การผลิตกรดแอลแลกติกโดยวิธีตรึงเซลล์เชื้อรา *Rhizopus oryzae* ในถังหมักแบบเบดสถิต

นายนวกร โชติศุภอนันต์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF L(+)-LACTIC ACID BY IMMOBILIZED *Rhizopus oryzae*

IN A STATIC BED BIOREACTOR

Mr. Nawakorn Chotisubha-anandha

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

511726

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตกรดแอลแลกติกโดยวิธีตรึงเซลล์เชื้อรา *Rhizopus oryzae* ในถังหมักแบบเบดสถิต
โดย	นายนวกร โชติศุภอนันต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ดร. ณัฏฐา ทองจุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์วาสนา โตเลี้ยง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

รองคณบดีฝ่ายบริหารรักษาการแทน

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. วิมลวรรณ พิมพ์พันธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ดร. ณัฏฐา ทองจุล)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์วาสนา โตเลี้ยง)

.... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์)

.... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

นายนวกร โชติศุภอนันต์ : การผลิตกรดแลกติกโดยวิธีตรึงเซลล์เชื้อรา *Rhizopus oryzae* ในถังหมักแบบเบดสถิต. (PRODUCTION OF L(+)-LACTIC ACID BY IMMOBILIZED *Rhizopus oryzae* IN A STATIC BED BIOREACTOR) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ดร. ณัฏฐา ทองจุล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อ.วาสนา โตเลี้ยง, 119 หน้า.

ในงานวิจัยศึกษาการผลิตกรดแอลแลกติกจากกลูโคสโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในการหมักระดับขวดเขย่าและในถังหมักแบบเบดสถิต เมื่อทำการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง พบว่า สปอร์ของ *R. oryzae* จะเริ่มเจริญไปเป็นเซลล์ด้วยอาหารเพื่อการเจริญ และในอาหารเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์ เซลล์จะผลิตกรดแลกติกได้สูงในช่วงที่พีเอชเท่ากับ 6.0 และศึกษาชนิดของด่างที่ใช้ในการควบคุมค่าพีเอชที่มีผลต่อลักษณะสัณฐาน การเจริญและการผลิตกรดแลกติกด้วยการหมักแบบเซลล์แขวนลอยระดับขวดเขย่าที่ 30 องศาเซลเซียส 200 รอบต่อนาที โดยเปรียบเทียบระหว่างโซเดียมไฮดรอกไซด์กับแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่า แคลเซียมคาร์บอเนตสามารถควบคุมค่าพีเอชได้ดีและผลิตกรดแลกติกได้สูง แต่อย่างไรก็ดี เนื่องจากค่าการละลายของแคลเซียมคาร์บอเนตมีค่าต่ำ ดังนั้น ในกระบวนการหมักระดับถังหมักจะก่อให้เกิดปัญหาในเรื่องของการไม่ละลายน้ำ จึงส่งผลให้การเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์นั้นทำได้ยาก ดังนั้น เพื่อลดปัญหาดังกล่าว ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อใช้เป็นสารปรับค่าพีเอชในกระบวนการหมัก เนื่องจากปัญหาทางด้านสัณฐานของเชื้อราที่ยากต่อการควบคุมในกระบวนการหมักแบบเซลล์แขวนลอยในถังกวน ทำให้เกิดการคิดค้นและพัฒนาถังถังหมักแบบเบดสถิตขึ้น โดยศึกษาเส้นใยที่ใช้สำหรับตรึงเซลล์ พบว่า ผ้าฝ้ายชนิดที่ถักหรือผ้าขนหนู มีลักษณะโครงสร้างและพื้นผิวที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรึงของเซลล์ ซึ่งผ้าฝ้ายชนิดที่ถักจะถูกตรึงกับตัวเบดสถิตที่ยึดกับฝาบนของถังกวนทำให้มีพื้นที่มากพอที่ทำให้สปอร์ของเชื้อรามาเกาะและเจริญไปเป็นเซลล์ในอาหารเพื่อการเจริญ และยังพบว่า การหมักในถังหมักแบบเบดสถิตนั้นช่วยเพิ่มการส่งผ่านของออกซิเจนหรือค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนเพิ่มขึ้นถึง 4 เท่า และช่วยเพิ่มปริมาณของกรดแลกติกได้ เมื่อเทียบกับการหมักในถังกวนที่สภาวะเดียวกัน อย่างไรก็ดี ค่าแอคติวิตีจำเพาะของแลกเตทดีไฮโดรจีเนสในการหมักแบบเซลล์แขวนลอยในถังกวนมีค่าสูงกว่าการหมักแบบตรึงเซลล์ในถังหมักแบบเบดสถิต

สาขาวิชา.........เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต ....

ปีการศึกษา.................2551.............. ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม..

487 23314 23 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: LACTIC ACID / *Rhizopus oryzae* / STATIC BED BIOREACTOR

NAWAKORN CHOTISUBHA-ANANDHA : PRODUCTION OF L(+)-LACTIC ACID BY IMMOBILIZED *Rhizopus oryzae* IN A STATIC BED BIOREACTOR. THESIS PRINCIPAL ADVISOR : NUTTHA THONGCHUL, Ph.D. THESIS COADVISOR : VASANA TOLIENG, 119 pp.

L-lactic acid fermentation from a simple glucose medium by *Rhizopus oryzae* NRRL 395 was studied in both a shaken flask and a static bed bioreactor. Batch fermentation of *R. oryzae* consisted of a growth phase when spores started to germinated and initial cell growth occurred and a production phase when lactic acid was produced at the optimal pH of 6.0. The effects of neutralizing agent on fungal morphology, growth, and product formation were observed in a free cell culture in the shaken flask at 30 °C, 200 rpm. Compared with NaOH, $CaCO_3$ with low solubility in the fermentation medium gave a higher lactic acid production. However, using $CaCO_3$ in the fermentation especially in a large scale is cumbersome in terms of the solubility and product recovery. Therefore, NaOH was used as the neutralizing agent later in this study. To minimize the difficulty in controlling the filamentous morphology, the static bed bioreactor was constructed by modifying a stirred tank bioreactor. Among 4 fibrous matrices studied, woven cotton (cotton towel) provided the best preferential surface for cell immobilization. The woven cotton fibrous matrix, affixed to the top plate of the stirred tank bioreactor, provided enough space for spore immobilization and cell growth. This resulted in cell free medium, better oxygen transfer as observed from c.a. 4 fold increases in K_La values compared to those in the stirred tank bioreactor operated at the same conditions, and eventually enhanced lactic acid fermentation. Nevertheless, specific lactate dehydrogenase (LDH) activity of free cells in the stirred tank bioreactor was much higher than that of immobilized cells in the static bed bioreactor.

Field of Study : ......Biotechnology...... Student's Signature....Nawakorn Ch.....

Academic Year : ....2008......... Principal Advisor's Signature....Nuttha Thongchul....

Co-advisor's Signature.....Vasana Tolieng.......

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาในหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต ซึ่งสำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์อย่างดียิ่งจาก ดร. ณัฏฐา ทองจุลและอาจารย์วาสนา โตเลี้ยง ที่กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาทางวิชาการ ในการทำวิจัยตลอดการทำวิทยานิพนธ์นี้รวมทั้งแนะนำเรื่องระเบียบวินัย การใช้ชีวิตในสังคม ตลอดจนอบรมตักเตือน แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในตัวของข้าพเจ้าและกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ถูกต้อง จึงขอขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และ รองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และ รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์ คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ขอกราบขอบพระคุณ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ข้อมูลความรู้ทางวิชาการ การช่วยเหลือในด้านการทำวิจัยและคำแนะนำการจัดทำวิทยานิพนธ์ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ถูกต้อง

ขอขอบคุณ รุ่นพี่ทุกคน นักวิจัย และบุคลากรทุกท่านของสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ความอนุเคราะห์ในเรื่องอุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือในการทำวิจัย ตลอดจนคำแนะนำต่างๆที่เป็นประโยชน์แก่ข้าพเจ้า

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และบรรดาเครือญาติทุกๆคนที่คอยเป็นกำลังใจสำคัญช่วยผลักดันให้ข้าพเจ้าได้ก้าวเดินมาจนถึง ณ จุดนี้ได้ อีกทั้งยังให้การสนับสนุนในทุกๆด้านด้วยดีเสมอมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
คำย่อและสัญลักษณ์ที่ใช้	ฌ
บทที่	
1. บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 กรดแลกติก	5
2.2 ประโยชน์ของกรดแลกติก	7
2.3 การผลิตกรดแลกติก	8
2.3.1 กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี	8
2.3.2 กระบวนการหมัก	10
2.4 วิถีเมแทบอลิซึมของ *R. oryzae*	15
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก	16
2.5.1 สารอาหาร	16
2.5.2 สัณฐานวิทยา	19
2.5.3 การตรึงเซลล์	23
2.5.4 พีเอช	28
2.5.5 การให้อากาศ	28
2.5.6 อุณหภูมิ	29
2.5.7 ระบบการหมัก	30

บทที่ หน้า

2.5.8 ชนิดของถังหมัก.. 32

2.6 การออกแบบและพัฒนาถังหมัก.. 35

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.. 42

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี.. 42

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์.. 42

3.1.2 สารเคมี.. 44

3.2 เชื้อจุลินทรีย์และการเตรียมกล้าเชื้อ.. 45

3.2.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย... 45

3.2.2 วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์... 45

3.3.3 การเตรียมกล้าเชื้อ.. 45

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมัก.. 46

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย... 47

3.4.1 การหมักในระดับขวดเขย่า... 47

3.4.2 กระบวนการผลิตกรดแลกติกในถังหมัก 5 ลิตร... 48

3.5 วิธีการวิเคราะห์.. 49

3.5.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง.. 49

3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก กรดฟูมาริก เอทานอล ปริมาณน้ำตาล กลูโคสด้วยเครื่อง HPLC.. 49

3.5.3 การเตรียมตัวอย่างส่วนใส (Crude extract).. 50

3.5.4 การหาค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจน.. 51

3.5.5 Scanning electron microscope (SEM).. 52

4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง... 53

4.1 เปรียบเทียบด่างที่ใช้ในการควบคุมพีเอชในการหมักระดับขวดเขย่าแบบเซลล์แขวนลอย... 53

4.2 การคัดเลือกเส้นใยที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติก... 59

4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึงของ *R. oryzae* ในถังหมักแบบเบดสถิตโดยเปรียบเทียบกับการหมักโดยเซลล์แขวนลอยในถังกวน...... 67

4.3.1 การหมักแบบเซลล์แขวนลอยในถังกวน.. 67

4.3.2 การหมักด้วยวิธีตรึงเซลล์เชื้อรา *R. oryzae* ในถังหมักแบบเบดสถิต................. 76

บทที่ หน้า

4.3.3 ลักษณะสัณฐานของเชื้อราในภาวะการตรึงเซลล์ในถังหมักแบบเบดสถิตกับเซลล์แขวนลอยในถังกวน........ 83
4.3.4 วิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวและโครงสร้างของ *R. oryzae* ที่ยึดตรึงบนเส้นใยในถังหมักแบบเบดสถิต........ 84
4.4 ศึกษาแอกติวิตีของแลกเตทดีไฮโดรจีเนสของเซลล์แขวนลอยในถังกวนและเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิต........ 88
5. สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ........ 91
รายการอ้างอิง........ 94
ภาคผนวก........ 102
ภาคผนวก ก........ 103
ภาคผนวก ข........ 105
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์........ 119

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คุณสมบัติของกรดแลกติก	6
2.2	เปรียบเทียบกระบวนการหมักระหว่าง *Lactobacillus sp.* กับ *R. oryzae*	13
2.3	เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกระหว่าง *Lactobacillus sp.* กับ *R. oryzae*	14
2.4	ลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก	21
2.5	การหมักกรดแลกติกด้วยเซลล์แขวนลอยในระดับขวดเขย่า	24
2.6	การผลิตกรดแลกติกจากกระบวนการหมักโดยเซลล์แขวนลอยในถังกวน	25
2.7	การหมักกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงในระดับขวดเขย่า	26
2.8	การยึดตรึงเซลล์เชื้อรา *R. oryzae* ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก	27
2.9	การผลิตกรดแลกติกด้วยกระบวนการหมักแบบต่างๆ ด้วยเชื้อแบคทีเรีย	31
4.1	เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกของด่างในการหมักแบบเซลล์แขวนลอยระดับขวดเขย่าปริมาตร 50 มิลลิลิตร	58
4.2	เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกในการหมักระดับขวดเขย่าแบบเซลล์แขวนลอยปริมาตร 50 มิลลิลิตรกับเซลล์ตรึงบนเส้นใยชนิดต่างๆปริมาตร 50 มิลลิลิตร	66
4.3	เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกในการหมักแบบเซลล์แขวนลอยในถังกวนที่สภาวะต่างๆที่มีน้ำหมักปริมาตร 3 ลิตร	75
4.4	เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกในการหมักแบบเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิตที่สภาวะต่างๆที่มีน้ำหมักปริมาตร 3 ลิตร	82
4.5	ค่าแอกติวิตีจำเพาะของแลกเตทดีไฮโดรจีเนสของเซลล์แขวนลอยในถังกวนกับเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิตปริมาตร 3 ลิตร	90
ข.1	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดแลกติกกับกลูโคสในอาหารเพื่อการเจริญ	105
ข.2	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดแลกติกกับกลูโคสในอาหารเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์	106
ข.3	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอลกับกลูโคสในอาหารเพื่อการเจริญ	107
ข.4	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอลกับกลูโคสในอาหารเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์	108
ข.5	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดแลกติกกับเวลาในอาหารเพื่อการเจริญ	109
ข.6	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดแลกติกกับเวลาในอาหารเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์	110

ตารางที่ หน้า

ข.7 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอลกับเวลาในอาหารเพื่อการเจริญ........... 111
ข.8 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอลกับเวลาในอาหารเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์.. 112
ข.9 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเวลากับ DO และค่า C_L ในการหมักแบบเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิต ที่อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.50 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที... 117

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของกรดดี (-)-และแอล (+)-แลกติก	5
2.2	เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีและกระบวนการหมัก	9
2.3	เมแทบอลิซึมการผลิตกรดแลกติกแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟและเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟจากแลกติกแอซิดแบคทีเรีย	11
2.4	ลักษณะของเชื้อรา *R. oryzae*	12
2.5	กระบวนการเมแทบอลิซึมของกลูโคสในเชื้อรา *R. oryzae*	16
2.6	ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อรา	20
2.7	ลักษณะของถังกวน (Stirred-tank reactor)	32
2.8	ลักษณะของถังหมักแบบ Packed bed	33
2.9	ลักษณะของถังหมักแบบ Air-lift	34
2.10	ลักษณะของถังหมักแบบ Bubble column	35
2.11	ลักษณะของถังหมักแบบ Three-phase Fluidized bed	36
2.12	ลักษณะของถังหมักแบบ Packed bed ที่ใช้ในการตรึงเซลล์แบคทีเรีย	37
2.13	ลักษณะของถังหมักแบบ Packed bed biofilm reactor (PBBR)	38
2.14	ถังหมักแบบ Tubular loop bioreactor (TLB)	38
2.15	ลักษณะของ Plastic composite support (PCS)	39
2.16	แบบการทดลองในถังหมักแบบ Plastic composite support (PCS)	39
2.17	ถังหมักแบบ Semi-fixed packing	40
2.18	ถังหมักแบบ 2 ระบบ (Two-stage systems)	40
2.19	ลักษณะของถังหมักแบบ Rotating fibrous-bed (RFB)	41
3.1	ลักษณะของ Haemacytometer	46
3.2	ลักษณะของถังหมักแบบเบดสถิต	48
3.3	ค่าการละลายของออกซิเจนภายในถังหมักด้วยเทคนิค Gassing out	52
4.1	ลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ในการหมักระดับขวดเขย่าแบบเซลล์แขวนลอยที่ปรับความเป็นกรดด่างด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตและโซเดียมไฮดรอกไซด์	54
4.2	จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติก โดยเปรียบเทียบด่างที่ใช้ในการควบคุมความเป็นกรดด่างในการหมักระดับขวดเขย่าแบบเซลล์แขวนลอยระหว่างแคลเซียมคาร์บอเนตและโซเดียมไฮดรอกไซด์	55

รูปที่ หน้า

4.3 ลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ในการหมักแบบเซลล์แขวนลอยและแบบเซลล์ตรึงบนเส้นใยชนิดต่างๆได้แก่ ผ้าฝ้ายชนิดที่ถักและชนิดที่ไม่ถัก...... 60
4.4 จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกในการหมักระดับขวดเขย่าแบบเซลล์แขวนลอย........ 60
4.5 เปรียบเทียบจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกระดับขวดเขย่าแบบเซลล์ตรึงบนผ้าฝ้ายชนิดที่ถักและชนิดที่ไม่ถัก........ 61
4.6 ลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ในการหมักแบบเซลล์ตรึงบนเส้นใยพอลิเอสเทอร์ชนิดที่ถักและชนิดที่ไม่ถัก........ 62
4.7 เปรียบเทียบจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกระดับขวดเขย่าแบบเซลล์ตรึงบนผ้าพอลิเอสเทอร์ชนิดที่ถักและไม่ถัก........ 63
4.8 วิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างของเส้นใยชนิดต่างๆผ้าฝ้ายชนิดที่ถักและชนิดที่ไม่ถักและพอลิเอสเทอร์ชนิดที่ถักและชนิดที่ไม่ถักด้วยเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 800 เท่า........ 65
4.9 ลักษณะโครงสร้างของเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดที่ถักวิเคราะห์ด้วยเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 100 เท่าและกำลังขยาย 1000 เท่า........ 65
4.10 ลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* แบบเซลล์แขวนลอยในถังกวนที่อัตราการกวน 100 และ 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที........ 68
4.11 การหมักแบบเซลล์แขวนลอยในถังกวนที่อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที การให้อากาศเท่ากับ 0.50 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที..... 69
4.12 การหมักแบบเซลล์แขวนลอยในถังกวนที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที การให้อากาศเท่ากับ 0.50 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที..... 70
4.13 ลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* แบบเซลล์แขวนลอยในถังกวนที่อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที การให้อากาศเท่ากับ 0.5 และ 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที........ 71
4.14 การหมักแบบเซลล์แขวนลอยในถังกวนที่อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที การให้อากาศเท่ากับ 0.50 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที... 72
4.15 การหมักแบบเซลล์แขวนลอยในถังกวนที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศเท่ากับ 0.50 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที... 73

รูปที่ หน้า

4.16 การหมักแบบเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิตที่อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.50 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที........ 77

4.17 การหมักแบบเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิตที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.50 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที........ 78

4.18 การหมักแบบเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิตที่อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.50 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที........ 79

4.19 การหมักแบบเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิตที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.50 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที........ 81

4.20 แสดงลักษณะสัณฐานของเซลล์แขวนลอยในถังกวนและลักษณะสัณฐานของเชื้อรา *R. oryzae* ที่ถูกตรึงในถังหมักแบบเบดสถิต........ 83

4.21 ลักษณะการยึดเกาะของ *R. oryzae* บนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่บริเวณด้านนอกของเบดสถิตที่กำลังขยาย 350 เท่า สภาวะอัตราการกวน 300 500 และ 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที........ 85

4.22 ลักษณะการยึดเกาะของ *R. oryzae* บนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่บริเวณด้านในของเบดสถิตที่กำลังขยาย 350 เท่า สภาวะอัตราการกวน 300 500 และ 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที........ 86

4.23 ลักษณะการยึดเกาะของ *R. oryzae* บนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่บริเวณด้านในของเบดสถิตที่กำลังขยาย 750 เท่า สภาวะอัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที........ 87

ก.1 กราฟมาตรฐานโปรตีน........ 103

ก.2 กราฟมาตรฐานของ NADH........ 104

ข.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดแลกติกกับกลูโคสในอาหารเพื่อการเจริญ........ 105

รูปที่ หน้า

ข.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดแลกติกกับกลูโคสในอาหารเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์...... 106
ข.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอลกับกลูโคสในอาหารเพื่อการเจริญ...... 107
ข.4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอลกับกลูโคสในอาหารเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์...... 108
ข.5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดแลกติกกับเวลาในอาหารเพื่อการเจริญ...... 109
ข.6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดแลกติกกับเวลาในอาหารเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์...... 110
ข.7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอลกับเวลาในอาหารเพื่อการเจริญ...... 111
ข.8 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอลกับเวลาในอาหารเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์...... 112
ข.9 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหาร (C_L) กับ เวลา (วินาที)...... 114
ข.10 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง C_L กับ เวลา (วินาที)...... 114
ข.11 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $dC_L/dt+OUR$ กับ C_L...... 116

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	เปอร์เซ็นต์
ml	มิลลิลิตร
L	ลิตร
mg	มิลลิกรัม
g	กรัม
g/L	กรัมต่อลิตร
w/v	น้ำหนักต่อปริมาตร
h	ชั่วโมง
M	โมลาร์
GM	อาหารเพื่อการเจริญ
PM	อาหารเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์
U	หน่วยของเอนไซม์
mg Protein	มิลลิกรัมโปรตีน
OD	ค่าการดูดกลืนแสง
g/L·h	กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง
g/L·d	กรัมต่อลิตรต่อวัน
g/g	กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมซับสเตรท
rpm	รอบต่อนาที
vvm	ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที