหาของการเตรียมน้ำตาลไซโลสในปริมาณเพิ่มสูงขึ้นจากการย่อยสลายขานอ้อยด้วยเอนไซม์ การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช การแลกเปลี่ยนความร้อนเมื่อขยายขนาดการผลิต ระยะเวลาที่จำเป็นสำหรับการผลิตไซลิทอลในถังหมัก ฯลฯ

3.7. การศึกษากระบวนการทำให้ไซลิทอลบริสุทธิ์

ทำการศึกษากระบวนการทำให้ไซลิทอลบริสุทธิ์โดยหลักการแยกไซลิทอลด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟี ซึ่งใช้เรซิน Purolite PCR833 (Product Code 10852) ซึ่งเป็น Polystyrenic Gel, Strong Acid Cation Resin, Sodium form, Chromatographic Grade ของบริษัท Purolite ประเทศสหรัฐอเมริกา เรซิน Purolite PCR833 มีคุณสมบัติเป็นผงละเอียดที่มีขนาด 0.177-0300 นาโนเมตร มีความชื้นประมาณ 44-48% มีความหนาแน่น 1.28 กรัมต่อมิลลิลิตร และความสามารถในการแลกเปลี่ยนประจุเท่ากับ 2 me ต่อ มิลลิลิตร

3.7.1 การเตรียมคอลัมน์ Purolite PCR833

ทำการ regenerate เรซิน Purolite PCR833 ให้อยู่ในรูปของแคลเซียม โดยการใช้สารละลาย CaCl_2 ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตรมากกว่า 2 เท่าของเรซิน กวนผสมตลอดเวลาประมาณ 1 คืน จากนั้นเทสารละลายทิ้ง ล้างด้วยน้ำปราศจากประจุ (Deionized water) จนกระทั่ง CaCl_2 ส่วนเกินหมดไป บรรจุเรซินที่เตรียมได้ลงในคอลัมน์แก้ว Spectra/Chrom LC Column ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2.5 เซนติเมตร (Volume 4.91 mL/cm, ความสูงของคอลัมน์ 50 เซนติเมตร) อุดปลายคอลัมน์ด้วยใยแก้ว เติมน้ำเพื่อไล่อากาศที่ค้างอยู่ ปิดปลายคอลัมน์ ดูดเรซินปริมาตร 120 มิลลิลิตร ใส่เข้าไปในคอลัมน์อย่างต่อเนื่อง ขณะบรรจุปล่อยให้ให้น้ำไหลออกจากคอลัมน์ในอัตราที่สูงเพื่อให้เรซินมีการอัดตัวอย่างสม่ำเสมอ และไม่มีการอัดตัวเพิ่มในระหว่างการทดลอง ปล่อยให้เรซินเรียงตัวประมาณ 1 คืน

3.7.2 การทำบริสุทธิ์ไซลิทอลจากน้ำหมักของ *Candida magnolia* TISTR 5664

ป้อนน้ำหมักจากการเลี้ยง *C. magnolia* TISTR 5664 เพื่อผลิตไซลิทอลซึ่งผ่านการเหวี่ยงแยกเซลล์ออกแล้ว ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ด้วย Peristaltic pump เข้าไปในคอลัมน์เรซินซึ่งมีเรซินปริมาตร 120 มิลลิลิตร แล้วปล่อยให้ น้ำหมักถูกดูดซับด้วยเรซินเพื่อให้ไซลิทอลถูกดักจับไว้นาน 1 ชั่วโมง ภายหลังจากนั้นจึงเริ่มการชะล้างน้ำตาลไซโลสที่อยู่ภายในคอลัมน์เรซินออกก่อนจะแยกน้ำตาลไซลิทอลให้บริสุทธิ์ โดยป้อนน้ำปราศจากประจุ (Deionized water) ที่อุณหภูมิห้องด้วยอัตราการไหล 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง และเก็บตัวอย่างน้ำชะล้างเพื่อวัดค่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส และน้ำตาลไซลิทอลต่อไป

3.8 การทดสอบความเป็นพิษของไซลิทอลที่ผลิตได้และผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในสัตว์ทดลอง

เพื่อให้เกิดความมั่นใจด้านความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ไซลิทอลที่ผลิตได้ ทดสอบความเป็นพิษของไซลิทอลที่ผลิตได้และผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วกับสัตว์ทดลอง โดยทดลองป้อนไซลิทอลซึ่งผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วพร้อมกับอาหารให้หนูทดลองเพื่อศึกษาความเป็นพิษ

3.9 สรุปผลการวิจัย และจัดทำรายงาน

ภายหลังเสร็จสิ้นการทดลองแล้วจะรวบรวมผลการทดลองทั้งหมด เพื่อรวบรวมจัดทำรายงานผลการวิจัยต่อไป

บทที่ 4

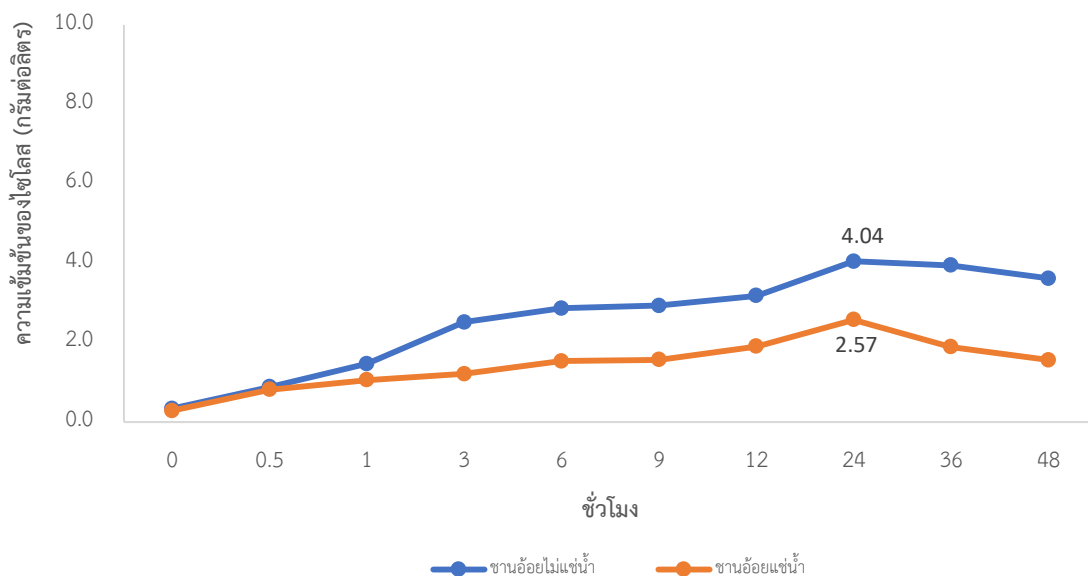
ผลการศึกษาและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยสลายไซแลนภายในขานอ้อยด้วยเอนไซม์ไซลานเนสและไฮโลซิเตส

4.1.1 การศึกษาการแช่น้ำและไม่แช่น้ำของขานอ้อยก่อนการผลิตน้ำตาลไฮโลสจากขานอ้อยที่ย่อยด้วยเอนไซม์ไซลานเนส

การผลิตน้ำตาลไฮโลสจากขานอ้อยที่ย่อยด้วยเอนไซม์ไซลานเนสจาก *Thermobifida fusca* PA 1-1 ที่ค่ากิจกรรมของไซลานเนสเท่ากับ 69.09 หน่วยต่อมิลลิกรัม ในละลายไฮเดียมซัลเฟต 0.1 โมลาร์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พบว่า น้ำตาลไฮโลสที่ได้จากขานอ้อยที่ไม่แช่น้ำมีปริมาณมากกว่าน้ำตาลไฮโลสจากขานอ้อยที่แช่น้ำ และระยะเวลาที่สามารถผลิตน้ำตาลไฮโลสได้สูงสุดคือ ชั่วโมงที่ 24 โดยปริมาณน้ำตาลไฮโลสมีค่าเท่ากับ 4.04 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ ชั่วโมงที่ 36 โดยปริมาณน้ำตาลไฮโลสมีค่าเท่ากับ 3.94 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 2) ในส่วนของการแช่น้ำขานอ้อยก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ไซลานเนส พบว่า ระยะเวลาที่สามารถผลิตน้ำตาลไฮโลสได้สูงสุดคือ ชั่วโมงที่ 24 โดยปริมาณน้ำตาลไฮโลสมีค่าเท่ากับ 2.57 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ ชั่วโมงที่ 36 และ 12 คือ 1.90 และ 1.89 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

การแช่น้ำและไม่แช่น้ำของขานอ้อยก่อนการผลิตน้ำตาลไฮโลสจากขานอ้อยซึ่งย่อยด้วยเอนไซม์ไซลานเนส พบว่าการไม่แช่น้ำของขานอ้อยสามารถผลิตน้ำตาลไฮโลสได้มากกว่าการแช่น้ำของขานอ้อย อาจเนื่องมาจากการนำจากการแช่ขานอ้อยเข้าไปขัดขวางการเข้าไปทำงานที่มีความจำเพาะของเอนไซม์ จึงทำให้ไม่สามารถผลิตน้ำตาลไฮโลสได้ดีเท่าที่ควร ในขณะที่ขานอ้อยที่ไม่ได้แช่น้ำซึ่งจะมีลักษณะแห้งมาก ดังนั้นเมื่อขานอ้อยเหล่านี้อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีเอนไซม์ไซลานเนสประกอบอยู่ด้วย ฯลฯ สารละลายน้ำและเอนไซม์ไซลานเนสจะถูกดูดซับเข้าไปภายในเส้นใยของขานอ้อยอย่างรวดเร็ว ส่งผลทำให้เอนไซม์ไซลานเนสสามารถเข้าไปกระจายอยู่ในกลุ่มเส้นใยของขานอ้อยได้มากกว่าขานอ้อยที่ผ่านการแช่น้ำก่อนการย่อย ดังนั้นจึงสามารถย่อยสลายไซแลนให้เปลี่ยนไปน้ำตาลไฮโลสได้สูงกว่าการย่อยขานอ้อยซึ่งผ่านการแช่น้ำมาก่อน



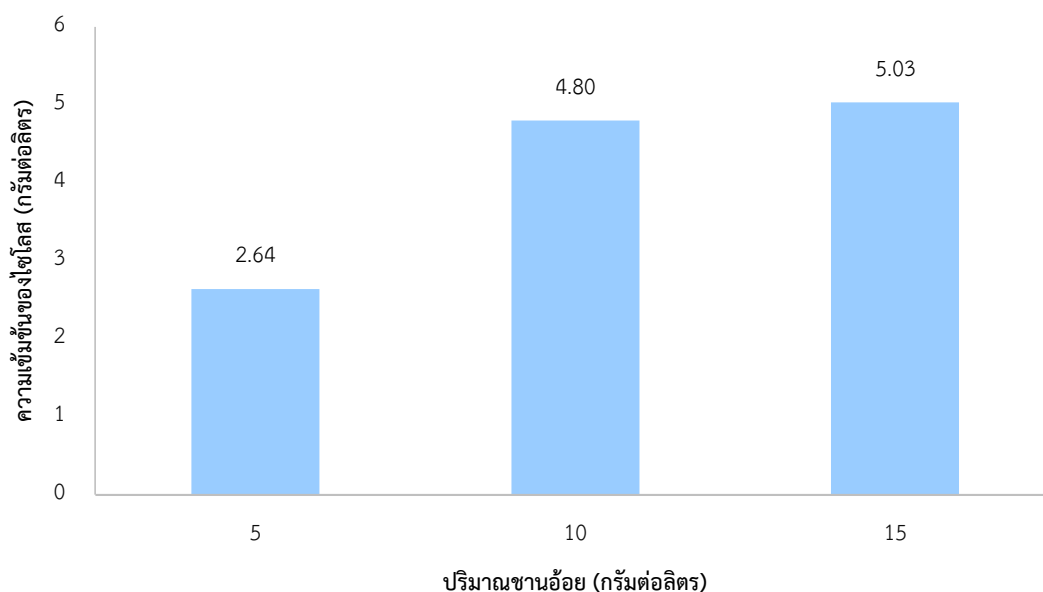
ภาพที่ 2 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลไซโลสของการแช่น้ำและไม่แช่น้ำของชานอ้อยก่อนการผลิตน้ำตาลไซโลสจากชานอ้อยที่ย่อยด้วยเอนไซม์ไซลานเนสในละลายโซเดียมซิเตรทไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0 นาน 48 ชั่วโมง

4.1.2 การศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณชานอ้อยต่อปริมาตรเอนไซม์ไซลานเนสในการผลิตไซโลส

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4.1.1 คือ การไม่แช่น้ำชานอ้อยก่อนผลิตน้ำตาลไซโลสจากชานอ้อยที่ย่อยด้วยเอนไซม์ไซลานเนสจาก *Thermobifida fusca* PA 1-1 จึงศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาตรชานอ้อยต่อปริมาตรเอนไซม์ไซลานเนส ซึ่งมีใช้ปริมาณชานอ้อยที่แตกต่างกันคือ 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ในละลายโซเดียมซิเตรทไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0 นาน 24 ชั่วโมง พบว่า การผลิตน้ำตาลไซโลสจะได้ปริมาณสูงที่สุดเมื่อใช้ปริมาณชานอ้อย 15 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร มีค่าเท่ากับ 5.03 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ ใช้ปริมาณชานอ้อย 10 และ 5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร มีค่าเท่ากับ 4.80 และ 2.64 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังภาพที่ 3

จากผลการศึกษาข้างต้นจะเห็นว่าปริมาณน้ำตาลไซโลสที่ได้จากการย่อยสลายไซแลนภายในชานอ้อยด้วยการใช้ปริมาณชานอ้อยที่แตกต่างกันคือ 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร จะเห็นได้ว่าปริมาณของน้ำตาลไซโลสที่เกิดขึ้นจากการใช้ปริมาณชานอ้อยที่ 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร มีค่าที่ไม่แตกต่าง แสดงให้เห็นว่าเมื่อปริมาณของชานอ้อยเพิ่มมากขึ้นไม่ได้ทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลไซโลสเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย ทั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับความจำเพาะของการทำงานระหว่างเอนไซม์และชานอ้อยในปริมาณที่

เหมาะสมที่จะทำงานร่วมกัน ดังนั้นปริมาณขานอ้อยที่ 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร จึงมีความเหมาะสมที่จะใช้ในการผลิตน้ำตาลไซโลส

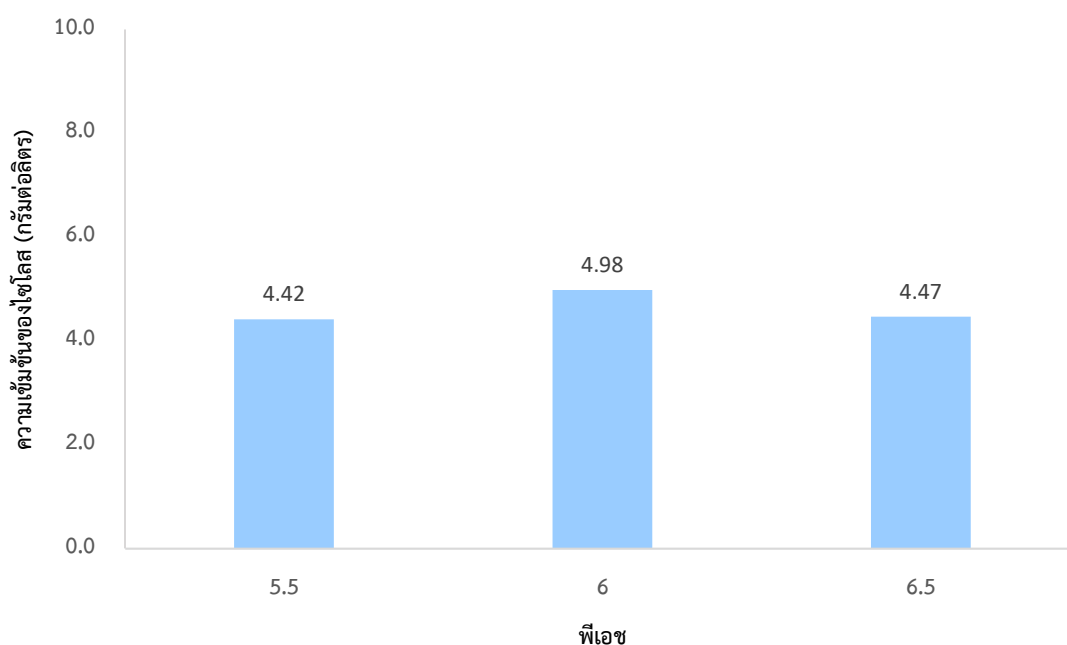


ภาพที่ 3 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลไซโลสซึ่งเกิดจากการใช้ปริมาณขานอ้อยต่อปริมาณเอนไซม์ไซลาเนส โดยใช้ปริมาณขานอ้อยที่แตกต่างกันคือ 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ในละลายโซเดียมซิเตรทไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0 นาน 24 ชั่วโมง

4.1.3 การศึกษาหาพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตไซโลสจากขานอ้อยที่ย่อยด้วยเอนไซม์ไซลาเนส

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4.1.1 และ 4.1.2 คือ การไม่แช่น้ำขานอ้อยก่อนผลิตน้ำตาลไซโลสจากขานอ้อยที่ย่อยด้วยเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Thermobifida fusca* PA 1-1 และอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณขานอ้อยต่อปริมาณเอนไซม์ในการผลิตน้ำตาลไซโลส (น้ำหนักต่อปริมาตร) จึงศึกษาหาพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลไซโลสจากขานอ้อย ละลายในโซเดียมซิเตรทไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ในพีเอชที่แตกต่างกันคือพีเอช 5.5, 6.0 และ 6.5 นาน 24 ชั่วโมง พบว่าการผลิตน้ำตาลไซโลสจะได้ปริมาณสูงที่สุดเมื่อใช้ละลายในโซเดียมซิเตรทไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ที่พีเอช 6 มีค่าเท่ากับ 4.98 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือพีเอช 6.5 และ 5.5 มีค่าเท่ากับ 4.47 และ 4.42 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากการศึกษาข้างต้นจึงเห็นได้ว่าการผลิตน้ำตาลไซโลสจากขานอ้อยที่ย่อยด้วยเอนไซม์ไซลานเนสจาก *Thermobifida fusca* PA 1-1 โดยใช้สารละลายไซเดียมซิเตรทไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ในพีเอชที่แตกต่างกันคือ 5.5, 6.0 และ 6.5 ปริมาณน้ำตาลไซโลสที่ผลิตได้แทบจะไม่มี ความแตกต่างกัน และเอนไซม์ไซลานเนสยังคงสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นที่พีเอชทั้งสามนั้นจึงสามารถใช้งาน สำหรับการย่อยสลายไซแลนภายในขานอ้อยได้



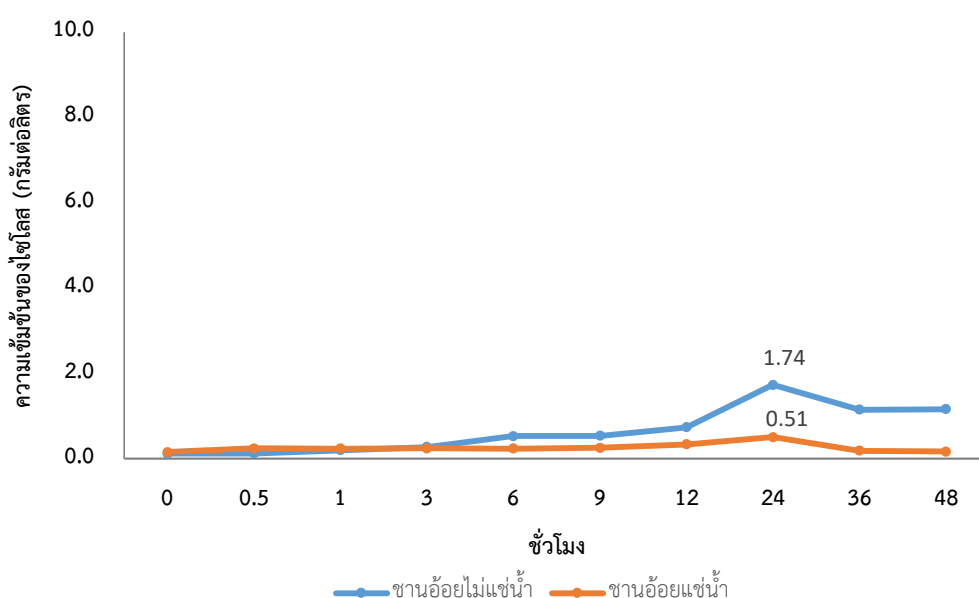
ภาพที่ 4 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลไซโลสซึ่งเกิดจากการใช้เอนไซม์ไซลานเนสละลายใน ไซเดียมซิเตรทไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ในพีเอชที่แตกต่างกันคือพีเอช 5.5, 6.0 และ 6.5 นาน 24 ชั่วโมง

4.1.4 การศึกษาการแช่น้ำและไม่แช่น้ำของขานอ้อยก่อนการผลิตไซโลสจากขานอ้อยที่ย่อยด้วย เอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส

การผลิตน้ำตาลไซโลสจากขานอ้อยซึ่งย่อยด้วยเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส (β -xylosidase) จาก *Bacillus amyloliquefaciens* DMKUB24 ที่ค่ากิจกรรมของไซโลซิเดสเท่ากับ 15.49 มิลลิหน่วยต่อมิลลิลิตร ในละลายไซเดียมซิเตรทไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 5.5 นาน 48 ชั่วโมง พบว่า น้ำตาลไซโลสที่ได้จากขานอ้อยที่ไม่แช่น้ำมีปริมาณมากกว่าน้ำตาลไซโลสจากขานอ้อยที่แช่น้ำ และระยะเวลา ที่สามารถผลิตน้ำตาลไซโลสได้สูงสุดคือ ชั่วโมงที่ 24 โดยปริมาณน้ำตาลไซโลสมีค่าเท่ากับ 1.74 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ ชั่วโมงที่ 48 และ 36 โดยปริมาณน้ำตาลไซโลสมีค่าเท่ากับ 1.16 และ 1.15 กรัมต่อลิตร

ตามลำดับ (ภาพที่ 4) ขณะที่การแช่น้ำขานอ้อยก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ไซลาเนส พบว่า ระยะเวลาที่สามารถผลิตน้ำตาลไซโลสได้สูงสุดคือ ชั่วโมงที่ 24 โดยปริมาณน้ำตาลไซโลสมีค่าเท่ากับ 0.51 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ ชั่วโมงที่ 12 คือ 0.34 กรัมต่อลิตร

จากผลการทดลองพบว่าการผลิตน้ำตาลไซโลสจากขานอ้อยที่ย่อยด้วยเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* DMKUB24 สามารถผลิตไซโลสได้ในปริมาณไม่มากนักซึ่งสอดคล้องกับการทำงานของเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสที่จะย่อยโมเลกุลของ xylooligosaccharides ซึ่งเกิดจากการย่อยไซแลนด้วยเอนไซม์ไซลาเนส เพื่อให้มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นจึงสมควรจะใช้เอนไซม์ไซลาเนสร่วมกับเอนไซม์ไซโลซิเดสในการผลิตน้ำตาลไซโลสจากขานอ้อย



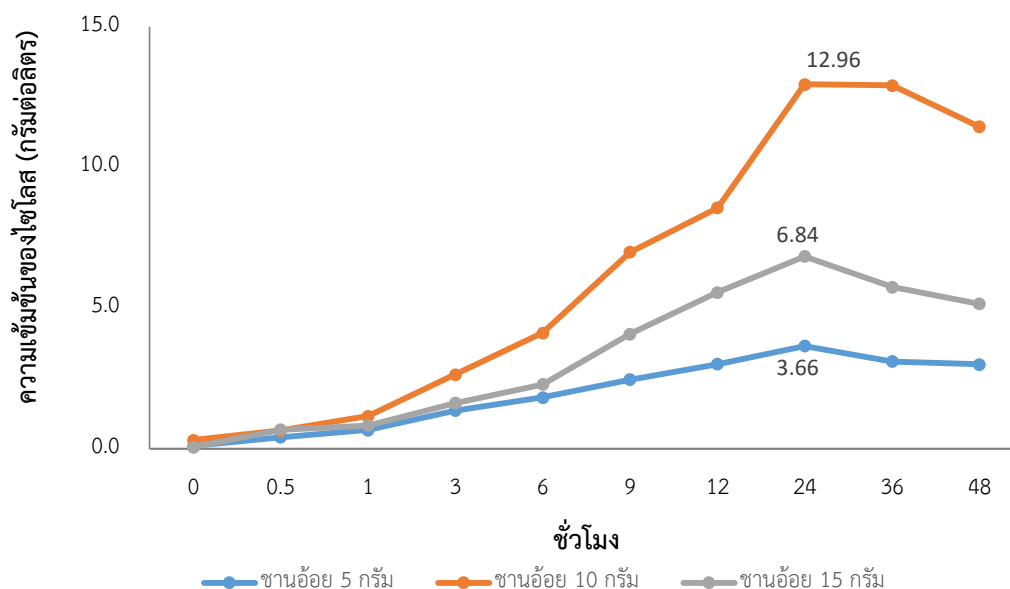
ภาพที่ 5 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลไซโลสของการแช่น้ำและไม่แช่น้ำของขานอ้อยก่อนการผลิตน้ำตาลไซโลสจากขานอ้อยที่ย่อยด้วยเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส ในละลายไซเดียมซิเตรทไฮโดรคลอริก บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0 นาน 48 ชั่วโมง

4.2. การศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณขานอ้อยต่อเอนไซม์ไซลาเนสและเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส

จากการศึกษาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาตรขานอ้อยต่อปริมาตรเอนไซม์ไซลาเนสจาก *Thermobifida fusca* PA 1-1 และเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* DMKUB24 โดยใช้เอนไซม์ไซลาเนส 69.09 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส 15.49 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร

และใช้ปริมาณขานอ้อยที่แตกต่างกันคือ 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ในละลายโซเดียมซิติเรทไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.0 นาน 48 ชั่วโมง พบว่า การผลิตน้ำตาลไซโลสจะได้ปริมาณสูงที่สุดเมื่อใช้ปริมาณขานอ้อย 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และระยะเวลาที่สามารถผลิตน้ำตาลไซโลสได้สูงสุดคือ ชั่วโมงที่ 24 โดยปริมาณน้ำตาลไซโลสมีค่าเท่ากับ 12.96 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ ชั่วโมงที่ 36 โดยปริมาณน้ำตาลไซโลสมีค่าเท่ากับ 12.91 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือใช้ปริมาณขานอ้อย 15 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และระยะเวลาที่สามารถผลิตน้ำตาลไซโลสได้สูงสุดคือ ชั่วโมงที่ 24 โดยปริมาณไซโลสมีค่าเท่ากับ 6.84 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ ชั่วโมงที่ 36 โดยปริมาณน้ำตาลไซโลสมีค่าเท่ากับ 5.75 กรัมต่อลิตร และการผลิตน้ำตาลไซโลสจะได้ปริมาณน้อยสุดคือ เมื่อใช้ปริมาณขานอ้อย 5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และระยะเวลาที่สามารถผลิตไซโลสได้สูงสุดคือ ชั่วโมงที่ 24 โดยปริมาณน้ำตาลไซโลสมีค่าเท่ากับ 3.66 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ ชั่วโมงที่ 36 โดยปริมาณน้ำตาลไซโลสมีค่าเท่ากับ 3.11 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์ไซลาเนสจาก *Thermobifida fusca* PA 1-1 และเอนไซม์ไซโลซิเดสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* DMKUB24 โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ไซลาเนส 69.09 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส 15.49 มิลลิหน่วยต่อมิลลิลิตร โดยใช้ปริมาณขานอ้อยที่แตกต่างกันคือ 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งเป็นการใช้เอนไซม์ที่ผสมกันสองชนิดพบว่า ปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลไซโลสมากที่สุดคือ 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร แม้ว่าปริมาณขานอ้อย 15 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตรจะมีปริมาณของไซแลนมากกว่า แต่กลับไม่สามารถผลิตน้ำตาลไซโลสได้ในปริมาณที่มากขึ้น เนื่องจากปริมาณสับสเตรตอาจจะมีผลกระทบเช่นเดียวกับปริมาณของเอนไซม์คือถ้าเพิ่มสับสเตรตมากเกินไปแล้ว ปฏิกิริยาก็จะไม่เกิดเร็วขึ้น เพราะปริมาณของเอนไซม์มีไม่เพียงพอต่อปริมาณของสับสเตรต



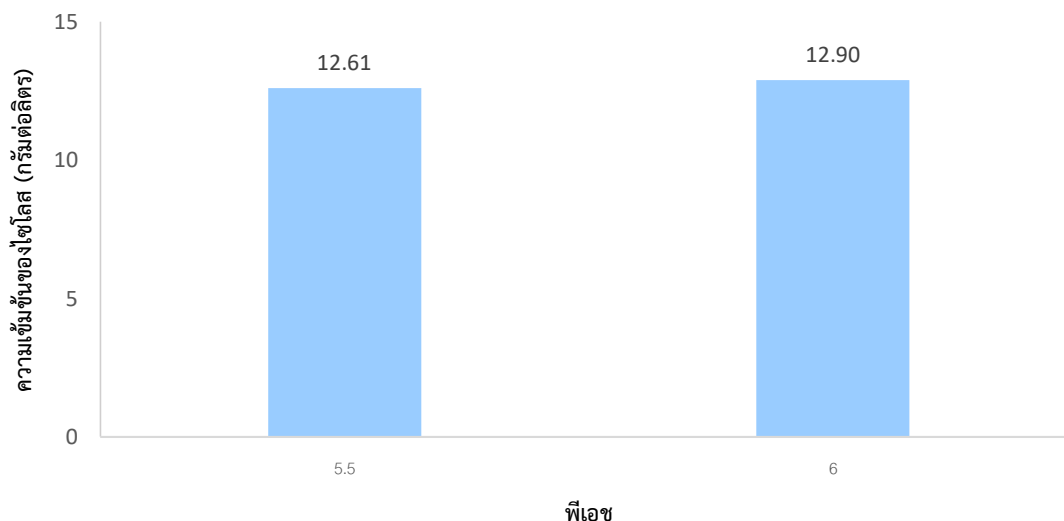
ภาพที่ 6 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลไซโลสระหว่างปริมาณขานอ้อยต่อปริมาณเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์ไซโลซิเดสในอัตราส่วน 1:1 และปริมาณขานอ้อยที่แตกต่างกันคือ 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ในละลายไซเดียมซิเตรทไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ค่าพีเอช 6.0 นาน 48 ชั่วโมง

4.2.1 การศึกษาหาพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลไซโลสจากขานอ้อยที่ย่อยด้วยเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์ไซโลซิเดส

เมื่อทราบอัตราส่วนที่เหมาะสมจากข้อ 4.2. คือ ปริมาตรขานอ้อยต่อปริมาตรเอนไซม์ไซลานเนสจาก *Thermobifida fusca* PA 1-1 และเอนไซม์ไซโลซิเดสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* DMKUB24 โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ในอัตราส่วนที่เท่ากันคือ 1:1 ใช้ปริมาณขานอ้อยที่ 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร จึงศึกษาหาพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตน้ำตาลไซโลสจากการย่อยขานอ้อยด้วยเอนไซม์ไซลานเนสร่วมกับเอนไซม์ไซโลซิเดส โดยละลายในไซเดียมซิเตรทไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ในพีเอชที่แตกต่างกันคือพีเอช 5.5 และ 6.0 นาน 24 ชั่วโมง พบว่าการผลิตน้ำตาลไซโลสจะได้ปริมาณสูงที่สุดเมื่อละลายในไซเดียมซิเตรทไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ค่าพีเอช 6.0 และ 5.5 โดยปริมาณน้ำตาลไซโลสมีค่าเท่ากับ 12.90 กรัมต่อลิตร และ 12.61 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 7)

จากการศึกษาข้างต้นจึงทำให้ทราบว่า การผลิตน้ำตาลไซโลสจากการย่อยขานอ้อยด้วยเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์ไซโลซิเดส โดยใช้สารละลายไซเดียมซิเตรทไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโม

ลาร์ ที่ค่าพีเอชแตกต่างกันคือ 5.5 และ 6.0 นั้น พบว่าปริมาณน้ำตาลไซโลสที่ได้รับไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และเอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์ไซโลซิเดสยังคงสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพทั้งสองชนิด ดังนั้นที่ค่าพีเอชทั้งสองค่านี้จึงสามารถใช้อยู่ในกระบวนการได้



ภาพที่ 7 กราฟแสดงการเปรียบเทียบน้ำตาลไซโลสซึ่งเกิดจากการใช้เอนไซม์ไซลานเนสและเอนไซม์ไซโลซิเดสละลายในโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ pH 5.5 และ 6.0 นาน 24 ชั่วโมง

4.3 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมของการผลิตไซลิตอลจากน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์

