

การผลิตกรดแอล(+)-แลกติกจากสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังโดย
Rhizopus oryzae ที่ถูกตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด

นางสาว ศิริพร อุ่นแอบ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

PRODUCTION OF L(+)-LACTIC ACID FROM CASSAVA PULP HYDROLYSATE BY
IMMOBILIZED *Rhizopus oryzae* IN A STATIC BED BIOREACTOR

Miss Siriporn Ounaeb

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การผลิตกรดแอล(+)-แลกติกจากสารละลายที่ได้จากการ
ย่อยกากมันสำปะหลังโดย *Rhizopus oryzae* ที่ถูกตรึงใน
เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด

โดย

นางสาว ศิริพร ชุ่มแอบ

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ ดร. ณีฎฐา ทองจุล

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

อาจารย์ ดร. ศรินทิพ สุขใส

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัย
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร. ณีฎฐา ทองจุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร. ศรินทิพ สุขใส)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นาดยา งามโรจนวณิชย์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร. สุวัฒนา พุกษะศรี)

ศิริพร อุ๋นแอบ : การผลิตกรดแลค(+)-แลกติกจากสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมัน
สำปะหลังโดย *Rhizopus oryzae* ที่ถูกตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต.

(PRODUCTION OF L(+)-LACTIC ACID FROM CASSAVA PULP HYDROLYSATE

BY IMMOBILIZED *Rhizopus oryzae* IN A STATIC BED BIOREACTOR) อ. ที่

ปรีกษานิพนธ์หลัก : อาจารย์ ดร. ณีฎฐา ทองจุล, อ. ที่ปรีกษานิพนธ์ร่วม :

อาจารย์ ดร. ศรีนทิพ สุกใส, 151 หน้า.

งานวิจัยนี้ศึกษาการนำกากมันสำปะหลังมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดแลค-แลกติกโดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต โดยก่อนเข้าสู่กระบวนการหมักจะต้องนำกากมันไปปรับสภาพและย่อยเพื่อให้ได้เป็นสารละลายซึ่งจะนำไปเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเทคนิคทางเคมีกายภาพ กากถูกนำไปปรับสภาพภายใต้อุณหภูมิและความดันสูง เพื่อทำลายโครงสร้างลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ทำให้สามารถย่อยเซลลูโลสและแป้งที่ติดอยู่ได้ง่ายขึ้น ในการปรับสภาพจะศึกษาผลของเวลาที่ใช้ (15-60 นาที) ความเข้มข้นของกากมัน (อัตราส่วนของกากมันแห้งต่อสารละลาย 5-20 เปอร์เซ็นต์) และความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.1-1.0 นอร์มอล) โดยภาวะที่เหมาะสม คือ ใช้กากมัน 20 เปอร์เซ็นต์ นำไปปรับสภาพที่ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที จากนั้นนำกากมันที่ปรับสภาพไปย่อยต่อด้วยเซลลูเลสและอัลฟาอะไมเลสตามลำดับ โดยปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ (เซลลูเลส: 5.61 และ 33.15 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งที่ปรับสภาพแล้ว และอัลฟาอะไมเลส: 16.8 และ 33.6 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งที่ปรับสภาพแล้ว) และเวลาที่ใช้ในการย่อย (เซลลูเลส: 1 และ 6 ชั่วโมง และอัลฟาอะไมเลส: 15 และ 30 นาที) โดยภาวะการย่อยที่เหมาะสมที่สุดใช้เซลลูเลส 33.15 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งที่ปรับสภาพแล้ว ย่อยนาน 6 ชั่วโมง ต่อด้วยอัลฟาอะไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งที่ปรับสภาพแล้ว นาน 15 นาที โดยได้น้ำตาลออกมาสูงสุดที่ 0.6 กรัมต่อกรัมกากมันแห้ง คิดเป็นปริมาณน้ำตาลที่ได้ทั้งหมด เท่ากับ 0.541 กรัมต่อกรัมกากมันแห้ง หลังจากนั้นสารละลายที่ได้ถูกนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักกรดแลค-แลกติกด้วย *R.oryzae* ที่ถูกตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต โดยได้ความเข้มข้นของกรดแลค-แลกติกสูงสุดที่ 25.41 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่าปริมาณผลผลิตกรดแลค-แลกติก เท่ากับ 48.95% และค่าอัตราการผลิตกรดแลค-แลกติกเท่ากับ 1.12 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเทียบกับการหมักภาวะอื่นๆ จากผลทดลองแสดงการใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกของ *R.oryzae*

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....

ปีการศึกษา.....2554.....

ลายมือชื่อ.....

ลายมือชื่อ.....ที่ปรีกษานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ.....ที่ปรีกษานิพนธ์ร่วม.....

517 24758 23 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORDS : LACTIC ACID / CASSAVA PULP HYDROLYSATE / *Rhizopus oryzae* / FERMENTATION

SIRIPORN OUNAEB : PRODUCTION OF L(+)-LACTIC ACID FROM CASSAVA PULP BY IMMOBILIZED *Rhizopus oryzae* IN A STATIC BED BIOREACTOR.

ADVISOR : NUTTHA THONGCHUL, Ph.D., CO-ADVISOR : SARINTIP SOOKSAI, Ph.D., 151 pp.

This study investigated L-lactic acid production from cassava pulp feedstocks by *Rhizopus oryzae* NRRL 395 in the static bed bioreactor. Prior to fermentation, cassava pulp was pretreated and hydrolyzed to obtain the hydrolysate to be used as the carbon source in the fermentation medium. By physicochemical pretreatment, cassava pulp was pretreated under high temperature and pressure to eliminate lignin and hemicellulose contents; thus, facilitating cellulose and starch hydrolysis later. The effects of pretreatment time (15-60 min), pulp concentration (ratio of dry pulp to solution: 5-20%), and NaOH concentration (0.1-1.0 N) were observed during pretreatment. The optimal pretreatment condition was at 20% w/v pulp concentration, 121°C, and 15 psig for 15 min. After that cellulose and starch in the pretreated pulp were digested by cellulase and α -amylase respectively. During hydrolysis, the effects of enzyme load (cellulase: 5.61 and 33.15 U/g dry pretreated pulp and α -amylase: 16.8 and 33.6 U/g dry pretreated pulp) and digestion time (cellulase: 1 and 6 h and α -amylase: 15 and 30 min) on fermentable sugar recovery were observed. The optimal enzyme hydrolysis condition was at cellulase digestion for 6 h (33.15 U/g dry pretreated pulp) followed by α -amylase digestion (16.8 U/g dry pretreated pulp) for 15 min. The highest fermentable sugar yield of 0.6 g/g dry pulp and sugar recovery yield of 0.541 g/g dry pulp were achieved under the conditions mentioned above. The hydrolysates obtained were tested as the carbon source during L-lactic acid fermentation. The final lactate concentration of 25.41 g/L, corresponding to the yield of 48.95% and the production rate of 1.12 g/L·h was achieved. Comparison of the other fermentation condition, this result indicated that using of various carbon sources effect to lactic acid production by *R.oryzae*

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

Academic Year :2011..... Advisor's Signature :

Co-advisor's Signature :

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากอาจารย์ ดร. ญัฐฐา ทองจุล ที่เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลักและ อาจารย์ ดร. ศรินทิพ สุขใส อาจารย์ที่ปรึกษา ร่วม ซึ่งได้ให้แนวความคิด คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยรวมทั้ง ตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม ที่กรุณาเป็นประธาน กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. นาทยา งามโรจนวณิชย์ อาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โภมลภิส และอาจารย์ ดร. สุวัฒนา พฤกษะศรี ที่กรุณาเข้าร่วมเป็นกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ และช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และในสถาบันวิจัย เทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยอบรมสั่งสอน ให้ความรู้ และคอยเป็นที่ปรึกษาในเรื่องต่างๆ เสมอมา

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่สนับสนุนค่าใช้จ่ายด้านสารเคมีที่ใช้ปฏิบัติการในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ คณะผู้บริหารและบุคลากรทุกท่านในสถาบันวิจัย เทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ และความสะดวกในด้านอุปกรณ์ สถานที่และสารเคมีในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรม พันธุศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือทั้งด้านวิชาการและการปฏิบัติการในห้องปฏิบัติการตลอดการทำ วิจัย

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชา ชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือทางด้านวิชาการ ตลอดจนกำลังใจที่มีให้กันและกันเสมอมา

ขอขอบคุณเพื่อนๆ สมัยมัธยมและเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ จากต่างคณะทุกคน ที่คอย แวะเวียนมาหาและคอยให้กำลังใจในระหว่างการปฏิบัติการทดลองที่แสนยาวนานในแต่ละครั้ง ขอขอบคุณในมิตรภาพที่มีให้กันและกันตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณคุณพ่อคุณแม่และพี่ชายเป็นอย่างสูง ที่คอยมารับมาส่ง ในระหว่างการปฏิบัติการทดลอง ขอขอบคุณที่สนับสนุนด้านการเงินในการศึกษาทุกๆ ด้าน และเป็นคอยให้กำลังใจ คำปลอบใจ และเข้าใจเรื่องต่างๆ ตลอดในช่วงเวลาการศึกษา

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ด
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	5
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	5
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย.....	5
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
2.1 กรดแลกติก.....	7
2.2 ประโยชน์ของกรดแลกติก.....	9
2.3 การผลิตกรดแลกติก.....	10
2.3.1 กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี.....	10
2.3.2 กระบวนการหมัก.....	12
2.4 วิถีเมแทบอลิซึมของ <i>Rhizopus oryzae</i>	16
2.5 ลักษณะพื้นฐานของ <i>R. oryzae</i>	18
2.6 การตรึงเซลล์ <i>R. oryzae</i>	23
2.7 ชับสเตอร์ทในกระบวนการหมักกรดแลกติก.....	29
2.8 กากมันสำปะหลัง.....	34
2.8.1 แบ่งและโครงสร้างของแป้ง.....	36
2.8.2 เส้นใยหรือส่วนที่เป็นลิกโนเซลลูโลสในกากมันสำปะหลัง.....	37
2.9 กระบวนการผลิตกรดแลกติกจากวัตถุดิบเหลือใช้จากทางอุตสาหกรรม เกษตรที่มีส่วนประกอบของลิกโนเซลลูโลส.....	39

บทที่	หน้า
2.9.1 การปรับสภาพ (pretreatment).....	39
2.9.2 การย่อยสลาย (hydrolysis).....	46
2.9.3 กระบวนการหมัก (fermentation).....	53
2.10 ชนิดของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ.....	56
2.10.1 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบปั่นกววน (Stirred-tank reactor).....	56
2.10.2 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Packed bed.....	57
2.10.3 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift.....	57
2.10.4 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Bubble column.....	58
2.11 การออกแบบและพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ.....	60
3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	64
3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี.....	64
3.1.1 วัสดุอุปกรณ์.....	64
3.1.2 สารเคมี.....	65
3.2 จุลินทรีย์และการเตรียมกล้าเชื้อ.....	66
3.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย.....	66
3.2.2 วิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์.....	66
3.2.3 การเตรียมกล้าเชื้อ.....	66
3.3 สูตรอาหารที่ใช้ในการหมัก.....	68
3.4 กากมันสำปะหลัง.....	68
3.5 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	68
3.5.1 การเตรียมสารละลายจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์.....	69
3.5.2 กระบวนการหมักกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต 5 ลิตร.....	71
3.6 การวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	73
3.6.1 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในสารละลายที่แยกออกมาภายหลังการปรับสภาพกากมันและในสารละลายที่ได้จากการย่อย.....	73
3.6.2 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง.....	73
3.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก กรดฟูมาริก เอทานอล ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC).....	73

บทที่	หน้า
3.6.4 การหาค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนด้วยวิธี Dynamic method of gassing out.....	74
3.6.5 Scanning electron microscope (SEM) และ Energy Dispersive X-ray spectrometer (EDX)	75
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	76
4.1 การปรับสภาพกากมันสำปะหลังก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์.....	76
4.2 การย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโดยเทคนิคทางเคมีกายภาพ (physicochemical pretreatment) มาแล้ว ด้วยเอนไซม์.....	80
4.3 กระบวนการหมักกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด 5 ลิตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน.....	93
4.3.1 ลักษณะสัณฐานของ <i>R. oryzae</i> ที่ตรึงอยู่บนเส้นใยในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ.....	93
4.3.2 จลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแลกติกโดย <i>R. oryzae</i> ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด.....	102
4.3.3 วิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวและโครงสร้างของ <i>R. oryzae</i> ที่ตรึงบนเส้นใยและภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด.....	109
5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ.....	115
รายการอ้างอิง.....	118
ภาคผนวก.....	
ภาคผนวก ก.....	133
ภาคผนวก ข.....	140
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	151

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คุณสมบัติของกรดแลกติก.....	8
2.2	เปรียบเทียบกระบวนการหมักระหว่าง <i>Lactobacillus sp.</i> กับ <i>R. oryzae</i>	16
2.3	ลักษณะสัณฐานของ <i>R. oryzae</i> ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก.....	21
2.4	การผลิตกรดแลกติกจากกระบวนการหมักโดยเซลล์แขวนลอยในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ.....	26
2.5	การผลิตกรดแลกติกจากกระบวนการหมักโดยเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ.....	27
2.6	การยัดตรึงเซลล์รา <i>R. oryzae</i> ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก.....	28
2.7	ข้อบ่งชี้ที่สามารถนำมาผลิตกรดแลกติก.....	31
2.8	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักข้อบ่งชี้ที่เป็นสิ่งเหลือใช้จากการเกษตร.....	32
2.9	องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง.....	35
2.10	ผลของการปรับสภาพด้วยเทคนิคต่างๆ ต่อองค์ประกอบทางกายภาพและทางเคมี หรือโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส.....	45
2.11	เปรียบเทียบการใช้กรดเจือจางและกรดเข้มข้นในการย่อยสลายเซลลูโลส.....	46
2.12	ข้อดีและข้อเสียของการย่อยสลายด้วยกรด.....	48
2.13	ข้อดีและข้อเสียของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์.....	49
2.14	ความแตกต่างของกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง(solid-state fermentation) และอาหารเหลว (submerged fermentation).....	55
3.1	ปัจจัยเคมีและทางกายภาพที่ศึกษาต่อประสิทธิภาพของสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ ในขั้นตอนของการปรับสภาพกากมันสำปะหลังก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์.....	70
3.2	ปัจจัยเคมีและทางกายภาพที่ศึกษาต่อประสิทธิภาพของสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ ในขั้นตอนของการย่อยส่วนที่เป็นเซลลูโลสและแป้งด้วยเอนไซม์เป็นลำดับขั้นตอน.....	71
4.1	กลูโคสที่ได้ออกมาทั้งหมดในรูปของ yield ของกลูโคส จากกระบวนการการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดันและผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดันที่มีการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ และนำมาย่อยต่อด้วยเซลลูเลสและอะไมเลส.....	92

ตารางที่		หน้า
4.2	เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกในการหมักแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติดที่สภาวะต่างๆที่มีอาหารปริมาณ 3 ลิตร.....	108
ข.1	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคส ความเข้มข้นของกรดแลกติก ความเข้มข้นของเอทานอลกับเวลาในอาหารเพื่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์.....	143
ข.2	ค่าการละลายของออกซิเจน (DO) ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในอาหาร (C_p)กับเวลา (วินาที).....	148

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของกรดแอล (+)-และดี (-)-แลกติก.....	7
2.2	เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีและกระบวนการหมัก.....	12
2.3	เมแทบอลิซึมการผลิตกรดแลกติกแบบไฮโมเฟอร์เมนเทที่ฟด้วยวิถี glycolysis, Embden-Meyerhof-Parnas.....	14
2.4	กระบวนการเมแทบอลิซึมของกลูโคสในรา <i>R. oryzae</i>	18
2.5	ลักษณะของรา <i>Rhizopus oryzae</i>	19
2.6	ลักษณะทางสัณฐานของรา.....	20
2.7	วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์.....	25
2.8	ลักษณะของต้นมันสำปะหลัง หัวมันสำปะหลัง และกากมันสำปะหลัง.....	35
2.9	โครงสร้างของอะไมโลส (amylose).....	36
2.10	โครงสร้างของอะไมโลเพกติน (amylopectin).....	37
2.11	ลักษณะของลิกโนเซลลูโลสภายหลังจากการปรับสภาพ.....	40
2.12	การทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสที่ตำแหน่งต่างๆ ของเซลลูโลส.....	51
2.13	ลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบปั่นกววน (Stirred-tank reactor).....	56
2.14	ลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Packed bed.....	57
2.15	ลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift.....	58
2.16	ลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Bubble column.....	58
2.17	เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ 2 ระบบ (Two-stage systems).....	60
2.18	ลักษณะของ Plastic composite support (PCS).....	61
2.19	แบบการทดลองในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Plastic composite support (PCS).....	62
2.20	ลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Three-phase fluidized bed.....	62
2.21	ลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Rotating fibrous-bed bioreactor (RFB).....	63
3.1	ลักษณะของ Haemocytometer.....	67
3.2	ลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต.....	72
3.3	ค่าการละลายของออกซิเจนภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยเทคนิค Gassing out.....	75

ภาพที่	หน้า
4.1 อนุภาคแป้งที่หลุดออกจากกากมัน รายงานในรูปแบบ yield ของกลูโคส (กรัม/กรัม กากมันแห้ง) ที่ปรากฏในของเหลวที่แยกได้จากกากมันภายหลังการปรับสภาพ ด้วยสองวิธี ที่ความเข้มข้นของกากมัน ความเข้มข้นของไซเตียมไฮดรอกไซด์ และเวลาที่ใช้ในการปรับสภาพต่างกัน.....	79
4.2 กลูโคสที่ได้ในรูปแบบของ yield ของกลูโคส จากการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดัน ด้วยเซลลูเลสและอะไมเลส โดยใช้ความเข้มข้นของกากมันเริ่มต้น 5%.....	85
4.3 กลูโคสที่ได้ในรูปแบบของ yield ของกลูโคส จากการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดัน ด้วยเซลลูเลสและอะไมเลส โดยใช้ความเข้มข้นของกากมันเริ่มต้น 6.7%	86
4.4 กลูโคสที่ได้ในรูปแบบของ yield ของกลูโคส จากการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดัน ด้วยเซลลูเลสและอะไมเลส โดยใช้ความเข้มข้นของกากมันเริ่มต้น 20%.....	87
4.5 กลูโคสที่ได้ในรูปแบบของ yield ของกลูโคส จากการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดันที่มีการเติมไซเตียมไฮดรอกไซด์ (0.5 นอร์มัล) ด้วยเซลลูเลสที่ 50 องศาเซลเซียส และอะไมเลสที่ 100 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเข้มข้นของกากมันเริ่มต้น 6.7%.....	88
4.6 กลูโคสที่ได้ออกมาทั้งหมดในรูปแบบของ yield ของกลูโคส จากกระบวนการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดัน และนำมาย่อยต่อด้วยเซลลูเลสและอะไมเลส โดยใช้ความเข้มข้นของกากมันเริ่มต้น 5%.....	89
4.7 กลูโคสที่ได้ออกมาทั้งหมดในรูปแบบของ yield ของกลูโคส จากกระบวนการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดัน และนำมาย่อยต่อด้วยเซลลูเลสและอะไมเลส โดยใช้ความเข้มข้นของกากมันเริ่มต้น 6.7%.....	90
4.8 กลูโคสที่ได้ออกมาทั้งหมดในรูปแบบของ yield ของกลูโคส จากกระบวนการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดันที่มีการเติมไซเตียมไฮดรอกไซด์ (0.5 นอร์มอล) และนำมาย่อยต่อด้วยเซลลูเลสที่ 50 องศาเซลเซียส และอะไมเลสที่ 100 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเข้มข้นของกากมันเริ่มต้น 6.7%.....	91

ภาพที่	หน้า
4.9	ลักษณะสัณฐานของ <i>R. oryzae</i> ที่ถูกตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบด สติก อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การ ให้อากาศเท่ากับ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในระยะการ เจริญเติบโตที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ของการใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด 97
4.10	ลักษณะสัณฐานของ <i>R. oryzae</i> ที่ถูกตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบด สติก อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การ ให้อากาศเท่ากับ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในระยะการ สร้างผลิตภัณฑ์ที่เวลาการหมัก 96 ชั่วโมง ของการใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด..... 98
4.11	ลักษณะการยึดเกาะของเซลล์บนเบดสติกด้านนอก และด้านในของเครื่อง ปฏิกรณ์ชีวภาพ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 6.0 อัตราการกวน 700 รอบ ต่อนาที การให้อากาศเท่ากับ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ของการใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด..... 99
4.12	ความหนาของเซลล์ของ <i>R. oryzae</i> ที่ถูกตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบด สติก อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การ ให้อากาศเท่ากับ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ของการใช้ แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด..... 100
4.13	ลักษณะเซลล์ <i>R. oryzae</i> ที่ตรึงอยู่ด้านในของเบดสติกในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ แบบเบดสติก อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อ นาที การให้อากาศเท่ากับ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ของ การใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด..... 101
4.14	จลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแลกติกโดย <i>R. oryzae</i> อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศเท่ากับ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ของแหล่งคาร์บอน 6 ชนิด..... 107

ภาพที่	หน้า	
4.15	ลักษณะของเซลล์ <i>R. oryzae</i> บริเวณด้านในของเบดสติดที่กำลังขยาย 350 เท่า โดยใช้กลูโคส สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และสารละลายแบ่งเป็นแหล่งคาร์บอน.....	111
4.16	ลักษณะของเซลล์ <i>R. oryzae</i> บริเวณด้านในของเบดสติดที่กำลังขยาย 750 เท่า โดยใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และสารละลายแบ่งเป็นแหล่งคาร์บอน	112
4.17	ลักษณะของเซลล์ <i>R. oryzae</i> บริเวณด้านในของเบดสติดที่กำลังขยาย 3,500 เท่า โดยใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอน.....	113
4.18	ลักษณะโครงสร้างของเส้นใยฝ้ายฝ้าย และลักษณะการยึดเกาะของเซลล์ <i>R. oryzae</i> บนเส้นใยฝ้ายชนิดผ้าขนหนูบริเวณด้านนอกของเบดสติดที่กำลังขยาย 350 เท่า โดยใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และสารละลายแบ่งเป็นแหล่งคาร์บอน.....	114

ภาพที่		หน้า
ข.1	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย (C_L) กับเวลา (วินาที) จากรูปแบบจำลองในทางทฤษฎี.....	144
ข.2	ความสัมพันธ์ระหว่าง dC_L/dt กับ C_L จากแบบจำลองในทางทฤษฎี.....	145
ข.3	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหาร (C_L) กับเวลา (วินาที) ในการทดลอง.....	146
ข.4	ความสัมพันธ์ระหว่าง C_L กับ เวลา (วินาที) ในช่วงการไม่มีอากาศ.....	146
ข.5	ความสัมพันธ์ระหว่าง $dC_L/dt+OUR$ กับ C_L	147

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	เปอร์เซ็นต์
mL	มิลลิลิตร
L	ลิตร
mg	มิลลิกรัม
g	กรัม
g/L	กรัมต่อลิตร
w/v	น้ำหนักต่อปริมาตร
h	ชั่วโมง
M	โมลาร์
GM	อาหารเพื่อการเจริญเติบโต
PM	อาหารเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์
N	นอร์มอล
U	ยูนิต (หน่วยของเอนไซม์)
g/g	กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมซับสเตรท
rpm	รอบต่อนาที
vvm	ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กรดแลกติก (กรด 2-ไฮดรอกซีโพรไพโอนิก, $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$) เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง ซึ่งประกอบไปด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) และหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) กรดแลกติกถูกนำมาใช้งานอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเคมี เครื่องสำอาง และเภสัชกรรม ปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้กรดแลกติกเป็นโมโนเมอร์ในการผลิตพอลิเมอร์ของกรดแลกติก หรือพอลิแลกติกแอซิด (PLA) ซึ่งใช้ผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Kadam และคณะ, 2006; Zhang และคณะ, 2007; Miura และคณะ, 2003) ทำให้แนวโน้มความต้องการและราคาในตลาดโลกเพิ่มขึ้น ปัจจุบันพบว่าความต้องการกรดแลกติกทั่วโลกประมาณ 130,000 ถึง 150,000 ตันต่อปี และในปี 2011 คาดว่าจะมีแนวโน้มของตลาด PLA โลกสูงถึง 500,000 ตันต่อปี (Wee และคณะ, 2006; John และคณะ, 2007) ซึ่งในปัจจุบันประเทศไทยต้องนำเข้ากรดแลกติกจากต่างประเทศเพื่อการใช้งานในประเทศ ดังนั้นถ้าหากประเทศไทยสามารถผลิตกรดแลกติกได้เองจะช่วยลดปัญหาการนำเข้าและการขาดดุลกับต่างประเทศได้ การผลิตกรดแลกติกสามารถผลิตได้ 2 วิธีด้วยกันคือ กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีและกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ ซึ่งพบว่า กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีนั้น กรดแลกติกที่ผลิตได้จะอยู่ในรูปไอโซเมอร์ผสม คือกรดแอลแลกติกและดีแลกติก (Wee และคณะ, 2006; Zhang และคณะ, 2007; Tay และ Yang, 2002) และใช้ภาวะรุนแรงในกระบวนการสังเคราะห์ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตยังมาจากปิโตรเคมี ซึ่งในปัจจุบันมีราคาสูงขึ้นเรื่อยๆ (Kadam และคณะ, 2006; Wee และคณะ, 2006) ในขณะที่กระบวนการหมักนั้นสามารถผลิตกรดแลกติกได้ทั้งในรูปไอโซเมอร์ผสมและกรดแลกติกในรูปบริสุทธิ์ โดยขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ที่ใช้ ซับสเตรท และภาวะที่ใช้ในกระบวนการหมัก (Zhang และคณะ, 2007) กรดแอลแลกติกบริสุทธิ์ เป็นที่ได้รับความนิยมมากกว่ากรดดีแลกติกบริสุทธิ์ เนื่องจากกรดดีแลกติกนั้นเป็นอันตรายต่อมนุษย์ จึงนิยมนำกรดแอลแลกติกมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา (Zhang และคณะ, 2007) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการผลิตพอลิแลกติกแอซิด (PLA) เนื่องจากสามารถให้พอลิเมอร์ที่มีความเป็นผลึกสูงจึงเหมาะกับการนำไปใช้ในการผลิตพลาสติก (Oh และคณะ, 2005; Kadam และคณะ, 2006; Wee และคณะ, 2006; Lin และคณะ, 2007)

ในกระบวนการหมัก กรดแลกติกผลิตโดยจุลินทรีย์ 2 กลุ่ม คือแบคทีเรียและรา ซึ่ง *Lactobacillus* sp. เป็นที่สนใจกันอย่างกว้างขวาง โดยใช้กระบวนการหมักชนิดไฮโมเฟอร์เมนเท

ชั้นเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากให้อัตราการผลิตสูงและกระบวนการหมักสามารถทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน (Oh และคณะ, 2005; Wee และคณะ, 2006; John และคณะ, 2007) จากงานวิจัยของ Michelson และคณะ (2006) พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Lactis* DSM 20073 สามารถให้ผลผลิตกรดแลกติกสูงถึง 9.9 และ 5.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในการหมักแบบไม่ต่อเนื่องสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 91.5 กรัมต่อลิตร แต่อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องการสารอาหารพวกไวตามินและกรดอะมิโนในปริมาณมากสำหรับการเจริญ และกรดแลกติกที่ผลิตได้ประกอบไปด้วยกรดแอลแลกติกและดีแลกติก ทำให้เกิดความซับซ้อนในการทำให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปใช้ในการผลิตพอลิแลกติกแอซิด ซึ่งส่งผลต่อต้นทุนในการผลิตที่สูงขึ้น (Lin และคณะ, 2007; Miura และคณะ, 2003)

ในขณะที่ *Rhizopus* sp. สามารถผลิตกรดแอลแลกติกบริสุทธิ์จากวัสดุทางการเกษตรที่มีราคาถูก เนื่องจากเราสามารถสร้างอะไมเลสเพื่อย่อยแป้งและสามารถใช้น้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอมซึ่งพบในเฮมิเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (Tay และ Yang, 2002; Wee และคณะ, 2006; Zhang และคณะ, 2007) ทำให้กระบวนการหมักด้วย *R. oryzae* มีต้นทุนการผลิตทั้งด้านวัตถุดิบและกระบวนการแยกบริสุทธิ์หลังกระบวนการหมักที่ต่ำกว่าการหมักโดยแบคทีเรีย ทำให้มีนักวิจัยหลายกลุ่มให้ความสนใจที่จะนำ *R. oryzae* มาใช้ในกระบวนการผลิตกรดแอลแลกติก (Sun และคณะ, 1999; Zhang และคณะ, 2007) *R. oryzae* เป็นราที่ต้องการอากาศในการเจริญ ในภาวะที่ขาดอากาศราจะเปลี่ยนวิถีเมแทบอลิซึมโดยจะเปลี่ยนเป็นเอทานอล ซึ่งราจะสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในระยะหนึ่งและตายในที่สุด ดังนั้นการรักษาระดับออกซิเจนในกระบวนการหมักกรดแลกติกจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง (Bai และคณะ, 2003; Wee และคณะ, 2006) จากลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักและขึ้นกับภาวะที่ใช้ในการหมัก กระบวนการหมักกรดแลกติกด้วยเซลล์แขวนลอยของ *R. oryzae* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพมักจะประสบปัญหาเรื่องการถ่ายเทอากาศ ซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อการเจริญของราและการสร้างกรดแลกติก (Skory และคณะ, 1998; Bai และคณะ, 2003) เพื่อกำจัดปัญหาเรื่องการเปลี่ยนแปลงของสัณฐาน จึงได้มีการพัฒนาเทคนิคการตรึงเซลล์เพื่อใช้ในการควบคุมสัณฐานของราตามต้องการ และพบว่าวิธีการตรึงเซลล์นอกจากจะใช้ในการควบคุมสัณฐานของราแล้วยังสามารถเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ อัตราการผลิตกรดแลกติกและผลผลิตกรดแลกติก (Tay และ Yang, 2002; Dong และคณะ, 1996) งานวิจัยของ Yin และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตกรดแอลแลกติก ด้วย *Rhizopus* sp. จำนวน 8 สายพันธุ์และเปรียบเทียบภาวะที่ใช้ในการหมักด้วยระบบ Air-Lift โดยใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *R. oryzae* NRRL 395 สามารถผลิตกรดแอล (+)-แลกติกได้สูงสุดคือ 102 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 85 % ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร งานวิจัยของ Tay และ Yang (2002) ศึกษาการผลิตกรดแอลแลกติกด้วยการตรึง *R. oryzae*

NRRL 395 ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ rotating fibrous-bed bioreactor (RFB) โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การตรึงเซลล์สามารถใช้ควบคุมสัญญาณของรา ทำให้มีอัตราการเจริญและผลผลิตสูง สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดคือ 127 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 90 % และอัตราการผลิตกรดแลคติก 2.5 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเมื่อใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สามารถผลิตกรดแลคติก คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 100 % และอัตราการผลิตกรดแลคติก 1.65 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกจากนี้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเซลล์ตรึงดังกล่าวมาแล้วข้างต้น กลุ่มผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติกเพื่อใช้ในการตรึงเซลล์รา และพบว่าเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้สามารถช่วยเพิ่มอัตราการผลิตกรดแลคติกเป็น 2.09 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกระบวนการหมักแบบเซลล์แขวนลอยในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ คือ 0.58 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่รอบการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.50 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้นที่ว่ากรดแลคติกนั้นสามารถใช้ผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพทำให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการขยายการตลาดของกรดแลคติกในอนาคตถ้าหากมีการพัฒนากระบวนการผลิตมากยิ่งขึ้นจากเดิม แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพและเศรษฐศาสตร์ของการหมักกรดแลคติกที่ดีที่สุดนั้น ยังคงประสบปัญหาที่เกิดจากหลายแนวทางด้วยกันและองค์ประกอบที่สำคัญอย่างยิ่งในการปรับปรุงนั้นคือกระบวนการผลิต มีหลายงานวิจัยที่มุ่งเน้นศึกษาและค้นคว้าเกี่ยวกับการนำวัตถุดิบที่ราคาถูกและสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ เช่น กากน้ำตาล ชั่งข้าวโพด กากมันสำปะหลัง และวัตถุดิบที่มีส่วนประกอบของแป้ง มาใช้เป็นซับสเตรทในการผลิตกรดแลคติก ปัจจุบันนี้เป็นที่ทราบกันดีกว่า *R. oryzae* นั้นสามารถใช้สิ่งเหลือใช้จากทางเกษตรกรรม รวมถึงของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมทางการเกษตรมาใช้เป็นซับสเตรทได้ (Pandey และคณะ, 2000; Carta และคณะ, 1999) เนื่องจาก *R. oryzae* มีอะไมโลไลติกแอกทิวิตีที่สามารถเปลี่ยนแป้งให้เป็นกรดแอล(+)-แลคติกได้โดยตรง (Wee และคณะ, 2006)

ในประเทศไทยอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังมีขนาดใหญ่และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งในการผลิตแป้งแต่ละครั้งจะใช้หัวมันสำปะหลังสดประมาณ 10 ล้านตัน ซึ่งก่อให้เกิดกากมันอย่างน้อยไม่ต่ำกว่า 1 ล้านตันต่อปี (Sriroth และคณะ, 2000) ปัจจุบันกากมันสำปะหลังสามารถนำมาทำเป็นอาหารสัตว์ซึ่งค่อนข้างมีมูลค่าต่ำ แม้ว่ากากมันสำปะหลังคือส่วนของลิกโนเซลลูโลสที่หลงเหลืออยู่ แต่ประกอบด้วยแป้งประมาณ 50-60% (โดยกรัมน้ำหนักแห้ง) (Carta และคณะ, 1999; Sriroth และคณะ, 2000; Pandey และคณะ, 2000) ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นซับสเตรทในการหมักสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ที่สามารถเพิ่มมูลค่าได้มากขึ้น การประยุกต์ใช้กากมันสำปะหลังในการหมักนั้น ไม่เพียงใช้เป็นซับสเตรททางเลือกทางหนึ่งแต่ยังเป็นการช่วยลดและแก้ไขปัญหาของ

มลพิษของโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปมันสำปะหลังอีกด้วย (Thongchul และคณะ, 2010) ถึงอย่างไรก็ตามการใช้ประโยชน์ทางเศรษฐกิจของสารชีวมวลที่เมืองค์ประกอบหลักเป็นแป้งแต่มีส่วนของลิกโนเซลลูโลสอยู่ปนเล็กน้อยอย่างเช่น กากมันสำปะหลัง เป็นต้นนี้ จำเป็นต้องมีพัฒนาให้ง่ายขึ้น วิธีการปรับสภาพนั้นส่งผลให้ yield ของน้ำตาลจากพอลิแซคคาไนด์ (แป้ง เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส) ที่มีอยู่ในกากมันสำปะหลังเพิ่มมากขึ้น เส้นใยในกากมันสำปะหลังมีบทบาทสำคัญต่อการสกัดแยกส่วนที่เป็นแป้งออกมาซึ่งมันจะมีลักษณะเป็นโครงร่างตาข่ายห่อหุ้มแกรนูลแป้งอยู่ภายใน ในเซลล์พืชผนังเซลล์มีลักษณะเป็นโครงร่างขนาดเล็กจะประกอบด้วยเซลลูโลสที่ปรากฏตัวในรูปของพอลิแซคคาไนด์ และเมทริกซ์ของโปรตีนถูกห่อหุ้มด้วยชั้นที่ประกอบส่วนที่เป็นเพคติน แกรนูลของแป้งจะอยู่ในเมทริกซ์พอลิเมอร์ที่ซับซ้อนซึ่งยากต่อการที่จะถูกปลดปล่อยออกมา ดังนั้นการพัฒนาการสกัดแป้งออกจากกากมันควรต้องมีการปรับปรุงโดยการไปทำลายเมทริกซ์เหล่านั้นเพื่อที่แกรนูลของแป้งจะสามารถถูกปลดปล่อยออกมาภายนอกได้ การทำลายเมทริกซ์ที่เป็นเส้นใยสามารถทำได้โดยวิธีการปรับสภาพ (Sriroth และคณะ, 2000) เนื่องจากกากมันสำปะหลัง คือส่วนของลิกโนเซลลูโลสที่หลงเหลืออยู่ดังนั้นกากมันจึงประกอบไปด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสนั้นมีจุดมุ่งหมายคือการปรับเปลี่ยนขนาดและโครงร่างตำแหน่งทางเคมีของสารชีวมวล ทำให้โครงร่างของลิกนินแตกสลายและทำลายโครงร่างผลึกของเซลลูโลสเพื่อเอนไซม์สามารถที่จะเข้าไปย่อยเซลลูโลสได้ง่ายขึ้น ส่งผลให้การย่อยส่วนของแป้งให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวนั้นสามารถทำได้อย่างรวดเร็วและได้ yield ที่สูงขึ้น กระบวนการย่อยสลายสามารถเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญโดยการกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ลดความเป็นผลึกของเซลลูโลส และเพิ่มช่องว่างด้วยการผ่านกระบวนการปรับสภาพ (Kumar และคณะ, 2009)

เนื่องจากแป้งในกากมันสำปะหลังติดอยู่ในโครงร่างของลิกโนเซลลูโลสที่มีความแข็งแรงซึ่งอาจส่งผลต่อกระบวนการย่อยแป้งโดยรา และการผลิตกรดแลคติก ทำให้อัตราผลผลิตต่ำกว่าที่ควร ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบกากมันสำหรับกระบวนการหมักที่เหมาะสมจะช่วยเพิ่มอัตราการย่อยแป้งและการผลิตกรดแลคติกได้ ในงานวิจัยนี้ทีมผู้วิจัยมีจุดมุ่งหมายที่จะทำการพัฒนากระบวนการปรับสภาพกากมันสำปะหลังเพื่อง่ายต่อการนำไปสู่ขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์ ส่งผลให้ได้สารละลายที่ได้จากการย่อยมี yield ของน้ำตาลในปริมาณที่สูง นอกจากนั้นสารละลายที่ได้จากการย่อยนี้จะต้องเหมาะสมสำหรับใช้ในการหมักกรดแลคติกจาก *R. oryzae* กากมันสำปะหลังจะถูกปรับสภาพด้วยการใช้น้ำและการใช้ไฮดรอกไซด์ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ก่อนที่จะนำไปสู่ขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งทำการศึกษาค้นคว้าผลของระยะเวลาที่ใช้ในการปรับสภาพ ปริมาณความเข้มข้นของกากมันในสารละลาย ความเข้มข้นของสารละลายไฮดรอกไซด์ในขั้นตอนการปรับสภาพ จากนั้นทำการศึกษาค้นคว้าผลของความเข้มข้นของ

เอนไซม์ และเวลาที่ใช้ในการบ่มในขั้นการย่อยด้วยเอนไซม์ เพื่อให้ได้ yield ของน้ำตาลที่ได้ ภายหลังจากการย่อยกากมันสำปะหลังในปริมาณที่เหมาะสม เมื่อได้รับการปรับสภาพและ กระบวนการย่อยที่เหมาะสม สารละลายที่ได้จากการย่อยนี้จะถูกนำมาเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับ การหมักกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด โดยจะศึกษา เปรียบเทียบจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมัก และความคั่งมุ่นของกระบวนการในระดับ ห้องปฏิบัติการ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบจลนพลศาสตร์ของกระบวนการผลิตกรดแลกติกจากสารละลายที่ได้ จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดและเอนไซม์ เทียบกับกระบวนการผลิตจากกลูโคส และ สารละลายแป้ง ด้วยเซลล์ตรึงของ *R. oryzae* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่ง คาร์บอนในกระบวนการหมักในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด โดยเปรียบเทียบแหล่ง คาร์บอนที่ใช้ในกระบวนการหมักที่แตกต่างกัน ซึ่งจะเน้นที่ศึกษาการนำกากมันสำปะหลังมาผ่าน การปรับสภาพด้วยวิธีที่แตกต่างกัน ทำการศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการปรับสภาพ ปริมาณ ความเข้มข้นของกากมันในสารละลาย ความเข้มข้นของสารละลายไฮเดียมไฮดรอกไซด์ในขั้นตอน การปรับสภาพ และทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของเซลล์และอะไมเลส และเวลาที่ใช้ใน การบ่มในขั้นตอนการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ เพื่อให้ได้แหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพ ต่อจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแอล(+)แลกติก

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

- 1.4.1 ศึกษาขั้นตอนการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดและเอนไซม์ เพื่อเตรียม สารละลายจากการย่อยสำหรับกระบวนการหมักกรดแลกติก
- 1.4.2 ศึกษากระบวนการหมักกรดแลกติกในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด โดย เปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน ได้แก่ กลูโคส สารละลายที่ได้จากการ ย่อยของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ สารละลายที่ได้จากการย่อย ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความ ดันด้วยเอนไซม์ สารละลายที่ได้จากการย่อยของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับ สภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์

ด้วยเอนไซม์ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และ สารละลายแป้ง

- 1.4.3 วิเคราะห์ผล และเปรียบเทียบกระบวนการผลิตทั้ง 6 แบบ เพื่อใช้ในการพัฒนา กระบวนการที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติกจากกากมันสำปะหลัง

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

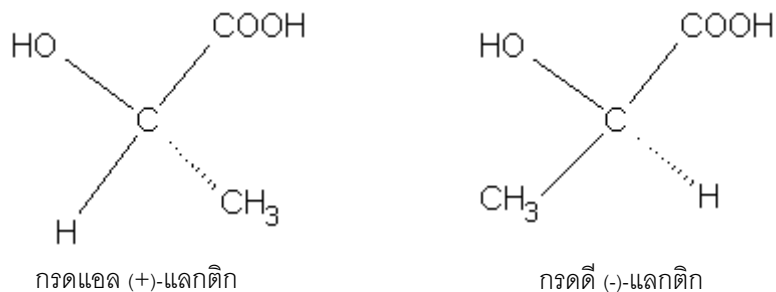
ทราบจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแลกติกจากสารละลายที่ได้จากการย่อย กากมันสำปะหลังแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดแลกติก

กรดแลกติก (Lactic acid) เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง ชื่อทางเคมี คือ 2-hydroxypropanoic acid มีสูตรทางเคมี คือ $C_3H_6O_3$ กรดแลกติกถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในผลิตภัณฑ์นมในปี ค.ศ. 1780 โดยนักเคมีชาวสวีเดน กรดชนิดนี้มี 2 ไอโซเมอร์ คือ กรดดี(-)-แลกติก และกรดแอล(+)-แลกติก (Wee และคณะ, 2006 ; Zhang และคณะ, 2007) ซึ่งแตกต่างกันที่การวางตัวของหมู่ไฮดรอกซีตรงตำแหน่งของคาร์บอนอะตอม แสดงในภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของกรดแอล (+)-และดี (-)-แลกติก

ความแตกต่างทางโครงสร้างทางเคมีของกรดแลกติกทั้งชนิดแอล(+)- และดี(-)-ไอโซเมอร์ ทำให้ไอโซเมอร์ทั้งสองชนิดนี้มีคุณสมบัติแตกต่างกัน เช่น จุดเดือดและจุดหลอมเหลว โดยกรดแอล-แลกติกซึ่งมีจุดเดือดที่ 82-85 องศาเซลเซียส และจุดหลอมเหลวที่ 16.8-33 องศาเซลเซียส ซึ่งต่ำกว่ากรดดี-แลกติกที่มีจุดเดือดที่ 103 องศาเซลเซียส และจุดหลอมเหลวที่ 52.8-53.6 องศาเซลเซียส (Budavari และคณะ, 1989; Holten และคณะ, 1971)

กรดแลกติกที่มีความบริสุทธิ์สูงจะไม่มีสี สามารถละลายในน้ำ เอทานอล อะซิโตนและอีเทอร์ได้ แต่ไม่ละลายในคลอโรฟอร์ม ปิโตรเลียมอีเทอร์และคาร์บอนไดซัลไฟด์ (Lockwood, 1965) ตารางที่ 2.1 แสดงคุณสมบัติต่างๆ ของกรดแลกติก

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของกรดแลกติก

ลักษณะของกรดแลกติก

CAS number	50-21-5, 79-33-4(L), 10326-41-7(D)
EINECS number	200-018-0
สูตร	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$
มวลโมเลกุล	90.08
H.S. code	2918.11
Toxicity	Oral rat LD50:3543 mg/kg
Synonyms	2-hydroxypropanoic acid; 1-hydroxyethanecarboxylic acid; Ethylidenelactic acid; Alpha-hydroxypropionic acid

สมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมี (99%)

Physical State	Colorless to slightly yellow, syrupy liquid
จุดหลอมเหลว	17 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	122 องศาเซลเซียส
Specific gravity	1.2
Solubility in water	Miscible
NFP Aratings	Health 3, Flammability 1, Reactivity 1
Flash point	112 องศาเซลเซียส
Stability	Stable under ordinary conditions

ที่มา : ดัดแปลงจาก Vaidya และคณะ (2005)

2.2 ประโยชน์ของกรดแลกติก

ด้านอาหาร กรดแลกติกเป็นกรดที่พบมากในผลิตภัณฑ์นม อาหารจำพวกหมักดอง มักนำไปใช้เป็นสารที่ให้รสเปรี้ยว เป็นสารปรับค่าพีเอชในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม นอกจากนี้ยังนิยมนำไปใช้ในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์หลากหลายชนิด รวมถึงใช้เป็นสารกันเสียและป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์

ด้านเภสัชกรรม กรดแลกติกถูกนำมาใช้เป็นสารปรับค่าพีเอชและเป็นวัตถุบิในการสังเคราะห์ยา เป็นสารเติมแต่งเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในการเตรียมวิตามิน เป็นส่วนประกอบของยาเพื่อเพิ่มคุณสมบัติในการละลายน้ำ เป็นสารตัวกลางเพื่อช่วยให้ตัวยาผสมกันได้ดีขึ้น นอกจากนี้อนุพันธ์ของกรดแลกติกยังถูกนำมาใช้ในการรักษาโรค เช่น โรคโลหิตจาง โรคขาดแคลเซียมในกระดูกและฟัน เป็นต้น

ด้านเครื่องสำอาง กรดแลกติกเป็นส่วนผสมที่อยู่ในครีมหรือโลชั่นสำหรับทาเพื่อเพิ่มความชุ่มชื้นให้กับผิว เป็นสารที่ผสมในเครื่องสำอางเพื่อกระตุ้นให้เกิดการหลุดลอกของผิวหนึ่ง ใช้เป็นสารช่วยให้ผิวขาวขึ้นโดยมีกลไกการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส และยังใช้เพื่อควบคุมค่าพีเอชและป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางอีกด้วย

ด้านการฟอกหนังและทอผ้า กรดแลกติกถูกนำไปใช้ในการฟอกหนังให้นุ่มในอุตสาหกรรมฟอกหนัง และเป็นตัวช่วยในการติดสีย้อมและฟิมพ์ซึ่งจะช่วยให้สีติดแน่นยิ่งขึ้นในอุตสาหกรรมทอผ้า

ด้านอุตสาหกรรมพลาสติก กรดแลกติกเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตพลาสติกชีวภาพ (พอลิแลกติกแอซิด) ที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ เพื่อนำมาใช้ทดแทนพลาสติกที่สังเคราะห์จากวัตถุดิบทางอุตสาหกรรมปิโตรเคมี โดยพอลิแลกติกแอซิดนี้สามารถนำไปใช้ในด้านต่างๆ ได้แก่ วัสดุทางการแพทย์และประมง เช่น ฟิล์มคลุมพืช กระถางต้นไม้ เชือกถนและแห วัสดุก่อสร้าง เช่น ฉนวนกันความร้อน ฉนวนกันหรือฉนวน วัสดุสำนักงาน เช่น ซองเอกสาร แฟ้มใส่ปกหนังสือ เป็นต้น ตลอดจนถูกนำมาใช้เป็นบรรจุภัณฑ์อาหาร เช่น ถาดอาหารหรือฟิล์มห่อหุ้มอาหาร ผลิตภัณฑ์เครื่องมือแพทย์ เช่น วัสดุเย็บแผล วัสดุซ่อมแซมกระดูกชิ้นเล็ก ๆ เนื่องจากพลาสติกชีวภาพสามารถย่อยสลายได้ง่าย

ด้านอื่น ๆ กรดแลกติกสามารถนำไปใช้ในการผลิตแลกเกอร์ น้ำหมัก ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด และสารฆ่าเชื้อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ เป็นต้น

จากการสำรวจการผลิตกรดแลกติกทั่วโลก พบว่า มีการผลิตกรดแลกติกถึง 130,000-150,000 ตันต่อปี (Wee และคณะ, 2006 John และคณะ, 2009) มีการคาดการณ์ว่าในแต่ละปี การผลิตกรดแลกติกใน และมีแนวโน้มความต้องการสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งในตลาดโลกจะเติบโต 10% ถึง 15% ต่อปี (Wassewar, 2005; Vijayakumar และคณะ, 2008) บริษัทต้นแบบการผลิต พอลิแลกติกแอซิด (polylactic acid) ของสหรัฐอเมริกา รายงานว่าในปี 2010 ตลาดพอลิแลกติก แอซิด (polylactic acid) มีเป้าหมายต้องการกรดแลกติกถึง 5,000,000 ตัน (Vijayakumar และ คณะ, 2008) และในปัจจุบันพบว่าธุรกิจผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและอุตสาหกรรมการผลิต พลาสติกชีวภาพมีความสนใจในการนำกรดแลกติกใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตมากขึ้นยิ่งขึ้น ซึ่ง ในปี 2012 มีการคาดการณ์ว่าจะสามารถผลิตกรดแลกติกได้มากกว่า 200,000 ตันต่อปี (Maneeboon และคณะ, 2010) โดยมีราคาประมาณ 1.59 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม ที่ความ เข้มข้นของกรดแลกติกเท่ากับ 88 เปอร์เซ็นต์ (Wee และคณะ, 2006; John และคณะ, 2009)

2.3 การผลิตกรดแลกติก

2.3.1 กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี

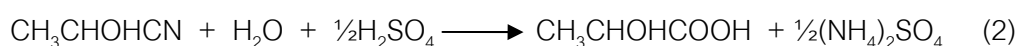
การผลิตกรดแลกติกในกระบวนการทางอุตสาหกรรมโดยวิธีทางเคมี ส่วนใหญ่มักนิยมใช้ การสังเคราะห์ผ่าน Lactonitrile โดยนำ HCN มาทำปฏิกิริยากับ Acetaldehyde ได้เป็น Lactonitrile ตามสมการที่ 1 จากนั้นนำ Lactonitrile ที่ได้มาผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสโดยใช้ กรดซัลฟูริกหรือกรดไฮโดรคลอริก ได้เป็นกรดแลกติกและเกลือแอมโมเนียม ตามสมการที่ 2 จากนั้นกรดแลกติกที่ได้จะถูกนำไปผ่านปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันด้วยเมทานอล ได้เป็นเมทิลแล็ก เททตามสมการที่ 3 แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่นและผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ได้เป็นกรด แลกติกและเมทานอลตามสมการที่ 4

ขั้นตอนที่ 1: Addition of Hydrogen Cyanide
catalyst



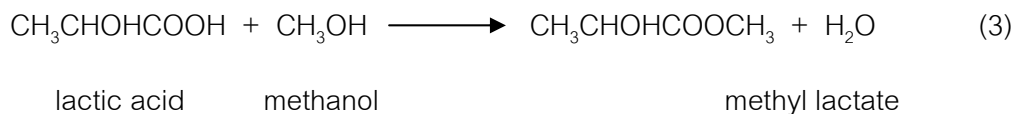
acetaldehyde hydrogen cyanide lactonitrile

ขั้นตอนที่ 2: Hydrolysis by H_2SO_4

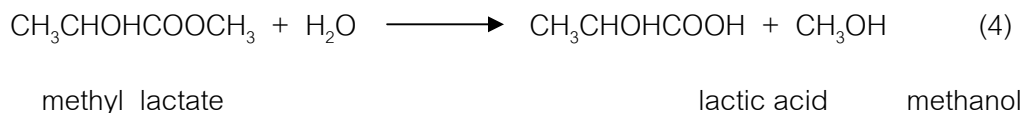


lactonitrile sulfuric acid lactic acid ammonium salt

ขั้นตอนที่ 3: Esterification



ขั้นตอนที่ 4: Hydrolysis by H₂O

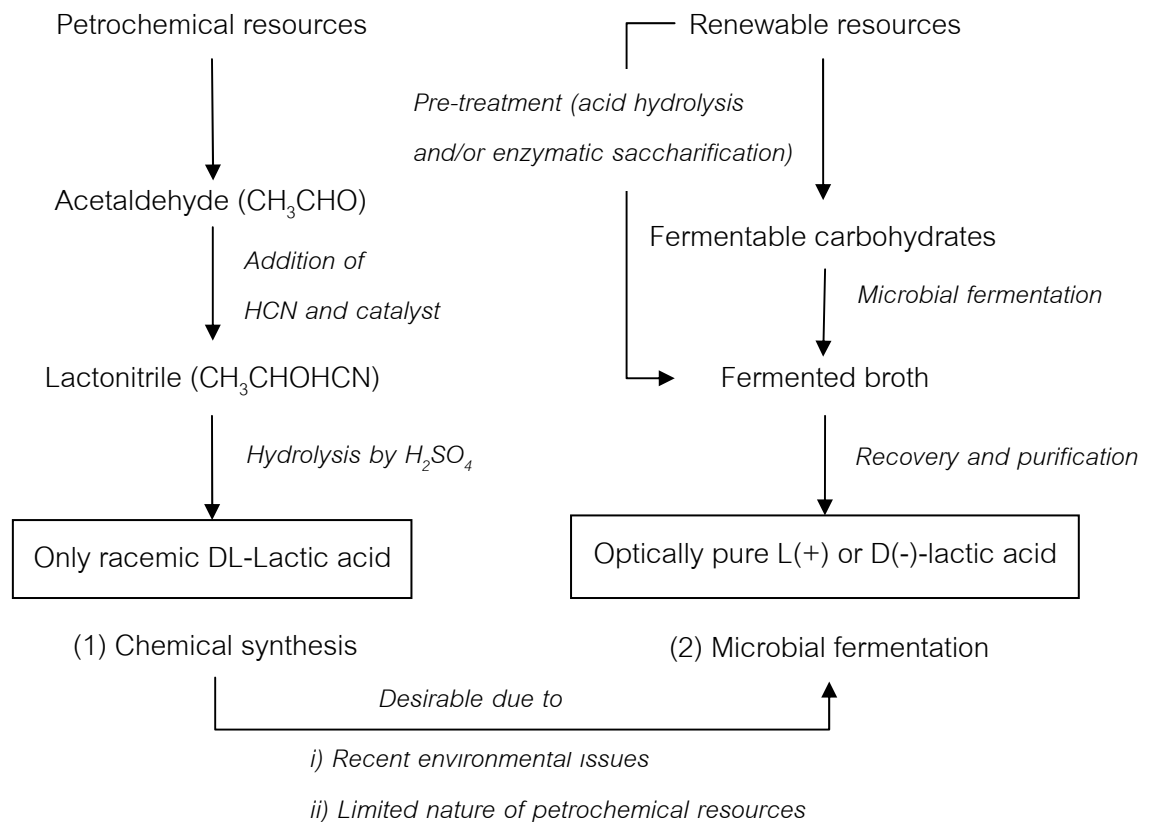


ที่มา : Narayanan และคณะ (2004)

นอกจากที่กล่าวไปแล้วข้างต้น เรายังสามารถผลิตกรดแลกติกโดยวิธีทางเคมีผ่านกระบวนการอื่นๆ ได้อีก ได้แก่ การสังเคราะห์โดยใช้ Propene เป็นซับสเตรท (Vaidya และคณะ, 2005) ปฏิกริยาการย่อยสลายด้วยต่าง (Varadarajan และ Miller, 1999) ปฏิกริยาออกซิเดชันของ propylene glycol ปฏิกริยาระหว่าง Acetaldehyde กับคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ภายใต้ อุณหภูมิและความดัน และปฏิกริยาไฮโดรไลซิสของ Chloropropionic acid เป็นต้น

กระบวนการสังเคราะห์กรดแลกติกโดยวิธีทางเคมีนั้นมีข้อเสียคือ มีการใช้ภาวะรุนแรงในกระบวนการสังเคราะห์ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม และที่สำคัญวัตถุดิบที่ใช้เป็นซับสเตรทในการผลิตนั้นได้มาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ซึ่งนับวันจะมีราคาสูงขึ้นเรื่อยๆ และยังก่อให้เกิดปัญหามลพิษภายหลัง (Kadam และคณะ, 2005; Wee และคณะ, 2006) นอกจากนี้กรดแลกติกที่สังเคราะห์ได้จะอยู่ในรูปไอโซเมอร์ผสม คือ กรด-แอลแลกติกและดี-แลกติก (Wee และคณะ, 2006; Zhang และคณะ, 2007; Tay และ Yang, 2002) ทำให้ต้องมีการทำให้กรดแลกติกมีความบริสุทธิ์ก่อนการนำไปใช้เพื่อการบริโภค ทั้งนี้เนื่องจากกรดแลกติกที่เป็นประโยชน์สำหรับสิ่งมีชีวิตและสามารถใช้ในอาหารและเภสัชกรรมมีเพียงชนิดแอลไอโซเมอร์เท่านั้น เนื่องจาก สิ่งมีชีวิตไม่สามารถเมตาบอลิซึมกรดดี-แลกติกได้ เพราะขาดเอนไซม์ชนิดดีแลกเตททีไฮโดรจีเนส ดังนั้นหากบริโภคกรดแลกติกที่มีปริมาณกรดดี-แลกติกปนเปื้อนในปริมาณมาก อาจส่งผลให้มีปริมาณกรดดี-แลกติกสะสมในกระแสโลหิตสูง เกิดภาวะความเป็นกรดสูงในร่างกาย (Hyper-acidity) และนอกจากนี้แล้วพบว่าในปัจจุบันกระบวนการสังเคราะห์พอลิแลกติกแอซิดมีความต้องการกรดแลกติกในรูปบริสุทธิ์เพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตพอลิเมอร์ชนิดนี้อีกด้วย จากที่กล่าวมาข้างต้นเห็นได้ว่าการสังเคราะห์ทางเคมีมีข้อจำกัดหลายประการในกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต และเมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกโดยการสังเคราะห์ทางเคมีและกระบวนการหมักแสดงดังภาพที่ 2.2 พบว่า การผลิตกรดแลกติกด้วยกระบวนการหมักโดยใช้จุลินทรีย์ จะให้

ผลผลิตกรดแลกติกในรูปของดีบริสุทธ์ หรือแอลบริสุทธ์อย่างเดียว หรืออยู่ในรูปของไอโซเมอร์ผสม ดีแอล ขึ้นอยู่กับลักษณะของจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในกระบวนการหมัก ในขณะที่การผลิตกรดแลกติกทางเคมีจะให้กรดแลกติกของไอโซเมอร์ผสมเพียงอย่างเดียว



ภาพที่ 2.2 เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (1) และกระบวนการหมัก (2)

ที่มา : Wee และคณะ, 2006

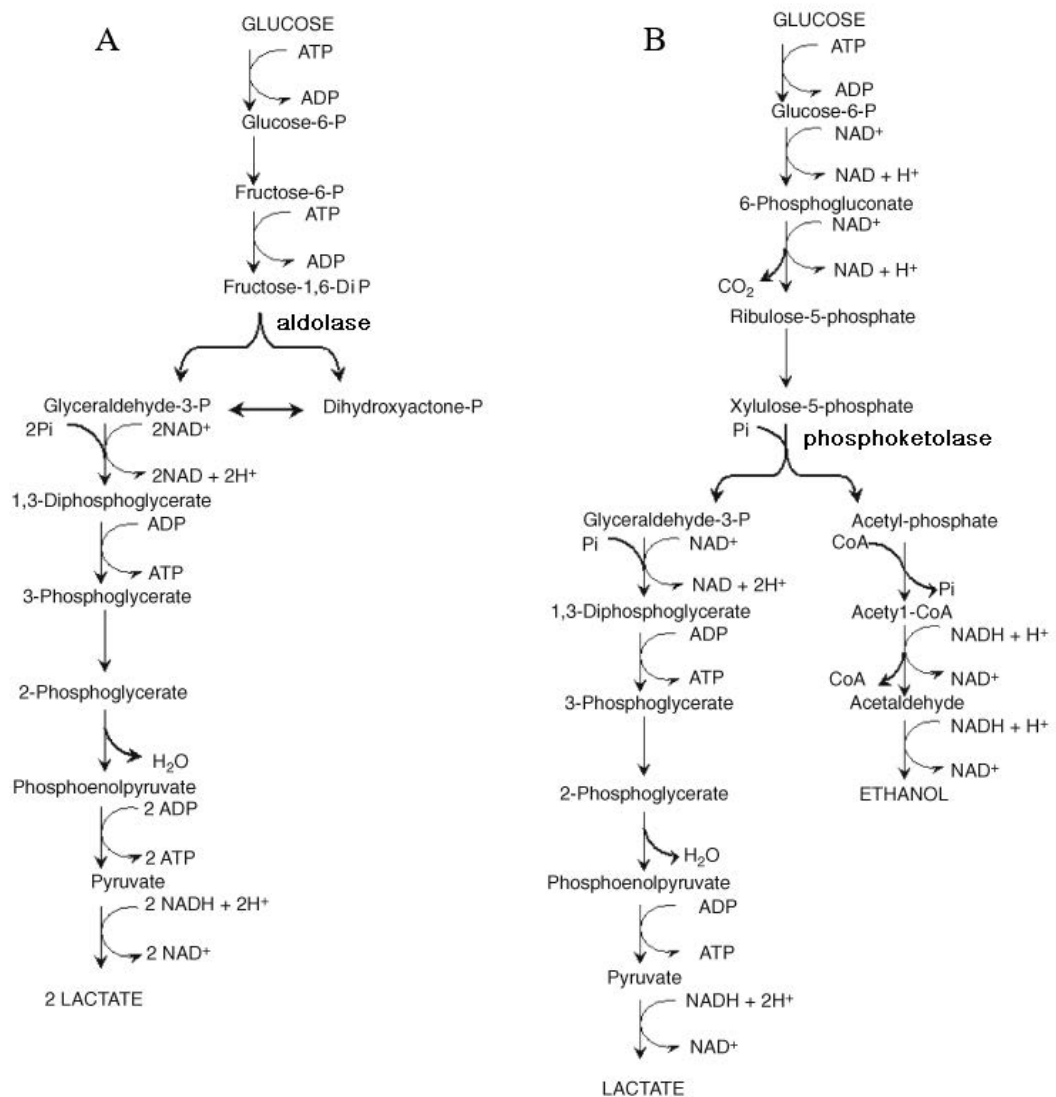
2.3.2 กระบวนการหมัก

2.3.2.1 กระบวนการหมักโดยแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลกติกแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่เป็นโฮโมเฟอร์เมนเททิฟ คือ จะผลิตกรดแลกติกเพียงอย่างเดียว ตัวอย่างของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่

Lactobacillus sp. *Bacillus* sp. และ *Lactococcus* sp. เป็นต้น อีกกลุ่มคือ แบคทีเรียพวกเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟซึ่งนอกจากจะผลิตกรดแลกติกแล้วยังผลิตผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ (Hofvendahl และ Hahn-Hagerdal, 2000) ดังแสดงในภาพที่ 2.3 แบคทีเรียพวกโฮโมเฟอร์เมนเททีฟจะใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแล้วเข้าวิถี Emden-Meyerhof pathway (EMP) โดยการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวทจากนั้นจึงเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นกรดแลกติก โดยกลูโคสหนึ่งโมเลกุลสามารถผลิตกรดแลกติกได้สองโมเลกุล แต่ในกรณีที่ภาวะในระหว่างกระบวนการหมักแปรผันไม่เหมาะสม เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นของสารอาหารอันมีสาเหตุจากการกวนที่ไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ก็สามารถทำให้แบคทีเรียโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ เปลี่ยนวิถีของการสังเคราะห์ไปเป็นแบบ phosphoketolase (PK) ได้ โดยจะได้เป็นกรดแลกติกเพียงหนึ่งโมเลกุล ทั้งนี้จะเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ร่วมอีกด้วยด้วย ส่งผลให้ได้ผลผลิตของกรดแลกติกลดลง (สาโรจน์, 2547) ส่วนพวกเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ กลูโคสหนึ่งโมเลกุลสามารถผลิตกรดแลกติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ อย่างละหนึ่งโมเลกุลออกมาด้วยการเข้าสู่วิถี phosphoketolase (PK) ในงานวิจัยของ Zhao และ Ding (2008) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจาก *Bacillus coagulans* B179 ทำการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 36.2 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

Michelson และคณะ (2006) พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Lactis* DSM 20073 ให้อัตราการผลิตกรดแลกติกสูงถึง 9.9 และ 5.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ ในการหมักแบบไม่ต่อเนื่องโดยใช้สารอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส 126 กรัมต่อลิตร Yeast autolysate 185.7 มิลลิลิตรต่อลิตร KH_2PO_4 0.25 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 0.024 กรัมต่อลิตร MgCl_2 0.03 กรัมต่อลิตร $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.08 กรัมต่อลิตร และ Microelements solution 2.3 มิลลิลิตรต่อลิตร แต่เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องการวิตามินและกรดอะมิโนหลายชนิดในการเจริญและไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจำพวกแป้งและเซลลูโลสได้เนื่องจากไม่มีเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยทำให้ต้องเพิ่มขั้นตอนในการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์หรือกรดก่อนนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักส่งผลให้การผลิตกรดแลกติกมีต้นทุนที่สูง อีกทั้งยังพบว่ากรดแลกติกที่ได้จากแบคทีเรียพวกโฮโมเฟอร์เมนเททีฟนั้นอยู่ในรูปของไอโซเมอร์ผสมหรือกรดแอล (+) และดี (-) แลกติกทำให้เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมักจึงต้องแยกไอโซเมอร์ผสมของกรดแลกติกออกจากกันก่อนนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆต่อไป



ภาพที่ 2.3 เมแทบอลิซึมการผลิตกรดแลกติกแบบโฮโมเฟอร์เมนเทที่ฟด้วยวิถี glycolysis, Embden-Meyerhof-Parnas (A) และเฮเทอโรเฟอร์เมนเทที่ฟด้วยวิถี phosphoketolase (B) จากแลกติกแอซิดแบคทีเรีย ที่มา : http://textbookofbacteriology.net/lactics_2.html

หมายเหตุ (P = phosphate, ADP = adenosine 5'-diphosphate, ATP = adenosine 5'-triphosphate, NAD⁺ = nicotinamide adenine dinucleotide, NADH = nicotinamide adenine dinucleotide)

2.3.2.2 กระบวนการหมักโดยรา

ราที่สามารถผลิตกรดแลกติกเป็นราที่อยู่ในจีนัส *Rhizopus* *Mucor* และ *Monilia* เช่น *Rhizopus arrhizus* *R. Delmar* *R. elegans* *R. japonicus* *R. oryzae* *R. stolonifer* และ *R. chinensis* เป็นต้น สำหรับการผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้ *R. oryzae* เนื่องจากราสามารถผลิตกรดแลค-แลกติกบริสุทธิ์จากแป้ง น้ำตาล รวมทั้งวัสดุการเกษตรที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ รวมทั้งกากน้ำตาลซึ่งมีราคาถูก เนื่องจากรามีอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่สามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล (Wee และคณะ, 2006) ในภาวะที่มีอากาศสามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เช่นเกลือแอมโมเนียมหรือไนเตรต อีกทั้งไม่ต้องการวิตามินหรือกรดอะมิโนเสริมในกระบวนการหมักเหมือนแบคทีเรีย จึงทำให้กระบวนการหมักด้วย *R. oryzae* มีต้นทุนการผลิตทั้งด้านวัตถุดิบและกระบวนการแยกบริสุทธิ์หลังกระบวนการหมักที่ต่ำกว่าการหมักด้วยแบคทีเรีย นอกจากนี้กระบวนการหมักกรดแลกติกจากราสามารถผลิตที่อุณหภูมิสูงและพีเอชต่ำ ซึ่งจะช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ รามีการหมักแบบเฮเทอโรเฟออร์เมนเททีฟ การหมักกรดแลกติกโดยราเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นซับสเตรทในสภาวะที่มีการให้อากาศจะให้อัตราการผลิต 1.5 โมลต่อโมลของกลูโคส เมื่อเปรียบเทียบกระบวนการหมักกรดแลกติกโดย *Lactobacillus* sp. กับ *R. oryzae* ในตารางที่ 2.2

งานวิจัยของ Mirdamadi และคณะ (2002) ได้ทำการเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกระหว่างแบคทีเรียและรา พบว่า สายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลกติกได้สูงได้แก่ *R. oryzae* PTCC 5263 *Lactobacillus plantarum* PTCC 1058 และ *L. bulgaricus* PTCC 1332 โดยสายพันธุ์ *Lactobacillus* sp. จะผลิตกรดแลกติกที่เป็นไอโซเมอร์ผสมโดยมีกรดดีแลกติกอยู่ประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง *R. oryzae* PTCC 5263 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 160 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 84 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 4.10 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เทียบกับ *L. plantarum* PTCC 1058 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 27 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 15 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.56 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ *L. bulgaricus* PTCC 1332 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 30 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 16.67 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.62 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตร ทำการหมักในระดับขวดเขย่าแบบไม่ต่อเนื่อง

ตารางที่ 2.2 เปรียบเทียบกระบวนการหมักระหว่าง *Lactobacillus sp.* กับ *R. oryzae*

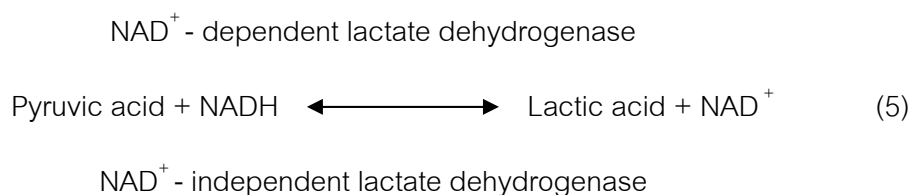
	<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>R. oryzae</i>
Substrates medium	unable to use starch and pentoses require complex growth nutrients	able to use starch and pentoses simple medium composition
Growth conditions	anaerobic, pH > 4.5	aerobic, pH > 3
Products	usually mixtures of L(+) and D(-)-lactic acids	pure L(+)-lactic acid, plus other byproducts (e.g., ethanol,) fumarate, CO ₂
Product yield from glucose	0.85 - 0.95 g/g	usually less than ~0.85 g/g
Product concentration	up to 150 g/L	up to ~130 g/L
Productivity	can be as high as 60 g/L·h	usually lower than 6 g/L·h
Reactor operation	Easy	difficult due to the filamentous cell morphology

ที่มา : Thongchul, 2005

2.4 วิถีเมแทบอลิซึมของ *R. oryzae*

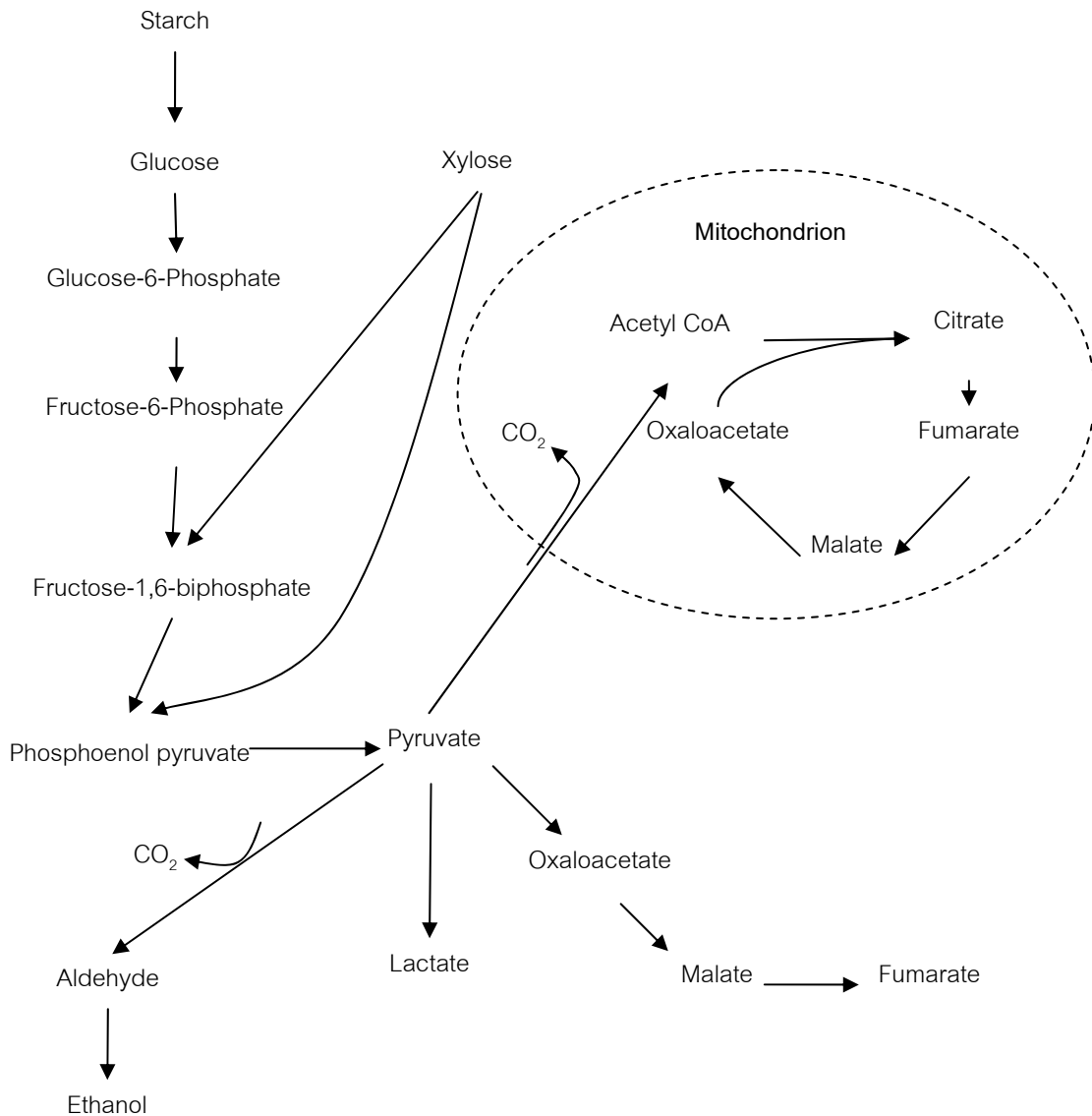
จากงานวิจัยของ Wright และคณะ (1996) ได้ศึกษาแบบจำลองวิถีเมแทบอลิซึมของ กลูโคสและพัฒนาแบบจำลองวิถีเมแทบอลิซึมของรา *R. oryzae* จากทฤษฎีการควบคุมวิถีเมแทบอลิซึม (Metabolic control theory) ภายใต้ภาวะที่ปัจจัยที่ถูกควบคุมต่างๆ คงที่ ด้วยการติดตาม (¹⁴C)-กลูโคสในวิถีไกลโคไลซิสและวัฏจักร TCA ดังภาพที่ 2.4 พบว่า รา *R. oryzae* สามารถใช้แป้งเป็นแหล่งอาหารได้โดยตรง เนื่องจากในรามีอะไมเลสเพื่อใช้ในการย่อยโมเลกุลของแป้งโดยเปลี่ยนแป้งเป็นกลูโคส จากนั้นจึงเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวท โดยวิถี Emden-Meyerhof pathway (EMP) นอกจากนี้ รายังสามารถใช้น้ำตาลไซโลสเป็นซับสเตรทโดยเปลี่ยนไซโลสเป็นไพรูเวทโดยวิถีเพนโทสฟอสเฟต (HMP) ถ้าอยู่ในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสและปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อสูง ราก็จะเปลี่ยนไพรูเวทเป็นแล็กเททด้วย NAD- dependent แล็กเททดีไฮโดรจีเนส (Pritchard, 1973) โดยมี NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน แต่ในสภาวะที่ปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อหมด หรือเมื่อรามีการสร้างสปอร์ ค่าแอกทิวิตี้ของแล็กเททดีไฮโดรจีเนสจะลดลง

จะเกิดการเปลี่ยนแล็กเททกลับมาเป็นไพรูเวทได้ด้วย NAD-independent แล็กเทดีไฮโดรจีเนส ดังสมการที่ 5



นอกจากนี้ไพรูเวทที่เกิดขึ้นยังถูกนำเข้าสู่วัฏจักร TCA ในไมโทคอนเดรียเพื่อสร้างเซลล์และพลังงานหรือเปลี่ยนเป็นกรดฟูมาริก สำหรับในภาวะที่ถูกจำกัดด้วยอากาศ ภาวะเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นเอทานอลด้วยแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ดังนั้นในการผลิตกรดแล็กติกโดยกระบวนการหมักด้วยรานนอกจากได้กรดแล็กติกแล้วยังอาจได้ผลิตภัณฑ์อื่น เช่น กรดฟูมาริก คาร์บอนไดออกไซด์ และเอทานอลขึ้นกับสภาวะที่ใช้ในการหมัก ดังนั้นการรักษาระดับออกซิเจนที่ละลายภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพจึงมีความสำคัญต่อกระบวนการผลิตกรดแล็กติก (Bai และคณะ, 2003)

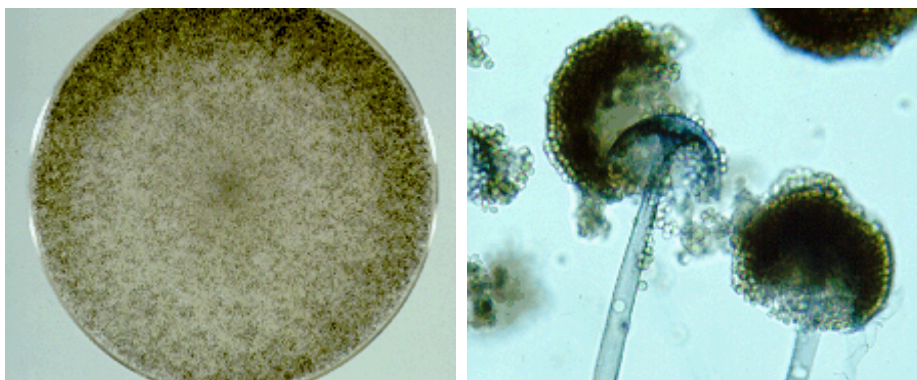
แต่เนื่องจากลักษณะสัณฐานวิทยาของราที่เป็นเส้นใย ทำให้กระบวนการหมักกรดแล็กติกด้วยอาหารเหลวด้วยเซลล์แขวนลอยของ *R. oryzae* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพมักจะมีประสบปัญหาเรื่องเส้นใยของราที่พันรอบแกนหมุนและใบพัด และเจริญเติบโตเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนตรงส่วนใดส่วนหนึ่งของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ทำให้เกิดปัญหาถ่ายเทอากาศและอาหารภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อการเจริญของรา และลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักจะมีผลต่อการผลิตกรดแล็กติก จึงมีลดปัญหาดังกล่าวนี้ด้วยวิธีการยัดตริงเซลล์ ซึ่งวิธีนี้สามารถช่วยในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานของราในระหว่างกระบวนการหมักในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ได้



ภาพที่ 2.4 กระบวนการเมแทบอลิซึมของกลูโคสในรา *R. oryzae*
(ที่มา: Thongchul, 2005)

2.5 ลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae*

รา *R. oryzae* ถูกจัดอยู่ใน Order Mucorales Family Mucoraceae เส้นใยไม่มีผนังกันเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่จะสร้างสปอร์สีดำ ดังแสดงในภาพที่ 2.5 มีอับสปอร์ลักษณะค่อนข้างกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40-350 ไมโครเมตร อยู่ที่ปลายก้านชูอับสปอร์ซึ่งมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงสีน้ำตาลอมดำ สปอร์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4-11 ไมโครเมตร ลักษณะกลม หรือรูปไข่ (Ellis, 1997) แสดงดังภาพที่ 2.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต คือ 35 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญเติบโตได้ คือ 5-7 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญเติบโตได้ คือ 44-49 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 2.5 ลักษณะของรา *Rhizopus oryzae*

(ที่มา: Domsch และคณะ, 1980)

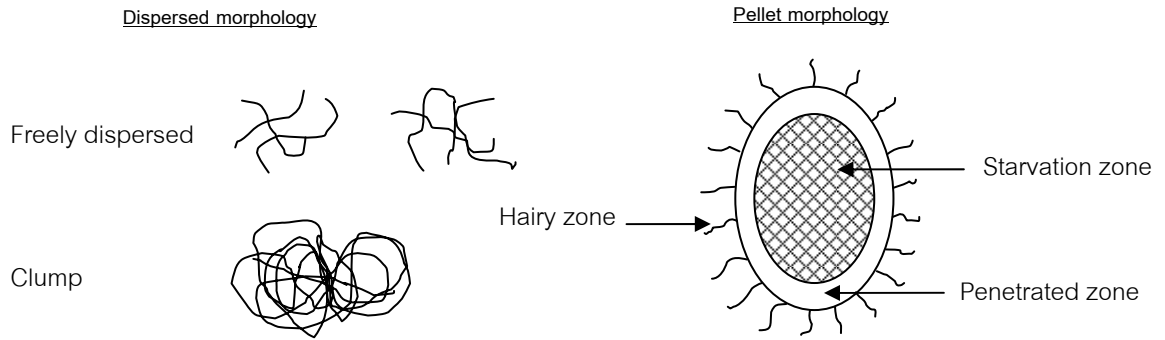
ในกระบวนการหมักในอาหารเหลวลักษณะทางสัณฐานของราจะถูกกำหนดโดยสภาวะแวดล้อมภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ เช่น อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ อัตราการให้อากาศ อัตราการกวน เป็นต้น ลักษณะทางสัณฐานทั่วไปของราแบ่งเป็น 2 กลุ่มได้แก่ Disperse mycelia และ Pellets ดังภาพที่ 2.6 ซึ่ง Disperse mycelia ยังแบ่งเป็น Freely disperse และ Mycelial clumps โดยลักษณะการเจริญแบบ Freely disperse ประกอบไปด้วยเส้นใย (Hyphal) มากกว่า 3 สาย มาเรียงซ้อนทับกันซึ่งลักษณะการเรียงแบบนี้นับเป็น 1 Loop เมื่อเส้นใยมาเรียงซ้อนทับกันมากกว่า 3 Loop เรียกว่า Clumps หรือ การเจริญแบบกลุ่มก้อน

ลักษณะการเจริญแบบ Pellets (Thongchul, 2005) แบ่งได้เป็น

The outer zone หรือ **Hairy zone** เป็นส่วนที่อยู่บริเวณรอบนอกของ Pellets มีลักษณะคล้ายขน ซึ่งขนเหล่านี้ทำหน้าที่ในการดูดซึมแร่ธาตุอาหารและอากาศเพื่อใช้ในการเจริญของเซลล์และผลิตกรดแลกติก

Penetrated zone เป็นโซนที่อยู่ถัดเข้ามาอีกชั้นของ Pellets ในโซนนี้แร่ธาตุอาหารและอากาศสามารถซึมผ่านเข้าถึงเซลล์ได้ ทำให้เซลล์เกิดกิจกรรมในการผลิตสารเมแทบอลิซึม ซึ่งขนาดของโซนขึ้นกับ ความหนาแน่นของ Pellets อัตราการเจริญและความเข้มข้นของอากาศที่ละลายในอาหาร

Starvation zone เป็นโซนที่อยู่บริเวณด้านในสุดของ Pellets ที่โซนนี้แร่ธาตุอาหารและอากาศไม่สามารถซึมผ่านเข้าถึงเซลล์บริเวณนี้ได้ ทำให้เซลล์ถูกจำกัดในเรื่องของการถ่ายเทอาหารและอากาศ เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมเซลล์จะผลิตผลิตภัณฑ์อื่น เช่น เอทานอล และเกิด Autolysis (Cui และคณะ 1998)



ภาพที่ 2.6 ลักษณะทางสัณฐานของรา

(ที่มา: ดัดแปลงจาก Thongchul, 2005)

R. oryzae มีลักษณะสัณฐานที่เปลี่ยนแปลงไปนั้น เนื่องจากมีกระบวนการหมักที่แตกต่างกัน และลักษณะสัณฐานแบบต่างๆ ของ *R. oryzae* นั้นได้ส่งผลต่อการผลิตกรดแลกติก ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ลักษณะพื้นฐานของ *R. oryzae* ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

Morphology	Process	Cultivation system	Yield (%)	Productivity (g/(L·h))	Concentration (g/L)	Reference
Cotton flocs	Batch	ALR	87	1.8	104.6	Park และคณะ (1998)
Cotton flocs	Batch	STR	86	1.7	103.6	Kosakai และคณะ (1997)
Small pellets	Batch	BCR	88	2.58	83	Zhou และคณะ (2000)
Small pellets	Repeated batch	ALR	-	1.07	85.7	Yin และคณะ (1998)
Small pellets	Repeated batch	STR	62-74	2.9-6.2	60	Yang และคณะ (1995)
Small pellets	Repeated batch	STR	74.2	-	74.92	Bai และคณะ (2003)
Filamentous	Semicontinuous	STR	75.3	2.91	--	Martak และคณะ (2003)

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Zhang และคณะ (2007)

หมายเหตุ ALR : Air-lift reactor
 BCR : Bubble column reactor
 STR : Stirred tank reactor

Du และคณะ (1998) พบว่าลักษณะของเส้นใยของ *R. oryzae* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Bubble column ทำการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง มี 2 แบบ คือการเจริญแบบ Filamentous และแบบ Pellet ซึ่งการเกิดลักษณะรูปร่างของเส้นใยขึ้นกับค่าพีเอชเริ่มต้นและการเติม CaCO_3 เมื่อค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เส้นใยของราเจริญเป็นแบบ Filamentous และสามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 62.5 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 1.46 กรัมต่อชั่วโมงต่อกรัม เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 27 ชั่วโมง ส่วนอาหารที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 2 เส้นใยของราเจริญเป็นแบบ Pellet โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 66 กรัมต่อลิตรคิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 1.46 กรัมต่อชั่วโมงต่อกรัม เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 43 ชั่วโมง

Bai และคณะ (2003) รายงานว่า ลักษณะสัณฐานแบบ Pellet นั้นเกิดในขั้นตอนของการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นจากการหมักในระดับขวดเขย่าของรา *R. oryzae* โดยมีปัจจัยที่ก่อให้เกิด Pellet ได้แก่ การเติมแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) ปริมาณของหัวเชื้อเริ่มต้นและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในกระบวนการหมักกรดแลกติกด้วยเซลล์แขวนลอยในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ เนื่องจากแคลเซียมคาร์บอเนตนั้นมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (Martak และคณะ, 2003) ดังนั้น เมื่อเติมแคลเซียมคาร์บอเนตมากเกินไปจึงทำให้ส่วนที่ไม่ละลายน้ำจะไปอยู่บริเวณด้านล่างของขวด เมื่อเซลล์เจริญเซลล์จะไปเกาะกับแคลเซียมคาร์บอเนตทำให้ลักษณะของเซลล์มีการเจริญแบบกลุ่มก้อน (Clump) และขนาดของ Pellet ที่เกิดขึ้นภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพนั้นจะขึ้นกับรอบการกวนและอัตราการให้อากาศ

Yang และคณะ (1995) พบว่า ลักษณะสัณฐานแบบ Pellet ที่มีขนาดเล็กในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพนั้นเกิดจากการใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนในระหว่างของขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อในการหมักในระดับขวดเขย่า Martak และคณะ (2003) พบว่า อัตราการผลิตกรดแลกติกลดลงจาก 2.91 เป็น 1.63 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและการผลิตกรดแลกติก คิดเป็นค่า Y_{PS} ลดลงจาก 75.3 เป็น 62.6 เปอร์เซ็นต์ เมื่อลักษณะสัณฐานของรา *R. arrhizus* เปลี่ยนเป็นแบบ Pellet หลังจากการหมักที่ 152 ชั่วโมงในการหมักระบบ Periodical bleed and feed

Liu และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดย *R. oryzae* NRRL 395 ที่มีลักษณะการเจริญแบบ Clump เทียบกับการเจริญแบบ Pellet ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร พบว่า ลักษณะการเจริญแบบ Clump สามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 33 กรัมต่อลิตร ส่วนเซลล์ที่มีการเจริญแบบ Pellet สามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 60 กรัม เมื่อทำการหมัก 2.5 วันที่ 200 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ควบคุมค่าพีเอชเท่ากับ 7.0 ± 0.1 ด้วย 20 เปอร์เซ็นต์ ของ Ca(OH)_2 และอุณหภูมิที่ใช้คือ 27 องศาเซลเซียส

2.6 การตรึงเซลล์ *R. oryzae*

กระบวนการหมักกรดแลกติกด้วยเซลล์แขวนลอยของ *R. oryzae* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพมักจะประสบปัญหาคือ เซลล์เจริญกระจัดกระจายทั่วเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ทำให้อาหารเกิดความหนืด ส่งผลให้ต้องเพิ่มแรงในการปั่นกวนมากขึ้น และที่สำคัญไม่สามารถในการควบคุมลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ได้ ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมัก ทำให้ประสบปัญหาในการถ่ายเทอากาศและอาหารให้กับเซลล์ภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ส่งผลโดยตรงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และความสามารถในการผลิตกรดแลกติก (Chotisubha-anadha และคณะ, 2011; Znidarsic และ Pavko, 2001; Wang และคณะ, 2010; Thongchul และ Yang, 2004) เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวการยึดตรึงเซลล์จึงเป็นวิธีทางเลือกหนึ่งในกระบวนการหมัก การยึดตรึงเซลล์สามารถควบคุมสัณฐานของเชื้อในระหว่างการบวกรวมกันได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการตรึงเซลล์ยังสามารถช่วยเพิ่มอัตราการผลิตกรดแลกติก เพิ่มอัตราการถ่ายเทอากาศให้กับเซลล์ และการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพยังทำได้สะดวกมากขึ้นเมื่อเทียบกับกระบวนการหมักกรดแลกติกด้วยเซลล์แขวนลอย (Chotisubha-anadha และคณะ, 2011; Tay และ Yang, 2002) แสดงดังตารางที่ 2.4 ดังนั้น จึงได้มีการศึกษาและพัฒนาเทคนิคการยึดตรึงเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก แสดงในตารางที่ 2.5 และ 2.6

วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์แบ่งออกเป็น 4 วิธี (Bicherstaff, 1997) (ภาพที่ 2.7)

1) การตรึงเซลล์จุลินทรีย์โดยวิธีการเชื่อมไขว้ (Cross linking method)

เซลล์จุลินทรีย์เกิดการเชื่อมโยงระหว่างเซลล์ด้วยตัวเอง เมื่อเติมสารเชื่อมไขว้ เช่น glutaraldehyde, toluene di-isocyanate ซึ่งสารเหล่านี้จะทำปฏิกิริยาที่กลุ่มอะมิโนอิสระ และกลุ่มคาร์บอกซิลอิสระบนผนังเซลล์ หรือการเติมสารจำพวก polyamines, polyethyleneimine หรือ polystyrene sulfonate ทำให้เกิดเป็นกลุ่มเซลล์จุลินทรีย์ขนาดใหญ่

2) การตรึงเซลล์จุลินทรีย์โดยวิธีการยึดเกาะ (Adsorption method)

แรงยึดเกาะระหว่างเซลล์จุลินทรีย์กับวัสดุตรึงจะมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ โดยวัสดุตรึงจะจับกับเซลล์ด้วยแรงแวนเดอร์วาลส์ พันธะไฮโดรเจน (เมื่อมีไอออนอื่นๆช่วย เช่น Ca^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+}) หรือพันธะไฮโดรเจน แรงเหล่านี้จะขึ้นอยู่กับกลุ่มต่างๆ ที่อยู่บนผิวของผนังเซลล์จุลินทรีย์ ได้แก่ peptide, hexosamines และ diaminopimelic เนื่องจากกลุ่มเหล่านี้จะมีประจุทำให้สามารถจับกับกลุ่มที่มีประจุของวัสดุตรึงได้ การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ด้วยวิธีนี้สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว วัสดุตรึงราคาถูก ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ เนื่องจากไม่มีการเติมสารเคมีลงไป แต่การตรึงเซลล์จุลินทรีย์ด้วยวิธีนี้ มีข้อเสียคือ อาจเกิดการหลุดของเซลล์ได้ง่าย เนื่องจากการ

ยึดเกาะนี้เกิดขึ้นแบบไม่จำเพาะ อาจจะทำให้สิ่งแปลกปลอม (contaminate product) บางส่วนไปยึดติดกับวัสดุตั้งแทนได้ นอกจากนี้การหลุดของเซลล์สามารถเกิดขึ้นได้ง่าย เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพการเพาะเลี้ยง เช่น ค่าพีเอช อุณหภูมิ และค่าไอออนิก เป็นต้น วัสดุตั้งที่นิยมใช้ในการยึดเกาะ ได้แก่ เรซินแลกเปลี่ยนประจุชนิด DEAE-cellulose CM-cellulose เซรามิก อีฐูแก้ว ซีลี้อย ฟองน้ำ เส้นใยผ้า เป็นต้น

3) การตรึงเซลล์จุลินทรีย์โดยวิธีการจับกันของพันธะโควาเลนต์ (Covalent binding method)

เซลล์จุลินทรีย์จะถูกตรึงจับกับวัสดุตั้งด้วยพันธะโควาเลนต์ที่เกิดขึ้นระหว่าง หมู่ฟังก์ชันที่ผิวของวัสดุตั้งกับหมู่ฟังก์ชันของกรดอะมิโนที่ผิวของเซลล์จุลินทรีย์ โดยการใช้สารพาหะที่มีกลุ่มกัมมันต์อยู่ ได้แก่ CNBr-cellulose และ glutaraldehyde-gelatin เป็นต้น ข้อดีของการตรึงโดยวิธีนี้คือ เซลล์จุลินทรีย์จะถูกตรึงถาวร ดังนั้นจึงไม่เกิดปัญหาการหลุดของเซลล์ออกจากวัสดุตั้ง นอกจากนี้เซลล์ตรึงยังสามารถดูดซึมอาหารได้โดยไม่มีข้อจำกัดในการแพร่กระจาย เหมือนกันกับการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการดักจับเซลล์ไว้ในพอลิเมอร์อีกด้วย

4) การตรึงเซลล์จุลินทรีย์โดยวิธีการดักจับ (Entrapment method)

การตรึงเซลล์โดยวิธีการดักจับนี้จะมีการจำกัดการเคลื่อนที่ของเซลล์จุลินทรีย์ไว้ในวัสดุตั้งที่มีลักษณะเป็นเจล การเกิดเจลนี้สามารถทำได้หลายวิธีด้วยกันคือ

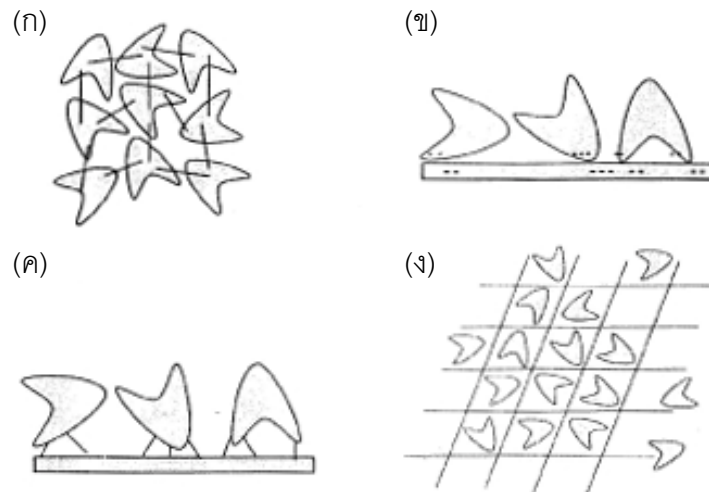
1) การเกิดเจลเนื่องจากการพอลิเมอร์ไรเซชัน (Polymerization) ของสารอินทรีย์ เช่น polyacrylamide

2) การเกิดเจลเนื่องจากความร้อน (Thermal gelation) เช่น collagen gelatin agar agarose และ K-carrageenan เป็นต้น

3) การเกิดเจลเนื่องจากการเชื่อมโยงไขว้เข้ากับไอออนของโลหะ (Ionotropic gelation) เช่น alginate และ chitosan เป็นต้น

4) การเกิดเจลเนื่องจากการควบแน่น (Polycondensation gelation) เช่น polyurethane และ epoxyresin เป็นต้น

การคัดเลือกวัสดุตั้งให้เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์จุลินทรีย์ ควรพิจารณาจากพื้นที่ผิว ขนาดและรูปร่างที่เหมาะสม มีการซึมผ่านของสารได้ ไม่ละลายน้ำ เสถียรต่อสารเคมี ความร้อน และแรงกระแทก สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้



ภาพที่ 2.7 วิธีการตรึงเซลล์จุลินทรีย์

(ก) การตรึงเซลล์จุลินทรีย์โดยวิธีการเชื่อมไข้ว (Cross linking method)

(ข) การตรึงเซลล์จุลินทรีย์โดยวิธีการยึดเกาะ (Adsorption method)

(ค) การตรึงเซลล์จุลินทรีย์โดยวิธีการจับกันของพันธะโควาเลนต์ (Covalent binding method)

(ง) การตรึงเซลล์จุลินทรีย์โดยวิธีการดักจับ (Entrapment method)

ตารางที่ 2.4 การผลิตกรดแลกติกจากกระบวนการหมักโดยเซลล์แขวนลอยในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

Fermentation conditions	Substrate	Yield (%)	Productivity (g/(L·h))	Concentration (g/L)	Operation period	Reference
Free cells (pellet) in air-lift bioreactor	Corn starch 90 g/L	75.8 (cycle 1-6)	2.02 (cycle 1-6)	91 (cycle 1-6) 76 (cycle 7-9)	9 repeated batches, 14 days	Yin และคณะ (1998)
Free cells (filamentous/pellet) in bubble bioreactor	Glucose 78 g/L (filamentous) Glucose 76 g/L (filamentous)	-	-	62 (filamentous) 66 (pellet)	Batch, 27 h Batch, 43 h	Du และคณะ (1998)
Free cells in bubble column bioreactor	Glucose 94 g/L	88	2.58	83	Batch, 32 h	Zhou และคณะ (2000)
Free cells in stirred tank bioreactor with a periodical bleed and feed (PBF)	Glucose 100 g/L	67.3	2.31 kg/m ³ ·h	~80	14 PBF cycles, 10 days	Martak และคณะ (2003)
Free cells (pellet) in stirred tank bioreactor	Glucose 100 g/L	74.2	-	74.92	6 repeated batches	Bai และคณะ (2003)
Free cells (pellet) in stirred tank bioreactor	Glucose 120 g/L	-	3.40-3.85	81-95	Semicontinuous, 25 cycles	Wu และคณะ (2010)

ตารางที่ 2.5 การผลิตกรดแลคติกจากกระบวนการหมักโดยเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

Fermentation conditions	Substrate	Yield (%)	Productivity (g/(L·h))	Concentration (g/L)	Operation period	Reference
Immobilized cells on fibrous matrix in a RFBB	Glucose 70 g/L	90	2.5	226	Repeated batch and fed-batch	Tay และ Yang (2002)
	Corn starch 70 g/L	100	1.65	127		
Immobilized cells on honeycomb matrix in bubble column bioreactor	Glucose 80 g/L	93.4	0.72	68.8	Repeated batch, 9 cycles	Wang และคณะ (2010)
Immobilized cells on cotton matrix in a static bed bioreactor	Glucose 70 g/L	83	2.1	137	Batch	Thongchul และ Yang (2004)
Immobilized cells on cotton matrix in a static bed bioreactor	Glucose 70 g/L	62	2.09	37.83	Batch	Chotisubha-anandha และคณะ (2011)

ตารางที่ 2.6 การยัดตริงเซลล์รา *R. oryzae* ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

Carrier	Process	Substrate	Yield (%)	Productivity (g/(L·h))	Concentration (g/L)	Reference
Calcium alginate	Repeated batch	Glucose	72	2.5	62	Hang และคณะ (1989)
Calcium alginate	Batch	Glucose	65	1.6	73	Hamamci และ Ryu (1994)
Cotton cloth	Repeated batch and	Starch	100	1.65	127	Tay และ Yang (2002)
	fed-batch	Glucose	90	2.5	226	
Cotton cloth	Batch	Glucose	83	2.1	137	Thongchul และ Yang (2004)
Cotton like flocs	Batch	Glucose	87	-	104.6	Park และคณะ (1998)
Honeycomb	Repeated batch	Glucose	93.4	0.72	68.8	Wang และคณะ (2010)
Loofa sponge	Repeated batch	Starch	-	1.84	80.75	Ganguly และคณะ (2007)
Polymer support	Batch	Glucose	65	-	-	Tamada และคณะ (1992)
Polyurethane foam	Repeated batch	Glucose	78	4.6	40	Dong และคณะ (1996)
Poly(vinyl alcohol)-cryogel	Batch	Glucose	94	5.0	112	Efremenko และคณะ (2006)
	Semi-batch	Glucose	78	2.8	173	
Rotating disc	Batch and continuous	Glucose	70	-	-	Lin และคณะ (1998)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Zhang และคณะ (2007)

Hang และคณะ (1989) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยเทคนิคตรึง ของ *R. oryzae* NRRL 395 บน Calcium alginate ในระดับขวดเขย่า ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเซลล์ตรึงสามารถรักษาสภาพได้ดี และสามารถนำกลับมาใช้หมักซ้ำได้ถึง 9 รอบ ในระยะเวลาการหมัก 18 วัน โดยการหมักรอบที่ 5 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 62.4 กรัมต่อลิตร ในขณะที่กระบวนการหมักด้วยเซลล์แขวนลอยเมื่อนำมาหมักซ้ำ พบว่าปริมาณของกรดแลกติกที่ผลิตได้ไม่คงที่ อัตราการผลิตกรดแลกติกจะสูงในช่วงแรกของการหมัก และจะเริ่มลดลงตามลำดับเมื่อทำการหมักต่อไประยะยาว

Hamamci และ Ryu (1994) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยเทคนิคตรึง *R. oryzae* บน Alginate ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ fluidized-bed โดยทำการหมักแบบไม่เนื่อง ใช้กลูโคส ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 73 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 64.8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการหมักนาน 44.5 ชั่วโมง

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

Ganguly และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีตรึงเซลล์ *R. oryzae* RBU2-10 บนใยบวบ โดยใส่ใยบวบขนาด 1.008 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 4 ชั้นต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 100 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น 3×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 80.75 กรัมต่อลิตรเมื่อทำการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยอัตราการผลิตกรดแลกติก 1.66 – 1.84 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

2.7 ข้อเสียดรหในกระบวนการหมักกรดแลกติก

การผลิตกรดแลกติกนั้นโดยส่วนใหญ่แล้วจะนิยมใช้กลูโคสบริสุทธิ์เป็นข้อเสียดรหในกระบวนการหมัก เนื่องจากหาง่าย และไม่ต้องผ่านขั้นตอนต่างๆ สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมักได้โดยตรง แต่ในปัจจุบันกลูโคสบริสุทธิ์มีราคาค่อนข้างสูง ส่งผลต่อราคาต้นทุนในการผลิตที่สูงขึ้นตามอีกด้วย ดังนั้นการเลือกใช้หัววัตถุดิบมาใช้เป็นข้อเสียดรหจึงเป็นสิ่งคัญอย่างยิ่งต่อการลดต้นทุนของกระบวนการผลิต ปัจจุบันจึงสนใจที่จะแก้ปัญหาดังกล่าวโดยมุ่งเน้นไปที่การเลือกใช้ข้อเสียดรห ซึ่งมีการเลือกใช้หัววัตถุดิบที่ราคาถูก รวมถึงสิ่งเหลือใช้จากทางเกษตรกรรมที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ ตลอดจนของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมทาง

การเกษตร เช่น มันฝรั่ง ชั่งข้าวโพดและกากน้ำตาล ตามลำดับ โดยเฉพาะอย่างยิ่งวัตถุดิบที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบเช่น กากมันสำปะหลัง เป็นต้น มาใช้เป็นขั้วสเตรทในการผลิตกรดแลกติก และจากคุณสมบัติ *R. oryzae* ซึ่งเป็นราที่มีอะไมโลไลติกแอกทิวิตี้ กล่าวคือมีอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่สามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคสได้ (Wee และคณะ, 2006) แต่อย่างไรก็ตามขั้วสเตรทดังกล่าวเหล่านั้นบางตัวยังไม่อยู่ในสภาพที่จะนำไปเข้าสู่กระบวนการหมักได้ทันที จะต้องผ่านการย่อยเพื่อให้ได้เป็นน้ำตาลที่พร้อมจะนำไปเข้าสู่กระบวนการหมักได้ก่อน (fermentable sugar) ซึ่งน้ำตาลที่ได้หลังจากผ่านการย่อยแล้วนั้น จะทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมักต่อไป ซึ่งสามารถจำแนกขั้วสเตรทได้คร่าวๆออกเป็น 3 ประเภท (ตารางที่ 2.7) ได้แก่

2.7.1 ขั้วสเตรทที่อยู่ในรูปของน้ำตาลบริสุทธิ์ (pure sugar) เช่น กลูโคส ซูโครส เป็นต้น กลูโคส (Glucose) เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว มีสูตรทั่วไปคือ $C_6H_{12}O_6$ เนื่องจากกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เชื้อจึงสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้โดยตรงไม่ต้องผ่านขั้นตอนการย่อยก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก กลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวทด้วยวิถี Emden-Meyerhof pathway (EMP) จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นกรดแลกติก

2.7.2 ขั้วสเตรทที่อยู่ในรูปของแป้งหรือมีแป้งเป็นองค์ประกอบ (starch/starchy materials) เช่น แป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง มันฝรั่ง กากมันสำปะหลัง เป็นต้น ขั้วสเตรทประเภทนี้ ไม่สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้โดยตรง จำเป็นต้องผ่านการย่อยให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อน (fermentable sugar) จึงจะสามารถนำไปใช้ในกระบวนการหมักได้ มีรายงานว่า *Rhizopus* spp. สามารถผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณสูงจากการใช้แหล่งคาร์บอนจำพวก แป้งข้าวโพด แป้งข้าวเจ้า แป้งมันสำปะหลัง เป็นต้น (Yu และ Hang, 1989) เนื่องจากรามีเอนไซม์อะไมเลสเพื่อย่อยโมเลกุลแป้ง (Wee และคณะ, 2006) จึงสามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากวัสดุการเกษตรที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบโดยไม่ต้องผ่านการย่อย

2.7.3 ขั้วสเตรทที่อยู่ในรูปของลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) เช่น ชั่งข้าวโพด ชานอ้อย เป็นต้น ขั้วสเตรทประเภทนี้ ไม่สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้โดยตรง จำเป็นต้องผ่านการย่อยให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อน (fermentable sugar) จึงจะสามารถนำไปใช้ในกระบวนการหมักได้ ลิกโนเซลลูโลสส่วนมากจะประกอบเซลลูโลส (cellulose) เป็นหลัก รองมาคือ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) ตามลำดับ ซึ่งจากองค์ประกอบดังกล่าวก่อให้เกิดอุปสรรคต่อการย่อยให้ได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการปรับสภาพ (pretreatment) ก่อนการนำไปย่อย (hydrolysis) ในขั้นตอนต่อไปเพื่อให้ได้เป็นน้ำตาลออกมาก่อนที่จะนำไปใช้ในกระบวนการหมัก

ตารางที่ 2.7 วัสดุที่สามารถนำมาผลิตกรดแลกติก

	Raw material	Microorganisms	Lactic acid yield	References
Pure sugar	Glucose	<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395	0.62 g/g substrate	Chotisubha-anandha และคณะ (2011)
	Glucose	<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395	0.90 g/g substrate	Tay และ Yang (2002)
	Sucrose	<i>Rhizopus oryzae</i> GY18	~0.81 g/g substrate	Guo และคณะ (2010)
Starchy	Potato starch	<i>Rhizopus oryzae</i> , <i>R. arrhizus</i>	0.87 to 0.97 g/g substrate	Huang และคณะ (2005)
	Cassava pulp hydrolysate	<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395	0.06 to 0.23 g/g substrate	Thongchul และคณะ (2010)
	Corn starch	<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395	~1.00 g/g substrate	Tay และ Yang (2002)
Lignocellulose	Corn cob hydrolysate	<i>Rhizopus oryzae</i> GY18	355 g/kg corn cob	Guo และคณะ (2010)
	Corn cob hydrolysate	<i>Rhizopus sp.</i> MK-96-1196	0.24 g/g substrate	Miura และคณะ (2004)
	Wood hydrolysate	<i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395	> 0.85 g/g substrate	Woiciechowski และคณะ (1999)
	Waste paper	<i>Rhizopus oryzae</i>	> 0.8 g/g substrate	Park และคณะ (1998)

ที่มา : ดัดแปลงจาก John และคณะ, 2009

ตารางที่ 2.8 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักซบสเตรทที่เป็นสิ่งเหลือใช้จากการเกษตร

Products	Substrates	Microorganisms	References
Lactic acid	Sugarcane bagasse	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	John และคณะ (2006)
	Cassava bagasse,	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	John และคณะ (2006)
	Cassava pulp	<i>Rhizopus oryzae</i>	Thongchul และคณะ (2010)
	Corn cob	<i>Rhizopus oryzae</i>	Miura และคณะ (2004)
Ethanol	Cassava pulp	<i>Escherichia</i>	Apiwatanapiwat และคณะ (2011)
		<i>Clostridium</i>	
		<i>saccharoperbutylacetomicum</i>	Thang และคณะ (2010)
Citric acid	Cassava bagasse	<i>Aspergillus niger</i>	Vandenberghe และคณะ (2004)
Mushrooms production	Cassava bagasse	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Leifa และคณะ (2001)
	Coffee residues	<i>Flamulina velutipes</i>	Leifa และคณะ (2000)
		<i>Pleurotus ostreatus</i>	Leifa และคณะ (2001)
Aroma production	Cassava bagasse	<i>Klyveromyces marxianus</i>	Christen และคณะ (2000)
	Coffee husks	<i>Ceratocystis fmlbriata</i>	Bramorski และคณะ (1998)
			Soares และคณะ (2000)
		<i>Rhizopus sp.</i>	Medeiros และคณะ (2000)
		Bramorski และคณะ (1998)	
		Brand และคณะ (2000)	
Fumaric acid	Cassava bagasse	<i>Rhizopus sp.</i>	Carta และคณะ (1999)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Soccol และ Vandenberghe (2003)

Bulut และคณะ (2004) ได้ทำการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอน 5 แหล่งในการผลิตกรดแลกติกได้แก่ กูลโคส ซูโครส กากน้ำตาลจากหัวบีท แครอบพอดและรำข้าวสาลี พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 60 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้กูลโคสความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งกากน้ำตาลจากหัวบีทเมื่อผ่านการพลาสเจอร์ไรเซชันสามารถผลิตกรดแลกติกได้เพิ่มขึ้นจาก 37 กรัมต่อลิตรเป็น 40 กรัมต่อลิตรและยังพบว่า เมื่อเติมสารสกัดจากยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดแลกติกเป็น 49 กรัมต่อลิตร พี่ชท้องถิ่นอย่างแครอบพอดยังสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลกติกโดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 58 กรัมต่อลิตร ส่วนรำข้าวสาลีไม่เหมาะสำหรับการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพราะให้ปริมาณกรดแลกติกต่ำเพียง 6 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

Yin และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดย *R. oryzae* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวน และเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบลอยตัว โดยใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร พบว่าราที่ทำการหมักในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบลอยตัว สามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 92 กรัมต่อลิตร ใช้ระยะเวลาการหมัก 3 วัน ในขณะที่ราที่ทำการหมักในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวนสามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 82 กรัมต่อลิตร ภายหลังจากการหมักเป็นระยะเวลา 4 วัน จะเห็นว่าความสามารถในการผลิตกรดแลกติกของราที่เลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวนน้อยกว่าการหมักในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบลอยตัว เนื่องจากราที่เลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวนมีการเจริญเกาะกลุ่มเป็นก้อนเซลล์ขนาดใหญ่ บางส่วนจะเกิดเป็น wall growth ติดตามผนังภายในของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ และอุดตันท่อส่งอากาศ ทำให้ประสิทธิภาพในการใช้ซับสเตรทและความสามารถในการผลิตกรดแลกติกลดลง

Ruengruglikit และ Hang (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดย *R. oryzae* โดยใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนโดยการหมักในระดับขวดเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที 30 องศาเซลเซียส พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 299 ± 6.8 กรัมต่อกลีโกรัมแป้งข้าวโพดแห้ง ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

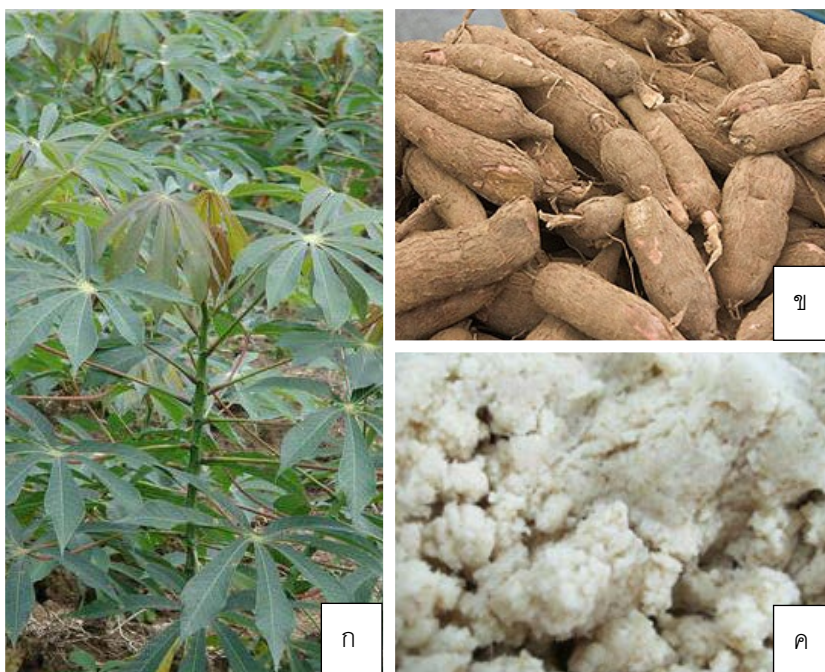
Tay และ Yang (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดย *R. oryzae* NRRL 395 ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Rotating fibrous-bed แบบ Fed-batch โดยใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สามารถผลิตกรดได้สูงถึง 127 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 1.65 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Park และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากของเหลือที่ได้จากสำนักงาน (Waste office) ได้แก่ กระดาษ จากนั้นนำกระดาษมาผ่านกระบวนการย่อย ก่อนนำมาเป็นวัตถุดิบในการหมัก โดย *R. oryzae* NRRL 395 ทำการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง ในระดับขวดเขย่า พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 49.1 กรัมต่อลิตร ค่า $Y_{p/s}$ เท่ากับ 59 เปอร์เซ็นต์

Jin และคณะ (2005) เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกระหว่าง *R. arrhizus* 36017 กับ *R. oryzae* 2062 โดยใช้ของเสียอุตสาหกรรมการผลิตอาหารจากมันฝรั่ง ข้าวโพด ข้าวสาลีและสับปะรด เป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นของแป้งหรือน้ำตาล 20 กรัมต่อลิตร พบว่า *R. arrhizus* 36017 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด คิดเป็นค่า $Y_{p/s}$ 0.94-0.97 กรัมต่อกรัมของแป้งหรือน้ำตาล ขณะที่ *R. oryzae* 2062 สามารถผลิตกรดแลกติกคิดเป็นค่า $Y_{p/s}$ 0.65-0.76 กรัมต่อกรัมของแป้งหรือน้ำตาล และยังพบว่า เมื่อเติม $(NH_4)_2SO_4$ สารสกัดจากยีสต์และเปปโตินสามารถเพิ่มผลผลิตกรดแลกติกขึ้น 8-15 เปอร์เซ็นต์และมีน้ำหนักเซลล์เพิ่มขึ้น 10-20 เปอร์เซ็นต์

2.8 กากมันสำปะหลัง

มันสำปะหลัง (cassava, tapioca, manioc, mandioca หรือ yuca) มีชื่อสามัญหรือชื่อที่เรียกทั่วไปเป็นภาษาอังกฤษว่า cassava หรือ tapioca ในประเทศบราซิลและอาร์เจนตินา เรียกว่า madioca ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลังเป็นไม้พุ่มยืนต้น (ภาพที่ 2.8 (ก)) มีอายุอยู่ได้หลายปี ลักษณะลำต้นสูงแตกต่างกันตามพันธุ์ และสภาพแวดล้อมโดยอาจสูงถึง 1-5 เมตร ลักษณะของใบมันสำปะหลังเป็นแบบใบเดี่ยว (single leaf) สีของใบแตกต่างกันตามพันธุ์ เช่นเดียวกับสีของลำต้น ระบบรากของมันสำปะหลังสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ รากจริง (true or wiry root) และรากสะสม (modified or storages roots) รากสะสมนี้จะเจริญกลายเป็นหัวมันสำปะหลัง โดยทั่วไปในต้นมันสำปะหลังต้นหนึ่งจะมีรากสะสมอาหารหรือหัวอยู่ประมาณ 5-20 หัวต่อต้น มันสำปะหลังเป็นพืชที่เก็บสะสมอาหารไว้ในราก เมื่อพืชมีการสร้างอาหารจากใบและส่วนเป็นสีเขียวแล้ว จะสะสมในรูปของคาร์โบไฮเดรต คือ แป้ง ไว้ในราก จะเห็นว่องค์ประกอบส่วนใหญ่ในรากนั้นนอกจากน้ำแล้วคือแป้ง ซึ่งมีถึงร้อยละ 70-80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหัวมันสำปะหลังถูกนำเข้าสู่กระบวนการเพื่อเปลี่ยนให้เป็นแป้งมันสำปะหลังดิบ เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการดังกล่าวจะได้เป็นส่วนที่เป็นกากออกมาในภายหลัง ซึ่งในประเทศไทยอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังมีขนาดใหญ่และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ผลิตแป้งแต่ละครั้งจะใช้หัวมันสำปะหลังสดประมาณ 10 ล้านตัน ซึ่งก่อให้เกิดกากมันอย่างน้อยไม่ต่ำกว่า 1 ล้านตันต่อปี (Sriroth และคณะ, 2000)



ภาพที่ 2.8 ลักษณะของต้นมันสำปะหลัง (ก), หัวมันสำปะหลัง (ข) และกากมันสำปะหลัง (ค)

ตารางที่ 2.9 องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง

องค์ประกอบ	% (โดยน้ำหนักเปียก)	% (โดยน้ำหนักแห้ง)
แป้ง	17.80 ± 1.24	68.89 ± 4.00
ความชื้น	72.00 ± 0.08	-
เถ้า	0.44 ± 0.00	1.70 ± 0.01
โปรตีน	0.40 ± 0.00	1.55 ± 0.03
เส้นใย	7.17 ± 0.06	27.75 ± 0.20
ไขมัน	0.03 ± 0.00	0.12 ± 0.01
pH	4.99	4.99

Values are the mean. S.E. of two determinations.

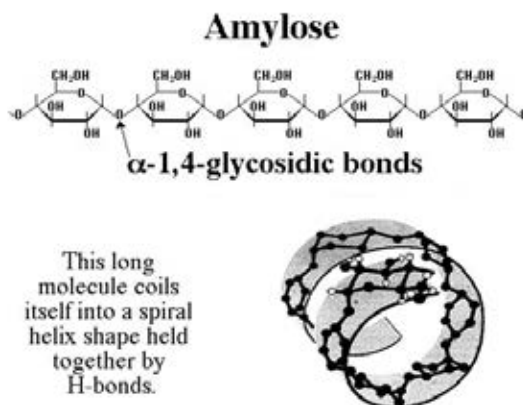
ที่มา : Sriroth และคณะ, 2000

กากมันสำปะหลัง (cassava pulp) เป็นของแข็งที่เหลือจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง มีลักษณะดังภาพที่ 2.8 (ค) ซึ่งมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักอยู่ในปริมาณมาก (ประมาณร้อยละ 50-60 โดยน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 2.9) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณภาพหัวมันและกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังของโรงงาน) ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นวัสดุเสริมในกระบวนการหมัก และองค์ประกอบที่รองลงมาคือพวกเส้นใย (fiber) หรือส่วนที่เป็นลิกโนเซลลูโลสอยู่ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งรายละเอียดของแต่ละองค์ประกอบของกากมันสำปะหลังมีดังนี้

2.8.1 แป้งและโครงสร้างของแป้ง

แป้ง (starch) เป็นโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) ที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช ประกอบด้วยหน่วยย่อย คือ กลูโคส ซึ่งจะถูกเก็บสะสมไว้ที่ส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ ราก ลำต้นใต้ดิน ผล และเมล็ด ในธรรมชาติจะพบอยู่ในรูปเม็ดแป้ง แป้งประกอบด้วยพอลิเมอร์ 2 ชนิด ได้แก่

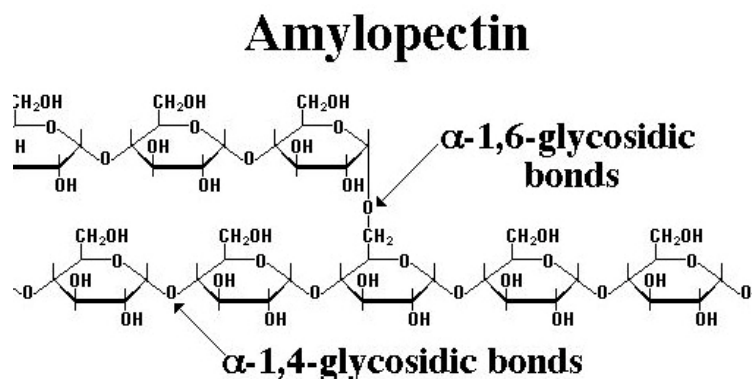
2.8.1.1 อะไมโลส (amylose) มีอยู่ในแป้งประมาณ 10-25% ประกอบด้วยกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -1, 4-ไกลโคซิดิก เป็นสายยาวไม่แตกกิ่งหรือแขนง ดังแสดงในภาพที่ 2.9 จึงจัดเป็นเกลียว helix อะไมโลสเป็นผงสีขาว ไม่มีรสหวาน เมื่ออยู่ในน้ำจะมีสีขุ่นขาว ทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนให้สีน้ำเงินเข้ม เกิดจากการที่โมเลกุลของไอโอดีนแทรก (intercalate) เข้าไประหว่างเกลียว helix ของอะไมโลส ทำให้เกิดสีม่วงขึ้นมา



ภาพที่ 2.9 โครงสร้างของอะไมโลส(amylose)

2.8.1.2 อะไมโลเพกติน (amylopectin) ประกอบด้วยกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -1, 4-ไกลโคซิดิก และมีการแตกกิ่งที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -1, 6-ไกลโคซิดิก ทำให้มี

โครงสร้างเป็นกิ่ง ดังแสดงในภาพที่ 2.10 เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนจะให้สีม่วงแดง เนื่องจากมีการแตกกิ่งจำนวนมาก ทำให้ไอโอดีนที่แทรกซึมเข้าไปติดได้ในปริมาณน้อย ทำให้เกิดสีม่วงแดงขึ้นมา



ภาพที่ 2.10 โครงสร้างของอะไมโลเพกติน (amylopectin)

2.8.2 เส้นใยหรือส่วนที่เป็นลิกโนเซลลูโลสในกากมันสำปะหลัง

เส้นใย (fiber) คือส่วนที่เป็นลิกโนเซลลูโลสที่หลงเหลืออยู่ในกากมันสำปะหลังซึ่งมาจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังของโรงงานอุตสาหกรรมแป้ง เส้นใยนี้จัดได้ว่ามีอยู่ในปริมาณน้อยมากถ้าเทียบกับสัดส่วนขององค์ประกอบทั้งหมด ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าเส้นใยก็คือลิกโนเซลลูโลส ซึ่งลิกโนเซลลูโลสส่วนมากจะประกอบด้วยเซลลูโลส (cellulose) เป็นหลัก รองมาคือ เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) และลิกนิน (lignin) ตามลำดับ ดังนี้

2.8.2.1 เซลลูโลส (Cellulose) พบในผนังเซลล์ (cell wall) ของพืช เป็นพอลิเมอร์ของ β -D-กลูโคส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β -1,4 ไกลโคซิดิก ซึ่งต่างจากพอลิเมอร์ของอะไมโลสและอะไมโลเพกติน พันธะ β -1, 4 ไกลโคซิดิก ทำให้พอลิเมอร์ของเซลลูโลสมีลักษณะยึดออกไปเป็นเส้นตรง ในขณะที่พันธะ α -1, 4-ไกลโคซิดิก จะทำให้เกิดการขดเป็นวง (helix) นอกจากนี้การเกิดพันธะ อินเตอร์- และ อินตรา- เซน ไฮโดรเจน (inter- and intra-hydrogen bond) ทำให้เซลลูโลสมีความแข็งแรง และทนแรงดึงได้สูง เซลลูโลสจะถูกสลายด้วยเซลลูเลสซึ่งจะได้เป็นกลูโคสออกมา

2.8.2.2 เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช ประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลเชิงเดี่ยว (monosaccharide) ชนิดต่างๆ ตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปเป็นจำนวน 100 โมเลกุลที่มีคุณสมบัติในการละลายเหมือนกันคือ ละลายได้ในสารละลายต่าง น้ำตาลเชิงเดี่ยวนี้แบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ เพนโทแซนส์ (pentosans) และ เฮกโซแซนส์ที่ไม่ใช่เซลลูโลส

(non cellulose hexosans) น้ำตาลเชิงเดี่ยวที่พบมากในเฮมิเซลลูโลสคือ ดี-ไซแลนส์ (D-xylans) และ ดี-กลูโค-ดีแมนแนนส์ (D-gluco-D-mannans) และมีไซโตเซนส์เป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยวชนิดอื่นๆ เช่น แอล-อะราบิโนส (L-arabinoses)

2.8.2.3 ลิกนิน (lignin) เป็นสารประกอบพอลิเมอร์ไม่มีรูปผลึก จะเกาะกันอยู่ในชั้นระหว่างเส้นใย (middle lamella) ซึ่งทำหน้าที่ ยึดเกาะเส้นใยเข้าด้วยกัน และมีบางส่วนผสมอยู่ในเส้นใยด้วย โครงสร้างพื้นฐานของลิกนินคือ ฟีนิลโพรเพน (phenylpropane) หรือสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีคาร์บอน 9 อะตอม ประมาณร้อยละ 65-67 เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มักพบอยู่ร่วมกับเซลลูโลส ลิกนินไม่ละลายน้ำ ไม่มีสมบัติทางการยืดหยุ่น เพราะฉะนั้นจึงทำให้พืชที่มีลิกนินมากมีความแข็งแรงทนทาน เมื่อพืชตายลิกนินจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ลิกเนส (Lignase) หรือลิกนินเนส (Ligninase)

เนื่องจากองค์ประกอบส่วนใหญ่ของกากมันสำปะหลัง คือ คาร์โบไฮเดรต และมีส่วนของลิกโนเซลลูโลสอยู่ปนเล็กน้อย จึงมีความเป็นไปได้สูงในการนำกากมันสำปะหลังกลับมาใช้ประโยชน์ โดยการย่อยกากมันสำปะหลังให้เป็นสารละลายน้ำตาลกลูโคส เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมัก ได้มีการรายงานการนำกากมันสำปะหลังมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น รายงานของ Kosugi และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai no.7 (strain K7) โดยการย่อยแป้งที่อยู่ในกากมันโดยใช้เอนไซม์ทางการค้า ได้แก่ อัลฟา-อะไมเลส กลูโคอะไมเลส และเซลลูเลสในการย่อยเส้นใยเซลลูโลส เพื่อเปลี่ยนให้เป็นกลูโคส พบว่า สามารถได้กลูโคส 37.2 กรัมต่อลิตร จากการใช้กากมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์ ในหน่วยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้ผลผลิตเอทานอล 0.50 กรัมต่อกรัมซบสเตรท อัตราการผลิต 0.77 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็นค่า $Y_{p/s}$ เท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์

แต่อย่างไรก็ตามเส้นใยที่เป็นส่วนของลิกโนเซลลูโลสที่อยู่ภายในกากมันสำปะหลังนี้มีบทบาทสำคัญต่อการสกัดแยกส่วนที่เป็นแป้งออกมา ซึ่งเส้นใยจะมีลักษณะเป็นโครงร่างตาข่ายห่อหุ้มแกรนูลแป้งอยู่ภายใน ในเซลล์พืชผนังเซลล์มีลักษณะเป็นโครงสร้างขนาดเล็กจะประกอบด้วยเซลลูโลสที่ปรากฏตัวในรูปของพอลิแซ็กคาไรด์ และเมทริกซ์ของโปรตีนห่อหุ้มล้อมด้วยชั้นที่ประกอบส่วนที่เป็นเพคติน แกรนูลของแป้งจะอยู่ในเมทริกซ์พอลิเมอร์ที่ซับซ้อนซึ่งยากต่อการที่จะถูกปลดปล่อยออกมา ดังนั้นเส้นใยเหล่านี้จึงเป็นอุปสรรคในการย่อยให้ได้กลูโคส ดังนั้นการพัฒนาการสกัดแป้งออกจากกากมันควรต้องมีการปรับปรุงโดยการไปทำลายเมทริกซ์เหล่านั้นเพื่อที่แกรนูลของแป้งจะสามารถถูกปลดปล่อยออกมาภายนอกได้ การทำลายเมทริกซ์ที่เป็นเส้นใยสามารถทำได้โดยวิธีการปรับสภาพ (pretreatment) (Sriroth และคณะ, 2000) กากมัน

สำปะหลังก่อนการนำไปย่อย (hydrolysis) ในขั้นตอนลำดับต่อไปเพื่อให้ได้เป็นน้ำตาล (fermentable sugar) จากส่วนที่เป็นพอลิแซคคาไนด์ (แป้ง เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส) ที่อยู่ในกากมันสำปะหลัง ก่อนที่จะนำไปใช้ในกระบวนการหมัก

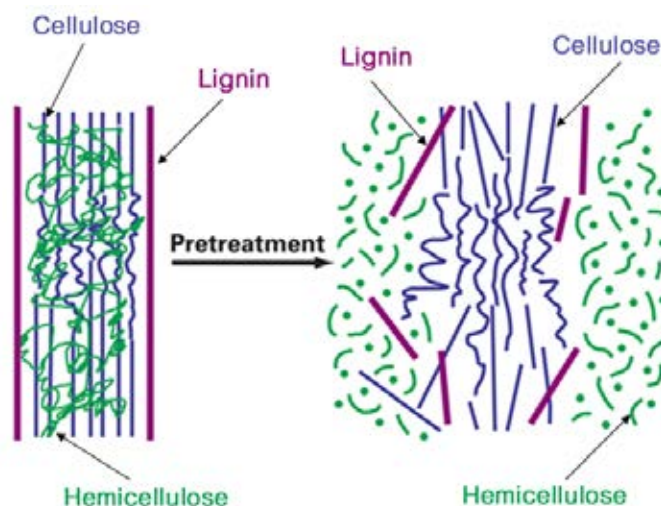
2.9 กระบวนการผลิตกรดแลคติกจากวัตถุดิบเหลือใช้จากทางอุตสาหกรรมเกษตรที่มีส่วนประกอบของลิกโนเซลลูโลส

การผลิตกรดแลคติกจากวัตถุดิบเหลือใช้จากทางอุตสาหกรรมเกษตรที่มีส่วนประกอบของลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยกระบวนการที่สำคัญ 3 ขั้นตอน คือ การปรับสภาพ (pretreatment) การย่อยสลาย (hydrolysis) และกระบวนการหมัก (fermentation)

2.9.1 การปรับสภาพ (pretreatment)

การปรับสภาพวัตถุดิบเป็นการแยกส่วนประกอบของลิกโนเซลลูโลสออกจากกันเป็น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ดังแสดงในภาพที่ 2.11 วัตถุประสงค์ของการปรับสภาพคือ เพื่อที่จะกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ลดความเป็นคริสตัลไลน์ของเซลลูโลส เพิ่มรูพรุนและพื้นที่ผิวให้กับวัตถุดิบ ทำให้วัตถุดิบถูกย่อยสลายได้ดีขึ้น (Kumar และคณะ, 2009) (ตารางที่ 2.10)

กากมันสำปะหลังมีองค์ประกอบของส่วนที่เป็นเส้นใยซึ่งก็คือส่วนของลิกโนเซลลูโลสที่หลงเหลืออยู่ ดังนั้นกากมันสำปะหลังจึงประกอบไปด้วยแป้ง เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน การปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสนั้นมีจุดมุ่งหมาย คือการปรับเปลี่ยนขนาดและโครงสร้างตำแหน่งทางเคมีของสารชีวมวล ทำให้โครงสร้างของลิกนินแตกสลายและทำลายโครงสร้างผลึกของเซลลูโลส โดยการกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ลดความเป็นผลึกของเซลลูโลส และเพิ่มช่องว่างด้วยการผ่านกระบวนการปรับสภาพ (Kumar และคณะ, 2009) เพื่อเอนไซม์สามารถที่จะเข้าไปย่อยเซลลูโลสได้ง่ายขึ้น ส่งผลให้การย่อยส่วนของแป้งให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดียวนั้นสามารถทำได้อย่างรวดเร็วและได้ yield ที่สูงขึ้น



ภาพที่ 2.11 ลักษณะของลิกนินเซลลูโลสภายหลังจากการปรับสภาพ

(ที่มา: ดัดแปลงจาก Kumar และคณะ, 2009)

การปรับสภาพที่ดีต้องมีลักษณะดังต่อไปนี้ (Sun และ Cheng, 2002)

- 1) เพิ่มความสามารถในการย่อยสลายของเอนไซม์ได้
- 2) หลีกเลี่ยงการทำลายคาร์โบไฮเดรต
- 3) หลีกเลี่ยงการเกิดผลิตภัณฑ์ที่จะเป็นตัวยับยั้งกระบวนการย่อยสลายและกระบวนการหมักในภายหลัง
- 4) มีค่าใช้จ่ายที่ไม่สูงจนเกินไป

วิธีการปรับสภาพวัสดุประเภทลิกนินเซลลูโลสแบ่งเป็น 4 วิธี ดังต่อไปนี้

2.9.1.1 การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ (physical pretreatment)

การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพเป็นการลดขนาดและเพิ่มพื้นที่ของวัตถุดิบเพื่อให้เอนไซม์สามารถเข้าย่อยสลายได้ดีขึ้น วัตถุดิบสามารถถูกบดให้ละเอียดได้โดยการใช้หลายวิธีรวมกัน คือ การตัด การบด และการม่ โดยปกติภายหลังจากการตัดแล้ววัตถุดิบจะมีขนาด 10 – 30 มิลลิเมตร และหลังจากการบดหรือม่แล้ววัตถุดิบจะมีขนาด 0.2 – 2 มิลลิเมตร (Sun และ Cheng, 2002) นอกจากนี้การแยกสลายด้วยความร้อน (pyrolysis) ยังเป็นการปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพอีกวิธีหนึ่งที่สามารถแยกสลายเซลลูโลสได้อย่างรวดเร็วโดยใช้อุณหภูมิสูง (Sánchez และ Cardona, 2008)

ในการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ หากมีการลดขนาดของวัตถุดิบแล้วตามด้วยการปรับสภาพด้วยวิธีอื่นๆ จะทำให้เกิดการย่อยสลายได้ดีขึ้น ดังนั้นถ้าไม่มีการปรับสภาพต่อ จะส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ลดลง 20 เปอร์เซ็นต์ของค่าที่ได้ตามทฤษฎี ในขณะที่หากมีการปรับสภาพต่อจะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลสูงขึ้น 90 เปอร์เซ็นต์หรือมากกว่า

2.9.1.2 การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีกายภาพ (physicochemical pretreatment)

การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีกายภาพเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีทางกายภาพ โดยวิธี steam explosion หรือ autohydrolysis เป็นวิธีที่มีการศึกษามากที่สุดในกระบวนการนี้จะใช้น้ำที่ความดันสูงทำให้เกิดปฏิกิริยา autohydrolysis (Sánchez และ Cardona, 2008) วิธีนี้จะใช้อุณหภูมิ 160 – 260 องศาเซลเซียส ความดัน 0.69 – 4.89 MPa เป็นเวลาไม่กี่วินาทีจนถึง 2 – 3 นาที ก่อนที่วัตถุดิบจะกลับสู่ความดันบรรยากาศ เมื่อความดันลดลงอย่างรวดเร็วจะทำให้วัตถุดิบนั้นแตกออกเป็นชิ้นเล็กๆ (Sun และ Cheng, 2002) ทำให้เฮมิเซลลูโลสเกิดการย่อยสลาย สามารถแยกเซลลูโลสออกจากเฮมิเซลลูโลสและลิกนินได้ ดังนั้นจึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของการย่อยสลายเซลลูโลส ปัจจัยที่ส่งผลต่อการปรับสภาพด้วยวิธี steam explosion คือ ระยะเวลาที่ใช้ อุณหภูมิ ขนาดของวัตถุดิบ และปริมาณความชื้น วิธีนี้เป็นหนึ่งในวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดสำหรับการปรับสภาพไม้เนื้อแข็งและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร แต่มีประสิทธิภาพน้อยในไม้เนื้ออ่อน (Sánchez และ Cardona, 2008)

การเติมกรดซัลฟิวริก (อาจจะเป็นซัลเฟอร์ไดออกไซด์) หรือคาร์บอนไดออกไซด์ ลงใน steam explosion สามารถเพิ่มการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ลดการเกิดสารยับยั้ง และสามารถกำจัดเฮมิเซลลูโลสได้อย่างสมบูรณ์มากขึ้น (Morjanoff และ Gray, 1987)

นอกจากนี้ ammonia fiber explosion (AFEX) จัดเป็นการปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีกายภาพอีกวิธีหนึ่งซึ่งวัสดุประเภทลิกนินเซลลูโลสจะอยู่ในแอมโมเนียเหลวที่อุณหภูมิและความดันสูงเป็นระยะเวลาหนึ่งก่อนที่ความดันจะลดลงอย่างรวดเร็ว (Sun และ Cheng, 2002)

2.9.1.3 การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี (chemical pretreatment)

มีการใช้สารเคมีต่างๆในการปรับสภาพวัตถุดิบ Sun และ Cheng (2002) ได้ปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีออกเป็น 5 วิธี คือ

1) การปรับสภาพด้วยกรด แบ่งออกเป็น

1.1) การใช้กรดเข้มข้น เช่นกรดซัลฟิวริกหรือกรดไฮโดรคลอริก แม้ว่าจะเป็นสารที่ทำให้เกิดการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี แต่กรดที่มีความเข้มข้นสูงจะมีความเป็นพิษ มีฤทธิ์กัดกร่อนรุนแรง จึงต้องการภาชนะที่ทนต่อการกัดกร่อนได้ นอกจากนี้ยังต้องมีกระบวนการนำกรดเข้มข้นกลับมาใช้ภายหลังการย่อยสลายแล้ว เพื่อให้มีความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ (Sivers และ Zacchi, 1995)

1.2) การใช้กรดเจือจาง เป็นหนึ่งในวิธีการปรับสภาพที่มีการศึกษามากที่สุด เกิดขึ้นที่อุณหภูมิปานกลางโดยมีการใช้กรดเจือจาง เช่น กรดซัลฟิวริก กรดฟอสฟอริกและกรดไนตริก แต่ส่วนใหญ่นิยมใช้กรดซัลฟิวริกเจือจาง หน้าที่ของกรดอ่อน คือ จะไปย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาล หรืออาจจะกำจัดเฮมิเซลลูโลสและลิกนินบางส่วนออกไปเพื่อให้เซลลูโลสสามารถถูกย่อยสลายได้ดีขึ้น แม้ว่าการใช้กรดอ่อนในการปรับสภาพจะสามารถเพิ่มการย่อยสลายเซลลูโลสได้ดี แต่การใช้วิธีนี้จะมีต้นทุนสูงกว่าการปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีกายภาพบางวิธี เช่น steam explosion หรือ AFEX เนื่องจากต้องมีการทำให้ค่าพีเอชเป็นกลางซึ่งมีความจำเป็นสำหรับกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และกระบวนการหมัก (Sun และ Cheng, 2002) นอกจากนี้การใช้กรดอ่อนยังก่อให้เกิดการสร้างสารประกอบ เช่น กรดอะซิติกและเพอร์ฟลูออรีนในไฮโดรไลเสตซึ่งมีความเป็นพิษต่อเชื้อที่ใช้ในกระบวนการหมัก

2) การปรับสภาพด้วยด่าง

วิธีนี้ใช้อุณหภูมิและความดันต่ำกว่าการปรับสภาพด้วยวิธีอื่นๆ สามารถเกิดขึ้นได้ที่สภาวะห้องแต่ใช้ระยะเวลาอันยาวนานเป็นชั่วโมงหรือเป็นวัน การปรับสภาพด้วยด่างเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิว ลดปริมาณของลิกนินและเฮมิเซลลูโลสในชีวมวลโดยทำลายพันธะระหว่างเฮมิเซลลูโลสและพันธะระหว่างลิกนินที่เชื่อมกับคาร์โบไฮเดรต (Balat และคณะ, 2008) สามารถกำจัดลิกนินได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อองค์ประกอบอื่นๆ (McMillan, 1997) การปรับสภาพวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางจะทำให้วัตถุดิบเกิดการบวมพองส่งผลให้พื้นที่ผิวภายในเพิ่มขึ้น เกิดการลดลงของ degree of polymerization สามารถแยกลิกนินออกจากคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ เป็นการทำลายโครงสร้างของลิกนิน (Sun และ Cheng, 2002) นอกจากนี้การปรับสภาพด้วยด่างอาจใช้เป็นแอมโมเนียหรือแคลเซียมไฮดรอกไซด์ได้เช่นกัน

3) การกำจัดลิกนินด้วยการทำปฏิกิริยาออกซิไดเซชัน (oxidative delignification)

นิยมใช้เป็นไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่มีความเป็นด่าง (ค่าพีเอช 11.5) หรือเรียกว่าอัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์ เป็นวิธีที่สามารถละลายส่วนที่เป็นเฮมิเซลลูโลสและ

ลิกนินออกจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสได้ และสามารถลดความเป็นคริสตัลไลน์ของเซลลูโลสลง จากการศึกษารายงานของ Saha และ Cotta (2006, 2007) พบว่า ฟางข้าวสาลีและแกลบที่ได้รับการปรับสภาพด้วยอัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์ เมื่อถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลที่ใช้ในการหมักได้ถึง 97 และ 96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไม่เกิดสารยับยั้งที่เป็นเพอร์ฟูรัลและไฮดรอกซีเมทิลเพอร์ฟูรัล

4) การใช้โอโซน (ozonolysis)

โอโซนสามารถย่อยลิกนินและเฮมิเซลลูโลสวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสได้ การปรับสภาพด้วยวิธีนี้มีข้อดีคือ สามารถกำจัดลิกนินได้อย่างมีประสิทธิภาพ ไม่ก่อให้เกิดสารพิษในกระบวนการ และสามารถเกิดปฏิกิริยาได้ที่ความดันและอุณหภูมิห้อง (Vidal และ Molinier, 1988) แต่ข้อเสียคือ ต้องใช้โอโซนปริมาณมากทำให้กระบวนการนี้มีต้นทุนสูง

5) กระบวนการ organosolv

เป็นวิธีที่มีการผสมตัวทำละลายอินทรีย์กับตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรดอินทรีย์ เช่นกรดซัลฟิวริกหรือกรดไฮโดรคลอริก เพื่อทำลายลิกนินและพันธะระหว่างเฮมิเซลลูโลส ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการนี้ ได้แก่ เมทานอล เอทานอล อะซิโตน เอทิลีนไกลคอล ไตรเอทิลีนไกลคอล และเตตระไฮโดรเพอร์ฟูรัลแอลกอฮอล์ นอกจากนี้กรดอินทรีย์ เช่น กรดออกซาลิก กรดอะซิติกซัลโฟลิก และกรดซัลโฟลิก สามารถใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการ organosolv ได้เช่นกัน ตัวทำละลายที่ใช้ในกระบวนการนี้ต้องมีการกำจัดออก อาจจะเป็นการระเหยและควบแน่นเพื่อหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ซึ่งช่วยลดต้นทุนได้ การกำจัดตัวทำละลายออกจากกระบวนการเป็นสิ่งจำเป็น เนื่องจากตัวทำละลายเป็นสารยับยั้งในกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก (Sun และ Cheng, 2002)

2.9.1.4 การปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ (biological pretreatment)

เป็นการใช้จุลินทรีย์เช่น brown-rot fungi white-rot fungi และ soft-rot fungi ในการย่อยสลายลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ส่วนใหญ่ brown-rot fungi จะย่อยเซลลูโลส ในขณะที่ white-rot fungi และ soft-rot fungi จะย่อยทั้งเซลลูโลสและลิกนิน white-rot fungi เป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการปรับสภาพวัสดุประเภทเซลลูโลสด้วยวิธีทางชีวภาพ (Sun และ Cheng, 2002) การย่อยสลายลิกนินด้วย white-rot fungi มักจะใช้จุลินทรีย์ซึ่งได้แก่ *Phanerochaete chrysosporium* *Pleurotus ostreatus* และ *Trametes versicolor* เป็นต้น โดยราเหล่านี้สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยสลายลิกนิน (ligninase) ได้แก่ ลิกนินเพอร์ออกซิเดส

แมงกานีสเพอร์ออกไซด์ และแลคเคส ข้อดีของการปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ คือ ใช้พลังงานน้อย และสามารถเกิดได้ในสภาวะที่ไม่รุนแรง แต่ข้อเสีย คือ ต้องใช้ระยะเวลาในการย่อยสลายลิกนิน (Silverstein, 2004)

ตารางที่ 2.10 ผลของการปรับสภาพด้วยเทคนิคต่างๆ ต่อองค์ประกอบทางกายภาพและทางเคมี หรือโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส

Pretreatment methods	Increase accessible surface area	Decrystallization cellulose	Solubilization hemicellulose	Solubilization lignin	Formation furfural / HMF	Alteration lignin structure
Mechanical	+	+				
ST / SE	+		+	-	+	+
LHW (batch)	+	ND	+	-	-	-
LHW (flow through)	+	ND	+	+ / -	-	-
Acid	+		+	-	+	+
Alkaline	+		-	+ / -	-	+
Oxidative	+	ND		+ / -	-	+
Thermal + acid	+	ND	+	+ / -	+	+
Thermal + alkaline (lime)	+	ND	-	+ / -	-	+
Thermal + oxidative	+	ND	-	+ / -	-	+
Thermal + alkaline + oxidative	+	ND	-	+ / -	-	+
Ammonia (AFEX)	+	+	-	+	-	+
CO ₂ explosion	+		+			

ST / SE : Steam pretreatment/steam explosion

LHW : Liquid hot water

AFEX : Ammonia fiber explosion

+ = major effect, - = minor effect, ND = not determined

ที่มา: Hendriks และ Zeeman, 2009

2.9.2 การย่อยสลาย (hydrolysis)

วัตถุดิบจากวัสดุเหลือใช้จากทางอุตสาหกรรมเกษตรที่มีส่วนประกอบของลิกโนเซลลูโลส ประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวที่อยู่ในรูปของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส และเมื่อถูกย่อยจะได้เป็นโมเลกุลของน้ำตาลที่มีขนาดสั้นลง

กากมันสำปะหลังคือวัตถุดิบจากวัสดุเหลือใช้ที่มาจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังดังนั้นจึงมีส่วนของแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก รองลงมาคือเส้นใยซึ่งเป็นส่วนของลิกโนเซลลูโลสที่หลงเหลืออยู่จากกระบวนการผลิตแป้งมัน การย่อยสลายแป้ง เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส เพื่อให้ได้น้ำตาลสำหรับใช้ในกระบวนการหมักนั้นสามารถทำได้ 2 วิธี คือ วิธีทางเคมีโดยการใช้กรด และวิธีทางชีวภาพโดยใช้เอนไซม์

2.9.2.1 การย่อยสลายด้วยวิธีทางเคมี (chemical hydrolysis)

วิธีที่นิยมใช้ คือ การย่อยสลายด้วยกรด (acid hydrolysis) สามารถใช้ได้ทั้งกรดเข้มข้นและกรดเจือจางในการย่อยสลาย กรดที่นิยมใช้ ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริกและกรดซัลฟิวริก การใช้กรดเข้มข้น เช่นกรดซัลฟิวริกความเข้มข้น 72 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้องจะทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลที่สูงมากถึงเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณน้ำตาลที่ได้ตามทฤษฎี แต่การใช้กรดในปริมาณมากนี้จำเป็นที่จะต้องมีการนำกรดกลับมาใช้ใหม่ ส่วนการใช้กรดเจือจาง เช่น ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นการใช้ปริมาณของกรดน้อยกว่าแต่ใช้อุณหภูมิที่สูง ซึ่งทำให้ได้ปริมาณน้ำตาลเพียง 55 – 60 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณน้ำตาลที่ได้ตามทฤษฎีเท่านั้น (Silverstein, 2004) Hamelinck และคณะ (2005) ได้รายงานการเปรียบเทียบการใช้กรดเจือจางและกรดเข้มข้นในการย่อยสลายเซลลูโลสดังตารางที่ 2.11 จะเห็นได้ว่าการใช้กรดเจือจางจะใช้อุณหภูมิต่ำกว่าและใช้เวลาน้อยกว่าการใช้กรดเข้มข้น แต่ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการใช้กรดเข้มข้นจะมีค่าสูงกว่า

ตารางที่ 2.11 เปรียบเทียบการใช้กรดเจือจางและกรดเข้มข้นในการย่อยสลายเซลลูโลส

กรดซัลฟิวริก	ความเข้มข้น	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลาที่ใช้	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (เปอร์เซ็นต์)
เจือจาง	น้อยกว่า 1 %	215	3 นาที	50 – 70
เข้มข้น	30 – 70 %	40	2 – 6 ชั่วโมง	90

ในระหว่างการย่อยสลายด้วยกรด เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินจะถูกย่อยสลายกลายเป็นน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแมนโนสหรือน้ำตาลไซโลส และสารประกอบฟีนอลิกตามลำดับ ในขณะที่เกิดโมโนเมอร์ชนิดต่างๆ ขึ้นนี้ จะมีการย่อยสลายเกิดขึ้นต่อไปทำให้ได้สารต่างๆ เช่น 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอรัล (HMF) จากน้ำตาลคาร์บอนหกอะตอม และเฟอรัลจากน้ำตาลคาร์บอนห้าอะตอม ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้จะถูกย่อยสลายกลายเป็นกรดลิวลินิกและกรดฟอรัลมีมิคต่อไป นอกจากนี้กรดอะซิติกยังสามารถถูกปล่อยออกมาจากหมู่อะซิติกที่อยู่ในเฮมิเซลลูโลสได้อีกด้วย ในขณะที่ลิกนินจะถูกย่อยสลายและปล่อยสารประกอบฟีนอลิกออกมา (Purwadi, 2006) ผลพลอยได้ต่างๆ ที่เกิดขึ้นมาในระหว่างการย่อยสลายด้วยกรดนี้ส่งผลต่อกระบวนการหมัก เนื่องจากเป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ใช้ในการหมัก

2.9.2.2 การย่อยสลายด้วยวิธีทางชีวภาพโดยการใช้เอนไซม์ (enzymatic hydrolysis)

เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด ส่วนใหญ่มักเป็นราและแบคทีเรีย การย่อยสลายด้วยเอนไซม์เป็นวิธีที่มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ปฏิกริยาเกิดขึ้นไม่รุนแรง เป็นการย่อยสลายแบบเฉพาะเจาะจงระหว่างเอนไซม์กับวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส ข้อดีและข้อเสียของการย่อยสลายด้วยกรดกับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ดังตารางที่ 2.12 และ 2.13

ตารางที่ 2.12 ข้อดีและข้อเสียของการย่อยสลายด้วยกรด (Woodward, 1987; Parisi, 1989)

ข้อดี	ข้อเสีย
1. สารเคมีที่ใช้มีราคาถูก	1. ต้องมีการปรับสภาพน้ำตาลให้เป็นกลางก่อนนำไปหมัก (neutralization)
2. เป็นกระบวนการที่ทำได้ง่าย	2. ต้องมีกระบวนการนำกรดกลับมาหมุนเวียนใช้ใหม่
3. วัตถุดิบไม่ต้องผ่านการปรับสภาพ	3. ใช้อุณหภูมิสูง (กรณีใช้กรดเจือจาง)
4. ปฏิกิริยาเกิดขึ้นเร็ว ใช้เวลาน้อย	4. ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่เฉพาะเจาะจง ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ไม่บริสุทธิ์
5. ปฏิกิริยาเกิดได้ที่อุณหภูมิต่ำ (กรณีใช้กรดเข้มข้น)	5. น้ำตาลที่ได้จะเปลี่ยนเป็นสารอื่น เช่น เฟอร์ฟูรัล ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเชื้อที่ใช้ในกระบวนการหมัก
6. ให้ปริมาณน้ำตาลสูง (กรณีใช้กรดเข้มข้น)	6. กรดที่ถูกล้างออกมาก่อนทำให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม
	7. ต้องใช้เครื่องมือที่ทนต่อการกัดกร่อนของกรดได้ซึ่งมีราคาแพง

ตารางที่ 2.13 ข้อดีและข้อเสียของการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Woodward, 1987; Parisi, 1989)

ข้อดี	ข้อเสีย
1. สภาวะที่ใช้ทั้งอุณหภูมิและความเป็นกรดต่างไม่รุนแรง	1. เอนไซม์มีราคาสูง
2. ปฏิกริยามีความเฉพาะเจาะจงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง	2. นำเอนไซม์กลับมาใช้ใหม่ยาก
3. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไม่เปลี่ยนเป็นสารอื่น	3. ต้องมีการปรับสภาพวัตถุดิบก่อน
4. สามารถหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้นไปพร้อมกับการย่อยได้	4. ผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถยับยั้งปฏิกริยาที่เกิดขึ้น (product inhibition)
5. ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์ที่ทนต่อการกัดกร่อน	5. อาจเกิดการสูญเสียเอนไซม์ เนื่องจากถูกดูดซับบนวัสดุที่ไม่ย่อย
	6. เกิดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อน (contamination) ของเชื้อจุลินทรีย์
	7. ถ้าระบบมีสารที่ขัดขวางปฏิกริยา เช่น เฮมิเซลลูโลส หรือลิกนิน จะทำให้อัตราการเกิดปฏิกริยาช้าลง

2.9.2.2.1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโมเลกุลของแป้ง

เอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งได้คือ อะไมเลส เป็นเอนไซม์ที่มีหลายชนิด สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆ ได้ 3 กลุ่ม ได้แก่

1) อัลฟา-อะไมเลส (α -amylase)

ชื่อตามระบบ α -1,4-glucan-4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1 เป็นพวกเอนโดเอนไซม์ (endoenzyme) ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายพันธะอัลฟา-1, 4 กลูโคซิดิก ระหว่างโมเลกุลกลูโคสภายในส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินภายในโมเลกุลของแป้ง ได้เป็นพวกโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) และอัลฟา-ลิมิท-เดกซ์ตริน (α -limit-dextrins) ออกมา

2) บีตา-อะไมเลส (β -amylase)

ชื่อตามระบบ α -1,4-glucan maltohydrolase, EC 3.2.1.2 มีความจำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกของแป้งที่ตำแหน่งอัลฟา-1,4 ในลักษณะการตัดสายพอลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบจากปลายสาย ด้านไม่มีหมู่รีดิวซ์ เข้าไปสู่ภายในสายครั้งละ 2 หน่วยของโมเลกุลกลูโคส และจะหยุดปฏิกิริยาทันทีที่พบพันธะอัลฟา-1,6 ไกลโคซิดิก

3) แกมมา-อะไมเลส (λ -amylase) หรือกลูโคอะไมเลส (glucoamylase) หรืออะมิโลกลูโคซิเดส (amiloglucosidase)

ชื่อตามระบบ λ -1,4-glucan glucohydrolase, EC 3.2.1.3 เป็นพวกเอ็กโซเอนไซม์ (exoenzyme) มีความจำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายพันธะพันธะ α -1, 4 และ α -1, 6 กลูโคซิดิก โดยจะทำการตัดโมเลกุลของกลูโคสที่ตำแหน่งปลายของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน ในลักษณะการตัดสายพอลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบจากปลายสาย ด้านไม่มีหมู่รีดิวซ์เข้าไปสู่ภายในสายครั้งละหน่วยของโมเลกุลกลูโคส ดังนั้นผลผลิตที่ได้จะเป็นกลูโคสเพียงอย่างเดียว

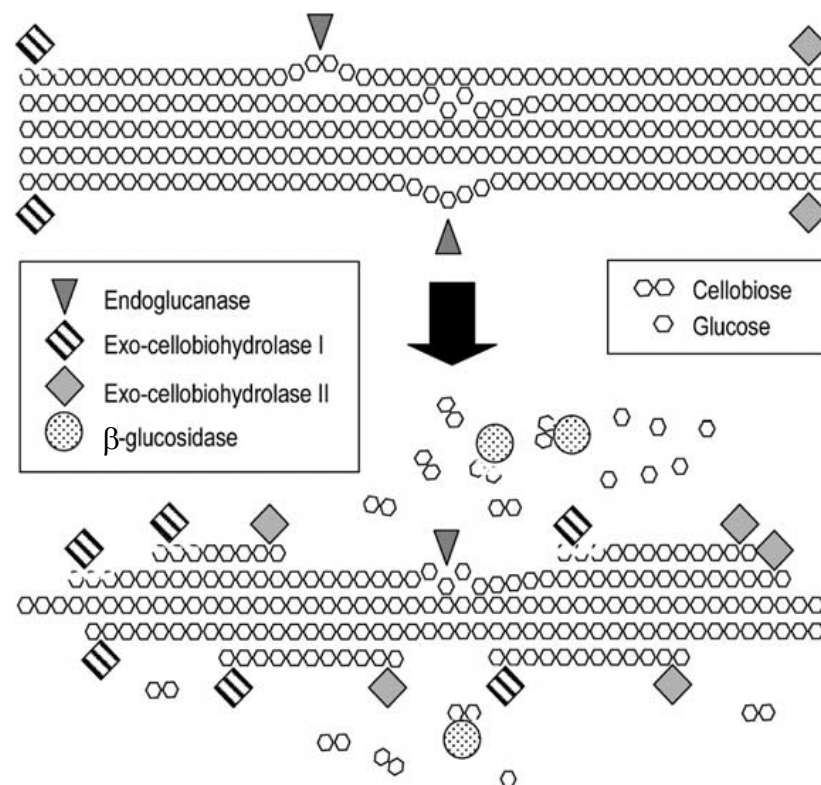
2.9.2.2.2 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเซลลูโลส

เอนไซม์ที่ใช้ย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส คือ เอนไซม์ในกลุ่มของเซลลูเลส ซึ่งเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดที่มีความจำเพาะในการย่อยสลายแตกต่างกันมาทำงานร่วมกัน สามารถแบ่งเอนไซม์ในกลุ่มของเซลลูเลสออกเป็น 3 ชนิด (Sun และ Cheng, 2002)

1.1) เอนโดกลูคาเนส (EG หรือ เอนโด-1,4-เบตา-กลูคาเนส หรือ คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส: EC 3.2.1.4) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ตัดพันธะเบตา-1,4-ไกลโคซิดิกแบบสุ่มภายในบริเวณที่เป็นอะมอร์ฟัสของเซลลูโลส ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ผสมหลายชนิด คือ กลูโคส เซลโลไบโอสและเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ โดยกลูโคสจะได้ในปริมาณที่น้อยมาก

1.2) เอกโซกลูคาเนส (CBH หรือ เอกโซ-1,4-เบตา-กลูคาเนส หรือ เซลโลไบโอสไฮโดรเลส: EC 3.2.1.91) เป็นเอนไซม์ที่เป็นองค์ประกอบหลักของเซลลูเลสที่ผลิตจากรา โดยมีปริมาณ 40-70 เปอร์เซ็นต์ของเซลลูเลสทั้งหมด (Howard และคณะ, 2003) ทำหน้าที่ตัดพันธะเบตา-1,4-ไกลโคซิดิกจากปลายด้านที่เป็น non-reducing ของสายเซลลูโลส และสามารถย่อยเซลลูโลสบริเวณที่มีความเป็นคริสตัลไลน์สูงได้ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคสและเซลโลไบโอส โดยจะได้เซลโลไบโอสเป็นส่วนใหญ่

1.3) เบตา-กลูโคซิเดส (BGL หรือ เซลโลไบโอส: EC 3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลโลไบโอสที่ได้จากการทำงานของเอนโดกลูคาเนสและเอกโซกลูคาเนส ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลูโคส



ภาพที่ 2.12 การทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสที่ตำแหน่งต่างๆ ของเซลลูโลส

(ที่มา: Malherbe และ Cloete, 2002)

Yu และคณะ (2010) ศึกษาการย่อยสลายที่เป็นเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสของ *Eucalyptus grandis* ด้วยการปรับสภาพโดยวิธี Two-step liquid hot water pretreatment ก่อน จากนั้นนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งวิธีการปรับสภาพทำ 2 ครั้ง ครั้งแรกทำการ pretreatment ที่ อุณหภูมิ 180 ถึง 200 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถย่อยได้เป็นไซโลสที่มากที่สุดคิดเป็น yield 86.4% ในระยะเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส ครั้งต่อมาทำการ pretreatment ที่ อุณหภูมิ 180 ถึง 240 องศาเซลเซียส เป็นช่วงเวลา 0 ถึง 60 นาที พบว่า อุณหภูมิมีผลต่ออัตราการเปลี่ยนของกลูแคนมากกว่าเวลา ซึ่งภาวะที่เหมาะสมของขั้นตอนที่สองคือ อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 20 นาที จากนั้นย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่าสามารถย่อยได้ปริมาณน้ำตาล ทั้งหมดสูงถึง 96.63% โดยใช้เวลา 72 ชั่วโมง

Woiciechowski และคณะ (2002) ศึกษาการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดและ เอนไซม์ พบว่าการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกสามารถผลิต reducing sugar ได้ 62.4 กรัมต่อกาก มันสำปะหลัง 100 กรัม ซึ่งมีปริมาณแป้งอยู่ 66% คิดเป็น 94.5% ของ reducing sugar recovery และการย่อยด้วยเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสสามารถผลิต reducing sugar ได้ 77.1 กรัมต่อกากมันสำปะหลัง 120 กรัม คิดเป็น 97.3% ของ reducing sugar recovery

Zhao และคณะ (2009) ศึกษาการย่อยชานอ้อยด้วยเอนไซม์ โดยผ่านการปรับ สภาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดเปอร์อะซิติค(PAA) พบว่าเมื่อทำการปรับสภาพด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10% (โดยน้ำหนักแห้ง) ด้วยอัตราส่วน 3:1 (น้ำต่อของแข็ง) ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1.5 ชั่วโมง จากนั้นทำการขจัดลิกนินด้วย PAA 10% (โดยน้ำหนัก แห้ง) ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2.5 ชั่วโมง สามารถผลิต reducing sugar ได้ 92.04% จากการย่อยต่อด้วยเซลลูเลส ความเข้มข้น 15 ยูนิตต่อกรัมของแข็ง

Sriroth และคณะ (2000) ศึกษาการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ โดยใช้ เซลลูเลสความเข้มข้น 15 ยูนิตต่อกรัม น้ำหนักแห้ง และเพคติเนสความเข้มข้น 122.5 ยูนิตต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ใช้ระยะเวลาในการบ่ม 60 นาที พบว่าสามารถย่อยแป้งออกมาจากกากมันได้ปริมาณ สูงถึง 40% ของกากมัน

2.9.3 กระบวนการหมัก (fermentation)

ระบบการหมักมีความสำคัญต่อประสิทธิภาพในผลิตภัณฑ์ในการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากกระบวนการหมักในแต่ละแบบนี้มีผลโดยตรงต่อความสามารถของการผลิตกรดแลกติก ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ ตลอดจนการกำจัดของเสียภายหลังกระบวนการหมัก สามารถแบ่งได้ 2 ประเภทคือ กระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง (Solid-state fermentation: SSF) และกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว (Submerged fermentation: SmF)

2.9.3.1 กระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง (Solid-state fermentation: SSF)

เป็นกระบวนการหมักจุลินทรีย์บนอาหารแข็งที่มีความชื้น ในสภาวะที่ไม่มีน้ำอิสระ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา จำนวนมากมายที่สามารถเจริญอยู่บนอาหารแข็งซึ่งถูกค้นพบและนำไปประยุกต์เข้าสู่กระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง วัตถุประสงค์ที่นำมาใช้ในการหมักมีมากมายหลากหลาย วัตถุประสงค์ประเภทนี้มักเป็นพวกที่มีแป้งหรือลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ มักเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเกษตรกรรมเป็นหลัก หรือของเหลือทิ้งจากโรงงานเกษตร เช่น พวงอัญชี่และ byproduct การหมักแบบอาหารแข็งมักนิยมนำมาใช้ในขั้น primary screening ของการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ (Davis และ Blevins 1979) และการผลิตปราบแมลงศัตรูพืชขั้นต้น เนื่องจากเราสามารถสร้างสปอร์ที่เหมาะสมบนอาหารแข็ง (Jackson, 1997) แต่อย่างไรก็ตามการหมักแบบอาหารแข็งนั้นก็ยังคงมีข้อเสียในหลายประการด้วยกันคือ หากทำการหมักในระยะยาว (long-term cultivation) การหมักแบบอาหารแข็งนี้จะการจำกัดของการถ่ายเทสารอาหารและอากาศ ส่งผลให้เซลล์สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้น้อยลง ชับสเตรทบางชนิดที่นำมาทำการหมักแบบอาหารแข็งจำเป็นต้องมีการผ่านการปรับสภาพ (pretreatment) ก่อนเพื่อให้เซลล์สามารถนำซับสเตรทเหล่านั้นไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นยิ่งขึ้น โดยธรรมชาติของของแข็งนั้นจะพบปัญหาในการวัดและควบคุมปัจจัยในการหมัก ได้แก่ พีเอช ความชื้น อุณหภูมิ อากาศ อาหาร และความเข้มข้นของเซลล์ (Toca-Herrera และคณะ, 2007) ด้วยเหตุผลนี้จึงยังไม่เป็นที่นิยมใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ในระดับอุตสาหกรรม (Yu และคณะ, 1998)

2.9.3.2 กระบวนการหมักแบบอาหารเหลว (Submerged fermentation: SmF)

เป็นกระบวนการหมักจุลินทรีย์ในอาหารเหลว โดยที่ซับสเตรทอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เป็นของเหลว ซึ่งอาหารเหลวนั้นจะมีแหล่งคาร์บอนและธาตุอาหารอื่นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต การหมักในอาหารเหลวนั้นสามารถทำได้ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) ซึ่งสามารถจะควบคุมสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้เช่น พีเอช การให้อากาศ อุณหภูมิ และจะใช้พื้นที่น้อยกว่าการหมักแบบอาหารแข็ง การหมักแบบอาหารเหลวเป็นที่นิยมในการหมักขนาดใหญ่ (large-scale) (Davis

และ Blevins 1979) เนื่องจากระบบมีสภาพเป็นของเหลวทำให้มีความเป็นเนื้อเดียวกัน ส่งผลให้
 ง่ายต่อการควบคุม การตรวจติดตามในระหว่างกระบวนการหมัก (Jackson, 1997) การแยก
 ผลิตภัณฑ์ออกจากเซลล์สามารถใช้วิธี centrifugation หรือ filtration ได้ (Davis และ Blevins,
 1979) ตลอดจนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่า สามารถทำได้มากกว่าการหมัก
 แบบอาหารแข็ง ปัจจุบันมีการใช้อย่างกว้างขวางในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งเทคนิคนี้ถือได้ว่าเป็น
 ความรู้ที่ใช้กันเป็นรู้จักกันอย่างแพร่หลาย ประกอบกับในระดับอุตสาหกรรมได้มีการพัฒนาและ
 การผลิตโดยใช้กระบวนการหมักแบบอาหารเหลวมาอยู่ก่อนแล้ว ดังนั้นในการเลือกใช้การหมัก
 แบบอาหารเหลวจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่เป็นที่นิยมนำมาใช้ในงานวิจัย เพื่อที่จะสามารถพัฒนา
 ต่อยอดในระดับอุตสาหกรรมได้ต่อไป

Wee และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วย *Enterococcus faecalis*
 โดยใช้ wood hydrolysate 30 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอัตราการผลิตกรดแลกติกและ
 ความเข้มข้นของเซลล์ เท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 2.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อ
 เปลี่ยนความเข้มข้นของซัสเตรทเป็น 25 ถึง 100 กรัมต่อลิตร และ Yeast extract พบว่าสามารถ
 ผลิตกรดแลกติกได้ 24-93 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตกรดแลกติก เท่ากับ 1.7 ถึง 3.2 กรัมต่อ
 ลิตรต่อชั่วโมง

Woiciechowski และคณะ (1999) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วย *Rhizopus*
oryzae โดยใช้ Hemicellulosic hydrolysate เป็นแหล่งคาร์บอน จาก *Pinus taeda* chips ทำการ
 วิเคราะห์ทางสถิติพบว่าอัตราส่วนของ C/N ที่ 35 และความเข้มข้นของซัสเตรท 90 กรัมต่อลิตร
 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ดีที่สุด

Guo และคณะ (2010) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดย *Rhizopus oryzae* GY18
 โดยใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพดด้วยกรดเจือจางและเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน
 พบว่าสามารถผลิตได้ภายใน 72 ชั่วโมง คิดเป็น yield ของกรดแลกติก 355 กรัมต่อกิโลกรัมของ
 corncob

Miura และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วย *Rhizopus* sp. MK-96-
 1196 โดยใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยซังข้าวโพดด้วยเซลลูเลสจาก *Acremonium* ปริมาณ 10
 ยูนิตต่อกรัมของซัสเตรท คิดเป็นความเข้มข้นของกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน
 สามารถผลิตกรดแลกติกได้มากกว่า 25 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 2.14 ความแตกต่างของกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง (solid-state fermentation) และอาหารเหลว (submerged fermentation)

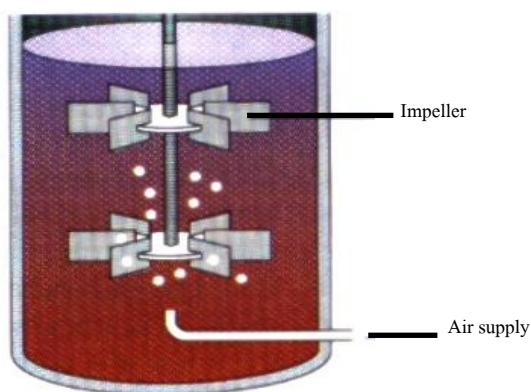
การหมักแบบอาหารแข็ง	การหมักแบบอาหารเหลว
<ul style="list-style-type: none"> - สามารถใช้วัตถุดิบเป็นสารอาหารและเป็นแหล่งที่จุลินทรีย์เกาะติดได้โดยตรง - มีต้นทุนต่ำ - ควบคุมการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ง่าย - อาหารที่ใช้ในกระบวนการหมักมีองค์ประกอบที่ไม่ซับซ้อนและหาได้ง่าย - ใช้น้ำในปริมาณน้อย ดังนั้นจุลินทรีย์ที่จะนำมาใช้จะต้องเป็นจุลินทรีย์จำพวกที่สามารถเจริญที่ภาวะน้ำน้อยได้ - ระบบอยู่ในลักษณะ Heterogeneous 	<ul style="list-style-type: none"> - เนื่องจากส่วนมากอาหารที่ใช้อยู่ในรูปของสารละลายสมบูรณ์ทำให้ซับซ้อนผสมผสานกับเชื้อได้อย่างทั่วถึงเท่ากันทุกบริเวณ - ติดตามการเจริญเติบโตและการคำนวณหาปริมาณมวลชีวภาพได้ง่าย - ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างได้ง่าย - การให้อากาศทำได้ง่าย เนื่องจากในระบบมีน้ำปริมาณมากทำให้ออกซิเจนละลายได้ดี - ระบบมีความเป็น Homogeneous - มีการถ่ายเทความร้อนที่ดี - ปัจจุบันเป็นที่นิยมในระดับอุตสาหกรรม

2.10 ชนิดของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นส่วนประกอบหลักในการใช้จุลินทรีย์เพื่อการผลิตสารชีวภาพที่มีประโยชน์ เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่ถูกออกแบบอย่างเหมาะสมต้องสามารถควบคุมสภาวะแวดล้อม เช่น ค่าพีเอช อุณหภูมิภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพได้ สามารถรักษาสภาวะปลอดเชื้อ (Sterile condition) และให้การกวนผสมที่มีประสิทธิภาพ เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่นิยมในการผลิตกรดแลกติก ได้แก่

2.10.1 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบปั่นกวน (Stirred-tank reactor)

ลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ นิยมทำด้วยแก้ว ที่ด้านข้างของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพจะมี Baffle ติดตั้งอยู่โดยทั่วไปจะมีอยู่ 4 อัน เพื่อป้องกันการเกิด Vortex ซึ่งเกิดจากการหมุนของใบพัดที่ความเร็วรอบสูง ใบพัดของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพอาจติดตั้งอยู่ด้านบนหรือด้านล่างของตัวเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งอัตราส่วนความกว้างของใบพัดต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเป็น 1:10 ถึง 1:12 แสดงดังภาพที่ 2.13 ให้อากาศทางด้านล่างของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ข้อดีของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้คือ ค่าดำเนินการต่ำ และกระบวนการหมักสามารถทำได้ง่าย แต่เนื่องจากลักษณะเส้นใยของราที่มีการเจริญแบบ Freely disperse mycelia จะก่อให้เกิดปัญหาในการควบคุมระบบในการหมัก เนื่องจากเซลล์ไปเกาะที่บริเวณมาตรวัดค่าพีเอช (pH sensor) และมาตรวัดออกซิเจนที่ละลาย (DO Probe) อีกทั้งค่าการละลายของออกซิเจนต่ำลงและเกิดปัญหาในการกวนภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

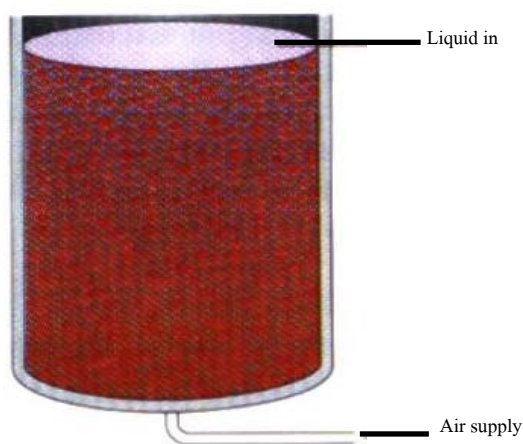


ภาพที่ 2.13 ลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบปั่นกวน (Stirred-tank reactor)

(ที่มา: Thongchul, 2005)

2.10.2 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Packed bed

ลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้ คือ ให้อากาศเข้าทาง ด้านล่างของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ส่งผลให้เกิดการไหลวนด้วยแรงดันของอากาศ ค่าแรงเฉือนจึงต่ำเนื่องจากไม่มีใบพัด และมีพื้นที่ไว้สำหรับให้เซลล์ยึดเกาะ ภายในมีลักษณะเป็นช่อง จึงเกิดการตรึงเซลล์ภายในช่องดังกล่าว (ภาพที่ 2.14) เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบนี้มักมีปัญหาเรื่องการควบคุมขนาดของเซลล์ทำให้เกิดการจำกัดการถ่ายเทอากาศภายในเซลล์

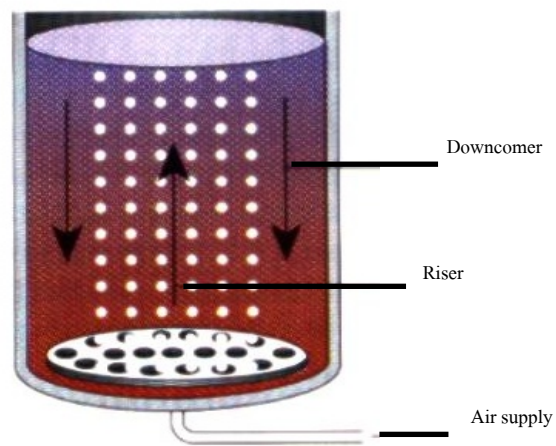


ภาพที่ 2.14 ลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Packed bed

(ที่มา: Thongchul, 2005)

2.10.3 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift

หลักการทำงานจะอาศัยความแตกต่างของความถ่วงจำเพาะของของเหลวเมื่อมีอากาศผสมอยู่ในปริมาณแตกต่างกัน การส่งผ่านออกซิเจนเข้าสู่ของเหลวในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเกิดขึ้นจากแรงดันของของเหลวภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยเกิดมากที่สุดบริเวณฐานของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ และน้อยลงตามลำดับความสูงที่เพิ่มขึ้น แสดงดังภาพที่ 2.15

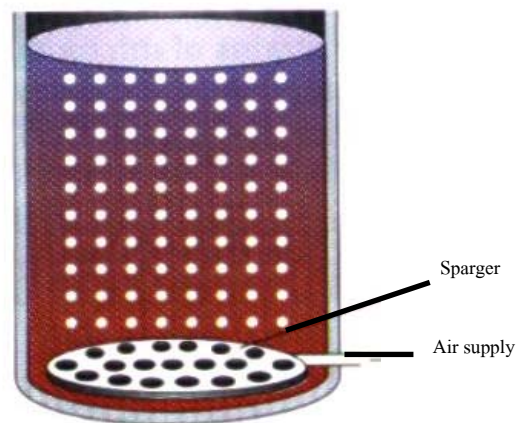


ภาพที่ 2.15 ลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift

(ที่มา: Thongchul, 2005)

2.10.4 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Bubble column

ลักษณะการทำงานคล้ายเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift คือมีการให้อากาศทางด้านล่างของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ แต่ไม่มีท่อบังคับอากาศ (draft tube) แสดงดังภาพที่ 2.16



ภาพที่ 2.16 ลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Bubble column

(ที่มา: Thongchul, 2005)

Martak และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดย *R. oryzae* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูง 80 กรัมต่อลิตร เป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 67.3 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 2.31 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมง ใช้กลูโคสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อทำการหมักแบบ Periodical bleed and feed (PBF)

Zhang และคณะ (2008) ศึกษาการเลี้ยงรา *R. arrhizus* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อผลิตกรดแลกติก รวมถึงศึกษาข้อจำกัดของการถ่ายเทอาหารและการกวนที่เป็นปัญหาจากสัณฐานของราในรูปกลุ่มก้อนในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่า การใช้กรดไฮโดรคลอริกเพื่อปรับค่าพีเอชในการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นนั้นสามารถควบคุมลักษณะสัณฐานของราได้ โดยลักษณะสัณฐานของราแบบ Pellet สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 85.7 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 86 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ของเหลือที่ได้จากการผลิตแป้งมันฝรั่ง (Waste potato starch) เป็นแหล่งอาหาร

Sirisansaneeyakul และคณะ (2007) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกโดยเทคนิคการตรึงเซลล์ *Lactococcus lactis* IO-1 แบบ microencapsulated ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Packed bed แบบ Repeated Batch พบว่า อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 4.5 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคส 45 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากเนื้อ 10 กรัมต่อลิตร เปปโตน 7.5 กรัมต่อลิตร และแคลเซียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งอาหาร ค่าพีเอชเริ่มต้น 6.85 และ 37 องศาเซลเซียส

Yin และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วย *Rhizopus* sp. จำนวน 8 สายพันธุ์และเปรียบเทียบสภาวะที่ใช้ในการหมักด้วยระบบ Air-Lift โดยใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *R. oryzae* NRRL 395 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดคือ 102 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร

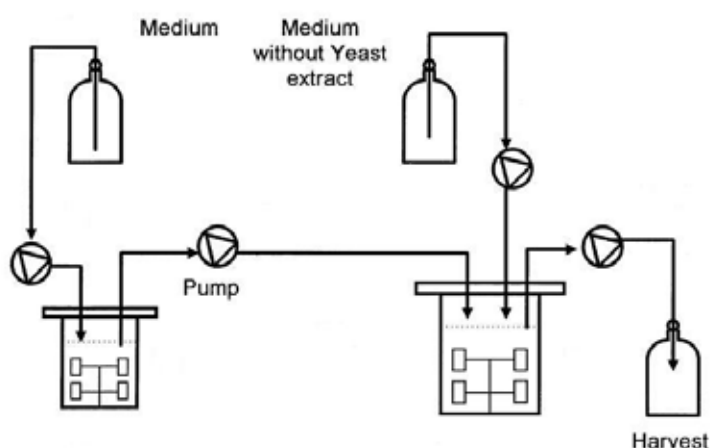
Park และคณะ (1998) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดย *R. oryzae* NRRL 395 ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ Air-lift แบบไม่ต่อเนื่อง พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 104.6 กรัมต่อลิตร ค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 87 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 1.8 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน

Du และคณะ (1998) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดย *R. oryzae* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Bubble column พบว่า ผลิตรกรดแลกติกได้สูงถึง 62 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตแลกติกเท่ากับ 1.46 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 78 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ทำการหมักนาน 27 ชั่วโมง

2.11 การออกแบบและพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

หน้าที่สำคัญของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ได้แก่ การทำให้เกิดสภาวะแวดล้อมที่สามารถควบคุมได้สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ เพื่อให้ได้ผลิตผลตามที่ต้องการ ดังนั้นจึงต้องออกแบบเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพให้มีความเหมาะสมกับกระบวนการหมักแต่ละชนิด (Liden, 2002)

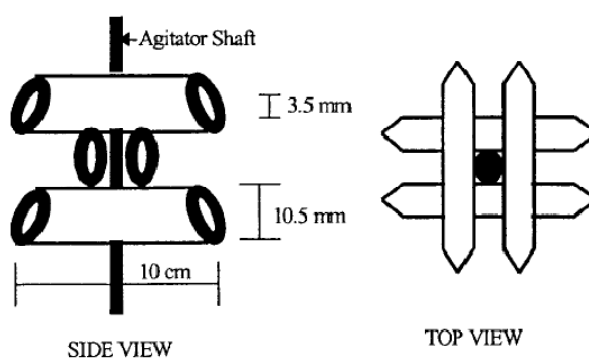
Bruno-Barcena และคณะ (1999) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดย *Lactobacillus casei* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Packed-bed 2 ระบบ (Two-stage systems) ทำการหมักแบบต่อเนื่อง โดยลักษณะเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพนั้นประกอบด้วย คอลัมน์แฉกเกิดแก้วเพื่อควบคุมอุณหภูมิ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร สูง 10 เซนติเมตรในถังแรก ถังที่สองมีขนาดของคอลัมน์แฉกเกิดแก้วเท่ากับ 3.5 เซนติเมตร สูง 14 เซนติเมตร ภายในบรรจุด้วย Porous foam glass ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-4 มิลลิเมตร ด้วยอัตราส่วนปริมาตรต่อช่อง 60 เปอร์เซ็นต์ หนา 2 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ตัวคอลัมน์ประกอบด้วย External Loop และมาตรวัดค่าพีเอช (ภาพที่ 2.17)



ภาพที่ 2.17 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ 2 ระบบ (Two-stage systems)

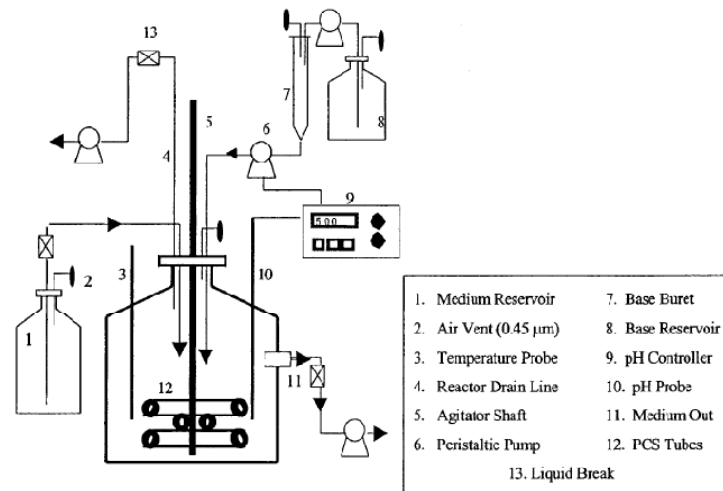
พบว่าความสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 57.5 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 9.72 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อาหารที่ใช้คือกลูโคสความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร ควบคุมอุณหภูมิในถังแรกและถังที่สองที่ 42 และ 45 องศาเซลเซียสตามลำดับ และควบคุมพีเอชเท่ากับ 6.0

Cotton และคณะ (2001) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดย *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* (ATCC 1143) ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Plastic composite support (PCS) ทำการหมักแบบต่อเนื่อง ลักษณะของ PCS เป็น Biofilm หนา 3.5 มิลลิเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10.5 มิลลิเมตร ระยะห่างของ PCS เท่ากับ 10 เซนติเมตร ประกอบด้วย PCS จำนวน 6 ตัว วางตามแนวนอนชั้นละ 2 ตัวและมี 3 ชั้นที่ยึดอยู่กับแกนใบพัด แสดงดังภาพที่ 2.18



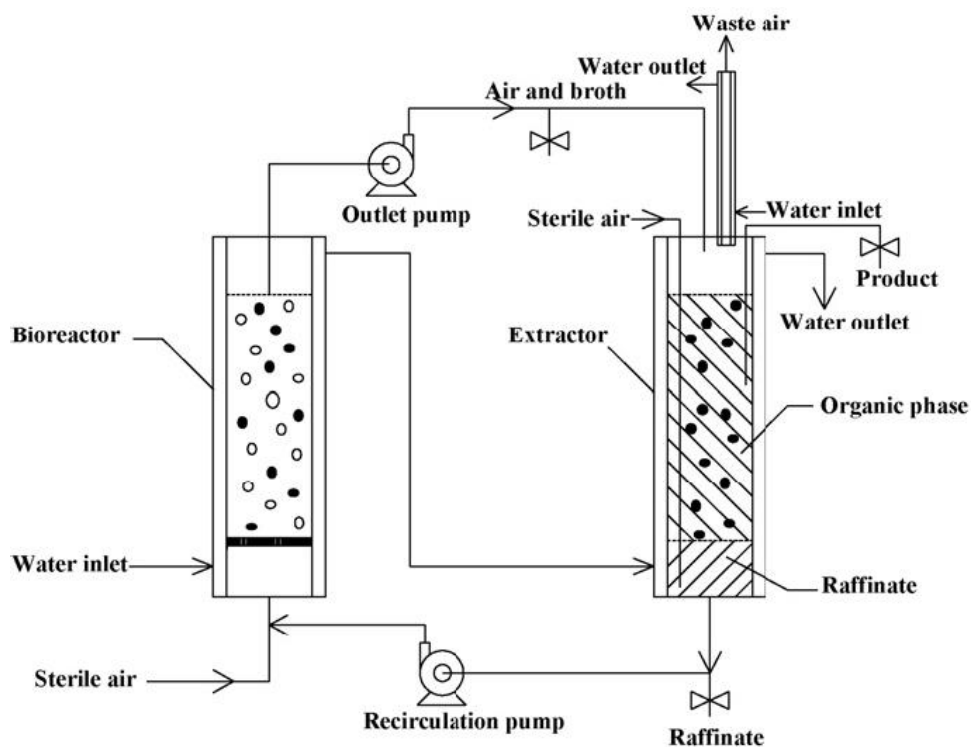
ภาพที่ 2.18 ลักษณะของ Plastic composite support (PCS)

โดยได้ออกแบบการทดลองดังภาพที่ 2.19 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพถูกดัดแปลงจากถังกวนเมื่อใช้ผลิตภัณฑ์จากการเกษตร 50 เปอร์เซ็นต์ (w/w) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ค่าเฉลี่ยของอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 9.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่ออัตราการไหลเท่ากับ 0.4 ลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 2.19 แบบการทดลองในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Plastic composite support (PCS)

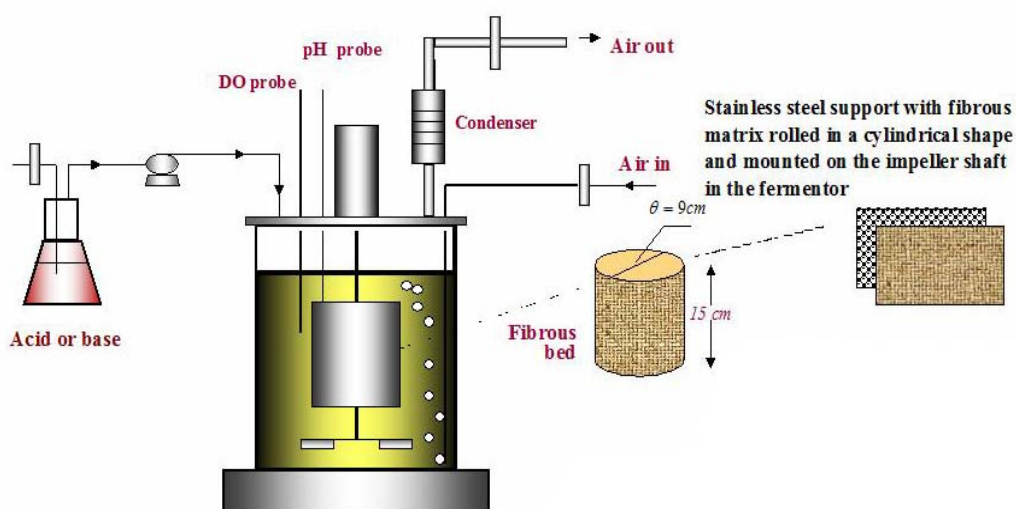
Lin และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วย *R. oryzae* ที่ถูกตรึงด้วย Calcium alginate ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Three-phase fluidized bed แสดงดังภาพที่ 2.20



ภาพที่ 2.20 ลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Three-phase fluidized bed

ซึ่งภายในระบบประกอบด้วยคอลัมน์แก้ว 2 แห่ง โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 70 มิลลิเมตรและกว้าง 420 มิลลิเมตร เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพจะประกอบด้วย Water jacket เพื่อควบคุมอุณหภูมิ บริเวณด้านล่างของถังจะบรรจุ Glass screen เพื่อรองรับเม็ดบีท โดยเติมหัวเชื้อเริ่มต้นกับเม็ดบีทลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 600 มิลลิลิตร อัตราการให้อากาศ 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อหน้าที่ หลังจากหมัก 12 ชั่วโมง จึงเติมลงไปนในคอลัมน์ซึ่งบรรจุด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ 1,200 มิลลิลิตร จึงเริ่มกระบวนการหมัก ที่สภาวะการหมัก 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการไหล 3.0 ลิตรต่อชั่วโมง โดยสามารถผลิตกรดแลกติกคิดเป็นค่าอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Tay และ Yang (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยการตรึง *R. oryzae* NRRL 395 โดยได้ออกแบบและพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขึ้นเป็นเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Rotating fibrous-bed bioreactor (RFB) โดยมีโครงร่างแบบทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 15 เซนติเมตร ทำจากสแตนเลสสตีล ซึ่งยึดอยู่กับฝาบนของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพและใช้ตะแกรงสแตนเลสสตีลหุ้มเป็นโครงร่าง RFB จากนั้นจึงหุ้มด้วยเส้นใยผ้าฝ้าย 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังภาพที่ 2.21



ภาพที่ 2.21 ลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Rotating fibrous-bed bioreactor (RFB)

พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดคือ 127 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 2.5 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกเหนือจากกลูโคส เมื่อใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติก คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 1.65 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัท	ประเทศ
กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)	Alphaphot-2 YS2	Nikon Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
แผ่นนับเม็ดเลือดแดง (Heamacytometer)	Neubauer Bright Line	Bocco Co., Ltd.	เยอรมัน
เครื่องชั่งแบบละเอียด (Electronic balance)	FX-180	A&D Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
เครื่องชั่งแบบหยาบ (Electronic balance)	FX-3000	A&D Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter)	F-13	Horiba	ญี่ปุ่น
เครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography)	Shimadzu LC-6A	Shimadzu Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow hood)	NK system clean bench	International Scientific Supply	ไทย
ตู้อบแห้ง (Oven)	UL-80	Memmert Co., Ltd.	เยอรมัน
เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer)	Vortex-Genie No.2	Scientific Industries Inc.	สหรัฐอเมริกา
เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)	KT-30 SD	ALP Co., Ltd.	ญี่ปุ่น

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัท	ประเทศ
ปั๊มไหลวน (Peristaltic pump)	P-3	Pharmacia Fine Chemical	สหรัฐอเมริกา
เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร (Fermentor 5 L)	MD 300-5L	B.E. Marubishi	ญี่ปุ่น
ชุดควบคุมสภาวะ (Bio process controller)	MD 300-5L	B.E. Marubishi	ญี่ปุ่น
เครื่องอัดอากาศ (Air compressor)	-	Hitachi	ญี่ปุ่น
เครื่องควบคุมระบบน้ำหล่อเย็น (Circulation type hardy cooler)	TRL-108	Thomas Kagaka	ญี่ปุ่น
มาตรฐานวัดความเป็นกรดต่าง (pH combination electrode)	405-DPAS- SC-K85/225	Mettler toledo	สวิตเซอร์แลนด์
มาตรฐานวัดออกซิเจนที่ละลาย (Dissolved oxygen electrode)	O ₂ sensor InPro 6820/12/220	Mettler toledo	สวิตเซอร์แลนด์
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน (Scanning electron microscope)	JSM-5410LV	Jeol	ญี่ปุ่น
เครื่องวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (YSI Select Biochemistry Analyzer)	Model 2700	YSI Limited	อังกฤษ

3.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
Acetic acid (C ₂ H ₄ O ₂)	Merck	เยอรมัน
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	สยามชัยเคมีคอล	ไทย
Hydrochloric acid (HCl)	Merck	เยอรมัน

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
Magnesium sulfate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	Carlo erba	อิตาลี
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Merck	เยอรมัน
Sodium hydroxide (NaOH)	Merck	เยอรมัน
Sulfuric acid (H_2SO_4)	Merck	เยอรมัน
Urea ($(NH_2)_2CO$)	Merck	เยอรมัน
Yeast extract (สารสกัดจากยีสต์)	Difco	สหรัฐอเมริกา
Zinc sulfate ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	Merck	เยอรมัน

3.2 จุลินทรีย์และการเตรียมกล้าเชื้อ

3.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาการผลิตกรดแลกติก คือ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 จาก Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.2 วิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์

ใช้เข็มเย็บสปอร์ของรา *R. oryzae* NRRL 395 ฉากลงบนอาหารวุ้นสำเร็จรูป Potato dextrose agar หรือ PDA 39 กรัมต่อลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อทุกๆ เดือน

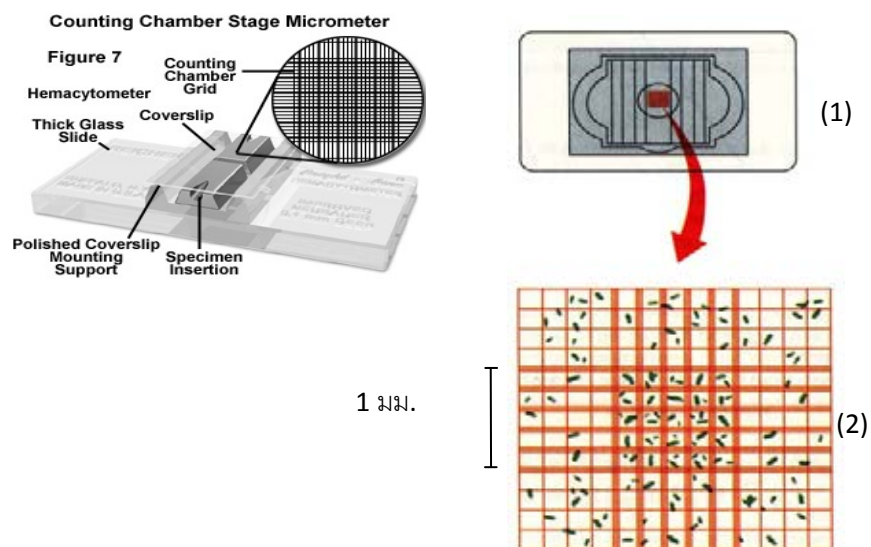
3.2.3 การเตรียมกล้าเชื้อ

เลี้ยงรา *R. oryzae* NRRL 395 บนอาหารเลี้ยงวุ้น PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 7 วัน เมื่อราเจริญเต็มที่แล้วใช้เข็มเย็บสปอร์ ใส่น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร เขี่ยสปอร์ให้กระจาย ปิดตสปอร์แขวนลอยมาประมาณ 20 ไมโครลิตร ถ่ายลงบน Haemocytometer ที่ปิดด้วย Cover slip นับจำนวนสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า ตามแนวเส้น ดังภาพที่ 3.1

การคำนวณหาความเข้มข้นโดยใช้ Haemocytometer

ปริมาตรใน 25 ช่องใหญ่ (400 ช่องเล็ก)	= 0.1	ลูกบาศก์มิลลิเมตร
สมมติค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์ใน 1 ช่องใหญ่	= X	เซลล์
ใน 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด	= (X)x25	เซลล์
ใน 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด	= (X)x25x10	เซลล์
ใน 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด	= (X)x25x10x1000	เซลล์
	= 25(X)x10 ⁴	เซลล์

โดยนับจำนวนสปอร์ตามแนวเส้นทั้งหมด 5 ช่อง นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยเพื่อคำนวณความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอย จากนั้นเตรียมสปอร์แขวนลอยที่ความเข้มข้น 10⁷ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติงไปในอาหารเพื่อการเจริญปริมาณ 3 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นประมาณ 6.0 อัตราการกวนคือ 700 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศคือ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที



ภาพที่ 3.1 ลักษณะของ Haemocytometer (1) ภาพที่มองจากด้านบนของ chamber มีตารางอยู่กลางสไลด์ (2) ภาพขยายของตารางที่กำลังขยาย 10 เท่าประกอบด้วยสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดใหญ่ แต่ละด้านยาว 1 มิลลิเมตร ภายในมีสี่เหลี่ยมจัตุรัสเล็กบรรจุอยู่ 25 ช่องแต่ละช่องมีเส้น 3 เส้น ล้อมรอบโดยแต่ละด้านยาว 0.2 มิลลิเมตร ภายในมีสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดเล็กบรรจุอยู่อีก 16 ช่อง

ที่มา : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, (2551)

3.3 สูตรอาหารที่ใช้ในการหมัก

อาหารเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ใช้ตามงานวิจัยที่ผ่านมาของ Chotisubhanandha และคณะ (2011) โดยอาหารที่นำมาใช้เลี้ยงราแบ่งเป็น 2 ชนิดได้แก่ อาหารเพื่อการเจริญ (Growth Medium) และอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ (Production Medium)

3.3.1 อาหารเพื่อการเจริญ (Growth Medium) ประกอบด้วย

แหล่งคาร์บอน (สารละลายจากการย่อยกากมันด้วยเอนไซม์หรือกรด สารละลายแป้ง และกลูโคส)	50	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัมต่อลิตร

3.3.2 อาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ (Production Medium) ประกอบด้วย

แหล่งคาร์บอน (สารละลายจากการย่อยกากมันด้วยเอนไซม์หรือกรด สารละลายแป้ง และกลูโคส)	70	กรัมต่อลิตร
ยูเรีย	0.3	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.6	กรัมต่อลิตร
MgSO_4	0.25	กรัมต่อลิตร
ZnSO_4	0.088	กรัมต่อลิตร

3.4 กากมันสำปะหลัง

กากมันสำปะหลังจากบริษัท แป้งมันเขี่ยมเฮงอุตสาหกรรม จำกัด มีความชื้นประมาณ 81.50% โดยมีองค์ประกอบของแป้ง 85.66% เส้นใย (ไฟเบอร์) 11.85% โปรตีน 1.37% และเถ้า 1.12% (โดยน้ำหนักแห้ง) (A.O.A.C., 1995) ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้ขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังของแต่ละโรงงาน

3.5 วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ หรือกรด และการหมักกรดแลกติกโดยใช้สารละลายจากการย่อยกากมันเป็นแหล่งคาร์บอน การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลัก ในขั้นตอนแรก จะทำการปรับสภาพกากมันสำปะหลังเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยด้วยเอนไซม์ให้มากขึ้นโดยใช้อุณหภูมิและความดันสูงควบคู่กับการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ เวลาที่ใช้ในการปรับสภาพ อุณหภูมิและความดัน ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่เติมในกากมัน อัตราส่วนของกากมันสำปะหลังที่ใช้ต่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือน้ำ ในขั้นตอนที่ 2 จะ

นำกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพแล้วมาย่อยด้วยเซลลูโลสและแป้งด้วยเอนไซม์ โดยแปร เวลาที่ใช้ในการย่อย และความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ โดยสารละลายจากการย่อยในขั้นตอนแรก จะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักกรดแลกติก เทียบกับการหมักกรดแลกติกจากแหล่ง คาร์บอนชนิดอื่น และการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล เป็นเวลา 15 นาที (Thongchul และคณะ, 2010)

3.5.1 การเตรียมสารละลายจากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์

การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ

3.5.1.1 การปรับสภาพกากมันสำปะหลังก่อนการย่อย

โดยใช้วิธี physicochemical pretreatment ได้แก่

3.5.1.1.1 การปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (steam pretreatment)

นำกากมันสดมาเติมน้ำให้มีความเข้มข้นของกากมันอยู่ที่ 5 - 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) จากนั้นนำไปทำการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psig) โดยแปรระยะเวลาในการ autoclave ที่ 15 30 45 และ 60 นาที

3.5.1.1.2 การปรับสภาพด้วยการใช้ร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับการใช้ สารละลายแอลคาไลน์ (steam with combination of alkaline treatment)

นำกากมันสดมาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.1 0.5 และ 1 นอร์มอล (N) ซึ่งความเข้มข้นของกากมันอยู่ที่ 5% -10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) จากนั้นนำไปทำการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psig) โดยแปรระยะเวลาในการ autoclave ที่ 15 30 45 และ 60 นาที

ภายหลังการปรับสภาพแยกเอาสารละลายออกจากตัวอย่าง แล้วนำกากที่เหลือจากการย่อยไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส แล้วนำกากอบแห้งที่ได้ไปย่อยด้วย เอนไซม์ต่อไป ส่วนสารละลายที่แยกได้นำไปหาปริมาณน้ำตาลที่สูญเสียจากกากมันไปภายหลัง การปรับสภาพด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น โดยสามารถสรุปวิธีการได้ ดังตารางที่ 3.1

3.5.1.2 การย่อยเซลลูโลสและแป้ง

นำกากมันที่ผ่านการปรับสภาพจากข้อ 3.5.1.1 มาทำการย่อยส่วนที่เป็น เซลลูโลสและแป้งที่อยู่ในกากมัน (นำกากมันแห้ง 0.5 กรัม จากนั้นเติมน้ำ DI ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ซึ่งจะมีความเข้มข้นของกากมันอยู่ที่ 6.7 % (น้ำหนัก/ปริมาตร)) ในการย่อยลำดับแรกจะใช้เซลลู

เลส (Accellerase®1500, Genencor, USA, 2,200-2,800 CMCU/กรัม, ความถ่วงจำเพาะประมาณ 1.00 กรัม/มิลลิลิตร) เพื่อทำการย่อยสลายเซลลูโลสและทำให้แกรนูลของแป้งที่อยู่ภายในโครงสร้างของเซลลูโลสถูกปลดปล่อยออกมา โดยแปรความเข้มข้นของเซลลูเลสที่ 5.61 และ 33.15 ยูนิต/กรัมกากมันแห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แปรระยะเวลาในการบ่มที่ 1 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปย่อยต่อด้วย อะไมเลส (Spezyme ethyl, Genencor, USA, 6,700–7,300 AAU/กรัม, ความถ่วงจำเพาะประมาณ 1.18–1.22 กรัม/มิลลิลิตร) แปรความเข้มข้นของอะไมเลสที่ 16.8 และ 33.6 ยูนิต/กรัมกากมันแห้ง โดยเติมอะไมเลสลงในสารละลาย ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส แปรระยะเวลาในการบ่มที่ 15 และ 30 นาที สามารถสรุปวิธีการได้ ดังตารางที่ 3.2

หลังการย่อยนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงและแยกสารละลายส่วนใสเก็บไว้สำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักกรดแลกติกโดยปรับพีเอชเป็น 6.0 แบ่งตัวอย่างสารละลายส่วนหนึ่งไว้สำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาล และสารประกอบอื่นๆ

ตารางที่ 3.1 ปัจจัยเคมีและทางกายภาพที่ศึกษาต่อประสิทธิภาพของสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ ในขั้นตอนของการปรับสภาพกากมันสำปะหลังก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ (ขั้นตอนที่ 1)

ขั้นตอนที่ 1 การปรับสภาพกากมันสำปะหลังก่อนการย่อย	วิธีการปรับสภาพ	ความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังในการทำปฏิกิริยา	ความเข้มข้นของสารละลายแอลคาไลน์	ระยะเวลาที่ใช้ในการปรับสภาพ
	การปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน	5, 10, 15 และ 20 %	-	15, 30, 45 และ 60 นาที
	การปรับสภาพด้วยการใช้ร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับการใช้สารละลายแอลคาไลน์	6.7, 10 และ 20 %	0.1, 0.5 และ 1.0 นอร์มอล	

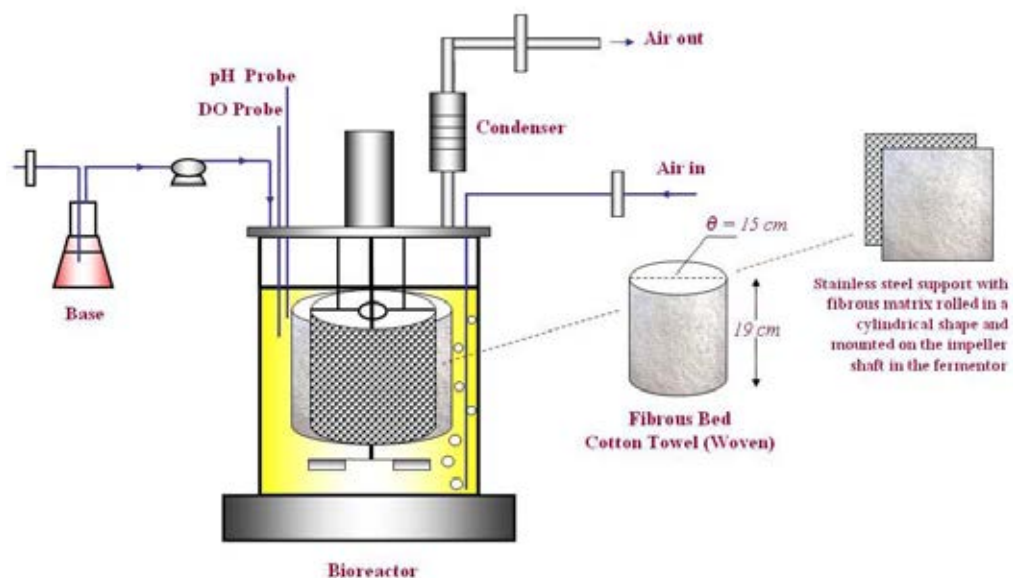
ตารางที่ 3.2 ปัจจัยเคมีและทางกายภาพที่ศึกษาต่อประสิทธิภาพของสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ ในขั้นตอนของการย่อยส่วนที่เป็นเซลลูโลสและแป้งด้วยเอนไซม์เป็นลำดับขั้นตอน (ขั้นตอนที่ 2)

ขั้นตอนที่ 2 การย่อยส่วนที่เป็นเซลลูโลสและแป้งด้วยเอนไซม์	เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย	ความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังในการทำปฏิกิริยา	ปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์	ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม
	เซลลูเลส	6.7 %	5.61 และ 33.15 ยูนิต/กรัมกากมันแห้ง	1 และ 6 ชั่วโมง
	อะไมเลส		16.8 และ 33.6 ยูนิต/กรัมกากมันแห้ง	15 และ 30 นาที

3.5.2 กระบวนการหมักกรดแลกติกโดยเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด 5 ลิตร

ก่อนการจะปฏิบัติการทดลองทุกครั้ง เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพจะต้องผ่านการสเตอริไลซ์ (sterilization) เพื่อให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ และป้องกันการปนเปื้อน (contamination) ในระหว่างกระบวนการหมัก โดยต่ออุปกรณ์ของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพครบสมบูรณ์แล้วนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psig) เป็นเวลา 30 นาที

เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติดดัดแปลงจากเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ มีโครงร่างแบบทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร สูง 19 เซนติเมตร ทำจากสแตนเลสสตีลยึดอยู่กับฝาด้านบนของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพดัดแปลงตัวเบดสติดจึงไม่เคลื่อนที่และใช้ตะแกรงสแตนเลสสตีลที่มีขนาดช่องตาข่าย 0.5x0.5 ตารางมิลลิเมตร หุ้มเป็นโครงร่างตัวเบดสติด จากนั้นจึงหุ้มด้วยผ้าเส้นใยฝ้ายสำหรับเป็นตัวยึดเกาะของ *R. oryzae* แสดงดังภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.2 ลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต

ที่มา : (Chotisubha-anandha และคณะ, 2011)

ทำการหมักแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต โดยถ่ายหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เทลงไปในอาหารเพื่อการเจริญปริมาตร 3 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นประมาณ 6.0 อัตราการกวนคือ 700 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศคือ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ทำการหมักจนครบ 48 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนอาหารเป็นอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ควบคุมค่าพีเอชที่ 6.0 ด้วยไซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ตลอดการหมัก ทำการหมักต่อจนครบ 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์และนำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) เพื่อหาปริมาณกรดแอล(+) แลกติกต่อไป (Chotisubha-anandha และคณะ, 2011)

อาหารเพื่อการเจริญเติบโต และอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในกระบวนการหมักนี้ จะใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันได้แก่ กลูโคส สารละลายที่ได้จากการย่อยของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ สารละลายที่ได้จากการย่อยของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันด้วยเอนไซม์ สารละลายที่ได้จากการย่อยของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ด้วยเอนไซม์ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และสารละลายแบ่ง 50 กรัมต่อลิตรสำหรับอาหารเพื่อการเจริญเติบโต และ 70 กรัมต่อลิตรสำหรับอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์

3.6 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.6.1 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในสารละลายที่แยกออกมาภายหลังการปรับสภาพกากมันและในสารละลายที่ได้จากการย่อย

นำสารตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกสารละลายส่วนใสออกจากส่วนที่ตกตะกอน จากนั้นทำการเจือจาง 10 เท่า แล้วนำไปทำการวิเคราะห์กลูโคสด้วยเครื่อง YSI 2700 Biochemistry Analyzer แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณปริมาณ yield ของกลูโคสที่ได้ต่อกรัมของกากมันสำปะหลังแห้ง ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในรูปของ glucose equivalent ในของเหลวที่แยกออกมาภายหลังการปรับสภาพกากมันและในส่วนสารละลายที่ได้จากการย่อย หาได้จากการนำสารละลายที่ได้มาทำปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริก 0.25 โมลาร์ ในอัตราส่วนของสารตัวอย่างกับกรดไฮโดรคลอริกเป็น 1 : 9 จากนั้นนำไปทำการ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psig) เป็นเวลา 60 นาที ทำให้เย็นลง จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกสารละลายส่วนใสออกจากส่วนที่ตกตะกอน จากนั้นทำการเจือจาง 10 เท่า แล้วนำไปทำการวิเคราะห์กลูโคสด้วยเครื่อง YSI 2700 Biochemistry Analyzer แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณปริมาณ yield ของกลูโคสที่ได้ต่อกรัมของกากมันสำปะหลังแห้ง

3.6.2 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

เมื่อสิ้นสุดการหมัก นำเซลล์ที่เกาะอยู่บนผ้าเส้นใยฝ้ายล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ซึ่งให้เย็นในโถดูดความชื้นประมาณ 45 – 60 นาทีนำไปชั่งน้ำหนัก หักลบกับผ้าเส้นใยฝ้ายที่ชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอนไว้ก่อนหน้าแล้ว จะได้น้ำหนักเซลล์แห้งของ *R. oryzae*

3.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก กรดฟูมาริก เอทานอล ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC)

นำตัวอย่างส่วนใสที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสมาทำการเจือจางให้ความเข้มข้นเป็น 0.1 เท่า นำมากรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตทชนิดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) เพื่อหาปริมาณกรดแลกติก กรดฟูมาริก เอทานอลและกลูโคส

คอลัมน์

Biorad Aminex HPX-87H ion exclusion organic acid

column ขนาด 300 มิลลิเมตร x 7.8 มิลลิเมตร

สารละลายตัวพา	กรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 0.005 mM
อุณหภูมิ	45 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	0.6 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจวัด	RI detector (Shimadzu รุ่น RID-6A)
เวลาที่อยู่ในคอลัมน์	45 และ 25 นาที

คำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแลคติก กรดฟูมาริก เอทานอล และกลูโคสที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร

3.6.4 การหาค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนด้วยวิธี Dynamic method of gassing out

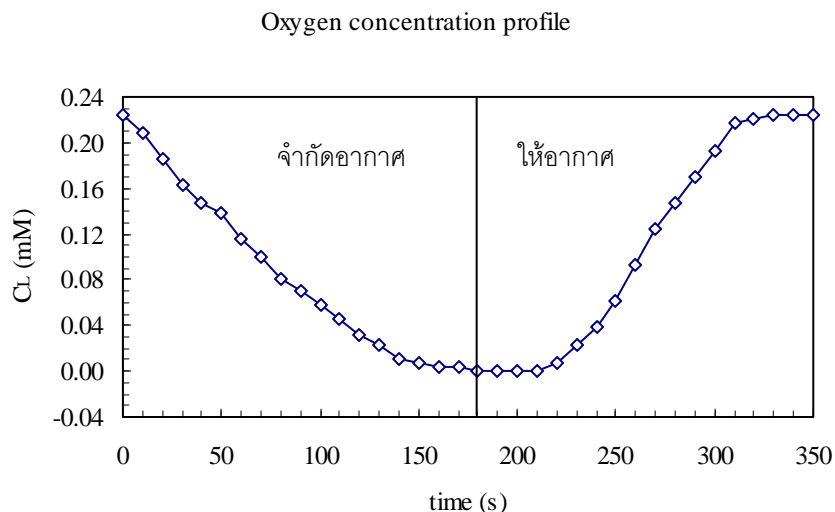
Dynamic method of gassing out สามารถใช้การคำนวณหาค่า K_La ในกรณีที่สภาวะของการหมักยังมีเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ โดยในระหว่างขั้นตอนการหมักนั้นจะหยุดการให้อากาศทำให้ความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหาร (C_L) ลดลงอย่างต่อเนื่องแต่ยังคงให้มีการกวนระดับต่ำอยู่เพื่อคงให้คงความเป็นเนื้อเดียวกัน ทำการวัดความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารทุกๆ 10 วินาทีจนกระทั่งค่าความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารวัดได้ค่าคงที่ หลังจากนั้นจึงให้อากาศตามเดิมแล้วนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารกับเวลา อยู่ในเทอมของ $\frac{dC_L}{dt}$ เพื่อหาความชันหรือ อัตราการใช้ออกซิเจนของเซลล์ (OUR) จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณจากสูตร

$$\frac{dC_L}{dt} = OTR - OUR$$

โดยอัตราการถ่ายเทออกซิเจน (OTR) นั้นสามารถหาได้จาก

$$OTR = K_La \times (C_L^* - C_L)$$

C^* คือ ค่าการละลายของออกซิเจนในอาหาร (mM) และ K_La หรือค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน (min^{-1}) ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ พบว่าค่า $OTR = 0$ และ ค่า OUR (mM/min) สามารถหาได้จากความสัมพันธ์ระหว่าง C_L กับ เวลา (ไม่มีอากาศ) แสดงดังภาพที่ 3.3 ซึ่งทั้งค่า K_La และค่า C^* สามารถหาได้จากความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\frac{dC_L}{dt} + OUR$ กับ C_L ซึ่งค่า K_La คือ ส่วนกลับของความชัน ส่วนค่า C^* เท่ากับ จุดตัดแกน Y ต่อ K_La



ภาพที่ 3.3 ค่าการละลายของออกซิเจนภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยเทคนิค Gassing out

3.6.5 Scanning electron microscope (SEM) และ Energy Dispersive X-ray spectrometer (EDX)

แบ่งตัวอย่างของเซลล์ยีส่ดึ่งแบบเบดสเถดที่ไ้จากข้อ 3.5.2 มาเล็กน้อย โดยตัดให้ไ้ขนาด 2.5x2.5 ตารางเซนดเเมตร นำมาแ่ในสารละลายผสมระหว่างกลูตารัลดีไฮด์ 2.5% กับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 7.2 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 คเิน จากนั้นล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 7.2 เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 2 ครั้งและน้ำ DI เป็นเวลา 10 นาที อีก 1 ครั้ง ต่อมาทำการดีไฮเดรตด้วยเอทานอล (30% 50% 70% และ 95% เป็นเวลา 10 นาทีต่อครั้ง สูดทำยใช้ absolute เอทานอล เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง เมื่อไ้แล้วนำเซลล์ไปทำไ้แห้งด้วยวิธี Critical point (Critical point dryer, Balzer model CPD 020) จากนั้นนำไปเคลือบติดด้วยทอง (Sputter coater, Balzer model CPD 020) ชั้นตอนสุดท้ายนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน (JEOL, model JSM-5410LV) ของศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อศึกษาคูโครงสร้างของเส้นใยและลักษณะของ *R. oryzae* ที่ยีส่ดึ่งบนผ้าเส้นใยฝ้าย อันเนื่องมาจากการใช้แหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมักในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด โดยเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในกระบวนการหมักที่แตกต่างกัน ซึ่งกากมันสำปะหลังจะต้องผ่านกระบวนการย่อยเพื่อให้ได้ปริมาณของน้ำตาลที่ใช้ในการหมักที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในกระบวนการหมักกรดแลกติก (Balat และคณะ, 2008) ซึ่งขั้นตอนการย่อยแป้งที่หลงเหลืออยู่ในกากมันในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่ การปรับสภาพกากมันก่อนการย่อยโดยเทคนิคทางเคมีกายภาพ (physicochemical pretreatment) และการย่อยแป้งและเซลลูโลส ซึ่งจะเน้นที่ศึกษาการนำกากมันสำปะหลังมาผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีที่แตกต่างกัน ทำการศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการปรับสภาพ ปริมาณความเข้มข้นของกากมันในสารละลาย ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในขั้นตอนการปรับสภาพ และทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของเซลลูโลสและอะไมเลส และเวลาที่ใช้ในการบ่มในขั้นตอนการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ เพื่อให้ได้แหล่งคาร์บอนที่มีประสิทธิภาพต่อจุลณพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแลกติก(+)

4.1 การปรับสภาพกากมันสำปะหลังก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์

ศึกษาและเปรียบเทียบการปรับสภาพกากมันสำปะหลังก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ด้วยวิธีที่แตกต่างกัน ทำการศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการปรับสภาพ ปริมาณความเข้มข้นของกากมันในสารละลาย ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ในขั้นตอนการปรับสภาพ การปรับสภาพกากมันก่อนการย่อยโดยเทคนิคทางเคมีกายภาพ (physicochemical pretreatment) ในขั้นตอนนี้จะศึกษาผลของการใช้ความร้อนภายใต้ความดันสูงเพียงอย่างเดียว (steam pretreatment) เปรียบเทียบกับการใช้ภาวะดังกล่าวควบคู่กับการเติมสารละลายแอลคาไลน์ไปด้วย (steam with combination of alkaline treatment)

การปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน จากการทดลองพบว่าน้ำที่แยกออกมาจากกากมันภายหลังการปรับสภาพมีอนุภาคของแป้งในรูปของกลูโคสหลุดออกมาจากกากมัน ได้ผลดังกราฟภาพที่ 4.1 (ก) ซึ่งเมื่อทำการเพิ่มระยะเวลาจาก 15 นาที เป็น 30 นาที กลูโคสจะหลุดออกมามากขึ้น แต่เมื่อเพิ่มเวลาในการปรับสภาพนานถึง 60 นาที พบว่าปริมาณของอนุภาคแป้งที่หลุดออกจากกากมันไม่เพิ่มขึ้นมากไปกว่าที่เวลา 30 นาที โดยคิดปริมาณของแป้งที่หลุดออกจากกากมันในรูปของกลูโคส จะได้ yield ของกลูโคสประมาณ 0.5 กรัมต่อกรัมกากมัน

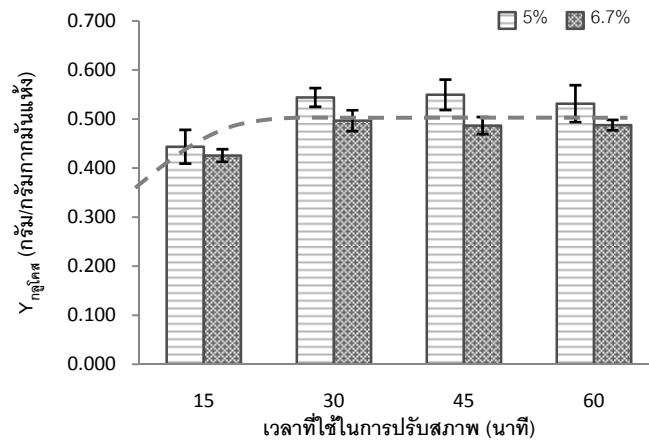
แห้งที่นำไปปรับสภาพ และจะเห็นได้ว่าเมื่อใช้กากมันที่ความเข้มข้นต่ำกว่า (5%) จะได้ yield ของ กลูโคสสูงกว่าเมื่อใช้ปริมาณกากมันเพิ่มขึ้น (ที่ความเข้มข้น 6.7%) ในกรณีของปริมาณความเข้มข้นของกากมันที่ 10% น้ำที่แยกออกมาที่มีปริมาณน้อยมากจึงไม่สามารถนำไปวิเคราะห์ ปริมาณกลูโคสได้ และเมื่อใช้ปริมาณกากมันมากเกินไป (20%) จะไม่สามารถแยกส่วนของ สารละลายที่เกิดจากการปรับสภาพได้ เนื่องจากกากมันดูดซับสารละลายทั้งหมดไว้ และที่ความเข้มข้น 20% จะเป็นความเข้มข้นของกากมันตั้งต้นในการทดลองอยู่แล้วด้วย โดยกากมันที่ได้จากการปรับสภาพโดยวิธีนี้ (ที่ความเข้มข้น 5% 6.7% และ 20%) จะนำไปย่อยต่อด้วยเอนไซม์ใน ขั้นตอนต่อไป เพื่อให้ได้เป็นสารละลายจากการย่อยซึ่งจะนำไปใช้ในการหมักกรดแอล-แลคติกในการทดลองอีกส่วนหนึ่ง โดยวัตถุประสงค์หลักของการปรับสภาพด้วยวิธีนี้ คือ ทำให้เฮมิเซลลูโลสเกิดการละลายและปรับเปลี่ยนโครงสร้าง ทั้งนี้เพื่อให้เอนไซม์สามารถเข้าไปย่อยเซลลูโลสและแป้ง ได้ดีขึ้น อีกทั้งเพื่อหลีกเลี่ยงการก่อตัวของสารยับยั้ง ซึ่งระหว่างการเกิดปฏิกิริยาจะมีกรดอะซีติกเกิดขึ้น โดยกรดที่เกิดขึ้นนี้จะทำหน้าที่ย่อยส่วนที่เป็นเฮมิเซลลูโลสได้เรียกว่า “auto-cleave” (Hendriks และ Zeeman, 2009; Bulat และคณะ, 2008) อย่างไรก็ตาม หลังกระบวนการปรับสภาพ ควรจะมีการกำจัดสิ่งเจือปนเหล่านั้นออกก่อนที่จะนำไปใช้ในกระบวนการหมัก เนื่องจากสิ่งปนเปื้อนดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อเซลล์จุลินทรีย์ที่จะใช้ในการหมักกรดแอล-แลคติก และกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ภายหลังจากการหมัก

วิธีปรับสภาพกากมันก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์อีกวิธีหนึ่งที่ศึกษา คือ การใช้ความร้อนสูง ภายใต้อุณหภูมิที่ควบคู่กับการเติมสารละลายแอลคาไลน์ลงในกากมันที่นำไปย่อย โดยสารละลาย แอลคาไลน์ที่ใช้ ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ จากการทดลองพบว่าน้ำที่แยกออกมาจากกากมัน ภายหลังจากการปรับสภาพนั้นมีอนุภาคของแป้งในรูปของกลูโคสหลุดออกมาจากกากมันเช่นกันกับการปรับสภาพด้วยวิธีแรก ได้ผลดังกราฟภาพที่ 4.1 (ข) พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์จาก 0.1 นอร์มอล ถึง 1.0 นอร์มอล อนุภาคของแป้งจะหลุดออกจากกากมันได้มากขึ้น โดยคิดเป็น yield ของกลูโคสที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ อีกทั้งการเพิ่มปริมาณของกากมัน (จากความเข้มข้น 5% เป็น 6.7 %) ก็ส่งผลให้อนุภาคแป้งหลุดจากกากมันได้มากขึ้นเช่นกัน สังเกตได้จาก yield ของกลูโคสที่เพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อมีปริมาณของกากมันที่มากขึ้นส่งผลให้ความเข้มข้นของกลูโคสในน้ำที่แยกออกมาที่มีปริมาณที่มากขึ้น ไม่เกิดการเจือจางของสารละลายส่งผลให้ yield ของกลูโคสเพิ่มขึ้นตาม ในกรณีของปริมาณความเข้มข้นของกากมันที่ 10% น้ำที่แยกออกมาที่มีปริมาณน้อยมากจึงไม่สามารถนำไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสได้เช่นเดียวกันกับการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนภายใต้อุณหภูมิสูงเพียงอย่างเดียว ในขณะที่เดียวกันการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ส่งผลให้โครงสร้างลิกนินสามารถแตกสลายได้มากขึ้น (Mission และ คณะ, 2009) ส่งผลให้กลูโคสหลุดออกมาได้มากขึ้น และเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการปรับสภาพ

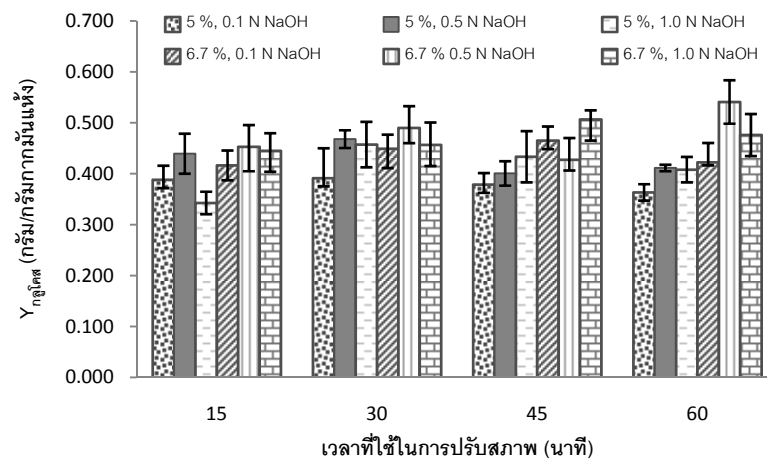
กากมันจาก 15 นาที จนถึง 60 นาที พบว่า อนุภาคแป้งที่หลุดออกจากกากมันเพิ่มมากขึ้น โดยสังเกตได้จากปริมาณแป้งที่วิเคราะห์ในรูปของกลูโคสที่อยู่ในสารละลายที่แยกได้จากการปรับสภาพเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากระยะเวลาที่ใช้ในการปรับสภาพที่มากพอควร มีผลต่อการทำปฏิกิริยาของไซโตเต็มไฮดรอกไซด์ส่งผลให้ yield ของกลูโคสเพิ่มขึ้นตาม (Saha และคณะ, 2010; Kumar และคณะ, 2009) โดยสามารถคิดเป็น yield ของกลูโคสที่หลุดออกจากกากมัน อยู่ที่ประมาณ 0.4-0.5 กรัมต่อกรัมกากมันแห้ง จากผลการทดลองในส่วนนี้ พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของกากมัน 6.7% และเติมไซโตเต็มไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 นอร์มอล แล้วนำไปปรับสภาพโดยใช้ความร้อนภายใต้ความดันสูงนาน 60 นาที จะให้ yield ของกลูโคสที่สูงที่สุด คือ ประมาณ 0.541 กรัมต่อกรัมกากมันแห้ง ดังนั้น ในการทดลองต่อไป จึงจะนำภาวะนี้เพื่อใช้ในการเตรียมปรับสภาพกากมันก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ต่อไป

ข้อสังเกตที่ได้จากการปรับสภาพโดยวิธีนี้ เมื่อเทียบกับวิธีแรก จะเห็นว่าสารละลายที่แยกออกมาภายหลังการปรับสภาพมีลักษณะหนืดเล็กน้อย เนื่องจากมีการบวมของแกรนูลแป้งที่ถูกปลดปล่อยออกมาหลังจากที่มีการปรับสภาพด้วยสารแอลคาไลน์ที่อุณหภูมิสูง (Wyman และคณะ, 2005) ซึ่งการปรับสภาพด้วยวิธีนี้จุดประสงค์หลักคือ ทำให้ลิกนินเกิดการละลาย แยกออกจากกัน และทำให้โครงสร้างของเซลลูโลสบริเวณที่เป็นคริสตัลไลน์มีการเปลี่ยนแปลง (Hendriks และ Zeeman, 2009) ซึ่งการเติมสารละลายแอลคาไลน์ลงไปควบคู่กับการใช้ความร้อนสูงนั้นเพื่อที่จะเป็นการแก้ไขปัญหาในส่วนของการเกิดกรดอะซีติกของขั้นตอนการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันได้ (Bulat และคณะ, 2008) แต่อย่างไรก็ตามการที่ใช้ไซโตเต็มไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นมากเกินไปจะส่งผลให้สารละลายที่ได้มีค่าพีเอชสูง หากจะนำไปใช้ในการหมัก ต้องมีการปรับค่าให้เป็นกลาง ส่งผลให้เกิดเกลือในสารละลายมากเกินไป อาจส่งผลเชิงลบต่อการหมักกรดแลกติกโดย *R. oryzae*

(ก)



(ข)



ภาพที่ 4.1 อนุภาคแป้งที่หลุดออกจากกากมัน รายงานในรูปแบบ yield ของกลูโคส (กรัม/กรัมกากมันแห้ง) ที่ปรากฏในของเหลวที่แยกได้จากกากมันภายหลังการปรับสภาพด้วยสองวิธี ที่ความเข้มข้นของกากมัน ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ และเวลาที่ใช้ในการปรับสภาพต่างกัน

(ก) การปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (steam pretreatment)

(ข) การปรับสภาพด้วยการใช้ร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับการใช้สารละลายแอมโมเนีย (steam with combination of alkaline treatment)

4.2 การย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยโดยเทคนิคทางเคมีกายภาพ (physicochemical pretreatment) มาแล้ว ด้วยเอนไซม์

ในขั้นตอนนี้ได้นำกากมันที่ผ่านการปรับสภาพแล้วด้วยเทคนิคและภาวะต่างๆกันมาย่อยด้วยเอนไซม์ เพื่อย่อยส่วนที่เป็นเซลลูโลสที่ยังไม่ถูกทำลายจากขั้นตอนของการปรับสภาพข้างต้น อีกทั้งเพื่อย่อยส่วนที่เป็นแป้ง คงตัวเป็นแกรนูลที่ถูกห่อหุ้มอยู่ในส่วนของลิกโนเซลลูโลส ดังนั้นปริมาณกลูโคสที่ได้ออกมาภายหลังจึงเป็นกลูโคสที่ได้มาจากการย่อยส่วนที่เป็นเซลลูโลสและแป้ง โดยได้ศึกษาและเปรียบเทียบปริมาณของกลูโคสที่ได้มาหลังจากการย่อยด้วยเซลลูโลเลส และอะไมเลส โดยแปรความเข้มข้นของเซลลูโลเลส และอะไมเลสที่ใช้ ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม (ย่อย) ทั้งนี้เพื่อให้ได้ปริมาณกลูโคสออกมาจากกากมันได้มากที่สุด เพื่อนำไปใช้ในการหมักกรดแลคติกต่อไป การย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน มีสองขั้นตอนคือ ขั้นตอนแรกนำกากมันที่ปรับสภาพแล้วมาย่อยด้วยเซลลูโลเลส 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 ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.2 ถึง 4.4 จะเห็นได้ว่า ความเข้มข้นของเซลลูโลเลสและเวลาที่ใช้ในการบ่มมีผลต่อปริมาณกลูโคสที่ได้ เมื่อทำการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันโดยเมื่อความเข้มข้นของเซลลูโลเลสที่มากขึ้น และเวลาที่ใช้ในการบ่มนานขึ้น จะให้ค่า yield ของกลูโคสมีแนวโน้มที่มากขึ้นตามด้วย อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของอะไมเลสและเวลาในการบ่มในขั้นตอนนี้ไม่มีผลต่อการย่อยกากมันที่ปรับสภาพแล้ว

ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า ในขั้นตอนการย่อยกากมันด้วยอะไมเลส ปริมาณอะไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง และระยะเวลาในการบ่ม 15 นาที เพียงพอสำหรับการย่อยกากมันที่ปรับสภาพด้วยวิธีข้างต้น และย่อยด้วยเซลลูโลสมาแล้วเบื้องต้น (ภาพที่ 4.2(ก) 4.3(ก) และ 4.4(ก)) ทั้งนี้เนื่องจากการเลือกใช้ปริมาณของอะไมเลสที่น้อยและระยะเวลาในการบ่มที่สั้น จะสามารถช่วยลดต้นทุนได้ นอกจากนี้จะเห็นได้ว่า เมื่อย่อยกากมันด้วยเอนไซม์ที่ภาวะเดียวกัน โดยเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของกากมันในขั้นตอนการปรับสภาพจาก 5% เป็น 6.7% และ 20% ตามลำดับ จะได้ค่า yield ของกลูโคสสูงขึ้นตามไปด้วย (ภาพที่ 4.2(ก) 4.3(ก) และ 4.4(ก))

จากผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น สามารถสรุปได้ว่า ภาวะที่เหมาะสมสำหรับย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันด้วยเซลลูโลเลส และอะไมเลส ได้ดังนี้ ปริมาณความเข้มข้นของกากมันสด 20% ปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดัน เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นย่อยต่อด้วยเซลลูโลเลส 33.15 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง นาน 6 ชั่วโมง แล้ว

ย่อยต่อด้วยอะไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง นาน 15 นาที โดยได้ yield ของกลูโคสสูงสุดประมาณ 0.6 กรัมต่อกรัมของกากมันแห้ง เมื่อเปรียบเทียบผลของการย่อยด้วยเซลลูเลสและอะไมเลส จะเห็นได้ว่าขั้นตอนการย่อยกากมันปรับสภาพแล้วด้วยเซลลูเลสมีบทบาทสำคัญมากกว่า ขั้นตอนการย่อยด้วยอะไมเลส กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของเซลลูเลสมากขึ้น และเวลาที่ใช้ในการย่อยนานขึ้น จะให้ค่า yield ของกลูโคสมีแนวโน้มที่สูงขึ้น ในขณะที่ความเข้มข้นของอะไมเลสและเวลาที่ใช้ในการบ่ม จะไม่ส่งผลต่อ yield ของกลูโคสมากนัก

ขั้นตอนการเตรียมสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันอีกวิธีหนึ่ง คือ การนำกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์มาย่อยต่อด้วยเซลลูเลส และอะไมเลส ได้ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.5 พบว่าความเข้มข้นของเซลลูเลสและเวลาในการบ่มมีผลต่อการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีนี้เช่นเดียวกันกับการนำกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดัน เห็นได้จากปริมาณของกลูโคสที่ได้ในสารละลายที่ออกมาภายหลังการย่อย หากความเข้มข้นของเซลลูเลสมากขึ้นและใช้ระยะเวลาในการบ่มที่นานขึ้น จะได้ yield ของกลูโคสในปริมาณที่มากขึ้นตามไปด้วย แต่พบว่าความเข้มข้นของอะไมเลสและเวลาในการบ่มไม่มีผลต่อการย่อยเช่นเดียวกับที่พบในการย่อยกากมันที่ปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดัน แต่อย่างไรก็ตาม ค่า yield ของกลูโคสที่ได้ในที่สุดอยู่ที่ประมาณ 0.16 กรัมต่อกรัมของกากมันแห้ง ซึ่งยังคงน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีที่ใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ประมาณ 0.6 กรัมต่อกรัมของกากมันแห้ง) ซึ่งน้อยกว่าเกือบ 4 เท่า ผลการทดลองที่ได้นี้อาจอธิบายได้จากการปรับสภาพด้วยวิธีใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันควบคู่กับการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป ทำให้กากมันที่ได้มีค่าพีเอชสูง ก่อนทำการย่อยด้วยเอนไซม์ต้องมีการปรับค่าพีเอชให้อยู่ที่ค่าที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์แต่ละตัว การปรับพีเอชส่งผลให้มีปริมาณเกลือที่ปนในกากมันในจำนวนค่อนข้างมาก เกลือดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดที่ใช้ก็อาจจะเป็นได้ นอกจากนี้แล้ว ยังพบว่า การปรับสภาพกากมันก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์นับเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากการปรับสภาพกากมันจะช่วยทำให้โครงสร้างลิกโนเซลลูโลสถูกทำลาย ทำให้เอนไซม์เข้าถึงแกรนูลของแป้งที่อยู่ภายในโครงสร้างของกากมันได้ง่ายขึ้น (Thongchul และคณะ, 2010)

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการปรับสภาพและการย่อยด้วยเอนไซม์ สามารถวิเคราะห์เป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้ออกมาทั้งหมด (glucose recovery yield) โดยคิดจากกากมันปะหลังตั้งต้นในการทดลอง ผ่านเข้าสู่กระบวนการปรับสภาพซึ่งในขั้นตอนนี้จะมีปริมาณของแป้งที่อยู่ในรูปของกลูโคสหลุดออกมาในน้ำ ซึ่งได้ทำการแยกกากน้ำและกากออกเพื่อที่จะนำไปย่อยด้วยเอนไซม์โดย

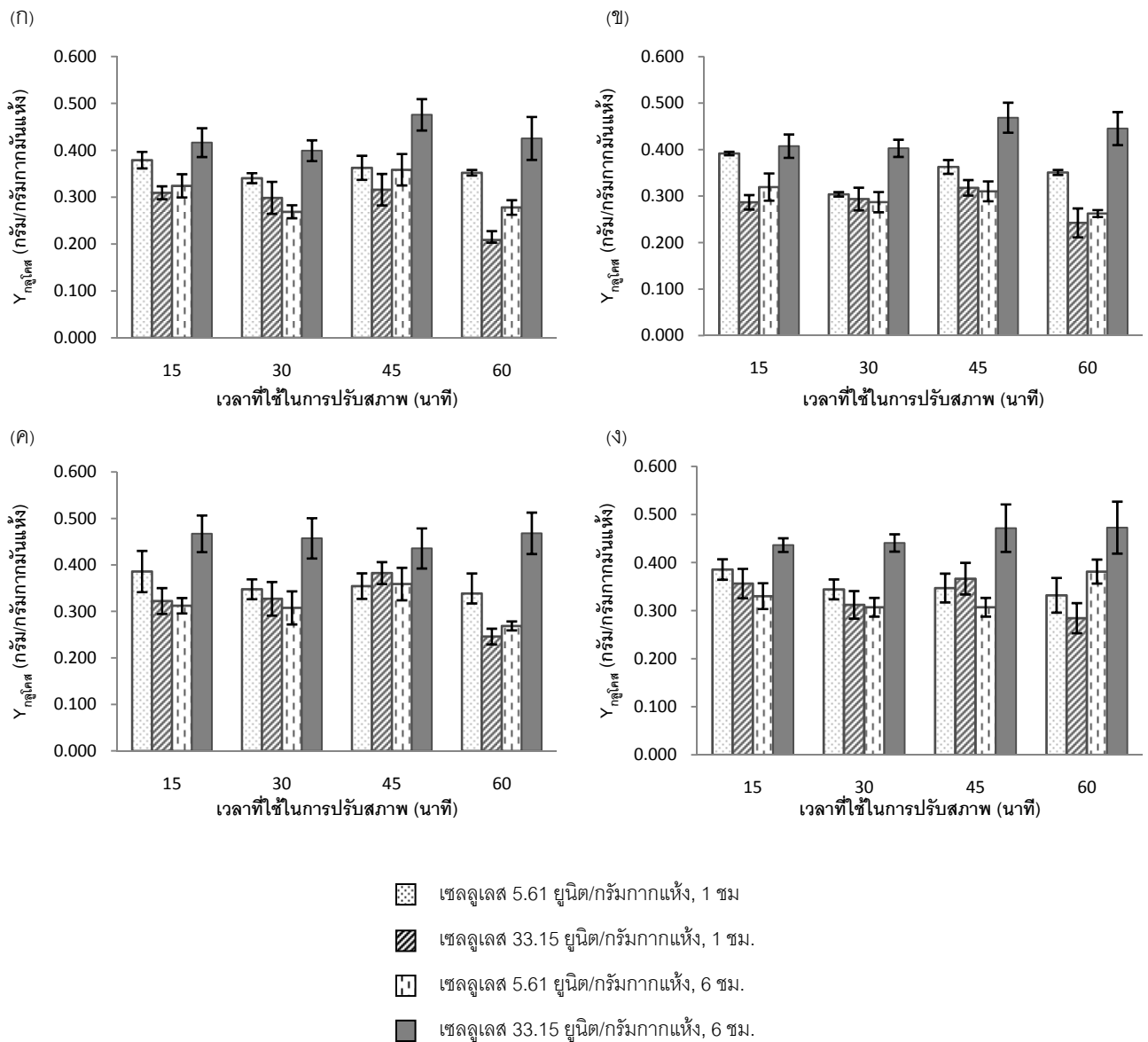
จะนำปริมาณของกลูโคสที่หลุดออกมาในส่วนนี้ไปคิดรวมกับกลูโคสที่ได้ภายหลังจากการนำกากไปย่อยด้วยเอนไซม์ จากการทดลองในกระบวนการของการปรับสภาพด้วยเทคนิคแรกพบว่า กลูโคสที่หลุดออกมาในน้ำที่ทำการแยกกากจากกระบวนการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 4.1 (ก)) และกลูโคสที่ได้จากการนำกากมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและอะไมเลส (ภาพที่ 4.2(ก) 4.3(ก) และ 4.4(ก)) สามารถวิเคราะห์เป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้ออกมาทั้งหมดได้ดังกราฟภาพที่ 4.6 และ 4.7 (ที่ความเข้มข้นกากมันในขั้นตอนการปรับสภาพ 5% และ 6.7% ตามลำดับ) ซึ่งคิดเป็นกลูโคสประมาณ 0.7 กรัมต่อกรัมของกากมันแห้ง ส่วนในกระบวนการของการปรับสภาพด้วยอีกเทคนิคหนึ่งพบว่า กลูโคสที่หลุดออกมาในน้ำที่ทำการแยกกากจากกระบวนการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับการใช้สารละลายแอสคาโลน (ความเข้มข้นของกากมัน 6.7% และเติมไซโตเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.5 นอร์มอล แล้วนำไปปรับสภาพโดยใช้ความร้อนภายใต้ความดันสูงนาน 60 นาที) และกลูโคสที่ได้จากการนำกากมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและอะไมเลส (ภาพที่ 4.5) สามารถวิเคราะห์เป็นปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้ออกมาทั้งหมดได้ดังกราฟภาพที่ 4.8 ซึ่งคิดเป็นกลูโคสประมาณ 0.6 กรัมต่อกรัมของกากมันแห้ง ผลปรากฏว่าในกระบวนการแรกนั้นสามารถให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้ออกมาทั้งหมด (glucose recovery yield) ได้มากกว่ากระบวนการหลัง

เมื่อนำมาเปรียบเทียบกันระหว่างสองกระบวนการ คือกระบวนการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเพียงอย่างเดียวแล้วนำไปย่อยต่อด้วยเอนไซม์ กับ กระบวนการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับการใช้สารละลายแอสคาโลนแล้วนำไปย่อยต่อด้วยเอนไซม์ โดยเลือกเฉพาะภาวะที่เหมาะสมในการนำไปใช้ในขั้นตอนกระบวนการหมักในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ผลปรากฏดังตารางที่ 4.1 พบว่าในกระบวนการแรกคือการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเพียงอย่างเดียวแล้วนำไปย่อยต่อด้วยเอนไซม์ ความเข้มข้นของกากมันมีผลต่อปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้ออกมาทั้งหมด ซึ่งพบว่าการใช้ความเข้มข้นของกากมันในปริมาณที่น้อยจะสามารถให้ปริมาณน้ำตาลได้มากที่สุด แต่อย่างที่กล่าวมาแล้วในข้างต้นว่า ในขั้นตอนของการปรับสภาพนั้น เราสนใจที่จะปรับสภาพกากมันเพื่อทำลายโครงสร้างส่วนที่เป็นเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ดังนั้นในน้ำส่วนที่แยกออกมาจึงควรจะเป็นส่วนที่เราไม่ต้องการหลุดออกมา แต่จากการทดลองกลับพบว่า ในน้ำที่แยกออกจากกากในขั้นตอนของการปรับสภาพนั้นมีปริมาณของน้ำตาลกลูโคสหลุดออกมาอยู่ในปริมาณที่ค่อนข้างมาก ซึ่งที่ความเข้มข้นของกากมัน 5% และ 6.7% คิดเป็น 0.443 และ 0.426 กรัม ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นของกากมัน 20% นั้นสามารถแยกน้ำออกมาได้ จึงไม่สามารถวัดปริมาณกลูโคสที่หลุดออกมาได้ จึงมาพิจารณาที่ขั้นตอนของการย่อย โดยปริมาณน้ำตาลกลูโคสในส่วนไฮโดรไลเซทภายหลังจากการย่อยพบว่า ซึ่งที่ความเข้มข้นของกากมัน 5% 6.7% และ 20% คิดเป็น 0.232 0.232 และ 0.541 กรัม ตามลำดับ เห็นได้ว่าที่

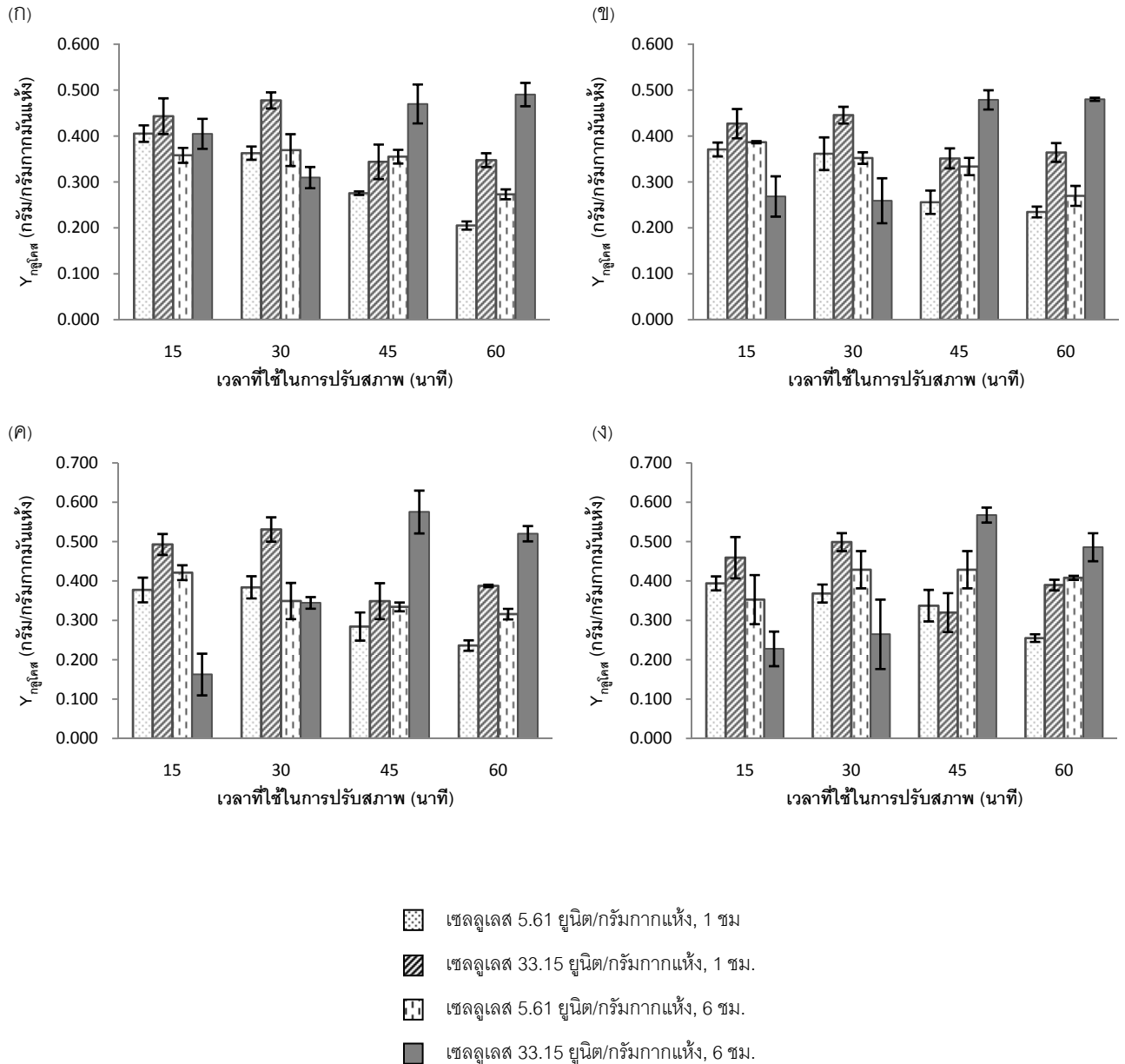
ความเข้มข้นของกากมัน 20% จะสามารถย่อยด้วยเอนไซม์แล้วให้ปริมาณกลูโคสออกมาได้มากกว่าที่ 5% และ 6.7% ทั้งนี้จึง เห็นได้ว่า ปริมาณแป้งยังคงอยู่ในกากมัน ไม่ได้สูญหายไปในช่วงขั้นตอนของการปรับสภาพ เมื่อมาพิจารณาปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้ออกมาทั้งหมดภายหลังจากสิ้นสุดกระบวนการ (glucose recovery yield) พบว่ากระบวนการของการใช้ความเข้มข้นของกากมันน้อยในขั้นตอนการปรับสภาพนั้น จะได้ปริมาณของน้ำตาลออกมามากในปริมาณที่สูงกว่า ดูจากผลการวิเคราะห์ของความเข้มข้นของกากมัน 5% 6.7% และ 20% เท่ากับ 0.675 0.658 และ 0.541 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ แต่ภาวะที่เราเลือกนำไปใช้ในการย่อยในระดับสเกลใหญ่เพื่อนำไปใช้เป็นขั้วสเตรทสำหรับการหมักในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ สำหรับกระบวนการของเทคนิคการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเพียงอย่างเดียวแล้วนำไปย่อยต่อด้วยเอนไซม์นั้น การที่เลือกใช้ความเข้มข้นกากมันน้อย จะพบปัญหาในเรื่องการเจือจางของกลูโคสในไฮโดรไลเซท ทำให้ต้องมีขั้นตอนของการระเหยน้ำ (evaporation) เพื่อให้ได้ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคสที่มากพอสมควร และเหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมัก ดังนั้นจึงเลือกภาวะที่ใช้ความเข้มข้นของกากมันที่ 20% ของขั้นตอนการปรับสภาพ เพราะว่าการที่ไฮโดรไลเซทนั้นมีปริมาณความเข้มข้นของกลูโคสสูง ส่งผลดีต่อการเก็บเป็น feedstock และนำไปใช้ เนื่องจากไม่ต้องสิ้นเปลืองพลังงานและช่วยให้ลดต้นทุนในการระเหยน้ำอีกด้วย ส่วนในอีกกระบวนการหนึ่งคือ กระบวนการปรับสภาพด้วยการใช้ร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับการใช้สารละลายแอสคาไลน์แล้วนำไปย่อยต่อด้วยเอนไซม์ พบว่าสามารถให้ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้ออกมาทั้งหมดภายหลังจากสิ้นสุดกระบวนการ (glucose recovery yield) เท่ากับ 0.612 กรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ซึ่งไฮโดรไลเซทที่ได้จากกระบวนการนี้จะมีเกลืออยู่ในสารละลายปริมาณมาก ซึ่งเกิดจากการปรับพีเอชของสารละลายให้เหมาะสมต่อการย่อยของเอนไซม์ ดังนั้นถึงแม้ว่าในไฮโดรไลเซทจะมีปริมาณกลูโคสที่ได้ออกมาทั้งหมดมากกว่ากระบวนการแรก แต่ก็อาจจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตการสร้างผลิตภัณฑ์ของเรา ส่งผลเชิงลบต่อการนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักได้ (Thongchul และคณะ, 2010)

เมื่อทำการเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Thongchul และคณะ (2010) ซึ่งได้ทำการศึกษาเทคนิคการย่อยกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ โดยใช้เซลล์ลูเลส 1.41 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตามด้วย อะไมเลส 48 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วย่อยต่อด้วยกลูโคอะไมเลส 4.8 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สามารถให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้ออกมาทั้งหมดภายหลังจากสิ้นสุดกระบวนการ (glucose recovery yield) เท่ากับ 0.407 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง เห็นได้ว่าเทคนิคการปรับสภาพกากมันสำปะหลังก่อนจะนำไปย่อยด้วยเอนไซม์นั้น สามารถให้ปริมาณกลูโคสที่ได้ออกมาทั้งหมดในปริมาณที่สูงขึ้น ดังนั้นจึงสรุปได้ การปรับสภาพกากมันสำปะหลังด้วยการทำลายโครงสร้างของส่วนที่เป็นลิกโนเซลลูโลส

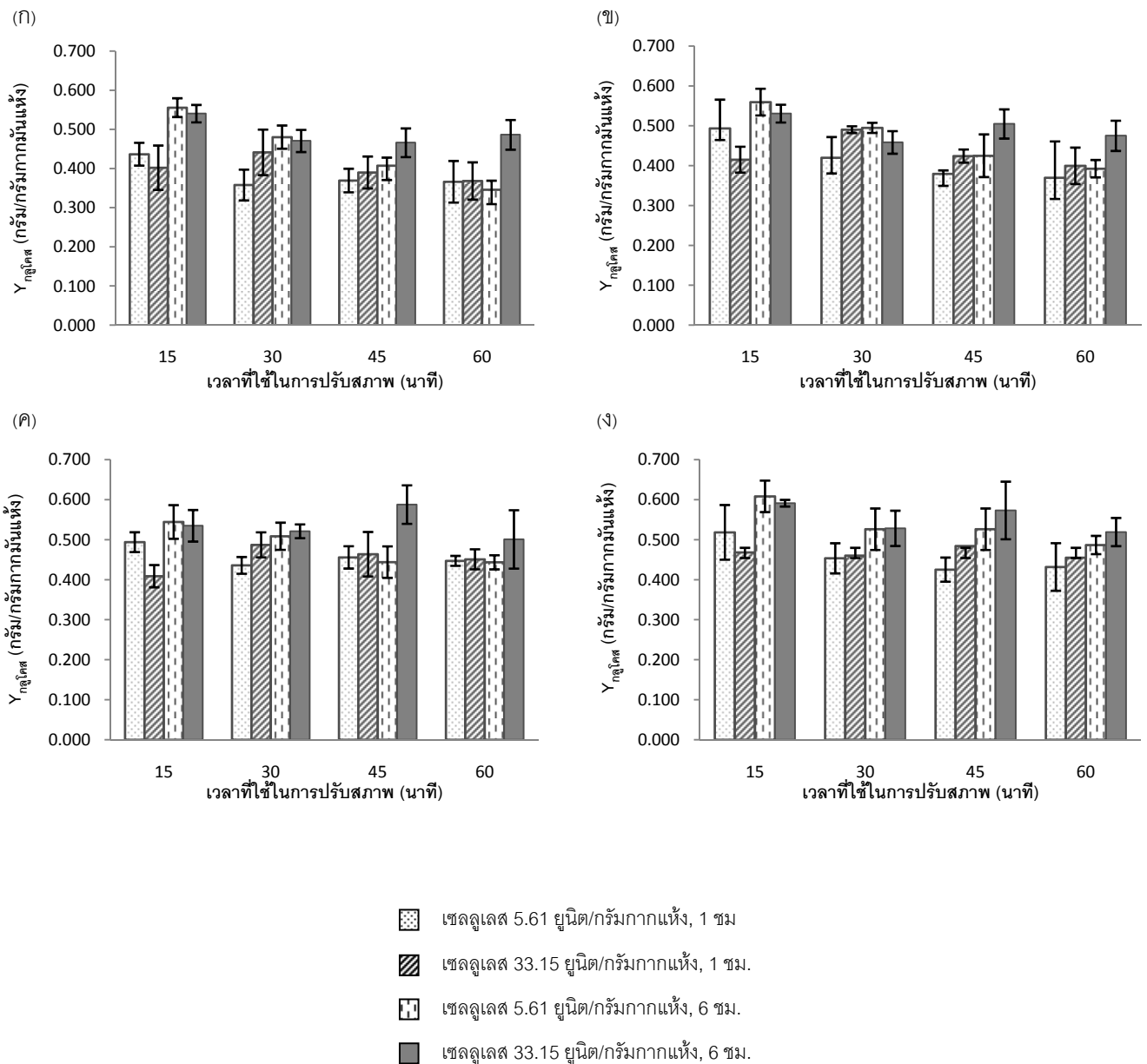
นั้นมีประโยชน์ต่อการย่อยของเอนไซม์ โดยที่วัตถุประสงค์ของการปรับสภาพคือ กำจัดลิกนินและ
เฮมิเซลลูโลส ลดความเป็นคริสตัลไลน์ของเซลลูโลส เพิ่มรูพรุนและพื้นที่ผิวให้กับวัตถุดิบ ทำให้
วัตถุดิบถูกย่อยสลายได้ดีขึ้น (Kumar และคณะ, 2009)



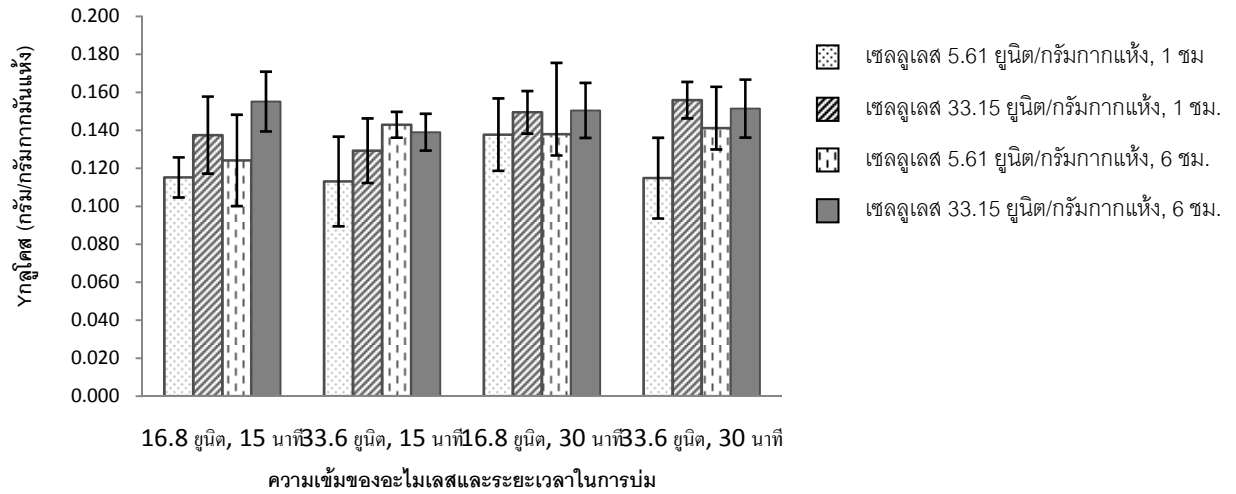
ภาพที่ 4.2 กลูโคสที่ได้ในรูปของ yield ของกลูโคส จากการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดัน ด้วยเซลลูโลสและอะไมเลส โดยใช้ความเข้มข้นของกากมันเริ่มต้น 5% (ก) อะไมเลส 16.8 ยูนิต/กรัมกากแห้ง 15 นาที; (ข) อะไมเลส 33.16 ยูนิต/กรัมกากแห้ง 15 นาที; (ค) อะไมเลส 16.8 ยูนิต/กรัมกากแห้ง 30 นาที; (ง) อะไมเลส 33.6 ยูนิต/กรัมกากแห้ง 30 นาที



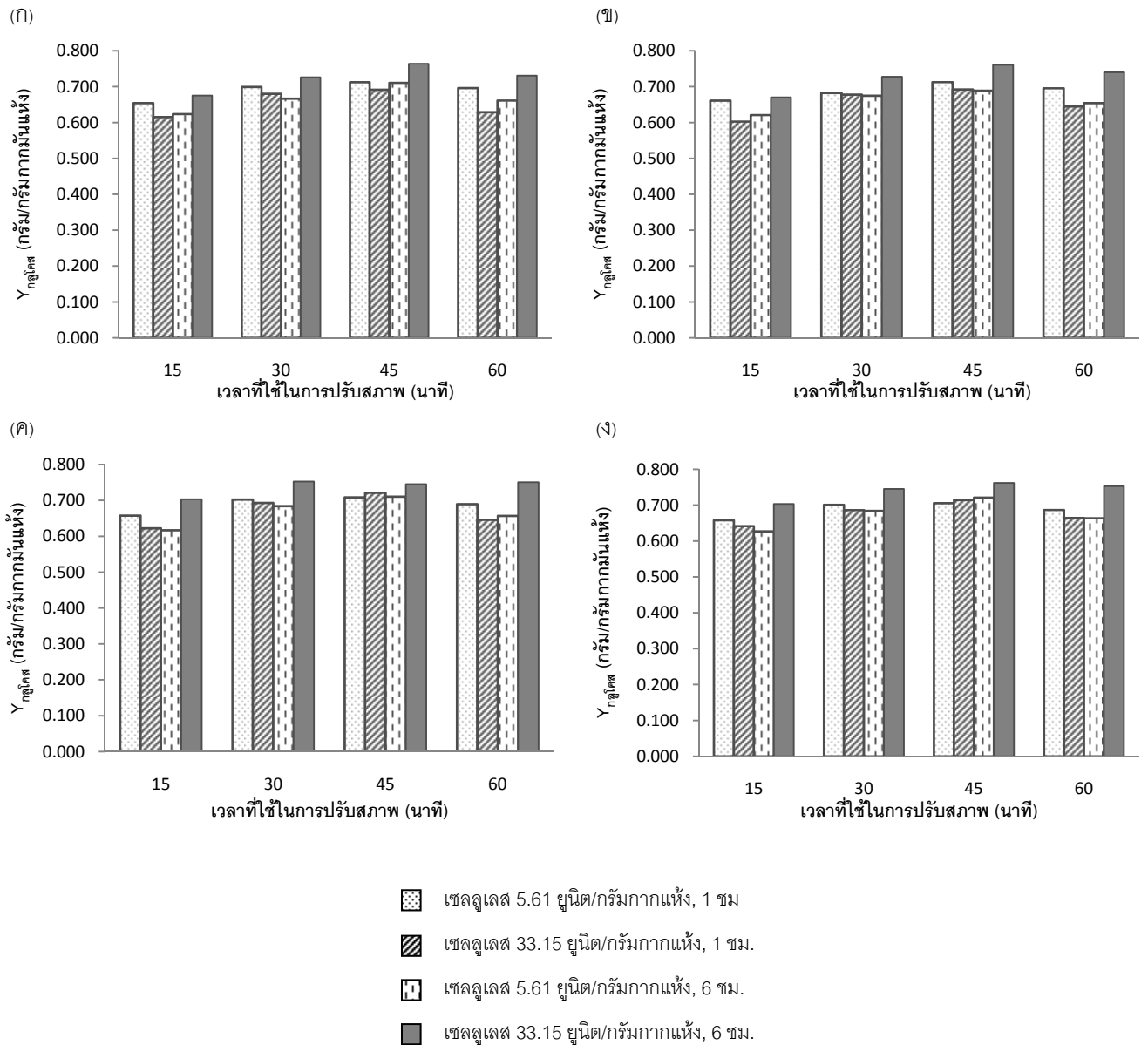
ภาพที่ 4.3 กลูโคสที่ได้ในรูปของ yield ของกลูโคส จากการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดัน ด้วยเซลลูเลสและอะไมเลส โดยใช้ความเข้มข้นของกากมันเริ่มต้น 6.7% (ก) อะไมเลส 16.8 ยูนิต/กรัมกากแห้ง 15 นาที; (ข) อะไมเลส 33.16 ยูนิต/กรัมกากแห้ง 15 นาที; (ค) อะไมเลส 16.8 ยูนิต/กรัมกากแห้ง 30 นาที; (ง) อะไมเลส 33.6 ยูนิต/กรัมกากแห้ง 30 นาที



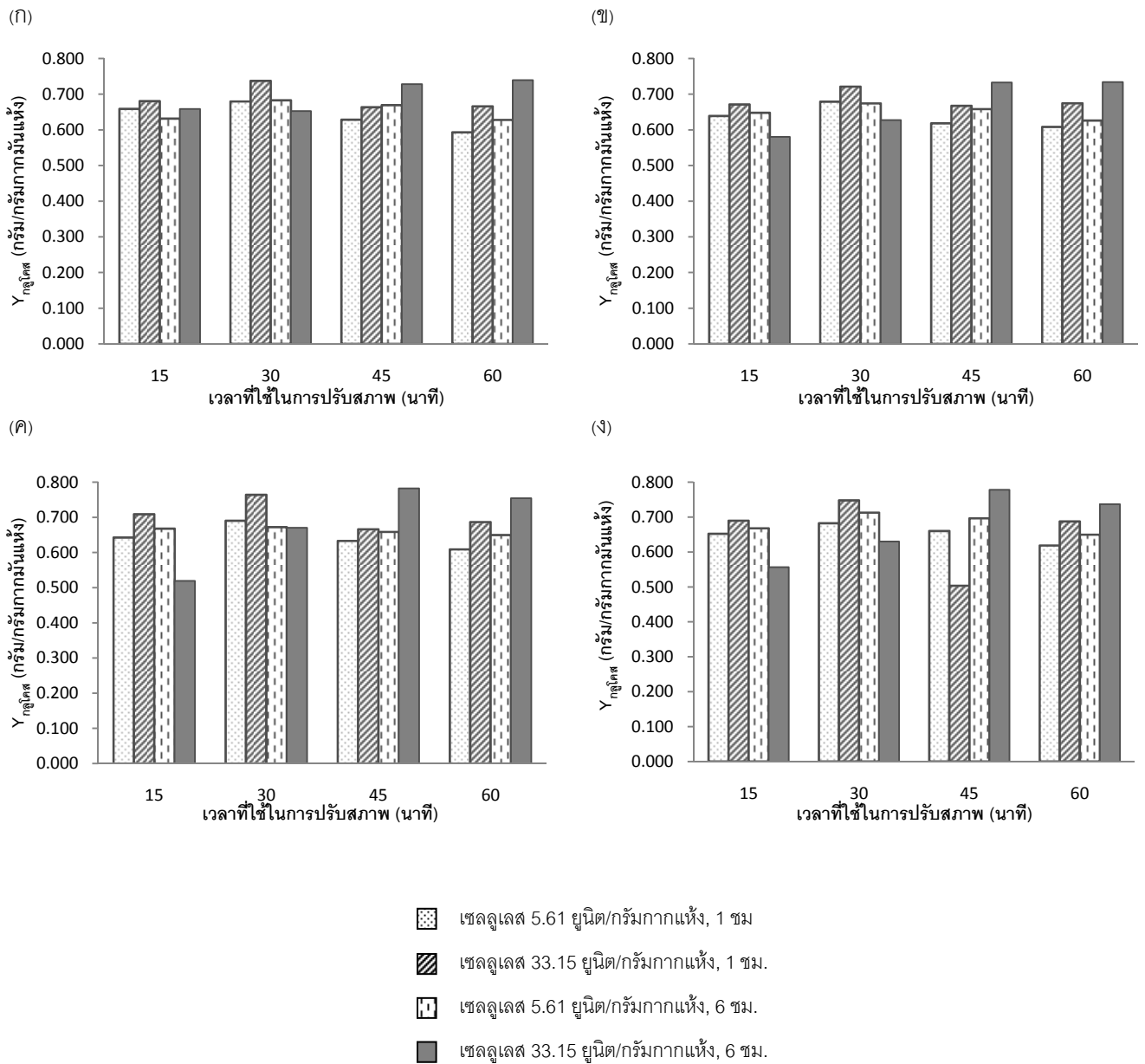
ภาพที่ 4.4 กลูโคสที่ได้ในรูปของ yield ของกลูโคส จากการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดัน ด้วยเซลลูโลสและอะไมเลส โดยใช้ความเข้มข้นของกากมันเริ่มต้น 20% (ก) อะไมเลส 16.8 ยูนิต/กรัมกากแห้ง 15 นาที; (ข) อะไมเลส 33.16 ยูนิต/กรัมกากแห้ง 15 นาที; (ค) อะไมเลส 16.8 ยูนิต/กรัมกากแห้ง 30 นาที; (ง) อะไมเลส 33.6 ยูนิต/กรัมกากแห้ง 30 นาที



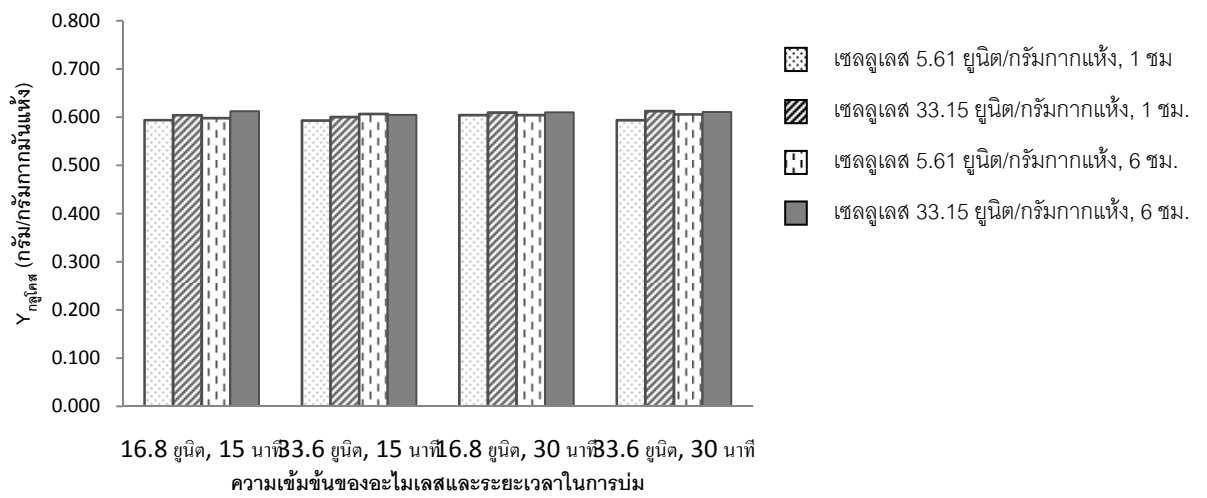
ภาพที่ 4.5 กลูโคสที่ได้ในรูปของ yield ของกลูโคส จากการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดันที่มีการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.5 นอร์มอล) ด้วยเซลล์เลสที่ 50 องศาเซลเซียส และอะไมเลสที่ 100 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเข้มข้นของกากมันเริ่มต้น 6.7%



ภาพที่ 4.6 กลูโคสที่ได้ออกมาทั้งหมดในรูปของ yield ของกลูโคส จากกระบวนการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดัน และนำมาย่อยต่อด้วยเซลลูเลสและอะไมเลส โดยใช้ความเข้มข้นของกากมันเริ่มต้น 5% (ก) อะไมเลส 16.8 ยูนิต/กรัมกากแห้ง 15 นาที; (ข) อะไมเลส 33.16 ยูนิต/กรัมกากแห้ง 15 นาที; (ค) อะไมเลส 16.8 ยูนิต/กรัมกากแห้ง 30 นาที; (ง) อะไมเลส 33.6 ยูนิต/กรัมกากแห้ง 30 นาที



ภาพที่ 4.7 กลูโคสที่ได้ออกมาทั้งหมดในรูปของ yield ของกลูโคส จากกระบวนการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดัน และนำมาย่อยต่อด้วยเซลลูเลสและอะไมเลส โดยใช้ความเข้มข้นของกากมันเริ่มต้น 6.7% (ก) อะไมเลส 16.8 ยูนิต/กรัมกากแห้ง 15 นาที; (ข) อะไมเลส 33.16 ยูนิต/กรัมกากแห้ง 15 นาที; (ค) อะไมเลส 16.8 ยูนิต/กรัมกากแห้ง 30 นาที; (ง) อะไมเลส 33.6 ยูนิต/กรัมกากแห้ง 30 นาที



ภาพที่ 4.8 กลูโคสที่ได้ออกมาทั้งหมดในรูปของ yield ของกลูโคส จากกระบวนการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดันที่มีการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.5 นอร์มอล) และนำมาย่อยต่อด้วยเซลลูโลสที่ 50 องศาเซลเซียส และอะไมเลสที่ 100 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเข้มข้นของกากมันเริ่มต้น 6.7%

ตารางที่ 4.1 กลูโคสที่ได้ออกมาทั้งหมดในรูปของ yield ของกลูโคส จากกระบวนการการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดันและผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดันที่มีการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ และนำมาแยกต่อด้วยเซลลูเลสและอะไมเลส จากการย่อยกากมันที่ผ่าน ด้วยเซลลูเลส 33.15 ยูนิต/กรัม กากแห้ง 6 ชั่วโมง ตามด้วยอะไมเลส 16.8 ยูนิต/กรัมกากแห้ง 15 นาที

ภาวะที่ใช้การปรับสภาพกากมันสำหรับ			yield ของกลูโคส ในน้ำที่แยก ออกมา(กรัม/กรัม กากแห้ง)	yield ของกลูโคสใน ไฮโดรไลเซต(กรัม/ กรัมกากแห้ง)	ปริมาณกลูโคสใน น้ำที่แยกออกมา (กรัม)	ปริมาณกลูโคสใน ไฮโดรไลเซต(กรัม)	yield ของกลูโคสที่ ได้ออกมาทั้งหมด เมื่อสิ้นสุด กระบวนการ (กรัม/ กรัมกากแห้ง)
ความเข้มข้นของกาก มัน (%)	ความเข้มข้น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (นอร์มอล)	เวลาในการปรับ สภาพ (นาที)					
<i>กากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดัน</i>							
5%	-	15	0.443	0.416	0.443	0.232	0.675
6.7%	-	15	0.426	0.405	0.426	0.232	0.658
20%	-	15	ND*	0.541	ND*	0.541	0.541
<i>กากมันผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดันที่มีการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์</i>							
6.7%	0.5	60	0.541	0.155	0.541	0.071	0.612

ND* คือ ไม่สามารถวัดปริมาณกลูโคสได้เนื่องจากไม่สามารถแยกน้ำออกมาจากส่วนที่เป็นกากได้

4.3 กระบวนการหมักกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด 5 ลิตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

ศึกษาและเปรียบเทียบลักษณะพื้นฐานและจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแลกติกโดย *R. oryzae* โดยการใช้ซับสเตรตต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และสารละลายแป้ง

การหมักกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันนี้ จะทำการหมักเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง โดยแบ่งเป็นสองช่วงคือ ในช่วง 0 – 48 ชั่วโมงจะเป็น growth phase และในช่วง 48 – 96 ชั่วโมงจะเป็น production phase

4.3.1 ลักษณะพื้นฐานของ *R. oryzae* ที่ตรึงอยู่บนเส้นใยในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

ในกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว *R. oryzae* สามารถเจริญเติบโตโดยมีลักษณะพื้นฐานที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างด้วยกัน ยกตัวอย่างเช่น ขนาดของสปอร์เริ่มต้น (initial spore inoculum size) ซับสเตรตที่ใช้ ค่าพีเอช อัตราการปั่นกววน อัตราการให้อากาศ และ อุณหภูมิ เป็นต้น (Zhang และคณะ, 2007) ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ซับสเตรตที่ต่างกันมาเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับใช้ในกระบวนการหมักกรดแลกติกโดย *R. oryzae* ที่ตรึงอยู่บนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนู ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.6 ถึง 4.10

เมื่อพิจารณาถึงลักษณะพื้นฐานของ *R. oryzae* ในระยะการเจริญเติบโต (growth phase) ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.9) พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตเป็นตัวเซลล์แบบลักษณะเส้นใย โดยจัดวางตัวเป็นชั้นๆ เกาะอยู่บนเส้นใยของผ้า ซึ่งจะมีรูปร่างหน้าตาเหมือนกัน แต่ต่างกันที่ปริมาณเซลล์ที่เกาะอยู่บนเส้นใย และสีของตัวเซลล์ โดยจะขึ้นอยู่กับแต่ละภาวะของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ กรณีภาวะที่ใช้ซับสเตรตกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เซลล์มีสีขาวนวล แต่มีปริมาณที่ไม่มากนักเมื่อเทียบกับภาวะอื่น ดังแสดงในภาพที่ 4.9 (ก) ส่วนภาวะที่ใช้ซับสเตรตเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น (ภาพที่ 4.9 (ข) และ 4.9 (ค)) พบว่า เซลล์มีสีน้ำตาล เนื่องจากสีของอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต (growth medium) และอาหารที่ใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์ (production medium) ที่ผ่านการปรับสภาพและการย่อย

เซลล์มีการเจริญเติบโตค่อนข้างมาก ซึ่งสังเกตจากปริมาณของเซลล์ที่เกาะอยู่บนผ้าในจำนวนที่มากพอควร ส่งผลให้อาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต มีปริมาณน้อย เนื่องจากถูกเซลล์ดูดน้ำเข้าไปเป็นจำนวนมาก คาดว่าน่าจะมาจากการที่สารอาหารที่ใช้ในการเป็นอาหารสำหรับการเจริญเติบโต และอาหารสำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์นั้นมีโปรตีนอยู่ค่อนข้างมาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Thongchul และคณะ (2010) พบว่ากากมันสำปะหลังประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 5.3 % ทำให้สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังมีปริมาณของโปรตีนสูงเช่นกัน ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณของแหล่งไนโตรเจนอีกทางหนึ่ง ส่งผลให้ช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์ในปริมาณที่มากขึ้น (Yao และคณะ, 2010) ส่วนภาวะที่ซบสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด (ภาพที่ 4.9 (ง) และ 4.9 (จ)) พบว่า เซลล์มีสีน้ำตาลเข้ม และน้ำตาลส้มตามลำดับ เนื่องจากสีของอาหารที่ใช้เช่นกัน และในระหว่างการหมักนั้นจะมีปริมาณของฟองเกิดขึ้นเป็นปริมาณมากโดยจะเกิดเป็นฟองลอยขึ้นมากอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา จวบจนกระทั่งฟองคงที่ซึ่งใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง และภาวะที่ซบสเตรทเป็นสารละลายแป้ง (ภาพที่ 4.9 (ด)) พบว่า เซลล์มีสีขาวขุ่น แต่จะขาวกว่าการใช้กลูโคส เนื่องจากสีของสารละลายแป้ง และในช่วงเริ่มต้นกระบวนการหมักนั้น สารละลายแป้งที่ใช้จะเกิดเจลาตินในเซชัน ทำให้น้ำหมักมีความหนืดค่อนข้างสูง และเนื่องจากสารละลายแป้งที่มีลักษณะเป็นเจล จึงไปเกาะกับเส้นใยผ้าฝ้ายที่เตรียมไว้สำหรับให้เซลล์ขึ้นไปเกาะในขณะที่เจริญเติบโต จึงส่งผลให้เซลล์เกาะตัวบนผ้าฝ้ายแบบไม่แน่นนัก แต่เมื่อทำการหมักไประยะหนึ่งประมาณชั่วโมงที่ 24 พบว่า สารละลายแป้งมีความหนืดลดลง อาจมาจากการที่มีการปั่นกววนของใบพัดทำให้โมเลกุลของแป้งสั้นลง อีกทั้ง *R. oryzae* มีเอนไซม์ในกลุ่มอะไมโลไลติกมาช่วยย่อยโมเลกุลของแป้งให้มีขนาดเล็กลงความหนืดของอาหารจึงลดลง (Wee และคณะ, 2006)

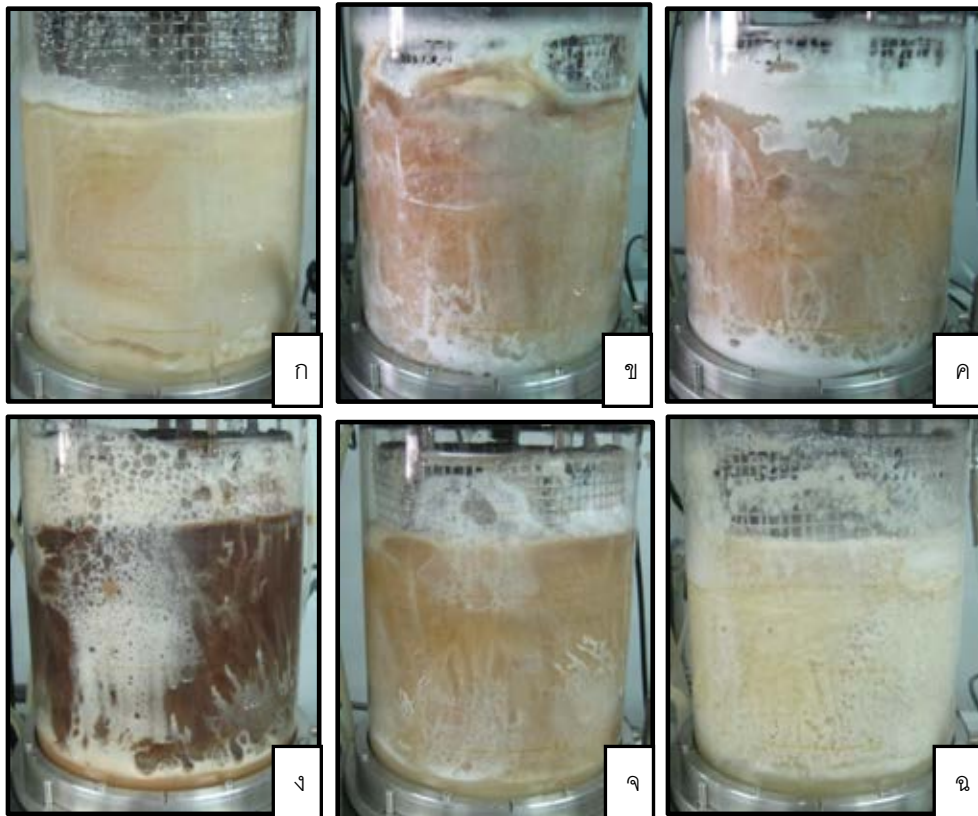
เมื่อพิจารณาลักษณะสัญญาณของ *R. oryzae* ในระยะการสร้างผลิตภัณฑ์ (production phase) ที่เวลาการหมัก 96 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.10) พบว่า เซลล์ในแต่ละภาวะมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะภาวะที่ซบสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น (ภาพที่ 4.10 (ข) และ 4.10 (ค)) พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เซลล์บางส่วนไม่ได้สัมผัสกับอาหารทำให้เซลล์เจริญเป็นสปอร์ในบริเวณด้านบนของเบดสตีต ส่วนภาวะที่ซบสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด (ภาพที่ 4.10 (ง) และ 4.10 (จ))

พบว่า เชลล์มีการเจริญเติบโตมากขึ้นเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามความถี่ของการเกิดฟองในขณะนี้จะมีมากกว่าในระยะของการเจริญเติบโต

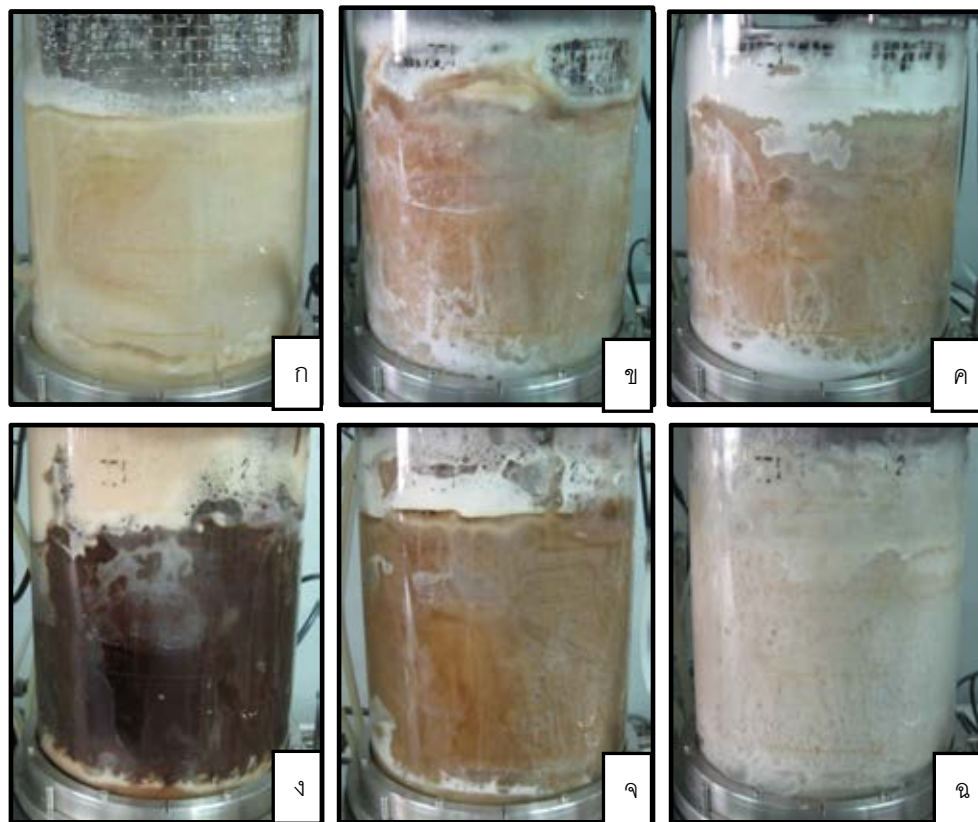
เมื่อพิจารณาลักษณะการยึดเกาะของ *R. oryzae* บนเบดสติด้านนอก และด้านใน (ภาพที่ 4.11) และความหนาของเชลล์ (ภาพที่ 4.12) พบว่า เชลล์มีการยึดเกาะบนเบดสติดที่หนาแน่นและมีความหนาที่แตกต่างกันไปในแต่ละภาวะ จะเห็นได้ชัดเจนในกรณีของภาวะที่ซับซ้อนเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ และผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาพที่ 4.11 (ข) และ 4.11 (ค)) พบว่า เชลล์มีปริมาณมาก และเจริญเติบโต ขยายขนาดเกินบริเวณที่ยึดเกาะของเบดสติด เชลล์มีลักษณะยึดเกาะกันอย่างหลวมๆ ตัวเชลล์มีความหนามากพอควร ดังแสดงในภาพที่ 4.12 (ข) และ 4.12 (ค) มีการพองน้ำเนื่องมาจากการที่เชลล์ดูดน้ำเข้าไปในระหว่างกระบวนการหมัก น้ำหนักแห้งของทั้งสองภาวะนี้คือ 57.26 และ 58.09 กรัม ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนคือ 35.12 กรัม กรณีภาวะที่ซับซ้อนเตรทเป็นสารละลายแป้ง (ภาพที่ 4.11 (ง)) พบว่า เชลล์มีปริมาณมากเช่นกัน มีการเจริญเติบโตของเชลล์ที่มีขนาดค่อนข้างหนา ดังแสดงในภาพที่ 4.12 (ง) แต่ในภาวะนี้เชลล์มีการหลุดออกจากเบดสติดได้ง่าย เนื่องจากการเกาะตัวกันอย่างหลวมๆ ปนอยู่กับสารละลายแป้งที่ยังคงมีสภาพเป็นเจล และมีการพองน้ำเช่นกันด้วย กรณีของภาวะที่ซับซ้อนเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด (ภาพที่ 4.11 (จ) และ 4.11 (ฉ)) พบว่า เชลล์มีการเจริญเติบโต เกาะตัวกันอย่างหนาแน่นจึงสังเกตได้ว่าเชลล์มีปริมาณน้อย เจริญอยู่บนเส้นใยผ้าฝ้ายเท่านั้น และมีขนาดไม่หนามากเกินไป ดังแสดงในภาพที่ 4.12 (จ) และ 4.12 (ฉ) ซึ่งภาวะข้างต้นที่ได้กล่าวมานั้นแตกต่างกับภาวะที่ใช้ซับซ้อนเตรทกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาพที่ 4.11 (ก)) ในภาวะนี้เชลล์จะยึดเกาะเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ และเกาะตัวกันอย่างไม่หนาแน่นมากนัก ดังแสดงในภาพที่ 4.12 (ก) ทำให้มีช่องว่างภายในตัวเชลล์ ส่งผลให้การถ่ายเทอาหารและอากาศเข้าสู่ภายในตัวเชลล์มีประสิทธิภาพมากกว่าภาวะอื่นๆ เชลล์จึงสามารถผลิตกรดแลกติกได้มากขึ้น (Chotisubha-anandha และคณะ, 2011)

เมื่อพิจารณาลักษณะเชลล์ *R. oryzae* ที่ตรึงอยู่ด้านในของเบดสติด (ภาพที่ 4.13) พบว่า บริเวณผิวของเชลล์ที่อยู่ด้านในมีลักษณะด้านและแข็งกว่าเชลล์ที่อยู่ด้านนอกของเบดสติด เนื่องมาจากเป็นบริเวณที่อยู่ติดกับอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่าด้านนอกของเบด (Thongchul, 2005; Chotisubha-anandha และคณะ, 2011) กรณีของภาวะที่ซับซ้อนเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้

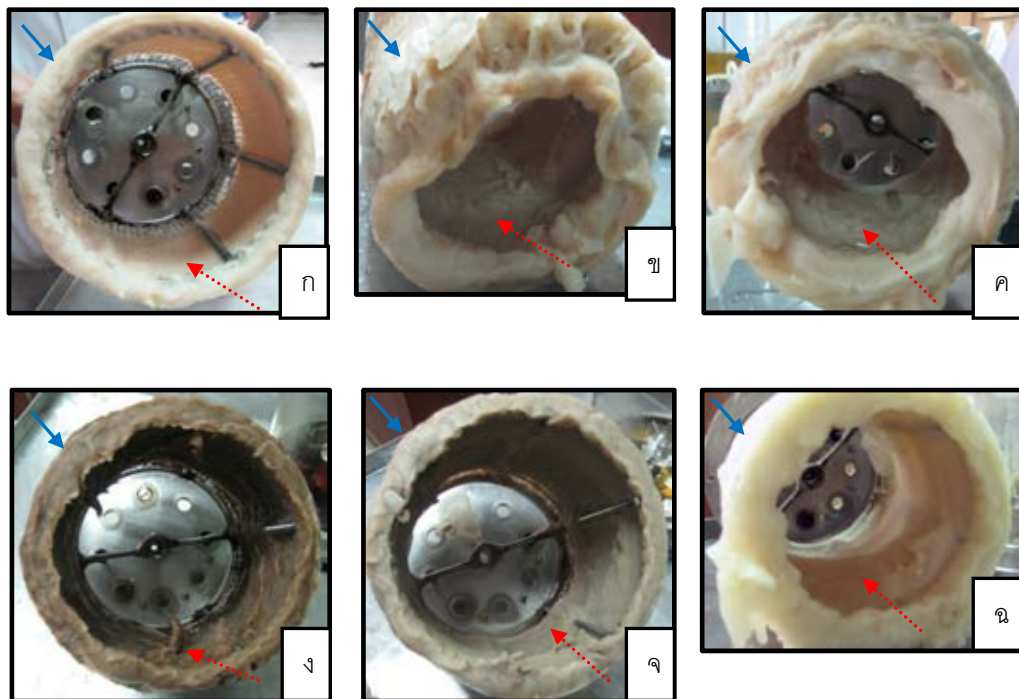
ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด (ภาพที่ 4.13 (ง) และ 4.13 (จ)) พบว่า ลักษณะที่ด้าน แข็ง และมีการจัดเรียงกันแน่นมากกว่าภาวะอื่นๆ ทั้งนี้อาจจะมาจากการที่สารละลายมีความเข้มข้นของเกลือสูง ซึ่งการองค์ประกอบของอากาศเลี้ยงเชื้อนั้นส่งผลโดยตรงต่อรูปร่างและลักษณะของเซลล์ (Zhang และคณะ, 2007) โดยน้ำหนักแห้งของทั้งสองภาวะนี้คือ 64.42 และ 76.81 กรัม ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการใช้ภาวะอื่น จึงเป็นสามารถสรุปได้ว่า เซลล์ที่เกิดในสองภาวะนี้มีการแพ็คตัวอยู่อย่างหนาแน่น และกรณีของภาวะที่ซับซ้อนเป็นสารละลายแป้ง (ภาพที่ 4.13 (ฉ)) พบว่า เซลล์มีลักษณะที่นุ่ม ไม่มีความคงตัวของตัวเซลล์ หลุดขาดจากกันง่าย แต่ยังมีบริเวณที่มีความแข็งอยู่บ้างเล็กน้อย เนื่องมาจากการในภาวะนี้มีโมเลกุลของแป้งที่มีลักษณะเป็นเจล มาแทรกอยู่ระหว่างตัวเซลล์กับเส้นใยผ้าฝ้ายที่ยืดตึง ทำให้เซลล์ไม่มีความคงตัวและหลุดออกจากกันง่าย ทำให้มีตัวเซลล์มีการหลุดออกมาบ้างในขณะที่ทำการเปลี่ยนถ่ายอาหาร และยังส่งผลให้ปริมาณของน้ำหนักแห้งของภาวะนี้มีค่ามากกว่าค่าที่เป็นจริงเพราะมีน้ำหนักของโมเลกุลแป้งปะปนไปด้วย คือ 33.77 กรัม



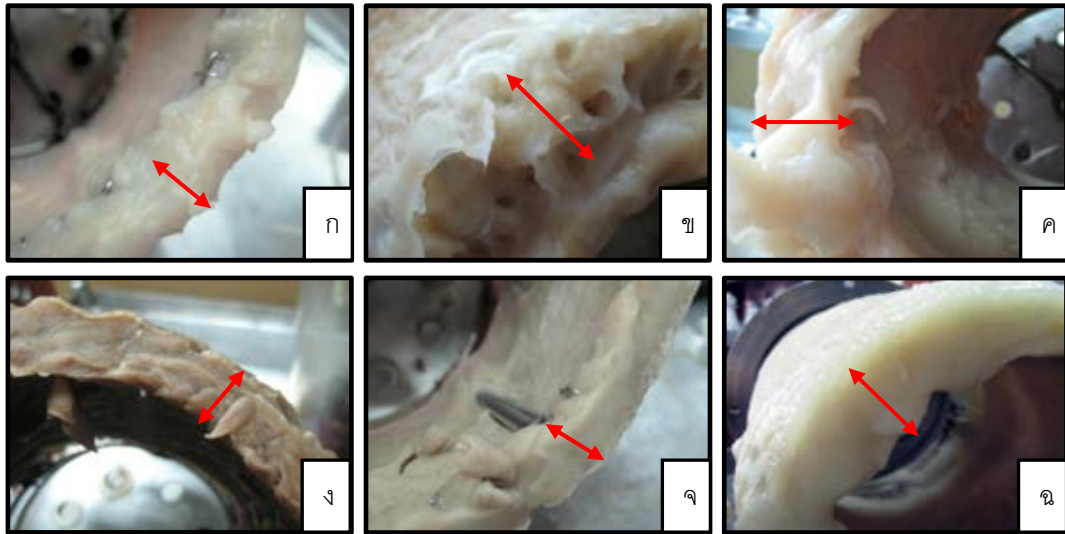
ภาพที่ 4.9 ลักษณะสีพื้นฐานของ *R. oryzae* ที่ถูกตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบด สติต อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศเท่ากับ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในระยะการเจริญเติบโตที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ของการใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด ได้แก่ กลูโคส (ก) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของ กากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมัน สำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ค) สารละลายที่ได้จาก การย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วย กรด (จ) และสารละลายแป้ง (ฉ)



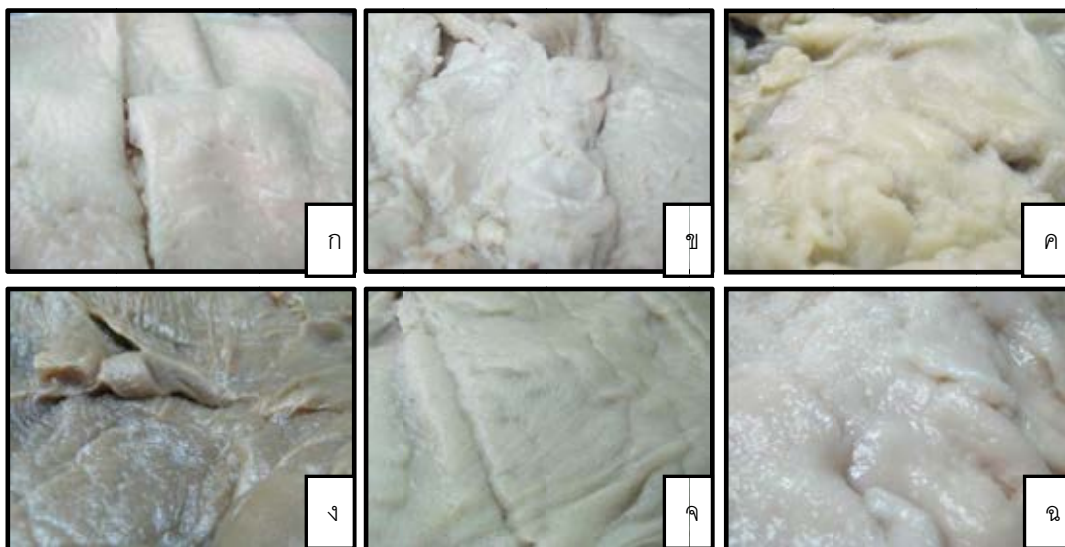
ภาพที่ 4.10 ลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ที่ถูกตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบด สติต อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 6.0 อัตราการกรวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศเท่ากับ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ในระยะการสร้างผลิตภัณฑ์ที่เวลาการหมัก 96 ชั่วโมง ของการใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด ได้แก่ กลูโคส (ก) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วย เอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วย เอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยกาก มันสำปะหลังด้วยกรด (จ) และสารละลายแป้ง (ฉ)



ภาพที่ 4.11 ลักษณะการยี่ดเกาะของเซลล์บนเบตสติด้านนอก (ลูกระสีน้ำเงิน) และด้านใน (ลูกระสีแดง) ของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศเท่ากับ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ของการใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด ได้แก่ กลูโคส (ก) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด (จ) และสารละลายแป้ง (ฉ)



ภาพที่ 4.12 ความหนาของเซลล์ของ *R. oryzae* (เส้นสีแดง) ที่ถูกตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศเท่ากับ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ของการใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด ได้แก่ กลูโคส(ก) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด (จ) และสารละลายแป้ง (ฉ)



ภาพที่ 4.13 ลักษณะเซลล์ *R. oryzae* ที่ตรึงอยู่ด้านในของเบดสติกในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติก อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศเท่ากับ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ของการใช้แหล่งคาร์บอน 6 ชนิด ได้แก่ กลูโคส (ก) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด (จ) และสารละลายแป้ง (ฉ)

4.3.2 จลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแลกติกโดย *R. oryzae* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติก

ศึกษาและเปรียบเทียบจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแลกติกโดย *R. oryzae* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติกที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศเท่ากับ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยการใช้ซับสเตรตต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และสารละลายแป้ง (ภาพที่ 4.14) พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 53.61 26.57 25.41 7.63 6.75 และ 33.77 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 75.55%, 41.57% 44.48% 12.56% 12.84% และ 53.10% ตามลำดับ อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 1.68 0.66 0.64 0.16 0.14 และ 0.70 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ โดยสามารถผลิตเอทานอลคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 5.65% 18.68% 16.38% 21.32% 23.84% และ 17.11% ตามลำดับ อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.13 0.49 0.38 0.27 0.26 และ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.2 จากผลทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อความสามารถในการผลิตกรดแลกติกที่แตกต่างกันด้วย เพราะว่าการประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในแต่ละภาชนะนั้นไม่เหมือนกัน และ *R. oryzae* เป็นราที่มีอะไมโลไลติกแอกทิวิตี กล่าวคือมีอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่สามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคสได้ (Wee และคณะ, 2006) ความสามารถในการที่รานี้จะนำเอาไปใช้ในแต่ละภาชนะจึงมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกันด้วย

จากการทดลองพบว่าการเลือกใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาพที่ 4.14 (ก)) จะสามารถผลิตกรดแลกติกได้มากที่สุดคือ 53.61 กรัมต่อลิตรคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 75.55% และอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 1.68 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง รองลงมาคือการแป้ง (ภาพที่ 4.14 (ข)) สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 33.77 กรัมต่อลิตรคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 53.10% และอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.70 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จะเห็นได้ว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยตรง *R. oryzae* จะสามารถนำไปใช้ในวิถีเมแทบอลิซึมโดยเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวทด้วยวิถี Emden-Meyerhof pathway (EMP) ได้ทันที (Thongchul, 2005) ส่งผลให้อัตราการผลิตกรดแลกติกสูงกว่าการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ซึ่งพบว่าเมื่อใช้สารละลายแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น จะมีความสามารถในการผลิตกรดแลกติกน้อยกว่าการใช้กลูโคส ทั้งนี้เนื่องจากในขั้นตอนของการ

นำไปใช้ในวิธีเมแทบอลิซึมได้นั้น จะต้องมีการกระบวนการตัดโมเลกุลของแป้งให้มีขนาดเล็กจนได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) ก่อน ว่าจะสามารถนำเข้าสู่วิถีเมแทบอลิซึมได้และสามารถผลิตเป็นกรดแลกติกออกมาได้ ซึ่งสังเกตได้จากกราฟภาพที่ 4.14 (ด) พบว่าค่าพีเอชในช่วงแรกขงระยะการเจริญเติบโต (growth phase) มีค่าเพิ่มสูงขึ้น แสดงว่าโมเลกุลของแป้งมีการตัดให้สั้นลงเกิดเป็นโมโนแซคคาไรด์มากขึ้น ส่งผลให้มีความเป็นเบสเพิ่มขึ้นตาม เนื่องจากมีหมู่ reducing sugar ปรากฏออกมาเพิ่มขึ้น ค่าพีเอช จึงเพิ่ม (Williams และ Flowers, 1978) อาจส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างกรดแลกติกของเราได้ เนื่องจากค่าพีเอช ที่เหมาะสมต่อการการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ของ *R. oryzae* คือ 6 (Chotisubha-anandha และคณะ, 2011)

จากการทดลองพบว่าซัสเตรทที่สามารถผลิตกรดแลกติกถัดมาจากกลูโคสและสารละลายแป้งคือ ภาวะที่ซัสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งซัสเตรททั้งสองชนิดนี้มีความสามารถในการผลิตกรดแลกติกใกล้เคียงกัน ดังแสดงผลดังตารางที่ 4.2 คือ 26.57 และ 25.41 กรัมต่อลิตรคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 41.57% และ 44.48 อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.66 และ 0.64 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ประมาณ 0.5 เท่าของการใช้กลูโคส ซึ่งในสองภาวะนี้เซลล์มีการเจริญไปเป็นตัวเซลล์ค่อนข้างมาก (ภาพที่ 4.11 (ข) และ 4.11 (ค)) คาดว่าน่าจะมาจากการที่สารละลายมีโปรตีนสูงจึงทำให้ส่งเสริมการเจริญของเซลล์ทำให้อัตราการถ่ายเทอาหารและอากาศภายในตัวเซลล์มีประสิทธิภาพต่ำ และซัสเตรทดังกล่าวไม่ได้อยู่ในรูปของกลูโคสบริสุทธิ์ ซึ่งจะมีองค์ประกอบของสารอื่นปะปนอยู่ด้วย ซึ่งอาจจะไปส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *R. oryzae* ทำให้ภาวะที่เป็นอยู่นั้นกลับเข้าสู่ระยะของการเจริญเติบโตอีกครั้ง และเราก็สามารถใช้น้ำตาลหมดไปอย่างรวดเร็ว ซึ่งพบว่าน้ำตาลของทั้งสองภาวะนี้หมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 และ 80 ตามลำดับ ดังแสดงในกราฟภาพที่ 4.14 (ข) และ 4.14 (ค) ตามลำดับ อีกทั้งการย่อยของกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์นี้อาจจะยังไม่เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ เนื่องจากการย่อยด้วยเอนไซม์นี้เป็นการย่อยที่ภาวะไม่รุนแรงส่งผลให้โมเลกุลของแป้งยังอยู่ในรูปของโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ดังนั้น *R. oryzae* จึงต้องสร้างเอนไซม์จำพวกอะไมโลไลติกออกมาย่อยให้ได้กลายเป็นกลูโคสบริสุทธิ์ เพื่อที่จะนำเข้าสู่วิถีเมแทบอลิซึมต่อไป ทำให้เซลล์มีความสามารถผลิตกรดแลกติกได้ในระดับหนึ่ง เมื่อมาพิจารณาตามค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนเท่ากับ 0.033 และ 0.049 ต่อวินาที ตามลำดับ เมื่อทำการหมักเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง แสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าประสิทธิภาพของการถ่ายเทออกซิเจนของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพนั้นมีค่อนข้างต่ำกว่ากากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน และน้ำหนักเซลล์แห้ง

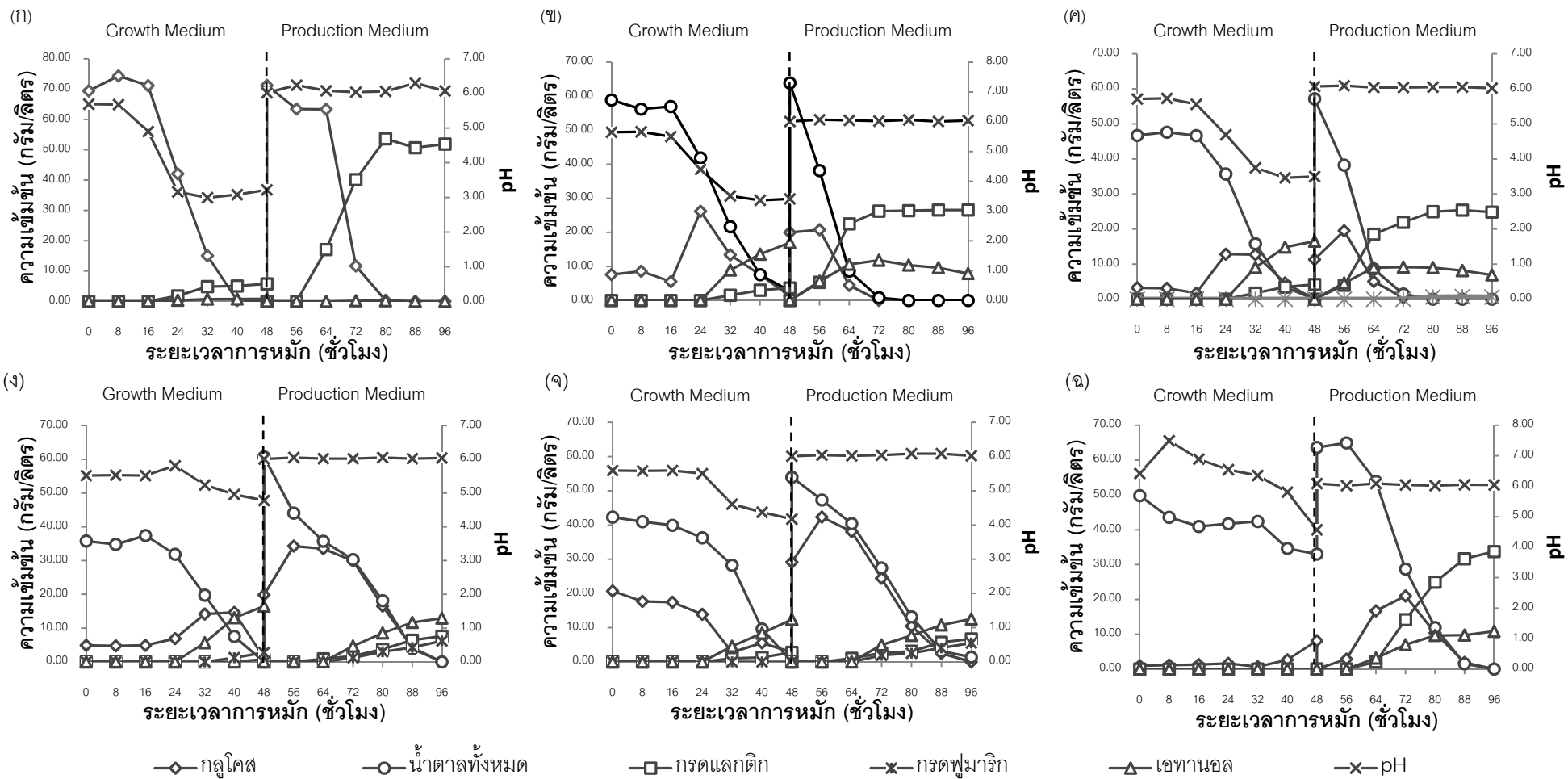
เท่ากับ 57.26 และ 58.09 กรัมตามลำดับ ซึ่งในปริมาณของเซลล์ที่ใกล้เคียงกัน แต่ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนแตกต่างกัน ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าการปรับสภาพกากมันนั้น ส่งผลให้ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพมีค่าที่สูงขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพของการถ่ายเทอาหารและอากาศมีมากขึ้น ส่งผลดีต่อการเจริญของเซลล์และการผลิตกรดแลกติกให้ได้ในปริมาณสูงในการหมักระยะยาว (Thongchul และ Yang, 2004) และจากผลการทดลองในตารางที่ 4.2 พบว่า ภาวะที่ซบสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันมีน้ำหนักเซลล์แห้งที่ใกล้เคียงกันกับภาวะที่ซบสเตรทใช้แบ่งเป็นแหล่งคาร์บอน คือ 55.62 กรัม ในขณะที่ ภาวะที่ซบสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น ได้น้ำหนักเซลล์แห้งที่มากกว่า คือ 64.42 และ 76.81 กรัม ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน น่าจะมีคุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใกล้เคียงกับสารละลายแบ่งด้วย

จากการทดลองพบว่าซบสเตรทที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณที่ต่ำคือ สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอน กรดแลกติกที่ได้มีปริมาณต่ำกว่าซบสเตรทชนิดอื่น แสดงผลดังตารางที่ 4.2 คือสามารถผลิตกรดแลกติกได้เพียง 7.63 และ 6.75 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.16 และ 0.14 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากซบสเตรทสองชนิดนี้จำเป็นต้องมีการปรับค่าพีเอช ให้เหมาะสมด้วยกรดและเบสก่อนที่จะนำไปเข้าสู่การย่อยด้วยเอนไซม์ ดังนั้นจึงทำให้มีความเข้มข้นของเกลือในปริมาณที่สูงเช่นกัน อีกทั้งอาจจะมีผลิตภัณฑ์ร่วมอื่นๆ เกิดขึ้นด้วย ซึ่งในกรณีของการย่อยด้วยกรดนั้นจะเกิดผลิตภัณฑ์ร่วมที่ไม่ต้องการเช่น เฟอร์ฟูรอล และสารประกอบฟีนอลิก เป็นต้น ซึ่งก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ *R. oryzae* และเป็นตัวยับยั้งกระบวนการหมักได้ (Wojciechowski และคณะ, 1999) ซึ่งในการทดลองนี้เพื่อเป็นการประหยัดต้นทุนให้มากที่สุด จึงไม่ได้มีการนำเกลือที่เกิดขึ้นออกไปก่อนที่จะนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมัก ส่งผลให้กรดแลกติกที่ได้จากการใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์มาเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นมีปริมาณที่ต่ำ มีกรดฟูมาริกเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักของแหล่งคาร์บอนทั้งสองชนิดด้วยเช่นกัน การใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความ

ต้นพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์มาเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาพที่ 4.14 (ง)) กรดฟูมาริกเกิดขึ้นในช่วงชั่วโมงที่ 40 ของระยะเวลาเจริญเติบโต และชั่วโมงที่ 24 ของระยะเวลาสร้างผลิตภัณฑ์ ซึ่งสามารถผลิตกรดฟูมาริกสูงสุด 6.20 กรัมต่อลิตร ส่วนสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดมาเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น (ภาพที่ 4.14 (จ)) กรดฟูมาริกเกิดขึ้นในช่วงชั่วโมงที่ 24 ของระยะเวลาสร้างผลิตภัณฑ์ ซึ่งสามารถผลิตกรดฟูมาริกสูงสุด 5.51 กรัมต่อลิตร แต่สองภาชนะนี้จะเห็นได้ว่า *R. oryzae* มีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าภาชนะอื่นๆ ซึ่งเซลล์จะเริ่มโตภายหลังจากชั่วโมงที่ 24 ของระยะเวลาเจริญเติบโตเป็นต้นไป สังเกตได้จากค่าพีเอชที่เริ่มลดลง เนื่องมาจากเซลล์เริ่มมีการเจริญเติบโตและมีการผลิตกรดแลกติกออกมาจึงทำให้ค่าพีเอชลดลง ในขณะที่ภาชนะอื่นนั้น เซลล์จะเริ่มโตตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 ของระยะเวลาเจริญเติบโตเป็นต้นไป และพบว่าสองภาชนะนี้มีการผลิตเอทานอลเป็นปริมาณสูงกว่าการผลิตกรดแลกติก ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลเท่ากับ 12.95 และ 12.53 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ถึงแม้ว่าจะสามารถใช้ซับสเตรทจำพวกสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์กับสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลกติกได้ แต่ก็จำเป็นต้องมีกำจัดสิ่งเจือปน (detoxification) จำพวกสารยับยั้งในกระบวนการหมักเช่น กรดอะซิติก เพอร์ฟูรอล ไฮดรอกซีเมทิลเพอพิวรอล(HMF) และเกลือ เป็นต้น (Zhao และคณะ, 2009) เพื่อที่จะให้เชื้อมีประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ได้มากขึ้น

จากการทดลองพบว่าภาชนะที่ซับสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันจะสามารถผลิตกรดแลกติกได้ดีกว่าภาชนะที่ใช้ซับสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ ทั้งนี้เนื่องมาจากการที่ซับสเตรทที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงอย่างเดียว ไม่มีการใช้สารเคมีซึ่งในที่นี้คือโซเดียมไฮดรอกไซด์ในระหว่างขั้นตอนการปรับสภาพเข้ามาเกี่ยวข้อง ส่งผลให้ไม่จำเป็นต้องมีการปรับค่าพีเอช ด้วยกรดและเบสเพื่อให้ได้พีเอชที่ต้องการ ก่อนที่จะนำไปเข้าสู่การย่อยด้วยเอนไซม์ต่อไป จึงไม่ก่อให้เกิดปริมาณของเกลือในสารละลายได้ ดังนั้นภาชนะที่สารละลายที่ได้จากการย่อยของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น จึงมีความสามารถในการผลิตกรดแลกติกได้มากกว่า ส่งผลให้มีค่า yield และอัตราการผลิตกรดแลกติกที่สูงกว่าเช่นกัน ดังนั้นการนำกากมันสำปะหลังมาประยุกต์ในกระบวนการผลิตกรดแลกติกนั้น พบว่าการที่นำกากมันมาปรับสภาพด้วยเทคนิคการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเพียงอย่างเดียวจะสามารถผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณระดับหนึ่ง (25.41 กรัมต่อลิตร)

จากงานวิจัยนี้ได้ทำการเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Thongchul และคณะ (2009) ทำการศึกษาผลิตกรดแลกติก จากกลูโคส สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง ด้วยกรดและเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตร โดยการตรึงเซลล์ *R.oryzae* NRRL 395 บนเส้นใยผ้าฝ้าย ทำการหมักในขวดเขย่า พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 23.76 4.47 และ 15.43 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 33% 6% และ 2.3% ตามลำดับ อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.46 0.13 และ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ และสามารถผลิตเอทานอลสามารถผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 14.67 16.37 และ 24.25 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 21% 28% และ 31% ตามลำดับ อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.29 0.60 และ 0.30 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ จากผลการทดลองเห็นได้ว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จะสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุด เนื่องจากกากมันสำปะหลังประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 5.3 % ทำให้สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังมีปริมาณของโปรตีนสูงเช่นกัน ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณของแหล่งไนโตรเจนอีกทางหนึ่ง ส่งผลให้ช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์ในระหว่างกระบวนการหมักมากขึ้นแทนที่จะไปสร้างเป็นกรดแลกติก และการทดลองนี้เป็นการหมักในระดับขวดเขย่า ทำให้ประสิทธิภาพของการถ่ายเทออกซิเจนภายในขวดเขย่าไม่เพียงพอและมีการ เนื่องจาก *R. oryzae* เป็นราที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ ดังนั้นออกซิเจนจึงเป็นปัจจัยสำคัญวิธีเมแทบอลิซึมของเซลล์ ถ้าหากมีออกซิเจนไม่เพียงพอสาเหตุจากการกวนที่ไม่ทั่วถึง จะเปลี่ยนวิธีไปสร้างเป็นผลิตภัณฑ์อื่น เช่น เอทานอล เป็นต้น (Zhang และคณะ, 2007) ดังนั้นสามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ได้โดยการทำหมักโดยการใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งจะสามารถควบคุมอัตราการปั่นกวนและให้อากาศอย่างทั่วถึง ส่งผลให้การถ่ายเทออกซิเจนและการผสมเป็นเนื้อเดียวกันของอาหารมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tay และ Yang (2002) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดย *R. oryzae* NRRL 395 ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Rotating fibrous-bed แบบ Fed-batch โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงคิดเป็น $Y_{P/S}$ เท่ากับ 90% เนื่องจากมีการตรึงเซลล์บนเส้นใยผ้าฝ้าย และมีการให้ออกซิเจนที่ทั่วถึง และงานวิจัยนี้พบว่าเมื่อทำการหมักโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยใช้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตรเช่นกัน พบว่าสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตกรดแลกติก อีกทั้งช่วยลดปริมาณของการผลิตเอทานอลได้อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตาม ชับสเตรทที่มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนก็เป็นอีกปัจจัยสำคัญ ถ้าหากมีองค์ประกอบที่เป็นอุปสรรคต่อการผลิตกรดแลกติก ก็จะทำให้ประสิทธิภาพของการผลิตกรดแลกติกลดลงอีกด้วย โดยจะเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ร่วมคือ เอทานอล และกรดฟumaric แทน (Zhang และคณะ, 2007; Wee และคณะ, 2006; John และคณะ, 2007)



ภาพที่ 4.14 จลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแลกติกโดย *R. oryzae* อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศเท่ากับ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ของแหล่งคาร์บอน 6 ชนิดได้แก่ กลูโคส (ก) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์ (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาลีน (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด (จ) และสารละลายแป้ง (ฉ)

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกในการหมักแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติดที่สภาวะต่างๆที่มีอาหารปริมาตร 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
ECPHSP	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

หมายเหตุ *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

ECPHSP : Enzyme-treated cassava pulp hydrolysate by steam with NaOH-pretreatment

HACPH : HCl-treated cassava pulp hydrolysate

4.3.3 วิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวและโครงสร้างของ *R. oryzae* ที่เจริญบนเส้นใยและภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติก

เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมักทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ที่ยึดตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติก ตัดให้ได้ขนาด 2.5 x 2.5 เซนติเมตร มาวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) พบว่า ลักษณะเส้นใยของ *R. oryzae* ที่เจริญบนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่บริเวณภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติกที่กำลังขยาย 350 เท่า (ภาพที่ 4.15) โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันได้แก่ กลูโคส สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดและสารละลายแป้ง พบว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาพที่ 4.15 (ก)) เซลล์มีลักษณะเรียวยาวและลักษณะการเกิดกิ่งเล็ก ๆ (Fragmentation) ภายในหนึ่งสาย ซึ่งไม่แตกต่างกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 53.61 กรัมต่อลิตร แสดงว่าการใช้กลูโคสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอน เซลล์จะมีการเจริญเติบโตในลักษณะที่สมบูรณ์ที่สุดและสามารถผลิตกรดแลกติกได้มากที่สุด แต่อย่างไรก็ดีค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนก็ควรจะสูงตามไปด้วยเพื่อแสดงถึงการถ่ายเทอาหารและอากาศที่เพียงพอ

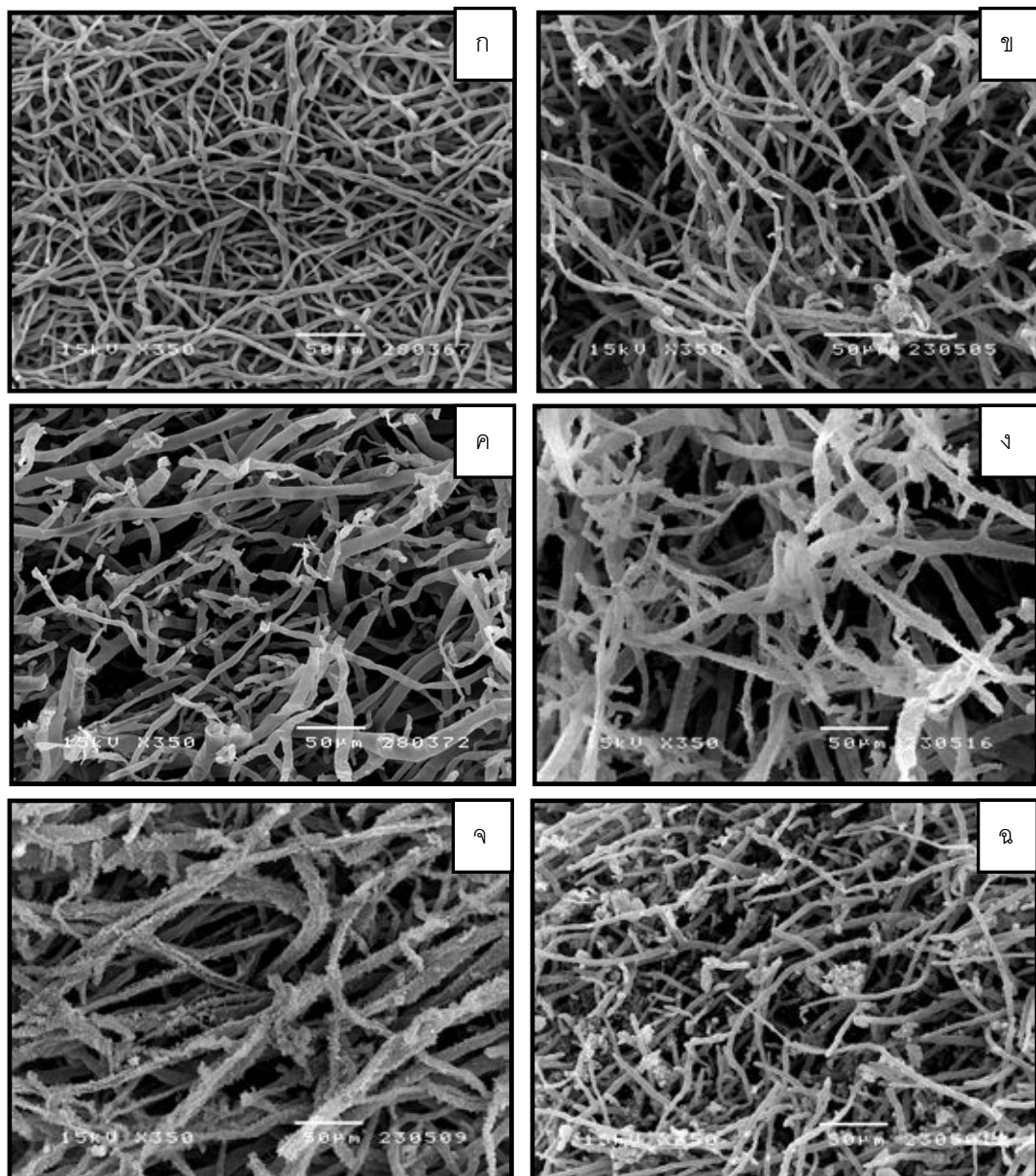
แต่เมื่อพิจารณาลักษณะเส้นใยของ *R. oryzae* ที่เจริญบนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่บริเวณภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติกที่กำลังขยาย 750 เท่า พบว่าการใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเป็นแหล่งคาร์บอน (ภาพที่ 4.16 (ข)) เซลล์มีลักษณะอ้วน ยาวแต่บริเวณด้านปลายจะขาด เนื่องจากเซลล์มีการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างหนาแน่น โดยดูจากภาพที่ 4.11 (ค) พบว่าเซลล์นั้นมีปริมาณมาก ทำให้ระยะห่างระหว่างเซลล์และไบโพดมีน้อย ส่งผลเซลล์เกิดการฉีกขาดจากแรงเฉือนจากไบโพดแต่อย่างไรก็ดีที่สภาวะนี้เซลล์ก็ยังสามารถผลิตกรดแลกติกได้ถึง 25.41 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาการใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าลักษณะเส้นใยของ *R. oryzae* ที่เจริญบนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่บริเวณภายในเครื่องปฏิกรณ์

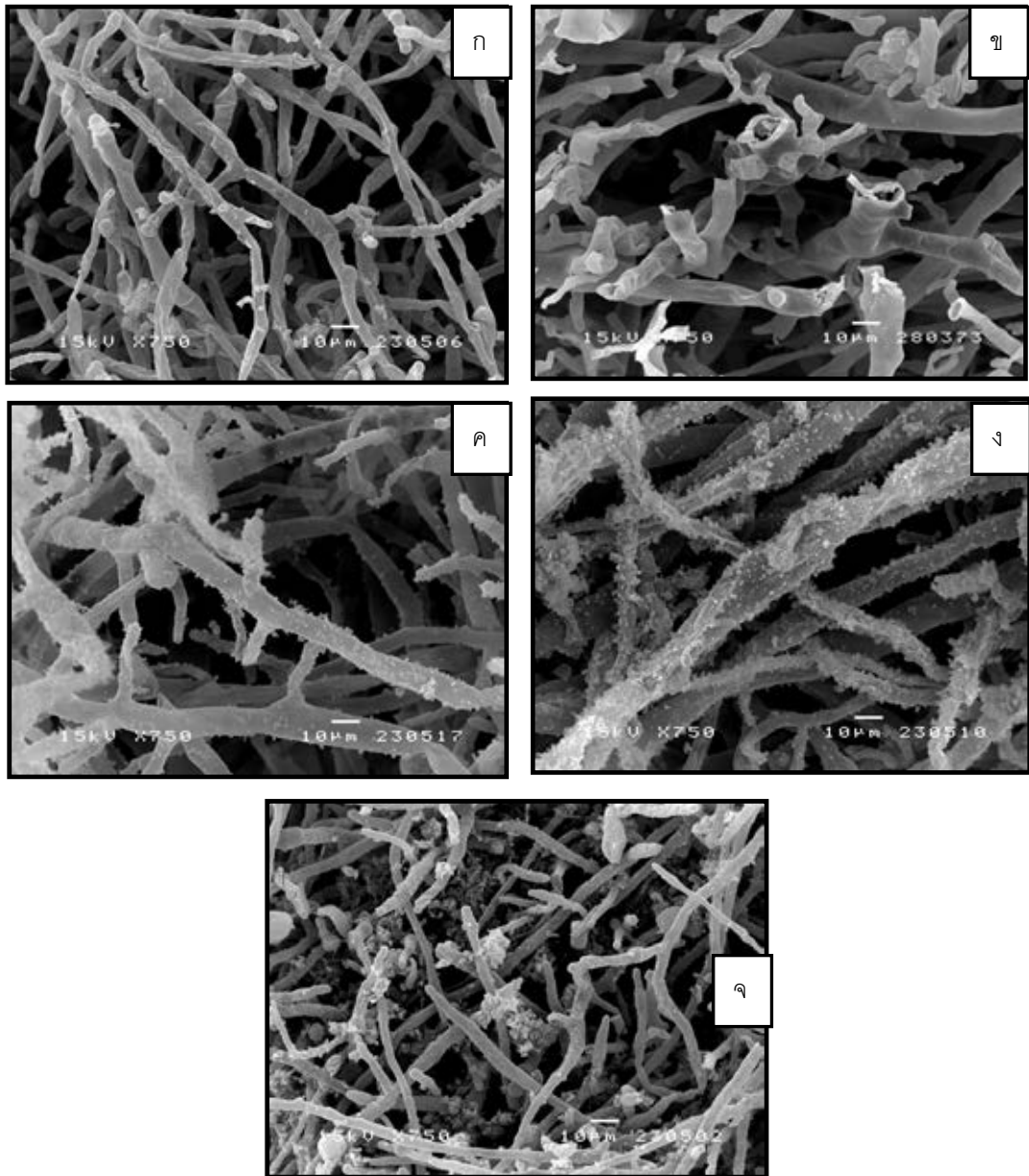
ชีวภาพแบบเบดสติดที่กำลังขยาย 750 เท่า (ภาพที่ 4.16 (ง) และ 4.16 (จ)) เซลล์มีลักษณะที่ลึบแบนและมีผลึกมาเกาะอยู่ตัวเซลล์ และเมื่อทำการเพิ่มกำลังขยายเป็นที่ 3500 เท่า (ภาพที่ 4.17) พบว่าผลึกที่มาเกาะอยู่บนตัวเซลล์นั้นมีลักษณะเป็นรูปแฉกคล้ายลักษณะของผลึกของเกลือ (Fontana และคณะ, 2011) และเมื่อทำการวิเคราะห์หาธาตุองค์ประกอบของผลึกด้วยเครื่อง Energy Dispersive X-ray spectrometer (EDX) พบว่าประกอบไปด้วยธาตุคาร์บอน ประมาณ 52% ออกซิเจนประมาณ 42% และไฮโดรเจนประมาณ 6% ซึ่งผลึกที่เกิดขึ้นนี้ส่งผลให้ความสามารถในการผลิตกรดแลกติกของซีสเตรททั้งสองชนิดนี้มีประสิทธิภาพลดลง เห็นได้ว่าในภาวะนี้เซลล์ผลิตกรดแลกติกได้เพียง 7.63 และ 6.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาลักษณะการยึดเกาะของ *R. oryzae* บนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนู ที่บริเวณด้านนอกของเบดสติด แสดงดังภาพที่ 4.18 เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะของเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่ไม่มีเซลล์ (ภาพที่ 4.18 (ก)) กับเซลล์ที่ตรึงอยู่บนเส้นใย (ภาพที่ 4.18 (ข) ถึง ภาพที่ 4.18 (จ)) พบว่าเซลล์มีการยึดเกาะที่มั่นคง มีการพันเกี่ยวกันระหว่างเส้นใยของเซลล์และเส้นใยผ้าฝ้าย ทำให้ยากต่อการหลุดออกมาในระหว่างกระบวนการหมัก อันเนื่องจากแรงปั่นกวน การตรึงเซลล์สามารถช่วยเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ในการหมักระยะยาว และใช้พลังงานในการปั่นกวนและการให้อาหารน้อยลงเนื่องจากอาหารที่ใช้ในการหมักมีความหนืดต่ำ เพราะเซลล์ได้ถูกตรึงไว้แล้ว ด้วยเหตุนี้เองยังส่งผลให้การเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ภายหลังเสร็จสิ้นกระบวนการหมักแล้ว เป็นไปได้ง่ายขึ้น (Thongchul, 2005; Chotisubha-anandha และคณะ, 2011)

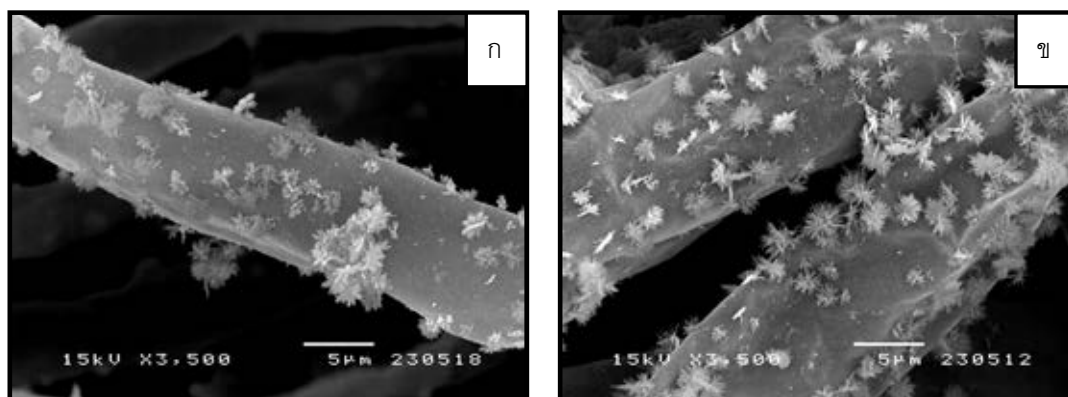
เมื่อพิจารณาการใช้สารละลายแป้งเป็นแหล่งคาร์บอน จากภาพที่ 4.18 (ฉ) พบว่าการยึดเกาะของ *R. oryzae* บนเส้นใยผ้าฝ้าย ไม่แน่นอนเหมือนกับการใช้ซีสเตรทชนิดอื่น เนื่องจากมีโมเลกุลของแป้งมาเกาะร่วมอยู่ด้วย เห็นได้จากมีเม็ดแป้งลักษณะกลมๆ (Chen และคณะ, 2011) แทรกกระจายอยู่ระหว่างตัวเซลล์และเส้นใย ทำให้เซลล์นั้นสามารถหลุดออกจากเส้นใยผ้าฝ้ายได้ง่าย ส่งผลต่อการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ภายหลังเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก และยังส่งผลให้น้ำหนักเซลล์แห้งของการใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นมีปริมาณสูงด้วย เนื่องจากมีน้ำหนักของโมเลกุลแป้งเกาะอยู่ที่ตัวเซลล์และบริเวณเส้นใยที่ยึดตรึง แต่อย่างไรก็ตามเซลล์ก็ยังสามารถผลิตกรดแลกติกได้ถึง 33.77 กรัมต่อลิตร



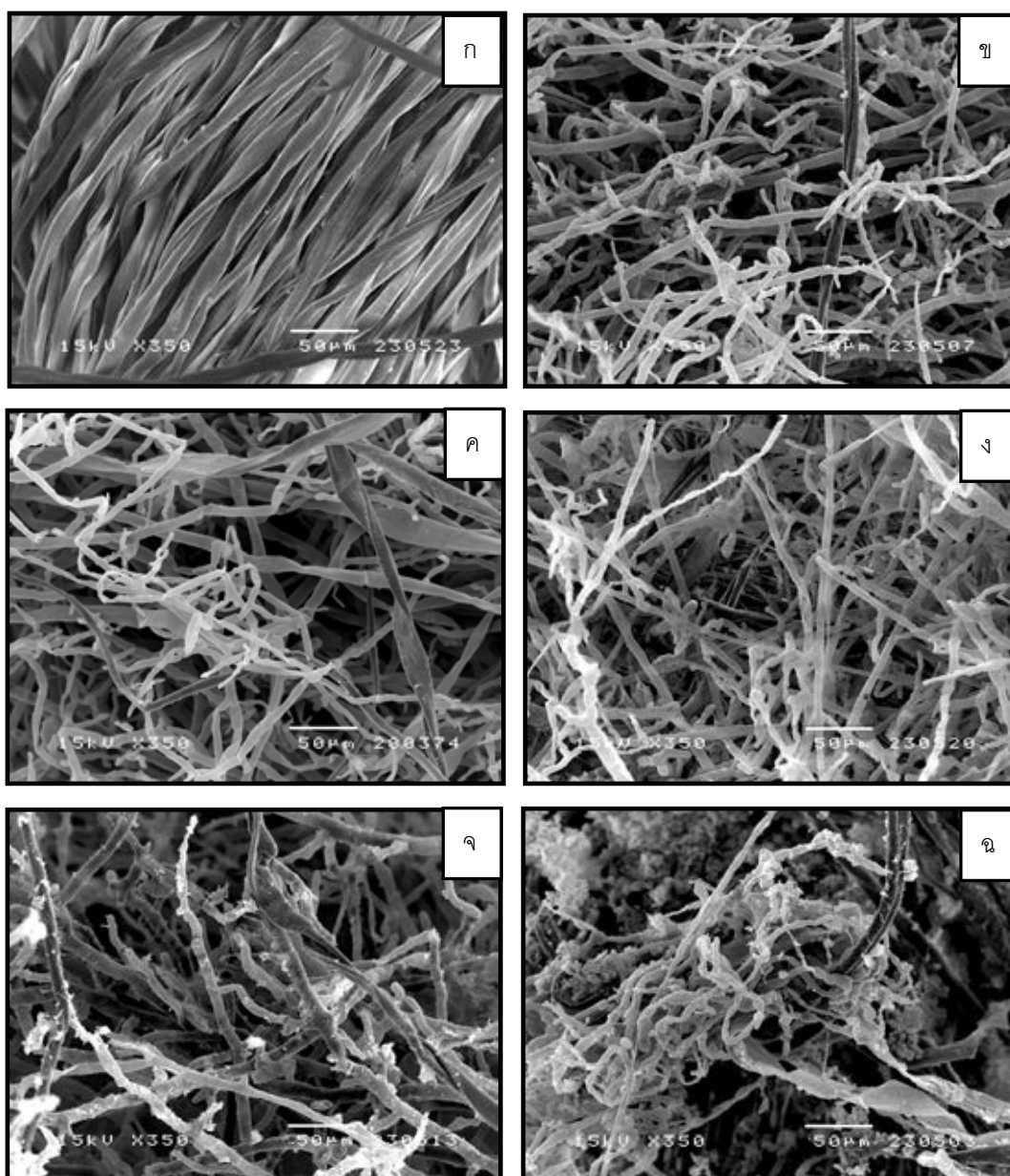
ภาพที่ 4.15 ลักษณะของเซลล์ *R. oryzae* บริเวณด้านในของเบดสติกที่กำลงขยาย 350 เท่า โดยใช้กลูโคส (ก) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด (จ) และ สารละลายแป้ง (ฉ) เป็นแหล่งคาร์บอน



ภาพที่ 4.16 ลักษณะของเซลล์ *R. oryzae* บริเวณด้านในของเบดสทิทที่กำลังขยาย 750 เท่า โดยใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ก) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด (ง) และสารละลายแบ่ง (จ) เป็นแหล่งคาร์บอน



ภาพที่ 4.17 ลักษณะของเซลล์ *R. oryzae* บริเวณด้านในของเบดสติกที่กำลังขยาย 3,500 เท่า โดยใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (ก) และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด (ข) เป็นแหล่งคาร์บอน



ภาพที่ 4.18 ลักษณะโครงสร้างของเส้นใยผ้าฝ้าย (ก) และลักษณะการยึดเกาะของเซลล์ *R. oryzae* บนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูบริเวณด้านนอกของเบตสติดที่กำลังขยาย 350 เท่า โดยใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ข) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ค) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ (ง) สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด (จ) และสารละลายแป้ง (ฉ) เป็นแหล่งคาร์บอน

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยนี้ ได้ศึกษาไปที่การนำกากกมันสำปะหลังมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์มากขึ้น ซึ่งพบว่า เราสามารถนำกากกมันสำปะหลังที่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางเกษตรกรรมมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมักแบบอาหารเหลวด้วย *R. oryzae* แบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติก 5 ลิตรเพื่อผลิตกรดแลกติก ซึ่งนับว่าเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้น

การเตรียมสารละลายที่ได้จากการย่อยกากกมันสำปะหลัง

จากการเปรียบเทียบเทคนิคในการเตรียมสารละลายที่ได้จากการย่อยกากกมันสำปะหลังพบว่าเทคนิคที่เหมาะสมที่สุดในการเตรียมสารละลายคือ การนำกากกมันไปปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (steam pretreatment) จากนั้นนำไปย่อยต่อด้วยเอนไซม์เซลลูเลสและอะไมเลส ซึ่งสังเกตได้จากค่าของน้ำตาลทั้งหมดที่ได้ภายหลังการย่อย อีกทั้งการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (steam pretreatment) ในขั้นตอนของการปรับสภาพนั้น จะไม่ส่งผลต่อกระบวนการหมักกรดแลกติกได้ เนื่องจากไม่มีสารเคมีเข้ามาเกี่ยวข้อง จึงไม่ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ และความสามารถในการผลิตกรดแลกติกได้

กระบวนการหมักกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติก 5 ลิตร โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

จากการเปรียบเทียบการหมักกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติก โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน พบว่า ซับสเตรทที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งได้จากการย่อยกากกมันสำปะหลังที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาผลิตกรดแลกติก คือ สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) ของกากกมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (steam pretreatment) และจากผลการทดลองนี้เองพบว่ากากกมันสำปะหลังสามารถนำมาผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อย่างเดียวกันได้ ไม่จำเป็นต้องผ่านการปรับสภาพในกรณีใช้กระบวนการหมักในระยะสั้น แต่ว่าถ้าหากเป็นกระบวนการหมักในระยะยาว (long-term cultivation) สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากกมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันจะเหมาะสมที่สุด เนื่องจากลักษณะสัณฐานของเซลล์ที่เกิดขึ้นของแหล่งคาร์บอนทั้งสองชนิดนี้มีลักษณะที่ต่างกัน ซึ่งการใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยของกากกมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์นั้นมีความหนาแน่นของเซลล์มากกว่าส่งผลให้อาจเกิดปัญหาของ mass transfer ก่อให้เกิด diffusion

limitation และที่สำคัญอาจจะมีผลเสียในระหว่างทำการหมักระยะยาวไม่ดีเท่ากับการใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันด้วยเอนไซม์ โดยดูจากค่าประสิทธิภาพของการถ่ายเทออกซิเจนภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ($K_L a$) ซึ่งจากการหมักกรดแลกติกโดยใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันด้วยเอนไซม์ และการใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถให้ค่า $K_L a$ เท่ากับ 0.049 และ 0.033 ตามลำดับ ในการหมักระยะยาวนั้น การใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพด้วยเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน เซลล์จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นและเนื่องจากเซลล์มีความหนาแน่นของเซลล์มากกว่า ส่งผลให้ประสิทธิภาพของการถ่ายเทอาหารและอากาศลดน้อยลงได้ และถ้าเทียบกับภาวะที่ใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น พบว่า สองภาวะนี้มีเอทานอลเกิดขึ้นในปริมาณที่สูงกว่า ภาวะที่ใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน คือ 21.32% และ 23.84% ตามลำดับ อีกทั้งสารละลายยังมีองค์ประกอบของสารเคมีเข้ามาเกี่ยวข้อง ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ และความสามารถในการผลิตกรดแลกติกได้ เหตุผลดังกล่าวจึงเป็นตัวเลือกในการตัดสินใจอีกทางหนึ่ง

ดังนั้นเราสามารถเพิ่มมูลค่าของกากมันสำปะหลังที่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางเกษตรกรรมได้ โดยการนำกากมันสำปะหลังนี้มาทำการปรับสภาพด้วยวิธีการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (steam pretreatment) เพื่อกำจัดสิ่งที่ไม่ต้องการออกไปและทำให้อนุภาคของแป้งที่หลงเหลืออยู่ในกากมันออกมาให้ได้มากที่สุด จากนั้นจึงย่อยอนุภาคแป้งที่หลุดออกมาและเซลลูโลสที่ยังเหลืออยู่ด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) เพื่อให้ได้น้ำตาลที่ใช้ในกระบวนการหมัก (fermentable sugar) มาเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสตีต ถึงแม้ว่าความเข้มข้นของกรดแลกติกที่ได้จะต่ำกว่าค่าที่ได้จากการหมักโดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน อย่างไรก็ตามหากมีการปรับสภาพสารละลายที่ได้จากการย่อย (post-treatment) ก่อนนำไปเป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักจะช่วยกำจัดสารยับยั้งการเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์ระหว่างการหมักได้ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะทำได้ค่าความเข้มข้น yield และ productivity ของกรดแลกติกเทียบเท่ากับการหมักโดยกลูโคสก็เป็นได้

ข้อเสนอแนะ

1. จากผลการทดลองในงานวิจัยนี้ พบว่าการใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันด้วยเอนไซม์มาเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลกติกในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Batch นี้ สามารถผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณระดับหนึ่ง ดังนั้นในงานวิจัยต่อไปควรมีการผลิตกรดแลกติกในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Fed-batch หรือ Continuous เพื่อให้ได้ปริมาณของกรดแลกติกเพิ่มมากขึ้น

2. ในระหว่างการหมักพบว่า อาหารมีเกลือและสิ่งเจือปนที่เกิดจากการปรับค่าพีเอชอยู่ด้วยซึ่งเป็นตัวยับยั้งการหมัก ดังนั้นก่อนการนำไปใช้ในกระบวนการหมักควรมีการกำจัดเกลือและสิ่งเจือปนออกก่อน เพื่อส่งผลให้เชื้อสามารถเจริญเติบโตและผลิตกรดแลกติกได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. บทปฏิบัติการที่ 7 การนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (Microbial Population), 2551. [online].แหล่งที่มา: <http://science.kmutt.ac.th/class/mic291/mic291lab7.doc> [2551, September 1]

สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล. เทคโนโลยีชีวภาพอาหาร การหมัก และสิ่งแวดล้อม. 1. 1. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2547.

ภาษาอังกฤษ

A.O.A.C. 1995. *Official Methods of Analysis of AOAC International 16th ed.*, Virginia : Association of Official. Analytical Chemists International.

Apiwatanapiwat, W., Murata, Y., Kosugi, A., Yamada, R., Kondo, A., Arai, T., Rugthaworn, P. and Mori, Y. 2011. Direct ethanol production from cassava pulp using a surface-engineered yeast strain co-displaying two amylases, two cellulases, and β -glucosidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 90: 377–384

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.

Balat, M., Balat, H. and Öz, C. 2008. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science*. 34: 551-573

Bicherstaff, G. F. 1997. *Immobilization of enzymes and cells*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey

Bramorski, A., Christen, P., Ramirez, M., Soccol, C. R., and Revah, S. 1998a. Production of volatile compounds by the edible fungus *Rhizopus oryzae* during solid-state cultivation on tropical agro-industry substrates. *Biotechnology Letters*. 20: 359-362

- Bramorski, A., Soccol, C. R., Christen, P. and Revah, S. 1998b. Fruit aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in static cultures from solid agro-industry wastes. *Revista de Microbiologia*. 28: 208-212
- Brand, D., Pandey, A., Roussos, S. and Soccol, C. R. 2000. Biological detoxification of coffee husk by filamentous fungi using a solid state fermentation system. *Enzyme and Microbial Technology*. 27: 127–133
- Bruno-Barcelona, J. M., Ragout, A. L., Cordoba, P. R. and Sineriz, F. 1999. Continuous production of L(+)-lactic acid by *Lactobacillus casei* in two-stage systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51: 316-324.
- Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, A. and Heckelman, P.E. (eds.). 1989. *The merck index* 11th Ed., 5214. Merck, Rahway,NJ.
- Bulut, S., Elibol, M. and Ozer, D. 2004. Effect of different carbon sources on L(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*. 21: 33-37.
- Carta, F.S., Soccol, C.R., Ramos, L.P. and Fontana, J.D. 1999. Production of fumaric acid by fermentation of enzymatic hydrolysates derived from cassava bagasse. *Bioresource Technology*. 68: 23-28.
- 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
- Christen, P., Bramorski, A., Revaha, S. and Soccol, C. R. 2000. Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* strains grown on agro-industrial solid wastes. *Bioresource Technology*. 71: 211-215.

- Cotton, J.C., Pometto III, A.L. and Gvozdenovic, J.J. 2001. Continuous lactic acid fermentation using plastic composite support biofilm reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57: 626-630.
- Cui, Y.Q., van der Lans, R.G.J.M. and Luyben, K.Ch.A.M. 1998. Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 57: 409-419.
- Davis, N.D., and Blevins, W.T. 1979. Methods for laboratory fermentations. In *Microbial technology: Microbial processes*. Edited by Pepler, H.J., and Perlman, D. Academic Press, Inc., New York, NY. pp. 303-329.
- Domsch, K.H., Games, W. and Anderson, T.H. 1980. *Compendium of soil fungi* 1. Academic Press, London, UK.
- Dong, X.Y., Bai, S. and Sun, Y. 1996. Production of L(+)-lactic acid with *Rhizopus oryzae* immobilized in polyurethane foam cubes. *Biotechnology Letters*. 18: 225-228.
- Du, J., Cao, N., Gone, C.S. and Tsao G.T. 1998. Production of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae* in a bubble column fermenter. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 70-72: 323-329.
- Efremenko, E.N., Spiricheva, O.V., Veremeenko, D.V., Baibak, A.V. and Lozinsky, V.I. 2006. L(+)-lactic acid production using poly(vinyl alcohol)-cryogel-entrapped *Rhizopus oryzae* fungal cells. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 81: 519-522.
- Ellis, D.H. 1997. Zygomycetes. *Microbiology and Microbial Infections*. 9: 247-277.
- Fontana, P., Schefer, J. and Pettit, D. 2011. Characterization of sodium chloride crystals grown in microgravity. *Journal of Crystal Growth*. 324: 207-211.
- Ganguly, R., Dwivedi, P. and Singh, R.P. 2007. Production of lactic acid with loofa sponge immobilized *Rhizopus oryzae* RBU2-10. *Bioresource Technology*. 98: 1246-1251.

- Guo, Y., Yan, Q., Jiang, Z., Teng, C., Wang, X. 2010. Efficient production of lactic acid from sucrose and corncob hydrolysate by a newly isolated *Rhizopus oryzae* GY18. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 37: 1137–1143
- Hamamci, H. and Ryu, D.D.Y. 1994. Production of L(+)-lactic acid using immobilized *Rhizopus oryzae*: reactor performance based on kinetic model and simulation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 44: 125-133.
- Hamelinck, C. N., van Hooijdonk, G. and Faaij, A. PC. 2005. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy*. 28: 384–410
- 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.
- Hendriks, A.T.W.M. and Zeeman, G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 100: 10–18
- Hofvendahl, K. and Hahn-Hagerdal, B. 2000. Factor affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 87-107.
- Holten, C.H., Muller, A. and Rehbinder, D. 1971. *Lactic acid-Properties and chemistry of lactic acid and derivatives* VCH, Weinheim, Germany
- Howard, R. L., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, E. L. and Howard, S. 2003. Lignocellulose biotechnology: Issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology*. 2: 602-619
- Huang, L. P., Jin, B., Lant, P. and Zhou, J. T. 2005. Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. *Biochemical Engineering Journal*. 23: 265-276.

- Jackson, M.A. 1997. Optimizing nutritional conditions for the liquid culture production of effective fungal biological control agents. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 19: 180-187.
- Jin, B., Yin, P. H., Ma, Y. H. and Zhao, L. 2005. Production of lactic acid and fungal biomass by *Rhizopus* fungi from food processing waste streams. *The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 32: 678-686.
- John, R. P., Nampoothiri, K. M. and Pandey, A. 2006. Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*. 41: 759–763.
- 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.
- John, R. P., Anisha G.S., Nampoothiri, K. M., Pandey, A. 2009. Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. *Biotechnology Advances*. 27: 145-152
- Kadam, S. R., Patil, S. S. and Bastawde, K. B. 2006. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. *Process Biochemistry*. 41: 120-126.
- 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
- Kosugi, A., Kondo, A., Ueda, M., Murata, Y., Vaithanomsat, P., Thanapase, W., Arai, T. and Mori, Y. 2009. Production of ethanol from cassava pulp via fermentation with a surface-engineered yeast strain displaying glucoamylase. *Renewable Energy*. 34: 1354-1358.

- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J., and Stroeve, P. 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 48: 3713–3729
- Leifa , F., Pandey, A. and Soccol, C. R. 2000 Use of various industry residues for the production of pleurotus in solid state fermentation. *Acta Biotechnology*. 20: 41-52
- Leifa , F., Pandey, A. and Soccol, C. R. 2001 Production of *Flammulina velutipes* on Coffee Husk and Coffee Spent-ground. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 44: 205-212
- Liden, G. 2002. Understanding the bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 24: 273-279.
- Lin, J.P., Ruan, S.D. and Cen P.L. 1998. Mathematical model of L-lactic acid fermentation in an RDC coupled with product separation by ion exchange. *Chemical Engineering Communications*. 168: 59-79.
- Lin, J., Zhou, M., Zhao, X., Luo, S. and Lu, Y. 2007. Extractive fermentation of L-lactic acid with immobilized *Rhizopus oryzae* in a three-phase fluidized bed. *Chemical Engineering and Processing*. 46: 369–374.
- Liu, Y., Liao, W., Liu, C., and Chen, S. 2006. Optimization of L-(+)-Lactic Acid Production Using Pelletized Filamentous *Rhizopus oryzae* NRRL 395. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 129–132: 844–853.
- Lockwood, L.B. 1965. Lactic acid. *Annals of the New York Academy of Science*. 119: 354-867.
- Maneeboon, T., Vanichsriratana, W., Pomchaitaward, C., and Kitpreechavanich, V. 2010. Optimization of lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* in 3-l airlift bioreactor using response surface methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 161: 137–146

- Malherbe, S. and Cloete, T.E. 2002. Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 1: 105–114
- Martak, J., Schollosser, 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.
- McMillan., J. D. 1997. Bioethanol production: status and prospects. *Renewable Energy*. 10: 295-302
- Medeiros, A. B. P., Pandey, A., Freitas, R. J. S., Christen, P. and Soccol, C R. 2000. Optimization of the production of aroma compounds by *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation using factorial design and response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*. 6: 33–39
- Mirdamadi, S., Sadeghi, H., Sharafi, N., Fallahpour, M., Mohseni F. A. and Bakhtiari, M.R. 2002. Comparison of lactic acid isomers produced by fungal and bacterial strains. *Iranian Biomedical Journal*. 2: 69-75.
- Michelson, T., Kask, K., Jögi, E., Talpsep, E., Suitso, I. and Nurk, A. 2006. L(+)-Lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 and its comparison with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. lactis DSM 20073. *Enzyme and Microbial Technology*. 39: 861-867.
- Miura, S., Arimura, T., Hoshino, M., Kojima, M., Dwiarti, L. and Okabe, M. 2003. Optimization and Scale-Up of L-lactic acid fermentation by mutant strain *Rhizopus* sp. MK-96-1196 in airlift bioreactors. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 96: 65-69.
- Miura, S., Arimura, T., Itoda, N., Dwiarti, L., Feng, J. B., Bin, C. H. and Okabe, M. 2004. Production of L-lactic acid from corncob. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 97: 153-157.

- Morjanoff, P. J. and Gray, P. P. 1987. Optimization of steam explosion as method for increasing susceptibility of sugarcane bagasse to enzymatic saccharification. *Biotechnology and Bioengineering*. 29: 733-741
- Narayanan, N., Roychoudhury, P. K. and Srivastava, A. 2004. L(+)-lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*. 7: 167-179.
- Oh, H., Wee, Y. J., Yun, J. S., Han, S. H., Jung, S. W. and Ryu, H. W. 2005. Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. *Bioresource Technology*. 96: 1492-1498.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T., Vandenberghe, L.P.S. and Mohan, R. 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II : cassava bagasse. *Bioresource Technology*. 74: 81-87.
- Parisi, F. 1989. Advances in lignocelluloses hydrolysis and in the utilization of the hydrolysate. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 38: 53-87
- Park, E. Y., Kosakaj, Y. and Okabe, M. 1998. Efficient production of L-(+)-lactic acid using mycelial cotton-like flocs of *Rhizopus oryzae* in an air-lift bioreactor. *Biotechnology Progress*. 14: 699-704.
- Park, E. Y., Anh, P. N. and Okuda, N. 2004. Bioconversion of waste office paper to L-(+)-lactic acid by the filamentous fungus *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technology*. 93: 77-83.
- 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.
- Purwadi, R. 2206. *Continuous Ethanol Production from Dilute-acid Hydrolyzates: Detoxification and Fermentation Strategy*. Doctoral dissertation. Department of Chemical and Biological Engineering, Chalmers University of Technology.

- 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.
- Saha, B. C. and Cotta, M. A. 2006. Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw. *Biotechnology Progress*. 22: 449-453
- Saha, B. C. and Cotta, M. A. 2007. Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hulls to ethanol. *Enzyme and Microbial Technology*. 41: 528-532
- Saha, P., Manna, S., Chowdhury, S. R., Sen, R., Roy, D. and Adhikari, B. 2010. Enhancement of tensile strength of lignocellulosic jute fibers by alkali-steam treatment. *Bioresource Technology*. 101: 3182-3187
- Sánchez, Ó. J. and Cardona, C. A. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*. 99: 5270–5295
- Silverstein, R. A. 2004. *A comparison of chemical pretreatment methods for converting cotton stalks to ethanol*. Master's Thesis. Biological and Agricultural Engineering, North Carolina State University.
- 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.
- Sirisansaneeyakul, S., Luangpipat, T., Vanichsriratana, W., Srinophakun, T., Chen, H. H. H. and Chisti Y. 2007. Optimization of lactic acid production by immobilized *Lactococcus lactis* IO-1. *Journal of Industrial of Microbiology and Biotechnology*. 34: 381–391.
- Sivers, M. V. and Zacchi, G. 1995. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. *Bioresource Technology*. 51: 43-52

- Soares, M., Christen, P., Pandey, A. and Soccol, C. R. 2000. Fruity flavour production by *Ceratocystis fimbriata* grown on coffee husk in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. 35: 857–861
- 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., and Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. 83: 1-11
- 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.
- Tamada, M., Begum, A.A. and Sadi, S. 1992. Production of L(+)-lactic acid by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* with polymer supports prepared by gamma-ray-induced polymerization. *Journal of Fermentation Bioengineering*. 74: 379-383.
- 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.
- Toca-Herrera, J. L., Osma, J. F. and Couto, S. R. 2007. Potential of solid-state fermentation for laccase production. In : *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. A. Méndez-Vilas (Ed.)
- Thang, V. H., Kanda, K. and Kobayashi, G. 2010. Production of acetone–butanol–ethanol (ABE) in direct fermentation of cassava. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 161: 157–170
- 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. 2004. Controlling filamentous fungal morphology by immobilization on a rotating fibrous matrix to enhance oxygen transfer and L(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. In: Saha BC (ed) *Fermentation biotechnology*. Oxford University Press, MA, pp 36–51
- 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
- Vaidya, A. N., Pandey, R. A., Mudliar, S., Kumar, M. S., Chakrabarti, T. and Devotta, S. 2005. Production and recovery of lactic acid for polylactide-an overview. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 35: 429-467.
- Vandenberghe, L. P. S., Soccol, C.R., Prado, F. C. and Pandey, A. 2004. Comparison of citric acid production by solid state fermentation in flask, column, tray, and drum bioreactors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 118: 293-303.
- Varadarajan, S. and Miller, D.J. 1999. Catalytic upgrading of fermentation-derived organic acids. *Biotechnology Progress*. 15: 845-854.
- Vidal, P. F. and Molinier, J 1988. Ozonolysis of lignin-improvement of in vitro digestibility of poplar sawdust. *Biomass*. 16: 1-17
- Vijayakumar, J., Aravindan, R., and Viruthagiri, T. 2008. Recent trends in the production, purification and application of lactic acid. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 22: 245-264.
- Wang, Z., Wang, Y., Yang, S-T., Wang, R., and Ren, H. 2010. A novel honeycomb matrix for cell immobilization to enhance lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technology*. 101: 5557-5564.
- Wassewar, K.L. 2005. Separation of lactic acid: recent advances. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 19: 159-172.

- Wee, Y. J., Yun, J. S., Park, D. W. and Ryu, H. W. 2004. Biotechnological production of L(+)-lactic acid from wood hydrolysate by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. *Biotechnology Letters*. 26: 71-74.
- Wee, Y. J., Kim, J. N. and Ryu, H. W. 2006. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technology and Biotechnology*. 44: 163-172.
- Williams S.T. and Flowers T.H. 1978. The influence of pH on starch hydrolysis by neutrophilic and acidophilic actinomycetes. *Microbios*. 20: 99-106.
- Woiciechowski, A.L., Soccol, C.R., Ramos, L.P. and Pandey, A. 1999. Experimental design to enhance the production of L(+)-lactic acid from steam-exploded wood hydrolysate using *Rhizopus oryzae* in a mixed-acid fermentation. *Process Biochemistry*. 34: 949-955.
- Woiciechowski, A. L., Nitsche, S., Pandey, A. and Soccol, C. R. 2002. Acid and Enzymatic Hydrolysis to Recover Reducing Sugars from Cassava Bagasse: an Economic Study. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 45: 393-400.
- Woodward, J., 1987. Utilization of cellulose as a fermentation substrate: Problems and potential. *Special Publications of the Society for General Microbiology*. 21: 45-46
- Wright, B.E., Longacre, A. and Reimers, J. 1996. Models of metabolism in *Rhizopus oryzae*. *Journal of Theoretical Biology*. 182: 453-457
- Wu, X., Jiang, S., Liu, M., Pan, L., Zheng, Z., Luo, S. 2010. Production of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae* using semicontinuous fermentation in bioreactor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 38: 565-571
- Wyman, C.E., Dale, B.E., Elander, R.T., Holtzapple, M., Ladisch, M.R., Lee, Y.Y. 2005. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. 96: 1959-1966.

- Yang, C.W., Lu, Z. and Tsao, G.T. 1995. Lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* in a submerged system. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 51-52: 57-71.
- 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. M., Nishina, N., Kosakai, Y., Yahiro, K., Park, Y. S. 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.
- Yin, P. M, Yahiro, K., Ishigaki, T., Park, Y. and Okabez, M. 1998. L(+)-lactic acid production by repeated batch culture of *Rhizopus oryzae* in air-lift bioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 85: 96-100.
- 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
- Yu, X., Hallett, S.G., Sheppard, J., and Watson, A.K. 1998. Effects of carbon concentration and carbon-to-nitrogen ratio on growth, conidiation, spore germination and efficacy of the potential bioherbicide *Colletotrichum coccodes*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 20: 333-338.
- Yu, Q., Zhuang, X., Yuan, Z., Wang, Q., Qi W., Wang, W., Zhang, Y., Xu J. and Xu, H. 2010. Two-step liquid hot water pretreatment of *Eucalyptus grandis* to enhance sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. *Bioresource Technology*. 101: 4895-4899
- 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.

- Zhang, Z. Y., Jin, B. and Kelly, J. M. 2008. Production of L(+)-lactic acid using acid-adapted precultures of *Rhizopus arrhizus* in a stirred tank. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 149: 265-276.
- Zhao, D. and Ding, X. 2008. Studies on the low-salt Chinese potherb mustard (*Brassica juncea*, Coss.) pickle. I-The effect of a homofermentative L(+)-lactic acid producer *Bacillus coagulans* on starter culture in the low-salt Chinese potherb mustard pickle fermentation. *Food Science and Technology*. 41: 474-482.
- 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
- Zhou, Y., Du, J. and Tsao, G.T. 2000. Mycelial pellet formation by *Rhizopus oryzae* ATCC52311. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 84-86: 779-789.
- Znidarsic, P. and Pavko, A. 2001. The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter. *Food Technology and Biotechnology*. 3: 237-252.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์หาคุณค่าทางอาหาร (A.O.A.C.,1995)

1. การหาปริมาณร้อยละของความชื้น (% Moisture)

อุปกรณ์

- 1) Aluminium foil
- 2) Spatula stainless / plastic (ช้อนตักสาร)
- 3) Hot air oven
- 4) เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 5) Desiccator
- 6) Forcep

วิธีวิเคราะห์

- 1) นำ Aluminium dish ไปอบในตู้อบ (Hot air oven) ที่ $100\pm 5^{\circ}\text{C}$ แล้วนำไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก
- 2) ชั่งตัวอย่าง 2 - 5 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ใน Aluminium dish
- 3) นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ $100\pm 5^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- 4) นำ Aluminium dish กับตัวอย่างที่ผ่านการอบไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่ง แล้วนำไปอบจนได้น้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

วิธีการคำนวณ

$$\% \text{ Moisture} = \frac{(\text{Wt. sample} - \text{Wt. sample หลังอบ})}{\text{Wt. sample}} \times 100$$

2. การหาปริมาณร้อยละของไขมัน (% Fat)

อุปกรณ์

- 1) ชุดกลั่น Soxhlet ประกอบด้วย Condenser, Soxhlet apparatus และ Round bottom flask
- 2) Spatula stainless / plastic (ช้อนตักสาร)

- 3) Hot air oven
- 4) เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 5) Desiccator
- 6) Forcep
- 7) Water bath
- 8) Cooling
- 9) Thimble
- 10) กระดาษกรอง
- 11) Cylinder / Beaker ขนาด 250 มล.

สารเคมี

- 1) Petroleum ether

วิธีวิเคราะห์

- 2) ชั่งตัวอย่างที่แห้ง 2 – 3 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ในกระดาษกรอง แล้วนำไปใส่ใน Thimble ใน Extraction tube ของ Soxhlet apparatus
- 3) ใส่ 250 มล. Petroleum ether ลงในขวดก้นกลมที่ทราบน้ำหนักแน่นอน
- 4) นำไป Reflux บน Heating mantle (โดยใช้ Water bath แทน) ใช้อุณหภูมิปานกลาง โดยให้อัตราการกลั่นตัวของ Petroleum ether 2 – 3 หยด / วินาที ใช้เวลาในการ Reflux \approx 10 ชั่วโมง
- 5) ระบายเอา Petroleum ether ออกจากขวดก้นกลม (Round bottom flask) ที่สกัดไขมัน
- 6) จากนั้นนำไปอบในตู้อบ (Hot air oven) ที่ $100 \pm 5^{\circ}\text{C}$ แล้วนำไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

วิธีการคำนวณ

$$\% \text{ Fat} = \frac{(\text{Wt. ขวดก้นกลมกับน้ำมัน} - \text{Wt. ขวดก้นกลม})}{\text{Wt. sample}} \times 100$$

3. การหาปริมาณร้อยละของโปรตีน (% Protein)

อุปกรณ์

- 1) ชุดย่อย ประกอบด้วย Kjeldahl flask, Digestion apparatus (เตาไฟ), Digestion rack
- 2) ชุดกลั่น (Distillation unit)
- 3) Spatula stainless / plastic (ช้อนตักสาร)
- 4) เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 5) Erlenmeyer flask 250 มล.
- 6) Burette ขนาด 25 มล.
- 7) Hood (ตู้ดูดควัน)
- 8) Volumetric flask

สารเคมี

- 1) Potassium sulphate
- 2) Copper sulphate heptahydrate
- 3) Sulfuric acid
- 4) Sodium hydroxide
- 5) Boric acid
- 6) Hydrochloric acid
- 7) Mixed indicator (methyl red + bromocresol green)
- 8) DI water

วิธีวิเคราะห์

- 1) ชั่งตัวอย่างแห้ง 0.5 - 2 กรัม ใส่ใน Kjeldahl flask
- 2) เติม Catalyst 7 กรัม (95 กรัม K_2SO_4 : 5 กรัม $CuSO_4 \cdot 5H_2O$)
- 3) เติม 15 มล. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
- 4) นำไปย่อยบนเตาไฟจนได้ของเหลวสีเขียวใส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
- 5) เติม 50 มล. DI water
- 6) เติม 40% NaOH ลงใน Kjeldahl flask

- 7) นำ Erlenmeyer flask ขนาด 250 มล. ซึ่งบรรจุ 100 มล. 4% Boric acid และหยด 2 – 3 หยด Mixed indicator ต่อเข้ากับชุดกลั่นโดยให้ปลายล่างของ Condenser อยู่ได้ระดับของเหลวใน Erlenmeyer flask
- 8) กลั่นจนได้ของเหลวประมาณ 200 มล. นำ Erlenmeyer flask ออก ล้างปลาย Condenser ด้วย DI water
- 9) นำมาทำการ titrate สารที่กลั่นได้กับ 0.1 N HCl ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)

วิธีการคำนวณ

$$N = (\text{Vol. HCl}_{\text{titrate}} - \text{Vol. HCl}_{\text{blank}}) \times N_{\text{HCl}} \times 0.014007$$

$$N \times 100$$

$$\% N = \frac{\text{Wt.}}{\text{sample}}$$

sample

$$\% \text{ Protein} = \% N \times \text{factor}$$

หมายเหตุ : factor ที่ใช้คำนวณ = 6.25

4. การหาปริมาณร้อยละของเส้นใยหยาบ (% Fiber)

อุปกรณ์

- 1) Erlenmeyer flask 500 มล.
- 2) Spatula stainless / plastic (ช้อนตักสาร)
- 3) Hot air oven
- 4) เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 5) Desiccator
- 6) Forcep
- 7) Cylinder 50 / 100 มล.
- 8) Hot plate
- 9) ชุดกรอง
- 10) Suction pump

- 11) กระจกทรง
- 12) เต้าเผา
- 13) Tong (ที่คีบถ้วย Crucible)
- 14) Crucible

สารเคมี

- 1) Sulfuric acid
- 2) Sodium hydroxide
- 3) DI Water
- 4) Ethyl alcohol

วิธีวิเคราะห์

- 1) ชั่งตัวอย่างแห้งที่สกัดไขมันออกแล้ว (ยกเว้นกรณีที่มีไขมันน้อยกว่า 1%) 2 กรัม ใส่ใน Erlenmeyer flask 500 มล.
- 2) เติม 50 มล. 5% H_2SO_4 และเติม 200 มล. DI Water
- 3) ต้มให้เดือดนาน 30 นาที บน Hot plate (ขณะต้มให้หมุน Erlenmeyer flask เป็นครั้งคราวเพื่อไม่ให้มีส่วนแข็งติด)
- 4) นำมากรองในชุดกรองผ่านกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนักแน่นอน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) โดยใช้ Suction pump ล้าง Erlenmeyer flask ด้วยน้ำร้อน 50 – 70 มล. แล้วเทลงผ่านกระดาษกรอง
- 5) ใช้น้ำร้อน 50 มล. ล้างซ้ำอีก 2 – 3 ครั้ง
- 6) นำกากที่ได้ใส่ใน Erlenmeyer flask เติม 50 มล. 5% NaOH เติม 200 มล. DI Water
- 7) ต้มให้เดือดนาน 30 นาที บน Hot plate (ขณะต้มให้หมุน Erlenmeyer flask เป็นครั้งคราวเพื่อไม่ให้มีส่วนแข็งติด)
- 8) กรองโดยใช้วิธีเดียวกับข้อ 4 และ 5
- 9) ล้างด้วย 25 มล. 1.25% H_2SO_4 ล้างตามด้วยน้ำร้อน 50 มล. และ 25 มล. Alcohol ตามลำดับ นำกระดาษกรองพร้อมกากเส้นใยใส่ใน Crucible ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)
- 10) นำไปอบในตู้อบ (Hot air oven) ที่ $100 \pm 5^\circ C$ แล้วนำไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

- 11) นำไปเผาที่อุณหภูมิ $600 \pm 5^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลานาน 30 นาที ทำให้เย็นใน Desiccator ชั่งน้ำหนักอีกครั้ง และนำไปเผาจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

วิธีการคำนวณ

$$\% \text{ Fiber} = \frac{(\text{Wt. sample หลังอบ} - \text{Wt. ภาชนะกรอง}) - \text{Wt. sample หลังเผา}}{\text{Wt. sample}} \times 100$$

5. การหาปริมาณร้อยละของเถ้า (% Ash)

อุปกรณ์

- 1) Crucible
- 2) Spatula stainless / plastic (ช้อนตักสาร)
- 3) Hot air oven
- 4) เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
- 5) Desiccator
- 6) Forcep
- 7) Hood
- 8) เตาเผา
- 9) Tong

วิธีวิเคราะห์

- 1) นำ Crucible ไปเผาที่เตาเผา ที่ $550 \pm 5^{\circ}\text{C}$ แล้วนำไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก
- 2) ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ใน Crucible
- 3) นำไปเผาบน Hot plate ในตู้ดูดควัน (Hood) จนหมดควันสีดำ
- 4) นำไปเผาในเตาเผาที่ $550 \pm 5^{\circ}\text{C}$ แล้วนำไปใส่ Desiccator เพื่อทิ้งไว้ให้เย็น นำไปชั่งน้ำหนัก และนำไปเผาจนน้ำหนักคงที่ จดบันทึกน้ำหนัก

วิธีการคำนวณ

$$\% \text{ Ash} = \frac{\text{Wt. sample หลังเผา}}{\text{Wt. sample}} \times 100$$

6. การหาปริมาณร้อยละของคาร์โบไฮเดรต (% Carbohydrate)

$$\% \text{ Carbohydrate} = 100 - \% \text{ Protein} - \% \text{ Fat} - \% \text{ Fiber} - \% \text{ Ash}$$

ภาคผนวก ข

การคำนวณ

ตัวอย่าง การหมักแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด ที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

1. การหาค่าปริมาณผลผลิตผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นต่อสารตั้งต้นที่ถูกใช้ไป (Yield : $Y_{P/S}$)

$$Y_{P/S} = \frac{P_t - P_0}{S_0 - S_t}$$

จากตารางที่ ข.1

1) $Y_{P/S}$ ของกรดแลกติกในอาหารเพื่อการเจริญ

$$\begin{aligned} Y_{P/S} &= (\text{กรดแลกติก}_t - \text{กรดแลกติก}_0) / (\text{กลูโคส}_0 - \text{กลูโคส}_t) \\ &= (5.73 - 0) / (69.43 - 0) \\ &= 0.0825 \end{aligned}$$

ค่า $Y_{P/S}$ ของกรดแลกติกในอาหารเพื่อการเจริญ เท่ากับ 0.0825 คิดเป็น 8.25 %

2) $Y_{P/S}$ ของกรดแลกติกในอาหารเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์

$$\begin{aligned} Y_{P/S} &= (\text{กรดแลกติก}_t - \text{กรดแลกติก}_0) / (\text{กลูโคส}_0 - \text{กลูโคส}_t) \\ &= (53.61 - 0) / (71.24 - 0.28) \\ &= 0.7555 \end{aligned}$$

ค่า $Y_{P/S}$ ของกรดแลกติกในอาหารเพื่อการเจริญ เท่ากับ 0.7555 คิดเป็น 75.55 %

3) $Y_{P/S}$ ของเอทานอลในอาหารเพื่อการเจริญ

$$\begin{aligned} Y_{P/S} &= (\text{เอทานอล}_t - \text{เอทานอล}_0) / (\text{เอทานอล}_0 - \text{เอทานอล}_t) \\ &= (16.01 - 0) / (69.43 - 0) \\ &= 0.2306 \end{aligned}$$

ค่า $Y_{P/S}$ ของกรดแลกติกในอาหารเพื่อการเจริญ เท่ากับ 0.2306 คิดเป็น 23.06 %

4) $Y_{P/S}$ ของกรดเอทานอลในอาหารเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์

$$\begin{aligned} Y_{P/S} &= (\text{เอทานอล}_t - \text{เอทานอล}_0) / (\text{เอทานอล}_0 - \text{เอทานอล}_t) \\ &= (4.01 - 0) / (71.24 - 0.28) \\ &= 0.0565 \end{aligned}$$

ค่า $Y_{P/S}$ ของกรดแลกติกในอาหารเพื่อการเจริญ เท่ากับ 0.0565 คิดเป็น 5.65 %

2. การหาค่าอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ (Productivity (g/L·h))

$$\text{Productivity (g/L·h)} = \frac{P_t}{\text{Time(h)}}$$

จากตารางที่ ข.1

1) Productivity ของกรดแลกติกในอาหารเพื่อการเจริญ

$$\begin{aligned} \text{Productivity} &= \text{กรดแลกติก}_t \text{ (กรัมต่อลิตร)} / \text{ระยะเวลา(ชั่วโมง)} \\ &= 5.73 / 48 \\ &= 0.12 \end{aligned}$$

อัตราการผลิตกรดแลกติกในอาหารเพื่อการเจริญ เท่ากับ 0.12 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

2) Productivity ของกรดแลกติกในอาหารเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์

$$\begin{aligned} \text{Productivity} &= \text{กรดแลกติก}_t \text{ (กรัมต่อลิตร)} / \text{ระยะเวลา(ชั่วโมง)} \\ &= 53.61 / 32 \\ &= 1.68 \end{aligned}$$

อัตราการผลิตกรดแลกติกในอาหารเพื่อการเจริญ เท่ากับ 1.68 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

3) Productivity ของเอทานอลในอาหารเพื่อการเจริญ

$$\begin{aligned} \text{Productivity} &= \text{เอทานอล}_t \text{ (กรัมต่อลิตร)} / \text{ระยะเวลา(ชั่วโมง)} \\ &= 16.01 / 48 \\ &= 0.33 \end{aligned}$$

อัตราการผลิตกรดแลกติกในอาหารเพื่อการเจริญ เท่ากับ 0.33 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

4) Productivity ของเอทานอลในอาหารเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์

$$\begin{aligned} \text{Productivity} &= \text{เอทานอล}_t \text{ (กรัมต่อลิตร)} / \text{ระยะเวลา(ชั่วโมง)} \\ &= 4.01 / 32 \\ &= 0.13 \end{aligned}$$

อัตราการผลิตกรดแลกติกในอาหารเพื่อการเจริญ เท่ากับ 0.13 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ตารางที่ ข.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคส ความเข้มข้นของกรดแลคติก ความเข้มข้นของเอทานอลกับเวลาในอาหารเพื่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์

สารตัวอย่าง	เวลา (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัมต่อลิตร)
G 0 h	0	69.43	0.00	0.00
G 8 h	8	74.33	0.00	0.00
G 16 h	16	71.12	0.00	0.00
G 24 h	24	42.07	1.83	6.92
G 32 h	32	15.03	4.84	14.36
G 40 h	40	0.27	5.07	15.64
G 48 h	48	0.00	5.73	16.01
P 0 h	48	71.24	0.00	0.00
P 8 h	56	63.43	0.00	0.00
P 16 h	64	63.35	17.11	0.00
P 24 h	72	11.69	40.16	3.53
P 32 h	80	0.28	53.61	4.01
P 40 h	88	0.00	50.68	0.00
P 48 h	96	0.00	51.86	0.00

3. การหาค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน (K_La) ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยวิธี

Dynamic method of gassing out

Dynamic method of gassing out สามารถใช้การคำนวณหาค่า K_La ในกรณีที่สภาวะของการหมักยังมีเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีกว่าวิธีอื่นๆคือ ไม่ต้องใช้ข้อมูลสมมติฐานแต่เป็นการใช้ข้อมูลจากการทดลองจริง แต่ข้อสำคัญคือ DO probe ต้องให้ค่าที่ถูกต้องจริงๆ โดยในการทดลองการให้อากาศจะถูกหยุดทำให้ dissolved oxygen concentration (C_L) ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงแต่ยังคงให้มีการกวนระดับต่ำอยู่เพื่อคงให้คงความเป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นจึงมีการให้อากาศอีกครั้ง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของ C_L กับเวลา อยู่ในเทอมของ $\frac{dC_L}{dt}$ และยังสัมพันธ์กับค่า Oxygen uptake rate (OUR) และ ค่า Oxygen transfer rate (OTR) ด้วยดังสมการ

$$\frac{dC_L}{dt} = OTR - OUR$$

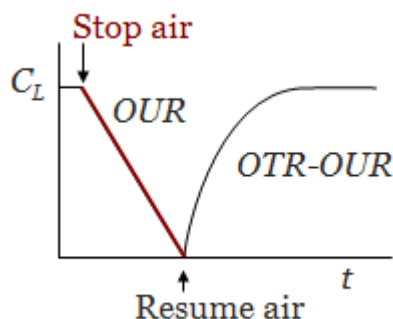
โดยที่

$$OTR = K_La \times (C_L^* - C_L)$$

เมื่อ C_L^* คือ solubility of oxygen ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (mM) และ K_La คือ volumetric oxygen transfer coefficient (min^{-1})

$$\frac{dC_L}{dt} = -OUR$$

ขณะที่ไม่มีการให้อากาศ $OTR = 0$ นั่นคือ อัตราการเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเท่ากับอัตราการนำออกซิเจนไปใช้ของเซลล์ และ OUR (mM/min) สามารถหาได้จากค่าความชันจากการสร้างกราฟระหว่าง C_L กับ เวลาในช่วงที่ไม่มีการให้อากาศ ดังภาพที่ ข.1



ภาพที่ ข.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย (C_L) กับเวลา (วินาที) จากแบบจำลองในทางทฤษฎี

ในช่วงที่สองที่มีการให้อากาศอีกครั้งอัตราการเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนเท่ากับอัตราการให้อากาศ ลบ อัตราการนำออกซิเจนไปใช้ของเซลล์

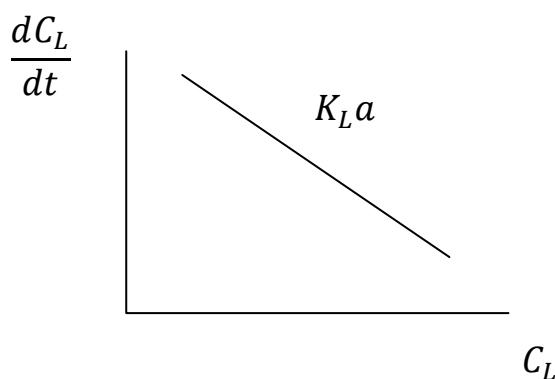
$$\frac{dC_L}{dt} = \text{OTR} - \text{OUR}$$

แต่
$$\text{OTR} = K_L a (C_L^* - C_L)$$

ดังนั้น
$$\frac{dC_L}{dt} + \text{OUR} = K_L a (C_L^* - C_L)$$

$$= -K_L a C_L + K_L a C_L^*$$

ช่วงที่มีการให้อากาศ ซึ่งค่า $K_L a$ เท่ากับค่าติดลบของความชันของกราฟ

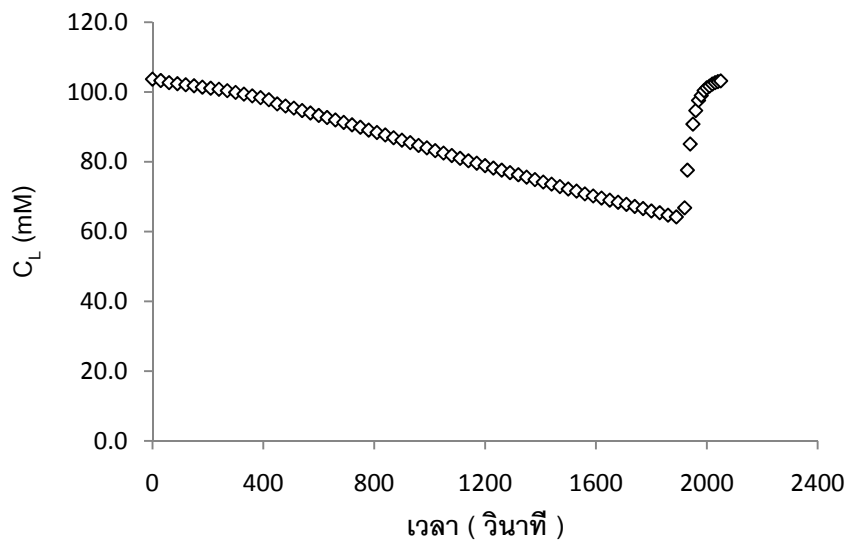


ภาพที่ ข.2 ความสัมพันธ์ระหว่าง dC_L/dt กับ C_L จากแบบจำลองในทางทฤษฎี

จากการทดลองนี้สมมติฐานให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพคล้ายน้ำ ค่าการอิ่มตัวของออกซิเจน 100 % ที่อุณหภูมิ 30° C มีค่าการละลายของน้ำเท่ากับ 0.2436 mM H₂O จากข้อมูลที่

กำหนดให้สามารถคำนวณหาค่า C_L ได้จากสมการ $C_L = \frac{\text{DO}\% \times 0.2436}{100}$ ได้ผลดังตารางที่ ข.2

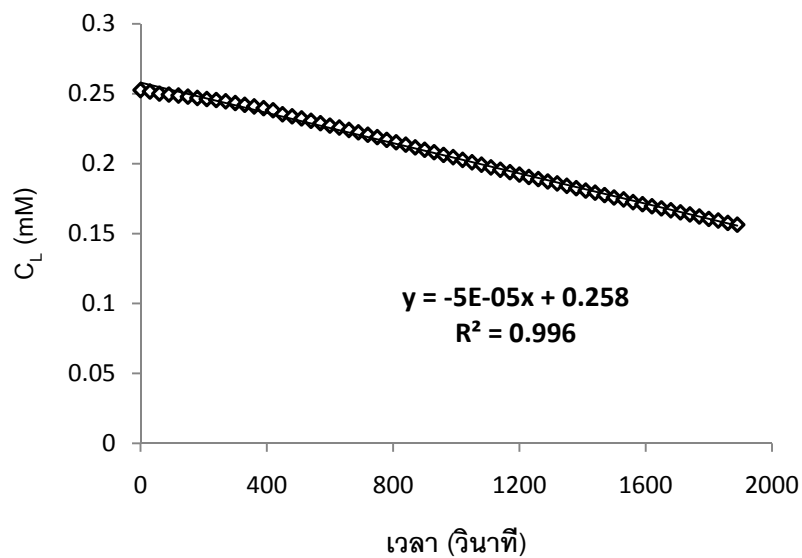
นำมาสร้างกราฟระหว่าง C_L กับ เวลาได้ดังกราฟภาพที่ ข.3



ภาพที่ ๓.3 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหาร (C_L) กับเวลา (วินาที) ในการทดลอง

คำนวณหาค่า OUR จากการหาค่าความชันของกราฟระหว่าง C_L กับ เวลา ขณะที่ไม่มีการให้อากาศ ค่า $OTR = 0$ ดังนั้น $\frac{dC_L}{dt} = -OUR$ ซึ่งสามารถสร้างกราฟคำนวณหาค่าความชันได้ดัง

ภาพที่ ๓.4 และได้ค่า OUR เท่ากับ 0.00005 mM/s



ภาพที่ ๓.4 ความสัมพันธ์ระหว่าง C_L กับ เวลา (วินาที) ในช่วงการไม่มีอากาศ

จากนั้นคำนวณหาค่า $K_L a$ หลังจากที่มีการให้อากาศอีกครั้งหนึ่ง โดยค่า C_L ในแต่ละเวลาจะขึ้นอยู่กับ OUR และ OTR ดังสมการ

$$\frac{dC_L}{dt} = \text{OTR} - \text{OUR}$$

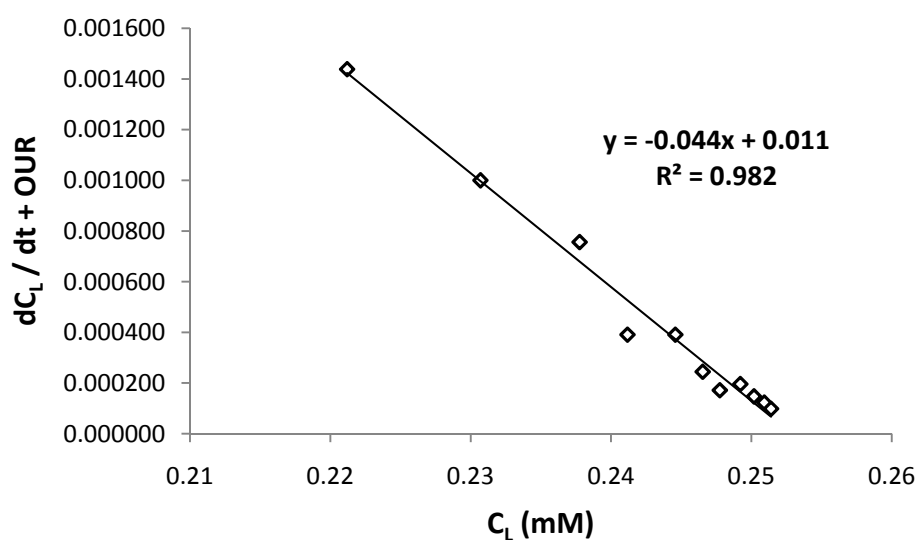
แต่
$$\text{OTR} = K_L a (C_L^* - C_L)$$

เพราะฉะนั้น
$$\frac{dC_L}{dt} + \text{OUR} = K_L a (C_L^* - C_L)$$

$$= -K_L a C_L + K_L a C_L^*$$

$$y = \text{slope} \times x + c$$

ดังนั้นสามารถหาค่า $K_L a$ จากการสร้างกราฟระหว่าง $\frac{dC_L}{dt} + \text{OUR}$ กับ C_L ได้ดังภาพที่ ๕.5 และสามารถคำนวณหาค่า $K_L a$ ได้เท่ากับ 0.045 s^{-1}



ภาพที่ ๕.5 ความสัมพันธ์ระหว่าง $dC_L/dt + \text{OUR}$ กับ C_L

ตารางที่ ข.2 ค่าการละลายของออกซิเจน (DO) ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในอาหาร (C_L) กับเวลา (วินาที) (ต่อ)

Time (s)	DO (%)	C_L (mM)	dCL/dt	OTR=dCL/dt+OUR
0	103.7	0.252613	-	-
30	103.3	0.251639	3.25E-05	-
60	102.7	0.250177	4.87E-05	-
90	102.4	0.249446	2.44E-05	-
120	102.1	0.248716	2.44E-05	-
150	101.8	0.247985	2.44E-05	-
180	101.4	0.24701	0.000032	-
210	101.1	0.24628	0.000024	-
240	100.8	0.245549	0.000024	-
270	100.4	0.244574	0.000032	-
300	99.9	0.243356	0.000041	-
330	99.4	0.242138	0.000041	-
360	98.9	0.24092	0.000041	-
390	98.4	0.239702	0.000041	-
420	97.8	0.238241	0.000049	-
450	96.6	0.235318	0.000097	-
480	96.0	0.233856	0.000049	-
510	95.4	0.232394	0.000049	-
540	94.7	0.230689	0.000057	-
570	94.0	0.228984	0.000057	-
600	93.3	0.227279	0.000057	-
630	92.7	0.225817	0.000049	-
660	92.0	0.224112	0.000057	-
690	91.3	0.222407	0.000057	-
720	90.6	0.220702	0.000057	-
750	89.9	0.218996	0.000057	-
780	89.1	0.217048	0.000065	-
810	88.4	0.215342	0.000057	-
840	87.7	0.213637	0.000057	-
870	86.9	0.211688	0.000065	-
900	86.2	0.209983	0.000057	-
930	85.5	0.208278	0.000057	-

ตารางที่ ข.2 ค่าการละลายของออกซิเจน (DO) ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในอาหาร (C_L) กับเวลา (วินาที) (ต่อ)

Time (s)	DO (%)	C_L (mM)	dCL/dt	OTR=dCL/dt+OUR
960	84.7	0.206329	0.000065	-
990	84.0	0.204624	0.000057	-
1020	83.2	0.202675	0.000065	-
1050	82.5	0.20097	0.000057	-
1080	81.8	0.199265	0.000057	-
1110	81.0	0.197316	0.000065	-
1140	80.3	0.195611	0.000057	-
1170	79.6	0.193906	0.000057	-
1200	78.9	0.1922	0.000057	-
1230	78.2	0.190495	0.000057	-
1260	77.6	0.189034	0.000049	-
1290	76.9	0.187328	0.000057	-
1320	76.3	0.185867	0.000049	-
1350	75.6	0.184162	0.000057	-
1380	74.9	0.182456	0.000057	-
1410	74.2	0.180751	0.000057	-
1440	73.6	0.17929	0.000049	-
1470	72.9	0.177584	0.000057	-
1500	72.2	0.175879	0.000057	-
1530	71.6	0.174418	0.000049	-
1560	70.8	0.172469	0.000065	-
1590	70.2	0.171007	0.000049	-
1620	69.6	0.169546	0.000049	-
1650	69.0	0.168084	0.000049	-
1680	68.4	0.166622	0.000049	-
1710	67.8	0.165161	0.000049	-
1740	67.2	0.163699	0.000049	-
1770	66.6	0.162238	0.000049	-
1800	65.9	0.160532	0.000057	-
1830	65.4	0.159314	0.000041	-
1860	64.7	0.157609	0.000057	-
1890	64.2	0.156391	0.000041	-

ตารางที่ ข.2 ค่าการละลายของออกซิเจน (DO) ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในอาหาร (C_L) กับเวลา (วินาที) (ต่อ)

Time (s)	DO (%)	C_L (mM)	dCL/dt	OTR=dCL/dt+OUR
1920	66.8	0.162725	0.000211	0.000261
1930	77.6	0.189034	0.002631	0.002681
1940	85.1	0.207304	0.001827	0.001877
1950	90.8	0.221189	0.001389	0.001439
1960	94.7	0.230689	0.000950	0.001000
1970	97.6	0.237754	0.000706	0.000756
1980	99.0	0.241164	0.000341	0.000391
1990	100.4	0.244574	0.000341	0.000391
2000	101.2	0.246523	0.000195	0.000245
2010	101.7	0.247741	0.000122	0.000172
2020	102.3	0.249203	0.000146	0.000196
2030	102.7	0.250177	0.000097	0.000147
2040	103.0	0.250908	0.000073	0.000123
2050	103.2	0.251395	0.000049	0.000099

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว ศิริพร ชุ่นแอบ เกิดวันที่ 25 ธันวาคม พ.ศ. 2529 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2550 ต่อมาได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2551

การเสนอผลงานวิจัย

Ounaeb, S., Sooksai, S. and Thongchul, N., Production of L(+)-lactic acid from cassava pulp hydrolysate by immobilized *Rhizopus oryzae* in a static bed bioreactor, Part I: pretreatment of raw material. The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology "International Conference on Biotechnology for Healthy Living" October 20-22, 2010, Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand.