จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การผลิตกรดแอล-แลกติกจากกากมันสำปะหลังโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ในระดับนำร่อง

โดย

ณัฏฐา ทองจุล

วาสนา โตเลี้ยง

ศิริพร อุ่นแอบ

มีนาคม 2555

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การผลิตกรดแอล-แลกติกจากกากมันสำปะหลังโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ในระดับนำร่อง

โดย

ณัฏฐา ทองจุล
วาสนา โตเลี้ยง
ศิริพร อุ่นแอบ

มีนาคม 2555

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความร่วมมือของคณะผู้วิจัย เงินทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ที่อนุเคราะห์สถานที่ และบุคลากรด้านเทคนิคเพื่อสนับสนุนงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ นายนวกร โชติศุภอนันต์ ที่ได้เริ่มดำเนินการศึกษาวิจัยการหมักกรดแอล-แลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต ผลงานวิจัยเบื้องต้นของคุณนวกรนับว่ามีประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการต่อยอดในงานวิจัยนี้

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณบริษัท เอี่ยมบูรพา จำกัด และบริษัท แป้งมันเอี่ยมเฮงอุตสาหกรรม จำกัด ที่กรุณาอนุเคราะห์ตัวอย่างกากมันสำปะหลังสดเพื่อใช้ในงานวิจัยนี้ และบริษัท สยามวิคตอรี่เคมิคอล จำกัด ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยกากมันสำปะหลัง

ชื่อโครงการวิจัย การผลิตกรดแอล-แลกติกจากกากมันสำปะหลังโดยรา *Rhizopus oryzae* ในระดับนำร่อง

ชื่อผู้วิจัย อาจารย์ ดร.ณัฏฐา ทองจุล อาจารย์ วาสนา โตเลี้ยง นางสาวศิริพร อุ่นแอบ

เดือนและปีที่ทำวิจัยสำเร็จ กันยายน พ.ศ. 2554

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำกากมันสำปะหลังสดมาใช้ในการผลิตกรดแอล-แลกติกโดยราเส้นใย *R. oryzae* โดยเริ่มจากการทดลองหาภาวะที่เหมาะสมเพื่อจะนำไปใช้ในการออกแบบขยายสเกล โดยทำการหมักกรดแลกติกด้วยกลูโคส จากผลการทดลอง พบว่า ได้อัตราการผลิตกรดแลกติกจากกลูโคสสูงสุดที่อัตราการปั่นกวน 700 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ในการทดลองอีกส่วน ได้นำกากมันสำปะหลังสดที่ได้มาหาเทคนิคในการปรับสภาพที่เหมาะสมก่อนที่นำไปย่อยต่อด้วยเอนไซม์ จากผลการทดลองพบว่า เมื่อนำกากมันสำปะหลังมาปรับสภาพโดยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันก่อนนำไปย่อยต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และอะไมเลส จะทำให้ได้ปริมาณแป้งที่ดึงออกมาจากกากมันสำปะหลังสดได้มากที่กว่าเมื่อเทียบกับการปรับสภาพกากมันสำปะหลังด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป โดยภาวะในการปรับสภาพและการย่อยที่ได้กลูโคสสูงสุดที่ 0.6 กรัมกลูโคสต่อกรัมกากมันสำปะหลังแห้ง คือ การปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดันนาน 15 นาที โดยใช้สารละลายกากมันสำปะหลังในน้ำ (20 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง) จากนั้นนำกากมันที่ผ่านการปรับสภาพแล้วไปย่อยต่อด้วยเซลลูเลส (33.15 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง) นาน 6 ชั่วโมง และอะไมเลส (16.8 ยูนิตต่อกากมันแห้ง) นาน 15 นาที นอกจากนี้ ยังได้ทำการทดลองนำสารละลายกากมันสำปะหลังที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยด้วยเอนไซม์ที่ภาวะต่างๆ กันมาใช้ในการหมักกรดแลกติกเทียบกับการหมักโดยกลูโคส และแป้ง ซึ่งพบว่า สารละลายที่ได้จากการปรับสภาพกากมันสำปะหลังด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดันแล้วนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์สามารถนำมาใช้หมักกรดแลกติกได้ดีเทียบเคียงกับการใช้กลูโคสและแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ ยังมีการคำนวณเพื่อออกแบบขยายสเกลการหมักกรดแลกติกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพระดับ 5 ลิตร ไปเป็นระดับ 90 ลิตร โดยใช้เกณฑ์คงที่ในการคำนวณ 4 เกณฑ์ ได้แก่ ค่า Reynold's number (Re_i) ความเร็วปลายใบพัดกวน (u_i) กำลังมอเตอร์ต่อปริมาตร (P/V) และอัตราการไหลวนของน้ำหมักภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (F/V) เพื่อหาภาวะที่จะนำไปทดลองในการหมักกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตรต่อไป

Project Title Pilot scale production of L-lactic acid from raw cassava pulp by *Rhizopus oryzae*

Name of the Investigators Nuttha Thongchul, Ph.D., Vasana Tolieng, Siriporn Ounaeb

Year September 2011

Abstract

This research studied the possibility of using cassava pulp to produce L-lactic acid by filamentous fungus *R. oryzae*. Firstly, the optimal operating condition required in scale up calculation was determined during lactic acid fermentation by glucose. The result showed that the best suited operating condition was at 700 rpm and 0.5 vvm air. At this operating condition, the highest lactic acid yield and productivity were accomplished. The other experiment performed in this research was to determine the appropriate pretreatment process prior to the enzymatic hydrolysis of cassava pulp in order to achieve high glucose recovery from cassava pulp. It was found that only steam pretreatment under high temperature and pressure was sufficient for pretreating cassava pulp. Using steam pretreatment with the addition of NaOH did not ease enzymatic hydrolysis of the pretreated pulp. More glucose was recovered from the hydrolysis of steam pretreated cassava pulp. The highest glucose recovery yield achieved was 0.6 g glucose per g dry pulp when pretreated the cassava pulp with steam for 15 min followed by hydrolyzing with cellulase (33.15 unit per g dry pulp) for 6 h and amylase (16.8 unit per g dry pulp) for 15 min. Later the cassava pulp hydrolysates prepared by different techniques were used as the carbon source in lactic acid fermentation. The fermentation results were compared with those using glucose and soluble starch as the carbon source. It was observed that the hydrolysates obtained from steam pretreatment followed by enzymatic hydrolysis and the enzyme treated hydrolysate gave the comparable lactic acid yield and productivity to glucose and soluble starch. In addition, scale up calculation was performed for predicting the operating condition in the large scale culture using the data obtained from glucose fermentation in the 5 L bioreactor. 4 criteria were used in the calculation. Those included Reynolds' number (Re_i), impeller tip speed (u_i), power input per unit volume (P/V), and mixing time (F/V).

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iv
สารบัญ	v
รายการตารางประกอบ	vii
รายการภาพประกอบ	viii
รายการสัญลักษณ์	xiii
บทนำ	1
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
วัตถุประสงค์ของโครงการ	6
วิธีการวิจัย	6
การหาอัตราการกวนและการให้อากาศที่เหมาะสมในการหมักกรดแอล-แลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิตขนาด 5 ลิตร	6
สายพันธุ์ การเก็บรักษาสายพันธุ์ การเตรียมหัวเชื้อ และอาหารเลี้ยงเชื้อ	6
การหมักกรดแอล-แลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต	7
สัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน	7
ค่าจลนพลศาสตร์ของการหมัก	8
การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมกากมันสำปะหลัง	8
การปรับสภาพกากมันสำปะหลังก่อนการย่อยโดยเทคนิค physicochemical pretreatment	9
การย่อยเซลลูโลสและแป้งจากกากมันสำปะหลังที่ปรับสภาพแล้ว	9
การหมักกรดแอล-แลกติกจากสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง	10
การคำนวณหาปัจจัยทางวิศวกรรมที่เหมาะสมต่อการหมักกรดแอล-แลกติก	11
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	11
การหมักกรดแอล-แลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต	11
การปรับสภาพกากมันสำปะหลังโดยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน	12

หน้า

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล (ต่อ)
การปรับสภาพกากมันสำปะหลังโดยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับการใช้สารละลายแอลคาไลน์ 13
การย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน 13
การย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ 14
การหมักกรดแอล-แลกติกแบบเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิตจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ 15
ลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ที่ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต 15
จลนพลศาสตร์ของการหมักกรดแอล-แลกติกจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ โดย *R. oryzae* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต 18
ลักษณะการจัดเรียงตัวของเส้นใยของ *R. oryzae* บนวัสดุตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต 23
ปัจจัยทางวิศวกรรมที่เหมาะสมต่อการหมักกรดแอล-แลกติก 25
ข้อสรุป 28
ข้อเสนอแนะ 29
บรรณานุกรม 29

รายการตารางประกอบ

		หน้า
ตารางที่ 1	ปริมาณเซลล์ของ *R. oryzae* ในการหมักด้วยกลูโคส และอัตราการถ่ายเทออกซิเจนในกระบวนการที่อัตราการปั่นกวนและอัตราการให้อากาศต่างๆ กัน ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต	34
ตารางที่ 2	ผลของการปั่นกวนและการให้อากาศต่อการผลิตกรดแอล-แลกติกโดยเซลล์ตรึงของ *R. oryzae* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต	34
ตารางที่ 3	ผลของการปั่นกวนและการให้อากาศต่อการผลิตผลิตภัณฑ์พลอยได้เอทานอลโดยเซลล์ตรึงของ *R. oryzae* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต	34
ตารางที่ 4	เปรียบเทียบการผลิตกรดแอล-แลกติกในการหมักแบบเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิตที่ภาวะต่างๆ (ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3 ลิตร)	35

รายการภาพประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	ลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ที่ตรึงบนผ้าขนหนูในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต	36
รูปที่ 2	จลนพลศาสตร์ของการหมักกรดแอล-แลกติกจากกลูโคสโดยเซลล์ตรึงของ *R. oryzae* บนผ้าขนหนูในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิตที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 ความเร็วการปั่นกวน 700 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที	37
รูปที่ 3	yield ของกลูโคส (กรัมต่อกรัมกากมันแห้ง) ในสารละลายที่แยกออกมาภายหลังการปรับสภาพด้วย (ก) การใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (steam pretreatment) และ (ข) การใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับการใช้สารละลายแอลคาไลน์ (steam with combination of alkaline treatment)	38
รูปที่ 4	yield ของกลูโคสภายหลังการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน ความเข้มข้นของกากมัน 5% จากนั้นนำมาทำการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และอะไมเลส (ก) อะไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 15 นาที (ข) อะไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 30 นาที (ค) อะไมเลส 33.6 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 15 นาที (ง) อะไมเลส 33.6 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 30 นาที	39
รูปที่ 5	yield ของกลูโคสภายหลังการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน ความเข้มข้นของกากมัน 6.7% จากนั้นนำมาทำการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และอะไมเลส (ก) อะไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 15 นาที (ข) อะไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 30 นาที (ค) อะไมเลส 33.6 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 15 นาที (ง) อะไมเลส 33.6 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง	40
รูปที่ 6	yield ของกลูโคสภายหลังการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน ความเข้มข้นของกากมัน 20% จากนั้นนำมาทำการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และอะไมเลส (ก) อะไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 15 นาที (ข) อะไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 30 นาที (ค) อะไมเลส 33.6 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 15 นาที (ง) อะไมเลส 33.6	41

หน้า

รูปที่ 6 (ต่อ)	ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 30 นาที	
รูปที่ 7	yield ของกลูโคสภายหลังการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.5 N) ความเข้มข้นของกากมัน 6.7% จากนั้นนำมาทำการย่อยต่อด้วยเซลลูเลสที่ 50 องศาเซลเซียส แล้วตามด้วยอะไมเลสที่ 100 องศาเซลเซียส	42
รูปที่ 8	ลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ที่ถูกตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ในระยะการเจริญเติบโตที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ของการใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด ได้แก่ (ก) กลูโคส (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (จ) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และ (ฉ) สารละลายแป้ง	43
รูปที่ 9	ลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ที่ถูกตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ในระยะการสร้างผลิตภัณฑ์ที่เวลาการหมัก 96 ชั่วโมง ของการใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด ได้แก่ (ก) กลูโคส (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (จ) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และ (ฉ) สารละลายแป้ง	44

หน้า

รูปที่ 10 ลักษณะการยึดเกาะของเซลล์บนเบดสถิตด้านนอก (ลูกศรสีดำ) และด้านใน (ลูกศรสีแดง) ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ของการใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด ได้แก่ (ก) กลูโคส (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (จ) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และ (ฉ) สารละลายแป้ง 45

รูปที่ 11 ความหนาของเซลล์ของ *R. oryzae* (เส้นสีแดง) ที่ถูกตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ของการใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด ได้แก่ (ก) กลูโคส (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกันสารละลายแอลคาไลน์ (จ) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และ (ฉ) สารละลายแป้ง 46

รูปที่ 12 ลักษณะเซลล์ *R. oryzae* ที่ตรึงอยู่ด้านในของเบดสถิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ของการใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด ได้แก่ (ก) กลูโคส (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการ 47

หน้า

รูปที่ 12 (ต่อ)	ปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (จ) สารละลายที่ได้จากการย่อยการมันสำปะหลังด้วยกรด และ (ฉ) สารละลายแป้ง	
รูปที่ 13	จลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแลกติกโดย R. oryzae อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ของแหล่งคาร์บอน 6 ชนิด ได้แก่ (ก) กลูโคส (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์ (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (จ) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และ (ฉ) สารละลายแป้ง	48
รูปที่ 14	ลักษณะของเซลล์ *R. oryzae* บริเวณด้านในของเบดสถิตที่กำลังขยาย 350 เท่า โดยใช้ (ก) กลูโคส (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (จ) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และ (ฉ) สารละลายแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนในการหมัก	49
รูปที่ 15	ลักษณะของเซลล์ *R. oryzae* บริเวณด้านในของเบดสถิตที่กำลังขยาย 750 เท่า โดยใช้ (ก) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน	50

หน้า

รูปที่ 15 (ต่อ)	พร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และ (จ) สารละลายแป้ง เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมัก	
รูปที่ 16	ลักษณะของเซลล์ *R. oryzae* บริเวณด้านในของเบดสถิตที่กำลังขยาย 3,500 เท่า โดยใช้ (ก) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน พร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ และ (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมัก	51
รูปที่ 17	ลักษณะโครงสร้างของ (ก) เส้นใยผ้าฝ้าย และลักษณะการยึดเกาะของเซลล์ *R. oryzae* บนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูบริเวณด้านนอกของเบดสถิตที่กำลังขยาย 350 เท่า โดยใช้ (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน พร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (จ) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และ (ฉ) สารละลายแป้ง เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมัก	52

รายการสัญลักษณ์

$K_L a$	ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน
C_L	ค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมัก
OUR	oxygen uptake rate
$Y_{p/s}$	อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ต่อแหล่งอาหารที่ใช้
$Y_{x/s}$	อัตราการสร้างเซลล์ต่อแหล่งอาหารที่ใช้
Re_i	ค่า Reynolds' number
u_i	ความเร็วปลายใบพัดกวน
P/V	กำลังมอเตอร์ต่อปริมาตร
F/V	อัตราการไหลวนของน้ำหมักภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ
P	กำลังมอเตอร์
P_a	กำลังมอเตอร์ในภาวะที่มีการให้อากาศ
F_l	อัตราการไหลของน้ำหมัก
N_i	อัตราเร็วรอบของใบพัดกวน
D_i	เส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัดกวน

บทนำ

ในปัจจุบัน เป็นที่ตระหนักกันดีถึงภาวะขาดแคลนน้ำมันเนื่องจากปริมาณการใช้น้ำมันดิบสูงขึ้นในขณะที่ปริมาณน้ำมันดิบมีน้อยลง นอกจากนี้ ปัญหาการเมืองและสังคมในกลุ่มประเทศผู้ค้าน้ำมันส่งผลให้ราคาน้ำมันดิบในตลาดโลกพุ่งตัวสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ก่อให้เกิดผลกระทบโดยตรงต่ออุตสาหกรรมกลุ่มพลังงาน นอกจากนี้ กลุ่มอุตสาหกรรมปิโตรเคมียังได้รับผลกระทบทางอ้อมจากภาวะนี้ด้วย ทั้งนี้ เนื่องจากน้ำมันเป็นที่มาของวัตถุดิบในการสังเคราะห์พลาสติกที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในชีวิตประจำวัน ดังนั้น กลุ่มนักวิจัยและภาคอุตสาหกรรมจึงร่วมมือกันเพื่อแสวงหาสารทดแทนน้ำมันดิบเพื่อใช้ในการสังเคราะห์พอลิเมอร์ งานวิจัยเบื้องต้นรายงานว่า กรดแลกติกนอกจากจะถูกนำมาใช้งานอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารและยาแล้ว ยังสามารถใช้เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์สารเคมีและพอลิเมอร์ได้หลายชนิด เช่น พอลิเอสเทอร์ (polyester) อิพ็อกไซด์ (epoxides) พอลิแอคริลิคแอซิด (polyacrylic acid) และที่กำลังเป็นที่สนใจเป็นอย่างยิ่ง คือ พอลิแลกติกแอซิด (polylactic acid) โดยพอลิเมอร์ชนิดนี้ย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ (compostable) และยังเข้ากันได้ดีกับสิ่งมีชีวิต (biocompatible) ที่ผ่านมาได้มีการทดลองนำพอลิเมอร์ชนิดนี้ไปประยุกต์ใช้งานหลายประเภท เช่น การขึ้นรูปเป็นเส้นใยสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ การขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มและบรรจุภัณฑ์ การทำเป็นไหมละลาย และ tissue engineering scaffold เพื่อใช้ในทางการแพทย์ เป็นต้น จากที่กล่าวมาแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของกรดแลกติกซึ่งสามารถนำมาใช้ทดแทนน้ำมันดิบซึ่งในปัจจุบันเป็นวัตถุดิบในกระบวนการสังเคราะห์พลาสติกได้เป็นอย่างดี (Tay and Yang, 2002; Thongchul et al., 2010)

ปัจจุบันกรดแลกติกผลิตได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสด้วยแบคทีเรียแลกติก ข้อดีของการหมักโดยแบคทีเรียแลกติก คือ ได้ผลผลิตกรดแลกติกสูง แต่เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกมักจัดอยู่ในกลุ่มจุลินทรีย์ที่เจริญแบบไม่ใช้อากาศ ทำให้อัตราการเจริญต่ำเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ที่เจริญแบบใช้อากาศ ดังนั้น หากต้องการเพิ่มจำนวนประชากรแบคทีเรียแลกติกให้มีปริมาณมากเพียงพอต่อการหมักเพื่อผลิตกรดแลกติก จำเป็นต้องเสริมแหล่งโปรตีน (กรดอะมิโน) ไวตามิน และธาตุอาหารจำเป็นหลายชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งส่งผลกระทบต่อต้นทุนการผลิตกรดแลกติก โดยปัจจุบันราคากรดแลกติกอยู่ที่ประมาณ 0.5 เหรียญสหรัฐต่อกิโลกรัม โดยราคาดังกล่าวเป็นราคาขายสำหรับเกรดที่นำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา ดังนั้น หากต้องการผลิตกรดแลกติกในปริมาณมากเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพ ราคาต้นทุนของกรดแลกติกจึงควรต้องลดต่ำลงมาเพื่อท้ายสุดแล้วต้นทุนการผลิตพอลิแลกติกแอซิดต้องเทียบเคียงได้กับพลาสติกที่ใช้กันในปัจจุบัน

จากที่กล่าวมา เห็นได้ว่าหากเราสามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต้นทุนต่ำและผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณมาก จะเป็นทางออกในการลดต้นทุนการผลิต

กรดแลกติกเพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพอลิแลกติกแอซิด ที่ผ่านมามีงานวิจัยว่าด้วยการปรับปรุงสายพันธุ์และการตัดต่อทางพันธุกรรมเพื่อผลิตกรดแลกติกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำที่ได้มาจากการแปรรูปเบื้องต้น (pretreatment) วัสดุทางการเกษตร อย่างไรก็ดีแบคทีเรียที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธ์และการตัดต่อทางพันธุกรรมมักประสบปัญหาความเสถียรของสายพันธุ์เมื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรม โดยต้องเฝ้าระวังการกลายพันธุ์ย้อนกลับ (reverse mutation) จึงจำเป็นต้องเพิ่มขั้นตอนการตรวจสอบในกระบวนการผลิต ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น (Persson et al., 2001; Soccol et al., 2000) อีกทั้ง การใช้แบคทีเรียที่ผ่านการตัดต่อทางพันธุกรรมไม่ได้รับการยอมรับจากกลุ่มประเทศยุโรป และญี่ปุ่น ดังนั้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการใช้แบคทีเรียดังกล่าวอาจถูกกีดกันทางการค้าได้

