บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

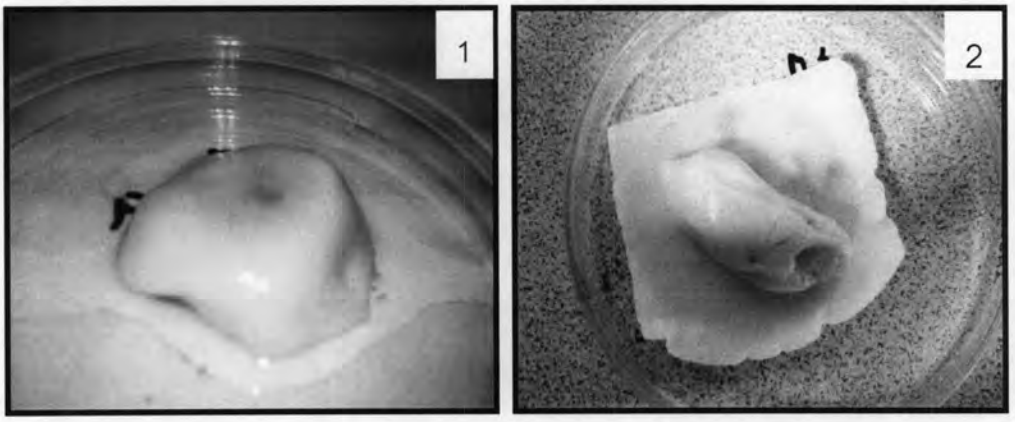
ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยกระบวนการหมักในระดับขวดเขย่า โดยเปรียบเทียบด่างที่ใช้ในการควบคุมค่าพีเอชแบบเซลล์แขวนลอยและคัดเลือกเส้นใยที่เหมาะสมระหว่างผ้าฝ้ายและผ้าพอลิเอสเทอร์ชนิดที่ถักและไม่ถักเพื่อใช้ในการตรึงเซลล์เทียบกับเซลล์แขวนลอย จากนั้นนำเส้นใยที่ผ่านการคัดเลือกมาใช้ในการตรึงเซลล์ในถังหมักแบบเบดสถิตเทียบกับการหมักแบบเซลล์แขวนลอยในถังกวน โดยมีปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ การกวน การให้อากาศและลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* จากนั้นนำสภาวะที่เหมาะสมมาวิเคราะห์ค่าแอกติวิตีจำเพาะของแลกเตทดีไฮโดรจีเนส รวมถึงวิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวและโครงสร้างของเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิต

4.1 เปรียบเทียบด่างที่ใช้ในการควบคุมพีเอชในการหมักระดับขวดเขย่าแบบเซลล์แขวนลอย

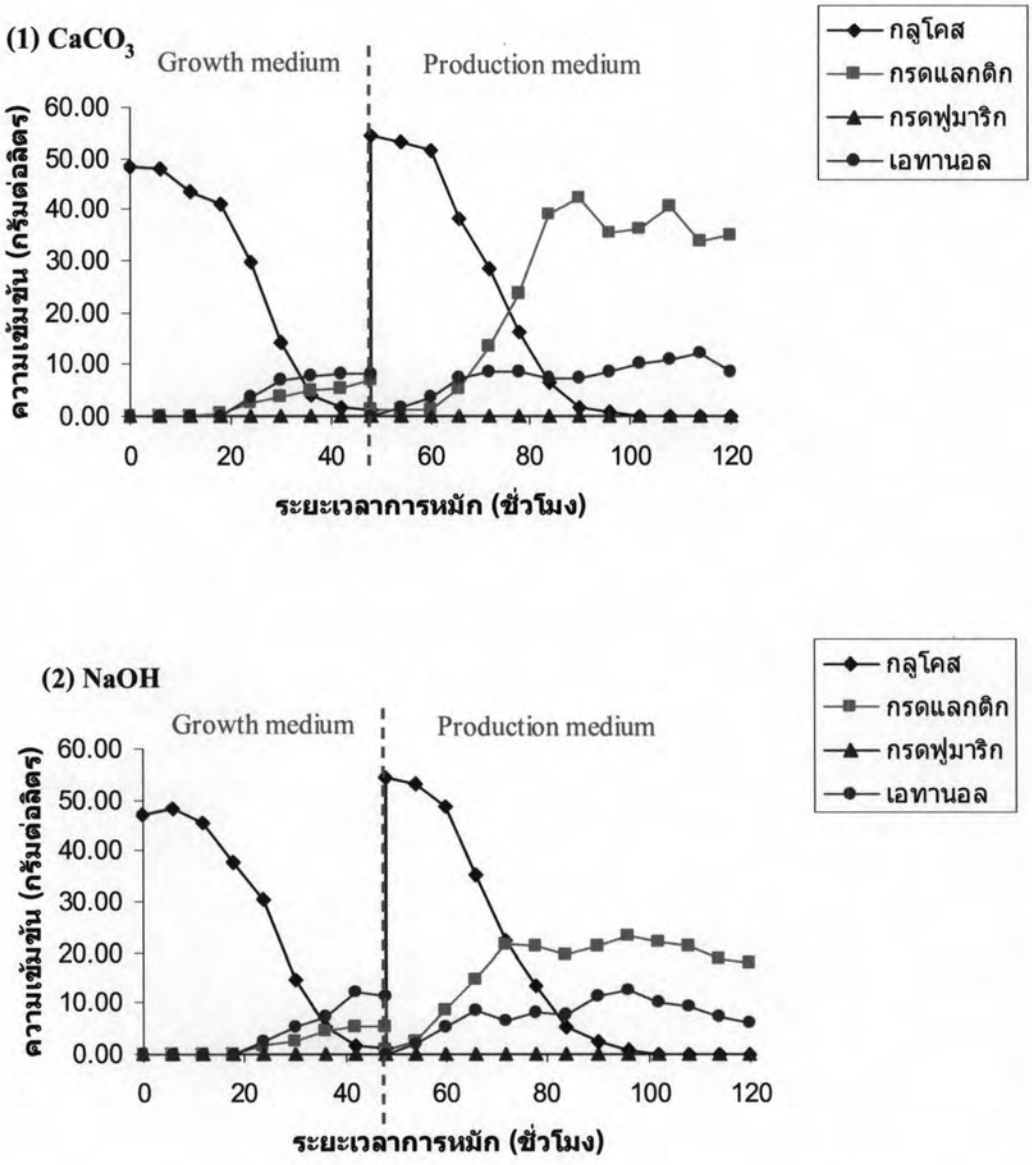
การเปรียบเทียบด่าง 2 ชนิดได้แก่ แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) กับโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ใช้ในการควบคุมพีเอชในช่วงการสร้างผลิตภัณฑ์ในการหมักระดับขวดเขย่าแบบไม่ต่อเนื่องด้วยเซลล์แขวนลอย เมื่อใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นตัวควบคุมพีเอช ในขั้นตอนการกรองเพื่อแยกเซลล์ออกจากตัวอย่างใช้กรดไฮโดรคลอริกทำปฏิกิริยากับตะกอนแคลเซียมแลกเตทได้เป็นกรดแลกติกและแคลเซียมคลอไรด์ (Narayanan และคณะ, 2004) โดยจะเติมกรดไฮโดรคลอริกลงในตัวอย่างน้ำหมักเพื่อชะตะกอนแคลเซียมแลกเตทและแคลเซียมคาร์บอเนตในเซลล์จนกว่าจะหมด โดยสังเกตจากฟองก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เนื่องจากแคลเซียมคาร์บอเนตนั้นมีคุณสมบัติในการละลายน้ำต่ำ (Martak และคณะ, 2003) จึงพบแคลเซียมคาร์บอเนตที่ไม่ละลายน้ำอยู่ในผนังเซลล์ของเชื้อราทำให้ไม่สามารถกำจัดแคลเซียมคาร์บอเนตได้หมดและเมื่อทำการหมักระดับขวดเขย่าส่วนที่ไม่ละลายน้ำจะไปอยู่บริเวณด้านล่างของขวดเมื่อเซลล์เจริญเซลล์จะไปเกาะกับแคลเซียมคาร์บอเนตทำให้ลักษณะของเซลล์มีการเจริญแบบกลุ่มก้อน (Clump) และมีเมือกมาเกาะบริเวณเซลล์ด้านนอกเทียบกับลักษณะของเซลล์ที่ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ใช้ในการควบคุมพีเอช พบว่า เซลล์มีการเจริญแบบกลุ่มก้อน แสดงดังรูปที่ 4.1

จากผลการทดลองพบว่า การหมักแบบเซลล์แขวนลอยที่ใช้แคลเซียมคาร์บอเนตในการควบคุมความเป็นกรดด่างสามารถผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 42.13 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.2) คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.8689 และอัตราการผลิตกรดแลกติก 1.5023 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เนื่องจากเป็นการหมักแบบเซลล์แขวนลอยทำให้ปริมาณออกซิเจนละลายน้อยไม่เพียงพอต่อการเจริญเซลล์จึงสร้างผลิตภัณฑ์อื่นหรือ เอทานอลแทนการผลิตกรดแลกติกโดยสามารถผลิตเอทานอลคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.2826 อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.4033 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและน้ำหนักเซลล์แห้ง

เท่ากับ 0.38 กรัมแสดงดังตารางที่ 4.1 จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ในขั้นตอนของการละลายตะกอนแคลเซียมแลกเตทเป็นกรดแลกติกด้วยกรดไฮโดรคลอริกนั้นพบแคลเซียมคาร์บอเนตที่ไม่ละลายน้ำถูกหุ้มอยู่ในผนังเซลล์ของเชื้อราทำให้ไม่สามารถละลายแคลเซียมแลกเตทให้กลับไปอยู่ในรูปของกรดแลกติกได้หมด (Zhang และคณะ, 2007) ดังนั้นปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากการละลายตะกอนแคลเซียมแลกเตทโดยการใช้กรดไฮโดรคลอริกจึงมีความคาดเคลื่อน ทั้งตัวอย่างที่ได้จากขั้นตอนของการกรองนั้นเมื่อนำมาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า เกิดการตกตะกอนของแคลเซียมแลกเตททำให้เมื่อนำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC มักจะเกิดการอุดตันภายในคอลัมน์



รูปที่ 4.1 ลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ในการหมักระดับขวดเขย่าแบบเซลล์แขวนลอยที่ปรับความเป็นกรดด่างด้วย (1) แคลเซียมคาร์บอเนต และ (2) โซเดียมไฮดรอกไซด์



รูปที่ 4.2 จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติก โดยเปรียบเทียบด่างที่ใช้ในการควบคุมความเป็นกรดด่างในการหมักระดับขวดเขย่าแบบเซลล์แขวนลอยระหว่าง (1) แคลเซียมคาร์บอเนต และ (2) โซเดียมไฮดรอกไซด์

เมื่อใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ในการควบคุมความเป็นกรดด่าง โดยจะเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ในช่วงเปลี่ยนอาหารเป็นอาหารเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์จนค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6 จากนั้นจะเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อปรับค่าความเป็นกรดด่างทุกๆ 24 ชั่วโมงจนจบกระบวนการหมัก พบว่า ลักษณะของเซลล์เจริญแบบกลุ่มก้อน สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 21.42 กรัมต่อลิตรคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.5707 และอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.8880 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและผลิตเอทานอลคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.2771 อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.4772 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.30 กรัม แสดงดังตารางที่ 4.1 เทียบกับงานวิจัยของ Ruengruglikit และ Hang (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยการใช้ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน 5 เปอร์เซ็นต์ ด้วยเชื้อรา *R. oryzae* พบว่า การใช้แคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร สามารถผลิตกรดแลกติกคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 299.4±6.8 กรัมต่อกิโลกรัมแห้งของซังข้าวโพด เมื่อทำการหมักในขวดเขย่า สภาวะที่ใช้คือ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส และงานวิจัยของ Dominguez และ Vazquez (1999) ศึกษาการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตเพื่อควบคุมค่าพีเอชจากการผลิตกรดแลกติกที่ช่วงเวลาต่างๆ โดยเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 50 กรัมต่อลิตรในช่วงแรกและเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 30 กรัมต่อลิตรหลังจากการหมักผ่านไป 24 36 48 และ 60 ชั่วโมงพบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 67.50 กรัมต่อลิตรและอัตราการผลิตกรดแลกติก 1.13 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงที่ระยะเวลาการหมัก 60 ชั่วโมง เมื่อทำการหมักในขวดเขย่า

งานวิจัยของ Martak และคณะ, 2003 ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดย *R. arrhizus* ทำการหมักในถังกวนด้วยระบบ Periodical bleed and feed สามารถผลิตกรดแลกติกคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 75.3 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 2.91 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมง เมื่อทำการหมักนาน 240 ชั่วโมง พบว่า แคลเซียมคาร์บอเนตนั้นมีคุณสมบัติในการละลายน้ำต่ำทำให้เมื่อเซลล์เจริญ จึงพบแคลเซียมคาร์บอเนตที่ไม่ละลายน้ำอยู่ในผนังเซลล์ของเชื้อรา จึงทำให้แคลเซียมคาร์บอเนตมีประสิทธิภาพในการควบคุมค่าพีเอชในกระบวนการหมักต่ำ

ซึ่งเมื่อใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ในการควบคุมความเป็นกรดด่างปรากฏว่าไม่พบถึงปัญหาดังกล่าวอีกทั้งในการหมักระดับถังหมักนั้นการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่มีความสามารถในการละลายต่ำลงในถังหมักเพื่อควบคุมความเป็นกรดด่างก็สามารถทำได้ยากกว่าการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่อยู่ในรูปสารละลายและยังพบว่าในขั้นตอนของการหมักนั้นแคลเซียมแลกเตทจะรวมตัวกันเป็นผลึกเมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูโคสสูง มีผลทำให้ลักษณะสัณฐานของเชื้อราเปลี่ยนรูปร่างไปซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bai และคณะ (2003) พบว่า เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตหลังจากการหมักผ่านไป 8 ชั่วโมงทำให้ลักษณะสัณฐานของเชื้อราเปลี่ยนรูปร่างไปจากการเจริญแบบกลุ่มก้อน (Clump) เป็น Pellet ในการหมักระดับขวดเขย่า โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 76.97 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 77 เปอร์เซ็นต์และน้ำหนักเซลล์เท่ากับ 0.30 กรัม เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร และยังพบว่าลักษณะการเจริญของเซลล์แบบ Pellet

นั้นสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงกว่าลักษณะการเจริญของเซลล์แบบกลุ่มก้อน (Clump) ซึ่งเมื่อทำการหมักโดยเซลล์แบบกลุ่มก้อนเมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตหลังจากการหมักผ่านไป 6 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 52.91 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 54 เปอร์เซ็นต์และน้ำหนักเซลล์เท่ากับ 0.30 กรัม

งานวิจัยของ Du และคณะ, 1998 ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อรา *R. oryzae* ในถังหมักแบบ Bubble column พบว่า การใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเพื่อปรับค่าพีเอชในถังหมักนั้นเกิดปัญหาการเปลี่ยนลักษณะสัณฐานของเชื้อรา เมื่อใส่กลูโคสความเข้มข้น 78 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 62 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการผลิตกรดแลกติก 1.46 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ลักษณะของเชื้อราเป็นแบบเส้นใย (Filamentous form) เมื่อทำการหมัก 27 ชั่วโมง เมื่อทำการหมักผ่านไป 43 ชั่วโมง ส่งผลให้เชื้อราเปลี่ยนรูปร่างเป็น Pellet โดยสามารถผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 66 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 86 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการผลิตกรดแลกติก 1.53 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 76 กรัมต่อลิตร

เพื่อลดปัญหาดังที่กล่าวมาข้างต้นของแคลเซียมคาร์บอเนตที่ไม่ละลายน้ำ การตกตะกอนของแคลเซียมแลกเตทและการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานของเชื้อรา ดังนั้นในการทดลองเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์แขวนลอยกับเซลล์ตรึงในระดับขวดเขย่าและถังหมักจึงเลือกใช้โซเดียม ไฮดรอกไซด์ในการควบคุมความเป็นกรดด่าง

ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกของด่างในการหมักแบบเซลล์แขวนลอยระดับขวดเขย่าปริมาตร 50 มิลลิลิตร

Process	Acid Neutralizer	$Y_{P/S}$ 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)
		GM	PM	GM	PM	GM	PM	GM	PM		
Free cells	$CaCO_3$	0.1310	0.8689	0.1998	1.5023	0.1980	0.2826	0.3360	0.4033	42.13	0.38
	5 M NaOH	0.2024	0.5707	0.3290	0.8880	0.2771	0.3927	0.4830	0.4772	21.42	0.30

หมายเหตุ GM : อาหารเพื่อการเจริญ

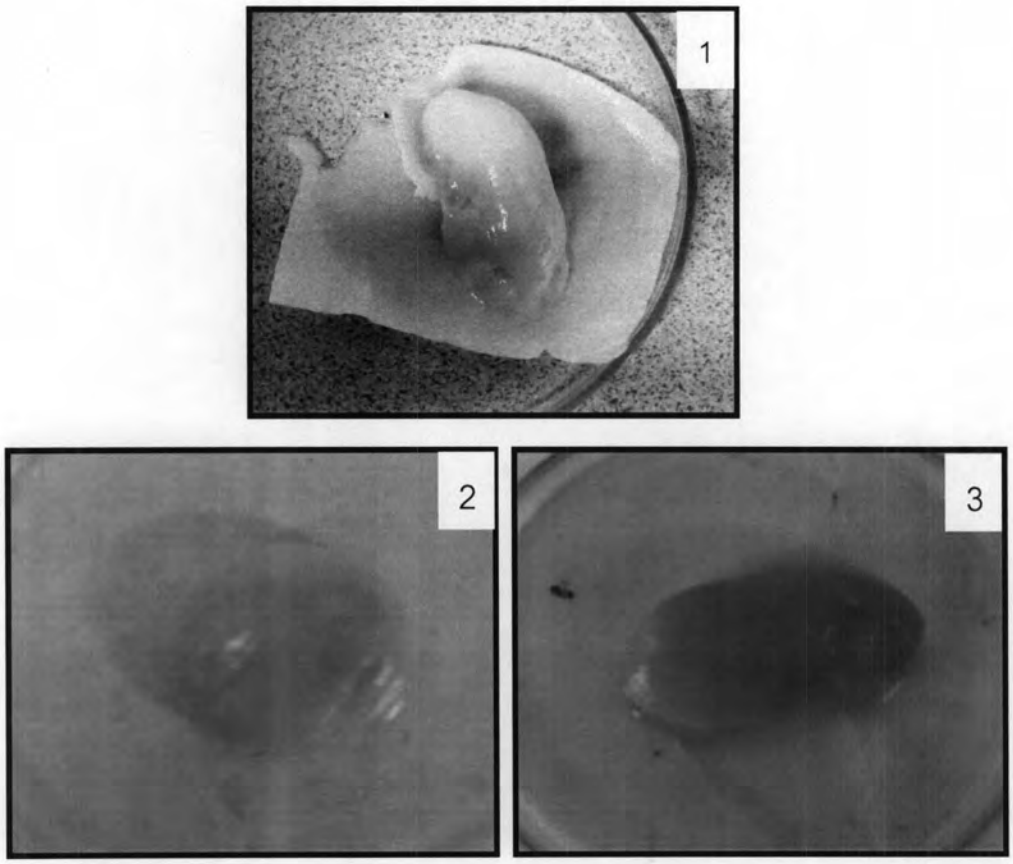
PM : อาหารเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์

4.2 การคัดเลือกเส้นใยที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติก

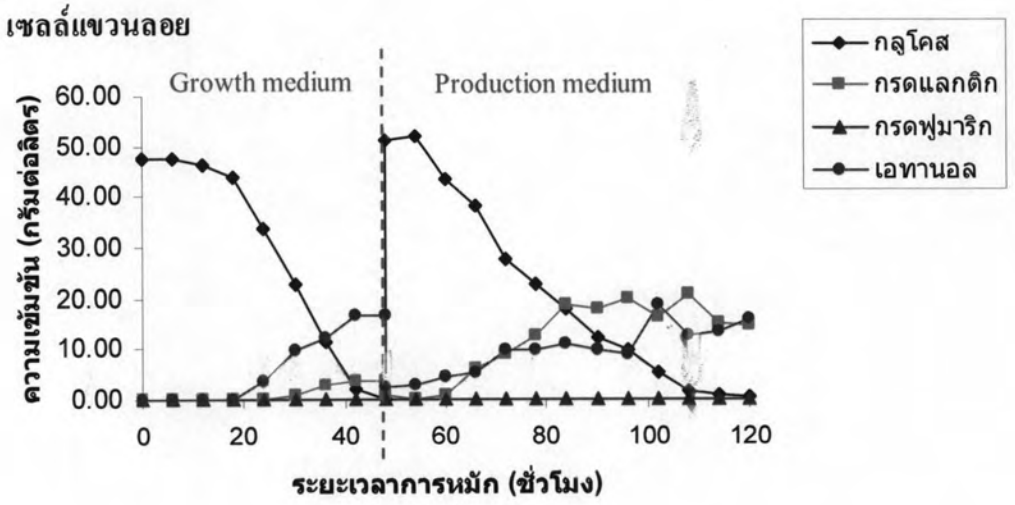
ศึกษาและเปรียบเทียบจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกระดับขวดเขย่าแบบเซลล์แขวนลอยกับเซลล์ตรึงบนเส้นใยชนิดต่างๆ โดยมีปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ ชนิดของเส้นใยได้แก่ผ้าฝ้ายและพอลิเอสเทอร์และโครงสร้างของเส้นใยได้แก่ชนิดที่ถักและไม่ถัก (Woven และ Non-woven) พบว่าในการหมักแบบเซลล์แขวนลอยเซลล์มีการเจริญแบบเป็นกลุ่มก้อน (รูปที่ 4.3) ทำให้เซลล์มีความหนาแน่นสูงการถ่ายเทอาหารและอากาศจึงเป็นไปได้ยาก ดังนั้นเซลล์ที่อยู่ในชั้นในสุด (Starvation zone) จึงผลิตเอทานอลคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เอทานอลเท่ากับ 0.2826 และอัตราการผลิตเอทานอล 0.3619 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยสามารถผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 20.71 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.4) คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.5233 อัตราการผลิตกรดแลกติก 0.6222 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.28 กรัมแสดงดังตารางที่ 4.2 เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Park และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยการหมักแบบเซลล์แขวนลอยแบบไม่ต่อเนื่อง โดยใช้ของเหลือจากการผลิตกระดาษ (Waste paper) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 49.1 กรัมต่อลิตรคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ 0.59 อัตราการผลิตกรดแลกติก 16.3 กรัมต่อลิตรต่อวัน โดย Huang และคณะ (2005a) ศึกษาการหมักแบบเซลล์แขวนลอยแบบไม่ต่อเนื่อง โดยใช้น้ำที่เหลือจากการผลิตมันฝรั่ง (Potato wastewater) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 21.25 กรัมต่อลิตรคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 87.4 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.98 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

การหมักแบบตรึงเซลล์ด้วยผ้าฝ้ายชนิดที่ถัก พบว่า ลักษณะสัณฐานของเชื้อพบว่ามีการตรึงเป็นแผ่น (Sheet) ซึ่งพบว่า การเจริญลักษณะนี้ในการหมักระดับขวดเขย่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงและช่วยเพิ่มการถ่ายเทของอากาศโดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 33.66 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.5) คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.8594 และอัตราการผลิตกรดแลกติก 1.3246 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและผลิตเอทานอลคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เอทานอลเท่ากับ 0.4249 อัตราการผลิตเอทานอล 0.2969 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.51 กรัม

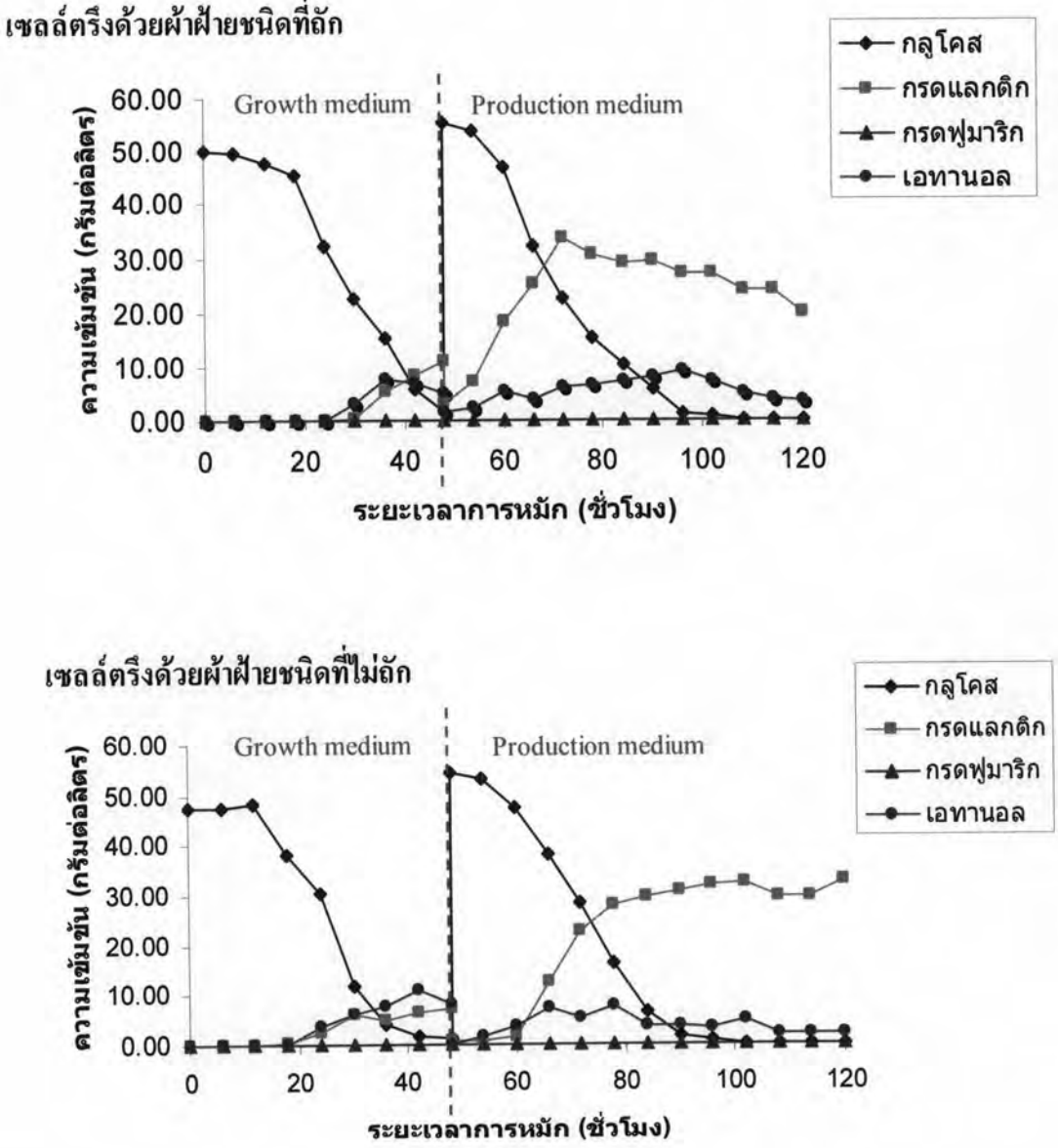
เมื่อทำการหมักเซลล์ตรึงบนผ้าฝ้ายชนิดที่ไม่ถัก พบว่า ลักษณะสัณฐานของเชื้อราพบว่า มีการมีการเจริญแบบเป็นกลุ่มก้อน ทำให้เซลล์สร้างเอทานอลคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เอทานอลเท่ากับ 0.4223 และอัตราการผลิตเอทานอล 0.4033 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งการเจริญลักษณะนี้ทำให้อัตราผลผลิตเอทานอลสูงกว่าในการหมักเซลล์ตรึงบนผ้าฝ้ายชนิดถัก อย่างไรก็ตาม ซึ่งไม่แตกต่างจากการหมักด้วยเซลล์ตรึงบนผ้าฝ้ายชนิดถักมากนัก สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 32.71 กรัมต่อลิตรคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.8519 อัตราการผลิตกรดแลกติก 1.2656 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.46 กรัม



รูปที่ 4.3 ลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ในการหมักแบบเซลล์แขวนลอย (1) และแบบเซลล์ตรึงบนเส้นใยชนิดต่างๆ ได้แก่ ผ้าฝ้ายชนิดที่ถัก (2) และชนิดที่ไม่ถัก (3)



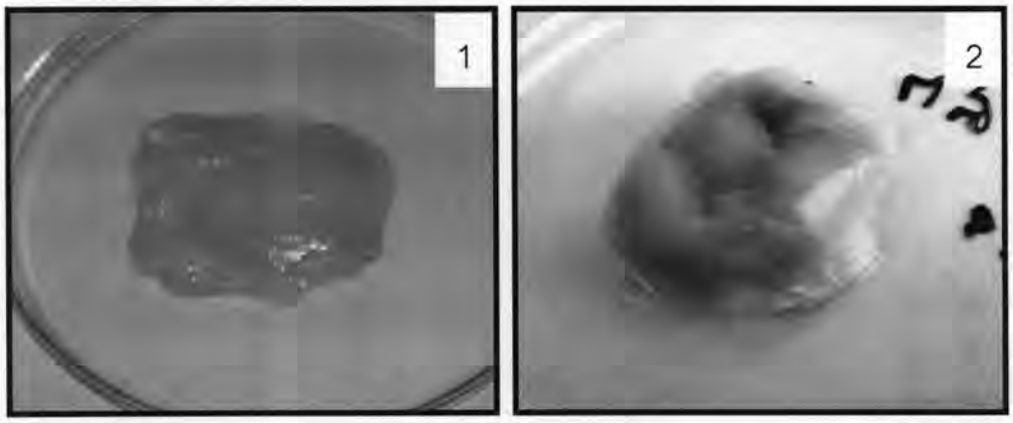
รูปที่ 4.4 จลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกในการหมักระดับขวดเขย่าแบบเซลล์แขวนลอย



รูปที่ 4.5 เปรียบเทียบจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกระดับขวดเขย่าแบบเซลล์ตรึงบนผ้าฝ้ายชนิดที่ถักและชนิดที่ไม่ถัก

เมื่อเปรียบเทียบผ้าแบบเดียวกันในการหมักแบบเซลล์ตรึงบนพอลิเอสเทอร์ชนิดถักและชนิดไม่ถัก พบว่า การหมักแบบเซลล์ตรึงบนพอลิเอสเทอร์ชนิดถักมีลักษณะสัณฐานของเซลล์ตรึงเป็นแผ่น (รูปที่ 4.6) สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 27.94 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.7) คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ กรดแลกติก 0.6591 และอัตราการผลิตกรดแลกติก 1.1105 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนการหมักแบบเซลล์ตรึงบนผ้าพอลิเอสเทอร์ชนิดไม่ถักสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 33.13 กรัมต่อลิตร $Y_{P/S}$ กรดแลกติก 0.7749 อัตราการผลิตกรดแลกติก 1.2802 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสามารถผลิต

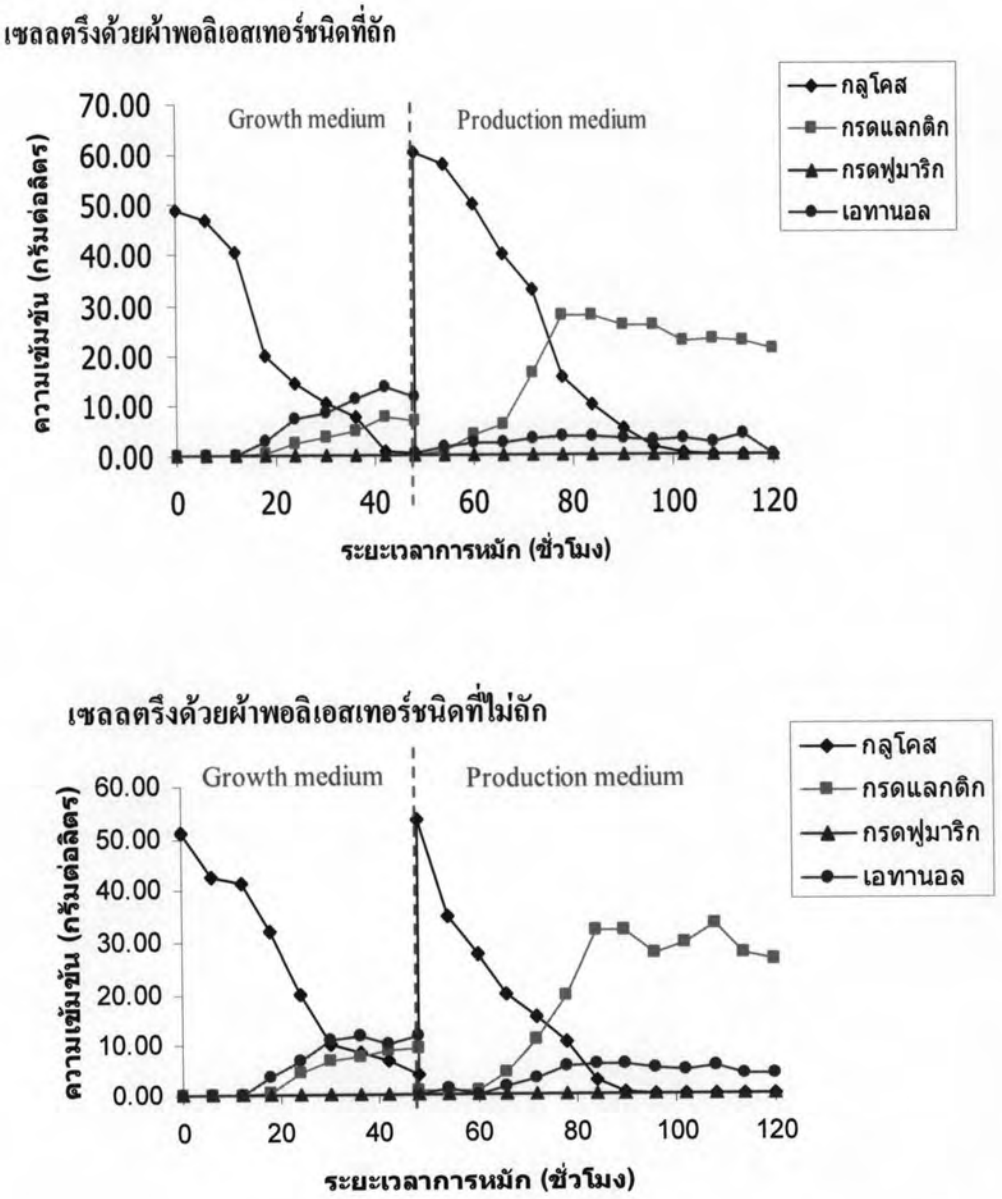
กรดแลกติกได้สูงกว่าการหมักแบบเซลล์ตรึงบนพอลิเอสเทอร์ชนิดถัก เมื่อพิจารณาถึงการผลิตเอทานอล พบว่า เซลล์ตรึงบนพอลิเอสเทอร์ชนิดถักสามารถผลิตเอทานอลคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เอทานอลเท่ากับ 0.0800 อัตราการผลิตเอทานอล 0.1046 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.31 กรัมเทียบกับเซลล์ตรึงบนพอลิเอสเทอร์ชนิดที่ไม่ถักสามารถผลิตเอทานอลคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เอทานอลเท่ากับ 0.2644 อัตราการผลิตเอทานอล 0.2641 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.43 กรัม



รูปที่ 4.6 ลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ในการหมักแบบเซลล์ตรึงบนเส้นใยพอลิเอสเทอร์ชนิดที่ถัก (1) และชนิดที่ไม่ถัก (2)

เมื่อพิจารณาถึงปริมาณกรดแลกติกและน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการหมักระดับขวดเขย่าแบบเซลล์แขวนลอยและแบบเซลล์ตรึงบนผ้าฝ้ายชนิดถักและไม่ถักกับพอลิเอสเทอร์ชนิดถักและไม่ถัก พบว่า ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้มีความสัมพันธ์กับน้ำหนักเซลล์แห้ง ถ้าน้ำหนักเซลล์แห้งมีปริมาณสูงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ก็จะสูงตามไปด้วยและสภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือผ้าฝ้ายชนิดถัก ซึ่งพบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเมื่อคิดเป็น $Y_{P/S}$ กรดแลกติกและอัตราการผลิตกรดแลกติก ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kosakai และคณะ (1997) ศึกษาการตรึงเซลล์ ลักษณะการเจริญแบบ Mycelial flocs บน Mineral supports ในการหมักระดับขวดเขย่าแบบไม่ต่อเนื่อง พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 103.6 กรัมต่อลิตร $Y_{P/S}$ กรดแลกติก 0.80 เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร

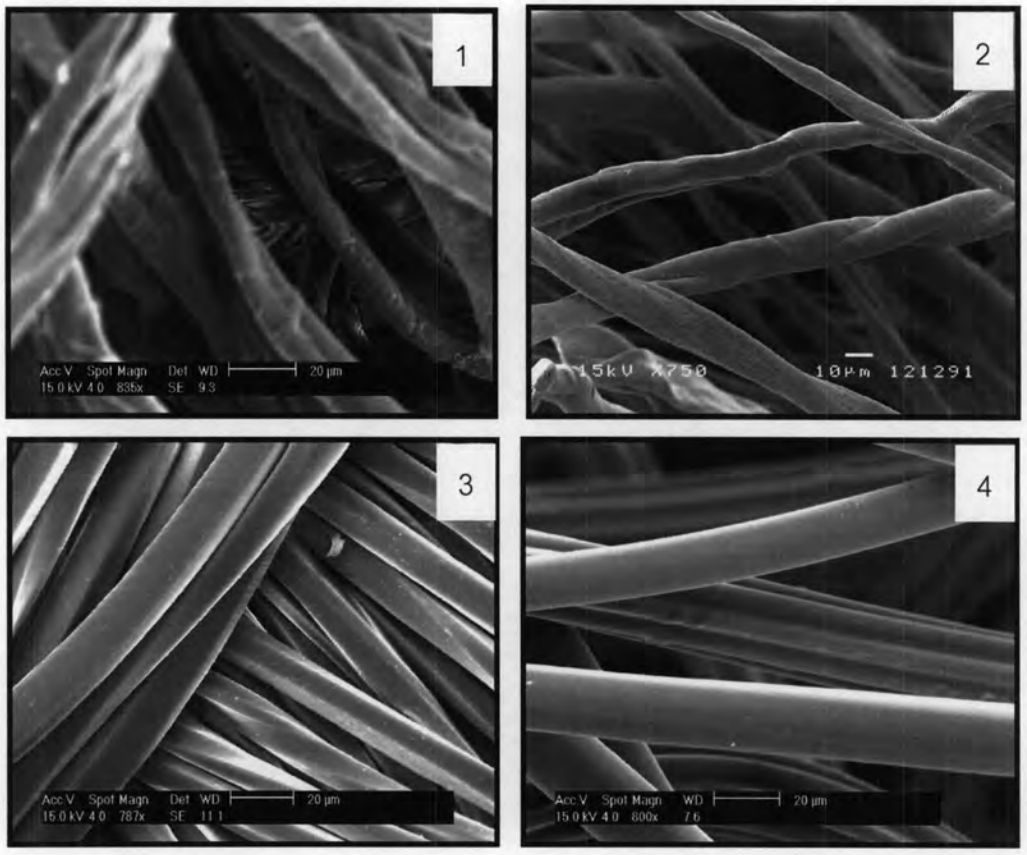
นอกจากนี้ Hang และคณะ (1989) ได้ศึกษาการตรึงเซลล์บนแคลเซียมแอลจิเนทในการหมักระดับขวดเขย่าแบบ Repeated batch พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 62 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ แลกติกเท่ากับ 0.72 อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 2.5 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้น ผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่า การตรึงเซลล์ช่วยเพิ่มผลผลิตกรดแลกติกโดย *R. oryzae*



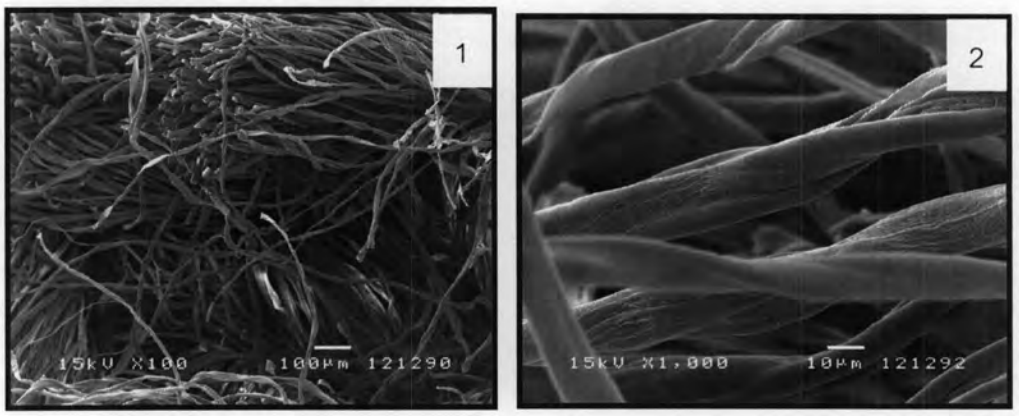
รูปที่ 4.7 เปรียบเทียบจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกระดับขวดเขย่าแบบเซลล์ตรึงบนผ้าพอลิเอสเทอร์ชนิดที่ถักและไม่ถัก

เมื่อวิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวและโครงสร้างของเส้นใยผ้าฝ้ายและพอลิเอสเทอร์ชนิดที่ถักและชนิดไม่ถัก จากรูปที่ 4.8 พบว่า ลักษณะพื้นผิวของเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดถักมีลักษณะไม่เรียบและโครงสร้างของเส้นใยมีการถักไปมา ซึ่งลักษณะการสานของเส้นใยชนิดนี้มีระยะการสานที่พอเหมาะ ทำให้ในขั้นตอนของการถ่ายหัวเชื้อเริ่มต้น สปอร์สามารถเข้าไปตรึงในช่องว่างของเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดที่ถักและเจริญได้ดีกว่าและเนื่องจากลักษณะพื้นผิวของเส้นใยมีลักษณะไม่เรียบทำให้สปอร์สามารถทำการยึดเกาะได้ง่ายกว่าเมื่อเทียบกับผ้าพอลิเอสเทอร์ที่มีลักษณะเรียบมัน เมื่อพิจารณาของเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดที่ถักที่กำลังขยาย 100 เท่า พบว่า เส้นใยผ้าฝ้ายชนิดที่ถักมีช่องว่างบริเวณตรงกลาง แสดงในรูปที่ 4.9 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสปอร์ซึ่งมีขนาด 5 – 12 ไมโครเมตร สามารถเข้าไปยึดตรึงและเจริญได้ดีในบริเวณดังกล่าว เมื่อเพิ่มกำลังขยายเป็น 1000 เท่า พบว่า ลักษณะพื้นผิวของเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดถัก มีลักษณะขุระ ไม่เรียบ และมีการบิดเป็นเกลียวของเส้นใยในแต่ละเส้น (Thongchul, 2005) ซึ่งการหมุนบิดนี้ก่อให้เกิดช่องว่างและหลุมภายในสายได้ สปอร์จะเข้าไปตรึงในหลุมดังกล่าวด้วยเทคนิค Entrapment ซึ่งภายในถังหมักจะมีแรงเฉือนจากใบพัดและแรงดันจากอากาศ แต่เนื่องจากพื้นที่ที่สปอร์อยู่มีลักษณะคล้ายหลุมจึงช่วยป้องกันแรงเฉือนจากใบพัดและแรงดันจากการให้อากาศได้ พบว่า ลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะที่เหมาะสมต่อการยึดเกาะและเจริญของ *R. oryzae* อีกทั้งผ้าฝ้ายทั้งชนิดที่ถักและไม่ถักเป็นผ้าที่ได้จากธรรมชาติ ผนังเซลล์จึงมีส่วนที่ชอบน้ำหรือส่วนที่มีขั้วหรือมีประจุ (hydrophilic regions) เหมือนกันกับผนังเซลล์ของเชื้อรา *R. oryzae* จึงเกิดการตรึงเซลล์บนผ้าฝ้ายด้วยเทคนิคการตรึงแบบ Adsorption ได้ดีกว่าผ้าพอลิเอสเทอร์ที่ผลิตจากการสังเคราะห์ทางเคมี

ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าผ้าฝ้ายชนิดที่ถัก (ผ้าขนหนู) เหมาะสมสำหรับใช้ในการตรึงสปอร์ของ *R. oryzae*



รูปที่ 4.8 วิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างของเส้นใยชนิดต่างๆผ้าฝ้ายชนิดที่ถัก (1) และชนิดที่ไม่ถัก (2) และพอลิเอสเทอร์ชนิดที่ถัก (3) และชนิดที่ไม่ถัก (4) ด้วยเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 800 เท่า
ที่มา : Thongchul, 2005



รูปที่ 4.9 ลักษณะโครงสร้างของเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดที่ถักวิเคราะห์ด้วยเครื่อง SEM ที่กำลังขยาย 100 เท่า (1) และกำลังขยาย 1000 เท่า (2)

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกในการหมักระดับขวดเขย่าแบบเซลล์แขวนลอยปริมาตร 50 มิลลิลิตรกับเซลล์ตรึงบนเส้นใยชนิดต่างๆปริมาตร 50 มิลลิลิตร

Process	Conditions	$Y_{P/S}$ 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)
		GM	PM	GM	PM	GM	PM	GM	PM		
Free cells	-	0.1160	0.5233	0.2060	0.6222	0.3850	0.2826	0.6833	0.3619	20.71	0.28
Immobilized cells	Cotton - woven	0.3810	0.8594	0.5933	1.3246	0.4395	0.4249	0.6312	0.2969	33.66	0.51
	Cotton – non woven	0.1721	0.8519	0.3290	1.2656	0.2007	0.4223	0.4158	0.4033	32.71	0.46
	Polyester - woven	0.3730	0.6591	0.2782	1.1105	0.5556	0.0800	0.4215	0.1046	27.94	0.31
	Polyester – non woven	0.2960	0.7749	0.3335	1.2802	0.3367	0.2644	0.5933	0.2641	33.13	0.43

หมายเหตุ GM : อาหารเพื่อการเจริญ

PM : อาหารเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์

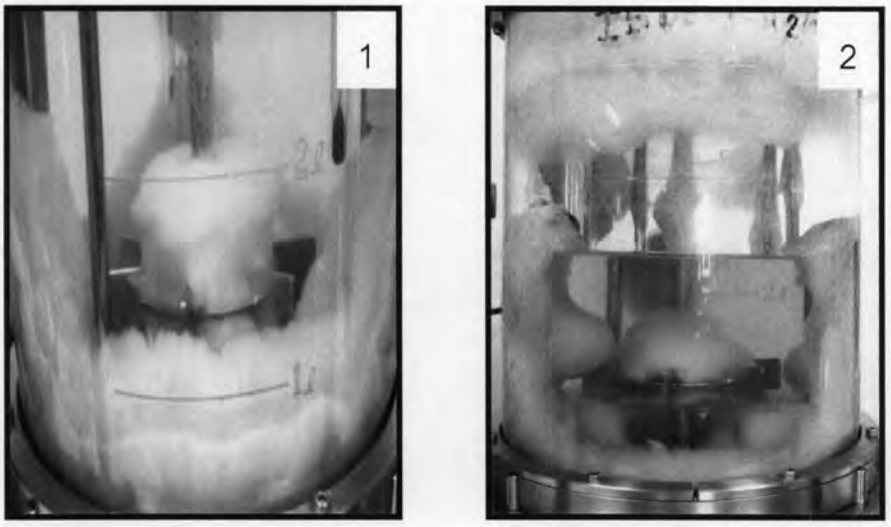
4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึงของ *R. oryzae* ในถังหมักแบบเบดสถิตโดยเปรียบเทียบกับการหมักโดยเซลล์แขวนลอยในถังกวน

4.3.1 การหมักแบบเซลล์แขวนลอยในถังกวน

ทำการหมักในอาหารเพื่อการเจริญในภาวะที่มีการให้อากาศเท่ากับ 0.50 และ 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยมีอัตราการกวนได้แก่ 100 300 500 และ 700 รอบต่อนาที หมักแบบไม่ต่อเนื่องที่ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.0 ทำการหมักจนครบ 48 ชั่วโมง โดยไม่มีการควบคุมพีเอชในช่วงนี้ แล้วจึงทำการเปลี่ยนอาหารเป็นอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์โดยจะควบคุมค่าพีเอชที่ 6.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ตลอดการหมัก พบว่าที่อัตราการกวน 100 และ 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ลักษณะของเซลล์มีการเจริญแบบกลุ่มก้อน (Clump) ที่บริเวณด้านบนและด้านล่างของถังหมักและยังพบอีกว่าเซลล์ของเชื้อราจะไปจับบริเวณแกนใบพัดทำให้ใบพัดหมุนไม่สม่ำเสมอทำให้ต้องใช้พลังงานเพิ่มขึ้นเพื่อที่จะใช้ในการหมุนใบพัด (รูปที่ 4.10) ทำให้ปริมาณออกซิเจนละลายน้อยไม่เพียงพอต่อการเจริญของเชื้อ โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 33.26 และ 35.22 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.5076 และ 0.5548 และอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 1.1315 และ 1.6155 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ เมื่อทำการหมักเป็นระยะเวลา 84 ชั่วโมง แสดงดังตารางที่ 4.3 โดยสามารถผลิตเอทานอลคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.0684 และ 0.0754 และอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.1528 และ 0.0857 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ พบว่า เมื่อเพิ่มรอบการกวนส่งผลให้อัตราการผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้นและการผลิตเอทานอลลดลง และที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.50 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที รอบการกวน 100 และ 300 รอบต่อนาที สามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 33.67 และ 35.05 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.5296 และ 0.5342 และอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 1.0664 และ 1.2251 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ

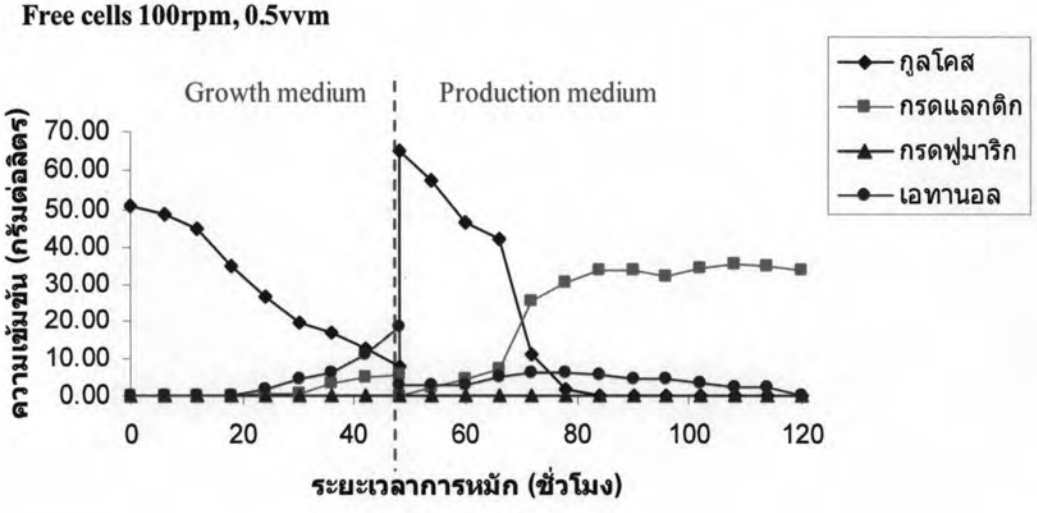
ที่อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 0.5 เป็น 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ส่งผลให้ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนมีค่าเพิ่มขึ้นจาก 0.0034 เป็น 0.0067 ต่อวินาที ค่า $Y_{P/S}$ เอทานอลและอัตราการผลิตเอทานอลมีค่าลดลงและอัตราการผลิตกรดแลกติกก็เพิ่มขึ้นด้วย (รูปที่ 4.11) มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tay และ Yang (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยวิธีตรึงเซลล์ในถังหมักแบบ Rotating fibrous-bed (RFB) เพื่อช่วยเพิ่มอัตราการถ่ายเทออกซิเจนภายในถังหมัก พบว่า ค่าการละลายของออกซิเจน (DO) เท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตกรดแลกติกคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 82.8 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 2.62 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงเทียบกับค่าการละลายของออกซิเจน

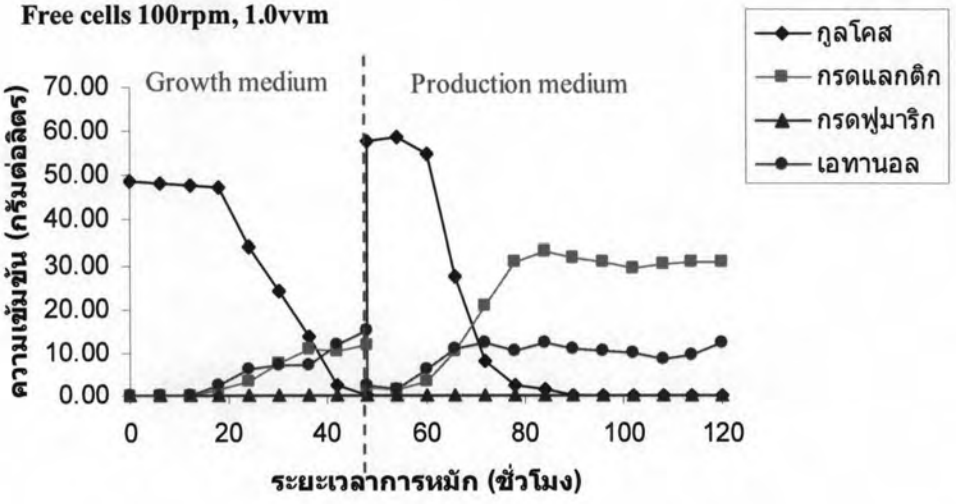
เท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตกรดแลกติกคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 49.7 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.42 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แสดงว่า ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนที่เพิ่มสูงขึ้นมีผลต่อการผลิตกรดแลกติก



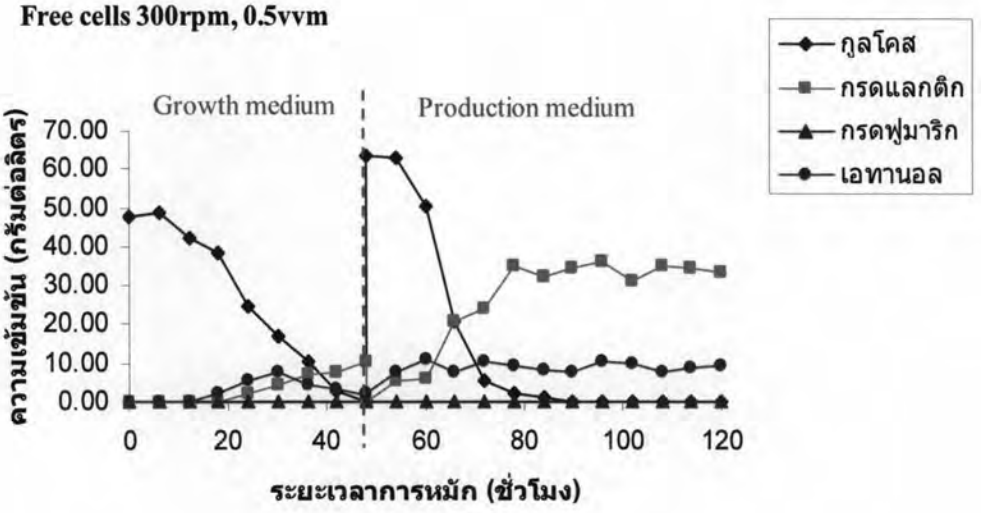
รูปที่ 4.10 ลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* แบบเซลล์แขวนลอยในถังกวนที่อัตราการกวน 100 และ 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (1) และ (2)

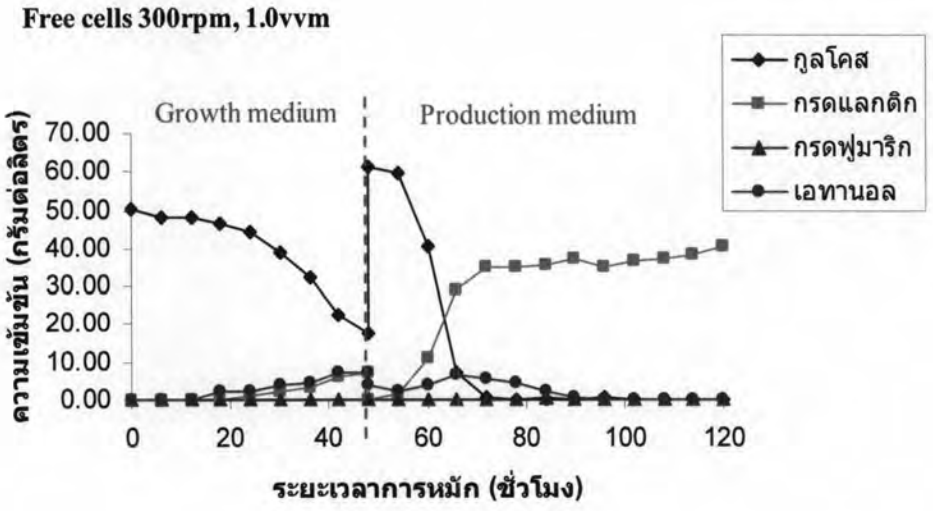
เมื่อเพิ่มอัตราการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.50 และ 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที พบว่า ลักษณะของเซลล์มีการเจริญแบบกลุ่มก้อน (Clump) โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 35.05 และ 35.22 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.12) คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.5342 และ 0.5548 และอัตราการผลิตกรดแลกติก 1.2251 และ 1.6155 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4.3) เมื่อทำการหมักเป็นระยะเวลา 84 ชั่วโมง ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจน 0.0083 และ 0.0111 ต่อวินาที แสดงให้เห็นว่าการกวนเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อระบบการหมักในถังหมัก ซึ่งมีหน้าที่ช่วยตีฟองที่ถูกปล่อยจากด้านล่างของฐานให้มีขนาดเล็กลงและทำให้สามารถส่งผ่านออกซิเจนได้ดีขึ้น โดยสามารถผลิตเอทานอลคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.0864 และ 0.0754 และอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.0985 และ 0.0857 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ





รูปที่ 4.11 การหมักแบบเซลล์แขวนลอยในถังกวนที่อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที การให้อากาศเท่ากับ 0.50 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

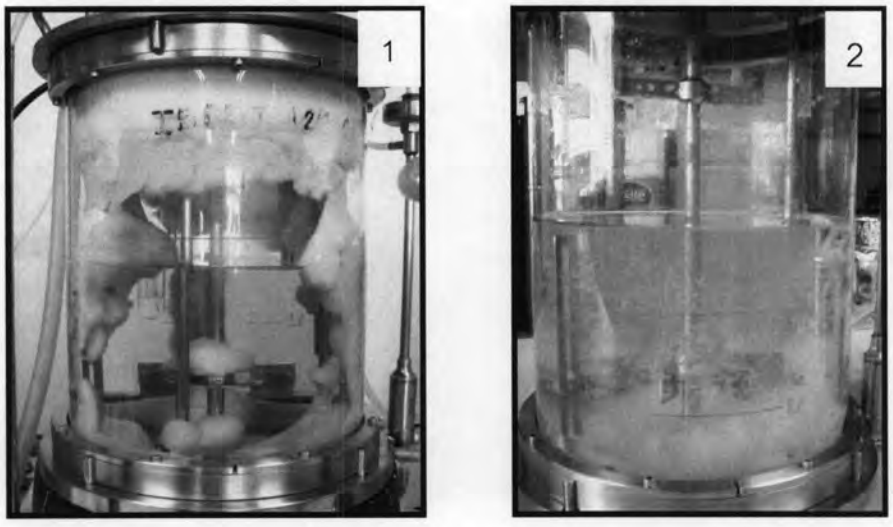




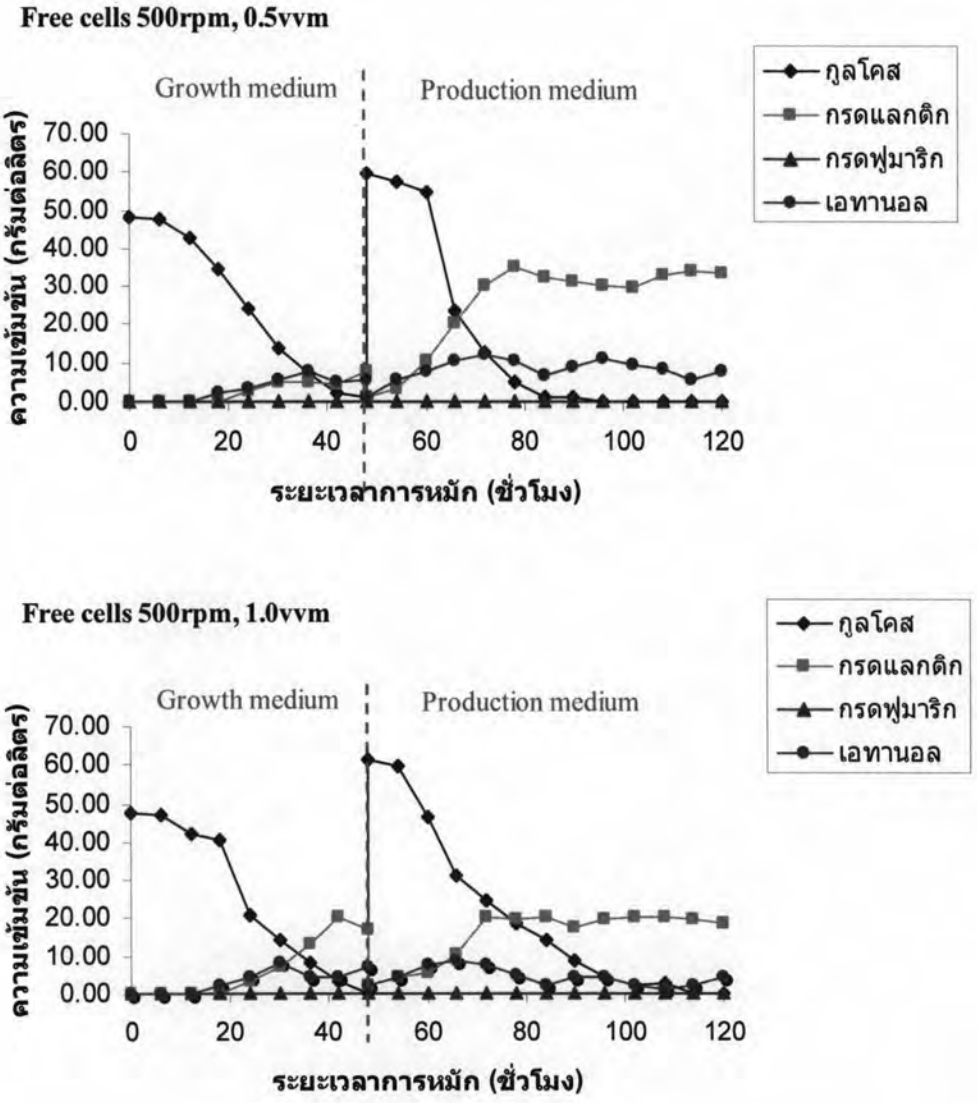
รูปที่ 4.12 การหมักแบบเซลล์แขวนลอยในถังกวนที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที การให้อากาศเท่ากับ 0.50 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

ที่อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.50 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที จากรูปที่ 4.13 พบว่า ลักษณะของเซลล์มีการจับกลุ่มเป็นก้อนที่บริเวณด้านล่างของถังหมักซึ่งมีลักษณะสัณฐานของเซลล์คล้ายคลึงกับที่อัตราการกวน 100 และ 300 รอบต่อนาที ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนเท่ากับ 0.0194 ต่อวินาที เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที พบว่า ลักษณะสัณฐานของเส้นใยถูกใบพัดตัดขาดเป็นชิ้นเล็กๆ (Fragmentation) ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนเท่ากับ 0.0219 ต่อวินาที แสดงว่า การเพิ่มอัตราการให้อากาศทำให้ลักษณะสัณฐานของเส้นใยราเปลี่ยนรูปร่างไป

ซึ่งลักษณะดังกล่าวนั้นส่งผลให้ปริมาณการผลิตกรดแลกติกลดลง ที่อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.50 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที สามารถผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 34.82 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.14) คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.5959 และอัตราการผลิตกรดแลกติก 1.4704 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที สามารถผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 20.10 กรัมต่อลิตรคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.4177 และอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.593 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แสดงดังตารางที่ 4.3 ที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.50 และ 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที สามารถผลิตเอทานอลคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.0675 และ 0.0584 อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.0564 และ 0.0486 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ



รูปที่ 4.13 ลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* แบบเซลล์แขวนลอยในถังกวนที่อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที การให้อากาศเท่ากับ 0.5 และ 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (1) และ (2) ตามลำดับ

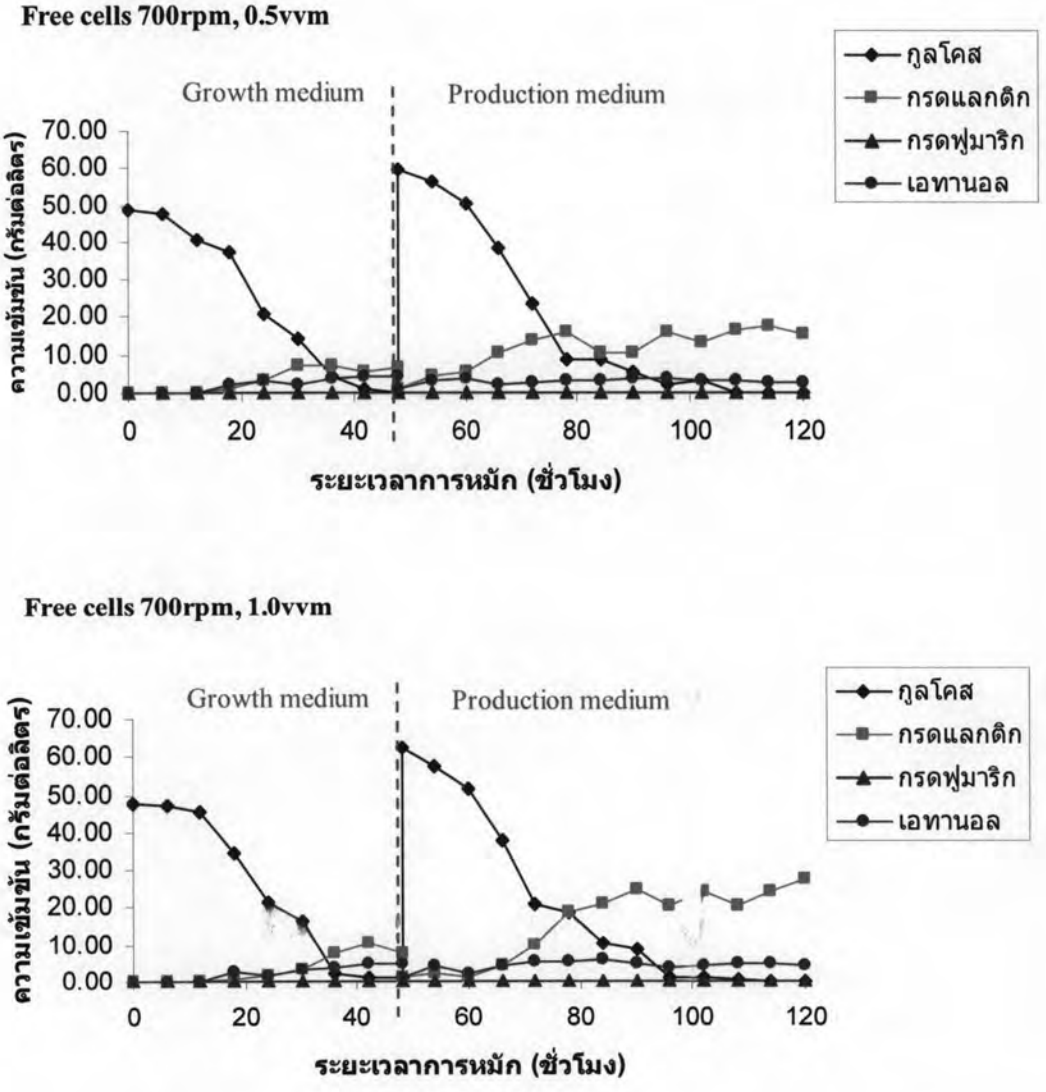


รูปที่ 4.14 การหมักแบบเซลล์แขวนลอยในถังกวนที่อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที การให้อากาศเท่ากับ 0.50 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

เมื่อเพิ่มอัตราการกวนเป็น 700 รอบต่อนาที การให้อากาศเท่ากับ 0.50 และ 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที นั้นส่งผลให้ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนเพิ่มขึ้นตาม ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนเท่ากับ 0.0173 และ 0.0164 ต่อวินาที แต่อย่างไรก็ดีเนื่องจากลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราเองที่เป็นแบบเซลล์แขวนลอยเมื่อต้องอยู่ในอัตราการกวนที่สูงๆทำให้เส้นใยเชื้อราขาด แตกหักเป็นชิ้นเล็กๆ (Fragmentation) และเสียหายได้เนื่องจากการกวนที่แรงขึ้น เมื่อเซลล์มีขนาดเล็กทำให้ในขั้นตอนการเปลี่ยนถ่ายอาหารจากอาหารเพื่อการเจริญมาเป็นอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์เซลล์ได้ถูกดูดออกมาด้วยซึ่งส่งผลให้ปริมาณกรดแลกติกลดลงเท่ากับ 15.85 และ 24.52 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.15) คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.2815 และ

0.4312 และอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.5762 และ 0.7412 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ เมื่อทำการหมักเป็นระยะเวลา 84 ชั่วโมง

ในกรณีที่เพิ่มอัตราการให้อากาศทำให้ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนเพิ่มขึ้นจึงส่งผลให้สามารถผลิตเอทานอลได้ลดลง ที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.50 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาทีสามารถผลิตเอทานอลคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.0241 อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.0432 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที สามารถผลิตเอทานอลคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.0175 อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.0315 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง



รูปที่ 4.15 การหมักแบบเซลล์แขวนลอยในถังกวนที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศเท่ากับ 0.50 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

เมื่อทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์แขวนลอยในถังกวน พบว่า ที่อัตราการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาทีเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 35.22 กรัมต่อลิตรที่กลูโคสความเข้มข้นเท่ากับ 70 กรัมต่อลิตรคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.5548 และอัตราการผลิตกรดแลกติก 1.6155 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อทำการหมักเป็นระยะเวลา 84 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามเมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบกับ Yin และคณะ (1998) พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 91 กรัมต่อลิตรเมื่อใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นเท่ากับ 90 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.75 และอัตราการผลิตกรดแลกติก 2.02 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์แขวนลอยในถังหมักแบบ Air-lift โดย Bai และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์แขวนลอยในถังกวน โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 74.92 กรัมต่อลิตรเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตรคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.74 สรุปได้ว่า จากลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักและขึ้นกับสภาวะที่ใช้ในการหมักกระบวนการหมักกรดแลกติกด้วยเซลล์แขวนลอยของ *R. oryzae* ในถังกวนมักประสบปัญหาเรื่องการถ่ายเทอากาศ ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อการเจริญของเชื้อราและการสร้างกรดแลกติก (Skory และคณะ, 1998) ซึ่งเมื่อเพิ่มรอบการกวนจาก 100 เป็น 300 500 จนถึง 700 รอบต่อนาที พบว่า ลักษณะสัณฐานของเชื้อรามีการเปลี่ยนแปลงคือ ที่รอบการกวน 100 ถึง 300 รอบต่อนาที ลักษณะรูปร่างของเชื้อราจะมีลักษณะเป็นกลุ่มก้อน ซึ่งเซลล์มักจะไปเจริญบริเวณด้านล่างของถังหมักทำให้การถ่ายเทออกซิเจนต่ำ จึงผลิตเอทานอลสูง แต่อย่างไรก็ดีเมื่อเพิ่มรอบการกวนจะเกิดแรงเฉือนสูงตามทำให้เซลล์ถูกแรงตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ส่งผลการผลิตกรดแลกติกลดลง เนื่องจากในขั้นตอนของการเปลี่ยนอาหารจากอาหารเพื่อการเจริญเป็นอาหารเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์นั้น เซลล์ถูกดูดออกมาด้วย ดังนั้นแทนที่เซลล์จะสร้างผลิตภัณฑ์เซลล์จึงต้องเปลี่ยนวิถีเมแทบอลิซึมเป็นสร้างเซลล์และรักษาสภาพแทน ซึ่งจะเห็นได้จากรอบกวนที่เพิ่มขึ้นทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นตาม และเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 0.50 เป็น 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที 100 และ300 รอบต่อนาที พบว่า มีผลทำให้อัตราการผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้นและปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ก็ลดลงซึ่งมีความสัมพันธ์กับค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน คือ เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศส่งผลให้การถ่ายเทอากาศเพียงพอต่อความต้องการของเชื้อ ดังนั้นปริมาณเอทานอลจึงลดลง

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกในการหมักแบบเซลล์แขวนลอยในถังกวนที่สภาวะต่างๆที่มีน้ำหมักปริมาตร 3 ลิตร

Conditions		$Y_{P/S}$ lactic acid		Productivity lactic acid (g/(L·h))		$Y_{P/S}$ ethanol		Productivity ethanol (g/(L·h))		Max lactic acid conc.	Cell dry weight	K_La
rpm	vvm	GM	PM	GM	PM	GM	PM	GM	PM	(g/L)	(g)	(s^{-1})
100	0.5	0.3810	0.5296	0.2750	1.0664	0.3332	0.0606	0.5882	0.1870	33.67	25.63	0.0034
100	1.0	0.3036	0.5076	0.2118	1.1315	0.2465	0.0684	0.4685	0.1528	33.26	26.14	0.0067
300	0.5	0.2764	0.5342	0.2542	1.2251	0.1235	0.0864	0.3528	0.0985	35.05	28.12	0.0083
300	1.0	0.2356	0.5548	0.2417	1.6155	0.1147	0.0754	0.3195	0.0857	35.22	26.00	0.0111
500	0.5	0.1613	0.5959	0.1459	1.4704	0.1041	0.0675	0.1785	0.0564	34.82	28.71	0.0194
500	1.0	0.4662	0.4177	0.2792	0.5933	0.0945	0.0584	0.1568	0.0486	20.10	31.85	0.0219
700	0.5	0.2142	0.2815	0.1574	0.5762	0.0531	0.0241	0.0854	0.0432	15.85	33.42	0.0173
700	1.0	0.2238	0.4312	0.2765	0.7412	0.0421	0.0175	0.0584	0.0315	24.52	34.74	0.0164

หมายเหตุ GM : อาหารเพื่อการเจริญ

PM : อาหารเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์

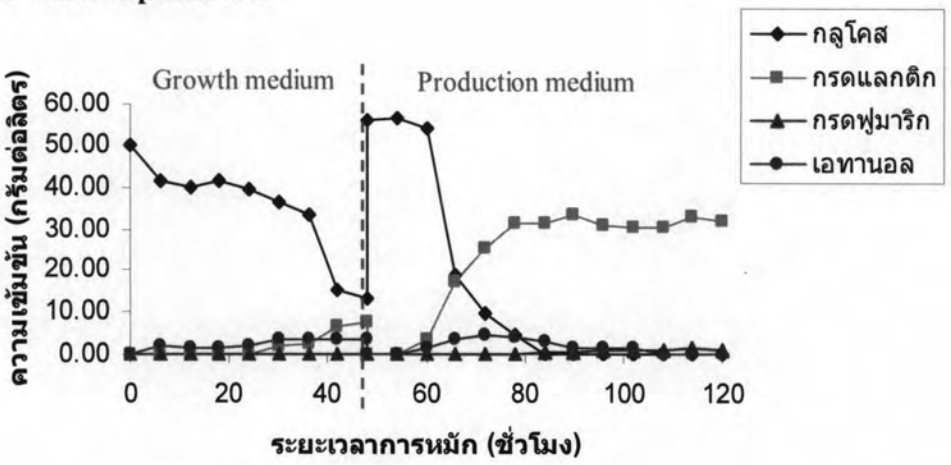
4.3.2 การหมักด้วยวิธีตรึงเซลล์เชื้อรา *R. oryzae* ในถังหมักแบบเบดสถิต

ทำการหมักแบบเดียวกับการหมักในถังกวนโดยใช้เซลล์ตรึงบนผ้าฝ้ายชนิดถัก (ผ้าขนหนู) ในถังหมักแบบเบดสถิต พบว่าที่อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.50 และ 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที สามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 33.29 และ 34.27 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.16) คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.5347 และ 0.5647 อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 1.3987 และ 1.1034 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยสามารถผลิตเอทานอลคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.2050 และ 0.0628 และอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.4131 และ 0.1307 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.4 จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศอัตราการผลิตเอทานอลกลับลดลงเพราะ *R. oryzae* เป็นเชื้อราที่ต้องการอากาศในการเจริญ ในภาวะที่ขาดอากาศเชื้อราจะเปลี่ยนวิถีเมแทบอลิซึมโดยจะเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นเอทานอลแทนที่จะใช้ในการเจริญและสร้างกรดแลกติก

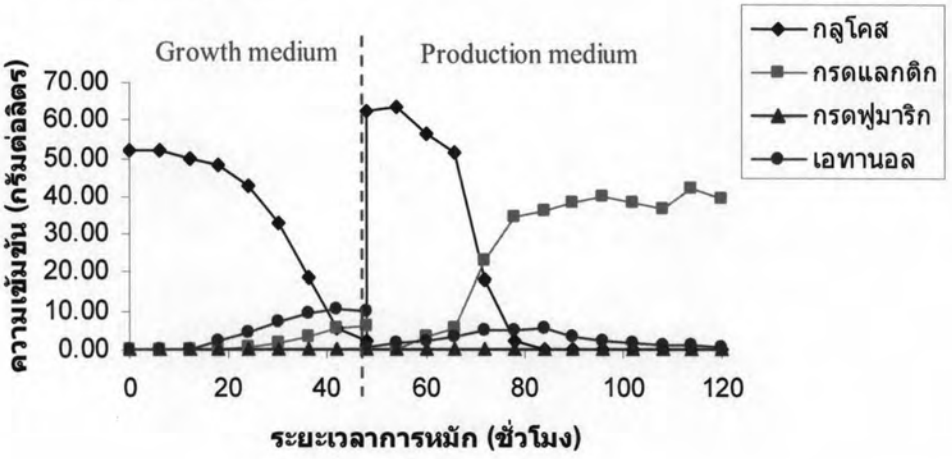
ที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.50 และ 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที สามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 33.12 และ 36.07 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.17) คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.5962 และ 0.6328 อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.9431 และ 1.5658 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยสามารถผลิตเอทานอลคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.2659 และ 0.0905 และอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.2635 และ 0.2281 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงโดยค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนเท่ากับ 0.0256 และ 0.0498 ต่อวินาทีตามลำดับ จากผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการเพิ่มอัตราการให้อากาศแนวโน้มของการผลิตกรดแลกติกก็เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน โดยมีความสัมพันธ์กับค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจน พบว่า อัตราการผลิตเอทานอลมีค่าลดลง

ที่อัตราการกวน 100 และ 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที พบว่า เมื่อเพิ่มรอบการกวนส่งผลให้อัตราการผลิตกรดแลกติกและค่า $Y_{P/S}$ เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มรอบการกวนเป็น 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.50 และ 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที สามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 39.00 และ 24.66 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.18) คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.5726 และ 0.5568 อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.9918 และ 0.6837 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ที่ 500 รอบต่อนาที เมื่ออัตราการให้อากาศเพิ่มขึ้นปริมาณกรดแลกติกไม่ได้เพิ่มขึ้น โดยสามารถผลิตเอทานอลคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.0791 และ 0.0873 และอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.1133 และ 0.2098 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงโดยค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนเท่ากับ 0.0303 และ 0.0497 ต่อวินาทีตามลำดับ

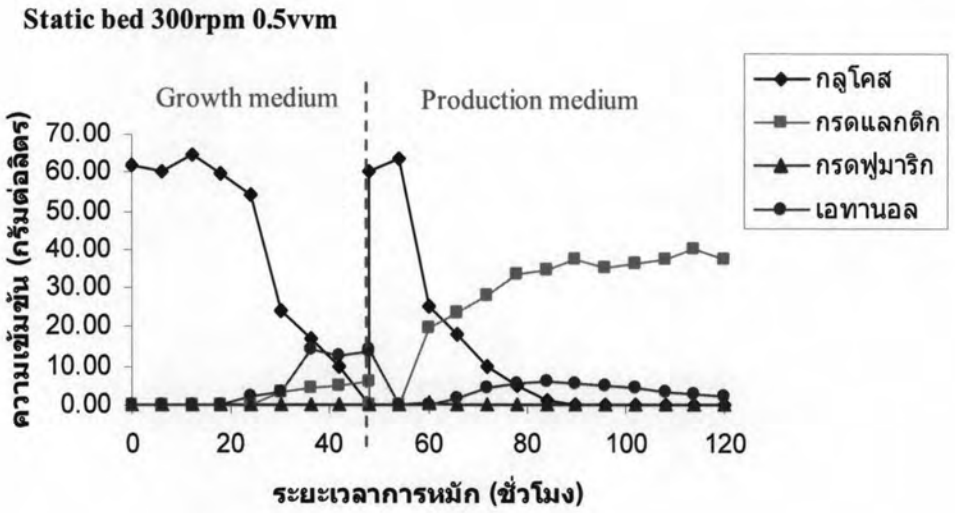
Static bed 100rpm 0.5vvm

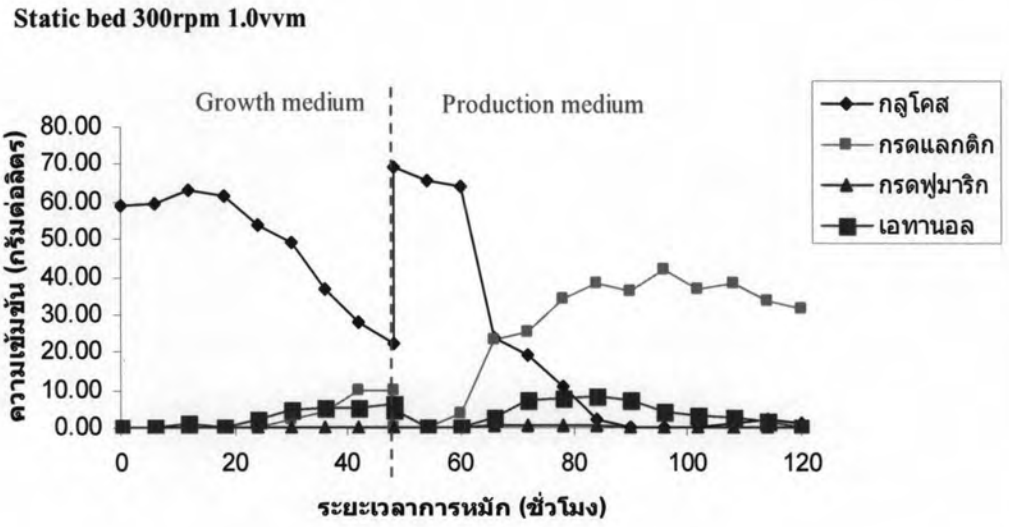


Static bed 100 rpm 1vvm

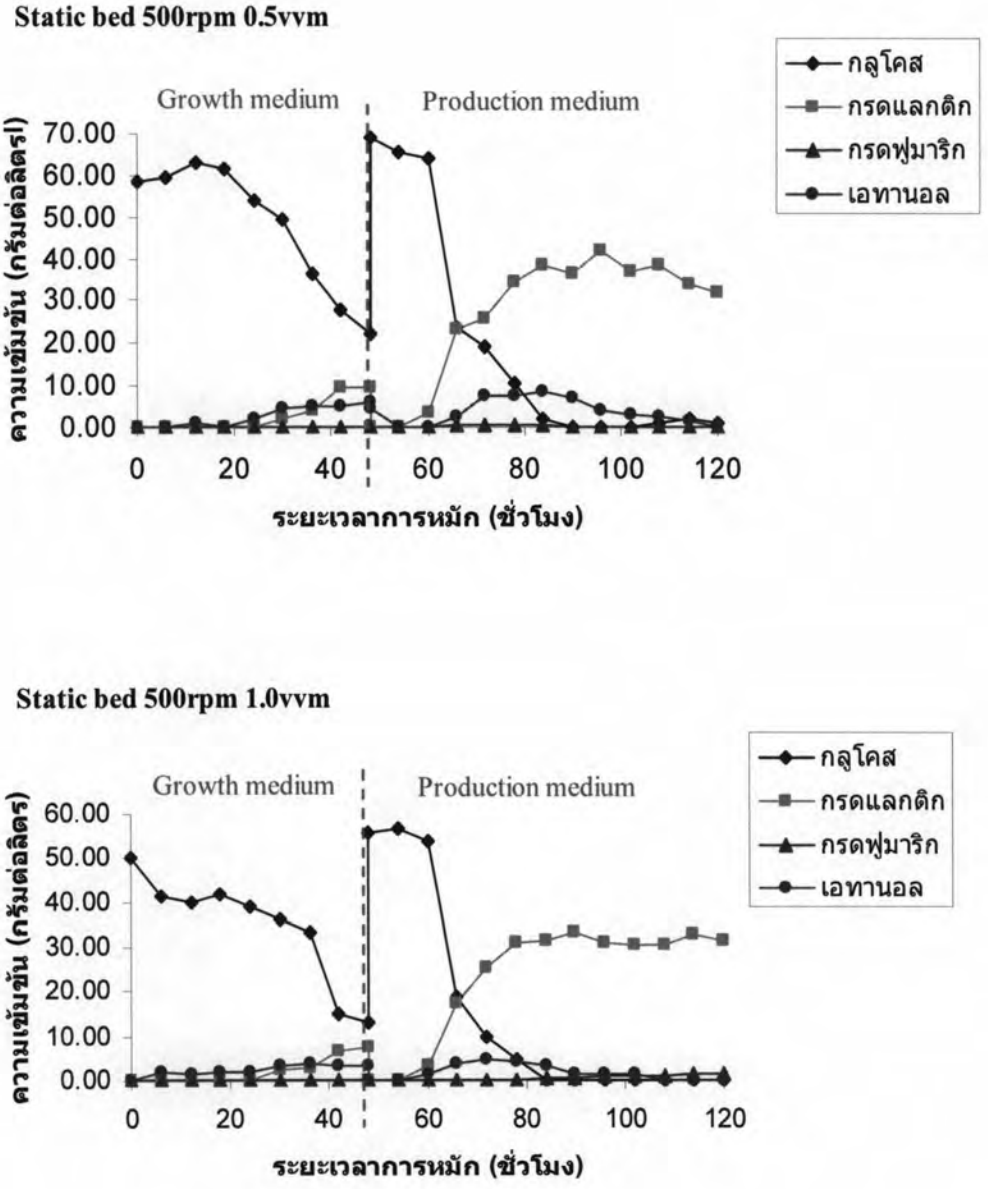


รูปที่ 4.16 การหมักแบบเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิตที่อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.50 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที





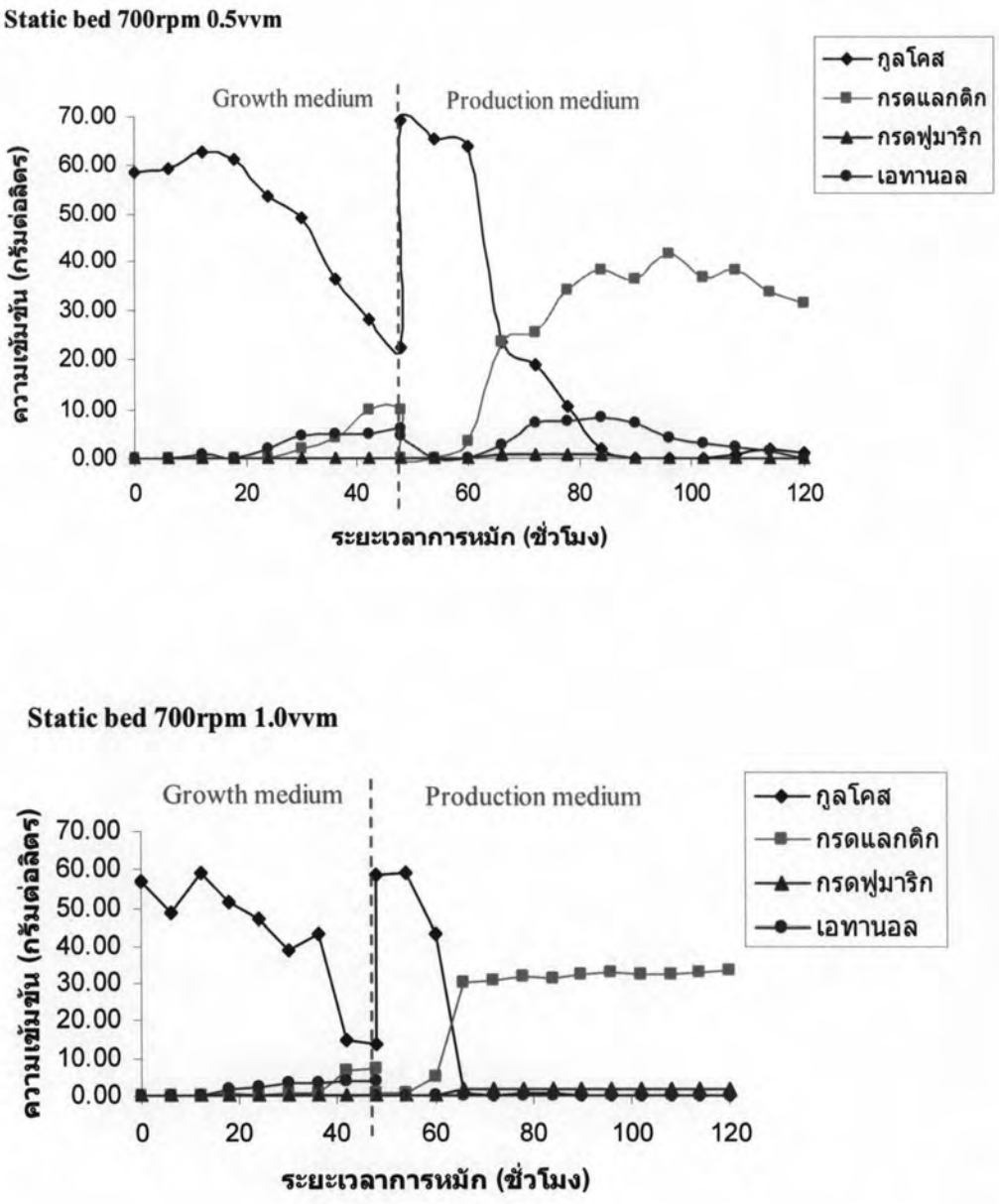
รูปที่ 4.17 การหมักแบบเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิตที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.50 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที



รูปที่ 4.18 การหมักแบบเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิตที่อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.50 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

ที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศเท่ากับ 0.50 และ 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดคือ 37.83 และ 33.26 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4. 19) คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.6157 และ 0.5559 และอัตราการผลิตกรดแลกติก 2.0912 และ 0.7780 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนเท่ากับ 0.0401 และ 0.0401 ต่อวินาทีตามลำดับ เมื่อทำการหมักเป็นระยะเวลา 78 ชั่วโมง แสดงในตารางที่ 4.4 เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศ พบว่า ปริมาณกรดแลกติกที่ได้มีปริมาณลดลง ค่า $Y_{P/S}$ และอัตราการผลิตกรดแลกติกจึงลดลงเนื่องจาก กระบวนการหมักด้วยเซลล์ตรึงยังคงประสบปัญหาเรื่องการซึมผ่านของออกซิเจนและอาหาร (Oxygen and substrate diffusion) ภายในเซลล์ตรึงต่ำ ซึ่งเป็นผลมาจากเซลล์ตรึงมีขนาดใหญ่ขึ้นและมีความหนาแน่นมากขึ้นเมื่อทำการหมักในระยะยาว (Sun และคณะ, 1999) จึงผลิตเอทานอลคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.1425 อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.4611 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และน้ำหนักเซลล์เท่ากับ 32.43 กรัม เมื่อการให้อากาศเท่ากับ 0.50 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที และเมื่อเพิ่มการให้อากาศเท่ากับ 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ไม่พบเอทานอลในอาหารเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์ โดยน้ำหนักเซลล์เท่ากับ 24.73 กรัม

เมื่อทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิต พบว่า ที่อัตราการกวนเป็น 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.50 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาทีเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดโดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 37.83 กรัมต่อลิตรที่กลูโคสความเข้มข้นเท่ากับ 70 กรัมต่อลิตรคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 0.6157 และอัตราการผลิตกรดแลกติก 2.0912 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อทำการหมักเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง แสดงว่า การตรึงเซลล์ช่วยในการควบคุมสัณฐานของเชื้อราและยังสามารถช่วยเพิ่มอัตราการผลิตกรดแลกติกและการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ภายในถังหมักยังทำได้สะดวกเมื่อเทียบกับกระบวนการหมักกรดแลกติกด้วยเซลล์แขวนลอย (Federici, 1993; Vassilev และ Vassilieva, 1992) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tay และ Yang (2002) ได้ศึกษาผ้าฝ้ายเพื่อใช้ตรึง *R. oryzae* ในถังหมักแบบ Rotating fibrous-bed (RFB) เพื่อผลิตกรดแลกติกโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การตรึงเซลล์สามารถใช้ควบคุมสัณฐานของเชื้อราทำให้มีอัตราการเจริญและผลผลิตสูง สามารถผลิตกรดได้สูงถึง 127 กรัมต่อลิตรคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการผลิตกรดแลกติก 2.5 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้กระบวนการหมักแบบ Fed-batch



รูปที่ 4.19 การหมักแบบเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิตที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.50 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกในการหมักแบบเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิตที่สภาวะต่างๆที่มีน้ำหมักปริมาตร 3 ลิตร

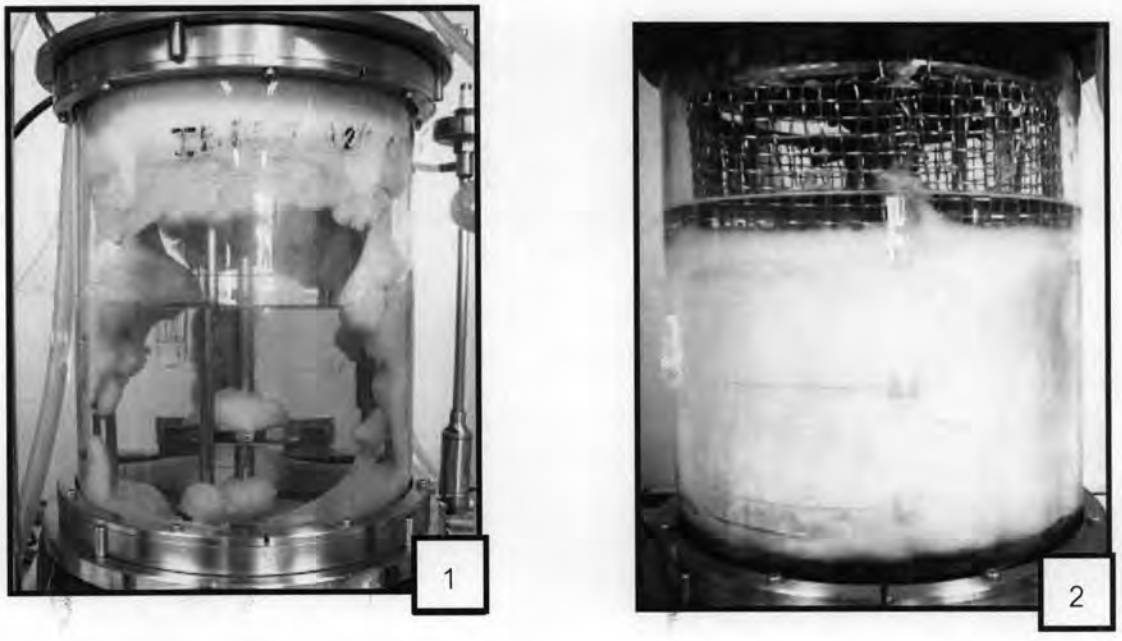
Conditions		$Y_{P/S}$ lactic acid		Productivity lactic acid (g/(L·h))		$Y_{P/S}$ ethanol		Productivity ethanol (g/(L·h))		Max lactic acid conc.	Cell dry weight	K_La (s^{-1})
rpm	vvm	GM	PM	GM	PM	GM	PM	GM	PM	(g/L)	(g)	
100	0.5	0.2597	0.5347	0.4233	1.3987	0.4501	0.2050	0.3867	0.4131	33.29	24.23	0.0124
100	1.0	0.1298	0.5647	0.2219	1.1034	0.3911	0.0628	0.3578	0.1307	34.27	21.76	0.0104
300	0.5	0.1091	0.5962	0.2215	0.9431	0.2395	0.2659	0.5348	0.2635	33.12	22.79	0.0256
300	1.0	0.2258	0.6328	0.3748	1.5658	0.0256	0.0905	0.308	0.2281	36.07	28.53	0.0498
500	0.5	0.2614	0.5726	0.3818	0.9918	0.1495	0.0791	0.1876	0.1133	35.49	39.00	0.0303
500	1.0	0.2685	0.5568	0.2345	0.9537	0.2262	0.0873	0.0888	0.2098	33.29	24.66	0.0497
700	0.5	0.0819	0.6157	0.1486	2.0912	0.3073	0.1425	0.6324	0.4611	37.83	32.43	0.0401
700	1.0	0.1983	0.5559	0.2504	0.7780	0.0686	N/A	0.104	N/a	33.26	24.73	0.0401

หมายเหตุ GM : อาหารเพื่อการเจริญ

PM : อาหารเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์

4.3.3 ลักษณะสัณฐานของเชื้อราในภาวะการตรึงเซลล์ในถังหมักแบบเบดสถิตกับเซลล์แขวนลอยในถังกวน

พบว่าการหมักแบบเซลล์แขวนลอยในถังกวน มีปัญหาด้านลักษณะสัณฐานของเชื้อราที่ไม่สามารถควบคุมได้ในระบบการหมักแบบถังกวน เมื่อเข้าสู่กระบวนการหมักเชื้อรามีการเจริญแบบกลุ่มก้อน (Clump) จะไปเกาะบริเวณมาตรวัดค่าพีเอช (pH sensor) และมาตรวัดออกซิเจนที่ละลาย (DO Probe) ทำให้การควบคุมระบบของกระบวนการหมักเกิดความผิดพลาดขึ้นและยังพบอีกว่าปัญหาในการเปลี่ยนถ่ายอาหารจากอาหารเพื่อการเจริญเป็นอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ซึ่งสามารถทำได้ยากในการหมักแบบถังกวน ดังนั้นเทคนิคการตรึงเซลล์เพื่อใช้ในการควบคุมสัณฐานของเชื้อราจึงเข้ามามีบทบาทแทนพบว่ากระบวนการหมักแบบเซลล์ตรึงของเชื้อราสามารถช่วยแก้ปัญหาในการเปลี่ยนถ่ายอาหารซึ่งสามารถทำได้สะดวกขึ้นเพื่อกำจัดปัญหาเรื่องการเปลี่ยนแปลงของสัณฐานของเชื้อราซึ่งมีเจริญแบบกลุ่มก้อนเพื่อลดปัญหาดังกล่าว พบว่า การตรึงเซลล์สามารถใช้ควบคุมสัณฐานของเชื้อรา (รูปที่ 4.20) และอีกทั้งการตรึงเซลล์ยังสามารถช่วยเพิ่มอัตราการผลิตกรดแลกติกและการถ่ายเทออกซิเจนภายในถังหมัก (Tay และ Yang, 2002)



รูปที่ 4.20 แสดงลักษณะสัณฐานของเซลล์แขวนลอยในถังกวน (1) และลักษณะสัณฐานของเชื้อรา *R. oryzae* ที่ถูกตรึงในถังหมักแบบเบดสถิต (2)

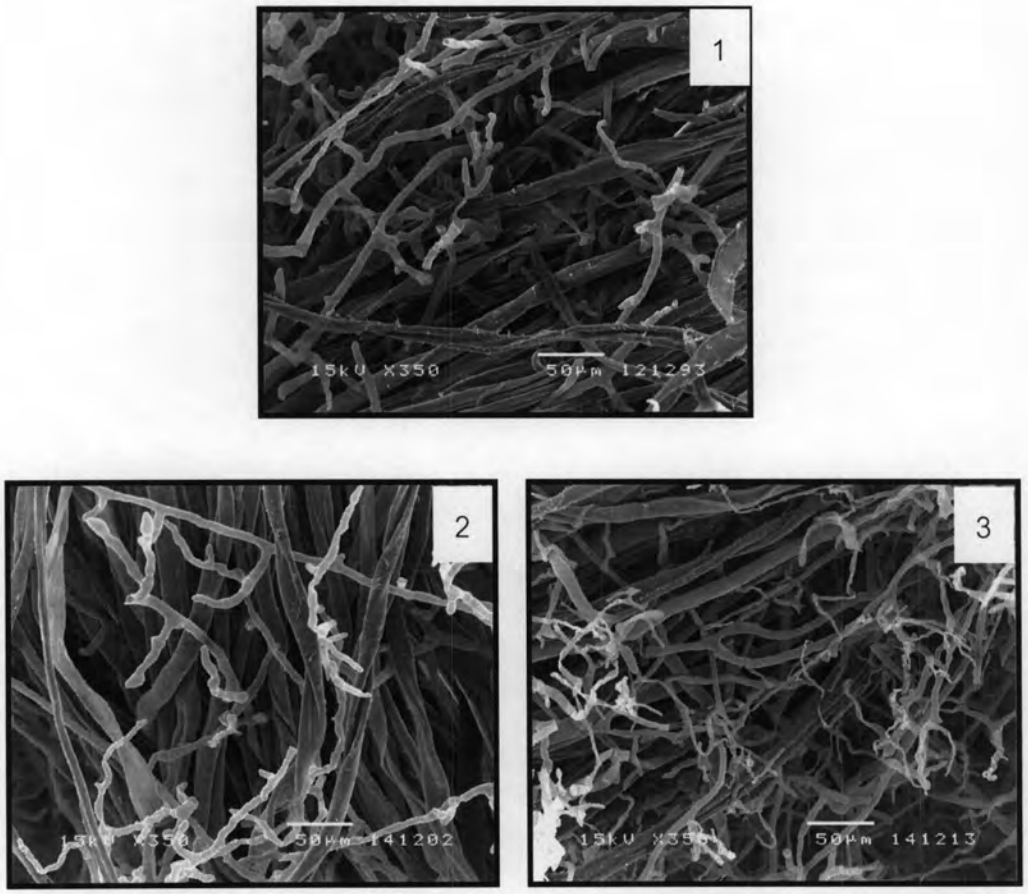
4.3.4 วิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวและโครงสร้างของ *R. oryzae* ที่ตรึงบนเส้นใยในถังหมักแบบเบดสถิต

ในถังหมักแบบเบดสถิต เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมักทำการเก็บตัวอย่างขนาด 2.5 x 2.5 เซนติเมตร มาวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) พบว่า ลักษณะเส้นใยราของ *R. oryzae* ที่เจริญบนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่บริเวณด้านนอกของเบดสถิตที่กำลังขยาย 350 เท่า (รูปที่ 4.21) อัตราการกวน 300 500 และ 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที พบว่า รอบการกวนที่สูงขึ้นเรื่อยๆนั้นเซลล์มีลักษณะลีบแบนและมีขนาดเล็กลง ลักษณะของเซลล์ที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที เส้นใยมีขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับอัตราการกวน 700 รอบต่อนาที เนื่องจากที่รอบการกวนสูงๆนั้นแรงเฉือนก็จะสูงตามไปด้วยทำให้เซลล์ถูกแรงดันจากใบพัดและอัตราการให้อากาศ ที่รอบการกวนสูงๆจึงทำให้เซลล์มีลักษณะเช่นนี้แสดงดังรูปที่ 4.21 พบว่า ที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เซลล์มีลักษณะเกิดการฉีกขาดจากแรงเฉือน แต่อย่างไรก็ดีที่สภาวะนี้เซลล์สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด

เมื่อพิจารณาจากลักษณะการเกิดกิ่งเล็กๆ (Fragmentation) ภายในหนึ่งสายนั้น ที่สภาวะอัตราการกวน 300 500 และ 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ที่รอบการกวน 300 รอบต่อนาที พบว่า เส้นใยของเชื้อราเกิดกิ่งเล็กๆ (Fragmentation) ขึ้นภายในสายเล็กน้อย ณ บริเวณด้านในของเบดสถิต แสดงดังรูปที่ 4.22 โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 33.12 กรัมต่อลิตร ที่รอบการกวน 500 รอบต่อนาที พบว่า เส้นใยของเชื้อราเกิดกิ่งขึ้นภายในสายเพิ่มขึ้น สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 33.49 กรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มรอบการกวนเป็น 700 รอบต่อนาที พบว่า เส้นใยของเชื้อราเกิดกิ่งเล็กๆขึ้นภายในสายเป็นจำนวนมาก โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 37.83 กรัมต่อลิตร แสดงว่า เมื่อเพิ่มรอบกวนและอัตราการให้อากาศคงที่ ส่งผลให้เกิดกิ่งเล็กๆขึ้นภายในสายใยราและกรดแลกติกก็มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามรอบการกวนที่เพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ดีค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนก็ควรจะสูงตามไปด้วยเพื่อแสดงถึงการถ่ายเทอาหารและอากาศที่เพียงพอ

เมื่อพิจารณาถึงสภาวะที่รอบการกวนเท่ากันคือ 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที แสดงดังรูปที่ 4.23 พบว่า ลักษณะของ *R. oryzae* บนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่บริเวณด้านในของเบดสถิตที่อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เซลล์มีลักษณะอ้วน ยาวแต่บริเวณด้านปลายจะขาดเมื่อเทียบกับอัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที พบว่า เซลล์มีลักษณะลีบเล็กโดยสามารถผลิต กรดแลกติกได้ 33.26 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นสภาวะที่ผลิตกรดแลกติกได้น้อยที่สุดในถังหมักแบบเบดสถิต ซึ่งจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า อัตราการให้อากาศมีผลต่อ

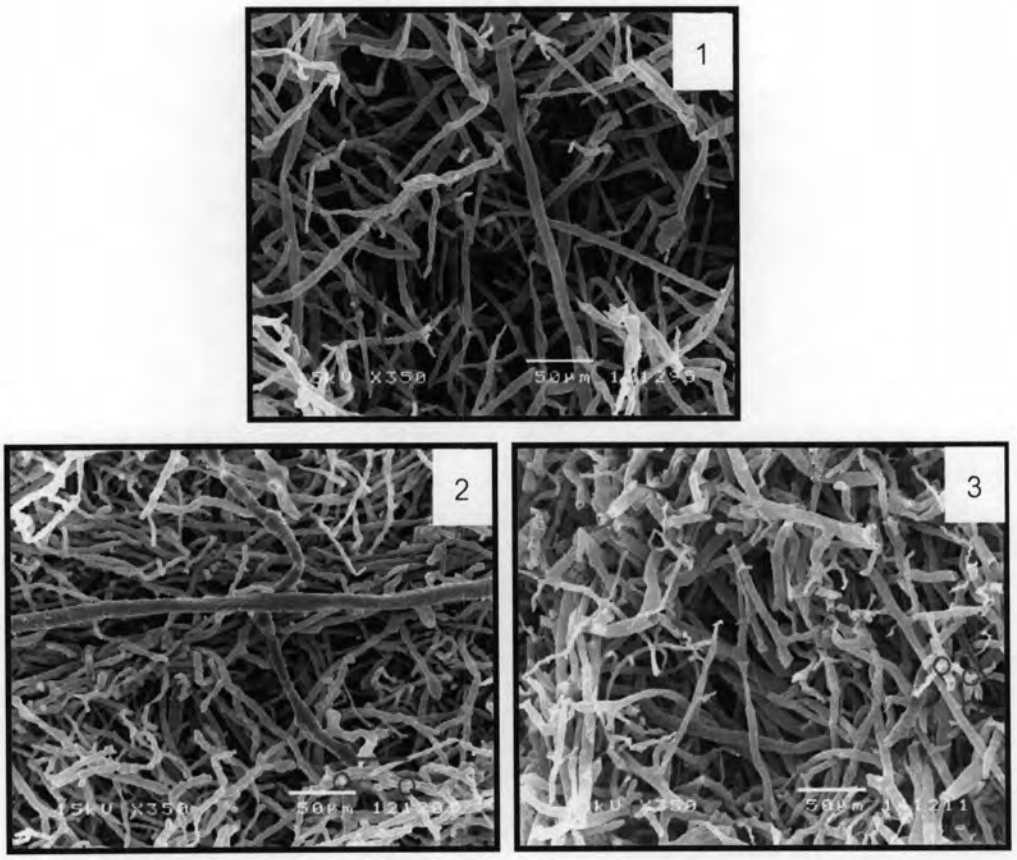
ลักษณะสัณฐานของเชื้อราและมีผลต่อการผลิตกรดแลกติกซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bai และคณะ (2003) กับ Zhou และคณะ (1999) กับ Martak และคณะ (2003)



รูปที่ 4.21 ลักษณะการยึดเกาะของ *R. oryzae* บนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่บริเวณด้านนอกของเบดสถิตที่กำลังขยาย 350 เท่า สภาวะอัตราการกวน 300 500 และ 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (1 2 และ 3) ตามลำดับ

หมายเหตุ

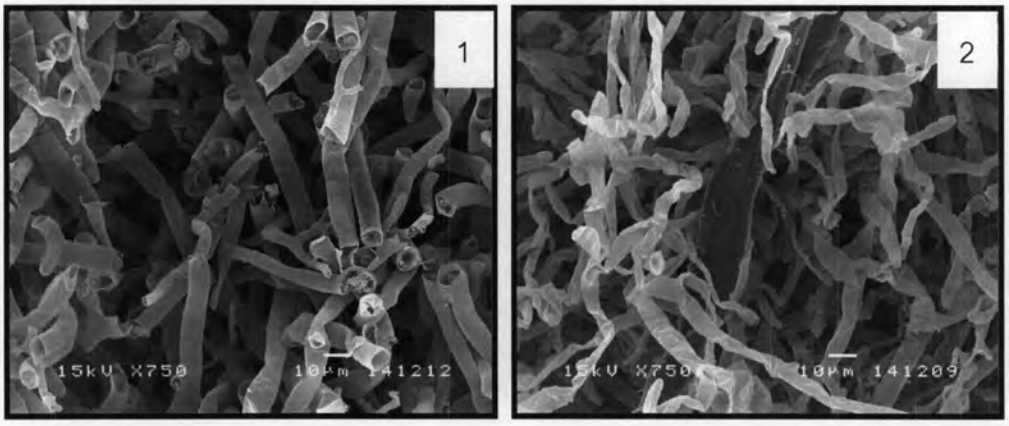
บริเวณด้านนอก : ส่วนของเบดสถิตบริเวณด้านที่ติดกับโถแก้ว



รูปที่ 4.22 ลักษณะการยึดเกาะและการเกิดกิ่งของ *R. oryzae* บนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่บริเวณด้านในของเบดสถิตที่กำลังขยาย 350 เท่า สภาวะอัตราการกวน 300 (1) 500 (2) และ 700 (3) รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (วงกลมแสดงการเกิดกิ่ง)

หมายเหตุ

บริเวณด้านใน : ส่วนของเบดสถิตบริเวณด้านในที่ติดกับใบพัด



รูปที่ 4.23 ลักษณะการยึดเกาะของ *R. oryzae* บนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่บริเวณด้านในของเบดสถิตที่กำลังขยาย 750 เท่า สภาวะอัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (1 และ 2) ตามลำดับ

หมายเหตุ

บริเวณด้านใน : ส่วนของเบดสถิตบริเวณด้านในที่ติดกับใบพัด

4.4 ศึกษาแอกติวิตีของแลกเตทดีไฮโดรจีเนสของเซลล์แขวนลอยในถังกวนและเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิต

เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *R. oryzae* ในถังหมักแบบเบดสถิต พบว่า รอบการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลกติกจึงทำการเปรียบเทียบกับเซลล์แขวนลอยในถังกวนในสภาวะเดียวกันและศึกษาเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่เหมาะสมที่สุดของถังหมักแบบเบดสถิต คือรอบการกวน 700 รอบต่อนาที 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

การหมักแบบเซลล์แขวนลอยในถังกวนที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ค่าแอกติวิตีจำเพาะของแลกเตทดีไฮโดรจีเนสที่ 48 72 และ 96 ชั่วโมงเป็น 0.0306 0.9610 และ 0.3659 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.5

การหมักแบบเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิต ที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ค่าแอกติวิตีจำเพาะของแลกเตทดีไฮโดรจีเนสที่ 72 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.1523 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ที่ 48 ชั่วโมงเท่ากับ 0.0072 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนและที่ 96 ชั่วโมงเท่ากับ 0.0102 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 37.83 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง ต่อมาเมื่อทำการหมักต่อไปจนครบ 96 ชั่วโมง พบว่าค่าแอกติวิตีจำเพาะของแลกเตทดีไฮโดรจีเนสมีค่าลดลงเมื่อปริมาณของกลูโคสหมด จากผลการทดลอง ค่าแอกติวิตีจำเพาะของแลกเตทดีไฮโดรจีเนสของทั้ง 3 ช่วงเวลานั้นในช่วงของการหมักในอาหารเพื่อการเจริญที่ 48 ชั่วโมง มีค่าต่ำกว่าที่ 72 และ 96 ชั่วโมง แสดงว่าค่าแอกติวิตีจำเพาะของแลกเตทดีไฮโดรจีเนสมีความสัมพันธ์กับปริมาณกรดแลกติกที่ถูกผลิตขึ้น

เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างเซลล์แขวนลอยในถังกวนกับเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิตที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที พบว่า เซลล์แขวนลอยในถังกวนมีค่าแอกติวิตีจำเพาะของแลกเตทดีไฮโดรจีเนสสูงกว่าเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิต พบว่า การหมักแบบเซลล์แขวนลอยในถังกวนที่ 72 ชั่วโมง มีค่ากิจกรรมจำเพาะของแลกเตทดีไฮโดรจีเนสเท่ากับ 0.9610 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักในถังหมักแบบเบดสถิตที่สภาวะเดียวกัน พบว่ามีค่าแอกติวิตีจำเพาะของแลกเตทดีไฮโดรจีเนสเท่ากับ 0.1523 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เนื่องจาก ลักษณะของเซลล์ตรึงคือเมื่อเซลล์เจริญบนพื้นผิวใดๆก็ตาม เซลล์จะมีความหนาแน่นของชั้นผนังเซลล์มากกว่าเมื่อเทียบกับเซลล์แขวนลอย (Suwannakham, 2005) ดังนั้นเมื่อใช้สภาวะในการเตรียมตัวอย่างส่วนใส (บทที่ 3 ข้อ 3.5.3) เหมือนกับเซลล์แขวนลอยจึงทำให้ปริมาณของแลกเตทดีไฮโดรจีเนสถูกสกัดออกมาได้น้อยกว่าที่ควรจะเป็น ซึ่งโดยปกติแล้วแลกเตทดีไฮโดรจีเนสมักจะอยู่บริเวณของผนังเซลล์

เมื่อพิจารณาการหมักแบบเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิต ที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ที่ 72 ชั่วโมง สามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 33.26 กรัมต่อลิตร พบว่า ค่าปริมาณของมิลลิกรัมโปรตีนต่อน้ำหนักเท่ากับ 61.92 กรัม แสดงให้เห็นว่า ค่าปริมาณของมิลลิกรัมโปรตีนต่อน้ำหนักกับปริมาณของกรดแลกติกที่ผลิตได้นั้นมีความสัมพันธ์กัน ถ้าปริมาณของมิลลิกรัมโปรตีนต่อน้ำหนักมีปริมาณสูงปริมาณกรดแลกติกก็จะสูงตามไปด้วย และค่าแอกติวิตีจำเพาะของแลกเตทดีไฮโดรจีเนสเท่ากับ 0.0004 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน

เมื่อพิจารณาจากค่าแอกติวิตีจำเพาะของแลกเตทดีไฮโดรจีเนสของเซลล์แขวนลอยในถังกวน พบว่า มีค่าสูงที่สุดเมื่อเทียบกับเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิต แต่เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตของกรดแลกติก ค่า $Y_{P/S}$ และอัตราการผลิตกรดแลกติกพบว่า เซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิตสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงกว่าการหมักแบบเซลล์แขวนลอยในถังกวน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก ในการหมักแบบเซลล์แขวนลอยในถังกวนเซลล์จะเจริญบริเวณขอบด้านล่างของถังหมัก (Dead zone) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีปัญหาเรื่องการซึมผ่านของออกซิเจนและอาหาร แม้ค่าแอกติวิตีจำเพาะของเอนไซม์แลกเตรตดีไฮโดรจีเนตของเซลล์แขวนลอยในถังกวนจะมีค่าสูงแต่เมื่อออกซิเจนและอาหารไม่สามารถซึมผ่านไปยังเซลล์ได้อย่างทั่วถึงเซลล์จึงผลิตกรดแลกติกได้น้อยเมื่อเทียบกับเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิตที่มีลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ที่วางตัวเรียงกันอย่างเป็นระเบียบบนเส้นใยที่ใช้สำหรับเป็นตัวยึดเกาะของ *R. oryzae* ซึ่งการหมักแบบเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิตสามารถช่วยในเรื่องการถ่ายเทออกซิเจนและอาหารได้ดีกว่าการหมักแบบเซลล์แขวนลอยในถังกวนเมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน (K_La) พบว่า ระบบการหมักแบบเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิตและการหมักแบบเซลล์แขวนลอยในถังกวนที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเท่ากับ 0.0401 และ 0.0173 ต่อวินาที ตามลำดับ

ตารางที่ 4.5 ค่าแอกติวิตีจำเพาะของแลกเตทดีไฮโดรจีเนสของเซลล์แขวนลอยในถังกวนกับเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิตปริมาตร 3 ลิตร

Process	Conditions	Time (h)	mg Protein/dry biomass (g)	Specific activity LDH (U/mg Protein)	Cell dry weight (g)	Lactic acid production	K_La (s^{-1})
Free cells in a STR	700 rpm 0.5 vvm	48	24.31±1.00	0.0306±0.01	33.42	max = 15.85 g/L $Y_{P/S}$ = 0.2815 g/g Productivity = 0.58 g/(L·h))	0.0173
	700 rpm 0.5 vvm	72	58.88±1.01	0.9610±0.03			
	700 rpm 0.5 vvm	96	49.56±0.59	0.3659±0.02			
Immobilized cells in STBR	700 rpm 0.5 vvm	48	22.93±1.50	0.0072±0	32.43	max = 37.83 g/L $Y_{P/S}$ = 0.6157 g/g Productivity = 2.09 g/(L·h))	0.0401
	700 rpm 0.5 vvm	72	62.58±1.38	0.1523±0.02			
	700 rpm 0.5 vvm	96	47.01±2.42	0.0102±0			
	700 rpm 1.0 vvm	48	22.45±0.85	0.0003±0.01	24.73	max = 33.26 g/L $Y_{P/S}$ = 0 .5559 g/g Productivity = 0.78 g/(L·h))	0.0401
	700 rpm 1.0 vvm	72	61.92±1.33	0.0004±0			
	700 rpm 1.0 vvm	96	52.93±1.75	0.0004±0.01			

หมายเหตุ STR : ถังกวน

STBR : ถังหมักแบบเบดสถิต