

รายงานการวิจัย

ชื่อเรื่อง (ไทย) การผลิตกรดแลคติกจากไฮโดรไลเสทของกากมันสำปะหลังโดยรา
Rhizopus oryzae ในระดับนำร่อง

(อังกฤษ) Pilot scale production of L-lactic acid from cassava pulp
hydrolysate by *Rhizopus oryzae*

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐฐา ทองจูล (หัวหน้าโครงการ)

อาจารย์วาสนา โตเลี้ยง (ผู้ร่วมวิจัย)

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มิถุนายน พ.ศ. 2556

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก เงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาลประจำปีงบประมาณ 2555

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความร่วมมือของคณะผู้วิจัย ทุนอุดหนุนการวิจัย จากเงินอุดหนุนทั่วไป จากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2555 และสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ที่อนุเคราะห์สถานที่ และบุคลากรด้านเทคนิคเพื่อสนับสนุนงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ นายนวกร โชติศุภอนันต์ และนางสาวศิริพร อุ่นแอมที่ได้เริ่มดำเนินการศึกษาวิจัยการหมักกรดแอส-แลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด และการหาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยกากมันสำปะหลังโดยเทคนิคต่างๆ ผลงานวิจัยเบื้องต้นของคุณนวกร และ คุณศิริพรนับว่ามีประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการต่อยอดในงานวิจัยนี้

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณบริษัท เอี่ยมบูรพา จำกัด บริษัท แป้งมันเอี่ยมเฮงอุตสาหกรรม จำกัด และบริษัท สวงวงษ์ จำกัด ที่กรุณาอนุเคราะห์ตัวอย่างกากมันสำปะหลังสดเพื่อใช้ในการงานวิจัยนี้ และบริษัท สยามวิคตอรีเคมีคอล จำกัด ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยกากมันสำปะหลัง

ชื่อโครงการวิจัย	การผลิตกรดแอล-แลกติกจากกากมันสำปะหลัง โดยรา <i>Rhizopus oryzae</i> ในระดับนําร่อง
ชื่อผู้วิจัย	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ณัฐษา ทองจุล อาจารย์ วาสนา โตเลียง
เดือนและปีที่ทำวิจัยสำเร็จ	มิถุนายน พ.ศ. 2556

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาความเป็นไปได้ในการนำกากมันสำปะหลังสดมาใช้ในการผลิตกรดแอล-แลกติกโดยราเส้นใย *R. oryzae* โดยเริ่มจากการทดลองหาภาวะที่เหมาะสมเพื่อจะนำไปใช้ในการออกแบบขยายสเกล โดยทำการหมักกรดแลกติกด้วยกลูโคส จากผลการทดลอง พบว่า ได้อัตราการผลิตกรดแลกติกจากกลูโคสสูงสุดที่อัตราการปั่นกววน 700 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ในการทดลองอีกส่วน ได้นำกากมันสำปะหลังสดที่ได้มาหาเทคนิคในการปรับสภาพที่เหมาะสมก่อนที่นำไปย่อยด้วยเอนไซม์ จากผลการทดลองพบว่า เมื่อนำกากมันสำปะหลังมาปรับสภาพโดยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ เซลลูเลส และอะไมเลส จะทำให้ได้ปริมาณแป้งที่ดึงออกมาจากกากมันสำปะหลังสดได้มากกว่าเมื่อเทียบกับการปรับสภาพกากมันสำปะหลังด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป โดยภาวะในการปรับสภาพและการย่อยที่ได้กลูโคสสูงสุดที่ 0.6 กรัมกลูโคสต่อกรัมกากมันสำปะหลังแห้ง คือ การปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดันนาน 15 นาที โดยใช้สารละลายกากมันสำปะหลังในน้ำ (20 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้ง) จากนั้นนำกากมันที่ผ่านการปรับสภาพแล้วไปย่อยด้วยเซลลูเลส (33.15 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง) นาน 6 ชั่วโมง และอะไมเลส (16.8 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง) นาน 15 นาที จากนั้นได้นำภาวะที่เหมาะสมไปทดลองการย่อยกากมันสำปะหลังสดในระดับนําร่อง นอกจากนี้ ยังได้ทำการทดลองนำสารละลายกากมันสำปะหลังที่ได้จากการปรับสภาพและย่อยด้วยเอนไซม์ที่ภาวะต่างๆ กันมาใช้ในการหมักกรดแลกติกเทียบกับการหมักโดยกลูโคส และแป้ง ซึ่งพบว่า สารละลายที่ได้จากการปรับสภาพกากมันสำปะหลังด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดันแล้วนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์สามารถนำมาใช้หมักกรดแลกติกได้ดีเทียบเคียงกับการใช้กลูโคสและแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้ ยังมี การคำนวณเพื่อออกแบบขยายสเกลการผลิตกรดแลกติกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพระดับ 5 ลิตรไปเป็นระดับ 90 ลิตร โดยใช้เกณฑ์คงที่ในการคำนวณ 4 เกณฑ์ ได้แก่ ค่า Reynold's number (Re_p) ความเร็วปลายใบพัดกววน (u_p) 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 Assistant Professor Nuttha Thongchul, Ph.D., Vasana Tolieng

Year June 2013

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. Pilot scale pretreatment and hydrolysis of fresh cassava pulp were also carried out using the optimal conditions obtained from the laboratory scale test. 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_p), 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	xii
บทนำ	1
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
วัตถุประสงค์ของโครงการ	5
วิธีการวิจัย	5
การหาอัตราการกวนและการให้อากาศที่เหมาะสมในการหมักกรดแอล-แลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติดขนาด 5 ลิตร	5
สายพันธุ์ การเก็บรักษาสายพันธุ์ การเตรียมหัวเชื้อ และอาหารเลี้ยงเชื้อ	6
การหมักกรดแอล-แลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด	6
สัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน	6
ค่าจลนพลศาสตร์ของการหมัก	7
การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมกากมันสำปะหลัง	7
การปรับสภาพกากมันสำปะหลังก่อนการย่อยโดยเทคนิค physicochemical pretreatment	8
การย่อยเซลลูโลสและแป้งจากกากมันสำปะหลังที่ปรับสภาพแล้ว	8
การหมักกรดแอล-แลกติกจากสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง	9
การคำนวณหาปัจจัยทางวิศวกรรมที่เหมาะสมต่อการหมักกรดแอล-แลกติก	9
การเตรียมสารละลายจากการย่อยกากมันสำปะหลังในระดับนำร่อง	10
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล	10
การหมักกรดแอล-แลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด	10
การปรับสภาพกากมันสำปะหลังโดยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน	11
การปรับสภาพกากมันสำปะหลังโดยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับการใช้สารละลายแอลคาไลน์	11
การย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน	12

	หน้า
ผลการวิจัยและการอภิปรายผล (ต่อ)	
การย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์	13
การหมักกรดแอล-แลกติกแบบเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติดจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ	13
ลักษณะพื้นฐานของ <i>R. oryzae</i> ที่ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด	13
จลนพลศาสตร์ของการหมักกรดแอล-แลกติกจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ โดย <i>R. oryzae</i> ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด	16
ลักษณะการจัดเรียงตัวของเส้นใยของ <i>R. oryzae</i> บนวัสดุตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด	20
ปัจจัยทางวิศวกรรมที่เหมาะสมต่อการหมักกรดแอล-แลกติก	22
การเตรียมสารละลายจากการย่อยกากมันสำปะหลังในระดับนำร่อง	25
ข้อสรุป	26
ข้อเสนอแนะ	27
บรรณานุกรม	27
ประวัตินักวิจัย	56

รายการตารางประกอบ

	หน้า
ตารางที่ 1 ปริมาณเซลล์ของ <i>R. oryzae</i> ในการหมักด้วยกลูโคส และอัตราการถ่ายเทออกซิเจนในกระบวนการที่อัตราการปั่นกววนและอัตราการให้อากาศต่างๆ กัน ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด	32
ตารางที่ 2 ผลของการปั่นกววนและการให้อากาศต่อการผลิตกรดแอล-แลกติกโดยเซลล์ตรึงของ <i>R. oryzae</i> ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด	33
ตารางที่ 3 ผลของการปั่นกววนและการให้อากาศต่อการผลิตผลิตภัณฑ์พลอยได้เอทานอลโดยเซลล์ตรึงของ <i>R. oryzae</i> ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด	34
ตารางที่ 4 เปรียบเทียบการผลิตกรดแอล-แลกติกในการหมักแบบเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติดที่ภาวะต่างๆ (ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 3 ลิตร)	35
ตารางที่ 5 เปรียบเทียบภาวะที่ใช้ในการปรับสภาพและย่อยกากมันสำปะหลังในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร	36
ตารางที่ 6 เปรียบเทียบความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังที่ใช้เมื่อนำมาย่อยด้วยเซลล์ตามด้วยการปรับ โครงสร้างภายใต้ความร้อน และความดันสูง และย่อยต่อด้วยอะไมเลสในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร	37
ตารางที่ 7 เปรียบเทียบความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังที่ใช้เมื่อนำมาผ่านการปรับ โครงสร้างภายใต้ความร้อน และความดันสูง แล้วย่อยด้วยเซลล์และอะไมเลส ตามลำดับในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร	38

รายการภาพประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	ลักษณะพื้นฐานของ <i>R. oryzae</i> ที่เจริญบนผ้าขนหนูในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด	39
รูปที่ 2	จลนพลศาสตร์ของการหมักกรดแอล-แลกติกจากกลูโคสโดยเซลล์ตรึงของ <i>R. oryzae</i> บนผ้าขนหนูในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติดที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 ความเร็วการปั่นกวน 700 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที	40
รูปที่ 3	yield ของกลูโคส (กรัมต่อกรัมกากมันแห้ง) ในสารละลายที่แยกออกมาภายหลังการปรับสภาพด้วย (ก) การใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (steam pretreatment) และ (ข) การใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับการใช้สารละลายแอลคาไลน์ (steam with combination of alkaline treatment)	41
รูปที่ 4	yield ของกลูโคสภายหลังการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน ความเข้มข้นของกากมัน 5% จากนั้นนำมาทำการย่อยด้วย เอนไซม์เซลลูเลส 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	42
รูปที่ 5	yield ของกลูโคสภายหลังการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน ความเข้มข้นของกากมัน 6.7% จากนั้นนำมาทำการย่อยด้วย เอนไซม์เซลลูเลส 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	43
รูปที่ 6	yield ของกลูโคสภายหลังการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน ความเข้มข้นของกากมัน 20% จากนั้นนำมาทำการย่อยด้วย เอนไซม์เซลลูเลส 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	44
รูปที่ 7	yield ของกลูโคสภายหลังการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.5 N) ความเข้มข้นของกากมัน 6.7% จากนั้นนำมาทำการย่อยด้วยเซลลูเลสที่ 50 องศาเซลเซียส แล้วตามด้วยอะไมเลสที่ 100 องศาเซลเซียส	45

	หน้า
รูปที่ 8	46
ลักษณะพื้นฐานของ <i>R. oryzae</i> ที่ถูกตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด 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	47
ลักษณะพื้นฐานของ <i>R. oryzae</i> ที่ถูกตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด 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	48
ลักษณะการยึดเกาะของเซลล์บนเบดสติดด้านนอก (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) สารละลายที่ได้จากการย่อย และ (ฉ) สารละลายแป้ง	

	หน้า
รูปที่ 11	49
<p>ความหนาของเซลล์ของ <i>R. oryzae</i> (เส้นสีแดง) ที่ถูกตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด 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</p>	
รูปที่ 12	50
<p>ลักษณะเซลล์ <i>R. oryzae</i> ที่ตรึงอยู่ด้านในของเบดสติดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด 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</p>	
รูปที่ 13	51
<p>จลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแลคติกโดย <i>R. oryzae</i> 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</p>	

		หน้า
รูปที่ 14	ลักษณะของเซลล์ <i>R. oryzae</i> บริเวณด้านในของเบดสติดที่กำลังขยาย 350 เท่า โดยใช้ (ก) กลูโคส (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (จ) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และ (ฉ) สารละลายแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนในการหมัก	52
รูปที่ 15	ลักษณะของเซลล์ <i>R. oryzae</i> บริเวณด้านในของเบดสติดที่กำลังขยาย 750 เท่า โดยใช้ (ก) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และ (จ) สารละลายแป้ง เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมัก	53
รูปที่ 16	ลักษณะของเซลล์ <i>R. oryzae</i> บริเวณด้านในของเบดสติดที่กำลังขยาย 3,500 เท่า โดยใช้ (ก) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ และ (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมัก	54
รูปที่ 17	ลักษณะโครงสร้างของ (ก) เส้นใยผ้าฝ้าย และลักษณะการยึดเกาะของเซลล์ <i>R. oryzae</i> บนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูบริเวณด้านนอกของเบดสติดที่กำลังขยาย 350 เท่า โดยใช้ (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (จ) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และ (ฉ) สารละลายแป้ง เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมัก	55

รายการสัญลักษณ์

K_La	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

การผลิตกรดแลคติก จากไฮโดรไลสของกากมันสำปะหลังโดย *hizopus ryzae* ในระดับนำร่อง

บทนำ

ในปัจจุบัน เป็นที่ตระหนักกันดีถึงภาวะขาดแคลนน้ำมันเนื่องจากปริมาณการใช้น้ำมันดิบสูงขึ้น ในขณะที่ปริมาณน้ำมันดิบมีน้อยลง นอกจากนี้ ปัญหาการเมืองและสังคมในกลุ่มประเทศผู้ค้าน้ำมันส่งผลให้ราคาน้ำมันดิบในตลาดโลกพุ่งตัวสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ก่อให้เกิดผลกระทบโดยตรงต่ออุตสาหกรรมกลุ่มพลังงาน นอกจากนี้ กลุ่มอุตสาหกรรมปิโตรเคมียังได้รับผลกระทบทางอ้อมจากภาวะนี้ด้วย ทั้งนี้ เนื่องจากน้ำมันเป็นที่มาของวัตถุดิบในการสังเคราะห์พลาสติกที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในชีวิตประจำวัน ดังนั้น กลุ่มนักวิจัยและภาคอุตสาหกรรมจึงร่วมมือกันเพื่อแสวงหาสารทดแทนน้ำมันดิบเพื่อใช้ในการสังเคราะห์พอลิเมอร์ งานวิจัยเบื้องต้นรายงานว่า กรดแลคติกนอกจากจะถูกนำมาใช้งานอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารและยาแล้ว ยังสามารถใช้เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์สารเคมีและพอลิเมอร์ได้หลายชนิด เช่น พอลิเอสเทอร์ (polyester) อีพ็อกไซด์ (epoxides) พอลิแอคริลิกแอซิด (polyacrylic acid) และที่กำลังเป็นที่สนใจเป็นอย่างยิ่ง คือ พอลิแลคติกแอซิด (polylactic acid) โดยพอลิเมอร์ชนิดนี้ย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ (compostable) และยังสามารถเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต (biocompatible) ที่ผ่านมา ได้มีการทดลองนำพอลิเมอร์ชนิดนี้ไปประยุกต์ใช้งานหลายประเภท เช่น การขึ้นรูปเป็นเส้นใยสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ การขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มและบรรจุภัณฑ์ การทำเป็นไหมละลาย และ tissue engineering scaffold เพื่อใช้ในทางการแพทย์ เป็นต้น จากที่กล่าวมาแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของกรดแลคติกซึ่งสามารถนำมาใช้ทดแทนน้ำมันดิบซึ่งในปัจจุบันเป็นวัตถุดิบในกระบวนการสังเคราะห์พลาสติกได้เป็นอย่างดี (Tay and Yang, 2002; Thongchul et al., 2010)

ปัจจุบันกรดแลคติกผลิตได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสด้วยแบคทีเรียแลคติก ข้อดีของการหมักโดยแบคทีเรียแลคติก คือ ได้ผลผลิตกรดแลคติกสูง แต่เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกมักจัดอยู่ในกลุ่มจุลินทรีย์ที่เจริญแบบไม่ใช้อากาศ ทำให้อัตราการเจริญต่ำเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ที่เจริญแบบใช้อากาศ ดังนั้น หากต้องการเพิ่มจำนวนประชากรแบคทีเรียแลคติกให้มีปริมาณมากเพียงพอต่อการหมัก เพื่อผลิตกรดแลคติก จำเป็นต้องเสริมแหล่งโปรตีน (กรดอะมิโน) ไบโตามีน และธาตุอาหารจำเป็นหลายชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งส่งผลกระทบต่อต้นทุนการผลิตกรดแลคติก โดยปัจจุบันราคากรดแลคติกอยู่ที่ประมาณ 0.5 เหรียญสหรัฐต่อกิโลกรัม โดยราคาคงกล่าวเป็นราคาขายสำหรับเกรดที่นำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยา ดังนั้น หากต้องการผลิตกรดแลคติกในปริมาณมากเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพ ราคาค่าต้นทุนของกรดแลคติกจึงควรต้องลดต่ำลงมาเพื่อทำยสุดแล้วต้นทุนการผลิตพอลิแลคติกแอซิดต้องเทียบเคียงได้กับพลาสติกที่ใช้กันในปัจจุบัน

จากที่กล่าวมา เห็นได้ว่าหากเราสามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต้นทุนต่ำและผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณมาก จะเป็นทางออกในการลดต้นทุนการผลิตกรดแลคติกเพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพอลิแลคติกแอซิด ที่ผ่านมามีงานวิจัยว่าด้วยการปรับปรุงสายพันธุ์และกา ร

ตัดต่อทางพันธุกรรมเพื่อผลิตกรดแลกติกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นต่ำที่ได้มาจากการแปรรูปเบื้องต้น (pretreatment) วัสดุทางการเกษตร อย่างไรก็ตามที่เรียกว่าผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์และการตัดต่อทางพันธุกรรมมักประสบปัญหาความเสถียรของสายพันธุ์เมื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรม โดยต้องเฝ้าระวังการกลายพันธุ์ย้อนกลับ (reverse mutation) จึงจำเป็นต้องเพิ่มขึ้นขั้นตอนการตรวจสอบในกระบวนการผลิต ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น (Persson et al., 2001; Soccol et al., 2000) อีกทั้ง การใช้แบคทีเรียที่ผ่านการตัดต่อทางพันธุกรรมไม่ได้รับการยอมรับจาก กลุ่มประเทศยุโรป และญี่ปุ่น ดังนั้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการใช้แบคทีเรียดังกล่าวอาจถูกกีดกันทางการค้าได้

อย่างไรก็ดี นอกจากแบคทีเรียแลกติกและแบคทีเรียที่ผ่านการตัดต่อทางพันธุกรรมแล้ว ยังพบว่า รา *Rhizopus oryzae* สามารถผลิตแอล (+) ไอโซเมอร์บริสุทธิ์ของกรดแลกติก โดยการหมักอาหารเลี้ยงเชื้อที่มาจากแป้ง หรือน้ำตาลไซโลส (xylose) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของเฮมิเซลลูโลสซึ่งพบได้ในปริมาณมากในวัสดุทางการเกษตรรองมาจากเซลลูโลส ทั้งนี้เนื่องจาก *R. oryzae* มีวิถีเมแทบอลิซึม (metabolic pathway) เพื่อนำแป้งและวัตถุดิบทางการเกษตรซึ่งราคาถูกกว่ากลูโคสมาเป็นวัตถุดิบในการหมักได้โดยตรงโดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการย่อยแป้งหรือวัตถุดิบทางการเกษตรโดยกรดหรือเอนไซม์ให้เป็นกลูโคสเพื่อนำไปใช้ในการหมัก นอกจากนั้น *R. oryzae* สามารถเจริญและสร้างกรดแลกติกได้ในแหล่งอาหารที่ปราศจากไนโตรเจนหรือกรดอะมิโน ซึ่งมีความจำเป็นอย่างยิ่งในกระบวนการหมักโดยแบคทีเรีย จึงช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้อีกทางหนึ่ง อีกหนึ่งประเด็นสำคัญคือ ยังสามารถลดขั้นตอนในการแยกบริสุทธิ์ไอโซเมอร์ของกรดแลกติกได้อีกด้วย เห็นได้ว่าการผลิตกรดแลกติกโดยการหมักด้วย *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 กรัมแลกเตตต่อกรัมกลูโคส และ reactor productivity เท่ากับ 2.1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อีกทั้งยังไม่มีการสร้างผลพลอยได้ซึ่งได้แก่ เอทานอล (ethanol) และ กรดฟูมาริก (fumaric acid) จากการหมักนี้ด้วย ซึ่งอัตราการผลิตนี้สามารถเทียบเท่าได้กับอัตราที่ได้จากกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียแลกติก

ปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มีโรงงานผลิตกรดแลกติกที่เป็นของตนเอง ในขณะที่มีเพียงบริษัท Purac Biochem B.V. (Thailand) จำกัด เป็นผู้ประกอบการผลิตกรดแลกติกเพียงรายเดียวโดยมีกำลังการผลิตอยู่ที่ 100,000 ตันต่อปี ซึ่ง 90 เปอร์เซ็นต์ของกรดแลกติกที่ผลิตได้ถูกส่งออกไปยังต่างประเทศ เหลือเพียงแค่ 10 เปอร์เซ็นต์ที่ขายให้กับกลุ่มธุรกิจในประเทศไทย เช่น บริษัท บุญรอด บริวเวอรี่ จำกัด เป็นสาเหตุให้ประเทศไทยยังคงต้องนำเข้ากรดแลกติกและอนุพันธ์มาจากต่างประเทศเพื่อให้เพียงพอกับความต้องการของตลาด เมื่อพิจารณาถึงศักยภาพในการสร้างเทคโนโลยีเพื่อผลิตกรดแลกติกจากวัสดุทางการเกษตรที่มีใน

ท้องถิ่นเพื่อใช้ภายในประเทศ รวมถึงการส่งออกกรดแลกติกและอนุพันธ์สู่ ตลาดโลก ตามแนวทางที่ระบุไว้
ในการพัฒนาแผนที่นำทางสำหรับอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพในประเทศไทย (national bioplastics
roadmap) จัดเตรียมโดยสำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี พบว่าประเทศ
ไทยเป็นผู้ผลิตมันสำปะหลังในระดับแนวหน้าของโลก คิดเป็นพื้นที่ที่เก็บเกี่ยวมากถึง 6 ล้านไร่ต่อปี
(สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร ปี พ.ศ. 2546) คิดเป็นผลผลิตมันสำปะหลังสดประมาณ 20 ล้านตันต่อปี ซึ่ง
ทั้งหมดจะถูกนำไปแปรรูปเป็นแป้งมันสำปะหลัง มันอัดเม็ด และมันเส้น ในกระบวนการแปรรูปมีกากมัน
สำปะหลังเหลือจากขั้นตอนการผลิตประมาณ 10-15% (ขึ้นกับปริมาณความชื้นในมันสำปะหลังสด) ซึ่งใน
กากมันยังมีแป้งเหลืออยู่ในปริมาณสูงถึง 50-60% ของน้ำหนักแห้ง (Sriroth et al., 2000) ผู้วิจัยมองเห็นความ
เป็นไปได้ในการนำกากมันเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดแลกติกด้วย *R. oryzae* โดยประเมินมูลค่าแล้ว
พบว่าการนำกากมันสำปะหลังมาแปรรูปเป็นกรดแลกติกซึ่งมีราคาขายสูงกว่าแป้งมันสำปะหลัง มันอัดเม็ด
และมันเส้น ช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับกากมันโดยตรง และยกระดับผลผลิตทางการเกษตรของประเศมี
มูลค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งจะเป็แนวทางในการพัฒนาและส่งเสริมการนำวัตถุดิบทางการเกษตรชนิดอื่นๆ ที่มี อยู่
ภายในประเทศมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมัก ช่วยลดปัญหาหาค่าพืชผลทางการเกษตรตกต่ำ และลด
การนำเข้ากรดแลกติก 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 วิธีที่ใช้ทั่วไปสำหรับการ
สังเคราะห์ทางเคมี คือ การทำไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของแลคโทไนไทรล์ (lactonitrile) ซึ่งเกิดจากอะ
ซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) ทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนไซยาไนด์ (hydrogen cyanide) ได้ไอโซเมอร์ผสมของ
กรดแลกติก ทั้ง แอล (+) และ ดี (-) ไอโซเมอร์ ซึ่งปฏิกิริยาทางเคมีนั้นเกิดขึ้นในภาวะที่รุนแรง ส่งผลเสียต่อ
สิ่งแวดล้อม และมีต้นทุนการผลิตสูงเนื่องจากวัตถุดิบที่เข้ามาจากปิโตรเคมีซึ่งไม่สามารถหาทดแทนได้ (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* เนื่องจากมีอัตรา
การเจริญและให้ผลผลิตกรดแลกติกสูง แต่การหมักด้วย *Lactobacillus* นั้นมีข้อจำกัดเรื่องวัตถุดิบในการ
หมัก เนื่องจาก *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียกลุ่ม fastidious จำเป็นต้องใช้ growth factors เช่น ไวตามินและ
กรดอะมิโนหลายชนิดเพื่อเร่งการเจริญและการสร้างกรดแลกติก นอกจากนี้ *Lactobacillus* ไม่มีเอนไซม์อะ
ไมเลสเพื่อย่อยแป้งในวัตถุดิบทางการเกษตร ดังนั้น ในการผลิตกรดแลกติกจากวัตถุดิบทางการเกษตรต้อง

ทำการย่อยแป้งให้เป็นกลูโคสสำหรับการหมัก ทำให้ต้นทุนในการผลิตสูงขึ้น ข้อจำกัดสำคัญอีกข้อหนึ่งของกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรีย คือ แบคทีเรียจะผลิตทั้งแอล(+) และ ดี(-) ไอโซเมอร์ ทำให้ต้องแยกบริสุทธิ์ ไอโซเมอร์ทั้งสองออกจากกันก่อนนำไปสังเคราะห์พอลิแลคติกแอซิด ซึ่งการแยกไอโซเมอร์บริสุทธิ์นั้น มีขั้นตอนที่ยุ่งยากและซับซ้อน อีกทั้งไวมินและกรดอะมิโนที่เหลือจากกระบวนการหมักยังเพิ่มความซับซ้อนและต้นทุนการแยกบริสุทธิ์ของกรดแลคติกอีกด้วย (Ruengruglikit and Hang, 2003; Tay and Yang, 2002; Yin et al., 1997)

เนื่องจาก การหมักด้วยแบคทีเรียมีข้อจำกัดเรื่องวัตถุดิบและการแยกบริสุทธิ์ ดังนั้น จึงมีการพัฒนาวิธีการอื่นเพื่อทดแทนกระบวนการหมัก ด้วยแบคทีเรีย และพบว่ารา *R. oryzae* สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสเพื่อย่อยแป้งเป็นกลูโคสเพื่อใช้ผลิตกรดแลคติกตามวิธีเมแทบอลิซึม ดังนั้นการหมักด้วย *R. oryzae* จึงสามารถใช้มันสำปะหลัง ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบได้โดยตรงซึ่งแตกต่างจากการหมักด้วยแบคทีเรีย นอกจากนี้ *R. oryzae* ยังสามารถย่อยน้ำตาลคาร์บอน 5 โมเลกุล เช่น ไซโลส (xylose) ผ่านวิถี pentose phosphate pathway (HMP) ได้ งานวิจัยเบื้องต้น รายงานว่า *R. oryzae* สามารถใช้แป้งข้าวโพด (corn starch) แป้งมันฝรั่ง (potato starch) ข้าวสาลี (wheat) ข้าวโพด (corn) และสารสกัดจากกากข้าวโพดโดยกรด (corn fiber hydrolysate) เพื่อผลิตกรดแลคติกได้ (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% ของน้ำหนักแห้งมาใช้ผลิตกรดแลคติก ซึ่งช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับผลผลิตทางการเกษตร และช่วยลดภาระในการกำจัดของเสียให้กับโรงงานอีกด้วย

โดยทั่วไปสำหรับกระบวนการหมักในอุตสาหกรรมนั้น ถึงปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ ถังกวน (stirred tank bioreactor) เพราะเป็นระบบที่ง่ายไม่ซับซ้อนต่อการออกแบบและควบคุม แต่การใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้มีข้อจำกัดสำหรับการหมักด้วยรา เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานของราที่มีความหลากหลายและสามารถเปลี่ยนแปลงได้ในระหว่างการหมัก สัณฐานของราในถังกวน สามารถแบ่งได้ออกเป็น 2 ลักษณะใหญ่ๆ ได้แก่ dispersed mycelia และ pellet ซึ่งขึ้นกับปัจจัยที่ใช้ในการหมัก เช่น อุณหภูมิ ค่าพีเอช อัตราการกวนและการให้อากาศ อาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ลักษณะเฉพาะของราแต่ละสายพันธุ์ก็ส่งผลต่อลักษณะของสัณฐานในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเช่นกัน โดยปกติ ลักษณะสัณฐานแบบ dispersed mycelia จะกระจายตัวไปในถังกวน ระบบการทำงานของระบบควบคุม โดยไปเกาะติดอยู่ที่อุปกรณ์วัดและควบคุม เช่น อุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิ อุปกรณ์วัดค่าการละลายของออกซิเจนและค่าพีเอช เป็นต้น ทำให้ค่าที่ได้จากการวัดผิดพลาดส่งผลถึงการสั่งงานที่ผิดพลาดของระบบควบคุมของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ นอกจากนี้ ถ้าเส้นใยไปเจริญและยึดเกาะอยู่รอบๆ บริเวณแกนใบพัดกวน ทำให้บริเวณแกนหมุนของใบพัดกวนมีแรงบิด (torque) สูงขึ้น ทำให้เกิดความร้อนที่มอเตอร์ของแกนใบพัด อาจก่อให้เกิดความเสียหายได้นอกจากนี้ สายใยราที่กระจายไปทั่วในถังปฏิกรณ์ชีวภาพทำให้น้ำหมักมีความหนืดสูงขึ้น ซึ่งของเหลวในถัง

ปฏิกรณ์ชีวภาพจะมีสมบัติเป็น pseudoplastic เมื่อน้ำหมักมีความหนืดสูงขึ้น ทำให้ค่าการละลายของออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพต่ำ ดังนั้น ถ้าต้องการควบคุมปริมาณออกซิเจนในน้ำหมัก ซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญของเซลล์และการสร้างกรดแลกติกให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม จึงจำเป็นต้องปั่นกวนด้วยความเร็วรอบสูง ทำให้สิ้นเปลืองพลังงาน (high power input) และการปั่นกวนที่ความเร็วรอบสูงยังทำลายสายใยรา เกิดเป็นสายสั้นๆ (fragmentation) ซึ่งมีรายงานอ้างอิงว่าทำให้ผลผลิตของกรดแลกติกลดลง ในการเลี้ยงเซลล์ร่าแบบ pellet มีข้อดี คือ ลดปัญหาเรื่องน้ำหมักมีความหนืดสูง ช่วยลดการใช้ความเร็วรอบสูงเพื่อปั่นกวนให้ได้ค่าการละลายออกซิเจนในน้ำหมักตามต้องการ อย่างไรก็ตาม ในการหมักระบบต่อเนื่อง (long term production) ลักษณะพื้นฐานแบบนี้ 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) จะถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์นี้จะเปลี่ยนไพรูเวท (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* ต้องการการควบคุมพื้นฐานของราที่เหมาะสม ซึ่งสามารถควบคุมได้โดยปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพที่เหมาะสม ดังนั้น โครงการวิจัยนี้ จะศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อพื้นฐานของรา และการผลิตกรดแลกติก เพื่อนำไปใช้สำหรับการออกแบบกระบวนการในอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

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

วิธีดำเนินการวิจัย

การหาอัตราการกวนและการให้อากาศที่เหมาะสมในการหมักกรดแลกติกจากกลูโคสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสตีขนาด 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-แลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด พัฒนามาจากการดัดแปลงถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน ปริมาตร 5 ลิตร โดยเสริมโครงสร้างสแตนเลสซึ่งมีผ้าขนหนูเย็บตรึงไว้สำหรับตรึงสปอร์และเส้นใยรา โดยโครงสร้างสแตนเลสจะยึดไว้กับฝาของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ การเตรียมถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อใช้งาน โดยเริ่มแรก เตรียมอาหารเพื่อการเจริญ 3 ลิตร ใส่ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 30 นาที หลังจากที่อยู่อุณหภูมิภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพลดลง ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส แล้วเริ่มปรับค่ามาตรฐานหัววัดออกซิเจน (DO probe) โดยแก้สไนโตรเจน (zero 0%DO) และอากาศ (slope 100%DO) หลังจากนั้น ถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร (10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 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 จะหยุดให้อากาศแล้ววัดอัตราการกวนให้ต่ำเพียงแค่ว่าสามารถรักษาความเป็นเนื้อเดียวของน้ำหมักไว้ได้ 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 กรดแอส-แลกติก และเอทานอล โดยปริมาณน้ำหนักแห้ง หาได้เมื่อสิ้นสุดการหมัก โดยเก็บเกี่ยวเซลล์ราที่ตรึงบนผ้าขนหนู นำไปล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ แล้วนำมาหาคลกับน้ำหนักผ้าขนหนูที่ได้ชั่งน้ำหนักแน่นอนไว้แล้วก่อนการหมัก นำน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้หารด้วยปริมาณน้ำหมัก (3 ลิตร) ได้เป็นค่าความเข้มข้นของเซลล์

การหาปริมาณกลูโคสที่เหลือ กรดแอส-แลกติก และเอทานอลที่ *R. oryzae* ผลิตขึ้น ทำได้โดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี นำตัวอย่างน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยง กรองด้วยเมมเบรนเซลลูโลสอะซิเตด 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 แป้งมันเอี่ยมเฮง อุตสาหกรรม จำกัด และบริษัท เอี่ยมบูรพา จำกัด กากมันสดที่ได้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนใช้งาน

ทำการปรับสภาพกากมันก่อนนำกากมันก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยมุ่งหวังลดต้นทุนปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในขั้นตอนการย่อยแป้งที่หลงเหลือ

อยู่ในกากมัน 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

การปรับสภาพด้วยการใช้ร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับการใช้สารละลายแอลคาไลน์ โดยนำกากมันสดมาเติมสารละลาย NaOH ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.1 0.5 และ 1 N ปริมาณของกากมันที่ใส่อยู่ในช่วง 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 โดยที่สารละลายที่ได้ นั้นนำไปวัดหาปริมาณน้ำตาลที่สูญเสียไปภายหลังการปรับสภาพด้วย

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 เพื่อทำการย่อยสลายเซลลูโลสและทำให้เกรนูลของแป้งที่อยู่ภายในโครงสร้างของเซลลูโลสถูกปลดปล่อยออกมา 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 ใส่งในสารละลาย ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างกันคือ 15 และ 30 นาที

แปรระยะเวลาในการบ่ม ปริมาณของเซลลูเลส และปริมาณอะไมเลส เพื่อศึกษาถึงผลของความเข้มข้น และ yield ของกลูโคสที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง ภายหลังการย่อยนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงและ

แยกสารละลายส่วนใสเก็บไว้สำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักกรดแลกติกโดยปรับพีเอชเป็น 6.0 แบ่งตัวอย่างสารละลายส่วนหนึ่งไว้สำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาล และสารประกอบอื่นๆ

โดยกลูโคสที่ปรากฏในของเหลวที่แยกออกมาภายหลังการปรับสภาพกากมันและในส่วนของ การละลายที่ได้จากการย่อยจะทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง YSI 2700 Biochemistry Analyzer ส่วนปริมาณน้ำตาล ทั้งหมดในรูปของกลูโคสที่ปรากฏในของเหลวที่แยกออกมาภายหลังการปรับสภาพกากมันและในส่วนของ การละลายที่ได้จากการย่อยหาได้จาก การนำสารละลายที่ได้มาทำปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริก 0.25 M จากนั้น autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 60 นาที หลังการ จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงและแยกสารละลายส่วนใสไปทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง YSI 2700 Biochemistry Analyzer

การหมักกรดแอล-แลกติกจากสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง

ทำการหมักแบบเชลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด โดยถ่ายหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เทลงไปในอาหารเพื่อการเจริญปริมาตร 3 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ทำ การหมักจนครบ 48 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนอาหารเป็นอาหารเพื่อสร้าง ผลิตภัณฑ์ ควบคุมค่าพีเอชที่ 6.0 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 M ตลอดการหมัก ทำการหมักต่อจนครบ 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 8 ชั่วโมง เมื่อครบ 96 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์และนำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ ฟอว์มานซ์ลิกวิดโครมาโทกราฟี (HPLC) เพื่อหาปริมาณกรดแอล -แลกติก และผลิตภัณฑ์พลอยได้ รวมทั้ง กลูโคสที่เหลือจากการหมัก (Chotisubha-anandha et al., 2011)

อาหารเพื่อการเจริญเติบโต และอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ที่ใช้ได้แก่ กลูโคส สารละลายที่ได้จาก การย่อยของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ สารละลายที่ได้จากการย่อยของกากมันสำปะหลังที่ ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันด้วยเอนไซม์ สารละลายที่ได้จากการย่อยของกาก มันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ ด้วยเอนไซม์ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และสารละลายแป้ง 50 กรัมต่อลิตร สำหรับอาหารเพื่อการเจริญเติบโต และ 70 กรัมต่อลิตรสำหรับอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์

การคำนวณหาปัจจัยทางวิศวกรรมที่เหมาะสมต่อการหมักกรดแอล-แลกติก

ทำการออกแบบขยายสเกลการหมักกรดแอล-แลกติก โดยใช้ค่า $K_L a$ เป็นปัจจัยคงที่ในการคำนวณ โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อค่า $K_L a$ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ได้แก่ ค่า Reynolds' number (Re_p) ความเร็วปลายใบพัด กวน (u_p) กำลังมอเตอร์ต่อปริมาตร (P/V) และอัตราการไหลวนของน้ำหมักภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (F/V) ทำการคำนวณเพื่อหาค่าอัตราการกวน และการให้อากาศในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร โดยกำหนดให้ ปัจจัยแต่ละปัจจัยเป็นค่าคงที่ในการขยายสเกลจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร เป็นขนาด 90 ลิตร

การเตรียมสารละลายจากการย่อยกากมันสำปะหลังในระดับนำร่อง

จากการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ ได้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับย่อยกากมันสำปะหลังผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันต่อด้วยเซลล์และอะไมเลสดังนี้ โดยเริ่มจากปริมาณความเข้มข้นของกากมันสด 20% ปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดัน เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นย่อยต่อด้วยเซลล์ 33.15 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง นาน 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 4.6 – 5 แล้วย่อยต่อด้วยอะไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 5.4 – 5.8 โดยได้ yield ของกลูโคสสูงสุดประมาณ 0.6 กรัมต่อกรัมของกากมันแห้ง โดยทำการย่อยกากมันสำปะหลังในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 90 ลิตร

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

การหมักกรดแอล-แลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด

รูปที่ 1 แสดงลักษณะพื้นฐานของ *R. oryzae* เมื่อเจริญในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด หลังจากเติมหัวเชื้อ เมื่อสปอร์เกิดการงอกและเซลล์เริ่มเจริญเติบโต ในระหว่างนั้นสปอร์ที่งอกและเซลล์เส้นใยที่เจริญเติบโตจะเข้าไปติดในวัสดุสำหรับตรึงเซลล์ซึ่งได้แก่ ผ้ายขนหนู ซึ่งการที่สปอร์และเซลล์เส้นใยที่เติบโตทั้งหมดเข้าไปยึดเกาะที่ผ้ายขนหนูที่ตรึงไว้กับ โครงสแตนเลส ส่งผลให้ไม่มีเซลล์เจริญแบบอิสระในน้ำหมักหรือที่บริเวณพื้นผิวอื่นในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเลย เมื่อเทียบกับการเลี้ยงราเส้นใยในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนที่ใช้กันทั่วไป ดังนั้น จึงทำให้ง่ายต่อการทำงานและควบคุมภาวะการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดนี้ นอกจากนี้ ผลการทดลองที่ได้ยังบ่งชี้ว่าผ้ายขนหนูเป็นพื้นผิวจริงที่เหมาะสมสำหรับ *R. oryzae* ทั้งนี้โดยอาศัยแรงเหนือนจากการปั่นกวนเป็นตัวเสริมสร้างความแข็งแกร่งในการยึดเกาะกับวัสดุตรึง

ถึงแม้ว่าจะมีงานวิจัยที่ผ่านมากล่าวถึง ความสะดวกในการเลี้ยงราเส้นใยให้อยู่ในรูปของ pellet อย่างไรก็ดี เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างทำการหมัก การเลี้ยงราเส้นใยตามรูปที่ 1 ส่งผลดีมากกว่าการเลี้ยงในรูปของ pellet เนื่องจาก การปั่นกวนและการให้อากาศทำให้เกิดแรงเฉือนที่บริเวณผิวของแผ่นของราเส้นใยที่เกาะเป็นเยื่อบางๆ ที่บริเวณผ้ายขนหนูในการเลี้ยงแบบระยะยาว เมื่อเทียบกับการเลี้ยงแบบ pellet ซึ่งมักประสบปัญหาเรื่องความหนาแน่นและขนาดของ pellet ที่เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาที่เลี้ยงนานขึ้น ซึ่งในที่สุดแล้วจะส่งผลเชิงลบต่อการผลิตกรดแอล-แลกติก เนื่องจาก พบภาวะการขาดออกซิเจนที่บริเวณศูนย์กลางของ pellet นั้นเอง

ในการหมักด้วยเซลล์ตรึงของ *R. oryzae* พบว่าอัตราการถ่ายเทออกซิเจนเพิ่มขึ้นอย่างมากตามอัตราการปั่นกวนที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามการเพิ่มอัตราการให้อากาศโดยคงอัตราการปั่นกวนไว้ไม่ได้ช่วยเพิ่มอัตราการถ่ายเทออกซิเจนได้มากนัก (ตารางที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน (K_La) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติดเทียบกับค่าที่ได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนที่ควบคุมภาวะการปั่นกวนและการให้อากาศเท่ากัน จะพบว่าอัตราการถ่ายเทของออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติดจะมีค่า

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

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

การปรับสภาพกากมันสำปะหลังโดยใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน

จากรูปที่ 3(ก) พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาจาก 15 นาทีเป็น 30 นาที สามารถแยกน้ำตาลออกจากกากมันได้มากขึ้น แต่เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นไปจนถึง 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 ของกลูโคสที่

ใกล้เคียงกันประมาณ 0.4-0.5 กรัมต่อกรัมกากมันแห้ง และพบว่าภาวะที่ได้ yield ของกลูโคสสูงที่สุดคือ ประมาณ 0.541 กรัมต่อกรัมกากมันแห้ง ที่ภาวะความเข้มข้นของกากมัน 6.7 % ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N และระยะเวลาที่ใช้ในการปรับสภาพ 60 นาที จึงถือว่าเป็นภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพด้วยวิธีนี้ เพื่อนำไปทำการย่อยด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไป นอกจากนี้ ยังพบว่าสารละลายที่แยกออกมาภายหลังการปรับสภาพมีลักษณะหนืดเล็กน้อย เนื่องจากการบวมของแกรนูลแป้งที่ถูกปลดปล่อยออกมาหลังจากที่มีการปรับสภาพด้วยสารแอลคาไลน์ที่อุณหภูมิสูง (Wyman et al., 2005) แต่อย่างไรก็ตาม การที่ใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นมากเกินไปจะส่งผลให้สารละลายที่ได้มีค่าพีเอชสูง หากจะนำไปใช้ในการหมัก ต้องมีการปรับค่าให้เป็นกลาง ส่งผลให้เกิดเกลือในสารละลายมากเกินไป อาจส่งผลเชิงลบต่อการหมักกรดแลกติกโดย *R.oryzae*

การย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน

ขั้นตอนแรกนำกากมันที่ปรับสภาพแล้วมาย่อยด้วยเซลล์ูลัส 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 พบว่าความเข้มข้นของเซลล์ูลัสและเวลาในการบ่มมีผลต่อการย่อย เห็นได้จากปริมาณของกลูโคสที่ออกมา ภายหลังการย่อย ซึ่งถ้าใช้ความเข้มข้นของเซลล์ูลัสที่มากและใช้ระยะเวลาในการบ่มที่นานขึ้น จะได้ yield ของกลูโคสในปริมาณที่มากขึ้นด้วย แต่พบว่าความเข้มข้นของอะไมเลสและเวลาในการบ่มไม่มีผลต่อการย่อย คือ เมื่อใช้ความเข้มข้นของอะไมเลสที่มากและใช้ระยะเวลาในการบ่มที่ นานขึ้น 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) จึงสามารถเลือกภาวะที่เหมาะสมสำหรับย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันต่อด้วยเซลล์ูลัส และอะไมเลส ได้ดังนี้ เริ่มจากปริมาณความเข้มข้นของกากมันสด 20% ปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดันเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นย่อยต่อด้วยเซลล์ูลัส 33.15 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง นาน 6 ชั่วโมง แล้วย่อยต่อด้วยอะไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง นาน 15 นาที โดยได้ yield ของกลูโคสสูงสุดประมาณ 0.6 กรัมต่อกรัมของกากมันแห้ง เมื่อเปรียบเทียบผลของการย่อยด้วยเซลล์ูลัสและอะไมเลส จะเห็นได้ว่าความ

เข้มข้นของเซลลูโลสที่ใช้ในการย่อยกากมัน และเวลาที่ใช้มีผลต่อ yield ของกลูโคสที่ได้ กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์มากขึ้น และเวลาที่ใช้ในการย่อยนานขึ้น จะให้ค่า yield ของกลูโคสสูงขึ้น ในขณะที่ความเข้มข้นของอะไมเลสและเวลาที่ใช้ จะไม่ส่งผลต่อ yield ของกลูโคสมากนัก

การย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์

จากรูปที่ 7 พบว่าความเข้มข้นของเซลลูโลสและเวลาในการบ่มมีผลต่อการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีนี้เช่นเดียวกันกับการนำกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดัน เห็นได้จากปริมาณของกลูโคสที่ได้ในสารละลายที่ออกมาภายหลังการย่อย หากความเข้มข้นของเซลลูโลสมา กขึ้นและใช้ระยะเวลาในการบ่มที่นานขึ้น จะได้ yield ของกลูโคสในปริมาณที่มากขึ้นตามไปด้วย แต่พบว่าความเข้มข้นของอะไมเลสและเวลาในการบ่มไม่มีผลต่อการย่อยเช่นเดียวกับที่พบในการย่อยกากมันที่ปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดัน แต่อย่างไรก็ตาม ค่า yield ของกลูโคสที่ได้นั้นสูงสุดอยู่ที่ประมาณ 0.16 กรัมต่อกรัมของกากมันแห้ง ซึ่งยังคงน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ประมาณ 0.6 กรัมต่อกรัมของกากมันแห้ง) ซึ่งน้อยกว่าเกือบ 4 เท่า ผลการทดลองที่ได้นี้อาจอธิบายได้จากการปรับสภาพด้วยวิธีใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันควบคู่กับการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป ทำให้กากมันที่ได้มีค่าพีเอชสูง ก่อนทำการย่อยด้วยเอนไซม์ต้องมีการปรับค่าพีเอชให้อยู่ที่ค่าที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์แต่ละตัว การปรับพีเอชส่งผลให้มีปริมาณเกลือที่ปนในกากมันในจำนวนค่อนข้างมาก เกลือดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดที่ใช้ก็อาจจะเป็นได้ นอกจากนี้แล้ว ยังพบว่า การปรับสภาพกากมันก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์นับเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากการปรับสภาพกากมันจะช่วยทำให้โครงสร้างลิกโนเซลลูโลสถูกทำลาย ทำให้เอนไซม์เข้าถึงแกรนูลของแป้งที่อยู่ภายใน โครงสร้างของกากมันได้ง่ายขึ้น (Thongchul et al., 2010)

การหมักกรดแอล-แลกติกแบบเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติกจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

การทดลองนี้ ได้ศึกษาและเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานและจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแลกติกโดย *R. oryzae* โดยการใช้สับสเตรตต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน พร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และสารละลายแป้ง

ลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ที่ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติก

ในกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว *R. oryzae* สามารถเจริญเติบโตโดยมีลักษณะพื้นฐานที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างด้วยกัน ยกตัวอย่างเช่น ขนาดของสปอร์เริ่มต้น (initial spore inoculum size) สับสเตรทที่ใช้ ค่าพีเอช อัตราการปั่นกวน อัตราการให้อากาศ และ อุณหภูมิ เป็นต้น (Zhang et al., 2007) ในงานวิจัยนี้ได้ใช้สับสเตรทที่แตกต่างกันมาเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับใช้ในกระบวนการหมักกรดแลกติกโดย *R. oryzae* ที่ตั้งอยู่บนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนู

เมื่อพิจารณาลักษณะพื้นฐานของ *R. oryzae* ในระยะการเจริญเติบโต (growth phase) ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง (รูปที่ 8) พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตเป็นตัวเซลล์แบบลักษณะเส้นใย โดยจัดวางตัวเป็นชั้นๆ เกาะอยู่บนเส้นใยของผ้า ซึ่งจะมีรูปร่างหน้าตาเหมือนกัน แต่ต่างกันที่ปริมาณเซลล์ที่เกาะอยู่บนเส้นใยและสีของตัวเซลล์ โดยจะขึ้นอยู่กับแต่ละภาวะของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ กรณีภาวะที่ใช้สับสเตรทกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เซลล์มีสีขาวนวล แต่มีปริมาณที่ไม่มากนักเมื่อเทียบกับภาวะอื่น ดังแสดงในรูปที่ 8(ก) ส่วนภาวะที่สับสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น (รูปที่ 8(ข) และ 8(ค)) พบว่า เซลล์มีสีน้ำตาล เนื่องจากสีของอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต และอาหารที่ใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการปรับสภาพและการย่อย เซลล์มีการเจริญเติบโตค่อนข้างมาก ซึ่งสังเกตจากปริมาณของเซลล์ที่เกาะอยู่บนผ้าในจำนวนที่มากพอควร ส่งผลให้อาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต มีปริมาณน้อย เนื่องจากถูกเซลล์ดูดน้ำเข้าไปเป็นจำนวนมาก คาดว่าน่าจะมาจากคาร์โบไฮเดรตที่สารอาหารที่ใช้ในการเป็นอาหารสำหรับการเจริญเติบโต และอาหารสำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์นั้นมีโปรตีนอยู่ค่อนข้างมาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Thongchul et al. (2010) พบว่ากากมันสำปะหลังประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 5.3 % ทำให้สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังมีปริมาณของโปรตีนสูงเช่นกัน ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณของแหล่งไนโตรเจนอีกทางหนึ่ง ส่งผลให้ช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์ในปริมาณที่มากขึ้น (Yao et al., 2010) ส่วนภาวะที่สับสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์และ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด (รูปที่ 8(ง) และ 8(จ)) พบว่า เซลล์มีสีน้ำตาลเข้ม และน้ำตาลส้มตามลำดับ เนื่องจากสีของอาหารที่ใช้เช่นกัน และในระหว่างการหมักนั้นจะมีปริมาณของฟองเกิดขึ้นเป็นปริมาณมาก โดยจะเกิดเป็นฟองลอยขึ้นมากอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา จวบจนกระทั่งฟองคงที่ซึ่งใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง และภาวะที่สับสเตรทเป็นสารละลายแป้ง (รูปที่ 8(ฉ)) พบว่า เซลล์มีสีขาวนวล แต่จะขาวกว่าการใช้กลูโคส เนื่องจากสีของสารละลายแป้ง และในช่วงเริ่มต้นกระบวนการหมักนั้น สารละลายแป้งที่ใช้จะเกิดเจลลาตินเซชัน ทำให้น้ำหมักมีความหนืดค่อนข้างสูง และเนื่องจากสารละลายแป้งที่มีลักษณะเป็นเจล จึงไปเกาะกับเส้นใยผ้าฝ้ายที่เตรียมไว้สำหรับให้เซลล์ขึ้นไปเกาะในขณะที่เจริญเติบโต จึงส่งผลให้เซลล์เกาะตัวบนผ้าฝ้ายแบบไม่แน่นนัก แต่เมื่อทำการหมักไประยะหนึ่งประมาณชั่วโมงที่ 24 พบว่า สารละลายแป้งมีความหนืดลดลง อาจมาจากการที่มีการปั่นกวนของใบพัดทำให้โมเลกุลของแป้งสั่นลง อีกทั้ง *R. oryzae* มีเอนไซม์ใน

กลุ่มอะไมโลไลติกมาช่วยย่อยโมเลกุลของแป้งให้มีขนาดเล็กลงความหนืดของอาหารจึงลดลง (Wee et al., 2006)

เมื่อพิจารณาลักษณะพื้นฐานของ *R. oryzae* ในระยะการสร้างผลิตภัณฑ์ (production phase) ที่เวลาการหมัก 96 ชั่วโมง (รูปที่ 9) พบว่า เซลล์ในแต่ละภาวะมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะภาวะที่สับสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น (รูปที่ 9(ข) และ 9(ค)) พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เซลล์บางส่วนไม่ได้สัมผัสกับอาหารทำให้เซลล์เจริญเป็นสปอร์ในบริเวณด้านบนของเบดสติก ส่วนภาวะที่สับสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด (รูปที่ 9(ง) และ 9(จ)) พบว่า เซลล์มีการเจริญเติบโตมากขึ้นเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามความถี่ของการเกิดฟองในระยะนี้จะมีมากกว่าในระยะของการเจริญเติบโต

เมื่อพิจารณาลักษณะการยึดเกาะของ *R. oryzae* บนเบดสติกด้านบน และด้านใน (รูปที่ 10) และความหนาของเซลล์ (รูปที่ 11) พบว่า เซลล์มีการยึดเกาะบนเบดสติกที่หนาแน่นและมีความหนาที่แตกต่างกันไปในแต่ละภาวะ จะเห็นได้ชัดเจนในกรณีของภาวะที่สับสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 10 (ข) และ 10(ค)) พบว่า เซลล์มีปริมาณมาก และเจริญเติบโตขยายขนาดเกินบริเวณที่ยึดเกาะของเบดสติก เซลล์มีลักษณะยึดเกาะกันอย่างหลวมๆ ตัวเซลล์มีความหนามากพอควร ดังแสดงในรูปที่ 11(ข) และ 11(ค) มีการพองน้ำเนื่องมาจากการที่เซลล์ดูดน้ำเข้าไปในระหว่างกระบวนการหมัก น้ำหนักแห้งของทั้งสองภาวะนี้คือ 57.26 และ 58.09 กรัม ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนคือ 35.12 กรัม กรณีภาวะที่สับสเตรทเป็นสารละลายแป้ง (รูปที่ 10(ง)) พบว่า เซลล์มีปริมาณมากเช่นกัน มีการเจริญเติบโตของเซลล์ที่มีขนาดค่อนข้างหนา ดังแสดงในรูปที่ 11(ง) แต่ในภาวะนี้เซลล์มีการหลุดออกจากเบดสติกได้ง่าย เนื่องจากมีการเกาะตัวกันอย่างหลวมๆ ปนอยู่กับสารละลายแป้งที่ยังคงมีสภาพเป็นเจล และมีการพองน้ำเช่นกันด้วย กรณีของ ภาวะที่สับสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด (รูปที่ 10(จ) และ 10(จ)) พบว่า เซลล์มีการเจริญเติบโต เกาะตัวกันอย่างหนาแน่นจึงสังเกตได้ว่าเซลล์มีปริมาณน้อย เจริญอยู่บนเส้นใยผ้าฝ้ายเท่านั้น และมีขนาดไม่หนามากเกินไป ดังแสดงในรูปที่ 11(จ) และ 11(จ) ซึ่งภาวะข้างต้นที่ได้กล่าวมานั้นแตกต่างกับภาวะที่ใช้สับสเตรทกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 10(ก) ในภาวะนี้เซลล์จะยึดเกาะเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ และเกาะตัวกันอย่างไม่หนาแน่นมากนัก ดังแสดงในรูปที่ 11(ก) ทำให้มีช่องว่างภายในตัวเซลล์ ส่งผลให้การถ่ายเทอาหารและอากาศเข้าสู่ภายในตัวเซลล์มีประสิทธิภาพมากกว่า ภาวะอื่นๆ เซลล์จึงสามารถผลิตกรดแลกติกได้มากขึ้น (Chotisubha-anandha et al., 2011)

เมื่อพิจารณาลักษณะเซลล์ *R. oryzae* ที่ตรึงอยู่ด้านในของเบดสติด (รูปที่ 12) พบว่า บริเวณผิวของเซลล์ที่อยู่ด้านในมีลักษณะด้านและแข็งกว่าเซลล์ที่อยู่ด้านนอกของเบดสติด เนื่องมาจากเป็นบริเวณที่อยู่ติดกับอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่าด้านนอกของเบด (Thongchul, 2005; Chotisubha-anandha et al., 2011) กรณีของภาวะที่สับสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด (รูปที่ 12 (ง) และ 12(จ)) พบว่า ลักษณะที่ด้าน แข็ง และมีการจัดเรียงกันแน่นมากกว่าภาวะอื่นๆ ทั้งนี้อาจจะมาจากการที่สารละลายมีความเข้มข้นของเกลือสูง ซึ่งการองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื่อนั้นส่งผลโดยตรงต่อรูปร่างและลักษณะของเซลล์ (Zhang et al., 2007) โดยน้ำหนักแห้งของทั้งสองภาวะนี้คือ 64.42 และ 76.81 กรัม ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการใช้ภาวะอื่น จึงเป็นสามารรถสรุปได้ว่า เซลล์ที่เกิดในสองภาวะนี้มีการแพ็คตัวอยู่อย่างหนาแน่น และกรณีของภาวะที่สับสเตรทเป็นสารละลายแข็ง (รูปที่ 12(ฉ)) พบว่า เซลล์มีลักษณะที่นุ่ม ไม่มีความคงตัวของตัวเซลล์ หลุดขาดจากกันง่าย แต่ยังมีบริเวณที่มีความแข็งอยู่บ้างเล็กน้อย เนื่องมาจากการในภาวะนี้มีโมเลกุลของแข็งที่มีลักษณะเป็นเจล มาแทรกอยู่ระหว่างตัวเซลล์กับเส้นใยผ้าฝ้ายที่ยึดตรึง ทำให้เซลล์ไม่มีความคงตัวและหลุดออกจากกันง่าย ทำให้มีตัวเซลล์ มีการหลุดออกมาบ้างในขณะที่ทำการเปลี่ยนถ่ายอาหาร และยังส่งผลให้ปริมาณของน้ำหนักแห้งของภาวะนี้มีค่ามากกว่าค่าที่เป็นจริงเพราะมีน้ำหนักของโมเลกุลแข็งปะปนไปด้วย คือ 33.77 กรัม

จลนพลศาสตร์ของการหมักกรดแอล- แลกติกจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ โดย *R. oryzae* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด

จากการเปรียบเทียบจลนพลศาสตร์ของการหมักกรดแลกติกโดย *R. oryzae* ที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศเท่ากับ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที โดยการใช้สับสเตรทต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และสารละลายแข็ง (รูปที่ 13) พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 53.61 26.57 25.41 7.63 6.75 และ 33.77 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า Y_{PS} 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_{PS} 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 ส่งผลต่อความสามารถในการผลิต กรดแลกติกที่แตกต่างกันด้วย เพราะว่องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในแต่ละภาะนั้นไม่เหมือนกัน และ *R.*

oryzae เป็นราที่มีอะไมโลไลติกแอกทิวิตี้ กล่าวคือมีอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่สามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคสได้ (Wee et al., 2006) ความสามารถในการที่รานั้นจะนำไปใช้ในแต่ละภาวะจึงมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกันด้วย

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

จากการทดลองพบว่าสับสเตรทที่สามารถนำมาใช้ในการหมักกรดแลกติกได้ดีถัดมาจากกลูโคสและสารละลายแป้ง คือ สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสับสเตรททั้งสองชนิดนี้ให้ปริมาณกรดแลกติกใกล้เคียงกันดังแสดงผลดังตารางที่ 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* นำสับสเตรททั้งสองชนิดนี้ไปใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ในปริมาณค่อนข้างสูง สังเกตได้จากรูปที่ 10(ข) และ 10(ค) ซึ่งคาดว่าน่าจะมาจากการที่สารละลายมีโปรตีนสูงจึงทำให้ส่งเสริมการเจริญของเซลล์ ทำให้อัตราการถ่ายเทอาหารและอากาศภายในเซลล์ดีขึ้นมีประสิทธิภาพลดลง และเนื่องจากสับสเตรทดังกล่าวไม่ได้อยู่ในรูปของกลูโคสบริสุทธิ์ โดยมีองค์ประกอบของสารอื่นปะปนอยู่ด้วยซึ่งอาจจะไปส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *R. oryzae* ทำให้ *R. oryzae* สามารถใช้น้ำตาลหมดไปอย่างรวดเร็ว ซึ่งพบว่าน้ำตาลของทั้งสองภาวะนี้หมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 และ 80 ตามลำดับ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 13(ข) และ 13(ค) ตามลำดับ อีกทั้งการย่อยของกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์นี้อาจจะยังไม่เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ เนื่องจากการย่อยด้วยเอนไซม์นี้เป็น

การย่อยที่ภาวะไม่รุนแรงส่งผลให้โมเลกุลของแป้งยังอยู่ในรูปของโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ดังนั้น *R. oryzae* จึงต้องสร้างเอนไซม์จำพวกอะไมโลไลติกออกมาย่อยให้ได้กลายเป็นกลูโคสบริสุทธิ์ เพื่อที่จะนำเข้าสู่วิถีเมแทบอลิซึมต่อไป ทำให้เซลล์มีสามารถผลิตกรดแลกติกได้ในระดับหนึ่ง เมื่อมาพิจารณาตามค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนเท่ากับ 0.033 และ 0.049 ต่อวินาทีตามลำดับ เมื่อทำการหมักเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง แสดงในตารางที่ 4 พบว่าประสิทธิภาพของการถ่ายเทออกซิเจนของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพนั้นมีความต้านทานต่ำกว่ากากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน และน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 57.26 และ 58.09 กรัมตามลำดับ ซึ่งในปริมาณของเซลล์ที่ใกล้เคียงกัน แต่ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนแตกต่างกัน ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าการปรับสภาพกากมันสำปะหลังส่งผลให้ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีค่าที่สูงขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพของการถ่ายเทอาหารและอากาศมีมากขึ้น ส่งผลต่อการเจริญของเซลล์และการผลิตกรดแลกติกให้ได้ในปริมาณสูงในการหมักระยะยาว (Thongchul and Yang, 2006) และจากผลการทดลองในตารางที่ 4 พบว่า ภาวะที่ใช้สับสเตรทที่เป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน มีน้ำหนักเซลล์แห้งที่ใกล้เคียงกันกับภาวะที่ใช้สับสเตรทใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน คือ 55.62 กรัม ในขณะที่ ภาวะที่ใช้สับสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์และ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอน ได้น้ำหนักเซลล์แห้งที่มากกว่า คือ 64.42 และ 76.81 กรัม ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน น่าจะมีคุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใกล้เคียงกับสารละลายแป้ง

จากการทดลองพบว่าสับสเตรทที่ *R. oryzae* นำไปใช้เพื่อผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณที่ต่ำ คือ สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ และ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด โดยกรดแลกติกที่ได้มีปริมาณต่ำกว่าการหมักด้วย สับสเตรทชนิดอื่นแสดงผลดังตารางที่ 4 คือสามารถผลิตกรดแลกติกได้เพียง 7.63 และ 6.75 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.16 และ 0.14 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากก่อนนำสับสเตรทสองชนิดนี้มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนจำเป็นต้องมีการปรับค่าพีเอชให้เหมาะสมด้วยกรดและเบสก่อนที่จะนำไปเข้าสู่การย่อยด้วยเอนไซม์ ดังนั้น จึงส่งผลให้ความเข้มข้นของเกลือในสับสเตรทดังกล่าวมีปริมาณสูง อีกทั้งในการปรับสภาพ ภาวะที่ใช้รุนแรงกว่าภาวะอื่นๆ อาจทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ร่วมอื่นๆ ขึ้นด้วย ซึ่งในกรณีของการย่อยด้วยกรดนั้นอาจก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ร่วมที่ไม่ต้องการ เช่น เฟอร์ฟูรอล และสารประกอบฟีนอลิก เป็นต้น ซึ่งสารดังกล่าวเป็นอันตรายต่อเซลล์ *R. oryzae* และเป็นตัวยับยั้งกระบวนการหมักได้ (Woiciechowski et al., 1999) เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตในการทดลองนี้ไม่ได้มีการทดลองเพื่อกำจัดเกลือที่เกิดจากการปรับค่าพีเอชออกจากสารละลายที่ได้จากการ

ย่อยก่อนที่จะนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมัก ส่งผลให้กรดแลกติกที่ได้จากการใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์มาเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นมีปริมาณที่ต่ำ เกิดผลิตภัณฑ์พลอยได้ (กรดฟูมาริก) ในระหว่างการหมักของแหล่งคาร์บอนทั้งสองชนิดด้วยเช่นกัน การใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์มาเป็นแหล่งคาร์บอน (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 ซึ่งเซลล์จะเริ่มโตภายหลังจากชั่วโมงที่ 24 ของระยะการเจริญเติบโตเป็นต้นไป สังเกตได้จากค่าพีเอชที่เริ่มลดลง เนื่องจากเซลล์เริ่มมีการเจริญเติบโตและมีการผลิตกรดแลกติกออกมาจึงทำให้ค่าพีเอชลดลง ในขณะที่ภาวะอื่นนั้นเซลล์จะเริ่มโตตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 ของระยะการเจริญเติบโตเป็นต้นไป นอกจากนี้ ยังพบว่าทั้งสองภาวะนี้มีการผลิตเอทานอลเป็นปริมาณสูงกว่าการผลิตกรดแลกติก ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลเท่ากับ 12.95 และ 12.53 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่า ถึงแม้ว่าจะเราสามารถใช้อัตราส่วนที่พวกสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์กับ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลกติกได้ แต่ก็จำเป็นต้องมี กำจัดสิ่งเจือปน (detoxification) จำพวกสารยับยั้งในกระบวนการหมักเช่น กรดอะซิติก เฟอร์ฟูรอล ไฮดรอกซีเมทิล เฟอร์ฟูรอล(HMF) และเกลือ เป็นต้น (Zhao et al., 2009) เพื่อที่จะให้เชื้อมีประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ได้มากขึ้น

จากการทดลองพบว่า การหมักที่ใช้สับสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันจะสามารถผลิตกรดแลกติกได้ดีกว่าการหมักที่ใช้สับสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ ทั้งนี้เนื่องมาจากการที่สับสเตรทที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงอย่างเดียว ไม่มีการใช้สารเคมีซึ่งในที่นี้คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ในระหว่างขั้นตอนการปรับสภาพเข้ามาเกี่ยวข้อง ส่งผล ให้ไม่จำเป็นต้องมีการปรับค่าพีเอช ด้วยกรดและเบสเพื่อให้ได้พีเอชที่ต้องการ ก่อนที่จะนำไปเข้าสู่การย่อยด้วยเอนไซม์ต่อไป จึงไม่ก่อให้เกิดปริมาณของเกลือในสารละลายได้ ดังนั้นภาวะที่สารละลายที่ได้จากการย่อยของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูง ภายใต้ความดันเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น จึงมีความสามารถในการผลิตกรดแลกติกได้มากกว่า ส่งผลให้มีค่า yield และอัตราการผลิตกรดแลกติกที่สูงกว่าเช่นกัน ดังนั้นการนำกากมันสำปะหลังมาประยุกต์ในกระบวนการผลิตกรดแลกติกนั้น พบว่าการที่นำกากมันมาปรับ

สภาพด้วยเทคนิคการใช้ความถี่ อนุสูงภายใต้ความดันเพียงอย่างเดียวจะสามารถผลิตกรดแลกติกได้ใน ปริมาณระดับหนึ่ง (25.41 กรัมต่อลิตร) ไม่มีความจำเป็นต้องใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้าช่วย

ผลการทดลองจากงานวิจัยนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Thongchul et al. (2010) ซึ่ง ทำการศึกษาผลิตกรดแลกติก จาก กลูโคส สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดและ เอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน (ความเข้มข้นเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร) โดยการตรึงเซลล์ *R.oryzae* NRRL 395 บนเส้นใยผ้าฝ้าย ทำการหมักในขวดเขย่า พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 23.76 4.47 และ 15.43 กรัม ต่อลิตร 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 อัตราการผลิตเอทานอล เท่ากับ 0.29 0.60 และ 0.30 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ จากผลการทดลองเห็นได้ว่าการใช้กลูโคสเป็น แหล่งคาร์บอน จะสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุด เนื่องจากกากมันสำปะหลังประกอบด้วยโปรตีน ประมาณ 5.3 % ทำให้สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง มีปริมาณของโปรตีนสูงเช่นกัน ซึ่งเป็น การเพิ่มปริมาณของแหล่งไนโตรเจนอีกทางหนึ่ง ส่งผลให้ช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์ใน ระหว่างกระบวนการหมักมากขึ้นแทนที่จะไปสร้างเป็นกรดแลกติก และการทดลองนี้เป็นการหมักในระดับ ขวดเขย่า ทำให้ประสิทธิภาพของการถ่ายเทออกซิเจน ภายในขวดเขย่าไม่เพียงพอและมีการ เนื่องจาก *R. oryzae* เป็นราที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ ดังนั้นออกซิเจนจึงเป็นปัจจัย สำคัญวิธีกึ่งแบบอิมเมอร์ชันของเซลล์ ถ้าหากมีออกซิเจนไม่เพียงพอสาเหตุจากการกวนที่ไม่ทั่วถึง จะเปลี่ยนวิถี ไปสร้างเป็นผลิตภัณฑ์อื่น เช่น เอทานอล เป็นต้น (Zhang et al., 2007) ดังนั้น เราสามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ โดยการทำการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งจะสามารถควบคุมอัตราการปั่นกวนและให้อากาศอย่างทั่วถึง ส่งผลให้การถ่ายเทออกซิเจนและการผสมเป็นเนื้อเดียวกันของอาหารมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น สอดคล้องกับ งานวิจัยของ Tay and Yang (2002) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดย *R. oryzae* NRRL 395 ในถังปฏิกรณ์ ชีวภาพแบบ rotating fibrous-bed แบบ fed-batch โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงคิดเป็น $Y_{P/S}$ เท่ากับ 90% เนื่องจากมีการตรึงเซลล์บนเส้น ใยผ้าฝ้าย และมีการให้ออกซิเจนที่ทั่วถึง และงานวิจัยนี้พบว่าเมื่อทำการหมักโดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดย ใช้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตรเช่นกัน พบว่าสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตกรด แลกติก อีกทั้งช่วยลดปริมาณของการผลิตเอทานอลได้อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตาม สับสเตรทที่มาใช้เป็นแหล่ง คาร์บอนก็เป็นอีกปัจจัยสำคัญ ถ้าหากมีองค์ประกอบที่เป็นอุปสรรคต่อการผลิตกรดแลกติก ก็จะส่งผลให้ ประสิทธิภาพของการผลิตกรดแลกติกลดลงอีกด้วย โดยจะเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ร่วมคือ เอทานอล และกรดฟู มาริกแทน (John et al., 2007; Wee et al., 2006; Zhang et al., 2007)

ลักษณะการจัดเรียงตัวของเส้นใยของ *R. oryzae* บนวัสดุตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสตีค

เมื่อจบกระบวนการหมัก ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ตรึงบนวัสดุตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบด สติต ตัดให้ได้ขนาด 2.5×2.5 เซนติเมตร นำไปตรวจสอบลักษณะโดยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) พบว่า ลักษณะเส้นใยของ *R. oryzae* ที่เจริญบนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่บริเวณ ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติตที่กำลังขยาย 350 เท่า (รูปที่ 14) โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ได้แก่ กลูโคส สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูง ภายใต้ความดัน สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการ ใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมัน สำปะหลังด้วยกรด และสารละลายแป้ง พบว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 14(ก)) เซลล์มี ลักษณะเรียวยาวและลักษณะการเกิดกิ่งเล็กๆ (Fragmentation) ภายในหนึ่งสาย ซึ่งไม่แตกต่างกับแหล่ง คาร์บอนชนิดอื่นๆ โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 53.61 กรัมต่อลิตร แสดงว่าการใช้กลูโคสบริสุทธิ์เป็น แหล่งคาร์บอน เซลล์จะมีการเจริญเติบโตในลักษณะที่สมบูรณ์ที่สุดและสามารถผลิตกรดแลกติกได้มาก ที่สุด แต่อย่างไรก็ดี ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนก็ควรจะสูงตามไปด้วยเพื่อแสดงถึงการถ่ายเท อาหารและอากาศที่เพียงพอ

แต่เมื่อพิจารณาลักษณะเส้นใยของ *R. oryzae* ที่เจริญบนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่บริเวณ ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติตที่กำลังขยาย 750 เท่า พบว่าการใช้สารละลาย ที่ได้จากการย่อยด้วย เอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเป็นแหล่ง คาร์บอน (รูปที่ 15(ข)) เซลล์มีลักษณะอ้วน ยาวแต่บริเวณด้านปลายจะขาด เนื่องจากเซลล์มีการเจริญเติบโต ที่ค่อนข้างหนาแน่น โดยดูจากรูปที่ 10(ค) พบว่าเซลล์นั้น มีปริมาณมาก ทำให้ระยะห่างระหว่างเซลล์และ ไบพัดมีน้อย ส่งผลเซลล์เกิดการฉีกขาดจากแรงเฉือนจากไบพัดแต่อย่างไรก็ดีที่สภาวะนี้เซลล์ก็ยังสามารถ ผลิตกรดแลกติกได้ถึง 25.41 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาการใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับ สสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ สารละลายที่ได้จากการย่อย กากมันสำปะหลังด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าลักษณะเส้นใยของ *R. oryzae* ที่เจริญบนเส้น ใยผ้าฝ้าย ชนิดผ้าขนหนูที่บริเวณภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติตที่กำลังขยาย 750 เท่า (รูปที่ 15(ง) และ 15(จ)) เซลล์มีลักษณะที่ลึบแบนและมีผลึกมาเกาะอยู่ตัวเซลล์ และเมื่อทำการเพิ่มกำลังขยายเป็น 3500 เท่า (รูปที่ 16) พบว่าผลึกที่มาเกาะอยู่บนตัวเซลล์มีลักษณะเป็นรูปแฉกคล้ายลักษณะของผลึกของเกลือ (Fontana et al., 2011) และเมื่อทำการวิเคราะห์ หาธาตุงค์ประกอบของผลึกด้วยเครื่อง Energy Dispersive X-ray spectrometer (EDX) พบว่าประกอบไปด้วยธาตุคาร์บอนประมาณ 52% ออกซิเจนประมาณ 42% และ โซเดียมประมาณ 6% ซึ่งผลึกที่เกิดขึ้นนี้ส่งผลให้ความสามารถในการผลิตกรดแลกติกของสับสเตรททั้งสอง ชนิดนี้มีประสิทธิภาพลดลง เห็นได้ว่า ในภาวะนี้เซลล์ผลิตกรดแลกติกได้เพียง 7.63 และ 6.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาลักษณะการยึดเกาะของ *R. oryzae* บนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่บริเวณด้านนอกของเบดสติด แสดงดังรูปที่ 17 เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะของเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่ไม่มีเซลล์ (รูปที่ 17(ก)) กับเซลล์ที่ตรึงอยู่บนเส้นใย (รูปที่ 17(ข) ถึง รูปที่ 17(จ)) พบว่าเซลล์มีการยึดเกาะที่มั่นคง มีการพันเกี่ยวกันระหว่างเส้นใยของเซลล์และเส้นใยผ้าฝ้าย ทำให้ยากต่อการหลุดออกมาในระหว่างกระบวนการหมัก อันเนื่องมาจากแรงปั่นกววน การตรึงเซลล์สามารถช่วยเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ในการหมักระยะยาว และใช้พลังงานในการปั่นกววนและการให้อาหารน้อยลงเนื่องจากอาหารที่ใช้ในการหมักมีความหนืดต่ำ เพราะเซลล์ได้ถูกตรึงไว้แล้ว ด้วยเหตุนี้เองยังส่งผลให้การเก็บเกี่ยวผลผลิตก้นถังภายหลังเสร็จสิ้นกระบวนการหมักแล้วเป็นไปได้ง่ายขึ้น (Thongchul, 2005; Chotisubha-anandha et al., 2011)

เมื่อพิจารณาการใช้สารละลายแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน จากรูปที่ 17(ฉ) พบว่าการยึดเกาะของ *R. oryzae* บนเส้นใยผ้าฝ้าย ไม่แน่นอนหนาเหมือนกับการใช้สับสเตรท ชนิดอื่น เนื่องจากมีโมเลกุลของแป้งมาเกาะร่วมอยู่ด้วย เห็นได้จากมีเม็ดแป้งลักษณะกลมๆ (Chen et al., 2011) แทรกกระจัดกระจายอยู่ระหว่างตัวเซลล์และเส้นใย ทำให้เซลล์นั้นสามารถหลุดออกจากเส้นใยผ้าฝ้ายได้ง่าย ส่งผลต่อการเก็บเกี่ยวผลผลิตก้นถังภายหลังเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก และยังส่งผลให้น้ำหนักเซลล์แห้งของการใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นมีปริมาณสูงด้วย เนื่องจากมีน้ำหนักของโมเลกุลแป้งเกาะอยู่ที่ตัวเซลล์และบริเวณเส้นใยที่ยึดตรึง แต่อย่างไรก็ตามเซลล์ก็ยังสามารถผลิตกรดแลกติกได้ถึง 33.77 กรัมต่อลิตร

ปัจจัยทางวิศวกรรมที่เหมาะสมต่อการหมักกรดแอล-แลกติก

ลักษณะ และ โครงสร้างของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการทดลองขนาด 5 ลิตร และขนาด 90 ลิตร ดังนี้

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร			ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร		
เส้นผ่านศูนย์กลางถัง	160	mm	เส้นผ่านศูนย์กลางถัง	400	mm
เส้นผ่านศูนย์กลางใบพัด	64	mm	เส้นผ่านศูนย์กลางใบพัด	160	mm
ความเร็วรอบการกววน	20-1200	rpm	ความเร็วรอบการกววน	120-1200	rpm
อัตราการให้อากาศ	0-13	L/min	อัตราการให้อากาศ	>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)
F_l	1	8.49
F/V	1	0.54
$N_i D_i$	1 ($N_i D_i = 0.75$ m/s)	1.35 ($N_i D_i = 1.01$ m/s)
Re_i	1 ($Re_i = 47,704.91$)	3.40 ($Re_i = 161,980.04$)

จากผลการคำนวณ จะพบว่าหากออกแบบขยายสเกลโดยใช้กำลังมอเตอร์ต่อปริมาตร เป็นเกณฑ์ คงที่ ในการหมักกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร จะต้องใช้อัตราการกวน 380 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เพื่อให้ได้ผลผลิตศาสตร์ของ กระบวนการเทียบเคียงได้กับค่าที่ได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

เกณฑ์ที่ 2 อัตราการไหลวนของน้ำหมัก (F/V) คงที่

โดยสำหรับการปั่นกวนที่รุนแรง (turbulent region) ค่า F/V สามารถอธิบายได้ ดังนี้

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

เมื่ออัตราการไหลวนของน้ำหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพทั้งสองขนาดมีค่าเท่ากัน จะพบว่า ถังทั้งสองจะปั่น กวนที่ความเร็วรอบเดียวกัน คือ 700 รอบต่อนาที อย่างไรก็ตาม การปั่นกวนน้ำหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ขนาด 90 ลิตรที่ความเร็วรอบสูงขนาดนี้ จะก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนได้ เนื่องจาก การปั่นกวนที่ความเร็วรอบสูงเป็นที่มาของการเกิดฟอง ทำให้ต้องมีการใช้สารลดฟอง ซึ่งหากใช้ในปริมาณมากจะส่งผลต่อค่าการละลายของออกซิเจน และการเมแทบอลิซึมของเรา อีกทั้งการปั่นกวนที่ความเร็วสูง ยังใช้พลังงานสูงมาก ดังนั้น เกณฑ์คองที่นี้จึงไม่เหมาะสำหรับนำไปใช้ในการขยายสเกล

เกณฑ์ที่ 3 ความเร็วปลายใบพัดกวน (u_i) คองที่

ความเร็วปลายใบพัดกวน แปรผันกับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัดและความเร็วรอบในการกวน ดังนี้

$$u_i \propto N_i D_i$$

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)
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_l/V	1	0.4
$N_i D_i$	1 ($N_i D_i = 0.75$ m/s)	1 ($N_i D_i = 0.75$ m/s)
Re_i	1 ($Re_i = 47,704.91$)	2.50 ($Re_i = 119,262.28$)

จากผลการคำนวณ จะพบว่าหากออกแบบขยายสเกลโดยใช้ความเร็วปลายใบพัดกวนเป็นเกณฑ์คองที่ ในการหมักกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร จะต้องใช้อัตราการกวน 280 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เพื่อให้ได้जनผลผลิตของกระบวนการเทียบเคียงได้กับค่าที่ได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

เกณฑ์ที่ 4 ค่า Reynolds' number (Re_i) คองที่

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_i	1	2.5
F/V	1	0.16
$N_i D_i$	1 ($N_i D_i = 0.75$ m/s)	0.4 ($N_i D_i = 0.3$ 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 และ อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เพื่อให้ได้จลนพลศาสตร์ของ กระบวนการเทียบเคียงได้กับค่าที่ได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

การเตรียมสารละลายจากการย่อยกากมันสำปะหลังในระดับนำร่อง

ในการเตรียมสารละลายจากการย่อยกากมันสำปะหลังในระดับนำร่องสำหรับนำไปใช้ในกา รหมัก กรดแอล-แลกติกต่อไปนั้น มีขั้นตอนการดำเนินงานที่แตกต่างไปจากการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ ในช่วงแรกของการทดลองในระดับนำร่อง ได้ทำการแปรผันเพื่อเปรียบเทียบขั้นตอนการย่อย โดยนำกากมัน สดที่เก็บตัวอย่างจากบริษัทสวนวงศ์ จำกัด โดยเริ่มจากกากมันความเข้มข้นเริ่มต้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก แห้งต่อปริมาตรทั้งหมด) ภาวะที่ใช้ทดสอบ คือ การใช้ความร้อนพร้อมแรงดัน (autoclave) นาน 15 นาที เติม เซลลูโลส 33.15 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง ที่ค่าพีเอช 4.6 – 5.0 ที่ 50 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง และ เติมอะ ไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง ที่ค่าพีเอช 5.4 – 5.8 ที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ได้ผลดังแสดง ในตารางที่ 5 จากการทดลอง พบว่า การย่อยกากมันโดยการย่อยกากมันโดยเริ่มย่อยด้วย cellulose ก่อน

amylase จะให้ผลดีกว่าการเริ่มย่อยด้วย amylase โดยการ autoclave ก่อนทำการย่อยจะให้ผลดีที่สุด ตามลำดับดังนี้ autoclave → cellulase → amylase จะให้ผลดีที่สุด ในลำดับรองลงมาคือการย่อยด้วย cellulase ก่อน หลังจากนั้น การย่อยด้วย amylase หรือ autoclave ก่อนหรือหลังจะให้ผลใกล้เคียงกัน อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถทำการทดลองด้วยขั้นตอน autoclave → amylase → cellulase เนื่องจากกากมันจับกันเป็นก้อนจากความร้อนทำให้ไม่สามารถกวนได้

เมื่อได้ขั้นตอนที่เหมาะสมในการปรับสภาพและย่อยกากมันในระดับนําร่องแล้ว จึงทำการเพิ่มปริมาณของกากมันสดเริ่มต้นที่ใช้ ดังแสดงในตารางที่ 6 และ 7 โดยศึกษาเปรียบเทียบ glucose recovery ที่ได้จาก 2 วิธี โดยพบว่า เมื่อนำกากมันไปเปิดโครงสร้างด้วยอุณหภูมิและความดันสูงก่อนนำไปย่อยต่อด้วย เอนไซม์ทั้งสองชนิด ให้สารละลายกลูโคสที่มีความเข้มข้นสูงที่สุด และมี % recovery ของกลูโคสสูงเพียงพอที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักต่อไป จากผลการทดลองปรับสภาพและย่อยกากมันในระดับนําร่อง ทำให้ได้ภาวะที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้เตรียมแหล่งคาร์บอนเพื่อนำไปใช้ในการหมักกรดแอล-แลกติกในระดับนําร่องต่อไป คือ ความเข้มข้นเริ่มต้นของกากมันที่ 7.5 เปอร์เซ็นต์ นำมาปรับสภาพที่อุณหภูมิ 110 – 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 บรรยากาศ เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปย่อยต่อด้วยเซลลูเลสที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 100 องศาเซลเซียส ก่อนเติมอะไมเลส ทำการรักษาอุณหภูมิ 15 นาที เพื่อให้อะไมเลสย่อยสายโพลิไกลิแซคคาไรด์ที่หลุดออกจากโครงสร้างของกากมันให้เป็นกลูโคส และในขณะเดียวกันทำการฆ่าเชื้อสารละลายที่เตรียมได้ เพื่อนำไปใช้ในการหมักกรดแอล-แลกติกได้ทันที

ข้อสรุป

จากผลการทดลองในขั้นตอนการแปรอัตราการปั่นกวนและอัตราการให้อากาศในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด เห็นได้ชัดว่าการตรึงเซลล์ *R. oryzae* บนฝ้ายขนหนูช่วยในการควบคุมสัณฐานของราเส้นใยให้อยู่ในภาวะที่เหมาะสมต่อภาวะการเจริญและการผลิตกรดแลกติก โดยในระบบเซลล์ตรึงมีอัตราการถ่ายเทออกซิเจนที่สูงขึ้นเมื่อเทียบกับค่าที่ได้ในถังกวนที่ควบคุมที่อัตราการปั่นกวนและอัตราการให้อากาศเท่ากัน อีกทั้งยังได้ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแอล-แลกติกเพื่อนำไปใช้ในการประเมินและออกแบบขยายสเกลการผลิตต่อไป (700 รอบต่อนาที 0.5 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที)

ในขั้นตอนการเตรียมกากมันสำปะหลังเพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักกรดแอล-แลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด พบว่าหากมีการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเพื่อเป็นการทำลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ตามด้วยการย่อยสลายโครงสร้างเซลลูโลสด้วยอะไมเลสจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของอะไมเลสที่เข้าไปย่อยแอมูลแป้งที่ติดอยู่ในกากมันได้ดียิ่งขึ้น ในขณะที่การใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ช่วยในการปรับสภาพกลับส่งผลต่อการนำไปย่อยต่อด้วยเซลลูเลสและอะไมเลส เนื่องจากภาวะความเป็นด่างสูงหลังจากการปรับสภาพ ทำให้ต้องเติมกรดเพื่อปรับค่าพีเอชให้

เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไป ซึ่งเกลือที่เกิดขึ้นจากการปรับพีเอชอาจส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ทำให้ไม่สามารถย่อยโครงสร้างเซลลูโลสและแกรนูลแป้งได้ดีนัก

เมื่อนำสารละลายที่ได้จากการย่อยมันสำปะหลังด้วยวิธีต่างๆ กันมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักกรดแลกติกโดย *R. oryzae* เทียบกับการใช้กลูโคส สารละลายแป้ง พบว่า สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกาก มันสำปะหลัง ทั้งที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันและที่ไม่ได้ปรับสภาพ ให้ผลผลิตกรดแลกติกใกล้เคียงกับการหมักโดยกลูโคส และสารละลายแป้ง สำหรับสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมทั้งสารละลายแอลคาไลน์ และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด ให้ผลผลิตกรดแลกติกต่ำ นอกจากนี้ ยังพบว่า เกิดผลิตภัณฑ์พลอยได้ (กรดฟูมริก) ระหว่างการหมัก และปริมาณเซลล์มากกว่าในภาวะอื่นๆ

จากการคำนวณเพื่อการขยายสเกลการผลิตกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร โดยใช้เกณฑ์คงที่หลัก 4 เกณฑ์ พบว่า การกำหนดให้อัตราการไหลวนของน้ำหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นเกณฑ์คงที่ ไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการทดลองระดับนำร่อง เนื่องจาก อัตราการปั่นกววนที่จะใช้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร มีค่าสูงมากเกินไป

จากการทดลองเตรียมสารละลายกลูโคสจากการปรับสภาพและย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ ได้ภาวะที่เหมาะสมที่มีความแตกต่างไปจากผลการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากการในภาวะดังกล่าวในระดับนำร่อง จำเป็นต้องพิจารณาปัจจัยเรื่องการใช้พลังงานเป็นส่วนประกอบด้วย เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดต้นทุนในการผลิตสูงมากเกินไป

ข้อเสนอแนะ

ข้อมูลเบื้องต้นที่ได้จากการทดลองรวมถึงข้อมูลการคำนวณขยายสเกล สามารถนำไปใช้ในการทดลองการหมักกรดแลกติกจากกากมันสำปะหลังในระดับนำร่องต่อไป เพื่อคัดเลือกพารามิเตอร์ที่เหมาะสมที่สุดในการขยายสเกล การหมักกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสตีต 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 Heuvel 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 *actinomyces*. *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. Enhancement of the enzymatic digestibility sugarcane bagasse by alkali-peracetic acid pretreatment. *Enzyme and Microbial Technology*, 44: 17-23.

ตารางที่ 1 ปริมาณเซลล์ของ *R. oryzae* ในการหมักด้วยกลูโคส และอัตราการถ่ายเทออกซิเจนใน กระบวนการที่อัตราการปั่นกวนและอัตราการให้อากาศต่างๆ กัน ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด

Aeration (vvm)	Agitation (rpm)	Impeller tip speed (m/s)	Total cell biomass (g)	$K_L a$ (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 ผลของการปั่นกววนและการให้อากาศต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเซลล์ตรึงของ *R. oryzae* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด

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	
	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 ผลของการปั่นกววนและการให้อากาศต่อการผลิตผลิตภัณฑ์พลอยได้เอทานอลโดยเซลล์ตรึงของ *R. oryzae* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด

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	
	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 เปรียบเทียบการผลิตกรดแลคติกและการหมักแบบเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติดที่ภาวะต่างๆ (ปริมาณน้ำหมักเริ่มต้น 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 _L a (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

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบภาวะที่ใช้ในการปรับสภาพและย่อยกากมันสำปะหลังในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร

Tested conditions	Glucose conc (g/L)	Total glucose conc after hydrolysis (g/L)	Recovery ratio (g glc/g dry pulp)	Ref #
Autoclave → Cellulase → Amylase	12.6	30.2	0.61	B2
Amylase → Autoclave → Cellulase	0.47	4.0	0.08	B3
Cellulase → Amylase → Autoclave	0.62	27.4	0.55	B4
Cellulase → Autoclave → Amylase	0.26	26.6	0.53	B5

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังที่ใช้เมื่อนำมาย่อยด้วยเซลลูเลส ตามด้วยการปรับโครงสร้างภายใต้ความร้อน และความดันสูง และย่อยต่อด้วยอะไมเลสในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร

Initial cassava pulp loading (% dry weight)	Source	Glucose conc (g/L)	Total glucose conc after hydrolysis (g/L)	Recovery ratio (g glc/g dry pulp)	Ref #
5.0%	Sanguan Wongse	0.26	26.6	0.53	B5
7.5%	Sanguan Wongse	2.40	40.6	0.54	B7

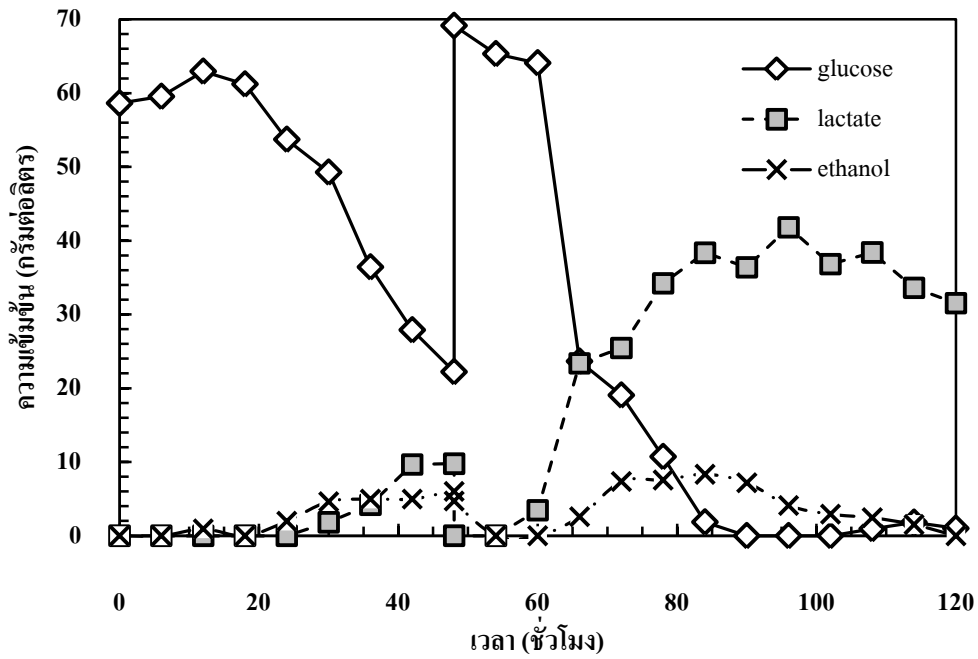
หมายเหตุ กากมันสำปะหลังที่ใช้ ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท สงวนวงศ์ จำกัด

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังที่ใช้เมื่อนำมาผ่านการปรับโครงสร้างภายใต้ความร้อน และความดันสูง แล้วย่อยด้วยเซลลูเลสและอะไมเลส ตามลำดับในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร

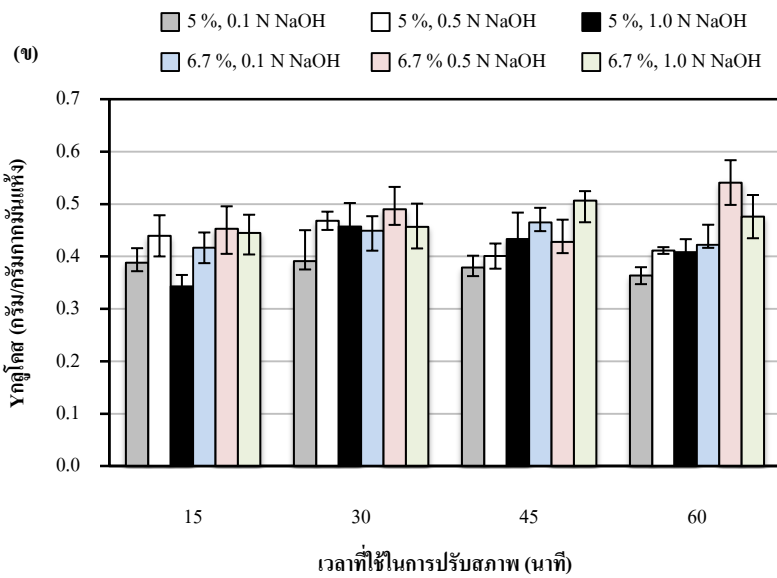
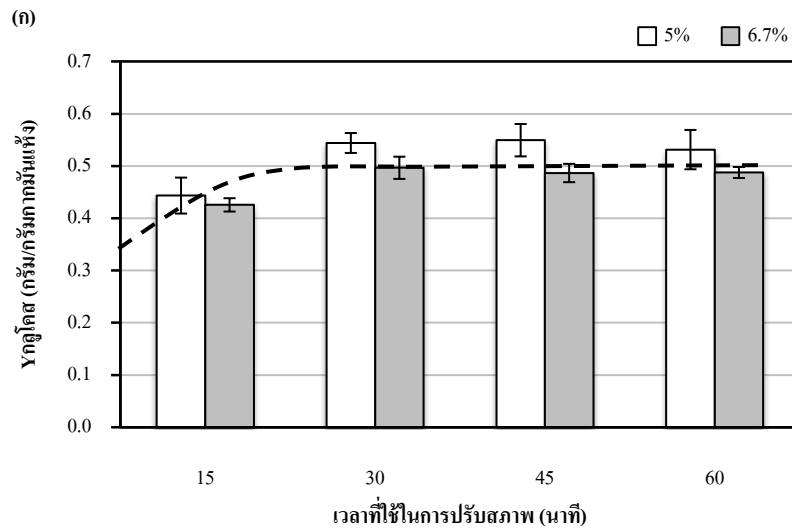
Initial cassava pulp loading (% dry weight)	Source	Glucose conc (g/L)	Total glucose conc after hydrolysis (g/L)	Recovery ratio (g glc/g dry pulp)	Ref #
5.0%	Sanguan Wongse	12.6	30.2	0.61	B2
	Eiam Heng	1.69	34.0	0.68	B10
7.5%	Sanguan Wongse	2.08	39.3	0.52	B6
	Eiam Heng	2.23	50.3	0.67	B11
10.0%	Sanguan Wongse	3.47	45.4	0.45	B8
	Eiam Heng	3.74	58.5	0.59	B9



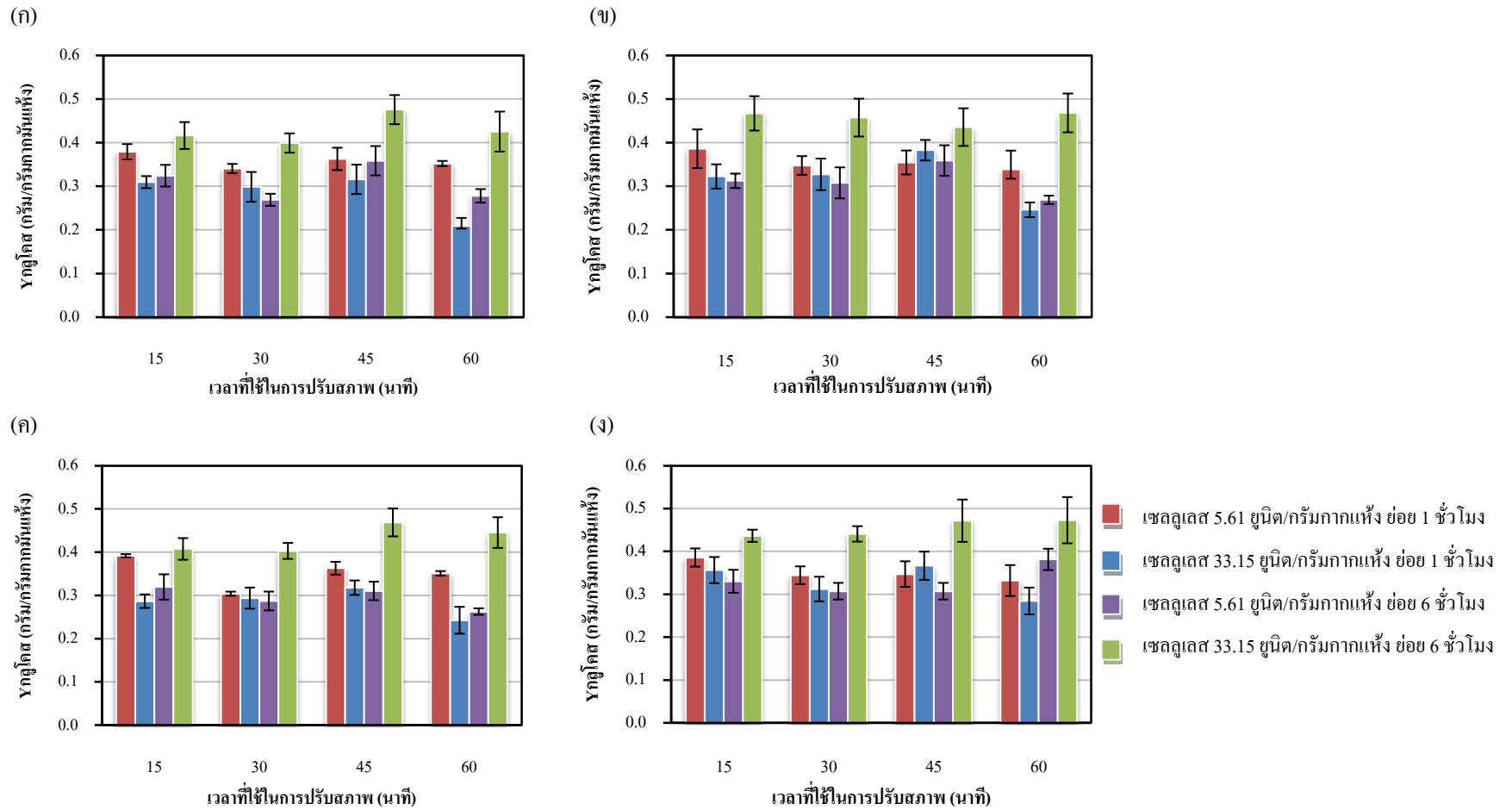
รูปที่ 1 ลักษณะพื้นฐานของ *R. oryzae* ที่ตรึงบนผ้าขนหนูในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด



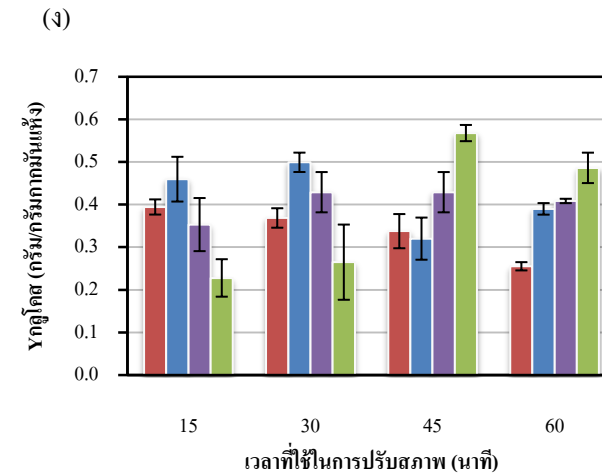
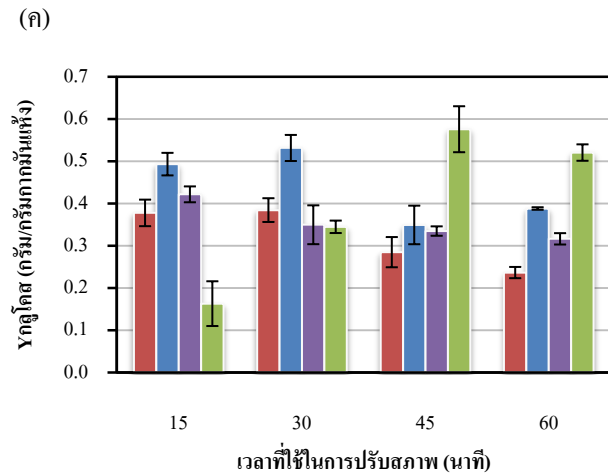
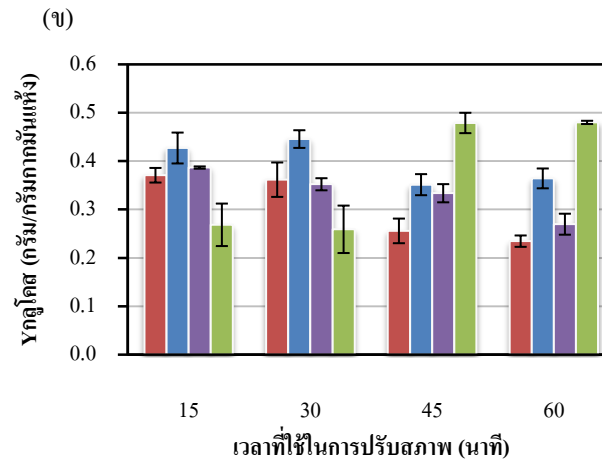
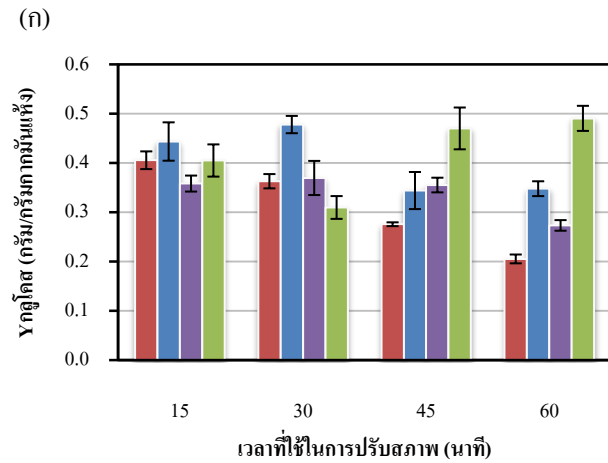
รูปที่ 2 จลนพลศาสตร์ของการหมักกรดแลคติกจากกลูโคสโดยเซลล์ตรึงของ *R. oryzae* บนฟ้ายخنหนู ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติดที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 ความเร็วการปั่นกวน 700 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที



รูปที่ 3 yield ของกลูโคส (กรัมต่อกรัมกากมันแห้ง) ในสารละลายที่แยกออกมาภายหลังการปรับสภาพด้วย (ก) การใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (steam pretreatment) และ (ข) การใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน พร้อมกับการใช้สารละลายแอสคาโลน (steam with combination of alkaline treatment)

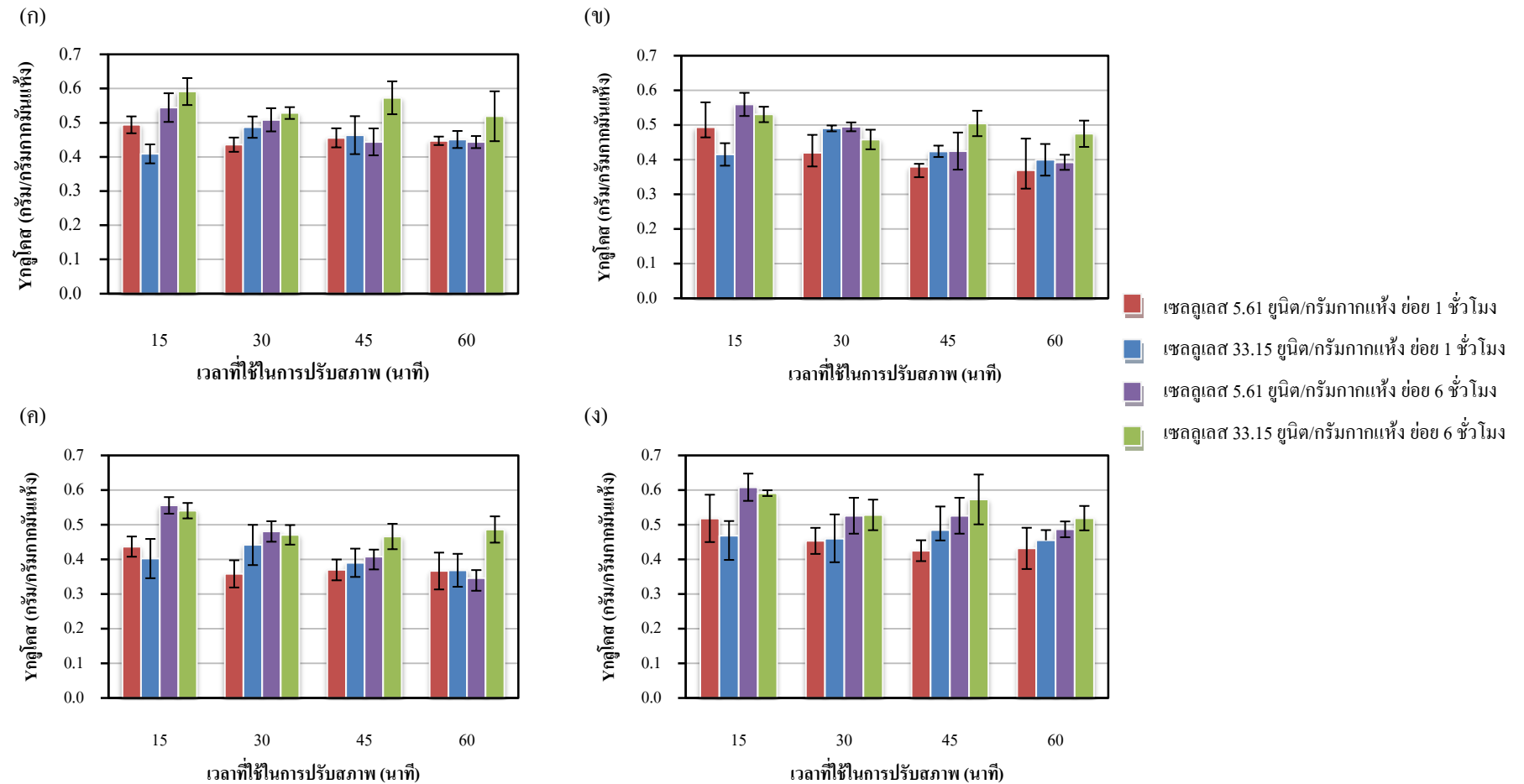


รูปที่ 4 yield ของกลูโคสภายหลังการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน ความเข้มข้นของกากมัน 5% จากนั้นนำมาทำการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และอะไมเลส (ก) อะไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 15 นาที (ข) อะไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 30 นาที (ค) อะไมเลส 33.6 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง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

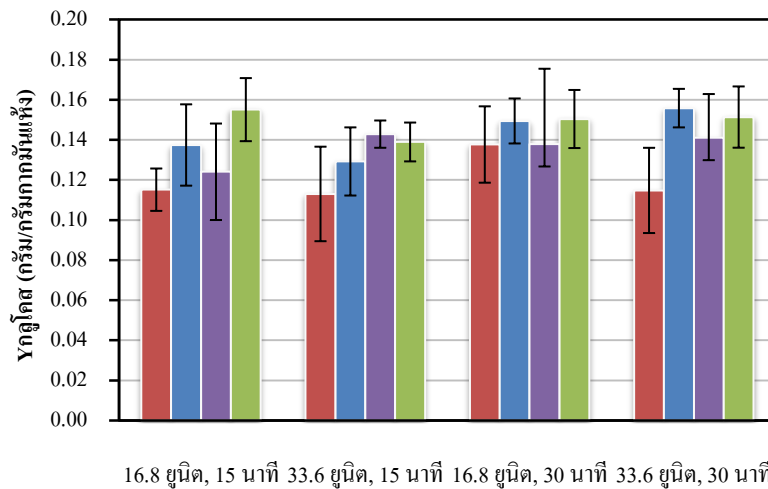


เซลล์ลอส 5.61 ยูนิต/กรัมกากแห้ง ย่อย 1 ชั่วโมง
 เซลล์ลอส 33.15 ยูนิต/กรัมกากแห้ง ย่อย 1 ชั่วโมง
 เซลล์ลอส 5.61 ยูนิต/กรัมกากแห้ง ย่อย 6 ชั่วโมง
 เซลล์ลอส 33.15 ยูนิต/กรัมกากแห้ง ย่อย 6 ชั่วโมง

รูปที่ 5 yield ของกลูโคสภายหลังการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน ความเข้มข้นของกากมัน 6.7% จากนั้นนำมาทำการย่อยด้วยเอนไซม์เซลล์ลอส 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



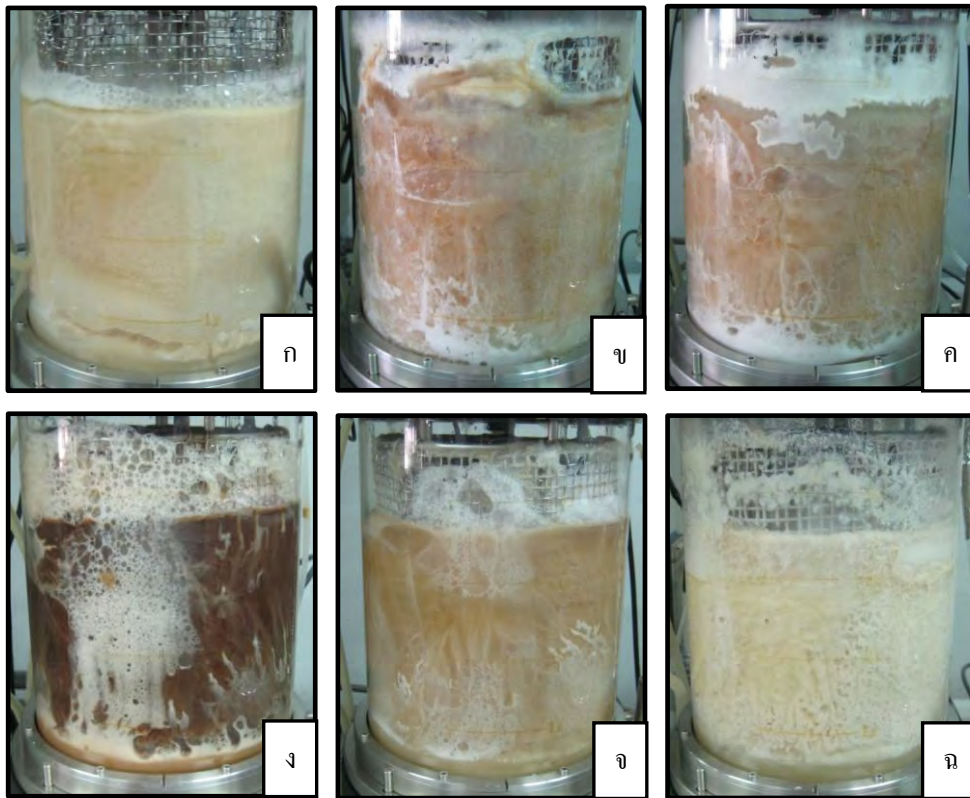
รูปที่ 6 yield ของกัญโคสภายหลังจากการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน ความเข้มข้นของกากมัน 20% จากนั้นนำมาทำการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูโลส และอะไมเลส (ก) อะไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 15 นาที (ข) อะไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง 30 นาที (ค) อะไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากแห้ง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



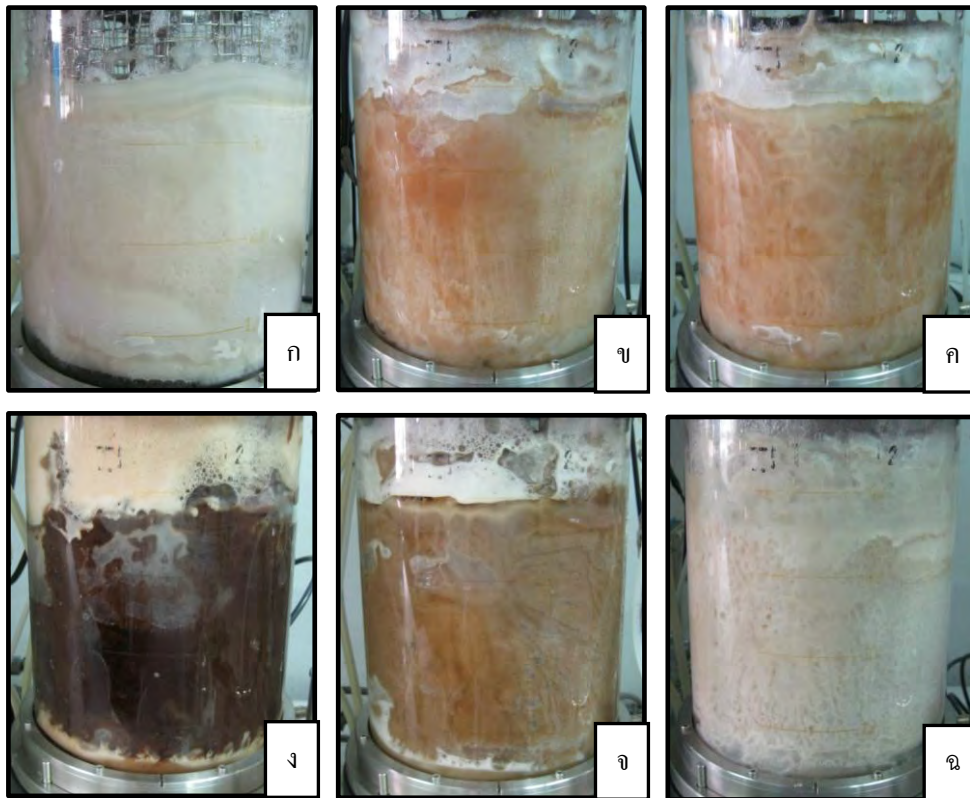
ปริมาณของอะไมเลส (ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง) และระยะเวลาในการบ่ม

- เซลลูเลส 5.61 ยูนิต/กรัมกากแห้ง ย่อย 1 ชั่วโมง
- เซลลูเลส 33.15 ยูนิต/กรัมกากแห้ง ย่อย 1 ชั่วโมง
- เซลลูเลส 5.61 ยูนิต/กรัมกากแห้ง ย่อย 6 ชั่วโมง
- เซลลูเลส 33.15 ยูนิต/กรัมกากแห้ง ย่อย 6 ชั่วโมง

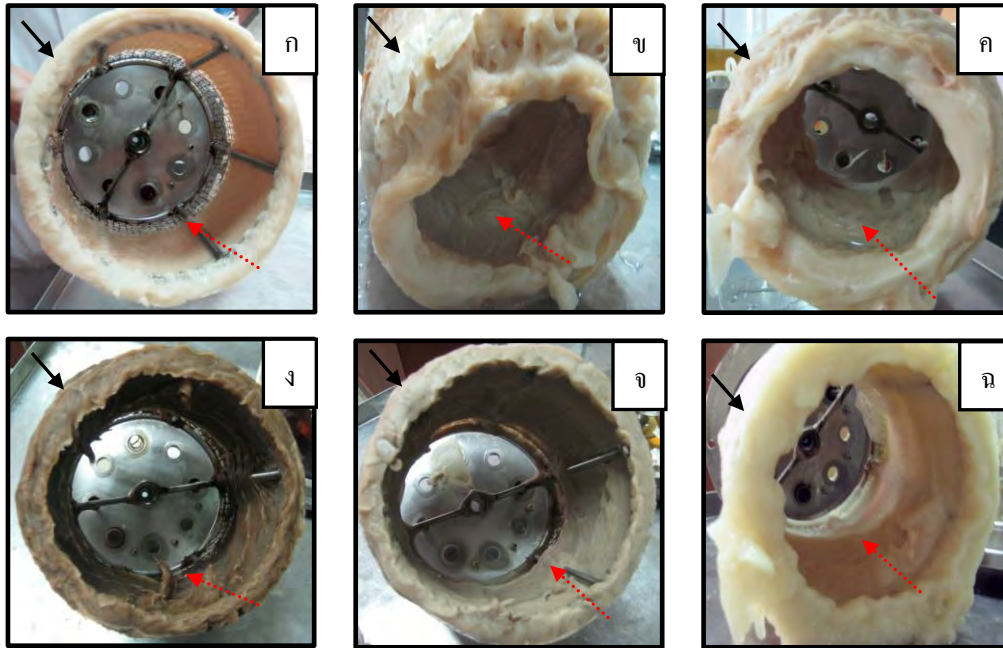
รูปที่ 7 yield ของกลูโคสภายหลังจากการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.5 N) ความเข้มข้นของกากมัน 6.7% จากนั้นนำมาทำการย่อยต่อด้วยเซลลูเลสที่ 50 องศาเซลเซียส แล้วตามด้วยอะไมเลสที่ 100 องศาเซลเซียส



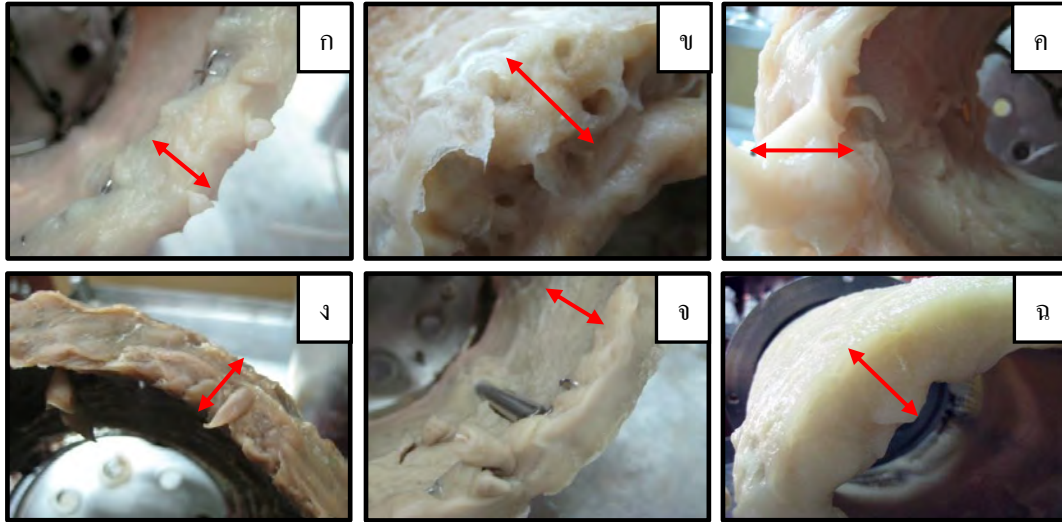
รูปที่ 8 ลักษณะพื้นฐานของ *R. oryzae* ที่ถูกตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ในระยะการเจริญเติบโตที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ของการใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด ได้แก่ (ก) กลูโคส (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภา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



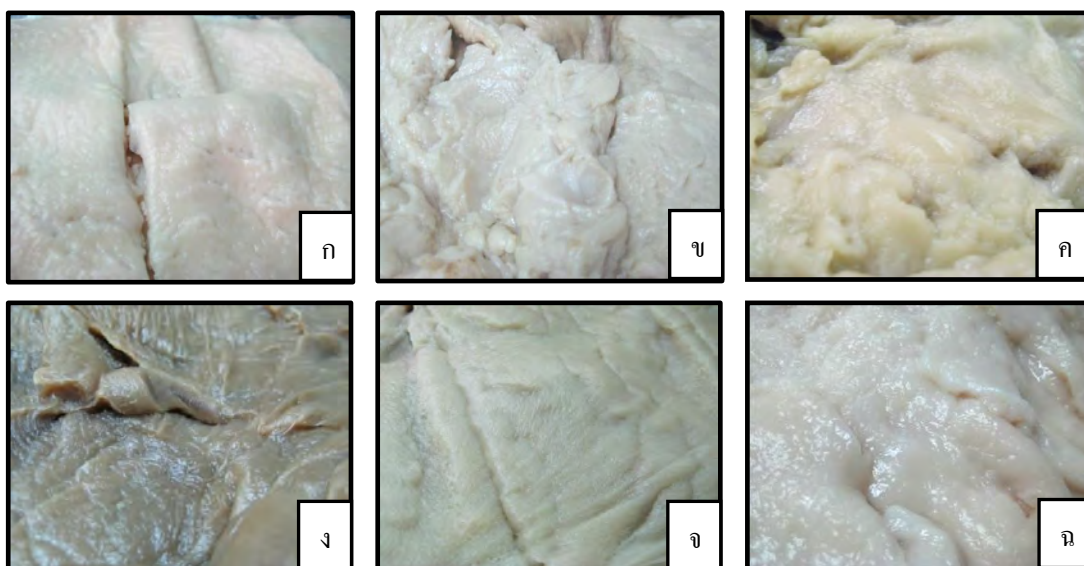
รูปที่ 9 ลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ที่ถูกตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ในระยะการสร้างผลิตภัณฑ์ที่เวลาการหมัก 96 ชั่วโมง ของการใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด ได้แก่ (ก) กลูโคส (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับส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



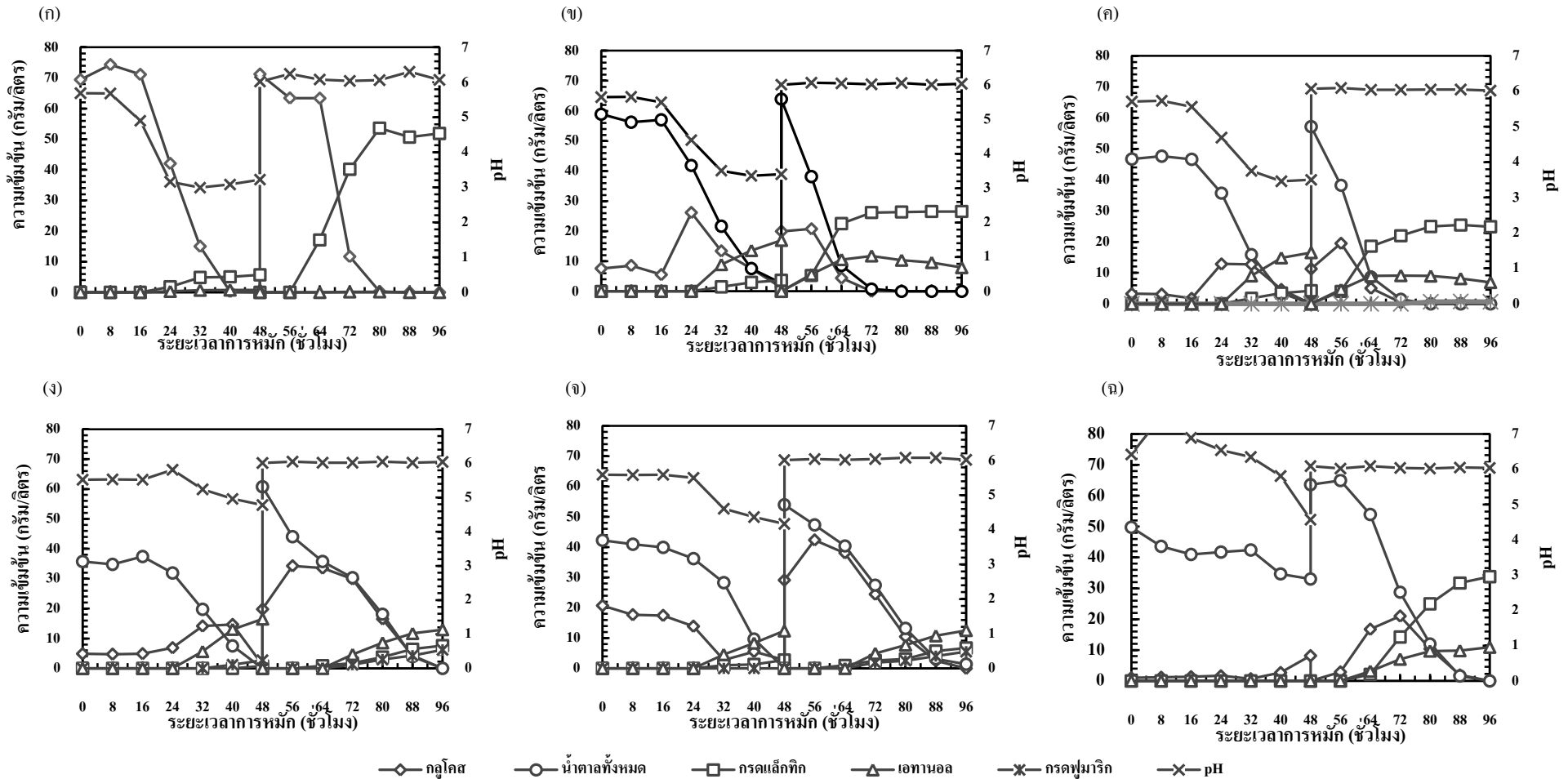
รูปที่ 10 ลักษณะการยึดเกาะของเซลล์บนเบดสติด้านนอก (ลูกศรสีดำ) และด้านใน (ลูกศรสีแดง) ของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ของการใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด ได้แก่ (ก) กลูโคส (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ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



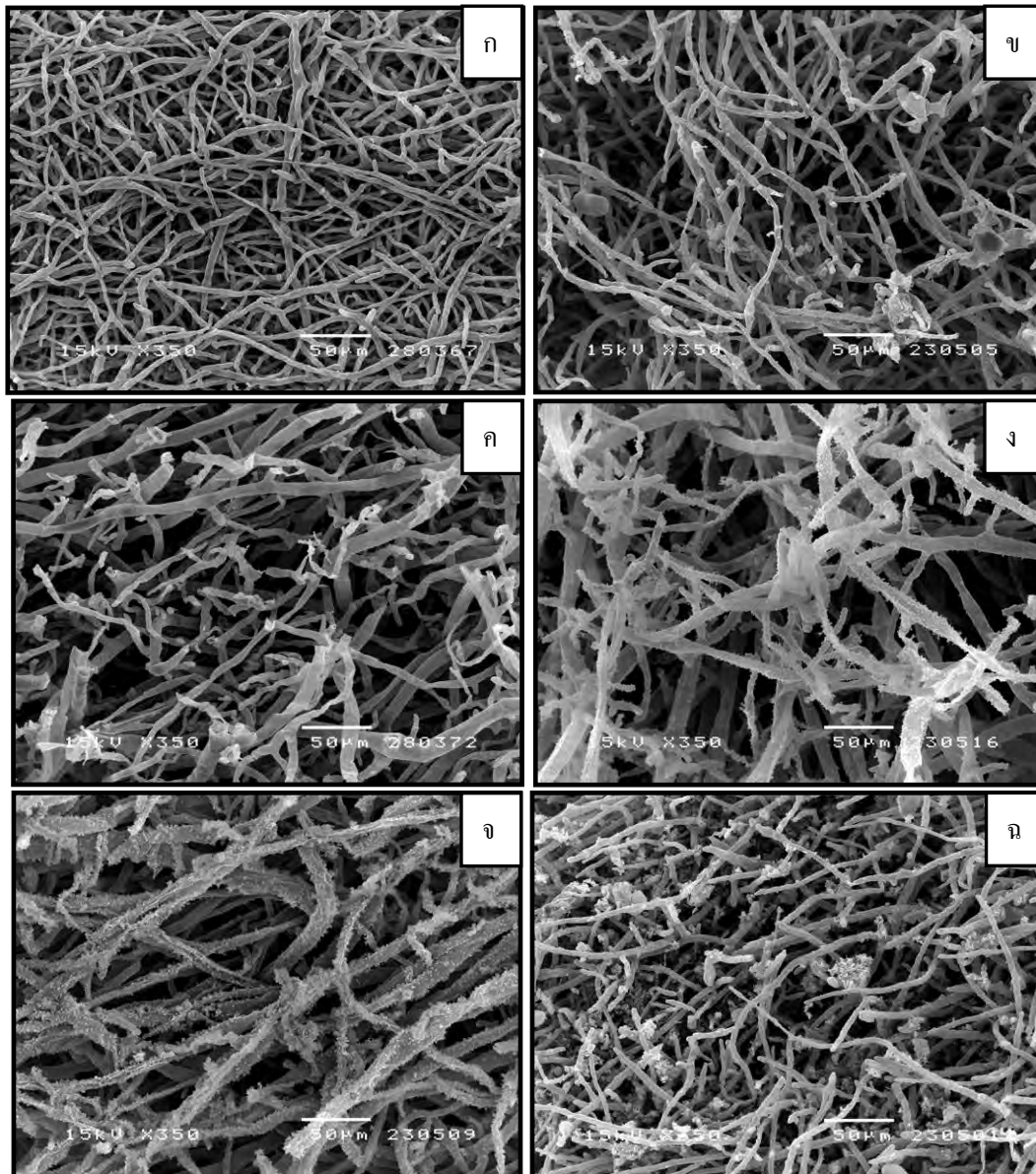
รูปที่ 11 ความหนาของเซลล์ของ *R. oryzae* (เส้นสีแดง) ที่ถูกตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ของการใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด ได้แก่ (ก) กลูโคส (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ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



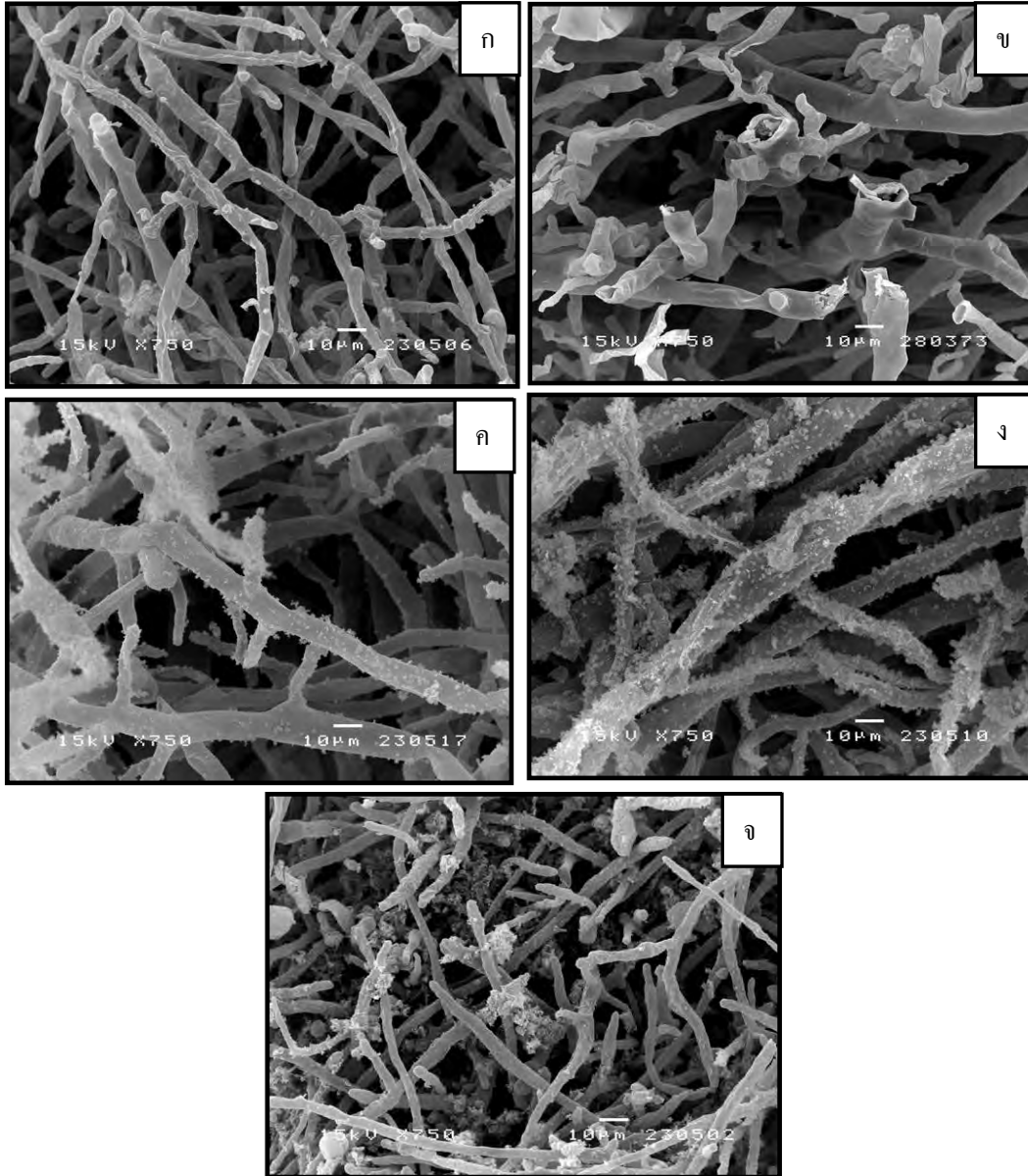
รูปที่ 12 ลักษณะเซลล์ *R. oryzae* ที่ตรึงอยู่ด้านในของเบดสติดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ของการใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด ได้แก่ (ก) กลูโคส (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ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



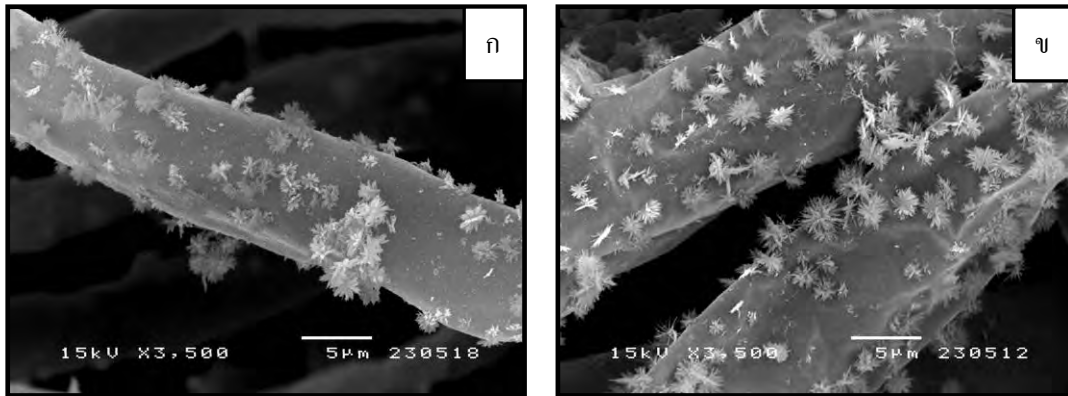
รูปที่ 13 จลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแล็กติกโดย *R. oryzae* อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ของแหล่งคาร์บอน 6 ชนิด ได้แก่ (ก) กลูโคส (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์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



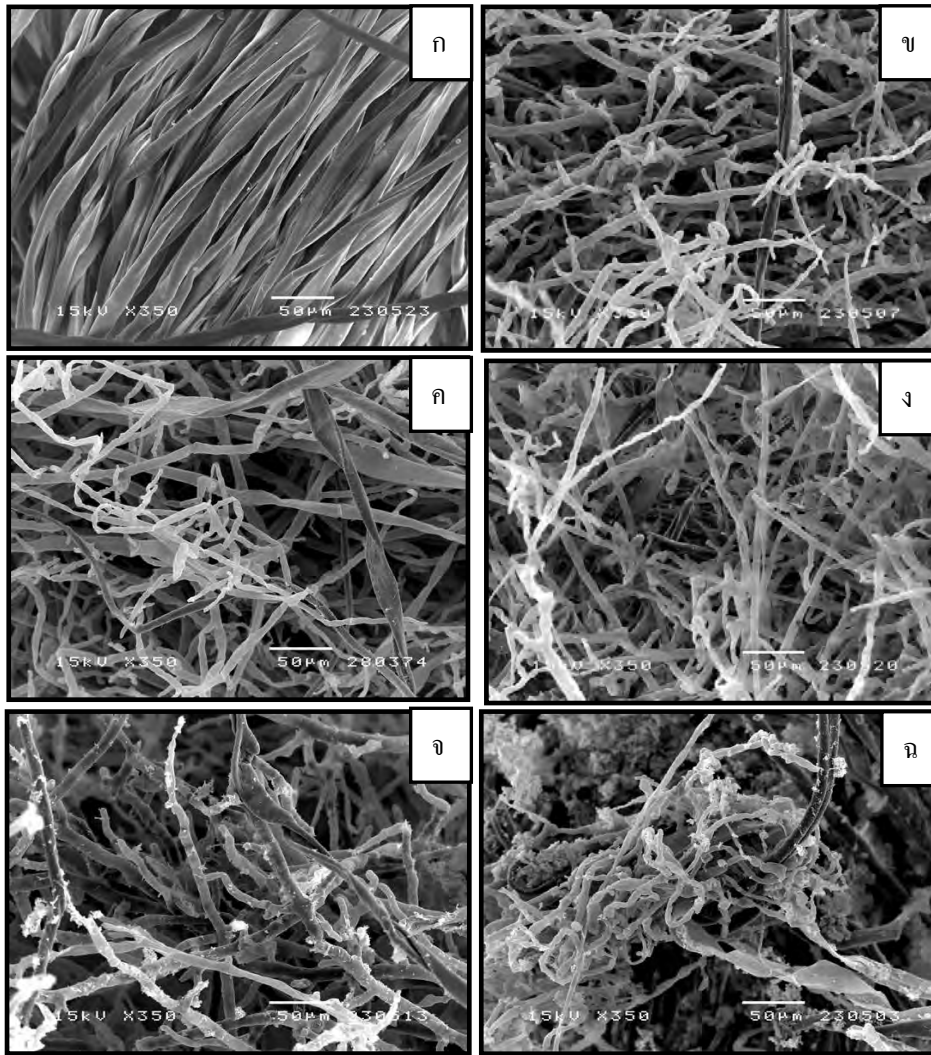
รูปที่ 14 ลักษณะของเซลล์ *R. oryzae* บริเวณด้านในของเบดสติดที่กำลังขยาย 350 เท่า โดยใช้ (ก) กลูโคส (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วย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



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



รูปที่ 16 ลักษณะของเซลล์ *R. oryzae* บริเวณด้านในของเบดสติดที่กำลังขยาย 3,500 เท่า โดยใช้ (ก) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนสูง ภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ และ (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมัก



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

ประวัตินักวิจัย

หัวหน้าโครงการ

- 1) ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) นาย นาง นางสาว ยศ.....นางสาวณัฐา ทองจุล.....
ชื่อ-นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr., Mrs., Miss, Rank.....Miss Nuttha Thongchul.....
- 2) เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน..... 3 1201 01630 20 8.....
- 3) ตำแหน่งปัจจุบัน.....ผู้ช่วยศาสตราจารย์.....
- 4) หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์
อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)
.....สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.....
.....อาคารสถาบัน 3 ถ.พญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330.....
โทรศัพท์..... 0 2218 8073..... โทรสาร 0 2253 3543..... e-mail..... Nuttha.T@chula.ac.th.....

5) ประวัติการศึกษา

มหาวิทยาลัย	ปริญญา	สาขาวิชา	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
The Ohio State University	Doctor of Philosophy	Chemical Engineering	2548
Asian Institute of Technology	Master of Engineering	Bioprocess Technology	2541
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต	วิศวกรรมเคมี	2538

- 6) สาขาวิชาที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
Biotechnology, Bioengineering, and Bioprocessing; emphasizing on development of novel
fermentation and bioseparation processes to produce value-added products such as organic acid from
low-value substrates locally available.....
- 7) ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิ จัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพใน
การทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย
ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย: ชื่อแผนงานวิจัย..... -.....
หัวหน้าโครงการวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย
- Improved lactic acid fermentation by immobilization of *Rhizopus oryzae* NRRL395 on fibrous
matrices: I. strain improvement. (Ratchadapiseksomphot Endowment Fund – Seed Money Phase I;
120,000 Baht; 2005-2006)

- Improved L-lactic acid production by *Rhizopus oryzae* by alteration of metabolic pathway using promoter and/or inhibitor. (Ratchadapiseksomphot Endowment Fund – Seed Money Phase II; 120,000 Baht; 2007-2009)
- L(+)-lactic acid fermentation from cassava pulp by *Rhizopus oryzae*. (Thailand Research Fund – Seed Money; 480,000 Baht; 2007-2009)
- Enhanced treatment of hemorrhage from open wounds by biodegradable copolymer wound dressing device containing Thai medicinal plant extract. (Rapier-Behr Co., Ltd., Singapore; 1,811,200 Baht; 2008-2010)
- Enhanced L(+)-lactic acid production by inhibition of alcohol dehydrogenase in *Rhizopus oryzae*. (TRF-MAG Window II Co-funding; 200,000 Baht; 2008-2010)
- Screening of Thai native bacteria that give high lactic acid production. (Musashino Chemical Laboratory, Ltd., Japan; 1,985,000 Baht; 2009-2010)
- Stopping hemorrhage by biodegradable copolymer wound dressing (prelim). (National Research University Project of CHE and Ratchadapiseksomphot Endowment Fund (AM007D); 320,000 Baht; 2010-2011)
- Facility use and experimental support regarding ethanol fermentation using a sugarcane molasses material. (Iwata Chemical Co., Ltd., Japan; 750,000 Baht; 2010)
- Pilot scale production of L-lactic acid from raw cassava pulp by *Rhizopus oryzae*. (National Research Council of Thailand via Ratchadapiseksomphot Endowment Fund; 400,000 Baht; 2010-2011)
- Development of alternated technology for production of polylactic acid feedstock. (National Research University Project of Commission on Higher Education and Ratchadapiseksomphot Endowment Fund; 300,000 Baht; 2010-2011)
- Technological development for biosuccinic acid production from renewable feedstocks available in South East Asia. (PTT Chemical Public Company Limited; 400,000 Baht; 2011-2012)
- Development of alternated technology for production of polylactic acid feedstock (Phase II). (National Research University Project of Commission on Higher Education and Ratchadapiseksomphot Endowment Fund; 300,000 Baht; 2011-2012)
- Technological development for the pilot scale biosuccinic acid production from renewable feedstocks available in South East Asia. (PTT Global Chemical Public Company Limited; 400,000 Baht; 2012-2013)

ผู้ร่วมวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย

- Pilot-scale production of poly(β -hydroxybutyric acid) from sugarcane molasses by *Bacillus megaterium* BA-019. (Mitr Phol Sugarcane Research Center and National Innovation Agency; 1,629,700 Baht; 2007-2008)
- Production of single cell protein and product thereof by *Hansenula polymorpha* IBGE HP-5001 using glycerol containing wastes discharged from biodiesel manufacturing process. (PTT Chemical Public Company Limited; 3,359,800 Baht; 2007-2009)

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว: ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

Refereed Journal (* Corresponding author)

- **Thongchul N.**, Yang S.-T.*, 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*, 2006, **37** 1-13. (ทุนปริญญาชั้นสูง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
- Kulpreecha S.*, Boonruangthavorn A., Meksiriporn B., **Thongchul N.**, Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009, **107** 240-245. (บริษัท มิตรผล วิจัยและพัฒนา อ้อยและน้ำตาล จำกัด และสำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ)
- Boonkong W., Sangvanich P., Petsom A., **Thongchul N.***, Comparison of ion exchanger and in-house electrodialysis unit for recovery of L-lactic acid from fungal fermentation broth. *Chemical Engineering & Technology*, 2009, **32** 1542-1549. (ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)
- **Thongchul N.***, Navankasattusas S., Yang S.-T., Production of lactic acid and ethanol by *Rhizopus oryzae* integrated with cassava pulp hydrolysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2010, **33** 407-416. (ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ สกอ. / สกว.)
- Chotisubha-anandha N., Thitiprasert S., Tolieng V., **Thongchul N.***, Improved oxygen transfer and increased L-lactic acid production by morphology control of *Rhizopus oryzae* in a static bed bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2011, **34** 163-172. (ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ และกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

- Vallapa N., Wiarachai O., Thongchul N., Pan J., Tangpasuthadol V., Kiatkamjornwong S., Hoven V.P.*, Enhancing antibacterial activity of chitosan surface by heterogeneous quarternization. *Carbohydrate Polymers*, 2011, **83** 868-875.
- Thitiprasert S., Sooksai S., Thongchul N.*, *In vivo* regulation of alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase in *Rhizopus oryzae* to improve L-lactic acid fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, **164** 1305-1322.
- Wiarachai O., Thongchul N., Kiatkamjornwong S., Hoven V.P.*, Surface-quarternized chitosan particles as an alternative and effective organic antibacterial material. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2012, **92** 121-129.
- Sriputtirat S., Boonkong W., Pengpreecha S., Petsom A., Thongchul N.*, Low molecular weight poly(lactide-co-caprolactone) for tissue adhesion and tetracycline hydrochloride controlled release in wound management. *Advances in Chemical Engineering and Science*, 2012, **2** 15-27.
- Kommanee J., Tanasupawat S.*, Yukphan P., Thongchul N., Moonmangmee D., Yamada Y., Identification of *Acetobacter* strains isolated in Thailand based the phenotypic, chemotaxonomic, and molecular characterizations. *Science Asia*, 2012, **38** 44-53.
- Phruksawan P., Kulpreecha S., Sooksai S., Thongchul N.*, Direct fermentation of L(+)-lactic acid from cassava pulp by solid state culture of *Rhizopus oryzae*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2012 **35** 1429-1436.
- Noppakundilokrat S., Sonjaipanich K., Thongchul N., Kiatkamjornwong S.*, Syntheses, characterization and antibacterial activity of chitosan grafted hydrogels and associated mica-containing nanocomposite hydrogels. *Journal of Applied Polymer Science*, 2012 (in press).
- Kanjanachumpol P., Kulpreecha S., Tolieng V., Thongchul N.*, Enhancing polyhydroxybutyrate production from high cell density fed-batch fermentation of *Bacillus megaterium* BA-019. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2013 (in press).
- Boonkong W., Petsom A.*, Thongchul N., Rapidly stopping hemorrhage by enhancing blood clotting at an opened wound using chitosan/poly(lactic acid)/polycaprolactone wound dressing device. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2013 (in press).

Book chapter/Review article

- Thongchul, N. and Yang, S.-T., 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, 2003, pp. 36-51.
- Thongchul N., Thitiprasert S., Morphological control in filamentous fungal fermentation. *Thaksin Journal*, 2010, **13(2)** 109-119.

งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุ่ลงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

- Screening thermophilic lactic acid producing bacteria and developing a bench-scale fermentation process for industrial polylactic acid production (ลุ่ลงไปแล้วร้อยละ 50).....
- D-lactic acid bacterial selection and its optimal fermentaiton condition (ลุ่ลงไปแล้วร้อยละ 85).....
- Development of alternated technology for production of polylactic acid feedstock (Phase III). (ลุ่ลงไปแล้วร้อยละ 50).....

ผู้ร่วมวิจัย

- 1) ชื่อ-สกุล นาง วาสนา โตเลี้ยง
..... Mrs. Vasana Tolieng
- 2) เลขหมายประจำตัวประชาชน 3102002151826
- 3) ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์
- 4) หน่วยงานที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และ e-mail
..... สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
..... อาคารสถาบัน 3 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
..... โทรศัพท์: 0-2218-8053-4 โทรสาร: 0-2253-3543 e-mail vasanato@hotmail.com
- 5) ประวัติการศึกษา
ปริญญาโท (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะวิทยาศาสตร์) 2528 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปริญญาตรี (วิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์) 2523 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 6) สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ
..... การหมักและการทำให้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติบริสุทธิ์
- 7) ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ
หัวหน้าโครงการวิจัย
- การเร่งให้เกิดการย่อยตัวเองของยีสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ทุนอุดหนุนจากโครงการวิจัยและ
ถ่ายทอดเทคโนโลยีของทบวงมหาวิทยาลัย ปี 2544
- การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตจิบเบอเรลลินโดยรา *Gibberella fujikuroi* สายพันธุ์กลาย
พันธุ์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร งบประมาณแผ่นดิน 2538

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- Nhujak, T., Srisa-art, M., Kalampakorn, K., Tolieng, V., and Petsom, A., (2005) "Determination of Gibberellic Acid in Fermentation Broth and Commercial Products by Micellar Electrokinetic Chromatography" *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1884-1889.
- Luengchaichaiwange, W., Tolieng, V., Pinphanichakarn, P. and Navangkasattusas, S. (2003) "Acceleration of Autolysis of cultured yeast 29th conference on Science and Technology of Thailand.
- Tolieng, V., Yoshida, T. (1994) "Fermentative Production of Citric Acid by *Candida oleophila* and Its Process Control" *Annual Reports of International Center of Cooperative Research in Biotechnology, Japan*. Vol. 17 306-308.

- Laosinchai, W., Intharasen, V., Tolieng, V. and Pinphanichakarn, P. (1991) Characterization of *Streptomyces* Fusants by DNA Restriction Fingerprints, Proceedings of the 3rd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, Thailand, 21-25.
- Sangpitug, V., Pinphanichakarn, P., Raengsumrarn, S., Navankasattusas, S. and Nilubol, N., and Nihira, T. (1988) "Optimization of Sterols Bioconversion into 4-Androstene-3, 17-dione (AD) by *Mycobacterium fortuitum*" Microbial Utilization of Renewable Resource. JSPS-NRCT, Osaka, Japan. Vol. 6 312-317.
- Sangpitug, V., Pinphanichakarn, P., Raengsumrarn, S., Navankasattusas, S. and Nilubol, N., (2531) "Bioconversion of *Pueraria mififica* Sterols into 4-Androstene-3, 17-dione (AD) by *Mycobacterium fortuitum*" 14th Conference on Science and Technology of Thailand, 416-417.
- Sangpitug, V., Pinphanichakarn, P., Navankasattusas, S. and Nilubol, N., (2531) "Enzymatic Conversion of Stevioside into Steviol" 14th Conference on Science and Technology of Thailand, 342-343.

งานวิจัยที่กำลังทำ

- การผลิตสารฆ่าแมลงจาก *Streptomyces* sp และการทำให้บริสุทธิ์ เป็นผู้ร่วมวิจัย
- การผลิตแอลกอฮอล์จากวัสดุเหลือทิ้ง