



วิทยานิพนธ์

การผลิตไซลิทอลโดยเซลล์ที่ห่อหุ้มด้วยลิควิดอิมัลชันเมมเบรน

**XYLITOL PRODUCTION BY LIQUID EMULSION
MEMBRANE-ENCAPSULATED CELLS**

นายฤทธิกร ชายน้อย

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2550



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ

เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การผลิตไซลิตอลโดยเซลล์ที่ห่อหุ้มด้วยลิควิดอิมัลชันเมมเบรน

Xylitol Production by Liquid Emulsion Membrane-Encapsulated Cells

นามผู้วิจัย นายฤทธิกร ชายน้อย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์สาโรจน์ ศิริสัมพันธ์กุล, Dr.rer.nat.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์ภกมณ จิตประเสริฐ, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ธงไชย ศรีนพคุณ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อากงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตไซลิทอลโดยเซลล์ที่ห่อหุ้มด้วยลิควิดอิมัลชันเมมเบรน

Xylitol Production by Liquid Emulsion Membrane-Encapsulated Cells

โดย

นายฤทธิกร ชายน้อย

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

พ.ศ. 2550

ฤทธิ์กร ชายน้อย 2550: การผลิตไซลิทอลโดยเซลล์ที่ห่อหุ้มด้วยลิวคิโนมัลชันเมมเบรน
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชา
เทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล, Dr.rer.nat.
129 หน้า

การพัฒนาระบบลิวคิโนมัลชันเมมเบรนห่อหุ้มเซลล์ *Candida mogii* ATCC 18364 เพื่อใช้ในกระบวนการหมักไซโลสเพื่อผลิตไซลิทอล โดยได้ศึกษาระบบลิวคิโนมัลชันเมมเบรนของพาราฟินเหลว และของน้ำมันถั่วเหลือง พบว่าสภาวะที่คงตัวที่สุดของลิวคิโนมัลชันเมมเบรนของพาราฟินเหลว ในเฟสเมมเบรนประกอบด้วย span 80 ความเข้มข้น 6.0 เปอร์เซ็นต์ และในเฟสนอกประกอบด้วยตัวทำอิมัลชันผสม tween 40 และ span 80 (HLB 11) ความเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนระบบลิวคิโนมัลชันเมมเบรนของน้ำมันถั่วเหลือง เฟสในประกอบด้วยลาโนลินความเข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ และเฟสเมมเบรนประกอบด้วยไมโครแวกซ์ความเข้มข้นมากกว่า 4.0 เปอร์เซ็นต์ ลิวคิโนมัลชันเมมเบรนของน้ำมันถั่วเหลืองนี้มีความคงตัวมากกว่า 7 วัน ที่มีอัตราส่วนของปริมาตรเฟสเมมเบรนต่อเฟสใน (V_o/V_w) ได้สูงเท่ากับ 1:2.5

สภาวะที่เหมาะสมของระบบลิวคิโนมัลชันเมมเบรนของน้ำมันถั่วเหลืองที่ใช้ห่อหุ้มเซลล์ยีสต์ในเฟสเมมเบรนประกอบด้วยไมโครแวกซ์ความเข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ และในเฟสในประกอบด้วยลาโนลินความเข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ ใช้หมักไซโลสเพื่อผลิตไซลิทอลแบบเบ็ดเสร็จหมุนเวียนน้ำหมัก โดยเคลือบลิวคิโนมัลชันที่ห่อหุ้มเซลล์บนผิวด้านในของท่อซีลิโคน ควบคุมสภาวะการหมักที่พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณออกซิเจนละลาย 30 เปอร์เซ็นต์ และมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่อัตราส่วนปริมาตรอิมัลชันต่อน้ำหมัก (V_E/V_M) 1:4 ภายใต้อากาศอย่างเพียงพอ ผลได้ไซลิทอล ($Y_{P/S}$) และอัตราการผลิตไซลิทอลเชิงปริมาณสูงสุด (dC_{xyt}/dt) เท่ากับ 0.49 กรัมต่อกรัม และ 0.022 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนการหมักภายใต้สภาวะที่จำกัดออกซิเจน ผลได้ไซลิทอลและอัตราการผลิตไซลิทอลเชิงปริมาณเท่ากับ 0.52 กรัมต่อกรัม และ 0.005 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณเซลล์ในลิวคิโนมัลชันเมมเบรน ($C_x = 15.31 \text{ g l}^{-1}$) ไม่สามารถเพิ่มอัตราการใช้ไซโลสและการผลิตไซลิทอลเชิงปริมาณได้ แสดงถึงภาวะจำกัดของการแพร่ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลว ทำให้จำกัดขั้นตอนการใช้ไซโลสและการผลิตไซลิทอล

Rittikorn Chainoy 2007: Xylitol Production by Liquid Emulsion Membrane-Encapsulated Cells. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Sarote Sirisansaneeyakul, Dr.rer.nat. 129 pages.

Two Liquid Emulsion Membrane (LEM) systems, i.e. liquid paraffin and soybean oil were developed for encapsulating *Candida mogii* ATCC 18364 cells, applying in xylitol fermentation process. A liquid paraffin LEM system was found to be optimal with using 6.0 % w/v span 80 emulsifier in the membrane phase and 0.4 % w/v tween 40 and span 80 (HLB 11) as a stabilizer in the outer phase. On the other hand, a soybean oil LEM system was optimized by using 5.0 % w/v lanolin emulsifier in the inner phase and more than 4.0 % w/v microwaxes as a stabilizer in the membrane phase. The ratio of the membrane to the inner phase (V_o/V_w) was attainable up to 1:2.5. This soybean oil LEM found to be stable longer than 7 days.

The soybean oil LEM, 5.0 % w/v each of lanolin and microwaxes was selected for encapsulating yeast cells. Due to the system stability, LEM with encapsulated cells were coated on the inner surface of silicone tube performing as a tubular loop reactor. The batch production of xylitol from D-xylose was conducted with broth recycle at controlled pH 6.0, 30 °C under aerobic (> 70 % DO) and oxygen limiting (30 % DO) conditions. With the phase ratio (V_E/V_M) of 1:4, xylitol productivity (dC_{xyt}/dt) and yield ($Y_{p/s}$) were 0.022 g l⁻¹ h⁻¹, 0.49 g g⁻¹ and 0.005 g l⁻¹ h⁻¹, 0.52 g g⁻¹, which obtained under aerobic and oxygen limited conditions, respectively. At high cell density LEM ($C_X = 15.31$ g l⁻¹), volumetric xylose consumption and xylitol production were not increased under oxygen limited condition. This suggested that xylose transport through liquid emulsion membrane was diffusion limited. Therefore, the consumption of xylose could not be enhanced to improve the xylitol production.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

____ / ____ / ____

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สาโรจน์ ศิริสันตนิยกุล ประธาน
กรรมการที่ปรึกษา ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัย และให้โอกาสในการเสนอความคิดใน
วิทยานิพนธ์ฉบับนี้อย่างเต็มที่ ตลอดจนการให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ
กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน และ ดร.ภคมน จิตประเสริฐ
กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก รองศาสตราจารย์ ดร.ธงไชย ศรีนพคุณ กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง และ
รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณวิบูลย์ กาญจนกฤษร ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ
และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ให้ทุนอุดหนุนวิจัย ภายใต้โครงการ
ทุนวิจัยมหบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ประจำปี 2548

ขอกราบขอบพระคุณ พ่อ แม่ และขอบคุณพี่สาว ที่เป็นกำลังใจที่ดี ดร.วรสิทธิ์ โทจำปา ที่
กรุณาถ่ายทอดความรู้ในการทำงานวิจัย ตลอดจนพี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ในห้องวิจัยทุกคน ที่ให้ความ
ช่วยเหลือกันในเรื่องต่าง ๆ เสมอมา

ฤทธิกร ชายน้อย

27 เมษายน 2550

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ	(9)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	16
อุปกรณ์	16
วิธีการ	18
ผลและวิจารณ์	32
สรุปและข้อเสนอแนะ	61
สรุป	61
ข้อเสนอแนะ	63
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	64
ภาคผนวก	69
ภาคผนวก ก ข้อมูลจากการทดลอง	70
ภาคผนวก ข วิเคราะห์	91
ภาคผนวก ค การคำนวณ	98
ภาคผนวก ง การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์	106
ภาคผนวก จ การประมาณค่าพารามิเตอร์ด้วยโปรแกรม MATLAB™	113
ภาคผนวก ฉ การใช้ไฮโดรเจลห่อหุ้มเซลล์ยีสต์เพื่อผลิตไซลิทอล	122
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	129

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติของโซลิตอล	6
2	ภาวะการผลิตโซลิตอลด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงลิวคิอิมัลชันเมมเบรน	27
3	การแพร่ของโซไลตผ่านลิวคิอิมัลชันเมมเบรนของพาราฟินเหลวที่อัตราส่วนปริมาตรน้ำมันต่อน้ำเท่ากับ 1:0.67 (เฟสเมมเบรนต่อเฟสใน)	38
4	สัมประสิทธิ์การแพร่ (P) ของโซไลตผ่านเยื่อเมมเบรนเหลวของลิวคิอิมัลชันเมมเบรนของน้ำมันถั่วเหลือง ที่อัตราส่วนปริมาตรน้ำมันต่อน้ำเท่ากับ 1:0.67 และ 1:2	48
5	พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการหมักโซลิตอลจากโซไลตแบบเบ็ดเสร็จหมุนเวียนน้ำหมักด้วยระบบเซลล์ยีสต์ตรึงลิวคิอิมัลชันเมมเบรน	54
6	พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการหมักโซลิตอลด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงลิวคิอิมัลชันเมมเบรน	59
ตารางผนวกที่		
ก1	การเปลี่ยนแปลงพีเอชตามเวลาและเปอร์เซ็นต์การรั่ว ในการทดสอบความคงตัวของอิมัลชัน ที่ความเข้มข้นของ span 80 ตั้งแต่ 2-8 เปอร์เซ็นต์	71
ก2	อัตราการรั่วเริ่มต้น ที่ความเข้มข้นของ span 80 ตั้งแต่ 2-8 เปอร์เซ็นต์	72
ก3	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชตามเวลาและเปอร์เซ็นต์การรั่ว ในการทดสอบความคงตัวของอิมัลชัน ที่ความเข้มข้นของ tween 40 ตั้งแต่ 0-0.375 เปอร์เซ็นต์	73
ก4	อัตราการรั่วเริ่มต้น ที่ความเข้มข้นของ tween 40 ตั้งแต่ 0-0.375 เปอร์เซ็นต์	74
ก5	การเปลี่ยนแปลงพีเอชตามเวลาและเปอร์เซ็นต์การรั่ว ในการทดสอบความคงตัวของอิมัลชัน ที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวผสม tween 40 และ span 80 ตั้งแต่ 0.1-0.6 เปอร์เซ็นต์	75
ก6	อัตราการรั่วเริ่มต้น ที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวผสม tween 40 และ span 80 ตั้งแต่ 0.1-0.6 เปอร์เซ็นต์	76

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ก7 การแพร่ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลวของระบบน้ำมันถั่วเหลืองและระบบของพาราฟินเหลว ที่อัตราส่วนปริมาตรน้ำมันและน้ำเท่ากับ 1:0.67 (เฟสเมมเบรนต่อเฟสใน)	80
ก8 การแพร่ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลวของระบบน้ำมันถั่วเหลือง ที่อัตราส่วนปริมาตรน้ำมันและน้ำเท่ากับ 1:2 (เฟสเมมเบรนต่อเฟสใน)	81
ก9 การคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (P)	84
ก10 การเจริญของยีสต์จากการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาस्कที่สภาวะ พีเอช 6 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที	85
ก11 การผลิตไซลิทอลจากไซโลสแบบเบ็ดเสร็จหมุนเวียนน้ำหมัก ในระบบถังหมักเซลล์ยีสต์ตรึงแบบลิกวิดอิมัลชันเมมเบรน ที่อัตราส่วนปริมาตรอิมัลชันต่อน้ำหมักเท่ากับ 1:10 และความเข้มข้นเซลล์ 4.2 กรัมต่อลิตร ภายใต้ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอ (DO > 70 %) (SLM-1)	87
ก12 การผลิตไซลิทอลจากไซโลสแบบเบ็ดเสร็จหมุนเวียนน้ำหมัก ในระบบถังหมักเซลล์ยีสต์ตรึงแบบลิกวิดอิมัลชันเมมเบรน ที่อัตราส่วนปริมาตรอิมัลชันต่อน้ำหมักเท่ากับ 1:4 และความเข้มข้นเซลล์ 3.89 กรัมต่อลิตร ภายใต้ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอ (DO > 70 %) (SLM-2)	88
ก13 การผลิตไซลิทอลจากไซโลสแบบเบ็ดเสร็จหมุนเวียนน้ำหมัก ในระบบถังหมักเซลล์ยีสต์ตรึงแบบลิกวิดอิมัลชันเมมเบรน ที่อัตราส่วนปริมาตรอิมัลชันต่อน้ำหมักเท่ากับ 1:4 และความเข้มข้นเซลล์ 6.2 กรัมต่อลิตร ภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน (DO 30 %) (SLM-3)	89

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ก14 การผลิตไซลิทอลจากไซโลสแบบเบ็ดเสร็จหมุนเวียนน้ำหมักในระบบถังหมัก เซลล์ยีสต์ตรึงแบบลิกวิดอิมัลชันเมมเบรน ที่อัตราส่วนปริมาตรอิมัลชันต่อน้ำ หมักเท่ากับ 1:4 และความเข้มข้นเซลล์ 15.31 กรัมต่อลิตร ภายใต้ภาวะจำกัด ออกซิเจน (30 % DO) (SLM-4)	90
ข1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไซโลสที่ความเข้มข้น 0-0.5 กรัมต่อลิตร	93
ข2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไซลิทอลที่ความเข้มข้น 0-50 มิลลิกรัมต่อ ลิตร	96
ฉ1 สภาวะการผลิตไซลิทอลด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงไฮโดรเจล	125
ฉ2 การผลิตไซลิทอลจากไซโลสแบบเบ็ดเสร็จหมุนเวียนน้ำหมักในระบบถังหมัก เซลล์ยีสต์ตรึงไฮโดรเจล	126
ฉ3 พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการหมักไซลิทอลจากไซโลสแบบ เบ็ดเสร็จหมุนเวียนน้ำหมักด้วยระบบเซลล์ยีสต์ตรึงไฮโดรเจล	127

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เมแทบอลิซึมของไซโลสในยีสต์	9
2	ขั้นตอนการเตรียมลิวิดอิมัลชันเมมเบรน (LEM)	12
3	โครงสร้างและองค์ประกอบของเม็ดลิวิดอิมัลชันเมมเบรน (LEM droplet)	12
4	แผนภูมิแสดงขั้นตอนการทดลอง ผลของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว span 80 ในเฟสเมมเบรนต่อความคงตัวของลิวิดอิมัลชันเมมเบรน	19
5	เครื่องมือและอุปกรณ์ศึกษาความคงตัวของลิวิดอิมัลชันเมมเบรนของพาราฟินเหลว	21
6	แผนภูมิแสดงขั้นตอนการทดลอง ผลของความเข้มข้นของลาโนลินในเฟสในต่อความคงตัวของลิวิดอิมัลชันเมมเบรน	22
7	เครื่องมือและอุปกรณ์ศึกษาการแพร่ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลว	24
8	ระบบถังหมักเซลล์ยีสต์ตรึงลิวิดอิมัลชันเมมเบรน ประกอบด้วย (a) Silicone tubular loop reactor (b) Stirred tank reactor (ถังพักน้ำหมัก) และ (c) อุปกรณ์ควบคุมระบบการหมักอัตโนมัติ (New Brunswick Scientific, Bioflo 110, ระบบควบคุมด้วยซอฟต์แวร์ Biocommand Plus)	28
9	ผลของความเข้มข้นของ span 80 ในเฟสเมมเบรน ต่ออัตราการรื้อเริ่มต้น	33
10	ผลของความเข้มข้นของ tween 40 ในเฟสนอกต่ออัตราการรื้อเริ่มต้น	34
11	ผลของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวผสม tween 40 และ span 80 ในเฟสนอกต่ออัตราการรื้อเริ่มต้น	36
12	การทำงานร่วมกันระหว่างสารลดแรงตึงผิว tween 40 และ span 80	37
13	ผลของความเข้มข้นของลาโนลินต่อความคงตัวของอิมัลชัน ที่อุณหภูมิห้อง ที่ (a) 0 ชั่วโมง และ (b) 24 ชั่วโมง	39
14	ผลของความเข้มข้นของไมโครเวกซ์ต่อความคงตัวของอิมัลชันเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเข้มข้นของลาโนลิน 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่เวลา (a) 0 (b) 24 (c) 48 (d) 72 (e) 96 ชั่วโมง และ (f) 7 วัน	41

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
15	ผลของความเข้มข้นของไมโครแวกซ์ต่อความคงตัวของอิมัลชัน เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเข้มข้นของลาโนลิน 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่เวลา (a) 0 (b) 24 (c) 48 (d) 72 (e) 96 ชั่วโมง และ (f) 7 วัน	42
16	ผลของอัตราส่วนปริมาตรระหว่างน้ำมันและน้ำต่อความคงตัวของอิมัลชัน ที่อุณหภูมิห้อง (ความเข้มข้นของลาโนลินและไมโครแวกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ (a) 0 (b) 24 (c) 48 ชั่วโมง และ (d) 7 วัน	45
17	การแพร่ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลวของระบบน้ำมันถั่วเหลืองและระบบของพาราฟินเหลว ที่อัตราส่วนปริมาตรน้ำมันและน้ำเท่ากับ 1:0.67 (เฟสเมมเบรนต่อเฟสใน)	46
18	การแพร่ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลวของระบบน้ำมันถั่วเหลือง ที่อัตราส่วนปริมาตรน้ำมันและน้ำเท่ากับ 1:2 (เฟสเมมเบรนต่อเฟสใน)	47
19	การผลิตไซลิทอลจากไซโลสแบบเบ็ดเสร็จหมุนเวียนน้ำหมักด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงลิวคิโดอิมัลชันเมมเบรน โดยใช้ปริมาตรอิมัลชันต่อน้ำหมักเท่ากับ 1:10 และความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 4.20 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6 และปริมาณออกซิเจนละลายมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์	50
20	การผลิตไซลิทอลจากไซโลสแบบเบ็ดเสร็จหมุนเวียนน้ำหมักด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงลิวคิโดอิมัลชันเมมเบรน โดยใช้ปริมาตรอิมัลชันต่อน้ำหมักเท่ากับ 1:4 และความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 3.89 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6 และปริมาณออกซิเจนละลายมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์	51
21	การผลิตไซลิทอลจากไซโลสแบบเบ็ดเสร็จหมุนเวียนน้ำหมักด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงลิวคิโดอิมัลชันเมมเบรน โดยใช้ปริมาตรอิมัลชันต่อน้ำหมักเท่ากับ 1:4 และความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 6.20 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6 และปริมาณออกซิเจนละลาย 30 เปอร์เซ็นต์	52

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	การผลิตไซลิทอลจากไซโลสแบบเบ็ดเสร็จหมุนเวียนน้ำหมักด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงลิกวิดิอิมัลชันเมมเบรน โดยใช้ปริมาตรอิมัลชันต่อน้ำหมักเท่ากับ 1:4 และความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 15.31 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6 และปริมาณออกซิเจนละลาย 30 เปอร์เซ็นต์	53
23	แบบจำลองของกระบวนการสร้างและสลายไซโลสเพื่อสังเคราะห์ไซลิทอลโดยยีสต์ <i>Candida mogii</i> ภายใต้ระบบการตรึงเซลล์ลิกวิดิอิมัลชันเมมเบรน	56
24	ระบบถังหมักเซลล์ยีสต์ตรึงลิกวิดิอิมัลชันเมมเบรน	58
25	เปรียบเทียบผลการทดลองแสดงความเข้มข้นของไซโลส (○) และไซลิทอล (□) (การทดลอง SLM-2) กับแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (เส้น)	60

ภาพผนวกที่

ก1	การประมาณอัตราการรั่วเริ่มต้นแปรผันตามความเข้มข้นของ span 80	77
ก2	การประมาณอัตราการรั่วเริ่มต้นแปรผันตามความเข้มข้นของ tween 40	78
ก3	การประมาณอัตราการรั่วเริ่มต้นแปรผันตามความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวผสม tween 40 และ span 80	79
ก4	การหาค่าความสามารถในการแพร่ของไซโลสในระบบน้ำมันถั่วเหลือง จากความชันของกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(C_{xyl})$ และ เวลา (นาที่) แปรผันความเข้มข้นไมโครแก๊ซ 5 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตราส่วนปริมาตรน้ำมันต่อน้ำเท่ากับ 1:0.67	82
ก5	การหาค่าความสามารถในการแพร่ของไซโลสในระบบน้ำมันถั่วเหลือง จากความชันของกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(C_{xyl})$ และ เวลา (นาที่) แปรผันความเข้มข้นไมโครแก๊ซ 5 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตราส่วนปริมาตรน้ำมันต่อน้ำเท่ากับ 1:2	83

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
ก6 กราฟการเจริญของยีสต์ <i>Candida mogii</i> จากการเพาะเลี้ยงในระดับพลาสติกที่ สภาวะ พีเอช 6 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที	86
ข1 กราฟมาตรฐานสารละลายไซโลส	94
ข2 กราฟมาตรฐานสารละลายไซลิทอล	97
ค1 ตัวอย่างการประมาณอัตราการรั่วเริ่มต้น (%L/min) จากความชันของกราฟระหว่าง เปอร์เซ็นต์การรั่ว (%L) และเวลา (นาท)	101
ค2 รัศมีภายในและภายนอกของลิควิดอิมัลชันที่เคลือบบนผิวภายในของท่อซิลิโคน	103
ง1 แบบจำลอง Silicone tube supported liquid membrane แสดงภาคตัดขวางที่มี ความยาว dZ และปริมาตร dV	108
จ1 ไฟล์ “BatchEstim.m”	118
จ2 ไฟล์ “ExpFitEval.m”	120
จ3 ไฟล์ “BatchFcn.m”	120
ฉ1 เปรียบเทียบระบบตรึงเซลล์ด้วยไฮโดรเจลและระบบลิควิดอิมัลชันเมมเบรน	122
ฉ2 ระบบถังหมักเซลล์ยีสต์ตรึงไฮโดรเจลแบบคอลัมน์	125
ฉ3 การผลิตไซลิทอลจากไซโลสแบบเบ็ดเสร็จหมุนเวียนน้ำหมักด้วยเซลล์ยีสต์ตรึง ไฮโดรเจล	127

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A	=	พื้นที่ผิวหน้าตัดของท่อซิลิโคน (ตารางเมตร)
A_C	=	พื้นที่ผิวสัมผัสของอิมัลชันที่เคลือบภายในท่อซิลิโคน (ตารางเมตร)
b	=	สารลดแรงตึงผิวชนิดบี
C_X	=	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)
C_X^0	=	ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
$\overline{C}_X$	=	ความเข้มข้นของเซลล์เฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)
C_{xyl}	=	ความเข้มข้นของไซโลส (กรัมต่อลิตร)
C_{xyt}	=	ความเข้มข้นของไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
C_{xyl}^E	=	ความเข้มข้นของไซโลสในอิมัลชัน (กรัมต่อลิตร)
C_{xyl}^{out}	=	ความเข้มข้นของไซโลสในเฟสนอก (กรัมต่อลิตร)
F	=	อัตราการไหล (มิลลิลิตรต่อชั่วโมง)
K_{xyl}	=	ค่าคงที่โมโนดสำหรับไซโลสในการเจริญของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)
J	=	ฟลักซ์ของไซโลส (กรัมต่อตารางเมตรต่อวินาที)
N_S	=	ฟลักซ์ของไซโลส (กรัมต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง)
$[NaOH]_{in}$	=	ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเฟสใน (นอร์มัล)
$[NaOH]_{out}$	=	ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเฟสนอก (นอร์มัล)
P	=	สัมประสิทธิ์การแพร่ (เมตรต่อวินาที)
q_P	=	อัตราจำเพาะการผลิตไซลิทอล (กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง)
q_S	=	อัตราจำเพาะการใช้ไซโลส (กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง)
r	=	รัศมีภายในท่อซิลิโคนที่เคลือบอิมัลชัน (เมตร)
R	=	รัศมีภายในท่อซิลิโคนที่ไม่เคลือบอิมัลชัน (เมตร)
r_X	=	อัตราการเจริญของเซลล์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
$(r_{xyl})^{diff}$	=	อัตราการใช้ไซโลสภายใต้ภาวะจำกัดของการแพร่ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
$(r_{xyt})^{diff}$	=	อัตราการผลิตไซลิทอลภายใต้ภาวะจำกัดของการแพร่ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
r_{xyl}^m	=	อัตราการใช้ไซโลสสูงสุด (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

t	= เวลา
V	= ปริมาตร (มิลลิลิตร)
V_E	= ปริมาตรของอีมีลชัน (มิลลิลิตร)
V_O	= ปริมาตรของน้ำมัน (มิลลิลิตร)
V_{out}	= ปริมาตรของเฟสนอก (มิลลิลิตร)
V_M	= ปริมาตรของน้ำหมัก (มิลลิลิตร)
V_W	= ปริมาตรของน้ำ (มิลลิลิตร)
X_a	= สัดส่วนของสารลดแรงตึงผิวเอ
$Y_{P/S}$	= ผลได้ไซลิทอลจากไซโลส (กรัมต่อกรัม)
$Y_{X/S}$	= ผลได้ของเซลล์จากไซโลส (กรัมต่อกรัม)
Z	= ความยาวของท่อซิลิโคน (เมตร)
μ_m	= อัตราจำเพาะการเจริญสูงสุด (ชั่วโมง ⁻¹)
η	= Effectiveness factor
HLB	= Hydrophile-Lipophile Balance
%L	= Percentage Leakage
LEM	= Liquid Emulsion Membrane
SLM	= Silicone tube supported Liquid Membranes
PEG	= Polyethylene glycol
HPS	= Hydroxypropyl starch

การผลิตไซลิทอลโดยเซลล์ที่ห่อหุ้มด้วยลิควิดอิมัลชันเมมเบรน

Xylitol Production by Liquid Emulsion Membrane-Encapsulated Cells

คำนำ

ไซลิทอลเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไซโลส ที่มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยาอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีคุณสมบัติเฉพาะตัวที่แตกต่างจากน้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดอื่น คือ มีความหวานใกล้เคียงกับซูโครส ให้ความรู้สึกเย็น และช่วยป้องกันฟันผุได้ (Peper and Olinger, 1988) ปัจจุบันมีการใช้น้ำตาลไซลิทอลเป็นสารให้ความหวานในผลิตภัณฑ์หลายชนิด อาทิ หมากฝรั่ง ช็อกโกแลต ทอฟฟี่ ลูกกวาด ไอศกรีม เครื่องดื่ม และผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรม เป็นต้น (Emodi, 1978) ยังมีการนำไซลิทอลมาใช้ในการแพทย์ สำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน และช่วยป้องกันการเกิดโรคกระดูกพรุน (Mattila *et al.*, 2002) และมีการนำไปใช้เป็นสารป้องกันภาวะหัวใจเสปรุนแรง (Uhari *et al.*, 2001) เป็นต้น

การศึกษาและวิจัยการผลิตไซลิทอลโดยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพ มักใช้ยีสต์สกุล *Candida* ด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบเบตช์เสร็จ (Batch culture) และการใช้เซลล์ยีสต์ตรึงบนสารพองของแข็ง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไซลิทอลให้สูงขึ้น (Dominguez, 1998) ทำให้ง่ายต่อการแยกผลิตภัณฑ์ และสามารถนำเซลล์ยีสต์ตรึงกลับมาใช้ใหม่ แต่การใช้เซลล์ตรึงที่ไม่มีการเจริญเติบโต เซลล์อาจสูญเสียกิจกรรมความสามารถในการหมัก จึงต้องให้สารอาหารกับเซลล์ตรึงในระบบการหมักเพื่อให้เซลล์มีชีวิตอยู่ได้ และยังคงมีประสิทธิภาพในการทำงาน อย่างไรก็ตาม การใช้เซลล์ตรึงยังคงมีปัญหาเกี่ยวกับการกระจายตัว การขนส่งสารอาหาร ออกาส และผลิตภัณฑ์ผ่านสารพองที่ใช้ตรึง นอกจากนี้สารพองของแข็งที่ใช้มักมีราคาแพงทำให้ต้นทุนในการผลิตสูง

ลิควิดอิมัลชันเมมเบรน (Liquid emulsion membrane, LEM) ใช้ในการแยกและการทำให้สารเข้มข้น เช่น การแยกโลหะโมลิบดีนัมจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม (Kulkarni and Mahajani, 2002) การสกัดยูรานิยมจาก gatta sulfate ในของเหลว (Sayed, 2003) นอกจากนั้น ยังมีการประยุกต์ใช้ลิควิดอิมัลชันเมมเบรนในการตรึงเอนไซม์ α -glucosidase และ glucose oxidase (Pal *et al.*, 2000; 2002) หรือใช้ตรึงเซลล์ *Micrococcus denitrificans* (Mohan and Li, 1975)

งานวิจัยนี้มุ่งสนใจศึกษาการตรึงเซลล์โดยใช้ระบบลิควิดอิมัลชันเมมเบรนซึ่งมีข้อดีหลายประการ ได้แก่ ทำให้เซลล์มีเสถียรภาพสูง และเซลล์อยู่ในสภาพแวดล้อมที่เป็นน้ำล้อมรอบด้วยชั้นไฮโดรคาร์บอน ลิควิดอิมัลชันเมมเบรนยังช่วยป้องกันเซลล์จากผลกระทบที่เกิดจากสภาวะของสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น พีเอชและตัวยับยั้ง นอกจากนี้การเตรียมลิควิดอิมัลชันเมมเบรนมีค่าใช้จ่ายต่ำ และเตรียมได้ง่ายไม่ยุ่งยาก ลักษณะที่เป็นเยื่อเมมเบรนเหลวอาจช่วยส่งเสริมการถ่ายโอนมวลสาร ฉะนั้นการประยุกต์ใช้ลิควิดอิมัลชันเมมเบรนในการตรึงเซลล์ยีสต์เพื่อใช้ในการผลิตไซลิทอลจากไซโลสคาดว่าจะเป็นการพัฒนากรรมวิธีการผลิตไซลิทอลวิธีใหม่ที่สามารถเพิ่มอัตราการผลิตได้

วัตถุประสงค์

1. พัฒนาการเตรียมเซลล์ด้วยลิควิดอิมัลชันเมมเบรน (Liquid emulsion membrane, LEM)
2. ศึกษาการใช้เซลล์ด้วยลิควิดอิมัลชันเมมเบรนในการหมักไซโตสเพื่อผลิตไซลิทอล

การตรวจเอกสาร

1. ไซลิตอล

ไซลิตอล (Xylitol) เป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่เป็นอนุพันธ์ของไซโลส มีรูปร่างผลึกแบบบรอมบิกและพบได้ตามธรรมชาติในผักผลไม้หลายชนิด มีคุณสมบัติแสดงสรุปดังตารางที่ 1 ส่วนการผลิตไซลิตอลเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมอาหารนั้นสามารถผลิตได้จากไซโลสโดยกระบวนการการเติมไฮโดรเจนหรือผลิตจากกระบวนการหมักจากวัสดุเหลือทิ้งที่มีไซโลสเป็นองค์ประกอบ (Parajo *et al.*, 1998 b)

คุณสมบัติพิเศษอื่นของไซลิตอล (สารโจน, 2547) มีดังต่อไปนี้

1. ไซลิตอลละลายน้ำได้ง่าย ได้สารละลายที่มีความคงตัวสูงแม้ว่าจะถูกความร้อนหรือเก็บไว้นาน ๆ ก็ไม่เกิดปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสีน้ำตาล (Maillard reaction) และการเกิดคาราเมล (Caramelization) เหมือนน้ำตาลฟรุกโทสหรือเดกซ์โทรส เมื่อใช้ความร้อนสูงกว่า 150 องศาเซลเซียส เนื่องจากไซลิตอลไม่มีหมู่อัลโดสหรือคีโตน

2. ไซลิตอลให้รสชาติที่ดี เย็นสดชื่น (cooling effect) คล้ายเมนทอล เนื่องจากการละลายของไซลิตอลต้องการความร้อน (endothermic dissolution) เพราะไซลิตอลมีค่าความร้อนจำเพาะ (heat of solution) ของการละลายเป็นลบ เท่ากับ -34.8 แคลอรีต่อกรัม เมื่อไซลิตอลอยู่ในสภาพผลึกเท่านั้น แต่ในรูปสารละลายหรือรูปอสัณฐาน (amorphous) จะไม่มีคุณสมบัติข้อดังกล่าว

3. ไซลิตอลมีความหวานเช่นเดียวกับน้ำตาลทั่วไป แต่มีความหวานมากกว่าน้ำตาลแมนนิทอลและซอร์บิทอล 2.5 และ 2 เท่า ตามลำดับ ความหวานเมื่อเทียบกับซูโครสจะมีตั้งแต่ 0.85-1.25 เท่า ขึ้นอยู่กับพีเอช ความเข้มข้นและอุณหภูมิ เป็นต้น เช่น ไซลิตอลที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ สารละลายไซลิตอลจะมีความหวานมากกว่า แต่ถ้าความเข้มข้นน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ สารละลายซูโครสจะมีความหวานมากกว่า หรือความหวานสัมพัทธ์ (relative sweetness) ของไซลิตอลเมื่อเทียบกับซูโครสจะลดลงจาก 103 เป็น 78 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิของสารละลายที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ จาก 5 เป็น 50 องศาเซลเซียส เป็นต้น

4. ไชลิทอลให้พลังงานเท่ากับคาร์โบไฮเดรตทั่วไป (4.06 กิโลแคลอรีต่อกรัม) แต่เมื่อใช้ ไชลิทอลร่วมกับสารให้ความหวานชนิดอื่น ความหวานและรสชาติยังคงเดิม เนื่องจากไชลิทอลมีความหวานมากกว่าซอร์บิทอลและแมนนิทอล จึงมีข้อดีที่ทำให้ใช้ปริมาณน้อยกว่าในระดับความหวานที่เท่ากัน ยังเป็นการลดพลังงานแคลอรีต่อหน่วยน้ำหนักได้อีกด้วย ซึ่งมีการใช้ในเครื่องดื่มหลายชนิด เหมาะกับผู้บริโภคที่ต้องการควบคุมน้ำหนัก

5. ไชลิทอลไม่ทำให้ฟันผุเนื่องจากจุลินทรีย์ในช่องปาก โดยเฉพาะ *Streptococcus mutans* ไม่สามารถใช้ไชลิทอลเป็นแหล่งอาหารได้ ทำให้สภาพฟันเขบนเคลือบฟันไม่ต่ำกว่า 5.7 จึงไม่ทำให้ฟันผุ

6. ไชลิทอลสามารถนำไปใช้ในผู้ป่วยโรคเบาหวานได้ เนื่องจากการเผาผลาญไชลิทอลไม่ขึ้นอยู่กับอินซูลิน ดังนั้นไม่ทำให้เกิดสภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (Hyperglycemia) และน้ำตาลในเลือดต่ำ (Hypoglycemia)

7. ไชลิทอลสามารถช่วยยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์ เนื่องจากมีจุลินทรีย์เพียงน้อยชนิดเท่านั้นที่สามารถใช้ไชลิทอลได้ ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่มีไชลิทอลเป็นองค์ประกอบจึงเกิดการหมักโดยจุลินทรีย์ได้ยาก ทำให้ผลิตภัณฑ์มีอายุการเก็บนานขึ้น

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของไซลิทอล

คุณสมบัติ		รายละเอียด
โครงสร้าง		$ \begin{array}{ccccccc} & & \text{H} & \text{OH} & \text{H} & & \\ & & & & & & \\ \text{HOCH}_2 & - & \text{C} & - & \text{C} & - & \text{C} & - & \text{CH}_2\text{OH} \\ & & & & & & \\ & & \text{OH} & \text{H} & \text{OH} & & \end{array} $
สูตรโมเลกุล	$\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_5$	
น้ำหนักโมเลกุล	152.1	
รูปร่าง	ผงผลึก	
สี	ขาว	
กลิ่น	ไม่มีกลิ่น	
รสชาติ	ความหวานใกล้เคียงซูโครส	
จุดเดือด	216 องศาเซลเซียส	
จุดหลอมเหลว	93.4-94.7 องศาเซลเซียส	
ค่าเบี่ยงเบนแสงจำเพาะ	ไม่มีคุณสมบัติในการเบี่ยงเบนแสง	
การดูดความชื้น	ในที่ที่มีความชื้นสูงดูดความชื้นได้มากกว่าซูโครสแต่น้อยกว่าซอร์บิทอล	
การละลายน้ำ	64.2 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร	
การละลายในเอทานอล	6.0 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร	
สารเจือปน	แมนนิทอล ซอร์บิทอล กาแลกทิทอล อะราบิทอล	

ที่มา : Emodi (1978)

อย่างไรก็ตามไซลิทอลยังมีข้อจำกัดในการใช้ดังนี้

1. การบริโภคไซลิทอลเป็นปริมาณมากในคราวเดียวจะทำให้ท้องเสียได้ (Gastrointestinal distress and osmotic diarrhea) เนื่องจากไซลิทอลมีคุณสมบัติเป็นยาระบาย เพราะไซลิทอลมีคุณสมบัติเหมือนคาร์โบไฮเดรตอื่น ๆ คือดูดซับน้ำไว้อย่างช้า ๆ ดังนั้นเมื่อบริโภคเป็นครั้งแรกควรบริโภคในปริมาณน้อยเสียก่อน (30 กรัมต่อวัน) และค่อย ๆ เพิ่มปริมาณมากขึ้น แต่จะบริโภคได้สูงสุดราว 200-300 กรัมต่อวัน

2. การใช้ไขมันในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อให้มีรสชาติเย็นสดชื่นนั้นจะต้องใช้ไขมันที่อยู่ในรูปผลึกเท่านั้น ซึ่งอาจทำให้เกิดลักษณะผิวสัมผัสเปลี่ยนแปลงไปจนไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคได้

3. ไขมันยังคงมีราคาแพงเมื่อเทียบกับสารให้ความหวานชนิดอื่น เนื่องจากต้นทุนที่ใช้ในการผลิตสูงจึงทำให้การใช้ไขมันไม่แพร่หลายเท่าที่ควร แม้ว่าจะสามารถใช้ไขมันในผู้ป่วยเบาหวานได้ แต่ในอาหารสำหรับผู้ป่วยเบาหวานก็ใช้ฟรุคโทสแทน เพราะฟรุคโทสมีราคาถูกกว่าและไม่เกิดผลข้างเคียงเหมือนไขมัน

การผลิตไขมัน

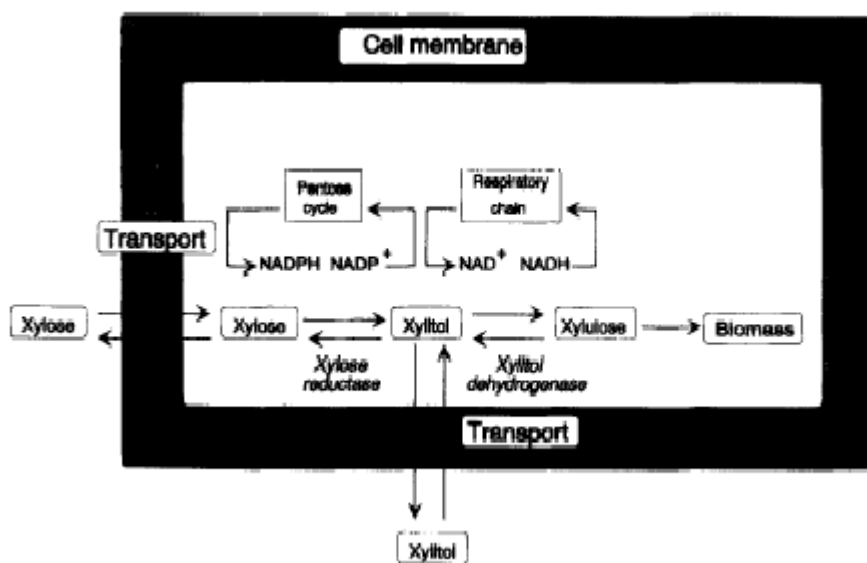
เนื่องจากสามารถประยุกต์ใช้ไขมันเป็นสารให้ความหวานแทนน้ำตาลในผลิตภัณฑ์อาหารได้อย่างกว้างขวาง ปัจจุบันจึงมีการใช้ไขมันในผลิตภัณฑ์อาหารมากขึ้น โดยเฉพาะหมากฝรั่งพบว่ามีส่วนผสมที่จะใช้ไขมันมาก รวมทั้งในอุตสาหกรรมประเภทขนมหวานและขนมขบเคี้ยว แต่การใช้ไขมันในผลิตภัณฑ์ดังกล่าวยังมีข้อจำกัดอยู่ที่การผลิตไขมันซึ่งมีต้นทุนสูงกว่ากระบวนการผลิตน้ำตาล เพราะการผลิตโดยสกัดจากผักและผลไม้จะให้ผลผลิตไม่คุ้มค่าเนื่องจากปริมาณไขมันในผักและผลไม้มีปริมาณน้อย ส่วนการผลิตด้วยวิธีทางเคมีด้วยปฏิกิริยาการเติมไฮโดรเจน (Hydrogenation) ต้องใช้ต้นทุนในการผลิตสูงโดยเฉพาะค่าใช้จ่ายในการทำปฏิกิริยา ทำให้ราคาของไขมันแพงกว่าน้ำตาลทั่วไป อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันมีการค้นคว้าวิจัยเพื่อลดต้นทุนการผลิตไขมันโดยใช้วิธีการหมักโดยนำเอาวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบมาใช้เป็นวัตถุดิบ ซึ่งจะช่วยให้ต้นทุนการผลิตต่ำกว่ากระบวนการผลิตทางเคมี เทคนิคการผลิตไขมันมีหลายวิธีและสามารถใช้วัตถุดิบได้หลายชนิด เช่น ฟางข้าว ชังข้าวโพด ชานอ้อย และเศษวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมปาล์มและกระชาย หรืออาจจะใช้น้ำตาลไซโลสเป็นวัตถุดิบได้โดยตรง ซึ่งการใช้วัสดุแต่ละชนิดในการผลิตไขมันก็จะมีกรรมวิธีแตกต่างกันออกไปบ้าง

การผลิตไขมันด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพเป็นที่สนใจเนื่องจากมีต้นทุนที่สามารถนำมาทดแทนการผลิตด้วยวิธีทางเคมีซึ่งมีต้นทุนการผลิตสูง โดยใช้เอนไซม์หรือจุลินทรีย์ในการผลิตได้ แต่กระบวนการที่ใช้เอนไซม์ค่อนข้างยุ่งยากและไม่เป็นที่นิยมเท่ากระบวนการผลิตโดยใช้จุลินทรีย์ มีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไขมันได้หลายชนิด แต่จุลินทรีย์ที่นิยมใช้มากที่สุดในการผลิตไขมัน คือ ยีสต์ โดยเฉพาะในสกุล *Candida* (Parajo *et al.*, 1998a)

การผลิตไซลิทอลโดยยีสต์

กระบวนการเมแทบอลิซึมของไซโลสโดยยีสต์ในการเปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลูลอสมิ 2 ขั้นตอน (Hahn-Hagerdal *et al.*, 1994) คือ ปฏิกิริยาออกซิโดรีดักชัน (Oxido-reduction) และ ฟอสฟอริเลชัน (Phosphorylation) เอนไซม์ชนิดแรกที่เกี่ยวข้องในปฏิกิริยา คือ NAD(P)H-dependent xylose reductase (XR) (aldose reductase EC 1.1.1.21 อยู่ในกลุ่ม aldo/keto reductase) ซึ่งจะเปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลิทอล ไซลิทอลนี้จะถูกขับออกจากเซลล์หรือถูกออกซิไดซ์ต่อโดย NAD-dependent xylitol dehydrogenase (XDH; EC 1.1.1.9) จากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการ ฟอสฟอริเลชันโดยเอนไซม์ไซลูลูโลสไคเนส (xylulose kinase; EC 2.7.1.17)

ความต้องการออกซิเจนในระหว่างกระบวนการหมักเพื่อผลิตไซลิทอลเกี่ยวข้องกับ ความไม่สมดุลของรีดอกซ์ (redox imbalance) ซึ่งเกิดขึ้นในสภาวะขาดแคลนออกซิเจน เนื่องจากความแตกต่างในความต้องการโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ปฏิกิริยาทั้งสอง มีการศึกษาสภาพไม่สมดุลของรีดอกซ์ในยีสต์ *Candida utilis* ซึ่งมีเอนไซม์ xylose reductase และ xylitol dehydrogenase ที่ต้องการโคแฟกเตอร์ NADPH และ NAD^+ ในปฏิกิริยาเอนไซม์ ตามลำดับ จากผลของปฏิกิริยาทั้งสองทำให้เกิดปริมาณโคแฟกเตอร์ NADP^+ และ NADH ขึ้นเป็นจำนวนมาก โดยที่โคแฟกเตอร์ NADP^+ ถูกรีดิวซ์โดยผ่านวิถีเพนโทส ขณะที่ในภาวะขาดแคลนออกซิเจนยีสต์ไม่สามารถออกซิไดซ์โคแฟกเตอร์ NADH ในกระบวนการลูกโซ่หายใจ นอกจากนี้ยีสต์ไม่มีเอนไซม์ transhydrogenase จึงไม่เกิดกระบวนการเปลี่ยนระหว่างโคแฟกเตอร์ NADH และ NADPH ($\text{NADH} + \text{NADP}^+ \longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{NADPH}$) ทำให้เกิดการสะสมไซลิทอลจากภาวะยับยั้งของปฏิกิริยาไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสและถูกขับออกนอกเซลล์ ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 เมแทบอลิซึมของไซโลสในยีสต์

ที่มา : Sirisansaneeyakul *et al.* (1995)

Horitsu *et al.* (1992) รายงานในการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ xylose reductase (XR) กับ xylitol dehydrogenase (XDH) จากยีสต์ *Candida tropicalis* IFO 0618 พบว่ายีสต์ชนิดนี้เปลี่ยนไซโลสไปเป็นไซลิตอลโดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสที่อาศัย NADPH เป็นโคแฟกเตอร์ที่สูง แต่มีกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำที่อาศัย NADH เป็นโคแฟกเตอร์ สารมัธยันตร์ไซลิตอลจะเปลี่ยนไปเป็นไซลูโลสโดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ไซลิตอลดีไฮโดรจีเนสสูงที่มี NAD เป็นโคแฟกเตอร์ แต่มีกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำที่อาศัย NADP เป็นโคแฟกเตอร์ ในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำยีสต์จะมีกิจกรรมของเอนไซม์รีดักเทสที่อาศัยโคเอนไซม์ NAD⁺ ต่ำ ดังนั้นการสร้างโคเอนไซม์ NAD จากปฏิกิริยาเอนไซม์รีดักเทสที่อาศัยโคแฟกเตอร์ NADH จึงไม่เกิดขึ้น ทำให้เกิดภาวะขาดแคลนโคแฟกเตอร์ NAD⁺ ในการออกซิไดซ์ไซลิตอลเป็นไซลูโลส จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการสะสมไซลิตอลในภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด

มีงานวิจัยที่พยายามพัฒนากระบวนการผลิตไซลิตอลด้วยวิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพโดยการใช้เซลล์ตรึงบนตัวตรึงที่เป็นของแข็ง ตัวอย่างการใช้เซลล์ตรึงบนตัวตรึงแอลจีเนตภายใต้ระบบการหมักแบบต่าง ๆ เช่น การศึกษาการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมแอลจีเนตในพลาสติกเยื่อ ถังกวน (stirred tank) และ ถังกวนที่มีตะกร้า (basket-stirred tank) (Cavalho *et al.*, 2003) การศึกษาระบบการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ฟลูอิดไคซ์เบดด้วยเซลล์ตรึงด้วย porous glass (Silva *et al.*, 2003) และการศึกษาการประยุกต์ใช้ non-woven fabric เป็นตัวตรึงเซลล์เพื่อผลิตไซลิตอล (Yahashi

et al., 1996) และการศึกษาการผลิตไซลิทอลเปรียบเทียบระหว่างระบบเซลล์อิสระและเซลล์ตรึง ซึ่งพบว่าการใช้เซลล์ตรึงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไซลิทอลได้สูงขึ้น (Dominguez, 1998)

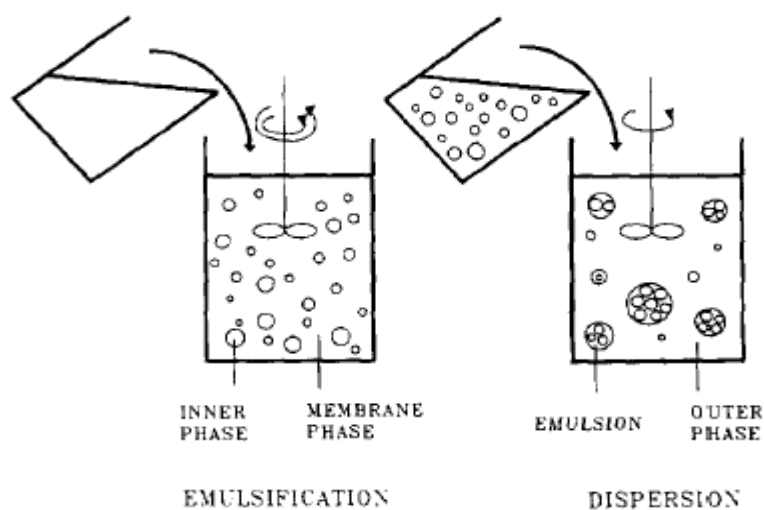
2. ระบบลิควิดอิมัลชันเมมเบรน

ลิควิดอิมัลชันเมมเบรน (Liquid Emulsion Membrane, LEM) เป็นอิมัลชันแบบ double emulsion ประกอบด้วยสารประกอบไฮโดรคาร์บอนซึ่งไม่ละลายน้ำทำหน้าที่เป็นเมมเบรน (membrane phase) เมื่อเติมสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ในชั้นไฮโดรคาร์บอนจะเกิดฟิล์มห่อหุ้มน้ำไว้ภายในที่เรียกว่า หยดของเหลว (droplet) ของเหลวที่อยู่ภายในหยดของเหลวเรียกว่า เฟสใน (inner phase) ส่วนของเหลวที่อยู่ภายนอกหยดของเหลวเรียกว่า เฟสนอก (outer phase) ดังภาพที่ 3

ลิควิดอิมัลชันเมมเบรนพัฒนาขึ้นในปี ค.ศ. 1968 โดย Norman Li โดยเฟสของน้ำถูกกวนผสมในสารละลายไฮโดรคาร์บอนที่มีสารลดแรงตึงผิวทำให้เกิดเป็นอิมัลชันน้ำในน้ำมัน (w/o emulsion) ส่วนที่เป็นเฟสเมมเบรนประกอบด้วยสารไฮโดรคาร์บอน (aliphatic solvent) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลและความหนืดปานกลาง สารลดแรงตึงผิวสำหรับอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ได้แก่ span 80 มีการใช้สารเพิ่มความแข็งแรงของเมมเบรน (membrane strengthening agent) ได้แก่ paranox 100 หรือ lubrizol #3702 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ มีส่วนหางที่เป็นไฮโดรคาร์บอนสายยาวที่ไม่ชอบน้ำ ส่วนหัวที่ชอบน้ำมีขนาดเล็กจึงช่วยทำให้อิมัลชันรักษาเสถียรภาพไว้ได้โดยเกิดเป็นฟิล์มรอบเฟสน้ำ ป้องกันการรวมตัวของเฟสน้ำเข้าด้วยกัน ส่วนของสารลดแรงตึงผิวจำเป็นสำหรับทำให้อิมัลชันคงตัวขึ้นอยู่กับค่าสมดุล HLB (Hydrophile-Lipophile Balance) ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำในโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว โดยกำหนดค่าสมดุล HLB ระหว่าง 3-6 สำหรับการเกิดอิมัลชันน้ำในน้ำมัน (w/o emulsion) ค่าสมดุล HLB ระหว่าง 8-18 สำหรับการเกิดอิมัลชันน้ำมันในน้ำ (o/w emulsion) (Davis, 1994)

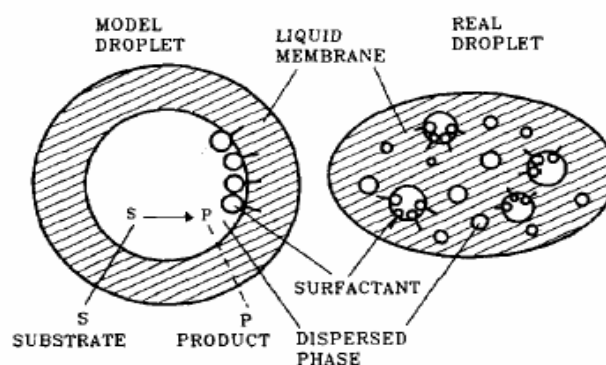
การเตรียมลิวิดอิมัลชันเมมเบรน

การเตรียมลิวิดอิมัลชันเมมเบรน (LEM) ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก (ภาพที่ 2) คือ ขั้นตอนแรกการสร้างอิมัลชัน (emulsification) โดยค่อย ๆ เติมเฟสในซึ่งเป็นเฟสของน้ำ (aqueous phase) ลงในเฟสเมมเบรนอย่างช้า ๆ ด้วยสัดส่วนปริมาตรที่เหมาะสมภายใต้การกวนด้วยความเร็วสูง เพื่อให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นค่อย ๆ เติมอิมัลชันที่ได้ลงในเฟสนอกเพื่อให้เกิดสภาพกระจายตัว (dispersion) ซึ่งเป็นสารละลายของน้ำภายใต้การกวนด้วยความเร็วต่ำ 300 ถึง 500 รอบต่อนาที เพื่อให้เกิดลักษณะเป็นเม็ดอิมัลชัน (LEM droplet) และหลีกเลี่ยงการแตกของลิวิดเมมเบรน ขนาดของเม็ดอิมัลชันขึ้นอยู่กับสมบัติของของเหลว ส่วนประกอบของเฟสเมมเบรน และความเร็วในการกวน โดยปกติเส้นผ่าศูนย์กลางของเฟสในซึ่งเป็นเฟสของน้ำมีขนาดประมาณ 20-40 ไมโครเมตร ส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดอิมัลชัน ประมาณ 200 ไมโครเมตร ถึง 2 มิลลิเมตร การเลือกขนาดของเม็ดอิมัลชันมีความสำคัญ ถ้ามีขนาดเล็ก เม็ดอิมัลชันที่มีสารละลายน้ำถูกกักอยู่ภายในจะทำให้ลิวิดเมมเบรนมีขนาดบางและแตกง่าย ในทางตรงกันข้ามถ้าเม็ดอิมัลชันมีขนาดใหญ่จะทำให้เม็ดอิมัลชันมีประสิทธิภาพในการทำงานต่ำ เนื่องจากอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรเฟสนอกมีค่าน้อย ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของลิวิดอิมัลชันเมมเบรน คือ ชนิดของเฟสในและเฟสเมมเบรน อัตราส่วนเฟสในต่อเฟสเมมเบรน ขนาดของเม็ดอิมัลชัน และความหนืด เป็นต้น ดังนั้นการพิจารณาเลือกองค์ประกอบของลิวิดอิมัลชันเมมเบรนและสถานะที่ใช้การเตรียมอิมัลชันที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการเตรียมลิควิดอิมัลชันเมมเบรน (LEM)

ที่มา: Patnaik (1995)



ภาพที่ 3 โครงสร้างและองค์ประกอบของเม็ดลิควิดอิมัลชันเมมเบรน (LEM droplet)

ที่มา: Patnaik (1995)

พื้นฐานของการสร้างลิควิดอิมัลชันเมมเบรน มาจากเทคโนโลยีการของแยกและการสกัด อาทิ การแยกโลหะ การแยกกรดหรือด่างอินทรีย์ การแยกสารทางเภสัชกรรม และใช้ในการบำบัดน้ำเสีย เป็นต้น ตัวอย่างงานวิจัยที่มีการนำระบบลิควิดอิมัลชันเมมเบรน (LEM) มาใช้ได้แก่ การแยกโลหะโมลิบดีนัมจากน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรม (Kulkarni and Mahajani, 2002) การสกัดยูรานิยมจาก gatta sulfate ในของเหลว (Sayed, 2003) เนื่องจากลิควิดอิมัลชันเมมเบรนมีอัตราส่วน

พื้นที่ผิวในการถ่ายโอนมวลและอัตราส่วนพื้นที่ผิวต่อปริมาตรเฟสนอกสูง ลิวคิวติไมล์ชั้นเมมเบรนจากการใช้เพื่อการแยกและทำเข้มข้นจึงนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการหมักโดยใช้ตรึงเซลล์ไว้ในลิวคิวติเมมเบรน สับสเตรตและผลิตภัณฑ์เคลื่อนที่เข้าออกผ่านลิวคิวติเมมเบรนโดยการแพร่ (passive transport) หรือการขนส่งที่มีตัวพา (carrier-facilitated transport) ลิวคิวติเมมเบรนช่วยป้องกันเซลล์ที่ถูกกักอยู่ในจากผลของพีเอช สับสเตรต และสารยับยั้งที่ไม่เหมาะสม และยังสามารถนำเซลล์ที่ถูกตรึงกลับมาใช้ใหม่ได้ ระบบเซลล์ยีสต์ตรึงลิวคิวติไมล์ชั้นเมมเบรนยังมีศักยภาพที่จะสามารถใช้ได้ในการหมักแบบต่อเนื่อง เพื่อให้ผลผลิตของผลิตภัณฑ์ต่อเวลาสูงขึ้นได้

การนำลิวคิวติไมล์ชั้นเมมเบรนมาใช้ในการห่อหุ้มเซลล์จุลินทรีย์เริ่มต้นเมื่อปี ค.ศ. 1975 Mohan และ Norman ทดลองตรึงเซลล์ *Micrococcus denitrificans* ATTC 21909 ด้วยลิวคิวติไมล์ชั้นเมมเบรนโดยใช้เฟสเมมเบรน คือ isoparaffin ที่มี span 80 เป็นสารลดแรงตึงผิว และใช้ amberlite LA-2 เป็นสารตัวพา พบว่าระบบนี้สามารถกำจัดไนเตรตและไนไตรต์ในน้ำเสียได้จากการทดลองในระดับถังกวน โดยยังสามารถรักษากิจกรรมของเซลล์ และยังสามารถปกป้องเซลล์จากสารยับยั้ง mercuric chloride ที่ความเข้มข้น 10^{-4} โมลลาร์ ซึ่งอยู่ในเฟสนอกที่มีความเป็นพิษสูงต่อเซลล์ได้ถึง 5.5 วัน แต่ไม่มีรายงานถึงประสิทธิภาพในการห่อหุ้มเซลล์

Prichanont *et al.* (2000) ได้ศึกษาการตรึงเซลล์ *Mycobacterium* M156 ด้วยไมโครอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน สำหรับปฏิกิริยา epoxidation เพื่อเปลี่ยน Allylphenyl ether (APE) เป็น S-Phenylglycidyl ether (PGE) เนื่องจากการผลิตสารดังกล่าวด้วยวิธีทางชีวภาพทั่วไปประสบปัญหาเกี่ยวกับการละลายของสับสเตรต การเกิดภาวะยับยั้งของผลิตภัณฑ์ และการเกิดผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้อื่นที่ไม่ต้องการ จึงได้ศึกษาแนวทางการห่อหุ้มเซลล์ด้วยไมโครอิมัลชันเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว โดยพบว่าระบบลิวคิวติไมล์ชั้นเมมเบรนที่เหมาะสมที่สุดคือการเลือกใช้สารไฮโดรคาร์บอน n-Hexadecane และใช้สารลดแรงตึงผิวผสมระหว่าง tween 85 และ span 80 ที่มีค่าสมดุล HLB เท่ากับ 10 ที่บรรจุเซลล์ความเข้มข้น 0.36 กรัมต่อลิตร ไมโครอิมัลชันที่เตรียมขึ้นมีความคงตัวอยู่ได้เพียง 2 ชั่วโมง และถ้าความเข้มข้นเซลล์ลดลงเหลือ 0.22 กรัมต่อลิตร ไมโครอิมัลชันดังกล่าวสามารถคงตัวอยู่ได้ 9 ชั่วโมง

นอกจากนี้ Pal *et al.* (2002) ได้ศึกษาทดลองสร้างระบบลิควิดคริสตัลเมมเบรนเพื่อใช้ในการห่อหุ้มเอนไซม์ 2 ชนิด ในกระบวนการสลายมอลโทสเป็นกลูโคส ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ α -glucosidase และ glucose oxidase บรรจุไว้ในระบบลิควิดคริสตัลเมมเบรนที่ใช้ xylene เป็นเฟสเมมเบรน โดยมี span 80 เป็นสารลดแรงตึงผิว และมี tri-octyl amine เป็นสารตัวพา จากผลการทดลองพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวจนถึงจุดหนึ่งสามารถเพิ่มความคงตัวของลิควิดคริสตัลเมมเบรนได้ แต่ความคงตัวของเมมเบรนที่สูงมากเกินไปกลับมีผลต่อการแพร่ของสารลดลงและเกิดการบวมน้ำเพิ่มขึ้น ดังนั้นแทนที่การพยายามทำให้เมมเบรนคงตัวมากที่สุดโดยการเพิ่มสารลดแรงตึงผิว แต่เพิ่มความคงตัวของเมมเบรนโดยการเติมสารพอลิเมอร์ในปริมาณที่เหมาะสมซึ่งไม่มีผลต่อการแพร่ของสาร ดังนั้นการใช้ความเข้มข้นของ span 80 3.5 เปอร์เซ็นต์ ผสมรวมกับ polystyrene 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าให้ความคงตัวของเมมเบรนที่ดีและไม่มีผลต่อการแพร่ โดยที่ xylene มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเพียง 17-19 เปอร์เซ็นต์

จากงานวิจัยที่กล่าวถึงข้างต้นมักใช้สารไฮโดรคาร์บอนที่เป็นตัวทำละลาย ซึ่งมีคุณสมบัติติดไฟได้ มีไอระเหย และมีความเป็นพิษซึ่งไม่ปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงพิจารณาเลือกใช้สารสารไฮโดรคาร์บอนและสารเคมีที่มีความปลอดภัย ราคาถูก ได้แก่ พาราฟินเหลว และน้ำมันพืช เป็นต้น ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างมากในกระบวนการชีวภาพและการผลิตในระดับขยายการผลิต

อย่างไรก็ตาม ลิควิดคริสตัลเมมเบรนยังมีปัญหาจากการแตกหรือรั่ว ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากการมีพันธะที่อ่อนกว่าพันธะของตัวจริงที่เป็นของแข็ง การนำลิควิดคริสตัลเมมเบรนมาใช้ขึ้นอยู่กับคุณสมบัติ 2 ประการหลัก คือ ความคงตัว และการแพร่ของสารผ่านเมมเบรน ความคงตัวต่ำหมายถึง การที่เมมเบรนเกิดการแตกหรือรั่ว เป็นผลทำให้เฟสในหลอดออกสู่เฟสนอก ความคงตัวของเมมเบรนเป็นเวลานานจึงมีความจำเป็นในการรักษากิจกรรมของเซลล์ภายในอิมัลชัน ส่วนการแพร่สูงหมายถึงการถ่ายโอนมวลสูงและการแยกสารเกิดขึ้นได้รวดเร็ว เพราะฉะนั้นคุณสมบัติของความคงตัวและการแพร่ของสารจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญของการประยุกต์ใช้ลิควิดคริสตัลเมมเบรน

3. แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิตไซลิทอลด้วยลิกวิดอิมัลชันเมมเบรน

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ใช้อธิบายการหมักไซโลสเพื่อผลิตไซลิทอล สร้างขึ้นโดยอาศัยสมการที่เกี่ยวข้องกับภาวะจำกัดการแพร่ของเซลล์ครึ่ง (Shuler and Kargi, 2002) และสร้างสมการดุลของสับสเตรตและผลิตภัณฑ์ในระบบการหมักแบบ Plug Flow Reactor (PFR) (Richardson, 1994) รายละเอียดของการพัฒนาสมการอนุพันธ์ดังกล่าวแสดงดังภาคผนวก ง สรุปสมการของแบบจำลองอธิบายการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไซโลส (C_{xyl}) และไซลิทอล (C_{xyl}) ดังสมการ (1) และ (2) ตามลำดับ

$$\frac{dC_{xyl}}{dt} = -\eta \left(\frac{r_{xyl}^m C_{xyl}}{K_{xyl} + C_{xyl}} \right) \frac{V_E}{V_{out}} \quad (1)$$

$$\frac{dC_{xyl}}{dt} = \eta \left(\frac{r_{xyl}^m C_{xyl}}{K_{xyl} + C_{xyl}} \right) \frac{V_E}{V_{out}} Y_{P/S} \quad (2)$$

เมื่อ η คือ Effectiveness factor

r_{xyl}^m คือ อัตราการใช้ไซโลสสูงสุด (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

K_{xyl} คือ ค่าคงที่โมนอดสำหรับไซโลสในการเจริญของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)

V_E คือ ปริมาตรของอิมัลชัน (มิลลิลิตร)

V_{out} คือ ปริมาตรของเฟสออก (มิลลิลิตร)

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่สร้างขึ้นสามารถอธิบายปัจจัยทางด้านการแพร่ที่มีผลกระทบต่อการบวนการหมักไซลิทอลจากไซโลสด้วยเซลล์ยีสต์ครึ่งลิกวิดอิมัลชันเมมเบรน เพราะฉะนั้นการประมาณค่าพารามิเตอร์ (η) ในสมการจึงใช้บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของการหมักที่มีผลจากขั้นตอนจำกัดของการแพร่ได้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องมือ

1.1 ถังหมัก (New Brunswick Scientific, Bioflo 110, Germany) ขนาด 2 ลิตร พร้อมระบบควบคุมการกวน การให้อากาศ พีเอช อุณหภูมิ และโปรแกรมควบคุมการทำงาน Biocommand Plus Bioprocessing Software

1.2 เครื่องสูบลม (Roller pump); (EYELA, RP-1000, Japan)

1.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge); (Labnet, Spectrafuge 16 M, USA และ Braun Biotech International, Sigma 203, Germany)

1.4 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer); (Shimadzu Corporation, UV 1210, Japan)

1.5 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter); (HORIBA, M-11)

1.6 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator); (Mettler, Germany)

1.7 เครื่องชั่งแบบละเอียด (Balance); (S&D Company limited, FR-200)

1.8 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave); (Sanyo, Labo Autoclave)

1.9 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker); (New Brunswick Scientific, G25, Germany)

1.10 เครื่องกวนแบบแม่เหล็ก (Magnetic Stirrer); (Sctott , CAT-M6, Germany)

1.11 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath); (Precision Scientific, 280, USA)

1.12 สายยางซิลิโคน (Silicone tube); (Dura EZ-TG105 ขนาด 5x9 มิลลิเมตร)

1.13 เครื่องกวนแบบใบกวน (Stirrer); (Heidolph, RZR1, Cannada)

1.14 เครื่องไมโครคอมพิวเตอร์

1.15 กระดาษกรอง (Membrane filter); (Satorious ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน)

2. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ คือ *Candida mogii* ATCC 18364 ซึ่งเป็นยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้สูงสุด (Sirisansaneeyakul *et al.*, 1995)

3. สารเคมี

3.1 อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

อาหารที่ใช้เพาะเชื้อยีสต์ในปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย KH_2PO_4 18.75 กรัม และ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 6.0 กรัม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.13 กรัม CaCl_2 0.10 กรัม FeCl_3 9.10 มิลลิกรัม $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 6.40 มิลลิกรัม $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.46 มิลลิกรัม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.46 มิลลิกรัม Myo-Inositol 36.50 มิลลิกรัม Ca-Pantothenate 18.20 มิลลิกรัม Thiamine-HCl 3.66 มิลลิกรัม Pyridoxal-HCl 0.90 มิลลิกรัม Biotin 0.018 มิลลิกรัม ไชโลสและกลูโคส 5 และ 10 กรัม ตามลำดับ

3.2 สารเตรียมลิวคิวคิมัลชันนมเบรน

3.2.1 พาราฟินเหลว (liquid paraffin); (ASP Ajax Finechem, Australia)

3.2.2 น้ำมันถั่วเหลือง (soybean oil); (ก๊วก ประเทศไทย)

3.2.3 span 80; (Fluka Chemika, Switzerland)

3.2.4 tween 40; (Fluka Chemika, Switzerland)

3.2.5 ลาโนลิน (lanolin); (ศึกษาภัณฑ์พาณิชย์ ประเทศไทย)

3.2.6 ไมโครแวกซ์ (microwaxes); (Symbol Service ประเทศไทย)

วิธีการ

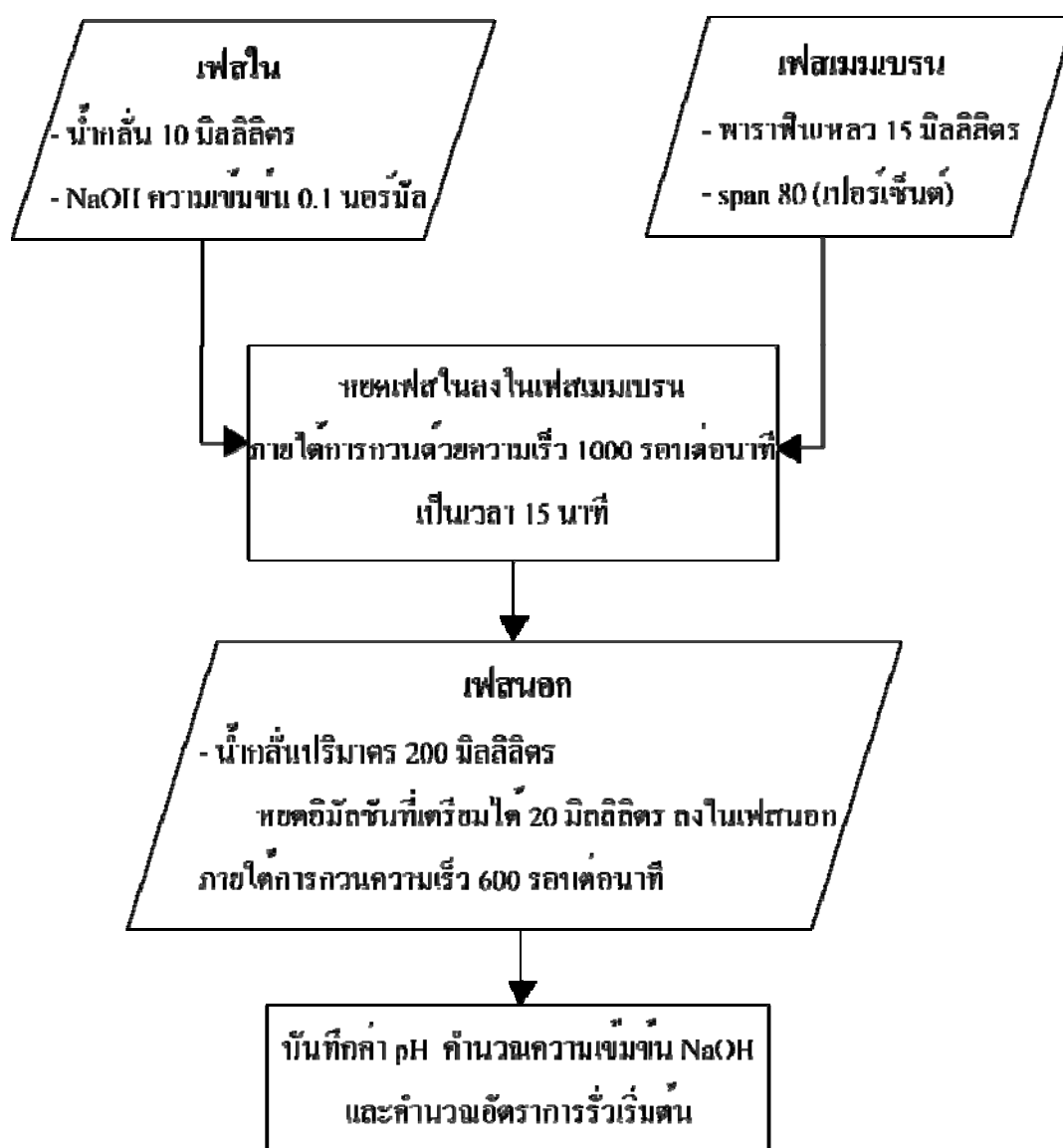
1. ศึกษาการเตรียมลิกวิดอิมัลชันเมมเบรน

1.1 การเตรียมลิกวิดอิมัลชันเมมเบรนของพาราฟินเหลว

1.1.1 ผลของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว span 80 ในเฟสเมมเบรนต่อความคงตัวของลิกวิดอิมัลชันเมมเบรน

เตรียมเฟสเมมเบรนซึ่งประกอบด้วย span 80 ความเข้มข้น 1-8 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในพาราฟินเหลว (กรัม span 80 ต่อ 100 มิลลิลิตร เฟสเมมเบรน) เตรียมเฟสในด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ค่อย ๆ หยดเฟสในปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในเฟสเมมเบรน ปริมาตร 15 มิลลิลิตร (อัตราส่วนปริมาตรของน้ำมันต่อน้ำ เท่ากับ 1:0.67) ภายใต้การกวนด้วยเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ที่อัตราเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จะเกิดลักษณะเป็นอิมัลชันสีขาวขุ่น ค่อย ๆ หยดอิมัลชันที่ได้ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่นซึ่งเป็นเฟสนอก ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ภายใต้การกวนด้วยอัตราเร็ว 600 รอบต่อนาที (ภาพที่ 4)

บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของพีเอชในเฟสนอกอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่องวัดพีเอช คำนวณความเข้มข้นของ NaOH ในเฟสนอก และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรั่วเริ่มต้น (initial percentage leakage) ของ NaOH จากเฟสในตามเวลาที่ผ่านไป (ภาคผนวก ค) จากนั้นประมาณค่าอัตราการรั่วเริ่มต้น เพื่อใช้เปรียบเทียบผลของสารลดแรงตึงผิว span 80 ในเฟสเมมเบรนต่อความคงตัวของอิมัลชันของพาราฟินเหลว



ภาพที่ 4 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการทดลอง ผลของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว span 80 ในเฟสเมมเบรนต่อความคงตัวของลิวอดิมัลชันเมมเบรน

1.1.2 ผลของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว tween 40 ในเฟสนอกต่อความคงตัวของลิวคิวลิตีอิมัลชันเมมเบรน

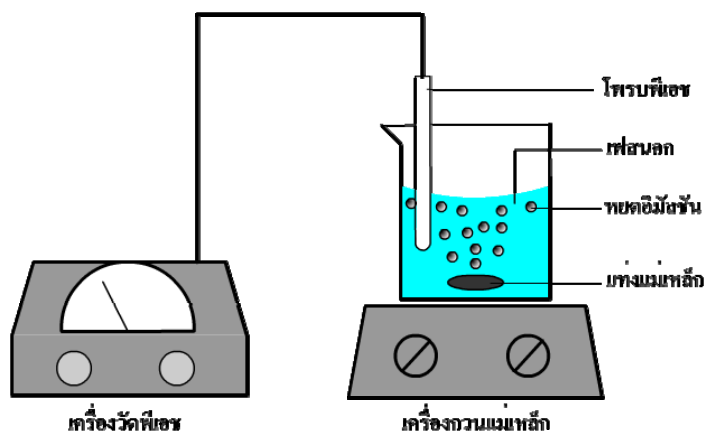
ทำการทดลองด้วยวิธีการเดียวกันกับวิธีการทดลองข้อ 1.1.1 ด้วยความเข้มข้นของ span 80 ในเฟสเมมเบรนที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 1.1.1 (ความเข้มข้นของ span 80 เท่ากับ 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) แต่เปลี่ยนเฟสนอกจากน้ำกลั่นเป็นสารละลายของ tween 40 ที่มีความเข้มข้น 0-0.375 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของพีเอชในเฟสนอก คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรั่วของ NaOH จากเฟสใน และประมาณค่าอัตราการรั่วเริ่มต้น เพื่อใช้เปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว tween 40 ในเฟสนอก ต่อความคงตัวของอิมัลชันของพาราฟินเหลว

1.1.3 ผลของสารลดแรงตึงผิวผสม tween 40 และ span 80 ในเฟสนอกต่อความคงตัวของลิวคิวลิตีอิมัลชันเมมเบรน

ทำการทดลองด้วยวิธีการเดียวกันกับวิธีการทดลองข้อ 1.1.1 โดยใช้ความเข้มข้นของ span 80 ในเฟสเมมเบรนที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 1.1.1 (ความเข้มข้นของ span 80 เท่ากับ 6 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และเปลี่ยนเฟสนอกจากน้ำกลั่นเป็นสารละลายผสมของ tween 40 และ span 80 ที่อัตราส่วน 3:2 ซึ่งสารลดแรงตึงผิวผสมจะมีค่า HLB เท่ากับ 11 (ภาคผนวก ก) เป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการเกิดอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำของพาราฟินเหลว (Fox, 1974) เตรียมสารลดแรงตึงผิวผสมด้วยความเข้มข้น 0.1-0.6 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (กรัม สารลดแรงตึงผิวผสม ต่อ 100 มิลลิลิตร ของเฟสนอก) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นเฟสนอกในการศึกษาความคงตัวของลิวคิวลิตีอิมัลชันเมมเบรน

บันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของพีเอชในเฟสนอก คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรั่วของ NaOH จากเฟสใน และประมาณค่าอัตราการรั่วเริ่มต้น เพื่อใช้เปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวผสมในเฟสนอก ต่อความคงตัวของอิมัลชันของพาราฟินเหลว



ภาพที่ 5 เครื่องมือและอุปกรณ์ศึกษาความคงตัวของลิกวิดอิมัลชันเมมเบรนของพาราฟินเหลว

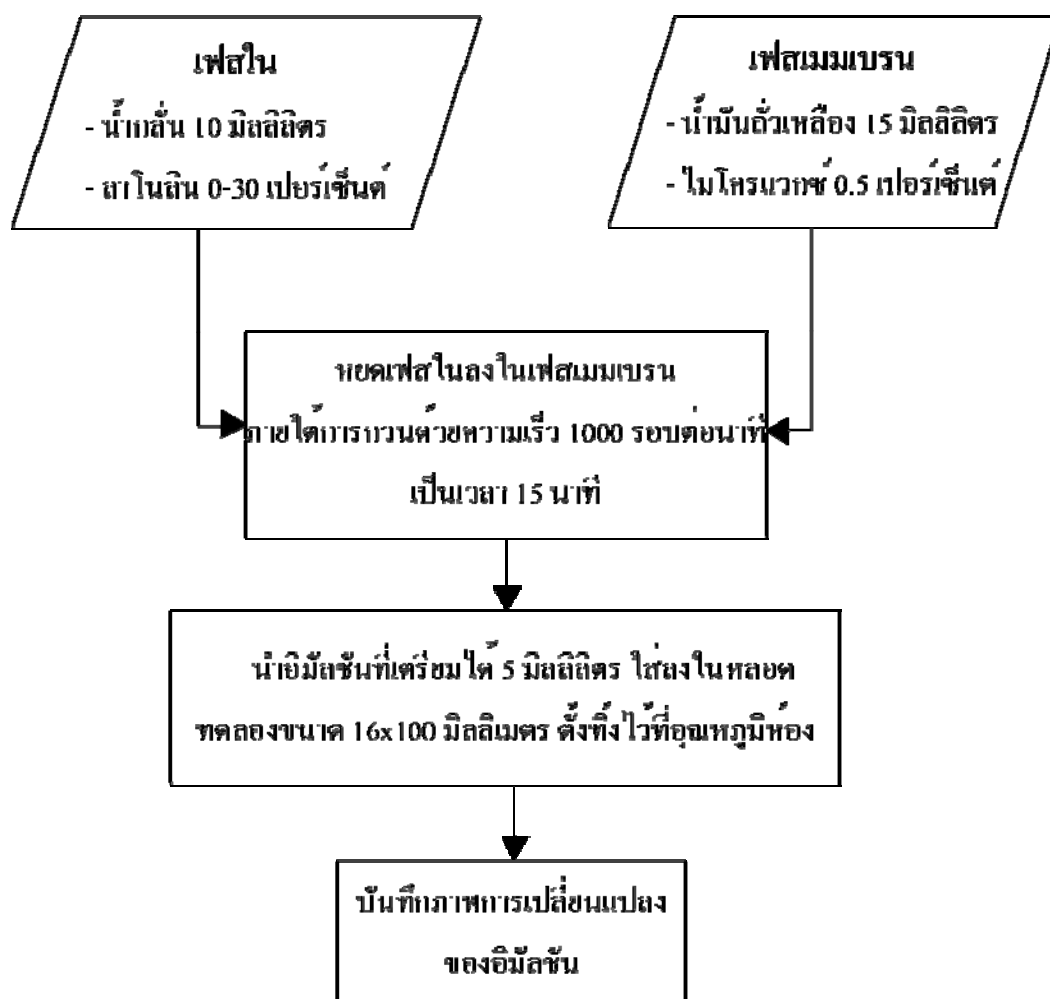
1.2 การเตรียมลิกวิดอิมัลชันเมมเบรนของน้ำมันถั่วเหลือง

1.2.1 ผลของความเข้มข้นของลาโนลินในเฟสในต่อความคงตัวของลิกวิดอิมัลชันเมมเบรน

เตรียมเฟสเมมเบรน 15 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยไมโครเวกซ์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อทำหน้าที่เป็นสารเพิ่มความหนืดในเฟสเมมเบรน โดยใช้ไมโครเวกซ์ 0.075 กรัม ในน้ำมันถั่วเหลือง 15 มิลลิลิตร (0.5 กรัม ไมโครเวกซ์ ต่อ 100 มิลลิลิตร เฟสเมมเบรน) เตรียมเฟสในปริมาตร 10 มิลลิลิตร ประกอบด้วยลาโนลิน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0 5 10 15 20 25 และ 30 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เตรียมโดยละลายลาโนลิน 0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 กรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร (กรัม ลาโนลิน ต่อ 100 มิลลิลิตร เฟสใน)

ทำการเตรียมอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน โดยค่อย ๆ หยดเฟสในปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในเฟสเมมเบรนปริมาตร 15 มิลลิลิตร ซึ่งเท่ากับอัตราส่วนปริมาตรของน้ำมันต่อน้ำ เท่ากับ 1:0.67 กวนสารผสมด้วยเครื่องกวนแม่เหล็กที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จะเกิดอิมัลชันสีขาวขุ่น จากนั้นนำอิมัลชันที่ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด

16x100 มิลลิเมตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกผลการทดลองโดยการถ่ายภาพการเปลี่ยนแปลงของอิมัลชันที่เตรียมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 6 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการทดลอง ผลของความเข้มข้นของลาโนลินในเฟสในต่อความคงตัวของลิวิดอิมัลชันแมมเบรอน

1.2.2 ผลของความเข้มข้นของไมโครเวกซ์ในเฟสเมมเบรนต่อความคงตัวของลิวิดอิมัลชันเมมเบรน

ทดลองด้วยวิธีการเดียวกันกับวิธีการทดลองข้อ 1.2.1 โดยใช้ความเข้มข้นของลาโนลินที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 1.2.1 (ความเข้มข้นลาโนลิน 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) แต่แปรผันความเข้มข้นของไมโครเวกซ์ 0-7 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (กรัม ไมโครเวกซ์ ต่อ 100 มิลลิลิตร เฟสเมมเบรน) เตรียมโดยละลายไมโครเวกซ์ 0 0.15 0.30 0.45 0.60 0.75 0.90 และ 1.05 กรัม ในน้ำมันถั่วเหลือง 15 มิลลิลิตร บันทึกผลการทดลองสังเกตการแยกชั้นน้ำและน้ำมันโดยการถ่ายภาพการเปลี่ยนแปลงของอิมัลชันที่เตรียมทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน

1.2.3 ผลของอัตราส่วนปริมาตรน้ำมันต่อน้ำต่อความคงตัวของลิวิดอิมัลชันเมมเบรน

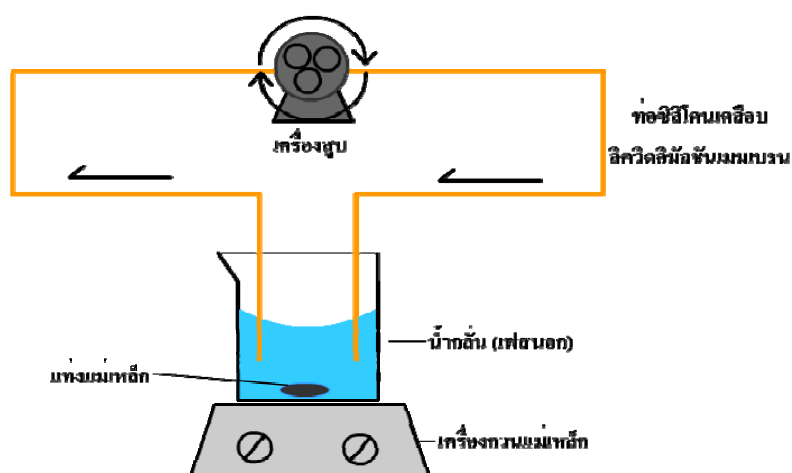
ทำการทดลองด้วยวิธีการเดียวกันกับวิธีการทดลองข้อ 1.2.1 โดยใช้ความเข้มข้นของลาโนลินและไมโครเวกซ์ที่เหมาะสมที่ได้ (5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) แปรผันอัตราส่วนปริมาตรน้ำมันต่อน้ำ (เฟสเมมเบรนต่อเฟสใน) 1:1 1:1.5 1:2 1:2.5 และ 1:3 เตรียมโดยคงที่เฟสเมมเบรน 10 มิลลิลิตร แปรผันปริมาตรเฟสใน 10 15 20 25 และ 30 มิลลิลิตร บันทึกผลการทดลองสังเกตการแยกชั้นน้ำและน้ำมันโดยการถ่ายภาพการเปลี่ยนแปลงของอิมัลชันที่เตรียมทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 7 วัน

1.3 การแพร่ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลว

เลือกลิวิดอิมัลชันเมมเบรนของน้ำมันถั่วเหลืองที่อัตราส่วนปริมาตรของน้ำมันต่อน้ำเท่ากับ 1:0.67 โดยเตรียมเฟสเมมเบรน 15 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยไมโครเวกซ์ความเข้มข้นเท่ากับ 5 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (0.75 1.05 และ 1.50 กรัม ตามลำดับ) ในน้ำมันถั่วเหลืองปริมาตร 15 มิลลิลิตร (กรัม ไมโครเวกซ์ ต่อ 100 มิลลิลิตร เฟสเมมเบรน) และเตรียมเฟสใน 10 มิลลิลิตร ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (0.1 กรัม) และความเข้มข้นลาโนลิน 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (0.5 กรัม) ในน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร (5 กรัม ลาโนลิน ต่อ 100 มิลลิลิตร เฟสใน)

ทำการเตรียมอิมัลชันน้ำในน้ำมัน โดยค่อย ๆ หยดเฟสในปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในเฟสเมมเบรนปริมาตร 15 มิลลิลิตร กวนด้วยแท่งแม่เหล็กที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จะเกิดอิมัลชันสีขาวขุ่น นำอิมัลชันที่ได้ผ่านเข้าไปในท่อซิลิโคนขนาด 5x9 มิลลิเมตร ความยาว 1.5 เมตร ด้วยเครื่องสูบ (EYELA, RP-1000) ผิวภายในของท่อซิลิโคนจะถูกเคลือบด้วยอิมัลชัน ส่วนอิมัลชันที่ไม่เคลือบภายในท่อจะเคลื่อนตัวออกมาออกมา วัดปริมาตรอิมัลชันที่เหลือออกมาด้วยกระบอกตวง เพื่อใช้คำนวณหาพื้นที่ผิวภายในของลิกวิดอิมัลชันเมมเบรนที่เคลือบบนผิวภายในของท่อซิลิโคน จากนั้นผ่านน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร หมุนเวียนภายในท่อซิลิโคนด้วยอัตราการไหล 300 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง (ภาพที่ 7) เก็บตัวอย่างน้ำ (เฟสนอก) ทุก 15 นาที วิเคราะห์ปริมาณไซโลสที่แพร่ออกมาจากเฟสใน (ภาคผนวก ก) หาความสามารถในการแพร่และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (P) (ภาคผนวก ค)

สำหรับกรณีการศึกษาการแพร่ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลวของอิมัลชันของน้ำมันตัวเหลืองที่อัตราส่วนปริมาตรน้ำมันต่อน้ำเท่ากับ 1:2 ทำการทดลองด้วยวิธีการเดียวกัน แต่เปลี่ยนปริมาตรในการเตรียมอิมัลชัน โดยปริมาตรเฟสเมมเบรนเท่ากับ 10 มิลลิลิตร และปริมาตรของเฟสในเท่ากับ 20 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างน้ำ (เฟสนอก) ทุก 5 นาที วิเคราะห์ปริมาณไซโลสที่แพร่ออกมาจากเฟสใน หาความสามารถในการแพร่และคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การแพร่เช่นเดียวกัน



ภาพที่ 7 เครื่องมือและอุปกรณ์ศึกษาการแพร่ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลว

2. ศึกษาการผลิตไซลิทอลโดยเซลล์ยีสต์ที่ห่อหุ้มด้วยลิกวิดอิมัลชันเมมเบรน

2.1 การเตรียมเซลล์ยีสต์

เตรียมกล้าเชื้อในหลอดทดลอง โดยเชื้อยีสต์ *Candida mogii* ATCC 18364 ลงในอาหารเพาะเชื้อปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร และไซโลส 5 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 (วรสิทธิ์, 2541) ทำการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ โดยบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายกล้าเชื้อลงในอาหารเพาะเชื้อใหม่ปริมาตร 22.5 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดียวกัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายกล้าเชื่อดังกล่าวลงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเพาะเชื้อใหม่ปริมาตร 225 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดียวกัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื่อดังกล่าวลงในอาหารเพาะเชื้อใหม่ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จำนวน 8 พลาสติก พลาสติกละ 25 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดียวกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำหมักมาทำการเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ 4000 รอบต่อนาที (1753xg) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บตะกอนเซลล์ที่ได้เพื่อใช้เตรียมเซลล์ตรงต่อไป ซึ่งจะได้ปริมาณเซลล์คิดเป็นน้ำหนักแห้งประมาณ 4-12 กรัม จากปริมาตรน้ำหมัก 2000 มิลลิลิตร (จำนวน 8 พลาสติก)

หมายเหตุ การกำหนดปริมาตรอาหารเพาะเชื้อที่ใช้เพื่อผลิตปริมาณเซลล์ยีสต์ที่ต้องการ จะคำนวณจากความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 4 กรัมต่อลิตร (น้ำหนักแห้ง) ที่เวลา 24 ชั่วโมงได้จากกราฟการเจริญของยีสต์จากการเพาะเลี้ยงในระดับพลาสติกภายใต้สภาวะเดียวกัน (ภาพผนวกที่ ก6)

2.2 การตรึงเซลล์ยีสต์ด้วยลิกวิดอิมัลชันเมมเบรน

เตรียมลิกวิดอิมัลชันเมมเบรนของน้ำมันถั่วเหลือง โดยเตรียมเฟสเมมเบรนประกอบด้วย ไมโครแวกซ์ 5 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในน้ำมันถั่วเหลือง (5 กรัม ไมโครแวกซ์ ต่อ น้ำมันถั่วเหลือง 100 มิลลิลิตร) เตรียมเฟสในที่ประกอบด้วยลาโนลิน 5 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในน้ำกลั่น (5 กรัม ลาโนลินต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) ปริมาตรในการเตรียมเฟสเมมเบรนและเฟสในของแต่ละการทดลองดูได้จากตารางที่ 2

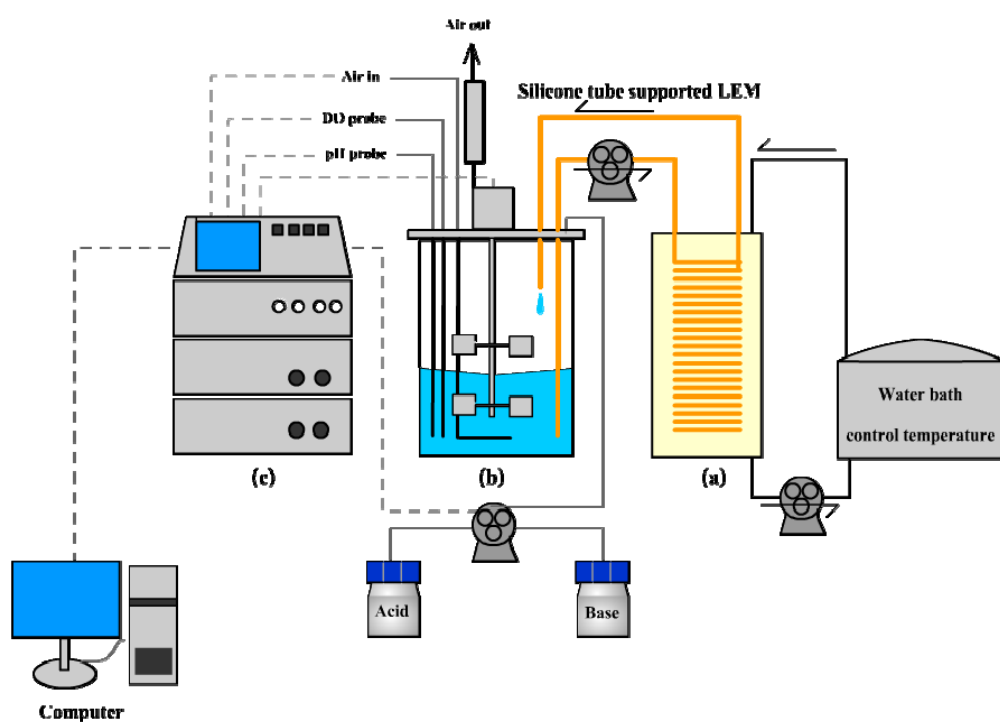
เซลล์ยีสต์ที่เตรียมไว้จากข้อ 2.1 ทำให้แขวนลอยในเฟสใน จากนั้นค่อย ๆ หยดเฟสในลงในเฟสเมมเบรนที่บรรจุในปิเกตอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร ภายใต้การกวนด้วยเครื่องกวนแบบใบ

กวนอัตราเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จะเกิดอิมัลชันสีขาวขุ่น นํ้าอิมัลชันที่ได้ ผ่านเข้าไปในท่อซีลีโคนขนาด 5x9 มิลลิเมตร ยาว 15 เมตร ด้วยเครื่องสูบ ผิวภายในของท่อซีลีโคนจะถูกเคลือบด้วยอิมัลชัน วัสดุอิมัลชันที่เหลืออกมาจากท่อซีลีโคน ผ่านน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เพื่อล้างเซลล์ยีสต์ที่ไม่ถูกตรึงออก ทุกขั้นตอนดำเนินการแบบปลอดเชื้อในตู้เขี่ยเชื้อ จากนั้นจึงนำท่อซีลีโคนบรรจุเซลล์ยีสต์ตรึงลิวิดอิมัลชันเมมเบรน ชีดด้วยแกนทรงกระบอกติดตั้งในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และต่อถึงปฏิกรณ์เซลล์ยีสต์ตรึงลิวิดอิมัลชันเมมเบรนเข้ากับถังพักแบบกวนที่ใช้เป็นที่พักนํ้าหมักหมุนเวียนเพื่อควบคุมสภาพพีเอชและอุณหภูมิคงที่ ซึ่งแสดงดังภาพที่ 8 หมักไซโลส โดยการผ่านนํ้าหมักหมุนเวียนผ่านถึงปฏิกรณ์เซลล์ยีสต์ตรึงด้วยเครื่องสูบควบคุมอัตราการไหล 300 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง และควบคุมการทำงานของถังพักแบบกวนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6 อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 vvm เก็บตัวอย่างนํ้าหมักจากถังพักทุก 6 ชั่วโมง ตลอดระยะเวลาของการหมัก เป็นเวลา 3-5 วัน เพื่อวิเคราะห์ปริมาณไซโลส ไซลิทอล และปริมาณเซลล์อิสระที่หลุดออกจากถังปฏิกรณ์เซลล์ยีสต์ตรึงลิวิดอิมัลชันเมมเบรน

ตารางที่ 2 ภาวะการผลิตไฮโดรอลด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงลิวอดิมัลชันเมมเบรน

สภาวะการหมัก	การหมักแบบเปิดเสร็จหมุนเวียนน้ำหมัก			
	SLM-1	SLM-2	SLM-3	SLM-4
1. อัตราส่วนปริมาตรอิมัลชันต่อน้ำหมัก	1:10	1:4	1:4	1:4
2. อัตราส่วนปริมาตรเฟสเมมเบรนต่อเฟสใน	1:2	1:2	1:2	1:2
3. ปริมาตรน้ำหมักในถังพัก (มิลลิลิตร)	1000	600	600	600
4. ความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)*	10	10	10	10
5. อิมัลชัน (มิลลิลิตร)	100	150	150	150
เฟสใน (มิลลิลิตร)	66.67	100	100	100
ความเข้มข้นลาโนลิน				
(เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)	5	5	5	5
ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)*	4.2	3.89	6.2	15.31
เฟสเมมเบรน (มิลลิลิตร)	33.33	50	50	50
ความเข้มข้นไมโครเวกซ์				
(เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)	5	5	5	5
6. ปริมาณออกซิเจนละลาย (เปอร์เซ็นต์)	>70	>70	30	30

หมายเหตุ * คัดต่อปริมาตรน้ำหมัก (เฟสนอก)



ภาพที่ 8 ระบบถังหมักเซลล์ยีสต์ตรึงลิควิดอิมัลชันเมมเบรน ประกอบด้วย (a) Silicone tubular loop reactor (b) Stirred tank reactor (ถังพักน้ำหมัก) และ (c) อุปกรณ์ควบคุมระบบการหมักอัตโนมัติ (New Brunswick Scientific, Bioflo 110 ระบบควบคุมด้วยซอฟต์แวร์ Biocommand Plus)

3. การวิเคราะห์

3.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง จากตัวอย่างที่เก็บแยกเซลล์ออกโดยการเหวี่ยง เก็บส่วนใสไว้วิเคราะห์ไซโลสและไซลิตอล ส่วนตะกอนเซลล์ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นจึงกรองด้วยกระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน แล้วอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข)

3.2 การวิเคราะห์ไซโลส ส่วนใสที่ได้จากการเหวี่ยงเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม วิเคราะห์หาปริมาณไซโลสตามวิธีของ Deschatelets และ Yu (1986) โดยใช้ไซโลสเป็นสารมาตรฐาน (ภาคผนวก ข)

3.3 การวิเคราะห์ไซลิตอล ส่วนใสที่ได้จากการเหวี่ยงเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม วิเคราะห์หาปริมาณไซลิตอลตามวิธีของ Adler และ Gustafsson (1980) โดยใช้ไซลิตอลเป็นสารมาตรฐาน (ภาคผนวก ข)

4. การคำนวณพารามิเตอร์

4.1 อัตราการใช้ไซโลส ($\frac{dC_{xyl}}{dt}$; กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) จากความชันของกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของไซโลส (C_{xyl} ; กรัมต่อลิตร) และเวลา (t ; ชั่วโมง)

4.2 อัตราการผลิตไซลิตอล ($\frac{dC_{xyt}}{dt}$; กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) จากความชันของกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของไซลิตอล (C_{xyt} ; กรัมต่อลิตร) และเวลา (t ; ชั่วโมง)

4.3 ผลได้ไซลิตอลจากไซโลส ($Y_{P/S}$; กรัมต่อกรัม) จากความชันของกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ความเข้มข้นของไซโลส (C_{xyl} ; กรัมต่อลิตร) และความเข้มข้นของไซลิตอล (C_{xyt} ; กรัมต่อลิตร) ดังสมการ (3)

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta C_{xyt}}{\Delta C_{xyl}} \quad (3)$$

4.4 อัตราจำเพาะของการใช้ไซโลส (q_s ; กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง) คำนวณจากอัตราการใช้ไซโลส ($\frac{dC_{xyl}}{dt}$; กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)หารด้วยความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น (C_X^0 ; กรัมต่อลิตร) ดังสมการ (4)

$$q_s = \frac{1}{C_X^0} \frac{dC_{xyl}}{dt} \quad (4)$$

4.5 อัตราจำเพาะของการผลิตไซลิทอล (q_p ; กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง) คำนวณจากอัตราการผลิตไซลิทอล ($\frac{dC_{xyl}}{dt}$; กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)หารด้วยความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น (C_X^0 ; กรัมต่อลิตร) ดังสมการ (5)

$$q_p = \frac{1}{C_X^0} \frac{dC_{xyl}}{dt} \quad (5)$$

หมายเหตุ เนื่องจากเป็นระบบการผลิตไซลิทอลด้วยเซลล์ตรึง จึงคำนวณอัตราจำเพาะของการใช้ไซโลสและการผลิตไซลิทอลโดยหารด้วยความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นแทนความเข้มข้นเฉลี่ยของเซลล์ ($\bar{C}_X$)

5. การประมาณค่าพารามิเตอร์และการเลียนแบบกระบวนการหมัก

การประมาณค่าพารามิเตอร์และการเลียนแบบกระบวนการหมักของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิตไซลิทอลจากไซโลสด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงลิกวิดิมัลชันเมมเบรน โดยวิธี Nonlinear least square curve fit (Ordinary differential equation) อาศัยกล่องเครื่องมือที่เรียกว่า Optimization Toolbox[®] ในโปรแกรม MATLAB[™] (ภาคผนวก จ) เปรียบเทียบผลที่ได้จากการทดลองกับผลที่ได้จากการเลียนแบบกระบวนการหมัก เพื่อประมาณค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่สร้างขึ้นมา

6. สถานที่และระยะเวลาการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย ห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

ระยะเวลาในการวิจัย เริ่มตั้งแต่ มิถุนายน 2546 ถึง เมษายน 2550

ผลและวิจารณ์

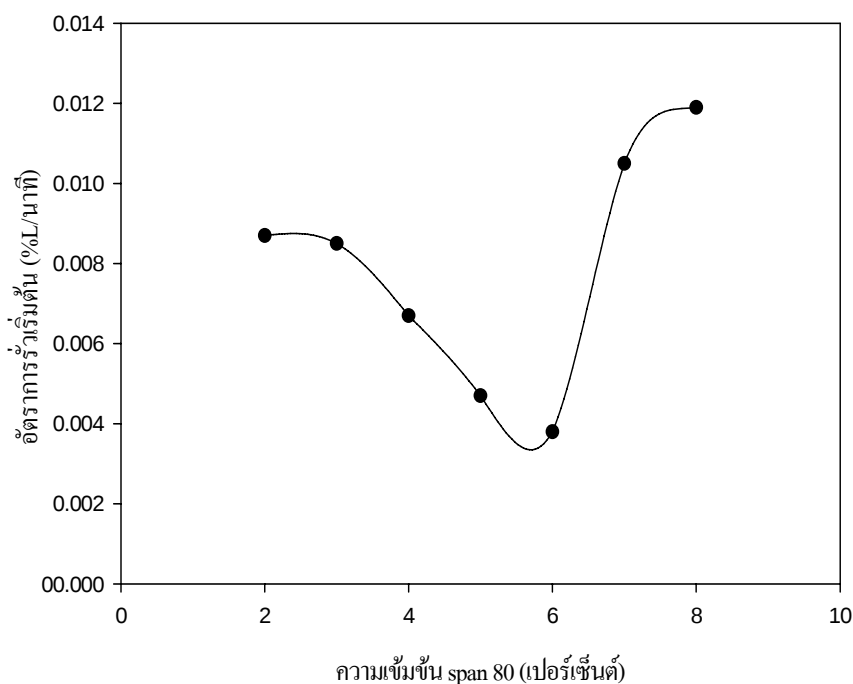
1. ศึกษาการเตรียมลิกวิดอิมัลชันเมมเบรน

การศึกษาการเตรียมลิกวิดอิมัลชันเมมเบรนแบ่งออกเป็น การเตรียมลิกวิดอิมัลชันเมมเบรนของพาราฟินเหลวและน้ำมันถั่วเหลือง โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความคงตัวของระบบลิกวิดอิมัลชันเมมเบรนที่เตรียมขึ้นเพื่อประยุกต์ใช้ในการห่อหุ้มเซลล์ยีสต์ในการหมักไซลิทอลจากไซโลส

1.1 การเตรียมลิกวิดอิมัลชันเมมเบรนของพาราฟินเหลว

1.1.1 ผลของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว span 80 ในเฟสเมมเบรนต่อความคงตัวของลิกวิดอิมัลชันเมมเบรน

จากการแปรผันความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว span 80 ตั้งแต่ 1-8 เปอร์เซ็นต์ ในเฟสเมมเบรนต่อความคงตัวของอิมัลชัน โดยวัดเปอร์เซ็นต์การรั่วต่อเวลา แสดงผลดังตารางผนวกที่ ก1 และประมาณอัตราการรั่วเริ่มต้น แสดงผลดังตารางผนวกที่ ก2 และภาพผนวกที่ ก1

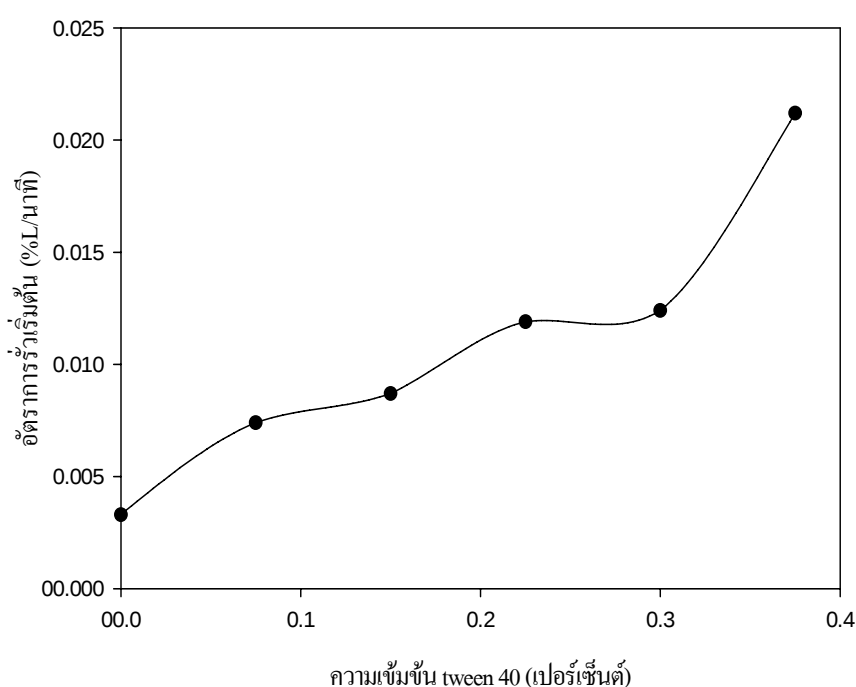


ภาพที่ 9 ผลของความเข้มข้นของ span80 ในเฟสเมมเบรน ต่ออัตราการร่วเริ่มต้น

ภาพที่ 9 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการร่วเริ่มต้นและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว span 80 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวระหว่าง 2-6 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีอัตราการร่วเริ่มต้นลดลง แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ span 80 มากกว่า 6 เปอร์เซ็นต์ ทำให้อัตราการร่วเริ่มต้นเพิ่มขึ้น เพราะฉะนั้นความเข้มข้นของ span 80 ที่ทำให้อัตราการร่วเริ่มต้นต่ำสุดคือ 6 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในช่วงแรกของการเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวสูงขึ้น นั้น จะช่วยให้ความตึงผิวของเม็ดอิมัลชันขนาดเล็กมีค่าลดลง จึงทำให้เมมเบรนเหลวมีความคงตัวมากขึ้น แต่การเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่มากเกินไปกลับส่งผลให้การร่วเพิ่มขึ้น เนื่องจากความตึงผิวที่ต่ำมากเกินไปจะทำให้การแตกของเม็ดอิมัลชันเกิดง่ายยิ่งขึ้น อีกประการการเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวในช่วงแรกจึงมีส่วนช่วยเพิ่มความคงตัวของเมมเบรน เพราะเป็นการเพิ่มชั้น surfactant mono-layers ที่ถูกดูดซับบนผิวของเม็ดอิมัลชันขนาดเล็ก การเพิ่มชั้นดังกล่าวขึ้นนี้ส่งผลให้ความคงตัวของเม็ดอิมัลชันดีขึ้น จนกระทั่งถึงจุดที่ผิวของเม็ดอิมัลชันอิ่มตัวด้วยชั้น surfactant mono-layers อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่มากเกินไปจุดอิ่มตัวนี้ก็จะทำให้เมมเบรนอ่อนแอลง (Pal *et al.*, 2002)

1.1.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว tween 40 ในเฟสนอกต่อความคงตัวของลิควิดอิมัลชันแมมเบรน

จากการแปรผันความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว tween 40 ตั้งแต่ 0-0.375 เปอร์เซ็นต์ ในเฟสนอกต่อความคงตัวของอิมัลชันโดยวัดเปอร์เซ็นต์การรั่วต่อเวลาแสดงดังตารางผนวกที่ ก3 และประมาณค่าอัตราการรั่วเริ่มต้น แสดงดังตารางผนวกที่ ก4 และภาพผนวกที่ ก2



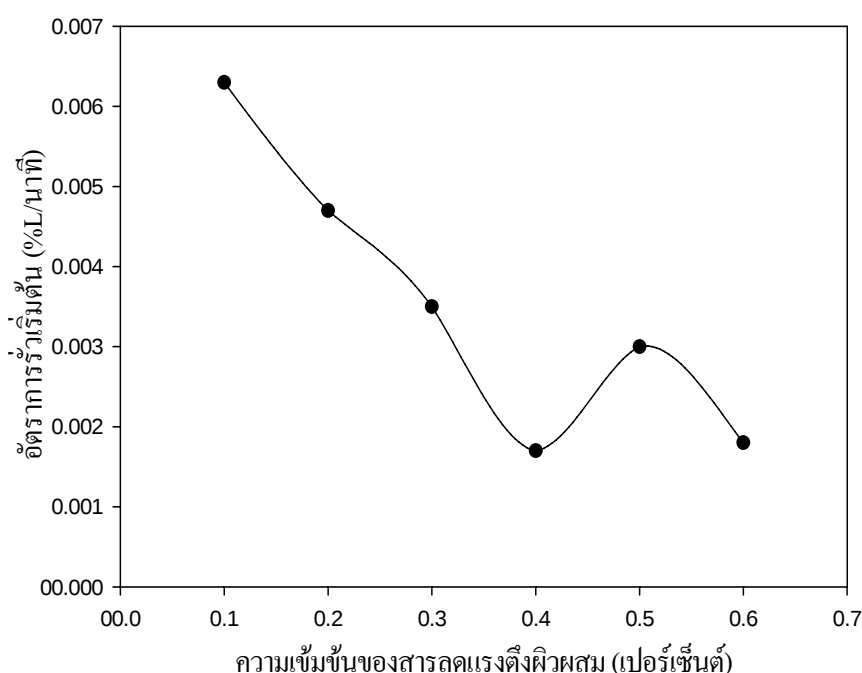
ภาพที่ 10 ผลของความเข้มข้นของ tween 40 ในเฟสนอกต่ออัตราการรั่วเริ่มต้น

ภาพที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการรั่วเริ่มต้นและความเข้มข้นของ tween 40 พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ tween 40 ในเฟสนอกสูงขึ้น ไม่ช่วยทำให้อัตราการรั่วเริ่มต้นลดลง ในทางตรงกันข้ามกลับทำให้อัตราการรั่วเริ่มต้นเพิ่มขึ้น โดยปกติสารลดแรงตึงผิวที่ทำให้เกิดอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำจะต้องมีค่า Hydrophilic Lipophilic Balance (HLB) มากกว่า 7 และจะคงตัวมากที่สุดที่ค่า HLB ระหว่าง 10-12 (McClement, 1999) สำหรับสารลดแรงตึงผิว tween 40 มีค่า HLB เท่ากับ 15.6 สามารถทำให้เกิดอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำได้แต่ความคงตัวต่ำ เนื่องจากสารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB สูงหรือค่าเกินไปจะมีค่า surface activity ต่ำ ทำให้สารไม่เกาะผิวอนุภาค

หรือเกาะได้น้อย จากการทดลองของ Fox (1986; อ้างโดย Hou, 1997) ได้อธิบายไว้ว่าสารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB สูง ซึ่งมีคุณสมบัติ hydrophilic ในระดับความเข้มข้นสูง จะสามารถละลายสารลดแรงตึงผิวที่มีค่า HLB ต่ำ ซึ่งมีคุณสมบัติ lipophilic ได้บางส่วน จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดการแตกของเม็ดอิมัลชันได้ง่ายยิ่งขึ้น เพราะฉะนั้นจากผลการทดลองนี้จึงไม่สามารถใช้สารลดแรงตึงผิว tween 40 เพียงชนิดเดียวในเฟสนอก เพื่อสร้างความคงตัวให้กับอิมัลชัน

1.1.3 ผลของสารลดแรงตึงผิวผสม tween 40 และ span 80 ในเฟสนอกต่อความคงตัวของลิวคิวอิมัลชันเมมเบรน

จากการแปรผันความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว tween 40 และ span 80 ตั้งแต่ 0.1-0.6 เปอร์เซ็นต์ ในเฟสนอกต่อความคงตัวของอิมัลชันโดยวัดเปอร์เซ็นต์การรั่วต่อเวลา แสดงดังตารางผนวกที่ ก5 และประมาณอัตราการรั่วเริ่มต้น แสดงดังตารางผนวกที่ ก6 และภาพผนวกที่ ก3

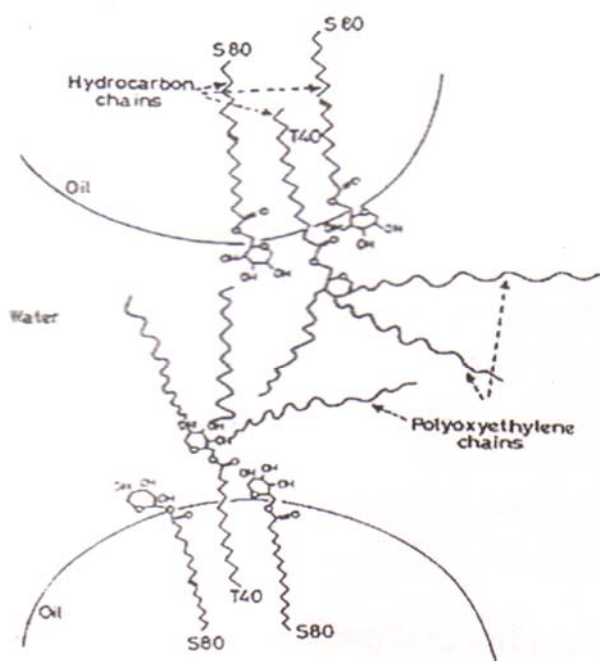


ภาพที่ 11 ผลของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวผสม tween 40 และ span 80 ในเฟสนอก ต่อ อัตราการร่วเริ่มต้น

ภาพที่ 11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการร่วเริ่มต้นและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวผสมระหว่าง tween 40 และ span 80 ในเฟสนอก พบว่าอัตราการร่วเริ่มต้นลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวผสมเพิ่มขึ้น การใช้สารลดแรงตึงผิวผสมมักนิยมทำการผสมระหว่างสารลดแรงตึงผิวที่ละลายได้ดีในน้ำมันกับสารลดแรงตึงผิวที่ละลายได้ดีในน้ำ ดังตัวอย่างใช้สารลดแรงตึงผิวในกลุ่ม span และในกลุ่ม tween ตามลำดับ (Dickinson and Stainby, 1982) การทำงานร่วมกันระหว่างสารลดแรงตึงผิว span และ tween จะให้อิมัลชันที่มีความคงตัวมากกว่า ในอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ สารลดแรงตึงผิว span และ tween จะเข้าจัดเรียงตัวบริเวณผิวร่วมของน้ำมันและน้ำ ในกรณีของสารลดแรงตึงผิวผสม span 80 และ tween 40 สายไฮโดรคาร์บอนของสารลดแรงตึงผิว span 80 จะวางตัวอยู่ในส่วนของน้ำมัน ส่วน sorbitan ring จะอยู่ในส่วนของน้ำ สำหรับสารลดแรงตึงผิว tween 40 สาย polyoxyethylene จะมีแรงดึงดูดกับน้ำมาก ทำให้โมเลกุลส่วนใหญ่จะวางตัวอยู่ในน้ำโดยมีสายไฮโดรคาร์บอนบางส่วนที่วางตัวอยู่ในส่วนของน้ำมัน เมื่อใช้สารลดแรงตึงผิวทั้งสองชนิดร่วมกัน สายไฮโดรคาร์บอนของสารลดแรงตึงผิว tween 40 จะเรียงตัวแทรกอยู่ระหว่างโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว span 80 และวางตัวสลับกันบนผิวของน้ำมัน

ดั่งภาพที่ 12 ความอยู่ตัวที่ดีขึ้นเกิดจากสารลดแรงตึงผิวที่ละลายในน้ำมันได้ดีช่วยให้โมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวที่ละลายน้ำได้ดีจับตัวกันอย่างแบบสนิทเกิดเป็นฟิล์มที่แข็งแรง อีกทั้งสารลดแรงตึงผิว tween 40 มีส่วนที่ชอบน้ำคือ สาย polyoxyethylene 3 สายโดยสายเหล่านี้จะดึงโมเลกุลของน้ำเอาไว้ทำให้โอกาสที่เม็ดอิมัลชันจะเข้ามาชนกันแล้วเกิดการรวมตัวกันน้อยลง เม็ดอิมัลชันจึงคงรักษารูปร่างเป็นเม็ดกลมขนาดเล็กได้

จากการทดลองพบว่าเม็ดอิมัลชันมีความคงตัวมากที่สุดที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวผสม tween 40 และ span 80 ประมาณ 0.4 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ของเฟสนอก การเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวผสมมากกว่านี้จะไม่มีผลต่อการลดแรงตึงผิวของน้ำมากนัก เนื่องจากปริมาณสารลดแรงตึงผิวส่วนเกินได้ถูกผลักให้เข้าไปอยู่ใต้ผิวสัมผัสของส่วนที่เป็นน้ำ (เฟสนอก) ผลที่ติดตามมาคือโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวส่วนเกินนี้ได้รับความกดดันมาก โดยเฉพาะส่วนที่ไม่ชอบน้ำจึงรวมตัวกันเป็นกลุ่มหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำไปรวมตัวกันไว้ และหันส่วนที่ชอบน้ำออกทางด้านนอกจึงเกิดเป็นสภาพของไมเซลล์อยู่ในเฟสนอก ไม่ส่งผลกระทบต่อเสถียรภาพของเฟสแมมเบรน



ภาพที่ 12 การทำงานร่วมกันระหว่างสารลดแรงตึงผิว tween 40 และ span 80

ที่มา: Boyd *et al.* (1972)

ในการสร้างระบบลิควิดคริสตัลชั้นเมมเบรนของพาราฟินเหลว ขั้นแรกจำเป็นต้องสร้างระบบให้มีความคงตัวก่อนแล้วจึงศึกษาคุณสมบัติด้านการแพร่ เมื่อทำการทดลองความสามารถในการแพร่ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลวของพาราฟินเหลว พบว่าไซโลสสามารถแพร่ผ่านเยื่อเมมเบรนเหลวของพาราฟินได้น้อยมาก แสดงดังตารางที่ 3 และภาพที่ 17 เนื่องจากพาราฟินเหลวเป็นสารไฮโดรคาร์บอนที่มีความไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ในทางด้านเครื่องสำอางมักใช้พาราฟินเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ปกป้องผิว เช่น ครีมกันแดด ซึ่งพาราฟินมีคุณสมบัติที่สำคัญคือ ทำให้เกิดฟิล์มกั้นน้ำบนผิว ด้วยคุณสมบัติกั้นน้ำนี้ทำให้การแพร่ผ่านของน้ำและสารละลายที่ชอบน้ำผ่านเยื่อเมมเบรนเหลวของพาราฟินเป็นไปได้ยากมาก ฉะนั้นการห่อหุ้มเซลล์ด้วยลิควิดคริสตัลชั้นเมมเบรนของพาราฟินเหลวจึงไม่สามารถประยุกต์ใช้เพื่อผลิตไซลิทอลได้

ตารางที่ 3 การแพร่ของไซโลสผ่านลิควิดคริสตัลชั้นเมมเบรนของพาราฟินเหลวที่อัตราส่วนปริมาตรน้ำมันต่อน้ำเท่ากับ 1:0.67 (เฟสเมมเบรนต่อเฟสใน)

เวลา (วินาที)	0	900	1800	2700	3600	4500	5400	6300
อัตราการแพร่ของไซโลส (กรัมต่อลูกบาศก์เมตร)	0.56	0.00	0.56	0.00	2.23	1.12	3.35	1.12

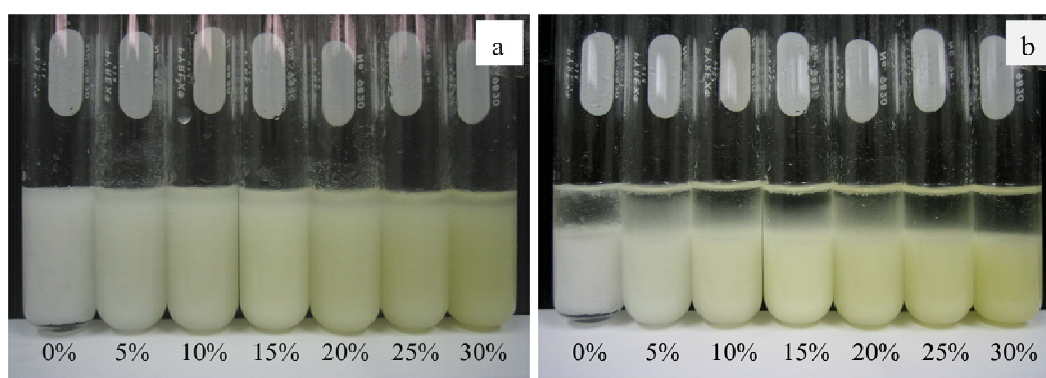
หมายเหตุ วิธีการทดลองเหมือนวิธีการทดลองข้อ 1.3 แต่เปลี่ยนเป็นระบบอิมัลชันเมมเบรนของพาราฟินเหลว

1.2 การเตรียมลิวคิวอิมัลชันเมมเบรนของน้ำมันถั่วเหลือง

เนื่องจากการแพร่ของน้ำตาลไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลวที่เตรียมจากพาราฟินเหลว มีค่าที่ต่ำ จึงเลือกใช้น้ำมันถั่วเหลืองในการเตรียมลิวคิวอิมัลชันเมมเบรนแทน เพราะน้ำมันถั่วเหลือง มีความปลอดภัย หาง่าย ราคาถูก มีองค์ประกอบที่ชอบน้ำอยู่บ้าง โดยศึกษาผลของลาโนลินในเฟส ในและไมโครแวกซ์ในเฟสเมมเบรนต่อความคงตัวของลิวคิวอิมัลชันเมมเบรน และเพื่อกำจัด ข้อผิดพลาดอันอาจเกิดจากการแพร่จึงจำเป็นต้องเปลี่ยนวิธีการทดลองให้เหมาะสม

1.2.1 ผลของความเข้มข้นของลาโนลินในเฟสในต่อความคงตัวของอิมัลชัน

ลาโนลิน (lanolin) เป็นตัวทำอิมัลชันที่ได้จากธรรมชาติโดยสกัดได้จากไขมัน สัตว์ มีลักษณะคล้ายขี้ผึ้งเหนียวเหนอะ มักใช้แพร่หลายในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ปัจจุบันมีการ พัฒนาการผลิตให้บริสุทธิ์สูงขึ้น และมีอนุพันธ์มากมายเพื่อใช้เป็นตัวทำอิมัลชันได้ ลาโนลินเป็น สารประกอบเชิงซ้อน ประกอบด้วย เอสเทอร์ 94 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมี sterols, aliphatic alcohol, triterpene และ fatty acid อนุพันธ์ของลาโนลินมีมากมาย เช่น lanolin alcohols, lanolin acid และ dewaxed lanolin เป็นต้น ลาโนลินสามารถทำให้เกิดอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมันได้โดยบทบาทและ หน้าที่ของ cholesterol และ cholestanol ซึ่งเป็น sterol ที่พบในลาโนลิน (พิมพร, 2534) แปรผัน ความเข้มข้นของลาโนลินตั้งแต่ 0-30 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร การเปลี่ยนแปลงของ อิมัลชันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง แสดงดังภาพที่ 13



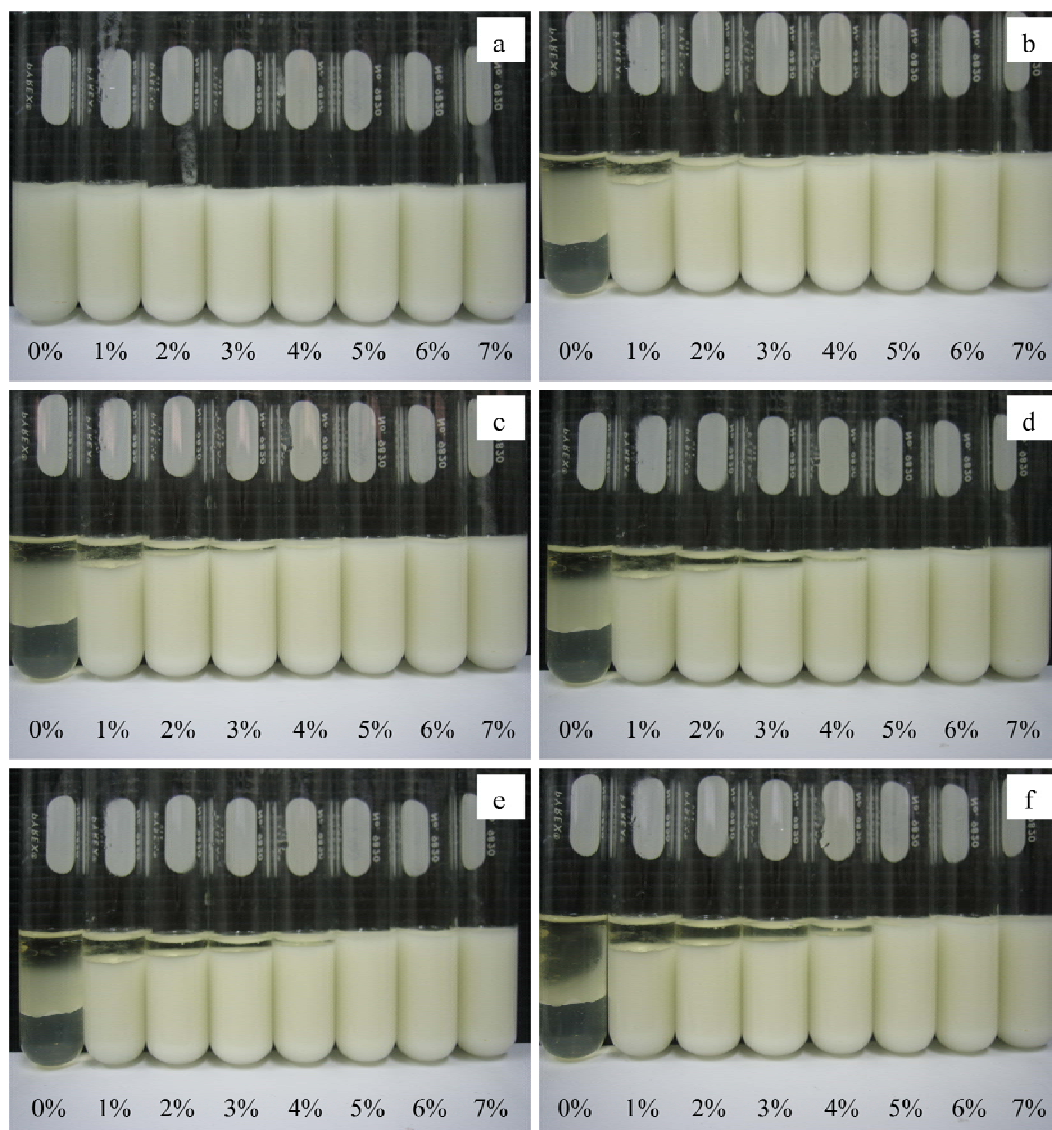
ภาพที่ 13 ผลของความเข้มข้นของลาโนลินต่อความคงตัวของอิมัลชัน ที่อุณหภูมิห้อง
ที่ (a) 0 ชั่วโมง และ (b) 24 ชั่วโมง

ภาพที่ 13 แสดงผลการใช้ลาโนลินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นตัวทำอิมัลชันของน้ำ และน้ำมันถั่วเหลืองที่มีผลต่อความคงตัวของอิมัลชันเมื่อตั้งที่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากอิมัลชันเป็นระบบที่ไม่คงตัวทางเทอร์โมไดนามิกส์ จึงเปลี่ยนแปลงได้ตลอดเวลาภายหลังการเตรียม ความไม่คงสภาพของอิมัลชันอาจค่อยเป็นค่อยไปหรือมีการเปลี่ยนแปลงที่สังเกตได้ชัด เช่น การแยกชั้น หรือการตกตะกอน เป็นต้น จากผลการทดลอง พบว่าเมื่อทดลองเตรียมอิมัลชันโดยแปรผันความเข้มข้นของลาโนลินคือ 0 5 10 15 20 25 และ 30 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตั้งอิมัลชันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทุกความเข้มข้นของลาโนลินเกิดการแยกชั้นของอิมัลชัน ที่ความเข้มข้น 5-30 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อิมัลชันแยกเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นน้ำมันอยู่ด้านบน ชั้นอิมัลชันอยู่ด้านล่าง สำหรับกรณีที่ไม่มีสารเติมลาโนลิน (ความเข้มข้นลาโนลิน 0 เปอร์เซ็นต์) จะพบอิมัลชันแยกเป็น 3 ชั้น คือ ชั้นน้ำมันอยู่ด้านบน ชั้นอิมัลชันอยู่ตรงกลาง และชั้นน้ำอยู่ด้านล่าง หลังการเตรียม (0 ชั่วโมง) แม้ว่าจะไม่มีลาโนลินเป็นตัวทำอิมัลชัน แต่ยังคงมีชั้นของอิมัลชัน แสดงให้เห็นว่าไมโครแวกซ์ที่เติมลงไป 0.5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้สังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของอิมัลชันนั้น ทำหน้าที่เป็นตัวทำอิมัลชันได้เช่นเดียวกัน

1.2.2 ผลของความเข้มข้นของไมโครแวกซ์ในเฟสเมมเบรนต่อความคงตัวของอิมัลชัน

ไมโครแวกซ์ (Microwaxes) หรือ microcrystalline waxes เป็น mineral waxes ซึ่งเป็นของแข็งไฮโดรคาร์บอนอิ่มตัวน้ำหนักโมเลกุลสูง ไม่ละลายในตัวทำละลายชนิดมีขั้ว เข้ากันได้ดีกับน้ำมันเหลวโดยไม่เกิดการตกผลึก ช่วยเพิ่มความหนืดให้แก่อิมัลชัน (พิมพร, 2534) นิยมใช้ในการทำเทียน ช่วยให้เทียนเนียน แะออกจากแม่พิมพ์ได้ง่าย นอกจากนี้ยังใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางบางชนิดอีกด้วย

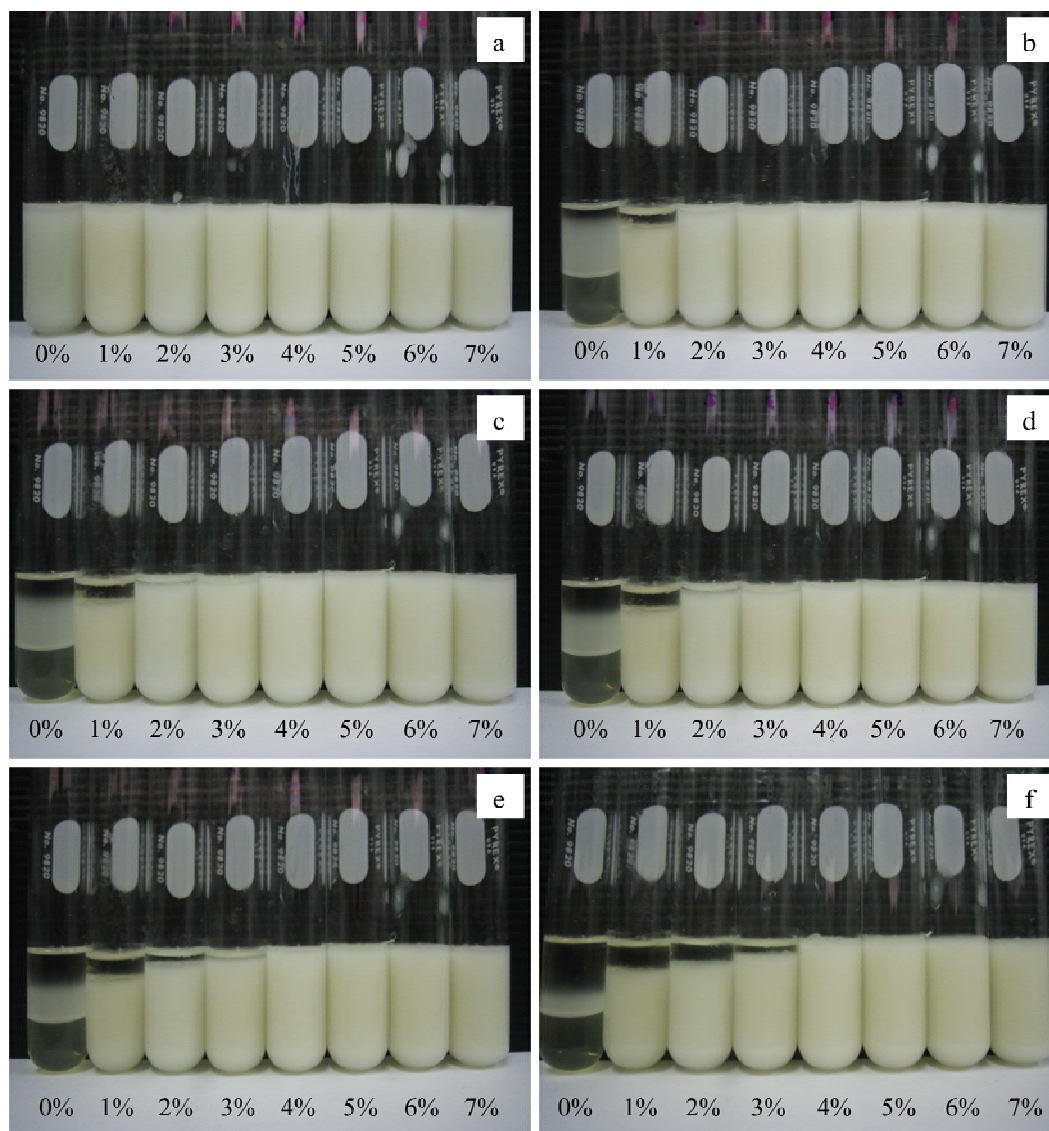
ในการทดลองผลของไมโครแวกซ์ต่อความคงตัวของอิมัลชันได้เตรียมอิมัลชันโดยเลือกใช้ความเข้มข้นของลาโนลินที่ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ภาพที่ 13) เติมไมโครแวกซ์เพื่อช่วยเพิ่มความหนืดให้แก่เฟสเมมเบรน ซึ่งจะทำให้อิมัลชันมีความคงตัวเพิ่มมากขึ้น โดยแปรผันความเข้มข้นของไมโครแวกซ์ 0 1 2 3 4 5 6 และ 7 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตั้งอิมัลชันทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของอิมัลชันโดยการบันทึกภาพถ่ายแสดงดังภาพที่ 14 และ 15



ภาพที่ 14 ผลของความเข้มข้นของไมโครเวกซ์ต่อความคงตัวของอิมัลชันเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเข้มข้นของลาโนลิน 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่เวลา (a) 0 (b) 24 (c) 48 (d) 72 (e) 96 ชั่วโมง และ (f) 7 วัน

ภาพที่ 14 เมื่อเตรียมเฟสในด้วยลาโนลินความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าที่ 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของไมโครเวกซ์ 0 และ 1 เปอร์เซ็นต์ อิมัลชันเกิดการแยกชั้นอย่างชัดเจน (ภาพที่ 14(b)) ที่ 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นไมโครเวกซ์ 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ อิมัลชันเริ่มเกิดการแยกชั้นเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 14(c)) เมื่อตั้งทิ้งไว้ 72 ชั่วโมง จะเกิด

การแยกชั้นอย่างชัดเจน (ภาพที่ 14(d)) ส่วนที่ความเข้มข้นไมโครเวกซ์ 4 เปอร์เซ็นต์ เริ่มสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยที่เวลา 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 14(d)) และเกิดการแยกชั้นอย่างชัดเจนเมื่อตั้งทิ้งไว้ 7 วัน (ภาพที่ 14(f)) ขณะที่ความเข้มข้นไมโครเวกซ์ 5-7 เปอร์เซ็นต์ ยังคงสภาพเดิมไม่เกิดการแยกชั้นเมื่อตั้งทิ้งไว้ 7 วัน (ภาพที่ 14(f))



ภาพที่ 15 ผลของความเข้มข้นของไมโครเวกซ์ต่อความคงตัวของอิมัลชัน เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ที่ความเข้มข้นของลาโนลิน 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่เวลา (a) 0 (b) 24 (c) 48 (d) 72 (e) 96 ชั่วโมง และ (f) 7 วัน

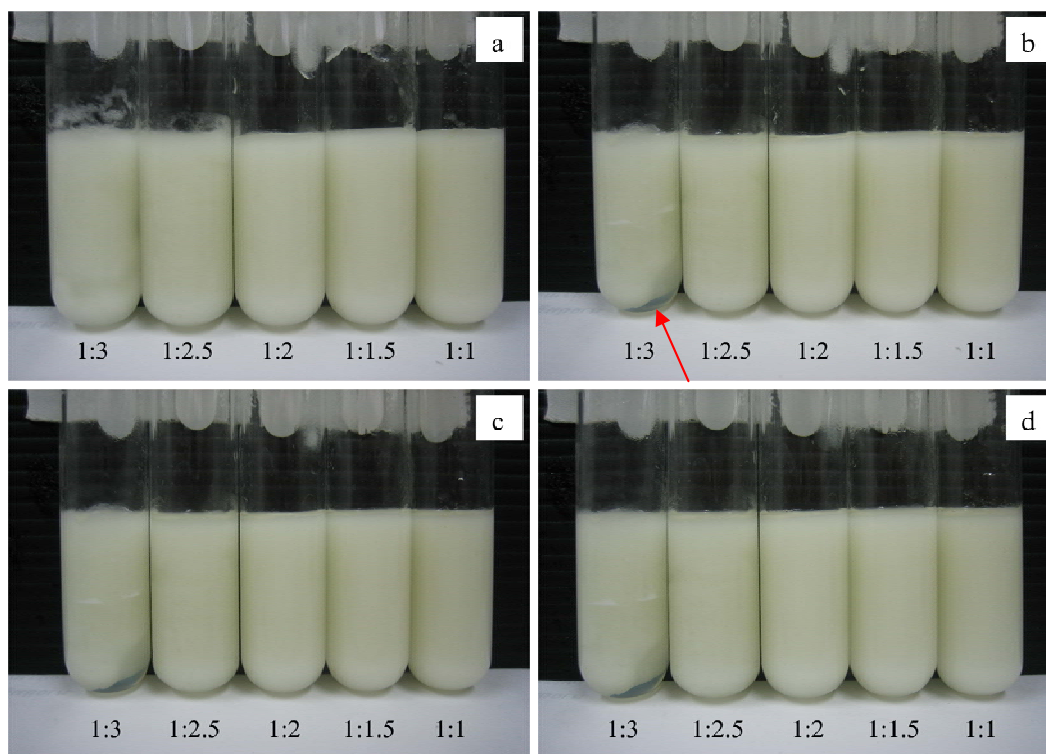
เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของลาโนลินเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผลการเตรียมอิมัลชันพบว่าที่ 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของไมโครเวกซ์ 0 และ 1 เปอร์เซ็นต์ อิมัลชันเกิดการแยกชั้น (ภาพที่ 15(b)) ที่ 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นไมโครเวกซ์ 2 เปอร์เซ็นต์ เริ่มเกิดการแยกชั้นเล็กน้อย (ภาพที่ 15(c)) ที่ 72 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นไมโครเวกซ์ 3 เปอร์เซ็นต์ เริ่มเกิดการแยกชั้น (ภาพที่ 15(d)) ที่ 96 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นไมโครเวกซ์ 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ เกิดการแยกชั้นมากขึ้นเล็กน้อย (ภาพที่ 15(e)) แต่เมื่อตั้งทิ้งไว้ 7 วัน พบว่าที่ความเข้มข้นไมโครเวกซ์ 0-3 เปอร์เซ็นต์ อิมัลชันเกิดการแยกชั้นชัดเจน ส่วนที่ความเข้มข้นของไมโครเวกซ์ 4-7 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะของอิมัลชันยังคงมีสภาพเช่นเดิมไม่เกิดการแยกชั้น (ภาพที่ 15(f))

จากผลของลาโนลินและไมโครเวกซ์ต่อความคงตัวของลิวิดอิมัลชันเมมเบรนของน้ำมันถั่วเหลือง จะเห็นว่าการเพิ่มความเข้มข้นของลาโนลินในเฟสในมีผลทำให้ความคงตัวของอิมัลชันเพิ่มขึ้น จึงสามารถใช้ไมโครเวกซ์ที่ความเข้มข้นต่ำลงได้ ดังนั้นในการเตรียมเซลล์จริงของยีสต์ด้วยวิธีลิวิดอิมัลชันเมมเบรนเพื่อนำไปใช้ในการหมักไซโลสเพื่อผลิตไซลิทอล ซึ่งควรเตรียมเฟสเมมเบรนด้วยไมโครเวกซ์ความเข้มข้นมากกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ระดับความเข้มข้นของลาโนลิน 5 เปอร์เซ็นต์ และเตรียมเฟสเมมเบรนด้วยไมโครเวกซ์ความเข้มข้นมากกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ระดับลาโนลินความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

1.2.3 ผลของอัตราส่วนปริมาตรระหว่างน้ำมันต่อน้ำ (เฟสเมมเบรนต่อเฟสใน) ต่อความคงตัวของลิกวิดอิมัลชันเมมเบรน

ในการเตรียมอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน ปัจจัยของอัตราส่วนระหว่างน้ำมันและน้ำย่อมมีผลต่อความคงตัวของอิมัลชัน การเพิ่มสัดส่วนของน้ำในเฟสในย่อมส่งผลทำให้ความคงตัวของอิมัลชันลดลง เนื่องจากวัฏภาคภายในมีขนาดใหญ่ขึ้น และชั้นเมมเบรนของน้ำมันบางลง อย่างไรก็ตาม การเพิ่มปริมาตรเฟสในจะทำให้สามารถบรรจุปริมาณเซลล์ได้มากขึ้น นอกจากนี้การที่ชั้นเมมเบรนเหลวบางลงน่าจะช่วยให้การแพร่ผ่านของสารดีขึ้นด้วย

จากผลการทดลองการเตรียมลิกวิดอิมัลชันเมมเบรนของน้ำมันถั่วเหลือง ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของลาโนลินและไมโครเวกซ์เท่ากับ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นแปรผันอัตราส่วนปริมาตรน้ำมันต่อน้ำในการเตรียมอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน เท่ากับ 1:1 1:1.5 1:2 1:2.5 และ 1:3 ได้ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 16



ภาพที่ 16 ผลของอัตราส่วนปริมาตรระหว่างน้ำมันกับน้ำต่อความคงตัวของอิมัลชัน ที่อุณหภูมิห้อง (ความเข้มข้นของลาโนลินและไมโครแวกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่ (a) 0 (b) 24 (c) 48 ชั่วโมง และ (d) 7 วัน

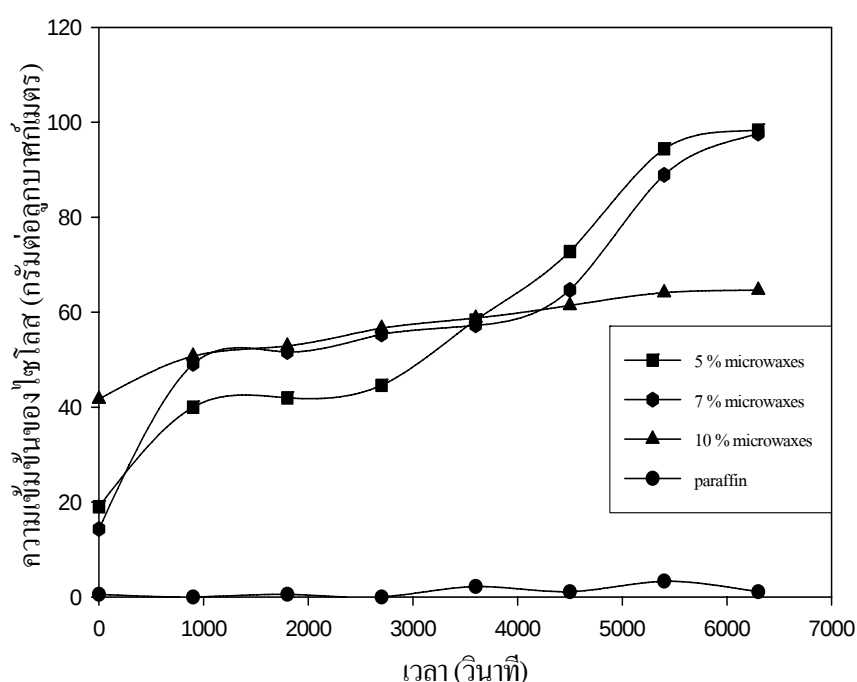
หมายเหตุ ตรงตำแหน่งลูกศรชี้แสดงให้เห็นถึงการแยกชั้นของอิมัลชัน

จะเห็นว่าเมื่อตั้งอิมัลชันทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ที่อัตราส่วนปริมาตร น้ำมันต่อน้ำเท่ากับ 1:3 พบว่าอิมัลชันเกิดการแยกชั้น (ภาพที่ 16(b)) อิมัลชันที่อัตราส่วนปริมาตร น้ำมันต่อน้ำเท่ากับ 1:1-1:2.5 พบว่าอิมัลชันยังคงสภาพอยู่ได้เมื่อตั้งทิ้งไว้ 7 วัน (ภาพที่ 16(d)) แสดงให้เห็นว่าสามารถเพิ่มอัตราส่วนของน้ำในเฟสในได้สูงสุดถึง 2.5 เท่า หากเพิ่มปริมาตรของ เฟสในมากกว่านี้จะทำให้เฟสเมมเบรนไม่สามารถรองรับเฟสในได้ จึงทำให้เมมเบรนแตกและเกิด สภาพการกลับวัฏภาคได้ในที่สุด

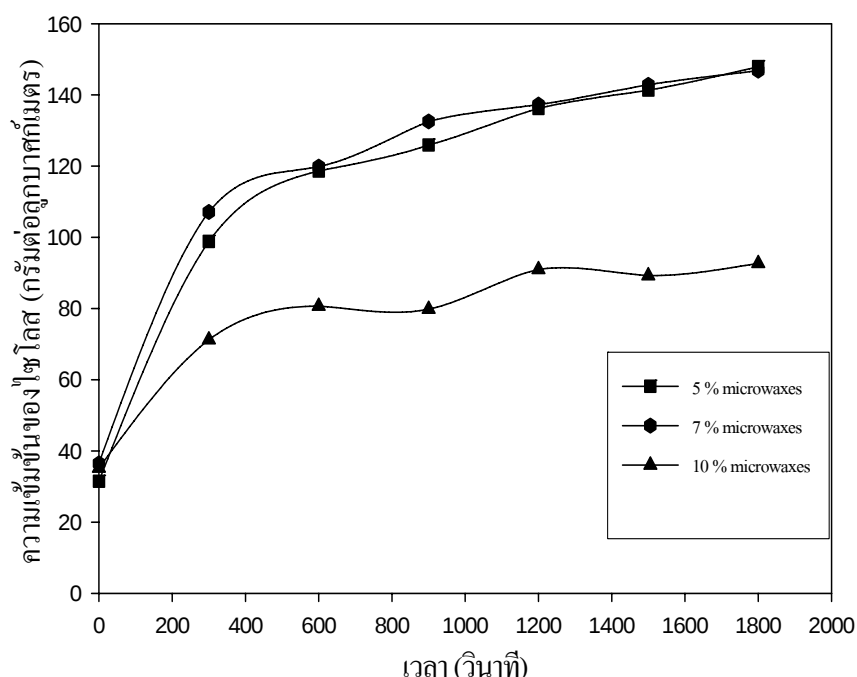
1.3 การแพร่ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลว

น้ำมันที่ได้จากพืชและสัตว์ส่วนใหญ่ประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ของกรดไขมันสาย ตรงที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงทั้งชนิดอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว และยังมีกลุ่มเอสเทอร์ที่ชอบน้ำบ้าง ดังนั้น

น้ำมันเหล่านี้จึงไม่ละลายน้ำแต่ไม่ถึงกับไร้ขั้ว (non polar) เหมือนกับน้ำมันแร่หรือพาราฟิน น้ำพร้อมกับสารละลายของสารที่ชอบน้ำจึงสามารถแพร่ผ่านชั้นเมมเบรนของน้ำมันเหล่านี้ได้บ้าง ในการศึกษาการเตรียมลิควิดคริสตัลชั้นเมมเบรนได้เลือกใช้น้ำมันถั่วเหลืองเนื่องจากมีความปลอดภัย ไม่เป็นพิษ ไม่ติดไฟ หาง่ายและราคาถูก แต่น้ำมันถั่วเหลืองประกอบไปด้วยไตรกลีเซอไรด์สายยาว ซึ่งมีลักษณะกึ่งมีขั้ว ทำให้ยากในการเตรียมอิมัลชันที่คงตัว (พิมพร, 2534) จากการทดลองผลการใช้ลาโนลินเป็นตัวทำอิมัลชันเพียงอย่างเดียวไม่สามารถทำให้เกิดอิมัลชันของน้ำมันถั่วเหลืองที่คงตัวได้ (ภาพที่ 13) จึงจำเป็นต้องเติมไมโครแวกซ์เพื่อเพิ่มความหนืดให้แก่อิมัลชัน อย่างไรก็ตาม ความหนืดที่เพิ่มขึ้นก็อาจมีผลทำให้การแพร่ของสารลดลงได้ ดังนั้นจึงทำการทดลองศึกษาผลของความเข้มข้นของไมโครแวกซ์ต่อความสามารถในการแพร่ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลวของอิมัลชันของน้ำมันถั่วเหลือง



ภาพที่ 17 การแพร่ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลวของระบบน้ำมันถั่วเหลืองและระบบของพาราฟินเหลว ที่อัตราส่วนปริมาตรน้ำมันและน้ำเท่ากับ 1:0.67 (เฟสเมมเบรนต่อเฟสใน)



ภาพที่ 18 การแพร่ของไฮโดรคาร์บอนผ่านเยื่อเมมเบรนเหลวของระบบน้ำมันถั่วเหลือง ที่อัตราส่วน ปริมาณน้ำมันและน้ำเท่ากับ 1:2 (เฟสเมมเบรนต่อเฟสใน)

จากการทดลองเตรียมอิมัลชันของน้ำมันถั่วเหลืองโดยเตรียมเฟสในด้วยสารละลายไฮโดรคาร์บอนความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร เคลือบอิมัลชันที่เตรียมขึ้นในผิวด้านในของท่อซิลิโคน เตรียมเฟสนอกด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใช้เครื่องสูบหมุนเวียนเฟสนอกผ่านท่อซิลิโคน (ภาพที่ 4) โดยเก็บตัวอย่างเฟสนอกมาวิเคราะห์ปริมาณไฮโดรคาร์บอนที่แพร่ผ่านเยื่อเมมเบรนเหลวออกมา ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางผนวกที่ ก7 และ ก8 และแสดงดังภาพที่ 17 และ 18 จะเห็นว่าการเพิ่มความเข้มข้นของไมโครเวกซ์ทำให้ความชันของกราฟการแพร่ของไฮโดรคาร์บอนเริ่มต้นลดลงและเข้าสู่สภาวะคงที่เร็วขึ้น

สามารถประมาณค่าความสามารถในการแพร่ $\left(\frac{PA_C}{V_{out}} \right)$ ได้จากความชันของกราฟ

ระหว่างลอการิทึมของความเข้มข้นของไฮโดรคาร์บอนในเฟสนอกและเวลา ดังภาพผนวกที่ ก4 และ ก5 และตารางผนวกที่ ก9 จากนั้นคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (Permeability coefficient; P) ของอิมัลชันที่

ความเข้มข้นไมโครแวกซ์ 5 7 และ 10 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ผลการคำนวณได้สรุปไว้ในตารางที่ 4

พบว่าที่อัตราส่วนปริมาตรน้ำมันต่อน้ำเท่ากับ 1:0.67 ได้ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (P) เท่ากับ 4.72×10^{-7} 3.31×10^{-7} และ 1.34×10^{-7} เมตรต่อวินาที ตามลำดับ จะเห็นว่าปริมาณไมโครแวกซ์ที่เพิ่มขึ้นทำให้อัตราการแพร่ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนลดลง เนื่องจากความหนืดของเฟสเมมเบรนที่เพิ่มขึ้น สังเกตได้จากค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (P) ที่ลดลง นอกจากนี้ความหนืดสูงยังทำให้ลิกวิดอิมัลชันเมมเบรนยึดเกาะผิวด้านในของท่อซิลิโคนหนามากขึ้น ทำให้พื้นที่ผิวสัมผัสด้านในของอิมัลชันลดลงมีผลต่อค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (P) ลดลงเช่นเดียวกัน เมื่อเพิ่มอัตราส่วนปริมาตรน้ำมันต่อน้ำจาก 1:0.67 เป็น 1:2 ได้ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (P) เท่ากับ 6.37×10^{-7} 4.76×10^{-7} และ 4.33×10^{-7} เมตรต่อวินาที ตามลำดับ จะเห็นว่าสัมประสิทธิ์การแพร่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาตรของเฟสใน เนื่องจากทำให้ชั้นเมมเบรนเหลวของน้ำมันบางลง

การเพิ่มความเข้มข้นของไมโครแวกซ์หรือการลดอัตราส่วนปริมาตรของน้ำมันต่อน้ำจะช่วยทำให้ลิกวิดอิมัลชันเมมเบรนมีความคงตัวที่ดี แต่กลับมีผลทำให้การแพร่ของไซโลสผ่านเมมเบรนลดลงเช่นกัน ดังนั้นการนำระบบลิกวิดอิมัลชันเมมเบรนเพื่อใช้ห่อหุ้มเซลล์ยีสต์ในการผลิตไซลิทอลจำเป็นต้องพิจารณาปัจจัยทั้งสอง ได้แก่ ความคงตัวของลิกวิดอิมัลชันเมมเบรนและการแพร่ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลว เพื่อได้ระบบที่มีความเหมาะสมของทั้งความเข้มข้นของไมโครแวกซ์ และอัตราส่วนปริมาตรของน้ำมันต่อน้ำ

ตารางที่ 4 สัมประสิทธิ์การแพร่ (P) ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลว ของลิกวิดอิมัลชัน

เมมเบรนของน้ำมันถั่วเหลืองที่อัตราส่วนปริมาตรน้ำมันต่อน้ำเท่ากับ 1:0.67 และ 1:2

ไมโครแวกซ์ (เปอร์เซนต์)	สัมประสิทธิ์การแพร่, P (10^{-7} เมตรต่อวินาที)	
	$\frac{V_o}{V_w} = 1:0.67$	$\frac{V_o}{V_w} = 1:2$
5	4.72	6.37
7	3.31	4.76
10	1.34	4.33

หมายเหตุ $\frac{V_o}{V_w}$ หมายถึง อัตราส่วนปริมาตรของน้ำมันต่อน้ำ (เฟสเมมเบรนต่อเฟสใน)

จะนั้นจึงได้เลือกกระบวนการเตรียมลิวคิวติคัลชันเมมเบรนของน้ำมันถั่วเหลือง ที่ใช้อัตราส่วนของน้ำมัน (เฟสเมมเบรน) ต่อน้ำ (เฟสใน) เท่ากับ 1:2 ที่ประกอบด้วยความเข้มข้นของ ไมโครเวกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ของเฟสเมมเบรน และความเข้มข้นของลาโนลิน 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ของเฟสใน ในการหุ้มเซลล์ยีสต์ *Candida mogii* ATCC 18364 เพื่อใช้ในการศึกษาการผลิตไซลิทอลด้วยระบบหมุนเวียนน้ำหมัก (เฟสนอก) แบบเบ็ดเสร็จในถังหมักต่อไป

จากตารางผนวกที่ ก9 หากคำนวณค่าอัตราส่วนปริมาตรลิวคิวติคัลชันต่อพื้นที่ผิว $\left(\frac{V_E}{A_C}\right)$ ที่ ลา

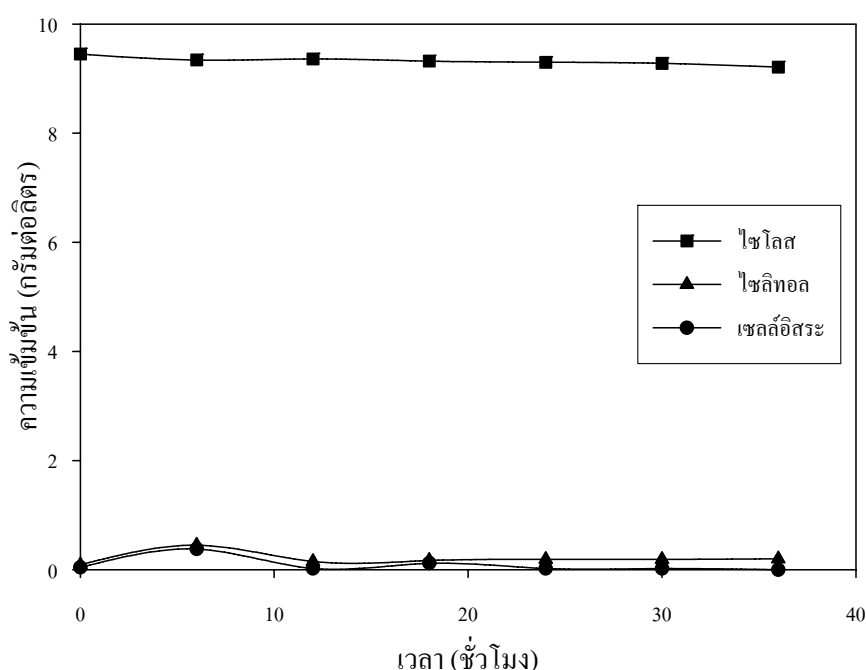
โนลินและไมโครเวกซ์ 5 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนปริมาตรน้ำมันและน้ำ 1:2 ได้เท่ากับ 460 มิลลิลิตร ต่อตารางเมตร เพราะฉะนั้นถ้านำลิวคิวติคัลชันเมมเบรนของน้ำมันถั่วเหลืองที่เตรียมขึ้นด้วยสภาวะดังกล่าวที่มีปริมาตร 460 มิลลิลิตร เคลือบบนผิวภายในของท่อซิลิโคนจะได้พื้นที่ผิวสัมผัส 1 ตารางเมตร จึงสามารถใช้อัตราส่วนระหว่างปริมาตรลิวคิวติคัลชันเมมเบรนและพื้นที่ผิวภายในของท่อซิลิโคนนี้ในการออกแบบการหมักเพื่อศึกษาการเพิ่มหรือการลดพื้นที่ผิวสัมผัสได้

2. ศึกษาการผลิตไซลิทอลโดยเซลล์ยีสต์ที่ห่อหุ้มด้วยลิวคิวติคัลชันเมมเบรน

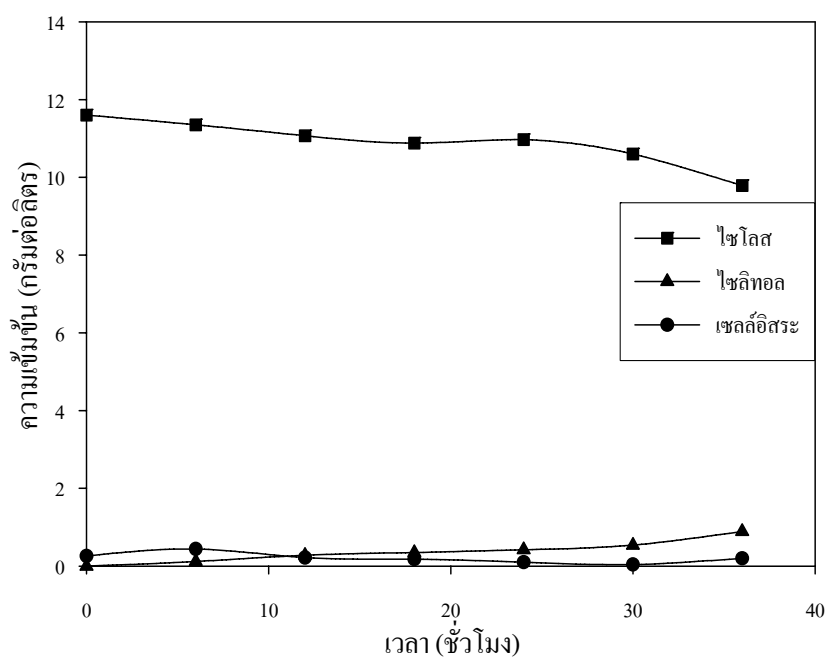
ปัญหาที่สำคัญของระบบลิวคิวติคัลชันเมมเบรนคือ ความคงตัวของอิมัลชัน ถึงแม้จะได้สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมอิมัลชันที่คงตัวแล้วก็ตาม แต่พบว่าการนำอิมัลชันไปใช้ในการตรึงเซลล์ยีสต์และทำการหมักในอาหารเหลวภายใต้สภาวะที่มีการกวนหรือการเขย่า สามารถทำให้อิมัลชันสูญเสียความคงตัว เกิดการแตกและหลุดของเซลล์ที่อยู่ภายในเม็ดอิมัลชันได้ง่าย หรือการเตรียมเซลล์ยีสต์ในลักษณะเม็ดอิมัลชัน (droplet) แล้วบรรจุลงในคอลัมน์แบบ Packed bed แม้ระบบจะมีความปั่นป่วนน้อย แต่ก็เกิดการรวมตัวของเม็ดอิมัลชันเล็ก ๆ เข้าด้วยกัน กลายเป็นเม็ดอิมัลชันขนาดใหญ่ ทำให้พื้นที่ผิวสัมผัสของลิวคิวติคัลชันเมมเบรนลดลง การนำระบบนี้มาใช้ในการหมักอย่างมีประสิทธิภาพควรอยู่ในสภาวะที่มีความปั่นป่วนน้อยและกระจายตัว ดังนั้นจึงออกแบบถังหมักเซลล์ยีสต์ตรึง โดยอาศัยการเคลือบอิมัลชันเซลล์ยีสต์ตรึงที่เตรียมได้บนวัสดุพองของแข็ง โดยการเคลือบอิมัลชันที่ห่อหุ้มเซลล์ยีสต์แล้วบนผิวด้านในของท่อซิลิโคนลักษณะคล้ายคลึงแผ่นฟิล์มชีวภาพ แล้วนำไปใช้ในการหมักไซโลสเพื่อผลิตไซลิทอล จากคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ของท่อซิลิโคน ทำให้ลิวคิวติคัลชันของน้ำมันสามารถยึดเกาะบนผิวของท่อซิลิโคนได้ ใช้เครื่องสูบน้ำหมักจากถังพักแบบกวนหมุนเวียนเข้าและออกจากท่อซิลิโคนเคลือบเซลล์

ยีสต์ตรึงลิกวิดอิมัลชันเมมเบรน แสดงการทำงานของระบบถังหมักเซลล์ยีสต์ตรึง แสดงดังภาพที่ 6 และ 24

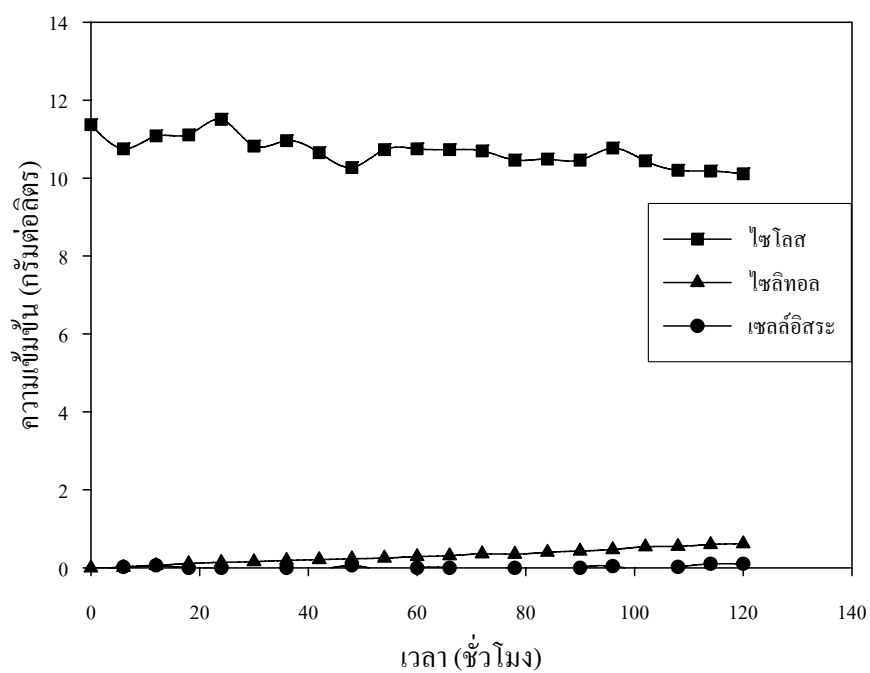
ในการศึกษาการหมักไซลิทอลด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงลิกวิดอิมัลชันเมมเบรนที่พองด้วยท่อซิลิโคน ได้แปรผันปริมาณอิมัลชันต่อน้ำหมักและความเข้มข้นเซลล์ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 19-22 และคำนวณพารามิเตอร์ของจลนพลศาสตร์การหมัก ดังตารางที่ 5



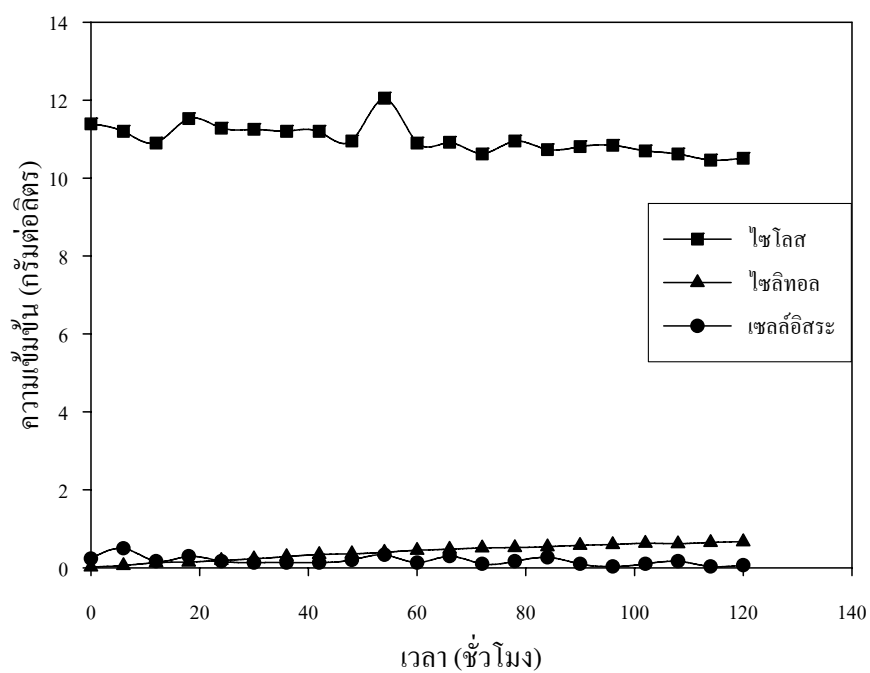
ภาพที่ 19 การผลิตไซลิทอลจากไซโลสแบบเบ็ดเสร็จหมุนเวียนน้ำหมักด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงลิกวิดอิมัลชันเมมเบรน โดยใช้ปริมาณอิมัลชันต่อน้ำหมักเท่ากับ 1:10 และความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 4.20 กรัมต่อลิตรน้ำหมัก ภายใต้สภาวะควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6 และปริมาณออกซิเจนละลายมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ (SLM-1)



ภาพที่ 20 การผลิตไซลิทอลจากไซโลสแบบเปิดเสรีหมุนเวียนน้ำหมักด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงลิวิดอิมัลชันเมมเบรน โดยใช้ปริมาณอิมัลชันต่อน้ำหมักเท่ากับ 1:4 และความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 3.89 กรัมต่อลิตรน้ำหมัก ภายใต้สภาวะควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6 และปริมาณออกซิเจนละลายมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ (SLM-2)



ภาพที่ 21 การผลิตไซลิทอลจากไซโลสแบบเปิดเสรีหมุนเวียนน้ำหมักด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงลิวคิไดอิมัลชันเมมเบรน โดยใช้ปริมาตรอิมัลชันต่อน้ำหมักเท่ากับ 1:4 และความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 6.20 กรัมต่อลิตรน้ำหมัก ภายใต้สภาวะควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6 และปริมาณออกซิเจนละลาย 30 เปอร์เซ็นต์ (SLM-3)



ภาพที่ 22 การผลิตไซลิทอลจากไซโลสแบบเปิดเสร็จหมุนเวียนน้ำหมักด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงลิวคิไดอิมัลชันเมมเบรน โดยใช้ปริมาตรอิมัลชันต่อน้ำหมักเท่ากับ 1:4 และความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 15.31 กรัมต่อลิตรน้ำหมัก ภายใต้สภาวะควบคุมการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6 และปริมาณออกซิเจนละลาย 30 เปอร์เซ็นต์ (SLM-4)

ตารางที่ 5 พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการหมักไซลิทอลจากไซโลสแบบเบ็ดเสร็จ
หมวนเวียนน้ำหมักด้วยระบบเซลล์ยีสต์ตรึงลิกวิดอิมัลชันเมมเบรน

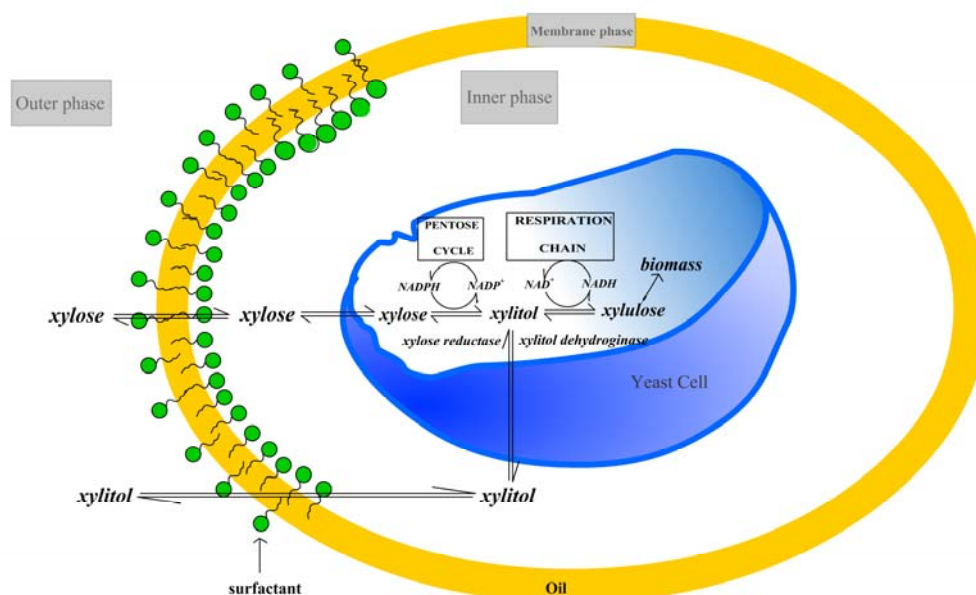
สภาวะ การหมัก	ผลได้	อัตราเชิงปริมาตร		อัตราจำเพาะ	
	ไซลิทอล				
	(กรัมต่อกรัม)	(กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)		(กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง)	
	$Y_{P/S}$	$\frac{dC_{xyl}}{dt}$	$\frac{dC_{xyt}}{dt}$	q_s	q_p
SLM-1	0.31	0.0187	0.0078	0.0044	0.0017
SLM-2	0.49	0.0416	0.0216	0.0107	0.0056
SLM-3	0.52	0.0090	0.0050	0.0014	0.0008
SLM-4	0.52	0.0093	0.0055	0.0006	0.0004

หมายเหตุ สภาวะการหมัก แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 2

จากการทดลองใช้อัตราส่วนปริมาตรอิมัลชันต่อน้ำหมักเท่ากับ 1:10 โดยใช้ปริมาตรอิมัลชัน 100 มิลลิลิตร และปริมาตรน้ำหมัก 1000 มิลลิลิตร (SLM-1) พบว่าอัตราการใช้ไซโลส ($\frac{dC_{xyl}}{dt}$) ก่อนข้างต่ำ ทำให้ต้องใช้ระยะเวลาในการหมักไซโลสที่นาน เมื่อเพิ่มอัตราส่วนปริมาตรอิมัลชันต่อน้ำหมักเท่ากับ 1:4 โดยใช้ปริมาตรอิมัลชัน 150 มิลลิลิตร และปริมาตรน้ำหมัก 600 มิลลิลิตร (SLM-2) ซึ่งเป็นอัตราส่วนสูงสุดของระบบถังหมักเซลล์ตรึงที่ออกแบบไว้ เนื่องจากข้อจำกัดปริมาณขั้นต่ำของถังพักแบบกวนเท่ากับ 400 มิลลิลิตร จะเห็นว่าเมื่อเปลี่ยนอัตราส่วนปริมาตรอิมัลชันต่อน้ำหมัก จาก 1:10 เป็น 1:4 เท่า อัตราการจำเพาะของการใช้ไซโลส (q_s) เพิ่มขึ้นจาก 0.0044 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง เป็น 0.0107 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง อัตราจำเพาะของการผลิตไซลิทอล (q_p) เพิ่มขึ้นจาก 0.0017 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง เป็น 0.0056 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง และผลได้ไซลิทอล ($Y_{P/S}$) เพิ่มขึ้นจาก 0.31 กรัมต่อกรัม เป็น 0.49 กรัมต่อกรัม เนื่องจากการเพิ่มสัดส่วนพื้นที่ผิวอิมัลชันต่อปริมาตรน้ำหมัก อย่างไรก็ตาม ในการหมักไซโลสภายใต้สภาวะที่ให้อากาศอย่างเพียงพอ ที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำหมักมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ พบว่าหลังจากเวลาเพาะเลี้ยง 36 ชั่วโมง มีการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์อิสระซึ่งหลุดออกมาจากอิมัลชันค่อนข้างรวดเร็วภายใต้สภาวะที่ให้อากาศ เนื่องจากยีสต์จะใช้ไซโลสในสภาวะการ

เพาะเลี้ยงที่มีการให้ออกซิเจน (aerobic condition) ในการสร้างเซลล์ (Sirisansaneeyakul *et al.*, 1995) จากการทำงานที่สมบูรณ์ของกระบวนการหายใจของยีสต์ ทำให้ผลิตปริมาณของโคเอนไซม์ NAD^+ ได้เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์จำเพาะในการทำงานของเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส จึงส่งเสริมวิธีการใช้ไซโลสเพื่อสังเคราะห์เป็นมวลชีวภาพของเซลล์มากขึ้น (ภาพที่ 23) ส่งผลให้ไซลิทอลถูกผลิตและขับออกนอกเซลล์ลดน้อยลง ผลได้ไซลิทอลจากไซโลสจึงลดลงภายใต้สภาวะที่ให้อากาศ เพราะฉะนั้นทำให้การศึกษาการหมักไซโลสเพื่อผลิตไซลิทอลโดยเซลล์ยีสต์ด้วยเทคนิคอิมัลชันแบบวนกระทำได้ในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ เท่านั้น เนื่องจากภาวะการทำงานเสริมของเซลล์ยีสต์อิสระที่เพิ่มขึ้นแทนในระบบเซลล์ยีสต์ตรึงภายใต้สภาวะที่ให้อากาศอย่างเพียงพอ

ฉะนั้นจึงได้ทำการหมักไซโลสในระบบเซลล์ยีสต์ตรึงด้วยเทคนิคอิมัลชันภายใต้สภาวะที่จำกัดออกซิเจน โดยลดการให้อากาศลงในระหว่างการหมัก ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำหมักลงเท่ากับ 30 เปอร์เซ็นต์ ด้วยระบบการให้ก๊าซผสมระหว่างไนโตรเจนและอากาศดังการทดลอง SLM-3 ผลการทดลองพบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์อิสระลดลง ทำให้การหมักไซโลสด้วยระบบเซลล์ยีสต์ตรึงดังกล่าวมีเสถียรภาพเพิ่มขึ้นเป็น 120 ชั่วโมง จากระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ให้อากาศอย่างเพียงพอ ทำให้ค่าผลได้ของไซลิทอลจากไซโลสเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเป็น 0.52 กรัมต่อกรัม แต่อัตราจำเพาะของการใช้ไซโลสและการผลิตไซลิทอลลดลงเหลือเท่ากับ 0.0014 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง และ 0.0008 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 5) เนื่องจากอิทธิพลของปริมาณออกซิเจนที่มีต่อการสังเคราะห์ไซลิทอลจากความไม่สมดุลของปฏิกิริยารีดอกซ์ ซึ่งเกิดขึ้นในสภาวะขาดแคลนออกซิเจน (Sirisansaneeyakul *et al.*, 1995) ทำให้ยับยั้งกิจกรรมในกระบวนการหายใจของยีสต์ จึงมีการสะสมเพิ่มขึ้นของปริมาณโคเอนไซม์ NADH ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส และขัดขวางวิธีการเปลี่ยนไซลิทอลไปเป็นไซลูโลส ปริมาณไซลิทอลภายในเซลล์สะสมมากขึ้นและถูกขับออกนอกเซลล์ ดังวิธีการสร้างและสลายไซโลสของยีสต์ที่แสดงในภาพที่ 23 อย่างไรก็ตาม พบว่าการหมักไซโลสในสภาวะขาดแคลนออกซิเจน ถึงแม้ผลได้ของไซลิทอลจะเพิ่มขึ้นก็ตาม แต่อัตราจำเพาะของการใช้ไซโลสและการผลิตไซลิทอลกลับลดลง เนื่องจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับอัตราการขนส่งไซโลสเข้าสู่เซลล์และอัตราการใช้ไซโลสของยีสต์ต่ำกว่ากรณีของการใช้ไซโลสของยีสต์ภายใต้สภาวะที่ให้อากาศอย่างเพียงพอ



ภาพที่ 23 แบบจำลองของกระบวนการสร้างและสลายไซโลสเพื่อสังเคราะห์ไซลิตอลโดยยีสต์

Candida mogii ภายใต้ระบบการตรึงเซลล์แบบลิควิดิมัลชันเมมเบรน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Sirisansaneeyakul *et al.* (1995)

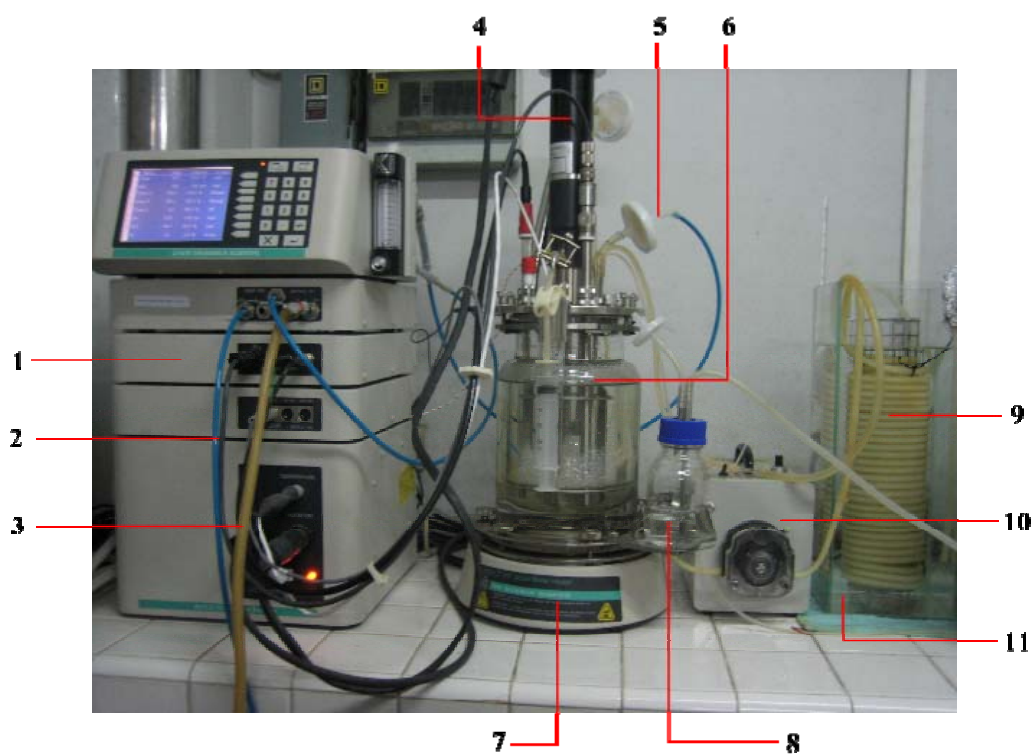
กรรมวิธีการผลิตไซลิตอลที่มีอัตราการผลิตไซลิตอลเชิงปริมาตรสูง สามารถทำได้ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ตรึงภายในลิควิดิมัลชันเมมเบรน จึงทดลองเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ตรึงขึ้นประมาณ 2.5 เท่า ภายใต้สภาวะการหมักที่จำกัดออกซิเจนด้วยการทดลอง SLM-4 พบว่าในการหมักไซโลส มีค่าอัตราการใช้ไซโลสเท่ากับ 0.0093 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราการผลิตไซลิตอลเท่ากับ 0.0055 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งไม่แตกต่างจากการหมักไซโลสในสภาวะเดียวกันแต่มีความเข้มข้นเซลล์ต่ำกว่า (SLM-3) เมื่อคำนวณอัตราจำเพาะการใช้ไซโลส และการผลิตไซลิตอล จึงมีค่าลดลงเหลือเท่ากับ 0.0006 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง และ 0.0004 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง ตามลำดับ โดยทั่วไปการประยุกต์ใช้เซลล์ตรึงมักประสบปัญหาเกี่ยวกับการขนส่งของสารผ่านสารตัวตรึง ในกรณีนี้แสดงให้เห็นชัดถึงปัญหาประสิทธิภาพของการแพร่ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลวของน้ำมัน ทำให้อัตราการใช้ไซโลสและอัตราการผลิตไซลิตอลต่ำกว่าระบบของเซลล์อิสระ ถึงแม้ปริมาณเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มจะเพิ่มมากขึ้น แต่อัตราการแพร่ของไซโลสที่เข้าสู่ภายในเฟสในมีอัตราคงที่ ดังนั้นอัตราการใช้ไซโลสจึงไม่เปลี่ยนแปลงมากนักแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของ

เซลล์สูงขึ้น เพราะฉะนั้นขั้นตอนการขนส่งไซโลสจากเฟสนอกผ่านเยื่อของเหลวเข้าสู่เฟสในของ ลิวคิวติคัลชั้นเมมเบรน จึงกลายเป็นขั้นตอนจำกัดปฏิกิริยาของการใช้ไซโลสในระบบของเซลล์ ยีสต์ครั้งนี้ นอกจากขั้นตอนของการใช้ไซโลสภายในเซลล์ยีสต์ภายใต้สภาวะการหมักที่จำกัด ออกซิเจนแล้ว จึงทำให้อัตราการผลิตไซลิทอลเชิงปริมาตรด้วยการเพิ่มปริมาณเซลล์ยีสต์ภายในเฟส ในไม่เพิ่มขึ้นตามที่คาดเอาไว้

การนำระบบการตรึงเซลล์ด้วยลิวคิวติคัลชั้นเมมเบรนมาใช้ในการหมักไซโลสเพื่อการผลิต ไซลิทอลดังผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่าความคงตัวของระบบสามารถแก้ไขได้ด้วยการใช้ วิธีการพองเซลล์ยีสต์ตรึงลิวคิวติคัลชั้นเมมเบรนบนท่อซิลิโคน แต่ยังคงประสบกับปัญหาของการ แพร่ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลว ทำให้อัตราการผลิตไซลิทอลจากไซโลสด้วยระบบเซลล์ ยีสต์ตรึงค่อนข้างต่ำแม้ว่าผลได้ไซลิทอลค่อนข้างดีก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจากลิวคิวติคัลชั้นเมมเบรนที่ เติบโตขึ้นมีคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และมีความหนืดสูงเพื่อรักษาสภาพความคงตัว ของเมมเบรนเอาไว้

ฉะนั้นระบบลิวคิวติคัลชั้นเมมเบรนห่อหุ้มเซลล์ยีสต์ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ภายใต้ข้อจำกัดของ การแพร่ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลวที่มีอยู่ สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการหมักได้โดยการเพิ่ม สัดส่วนปริมาณอิมัลชันต่อน้ำหมักและพื้นที่ผิวของเซลล์ยีสต์ตรึงภายใต้สภาวะการหมักที่ให้ อากาศอย่างเหมาะสม

เนื่องจากชั้นเมมเบรนของระบบลิวคิวติคัลชั้นเมมเบรนของน้ำมันถั่วเหลืองมีคุณสมบัติไม่ ชอบน้ำ (hydrophobic) จึงทำให้น้ำตาลไซโลสแพร่ผ่านเมมเบรนได้ไม่ดี ฉะนั้นการเลือกใช้ระบบ ไฮโดรเจลที่มีคุณสมบัติที่ชอบน้ำจะช่วยทำให้น้ำตาลไซโลสแพร่ผ่านได้ดียิ่งขึ้น จึงทำให้อัตราการ ใช้ไซโลสของเซลล์ตรึงไฮโดรเจลเพิ่มขึ้นได้ ดังการทดลองเบื้องต้นของการใช้ไฮโดรเจลห่อหุ้ม เซลล์ยีสต์เพื่อผลิตไซลิทอล ดังภาคผนวก จ ที่มีอัตราการใช้ไซโลสเท่ากับ 0.1558 กรัมต่อลิตรต่อ ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าอัตราการใช้ไซโลสในระบบเซลล์ตรึงลิวคิวติคัลชั้นเมมเบรน (SLM-2) 3.7 เท่า (ตารางที่ 5)



ภาพที่ 24 ระบบถังหมักเซลล์ยีสต์รีงแบบลิควิดอิมัลชันเมมเบรน

(1) หน่วยควบคุมอัตโนมัติ (2) ท่ออากาศเข้า (3) ท่อไนโตรเจนเข้า (4) มอเตอร์ (5) ท่อก๊าซผสมเข้า (6) ถังพักแบบกวน (7) แผ่นแลกเปลี่ยนความร้อน (8) ขวดเก็บต่างควบคุมพีเอช (9) ท่อซิลิโคนเคลือบภายในด้วยลิควิดเมมเบรนหุ้มเซลล์ยีสต์ (10) เครื่องสูบลมวนเวียนน้ำหมัก (11) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

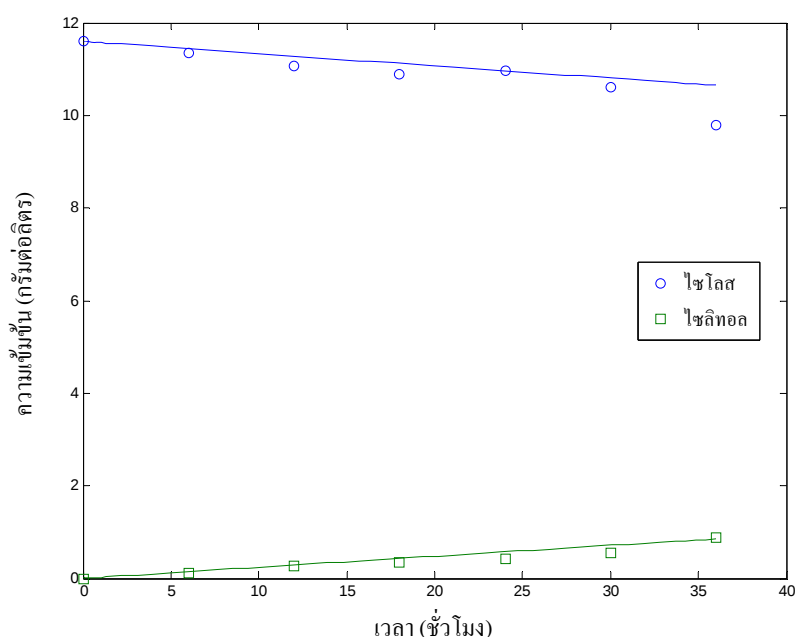
3. การประมาณค่าพารามิเตอร์และการเลียนแบบการหมัก

จากการศึกษาการสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิตไซลิทอลจากไซโลสแบบบีคส์รีหมักวนเวียนน้ำหมัก ในระบบถังหมักเซลล์ยีสต์ตรึงลิกวิดิมัลชันเมมเบรน รายละเอียดแสดงไว้ในภาคผนวก ง เมื่ออาศัยผลจากการทดลอง SLM-2 ในการประมาณค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ตามสมการที่ 1 และ 2 ซึ่งอธิบายถึงการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไซโลสและไซลิทอลในน้ำหมัก (เฟสนอก) โดยอาศัยกล่องเครื่องมือ Optimization toolbox[®] ในโปรแกรม MATLAB[™] ในการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงตัวเลขได้ค่าพารามิเตอร์ที่เหมาะสมที่สุดสรุปดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการหมักไซลิทอลด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงลิกวิดิมัลชันเมมเบรน

พารามิเตอร์	ค่าพารามิเตอร์
r_{xyl}^m (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	1.00
K_{xyl} (กรัมต่อลิตร)	10.00
$Y_{P/S}$ (กรัมต่อกรัม)	0.90
η	0.20

หมายเหตุ พารามิเตอร์ที่ได้จากการประมาณค่าด้วยโปรแกรม MATLAB[™]



ภาพที่ 25 การเปรียบเทียบผลการทดลองแสดงความเข้มข้นของไชโลส (○) และไชลิตอล (□)
(การทดลอง SLM-2) กับแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (เส้น) (ภาคผนวก ง)

ภาพที่ 25 แสดงการเปรียบเทียบผลการทดลองและค่าที่คำนวณได้จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ พบว่ามีความสอดคล้องกันเป็นอย่างดี แสดงว่าแบบจำลองการหมักแบบ Plug flow สามารถประยุกต์ใช้กับการหมักไชลิตอลด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงลิควิดิมัลชันเมมเบรนที่พองด้วยท่อซิลิโคน โดยนิยามค่า effectiveness factor (η) หมายถึง อัตราการใช้ไชโลสภายใต้ผลของภาวะจำกัดของการแพร่ต่ออัตราการใช้ไชโลสเมื่อไม่มีผลจากภาวะจำกัดของการแพร่ กรณีที่การแพร่เกิดขึ้นได้ดี η จะมีค่าเข้าใกล้ 1 แต่ถ้ามีผลของภาวะจำกัดของการแพร่หรือการแพร่เกิดขึ้นได้ไม่ดี ค่า η จะน้อยกว่า 1 จากค่าพารามิเตอร์ที่ประมาณค่าได้ในตารางที่ 6 จะเห็นว่าค่า η มีค่าประมาณ 0.20 ซึ่งมีค่าน้อย แสดงให้เห็นชัดเจนถึงขั้นตอนจำกัดของการแพร่ที่มีผลต่ออัตราการใช้ไชโลสของเซลล์ที่ถูกห่อหุ้มไว้ในลิควิดิมัลชันเมมเบรน

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาถึงระบบการห่อหุ้มเซลล์ยีสต์แบบลิวติคิมัลชันเมมเบรน ซึ่งเป็นแนวทางใหม่ในการสร้างระบบการตรึงเซลล์เพื่อใช้ในกระบวนการทางชีวภาพ เป้าหมายเพื่อเป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่นอกเหนือจากระบบเซลล์ตรึงแบบเดิมที่ใช้กันอยู่ และเพื่อเป็นการพัฒนาสู่กระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมด้วยการประยุกต์ใช้วัสดุที่ปลอดภัย ง่าย และราคาถูก จากการพัฒนาระบบลิวติคิมัลชันเมมเบรนห่อหุ้มเซลล์ยีสต์ *Candida mogii* ATCC 18364 เพื่อใช้ในกระบวนการหมักไซโลสเพื่อผลิตไซลิทอล ได้ศึกษาระบบลิวติคิมัลชันเมมเบรน 2 ชนิด คือ ลิวติคิมัลชันเมมเบรนของพาราฟินเหลว และน้ำมันถั่วเหลือง ในระบบอิมัลชันของพาราฟินเหลว เลือกใช้สารลดแรงตึงผิว span 80 เป็นตัวทำอิมัลชันในเฟสเมมเบรน และใช้สารลดแรงตึงผิวผสมของ tween 40 และ span 80 ในเฟสนอก เพื่อทำให้อิมัลชันกระจายเป็นเม็ดที่คงตัว พบว่าความเข้มข้นของ span 80 ที่เหมาะสมคือ 6 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (6 กรัม span 80 ต่อ 100 มิลลิลิตร ของเฟสเมมเบรน) ความเข้มข้นสารลดแรงตึงผิวผสมที่เหมาะสมคือ 0.4 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (0.4 กรัม สารลดแรงตึงผิวผสม tween 40 และ span 80 ต่อ 100 มิลลิลิตร ของเฟสนอก) อย่างไรก็ตาม เมื่อทดลองความสามารถในการแพร่ของไซโลส พบว่าไซโลสแพร่ผ่านเยื่อเมมเบรนเหลวของพาราฟินได้น้อยมาก จึงทำการศึกษาระบบอิมัลชันของน้ำมันถั่วเหลืองเปรียบเทียบ โดยใช้ลาโนลินเป็นตัวทำอิมัลชันและใช้ไมโครเวกซ์เป็นสารช่วยเพิ่มความคงตัว พบว่าที่ความเข้มข้นของลาโนลิน 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (5 กรัม ลาโนลิน ต่อ 100 มิลลิลิตร ของเฟสใน) และไมโครเวกซ์มากกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (4 กรัม ไมโครเวกซ์ ต่อ 100 มิลลิลิตร ของเฟสเมมเบรน) สามารถทำให้อิมัลชันของน้ำมันถั่วเหลืองคงตัวได้มากกว่า 7 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาเพียงพอสำหรับการตรึงเซลล์ยีสต์เพื่อใช้ผลิตไซลิทอล นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มอัตราส่วนปริมาตรของน้ำมันต่อน้ำ (เฟสเมมเบรนต่อเฟสใน) ได้สูงถึง 1:2.5 ในการทดลองหาค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (permeability coefficient; P) ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลวของน้ำมันถั่วเหลืองโดยแปรผันความเข้มข้นของไมโครเวกซ์ 5 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าที่อัตราส่วนปริมาตรน้ำมันต่อน้ำเท่ากับ 1:0.67 ได้ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (P) เท่ากับ 4.72×10^{-7} 3.31×10^{-7} และ 1.34×10^{-7} เมตรต่อวินาที ตามลำดับ ถ้าเพิ่มอัตราส่วนปริมาตรน้ำมันต่อน้ำเท่ากับ 1:2 ได้ค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (P) เท่ากับ 6.37×10^{-7} 4.76×10^{-7} และ 4.33×10^{-7}

เมตรต่อวินาที ตามลำดับ แสดงว่าการเพิ่มปริมาณไมโครเวกซ์และการลดอัตราส่วนปริมาตรน้ำมันต่อน้ำมันมีผลทำให้อัตราการแพร่ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลวของน้ำมันถั่วเหลืองลดลง

สรุปเลือกใช้ระบบลิกวิดอิมัลชันเมมเบรนของน้ำมันถั่วเหลืองภายใต้สภาพการเตรียมที่เหมาะสม คือ ความเข้มข้นของไมโครเวกซ์ในเฟสเมมเบรน 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและความเข้มข้นของลาโนลินในเฟสใน 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อัตราส่วนปริมาตรเฟสเมมเบรนต่อเฟสในเท่ากับ 1:2 ใช้ตรึงเซลล์ยีสต์ *C. mogii* เพื่อใช้หมักไซลิทอลโดยใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ควบคุม พีเอช 6 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ออกแบบถังหมักเซลล์ยีสต์ตรึงลิกวิดอิมัลชันเมมเบรนที่พวยด้วยท่อซิลิโคน (Silicone tubular loop reactor) โดยใช้ลิกวิดอิมัลชันปริมาตร 100 มิลลิลิตร ตรึงเซลล์ยีสต์ประมาณ 4 กรัม เคลือบอิมัลชันที่ห่อหุ้มเซลล์ยีสต์บนผิวด้านในของท่อซิลิโคนความยาว 15 เมตร ทำการหมักแบบเบ็ดเสร็จที่มีการหมุนเวียนน้ำหมักในถังพักแบบกวนขนาด 2 ลิตร ที่มีการควบคุมพีเอช อุณหภูมิและการละลายของออกซิเจน ปริมาตรน้ำหมัก 1000 มิลลิลิตร (เฟสนอก) ในอัตราส่วนปริมาตรอิมัลชันต่อน้ำหมักเท่ากับ 1:10 ภายใต้สภาวะที่ให้อากาศอย่างเพียงพอ (ปริมาณออกซิเจนละลายมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์) ได้ผลได้ไซลิทอล ($Y_{P/S}$) และอัตราการผลิตไซลิทอล ($\frac{dC_{xyt}}{dt}$) เท่ากับ 0.31 กรัมต่อกรัม และ 0.0078 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อลดอัตราส่วนปริมาตรอิมัลชันต่อน้ำหมักเป็น 1:4 โดยใช้ปริมาตรของลิกวิดอิมัลชันต่อน้ำหมักเท่ากับ 150 และ 600 มิลลิลิตร ตามลำดับ ได้ผลได้ไซลิทอลและอัตราการผลิตไซลิทอลเพิ่มขึ้นเท่ากับ 0.49 กรัมต่อกรัม และ 0.0216 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ แต่เมื่อทำการหมักภายใต้สภาวะที่ให้อากาศอย่างจำกัด (ปริมาณออกซิเจนละลายประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์) ได้ผลได้ไซลิทอลเพิ่มขึ้นเท่ากับ 0.52 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิตไซลิทอลลดลงเท่ากับ 0.0050 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จะเห็นว่าผลได้ไซลิทอลเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่อัตราจำเพาะของการใช้ไซโลสและการผลิตไซลิทอลกลับลดลง เมื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ยีสต์ตรึงในลิกวิดอิมัลชันเมมเบรนขึ้นประมาณ 2.5 เท่า จากความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 6.2 กรัม เป็น 15.31 กรัม และทำการหมักภายใต้สภาวะที่ให้อากาศอย่างจำกัดดังกล่าว ได้ผลได้ไซลิทอลและอัตราการผลิตไซลิทอลเท่ากับ 0.52 กรัมต่อกรัม และ 0.0055 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มปริมาณเซลล์ยีสต์ตรึงในลิกวิดอิมัลชันเมมเบรนภายใต้สภาวะของการหมักที่ให้อากาศอย่างจำกัด ไม่สามารถเพิ่มอัตราการใช้ไซโลสและการผลิตไซลิทอลได้ แสดงให้เห็นชัดถึงขั้นตอนจำกัดของการแพร่ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลว ทำให้จำกัดขั้นตอนการใช้ไซโลสและการผลิตไซลิทอลของเซลล์ยีสต์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยลิกวิดอิมัลชันเมมเบรน

ข้อเสนอแนะ

การนำระบบลิกวิดอิมัลชันเมมเบรนมาประยุกต์ใช้ห่อหุ้มเซลล์ยีสต์ เพื่อใช้ในกระบวนการหมักไซโลสเพื่อผลิตไซลิทอล ประสบปัญหา 2 ประการ คือ ความคงตัวของอิมัลชัน และการแพร่ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลวของน้ำมัน ความคงตัวของอิมัลชันสามารถแก้ไขได้ด้วยวิธีการพองด้วยวัสดุของแข็ง ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้วิธีเคลือบอิมัลชันไว้บนผิวภายในของท่อซิลิโคน ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพในการรักษาความคงตัวของอิมัลชันไว้ได้เป็นระยะเวลานาน และให้พื้นที่ผิวสัมผัสสูง และมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าการใช้ตัวพองของแข็งอย่างเช่น hollow fiber และ flat sheet เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ปัญหาการแพร่ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลวของน้ำมันยังคงเป็นปัญหาสำคัญ ดังจะเห็นได้จากผลการทดลองว่าไซโลสสามารถแพร่ผ่านเยื่อเมมเบรนเหลวของน้ำมันถั่วเหลืองยังไม่ได้ จึงเป็นขั้นตอนจำกัดของการหมักไซโลสเพื่อผลิตไซลิทอล ซึ่งอาจแก้ไขได้ด้วยอาศัยการเติมตัวพา (carriers) ของน้ำตาลไซโลสในชั้นของเฟสเมมเบรน ตัวอย่างตัวพาที่ใช้ในการแยกและสกัดน้ำตาล ได้แก่ methyl cholate (Hassoune *et al.*, 2006), boronic acid และเกลือ quaternary ammonium (Lee, 2005) แต่ความสามารถในการแพร่ของน้ำตาลโดยตัวพายังขึ้นอยู่กับชนิดและความหนืดของเฟสเมมเบรน ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องศึกษาต่อไป

ระบบลิกวิดอิมัลชันเมมเบรนของน้ำมันถั่วเหลืองที่มีไมโครเวกซ์เป็นสารช่วยเพิ่มความคงตัวและมีลานอลีนเป็นตัวทำอิมัลชัน การนำระบบนี้มาใช้ในการห่อหุ้มเซลล์เพื่อใช้ในการหมักไซโลสเพื่อผลิตไซลิทอลยังมีประสิทธิภาพต่ำ เนื่องจากข้อจำกัดของการแพร่ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลวของน้ำมัน เพราะไซโลสเป็นสารที่ละลายในตัวทำละลายที่มีขั้ว หรือชอบน้ำ (hydrophilic) ส่วนเฟสเมมเบรนเป็นน้ำมันค่อนข้างไม่มีขั้วหรือไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) อย่างไรก็ตาม ระบบนี้อาจจะเหมาะสมและสามารถนำไปใช้ในกระบวนการทางชีวภาพอื่นที่สารที่สนใจสามารถละลายได้ในตัวทำละลายไม่มีขั้ว อาทิ การประยุกต์ใช้ในการบำบัดน้ำเสียที่มีสารประกอบของฟีนอล (Venkateswaran and Palanivelu, 2006; Park, 2006) หรือสีย้อม (Muthuraman and Palanivelu, 2006) เนื่องจากสารเคมีเหล่านี้สามารถละลายได้ทั้งในตัวทำละลายที่มีขั้วและไม่มีขั้ว นอกจากนี้การออกแบบถึงปฏิกรณ์ชีวภาพที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวการทำงานของระบบเซลล์ตรึงลิกวิดอิมัลชันเมมเบรนบนวัสดุพองของแข็ง อาทิ ถึงปฏิกรณ์แบบถังหยด (Trickling Filter) จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพอัตราการผลิตชีวภัณฑ์ได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

มนัส สังวรศิลป์ และ วรัตน์ ภัทรอมรกุล. 2543. คู่มือการใช้งาน MATLAB ฉบับสมบูรณ์.
สำนักพิมพ์ อินโฟเพรส, นนทบุรี.

พิมพ์ร ลีลาพรพิสิฐ. 2534. อิมัลชันทางเครื่องสำอาง. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

วรสิทธิ์ โทจำปา. 2541. การผลิตไซลิทอลโดยการหมักบนเยื่อเซลล์ด้วย hollow fibers.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สาโรจน์ สิริคันสนียกุล. 2547. เทคโนโลยีชีวภาพอาหาร การหมัก และสิ่งแวดล้อม.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ ฯ.

Alder, L. and L. Gustafsson. 1980. Polyhydric alcohol production and intracellular amino acid
pool in relation to halotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. **Arch. Microbiol.**
124: 123-130.

Boyd, J., C. Parkinson and P. Sherman. 1972. Factors affecting emulsion stability and the HLB
concept. **J. Colloid Interface Sci.** 41(2): 359-370.

Cavalho, W., S.S. Silva, J.C. Santos and A. Converti. 2003. Xylitol production by ca-alginate
entrapped cells comparison of different fermentation systems. **Enzyme Microb.**
Technol. 32: 552-559.

Davis, H.T. 1994. Factor determining emulsion type: hydrophile-lipophile balance and beyond.
Colloids Surf. 91: 9-24.

Deschatelets, L. and E.K.C. Yu. 1986. A simple pentose assay for biomass conversion study.

Appl. Microbiol. Biotechnol. 24: 379-397.

Dickinson, E. and G. Stainsby. 1982. **Colloid in Food.** Applied Science Publishers, London.

Dominguize, J.M. 1998. Xylitol production by free and immobilized *Debaryomyces hansenii*.

Biotechnol. Lett. 20(1): 53-56.

Emodi, A. 1978. Xylitol its properties and food applications. **Food Technol.** Jan.: 28-32.

Fox, C. 1974. Cosmetic emulsion. In K.J. Lissant, ed. **Emulsion and Emulsion Technology**

Part 2. Mercel Dekker, New York.

Griffin, W.C. and M.J. Lynch. 1972. Surface active agents, pp. 397-429. In T.E. Furia, ed.

Hanbook of Food Additives, 2nd ed. CRC Press, Ohio.

Hann-Hagerdal, B., H. Jeppsson, K. Skoog and B.A. Prior. 1994. Biochemistry and physiology

of xylose fermentation by yeast. **Enzyme Microb. Technol.** 16: 933-943.

Hassoune, H., T. Rhlalou, M. A. Frouji, C. Chappey and J. F. Verchere. 2006. Application of

supported liquid membranes containing methyl cholate in cyclohexane for the carrier-mediated transport of sugars. **Desaltlnation** 189: 31-42.

Horitsu , H., Y. Yahashi, K. Takamizawa, K. Kawai, T. Suzuki and N. Watanabe. 1992.

Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis* optimization of production rate. **Biotechnol. Bioeng.** 40: 1085-1091.

Hou, W. and K.D. Papadopoulos. 1997. W1/O/W2 and O1/W/O2 globules stabilized with span

80 and tween 80. **Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.** 125: 181-187.

Cited C. Fox. 1986. **Cosmetics Toiletries.** n.p.

- Kedari, C.S., S.S. Pandit, S.K. Misra and A. Ramanujam. 2001. Mass transfer mechanism of the carrier-facilitated transport of uranium (VI) across 2-ethylhexyl phosphonic acid mono-2-ethylhexyl ester immobilized liquid membranes. **Hydrometallurgy** 62: 47-45.
- Kulkarni, P.S. and V.V. Mahajani. 2002. Application of liquid emulsion membrane (LEM) process for enrichment of molybdenum from aqueous solutions. **J. Membr. Sci.** 201: 123-135.
- Lee, S. C. and H. K. Lee. 2005. Development of an emulsion liquid membranes system for extraction of a neutral species. **J. Membr. Sci.** 246: 13-19.
- Li, M., Z.Q. Zhu, Y.T. Wu and D.Q. Lin. 1998. Measurement of phase diagrams for new aqueous two phase systems and prediction by a generalized multicomponent osmotic virial equation. **Chem. Eng. Sci.** 53(15): 2755-2767.
- Li, N.N. 1968. U.S. Patent 3,410,794.
- Mattila, P.T., M.J. Svanberg, T. Jamsa and M.L.E. Knuuttila. 2002. Improved bone biochemical properties in xylitol-fed aged rats. **Metabolism** 51(1): 92-96.
- McClements, D.J. 1999. **Food Emulsion: Principle Practice and Techniques**. CRC Press LLC, Florida.
- Mohan, R.R. and N.N. Li. 1975. Nitrate and nitrite reduction by liquid membrane encapsulated whole cells. **Biotechnol. Bioeng.** 17: 1137-1156.
- Muthuraman, G. and K. Palanivelu. 2006. Transport of textile dye in vegetable oils based supported liquid membrane. **Dyes and Pigments** 70: 99-104.

- Pal, P., S. Datta and P. Bhattacharya. 2000. Study on modeling and simulation of a sequential bienzymatic reaction system immobilized in emulsion liquid membrane. **Biochem. Eng.** 5: 89-100.
- _____ and _____. 2002. Multi-enzyme immobilization in eco-friendly emulsion liquid membrane reactor a new approach to membrane formulation. **Sep. Purif. Technol.** 27: 145-154.
- Parajo, J. C., H. Dominguez and J. M. Dominguez. 1998a. Biotechnological production of xylitol. part 1: interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Biores. Technol.** 66: 191-201
- _____, _____ and _____. 1998b. Biotechnological production of xylitol. part 3: operation in culture media made from lignocellulos hydrolysates. **Biores. Technol.** 66: 25-40.
- Park, Y., A. H. P Skelland, L. J. Forney and J. H. Kim. 2006. Removal of phenol and substituted phenols by newly developed emulsion liquid membrane process. **Water Research** 40: 1763-1772.
- Patnaik, P.R. 1995. Liquid emulsion membrane principle problems and applications in fermentation process. **Biotechnol. Adv.** 13(2): 175-208.
- Pepper, T. and P.M. Olinger. 1988. Xylitol in sugar free confection. **Food Technol.** 42: 98-104.
- Prichanont, S., D.J. Leak and D.C. Stuckey. 2000. The solubilization of mycobacterium in water in oil microemulsion for biotransformations: system selection and characterisation. **Colloids and Surfaces A: Physiochem. Eng. Aspects** 166: 177-186.

Richardson, J.F. and D.G. Peacock. 1994. **Chemical Engineering Vol. 3 (Chemical & Biochemical Reactor & Process Control)**. 3rd ed. Pergamon Press, USA.

Sayed, M.S.E. 2003. Uranium extraction from gatta sulfate leach liquor using aliquat-336 in a liquid emulsion membrane process. **Hydrometallurgy** 68: 51-56.

Shuler, M.L. and F. Kargi. 2002. **Bioprocess Engineering Basic Concepts**. 2nd ed. Prentice Hall PTR, United States of America.

Silva, S.S., J.C. Santos, W. Carvalho, K.K. Aracava and M. Vitolo. 2003. Use of a fluidized bed reactor operated in semi-continuous mode for xylose to xylitol conversion by *Candida guilliermondii* immobilized on porous glass. **Process Biochem.** 38: 903-907.

Sirisansaneeyakul, S., M. Staniszewski and M. Rizzi. 1995. Screening of yeast for production of xylitol from D-xylose. **J. Ferment. Bioeng.** 80(6): 565-570.

Tochampa, W. 2004. **Matlab Tutorial & Applications in Biotechnology**. Naresuan University. (Unpublished manuscript)

Uhari, M., T. Tapiainen and T. Kontiokari. 2000. Xylitol in preventing acute otitis media. **Vaccine** 19: 144-147.

Venkateswaran, P. and K. Palanivelu. 2006. Recovery of phenol from aqueous solution by supported liquid membrane using vegetable oils as liquid membrane. **J. Hazardous Material B** 131: 146-152.

Yahashi, Y., M. Hatsu, H. Horisu, K. Kawai, T. Suzuki and K. Takamizawa. 1996. D-glucose feeding for improvement of xylitol productivity from D-xylose using *Candida tropicalis* immobilized on non-woven fabric. **Biotechnol. Lett.** 18(12): 1395-1400.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ข้อมูลจากการทดลอง

ตารางผนวกที่ ก1 การเปลี่ยนแปลงพีเอชตามเวลาและเปอร์เซ็นต์การรั่ว ในการทดสอบความคงตัวของอิมัลชันที่ ความเข้มข้นของ span 80 ตั้งแต่ 2-8 เปอร์เซนต์

เวลา (นาทึ)	พีเอช						
	ความเข้มข้นของ span 80 (เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)						
	2	3	4	5	6	7	8
0	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
5	8.05	7.85	8.18	7.95	7.95	8.45	8.40
10	8.60	8.55	8.60	8.45	8.35	8.85	8.85
15	8.85	8.80	8.78	8.63	8.45	9.00	9.00
20	8.95	8.90	8.88	8.70	8.40	9.10	9.05
25	9.00	8.90	8.95	8.75	8.25	9.15	9.05
30	9.00	8.80	8.98	8.73	8.18	9.18	9.03

เวลา (นาทึ)	เปอร์เซ็นต์การรั่ว (%L)						
	ความเข้มข้นของ span 80 (เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)						
	2	3	4	5	6	7	8
0	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
5	0.022	0.014	0.030	0.018	0.018	0.056	0.050
10	0.080	0.071	0.080	0.056	0.045	0.142	0.142
15	0.142	0.126	0.121	0.085	0.056	0.200	0.200
20	0.178	0.159	0.152	0.100	0.050	0.252	0.224
25	0.200	0.159	0.178	0.112	0.036	0.283	0.224
30	0.200	0.126	0.191	0.107	0.030	0.303	0.214

ตารางผนวกที่ ก2 อัตราการรั่วเริ่มต้น ที่ความเข้มข้นของ span 80 ตั้งแต่ 2-8 เปอร์เซ็นต์

ความเข้มข้น span 80 (เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)	อัตราการรั่วเริ่มต้น (%L/นาทีก)
2	0.0087
3	0.0085
4	0.0067
5	0.0047
6	0.0038
7	0.0105
8	0.0119

หมายเหตุ การประมาณค่าอัตราการรั่วเริ่มต้นจากภาพผนวกที่ ก1

ตารางผนวกที่ ก3 การเปลี่ยนแปลงค่าฟิโอะตามเวลาและเปอร์เซ็นต์การรั่ว ในการทดสอบความคงตัวของอิมัลชันที่ความเข้มข้นของ tween 40 ตั้งแต่ 0-0.375 เปอร์เซ็นต์

เวลา (นาที)	ฟิโอะ					
	ความเข้มข้นของ tween 40 (เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)					
	0	0.075	0.150	0.225	0.300	0.375
0	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00	7.00
5	7.90	8.45	8.48	8.48	8.6	8.88
10	8.25	8.58	8.65	8.78	8.8	9.03
15	8.4	8.53	8.6	8.83	8.83	9.03
20	8.48	8.45	8.5	8.85	8.75	8.95

เวลา (นาที)	เปอร์เซ็นต์การรั่ว (%L)					
	ความเข้มข้นของ tween 40 (เปอร์เซ็นต์)					
	0	0.075	0.150	0.225	0.300	0.375
0	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002	0.002
5	0.016	0.056	0.060	0.060	0.080	0.152
10	0.036	0.076	0.089	0.121	0.126	0.214
15	0.050	0.068	0.080	0.135	0.135	0.214
20	0.060	0.056	0.063	0.142	0.112	0.178

ตารางผนวกที่ ก4 อัตราการรั่วเริ่มต้น ที่ความเข้มข้นของ tween 40 ตั้งแต่ 0-0.375 เปอร์เซ็นต์

ความเข้มข้น tween 40 (เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)	อัตราการรั่วเริ่มต้น (%L/นาทีก)
0	0.0033
0.075	0.0074
0.150	0.0087
0.225	0.0119
0.300	0.0124
0.375	0.0212

หมายเหตุ การประมาณค่าอัตราการรั่วเริ่มต้นจากภาพผนวกที่ ก2

ตารางผนวกที่ ก5 การเปลี่ยนแปลงพีเอชตามเวลาและเปอร์เซ็นต์การรั่ว ในการทดสอบความคงตัวของอิมัลชัน ที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวผสม tween 40 และ span 80 ตั้งแต่ 0.1-0.6 เปอร์เซ็นต์

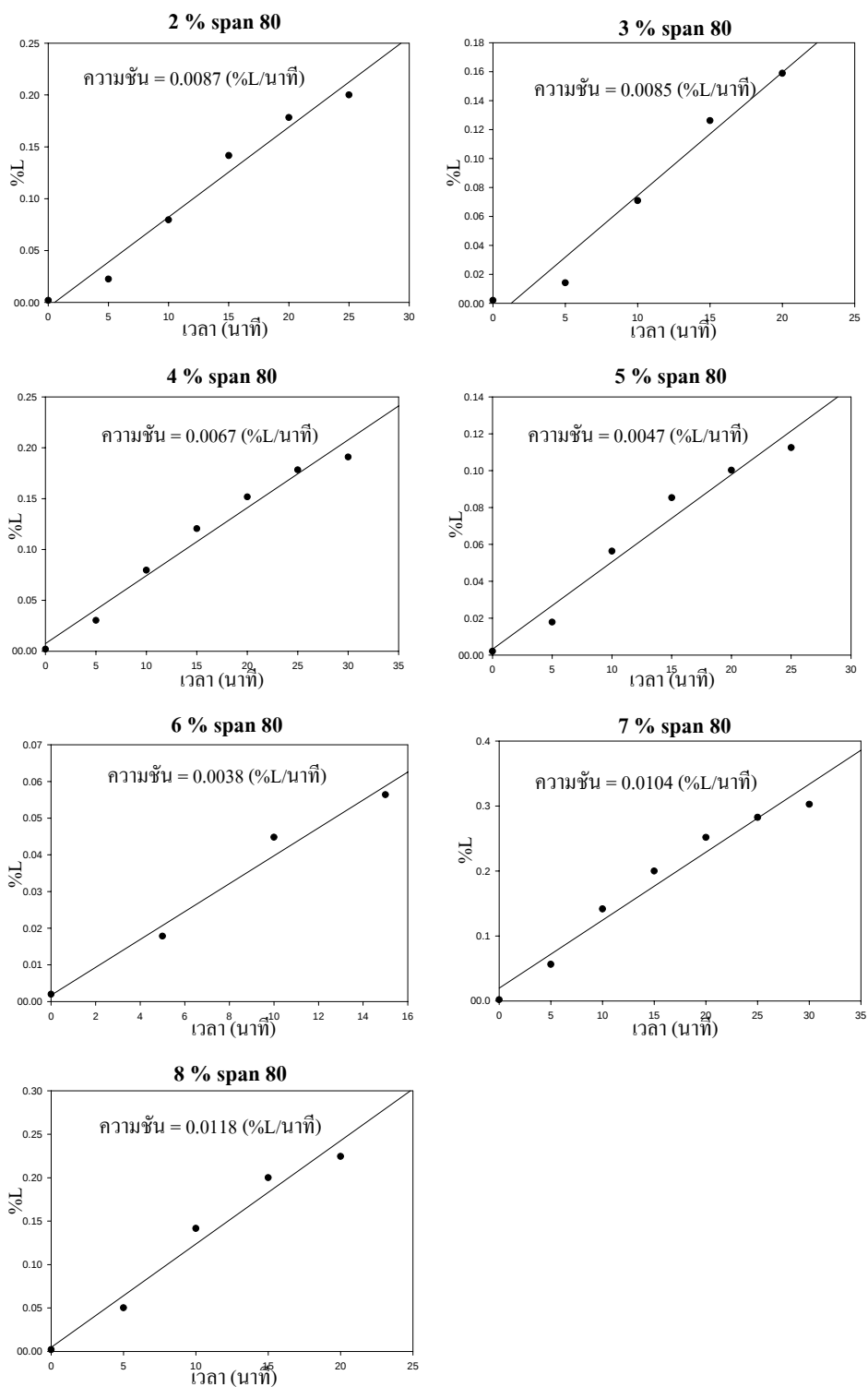
เวลา (นาที)	พีเอช					
	สารลดแรงตึงผิวผสม (เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)					
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
0	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50
5	8.20	7.93	7.68	7.00	7.00	7.00
10	8.50	8.38	8.25	7.95	8.15	7.90
15	8.55	8.40	8.23	8.08	8.38	8.10
20	8.53	8.40	8.10	8.05	8.43	8.15

เวลา (นาที)	เปอร์เซ็นต์การรั่ว (%L)					
	สารลดแรงตึงผิวผสม (เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)					
	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6
0	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006	0.0006
5	0.0320	0.0170	0.010	0.0020	0.0020	0.0020
10	0.0630	0.0480	0.0360	0.0180	0.0280	0.0160
15	0.0710	0.050	0.0340	0.0240	0.0480	0.0250
20	0.0680	0.050	0.0250	0.0220	0.0540	0.0280

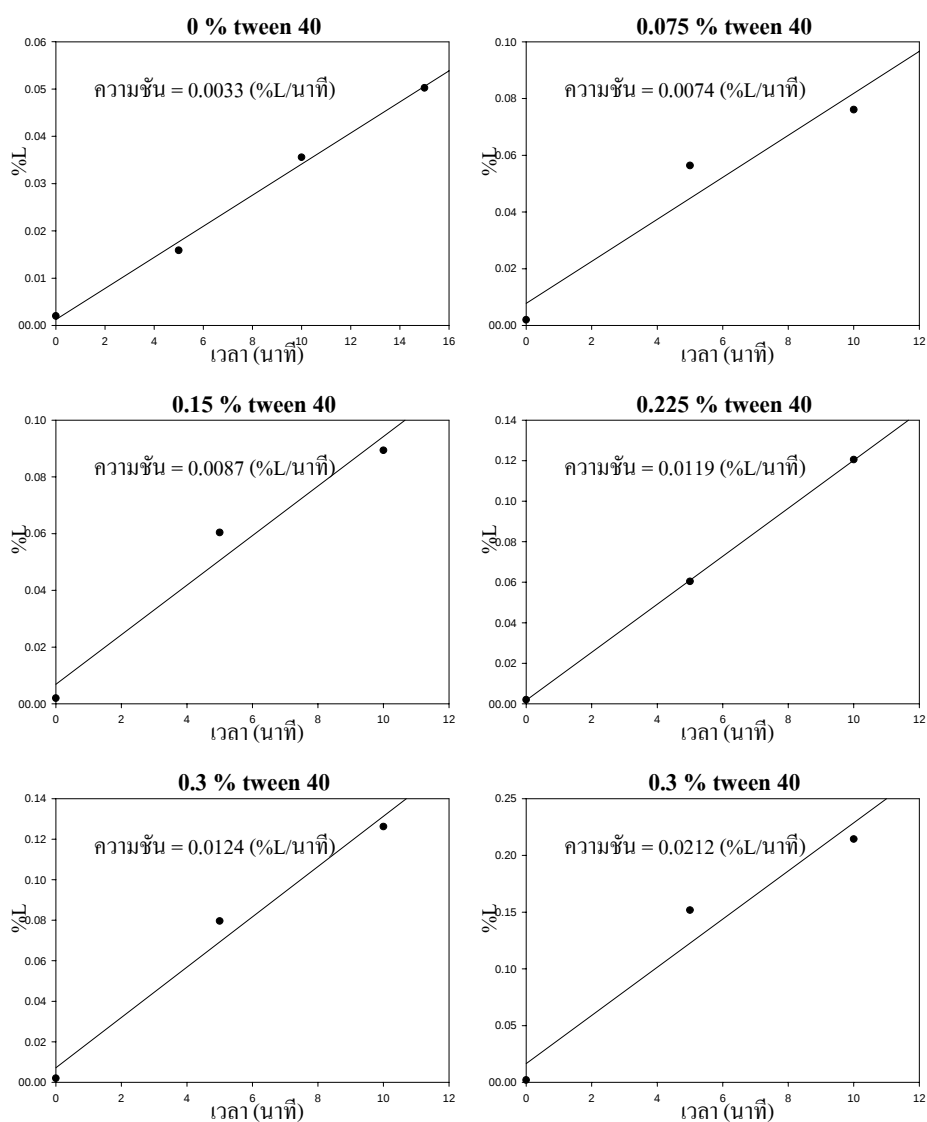
ตารางผนวกที่ ก6 อัตราการรั่วเริ่มต้น ที่ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวผสม tween 40 และ span 80 ตั้งแต่ 0.1-0.6 เปอร์เซ็นต์

สารลดแรงตึงผิวผสม (เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)	อัตราการรั่วเริ่มต้น (%L/นาท)
0.1	0.0063
0.2	0.0047
0.3	0.0035
0.4	0.0017
0.5	0.0030
0.6	0.0018

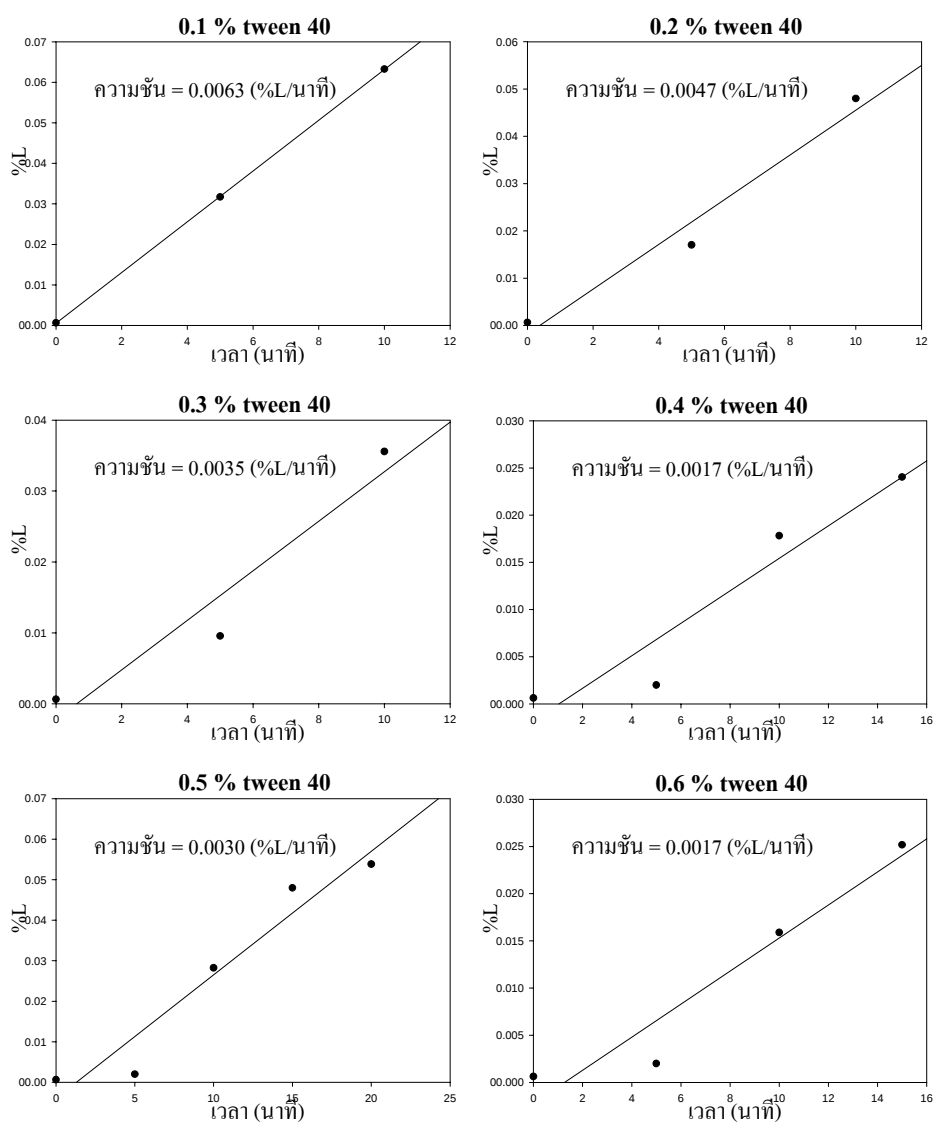
หมายเหตุ การประมาณค่าอัตราการรั่วเริ่มต้นจากภาพผนวกที่ ก3



ภาพผนวกที่ ก1 การประมาณอัตราการรื้อเริ่มต้นแปรผันตามความเข้มข้นของ span 80



ภาพผนวกที่ ก2 การประมาณอัตราการร่วเริ่มต้นแปรผันตามความเข้มข้นของ tween 40



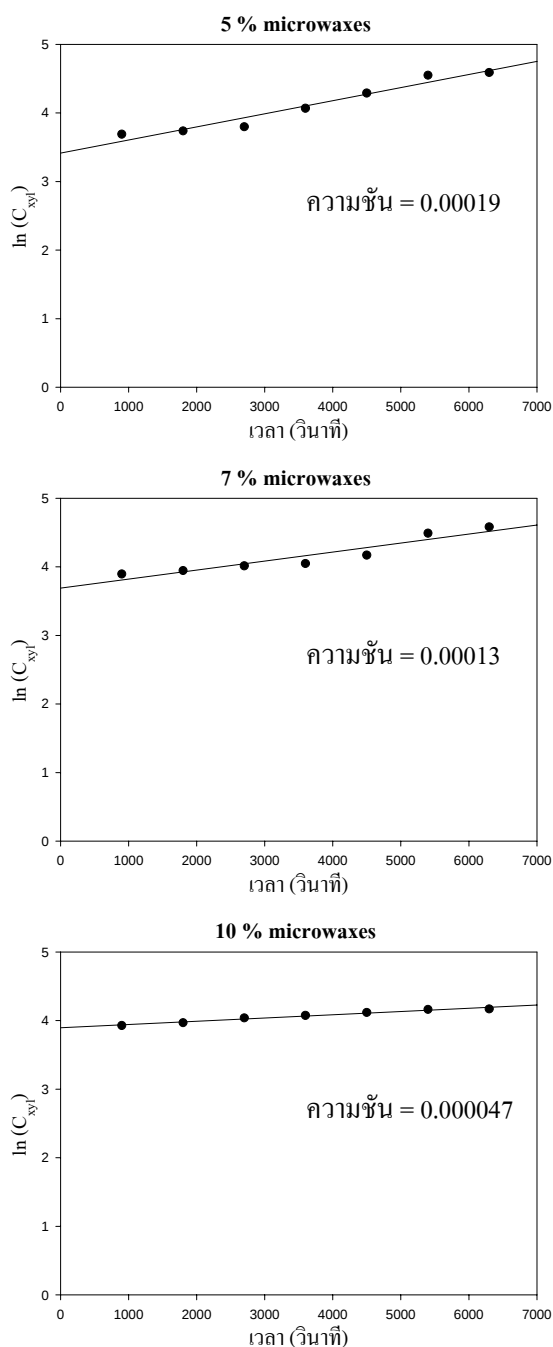
ภาพผนวกที่ ก3 การประมาณอัตราการรั่วเริ่มต้นแปรผันตามความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิว
ผสม tween 40 และ span 80

ตารางผนวกที่ ก7 การแพร่ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลวของระบบน้ำมันถั่วเหลือง ที่ อัตราส่วนปริมาตรน้ำมันและน้ำเท่ากับ 1:0.67 (เฟสเมมเบรนต่อเฟสใน)

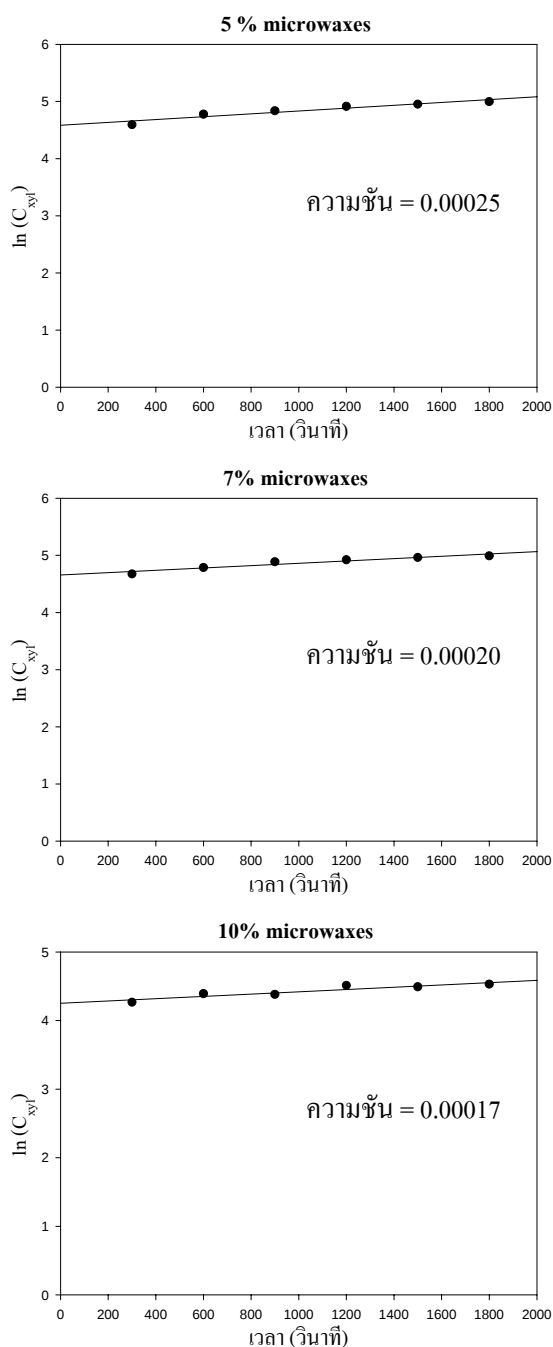
เวลา (วินาที)	ไซโลส (กรัมต่อลูกบาศก์เมตร)		
	ไมโครแวกซ์ (เปอร์เซ็นต์)		
	5	7	10
0	19.01	14.30	41.67
900	39.99	49.12	50.75
1800	41.96	51.61	52.88
2700	44.58	55.34	56.62
3600	58.35	57.21	58.76
4500	72.77	64.67	61.43
5400	94.41	88.92	64.10
6300	98.34	97.62	64.64

ตารางผนวกที่ ก8 การแพร่ของไซโลสผ่านเยื่อเมมเบรนเหลวของระบบน้ำมันถั่วเหลือง ที่
อัตราส่วนปริมาตรน้ำมันและน้ำเท่ากับ 1:2 (เฟสเมมเบรนต่อเฟสใน)

เวลา (วินาที)	ไซโลส (กรัมต่อลูกบาศก์เมตร)		
	ไมโครแวกซ์ (เปอร์เซ็นต์)		
	5	7	10
0	31.49	36.51	35.19
300	98.88	107.16	71.24
600	118.66	119.86	80.68
900	125.98	132.56	79.82
1200	136.23	137.32	90.98
1500	141.36	142.88	89.26
1800	147.95	146.85	92.70



ภาพผนวกที่ ก4 การหาค่าความสามารถในการแพร่ของไซโลสในระบบน้ำมันถั่วเหลือง จากความชันของกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(C_{xy})$ และ เวลา (วินาที) แปรผันความเข้มข้นไมโครเวกซ์ 5 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตราส่วนปริมาณน้ำมันต่อน้ำเท่ากับ 1:0.67



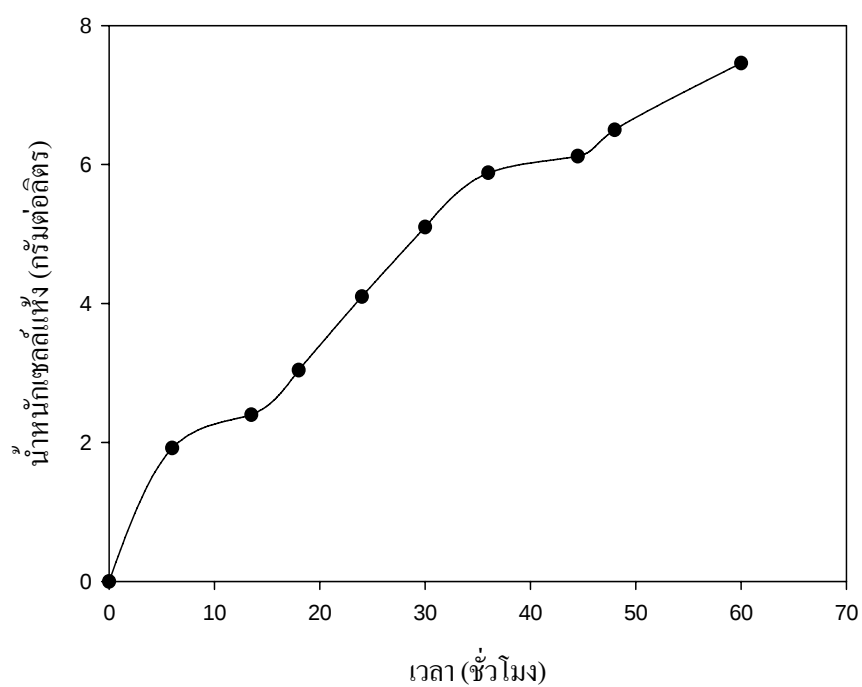
ภาพผนวกที่ ก5 การหาค่าความสามารถในการแพร่ของไซโลสในระบบน้ำมันถั่วเหลือง จากความชันของกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln(C_{xyl})$ และ เวลา (วินาที) แปรผันความเข้มข้นไมโครแว็กซ์ 5 7 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตราส่วนปริมาณน้ำมันต่อน้ำเท่ากับ 1:2

ตารางผนวกที่ ก9 การคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (P)

ไมโครเวกซ์ (เปอร์เซ็นต์)	อิมัลชัน		พื้นที่ผิว (A_C)		$\frac{PA_C}{V_{out}}$		P	
	(x 10 ⁻⁶ ลูกบาศก์เมตร)		(x 10 ⁻² ตารางเมตร)		(x 10 ⁻⁴ วินาที ⁻¹)		(x 10 ⁻⁷ เมตรต่อวินาที)	
	อัตราส่วนปริมาตรน้ำมันและน้ำ							
	1:0.67	1:2	1:0.67	1:2	1:0.67	1:2	1:0.67	1:2
5	8	9	2.01	1.96	1.90	2.50	4.724	6.37
7	9	6	1.96	2.10	1.30	2.00	3.310	4.76
10	11	9	1.86	1.96	5.00	1.70	1.340	4.33

ตารางผนวกที่ ก10 การเจริญของยีสต์ *Candida mogii* จากการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์ที่สภาวะ
พีเอช 4.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	0.00
6	1.92
13.5	2.40
18	3.04
24	4.10
30	5.10
36	5.88
44.5	6.12
48	6.50
60	7.46



ภาพผนวกที่ 6 การเจริญของยีสต์ *Candida mogii* จากการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาस्क ที่สภาวะ
พีเอช 4.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที

ตารางผนวกที่ ก11 การผลิตไซลิทอลจากไซโลสแบบเปิดเสร็จหมุนเวียนน้ำหมัก ในระบบถังหมัก เซลล์ยีสต์ตรึงแบบลิกวิดิมัลชันเมมเบรน ที่อัตราส่วนปริมาตรอิมัลชันต่อน้ำหมักเท่ากับ 1:10 และความเข้มข้นเซลล์ 4.2 กรัมต่อลิตรน้ำหมัก ภายใต้ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอ ($DO > 70\%$) (SLM-1)

เวลา (ชั่วโมง)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)	เซลล์อิสระ (กรัมต่อลิตร)
0	10.02	0.00	0.04
6	9.65	0.03	0.04
12	9.51	0.09	0.00
18	9.69	0.11	0.00
24	9.51	0.14	0.26
30	9.44	0.17	0.16
36	9.12	0.28	0.00

ตารางผนวกที่ ก12 การผลิตไซลิทอลจากไซโลสแบบเปิดเสร็จหมุนเวียนน้ำหมัก ในระบบถังหมัก เซลล์ยีสต์ตรึงแบบลิกวิดิมัลชันเมมเบรน ที่อัตราส่วนปริมาตรอิมัลชันต่อน้ำหมักเท่ากับ 1:4 และความเข้มข้นเซลล์ 3.89 กรัมต่อลิตรน้ำหมัก ภายใต้ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอ ($DO > 70\%$) (SLM-2)

เวลา (ชั่วโมง)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)	เซลล์อิสระ (กรัมต่อลิตร)
0	11.60	0.00	0.26
6	11.35	0.12	0.44
12	11.07	0.28	0.22
18	10.88	0.35	0.18
24	10.97	0.42	0.10
30	10.60	0.54	0.04
36	9.79	0.89	0.20

ตารางผนวกที่ ก13 การผลิตไฮลิทอลจากไฮโดสแบบเปิดเสร็จหมุนเวียนน้ำหมัก ในระบบถังหมัก
เซลล์ยีสต์ตรึงแบบลิกวิดอิมัลชันเมมเบรน ที่อัตราส่วนปริมาตรอิมัลชันต่อน้ำ
หมักเท่ากับ 1:4 และความเข้มข้นเซลล์ 6.2 กรัมต่อลิตรน้ำหมัก ภายใต้ภาวะ
จำกัดออกซิเจน (DO 30 %) (SLM-3)

เวลา (ชั่วโมง)	ไฮโดส (กรัมต่อลิตร)	ไฮลิทอล (กรัมต่อลิตร)	เซลล์อิสระ (กรัมต่อลิตร)
0	11.37	0.00	0.00
6	10.75	0.01	0.02
12	11.08	0.06	0.06
18	11.11	0.11	0.00
24	11.51	0.14	0.00
30	10.82	0.16	0.00
36	10.96	0.19	0.00
42	10.65	0.21	0.00
48	10.27	0.23	0.06
54	10.73	0.25	0.00
60	10.75	0.29	0.00
66	10.73	0.31	0.00
72	10.70	0.36	0.00
78	10.46	0.35	0.00
84	10.49	0.40	0.00
90	10.46	0.43	0.00
96	10.77	0.47	0.04
102	10.44	0.54	0.00
108	10.20	0.55	0.02
114	10.18	0.60	0.10
120	10.11	0.62	0.10

ตารางผนวกที่ ก14 การผลิตไฮลิทอลจากไฮโดสแบบเปิดเสร็จหมุนเวียนน้ำหมักในระบบถังหมัก
เซลล์ยีสต์ตรึงแบบลิกวิดอิมัลชันเมมเบรน ที่อัตราส่วนปริมาตรอิมัลชันต่อน้ำ
หมักเท่ากับ 1:4 และความเข้มข้นเซลล์ 15.31 กรัมต่อลิตรน้ำหมัก ภายใต้ภาวะ
จำกัดออกซิเจน (30 % DO) (SLM-4)

เวลา (ชั่วโมง)	ไฮโดส (กรัมต่อลิตร)	ไฮลิทอล (กรัมต่อลิตร)	เซลล์อิสระ (กรัมต่อลิตร)
0	11.39	0.02	0.23
6	11.20	0.06	0.50
12	10.90	0.13	0.16
18	11.53	0.15	0.30
24	11.28	0.19	0.16
30	11.25	0.23	0.13
36	11.20	0.29	0.13
42	11.20	0.34	0.13
48	10.95	0.36	0.20
54	12.05	0.40	0.33
60	10.90	0.45	0.13
66	10.92	0.48	0.30
72	10.62	0.51	0.10
78	10.95	0.52	0.16
84	10.73	0.54	0.26
90	10.81	0.58	0.10
96	10.84	0.60	0.03
102	10.70	0.63	0.10
108	10.62	0.62	0.16
114	10.46	0.65	0.03
120	10.51	0.67	0.06

ภาคผนวก ข
วิธีวิเคราะห์

1. การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

1.1 อบกระดาษกรองแล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

1.2 บีบตัวอย่าง 3 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง แล้วนำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เก็บส่วนใสไว้วิเคราะห์ไซโตสและไซโทล

1.3 ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปหมุนเหวี่ยง รินส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำอีกครั้ง

1.4 นำตะกอนเซลล์ที่ได้มากรองผ่านกระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน ด้วยชุดกรองแบบดูดอากาศ (Suction flask) นีคล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วจึงนำกระดาษกรองไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.5 ชั่งน้ำหนักกระดาษกรองพร้อมเซลล์แห้ง แล้วคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งดังนี้

$$\text{น้ำหนักเซลล์ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักกระดาษกรองและเซลล์แห้ง (กรัม)} - \text{น้ำหนักกระดาษกรอง (กรัม)}}{3 \times 10^{-3}}$$

2. การวิเคราะห์ปริมาณไซโลส

วิเคราะห์หาปริมาณไซโลสในสารละลายตามวิธีของ Deschatelets และ Yu (1986) โดยอาศัยปฏิกิริยาการเกิดเฟอฟูรอล (furfural) จากเพนโทส ในสารละลายกรดแอซิดิกที่มี thiourea อยู่ จากนั้นเติม *p*-bromoaniline acetate เพื่อทำปฏิกิริยากับเฟอฟูรอลได้สารละลายสีชมพู

2.1 สารเคมี

p-bromoaniline reagent เตรียมโดยละลาย thiourea ปริมาณ 4 กรัม ในกรดแอซิดิกเข้มข้นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วแยกส่วนใส่ออกมา (กรดแอซิดิกอิ่มตัวด้วย thiourea) จากนั้นละลาย *p*-bromoaniline 2 กรัม ลงในส่วนใส่นั้น

2.2 เตรียมสารละลายไซโลสมาตรฐาน

2.2.1 เตรียมสารละลายไซโลสความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร โดยชั่งไซโลส 0.0500 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2.2.2 เตรียมสารละลายไซโลสความเข้มข้นต่าง ๆ จากสารละลายไซโลสความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางผนวกที่ ข1

ตารางผนวกที่ ข1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไซโลสที่ความเข้มข้น 0-0.5 กรัมต่อลิตร

หลอดที่	ไซโลส (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นไซโลส (กรัมต่อลิตร)
1	0.0	1.0	0.0
2	0.2	0.8	0.1
3	0.4	0.6	0.2
4	0.6	0.4	0.3
5	0.8	0.2	0.4
6	1.0	0.0	0.5

2.3 วิธีการ

2.3.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม (ความเข้มข้นประมาณ 0.1-0.5 กรัมต่อลิตร) หรือสารละลายไซโลสมมาตรฐาน ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

2.3.2 เติม *p*-bromoaniline reagent ลงไป 4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

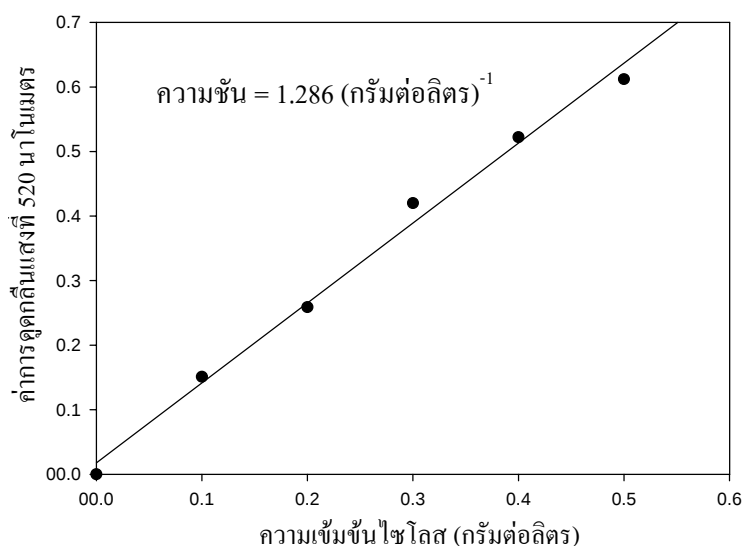
2.3.3 นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2.3.4 ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว แล้วบ่มต่อในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 70 นาที

2.3.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

2.3.6 นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของไซโลส ในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นไซโลส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานสารละลายไซโลส

3. การวิเคราะห์ปริมาณไซลิทอล

วิเคราะห์หาปริมาณไซลิทอลตามวิธีของ Adler และ Gustafsson (1980) โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของไซลิทอลเป็นฟอร์มัลดีไฮด์ด้วยเปอร์ไอโอเดตในสารละลายกรดในระยะเวลาสั้นๆ แล้วหยุดปฏิกิริยาด้วย butane-2,3-diol แล้ววิเคราะห์ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้น โดยทำปฏิกิริยากับสารละลาย pentane-2,4-dione ได้สารละลายสีเหลือง

3.1 สารเคมี

3.1.1 Periodate reagent (NaIO_4 0.015 โมลาร์ ใน HCl 0.16 โมลาร์) เตรียมโดย ละลาย NaIO_4 3.2084 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นลงไป 13.3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 มิลลิลิตร

3.1.2 Butane-2,3-diol 0.02 โมลาร์ เตรียมโดยปิเปต butane-2,3-diol มา 1.8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 มิลลิลิตร

3.1.3 Pentane-2,4-dione (เตรียมใช้ทันที) เตรียมโดยละลายแอมโมเนียมแอซีเทต 154.16 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมกรดแอซีติกเข้มข้นปริมาตร 40 มิลลิลิตร เติม pentane-2,4-dione ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 มิลลิลิตร

3.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานไซลิทอล

3.2.1 เตรียมสารละลายไซลิทอลความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร โดยชั่งไซลิทอล 0.0500 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3.2.2 เตรียมสารละลายไซลิทอลความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร ดูดสารละลายไซลิทอลจากข้อ 3.2.1 มา 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำไปเตรียมสารละลายไซลิทอลความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงในตารางผนวกที่ ข2

ตารางผนวกที่ ข2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไซลิทอลที่ความเข้มข้น 0-50 มิลลิกรัมต่อลิตร

หลอดที่	ไซลิทอล (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นไซลิทอล (มิลลิกรัมต่อลิตร)
1	0.0	1.0	0
2	0.2	0.8	10
3	0.4	0.6	20
4	0.6	0.4	30
5	0.8	0.2	40
6	1.0	0.0	50

3.3 วิธีการ

3.3.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม (ความเข้มข้นไซลิทอลประมาณ 10-50 มิลลิกรัมต่อลิตร) และสารละลายมาตรฐาน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

3.3.2 เติม periodate reagent ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.3.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที

3.3.4 เติม butane-2,3-diol 0.02 โมลาร์ ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

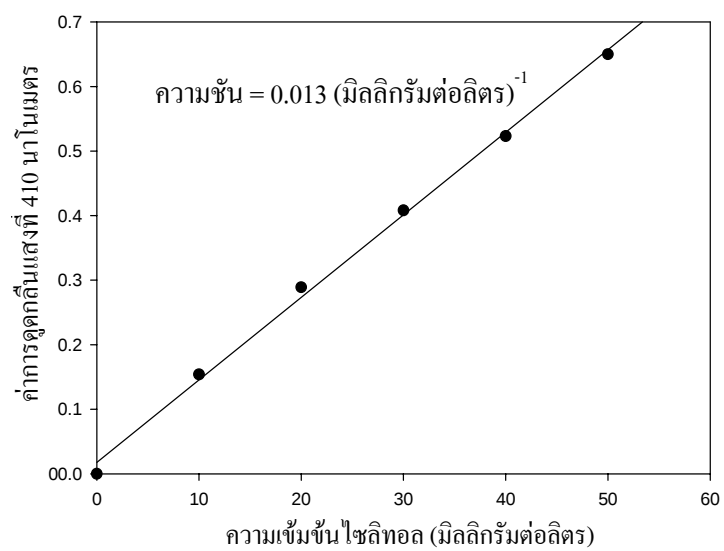
3.3.5 เติม pentane-2,4-dione solution ลงไป 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.3.6 นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3.3.7 ทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

3.3.8 นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของ ไซลิทอลในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณจาก

$$\text{ความเข้มข้นของไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times 1000}$$



ภาพผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานสารละลายไคลทอล

ภาคผนวก ค
การคำนวณ

1. คำนวณเปอร์เซ็นต์การรั่ว (Percentage leakage)

คำนวณเปอร์เซ็นต์การรั่ว (Percentage leakage) ตามวิธีการของ Pal *et al.* (2002) NaOH ที่รั่วออกสู่เฟสนอกเกิดจากการแตกของเมมเบรน (ไม่คำนึงถึง NaOH ที่เกิดจากการแพร่) สามารถวัดปริมาณ NaOH ในรูปของค่าพีเอช

คำนวณความเข้มข้น NaOH

$$[NaOH] = 10^{(pH-14)} \quad (6)$$

คำนวณเปอร์เซ็นต์การรั่ว (%L)

$$\%L = \frac{100[NaOH]_{out} V_{out}}{[NaOH]_{in} V_{in}} \quad (7)$$

เมื่อ %L คือ เปอร์เซ็นต์การรั่ว

V_{out} คือ ปริมาตรของเฟสนอก (มิลลิลิตร)

V_{in} คือ ปริมาตรเริ่มต้นของเฟสใน (มิลลิลิตร)

$[NaOH]_{out}$ คือ ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเฟสนอก (นอร์มัล)

$[NaOH]_{in}$ คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเฟสใน (นอร์มัล)

จากนั้นหาค่าอัตราการรั่วเริ่มต้น (%L/นาทีก) จากความชันของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การรั่ว (%L) และเวลา (นาทีก)

ตัวอย่างการประมาณค่าอัตราการรั่วเริ่มต้น

พิจารณาข้อมูลการทดลองในภาคผนวก ก ตารางผนวกที่ ก1 (ที่เวลา 10 นาที ของความเข้มข้น span 80 6 เปอร์เซนต์)

พีเอช (pH) = 8.35

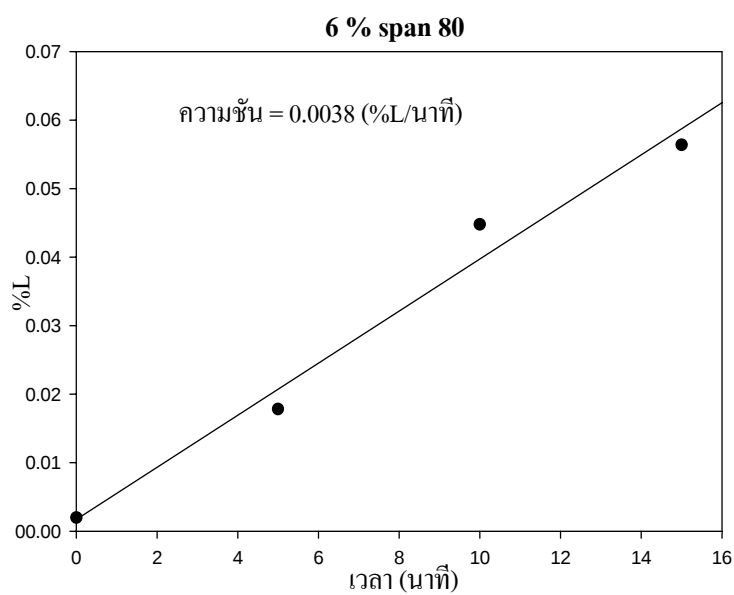
คำนวณความเข้มข้นไฮดรอกไซด์จากสมการที่ (6);

$$\begin{aligned}[NaOH] &= 10^{(pH-14)} \\ &= 10^{(8.35-14)} \\ &= 2.239 \times 10^{-6} \text{ (นอร์มัล)}\end{aligned}$$

คำนวณเปอร์เซ็นต์การรั่ว ;

$$\begin{aligned}\%L &= \frac{100[NaOH]_{out} V_{out}}{[NaOH]_{in} V_{in}} \\ &= \frac{100 \times 2.239 \times 10^{-6} \times 200}{0.1 \times 10} \\ &= 0.045 \text{ (เปอร์เซ็นต์)}\end{aligned}$$

จากการคำนวณจะได้เปอร์เซ็นต์การรั่วที่เวลา 10 นาที ของความเข้มข้น span 80 6 เปอร์เซนต์ เท่ากับ 0.045 เปอร์เซนต์ และเมื่อเขียนกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การรั่ว (%L) และเวลาต่าง ๆ สามารถหาค่าเปอร์เซ็นต์การรั่วเริ่มต้นจากความชันของกราฟได้เท่ากับ 0.0038 (%L/นาที) ดังภาพผนวกที่ ค1



ภาพผนวกที่ ค1 ตัวอย่างการประมาณอัตราการรั่วเริ่มต้น (%L/นาที) จากความชันของกราฟระหว่างเปอร์เซ็นต์การรั่ว (%L) และเวลา (นาที)

2. การคำนวณสัมประสิทธิ์การแพร่ (P)

การคำนวณความสามารถในการแพร่ ประยุกต์มาจากวิธีการของ Kedari *et al.* (2001) ซึ่งกำหนดฟลักซ์ (J) ของการแพร่ดังนี้

$$J = \frac{C_{xyl} V_{out}}{A_C t} \quad (8)$$

เมื่อ J คือ ฟลักซ์ของไซโลส (กรัมต่อตารางเมตรต่อวินาที)

C_{xyl} คือ ความเข้มข้นของไซโลส (กรัมต่อลิตร)

V_{out} คือ ปริมาตรของเฟสออก (ลูกบาศก์เมตร)

A_C คือ พื้นที่ผิวของเมมเบรน (ตารางเมตร)

t คือ เวลา (วินาที)

หาค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (Permeability coefficient, P) จากสมการ (9)

$$P = \frac{J}{C_{xyl}} = \frac{dC_{xyl}}{dt} \frac{V_{out}}{A_C} \frac{1}{C_{xyl}} \quad (9)$$

เมื่ออินทิเกรตสมการ (9) จะได้

$$\ln(C_{xyl})_t = \ln(C_{xyl})_0 + \frac{PA_C}{V_{out}} t \quad (10)$$

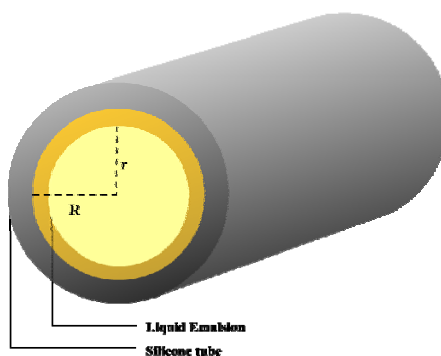
เมื่อ $(C_{xyl})_0$ คือ ความเข้มข้นของไซโลสในเฟสออกที่เวลาเริ่มต้น

$(C_{xyl})_t$ คือ ความเข้มข้นของไซโลสในเฟสออกที่เวลาใด ๆ

สามารถหาค่าความสามารถในการแพร่ $\left(\frac{PA_c}{V_{out}}\right)$ ได้จากความชันของกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง ล็อกความเข้มข้นของไซโลส $(C_{xyl})_t$ และ เวลา (t) และสามารถคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ (P) ได้จาก

$$P = \text{ความสามารถในการแพร่} \times \frac{V_{out}}{A_c}$$

3. การคำนวณพื้นที่ผิวภายในของอิมัลชัน (A_c)



ภาพผนวกที่ ค2 แสดงรัศมีภายในและภายนอกของลิควิดอิมัลชันที่เคลือบบนผิวภายในของท่อซิลิโคน

ปริมาตรของอิมัลชันภายในท่อซิลิโคนคำนวณได้ดังนี้

$$\begin{aligned} V_E &= \pi R^2 Z - \pi r^2 Z \\ &= \pi Z (R^2 - r^2) \end{aligned} \quad (11)$$

คำนวณรัศมีภายในของอิมัลชันได้จาก

$$r = \sqrt{R^2 - \frac{V_E}{\pi Z}} \quad (12)$$

และพื้นที่ผิวภายในของอิมัลชันได้จาก

$$A_C = 2\pi rZ = 2\pi Z \sqrt{R^2 - \frac{V_E}{\pi Z}} \quad (13)$$

เมื่อ R คือ รัศมีภายนอกของอิมัลชัน (เท่ากับรัศมีภายในของท่อ = 5×10^{-3} เมตร)

r คือ รัศมีภายในของท่อซิลิโคนที่ถูกเคลือบด้วยชั้นอิมัลชัน (เมตร)

V_E คือ ปริมาตรของอิมัลชันภายในท่อ (ปริมาตรอิมัลชันเริ่มต้น- ปริมาตรอิมัลชันที่หลุดออกจากท่อ; ลูกบาศก์เมตร)

Z คือ ความยาวของท่อ (1.5 เมตร)

4. การคำนวณค่า HLB (Griffin and Lynch, 1972)

$$(HLB)_{emulsion} = X_a(HLB)_a + (1 - X_a)(HLB)_b \quad (14)$$

เมื่อ $(HLB)_{emulsion}$ คือ ค่า HLB ผสมที่ต้องการ

$(HLB)_a$ คือ ค่า HLB ของสาร a

$(HLB)_b$ คือ ค่า HLB ของสาร b

X_a คือ สัดส่วนของสารลดแรงตึงผิว a

ตัวอย่างการคำนวณสารละลายผสมของ tween 40 และ span 80 ที่มีค่า HLB เท่ากับ 11

จากสมการที่ (14) จะได้

$$(HLB)_{emulsion} = X_{tween40} (HLB)_{tween40} + (1 - X_{tween40}) (HLB)_{span80}$$

$$X_{tween40} = \frac{(HLB)_{emulsion} - (HLB)_{span80}}{(HLB)_{tween40} - (HLB)_{span80}}$$

$$X_{tween40} = \frac{11 - 4.3}{15.6 - 4.3}$$

$$X_{tween40} = 0.593$$

ดังนั้นสัดส่วนของ span 80 $X_{span80} = 1 - 0.593 = 0.4$

คิดเป็นอัตราส่วน tween 40 ต่อ span 80 เท่ากับ 3:2

เพราะฉะนั้นสารละลายของสารลดแรงตึงผิวผสม tween 40 และ span 80 ที่มีค่า HLB เท่ากับ 11 จะต้องเตรียมโดยใช้อัตราส่วนระหว่าง tween 40 และ span 80 เท่ากับ 3:2

ภาคผนวก ง

การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของกระบวนการหมักไซลิทอลจากไซโลสด้วยการห่อหุ้มเซลล์ยีสต์แบบลิวิดิมัลชันเมมเบรน แบบจำลองทางคณิตศาสตร์สร้างขึ้นอาศัยสมการที่เกี่ยวข้องกับภาวะจำกัดของการแพร่ในเซลล์ตรึง (Shuler and Kargi, 2002) ร่วมกับสมการดุลของสับสเตรตและผลิตภัณฑ์ในระบบการหมักแบบ Plug Flow Reactor (PFR) (Richardson and Peacock, 1994)

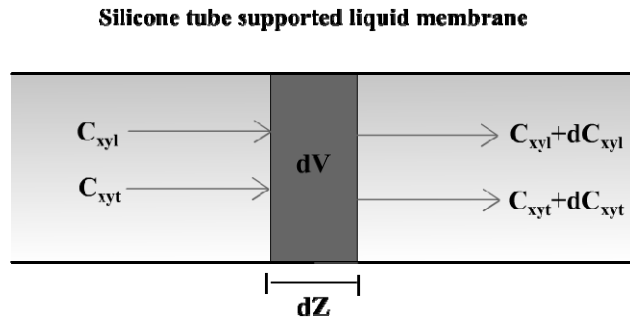
จากนิยามค่า effectiveness factor (η) คือ อัตราการใช้สับสเตรตภายใต้ผลของภาวะจำกัดการแพร่ $(r_{xyl})^{diff}$ ต่อดัชนีการใช้สับสเตรตเมื่อไม่มีผลจากภาวะจำกัดการแพร่ (r_{xyl})

ดังนั้นการใช้สับสเตรตภายใต้ภาวะจำกัดการแพร่จึงเป็นผลคูณระหว่าง η_{xyl} และ r_{xyl} และแก้สมการได้ดังสมการ (15)

$$\begin{aligned}(r_{xyl})^{diff} &= \eta(r_{xyl}) \\ &= \eta \left(\frac{r_x}{Y_{X/S}} \right) \\ &= \eta \left(\frac{\mu_m C_{xyl}}{K_{xyl} + C_{xyl}} \right) \frac{C_x}{Y_{X/S}}\end{aligned}\tag{15}$$

โดยกำหนดให้อัตราการใช้ไซโลสสูงสุด, $r_{xyl}^m = \frac{\mu_m C_x}{Y_{X/S}}$ จะได้ว่า

$$(r_{xyl})^{diff} = \eta \left(\frac{r_{xyl}^m C_{xyl}}{K_{xyl} + C_{xyl}} \right)\tag{16}$$



ภาพผนวกที่ ง1 แบบจำลอง Silicone tube supported liquid membrane แสดงภาคตัดขวางที่มีความยาว dZ และปริมาตร dV

การสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิตไซลิทอลจากไซโลสด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงลิควิดเมมเบรน ประกอบด้วยการสร้างสมการดุลของการใช้ไซโลสและการเกิดไซลิทอลดังต่อไปนี้

(1) พิจารณาการเปลี่ยนแปลงของสับสเทรตจากเฟสนอกเข้าสู่ลิควิดอิมัลชันได้ดังสมการ (17)

$$V_{out} \frac{dC_{xyl}^{out}}{dt} = -N_s A_C \quad (17)$$

เมื่อ N_s คือ ฟลักซ์ของไซโลส (กรัมต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง)

A_C คือ พื้นที่ผิวสัมผัสของลิควิดอิมัลชันที่เคลือบภายในท่อซิลิโคน (ตารางเมตร)

V_{out} คือ ปริมาตรของเฟสนอก (ลิตร)

โดยกำหนดให้ $a = \frac{A_C}{V_{out}}$ จะได้ว่า

$$\frac{dC_{xyl}^{out}}{dt} = -N_s a \quad (18)$$

เมื่อทำคูลมวลาของสัปสเทรตในลลควลคอลลัซันเมมเบรนได้ดั่งนี้

$$V_E \frac{dC_{xyl}^E}{dt} = N_S A_C - (r_{xyl})^{diff} V_E \quad (19)$$

เมื่อ V_E คือ ปริมาตรของลลควลคอลลัซัน (ลลตร)

ที่ภาวะคงตัว $\frac{dC_{xyl}^E}{dt} = 0$, จากสมการ (19) และ (16ก) จะได้ว่า

$$N_S \frac{A_C}{V_E} = (r_{xyl})^{diff} = \eta \left(\frac{r_{xyl}^m C_{xyl}}{K_{xyl} + C_{xyl}} \right)$$

$$N_S = \eta \left(\frac{r_{xyl}^m C_{xyl}}{K_{xyl} + C_{xyl}} \right) \frac{V_E}{A_C} \quad (20)$$

สำหรับสมการคูลของสัปสเทรตภายในทอซิลลโคน ดั่งภาพผนวกที่ 1 โดยพิจารณาได้จากสมการ (18) และ (20) สรุปลได้ดั่งสมการ (21)-(25) ดั่งนี้

$$dV \frac{dC_{xyl}}{dt} = F(C_{xyl}) - F(C_{xyl} + dC_{xyl}) + dV \frac{dC_{xyl}^{out}}{dt} \quad (21)$$

$$= -FdC_{xyl} - N_S a dV \quad (22)$$

เมื่อ F คือ อัตราการไหลของน้ำหมัก (ลลตรต่อช่วโมง)

ที่ภาวะคงตัว $\frac{dC_{xyl}}{dt} = 0$, จากสมการ (22) จะได้ว่า

$$-F \frac{dC_{xyl}}{dV} = N_S a = \eta \left(\frac{r_{xyl}^m C_{xyl}}{K_{xyl} + C_{xyl}} \right) \frac{V_E a}{A_C} \quad (23)$$

เมื่อกำหนดให้ $dV = AdZ$ และ $a = \frac{A_C}{V_{out}}$ จัดแจงสมการ (23) ใหม่ จะได้ว่า

$$\frac{dC_{xyl}}{dZ} = -\eta \left(\frac{r_{xyl}^m C_{xyl}}{K_{xyl} + C_{xyl}} \right) \frac{V_E}{V_{out}} \frac{A}{F} \quad (24)$$

เมื่อ A คือ พื้นที่หน้าตัดขวางของท่อซีลิโคน (ตารางเมตร)

Z คือ ความยาวของท่อซีลิโคน (เมตร)

จากสมการ (23) ถ้ากำหนดให้ $F = \frac{dV}{dt}$ จะได้สมการอนุพันธ์แสดงการเปลี่ยนแปลงของ
สับสเทรต (เฟสนอก) ดังนี้

$$\frac{dC_{xyl}}{dt} = -\eta \left(\frac{r_{xyl}^m C_{xyl}}{K_{xyl} + C_{xyl}} \right) \frac{V_E}{V_{out}} \quad (25)$$

(2) พิจารณาการเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์จากลิควิดอิมัลชันออกสู่เฟสนอกได้ดังสมการ (26)

$$V_{out} \frac{dC_{xyt}^{out}}{dt} = N_p A_C \quad (26)$$

เมื่อ N_p คือ ฟลักซ์ของไซลิทอล (กรัมต่อตารางเมตรต่อชั่วโมง)

เมื่อกำหนดให้ $a = \frac{A_C}{V_{out}}$ จะได้ว่า

$$\frac{dC_{xyt}^{out}}{dt} = N_p a \quad (27)$$

ทำดุลมวลของผลิตภัณฑ์ในลิควิดอิมัลชันเมมเบรนได้ดังนี้

$$V_E \frac{dC_{xyt}^E}{dt} = -N_p A_C + (r_{xyt})^{diff} V_E \quad (28)$$

ที่ภาวะคงตัว $\frac{dC_{xyt}^E}{dt} = 0$ และ $(r_{xyt})^{diff} = (r_{xyl})^{diff} Y_{P/S}$ เพราะฉะนั้นจากสมการ (28) จะได้ว่า

$$\begin{aligned} N_P A_C &= (r_{xyt})^{diff} V_E = (r_{xyl})^{diff} Y_{P/S} V_E \\ &= \eta \left(\frac{r_{xyl}^m C_{xyl}}{K_{xyl} + C_{xyl}} \right) Y_{P/S} V_E \\ N_P &= \eta \left(\frac{r_{xyl}^m C_{xyl}}{K_{xyl} + C_{xyl}} \right) \frac{Y_{P/S}}{A_C} V_E \end{aligned} \quad (29)$$

เมื่อ $(r_{xyt})^{diff}$ คือ อัตราการผลิตไซลิทอลภายใต้ผลของภาวะจำกัดการแพร่
(กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

$Y_{P/S}$ คือ ผลได้ไซลิทอลจากไซโลส (กรัมต่อกรัม)

สำหรับสมการดุลของผลิตภัณฑ์ภายในท่อซีลิโคนแสดงได้ดังสมการ (30)

$$\begin{aligned} dV \frac{dC_{xyt}}{dt} &= F(C_{xyt}) - F(C_{xyt} + dC_{xyt}) + \frac{dC_{xyt}}{dt} dV \\ &= -F dC_{xyt} + N_P a dV \end{aligned} \quad (30)$$

ที่ภาวะคงตัว $\frac{dC_{xyt}}{dt} = 0$, จากสมการ (30) จะได้ว่า

$$F \frac{dC_{xyt}}{dV} = N_P a = \eta \left(\frac{r_{xyl}^m C_{xyl}}{K_{xyl} + C_{xyl}} \right) \frac{V_E a}{A_C} Y_{P/S} \quad (31)$$

เมื่อกำหนดให้ $dV = AdZ$ และ $a = \frac{A_C}{V_{out}}$ จัดแจงสมการ (31) ใหม่ จะได้ว่า

$$\frac{dC_{xyt}}{dZ} = \eta \left(\frac{r_{xyl}^m C_{xyl}}{K_{xyl} + C_{xyl}} \right) \frac{V_E}{V_{out}} \frac{A}{F} Y_{P/S} \quad (32)$$

จากสมการ (31) ถ้ากำหนดให้ $F = \frac{dV}{dt}$ จะได้สมการอนุพันธ์แสดงการเปลี่ยนแปลงของ
ผลิตภัณฑ์ (เฟสนอก) ดังนี้

$$\frac{dC_{xyt}}{dt} = \eta \left(\frac{r_{xyl}^m C_{xyl}}{K_{xyl} + C_{xyl}} \right) \frac{V_E}{V_{out}} Y_{P/S} \quad (33)$$

ภาคผนวก จ

การประมาณค่าพารามิเตอร์ด้วยโปรแกรม MATLABTM

โปรแกรม MATLAB™ (มนัส และ วรรัตน์, 2543)

โปรแกรม MATLAB™ ย่อมาจาก Matrix Laboratory เริ่มต้นพัฒนามาจากภาษาฟอร์แทรนโดย Clave Moler และถูกพัฒนาจากโปรแกรมเมทริกซ์ของ LINPACK และ EISPACK ต่อมาจึงได้ถูกเขียนขึ้นใหม่โดยใช้ภาษาซีโดย Steve Bangert, Steve Kleimar, John Little และ Clave Moler จากบริษัท MathWorks โปรแกรม MATLAB™ เป็นโปรแกรมที่ใช้สำหรับคำนวณเชิงตัวเลข กราฟที่ซับซ้อน การจำลองแบบ และการแสดงผลข้อมูล เพื่อให้มองเห็นภาพจนได้ง่ายและชัดเจนขึ้น โดยในโปรแกรม MATLAB™ จะประกอบด้วยกล่องเครื่องมือ (Toolbox) ในแต่ละสาขา ซึ่งในกล่องเครื่องมือของแต่ละสาขาก็จะประกอบไปด้วยฟังก์ชันต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการแก้ปัญหาในสาขานั้น ๆ เพื่อประยุกต์ในการใช้งานจำนวนมาก ซึ่งในงานวิจัยนี้จะใช้กล่องเครื่องมือที่เรียกว่า Optimization Toolbox®

การใช้งานโปรแกรม MATLAB™ เบื้องต้น

เมื่อเข้าสู่โปรแกรม MATLAB™ จะพบหน้าต่างคำสั่ง ที่มีเครื่องหมาย >> (MATLAB prompt) เป็นตัวเริ่มต้นบรรทัดพร้อมที่จะรอรับคำสั่งต่าง ๆ เมื่อสิ้นสุดคำสั่งแล้วกดปุ่ม [Enter] โปรแกรม MATLAB™ จะมีการประมวลผลตามคำสั่งทันที และจะรับคำสั่งที่ละบรรทัด ซึ่งสามารถสร้างไฟล์ที่ประกอบด้วยชุดคำสั่งเก็บในรูปแบบ “ชื่อไฟล์. M” (มีนามสกุลของไฟล์เป็น M) เรียกว่าเอ็มไฟล์ (M-Files) การเขียนเอ็มไฟล์มี 2 รูปแบบ คือ

สคริปไฟล์ เป็นไฟล์ที่มีการกำหนดค่าตัวแปรและเขียนคำสั่ง หรือฟังก์ชันต่าง ๆ ที่ต้องการประมวลผลทีละคำสั่ง โดยสามารถเขียนคำอธิบายได้โดยใช้เครื่องหมาย “%” นำหน้าข้อความที่ต้องการอธิบาย โดยไม่มีผลต่อการทำงานของโปรแกรม การเรียกใช้สคริปไฟล์สามารถทำได้โดยเรียกชื่อเอ็มไฟล์ที่หน้าต่างของโปรแกรม MATLAB™

ฟังก์ชันไฟล์ คือ ไฟล์ที่เริ่มต้นบรรทัดแรกด้วยคำว่า “Function” และสามารถเขียนคำอธิบายได้เช่นเดียวกับสคริปไฟล์โดยใช้เครื่องหมาย “%”

การแก้สมการเชิงอนุพันธ์โดยใช้โปรแกรม MATLAB™

ปัญหาทางคณิตศาสตร์ วิทยาศาสตร์ และวิศวกรรมส่วนใหญ่ มักอยู่ในรูปของสมการเชิงอนุพันธ์ โดยเกี่ยวข้องกับอัตราการเปลี่ยนแปลงของสิ่งต่าง ๆ เมื่อเวลาเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งสามารถแก้ไขปัญหาลำนี้โดยการแก้สมการเชิงอนุพันธ์ด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น วิธีออยเลอร์ (Euler method) วิธีรุงเง-คุตตา (Runge-Kutta method) หรือการใช้ฟังก์ชัน ODE เพื่อหาคำตอบของสมการเชิงอนุพันธ์ โดยฟังก์ชันนี้อาศัยการแก้สมการเชิงอนุพันธ์ด้วยวิธี รุงเง-คุตตา (Runge-Kutta method) ประกอบด้วย 2 โครงสร้าง ดังนี้

ODE 23 เป็นฟังก์ชันที่หาคำตอบของสมการเชิงอนุพันธ์ด้วยวิธี รุงเง-คุตตา (Runge-Kutta method) อันดับ 2 และ 3 ของฟังก์ชัน FUN เมื่อ tspan คือค่าเริ่มต้นและค่าสุดท้ายของตัวแปรอิสระ t และค่าเริ่มต้น y (to) เท่ากับ yo โดย ODE 23 มีโครงสร้างดังนี้ $[t,y] = \text{ode 23 (FUN, tspan, yo)}$

ODE 45 เป็นฟังก์ชันที่หาคำตอบของสมการเชิงอนุพันธ์ด้วยวิธี รุงเง-คุตตา (Runge-Kutta method) อันดับ 4 และ 5 ของฟังก์ชัน FUN เมื่อ tspan คือค่าเริ่มต้นและค่าสุดท้ายของตัวแปรอิสระ t และค่าเริ่มต้น y (to) เท่ากับ yo โดย ODE 45 มีโครงสร้างดังนี้ $[t,y] = \text{ode 45 (FUN, tspan, yo)}$

Nonlinear Least Square Curve Fitting (Ordinary differential equation) (Tochampa, 2004)

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการหาค่าพารามิเตอร์ที่เหมาะสมที่สุด และทดสอบพารามิเตอร์ที่เหมาะสมที่ทำให้ค่าที่ได้จากแบบจำลองและค่าที่ได้จากการทดลอง (fitting) มีค่าต่างกันน้อยที่สุด โดยอาศัยกล่องเครื่องมือ Optimization toolbox® ในโปรแกรม MATLAB™

ฟังก์ชันที่ใช้คือ “lsqnonlin” ใช้แก้ปัญหาในรูป

$$\min_X \sum [FUN(X)^2]$$

มีรูปแบบโครงสร้าง

$[X, \text{resnorm}, \text{residual}] = \text{lsqnonlin}(\text{FUN}, X_0, \text{LB}, \text{UB}, \text{options}, \text{P1}, \text{P2}, \dots)$

ส่วน Output

X = ค่าสัมประสิทธิ์ที่เหมาะสมที่สุด

Resnorm = ค่าผลรวมของกำลังสองของค่า Residual ที่ค่า X ใด ๆ, $\sum [FUN(X)^2]$

Residual = ค่าของ $FUN(X)$ ที่ถูกส่งกลับมาจาก FUN

ส่วน Input

FUN = ฟังก์ชันไฟล์

X_0 = ค่าเริ่มต้น

LB = ค่าต่ำสุดของ X

UB = ค่าสูงสุดของ X

Options = options ที่ใช้ในการหาค่าที่เหมาะสมที่สุด

$\text{P1}, \text{P2}$ = ข้อมูลที่ต้องการประมาณค่า (ข้อมูลจากการทดลอง)

ขั้นตอนการทำงาน

ขั้นตอนที่ 1: เตรียมข้อมูลจากการทดลอง เก็บไว้ในรูป text file

ขั้นตอนที่ 2: กำหนดค่าพารามิเตอร์เริ่มต้นและขอบเขต (ค่าต่ำสุดและค่าสูงสุด)

ขั้นตอนที่ 3: สร้างฟังก์ชันไฟล์ที่ใช้ในการทำ interpolation และหาค่าผลต่างของข้อมูลจากการประมาณ กับการทดลอง

ขั้นตอนที่ 4: ทำการหาค่าที่เหมาะสมที่สุดด้วยฟังก์ชัน “lsqnonlin”

ขั้นตอนที่ 5: รายงานผล และสร้างกราฟจากข้อมูลการทดลองเทียบกับข้อมูลจากการเลียนแบบด้วยค่าพารามิเตอร์ที่เหมาะสมที่สุดที่ประมาณค่าได้

การนำข้อมูลจากการทดลองและแบบจำลองทางคณิตศาสตร์มาทำ curve fitting เพื่อหาค่าพารามิเตอร์ โดยใช้วิธี Nonlinear Least Square Curve Fitting โดยอาศัยกล่องเครื่องมือ Optimization toolbox[®] ในโปรแกรม MATLAB[™] เวอร์ชัน 6.5 ต้องมีการกำหนดค่าเริ่มต้นค่าพารามิเตอร์สุ่ม (guess parameter) แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ และข้อมูลจากการทดลอง ดังแสดงในไฟล์ทั้งหมด 3 ไฟล์คือ “BatchEstim.m”, “ExpFitEval.m” และ “BatchFcn.m” รายละเอียดการเขียนโปรแกรมดังแสดงในภาพผนวกที่ จ1 จ2 และ จ3 ตามลำดับ

```

% BatchEstim.m

clc

clear all

data = load('dataSLM2.txt')

%lower and upper bound of each parameter
LB=[0 0 10 0.9];
UB = [1 0.2 inf 1];

%initial guess parameter
rsm=0.5;      %maximum xylose consumption
n=0.1;        %effectiveness factor
Ks=0.559;
Yps=0.9;

p0=[rsm, n, Ks, Yps]

%generate random initial guess parameters
%p0 = LB+rand(1,length(LB)).*(UB-LB)

options = optimset('Display','iter','MaxIter',inf,'MaxFunEvals',inf);
[p,sse] = lsqnonlin('ExpFitEval',p0,LB,UB,options,data);

```

ภาพผนวกที่ จ1 ไฟล์ “BatchEstim.m”

```

%create sumary report
filename = 'report.txt';
fid = fopen(filename,'w');
fprintf(fid,'***SUMARY REPORT***\n');
fprintf(fid,'%s\n',datestr(now,0));
fprintf(fid,'the best found: Parameter(s) and sse \n');
for i=1:length(p)
    fprintf(fid,'Parameter(%d)=%f\n',i,p(i));
end
fprintf(fid,'sum of square error = %f \n',sse);
fclose(fid);
type(filename)

%-----

%create plot
tdata=data(:,1);
plot(tdata,data(:,2),'o',tdata,data(:,3),'s');
hold on
legend('xylose','xylitol');
tspan= [0 max(data(:,1))];
y0= data(1,2:end);
[t y]= ode45('BatchFunc',tspan,y0,[],p);
plot(t,y);
xlabel('time (h)');
ylabel('concentration (g/l)');
hold off

```

ภาพผนวกที่ ๑1 (ต่อ)

```

function err=ExpFitEval(p,data)

tspan = [0 max(data(:,1))];
y0= data(1,2:end);

[t y]= ode45('BatchFunc',tspan,y0,[],p);
ysim = interp1(t,y,data(:,1),'spline');
err = ysim-data(:,2:end);

```

ภาพผนวกที่ จ2 ไฟล์ “ExpFitEval.m”

```

function ydat = BatchFunc(t,y,flag,p)

%kinetic parameter
rsm=p(1);
n=p(2);
Ks=p(3);
Yps=p(4);

%assign variables
S=y(1);
P=y(2);

%condition parameter
Ve=150;      %Emulsion volume
Vout=600;    %Medium broth volume

```

ภาพผนวกที่ จ3 ไฟล์ “BatchFcn.m”

```
%kinetic equation  
ydat(1)=-n*(rsm*S/(Ks+S))*Ve/Vout;  
ydat(2)=n*(rsm*S/(Ks+S))*Yps*Ve/Vout;  
ydat = ydat(:);
```

ภาพผนวกที่ จ3 (ต่อ)

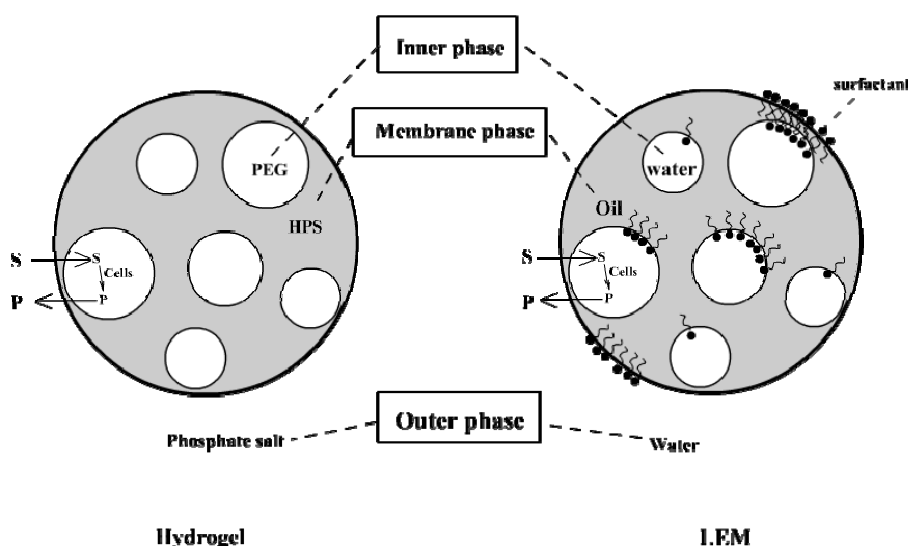
ภาคผนวก จ

การใช้ไฮโดรเจลห่อหุ้มเซลล์ยีสต์เพื่อผลิตไซลิทอล

เนื่องจากสารพอลิเมอร์ 2 ชนิด หรือ พอลิเมอร์-เกลือความแรงไอออนสูง เมื่อผสมกันและตั้งทิ้งไว้จะแยกชั้น เพราะสารทั้งสองเข้ากันไม่ได้ (immiscible) ซึ่งยังไม่มีความเข้าใจชัดเจนเกี่ยวกับกลไกการควบคุมของระบบ ตัวอย่างของสารพอลิเมอร์ 2 ชนิดที่ไม่ผสมเข้ากัน เช่น PEG-Dextran, PEG-Polyvinyl alcohol และ PEG-Hydroxypropyl starch เป็นต้น และตัวอย่างสารพอลิเมอร์-เกลือ เช่น PEG-phosphate และ PEG-Sulphate เป็นต้น (Li, 1998) เนื่องจากเฟสทั้งสองมีน้ำเป็นองค์ประกอบมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ จึงทำให้แรงดึงดูดระหว่างเฟสทั้งสองมีค่าต่ำ ทำให้การถ่ายโอนมวลเกิดขึ้นได้ดี วิธีการนี้จึงถูกนำไปใช้ในการแยกและสกัด ที่เรียกว่าระบบ Aqueous two phase เช่น ใช้ในการสกัดโปรตีนชนิดละลาย อย่างเช่นเอนไซม์ออกจากเศษเซลล์ เป็นต้น

จากหลักการของระบบ Aqueous two phase ที่ใช้พอลิเมอร์ 2 ชนิด หรือ พอลิเมอร์-เกลือ เมื่อผสมกันและตั้งทิ้งไว้จะแยกชั้นและการที่เฟสทั้งสองมีน้ำเป็นองค์ประกอบสูงจึงทำให้การถ่ายโอนมวลเกิดขึ้นได้ดี จึงได้ทดลองนำมาประยุกต์ใช้ในการตรึงเซลล์ในลักษณะคล้ายระบบลิวติค อิมัลชันเมมเบรนที่ประกอบด้วย 3 เฟส ณ ที่นี้เลือกสร้างระบบ พอลิเมอร์-พอลิเมอร์-เกลือ ที่ใช้ PEG-HPS-Phosphate ดังภาพผนวกที่ ฅ1

เมื่อ PEG คือ polyethylene glycol และ HPS คือ hydroxypropyl starch



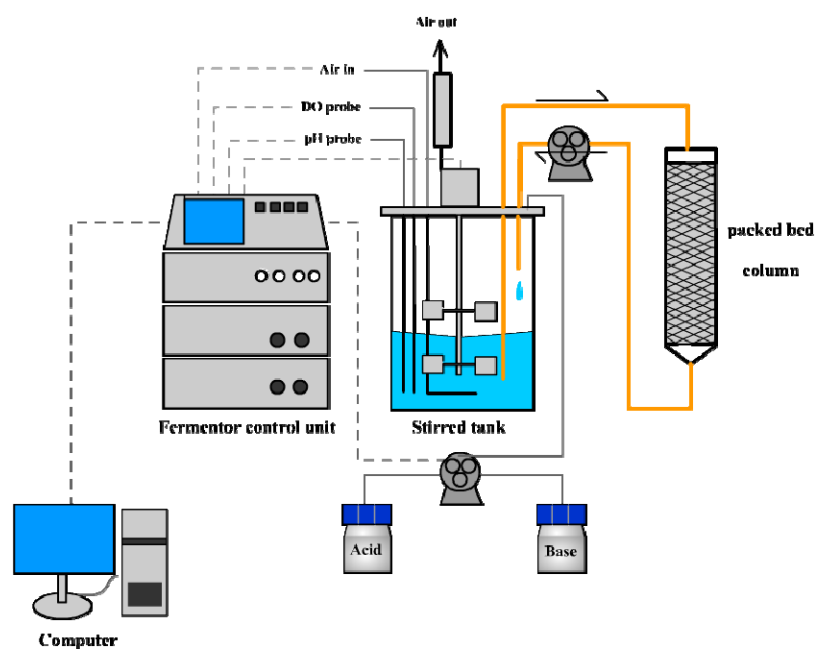
ภาพผนวกที่ ฅ1 เปรียบเทียบระบบตรึงเซลล์ด้วยไฮโดรเจลและระบบลิวติค อิมัลชันเมมเบรน

วิธีการ

เตรียม PEG โดยชั่ง PEG 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร (10 เปอร์เซ็นต์) และเตรียมเจลแข็ง HPS โดยชั่ง HPS 45 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร (15 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งทำให้เกิดเป็นเจลได้โดยการให้ความร้อนด้วย hot plate กวนด้วยแท่งแก้วตลอดเวลา จนกระทั่งเกิดลักษณะเป็นเจล

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อในถังพักแบบกวนปริมาตร 800 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 10 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 15 เปอร์เซ็นต์ (KH_2PO_4 120 กรัม และ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 38.4 กรัม ในน้ำหมัก 800 มิลลิลิตร) นำส่วนประกอบที่เตรียมทั้งหมดทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ

เตรียมเซลล์ยีสต์ *Candida mogii* ตามหัวข้อวิธีการที่ 2.1 นำเซลล์ยีสต์ผสมให้เข้ากันกับสารละลาย PEG จากนั้นนำสารแขวนลอยของเซลล์ยีสต์ใน PEG ค่อย ๆ เทลงในเจลของ HPS กวนด้วยแท่งแก้วให้ผสมเข้ากันจะได้เซลล์ตรึงของเซลล์ยีสต์ในไฮโดรเจลของสารผสม PEG-HPS จากนั้นค่อย ๆ เทเซลล์ตรึงดังกล่าวลงในคอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร ยาว 50 เซนติเมตร ที่ภายในบรรจุด้วยใยสังเคราะห์ นำคอลัมน์แก้วที่บรรจุเซลล์ตรึงไฮโดรเจลต่อเข้ากับถังพักแบบกวน ทำการหมักแบบเบี๊ตเสีร์จหมุนเวียนน้ำหมักด้วยเครื่องสูบ ควบคุมอัตราไหลเท่ากับ 300 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง พีเอช 6 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที และปริมาณออกซิเจนละลายมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพผนวกที่ ๓2



ภาพผนวกที่ ฉ2 ระบบถังหมักเซลล์ยีสต์ตรึงไฮโดรเจลแบบคอลัมน์

ตารางผนวกที่ ฉ1 สภาวะการผลิตไซลิทอลด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงไฮโดรเจล

สภาวะการหมัก	
1. ปริมาตรไฮโดรเจลต่อน้ำหมัก	1 : 2
2. อัตราส่วนปริมาตรเฟสเมมเบรนต่อเฟสใน	1 : 0.33
3. ปริมาตรน้ำหมักในถังหมัก (มิลลิลิตร)	800
4. ความเข้มข้นไซโลส (กรัมต่อลิตร)*	10
5. ไฮโดรเจล (มิลลิลิตร)	400
เฟสใน (มิลลิลิตร)	100
PEG (เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)	10
ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)*	5.07
เฟสเมมเบรน (มิลลิลิตร)	300 ml
HPS (เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)	15
6. ปริมาณออกซิเจนละลาย (เปอร์เซ็นต์)	>70

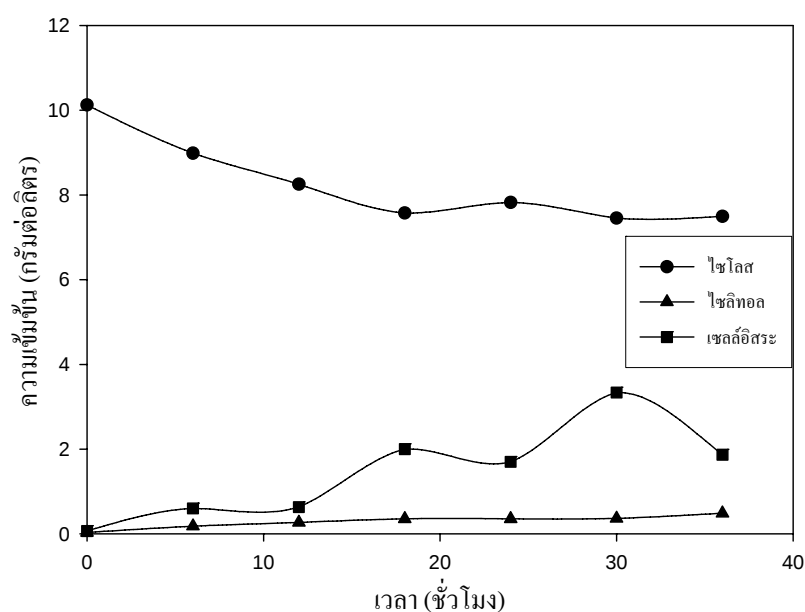
หมายเหตุ * คัดต่อปริมาตรน้ำหมัก (เฟสนอก)

ผลและวิจารณ์

การหมักไซลิทอลจากไซโลสแบบเปิดเสร็จหมุนเวียนน้ำหมักด้วยเซลล์ยีสต์ที่ถูกห่อหุ้มด้วยไฮโดรเจล ซึ่งบรรจุเซลล์ยีสต์ตรึงไฮโดรเจลไว้ในคอลัมน์แก้วที่มีใยสังเคราะห์เพื่อสร้างช่องว่างให้น้ำหมักไหลผ่านไฮโดรเจลห่อหุ้มเซลล์ยีสต์ที่มีลักษณะเป็นของเหลวได้สะดวก ผลของการหมักเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง แสดงดังตารางผนวกที่ น2 และภาพผนวกที่ น3

ตารางผนวกที่ น2 การผลิตไซลิทอลจากไซโลสแบบเปิดเสร็จหมุนเวียนน้ำหมักในระบบถังหมักเซลล์ยีสต์ตรึงไฮโดรเจล

เวลา (ชั่วโมง)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)	เซลล์ยีสระ (กรัมต่อลิตร)
0	10.122	0.032	0.067
6	8.985	0.180	0.600
12	8.252	0.270	0.633
18	7.572	0.354	2.000
24	7.821	0.354	1.700
30	7.454	0.365	3.333
36	7.494	0.487	1.867



ภาพผนวกที่ ๓ การผลิตไซลิตอลจากไซโลสแบบเบ็ดเสร็จหมุนเวียนน้ำหมักด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงไฮโดรเจล

ตารางผนวกที่ ๓ พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการหมักไซลิตอลจากไซโลสแบบ เบ็ดเสร็จหมุนเวียนน้ำหมักด้วยระบบเซลล์ยีสต์ตรึงไฮโดรเจล

พารามิเตอร์	ค่าพารามิเตอร์
$\frac{dC_{xyl}}{dt}$ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.1558
$\frac{dC_{xyl}}{dt}$ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.0198
$Y_{P/S}$ (กรัมต่อกรัม)	0.1275
q_S (กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง)	0.0307
q_P (กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง)	0.0039

หมายเหตุ คำนวณจากระยะเวลาการหมัก 1-12 ชั่วโมง

ในการหมักที่มีการให้อากาศอย่างเพียงพอ (ปริมาณออกซิเจนละลายมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์) ทำให้เซลล์ยีสต์ที่หลุดจากการตรึงด้วยไฮโดรเจลหลังชั่วโมงที่ 12 สามารถเจริญเติบโตเป็นเซลล์ยีสต์อิสระอย่างรวดเร็ว ดังจะเห็นได้ว่ามีความขุ่นของเซลล์ยีสต์เพิ่มขึ้นในถังพักแบบกวน (ตารางผนวกที่ ฅ2 และภาพผนวกที่ ฅ3) เมื่อคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการหมักในช่วงชั่วโมงที่ 0-12 ซึ่งยังไม่มีเซลล์อิสระหลุดออกจากเซลล์ตรึงไฮโดรเจลนั้น แสดงผลการคำนวณดังตารางผนวกที่ ฅ3 ซึ่งพบว่าค่าผลได้ไซลิทอลจากไซโลส ($Y_{P/S}$) ที่ได้เท่ากับ 0.13 กรัมต่อกรัม ต่ำกว่าการหมักไซลิทอลด้วยเซลล์ยีสต์อิสระในสภาวะการหมักเดียวกัน (ประมาณ 0.4-0.5 กรัมต่อกรัม) (วรสิทธิ์, 2541) แต่ก็แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเซลล์ตรึงไฮโดรเจลในการหมักไซโลสเพื่อผลิตไซลิทอลได้ หากมีการศึกษาสภาวะที่ใช้ในการตรึงเซลล์ยีสต์ด้วยระบบไฮโดรเจลที่เหมาะสมในการหมักไซลิทอล และการออกแบบคอลัมน์เซลล์ตรึงไฮโดรเจลที่เหมาะสม ก็จะทำให้สามารถสร้างนวัตกรรมของการผลิตไซลิทอลด้วยเซลล์ตรึงไฮโดรเจลที่เป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการหมักได้ในอนาคต

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	ฤทธิกร ชายน้อย
วัน เดือน ปี ที่เกิด	8 สิงหาคม 2523
สถานที่เกิด	จังหวัดเชียงใหม่
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีวเคมีและชีวเคมีเทคโนโลยี) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (พ.ศ. 2546)
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. ปี พ.ศ. 2548