บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กรดแลกติก ($C_3H_6O_3$) เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่นำมาใช้งานอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเคมี เครื่องสำอางและเภสัชกรรม นอกจากนี้กรดแอลแลกติกหรือดีแลกติกบริสุทธิ์ยังสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพอลิแลกติกแอซิด (PLA) ซึ่งใช้ผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ทำให้แนวโน้มความต้องการและราคาในตลาดโลกเพิ่มขึ้นทุกปี (Altaf และคณะ, 2006) กรดแลกติกสามารถผลิตได้ 2 วิธีคือ กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีและกระบวนการหมัก ซึ่งพบว่ากระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีนั้นกรดแลกติกที่ผลิตได้จะอยู่ในรูปไอโซเมอร์ผสม (Racemic mixture) และใช้สภาวะรุนแรงในกระบวนการสังเคราะห์ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Narayanan และคณะ, 2004) อีกทั้งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตยังมาจากปิโตรเคมี ซึ่งในปัจจุบันมีราคาสูงขึ้นเรื่อยๆ (Kadam และคณะ, 2005)

ในปัจจุบันการผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมักนั้น นิยมใช้แบคทีเรียแลกติกชนิดโฮโมเฟอร์เมนเทชัน หรือ *Lactobacillus* sp. เนื่องจากให้อัตราผลผลิตสูงและกระบวนการหมักสามารถทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน (Oh และคณะ, 2005) แต่เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องการไวตามินและกรดอะมิโน(Growth factor) ในปริมาณมากสำหรับการเจริญทำให้ต้นทุนในการหมักสูงและกรดแลกติกที่ผลิตได้อยู่ในรูปของไอโซเมอร์ผสม จึงต้องนำมาแยกบริสุทธิ์ก่อนนำไปใช้ในการผลิตพอลิแลกติกแอซิดเพราะในการสังเคราะห์พลาสติกชีวภาพจำเป็นต้องใช้ไอโซเมอร์บริสุทธิ์ของกรดแลกติก เพื่อให้ได้พลาสติกที่มีคุณภาพ ทำให้เกิดความพยายามที่จะแสวงหาวิธีการผลิตกรดแลกติกใหม่ ต่อมาพบว่าเชื้อรา *Rhizopus oryzae* สามารถผลิตกรดแอลแลกติกบริสุทธิ์จากแป้งและกากน้ำตาลซึ่งมีราคาถูก เนื่องจากเชื้อรามีเอนไซม์อะไมเลสเพื่อใช้ในการย่อยโมเลกุลแป้ง (Wee และคณะ, 2006) และไม่ต้องการไวตามินและกรดอะมิโนเสริมในกระบวนการหมัก ทำให้กระบวนการหมักด้วย *R. oryzae* มีต้นทุนการผลิตทั้งด้านวัตถุดิบและกระบวนการแยกบริสุทธิ์หลังกระบวนการหมักที่ต่ำกว่าการหมักด้วยแบคทีเรีย เนื่องจากเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้นทำให้มีนักวิจัยหลายกลุ่มให้ความสนใจที่จะนำ *R. oryzae* มาใช้ในกระบวนการผลิตกรดแลกติก (Hang และคณะ, 1989; Park และคณะ, 1998; Sun และคณะ, 1999; Bai และคณะ, 2003; Martak และคณะ, 2003; Lin และคณะ, 2007) เนื่องจาก *R. oryzae* เป็นเชื้อราที่ต้องการอากาศในการเจริญ ในภาวะที่ขาดอากาศเชื้อราจะเปลี่ยนวิถีเมแทบอลิซึม โดยจะเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นเอทานอลแทนที่จะใช้ใน

การเจริญและสร้างกรดแลกติก ซึ่งเชื้อราจะสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในระยะหนึ่งโดยวิถีเมแทบอลิซึมแบบนี้และตายในที่สุด ดังนั้นการรักษาระดับออกซิเจนในกระบวนการหมักกรดแลกติกจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง (Bai และคณะ, 2003)

การผลิตกรดแลกติกจากกระบวนการหมักด้วยเซลล์แขวนลอยโดย *R. oryzae* ในถังกวนมักจะประสบปัญหาเรื่องการถ่ายเทอากาศ ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อการเจริญของเชื้อราและการผลิตกรดแลกติก (Skory และคณะ, 1998) ในงานวิจัยของ Bai และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์แขวนลอยด้วย *R. oryzae* R1021 ในถังกวน ที่สภาวะ 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.60 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูง 76.1 กรัมต่อลิตรและน้ำหนักเซลล์ 9.62 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการหมัก 36 ชั่วโมง โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร พบว่า เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศส่งผลให้ค่าการละลายของออกซิเจนในถังกวนและขนาดของเซลล์เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการจำกัดการส่งผ่านอาหารและอากาศภายในเซลล์ มักจะเกิดปัญหากับเชื้อราในรูปของ Pellet จึงทำให้ค่า $Y_{P/S}$ แลกติกลดลงซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Martak และคณะ (2003) จึงได้เปลี่ยนไปใช้ระบบการหมักแบบ Air-Lift แทน

งานวิจัยของ Yin และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วย *Rhizopus* sp. จำนวน 8 สายพันธุ์ ในถังหมักขนาด 3 ลิตร ด้วยระบบ Air-Lift โดยใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *R. oryzae* NRRL 395 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดคือ 102 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ ในถังหมักขนาด 3 ลิตรและงานวิจัยของ Miura และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วย *Rhizopus* sp. MK-96-1196 ในถังหมักขนาด 3 ลิตร ด้วยระบบ Air-Lift โดยใช้แป้งข้าวโพดที่ผ่านการย่อยแล้วมาเป็นวัตถุดิบในการหมัก สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 90 กรัมต่อลิตร ค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 87 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 2.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง พบว่า การหมักด้วยระบบ Air-Lift มักมีปัญหาในเรื่องการส่งผ่านออกซิเจนเข้าสู่ของเหลวในถังหมักบริเวณด้านบนเพราะแรงดันของของเหลวภายในถังหมักส่งผ่านจากบริเวณฐานของถังหมักและปัญหาทางด้านสัณฐานของเชื้อราซึ่งเจริญแบบ Pellet ทำให้เกิดปัญหาการจำกัดการส่งผ่านอาหารและอากาศภายในเซลล์เช่นเดียวกับการการหมักในถังกวน เพื่อกำจัดปัญหาเรื่องการเปลี่ยนแปลงของสัณฐานของเชื้อรา จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคการตรึงเซลล์เพื่อใช้ในการควบคุมสัณฐานของเชื้อราและพบว่าการตรึงเซลล์นอกจากจะใช้ในการควบคุมสัณฐานของเชื้อราแล้วยังสามารถเพิ่มอัตราการผลิตกรดแลกติก งานวิจัยของ Tay และ Yang (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยการตรึง *R. oryzae* NRRL 395 ในถังหมักแบบ Rotating fibrous bed (RFB) โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดคือ 127 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการผลิตกรดแลกติก 2.5 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกเหนือจากกลูโคสแล้วเมื่อใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 1.65 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และงานวิจัยของ

Efremenko และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยการตรึง *R. oryzae* บน Poly(vinyl alcohol)-Cryogel ในถังหมัก โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูง 112 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 94 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการผลิตกรดแลกติก 5.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อทำการหมักแบบไม่ต่อเนื่องและเมื่อทำการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 173 กรัมต่อลิตร ซึ่งกระบวนการหมักแบบเซลล์ตรึงของเชื้อราสามารถแก้ปัญหาด้านการเปลี่ยนถ่ายอาหาร ซึ่งสามารถทำได้สะดวกเมื่อเทียบกับการหมักแบบเซลล์แขวนลอย

ที่ผ่านมายังพบว่ากระบวนการหมักด้วยเซลล์ตรึงยังคงประสบปัญหาเรื่องการซึมผ่านของออกซิเจนและอาหาร (Oxygen and substrate diffusion) ภายในเซลล์ตรึงต่ำ ซึ่งเป็นผลมาจากเซลล์ตรึงมีขนาดใหญ่ขึ้นและมีความหนาแน่นมากขึ้นเมื่อทำการหมักในระยะยาว จึงได้มีความพยายามที่จะพัฒนาถังหมักแบบเบดสถิตขึ้นเพื่อช่วยลดปัญหาการซึมผ่านของออกซิเจนและอาหารนอกเหนือจากการใช้งานเพื่อควบคุมสัณฐาน

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ออกแบบและพัฒนาถังหมักแบบเบดสถิตขึ้นเพื่อใช้ควบคุมลักษณะสัณฐานของเชื้อราและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตกรดแลกติกในถังหมักแบบเบดสถิต

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

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

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

1.4.1 ศึกษากระบวนการหมักในระดับขวดเขย่าแบบไม่ต่อเนื่อง

1.4.1.1 เปรียบเทียบด่างที่ใช้ในการควบคุมพีเอชโดยการหมักแบบเซลล์แขวนลอย

1.4.1.2 คัดเลือกเส้นใยที่เหมาะสมโดยการหมักแบบเซลล์ตรึงในระดับขวดเขย่า

1.4.2 ศึกษากระบวนการหมักในระดับถังหมักแบบไม่ต่อเนื่อง

1.4.2.1 ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมได้แก่ การกวนและการให้อากาศ โดยการหมักแบบเซลล์แขวนลอยในถังกวน

1.4.2.2 ออกแบบถังหมักแบบเบดสถิต

1.4.2.3 ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมได้แก่ การกวนและการให้อากาศ โดยการหมักแบบเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิต

1.4.2.4 ศึกษาแอกติวิตีจำเพาะของแลกเตทดีไฮโดรจีเนสในการหมักแบบเซลล์แขวนลอยในถังกวนและเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิต

1.4.2.5 วิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวและโครงสร้างของ *R. oryzae* ที่ยึดตรึงบนเส้นใยในถังหมักแบบเบดสถิต

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ช่วยเพิ่มอัตราผลผลิตกรดแลกติกจากกระบวนการหมักแบบเซลล์ตรึงในถังหมักแบบเบดสถิต