อย่างไรก็ดี นอกจากแบคทีเรียแลกติกและแบคทีเรียที่ผ่านการตัดต่อทางพันธุกรรมแล้ว ยังพบว่ารา *Rhizopus oryzae* สามารถผลิตแอล(+) ไอโซเมอร์บริสุทธิ์ของกรดแลกติกโดยการหมักอาหารเลี้ยงเชื้อที่มาจากแป้ง หรือน้ำตาลไซโลส (xylose) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสซึ่งพบได้ในปริมาณมากในวัสดุทางการเกษตรรองมาจากเซลลูโลส ทั้งนี้เนื่องจาก *R. oryzae* มีวิถีเมแทบอลิซึม (metabolic pathway) เพื่อนำแป้งและวัตถุดิบทางการเกษตรซึ่งราคาถูกกว่ากลูโคสมาเป็นวัตถุดิบในการหมักได้โดยตรง โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการย่อยแป้งหรือวัตถุดิบทางการเกษตรโดยกรดหรือเอนไซม์ให้เป็นกลูโคสเพื่อนำไปใช้ในการหมัก นอกจากนั้น *R. oryzae* สามารถเจริญและสร้างกรดแลกติกได้ในแหล่งอาหารที่ปราศจากไวตามินหรือกรดอะมิโน ซึ่งมีความจำเป็นอย่างยิ่งในกระบวนการหมักโดยแบคทีเรีย จึงช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้อีกทางหนึ่ง อีกหนึ่งประเด็นสำคัญคือ ยังสามารถลดขั้นตอนในการแยกบริสุทธิ์ไอโซเมอร์ของกรดแลกติกได้อีกด้วย เห็นได้ว่า การผลิตกรดแลกติกโดยการหมักด้วย *R. oryzae* มีข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับการหมักด้วยแบคทีเรียแลกติกหลายประการ หากในการหมักมีการควบคุมลักษณะทางสัณฐานของเส้นใยรา (morphology) ที่ดี (Bai et al., 2003; Hang et al., 1989; Hang, 1989; Ho, 1996; Kosakai et al., 1997; Longacre et al., 1997; Martak et al., 2003; Oh et al., 2003) จากรายงานวิจัยของ Thongchul and Yang (2003) พบว่าในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ rotating fibrous bed ด้วยระบบการหมักแบบ Repeated batch เป็นเวลานาน 11 วัน ให้ความเข้มข้นของกรดแลกติกสูงสุดถึง 137.3 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดเท่าที่เคยมีรายงานมาในการหมักโดยรา โดยให้ค่า yield ของกรดแลกติกสูง 0.83 กรัมแลกเตทต่อกรัมกลูโคส และ reactor productivity เท่ากับ 2.1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อีกทั้งยังไม่มีการสร้างผลิตผลพลอยได้ ซึ่งได้แก่ เอทานอล (ethanol) และ กรดฟูมาริก (fumaric acid) จากการหมักนี้ด้วย ซึ่งอัตราการผลิตนี้สามารถเทียบเท่าได้กับอัตราที่ได้จากกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียแลกติก

ปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีโรงงานผลิตกรดแลกติกที่เป็นของตนเอง ในขณะนี้มีเพียงบริษัท Purac Biochem B.V. (Thailand) จำกัด เป็นผู้ประกอบการผลิตกรดแลกติกเพียงรายเดียวโดยมีกำลังการผลิตอยู่ที่ 100,000 ตันต่อปี ซึ่ง 90 เปอร์เซ็นต์ของกรดแลกติกที่ผลิตได้ถูกส่งออกไปยังต่างประเทศ เหลือเพียงแค่ 10 เปอร์เซ็นต์ที่ขายให้กับกลุ่มธุรกิจในประเทศไทย เช่น บริษัท บุญรอดบริวเวรี่ จำกัด เป็นสาเหตุให้ประเทศไทยยังคงต้องนำเข้ากรดแลกติกและอนุพันธ์มาจากต่างประเทศเพื่อให้เพียงพอกับความต้องการของตลาด เมื่อพิจารณาถึงศักยภาพในการสร้างเทคโนโลยีเพื่อผลิตกรดแลกติกจากวัสดุทางการเกษตรที่มีในท้องถิ่นเพื่อใช้ภายในประเทศ รวมถึงการส่งออกกรดแลกติกและอนุพันธ์สู่ตลาดโลก ตามแนวทางที่ระบุไว้ในการพัฒนาแผนที่นำทางสำหรับอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพในประเทศไทย (national bioplastics roadmap) จัดเตรียมโดยสำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี พบว่าประเทศไทยเป็นผู้ผลิตมันสำปะหลังในระดับแนวหน้าของโลก คิดเป็นพื้นที่เก็บเกี่ยวมากถึง 6 ล้านไร่ต่อปี (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร ปี พ.ศ. 2546) คิดเป็นผลผลิตมันสำปะหลังสดประมาณ 20 ล้านตันต่อปี ซึ่งทั้งหมดจะถูกนำไปแปรรูปเป็นแป้งมันสำปะหลัง มันอัดเม็ด และมันเส้น ในกระบวนการแปรรูปมีกากมันสำปะหลังเหลือจากขั้นตอนการผลิตประมาณ 10-15% (ขึ้นกับปริมาณความชื้นในมันสำปะหลังสด) ซึ่งในกากมันยังมีแป้งเหลืออยู่ในปริมาณสูงถึง 50-60% ของน้ำหนักแห้ง (Sriroth et al., 2000) ผู้วิจัยมองเห็นความเป็นไปได้ในการนำกากมันเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดแลกติกด้วย *R. oryzae* โดยประเมินมูลค่าแล้ว พบว่าการนำกากมันสำปะหลังมาแปรรูปเป็นกรดแลกติกซึ่งมีราคาขายสูงกว่าแป้งมันสำปะหลัง มันอัดเม็ด และมันเส้น ช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับกากมันโดยตรงและยกระดับผลผลิตทางการเกษตรของประเทศมีมูลค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งจะเป็นแนวทางในการพัฒนาและส่งเสริมการนำวัตถุดิบทางการเกษตรชนิดอื่นๆ ที่มีอยู่ภายในประเทศมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมัก ช่วยลดปัญหาราคาพืชผลทางการเกษตรตกต่ำ และลดการนำเข้ากรดแลกติก และอนุพันธ์จากต่างประเทศ ลดการขาดดุลการค้าให้กับต่างประเทศอีกด้วย (Huang et al., 2003; Ruengruglikit and Hang, 2003; Skory et al., 1998; Skory, 2003; Skory, 2004; Sun et al., 1998; Sun et al., 1999; Woiciechowski et al., 1999; Yin et al., 1997)

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กรดแลกติกสามารถผลิตได้โดยการสังเคราะห์ทางเคมีหรือการหมัก วิธีที่ใช้ทั่วไปสำหรับการสังเคราะห์ทางเคมี คือ การทำไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของแลคโทไนไทรล์ (lactonitrile) ซึ่งเกิดจากอะซิทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) ทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนไซยาไนด์ (hydrogen cyanide) ได้ไอโซเมอร์ผสมของกรดแลกติก ทั้ง แอล(+) และ ดี(-) ไอโซเมอร์ ซึ่งปฏิกิริยาทางเคมีนั้นเกิดขึ้นใน

ภาวะที่รุนแรงส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม และมีต้นทุนการผลิตสูงเนื่องจากวัตถุดิบที่ใช้มาจากปิโตรเคมีซึ่งไม่สามารถหาทดแทนได้ (non sustainable resource) (Benninga, 1990)

นอกจากการสังเคราะห์ทางเคมี กรดแลกติกสามารถผลิตจากการหมักด้วยแบคทีเรียกลุ่ม Lactic acid bacteria เช่น *Carnobacterium Enterococcus Lactobacillus Lactococcus Leuconostoc Oenococcus Pediococcus Streptococcus Tetragenococcus Vagococcus Clostridium* และ *Weissella* (Huang et al., 2003; Skory, 2004) โดยทั่วไปแล้ว การผลิตกรดแลกติกในอุตสาหกรรม นิยมใช้ *Lactobacillus* เนื่องจากมีอัตราการเจริญและให้ผลผลิตกรดแลกติกสูง แต่การหมักด้วย *Lactobacillus* นั้นมีข้อจำกัดเรื่องวัตถุดิบในการหมัก เนื่องจาก *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียกลุ่ม fastidious จำเป็นต้องใช้ growth factors เช่น ไวตามินและกรดอะมิโนหลายชนิดเพื่อเร่งการเจริญและการสร้างกรดแลกติก นอกจากนี้ *Lactobacillus* ไม่มีเอนไซม์อะไมเลสเพื่อย่อยแป้งในวัตถุดิบทางการเกษตร ดังนั้น ในการผลิตกรดแลกติกจากวัตถุดิบทางการเกษตรต้องทำการย่อยแป้งให้เป็นกลูโคสสำหรับการหมัก ทำให้ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้น ข้อจำกัดสำคัญอีกข้อหนึ่งของกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรีย คือ แบคทีเรียจะผลิตทั้งแอล(+) และ ดี(-) ไอโซเมอร์ ทำให้ต้องแยกบริสุทธิ์ไอโซเมอร์ทั้งสองออกจากกันก่อนนำไปสังเคราะห์พอลิแลกติกแอซิด ซึ่งการแยกไอโซเมอร์บริสุทธิ์นั้นมีขั้นตอนที่ยุ่งยากและซับซ้อน อีกทั้งไวตามินและกรดอะมิโนที่เหลือจากกระบวนการหมักยังเพิ่มความซับซ้อนและต้นทุนการแยกบริสุทธิ์ของกรดแลกติกอีกด้วย (Ruengruglikit and Hang, 2003; Tay and Yang, 2002; Yin et al., 1997)

เนื่องจาก ก ารหมักด้วยแบคทีเรียมีข้อจำกัดเรื่องวัตถุดิบและการแยกบริสุทธิ์ ดังนั้น จึงมีการพัฒนาวิธีการอื่นเพื่อทดแทนกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรีย และพบว่ารา *R. oryzae* สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสเพื่อย่อยแป้งเป็นกลูโคสเพื่อใช้ผลิตกรดแลกติกตามวิถีเมแทบอลิซึม ดังนั้น การหมักด้วย *R. oryzae* จึงสามารถใช้มันสำปะหลัง ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบได้โดยตรงซึ่งแตกต่างจากการหมักด้วยแบคทีเรีย นอกจากนี้ *R. oryzae* ยังสามารถย่อยน้ำตาลคาร์บอน 5 โมเลกุล เช่น ไซโลส (xylose) ผ่านวิถี pentose phosphase pathway (HMP) ได้ งานวิจัยเบื้องต้น รายงานว่า *R. oryzae* สามารถใช้แป้งข้าวโพด (corn starch) แป้งมันฝรั่ง (potato starch) ข้าวสาลี (wheat) ข้าวโพด (corn) และสารสกัดจากกากข้าวโพดโดยกรด (corn fiber hydrolysate)เพื่อผลิตกรดแลกติกได้ (Hang, 1989; Hang et al., 1989; Ho, 1996; Huang et al., 2003; Jin et al., 1999; Soccol et al., 1994; Tay and Yang, 2002; Woiciechowski et al., 1999; Yin et al., 1997; Yu and Hang, 1989) ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำมันสำปะหลังที่มีอยู่เป็นจำนวนมากในประเทศและมีราคาถูก รวมทั้งกากมันซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานแป้งมัน ซึ่งมีปริมาณแป้งเหลืออยู่ถึง 50-60% ของน้ำหนักแห้งมาใช้

ผลิตกรดแลกติก ซึ่งช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับผลผลิตทางการเกษตร และช่วยลดภาระในการกำจัดของเสียให้กับโรงงานอีกด้วย

โดยทั่วไปสำหรับกระบวนการหมักในอุตสาหกรรมนั้น ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ ถังกวน (stirred tank bioreactor) เพราะเป็นระบบที่ง่ายไม่ซับซ้อนต่อการออกแบบและควบคุม แต่การใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้มีข้อจำกัดสำหรับการหมักด้วยรา เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานของราที่มีความหลากหลายและสามารถเปลี่ยนแปลงได้ในระหว่างการหมัก สัณฐานของราในถังกวน สามารถแบ่งได้ออกเป็น 2 ลักษณะใหญ่ๆ ได้แก่ dispersed mycelia และ pellet ซึ่งขึ้นกับปัจจัยที่ใช้ในการหมัก เช่น อุณหภูมิ ค่าพีเอช อัตราการกวนและการให้อากาศ อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นต้น ลักษณะเฉพาะของราแต่ละสายพันธุ์ก็ส่งผลต่อลักษณะของสัณฐานในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเช่นกัน โดยปกติ ลักษณะสัณฐานแบบ dispersed mycelia จะกระจายทั่วไปในถังกวน รบกวนการทำงานของระบบควบคุม โดยไปเกาะติดอยู่ที่อุปกรณ์วัดและควบคุม เช่น อุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิ อุปกรณ์วัดค่าการละลายของออกซิเจนและค่าพีเอช เป็นต้น ทำให้ค่าที่ได้จากการวัดผิดพลาดส่งผลถึงการสั่งงานที่ผิดพลาดของระบบควบคุมของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ นอกจากนี้ ถ้าเส้นใยไปเจริญและยึดเกาะอยู่รอบๆ บริเวณแกนใบพัดกวน ทำให้บริเวณแกนหมุนของใบพัดกวนมีแรงบิด (torque) สูงขึ้น ทำให้เกิดความร้อนที่มอเตอร์ของแกนใบพัด อาจก่อให้เกิดความเสียหายได้ นอกจากนี้สายใยราที่กระจายไปทั่วในถังปฏิกรณ์ชีวภาพทำให้น้ำหมักมีความหนืดสูงขึ้น ซึ่งของเหลวในถังปฏิกรณ์ชีวภาพจะมีสมบัติเป็น pseudoplastic เมื่อน้ำหมักมีความหนืดสูงขึ้น ทำให้ค่าการละลายของออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพต่ำ ดังนั้น ถ้าต้องการควบคุมปริมาณออกซิเจนในน้ำหมัก ซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญของเซลล์และการสร้างกรดแลกติกให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม จึงจำเป็นต้องปั่นกวนด้วยความเร็วรอบสูง ทำให้สิ้นเปลืองพลังงาน (high power input) และการปั่นกวนที่ความเร็วรอบสูงยังทำลายสายใยราเกิดเป็นสายสั้นๆ (fragmentation) ซึ่งมีรายงานอ้างอิงว่าทำให้ผลผลิตของกรดแลกติกลดลง ในการเลี้ยงเซลล์ราแบบ pellet มีข้อดี คือ ลดปัญหาเรื่องน้ำหมักมีความหนืดสูง ช่วยลดการใช้ความเร็วรอบสูงเพื่อปั่นกวนให้ได้ค่าการละลายออกซิเจนในน้ำหมักตามต้องการ อย่างไรก็ตาม ในการหมักระบบต่อเนื่อง (long term production) ลักษณะสัณฐานแบบนี้ มีข้อเสีย คือ ไม่สามารถควบคุมขนาดของ pellet ซึ่งโตขึ้นเรื่อยๆ รวมทั้งความหนาแน่นของเซลล์ภายใน pellet เพิ่มขึ้นด้วย ทำให้ยากต่อการแพร่ผ่านของออกซิเจนและอาหาร ทำให้เกิดภาวะขาดออกซิเจนและอาหาร ซึ่งเป็นผลมาจาก diffusion limitation ทำให้เมแทบอลิซึมของเซลล์ที่อยู่ข้างใน pellet ลดลง นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ที่เซลล์ภายใน pellet สร้างขึ้นยังแพร่ผ่านออกสู่น้ำหมักได้น้อย เกิดการสะสมผลิตภัณฑ์อยู่ภายในทำให้เกิดภาวะ product inhibition ได้ สำหรับ *R. oryzae* ในภาวะที่ขาดออกซิเจน เอนไซม์อัลกอฮอล์ดีไฮโดรเจนเนส (alcohol dehydrogenase, ADH) จะถูกกระตุ้น

โดยเอนไซม์นี้จะเปลี่ยนไพรูเวท (pyruvate) เป็นอัลดีไฮด์ (aldehyde) ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นเอทานอลแทนกรดแลกติก โดยเอนไซม์ ADH จะทำงานในระยะสั้นๆ ก่อนที่เซลล์จะเริ่มหยุดทำงานและตายในที่สุด (Agger, 1998; Cruz et al., 2001; Cui et al., 1998; Hellendoorn et al., 1998; Kobayashi et al., 1973; Oostra et al., 2001; Pritchard, 1973; Skory, 2004; Sun et al., 1999)

จากที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าการผลิตกรดแลกติกด้วย *R. oryzae* ต้องการการควบคุมสัณฐานของราที่เหมาะสม ซึ่งสามารถควบคุมได้โดยปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพที่เหมาะสม ดังนั้น โครงการวิจัยนี้ จะศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อสัณฐานของรา และการผลิตกรดแลกติก เพื่อนำไปใช้สำหรับการออกแบบกระบวนการในอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

- เพื่อหาภาวะในการผลิตกรดแลกติกจากกากมันสำปะหลังโดยรา *R. oryzae*
- เพื่อศึกษาภาวะและจลนพลศาสตร์ที่เหมาะสมในการขยายสเกลจากระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็น 90 ลิตร

วิธีการวิจัย

การหาอัตราการกวนและการให้อากาศที่เหมาะสมในการหมักกรดแอล-แลกติกจากกลูโคสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิตขนาด 5 ลิตร

สายพันธุ์ การเก็บรักษาสายพันธุ์ การเตรียมหัวเชื้อ และอาหารเลี้ยงเชื้อ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ *Rhizopus oryzae* สายพันธุ์ NRRL395 โดยได้รับอนุเคราะห์จาก USDA ประเทศสหรัฐอเมริกา *R. oryzae* NRRL395 เป็นราเส้นใยที่ผลิตกรดแอล-แลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก การเก็บรักษาสายพันธุ์ทำโดยการถ่ายเชื้อจาก stock culture ลงบนอาหารแข็ง PDA (potato dextrose agar) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน แล้วจึงเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยทำเป็นประจำทุกเดือน

การเตรียมหัวเชื้อ ทำได้โดยเก็บ sporangiospores จากเส้นใยราที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เพื่อนำมาเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ในน้ำ DI ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปรับความเข้มข้นของสปอร์เป็น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เตรียมสารแขวนลอยที่ความเข้มข้นดังกล่าวเพื่อสำหรับใช้เป็นหัวเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

อาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบด้วย อาหารเพื่อการเจริญ และอาหารเพื่อผลิตกรดแอล-แลกติก โดยอาหารเพื่อการเจริญประกอบด้วย กลูโคส 50 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร อาหารเพื่อผลิตกรดแอล-แลกติกประกอบด้วย กลูโคส 70 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 0.6 กรัมต่อลิตร $MgSO_4$ 0.25 กรัมต่อลิตร $ZnSO_4$ 0.088 กรัมต่อลิตร และยูเรีย 0.3 กรัมต่อลิตร

การหมักกรดแอล-แลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต พัฒนามาจากการดัดแปลงถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน ปริมาตร 5 ลิตร โดยเสริมโครงสแตนเลสซึ่งมีผ้าขนหนูเย็บตรึงไว้สำหรับตรึงสปอร์และเส้นใยรา โดยโครงสแตนเลสจะยึดไว้กับฝาของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ การเตรียมถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อใช้งาน โดยเริ่มแรกเตรียมอาหารเพื่อการเจริญ 3 ลิตร ใส่ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 30 นาที หลังจากที่อุณหภูมิภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพลดลง ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส แล้วเริ่มปรับค่ามาตรฐานหัววัดออกซิเจน (DO probe) โดยแก๊สไนโตรเจน (zero 0%DO) และอากาศ (slope 100%DO) หลังจากนั้น ถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร (10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ล งในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ในช่วงของการเจริญ (growth phase) ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช หลังจากนั้น 48 ชั่วโมง ถ่ายอาหารเพื่อการเจริญออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แล้วเติมอาหารเพื่อการผลิตกรดแอล-แลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แล้วควบคุมค่าพีเอชที่ 6.0 ทำการหมักไปจนกลูโคสหมด หรือความเข้มข้นของกรดแอล-แลกติกไม่เพิ่มขึ้น ระหว่างการทดลอง เก็บตัวอย่างทุก 6-8 ชั่วโมง ในการทดลองนี้ได้ศึกษาผลของอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศต่ออัตราการถ่ายเทออกซิเจนสู่น้ำหมัก (K_La) และค่าจลนพลศาสตร์ของการหมักโดยแปรอัตราการกวน (100 300 500 และ 700 รอบต่อนาที) และอัตราการให้อากาศ (0.5 และ 1.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

สัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน

โดยทั่วไป นิยมวัดค่า K_La ก่อนสิ้นสุดขั้นตอนการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยวิธี dynamic gassing out ซึ่งในการทดลองดังกล่าว จะหยุดให้อากาศแล้วลดอัตราการกวนให้ต่ำเพียงแค่ให้สามารถรักษาความเป็นเนื้อเดียวของน้ำหมักไว้ได้ แล้วอ่านค่า DO จากหัววัดออกซิเจน ณ เวลาใดๆ เพื่อนำมาคำนวณหาอัตราที่เซลล์นำออกซิเจนไปใช้ในการเมแทบอลิซึม จากความชันของเส้นตรงจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการละลายของออกซิเจน หรือค่า C_L (ได้จากค่า DO) และเวลา จากนั้นให้อากาศและกวนที่อัตราเท่าเดิม แล้วอ่านค่า DO ณ เวลาใดๆ จนได้ค่าคงที่ นำค่า DO

ที่ได้มาใช้ในการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{dC_L}{dt} + OUR$ กับ C_L โดยที่ค่า K_La หาได้จากค่าความชันของเส้นกราฟ (Chotisubha-ananda et al., 2011)

ค่าจลนพลศาสตร์ของการหมัก

ค่า product yield ($Y_{p/s}$ หรือ $Y_{x/s}$ (cell)) คำนวณได้จากอัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นต่อกลูโคสที่ใช้ไป ส่วนค่า productivity คำนวณจากปริมาณของผลิตภัณฑ์สุทธิต่อปริมาตรต่อเวลา

ผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้นจากการหมักโดย *R. oryzae* 3 ชนิด ได้แก่ น้ำหนักแห้งของรา กรดแอล-แลกติก และเอทานอล โดยปริมาณน้ำหนักแห้งหาได้เมื่อสิ้นสุดการหมัก โดยเก็บเกี่ยวเซลล์ราที่ตรึงบนผ้าขนหนู นำไปล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ แล้วนำมาหักลบกับน้ำหนักผ้าขนหนูที่ได้ชั่งน้ำหนักแน่นอนไว้แล้วก่อนการหมัก นำน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้หารด้วยปริมาตรน้ำหมัก (3 ลิตร) ได้เป็นค่าความเข้มข้นของเซลล์

การหาปริมาณกลูโคสที่เหลือ กรดแอล-แลกติก และเอทานอลที่ *R. oryzae* ผลิตขึ้น ทำได้โดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี นำตัวอย่างน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยง กรองด้วยเมมเบรนเซลลูโลสอะซิเทต แล้วนำไปเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน ฉีดตัวอย่างเจือจางปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใช้คอลัมน์สำหรับวิเคราะห์กรดอินทรีย์ (Biorad, Aminex HPX-87H ion exclusion; 300mm×7.8mm) รักษาอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 45 องศาเซลเซียส มีสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.005 M เป็นตัวพา ที่อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที โดยอ่านค่าพื้นที่ใต้พีคจาก Refractive index detector แล้วเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2.0 กรัมต่อลิตร

การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมกากมันสำปะหลัง

กากมันสำปะหลังสดที่ใช้ในการวิจัย ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท แป้งมันเอี่ยมเฮงอุตสาหกรรม จำกัด และบริษัท เอี่ยมบูรพา จำกัด กากมันสดที่ได้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนใช้งาน

ทำการปรับสภาพกากมันก่อนนำกากมันก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยมุ่งหวังลดต้นทุนปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในขั้นตอนการย่อยแป้งที่หลงเหลืออยู่ในกากมัน ซึ่งการย่อยกากมันในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่ การปรับสภาพกากมันก่อนการย่อยโดยเทคนิค physicochemical pretreatment และการย่อยแป้งและเซลลูโลส

การปรับสภาพกากมันสำปะหลังก่อนการย่อยโดยเทคนิค physicochemical pretreatment

ในขั้นตอนนี้จะศึกษาผลของการใช้ความร้อนภายใต้ความดันสูง (steam pretreatment) เปรียบเทียบกับการใช้ความร้อนสูงควบคู่กับการเติมสารละลายแอลคาไลน์ (steam with combination of alkaline treatment)

การปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน โดยนำกากมันสดมาเติมน้ำให้มีปริมาณของกากมันประมาณ 5 – 20% (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว แปรผันเวลาในการ autoclave ที่ 15 30 45 และ 60 นาที

การปรับสภาพด้วยการใช้ร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับการใช้สารละลายแอคคาไลน์ โดยนำกากมันสดมาเติมสารละลาย NaOH ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.1 0.5 และ 1 N ปริมาณของกากมันที่ใช้อยู่ในช่วง 6.7 – 20% (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลาต่างๆ กัน คือ 15 30 45 และ 60 นาที

ภายหลังการปรับสภาพนั้น นำตัวอย่างแยกเอาสารละลายออกและนำกากที่ได้อบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ต่อมานำกากมันแห้งที่ได้นั้นไปใช้ในการย่อยด้วยเอนไซม์ต่อไป โดยที่สารละลายที่ได้นั้นนำไปวัดหาปริมาณน้ำตาลที่สูญเสียไปภายหลังการปรับสภาพด้วย

การย่อยเซลลูโลสและแป้งจากกากมันสำปะหลังที่ปรับสภาพแล้ว

นำกากมันที่ผ่านการปรับสภาพมาทำการย่อยส่วนที่เป็นเซลลูโลสและแป้งที่เหลืออยู่ในกากมัน (นำกากมันแห้ง 0.5 กรัม จากนั้นเติมน้ำ DI ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ซึ่งจะมีความเข้มข้นของกากมันอยู่ที่ 6.7 % (น้ำหนักต่อปริมาตร)) ในขั้นตอนแรกจะใช้เซลลูเลส (Accellerase®1500, Genencor, USA, 2,200-2,800 CMCU ต่อกรัม ความถ่วงจำเพาะประมาณ 1.00 กรัมต่อมิลลิลิตร) ความเข้มข้นต่างกันคือ 5.61 และ 33.15 ยูนิต/กรัมกากมันแห้ง เพื่อทำการย่อยสลายเซลลูโลสและทำให้แกรนูลของแป้งที่อยู่ภายในโครงสร้างของเซลลูโลสถูกปลดปล่อยออกมา บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างกันคือ 1 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นจะเข้าสู่ขั้นตอนที่สองคือจะใช้อะไมเลส (Spezyme ethyl, Genencor, USA, 6,700–7,300 AAU ต่อกรัม ความถ่วงจำเพาะประมาณ 1.18–1.22 กรัมต่อมิลลิลิตร) ความเข้มข้นต่างกันคือ 16.8 และ 33.6 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง ใส่ลงในสารละลาย ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างกันคือ 15 และ 30 นาที

แปรระยะเวลาในการบ่ม ปริมาณของเซลลูเลส และปริมาณอะไมเลส เพื่อศึกษาถึงผลของความเข้มข้น และ yield ของกลูโคสที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง หลังการย่อยนำตัวอย่างไป

ปั่นเหวี่ยงและแยกสารละลายส่วนใสเก็บไว้สำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักกรดแลกติก โดยปรับพีเอชเป็น 6.0 แบ่งตัวอย่างสารละลายส่วนหนึ่งไว้สำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาล และสารประกอบอื่นๆ

โดยกลูโคสที่ปรากฏในของเหลวที่แยกออกมาภายหลังการปรับสภาพกากมันและในส่วนของการละลายที่ได้จากการย่อยจะทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง YSI 2700 Biochemistry Analyzer ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในรูปของกลูโคสที่ปรากฏในของเหลวที่แยกออกมาภายหลังการปรับสภาพกากมันและในส่วนของการละลายที่ได้จากการย่อยหาได้จาก การนำสารละลายที่ได้มาทำปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริก 0.25 M จากนั้น autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 60 นาที หลังการจากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงและแยกสารละลายส่วนใสไปทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง YSI 2700 Biochemistry Analyzer

การหมักกรดแอล-แลกติกจากสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง

ทำการหมักแบบเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต โดยถ่ายหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เทลงไปในอาหารเพื่อการเจริญปริมาตร 3 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ทำการหมักจนครบ 48 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนอาหารเป็นอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ ควบคุมค่าพีเอชที่ 6.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 M ตลอดการหมัก ทำการหมักต่อจนครบ 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 8 ชั่วโมง เมื่อครบ 96 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์และนำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) เพื่อหาปริมาณกรดแอล-แลกติก และผลิตภัณฑ์พลอยได้ รวมทั้งกลูโคสที่เหลือจากการหมัก (Chotisubha-anandha et al., 2011)

อาหารเพื่อการเจริญเติบโต และอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ที่ใช้ ได้แก่ กลูโคส สารละลายที่ได้จากการย่อยของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ สารละลายที่ได้จากการย่อยของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันด้วยเอนไซม์ สารละลายที่ได้จากการย่อยของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ด้วยเอนไซม์ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดและสารละลายแป้ง 50 กรัมต่อลิตรสำหรับอาหารเพื่อการเจริญเติบโต และ 70 กรัมต่อลิตรสำหรับอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์

การคำนวณหาปัจจัยทางวิศวกรรมที่เหมาะสมต่อการหมักกรดแอล-แลกติก

ทำการออกแบบขยายสเกลการหมักกรดแอล-แลกติก โดยใช้ค่า K_La เป็นปัจจัยคงที่ในการคำนวณ โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อค่า K_La ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ได้แก่ ค่า Reynolds' number (Re_i) ความเร็วปลายใบพัดกวน (u_i) กำลังมอเตอร์ต่อปริมาตร (P/V) และอัตราการไหลวนของน้ำหมักภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (F/V) ทำการคำนวณเพื่อหาค่าอัตราการกวน และการให้อากาศในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร โดยกำหนดให้ปัจจัยแต่ละปัจจัยเป็นค่าคงที่ในการขยายสเกลจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร เป็นขนาด 90 ลิตร

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

การหมักกรดแอล-แลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต

รูปที่ 1 แสดงลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* เมื่อเจริญในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต หลังจากเติมหัวเชื้อ เมื่อสปอร์เกิดการงอกและเซลล์เริ่มเจริญเติบโต ในระหว่างนั้นสปอร์ที่งอกและเซลล์เส้นใยราที่เจริญเติบโตจะเข้าไปติดในวัสดุสำหรับตรึงเซลล์ซึ่งได้แก่ ผ้าขนหนู ซึ่งการที่สปอร์และเซลล์เส้นใยที่เติบโตทั้งหมดเข้าไปยึดเกาะที่ผ้าขนหนูที่ตรึงไว้กับโครงสแตนเลส ส่งผลให้ไม่มีเซลล์เจริญแบบอิสระในน้ำหมัก หรือที่บริเวณพื้นผิวอื่นในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเลย เมื่อเทียบกับการเลี้ยงราเส้นใยในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนที่ใช้กันทั่วไป ดังนั้น จึงทำให้ง่ายต่อการทำงานและควบคุมภาวะการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสถิตนี้ นอกจากนี้ ผลการทดลองที่ได้ยังบ่งชี้ว่าผ้าขนหนูเป็นพื้นผิวตรึงที่เหมาะสมสำหรับ *R. oryzae* ทั้งนี้โดยอาศัยแรงเฉือนจากการปั่นกวนเป็นตัวเสริมสร้างความแข็งแกร่งในการยึดเกาะกับวัสดุตรึง

ถึงแม้ว่าจะมีงานวิจัยที่ผ่านมากล่าวถึงความสะดวกในการเลี้ยงราเส้นใยให้อยู่ในรูปของ pellet อย่างไรก็ดี เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างทำการหมัก การเลี้ยงราเส้นใยตามรูปที่ 1 ส่งผลดีมากกว่าการเลี้ยงในรูปของ pellet เนื่องจาก การปั่นกวนและการให้อากาศทำให้เกิดแรงเฉือนที่บริเวณผิวของแผ่นของราเส้นใยที่เกาะเป็นเยื่อบางๆ ที่บริเวณผ้าขนหนูในการเลี้ยงแบบระยะยาว เมื่อเทียบกับการเลี้ยงแบบ pellet ซึ่งมักประสบปัญหาเรื่องความหนาแน่นและขนาดของ pellet ที่เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาที่เลี้ยงนานขึ้น ซึ่งในที่สุดแล้วจะส่งผลเชิงลบต่อการผลิตกรดแอล-แลกติก เนื่องจาก พบภาวะการขาดออกซิเจนที่บริเวณศูนย์กลางของ pellet นั่นเอง

ในการหมักด้วยเซลล์ตรึงของ *R. oryzae* พบว่าอัตราการถ่ายเทออกซิเจนเพิ่มขึ้นอย่างมากตามอัตราการปั่นกวนที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามการเพิ่มอัตราการให้อากาศโดยคงอัตราการปั่นกวนไว้ไม่ได้ช่วยเพิ่มอัตราการถ่ายเทออกซิเจนได้มากนัก (ตารางที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบสัมประสิทธิ์การ

ถ่ายเทออกซิเจน (K_La) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิตเทียบกับค่าที่ได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนที่ควบคุมภาวะการปั่นกวนและการให้อากาศเท่ากัน จะพบว่าอัตราการถ่ายเทของออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิตจะมีค่ามากกว่าในถังกวน (จากข้อมูลงานวิจัยเบื้องต้น) ซึ่งทำให้ผลผลิตกรดแลกติกเพิ่มสูงขึ้นไปด้วย ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาหลายผลงาน ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความสามารถในการควบคุมสัณฐานของ *R. oryzae* อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งช่วยเพิ่มอัตราการถ่ายเทออกซิเจน ดังตัวอย่างงานวิจัยของ Thongchul and Yang (2003) ซึ่งได้หาค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนในการหมักด้วยเซลล์แขวนลอยในถังกวน เทียบกับการหมักด้วยเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ โดยพบว่าค่า K_La เพิ่มขึ้นถึง 3 เท่าในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ (0.36 min^{-1}) เมื่อเทียบกับค่าที่ได้ในถังกวน (0.13 min^{-1}) ที่ควบคุมที่ภาวะเดียวกัน (กำลังมอเตอร์ต่อปริมาตร และความเร็วปลายใบพัดกวน) นอกจากนี้ ยังพบว่าในถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับเซลล์ตรึงมักจะให้ผลผลิตเซลล์ที่ความหนาแน่นสูง ซึ่งส่งผลให้ผลผลิตของกรดแลกติกสูงขึ้นตามไปด้วย

รูปที่ 2 แสดงจลนพลศาสตร์ของการหมักกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึงของ *R. oryzae* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต จะเห็นได้ว่าผลผลิตกรดแลกติก (yield และ productivity) จะเพิ่มขึ้นเมื่ออัตราการปั่นกวนสูงขึ้น (ตารางที่ 2) โดยค่า productivity สูงสุดได้เท่ากับ 2.09 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ความเข้มข้นของกรดแอล-แลกติกเท่ากับ 37.83 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการปั่นกวน 700 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที นอกจากนี้แล้ว เมื่ออัตราการปั่นกวนและอัตราการให้อากาศเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ผลผลิตเอทานอลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้หลักลดลง (ตารางที่ 3)

การปรับสภาพกากมันสำปะหลังโดยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน

จากรูปที่ 3(ก) พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาจาก 15 นาทีเป็น 30 นาที สามารถแยกน้ำตาลออกมาจากกากมันได้มากขึ้น แต่เมื่อระยะเวลานานขึ้นไปจนถึง 60 นาที พบว่าไม่มีผลต่อปริมาณกลูโคสทั้งหมดที่ปรากฏในสารละลายที่แยกออกมาภายหลังการปรับสภาพกากมันด้วยวิธีนี้ โดยจะได้ yield ของกลูโคสประมาณ 0.5 กรัมต่อกรัมกากมันแห้ง และจะเห็นได้ว่าที่ปริมาณความเข้มข้นของกากมัน 5% จะได้ yield ของกลูโคสที่มากกว่าปริมาณความเข้มข้นของกากมัน 6.7% สำหรับในกรณีปริมาณความเข้มข้นของกากมัน 10 % และ 20% (ไม่แสดงผลการทดลอง) เนื่องจากได้ค่าจาก 10% ใกล้เคียงกับ 6.7% และปริมาณความเข้มข้นของกากมัน 20 % นั้นไม่สามารถแยกสารละลายที่ออกมาจากกากมันได้ จากนั้นนำกากมันที่ผ่านการปรับสภาพในแต่ละชุดการทดลอง (5% 6.7% และ 20%) ไปทำการย่อยด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไป

การปรับสภาพกากมันสำปะหลังด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับการใช้สารละลายแอลคาไลน์

จากรูปที่ 3(ข) พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์จาก 0.1 N ถึง 1.0 N จะได้ yield ของกลูโคสเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ และการเพิ่มความเข้มข้นของกากมัน จาก 5% เป็น 6.7 % จะได้ yield ของกลูโคสเพิ่มขึ้นเช่นกัน แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาจาก 15 ถึง 60 นาที น้ำตาลที่ปรากฏในของเหลวที่แยกออกมาภายหลังการปรับสภาพกากมันด้วยวิธีนี้สามารถแยกออกมาจากกากมันได้มากขึ้น จะได้ yield ของกลูโคสที่ใกล้เคียงกันประมาณ 0.4-0.5 กรัมต่อกรัมกากมันแห้ง และพบว่าภาวะที่ได้ yield ของกลูโคสสูงที่สุดคือประมาณ 0.541 กรัมต่อกรัมกากมันแห้ง ที่ภาวะความเข้มข้นของกากมัน 6.7 % ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N และระยะเวลาที่ใช้ในการปรับสภาพ 60 นาที จึงถือว่าเป็นภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพด้วยวิธีนี้ เพื่อนำไปทำการย่อยด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไป นอกจากนี้ ยังพบว่าสารละลายที่แยกออกมาภายหลังการปรับสภาพมีลักษณะหนืดเล็กน้อย เนื่องจากมีการบวมของแกรนูลแป้งที่ถูกปลดปล่อยออกมาหลังจากที่มีการปรับสภาพด้วยสารแอลคาไลน์ที่อุณหภูมิสูง (Wyman et al., 2005) แต่อย่างไรก็ตามการที่ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นมากเกินจะส่งผลให้สารละลายที่ได้มีค่าพีเอชสูง หากจะนำไปใช้ในการหมัก ต้องมีการปรับค่าให้เป็นกลาง ส่งผลให้เกิดเกลือในสารละลายมากเกินไป อาจส่งผลเชิงลบต่อการหมักกรดแลกติกโดย *R.oryzae*

การย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน

ขั้นตอนแรกนำกากมันที่ปรับสภาพแล้วมาย่อยด้วยเซลลูเลส ที่ความเข้มข้น 5.61 และ 33.15 ยูนิต/กรัมกากมันแห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดไปย่อยต่อด้วยอะไมเลสที่ความเข้มข้น 16.8 และ 33.6 ยูนิต/กรัมกากมันแห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสระยะเวลา 15 และ 30 นาที ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4 ถึง 6

จากรูปที่ 4 ถึง 6 เมื่อทำการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที โดยใช้ความเข้มข้นของกากมัน 5 % 6.7% และ 20% ตามลำดับ พบว่าความเข้มข้นของเซลลูเลสและเวลาในการบ่มมีผลต่อการย่อย เห็นได้จากปริมาณของกลูโคสที่ออกมาภายหลังการย่อย ซึ่งถ้าใช้ความเข้มข้นของเซลลลูเลสที่มากและใช้ระยะเวลาในการบ่มที่นานขึ้น จะได้ yield ของกลูโคสในปริมาณที่มากขึ้นด้วย แต่พบว่าความเข้มข้นของอะไมเลสและเวลาในการบ่มไม่มีผลต่อการย่อย คือ เมื่อใช้ความเข้มข้นของอะไมเลสที่มากและใช้ระยะเวลาในการบ่มที่นานขึ้น จะได้ yield ของกลูโคสในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน

จากผลการทดลองที่ได้ ดังนั้นการย่อยกากมันด้วยอะไมเลสที่ 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง นาน 15 นาที จึงเพียงพอสำหรับกากมันแห้งที่ผ่านการปรับสภาพมากแล้ว (รูปที่ 4(ก) 5(ก) และ 6 (ก)) นอกจากนี้จะเห็นได้ว่า เมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของกากมันจาก 5% เป็น 6.7% และ 20% ตามลำดับ ทำให้ yield ของกลูโคสทั้งหมดมีความเพิ่มขึ้นด้วยเมื่อใช้ภาวะในการย่อยด้วยเอนไซม์เหมือนกัน โดยที่ปริมาณกากมันเข้มข้น 20% ให้ yield ของกลูโคสสูงที่สุด จากรูปที่ 4(ก) 5(ก) และ 6(ก) จึงสามารถเลือกภาวะที่เหมาะสมสำหรับย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันต่อด้วยเซลลูเลส และอะไมเลส ได้ดังนี้ เริ่มจากปริมาณความเข้มข้นของกากมันสด 20% ปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดัน เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นย่อยต่อด้วยเซลลูเลส 33.15 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง นาน 6 ชั่วโมง แล้วย่อยต่อด้วยอะไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง นาน 15 นาที โดยได้ yield ของกลูโคสสูงสุดประมาณ 0.6 กรัมต่อกรัมของกากมันแห้ง เมื่อเปรียบเทียบผลของการย่อยด้วยเซลลูเลสและอะไมเลส จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของเซลลูเลสที่ใช้ในการย่อยกากมัน และเวลาที่ใช้มีผลต่อ yield ของกลูโคสที่ได้ กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์มากขึ้น และเวลาที่ใช้ในการย่อยนานขึ้น จะให้ค่า yield ของกลูโคสสูงขึ้น ในขณะที่ความเข้มข้นของอะไมเลสและเวลาที่ใช้ ดูจะไม่ส่งผลต่อ yield ของกลูโคสมากนัก

การย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์

จากรูปที่ 7 พบว่าความเข้มข้นของเซลลูเลสและเวลาในการบ่มมีผลต่อการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีนี้เช่นเดียวกันกับการนำกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดัน เห็นได้จากปริมาณของกลูโคสที่ได้ในสารละลายที่ออกมาภายหลังการย่อย หากความเข้มข้นของเซลลูเลสมากขึ้นและใช้ระยะเวลาในการบ่มที่นานขึ้น จะได้ yield ของกลูโคสในปริมาณที่มากขึ้นตามไปด้วย แต่พบว่าความเข้มข้นของอะไมเลสและเวลาในการบ่มไม่มีผลต่อการย่อยเช่นเดียวกับที่พบในการย่อยกากมันที่ปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดัน แต่อย่างไรก็ตาม ค่า yield ของกลูโคสที่ได้นั้นสูงสุดอยู่ที่ประมาณ 0.16 กรัมต่อกรัมของกากมันแห้ง ซึ่งยังคงน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ประมาณ 0.6 กรัมต่อกรัมของกากมันแห้ง) ซึ่งน้อยกว่าเกือบ 4 เท่า ผลการทดลองที่ได้อาจอธิบายได้จากการปรับสภาพด้วยวิธีใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันควบคู่กับการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป ทำให้กากมันที่ได้มีค่าพีเอชสูง ก่อนทำการย่อยด้วยเอนไซม์ต้องมีการปรับค่าพีเอชให้อยู่ที่ค่าที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์แต่ละตัว การปรับพีเอชส่งผลให้มีปริมาณเกลือที่ปนในกากมันในจำนวนค่อนข้างมาก เกลือดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์แต่

ละชนิดที่ใช้ก็อาจจะเป็นได้ นอกจากนี้แล้ว ยังพบว่าการปรับสภาพกากมันก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์นับเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากการปรับสภาพกากมันจะช่วยทำให้โครงสร้างลิกโนเซลลูโลสถูกทำลาย ทำให้เอนไซม์เข้าถึงแกรนูลของแป้งที่อยู่ภายในโครงสร้างของกากมันได้ง่ายขึ้น (Thongchul et al., 2010)

การหมักกรดแอล-แลกติกแบบเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิตจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

การทดลองนี้ ได้ศึกษาและเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานและจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแลกติกโดย *R. oryzae* โดยการใช้ซับสเตรทต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และสารละลายแป้ง

ลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ที่ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต

ในกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว *R. oryzae* สามารถเจริญเติบโตโดยมีลักษณะสัณฐานที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างด้วยกัน ยกตัวอย่างเช่น ขนาดของสปอร์เริ่มต้น (initial spore inoculum size) ซับสเตรทที่ใช้ ค่าพีเอช อัตราการปั่นกวน อัตราการให้อากาศ และอุณหภูมิ เป็นต้น (Zhang et al., 2007) ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ซับสเตรทที่แตกต่างกันมาเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับใช้ในกระบวนการหมักกรดแลกติกโดย *R. oryzae* ที่ตรึงอยู่บนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนู

เมื่อพิจารณาลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ในระยะการเจริญเติบโต (growth phase) ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง (รูปที่ 8) พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตเป็นตัวเซลล์แบบลักษณะเส้นใย โดยจัดวางตัวเป็นชั้นๆ เกาะอยู่บนเส้นใยของผ้า ซึ่งจะมีรูปร่างหน้าตาเหมือนกัน แต่ต่างกันที่ปริมาณเซลล์ที่เกาะอยู่บนเส้นใย และสีของตัวเซลล์ โดยจะขึ้นอยู่กับแต่ละภาวะของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ กรณีภาวะที่ใช้ซับสเตรทกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เซลล์มีสีขาวนวล แต่มีปริมาณที่ไม่มากนักเมื่อเทียบกับภาวะอื่น ดังแสดงในรูปที่ 8(ก) ส่วนภาวะที่ซับสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น (รูปที่ 8(ข) และ 8(ค)) พบว่า เซลล์มีสีน้ำตาล

เนื่องจากสีของอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต และอาหารที่ใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการปรับสภาพและการย่อย เซลล์มีการเจริญเติบโตค่อนข้างมาก ซึ่งสังเกตจากปริมาณของเซลล์ที่เกาะอยู่บนผ้าในจำนวนที่มากพอควร ส่งผลให้อาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต มีปริมาณน้อย เนื่องจากถูกเซลล์ดูดน้ำเข้าไปเป็นจำนวนมาก คาดว่าน่าจะมาจากการที่สารอาหารที่ใช้ในการเป็นอาหารสำหรับการเจริญเติบโตและอาหารสำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์นั้นมีโปรตีนอยู่ค่อนข้างมาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Thongchul et al. (2010) พบว่ากากมันสำหลังประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 5.3 % ทำให้สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังมีปริมาณของโปรตีนสูงเช่นกัน ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณของแหล่งไนโตรเจนอีกทางหนึ่ง ส่งผลให้ช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์ในปริมาณที่มากขึ้น (Yao et al., 2010) ส่วนภาวะที่ซับสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด (รูปที่ 8(ง) และ 8(จ)) พบว่า เซลล์มีสีน้ำตาลเข้ม และน้ำตาลส้มตามลำดับ เนื่องจากสีของอาหารที่ใช้เช่นกัน และในระหว่างการหมักนั้นจะมีปริมาณของฟองเกิดขึ้นเป็นปริมาณมากโดยจะเกิดเป็นฟองลอยขึ้นมากอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา จวบจนกระทั่งฟองคงที่ซึ่งใช้เวลานานประมาณ 24 ชั่วโมง และภาวะที่ซับสเตรทเป็นสารละลายแป้ง (รูปที่ 8(ฉ)) พบว่า เซลล์มีสีขาวนวล แต่จะขาวกว่าการใช้กลูโคส เนื่องจากสีของสารละลายแป้ง และในช่วงเริ่มต้นกระบวนการหมักนั้น สารละลายแป้งที่ใช้จะเกิดเจลาติไนเซชั่น ทำให้น้ำหมักมีความหนืดค่อนข้างสูง และเนื่องจากสารละลายแป้งที่มีลักษณะเป็นเจล จึงไปเกาะกับเส้นใยผ้าฝ้ายที่เตรียมไว้สำหรับให้เซลล์ขึ้นไปเกาะในขณะเจริญเติบโต จึงส่งผลให้เซลล์เกาะตัวบนผ้าฝ้ายแบบไม่แน่นนัก แต่เมื่อทำการหมักไประยะหนึ่งประมาณชั่วโมงที่ 24 พบว่า สารละลายแป้งมีความหนืดลดลง อาจมาจากการที่มีการปั่นกวนของใบพัดทำให้โมเลกุลของแป้งสั้นลง อีกทั้ง *R. oryzae* มีเอนไซม์ในกลุ่มอะไมโลไลติกมาช่วยย่อยโมเลกุลของแป้งให้มีขนาดเล็กลงความหนืดของอาหารจึงลดลง (Wee et al., 2006)

เมื่อพิจารณาลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ในระยะการสร้างผลิตภัณฑ์ (production phase) ที่เวลาการหมัก 96 ชั่วโมง (รูปที่ 9) พบว่า เซลล์ในแต่ละภาวะมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะภาวะที่ซับสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น (รูปที่ 9(ข) และ 9(ค)) พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เซลล์บางส่วนไม่ได้สัมผัสกับอาหารทำให้เซลล์เจริญเป็นสปอร์ในบริเวณด้านบนของเบดสถิต ส่วนภาวะที่ซับสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์และสารละลายที่ได้จากการย่อย

กากมันสำปะหลังด้วยกรด (รูปที่ 9(ง) และ 9(จ)) พบว่า เซลล์มีการเจริญเติบโตมากขึ้นเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามความถี่ของการเกิดฟองในระยะนี้จะมีมากกว่าในระยะของการเจริญเติบโต

เมื่อพิจารณาลักษณะการยึดเกาะของ *R. oryzae* บนเบดสถิตด้านนอก และด้านใน (รูปที่ 10) และความหนาของเซลล์ (รูปที่ 11) พบว่า เซลล์มีการยึดเกาะบนเบดสถิตที่หนาแน่นและมีความหนาที่แตกต่างกันไปในแต่ละภาวะ จะเห็นได้ชัดเจนในกรณีของภาวะที่ซับสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 10 (ข) และ 10(ค)) พบว่า เซลล์มีปริมาณมาก และเจริญเติบโต ขยายขนาดเกินบริเวณที่ยึดเกาะของเบดสถิต เซลล์มีลักษณะยึดเกาะกันอย่างหลวมๆ ตัวเซลล์มีความหนามากพอควร ดังแสดงในรูปที่ 11(ข) และ 11(ค) มีการพองน้ำ เนื่องมาจากการที่เซลล์ดูดน้ำเข้าไปในระหว่างกระบวนการหมัก น้ำหนักแห้งของทั้งสองภาวะนี้คือ 57.26 และ 58.09 กรัม ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนคือ 35.12 กรัม กรณีภาวะที่ซับสเตรทเป็นสารละลายแป้ง (รูปที่ 10(ฉ)) พบว่า เซลล์มีปริมาณมากเช่นกัน มีการเจริญเติบโตของเซลล์ที่มีขนาดค่อนข้างหนา ดังแสดงในรูปที่ 11(ฉ) แต่ในภาวะนี้เซลล์มีการหลุดออกจากเบดสถิตได้ง่าย เนื่องจากมีการเกาะตัวกันอย่างหลวมๆ ปนอยู่กับสารละลายแป้งที่ยังคงมีสภาพเป็นเจล และมีการพองน้ำเช่นกันด้วย กรณีของภาวะที่ซับสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด (รูปที่ 10(ง) และ 10(จ)) พบว่า เซลล์มีการเจริญเติบโต เกาะตัวกันอย่างหนาแน่นจึงสังเกตได้ว่าเซลล์มีปริมาณน้อย เจริญอยู่บนเส้นใยผ้าฝ้ายเท่านั้น และมีขนาดไม่หนามากเกินไป ดังแสดงในรูปที่ 11(ง) และ 11(จ) ซึ่งภาวะข้างต้นที่ได้กล่าวมานั้นแตกต่างกับภาวะที่ใช้ซับสเตรทกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 10(ก) ในภาวะนี้เซลล์จะยึดเกาะเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ และเกาะตัวกันอย่างไม่หนาแน่นมากนัก ดังแสดงในรูปที่ 11(ก) ทำให้มีช่องว่างภายในตัวเซลล์ ส่งผลให้การถ่ายเทอาหารและอากาศเข้าสู่ภายในตัวเซลล์มีประสิทธิภาพมากกว่าภาวะอื่นๆ เซลล์จึงสามารถผลิตกรดแลกติกได้มากขึ้น (Chotisubha-anandha et al., 2011)

เมื่อพิจารณาลักษณะเซลล์ *R. oryzae* ที่ตรึงอยู่ด้านในของเบดสถิต (รูปที่ 12) พบว่าบริเวณผิวของเซลล์ที่อยู่ด้านในมีลักษณะด้านและแข็งกว่าเซลล์ที่อยู่ด้านนอกของเบดสถิต เนื่องมาจากเป็นบริเวณที่อยู่ติดกับอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่าด้านนอกของเบด (Thongchul, 2005; Chotisubha-anandha et al., 2011) กรณีของภาวะที่ซับสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด (รูปที่ 12 (ง)

และ 12(จ)) พบว่า ลักษณะที่ด้าน แข็ง และมีการจัดเรียงกันแน่นมากกว่าภาวะอื่นๆ ทั้งนี้อาจจะมาจากการที่สารละลายมีความเข้มข้นของเกลือสูง ซึ่งการองค์ประกอบของอาการเลี้ยงเชื้อนั้นส่งผลโดยตรงต่อรูปร่างและลักษณะของเซลล์ (Zhang et al., 2007) โดยน้ำหนักแห้งของทั้งสองภาวะนี้คือ 64.42 และ 76.81 กรัม ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการใช้ภาวะอื่น จึงเป็นสามารถสรุปได้ว่า เซลล์ที่เกิดในสองภาวะนี้มีการแพ็คตัวอยู่อย่างหนาแน่น และกรณีของภาวะที่ซับสเตรทเป็นสารละลายแป้ง (รูปที่ 12(ฉ)) พบว่า เซลล์มีลักษณะที่นุ่ม ไม่มีความคงตัวของตัวเซลล์ หลุดขาดจากกันง่าย แต่ยังมีบริเวณที่มีความแข็งอยู่บ้างเล็กน้อย เนื่องมาจากการในภาวะนี้มีโมเลกุลของแป้งที่มีลักษณะเป็นเจลมาแทรกอยู่ระหว่างตัวเซลล์กับเส้นใยผ้าฝ้ายที่ยึดตรึง ทำให้เซลล์มีไม่มีความคงตัวและหลุดออกจากกันง่าย ทำให้มีตัวเซลล์มีการหลุดออกมาบ้างในขณะที่ทำการเปลี่ยนถ่ายอาหาร และยังส่งผลให้ปริมาณของน้ำหนักแห้งของภาวะนี้มีค่ามากกว่าค่าที่เป็นจริงเพราะมีน้ำหนักของโมเลกุลแป้งปะปนไปด้วย คือ 33.77 กรัม

จลนพลศาสตร์ของการหมักกรดแอล-แลกติกจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ โดย *R. oryzae* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต

จากการเปรียบเทียบจลนพลศาสตร์ของการหมักกรดแลกติกโดย *R. oryzae* ที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศเท่ากับ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที โดยการใช้ซับสเตรทต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และสารละลายแป้ง (รูปที่ 13) พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 53.61 26.57 25.41 7.63 6.75 และ 33.77 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 75.55%, 41.57% 44.48% 12.56% 12.84% และ 53.10% ตามลำดับ อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 1.68 0.66 0.64 0.16 0.14 และ 0.70 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ โดยสามารถผลิตเอทานอลคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 5.65%, 18.68%, 16.38%, 21.32%, 23.84% และ 17.11% ตามลำดับ อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.13 0.49 0.38 0.27 0.26 และ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.2 จากผลทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อความสามารถในการผลิตกรดแลกติกที่แตกต่างกันด้วย เพราะว่าองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในแต่ละภาวะนั้นไม่เหมือนกัน และ *R. oryzae* เป็นราที่มีอะไมโลไลติกแอคทิวิตี้ กล่าวคือมีอะไมเลสและกลูโคอะ

ไมเลสที่สามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคสได้ (Wee et al., 2006) ความสามารถในการที่รานั้นจะนำเอาไปใช้ในแต่ละภาวะจึงมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกันด้วย

จากการทดลองพบว่าการเลือกใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 13(ก)) จะสามารถผลิตกรดแลกติกได้มากที่สุดคือ 53.61 กรัมต่อลิตรคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 75.55% และอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 1.68 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง รองลงมาคือการแป้ง (รูปที่ 13(ฉ))สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 33.77 กรัมต่อลิตรคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 53.10% และอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.70 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยตรง *R. oryzae* จะสามารถนำไปใช้ในวิถีเมแทบอลิซึมโดยเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวทด้วยวิถี Emden-Meyerhof pathway (EMP) ได้ทันที (Thongchul, 2005) ส่งผลให้อัตราการผลิตกรดแลกติกสูงกว่าการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ซึ่งพบว่าเมื่อใช้สารละลายแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นจะมีความสามารถในการผลิตกรดแลกติกน้อยกว่าการใช้กลูโคส ทั้งนี้เนื่องจากในขั้นตอนของการนำแป้งไปใช้ในวิถีเมทอบอรึซึมได้นั้น จะต้องมีการกระบวนการตัดโมเลกุลของแป้งให้มีขนาดเล็กจนได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) ก่อน ราจึงสามารถนำเข้าสู่วิถีเมทอบอลิซึมได้และสามารถผลิตเป็นกรดแลกติกออกมาได้ ซึ่งสังเกตได้จากกราฟรูปที่ 13(ฉ) พบว่าค่าพีเอชในช่วงแรกของระยะการเจริญเติบโต (growth phase) มีค่าเพิ่มสูงขึ้น แสดงว่าโมเลกุลของแป้งมีการตัดให้สั้นลงเกิดเป็นโมโนแซคคาไรด์มากขึ้น ส่งผลให้มีความเป็นเบสเพิ่มขึ้นตาม เนื่องจากมีหมู่ reducing sugar ปรากฏออกมาเพิ่มขึ้น ค่าพีเอช จึงเพิ่ม (Williams and Flowers, 1978) อาจจะส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างกรดแลกติกของราได้ เนื่องจากค่าพีเอช ที่เหมาะสมต่อการการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ของ *R. oryzae* คือ 6 (Chotisubha-anandha et al., 2011)

จากการทดลองพบว่าซับสเตรทที่สามารถนำมาใช้ในการหมักกรดแลกติกได้ดีถัดมาจากกลูโคสและสารละลายแป้ง คือ สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งซับสเตรททั้งสองชนิดนี้ให้ปริมาณกรดแลกติกใกล้เคียงกันดังแสดงผลดังตารางที่ 4 คือ 26.57 และ 25.41 กรัมต่อลิตรคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 41.57% และ 44.48 อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.66 และ 0.64 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้ประมาณ 0.5 เท่าของการใช้กลูโคส โดย *R. oryzae* นำซับสเตรททั้งสองชนิดนี้ไปใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ในปริมาณค่อนข้างสูง สังเกตได้จากรูปที่ 10(ข) และ 10(ค) ซึ่งคาดว่าน่าจะมาจากการที่สารละลายมีโปรตีนสูงจึงทำให้ส่งเสริมการเจริญของเซลล์ ทำให้อัตราการถ่ายเทอาหารและอากาศภายในเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพลดลง และเนื่องจากซับสเตรทดังกล่าวไม่ได้อยู่ในรูปของกลูโคสบริสุทธิ์ โดยมีองค์ประกอบของสารอื่นปะปนอยู่ด้วยซึ่งอาจจะไปส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *R. oryzae* ทำให้ *R.*

oryzae สามารถใช้น้ำตาลหมดไปอย่างรวดเร็ว ซึ่งพบว่าน้ำตาลของทั้งสองภาวะนี้หมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 และ 80 ตามลำดับ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 13(ข) และ 13(ค) ตามลำดับ อีกทั้งการย่อยของกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์นี้อาจจะยังไม่เกิดปฏิกิยาที่สมบูรณ์ เนื่องจากการย่อยด้วยเอนไซม์นี้เป็นการย่อยที่ภาวะไม่รุนแรงส่งผลให้โมเลกุลของแป้งยังอยู่ในรูปของโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ดังนั้น *R. oryzae* จึงต้องสร้างเอนไซม์จำพวกอะไมโลไลติกออกมาย่อยให้ได้กลายเป็นกลูโคสบริสุทธิ์เพื่อที่จะนำเข้าสู่วิถีเมแทบอลิซึมต่อไป ทำให้เซลล์มีสามารถผลิตกรดแลกติกได้ในระดับหนึ่ง เมื่อมาพิจารณาตามค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนเท่ากับ 0.033 และ 0.049 ต่อวินาทีตามลำดับ เมื่อทำการหมักเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง แสดงในตารางที่ 4 พบว่าประสิทธิภาพของการถ่ายเทออกซิเจนของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพนั้นมีค่อนข้างต่ำกว่ากากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 57.26 และ 58.09 กรัมตามลำดับ ซึ่งในปริมาณของเซลล์ที่ใกล้เคียงกัน แต่ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนแตกต่างกัน ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าการปรับสภาพกากมันนั้นส่งผลให้ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีค่าที่สูงขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพของการถ่ายเทอาหารและอากาศมีมากขึ้น ส่งผลดีต่อการเจริญของเซลล์และการผลิตกรดแลกติกให้ได้ในปริมาณสูงในการหมักระยะยาว (Thongchul and Yang, 2006) และจากผลการทดลองในตารางที่ 4 พบว่า ภาวะที่ใช้ซับสเตรทที่เป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน มีน้ำหนักเซลล์แห้งที่ใกล้เคียงกันกับภาวะที่ซับสเตรทใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน คือ 55.62 กรัม ในขณะที่ ภาวะที่ใช้ซับสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอน ได้น้ำหนักเซลล์แห้งที่มากกว่า คือ 64.42 และ 76.81 กรัม ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน น่าจะมีคุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใกล้เคียงกับสารละลายแป้ง

จากการทดลองพบว่าซับสเตรทที่ *R. oryzae* นำไปใช้เพื่อผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณที่ต่ำ คือ สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด โดยกรดแลกติกที่ได้มีปริมาณต่ำกว่าการหมักด้วยซับสเตรทชนิดอื่น แสดงผลดังตารางที่ 4 คือสามารถผลิตกรดแลกติกได้เพียง 7.63 และ 6.75 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.16 และ 0.14 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากก่อนนำซับส

เตรทสองชนิดนี้มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนจำเป็นต้องมีการปรับค่าพีเอชให้เหมาะสมด้วยกรดและเบสก่อนที่จะนำไปเข้าสู่การย่อยด้วยเอนไซม์ ดังนั้น จึงส่งผลให้ความเข้มข้นของเกลือในซับสเตรทดังกล่าวมีปริมาณสูง อีกทั้งในการปรับสภาพ ภาวะที่ใช้รุนแรงกว่าภาวะอื่นๆ อาจทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ร่วมอื่นๆ ขึ้นด้วย ซึ่งในกรณีของการย่อยด้วยกรดนั้นอาจก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ร่วมที่ไม่ต้องการ เช่น เฟอร์ฟูรอล และสารประกอบฟีโนลิก เป็นต้น ซึ่งสารดังกล่าวเป็นอันตรายต่อเซลล์ *R. oryzae* และเป็นตัวยับยั้งกระบวนการหมักได้ (Woiciechowski et al., 1999) เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิต ในการทดลองนี้ไม่ได้มีการทดลองเพื่อกำจัดเกลือที่เกิดจากการปรับค่าพีเอชออกจากสารละลายที่ได้จากการย่อยก่อนที่จะนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมัก ส่งผลให้กรดแลกติกที่ได้จากการใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์มาเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นมีปริมาณที่ต่ำ เกิดผลิตภัณฑ์พลอยได้ (กรดฟูมาริก) ในระหว่างการหมักของแหล่งคาร์บอนทั้งสองชนิดด้วยเช่นกัน การใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์มาเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 13(ง)) กรดฟูมาริกเกิดขึ้นในช่วงชั่วโมงที่ 40 ของระยะการเจริญเติบโต และชั่วโมงที่ 24 ของระยะการสร้างผลิตภัณฑ์ ซึ่งสามารถผลิตกรดฟูมาริกสูงสุด 6.20 กรัมต่อลิตร ส่วนสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดมาเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น (รูปที่ 13(จ)) กรดฟูมาริกเกิดขึ้นในช่วงชั่วโมงที่ 24 ของระยะการสร้างผลิตภัณฑ์ ซึ่งสามารถผลิตกรดฟูมาริกสูงสุด 5.51 กรัมต่อลิตร แต่สองภาวะนี้จะเห็นได้ว่า *R. oryzae* มีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าภาวะอื่นๆ ซึ่งเซลล์จะเริ่มโตภายหลังชั่วโมงที่ 24 ของระยะการเจริญเติบโตเป็นต้นไป สังเกตได้จากค่าพีเอชที่เริ่มลดลง เนื่องมาจากเซลล์เริ่มมีการเจริญเติบโตและมีการผลิตกรดแลกติกออกมาจึงทำให้ค่าพีเอชลดลง ในขณะที่ภาวะอื่นนั้นเซลล์จะเริ่มโตตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 ของระยะการเจริญเติบโตเป็นต้นไป นอกจากนี้ ยังพบว่าทั้งสองภาวะนี้มีการผลิตเอทานอลเป็นปริมาณสูงกว่าการผลิตกรดแลกติก ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลเท่ากับ 12.95 และ 12.53 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่า ถึงแม้ว่าจะราสามารถใช้ซับสเตรทจำพวกสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์กับสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลกติกได้ แต่ก็จำเป็นต้องมีกำจัดสิ่งเจือปน (detoxification) จำพวกสารยับยั้งในกระบวนการหมักเช่น กรดอะซิติก เฟอร์ฟูรอล ไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟิวรอล(HMF) และเกลือ เป็นต้น (Zhao et al., 2009) เพื่อที่จะให้เชื้อมีประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ได้มากขึ้น

จากการทดลองพบว่า การหมักที่ใช้ซับสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันจะสามารถผลิตกรดแลกติกได้ดีกว่าการหมักที่ใช้ซับสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ ทั้งนี้เนื่องมาจากการที่ซับสเตรทที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงอย่างเดียว ไม่มีการใช้สารเคมีซึ่งในที่นี้คือโซเดียมไฮดรอกไซด์ในระหว่างขั้นตอนการปรับสภาพเข้ามาเกี่ยวข้อง ส่งผลให้ไม่จำเป็นต้องมีการปรับค่าพีเอช ด้วยกรดและเบสเพื่อให้ได้พีเอชที่ต้องการ ก่อนที่จะนำไปเข้าสู่การย่อยด้วยเอนไซม์ต่อไป จึงไม่ก่อให้เกิดปริมาณของเกลือในสารละลายได้ ดังนั้นภาวะที่สารละลายที่ได้จากการย่อยของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น จึงมีความสามารถในการผลิตกรดแลกติกได้มากกว่า ส่งผลให้มีค่า yield และอัตราการผลิตกรดแลกติกที่สูงกว่าเช่นกัน ดังนั้นการนำกากมันสำปะหลังมาประยุกต์ในกระบวนการผลิตกรดแลกติกนั้น พบว่าการที่นำกากมันมาปรับสภาพด้วยเทคนิคการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเพียงอย่างเดียวจะสามารถผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณระดับหนึ่ง (25.41 กรัมต่อลิตร) ไม่มีความจำเป็นต้องใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้าช่วย

ผลการทดลองจากงานวิจัยนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Thongchul et al. (2010) ซึ่งทำการศึกษาผลิตกรดแลกติก จากกลูโคส สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดและเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน (ความเข้มข้นเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร) โดยการตรึงเซลล์ *R.oryzae* NRRL 395 บนเส้นใยผ้าฝ้าย ทำการหมักในขวดเขย่า พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 23.76 4.47 และ 15.43 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 33% 6% และ 2.3% ตามลำดับ อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.46 0.13 และ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ และสามารถผลิตเอทานอลสามารถผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 14.67 16.37 และ 24.25 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 21% 28% และ 31% ตามลำดับ อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.29 0.60 และ 0.30 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ จากผลการทดลองเห็นได้ว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จะสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุด เนื่องจากกากมันสำหลังประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 5.3 % ทำให้สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังมีปริมาณของโปรตีนสูงเช่นกัน ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณของแหล่งไนโตรเจนอีกทางหนึ่ง ส่งผลให้ช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์ในระหว่างกระบวนการหมักมากขึ้นแทนที่จะไปสร้างเป็นกรดแลกติก และการทดลองนี้เป็นการหมักในระดับขวดเขย่า ทำให้ประสิทธิภาพของการถ่ายเทออกซิเจนภายในขวดเขย่าไม่เพียงพอและมีการ เนื่องจาก *R. oryzae* เป็นราที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ ดังนั้นออกซิเจนจึงเป็นปัจจัยสำคัญวิถีเมแทบอลิซึมของเซลล์ ถ้าหากมีออกซิเจนไม่เพียงพอสาเหตุจากการกวนที่ไม่ทั่วถึง จะ

เปลี่ยนวิถีไปสร้างเป็นผลิตภัณฑ์อื่น เช่น เอทานอล เป็นต้น (Zhang et al., 2007) ดังนั้น เราสามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ได้โดยการทำการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งจะสามารถควบคุมอัตราการปั่นกวนและให้อากาศอย่างทั่วถึง ส่งผลให้การถ่ายเทออกซิเจนและการผสมเป็นเนื้อเดียวกันของอาหารมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tay and Yang (2002) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดย *R. oryzae* NRRL 395 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ rotating fibrous-bed แบบ fed-batch โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูง คิดเป็น $Y_{P/S}$ เท่ากับ 90% เนื่องจากมีการตรึงเซลล์บนเส้นใยผ้าฝ้าย และมีการให้ออกซิเจนที่ทั่วถึง และงานวิจัยนี้พบว่าเมื่อทำการหมักโดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยใช้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตรเช่นกัน พบว่าสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตกรดแลกติก อีกทั้งช่วยลดปริมาณของการผลิตเอทานอลได้อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตาม ซับสเตรทที่มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนก็เป็นอีกปัจจัยสำคัญ ถ้าหากมีองค์ประกอบที่เป็นอุปสรรคต่อการผลิตกรดแลกติก ก็จะส่งผลให้ประสิทธิภาพของการผลิตกรดแลกติกลดลงอีกด้วย โดยจะเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ร่วมคือ เอทานอล และกรดฟูมาริกแทน (John et al., 2007; Wee et al., 2006; Zhang et al., 2007)

ลักษณะการจัดเรียงตัวของเส้นใยของ *R. oryzae* บนวัสดุตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต

เมื่อจบกระบวนการหมัก ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ตรึงบนวัสดุตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต ตัดให้ได้ขนาด 2.5 × 2.5 เซนติเมตร นำไปตรวจสอบลักษณะโดยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) พบว่า ลักษณะเส้นใยราของ *R. oryzae* ที่เจริญบนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่บริเวณภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิตที่กำลังขยาย 350 เท่า (รูปที่ 14) โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันได้แก่ กลูโคส สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และสารละลายแป้ง พบว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 14(ก)) เซลล์มีลักษณะเรียวยาวและลักษณะการเกิดกิ่งเล็กๆ (Fragmentation) ภายในหนึ่งสาย ซึ่งไม่แตกต่างกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 53.61 กรัมต่อลิตร แสดงว่าการใช้กลูโคสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอนเซลล์จะมีการเจริญเติบโตในลักษณะที่สมบูรณ์ที่สุดและสามารถผลิตกรดแลกติกได้มากที่สุด แต่อย่างไรก็ดีค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนก็ควรจะสูงตามไปด้วยเพื่อแสดงถึงการถ่ายเทอาหารและอากาศที่เพียงพอ

แต่เมื่อพิจารณาลักษณะเส้นใยราของ *R. oryzae* ที่เจริญบนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่บริเวณภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิตที่กำลังขยาย 750 เท่า พบว่าการใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 15(ข)) เซลล์มีลักษณะอ้วน ยาวแต่บริเวณด้านปลายจะขาดเนื่องจากเซลล์มีการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างหนาแน่น โดยดูจากรูปที่ 10(ค) พบว่าเซลล์นั้นมีปริมาณมาก ทำให้ระยะห่างระหว่างเซลล์และใบพัดมีน้อย ส่งผลเซลล์เกิดการฉีกขาดจากแรงเฉือนจากใบพัดแต่อย่างไรก็ดีที่สภาวะนี้เซลล์ก็ยังสามารถผลิตกรดแลกติกได้ถึง 25.41 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาการใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าลักษณะเส้นใยราของ *R. oryzae* ที่เจริญบนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่บริเวณภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิตที่กำลังขยาย 750 เท่า (รูปที่ 15(ง) และ 15(จ)) เซลล์มีลักษณะที่ลีบแบนและมีผลึกมาเกาะอยู่ตัวเซลล์ และเมื่อทำการเพิ่มกำลังขยายเป็นที่ 3500 เท่า (รูปที่ 16) พบว่าผลึกที่มาเกาะอยู่บนตัวเซลล์มีลักษณะเป็นรูปแฉกคล้ายลักษณะของผลึกของเกลือ (Fontana et al., 2011) และเมื่อทำการวิเคราะห์หาธาตุองค์ประกอบของผลึกด้วยเครื่อง Energy Dispersive X-ray spectrometer (EDX) พบว่าประกอบไปด้วยธาตุคาร์บอนประมาณ 52% ออกซิเจนประมาณ 42% และโซเดียมประมาณ 6% ซึ่งผลึกที่เกิดขึ้นนี้ส่งผลให้ความสามารถในการผลิตกรดแลกติกของซับสเตรททั้งสองชนิดนี้มีประสิทธิภาพลดลง เห็นได้ว่า ในภาวะนี้เซลล์ผลิตกรดแลกติกได้เพียง 7.63 และ 6.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาลักษณะการยึดเกาะของ *R. oryzae* บ นเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่บริเวณด้านนอกของเบดสถิต แสดงดังรูปที่ 17 เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะของเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่ไม่มีเซลล์ (รูปที่ 17(ก)) กับเซลล์ที่ตรึงอยู่บนเส้นใย (รูปที่ 17(ข) ถึง รูปที่ 17(จ)) พบว่าเซลล์มีการยึดเกาะที่มั่นคง มีการพันเกี่ยวกันระหว่างเส้นใยของเซลล์และเส้นใยผ้าฝ้าย ทำให้ยากต่อการหลุดออกมาในระหว่างกระบวนการหมัก อันเนื่องจากแรงปั่นกวน การตรึงเซลล์สามารถช่วยเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ในการหมักระยะยาว และใช้พลังงานในการปั่นกวนและการให้อาหารน้อยลง เนื่องจากอาหารที่ใช้ในการหมักมีความหนืดต่ำ เพราะเซลล์ได้ถูกตรึงไว้แล้ว ด้วยเหตุนี้เองยังส่งผลให้การเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ภายหลังเสร็จสิ้นกระบวนการหมักแล้วเป็นไปได้ง่ายขึ้น (Thongchul, 2005; Chotisubha-anandha et al., 2011)

เมื่อพิจารณาการใช้สารละลายแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน จากรูปที่ 17(ฉ) พบว่าการยึดเกาะของ *R. oryzae* บนเส้นใยผ้าฝ้าย ไม่แน่นหนาเหมือนกับการใช้ซับสเตรทชนิดอื่น เนื่องจากมี

โมเลกุลของแป้งมาเกาะร่วมอยู่ด้วย เห็นได้จากมีเม็ดแป้งลักษณะกลมๆ (Chen et al., 2011) แทรกกระจัดกระจายอยู่ระหว่างตัวเซลล์และเส้นใย ทำให้เซลล์นั้นสามารถหลุดออกจากเส้นใยผ้าฝ้ายได้ง่าย ส่งผลต่อการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ภายหลังเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก และยังส่งผลให้น้ำหนักเซลล์แห้งของการใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นมีปริมาณสูงด้วย เนื่องจากมีน้ำหนักของโมเลกุลแป้งเกาะอยู่ที่ตัวเซลล์และบริเวณเส้นใยที่ยึดตรึง แต่อย่างไรภาวะนี้เซลล์ก็ยังสามารถผลิตกรดแลกติกได้ถึง 33.77 กรัมต่อลิตร

ปัจจัยทางวิศวกรรมที่เหมาะสมต่อการหมักกรดแอล-แลกติก

ลักษณะ และโครงสร้างของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการทดลองขนาด 5 ลิตร และขนาด 90 ลิตร ดังนี้

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร			ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร		
เส้นผ่านศูนย์กลางถัง	160	mm	เส้นผ่านศูนย์กลางถัง	400	mm
เส้นผ่านศูนย์กลางใบพัด	64	mm	เส้นผ่านศูนย์กลางใบพัด	160	mm
ความเร็วรอบการกวน	20-1200	rpm	ความเร็วรอบการกวน	120-1200	rpm
อัตราการให้อากาศ	0-13	L/min		>12	m^3/h
มอเตอร์	0.77	kW	มอเตอร์	2.2	kW

การคำนวณเพื่อขยายสเกล ทำโดยใช้เกณฑ์คงที่ 4 เกณฑ์ ดังต่อไปนี้

เกณฑ์ที่ 1 กำลังมอเตอร์ต่อปริมาตร (*P/V*) คงที่

โดยสำหรับการปั่นกวนที่รุนแรง (turbulent region) ค่า *P/V* สามารถอธิบายได้ ดังนี้

$$\frac{P}{V} \propto N_i^3 D_i^2$$

จากการคำนวณ ได้ปัจจัยทางวิศวกรรมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร ดังต่อไปนี้

Property	**Small scale, 5 L**	**Large scale, 90 L**
P	1 (P = 11.52 W)	15.625 (P = 180.37 W)
P_a	1 (P_a = 10.60 W)	14.24 (P_a = 158.73 W)
P/V	1	1
N_i	1 (N_i = 700 rpm = 11.67 s^{-1})	0.54 (N_i = 380 rpm = 6.34 s^{-1})
D_i	1 (D_i = 64 mm)	2.5 (D_i = 160 mm)

Property	Small scale, 5 L	Large scale, 90 L
F_i	1	8.49
F_i/V	1	0.54
N_iD_i	1 (N_iD_i = 0.75 m/s)	1.35 (N_iD_i = 1.01 m/s)
Re_i	1 (Re_i = 47,704.91)	3.40 (Re_i = 161,980.04)

จากผลการคำนวณ จะพบว่าหากออกแบบขยายสเกลโดยใช้กำลังมอเตอร์ต่อปริมาตร เป็นเกณฑ์คงที่ ในการหมักกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร จะต้องใช้อัตราการกวน 380 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เพื่อให้ได้จลนพลศาสตร์ของกระบวนการเทียบเคียงได้กับค่าที่ได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

เกณฑ์ที่ 2 อัตราการไหลวนของน้ำหมัก (F/V) คงที่

โดยสำหรับการปั่นกวนที่รุนแรง (turbulent region) ค่า F/V สามารถอธิบายได้ ดังนี้

$$\frac{F_i}{V} \propto N_i$$

เมื่ออัตราการไหลวนของน้ำหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพทั้งสองขนาดมีค่าเท่ากัน จะพบว่า ถังทั้งสองจะปั่นกวนที่ความเร็วรอบเดียวกัน คือ 700 รอบต่อนาที อย่างไรก็ตาม การปั่นกวนน้ำหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตรที่ความเร็วรอบสูงขนาดนี้ จะก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนได้ เนื่องจาก การปั่นกวนที่ความเร็วรอบสูงเป็นที่มาของการเกิดฟอง ทำให้ต้องมีการใช้สารลดฟอง ซึ่งหากใช้ในปริมาณมากจะส่งผลต่อค่าการละลายของออกซิเจน และการเมแทบอลิซึมของรา อีกทั้งการปั่นกวนที่ความเร็วสูง ยังใช้พลังงานสูงมาก ดังนั้น เกณฑ์คงที่นี้จึงไม่เหมาะสำหรับนำไปใช้ในการขยายสเกล

เกณฑ์ที่ 3 ความเร็วปลายใบพัดกวน (u_i) คงที่

ความเร็วปลายใบพัดกวน แปรผันกับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัดและความเร็วรอบในการกวน ดังนี้

$$u_i \propto N_iD_i$$

จากการคำนวณ ได้ปัจจัยทางวิศวกรรมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร ดังต่อไปนี้

Property	Small scale, 5 L	Large scale, 90 L
P	1 (P = 11.52 W)	6.25 (P = 72 W)

Property	Small scale, 5 L	Large scale, 90 L
P_a	1 (P_a = 10.60 W)	5.98 (P_a = 63.36 W)
P/V	1	0.4
N_i	1 (N_i = 700 rpm = 11.67 s^{-1})	0.4 (N_i = 280 rpm = 4.67 s^{-1})
D_i	1 (D_i = 64 mm)	2.5 (D_i = 160 mm)
F_l	1	6.25
F/V	1	0.4
N_iD_i	1 (N_iD_i = 0.75 m/s)	1 (N_iD_i = 0.75 m/s)
Re_i	1 (Re_i = 47,704.91)	2.50 (Re_i = 119,262.28)

จากผลการคำนวณ จะพบว่าหากออกแบบขยายสเกลโดยใช้ความเร็วปลายใบพัดกวนเป็นเกณฑ์คงที่ ในการหมักกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร จะต้องใช้อัตราการกวน 280 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เพื่อให้ได้จลนพลศาสตร์ของกระบวนการเทียบเคียงได้กับค่าที่ได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

เกณฑ์ที่ 4 ค่า Reynolds' number (Re_i) คงที่

สำหรับการปั่นกวนที่รุนแรง (turbulent region) ค่า Re_i สามารถอธิบายได้ ดังนี้

$$Re_i \propto N_i D_i^2$$

เมื่อกำหนดให้ค่า Re_i คงที่จากการคำนวณ ได้ปัจจัยทางวิศวกรรมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร ดังต่อไปนี้

Property	Small scale, 5 L	Large scale, 90 L
P	1 (P = 11.52 W)	0.4 (P = 4.61 W)
P_a	1 (P_a = 10.60 W)	0.31 (P_a = 3.32 W)
P/V	1	0.0256
N_i	1 (N_i = 700 rpm = 11.67 s^{-1})	0.16 (N_i = 112 rpm = 1.87 s^{-1})
D_i	1 (D_i = 64 mm)	2.5 (D_i = 160 mm)
F_l	1	2.5
F/V	1	0.16
N_iD_i	1 (N_iD_i = 0.75 m/s)	0.4 (N_iD_i = 0.3 m/s)
Re_i	1 (Re_i = 47,704.91)	1 (Re_i = 47,704.91)

จากผลการคำนวณ จะพบว่าหากออกแบบขยายสเกลโดยใช้ค่า Reynold's number เป็นเกณฑ์คงที่ ในการหมักกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร จะต้องใช้อัตราการกวน 112 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เพื่อให้ได้จลนพลศาสตร์ของกระบวนการเทียบเคียงได้กับค่าที่ได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

ข้อสรุป

จากผลการทดลองในขั้นตอนการแปรอัตราการปั่นกวนและอัตราการให้อากาศในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต เห็นได้ชัดว่าการตรึงเซลล์ *R. oryzae* บนผ้าขนหนูช่วยในการควบคุมสัณฐานของราเส้นใยให้อยู่ในภาวะที่เหมาะสมต่อภาวะการเจริญและการผลิตกรดแลกติก โดยในระบบเซลล์ตรึงมีอัตราการถ่ายเทออกซิเจนที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับค่าที่ได้ในถังกวนที่ควบคุมที่อัตราการปั่นกวนและอัตราการให้อากาศเท่ากัน อีกทั้งยังได้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแอล-แลกติกเพื่อนำไปใช้ในการประเมินและออกแบบขยายสเกลการผลิตต่อไป (700 รอบต่อนาที 0.5 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที)

ในขั้นตอนการเตรียมกากมันสำปะหลังเพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักกรดแอล-แลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต พบว่าหากมีการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเพื่อเป็นการทำลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ตามด้วยการย่อยสลายโครงสร้างเซลลูโลสด้วยอะไมเลสจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของอะไมเลสที่เข้าไปย่อยแกรนูลแป้งที่ติดอยู่ในกากมันได้ดียิ่งขึ้น ในขณะที่การใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้าช่วยในการปรับสภาพกลับส่งผลลบต่อการนำไปย่อยต่อด้วยเซลลูเลสและอะไมเลส เนื่องจากภาวะความเป็นด่างสูงหลังจากการปรับสภาพ ทำให้ต้องเติมกรดเพื่อปรับค่าพีเอชให้เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไป ซึ่งเกลือที่เกิดขึ้นจากการปรับพีเอชอาจส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ทำให้ไม่สามารถย่อยโครงสร้างเซลลูโลสและแกรนูลแป้งได้ดีนัก

เมื่อนำสารละลายที่ได้จากการย่อยมันสำปะหลังด้วยวิธีต่างๆ กันมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักกรดแลกติกโดย *R. oryzae* เทียบกับการใช้กลูโคส สารละลายแป้ง พบว่า สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลัง ทั้งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันและที่ไม่ได้ปรับสภาพ ให้ผลผลิตกรดแลกติกใกล้เคียงกับการหมักโดยกลูโคส และสารละลายแป้ง สำหรับสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกันสารละลายแอลคาไลน์ และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด ให้ผลผลิตกรดแลกติกต่ำ นอกจากนี้ ยังพบว่า เกิดผลิตภัณฑ์พลอยได้ (กรดฟูมาริก) ระหว่างการหมัก และปริมาณเซลล์มากกว่าในภาวะอื่นๆ

จากการคำนวณเพื่อการขยายสเกลการผลิตกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร โดยใช้เกณฑ์คงที่หลัก 4 เกณฑ์ พบว่า การกำหนดให้อัตราการไหลวนของน้ำหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นเกณฑ์คงที่ ไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการทดลองระดับนำร่อง เนื่องจากอัตราการปั่นกวนที่จะใช้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร มีค่าสูงมากเกินไป

ข้อเสนอแนะ

ข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการทดลองรวมถึงข้อมูลการคำนวณขยายสเกล สามารถนำไปใช้ในการทดลองการหมักกรดแลกติกจากกากมันสำปะหลังในระดับนำร่องต่อไป เพื่อคัดเลือกพารามิเตอร์ที่เหมาะสมที่สุดในการขยายสเกลการหมักกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต และเพื่อใช้ในการปรับปรุงกระบวนการหมักให้มีความเหมาะสมยิ่งขึ้นหากนำไปใช้จริงในอุตสาหกรรม

บรรณานุกรม

Agger T., Spohr A.B., Carlsen M. and Nielsen J. 1998. Growth and product formation of *Aspergillus oryzae* during submerged cultivations: verification of a morphologically structured model using fluorescent probes. *Biotechnology and Bioengineering*, 57: 321-329.