เนื่องจากผลของการย่อยชานอ้อยด้วยเอนไซม์ไซลานเนสร่วมกับเอนไซม์ไซโลซิเดสยังได้ปริมาณน้ำตาลไซโลสในระดับต่ำสืบเนื่องจากเหตุผลสำคัญ 2 ประการ ได้แก่

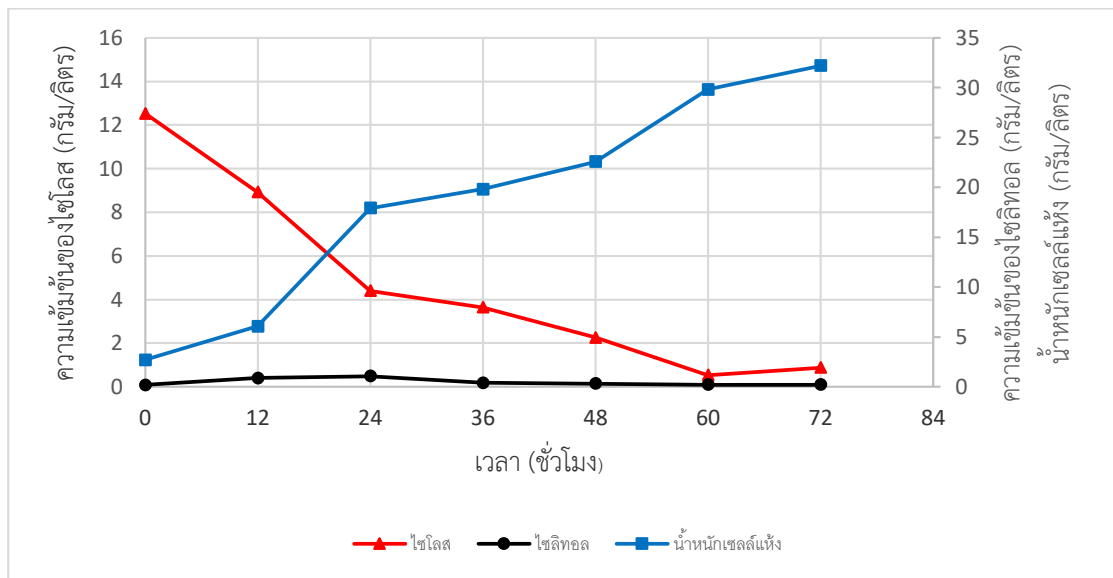
- 1) ปริมาณเอนไซม์ไซโลสในชานอ้อยซึ่งมีไซลิตอลประกอบอยู่นั้น มีสัดส่วนองค์ประกอบในชานอ้อยเพียงประมาณ 25% เท่านั้น (ก่อนสกัดแยกกลีโนออก) ดังนั้นแม้จะสามารถย่อยไซลิตอลในชานอ้อยซึ่งสกัดแยกกลีโนออกแล้ว (ภายหลังสกัดแยกกลีโนออกแล้ว สัดส่วนองค์ประกอบของเอนไซม์ไซโลสจะเปลี่ยนเป็นประมาณ 33% ของชานอ้อยซึ่งผ่านการสกัดแยกกลีโนออกแล้ว) ให้เป็นน้ำตาลไซโลสได้ทั้งหมดก็ไม่สามารถผลิตน้ำตาลไซโลสได้เกิน 33% ของน้ำหนักชานอ้อย

- 2) ขานอ้อยมีลักษณะเป็นเส้นใยที่มีความหนาแน่นต่ำ ดังนั้นเมื่อเติมลงในสารละลายบัฟเฟอร์ของเอนไซม์แล้วจะพองฟูขึ้นจึงไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้มากกว่านี้ และผลการทดลองก่อนหน้านี้ทำให้ทราบว่าสามารถผลิตน้ำตาลไซโลสได้สูงสุดเมื่อใช้ขานอ้อย 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ในบัฟเฟอร์

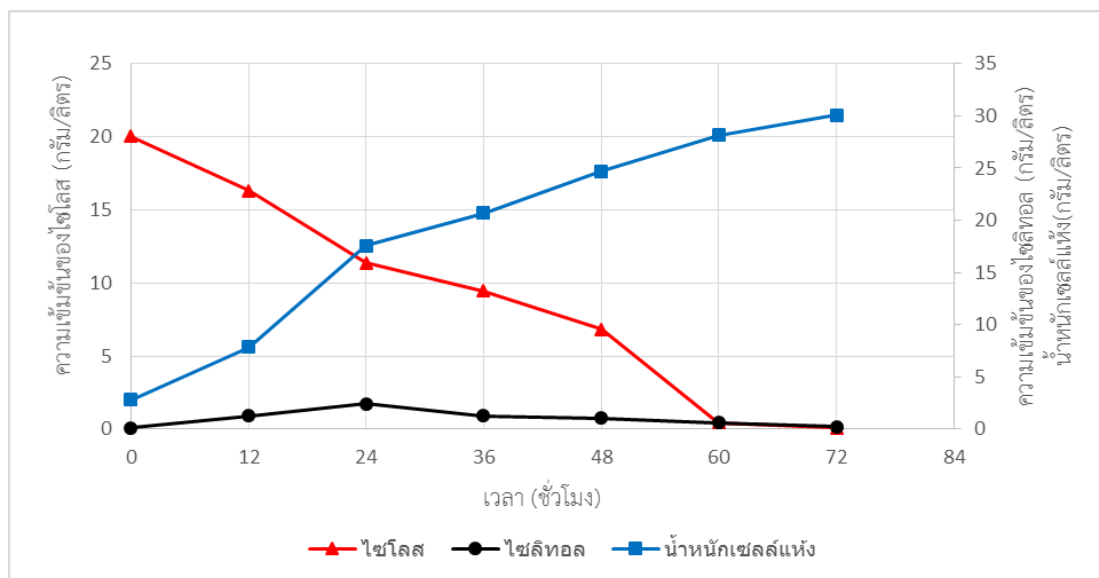
ด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้นนี้ ส่งผลทำให้ในขณะนี้คณะวิจัยจึงยังย่อยสลายน้ำตาลไซโลสจากขานอ้อยด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดได้ในปริมาณต่ำเพียงประมาณ 12.96 กรัมต่อลิตรเท่านั้น (ภาพที่ 6) ดังนั้นจึงมีความคิดเห็นว่าในระหว่างที่ยังไม่สามารถพัฒนาการย่อยขานอ้อยให้ได้น้ำตาลไซโลสได้มากกว่านี้ คณะวิจัยจะทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์ โดยจะใช้น้ำตาลไซโลสบริสุทธิ์เป็นสารตั้งต้นสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ เพื่อให้ทราบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซลิทอลโดยยีสต์สายพันธุ์ *Candida magnoliae* TISTR 5664 ซึ่งสามารถผลิตไซลิทอลได้

4.3.1 การศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสต่อการผลิตไซลิทอล

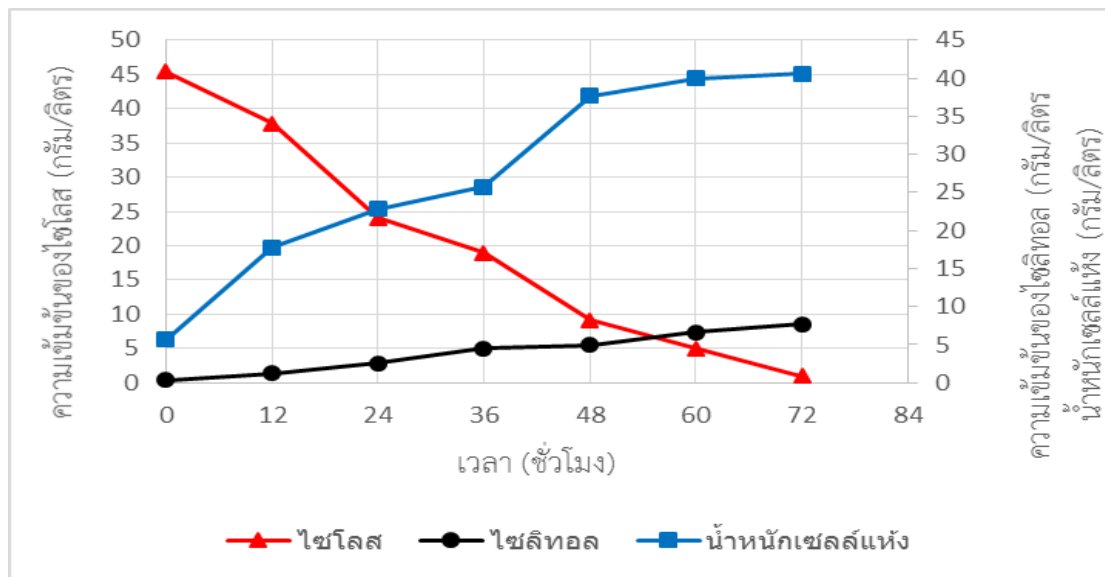
ผลจากการเพาะเลี้ยง *Candida magnoliae* TISTR 5664 ในอาหารเหลว YNB ซึ่งเป็นอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซลิทอลด้วยยีสต์สายพันธุ์นี้ โดยเติมน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้น 15, 25, 50, 75 และ 100 กรัมต่อลิตร โดยค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 โดยทำการบ่มบนเครื่องเขย่า 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง พบว่ามีการผลิตไซลิทอลได้สูงสุดในอาหารเหลว YNB ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 100 กรัมต่อลิตร คือสามารถผลิตไซลิทอลได้สูงสุดเท่ากับ 14.935 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 ของการหมัก (ภาพที่ 12) รองลงมาคือในอาหารที่มีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 75, 50, 25 และ 15 กรัมต่อลิตร โดยได้ผลผลิตไซลิทอล 13.390, 7.721, 2.454, และ 1.058 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 8 - ภาพที่ 11) ดังนั้นการศึกษาขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 100 กรัมต่อลิตร ไปทำการศึกษาต่อไป



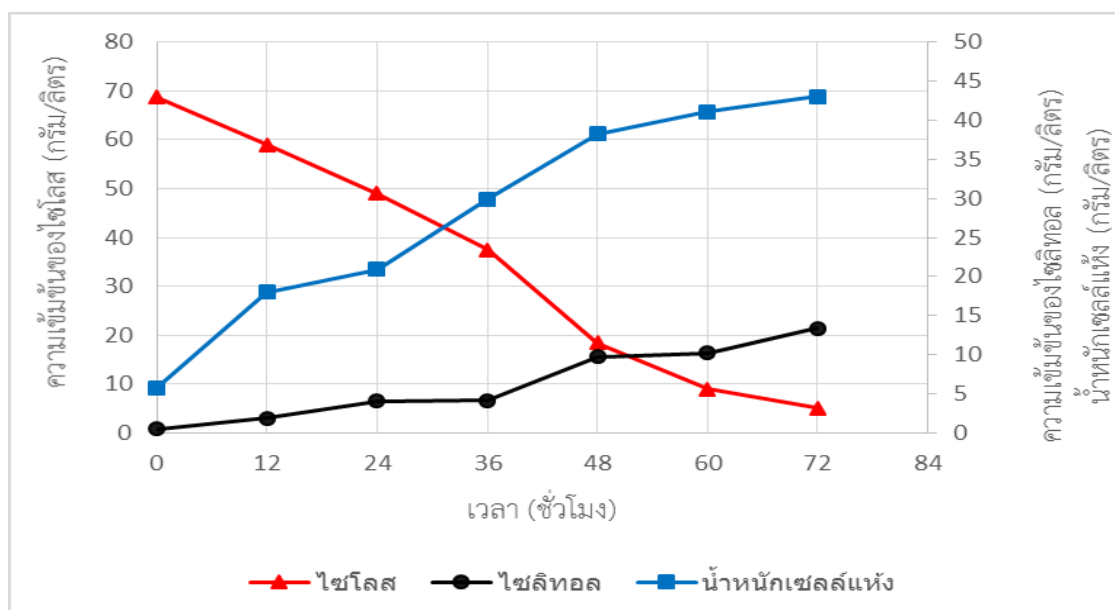
ภาพที่ 8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักรเซลล์แห้ง ต่อการผลิตไซลิทอลโดย *Candida magnoliae* TISTR 5664 ที่ความเข้มข้นของไซโลส 15 กรัมต่อลิตร



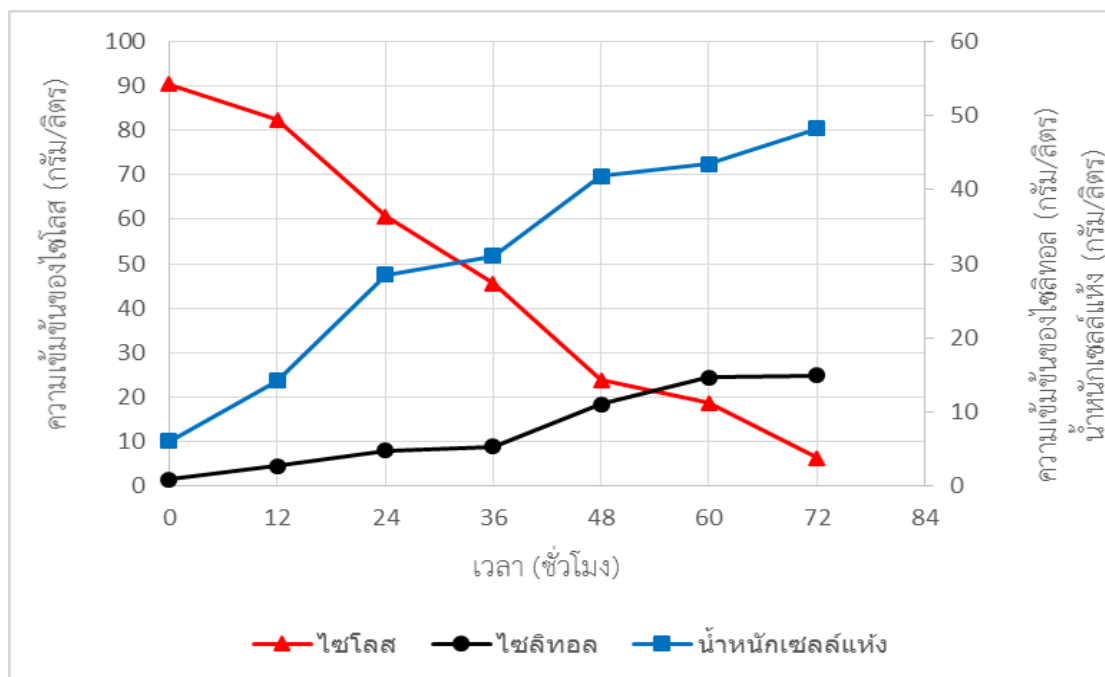
ภาพที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักรเซลล์แห้ง ต่อการผลิตไซลิทอลโดย *Candida magnoliae* TISTR 5664 ที่ความเข้มข้นของไซโลส 25 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไคโลส ความเข้มข้นของไคลิทอล และน้ำหนักเซลล์แห้ง ต่อการผลิตไคลิทอลโดย *Candida magnoliae* TISTR 5664 ที่ความเข้มข้นของไคโลส 50 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไคโลส ความเข้มข้นของไคลิทอล และน้ำหนักเซลล์แห้ง ต่อการผลิตไคลิทอลโดย *Candida magnoliae* TISTR 5664 ที่ความเข้มข้นของไคโลส 75 กรัมต่อลิตร

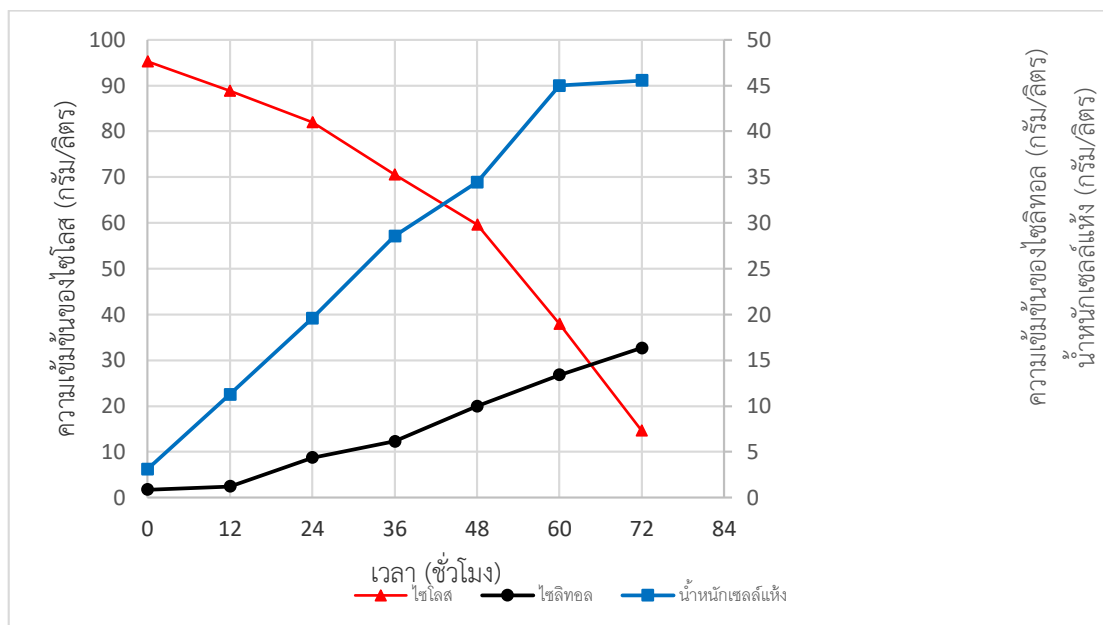


ภาพที่ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำนักเซลล์แห้ง ต่อการผลิตไซลิทอลโดย *Candida magnoliae* TISTR 5664 ที่ความเข้มข้นของไซโลส 100 กรัมต่อลิตร

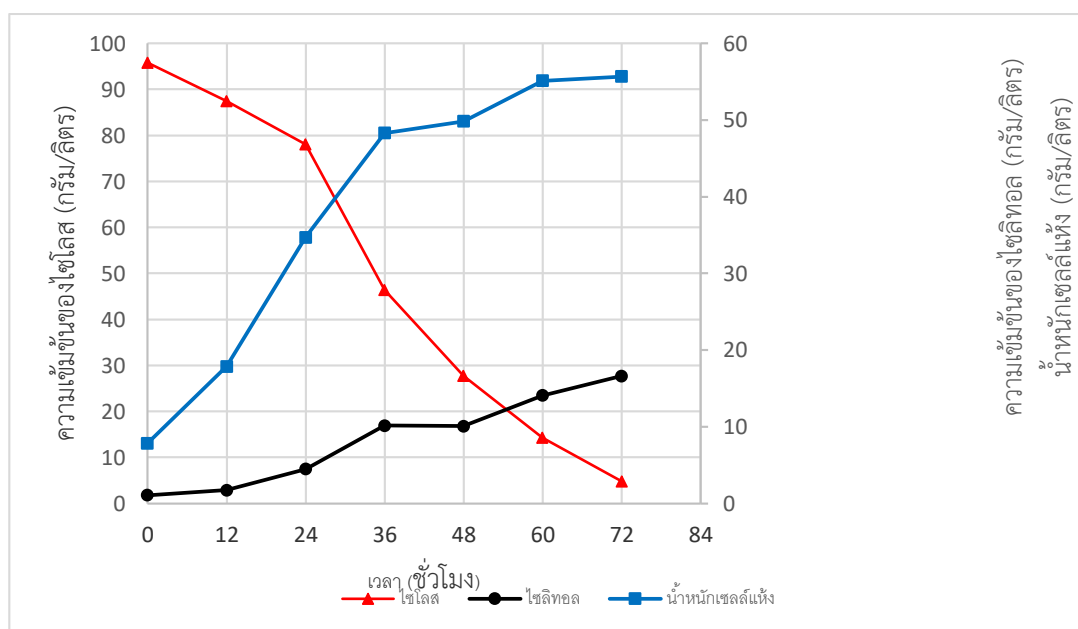
4.4 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์

4.4.1 การศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตไซลิทอล

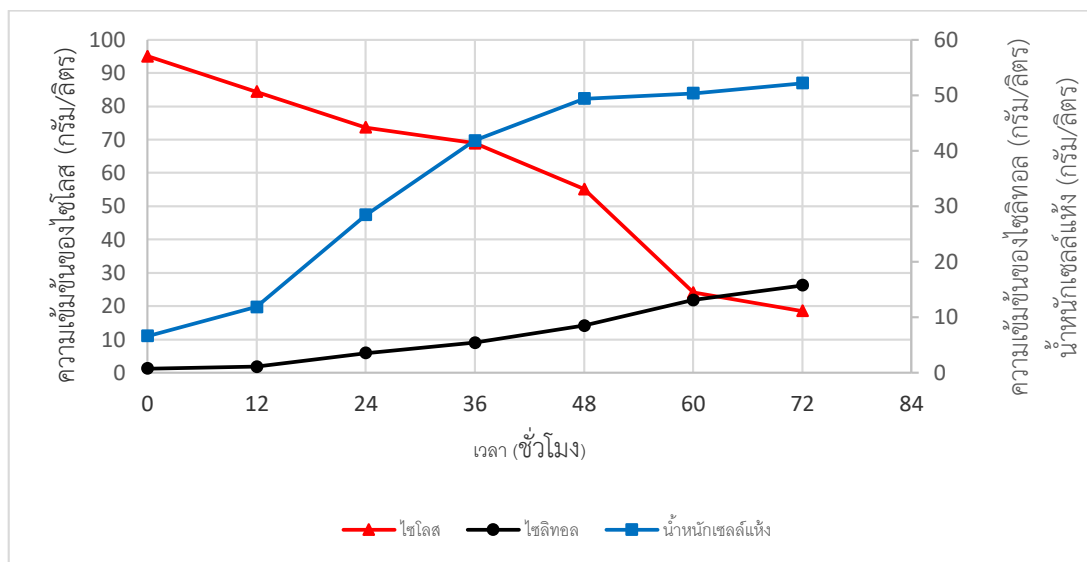
ผลของการเพาะเลี้ยง *Candida magnoliae* TISTR 5664 ในอาหารเหลว YNB ที่เติมน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 โดยทำการบ่มบนเครื่องเขย่า 170 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง พบว่า มีการผลิตไซลิทอลได้สูงสุดในอาหารเหลว YNB ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 โดยสามารถผลิตไซลิทอลได้สูงสุดเท่ากับ 16.620 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 ของการหมัก (ภาพที่ 14) รองลงมาคือค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 โดยผลิตไซลิทอลได้ 16.342, 15.716, 14.935 และ 13.909 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 13, 15, 16 และ 17) และจะใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ไปใช้ในการศึกษาต่อไป



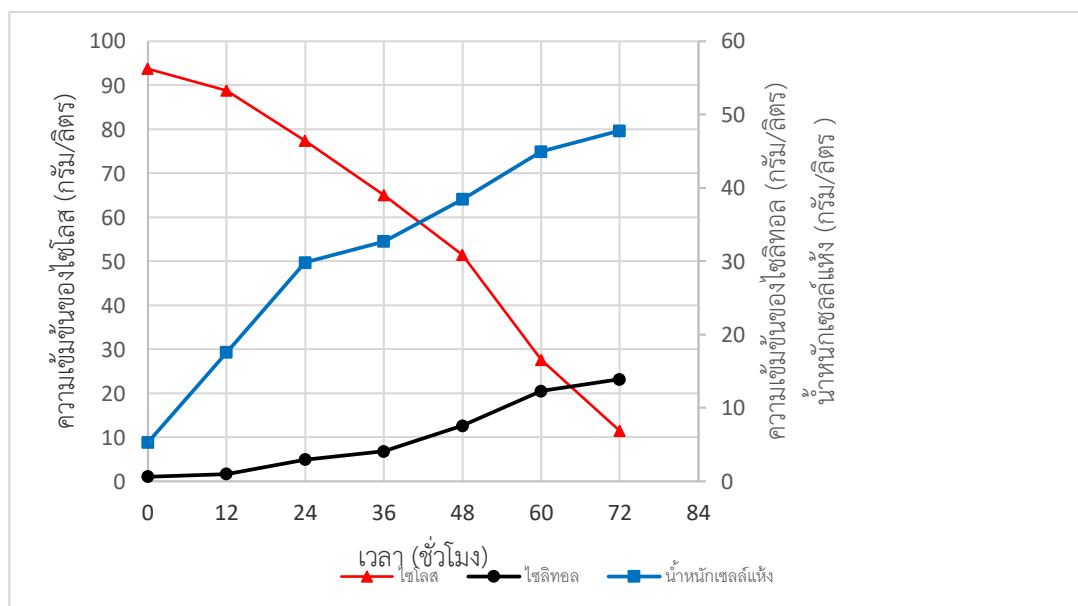
ภาพที่ 13 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และ น้ำหนักเซลล์แห้งในการผลิตไซลิทอลโดย *Candida magnoliae* TISTR 5664 ที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 4.0



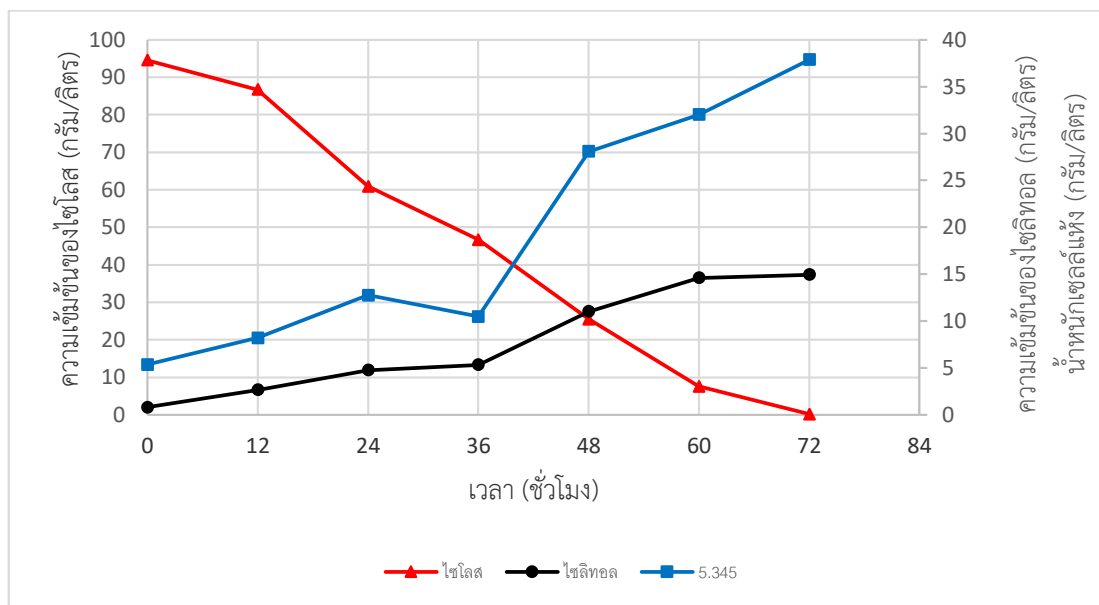
ภาพที่ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และ น้ำหนักเซลล์แห้งในการผลิตไซลิทอลโดย *Candida magnoliae* TISTR 5664 ที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 5.0



ภาพที่ 15 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้นของไซลิตอล และ น้ำหนักเซลล์แห้งในการผลิตไซลิตอลโดย *Candida magnoliae* TISTR 5664 ที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 6.0



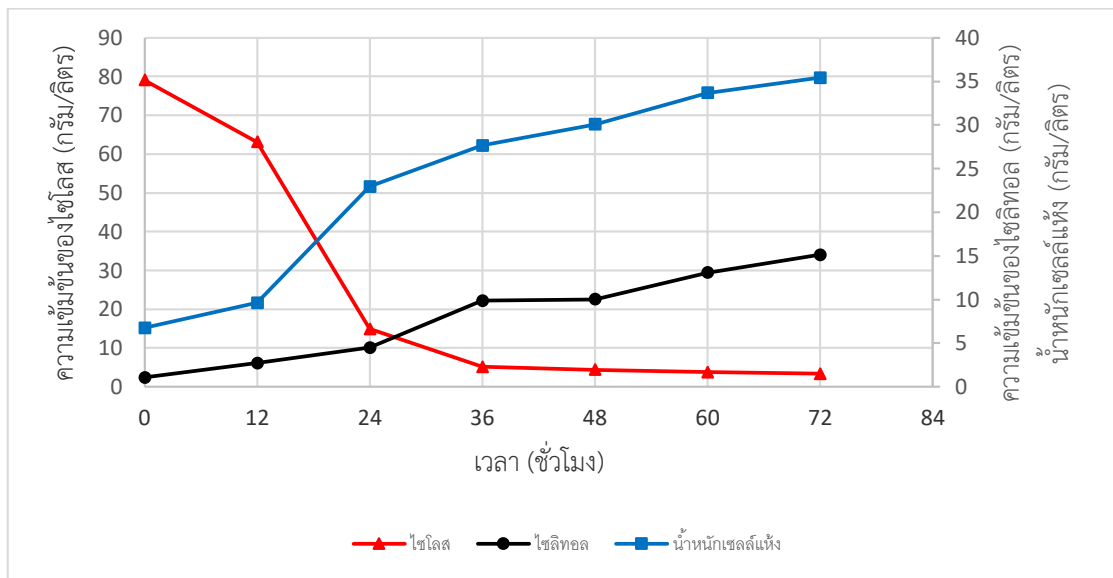
ภาพที่ 16 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้นของไซลิตอล และ น้ำหนักเซลล์แห้งในการผลิตไซลิตอลโดย *Candida magnoliae* TISTR 5664 ที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 7.0



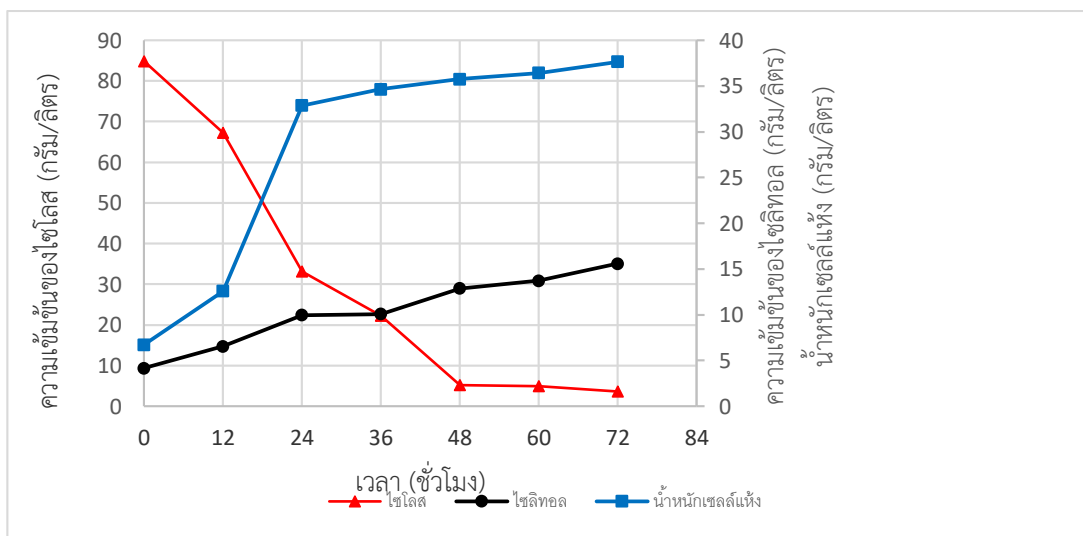
ภาพที่ 17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และ น้ำหนักเซลล์แห้งในการผลิตไซลิทอลโดย *Candida magnoliae* TISTR 5664 ที่ค่าพีเอชเริ่มต้น 8.0

4.4.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตไซลิทอล

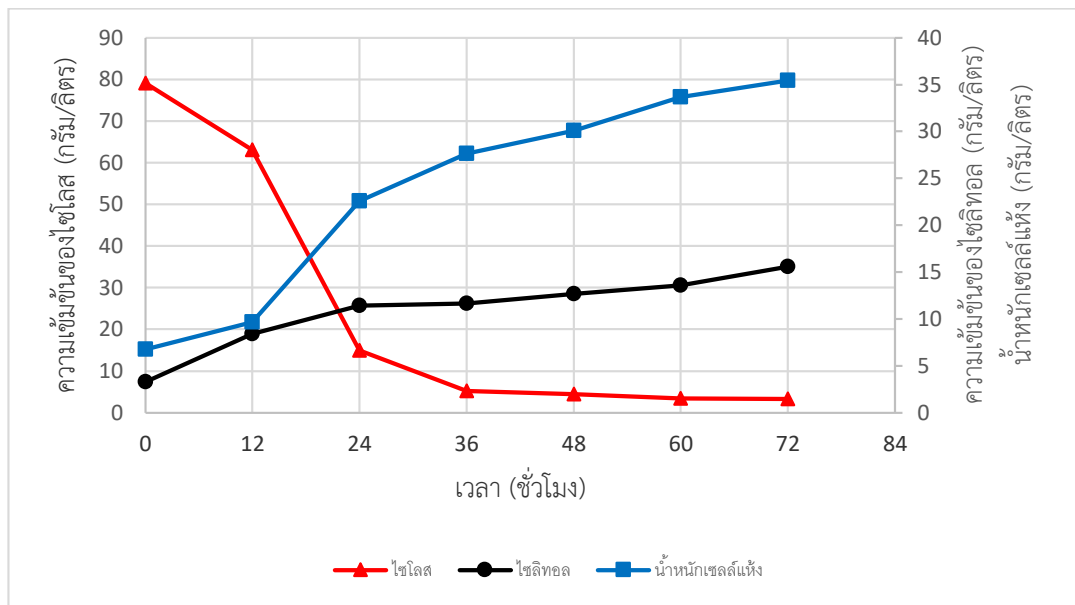
ผลของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Candida magnoliae* TISTR 5664 ในอาหารเหลว YNB ซึ่งเติมน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร โดยทำการบ่มบนเครื่องเขย่า 170 รอบต่อนาที ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ควบคุมอุณหภูมิที่ 30, 33, 35, 37 และ 40 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง พบว่า มีการผลิตไซลิทอลได้สูงสุดในอาหารเหลว YNB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยสามารถผลิตไซลิทอลได้สูงสุดเท่ากับ 17.775 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 24 ของการหมัก (ภาพที่ 21) รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 35, 33, 30 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งสามารถผลิตไซลิทอลได้เท่ากับ 15.598, 15.588, 15.115 และ 9.324 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 18, 19, 20 และ 22)



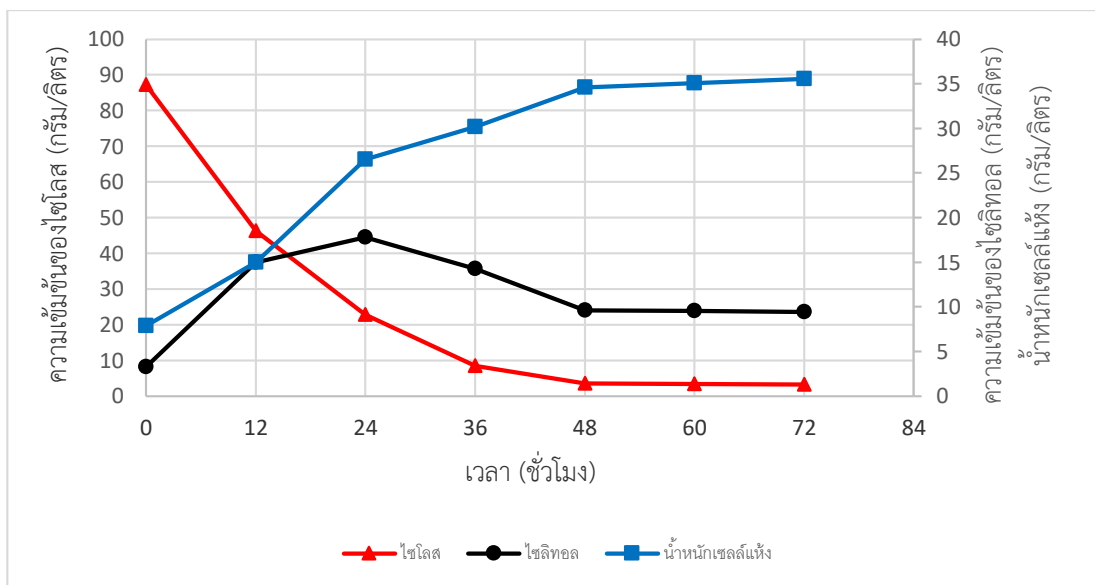
ภาพที่ 18 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และ น้ำหนักรเซลล์แห้งในการผลิตไซลิทอลโดย *Candida magnoliae* TISTR 5664 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



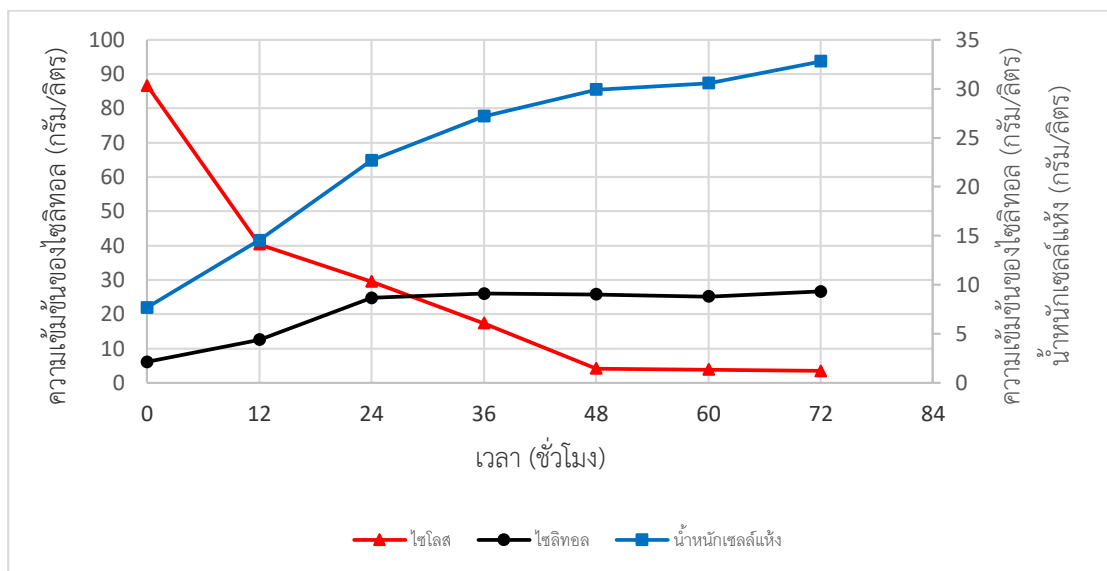
ภาพที่ 19 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และ น้ำหนักรเซลล์แห้งในการผลิตไซลิทอลโดย *Candida magnoliae* TISTR 5664 ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 20 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และ น้ำนักเซลล์แห้งในการผลิตไซลิทอลโดย *Candida magnoliae* TISTR 5664 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 21 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และ น้ำนักเซลล์แห้งในการผลิตไซลิทอลโดย *Candida magnoliae* TISTR 5664 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 22 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และ น้ำหนักเซลล์แห้งในการผลิตไซลิทอลโดย *Candida magnoliae* TISTR 5664 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

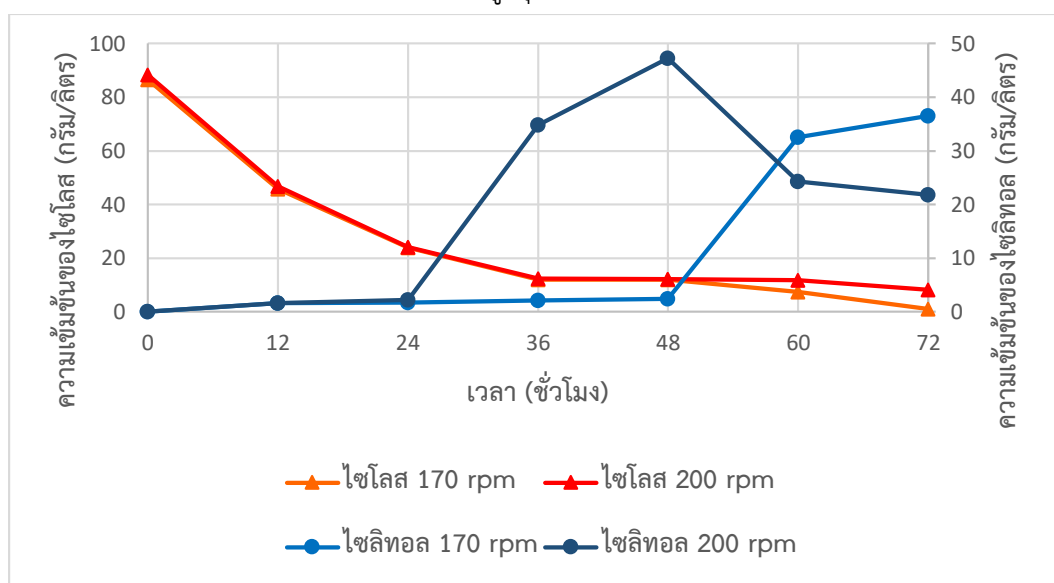
ดังนั้นผลจากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลโดยยีสต์ *Candida magnoliae* TISTR 5664 ในระดับฟลาสก์เยย่า พบว่าการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Candida magnoliae* TISTR 5664 ในอาหารเหลว YNB ซึ่งเติมน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร บ่มบนเครื่องเขย่า 170 รอบต่อนาที ค่าพีเอช เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส คือสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลโดยยีสต์ *Candida magnoliae* TISTR 5664 โดยสามารถผลิตไซลิทอลได้สูงสุดเท่ากับ 17.775 กรัมต่อลิตร ใน ชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก คณะผู้วิจัยสันนิษฐานว่ามีเหตุผลเนื่องจากยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5664 เป็น ยีสต์ประเภท Mesophilic yeast จึงเจริญเติบโตดีและให้ผลผลิตไซลิทอลสูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4.4.3 การศึกษาผลของการเพิ่มความเร็วยรอบการเขย่าต่อการผลิตไซลิทอลในระดับฟลาสก์

ศึกษาการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อ *Candida magnoliae* TISTR 5664 ในอาหารเหลว YNB ซึ่งมี น้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 5.0 บ่มบนเครื่องเขย่า 170 และ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง นาน 72 ชั่วโมง

จากผลการทดลองเปรียบเทียบผลผลิตไซลิทอลในระดับฟลาสก์เมื่อบ่มบนเครื่องเขย่า 170 และ 200 รอบต่อนาที พบว่าการบ่มที่ 200 รอบต่อนาที ให้ผลผลิตไซลิทอล 47.29 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 48 ซึ่งสูง

กว่าผลผลิตไซลิทอล 36.54 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 72 เมื่อบ่มที่ 170 รอบต่อนาที (ภาพที่ 23) และที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาทีก็ยิ่งให้ผลผลิตไซลิทอลสูงสุดเร็วกว่าที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที อีกด้วย



ภาพที่ 23 กราฟแสดงความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส และปริมาณผลผลิตไซลิทอลในการผลิตไซลิทอลในระดับฟลาสก์โดย *Candida magnoliae* TISTR 5664 ในอาหารเหลว YNB ซึ่งมีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 5.0 บ่มบนเครื่องเขย่า 170 และ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

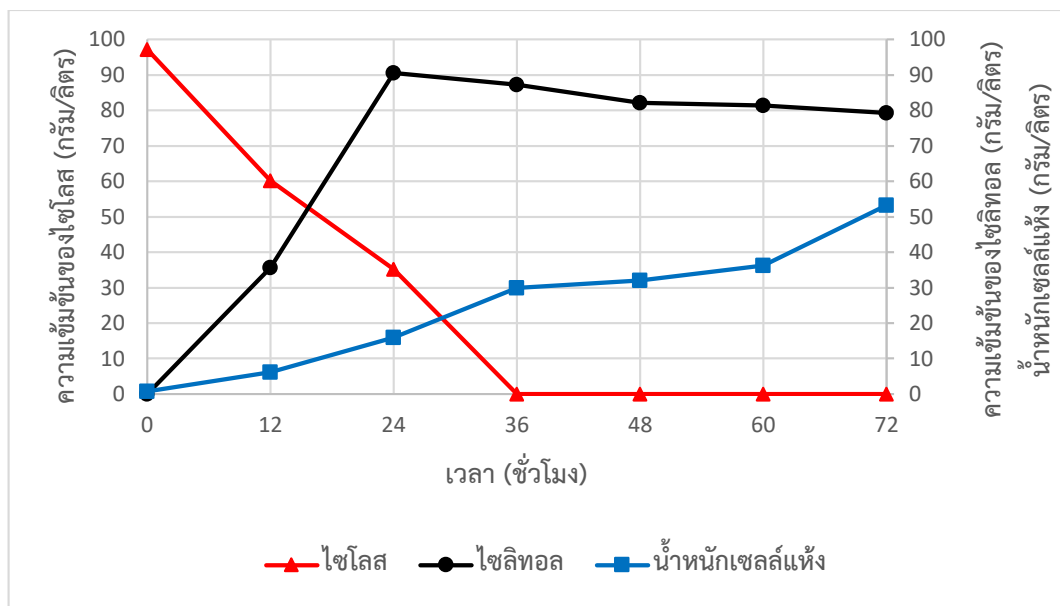
คณะผู้วิจัยสันนิษฐานว่าการผลิตไซลิทอลเมื่อบ่มที่การเขย่า 200 รอบต่อนาทีให้ผลผลิตไซลิทอลสูงกว่าและรวดเร็วกว่าการเขย่า 170 รอบต่อนาที คงจะมีเหตุผลจากการที่ยีสต์ *Candida magnoliae* TISTR 5664 ในอาหารเหลวได้รับออกซิเจนในปริมาณที่สูงกว่าจึงเจริญได้ดีกว่า และเกิดเมตาบอลิซึมใน Pathway ต่างๆ ดีกว่า

4.4.4 การศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลไซโลสต่อการผลิตไซลิทอลในระดับฟลาสก์เขย่า

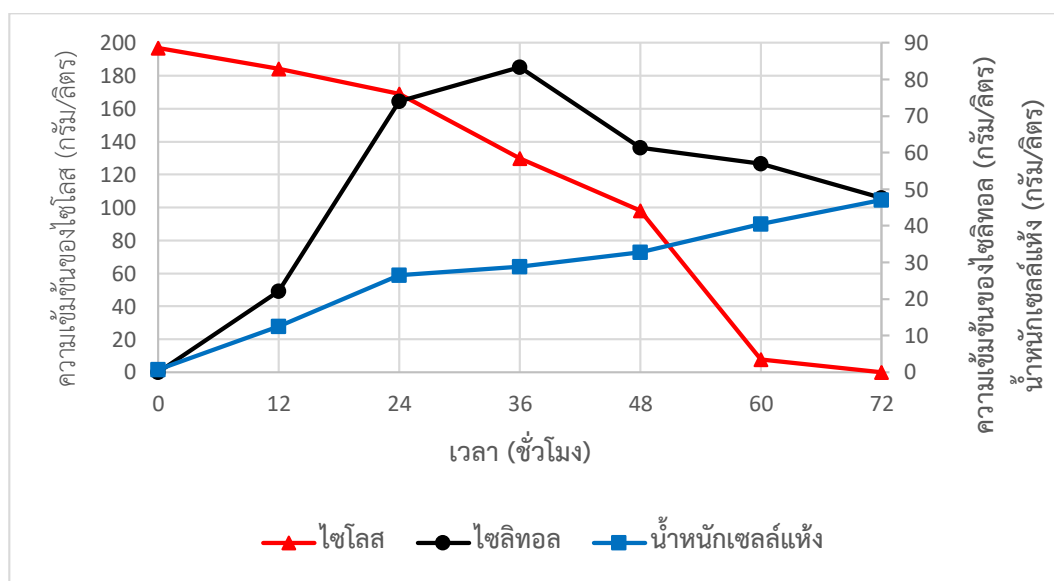
ศึกษาการผลิตไซลิทอลโดยยีสต์ *Candida magnoliae* TISTR 5664 ในอาหารเหลว YNB ซึ่งมีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100, 200 และ 300 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 5.0 บ่มบนเครื่องเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง นาน 72 ชั่วโมง

สืบเนื่องจากผลการศึกษาในหัวข้อก่อนหน้านี้ (4.4.3 การศึกษาผลของการเพิ่มความเร็วรอบการเขย่าต่อการผลิตไซลิทอลในระดับฟลาสก์) ทำให้ทราบว่าเมื่อเพิ่มความเร็วรอบการเขย่าจาก 170 รอบต่อนาที เป็น

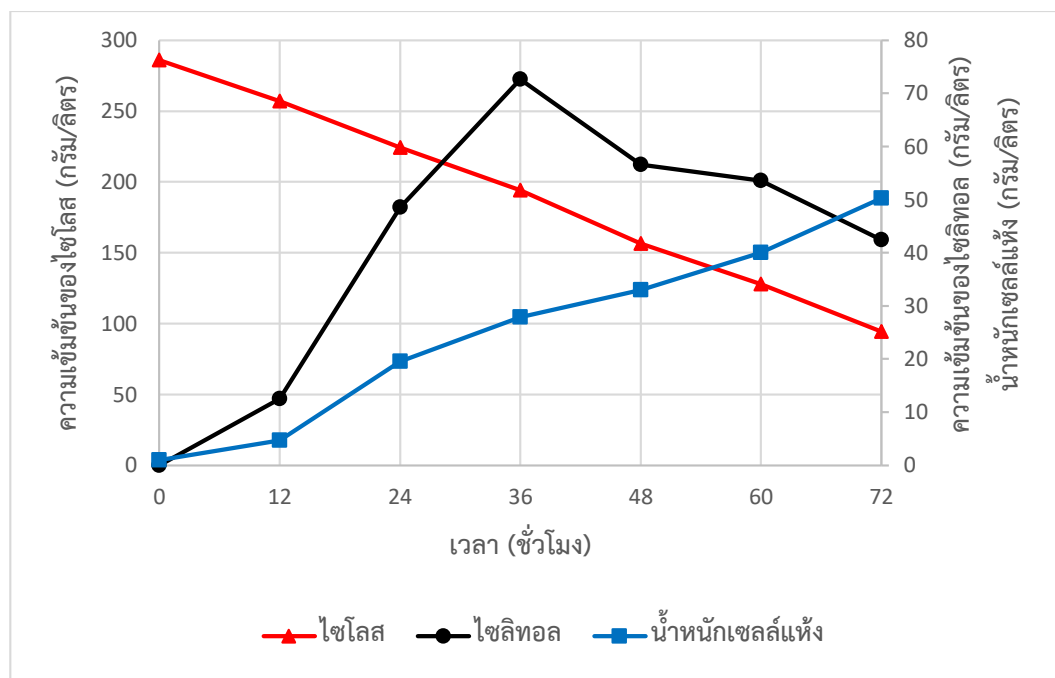
200 รอบต่อนาที สามารถเพิ่มผลผลิตของไซลิทอลให้สูงขึ้นได้ ประกอบกับการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเป็น 200 และ 300 กรัมต่อลิตร ในครั้งนี้ทำให้ค่าความหนืดของอาหารเหลวเพิ่มสูงขึ้น คณะผู้วิจัยจึงมีความกังวลว่ายีสต์จะได้รับออกซิเจนไม่เพียงพอจึงได้ปรับการเขย่าเป็น 250 รอบต่อนาที



ภาพที่ 24 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ ในการผลิตไซลิทอลในระดับฟลask โดย *Candida magnoliae* TISTR 5664 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลไซโลส 100 กรัมต่อลิตร บ่มบนเครื่องเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 25 กราฟแสดงความสัมพันธ์ผลระหว่างความเข้มข้นของไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และ น้ำหนักเซลล์แห้ง ในการผลิตไซลิทอลในระดับพลาสติกโดย *Candida magnoliae* TISTR 5664 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลไซโลส 200 กรัมต่อลิตร บ่มบนเครื่องเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง



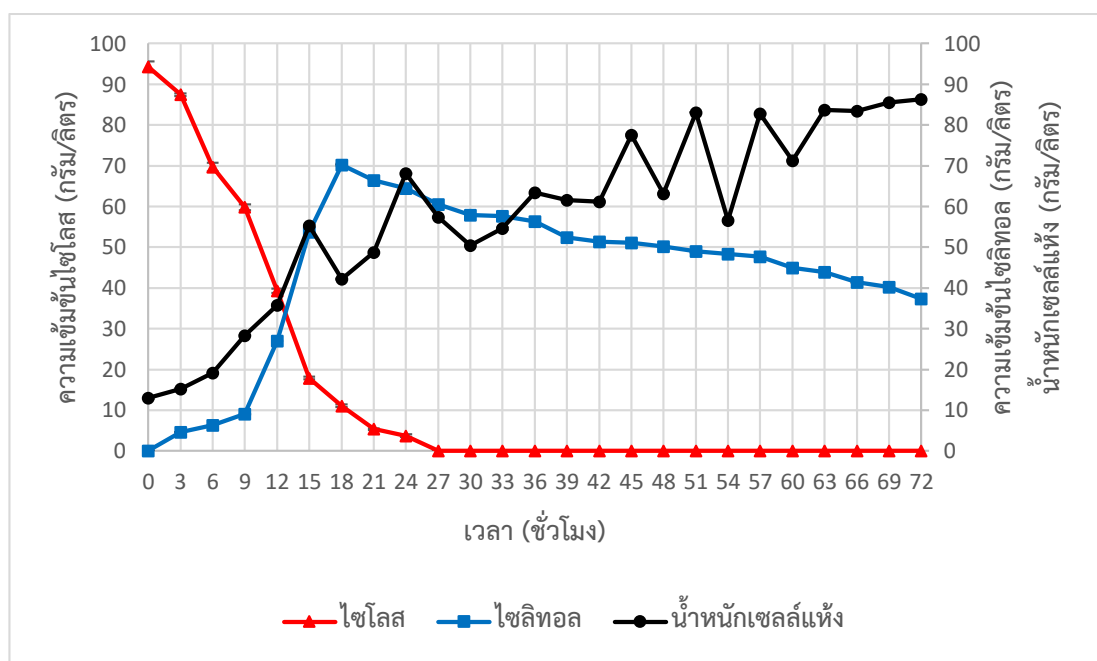
ภาพที่ 26 กราฟแสดงความสัมพันธ์ผลระหว่างความเข้มข้นของไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และ น้ำหนักเซลล์แห้ง ในการผลิตไซลิทอลในระดับพลาสติกโดย *Candida magnoliae* TISTR 5664 ที่ความเข้มข้นน้ำตาลไซโลส 300 กรัมต่อลิตร บ่มบนเครื่องเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

ผลการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตไซลิทอลโดยใช้น้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100, 200 และ 300 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YNB พบว่า ความเข้มข้นน้ำตาลไซโลส 100 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตไซลิทอลสูงสุด นอกจากนี้ยังให้ผลผลิตสูงสุดเร็วที่สุด คือ ให้ผลผลิตไซลิทอลสูงสุด 90.52 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 24 ในขณะที่ความเข้มข้นน้ำตาลไซโลส 200 และ 300 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตไซลิทอลสูงสุด 83.35 กรัมต่อลิตร (ณ ชั่วโมงที่ 36) และ 72.65 กรัมต่อลิตร (ณ ชั่วโมงที่ 36) ตามลำดับ

ดังนั้นการศึกษาในขั้นต่อไปคือ การศึกษาการผลิตไซลิทอลในระดับถึงหมัก คณะผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้ความเข้มข้นน้ำตาลไซโลส 100 กรัมต่อลิตร ในการศึกษาขั้นต่อไป

4.5 การศึกษาการขยายขนาดการผลิตจากระดับฟลาสก์เขย่าไปสู่ระดับถังหมัก

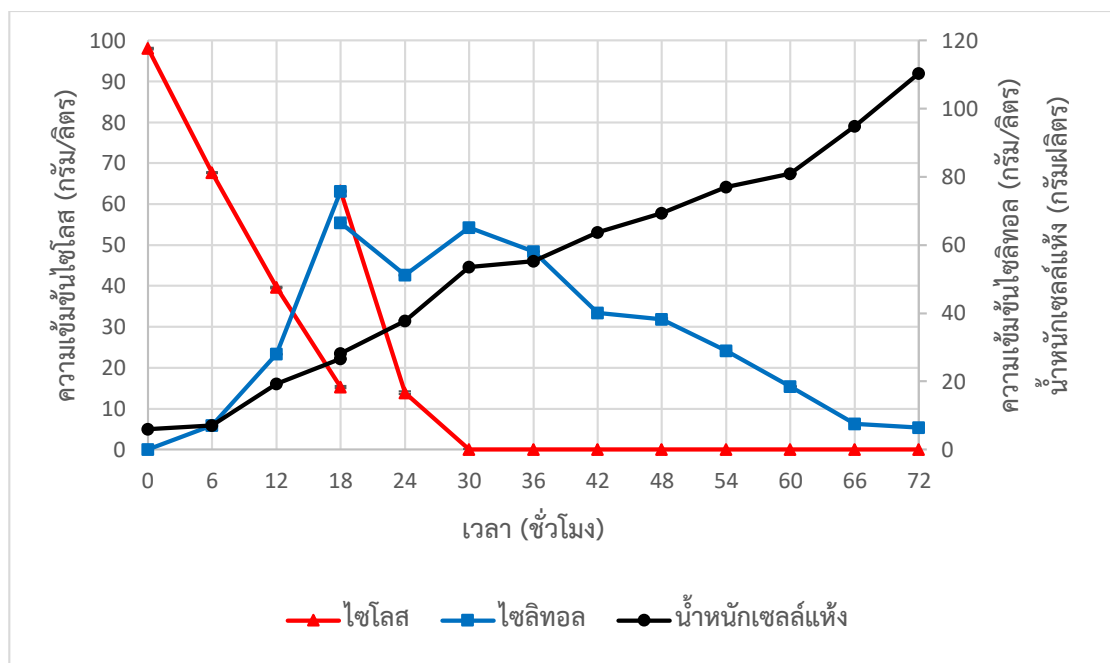
ผลจากการศึกษาการผลิตไซลิทอลในระดับถังหมักขนาด 10 ลิตร แต่ใช้ Working Volume 6 ลิตร เพื่อป้องกันปัญหาฟองอากาศล้นถังหมัก โดยทำการเพาะเลี้ยง *Candida magnoliae* TISTR 5664 ในอาหารเหลว YNB ซึ่งมีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ความเร็วรอบ 300 rpm ให้อากาศ 1 VVM อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง พบว่า มีการผลิตไซลิทอลได้สูงสุดเท่ากับ 70.25 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 18 และน้ำตาลไซโลสถูกใช้จนหมด ณ ชั่วโมงที่ 27 ดังแสดงในภาพที่ 27 และจากผลการศึกษาค้างนี้จึงกำหนดให้มีการเติมน้ำตาลไซโลสเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นอีก 50 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 18 ในการศึกษาครั้งต่อไป



ภาพที่ 27 กราฟแสดงความสัมพันธ์ผลระหว่างความเข้มข้นของไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักรากเซลล์แห้ง ในการผลิตไซลิทอลในระดับถังหมักโดย *Candida magnoliae* TISTR 5664 ในอาหาร YNB ซึ่งมีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 5.0 ความเร็วรอบ 300 rpm ให้อากาศ 1 VVM อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

จากการศึกษาการผลิตไซลิทอลในระดับถังหมักขนาด 10 ลิตร (Working Volume 6 ลิตร) ครั้งที่ 2 โดยการเพาะเลี้ยง *Candida magnoliae* TISTR 5664 ในอาหารเหลว YNB ซึ่งมีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ความเร็วรอบ 300 rpm ให้อากาศ 1 VVM อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง และเติมน้ำตาลไซโลสเพิ่มเพื่อให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสในอาหารเหลวเพิ่มขึ้นอีก 50 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 18 พบว่า มีการผลิตไซลิทอลได้สูงสุดเท่ากับ 75.70 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 18 และน้ำตาลไซโลสถูกใช้จนหมด ณ ชั่วโมงที่ 30 (ภาพที่ 28) โดยผลการศึกษาการผลิตไซลิทอลในระดับถังหมักครั้งที่ 2 นี้ให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งที่ 1 ด้านบน (ภาพที่ 27)

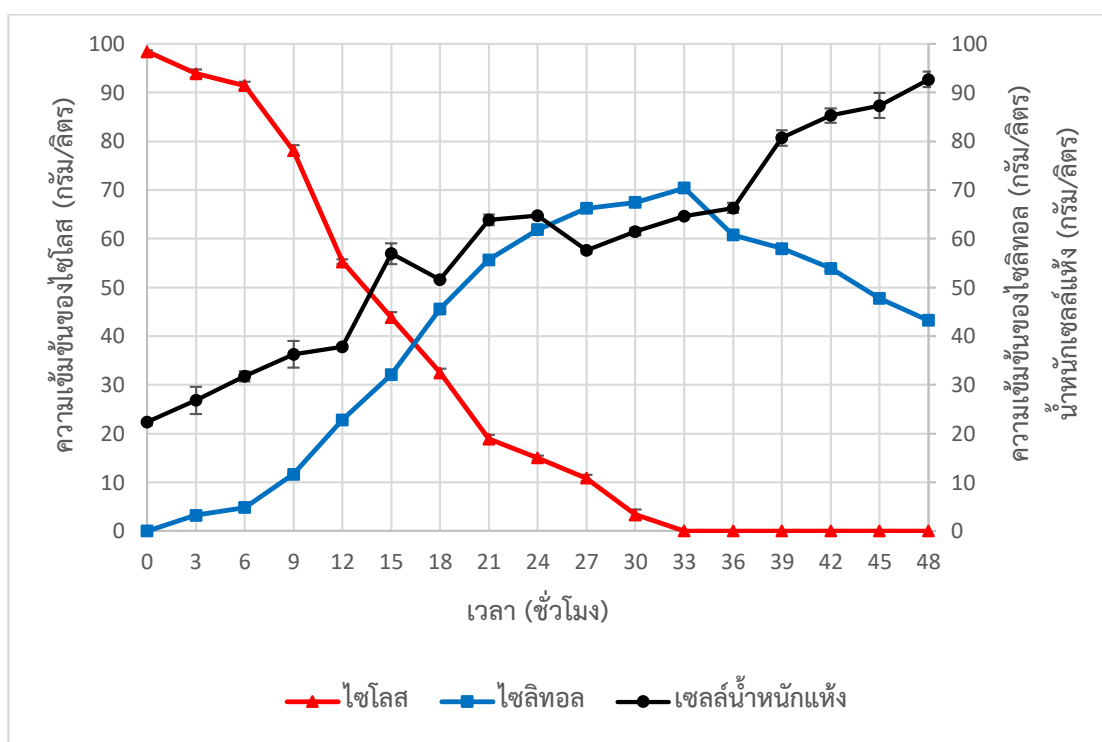
ในการศึกษาครั้งต่อไปกำหนดการให้อากาศเป็น 1.2 VVM ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 24 และปรับการให้อากาศเป็น 1 VVM ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ถึงชั่วโมงที่ 48 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อจะศึกษาว่าการเพิ่มปริมาณออกซิเจนให้แก่ยีสต์ในช่วงต้นจะสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ยีสต์ให้สูงขึ้นและให้เกิดผลผลิตไซลิทอลสูงขึ้นได้หรือไม่



ภาพที่ 28 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และน้ำหนักรเซลล์แห้ง ในการผลิตไซลิทอลในระดับถังหมักโดย *Candida magnoliae* TISTR 5664 ในอาหาร YNB ซึ่งมีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 5.0 ความเร็วรอบ 300 rpm ให้อากาศ 1 VVM อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

หมายเหตุ : เติมน้ำตาลไซโลสเพื่อให้ได้ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 50 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 18

จากการศึกษาผลิตไซลิทอลในระดับถังหมักขนาด 10 ลิตร (Working Volume 6 ลิตร) ครั้งที่ 3 โดยทำการเพาะเลี้ยง *Candida magnoliae* TISTR 5664 ในอาหารเหลว YNB ซึ่งมีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ความเร็วรอบ 300 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง และกำหนดให้อากาศ 1.2 VVM ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 24 และปรับการให้อากาศเป็น 1 VVM ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ถึงชั่วโมงที่ 48 พบว่า มีการผลิตไซลิทอลได้สูงสุดเท่ากับ 70.42 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลไซโลสถูกใช้จนหมด ณ ชั่วโมงที่ 33 ดังแสดงในภาพที่ 29

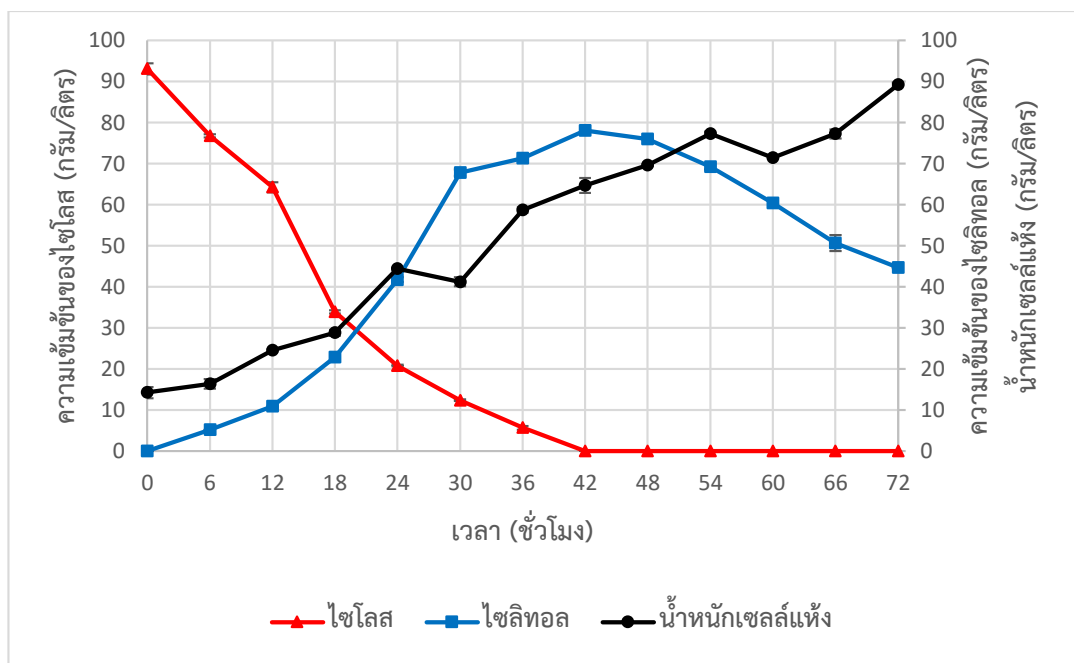


ภาพที่ 29 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และ น้ำหนักเซลล์แห้ง ในการผลิตไซลิทอลในระดับถังหมักโดย *Candida magnoliae* TISTR 5664 ในอาหาร YNB ซึ่งมีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 5.0 ความเร็วรอบ 300 rpm อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

หมายเหตุ : ให้อากาศ 1.2 VVM ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 24 และปรับการให้อากาศเป็น 1 VVM ตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 24 ถึงชั่วโมงที่ 48

ผลจากการศึกษาการผลิตไซลิทอลในระดับถังหมักขนาด 10 ลิตร (Working Volume 6 ลิตร) ครั้งที่ 4 โดยทำการเพาะเลี้ยง *Candida magnoliae* TISTR 5664 ในอาหารเหลว YNB ซึ่งมีน้ำตาลไซโลสความ

เข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 ความเร็วรอบ 300 rpm ให้อากาศ 0.8 vvm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า มีการผลิตไซลิทอลได้สูงสุดเท่ากับ 78.07 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลไซโลสถูกใช้จนหมด ณ ชั่วโมงที่ 42 ดังแสดงในภาพที่ 30



ภาพที่ 30 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไซโลส ความเข้มข้นของไซลิทอล และ น้ำหนักเซลล์แห้ง ในการผลิตไซลิทอลในระดับถังหมักโดย *Candida magnoliae* TISTR 5664 ในอาหาร YNB ซึ่งมีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ความเร็วรอบ 300 rpm ให้ อากาศ 0.8 VVM อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

จากผลการศึกษาการผลิตไซลิทอลในระดับถังหมักขนาด 10 ลิตร (Working Volume 6 ลิตร) ทั้ง 4 ครั้งในสภาวะที่แตกต่างกันนั้น พบว่า การเพาะเลี้ยง *Candida magnoliae* TISTR 5664 ในอาหารเหลว YNB ซึ่งมีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ความเร็วรอบ 300 rpm ให้อากาศ 1 VVM อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต ไซลิทอลทั้งในแง่ของการให้ผลผลิตไซลิทอลในปริมาณสูงสุด (70.25 – 75.70 กรัมต่อลิตร) และใช้ระยะเวลา ในการผลิตที่สั้นที่สุด (ระยะเวลา 18 ชั่วโมง) จึงนับว่าเป็นข้อดีด้านต้นทุนการผลิตที่ต่ำสุด แม้ว่าการให้ อากาศ 0.8 VVM ให้ผลผลิตไซลิทอลในปริมาณที่สูงกว่า แต่ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก และในทางตรงข้าม การให้อากาศ 0.8 VVM จำเป็นต้องใช้ระยะเวลาในการผลิตนานกว่า (ระยะเวลา 42 ชั่วโมง) จึงจะให้ผลผลิต

โซลิทอลในปริมาณสูงกว่าเพียงเล็กน้อย จึงนับเป็นข้อเสียเปรียบในแง่ด้านต้นทุนการผลิตเนื่องจากต้องใช้ระยะเวลาหมักที่ยาวนานกว่า

สำหรับการเติมน้ำตาลไซโลสเพิ่มเติมระหว่างการหมักเพื่อให้น้ำตาลไซโลสในอาหารเหลว YNB มีค่าความเข้มข้นเพิ่มขึ้นอีก 50 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 18 นั้น พบว่าผลผลิตโซลิทอลไม่ได้เพิ่มสูงขึ้นแต่อย่างใด ดังนั้นการเติมน้ำตาลไซโลสเพิ่มเติมระหว่างการหมักจึงกลายเป็นการเพิ่มต้นทุนโดยไม่ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น จึงไม่สมควรดำเนินการ

จากผลการศึกษาการผลิตน้ำตาลโซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสครั้งนี้ทำให้คณะผู้วิจัยสามารถสรุปปัจจัยสำคัญซึ่งมีผลต่อการเพิ่มผลผลิตน้ำตาลโซลิทอลได้ดังต่อไปนี้

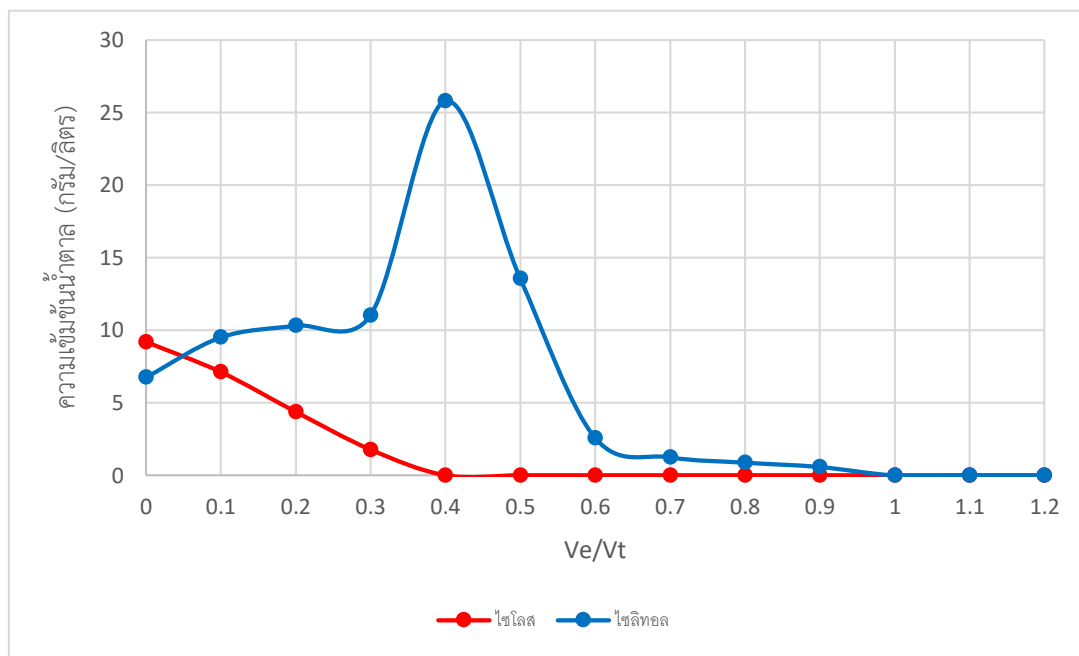
- | | | |
|--|---|-----------------|
| 1. ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส | : | 100 กรัมต่อลิตร |
| 2. ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ | : | pH 5.0 |
| 3. อุณหภูมิของการหมัก | : | 37 องศาเซลเซียส |
| 4. อัตราการให้อากาศ | : | 1 VVM |

4.6 การศึกษากระบวนการทำให้โซลิทอลบริสุทธิ์

เนื่องจากมีรายงานว่า Strong cation-exchange resins ที่อยู่ในรูปแคลเซียมสามารถจับกับ โซลิทอลได้แข็งแรงกว่าน้ำตาลตัวอื่น โดยภายหลังจากถึงจุดสมดุลของการดูดซับแล้วน้ำตาลชนิดอื่นจะถูกล้างออกไปก่อน ดังนั้นน้ำตาลโซลิทอลก็จะถูกแยกออกจากน้ำตาลอื่นในน้ำหมักได้ จึงทำให้ความบริสุทธิ์ของน้ำตาลโซลิทอลเพิ่มมากขึ้น (Jinchao, W. *et al.*, 2010) การศึกษาครั้งนี้จึงเลือกใช้เรซิน Purolite PCR833 ซึ่งเป็น Strong Acid Cation Resin ที่ผ่านการเปลี่ยนจาก Sodium form ให้เป็น Calcium form โดยการใช้สารละลาย CaCl_2 ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตรมากกว่า 2 เท่าของเรซิน กวนผสมตลอดเวลาประมาณ 1 คืน ก่อนเริ่มบรรจุเรซินลงในคอลัมน์เพื่อการทำโซลิทอลบริสุทธิ์

ภายหลังจากได้น้ำหมักจากการเพาะเลี้ยง *Candida magnolia* TISTR 5664 ซึ่งมีโซลิทอล 45.11 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลไซโลส เท่ากับ 26.18 กรัมต่อลิตร จึงทำการแยกโซลิทอลออกจากไซโลสโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ ผ่านคอลัมน์เรซิน Purolite PCR833 ที่อยู่ในรูปของแคลเซียม กำหนดอัตราส่วนปริมาตรบรรจุเรซินต่อปริมาตรสารตัวอย่าง 120 : 30 โดยใช้ น้ำปราศจากประจุเป็นตัวชะล้างที่อุณหภูมิห้องด้วยอัตราการไหล 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง พบว่า สามารถแยกโซลิทอลออกจากน้ำตาลไซโลสที่

เหลือได้อย่างสมบูรณ์เมื่อสัดส่วนระหว่างปริมาตรของน้ำล้างกับปริมาตรของเรซินทั้งหมด (V_e / V_t) สูงกว่า 0.4 เป็นต้นไป และค่า % Recovery คิดเป็นเท่ากับ 57.21% ดังแสดงในภาพที่ 31



ภาพที่ 31 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนระหว่างปริมาตรของสารชะกับปริมาตรของเรซินทั้งหมด (V_e / V_t) กับความเข้มข้นน้ำตาลภายหลังจากการชะล้างน้ำหมักที่ได้จาก *Candida magnolia* TISTR 5664 ผ่านคอลัมน์เรซิน Purolite PCR833

ตารางที่ 2 การแยกไซลิทอลซึ่งผลิตได้จากยีสต์ *Candida magnolia* TISTR 5664 โดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ ผ่านคอลัมน์เรซิน Purolite PCR833 (กำหนดอัตราส่วนปริมาตรบรรจุเรซินต่อปริมาตรสารตัวอย่าง 120 : 30 โดยใช้ น้ำปราศจากประจุเป็นตัวชะล้างที่อุณหภูมิห้องด้วยอัตราการไหล 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง)

สัดส่วนระหว่างปริมาตรของสารชะต่อ ปริมาตรของเรซินทั้งหมด (V_e / V_t)	ปริมาตรของสารชะ (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นน้ำตาล (กรัม/ลิตร)	
		ไซโลส	ไซลิทอล
0	0	9.21	6.76
0.1	12	7.13	9.51
0.2	24	4.38	10.33
0.3	36	1.77	11.05
0.4	48	0.00	25.80
0.5	60	0.00	13.57
0.6	72	0.00	2.59
0.7	84	0.00	1.25
0.8	96	0.00	0.88
0.9	108	0.00	0.58
1	120	0.00	0.00
1.1	132	0.00	0.00
1.2	144	0.00	0.00

4.7 การทดสอบความเป็นพิษของไซลิทอลที่ผลิตได้และผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในสัตว์ทดลอง

ผลการทดสอบความเป็นพิษของไซลิทอลที่ผลิตได้จากการหมักด้วยยีสต์ *Candida magnolia* TISTR 5664 ซึ่งเป็นกระบวนการผลิตทางชีวภาพ และผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในสัตว์ทดลองคือ หนูทดลอง โดยเมื่อนำตัวอย่างของไซลิทอลที่ผลิตได้และทำให้แห้งไปทดสอบความเป็นพิษโดยการป้อนพร้อมอาหารให้แก่หนูทดลองในอัตรา 2,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูทดลอง 1 กิโลกรัม พบว่าไม่มีการตายของหนูทดลอง และไม่พบอาการหรือสัญญาณเกี่ยวกับความเป็นพิษเลยตลอดการสังเกตเป็นระยะเวลา 14 วัน โดยมีรายละเอียดดังแสดงในรายงาน “Final Report – Acute Oral Toxicity Testing of Xylitol in Wistar Rats” ในภาคผนวก

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

ผลการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยสลายไซแลนภายในชานอ้อยด้วยเอนไซม์ ไซแลเนสพบว่าชานอ้อยที่ไม่แช่น้ำสามารถผลิตไซโลสได้ดีกว่าชานอ้อยที่แช่น้ำ ระยะเวลาที่เหมาะสมคือ 24 ชั่วโมง ปริมาณชานอ้อยที่เหมาะสมต่อปริมาณเอนไซม์ไซแลเนสคือ 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และค่าพีเอชที่เหมาะสมคือ 6.0 และสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยสลายไซแลนภายในชานอ้อยด้วยเอนไซม์ไซโลซิเดส พบว่าชานอ้อยที่ไม่แช่น้ำสามารถผลิตไซโลสได้ดีกว่าชานอ้อยที่แช่น้ำแต่ได้ปริมาณของน้ำตาลไซโลสน้อยเกินไป ดังนั้นจึงนำเอนไซม์ไซแลเนสและไซโลซิเดสมาทำงานร่วมกัน และหาสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยสลายไซแลนภายในชานอ้อยด้วยเอนไซม์ไซแลเนสและเอนไซม์ไซโลซิเดส พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างปริมาณชานอ้อยต่อเอนไซม์ไซแลเนสและไซโลซิเดสคือ 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และค่าพีเอชที่เหมาะสมคือ 6.0

ผลของการเพาะเลี้ยงยีสต์ *Candida magnoliae* TISTR 5664 เพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมของการผลิตไซลิทอล โดยวัดการเจริญเติบโต การใช้น้ำตาลไซโลส และการผลิตไซลิทอล โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YNB ซึ่งเติมน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้น 15, 25, 50, 75 และ 100 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณไซลิทอลเพิ่มสูงขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสที่เพิ่มสูงขึ้น และในอาหารเหลว YNB ซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 100 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตไซลิทอลได้สูงสุด 14.935 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 72 ของการหมัก รองลงมาคือในอาหารเหลวซึ่งมีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 75, 50, 25 และ 15 กรัมต่อลิตร ได้ผลผลิตไซลิทอล 13.390, 7.721, 2.454 และ 1.058 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกอาหารเหลว YNB ซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 100 กรัมต่อลิตร เพื่อใช้ศึกษาในลำดับต่อไป

สำหรับการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลด้วยยีสต์ โดยเริ่มต้นจากการศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลในระดับฟลาสก์เขย่า ทดลองปรับค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลว YNB ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 100 กรัมต่อลิตร ให้มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 พบว่า *Candida magnoliae* TISTR 5664 สามารถผลิตไซลิทอลได้สูงสุดที่ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 โดยสามารถผลิตไซลิทอลได้สูงสุดที่ 16.620 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 72 ของการหมัก รองลงมาคือค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 ซึ่งผลิตไซลิทอลได้เท่ากับ 16.342, 15.716, 14.935 และ 13.909 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกใช้ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

และการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลด้วยยีสต์ โดยเฉพาะเลี้ยงยีสต์ *Candida magnoliae* TISTR 5664 ในอาหารเหลว YNB ซึ่งมีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร บ่มบนเครื่องเขย่า 170 รอบต่อนาที ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ที่อุณหภูมิ 30, 33, 35, 37 และ 40 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง พบว่าเนื่องจากยีสต์ *Candida magnoliae* TISTR 5664 ที่ใช้เป็น mesophilic yeast จึงสามารถผลิตไซลิทอลได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส และสามารถผลิตไซลิทอลได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยสามารถผลิตไซลิทอลได้สูงสุดเท่ากับ 17.775 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 35, 33, 30 องศาเซลเซียส ได้ผลผลิตไซลิทอล 15.598, 15.588, 15.115 และ 9.324 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

การศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลไซโลสต่อการผลิตไซลิทอลโดยยีสต์ *Candida magnoliae* TISTR 5664 ในระดับพลาสม์เขย่า พบว่า ระหว่างน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100, 200 และ 300 กรัมต่อลิตรนั้น ความเข้มข้นน้ำตาลไซโลส 100 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตไซลิทอลสูงสุด และให้ผลผลิตสูงสุดเร็วที่สุด คือ ให้ผลผลิตไซลิทอลสูงสุด 90.52 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 24

สำหรับการศึกษาการขยายขนาดการผลิตจากระดับพลาสม์เขย่าไปสู่ระดับถังหมักโดยใช้ถังหมักขนาด 10 ลิตร (Working Volume 6 ลิตร) พบว่า การเพาะเลี้ยง *Candida magnoliae* TISTR 5664 ในอาหารเหลว YNB ซึ่งมีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ความเร็วรอบ 300 rpm ให้อากาศ 1 VVM อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซลิทอล โดยให้ผลผลิตไซลิทอลในปริมาณสูงสุด (70.25 – 75.70 กรัมต่อลิตร) และใช้ระยะเวลาในการผลิตสั้นที่สุด (ระยะเวลา 18 ชั่วโมง) จึงนับว่าเป็นข้อดีด้านต้นทุนการผลิตที่สำคัญ

ส่วนการศึกษาระบวนการทำให้ไซลิทอลบริสุทธิ์นั้นได้แยกไซลิทอลออกจากน้ำตาลไซโลสโดยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ ผ่านคอลัมน์เรซิน purolite PCR 833 ซึ่งอยู่ในรูปของแคลเซียม กำหนดอัตราส่วนปริมาตรบรรจุเรซินต่อปริมาตรสารตัวอย่าง 120 : 30 ใช้น้ำเป็นตัวล้าง โดยใช้น้ำเป็นตัวชะล้างที่อุณหภูมิห้องด้วยอัตราการไหล 60 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง พบว่า สามารถแยกไซลิทอลออกจากน้ำตาลไซโลสที่เหลือได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อสัดส่วนระหว่างปริมาตรของน้ำล้างกับปริมาตรของเรซินทั้งหมด (V_e / V_t) สูงกว่า 0.4 เป็นต้นไป และค่า % Recovery คิดเป็นเท่ากับ 57.21%

และผลการทดสอบความเป็นพิษของไซลิทอลที่ผลิตได้และผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วในสัตว์ทดลอง โดยนำตัวอย่างของไซลิทอลที่ผลิตได้และทำให้แห้งไปทดสอบความเป็นพิษโดยการป้อนพร้อมอาหารให้แก่หนูทดลองในอัตรา 2,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนูทดลอง 1 กิโลกรัม พบว่าไม่มีการตายของหนูทดลอง และไม่พบอาการหรือสัญญาณเกี่ยวกับความเป็นพิษของไซลิทอลต่อหนูทดลองตลอดการสังเกตนาน 14 วัน

สรุปกระบวนการย่อยชานอ้อยด้วยเอนไซม์ไซลาลเนสและเอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส

ชานอ้อย 10% w/v ในสารละลายโซเดียมซิเตรทไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ 50mM, pH 6.0

- เอนไซม์ไซลาลเนส 70 U/ml
- เอนไซม์เบต้าไซโลซิเดส 15 mU/ml
- นาน 24 ชั่วโมง
- อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

น้ำตาลไซโลส 12.96 กรัมต่อลิตร

สรุปกระบวนการผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสด้วย *Candida magnoliae* TISTR 5664
ในถังหมักขนาด 10 ลิตร

อาหารเหลว YNB + น้ำตาลไซโลส 100 กรัม/ลิตร, pH เริ่มต้น 5.0

Candida magnoliae
TISTR 5664 inoculum

- กวนด้วยความเร็วรอบ 300 rpm
- การให้อากาศ 1 VVM
- นาน 18 ชั่วโมง
- อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

น้ำหมักซึ่งมีน้ำตาลไซลิทอล 75 กรัม/ลิตร

ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออก

เซลล์ของ *C. magnoliae*
TISTR 5664

การทำให้ไซลิทอลบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์เรซินแลกเปลี่ยนประจุ

- Purolite PCR833 (Calcium form)
- อัตราส่วนปริมาตรเรซินต่อน้ำหมัก 120 : 30
- อัตราการไหลของน้ำชะล้าง 60 ml/h

สารละลายไซลิทอลบริสุทธิ์

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm ของไซโลสจากขานอ้อยไม่แช่น้ำที่ย่อยด้วยเอนไซม์ไซลานเนส

ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)
0	0.021	0.013	0.022	0.028	0.280
0.5	0.077	0.086	0.076	0.081	0.811
1	0.094	0.112	0.098	0.105	1.051
3	0.125	0.119	0.122	0.121	1.206
6	0.156	0.151	0.154	0.153	1.527
9	0.157	0.156	0.156	0.156	1.562
12	0.201	0.182	0.197	0.190	1.897
24	0.25	0.256	0.257	0.257	2.568
36	0.198	0.189	0.188	0.189	1.887
48	0.157	0.155	0.156	0.156	1.557

ตารางผนวกที่ 2 ค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm ของไซโลสจากขานอ้อยแช่น้ำที่ย่อยด้วยเอนไซม์ไซลานเนส

ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)
0	0.017	0.051	0.032	0.033	0.334
0.5	0.095	0.078	0.091	0.088	0.881
1	0.151	0.154	0.134	0.146	1.465
3	0.255	0.251	0.247	0.251	2.513
6	0.282	0.284	0.29	0.285	2.857
9	0.299	0.289	0.288	0.292	2.924
12	0.32	0.311	0.321	0.317	3.177
24	0.41	0.399	0.402	0.404	4.042
36	0.4	0.382	0.398	0.393	3.938
48	0.36	0.365	0.357	0.361	3.611

ตารางภาคผนวกที่ 3 ค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm ของไซโลสจากขานอ้อยที่ย่อยด้วยเอนไซม์ไซลานเนส โดยใช้ปริมาณขานอ้อยที่ต่างกันคือ 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร

ขานอ้อย (กรัม)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)
5	0.298	0.292	0.202	0.264	2.643
10	0.479	0.481	0.46	0.473	4.739
15	0.525	0.522	0.461	0.503	5.033

ตารางภาคผนวกที่ 4 ค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm ของไซโลสจากขานอ้อยที่ย่อยด้วยเอนไซม์ไซลานเนส โดยใช้โซเดียมซิเตรทไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ที่พีเอชต่างกันคือ 5.5, 6.0 และ 6.5

พีเอช	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)
5.5	0.450	0.427	0.446	0.441	4.415
6.0	0.503	0.479	0.511	0.498	4.983
6.5	0.449	0.439	0.451	0.446	4.469

ตารางภาคผนวกที่ 5 ค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm ของไซโลสจากขานอ้อยไม่แช่น้ำที่ย่อยด้วยเอนไซม์ไซโลซิ-เดส

ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)
0	0.012	0.012	0.012	0.012	0.120
0.5	0.008	0.024	0.007	0.013	0.130
1	0.027	0.022	0.011	0.02	0.200
3	0.022	0.033	0.029	0.028	0.280
6	0.057	0.045	0.057	0.053	0.531
9	0.055	0.051	0.055	0.0537	0.537
12	0.065	0.091	0.066	0.074	0.741
24	0.178	0.183	0.159	0.173	1.735
36	0.107	0.103	0.135	0.115	1.151
48	0.144	0.105	0.1	0.116	1.165

ตารางผนวกที่ 6 ค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm ของไซโลสจากขานอ้อยแช่น้ำที่ย่อยด้วยเอนไซม์ไซโลซิเดส

ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)
0	0.021	0.01	0.016	0.016	0.157
0.5	0.022	0.024	0.028	0.025	0.247
1	0.018	0.023	0.031	0.024	0.240
3	0.025	0.022	0.027	0.025	0.247
6	0.023	0.024	0.025	0.024	0.240
9	0.028	0.027	0.022	0.026	0.257
12	0.039	0.038	0.024	0.034	0.337
24	0.035	0.063	0.055	0.051	0.511
36	0.026	0.018	0.013	0.019	0.190
48	0.023	0.015	0.013	0.017	0.170

ตารางผนวกที่ 7 ค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm ของไซโลสจากขานอ้อยย่อยด้วยเอนไซม์ไซลานเนสและไซโลซิเดส ด้วยปริมาณขานอ้อยที่ 5 กรัมต่อลิตร

ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)
0	0.02	0.007	0.005	0.011	0.107
0.5	0.043	0.042	0.039	0.041	0.414
1	0.064	0.07	0.069	0.068	0.677
3	0.147	0.138	0.125	0.137	1.368
6	0.18	0.181	0.187	0.183	1.829
9	0.236	0.264	0.238	0.246	2.463
12	0.286	0.316	0.301	0.301	3.014
24	0.357	0.365	0.374	0.365	3.658
36	0.318	0.309	0.305	0.311	3.110
48	0.304	0.297	0.299	0.300	3.004

ตารางผนวกที่ 8 ค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm ของไซโลสจากขานอ้อยย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูลาเนสและไซโลซิเตส ด้วยปริมาณขานอ้อยที่ 10 กรัมต่อลิตร

ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)
0	0.03	0.024	0.035	0.030	0.314
0.5	0.059	0.075	0.052	0.062	0.655
1	0.116	0.106	0.109	0.110	1.166
3	0.24	0.252	0.259	0.250	2.645
6	0.375	0.392	0.403	0.390	4.121
9	0.657	0.667	0.661	0.662	6.992
12	0.839	0.805	0.788	0.811	8.567
24	1.262	1.215	1.201	1.226	12.956
36	1.21	1.216	1.239	1.222	12.910
48	1.099	0.996	1.155	1.083	11.448

ตารางผนวกที่ 9 ค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm ของไซโลสจากขานอ้อยย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูลาเนสและไซโลซิเตส ด้วยปริมาณขานอ้อยที่ 15 กรัมต่อลิตร

ชั่วโมง	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)
0	0.009	0.005	0.006	0.007	0.067
0.5	0.07	0.069	0.065	0.068	0.681
1	0.081	0.082	0.087	0.083	0.834
3	0.164	0.162	0.162	0.163	1.629
6	0.241	0.217	0.23	0.229	2.296
9	0.414	0.406	0.405	0.408	4.088
12	0.548	0.558	0.56	0.555	5.560
24	0.678	0.688	0.684	0.683	6.842
36	0.587	0.555	0.582	0.575	5.754
48	0.524	0.516	0.504	0.515	5.153

ตารางผนวกที่ 10 ค่าดูดกลืนแสงที่ 520 nm ของไซโลสจากขานอ้อยย่อยด้วยเอนไซม์ไลนาเนสและไซโลซิเดส ด้วยโซเดียมซิเตรทไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ในพีเอชที่แตกต่างกันคือพีเอช 5.5 และ 6.0

พีเอช	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	เฉลี่ย	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)
5.5	0.812	0.896	0.811	0.840	12.610
6	0.847	0.861	0.868	0.859	12.895

ตารางผนวกที่ 11 การผลิตไซลิทอลโดยเชื้อ *Candida magnoliae* TISTR 5664 ในอาหารเหลว YNB ที่มีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.0 บ่มบนเครื่องเขย่า 170 และ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณไซโลสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)		ปริมาณไซลิทอลที่เกิดขึ้น (กรัมต่อลิตร)	
	170	200	170	200
0	86.57	88.30	0.00	0.00
12	45.78	46.71	1.61	1.66
24	23.92	24.18	1.68	2.18
36	12.10	12.32	2.10	34.86
48	12.06	12.14	2.38	47.29
60	7.41	11.83	32.54	24.29
72	1.02	8.24	36.54	21.84

ตารางผนวกที่ 12 การผลิตไซลิทอลโดยเชื้อ *Candida magnoliae* TISTR 5664 ในอาหารเหลว YNB ที่มีน้ำตาลไซโลสเข้มข้น 100, 200 และ 300 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.0 บ่มบนเครื่องเขย่า 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

น้ำหนักเซลล์แห้ง

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		
	100	200	300
0	0.8	0.7	1.0
12	6.1	12.5	4.7
24	16.0	26.5	19.5
36	30.0	28.8	27.9
48	32.0	32.7	33.0
60	36.3	40.5	40.0
72	53.3	47.1	50.3

ปริมาณไซโลสที่เหลือ

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณไซโลสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)		
	100	200	300
0	97.13	197.05	285.94
12	60.19	184.16	256.98
24	35.21	169.15	224.16
36	0.00	129.82	194.26
48	0.00	98.06	156.52
60	0.00	7.71	127.70
72	0.00	0.00	94.47

ปริมาณไซลิทอลที่เกิดขึ้น

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณไซลิทอลที่เกิดขึ้น (กรัมต่อลิตร)		
	100	200	300
0	0.00	0.00	0.00
12	35.65	22.13	12.48
24	90.52	73.96	48.52
36	87.26	83.35	72.65
48	82.17	61.30	56.54
60	81.39	56.93	53.54
72	79.30	47.61	42.39

ตารางผนวกที่ 13 ผลการทดลองการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5664 จากการเพาะเลี้ยงในระดับถึงหมักในอาหาร YNB ที่มีน้ำตาลไซโลสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 ความเร็วรอบ 300 rpm ให้อากาศ 1 vvm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ไซโลสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอลที่เกิดขึ้น (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
0	94.30	0.00	13.0	7.32
3	87.43	4.62	15.2	6.79
6	69.67	6.31	12.2	4.30
9	59.84	9.01	28.3	3.31
12	39.29	27.01	35.8	3.35
15	17.89	53.75	55.3	3.56
18	11.07	70.25	42.2	3.49
21	5.36	66.42	48.7	3.35
24	3.76	64.49	68.1	3.70
27	0.00	60.46	57.4	3.78
30	0.00	57.94	50.5	3.73
33	0.00	57.59	54.6	3.71
36	0.00	56.36	63.4	3.70
39	0.00	52.42	61.5	3.68
42	0.00	51.42	61.2	3.67
45	0.00	51.16	77.6	3.65
48	0.00	50.19	63.2	3.64
51	0.00	48.96	83.1	3.62
54	0.00	48.33	56.6	3.60
57	0.00	47.65	82.8	3.59
60	0.00	44.99	71.3	3.57
63	0.00	43.93	83.7	3.55
66	0.00	41.43	83.4	3.54
69	0.00	40.19	85.5	3.53
72	0.00	37.38	86.4	3.52

ตารางผนวกที่ 14 ผลการทดลองการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5664 จากการเพาะเลี้ยงในระดับถังหมักในอาหาร YNB ที่มีน้ำตาลไซโลสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 ความเร็วรอบ 300 rpm ให้อากาศ 1 vvm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (กำหนดให้มีการเติมน้ำตาลไซโลสเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรเพิ่มหลังชั่วโมงที่ 18)

เวลา (ชั่วโมง)	ไซโลสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอลที่เกิดขึ้น (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
0	98.02	0.00	6.03	7.32
6	67.72	7.10	7.07	3.52
12	39.64	27.99	19.27	3.53
18	15.32	75.70	26.60	3.51
18	63.25	66.47	28.20	3.51
24	13.91	51.12	37.77	3.25
30	0.00	65.08	53.60	3.38
36	0.00	58.08	55.28	3.46
42	0.00	40.13	63.77	3.97
48	0.00	38.26	69.37	3.92
54	0.00	29.02	77.07	3.84
60	0.00	18.50	80.87	3.77
66	0.00	7.61	94.80	3.71
72	0.00	6.41	110.33	3.73

ตารางผนวกที่ 15 ผลการทดลองการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5664 จากการเพาะเลี้ยงในระดับถังหมักในอาหาร YNB ที่มีน้ำตาลไซโลสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 ความเร็วรอบ 300 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง (กำหนดให้อากาศ 1.2 VVM ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 24 และปรับการให้อากาศเป็น 1 VVM หลังชั่วโมงที่ 24 ถึง ชั่วโมงที่ 48)

เวลา (ชั่วโมง)	ไซโลสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอลที่เกิดขึ้น (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
0	98.41	0.00	22.40	7.48
3	93.90	3.25	26.83	6.75
6	91.46	4.84	31.73	4.43
9	78.08	11.67	36.23	3.28
12	55.28	22.81	37.80	3.67
15	43.85	32.08	56.93	3.72
18	32.47	45.63	51.57	3.60
21	18.87	55.67	63.87	3.51
24	15.01	61.88	64.70	3.70
27	10.85	66.25	57.63	3.72
30	3.32	67.44	61.47	3.69
33	0.00	70.42	64.60	3.68
36	0.00	60.76	66.33	3.67
39	0.00	57.97	80.73	3.65
42	0.00	53.93	85.30	3.64
45	0.00	47.72	87.37	3.59
48	0.00	43.24	92.73	3.58

ตารางผนวกที่ 16 ผลการทดลองการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5664 จากการเพาะเลี้ยงในระดับถังหมักในอาหาร YNB ที่มีน้ำตาลไซโลสเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 ความเร็วรอบ 300 rpm ให้อากาศ 0.8 vvm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ไซโลสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอลที่เกิดขึ้น (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
0	93.06	0.00	14.27	7.30
6	76.71	5.19	16.37	6.77
12	64.27	10.89	24.53	5.43
18	33.88	22.86	28.80	3.59
24	20.82	41.74	44.40	3.77
30	12.40	67.77	41.23	3.64
36	5.71	71.33	58.67	3.47
42	0.00	78.07	64.67	3.31
48	0.00	75.92	69.60	3.20
54	0.00	69.18	77.20	3.71
60	0.00	60.34	71.47	3.90
66	0.00	50.65	77.23	3.90
72	0.00	44.71	89.20	3.88