



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การผลิตไซลิตอลจากน้ำตาลไซโลสโดยวิธีการหมัก Production of Xylitol from Xylose by Fermentation

โดย สาโรจน์ ศิริคั่นสนียกุล และคณะ

กรกฎาคม พ.ศ. 2543

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การผลิตไซลิทอลจากน้ำตาลไซโลสโดยวิธีการหมัก Production of Xylitol from Xylose by Fermentation

คณะผู้วิจัย

1. นายสาโรจน์ หิรัญเสนากุล ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร ม.เกษตรศาสตร์
2. นายวรสิทธิ์ โทจำปา ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร ม.เกษตรศาสตร์
3. นายวันทร์ เรืองพานิช ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร ม.เกษตรศาสตร์
4. นายศุภพงศ์ ภูวนิพนธ์พันธุ์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร ม.เกษตรศาสตร์
5. Prof. Masatoshi Matsumura Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba, Japan

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ชุดโครงการ ทุนวิจัยหลังปริญญาเอก

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การผลิตโซลิตทอลจากน้ำตาลไซโลสโดยวิธีการหมัก ได้รับทุนวิจัยหลังปริญญาเอกจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) เป็นระยะเวลาโครงการ 3 ปี ตั้งแต่วันที่ 1 สิงหาคม 2540 ถึงวันที่ 31 กรกฎาคม 2543 คณะผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบคุณ สกว. ที่ให้การอุดหนุนทุนวิจัยในการทํางานวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขออวยพรภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนด้านอุปกรณ์เครื่องมือและห้องวิจัยในการทํางานวิจัยในหัวข้อมานานตั้งกล่าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งคณะผู้วิจัยขอขอบคุณผลงานวิจัยนี้แก่ Prof. Dr.-Ing. Manfred Rizzi ที่ล่วงลับไปแล้วที่เป็นผู้ริเริ่มและสนับสนุนการวิจัยเรื่องนี้ตลอดมา

คณะผู้วิจัย

31 กรกฎาคม 2543

บทคัดย่อ

สัญญาเลขที่ PDF/68/2540

ชื่อโครงการ การผลิตโซลิตอลจากน้ำพาดโซไลต์โดยวิธีการหมัก

คณะผู้วิจัย สาโรจน์ ศิริคันธนีโยกุล¹ วรสิทธิ์ โทงจำปา¹ พรินทร์ เรืองพาณิชย์¹
ศุภพงศ์ ภูวพัฒน์พันธ์² Masatoshi Matsumura²

¹ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ฯ กรุงเทพฯ 10900

โทร. 579-8903, 579-5521 โทรสาร 579-4096, 942-8442

² Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba, Tennodai 1-1-1
Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

อีเมล tagissai@ku.ac.th

ระยะเวลาโครงการ 3 ปี (1 สิงหาคม พ.ศ. 2540 - 31 กรกฎาคม พ.ศ. 2543)

วัตถุประสงค์ 1. ศึกษาผลของพีเอชและแบบจำลองของพีเอชต่อการผลิตโซลิตอล
2. ศึกษาการผลิตโซลิตอลแบบต่อเนื่องระบบหมักเบียร์เซลล์
3. ศึกษาการผลิตโซลิตอลด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

วิธีการ ศึกษาผลของพีเอชต่อการเพาะเลี้ยง *Candida mogii* ATCC 18364 แบบเบ็ดเสร็จ ในอัตรา 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 °C และเวลาเพาะเลี้ยงโซไลต์เริ่มต้น 30 g l⁻¹ ภายใต้ภาวะที่มีอากาศเพียงพอและออกซิเจนจำกัด และศึกษาผลของอัตราหมักเบียร์ในการผลิตโซลิตอลแบบต่อเนื่องระบบหมักเบียร์เซลล์ ภายใต้ภาวะที่มีอากาศเพียงพอและออกซิเจนจำกัด ที่อุณหภูมิ 30 °C และ pH 5.0

ผลการทดลอง *Candida mogii* ATCC 18364 เติบโตและผลิตโซลิตอลได้ดีที่ pH 4.5 และ 5.0 ในการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ ซึ่งให้ผลได้โซลิตอลเท่ากับ 0.55 g g⁻¹ (อากาศเพียงพอ) และ 0.71 g g⁻¹ (ออกซิเจนจำกัด) ในการผลิตโซลิตอลแบบต่อเนื่องระบบหมักเบียร์เซลล์ เมื่อลดอัตราส่วนการหมักเบียร์ลง ทำให้ผลได้เซลล์สูงขึ้น 1.76 เท่า (อากาศเพียงพอ) และผลได้และอัตราจำเพาะการผลิตของโซลิตอลเพิ่มขึ้น 3 และ 1.5 เท่า (ออกซิเจนจำกัด) พบว่าระบบหมักเบียร์เซลล์ที่มีเซลล์เริ่มต้นสูงให้อัตราการผลิตโซลิตอลสูงกว่าระบบที่มีเซลล์เริ่มต้นต่ำ 3.3 เท่า และสูงกว่าการผลิตโซลิตอลแบบเบ็ดเสร็จ 5.2 เท่า

สรุปและวิจารณ์ การผลิตโซลิตอลแบบเบ็ดเสร็จควรแบ่งเป็น 2 ระยะ คือ การผลิตเซลล์ที่ pH 4.5 (อากาศเพียงพอ) และการผลิตโซลิตอลที่ pH 5.0 (ออกซิเจนจำกัด) การเติมกลูโคสทำให้ผลได้โซลิตอลและอัตราการผลิตโซลิตอลเพิ่มขึ้น 23.59 และ 58.82 % ส่วนการผลิตโซลิตอลแบบต่อเนื่องระบบหมักเบียร์เซลล์ภายใต้ภาวะออกซิเจนจำกัด ให้อัตราจำเพาะการผลิตโซลิตอลสูงสุด ($\mu = 0.028 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) ที่ $D = 0.067 \text{ h}^{-1}$, $R = 0.50$ และอัตราการผลิตโซลิตอลเชิงปริมาตรสูงสุด ($Q_p = 0.160 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) ที่ $D = 0.087 \text{ h}^{-1}$, $R = 0.76$

ข้อเสนอแนะ การผลิตโซลิตอลแบบต่อเนื่องระบบหมักเบียร์เซลล์ภายใต้ภาวะออกซิเจนจำกัด สามารถให้อัตราการผลิตโซลิตอลเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นสูง และการใช้กลูโคสเป็นสับสเตรตร่วม การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์โซลิตริกเทสและโซลิตอลฟิโตรีเจนจะช่วยให้เข้าใจถึงกลไกการผลิตโซลิตอลภายในเซลล์เพื่อใช้กับการผลิตโซลิตอลด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เชิงโครงสร้างต่อไป

คำสำคัญ โซลิตอล, *Candida mogii* ATCC 18364, โซไลต์, แบบจำลองทางคณิตศาสตร์

Abstract

Project Code	PDF/68/2540
Project Title	Production of Xylitol from Xylose by Fermentation
Investigators	Sarola Sirisansaneeyakul ¹ Wacalit Tochampa ² Nann Ruangpanit ¹ Supapong Bhuwapathanapun ¹ Masatoshi Matsumura ² ¹ Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok 10900, Thailand Tel. 579-8903, 579-5521 Fax 579-4096, 942-8442 ² Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba, Tennodai 1-1-1 Tsukuba, Ibaraki 305, Japan
E-mail Address	tagisai@ku.ac.th
Project Period	3 years (August 1997 to July 2000)
Objectives	1. Study on pH and kinetic model for pH affecting xylitol production 2. Study on continuous production of xylitol with cell recycle 3. Kinetic modelling of the production of xylitol

Methodology *Candida mogii* ATCC 18364 was used in both batch and continuous culture with cell recycle for xylitol production from D-xylose under aerobic and oxygen-limited conditions. In batch culture, the effects of pH (3.0-7.0) on growth and xylitol production were investigated with an initial xylose concentration of 30 g l⁻¹ and 30 °C. In continuous culture with cell recycle, xylitol production was investigated under at controlled pH 5.0 and 30 °C with a feed xylose concentration of 30 g l⁻¹ at D = 0.06-0.07 h⁻¹ and at recycle ratios (R) of 0.50 and 0.75.

Results *Candida mogii* ATCC 18364 found its optimal growth and xylitol formation in batch culture at pH 4.5 and 6.0, respectively. As a result, the xylitol yield in aerobic and oxygen-limited conditions were 0.55 and 0.71 g g⁻¹, respectively. In continuous culture with cell recycle, an decrease of recycle ratio (R), increased the biomass yield 1.70 times under aerobic condition, while the xylitol yield and productivity were increased 3 and 1.5 times under oxygen-limited condition. As compared to cell recycling system with low cell density and to batch culture, the cell recycling system with high cell density enhanced the productivity of xylitol 3.3 and 5.2 times under oxygen-limited condition, respectively.

Discussion/ Conclusion In batch culture, the production of biomass and xylitol should be performed at pH 4.5 (aerobic) and pH 6.0 (oxygen-limited), respectively. Glucose feeding improves both xylitol yield (23.58%) and productivity (58.82%) in oxygen-limited batch culture. In oxygen-limited continuous culture with cell recycle, maximum specific rate of xylitol production ($\mu_x = 0.028$ g g⁻¹ h⁻¹) was obtained at D = 0.067 h⁻¹ and R = 0.50, while maximum volumetric productivity ($Q_p = 0.160$ g l⁻¹ h⁻¹) was found at a higher recycle ratio (R = 0.76).

Suggestion/ Further Implication/ Implementation In oxygen-limited continuous culture with cell recycle, xylitol productivity can be improved with using higher initial cell density and glucose as co-substrate. The study of intracellular xylose reductase and xylitol dehydrogenase affecting xylitol formation is necessary to develop structured model describing the production of xylitol by fermentation.

Keywords xylitol, *Candida mogii* ATCC 18364, xylose, kinetic modelling

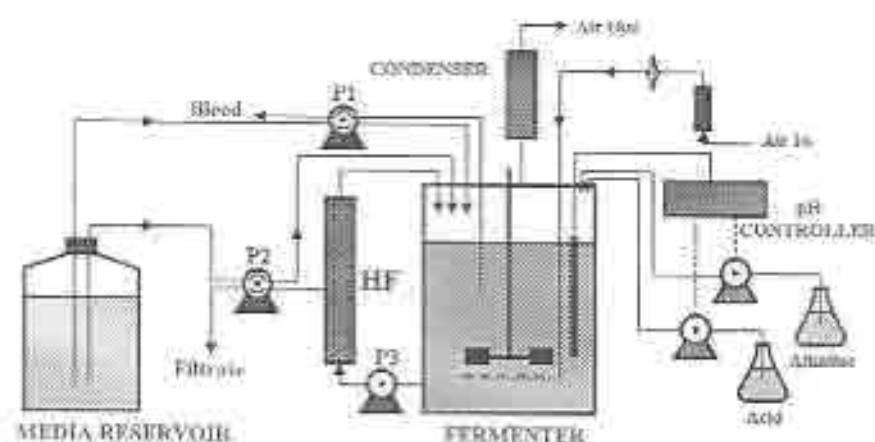
เนื้อเรื่องย่อ (Executive Summary)

สัญญาเลขที่	PDF/68/2540
ชื่อโครงการ	การผลิตไซอิทธิตจากน้ำตาลไซโลสโดยวิธีการหมัก
คณะผู้วิจัย	ลาโรจน์ หิรัณสนธิกุล¹ วรสิทธิ์ โทงจำปา¹ นรินทร์ เรืองพานิช¹ คุณพงศ์ ภูวพัฒน์พันธ์² Masatoshi Matsumura² ¹ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900 โทร. 579-8903, 579-5521 โทรสาร 579-4096, 942-8442 ² Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba, Tennodai 1-1-1 Tsukuba, Ibaraki 305, Japan Tel. 0298 (53) 6624 Fax 0298 (53) 4605
อีเมล	nglath@ku.ac.th
ระยะเวลาโครงการ	3 ปี (1 สิงหาคม พ.ศ. 2540 - 31 กรกฎาคม พ.ศ. 2543)
วัตถุประสงค์	1. ศึกษาผลของพีเอชและแบบจำลองของพีเอชต่อการผลิตไซอิทธิตด้วยการหมัก 2. ศึกษาการผลิตไซอิทธิตแบบต่อเนื่องระบบหมวนเวียนเซลล์ 3. ศึกษาการผลิตไซอิทธิตด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

วิธีการทดลอง

การเพาะเลี้ยง *Candida mogii* ATCC 16354 แบบเบ็ดเสร็จ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ประกอบด้วยกลีเซอรอล 135 มิลลิลิตร และอาหารเพาะเชื้อ 1.35 ลิตร ที่มีกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร และไซโลส 5 กรัมต่อลิตร ควบคุมการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 1,000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm และพีเอชเท่ากับ 5.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมไซโลสให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอชของน้ำหมักในถังหมักของแต่ละการทดลองเป็น 3.0, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0 และ 7.0 ควบคุมพีเอชให้คงที่ตลอดการเพาะเลี้ยง เมื่อไซโลสลดลงเหลือ 5 กรัมต่อลิตร จึงเติมไซโลสอีกเพื่อให้ได้ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงต่อภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจนโดยใช้อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.3 vvm

ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องระบบหมวนเวียนเซลล์ (ภาพที่ 1) หลังจากเตรียมกลีเซอรอลในถังหมักจนครบ 24 ชั่วโมงแล้ว ทำการควบคุมการเติมอาหารเพาะเชื้อที่อัตราส่วนการหมวนเวียน (R) เท่ากับ 0.75 และ 0.50 ภายใต้ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอ (aerobic condition) ด้วยอัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm และภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน (oxygen limiting condition) ด้วยอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.3 vvm และควบคุมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพีเอช 5.0 จนกระทั่งการเพาะเลี้ยงจนเข้าสู่สภาวะคงตัว (steady state) โดยกำหนดไว้ที่ปริมาณการแทนที่น้ำหมักเท่ากับ 4 เท่า



ภาพที่ 1 การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องระบบหมุนเวียนเซลล์

ผลการทดลอง

ในการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ พืช *Candida mogii* ATCC 18364 เติบโตและผลิตไซลิทอลได้ ที่พีเอช 4.5 และ 6.0 ความเข้มข้น ซึ่งให้ผลไซลิทอล (Y_{exo}) ในการที่มีอากาศและภาวะที่มีออกซิเจน จำกัดเท่ากับ 0.55 and 0.71 g g⁻¹ ตามลำดับ จากผลการทดลองสามารถสรุปแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ ที่ใช้ทำนายอัตราผลของพีเอชต่อการเติบโตและการเกิดไซลิทอลได้ดังนี้

ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอ

$$\begin{aligned}\frac{dC_x}{dt} &= \frac{0.0394 \cdot C_s}{(0.559 + C_s) \left(1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{5.76 \times 10^{-3}} + \frac{1.43 \times 10^{-8}}{10^{-\text{pH}}} \right)} C_s \\ \frac{dC_s}{dt} &= - \left(\frac{r_s}{0.173} + 4.83 \times 10^{-3} C_s \right) \\ \frac{dC_p}{dt} &= \frac{0.223 \cdot C_s}{(17.7 + C_s) \left(1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{1.05 \times 10^{-4}} + \frac{1.81 \times 10^{-8}}{10^{-\text{pH}}} \right)} C_s\end{aligned}$$

ภาวะจำกัดออกซิเจน

$$\begin{aligned}\frac{dC_x}{dt} &= \frac{0.005 \cdot C_s}{(17.65 + C_s) \left(1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{8.09 \times 10^{-7}} + \frac{1.74 \times 10^{-8}}{10^{-\text{pH}}} \right)} C_s \\ \frac{dC_s}{dt} &= - \left(\frac{r_s}{0.0328} + 8.83 \times 10^{-3} C_s \right) \\ \frac{dC_p}{dt} &= \frac{0.108 \cdot C_s}{(27.57 + C_s) \left(1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{3.39 \times 10^{-4}} + \frac{1.25 \times 10^{-8}}{10^{-\text{pH}}} \right)} C_s\end{aligned}$$

ในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องด้วยระบบหมุนเวียนเซลล์ ภายใต้ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอ เมื่อลดอัตราส่วนการหมุนเวียนลงจาก 0.75 เป็น 0.50 ทำให้ผลได้เซลล์สูงขึ้น 1.76 เท่า ส่วนการลดอัตราส่วนการหมุนเวียนลงจาก 0.76 เป็น 0.50 ภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน ทำให้ผลได้โซลิตทอลและอัตราจำเพาะการผลิตโซลิตทอลเพิ่มขึ้น 3 และ 1.5 เท่าตามลำดับ การผลิตโซลิตทอลในระบบหมุนเวียนเซลล์ที่มีเซลล์เริ่มต้นสูง ภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน ให้อัตราการผลิตโซลิตทอลสูงกว่าระบบหมุนเวียนเซลล์ที่มีเซลล์เริ่มต้นต่ำ 3.3 เท่า และสูงกว่าอัตราการผลิตโซลิตทอลของการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ 5.2 เท่า และสามารถอธิบายการผลิตโซลิตทอลแบบต่อเนื่องระบบหมุนเวียนเซลล์ในภาวะจำกัดออกซิเจนได้ด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่บรรยายการสร้างมวลชีวภาพ การใช้ไนโตรเจน และการเกิดโซลิตทอล ดังนี้

$$\begin{aligned}\frac{dC_x}{dt} &= \left(\frac{0.0485 - C_x}{13.91 + C_x} - \beta \cdot D \right) C_x \\ \frac{dC_s}{dt} &= D \cdot (C_s^f - C_s) - \left(\frac{r_s}{0.371} + 0.0653 \cdot C_x \right) \\ \frac{dC_p}{dt} &= -D \cdot C_p + \frac{0.0735 \cdot C_x}{35.53 + C_x} C_s\end{aligned}$$

สำหรับการเพิ่มอัตราการผลิตโซลิตทอลแบบเบ็ดเสร็จภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจนโดยการเติมกลูโคส พบว่าการเติมกลูโคสเพื่อทดแทนการใช้ไนโตรเจนในการเติบโตและการสังเคราะห์โคเอนไซม์ NADPH ของยีสต์ในวิถีเพนโทสนั้น สามารถทำให้ผลได้และอัตราการผลิตของโซลิตทอลเพิ่มขึ้นได้ 23.59 และ 58.82 % ตามลำดับ โดยผลได้โซลิตทอลที่ได้คิดเป็น 93.84 % ของค่าผลได้โซลิตทอลทรงพุ่ม

สรุปและวิจารณ์

จากการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ *C. mogii* ATCC 18364 สามารถเติบโตและผลิตโซลิตทอลได้ ภายใต้ภาวะที่แตกต่างกัน โดยมีอัตราการผลิตเฉพาะสูงสุดเท่ากับ 0.046 h^{-1} ภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจนที่พีเอช 4.5 ส่วนการผลิตโซลิตทอลจะเกิดได้ดีภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน ที่พีเอช 6.0 ให้ผลได้โซลิตทอลเท่ากับ 0.711 กรัมโซลิตทอลต่อกรัมไนโตรเจน คิดเป็น 77.96 เปอร์เซ็นต์ของผลได้ตามทฤษฎี ดังนั้น ต้องการเพิ่มผลผลิตโซลิตทอลในการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จด้วยการเพาะเลี้ยงเป็น 2 ระยะ คือ เริ่มจากการเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีพีเอช 4.5 ภายใต้ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอ เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ จากนั้นจึงค่อยปรับพีเอชให้เป็น 6.0 ภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน เพื่อการผลิตโซลิตทอลต่อไป

ส่วนการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องระบบหมุนเวียนเซลล์ภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจนพบว่า ที่อัตราการเจือจาง $D = 0.067 \text{ h}^{-1}$ ให้อัตราจำเพาะการผลิตโซลิตทอลสูงสุด ($q_p = 0.028 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) ที่อัตราส่วนหมุนเวียน $R = 0.50$ แต่ให้อัตราการผลิตโซลิตทอลเชิงปริมาตรสูงสุด ($Q_p = 0.160 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) ที่อัตราหมุนเวียน $R = 0.76$ การผลิตโซลิตทอลในระบบหมุนเวียนเซลล์ที่มีเซลล์เริ่มต้นสูง ภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน จะให้อัตราการผลิตโซลิตทอลสูงกว่าระบบหมุนเวียนเซลล์ที่มีเซลล์เริ่มต้นต่ำ 3.3 เท่า และสูงกว่าอัตราการผลิตโซลิตทอลของการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ 5.2 เท่า อย่างไรก็ตาม จากการศึกษานี้พบว่าการเติมกลูโคสเพื่อทดแทนการใช้ไนโตรเจนในการเติบโตและการสังเคราะห์โคเอนไซม์ NADPH ของยีสต์ในวิถีเพนโทส ถือได้ว่าเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการเพิ่มอัตราการผลิตโซลิตทอลโดยวิธีการหมัก เพราะทำให้

ผลได้และอัตราการผลิตของโซลิกทอลเพิ่มขึ้นได้ โดยมีผลได้ของโซลิกทอลคิดเป็น 93.64 % ของค่าผลได้โซลิกทอลทางทฤษฎี ส่วนแนวทางการทางคณิตศาสตร์ของการผลิตโซลิกทอลที่พัฒนาขึ้นมาสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นแนวทางเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตโซลิกทอลด้วยวิธีการหมักต่อไปได้

ข้อเสนอแนะ

การผลิตโซลิกทอลแบบต่อเนื่องระบบหมุนเวียนเซลล์ที่มีเซลล์เริ่มชั้นสูงภายใต้ภาวะจำเพาะออกซิเจน สามารถทำให้ลดเวลาการผลิตโซลิกทอลเพิ่มขึ้นได้ แต่ควรเลือกใช้ความเข้มข้นของโซไลสที่เหมาะสมร่วมกับการเติมกลูโคสเป็นกับสเทรตรวมในอาหารเพาะเชื้อที่ใช้เดิม และพัฒนารูปแบบการเติมอาหารให้สัมพันธ์กับอัตราการให้สับสเทรตและการผลิตโซลิกทอล นอกจากนี้การผลิตโซลิกทอลที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ยีสต์ยังมีสหสัมพันธ์กับเอนไซม์โซไลสรีกเทสและโซลิกทอลดีไฮโดรจีเนสภายในเซลล์ และเน้นการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ภายใต้ภาวะการเพาะเลี้ยงต่างๆ จะช่วยให้เข้าใจถึงกลไกที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ได้ดียิ่งขึ้น และนำไปสู่การอธิบายการผลิตโซลิกทอลจากโซไลสโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์เชิงโครงสร้างได้

คำสำคัญ โซลิกทอล, *Candida mogii* ATCC 18364, โซไลส, แบบจำลองทางคณิตศาสตร์

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	(1)
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	(2)
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	(3)
เนื้อเรื่องย่อ (Executive Summary)	(4)
สารบัญ	(8)
เนื้อหางานวิจัย	
บทนำ	1
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	10
ผลการทดลองและวิจารณ์	15
สรุปและข้อเสนอแนะ	30
คำอธิบายสัญลักษณ์	32
เอกสารอ้างอิง	33
การนำเสนอผลงานวิจัย (Output)	36
ภาคผนวก	37
1. การไปประชุมเสนอผลงานวิชาการ	38
2. การตีพิมพ์บทความวิจัยในวารสาร	57

บทกวี

โซลิตทอลเป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งซึ่งเป็นอนุพันธ์ของโซโลส พกติโซลิตทอลเป็นสารมีฤทธิ์ในกระบวนการหมักแบบอซิติกของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Hollman และ Touster, 1957) และสามารถพบได้ตามธรรมชาติในผักและผลไม้หลายชนิด (Washburn และคณะ, 1973) โซลิตทอลมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพดังแสดงสรุปไว้ในตารางที่ 1 แต่โซลิตทอลมีคุณสมบัติที่แตกต่างจากน้ำตาลแอลกอฮอล์ชนิดอื่น ๆ คือ มีความหวานประมาณเท่ากับซูโครส ให้ความรู้สึกเย็น และไม่ทำให้เกิดฟันผุ (Popper และ Olinger, 1988) เนื่องจากจุลินทรีย์ในช่องปากเช่น Streptococci ไม่สามารถให้โซลิตทอลเป็นแหล่งอาหารได้จึงไม่มีการผลิตกรดขึ้น (Makioka, 1979) ดังนั้นในมิวจูบัสจึงมีการนำโซลิตทอลไปใช้เป็นสารให้ความหวานในผลิตภัณฑ์หลายชนิด เช่น หมากฝรั่ง ทอฟฟี่ เครื่องดื่ม ชาเย็น และผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ (สารวิจัย, 2537 สารวิจัย, 2540/41) แต่เมื่อนำมาผลิตโซลิตทอล ทำไม่ได้โดยการสกัดจากผักและผลไม้ แต่ให้ผลได้ที่ไม่คุ้มค่าเนื่องจากโซลิตทอลที่เป็นองค์ประกอบในผักและผลไม้มีปริมาณต่ำ ปัจจุบันการผลิตโซลิตทอลในระดับอุตสาหกรรมใช้กระบวนการทางเคมี (Makino และ Hamalainen, 1977) โดยการนำโซลูชันของน้ำตาลเรสเปคตาโมสตามด้วยแอลกอฮอล์ ซึ่งจะได้น้ำตาลและน้ำโซโลสเป็นองค์ประกอบอยู่ จากนั้นนำสารผ่านกระบวนการเติมไฮโดรเจน (hydrogenation) แล้วกระบวนการนี้ใช้ต้นทุนในการผลิตสูงและมีสารปนเปื้อนมาก ทำให้ยากต่อการทำใหบริสุทธิ์ ดังนั้นจึงมีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับการผลิตโซลิตทอลโดยวิธีทางชีวภาพมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อยีสซึ่งสกุล *Candida* ยีสเช่น *C. boidinii* (Vanderkna และคณะ, 1985; Vongkaveanwit และ Tani, 1989) *C. guilliermondii* (Meynal และคณะ, 1981; Nolleau และคณะ, 1993; Roberto และคณะ, 1995; Tamsila และคณะ, 1993) *C. rugosa* (Srisamsameeyakul และคณะ, 1995) *C. piraprosia* (Furuta และคณะ, 1991) *C. pulchra* (Kilpreedhavanich และคณะ, 1984; Nishio และคณะ, 1989) *C. tropicalis* (Gong และคณะ, 1981; Honiso และคณะ, 1992; Silva และ Atchar, 1994; Silva และคณะ, 1998) โดยส่วนใหญ่จะศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเติบโตและการผลิตโซลิตทอล เช่น พีเอช อุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ และปริมาณน้ำของน้ำกลั่น เป็นต้น

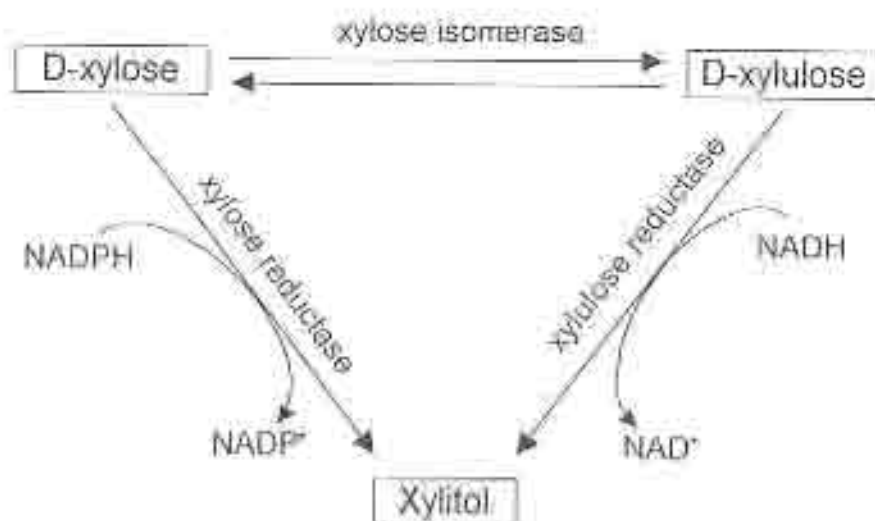
วิธีการผลิตโซลิตทอลโดยจุลินทรีย์

การผลิตโซลิตทอลจากโซโลสในจุลินทรีย์เกิดได้ 2 วิธี คือ โซโลสจะถูกเปลี่ยนไปเป็นโซลิตทอลโดยตรงโดยเอนไซม์โซโลสรีดักเทสที่มี NADPH เป็นโคแฟกเตอร์ หรือโซโลสถูกเปลี่ยนไปเป็นโซลิตทอลโดยเอนไซม์โซโลสรีดักเทสโดยมี NADH เป็นโคแฟกเตอร์ (Hofer และคณะ, 1971) ดังแสดงไว้ในภาพที่ 1

ตารางที่ 1 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพที่สำคัญของไซอิทอล

คุณสมบัติ	รายละเอียด
สูตรโมเลกุล	$C_5H_{12}O_5$
โครงสร้าง	$ \begin{array}{ccccccc} & H & & OH & & H & \\ & & & & & & \\ HOCH_2 & -C- & C- & C- & CH_2OH \\ & & & & & & \\ & OH & & H & & OH & \end{array} $
น้ำหนักโมเลกุล	152.1
รูปร่าง	ผลึก
สี	ขาว
รสชาติ	หวาน
กลิ่น	ไม่มีกลิ่น
ความหวานสัมพัทธ์	มีความหวานเท่ากับซูโครส แต่หวานมากกว่า ซอร์บิทอล และแมนนิทอล
จุดหลอมเหลว	$93.4 - 94.7^{\circ}C$
จุดเดือด	$216^{\circ}C$
การละลายในน้ำ ($20^{\circ}C$)	64.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
การละลายในเอทานอล	1.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
การละลายในเมทานอล	6.0 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร
การดูดความชื้น	ในที่มีความชื้นสูงจะดูดความชื้นได้มากกว่าซูโครส แต่โดยกว่าซอร์บิทอล
ค่าเบี่ยงเบนแสงจำเพาะ สารปนเปื้อน	ไม่มีคุณสมบัติการเบี่ยงเบนแสง แมนนิทอล, ซอร์บิทอล, กาแลกติกอล, อะราบิทอล

ที่มา : Emodi (1978)

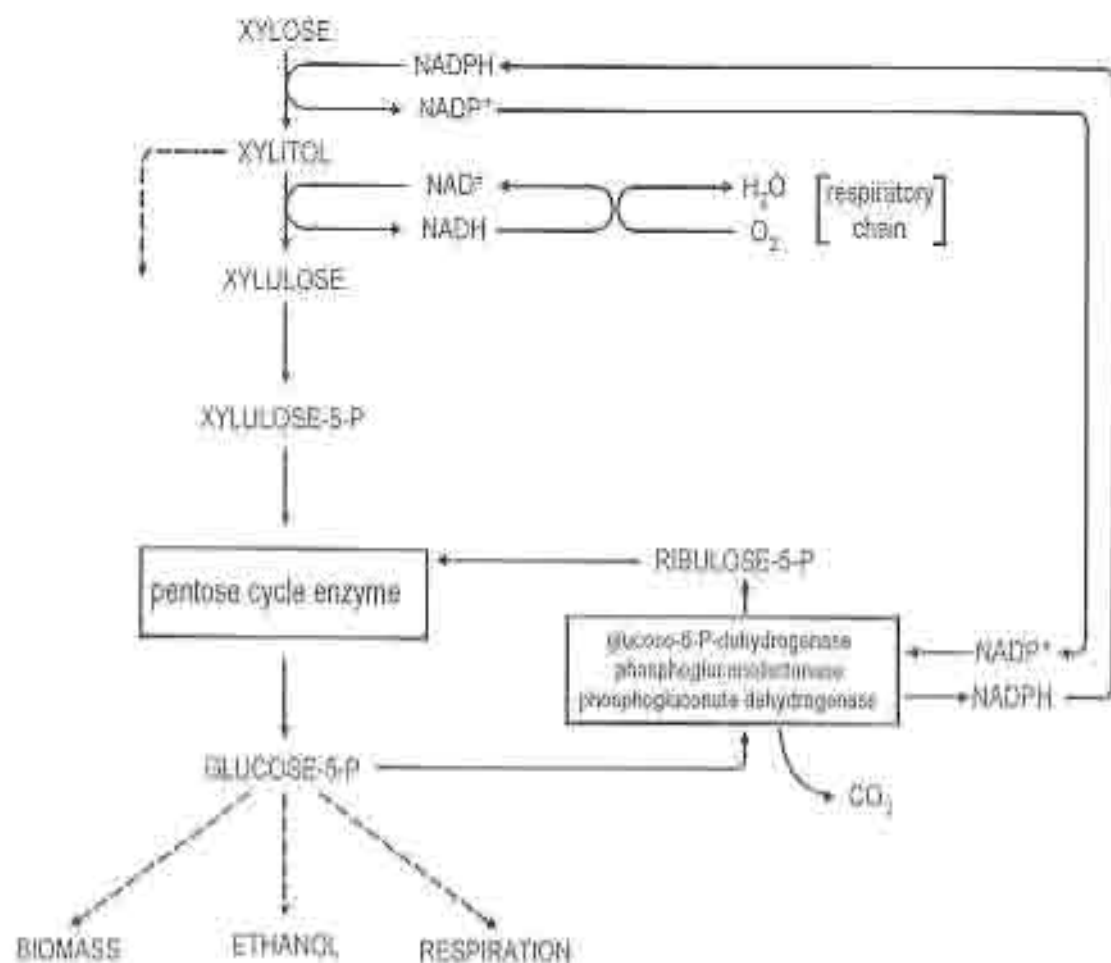


ภาพที่ 1 วิธีการผลิตไซลิทอลจากเมแทบอลิซึมของไซโลส

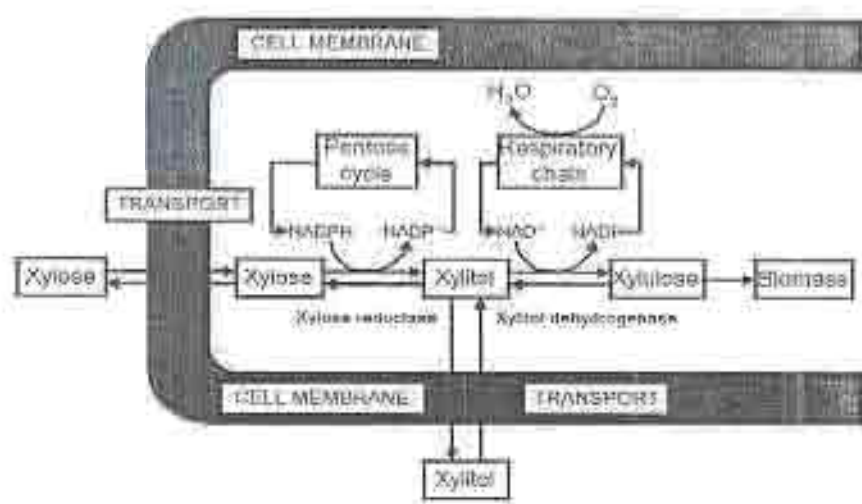
การคำนวณหาผลได้ทางทฤษฎีของการเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลิทอลจากเมแทบอลิซึมของไซโลสในยีสต์ (ภาพที่ 2) พิจารณาได้จาก 4 ภาวะคือ

1. การที่ยีสต์ไซโลสไปเป็นไซลิทอลด้วยเอนไซม์ไซโลสรีดักเตสนั้นใช้โคเอนไซม์ NADPH ส่วนการออกซิไดส์ไซลิทอลไปเป็นไซลูโลสด้วยเอนไซม์ไซลิทอลดีไฮโดรจีเนสนั้นใช้โคเอนไซม์ NAD⁺
2. ไซโลสทั้งหมดถูกยีสต์ไปเป็นไซลิทอล โดยมีโคเอนไซม์ NADPH ที่ได้จากสิ่งเฉพาะที่มาจากวัฏจักรเพนโทส และไซลิทอลทั้งหมดถูกออกซิไดส์ไปเป็นไซลูโลส โดยใช้โคเอนไซม์ NAD⁺ ที่ได้จากการสังเคราะห์จากกระบวนการหายใจ
3. ยีสต์ไม่มีกลไกของการเปลี่ยนโคเอนไซม์ระหว่าง NADH และ NADPH
4. ภายใต้ภาวะที่เซลล์ไม่มีการเติบโต ไซลิทอลจะถูกออกซิไดส์เพื่อการสังเคราะห์ NADPH เท่านั้น ส่วนไซลิทอลที่เหลือจะถูกปล่อยออกมานอกเซลล์

การผลิตไซลิทอลในยีสต์โดยใช้ไซโลสเป็นสารตั้งต้นในภาวะที่เซลล์ไม่มีการเติบโตนั้น ไซลิทอลส่วนใหญ่จะถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ โดยมีบางส่วนที่ถูกออกซิไดส์ไปเพื่อสังเคราะห์ NADPH เท่านั้น (ภาพที่ 2) เมื่อทำสมดุลมวลของคาร์บอนและโคเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง จะได้สมการทางทฤษฎีเท่ากับ 0.90 โมลของไซลิทอลต่อโมลของไซโลสที่ถูกใช้ (Babosa และคณะ, 1988)



ภาพที่ 2 การสร้างและใช้โคเอนไซม์(coenzyme regeneration) ในยีสต์ที่หมักไซโลสได้
ที่มา : Barbosa และคณะ (1988)



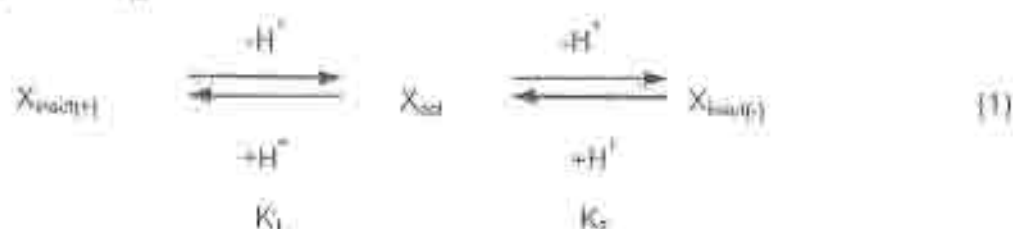
ภาพที่ 3 เมแทบอลิซึมของไซโลสในยีสต์
ที่มา : Sirlsaneeyakul และคณะ (1992)

นอกจากนี้ Srisansakooeyakul และคณะ (1992) ยังได้สร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์เชิงโครงสร้างของการใช้ไฮโดรไลติกโดยเอนไซม์ *C. mogii* ATCC 18384 เพื่ออธิบายถึงการผลิตไซลิทอลจำพวกการหมัก โดยพิจารณาถึงไฮโดรและไซลิทอลที่อยู่ในเซลล์และนอกเซลล์ (ภาพที่ 3) เริ่มจากการที่ไฮโดรนอกเซลล์ถูกส่งผ่านเข้าไปในเซลล์ และไฮโดรในเซลล์ถูกเปลี่ยนเป็นไซลิทอลโดยเอนไซม์ไฮโดรลิติกเซลล์ ไซลิทอลที่เกิดขึ้นจะถูกส่งออกนอกเซลล์ อีกส่วนหนึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรไลติกโดยเอนไซม์ไฮโดรลิติกเซลล์ไฮโดรลิติกเซลล์เพื่อใช้สังเคราะห์เป็นมวลชีวภาพต่อไป

ผลของพีเอชต่อการเติบโตและการเกิดผลิตภัณฑ์

ค่าพีเอชของอาหารเพาะเชื้อเป็นพารามิเตอร์สำคัญที่มีผลกระทบต่ออัตราการเติบโตของเซลล์ และการเกิดผลิตภัณฑ์ของกระบวนการหมัก จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถเติบโตได้ในช่วง 3-4 หน่วยพีเอช พีเอชที่จุลินทรีย์เติบโตได้ดีที่สุดจะอยู่ในช่วงแคบๆ จึงต้องมีการควบคุมพีเอชให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม โดยมีการใช้บัฟเฟอร์หรือการใช้ระบบควบคุมพีเอชด้วยการเติมกรด-ด่าง เนื่องจากการหมักบางกระบวนการจะมีค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตและการเกิดผลิตภัณฑ์แตกต่างกัน (Vongsvannit และ Tani, 1989; Vandeska และคณะ, 1995) ฉะนั้นจึงควรมีการหาพีเอชที่เหมาะสมที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สูงสุด

Andriyeva และ Bryukov (1973) ได้เสนอแบบจำลองทางคณิตศาสตร์แสดงผลของพีเอชต่อการเติบโตและการเกิดผลิตภัณฑ์ โดยอาศัยกลไกทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ ในทำนองเดียวกัน Ohara และคณะ (1992) ได้ใช้จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ที่อธิบายถึงผลของ H^+ ต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา (Bailey และ Ollis, 1986) มาประยุกต์ใช้กับอัตราการเติบโตของเซลล์ โดยกำหนดให้เซลล์ที่มีกิจกรรม (X_{act}) และเซลล์ที่ไม่มีกิจกรรม (X_{inact}) เปลี่ยนแปลงไปตามปฏิกิริยาการให้และรับโปรตอน (H^+) จึงกลไกปฏิกิริยาดังต่อไปนี้



โดยที่

$$K_1 = \frac{X_{act}[H^+]}{X_{inact(+)}} \quad (2)$$

$$K_2 = \frac{X_{inact(-)}[H^+]}{X_{act}} \quad (3)$$

$$X_c = X_{act} = X_{inact(+)} + X_{inact(-)} \quad (4)$$

ดังนั้นสัดส่วนของเซลล์ที่มีกิจกรรมต่อเซลล์ทั้งหมด ($\frac{X_{act}}{X_o}$) จึงเท่ากับ

$$\frac{X_{act}}{X_o} = \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}} \quad (5)$$

เนื่องจากอัตราการเติบโตจำเพาะของเซลล์จะขึ้นอยู่กับเซลล์ที่มีกิจกรรม เพราะฉะนั้น สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเติบโตจำเพาะ และ $[H^+]$ ได้ดังนี้

$$kX_o \frac{X_{act}}{X_o} = \mu(H^+) = \frac{kX_o}{1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}} \quad (6)$$

$$\mu(H^+) = \frac{\mu_m}{1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}} \quad (7)$$

$$\text{หรือ} \quad \mu(pH) = \frac{\mu_m}{1 + \frac{[10^{-pH}]}{K_1} + \frac{K_2}{[10^{-pH}]}} \quad (8)$$

ในทางตรงกันข้าม ก็สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นอยู่กับพารามิเตอร์ $q_p(pH)$ ได้ดังนี้

$$q_p(pH) = \frac{\mu_p^m}{1 + \frac{[10^{-pH}]}{K_1} + \frac{K_4}{[10^{-pH}]}} \quad (9)$$

จากสมการ (8) และ (9) สามารถคำนวณหาค่าพีเอชที่เหมาะสมที่จะใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้อัตราการเติบโตและอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์สูงสุดได้ดังนี้

สำหรับการเติบโต

$$[H^+]_{opt}^0 = \sqrt{K_1 K_2} \quad (10)$$

$$pH_{opt}^0 = \frac{1}{2}(pK_1 + pK_2) \quad (11)$$

สำหรับการเกิดผลิตภัณฑ์

$$[H^+]_{opt}^p = \sqrt{K_3 K_4} \quad (12)$$

$$pH_{opt}^p = \frac{1}{2}(pK_3 + pK_4) \quad (13)$$

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิตไฮโดรเจน

เมื่ออาศัยสมการโมนอด (Monod equation) ร่วมกับจลนพลศาสตร์การเติบโตที่ขึ้นอยู่กับพีเอช สามารถอธิบายอัตราการเติบโตจำเพาะของเซลล์ที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไฮโดรเจนและพีเอชได้ดังนี้

$$\mu(C_s, pH) = \frac{\mu_m C_s}{(K_s^* + C_s) \left(1 + \frac{10^{-pH}}{K_1} + \frac{K_2}{10^{-pH}} \right)} \quad (14)$$

ฉะนั้นสามารถแสดงสมการอนุพันธ์ของการเติบโตและการใช้ไฮโดรเจนได้ดังนี้

$$\begin{aligned} \frac{dC_s}{dt} = r_s &= \mu(C_s, pH) C_x \\ &= \frac{\mu_m C_s C_x}{(K_s^* + C_s) \left(1 + \frac{10^{-pH}}{K_1} + \frac{K_2}{10^{-pH}} \right)} \end{aligned} \quad (15)$$

$$\frac{dK_s^*}{dt} = -r_s = -\left(\frac{r_s}{Y_{x/s}} + m_s C_s \right) \quad (16)$$

ส่วนสมการอนุพันธ์ของการเกิดไฮโดรเจนนั้นก็อาศัยจลนพลศาสตร์แบบโมนอดอธิบายเช่นเดียวกัน โดยที่อัตราการผลิตก๊าซจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไฮโดรเจนและพีเอชดังนี้

$$\frac{dC_H}{dt} = r_H = \frac{q_p^m C_s C_x}{(K_H^* + C_s) \left(1 + \frac{10^{-pH}}{K_3} + \frac{K_4}{10^{-pH}} \right)} \quad (17)$$

การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องด้วยระบบหมุนเวียนเซลล์

การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่เรียกว่า "chemostat" นั้น อัตราการเติบโตจะถูกจำกัดด้วยอัตราเจือจาง (dilution rate) โดยไม่สามารถเพาะเลี้ยงที่อัตราเจือจางสูงกว่าอัตราเจือจางวิกฤตได้เพราะจะทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า "wash out" ดังนั้นจึงมีการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงแบบหมุนเวียนเซลล์ขึ้นมา ซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องที่มีการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักโดยการพ่นของแยก การตกตะกอน หรือการกรอง แล้วนำเซลล์กลับเข้าไปยังถังหมักดังเดิม ระยะเวลาที่เซลล์อยู่ในถังหมัก (cell retention time) จึงไม่ขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่น้ำหมักอยู่ในถังหมัก (culture liquid retention time) ทำให้สามารถเพาะเลี้ยงด้วยอัตราเจือจางที่สูงกว่าอัตราเจือจางวิกฤตได้ เมื่อความ

เข้มข้นของเซลล์สูงขึ้น จะสามารถทำให้ระบบเข้าสู่ภาวะคงตัว (steady state) ได้โดยการแบ่งน้ำหมักออกจากถังหมักโดยตรงอย่างต่อเนื่อง (bleeding) ด้วยอัตราที่เหมาะสม

ดังนั้นจึงมีการนำระบบเซลล์หมุนเวียนนี้มาใช้ในการเพิ่มอัตราการผลิต และลดผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากผลิตภัณฑ์ เช่น การผลิตเอทานอล (Damiano และคณะ, 1985; Lafforgue-Delome และคณะ, 1994; Lee และ Chang, 1987; Monbouquette, 1992; Mistry และ Cooney, 1989; Nishisawa และคณะ, 1983) และการผลิตกรดแลคติก (Park และคณะ, 1989; Nishiwaki, 1997) เป็นต้น โดยศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อสภาพเพาะเลี้ยงแบบหมุนเวียนเหล่านี้ อาทิเช่น อัตราเจือจาง อัตราส่วนการหมุนเวียน (recycle ratio) และ อัตราการไหลเวียน (circulation flow rate) เป็นต้น

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของระบบหมุนเวียนเซลล์ (Lee และ Chang, 1987)

สมมติมวลของเซลล์ สืบเสาะส และผลิตภัณฑ์ในระบบหมุนเวียนเซลล์ (ภาพที่ 4) แสดงได้ดังนี้

$$\begin{aligned}\frac{dC_s}{dt} &= -\beta DC_s + r_s \\ &= (\mu - \beta D)C_s\end{aligned}\quad (18)$$

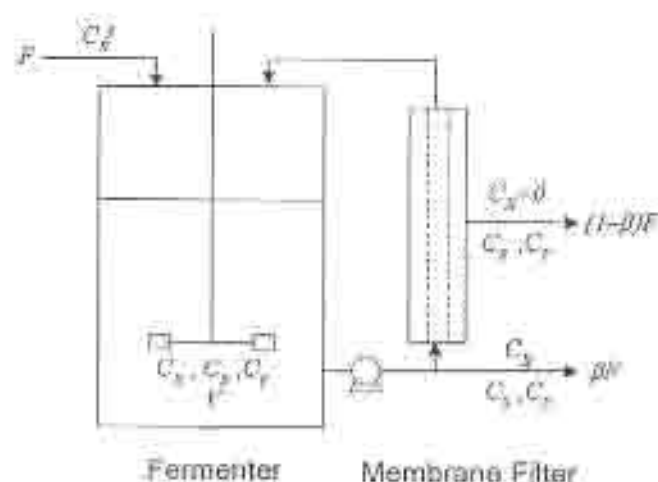
$$\begin{aligned}\frac{dC_p}{dt} &= D(C_p^f - C_p) - r_p \\ &= D(C_p^f - C_p) - \left(\frac{r_p}{Y_{p/s}} + m_p C_s\right)\end{aligned}\quad (19)$$

$$\begin{aligned}\frac{dC_v}{dt} &= -DC_v + r_v \\ &= -DC_v + q_v C_s\end{aligned}\quad (20)$$

โดยที่อัตราการเติบโตจำเพาะ และอัตราจำเพาะการเกิดผลิตภัณฑ์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสืบเสาะส ตามสมการของโมแนต์

$$\mu = \frac{\mu_m C_s}{K_s^* + C_s}\quad (21)$$

$$q_p = \frac{q_p^m C_s}{K_s^* + C_s}\quad (22)$$



ภาพที่ 4 ระบบการเพาะเลี้ยงแบบหมุนเวียนเซลล์

จากสมการที่ 18 จะเห็นได้ว่า ถ้าเป็นระบบที่มีการหมุนเวียนเซลล์ทั้งหมด ($\beta = 0$) เซลล์จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ความเข้มข้นของเซลล์จะสูงที่สุดจนไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงต่อไปได้ ดังนั้น เพื่อรักษาความเข้มข้นของเซลล์ให้เหมาะสมจึงจำเป็นต้องมีการแยกน้ำหมักออกจากถังหมักโดยตรงอย่างต่อเนื่อง และทำการเพาะเลี้ยงในภาวะที่ไม่ทำให้เกิดปรากฏการณ์ "wash out" ($D < \frac{\mu}{\beta}$) จนระบบสามารถเข้าสู่ภาวะคงตัว จะได้ว่า

$$\mu = \beta D \quad (23)$$

$$\eta_p = \frac{DC_p}{C_x} \quad (24)$$

$$\eta_d = \frac{D(C_s^f - C_s)}{C_x} \quad (25)$$

$$Y_{s/x} = \frac{\mu C_x}{D(C_s^f - C_s)} = \frac{\beta C_s}{C_s^f - C_s} \quad (26)$$

$$Y_{p/s} = \frac{\eta_p C_x}{D(C_s^f - C_s)} = \frac{C_p}{C_s^f - C_s} \quad (27)$$

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์การทดลอง

- 1.1 ถังหมัก (EYELA Mini Jar fermenter, Model M-100, Tokyo Rikakikai Co.,Ltd.) ขนาด 2 ลิตร พร้อมระบบควบคุมการกวน การให้อากาศ และอุณหภูมิ
- 1.2 เครื่องควบคุมพีเอช (EYELA pH Contruller, Model FC-10, Tokyo Rikakikai Co.,Ltd.)
- 1.3 เครื่องสูบลม (EYELA Microtube pump, Model MP-3, Model MP-201 และ Model RP-1000, Tokyo Rikakikai Co.,Ltd.)
- 1.4 หน่วยกรองเซลล์ (Kurafay UF Module, Model KL-U-M 6302) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.5 เซนติเมตร ยาว 34.5 เซนติเมตร
- 1.5 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์
- 1.6 เครื่องหมุนเหวี่ยง
- 1.7 ไมโครคอมพิวเตอร์

2. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ศึกษาคือ *Candida mogii* ATCC 18364 ซึ่งเป็นยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตไซโทลเอสได้สูงสุด (Sittirakongkeeyakul และคณะ, 1995)

3. อาหารเพาะเชื้อ

อาหารที่ใช้เพาะเชื้อในปริมาณ 1 ลิตร (Rizzi และคณะ, 1988) ประกอบด้วย KH_2PO_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 CaCl_2 0.10 กรัม FeCl_3 0.10 มิลลิกรัม $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.40 มิลลิกรัม $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.46 มิลลิกรัม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.40 มิลลิกรัม Myo-Inositol 30.50 มิลลิกรัม Ca-Pantothenate 16.20 มิลลิกรัม Thiamine- HCl 3.60 มิลลิกรัม Pyridoxal- HCl 0.90 มิลลิกรัม Biotin 0.018 มิลลิกรัม และแหล่งอาหารคาร์บอน ปริมาณเท่ากับ 5.0

4. วิธีการทดลอง

4.1 การศึกษาผลของพีเอชต่อการเติบโต การใช้ไซโตสและการผลิตไซลิทอล

เตรียมกล้าเชื้อในฟลาสก์ โดยเชื้อยีสต์ตั้งในอาหารเพาะเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปั่นบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายลงในอาหารเพาะเชื้อใหม่ปริมาตร 135 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปั่นบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เตรียมกล้าเชื้อในถังหมัก โดยถ่ายกล้าเชื้อจากฟลาสก์ลงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีอาหารเพาะเชื้ออยู่ 1.35 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเซลล์ โดยใช้แหล่งอาหารคาร์บอนเป็นกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร และไซโตส 5 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 1,000 รอบต่อ

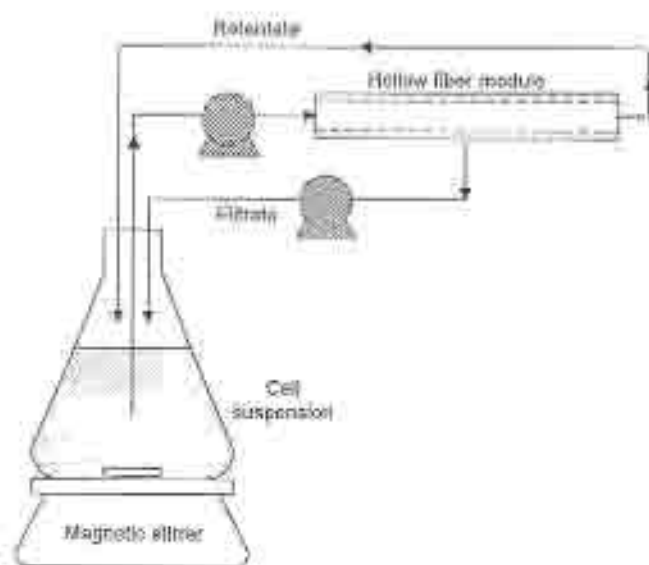
น้ำที่ อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm ความเข้มข้นเท่ากับ 5.0 โดยทางเติม NaOH หรือ H_2PO_4 ความเข้มข้น 2.0 นอร์มัล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

หลังจากเตรียมสารเชื้อในถังหมักจนครบ 24 ชั่วโมงแล้ว เริ่มศึกษาผลของพีเอช โดยเติมโซเดียมลงไปให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอชของน้ำหมักในถังหมักของแต่ละการทดลองเป็น 3.0, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0 และ 7.0 ความเข้มข้นให้คงที่ตลอดการเพาะเลี้ยง ภายใต้ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอโดยใช้อัตราการกวน 1,000 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 1 ชั่วโมง เมื่อโซเดียมลดลงเหลือประมาณ 5 กรัมต่อลิตร จึงเติมโซเดียมไปอีกครั้งให้ได้ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร แล้วเพาะเลี้ยงต่อภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจนโดยใช้อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.3 vvm เก็บตัวอย่างทุกๆ 4-6 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์แห้ง โซเดียม และโซเดียมฟอสเฟต

4.2 การศึกษาผลของอัตราการไหลเวียนและความเข้มข้นของเซลล์ต่ออัตราการกรอง

เตรียมสารแขวนลอยเซลล์ โดยนำน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบเบดสเติร์มาเหียงแยกเซลล์ นำเซลล์ที่ได้มาเจือจางด้วยอาหารเพาะเชื้อที่ไม่มีแหล่งอาหารคาร์บอนให้ได้ความเข้มข้น 20 และ 40 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปทดสอบการกรอง

จัดตั้งระบบทดสอบการกรอง โดยนำหน่วยกรองเซลล์ (hollow fiber module) มาต่อเข้ากับฟลาสก้าขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีสารแขวนลอยเซลล์อยู่ และตั้งอยู่บนเครื่องกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ใช้เครื่องสูบลมเวียนเซลล์ผ่านหน่วยกรองเซลล์และแยกของเหลวส่วนที่กรองได้ผ่านแก้วสู่ฟลาสก้าตั้งแสดงในภาพที่ 5 ทดสอบทดสอบการกรองโดยใช้เครื่องสูบลมเวียนเซลล์ด้วยอัตราการไหลเวียนเป็น 20, 30 และ 40 ลิตรต่อชั่วโมง เก็บตัวอย่างเซลล์เพื่อตรวจสอบการมีชีวิตของเซลล์ และวัดอัตราการกรองทุกๆ 4 ชั่วโมง



ภาพที่ 5 การกรองเซลล์ด้วย hollow fiber module

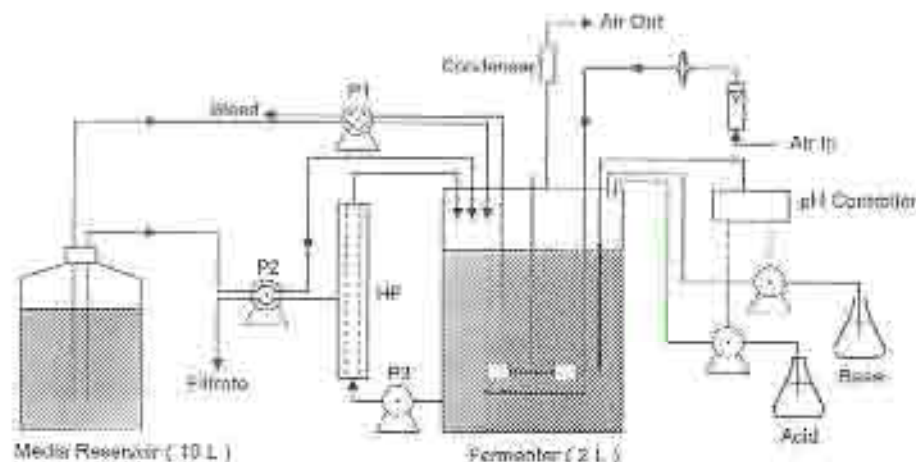
4.3 การศึกษาการผลิตโพลิทอสแบบต่อเนื่องโดยการหมุนเวียนเซลล์

ติดตั้งระบบการหมักแบบหมุนเวียนเซลล์ โดยทำการฆ่าเชื้อในหน่วยกรองเซลล์ โดยใช้เครื่องสูบลมเจียนเสทวาล์วความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เข้าไปในหน่วยกรองเซลล์เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หลังจากนั้นนำไปต่อเข้ากับถังหมักดังภาพที่ 6 ในระหว่างการเพาะเลี้ยงนั้น น้ำหมักจะถูกสูบล้อออกจากถังหมักเข้าสู่หน่วยกรองเซลล์ แล้วกลับเข้าไปยังถังหมักด้วยอัตราการไหลเวียนคงที่ ส่วนอาหารเพาะเชื้อจะถูกเติมเข้าไปยังถังหมักอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราที่เท่ากับอัตราของน้ำหมักที่ออกจากถังหมัก น้ำหมักที่ออกจากถังหมักมี 2 ส่วนคือ น้ำหมักส่วนที่กรองผ่านหน่วยกรองเซลล์ (filtrate) และน้ำหมักส่วนที่ออกจากถังหมักโดยตรง (bleed)

หลังจากที่เตรียมกล้าเชื้อในถังหมักจนครบ 24 ชั่วโมงแล้ว เริ่มการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องโดยการหมุนเวียนเซลล์ ควบคุมการเติมอาหารเพาะเชื้อโดยการปรับความเร็วของเครื่องสูบลมให้ได้ อัตราการไหล (F) เท่ากับ 0.1 ลิตรต่อชั่วโมง ปรับความเร็วของเครื่องสูบลมตัวที่ 1 (P1) และตัวที่ 2 (P2) เพื่อให้ได้อัตราส่วนการหมุนเวียน (R) เท่ากับ 0.75 และ 0.50 ดังตารางที่ 2 ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะการให้อากาศ 2 ภาวะ คือ ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอ (aerobic condition) ด้วยอัตราการหมุน 1000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 vvm และภาวะจำกัดออกซิเจน (oxygen limiting condition) ด้วยอัตราการหมุน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.3 vvm ในแต่ละการทดลองมีการควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และพีเอช 5.0 เพาะเลี้ยงจนเข้าสู่ภาวะคงตัว โดยกำหนดไว้ที่เริ่มการแทนที่น้ำหมักเท่ากับ 4 เท่า

ตารางที่ 2 อัตราการไหลของอาหารเพาะเชื้อผ่านเครื่องสูบลม P1 และ P2

$R = \frac{P2}{F}$	$\beta = \frac{P1}{F}$	P1 (l.h ⁻¹)	P2 (l.h ⁻¹)	F = P1 + P2 (l.h ⁻¹)
0.75	0.25	0.025	0.075	0.10
0.50	0.50	0.050	0.50	0.10



ภาพที่ 6 การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องโดยการหมุนเวียนเซลล์ด้วย hollow fiber module

4.4 การศึกษาการเติมเกลือโคสเพื่อเพิ่มอัตราการผลิตไฮลิทอลจากไฮไลส

เตรียมกัลลาเชื้อในฟลาสก์ เชื้อยีสต์เลี้ยงในอาหารเพาะเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปั่นบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายลงในอาหารเพาะเชื้อใหม่ปริมาตร 135 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปั่นบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เตรียมกัลลาเชื้อในถังหมัก ถ่ายกัลลาเชื้อจากฟลาสก์ลงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยง เชื้ออยู่ 1.15 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเซลล์ โดยใช้แหล่งอาหารคาร์บอนเป็นกลูโคส 10 กรัมต่อ ลิตร และไฮไลส 5 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที อัตรา การให้อากาศ 1.0 vvm ควบคุมพีเอชเท่ากับ 5.0 โดยการเติม NaOH หรือ H_2PO_4 ความเข้มข้น 2.0 นอร์มัล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เตรียมยีสต์ที่มีแอกติวิตีของเอนไซม์กลูโคสไฮไลส หลังจากเตรียมกัลลาเชื้อในถังหมักครบ 24 ชั่วโมงแล้ว เติมไฮไลสลงไปอีก 100 มิลลิลิตรให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร และปรับพี เอชของน้ำหมักในถังหมักเป็น 4.5 แล้วทำการเพาะเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการ กวน 1,000 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 vvm เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

เพาะเลี้ยงกัลลาภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน ภายหลังจากเพาะเชื้อในถังหมักจนครบ 12 ชั่วโมงแล้ว เติมไฮไลสลงไปอีก 100 มิลลิลิตรให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร และปรับพีเอช ของน้ำหมักในถังหมักเป็น 6.0 เพาะเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบ ต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.3 vvm

ศึกษามหาของการเติมกลูโคส ทำการแปรผันการเติมกลูโคส 1.15, 2.3, 4.5 และ 9.5 กรัมต่อ การเพาะเลี้ยง โดยใช้สารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 0.25, 12.53, 25.0, 37.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ด้วยอัตราการเติมกลูโคสเท่ากับ 3.5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมีปริมาตรทั้งหมดของสารละลายกลูโคสเท่ากับ 185 มิลลิลิตรต่อการเพาะเลี้ยง โดยใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง เท่ากับ 88 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 4 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง กลูโคส ไฮไลส และไฮลิทอล

5. การวิเคราะห์

5.1 จำนวนเซลล์ยีสต์ทั้งหมด นำสารแขวนลอยเซลล์มาเจือจางด้วย Ringer salt solution ให้ได้ ปริมาณเซลล์ประมาณ 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วผสมกับสารละลายเมทิลีนบลู หยอดลงบน haemocytometer ตรวจนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตามวิธีของ Lee และคณะ (1981)

5.2 ความหนาแน่นของเซลล์และน้ำหนักเซลล์แห้ง นำตัวอย่างที่เก็บได้ในแต่ละช่วงเวลามาวัด ความชื้นด้วยออสโมมิเตอร์ไฟฟ้าอัตโนมัติ ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร นำตัวอย่างที่เหลือมาหมุน เหยียง เก็บส่วนใสไว้วิเคราะห์ไฮไลสและไฮลิทอล ส่วนเซลล์นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

5.3 ไซโลส นำส่วนโลที่เก็บไว้มานั่งจากรางให้เหมาะสมแล้ววิเคราะห์ไซโลส ตามวิธีของ Deschatelots และ Yu (1986) โดยใช้ไซโลสเป็นสารมาตรฐาน

5.4 ไซลิทอล นำส่วนโลที่เก็บไว้มานั่งจากรางให้เหมาะสมแล้ววิเคราะห์ไซลิทอล ตามวิธีของ Adler และ Gustafsson (1980) โดยใช้ไซลิทอลเป็นสารมาตรฐาน

6. การประมาณค่าพารามิเตอร์และการเขียนแบบกระบวนการหมัก

การประมาณค่าพารามิเตอร์แบบจำลองทางคณิตศาสตร์โดยวิธี Simplex method (Nelder และ Mead, 1965) อาศัยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่พัฒนาโดย Institut fuer Bioverfahrenstechnik, Universität Stuttgart (ภาคผนวก ก) และเขียนแบบกระบวนการหมักโดยการแก้สมการเชิงอนุพันธ์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป ISIM digital simulation language (Dunn และคณะ, 1982) เปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าที่ได้จากการเขียนแบบกระบวนการหมัก ตามแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่สร้างขึ้นมา

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลของพีเอชต่ออัตราการเติบโต การใช้ไฮโดร และการผลิตไซลิทอล

จากการเพาะเลี้ยง *Candida mogii* แบบเบดเลอร์ในอาหารเพาะเชื้อที่ควบคุมพีเอช 3.0-7.0 จากผลการทดลองได้ค่าเฉพาะพารามิเตอร์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเติบโต การใช้ไฮโดร และการผลิตไซลิทอล แล้วหาความสัมพันธ์ของพารามิเตอร์ดังกล่าวกับพีเอช

1.1 ผลของพีเอชต่ออัตราการเติบโตจำเพาะ อัตราจำเพาะของการใช้ไฮโดร และอัตราจำเพาะของการผลิตไซลิทอล

อัตราการเติบโตจำเพาะของ *C. mogii* ให้แสดงในตารางที่ 3 ในระยะแรกของการเพาะเลี้ยงมีการให้อากาศอย่างเพียงพอ พบว่าเซลล์มีการเติบโตได้ดีที่พีเอช 4.5 ($\mu = 0.046\ h^{-1}$) และมีอัตราการเติบโตลดลงเมื่อพีเอชสูงหรือต่ำกว่า 4.5 เมื่อเริ่มภาวะการเพาะเลี้ยงให้ดูภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน ทำให้อัตราการเติบโตจำเพาะลดลงในทุกพีเอชของการเพาะเลี้ยง และพบว่าภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจนเซลล์มีอัตราการเติบโตจำเพาะที่ใกล้เคียงกัน ยกเว้นที่พีเอช 3.0 ซึ่งเซลล์ไม่มีการเติบโต

ตารางที่ 3 อัตราการเติบโตจำเพาะ การใช้ไฮโดร และการผลิตไซลิทอลที่พีเอชต่าง ๆ

pH	Anaerobic condition			Oxygen limiting condition		
	μ (h^{-1})	η_e ($g\ g^{-1}\ h^{-1}$)	η_p ($g\ g^{-1}\ h^{-1}$)	μ (h^{-1})	η_e ($g\ g^{-1}\ h^{-1}$)	η_p ($g\ g^{-1}\ h^{-1}$)
3.0	0.034	0.214	0.072	-	0.032	0.010
4.0	0.029	0.168	0.077	0.003	0.050	0.030
4.5	0.046	0.206	0.089	0.012	0.035	0.051
5.0	0.040	0.240	0.131	0.010	0.063	0.038
6.0	0.038	0.240	0.131	0.010	0.059	0.038
7.0	0.034	0.262	0.114	0.010	0.064	0.039

ความสัมพันธ์ระหว่างพีเอชของอาหารเพาะเชื้อกับอัตราการเติบโตจำเพาะแสดงดังภาพที่ 7 สามารถประมาณค่าพารามิเตอร์ตามสมการที่ 8 ได้ดังนี้

ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอ

$$\mu_m = 0.039\ h^{-1}$$

$$K_1 = 5.76 \times 10^{-2}\ mol\ l^{-1}$$

$$K_2 = 1.43 \times 10^{-8}\ mol\ l^{-1}$$

$$pH_m = 5.04$$

ภาวะจับติดออกซิเจน

$$\begin{aligned}\mu_n &= 0.012 \text{ h}^{-1} \\ K_i &= 8.99 \times 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1} \\ K_d &= 1.74 \times 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1} \\ pH_{opt} &= 5.90\end{aligned}$$

เมื่อพิจารณาสูงขึ้นทำให้อัตราจำเพาะของการใช้ไฮโดรเจนสูงขึ้น แต่ที่พีเอช 5.0, 6.0 และ 7.0 มีอัตราจำเพาะของการใช้ไฮโดรเจนที่ใกล้เคียงกัน และเมื่อจำกัดการให้ออกซิเจนจะทำให้อัตราจำเพาะของการใช้ไฮโดรเจนลดลงในทุกกรณี และทำให้อัตราจำเพาะของการผลิตโซลิกทอลลดลงด้วยเช่นกัน พีเอชนี้มีผลต่ออัตราจำเพาะของการผลิตโซลิกทอลทั้งภายใต้ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอและภาวะจำกัดออกซิเจนด้วยค่าที่ 8 สามารถประมาณค่าพารามิเตอร์ตามสมการที่ 9 ได้ดังนี้

ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอ

$$\begin{aligned}q_p'' &= 0.135 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1} \\ K_i &= 1.05 \times 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1} \\ K_d &= 1.81 \times 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1} \\ pH_{opt} &= 5.86\end{aligned}$$

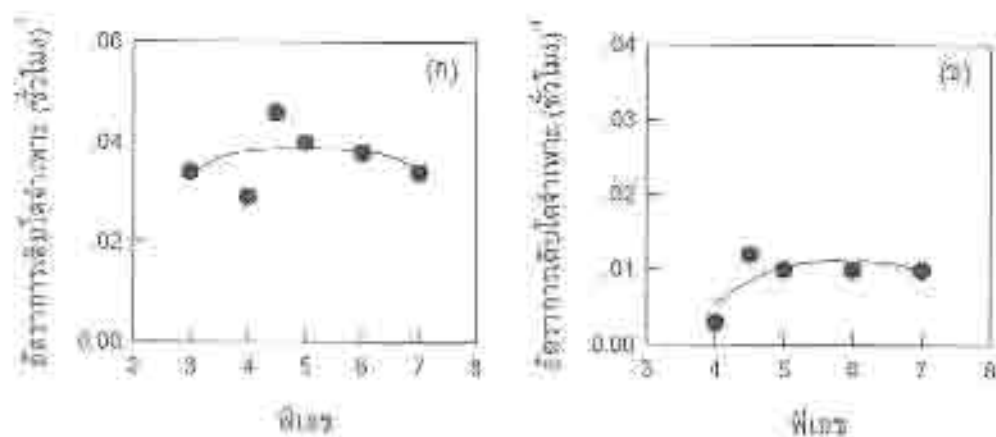
ภาวะจำกัดออกซิเจน

$$\begin{aligned}q_p'' &= 0.043 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1} \\ K_i &= 3.39 \times 10^{-6} \text{ mol.l}^{-1} \\ K_d &= 1.25 \times 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1} \\ pH_{opt} &= 5.69\end{aligned}$$

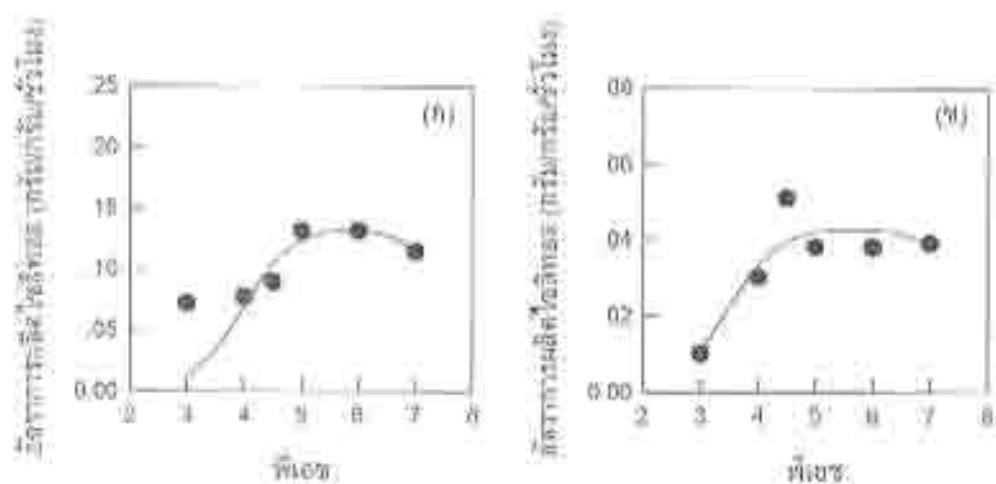
1.2 ผลของพีเอชต่อผลได้ของเซลล์และโซลิกทอล

ตารางที่ 4 แสดงผลได้ของเซลล์และผลได้ของโซลิกทอลจากไฮโดรเจนที่พีเอชต่างๆ จะเห็นได้ว่า ภายใต้ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอจะได้ผลได้ของเซลล์สูงสุดที่พีเอช 4.5 และภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจนจะได้ผลได้ของเซลล์สูงสุดที่พีเอช 6.0 ส่วนผลได้ของโซลิกทอลนั้นแตกต่างกันตามพีเอชและภาวะการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 4) เมื่อควบคุมการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 6.0 จะให้ผลได้ของโซลิกทอลสูงสุดทั้งภายใต้ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอและภาวะจำกัดออกซิเจน และพบว่ผลได้ของโซลิกทอลภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจนสูงกว่าภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอเฉลี่ยประมาณ 1.3 เท่า ยกเว้นที่พีเอช 3.0 ซึ่งภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอมีผลได้ของโซลิกทอลสูงกว่า

จะเห็นได้ว่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตและการเกิดโซลิกทอลนั้นต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Vongsavanter และ Tani (1989) และ Vandeska และคณะ (1995) ทั้งนี้เนื่องจากในช่วงที่เซลล์มีการเติบโตสูงนั้น ไฮโดรเจนถูกใช้ไปเพื่อการสร้างเซลล์มากกว่าการเกิดโซลิกทอล จึงทำให้ผลได้ของโซลิกทอลต่ำ จากการทดลองนี้ผลได้ของโซลิกทอลสูงสุดภายใต้ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอและภาวะจำกัดออกซิเจนที่พีเอช 6.0 คิดเป็น 80.42 % และ 77.96 % ของผลได้ตามทฤษฎี ตามลำดับ



ภาพที่ 7 ผลของพีเอชต่ออัตราการเติบโตจำเพาะภายใต้ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอ (ก) และภาวะจำกัดของออกซิเจน (ข)



ภาพที่ 8 ผลของพีเอชต่ออัตราจำเพาะของการผลิตไฮลิกอลภายใต้ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอ (ก) และภาวะจำกัดของออกซิเจน (ข)

ตารางที่ 4 ผลได้ของเซลล์และไซลิทอลที่พีเอชต่างๆ

pH	Aerobic condition			Oxygen limiting condition		
	Y_{xs} (g.g ⁻¹)	Y_{ps} (g.g ⁻¹)	$Y_{p/s}$ (%)	Y_{xs} (g.g ⁻¹)	Y_{ps} (g.g ⁻¹)	$Y_{p/s}$ (%)
3.0	0.154	0.362	39.69	-	0.253	27.74
4.0	0.167	0.482	50.66	0.064	0.589	64.58
4.5	0.221	0.460	50.44	0.148	0.627	68.75
5.0	0.158	0.546	59.87	0.155	0.605	68.34
6.0	0.158	0.551	60.42	0.166	0.711	77.98
7.0	0.134	0.451	49.45	0.150	0.607	68.58

หมายเหตุ ผลได้ของไซลิทอลตามทฤษฎีเท่ากับ 0.912 กรัมไซลิทอลต่อกรัมไซโลสที่ใช้ (Barbosa และคณะ 1988)

1.3 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิตไซลิทอลแบบเบิลเสิร์จ

ความเข้มข้นของเซลล์ ไซโลส และไซลิทอล ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่พีเอชต่างๆ เมื่อนำมาประมาณค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในสมการ 16-17 โดยวิธี Simplex method ได้ค่าพารามิเตอร์ที่เหมาะสมที่สุดดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 พารามิเตอร์ที่ได้จากการประมาณค่าโดยวิธี Simplex method

พารามิเตอร์	ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอ	ภาวะจำกัดออกซิเจน
μ_m (h ⁻¹)	0.0394	0.005
K_s^a (g.l ⁻¹)	0.559	17.65
$Y_{p/s}$ (g.g ⁻¹)	0.173	0.0328
m_s (g.g ⁻¹ h ⁻¹)	4.83×10^{-3}	8.83×10^{-3}
q_p^a (g.g ⁻¹ h ⁻¹)	0.223	0.108
K_p^b (g.l ⁻¹)	17.7	27.57

เมื่อนำค่าพารามิเตอร์ที่ได้มาลงในสมการ 15-16 ได้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิตไซลิทอลแบบเบิลเสิร์จดังนี้

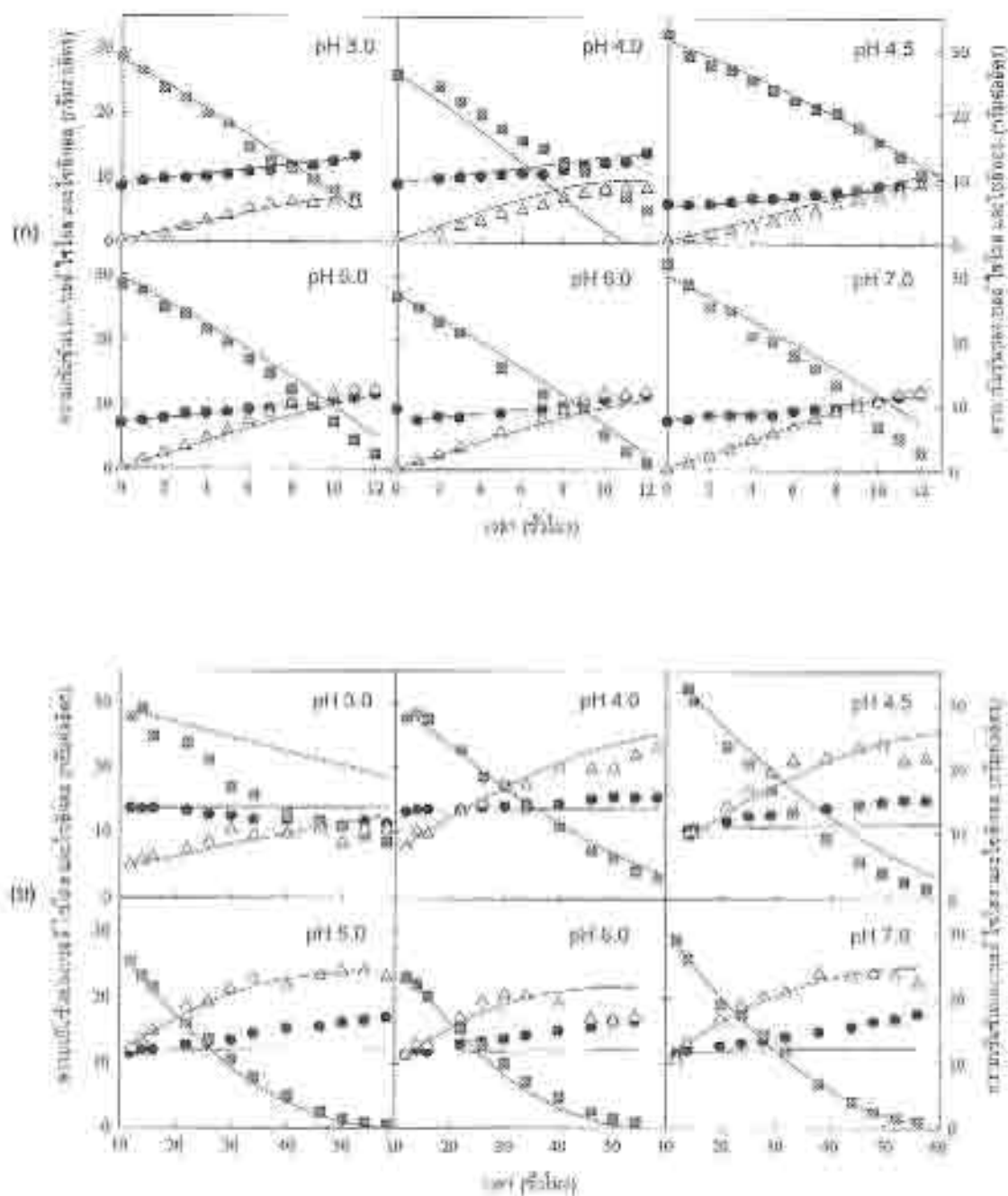
ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอ

$$\begin{aligned}\frac{dC_x}{dt} &= \frac{0.0394 \cdot C_s}{(0.559 + C_s) \left(1 + \frac{10^{-pH}}{5.76 \times 10^{-4}} + \frac{1.43 \times 10^{-8}}{10^{-pH}} \right)} C_x \\ \frac{dC_s}{dt} &= - \left(\frac{r_s}{0.173} + 4.83 \times 10^{-3} C_s \right) \\ \frac{dC_p}{dt} &= \frac{0.223 \cdot C_s}{(17.7 + C_s) \left(1 + \frac{10^{-pH}}{1.05 \times 10^{-4}} + \frac{1.81 \times 10^{-8}}{10^{-pH}} \right)} C_x\end{aligned}$$

ภาวะจำกัดออกซิเจน

$$\begin{aligned}\frac{dC_x}{dt} &= \frac{0.005 \cdot C_s}{(17.65 + C_s) \left(1 + \frac{10^{-pH}}{8.99 \times 10^{-4}} + \frac{1.74 \times 10^{-8}}{10^{-pH}} \right)} C_x \\ \frac{dC_s}{dt} &= - \left(\frac{r_s}{0.0328} + 8.83 \times 10^{-3} C_s \right) \\ \frac{dC_p}{dt} &= \frac{0.108 \cdot C_s}{(27.57 + C_s) \left(1 + \frac{10^{-pH}}{3.39 \times 10^{-4}} + \frac{1.25 \times 10^{-8}}{10^{-pH}} \right)} C_x\end{aligned}$$

เมื่อนำแบบจำลองที่ได้มาเขียนแบบกระบวนการทางคณิตศาสตร์ที่ให้อธิบายต่าง ๆ เปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการทดลองได้มอดังแสดงในภาพที่ ๑ จะเห็นได้ว่าค่าที่ได้จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์และค่าที่ได้จากการทดลองก็ใกล้เคียงกัน ภายใต้ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอมีความสอดคล้องกันเป็นอย่างดี ส่วนการเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจนนั้น แบบจำลองที่พัฒนาขึ้นมาสามารถอธิบายการใช้ไซโตสและการผลิตไซลิทอลได้เป็นแนวทางดี แต่ยังไม่สามารถตอบข้อสงสัยได้มากนัก



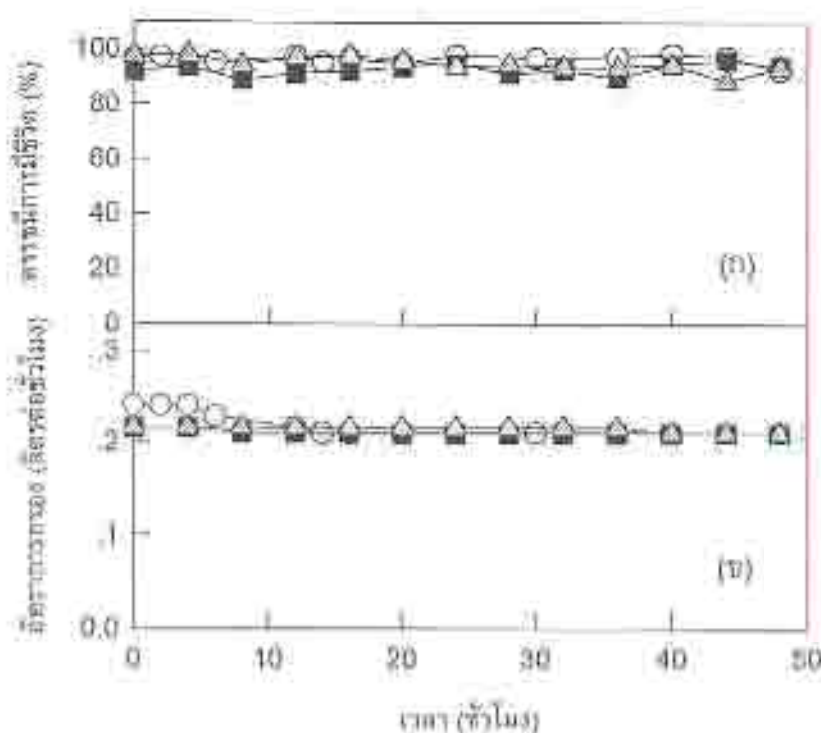
ภาพที่ 9 การเปรียบเทียบค่าความชื้นขั้วของเซลด์ (●) ไฮโลส (■) และไฮลิตอล (Δ) ที่ได้จากทางทดลองกับแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (เส้น) ภายใต้ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอ (ก) และภาวะจำกัดออกซิเจน (ข)

2. ผลของอัตราการไหลเวียนและความเข้มข้นของเซลล์ต่ออัตราการกรอง

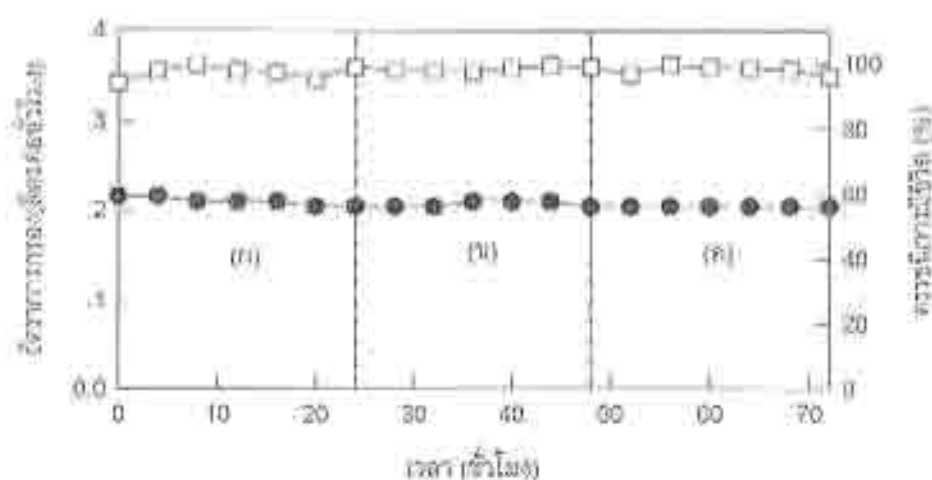
เมื่อนำสารแขวนลอยเซลล์ที่มีความเข้มข้นประมาณ 20 กรัมต่อลิตร มาทดสอบการกรองโดยใช้ อัตราการไหลเวียน 20 ลิตรต่อชั่วโมง แล้ววัดอัตราการกรองและการมีชีวิตของเซลล์ที่เวลาต่างๆ กัน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า การมีชีวิตของเซลล์ที่เวลาต่างๆ มีค่าใกล้เคียงกันและมีการเปลี่ยนแปลง น้อยมาก โดยมีดัชนีการมีชีวิต (viability index) อยู่ระหว่าง 92.5 - 98.2 % เมื่อทำการทดลองโดยใช้ อัตราการไหลเวียนเป็น 30 และ 40 ลิตรต่อชั่วโมง พบว่าดัชนีการมีชีวิตของเซลล์มีค่าใกล้เคียงกัน โดยอยู่ในช่วง 88.7 - 98.2 % และ 88.4 - 98.0 % ตามลำดับ จึงเห็นได้ว่าอัตราการไหลเวียนและระยะเวลาการกรองไม่มีผลต่อดัชนีการมีชีวิตของเซลล์ ดังภาพที่ 10(ก)

เมื่อพิจารณาถึงอัตราการกรองพบว่า ในช่วง 14 ชั่วโมงแรกของอัตราการไหลเวียน 20 ลิตรต่อ ชั่วโมง อัตราการกรองจะลดลงเล็กน้อยจาก 0.24 เป็น 0.21 ลิตรต่อชั่วโมง จากนั้นอัตราการกรองคงที่ ส่วนที่อัตราการไหลเวียน 30 และ 40 ลิตรต่อชั่วโมงนั้นอัตราการกรองมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก โดยมีอัตราการกรองอยู่ในช่วง 0.210 - 0.216 ลิตรต่อชั่วโมง จะเห็นได้ว่าอัตราการกรองไม่ขึ้นอยู่กับเวลา และอัตราการไหลเวียน ดังภาพที่ 10(ข) ทั้งนี้เนื่องจากในการทดลองนี้มีการควบคุมเครื่องสูบที่แยกของเหลวส่วนที่กรองได้ออกมาให้ความเร็วคงที่ ดังนั้นอัตราการกรองจึงคงที่

เมื่อให้ความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 40 กรัมต่อลิตร แล้วทำการทดสอบการกรองโดยใช้ อัตราการไหลเวียน 20, 30 และ 40 ลิตรต่อชั่วโมง โดยทำการเปลี่ยน อัตราการไหลเวียนทุก 24 ชั่วโมง พบว่า ดัชนีการมีชีวิตและอัตราการกรองมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก และมีค่าใกล้เคียงกับค่าทดลอง ที่ใช้ความเข้มข้นของเซลล์ 20 กรัมต่อลิตร ดังภาพที่ 11



ภาพที่ 10 ผลของอัตราความร้อนต่ออัตราการมีผลึก (ก) และอัตราการกร่อน (ข) ที่ความเข้มข้นของเกลือ 20 กรัมต่อลิตร อัตราความร้อน 20 (O), 30 (■) และ 40 (Δ) ลิตรต่อชั่วโมง



ภาพที่ 11 ผลของอัตราความร้อนต่ออัตราการมีผลึก (□) และอัตราการกร่อน (●) ที่ความเข้มข้นของเกลือ 40 กรัมต่อลิตร อัตราความร้อน 20 (ก), 30 (ข) และ 40 (ค) ลิตรต่อชั่วโมง

3. การผลิตไฮโดรเจนแบบต่อเนื่องโดยการหมุนเวียนเซลล์

ทำการเพาะเลี้ยง *C. motu* แบบต่อเนื่องโดยใช้ระบบหมุนเวียนเซลล์ โดยใช้ไฮโดรเจนความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนในอาหารที่ใช้เดิม เติมน้ำใหม่ด้วยอัตราเจือจางคงที่ประมาณ 0.087 h^{-1} ทำการเพาะเลี้ยงใน 2 ภาวะคือ ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอ และภาวะจำกัดออกซิเจน โดยใช้อัตราส่วนการหมุนเวียน (R) 0.75 และ 0.50 ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 6

3.1 ผลของภาวะการให้อากาศต่อผลได้ของเซลล์และไฮโดรเจน

ในการทดลอง CRS-1 และ CRS-2 เป็นการเพาะเลี้ยงที่อัตราส่วนการหมุนเวียน 0.75 ภายใต้ภาวะการให้อากาศที่แตกต่างกัน จะเห็นได้ว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอทำให้ได้ผลได้ของเซลล์สูงกว่าภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน แต่ในการพรวนน้ำพบว่าภาวะจำกัดออกซิเจนจะได้น้ำไฮโดรเจนของไฮโดรเจนสูงกว่าภายใต้ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอ ทั้งนี้เนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของออกซิเจนในน้ำหมัก ทำให้แอกติวิตีของเอนไซม์ไฮโดรเจนไดออกซิเดสสูงขึ้น (Kim และคณะ, 1997) ประกอบกับการสังเคราะห์ NAD^+ มากขึ้นโดยกระบวนการหมัก ทำให้ไฮโดรเจนส่วนใหญ่ถูกเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรเจนและนำไปสร้างเป็นเซลล์ต่อไป ดังนั้นปริมาณไฮโดรเจนที่สะสมอยู่ภายในเซลล์จึงลดลง แต่เมื่อความเข้มข้นของออกซิเจนในน้ำหมักต่ำลง ส่งผลทำให้ปริมาณเอนไซม์ NADH ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งจะยับยั้งแอกติวิตีของเอนไซม์ไฮโดรเจนไดออกซิเดส (Pilor และคณะ, 1989) หรือเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของเอนไซม์ไฮโดรเจนไดออกซิเดส (Srisongsaneeyakul และคณะ, 1992) ทำให้ไฮโดรเจนและผลในเซลล์เพิ่มขึ้นและจับเอาไฮโดรเจนออกนอกเซลล์มากขึ้น ที่อัตราส่วนการหมุนเวียน 0.50 (CRS-3 และ CRS-4) ก็จะได้ผลการทดลองเช่นเดียวกันคือ ผลได้ของไฮโดรเจนภายใต้ภาวะที่จำกัดออกซิเจนจะสูงกว่าภายใต้ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอ แต่ผลได้ของเซลล์ภายใต้ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอสูงกว่าภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจนไม่มากนัก

3.2 ผลของอัตราส่วนการหมุนเวียนต่อผลได้ของเซลล์และไฮโดรเจน

ในการทดลอง CRS-1 และ CRS-3 เป็นการเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอแต่มีอัตราส่วนการหมุนเวียนต่างกัน จากตารางที่ 6 จะเห็นว่าทั้งสองการทดลองจะได้ความเข้มข้นของเซลล์สูงกว่าไฮโดรเจนมาก เนื่องจากภาวะการให้อากาศดังกล่าวเหมาะสำหรับการเติบโตมากกว่าการผลิตไฮโดรเจน เมื่อพิจารณาถึงผลของอัตราส่วนการหมุนเวียนแล้ว พบว่าการลดอัตราส่วนการหมุนเวียนลงจาก 0.75 เป็น 0.50 จะทำให้ผลได้ของเซลล์สูงขึ้น 1.76 เท่า ทั้งนี้เนื่องจากผลได้ของเซลล์มีความสัมพันธ์กับอัตราการแยกน้ำหมักออกจากถังหมักโดยตรง (β) ตามสมการที่ 26 การลดอัตราส่วนการหมุนเวียนเป็นการเพิ่มอัตราการแยกน้ำหมักออกจากถังหมักโดยตรง เพราะฉะนั้นจึงทำให้ได้ผลได้ของเซลล์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้จะเห็นวามผลได้ของไฮโดรเจนภายใต้ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอต่ำกว่าผลได้ของเซลล์อย่างเห็นได้ชัด

สำหรับการทดลอง CRS-2 และ CRS-4 เป็นการเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน พบว่าการลดอัตราส่วนการหมุนเวียนลงจาก 0.76 เป็น 0.50 ทำให้ผลได้ของเซลล์สูงขึ้น 4.5 เท่าและทำให้ผลได้ของไฮโดรเจนสูงขึ้น 3 เท่า

ตารางที่ 8. ผลการทดลอง *C. magi* ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบไม่จำกัดสารอาหาร

Run	Condition	Recycle ratio (R)	Dilution rate (h ⁻¹)	C _s (g l ⁻¹)	C _x (g l ⁻¹)	C _p (g l ⁻¹)	Y _{x/s} (g g ⁻¹)	Y _{p/s} (g g ⁻¹)	μ _p (mg g ⁻¹ h ⁻¹)	Q _p (mg l ⁻¹ h ⁻¹)
CRS-1	aerobic	0.75	0.057	0.04	30.05	0.18	0.25	0.006	0.40	12.08
CRS-2	oxygen limiting	0.76	0.054	4.59	5.49	2.50	0.06	0.100	18.84	160.00
CRS-3	aerobic	0.50	0.074	2.47	25.54	0.06	0.44	0.002	0.18	4.44
CRS-4	oxygen limiting	0.50	0.067	25.06	3.33	1.48	0.36	0.299	28.09	99.16

3.3 ผลของภาวะการให้อากาศและอัตราส่วนการหมุนเวียนต่ออัตราการผลิตโซลิตฮอล

พิจารณาถึงผลของภาวะการให้อากาศ เมื่อใช้อัตราส่วนการหมุนเวียนที่เท่ากัน พบว่าทั้งอัตราการผลิตโซลิตฮอล (Q_p) และอัตราจำเพาะของการผลิตโซลิตฮอล (q_p) ภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจนจะสูงกว่าภายใต้ภาวะการให้อากาศพอเพียงพอ โดยที่อัตราส่วนการหมุนเวียน 0.75 จะให้อัตราการผลิตโซลิตฮอลและอัตราการผลิตโซลิตฮอลจำเพาะภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจนจะสูงกว่าภายใต้ภาวะการให้อากาศพอเพียงพอ 13 และ 47 เท่า ตามลำดับ และที่อัตราส่วนการหมุนเวียน 0.50 จะให้อัตราการผลิตโซลิตฮอลและอัตราการผลิตโซลิตฮอลจำเพาะภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจนจะสูงกว่าภายใต้ภาวะการให้อากาศพอเพียงพอ 22 และ 156 เท่า ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาถึงผลของอัตราส่วนการหมุนเวียนภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน พบว่าการลดอัตราส่วนการหมุนเวียนลงจาก 0.75 เป็น 0.50 จะทำให้ได้ความเข้มข้นของโซลิตฮอลต่ำลง ส่งผลให้อัตราการผลิตโซลิตฮอลลดลงประมาณ 1.6 เท่า ถึงแม้ว่าการลดอัตราส่วนการหมุนเวียนจะทำให้ได้ความเข้มข้นของซอลล์และโซลิตฮอลลดลง แต่การลดอัตราส่วนการหมุนเวียนจะทำให้อัตราการเติบโตจำเพาะสูงขึ้นตามสมการที่ 23 และเนื่องจากอัตราจำเพาะของการผลิตโซลิตฮอลแปรผันโดยตรงกับอัตราการเติบโตจำเพาะตามแบบจำลองของ Lundekking-Piret (Fulan และคณะ, 1991) ดังนั้นเมื่ออัตราการเติบโตจำเพาะสูงขึ้น (CRS-4) จึงทำให้อัตราจำเพาะของการผลิตโซลิตฮอลสูงขึ้นตาม โดยเพิ่มขึ้นเป็น 1.5 เท่า เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่อัตราส่วนการหมุนเวียน 0.75

3.4 การเปรียบเทียบการผลิตโซลิตฮอลแบบเบ็ดเสร็จและแบบหมุนเวียนเซลล์

ตารางที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบความเข้มข้นของเซลล์ โซไลต์ โซลิตฮอล และอัตราการผลิตโซลิตฮอลของการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จและแบบต่อเนื่องโดยระบบหมุนเวียนเซลล์ ในการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จนั้นใช้ความเข้มข้นโซไลต์เริ่มต้น 25.58 กรัมต่อลิตร ทำการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมกับการผลิตโซลิตฮอล สำหรับการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องของทั้ง 2 การทดลองนั้นให้อัตราการให้อากาศเท่ากันคือ 0.087 h^{-1} แต่การทดลอง CRS-4 ใช้อัตราส่วนการหมุนเวียนเท่ากับ 0.50 ที่พีเอช 5.0 ภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน ส่วนการทดลอง CRS-5 นั้นมีการเพาะเลี้ยง 2 ระยะ คือ ระยะแรกเป็นการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเซลล์โดยใช้อัตราส่วนการหมุนเวียนเท่ากับ 1.0 ภายใต้ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอ ที่พีเอช 4.5 ซึ่งเหมาะสำหรับการเติบโตของเซลล์ เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นปรับพีเอช เป็น 5.0 อัตราส่วนการหมุนเวียนเท่ากับ 0.50 ภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจนเพื่อผลิตโซลิตฮอล

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบการผลิตโซลิตทอลแบบเบ็ดเสร็จและแบบต่อเนื่องโดยระบบหมุนเวียนเซลล์

Run	C_s (g·l ⁻¹)	C_x (g·l ⁻¹)	C_p (g·l ⁻¹)	Q_p (mg·l ⁻¹ ·h ⁻¹)
Batch	15.51	0.184	16.581	62.34
CRS-4	3.53	25.05	1.48	99.16
CRS-5	16.10	15.15	4.86	325.62

อัตราการผลิตโซลิตทอลในระบบหมุนเวียนเซลล์ของการทดลอง CRS-4 สูงกว่าแบบเบ็ดเสร็จ 1.8 เท่า เนื่องจาก *C. mogii* มีอัตราการเติบโตช้า เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องซึ่งเป็นระบบที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ที่มีอัตราการเติบโตสูง (Aiba และคณะ, 1973) ทำให้เกิดการเติบโตถูกจำกัดโดยอัตราเลี้ยงจาก ดังนั้นความเข้มข้นของเซลล์และโซลิตทอลที่ได้จึงต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ ในการทดลอง CRS-5 มีการเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตและการผลิตโซลิตทอล ทำให้ความเข้มข้นของเซลล์และโซลิตทอลสูงขึ้น ถึงแม้ว่าความเข้มข้นของโซลิตทอลที่ได้ต่ำ แต่ก็สามารถเพิ่มอัตราการผลิตโซลิตทอลได้สูงถึง 325.62 มีอีกวิธีหนึ่งคือการต่อตัวโม่ง ซึ่งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จและแบบหมุนเวียนเซลล์ (CRS-4) ถึง 3.2 และ 3.3 เท่าตามลำดับ

3.5 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการผลิตโซลิตทอลในระบบหมุนเวียนเซลล์

สามารถอธิบายการเกิดโซลิตทอลแบบต่อเนื่องในระบบหมุนเวียนเซลล์ภายใต้ภาวะสภาวะคงที่เฉพาะได้ด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ดังนี้

$$\text{มวลชีวภาพ} \quad \frac{dC_x}{dt} = \frac{\mu_m C_s}{K_s^x + C_s} C_x - \beta D C_x$$

$$\text{โซไลส} \quad \frac{dC_s}{dt} = D(C_{in} - C_s) - \left(\frac{\mu}{Y_{x/s}} + m_s\right) C_x$$

$$\text{โซลิตทอล} \quad \frac{dC_p}{dt} = \frac{q_p^m C_s}{K_s^p + C_s} C_x - D C_p$$

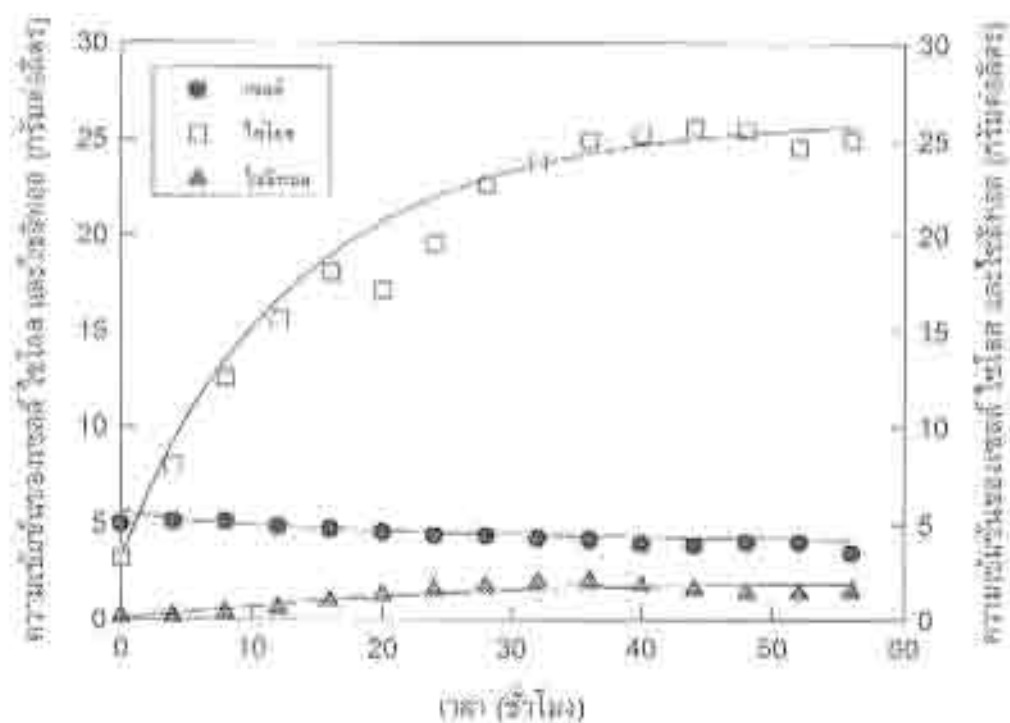
เมื่อนำข้อมูลความเข้มข้นของเซลล์ โซไลส และโซลิตทอลของการทดลอง CRS-4 มาประมาณค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ตามสมการข้างต้น โดยวิธี Simplex method ได้ค่าพารามิเตอร์ที่เหมาะสมดังนี้

$$\begin{aligned} \mu_m &= 0.0485 \text{ h}^{-1}, & K_s^x &= 13.91 \text{ g l}^{-1} \\ Y_{x/s} &= 0.371 \text{ g g}^{-1}, & m_s &= 0.0653 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1} \\ q_p^m &= 0.0735 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}, & K_s^p &= 35.53 \text{ g l}^{-1} \end{aligned}$$

จากค่าพารามิเตอร์ข้างต้นสามารถอธิบายการเติบโต การใช้โซไลส และการผลิตโซลิตทอล ในระบบหมุนเวียนเซลล์ด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ได้ดังนี้

$$\begin{aligned}\frac{dC_x}{dt} &= \left(\frac{0.0485 \cdot C_s}{13.91 + C_s} - \beta \cdot D \right) C_x \\ \frac{dC_s}{dt} &= D \cdot (C_s^f - C_s) - \left(\frac{I_x}{0.371} + 0.0653 \cdot C_x \right) C_s \\ \frac{dC_p}{dt} &= -D \cdot C_p + \frac{0.0735 \cdot C_s}{35.53 + C_s} C_x\end{aligned}$$

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลอง (CRS-4) กับแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้ พบว่ามีความสอดคล้องกันเป็นอย่างดี ดังภาพที่ 12 แสดงให้เห็นถึงความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่พัฒนาขึ้นสามารถใช้กับภาวะการเลี้ยงไฮโดรไลซิสของโปรตีนในถังหมักได้



ภาพที่ 12 การเปรียบเทียบข้อมูลจากการทดลอง (สำริดศึกษา) กับแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (เน้น) ของการเพาะเลี้ยงแบบหมักต่อเนื่อง (เซลล์ตายได้) ภาวะจำกำตอออกซิเจน ที่ $D = 0.0671 \text{ h}^{-1}$, $\beta = 0.50$, $C_s^f = 30 \text{ g l}^{-1}$

4. การเติมกลูโคสเพื่อเพิ่มอัตราการผลิตไซลิทอลจากไซโลส

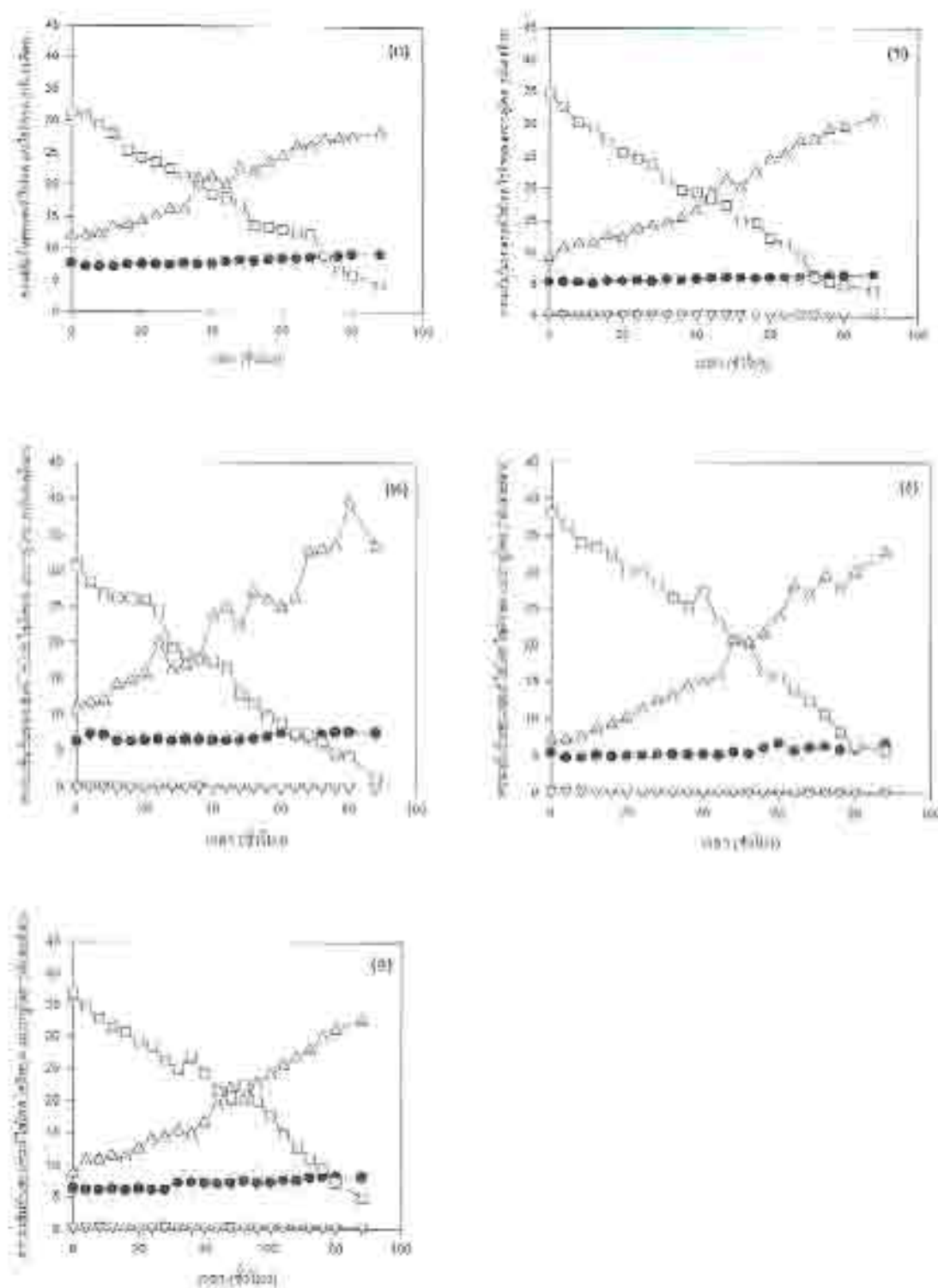
ภาพที่ 13 แสดงผลการทดลองของการผลิตไซลิทอลโดย *Candida mogii* ATCC 18364 ภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน ในการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จก็ไม่ได้มีการเติมกลูโคสและมีการเติมกลูโคส สำหรับสภาพรมิตเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการหมักจากการทดลองดังกล่าวได้สรุปเอาไว้ในตารางที่ 8

ตารางที่ 8: การผลิตไซลิทอลจากไซโลสด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน

การเพาะเลี้ยง แบบเบ็ดเสร็จ	μ (h ⁻¹)	ผลได้			อัตราจำเพาะ		อัตราการผลิต
		$Y_{X/S}$ (g g ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	$Y_{P/X}$ (%)	q_X (g g ⁻¹ h ⁻¹)	q_P (g g ⁻¹ h ⁻¹)	Q_P (g l ⁻¹ h ⁻¹)
ไม่เติมกลูโคส	0.0029	0.076	0.691	75.77	0.038	0.0239	0.187
เติมกลูโคส (กรัม)							
1.15	0.0026	0.042	0.742	81.36	0.058	0.0425	0.251
2.30	0.0017	0.034	0.854	93.64	0.051	0.0440	0.297
4.60	0.0036	0.052	0.838	91.67	0.068	0.0536	0.292
6.90	0.0037	0.073	0.806	88.38	0.052	0.0384	0.269

* ผลได้ไซลิทอลทางทฤษฎีเท่ากับ 0.912 กรัมไซลิทอล/กรัมไซโลส (Barnes และคณะ, 1988)

ปริมาณของกลูโคสที่เติมลงไปในการเพาะเลี้ยงมีผลต่ออัตราการเติบโตของ *C. mogii* ATCC 18364 และการเกิดไซลิทอลภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน ปริมาณกลูโคสที่เติมจะตรงเหมาะสมหรือไม่ให้เกิดการยับยั้งการใช้ไซโลส และถูกใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนทดแทนการใช้ไซโลสของเซลล์ยีสต์เพื่อการเติบโตและการสังเคราะห์โคเอนไซม์ NADPH ในวิถีเพนโทส ทำให้ไซโลสถูกนำไปใช้เพื่อผลิตไซลิทอลเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ผลได้และอัตราการผลิตของไซลิทอลเพิ่มขึ้น จากการทดลองพบว่าปริมาณกลูโคส 2.3 กรัมต่อการทดลอง เป็นปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมที่ให้ผลได้ไซลิทอล (0.854 กรัม/กรัม) และอัตราการผลิตไซลิทอล (0.297 กรัม/ลิตร/ชม.) สูงสุด เมื่อเทียบกับ การเพาะเลี้ยงในภาวะเดียวกันที่ไม่มีการเติมกลูโคส พบว่ามีค่าผลได้และอัตราการผลิตของไซลิทอลเพิ่มขึ้น 23.58 และ 58.82 % ตามลำดับ เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับผลได้ไซลิทอลทางทฤษฎีแล้ว พบว่าได้ผลได้ไซลิทอลเท่ากับ 93.64 % ของค่าผลได้ไซลิทอลทางทฤษฎี จึงแสดงให้เห็นได้ว่ากลูโคสที่เติมถูกนำไปใช้เพื่อการเติบโตของยีสต์ทดแทนไซโลส ฉะนั้นไซโลสจึงถูกนำไปใช้เพื่อผลิตไซลิทอลเพิ่มขึ้น



ภาพที่ 13 การผลิตไขมันหลุดจากโซลอสด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน

(ก) ไม่เติมกลูโคส (ข) เติมกลูโคส 1.15 กรัม (ค) เติมกลูโคส 2.30 กรัม

(ง) เติมกลูโคส 4.60 กรัม (จ) เติมกลูโคส 6.90 กรัม

สัญลักษณ์: ○ โซลอส △ โซลอส V กลูโคส ● น้ำหนักแห้งเซลล์

สรุปและข้อเสนอแนะ

C. magii ATCC 18364 สามารถเติบโตและผลิตไฮโดรเจนได้ดีภายใต้ภาวะที่แตกต่างกัน โดยมีอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.046 h^{-1} ภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจนที่พีเอช 4.5 ส่วนการผลิตไฮโดรเจนจะเกิดได้ดีภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจนที่พีเอช 6.0 ให้ผลได้ของไฮโดรเจนเท่ากับ 0.711 กรัมไฮโดรเจนต่อกรัมไบโอส คัดเป็น 77.96 เปอร์เซ็นต์ของผลได้ตามทฤษฎี ดังนั้นถ้าต้องการเพิ่มผลผลิตไฮโดรเจนในการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จควรเพาะเลี้ยงเป็น 2 ระยะ คือเริ่มจากการเพาะเลี้ยงมีสฟ์ในอาหารที่มีพีเอช 4.5 ภายใต้ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอ เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ จากนั้นจึงค่อยปรับพีเอชให้เป็น 6.0 ภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน เพื่อการผลิตไฮโดรเจนต่อไป จากการทดลองสามารถสรุปแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่จะนำไปใช้ในการอธิบายกระบวนการหมักไฮโดรเจนแบบเบ็ดเสร็จที่พีเอชต่างๆ ได้ดังนี้

ภาวะจำกัดออกซิเจน

$$\frac{dC_s}{dt} = \frac{0.0394 - C_s}{(0.559 + C_s) \left(1 + \frac{10^{-pH}}{5.76 \times 10^{-3}} + \frac{1.43 \times 10^{-8}}{10^{-pH}} \right)} C_s$$

$$\frac{dC_o}{dt} = - \left(\frac{r_o}{0.173} + 4.83 \times 10^{-3} C_s \right)$$

$$\frac{dC_p}{dt} = \frac{0.223 \cdot C_s}{(17.7 + C_s) \left(1 + \frac{10^{-pH}}{1.05 \times 10^{-4}} + \frac{1.81 \times 10^{-8}}{10^{-pH}} \right)} C_s$$

ภาวะจำกัดออกซิเจน

$$\frac{dC_s}{dt} = \frac{0.005 - C_s}{(17.65 + C_s) \left(1 + \frac{10^{-pH}}{8.99 \times 10^{-3}} + \frac{1.74 \times 10^{-8}}{10^{-pH}} \right)} C_s$$

$$\frac{dC_o}{dt} = - \left(\frac{r_o}{0.0328} + 8.83 \times 10^{-3} C_s \right)$$

$$\frac{dC_p}{dt} = \frac{0.108 \cdot C_s}{(27.57 + C_s) \left(1 + \frac{10^{-pH}}{3.39 \times 10^{-4}} + \frac{1.25 \times 10^{-8}}{10^{-pH}} \right)} C_s$$

ในการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องโดยระบบหมุนเวียนเซลล์ภายใต้ภาวะให้อากาศอย่างเพียงพอ เมื่อลดอัตราส่วนการหมุนเวียนลงจาก 0.75 เป็น 0.50 ทำให้ผลได้ของเซลล์สูงขึ้น 1.76 เท่า ส่วนการลดอัตราส่วนการหมุนเวียนลงจาก 0.76 เป็น 0.50 ภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน ทำให้ผลได้ของไฮโดรเจนและอัตราจำเพาะของการผลิตไฮโดรเจนเพิ่มขึ้น 3 และ 1.5 เท่าตามลำดับ

การผลิตไซลิทอลในระบบหมวนเวียนเซลล์ที่มีเซลล์เริ่มต้นสูง (CRS-5) ภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน จะให้อัตราการผลิตไซลิทอลสูงกว่าระบบหมวนเวียนเซลล์ที่มีเซลล์เริ่มต้นต่ำ (CRS-4) 3.3 เท่า และสูงกว่าอัตราการผลิตไซลิทอลของการเพาะเลี้ยงแบบเบดเสร็จ 5.2 เท่า

จากการทดลอง (CRS-4) สามารถอธิบายการผลิตไซลิทอลในระบบหมวนเวียนเซลล์ ภายใต้ภาวะที่จำกัดของออกซิเจนด้วยแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ได้ดังนี้

$$\frac{dC_s}{dt} = \left(\frac{0.0485 \cdot C_s}{13.91 + C_s} - \beta \cdot D \right) C_s$$

$$\frac{dC_x}{dt} = D \cdot (C_x^f - C_x) - \left(\frac{r_x}{0.371} + 0.0653 \cdot C_x \right)$$

$$\frac{dC_p}{dt} = -D \cdot C_p + \frac{0.0735 \cdot C_x}{35.53 + C_x} C_x$$

ถึงแม้ว่าการใช้ระบบหมวนเวียนเซลล์สามารถให้อัตราการผลิตไซลิทอลเพิ่มขึ้น แต่ความเข้มข้นของไซลิทอลก็ต่ำอยู่เมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงแบบเบดเสร็จ และมีปริมาณไซลิทอลเหลืออยู่ในน้ำหมักสูง จึงควรใช้ความเข้มข้นของไซลิทอลที่เหมาะสมหรือใช้ซับสเตรตร่วม (co-substrate) ในอาหารเพาะเชื้อที่ใช้เติม และพัฒนารูปแบบการเติมอาหารให้สัมพันธ์กับอัตราการใช้ซับสเตรตและการผลิตไซลิทอล เช่น การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว (fed-batch) เป็นต้น การผลิตไซลิทอลเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ และสัมพันธ์กับเอนไซม์ไซโลสรีดักเทสและไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส หากทำการศึกษาถึงผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเอนไซม์ทั้งสองชนิดที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ของการเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะต่างๆ จะทำให้เข้าใจถึงกลไกที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ และนำไปสู่การอธิบายโดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์เชิงโครงสร้างได้

อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาในงานวิจัยนี้ พบว่าการเติมกลูโคสเพื่อทดแทนการใช้ไซลิทอลในการเติบโตและการสังเคราะห์โคเอนไซม์ NADPH ของยีสต์ในเวทิเพนโทส สามารถทำให้ผลได้นะอัตราการผลิตของไซลิทอลเพิ่มขึ้น 23.59 และ 58.82 % ตามลำดับ จากการทดลองที่มีการเติมกลูโคส 2.3 กรัมต่อกลเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน โดยที่ผลได้ไซลิทอลที่ได้นี้คิดเป็น 93.64 % ของค่าผลได้ไซลิทอลทางทฤษฎี จึงถือได้ว่าเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการเพิ่มอัตราการผลิตไซลิทอลโดยวิธีการหมักได้เช่นกัน

ทำอธิบายสัญลักษณ์

C_p	ความเข้มข้นของไซลิทอล (กรัมไซลิทอล/ลิตร)
C_s	ความเข้มข้นของไซโลส (กรัมไซโลส/ลิตร)
C_{s0}^i	ความเข้มข้นของไซโลสในอาหารเพาะเชื้อที่ใช้เดิม (กรัมไซโลส/ลิตร)
C_x	ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมเซลล์/ลิตร)
D	อัตราเจือจาง (1/ชั่วโมง)
F	อัตราการเติมอาหารเข้าสู่ถังหมัก (ลิตร/ชั่วโมง)
K_1, K_2, K_3, K_4	ค่าคงที่การแตกตัว (โมลโปรตอน/ลิตร)
K_s^*, K_p^*	ค่าคงที่ไมโนตสำหรับไซโลสในการเติบโตและการเกิดไซลิทอล ตามลำดับ (กรัมไซโลส/ลิตร)
m_x	ค่าสัมประสิทธิ์การบำรุงรักษาเซลล์ (กรัมไซโลส/กรัมเซลล์/ชั่วโมง)
Q_p	อัตราการผลิตไซลิทอล (กรัมไซลิทอล/ลิตร/ชั่วโมง)
q_p	อัตราจำเพาะของการผลิตไซลิทอล (กรัมไซลิทอล/กรัมเซลล์/ชั่วโมง)
q_p^m	อัตราจำเพาะของการผลิตไซลิทอลสูงสุด (กรัมไซลิทอล/กรัมเซลล์/ชั่วโมง)
q_s	อัตราจำเพาะของการใช้ไซโลส (กรัมไซโลส/กรัมเซลล์/ชั่วโมง)
R	อัตราส่วนการหมุนเวียน = $1 - \beta$
r_p	อัตราการผลิตไซลิทอล (กรัมไซลิทอล/ลิตร/ชั่วโมง)
r_s	อัตราการใช้ไซโลส (กรัมไซโลส/ลิตร/ชั่วโมง)
r_x	อัตราการเติบโต (กรัมเซลล์/ลิตร/ชั่วโมง)
t	เวลา (ชั่วโมง)
X_{ad}	เซลล์ที่มีแอลกอฮอล์
X_{dead}	เซลล์ที่ไม่มีแอลกอฮอล์
X_o	เซลล์ทั้งหมด
$Y_{x/s}$	ผลได้ของเซลล์จากไซโลส (กรัมเซลล์/กรัมไซโลส)
$Y_{p/s}$	ผลได้ของไซลิทอลจากไซโลส (กรัมไซลิทอล/กรัมไซโลส)
Y_p	ผลได้ของไซลิทอลจากไซโลสเทียบกับผลได้ตามทฤษฎี (%)

อักษรกรีก

β	อัตราส่วนการแยกน้ำหมักออกจากถังหมักโดยตรง
μ	อัตราการเติบโตจำเพาะ (1/ชั่วโมง)
μ_m	อัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด (1/ชั่วโมง)

เอกสารอ้างอิง

- ลาโรจน์ ศิริคันสนียกุล. 2537. ไซลิตอล. วารสารอุตสาหกรรมเกษตร. 5(3) : 13-27.
- ลาโรจน์ ศิริคันสนียกุล. 2540/41. น้ำตาลป๊อกรับพันธุ์. ส่งเสริมเทคโนโลยี, 24 (136) : 161-164.
- Adler, L. and L. Gustafsson. 1980. Polyhydric alcohol production and intracellular amino acid pool in relation to halotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. Arch. Microbiol. 124 : 123-130.
- Aiba, S., A. E. Humphrey and N. F. Mills. 1973. Biochemical Engineering. University of Tokyo Press, Tokyo. 434 p.
- Andreyeva, L. N., and V. V. Biryukov. 1973. Analysis of mathematical models of the effect of pH on fermentation processes and their use for calculating optimal fermentation conditions. Biotechnol. Bioeng. Symp. 4 : 61-76.
- Bailey, J. E. and D. F. Ollis. 1986. Biochemical engineering fundamentals. pp. 130-132. McGraw-Hill, Singapore.
- Barbosa, M. F. S., M. B. de Medeiros, I. M. de Mancilla, H. Schneider, and H. Leo. 1988. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylitol and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. J. Ind. Microbiol. 3 : 241-251.
- Damiano, D., C. S. Shin, N. H. Ju, and S. S. Wang. 1985. Performance, kinetics and substrate utilization in a continuous yeast fermentation with cell recycle by ultrafiltration membrane. Appl. Microbiol. Biotechnol. 21 : 69-77.
- Deschatelets, L. and E. K. C. Yui. 1988. A Simple pentose assay for biomass conversion studies. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24 : 379-397.
- Dunn, I. J., E. Hornitz, J. Ingham and I. F. Prenosil. 1992. Biological engineering : principles, applications and modelling with PC simulation. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim. 438 p.
- Emodi, A. 1978. Xylitol : its properties and food applications. Food Technol. Jan : 28-32.
- Furlan, S. A., P. Bouilloud, P. Strehiano and J. P. Riba. 1991. Study of xylitol formation from xylose under oxygen limiting conditions. Biotechnol. Lett. 3 : 203-206.
- Gong, C., 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. 3 : 130-135.
- Höllmann, S. and O. Touster. 1957. L-xylulose-xylitol enzyme and other polyol dehydrogenase of guinea pig liver mitochondria. J. Biol. Chem. 225 : 87-102.

- Horitsu, H., Y. Yahashi, K. Takamizawa, K. Kawai, T. Suzuki and N. Watanabe. 1992. Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis* : optimization of production rate. *Biotechnol. Bioeng.* 40 : 1085-1091.
- Kilpreedchavanich, V., M. Hayashi, N. Nishio, and S. Nagai. 1984. Conversion of D-xylose into xylitol by xylose reductase from *Candida pelliculosa* coupled with oxido-reductase system of methanogen strain HU. *Biotechnol. Lett.* 6 : 651-656.
- Lafforgue-Delorme, C., P. Delorme, and G. Gama. 1994. Continuous alcoholic fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* recycle by tangential filtration : key points for process modelling. *Biotechnol. Lett.* 16 : 741-746.
- Makinen, K. K. 1979. Xylitol and oral health. *Adv. Food Res.* 25 : 137-180.
- Melaja, A. J. and L. Hamalainen. 1977. Process for making xylitol. US Patent 4,008,285.
- 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 : 281-86.
- Mistry, F. R. and C. L. Cooney. 1989. Production of ethanol by *Clostridium thermosaccharolyticum* : I. effect of cell recycle and environmental parameters. *Biotechnol. Bioeng.* 34 : 1295-1304.
- Monbouquette, H. G. 1992. Modelling high-biomass-density cell recycle fermentors. *Biotechnol. Bioeng.* 39 : 498-503.
- Nelder, J. A. and R. Mead. 1965. A simplex method for function minimization. *Computer J.* 7 : 308-312.
- Nishio, N., K. Sugawara, N. Hayase, and S. Nagai. 1989. Conversion of D-xylose into xylitol by immobilized cells of *Candida pelliculosa* and *Methanobacterium* sp. HU. *J. Ferment. Bioeng.* 67 : 356-360.
- Nishiwaki, A. 1997. Analysis of a two-stage fermentor with cell recycling for continuous acetic acid production. *J. Ferment. Bioeng.* 83 : 565-570.
- Nishizawa, Y., Y. Mitani, M. Tamai, and S. Nagai. 1983. Ethanol production by cell recycling with hollow fibers. *J. Ferment. Technol.* 61 : 599-605.
- Nolleau, V., L. Preziosi-Belloy, J. P. Delgenes, and J. M. Navarro. 1993. Xylitol production from xylose by two yeast strains : sugar tolerance. *Curr. Microbiol.* 27 : 191-197.
- Ohara, H., K. Hiyama, and T. Yoshida. 1992. Kinetic study on pH dependence of growth and death of *Streptococcus faecalis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38 : 403-407.
- Park, Y. S., H. Ohtake, M. Fukaya, H. Okumura, Y. Kawamura, and K. Toda. 1989. Acetic acid production using a fermentor equipped with a hollow fiber filter module. *Biotechnol. Bioeng.* 33 : 918-923.

- Pepper, T. and P. M. Oringer. 1988. Xylitol in sugar-free confections. *Food Technol.* 42 : 98-104.
- Rizzi, M., P. Erlemann, N.A. Bui-Thanh, and H. Dellweg. 1988. Xylose fermentation by yeast. IV. Purification and kinetic studies of xylose reductase from *Pichia stipitis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29 : 148-154.
- Rizzi, M., K. Hartward, P. Erlemann, N.A. Bui-Thanh, and H. Dellweg. 1989a. Purification and properties of the NAD^+ -xylitol dehydrogenase from the yeast *Pichia stipitis*. *J. Ferment. Bioeng.* 67 : 20-24.
- Rizzi, M., K. Hartward, N.A. Bui-Thanh, and H. Dellweg. 1989b. A kinetic study of the NAD^+ -xylitol dehydrogenase from the yeast *Pichia stipitis*. *J. Ferment. Bioeng.* 67 : 25-30.
- Roberto, I. C., M. G. A. Felipe, I. M. de Mancilha, M. Vitolo, S. Sato, and S. S. de Silva. 1995. Xylitol production by *Candida guilliermondii* as an approach for the utilization of agroindustrial residues. *Biores. Technol.* 51 : 255-257.
- Silva, S. S., 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 : 549-553.
- Silva, S. S. and A. S. Afschar. 1994. Microbial production of xylitol from D-xylose using *Candida tropicalis*. *Bioprocess Eng.* 11 : 129-134.
- Sirisantameeyakul, S., M. Staniszevski, and M. Rizzi. 1995. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose. *J. Ferment. Bioeng.* 80 : 565-570.
- Tarascio, J., H. Ojama, and V. Kauppinen. 1993. Multigradient method for optimization of slow biotechnological processes. *Biotechnol. Bioeng.* 42 : 1301-1310.
- Vandeksa, E., S. Amarty, S. Kuzmanova, and T. W. Jeffries. 1995. Effect of environmental conditions on production of xylitol by *Candida boidinii*. *Wild. J. Microbiol. Biotechnol.* 11 : 213-218.
- Vongsaväntert, V. and Y. Tani. 1989. Xylitol production by a methanol yeast, *Candida boidinii* (Kloeckers sp.) No. 2201. *J. Ferment. Bioeng.* 67 : 35-39.
- Washuttl, J., P. Riederer and E. Bancher. 1973. A qualitative and quantitative study of sugar-alcohols in several foods. *J. Food. Sci.* 38 : 1262-1263.
- Winkelhausen, E. and Kuzmanova, S. 1998. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. *J. Ferment. Bioeng.* 86 : 1-14.

ภาพนำเสนอผลงานวิจัย

1. การไปประชุมเสนอผลงานวิชาการ (Paper Published in International or National Conferences)
 - 1.1 Sirisansaneeeyakul S., W. Tochampa and M. Rizzi. 1997. Kinetic modelling of pH affecting xylitol production by *Candida mogii*. 8th European Congress on Biotechnology, August 17-21, Budapest, Hungary.
 - 1.2 Sirisansaneeeyakul S., W. Tochampa and S. Bhuwapathanapun. 1999. Microbial production of xylitol with cell recycle. 9th European Congress on Biotechnology, July 11-15, Brussels, Belgium.
2. การตีพิมพ์บทความวิจัยในวารสาร (Paper Published in International or National Journals)
 - 2.1 Sirisansaneeeyakul, S., W. Tochampa and S. Bhuwapathanapun. 2000. Kinetic modeling of pH affecting xylitol production by *Candida mogii*. Thai J. Agric. Sci. (submitted).
 - 2.2 Sirisansaneeeyakul, S., W. Tochampa and S. Bhuwapathanapun. 2000. Continuous production of xylitol by cell recycling system. Thai J. Agric. Sci. (submitted).
 - 2.3 Sirisansaneeeyakul, S., W. Tochampa, M. Matsumura and S. Bhuwapathanapun. 2000. Microbial production of xylitol with cell recycle. J. Biosci. Bioeng. (submitted).

การคำนวณ

(Reprint with Manuscript)

1. การเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม

- 1.1 Sirisansaneeyakul S., W. Tuchampa and M. Rizzi. 1997. Kinetic modelling of pH affecting xylitol production by *Candida mogii*. 8th European Congress on Biotechnology, August 17-21, Budapest, Hungary.

KINETIC MODELLING OF pH AFFECTING XYLITOL PRODUCTION BY *CANDIDA MOGII**

Sarote Sirisansaneeayukul¹, Worasit Tuchampa¹ and Manfred Rizzi²

¹Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

²Institut fuer Bioverfahrenstechnik, Universitaet Stuttgart, 70569 Stuttgart, Germany.

Key words: Xylitol, Fermentation, pH effect, *Candida mogii*, modelling

ABSTRACT

Candida mogii ATCC 18364 was cultivated in minimal medium containing xylose as carbon source at various pH. The optimum pH for growth and xylitol formation are 4.5 and 6.0, respectively. Maximum xylitol yield from xylose found at pH 6.0 is 0.551 g xylitol/g xylose. Equilibrium constant of pH dependence specific growth rate and specific rate for xylitol formation, $K_1 = 5.76 \times 10^{-3}$, $K_2 = 1.43 \times 10^{-4}$, $K_3 = 1.30 \times 10^{-4}$ and $K_4 = 1.01 \times 10^{-38} \text{ mol l}^{-1}$, are obtained from non-linear regression analysis. The material balance equations expressing the growth, xylose consumption and xylitol formation are formulated to estimate the kinetic parameters of mathematical model. As a result, the following kinetic parameters, $\mu_m = 0.0394 \text{ h}^{-1}$, $K_1' = 0.559 \text{ g l}^{-1}$, $Y_{x/s} = 0.173 \text{ g g}^{-1}$, $m_s = 4.83 \times 10^{-4} \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $q_p^m = 0.223 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $K_2' = 17.7 \text{ g l}^{-1}$, are estimated by the simplex method. The comparison between the model predictions and experimental observations show very good agreement for different pH values.

INTRODUCTION

Candida mogii ATCC 18364 has been reported to efficiently produce xylitol ($Y_{p/s} = 0.62 \text{ g xylitol/g xylose}$). A maximum product yield was obtained when initial D-xylose concentration and specific oxygen uptake rate were 53 g/l and 0.5 mmol $\text{O}_2/\text{g h}$, respectively (Sirisansaneeayukul, S. *et al.*, 1995). This paper presents the effect of pH on xylitol formation under aerobic condition and its kinetic modelling.

MATHEMATICAL MODEL

The kinetic model for pH dependence has been proposed describing the specific growth rate (μ) and the specific rate for product formation (q_p) (Othman *et al.*, 1992).

$$\mu(\text{pH}) = \frac{\mu_m}{1 + \frac{[10^{-\text{pH}}]}{K_1} + \frac{K_2}{[10^{-\text{pH}}]}} \quad (1)$$

$$q_p(\text{pH}) = \frac{q_p^m}{1 + \frac{[10^{-\text{pH}}]}{K_3} + \frac{K_4}{[10^{-\text{pH}}]}} \quad (2)$$

The material balance equations expressing the growth, xylose consumption and xylitol formation are formulated in the Eq.(3)-(5).

$$\frac{dC_x}{dt} = \frac{\mu_m C_s C_x}{(K_1' + C_s) \left(1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{K_1} + \frac{K_2}{10^{-\text{pH}}} \right)} \quad (3)$$

$$\frac{dC_s}{dt} = - \left(\frac{r_s}{Y_{x/s}} + m_s C_s \right) \quad (4)$$

$$\frac{dC_p}{dt} = \frac{q_p^m C_s C_x}{(K_2' + C_s) \left(1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{K_3} + \frac{K_4}{10^{-\text{pH}}} \right)} \quad (5)$$

* Poster presented at the 8th European Congress on Biotechnology, 17-21 August 1997, Budapest.

RESULTS

Effect of pH on Growth and Xylitol Formation

The optimal pH for growth and xylitol formation are 4.5 ($\mu = 0.046 \text{ h}^{-1}$) and 6.0 ($Y_{pg} = 0.551 \text{ g/g}$), respectively (Table 1). Equilibrium constants of pH dependence specific growth rate and specific rate for xylitol formation are obtained from non-linear regression analysis:

$$\text{(Eq. 1)} \quad K_1 = 5.76 \times 10^{-3}, K_2 = 1.43 \times 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$$

$$\text{(Eq. 2)} \quad K_3 = 1.30 \times 10^{-3}, K_4 = 1.01 \times 10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$$

Table 1. Results from aerobic batch fermentation of *C. mogii* in xylitol medium at various pHs.

pH	μ (h^{-1})	q_x ($\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	q_p ($\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Y_{xg} (g.g^{-1})	Y_{pg} (g.g^{-1})	Y_{ph}^* %
3.0	0.034	0.214	0.072	0.154	0.362	32.68
4.0	0.029	0.168	0.077	0.167	0.462	36.66
4.5	0.046	0.200	0.089	0.221	0.460	36.44
5.0	0.040	0.240	0.131	0.158	0.546	50.81
6.0	0.038	0.240	0.131	0.158	0.551	60.43
7.0	0.033	0.260	0.114	0.134	0.451	49.45

* Theoretical xylitol yield is 0.912 g xylitol/g xylose (Barbosa et al., 1988.)

Comparison between Model Predictions and Experimental Observations

The remaining model kinetic parameters have been estimated by the simplex method:

$$\mu_m = 0.0394 \text{ h}^{-1}$$

$$K_1^* = 0.559 \text{ g.l}^{-1}$$

$$Y_{pg} = 0.173 \text{ g.g}^{-1}$$

$$m_1 = 4.83 \times 10^{-2} \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$$

$$q_p^m = 0.223 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$$

$$K_2^* = 17.7 \text{ g.l}^{-1}$$

The comparison between the model predictions and experimental observations show very good agreement for different pH values (Figure 1).

CONCLUSION

The optimal growth and xylitol formation are obtained at different pH values. Hence, the two stages process for xylitol production is recommended for the biomass and xylitol formations.

REFERENCES

- Andreyeva, L. N. and V. V. Biryukov. 1973. Analysis of mathematical models of the effect of pH on fermentation processes and their use for calculating optimal fermentation conditions. Biotechnol. Bioeng. Symp. 4: 61-76.
- Barbosa, M. F. S., M. B. de Medeiros, L. 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.
- Bailey, J. E. and D. F. Ollis. 1986. Biochemical engineering fundamentals. McGraw-Hill, Singapore. pp. 130-132.
- Nelder, J. A. and R. Mead. 1965. A simplex method for function minimization. Computer J. 7: 308-312.
- Ohara, H., K. Hiyama and T. Yoshida. 1992. Kinetic study on pH dependence of growth and death of *Streptococcus faecalis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38: 403-407.
- Sirisansanecysakul, S., M. Staniszwski and M. Rizzi. 1995. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose. J. Ferment. Bioeng. 80: 565-570.

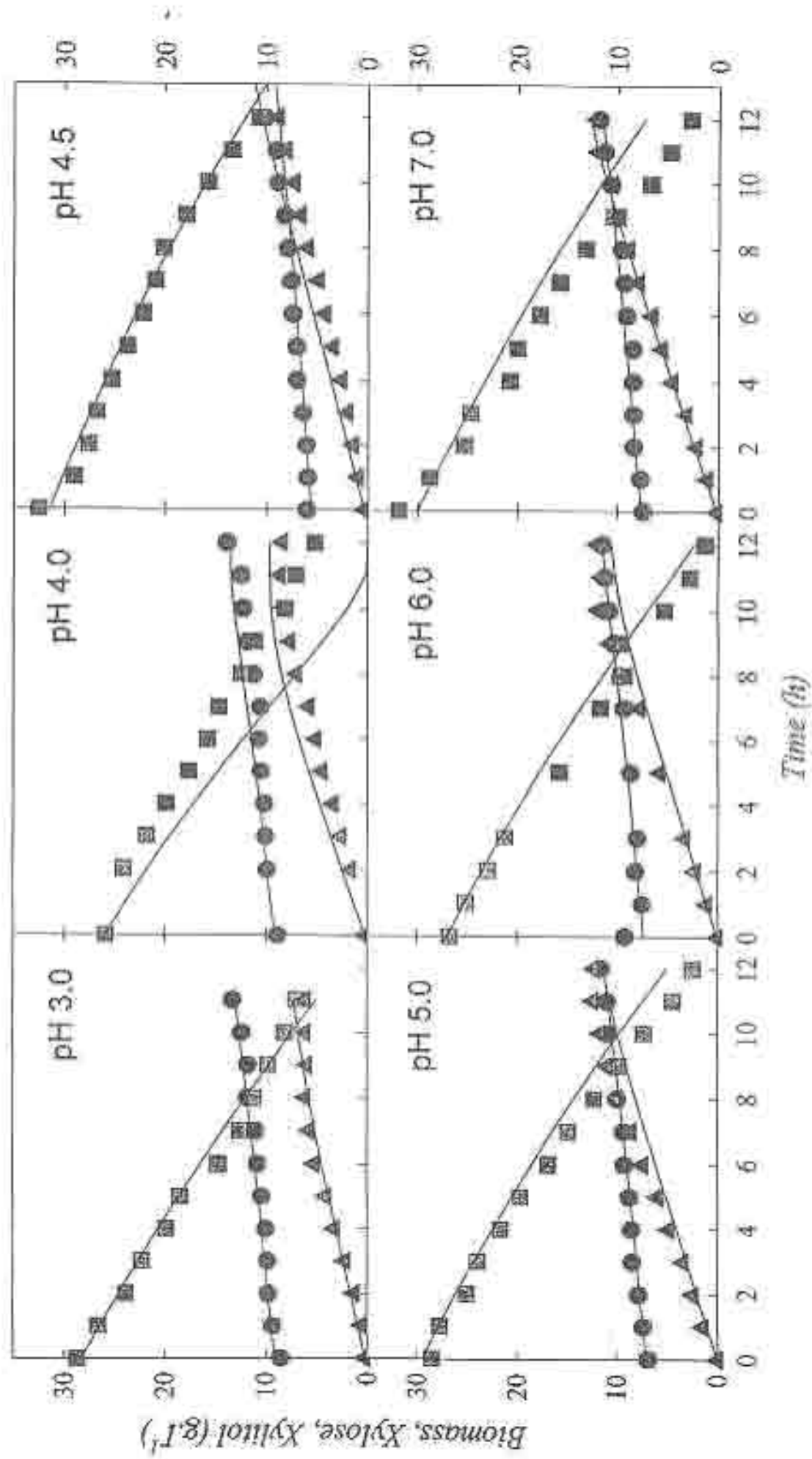


Figure 1 Growth, xylose consumption and xylitol formation at various pH values.
The curves show the changes of the values calculated by model.

● Biomass ■ Xylose ▲ Xylitol

INTRODUCTION

Candida mogii ATCC 18364 has been reported to efficiently produce xylitol ($Y_{P/S} = 0.62$ g xylitol/g xylose). A maximum product yield was obtained when initial D-xylose concentration and specific oxygen uptake rate were 53 g/l and 0.5 mmol O_2 /g/h, respectively /1/.

This paper presents the effect of pH on xylitol formation under aerobic condition and its kinetic modelling.

The material balance equations expressing the growth, xylose consumption and xylitol formation are formulated in the Eq.(3)-(5).

$$\frac{dC_x}{dt} = \frac{\mu_m C_s C_x}{\left(K_s^x + C_s\right) \left(1 + \frac{10^{-pH}}{K_1} + \frac{K_2}{10^{-pH}}\right)} \quad (3)$$

$$\frac{dC_s}{dt} = - \left(\frac{r_s}{Y_{X/S}} + m_s C_x \right) \quad (4)$$

$$\frac{dC_p}{dt} = \frac{q_p^m C_s C_x}{\left(K_p^m + C_s\right) \left(1 + \frac{10^{-pH}}{K_3} + \frac{K_4}{10^{-pH}}\right)} \quad (5)$$

MATHEMATICAL MODEL

The kinetic model for pH dependence has been proposed describing the specific growth rate (μ) the specific rate for product formation (q_p) /2/.

$$\mu(pH) = \frac{\mu_m}{1 + \frac{[10^{-pH}]}{K_1} + \frac{K_2}{[10^{-pH}]}}$$

$$q_p(pH) = \frac{q_p^m}{1 + \frac{[10^{-pH}]}{K_3} + \frac{K_4}{[10^{-pH}]}}$$

RESULTS

Effect of pH on Growth and Xylitol Formation

The optimal pH for growth and xylitol formation are 4.5 ($\mu = 0.046$ h⁻¹) and 6.0 ($Y_{P/S} = 0.551$ g respectively (Table 1).

Equilibrium constants of pH dependence specific growth rate and specific rate for xylitol formation obtained from non-linear regression analysis:

$$(Eq.1) \quad K_1 = 5.76 \times 10^{-3}, \quad K_2 = 1.43 \times 10^{-8} \text{ mol.l}^{-1}$$

$$(Eq.2) \quad K_3 = 1.90 \times 10^{-3}, \quad K_4 = 1.01 \times 10^{-14} \text{ mol.l}^{-1}$$

Table 1 Results from aerobic batch fermentation of *C. mogii* in xylose medium at various pHs.

pH	μ (h ⁻¹)	μ_0 (g·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	q_p (g·g ⁻¹ ·h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g·g ⁻¹)	$Y_{p/s}$ (g·g ⁻¹)	Y_p^* %
3.0	0.034	0.214	0.072	0.154	0.362	35.69
4.0	0.029	0.168	0.077	0.167	0.462	50.66
4.5	0.046	0.206	0.089	0.221	0.460	50.44
5.0	0.040	0.240	0.131	0.158	0.546	59.87
6.0	0.038	0.240	0.131	0.158	0.551	60.42
7.0	0.034	0.260	0.114	0.134	0.451	49.45

* Theoretical xylitol yield is 0.912 g xylitol/g xylose /3/.

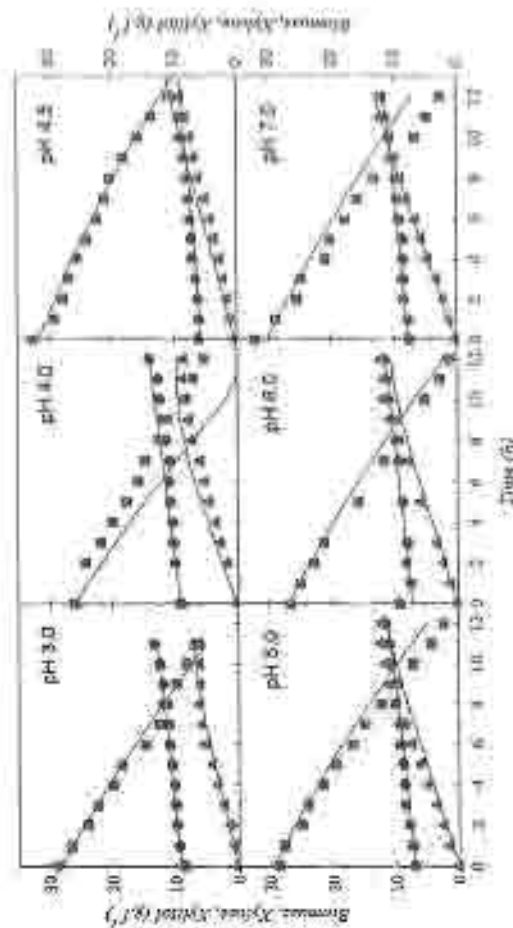


Figure 1 Growth, xylose consumption and xylitol formation at various pH values. The curves show the changes of the values calculated by model.

■ Biomass ■ Xylose ▲ Xylitol

Comparison between Model Predictions and Experimental Observations

The remaining model kinetic parameters have been estimated by the simplex method:

$$\begin{aligned}\mu_m &= 0.0394 \text{ h}^{-1} & K_s^x &= 0.559 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \\ Y_{x/s} &= 0.173 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} & m_s &= 4.83 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \\ q_p^m &= 0.223 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} & K_p^p &= 17.7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}\end{aligned}$$

The comparison between the model predictions and experimental observations show very good agreement for different pH values (Figure 1).

CONCLUSION

The optimal growth and xylitol formation obtained at different pH values. Hence, the two-step process for xylitol production is recommended for biomass and xylitol formations.

REFERENCES

- 1/ Sirisansameeyakul, S. *et al.* 1995. J. Ferment. Bioeng. 80: 565-570.
- 2/ Ohara, H. *et al.* 1992. Appl. Microbiol. Biotechnol. 38: 403-407.
- 3/ Barbosa, M. F. S. *et al.* 1988. J. Ind. Microbiol. 3: 241-251.

1. การแปรรูปของเสียจากโรงงาน

- 1.2 Sirisansaneeyakul S., W. Tochampa and S. Bhuwapathanapun. 1999. Microbial production of xylitol with cell recycle. 9th European Congress on Biotechnology, July 11-15, Brussels, Belgium.

MICROBIAL PRODUCTION OF XYLITOL WITH CELL RECYCLE

Sarote Sirisansaneeyakul, Worasit Tochanpa and Supapong Bhurwathanaporn
Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University,
Chamchak, Bangkok 10900, Thailand
(Fax: 662-579-4096; E-mail: fagissi@ku.ac.th)

Keywords: Xylitol, Cell recycle, D-xylase, Continuous culture, Fermentation kinetics

Summary

Candida mogii ATCC 18364 found its optimal growth and xylitol formation in batch culture at pH 4.5 and 6.0, respectively. As a result, the xylitol yield in aerobic and oxygen-limited conditions were 0.55 and 0.71 g g⁻¹, respectively. In continuous culture with cell recycle, the maximum specific rate of xylitol formation ($q_p = 0.028$ g g⁻¹h⁻¹) was obtained at $D = 0.067$ h⁻¹ and $R = 0.50$, while its maximum volumetric productivity ($Q_p = 0.160$ g l⁻¹h⁻¹) was found at a higher recycle ratio ($R = 0.76$) under oxygen-limited condition.

Introduction

Yeast is the most promising xylitol producers in microbial conversion of D-xylase to xylitol, as has been recently reviewed by Winkelhausen and Kuznetsova (1998). Xylase metabolism and xylitol production in yeasts were reported to be controlled by two key enzymes, NADH- or NADPH-xylase reductase and NAD-xylitol dehydrogenase (Rizzi *et al.*, 1988, 1989a, b). Among yeasts, *Candida mogii* ATCC 18364 was found to be one of the most promising in conversion of D-xylase to xylitol. Kinetics of D-xylase uptake and D-xylase reductase and xylitol dehydrogenase synthesis during aerobic and oxygen-limited conditions using synthetic medium was explained and postulated in complex regulatory models (Sirisansaneeyakul *et al.*, 1995). In this work, a process of xylitol production by a single-stage fermentation with cell recycle by varying recycle ratios under aerobic and oxygen-limited conditions was investigated.

Materials and Methods

Candida mogii ATCC 18364 was used in both batch and continuous culture with cell recycle for xylitol production from D-xylase under aerobic and oxygen-limited conditions. Fermentation was carried out with 1.5 l D-xylase minimal media of Sirisansaneeyakul *et al.*, (1995), in 2-l fermenter of Biostat B (B.Braun Biotech International). In batch culture, the effects of pH (3.0-7.0) on growth and xylitol production were investigated with an initial xylase concentration of 30 g l⁻¹, at controlled pH under consecutively aerobic and oxygen-limited conditions, respectively. In continuous culture, the preculture was grown aerobically at controlled pH 4.5 and temperature, 30°C, and was cultivated for 24 h at 1,000 rpm agitation rate and 1 vvm aeration rate, then switched to continuous mode with cell recycle using a hollow fiber module of model KL-U-M 6302 (Kuraray UF Module, Japan). Xylitol production was investigated under both aerobic (1,000 rpm and 1.0 vvm) and oxygen-limited (300 rpm and 0.3 vvm) conditions at controlled pH 5.0 with a feed xylase concentration of 30 g l⁻¹ at $D = 0.06$

0.07 h⁻¹ at recycle ratios (R) 0.50 and 0.75. The steady state was obtained after four volumes replacement.

The samples, taken at specified time intervals, were centrifuged; cells were washed with water, the residues were dried at 105°C for 24 h for cell mass determination; the supernatants were used for D-xylose and xylitol analysis by the methods of Deschâtelets and Yu (1986) and Adler and Gustafsson (1980), respectively.

Results and Discussion

In batch culture, under aerobic condition the maximum specific growth rate ($\mu = 0.046$ h⁻¹) and biomass yield ($Y_{XS} = 0.22$ g g⁻¹) were obtained at pH 4.5 (Table 1a), but under oxygen-limited condition maximum xylitol yield ($Y_{XS} = 0.71$ g g⁻¹) is of 78 % of the theoretical yield (Barbosa *et al.*, 1988) was obtained at pH 6.0 (Table 1b). However, maximum specific rates for xylitol production under aerobic ($q_p = 0.131$ g g⁻¹h⁻¹) and oxygen-limited ($q_p = 0.051$ g g⁻¹h⁻¹) conditions were obtained at pH between 5.0 to 6.0 (Table 1a) and 4.5 (Table 1b), respectively. So the medial range of pH of 5.0 was selected for studying the production of xylitol in continuous culture with cell recycle.

Table 1a Batch culture of xylitol production under aerobic condition.

pH	$C_x^{(1)}$ (g l ⁻¹)	$C_x^{(2)}$ (g l ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	q_s (g g ⁻¹ h ⁻¹)	q_p (g g ⁻¹ h ⁻¹)	Y_{XS} (g g ⁻¹)	Y_{PI} (g g ⁻¹)	Theoretical yield ⁽²⁾ (%)
3.0	10.10	4.94	0.034	0.214	0.072	0.154	0.382	39.69
4.0	13.29	8.46	0.029	0.168	0.077	0.167	0.462	50.66
4.5	10.23	8.90	0.046	0.206	0.089	0.221	0.360	50.44
5.0	11.52	12.29	0.040	0.340	0.131	0.158	0.546	59.87
6.0	11.50	12.09	0.038	0.260	0.111	0.158	0.551	60.42
7.0	11.88	12.30	0.034	0.262	0.114	0.134	0.451	49.45

Table 1b Batch culture of xylitol production under oxygen-limited condition.

pH	$C_x^{(1)}$ (g l ⁻¹)	$C_x^{(2)}$ (g l ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	q_s (g g ⁻¹ h ⁻¹)	q_p (g g ⁻¹ h ⁻¹)	Y_{XS} (g g ⁻¹)	Y_{XS} (g g ⁻¹)	Theoretical yield ⁽²⁾ (%)
3.0	10.23	11.28	-	0.032	0.010	-	0.253	27.74
4.0	16.53	22.03	0.009	0.030	0.030	0.064	0.589	64.58
4.5	17.63	17.98	0.012	0.085	0.051	0.148	0.627	68.75
5.0	18.67	18.93	0.010	0.063	0.038	0.155	0.605	66.34
6.0	18.78	14.24	0.010	0.059	0.038	0.365	0.711	77.96
7.0	20.34	17.12	0.010	0.064	0.039	0.150	0.607	66.56

⁽¹⁾ Cell and xylitol concentrations were reported as 12 and 74 h of cultivate time under consecutively aerobic and oxygen-limited conditions, respectively.

⁽²⁾ Theoretical yield of xylitol formation from D-xylose was 0.912 g g⁻¹ (Barbosa *et al.*, 1988).

Using an enzyme kinetic model proposed by Andreyeva and Biryukov (1973), the effects of pH on growth and product formation under aerobic and oxygen-limited conditions could be described mathematically for the production of xylitol. The rates of growth and xylitol formation were regulated by a ratio of active cells to total cells which was affected by surrounding proton ion. As a result, the optimal pH for maximizing growth and xylitol formation under aerobic and oxygen-limited conditions were numerically obtained at pH = 5.04, 5.86 and pH = 5.90, 5.69, respectively. Using a simple Monod kinetics including pH affecting model, the balancing equations for growth, D-xylose and xylitol in reactors were able to construct to explain the pattern for production of xylitol in batch culture. A curve fitting using non-linear least square analysis was performed to estimate relevant kinetic parameters of the proposed mathematical model for xylitol production.

In continuous culture with cell recycle, the high cell density ($C_x = 30.05 \text{ g l}^{-1}$, $Y_{xs} = 0.25 \text{ g g}^{-1}$) was obtained under aerobic condition, at a relatively high recycle ratio ($R = 0.75$) (Table 2a). However as expected, a relatively high xylitol yield ($Y_{ps} = 0.299 \text{ g g}^{-1}$) was obtained under oxygen-limited condition, at a lower recycle ratio ($R = 0.50$) (Table 2a). The specific rate of xylitol formation was also enhanced under oxygen-limited condition ($q_p = 0.028 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) at the lower recycle ratio ($R = 0.50$), whereas the volumetric rate of xylitol production was remarkably higher ($Q_p = 0.160 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) at the higher recycle ratio ($R = 0.76$) (Table 2b).

Table 2a Continuous culture with cell recycle for xylitol production under steady state.

Run	Condition	R	D	C_{s0}	C_s	C_x	C_p	Y_{xs}	Y_{ps}
CCR-1	Aerobic	0.75	0.067	50	0.04	30.05	0.18	0.25	0.006
CCR-2	Oxygen-limited	0.76	0.064	50	4.89	3.49	2.50	0.08	0.100
CCR-3	Aerobic	0.50	0.074	50	2.47	24.54	0.06	0.44	0.007
CCR-4	Oxygen-limited	0.50	0.067	50	35.65	3.53	1.48	0.38	0.299

Units of dilution rate (D), concentrations (C) and yields (Y) are h^{-1} , g l^{-1} and g g^{-1} , respectively.

Table 2b Continuous culture with cell recycle for xylitol production under steady state.

Run	Condition	R	D	Specific rates (q)		Volumetric rates (Q)	
				Xylose	Xylitol	Xylose	Xylitol
CCR-1	Aerobic	0.75	0.067	66.80	0.40	2007	12.06
CCR-2	Oxygen-limited	0.76	0.064	189.29	18.84	1607	160
CCR-3	Aerobic	0.50	0.074	83.02	0.18	2037	8.46
CCR-4	Oxygen-limited	0.50	0.067	93.95	28.09	300	22.16

Units of dilution rate (D), specific and volumetric rates are h^{-1} , $\text{mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $\text{mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectively.

Conclusion

Significant increase of xylitol from D-xylose to 78% the theoretical yield ($Y_{PS} = 0.71 \text{ g g}^{-1}$) with specific rate of xylitol formation of $q_p = 0.038 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in batch culture at pH 4.0, when oxygen became limited probably resulted from increase level of NADH in the cell (Rizzi *et al.*, 1989a, b) and it is the condition that enhances the efficiency of NADPH regeneration that keeps the level of NADP low and therefore stimulates the activity of D-xylose reductase and xylitol formation (Sirisansaneeyakul *et al.*, 1995). As this concept, was applied to continuous production of xylitol by using continuous culture with membrane filter to retain cell in the system. Maximum cell mass and specific growth rate ($C_x = 30.05 \text{ g l}^{-1}$, $\mu = 0.046 \text{ h}^{-1}$, $R = 0.75$) were obtained under aerobic condition at the controlled ranges of dilution rate ($D = 0.06\text{--}0.07 \text{ h}^{-1}$). Specific rate of xylitol production was increased after recycle ratio has been reduced ($q_p = 0.028 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) under oxygen-limited condition, but the volumetric rate ($Q_p = 0.160 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) was maximized at the increased recycle ratio. The data seem to indicate that cell density and intracellular pool of xylitol are inter-related in controlling xylitol concentration released from the culture. The phenomena are under further investigation including two stages continuous culture with cell recycle and a simulation of a single-stage fermentation with cell recycle is currently considered for elucidating a process optimization for xylitol production after conducting the parameter estimation, in which xylitol productivity will be theoretically maximized under steady state at optimal dilution rate with suitable concentrations of cells, D-xylose and xylitol.

		Nomenclature
C	concentrations	g l^{-1}
D	dilution rate	h^{-1}
R	recycle ratio	
q	specific rates	$\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$
Q	volumetric rates	$\text{g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$
Y	yields	g g^{-1}
μ	specific growth rate	
subscript		
f	feed	
p	product	
s	substrate	
x	cells	

References

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

- Andreyeva, L.N. and Biryakov, V.V. 1973. Analysis of mathematical models the effect of pH on fermentation processes and their use for calculating optimal fermentation conditions. Biotechnol. Bioeng. Symp., 4, 61-67.
- Barbosa, M.F.S., de Medeiros, M.B., de Mancilha, I.M., Schneider, H. and Lee, H. 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.
- Deschatelets, L. and Yu, E.K.C. 1986. A simple pentose assay for biomass conversion studies. Appl. Microbiol. Biotechnol., 24, 379-397.
- Rizzi, M., Erlemann, P., Bui-Thanh, N.A. and Dellweg, H. 1988. Xylose fermentation by yeast. IV. Purification and kinetic studies of xylose reductase from *Pichia stipitis*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 29, 148-154.
- Rizzi, M., Hartward, K., Erlemann, P., Bui-Thanh, N.A. and Dellweg, H. 1989a. Purification and properties of the NAD⁺-xylitol dehydrogenase from the yeast *Pichia stipitis*. J. Ferment. Bioeng., 67, 20-24.
- Rizzi, M., Hartward, K., Bui-Thanh, N.A. and Dellweg, H. 1989b. A kinetic study of the NAD⁺-xylitol dehydrogenase from the yeast *Pichia stipitis*. J. Ferment. Bioeng., 67, 25-30.
- Elrisansaneeyakul, S., Staniszeński, M., and Rizzi, M. 1995. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose. J. Ferment. Bioeng., 80, 565-570.
- Winkelhausen, E. and Kuzmanova, S. 1998. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. J. Ferment. Bioeng., 86, 1-14.

MICROBIAL PRODUCTION OF XYLITOL WITH CELL RECYCLE

Simile Sirisamsaeyakul, Wanchi Tochampa and Sanyasak Bhojwathongjai

Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Chulalongkorn, Bangkok 10900, Thailand
(Fax: 662-579-4096; E-mail: kassakul@ku.ac.th)

Keywords: Xylitol, Cell recycle, D-xylose, Continuous culture, Fermentation kinetics

Summary

Candida magii ATCC 18364 found its optimal growth and xylitol formation in batch culture at pH 4.5 and 6.0, respectively. As a result, the recycled yield in aerobic and oxygen-limited conditions were 0.55 and 0.71 g g⁻¹, respectively. In continuous culture with cell recycle, the maximum specific rate of xylitol formation ($\mu_p = 0.028$ g g⁻¹ h⁻¹) was obtained at D = 0.067 h⁻¹ and R = 0.50, while its maximum volumetric productivity ($Q_p = 0.160$ g l⁻¹ h⁻¹) was found at a higher recycle ratio (R = 0.76) under oxygen-limited condition.

Introduction

Yeast is the most promising xylitol producers in microbial conversion of D-xylose to xylitol, as has been recently reviewed by Winkelhuisen and Kuurmeijer (1998). Xylose metabolism and xylitol production in yeasts were reported to be controlled by two key enzymes, NADH- or NADPH-xylose reductase and NAD-xylitol dehydrogenase (Rizzi *et al.*, 1988, 1989a, b). Among yeasts, *Candida magii* ATCC 18364 was found to be one of the most promising in conversion of D-xylose to xylitol. Kinetics of D-xylose uptake and D-xylose reductase and xylitol dehydrogenase synthesis during aerobic and oxygen-limited conditions using synthetic medium was explained and postulated in complex regulatory models (Sirisamsaeyakul *et al.*, 1995). In this work, a process of xylitol production by a single-stage fermentation with cell recycle by varying recycle ratios under aerobic and oxygen-limited conditions was investigated.

Materials and Methods

Candida magii ATCC 18364 was used in both batch and continuous culture with cell recycle. For xylitol production from D-xylose under aerobic and oxygen-limited conditions. Fermentation was carried out with 1.5 l D-xylose minimal media of Sirisamsaeyakul *et al.* (1995), in 24 fermenter of Nissin B (H. Hsein Biotec)

International). In both cultures, the effects of pH (3.0-5.0) on growth and xylitol production were investigated with an initial xylose concentration of 30 g l⁻¹, at controlled pH under consecutively aerobic and oxygen-limited conditions, respectively. In continuous culture, the procedure was grown aerobically at controlled pH 4.5 and temperature, 30°C, and was cultivated for 24 h at 1,000 rpm agitation rate and 1 rpm recirculation rate, then switched to continuous mode with cell recycle using a hollow fiber module of model KL-21-AJ 5302 (Kumey (ZF Module, Japan). Xylitol production was investigated under both aerobic (1,000 rpm and 1 l vvm) and oxygen-limited (300 rpm and 0.3 vvm) conditions at controlled pH 5.0 with a feed xylose concentration of 30 g l⁻¹ at D = 0.06-0.07 h⁻¹ at recycle ratios (R) 0.50 and 0.75. The steady state was obtained after five volumes replacement.

The samples taken at specified time intervals, were centrifuged cells were washed with water, the residues were dried at 105°C for 24 h for cell mass determination. The experiments were used for D-xylose and xylitol analysis by the methods of Deschamps and Yu (1986) and Adler and Gerschlager (1983), respectively.

Results and Discussion

In batch culture, under aerobic condition, the maximum specific growth rate ($\mu = 0.045$ h⁻¹) and biomass yield ($Y_{x/s} = 0.22$ g g⁻¹) were obtained at pH 4.5 (Table 1a), but under oxygen-limited condition maximum xylitol yield ($Y_{x/s} = 0.71$ g g⁻¹) is of 78 % of the theoretical yield (Barbosa *et al.*, 1988) was obtained at pH 6.0 (Table 1b). However, maximum specific rates for xylitol production under aerobic ($\mu_p = 0.131$ g g⁻¹ h⁻¹) and oxygen-limited ($\mu_p = 0.051$ g g⁻¹ h⁻¹) conditions were obtained at pH between 5.0 to 6.0 (Table 1a) and 4.5 (Table 1b), respectively. So the optimal range of pH of 5.0 was selected for studying the production of xylitol in continuous culture with cell recycle.

Table 1a Batch culture of xylitol production under aerobic condition

#	μ (h ⁻¹)	μ_p (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$Y_{x/p}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$Y_{x/p}$ (g/g)
10	0.045	0.045	0.22	0.078	0.342	0.078	0.342
11	0.045	0.045	0.22	0.078	0.342	0.078	0.342
12	0.045	0.045	0.22	0.078	0.342	0.078	0.342
13	0.045	0.045	0.22	0.078	0.342	0.078	0.342
14	0.045	0.045	0.22	0.078	0.342	0.078	0.342
15	0.045	0.045	0.22	0.078	0.342	0.078	0.342
16	0.045	0.045	0.22	0.078	0.342	0.078	0.342
17	0.045	0.045	0.22	0.078	0.342	0.078	0.342
18	0.045	0.045	0.22	0.078	0.342	0.078	0.342

Table 1b Batch culture of xylitol production under aerobic condition

#	μ (h ⁻¹)	μ_p (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$Y_{x/p}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$Y_{x/p}$ (g/g)
10	0.045	0.045	0.22	0.078	0.342	0.078	0.342
11	0.045	0.045	0.22	0.078	0.342	0.078	0.342
12	0.045	0.045	0.22	0.078	0.342	0.078	0.342
13	0.045	0.045	0.22	0.078	0.342	0.078	0.342
14	0.045	0.045	0.22	0.078	0.342	0.078	0.342
15	0.045	0.045	0.22	0.078	0.342	0.078	0.342
16	0.045	0.045	0.22	0.078	0.342	0.078	0.342
17	0.045	0.045	0.22	0.078	0.342	0.078	0.342
18	0.045	0.045	0.22	0.078	0.342	0.078	0.342

Table 1c Continuous culture with cell recycle for 8 days

#	μ (h ⁻¹)	μ_p (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$Y_{x/p}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$Y_{x/p}$ (g/g)
10	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60
11	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60
12	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60
13	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60
14	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60
15	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60
16	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60
17	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60
18	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60

Table 1d Continuous culture with cell recycle for 18 days

#	μ (h ⁻¹)	μ_p (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$Y_{x/p}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$Y_{x/p}$ (g/g)
10	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60
11	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60
12	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60
13	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60
14	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60
15	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60
16	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60
17	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60
18	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60

Table 1e Continuous culture with cell recycle for 28 days

#	μ (h ⁻¹)	μ_p (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$Y_{x/p}$ (g/g)	$Y_{p/s}$ (g/g)	$Y_{x/p}$ (g/g)
10	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60
11	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60
12	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60
13	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60
14	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60
15	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60
16	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60
17	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60
18	0.067	0.067	0.55	0.028	0.60	0.028	0.60

Using an enzyme kinetic model Andreyeva and Belyakov (1973), the effect growth and product formation under aerobic limited conditions could be described mathematically. The rates of growth formation were regulated by a ratio of active cells which was affected by surrounding product, the optimal pH for maximizing growth formation under aerobic and oxygen-limited were successively obtained at pH = 5.04, 5.00, 5.06, respectively. Using a simple 54 including pH affecting model, the balancing growth, D-xylose and xylitol the models construct to explain the pattern for product batch culture. A curve fitting using non-linear analysis was performed to estimate the parameters of the proposed mathematical rate production.



Under the patronage
of His Royal Highness
Prince Philippe

9th EUROPEAN CONGRESS ON BIOTECHNOLOGY

Brussels, Belgium 11-15 July 1999
HEYSEL Congress and Exhibition Centre

simultaneously with

THE CONFERENCE OF

BIOLOP 99
BIOTECHNOLOGY

ECB9 is the 96th event of the European Federation of Biotechnology.



9th
EUROPEAN CONGRESS
ON BIOTECHNOLOGY

List of Contributors

<u>Name</u>	<u>Contribution</u>
Simon, Jean-Luc	
Simon, Jean-Paul	Converger Bioencapsulation and fermented foods and drinks
Simonneaux, Laurence	ECB9/1814 - Student conceptions about biotechnology
Simuth, Jozef	
Sinder, Christoph	ECB9/2817 - The DMT-BIODYN-process: a suspension reactor for biological treatment of fine grained soil
Singh, Jai Kishor	
Slinaovic, Georges	Converger Food and drink quality control: (bio)sensors and spectroscopic methods ECB9/2304 - The monitoring of the enzymatic depolymerisation of pectins by spectroscopy techniques ECB9/2304 - B - Monitoring biomass, polysaccharides, glucose and lactate in an industrial fermentation of <i>Streptococcus</i>
Siraansaneeyakul, Sarote	ECB9/2271 - Microbial Production of Xylitol with Cell Recycle System
Slisk, Csaba	ECB9/2435 - Analysis of Catalytic Activity and Inactivation of Amylomyrase
Skrabunek, Bernhard	
Slavkina, Olga	ECB9/2639 - Energetic expenditures by <i>S. cerevisiae</i> yeasts in anaerobic conditions during chemostat cultivation and etc
Sliskovic, Dario	
Smaal, Jean	Converger for the session on Adviments in downstream process technologies
Smales, Kornelia	ECB9/1518 - New approaches to study the prevalence and diversity of mobile genetic elements in bacterial populations
Snoets, Barth	ECB9/2100 - Nitroglycerin (NG) decoloration by mixed and pure bacterial cultures
Smidt, Hauke	ECB9/2014 - Molecular characterization of O-Chlorophenol Reductive Dehalogenase - A key enzyme in halorespiration
Smirnova, Evgeniya	A new 8.2 kDa differentiation factor from cultural
Smits, Elke	
Smits, Theo H.M.	ECB9/1832 - Alkane hydroxylases: applications and molecular genetic analysis

9th
**EUROPEAN CONGRESS
ON BIOTECHNOLOGY**

Book of Abstracts

*Title: ECD9/2271 - Microbial Production of Xylitol with Cell Recycle System

*Authors: Sarote Sirisantisueyikul, Worak Techampo and Supapong Bhawapathasupit Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Chantachak, Bangkok 10960, Thailand (ngissi@nontu.ku.ac.th)

*Keywords: Xylitol, Cell recycle, D-xylase, Continuous culture, Fermentation kinetics

*Summary: Agricultural wastes such as rice straw and corocoba, are abundant in Thailand. Dilute sulphuric acid hydrolysis releases pentose sugars, mainly D-xylase, which can be used as starting material for xylitol fermentation (1). The promising xylitol producer, *Candida mogii* ATCC 18364 (2) found its optimal growth and xylitol formation in batch culture at pH 4.5 and 6.0, respectively. As a result, the maximum yield of xylitol from D-xylase in aerobic and oxygen limiting conditions were 0.55 and 0.71 g.g⁻¹, respectively. In continuous culture with cell recycle, the specific xylitol production rate, $q_p = 0.028 \text{ g.g}^{-1}\text{h}^{-1}$, was obtained at a dilution rate (D) of 0.067 h⁻¹ under oxygen limiting condition at a low recycle ratio, R = 0.50.

*Materials and Methods: The preculture was carried out in a 2-l fermenter containing 1.5 l minimal xylase medium at controlled pH 4.5 and temperature, 30°C, and was cultivated aerobically at 1,000 rpm and 1 vvm for 24 h. This was then switched to continuous mode with cell recycle using a hollow fiber module. Xylitol production was investigated under both aerobic (1,000 rpm and 1.0 vvm) and oxygen limited (300 rpm and 0.3 vvm) conditions with a feed xylase concentration of 30 g.l⁻¹ at D = 0.06-0.07 h⁻¹ at recycle ratios, R, 0.50 and 0.75.

*Overview and discussion of results: *Candida mogii* ATCC 18364 was used in both batch and continuous culture with cell recycle for xylitol production from D-xylase under aerobic and oxygen limiting conditions. In batch culture, the optimal growth (YX/S = 0.22 g.g⁻¹) was obtained at pH 4.5 under aerobic condition while the optimal xylitol production (Yp/S = 0.71 g.g⁻¹) was obtained at pH 6.0 under oxygen limited condition. In continuous culture with cell recycle, the higher cell density (CX = 30.1 g.l⁻¹, YX/S = 0.22 g.g⁻¹) was obtained under aerobic condition at the higher recycle ratio (R = 0.75). However as expected, xylitol yield and specific production rate improved under oxygen limitation resulting in a relatively higher xylitol yield at the lower recycle ratio. Therefore, a process for obtaining higher xylitol productivity could be achieved by operating a high cell density culture under aerobic condition, followed by cultivation under oxygen limitation, while optimizing lower recycle ratios to obtain the highest specific xylitol production rate to enhance volumetric productivity.

*Conclusions: In batch culture, 78 % of the theoretical yield of xylitol from D-xylase (YX/S = 0.71 g.g⁻¹) was obtained under oxygen limitation. Continuous culture with cell recycle was exploited to obtain high cell density (CX = 30.05 g.l⁻¹, R = 0.75) under aerobic condition. However, the specific xylitol production rate was clearly improved under oxygen limiting condition, especially at the lower recycle ratio ($q_p = 0.028 \text{ g.g}^{-1}\text{h}^{-1}$, R = 0.50).

*References: (1) Wiselhausen, E. and Krammova, S. 1998. Microbial conversion of D-xylase to xylitol. *J. Ferment. Bioproc.* 86, 1-14.
(2) Sirisantisueyikul, S., Stanislawski, M., and Ritzel, M. 1995. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylase. *J. Ferment. Bioproc.* 80, 565-570.

2. การตีพิมพ์บทความวิจัยในวารสาร

- 2.1 Srisansaneeysakul, S., W. Techarapa and S. Bhuwaphanapant, 2000, Kinetic modeling of pH affecting xylitol production by *Candida mogii*. Thai J. Agric. Sci. (submitted)



สมาคมวิทยาศาสตร์การเกษตรแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์
ที่ ปณ.1070 ปทุมเกษรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10903
THE AGRICULTURAL SCIENCE SOCIETY OF THAILAND
UNDER THE PATRONAGE OF HIS MAJESTY THE KING
P.O.BOX 1070, KASETSART UNIVERSITY, BANGKOK 10903, THAILAND.

58

Acceptance Form of Manuscript for Thai Journal Agricultural Science

Corresponding Author :

S. Siraisansameeyakul

Manuscript Code :

AGR-SC 99-64

Manuscript Title :

Kinetic Modelling of pH affecting
xylitol production by *Candida
megii*

Dear Sir/Madame,

Please be informed that the above article(s) is

☒ received and shall be refereed within 6 months

☐ accepted for publication in Volume Number Year

Possible date of publication

Yours sincerely,

(Professor Suranant Subhadrabandhu)

Editor, Thai J. Agric. Sci.

Date 30/12/99

Tel : (66-2) 579-0308, 561-4891

Fax : (66-2) 579-1951

E-mail : agrsns@nontri.ku.ac.th

Kinetic Modeling of pH Affecting Xylitol Production by *Candida mogii*

S. Sirisansaneeyakul^{*1}, W. Tochampa², M. Rizzi² and S. Bhawapathanapun¹

Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

Abstract

Candida mogii ATCC 18364 which was cultivated in minimal medium containing xylose as carbon source at various pH, found its optimum pH for growth and xylitol formation both at pH 4.5 under aerobic ($\mu = 0.046 \text{ h}^{-1}$) and oxygen-limited ($q_o = 0.051 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) conditions, respectively. On the other hand, its maximum xylitol yield from xylose ($Y_{P/S}$) found at pH 6.0 is 0.711 g g^{-1} under oxygen-limited condition. Equilibrium constants of pH dependent specific growth rate and specific rate for xylitol formation under both aerobic and oxygen-limited conditions are optimally obtained from non-linear regression analysis. As a result, the material balance equations expressing growth, xylose consumption and xylitol formation under both conditions are formulated with numerically estimated kinetic parameters of the proposed unstructured model. The comparison between the model predictions and experimental observations show very good agreement for different pH values under aerobic condition, except those under oxygen-limited condition.

Key words : xylitol, pH effect, *Candida mogii*, kinetic modeling

Introduction

Xylitol, a five carbon sugar alcohol which is recommended for diabetics and for the prevention of dental caries occurs widely in nature. As compared to chemical production, its microbial production is lately becoming more attractive because of an expected cheaper downstream processing. Among microorganisms, *Candida mogii* ATCC 18364 has been reported to efficiently produce xylitol ($Y_{P/S} = 0.62 \text{ g xylitol/g xylose}$). A maximum product yield was obtained when initial D-xylose concentration and specific oxygen uptake rate were 53 g l^{-1} and $0.5 \text{ mmol O}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectively (Sirisansaneeyakul, S. *et al.*, 1995). This paper presents the effect of pH on xylitol formation under aerobic and oxygen-limited conditions and its pH affecting kinetic modeling on xylitol production.

* Correspondence

¹ Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

² Department of Agro-Industry, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

³ Department of Biotechnology, Institute of Food Technology, University of Hohenheim, D-70593 Stuttgart, Germany

Mathematical Model

As known, pH plays an important role affecting both microbial growth and product formation at different pH values (Vongsuvanlert and Tani, 1989; Vandeska *et al.*, 1995). Using enzyme kinetic approach, the mathematical model expressing pH effect was proposed for microbial growth kinetics (Andreyeva and Biryukov, 1973; Ohara *et al.*, 1992), whose rate equations were formulated in association with proton contribution in cells (Bailey and Ollis, 1986). Those cells under active or inactive condition were mechanistically shown in Eq. (1).



Providing $K_1 = \frac{X_{\text{active}}[H^+]}{X_{\text{inactive}}}$, $K_2 = \frac{X_{\text{inactive}}[H^+]}{X_{\text{active}}}$ and $X_t = X_{\text{active}} + X_{\text{inactive}}$, the ratio of active to total cells was resulted in Eq. (2).

$$\frac{X_{\text{active}}}{X_t} = \frac{1}{1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}} \quad (2)$$

Since the growth rate depends on the active cell present only, the specific growth rate was related to in terms of proton concentration or pH in the system as the following Eq. (3)-(4):

$$\left(X_a \frac{X_{\text{active}}}{X_t} \right) = \mu(H^+) = \frac{kX_t}{1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}} \quad (3)$$

$$\mu(H^+) = \frac{\mu_m}{1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}} \quad (4a)$$

$$\mu(\text{pH}) = \frac{\mu_m}{1 + \frac{[10^{-\text{pH}}]}{K_1} + \frac{K_2}{[10^{-\text{pH}}]}} \quad (4b)$$

The kinetic model for pH dependence was also proposed describing the specific rate for product formation (Eq. 5).

$$q_p(\text{pH}) = \frac{q_p^0}{1 + \frac{[10^{-\text{pH}}]}{K_1} + \frac{K_2}{[10^{-\text{pH}}]}} \quad (5)$$

The optimal pH for growth (Eq. 6) and product formation (Eq. 7) were obtained by the derivatives of Eq. (4) and (5) with proton concentration and setting to zero, respectively

$$[H^+]_{\text{opt}} = \sqrt{K_1 K_2} \quad \text{and} \quad \text{pH}_{\text{opt}} = \frac{1}{2}(\text{p}K_1 + \text{p}K_2) \quad (6)$$

$$[H^+]_{\text{opt}} = \sqrt{K_1 K_2} \quad \text{and} \quad \text{pH}_{\text{opt}} = \frac{1}{2}(\text{p}K_1 + \text{p}K_2) \quad (7)$$

By using Monod type kinetics shown in Eq. (3), hence, the material balance equations expressing the growth, xylose consumption and xylitol formation were formulated in the Eq.(9)-(11), where $r_x = \frac{dC_x}{dt} = \mu(C_x, pH)C_x$.

$$\mu(C_x, pH) = \frac{\mu_m C_x}{(K_s^x + C_x) \left(1 + \frac{10^{-pH}}{K_1} + \frac{K_2}{10^{-pH}} \right)} \quad (8)$$

$$\frac{dC_x}{dt} = \frac{\mu_m C_x C_x}{(K_s^x + C_x) \left(1 + \frac{10^{-pH}}{K_1} + \frac{K_2}{10^{-pH}} \right)} \quad (9)$$

$$\frac{dC_p}{dt} = - \left(\frac{r_x}{Y_{x/p}} + m_x C_x \right) \quad (10)$$

$$\frac{dC_r}{dt} = \frac{q_r^x C_x C_x}{(K_r^x + C_x) \left(1 + \frac{10^{-pH}}{K_3} + \frac{K_4}{10^{-pH}} \right)} \quad (11)$$

Results and Discussion

Effect of pH on growth and xylitol formation

The optimal pH for growth and xylitol formation under aerobic condition were 4.5 ($\mu = 0.046 \text{ h}^{-1}$) and 6.0 ($Y_{px} = 0.551 \text{ g g}^{-1}$), respectively (Table 1). And those under oxygen-limited condition were 4.5 ($\mu = 0.012 \text{ h}^{-1}$) and 6.0 ($Y_{px} = 0.711 \text{ g g}^{-1}$), respectively (Table 2). The growth decreased at higher and lower the optimal pH under aerobic condition. However, under oxygen-limited condition, specific growth rates at pH 4.5-7.0 were similarly in the range of 0.010-0.012 h^{-1} and no growth was found at pH 3.0. The xylitol yield at pH 4.0-7.0 were approximately 1.1-1.4 time higher in aerobic than in oxygen-limited conditions, except that at pH 3.0 whose xylitol yield was 1.4 time higher under aerobic condition. Though fast growing condition enhances its biomass production rather than xylitol formation resulting lower xylitol yield obtained (Vongsavanlerit and Tani, 1989; Vandeska *et al.*, 1995). In the latter case, with non growing phase, this might be a strong effect of pH on xylitol formation under oxygen limited condition. At present work, the xylitol yields both under aerobic and oxygen-limited conditions were maximized at pH 6.0, which are 60.42 and 77.96 % of theoretical yield, respectively.

The correlation between pH with specific growth rate (Figure 1) and specific rate of xylitol formation (Figure 2) can be expressed in Eq. 4b and 5, respectively. From non-linear regression analysis, those pH dependent constants including equilibrium constants, maximum specific growth rate and maximum specific rate of xylitol formation are summarized in Table 3. As a result, optimal pH (pH_{opt}) for growth and xylitol formation derived from the proposed model by Eq. 6 and 7 are 5.04, 5.86 under aerobic condition and 5.90, 5.69 under oxygen-limited condition, respectively. These optimal pH

values are slightly different from those obtained from experimental observation, except that for optimal growth under oxygen-limited condition, which was obtained at pH 4.5. These differences might be mainly resulted from numerical determination for appropriate curve fitting with limited experimental data, especially under oxygen-limited condition.

Besides growth and xylitol formation, an increase of pH increased slightly the specific rate of xylose consumption under aerobic condition and found its maximum at pH 7.0 ($0.262 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), while the maximal specific rate of xylose consumption ($0.085 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) was at pH 4.5 under oxygen limited condition. However, it is clear that the rate of xylose transportation was obviously more limited under oxygen-limited condition than in situation of pH effect. An accumulation of intracellular xylitol by partially inhibited respiratory chain with oxygen limitation can consequently decrease the forward activity of NADPH-dependent xylose reductase (Sinsamsanooyakul *et al.*, 1995). Therefore, this results in decrease of xylose utilization intracellularly against its transportation simultaneously. As a result, the specific rates of xylose consumption and xylitol formation were unfavorable under oxygen-limited condition as seen in the result, while the xylitol yield unlikely found its optimal value instead.

Comparison between model predictions and experimental observations

The remaining model kinetic constants (Eq. 9-11) have been estimated by the simplex method (Nelder and Mead, 1965). Some previously determined kinetic constants, i.e. $\mu_{\max}$, q_p^0 have also been modified for better fitting the experimental results. The optimal kinetic parameters obtained by curve fitting method are summarized in Table 4. The comparison between the model predictions and experimental observations show pretty good agreement for different pH values under aerobic condition (Figure 3A), but fairly satisfactory under oxygen-limited condition (Figure 3B).

Conclusion

Candida mogii ATCC 18364 was cultivated in minimal medium containing xylose as carbon source at pH 3.0-7.0. The optimum pH for the specific growth rate and the specific rate of xylitol formation are 4.5, 5.0-6.0 and 4.5, 4.5 under aerobic and oxygen-limited conditions, respectively. Maximum xylitol yield from xylose ($Y_{p/s}$) found at pH 6.0 under oxygen-limited condition is 0.711 g g^{-1} , which is 77.96 % of the theoretical yield (Barbosa, M. F. S. *et al.*, 1988). Equilibrium constant of pH dependent specific growth rate and specific rate for xylitol formation, $K_1 = 5.76 \times 10^{-3}$, $K_2 = 1.43 \times 10^{-3}$, $K_3 = 1.05 \times 10^{-4}$, $K_4 = 1.81 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$, and $K_5 = 8.99 \times 10^{-2}$, $K_6 = 1.74 \times 10^{-2}$, $K_7 = 3.39 \times 10^{-4}$, $K_8 = 1.25 \times 10^{-2} \text{ mol l}^{-1}$ under aerobic and oxygen-limited conditions, respectively, are obtained from non-linear regression analysis. The material balance equations expressing the growth, xylose consumption and xylitol formation are formulated to estimate the kinetic parameters of mathematical model. As a result, the following kinetic parameters, $\mu_{\max} = 0.0394 \text{ h}^{-1}$, $K_9^2 = 0.559 \text{ g l}^{-1}$, $Y_{x/r} = 0.173 \text{ g g}^{-1}$,

$m_s = 4.83 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $q_p^m = 0.223 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $K_s^x = 17.7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, and $\mu_m = 0.005 \text{ h}^{-1}$, $K_s^x = 17.65 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$, $Y_{X/S} = 0.0328 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, $m_s = 8.83 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $q_p^m = 0.108 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $K_s^x = 27.57 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ under aerobic and oxygen-limited conditions, respectively, were estimated by the simplex method. Therefore, the kinetic modeling of pH affecting xylitol production, which describes the concentrations of biomass, xylose, and xylitol have been finally constructed under both aerobic and oxygen-limited conditions, respectively, as followings:

Aerobic condition

$$\begin{aligned}\frac{dC_X}{dt} &= \frac{0.0394 \cdot C_S}{(0.559 + C_X) \left(1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{3.76 \times 10^{-1}} + \frac{1.43 \times 10^{-8}}{10^{-\text{pH}}} \right)} C_X \\ \frac{dC_S}{dt} &= - \left(\frac{r_X}{0.173} + 4.83 \times 10^{-3} C_X \right) \\ \frac{dC_P}{dt} &= \frac{0.223 \cdot C_X}{(17.7 + C_S) \left(1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{1.05 \times 10^{-1}} + \frac{1.81 \times 10^{-8}}{10^{-\text{pH}}} \right)} C_X\end{aligned}$$

Oxygen-limited condition

$$\begin{aligned}\frac{dC_X}{dt} &= \frac{0.005 \cdot C_S}{(17.65 + C_S) \left(1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{8.99 \times 10^{-1}} + \frac{1.74 \times 10^{-8}}{10^{-\text{pH}}} \right)} C_X \\ \frac{dC_S}{dt} &= - \left(\frac{r_X}{0.0328} + 8.83 \times 10^{-3} C_X \right) \\ \frac{dC_P}{dt} &= \frac{0.108 \cdot C_X}{(27.57 + C_S) \left(1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{3.39 \times 10^{-1}} + \frac{1.25 \times 10^{-8}}{10^{-\text{pH}}} \right)} C_X\end{aligned}$$

The comparison between the mathematical model predictions and experimental observations show fairly good agreement for different pH values. Since the optimal growth and xylitol formation are obtained at different pH values. Hence, the two stages process for xylitol production is recommended for the biomass and xylitol formations separately, which exploits the obtained optimal conditions. Such an observation is experimentally under investigation for concluding the expected result in the next report.

Acknowledgement

We acknowledge the financial support of the Thailand Research Fund (PDF/68/2540). We also dedicate this paper to the memory of Professor Dr.-Ing. M. Rizzi.

Literature Cited

- Andreyeva, L. N. and Biryukov, V. V. 1973. Analysis of mathematical models of the effect of pH on fermentation processes and their use for calculating optimal fermentation conditions. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 4 : 61-76.
- Barbosa, M. F. S., de Medeiros, M. B., de Mancilha, I. M., Schneider, H. and Lee, H. 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.
- Bailey, J. E. and Ollis, D. F. 1986. *Biochemical engineering fundamentals*. McGraw-Hill, Singapore. pp. 130-132.
- Nelder, J. A. and Mead, R. 1965. A simplex method for function minimization. *Computer J.* 7 : 308-312.
- Ohara, H., Hiyama, K. and Yoshida, T. 1992. Kinetic study on pH dependence of growth and death of *Streptococcus faecalis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38 : 403-407.
- Sirisansaneeyakul, S., Staniszewski, M. and Rizzi, M. 1995. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose. *J. Ferment. Bioeng.* 80 : 565-570.
- Vandeska, E., Anantey, S., Kuzmanova, S. and Jeffries, T. W. 1995. Effect of environmental conditions on production of xylitol by *Candida boidinii*. *Wld. J. Microbiol. Biotechnol.* 11 : 213-218.
- Vongsvaenlert, V. and Tani, Y. 1989. Xylitol production by a methanol yeast, *Candida boidinii* (*Kloeckera* sp.) No. 2201. *J. Ferment. Bioeng.* 67 : 35-39.

Table 1 Results from aerobic batch fermentation of *C. mogii* in xylose medium at various pHs

pH	μ (h ⁻¹)	q_s (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	q_p (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)	Y_{d}^* %
3.0	0.034	0.214	0.072	0.154	0.362	39.69
4.0	0.029	0.168	0.077	0.167	0.462	50.66
4.5	0.046	0.206	0.089	0.221	0.460	50.44
5.0	0.040	0.240	0.131	0.158	0.546	59.87
6.0	0.038	0.240	0.131	0.158	0.551	60.42
7.0	0.034	0.260	0.114	0.134	0.451	49.45

* Theoretical xylitol yield is 0.912 g xylitol/g xylose (Barbosa *et al.*, 1988.)Table 2 Results from oxygen-limited batch fermentation of *C. mogii* in xylose medium at various pHs

pH	μ (h ⁻¹)	q_s (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	q_p (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)	Y_{d}^* %
3.0	-	0.032	0.010	-	0.253	27.74
4.0	0.003	0.050	0.030	0.064	0.589	64.58
4.5	0.012	0.085	0.051	0.148	0.627	68.75
5.0	0.010	0.063	0.038	0.155	0.605	66.34
6.0	0.010	0.059	0.038	0.166	0.711	77.96
7.0	0.010	0.064	0.039	0.150	0.607	66.56

* Theoretical xylitol yield is 0.912 g xylitol/g xylose (Barbosa *et al.*, 1988.)

Table 3 Summary of kinetic constants obtained from pH dependent model (Eq. 4b and 5)

Kinetic constants	Aerobic condition	Oxygen-limited condition
K_s (mol.l ⁻¹)	5.76×10^{-3}	8.99×10^{-3}
K_p (mol.l ⁻¹)	1.43×10^{-6}	1.74×10^{-5}
K_i (mol.l ⁻¹)	1.05×10^{-3}	3.39×10^{-4}
K_{si} (mol.l ⁻¹)	1.81×10^{-5}	1.25×10^{-5}
μ_m (h ⁻¹)	0.039	0.012
q_p^m (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	0.135	0.043

Table 4 Kinetic parameters estimated by Simplex method

Kinetic parameters	Aerobic condition	Oxygen-limited condition
μ_m (h ⁻¹)	0.0394	0.005
K_s^a (g.l ⁻¹)	0.559	17.65
$v_{m/s}$ (g.g ⁻²)	0.173	0.0328
m_s (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	4.83×10^{-5}	8.85×10^{-5}
q_p^m (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	0.223	0.108
K_p^b (g.l ⁻¹)	17.7	27.57

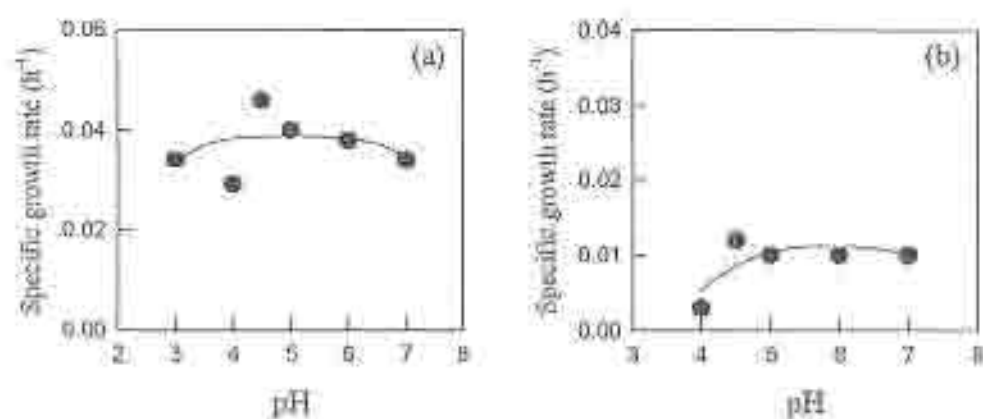


Figure 1 Effect of pH on specific growth rate under aerobic condition (a) and oxygen-limited condition (b).

RESULTS

(Reprint with Manuscript)

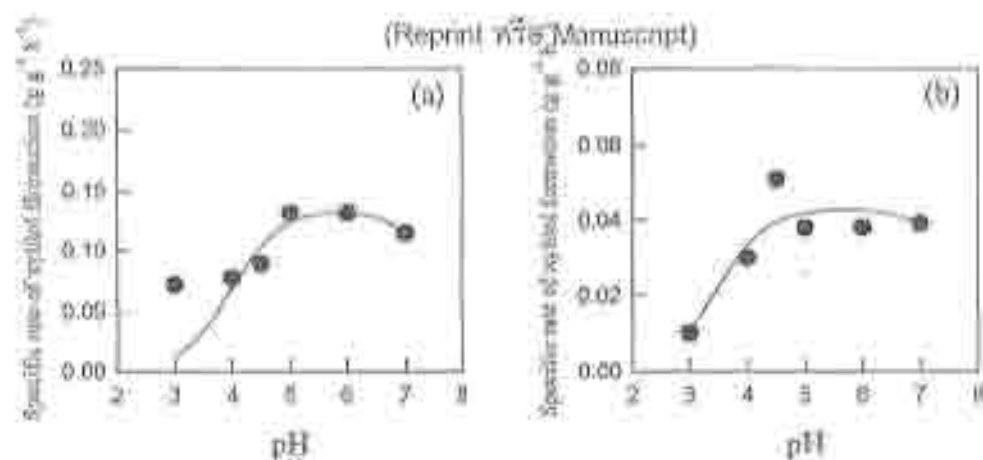
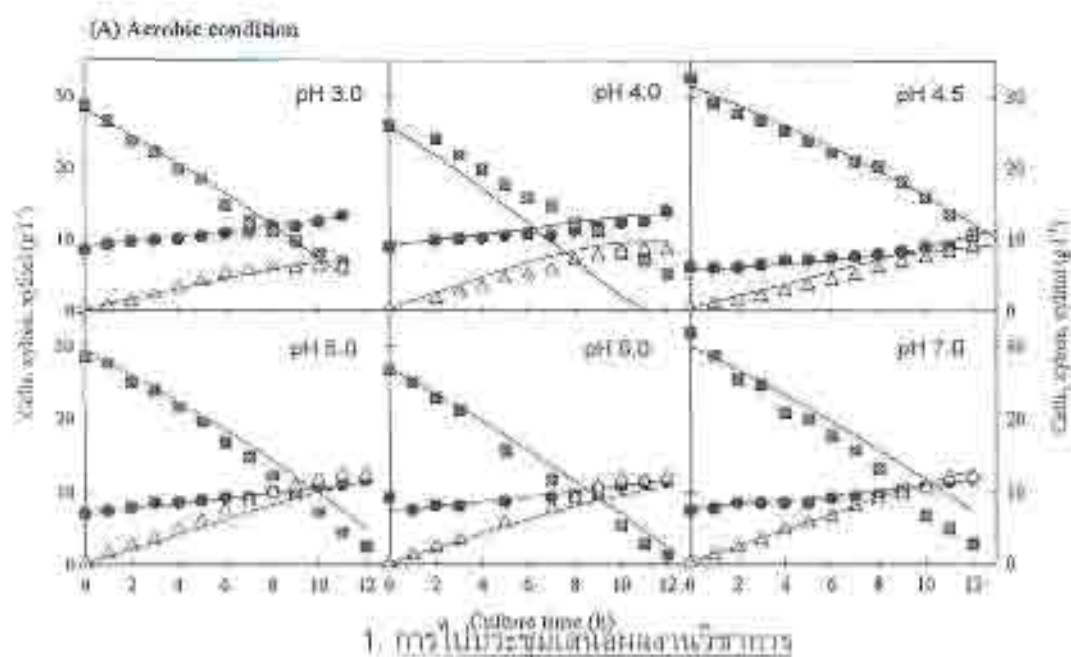


Figure 2 Effect of pH on specific rate of xylitol formation under aerobic condition (a) and oxygen-limited condition (b).



11. Srisansaneeyakul S., W. Tothampan and M. Rizzi. 1987. Kinetic modelling of pH affecting xylose consumption by *Candida mogii*. 11th European Congress on Biotechnology, August 21, Budapest, Hungary

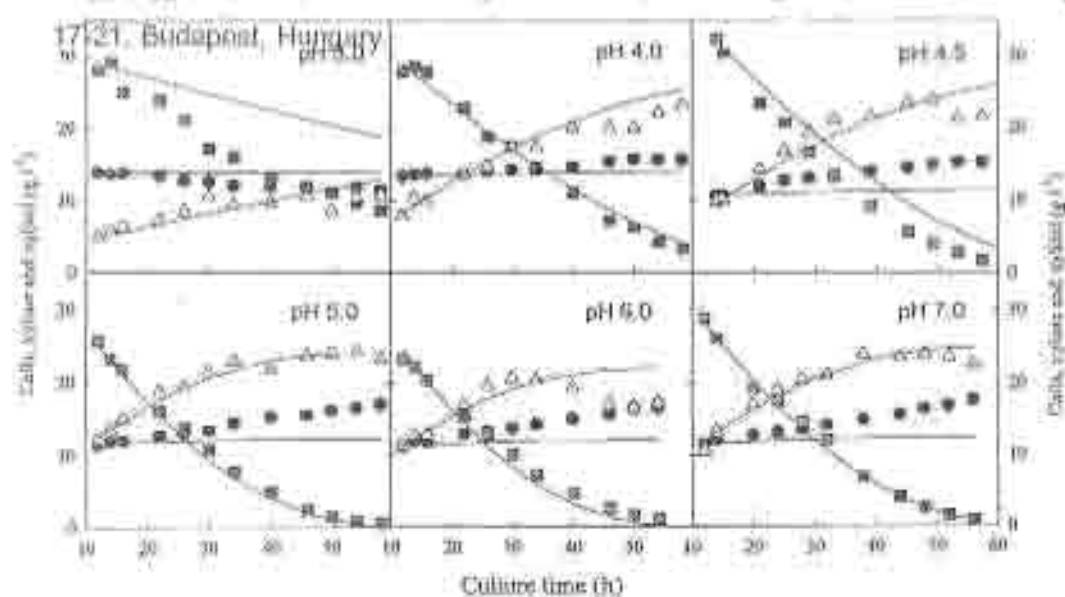


Figure 3 Comparison for the concentrations of cells (●), xylose (■) and xylytol (Δ) between measurements (symbols) and calculations (lines) under aerobic (A) and oxygen-limited (B) conditions.

2. การพัฒนาเทคโนโลยีในวนเกษตร

- 2.2 Sinsensaneeyakul, S., W. Tochampa and S. Bhuwapathanapun. 2000. Continuous production of xyllol by cell recycling system. Thai J. Agric. Sci. (submitted)



สมาคมวิทยาศาสตร์การเกษตรแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ ๘๙
๕ ปณ. 1070 ปตท.เกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร 10903
THE AGRICULTURAL SCIENCE SOCIETY OF THAILAND
UNDER THE PATRONAGE OF HIS MAJESTY THE KING
P.O. BOX 1070, KASETSART UNIVERSITY, BANGKOK 10903, THAILAND.

Acceptance Form of Manuscript
for Thai Journal Agricultural Science

Corresponding Author:

S. Srisansaneeeyakul

Manuscript Code: AGR-SC 00-02

Manuscript Title: Continuous production of xylitol by
cell recycling system

2. การผลิตแอลกอฮอล์ในวงจร

2.1 Srisansaneeeyakul, S., W. Tachampa and S. Buawansathakul 2000 Kinetic modeling of
pH affecting xylitol production by *Candida mogii*. Thai J. Agric. Sci. (submitted)

Dear Sir/Madame,

Please be informed that the above article(s) is

☒ received and shall be refereed within 6 months

☐ accepted for publication in Volume Number Year

Possible date of publication

Yours sincerely,

(Professor Suranant Subhadtrabandhu)

Editor, Thai J. Agric. Sci.

Date 13/11/00

Tel : (66-2) 579-0308, 561-4891

Fax : (66-2) 579-1951

E-mail : agrsns@nontvi.ku.ac.th

Continuous Production of Xylitol by Cell Recycling System

S. Sirisansaneeyakul¹*, W. Tochampa², M. Rizzi³ and S. Bhuvapathanapun¹

Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

Abstract

Candida mogii ATCC 18364 was carried out in continuous culture with cell recycle, the high cell density ($C_x = 30.05 \text{ g l}^{-1}$, $Y_{x/s} = 0.25 \text{ g g}^{-1}$) was obtained under aerobic condition, at a relatively high recycle ratio ($R = 0.75$). However as expected, a relatively high xylitol yield ($Y_{p/s} = 0.299 \text{ g g}^{-1}$) was obtained under oxygen-limited condition, at a lower recycle ratio ($R = 0.50$). The specific rate of xylitol formation was also enhanced under oxygen-limited condition ($q_p = 0.028 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) at the lower recycle ratio ($R = 0.50$), whereas the volumetric rate of xylitol production was remarkably higher ($Q_p = 0.160 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) at the higher recycle ratio ($R = 0.76$). As compared in batch and continuous production of xylitol, the maximal volumetric productivity of xylitol ($Q_p = 325.62 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) obtained in continuous culture with optimal two-step cell recycle, was 3.29 and 5.22 times higher than those obtained in continuous culture with single-step cell recycle and in batch culture, respectively.

Keywords : xylitol, cell recycle, *Candida mogii*, continuous culture

Introduction

Yeast is the most promising xylitol producers in microbial conversion of D-xylitol, an has been recently reviewed by Winkelhausen and Kuzmanova (1998). Xylose metabolism and xylitol production in yeasts were reported to be controlled by two key enzymes, NADH- or NADPH-xylose reductase and NAD-xylitol dehydrogenase (Rizzi *et al.*, 1988, 1989a, b). Among yeasts, *Candida mogii* ATCC 18364 was found to be one of the most promising in conversion of D-xylose to xylitol. Kinetics of D-xylose uptake and D-xylose reductase and xylitol dehydrogenase synthesis during aerobic and oxygen-limited conditions using synthetic medium was explained and postulated in complex regulatory models (Sirisansaneeyakul *et al.*, 1995). In this work, a process of xylitol production by a single-stage fermentation with cell recycle by varying recycle ratios under aerobic and oxygen-limited conditions was investigated.

* Correspondence

¹ Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

² Department of Agro-Industry, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

³ Department of Biotechnology, Institute of Food Technology, University of Hohenheim, D-70593 Stuttgart, Germany

Mathematical Model

In continuous culture with cell recycling system, as shown in Figure 1, the material balances of biomass, substrate and product can be formulated as follows (Lee and Chang, 1987):

$$\frac{dC_x}{dt} = -\beta DC_x + r_x = (a - \beta D)C_x \quad (1)$$

$$\frac{dC_s}{dt} = D(C_s^i - C_s) - r_s = D(C_s^i - C_s) - \left(\frac{r_x}{Y_{x/s}} + m_s C_x\right) \quad (2)$$

$$\frac{dC_p}{dt} = -DC_p + r_p = -DC_p + q_p C_x \quad (3)$$

With Monod kinetic equations for substrate-dependent growth and product formation, $\mu = \frac{\mu_m C_s}{K_s^s + C_s}$ and $q_p = \frac{q_{p,m} C_s}{K_s^p + C_s}$ are substituted into the above differential equations. To prevent the system from washing out, the continuous culture with cell recycle must operate within the critical dilution rate ($D < \frac{\mu}{\beta}$). Therefore, at steady state, specific rates of growth, substrate consumption and xylinol production, as well as biomass and product yields can be obtained as followings:

$$\mu = \beta D \quad (4)$$

$$q_x = \frac{D(C_s^i - C_s)}{C_x} \quad (5)$$

$$q_p = \frac{DC_p}{C_x} \quad (6)$$

$$Y_{x/s} = \frac{\mu C_x}{D(C_s^i - C_s)} = \frac{\beta C_x}{C_s^i - C_s} \quad (7)$$

$$Y_{p/s} = \frac{q_p C_x}{D(C_s^i - C_s)} = \frac{C_p}{C_s^i - C_s} \quad (8)$$

Materials and Methods

Preparation of filtration unit

Yeast cell suspension was prepared from batch culture of *Candida mogii* ATCC 18364 in minimal medium without carbon source (Srisansaneeyakul *et al.*, 1995). For checking cell recycling system, two cell concentrations of 20 and 40 g l⁻¹ were investigated using a hollow fiber module of model KL-U-M 6302 (Kuraray UF Module, Japan) under specified cell recycle rates (20, 30 and 40 l h⁻¹) with using high pressure peristaltic pump (Eyela Roller Pump, RP-1000, Japan). Samples were withdrawn every 4 h for determining cell viability and filtration rate. Cell viability was determined by methylene blue staining (Lee *et al.*, 1981) and calculated as percent of living cells to total cell count, so called viability index.

For connecting to continuous fermenter, the filtration unit was sterilized with circulating 70% ethanol for 30 minutes and washing with sterile water. The single-stage fermentation with cell recycle was set as shown systematically in Figure 2. Cell recycle rate was kept constant for retaining cells into

the fermenter, while the fresh medium was continuously fed into fermenter with controlled flow rate. Continuous culture was established by balancing inflow and outflow rates constantly. Therefore, bleeding from fermenter directly was necessarily compensated with outflowing of filtrate from filtration unit. For having cell recycle rate at $R = 0.75$ or 0.50 , its constant value was controlled by peristaltic pump P1 and P2 (Table 1).

Table 1 Flow rate of fermentation broth and fresh medium passing through peristaltic pump P1 and P2.

$R = \frac{P2}{F}$	$\beta = \frac{P1}{F}$	P1 (l h ⁻¹)	P2 (l h ⁻¹)	$F = P1 + P2$ (l h ⁻¹)
0.75	0.25	0.025	0.075	0.10
0.50	0.50	0.050	0.050	0.10

Symbols P1 and P2 referred to Figure 2.

Xylitol production with cell recycling system

Candida mogii ATCC 18364 was used in continuous culture with cell recycle for xylitol production from D-xylose under aerobic and oxygen-limited conditions. Fermentation was carried out with 1.5 l D-xylose minimal medium of Sirisānaneeyakul *et al.* (1995), in 2-l fermenter of Biotat II (B. Brann Biotech International). In continuous culture as shown in Figure 2, the preculture was grown aerobically at controlled pH 4.5 and temperature, 30°C, and was cultivated for 24 h at 1,000 rpm agitation rate and 1 vvm aeration rate, then switched to continuous mode with cell recycle using a hollow fiber module of model KL-U-M 6302 (Kuraray UF Module, Japan). Xylitol production was investigated under both aerobic (1,000 rpm and 1.0 vvm) and oxygen-limited (300 rpm and 0.3 vvm) conditions at controlled pH 5.0 with a feed xylose concentration of 30 g l⁻¹ at $D = 0.06$ – 0.07 h⁻¹ at recycle ratios (R) 0.50 and 0.75. The steady state was obtained after four volumes replacement.

The samples, taken at specified time intervals, were centrifuged; cells were washed with water the residues were dried at 105°C for 24 h for cell mass determination; the supernatants were used for D-xylose and xylitol analysis by the methods of Deschatelets and Yu (1986) and Adier and Gustafsson (1980), respectively.

Results and Discussion

Factors affecting filtration system

With 20 g l⁻¹ cell concentration at recycle rate 20 l h⁻¹, the cell viability index was obtained between 92.5–98.2 % in 48 h of circulation time and filtration rate found negligible changing. When increasing into higher recycle rates, 30 and 40 l h⁻¹, the cell viability index were still in the range of 88.7–96.2 and 88.4–98.6 %, respectively (Figure 3A). While the filtration rates had no change within 0.210–0.216 l h⁻¹ in 48 h of circulation time at higher recycle rates, except that at lower recycle rate 20 l h⁻¹ the filtration rate was slightly reduced from 0.24 to 0.21 l h⁻¹ in the first 14 h of circulation time.

(Figure 3B). It is, however, clear that both recycle rate and circulation time of 48 h did not remarkably affect the cell viability. It is also found that the filtration rate was independent from recycle rate and circulation time (48 h). Furthermore, an increase of cell concentration to 40 g l^{-1} gave similar results as obtained with lower cell concentration (20 g l^{-1}). With changing the recycle rates of 20, 30 and 40 l h^{-1} at every 24 h of circulation time, both cell viability and filtration rate kept clearly constant under the experimental conditions (Figure 4). Therefore, the filtration unit system shows its efficient performance for using in the continuous culture with cell recycle in this study.

Xylitol production with cell recycling system

The dilution rate was maintained approximately constant at 0.067 h^{-1} under aerobic and oxygen-limited conditions for the continuous cultivation of *Candida mogii* using 30 g l^{-1} D-xylose with two recycle ratios (R) 0.75 and 0.50 (Table 2). As compared with aerobic condition at $R = 0.75$ – 0.76 (CRS-1 and CRS-2), xylitol formation showed its better yield under oxygen-limited condition, but its biomass yield was certainly opposite. Since an increased activity of xylitol dehydrogenase resulted from an increase of dissolved oxygen under aerobic condition and respiratory enhanced coenzyme NAD^+ regeneration, intracellular xylitol is converted to xylulose for use in biomass synthesis via pentose-phosphate pathway (Sirisansaneeyakul *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1997). On the other hand, decreasing of dissolved oxygen under oxygen-limited condition inhibits dehydrogenase activity with an increased coenzyme NADH , resulting an accumulation of xylitol and its excretion extracellularly (Rizzi, 1989a, 1989b; Prior *et al.*, 1989; Sirisansaneeyakul *et al.*, 1995). At lower recycle ratio $R = 0.50$ (CRS-3 and CRS-4), the result was similar, however, the biomass and xylitol yields were increased 4.5 and 2.99 times higher than those obtained at higher recycle ratio $R = 0.75$, respectively.

Under aerobic condition at lower recycle ratio $R = 0.50$ (CRS-3), the biomass yield was 1.76 times higher than that obtained at higher recycle ratio $R = 0.75$ (CRS-1). Because the biomass yield depends on an increase of bleeding ratio ($\beta = 1 - R$) rather than the substrate concentration (C_s) in Eq. 7. As a result, the lower xylitol yield was obtained independently from the bleeding ratio (Eq. 8). For oxygen-limited condition, decreasing recycle ratio increased the xylitol yield 2.99 times higher than at higher recycle ratio $R = 0.76$ (CRS-2), whereas its specific rate of xylitol formation was lower 1.49 times instead. This indicates that not only oxygen limiting factor but also recycle ratio play an important role for an improvement of xylitol formation. The higher cell density by increasing recycle ratio does not seem suitably to enhance its specific rate of xylitol formation.

As compared to aerobic condition, both the volumetric productivity of xylitol (Q_p) and the specific rate of xylitol formation (q_p) found themselves favorably under oxygen-limited condition, were 13.27 (at $R = 0.76$) and 156.06 times (at $R = 0.50$) higher, respectively. In this work, the volumetric xylitol productivity was maximized at higher recycle ratio $R = 0.76$ ($Q_p = 160 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$), while the

specific rate of xylitol formation found its maximum at lower recycle ratio $R = 0.50$ ($q_p = 28.09 \text{ mg g}^{-1} \text{ h}^{-1}$). The xylitol formation has been reported as growth associated pattern with Luodcking and Piret kinetic model (Fulan *et al.*, 1991). At the lower recycle ratio $R = 0.50$ ($\beta = 0.50$), hence, an increased specific growth rate (Eq. 4) can increase the specific rate of xylitol formation 1.49 times, as compared to that at the higher recycle ratio $R = 0.76$ ($\beta = 0.24$).

Comparison between batch and continuous production of xylitol

The continuous production of xylitol with cell recycle was carried out in two steps cultivation of *Candida mogii* ATCC 18364. Firstly, biomass production was conducted under aerobic condition at recycle ratio $R = 1.0$ and the optimal pH for growth at 4.5 (Sirisansaneeyakul *et al.*, 2000) for 16 h of culture time. Finally, then, the culture broth was adjusted to the optimal pH for xylitol formation at 6.0 (Sirisansaneeyakul *et al.*, 2000) and controlled the fermentation under oxygen-limited condition at the recycle ratio $R = 0.50$ (CRS-5). The comparison of xylitol production was summarized in Table 3 between the batch production of xylitol ($C_0^d = 25.58 \text{ g l}^{-1}$ D-xylose; oxygen-limited condition at controlled pH 5.0 and temperature 30°C) (Sirisansaneeyakul *et al.*, 2000) and two continuous cultures with cell recycle at dilution rate $D = 0.067 \text{ h}^{-1}$ (CRS-4 and CRS-5). The maximal volumetric productivity of xylitol ($Q_p = 325.62 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) obtained in continuous culture with two-step cell recycle, was 3.29 and 5.22 times higher than those obtained in continuous culture with single-step cell recycle and in batch culture, respectively. However, the final concentration of xylitol in continuous culture was much lower than that obtained in batch culture. This does not lead appropriately into the down stream processing of xylitol recovery afterward, in particular to remaining a high concentration of D-xylose in the fermentation broth. However as expected, the high cell density can improve the volumetric productivity, but this circumstance in reverse retards its growth resulting subsequently the worse specific productivity of xylitol formation. Therefore, an optimization needs to overcome the technical problems mentioned above for giving an excellent advantage in continuous culture with cell recycle entirely.

Conclusion

From our previous report (Sirisansaneeyakul *et al.*, 2000), significant increase of xylitol from D-xylose to 78% the theoretical yield ($Y_{P/S} = 0.71 \text{ g g}^{-1}$) with specific rate of xylitol formation of $q_p = 0.038 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, in batch culture of pH 6.0, when oxygen became limited probably resulted from increase level of NADH in the cell (Rizzi *et al.*, 1989a, b) and it is the condition that enhances the efficiency of NADPH regeneration that keeps the level of NADP low and therefore stimulates the activity of D-xylose reductase and xylitol formation (Sirisansaneeyakul *et al.*, 1995). As this concept, was applied to continuous production of xylitol by using continuous culture with cell recycling system. Maximum cell

mass and specific growth rate ($C_X = 30.05 \text{ g l}^{-1}$, $\mu = 0.046 \text{ h}^{-1}$, $R = 0.75$) were obtained under aerobic condition at the controlled ranges of dilution rate ($D = 0.06\text{--}0.07 \text{ h}^{-1}$). Specific rate of xylitol production was increased after recycle ratio has been reduced ($q_P = 0.028 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) under oxygen-limited condition, but the volumetric rate ($Q_P = 0.160 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) was maximized at the increased recycle ratio. The data seem to indicate that cell density and intracellular pool of xylitol are inter-related in controlling xylitol concentration released from the culture.

Nomenclature

C	concentration	g l^{-1}
D	dilution rate	h^{-1}
R	recycle ratio	
q	specific rate	$\text{g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$
Q	volumetric rate	$\text{g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$
Y	yield	g g^{-1}
μ	specific growth rate	
subscript		
i	feed	
p	product	
s	substrate	
x	cells	

Acknowledgment

This research was financially supported by the Thailand Research Fund (PDF/58/2540). The paper is highly delicate to the memory of Professor Dr.-Ing. M. Rizzi, whose innovation was realized in this work after his passing away.

Literature Cited

- Adler, L. and Gustafsson, L. 1980. Polyhydric alcohol production and intracellular amino acid pool in relation to halotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Arch. Microbiol.* 124: 123-130.
- Andreyeva, I.N. and Biryukov, V.V. 1973. Analysis of mathematical models the effect of pH on fermentation processes and their use for calculating optimal fermentation conditions. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 4: 61-67.
- Barbosa, M.F.S., de Medeiros, M.B., de Meloilha, I.M., Schneider, H. and Lee, H. 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.
- Deschatelets, L. and Yu, E.K.C. 1986. A simple pentose assay for biomass conversion studies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24: 379-397.
- Furlan, S. A., Bouilleud, P., Struhano P. and Riba J. P. 1991. Study of xylitol formation from xylose under oxygen limiting conditions. *Biotechnol. Lett.* 13: 203-206.
- Kim, S. Y., Kim, J. H. and Oh, D. K. 1997. Improvement of xylitol production by controlling oxygen supply in *Candidaopsis*. *J. Ferment. Bioeng.* 83: 267-270.
- Lee, C. W. and Chang, H. N. 1987. Kinetics of ethanol fermentations in membrane cell recycle fermenters. *Biotechnol. Bioeng.* 29: 1105-1112.
- Lee, S. S., Robinson, F. M. and Wang, H. Y. 1981. Rapid determination of yeast viability. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 11: 641-649.
- Prior, B. A., Kilian, S. G. and Du Preez, J. C. 1989. Fermentation of D-xylose by the yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. *Process Biochem.* 24: 21-32.
- Rizzi, M., Eriemann, P., Bui-Thanh, N.A. and Dellweg, H. 1988. Xylose fermentation by yeast. IV. Purification and kinetic studies of xylose reductase from *Pichia stipitis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 29: 148-154.
- Rizzi, M., Hartward, K., Eriemann, P., Bui-Thanh, N.A. and Dellweg, H. 1989a. Purification and properties of the NAD⁺-xylitol dehydrogenase from the yeast *Pichia stipitis*. *J. Ferment. Bioeng.* 67: 20-24.
- Rizzi, M., Hartward, K., Bui-Thanh, N.A. and Dellweg, H. 1989b. A kinetic study of the NAD⁺-xylitol dehydrogenase from the yeast *Pichia stipitis*. *J. Ferment. Bioeng.* 67: 25-30.
- Sirisansaneeyakul, S., Staniszevski, M., and Rizzi, M. 1995. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose. *J. Ferment. Bioeng.* 80: 565-570.
- Sirisansaneeyakul, S., Tochanpa, W., Rizzi, M. and Bhuwapathanaput, S. 2000. Kinetic modeling of pH affecting xylitol production by *Candida mogii*. *Thai J. Agric. Sci.* (submitted).
- Winkelhausen, E. and Kuzmanova, S. 1998. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. *J. Ferment. Bioeng.* 86: 1-14.

Table 2a Continuous culture with cell recycle for xylitol production under steady state.

Run	Condition	R	D	C_{S0}	C_S	C_X	C_F	Y_{XS}	Y_{mg}
CCR-1	Aerobic	0.75	0.067	30	0.04	30.05	0.18	0.25	0.006
CCR-2	Oxygen-limited	0.76	0.064	30	4.89	8.49	2.50	0.08	0.100
CCR-3	Aerobic	0.50	0.074	30	2.47	24.54	0.06	0.44	0.002
CCR-4	Oxygen-limited	0.50	0.067	30	25.05	3.53	1.48	0.36	0.299

Units of dilution rate (D), concentrations (C_i) and yields (Y) are h^{-1} , $g\ l^{-1}$ and $g\ g^{-1}$, respectively.

Table 2b Continuous culture with cell recycle for xylitol production under steady state.

Run	Condition	R	D	Specific rates (q)		Volumetric rates (Q)	
				Xylose	Xylitol	Xylose	Xylitol
CCR-1	Aerobic	0.75	0.067	66.30	0.40	2007	12.06
CCR-2	Oxygen-limited	0.76	0.064	189.29	18.84	1607	160
CCR-3	Aerobic	0.50	0.074	83.02	0.18	2037	4.44
CCR-4	Oxygen-limited	0.50	0.067	93.95	28.09	300	99.16

Units of dilution rate (D), specific and volumetric rates are h^{-1} , $mg\ g^{-1}\ h^{-1}$ and $mg\ l^{-1}\ h^{-1}$, respectively.

Table 3 Comparison of xylitol production between in batch and continuous culture with cell recycle.

Mode of operation		C_X ($g\ l^{-1}$)	C_S ($g\ l^{-1}$)	C_F ($g\ l^{-1}$)	Q_F ($mg\ l^{-1}\ h^{-1}$)
Batch culture		15.51	0.184	16.561	62.34
Continuous culture with cell recycle	Single-step (CRS-4)	3.53	25.05	1.48	99.16
	Two-step (CRS-5)	16.10	15.15	4.86	125.62

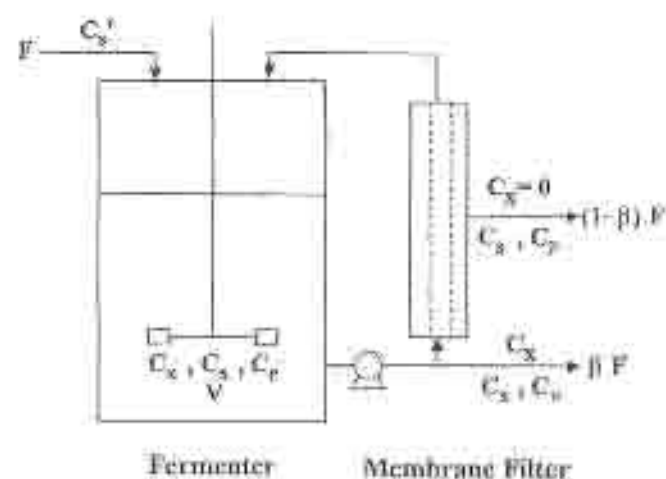


Figure 1 Continuous culture with cell recycling system

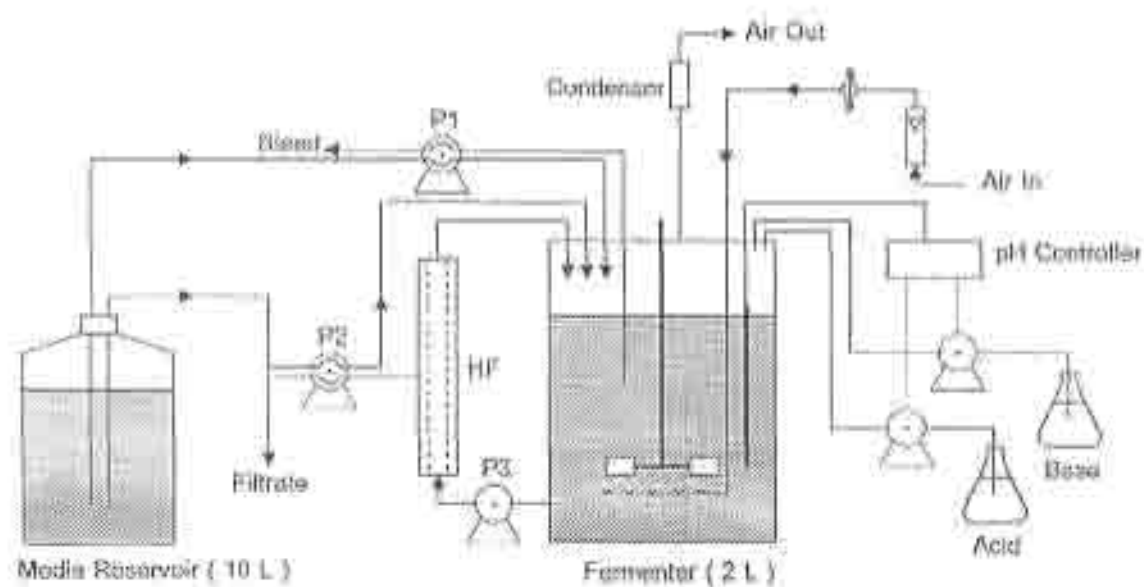


Figure 2 Flow diagram of continuous culture with cell recycling system

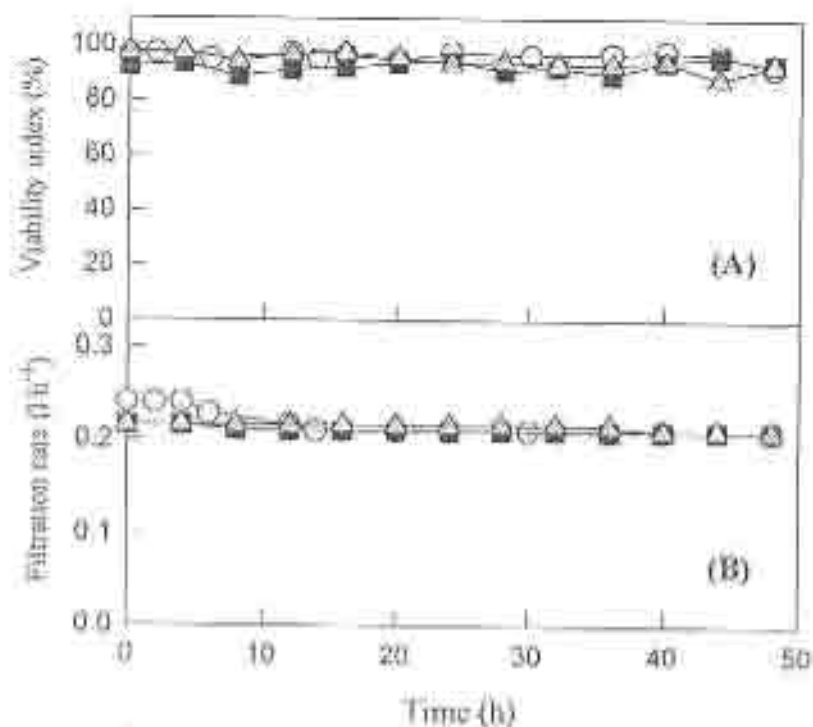


Figure 3 Effect of recycle rate on viability index (A) and filtration rate (B) at cell concentration of 20 g l^{-1} . Symbols: 20 ($\circ$), 30 ($\blacksquare$) and 40 (Δ) l h^{-1}

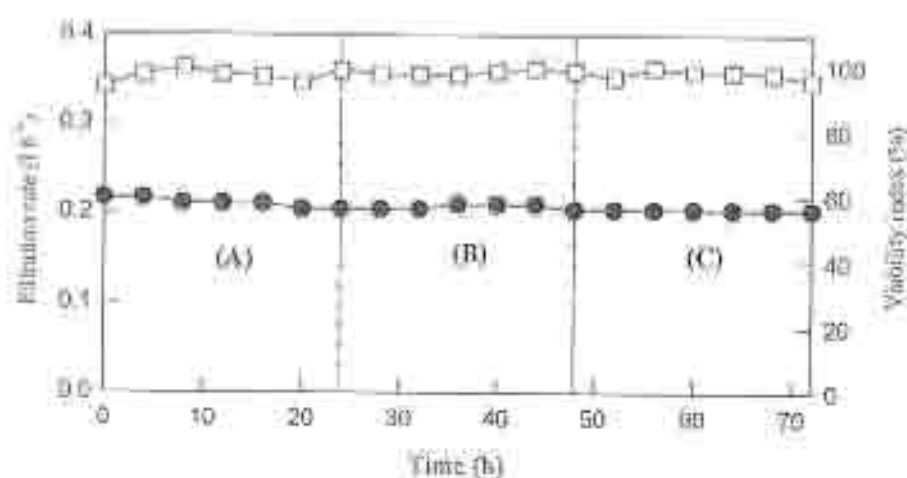


Figure 4 Effect of recycle rate on viability index ($\square$) and filtration rate ($\bullet$) at cell concentration of 40 g l^{-1} . Symbols: 20 (A), 30 (B), and 40 (C) l h^{-1}

2. การตีพิมพ์บทความวิจัยโพเทน

- 2.3 Sirisansaneeyakul, S., W. Tochampa, M. Matsumura and S. Bhowapathanapun, 2008.
Microbial production of xylitol with cell recycle. J. Biosci. Bioeng. (submitted).

From: katayama <sfbj@bio.eng.osaka-u.ac.jp>
To: fagissi@nontri.ku.ac.th <fagissi@nontri.ku.ac.th>
Date: Wednesday, December 15, 1999 7:54 AM
Subject: RECEIPT OF YOUR MANUSCRIPT (JBB)

Date: Dec. 15, 1999

Received date: Dec. 12, 1999

Article No.: 8898

Dr. Sarote Sirinuasameeyakul
Department of Biotechnology
Kasetsart University
Thailand

Dear Dr. Sirinuasameeyakul,

This is to acknowledge receipt of your manuscript entitled:

Microbial Production of Xylool with Cell Recycle

It is being referred to Dr. Kazuo OHTAUCHI, who will notify you as to its acceptability or suggestions for improvement within about four weeks. In any communication relating this paper, please contact to him with the article number shown above.

Yours sincerely,

Hiroko Kato

Executive Editor

Journal of Bioscience and Bioengineering

Dr. Shigenori Tokyo Inst. of Technol.

Tel./Fax: +81-3-5734-2412

e-mail: shigenori@chemeng.its.tohoku.ac.jp

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan
Business Office, c/o Faculty of Engineering, Osaka University
2-1 Y-meshaka, Suita, Osaka 565-0871, Japan
TEL: +81-6-6876-2754 FAX: +81-6-6876-2634
e-mail: sfbj@bio.eng.osaka-u.ac.jp

MICROBIAL PRODUCTION OF XYLITOL WITH CELL RECYCLE

Sarote Sirisananpanyakul¹, Wornsit Tuchampa², Masatoshi Matsumura³ and

Supapong Bhuwaphathanapun¹

¹Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University,

Chamchak, Bangkok 10900, Thailand

²Department of Agro-Industry, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment,

Naresuan University, Phitsanulok 6500, Thailand

³Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

Keywords: Xylitol, Cell recycle, D-xylose, Continuous culture, Fermentation kinetics

Optimal growth of *Candida mogii* ATCC 18364 and xylitol formation were respectively, at pH 4.5 and 6.0 in batch culture. As a result, the xylitol yield in aerobic and oxygen-limited conditions were 0.55 and 0.71 g g⁻¹, respectively. A kinetic model for pH affecting xylitol formation was constructed for explaining a process of batch production under aerobic and oxygen-limited conditions. In continuous culture with cell recycle, the maximum specific rate of xylitol production ($q_p = 0.028$ g g⁻¹h⁻¹) was obtained at $D = 0.067$ h⁻¹ and $R = 0.30$, while its maximum volumetric productivity ($Q_p = 0.160$ g l⁻¹ h⁻¹) was found at a higher recycle ratio ($R = 0.76$) under oxygen-limited condition.

Introduction

Xylitol, a five carbon sugar alcohol, is widely used as an alternative sweetener recommended for diabetics and for the prevention of dental caries. Fermentation process has been increasingly found more attractive than chemical process because of less complex in purification and cheaper downstream processing. Among the microorganisms, *Candida* yeasts have been found to be the best xylitol producers and effective in conversion of D-xylose to xylitol (Winkelhausen and Kuzmanova, 1998). Xylose metabolism and xylitol production by *Candida mogii* ATCC 18364 were reported to be controlled by two key enzymes, NADH- or NADPH-xylose reductase and NAD-xylitol dehydrogenase (Rizzi *et al.*, 1988, 1989a, b; Sirisanasameeyakul *et al.*, 1995). *Candida mogii* ATCC 18364 was found to be one of the most promising microorganism in conversion of D-xylose to xylitol. Complex regulatory models were postulated by Sirisanasameeyakul *et al.* (1995) to explain the kinetics of D-xylose uptake and D-xylose reductase and xylitol dehydrogenase synthesis during aerobic and oxygen-limited conditions using synthetic medium.

In this work, a biotechnological process for xylitol production using rice straw hydrolysates as a substrate in continuous culture with cell recycle using hollow fibers was developed. The effects of pH on the production of xylitol from D-xylose in batch culture were kinetically modelled under both aerobic and oxygen-limited conditions. pH controlled model was investigated for optimal growth and xylitol production in a single-stage fermentation with cell recycle both under aerobic and oxygen-limited conditions.

Materials and Methods

Microorganism. *Candida mogii* ATCC 18364 was obtained from American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) and collected at Microbiological Resource Center, Thailand (Bangkok MIRCEN), Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR). The strain was maintained on potato dextrose agar (Difco, Michigan, USA) slant at 4 °C.

Culture medium. The synthetic medium of Sirisansaneeyakul *et al.* (1995) was used throughout experiments. It contains per liter: 18.75 g KH_2PO_4 , 6 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1.13 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g CaCl_2 , 36.5 mg myo-inositol, 18.2 mg calcium pantothenate, 3.66 mg thiamine-HCl, 0.9 mg pyridoxal-HCl, 0.018 mg biotin, 9.1 mg FeCl_3 , 6.4 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5.46 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.46 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ and xylose concentration as used as carbon source.

Culture conditions. Fermentation was carried out using 2-l fermenter of Biostat B (B. Braun Biotech International) with 1:5:1 D-xylose minimal media. In batch culture, the effects of pH (3.0-7.0) on growth and xylitol production were investigated with an initial xylose concentration of 30 g l^{-1} , at temperature 30°C and controlled pH under aerobic condition for 12 h and the culture were switched to conduct consecutively under oxygen-limited conditions for further 72 h with addition of initial xylose concentration of 30 g l^{-1} . For continuous culture, the culture was grown aerobically ($\text{DO} > 90\%$) for 24 h at the controlled condition of pH 4.5, temperature 30°C , 1 vvm aeration rate and 1,000 rpm agitation rate before switching to a continuous mode with cell recycle using a hollow fiber module of model KL-U-M 6302 (Kuraray LF Module, Japan). The overall system is shown in Fig. 1. When the continuous operation with feeding of fresh medium (P1 and P2) and cell recycling was started, the circulating pump (P3) circulated the culture broth through the module. The flow rate (F) of fresh medium was equivalent to the feed rate of fresh medium

performed by two peristaltic pumps (designated as P1 and P2). While the bleeding rate (F_{P1}) and filtration rate (F_{P2}) were controlled at the same time by the same peristaltic pumps, P1 and P2, respectively. Therefore, the recycle ratio (R) and bleeding ratio (β) were calculated from the feed rate of P1 (F_{P1}) and P2 (F_{P2}) divided by the overall flow rate (F) of fresh medium, respectively. In this study, the flow rate of fresh medium was set to 0.10 l h^{-1} by controlling the feed rates of P1 and P2. F_{P1} and F_{P2} were adjusted to 0.025 l h^{-1} and 0.075 l h^{-1} for obtaining the recycle ratio (R) of 0.75 and bleeding ratio (β) of 0.25. When both F_{P1} and F_{P2} was adjusted to 0.050 l h^{-1} , the recycle ratio (R) of 0.50 and bleeding ratio (β) of 0.50 were obtained. Xylitol production was investigated under both aerobic condition (1,000 rpm and 1.0 vvm) and oxygen-limited condition (300 rpm and 0.3 vvm) at the controlled pH 5.0. DO measurement was also conducted simultaneously for confirming the conditions of aerobic ($\text{DO} > 90\%$) and oxygen-limited ($\text{DO} < 1\%$). The feed rate of xylose medium (30 g l^{-1} xylose) was controlled at $D = 0.06\text{--}0.07 \text{ h}^{-1}$ and recycle ratios (R) of 0.50 and 0.75. The steady state was obtained after four volumes replacement.

Analytical methods The samples, taken at specified time intervals, were centrifuged and yeast cells were washed with 10 ml distilled water and the residues were dried at 105°C for 24 h for cell mass determination. The supernatants was used for D-xylose and xylitol analysis using the methods of Deschatelets and Yu (1986) and Adler and Gustafsson (1980), respectively. Dissolved oxygen tension was measured with a polarographic oxygen electrode (Mettler Toledo, Switzerland).

Kinetic analysis Rates of cellular growth, D-xylose consumption and xylitol production were determined from the slope of the measured concentrations versus time. Specific rates were evaluated as the ratio of the above mentioned rates to the corresponding biomass concentration. Values of the yields for growth and xylitol

production were calculated from the slopes of biomass vs. D-xylose and xylitol vs. D-xylose plots, respectively.

Mathematical model Analysis of mathematical model on the effect of pH on growth and xylitol formation with the help of steady-state enzymatic kinetics was a modified model proposed by Andreyeva and Biryukov (1973) by combining Monod type kinetics. Expression for the specific rates of growth and xylitol production depending on pH value obtained are as shown in Eq. (1) and (2), respectively.

$$\mu(C_x, \text{pH}) = \frac{\mu_m C_x}{(K_s^x + C_x) \left(1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{K_1} + \frac{K_2}{10^{-\text{pH}}}\right)} \quad (1)$$

$$q_x(C_x, \text{pH}) = \frac{q_m^x C_x}{(K_s^x + C_x) \left(1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{K_1} + \frac{K_2}{10^{-\text{pH}}}\right)} \quad (2)$$

Results and Discussion

Effect of pH on Growth and Xylitol Formation

In batch culture, under aerobic condition, the maximum specific growth rate ($\mu = 0.046 \text{ h}^{-1}$) and biomass yield ($Y_{xw} = 0.22 \text{ g g}^{-1}$) were obtained at pH 4.5 (Table 1a), but maximum xylitol yield ($Y_{Pw} = 0.71 \text{ g g}^{-1}$) under oxygen-limited condition was obtained at pH 6.0, it was only 85 of 78 % of the theoretical yield (Barbosa *et al.*, 1988) (Table 1b). However, the maximum specific rates for xylitol production under aerobic condition ($q_p = 0.131 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) was obtained at pH between 5.0 to 6.0 (Table 1a), but the maximum specific rates for xylitol production under oxygen-limited condition ($q_p = 0.051 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) was obtained at pH 4.5 (Table 1b). From the result obtained, the medial range of pH of 5.0 was selected for studying the production of xylitol in continuous culture with cell recycle.

Using an enzyme kinetic model proposed by Andreyeva and Biryukov (1973), the effect of pH on growth and product formation under aerobic and oxygen-limited conditions could be described mathematically for the production of xylitol. The rates of growth and xylitol formation were proposed regulated by a ratio of active cells to total cells which was affected by surrounding proton ion as has been stipulated by Ohara *et al.* (1992). As a result, the optimal pH for maximizing cell growth and xylitol formation under aerobic condition were respectively pH = 5.04 and 5.86 (Fig. 2) and those under oxygen-limited condition were respectively pH = 5.90 and 5.69 (Fig. 3). pH dependence equilibrium constants for specific growth rate (Eq. 1) and specific rate for xylitol production (Eq. 2) obtained from non-linear regression analysis were $K_1 = 5.76 \times 10^{-3}$, $K_2 = 1.43 \times 10^{-8}$, $K_3 = 1.30 \times 10^{-3}$ and $K_4 = 1.01 \times 10^{-14} \text{ mol l}^{-1}$.

Using a combined simple Monod kinetics with pH affecting model of Andreyeva and Baryukov (1973), the following differential equations for growth, D-xylose consumption and xylitol formation the model could be constructed to explain the pattern for xylitol production in batch culture.

$$\frac{dC_x}{dt} = \frac{\mu_m C_s}{(K_s^s + C_s) \left(1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{K_1} + \frac{K_2}{10^{-\text{pH}}}\right)} C_s \quad (3)$$

$$\frac{dC_p}{dt} = \left(\frac{1}{Y_{x/p}} \frac{dC_x}{dt} + m_x C_x\right) \quad (4)$$

$$\frac{dC_r}{dt} = \frac{\mu_p^s C_s}{(K_s^p + C_s) \left(1 + \frac{10^{-\text{pH}}}{K_3} + \frac{K_4}{10^{-\text{pH}}}\right)} C_x \quad (5)$$

Estimated kinetic parameters of the proposed mathematical model for xylitol production using a curve fitting with non-linear least square analysis obtained are shown in Table 2. Results of model predictions and experimental observations were found to have a good agreement for different pH values both in aerobic and oxygen-limited conditions (Fig. 4), except for xylose utilization at pH 3.0 and cell growth between pH 4.5–7.0 under oxygen-limited condition.

A single-stage fermentation with cell recycle

In continuous culture with cell recycle, high cell density ($C_x = 30.05 \text{ g l}^{-1}$, $Y_{x/s} = 0.25 \text{ g g}^{-1}$) was obtained under aerobic condition, at a relatively high recycle ratio ($R = 0.75$) (Table 3A). But specific rate of xylitol production and xylitol yield were found enhanced under oxygen-limited condition. A relatively high xylitol yield ($Y_{ps} = 0.299 \text{ g g}^{-1}$) was obtained, under oxygen-limited condition, at a lower recycle ratio ($R = 0.50$) (Table 3A). The specific rate of xylitol production ($q_p = 0.028 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) was obtained under oxygen-limited condition at the lower recycle ratio ($R = 0.50$), whereas the

volumetric rate of xylitol production was remarkably higher ($Q_p = 0.160 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) at the higher recycle ratio ($R = 0.76$) (Table 3B).

Comparison of the volumetric rate of xylitol production between batch and continuous cultures

In batch culture with an initial xylose concentration of 25.58 g l^{-1} , volumetric rate of xylitol production was $62.34 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ under oxygen-limited condition at the controlled pH of 5.0 (Table 4). But in continuous culture with cell recycle at $R = 0.50$ and pH 5.0 (CCR-4), the volumetric rate of xylitol production was increased to $99.16 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ under oxygen-limited condition. However, xylitol concentration was remarkably decreased because biomass concentration was reduced. When cell recycle was included in a continuous culture in order to increase high cell density further and operated under aerobic condition at $R = 1.0$ and pH 4.5 before the mode of operation was switched to a continuous fermentation under oxygen-limited condition (CCR-5) with cell recycle at $R = 0.5$ and pH 5.0 for producing xylitol, the volumetric rate of xylitol production was improved to $325.62 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. It was 3.3 and 5.2 increase in comparison to the CCR-4's and batch culture's, respectively. But final concentration of xylitol was only 4.86 g l^{-1} or 3.4 times lower than the actual batch culture. But the results have been quite encouraging and show that there are rooms for adjusting to use a single-stage chemostat with cell recycle at very high initial cell concentration.

Comparison between Model Prediction and Experimental Observation

The balancing equations regardless the pH effect for biomass, D-xylose and xylitol were considered for a single-stage fermenter with cell recycle as shown in Eq. 6–8. D and β are, respectively, expressed as dilution rate and bleeding, where $1-\beta$ equals to

recycle ratio (R)

$$\frac{dC_X}{dt} = \frac{\mu_m C_X}{(K_X^S + C_X)} C_X - (D + R)C_X \quad (6)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = D(C_S^i - C_S) - \left(\frac{1}{Y_{X/S}} \frac{dC_X}{dt} + m_S C_X \right) \quad (7)$$

$$\frac{dC_P}{dt} = \frac{q_P^m C_X}{(K_S^P + C_S)} C_X - D C_P \quad (8)$$

The values of the kinetic parameters describing a cell recycle continuous process calculated using a non-linear least square analysis by simplex method of Nelder and Mead (1965) are as following, $\mu_m = 0.0485 \text{ h}^{-1}$, $K_X^S = 13.91 \text{ g l}^{-1}$, $Y_{X/S} = 0.371 \text{ g g}^{-1}$, $m_S = 0.0653 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $q_P^m = 0.0735 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $K_S^P = 35.53 \text{ g l}^{-1}$. Model predictions have been found satisfactorily fit to the experimental results in CCR-4 and as was clearly illustrated in Fig. 5.

Conclusion

Candida mogii ATCC 18364 was cultivated in minimal medium containing xylose as carbon source at various pH values. The optimum pH for growth and xylitol formation were found to be 4.5 and 6.0, respectively. Maximum xylitol yield of 0.551 g g⁻¹ was obtained at pH 6.0. Values of pH dependence equilibrium constants for specific growth rate and specific rate for xylitol production were obtained from non-linear regression analysis: $K_1 = 5.76 \times 10^{-5}$, $K_2 = 1.43 \times 10^{-5}$, $K_3 = 1.30 \times 10^{-3}$ and $K_4 = 1.01 \times 10^{-11}$ mol l⁻¹. The material balance equations expressing the growth, xylose consumption and xylitol production were found satisfactory used to estimate the kinetic parameters of mathematical model. As a result, the following kinetic parameters: $\mu_m = 0.0394$ h⁻¹, $K_s^X = 0.559$ g l⁻¹, $Y_{X/X_0} = 0.173$ g g⁻¹, $m_s = 4.83 \times 10^{-3}$ g g⁻¹ h⁻¹, $q_0^m = 0.223$ g g⁻¹ h⁻¹ and $K_i^P = 17.7$ g l⁻¹, were satisfactorily estimated by the simplex method. Comparison between the model predictions and experimental observations shows a very good agreement in the range of pH values operated.

Under oxygen-limited condition, 78% the theoretical yield ($Y_{P/S} = 0.71$ g g⁻¹) of D-xylose was converted to xylitol with specific rate of xylitol production of $q_p = 0.038$ g g⁻¹ h⁻¹, in batch culture controlled at pH 6.0. Increase in production of xylitol under oxygen-limited condition probably resulted from increase level of NADH in the cell (Rizzi *et al.*, 1989a, b) and it is the condition that enhances the efficiency of NADPH regeneration that keeps the level of NADP⁺ low and therefore stimulates the activity of D-xylose reductase (Sirisansaneeyakul *et al.*, 1995). This condition when extended to continuous production of xylitol by using a single-stage with membrane filter to retain cell in the system. Maximum cell mass and specific growth rate ($C_X = 30.05$ g l⁻¹, $\mu =$

0.046 h^{-1} , $R = 0.75$) were attained, under aerobic condition at the controlled ranges of dilution rate ($D = 0.06\text{--}0.07 \text{ h}^{-1}$). Specific rate of xylitol production was increased after recycle ratio has been reduced from $q_p = 0.019 \text{ g g}^{-1}\text{h}^{-1}$ to $q_p = 0.028 \text{ g g}^{-1}\text{h}^{-1}$ under oxygen-limited condition. But the volumetric rate attained was increased maximum value ($Q_p = 0.160 \text{ g l}^{-1}\text{h}^{-1}$) at $R = 0.76$. The data seem to indicate that cell density and intracellular pool of xylitol are inter-related in controlling xylitol concentration released from the culture. The phenomena are under further investigation in the two-stage fermentation with cell recycling system. Simulation of a single-stage fermentation with cell recycle is also considered for elucidating a process optimization of xylitol production after conducting the parameter estimation. As expected, at steady state, its xylitol productivity will be theoretically maximized at the optimal dilution rate with those suitable concentrations of cells, D-xylose and xylitol.

Acknowledgment

We acknowledge the financial support of the Thailand Research Fund (PDF/68/2540) for conducting this study. The authors also dedicate this paper to the memory of Prof. Dr.-Ing. Manfred Rizzi due to his academic advice of this work. As well as, a special thank is deeply expressed to Prof. Dr.-Ing. Matthias Reuss for his previous support for Dr. Sarote Srisamsaneeeyakul's dissertation in Germany.

Nomenclature

C	concentrations	$g\ l^{-1}$
D	dilution rate	h^{-1}
K	equilibrium constants	
m	maintenance coefficient	$g\ g^{-1}\ h^{-1}$
R	recycle ratio	
q	specific rates	$g\ g^{-1}\ h^{-1}$
Q	volumetric rates	$g\ l^{-1}\ h^{-1}$
Y	yields	$g\ g^{-1}$
μ	specific growth rate	h^{-1}
subscript		
f	feed	
m	maximum	
p	product	
s	substrate	
x	cells	

References

- Adler, L. and Gustafsson, L.: Polyhydric alcohol production and intracellular amino acid pool in relation to halotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. Arch. Microbiol., **124**, 123-130 (1980).
- Andreyeva, L. N. and Biryukov, V. V.: Analysis of mathematical models of the effect of pH on fermentation processes and their use for calculating optimal fermentation conditions. Biotechnol. Bioeng. Symp., **4**, 61-76 (1973).
- Bailey, J. E. and Ollis, D. F.: Biochemical engineering fundamentals, p. 130-132. McGraw-Hill, Singapore (1986).
- Barbosa, M. F. S., de Medeiros, M. B., de Mancilha, I. M., Schneider, H., and Lee, H.: 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 (1988).
- Deschatelets, L. and Yu, E.K.C.: A simple pentose assay for biomass conversion studies. Appl. Microbiol. Biotechnol., **24**, 379-397 (1986).
- Nelder, J. A. and Mead, R.: A simplex method for function minimization. Computer J., **7**, 308-312 (1965).
- Ohara, H., Hiyama, K., and Yoshida, T.: Kinetic study on pH dependence of growth and death of *Streptococcus faecalis*. Appl. Microbiol. Biotechnol., **38**, 403-407 (1992).
- Rizzi, M., Erdmann, P., Bui-Thanh, N.A., and Dellweg, H.: Xylose fermentation by yeast. IV. Purification and kinetic studies of xylose reductase from *Pichia stipitis*. Appl. Microbiol. Biotechnol., **29**, 148-154 (1988).

- Rizzi, M., Hartward, K., Bui-Thanh, N.A., and Dellweg, H.: A kinetic study of the NAD^+ -xylitol dehydrogenase from the yeast *Pichia stipitis*. J. Ferment. Bioeng., 67, 25-30 (1989b).
- Rizzi, M., Hartward, K., Erlemaun, P., Bui-Thanh, N.A., and Dellweg, H.: Purification and properties of the NAD^+ -xylitol dehydrogenase from the yeast *Pichia stipitis*. J. Ferment. Bioeng., 67, 20-24 (1989a).
- Sirisansaneeyakul, S., Staniszewski, M., and Rizzi, M.: Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose. J. Ferment. Bioeng., 80, 565-570 (1995).
- Winkelhausen, E. and Kuzmanova, S.: Microbial conversion of D-xylose to xylitol. J. Ferment. Bioeng., 86, 1-14 (1998).

TABLE 1A. Batch culture of xylitol production under aerobic condition.

pH	$C_x^{(2)}$ (g l ⁻¹)	$C_p^{(2)}$ (g l ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	q_s (g g ⁻¹ h ⁻¹)	q_p (g g ⁻¹ h ⁻¹)	Y_{xs} (g g ⁻¹)	Y_{ps} (g g ⁻¹)	Theoretical yield ⁽³⁾ (%)
3.0	10.10	4.94	0.034	0.214	0.072	0.154	0.362	39.69
4.0	13.89	8.46	0.029	0.108	0.077	0.167	0.462	50.66
4.5	10.23	8.90	0.046	0.206	0.089	0.221	0.460	50.44
5.0	11.57	12.29	0.040	0.240	0.131	0.158	0.546	59.87
6.0	11.50	12.09	0.038	0.240	0.131	0.158	0.551	60.42
7.0	11.88	12.20	0.034	0.262	0.114	0.134	0.451	49.45

TABLE 1B. Batch culture of xylitol production under oxygen-limited condition.

pH	$C_x^{(1)}$ (g l ⁻¹)	$C_p^{(1)}$ (g l ⁻¹)	μ (h ⁻¹)	q_s (g g ⁻¹ h ⁻¹)	q_p (g g ⁻¹ h ⁻¹)	Y_{xs} (g g ⁻¹)	Y_{ps} (g g ⁻¹)	Theoretical yield ⁽³⁾ (%)
3.0	10.23	11.28	-	0.032	0.010	-	0.253	27.74
4.0	16.53	22.63	0.003	0.050	0.030	0.064	0.589	64.58
4.5	17.63	17.98	0.012	0.085	0.051	0.148	0.627	68.75
5.0	18.67	18.93	0.010	0.063	0.038	0.155	0.605	66.34
6.0	18.78	14.24	0.010	0.059	0.038	0.166	0.711	77.96
7.0	20.34	17.12	0.010	0.064	0.039	0.150	0.607	66.56

⁽¹⁾ Cell and xylitol concentrations were reported as 12 and 74 h of culture time under consecutively aerobic (DO > 90 %) and oxygen-limited (DO < 1 %) conditions, respectively.

Yields (Y_{xs} , Y_{ps}) and specific rates (μ , q_s , q_p) were calculated from experimental data, taken under 0-12 h of culture time for aerobic condition and 12-74 h of culture time for oxygen-limited condition. These experimental data of batch cultures (pH 3.0-7.0) under both aerobic and oxygen-limited conditions were separately shown in Fig. 4 illustrated as symbols for cells, xylose and xylitol.

⁽³⁾ Theoretical yield of xylitol formation from D-xylose was 0.912 g g⁻¹ (Barbosa *et al.*, 1988).

TABLE 2. Model kinetic constants for xylitol production in batch culture

Parameters		Aerobic	Oxygen-limited
μ_m	(h ⁻¹)	0.0394	0.005
K_S^x	(g l ⁻¹)	0.359	17.65
$Y_{x/s}$	(g g ⁻¹)	0.173	0.0328
m_s	(g g ⁻¹ h ⁻¹)	4.83×10^{-3}	8.83×10^{-3}
q_P^m	(g g ⁻¹ h ⁻¹)	0.223	0.108
K_S^p	(g l ⁻¹)	17.7	27.57

Note. Parameter estimation was carried out with Simplex method (Nelder & Mead, 1965) by minimizing the error square between the model prediction (eqs. 3-5) and experimental observation in batch cultivation varying pH 3.0-7.0 at controlled temperature 30 °C under aerobic (DO>90%) and oxygen-limited (DO<1%) conditions. The experimental data for cells, xylose and xylitol were summarized and illustrated in Fig. 4. The computer program used in parameter optimization was prepared by the Institute of Biochemical Engineering, University of Stuttgart, Germany.

TABLE 3A. Continuous culture with cell recycle for xylitol production under steady state.

Run	Condition	R	D	C_{s0}	C_s	C_x	C_p	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
CCR-1	Aerobic	0.75	0.067	30	0.04	30.05	0.18	0.25	0.006
CCR-2	Oxygen-limited	0.76	0.064	30	4.89	8.49	2.50	0.08	0.100
CCR-3	Aerobic	0.50	0.074	30	2.47	24.54	0.06	0.44	0.002
CCR-4	Oxygen-limited	0.50	0.067	30	25.05	3.53	1.48	0.36	0.299

Units of dilution rate (D), concentrations (C_s) and yields (Y) are h^{-1} , $g\ l^{-1}$ and $g\ g^{-1}$, respectively.

TABLE 3B. Continuous culture with cell recycle for xylitol production under steady state.

Run	Condition	R	D	Specific rates (q)		Volumetric rates (Q)	
				Xylose	Xylitol	Xylose	Xylitol
CCR-1	Aerobic	0.75	0.067	66.80	0.40	2007	12.06
CCR-2	Oxygen-limited	0.76	0.064	189.29	18.84	1607	160
CCR-3	Aerobic	0.50	0.074	83.02	0.18	2037	4.44
CCR-4	Oxygen-limited	0.50	0.067	93.95	28.09	300	99.16

Units of dilution rate (D), specific and volumetric rates are h^{-1} , $mg\ g^{-1}\ h^{-1}$ and $mg\ l^{-1}\ h^{-1}$, respectively.

TABLE 4. Comparison between batch and continuous culture for the volumetric rate of xylitol production.

Mode of cultivation	C_X (g l ⁻¹)	C_S (g l ⁻¹)	C_P (g l ⁻¹)	Q_P (mg l ⁻¹ h ⁻¹)
Batch culture ⁽¹⁾ ($C_X^0 = 25.58$ g l ⁻¹) ($C_P^0 = 12.20$ g l ⁻¹)	15.51	0.184	16.561	62.34
Continuous culture with cell recycle				
CCR-4 O ₂ -limited ⁽²⁾	3.53	25.05	1.48	99.16
CCR-5 O ₂ -limited ⁽³⁾	16.10	15.15	4.86	325.62

⁽¹⁾ The data was taken from the batch culture at controlled pH 5.0 under oxygen-limited condition during 12-82 h of culture time. The cell concentration was average from cell concentrations between 12 to 82 h of culture time. The concentration of xylose and xylitol were at 82 h of culture time. Therefore, the volumetric rate of xylitol production was calculated from xylitol produced in 70 h of batch cultivation.

⁽²⁾ The data was taken from the under steady state of continuous culture at controlled R = 0.50 and D = 0.067 h⁻¹ under oxygen-limited condition (30 °C, pH 5.0).

⁽³⁾ The data was taken from the under steady state of continuous culture at controlled R = 0.50 and D = 0.067 h⁻¹ under oxygen-limited condition (30 °C, pH 6.0).

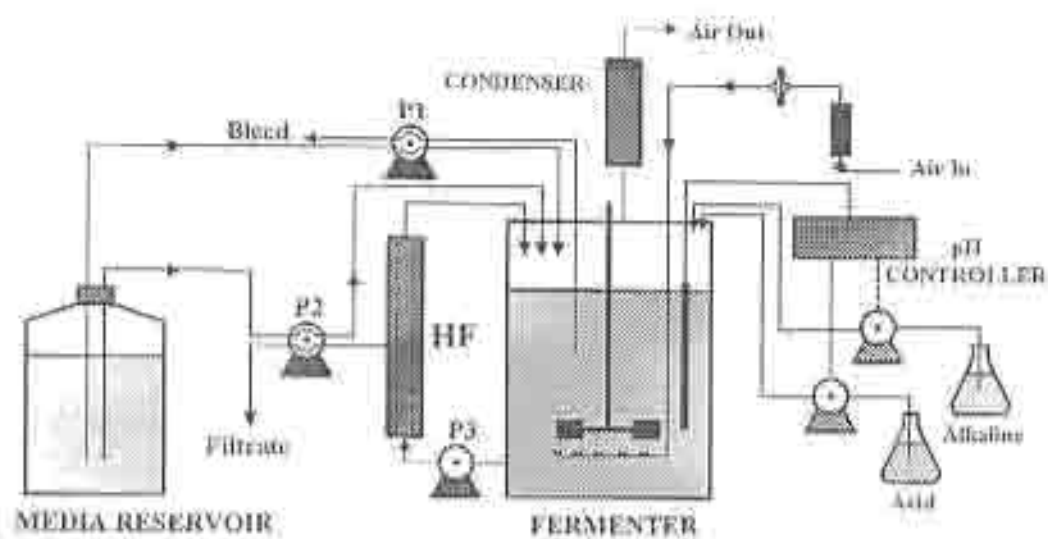


FIG. 1. Single-stage fermentation with cell recycle

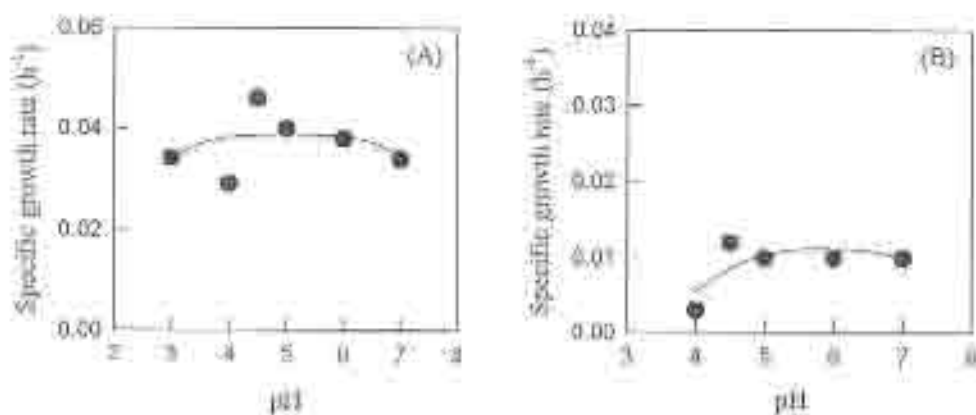


FIG. 2. Effect of pH on specific growth rate under aerobic (A) and oxygen limited conditions (B) in batch culture.

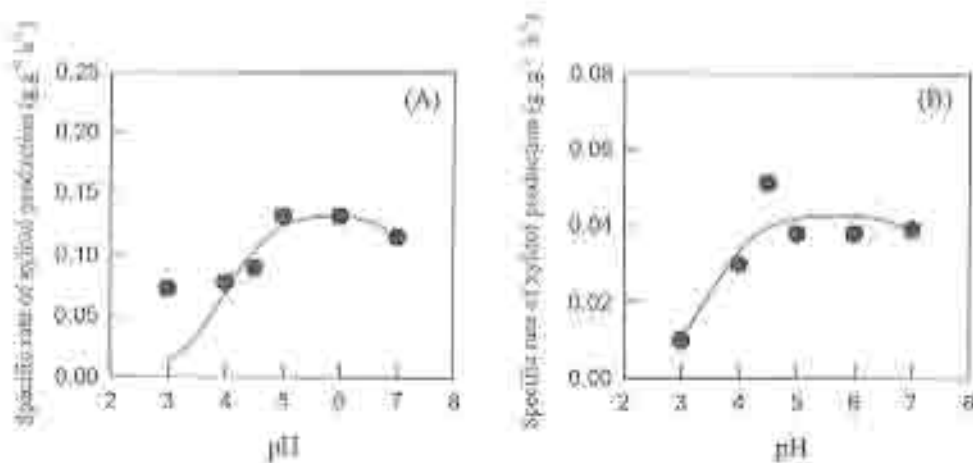
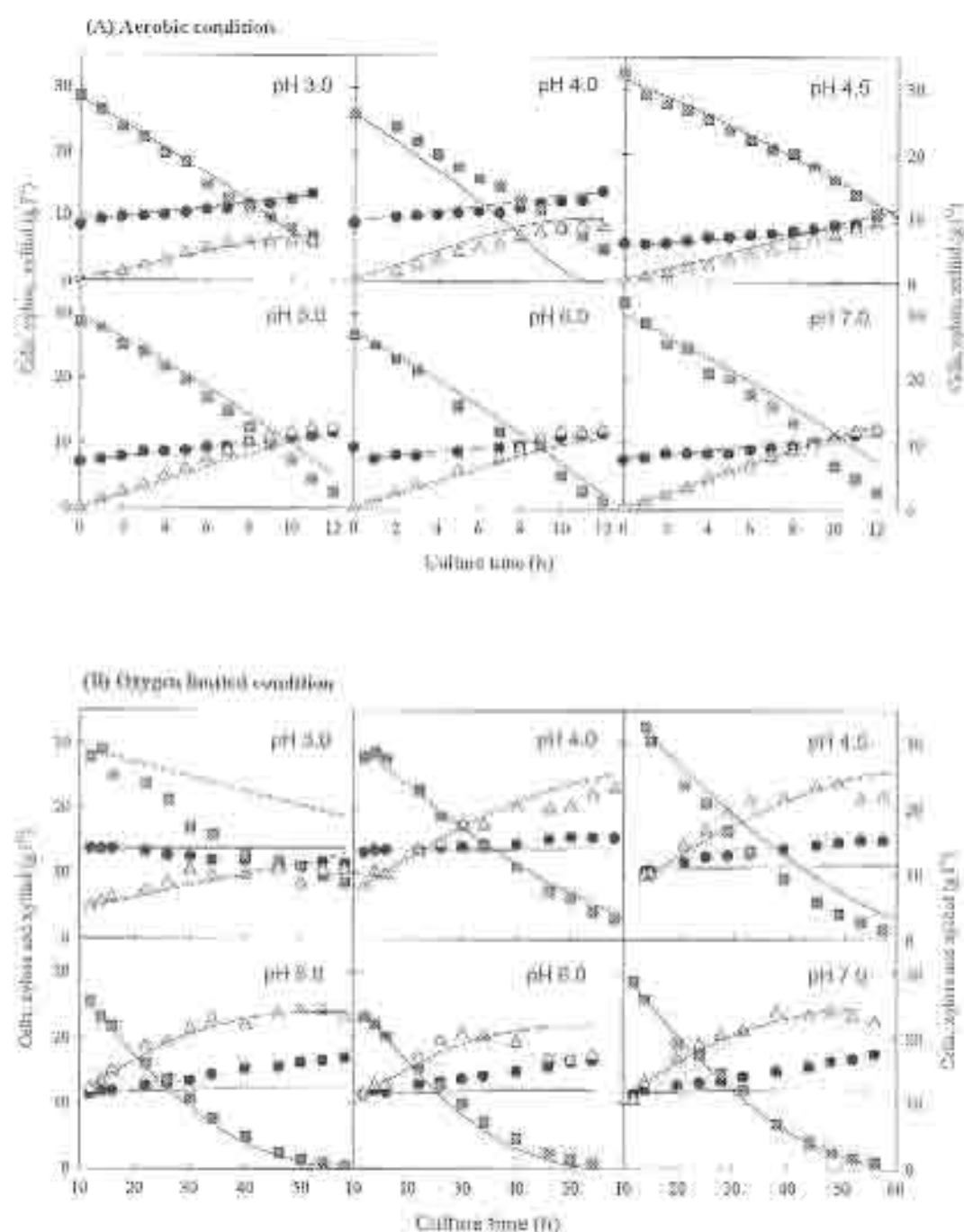


FIG. 3. Effect of pH on specific rate of xyliol production under aerobic (A) and oxygen limited conditions (B) in batch culture.



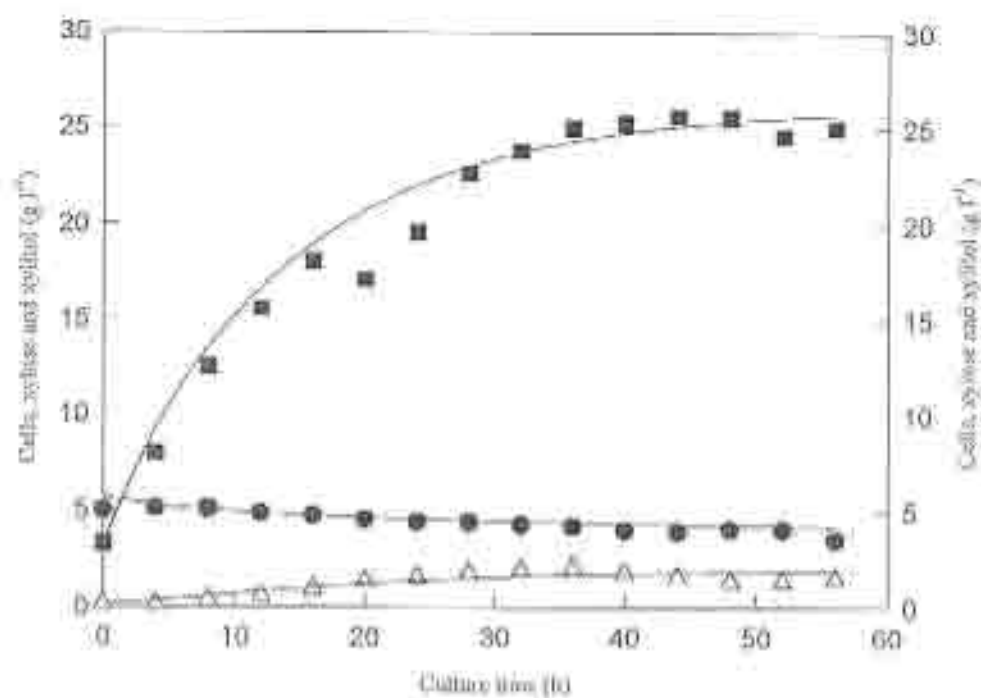


FIG. 5. Comparison for the concentrations of cells (●), xylose (■) and xylitol (Δ) between measurements (symbols) and calculations (lines) under oxygen limited conditions. ($D = 0.067 \text{ h}^{-1}$, $\beta = 0.05$ and $C_S^0 = 30 \text{ g l}^{-1}$)