Bai D.-M., Jia M.-Z., Zhao X.-M., Ban R., Shen F., Li X.-G. and Xu S.-M. 2003. L(+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* R1021 in a stirred tank fermentor. *Chemical Engineering Science*, 58: 785-791.

Benninga H. 1990. A history of lactic acid making. Kluwer Academic.

Chen Y., Huang S., Tang Z., Chen X. and Zhang Z. 2011. Structural changes of cassava starch granules hydrolyzed by a mixture of α-amylase and glucoamylase. *Carbohydrate Polymers*, 85: 272–275.

Chotisubha-anandha N., Thitiprasert S., Tolieng V. and Thongchul N. 2011. Improved oxygen transfer and increased L-lactic acid production by morphology control of *Rhizopus oryzae* in a static bed bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34: 163-172.

Cruz A.J.G., Almeida R.M.R.G., Araujo M.L.G.C., Giordano R.C. and Hokka C.O. 2001. The dead core model applied to beads with immobilized cells in a fed-batch cephalosporin C production bioprocess. *Chemical Engineering Science*, 56: 419-425.

Cui Y.Q., van der Lans R.G.J.M. and Luyben K.C.A.M. 1998. Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 57: 409-419.

Fontana P., Schefer J. and Pettit D. 2011. Characterization of sodium chloride crystals grown in microgravity. *Journal of Crystal Growth*, 324: 207–211.

Hang Y.D. 1989. Direct fermentation of corn to L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. *Biotechnology Letters*, 11: 299-300.

Hang Y.D., Hamamci H. and Woodams E.E. 1989. Production of L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae* immobilized in calcium alginate gels. *Biotechnology Letters*, 11: 119-120.

Hellendoorn L., Mulder H., van den Heuvel J.C. and Ottengraf S.P.P. 1998. Intrinsic kinetic parameters of the pellet forming fungus *Aspergillus awamori*. *Biotechnology and Bioengineering*, 58: 478-485.

Ho W. 1996. Kinetics of L(+)-lactic acid production from glucose, xylose, and starch by free cells and immobilized cells of *Rhizopus oryzae*. MS Thesis, The Ohio State University, Columbus, Ohio.

Huang L.P., Jin B., Lant P. and Zhou J. 2003. Biotechnological production of lactic acid integrated with potato wastewater treatment by *Rhizopus arrhizus*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78: 899-906.

Jin B. and van Leeuwen J. 1999. The influence of geometry on hydrodynamic and mass transfer characteristics in an external airlift reactor for the cultivation of filamentous fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15: 83-90.

John R.P. Nampoothiri K.M. and Pandey A. 2007. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74: 524-534.

Kobayashi T., van Dedem G. and Moo-Young M. 1973. Oxygen transfer into mycelial pellets. *Biotechnology and Bioengineering*, 15: 27-45.

Kosakai Y., Park Y.S. and Okabe M. 1997. Enhancement of L(+)-lactic acid production using mycelial flocs of *Rhizopus oryzae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 55: 461-470.

Longacre A., Reimers J.M., Gannon J.E. and Wright B.E. 1997. Flux analysis of glucose metabolism in *Rhizopus oryzae* in the purpose of increasing lactate yield. *Fungal Genetics and Biology*, 21: 30-39.

Martak J., Schlosser S., Sabolova E., Kristofikova L. and Rosenberg M. 2003. Fermentation of lactic acid with *Rhizopus arrhizus* in a stirred tank reactor with a periodical bleed and feed operation. *Process Biochemistry*, 38: 1573-1583.

Oh H., Wee Y.-J., Yun J.-S. and Ryu H.-W. 2003. Lactic acid production through cell-recycle repeated-batch bioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 105-108: 603-613.

Oostra J., le Comte E.P., van den Heuval J.C., Tramper J. and Rinzema A. 2001. Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 75: 13-24.

Persson A., Jonsson A.S. and Zacchi G. 2001. Separation of lactic acid-producing bacteria from fermentation broth using a ceramic microfiltration membrane with constant permeated flow. *Biotechnology and Bioengineering*, 72: 269-277.

Pritchard G.G. 1973. Factors affecting the activity and synthesis of NAD-dependent lactate dehydrogenase in *Rhizopus oryzae*. *Journal of General Microbiology*, 78: 125-137.

Ruengruglikit C. and Hang Y.D. 2003. L(+)-lactic acid production from corncobs by *Rhizopus oryzae* NRRL-395. *Swiss Society of Food Science and Technology*, 36: 573-575.

Skory C.D., Freer S.N. and Bothast R.J. 1998. Production of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae* under oxygen limiting conditions. *Biotechnology Letters*, 20: 191-194.

Skory C.D. 2003. Induction of *Rhizopus oryzae* pyruvate decarboxylase genes. *Current Microbiology*, 47: 59-64.

Skory C.D. 2004. Lactic acid production by *Rhizopus oryzae* transformants with modified lactate dehydrogenase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64: 237-242.

Soccol C.R., Stonoga V.I. and Raimbault M. 1994. Production of L(+)-lactic acid by *Rhizopus* species. *World Journal of Biotechnology and Microbiology*, 10: 433-435.

Sriroth K., Chollakup R., Chotineeranat S., Piyachomkwan K. and Oates C.G. 2000. Processing of cassava waste for improved biomass utilization. *Bioresource Technology*, 71: 63-69.

Sun Y., Li Y.-L., Bai S., Yang H. and Hu Z.-D. 1998. Stability of immobilized *R. oryzae* in repetitive batch productions of L(+)-lactic acid: effect of inorganic salts. *Bioprocess Engineering*, 19: 155-157.

Sun Y., Li Y.-L. and Bai S. 1999. Modeling of continuous L(+)-lactic acid production with immobilized *R. oryzae* in an airlift bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 3: 87-90.

Tay A. and Yang S.-T. 2002. Production of L(+)-lactic acid from glucose and starch by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* in a rotating fibrous bed bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 80: 1-12.

Thongchul N. and Yang S.-T. 2003. Controlling filamentous fungal morphology by immobilization on a rotating fibrous matrix to enhance oxygen transfer and L(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. In *ACS Symposium Series on Fermentation Process Development, volume 862*, ed. B.C. Saha. Oxford University Press, Cary, NC, pp. 36-51.

Thongchul N. 2005. *Lactic acid production by immobilized Rhizopus oryzae in a rotating fibrous bed bioreactor.* PhD Thesis. Program in Chemical engineering. The Ohio State University, Columbus, Ohio.

Thongchul N. and Yang S.-T. 2006. Controlling biofilm growth and lactic acid production by *Rhizopus oryzae* in a rotating fibrous bed bioreactor: effects of dissolved oxygen, rotational speed, and urea concentration. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 37: 1-13.

Thongchul N., Navankasattusas S. and Yang S.-T. 2010. Production of lactic acid and ethanol by *Rhizopus oryzae* integrated with cassava pulp hydrolysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33: 407-416.

Wee Y.J., Kim J.N. and Ryu H.W. 2006. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technology and Biotechnology*, 44: 163-172.

Williams S.T. and Flowers T.H. 1978. The influence of pH on starch hydrolysis by neutrophilic and acidophilic *actinomycetes*. *Microbios*. 20: 99–106.

Woiciechowski A.L., Soccol C.R., Ramos L.P. and Pandey A. 1999. Experimental design to enhance the production of L-(+)-lactic acid from steam-exploded wood hydrolysate using *Rhizopus oryzae* in a mixed-acid fermentation. *Process Biochemistry*, 34: 949-955.

Wyman C.E., Dale B.E., Elander R.T., Holtzapple M., Ladisch M.R. and Lee Y.Y. 2005. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, 96: 1959-1966.

Yao W.Y., Wu X., Zhu J., Sun B. and Miller C. 2010. Utilization of protein extract from dairy manure as a nitrogen source by *Rhizopus oryzae* NRRL 395 for L-lactic acid production. *Bioresource Technology*, 101: 4132-4138.

Yin P., Nishina N., Kosakai Y., Yahiro K., Park Y. and Okabe M. 1997. Enhanced production of L(+)-lactic acid from corn starch in a culture of *Rhizopus oryzae* using an air-lift bioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84: 249-253.

Yu R.-C. and Hang Y.D. 1989. Kinetics of direct fermentation of agricultural commodities to L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. *Biotechnology Letters*, 11: 597-600.

Zhang Z.Y., Jin B. and Kelly J.M. 2007. Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. *Biochemical Engineering Journal*, 35: 251-263.

Zhao X., Peng F., Cheng K. and Liu D. 2009. Enha ncement of the enzymatic digestibility sugarcane bagasse by alkali–peracetic acid pretreatment. *Enzyme and Microbial Technology*, 44: 17-23.

ตารางที่ 1 ปริมาณเซลล์ของ *R. oryzae* ในการหมักด้วยกลูโคส และอัตราการถ่ายเทออกซิเจนในกระบวนการที่อัตราการปั่นกวนและอัตราการให้อากาศต่างๆ กัน ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต

Aeration (vvm)	Agitation (rpm)	Impeller tip speed (m/s)	Total cell biomass (g)	K_La (s^{-1})
0.5	100	0.02	24.23	1.24×10^{-2}
	300	0.07	22.79	2.57×10^{-2}
	500	0.11	39.00	3.03×10^{-2}
	700	0.15	32.43	4.01×10^{-2}
1.0	100	0.02	21.76	1.04×10^{-2}
	300	0.07	28.53	4.98×10^{-2}
	500	0.11	24.66	4.97×10^{-2}
	700	0.15	24.73	4.01×10^{-2}

Remarks: impeller diameter = 7 cm; tank diameter = 17 cm; tank height = 24 cm

ตารางที่ 2 ผลของการปั่นกวนและการให้อากาศต่อการผลิตกรดแอล-แลกติกโดยเซลล์ตรึงของ *R. oryzae* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต

Aeration (vvm)	Agitation (rpm)	Lactic acid yield (g/g glc)		Productivity (g lac/L·h)		Max. lac conc.(g/L)
		growth	production	growth	production	
0.5	100	0.26	0.53	0.42	1.40	33.29
	300	0.11	0.60	0.22	0.94	33.12
	500	0.26	0.57	0.38	0.99	35.49
	700	0.08	0.62	0.15	2.09	37.83
1.0	100	0.13	0.56	0.22	1.10	34.27
	300	0.23	0.63	0.37	1.57	36.07
	500	0.27	0.56	0.23	0.95	33.29
	700	0.20	0.56	0.25	0.78	33.26

Remarks: growth refers to growth phase; production refers to production phase

ตารางที่ 3 ผลของการปั่นกวนและการให้อากาศต่อการผลิตผลิตภัณฑ์พลอยได้เอทานอลโดยเซลล์ตรึงของ *R. oryzae* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต

Aeration (vvm)	Agitation (rpm)	Ethanol yield (g/g glc)		Productivity (g eth/L·h)		Max. eth conc.(g/L)
		growth	production	growth	production	
0.5	100	0.45	0.21	0.39	0.41	10.03
	300	0.24	0.27	0.54	0.26	14.31
	500	0.15	0.08	0.19	0.11	8.33
	700	0.31	0.14	0.63	0.46	12.34
1.0	100	0.39	0.07	0.36	0.13	10.31
	300	0.03	0.09	0.31	0.23	7.90
	500	0.23	0.09	0.09	0.21	4.50
	700	0.07	0.00	0.10	0.00	3.87

Remarks: growth refers to growth phase; production refers to production phase

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบการผลิตกรดแอล-แลกติกในการหมักแบบเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิตที่ภาวะต่างๆ (ปริมาตรน้ำหมักเริ่มต้น 3 ลิตร)

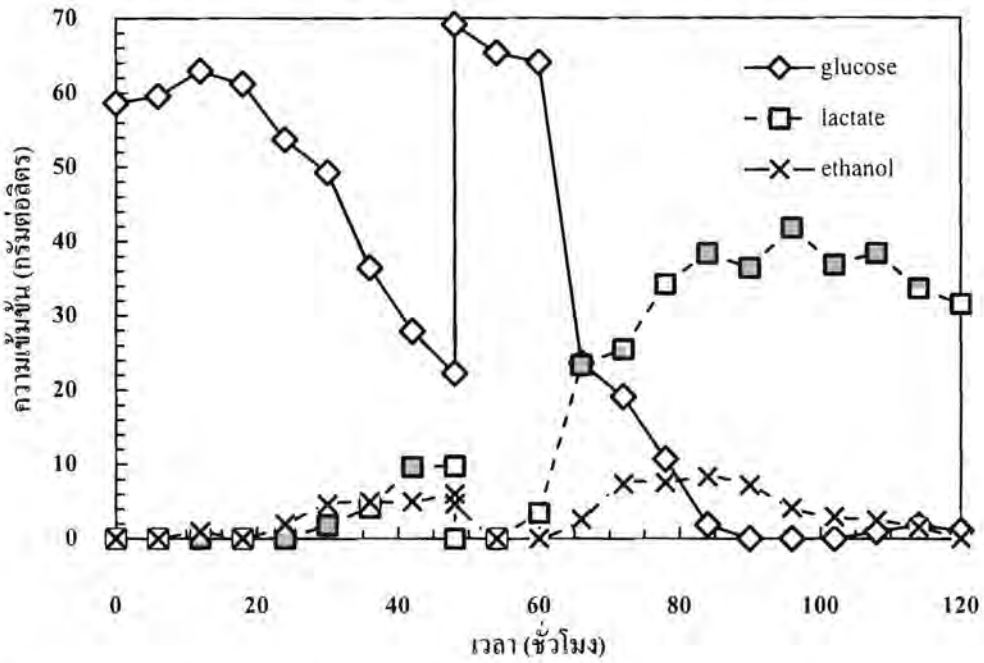
Carbon source	$Y_{P/S}$ lactic acid (%)		Productivity lactic acid (g/(L·h))		$Y_{P/S}$ ethanol (%)		Productivity ethanol (g/(L·h))		Max lactic acid conc. (g/L)	Cell dry weight (g)	K_La (s^{-1})
	GM	PM	GM	PM	GM	PM	GM	PM			
Glucose	8.25	75.55	0.12	1.68	23.06	5.65	0.33	0.13	53.61	35.12	0.045
ECPHNP	6.70	41.57	0.08	0.66	30.22	18.68	0.35	0.49	26.57	57.26	0.033
ECPHSP	8.99	44.48	0.09	0.64	35.35	16.38	0.34	0.38	25.41	58.09	0.049
ECPHSNP	2.18	12.56	0.02	0.16	46.14	21.32	0.34	0.27	7.63	64.42	0.041
HACPH	6.62	12.84	0.06	0.14	29.32	23.84	0.26	0.26	6.75	76.81	0.041
GS	-	53.10	-	0.70	-	17.11	-	0.23	33.77	55.62	0.043

Remarks:

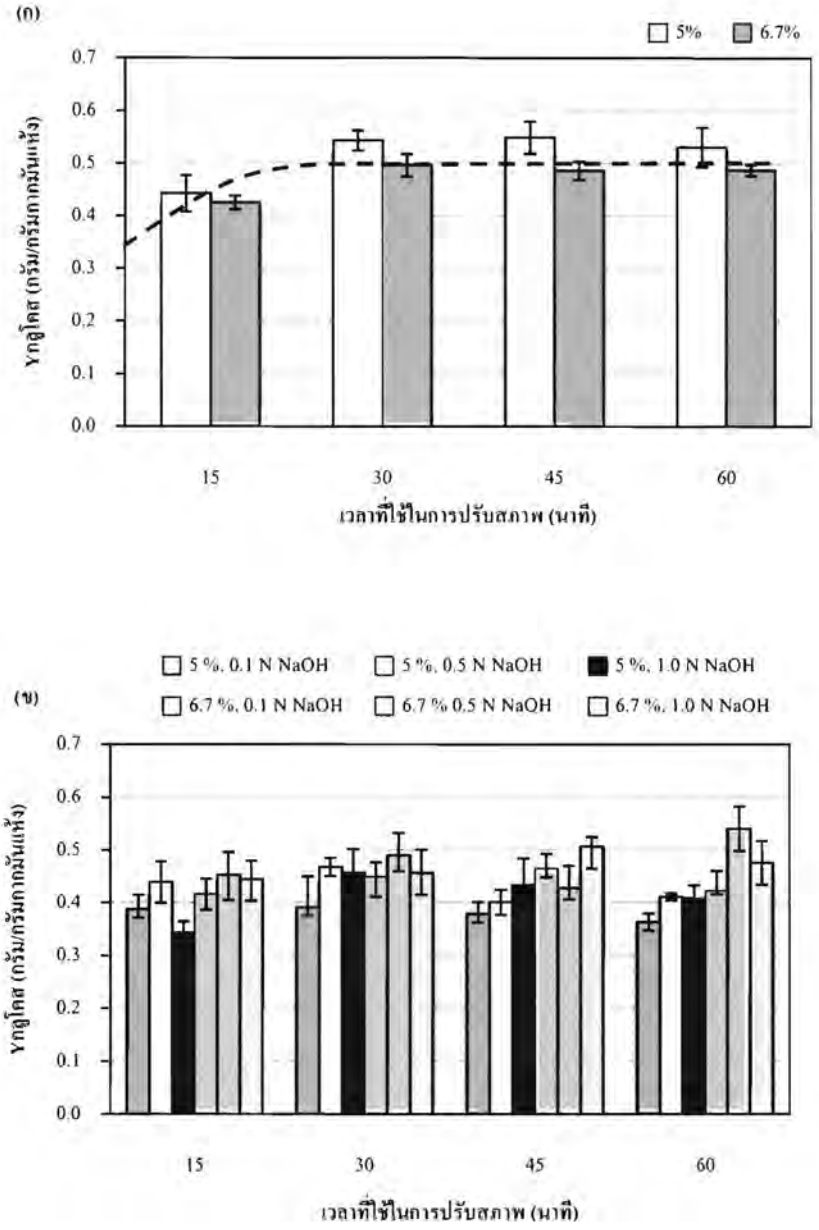
GM	Growth medium
PM	Production medium
GS	Gelatinized Starch
ECPHNP	Enzyme-treated cassava pulp hydrolysate by non-pretreatment
ECPHSP	Enzyme-treated cassava pulp hydrolysate by steam pretreatment
ECPHSNP	Enzyme-treated cassava pulp hydrolysate by steam with NaOH-pretreatment
HACPH	HCl-treated cassava pulp hydrolysate

127829820

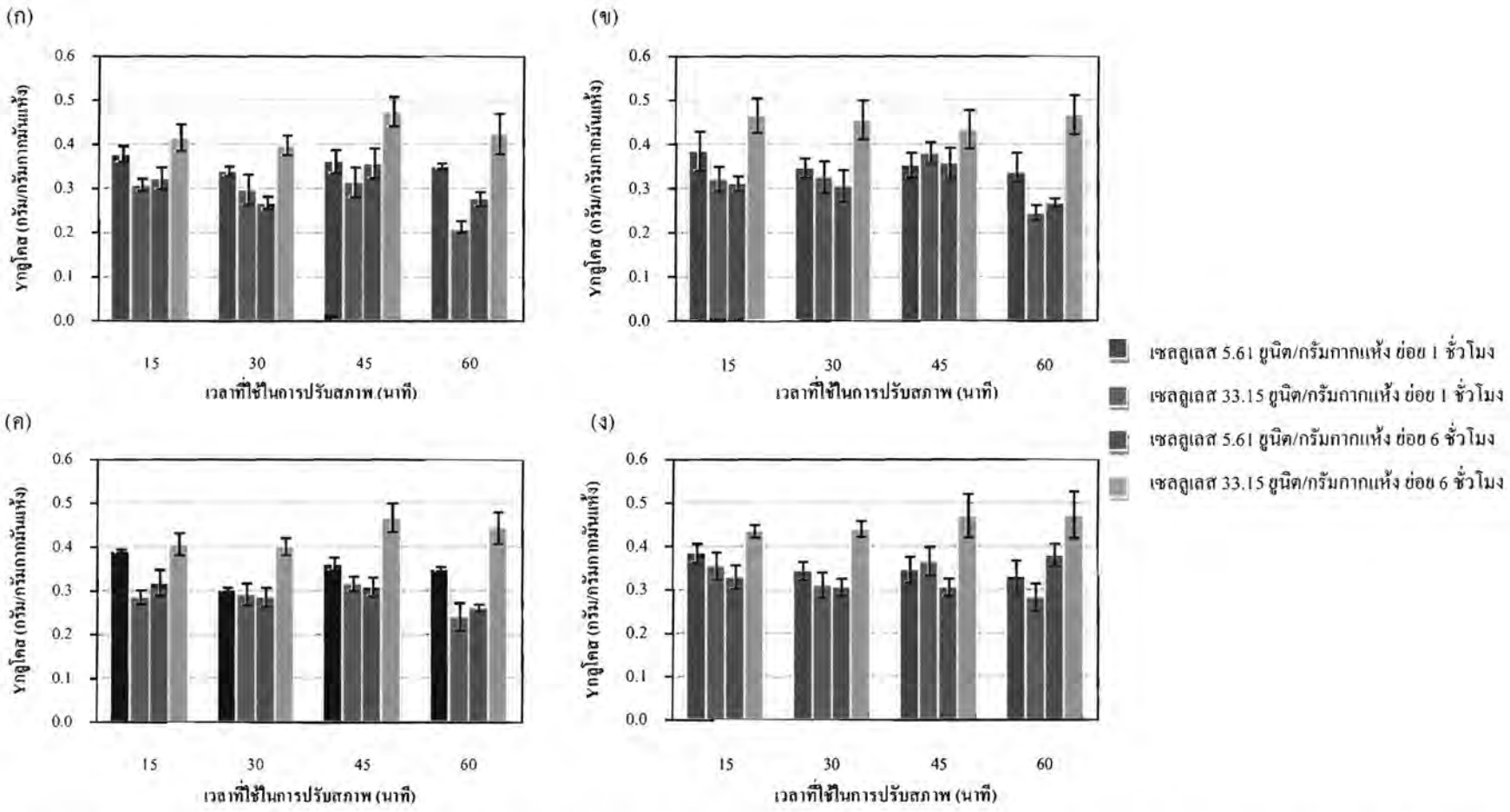
รูปที่ 1 ลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ที่ตรึงบนผ้าขนหนูในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต



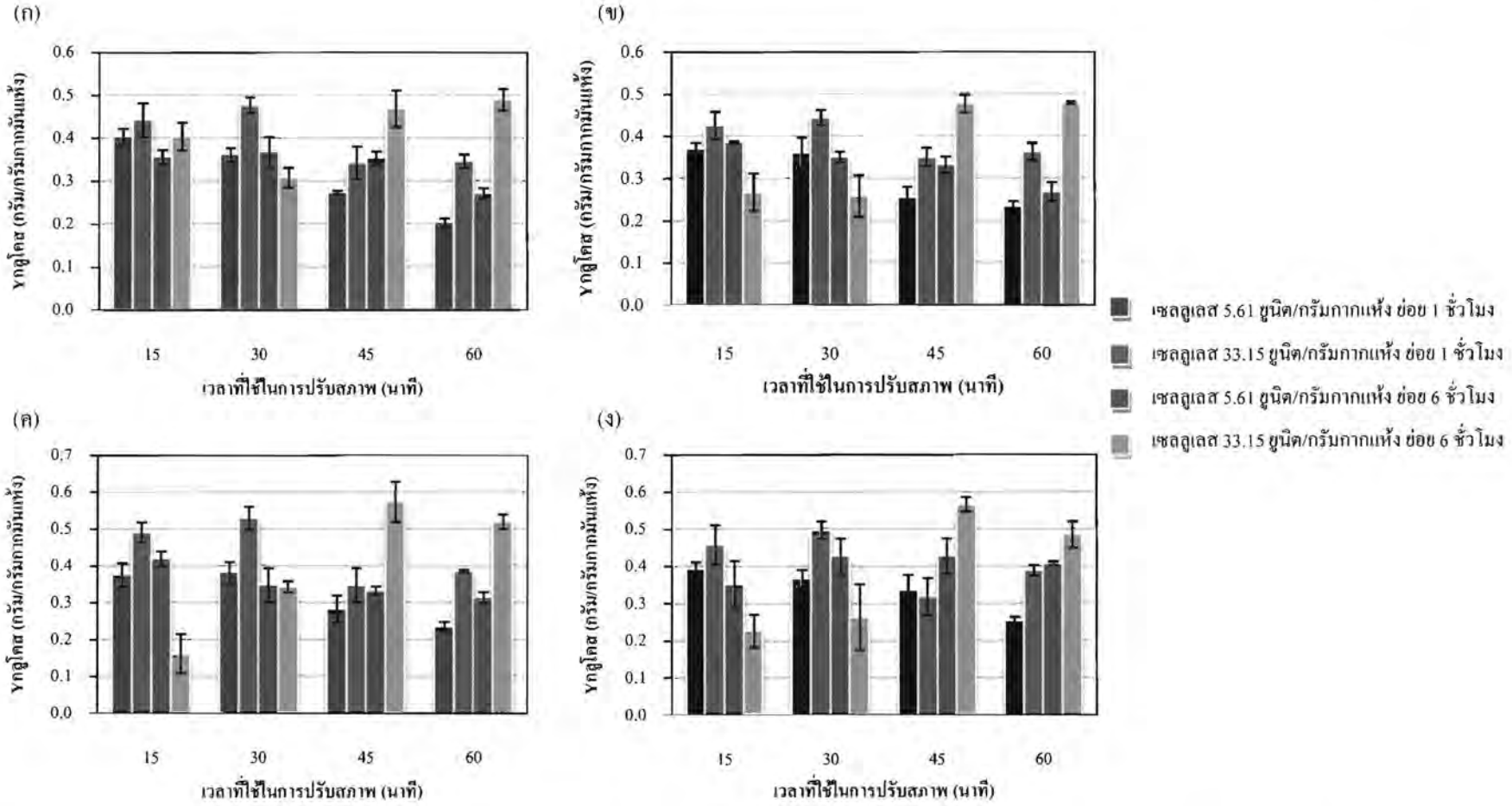
รูปที่ 2 จลนพลศาสตร์ของการหมักกรดแอล-แลกติกจากกลูโคสโดยเซลล์ตรึงของ *R. oryzae* บนผ้าขนหนูในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิตที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 ความเร็วการปั่นกวน 700 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที



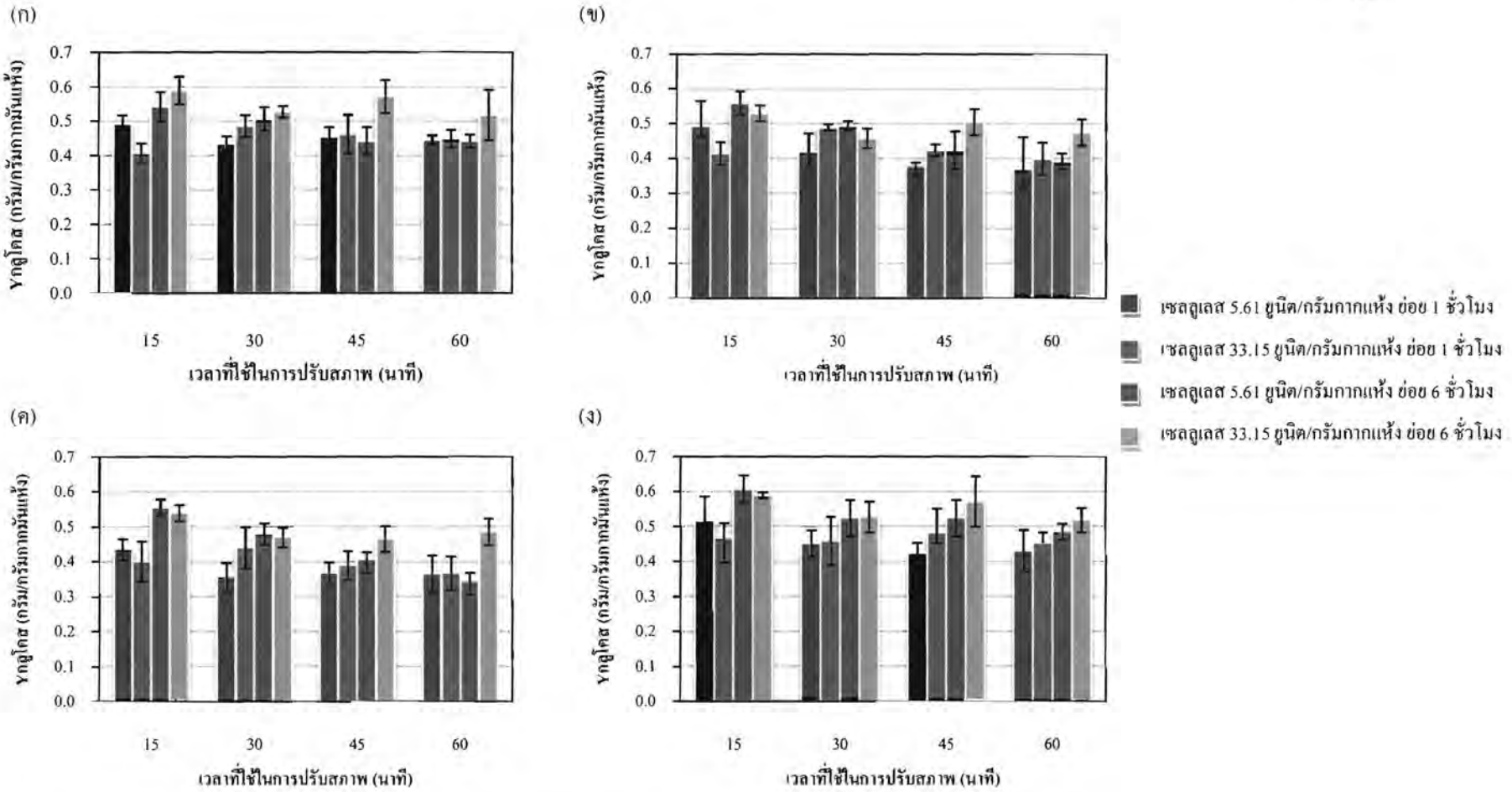
รูปที่ 3 yieldของกลูโคส (กรัมต่อกรัมกากมันแห้ง) ในสารละลายที่แยกออกมาภายหลังการปรับสภาพด้วย (ก) การใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (steam pretreatment) และ (ข) การใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับการใช้สารละลายแอลคาไลน์ (steam with combination of alkaline treatment)



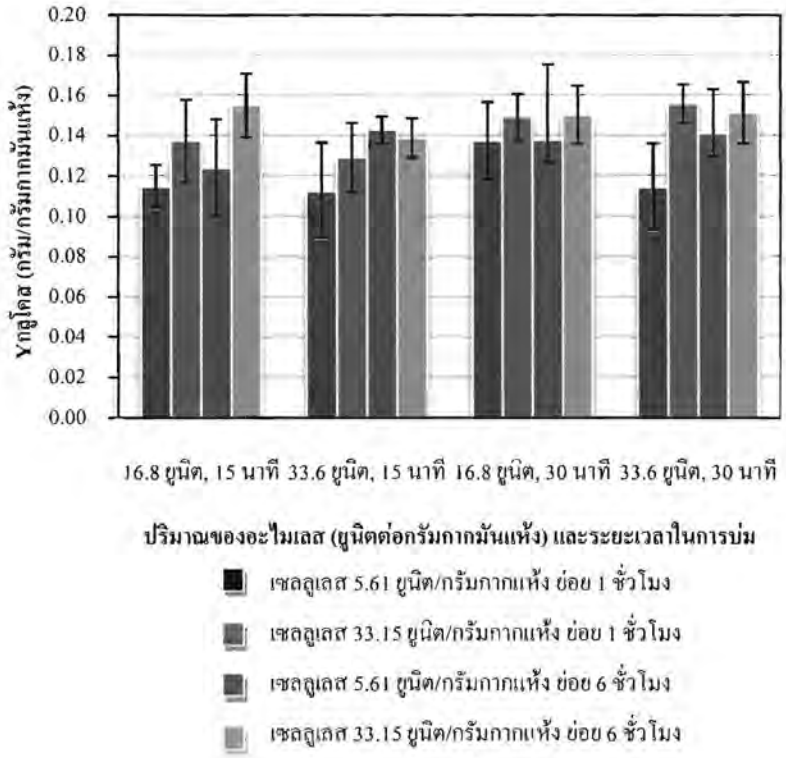
รูปที่ 4 yield ของกลูโคสภายหลังการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน ความเข้มข้นของกากมัน 5% จากนั้นนำมาทำการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และอะไมเลส (ก) อะไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 15 นาที (ข) อะไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 30 นาที (ค) อะไมเลส 33.6 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 15 นาที (ง) อะไมเลส 33.6 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 30 นาที



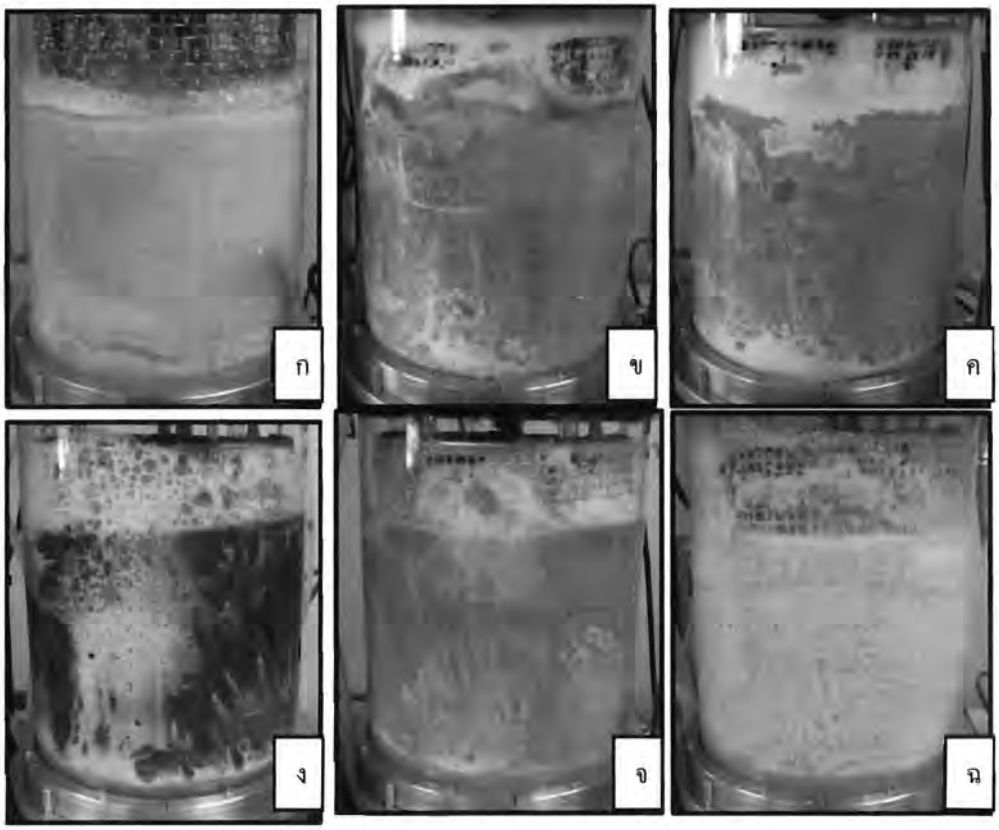
รูปที่ 5 yield ของกลูโคสภายหลังการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน ความเข้มข้นของกากมัน 6.7% จากนั้นนำมาทำการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และอะไมเลส (ก) อะไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 15 นาที; (ข) อะไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 30 นาที; (ค) อะไมเลส 33.6 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 15 นาที; (ง) อะไมเลส 33.6 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 30 นาที



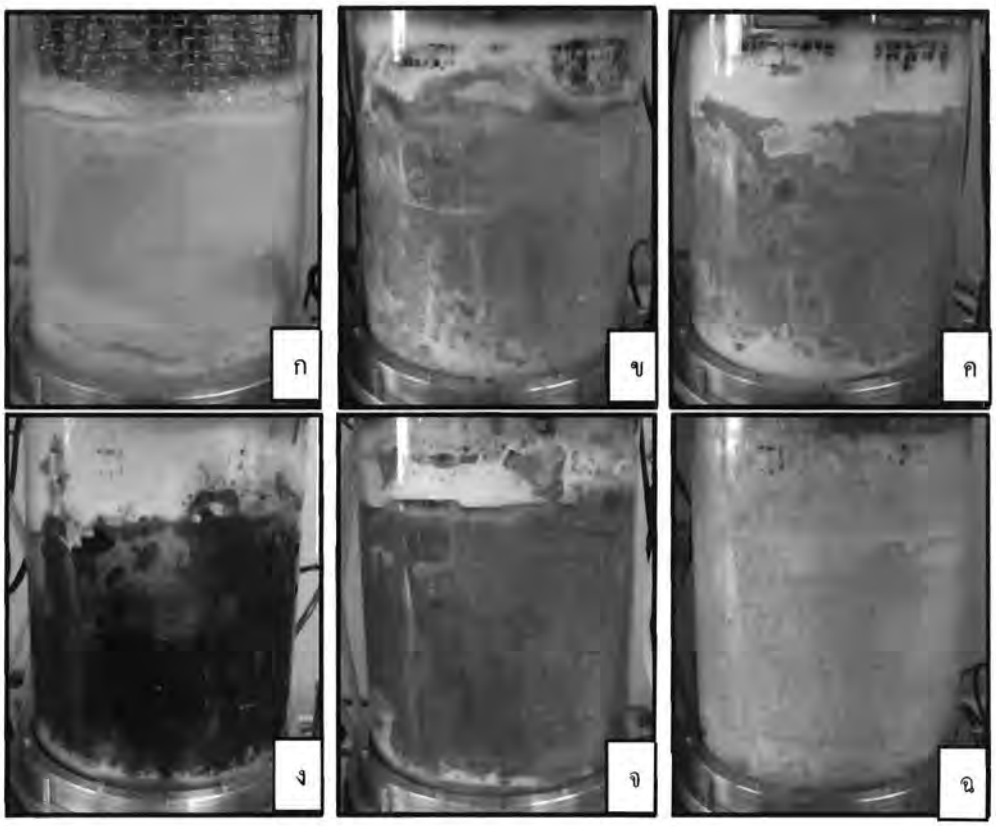
รูปที่ 6 yield ของกลูโคสภายหลังการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน ความเข้มข้นของกากมัน 20% จากนั้นนำมาทำการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และอะไมเลส (ก) อะไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 15 นาที (ข) อะไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 30 นาที (ค) อะไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 15 นาที (ง) อะไมเลส 33.6 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 30 นาที



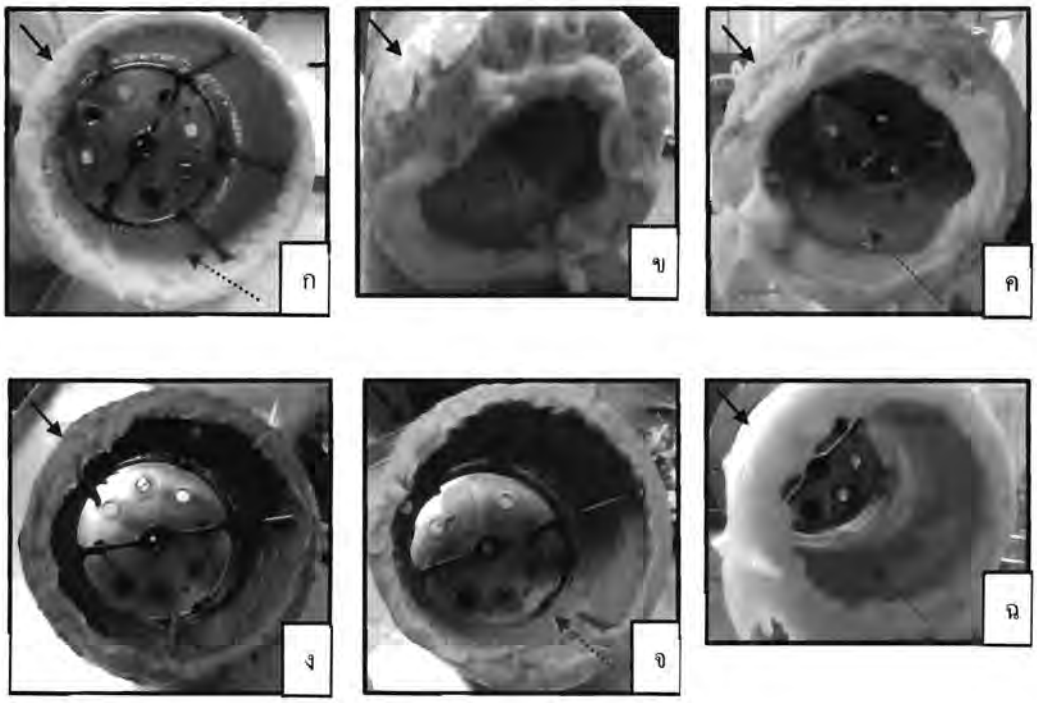
รูปที่ 7 yieldของกลูโคสภายหลังการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.5 N) ความเข้มข้นของกากมัน 6.7% จากนั้นนำมาทำการย่อยต่อด้วยเซลลูเลสที่ 50 องศาเซลเซียส แล้วตามด้วยอะไมเลสที่ 100 องศาเซลเซียส



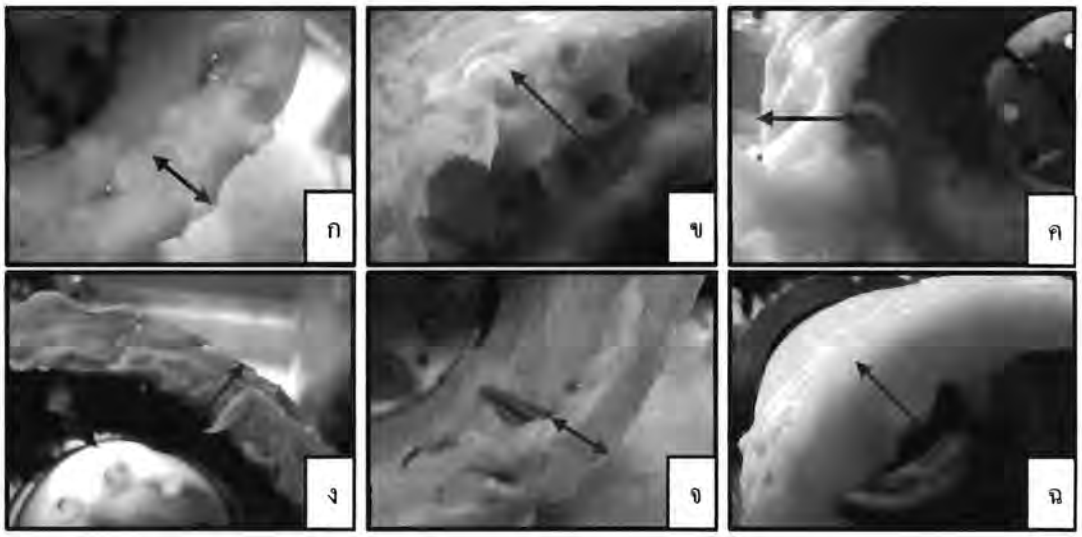
รูปที่ 8 ลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ที่ถูกตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ในระยะการเจริญเติบโตที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ของการใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด ได้แก่ (ก) กลูโคส (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (จ) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และ (ฉ) สารละลายแป้ง



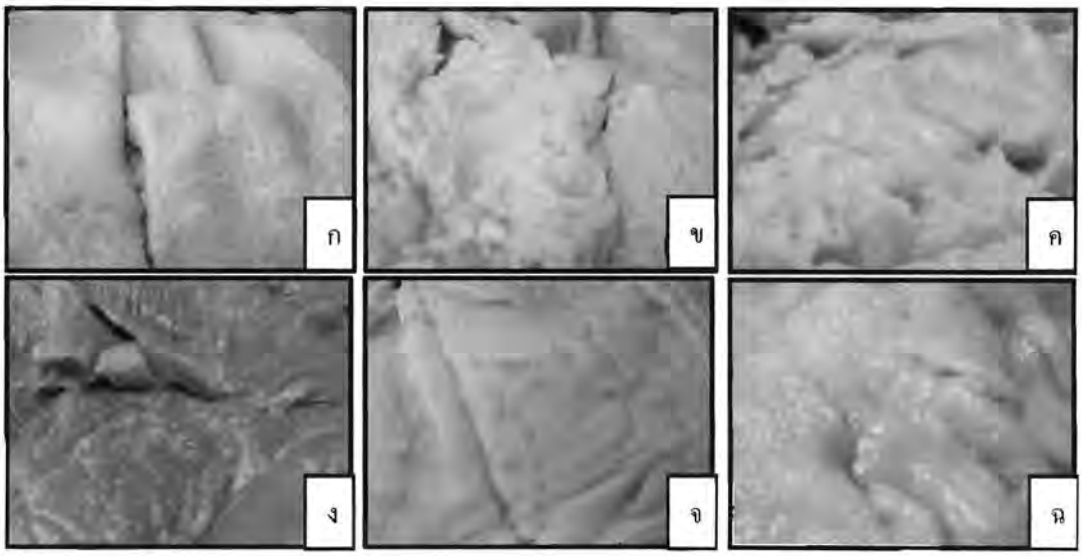
รูปที่ 9 ลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ที่ถูกตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ในระยะการสร้างผลิตภัณฑ์ที่เวลาการหมัก 96 ชั่วโมง ของการใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด ได้แก่ (ก) กลูโคส (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (จ) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และ (ฉ) สารละลายแป้ง



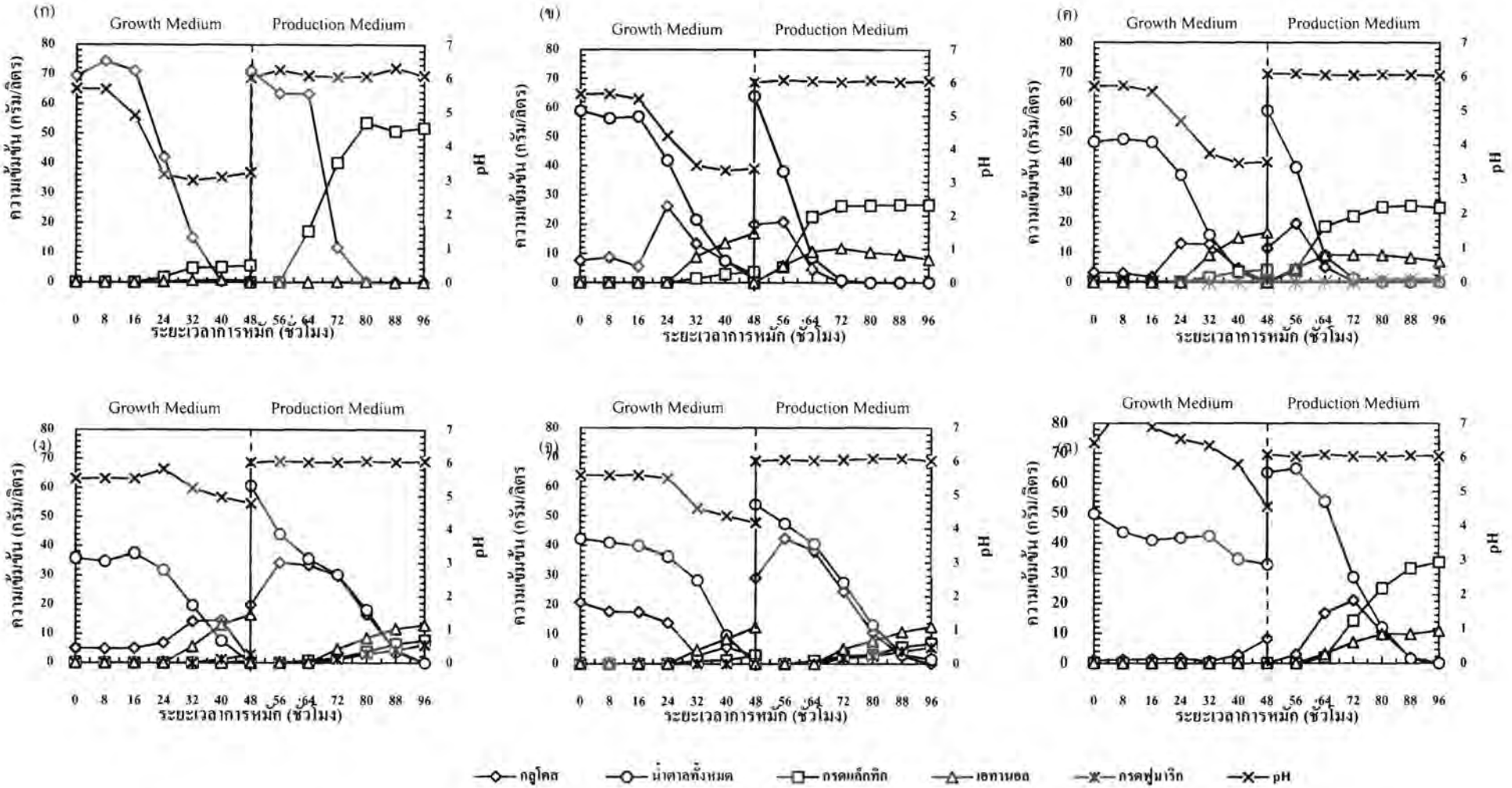
รูปที่ 10 ลักษณะการยึดเกาะของเซลล์บนเบดสถิตด้านนอก (ลูกศรสีดำ) และด้านใน (ลูกศรสีแดง) ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ของการใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด ได้แก่ (ก) กลูโคส (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (จ) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และ (ฉ) สารละลายแป้ง



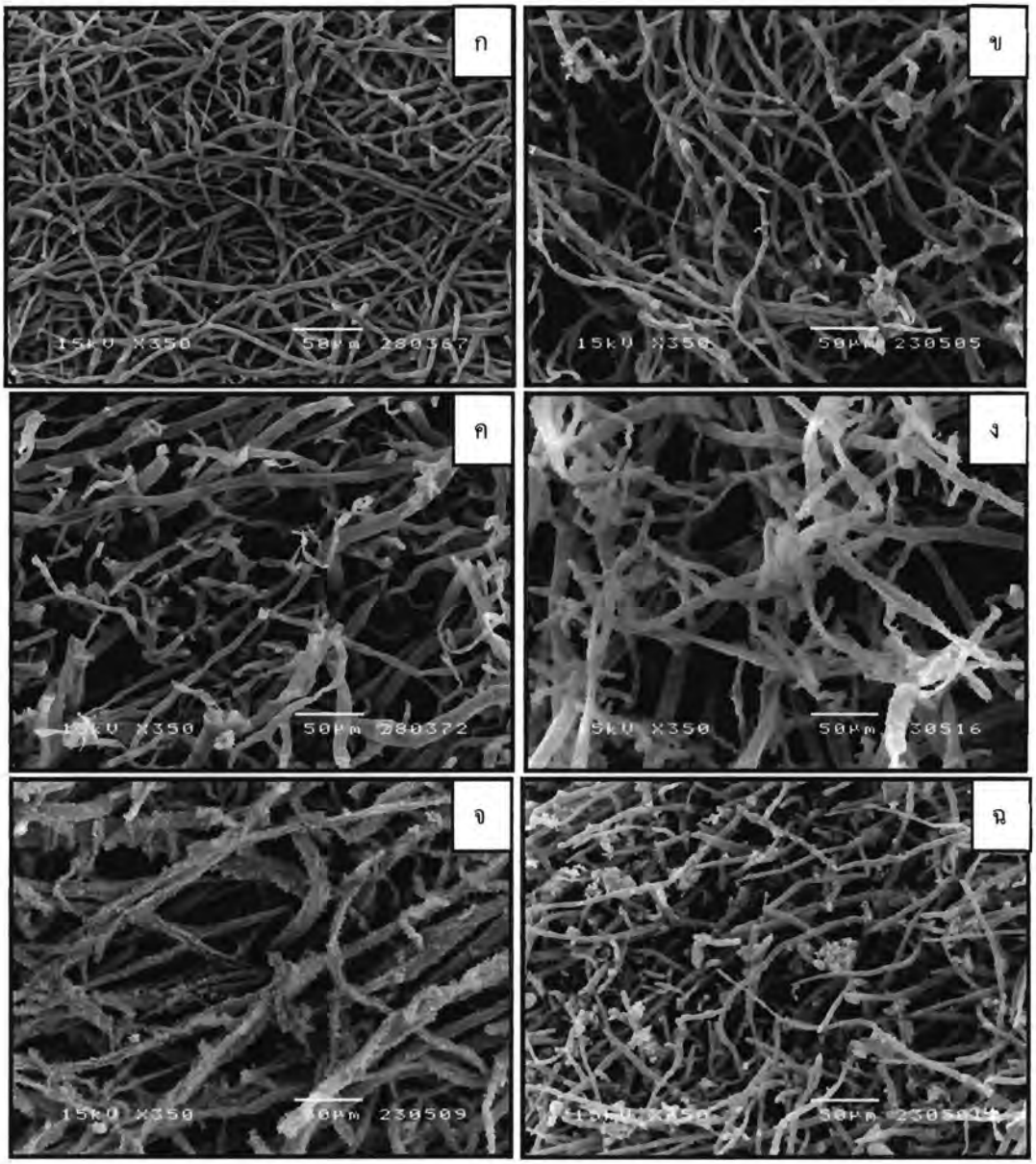
รูปที่ 11 ความหนาของเซลล์ของ *R. oryzae* (เส้นสีแดง) ที่ถูกตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ของการใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด ได้แก่ (ก) กลูโคส (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (จ) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และ (ฉ) สารละลายแป้ง



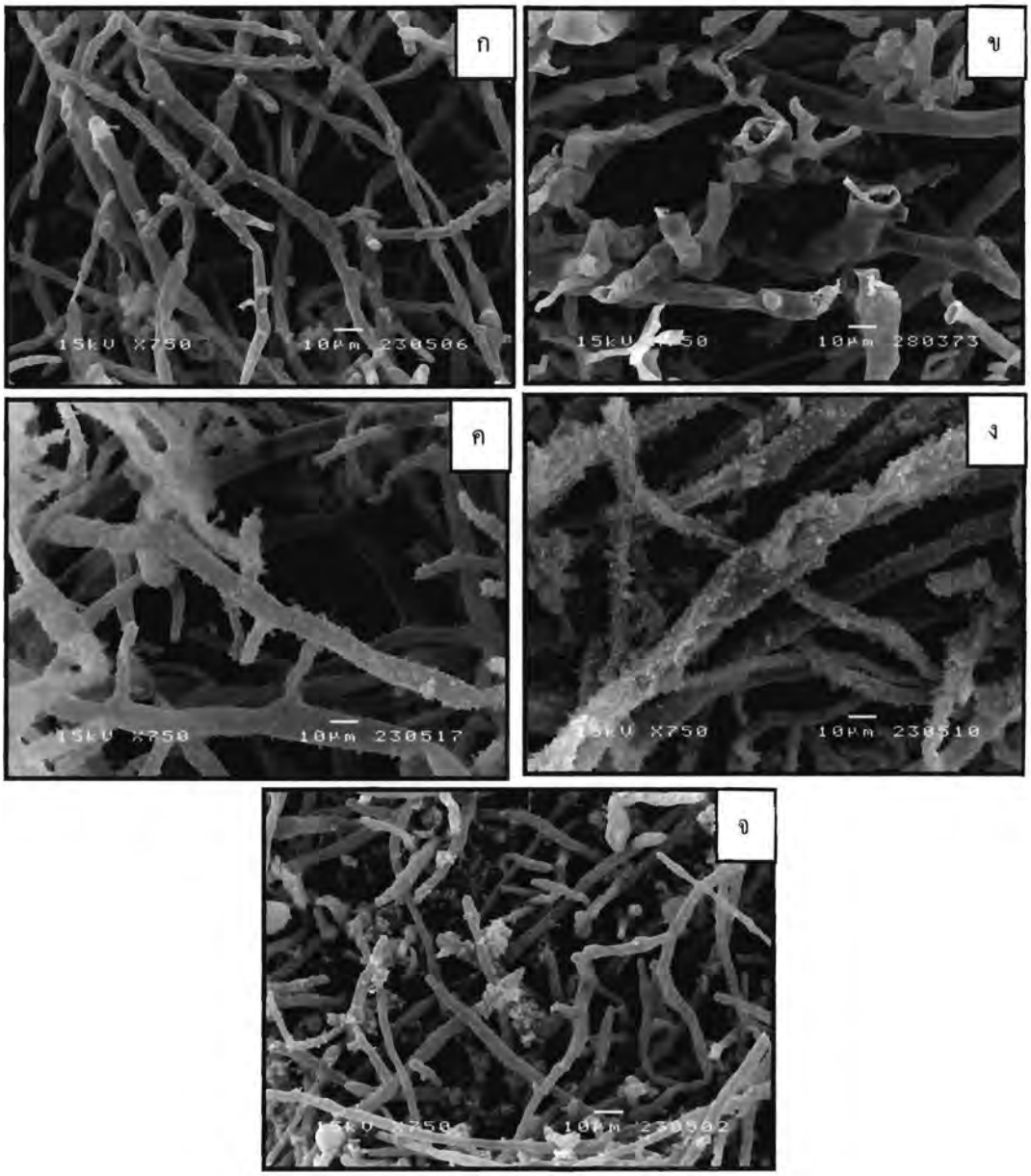
รูปที่ 12 ลักษณะเซลล์ *R. oryzae* ที่ตรึงอยู่ด้านในของเบดสถิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ของการใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด ได้แก่ (ก) กลูโคส (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (จ) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และ (ฉ) สารละลายแป้ง



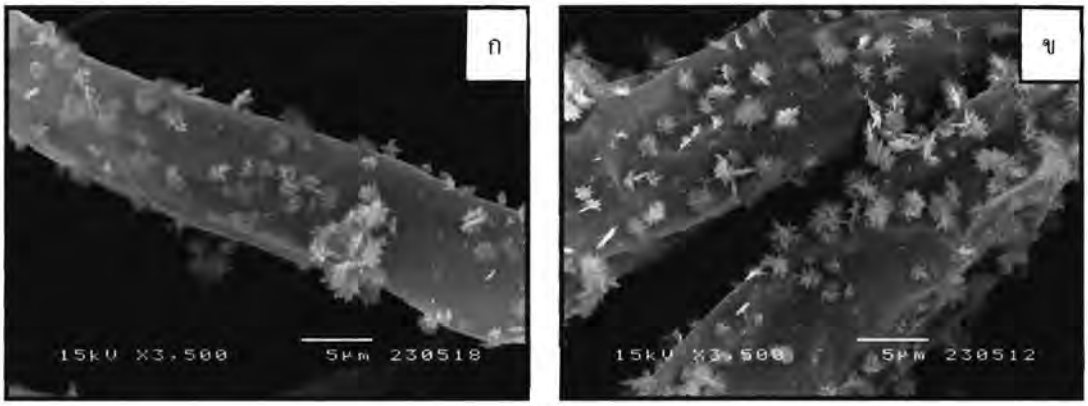
รูปที่ 13 จลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแลกติกโดย *R. oryzae* อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ของแหล่งคาร์บอน 6 ชนิดได้แก่ (ก) กลูโคส (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์ (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (จ) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และ (ฉ) สารละลายแป้ง



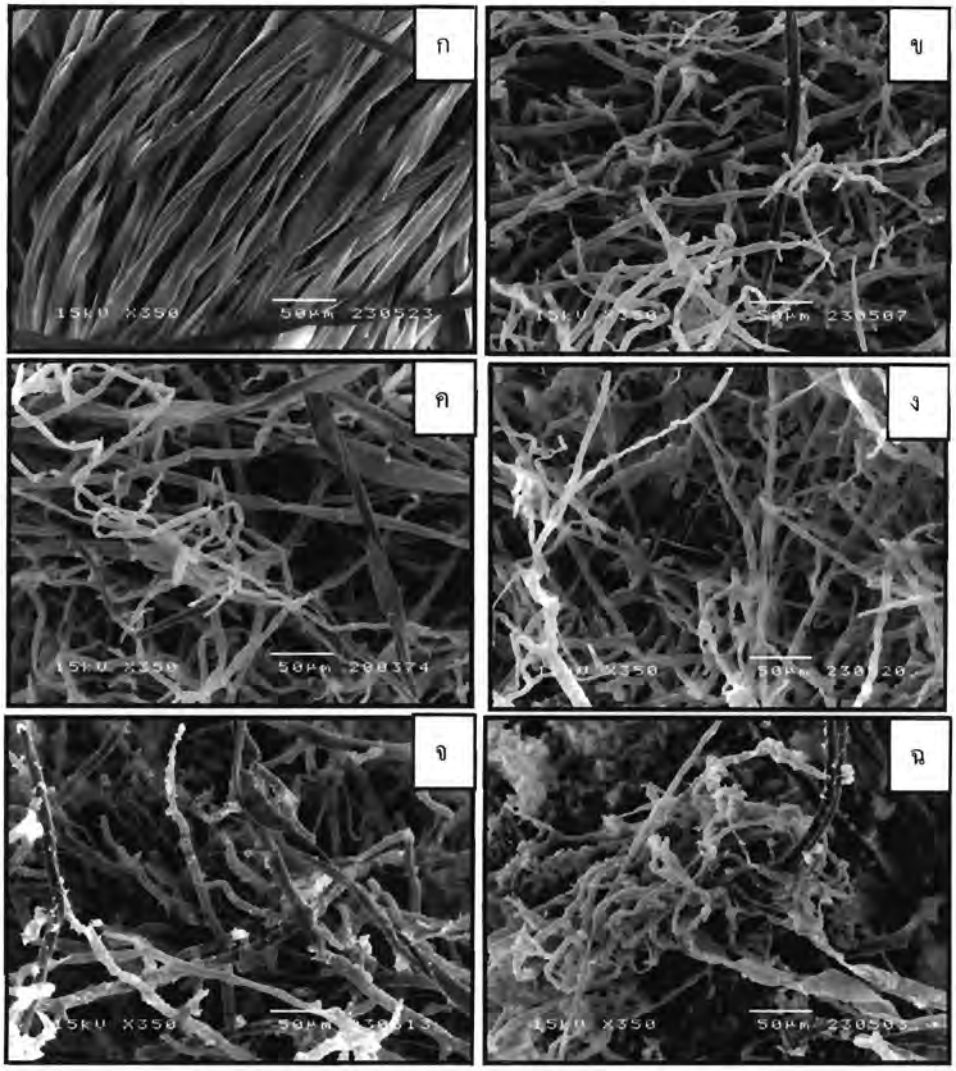
รูปที่ 14 ลักษณะของเซลล์ *R. oryzae* บริเวณด้านในของเบดสถิตที่กำลังขยาย 350 เท่า โดยใช้ (ก) กลูโคส (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (จ) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และ (ฉ) สารละลายแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนในการหมัก



รูปที่ 15 ลักษณะของเซลล์ *R. oryzae* บริเวณด้านในของเบดสถิตที่กำลังขยาย 750 เท่า โดยใช้ (ก) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และ (จ) สารละลายแป้ง เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมัก



รูปที่ 16 ลักษณะของเซลล์ *R. oryzae* บริเวณด้านในของเบดสถิตที่กำลังขยาย 3,500 เท่า โดยใช้ (ก) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ และ (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมัก



รูปที่ 17 ลักษณะโครงสร้างของ (ก) เส้นใยผ้าฝ้าย และลักษณะการยึดเกาะของเซลล์ *R. oryzae* บนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูบริเวณด้านนอกของเบดสถิตที่กำลังขยาย 350 เท่า โดยใช้ (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (จ) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และ (ฉ) สารละลายแป้ง เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมัก