



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ

เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การผลิตไซลิตอลแบบครั้งคราวซ้ำโดย *Candida magnoliae* TISTR 5663

Repeated Fed-batch Production of Xylitol by *Candida magnoliae* TISTR 5663

นามผู้วิจัย นางสาวศิวพร วรรณวิไล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

( รองศาสตราจารย์สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล, Dr.rer.nat. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( รองศาสตราจารย์วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน, Ph.D. )

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

( ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประมุข กระจุกสุขสถิตย์, Ph.D. )

หัวหน้าภาควิชา

( รองศาสตราจารย์สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญญา ธีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตไซลิตอลแบบครั้งคราวซ้ำโดย *Candida magnoliae* TISTR 5663

Repeated Fed-batch Production of Xylitol by *Candida magnoliae* TISTR 5663

โดย

นางสาวศิวพร วรรณวิไล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศิวพร วรรณวิไล 2553: การผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวซ้ำโดย *Candida magnoliae* TISTR 5663 ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ สาโรจน์ ศิริสันสนียกุล, Dr.rer.nat. 199 หน้า

ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลระหว่างเชื้อยีสต์ *Candida mogii* TISTR 5892 และ *C. magnoliae* TISTR 5663 พบว่าเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5663 เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไซลิทอล โดยเจริญเติบโตและผลิตไซลิทอลได้ดีที่พีเอช 4.0 และ 7.0 ภายใต้สภาวะมีอากาศเพียงพอและจำกัดออกซิเจน ตามลำดับ โดยไม่จำเป็นต้องเติมกลูโคส เป็นสับสเตรตร่วมในการผลิตไซลิทอลจากไซโลส

เนื่องจากปริมาณออกซิเจนละลายมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอล จึงเลือกการประมาณค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายโอนออกซิเจนเชิงปริมาตร ( $k_La$ ) เพื่อใช้เป็นพารามิเตอร์ในการติดตามและควบคุมการหมักไซลิทอลภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยศึกษาความสัมพันธ์ของค่า  $k_La$  กับอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศภายใต้สภาวะที่มีและไม่มีเซลล์ยีสต์

สำหรับการศึกษาการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวซ้ำภายใต้สภาวะความเข้มข้นเซลล์สูงที่มีการควบคุมการเติมแหล่งไนโตรเจน พบว่าความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้นที่เหมาะสมเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะที่มีการควบคุมพีเอช 7.0 อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถให้ผลได้ไซลิทอลจากไซโลสเท่ากับ 0.838 0.938 และ 0.997 กรัมต่อกรัม ณ ความเข้มข้นเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ 22 50 และ 54 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของไซลิทอลเท่ากับ 306 - 336 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตไซลิทอลเชิงปริมาตรเฉลี่ยเท่ากับ 1.79 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ภายใต้ระยะเวลารวมของการหมักแบบครั้งคราวซ้ำ 3 ครั้งเท่ากับ 682.25 ชั่วโมง

Siwaporn Wannawilai 2010: Repeated Fed-batch Production of Xylitol by *Candida magnoliae* TISTR 5663. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Associate Professor Sarote Sirisansaneeyakul, Dr.rer.nat. 199 pages.

In this study, the optimal yeast strain for xylitol production was compared between *Candida mogii* TISTR 5892 and *C. magnoliae* TISTR 5663. It was found that *C. magnoliae* was the better yeast strain grown optimally at pH 4.0 under aerobic condition and produced xylitol maximally at pH 7.0 under oxygen limiting condition. Moreover, glucose, the co-substrate showed no improvement in xylitol production by *C. magnoliae*.

As the dissolved oxygen plays an important role for growth and xylitol formation, the volumetric oxygen transfer coefficient ( $k_La$ ) was selected to both monitor and control xylitol fermentation. Studying a correlation of  $k_La$  affecting by agitation and aeration was investigated under condition with and without yeast cells.

The repeated fed-batch productions of xylitol with high-cell density of *C. magnoliae* were carried out under oxygen limiting condition and nitrogen sources controlled feeding. The xylitol yields of 0.838 0.938 and 0.997 g g<sup>-1</sup> were obtained at average cell concentrations of 22 50 and 54 g l<sup>-1</sup>, respectively with using an initial xylose concentration of 60 g l<sup>-1</sup> controlled at agitation rate 300 rpm, aeration rate 1.0 vvm, pH 7.0 and temperature 30 °C. For the total of 682.25 hours of three repeated fed-batch xylitol fermentation, the average xylitol productivity was 1.79 g l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> with the final xylitol concentration of 306 - 336 g l<sup>-1</sup>.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สาโรจน์ ศิริสันสนียกุล อาจารย์ที่  
ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาช่วยเหลือในการวางแผนการวิจัยและให้โอกาสในการแก้ไข  
ข้อบกพร่องต่าง ๆ ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วง  
ด้วยดี กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.  
ประมุข ทรกุลสุขสถิตย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำในการ  
ทำวิจัยและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ กราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร ลีลาวัชรมาศ  
ประธานการสอบ และรองศาสตราจารย์ ดร. นवलพรรณ ณ ระนอง ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่กรุณา  
แนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช ที่อนุญาตให้ใช้เชื้อยีสต์  
*Candida magnoliae* TISTR 5663 ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ให้ทุนวิจัยมหาดบัณฑิต สกว. สาขา  
วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้โครงการสร้างกำลังคนเพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมระดับปริญญา  
โท (สกว.- สสว.) ปี พ.ศ. 2550

ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ น้องชายและญาติมิตรที่คอยเป็นกำลังใจและให้การสนับสนุน  
ข้าพเจ้าเสมอมา ขอขอบคุณสมาชิกหน่วยวิจัยเทคโนโลยีการหมักทุก ๆ คนสำหรับคำแนะนำ  
บรรยากาศที่ดีในการทำงาน และการให้ความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ และขอขอบคุณรุ่นพี่ทุกคนที่  
ถ่ายทอดความรู้และเทคนิคการทำวิจัย รวมถึงเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ธุรการ ที่  
อำนวยความสะดวกในการเรียนและการทำวิจัยเป็นอย่างดีตลอดมา

สิวพร วรรณวิไล

เมษายน 2553

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(7)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(16)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	34
อุปกรณ์	34
วิธีการ	36
ผลและวิจารณ์	52
สรุปและข้อเสนอแนะ	121
สรุป	121
ข้อเสนอแนะ	123
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	124
ภาคผนวก	136
ภาคผนวก ก ข้อมูลจากการทดลอง	137
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์	190
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	199

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมีที่สำคัญของไซลิทอล	4
2	องค์ประกอบของสารละลายน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน	8
3	สายพันธุ์ยีสต์ในสกุล <i>Candida</i> ที่สามารถผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลส	9
4	พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ <i>C. mogii</i> TISTR 5892	53
5	พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ <i>C. mogii</i> TISTR 5892	55
6	พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ <i>C. magnoliae</i> TISTR 5663 ที่พีเอช 4 และ 7	58
7	พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ <i>C. magnoliae</i> TISTR 5663 ที่พีเอช 4 และ 7	60
8	เปรียบเทียบพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลระหว่างเชื้อยีสต์ <i>C. mogii</i> และ <i>C. magnoliae</i>	61
9	เปรียบเทียบพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ระหว่างการใช้สับสเตรตเดี่ยว (ไซโลส) และสับสเตรตร่วม (กลูโคสและไซโลส) ต่อการผลิตไซลิทอล	63
10	การตรวจทานความถูกต้องของสหสัมพันธ์ของค่า $k_{La}$ กับอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศในน้ำกลั่น	73
11	การตรวจทานความถูกต้องของสหสัมพันธ์ของค่า $k_{La}$ กับอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ	83
12	สรุปค่า $k_{La}$ ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการกวน 300 ถึง 1000 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 0.5 ถึง 2.0 vvm	86
13	สรุปสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า $k_{La}$ , อัตราการกวน ( $N$ ) และอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเซลล์ 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร	102

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14	ค่าสัมประสิทธิ์และค่าคงที่ยกกำลังของสหสัมพันธ์ของค่า $k_{La}$ กับอัตราการกวน ( $N$ ) และอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ภายใต้การแปรผันความเข้มข้นเซลล์ 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร	106
15	สรุปพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวเบื้องต้น ภายใต้สภาวะการหมักที่ควบคุมพีเอช และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	112
16	เปรียบเทียบอัตราจำเพาะและอัตราเชิงปริมาตรของการผลิตไซลิทอลจากไซโลส ด้วยการหมักแบบครั้งคราวครั้งที่ 1 (FB-I) โดยเชื้อยีสต์ <i>C. magnoliae</i> ภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจน	115
17	สรุปพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวซ้ำโดยเชื้อยีสต์ <i>C. magnoliae</i> ภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจนที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm	119
<b>ตารางผนวกที่</b>		
ก1	ผลการทดลองการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ <i>C. mogii</i> จากการเพาะเลี้ยงในระดับพลาสติกที่สภาวะพีเอชเริ่มต้น 4.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที (ภาพที่ 15)	138
ก2	ผลการทดลองการผลิตไซลิทอลจากไซโลสโดยเชื้อยีสต์ <i>C. mogii</i> ในระดับพลาสติกที่สภาวะพีเอชเริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที (ภาพที่ 16A)	139
ก3	ผลการทดลองการผลิตไซลิทอลจากสับสเตรตร่วมกลูโคสและไซโลสโดยเชื้อยีสต์ <i>C. mogii</i> ในระดับพลาสติกที่สภาวะพีเอชเริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที (ภาพที่ 16B)	142

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ก4 ผลการทดลองการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ <i>C. magnoliae</i> จากการเพาะเลี้ยงในระดับพลาสติกที่สภาวะพีเอช 4.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที (ภาพที่ 17A)	145
ก5 ผลการทดลองการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ <i>C. magnoliae</i> จากการเพาะเลี้ยงในระดับพลาสติกที่สภาวะพีเอช 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที (ภาพที่ 17B)	146
ก6 ผลการทดลองการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ <i>C. magnoliae</i> ในระดับพลาสติกที่สภาวะพีเอช 4 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที (ภาพที่ 18A)	147
ก7 ผลการทดลองการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ <i>C. magnoliae</i> ในระดับพลาสติกที่สภาวะพีเอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที (ภาพที่ 18B)	149
ก8 ผลการทดลองการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ <i>C. magnoliae</i> ระดับถังหมัก ที่สภาวะพีเอช 4.0 ออกซิเจนละลาย 70 - 80% ของออกซิเจนอิ่มตัว และพีเอช 7.0 อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm ตามลำดับ (ภาพที่ 19)	151
ก9 ค่า $k_{La}$ เฉลี่ยจากการทดลอง 3 ชั่วโมงในน้ำกลั่นที่อัตราการกวน ( $N$ ) 100 ถึง 1000 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) 0.2 ถึง 2.0 vvm (ภาพที่ 20 และ 21)	152
ก10 ค่า $k_{La}$ เฉลี่ยจากการทดลอง 3 ชั่วโมงในน้ำกลั่นที่อัตราการกวน ( $N$ ) 100 ถึง 800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) 0.2 ถึง 2.0 vvm (ชุดที่ 1)	153
ก11 ค่า $k_{La}$ เฉลี่ยจากการทดลอง 3 ชั่วโมงในน้ำกลั่นที่อัตราการกวน ( $N$ ) 150 ถึง 750 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) 0.35 ถึง 1.75 vvm (ชุดที่ 2)	154
ก12 ค่า $k_{La}$ จากการคำนวณจากสมการที่ 28a โดยใช้สมการ $b_{111}$ , $b_{112}$ และ $b_{113}$ ในน้ำกลั่น (ชุดที่ 1)	155

### สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ก13 ค่า $k_L a$ จากการคำนวณจากสมการที่ 29a ในน้ำกลั่น (ชุดที่ 1)	156
ก14 ค่า $k_L a$ จากการคำนวณจากสมการที่ 28a โดยใช้สมการ $b_{11}$ , $b_{112}$ และ $b_{113}$ ในน้ำกลั่น (ชุดที่ 2)	158
ก15 ค่า $k_L a$ จากการคำนวณจากสมการที่ 29a ในน้ำกลั่น (ชุดที่ 2)	159
ก16 ค่า $k_L a$ เฉลี่ยจากการทดลอง 3 ชั่วโมงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่อัตราการกวน ( $N$ ) 100 ถึง 1000 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) 0.2 ถึง 2.0 vvm (ภาพที่ 29 และ 30)	162
ก17 ค่า $k_L a$ เฉลี่ยจากการทดลอง 3 ชั่วโมงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่อัตราการกวน ( $N$ ) 100 ถึง 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) 0.2 ถึง 2.0 vvm (ชุดที่ 1)	163
ก18 ค่า $k_L a$ เฉลี่ยจากการทดลอง 3 ชั่วโมงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่อัตราการกวน ( $N$ ) 150 ถึง 550 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) 0.35 ถึง 1.75 vvm (ชุดที่ 2)	164
ก19 ค่า $k_L a$ จากการคำนวณจากสมการที่ 30a โดยใช้สมการ $b_{21}$ , $b_{212}$ และ $b_{213}$ ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (ชุดที่ 1)	165
ก20 ค่า $k_L a$ จากการคำนวณจากสมการที่ 31a ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (ชุดที่ 1)	166
ก21 ค่า $k_L a$ จากการคำนวณจากสมการที่ 30a โดยใช้สมการ $b_{21}$ , $b_{212}$ และ $b_{213}$ ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (ชุดที่ 2)	168
ก22 ค่า $k_L a$ จากการคำนวณจากสมการที่ 31a ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (ชุดที่ 2)	169
ก23 การเขียนแบบค่า $k_L a$ จากสมการประมาณค่า $k_L a$ ในน้ำกลั่น (สมการที่ 28b)	172
ก24 การเขียนแบบค่า $k_L a$ จากสมการประมาณค่า $k_L a$ ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (สมการที่ 30b)	173
ก25 การเขียนแบบค่า $k_L a$ จากสมการประมาณค่า $k_L a$ ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร (สมการที่ 32)	174
ก26 การเขียนแบบค่า $k_L a$ จากสมการประมาณค่า $k_L a$ ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (สมการที่ 33)	175

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ก27 การเลียนแบบค่า $k_{La}$ จากสมการประมาณค่า $k_{La}$ ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร (สมการที่ 34)	176
ก28 ผลการทดลองการผลิตไซลิทอลจากไซโลสแบบครั้งคราวเบื้องต้นโดยเชื้อยีสต์ <i>C. magnoliae</i> ที่สภาวะพีเอช 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 62)	177
ก29 ผลการทดลองการผลิตไซลิทอลจากไซโลสแบบครั้งคราวที่มีความเข้มข้นเซลล์สูงโดยเชื้อยีสต์ <i>C. magnoliae</i> ที่สภาวะพีเอช 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 63)	181
ข1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไซโลสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	192
ข2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไซลิทอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	194
ข3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลรีดิวิซ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	195

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เมแทบอลิซึมของไซโลสในยีสต์	11
2	เมแทบอลิซึมของไซโลสและกลูโคสในยีสต์	15
3	ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการให้อากาศ อัตราการถ่ายโอนออกซิเจนที่เวลา X เท่ากับความชันของเส้นสัมผัสที่ลากผ่านจุด Y	19
4	การเปลี่ยนแปลงของ $\ln \frac{C_L^* - C_L^0}{C_L^* - C_L}$ ตามระยะเวลาในการให้อากาศ	21
5	การเปลี่ยนแปลงของ $\frac{C_L^* - C_L^0}{C_L^* - C_L}$ ตามระยะเวลาในการให้อากาศ	21
6	ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายที่เปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาในการประมาณค่า $k_L a$ โดยวิธีการให้อากาศแบบพลวัต (dynamic gassing-out) A = จุดเริ่มหยุดการให้อากาศ ; B = จุดเริ่มการให้อากาศใหม่อีกครั้ง	23
7	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า $C_L$ กับ $\frac{dC_L}{dt} + q_{O_2} C_X$ ซึ่งมีค่าความชันเท่ากับ $-\frac{1}{k_L a}$	23
8	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของออกซิเจนละลายกับระยะเวลาในช่วงหยุดการให้อากาศจนกระทั่งความเข้มข้นของออกซิเจนละลายลดลงต่ำกว่า $C_{crit}$	24
9	การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว	27
10	การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวซ้ำ	31
11	รูปแบบของถังหมักแบบกวนยี่ห้อ B. Braun Biotech International รุ่น Biostat B ขนาด 2 ลิตร และไบปัดแบบเทอร์ไบน์ชนิด 6 ไบปัด โดยแสดงอัตราส่วนของระยะห่างระหว่างไบปัดต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของไบปัด เท่ากับ 1:1 และหัวพ่นอากาศอยู่ด้านล่างของไบปัดด้วยระยะห่าง 2.5 เซนติเมตร	38
12	การประมาณค่า $k_L a$ ในน้ำกลั่นที่อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.2 vvm ซ้ำที่ 1	41

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณออกซิเจนละลายกับเวลา ที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm เมื่อยุติการให้อากาศ (ความเข้มข้นเซลล์ยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร)	46
14	การประมาณค่า $k_{La}$ ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm	47
15	การเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ <i>C. mogii</i> TISTR 5892 ในระดับพลาสติก สภาวะพีเอชเริ่มต้น 4.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที	52
16	การผลิตไซลิทอลแบบเบ็ดเสร็จโดยเชื้อยีสต์ <i>C. mogii</i> TISTR 5892 ในระดับพลาสติก (ก) ระยะการผลิตเซลล์ (เขย่า 250 รอบต่อนาที) และ (ข) ระยะการผลิตไซลิทอล (เขย่า 100 รอบต่อนาที) เมื่อใช้สับสเตรตเดี่ยวไซโลส (A) และสับสเตรตร่วมไซโลสและกลูโคส (B)	54
17	การเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ <i>C. magnoliae</i> TISTR 5663 (A) พีเอช 4 และ (B) พีเอช 7 ในระดับพลาสติก ความคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราเขย่า 250 รอบต่อนาที	57
18	การผลิตไซลิทอลด้วยการหมักแบบเบ็ดเสร็จในระดับพลาสติก โดยเชื้อยีสต์ <i>C. magnoliae</i> TISTR 5663 ความคุม (A) พีเอช 4 และ (B) พีเอช 7 โดยกำหนดให้ (ก) ระยะการผลิตเซลล์ (เขย่า 250 รอบต่อนาที) และ (ข) ระยะการผลิตไซลิทอล (เขย่า 100 รอบต่อนาที)	59
19	การผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ <i>C. magnoliae</i> TISTR 5663 แบบเบ็ดเสร็จ (ก) ระยะการผลิตเซลล์ สภาวะควบคุมพีเอช 4.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ออกซิเจนละลาย 70 - 80 % (ข) ระยะการผลิตไซลิทอล สภาวะควบคุมพีเอช 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm (A) ใช้สับสเตรตร่วมระหว่างกลูโคสและไซโลส (ชั่วโมงที่ 9 - 12) และ (B) ใช้สับสเตรตเดี่ยวไซโลส (ชั่วโมงที่ 12 - 21)	62
20	ความสัมพันธ์ของค่า $k_{La}$ ในน้ำกลั่นที่อัตราการกวน 100 ถึง 1000 รอบต่อนาที	65

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
21	ความสัมพันธ์ของค่า $k_L a$ ในน้ำกลั่นที่อัตราการให้อากาศ 0.2 ถึง 2.0 vvm	65
22	สหสัมพันธ์เส้นตรงระหว่าง $k_L a$ กับอัตราการกวน ( $N$ ) ( $N = 100 - 800$ รอบต่อ นาที)	67
23	ความสัมพันธ์ระหว่างจุดตัดบนแกน $y$ ( $b_{11}$ ) กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ในน้ำ กลั่น ( $N = 100 - 800$ รอบต่อนาที และ $Q = 0.2 - 2.0$ vvm)	68
24	ความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{k_L a - b}{N}$ กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ในน้ำกลั่น ( $N = 100 - 800$ รอบต่อนาที และ $Q = 0.2 - 2.0$ vvm)	68
25	สหสัมพันธ์เส้นตรงระหว่าง $k_L a$ กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ( $N = 100 - 800$ รอบ ต่อนาที)	69
26	ความสัมพันธ์ระหว่างจุดตัดบนแกน $y$ ( $b_{12}$ ) กับอัตราการกวน ( $N$ ) ในน้ำกลั่น ( $N = 100 - 800$ รอบต่อนาที และ $Q = 0.2 - 2.0$ vvm)	70
27	ความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{k_L a - b}{Q}$ กับอัตราการกวน ( $N$ ) ในน้ำกลั่น ( $N = 100 - 800$ รอบต่อนาที และ $Q = 0.2 - 2.0$ vvm)	70
28	ผลของอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศต่อค่า $k_L a$ จากการเลียนแบบสมการ ที่ 28b ในการประมาณค่า $k_L a$ ในน้ำกลั่น	74
29	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า $k_L a$ เฉลี่ยในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่อัตราการกวน 100 ถึง 1000 รอบต่อนาที	76
30	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า $k_L a$ เฉลี่ยในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่อัตราการให้อากาศ 0.2 ถึง 2.0 vvm	76
31	สหสัมพันธ์เส้นตรงระหว่างค่า $k_L a$ กับอัตราการกวน ( $N$ ) ( $N = 100 - 600$ รอบ ต่อนาที)	77
32	ความสัมพันธ์ระหว่างจุดตัดบนแกน $y$ ( $b_{21}$ ) กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ใน อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ( $N = 100 - 600$ รอบต่อนาที และ $Q = 0.2 - 2.0$ vvm)	78

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
33	ความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{k_a - b}{N}$ กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ( $N = 100 - 600$ รอบต่อนาที และ $Q = 0.2 - 2.0$ vvm)	78
34	สหสัมพันธ์เส้นตรงระหว่าง $k_L a$ กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ( $N = 100 - 600$ รอบต่อนาที)	79
35	ความสัมพันธ์ระหว่างจุดตัดบนแกน $y$ ( $b_{22}$ ) กับอัตราการกวน ( $N$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ( $N = 100 - 600$ รอบต่อนาที และ $Q = 0.2 - 2.0$ vvm)	80
36	ความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{k_a - b}{Q}$ กับอัตราการกวน ( $N$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ( $N = 100 - 600$ รอบต่อนาที และ $Q = 0.2 - 2.0$ vvm)	80
37	ผลของอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศต่อค่า $k_L a$ จากการเลียนแบบสมการที่ 30b ในการประมาณค่า $k_L a$ ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ	84
38	สหสัมพันธ์เส้นตรงระหว่างค่า $k_L a$ กับอัตราการกวน ( $N$ ) ( $N = 500 - 1000$ รอบต่อนาที) (ความเข้มข้นเซลล์ 5 กรัมต่อลิตร)	87
39	ความสัมพันธ์ระหว่างจุดตัดบนแกน $y$ ( $b_{311}$ ) กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 5 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$ รอบต่อนาที และ $Q = 0.5 - 2.0$ vvm)	88
40	ความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{k_a - b}{N}$ กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 5 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$ รอบต่อนาที และ $Q = 0.5 - 2.0$ vvm)	88
41	สหสัมพันธ์เส้นตรงระหว่างค่า $k_L a$ กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ( $Q = 0.5 - 1.5$ vvm) (ความเข้มข้นเซลล์ 5 กรัมต่อลิตร)	89

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
42	ความสัมพันธ์ระหว่างจุดตัดบนแกน $y$ ( $b_{321}$ ) กับอัตราการกวน ( $N$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 5 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$ รอบต่อนาที และ $Q = 0.5 - 1.5$ vvm)	90
43	ความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{k}{L} \frac{a-b}{321}$ กับอัตราการกวน ( $N$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 5 กรัมต่อลิตร ( $Q = 0.5 - 1.5$ vvm) (a) $N = 500 - 1000$ รอบต่อนาที และ (b) $N = 600 - 800$ รอบต่อนาที	91
44	สหสัมพันธ์เส้นตรงระหว่างค่า $k_L a$ กับอัตราการกวน ( $N$ ) ( $N = 500 - 1000$ รอบต่อนาที) (ความเข้มข้นเซลล์ 10 กรัมต่อลิตร)	92
45	ความสัมพันธ์ระหว่างจุดตัดบนแกน $y$ ( $b_{312}$ ) กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 10 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$ รอบต่อนาที และ $Q = 0.5 - 2.0$ vvm)	93
46	ความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{k}{L} \frac{a-b}{312}$ กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 10 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$ รอบต่อนาที และ $Q = 0.5 - 2.0$ vvm)	93
47	สหสัมพันธ์เส้นตรงระหว่างค่า $k_L a$ กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ( $Q = 0.5 - 2.0$ vvm) (ความเข้มข้นเซลล์ 10 กรัมต่อลิตร)	95
48	ความสัมพันธ์ระหว่างจุดตัดบนแกน $y$ ( $b_{322}$ ) กับอัตราการกวน ( $N$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 10 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$ รอบต่อนาที และ $Q = 0.5 - 2.0$ vvm)	95
49	ความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{k}{L} \frac{a-b}{322}$ กับอัตราการกวน ( $N$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 10 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$ รอบต่อนาที และ $Q = 0.5 - 2.0$ vvm)	96

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
50	สหสัมพันธ์เส้นตรงระหว่างค่า $k_L a$ กับอัตราการกวน ( $N$ ) ( $N = 500 - 1000$ รอบต่อนาที) (ความเข้มข้นเซลล์ 20 กรัมต่อลิตร)	97
51	ความสัมพันธ์ระหว่างจุดตัดบนแกน $y$ ( $b_{313}$ ) กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 20 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$ รอบต่อนาที และ $Q = 0.5 - 2.0$ vvm)	98
52	ความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{k_L a - b}{N}$ กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 20 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$ รอบต่อนาที และ $Q = 0.5 - 2.0$ vvm)	98
53	สหสัมพันธ์เส้นตรงระหว่างค่า $k_L a$ กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ( $Q = 0.5 - 2.0$ vvm) (ความเข้มข้นเซลล์ 20 กรัมต่อลิตร)	99
54	ความสัมพันธ์ระหว่างจุดตัดบนแกน $y$ ( $b_{323}$ ) กับอัตราการกวน ( $N$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 20 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$ รอบต่อนาที และ $Q = 0.5 - 2.0$ vvm)	100
55	ความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{k_L a - b}{Q}$ กับอัตราการกวน ( $N$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 20 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$ รอบต่อนาที และ $Q = 0.5 - 2.0$ vvm)	100
56	ความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{k_L a - b}{Q}$ กับอัตราการกวน ( $N$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 20 กรัมต่อลิตร ( $N = 600 - 1000$ รอบต่อนาที และ $Q = 0.5 - 2.0$ vvm)	101
57	ผลของอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศต่อค่า $k_L a$ จากการเลียนแบบสมการประมาณค่า $k_L a$ ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$ รอบต่อนาที และ $Q = 0.5 - 2.0$ vvm)	103

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
58	ผลของอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศต่อค่า $k_La$ จากการเลียนแบบสมการ ประมาณค่า $k_La$ ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$ รอบต่อนาที และ $Q = 0.5 - 2.0$ vvm)	103
59	ผลของอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศต่อค่า $k_La$ จากการเลียนแบบสมการ ประมาณค่า $k_La$ ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$ รอบต่อนาที และ $Q = 0.5 - 2.0$ vvm)	104
60	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์ ( $A$ ) กับความเข้มข้นเซลล์ ( $C_X$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเซลล์ 5 ถึง 20 กรัมต่อลิตร	107
61	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าคงที่ยกกำลังของสหสัมพันธ์ ( $B$ ) กับความเข้มข้นเซลล์ ( $C_X$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเซลล์ 5 ถึง 20 กรัมต่อลิตร	107
62	การผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราว โดยเชื้อยีสต์ <i>C. magnoliae</i> TISTR 5663 (ก) ระยะเวลาผลิตเซลล์ครั้งที่ 1 สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ออกซิเจนละลาย 70 - 80 % ของออกซิเจนอิ่มตัว กำหนดพีเอชเริ่มต้น 6.8 และ ครั้งที่ 2 ควบคุมพีเอช 4.0 (ข) ระยะเวลาผลิตไซลิทอล ควบคุมพีเอช 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm โดยกำหนดอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm ระหว่างชั่วโมงที่ 114.25 - 142 (ลูกศรชี้)	111
63	การผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวซ้ำ โดยเชื้อยีสต์ <i>C. magnoliae</i> TISTR 5663 (ก) ระยะเวลาผลิตเซลล์ ภายใต้สภาวะควบคุมพีเอช 4.0 อุณหภูมิ 30 องศา เซลเซียส และออกซิเจนละลาย 70 - 80 % ของออกซิเจนอิ่มตัว (ข) ระยะเวลา ผลิตไซลิทอล ภายใต้สภาวะควบคุมพีเอช 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตรา การกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm (FB-I) ครั้งคราวครั้งที่ ที่ 1 (FB-II) ครั้งคราวครั้งที่ 2 และ (FB-III) ครั้งคราวครั้งที่ 3	114

## สารบัญภาพ (ต่อ)

## ภาพผนวกที่

## หน้า

ก1 การเปรียบเทียบค่า  $k_L a$  ระหว่างการทดลอง  $(k_L a)_{Exp}$  และการคำนวณ  $(k_L a)_{Cal}$  ใน

$$\text{น้ำกลั่น (ชุดที่ 1) จำนวนจากสมการ } \frac{k_L a - b_{11}}{N} = 0.1283Q^{0.3781} \text{ เมื่อ (A) } b_{111} =$$

$$5.2305Q - 10.759; \text{ (B) } b_{112} = 1.6842Q - 8.2953 \text{ และ (C) } b_{113} = 7.5917Q^3 -$$

$$21.187Q^2 + 19.134Q - 12.261 \text{ และ (D) จำนวนจาก } \frac{k_L a - b_{12}}{Q} = 0.4417N^{0.6838}$$

$$\text{เมื่อ } b_{12} = 0.00009N^2 - 0.0108N + 2.7045$$

157

ก2 การเปรียบเทียบค่า  $k_L a$  ระหว่างการทดลอง  $(k_L a)_{Exp}$  และการคำนวณ  $(k_L a)_{Cal}$  ใน

$$\text{น้ำกลั่น (ชุดที่ 2) จำนวนจากสมการ } \frac{k_L a - b_{11}}{N} = 0.1283Q^{0.3781} \text{ เมื่อ (A) } b_{111} =$$

$$5.2305Q - 10.759; \text{ (B) } b_{112} = 1.6842Q - 8.2953 \text{ และ (C) } b_{113} = 7.5917Q^3 -$$

$$21.187Q^2 + 19.134Q - 12.261 \text{ และ (D) จำนวนจาก } \frac{k_L a - b_{12}}{Q} = 0.4417N^{0.6838}$$

$$\text{เมื่อ } b_{12} = 0.00009N^2 - 0.0108N + 2.7045$$

160

ก3 การเปรียบเทียบค่า  $k_L a$  ระหว่างการทดลอง  $(k_L a)_{Exp}$  และการคำนวณ  $(k_L a)_{Cal}$  ใน

$$\text{น้ำกลั่น (ชุดที่ 3) จำนวนจากสมการ } \frac{k_L a - b_{11}}{N} = 0.1283Q^{0.3781} \text{ เมื่อ (A) } b_{111} =$$

$$5.2305Q - 10.759; \text{ (B) } b_{112} = 1.6842Q - 8.2953 \text{ และ (C) } b_{113} = 7.5917Q^3 -$$

$$21.187Q^2 + 19.134Q - 12.261 \text{ และ (D) จำนวนจาก } \frac{k_L a - b_{12}}{Q} = 0.4417N^{0.6838}$$

$$\text{เมื่อ } b_{12} = 0.00009N^2 - 0.0108N + 2.7045$$

161

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่	หน้า
<p>ก4 การเปรียบเทียบค่า <math>k_L a</math> ระหว่างการทดลอง <math>(k_L a)_{Exp}</math> และการคำนวณ <math>(k_L a)_{Cal}</math> ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (ชุดที่ 1) คำนวณจากสมการ <math>\frac{k a - b}{L} \frac{21}{22} = 0.1346Q^{0.3867}</math> เมื่อ (A) <math>b_{211} = -1.7963Q - 7.3236</math>; (B) <math>b_{212} = 3.916Q - 11.742</math> และ (C) <math>b_{213} = -10.963Q^3 + 33.505Q^2 - 28.241Q - 2.9206</math> และ (D) คำนวณจากสมการ <math>\frac{k a - b}{L} \frac{22}{22} = 0.0077N^{1.3265}</math> เมื่อ <math>b_{22} = 0.0002N^2 - 0.0477N + 7.9714</math></p>	167
<p>ก5 การเปรียบเทียบค่า <math>k_L a</math> ระหว่างการทดลอง <math>(k_L a)_{Exp}</math> และการคำนวณ <math>(k_L a)_{Cal}</math> ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (ชุดที่ 2) คำนวณจากสมการ <math>\frac{k a - b}{L} \frac{21}{22} = 0.1346Q^{0.3867}</math> เมื่อ (A) <math>b_{211} = -1.7963Q - 7.3236</math>; (B) <math>b_{212} = 3.916Q - 11.742</math> และ (C) <math>b_{213} = -10.963Q^3 + 33.505Q^2 - 28.241Q - 2.9206</math> และ (D) คำนวณจากสมการ <math>\frac{k a - b}{L} \frac{22}{22} = 0.0077N^{1.3265}</math> เมื่อ <math>b_{22} = 0.0002N^2 - 0.0477N + 7.9714</math></p>	170
<p>ก6 การเปรียบเทียบค่า <math>k_L a</math> ระหว่างการทดลอง <math>(k_L a)_{Exp}</math> และการคำนวณ <math>(k_L a)_{Cal}</math> ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (ชุดที่ 3) คำนวณจากสมการ <math>\frac{k a - b}{L} \frac{21}{22} = 0.1346Q^{0.3867}</math> เมื่อ (A) <math>b_{211} = -1.7963Q - 7.3236</math>; (B) <math>b_{212} = 3.916Q - 11.742</math> และ (C) <math>b_{213} = -10.963Q^3 + 33.505Q^2 - 28.241Q - 2.9206</math> และ (D) คำนวณจากสมการ <math>\frac{k a - b}{L} \frac{22}{22} = 0.0077N^{1.3265}</math> เมื่อ <math>b_{22} = 0.0002N^2 - 0.0477N + 7.9714</math></p>	171
<p>ข1 สไลด์ Haemocytometer ที่ใช้ในการหาปริมาณเซลล์</p>	198

### คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

$A$	=	ค่าสัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์
$b$	=	จุดตัดแกน y
$B$	=	ค่าคงที่ยกกำลัง
$C_L$	=	ความเข้มข้นออกซิเจนละลาย (มิลลิกรัมต่อลิตร)
$C_L^*$	=	ความเข้มข้นออกซิเจนอิ่มตัว (มิลลิกรัมต่อลิตร)
$C_p$	=	ความเข้มข้นไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
$C_p^F$	=	ความเข้มข้นไซลิทอลสุดท้าย (กรัมต่อลิตร)
$C_{xyl}^0$	=	ความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
$C_X$	=	ความเข้มข้นเซลล์ (กรัมต่อลิตร)
$\bar{C}_X$	=	ความเข้มข้นเซลล์เฉลี่ย (กรัมต่อลิตร)
$k_L a$	=	สัมประสิทธิ์การถ่ายโอนออกซิเจนเชิงปริมาตร (ต่อชั่วโมง)
$N$	=	อัตราการกวน (รอบต่อนาที)
$q_p$	=	อัตราจำเพาะของการผลิตไซลิทอล (กรัมต่อกรัม ชั่วโมง)
$q_{xyl}$	=	อัตราจำเพาะของการใช้ไซโลส (กรัมต่อกรัม ชั่วโมง)
$Q_p$	=	อัตราการผลิตไซลิทอลเชิงปริมาตร (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)
$Q$	=	อัตราการให้อากาศ (vvm)
$Q_{glc+xyl}$	=	อัตราการใช้กลูโคสและไซโลสเชิงปริมาตร (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)
$Q_{xyl}$	=	อัตราการใช้ไซโลสเชิงปริมาตร (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)
$Q_X$	=	อัตราการผลิตเซลล์ (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)
$R^2$	=	coefficient of determination
RMSE	=	root means square error
$Y_{X/glucose+xyl}$	=	ผลได้เซลล์จากกลูโคสและไซโลส (กรัมต่อกรัม)
$Y_{P/xyl}$	=	ผลได้ไซลิทอลจากไซโลส (กรัมต่อกรัม)
$\mu$	=	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

## การผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวซ้ำโดย *Candida magnoliae* TISTR 5663

### Repeated Fed-batch Production of Xylitol by *Candida magnoliae* TISTR 5663

#### คำนำ

ไซลิทอลเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ ซึ่งจัดเป็นสารให้ความหวานชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ทดแทนน้ำตาลซูโครสที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันได้ เนื่องจากไซลิทอลมีคุณสมบัติเฉพาะนานัปการที่ได้แก่ ไซลิทอลมีความหวานที่ใกล้เคียงกับซูโครส ช่วยป้องกันฟันผุเนื่องจากไซลิทอลไม่ส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ในช่องปาก มีรสเย็นสดชื่นคล้ายเมนทอล ไซลิทอลดูดซึมน้ำในร่างกายได้ช้า และการใช้ไซลิทอลในร่างกายไม่ขึ้นกับสารอินซูลิน จึงไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณน้ำตาลในเลือด ดังนั้นจึงเหมาะที่จะใช้กับผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวาน จากคุณสมบัติต่าง ๆ เหล่านี้ ทำให้นิยมใช้น้ำตาลไซลิทอลในอุตสาหกรรมอาหาร อาทิ อาหารควบคุมน้ำหนัก หมากฝรั่ง และขนมขบเคี้ยวต่าง ๆ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการใช้ไซลิทอลในยาและเวชภัณฑ์ทางการแพทย์ แต่จากข้อจำกัดของการผลิตไซลิทอลที่มีต้นทุนการผลิตสูงกว่าการผลิตน้ำตาลซูโครส จึงทำให้ไซลิทอลมีราคาสูงกว่าน้ำตาลซูโครสประมาณ 10 เท่า (4 - 5 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม) (Prakasham *et al.*, 2009) แต่จากการที่ผู้บริโภคมีความห่วงใยเกี่ยวกับเรื่องสุขภาพ ทำให้ปริมาณความต้องการบริโภคไซลิทอลเพิ่มมากขึ้น ถึงประมาณ 340 ล้านดอลลาร์สหรัฐต่อปี (Prakasham *et al.*, 2009) มีอัตราการผลิตไซลิทอลที่เพิ่มสูงขึ้นจากอัตราการผลิตเพียง 6,000 ล้านตันต่อปี (สารโจน, 2540/2541) เป็น 20,000 - 40,000 ล้านตันต่อปี (Granström *et al.*, 2007) โดยมีแนวโน้มการใช้ไซลิทอลในอุตสาหกรรมอาหารเพิ่มขึ้น และจากความต้องการบริโภคที่มีมากขึ้น จึงทำให้เกิดภาวะการแข่งขันในการผลิตไซลิทอลติดตามมา ซึ่งการผลิตไซลิทอลในปัจจุบันใช้กระบวนการทางเคมีโดยการเติมไฮโดรเจนที่ต้องใช้สภาวะอุณหภูมิและความดันสูง จึงมีต้นทุนในการผลิตสูง และมีสารปนเปื้อนมาก ทำให้ยากต่อการทำบริสุทธิ์ ความสามารถในการแข่งขันการผลิตไซลิทอลขึ้นอยู่กับภาวะการลดต้นทุนในการผลิตไซลิทอล ทางเลือกดังกล่าวก็คือการผลิตไซลิทอลโดยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพที่ต้องอาศัยกรรมวิธีการหมักด้วยเชื้อยีสต์โดยเฉพาะในสกุล *Candida* อาทิ *C. mogii* (Sirisansaneeyakul *et al.*, 1995) ซึ่งสามารถผลิตไซลิทอลได้ในปริมาณสูง และ *C. magnoliae* (Nakano *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2004) ซึ่งนอกจากสามารถผลิตไซลิทอลได้ในปริมาณสูงแล้วยังเป็นเชื้อยีสต์ที่ทนไซโลสและไซลิทอลความเข้มข้นสูงได้ เป็นต้น

ในการพัฒนาการผลิตไซลิทอลทางเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อวิธีการในการเพิ่มผลได้และอัตราการผลิตไซลิทอลให้สูงขึ้น ได้แก่ การหาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้สูง การใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการตัดต่อยีนให้ได้จุลินทรีย์รีคอมบิแนนต์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้สูง และการออกแบบกระบวนการผลิตไซลิทอลที่เหมาะสม

งานวิจัยนี้ศึกษาเปรียบเทียบการผลิตไซลิทอลระหว่างเชื้อยีสต์ *Candida mogii* TISTR 5892 และ *Candida magnoliae* TISTR 5663 เพื่อคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ดีนำไปใช้ในการศึกษาต่อถึงปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไซลิทอล ได้แก่ พีเอช และสับสเตรตร่วมกลูโคส

จากสภาวะจำกัดออกซิเจนซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ แต่ประสบปัญหาในการควบคุมให้ได้สภาวะจำกัดออกซิเจนตามที่ต้องการ ดังนั้นจึงได้ทำการประมาณค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายโอนออกซิเจนเชิงปริมาตร ( $k_L a$ ) ในสภาวะที่มีและไม่มีเซลล์ยีสต์ และสร้างสหสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวน อัตราการให้อากาศ และความเข้มข้นเซลล์ยีสต์ เพื่อใช้ค่า  $k_L a$  สำหรับควบคุมสภาวะในการหมักให้ได้สภาวะจำกัดออกซิเจนที่เหมาะสมตามที่ต้องการ

นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวที่มีเซลล์ความเข้มข้นสูง โดยการเติมสารอาหารเป็นระยะ (intermittent feed) ซึ่งเป็นกรรมวิธีที่ช่วยเพิ่มอัตราการผลิตและผลได้ของไซลิทอลให้สูงขึ้น ซึ่งสามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตลงได้

จากวิธีการต่าง ๆ เหล่านี้ซึ่งช่วยเพิ่มผลได้และอัตราการผลิตไซลิทอลให้สูงขึ้นได้ จึงน่าจะช่วยลดต้นทุนในการผลิตไซลิทอลในระดับอุตสาหกรรมให้ต่ำกว่าต้นทุนในการผลิตไซลิทอลโดยวิธีการทางเคมี ทำให้สามารถแข่งขันได้กับราคาของน้ำตาลซูโครสในปัจจุบัน ซึ่งเป็นทางเลือกของประเทศไทยที่มีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นจำนวนมากที่จะใช้เป็นวัตถุดิบใช้เพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตไซลิทอล (Parajó *et al.*, 1998; Winkelhausen and Kuzmanova, 1998) ได้จากรากฐานของอุตสาหกรรมการผลิตซอร์บิทอลและมอลทิทอลจากแป้งมันสำปะหลังที่มีอยู่แล้วในประเทศไทยปัจจุบัน

## วัตถุประสงค์

1. การเปรียบเทียบการผลิตไซลิทอลระหว่างเชื้อยีสต์ *Candida mogii* TISTR 5892 และ *Candida magnoliae* TISTR 5663 ระดับฟลาสก์
2. การประมาณค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายโอนออกซิเจนเชิงปริมาตร ( $k_L a$ ) ในสภาวะที่มีและไม่มีเซลล์ยีสต์
3. การผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

## การตรวจเอกสาร

### 1. ไซลิทอล (Xylitol)

#### 1.1 คุณสมบัติ

ไซลิทอล ( $C_5H_{12}O_5$ ; น้ำหนักโมเลกุล 152.1) เป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่ประกอบด้วยคาร์บอนห้าอะตอม จัดเป็นอนุพันธ์ของน้ำตาลไซโลส พบได้ในพืชและผลไม้ตามธรรมชาติ มีคุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมีที่สำคัญสรุปดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมีที่สำคัญของไซลิทอล

คุณสมบัติ	รายละเอียด
โครงสร้าง	$\begin{array}{ccccccc} & \text{H} & \text{OH} & \text{H} & & & \\ &   &   &   & & & \\ \text{HOCH}_2 & - \text{C} & - \text{C} & - \text{C} & - \text{CH}_2\text{OH} \\ &   &   &   & & & \\ & \text{OH} & \text{H} & \text{OH} & & & \end{array}$
รูปร่าง	ผงคริสตัล
สี	ขาว
กลิ่น	ไม่มีกลิ่น
รสชาติ	ความหวานใกล้เคียงซูโครส
จุดเดือด	216 องศาเซลเซียส
จุดหลอมเหลว	93.4-94.7 องศาเซลเซียส
การดูดความชื้น	ดูดความชื้นได้มากกว่าซูโครสแต่ดูดความชื้นได้น้อยกว่าซอร์บิทอล
การละลายในน้ำ	64.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
การละลายในเอทานอล	1.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
การละลายในเมทานอล	6.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
สารเจือปน	แมนนิทอล ซอร์บิทอล กาแลกทิทอล อาราบิทอล

ที่มา: Emodi (1978); อ้างโดย สาโรจน์ (2537ก)

## 1.2 คุณสมบัติอื่น ๆ ที่น่าสนใจของไซลิทอล (สารโรจน์, 2537ก)

1.2.1 ไซลิทอลละลายได้ง่ายในน้ำ ได้สารละลายที่มีความคงตัวสูงแม้ว่าจะถูกความร้อนหรือเก็บทิ้งไว้นานก็ไม่เกิดปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล (Maillard browning) และการเกิดคาราเมล (Caramelization) อย่างน้ำตาลฟรุกโทสหรือเด็คซ์โทรส เมื่อใช้ความร้อนสูงกว่า 150 องศาเซลเซียส จึงเป็นข้อเสียในการใช้ไซลิทอลในผลิตภัณฑ์ที่ต้องการคุณสมบัติดังกล่าว และเนื่องจากมีจุลินทรีย์ไม่มาก ที่สามารถใช้ไซลิทอลได้ จึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของไซลิทอลเก็บรักษาไว้ได้นานไม่เสียหาย

1.2.2 ไซลิทอลให้รสชาติที่ดีและเย็นสดชื่น (cooling effect) คล้ายกับเมนทอล เนื่องจากการละลายของไซลิทอลต้องการความร้อน (Endothermic dissolution) เพราะไซลิทอลมีค่าความร้อนจำเพาะของการละลายเป็นลบ (negative heat of solution) เท่ากับ  $-34.8$  แคลอรีต่อกรัม ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวดีกว่าซอร์บิทอล ( $-26.5$  แคลอรีต่อกรัม)

1.2.3 ไซลิทอลมีความหวานเช่นเดียวกับน้ำตาลทั่วไป แต่มีความหวานมากกว่าแมนนิทอลและซอร์บิทอล 2.5 และ 2 เท่า ตามลำดับ เมื่อเทียบกับซูโครสจะมีค่าความหวานตั้งแต่ 0.85 - 1.25 เท่า ขึ้นอยู่กับค่าพีเอช ความเข้มข้น และอุณหภูมิ เป็นต้น เช่น ไซลิทอลที่มีความเข้มข้น 10 % จะมีความหวานเท่ากับน้ำตาลซูโครส 10 % ถ้าความเข้มข้นมากกว่า 10 % สารละลายไซลิทอลจะมีความหวานมากกว่า แต่ถ้าความเข้มข้นน้อยกว่า 10 % สารละลายซูโครสจะมีความหวานมากกว่า หรือความหวานสัมพัทธ์ (Relative sweetness) ของไซลิทอล เมื่อเทียบกับซูโครสจะลดลงจาก 103 เป็น 78 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิของสารละลายที่มีความเข้มข้น 5 % จาก 5 ถึง 50 องศาเซลเซียส เป็นต้น

1.2.4 พลังงานที่ได้จากไซลิทอล 1 กรัมเท่ากับ 4.06 กิโลแคลอรี ซึ่งเหมือนกับคาร์โบไฮเดรตทั่วไป แต่การใช้ไซลิทอลผสมกับน้ำตาลหรือสารให้ความหวานชนิดอื่นสามารถคงความหวานและรสชาติของผลิตภัณฑ์เช่นเดิม แต่สามารถลดแคลอรีได้ 50 - 70 % ซึ่งได้มีการใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มประเภทชา กาแฟ น้ำผลไม้ และน้ำอัดลม จึงเหมาะสมกับผู้บริโภคที่ต้องการควบคุมน้ำหนักเป็นอย่างดี

1.2.5 ไชลิทอลป้องกันฟันผุ (non-cariogenicity) เนื่องจากจุลินทรีย์ในช่องปาก โดยเฉพาะ *Streptococcus mutans* ไม่สามารถใช้ไชลิทอลเป็นแหล่งอาหารได้ ทำให้สภาพพิเอชบนเคลือบฟันไม่ต่ำกว่า 5.7 คือไม่มีการผลิตกรดขึ้นจึงไม่ทำให้ฟันผุ

1.2.6 ไชลิทอลสามารถนำไปใช้กับผู้ป่วยโรคเบาหวานได้ เนื่องจากการใช้ไชลิทอลในร่างกายไม่ขึ้นกับสารอินซูลิน (insulin) และเป็นสารให้ความหวานที่ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณน้ำตาลในเลือด

1.2.7 ไชลิทอลช่วยยืดอายุผลิตภัณฑ์ได้ เนื่องจากมีจุลินทรีย์น้อยชนิดที่สามารถใช้ไชลิทอลได้ ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่มีไชลิทอลเป็นองค์ประกอบจึงไม่เสื่อมเสียง่าย สามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน

### 1.3 ประโยชน์ของไชลิทอล (สารโรจนัน, 2537ก)

#### 1.3.1 การนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

ในอุตสาหกรรมอาหารพบว่ามีแนวโน้มการใช้ไชลิทอลอย่างแพร่หลายในหมากฝรั่ง ผลิตภัณฑ์ขนมอบ แยม มาร์มาเลด และผลิตภัณฑ์ขนมหวาน เป็นต้น เนื่องจากไชลิทอลมีคุณสมบัติเฉพาะหลายประการที่เหมาะสมสามารถใช้ทดแทนน้ำตาลได้ นอกจากนี้ยังมีข้อดีคือไม่ทำให้ฟันผุ เนื่องจากจุลินทรีย์ในช่องปากไม่สามารถใช้ไชลิทอลเป็นแหล่งอาหารได้ ปกติการใช้ไชลิทอลจะให้คุณภาพของผลิตภัณฑ์ทัดเทียมกัน หรือดีกว่าการใช้น้ำตาลซูโครส อาทิ คุณสมบัติที่เย็นสดชื่นของไชลิทอล และยังช่วยเพิ่มคุณค่าทางรสชาติจำพวกรสเปปเปอร์มินต์ มะนาว และรสผลไม้ต่างๆ

#### 1.3.2 การนำไปใช้ในทางการแพทย์

การใช้ไชลิทอลเป็นอาหารทางสายยางสำหรับผู้ป่วย เนื่องจากไชลิทอลไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยากับกรดอะมิโน ทำให้การเตรียมอาหารเหลวสำหรับใช้ทางสายยางง่ายกว่าการเตรียมโดยใช้น้ำตาลกลูโคส และการใช้ไชลิทอลในร่างกายไม่ขึ้นกับสารอินซูลิน จึงทำให้ปัญหาในการใช้น้ำตาลกลูโคสของผู้ป่วยหมดไป และใช้ไชลิทอลเป็นอาหารของผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานเพราะไชลิทอลยังเป็นสารให้ความหวานที่ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณน้ำตาลในเลือด ซึ่งเป็นผลดีต่อผู้ป่วย

โรคเบาหวาน และยังคงปัญหาการเกิดฟันผุได้อีกด้วย ทำให้มีผลดีต่อผู้ป่วยที่จำเป็นต้องบริโภคน้ำเป็นเวลานาน โดยไม่ได้ทำความสะอาดช่องปาก นอกจากนี้พบว่าการใช้ไซลิทอลซึ่งไม่มีโครงสร้างของกลุ่มคาร์บอนิล เช่นน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหลาย จึงไม่มีผลต่อปฏิกิริยาทางเคมี ทำให้สารละลายที่เตรียมขึ้นมีความคงตัวสูง และไซลิทอลไม่มีคุณสมบัติทางการฆ่าเหล่าโดยการทดลองในห้องปฏิบัติการ ทำให้มั่นใจว่าไซลิทอลจะไม่ก่อให้เกิดโรคมะเร็งได้

#### 1.4 การผลิตไซลิทอล

##### 1.4.1 การสกัดไซลิทอลจากแหล่งธรรมชาติ

ไซลิทอลพบได้ในผักและผลไม้ตามธรรมชาติ เช่น ลูกพรุนเหลือง สตอเบอร์รี่ ดอกกะหล่ำ ราสป์เบอร์รี่ ผักกาด ผักขม หัวหอม แครอท กัลย และลูกเกาดัด เป็นต้น แต่ผักและผลไม้เหล่านี้มีปริมาณไซลิทอลค่อนข้างต่ำ ดังนั้นการสกัดไซลิทอลจากแหล่งธรรมชาติจึงไม่คุ้มกับการลงทุนในระดับอุตสาหกรรม (สาโรจน์, 2540/2541; Kim, 2006)

##### 1.4.2 การผลิตไซลิทอลด้วยวิธีการทางเคมี (สาโรจน์, 2537ก)

เนื่องจากการสกัดไซลิทอลจากแหล่งธรรมชาติซึ่งมีปริมาณไซลิทอลน้อยจึงไม่คุ้มทุนในแง่เชิงพาณิชย์ การผลิตไซลิทอลในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เป็นการผลิตด้วยวิธีการทางเคมี โดยใช้กระบวนการไฮโดรจีเนชันเปลี่ยนสารตั้งต้นน้ำตาลไซโลสให้เป็นไซลิทอล ซึ่งมีแหล่งวัตถุดิบที่สามารถใช้เป็นแหล่งของน้ำตาลไซโลสได้ เช่น วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เศษเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมไม้ และน้ำทิ้งจากโรงงานทำเยื่อกระดาษ เป็นต้น โดยมีขั้นตอนในกระบวนการผลิตดังนี้

1. ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เป็นขั้นตอนการสกัดน้ำตาลไซโลสจากส่วนของเฮมิเซลลูโลส โดยใช้กรดซัลฟูริกเจือจาง หรือด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์
2. การทำน้ำตาลไซโลสให้บริสุทธิ์
3. ปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชัน เป็นขั้นตอนการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสให้เป็นไซลิทอลภายใต้สภาวะความดัน 50 บรรยากาศ อุณหภูมิ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง โดยมีโลหะ



แต่จุลินทรีย์ที่นิยมมากที่สุดในการผลิตไซลิทอล คือ ยีสต์ โดยเฉพาะในสกุล *Candida* ที่สามารถใช้ น้ำตาลไซโลสเพื่อการเจริญและสะสมไซลิทอล (กัญญา, 2537) โดยสายพันธุ์ยีสต์ในสกุล *Candida* ที่สามารถผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสได้แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สายพันธุ์ยีสต์ในสกุล *Candida* ที่สามารถผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลส

สายพันธุ์	เอกสารอ้างอิง
<i>Candida sp.</i> L-102	Lu <i>et al.</i> (1995)
<i>Candida boidinii</i> BCRC 21432	Ko <i>et al.</i> (2008)
<i>Candida boidinii</i> NO2201	Vongsavanlert and Tani (1989)
<i>Candida boidinii</i> NRRL Y-17213	Vandeska <i>et al.</i> (1996); Winkelhausen <i>et al.</i> (2008)
<i>Candida guilliermondii</i> BCRC 21549	Ko <i>et al.</i> (2008)
<i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037	Babosa <i>et al.</i> (1988); Branco <i>et al.</i> (2007, 2009); Canilha <i>et al.</i> (2005); Carvalho <i>et al.</i> (2003, 2004, 2005); Cortez and Roberto (2010a, 2010b); Cunha <i>et al.</i> (2006, 2007); Felipe <i>et al.</i> (1997); Gurpilhares <i>et al.</i> (2006, 2009); Martinez <i>et al.</i> (2003, 2007); Mayerhoff <i>et al.</i> (1997); Mussatto <i>et al.</i> (2006); Mussatto and Roberto (2003, 2004); Preziosi-Belloy <i>et al.</i> (2000); Rodrigues <i>et al.</i> (1999, 2003, 2006); Santos <i>et al.</i> (2005a, 2005b, 2005c, 2005d, 2008); Silva <i>et al.</i> (1996, 2003, 2006, 2007); Silva and Roberto (2001a, 2001b)
<i>Candida guilliermondii</i> IM 50088	Aguiar Jr. <i>et al.</i> (2002)
<i>Candida guilliermondii</i> NRC 5578	Meyrial <i>et al.</i> (1991)
<i>Candida magnoliae</i> TISTR 5663	Nakano <i>et al.</i> (2000); Tada <i>et al.</i> (2004)
<i>Candida mogii</i> ATCC 18364	Baishan <i>et al.</i> (2003); Sirisansaneeyakul <i>et al.</i> (1995)
<i>Candida mogii</i> NRRL Y-17032	Mayerhoff <i>et al.</i> (1997)
<i>Candida parapsilosis</i> IZ-1710	Mayerhoff <i>et al.</i> (1997)
<i>Candida peltata</i> NRRL Y-6888	Saha and Bothast (1999)

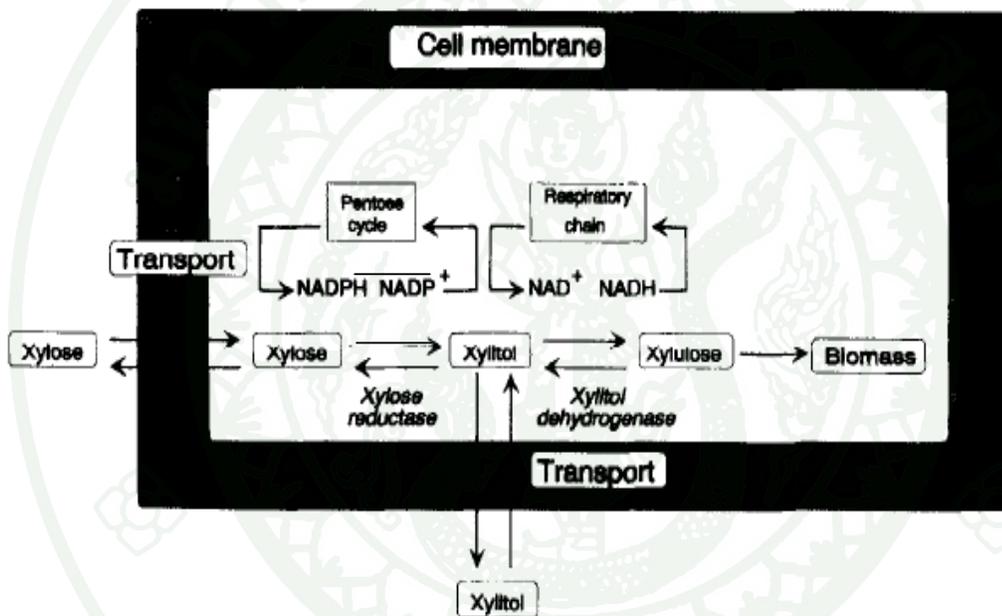
### ตารางที่ 3 (ต่อ)

สายพันธุ์	เอกสารอ้างอิง
<i>Candida subtropicalis</i> WF79	Liaw <i>et al.</i> (2008)
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	Choi <i>et al.</i> (2000); Kastner <i>et al.</i> (2001); Kim <i>et al.</i> (1999, 2002, 2004)
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 20311	López <i>et al.</i> (2004)
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 96745	Walther <i>et al.</i> (2001)
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 9968	Sheu <i>et al.</i> (2003)
<i>Candida tropicalis</i> BCRC 20520	Ko <i>et al.</i> (2008)
<i>Candida tropicalis</i> DSM 7524	Tamburini <i>et al.</i> (2010)
<i>Candida tropicalis</i> HXP2	Gong <i>et al.</i> (1981)
<i>Candida tropicalis</i> IFO 0618	Horitsu <i>et al.</i> (1992); Sanchez <i>et al.</i> (2008); Yahashi <i>et al.</i> (1996)
<i>Candida tropicalis</i> KCTC 10457	Kwon <i>et al.</i> (2006)
<i>Candida tropicalis</i> NRRL-Y 1367	López <i>et al.</i> (2004)
<i>Candida tropicalis</i> W103	Cheng <i>et al.</i> (2009)
<i>Candida utilis</i> BCRC 20334	Ko <i>et al.</i> (2008)
<i>Candida veronae</i> IZ-945	Mayerhoff <i>et al.</i> (1997)

#### 1.5 เมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสในยีสต์

ยีสต์ใช้น้ำตาลไซโลสเพื่อสร้างไซลูโลส-5-ฟอสเฟต (xylulose-5-phosphate) โดยน้ำตาลไซโลสเมื่อเข้าสู่เซลล์ยีสต์จะถูกเปลี่ยนไปเป็นไซลูโลส ซึ่งการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นไซลูโลสนั้นจะมีความแตกต่างกันในจุลินทรีย์พวกโปรคาริโอตและยูคาริโอต กล่าวคือในโปรคาริโอตน้ำตาลไซโลสจะถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลสด้วยปฏิกิริยาไอโซเมอร์ไรเซชัน โดยเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอร์เลส (Yoshitake *et al.*, 1973; Yoshitake *et al.*, 1976) ส่วนในยูคาริโอตน้ำตาลไซโลสจะเปลี่ยนเป็นไซลูโลสด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชันและรีดักชัน โดยน้ำตาลไซโลสจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นไซลิทอลด้วยเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส ซึ่งต้องการ NADPH เป็นโคเอนไซม์ และไซลิทอลจะถูกออกซิไดซ์ได้เป็นไซลูโลสโดยเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส ซึ่งต้องการ NAD<sup>+</sup> เป็น

โคเอนไซม์ (สารโรจน์, 2537ข) คุณสมบัติของเอนไซม์ทั้งสองจะแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ของยีสต์ ทำให้มีความสำคัญต่อกลไกเมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลส จึงเป็นผลให้ยีสต์บางสายพันธุ์สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้เฉพาะในการเจริญแบบให้อากาศ และบางสายพันธุ์ใช้ได้ทั้งในสภาพการเจริญแบบให้อากาศและไม่ให้อากาศ จากนั้นไซลูโลสจะถูกฟอสฟอริเลตก่อนที่จะเข้าสู่วัฏจักรเพนโทส เพื่อสังเคราะห์มวลชีวภาพและพลังงานต่อไป กระบวนการสร้างและสลายดังกล่าวแสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 เมแทบอลิซึมของไซโลสในยีสต์

ที่มา: Sirisansaneeyakul *et al.* (1995)

การที่ยีสต์บางสายพันธุ์เมื่อใช้น้ำตาลไซโลสในสภาพที่มีออกซิเจนจำกัดสามารถสะสมไซลิตอลได้ในปริมาณมากนั้น เพราะชนิดของโคเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาของเอนไซม์ xylose reductase และ xylitol dehydrogenase ในเซลล์ยีสต์เป็นชนิดละชนิด กล่าวคือโคเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาเอนไซม์ xylose reductase คือ NADPH ส่วนในปฏิกิริยาเอนไซม์ xylitol dehydrogenase โคเอนไซม์ที่ใช้คือ NAD<sup>+</sup> ดังนั้นในสภาพที่มีออกซิเจนจำกัด โคเอนไซม์ NADH และ NADPH จึงมีปริมาณมากส่งผลให้ไซโลสถูกเร่งเปลี่ยนเป็นไซลิตอลได้โดยใช้โคเอนไซม์ NADPH ขณะที่ไซลิตอลเปลี่ยนเป็นไซลูโลสได้น้อยเนื่องจากขาดโคเอนไซม์ NAD<sup>+</sup> และในขณะเดียวกันไม่

สามารถใช้  $\text{NADP}^+$  ที่เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ xylose reductase สำหรับการเปลี่ยนไซลิทอลให้เป็นไซลูลอส์ได้ ดังรายงานของ Horitsu *et al.* (1992) ที่ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ xylose reductase กับ xylitol dehydrogenase จากเชื้อยีสต์ *Candida tropicalis* IFO 0618 ที่เพาะเลี้ยงในสภาพที่มีออกซิเจนต่ำ พบว่ายีสต์นี้มีเอนไซม์ NADPH-linked xylose reductase และ  $\text{NAD}^+$ -linked xylitol dehydrogenase ในขณะที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ NADH-linked xylose reductase และ  $\text{NADP}^+$ -linked xylitol dehydrogenase ต่ำมาก ดังนั้นการสร้าง  $\text{NAD}^+$  จากเอนไซม์ NADH-linked xylose reductase จึงไม่เกิดขึ้น ทำให้เกิดภาวะขาดแคลน  $\text{NAD}^+$  ในการออกซิไดซ์ไซลิทอลเป็นไซลูลอส์ จึงเป็นสาเหตุทำให้เกิดการสะสมไซลิทอลในภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด

จากการศึกษาในเชื้อยีสต์ *Candida mogii* ATCC 18364 (Sirisansaneeyakul *et al.*, 1995) สรุปได้ว่า ปริมาณออกซิเจนมีผลต่อการสังเคราะห์ปริมาณ โคเอนไซม์ NADH โดยที่อัตราการให้อากาศน้อยลงจะทำให้ปริมาณ โคเอนไซม์ NADH ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น เนื่องจากการสลายโคเอนไซม์ NADH ด้วยกระบวนการหายใจไม่เพียงพอ ทำให้เป็นการเร่งปฏิกิริยาย้อนกลับของเอนไซม์ xylitol dehydrogenase เกิดการสะสมเพิ่มปริมาณของไซลิทอลภายในเซลล์และส่งผลให้มีการจับเอาไซลิทอลออกนอกเซลล์มากขึ้น ดังผลการทดลองได้ผลได้ของการผลิตไซลิทอลเพิ่มขึ้นเป็น 0.63 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซลูลอส์ภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจน

## 2. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตไซลิทอล

### 2.1 พีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (วรสิทธิ์, 2541)

พีเอชของน้ำหมักในระหว่างกระบวนการหมักจะมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา ในกรณีที่การเพาะเลี้ยงนั้นใช้แอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจน ค่าของพีเอชมีแนวโน้มที่จะลดลง เพราะแอมโมเนียเมื่ออยู่ในสารละลายจะอยู่ในรูป  $\text{NH}_4^+$  เมื่อจุลินทรีย์นำเข้าสู่เซลล์จะอยู่ในรูป  $\text{R-NH}_3^+$  แล้วปลดปล่อย  $\text{H}^+$  ออกสู่น้ำหมัก ถ้าใช้ในเทรตเป็นแหล่งไนโตรเจน  $\text{H}^+$  ในน้ำหมักจะถูกใช้เพื่อรีดิวซ์  $\text{NO}_3^-$  ไปเป็น  $\text{R-NH}_3^+$  ทำให้พีเอชมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ถ้าจุลินทรีย์ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเจริญเติบโตพีเอชจะเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงอาจเกิดจากการผลิตกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลกติก กรดแอสซิติค หรือกรดไพรูวิก เป็นต้น

ค่าพีเอชของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นพารามิเตอร์สำคัญที่มีผลกระทบต่อ การเจริญเติบโตของเซลล์ และการเกิดผลิตภัณฑ์ของกระบวนการหมัก ยีสต์และราชอบเจริญในสภาพที่

เป็นกรดพอสมควร คือในระดับ 3.8 - 5.5 ถ้าพีเอชต่ำกว่า 3.5 การเจริญจะลดลง ถ้าพีเอชต่ำถึง 3.0 หรือน้อยกว่านั้นก็ไม่เจริญ ดังนั้นในการหมักจึงนิยมปรับให้มีพีเอชในช่วง 4.0 - 4.5 (วรวิฑูรี, 2529) ซึ่งพีเอชที่เจริญเติบโตได้ดีที่สุดจะอยู่ในช่วงแคบ ๆ ดังนั้นจึงต้องมีการควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมโดยการใส่บัฟเฟอร์ หรือการใช้ระบบควบคุมพีเอช

ในกระบวนการหมักหลายประเภท ค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตจะแตกต่างจากค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเกิดผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจึงต้องมีการหาพีเอชที่เหมาะสมที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงและการผลิตผลิตภัณฑ์ ตัวอย่างเช่นการศึกษาของวารสิทธิ (2541) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ *Candida mogii* ATCC 18364 (TISTR 5892) คือ 4.5 และ 6.0 ภายใต้อากาศอย่างเพียงพอ และจำกัดออกซิเจนตามลำดับ

## 2.2 แหล่งไนโตรเจน

เซลล์จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณ 8 -10 % ของน้ำหนักแห้ง ความต้องการไนโตรเจนของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจน แต่บางชนิดจะต้องการไนโตรเจนจากสารอินทรีย์ โดยแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมหมัก ได้แก่ แก๊สแอมโมเนีย เกลือแอมโมเนียม และไนเตรต เป็นต้น เกลือแอมโมเนียม ส่วนแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน อาจใช้ในรูปกรดอะมิโน โปรตีน หรือยูเรีย โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์จะเจริญในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจนได้เร็วกว่าในอาหารที่มีอินทรีย์ไนโตรเจน แต่เนื่องจากกรดอะมิโนบริสุทธิ์มีราคาแพง ดังนั้นโดยทั่วไปจึงนิยมใช้กรดอะมิโนจากสารประกอบเชิงซ้อน ได้แก่ น้ำแช่ข้าวโพด, ถั่วเหลือง, กากถั่วเหลือง, กากถั่วลิสง, casein hydrolysate, fish meal และ yeast extract เป็นต้น

โดยที่จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารประกอบไนโตรเจนได้แตกต่างกัน การเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจึงขึ้นอยู่กับว่าจุลินทรีย์สามารถใช้สารประกอบชนิดใดได้ดีพิจารณาควบคู่กับราคาของแหล่งไนโตรเจน และประสิทธิภาพในการสร้างผลผลิตด้วย

จากการศึกษาของวิเชียรและคณะ (2538) ในการผลิตไซลิทอลจากไซโลสโดยยีสต์ *Candida sp.* WT 52 พบว่าการเติมยูเรีย 2.27 กรัมต่อลิตรทำให้เชื่อมีการเจริญเติบโตและผลิตไซลิทอลสูงสุด 75.8 กรัมต่อลิตร จากไซโลส 100 กรัมต่อลิตร และการเพิ่มความเข้มข้นยูเรียทำให้

การสะสมไซลิทอลลดลงเล็กน้อย แต่ทำให้เชื้อเจริญเติบโตขึ้น ส่วนการเติม casamino acids 1 หรือ 5 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารที่มียูเรีย 2.27 กรัมต่อลิตรช่วยเพิ่มผลผลิตไซลิทอลได้เล็กน้อย

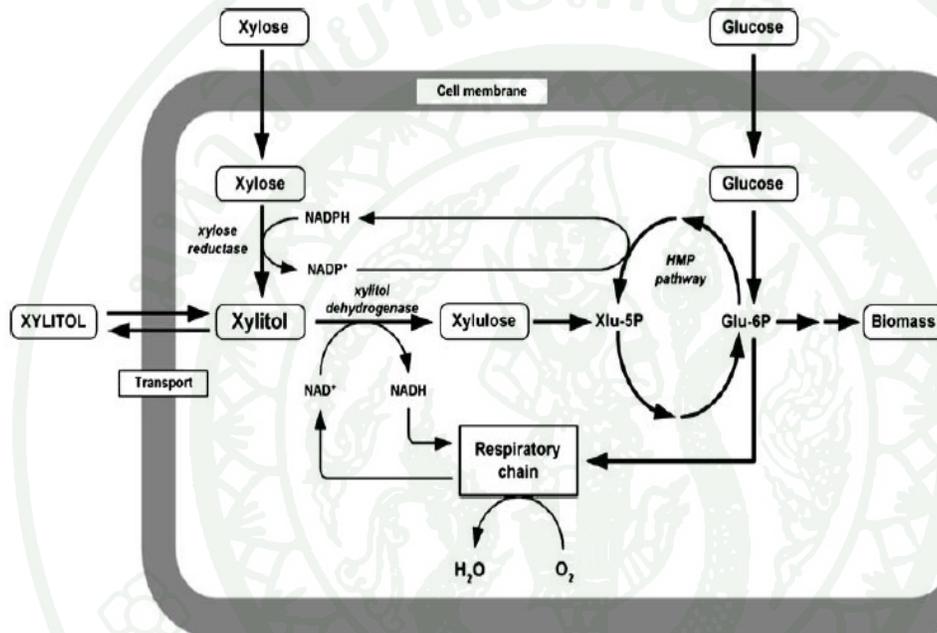
### 2.3 ผลของการใช้สับสเตรตร่วม

สำหรับวัตถุประสงค์ของการใช้สับสเตรตร่วมเพื่อเพิ่มผลได้ และอัตราการผลิตเชิงปริมาณของไซลิทอล จึงมีการศึกษาหาแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นมาเป็นสับสเตรตร่วมกับน้ำตาลไซโลสในการหมักโดยส่วนใหญ่จะใช้น้ำตาลกลูโคส เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและเซลล์จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ง่ายที่สุด สามารถนำผ่านเข้ามาภายในเซลล์ได้ผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์ โดยการใช้พลังงานจากสารพลังงานเรียกว่า active transport และวิธีเปลี่ยนกลูโคสเป็นกลูโคส-6-ฟอสเฟต เรียกกระบวนการนี้ว่า group translocation หรือ phosphotransferase อาจมีผลทำให้มีการเจริญค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น (กฤษณากร, 2549) กลูโคสจึงช่วยในการเจริญของเซลล์และเพื่อใช้เซลล์ต่อไปในช่วงการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสไปเป็นไซลิทอล นอกจากนี้น้ำตาลกลูโคสยังถูกใช้เพื่อสร้างโคเอนไซม์ NADPH ที่จำเป็นต่อการทำงานของเอนไซม์ xylose reductase (ภาพที่ 2) ดังนั้นการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสับสเตรตร่วมกับน้ำตาลไซโลสจึงช่วยเพิ่มอัตราการผลิตเชิงปริมาณไซลิทอลได้ (Kim *et al.*, 1999; Tochampa *et al.*, 2005) แต่มีบางงานวิจัยพบว่ากลูโคสยับยั้ง (repression) การสังเคราะห์เอนไซม์ได้จากกระบวนการ catabolite repression ดังนั้นการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสับสเตรตร่วมจึงไปยับยั้งการขนส่งน้ำตาลไซโลสเข้าสู่เซลล์และทำให้เกิดการสะสมเอทานอลซึ่งไปทำลายเซลล์ได้ การแก้ปัญหาดังกล่าวจึงต้องควบคุมปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ให้เหมาะสมในการหมักแบบครั้งคราว (fed-batch)

โดย Tochampa *et al.* (2005) ซึ่งศึกษาผลของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เป็นสับสเตรตร่วมกับน้ำตาลไซโลสในการหมักแบบเบ็ดเสร็จ พบว่าการใช้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสต่อน้ำตาลไซโลสมากกว่า 10% ได้อัตราการผลิตไซลิทอลลดลง เนื่องจากการใช้ไซโลสถูกยับยั้งโดยน้ำตาลกลูโคส

Choi *et al.* (2000) ได้ศึกษาการผลิตไซลิทอลด้วยระบบการหมักแบบเบ็ดเสร็จ (batch) โดยใช้การหมวนเวียนเซลล์ยีสต์ *Candida tropicalis* ATCC 13803 พบว่าการเติมน้ำตาลกลูโคสไซโลส และ yeast extract ในช่วงการผลิตไซลิทอลช่วยเพิ่มอัตราการผลิตไซลิทอลได้ โดยได้ผลได้ 0.82 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลส อัตราการผลิตไซลิทอล 4.94 กรัมไซลิทอลต่อลิตร ชั่วโมง และได้ความเข้มข้นสุดท้ายของไซลิทอล 189 กรัมต่อลิตร

จากการศึกษาของ Lee *et al.* (2000) พบว่าการใช้อัตราส่วนน้ำตาลไซโลสต่อน้ำตาลกลูโคสสูงในช่วงการผลิตไซลิตอลในการหมักแบบครั้งคราวโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ได้รับยีนเอนไซม์ xylose reductase จาก *Pichia stipitis* ผลิตไซลิตอลได้ 105.2 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิต 1.69 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง



ภาพที่ 2 เมแทบอลิซึมของไซโลสและกลูโคสในยีสต์

ที่มา: Tochampa *et al.* (2005)

## 2.4 ผลของสารประกอบอื่นๆ

ปัจจุบันพบว่าสารประกอบฟีนอลิกที่ได้จากการย่อยสลายลิกนินช่วยเพิ่มการผลิตไซลิตอลได้ โดยงานวิจัยของ Cortez และ Roberto (2010a, 2010b) พบว่าการเติมสารวานิลินซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *C. guilliermondii* ให้ผลได้ไซลิตอล 0.81 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิตไซลิตอล 0.74 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง

### 3. การให้อากาศและการกวน

จุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักส่วนใหญ่ มักต้องการออกซิเจนเพื่อการเจริญเติบโต ฉะนั้นการให้อากาศจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อให้จุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลวได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ ส่วนการกวนมีวัตถุประสงค์เพื่อให้จุลินทรีย์และสารอาหารในถังหมักกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ

#### 3.1 ทฤษฎีการถ่ายโอนออกซิเจน

การถ่ายโอนออกซิเจนเข้าสู่เซลล์เป็นกระบวนการที่มีหลายขั้นตอนดังนี้ คือ

1. การถ่ายโอนออกซิเจนจากฟองอากาศให้ละลายเข้าไปในอาหารเหลว
2. การถ่ายโอนออกซิเจนจากอาหารเหลวไปยังเซลล์จุลินทรีย์
3. การดูดซึมออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเหลวเข้าสู่เซลล์จุลินทรีย์

อัตราการถ่ายโอนออกซิเจนจากฟองอากาศให้ละลายเข้าไปในของเหลวสามารถอธิบายได้โดยใช้สมการดังนี้

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a (C_L^* - C_L) \quad (1)$$

เมื่อ	$C_L$	คือ ความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเหลว (มิลลิกรัมต่อลิตร)
	$t$	คือ เวลา (ชั่วโมง)
	$C_L^*$	คือ ความเข้มข้นอิ่มตัวของออกซิเจนที่ละลายได้ในอาหารเหลว (มิลลิกรัมต่อลิตร)
	$\frac{dC_L}{dt}$	คือ การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของออกซิเจนในระยะเวลาหนึ่ง หรืออัตราการถ่ายโอนออกซิเจน (มิลลิกรัมของออกซิเจนต่อลิตร ชั่วโมง)
	$k_L$	คือ สัมประสิทธิ์การถ่ายโอนออกซิเจน (เซนติเมตรต่อชั่วโมง)
	$a$	คือ พื้นผิวที่อยู่ระหว่างฟองอากาศและของเหลวต่อปริมาตรของของเหลว (ตารางเซนติเมตรต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)

อาจพิจารณาค่า  $k_L$  ได้ว่าเป็นส่วนกลับของความต้านทานต่อการถ่ายโอนออกซิเจนจากก๊าซไปยังของเหลว และ  $(C_L^* - C_L)$  หมายถึง แรงผลักดันที่จะเอาชนะความต้านทาน ในทางปฏิบัติการวัดค่า  $k_L$  และ  $a$  ในกระบวนการหมักนั้นกระทำได้ยาก โดยทั่วไปจึงวัดค่าทั้งสองเป็นค่า  $k_L a$  หมายถึงค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายโอนออกซิเจนเชิงปริมาตร มีหน่วยเป็น ต่อชั่วโมง การวัดประสิทธิภาพในการให้อากาศของถังหมักภายใต้สภาวะที่กำหนด ถ้างังหมักมีประสิทธิภาพสูงในการให้อากาศ จะมีค่า  $k_L a$  สูง

ความสัมพันธ์ระหว่างการให้ออกซิเจนละลายโดยถังหมัก กับความต้องการออกซิเจนของจุลินทรีย์จะแสดงในรูปของความเข้มข้นออกซิเจนละลายในอาหารเหลว ถ้า  $k_L a$  ของถังหมักมีค่าไม่มากพอที่จะทำให้เกิดออกซิเจนละลายได้ปริมาณมากตามความต้องการของจุลินทรีย์ ความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารเหลวจะลดลงต่ำกว่าความเข้มข้นวิกฤติ (critical concentration,  $C_{crit}$ ) แต่ถ้า  $k_L a$  มีค่าสูงกว่าที่จะทำให้เกิดออกซิเจนละลายในอาหารเหลวได้ตามความต้องการของจุลินทรีย์ ก็จะทำให้ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในอาหารเหลวสูงกว่า  $C_{crit}$  และอาจสูงถึง 70 - 80 % ของระดับอิ่มตัว ดังนั้นในกระบวนการหมักที่ต้องการออกซิเจน จึงต้องใช้ถังหมักที่มีค่า  $k_L a$  สูงพอที่จะทำให้เกิดออกซิเจนละลายในอาหารเหลวได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการสร้างผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ และสามารถควบคุมความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในอาหารเหลวได้อย่างเพียงพอตลอดระยะเวลาของการหมัก

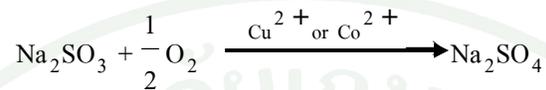
### 3.2 วิธีการประมาณค่า $k_L a$ (สมใจ, 2537; Garcia-Ochoa and Gomez, 2009)

การประมาณค่า  $k_L a$  ของถังหมักมีความสำคัญ เนื่องจากทำให้ทราบถึงประสิทธิภาพในการให้อากาศของถังหมัก และเป็นข้อมูลในการพิจารณาปรับค่าตัวแปรต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการให้อากาศ เพื่อให้ถังหมักให้ออกซิเจนในปริมาณที่เหมาะสมกับความต้องการของกระบวนการหมัก สำหรับเทคนิคที่ใช้ในการประมาณค่า  $k_L a$  มีหลายวิธี ณ ที่นี้ขออธิบายเฉพาะวิธีที่ปฏิบัติได้ง่ายไม่ยุ่งยาก ดังนี้

#### 3.2.1 วิธีซัลไฟต์ออกซิเดชัน (sulphite oxidation)

ในปี ค.ศ. 1944 Cooper และคณะได้อธิบายวิธีการหาอัตราการถ่ายโอนออกซิเจน (oxygen transfer rate, OTR) ในถังหมักแบบให้อากาศโดยใช้เทคนิคการออกซิโดส์

ซัลไฟต์ซึ่งไม่จำเป็นต้องวัดค่าความเข้มข้นออกซิเจนละลาย แต่วัดอัตราการเปลี่ยนแปลงของ โซเดียมซัลไฟต์เป็น โซเดียมซัลเฟต ในสภาวะที่มีทองแดงหรือโคบอลต์เป็นตัวเร่ง ดังสมการ



อัตราการออกซิไดส์ซัลไฟต์นี้จะมีค่าเท่ากับอัตราการถ่ายโอนออกซิเจน เนื่องจากเมื่อออกซิเจนถูกถ่ายโอนเข้าไปในสารละลายก็จะถูกนำไปใช้ออกซิไดส์ซัลไฟต์ในทันที ดังนั้นความเข้มข้นออกซิเจนละลายจึงมีค่าเท่ากับศูนย์ตลอดเวลา การหาค่า  $k_L a$  สามารถคำนวณได้โดยใช้สูตร

$$\text{OTR} = k_L a \cdot C_L^* \quad (2)$$

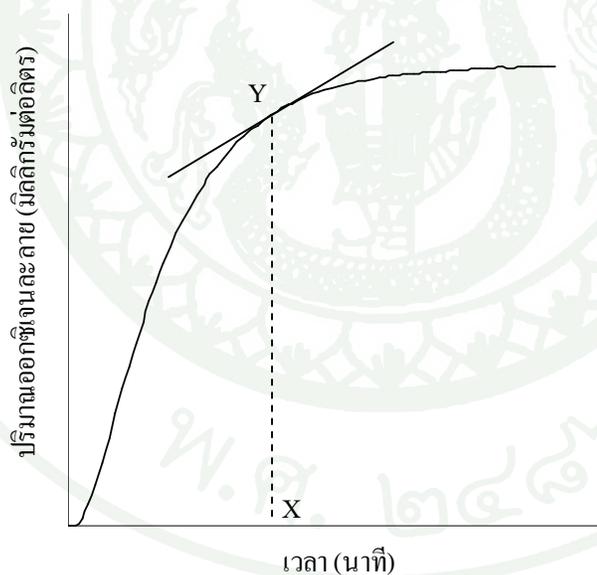
สำหรับวิธีการปฏิบัติเพื่อหาค่าอัตราการถ่ายโอนออกซิเจนโดยเทคนิคนี้ทำได้โดยเติมสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ 0.5 โมลาร์ ซึ่งมีความเข้มข้นของไอออน  $\text{Cu}^{2+}$  เท่ากับ  $10^{-3}$  โมลาร์ในถังหมัก ให้อากาศและกวนด้วยอัตราคงที่ เก็บตัวอย่างเป็นระยะ ๆ เติมสารละลายไอโอดีน ปริมาณมากเกินไปลงในตัวอย่าง เพื่อให้ไอโอดีนทำปฏิกิริยากับซัลไฟต์ที่เหลืออยู่ หลังจากนั้นนำไปไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตมาตรฐาน เขียนกราฟระหว่างปริมาณโซเดียมไทโอซัลเฟตที่ใช้ในการไทเทรตกับระยะเวลา คำนวณหาอัตราการถ่ายโอนออกซิเจนได้จากความชันของกราฟ และคำนวณค่า  $k_L a$  ได้โดยใช้สมการที่ 2

การใช้เทคนิคการออกซิไดส์ซัลไฟต์ในการประมาณค่า  $k_L a$  มีข้อดีคือ ทำได้ง่าย และให้ผลถูกต้องดีในกรณีถึงหมักสะอาดปราศจากสารปนเปื้อนอื่น และค่าที่ได้จะเป็นตัวแทนของ  $k_L a$  ในถังหมักได้ดี เนื่องจากเก็บตัวอย่างปริมาณมากพอสมควรทำให้ไม่มีปัญหาความแตกต่างของสภาพแวดล้อมภายในถังหมัก แต่ก็มีข้อเสียคือใช้เวลานาน เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่น ๆ และให้ผลผิดพลาดในกรณีที่มีสารลดแรงตึงผิว เช่น กรดอะมิโน โปรตีน กรดไขมัน ไขมัน หรือ เอสเทอร์ เจือปนแม้เพียงเล็กน้อย นอกจากนี้สารละลายโซเดียมซัลไฟต์ยังมีลักษณะแตกต่างไปจากอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเหลวที่ใช้ในกระบวนการหมัก ดังนั้น  $k_L a$  ที่ประมาณได้จากการออกซิไดส์ซัลไฟต์จึงแตกต่างไปจากสภาพความเป็นจริงในการใช้งานของถังหมัก และค่าใช้จ่ายของวิธีนี้สูงมาก เนื่องจากราคาของโซเดียมซัลไฟต์ จึงเป็นวิธีที่ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม

### 3.2.2 วิธีการไล่อากาศ (gassing-out)

เป็นเทคนิคการประมาณค่า  $k_L a$  โดยเริ่มต้นจากการไล่อากาศหรือออกซิเจนจากของเหลวที่จะใช้ในการทดลอง ก่อนที่จะมีการให้อากาศในถังหมัก หลังจากนั้นวัดความเข้มข้นของออกซิเจนที่เพิ่มขึ้นในสารละลายในระหว่างการให้อากาศและการกวน อัตราการถ่ายโอนออกซิเจนจะลดลงตามระยะเวลาในการให้อากาศ เนื่องจาก  $C_L$  มีค่าเพิ่มขึ้นทำให้แรงผลักดัน ( $C_L^* - C_L$ ) ที่จะทำให้เกิดการถ่ายโอนออกซิเจนลดลง อัตราการถ่ายโอนออกซิเจนที่เวลาใด ๆ จะมีค่าเท่ากับความชันของเส้นสัมผัสของกราฟที่เขียนระหว่างความเข้มข้นของออกซิเจนในสารละลายกับระยะเวลาในการให้อากาศ ดังแสดงในภาพที่ 3

สำหรับวิธีที่ใช้ในการไล่ออกซิเจนออกจากของเหลวทำได้ 2 วิธีคือ วิธีนิ่ง (static method) และวิธีพลวัต (dynamic method)



ภาพที่ 3 ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการให้อากาศ อัตราการถ่ายโอนออกซิเจนที่เวลา X เท่ากับความชันของเส้นสัมผัสที่ลากผ่านจุด Y

ก. Static method เป็นวิธีที่ใช้ก๊าซไนโตรเจนในการไล่ออกซิเจนออกจากของเหลว หลังจากนั้นจึงให้อากาศและกวนด้วยอัตราคงที่ วัดความเข้มข้นของออกซิเจนละลายโดยใช้โพรบออกซิเจนละลาย (dissolved oxygen probe) อัตราการถ่ายโอนออกซิเจนที่เกิดขึ้นในถังหมักจะอธิบายโดยใช้สมการที่ 1 คือ

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a (C_L^* - C_L) \quad (1)$$

เมื่ออินทิเกรตสมการที่ 1 จะได้

$$\ln \frac{C_L^* - C_L^0}{C_L^* - C_L} = k_L a \cdot t \quad (3)$$

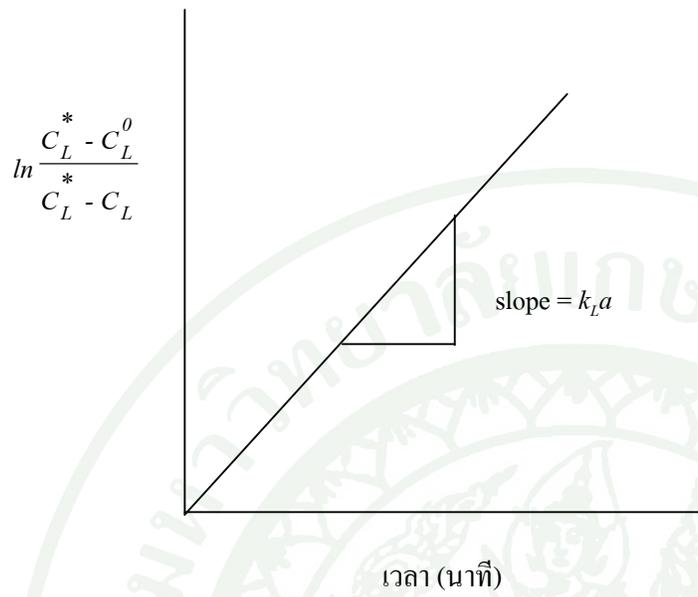
ดังนั้นถ้าเขียนกราฟระหว่างค่า  $\ln \frac{C_L^* - C_L^0}{C_L^* - C_L}$  กับเวลา จะได้กราฟเส้นตรงซึ่งมีความชันเท่ากับ  $k_L a$

(ภาพที่ 4) หรือจัดรูปสมการที่ 3 ได้สมการเอ็กโพเนนเชียล

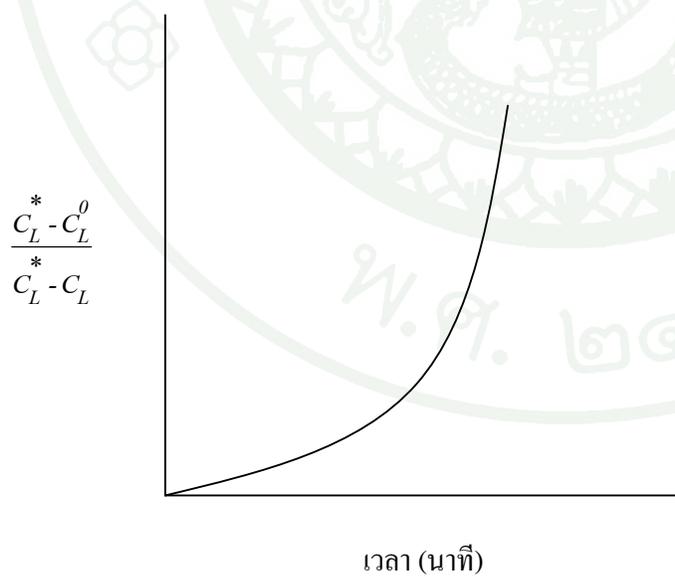
$$\frac{C_L^* - C_L^0}{C_L^* - C_L} = e^{k_L a \cdot t} \quad (4)$$

ประมาณค่า  $k_L a$  จากสมการที่ 4 โดยการสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $\frac{C_L^* - C_L^0}{C_L^* - C_L}$  กับเวลา

แล้ววิเคราะห์ไม่เชิงเส้นตรง (nonlinear regression) สมการเอ็กโพเนนเชียลเพื่อประมาณค่า  $k_L a$  (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 4 การเปลี่ยนแปลงของ  $\ln \frac{C_L^* - C_L^0}{C_L^* - C_L}$  ตามระยะเวลาในการให้อากาศ



ภาพที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของ  $\frac{C_L^* - C_L^0}{C_L^* - C_L}$  ตามระยะเวลาในการให้อากาศ

การประมาณค่า  $k_L a$  โดยวิธีนี้มีข้อดีคือ ใช้เวลาน้อย (ประมาณ 15 นาที) และสามารถประมาณค่า  $k_L a$  ในสภาวะที่ใกล้เคียงกับกระบวนการหมักจริงได้มากกว่า โดยการใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งอาจเติมเซลล์หรือยีสราที่ตายแล้วในปริมาณเท่ากับที่เกิดจริงในระหว่างการหมักลงไปด้วย แต่ก็มีข้อเสียคือ ค่าออกซิเจนละลายที่วัดได้นั้น วัดที่จุดใดจุดหนึ่งในถังหมัก ดังนั้นถ้าการกวนผสมไม่ดีพอจึงอาจไม่ใช่ค่าที่เป็นตัวแทนความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในของเหลวทั้งหมดในถังหมัก นอกจากนี้ยังไม่เหมาะสำหรับใช้ในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากต้องใช้ก๊าซไนโตรเจนปริมาณสูงมากในการไล่ออกซิเจน

ข. Dynamic method การประมาณค่า  $k_L a$  วิธีนี้ เริ่มต้นโดยการให้อากาศแก่อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเหลวในถังหมักไประยะหนึ่ง จากนั้นใส่จุลินทรีย์ลงไปจนถึงหมักพร้อมกับหยุดการให้อากาศ จุลินทรีย์จะใช้ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเหลว ทำให้ความเข้มข้นของออกซิเจนลดต่ำลง ดังแสดงในภาพที่ 6 หลังจากนั้นจึงเริ่มให้อากาศแก่อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเหลวอีกครั้งหนึ่ง ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการให้อากาศ และอัตราการถ่ายโอนออกซิเจนจะอธิบายได้โดยใช้สมการดังนี้

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a (C_L^* - C_L) - q_{O_2} C_X \quad (5)$$

เมื่อ  $C_X$  คือ ความเข้มข้นเซลล์ (กรัมต่อลิตร)  
 $q_{O_2}$  คือ อัตราจำเพาะการใช้ออกซิเจน (มิลลิกรัมต่อกรัม ชั่วโมง)

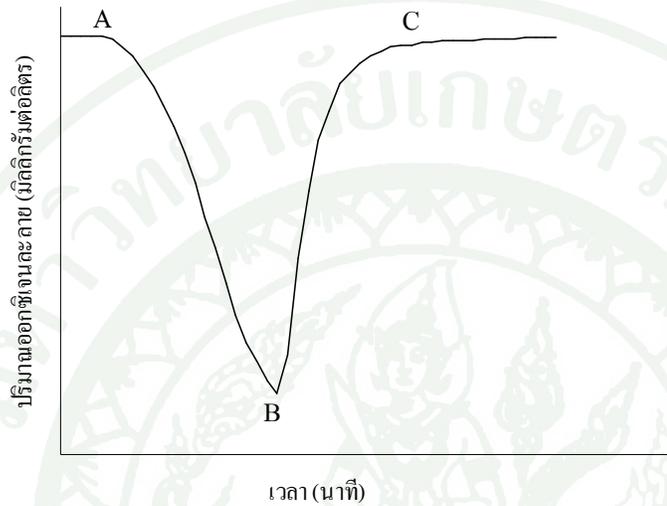
ถ้าจัดสมการที่ 5 ใหม่ จะได้

$$C_L = -\frac{1}{k_L a} \left\{ \frac{dC_L}{dt} + q_{O_2} C_X \right\} + C_L^* \quad (6)$$

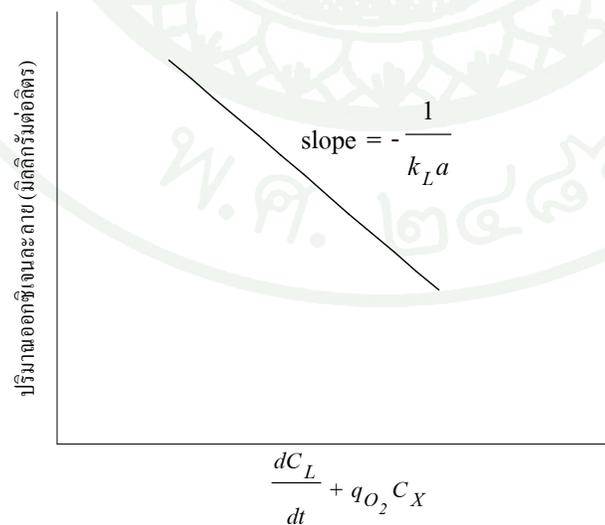
เพราะฉะนั้นถ้าเขียนกราฟระหว่างค่า  $C_L$  กับ  $\frac{dC_L}{dt} + q_{O_2} C_X$  จะได้กราฟเส้นตรง ซึ่งมีความชัน

เท่ากับ  $-\frac{1}{k_L a}$  ดังแสดงในภาพที่ 7 ค่า  $\frac{dC_L}{dt}$  และ  $q_{O_2} C_X$  หาได้จากภาพที่ 6 โดย  $\frac{dC_L}{dt}$  หาได้จาก

ความชันของเส้นที่ลากให้สัมผัสกับกราฟ BC และ  $q_{O_2} C_X$  หาได้จากความชันของกราฟ AB ซึ่งก็คืออัตราการใช้ออกซิเจนของจุลินทรีย์

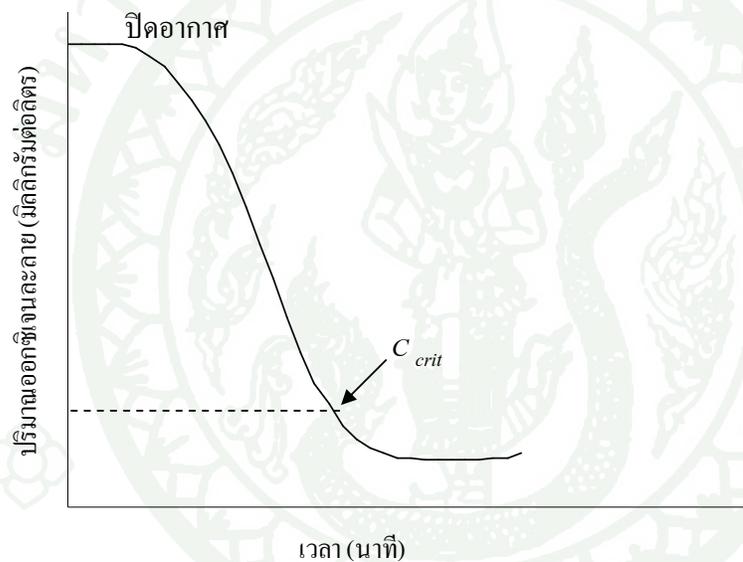


ภาพที่ 6 ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายที่เปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาในการประมาณค่า  $k_L a$  โดยวิธีการไล่อากาศแบบพลวัต (dynamic gassing-out)  
A = จุดเริ่มหยุดการให้อากาศ ; B = จุดเริ่มการให้อากาศใหม่อีกครั้ง



ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $C_L$  กับ  $\frac{dC_L}{dt} + q_{O_2} C_X$  ซึ่งมีค่าความชันเท่ากับ  $-\frac{1}{k_L a}$

สำหรับข้อควรระวังในการหาค่า  $k_L a$  ด้วยวิธีนี้คือ ในขั้นตอนที่หยุดการให้อากาศ เพื่อให้จุลินทรีย์กำจัดออกซิเจนละลายนั้น ระยะเวลาที่ใช้ต้องไม่มากเกินไปจนทำให้ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายต่ำกว่า  $C_{crit}$  เพราะจะทำให้อัตราการดูดซึมออกซิเจนของจุลินทรีย์ถูกจำกัด และอัตราการใช้ออกซิเจนของจุลินทรีย์ไม่คงที่ การเกิดสภาวะความเข้มข้นของออกซิเจนละลายต่ำกว่า  $C_{crit}$  นี้ สามารถสังเกตเห็นได้จากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของออกซิเจนละลายกับระยะเวลา จะมีลักษณะเป็นเส้นโค้ง ซึ่งมีค่าความชันน้อยกว่าเมื่อความเข้มข้นของออกซิเจนละลายสูงกว่า  $C_{crit}$  ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของออกซิเจนละลายกับระยะเวลาในช่วงหยุดการให้อากาศจนกระทั่งความเข้มข้นของออกซิเจนละลายลดลงต่ำกว่า  $C_{crit}$

การประมาณค่า  $k_L a$  โดยวิธีนี้มีข้อดีคือ ใช้สภาพแวดล้อมเหมือนกระบวนการหมักจริง ดังนั้นค่าที่ได้จึงมีความถูกต้องตามความเป็นจริงมากกว่าวิธีอื่น สามารถใช้ประมาณค่า  $k_L a$  ที่ระยะต่าง ๆ กันในกระบวนการหมักได้ ทำได้ง่ายและรวดเร็ว แต่ก็มีข้อเสียคือการรักษาความเข้มข้นของออกซิเจนละลายให้มีค่าสูงกว่า  $C_{crit}$  ในระหว่างการหมัก จะทำได้ยากในกรณีที่จุลินทรีย์มีความต้องการออกซิเจนสูงมาก ๆ ดังนั้นช่วงระยะเวลาที่สามารถใช้ในการประมาณค่า  $k_L a$  ได้จึงสั้นมาก

### 3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อค่า $k_L a$ และอัตราการถ่ายโอนออกซิเจน (สมใจ, 2537)

#### 3.3.1 อัตราการให้อากาศ (Air-flow rate)

ในถังหมักที่มีเครื่องกวนนิยมใช้อัตราการให้อากาศอยู่ในช่วง 0.5-1.5 vvm (ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที) ซึ่งอัตราการให้อากาศในช่วงนี้มีผลต่อค่า  $k_L a$  เพียงเล็กน้อย แต่ถ้าใช้อัตราการให้อากาศสูงมากเกินไป อาจทำให้อัตราการส่งผ่านออกซิเจนลดลง เนื่องจากฟองอากาศที่เกิดขึ้นปริมาณมากจะท่วมใบพัด ทำให้ใบพัดหมุนอยู่ใน gas phase จึงไม่สามารถช่วยส่งผ่านออกซิเจนเข้าไปในสารละลายได้

#### 3.2.2 อัตราการกวน (Agitation rate)

เมื่อใช้อัตราการกวนสูงขึ้น ก็จะทำให้ค่า  $k_L a$  สูงขึ้นด้วย เนื่องจากการกวนทำให้ฟองอากาศมีขนาดเล็กจึงช่วยเพิ่มพื้นที่ในการส่งผ่านออกซิเจน ช่วยลดการระเหยของฟองอากาศออกจากของเหลว ช่วยป้องกันการรวมตัวของฟองอากาศ และทำให้อาหารเหลวเกิดการหมุนวน ซึ่งเป็นผลให้ความหนาของแผ่นฟิล์มของของเหลวที่อยู่รอบ ๆ ฟองอากาศลดลง

#### 3.3.3 ความหนืดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

โดยทั่วไปอัตราการถ่ายโอนออกซิเจนจะมีค่าลดลง เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดมากขึ้น และทำให้ค่า  $k_L a$  ลดลงด้วย สำหรับปัจจัยที่มีผลต่อความหนืดของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ ส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ลักษณะการเจริญเติบโตและความเข้มข้นของจุลินทรีย์ และผลผลิตของจุลินทรีย์

#### 3.3.4 ฟองและสารกำจัดฟอง

สำหรับสารเคมีที่นิยมใช้ในการกำจัดฟองโดยทั่วไปมีสมบัติเป็นสารลดแรงตึงผิว ซึ่งส่วนใหญ่ทำให้อัตราการถ่ายโอนออกซิเจนและค่า  $k_L a$  ลดลง เนื่องจากการสะสมของสารลดแรงตึงผิวที่บริเวณผิวสัมผัสระหว่างฟองอากาศและของเหลวทำให้ความต้านทานต่อการแพร่ของออกซิเจนสูงขึ้น ดังนั้นการใช้สารกำจัดฟองจึงต้องคำนึงถึงผลเสียที่อาจเกิดขึ้นด้วย ตามปกติควรใช้สารกำจัดฟองปริมาณน้อยที่สุดเท่าที่จะทำได้ อย่างไรก็ตามสารลดแรงตึงผิวบางชนิดมีผลทำให้

อัตราการถ่ายโอนออกซิเจนและค่า  $k_L a$  สูงขึ้นได้ เช่น โซเดียมลอริลซัลเฟต (sodium lauryl sulphate) เป็นต้น

### 3.4 สหสัมพันธ์สำหรับ $k_L a$ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบชนิดเครื่องกวน

ในกระบวนการที่ออกซิเจนละลายน้ำที่อุณหภูมิห้อง โดยสันนิษฐานให้สมบัติสสารคงที่ จะได้สมการที่แสดงถึงสหสัมพันธ์ของ  $k_L a$  ที่ค่อนข้างเป็นที่นิยมใช้กัน (สารโรจน์และคณะ, 2544) ตามสมการที่ 7

$$k_L a = C \left( \frac{P}{V} \right)^{a_1} v_G^{a_2} \quad (7)$$

เมื่อ  $a_1$  คือ ค่ายกกำลังของเพาเวอร์อินพุต  
 $a_2$  คือ ค่ายกกำลังของความเร็วตามผิวของก๊าซ  
 $C$  คือ ค่าคงที่ขึ้นอยู่กับเรขาคณิตของเครื่องกวนและถังหมัก  
 $P$  คือ เพาเวอร์อินพุตจากเครื่องกวน (วัตต์)  
 $V$  คือ ปริมาตรกระจายตัวของของเหลว (ลิตร)

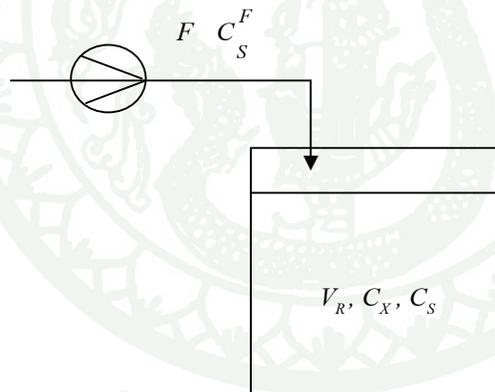
นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Aguiar Jr. *et al.* (2002) ในการสร้างสหสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวน ( $N$ ) และอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ประมาณค่า  $k_L a$  เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศในระหว่างการหมักดังสมการที่ 8

$$\frac{k_L a}{N} = 0.0461 \ln Q + 0.1165 \quad (8)$$

#### 4. การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว (Fed-batch culture) (สาโรจน์และคณะ, 2544)

##### 4.1 การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวอย่างง่าย

การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวเป็นเทคนิคการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูง โดยเฉพาะในสภาพที่มีภาวะยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์จากสภาวะความเข้มข้นสูง การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวนิยมใช้สำหรับการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวและเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ เพราะสามารถให้อัตราการผลิตเซลล์และผลิตภัณฑ์ได้สูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ (batch) โดยควบคุมอัตราการเติมสับสเตรตที่จะทำให้การเพาะเลี้ยงอยู่ในภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญหรือการเกิดผลิตภัณฑ์ตลอดเวลา โดยมีการเติมสับสเตรตลงไปจนถึงหมักอย่างต่อเนื่องโดยไม่มีการนำน้ำหมักออก นอกจากการเก็บตัวอย่างเท่านั้น ดังนั้นปริมาตรของน้ำหมักจึงเปลี่ยนแปลง (เพิ่มขึ้น) ตลอดเวลาจนกว่าจะเสร็จสิ้นกระบวนการเพาะเลี้ยง ดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9 การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว

สามารถทำสมมูลมวลได้ดังนี้

$$\frac{d(V_R C_i)}{dt} = F C_i^F + r_i V_R \quad (9)$$

$$V_R \frac{dC_i}{dt} + C_i \frac{dV_R}{dt} = F C_i^F + r_i V_R \quad (10)$$

$$\frac{dC_i}{dt} = \frac{F}{V_R} C_i^F + r_i - \frac{C_i}{V_R} \frac{dV_R}{dt} \quad (11)$$

เมื่อ  $\frac{dV_R}{dt} = F$

ดังนั้น 
$$\frac{dC_i}{dt} = \frac{F}{V_R} (C_i^F - C_i) + r_i \quad (12)$$

#### 4.1.1 กรณีของเซลล์

$$\frac{dC_X}{dt} = -\frac{F}{V_R} C_X + r_X \quad (13)$$

$$\frac{dC_X}{dt} = -\frac{F}{V_R} C_X + \mu C_X \quad (14)$$

- เมื่อ  $C_X$  = ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)  
 $F$  = อัตราการเติมสับสเทรต (ลิตรต่อชั่วโมง)  
 $V_R$  = ปริมาตรน้ำหมัก (ลิตร)  
 $\mu$  = อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)  
 $t$  = เวลา (ชั่วโมง)  
 $r_X$  = อัตราการเจริญเติบโต (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)

#### 4.1.2 กรณีของสับสเทรต

$$\frac{dC_S}{dt} = \frac{F}{V_R} (C_S^F - C_S) + r_S \quad (15)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = \frac{F}{V_R} (C_S^F - C_S) - \left( \frac{\mu C_X}{Y_{X/S}} + m_S C_X \right) \quad (16)$$

- เมื่อ  $C_S$  = ความเข้มข้นของสับสเตรดระหว่างการเพาะเลี้ยง (กรัมต่อลิตร)  
 $C_S^F$  = ความเข้มข้นของสับสเตรดที่เติม (กรัมต่อลิตร)  
 $m_S$  = ค่าคงที่การบำรุงรักษาเซลล์ (กรัมต่อกรัม ชั่วโมง)  
 $Y_{XS}$  = ผลได้ของเซลล์จากสับสเตรด (กรัมต่อกรัม)  
 $r_S$  = อัตราการใช้สับสเตรด (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)

#### 4.1.3 กรณีของไนโตรเจน

$$\frac{dC_N}{dt} = -\frac{F}{V} C_N + r_N \quad (17)$$

$$\frac{dC_N}{dt} = -\frac{F}{V} C_N + \frac{\mu C_X}{Y_{XN}} \quad (18)$$

- เมื่อ  $C_N$  = ความเข้มข้นของไนโตรเจนระหว่างการเพาะเลี้ยง (กรัมต่อลิตร)  
 $Y_{XN}$  = ผลได้ของเซลล์จากไนโตรเจน (กรัมต่อกรัม)  
 $r_N$  = อัตราการใช้ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)

สำหรับการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวเพื่อหลีกเลี่ยงภาวะยับยั้งการเจริญเติบโตจากสับสเตรดสามารถกระทำได้โดยควบคุมระดับความเข้มข้นของสับสเตรดระหว่างการเพาะเลี้ยงไว้ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ เทคนิคแบบนี้ยังเป็นวิธีการใช้สับสเตรดอย่างมีประสิทธิภาพสูงอีกด้วย

เมื่อความเข้มข้นของสับสเตรดถูกควบคุมให้คงที่ ( $\frac{dC_S}{dt} = 0$ ) จึงจำเป็นต้องมีการปรับอัตราการเติมสับสเตรดตลอดเวลา เพื่อรักษาระดับความเข้มข้นของสับสเตรดให้คงที่ตามที่กำหนดไว้ ซึ่งสามารถคำนวณหาอัตราการเติมสับสเตรดระหว่างการเพาะเลี้ยงได้ดังนี้

$$\frac{dC_S}{dt} = 0 = \frac{F}{V_R} (C_S^F - C_S) + r_S \quad (19)$$

$$F = - \frac{r_S V_R}{C_S^F - C_S} \quad (20)$$

นอกจากนั้นปริมาตรของน้ำหมัก ( $V_R$ ) ในถังหมักสำหรับการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวจะไม่คงที่ จะเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ผ่านไป ทำให้ค่าอัตราการเจือจาง ( $D = \frac{F}{V_R}$ ) ไม่คงที่ จะเพิ่มขึ้นตามเวลาเช่นกัน แต่ก็สามารถเกิดสถานะคงตัวได้ที่เรียกว่า quasi-steady state เมื่อค่า  $F$  มีค่าน้อย ๆ

เพราะฉะนั้น

$$\mu = \frac{F}{V_R} \quad (21)$$

เมื่ออาศัยสมการของ Monod มาอธิบายสถานะคงตัวชั่วคราว (quasi-steady state) ดังกล่าว จะได้ว่า

$$\mu = \frac{F}{V_R} = \mu_{\max} \frac{C_S}{K_S + C_S} \quad (22)$$

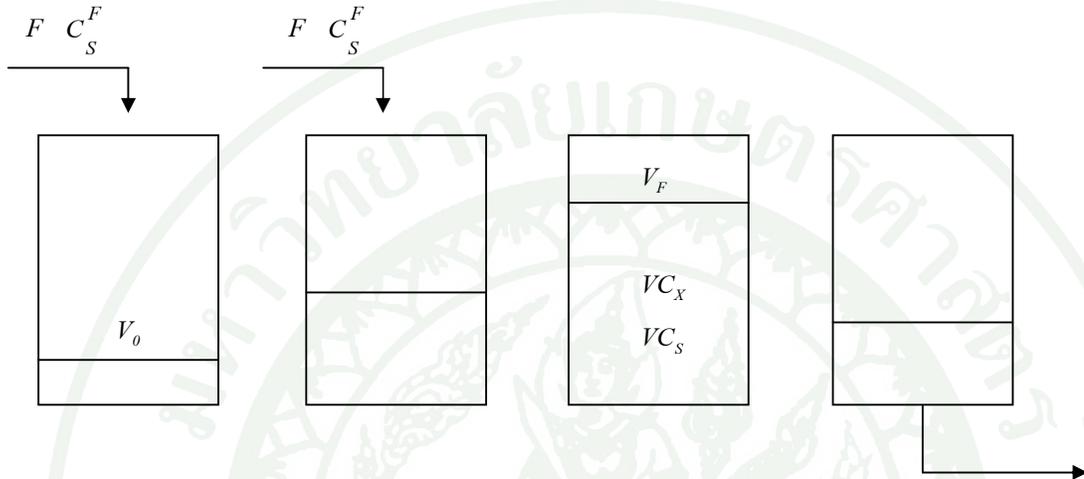
ซึ่งจะได้ว่า

$$C_S = \frac{F}{V_R} \frac{K_S}{\mu_{\max} - \frac{F}{V_R}} \quad (23)$$

4.2 การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวซ้ำ (Repeated fed-batch culture) (สารโรจน์ และคณะ, 2551)

ระบบการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวดังที่ได้อธิบายข้างต้นนั้น สามารถดัดแปลงให้เป็นระบบการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวซ้ำดังภาพที่ 10 ซึ่งมีการเติมอาหารใหม่เข้าสู่ถังหมักอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งได้ปริมาตรการทำงานของถังหมักสุดท้าย ( $V_F$ ) ตามที่ต้องการ จากนั้นนำเอาน้ำหมักบางส่วนออกไปจากถังหมัก เพื่อที่จะทำการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวอีกครั้ง โดยการเติมอาหารใหม่เข้าสู่ถังหมักอย่างต่อเนื่องต่อไป ตัวแปรสถานะของระบบการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวซ้ำจะ

ประกอบด้วยปริมาตรการทำงานเริ่มต้น ( $V_0$ ) ปริมาตรการทำงานสุดท้าย ( $V_F$ ) ความเข้มข้นของสับสเตรตในอาหารใหม่ที่เติม ( $C_S^F$ ) และอัตราการไหลของอาหารใหม่ที่เติม ( $F$ )



ภาพที่ 10 การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวซ้ำ

แบบจำลองอธิบายระบบการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวซ้ำคล้ายคลึงกับการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวอย่างง่าย แต่การทำสมดุลมวลของสับสเตรตและเซลล์จะแสดงในรูปของมวลรวมของสับสเตรต ( $VC_S$ ) และมวลรวมของเซลล์ ( $VC_X$ ) แทนการแสดงด้วยความเข้มข้นสับสเตรต ( $C_S$ ) และความเข้มข้นเซลล์ ( $C_X$ ) เพื่อเขียนแบบระบบของการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวซ้ำต่อไปจนกระทั่งสิ้นสุดเวลาสุดท้ายที่กำหนดเอาไว้ โดยกำหนดให้สัดส่วนของปริมาตรทำงานของถังหมัก ( $f$ ) ดังนี้

$f = \frac{V_0}{V_F}$  เพราะฉะนั้นสถานะเริ่มต้นของมวลรวมของสับสเตรต ( $VC_S^0$ ) และมวลรวมของเซลล์ ( $VC_X^0$ ) ในแต่ละรอบของการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวซ้ำจะขึ้นอยู่กับมวลรวมของสับสเตรต ( $VC_S^F$ ) และมวลรวมของเซลล์ ( $VC_X^F$ ) ที่สถานะสุดท้ายในรอบของการเพาะเลี้ยงก่อนหน้า ดังนี้

$$VC_S^0 = f VC_S^F \quad (24)$$

$$VC_X^0 = f VC_X^F \quad (25)$$

เทคนิคการควบคุมการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวโดยทั่วไปแบ่งได้ 2 วิธี ดังนี้

1. การควบคุมแบบย้อนกลับ (feedback control) เป็นการควบคุมอัตราการเติมสับสเตรตด้วยระบบอัตโนมัติ ซึ่งอาจจะเป็นการควบคุมด้วยการวัดความเข้มข้นของสับสเตรตโดยตรง หรือเป็นการควบคุมทางอ้อมโดยอาศัยพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่มีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตและการใช้สับสเตรต อาทิ DO, RQ, pH,  $p\text{CO}_2$  เป็นต้น

2. การควบคุมแบบไม่ย้อนกลับ (without feedback control) ซึ่งอาจจะเป็นการเติมสับสเตรตเป็นระยะ (intermittent) หรือเป็นการควบคุมการเติมสับสเตรตด้วยอัตราคงที่ (constant rate) หรือด้วยอัตราแบบเอ็กโพเนนเชียล (exponential rate) เป็นต้น

ข้อดีและข้อเสียของการหมักแบบครั้งคราว (จรูญ, 2536)

การหมักแบบครั้งคราวเป็นการผสมผสานกันระหว่างเทคนิคการหมักแบบเบ็ดเสร็จ (batch fermentation) และการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation)

### 1. ข้อดี

1.1 ให้ผลผลิตเซลล์ที่มีความหนาแน่นสูง (high cell densities) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญของการผลิตโปรตีนได้ความเข้มข้นสูง ในกรณีที่เป็นแบบการผลิตโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับการเจริญของเซลล์ (growth-associated products)

1.2 สามารถควบคุมการให้สับสเตรตในระหว่างกระบวนการหมักได้โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ความเข้มข้นสับสเตรตจำเพาะ เช่น แหล่งคาร์บอน เป็นการจำกัดการให้สับสเตรต (limited substrate) เป็นการควบคุมการเกิดผลพลอยได้และการยับยั้งการผลิตโปรตีนจากของเสียที่เกิดจากกระบวนการเผาผลาญพลังงานของจุลินทรีย์ ไม่ให้มากเกินไป

1.3 สามารถควบคุมความเป็นพิษ อันเนื่องมาจากปริมาณของสับสเตรต เช่น เมทานอล เอทานอล หรือ กรดน้ำส้ม เป็นต้น โดยการควบคุมความเข้มข้นให้อยู่ในระดับต่ำและมีการเติมอาหารอย่างต่อเนื่อง ซึ่งทำให้ไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อันเนื่องมาจากความเข้มข้นของสับสเตรตที่สูงเกินไป

1.4 ช่วยลดความหนืดของอาหาร (decreasing viscosity of broth) ที่เกิดจากพอลิเมอร์ โดยใช้จุลินทรีย์ เช่น เด็กซ์แทรน พอลูลูเลน และแซนแทนกัม เป็นต้น สามารถควบคุมความหนืดของอาหารโดยการค่อย ๆ เติมอย่างต่อเนื่อง ซึ่งหากความหนืดเพิ่มมากขึ้นจะมีผลต่อระบบการเติมอากาศ เช่น ใบพัดกวนจะต้องใช้กำลังไฟฟ้าเพิ่มขึ้นเกิดฟองมากขึ้นทำให้การละลายของออกซิเจนไม่ดีพอ

## 2. ข้อเสีย

2.1 การหมักแบบครั้งคราวนี้ จะต้องมีความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ ทั้งทางด้าน โครงสร้างสรีรวิทยา สภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์แล้ว เพื่อให้ได้การหมักที่มีประสิทธิภาพสูง

2.2 การออกแบบการควบคุมการหมักต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญทำให้เกิดสภาพแวดล้อมที่ควบคุมได้ สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์เพื่อให้ได้ผลผลิตตามต้องการนั้น การออกแบบการควบคุมการหมักจะต้องมีการพัฒนาอยู่เสมอ

2.3 ปริมาณของสารอาหารต่าง ๆ ต้องสามารถตรวจสอบได้ เพื่อให้ทราบว่ามีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารอาหารหรือความเข้มข้นของผลผลิตเป็นไปในทิศทางใด

# อุปกรณ์และวิธีการ

## อุปกรณ์

### 1. เครื่องมือ

- 1.1 ถังหมัก (fermenter); (ยี่ห้อ B. Braun Biotech International รุ่น Biostat B, Germany)  
ขนาด 2 ลิตร พร้อมระบบควบคุมการกวน การให้อากาศ พิเอชและอุณหภูมิ
- 1.2 เครื่องสูบ (Pump); (Swan, DR-115, Taiwan)
- 1.3 เครื่องควบคุมความเย็น (Cooling); (Scientific Promotion, CBE-15-10, Thailand)
- 1.4 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge); (B. Braun Biotech International, Sigma 203, Germany)
- 1.5 เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิต่ำ (Refrigerated Centrifuge); (Sigma, 3K-18, Germany)
- 1.6 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer); (Shimadzu, UV-1201, Japan)
- 1.7 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter); (Horiba, M-11, Japan)
- 1.8 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator); (Mettler, Germany)
- 1.9 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave); (Sanyo, Labo Autoclave, Japan)
- 1.10 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker); (New Brunswick Scientific, G25, USA)
- 1.11 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath); (Precision Scientific, 280, USA)
- 1.12 เครื่องชั่ง (Balance); (Sartorius, 1615 MP, USA และ Sartorius, CP 323S, Germany)
- 1.13 เครื่องกวน (Hotplate and stirrer); (Schott, CAT-M6, Germany)
- 1.14 สายยางซิลิโคน (Silicone tube); (Dura, EZ-TG105) ความยาว 15 เมตร ขนาด 5x9, 4x7 และ 3x5 มิลลิเมตร
- 1.15 เครื่องแก้วและอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์อื่น ๆ

## 2. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ คือ *Candida mogii* ATCC 18364 (Sirisansaneeyakul *et al.*, 1995) สั่งซื้อจาก American Type Culture Collection และเก็บรักษาไว้ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยมีรหัสของการเก็บรักษาสายพันธุ์ คือ TISTR 5892

*C. magnoliae* สั่งซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยในรหัส TISTR 5663 (Nakano *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2004)

## 3. อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

อาหารวุ้น YMP 1 ลิตร ประกอบด้วย yeast extract 3 กรัม, malt extract 3 กรัม, peptone 5 กรัม กลูโคส 10 กรัม และวุ้น 15 กรัม

อาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *C. mogii* ATCC 18364 ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  18.75 กรัม  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  6.0 กรัม  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.13 กรัม  $\text{CaCl}_2$  0.10 กรัม  $\text{FeCl}_3$  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 (Sirisansaneeyakul *et al.*, 1995) และแหล่งอาหารคาร์บอนไซโลสและกลูโคส

อาหารเหลวที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *C. magnoliae* TISTR 5663 ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย casamino acid 1 กรัม yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulfate 1.7 กรัม urea 2.3 กรัม (Nakano *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2004) และแหล่งอาหารคาร์บอนไซโลสและกลูโคส

## วิธีการ

### 1. การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ *C. mogii* TISTR 5892 และ *C. magnoliae* TISTR 5663 ระดับฟลาस्क

#### 1.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

นำเชื้อยีสต์แห้งเยือกแข็ง *C. mogii* ที่เก็บใน 30 % กลีเซอรอล มาละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ชีคเชื้อ (streak) ลงบนจานอาหารวุ้น YMP แล้วบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 24 ถึง 48 ชั่วโมง เมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโต ชีคเชื้อที่ได้ลงบนหลอดอาหารวุ้น YMP อีกครั้ง จากนั้นบ่มประมาณ 24 ถึง 48 ชั่วโมง

เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *C. mogii* ในฟลาस्क โดยเขี่ยเชื้อ 1 ลูบจากหลอดอาหารวุ้น YMP ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร โดยใช้แหล่งอาหารคาร์บอนเป็นกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร และไซโลส 5 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที แล้วถ่ายกล้าเชื้อลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ ปริมาตร 22.5 มิลลิลิตร ในฟลาस्कขนาด 125 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายกล้าเชื้อลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ในฟลาस्कขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดียวกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

#### 1.2 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ *C. mogii* TISTR 5892

ศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *C. mogii* ในฟลาस्कขนาด 500 มิลลิลิตร มีปริมาตรการทำงาน 250 มิลลิลิตร โดยใช้แหล่งอาหารคาร์บอนเป็นกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร และไซโลส 5 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 4.5 (วรสิทธิ์, 2541) ใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 10 % ควบคุมสภาวะให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง จนกระทั่งกลูโคสและไซโลสหมด ตัวอย่างที่ได้นำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ไซโลส ไซลิทอล น้ำหนักเซลล์แห้ง และวัดความขุ่นของเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสง 620 นาโนเมตร

ศึกษาการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ *C. mogii* โดยผลิตเซลล์ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 10 % แหล่งอาหารคาร์บอนเป็นกลูโคส 10 กรัม ต่อลิตร และไซโลส 5 กรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นศึกษาการผลิตไซลิทอลจากสับสเตรตเดี่ยวไซโลส 30 กรัมต่อลิตร และ สับสเตรตร่วมระหว่างกลูโคส 3 กรัมต่อลิตร และไซโลส 30 กรัมต่อลิตร (Tochampa *et al.*, 2005) ที่พีเอชเริ่มต้น 6.0 ปริมาตรทำงาน 335 มิลลิลิตร ทำการหมักในสภาวะจำกัดออกซิเจนเขย่าที่ ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล ริคิวิซ์ ไซโลส ไซลิทอล น้ำหนักเซลล์แห้ง และวัดความขุ่นของเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสง 620 นาโนเมตร

### 1.3 การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5663

เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5663 เช่นเดียวกับกล้าเชื้อยีสต์ *C. mogii* ใน ข้อ 1.1 จากนั้นศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5663 ที่พีเอช  $4.0 \pm 0.2$  (Nakano *et al.*, 2000) และ  $7.0 \pm 0.2$  (Tada *et al.*, 2004) ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร มีปริมาตร การทำงาน 250 มิลลิลิตร โดยใช้แหล่งอาหารคาร์บอนเป็นกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร และไซโลส 5 กรัมต่อลิตร ใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 10 % นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมง จนถึงชั่วโมงที่ 27 ตัวอย่างที่ได้นำไปวิเคราะห์ปริมาณ น้ำตาลริคิวิซ์ ไซโลส ไซลิทอล น้ำหนักเซลล์แห้ง และวัดความขุ่นของเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสง 660 นาโนเมตร

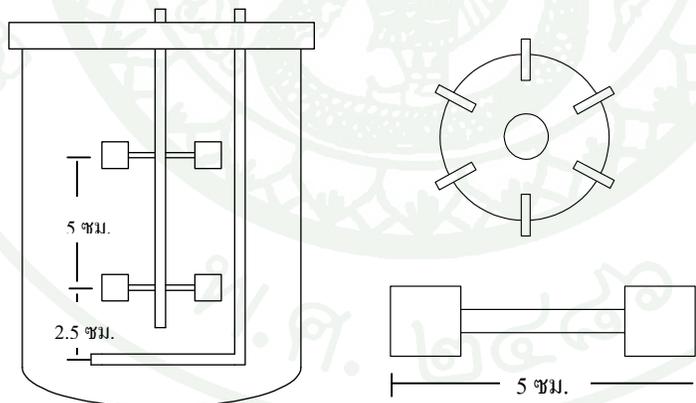
ศึกษาการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5663 โดยผลิตเซลล์ใน พลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 10 % แหล่งอาหารคาร์บอน เป็นกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร และไซโลส 5 กรัมต่อลิตร เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 32 ชั่วโมง จากนั้นศึกษาการผลิตไซลิทอลที่พีเอช  $4.0 \pm 0.2$  และ  $7.0 \pm 0.2$  จากสับสเตรตร่วมระหว่างไซโลส 30 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 3 กรัมต่อลิตร ปริมาตรทำงาน 300 มิลลิลิตร ทำการหมักในสภาวะจำกัดออกซิเจนเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลริคิวิซ์ ไซโลส ไซลิทอล น้ำหนักเซลล์แห้ง และวัดความขุ่นของเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสง 660 นาโนเมตร

1.4 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลระหว่างเชื้อยีสต์ *C. mogii* TISTR 5892 และ *C. magnoliae* TISTR 5663 ในระดับฟลasks

เปรียบเทียบการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลระหว่างเชื้อยีสต์ *C. mogii* TISTR 5892 และ *C. magnoliae* TISTR 5663 จากพารามิเตอร์ทางจุลพลศาสตร์ของการหมัก เพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไซลิทอลได้ดี จากนั้นนำเชื้อยีสต์ที่ได้ไปศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลในระดับถังหมักต่อไป

## 2. การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อ *C. magnoliae* TISTR 5663 ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

ทุกการทดลองระดับถังหมักทำในถังหมักแบบกวนยี่ห้อ B. Braun Biotech International รุ่น Biostat B ขนาด 2 ลิตร โดยจัดเตรียมถังหมักให้มีการกวนด้วยใบพัดแบบเทอร์ไบน์ชนิด 6 ใบพัด จำนวน 2 ชุด ดังภาพที่ 11



ภาพที่ 11 รูปแบบของถังหมักแบบกวนยี่ห้อ B. Braun Biotech International รุ่น Biostat B ขนาด 2 ลิตร และใบพัดแบบเทอร์ไบน์ชนิด 6 ใบพัด โดยแสดงอัตราส่วนของระยะห่างระหว่างใบพัดต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัด เท่ากับ 1:1 และหัวพ่นอากาศอยู่ด้านล่างของใบพัดด้วยระยะห่าง 2.5 เซนติเมตร

เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* ในฟลาสก์ โดยเชื้อยีสต์ 1 ลูก ลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใช้แหล่งอาหารคาร์บอนเป็นกลูโคส 10 กรัม ต่อลิตร และไนโตรเจน 5 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที แล้วถ่ายกล้าเชื้อลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อใหม่ปริมาตร 90 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้กล้าเชื้อทั้งหมดสำหรับการทดลองในระดับถังหมัก

ผลิตเซลล์ในถังหมัก มีปริมาตรทำงาน 1 ลิตร โดยถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ 900 มิลลิลิตร ที่มีแหล่งอาหารคาร์บอนเป็นกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร และไนโตรเจน 5 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 4.0 ออกซิเจนละลาย 70 - 80 % ของออกซิเจนอิ่มตัว เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส ไนโตรเจน โซลิดทอล น้ำหนักเซลล์แห้ง และวัดความขุ่นของเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสง 660 นาโนเมตร

หลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อถึงชั่วโมงที่ 9 กลูโคสและไนโตรเจนหมด เติมน้ำสารละลายระหว่างไนโตรเจนความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร และกลูโคส 3 กรัมต่อลิตร (Tochampa *et al.*, 2005) ทำการผลิตโซลิดทอลที่สภาวะควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm เก็บตัวอย่างทุกชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ปริมาณ กลูโคส ไนโตรเจน โซลิดทอล น้ำหนักเซลล์แห้ง และวัดความขุ่นของเซลล์ที่ค่าการดูดกลืนแสง 660 นาโนเมตร ศึกษาผลของกลูโคสต่อการผลิตโซลิดทอล โดยเปรียบเทียบพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการหมักในช่วงสับสเตรตระหว่างกลูโคสและไนโตรเจน กับช่วงสับสเตรตเดี่ยวไนโตรเจน

### 3. การประมาณค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายโอนออกซิเจนเชิงปริมาตร ( $k_L a$ ) ระดับถังหมัก 2 ลิตร

จากความสำคัญของออกซิเจนละลายที่มีผลต่อการผลิตโซลิดทอล แต่เนื่องจากสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโซลิดทอลเป็นสภาวะจำกัดออกซิเจน การควบคุมปริมาณออกซิเจนให้ได้สภาวะที่ต้องการทำได้ยาก ดังนั้นจึงได้มีการสร้างสหสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศทั้งในกรณีที่มีและไม่มีเซลล์ เพื่อใช้ค่า  $k_L a$  เป็นพารามิเตอร์ในการควบคุมสภาวะในการหมัก

### 3.1 การประมาณค่า $k_{La}$ ในกรณีไม่มีเซลล์

ในกรณีนี้ได้ทำการทดลองในน้ำกลั่นและในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเชื้อยีสต์ *C. magnoliae*

#### 3.1.1 ในน้ำกลั่น

ทดลองประมาณค่า  $k_{La}$  ด้วยวิธีไล่อากาศ (gassing-out method) (สมใจ, 2537; Aguiar Jr. *et al.*, 2002; Garcia-Ochoa and Gomez, 2009) โดยจัดเตรียมอุปกรณ์ต่าง ๆ ได้แก่ ถังหมักแบบกวนดังภาพที่ 11 แล้วเชื่อมต่อระบบควบคุมการกวน การให้อากาศ โพรบพีเอช โพรบอุณหภูมิ และโพรบออกซิเจนกับถังหมัก เปิดถังหมักและระบบควบคุมต่าง ๆ อย่างน้อย 6 ชั่วโมง เพื่อให้โพรบออกซิเจนพร้อมสำหรับการวัดค่าออกซิเจนละลาย จากนั้นทำการ calibrate โพรบออกซิเจนในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเปิดก๊าซไนโตรเจนเข้าสู่ถังหมักเพื่อไล่ออกซิเจนออกจากน้ำกลั่น รอจนกระทั่งโพรบออกซิเจนอ่านค่าออกซิเจนละลายได้ต่ำสุดและคงที่ประมาณ 5 นาที จึงตั้งค่าให้โพรบออกซิเจนอ่านค่าออกซิเจนละลายเป็น 0 % จากนั้นเปิดอากาศเข้าสู่ถังหมัก รอจนกระทั่งโพรบออกซิเจนอ่านค่าออกซิเจนละลายได้สูงสุดและคงที่ประมาณ 5 นาที จึงตั้งค่าให้โพรบออกซิเจนอ่านค่าออกซิเจนละลายเป็น 100 % ทำการ calibrate โพรบออกซิเจนตามวิธีดังกล่าวอีก 2 ครั้ง จึงได้โพรบออกซิเจนที่พร้อมสำหรับการทดลองประมาณค่า  $k_{La}$

ทดลองประมาณค่า  $k_{La}$  ในน้ำกลั่น ปริมาตรทำงาน 1 ลิตร ที่อัตราการให้อากาศ 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 vvm โดยทุกอัตราการให้อากาศแปรผันที่อัตราการกวน 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 และ 1,000 รอบต่อนาที ควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพีเอช 7.0

ตัวอย่างการประมาณค่า  $k_{La}$  ในน้ำกลั่น ที่อัตราการให้อากาศ 0.2 vvm อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที ทำการทดลองโดยปรับอัตราการกวนของถังหมักให้อยู่ที่ 100 รอบต่อนาที จากนั้นเปิดก๊าซไนโตรเจนเข้าสู่ถังหมักเพื่อไล่ออกซิเจนออกจากน้ำกลั่น รอจนกระทั่งโพรบออกซิเจนอ่านค่าออกซิเจนละลายเป็น 0 % เมื่อโพรบออกซิเจนอ่านค่าออกซิเจนละลายเป็น 0 % จึงเปิดอากาศเข้าสู่ถังหมักที่อัตราการให้ออกซิเจน 0.2 vvm พร้อมกับเริ่มจับเวลา บันทึกออกซิเจนละลายที่อ่านค่าได้ตามเวลาทุก ๆ 10 วินาที จนกระทั่งออกซิเจนละลายมีค่าคงที่จึงยุติการทดลอง

โดยแต่ละสภาวะการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นนำข้อมูลออกซิเจนละลายที่วัดได้ตามเวลามาประมาณค่า  $k_L a$  จากสมการที่ 1

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a (C_L^* - C_L) \quad (1)$$

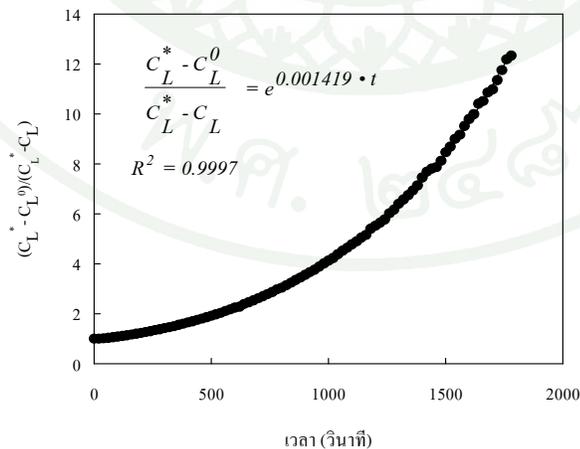
อินทิเกรตสมการที่ 1 และจัดรูปสมการได้สมการเอ็กโพเนนเชียล ดังสมการที่ 4

$$\frac{C_L^* - C_L^0}{C_L^* - C_L} = e^{-k_L a \cdot t} \quad (4)$$

ประมาณค่า  $k_L a$  จากผลการทดลองโดยอาศัยสมการที่ 4 โดยการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์

ระหว่าง  $\frac{C_L^* - C_L^0}{C_L^* - C_L}$  กับเวลาอาศัยการวิเคราะห์ไม่เชิงเส้น (nonlinear regression) จากสมการ

เอ็กโพเนนเชียล (สมการที่ 4) เพื่อประมาณค่า  $k_L a$  ดังภาพที่ 12 ซึ่งแสดงตัวอย่างการประมาณค่า  $k_L a$  ในน้ำกลั่นที่อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.2 vvm ซ้ำที่ 1 ได้ค่า  $k_L a$  เท่ากับ 0.001419 ต่อวินาที หรือ 5.11 ต่อชั่วโมง สำหรับการประมาณค่า  $k_L a$  ในน้ำกลั่นที่สภาวะอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศอื่น ๆ ก็ดำเนินการในทำนองเดียวกัน



ภาพที่ 12 การประมาณค่า  $k_L a$  ในน้ำกลั่นที่อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.2 vvm ซ้ำที่ 1

จากนั้นสร้างสหสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ (ดัดแปลงจากวิธีของ Aguiar Jr. *et al.*, 2002) ได้สมการ 2 แบบ ดังนี้

$$\text{แบบที่ 1 สมการระหว่าง } \frac{k_L a - b_{ij}}{N} \text{ กับอัตราการให้อากาศ (Q)}$$

สร้างจากความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวน (N) เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศ (Q)

$$\text{แบบที่ 2 สมการระหว่าง } \frac{k_L a - b_{ij}}{Q} \text{ กับอัตราการกวน (N)}$$

สร้างจากความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการให้อากาศ (Q) เมื่อแปรผันอัตราการกวน (N)

โดยที่  $b_{ij}$  (บางกรณีเป็น  $b_{ijk}$ ) คือ สมการประมาณค่าจุดตัดบนแกน y

เมื่อ  $i = 1, 2$  และ 3 หมายถึง น้ำกลั่น, อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์ และมีเซลล์ ตามลำดับ

$j = 1$  และ 2 หมายถึง จุดตัดบนแกน y จากความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง  $k_L a$  กับ N และ  $k_L a$  กับ Q ตามลำดับ

หรือ กรณี  $b_{ijk}$  กำหนดเพิ่มเติมสัญลักษณ์ k ดังนี้

$k = 1, 2$  และ 3 หมายถึง (1) แบบชนิดของสมการประมาณค่า  $b_{ij}$  เฉพาะกรณีการประมาณค่า  $k_L a$  ในน้ำกลั่น และอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์ (2) ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เฉพาะกรณีการประมาณค่า  $k_L a$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์

ดังนั้น ได้สหสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ ในน้ำกลั่น ดังนี้

$$\text{แบบที่ 1 สมการระหว่าง } \frac{k_L a - b_{11}}{N} \text{ กับอัตราการให้อากาศ (Q)}$$

$$\text{แบบที่ 2 สมการระหว่าง } \frac{k_L a - b_{12}}{Q} \text{ กับอัตราการกวน (N)}$$

หลังจากได้สหสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_La$  กับอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ ในน้ำกลั่นทำการตรวจทานความถูกต้องของสหสัมพันธ์ทั้งสองแบบโดยอาศัยค่า coefficient of determination ( $R^2$ ) และ root means square error (RMSE) ดังสมการ

$$R^2 = 1 - \frac{\sum [(k_La)_{Exp} - (k_La)_{Cal}]^2}{\sum (k_La)_{Cal}^2} \quad (26)$$

และ

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum [(k_La)_{Cal} - (k_La)_{Exp}]^2}{n}} \quad (27)$$

โดยที่  $n$  คือ จำนวนข้อมูลที่ทำการทดสอบ

ทำการเปรียบเทียบค่า  $k_La$  จากการคำนวณ กับค่า  $k_La$  ที่ได้จากการทดลอง โดยแบ่งการประมาณค่า  $k_La$  จากการทดลองเป็น 3 ชุด ดังนี้

ชุดที่ 1: การประมาณค่า  $k_La$  จากการทดลองโดยแปรผันอัตราการกวน 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 และ 800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 vvm

ชุดที่ 2: การประมาณค่า  $k_La$  จากการทดลองโดยแปรผันที่อัตราการกวน 150, 250, 350, 450, 550, 650 และ 750 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.35, 0.75, 1.25 และ 1.75 vvm

ชุดที่ 3: การประมาณค่า  $k_La$  จากการทดลองทั้งหมด (ชุดที่ 1 และชุดที่ 2)

พิจารณาเลือกสหสัมพันธ์ที่ถูกต้องจากค่า  $R^2$  สูงสุด และค่า RMSE ต่ำสุด

### 3.1.2 ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

สำหรับในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อมีขั้นตอนการทดลองเช่นเดียวกับในน้ำกลั่น โดยเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย casamino acid 1 กรัม yeast nitrogen base without amino acid and ammonium sulfate 1.7 กรัม urea 2.3 กรัม (Nakano *et al.*, 2000 และ Tada *et al.*, 2004) แหล่งคาร์บอนไซโลส 30 กรัม โดยเติมสารละลายไซโลสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ลงในถังหมักแบบกวนที่จัดเตรียมไว้ (ภาพที่ 11) แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นรอนอุณหภูมิถึงหมักลดลงเท่าอุณหภูมิห้อง จึงเติมสารอาหารที่เหลือซึ่งผ่านการกรอง

ฆ่าเชื้อแล้วลงไปจนถึงหมัก แล้วเชื่อมต่อระบบควบคุมการกวน การให้อากาศ โพรบพีเอช โพรบอุณหภูมิ และโพรบออกซิเจนกับถังหมัก เปิดถังหมักและระบบควบคุมต่าง ๆ อย่างน้อย 6 ชั่วโมง เพื่อให้โพรบออกซิเจนพร้อมสำหรับการวัดค่าออกซิเจนละลาย หลังจากตั้งถังหมักไว้อย่างน้อย 6 ชั่วโมง ทำการ calibrate โพรบออกซิเจนในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ และทำการทดลองประมาณค่า  $k_L a$  โดยสร้างสหสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ และตรวจทานความถูกต้องของสหสัมพันธ์ประมาณค่า  $k_L a$  ในทำนองเดียวกันกับในน้ำกลั่น

### 3.2 การประมาณค่า $k_L a$ ในกรณีมีเซลล์

ทำการทดลองโดยแปรผันค่าความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 5 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีแต่แหล่งคาร์บอน

#### 3.2.1 ความเข้มข้นเซลล์ 5 กรัมต่อลิตร

ผลิตเซลล์ยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5663 ในฟลาสก์ให้ได้รับความเข้มข้นเซลล์ 5 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำน้ำหมักมาเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที (1,753xg) (Sigma, 3K-18, Germany) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำไปเหวี่ยงที่สภาวะเดิมเพื่อแยกเอาเซลล์ออก ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วละลายเซลล์ด้วยน้ำกลั่น ฆ่าเชื้อปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บเซลล์แขวนลอยที่ได้เพื่อนำไปทำการทดลองประมาณค่า  $k_L a$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 5 กรัมต่อลิตร

เตรียมถังหมักแบบกวนดังภาพที่ 11 พร้อมระบบควบคุมการกวน การให้อากาศ โพรบพีเอช โพรบอุณหภูมิ และโพรบออกซิเจน เต็มสารละลายไซโลส 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ลงในถังหมักที่จัดเตรียมไว้ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 30 นาที เมื่ออุณหภูมิถังหมักลดลงเท่าอุณหภูมิห้อง จึงเชื่อมต่อระบบต่าง ๆ เข้ากับถังหมัก จากนั้นเปิดถังหมักและระบบควบคุมต่าง ๆ อย่างน้อย 6 ชั่วโมง เพื่อให้โพรบออกซิเจนพร้อมสำหรับการวัดค่าออกซิเจนละลาย แล้วทำการ calibrate โพรบออกซิเจนในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีแต่แหล่งคาร์บอน ไซโลสที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเปิดก๊าซไนโตรเจนเข้าสู่ถังหมักเพื่อไล่ออกซิเจนออกจากอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ รอจนกระทั่งโพรบออกซิเจนอ่านค่าออกซิเจนละลายได้ต่ำสุดและคงที่ประมาณ 5 นาที จึงตั้งค่าให้โพรบออกซิเจนอ่านค่าออกซิเจนละลายเป็น 0 % จากนั้นเปิดอากาศเข้าสู่ถังหมัก รอจนกระทั่งโพรบออกซิเจนอ่านค่าออกซิเจนละลายได้สูงสุดและคงที่ประมาณ 5 นาที

จึงตั้งค่าให้โพรบออกซิเจนอ่านค่าออกซิเจนละลายเป็น 100 % ทำการ calibrate โพรบออกซิเจนตามวิธีดังกล่าวอีก 2 ครั้ง จึงได้โพรบออกซิเจนที่พร้อมสำหรับการทดลองประมาณค่า  $k_L a$

ประมาณค่า  $k_L a$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ปริมาตรทำงาน 1 ลิตร ที่อัตราการให้อากาศ 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 vvm โดยทุกอัตราการให้อากาศแปรผันอัตราการกวน 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 และ 1,000 รอบต่อนาที ความคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพีเอช 7.0

ตัวอย่างการประมาณค่า  $k_L a$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm และอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที เริ่มจากการเติมกล้าเชื้อลงไปจนถึงหมัก กวนผสมที่อัตรา 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเก็บตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อนำน้ำหนักเซลล์แห้ง และหาปริมาณเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตด้วยการย้อมเซลล์ด้วยเมทิลีนบลู (ภาคผนวก ข) จากนั้นปรับอัตราการกวนที่ 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm ความคุมสภาวะดังกล่าวจนกระทั่งออกซิเจนละลายคงที่ เมื่อออกซิเจนละลายคงที่ปรับลดอัตราการกวนอยู่ที่ 100 รอบต่อนาที และปิดการให้อากาศพร้อมกับเริ่มจับเวลา บันทึกค่าออกซิเจนละลายที่วัดได้ตามเวลา จนกระทั่งค่าออกซิเจนละลายลดลงเหลือประมาณ 15 % จึงปรับอัตราการกวนพร้อมกับเปิดอากาศลงสู่ถังหมักทันทีด้วยอัตราเดียวกันกับก่อนการปิดอากาศ โดยยังมีการจับเวลาอยู่ บันทึกค่าออกซิเจนละลายตามเวลาจนกระทั่งค่าออกซิเจนละลายคงที่จึงยุติการทดลอง โดยแต่ละสภาวะการทดลองทำซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากเสร็จสิ้นการทดลองในแต่ละสภาวะ หาปริมาณเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตด้วยการย้อมเซลล์ด้วยเมทิลีนบลู ถ้าพบว่ามีดรชนีการมีชีวิตมากกว่า 90 % จึงจะทำการทดลองประมาณค่า  $k_L a$  ในสภาวะอื่นต่อไป จากนั้นนำค่าออกซิเจนละลายที่วัดได้ตามเวลาเพื่อประมาณค่า  $k_L a$  ดังสมการที่ 5

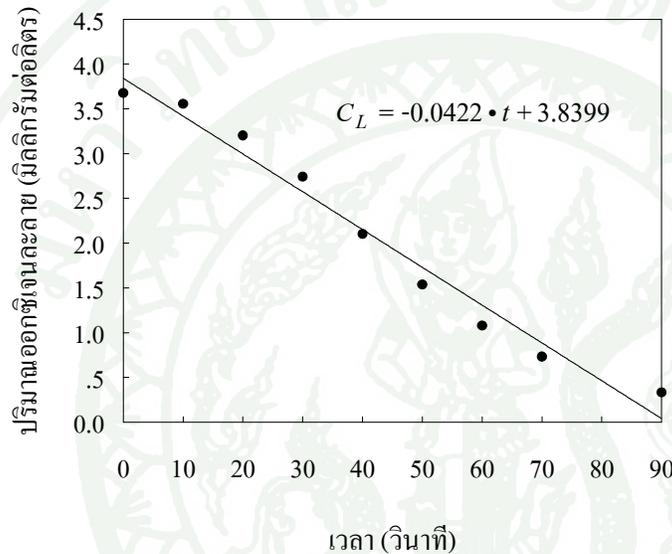
$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a (C_L^* - C_L) - q_{O_2} C_X \quad (5)$$

ในกรณีที่มีเซลล์ ( $C_X \neq 0$ ) เมื่อยุติการให้อากาศจะได้ว่า  $k_L a (C_L^* - C_L) = 0$

เพราะฉะนั้น

$$\frac{dC_L}{dt} = -q_{O_2} C_X$$

สามารถประมาณค่าอัตราการใช้ออกซิเจน ( $q_{O_2} C_X$ ) ได้จากค่าความชันของกราฟระหว่างออกซิเจนละลาย ( $C_L$ ) กับเวลา ( $t$ ) ดังภาพที่ 13 ซึ่งแสดงค่า  $q_{O_2} C_X$  ที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm ซ้ำที่ 1 เท่ากับ 0.0422 โดย  $C_X$  คือความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร



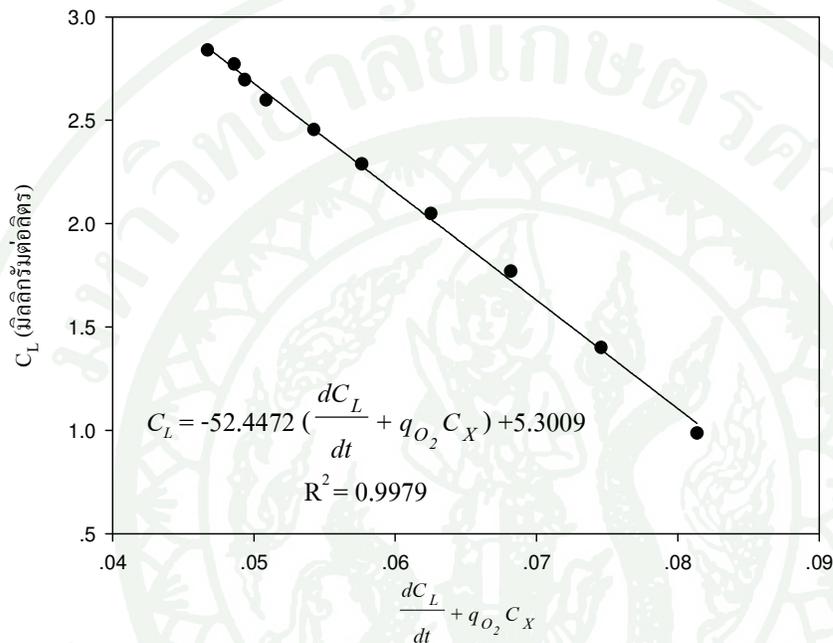
ภาพที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณออกซิเจนละลายกับเวลา ที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm เมื่อยุติการให้อากาศ (ความเข้มข้นเซลล์ยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร)

เมื่อจัดรูปสมการที่ 5 จะได้สมการที่ 6 ดังนี้

$$C_L = -\frac{1}{k_L a} \left\{ \frac{dC_L}{dt} + q_{O_2} C_X \right\} + C_L^* \quad (6)$$

โดยสามารถประมาณค่า  $k_L a$  ได้จากค่าความชันของกราฟเส้นตรงที่แสดง ความสัมพันธ์ระหว่าง  $C_L$  กับ  $\frac{dC_L}{dt} + q_{O_2} C_X$  ในช่วงเปิดการให้อากาศแก่ถังหมัก ดังภาพที่ 14 ซึ่งแสดงการประมาณค่า  $k_L a$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm (ซ้ำที่ 1) ได้กราฟเส้นตรงที่มีความชัน

เท่ากับ -52.4472 ดังนั้นได้ค่า  $k_L a$  เท่ากับ 0.0191 ต่อวินาที หรือ 68.64 ต่อชั่วโมง สำหรับการทดลอง ประมาณค่า  $k_L a$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะต่าง ๆ ดำเนินการทดลองในทำนองเดียวกัน



ภาพที่ 14 การประมาณค่า  $k_L a$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm

จากนั้นสร้างสหสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ได้สมการ 2 แบบทำนองเดียวกับการประมาณค่า  $k_L a$  ในน้ำกลั่นและอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์

### 3.2.2 ความเข้มข้นเซลล์ 10 กรัมต่อลิตร

ทำการทดลองในทำนองเดียวกันกับที่ความเข้มข้นเซลล์ 5 กรัมต่อลิตร แต่เปลี่ยนความเข้มข้นเซลล์เป็น 10 กรัมต่อลิตร

### 3.2.3 ความเข้มข้นเซลล์ 20 กรัมต่อลิตร

ทำการทดลองในทำนองเดียวกันกับที่ความเข้มข้นเซลล์ 5 กรัมต่อลิตร แต่เปลี่ยนความเข้มข้นเซลล์เป็น 20 กรัมต่อลิตร

### 3.2.4 การสร้างสหสัมพันธ์ระหว่างค่า $k_{La}$ กับอัตราการกวน อัตราการให้อากาศ และความเข้มข้นเซลล์

หลังจากได้สหสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_{La}$  กับอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร จึงสร้างสหสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_{La}$  กับอัตราการกวน อัตราการให้อากาศ และความเข้มข้นเซลล์ โดยสมการที่ได้นี้สามารถประยุกต์ใช้ในการประมาณค่า  $k_{La}$  ภายใต้สภาวะและความเข้มข้นเซลล์ที่กำหนด และใช้ติดตามและควบคุมการหมักภายใต้ค่า  $k_{La}$  ที่กำหนด เมื่อทราบค่าความเข้มข้นเซลล์

## 4. การศึกษาการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

### 4.1 การผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวเบื้องต้น

เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* ในพลาสติกและผลิตเซลล์ในถังหมักเช่นเดียวกับข้อ 2 โดยมีปริมาตรทำงาน 1 ลิตร พีเอชเริ่มต้น 6.8 และไม่มีการควบคุมพีเอชในระหว่างการทดลอง เมื่อสัปดาห์ระหว่างกลูโคสและไซโลสถูกใช้หมดไป ทำการผลิตเซลล์สูงจากความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร โดยควบคุมที่พีเอช 4.0 และทำการเติมแหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของ casamino acids 1 กรัมต่อลิตร และ urea 2.3 กรัมต่อลิตร เมื่อได้ความเข้มข้นเซลล์ประมาณ 10 กรัมต่อลิตร หลังจากไซโลสหมดไปจึงทำการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวด้วยการเติมสัปดาห์เป็นระยะ (intermittent fed-batch production) โดยเติมไซโลสจำนวน 5 ครั้ง ครั้งที่ 1 - 3 ทำการเติมไซโลสให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร ครั้งที่ 4 และ 5 เติมไซโลสให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะเติมไซโลสเมื่อความเข้มข้นไซโลสในน้ำหมักเหลือประมาณ 5 กรัมต่อลิตร และการเติมไซโลสทุกครั้งจะเติมพร้อมกับแหล่งไนโตรเจน casamino acids 1 กรัมต่อลิตร และ urea 2.3 กรัมต่อลิตร (ไม่คำนึงถึงความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหลืออยู่ก่อนการเติม) ทำการหมักที่สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 โดยการเติมไซโลสในครั้งที่ 1, 3, 4 และ 5 ทำการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้

อากาศ 1.0 vvm ส่วนการเติมไซโลสครั้งที่ 2 ควบคุมที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณไซโลส ไซลิตอล น้ำหนักเซลล์แห้ง และวัดความขุ่นของเซลล์ที่ทำการดูดกลืนแสง 660 นาโนเมตร

#### 4.2 การผลิตไซลิตอลแบบครั้งคราวที่มีความเข้มข้นเซลล์สูง

##### 4.2.1 การผลิตไซลิตอลแบบครั้งคราวครั้งที่ 1

เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* ในพลาสติกและผลิตเซลล์ในถังหมักเช่นเดียวกับข้อ 2 โดยมีปริมาตรทำงาน 1 ลิตร เมื่อสัปดาห์ระหว่างกลุโคสและไซโลสถูกใช้หมดไป ทำการผลิตเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูงจากไซโลส 30 กรัมต่อลิตร casamino acids 1 กรัมต่อลิตร และ urea 2.3 กรัมต่อลิตร โดยระยะผลิตเซลล์ควบคุมสภาวะที่พีเอช 4.0 ออกซิเจนละลาย 70 - 80 % ของออกซิเจนอิ่มตัว อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หลังจากไซโลสหมดไปจึงทำการผลิตไซลิตอลแบบครั้งคราวครั้งที่ 1 ด้วยการเติมไซโลสเป็นระยะ โดยเติมไซโลสให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้น 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 กรัมต่อลิตร มีปริมาตรทำงานเริ่มต้น ( $V_0$ ) เท่ากับ 1,017.2 มิลลิลิตร ทุกครั้งของการเติมไซโลสจะเติมเมื่อเหลือความเข้มข้นไซโลสในน้ำหมักประมาณ 5 กรัมต่อลิตร และการเติมไซโลสทุกครั้งจะเติมพร้อมกับแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ casamino acids 1 กรัมต่อลิตร และ urea 2.3 กรัมต่อลิตร ทำการหมักที่สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณไซโลส ไซลิตอล น้ำหนักเซลล์แห้ง และวัดความขุ่นของเซลล์ที่ทำการดูดกลืนแสง 660 นาโนเมตร เมื่อเสร็จสิ้นการผลิตไซลิตอลแบบครั้งคราวครั้งที่ 1 หลังจากเติมไซโลสครั้งสุดท้ายที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 90 กรัมต่อลิตร โดยเหลือความเข้มข้นไซโลสในน้ำหมักประมาณ 5 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาตรทำงานสุดท้าย ( $V_F$ ) เท่ากับ 1,296.4 มิลลิลิตร

##### 4.2.2 การผลิตไซลิตอลแบบครั้งคราวซ้ำครั้งที่ 2 และ 3

เก็บเกี่ยวน้ำหมักจากการผลิตไซลิตอลแบบครั้งคราวครั้งที่ 1 ให้เหลือปริมาตรในถังหมักเท่ากับ 500 มิลลิลิตร จากนั้นเติมไซโลสให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตรที่มีความเข้มข้นของ casamino acids 1 กรัมต่อลิตร และ urea 2.3 กรัมต่อลิตร ในปริมาตรทำงานเริ่มต้นเท่ากับ 1 ลิตร ทำการผลิตเซลล์ภายใต้สภาวะควบคุมที่พีเอช 4.0 ออกซิเจนละลาย 70 - 80 % ของออกซิเจนอิ่มตัว และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อไซโลสถูกใช้หมดไป จึงทำการผลิตไซลิตอล

แบบครั้งคราวซ้ำครั้งที่ 2 ที่มีปริมาตรทำงานเริ่มต้น ( $V_0$ ) เท่ากับ 1,069.8 มิลลิลิตร โดยเติมไซโลส ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นในน้ำหมักเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตรที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นของ casamino acids 1 กรัมต่อลิตร และ urea 2.3 กรัมต่อลิตรในทุกครั้งของการเติมไซโลส ปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 อัตราการกวน 300 รอบต่อ นาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm ทำการผลิตไซลิทอลโดยเติมไซโลสจำนวน 6 ครั้ง เมื่อได้ ความเข้มข้นไซลิทอลสุดท้ายประมาณ 300 กรัมต่อลิตร และมีปริมาตรทำงานสุดท้าย ( $V_F$ ) เท่ากับ 1,336.8 มิลลิลิตร จึงยุติการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวซ้ำครั้งที่ 2

จากนั้นผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวซ้ำครั้งที่ 3 โดยเก็บเกี่ยวน้ำหมักจากการผลิต ไซลิทอลแบบครั้งคราวซ้ำครั้งที่ 2 ให้เหลือปริมาตรในถังหมักเท่ากับ 500 มิลลิลิตร แล้วทำการเติม ไซโลสเพื่อผลิตเซลล์ให้มีความเข้มข้นเซลล์สูงกว่าการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวซ้ำครั้งที่ 2 กำหนดปริมาตรทำงานเริ่มต้นเท่ากับ 750 มิลลิลิตร ทำการผลิตเซลล์ภายใต้สภาวะควบคุมที่พีเอช 4.0 ออกซิเจนละลาย 70 - 80 % ของออกซิเจนอิ่มตัว และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่อไซโลสถูก ใช้หมดไป จึงทำการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวซ้ำครั้งที่ 3 ที่มีปริมาตรทำงานเริ่มต้น ( $V_0$ ) เท่ากับ 796 มิลลิลิตร โดยเติมไซโลสให้มีความเข้มข้นเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตรและแหล่งไนโตรเจนได้แก่ casamino acids 1 กรัมต่อลิตร และ urea 2.3 กรัมต่อลิตร ในทุกครั้งของการเติมไซโลส ปรับสภาวะ ให้เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 อัตราการกวน 300 รอบต่อ นาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm ทำการผลิตไซลิทอลโดยเติมไซโลสจำนวน 4 ครั้ง ได้ความ ความเข้มข้นไซลิทอลประมาณ 300 กรัมต่อลิตร และมีปริมาตรทำงานสุดท้าย ( $V_F$ ) เท่ากับ 787 มิลลิลิตรจึงยุติการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวซ้ำครั้งที่ 3

## 5. การวิเคราะห์

5.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง นำตัวอย่างที่เก็บแยกเซลล์ออกโดยการเหวี่ยง เก็บส่วนใสไว้ วิเคราะห์ไซโลสและไซลิทอล ส่วนตะกอนเซลล์นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นจึงนำไปอบที่ อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข)

5.2 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ นำส่วนใสที่ได้จากการเหวี่ยงเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (ภาคผนวก ข)

5.3 การวิเคราะห์ไซโลส นำส่วนไซที่ได้จากการเหวี่ยงเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม วิเคราะห์หาปริมาณไซโลสตามวิธีของ Deschatelets and Yu (1986) โดยใช้ไซโลสเป็นสารมาตรฐาน (ภาคผนวก ข)

5.4 การวิเคราะห์ไซลิตอล นำส่วนไซที่ได้จากการเหวี่ยงมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม วิเคราะห์หาปริมาณไซลิตอลตามวิธีของ Adler and Gustafsson (1980) โดยใช้ไซลิตอลเป็นสารมาตรฐาน (ภาคผนวก ข)

5.5 การหาปริมาณกลูโคสจากการคำนวณอาศัยความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์และไซโลสที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง (ข้อ 5.2 และ 5.3 ตามลำดับ) ดังนี้  
ความเข้มข้นกลูโคส = ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ - ความเข้มข้นไซโลส

## 6. สถานที่และระยะเวลาการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย ห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร และหน่วยวิจัยเทคโนโลยีการหมัก อาคารอมรภูมิรัตน์ ชั้น 7 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

ระยะเวลาในการวิจัย เริ่มตั้งแต่ มีนาคม 2550 ถึง มีนาคม 2553

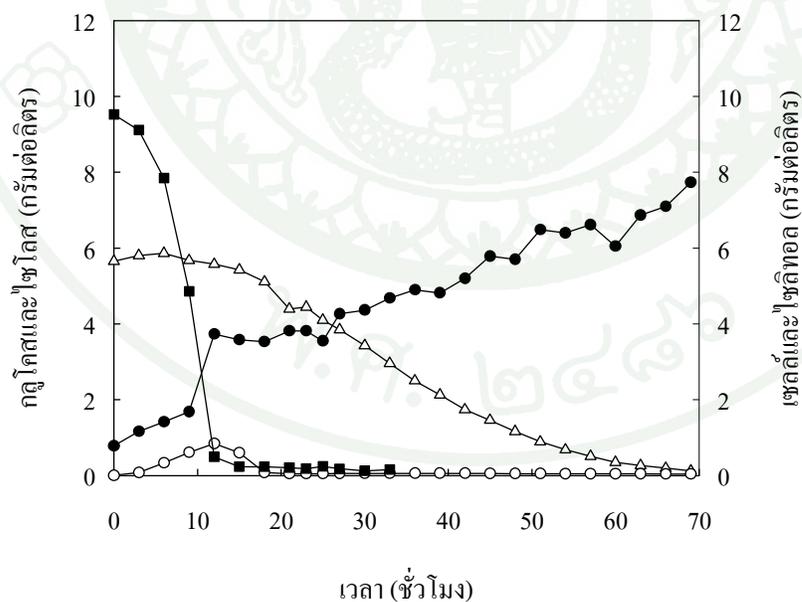
## ผลและวิจารณ์

### 1. การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลระหว่างเชื้อยีสต์ *C. mogii* TISTR 5892 และ *C. magnoliae* TISTR 5663 ระดับฟลาสก์

เพื่อคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไซลิทอลได้ดี จึงศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลระหว่างเชื้อยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ โดยคัดเลือกด้วยการเปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลของเชื้อยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์

#### 1.1 การเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *C. mogii* TISTR 5892

ผลการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *C. mogii* TISTR 5892 แสดงดังภาพที่ 15 (ตารางผนวกที่ ก1) โดยคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตสรุปดังตารางที่ 4



ภาพที่ 15 การเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *C. mogii* TISTR 5892 ในระดับฟลาสก์ สภาวะพีเอชเริ่มต้น

4.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที

สัญลักษณ์: ความเข้มข้น ■ กลูโคส; ● เซลล์; Δ ไซลิทอล และ ○ ไซลิทอล

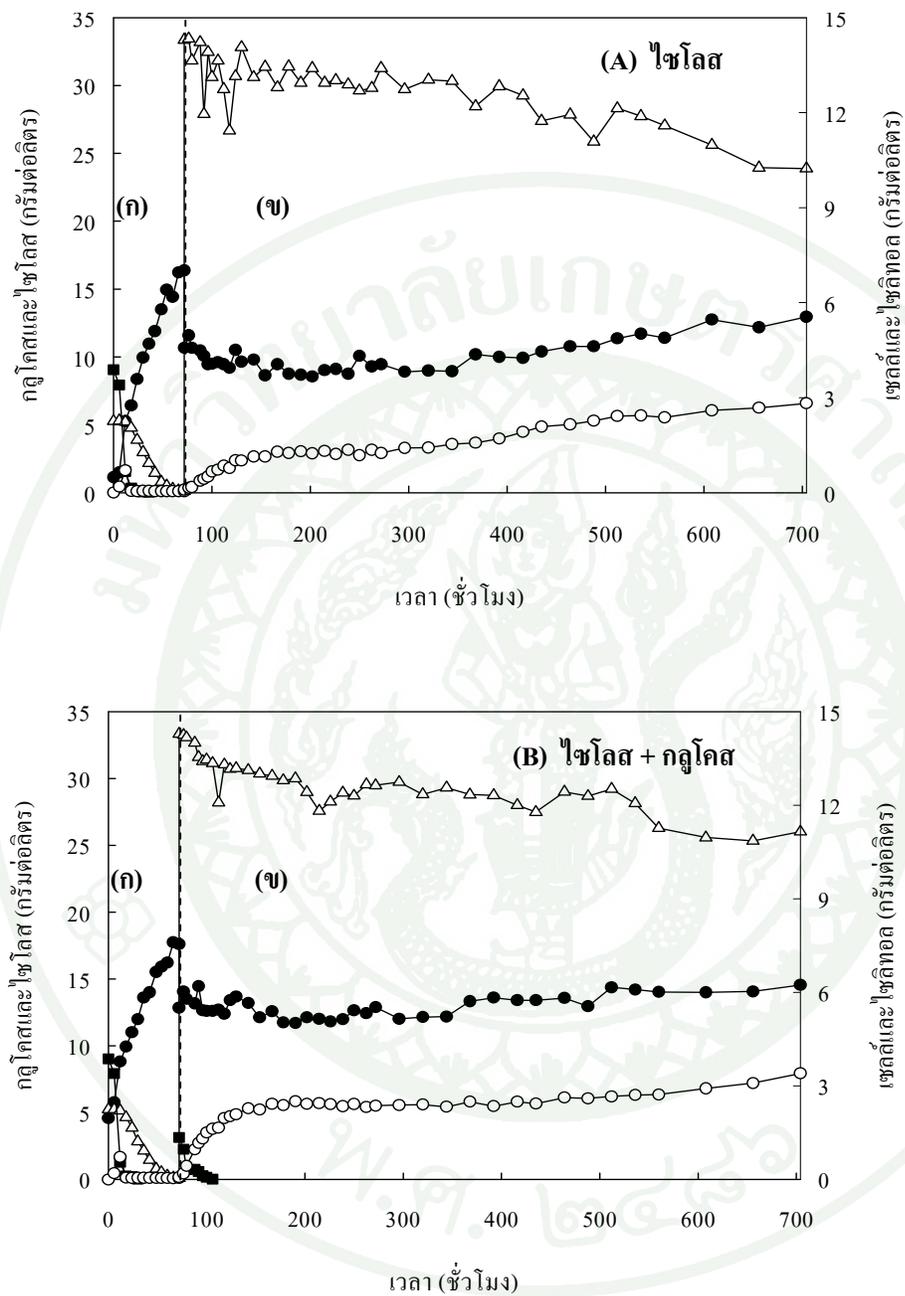
ตารางที่ 4 พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *C. mogii* TISTR 5892

พารามิเตอร์	ค่าที่ได้
$C_x$ (กรัมต่อลิตร)	7.733
$\mu$ (ต่อชั่วโมง)	0.025
$Q_{glc+xyI}$ (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)	0.218
$Q_x$ (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)	0.101
$Y_{X/glC+xyI}$ (กรัมต่อกรัม)	0.392

จากผลการทดลองภาพที่ 15 จะเห็นได้ว่าการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *C. mogii* ในช่วงแรกเชื้อจะใช้กลูโคสเพียงอย่างเดียวในการผลิตเซลล์จะไม่มีการใช้ไซโลสเนื่องจากกลูโคสทำให้เกิดภาวะกด (repression) ต่อการใช้น้ำตาลไซโลสจนกระทั่งกลูโคสถูกใช้ไปจนเหลือปริมาณน้อยภาวะการกดของกลูโคสจึงลดลง เชื้อยีสต์จึงเริ่มใช้ไซโลสได้ ดังนั้นจึงเกิดการใช้น้ำตาลทั้งสองชนิดพร้อม ๆ กัน โดยเชื้อยีสต์ *C. mogii* จะเริ่มใช้ไซโลสในชั่วโมงที่ 12 มีกลูโคสเหลือ 0.495 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นเชื้อยีสต์จะใช้กลูโคสและไซโลสในการผลิตเซลล์จนน้ำตาลทั้งสองชนิดหมดได้ความเข้มข้นเซลล์สุดท้าย ณ ชั่วโมงที่ 69 เท่ากับ 7.733 กรัมต่อลิตร มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.025 ต่อชั่วโมง และในช่วงการผลิตเซลล์นี้มีการผลิตไซลิทอลได้เล็กน้อยเนื่องจากสภาวะที่ใช้ไม่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอล

## 1.2 การผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ *C. mogii* TISTR 5892

ผลการทดลองการผลิตไซลิทอลจากสับสเตรตเดี่ยวไซโลสและสับสเตรตร่วมระหว่างกลูโคสและไซโลสแสดงดังตารางผนวกที่ ก2 และ ก3 ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลูโคส ไซโลส ไซลิทอล และเซลล์ที่เวลาต่าง ๆ เมื่อใช้สับสเตรตเดี่ยวไซโลสและสับสเตรตร่วมระหว่างกลูโคสและไซโลสแสดงดังภาพที่ 16 (16A และ 16B ตามลำดับ) และคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตไซลิทอลสรุปดังตารางที่ 5



**ภาพที่ 16** การผลิตไซลิทอลแบบเบ็ดเสร็จโดยเชื้อยีสต์ *C. mogii* TISTR 5892 ในระดับพลาสติก (ก) ระยะการผลิตเซลล์ (เขย่า 250 รอบต่อนาที) และ (ข) ระยะการผลิตไซลิทอล (เขย่า 100 รอบต่อนาที) เมื่อใช้สับสเตรตเดี่ยวไซโลส (A) และสับสเตรตร่วมไซโลสและกลูโคส (B)

สัญลักษณ์: ความเข้มข้น ■ กลูโคส; ● เซลล์; Δ ไซโลส และ ○ ไซลิทอล

ตารางที่ 5 พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ *C. mogii* TISTR 5892

ค่าพารามิเตอร์	สับสเตรต	
	กลูโคสและไซโลส	ไซโลส
$C_p$ (กรัมต่อลิตร)	3.401	2.824
$Q_p$ (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)	0.012	0.0065
$Y_{P_{kxy}}$ (กรัมต่อกรัม)	0.322	0.246

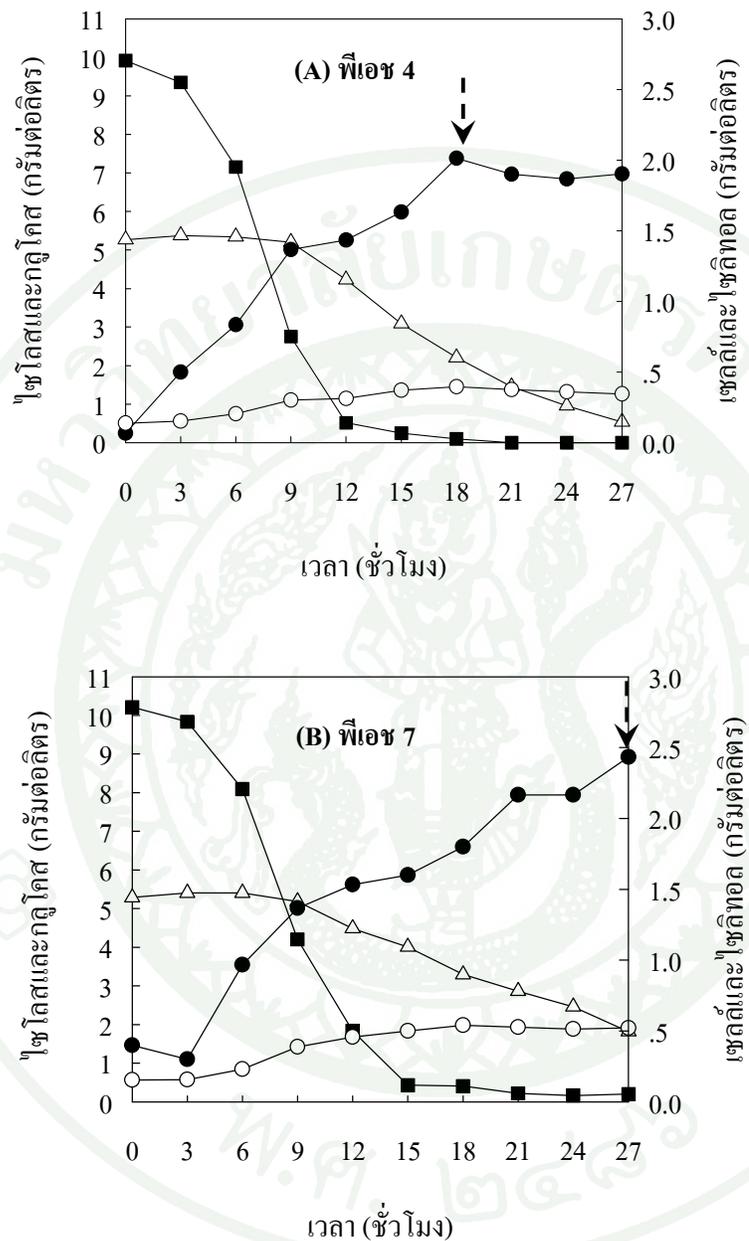
การศึกษาการผลิตไซลิทอลจากสับสเตรตไซโลสเพียงชนิดเดียวและสับสเตรตสองชนิด ได้แก่ ไซโลสและกลูโคส พบว่าการใช้สับสเตรตร่วมระหว่างไซโลสและกลูโคสที่อัตราส่วนกลูโคสต่อไซโลส 10 % (Tochampa *et al.*, 2005) ให้ผลได้ไซลิทอล 0.322 กรัมต่อกรัม สูงกว่าการใช้สับสเตรตไซโลสชนิดเดียว (0.246 กรัมต่อลิตร) ประมาณ 1.3 เท่า และการใช้สับสเตรตร่วมยังให้อัตราการผลิตไซลิทอลเชิงปริมาตรที่สูงกว่าการใช้สับสเตรตไซโลสชนิดเดียว (0.012 และ 0.0065 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ) ซึ่งการเติมกลูโคสเป็นสับสเตรตร่วมช่วยสนับสนุนการผลิตไซลิทอลออกนอกเซลล์มากขึ้น โดยทั่วไปเซลล์ยีสต์มีการสร้างพลังงานและผลิตเซลล์โดยการเปลี่ยนไซลูโลสเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟตก่อนเข้าวิถี hexose monophosphate (HMP) เพื่อเปลี่ยนเป็นกลูโคส-6-ฟอสเฟต จากนั้นกลูโคส-6-ฟอสเฟตถูกใช้เป็นส่วนตั้งต้นในการสังเคราะห์พลังงานและเซลล์ต่อไป การเติมกลูโคสจะสนับสนุนการสังเคราะห์กลูโคส-6-ฟอสเฟตผ่านทางวิถี glycolysis เซลล์ยีสต์จึงสามารถนำกลูโคส-6-ฟอสเฟตไปใช้ได้ทันที โดยไม่จำเป็นต้องใช้กลูโคส-6-ฟอสเฟตที่ได้จากการเปลี่ยนไซลูโลส-5-ฟอสเฟตจากวิถี HMP ดังนั้นการเติมกลูโคสทำให้เกิดการสะสมของไซลิทอลภายในเซลล์เพิ่มขึ้น ไซลิทอลจึงถูกขับออกมานอกเซลล์มากขึ้น จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ได้ปริมาณไซลิทอลภายนอกเซลล์มากขึ้นกว่าการใช้สับสเตรตไซโลสเพียงชนิดเดียว

จากผลการทดลองที่ได้จึงเป็นการยืนยันรายงานของ Tochampa *et al.* (2005) ที่ศึกษาผลของกลูโคสที่ใช้เป็นสับสเตรตร่วมกับไซโลสในการผลิตไซลิทอลแบบเบ็ดเสร็จ ซึ่งพบว่าการเติมกลูโคสร่วมกับไซโลสที่อัตราส่วน 10 % ช่วยเพิ่มอัตราการผลิตไซลิทอลเชิงปริมาตรได้ แต่ถ้าใช้ในอัตราส่วนมากกว่า 10 % ทำให้อัตราการผลิตไซลิทอลเชิงปริมาตรลดลง เนื่องจากการใช้ไซโลสถูกยับยั้งโดยปริมาณกลูโคสที่มากเกินไป (Tochampa *et al.*, 2005)

### 1.3 การเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5663

ผลการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* ทั้งที่พีเอช 4 และ 7 มีลักษณะคล้ายกับเชื้อยีสต์ *C. mogii* ซึ่งช่วงแรกเชื้อจะใช้กลูโคสเพียงอย่างเดียวในการผลิตเซลล์จนถึงชั่วโมงที่ 9 เหลือกลูโคส 2.751 และ 4.203 กรัมต่อลิตรที่พีเอช 4 และ 7 ตามลำดับ จากนั้นเชื้อจึงใช้ไซโลสได้ และใช้น้ำตาลทั้งสองชนิดพร้อมกันจนกระทั่งกลูโคสหมดไป เชื้อยีสต์จึงผลิตเซลล์จากไซโลสเพียงชนิดเดียว

สำหรับผลของพีเอช 4 และ 7 ภายใต้สภาวะมีอากาศ (เขย่า 250 รอบต่อนาที) ต่อการเจริญเติบโตแสดงดังภาพที่ 17 (ตารางผนวกที่ ก4 และ ก5 ตามลำดับ) พบว่าที่พีเอช 4 ได้รับความเข้มข้นเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 18 หลังจากนั้นการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) ส่วนการเจริญเติบโตที่พีเอช 7 เมื่อทดลองถึงชั่วโมงที่ 27 พบว่าเซลล์ยังมีการเจริญเติบโต และใช้สับสเตรตได้ช้ากว่าที่พีเอช 4 เห็นได้จากอัตราการใช้สับสเตรตกลูโคสและไซโลส ( $Q_{glc+xy}$ ) ที่พีเอช 4 มีค่าสูงกว่าที่พีเอช 7 นอกจากนี้ที่พีเอช 4 ยังมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $\mu$ ) และอัตราการผลิตเซลล์เชิงปริมาตร ( $Q_x$ ) สูงกว่าที่พีเอช 7 ถึง 2.2 เท่า และ 1.4 เท่า ตามลำดับ ดังตารางที่ 6 แต่มีค่าผลได้เซลล์จากสับสเตรตที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นพีเอช 4 จึงเป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5663 ภายใต้สภาวะมีอากาศเพียงพอ สอดคล้องกับความรู้ที่ว่ายีสต์เจริญเติบโตได้ดีในช่วงพีเอช 4 - 4.5 (วรารุณี, 2529)



ภาพที่ 17 การเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5663 (A) พีเอช 4 และ (B) พีเอช 7 ในระดับพลาสติก ควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราเขย่า 250 รอบต่อนาที สัญลักษณ์: ความเข้มข้น ■ กลูโคส; ● เซลล์; Δ ไซโลส และ ○ ไซลิทอล

ตารางที่ 6 พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5663 ที่พีเอช 4 และ 7

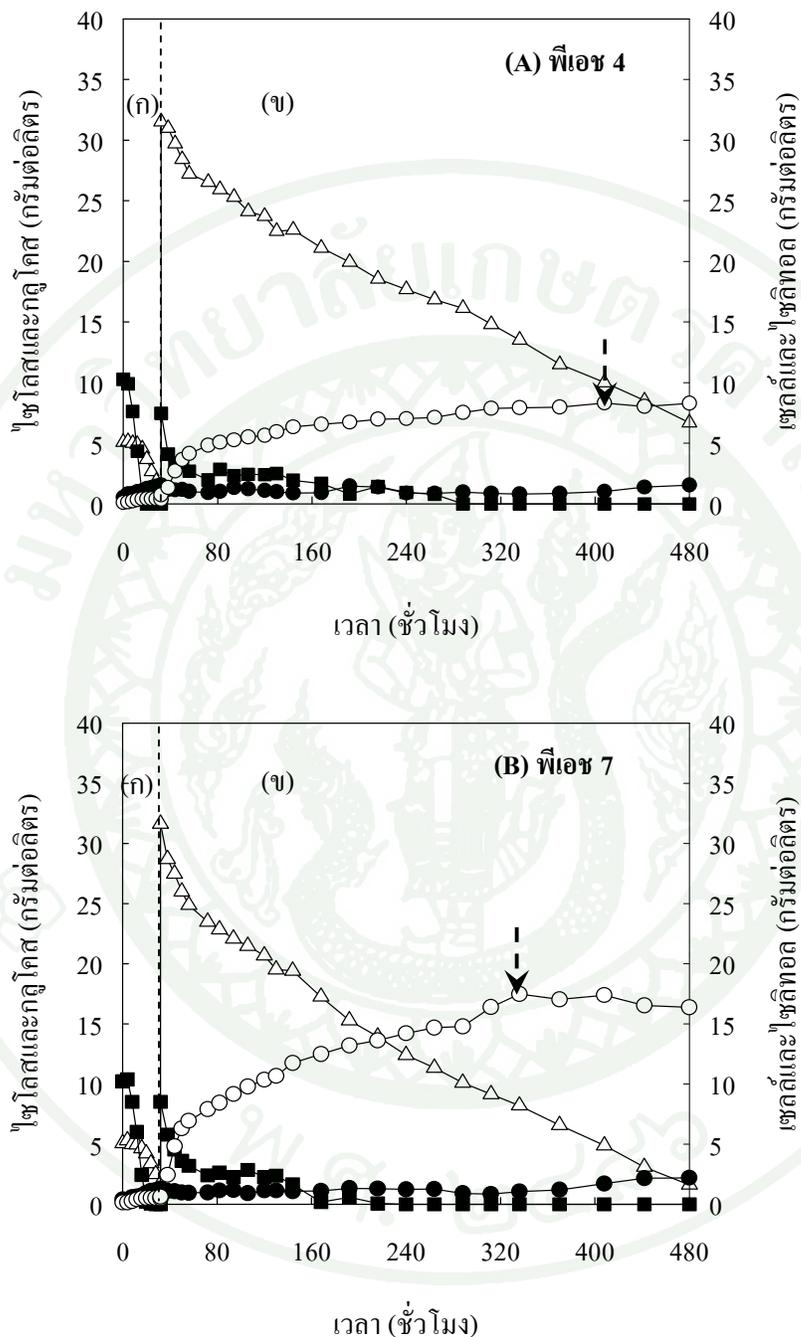
พารามิเตอร์	พีเอช	
	4.0 <sup>1</sup>	7.0 <sup>2</sup>
$\mu$ (ต่อชั่วโมง)	0.156	0.071
$Q_{glc+xy}$ (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)	0.716	0.499
$Q_X$ (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)	0.108	0.075
$Y_{X/gl+xy}$ (กรัมต่อกรัม)	0.121	0.131

หมายเหตุ<sup>1</sup> จำนวนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 - 18 ของการเจริญเติบโตที่พีเอช 4

<sup>2</sup> จำนวนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 - 27 ของการเจริญเติบโตที่พีเอช 7

#### 1.4 การผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5663

ผลการทดลองการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* ที่พีเอช 4 และ 7 แสดงดังตารางผนวกที่ 6 และ 7 ตามลำดับ และแสดงผลการผลิตไซลิทอลดังภาพที่ 18 สำหรับตารางที่ 7 แสดงพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์ของการผลิตไซลิทอลที่พีเอช 4 และ 7 ภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจน (เขย่า 100 รอบต่อนาที) จะเห็นได้ว่าพีเอช 7 เป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลเนื่องจากมีผลได้ไซลิทอลจากไซโลส ( $Y_{p/xy}$ ) อัตราการผลิตไซลิทอลเชิงปริมาตร ( $Q_p$ ) มากกว่าที่พีเอช 4 ถึง 1.8 และ 2.4 เท่า ตามลำดับ นอกจากนั้นการผลิตไซลิทอลที่พีเอช 7 ยังได้ความเข้มข้นไซลิทอลสูงสุด ( $C_p$ ) ถึง 15.283 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 336 มากกว่าที่พีเอช 4 (8.309 กรัมต่อลิตร) ถึง 1.8 เท่า ซึ่งการผลิตไซลิทอลที่พีเอช 4 ต้องใช้เวลาถึง 408 ชั่วโมง จึงจะได้ไซลิทอลสูงสุด (ลูกศรชี้ในภาพที่ 18)



**ภาพที่ 18** การผลิตไชลิทอลด้วยการหมักแบบเบ็ดเสร็จในระดับฟลาस्क โดยเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5663 ควบคุม (A) พีเอช 4 และ (B) พีเอช 7 โดยกำหนดให้ (ก) ระยะเวลาผลิตเซลลล์ (เขย่า 250 รอบต่อนาที) และ (ข) ระยะเวลาผลิตไชลิทอล (เขย่า 100 รอบต่อนาที)  
 สัญลักษณ์: ความชื้น ■ กลูโคส ● เซลล์; Δ ไชโลส และ ○ ไชลิทอล

ตารางที่ 7 พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5663 ที่พีเอช 4 และ 7

พารามิเตอร์	พีเอช	
	4.0 <sup>1</sup>	7.0 <sup>2</sup>
$C_p$ (กรัมต่อลิตร)	8.309	15.283
$Q_p$ (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)	0.020	0.048
$Y_{P/xyl}$ (กรัมต่อกรัม)	0.314	0.567

หมายเหตุ<sup>1</sup> จำนวนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 32 - 408 ของการผลิตไซลิทอลที่พีเอช 4

<sup>2</sup> จำนวนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 32 - 336 ของการผลิตไซลิทอลที่พีเอช 7

ดังนั้นพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5663 คือที่พีเอช 4 และ 7 ภายใต้สภาวะมีอากาศและจำกัดอากาศ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตและการเกิดไซลิทอลนั้นแตกต่างกัน เนื่องจากในช่วงที่เซลล์มีการเจริญเติบโตสูงนั้น สับสเตรตถูกใช้เพื่อการสร้างเซลล์มากกว่าการเกิดไซลิทอล จึงทำให้ผลได้ไซลิทอลต่ำ สอดคล้องกับการศึกษาของวรสิทธิ์ (2541) ที่พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตโดยเชื้อยีสต์ *C. mogii* ATCC 18364 (TISTR 5892) คือพีเอช 4.5 ภายใต้สภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอ และพีเอช 6.0 ภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจนเป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอล

1.5 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลระหว่างเชื้อยีสต์ *C. mogii* TISTR 5892 และ *C. magnoliae* TISTR 5663 ในระดับพลาสติก

จากผลการศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ *C. mogii* และ *C. magnoliae* ในระดับพลาสติก ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ พบว่าเชื้อยีสต์ *C. mogii* ซึ่งเจริญเติบโตได้ดีที่สภาวะพีเอช 4.5 ภายใต้สภาวะมีอากาศ (เขย่า 250 รอบต่อนาที) และผลิตไซลิทอลได้ดีเมื่อมีการใช้สับสเตรตร่วมระหว่างกลูโคสและไซโลสในอัตราส่วน 10 % ที่พีเอช 6.0 ภายใต้สภาวะจำกัดอากาศ (เขย่า 100 รอบต่อนาที) (วรสิทธิ์, 2541; Tochampa *et al.*, 2005) มีผลลัพธ์ของการเจริญเติบโตและการ

ผลิตไซลิทอลที่น้อยกว่าเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* ซึ่งเจริญเติบโตได้ดีที่สภาวะพีเอช 4.0 ภายใต้สภาวะมีอากาศ (เขย่า 250 รอบต่อนาที) และผลิตไซลิทอลได้ดีเมื่อมีการใช้สับสเตรตร่วมระหว่างกลูโคสและไซโลสในอัตราส่วน 10 % ที่พีเอช 7.0 ภายใต้สภาวะจำกัดอากาศ (เขย่า 100 รอบต่อนาที) ดังตารางที่ 8 เนื่องจากเชื้อยีสต์ *C. mogii* มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการใช้สับสเตรต และอัตราการผลิตไซลิทอลน้อยกว่าเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* ยกเว้นค่าผลได้เซลล์จากสับสเตรตซึ่งเชื้อยีสต์ *C. mogii* มีค่ามากกว่าเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* จึงสามารถผลิตเซลล์ได้มากกว่า ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบจากค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอล จึงสรุปได้ว่าเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5663 เป็นเชื้อยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไซลิทอลได้ดี ซึ่งจะได้นำไปศึกษาต่อไป

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลระหว่างเชื้อยีสต์ *C. mogii* และ *C. magnoliae*

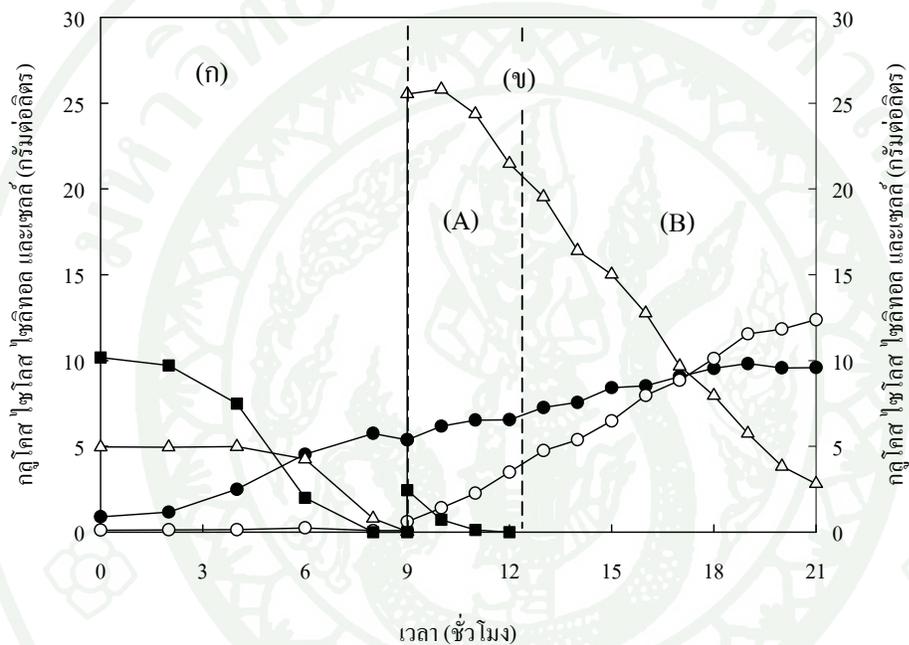
ระยะการเพาะเลี้ยง	พารามิเตอร์	<i>C. mogii</i>	<i>C. magnoliae</i>
เจริญเติบโต <sup>1</sup>	$C_x$ (กรัมต่อลิตร)	7.733	2.013
	$\mu$ (ต่อชั่วโมง)	0.025	0.156
	$Q_{glc+xyI}$ (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)	0.218	0.716
	$Q_x$ (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)	0.101	0.108
	$Y_{X/glC+xyI}$ (กรัมต่อกรัม)	0.392	0.121
ผลิตไซลิทอล <sup>2</sup>	$C_p$ (กรัมต่อลิตร)	3.401	15.283
	$Q_p$ (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)	0.012	0.048
	$Y_{p/xyI}$ (กรัมต่อกรัม)	0.322	0.567

หมายเหตุ<sup>1</sup> คำนวณตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 - 69 สำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *C. mogii* ที่พีเอช 4.5 และชั่วโมงที่ 0 - 18 สำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* ที่พีเอช 4.0 ภายใต้สภาวะมีอากาศ (เขย่า 250 รอบต่อนาที)

<sup>2</sup> คำนวณตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 - 704 สำหรับการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ *C. mogii* ที่พีเอช 6.0 และชั่วโมงที่ 32 - 336 สำหรับการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* ที่พีเอช 7.0 เมื่อใช้สับสเตรตร่วมระหว่างกลูโคสและไซโลสที่อัตราส่วน 10 % ภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจน (เขย่า 100 รอบต่อนาที)

## 2. การศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5663 ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

ทำการเพาะเลี้ยงและผลิตไซลิทอลด้วยเชื้อ *C. magnoliae* TISTR 5663 โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากในระดับฟลasks ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 19 (ตารางผนวกที่ 8)



**ภาพที่ 19** การผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5663 แบบเบ็ดเสร็จ (ก) ระยะเวลาผลิตเซลล์ สภาวะควบคุมพีเอช 4.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ออกซิเจนละลาย 70 - 80 % (ข) ระยะเวลาผลิตไซลิทอล สภาวะควบคุมพีเอช 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm (A) ใช้สับสเตรตร่วมระหว่างกลูโคสและไซโลส (ชั่วโมงที่ 9 - 12) และ (B) ใช้สับสเตรตเดี่ยวไซโลส (ชั่วโมงที่ 12 - 21)

สัญลักษณ์: ความเข้มข้น ■ กลูโคส; ● เซลล์; △ ไซโลส และ ○ ไซลิทอล

จากการศึกษาของ Tochampa *et al.* (2005) พบว่าการเติมอัตราส่วนกลูโคสต่อไซโลส 10 % เป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมในการช่วยเพิ่มอัตราการผลิตไซลิทอลเชิงปริมาณในการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อ *C. mogii* TISTR 5892 ได้ ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาผลของการเติมกลูโคส 10 % เป็นสับสเตรตร่วมกับน้ำตาลไซโลสต่อการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5663

ภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจน (อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 vvm) จำนวนพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ในช่วงที่มีการใช้กลูโคสร่วมกับไซโลสเปรียบเทียบกับช่วงที่ใช้เฉพาะไซโลสเป็นสับสเตรตแสดงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ระหว่างการใช้สับสเตรตเดี่ยว (ไซโลส) และสับสเตรตร่วม (กลูโคสและไซโลส) ต่อการผลิตไซลิทอล

พารามิเตอร์	สับสเตรต	
	กลูโคสและไซโลส <sup>1</sup>	ไซโลส <sup>2</sup>
อัตราจำเพาะ (กรัมต่อกรัม ชั่วโมง)		
$q_{xyl}$	0.220	0.241
$q_p$	0.156	0.115
อัตราเชิงปริมาตร (กรัมต่อลิตร ชั่วโมง)		
$Q_{xyl}$	1.352	2.073
$Q_p$	0.961	0.986

หมายเหตุ<sup>1,2</sup> จำนวนตั้งแต่ชั่วโมงที่ 9 - 12 และ 12 - 21 ตามลำดับ สำหรับการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* ที่พีเอช 7.0 ภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจน (อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm)

จากภาพที่ 19 ระหว่างชั่วโมงที่ 9 - 12 เป็นระยะของการใช้สับสเตรตร่วมระหว่างกลูโคสและไซโลส หลังจากนั้นระหว่างชั่วโมงที่ 12 - 21 เป็นระยะเวลาของการใช้สับสเตรตเดี่ยวไซโลสในการผลิตไซลิทอล ซึ่งพบว่าในช่วงของการใช้สับสเตรตเดี่ยวไซโลสมีอัตราเชิงปริมาตรและจำเพาะของการใช้ไซโลสสูงกว่าในช่วงของการใช้สับสเตรตร่วมระหว่างกลูโคสและไซโลส เนื่องจากเซลล์สามารถใช้กลูโคสได้เร็วกว่าไซโลส และกลูโคสยังยับยั้งการขนส่งน้ำตาลไซโลสเข้าสู่เซลล์ (Tochampa *et al.*, 2005) ดังนั้นเมื่อกลูโคสถูกใช้จนหมดจนเหลือเพียงไซโลสเป็นสับสเตรตจึงทำให้อัตราเชิงปริมาตรและจำเพาะของการใช้ไซโลสสูงขึ้น และเมื่อพิจารณาอัตราการผลิตไซลิทอลเชิงปริมาตรเมื่อมีเพียงไซโลสเป็นสับสเตรตมีค่าสูงกว่าเมื่อใช้สับสเตรตร่วมระหว่างกลูโคสและไซโลสเพียงเล็กน้อย (ตารางที่ 9) ดังนั้นการเติมกลูโคสเป็นสับสเตรตร่วมจึงไม่มีความจำเป็นในการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5663

### 3. การประมาณค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายโอนออกซิเจนเชิงปริมาตร ( $k_L a$ ) ระดับถังหมัก 2 ลิตร

จากปัจจัยสำคัญของออกซิเจนละลายต่อการผลิตไซลิทอล และอุปสรรคจากการวัดออกซิเจนละลายด้วยโพรบออกซิเจนภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจน ทำให้ไม่สามารถควบคุมสภาวะจำกัดออกซิเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอล จึงจำเป็นต้องควบคุมออกซิเจนละลายในน้ำหมัก โดยอาศัยสหสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ จึงศึกษาการประมาณค่า  $k_L a$  ทั้งในกรณีที่มีและไม่มีเซลล์ โดยการศึกษากรณีไม่มีเซลล์แบ่งออกเป็นในน้ำกลั่นและในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

#### 3.1 กรณีไม่มีเซลล์

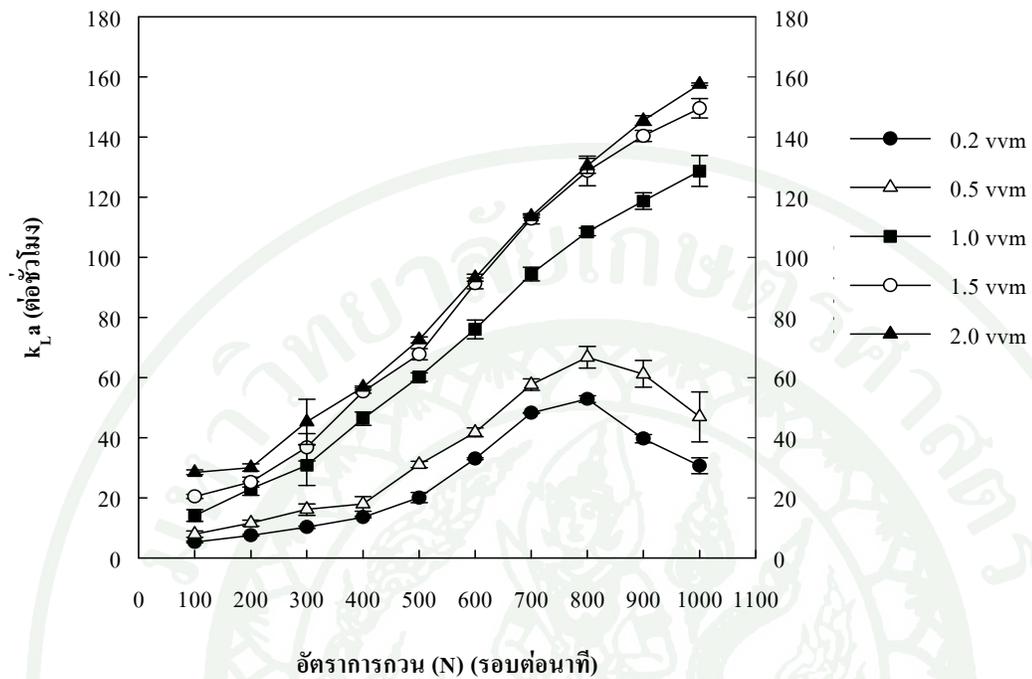
โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กรณีคือ ในน้ำกลั่นและในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ดังนี้

##### 3.1.1 ในน้ำกลั่น

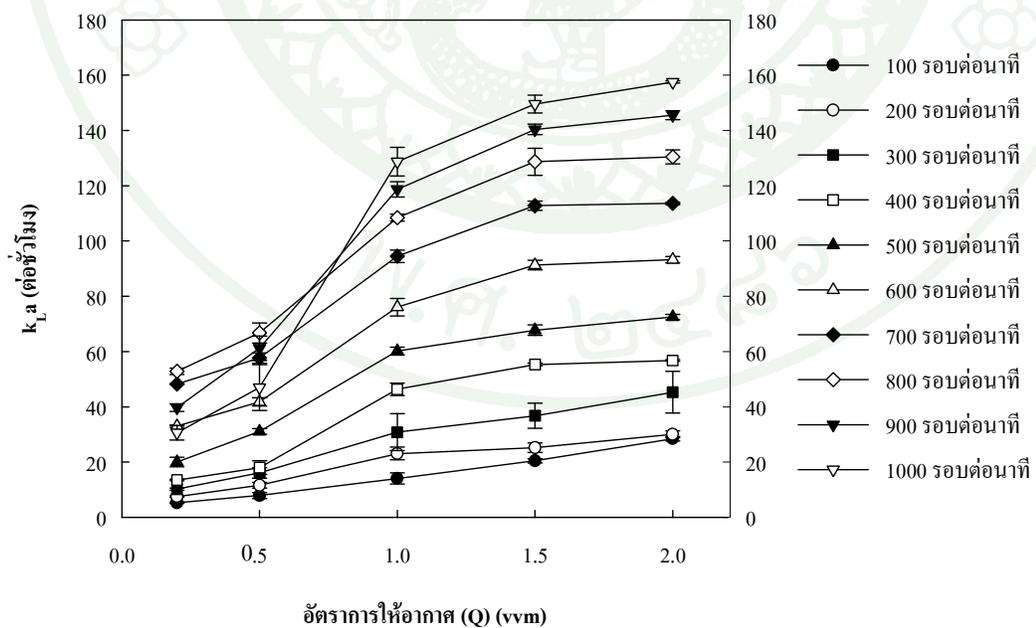
ประมาณค่า  $k_L a$  โดยการแปรผันอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ จากนั้นจึงสร้างสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ และการตรวจทานสหสัมพันธ์ที่ได้โดยการทดลองที่อาศัยค่า  $R^2$  และ RMSE ในการเปรียบเทียบระหว่างผลการทดลองและการคำนวณ

#### ก. การประมาณค่า $k_L a$

จากการทดลองการประมาณค่า  $k_L a$  ในน้ำกลั่น สรุปค่า  $k_L a$  เฉลี่ยจากการประมาณค่า  $k_L a$  สามซ้ำที่อัตราการกวนและอัตราการให้อากาศต่าง ๆ แสดงดังตารางผนวกที่ ก9 สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  ในน้ำกลั่นที่อัตราการกวน และอัตราการให้อากาศต่าง ๆ แสดงดังภาพที่ 20 และ 21 ตามลำดับ



ภาพที่ 20 ความสัมพันธ์ของค่า  $k_La$  ในน้ำกลั่นที่อัตราการกวน 100 ถึง 1000 รอบต่อนาที



ภาพที่ 21 ความสัมพันธ์ของค่า  $k_La$  ในน้ำกลั่นที่อัตราการให้อากาศ 0.2 ถึง 2.0 vvm

ภาพที่ 20 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวน ( $N$ ) จะเห็นได้ว่าค่า  $k_L a$  เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราการกวน ยกเว้นที่อัตราการให้อากาศ 0.2 และ 0.5 vvm เมื่อเพิ่มอัตราการกวนมากกว่า 800 รอบต่อนาทีค่า  $k_L a$  มีค่าลดลง และในทำนองเดียวกันการเพิ่มอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ทำให้ค่า  $k_L a$  เพิ่มขึ้นแสดงดังภาพที่ 21 โดยที่อัตราการให้อากาศสูง 1.0, 1.5 และ 2.0 vvm จะได้ค่า  $k_L a$  สูงสุด ณ อัตราการให้อากาศที่ 1000 รอบต่อนาที ซึ่งแตกต่างจากกรณีอัตราการให้อากาศต่ำที่ 0.2 และ 0.5 vvm จะได้ค่า  $k_L a$  สูงสุดที่อัตราการกวน 800 รอบต่อนาที อย่างไรก็ตามพบว่าที่อัตราการกวน 900 และ 1000 รอบต่อนาทีที่อัตราการให้อากาศ 0.2 และ 0.5 vvm ค่า  $k_L a$  มีค่าลดลง (ภาพที่ 20)

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศในน้ำกลั่น พบว่าเมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) และอัตราการกวน ( $N$ ) ค่า  $k_L a$  มีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ระหว่างอัตราการกวน 100 ถึง 800 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.2 ถึง 2.0 vvm ดังนั้นจึงสรุปความสัมพันธ์เส้นตรงโดยอาศัยผลการทดลองดังกล่าวเป็นเกณฑ์

#### ข. สหสัมพันธ์ระหว่างค่า $k_L a$ กับอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ

พิจารณาสร้างสมการสหสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวน ( $N$ ) และอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ได้ 2 แบบ ดังนี้

$$\text{แบบที่ 1 สมการระหว่าง } \frac{k_L a - b}{N} \text{ กับอัตราการให้อากาศ } (Q)$$

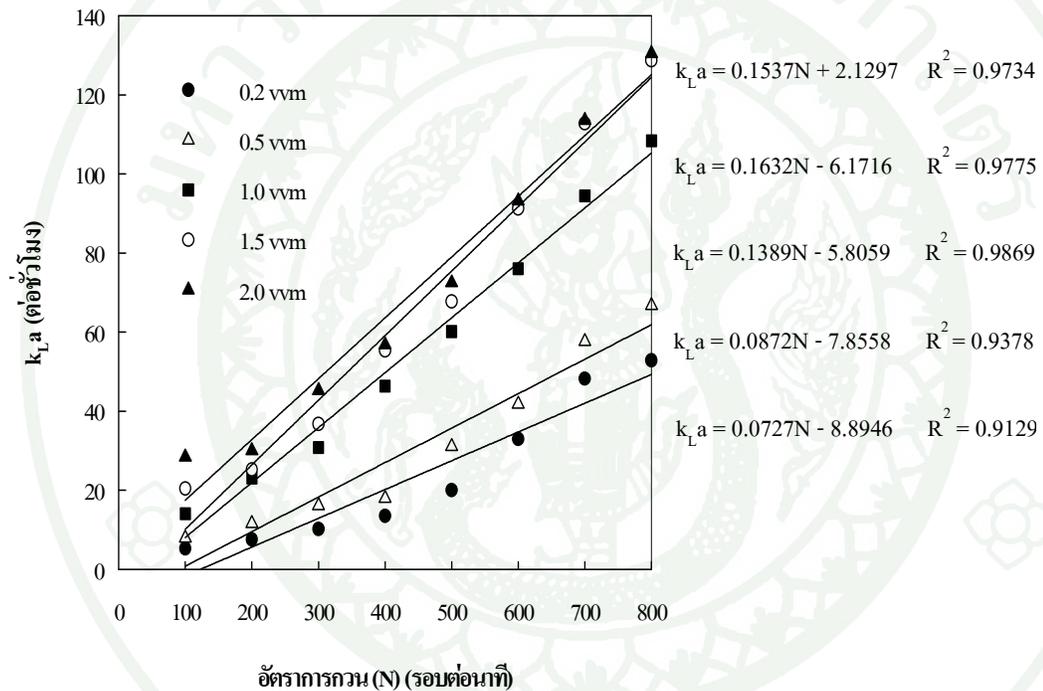
สร้างจากความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวน ( $N$ ) เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศ ( $Q$ )

$$\text{แบบที่ 2 สมการระหว่าง } \frac{k_L a - b}{Q} \text{ กับอัตราการกวน } (N)$$

สร้างจากความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) เมื่อแปรผันอัตราการกวน ( $N$ )

1) สมการระหว่าง  $\frac{k_L a - b}{N}$  กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ )

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $k_L a$  กับ  $N$  ในน้ำกลั่นดังภาพที่ 20 นำผลการทดลองที่แสดงสหสัมพันธ์เส้นตรงระหว่างอัตราการกวน 100 และ 800 รอบต่อนาที สรุปเป็นสมการเส้นตรงที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $k_L a$  กับ  $N$  ดังภาพที่ 22

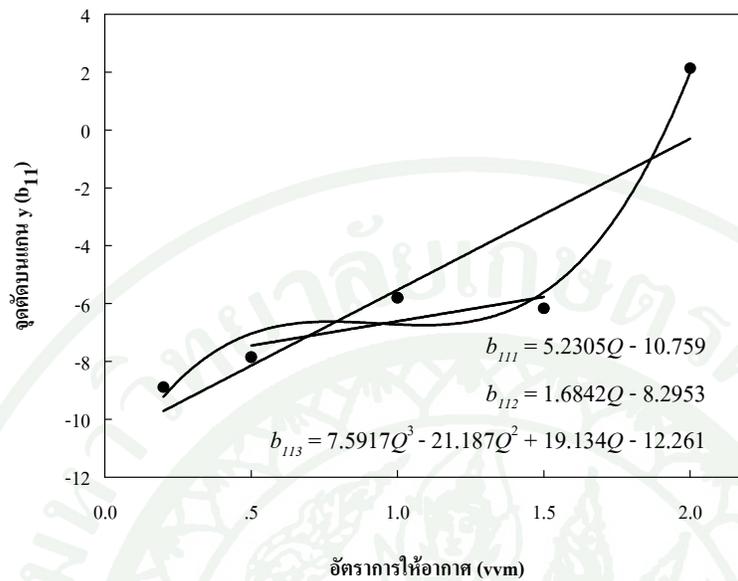


ภาพที่ 22 สหสัมพันธ์เส้นตรงระหว่าง  $k_L a$  กับอัตราการกวน ( $N$ ) ( $N = 100 - 800$  รอบต่อนาที)

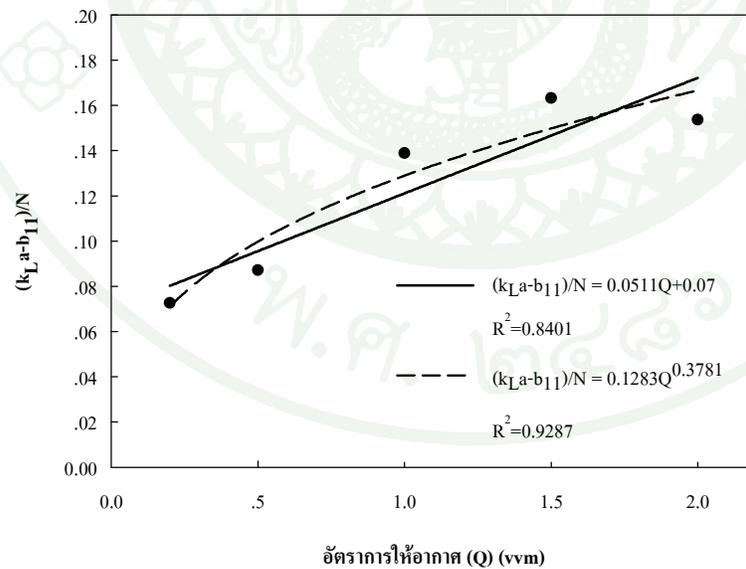
เนื่องจากสหสัมพันธ์เส้นตรงไม่ผ่านจุดเริ่มต้น (0,0) (ภาพที่ 22) จึงจำเป็นต้องประมาณค่าจุดตัดบนแกน  $y$  ( $b_{11}$ ) เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศตั้งแต่ 0.2 ถึง 2.0 vvm แสดงดังภาพที่ 23 จะได้สมการประมาณค่า  $b_{11}$  ทั้งสิ้น 3 สมการ และเมื่ออาศัยค่าความชัน

$\left(\frac{k_L a - b}{N}\right)$  จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง  $k_L a$  กับอัตราการกวน (ภาพที่ 22) สร้างกราฟแสดง

ความสัมพันธ์ระหว่าง  $\frac{k_L a - b}{N}$  กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ได้ดังภาพที่ 24



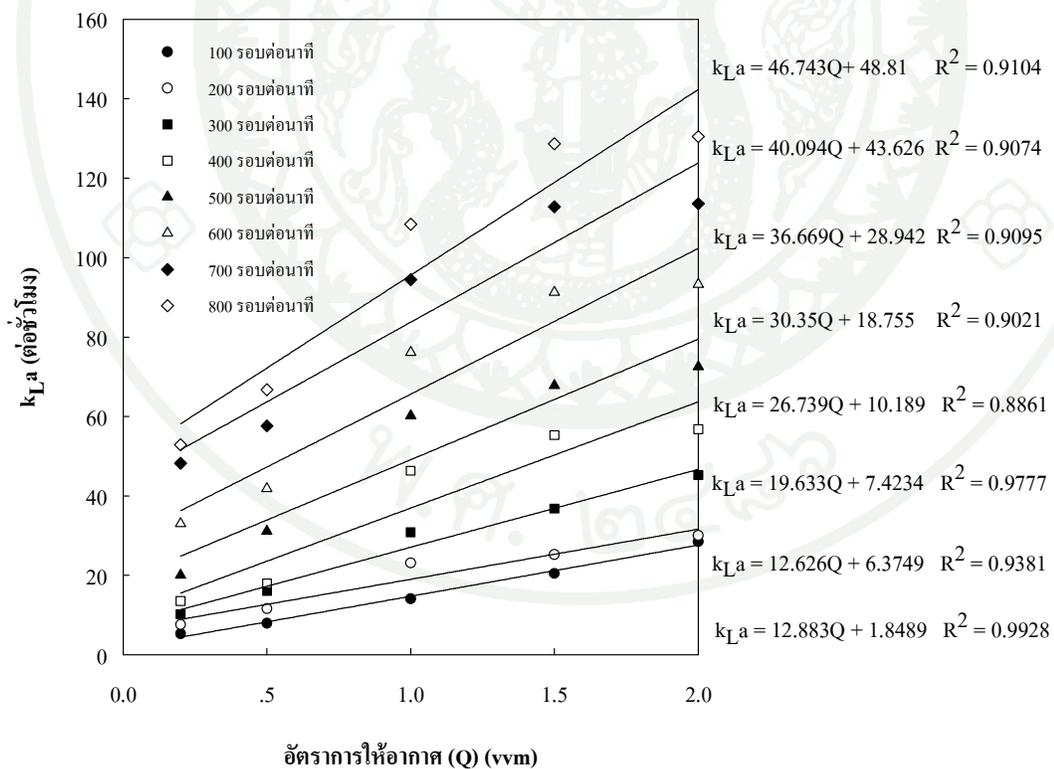
ภาพที่ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างจุดตัดบนแกน  $y$  ( $b_{11}$ ) กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ในน้ำกลั่น  
( $N = 100 - 800$  รอบต่อนาที และ  $Q = 0.2 - 2.0$  vvm)



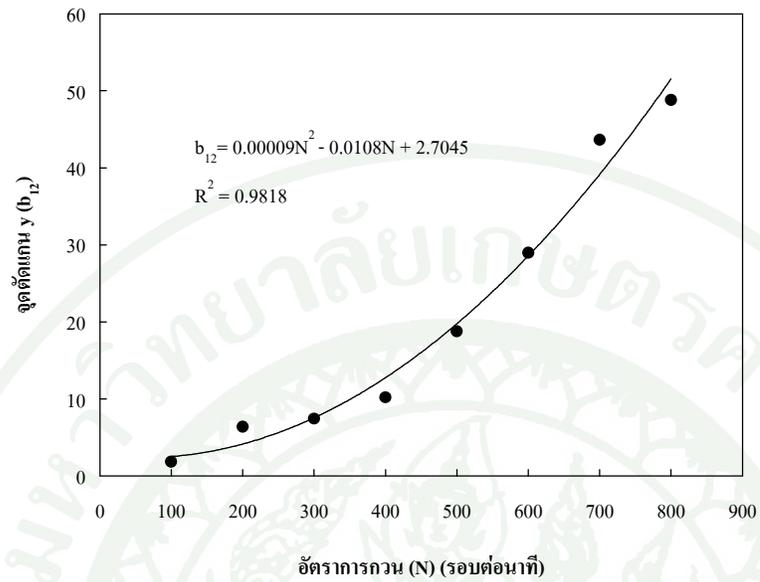
ภาพที่ 24 ความสัมพันธ์ระหว่าง  $\frac{k_L a - b_{11}}{N}$  กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ในน้ำกลั่น  
( $N = 100 - 800$  รอบต่อนาที และ  $Q = 0.2 - 2.0$  vvm)

2) สมการระหว่าง  $\frac{k_L a - b_{12}}{Q}$  กับอัตราการกวน ( $N$ )

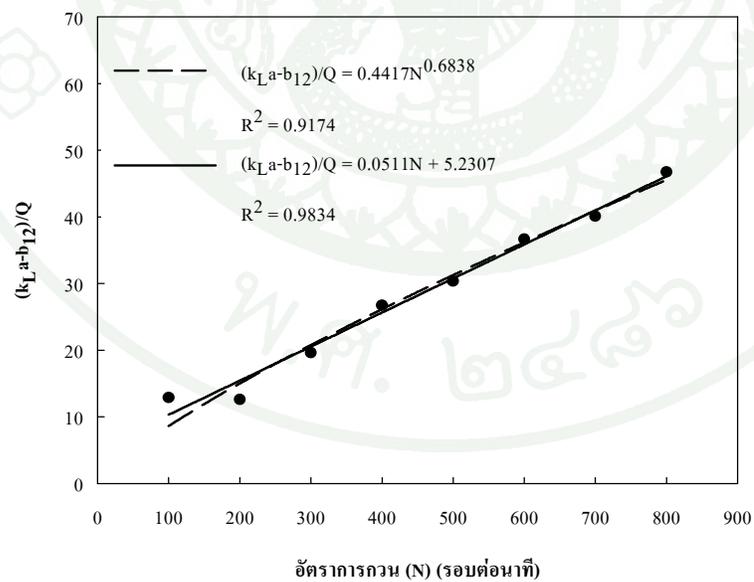
สำหรับสหสัมพันธ์จากค่า  $k_L a$  และอัตราการให้อากาศ (ภาพที่ 21) แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง  $k_L a$  กับอัตราการให้อากาศ ที่อัตราการกวนตั้งแต่ 100 ถึง 800 รอบต่อนาที ดังภาพที่ 25 ทำการการประมาณค่าจุดตัดบนแกน  $y$  ( $b_{12}$ ) แสดงได้ดังสมการ  $b_{12} = 0.00009N^2 - 0.0108N + 2.7045$  (ภาพที่ 26) และเมื่ออาศัยค่าความชันที่ประมาณค่าได้ ( $\frac{k_L a - b_{12}}{Q}$ ) จากสหสัมพันธ์เส้นตรงระหว่าง  $k_L a$  กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) จะได้สหสัมพันธ์ระหว่าง  $\frac{k_L a - b_{12}}{Q}$  กับอัตราการกวน ( $N$ ) แสดงดังภาพที่ 27



ภาพที่ 25 สหสัมพันธ์เส้นตรงระหว่าง  $k_L a$  กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ( $N = 100 - 800$  รอบต่อนาที)



ภาพที่ 26 ความสัมพันธ์ระหว่างจุดตัดบนแกน y ( $b_{12}$ ) กับอัตราการกวน (N) ในน้ำกลั่น  
( $N = 100 - 800$  รอบต่อนาที และ  $Q = 0.2 - 2.0$  vvm)



ภาพที่ 27 ความสัมพันธ์ระหว่าง  $\frac{k_L a - b_{12}}{Q}$  กับอัตราการกวน (N) ในน้ำกลั่น

( $N = 100 - 800$  รอบต่อนาที และ  $Q = 0.2 - 2.0$  vvm)

ดังนั้นจากภาพที่ 24 และ 27 สรุปได้สมการที่เหมาะสมที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวน ( $N$ ) และอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ในน้ำกลั่นดังนี้

$$\frac{k_L a - b_{11}}{N} = 0.1283Q^{0.3781} \quad (28a)$$

เมื่อกำหนดให้  $b_{11} = b_{11p}$ ,  $b_{112}$  และ  $b_{113}$  ดังนี้

$$b_{111} = 5.2305Q - 10.759 \text{ (สมการเส้นตรงที่อัตราการให้อากาศ 0.2 - 2.0 vvm)}$$

$$b_{112} = 1.6842Q - 8.2953 \text{ (สมการเส้นตรงที่อัตราการให้อากาศ 0.5 - 1.5 vvm)}$$

$$b_{113} = 7.5917Q^3 - 21.187Q^2 + 19.134Q - 12.261 \text{ (สมการพอลิโนเมียล)}$$

$$\frac{k_L a - b_{12}}{Q} = 0.4417N^{0.6838} \quad (29a)$$

เมื่อ  $b_{12} = 0.00009N^2 - 0.0108N + 2.7045$  (สมการพอลิโนเมียล)

สหสัมพันธ์ทั้งสองสมการ (28a และ 29a) ใช้ในการประมาณค่า  $k_L a$  ในน้ำกลั่นภายใต้สภาวะอัตราการกวน 100 ถึง 800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.2 ถึง 2.0 vvm สำหรับการตรวจทานความถูกต้องของสมการทั้งสองแสดงในหัวข้อ ค.

#### ค. การตรวจทานสหสัมพันธ์ของค่า $k_L a$ กับอัตราการกวนและการให้อากาศ

จากสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศที่สร้างขึ้นในน้ำกลั่น (สมการที่ 28a และ 29a) นำมาตรวจทานความถูกต้องโดยการเปรียบเทียบจากค่า  $k_L a$  จากการคำนวณและจากการทดลองจริงโดยอาศัยค่า  $R^2$  และ RMSE สรุปสมการสหสัมพันธ์  $k_L a$  ที่เหมาะสมที่สุดจากค่า  $R^2$  สูงสุด และค่า RMSE ต่ำสุด

พิจารณาสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวน ( $N$ ) และอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ทั้ง 2 สมการคือ สมการที่ 28a และ 29a ทำการทดสอบความเหมาะสมของสมการที่ 28a และ 29a ด้วยการเปรียบเทียบค่า  $k_L a$  จากการคำนวณ กับค่า  $k_L a$  ที่ได้จากการทดลองจริง โดยการประมาณค่า  $k_L a$  จากการทดลองซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ชุดการทดลองดังนี้

ชุดที่ 1: การประมาณค่า  $k_L a$  จากการทดลองโดยแปรผันอัตราการกวน 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 และ 800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 vvm

ชุดที่ 2: การประมาณค่า  $k_L a$  จากการทดลองโดยแปรผันอัตราการกวน 150, 250, 350, 450, 550, 650 และ 750 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.35, 0.75, 1.25 และ 1.75 vvm

ชุดที่ 3: การประมาณค่า  $k_L a$  จากการทดลองทั้งหมด (ชุดที่ 1 และชุดที่ 2)

เมื่อเปรียบเทียบค่า  $k_L a$  จากการทดลองทั้ง 3 ชุดกับค่า  $k_L a$  จากการคำนวณด้วยสมการทั้ง 2 สมการ (28a และ 29a) จะได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  จากการทดลอง  $(k_L a)_{Exp}$  กับค่า  $k_L a$  จากการคำนวณ  $(k_L a)_{Cal}$  (ภาพผนวกที่ ก1 ถึง ก3) และสรุปค่า  $R^2$  และ RMSE ดังตารางที่ 10

จากตารางที่ 10 จะเห็นว่าสมการที่ 28a จากการเปรียบเทียบกับชุดที่ 3 มีค่า  $R^2$  สูงสุด และค่า RMSE ต่ำสุด เมื่อเลือกใช้สมการเส้นตรงที่อัตราการให้อากาศ 0.2 ถึง 2.0 vvm ประมาณค่า  $b_{II}$  ( $b_{II} = b_{III}$ ) คือ  $R^2 0.9882$  และ RMSE 6.5313 ดังนั้นสมการสหสัมพันธ์ที่เหมาะสมจะนำมาใช้ประมาณค่า  $k_L a$  ในน้ำกลั่นคือ

$$\frac{k_L a - b_{II}}{N} = 0.1283Q^{0.3781} \quad (28b)$$

โดยกำหนดให้  $b_{II} = 5.2305Q - 10.759$

ภายใต้สภาวะที่มีอัตราการกวน 100 ถึง 800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.2 ถึง 2.0 vvm

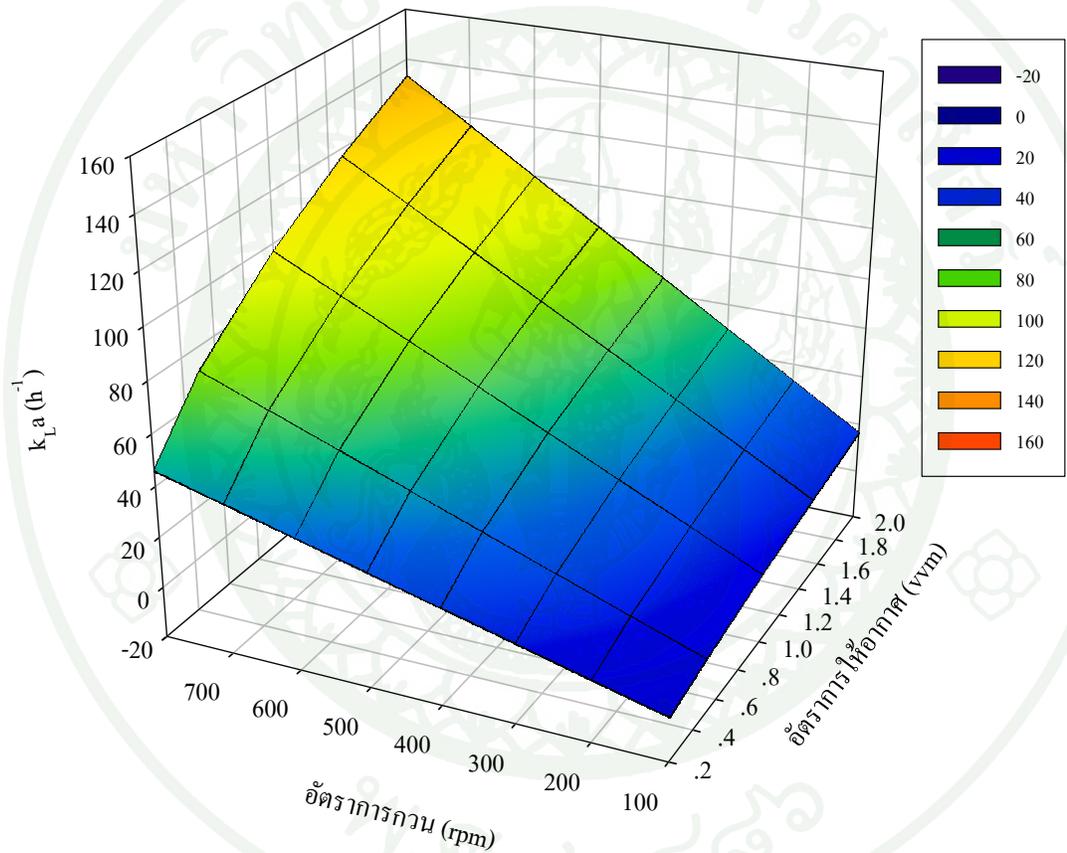
ตารางที่ 10 การตรวจทานความถูกต้องของสหสัมพันธ์ของค่า  $k_{La}$  กับอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศในน้ำกลั่น

สมการ	ชุดที่ 1		ชุดที่ 2		ชุดที่ 3	
	R <sup>2</sup>	RMSE	R <sup>2</sup>	RMSE	R <sup>2</sup>	RMSE
$\frac{k_{La} - b_{11}}{N} = 0.1283Q^{0.3781} \text{ (เมื่อ } b_{11} = b_{111}, b_{112}, b_{113}\text{)}$						
$b_{111} = 5.2305Q - 10.759$	0.9874	6.8347	0.9893	6.0716	0.9882	6.5313
$b_{112} = 1.6842Q - 8.2953$	0.9851	7.2318	0.9881	6.2573	0.9863	6.8474
$b_{113} = 7.5917Q^3 - 21.187Q^2 + 19.134Q - 12.261$	0.9838	7.7430	0.9891	6.0561	0.9859	7.0971
$\frac{k_{La} - b_{12}}{Q} = 0.4417N^{0.6838}$						
$b_{12} = 0.00009N^2 - 0.0108N + 2.7045$	0.9865	6.9677	0.9882	6.0806	0.9871	6.6169

หมายเหตุ ชุดที่ 1 คือค่า  $k_{La}$  ที่อัตราการกวน 100, 200, 300, 400, 500, 600 700 และ 800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 vvm  
 ชุดที่ 2 คือค่า  $k_{La}$  ที่อัตราการกวน 150, 250, 350, 450, 550, 650 และ 750 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.35, 0.75, 1.25 และ 1.75 vvm  
 ชุดที่ 3 คือ รวมค่า  $k_{La}$  จากชุดที่ 1 และชุดที่ 2

จากสหมัมพันธ์ที่สร้างขึ้นนำมาเลียนแบบ (simulation) ภายใต้สภาวะที่มีอัตราการกวนที่ 100 ถึง 800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.2 ถึง 2.0 vvm นำผลการเลียนแบบมาสร้างเป็นกราฟ 3 มิติเพื่อดูผลของอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศต่อค่า  $k_{L,a}$  ดังแสดงในภาพที่

28



ภาพที่ 28 ผลของอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศต่อค่า  $k_{L,a}$  จากการเลียนแบบสมการที่ 28b ในการประมาณค่า  $k_{L,a}$  ในน้ำกลั่น

จากภาพที่ 28 แสดงให้เห็นว่าอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศมีผลต่อค่า  $k_{L,a}$  ในน้ำกลั่นพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศจะทำให้ค่า  $k_{L,a}$  สูงขึ้น

### 3.1.2 ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

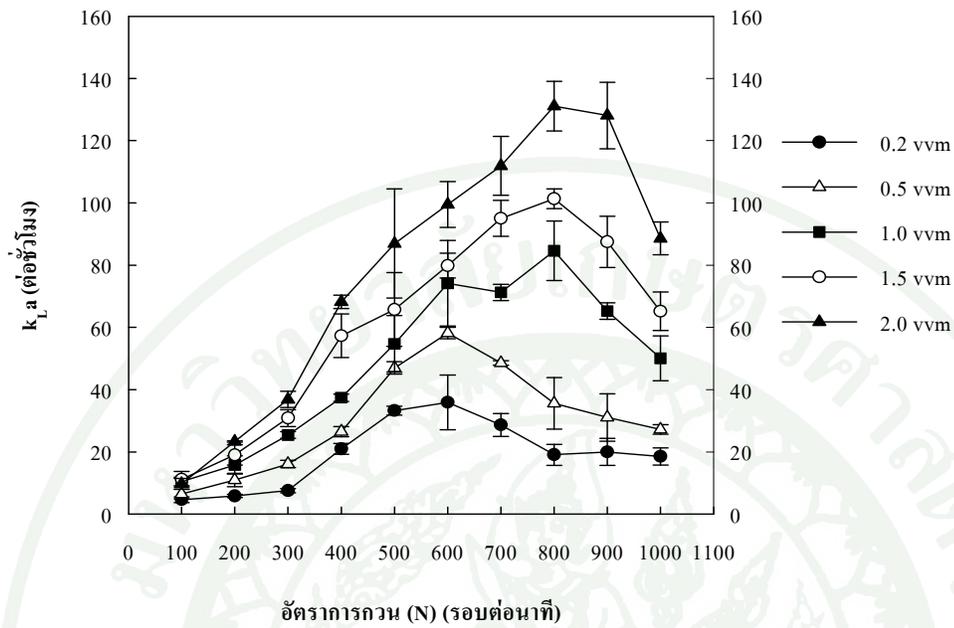
ขั้นตอนการทดลองดำเนินการเช่นเดียวกับกรณีของการประมาณค่า  $k_L a$  ในน้ำกลั่น โดยแปรผันอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ จากนั้นสร้างสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ และการตรวจทานความถูกต้องของสหสัมพันธ์ที่ได้โดยการทดลองที่อาศัยค่า  $R^2$  และ RMSE ในการเปรียบเทียบระหว่างผลการทดลองและการคำนวณ

#### ก. การประมาณค่า $k_L a$

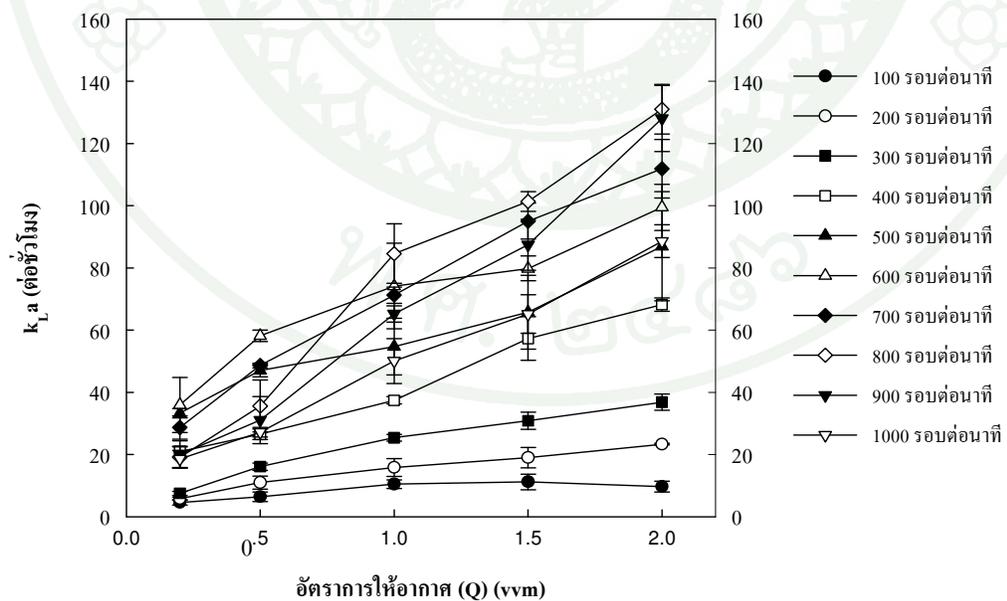
จากการประมาณค่า  $k_L a$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ สรุปค่า  $k_L a$  เฉลี่ยจากการทดลองสามซ้ำที่อัตราการกวนและการให้อากาศต่าง ๆ แสดงดังตารางผนวกที่ ก16

ในลักษณะทำนองเดียวกันกับกรณีในน้ำกลั่นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่แปรผันอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศแสดงดังภาพที่ 29 และ 30 ตามลำดับ

จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 29 และ 30) พบว่ามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงตั้งแต่อัตราการกวน 100 ถึง 600 รอบต่อนาที ดังนั้นจึงสรุปสหสัมพันธ์เส้นตรงโดยอาศัยผลการทดลองดังกล่าวเป็นเกณฑ์



ภาพที่ 29 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_{L,a}$  เฉลี่ยในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่อัตราการกวน 100 ถึง 1000 รอบต่อนาที

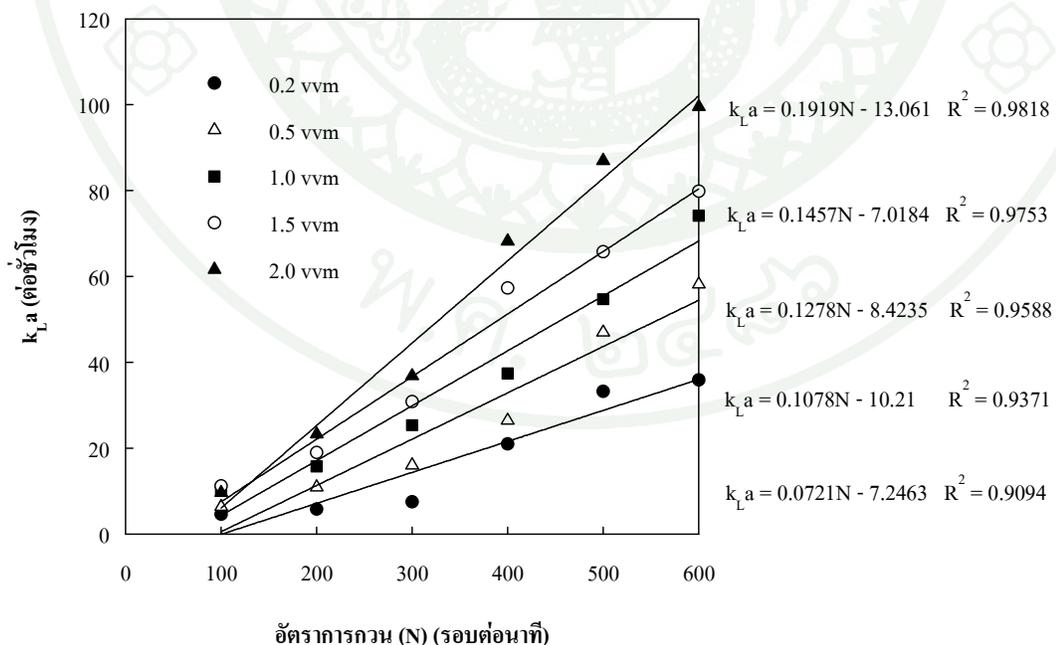


ภาพที่ 30 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_{L,a}$  เฉลี่ยในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่อัตราการให้อากาศ 0.2 ถึง 2.0 vvm

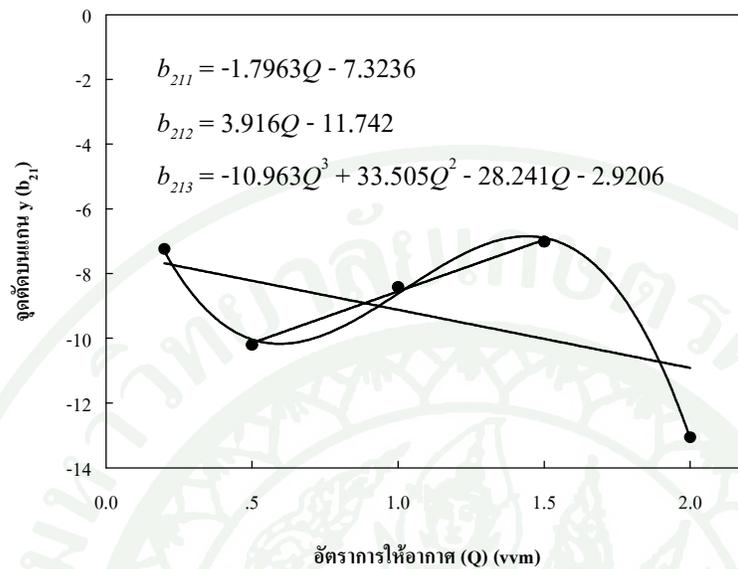
ข. สหสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ

$$1) \text{ สมการระหว่าง } \frac{k_L a - b}{2l} \text{ กับอัตราการให้อากาศ } (Q)$$

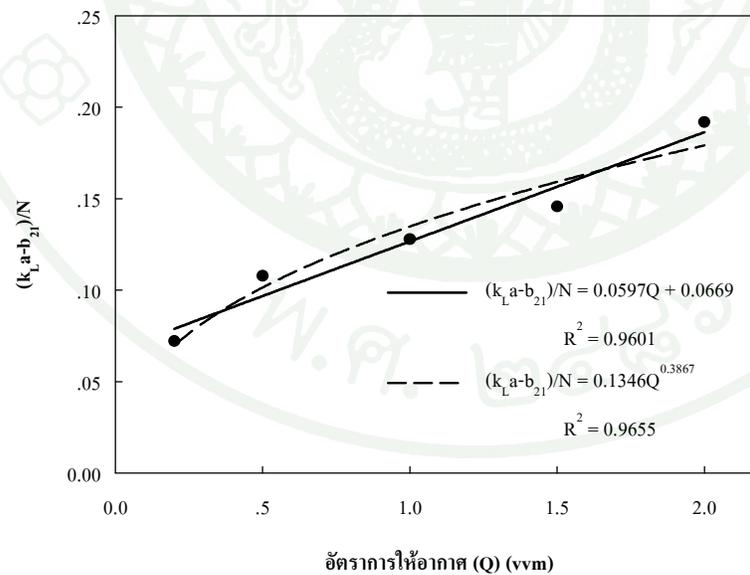
จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $k_L a$  กับอัตราการกวน ( $N$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อดังภาพที่ 29 นำผลการทดลองที่แสดงสหสัมพันธ์เส้นตรงระหว่างอัตราการกวน 100 และ 600 รอบต่อนาที สรุปลงเป็นสมการเส้นตรงที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $k_L a$  กับ  $N$  ดังภาพที่ 31 และเนื่องจากสหสัมพันธ์เส้นตรงไม่ผ่านจุดเริ่มต้น (0,0) (ภาพที่ 31) จึงจำเป็นต้องประมาณค่าจุดตัดบนแกน  $y$  ( $b_{2l}$ ) เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศตั้งแต่ 0.2 ถึง 2.0 vvm แสดงดังภาพที่ 32 สรุปลงสมการประมาณค่า  $b_{2l}$  ทั้งสิ้น 3 สมการ และเมื่ออาศัยค่าความชัน ( $\frac{k_L a - b}{2l}$ ) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง  $k_L a$  กับอัตราการกวน (ภาพที่ 31) สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $\frac{k_L a - b}{2l}$  กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ดังภาพที่ 33



ภาพที่ 31 สหสัมพันธ์เส้นตรงระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวน ( $N$ ) ( $N = 100 - 600$  รอบต่อนาที)



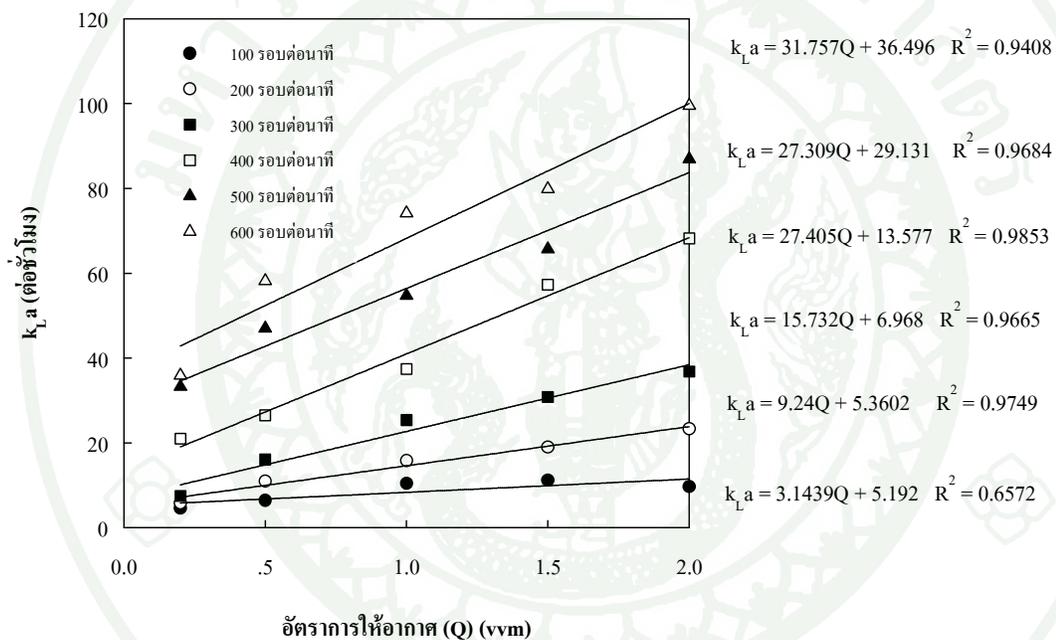
ภาพที่ 32 ความสัมพันธ์ระหว่างจุดตัดบนแกน  $y$  ( $b_{21}$ ) กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ( $N = 100 - 600$  รอบต่อนาที และ  $Q = 0.2 - 2.0$  vvm)



ภาพที่ 33 ความสัมพันธ์ระหว่าง  $\frac{k_L a - b_{21}}{N}$  กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ( $N = 100 - 600$  รอบต่อนาที และ  $Q = 0.2 - 2.0$  vvm)

$$2) \text{ สมการระหว่าง } \frac{k_L a - b}{Q} \text{ กับอัตราการกวน (N)}$$

สำหรับสหสัมพันธ์จากค่า  $k_L a$  และอัตราการให้อากาศ (ภาพที่ 30) แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง  $k_L a$  กับอัตราการให้อากาศ ที่อัตราการกวนตั้งแต่ 100 ถึง 600 รอบต่อนาที ดังภาพที่ 34



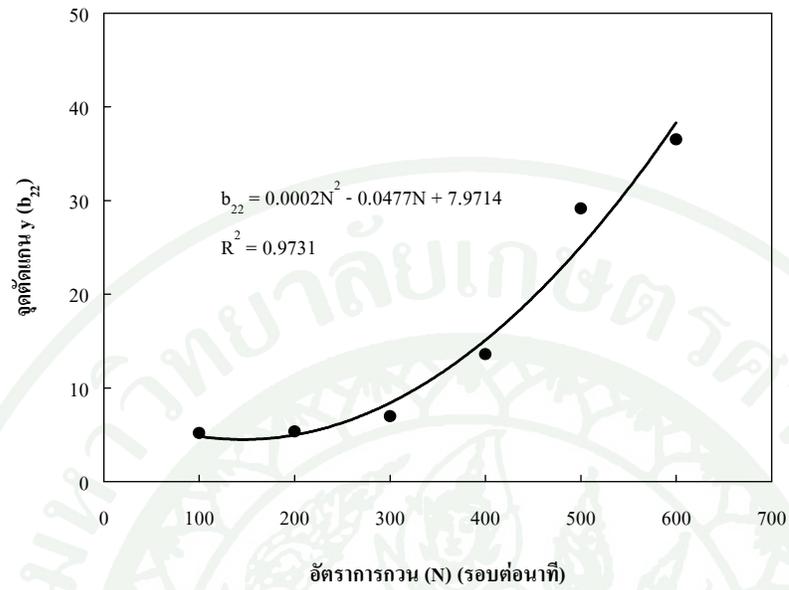
ภาพที่ 34 สหสัมพันธ์เส้นตรงระหว่าง  $k_L a$  กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ( $N = 100 - 600$  รอบต่อนาที)

ในทำนองเดียวกันการประมาณค่าจุดตัดบนแกน  $y$  ( $b_{22}$ ) แสดงดังภาพที่ 35 พบว่าสมการพหุนามเมียดกำลังสอง แสดงความเหมาะสมที่สุด ดังนี้  $b_{22} = 0.0002N^2 - 0.0477N +$

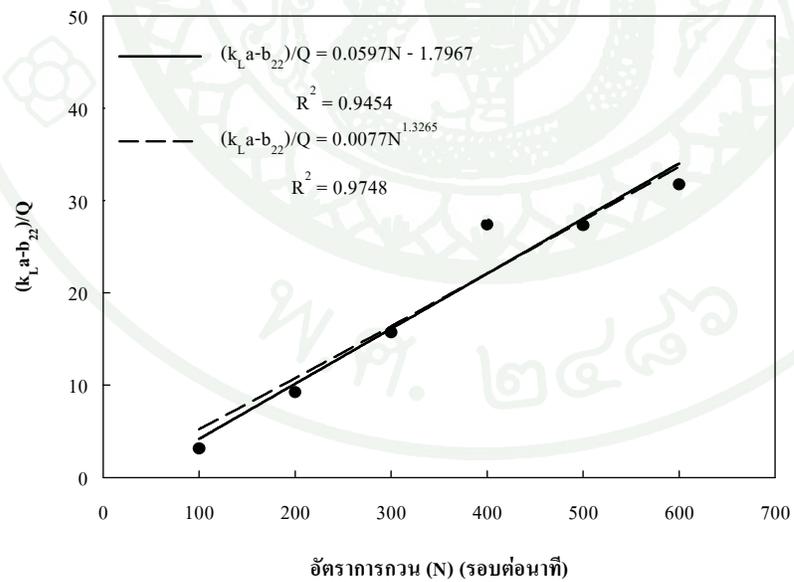
7.9714 และเมื่ออาศัยค่าความชันที่ประมาณค่าได้ ( $\frac{k_L a - b}{Q}$ ) จากสหสัมพันธ์เส้นตรงระหว่าง  $k_L a$

กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) จะได้สหสัมพันธ์ระหว่าง  $\frac{k_L a - b}{Q}$  กับอัตราการกวน ( $N$ ) แสดงดังภาพ

ที่ 36



ภาพที่ 35 ความสัมพันธ์ระหว่างจุดตัดบนแกน  $y$  ( $b_{22}$ ) กับอัตราการกวาด ( $N$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ( $N = 100 - 600$  รอบต่อนาที และ  $Q = 0.2 - 2.0$  vvm)



ภาพที่ 36 ความสัมพันธ์ระหว่าง  $\frac{k_L a - b_{22}}{Q}$  กับอัตราการกวาด ( $N$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ( $N = 100 - 600$  รอบต่อนาที และ  $Q = 0.2 - 2.0$  vvm)

ดังนั้นจากภาพที่ 33 และ 36 สรุปได้สมการที่เหมาะสมที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวน ( $N$ ) และอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ดังนี้

$$\frac{k_L a - b_{21}}{N} = 0.1346Q^{0.3867} \quad (30a)$$

เมื่อกำหนดให้  $b_{21} = b_{211}$ ,  $b_{212}$  และ  $b_{213}$  ดังนี้

$$b_{211} = -1.7963Q - 7.3236 \text{ (สมการเส้นตรงที่อัตราการให้อากาศ 0.2 - 2.0 vvm)}$$

$$b_{212} = 3.916Q - 11.742 \text{ (สมการเส้นตรงที่อัตราการให้อากาศ 0.5 - 1.5 vvm)}$$

$$b_{213} = -10.963Q^3 + 33.505Q^2 - 28.241Q - 2.9206 \text{ (สมการพอลิโนเมียล)}$$

$$\frac{k_L a - b_{22}}{Q} = 0.0077N^{1.3265} \quad (31a)$$

เมื่อ  $b_{22} = 0.0002N^2 - 0.0477N + 7.9714$  (สมการพอลิโนเมียล)

สหสัมพันธ์ทั้งสองสมการ (30a และ 31a) ใช้ในการประมาณค่า  $k_L a$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ภายใต้สภาวะอัตราการกวน 100 ถึง 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.2 ถึง 2.0 vvm สำหรับการตรวจทานความถูกต้องของสมการทั้งสองแสดงในหัวข้อ ค.

#### ค. การตรวจทานสหสัมพันธ์ของค่า $k_L a$ กับอัตราการกวนและการให้อากาศ

จากสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศที่สร้างขึ้นในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (สมการที่ 30a และ 31a) นำมาตรวจทานความถูกต้องโดยการเปรียบเทียบจากค่า  $k_L a$  จากการคำนวณและจากการทดลองจริงโดยอาศัยค่า  $R^2$  และ RMSE สรุปสมการสหสัมพันธ์  $k_L a$  ที่เหมาะสมที่สุดจากค่า  $R^2$  สูงสุด และค่า RMSE ต่ำสุด

พิจารณาสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวน ( $N$ ) และอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ทั้ง 2 สมการคือ สมการที่ 30a และ 31a ทำการทดสอบความเหมาะสม

ของสมการที่ 30a และ 31a ด้วยการเปรียบเทียบค่า  $k_{La}$  จากการคำนวณ กับค่า  $k_{La}$  ที่ได้จากการทดลองจริง โดยการประมาณค่า  $k_{La}$  จากการทดลองซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ชุดการทดลองดังนี้

ชุดที่ 1: การประมาณค่า  $k_{La}$  จากการทดลองโดยแปรผันอัตราการกวน 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 vvm

ชุดที่ 2: การประมาณค่า  $k_{La}$  จากการทดลองโดยแปรผันอัตราการกวน 150, 250, 350, 450 และ 550 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.35, 0.75, 1.25 และ 1.75 vvm

ชุดที่ 3: การประมาณค่า  $k_{La}$  จากการทดลองทั้งหมด (ชุดที่ 1 และชุดที่ 2)

เมื่อเปรียบเทียบค่า  $k_{La}$  จากการทดลองทั้ง 3 ชุดกับค่า  $k_{La}$  จากการคำนวณ ด้วยสมการทั้งสอง (สมการที่ 30a และ 31a) จะได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_{La}$  จากการทดลอง ( $k_{La}$ )<sub>Exp</sub> กับค่า  $k_{La}$  จากการคำนวณ ( $k_{La}$ )<sub>Cal</sub> (ภาพผนวกที่ ก4 ถึง ก6) และสรุปค่า  $R^2$  และ RMSE แสดงดังตารางที่ 11

จากตารางที่ 11 จะเห็นว่าสมการที่ 30a จากการเปรียบเทียบกับชุดที่ 3 มีค่า  $R^2$  สูงสุด และค่า RMSE ต่ำสุด เมื่อเลือกใช้สมการเส้นตรงที่อัตราการให้อากาศ 0.2 ถึง 2.0 vvm ประมาณค่า  $b_{21}$  ( $b_{21} = b_{211}$ ) คือ  $R^2$  0.9758 และ RMSE 6.7511 ดังนั้นสมการที่เหมาะสมจะนำมาใช้ประมาณค่า  $k_{La}$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ คือ

$$\frac{k_{La} - b_{21}}{N} = 0.1346Q^{0.3867} \quad (30b)$$

$$\text{โดยกำหนด } b_{21} = -1.7963Q - 7.3236$$

ภายใต้สภาวะที่มีอัตราการกวน 100 ถึง 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.2 ถึง 2.0 vvm

ตารางที่ 11 การตรวจทานความถูกต้องของสหสัมพันธ์ของค่า  $k_{La}$  กับอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

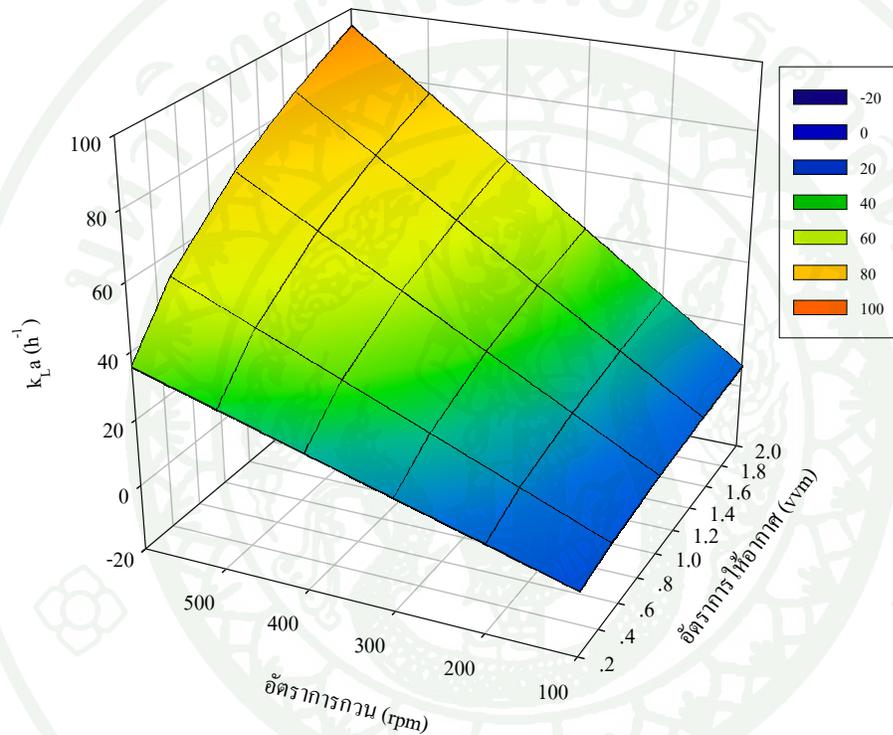
สมการ	ชุดที่ 1		ชุดที่ 2		ชุดที่ 3	
	R <sup>2</sup>	RMSE	R <sup>2</sup>	RMSE	R <sup>2</sup>	RMSE
$\frac{k_{La} - b_{21}}{N} = 0.1346Q^{0.3867} \text{ (เมื่อ } b_{21} = b_{211}, b_{212}, b_{213}\text{)}$						
$b_{211} = -1.7963Q - 7.3236$	0.9874	4.9643	0.9570	8.7737	0.9758	6.7511
$b_{212} = 3.916Q - 11.742$	0.9841	5.8618	0.9559	9.2982	0.9735	7.4296
$b_{213} = -10.963Q^3 + 33.505Q^2 - 28.241Q - 2.9206$	0.9833	5.7167	0.9576	8.8627	0.9733	7.1434
$\frac{k_{La} - b_{22}}{Q} = 0.0077N^{1.3265}$						
$b_{22} = 0.0002N^2 - 0.0477N + 7.9714$	0.9656	9.7425	0.9686	8.3082	0.9666	9.1956

หมายเหตุ ชุดที่ 1 คือค่า  $k_{La}$  ที่อัตราการกวน 100, 200, 300, 400, 500 และ 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 vvm

ชุดที่ 2 คือค่า  $k_{La}$  ที่อัตราการกวน 150, 250, 350, 450 และ 550 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.35, 0.75, 1.25 และ 1.75 vvm

ชุดที่ 3 คือ รวมค่า  $k_{La}$  จากชุดที่ 1 และชุดที่ 2

ทำการเขียนแบบสมการประมาณค่า  $k_La$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่สร้างขึ้น (สมการ 30b) โดยใช้สภาวะอัตราการกวน 100 ถึง 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.2 ถึง 2.0 vvm นำผลการเขียนแบบมาสร้างเป็นกราฟ 3 มิติเพื่อดูผลของอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศต่อค่า  $k_La$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในภาพที่ 37



ภาพที่ 37 ผลของอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศต่อค่า  $k_La$  จากการเขียนแบบสมการที่ 30b ในการประมาณค่า  $k_La$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

จากภาพที่ 37 จะเห็นได้ว่าค่า  $k_La$  เพิ่มขึ้นตามอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศที่เพิ่มขึ้นในลักษณะทำนองเดียวกับกรณีของการประมาณค่า  $k_La$  ในน้ำกลั่น

เมื่อได้ความสัมพันธ์ของค่า  $k_La$  กับอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศในสภาวะที่ไม่มีเซลล์ทั้งในกรณีของน้ำกลั่นและอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแล้ว จึงพิจารณาสร้างสหสัมพันธ์เพื่อประมาณค่า  $k_La$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อกรณีที่มีเซลล์ต่อไป

### 3.2 กรณีมีเซลล์

กรณีนี้เป็นการประมาณค่า  $k_{L,a}$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะที่มีเซลล์ยีสต์ โดยการแปรผันความเข้มข้นเซลล์ 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศเป็นปัจจัยหลัก เพื่อสร้างสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_{L,a}$  กับอัตราการกวน ( $N$ ) และอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ภายใต้ความเข้มข้นเซลล์ที่แตกต่างกัน

#### 3.2.1 การประมาณค่า $k_{L,a}$ ที่ความเข้มข้นเซลล์ 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร

การประมาณค่า  $k_{L,a}$  เมื่อแปรผันความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 5 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลไซโลสความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพีเอช 7.0 (ไม่เติมแหล่งไนโตรเจน) ได้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 12 ซึ่งประกอบด้วยค่า  $k_{L,a}$  ที่วัดได้ที่อัตราการกวน 300 ถึง 1000 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ถึง 2.0 vvm ที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 5 10 และ 20 กรัมต่อลิตร เนื่องจากการประมาณค่า  $k_{L,a}$  ในการทดลองเป็นสภาวะที่อัตราการถ่ายโอนออกซิเจน (Oxygen transfer rate) มากกว่าอัตราการใช้ออกซิเจน (Oxygen uptake rate) ของเซลล์ ดังนั้นเมื่อเพิ่มอัตราการกวนค่า  $k_{L,a}$  จะมีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากการเพิ่มอัตราการกวนช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวของการสัมผัสกันระหว่างฟองอากาศกับสารละลาย และการเพิ่มอัตราการให้อากาศทำให้ออกซิเจนสามารถละลายในสารละลายเพิ่มขึ้น ทำให้ค่า  $k_{L,a}$  มีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบการประมาณค่า  $k_{L,a}$  ที่ความเข้มข้นเซลล์ต่าง ๆ พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นเซลล์ทำให้สารละลายมีความหนืดเพิ่มขึ้น ทำให้การละลายของออกซิเจนลดลง ส่งผลทำให้ค่า  $k_{L,a}$  ลดลงที่ความเข้มข้นเซลล์สูงขึ้น แต่เมื่อพิจารณาจากการทดลอง พบว่าค่า  $k_{L,a}$  ที่วัดได้ส่วนใหญ่มีแนวโน้มเป็นไปตามทฤษฎี โดยพบบางสภาวะที่การประมาณค่า  $k_{L,a}$  แตกต่างออกไป ได้แก่ ภายใต้สภาวะความเข้มข้นเซลล์ 5 กรัมต่อลิตร การประมาณค่า  $k_{L,a}$  ที่อัตราการให้อากาศ 2.0 vvm เมื่อแปรผันอัตราการกวน 300 ถึง 1000 รอบต่อนาที มีค่าต่ำกว่าค่า  $k_{L,a}$  ที่อัตราการให้อากาศ 0.5, 1.0 และ 1.5 vvm ซึ่งแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการให้อากาศของถังหมักต่ำลง เมื่ออัตราการให้อากาศเท่ากับ 2.0 vvm โดยเฉพาะเมื่อมีอัตราการให้อากาศสูง 2.0 vvm ที่อัตราการกวนต่ำระหว่าง 300 และ 400 รอบต่อนาที พบการเกิดปัญหาฟองอากาศบริเวณใบพัดที่ไม่มีการกระจายตัวโดยฟองอากาศเกาะติดกับโพรบออกซิเจน ทำให้การอ่านค่าออกซิเจนละลายที่เวลาต่าง ๆ เกิดความคลาดเคลื่อน จึงทำให้ไม่สามารถวัดค่า  $k_{L,a}$  ที่ถูกต้องได้

ตารางที่ 12 สรุปค่า  $k_{La}$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้น 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการกวน 300 ถึง 1000 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 0.5 ถึง 2.0 vvm

อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	$k_{La}$ (ต่อชั่วโมง)											
	ความเข้มข้นเซลล์ 5 กรัมต่อลิตร				ความเข้มข้นเซลล์ 10 กรัมต่อลิตร				ความเข้มข้นเซลล์ 20 กรัมต่อลิตร			
	0.5 vvm	1.0 vvm	1.5 vvm	2.0 vvm	0.5 vvm	1.0 vvm	1.5 vvm	2.0 vvm	0.5 vvm	1.0 vvm	1.5 vvm	2.0 vvm
300			29.66	***				36.32				34.38
400		69.18	57.60	***	46.84	51.03	78.68		31.50	32.21	58.02	
500	74.79	89.27	96.92	88.01	52.43	62.77	76.09	102.24	45.49	47.64	54.21	87.48
600	122.30	126.74	127.79	91.32	94.30	102.21	114.90	128.57	63.06	89.77	90.51	117.41
700	139.51	146.38	156.19	99.55	120.64	132.92	144.40	152.87	95.30	102.36	107.36	144.21
800	142.67	158.28	165.82	113.15	139.89	148.28	160.26	169.46	115.39	120.68	132.43	151.52
900	152.64	162.08	166.49	126.69	160.70	165.93	172.44	181.92	142.88	130.05	146.03	172.08
1000	167.72	180.37	180.39	136.77	184.83	188.01	176.68	190.74	163.99	137.97	148.87	188.37

หมายเหตุ \*\*\* คือ สภาวะการทดลองเพื่อประมาณค่า  $k_{La}$  ที่มีความคลาดเคลื่อนสูงเนื่องจากฟองอากาศบริเวณใบพัดที่ไม่มีการกระจายตัวและฟองอากาศเกาะติดกับโพรบออกซิเจน

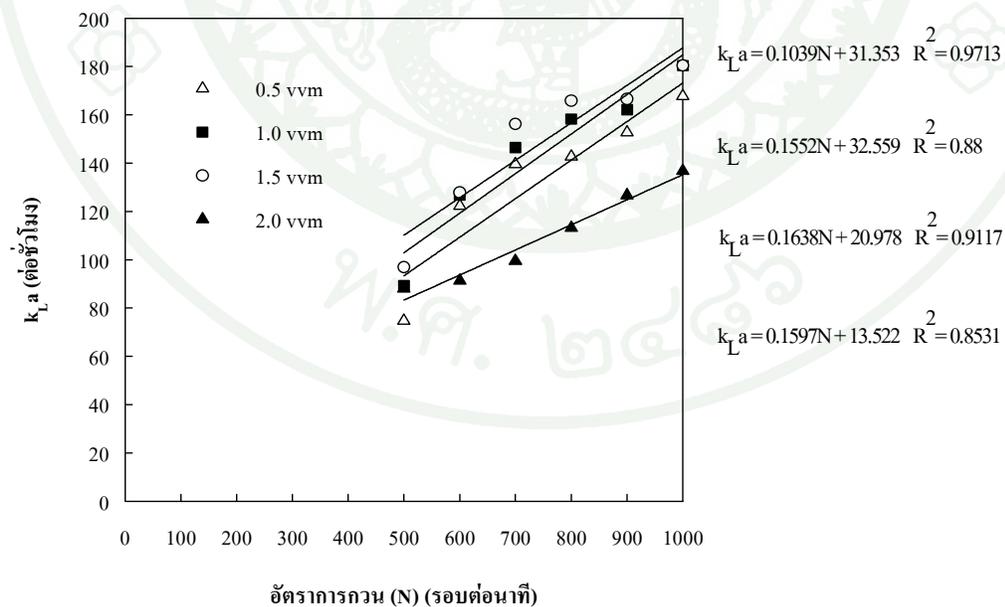
### 3.2.2 สหสัมพันธ์ระหว่างค่า $k_L a$ กับอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์

สร้างสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวน ( $N$ ) และอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ทำนองเดียวกันกับในกรณีน้ำกลั่นและอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเซลล์

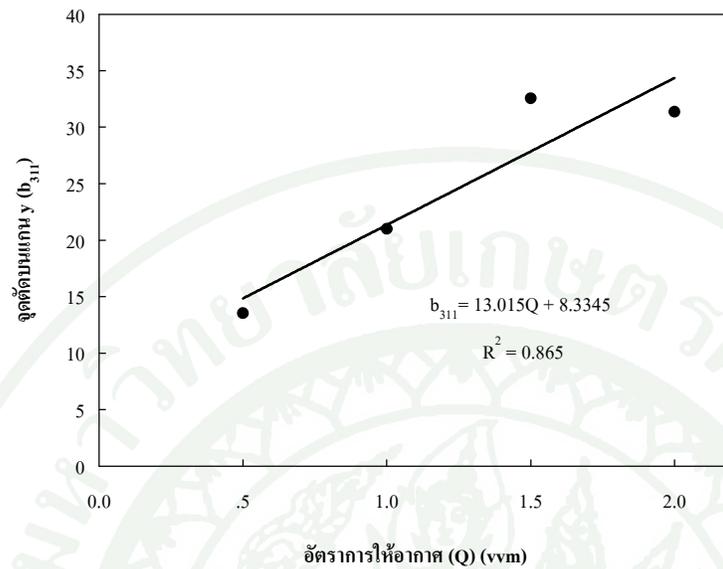
ก. สหสัมพันธ์ของค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศ ที่ความเข้มข้นเซลล์ 5 กรัมต่อลิตร

$$1) \text{ สมการระหว่าง } \frac{k_L a - b}{N} \text{ กับอัตราการให้อากาศ } (Q)$$

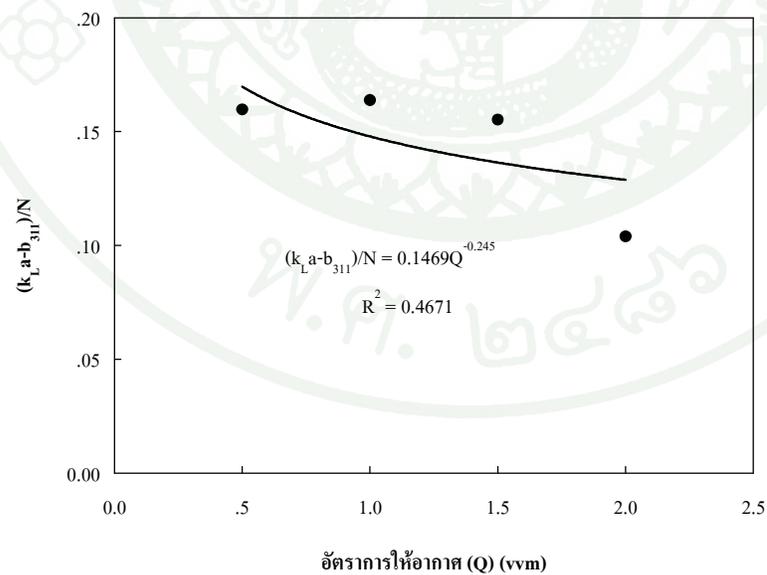
สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง  $k_L a$  กับ  $N$  ที่อัตราการกวน 500 ถึง 1000 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ถึง 2.0 vvm สรุปลงเป็นสมการเส้นตรงที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $k_L a$  กับ  $N$  ดังภาพที่ 38



ภาพที่ 38 สหสัมพันธ์เส้นตรงระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวน ( $N$ ) ( $N = 500 - 1000$  รอบต่อนาที) (ความเข้มข้นเซลล์ 5 กรัมต่อลิตร)



ภาพที่ 39 ความสัมพันธ์ระหว่างจุดตัดบนแกน y ( $b_{311}$ ) กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 5 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$  รอบต่อนาที และ  $Q = 0.5 - 2.0$  vvm)



ภาพที่ 40 ความสัมพันธ์ระหว่าง  $\frac{k_L a - b_{311}}{N}$  กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 5 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$  รอบต่อนาที และ  $Q = 0.5 - 2.0$  vvm)

จากภาพที่ 39 แสดงสมการเส้นตรงสำหรับประมาณค่าจุดตัดบนแกน y ( $b_{311}$ ) เนื่องจากสหสัมพันธ์เส้นตรงไม่ผ่านจุดเริ่มต้น (0,0) (ภาพที่ 38) เมื่อแปรผันอัตราการให้อากาศตั้งแต่ 0.5 ถึง 2.0 vvm โดยได้ความสัมพันธ์เป็นสมการเส้นตรง  $b_{311} = 13.015Q + 8.3345$  และ

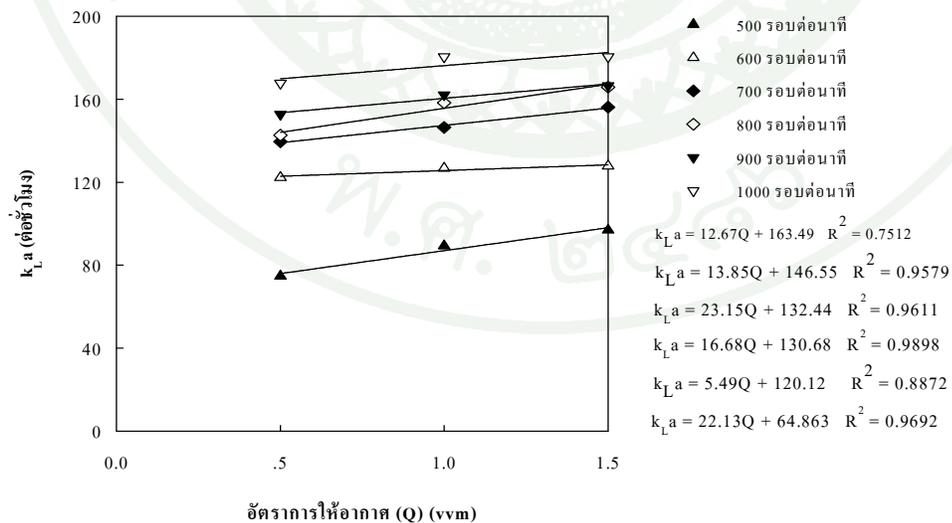
ภาพที่ 40 แสดงสหสัมพันธ์ระหว่าง  $\frac{k_L a - b}{N}$  กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) เพื่อใช้ประมาณค่า  $k_L a$  เมื่อมีความเข้มข้นเซลล์ 5 กรัมต่อลิตร

ดังนั้น สรุปได้สมการความสัมพันธ์  $\frac{k_L a - b}{N} = 0.1469Q^{0.245}$  โดย

$b_{311} = 13.015Q + 8.3345$  ที่สภาวะอัตราการให้อากาศ 0.5 ถึง 2.0 vvm อัตราการกวน 500 ถึง 1000 รอบต่อนาที ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 5 กรัมต่อลิตร

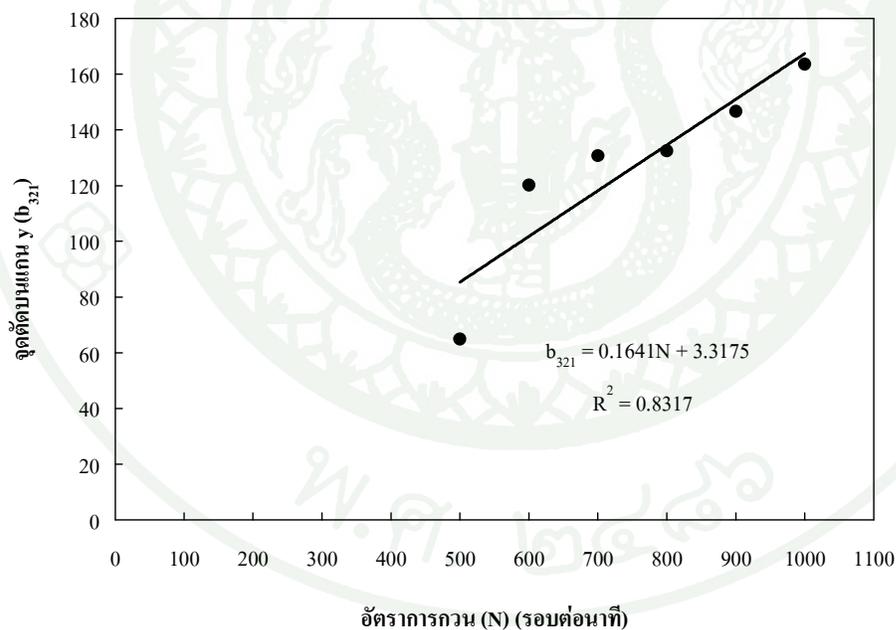
2) สมการระหว่าง  $\frac{k_L a - b}{Q}$  กับอัตราการกวน ( $N$ )

สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $k_L a$  กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ที่ 0.5 ถึง 1.5 vvm ที่อัตราการกวน 500 ถึง 1000 รอบต่อนาที ได้สมการเส้นตรงดังภาพที่ 41

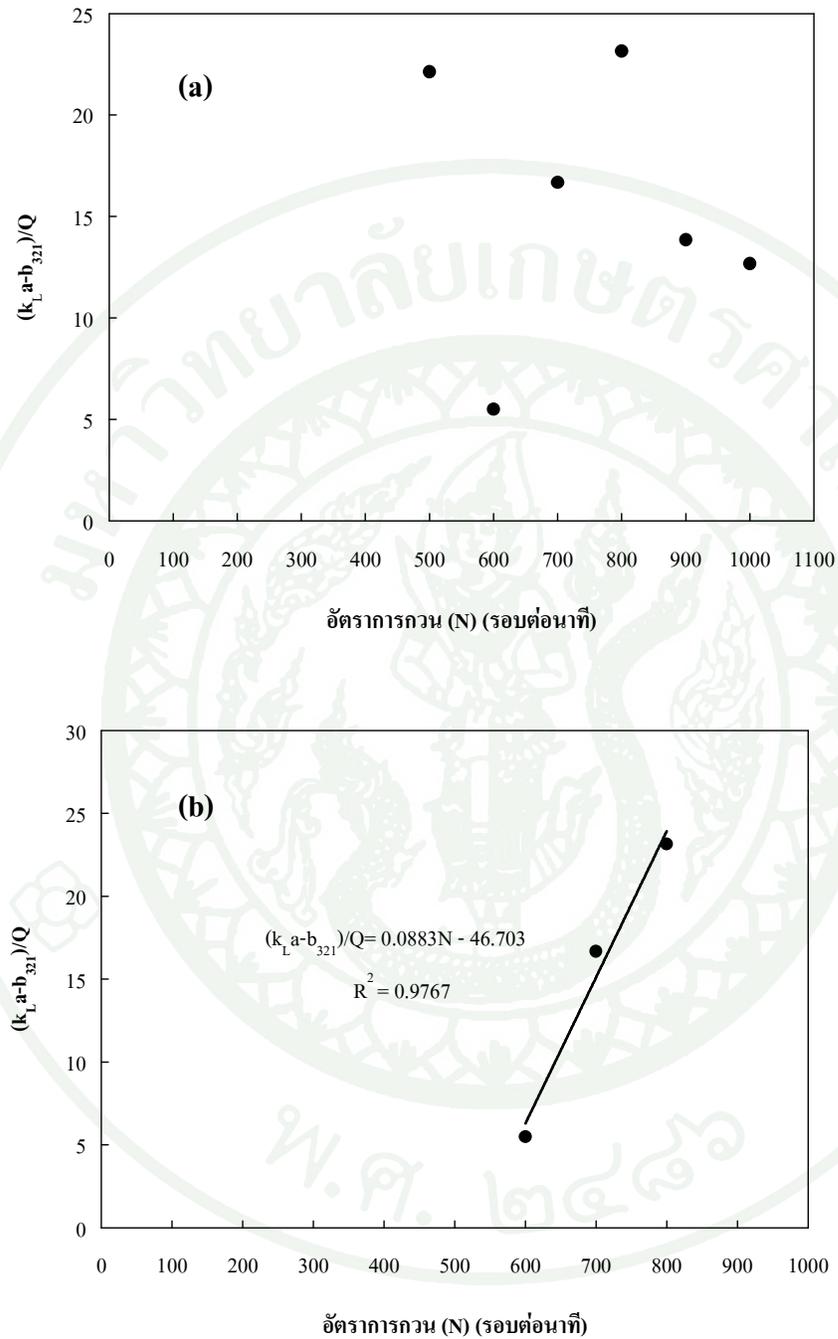


ภาพที่ 41 สหสัมพันธ์เส้นตรงระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ( $Q = 0.5 - 1.5$  vvm) (ความเข้มข้นเซลล์ 5 กรัมต่อลิตร)

นำค่าจุดตัดบนแกน  $y$  ( $b_{321}$ ) มาสร้างสมการความสัมพันธ์กับค่าอัตราการกววน 500 ถึง 1000 รอบต่อนาที จะได้สมการเส้นตรงดังภาพที่ 42 และนำค่าความชันที่ได้ ( $\frac{k}{L} \frac{a-b}{321}$ ) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง  $k_L a$  กับอัตราการให้อากาศ (ภาพที่ 41) มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $\frac{k}{L} \frac{a-b}{321}$  กับอัตราการกววน ( $N$ ) แสดงดังภาพที่ 43 โดยภาพที่ 43a ค่า  $\frac{k}{L} \frac{a-b}{321}$  ที่อัตราการกววน ( $N$ ) ตั้งแต่ 500 - 1000 รอบต่อนาที มีการกระจายตัวไม่แสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง จึงพิจารณาเฉพาะค่า  $\frac{k}{L} \frac{a-b}{321}$  ที่อัตราการกววน 600 ถึง 800 รอบต่อนาที ได้สมการความสัมพันธ์ดังภาพที่ 43b



ภาพที่ 42 ความสัมพันธ์ระหว่างจุดตัดบนแกน  $y$  ( $b_{321}$ ) กับอัตราการกววน ( $N$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 5 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$  รอบต่อนาที และ  $Q = 0.5 - 1.5$  vvm)



ภาพที่ 43 ความสัมพันธ์ระหว่าง  $\frac{k_L a - b_{321}}{Q}$  กับอัตราการกวน ( $N$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มี  
 เซลล์ 5 กรัมต่อลิตร ( $Q = 0.5 - 1.5$  vvm) (a)  $N = 500 - 1000$  รอบต่อนาที และ  
 (b)  $N = 600 - 800$  รอบต่อนาที

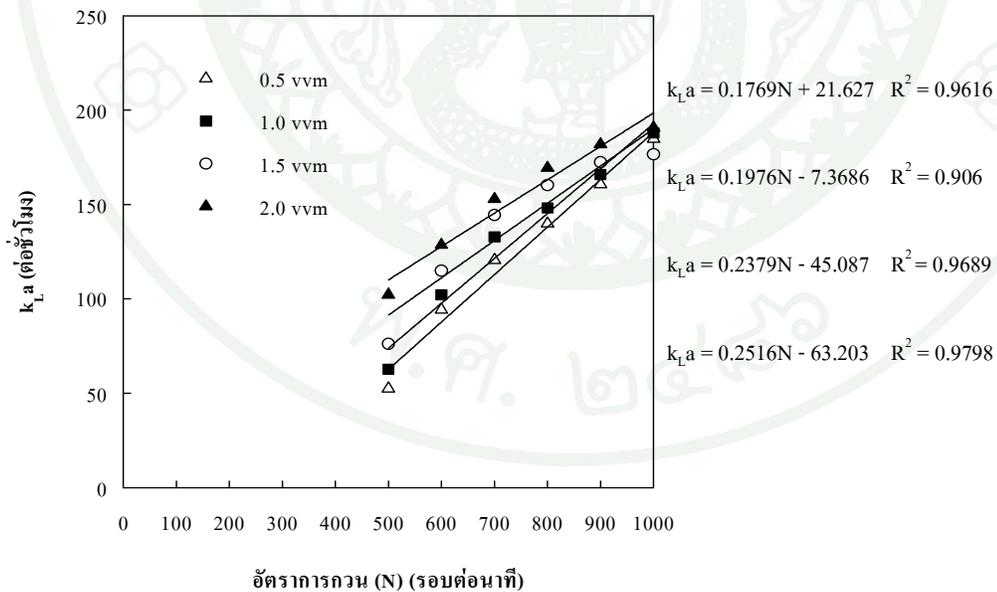
ดังนั้น สรุปได้สมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์  $\frac{k_L a - b}{L} = \frac{312}{Q}$

$0.0883N - 46.703$  โดย  $b_{321} = 0.1641N + 3.3175$  ที่สภาวะอัตราการให้อากาศ 0.5 ถึง 1.5 vvm อัตราการกวน 600 ถึง 800 รอบต่อนาที ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 5 กรัมต่อลิตร

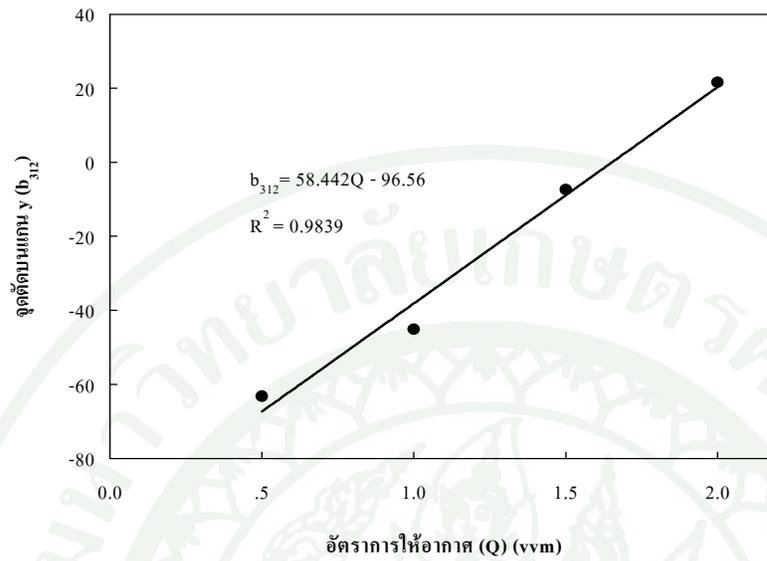
ข. สหสัมพันธ์ของค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศ ที่ความเข้มข้นเซลล์ 10 กรัมต่อลิตร

1) สมการระหว่าง  $\frac{k_L a - b}{L} = \frac{312}{N}$  กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ )

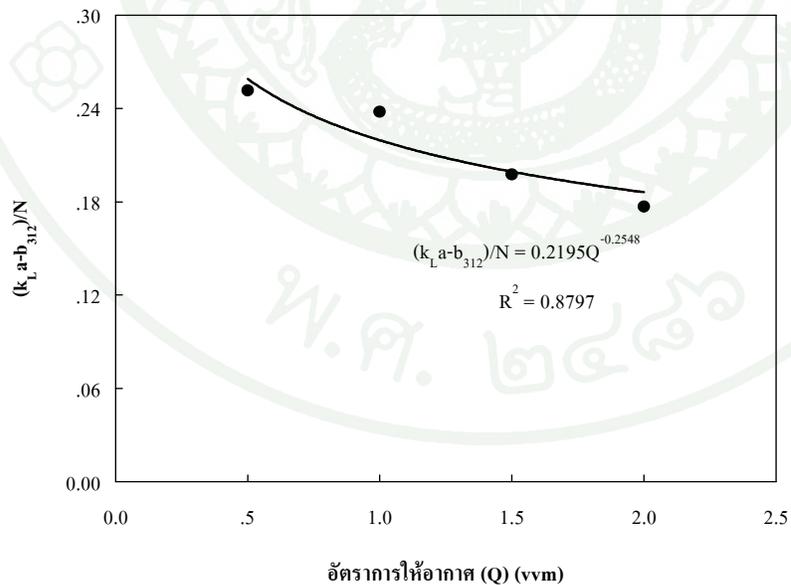
สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง  $k_L a$  กับ  $N$  ที่อัตราการกวน 500 ถึง 1000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ถึง 2.0 vvm สรุปสมการเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $k_L a$  กับ  $N$  ได้ดังภาพที่ 44



ภาพที่ 44 สหสัมพันธ์เส้นตรงระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวน ( $N$ ) ( $N = 500 - 1000$  รอบต่อนาที) (ความเข้มข้นเซลล์ 10 กรัมต่อลิตร)



ภาพที่ 45 ความสัมพันธ์ระหว่างจุดตัดบนแกน  $y$  ( $b_{312}$ ) กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 10 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$  รอบต่อนาที และ  $Q = 0.5 - 2.0$  vvm)



ภาพที่ 46 ความสัมพันธ์ระหว่าง  $\frac{k_L a - b_{312}}{N}$  กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 10 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$  รอบต่อนาที และ  $Q = 0.5 - 2.0$  vvm)

จากภาพที่ 45 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจุดตัดบนแกน y ( $b_{312}$ ) กับ อัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) 0.5 ถึง 2.0 vvm ได้สมการเส้นตรง ดังนี้  $b_{312} = 58.442N - 96.56$  และนำค่า ความชัน ( $\frac{k}{L} \frac{a-b}{312}$ ) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง  $k_L a$  กับอัตราการกวน ( $N$ ) (ภาพที่ 44) มา

สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $\frac{k}{L} \frac{a-b}{312}$  กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ได้ดังภาพที่ 46

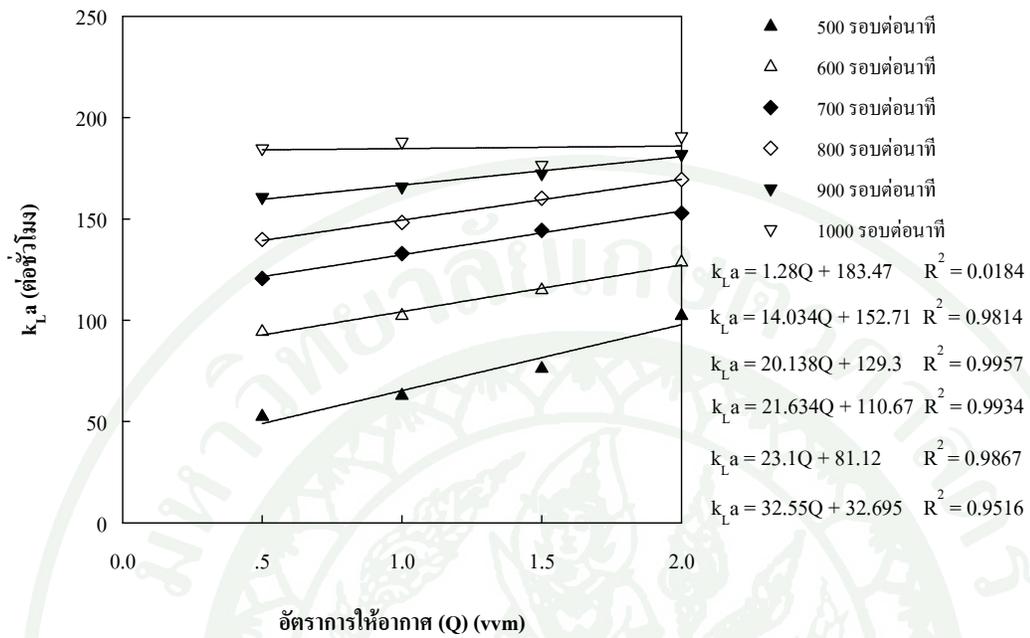
ดังนั้น สรุปได้สมการความสัมพันธ์  $\frac{k}{L} \frac{a-b}{312} = 0.2195Q^{-0.2548}$  โดย  $b_{312} = 58.442Q - 96.56$  ที่สภาวะอัตราการให้อากาศ 0.5 ถึง 2.0 vvm อัตราการกวน 500 ถึง 1000 รอบต่อนาที ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 10 กรัมต่อลิตร

2) สมการระหว่าง  $\frac{k}{L} \frac{a-b}{322}$  กับอัตราการกวน ( $N$ )

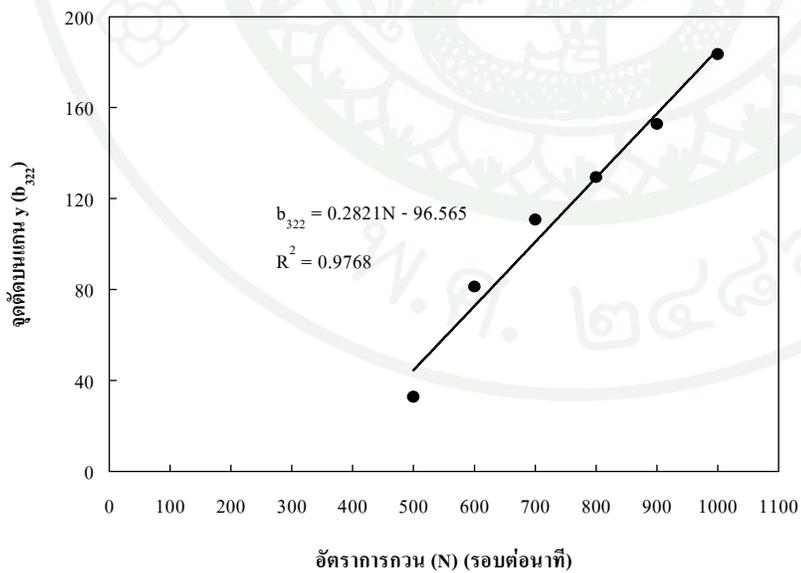
สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $k_L a$  กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ที่ 0.5 ถึง 2.0 vvm ที่อัตราการกวน 500 ถึง 1000 รอบต่อนาที ได้สมการเส้นตรงดังภาพที่ 47 และนำค่า จุดตัดบนแกน y ( $b_{322}$ ) มาสร้างสมการความสัมพันธ์กับค่าอัตราการกวน ( $N$ ) จะได้สมการ

ความสัมพันธ์ดังภาพที่ 48 และจากค่าความชัน ( $\frac{k}{L} \frac{a-b}{322}$ ) ของกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง

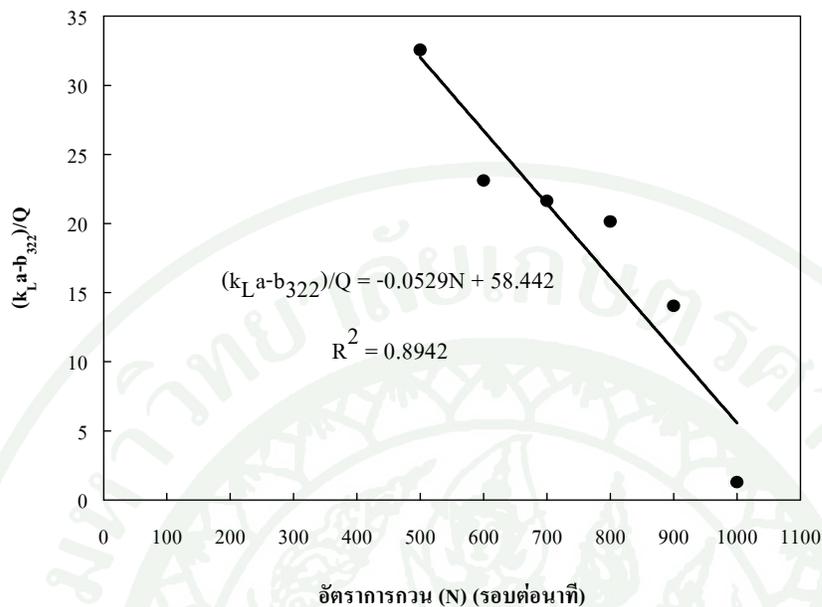
$k_L a$  กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $\frac{k}{L} \frac{a-b}{322}$  กับอัตราการ กวน ( $N$ ) ได้ดังภาพที่ 49



ภาพที่ 47 สหสัมพันธ์เส้นตรงระหว่างค่า  $k_{La}$  กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ( $Q = 0.5 - 2.0$  vvm) (ความเข้มข้นเซลล์ 10 กรัมต่อลิตร)



ภาพที่ 48 ความสัมพันธ์ระหว่างจุดตัดบนแกน y ( $b_{322}$ ) กับอัตราการกวน ( $N$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยง เชื้อที่มีเซลล์ 10 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$  รอบต่อนาที และ  $Q = 0.5 - 2.0$  vvm)



ภาพที่ 49 ความสัมพันธ์ระหว่าง  $\frac{k_L a - b_{322}}{Q}$  กับอัตราการกวน ( $N$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 10 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$  รอบต่อนาที และ  $Q = 0.5 - 2.0$  vvm)

ดังนั้น สรุปได้สมการเส้นตรง  $\frac{k_L a - b_{322}}{Q} = -0.0529 N + 58.442$  โดย

$b_{322} = 0.2821N - 96.565$  ที่สภาวะอัตราการให้อากาศ 0.5 ถึง 2.0 vvm อัตราการกวน 500 ถึง 1000 รอบต่อนาที ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 10 กรัมต่อลิตร

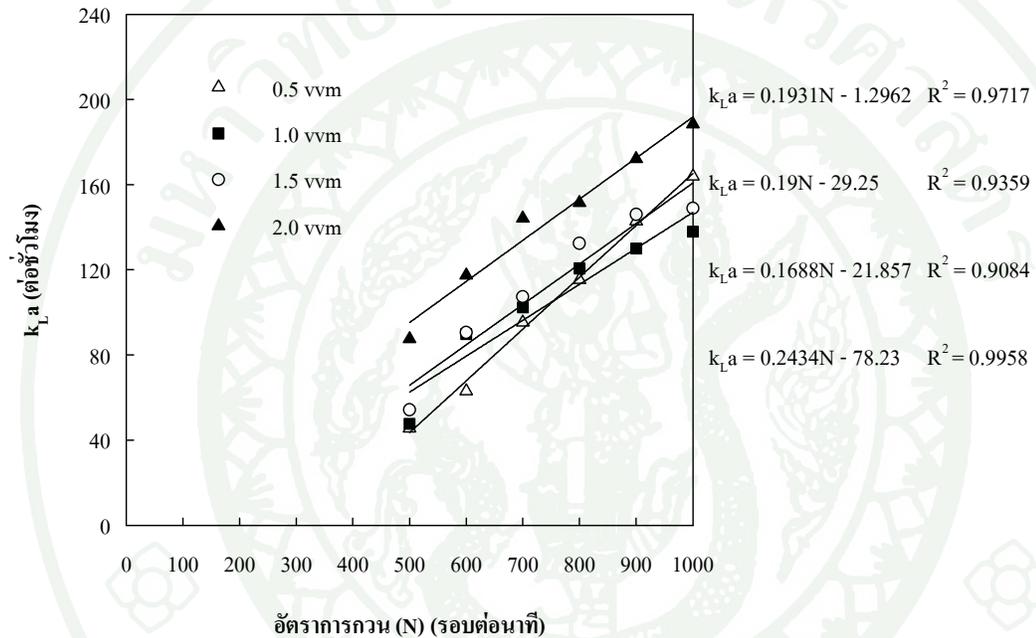
ค. สหสัมพันธ์ของค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ ที่ความเข้มข้นเซลล์ 20 กรัมต่อลิตร

1) สมการระหว่าง  $\frac{k_L a - b_{313}}{N}$  กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ )

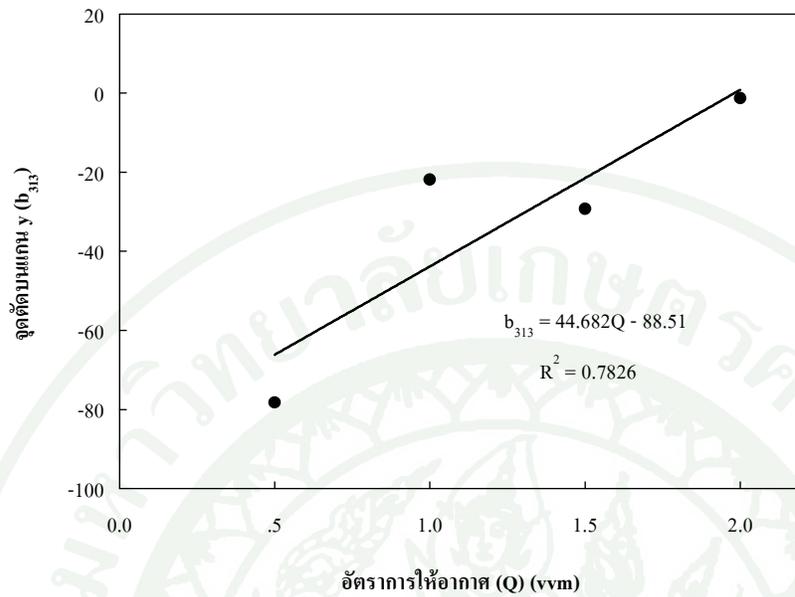
สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง  $k_L a$  กับ  $N$  ที่อัตราการกวน 500 ถึง 1000 รอบต่อนาที ที่ทุกอัตราการให้อากาศมาสร้างสมการความสัมพันธ์ระหว่าง  $k_L a$  กับ  $N$  ได้ดังภาพที่ 50 และนำค่าจุดตัดบนแกน y ( $b_{313}$ ) มาสร้างสมการความสัมพันธ์กับค่าอัตราการให้อากาศ

(Q) 0.5 ถึง 2.0 vvm จะได้สมการความสัมพันธ์เป็นดังภาพที่ 51 และนำค่าความชันที่ได้  $\left(\frac{k_L a - b}{N}\right)^{313}$  จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง  $k_L a$  กับอัตราการกวน ( $N$ ) มาสร้างกราฟแสดง

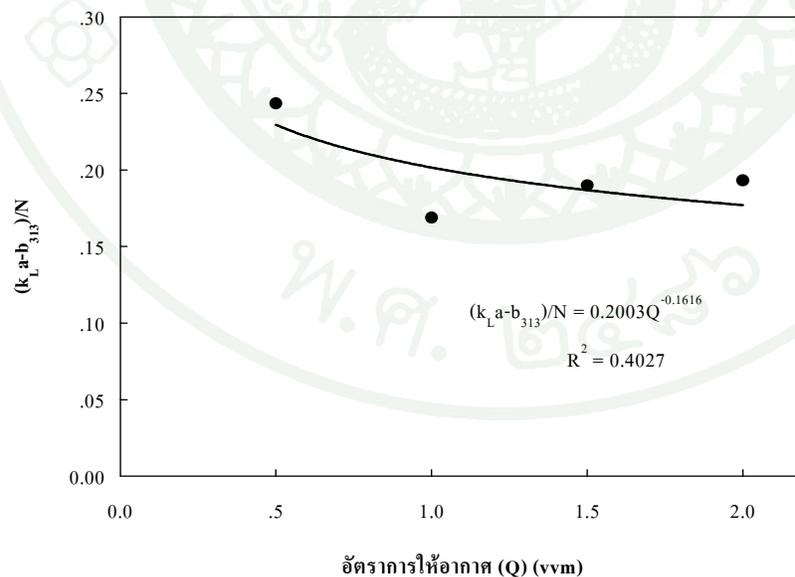
ความสัมพันธ์ระหว่าง  $\frac{k_L a - b}{N}$  กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ได้ดังภาพที่ 52



ภาพที่ 50 สหสัมพันธ์เส้นตรงระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวน ( $N$ ) ( $N = 500 - 1000$  รอบต่อนาที) (ความเข้มข้นเซลล์ 20 กรัมต่อลิตร)



ภาพที่ 51 ความสัมพันธ์ระหว่างจุดตัดบนแกน  $y$  ( $b_{313}$ ) กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 20 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$  รอบต่อนาที และ  $Q = 0.5 - 2.0$  vvm)



ภาพที่ 52 ความสัมพันธ์ระหว่าง  $\frac{k_L a - b_{313}}{N}$  กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 20 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$  รอบต่อนาที และ  $Q = 0.5 - 2.0$  vvm)

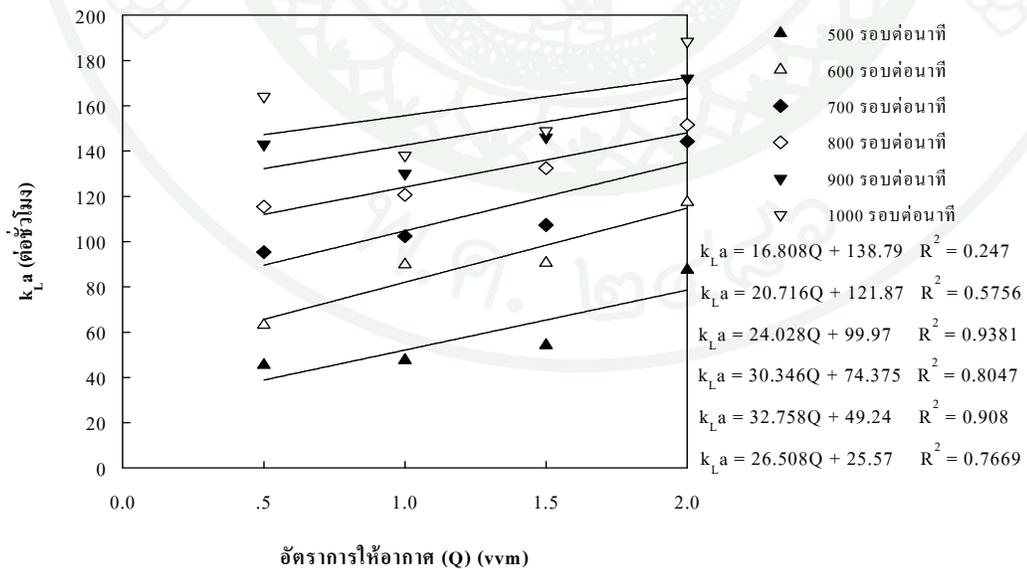
ดังนั้น ได้สมการความสัมพันธ์  $\frac{k_L a - b}{N} = 0.2003Q^{-0.1616}$  โดย  $b_{313} =$

44.682Q - 88.51 ที่สภาวะอัตราการให้อากาศ 0.5 ถึง 2.0 vvm อัตราการกวน 500 ถึง 1000 รอบต่อ นาที ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 20 กรัมต่อลิตร

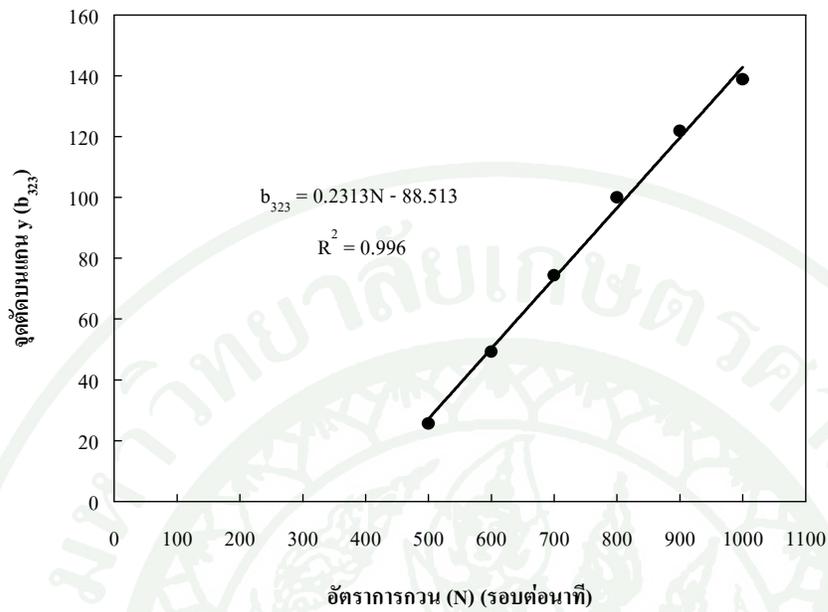
2) สมการระหว่าง  $\frac{k_L a - b}{Q^{323}}$  กับอัตราการกวน (N)

สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง  $k_L a$  กับอัตราการให้อากาศ (Q) ที่ 0.5 ถึง 2.0 vvm ที่อัตราการกวน 500 ถึง 1000 รอบต่อ นาที ได้สมการเส้นตรงดังภาพที่ 53 และนำค่า จุดตัดบนแกน y ( $b_{323}$ ) มาสร้างสมการความสัมพันธ์กับค่าอัตราการกวน (N) 500 ถึง 1000 รอบต่อ นาที จะได้สมการความสัมพันธ์ดังภาพที่ 54 และนำค่าความชันที่ได้ ( $\frac{k_L a - b}{Q^{323}}$ ) จากกราฟ ความสัมพันธ์ระหว่าง  $k_L a$  กับอัตราการให้อากาศ (Q) (ภาพที่ 53) มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์

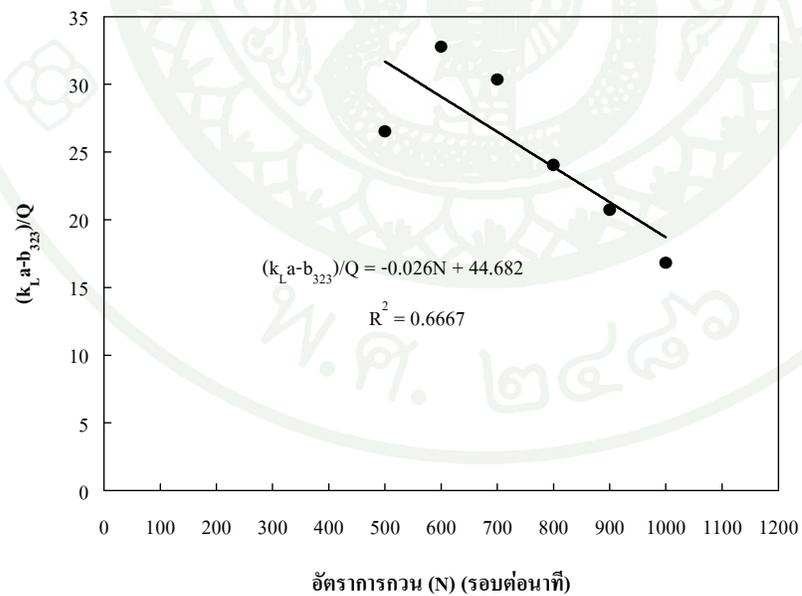
ระหว่าง  $\frac{k_L a - b}{Q^{323}}$  กับอัตราการกวน (N) ได้ดังภาพที่ 55



ภาพที่ 53 สหสัมพันธ์เส้นตรงระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการให้อากาศ (Q) (Q = 0.5 - 2.0 vvm) (ความเข้มข้นเซลล์ 20 กรัมต่อลิตร)



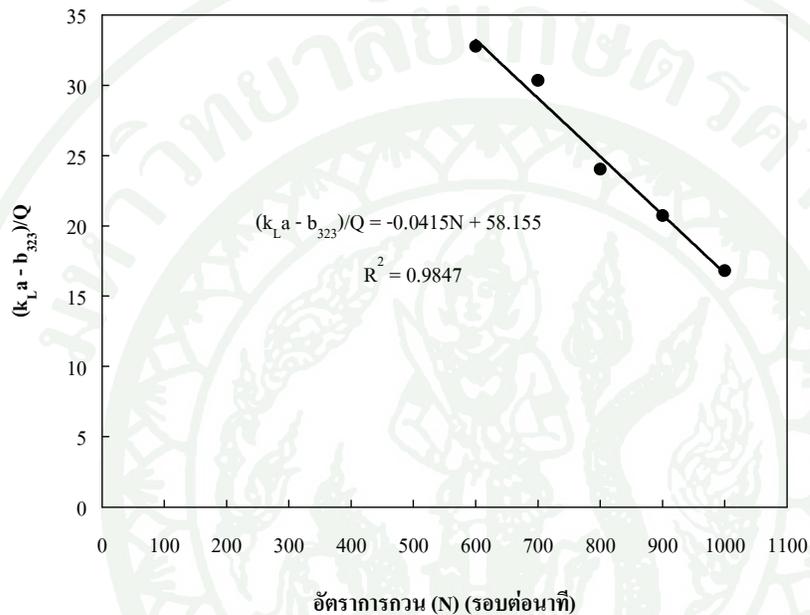
ภาพที่ 54 ความสัมพันธ์ระหว่างจุดตัดบนแกน y ( $b_{323}$ ) กับอัตราการกววน ( $N$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ 20 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$  รอบต่อนาที และ  $Q = 0.5 - 2.0$  vvm)



ภาพที่ 55 ความสัมพันธ์ระหว่าง  $\frac{k_a - b_{323}}{Q}$  กับอัตราการกววน ( $N$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มี

เซลล์ 20 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$  รอบต่อนาที และ  $Q = 0.5 - 2.0$  vvm)

พิจารณาเฉพาะค่า  $\frac{k_L a - b_{323}}{Q}$  ที่อัตราการกวน 600 ถึง 1000 รอบต่อนาที ได้รับความสัมพันธ์แสดงดัง  
ภาพที่ 56



ภาพที่ 56 ความสัมพันธ์ระหว่าง  $\frac{k_L a - b_{323}}{Q}$  กับอัตราการกวน ( $N$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มี  
เซลล์ 20 กรัมต่อลิตร ( $N = 600 - 1000$  รอบต่อนาที และ  $Q = 0.5 - 2.0$  vvm)

ดังนั้น สรุปได้สมการเส้นตรง  $\frac{k_L a - b_{323}}{Q} = -0.0415 N + 58.155$  โดย

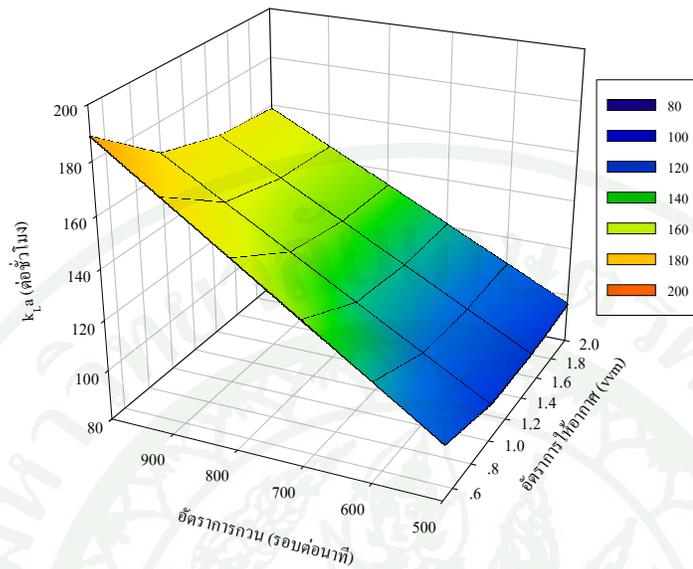
$b_{323} = 0.2313N - 88.513$  ที่สภาวะอัตราการให้อากาศ 0.5 ถึง 2.0 vvm อัตราการกวน 600 ถึง 1000  
รอบต่อนาที ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร

สรุปสมการทั้งหมดที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวนและอัตราการ  
ให้อากาศในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่

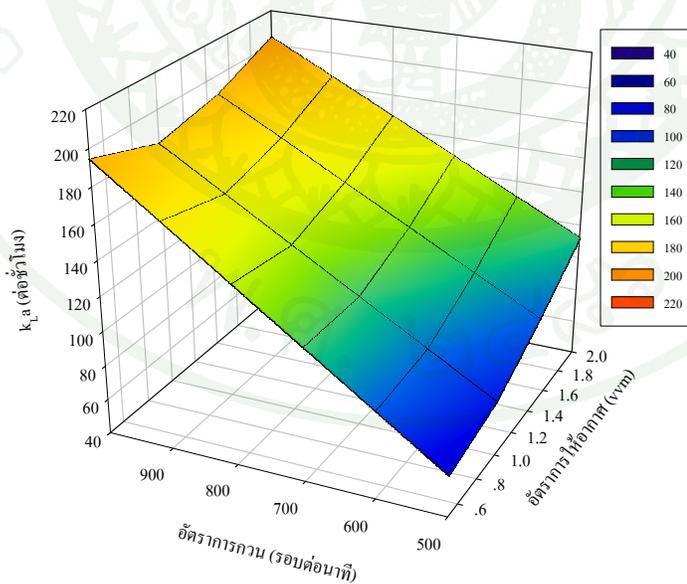
**ตารางที่ 13** สรุปสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$ , อัตราการกวน ( $N$ ) และอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเซลล์ 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	สหสัมพันธ์	สมการประมาณค่า b	สภาวะเกณฑ์
5	$\frac{k_L a - b_{311}}{N} = 0.1469Q^{-0.245}$	$b_{311} = 13.015Q + 8.3345$	0.5 - 2.0 vvm 500 -1000 รอบต่อนาที
	$\frac{k_L a - b_{321}}{Q} = 0.0883N - 46.703$	$b_{321} = 0.1641N + 3.3175$	0.5 - 1.5 vvm 600 -800 รอบต่อนาที
10	$\frac{k_L a - b_{312}}{N} = 0.2195Q^{-0.2548}$	$b_{312} = 58.442Q - 96.56$	0.5 - 2.0 vvm 500 -1000 รอบต่อนาที
	$\frac{k_L a - b_{322}}{Q} = -0.0529N + 58.442$	$b_{322} = 0.2821N - 96.565$	0.5 - 2.0 vvm 500 -1000 รอบต่อนาที
20	$\frac{k_L a - b_{313}}{N} = 0.2003Q^{-0.1616}$	$b_{313} = 44.682Q - 88.51$	0.5 - 2.0 vvm 500 -1000 รอบต่อนาที
	$\frac{k_L a - b_{323}}{Q} = -0.0415N + 58.155$	$b_{323} = 0.2313N - 88.513$	0.5 - 2.0 vvm 600 -1000 รอบต่อนาที

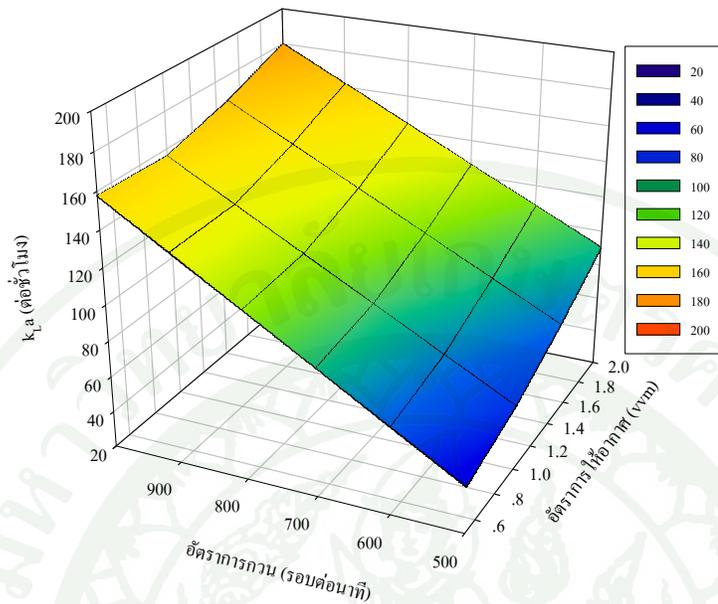
หลังจากได้สมการความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศที่ความเข้มข้นเซลล์ 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 13) เขียนแบบสหสัมพันธ์ระหว่าง  $\frac{k_L a - b}{N}$  กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ที่สร้างขึ้นในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเซลล์ 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตรทั้งสามสมการที่อัตราการให้อากาศ 0.5 ถึง 2.0 vvm อัตราการกวน 500 ถึง 1000 รอบต่อนาที จากนั้นสร้างกราฟ 3 มิติเพื่อพิจารณาผลของอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศต่อค่า  $k_L a$  ที่ความเข้มข้นเซลล์ 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ดังภาพที่ 57, 58 และ 59 ตามลำดับ



ภาพที่ 57 ผลของอัตราการกวนและอัตราการให้ออกซิเจนต่อค่า  $k_La$  จากการเลียนแบบสมการ ประมาณค่า  $k_La$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$  รอบต่อนาที และ  $Q = 0.5 - 2.0$  vvm)



ภาพที่ 58 ผลของอัตราการกวนและอัตราการให้ออกซิเจนต่อค่า  $k_La$  จากการเลียนแบบสมการ ประมาณค่า  $k_La$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$  รอบต่อนาที และ  $Q = 0.5 - 2.0$  vvm)



**ภาพที่ 59** ผลของอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศต่อค่า  $k_La$  จากการเลียนแบบสมการ  
ประมาณค่า  $k_La$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ( $N = 500 - 1000$  รอบต่อนาที และ  $Q = 0.5 - 2.0$  vvm)

จากภาพที่ 57 จะเห็นได้ถึงผลของอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศต่อค่า  $k_La$  แตกต่างจากกรณีศึกษาภายใต้สภาวะที่ไม่มีเซลล์ (ในน้ำกลั่นและในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ) โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 5 กรัมต่อลิตรมีเพียงอัตราการกวนที่มีผลต่อค่า  $k_La$  ซึ่งเมื่อเพิ่มอัตราการกวน ค่า  $k_La$  มีค่าสูงขึ้น แต่เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศไม่พบการเพิ่มขึ้นของค่า  $k_La$  แต่กลับพบว่าค่า  $k_La$  มีค่าลดลง ซึ่งแสดงถึงประสิทธิภาพของถังหมักที่ลดลงเมื่อมีอัตราการให้อากาศสูง เนื่องจากเมื่อมีความเข้มข้นเซลล์ต่ำ ความหนืดของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อต่ำ ดังนั้นการให้อากาศมากจะทำให้ฟองอากาศลอยตัวสู่อากาศได้เร็ว ฉะนั้นออกซิเจนจึงละลายเข้าสู่อาหารเหลวได้น้อยลง

จากภาพที่ 58 จะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร พบว่าค่า  $k_La$  มีค่าสูงขึ้น เมื่ออัตราการกวนสูงขึ้น และมีค่า  $k_La$  สูงขึ้นเมื่อมีอัตราการให้อากาศมากกว่า 1 vvm แสดงถึงผลของความเข้มข้นเซลล์ที่มากขึ้นช่วยกักฟองอากาศที่อยู่ในอาหารได้นานขึ้น ดังนั้นออกซิเจนจึงละลายในอาหารเหลวได้มากขึ้น ค่า  $k_La$  จึงมีค่ามากขึ้นเมื่อมีอัตราการให้อากาศมากขึ้น (ตารางผนวกที่ ก26) เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีที่มีความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร (ตารางผนวกที่ ก25)

สำหรับผลของค่า  $k_L a$  เมื่อเปลี่ยนแปลงอัตราความเข้มข้นและอัตราการให้อากาศที่ความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร แสดงดังภาพที่ 59 (ตารางผนวกที่ ก27) พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราความเข้มข้นและอัตราการให้อากาศค่า  $k_L a$  มีค่าสูงขึ้น แสดงถึงผลของความเข้มข้นเซลล์ต่อความหนืดของอาหารเหลวที่ส่งผลต่อค่า  $k_L a$  และทำให้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเซลล์จึงได้ค่า  $k_L a$  ลดลง

หลังจากนี้นำสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการความเข้มข้นเซลล์ ( $N$ ) และอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเซลล์ 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร เลือกเฉพาะความสัมพันธ์ระหว่าง  $\frac{k_L a - b}{N}^{31}$  กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) มาสร้างสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการความเข้มข้นเซลล์ อัตราการให้อากาศ และความเข้มข้นเซลล์ เนื่องจากมีสถานะเกณฑ์ช่วงเดียวกัน

3.2.3 สหสัมพันธ์ของค่า  $k_L a$  กับอัตราการความเข้มข้นเซลล์ อัตราการให้อากาศ และความเข้มข้นเซลล์

สรุปสมการที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง  $\frac{k_L a - b}{N}^{31}$  กับอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ที่ความเข้มข้นเซลล์ 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นเซลล์ 5 กรัมต่อลิตร; } \frac{k_L a - b}{N}^{311} = 0.1469Q^{-0.245} \quad (32)$$

$$\text{ความเข้มข้นเซลล์ 10 กรัมต่อลิตร; } \frac{k_L a - b}{N}^{312} = 0.2195Q^{-0.2548} \quad (33)$$

$$\text{ความเข้มข้นเซลล์ 20 กรัมต่อลิตร; } \frac{k_L a - b}{N}^{313} = 0.2003Q^{-0.1616} \quad (34)$$

โดยกำหนดให้  $b_{31} = b_{311}$ ,  $b_{312}$  และ  $b_{313}$  เมื่ออาหารเพาะเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากนั้นสร้างสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการความเข้มข้นเซลล์ และอัตราการให้อากาศที่ความเข้มข้นเซลล์ต่างๆ โดยอาศัยสหสัมพันธ์ดังสมการที่ 35

$$\frac{k}{N} \frac{a-b}{3I} = A Q^B \quad (35)$$

เมื่อจัดรูปสมการใหม่เป็นสมการเส้นตรงได้ดังนี้

$$\ln \frac{k}{N} \frac{a-b}{3I} = \ln A + B \ln Q \quad (36a)$$

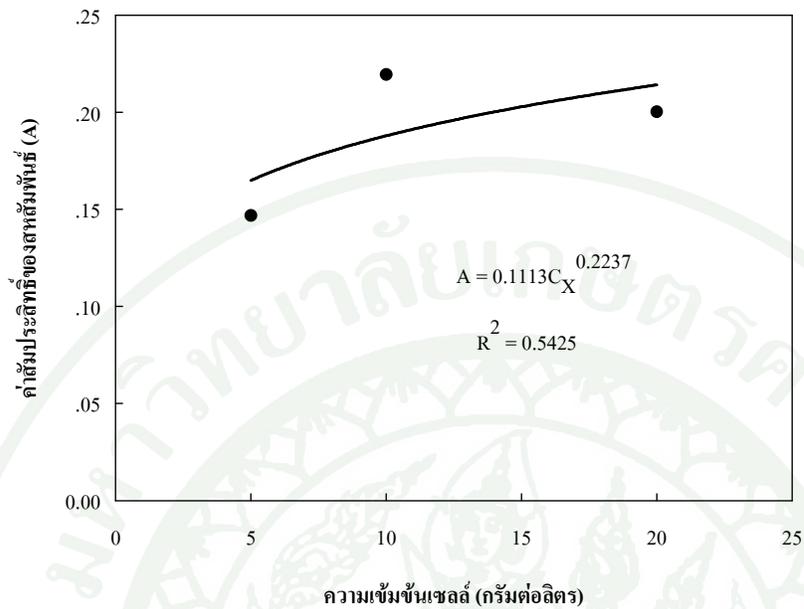
โดย  $A$  คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์

$B$  คือ ค่าคงที่ยกกำลังของสหสัมพันธ์

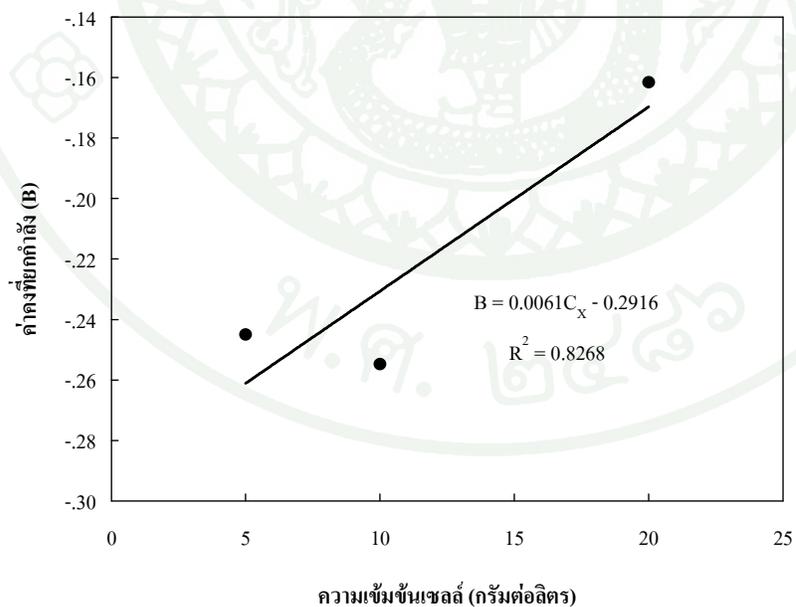
เมื่อนำค่าสัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์และค่าคงที่ยกกำลังของสมการที่ 35 ที่ความเข้มข้นเซลล์ 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 14 สร้างสมการแสดงความสัมพันธ์กับความเข้มข้นเซลล์ ดังภาพที่ 60 และ 61 ตามลำดับ

**ตารางที่ 14** ค่าสัมประสิทธิ์และค่าคงที่ยกกำลังของสหสัมพันธ์ของค่า  $k_{L,a}$  กับอัตราการกวน ( $N$ ) และอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) ภายใต้การแปรผันความเข้มข้นเซลล์ 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าสัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์ ( $A$ )	ค่าคงที่ยกกำลัง ( $B$ )
5	0.1469	-0.2450
10	0.2195	-0.2548
20	0.2003	-0.1616



ภาพที่ 60 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าสัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์ ( $A$ ) กับความเข้มข้นเซลลูล์ ( $C_x$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเซลลูล์ 5 ถึง 20 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 61 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าคงที่แยกกำลังของสหสัมพันธ์ ( $B$ ) กับความเข้มข้นเซลลูล์ ( $C_x$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเซลลูล์ 5 ถึง 20 กรัมต่อลิตร

สรุปได้สมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวน อัตราการให้อากาศและความเข้มข้นเซลล์ ดังนี้

$$\ln \frac{k_L a - b}{N} = \ln A + B \ln Q \quad (36b)$$

เมื่อ  $A = 0.1113 C_X^{0.2237}$ ,  $C_X$  คือ ความเข้มข้นเซลล์ (กรัมต่อลิตร)  
 $B = 0.0061 C_X - 0.2916$

กำหนดให้  $b_{31} = b_{311}$ ,  $b_{312}$  และ  $b_{313}$  ที่ความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ดังนี้  $b_{311} = 13.015Q + 8.3345$ ,  $b_{312} = 58.442Q - 96.56$  และ  $b_{313} = 44.682Q - 88.51$  ตามลำดับ

ซึ่งสมการความสัมพันธ์ที่ได้ใช้สำหรับประมาณค่า  $k_L a$  ที่อัตราการกวน 500 ถึง 1000 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ถึง 2.0 vvm ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นเซลล์ 5 ถึง 20 กรัมต่อลิตร

โดยสมการที่ 36b ที่ได้นี้สามารถประยุกต์ใช้ในการประมาณค่า  $k_L a$  ภายใต้สภาวะควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 และความเข้มข้นเซลล์ที่กำหนด นอกจากนี้ยังสามารถใช้ติดตามและควบคุมการหมักภายใต้การกำหนดค่า  $k_L a$  เมื่อทราบค่าความเข้มข้นของเซลล์ในระหว่างการเพาะเลี้ยง

#### 4. การศึกษาการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวในด้งหมักระดับห้องปฏิบัติการ

โดยทั่วไปการหมักแบบครั้งคราวจะให้ผลได้และอัตราการผลิตที่สูงกว่าการหมักแบบเบ็ดเสร็จ โดยเฉพาะเหมาะสมต่อการหมักที่มีความเข้มข้นเซลล์สูง การศึกษานี้ต้องการผลิตไซลิทอลภายใต้สภาวะความเข้มข้นเซลล์สูงเพื่อเพิ่มอัตราการผลิตและผลได้ไซลิทอล ในการศึกษาเบื้องต้นเพื่อหาปัจจัยที่สนับสนุนการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราว ได้แก่ ผลของแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นสับสเตรตเริ่มต้น และความเข้มข้นเซลล์ต่อการผลิตไซลิทอล เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนากระบวนการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวที่มีเซลล์ความเข้มข้นสูงต่อไป

##### 4.1 การผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวเบื้องต้น

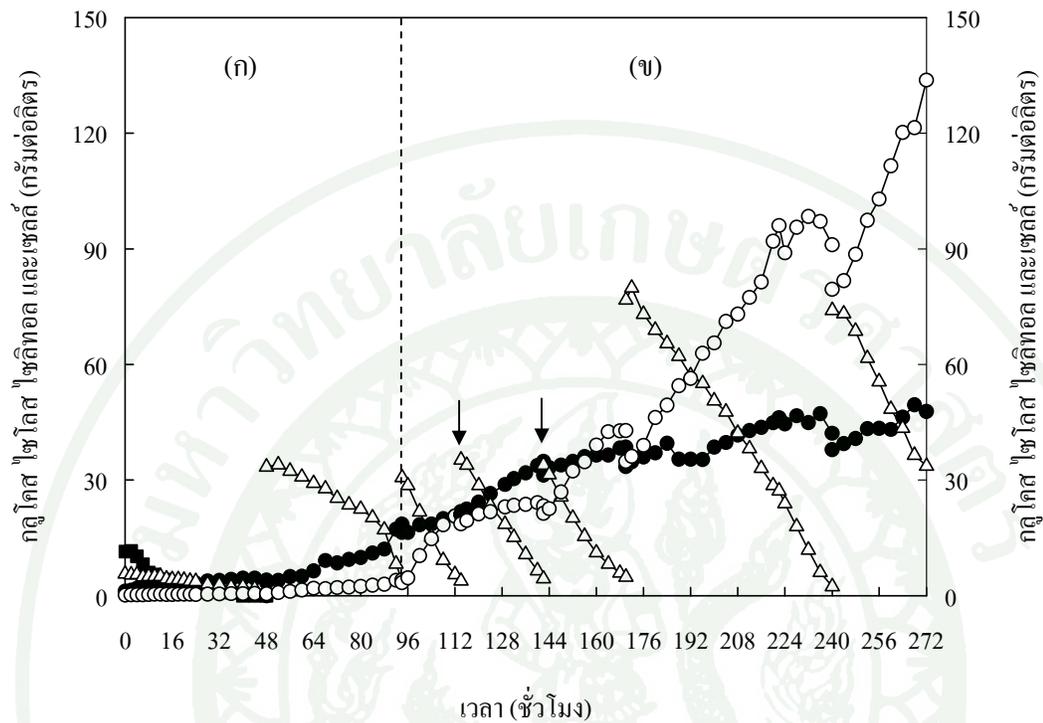
###### 4.1.1 ระยะการผลิตเซลล์

ผลการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวโดยเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* แสดงดังภาพที่ 62 (ตารางผนวกที่ ก28) ซึ่งในระยะเวลาเจริญเติบโตทำการผลิตเซลล์ 2 ครั้ง (1) การผลิตเซลล์จากสับสเตรตร่วมระหว่างกลูโคสและไซโลส จากนั้นเติมไซโลสอีกครั้งเพื่อผลิตเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูง ซึ่งในการผลิตเซลล์ครั้งที่ 1 กำหนดพีเอชเริ่มต้น 6.8 โดยไม่มีการควบคุมพีเอช พบว่าพีเอชลดลงในช่วงแรกหลังจากนั้นพีเอชมีค่าสูงขึ้นและคงที่ที่พีเอช 6.8 จนกระทั่งสิ้นสุดระยะเวลาผลิตเซลล์ในครั้งที่ 1 ซึ่งการผลิตเซลล์ภายใต้สภาวะนี้ใช้เวลาจนถึง 48 ชั่วโมง จนกระทั่งสับสเตรตถูกใช้หมดไป ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสภาวะการทดลองผลิตเซลล์ภายใต้พีเอชเริ่มต้น 6.8 และไม่มีการควบคุมพีเอชยังไม่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ สอดคล้องกับการศึกษาพีเอชที่เหมาะสมก่อนหน้านี้ซึ่งพบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตคือพีเอช 4 ดังนั้นในการผลิตเซลล์ครั้งที่สอง (2) โดยใช้ความเข้มข้นไซโลส 30 กรัมต่อลิตร ควบคุมการผลิตเซลล์ที่พีเอช 4.0 และมีการเติมแหล่งไนโตรเจนคือ casamino acids 1 กรัมต่อลิตร และ urea 2.3 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 84 (ภาพที่ 62) ซึ่งพบว่า การเติมไนโตรเจน (ชั่วโมงที่ 84 - 94) ทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $\mu$ ) เพิ่มขึ้น โดยที่อัตราการผลิตเซลล์ ( $Q_x$ ) และอัตราการใช้ไซโลส ( $Q_{xy}$ ) สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกรณีไม่เติมแหล่งไนโตรเจน (ชั่วโมงที่ 48 - 84) จากภาพที่ 62 หลังจากชั่วโมงที่ 84 ความเข้มข้นไซโลสลดลงอย่างรวดเร็ว และความเข้มข้นเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ระหว่างชั่วโมงที่ 84 - 94 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.056 ต่อชั่วโมง สูงกว่าระหว่างชั่วโมงที่ 48 - 84 (0.033 ต่อชั่วโมง) 1.7 เท่า โดยมีอัตราการผลิตเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 0.211 เป็น 0.753 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง และมี

อัตราการใช้ไซโลสสูงขึ้น 4.5 เท่า ( 0.366 และ 1.642 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ) จึงแสดงให้เห็นว่าแหล่งไนโตรเจนที่เพียงพอสามารถทำให้อัตราการผลิตเซลล์เชิงปริมาณเพิ่มสูงขึ้น

#### 4.1.2 ระยะเวลาผลิตไซลิทอล

เมื่อไซโลสในระยะเวลาผลิตเซลล์ถูกใช้หมดไปจึงทำการผลิตไซลิทอลโดยการเติมไซโลสให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร และเติมแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ casamino acids 1 กรัมต่อลิตร และ urea 2.3 กรัมต่อลิตร ปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลที่พีเอช 7.0 ภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจนที่มีอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm โดยมีความเข้มข้นเซลล์เฉลี่ย 18.862 กรัมต่อลิตร (ระหว่างชั่วโมง 94.25 - 114) คำนวณค่า  $k_{La}$  โดยอาศัยสมการความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_{La}$  กับอัตราการกวน อัตราการให้อากาศและความเข้มข้นเซลล์ (สมการที่ 36b) ได้ค่า  $k_{La}$  เท่ากับ 21 ต่อชั่วโมง พบว่าภายใต้สภาวะดังกล่าวได้ผลได้ไซลิทอล 0.642 กรัมต่อกรัม (ตารางที่ 15) จากนั้นเมื่อไซโลสเหลือประมาณ 5 กรัมต่อลิตร จึงเติมไซโลสอีกครั้งเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร พร้อมแหล่งไนโตรเจน โดยเพิ่มอัตราการกวนเท่ากับ 400 รอบต่อนาที ที่อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm พบว่าภายใต้สภาวะดังกล่าวนี้ไม่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอล แต่สนับสนุนการผลิตเซลล์เนื่องจากมีปริมาณออกซิเจนละลายเพิ่มขึ้น จึงมีค่าอัตราการผลิตเซลล์สูงกว่าอัตราการผลิตไซลิทอล (0.489 และ 0.178 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังให้ผลได้ไซลิทอลลดลงเหลือ 0.113 กรัมต่อกรัม (ตารางที่ 15) ดังนั้นในระยะเวลาผลิตไซลิทอลครั้งที่ 3 จึงกำหนดสภาวะอัตราการกวนที่ 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm เหมือนกับสภาวะการผลิตไซลิทอลครั้งที่ 1 และกำหนดการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวภายใต้สภาวะนี้จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง



ภาพที่ 62 การผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวโดยเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5663 (ก) ระยะการผลิตเซลล์ครั้งที่ 1 สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ออกซิเจนละลาย 70 - 80 % ของออกซิเจนอิ่มตัว กำหนดพีเอชเริ่มต้น 6.8 และครั้งที่ 2 ควบคุมพีเอช 4.0 (ข) ระยะการผลิตไซลิทอล ควบคุมพีเอช 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm โดยกำหนดอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm ระหว่างชั่วโมงที่ 114.25 - 142 (ลูกศรชี้)  
สัญลักษณ์: ความเข้มข้น ■ กัลลูโคส; ● เซลล์; Δ ไซโลส และ ○ ไซลิทอล

ตารางที่ 15 สรุปพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวเบื้องต้น ภายใต้สภาวะการหมักที่ควบคุมพีเอช และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส \*

การเติม ไซโลส	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้น (g l <sup>-1</sup> )			อัตราจำเพาะ (g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )		อัตราเชิงปริมาตร (g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )		ผลได้ (g g <sup>-1</sup> )
		$C_{xyl}^0$	$\bar{C}_X$	$C_P^F$	$q_{xyl}$	$q_P$	$Q_{xyl}$	$Q_P$	
1	19.75	30.674	18.862	20.977	0.075	0.051	1.379	0.932	0.642
2 **	27.75	35.263	28.194	23.224	0.041	0.007	1.123	0.178	0.113
3	27.75	33.913	35.416	42.821	0.030	0.023	1.052	0.786	0.700
4	69.75	76.714	40.457	91.003	0.027	0.021	1.106	0.837	0.741
5	31.75	74.022	43.480	133.715	0.032	0.039	1.380	1.683	0.970

หมายเหตุ \* ดูรายละเอียดสภาวะการหมักดังภาพที่ 62 (อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm)

\*\* อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm

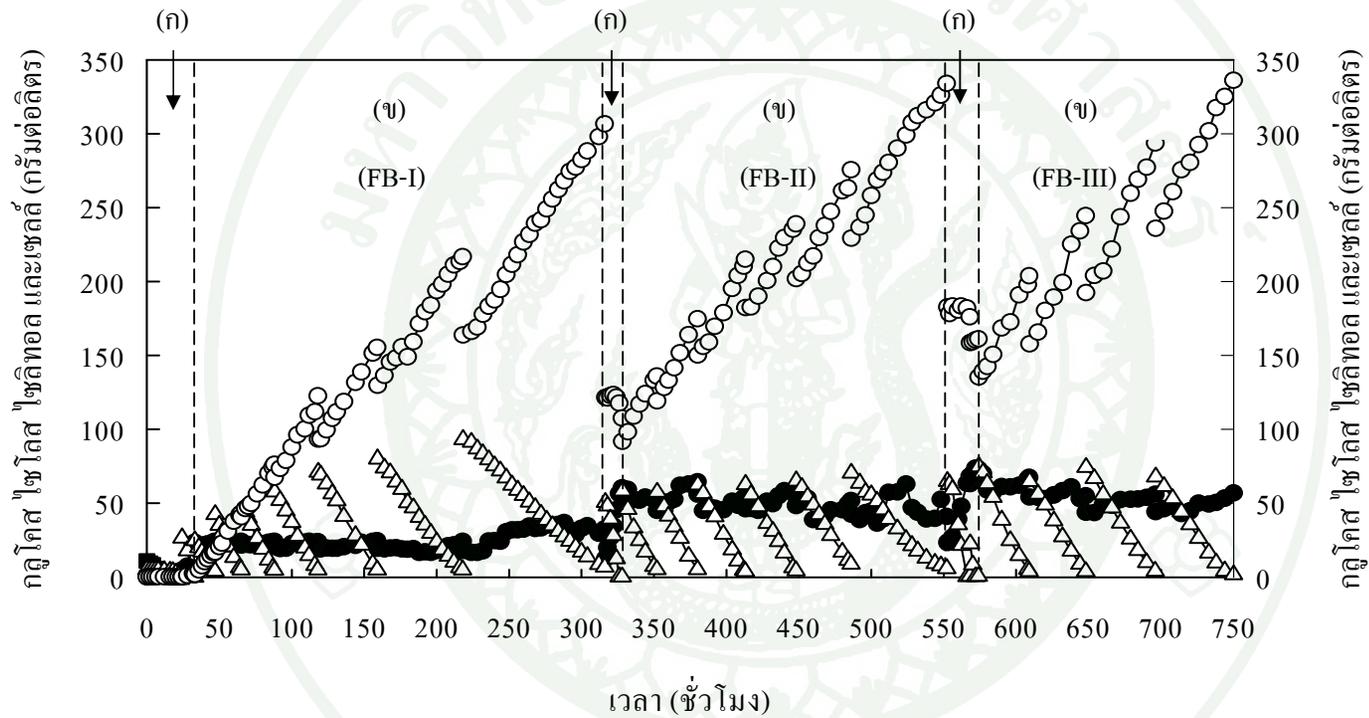
จากตารางที่ 15 จะเห็นได้ว่าเมื่อมีความเข้มข้นเซลล์เพิ่มสูงขึ้น ผลได้ไซลิทอลก็จะมีค่าสูงขึ้นภายใต้สภาวะอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm เนื่องจากเมื่อมีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นทำให้ค่า  $k_La$  ลดลงจากผลของความหนืดของน้ำหมัก ฉะนั้นปริมาณออกซิเจนละลายลดลงจากการใช้ของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดสภาวะจำกัดออกซิเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสภายใต้สภาวะการขาดแคลนออกซิเจน เมื่อสรุปการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวจากการเติมไซโลส 5 ครั้ง ใช้ระยะเวลาในการหมักทั้งสิ้น 177.75 ชั่วโมง ได้ความเข้มข้นไซลิทอลสุดท้ายเท่ากับ 133.715 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตไซลิทอลเชิงปริมาตรเฉลี่ยเท่ากับ 0.883 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง

สรุปจากการศึกษาการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวเบื้องต้น พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์คือพีเอช 4.0 ภายใต้สภาวะมีอากาศอย่างเพียงพอ การเติมแหล่งไนโตรเจนพบว่าสามารถเพิ่มอัตราการผลิตเซลล์และไซลิทอลได้ การเพิ่มความเข้มข้นเซลล์ทำให้ผลได้ไซลิทอลเพิ่มขึ้นเนื่องจากสภาวะจำกัดออกซิเจนเพิ่มมากขึ้นเมื่อควบคุมที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm จึงนำสภาวะที่เหมาะสมนี้ไปใช้ศึกษาการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นเซลล์สูงต่อไป

## 4.2 การผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวที่มีความเข้มข้นเซลล์สูง

### 4.2.1 การผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวครั้งที่ 1

การทดลองเริ่มจากการผลิตเซลล์ด้วยกลูโคสและไซโลส และผลิตเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูงโดยการเติมไซโลสพร้อมแหล่งไนโตรเจนควบคุมสภาวะให้เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ที่ พีเอช 4.0 ความเข้มข้นออกซิเจนละลาย 70 - 80 % ของออกซิเจนอิ่มตัว เมื่อไซโลสถูกใช้หมดไปจึงทำการผลิตไซลิทอลโดยปรับสภาวะควบคุมที่พีเอช 7.0 อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm จนกระทั่งสิ้นสุดการหมักดังภาพที่ 63 (FB-I) (ตารางผนวกที่ ก29)



**ภาพที่ 63** การผลิตไชลิทอลแบบครั้งคราวซ้ำโดยเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5663 (ก) ระยะเวลาผลิตเซลล์ ภายใต้สภาวะควบคุมพีเอช 4.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และออกซิเจนละลาย 70 - 80 % ของออกซิเจนอิ่มตัว (ข) ระยะเวลาผลิตไชลิทอล ภายใต้สภาวะควบคุมพีเอช 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm (FB-I) ครั้งคราวครั้งที่ 1 (FB-II) ครั้งคราวครั้งที่ 2 และ (FB-III) ครั้งคราวครั้งที่ 3

สัญลักษณ์: ความเข้มข้น ■ กลูโคส; ● เซลล์; △ ไชโลส และ ○ ไชลิทอล

**ตารางที่ 16** เปรียบเทียบอัตราจำเพาะและอัตราเชิงปริมาตรของการผลิตไซลิทอลจากไซโลสด้วยการหมักแบบครั้งคราวครั้งที่ 1 (FB-I) โดยเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* ภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจน \*

การเติม ไซโลส	ความเข้มข้น ( $\text{g l}^{-1}$ )			อัตราจำเพาะ ( $\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )		อัตราเชิงปริมาตร ( $\text{g l}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	
	$C_{\text{xyI}}^0$	$\bar{C}_X$	$C_P^F$	$q_{\text{xyI}}$	$q_P$	$Q_{\text{xyI}}$	$Q_P$
1	24.858	22.099	18.539	0.068	0.054	1.491	1.198
2	42.551	23.374	43.150	0.090	0.063	2.110	1.465
3	43.989	22.801	76.334	0.080	0.064	1.820	1.466
4	57.815	22.205	122.530	0.081	0.079	1.789	1.752
5	71.204	21.145	155.404	0.079	0.074	1.634	1.545
6	80.105	19.505	216.654	0.068	0.078	1.280	1.468
7	93.180	29.301	306.615	0.033	0.052	0.924	1.491

หมายเหตุ \* ดูรายละเอียดสภาวะการหมักดังภาพที่ 63 (อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm)

จากตารางที่ 16 แสดงการเปรียบเทียบอัตราจำเพาะและอัตราเชิงปริมาตรของการผลิตไซลิทอลจากไซโลสด้วยการหมักแบบครั้งคราวครั้งที่ 1 (FB-I) โดยเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* ภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจน เมื่อแปรผันการเติมความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้นจำนวน 7 ครั้ง ตั้งแต่ความเข้มข้น 30 ถึง 90 กรัมต่อลิตร โดยมีความเข้มข้นเซลล์เฉลี่ย 22 กรัมต่อลิตร พบว่าอัตราการผลิตไซลิทอลเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้นจนกระทั่งถึงความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้นเท่ากับ 57.815 กรัมต่อลิตร มีอัตราอัตราการผลิตไซลิทอลสูงสุดที่ 1.752 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้นสูงขึ้นอีก พบว่าเซลล์ใช้ไซโลสได้ช้าลง พิจารณาจากอัตราจำเพาะการใช้ไซโลสลดลง เนื่องจากเกิดภาวะการยับยั้งจากสับสเตรตความเข้มข้นสูง (substrate inhibition) จึงส่งผลต่ออัตราการใช้ไซโลสและอัตราการผลิตไซลิทอลลดลงด้วย ดังนั้น จึงสรุปความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้นที่เหมาะสมประมาณ 60 กรัมต่อลิตร เพื่อใช้เป็นความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้นที่จะเติมในการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวซ้ำต่อไป

#### 4.2.2 การผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวซ้ำครั้งที่ 2 และ 3

หลังจากทำการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวครั้งที่ 1 (FB-I) โดยมีความเข้มข้นเซลล์เฉลี่ย 22 กรัมต่อลิตร จึงศึกษาการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวซ้ำเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเซลล์สูงขึ้นในครั้งที่ 2 (FB-II) และ 3 (FB-III) โดยคาดว่าความเข้มข้นเซลล์ที่เพิ่มขึ้นจะช่วยลดระยะเวลาในการใช้ไซโลสและการผลิตไซลิทอลเพื่อเพิ่มอัตราการใช้ไซโลสและการผลิตไซลิทอล โดยมีความเข้มข้นเซลล์เฉลี่ยในครั้งที่ 2 และ 3 เท่ากับ 50 และ 54 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าได้อัตราเชิงปริมาตรการใช้ไซโลสและการผลิตไซลิทอล อัตราจำเพาะของการใช้ไซโลสและการผลิตไซลิทอล ผลได้ไซลิทอลจากไซโลส และความเข้มข้นไซลิทอลสุดท้าย สรุปดังภาพที่ 63 และตารางที่ 17

จากตารางที่ 17 พิจารณาแต่ละครั้งของการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราว พบว่าเมื่อความเข้มข้นเซลล์สูงขึ้นอัตราการผลิตไซลิทอลเชิงปริมาตรเพิ่มขึ้น เปรียบเทียบการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวครั้งที่ 2 (FB-II) กับครั้งที่ 1 (FB-I) พบว่าอัตราการผลิตไซลิทอลสูงขึ้นถึง 38 % เนื่องจากผลิตไซลิทอลที่ความเข้มข้นไซโลสเริ่มต้นที่เหมาะสม (60 กรัมต่อลิตร) และความเข้มข้นเซลล์ของการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวครั้งที่ 1 (FB-I) น้อยกว่าครั้งที่ 2 (FB-II) ถึง 2.2 เท่า (22 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ในขณะที่ครั้งที่ 3 (FB-III) ซึ่งมีความเข้มข้นเซลล์มากกว่าครั้งที่ 2 (FB-II) ประมาณ 4 กรัมต่อลิตร แต่ให้อัตราการใช้ไซโลสเชิงปริมาตรสูงกว่า 15 % แสดงว่าความเข้มข้นเซลล์ที่สูงขึ้นมีผลต่ออัตราการใช้ไซโลสไม่มากนัก แต่ความเข้มข้นเซลล์ที่สูงมากยิ่งขึ้นทำให้อัตราจำเพาะการใช้ไซโลสและการผลิตไซลิทอลลดลง สำหรับผลได้ไซลิทอลจากไซโลสพบว่าผลได้ไซลิทอลมีค่าสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นเซลล์สูงขึ้น เนื่องจากการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวทั้ง 3 ครั้ง ควบคุมที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 vvm เมื่อความเข้มข้นเซลล์มากขึ้นทำให้ค่า  $k_L a$  ลดลง เนื่องจากความเข้มข้นเซลล์สูงขึ้นทำให้เกิดความหนืดของน้ำหมักเพิ่มขึ้น และมีการใช้ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำหมักเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นเมื่อความเข้มข้นเซลล์สูงขึ้น ในขณะที่อัตราการกวนและอัตราการให้อากาศคงที่ ค่า  $k_L a$  มีค่าลดลง ฉะนั้นปริมาณออกซิเจนละลายจึงถูกใช้มากขึ้นตามความต้องการของเซลล์ที่เพิ่มสูงขึ้น สถานะการหมักจึงเป็นภาวะจำกัดออกซิเจนมากยิ่งขึ้น ดังนั้นเมื่อมีความเข้มข้นเซลล์มากขึ้นเกิดภาวะจำกัดออกซิเจนมากยิ่งขึ้น จึงส่งผลให้ผลได้ไซลิทอลมีค่าสูงขึ้น (Sirisansaneeyakul *et al.*, 1995)

สำหรับผลของปริมาตรเริ่มต้น ( $V_0$ ) และปริมาตรสุดท้าย ( $V_F$ ) ของการหมักและความเข้มข้นไซลิทอลสุดท้ายของการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวในแต่ละครั้งก็มีความสำคัญต่อ

อัตราการผลิตไซลิทอล โดยในการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวครั้งที่ 1 (FB-I) (ตารางผนวกที่ ก29) มี  $V_0$  เท่ากับ 1,017.2 มิลลิลิตร และ  $V_F$  เท่ากับ 1,296.4 มิลลิลิตร (ปริมาตรเพิ่มขึ้น 279.2 มิลลิลิตร) มีความเข้มข้นไซลิทอลเริ่มต้น 1.823 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการหมักใช้ระยะเวลา 282.75 ชั่วโมง ได้รับความเข้มข้นไซลิทอลสุดท้าย 306.615 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวครั้งที่ 2 (FB-II) มี  $V_0$  เท่ากับ 1,069.8 มิลลิลิตร และ  $V_F$  เท่ากับ 1,336.8 มิลลิลิตร (ปริมาตรเพิ่มขึ้น 267 มิลลิลิตร) มีความเข้มข้นไซลิทอลเริ่มต้น 91.875 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการหมักใช้ระยะเวลา 223.75 ชั่วโมง ได้รับความเข้มข้นไซลิทอลสุดท้าย 334.063 กรัมต่อลิตร และในครั้งที่ 3 (FB-III) มี  $V_0$  เท่ากับ 796 มิลลิลิตร และ  $V_F$  เท่ากับ 787 มิลลิลิตร (ปริมาตรลดลง 9 มิลลิลิตร) มีความเข้มข้นไซลิทอลเริ่มต้น 135.344 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการหมักใช้ระยะเวลา 175.75 ชั่วโมง ได้รับความเข้มข้นไซลิทอลสุดท้าย 336.016 กรัมต่อลิตร ซึ่งการทดลองผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวนี้ได้กำหนดไว้ว่าจะผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวรอบต่อไปเมื่อได้รับความเข้มข้นไซลิทอลสุดท้ายประมาณ 300 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวครั้งที่ 1 (FB-I) ซึ่งมีความเข้มข้นไซลิทอลเริ่มต้นเพียงแค่ 1.823 กรัมต่อลิตร จึงต้องใช้เวลานานถึง 282.75 ชั่วโมง ในการผลิตไซลิทอลให้ได้ 306.615 กรัมต่อลิตร จึงมีอัตราการผลิตไซลิทอลน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวครั้งที่ 2 (FB-II) และ 3 (FB-III) ซึ่งมีความเข้มข้นไซลิทอลเริ่มต้น 91.875 และ 135.344 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นระยะเวลาในการผลิตไซลิทอลจึงลดลง ส่งผลให้อัตราการผลิตไซลิทอลเพิ่มขึ้นในครั้งที่ 2 (FB-II) และ 3 (FB-III) ตามลำดับ นอกจากนี้ จากผลของความเข้มข้นไซลิทอลเริ่มต้นที่สูงขึ้นในแต่ละครั้งของการผลิตทำให้มีจำนวนการเติมไซโลสลดลงจากครั้งที่ 1 (FB-I) เติมไซโลสจำนวน 7 ครั้ง เหลือ 6 และ 4 ครั้ง ในครั้งที่ 2 (FB-II) และ 3 (FB-III) ตามลำดับ จึงส่งผลต่อผลต่างระหว่างปริมาตรทำงานเริ่มต้น ( $V_0$ ) และปริมาตรทำงานสุดท้าย ( $V_F$ ) ของการหมักที่ลดลง ซึ่งถ้ากำหนดปริมาตรสุดท้ายของการหมักเท่ากัน อาทิ ปริมาตร 1,500 มิลลิลิตร คาดว่าในการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวครั้งที่ 3 (FB-III) ซึ่งมี  $V_0$  น้อยที่สุดจะได้รับความเข้มข้นไซลิทอลสุดท้ายสูงสุดเมื่อเทียบกับในครั้งที่ 1 (FB-I) และ 2 (FB-II) ซึ่งความเข้มข้นไซลิทอลสูงจะมีประโยชน์ในกระบวนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ที่ช่วยลดขั้นตอนของการทำให้เข้มข้น ดังนั้นในการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวซ้ำครั้งต่อไป จึงควรมีการศึกษาถึงปริมาตรทำงานเริ่มต้น ( $V_0$ ) และความเข้มข้นไซลิทอลเริ่มต้นที่เหมาะสมที่จะทำให้ได้อัตราการผลิตไซลิทอลและความเข้มข้นสุดท้ายของไซลิทอลสูงสุด

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองนี้กับงานวิจัยของ Nakano *et al.* (2000) ซึ่งศึกษาการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวโดยเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5663 ที่สภาวะจำกัออกซิเจนเช่นเดียวกัน ได้รับความเข้มข้นไซลิทอลสุดท้าย 356 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลา 830 ชั่วโมง มีอัตราการ

ผลิตไซลิทอล 0.429 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง และผลได้ไซลิทอลจากไซโลส 0.750 กรัมต่อกรัม จะเห็นได้ว่าการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวซ้ำให้ทั้งผลได้ไซลิทอลและอัตราการผลิตไซลิทอลสูงขึ้นได้ ส่วนความเข้มข้นไซลิทอลสุดท้ายที่ได้เนื่องจากในการทดลองไม่ได้กำหนดปริมาณสุดท้ายของการผลิตแบบครั้งคราว จึงทำให้ได้ความเข้มข้นไซลิทอลสุดท้ายยังคงน้อยกว่า ซึ่งคาดว่า จะได้ความเข้มข้นไซลิทอลสูงกว่าได้เมื่อยังคงทำการผลิตจนกระทั่งถึงปริมาณสุดท้ายของการหมักเท่ากับ 1,500 มิลลิลิตร จึงสรุปให้เห็นว่าเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5663 สามารถผลิตไซลิทอลได้ในความเข้มข้นสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อยีสต์สายพันธุ์อื่นที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ดี เช่น *C. tropicalis* ATCC 13803 (Choi *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004) และ *C. guilliermondii* FTI 20037 (Rodrigues *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2003; Mussatto *et al.*, 2006) เป็นต้น ซึ่งจะได้พัฒนากระบวนการผลิตไซลิทอลความเข้มข้นสูงต่อไปโดยอาศัยกระบวนการหมักแบบครั้งคราวซ้ำ

ตารางที่ 17 สรุปพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวซ้ำโดยเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* ภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจนที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm

Repeated fed-batch	ความเข้มข้น (g l <sup>-1</sup> )		อัตราเชิงปริมาตร (g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )		อัตราจำเพาะ (g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )		ผลได้ (g g <sup>-1</sup> )	
	$C_{xyl}^0$	$\bar{C}_X$	$C_P^F$	$Q_{xyl}$	$Q_P$	$q_{xyl}$		$q_P$
<b>Fed-batch I (FB-I)</b>								
Feed 1	24.858	22.099	18.539	1.491	1.198	0.068	0.054	
Feed 2	42.551	23.374	43.150	2.110	1.465	0.090	0.063	
Feed 3	43.989	22.801	76.334	1.820	1.466	0.080	0.064	
Feed 4	57.815	22.205	122.530	1.789	1.752	0.081	0.079	
Feed 5	71.204	21.145	155.404	1.634	1.545	0.079	0.074	
Feed 6	80.105	19.505	216.654	1.280	1.468	0.068	0.078	
Feed 7	93.180	29.301	306.615	0.924	1.491	0.033	0.052	
<b>Average</b>		<b>22.919</b>		<b>1.578</b>	<b>1.484</b>	<b>0.071</b>	<b>0.067</b>	<b>0.838</b>
<b>Fed-batch II (FB-II)</b>								
Feed 1	58.427	53.604	135.982	2.231	1.909	0.041	0.035	
Feed 2	57.506	55.533	174.713	1.938	2.032	0.035	0.037	
Feed 3	62.566	49.858	215.067	1.796	1.944	0.037	0.040	

ตารางที่ 17 (ต่อ)

Repeated fed-batch	ความเข้มข้น (g l <sup>-1</sup> )			อัตราเชิงปริมาตร (g l <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )		อัตราจำเพาะ (g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )		ผลได้ (g g <sup>-1</sup> )
	$C_{xyl}^0$	$\bar{C}_X$	$C_P^F$	$Q_{xyl}$	$Q_P$	$q_{xyl}$	$q_P$	
Feed 4	62.847	51.704	238.961	1.684	1.734	0.033	0.034	
Feed 5	65.196	46.772	275.680	1.514	1.932	0.034	0.044	
Feed 6	70.520	45.786	334.063	0.994	1.652	0.022	0.036	
<b>Average</b>		<b>50.543</b>		<b>1.693</b>	<b>1.867</b>	<b>0.034</b>	<b>0.038</b>	<b>0.938</b>
<b>Fed-batch III (FB-III)</b>								
Feed 1	74.939	63.366	203.843	2.061	1.878	0.033	0.030	
Feed 2	64.945	55.546	244.472	1.594	2.277	0.029	0.040	
Feed 3	74.394	50.345	293.583	1.514	2.064	0.030	0.041	
Feed 4	67.938	48.645	336.016	1.284	1.859	0.027	0.039	
<b>Average</b>		<b>54.475</b>		<b>1.613</b>	<b>2.019</b>	<b>0.030</b>	<b>0.038</b>	<b>0.997</b>

หมายเหตุ

1. Fed-batch I คือ การผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวครั้งที่ 1 กำหนด  $V_0$  1,017.2 มิลลิลิตร และ  $V_F$  1,296.4 มิลลิลิตร ในระยะเวลาของการหมัก 282.75 ชั่วโมง
2. Fed-batch II คือ การผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวครั้งที่ 2 กำหนด  $V_0$  1,069.8 มิลลิลิตร และ  $V_F$  1,336.8 มิลลิลิตร ในระยะเวลาของการหมัก 223.75 ชั่วโมง
3. Fed-batch III คือ การผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวครั้งที่ 3 กำหนด  $V_0$  796 มิลลิลิตร และ  $V_F$  787 มิลลิลิตร ในระยะเวลาของการหมัก 175.75 ชั่วโมง

## สรุปและข้อเสนอแนะ

### สรุป

*C. magnoliae* TISTR 5663 เป็นเชื้อยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลมากกว่าเชื้อยีสต์ *C. mogii* TISTR5892 โดยเจริญเติบโตได้ดีที่พีเอช 4 ภายใต้สภาวะมีอากาศเพียงพอ และผลิตไซลิทอลได้ดีที่พีเอช 7 ภายใต้สภาวะจำกัดอากาศ ดังนั้นการผลิตไซลิทอลจึงแบ่งการเพาะเลี้ยงเป็น 2 ระยะคือ (1) ระยะการผลิตเซลล์ เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีสับเทรตร่วมระหว่างกลูโคสและไซโลส เพื่อใช้กลูโคสในการผลิตเซลล์ และใช้ไซโลสในการชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ไซโลสรีดักเทส และ (2) ระยะผลิตการไซลิทอล โดยใช้ไซโลสเป็นสับเทรตเพียงชนิดเดียวเนื่องจากกลูโคสยับยั้งการใช้ไซโลสของเซลล์ยีสต์ และพบว่าไม่มีผลต่อการเพิ่มอัตราการผลิตไซลิทอลเชิงปริมาตร

การผลิตไซลิทอลขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจนละลาย จึงสามารถอาศัยการประมาณค่า  $k_L a$  เพื่อใช้ในการควบคุมกระบวนการผลิตไซลิทอล ดังนั้นจึงศึกษาเพื่อสรุปสหสัมพันธ์ระหว่างค่า  $k_L a$  กับอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศ ดังนี้

$$\text{น้ำกลั่น} \quad \frac{k_L a - b}{N} = 0.1283Q^{0.3781}; \quad b_{11} = 5.2305Q - 10.759 \quad (28b)$$

ที่อัตราการกวน 100 ถึง 800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.2 ถึง 2.0 vvm

$$\text{อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ} \quad \frac{k_L a - b}{N} = 0.1346Q^{0.3867}; \quad b_{21} = -1.7963Q - 7.3236 \quad (30b)$$

ที่อัตราการกวน 100 ถึง 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.2 ถึง 2.0 vvm

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์ยีสต์ *C. magnoliae* TISTR 5663

$$\ln \frac{k}{N} \frac{a-b}{L} \frac{3l}{3l} = \ln A + B \ln Q \quad (36b)$$

เมื่อ  $A = 0.1113C_X^{0.2237}$  และ  $B = 0.0061C_X - 0.2916$

โดยที่  $b_{311} = 13.015Q + 8.3345$ ,  $b_{312} = 58.442Q - 96.56$  และ  $b_{313} = 44.682Q - 88.51$  ที่ความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

สหสัมพันธ์ดังกล่าว (สมการที่ 36b) สามารถใช้ประมาณค่า  $k_L a$  ที่อัตราการกวน 500 ถึง 1000 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ถึง 2.0 vvm ภายใต้ความเข้มข้นเซลล์ 5 ถึง 20 กรัมต่อลิตร

สำหรับการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวที่ความเข้มข้นเซลล์สูงในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ แสดงให้เห็นว่าแหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการผลิตเซลล์และไซลิทอล และพบว่าผลได้ไซลิทอลเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเซลล์สูงขึ้น เนื่องจากเกิดสภาวะจำกัดออกซิเจนมากยิ่งขึ้นเมื่อทำการผลิตที่สภาวะอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศเดียวกัน โดยในการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวซ้ำที่มีความเข้มข้นเซลล์สูง 3 ครั้ง ให้ผลได้ไซลิทอล 0.838, 0.938 และ 0.997 กรัมต่อกรัม เมื่อมีความเข้มข้นเซลล์เฉลี่ย 22, 50 และ 54 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยมีความเข้มข้นไซลิทอลสุดท้ายตั้งแต่ 306 - 336 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตไซลิทอลเชิงปริมาตรเฉลี่ยเท่ากับ 1.79 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง โดยใช้ระยะเวลาในการหมัก 682.25 ชั่วโมง จากผลการทดลองที่ได้ทำให้สรุปได้ว่าการผลิตไซลิทอลด้วยวิธีการหมักแบบครั้งคราวซ้ำนี้เป็นกรรมวิธีต้นแบบที่เหมาะสมของการผลิตไซลิทอลระดับอุตสาหกรรมได้

### ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการเติมแหล่งไนโตรเจน (casamino acids 1 กรัมต่อลิตร และ urea 2.3 กรัมต่อลิตร) พร้อมการเติมไซโลส มีผลต่อการผลิตเซลล์และการผลิตไซลิทอล ดังนั้นจึงควรมีการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนต่อการนำไปใช้เพื่อผลิตเซลล์และไซลิทอล และความเข้มข้นวิกฤติเพื่อป้องกันภาวะการยับยั้งของไนโตรเจนต่อการผลิตไซลิทอล นอกจากนี้ควรมีการหาแหล่งไนโตรเจนทดแทนที่มีราคาถูกที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไซลิทอลเช่นเดียวกับแหล่งไนโตรเจนข้างต้น เพื่อลดต้นทุนในการผลิตไซลิทอลระดับอุตสาหกรรม

สำหรับสหสัมพันธ์ที่ใช้ในการประมาณค่า  $k_{La}$  ที่ได้มีความเหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลภายใต้ความเข้มข้นเซลล์ไม่เกิน 20 กรัมต่อลิตร จึงควรศึกษาถึงสภาวะจำกัดออกซิเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไซลิทอลโดยอาศัยการควบคุมการผลิตไซลิทอลด้วยค่า  $k_{La}$  เพื่อให้ได้ผลได้และอัตราการผลิตของไซลิทอลสูงสุด ซึ่งจะทำได้โดยใช้ค่า  $k_{La}$  ในการควบคุมสภาวะของการผลิตไซลิทอลภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจน ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการศึกษารายขนาดของการผลิตไซลิทอลต่อไป

นอกจากนี้ควรศึกษารวมวิธีการผลิตไซลิทอลแบบครั้งคราวจากไฮโดรไลเสตจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร อาทิ ช้างข้าวโพด และฟางข้าว เป็นต้น เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตไซลิทอลทางอุตสาหกรรม

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กฤษฎากร จริโมภาส. 2549. การผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดย *Bacillus* sp. ที่ชอบต่างในอาหารเหลว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- กัญญา สอนสนิท. 2537. การผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสโดยยีสต์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- จรรยา คำนวมดา. 2536. เทคนิคการหมักแบบ Fed-batch และการประยุกต์ใช้สำหรับการผลิตแอลกอฮอล์ทางอุตสาหกรรม. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม, กรุงเทพฯ.
- วรวิภา ครุสง. 2529. เทคโนโลยีชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1 สำนักพิมพ์โอเคียนสโตร์, กรุงเทพฯ.
- วรสิทธิ์ โทจำปา. 2541. การผลิตไซลิทอลโดยการหมักเวียนเซลล์ด้วย hollow fiber. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วิเชียร กิจปรีชาวนิช, กล้าณรงค์ ศรีรอด, กัญญา สอนสนิท, สาวิตรี ลิมทอง และชาญวิทย์ โฆษิตานนท์. 2538. การผลิตไซลิทอลจากไซโลสโดยยีสต์ *Candida* sp. WT 52. น. 216-230. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 33. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สมใจ ศิริโชค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพฯ, กรุงเทพฯ.
- สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล. 2537ก. ไซลิทอล. วารสารอุตสาหกรรมเกษตร. 5(3): 13-27.
- \_\_\_\_\_. 2537ข. สารให้ความหวานจากฟางข้าว. วารสารอุตสาหกรรมเกษตร. 27(3-4): 71-81.
- \_\_\_\_\_. 2540/41. น้ำตาลป้องกันฟันผุ. ส่งเสริมเทคโนโลยี. 24(136): 161-164.

สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล, วรสิทธิ์ โทจำปา และประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. 2544. **วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 2**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

\_\_\_\_\_, วิรัตน์ วาณิชศรีรัตนา, ประมุข กระจุกสุขสถิต และกิติพงษ์ รัตนารักษ์. 2551. **คู่มือปฏิบัติการวิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

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

Aguiar Jr. , W. B. , L. F. F. Faria, M. A. P. G. Couto, O.Q.F. Araujo and N. Pereira Jr. 2002. Growth model and prediction of oxygen transfer rate for xylitol production from d-xylose by *C. guilliermondii*. **Biochem. Eng. J.** 12: 49–59.

Baishan, F. , C. Hongwen, X. Xiaolan, W. Ning and H. Zongding. 2003. Using genetic algorithms coupling neural networks in a study of xylitol production: medium optimization. **Process Biochem.** 38: 979-985.

Barbosa, M. F. S. , M. B. de Medeiros, I. M. de Mancilha, H. Schneider and H. Lee. 1988. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **J. Ind. Microbiol.** 3: 241-251.

Branco, R. F. , J. C. Santos, L. Y. Murakami, S. I. Mussatto, G. Dragone and S. S. Silva. 2007. Xylitol production in a bubble column bioreactor: Influence of the aeration rate and immobilized system concentration. **Process Biochem.** 42: 258–262.

\_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, B. F. Sarrouh, J. D. Rivaldi, A. Pessoa Jr. and S. S. Silva. 2009. Profiles of xylose reductase, xylitol dehydrogenase and xylitol production under different oxygen transfer volumetric coefficient values. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 84: 326–330.

- Canilha, L. , W. Carvalho and J. B. Almeida e Silva. 2005. Influence of medium composition on xylitol bioproduction from wheat straw hemicellulosic hydrolysate. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 21: 1087–1093.
- Carvalho, W. , J. C. Santos, L. Canilha, J. B. A. Silva, M. G. A. Felipe, I. M. Mancilha and S. S. Silva. 2004. A study on xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by Ca-alginate entrapped cells in a stirred tank reactor. **Process Biochem.** 39 : 2135–2141.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, S. S. Silva, P. Perego and A. Converti. 2005. Xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate Metabolic behaviour of *Candida guilliermondii* cells entrapped in Ca-alginate. **Biochem. Eng. J.** 25: 25–31.
- \_\_\_\_\_, 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: 553–559.
- Cheng, K. K. , J. A. Zhang, H. Z. Ling, W. X. Ping, W. Huang, J. P. Ge and J. M. Xua. 2009. Optimization of pH and acetic acid concentration for bioconversion of hemicellulose from corncobs to xylitol by *Candida tropicalis*. **Biochem. Eng. J.** 43: 203–207.
- Choi, J. H. , K. H. Moon, Y. W. Ryu and J. H. Seo. 2000. Production of xylitol in cell recycle fermentations of *Candida tropicalis*. **Biotechnol. Lett.** 22: 1625–1628.
- Collin, C. H. , P. M. Lyne and J. M. Grange. 1989. **Collins and Lyne's Microbiological Methods.** 16<sup>th</sup> ed. , Buterworth & Co. Ltd., London. 409 p.
- Cooper, C. M., G. A. Fernstorm and S.A. Miller. 1944. Performance of agitated gas-liquid contactors. **Ind. Eng. Chem.** 36: 504-509

- Cortez, D. V. and I. C. Roberto. 2010a. Improved xylitol production in media containing phenolic aldehydes: application of response surfacemethodology for optimization and modeling of bioprocess. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 85: 33–38.
- \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 2010b. Individual and interaction effects of vanillin and syringaldehyde on the xylitol formation by *Candida guilliermondii*. **Bioresour. Technol.** 101: 1858–1865.
- Cunha, M. A. A. , A. Converti, J. C. Santos and S. S. Silva. 2006. Yeast immobilization in LentiKats®: a new strategy for xylitol bioproduction from sugarcane bagasse. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 22: 65–72.
- \_\_\_\_\_, R. C. B. Rodrigues, J. C. Santos, A. Converti and S. S. Silva. 2007. Repeated-batch xylitol bioproduction using yeast cells entrapped in polyvinyl alcohol–hydrogel. **Curr. Microbiol.** 54: 91–96.
- Deschatelets, L. and E. K. C. Yu. 1986. A simple pentose assay for biomass conversion studies. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 24: 379-397.
- Emodi, A. 1978. Xylitol, its properties and food applications. **Food Technol.** 32: 28-32.
- Felipe, M. G. A. , M. Vitolo, I. M. Mancilha and S. S. Silva. 1997. Fermentation of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate for xylitol production: effect of pH. **Biomass Bioenergy** 13(1/2): 11-14.
- Garcia-Ochoa, F. and E. Gomez. 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. **Biotechnol. Adv.** 27: 153–176.
- Gong, C. S. , L. F. Chen and G. T. Tsao. 1981. Quantitative production of xylitol from D-xylose by a high-xylitol producing yeast mutant *Candida tropicalis* HXP2. **Biotechnol. Lett.** 13(3): 130-135.

- Granström, T. B. , K. Izumori and M. Leisola. 2007. A rare sugar xylitol. Part II: biotechnological production and future applications of xylitol. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 74: 273–276.
- Gurpilhares, D. B. , F. A. Hasmann, A. Pessoa Jr. and I. C. Roberto. 2009. The behavior of key enzymes of xylose metabolism on the xylitol production by *Candida guilliermondii* grown in hemicellulosic hydrolysate. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 36: 87–93.
- , A. Pessoa Jr. and I. C. Roberto. 2006. Glucose-6-phosphate dehydrogenase and xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 using statistical experimental design. **Process Biochem.** 41: 631–637.
- Horitsu, H. , Y. Yahashi, K. Takamizawa, K. Kawai, T. Suzaki and N. Watanabe. 1992. Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: optimization of production rate. **Biotechnol. Bioeng.** 40: 1085-1091.
- Kastner, J. R. , M. A. Eiteman and S. A. Lee. 2001. Glucose repression of xylitol production in *Candida tropicalis* mixed-sugar fermentations. **Biotechnol. Lett.** 23: 1663–1667.
- Kim, J. H. 2006. **Novel *Candida tropicalis* CJ-FID (KCTC 10457BP) and manufacturing method of xylitol thereby.** U.S. Patent 2006/0110811 A1.
- , K. C. Han, Y. H. Koh, Y. W. Ryu and J. H. Seo. 2002. Optimization of fed-batch fermentation for xylitol production by *Candida tropicalis*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 29: 16 – 19.
- , Y. W. Ryu and J. H. Seo. 1999. Analysis and optimization of a two-substrate fermentation for xylitol production using *Candida tropicalis*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 22: 181–186.

- Kim, T. B. , Y. J. Lee, P. Kim, C. S. Kim and D. K. Oh. 2004. Increased xylitol production rate during long-term cell recycle fermentation of *Candida tropicalis*. **Biotechnol. Lett.** 26: 623–627.
- Ko, C. H. , P. C. Chiu, C. L. Yang and K. H. Chang. 2008. Xylitol conversion by fermentation using five yeast strains and polyelectrolyte-assisted ultrafiltration. **Biotechnol. Lett.** 30: 81–86.
- Kwon, S. G. , S. W. Park and D. K. Oh. 2006. Increase of xylitol productivity by cell-recycle fermentation of *Candida tropicalis* using submerged membrane bioreactor. **J. Biosci. Bioeng.** 101(1): 13-18.
- Lee, S. S. , F. M. Robinson and H. Y. Wang. 1981. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnol. Bioeng. Symp.** 11: 641-649.
- Lee, W. J. , Y. W. Ryu and J. H. Seo. 2000. Characterization of two-substrate fermentation processes for xylitol production using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing xylose reductase gene. **Process Biochem.** 35: 1199–1203.
- Liaw, W. C. , C. S. Chen, W. S. Chang and K. P. Chen. 2008. Xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolyzate by polyacrylic hydrogel thin films with immobilized *Candida subtropicalis* WF79. **J. Biosci. Bioeng.** 105(2): 97–105.
- López, F. , O. D. Delgado, M. A. Martínez, J. F. T. Spencer and L. I. C. Figueroa. 2004. Characterization of a new xylitol-producer *Candida tropicalis* strain. **Antonie van Leeuwenhoek** 85: 281–286.
- Lu, J. , L. B. Tsai, C. S. Gong, and G. T. Tsao. 1995. Effect of nitrogen sources on xylitol production from D-xylose by *Candida* Sp. L-102. **Biotechnol. Lett.** 17(2): 167-170.

- Martinez, E. A. , J. B. A. Silva, M. Giulietti, A. I. N. Solenzal. 2007. Downstream process for xylitol produced from fermented hydrolysate. **Enzyme Microb. Technol.** 40: 1193–1198.
- , S. S. Silva, J. B. Almeida e Silva, A. I. N. Solenzal and M. G. A. Felipe. 2003. The influence of pH and dilution rate on continuous production of xylitol from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *C. guilliermondii*. **Process Biochem.** 38: 1677–1683.
- Mayerhoff, Z. D. V. L. , I. C. Roberto and S. S. Silva. 1997. Xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate using different yeast strains. **Biotechnol. Lett.** 19(5): 407–409.
- Meyrial, V. , J. P. Delgenes, R. Moletta and J. M. Navarro. 1991. Xylitol production from D-xylose by *Candida guilliermondii*: fermentation behaviour. **Biotechnol. Lett.** 13(4): 281–286.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31: 426–428.
- Mussatto, S. I. and I. C. Roberto. 2003. Xylitol production from high xylose concentration: evaluation of the fermentation in bioreactor under different stirring rates. **J. Appl. Microbiol.** 95: 331–337.
- and ———. 2004. Kinetic behavior of *Candida guilliermondii* yeast during xylitol production from highly concentrated hydrolysate. **Process Biochem.** 39: 1433–1439.
- , C. J. S. M. Silva and I. C. Roberto. 2006. Fermentation performance of *Candida guilliermondii* for xylitol production on single and mixed substrate media. **Appl Microbiol. Biotechnol.** 72: 681–686.

- Nakano, K. , R. Katsu, K. Tada and M. Matsumura. 2000. Production of highly concentrated xylitol by *Candida magnoliae* under a microaerobic condition maintained by simple fuzzy control. **J. Biosci. Bioeng.** 89(4): 372-376.
- Parajó, J. C. H. Dominguez and J. M. Dominguez. 1998. Biotechnological production of xylitol: Part 3 Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresour. Technol.** 66: 25-40.
- Prakasham, R. S. , R. S. Rao and P. J. Hobbs. 2009. Current trends in biotechnological production of xylitol and future prospects. **Curr. Trends. Biotechnol. Pharm.** 3(1): 8-36.
- Preziosi-Belloy, L. , V. Nolleau and J. M. Navarro. 2000. Xylitol production from aspenwood hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **Biotechnol. Lett.** 22: 239-243.
- Rodrigues, D. C. G. A. , S. S. Silva and M. G. A. Felipe. 1999. Fed-batch culture of *Candida guilliermondii* FTI 20037 for xylitol production from sugar cane bagasse hydrolysate. **Let. Appl. Microbiol.** 29: 359-363.
- Rodrigues, R. C. L. B. , L. Sene, G. S. Matos, I. C. Roberto, A. Pessoa Jr. and M. G. A. Felipe. 2006. Enhanced xylitol production by precultivation of *Candida guilliermondii* cells in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. **Curr. Microbiol.** 53: 53-59.
- \_\_\_\_\_, M. G. A. Felipe, I. C. Roberto and M. Vitolo. 2003. Batch xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate at controlled pH values. **Bioproc. Biosyst. Eng.** 26: 103-107.
- Saha, B. C. and R. J. Bothast. 1999. Production of xylitol by *Candida peltata*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 22: 633-636.

- Sanchez, S. , V. Bravo, J. F. Garcia, N. Cruz and M. Cuevas. 2008. Fermentation of D-glucose and D-xylose mixtures by *Candida tropicalis* NBRC 0618 for xylitol production. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 24: 709–716
- Santos, D. T. , B. F. Sarrouh, J. D. Rivaldia, A. Converti and S. S. Silva. 2008. Use of sugarcane bagasse as biomaterial for cell immobilization for xylitol production. **J. Food Eng.** 86: 542–548.
- Santos, J. C. , A. Converti, W. Carvalho, S. I. Mussatto and S. S. Silva. 2005a. Influence of aeration rate and carrier concentration on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolyzate in immobilized-cell fluidized bed reactor. **Process Biochem.** 40: 113–118.
- , S. I. Mussatto, G. Dragone, A. Converti and S. S. Silva. 2005b. Evaluation of porous glass and zeolite as cells carriers for xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate. **Biochem. Eng. J.** 23: 1–9.
- , ———, M. A. A. Cunha and S. S. Silva. 2005c. Variables that affect xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate in a zeolite fluidized bed reactor. **Biotechnol. Prog.** 21: 1639-1643.
- , S. S. Silva, S. I. Mussatto, W. Carvalho and M. A. A. Cunha. 2005d. Immobilized cells cultivated in semi-continuous mode in a fluidized bed reactor for xylitol production from sugarcane bagasse. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 21: 531–535.
- Sheu, D. C. , K. J. Duan, S. R. Jou, Y. C. Chen and C. W. Chen. 2003. Production of xylitol from *Candida tropicalis* by using an oxidation-reduction potential-stat controlled fermentation. **Biotechnol. Lett.** 25: 2065–2069.
- Silva, C. J. S. M. , S. I. Mussatto and I. C. Roberto. 2006. Study of xylitol production by *Candida guilliermondii* on a bench bioreactor. **J. Food Eng.** 75: 115–119.

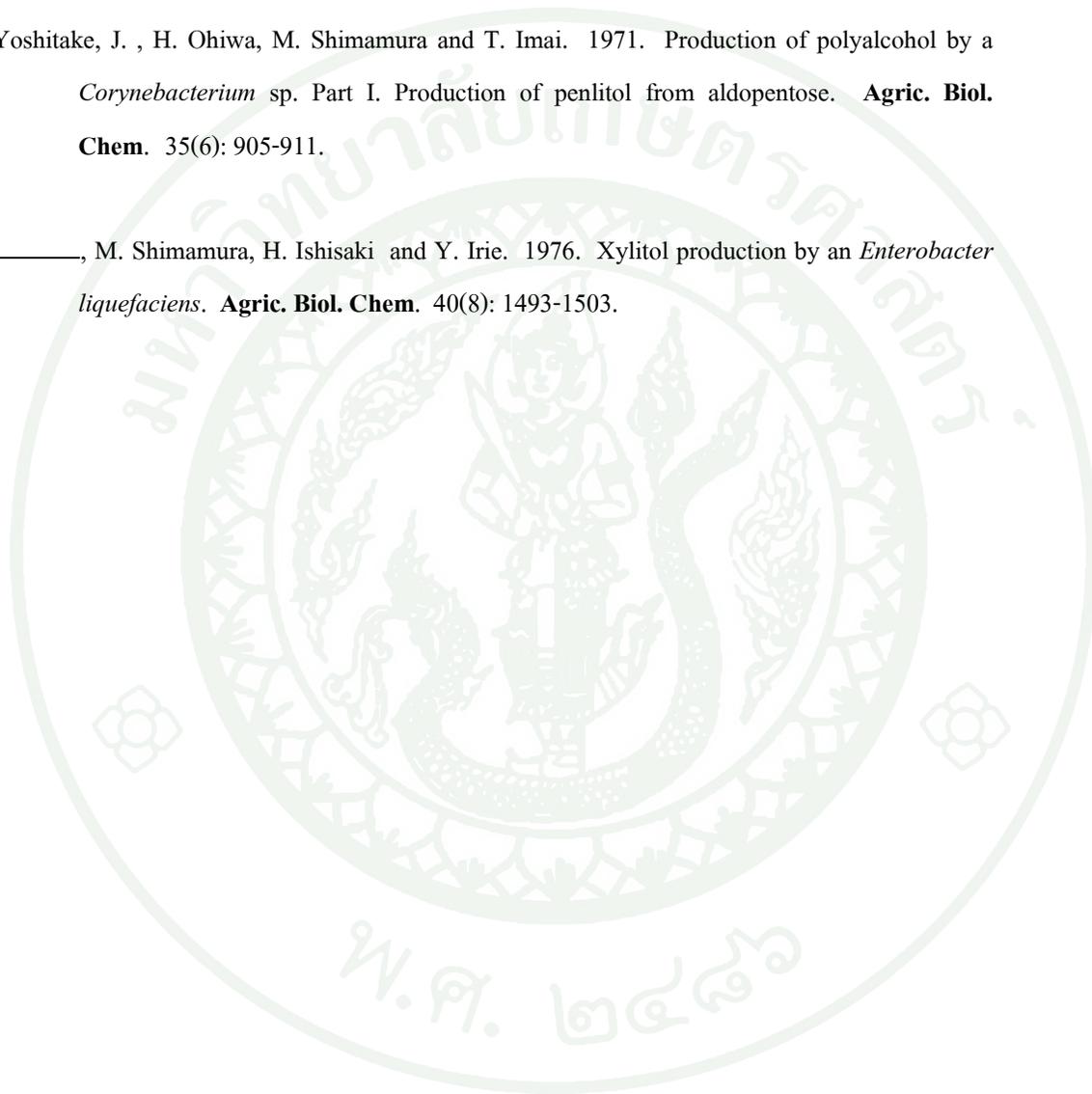
- Silva, C. J. S. M. and I. C. Roberto. 2001a. Improvement of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 previously adapted to rice straw hemicellulosic hydrolysate. **Lett. Appl. Microbiol.** 32: 248-252.
- \_\_\_\_\_ and I. C. Roberto. 2001b. Optimization of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 using response surface methodology. **Process Biochem.** 36: 1119-1124.
- Silva, S. S. , S. I. Mussatto, J. C. Santos, D. T. Santos and J. Polizel. 2007. Cell immobilization and xylitol production using sugarcane bagasse as raw material. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 141: 215-228.
- \_\_\_\_\_, I. C. Roberto, M. G. A. Felipe and I. M. Mancilha. 1996. Batch fermentation of xylose for xylitol production in stirred tank bioreactor. **Process Biochem.** 31(6): 549-553.
- \_\_\_\_\_, 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. Rizzi and M. Reuss. 1992. Microbiol production of xylitol from wheat straw hydrolysates. **DECHEMA Biotechnology Conference.** 5(B): 541-544.
- \_\_\_\_\_, M. Staniszewski and M. Rizzi. 1995. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose. **J. Ferment. Bioeng.** 80: 565-570.
- Tada, K. , J. Horiuchi, T. Kanno and M. Kobayashi. 2004. Microbial xylitol production from corn cobs using *Candida magnoliae*. **J. Biosci. Bioeng.** 98(3): 228-230.

- Tamburini, E. , E. Bianchini, A. Bruni and G. Forlani. 2010. Cosubstrate effect on xylose reductase and xylitol dehydrogenase activity levels, and its consequence on xylitol production by *Candida tropicalis*. **Enzyme Microb. Technol.** 46: 352–359.
- Tochampa, W. , S. Sirisansaneeyakul, W. Vanichsriratana, P. Srinophakun, H. H. C. Bakker and Y. Chisti. 2005. A model of xylitol production by the yeast *Candida mogii*. **Bioproc. Biosys. Eng.** 28: 175–183.
- Vandeska, E. , S. Amartei, S. Kuzmanovat and T. W. Jeffries. 1996. Fed-batch culture for xylitol production by *Candida boidinii*. **Process Biochem.** 31(3): 265-270.
- Vongsuvanlert, V. and S. Tani. 1989. Xylitol production by methanol yeast, *Candida boidinii* (*Kloeckera* sp.) NO 2201. **J. Ferm. Bioeng.** 67(1): 35-39.
- Walther, T. , P. Hensirisak and F. A. Agblevor. 2001. The influence of aeration and hemicellulosic sugars on xylitol production by *Candida tropicalis*. **Bioresour. Technol.** 76: 213-220.
- Winkelhausen, E. and S. Kuzmanova. 1998. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. **J. Ferment. Bioeng.** 86(1): 1-14.
- , R. J. Malinowska, S. Kuzmanova, M. Cvetkovska and C. Tsvetanov. 2008. Hydrogels based on u.v.-crosslinked poly (ethylene oxide)–matrices for immobilization of *Candida boidinii* cells for xylitol production. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 24: 2035–2043.
- Yahashi, Y. , H. Horitsu, K. Kawai, T. Suzuki and K. Takamizawa. 1996. Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: the effect of D-glucose feeding. **J. Ferment. Bioeng.** 81(2): 148-152.

Yoshitake, J. , H. Ishisaki, M. Shimamura and T. Imai. 1973. Xylitol production by an *Enterobacter* sp.. **Agric. Biol. Chem.** 37(10): 2261-2267.

Yoshitake, J. , H. Ohiwa, M. Shimamura and T. Imai. 1971. Production of polyalcohol by a *Corynebacterium* sp. Part I. Production of penlitol from aldopentose. **Agric. Biol. Chem.** 35(6): 905-911.

———, M. Shimamura, H. Ishisaki and Y. Irie. 1976. Xylitol production by an *Enterobacter liquefaciens*. **Agric. Biol. Chem.** 40(8): 1493-1503.





ภาคผนวก



**ตารางผนวกที่ ก1** ผลการทดลองการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *C. mogii* จากการเพาะเลี้ยงในระดับ  
 ฟลาस्कที่สภาวะพีเอชเริ่มต้น 4.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250  
 รอบต่อนาที (ภาพที่ 15)

เวลา (ชั่วโมง)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	9.524	5.654	0.002	0.783
3	9.116	5.805	0.075	1.167
6	7.850	5.865	0.335	1.417
9	4.861	5.674	0.614	1.683
12	0.495	5.575	0.842	3.733
15	0.235	5.427	0.597	3.583
18	0.233	5.116	0.082	3.533
21	0.206	4.393	0.050	3.817
23	0.184	4.442	0.048	3.817
25	0.242	4.102	0.051	3.550
27	0.182	3.852	0.054	4.267
30	0.124	3.428	0.057	4.367
33	0.157	2.959	0.058	4.683
36	0.000	2.499	0.061	4.900
39		2.133	0.059	4.817
42		1.740	0.057	5.200
45		1.462	0.054	5.783
48		1.164	0.051	5.700
51		0.891	0.048	6.483
54		0.680	0.045	6.400
57		0.508	0.044	6.617
60		0.352	0.044	6.050
63		0.265	0.044	6.867
66		0.193	0.040	7.100
69		0.124	0.041	7.733

**ตารางผนวกที่ ก2** ผลการทดลองการผลิตไซลิทอลจากไซโลสโดยเชื้อยีสต์ *C. mogii* ในระดับ  
 ฟลาสก์ที่สภาวะพีเอชเริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100  
 รอบต่อนาที (ภาพที่ 16A)

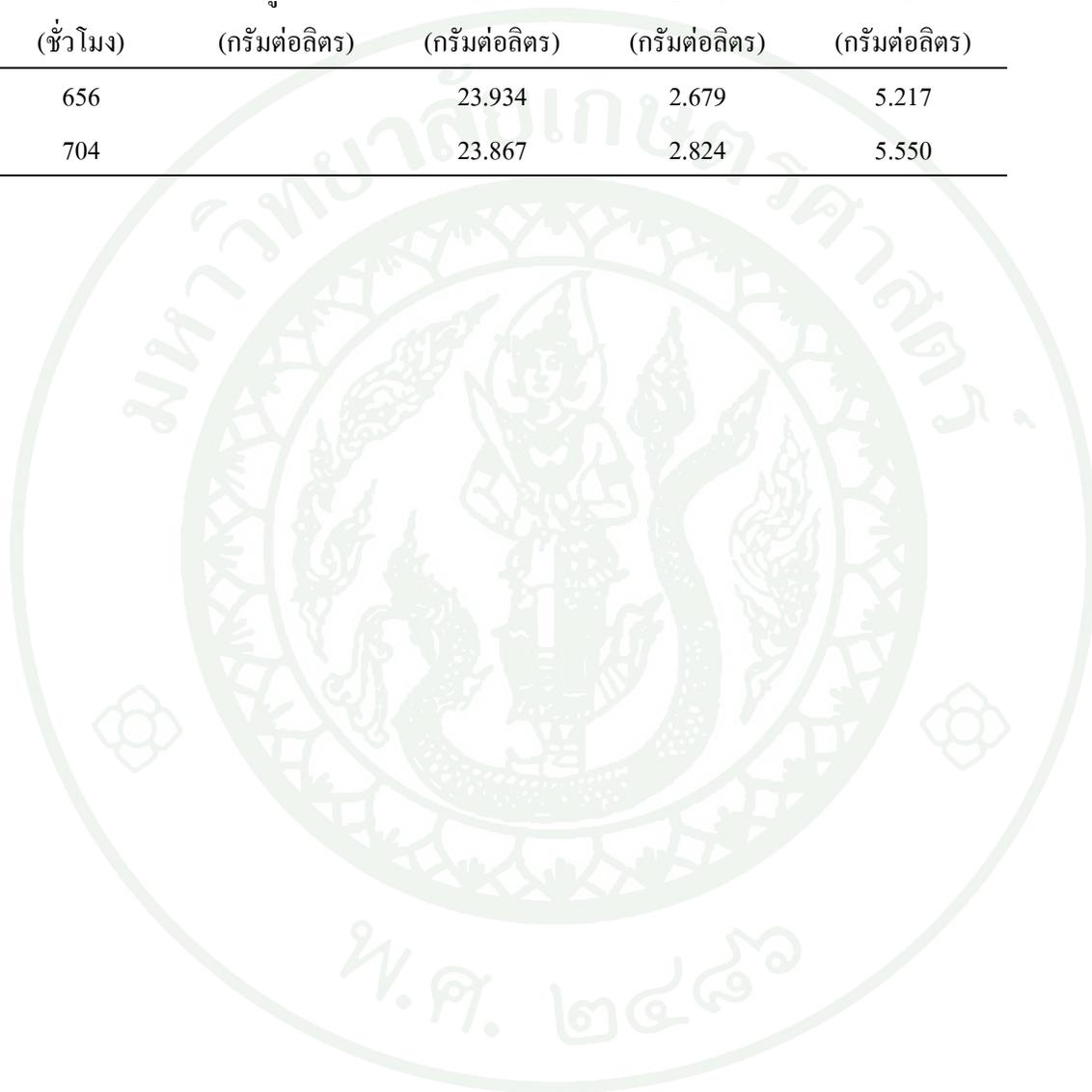
เวลา (ชั่วโมง)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	9.057	5.267	-0.018	0.483
6	7.940	5.310	0.188	0.633
12	1.549	5.214	0.700	2.250
18	0.325	4.776	0.049	2.750
24	0.129	3.884	0.040	3.583
30	0.065	2.987	0.049	4.267
36	0.023	2.176	0.055	4.700
42	0.000	1.458	0.047	5.100
48.75		0.799	0.044	5.783
54		0.518	0.040	6.400
60		0.258	0.040	6.183
66		0.154	0.039	6.950
72		0.106	0.037	7.017
72		33.356	0.094	4.567
76.5		33.450	0.150	4.967
79.5		31.833	0.176	4.567
88		33.185	0.372	4.483
92		27.888	0.429	4.317
96		32.457	0.500	4.050
100		30.617	0.663	4.067
106		31.823	0.722	4.117
112		29.727	0.850	4.050
118		26.674	0.774	3.933
124		30.681	1.016	4.500

## ตารางผนวกที่ ก2 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิตอล (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักรีดแห้ง (กรัมต่อลิตร)
130		32.804	1.010	4.133
142.5		30.601	1.134	4.200
154		31.370	1.138	3.700
166.5		29.861	1.290	4.050
178		31.394	1.248	3.750
190.5		30.198	1.301	3.717
202		31.268	1.240	3.667
214.5		30.190	1.310	3.867
226		30.380	1.218	3.900
238.5		30.071	1.348	3.750
250		29.624	1.180	4.317
262.5		29.803	1.348	3.983
272		31.267	1.244	4.050
296		29.717	1.409	3.817
320		30.422	1.419	3.850
344		30.328	1.529	3.833
368		28.462	1.574	4.367
392		29.938	1.705	4.283
416		29.256	1.917	4.250
435		27.386	2.085	4.450
464		27.855	2.149	4.617
488		25.865	2.269	4.617
512		28.312	2.416	4.867
536		27.741	2.435	5.017
560		27.042	2.374	4.883
608		25.621	2.595	5.467

## ตารางผนวกที่ ก2 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิตอล (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
656		23.934	2.679	5.217
704		23.867	2.824	5.550



**ตารางผนวกที่ ก3** ผลการทดลองการผลิตไซลิทอลจากสับสเตรตร่วมกลูโคสและไซโลสโดยเชื้อยีสต์ *C. mogii* ในระดับพลาสติกที่สภาวะพีเอชเริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที (ภาพที่ 16B)

เวลา (ชั่วโมง)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	9.033	5.241	0.000	0.400
6	7.937	5.254	0.199	0.967
12	1.299	5.156	0.720	2.433
18	0.262	4.658	0.058	2.967
24	0.218	3.867	0.046	3.483
30	0.013	2.853	0.051	3.950
36	0.000	2.150	0.052	4.733
42		1.449	0.049	4.917
48.75		0.803	0.046	5.650
54		0.526	0.043	5.833
60		0.283	0.041	5.983
66		0.138	0.037	6.717
72		0.093	0.040	6.650
72	3.135	33.338	0.073	4.367
76.5	2.272	33.248	0.194	4.950
79.5	0.738	33.056	0.434	4.683
88	0.757	32.673	0.963	4.517
92	0.605	31.598	1.170	5.133
96	0.288	31.280	1.306	4.267
100	0.162	31.406	1.500	4.250
106	0.025	31.134	1.619	4.250
112	0.000	28.197	1.662	4.300
118		31.043	1.964	4.150

## ตารางผนวกที่ ก3 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิตอล (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักรีดแห้ง (กรัมต่อลิตร)
124		30.701	2.028	4.633
130		30.765	2.088	4.767
142.5		30.625	2.278	4.533
154		30.355	2.241	4.017
166.5		30.189	2.426	4.233
178		29.854	2.381	3.833
190.5		30.010	2.509	3.817
202		28.971	2.424	4.017
214.5		27.571	2.446	3.967
226		28.256	2.414	3.867
238.5		28.932	2.344	3.950
250		28.708	2.415	4.267
262.5		29.550	2.321	4.167
272		29.488	2.365	4.383
296		29.723	2.381	3.967
320		28.809	2.401	4.033
344		29.301	2.330	4.050
368		28.798	2.494	4.600
392		28.738	2.348	4.733
416		27.996	2.495	4.633
435		27.488	2.431	4.633
464		29.009	2.625	4.717
488		28.679	2.598	4.417
512		29.212	2.661	5.100
536		28.134	2.709	5.017

## ตารางผนวกที่ ก3 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิตอล (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
560		26.285	2.722	4.933
608		25.584	2.918	4.917
656		25.326	3.088	4.950
704		26.017	3.401	5.183

**ตารางผนวกที่ ก4** ผลการทดลองการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* จากการเพาะเลี้ยงในระดับพลาสติกที่สภาวะพีเอช 4.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที (ภาพที่ 17A)

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโทส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
0	0.067	8.373	5.269	0.138
3	0.500	9.348	5.377	0.152
6	0.833	7.155	5.343	0.205
9	1.367	2.751	5.205	0.301
12	1.433	0.513	4.230	0.314
15	1.633	0.243	3.089	0.372
18	2.013	0.096	2.209	0.396
21	1.900	0.000	1.450	0.375
24	1.867	0.000	0.956	0.359
27	1.902	0.000	0.536	0.345

ตารางผนวกที่ ก5 ผลการทดลองการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* จากการเพาะเลี้ยงในระดับพลาสติกที่สภาวะพีเอช 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 250 รอบต่อนาที (ภาพที่ 17B)

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิตอล (กรัมต่อลิตร)
0	0.400	10.213	5.286	0.154
3	0.300	9.834	5.407	0.156
6	0.967	8.093	5.407	0.231
9	1.367	4.203	5.185	0.388
12	1.533	1.837	4.486	0.458
15	1.600	0.431	4.006	0.501
18	1.800	0.408	3.295	0.541
21	2.167	0.223	2.868	0.527
24	2.167	0.165	2.459	0.514
27	2.433	0.204	1.817	0.522

ตารางผนวกที่ 6 ผลการทดลองการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* ในระดับพลาสติกที่  
สภาวะพีเอช 4 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที  
(ภาพที่ 18A)

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
0	0.467	10.275	5.098	0.111
4	0.700	9.888	5.153	0.132
8	0.733	7.627	5.004	0.221
12	0.867	4.348	4.896	0.345
16	0.933	0.657	4.535	0.406
20	1.100	0.000	3.674	0.420
24	1.167		2.665	0.412
28	1.267		1.864	0.402
32	1.367		1.241	0.375
32	1.033	7.467	31.523	0.734
38	1.033	4.110	30.978	1.340
44	1.000	3.327	29.704	2.713
50	1.033	3.357	28.404	3.654
56	0.900	2.694	27.222	4.149
72	0.800	1.967	26.526	4.819
82	0.900	2.843	25.922	5.074
94	1.167	2.331	25.286	5.266
106	1.070	2.437	24.121	5.505
120	0.954	2.408	23.726	5.633
130	0.867	2.500	22.484	5.936
144	0.767	1.941	22.590	6.335
168	0.800	1.671	21.106	6.559
192	1.700	0.807	19.939	6.734

## ตารางผนวกที่ 6 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิตอล (กรัมต่อลิตร)
216	1.200	1.435	18.557	6.968
240	0.767	0.934	17.682	7.016
264	0.750	0.790	16.844	7.121
288	0.850	0.000	16.136	7.532
312	0.750		14.810	7.879
336	0.700		13.515	7.916
370	0.750		11.506	7.979
408	0.900		10.002	8.309
442	1.200		8.506	8.027
480	1.350		6.686	8.282

ตารางผนวกที่ ๓7 ผลการทดลองการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* ในระดับพลาสติกที่  
 สภาวะพีเอช 7 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที  
 (ภาพที่ 18B)

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
0	0.400	10.232	5.070	0.116
4	0.367	10.388	5.308	0.136
8	0.567	8.517	5.001	0.225
12	0.633	6.011	4.957	0.354
16	0.700	2.446	4.650	0.429
20	0.933	0.256	4.230	0.456
24	1.100	0.057	3.390	0.462
28	1.167	0.000	2.496	0.449
32	1.300		1.730	0.421
32	0.900	8.517	31.635	0.545
38	1.100	5.791	28.688	2.128
44	1.067	4.547	27.463	4.215
50	0.967	3.604	25.989	5.505
56	0.933	3.200	24.867	6.064
72	0.967	2.398	23.480	6.902
82	1.133	2.626	22.845	7.367
94	1.167	2.254	22.071	8.005
106	0.900	2.853	21.473	8.551
120	1.133	2.255	20.671	9.043
130	1.133	2.373	19.510	9.322
144	1.067	1.645	19.398	10.266
168	1.100	0.178	17.245	10.915
192	1.767	0.576	15.271	11.537

## ตารางผนวกที่ ก7 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิตอล (กรัมต่อลิตร)
216	1.300	0.071	13.929	11.905
240	1.233	0.000	12.386	12.429
264	1.250		11.347	12.837
288	0.900		10.094	12.916
312	0.850		9.136	14.337
336	1.050		8.201	15.283
370	1.200		6.579	14.890
408	1.700		4.882	15.204
442	2.150		3.102	14.457
480	2.200		1.617	14.314

**ตารางผนวกที่ ๘** ผลการทดลองการเจริญเติบโตและการผลิตไซลิทอลโดยเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* ระดับถังหมัก ที่สภาวะพีเอช 4.0 ออกซิเจนละลาย 70 - 80% ของออกซิเจนอิ่มตัว และพีเอช 7.0 อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm ตามลำดับ (ภาพที่ 19)

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
0	0.883	10.184	4.953	0.118
2	1.162	9.708	4.948	0.134
4	2.494	7.482	4.983	0.136
6	4.536	1.993	4.256	0.243
8	5.755	0.000	0.802	0.084
9	5.379		0.026	0.085
9	5.375	2.454	25.534	0.614
10	6.166	0.722	25.804	1.409
11	6.525	0.135	24.367	2.259
12	6.553	0.000	21.477	3.496
13	7.264		19.541	4.747
14	7.560		16.407	5.384
15	8.423		15.018	6.484
16	8.523		12.756	7.964
17	9.069		9.671	8.846
18	9.537		7.957	10.117
19	9.817		5.754	11.549
20	9.568		3.829	11.833
21	9.587		2.817	12.376

ตารางผนวกที่ ๑๑ ค่า  $k_{La}$  เฉลี่ยจากการทดลอง 3 ชั่วโมงในน้ำกลั่นที่อัตราการกวน ( $N$ ) 100 ถึง 1000 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) 0.2 ถึง 2.0 vvm (ภาพที่ 20 และ 21)

$N$ (รอบต่อนาที)	$k_{La}$ (ต่อชั่วโมง)				
	$Q = 0.2$ vvm	$Q = 0.5$ vvm	$Q = 1.0$ vvm	$Q = 1.5$ vvm	$Q = 2.0$ vvm
100	$5.29 \pm 0.25$	$7.92 \pm 1.10$	$14.10 \pm 2.00$	$20.45 \pm 0.73$	$28.48 \pm 0.82$
200	$7.55 \pm 0.29$	$11.59 \pm 1.02$	$23.11 \pm 2.31$	$25.24 \pm 1.68$	$30.04 \pm 1.21$
300	$10.22 \pm 0.39$	$16.11 \pm 1.89$	$30.83 \pm 6.68$	$36.78 \pm 4.55$	$45.27 \pm 7.54$
400	$13.54 \pm 0.24$	$18.00 \pm 2.43$	$46.34 \pm 2.25$	$55.32 \pm 0.48$	$56.79 \pm 0.27$
500	$20.06 \pm 1.70$	$31.12 \pm 1.09$	$60.16 \pm 1.42$	$67.75 \pm 1.87$	$72.50 \pm 0.99$
600	$32.99 \pm 0.37$	$41.80 \pm 1.53$	$76.06 \pm 3.14$	$91.27 \pm 1.76$	$93.25 \pm 1.15$
700	$48.23 \pm 0.13$	$57.62 \pm 1.88$	$94.45 \pm 2.26$	$112.77 \pm 1.68$	$113.55 \pm 0.39$
800	$52.84 \pm 1.15$	$66.73 \pm 3.59$	$108.42 \pm 1.29$	$128.67 \pm 4.93$	$130.45 \pm 2.49$
900	$39.69 \pm 1.38$	$61.21 \pm 4.43$	$118.67 \pm 2.78$	$140.35 \pm 1.89$	$145.49 \pm 1.64$
1000	$30.68 \pm 2.64$	$46.95 \pm 8.31$	$128.69 \pm 5.16$	$149.55 \pm 3.19$	$157.53 \pm 0.42$

ตารางผนวกที่ ก10 ค่า  $k_{La}$  เฉลี่ยจากการทดลอง 3 ชั่วโมงในน้ำกลั่นที่อัตราการกวน ( $N$ ) 100 ถึง 800 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) 0.2 ถึง 2.0 vvm (ชุดที่ 1)

$N$ (รอบต่อนาที)	$k_{La}$ (ต่อชั่วโมง)				
	$Q = 0.2$ vvm	$Q = 0.5$ vvm	$Q = 1.0$ vvm	$Q = 1.5$ vvm	$Q = 2.0$ vvm
100	$5.29 \pm 0.25$	$7.92 \pm 1.10$	$14.10 \pm 2.00$	$20.45 \pm 0.73$	$28.48 \pm 0.82$
200	$7.55 \pm 0.29$	$11.59 \pm 1.02$	$23.11 \pm 2.31$	$25.24 \pm 1.68$	$30.04 \pm 1.21$
300	$10.22 \pm 0.39$	$16.11 \pm 1.89$	$30.83 \pm 6.68$	$36.78 \pm 4.55$	$45.27 \pm 7.54$
400	$13.54 \pm 0.24$	$18.00 \pm 2.43$	$46.34 \pm 2.25$	$55.32 \pm 0.48$	$56.79 \pm 0.27$
500	$20.06 \pm 1.70$	$31.12 \pm 1.09$	$60.16 \pm 1.42$	$67.75 \pm 1.87$	$72.50 \pm 0.99$
600	$32.99 \pm 0.37$	$41.80 \pm 1.53$	$76.06 \pm 3.14$	$91.27 \pm 1.76$	$93.25 \pm 1.15$
700	$48.23 \pm 0.13$	$57.62 \pm 1.88$	$94.45 \pm 2.26$	$112.77 \pm 1.68$	$113.55 \pm 0.39$
800	$52.84 \pm 1.15$	$66.73 \pm 3.59$	$108.42 \pm 1.29$	$128.67 \pm 4.93$	$130.45 \pm 2.49$

**ตารางผนวกที่ ก11** ค่า  $k_{La}$  เฉลี่ยจากการทดลอง 3 ชั่วโมงในน้ำกลั่นที่อัตราการกวน ( $N$ ) 150 ถึง 750 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) 0.35 ถึง 1.75 vvm (ชุดที่ 2)

$N$ (รอบต่อนาที)	$k_{La}$ (ต่อชั่วโมง)			
	$Q = 0.35$ vvm	$Q = 0.75$ vvm	$Q = 1.25$ vvm	$Q = 1.75$ vvm
150	10.06 ± 0.18	15.86 ± 0.19	21.84 ± 0.35	31.59 ± 0.40
250	12.55 ± 0.16	22.72 ± 0.73	34.43 ± 0.77	43.36 ± 2.11
350	18.11 ± 0.43	29.61 ± 0.53	43.39 ± 1.13	54.25 ± 2.54
450	26.41 ± 0.31	40.42 ± 0.79	52.92 ± 1.10	64.59 ± 0.29
550	41.00 ± 0.19	57.59 ± 1.77	68.80 ± 2.30	83.41 ± 0.35
650	59.24 ± 1.54	72.99 ± 1.82	87.78 ± 2.32	93.44 ± 1.25
750	73.94 ± 0.55	88.85 ± 0.66	103.38 ± 0.43	116.43 ± 0.70

ตารางผนวกที่ ก12 ค่า  $k_L a$  จากการคำนวณจากสมการที่ 28a โดยใช้สมการ  $b_{111}$ ,  $b_{112}$  และ  $b_{113}$  ในน้ำกลั่น (ชุดที่ 1)

N (รอบต่อนาที)	$k_L a$ (ต่อชั่วโมง)														
	Q = 0.2 vvm			Q = 0.5 vvm			Q = 1.0 vvm			Q = 1.5 vvm			Q = 2.0 vvm		
	$b_{111}$	$b_{112}$	$b_{113}$	$b_{111}$	$b_{112}$	$b_{113}$	$b_{111}$	$b_{112}$	$b_{113}$	$b_{111}$	$b_{112}$	$b_{113}$	$b_{111}$	$b_{112}$	$b_{113}$
100	-2.73	-0.98	-2.24	1.73	2.42	2.83	7.30	6.22	6.11	12.04	9.19	9.35	16.38	11.75	18.67
200	4.25	6.00	4.74	11.60	12.29	12.70	20.13	19.05	18.94	27.00	24.14	24.30	33.05	28.42	35.34
300	11.23	12.99	11.72	21.47	22.16	22.57	32.96	31.88	31.77	41.95	39.10	39.26	49.72	45.10	52.02
400	18.21	19.97	18.70	31.34	32.03	32.45	45.79	44.71	44.60	56.91	54.05	54.21	66.40	61.77	68.69
500	25.19	26.95	25.69	41.22	41.91	42.32	58.62	57.54	57.43	71.87	69.01	69.17	83.07	78.44	85.36
600	32.18	33.93	32.67	51.09	51.78	52.19	71.45	70.37	70.26	86.82	83.97	84.13	99.75	95.12	102.04
700	39.16	40.91	39.65	60.96	61.65	62.06	84.28	83.20	83.09	101.78	98.92	99.08	116.42	111.79	118.71
800	46.14	47.89	46.63	70.83	71.52	71.93	97.11	96.03	95.92	116.73	113.88	114.04	133.10	128.47	135.39

หมายเหตุ สมการที่ 28a:  $\frac{k_L a - b_{11}}{N} = 0.1283Q^{0.3781}$  โดย  $b_{111} = 5.2305Q - 10.759$ ,  $b_{112} = 1.6842Q - 8.2953$  และ  $b_{113} = 7.5917Q^3 - 21.187Q^2 + 19.134Q -$

12.261 เมื่อ  $N$  หมายถึงอัตราการกวน (รอบต่อนาที) และ  $Q$  หมายถึงอัตราการให้อากาศ (vvm) และ  $b_{ij}$  ( $b_{11}$ ) หมายถึงสมการประมาณค่าจุดตัดบนแกน  $y$  จากความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง  $k_L a$  กับ  $N$  ( $j=1$ ) ในน้ำกลั่น ( $i=1$ ) โดยที่ 1, 2, 3 หมายถึงแบบชนิดของสมการประมาณค่า  $b_{1j}$  ที่แตกต่างกัน 3 สมการ

ตารางผนวกที่ ก13 ค่า  $k_L a$  จากการคำนวณจากสมการที่ 29a ในน้ำกลั่น (ชุดที่ 1)

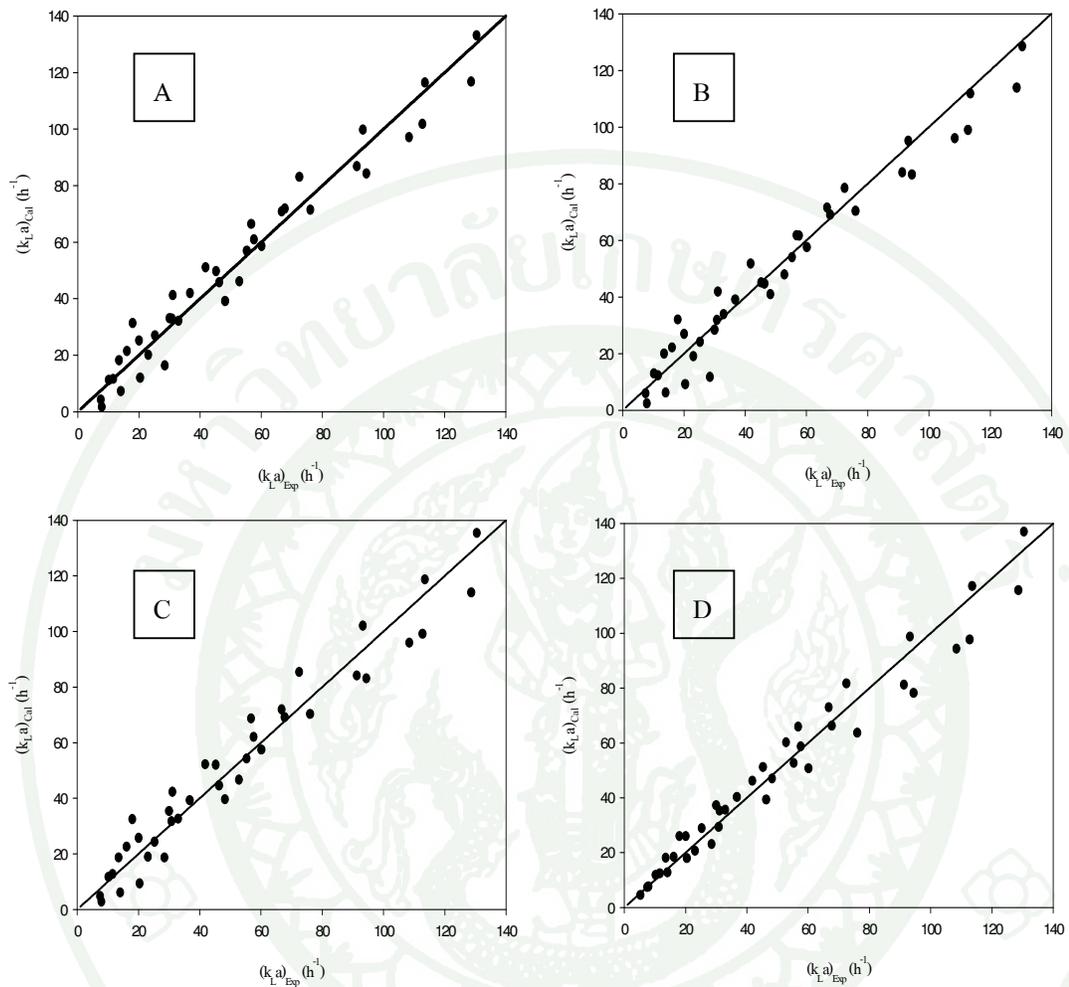
N (รอบต่อนาที)	$k_L a$ (ต่อชั่วโมง)				
	Q = 0.2 vvm	Q = 0.5 vvm	Q = 1.0 vvm	Q = 1.5 vvm	Q = 2.0 vvm
100	4.58	7.67	12.82	17.97	23.12
200	7.45	12.42	20.69	28.96	37.23
300	11.93	18.48	29.39	40.30	51.22
400	18.10	26.07	39.36	52.64	65.93
500	25.99	35.28	50.76	66.23	81.71
600	35.64	46.16	63.69	81.22	98.75
700	47.04	58.72	78.20	97.68	117.16
800	60.20	73.01	94.35	115.69	137.03

หมายเหตุ สมการที่ 29a:  $\frac{k_L a - b_{12}}{Q} = 0.4417N^{0.6838}$  โดย  $b_{12} = 0.00009N^2 - 0.0108N + 2.7045$

เมื่อ N หมายถึงอัตราการกวน (รอบต่อนาที) และ Q หมายถึงอัตราการให้อากาศ (vvm)

และ  $b_{ij}$  ( $b_{12}$ ) หมายถึงสมการประมาณค่าจุดตัดบนแกน y จากความสัมพันธ์เชิงเส้น

ระหว่าง  $k_L a$  กับ Q ( $j=2$ ) ในน้ำกลั่น ( $i=1$ )



ภาพผนวกที่ ๑ การเปรียบเทียบค่า  $k_L a$  ระหว่างการทดลอง  $(k_L a)_{Exp}$  และการคำนวณ  $(k_L a)_{Cal}$  ใน

น้ำกลั่น (ชุดที่ 1) จำนวนจากสมการ  $\frac{k_L a - b}{N} = 0.1283Q^{0.3781}$  เมื่อ (A)  $b_{111} =$

$5.2305Q - 10.759$ ; (B)  $b_{112} = 1.6842Q - 8.2953$  และ (C)  $b_{113} = 7.5917Q^3 -$

$21.187Q^2 + 19.134Q - 12.261$  และ (D) จำนวนจาก  $\frac{k_L a - b}{Q} = 0.4417N^{0.6838}$

เมื่อ  $b_{12} = 0.00009N^2 - 0.0108N + 2.7045$

ตารางผนวกที่ ก14 ค่า  $k_L a$  จากการคำนวณจากสมการที่ 28a โดยใช้สมการ  $b_{111}$ ,  $b_{112}$  และ  $b_{113}$  ในน้ำกลั่น (ชุดที่ 2)

N (รอบต่อนาที)	$k_L a$ (ต่อชั่วโมง)											
	Q = 0.35 vvm			Q = 0.75 vvm			Q = 1.25 vvm			Q = 1.75 vvm		
	$b_{111}$	$b_{112}$	$b_{113}$	$b_{111}$	$b_{112}$	$b_{113}$	$b_{111}$	$b_{112}$	$b_{113}$	$b_{111}$	$b_{112}$	$b_{113}$
150	4.01	5.23	5.11	10.43	10.23	10.64	16.72	14.75	14.32	22.17	18.43	20.81
250	12.64	13.86	13.73	21.93	21.74	22.14	30.68	28.71	28.28	38.03	34.29	36.66
350	21.26	22.49	22.36	33.44	33.24	33.65	44.64	42.67	42.24	53.88	50.14	52.51
450	29.89	31.11	30.99	44.95	44.75	45.16	58.60	56.63	56.20	69.73	65.99	68.36
550	38.52	39.74	39.61	56.46	56.26	56.67	72.56	70.59	70.16	85.59	81.85	84.22
650	47.14	48.37	48.24	67.96	67.77	68.17	86.52	84.55	84.12	101.44	97.70	100.07
750	55.77	56.99	56.87	79.47	79.28	79.68	100.48	98.51	98.08	117.29	113.55	115.92

หมายเหตุ สมการที่ 28a:  $\frac{k_L a - b_{11}}{N} = 0.1283Q^{0.3781}$  โดย  $b_{111} = 5.2305Q - 10.759$ ,  $b_{112} = 1.6842Q - 8.2953$  และ  $b_{113} = 7.5917Q^3 - 21.187Q^2 + 19.134Q -$

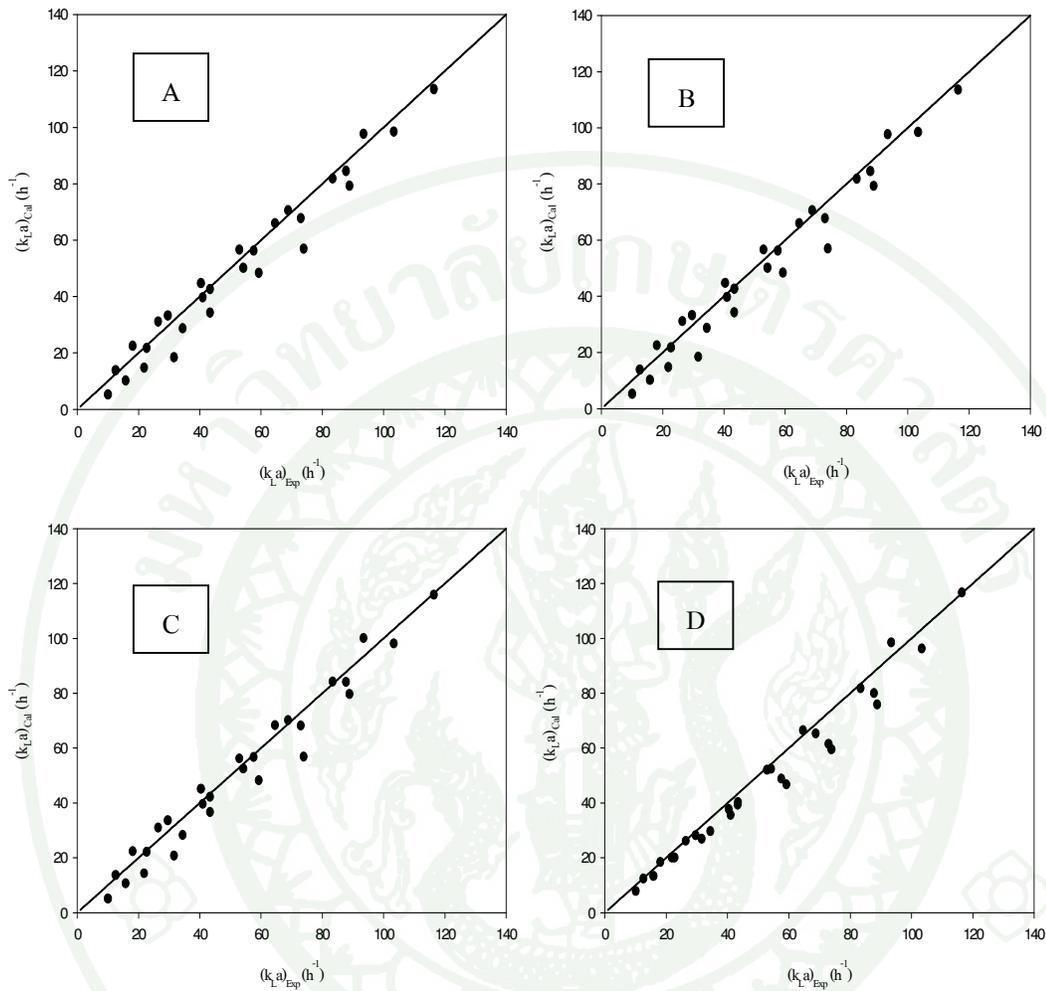
12.261 เมื่อ  $N$  หมายถึงอัตราการกวน (รอบต่อนาที) และ  $Q$  หมายถึงอัตราการให้อากาศ (vvm) และ  $b_{ij}$  ( $b_{11}$ ) หมายถึงสมการประมาณค่าจุดตัดบนแกน  $y$  จากความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง  $k_L a$  กับ  $N$  ( $j=1$ ) ในน้ำกลั่น ( $i=1$ ) โดยที่ 1, 2, 3 หมายถึงแบบชนิดของสมการประมาณค่า  $b_{11}$  ที่แตกต่างกัน 3 สมการ

ตารางผนวกที่ ก15 ค่า  $k_L a$  จากการคำนวณจากสมการที่ 29a ในน้ำกลั่น (ชุดที่ 2)

N (รอบต่อนาที)	$k_L a$ (ต่อชั่วโมง)			
	$Q = 0.35$ vvm	$Q = 0.75$ vvm	$Q = 1.25$ vvm	$Q = 1.75$ vvm
150	7.87	13.30	20.09	26.89
250	12.37	20.08	29.71	39.35
350	18.44	28.14	40.27	52.39
450	26.15	37.67	52.07	66.47
550	35.55	48.77	65.28	81.80
650	46.67	61.48	80.00	98.52
750	59.52	75.86	96.28	116.70

หมายเหตุ สมการที่ 29a:  $\frac{k_L a - b_{12}}{Q} = 0.4417N^{0.6838}$  โดย  $b_{12} = 0.00009N^2 - 0.0108N + 2.7045$

เมื่อ  $N$  หมายถึงอัตราความเร็ว (รอบต่อนาที) และ  $Q$  หมายถึงอัตราการให้อากาศ (vvm)  
และ  $b_{ij}$  ( $b_{12}$ ) หมายถึงสมการประมาณค่าจุดตัดบนแกน  $y$  จากความสัมพันธ์เชิงเส้น  
ระหว่าง  $k_L a$  กับ  $Q$  ( $j=2$ ) ในน้ำกลั่น ( $i=1$ )



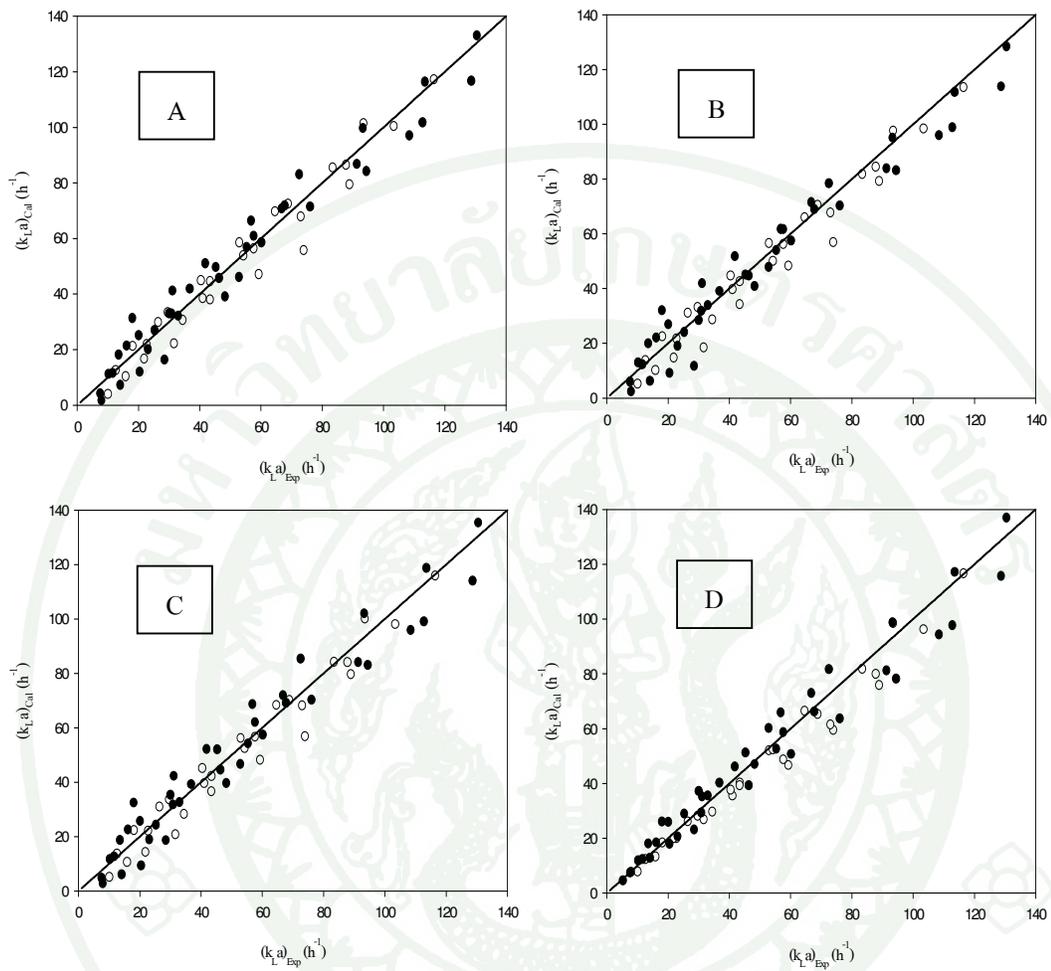
ภาพผนวกที่ 2 การเปรียบเทียบค่า  $k_L a$  ระหว่างการทดลอง  $(k_L a)_{Exp}$  และการคำนวณ  $(k_L a)_{Cal}$  ใน

น้ำกลั่น (ชุดที่ 2) คำนวณจากสมการ  $\frac{k_L a - b_{11}}{N} = 0.1283Q^{0.3781}$  เมื่อ (A)  $b_{11} =$

$5.2305Q - 10.759$ ; (B)  $b_{112} = 1.6842Q - 8.2953$  และ (C)  $b_{113} = 7.5917Q^3 -$

$21.187Q^2 + 19.134Q - 12.261$  และ (D) คำนวณจาก  $\frac{k_L a - b_{12}}{Q} = 0.4417N^{0.6838}$

เมื่อ  $b_{12} = 0.00009N^2 - 0.0108N + 2.7045$



ภาพผนวกที่ 3 การเปรียบเทียบค่า  $k_L a$  ระหว่างการทดลอง  $(k_L a)_{Exp}$  และการคำนวณ  $(k_L a)_{Cal}$  ใน

น้ำกลั่น (ชุดที่ 3) จำนวนจากสมการ  $\frac{k a - b}{N} = 0.1283Q^{0.3781}$  เมื่อ (A)  $b_{111} =$

$5.2305Q - 10.759$ ; (B)  $b_{112} = 1.6842Q - 8.2953$  และ (C)  $b_{113} = 7.5917Q^3 -$

$21.187Q^2 + 19.134Q - 12.261$  และ (D) จำนวนจาก  $\frac{k a - b}{Q} = 0.4417N^{0.6838}$

เมื่อ  $b_{12} = 0.00009N^2 - 0.0108N + 2.7045$

สัญลักษณ์ : ● ชุดที่ 1 และ ○ ชุดที่ 2

ตารางผนวกที่ ก16 ค่า  $k_L a$  เฉลี่ยจากการทดลอง 3 ชั่วโมงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่อัตราการกวน ( $N$ ) 100 ถึง 1000 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) 0.2 ถึง 2.0 vvm (ภาพที่ 29 และ 30)

$N$ (รอบต่อนาที)	$k_L a$ (ต่อชั่วโมง)				
	$Q = 0.2$ vvm	$Q = 0.5$ vvm	$Q = 1.0$ vvm	$Q = 1.5$ vvm	$Q = 2.0$ vvm
100	4.58 ± 0.90	6.42 ± 1.53	10.44 ± 1.35	11.19 ± 2.48	9.68 ± 1.77
200	5.80 ± 0.51	10.95 ± 2.14	15.80 ± 2.92	18.97 ± 0.69	23.32 ± 0.21
300	7.50 ± 0.67	16.09 ± 1.21	25.39 ± 1.07	30.85 ± 2.74	36.83 ± 2.63
400	20.97 ± 1.72	26.51 ± 1.64	37.40 ± 1.17	57.29 ± 6.99	68.23 ± 2.13
500	33.25 ± 1.47	47.00 ± 1.99	54.73 ± 9.08	65.73 ± 11.89	86.96 ± 17.54
600	35.92 ± 8.83	58.17 ± 1.81	74.18 ± 13.77	79.84 ± 3.99	99.51 ± 7.39
700	28.64 ± 3.74	48.62 ± 0.74	71.28 ± 2.59	95.05 ± 5.76	111.92 ± 9.45
800	19.08 ± 3.36	35.61 ± 8.31	84.62 ± 9.61	101.37 ± 3.15	131.08 ± 8.01
900	19.98 ± 4.37	31.06 ± 7.61	65.23 ± 2.63	87.47 ± 8.18	128.11 ± 10.66
1000	18.55 ± 2.76	27.19 ± 1.50	50.07 ± 7.22	65.20 ± 6.18	88.59 ± 5.26

ตารางผนวกที่ ก17 ค่า  $k_{La}$  เฉลี่ยจากการทดลอง 3 ชั่วโมงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่อัตราการกวน ( $N$ ) 100 ถึง 600 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) 0.2 ถึง 2.0 vvm (ชุดที่ 1)

$N$ (รอบต่อนาที)	$k_{La}$ (ต่อชั่วโมง)				
	$Q = 0.2$ vvm	$Q = 0.5$ vvm	$Q = 1.0$ vvm	$Q = 1.5$ vvm	$Q = 2.0$ vvm
100	4.58 ± 0.90	6.42 ± 1.53	10.44 ± 1.35	11.19 ± 2.48	9.68 ± 1.77
200	5.80 ± 0.51	10.95 ± 2.14	15.80 ± 2.92	18.97 ± 0.69	23.32 ± 0.21
300	7.50 ± 0.67	16.09 ± 1.21	25.39 ± 1.07	30.85 ± 2.74	36.83 ± 2.63
400	20.97 ± 1.72	26.51 ± 1.64	37.40 ± 1.17	57.29 ± 6.99	68.23 ± 2.13
500	33.25 ± 1.47	47.00 ± 1.99	54.73 ± 9.08	65.73 ± 11.89	86.96 ± 17.54
600	35.92 ± 8.83	58.17 ± 1.81	74.18 ± 13.77	79.84 ± 3.99	99.51 ± 7.39

ตารางผนวกที่ ก18 ค่า  $k_{La}$  เฉลี่ยจากการทดลอง 3 ชั่วโมงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่อัตราการกวน ( $N$ ) 150 ถึง 550 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ ( $Q$ ) 0.35 ถึง 1.75 vvm (ชุดที่ 2)

$N$ (รอบต่อนาที)	$k_{La}$ (ต่อชั่วโมง)			
	$Q = 0.35$ vvm	$Q = 0.75$ vvm	$Q = 1.25$ vvm	$Q = 1.75$ vvm
150	$8.72 \pm 0.60$	$11.30 \pm 0.17$	$14.62 \pm 0.20$	$18.40 \pm 0.92$
250	$12.87 \pm 1.06$	$18.08 \pm 1.43$	$24.49 \pm 0.26$	$26.52 \pm 2.11$
350	$13.95 \pm 0.41$	$27.32 \pm 1.03$	$33.60 \pm 0.20$	$40.03 \pm 0.37$
450	$22.00 \pm 1.35$	$33.76 \pm 0.43$	$45.22 \pm 0.42$	$54.49 \pm 0.05$
550	$36.61 \pm 1.17$	$73.02 \pm 1.50$	$87.85 \pm 0.58$	$95.04 \pm 1.28$

ตารางผนวกที่ ก19 ค่า  $k_{La}$  จากการคำนวณจากสมการที่ 30a โดยใช้สมการ  $b_{211}$ ,  $b_{212}$  และ  $b_{213}$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (ชุดที่ 1)

N (รอบต่อนาที)	$k_{La}$ (ต่อชั่วโมง)														
	Q = 0.2 vvm			Q = 0.5 vvm			Q = 1.0 vvm			Q = 1.5 vvm			Q = 2.0 vvm		
	$b_{211}$	$b_{212}$	$b_{213}$	$b_{211}$	$b_{212}$	$b_{213}$	$b_{211}$	$b_{212}$	$b_{213}$	$b_{211}$	$b_{212}$	$b_{213}$	$b_{211}$	$b_{212}$	$b_{213}$
100	-0.46	-3.74	-0.09	2.07	0.51	0.26	4.34	5.63	4.84	5.73	9.88	8.85	6.68	13.69	4.51
200	6.76	3.49	7.13	12.37	10.81	10.56	17.80	19.09	18.30	21.47	25.62	24.59	24.28	31.29	22.11
300	13.99	10.71	14.35	22.66	21.10	20.85	31.26	32.55	31.76	37.22	41.37	40.34	41.88	48.88	39.71
400	21.21	17.94	21.58	32.96	31.40	31.15	44.72	46.01	45.22	52.96	57.11	56.08	59.47	66.48	57.30
500	28.44	25.16	28.80	43.25	41.69	41.44	58.18	59.47	58.68	68.71	72.86	71.83	77.07	84.08	74.90
600	35.66	32.38	36.03	53.55	51.99	51.74	71.64	72.93	72.14	84.45	88.60	87.57	94.67	101.68	92.50

หมายเหตุ สมการที่ 30a:  $\frac{k_{La} - b}{N} = 0.1346Q^{0.3867}$  โดย  $b_{211} = -1.7963Q - 7.3236$ ,  $b_{212} = 3.916Q - 11.742$  และ  $b_{213} = -10.963Q^3 + 33.505Q^2 -$

$28.241Q - 2.9206$  เมื่อ  $N$  หมายถึงอัตราการกวน (รอบต่อนาที) และ  $Q$  หมายถึงอัตราการให้อากาศ (vvm) และ  $b_{ij}$  ( $b_{2j}$ ) หมายถึงสมการประมาณค่าจุดตัดบนแกน  $y$  จากความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง  $k_{La}$  กับ  $N$  ( $j=1$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ( $i=2$ ) โดยที่ 1, 2, 3 หมายถึงแบบชนิดของสมการประมาณค่า  $b_{2j}$  ที่แตกต่างกัน 3 สมการ

ตารางผนวกที่ ก20 ค่า  $k_L a$  จากการคำนวณจากสมการที่ 31a ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (ชุดที่ 1)

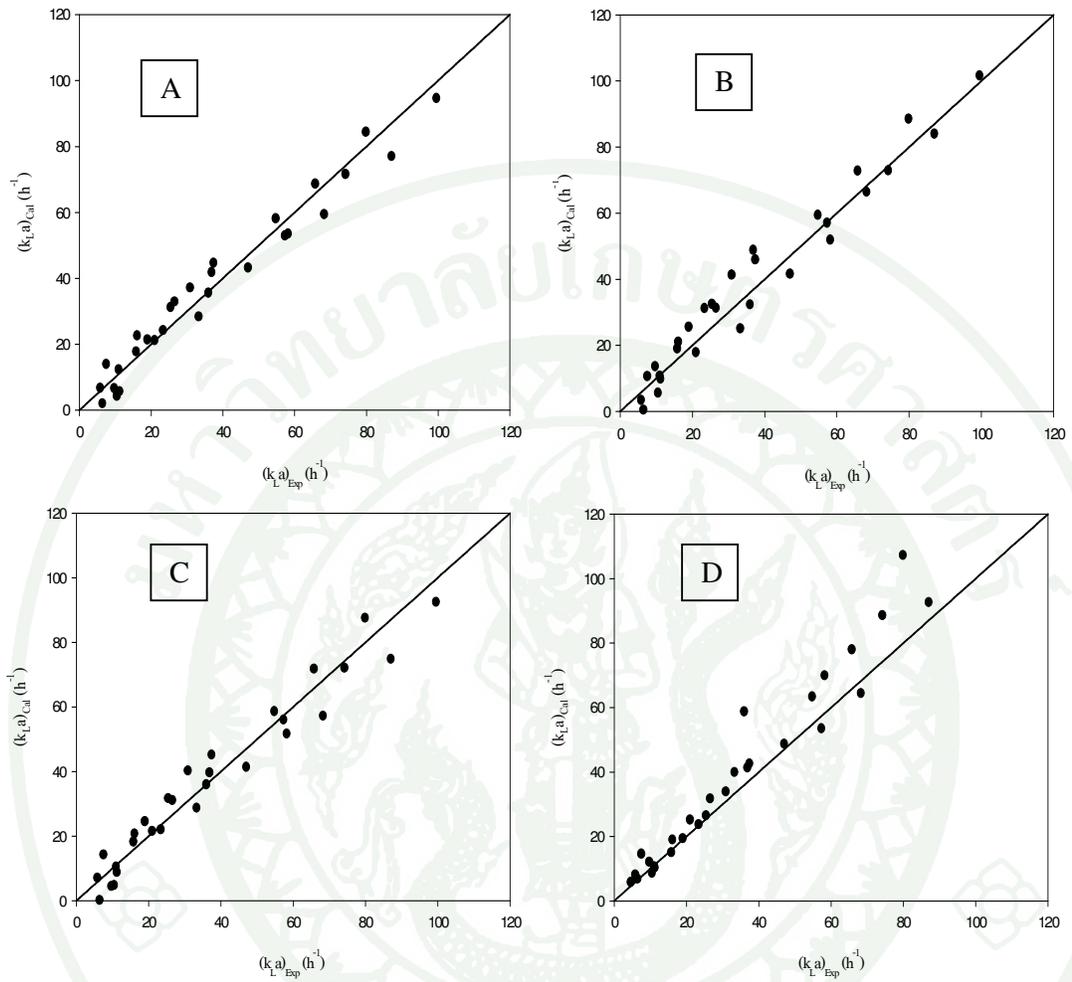
N (รอบต่อนาที)	$k_L a$ (ต่อชั่วโมง)				
	Q = 0.2 vvm	Q = 0.5 vvm	Q = 1.0 vvm	Q = 1.5 vvm	Q = 2.0 vvm
100	5.89	6.93	8.66	10.40	12.13
200	8.17	10.77	15.12	19.46	23.80
300	14.64	19.10	26.53	33.97	41.41
400	25.25	31.78	42.67	53.57	64.46
500	39.98	48.76	63.41	78.05	92.70
600	58.81	70.00	88.65	107.30	125.95

หมายเหตุ สมการที่ 31a:  $\frac{k_L a - b_{22}}{Q} = 0.0077N^{1.3265}$  โดย  $b_{22} = 0.0002N^2 - 0.0477N + 7.9714$

เมื่อ N หมายถึงอัตราการกวน (รอบต่อนาที) และ Q หมายถึงอัตราการให้อากาศ (vvm)

และ  $b_{ij}$  ( $b_{22}$ ) หมายถึงสมการประมาณค่าจุดตัดบนแกน y จากความสัมพันธ์เชิงเส้น

ระหว่าง  $k_L a$  กับ Q (j=2) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (i=2)



ภาพผนวกที่ 4 การเปรียบเทียบค่า  $k_L a$  ระหว่างการทดลอง  $(k_L a)_{Exp}$  และการคำนวณ  $(k_L a)_{Cal}$  ใน

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (ชุดที่ 1) คำนวณจากสมการ  $\frac{k_L a - b}{N} = 0.1346Q^{0.3867}$  เมื่อ

(A)  $b_{211} = -1.7963Q - 7.3236$ ; (B)  $b_{212} = 3.916Q - 11.742$  และ (C)

$b_{213} = -10.963Q^3 + 33.505Q^2 - 28.241Q - 2.9206$  และ (D) คำนวณจากสมการ

$\frac{k_L a - b}{Q} = 0.0077N^{1.3265}$  เมื่อ  $b_{22} = 0.0002N^2 - 0.0477N + 7.9714$

ตารางผนวกที่ ก21 ค่า  $k_L a$  จากการคำนวณจากสมการที่ 30a โดยใช้สมการ  $b_{211}$ ,  $b_{212}$  และ  $b_{213}$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (ชุดที่ 2)

N (รอบต่อนาที)	$k_L a$ (ต่อชั่วโมง)											
	Q = 0.35 vvm			Q = 0.75 vvm			Q = 1.25 vvm			Q = 1.75 vvm		
	$b_{211}$	$b_{212}$	$b_{213}$	$b_{211}$	$b_{212}$	$b_{213}$	$b_{211}$	$b_{212}$	$b_{213}$	$b_{211}$	$b_{212}$	$b_{213}$
150	5.50	3.08	4.28	9.39	9.26	8.18	12.44	15.16	14.73	14.60	20.18	16.58
250	14.47	12.05	13.25	21.44	21.30	20.23	27.11	29.84	29.40	31.31	36.89	33.29
350	23.44	21.02	22.22	33.48	33.35	32.27	41.79	44.51	44.07	48.02	53.60	50.00
450	32.41	29.99	31.19	45.52	45.39	44.31	56.46	59.18	58.75	64.74	70.31	66.72
550	41.38	38.96	40.16	57.57	57.43	56.36	71.13	73.85	73.42	81.45	87.03	83.43

หมายเหตุ สมการที่ 30a:  $\frac{k_L a - b}{N} = 0.1346Q^{0.3867}$  โดย  $b_{211} = -1.7963Q - 7.3236$ ,  $b_{212} = 3.916Q - 11.742$  และ  $b_{213} = -10.963Q^3 + 33.505Q^2 -$

$28.241Q - 2.9206$  เมื่อ  $N$  หมายถึงอัตราการกวน (รอบต่อนาที) และ  $Q$  หมายถึงอัตราการให้อากาศ (vvm) และ  $b_{ij}$  ( $b_{2i}$ ) หมายถึงสมการประมาณค่าจุดตัดบนแกน  $y$  จากความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่าง  $k_L a$  กับ  $N$  ( $j=1$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ( $i=2$ ) โดยที่ 1, 2, 3 หมายถึงแบบชนิดของสมการประมาณค่า  $b_{2i}$  ที่แตกต่างกัน 3 สมการ

ตารางผนวกที่ ก22 ค่า  $k_L a$  จากการคำนวณจากสมการที่ 31a ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (ชุดที่ 2)

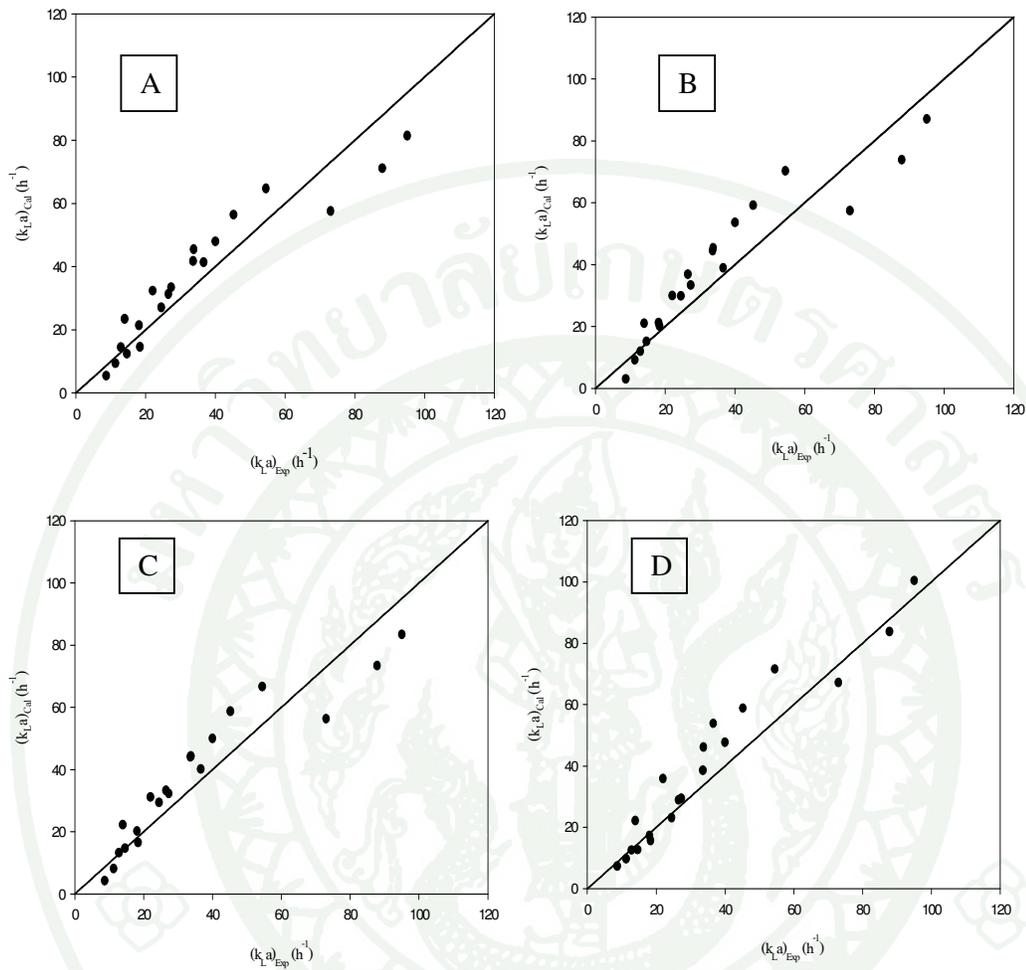
N (รอบต่อนาที)	$k_L a$ (ต่อชั่วโมง)			
	$Q = 0.35$ vvm	$Q = 0.75$ vvm	$Q = 1.25$ vvm	$Q = 1.75$ vvm
150	7.39	9.76	12.73	15.69
250	12.63	17.30	23.14	28.98
350	22.16	29.46	38.59	47.71
450	35.92	46.11	58.84	71.57
550	53.87	67.16	83.78	100.40

หมายเหตุ สมการที่ 31a:  $\frac{k_L a - b_{22}}{Q} = 0.0077N^{1.3265}$  โดย  $b_{22} = 0.0002N^2 - 0.0477N + 7.9714$

เมื่อ  $N$  หมายถึงอัตราการกวน (รอบต่อนาที) และ  $Q$  หมายถึงอัตราการให้อากาศ (vvm)

และ  $b_{ij}$  ( $b_{22}$ ) หมายถึงสมการประมาณค่าจุดตัดบนแกน  $y$  จากความสัมพันธ์เชิงเส้น

ระหว่าง  $k_L a$  กับ  $Q$  ( $j=2$ ) ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ ( $i=2$ )

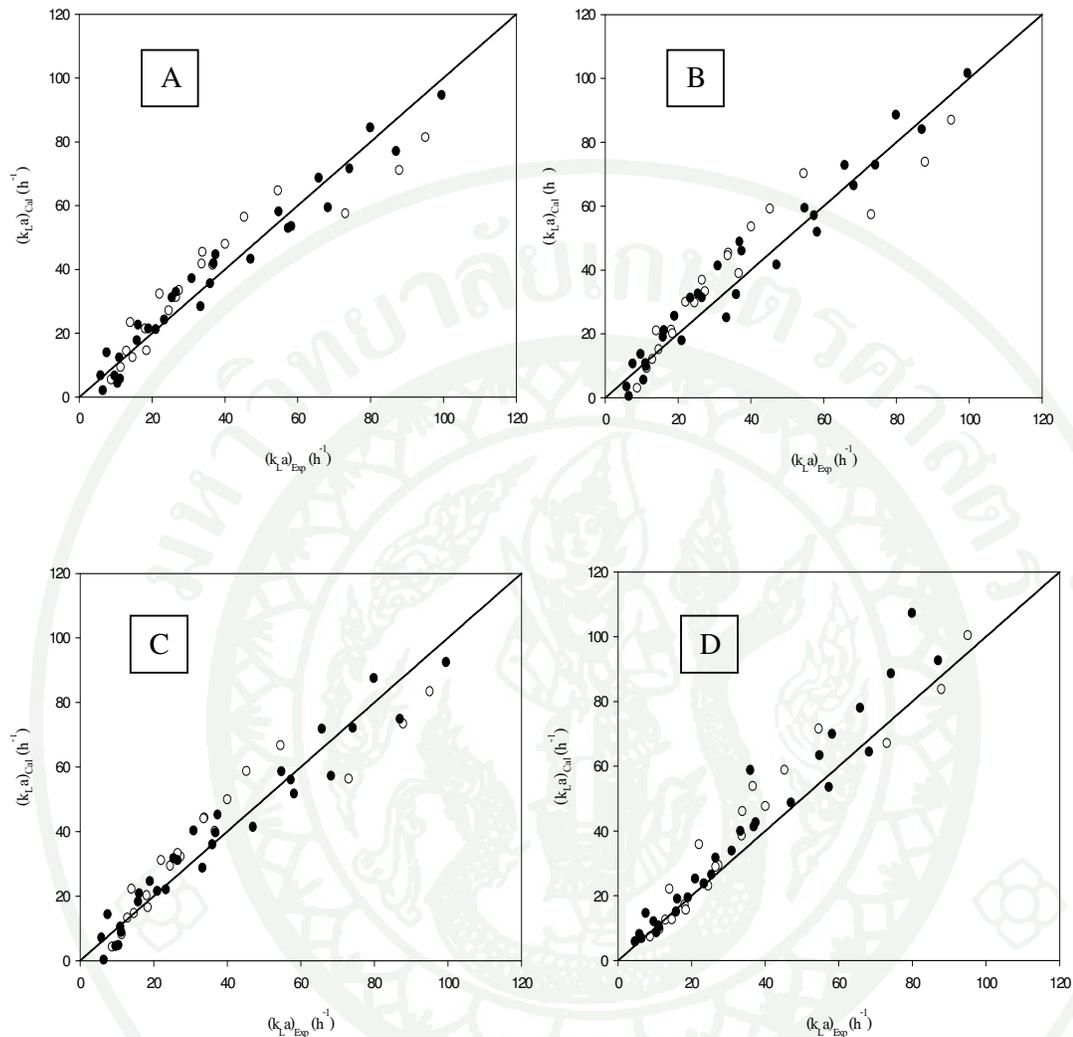


ภาพผนวกที่ ก5 การเปรียบเทียบค่า  $k_L a$  ระหว่างการทดลอง  $(k_L a)_{Exp}$  และการคำนวณ  $(k_L a)_{Cal}$  ใน

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (ชุดที่ 2) คำนวณจากสมการ  $\frac{k a - b}{N} = 0.1346Q^{0.3867}$  เมื่อ

(A)  $b_{211} = -1.7963Q - 7.3236$ ; (B)  $b_{212} = 3.916Q - 11.742$  และ (C)  $b_{213} = -10.963Q^3 + 33.505Q^2 - 28.241Q - 2.9206$  และ (D) คำนวณจากสมการ

$\frac{k a - b}{Q} = 0.0077N^{1.3265}$  เมื่อ  $b_{22} = 0.0002N^2 - 0.0477N + 7.9714$



ภาพผนวกที่ 6 การเปรียบเทียบค่า  $k_L a$  ระหว่างการทดลอง  $(k_L a)_{Exp}$  และการคำนวณ  $(k_L a)_{Cal}$  ใน

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (ชุดที่ 3) คำนวณจากสมการ  $\frac{k_L a - b}{N} = 0.1346Q^{0.3867}$  เมื่อ

(A)  $b_{211} = -1.7963Q - 7.3236$ ; (B)  $b_{212} = 3.916Q - 11.742$  และ (C)  $b_{213} = -10.963Q^3 + 33.505Q^2 - 28.241Q - 2.9206$  และ (D) คำนวณจากสมการ

$\frac{k_L a - b}{Q} = 0.0077N^{1.3265}$  เมื่อ  $b_{22} = 0.0002N^2 - 0.0477N + 7.9714$

สัญลักษณ์ : ● ชุดที่ 1 และ ○ ชุดที่ 2

ตารางผนวกที่ ก23 การเขียนแบบค่า  $k_L a$  จากสมการประมาณค่า  $k_L a$  ในน้ำกลั่น (สมการที่ 28b)

$Q$ (vvm)	$N$ (รอบต่อนาที)	$k_L a$ (ต่อชั่วโมง)	$Q$ (vvm)	$N$ (รอบต่อนาที)	$k_L a$ (ต่อชั่วโมง)
0.2	100	-2.73	1.0	500	58.62
0.2	200	4.25	1.0	600	71.45
0.2	300	11.23	1.0	700	84.28
0.2	400	18.21	1.0	800	97.11
0.2	500	25.19	1.5	100	12.04
0.2	600	32.18	1.5	200	27.00
0.2	700	39.16	1.5	300	41.95
0.2	800	46.14	1.5	400	56.91
0.5	100	1.73	1.5	500	71.87
0.5	200	11.60	1.5	600	86.82
0.5	300	21.47	1.5	700	101.78
0.5	400	31.34	1.5	800	116.73
0.5	500	41.22	2.0	100	16.38
0.5	600	51.09	2.0	200	33.05
0.5	700	60.96	2.0	300	49.72
0.5	800	70.83	2.0	400	66.40
1.0	100	7.30	2.0	500	83.07
1.0	200	20.13	2.0	600	99.75
1.0	300	32.96	2.0	700	116.42
1.0	400	45.79	2.0	800	133.10

หมายเหตุ สมการที่ 28b:  $\frac{k_L a - b_{II}}{N} = 0.1283Q^{0.3781}$ ;  $b_{II} = 5.2305Q - 10.759$

เมื่อ  $N$  หมายถึงอัตราการกวน (รอบต่อนาที) และ  $Q$  หมายถึงอัตราการให้อากาศ (vvm)

ตารางผนวกที่ ก24 การเขียนแบบค่า  $k_L a$  จากสมการประมาณค่า  $k_L a$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ  
(สมการที่ 30b)

$Q$ (vvm)	$N$ (รอบต่อนาที)	$k_L a$ (ต่อชั่วโมง)	$Q$ (vvm)	$N$ (รอบต่อนาที)	$k_L a$ (ต่อชั่วโมง)
0.2	100	-0.46	1.0	400	44.72
0.2	200	6.76	1.0	500	58.18
0.2	300	13.99	1.0	600	71.64
0.2	400	21.21	1.5	100	5.73
0.2	500	28.44	1.5	200	21.47
0.2	600	35.66	1.5	300	37.22
0.5	100	2.07	1.5	400	52.96
0.5	200	12.37	1.5	500	68.71
0.5	300	22.66	1.5	600	84.45
0.5	400	32.96	2.0	100	6.68
0.5	500	43.25	2.0	200	24.28
0.5	600	53.55	2.0	300	41.88
1.0	100	4.34	2.0	400	59.47
1.0	200	17.80	2.0	500	77.07
1.0	300	31.26	2.0	600	94.67

หมายเหตุ สมการที่ 30b:  $\frac{k_L a - b}{N} = 0.1346Q^{0.3867}$ ;  $b_{21} = -1.7963Q - 7.3236$

เมื่อ  $N$  หมายถึงอัตราการกวน (รอบต่อนาที) และ  $Q$  หมายถึงอัตราการให้อากาศ (vvm)

ตารางผนวกที่ ก25 การเขียนแบบค่า  $k_L a$  จากสมการประมาณค่า  $k_L a$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ  
ที่มีเซลล์ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร (สมการที่ 32)

$Q$ (vvm)	$N$ (รอบต่อนาที)	$k_L a$ (ต่อชั่วโมง)	$Q$ (vvm)	$N$ (รอบต่อนาที)	$k_L a$ (ต่อชั่วโมง)
0.5	500	101.89	1.5	500	94.36
0.5	600	119.30	1.5	600	107.66
0.5	700	136.71	1.5	700	120.96
0.5	800	154.11	1.5	800	134.26
0.5	900	171.52	1.5	900	147.56
0.5	1000	188.93	1.5	1000	160.87
1.0	500	94.80	2.0	500	96.34
1.0	600	109.49	2.0	600	108.74
1.0	700	124.18	2.0	700	121.13
1.0	800	138.87	2.0	800	133.53
1.0	900	153.56	2.0	900	145.93
1.0	1000	168.25	2.0	1000	158.32

หมายเหตุ สมการที่ 32:  $\frac{k_L a - b}{N} = 0.1469Q^{-0.245}$ ;  $b_{311} = 13.015Q + 8.3345$

เมื่อ  $N$  หมายถึงอัตราการกวน (รอบต่อนาที) และ  $Q$  หมายถึงอัตราการให้อากาศ (vvm)

ตารางผนวกที่ ก26 การเขียนแบบค่า  $k_L a$  จากสมการประมาณค่า  $k_L a$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ  
ที่มีเซลล์ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร (สมการที่ 33)

$Q$ (vvm)	$N$ (รอบต่อนาที)	$k_L a$ (ต่อชั่วโมง)	$Q$ (vvm)	$N$ (รอบต่อนาที)	$k_L a$ (ต่อชั่วโมง)
0.5	500	63.61	1.5	500	90.08
0.5	600	89.80	1.5	600	109.88
0.5	700	115.99	1.5	700	129.67
0.5	800	142.18	1.5	800	149.47
0.5	900	168.37	1.5	900	169.26
0.5	1000	194.56	1.5	1000	189.06
1.0	500	71.63	2.0	500	112.31
1.0	600	93.58	2.0	600	130.70
1.0	700	115.53	2.0	700	149.10
1.0	800	137.48	2.0	800	167.49
1.0	900	159.43	2.0	900	185.89
1.0	1000	181.38	2.0	1000	204.29

หมายเหตุ สมการที่ 33:  $\frac{k_L a - b}{N} = 0.2195Q^{-0.2548}$ ;  $b_{312} = 58.442Q - 96.56$

เมื่อ  $N$  หมายถึงอัตราการกวน (รอบต่อนาที) และ  $Q$  หมายถึงอัตราการให้อากาศ (vvm)

ตารางผนวกที่ ก27 การเขียนแบบค่า  $k_L a$  จากสมการประมาณค่า  $k_L a$  ในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ  
ที่มีเซลล์ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร (สมการที่ 34)

$Q$ (vvm)	$N$ (รอบต่อนาที)	$k_L a$ (ต่อชั่วโมง)	$Q$ (vvm)	$N$ (รอบต่อนาที)	$k_L a$ (ต่อชั่วโมง)
0.5	500	45.85	1.5	500	72.31
0.5	600	68.26	1.5	600	91.07
0.5	700	90.66	1.5	700	109.83
0.5	800	113.06	1.5	800	128.59
0.5	900	135.47	1.5	900	147.35
0.5	1000	157.87	1.5	1000	166.11
1.0	500	56.32	2.0	500	90.39
1.0	600	76.35	2.0	600	108.30
1.0	700	96.38	2.0	700	126.21
1.0	800	116.41	2.0	800	144.11
1.0	900	136.44	2.0	900	162.02
1.0	1000	156.47	2.0	1000	179.93

หมายเหตุ สมการที่ 34:  $\frac{k_L a - b}{N} = 0.2003Q^{-0.1616}$ ;  $b_{313} = 44.682Q - 88.51$

เมื่อ  $N$  หมายถึงอัตราการกวน (รอบต่อนาที) และ  $Q$  หมายถึงอัตราการให้อากาศ (vvm)

**ตารางผนวกที่ ก28** ผลการทดลองการผลิตไซลิทอลจากไซโลสแบบครึ่งคราวเบื้องต้นโดยใช้ยีสต์ *C. magnoliae* ที่สภาวะพีเอช 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 62)

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาตรน้ำหมัก (มิลลิลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
0	1000	1.180	11.483	5.641	0.132
2	993	1.360	11.622	5.461	0.176
4	988	1.822	10.220	5.499	0.198
6	983	2.218	8.212	4.902	0.175
8	977	2.027	6.017	5.028	0.225
10	970	2.062	5.470	5.000	0.309
12	964	1.950	4.219	5.031	0.355
14	958	2.359	4.188	4.367	0.266
16	952	2.458	3.281	4.231	0.263
18	946	2.960	2.924	4.203	0.321
20	940	2.723	2.203	4.030	0.328
22	934	3.169	2.423	3.778	0.320
24	928	3.190	1.974	3.724	0.294
28	922	3.783	2.027	2.980	0.362
32	913	3.907	1.089	2.850	0.421
36	906	4.194	0.830	2.286	0.476
40	900	4.500	0.000	2.359	0.496
44	893	4.511		1.842	0.549
48	885	4.011		1.211	0.543
48	924	3.420		33.405	0.430
52	918	3.925		34.024	0.767
56	911	4.936		32.385	1.070
60	904	5.008		30.801	1.445
64	898	6.397		29.159	1.902

## ตารางผนวกที่ ก28 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาตรน้ำหมัก (มิลลิลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิตอล (กรัมต่อลิตร)
68	891	9.084		27.743	1.796
72	885	8.436		25.308	2.044
76	879	9.371		23.612	2.183
80	871	9.866		22.522	2.409
84	866	11.008		20.246	2.697
88	873.2	12.046		17.112	2.959
92	866.2	17.214		8.223	3.958
94	856.2	18.540		3.819	4.039
94.25	900.4	16.400		30.674	3.309
96	894.4	16.409		28.591	4.612
100	889.4	18.358		21.786	10.354
104	882.4	18.546		15.283	14.767
108	877.4	19.926		9.210	18.338
112	870.4	20.627		5.542	20.596
114	864.4	21.770		3.833	20.977
114.25	919	21.120		35.263	18.626
116	913	22.447		33.879	19.509
120	908	24.230		28.589	21.201
124	900	26.447		23.447	21.731
129	892	28.796		18.565	23.013
132	886	30.329		15.192	23.406
136	878	31.820		10.724	23.656
140	869	33.735		6.518	24.124
142	863	34.822		4.442	23.224
142.25	913	31.260		33.913	21.299

## ตารางผนวกที่ ก28 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาตรน้ำหมัก (มิลลิลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
144	905	33.191		31.436	22.534
148	898	33.856		25.685	26.847
152	892	34.800		20.191	32.332
156	885	36.066		15.449	34.692
160	878	36.374		11.137	39.065
164	871	36.426		8.252	42.514
168	865	38.251		5.908	42.734
170	858	38.521		4.860	42.821
170.25	963.9	33.480		76.714	34.789
172	955.9	34.688		79.887	36.073
176	949.9	35.947		73.043	38.978
180	942.9	37.006		68.921	46.172
184	936.9	39.527		65.414	49.399
188	929.9	35.388		62.149	54.438
192	922.9	35.380		57.134	56.320
196	915.9	35.308		55.118	62.850
200	909.9	38.500		50.583	65.557
204	904.9	39.679		47.693	71.106
208	898.9	41.584		42.246	73.031
212	891.9	42.797		38.161	77.332
216	884.9	43.615		33.035	81.333
220	877.9	44.797		28.589	91.917
222	869.9	46.117		27.256	95.990
224	879.3	44.534		23.889	88.888
228	873.3	46.641		17.921	95.538

## ตารางผนวกที่ ก28 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาตรน้ำหมัก (มิลลิลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
232	868.3	44.848		11.878	98.376
236	862.3	47.195		6.080	97.074
240	854.3	42.114		2.406	91.003
240.25	957.1	37.880		74.022	79.443
244	947.1	39.412		73.181	81.683
248	941.1	40.731		68.667	88.547
252	935.1	43.270		61.630	97.362
256	927.1	43.393		55.531	102.853
260	917.1	43.090		48.428	111.478
264	907.1	46.267		43.456	120.111
268	899.1	49.478		36.493	121.365
272	889.1	47.796		33.618	133.715

**ตารางผนวกที่ ก29** ผลการทดลองการผลิตไซลิทอลจากไซโลสแบบครึ่งคราวที่มีความเข้มข้นเซลล์สูงโดยเชื้อยีสต์ *C. magnoliae* ที่สภาวะพีเอช 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 63)

รอบที่	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณน้ำ หมัก (มิลลิลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
1	0	1000.0	0.660	10.966	5.154	0.179
	2	992.0	0.685	9.478	4.942	0.197
	4	984.0	1.159	8.274	5.018	0.217
	6	976.0	0.594	5.859	4.979	0.240
	8	968.0	0.868	3.455	4.770	0.242
	12	960.0	0.708	0.652	4.423	0.247
	16	952.0	0.819	0.000	4.187	0.226
	18	944.0	1.250		3.774	0.188
	20	936.0	2.991		2.587	0.157
	22	928.0	3.772		1.510	0.156
	24	920.0	4.500		0.028	0.113
	24.25	979.2	4.567		26.622	0.246
	28	971.2	7.343		17.984	1.216
	32	963.2	21.518		0.579	2.453
	33	955.2	23.424		0.039	1.533
	33.25	1017.2	20.150		24.858	1.823
	36	1009.2	20.663		20.159	4.848
	38	1001.2	21.251		16.965	7.587
	40	993.2	21.815		13.798	10.453
	42	985.2	22.542		10.462	12.355
	44	977.2	22.363		8.223	14.763
	46	969.2	23.702		5.272	16.530

## ตารางผนวกที่ ก29 (ต่อ)

รอบที่	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาตรน้ำ หมัก (มิลลิลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
1	47	961.2	24.305		4.086	18.539
	47.25	1018.2	22.700		42.551	16.992
	50	1010.2	23.669		35.255	20.528
	52	1002.2	24.214		30.287	23.002
	56	1014.2	22.421		20.784	31.180
	60	1006.2	23.072		13.430	37.729
	64	998.2	23.478		6.530	42.052
	65	990.2	24.062		5.101	43.150
	65.25	1076.2	21.650		43.989	40.895
	68	1068.2	22.316		44.243	46.435
	70	1060.2	22.112		40.206	47.832
	72	1072.2	21.747		35.209	49.701
	76	1064.2	22.855		26.464	56.371
	80	1056.2	22.569		19.039	62.283
	84	1048.2	23.649		11.646	70.220
	87	1040.2	24.003		6.397	74.401
	88	1032.2	24.311		4.795	76.334
	88.25	1151.8	20.500		57.815	67.609
	92	1143.8	19.368		52.031	73.571
	96	1135.8	19.470		44.991	78.841
	100	1127.8	22.570		37.101	87.897
	104	1119.8	22.732		27.704	96.257
	109	1111.8	23.396		19.876	100.163
	112	1103.8	24.261		14.637	109.482

## ตารางผนวกที่ ก29 (ต่อ)

รอบที่	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาตรน้ำ หมัก (มิลลิลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
1	116	1095.8	23.597		8.114	111.743
	118	1087.8	23.947		4.959	122.530
	118.25	1237.0	19.317		71.204	93.231
	120	1229.0	19.124		69.183	93.528
	124	1221.0	19.671		63.115	99.648
	128	1213.0	19.410		56.607	107.417
	131	1205.0	19.539		51.823	111.816
	136	1197.0	20.668		41.166	118.816
	144	1189.0	21.380		28.118	131.674
	148	1181.0	23.515		21.797	138.796
	156	1173.0	24.237		9.020	151.424
	159	1165.0	24.594		5.033	155.404
	159.25	1344.4	19.400		80.105	129.789
	164	1336.4	18.996		73.998	136.523
	168	1328.4	19.651		70.729	145.495
	172	1320.4	19.888		64.390	148.185
	176	1312.4	19.036		59.600	155.881
	180	1330.4	18.745		50.473	148.986
	184	1322.4	19.333		46.997	159.277
	188	1314.4	16.621		40.452	171.511
	192	1306.4	17.151		35.441	179.435
	196	1298.4	16.636		29.768	184.072
	200	1290.4	18.059		23.973	193.800
	204	1282.4	19.045		18.633	198.138

## ตารางผนวกที่ ก29 (ต่อ)

รอบที่	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาตรน้ำ หมัก (มิลลิลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
1	208	1274.4	21.063		14.368	204.928
	212	1266.4	21.816		10.263	211.201
	216	1258.4	22.346		6.616	213.606
	218	1250.4	24.299		5.035	216.654
	218.25	1480.4	18.000		93.180	163.836
	224	1472.4	16.673		91.392	166.170
	228	1464.4	16.714		86.869	169.110
	232	1456.4	17.788		83.525	177.774
	236	1448.4	24.360		79.526	183.306
	240	1440.4	24.632		75.345	187.423
	244	1432.4	24.270		72.019	194.703
	248	1424.4	30.764		67.267	204.778
	252	1416.4	31.983		62.377	211.633
	256	1408.4	31.884		58.891	218.102
	260	1400.4	32.471		55.450	226.826
	264	1392.4	34.607		50.913	231.890
	268	1384.4	32.811		47.174	239.375
	272	1376.4	33.181		42.622	241.718
	276	1368.4	35.124		38.576	249.030
	280	1360.4	34.950		34.914	255.786
	284	1352.4	35.558		31.034	262.300
	288	1344.4	36.779		27.502	268.080
	292	1336.4	31.977		24.456	274.419
	296	1328.4	28.975		20.554	277.222

## ตารางผนวกที่ ก29 (ต่อ)

รอบที่	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาตรน้ำ หมัก (มิลลิลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
1	300	1320.4	33.112		17.117	282.371
	304	1312.4	34.667		13.863	288.248
	312	1304.4	29.584		8.743	298.044
	316	1296.4	32.583		6.983	306.615
2	316.5	1000.0	12.550		50.658	121.629
	318	992.0	19.993		48.200	121.213
	320	984.0	26.965		39.435	122.849
	322	976.0	34.529		28.188	123.419
	324	968.0	45.599		12.597	121.686
	326	960.0	56.580		0.313	117.703
	328	952.0	60.452		0.273	107.607
	328.25	1069.8	53.967		58.427	91.875
	332	1061.8	59.293		45.996	98.202
	336	1053.8	52.316		33.539	108.796
	340	1045.8	51.949		24.784	116.983
	344	1037.8	54.205		17.193	124.003
	350	1029.8	52.462		7.363	133.147
	352	1021.8	51.040		5.157	135.982
	352.25	1139.2	45.100		57.506	119.266
	357	1131.2	50.790		47.911	128.385
	360	1123.2	50.645		41.347	133.120
	364	1115.2	52.676		33.988	141.556
	368	1107.2	61.957		26.337	151.782
374	1099.2	63.064		14.180	164.038	

## ตารางผนวกที่ ก29 (ต่อ)

รอบที่	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาตรน้ำ หมัก (มิลลิลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
2	380	1091.2	64.501		5.202	174.713
	380.25	1219.2	56.150		62.566	150.111
	384	1211.2	45.062		56.750	155.931
	388	1203.2	47.439		47.762	159.069
	392	1195.2	46.652		41.032	169.654
	398	1187.2	45.648		29.052	178.918
	404	1179.2	51.282		18.447	195.277
	408	1171.2	48.649		11.022	204.033
	412	1163.2	53.473		4.823	210.463
	413	1155.2	54.371		3.838	215.067
	413.25	1290.6	46.150		62.847	182.259
	417	1282.6	46.388		55.961	182.744
	422	1274.6	45.092		47.809	190.060
	428	1266.6	51.457		36.362	200.620
	432	1258.6	49.613		31.091	210.098
	436	1250.6	55.108		24.170	222.603
	440	1242.6	58.406		16.409	229.575
	446	1234.6	56.815		6.544	235.244
	448	1226.6	56.309		4.481	238.961
	448.25	1369.4	48.433		65.196	201.926
	452	1361.4	54.787		60.782	205.348
	456	1353.4	53.239		54.506	212.408
	460	1345.4	38.881		49.022	217.139
	464	1337.4	38.909		42.426	229.815

## ตารางผนวกที่ ก29 (ต่อ)

รอบที่	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาตรน้ำ หมัก (มิลลิลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
2	468	1329.4	41.410		35.904	237.912
	472	1321.4	45.426		28.310	247.336
	480	1313.4	45.459		17.072	261.354
	484	1305.4	49.427		11.391	263.267
	486	1297.4	51.754		8.877	275.680
	486.25	1448.8	42.617		70.520	229.333
	492	1440.8	38.831		63.717	236.715
	496	1432.8	43.548		57.614	245.077
	500	1424.8	44.606		55.748	258.190
	504	1416.8	36.506		51.435	268.718
	508	1408.8	39.387		45.592	273.821
	512	1400.8	57.281		39.256	280.601
	518	1392.8	57.523		32.794	290.172
	524	1384.8	62.895		25.666	299.127
	528	1376.8	47.073		21.513	307.453
	532	1368.8	43.873		17.855	312.195
	538	1360.8	39.393		13.005	316.067
	544	1352.8	39.679		9.382	320.849
	548	1344.8	52.592		7.702	326.112
	552	1336.8	40.985		5.952	334.063
3	552.5	750.0	23.417		64.817	182.681
	554	742.0	23.854		62.866	178.225
	556	734.0	27.129		59.372	183.261
	560	726.0	39.339		35.736	180.590

## ตารางผนวกที่ ก29 (ต่อ)

รอบที่	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาตรน้ำ หมัก (มิลลิลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
3	562	718.0	47.824		21.594	183.392
	566	710.0	63.486		0.461	182.101
	568	702.0	68.180		0.615	176.091
	568.25	734.0	63.167		22.738	158.616
	570	726.0	69.895		8.392	159.293
	572	718.0	73.775		0.426	160.449
	574	710.0	73.090		0.595	161.161
	574.25	796.0	65.600		74.939	135.344
	577	788.0	70.064		70.688	139.191
	580	780.0	58.833		63.527	142.582
	584	772.0	57.493		54.103	150.730
	590	764.0	61.367		38.666	168.523
	596	756.0	61.086		24.711	172.516
	602	748.0	62.112		14.620	190.923
	608	740.0	66.351		5.336	197.877
	609	732.0	67.385		3.994	203.843
	609.25	813.0	54.100		64.945	157.727
	615	805.0	53.863		56.269	165.652
	620	797.0	53.129		49.000	180.336
	626	789.0	55.574		38.142	189.372
	632	781.0	58.555		27.385	199.321
	638	773.0	61.001		17.640	225.222
	644	765.0	53.155		8.852	234.195
	648	757.0	54.988		3.875	244.472

## ตารางผนวกที่ ก29 (ต่อ)

รอบที่	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาตรน้ำ หมัก (มิลลิลิตร)	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)
	648.25	845.0	43.833		74.394	192.346
	654	835.0	43.684		66.742	204.102
	660	827.0	49.062		55.932	207.137
	666	819.0	48.612		47.018	222.009
	672	811.0	52.478		36.667	243.744
	679	803.0	52.668		25.858	259.642
	684	795.0	52.914		18.112	269.236
	690	787.0	53.846		9.988	277.217
	696	779.0	56.008		4.175	293.583
	696.25	861.0	44.283		67.938	235.958
	702	851.0	46.288		61.401	247.591
	708	843.0	47.799		53.253	260.778
	714	835.0	42.964		44.164	275.607
	720	827.0	44.820		35.528	280.509
	726	819.0	50.094		26.385	292.611
	733	811.0	49.455		16.429	301.934
	738	803.0	50.466		9.812	317.538
	744	795.0	53.429		4.270	325.042
	750	787.0	56.853		1.715	336.016



ภาคผนวก ข  
วิธีวิเคราะห์

## 1. การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (วรสิทธิ์, 2541)

- 1.1 อบหลอดทดลองแล้วชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน
- 1.2 ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง นำไปหมუნเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไว้วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ ไซโลส และไซลิทอล
- 1.3 ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปหมუნเหวี่ยงที่ 4,000 รอบต่อนาที รินส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำอีกครั้ง
- 1.4 นำเซลล์ไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 1.5 ชั่งน้ำหนักหลอดพร้อมเซลล์แห้ง แล้วคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งดังนี้

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

## 2. การวิเคราะห์ปริมาณไซโลส (วรสิทธิ์, 2541)

วิเคราะห์หาปริมาณไซโลสในสารละลายตามวิธีของ Deschatelets and Yu (1986) โดยอาศัยการเกิดเฟอฟูรอล (furfural) จากเพนโทส ในสารละลายกรดแอสซิดิกที่มี thiourea อยู่แล้วเติม p-bromoaniline acetate เพื่อทำปฏิกิริยากับเฟอฟูรอลได้สารละลายสีชมพู

### 2.1 สารเคมี

ใช้ p-bromoaniline reagent เตรียมโดยละลาย thiourea ประมาณ 4 กรัม ในกรดแอสซิดิกเข้มข้นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วแยกส่วนใสออกมา (กรดแอสซิดิกเข้มข้นด้วย thiourea) จากนั้นละลาย p-bromoaniline 2 กรัม ลงในส่วนใสนั้น

### 2.2 การเตรียมสารละลายไซโลสมาตรฐาน

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** การเตรียมสารละลายมาตรฐานไซโลสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

หลอดที่	0.5 กรัมต่อลิตร 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 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง (ความเข้มข้นประมาณ 0.1-0.5 กรัมต่อลิตร) หรือสารละลายไซโลสมาตรฐาน 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 นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของไซโลสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จาก

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

### 3. การหาปริมาณไซลิทอล (สารโอรันและคณะ, 2544)

วิเคราะห์หาปริมาณไซลิทอลในสารละลายตามวิธีของ Adler and Gustafsson (1980) โดยอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชันของไซลิทอลเป็นฟอร์มัลดีไฮด์ด้วยเปอร์ไอโอเดตในสารละลายกรดในระยะเวลาสั้น ๆ แล้วหยุดปฏิกิริยากับ butane-2,3-diol แล้ววิเคราะห์ปริมาณด้วยฟอร์มัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้น โดยทำปฏิกิริยากับสารละลาย pentane-2,4-dione ได้สารละลายสีเหลือง

#### 3.1 สารเคมี

3.1.1 Periodate reagent ( $\text{NaIO}_4$  0.015 โมลาร์ ใน  $\text{HCl}$  0.16 โมลาร์) เตรียมโดยละลาย  $\text{NaIO}_4$  3.2084 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นลงไป 13.3 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร

3.1.2 Butane-2, 3-diol 0.02 โมลาร์เตรียมโดยบีบ butane-2, 3-diol มา 1.8 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร

3.1.3 Pentane-2, 4-dione (เตรียมใช้ทันที) เตรียมโดยการละลายแอมโมเนียมแอสซิเทต 154.16 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 500 มิลลิลิตร เติมกรดแอสซิติคเข้มข้นปริมาตร 40 มิลลิลิตร เติม pentane-2, 4-dione ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร

#### 3.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไซลิทอล

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 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น นำไปเตรียมสารละลายไซลิทอลความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงในตารางผนวกที่ ข2

## ตารางผนวกที่ ข2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไซลิทอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

หลอดที่	0.05 กรัมต่อลิตร 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 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง (ความเข้มข้นไซลิทอลประมาณ 10-50 มิลลิกรัมต่อลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

3.3.2 เติม periodate reagent ลงไป 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.3.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที

3.3.4 เติม butane-2, 3-diol 0.02 โมลาร์ ลงไป 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.3.5 เติม pentane-2, 4-dione solution ลงไป 2.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.3.6 นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3.3.7 ทำให้เย็นเท่าอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

3.3.8 นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของไซลิทอลในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณจาก

$$\text{ความเข้มข้นของไซลิทอล (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times 1,000}$$

#### 4. การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ด้วยวิธีดีเอ็นเอส (สารโรจนัมและคณะ, 2544)

วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ในสารละลายตามวิธีของ Miller (1959)

##### 4.1 สารเคมี

3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 1.0 % เตรียมโดยชั่งดีเอ็นเอส 10 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายด่างที่ละน้อย (NaOH 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) จนให้ละลายเข้ากันจนหมด นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนจนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นเติม potassium sodium tartrate (Rochelle salt) ลงไปที่ละน้อยจนครบ 300 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

**หมายเหตุ** อาจจะเติมโซเดียมซัลไฟต์อีก 0.05% ก่อนนำสารละลายดีเอ็นเอสไปใช้

##### 4.2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์ (ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารมาตรฐาน)

4.2.1 เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งกลูโคสมา 0.1000 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

4.2.2 เตรียมสารละลายน้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้นต่าง ๆ จากสารละลายน้ำตาลกลูโคส 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตารางผนวกที่ ข3

**ตารางผนวกที่ ข3** การเตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

หลอดที่	1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กลูโคส (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0.0	0.5	0.0
2	0.1	0.4	0.2
3	0.2	0.3	0.4
4	0.3	0.2	0.6
5	0.4	0.1	0.8
6	0.5	0.0	1.0

### 4.3 วิธีการ

4.3.1 บีบสารละลายตัวอย่าง (ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 0.0 – 1.0 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

4.3.2 เติมสารละลาย DNS ลงไป 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสม จากนั้นหุ้มปากหลอดด้วยกระดาษอลูมิเนียม

4.3.3 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปแช่น้ำเย็นทันที 5 นาที

4.3.4 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

4.3.5 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

4.3.6 นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน เพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณจาก

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

## 5. การหาปริมาณเซลล์ยีสต์ทั้งหมด (วรสิทธิ์, 2541)

การหาปริมาณเซลล์ยีสต์โดยการนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตามวิธีของ Lee *et al.* (1981) ย้อมสีเซลล์ด้วยเมทีลีนบลูเพื่อแยกความแตกต่างระหว่างเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต โดยที่เซลล์ที่ไม่มีชีวิตจะติดสีฟ้า ส่วนเซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสี

### 5.1 สารเคมี

5.1.1 สารละลายเมทีลีนบลู เตรียมโดยละลายเมทีลีนบลู 0.025 กรัม NaCl 0.9 กรัม KCl 0.042 กรัม  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.048 กรัม  $\text{NaHCO}_3$  0.02 กรัม และกลูโคส 1.0 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร

5.1.2 Ringer salt solution เตรียมโดยละลาย NaCl 2.15 กรัม KCl 0.075 กรัม  $\text{CaCl}_2$  0.12 กรัม และ  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.5 กรัม ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร (Collin *et al.*, 1989)

### 5.2 วิธีการ

5.2.1 เจือจางตัวอย่างสารแขวนลอยเซลล์ด้วย Ringer salt solution

5.2.2 นำตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายเมทีลีนบลู ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร

5.2.3 นำไปหยดลงบนสไลด์ Haemocytometer

5.2.4 วางสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้กำลังขยาย 40 เท่า ปรับจนเห็นตารางสี่เหลี่ยมชัดเจน

5.2.5 นับจำนวนเซลล์หนึ่งแถว (5 ช่องสี่เหลี่ยมใหญ่) หากเกิน 300 เซลล์ให้เจือจางตัวอย่างใหม่

5.2.6 นับจำนวนเซลล์อีกสองแถว รวมทั้งสิ้น 15 ช่องสี่เหลี่ยมใหญ่

### 5.3 การคำนวณ

#### 5.3.1 จำนวนเซลล์

$$\text{จำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อลิตร)} = \frac{\sum_{i=1}^{15} n_i}{15Ad(10^{-6})}$$

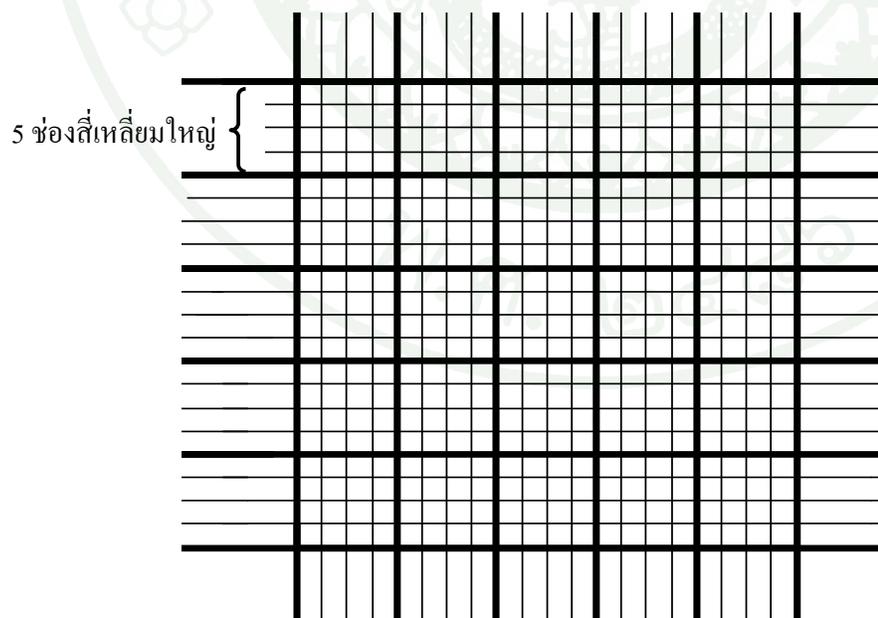
เมื่อ  $n_i$  คือ จำนวนเซลล์ในช่องสี่เหลี่ยมใหญ่

$A$  คือ พื้นที่ของสี่เหลี่ยมใหญ่ มีขนาดเท่ากับ 0.04 ตารางมิลลิเมตร

$d$  คือ ความลึกของสไลด์ (0.1 มิลลิเมตรสำหรับ Haemocytometer และ 0.2 มิลลิเมตรสำหรับ Petroff Hausser)

#### 5.3.2 ธรรมชาติการมีชีวิต

$$\text{ธรรมชาติการมีชีวิต (\%)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ไม่ติดสี}}{\text{จำนวนเซลล์ที่ไม่ติดสี} + \text{จำนวนเซลล์ที่ติดสี}} \times 100$$



ภาพผนวกที่ ๑1 สไลด์ Haemocytometer ที่ใช้ในการหาปริมาณเซลล์

## ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ -นามสกุล	ศิวพร วรรณวิไล
วัน เดือน ปี ที่เกิด	5 พฤษภาคม 2526
สถานที่เกิด	อำเภอเมืองน่าน จังหวัดน่าน
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ชีวเคมีและชีวเคมีเทคโนโลยี) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้โครงการสร้างกำลังคนเพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมระดับ ปริญญาโท (สกว. - สสว.) ปี พ.ศ. 2550