

مقایسه اثر میدان الکتریکی پالسی و فرآیند حرارتی بر انتقال جرم در استخراج قند از چغندر قند

عبدالمجید مسکوکي^{۱*} - محمد نقی اشتیاقی^۲

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۲۵

تاریخ پذیرش: ۹۰/۵/۱۹

چکیده

اثر میدان الکتریکی پالسی قوی بر فرآیند انتقال جرم از خلال چغندر با ضخامت های متفاوت در مقایسه با تیمار حرارت مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، میدان الکتریکی قوی (با قدرت ۳ kV، ۸ μF، ۲۰ پالس) بر دو نوع خلال ضخیم با ابعاد ۰/۵ ± ۳ میلی متر عرض و خلال نازک ۰/۳ ± ۲ عرض هر دو دارای ۳-۵ سانتی متر طول اعمال و با نمونه های تیمار شده توسط حرارت ۸۰°C به مدت ثابت ۱۵ دقیقه مقایسه گردیدند. نمونه های شاهد و تیمار شده توسط پرس آزمایشگاهی در سه مرحله و هربار به میزان ۲۰ بار (۲ مگاپاسکال) فشرده و میزان بریکس، هدایت الکتریکی شربت حاصل به عنوان شاخص های انتقال جرم، راندمان شربت و سرعت خشک شدن تفاله حاصل از نمونه ها نیز اندازه گیری شدند. نتایج پس از تجزیه و تحلیل آماری حاکی از افزایش انتقال جرم بیش از دو برابر در نمونه های تیمار شده با میدان الکتریکی به ویژه در خلال نازک و نیز افزایش راندمان بالاتر شربت نسبت به فرآیند حرارتی بود. بیشترین میزان مواد جامد محلول در اولین مرحله پرس به دست آمد. هم چنین سرعت خشک شدن تفاله در نمونه های تیمار شده توسط میدان الکتریکی به دلیل حفظ شکل فیزیکی خلال ها، افزایش روزه های ایجاد شده در یافت و سلولهای چغندر در مقایسه با نمونه های تیمار شده توسط حرارت به دلیل از هم گسیختگی سلولها و ایجاد کلوخه و ممانعت از خروج رطوبت افزایش قابل ملاحظه ای نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: میدانهای الکتریکی پالسی، انتقال جرم، چغندر قند، بریکس، هدایت الکتریکی

مقدمه

اساس این روش اعمال انرژی الکتریکی با استفاده از میدان الکتریکی و ایجاد روزه در غشای سلول می باشد که به آن حفره‌زایی الکتریکی الکتروپوراسیون^۲ می گویند (Barbosa et al., 1999). هرچند سازوکار این فرآیند هنوز به درستی شناخته نشده ولی بهترین مدل پذیرفته شده نظریه پاره شدن دی الکتریک است که توسط زیمرمن و همکاران ارائه شده است. این نظریه پیشنهاد می کند که میدان الکتریکی خارجی یک پتانسیل انتقال غشایی اضافی که بزرگتر از پتانسیل طبیعی سلول است ایجاد می کند و هنگامی که پتانسیل کلی غشا به حد بحرانی حدود ۱ ولت رسید پاره شدن اتفاق می افتد که می تواند به صورت برگشت پذیر یا قابل ترمیم و برگشت ناپذیر یا غیر قابل ترمیم باشد (Zimmerman, 1986). پارگی برگشت پذیر در تحریک سلولی، انتقال ژن و افزایش فعالیتهای متابولیکی سلول کاربرد دارد و پارگی برگشت ناپذیری می تواند در سه مقوله مهم فرآوری مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد. اول، نابودی میکرواورگانیزمها و

میدانهای الکتریکی با پالس‌های قوی (PEF) فرآیندی است که با اعمال پالس‌های با ولتاژ بالا توسط دو الکتروود در مواد غذایی صورت می گیرد (Dumand Pearleman, 1987). این فرآیند در حرارت معمولی در مدت زمان کمتر از ۱ ثانیه اعمال می شود و سبب به حداقل رساندن میزان از دست رفتن انرژی و ارزشهای تغذیه ای بر اثر حرارت دادن مواد غذایی می شود. فناوری PEF به دلیل جلوگیری از تغییرات نامطلوب و ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی مواد غذایی بهتر از فرآیند مواد غذایی با استفاده از حرارت است (Vega et al., 1999)

۱- استادیار گروه کشاورزی و صنایع غذایی پژوهشکده علوم و صنایع غذایی خراسان رضوی.

*- نویسنده مسئول: (Email: maskooki@yahoo.com)

۲- استاد گروه مهندسی شیمی دانشکده مهندسی دانشگاه مهاباد تایلند.

PEF نیز بطور قابل ملاحظه ای افزایش نشان داد و کدورت شربت بدست آمده نسبت به روش تیمار حرارتی ۳ تا ۴ برابر کمتر بود. به علاوه مقدار قابل ملاحظه ای سدیم و پتاسیم و ازت (α -آمینو) در نمونه ها و تفاله های تیمار شده با PEF وجود داشت که افزایش خلوص شربت را توجیه می کنند (Jemai and Vorobeiv, 2006). اثر بکارگیری سانتریفوژ در استخراج آبی قند از چغندر قند پس از تیمار با PEF توسط El-Belghiti و همکاران (۲۰۰۵) قرار گرفته است. در این تحقیق استخراج قند از چغندر قند تیمار شده با PEF در درجه حرارت معمول به وسیله نیروی سانتریفوژ بطور قابل ملاحظه ای سینتیک استخراج را از چغندرهای تیمار شده افزایش داد

هرچند در زمینه استخراج قند از چغندر با پیش فرآوری PEF تحقیقات بسیار وسیعی اجرا شده و هم اکنون برنامه ریزی برای استفاده در مقیاس صنعتی در بعضی کشورهای پیشرفته در دست اقدام است (Bluhm, and Sack, 2009 و Jaegr, et al., 2008). اما هنوز اثرات به کارگیری این فناوری در فرآیند های در حین و پس از استخراج نظیر اندازه خلال، میزان و تعداد مرحل پرس و بالاخره تفاله نامعلوم است لذا در این مقاله تاثیر این موارد مورد مطالعه قرار گرفته اند.

مواد و روش ها

چغندر قند از کارخانه قند در مهرماه سال ۱۳۸۸ به صورت تصادفی از نقاط مختلف سیلوی نگهداری چغندر قند نمونه برداری گردید. برای تولید خلال از مقاطع عرضی تهیه شده توسط یک پانچر (سوراخ کن) چوب پنبه قطعات استوانه ای شکل بصورت خلال چغندر قند دو نمونه خلال بزرگ و خلال کوچک تهیه گردید. اندازه خلال ضخیم با قطر 3 ± 0.5 میلی متر عرض و ۳-۵ سانتی متر طول و اندازه خلال نازک با قطر 2 ± 0.3 میلی متر عرض و ۳-۵ سانتی متر طول بود. برای عمل پرس و استخراج شربت پس از تیمار از پرس آزمایشگاهی استفاده شد دستگاه پرس با ابعاد سطح 75 cm^2 و ضخامت کیک پرس ۱-۰/۵ سانتی متر و دارای فشار حداکثر ۲۰ بار استفاده شده است. در هر مرحله میزان مشخصی از نمونه تحت فشاری معادل ۲۰ بار (۲ مگاپاسکال) به مدت ۵ دقیقه قرار می گرفت و در فاصله هر پرس مقدار ۱۰ میلی لیتر آب به وزن ثابت تفاله اضافه می شد و پرس اعمال می گردید. اضافه کردن آب مقطر به منظور حصول باقیمانده قند موجود در تفاله انجام شده است (Eshtiaghi & Knorr 2000 a,b).

برای انجام تیمارهای میدان الکتریکی پالسی قوی از دستگاه طراحی شده و ساخته شده توسط شرکت Sib Food.Tech آلمان در آزمایشگاه گروه مهندسی شیمی ماهیدول تایلند استفاده گردید این دستگاه قابلیت ایجاد جریان الکتریکی تا ۲۰ کیلوولت را با ایجاد

اعمال فرآیندهای پاستوریزاسیون و استریلیزاسیون بدون اعمال حرارت. دوم، در فرآیندهای استخراج مواد درون سلولی از بافتهای گیاهی و جانوری و سوم خشک کردن و کاهش آب در مواد غذایی است. هرسه پدیده به دلیل پارگی غشا و افزایش نفوذ پذیری سلول است. نابودی میکرو اورگانیزمها، تسهیل فرآیند انتقال جرم و ورود و خروج مواد به درون سلول و بالعکس در فرآیند های استخراج مواد درون سلولی، سهولت خروج آب و انتقال حرارت یا مواد اسمزی حاصل پدیده نفوذ پذیری است. تاکنون مطالعات بسیار گسترده ای در زمینه به کار گیری میدانهای الکتریکی پالسی در هر سه یعنی نابودی میکرواورگانیزمها و فرآیند های استخراج و خشک کردن مواد غذایی صورت گرفته است. استخراج آبیوه ها، ترکیبات زیست فعال، آنزیمها، رنگدانه ها، ویتامینها، قندها، پروتئینها و چربیها و یا کمک به فرآیند خشک کردن میوه ها و سبزیها با پیش فرآوری PEF مورد مطالعه قرار گرفته است و تسریع در عمل استخراج، افزایش راندمان و حفظ ویژگیهای کیفی مواد از مهم ترین دستاوردهای به کارگیری این فناوری بوده اند (Devito, et al., 2008, Dunn, et al., 1996, 1987, El-Belghiti, et al., 2005a,b, Eshtiaghi and Knorr 2000 a,b, 2002).

استفاده از PEF به منظور استخراج قند از چغندر قند اولین بار توسط Eshtiaghi and Knorr (2000b) مورد مطالعه قرار گرفت. در این مطالعات میدان های $2/5 - 1/2$ kV/cm و تعداد پالس ۲۰۰-۱ توانست به میزان قابل توجهی سلول های چغندر قند را تخریب کند.

Jemai and Vorobeiv (2003) افزایش استخراج شربت از خلال چغندر قند با استفاده از PEF اثر میدان الکتریکی پالسی با قدرت متوسط ($780 - 160$ V/cm) بوسیله یک سیستم استخراج مایع در مقیاس آزمایشگاهی را مورد تأیید قرار دادند. بر اساس مقادیر بدست آمده از اندازه گیری ضریب نفوذپذیری قبل و بعد از تیمار حداقل ولتاژ لازم 150 v/cm است تا بتوان افزایش قابل ملاحظه ای در میزان استخراج مشاهده نمود و قابلیت استخراج همبستگی نسبتاً کاملی با افزایش شدت میدان دارد. هم چنین کاربرد PEF به عنوان یک فرآیند استخراج سرد قند از چغندر قند با استفاده از میدان های الکتریکی پالسی به عنوان یک فرآیند واسطه ای برای استخراج شربت از خلال چغندر قند (خلال هایی با اندازه بلند) در مقیاس پایلوت و با استفاده از پرس دارای سینی های متعدد (چندگانه) با ظرفیت ۱۵-۴/۵ کیلوگرم و یک ژنراتور پالسی $1000 \text{ A} - 1000 \text{ V}$ نیز توسط Jemai and Vorobeiv (2006) مورد مطالعه قرار گرفته است. بهترین نتایج پس از اعمال تیمار PEF و دو مرحله پرس به دست آمد و راندمان استخراج تا ۸۰ درصد خروج مواد قندی از نمونه ای تیمار شده حاصل گردید و از دست رفتن قند در پالپ نمونه ها تا میزان ۳ درصد کاهش یافت. میزان خلوص شربت بعد از تیمار با

سانتیمتر استفاده گردید. برای خشک کردن تفاله از آون یا خشک کن با گردش هوای داغ 105°C استفاده شد. زمان خشک شدن تا رسیدن به وزن ثابت برای هر تیمار اندازه گیری گردید.

برای عمل پرس و استخراج شربت پس از تیمار از پرس آزمایشگاهی مدل Hetich با ابعاد سطح 75cm^2 و ضخامت کیک پرس ۱-۰/۵ سانتی متر و دارای فشار حداکثر ۲۰ بار استفاده شد. در هر مرحله میزان مشخصی از نمونه های خلال تحت ۲۰ بار (معادل ۲ مگاپاسکال) فشار به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت و در فاصله هر پرس مقدار ۱۰ میلی لیتر آب به وزن ثابت تفاله اضافه شد و پرس اعمال گردید. اضافه کردن آب مقطر به منظور حصول باقیمانده قند موجود در تفاله انجام شد (Eshtiaghi, & Eshtiaghi, & Knorr, 2000a). (Knorr, 2002).

پالسهای میرای لگاریتمی و یا مربعی دارا بود. یک منبع تغذیه AC (برق معمولی ۲۴۰-۲۲۰ ولت ۵۰ هرتز) برق را به یک منبع تغذیه DC منتقل کرده و در آنجا یک جریان خطی انرژی الکتریکی را به یک سری خازن منتقل کرده و انرژی ذخیره شده در خازن ها با یک کلید پالسی توسط دو الکتروود به محفظه تیمار تخلیه می کنند. شکل ۱ سیستم اعمال میدان الکتریکی پالسی قوی را برای اعمال میدانی با قدرت 3 kV/cm نشان می دهد (Eshtiaghi, & Knorr, 2002). تیمار PEF توسط میدان الکتریکی پالسی قوی با قدرت $3\text{ kV } 8\text{ }\mu\text{F}$ با ۲۰ پالس. پالسهها از نوع میرای لگاریتمی فاصله هر پالس ۱ ثانیه بود. نمونه های تیمار شده توسط میدان الکتریکی از نظر میزان بریکس و هدایت الکتریکی با نمونه های تیمار شده توسط حرارت 80°C به مدت ثابت ۱۵ دقیقه بر روی دو اندازه خلال ضخیم و نازک چغندر به عنوان فرآیند حرارتی مقایسه گردیدند. برای اعمال تیمار حرارت از یک حمام بن ماری جوش (100°C) با ابعاد 50×30



شکل ۱- سیستم اعمال میدان الکتریکی پالسی قوی $3\text{ kV } 8\text{ }\mu\text{F}$

خشک شدن تا رسیدن به وزن ثابت برای هر تیمار اندازه گیری گردید کلیه آزمایشات حداقل در سه تکرار انجام گردید و داده های به دست آمده در طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی و با استفاده از جدول ANOVA تجزیه و تحلیل شده و میانگین های به دست آمده با تعیین حداقل اختلاف معنی دار آماری در سطوح $P \leq 0.05$ در آزمون چند دامنه ای دانکن^۱ با یکدیگر مقایسه گردیدند. برای محاسبات

برای اندازه گیری بریکس شربت استخراجی از دستگاه رفاکتومتر و برای اندازه گیری میزان هدایت الکتریکی از دستگاه کنداکتیویتی متر مدل IDSC004 استفاده شد. بریکس و هدایت الکتریکی شربت تعیین کننده میزان انتقال مواد از داخل شلول به شربت است. مقدار شربت بدست آمده نسبت به وزن نمونه بر حسب درصد به عنوان راندمان محاسبه گردید. (Eshtiaghi & Knorr, 2000b) و (Maskooki & Eshtiaghi, 2010). برای خشک کردن تفاله از آون یا خشک کن با گردش هوای داغ 105°C استفاده شد و زمان

1- Duncan Multiple Range Test

به طور معنی داری ($p \leq 0.05$) بیشتر از شاهد و اعمال حرارت 80°C می باشد. نتایج به دست آمده حاکی از افزایش قابل ملاحظه خروج مواد از سلولهای چغندر صرفنظر از مرحله پرس می باشد. افزایش قابلیت نفوذ بافتهای خلال چغندر تحت اثر میدان و در نتیجه خروج بیشتر مواد درون سلولی نسبت به تیمار حرارتی به داخل شربت اطراف مهم ترین عامل می باشد. در هنگام تخریب سلولهای چغندر به وسیله اعمال حرارت به دلیل تخریب کامل بافتهای گیاهی و سلول و ایجاد یافت همگن و کلوخه ای بخشی از مواد در داخل بافتهای لپهیده ناشی از حرارت گیر افتاده و قادر به ورود آبی به درون شربت نیستند. در حالی که در فرآیند ایجاد نفوذ پذیری در غشای سلول چغندر و بافتهای گیاهی خلال چغندر نفوذ پذیر شده بدون این که آسیبی به قسمتهای دیگر دیواره سلول و ترکیبات درون سلولی وارد گردد. در نتیجه خلال ظاهری سالم دارد اما به طور قابل ملاحظه ای نفوذ پذیر شده است. که با نتایج به دست آمده در تحقیقات Knorr و همکاران (۲۰۰۱) و El-Belghiti و همکاران (۲۰۰۵) کاملاً منطبق است.

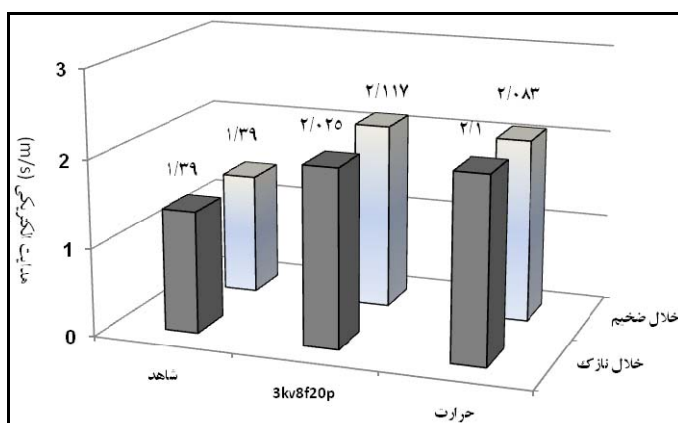
آماری از نرم افزار Sigmasat3.1 و برای رسم منحنی ها و اشکال از نرم افزار Microsoft Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

در بررسی اولیه نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری فاکتور اعمال فرآیند در سه سطح (شاهد، 3kV $8\ \mu\text{F}$ با 20 پالس، حرارت 80°C به مدت ثابت ۱۵ دقیقه) و اعمال پرس در سه سطح (مراحل اول، دوم و سوم) برای هر دو نوع خلال ضخیم و نازک به طور جداگانه و اثرات متقابل آنها بر یکدیگر نشان داد که اختلاف کاملاً معنی دار آماری در سطح ($P \leq 0.01$) وجود دارد. میزان هدایت الکتریکی و بریکس شربت به عنوان شاخص های انتقال جرم در فرآیند های پس از تیمار در نظر گرفته شدند.

قابلیت هدایت الکتریکی

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می گردد میزان هدایت الکتریکی شربت خام حاصل از اعمال میدان الکتریکی 3kV $8\ \mu\text{F}$ با 20 پالس



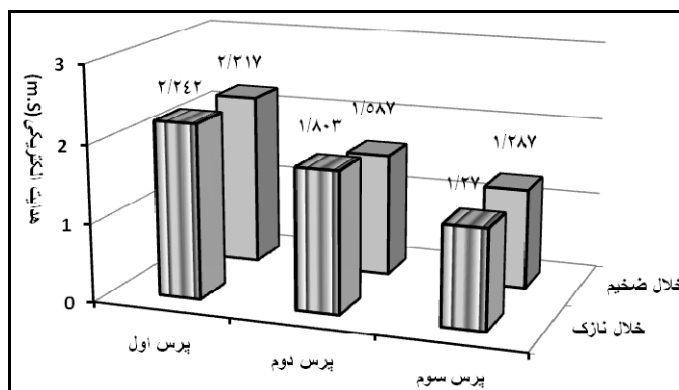
شکل ۲- تاثیر تیمارهای اعمال میدان الکتریکی پالسی قوی و حرارت روی میزان هدایت الکتریکی شربت خام چغندر قند.

پی و پرس مداوم ($10\ \text{Mpa}$ و $5\ \text{min}$) راندمان تولید را به ۵۱ تا ۷۶ درصد افزایش می دهد (ذرات پالپ $1/5$ میلی متر) و وقتی ذرات ۳ میلی متر بودند راندمان استخراج ۷۰-۳۰ درصد بود. در شکل ۳ مقایسه میزان هدایت الکتریکی که ناشی از خروج یونها از داخل سلول چغندر به درون شربت برای دو قطر متفاوت خلال نازک و ضخیم پس از هر مرحله پرس نشان داده شده اند. بالاترین میزان هدایت الکتریکی به دست آمده برای هر دو نوع خلال در اولین مرحله پرس به دست آمده است و طبیعتاً کمترین میزان مربوط به پرس مرحله سوم است و بین هر سه مرحله پرس اختلاف کاملاً معنی دار آماری وجود دارد. به عبارت دیگر بیش از ۹۰ درصد

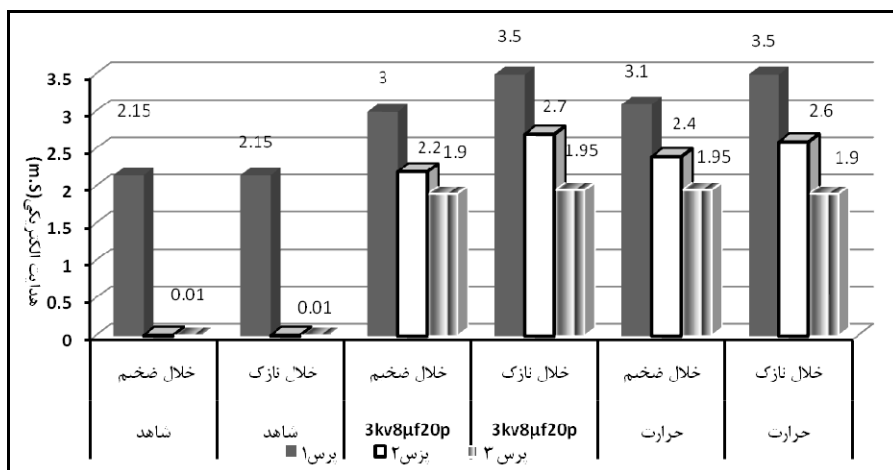
هم چنین مقایسه میزان هدایت الکتریکی در شربت حاصل از اعمال هر دو تیمار در شکل ۳ نشان داده شده است. اعمال حرارت و میدان الکتریکی در خلال نازک تر به طور معنی داری بیشتر از خلال ضخیم می باشد و ناشی از تأثیر قطر نمونه و انتقال جرم و حرارت بیشتر در تیمار حرارتی و هم چنین انتقال جرم بیشتر در میدان الکتریکی و استخراج بیشتر مواد است. به طور طبیعی با کاهش ضخامت و اندازه بافتهای گیاهی میزان تأثیر فرآیند PEF تشدید شده و انتقال مواد درون سلولی با سهولت بیشتری انجام می گیرد. بر اساس تحقیقات انجام شده توسط Knorr و همکاران (۲۰۰۱) پیش فرآوری آب هویج با 50 پالس در میدان $2/6\ \text{kV/cm}$ به صورت پی در

شده اند. همانطور که ملاحظه می گردد میزان هدایت الکتریکی شربت در پرس اول در هر دو اندازه خلال برای تمام تیمارها (شاهد، میدان الکتریکی و حرارت) دارای بیشترین مقدار است.

خروج شربت در اولین مرحله پرس انجام گرفته است. نتایج حاصل از اندازه گیری هدایت الکتریکی شربت خام تحت تأثیر هر سه فاکتور تیمار، اندازه قطر خلال و مراحل پرس در شکل ۴ با یکدیگر مقایسه



شکل ۳- اثر مراحل مختلف پرس بر میزان هدایت الکتریکی شربت حاصل از سه مرحله پرس در دو نوع خلال نازک و ضخیم تحت تیمارهای مختلف و مقایسه با شاهد.



شکل ۴- مقایسه اثر توأمان اعمال میدان الکتریکی و حرارت، اندازه خلال و مراحل پرس.

خلال نازک است و بین شربت دو نمونه خلال نازک و ضخیم تفاوت کاملاً معنی دار آماری وجود دارد در سطح $p \leq 0.05$ که ناشی از تأثیر قطر یا ضخامت نمونه بر میزان استخراج می باشد و به طور طبیعی با کاهش اندازه قطر خلال اثرپذیری و در نتیجه خروج بیشتر مواد مشاهده می گردد. اثر ضخامت خلال در فرآیند حرارتی نیز مشاهده می گردد و برای نمونه های شاهد فاقد اختلاف معنی دار می باشد. Rastogi و همکاران (۱۹۹۹)؛ Devito و همکاران (۲۰۰۸) و El-Belghiti و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که اندازه خلال های چغندر قند نیز از عوامل مهم در این فرآیند است و زمان مورد نیاز برای حصول بهترین نتیجه در مرحله پیش فرآوری با میدان الکتریکی و نیز مراحل بعدی از جمله پرس و میزان پرس کردن نیز اهمیت زیادی

میزان هدایت الکتریکی در شربت حاصل از اعمال میدان الکتریکی برای خلال نازک از خلال ضخیم بیشتر و ناشی از تأثیر بیشتر تخریب می باشد اما این مقدار برابر شربت حاصل از تیمار حرارتی برای خلال نازک در اولین پرس است. مقایسه نتایج حاصل از پرس دوم کاهش قابل ملاحظه هدایت الکتریکی شربت حاصل را در تمام تیمارها نشان می دهد. کمترین مقدار مربوط به شربت خام حاصل از نمونه شاهد و بیشترین مقدار در نمونه حاصل از فشردن خلال نازک پس از اعمال میدان الکتریکی می باشد. در پرس مرحله سوم به جز تیمار شاهد که دارای کمترین مقدار است بقیه تیمارها در سطح $p \geq 0.05$ تفاوت معنی داری ندارند. به علاوه بالاترین مقدار هدایت الکتریکی مربوط به شربت حاصل از اعمال میدان الکتریکی بر

بالاترین تخریب غشا مورد نیاز است. (Jemai, & E.Vorobiev, 2006). اثر PEF بسته به شدت میدان و تعداد پالس میزان تخریب سلول متفاوت است (Jaeger et al., 2008). اگرچه استخراج قند از چغندر قند در شرایط درجه حرارت محیط امکان پذیر است اما تنظیم درجه حرارت برای حصول حداکثر استخراج باید مورد بررسی قرار گیرد علاوه بر این تنظیم شرایط میدان از نظر قدرت و انرژی مورد نیاز اهمیت زیادی دارد تا این فرآیند بتواند در سطح اقتصادی مورد استفاده قرار گیرد. (Eshtiaghi & Knorr, 2002).

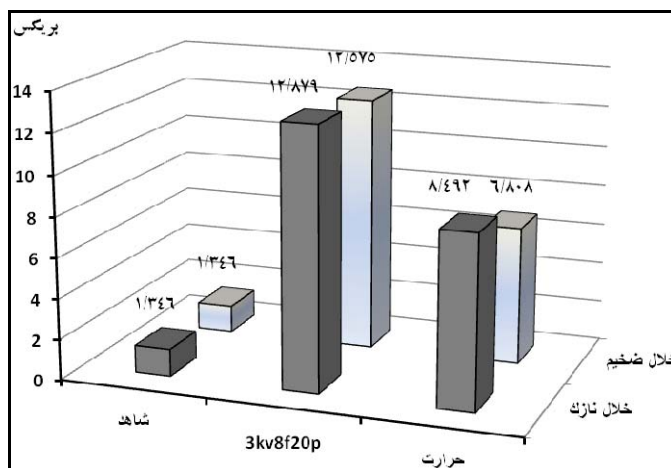
اثر توأمان اندازه خلال و مراحل پرس بر بریکس شربت خام در شکل ۶ نشان داده شده است. بیشترین میزان خروج مواد قندی در مرحله اول و از خلال نازک به دست آمده است و کمترین مقدار مربوط به شربت خام حاصل از فشردن نمونه شاهد در مرحله سوم می باشد. در تمام مراحل پرس، بین بریکس شربت های به دست آمده از دونه‌های مختلف اختلاف معنی دار آماری وجود دارد (LSD=0.0116). این اختلاف برای شربت حاصل از پرس اول بسیار قابل ملاحظه ولی در پرس های دوم و سوم مقدار اختلاف بسیار کمتر است. خروج بیشتر مواد قندی از مقاطع نازک تر چغندر توسط اشتیاقی و همکاران نیز تایید شده است که به دلیل افزایش تخریب در غشای سلولهای چغندر است (Eshtiaghi & Knorr, 2000b).

بیشترین بریکس شربت مربوط به نمونه های تیمار شده تحت تأثیر میدان الکتریکی در مرحله اول پرس در هر دو اندازه خلال و کمترین آن مربوط به نمونه های شاهد در مرحله سوم پرس است. مقدار بریکس شربت در فرآیند حرارتی نسبت به تیمار میدان در هر سه مرحله پرس کمتر می باشد. اختلاف معنی داری بین بریکس حاصل از نمونه های تیمار شده با حرارت و اعمال میدان الکتریکی در دو اندازه خلال مشاهده نمی گردد ($p \leq 0.05$).

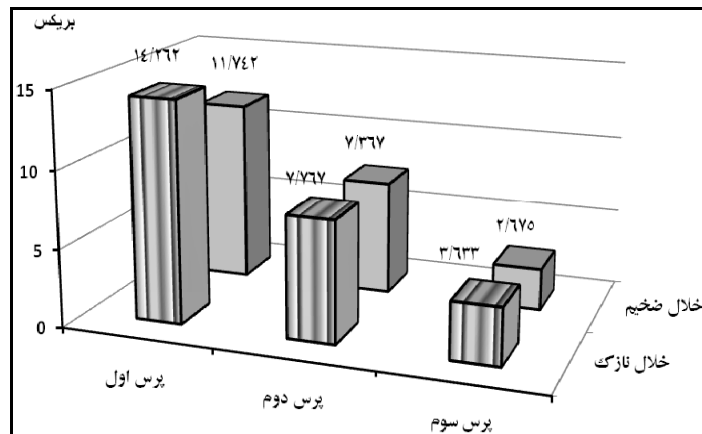
دارد. در این آزمایشات مشخص گردید که پس از دو مرحله پرس مقدار ماده خشک شربت به دست آمده در شرایط وزنی مساوی دو برابر ماده خشک بدست آمده نسبت به شاهد است و نشان دهنده افزایش راندمان شربت حاصل از پرس نسبت به تیمار شاهد است.

بریکس یا مواد جامد محلول

در شکل ۵ میزان بریکس شربت خام به دست آمده از اثر میدان الکتریکی ۳kV ۸ μF با ۲۰ پالس و نیز حرارت ۸۰°C و شاهد با یک دیگر مقایسه شده اند. بیشترین میزان بریکس برای نمونه های حاصل از اعمال میدان الکتریکی به دست آمده است. به عبارت دیگر هنگامی که خلال های چغندر تحت تأثیر پیش فرآوری با PEF قرار می گیرند میزان خروج مواد قندی در مقایسه با تیمار حرارتی و شاهد افزایش قابل ملاحظه ای می یابند. با کاهش قطر خلال مقدار بریکس شربت حاصل در هردو فرآیند حرارت و اعمال میدان الکتریکی افزایش یافته است. تفاوت معنی دار در این تیمار بین اندازه دو خلال و مقدار بیشینه شربت خلال نازک نسبت به خلال ضخیم وجود دارد. همچنین تفاوت کاملاً معنی داری بین بریکس شربت حاصل از دو خلال در فرآیند حرارتی مشاهده می گردد و هردو نمونه دارای بریکس کمتری نسبت به نمونه های حاصل از اعمال میدان الکتریکی می باشند. کمترین بریکس به دست آمده در نمونه های شاهد برای هردو اندازه خلال است که با یک دیگر برابر و فاقد اختلاف معنی دارند. در این نمودار ها تأثیر بیشتر میدان نسبت به حرارت و نیز اهمیت قطر خلال ملاحظه می گردد. اثر اعمال میدان الکتریکی بر اندازه خلال نیز توسط جمایی و همکاران مورد ارزیابی قرار گرفته و آنها در این بررسی به رابطه قطر خلال، شدت میدان و میزان نفوذ پذیری و تخریب غشا اشاره نمودند. به عبارت دیگر با افزایش قطر خلال میدانهای با شدت بیشتری برای رسیدن به



شکل ۵- مقایسه اثر قطر خلال و فرآیندهای پالس های الکتریکی و حرارت روی میزان بریکس شربت خام چغندر قند.



شکل ۶- مقایسه اثر توأمان قطر خلال و مراحل پرس روی بریکس شربت خام چغندر قند تیمار شده با میدان الکتریکی.

نوار ضخیم $0/84 \pm 11/10$ می باشد که از نظر آماری معنی دار نمی باشد و نتایج قابل توجه در پرس مرحله دوم و سوم بدست آمده بطوری که هیچ تغییر وزنی پس از پرس مجدد تفاله حاصل نشد در حالی که مقدار وزنی تفاله حاصل از پرس در مرحله دوم و سوم در نمونه های تیمار شده با PEF مقادیر کمتری را نشان می دهد و این حالت به علت خروج مقدار بیشتری شربت به واسطه ایجاد تخریب در غشای سلول و قابل نفوذ شدن نمونه های تیمار شده نسبت به نمونه های شاهد می باشد (Ade-Omowaye *et al.*, 2001 و Omowaye *et al.*, 2002).

تاثیر تیمار PEF روی راندمان شربت خام

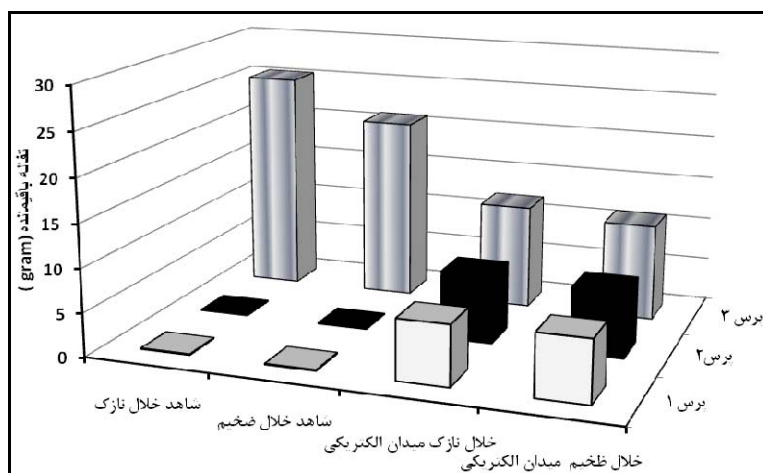
به موازات بررسی مقدار تفاله، مقدار شربت حاصل از سه مرحله پرس پس از اعمال تیمار با PEF با نمونه های خام (تیمار نشده) مورد ارزیابی قرار گرفت.

در جدول (۱) مقادیر شربت حاصل از سه مرحله فشردن نمونه های شاهد و تیمار بر حسب میلی لیتر نشان داده شده اند. نتایج نشان داد که مقدار شربت حاصل از فرآیند PEF در هر دو اندازه خلال به میزان تقریبی $1/5$ برابر بالاتر از مقدار شربت حاصل از نمونه های تیمار در پرس مرحله اول می باشد. نتایج قابل توجه در پرس مرحله دوم و سوم نشان می دهد که بدلیل عدم تخریب غشای سلول و ایجاد روزنه هیچگونه شربتی در نمونه های خام خارج نشده در حالی که برای نمونه های تیمار شده با PEF در هر دو مرحله خروج شربت نشان داده شده اند و حاکی از تأثیر قابل ملاحظه PEF بر قابل نفوذ نمودن غشای سلول می باشد. بین نمونه های خلال بزرگ و خلال کوچک در هیچکدام از مراحل پرس تفاوت معنی دار آماری مشاهده نمی شود شکل ۸ تفاوت بین راندمان شربت را پس از اعمال تیمار PEF در سه مرحله پرس نشان می دهد.

در تحقیقات انجام شده توسط Jemai و همکاران (۲۰۰۶) کاربرد PEF میدان های الکتریکی پالسی به عنوان یک فرآیند واسطه ای برای استخراج شربت از خلال چغندر قند مورد تأیید قرار گرفته است. در این تحقیق آنها خلال هایی با اندازه بلند را در مقیاس پایلو و با استفاده از پرس دارای سینی های متعدد (چندگانه) با ظرفیت ۱۵-۴/۵ کیلوگرم تحت تأثیر یک میدان الکتریکی با ژنراتور پالسی ۱ kV-۱ kA قرار دادند. بهترین نتایج پس از اعمال تیمار PEF در دو مرحله پرس به دست آمد و راندمان استخراج تا ۸۰ درصد خروج مواد قندی از نمونه ی تیمار شده حاصل گردید. از دست رفتن قند در پالپ نمونه ها تا میزان ۳ درصد کاهش یافت میزان خلوص شربت بطور سیستماتیک با اندازه گیری روش کالریمتری و با استفاده از اسپکتروفتومتر شربت قبل و بعد از تیمار با PEF بطور قابل ملاحظه ای افزایش نشان داد و کدورت شربت بدست آمده نسبت به روش تیمار حرارتی ۳ تا ۴ برابر کمتر از بود. به علاوه مقدار قابل ملاحظه ای سدیم و پتاسیم و ازت (α -آمینو) در نمونه ها و تفاله های تیمار شده با PEF بود که افزایش خلوص شربت را توجیه می کند (Lopez *et al.*, 2009).

مقدار وزنی تفاله حاصل از پرس پس از اعمال PEF

مقدار وزنی تفاله به دست آمده پس از اعمال PEF ۳ kV و $8\mu F$ و ۲۰ پالس روی دو اندازه متفاوت خلال نازک (با قطر $2 \pm 0/5$ و $3-5$ cm طول) و ضخیم (با قطر $3 \pm 0/5$ و $3-5$ cm طول) در سه مرحله پرس اندازه گیری و با نمونه های خام مقایسه گردید که میزان تفاوت آنها در شکل ۷ نشان داده شده اند. بطوریکه ملاحظه می شود مقدار تفاله باقیمانده پس از اولین پرس در نمونه خام به میزان قابل توجهی بیشتر از نمونه های تیمار شده با PEF است و تفاوت معنی داری بین دو اندازه خلال مشاهده نمی شود بطوری که مقدار تفاله برای نوار نازک $12/7 \pm 0/35$ و برای



شکل ۷- مقایسه تاثیر قطر خلال، مرحله پرس و تیمار با میدان الکتریکی روی میزان تفاله استحصالی.

جدول ۱- تاثیر قطر خلال و نوع تیمار روی مقدار حجمی وزنی شربت (میلی لیتر در صدگرم تفاله)

قطر خلال	تیمار	پرس مرحله اول	پرس مرحله دوم	پرس مرحله سوم
خلال نازک	خام (بدون تیمار)	۲۴/۵۳ ± ۰/۴۲	-	-
خلال ضخیم	خام (بدون تیمار)	۲۹ ± ۰/۳۶	-	-
خلال نازک	PEF (۳kV/cm و ۸ μf و ۲۰ پالس)	۳۷/۳ ± ۰/۳۵	۱۴/۹۹ ± ۰/۵۲	۱۰/۹ ± ۰/۲۸
خلال ضخیم	PEF (۳kV/cm و ۸ μf و ۲۰ پالس)	۳۸/۹ ± ۰/۸۴	۱۳/۱۴ ± ۱/۴۵	۱۰/۵۴ ± ۱/۴۱

خشک کردن تفاله با هوای داغ

در شکل ۸ کاهش مقدار رطوبت یا کاهش وزنی تفاله های تیمار شده با PEF نسبت به تفاله های تیمار شده با فرآیند حرارتی در طول زمان تا رسیدن به وزن ثابت مشاهده می شود. زمان خشک شدن تفاله های حاصل از پیش تیمار با PEF کوتاهتر از زمان خشک شدن تفاله های حاصل از نمونه های تیمار نشده می باشد. علت این امر ناشی از حفظ ساختار فیزیکی خلال و افزایش روزنه درغشای سلول و عدم بهم چسبیدن بافت‌های چغندر پی از اعمال میدان الکتریکی و در مقابل تخریب کامل بافت و ساختمان فیزیکی سلول‌های چغندر و ایجاد کلوخه و گیر افتادن رطوبت و مواد قندی در داخل آن است. به عبارت دیگر هنگامی که به منظور استحصال قند فرآیند حرارتی اعمال شود، حرارت باعث تخریب کامل سلول‌های چغندر و خروج محتویات قندی می شود و به همراه آن ترکیبات دیواره سلولی مثل پکتین، پروتئین و ترکیبات سلولزی تخریب و لهیده شده نه تنها وارد شربت می شوند بلکه در تفاله به صورت یک توده خمیری شکل به هم چسبیده باقی می ماند. بهم چسبیدن این بافت خمیری سبب گیر افتادن بخشی از شربت و محتویات قندی شده و سبب می شود که عمل استحصال شربت در پرس با اشکال صورت گیرد و راندمان استحصال کاهش می یابد. در نتیجه مواد قندی و رطوبت موجود در

اثر میدان الکتریکی بر مقدار و سرعت خشک شدن

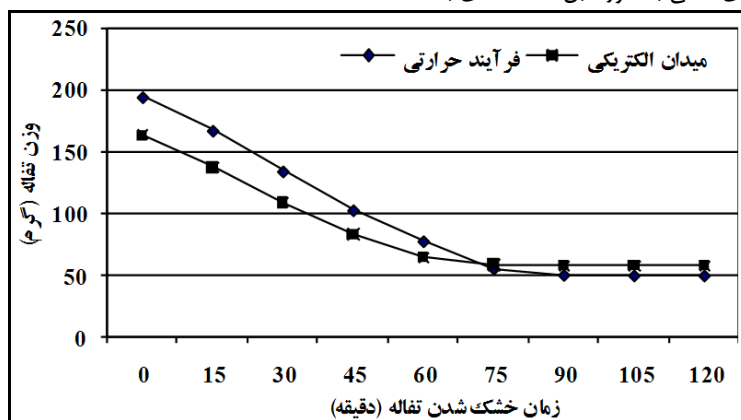
تفاله باقیمانده

به منظور حصول شربت با درصد قند بالا خلال ها پس از تیمار با PEF در سه مرحله پرس شدند با اندازه گیری قند یه دست آمده نسبت به استخراج با تیمار حرارتی سرعت استخراج قند ۲ تا ۳ برابر سریعتر از زمانی است که تیمار حرارتی در ۸۰°C اعمال می شود. علاوه بر این، وزن شربت استخراج شده در این فرآیند ۴۰ درصد بیشتر از وزن نمونه اولیه بود. در این آزمایشات مشخص گردید که تیمار PEF سبب افزایش استخراج قند در مقایسه با نمونه های کنترل و تیمار نشده در اندازه های خلال مشابه می گردد. در حین عمل پرس کردن بیشترین میزان شربت در اولین مرحله پرس به دست می آید (Jemai et al., 2003 و Maskooki & Eshtiaghi, 2010). Lopez et al., (2009) نشان دادند که راندمان استخراج ساکارز با شدت میدان، زمان استخراج و درجه حرارت افزایش می یابد. استفاده از ۲۰ پالس در ۷ kV/cm و بالاخره درجه حرارت دارای اثرات قابل ملاحظه ای هستند. استفاده از ۲۰ پالس در ۷kV/cm (۳/۹ kJ/kg) راندمان را در مقایسه با نمونه های شاهد بین ۷-۱/۶ برای درجه حرارت های ۷۰-۲۰°C افزایش می دهد.

است و به دلیل خروج بیش از ۹۷ درصد شربت خام پس از اولین مرحله پرس با محاسبات اقتصادی برای ادامه فرآیند حتی می توان از پرس های اضافی صرفنظر نمود. آزمایشات قبلی نشان دادند که مقدار انرژی الکتریکی مورد نیاز برای تخریب کامل سلول ها با کاهش درجه حرارت افزایش پیدا می کند بنابراین فرآیند بهینه ای بایستی انتخاب گردد که هزینه های اعمال PEF و پیش حرارت دادن چغندرها در یک کارخانه مورد ارزیابی قرار گیرد. هرچند گرم کردن چغندر در جریان خط تولید در یک کارخانه رقم قابل توجهی را تشکیل نمی دهد. بنابراین اگر چغندرها به قطعات کوچکتر تبدیل می شود و به صورت خلال در آیند استخراج در زمان کوتاه تری انجام شده و این فرآیند می تواند به افزایش تدریجی دما در مقیاس مورد نظر کمک نماید تا نیازی به گرم کردن چغندر ها نباشد. علاوه بر این حمل و نقل خلال در کارخانه آسانتر است. هم چنین تفاله حاصل از اعمال میدان الکتریکی با سرعت بیشتری خشک می شود که از نظر اقتصادی در افزایش بهره وری و صرفه جویی انرژی مؤثر است.

تشکر و قدردانی

طرح تحقیقاتی استخراج قند از چغندر قند با استفاده از میدانهای الکتریکی پالسی قوی با حمایت مالی، فنی و خدماتی صندوق حمایت از پژوهشگران و با نظارت علمی و فنی اساتید بزرگوار دکتر محمدرضا شکرانی و دکتر رسول کدخدایی، مشاوره تخصصی استاد دکتر سید علی مرتضوی و مهندس محمد باقر باقرزاده، همکاریهای آزمایشگاهی، فنی و علمی آقایان دکتر عباس پورزکی و خانم مهندس زهره کاظمی اجرا شده است. بدینوسیله از حمایتهای مالی، فنی و خدماتی صندوق حمایت از پژوهشگران ریاست جمهوری، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی خراسان رضوی و دانشکده مهندسی دانشگاه مایهدول تایلند و مرکز بررسی، آموزش و تحقیقات قند و چغندر قند برای اجرای این پروژه قدردانی می گردد.



شکل ۸- کاهش وزنی تفاله های تیمار شده با PEF نسبت به تفاله های تیمار شده با فرآیند حرارتی در طول زمان بعد از سه مرحله پرس.

تفاله افزایش می یابد و دیرتر خشک می شود. . این در حالی است که در روش استخراج با میدانهای الکتریکی به دلیل انجام عملیات در دمای معمول تخریب و نفوذپذیری سلول به نحوی است که ساختمان فیزیکی خلال سالم می ماند و فقط متخلخل و نفوذ پذیر می شود. این حالت باعث می شود که فقط ترکیبات محلول مثل قندها و املاح خارج شده و بقیه ترکیبات سلولی وارد شربت نشوند و در نتیجه عملیات پرس ساده تر انجام شود و تفاله حاصل رطوبت و مواد قندی کمتری داشته باشد و سریعتر خشک شود (Vorobiev & Lebovka, 2008). بدیهی است که انتقال حرارت و جرم در نمونه های تیمار شده توسط PEF با سهولت بیشتری انجام و سرعت خشک شدن افزایش می یابد (Ade-Omowaye et al., 2001 و Ade-Omowaye et al., 2002).

نتیجه گیری

بطور خلاصه می توان گفت که جایگزینی فرآیند غیر حرارتی PEF بجای فرآیند حرارتی برای تخریب بافت های چغندر در خط تولید کارخانه های تولید قند از چغندر قند دارای فواید بیشماری است. دو مقوله عمده برای صرفه جویی انرژی با اضافه کردن مرحله الکتروپوراسیون در این کارخانه ها وجود دارد. اولاً: استخراج می تواند در درجه حرارت های پایین و با نسبت شربت به وزن چغندر کمتری انجام شود ثانیاً تغییر عمده ای در سایر قسمت های کارخانه ایجاد نمی گردد. اندازه خلال در فرآیند استحصال قند با پیش فرآوری توسط اعمال میدانهای الکتریکی نقش عمده ای دارد. به دلیل این که خلال های نازک تحت اثر میدان قابلیت نفوذ بیشتری پیدا می کنند لذا خروج مواد قندی بیشتری در مرحله پرس دارند و علاوه بر این چون فرآیند میدان الکتریکی برخلاف فرآیند حرارتی سبب لهیدگی و تخریب کامل سلولهای چغندر نمی گردد لذا تشکیل کلوخه مرطوب و گیر افتادن شربت درون تفاله اتفاق نمی افتد و در نتیجه راندمان استحصال در مقایسه با روشهای سنتی به طور قابل ملاحظه ای بالا

منابع

- Ade-Omowaye, B.I. O., Angersbach, A., Eshtiaghi, N. M., & D. Knorr, 2001. Impact of high intensity electric field pulses on cell permeabilisation and as pre-processing step in coconut processing. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 1, Pp 203-209
- Ade-Omowaye, B. I. O., Taiwo, K. A., Eshtiaghi, N. M., Angersbach, A. and D. 2003. Knorr, Comparative evaluation of the effects of pulsed electric field and freezing on cell membrane permeabilisation and mass transfer during dehydration of red bell peppers. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4. Pp.177-188.
- Ade-Omowaye, B. I. O., Rastogi, N. K., Angersbach, A., & D. Knorr, 2002. Osmotic dehydration of bell peppers: influence of high intensity electric field pulses and elevated temperature treatment. *Journal of Food Engineering*, 54, Pp. 35-43.
- Barbosa-Cánovas, G.V., Nieto Gongora, M. M., Pothakamury, U. R. and B.G. Swanson. 1999. Preservation of foods with pulsed electric fields Academic Press Ltd. London(). pp. 1-9, 76-107, Pp.108-155
- Bluhm H., and M. Sack, 2009. Industrial-Scale Treatment of Biological Tissues with Pulsed Electric Fields Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Institute for Pulsed Power and Microwave Technology, Postfach 3640, D-76021. Karlsruhe
- De Vito, F., G., Lebovka, N. I., Shynkaryk N.V. and E. Vorobiev 2008. Pulse Duration and Efficiency of Soft Cellular Tissue Disintegration by Pulsed Electric Fields *Food Bioprocess Technol.* 1. Pp. 307-313
- Dunn, J. E. and Pearlman, J. S. 1987. Methods and apparatus for extending the shelf-life of fluid food products. Maxwell Laboratories, Inc. U. S. Patent 4,695,472.
- Dunne, C. P., Dunn, J., Clark, W., Ott, T. and Bushnell, A. H. 1996. Application of high energy electric field pulses to preservation of foods for combat rations. *Science and Technology for Force XXI*. Department of the Army. Norfolk, Virginia. 5, Pp.24-27.
- El-Belghiti, K., Rabhi, Z. and E. Vorobiev, 2005a. Effect of centrifugal force on the aqueous extraction of solute from sugar beet tissue pretreated by a pulsed electric field. *Journal of Food Process. Engineering*. 28, Pp 346-358.
- El-Belghiti, K. و Rabhi, Z. and E. Vorobiev, 2005b. Kinetic model of sugar beet diffusion from sugar beet tissue treated by pulsed electric field. *The sagkood Agric*, vol85, Pp. 213-218
- Eshtiaghi, M.N. and D. Knorr, 2000a. Anwendung elektrischer Hochspannungs impulse zum Zellaufschluss bei der Saftgewinnung am Beispiel von Weintrauben. *LVT*, 45, Pp. 23-27.
- Eshtiaghi, M.N. and D. Knorr, 2000b. Application of high electrical pulsed field for cell disintegration and sucrose extraction from sugar beet. International patent No: WO, 0996434
- Eshtiaghi, M. N. and D. Knorr, 2002. High electric field pulse pretreatment: Potential for sugar beet processing. *J. Food Engineering*, 52, Pp. 578-583.
- Jaeger, H., Balasa, A. and D. Knorr, 2008. Food Industry Applications for Pulsed Electric Fields *Electrotechnologies for Extraction from Food Plants and Biomaterials*, DOI:10.1007/978-0-387-79374-0, 7, C. Springer Science, Business Media, LLC
- Jemai, A.B. and E. Vorobiev, 2003. Enhanced leaching from sugar beet cassettes by pulsed electric field *Journal of Food Engineering* 59. Pp 405-412.
- Jemai, A.B. and E. Vorobiev, 2006. Pulsed Electric Field assisted Pressing of Sugar Slices: Toward a novel process of cold juice extraction *Biosystems Engineering* 93,1, pp57-68.
- Jeyamkondan, S., Jayas D. S. and R. A. Holley. 1999. Pulsed electric field processing of foods: a review. *J Food Protect.* 62, Pp. 1088-1096
- Knorr, D., Angersbach, A., Eshtiaghi, M.N. Heinz, V., and D. U. Lee, 2001. Processing concepts based on high intensity electric field pulses. *Trends in Food Science and Technology*, 12. Pp.129-135.
- Knorr, D., and A. Angersbach, 1998. Impact of high electric field pulses on plant membrane permeabilization. *Trends Food Sci. Technol.* 9. Pp.185-191.
- Knorr, D., Geulen, M., Grahl, T., & W. Sitzmann, 1994. Food application of high electric field pulses. *Trends in Food Science and Technology*, 5, Pp. 71-75.
- Lopez, N., Puertolas, E., Condo, S., Raso Javier, n., A. and I. Ivarez, 2009. Enhancement of the solid-liquid extraction of sucrose from sugar beet (*Beta vulgaris*) by pulsed electric fields. *LWT - Food Science and Technology* 42, Pp. 1674-1680
- Maskooki, A.M. and Eshtiaghi M.N. Effect of Various Pulsed Electric Fields Conditions on Extraction of Sugar from Sugar Beet. 2010, *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, Vol 5, No 2. Pp.151-162

- Quass, D.W., 1997. Pulsed electric field processing in the food industry. A status report on PEF. Palo Alto, CA. Electric Power Research Institute. CR-109742.
- Rastogi, N.K., , Eshtiaghi, M.N.and D. Knorr,1999. Accelerated Mass Transfer During Osmotic Dehydration of High Intensity Electrical Field Pulse Pretreated Carrot of food science ,Volume 64, 6, Pp. 1020- 1023
- Vega-Mercado, H., Gongora, M. M. -Nieto, G. V., Barbosa- Cánovas, G.V and B. G. Swanson1999. Nonthermal preservation of liquid foods using pulsed electric fields. Handbook of Food Preservation. Marcel Dekker, Inc. New York ..
- Vorobiev, E. and Lebovka ,N. 2008, Pulsed-Electric-Fields-Induced Effects in Plant Tissues: Fundamental Aspects and Perspectives of Applications Electro technologies for Extraction from Food Plants and Biomaterials, DOI: 10.1007/978-0-387-79374-0 2, C .Springer Science+Business Media, LLC
- Zimmerman, U., 1986. Electrical breakdown, electropermeabilization and electrofusion. Rev Physiol BioChem Pharmacol. 105 ,pp. 175-256

Comparison of Pulse Electric Field and Thermal Processing on Mass Transfer in Sugar Extraction from Sugar Beet

A. Maskooki^{1*} - M. N. Eshtiaghi²

Received: 15-01-2011

Accepted: 10-08-2011

Abstract

The effect of pulse electric field on mass transfer in sugar beet cossettes with different thicknesses were investigated and compared with traditional thermal processing. Two kinds of sugar beet cossettes 3 ± 0.5 cm and 2 ± 0.5 thicknesses with 3–5 cm long subjected to Pulse electric field (3kV, 8 μ F, and 20 pulse) and compared with heat treated samples (80°C for 15 minutes) as conventional thermal processing. All treated samples were pressed at 20 Bar (2Mpa) using laboratory press. Brix, electrical conductivity as mass transfer index, yield and drying rate of pulp for each treatment were evaluated. Further to statistical analysis, the results showed that the Brix and electrical conductivity as well as juice yield in PEF treated samples especially in thin cossettes were two times higher than thermal treated samples. The majority of juice extracted in the first step of pressing process. In addition, the drying rate of pulp amount in PEF treated samples was significantly higher than thermal treated one. This phenomenon can be due to keeping of physical structure of cossettes and increasing of porosities of PEF treated beet cells versus decomposed cell structure and lump formation which led to prevent the moisture release in thermal treated samples.

Keywords: Pulse electric fields, Mass transfer, Sugar beet, Brix, Electrical conductivity

1- Assistant Prof., Food Technology Dept. of Khorasan Research Institute for Food Science and Technology.

(*- Corresponding author Email: maskooki@yahoo.com)

2- Prof., Food Technology Dept. of Chemical Engineering, Mahidol University, Thailand.