

การผลิตกรดแอล-แลกติกแบบต่อเนื่อง โดย *Rhizopus oryzae* ที่ถูกตรึง

ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติก

นางสาววารุณี พิมพ์ทอง

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.

CONTINUOUS PRODUCTION OF L-LACTIC ACID BY IMMOBILIZED *Rhizopus oryzae*
IN A STATIC BED BIOREACTOR

Miss Varunee Pimtong

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	การผลิตกรดแอส-แลกติกแบบต่อเนื่อง โดย <i>Rhizopus oryzae</i> ที่ถูกตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติก
โดย	นางสาววารุณี พิมทอง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร. ณิชฐา ทองจุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร. ฤทัยรัตน์ บุญสมบัติ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับเป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร. ณิชฐา ทองจุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร. ฤทัยรัตน์ บุญสมบัติ)

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

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

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร. สุวัฒนา พุกกะศรี)

527 25320 23 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : CONTINUOUS PRODUCTION / STATIC BED BIOREACTOR /
L-LACTIC ACID / *Rhizopus oryzae* / INITIAL GLUCOSE CONCENTRATION

VARUNEE PIMTONG : CONTINUOUS PRODUCTION OF L-LACTIC ACID BY
IMMOBILIZED *Rhizopus oryzae* IN A STATIC BED BIOREACTOR. ADVISOR :
NUTTHA THONGCHUL, Ph.D., CO-ADVISOR : RUETHAIRAT
BOONSOMBAT, Ph.D., 182 pp.

This study investigated the ability of immobilized *Rhizopus oryzae* to grow and produce L-lactic acid in both batch and continuous operation in a static bed bioreactor. During batch fermentation of free cells, it was clear that fungal morphology had the profound effects on fermentation broth rheology and mixing in a conventional stirred tank bioreactor. This caused the difficulties in control and operating the bioreactor and eventually led to the low lactate yield and productivity. Comparing to free cells, immobilized cells in the static bed bioreactor proved that with a good morphological control, better mixing and oxygen transfer could be achieved. This resulted in a high cell density system and an improved lactate production rate by the immobilized cells in the static bed bioreactor. It was also found that the efficiency of the static bed bioreactor was significantly affected by agitation and aeration. A high lactate yield of 65.51% (w/w), productivity of 2.25 g/L·h and specific production rate of 0.14 h⁻¹ were achieved from the fermentation with the initial glucose concentration of 70 g/L during the production phase when operating the static bed bioreactor at 30°C, pH 6.0, 700 rpm, and 0.5 vvm air. Glucose tolerance was also observed in the immobilized cells in the static bed bioreactor. It was found that the immobilized cells could grow and produce lactic acid at the high initial glucose concentration up to 150 g/L. This led to the improved lactate production rate and final lactate liter. Later, immobilized cells in the static bed bioreactor were tested for the long term stability in producing lactic acid during continuous culture. It was found that by immobilization of *R. oryzae* on the cotton matrix provided in this bioreactor, the immobilized cells were actively kept in the prolonged exponential stage without any wash out phenomenon observed. In addition, the activity of the immobilized cells to produce lactic acid could also be maintained up to 449 h cultivation time when operating the bioreactor at the same conditions applied in the batch culture. This resulted in a high average lactate concentration up to 72.20 g/L with the lactate yield of 58.05% (w/w) and productivity of 0.72 g/L·h when feeding the glucose solution (150 g/L) continuously at the dilution rate of 0.01 h⁻¹. In addition, urea at the different concentrations (0.15 and 0.30 g/L) was added during the continuous culture. It was evident that urea stimulated cell growth rather than promoted lactic acid production. This resulted in an average lactate concentration of 43.25 and 41.07 g/L with the lactate yield of 31.10 and 30.35% (w/w) and productivity of 0.43 and 0.41 g/L·h respectively when feeding the glucose solution (150 g/L) continuously at the dilution rate of 0.01 h⁻¹ with 0.15 g/L and 0.30 g/L urea, respectively.

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

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

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความอนุเคราะห์อย่างยิ่งจากอาจารย์ ดร. ณีฎฐา ทองจุด อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และ อาจารย์ ดร.ฤทัยรัตน์ บุญสมบัติ อาจารย์ที่ปรึกษา ร่วม ที่คอยให้คำปรึกษาแนะนำ ชี้แนะแนวทางวิธีการคิด วิเคราะห์ อีกทั้งคอยช่วยแก้ไขปัญหาต่างๆ และให้กำลังใจ ตลอดระยะเวลาที่ข้าพเจ้าประสบปัญหา หรือ อุปสรรคต่างๆ อีกทั้งให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ และให้การดูแล ห่วงใยต่อข้าพเจ้าตลอดมา และกรุณาตรวจแก้ไข วิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ถูกต้อง จึงขอขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณาเป็นประธาน กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. นาดยา งามโรจนวิชัย อาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส และอาจารย์ ดร. สุวัฒนา พุกษะศรี ที่กรุณาเข้าร่วมเป็นกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ และช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่มอบทุน” 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” (กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช) ซึ่งคอยช่วยสนับสนุนค่าใช้จ่ายระหว่างการวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ น้องๆ รวมถึงนักวิจัย และบุคลากรทุกท่าน ของสถาบันวิจัย เทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ความช่วยเหลือ ความอนุเคราะห์ในเรื่องอุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือในการทำวิจัย ตลอดจนคำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์แก่ข้าพเจ้า

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคนของข้าพเจ้า และพี่ๆ ห้อง 611 ทุกๆ ท่าน ที่คอยให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทั้งกำลังกาย กำลังใจ และคอยมอบเสียงหัวเราะ รอยยิ้ม ในระหว่างการปฏิบัติการทดลอง และถือเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสมบูรณ์ได้

สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และพี่สาวเป็นอย่างสูง ที่คอยอบรมสั่งสอน และสนับสนุนในด้านการศึกษาเสมอมา อีกทั้งยังคอยให้คำแนะนำ ชี้แนะแนวทาง และถือเป็นกำลังใจที่สำคัญที่ผลักดันให้ข้าพเจ้ามาก้าวเดินมา ณ จุดนี้ได้

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ถ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	5
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	5
1.4 วิธีดำเนินการวิจัย.....	6
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	7
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
2.1 กรดแลกติก.....	8
2.2 การนำกรดแลกติกมาประยุกต์ใช้.....	9
2.3 การผลิตกรดแลกติก.....	13
2.3.1 กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี.....	13
2.3.2 กระบวนการหมัก.....	16
2.4 วิธีเมแทบอลิซึมของ <i>Rhizopus oryzae</i>	25
2.5 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตกรดแลกติก.....	26
2.5.1 สารอาหาร.....	26
2.5.2 สันฐานวิทยา.....	31
2.5.3 การตรึงเซลล์.....	35
2.5.4 จลนพลศาสตร์ของการหมัก.....	39
2.5.5 ชนิดของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ.....	45
2.5.5.1 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน.....	45

บทที่	หน้า
2.5.5.2 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Air-lift.....	47
2.5.5.3 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Bubble column.....	49
2.5.6 การออกแบบและพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพในการผลิตกรดแลกติก...	51
3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....	59
3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี.....	59
3.1.1 วัสดุอุปกรณ์.....	59
3.1.2 สารเคมี.....	61
3.2 จุลินทรีย์และการเตรียมกล้าเชื้อ.....	61
3.2.1 จุลินทรีย์.....	61
3.2.2 วิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์.....	62
3.2.3 การเตรียมกล้าเชื้อ.....	62
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมัก.....	63
3.4 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	65
3.4.1 การหมักกรดแลกติกแบบแบตช์ (Batch Process) ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร.....	65
3.4.1.1 การหมักกรดแลกติกในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน (Stirred Tank Bioreactor).....	65
3.4.1.2 การหมักกรดแลกติกในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต (Static Bed Bioreactor).....	66
3.4.2 การหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง (Continuous Process) ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร.....	67
3.5 การวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	68
3.5.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง.....	68
3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส กรดแลกติก กรดฟูมาริก และเอทานอล ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโทกราฟี (HPLC).....	68
3.5.3 การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธีเจลดาคาล์ (Kjeldahl protein, A.O.A.C., 1975; ตาลวงษ์, 2550).....	69
3.5.4 การหาค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนด้วยวิธี Dynamic method of gassing out.....	70

บทที่	หน้า
3.5.5 Scanning electron microscope (SEM).....	71
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	73
4.1 การหมักกรดแลกติกแบบแบตช์ (Batch Process) ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร.....	73
4.1.1 การหมักกรดแลกติกในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน (Stirred Tank Bioreactor).....	73
4.1.2 การหมักกรดแลกติกในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสถิต (Static Bed Bioreactor).....	75
4.1.3 การเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกแบบแขวนลอยในเครื่องปฏิกรณ์ ชีวภาพชนิดถังกวน และแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด เบดสถิต.....	84
4.1.4 ผลของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่อการเพิ่มความสามารถในการผลิต กรดแลกติกโดย <i>R. oryzae</i> ที่ถูกตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบด สถิต.....	86
4.2 การหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง (Continuous Process) ในเครื่องปฏิกรณ์ ชีวภาพขนาด 5 ลิตร.....	92
4.2.1 การหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่องที่ระดับความเข้มข้นกลูโคสในระยะ สร้างผลิตภัณฑ์ 70 กรัมต่อลิตร.....	92
4.2.2 การหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่องที่ระดับความเข้มข้นกลูโคสในระยะ สร้างผลิตภัณฑ์ 150 กรัมต่อลิตร.....	96
4.2.3 การหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่องที่ระดับความเข้มข้นกลูโคสในระยะ สร้างผลิตภัณฑ์ 150 กรัมต่อลิตร และเติมยูเรียทุก 24 ชั่วโมงในระยะ การหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง.....	107
4.3 วิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวและโครงสร้างของ <i>R. oryzae</i> ที่ถูกตรึงบนเส้นใยใน เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสถิต.....	128
4.3.1 วิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวและโครงสร้างของ <i>R. oryzae</i> ในการหมักแบบ แบตช์.....	128
4.3.2 วิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวและโครงสร้างของ <i>R. oryzae</i> ในการหมัก แบบต่อเนื่อง.....	130

บทที่	หน้า
5 สรุปลผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	136
รายการอ้างอิง.....	139
ภาคผนวก.....	
ภาคผนวก ก.....	148
ภาคผนวก ข.....	151
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	182

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คุณสมบัติของกรดแลกติก.....	9
2.2	แสดงแบคทีเรียแลกติกในกลุ่ม โยโมเฟอร์เมนเททีฟ และ เฮเทอร์โรเฟอร์เมนเททีฟ และชนิดไอโซเมอร์ของกรดแลกติก.....	17
2.3	การผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรียแลกติก.....	20
2.4	เปรียบเทียบกระบวนการผลิตกรดแลกติกระหว่าง <i>Lactobacillus sp.</i> และ <i>Rhizopus oryzae</i>	22
2.5	เปรียบเทียบผลการผลิตกรดแลกติกระหว่าง <i>Lactobacillus sp.</i> และ <i>Rhizopus oryzae</i>	24
2.6	ลักษณะสัณฐานของ <i>R. oryzae</i> ที่มีต่อการผลิตกรดแลกติก.....	33
2.7	การผลิตกรดแลกติกโดย <i>R. oryzae</i> ที่ถูกตรึง.....	37
2.8	การผลิตกรดแลกติกโดย <i>R. oryzae</i> ที่ถูกตรึง (ต่อ).....	38
4.1	ผลของอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศต่อค่าจลนพลศาสตร์ในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ระหว่างการเลี้ยงโดย <i>R.oryzae</i> ที่ถูกตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติด.....	83
4.2	แสดงการเปรียบเทียบผลการผลิตระหว่างการหมักในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน และแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติด.....	85
4.3	ผลของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่อค่าจลนพลศาสตร์ของ <i>R.oryzae</i> ที่ถูกตรึง ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติด ในระยะการผลิตกรดแลกติก ที่ภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส, พีเอช 6, อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที, อัตราการให้อากาศ 0.5 รอบต่อนาที.....	91
4.4	เปรียบเทียบผลการหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง โดยเซลล์ตรึงบนเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติด.....	106
4.5	เปรียบเทียบผลความเข้มข้นยูเรียต่อการหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง โดยเซลล์ตรึงบนเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติด ที่อัตราการเจือจาง 0.01 ต่อชั่วโมง.....	118
4.6	เปรียบเทียบการหมักกรดแลกติกในสถานะต่างๆ โดย <i>R. oryzae</i> ที่ศึกษาทั้งหมด.....	125
4.7	เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกในแต่ละสถานะ.....	127

ตารางที่

หน้า

ข.1	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกลูโคสกับกรดแลกติกในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์.....	151
ข.2	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกลูโคสกับเอทานอลในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์.....	153
ข.3	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกลูโคสกับกรดฟูมาริกในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์.....	155
ข.4	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกลูโคสกับกรดแลกติกในอาหารแบบต่อเนื่อง....	157
ข.5	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกลูโคสกับเอทานอลในอาหารแบบต่อเนื่อง.....	158
ข.6	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกลูโคสกับกรดฟูมาริกในอาหารแบบต่อเนื่อง....	159
ข.7	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกรดแลกติกกับเวลาในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์.....	160
ข.8	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเอทานอลกับเวลาในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์..	162
ข.9	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกรดฟูมาริกกับเวลาในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์.....	164
ข.10	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกรดแลกติกกับเวลาในอาหารแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจาง 0.14 ต่อชั่วโมง.....	166
ข.11	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเอทานอลกับเวลาในอาหารแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจาง 0.14 ต่อชั่วโมง.....	167
ข.12	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกรดฟูมาริกกับเวลาในอาหารแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจาง 0.14 ต่อชั่วโมง.....	168
ข.13	ความสัมพันธ์ระหว่าง \ln ของความเข้มข้นกรดแลกติกกับเวลาในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์.....	170
ข.14	ค่าการละลายของออกซิเจน(DO) ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในอาหาร (C_L) ต่อเวลา (วินาที).....	179

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1	8
2.2	15
2.3	19
2.4	22
2.5	26
2.6	27
2.7	32
2.8	39
2.9	42
2.10	43
2.11	46
2.12	47
2.13	48
2.14	51
2.15	52
2.16	53
2.17	54
2.18	55
2.19	56
2.20	57

รูปที่	หน้า	
2.21	ลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Bubble Column ที่ทำการประกอบกับเมทริกซ์รวงผึ้ง (Honeycomb Matrix).....	58
3.1	ลักษณะของ Haemocytometer	63
3.2	แผนภาพเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติก (Static Bed Bioreactor).....	66
3.3	ภาพการละลายของออกซิเจนด้วยเทคนิค Gassing out.....	71
4.1	สัณฐานวิทยาของเซลล์แขวนลอย ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน.....	74
4.2	การผลิตกรดแลกติกแบบแขวนลอยในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน ที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที.....	75
4.3	การผลิตกรดแลกติกแบบตรึงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติกที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 (ก.) และ 1.0 (ข.) ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที.....	77
4.4	การผลิตกรดแลกติกแบบตรึงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติกที่อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 (ก.) และ 1.0 (ข.) ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที.....	79
4.5	การผลิตกรดแลกติกแบบตรึงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติกที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 (ก.) และ 1.0 (ข.) ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที.....	81
4.6	สัณฐานวิทยาของการตรึงเซลล์ <i>R. oryzae</i> บนผ้าฝ้ายชนิดถัก (ผ้าขนหนู) ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติก.....	82
4.7	การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติกที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร.....	87
4.8	การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติกที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร.....	88

รูปที่	หน้า
4.9 การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร.....	89
4.10 แผนภาพแสดงรูปแบบการทำงานของกระบวนการผลิตแบบต่อเนื่อง.....	92
4.11 การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดแบบต่อเนื่อง อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 70 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.14 ต่อชั่วโมง.....	94
4.12 การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดแบบต่อเนื่อง อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 70 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.02 ต่อชั่วโมง.....	96
4.13 การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดแบบต่อเนื่อง อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.0025 ต่อชั่วโมง.....	98
4.14 การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดแบบต่อเนื่อง อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.01 ต่อชั่วโมง.....	100
4.15 การเจริญของสปอร์ <i>R. oryzae</i> ระยะทำยการทดลองที่เจริญบริเวณจุดอับที่อากาศและสารอาหารไม่สามารถเข้าถึง ในการหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้อัตราการเจือจางที่ 0.01 ต่อชั่วโมง.	101
4.16 การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดแบบต่อเนื่อง อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.015 ต่อชั่วโมง.....	103

รูปที่	หน้า
4.17 การเจริญของสปอร์ <i>R. oryzae</i> ระยะท้ายการทดลองบริเวณด้านบนของผ้าเหนืออาหารเลี้ยงเชื้อ ในการหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้อัตราการเจือจางที่ 0.015 ต่อชั่วโมง.....	103
4.18 การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดแบบต่อเนื่อง อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.02 ต่อชั่วโมง.....	105
4.19 การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดแบบต่อเนื่อง อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.01 ต่อชั่วโมง และทำการเติมยูเรีย ความเข้มข้น 0.15 กรัมต่อลิตร ทุกๆ 24 ชั่วโมงของการผลิตแบบต่อเนื่อง.....	111
4.20 การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดแบบต่อเนื่อง อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.01 ต่อชั่วโมง และทำการเติมยูเรีย ความเข้มข้น 0.30 กรัมต่อลิตร ทุกๆ 24 ชั่วโมงของการผลิตแบบต่อเนื่อง.....	115
4.21 ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราที่ถูกตรึงบนผ้าฝ้ายชนิดถัก หลังจากทำการแยกเซลล์ออกจาก baffle ในการหมักแบบต่อเนื่อง.....	116
4.22 ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อราที่ถูกตรึงบนผ้าฝ้ายชนิดถัก ในภาพตัดขวางในการผลิตแบบต่อเนื่อง.....	117
4.23 แสดงอัตราการผลิต และ Yield (%) ของกรดแลกติกในการหมักแบบแบตช์ และแบบต่อเนื่อง ในแต่ละอัตราการเจือจาง ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ที่ 150 กรัมต่อลิตร.....	120

รูปที่	หน้า
4.24	122
4.25	129
4.26	132
4.27	133
4.28	134
4.29	135

รูปที่	หน้า
ข.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกลูโคสกับกรดแลคติกในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์.....	152
ข.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกลูโคสกับเอทานอลในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์.....	154
ข.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกลูโคสกับกรดฟูมาริกในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์.....	156
ข.4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกรดแลคติกกับเวลาในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์.....	161
ข.5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเอทานอลกับเวลาในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์.....	163
ข.6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นกรดฟูมาริกกับเวลาในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์.....	165
ข.7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่าง \ln ของความเข้มข้นกรดแลคติกกับเวลาในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์.....	171
ข.8 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย(C_L) กับเวลา(วินาที) จากรูปแบบจำลองในทางทฤษฎี.....	175
ข.9 ความสัมพันธ์ระหว่าง dC_L/dt กับ C_L จากแบบจำลองในทางทฤษฎี.....	176
ข.10 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหาร (C_L) กับเวลา (วินาที) ในการทดลอง.....	177
ข.11 ความสัมพันธ์ระหว่าง C_L กับ เวลา (วินาที) ในช่วงไม่มีอากาศ.....	177
ข.12 ความสัมพันธ์ระหว่าง $dC_L/dt+OUR$ กับ C_L	178

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	เปอร์เซ็นต์
mL	มิลลิลิตร
L	ลิตร
mg	มิลลิกรัม
g	กรัม
g/L	กรัมต่อลิตร
w/w	น้ำหนักต่อน้ำหนัก
h	ชั่วโมง
M	โมลาร์
GM	อาหารเพื่อการเจริญเติบโต
PM	อาหารเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์
D	อัตราการเจือจาง
P	อัตราการผลิต
μ_p	อัตราการผลิตจำเพาะ
rpm	รอบต่อนาที
vvm	ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กรดแลกติก เป็นกรดอินทรีย์ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) และหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) กรดแลกติกถูกนำมาใช้งานอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารและยา และใช้เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์สารเคมีและพอลิเมอร์ที่สลายตัวได้ทางชีวภาพ (compostable polymer) ชนิดพอลิแลกติกแอซิด หรือ PLA ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (eco-friendly) นอกจากนี้ PLA ยังสามารถเข้ากันได้ดีกับร่างกาย (biocompatible) PLA สามารถถูกนำไปขึ้นรูปเพื่อใช้งานได้หลากหลายทั้งงานด้านบรรจุภัณฑ์ สิ่งทอ และการแพทย์ เป็นต้น ซึ่งนอกจากนี้กรดแลกติก ถูกนำมาใช้ทดแทนวัตถุดิบจากปิโตรเลียมเพื่อการผลิตพลาสติกได้เป็นอย่างดี (Tay และ Yang, 2002; Thongchul, 2005; Zhang และคณะ, 2007) กรดแลกติกแบ่งได้เป็น 2 ไอโซเมอร์ ได้แก่ กรดแอล-แลกติก และกรดดี-แลกติก ที่พบได้ทั่วไป 3 ชนิด ได้แก่ กรดแอล-แลกติก กรดดี-แลกติก และกรดดีแอล-แลกติก ซึ่งเกิดจากการรวมกันของกรดแอล-แลกติก และกรดดี-แลกติก ได้ทั่วไปในองค์ประกอบของอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มของอาหารหมักดอง นอกจากนี้กรดแอล-แลกติก ยังถูกพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งในร่างกายมนุษย์และสัตว์ ส่วนกรดดี-แลกติก มักพบได้ในปริมาณน้อยตามสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ เพราะกรดชนิดนี้หากมีในปริมาณมากจะส่งผลเสียต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของสิ่งมีชีวิต ทั้งนี้เนื่องจากระบบเมแทบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตโดยทั่วไปมีความจำเพาะต่อกรดแอล-แลกติกเท่านั้น ดังนั้น กรดดี-แลกติกที่สร้างหรือถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายไม่สามารถถูกกำจัดได้โดยกลไกตามธรรมชาติ เมื่อปริมาณที่ตกค้างมากขึ้นจะส่งผลต่อสมดุลเคมีภายในของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้น (Wee และคณะ, 2006)

กรดแลกติก สามารถผลิตได้โดยการสังเคราะห์ทางเคมี หรือการหมักโดยจุลินทรีย์ (Wee และคณะ, 2006) โดยการสังเคราะห์ทางเคมีเป็นกระบวนการที่ก่อให้เกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังเป็นกระบวนการที่ไม่ก่อให้เกิดความยั่งยืน เนื่องจากสารตั้งต้นที่ใช้มาจากปิโตรเลียม ในทาง

ตรงกันข้าม การผลิตกรดแลกติกจากการหมักโดยจุลินทรีย์เป็นกระบวนการที่ใช้วัตถุดิบชีวมวล (biomass) เป็นสารตั้งต้น ดังนั้นจึงเป็นกระบวนการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม และมีความยั่งยืน ในปัจจุบัน กรดแลกติกผลิตจากการหมักโดยแลกติกแอซิดแบคทีเรีย โดยกระบวนการดังกล่าวให้อัตราผลผลิตสูงผ่านกระบวนการที่เรียกว่า กระบวนการยิปซัม (gypsum process) หากพิจารณาถึงการผลิตกรดแลกติกเพื่อนำไปเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ PLA เมื่อความต้องการด้านการตลาดของ PLA มีมากขึ้น นั่นหมายถึงการเพิ่มปริมาณการผลิตของกรดแลกติกเพื่อรองรับอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพ ซึ่งจะก่อให้เกิดยิปซัมในปริมาณมหาศาลซึ่งท้ายสุดแล้วจะกลายเป็นมลภาวะในที่สุด นอกจากนี้การหมักกรดแลกติกโดยแลกติกแอซิดแบคทีเรียเป็นกระบวนการที่มีต้นทุนเรื่องวัตถุดิบ (สารอาหาร) ในการหมักค่อนข้างสูง เนื่องจากแลกติกแอซิดแบคทีเรียไม่สามารถสังเคราะห์สารเสริมการเจริญซึ่งมีความจำเป็นในการเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์ ปัญหาประการสำคัญ คือ โดยส่วนมากกรดแลกติกที่แลกติกแอซิดแบคทีเรียผลิตได้อยู่ในรูปของไอโซเมอร์ผสม ซึ่งหากนำกรดดังกล่าวไปใช้ในการสังเคราะห์ PLA จำเป็นต้องมีการทำให้ไอโซเมอร์บริสุทธิ์ก่อน ซึ่งขั้นตอนนี้ใช้เงินลงทุนค่อนข้างสูง ดังนั้น กระบวนการที่กล่าวมาอาจยังไม่เหมาะสมหากต้องการนำไปใช้เพื่อผลิตกรดแลกติกสำหรับการสังเคราะห์เป็น PLA โดยผลงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า ราเส้นใย *R.oryzae* ย่อยแป้งจากอะไมเลสที่สร้างขึ้นเองให้เป็นกลูโคสซึ่งถูกส่งเข้าวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis) ไพรูเวท (pyruvate) จากวิถีไกลโคไลซิส จะถูกเอน-แลกเตตดีไฮโดรจีเนส (L-lactate dehydrogenase) หรือ LDH ที่ *R.oryzae* สร้างขึ้นเปลี่ยนเป็นกรดแลกติก จึงเห็นได้ว่าการหมักกรดแลกติกด้วยรามิจุเด่น 2 ประการใหญ่ ได้แก่ ความสามารถในการนำวัตถุดิบชีวมวลจำพวกแป้ง หรือน้ำตาลเฮกโซส (hexose) และเพนโทส (pentose) มาใช้ในการผลิตกรดแลกติก ได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ (pretreatment) เพื่อให้ได้เป็นกลูโคส และความสามารถในการผลิตกรดแลกติกบริสุทธิ์ ซึ่งช่วยลดต้นทุนการผลิตได้ (Hang, 1989; Hang และคณะ, 1989; Ho, 1996; Soccol และคณะ, Tay และ Yang, 2002; Thongchul และคณะ, 2010; Wee และคณะ, 2006; Yin และคณะ, 1997) นอกจากนี้ กระบวนการดังกล่าวยังช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับผลผลิตทางการเกษตรและวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรได้อีกด้วย

โดยทั่วไปการหมักในระดับอุตสาหกรรมใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน (stirred tank bioreactor) กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากการออกแบบที่ง่ายไม่ซับซ้อนและสะดวกต่อการ

ควบคุม อย่างไรก็ตามการใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้มีข้อจำกัดสำหรับรา โดยเฉพาะ *R.oryzae* เนื่องจากการผลิตกรดแลกติก *R.oryzae* ต้องการอากาศในการเจริญโดยในสภาวะที่ขาดแคลนอากาศ *R.oryzae* นำแหล่งคาร์บอนที่ได้เข้าสู่วิถีเมแทบอลิซึมแบบไร้อากาศ (anaerobic pathway) ซึ่งท้ายที่สุดแล้วได้เอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์แทนกรดแลกติก (Bai และคณะ, 2003) อีกทั้งลักษณะพื้นฐานของเชื้อราที่มีความหลากหลายและเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักในถังกวนได้หากไม่ควบคุม โดยทั่วไปในถังกวนพบพื้นฐานวิทยาของราได้ 2 ลักษณะ ได้แก่ dispersed mycelia และ pellet ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการหมัก เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง อัตราการกวน และอัตราการให้อากาศ องค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ และลักษณะเฉพาะของราแต่ละสายพันธุ์ เป็นต้น พื้นฐานวิทยาแบบ dispersed mycelia มักก่อให้เกิดปัญหาต่อระบบควบคุม เนื่องจากเส้นใยราที่กระจายทั่วไปในถังกวนติดตามอุปกรณ์วัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากเส้นใยไปพันเกาะบริเวณใบกวน ก่อให้เกิดแรงบิด (torque) ที่ใบกวนสูงขึ้น หากสูงมากเกินไปอาจก่อให้เกิดความเสียหายได้นอกจากนี้ เส้นใยที่กระจายโดยทั่วถังกวนส่งผลต่อความหนืดของน้ำหมัก ซึ่งมีผลโดยตรงต่อการละลายของออกซิเจน และสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน (K_La) จะมีค่าลดลงทำให้ *R.oryzae* เปลี่ยนวิถีเมแทบอลิซึมเป็นวิถีแบบไร้อากาศ ทำให้ได้ผลผลิตกรดแลกติกต่ำลง ซึ่งหากต้องการเพิ่มค่า K_La ให้สูงขึ้น โดยทั่วไปในถังกวนอาศัยวิธีการเพิ่มอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศ ซึ่งต้องอาศัยพลังงานเพิ่มขึ้น (high power input) อีกทั้งการกวนที่ความเร็วรอบสูงยังทำลายเส้นใยราทำให้เกิดเป็นเส้นใยสายสั้นๆ (fragmentation) ซึ่งทำให้ผลผลิตของกรดแลกติกลดลง (Tay และ Yang, 2002; Thongchul, 2005) ส่วนพื้นฐานแบบ pellet ในถังกวนมีข้อดี คือ ช่วยลดปัญหาเรื่องความหนืดสูงของน้ำหมัก สามารถใช้อัตราการกวนที่ไม่สูงนักเพื่อให้ได้ K_La ตามต้องการ อย่างไรก็ตาม ในการหมักระยะยาว (long term fermentation) จะมีข้อเสีย คือ ไม่สามารถควบคุมขนาดของ pellet ซึ่งโตขึ้นเรื่อยๆ รวมทั้งความหนาแน่นของเซลล์ภายใน pellet ที่เพิ่มขึ้นด้วย ทำให้ยากต่อการแพร่ผ่านของอาหารและออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ในใจกลางของ pellet ส่งผลให้เมแทบอลิซึมของเซลล์ที่บริเวณด้านใน pellet ลดลง นอกจากนี้ ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในใจกลาง pellet สะสมอยู่ภายในทำให้เกิดภาวะ production inhibition ได้ (Cruz และคณะ, 2001; Cui และคณะ, 1998; Hellendoorn และคณะ, 1998; Kobayashi และคณะ, 1973; Oostra และคณะ, 2001; Pritchard, 1973; Skory, 2004)

เพื่อลดปัญหาเรื่องการเปลี่ยนแปลงของสัณฐานราเส้นใยระหว่างการหมัก จึงมีการพัฒนาเทคนิคตรึงเซลล์เพื่อใช้ในการควบคุมสัณฐานของราเส้นใย จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการตรึงเซลล์นอกจากจะใช้ในการควบคุมสัณฐานของราเส้นใยแล้วยังช่วยเพิ่มอัตราผลผลิตกรดแลกติกได้อีกทั้งกระบวนการหมักโดยเซลล์ตรึงของราทำได้สะดวกไม่ซับซ้อน ดังตัวอย่างงานวิจัยของ Yin และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วย *Rhizopus* sp. จำนวน 8 สายพันธุ์ เพื่อเปรียบเทียบภาวะที่ใช้ในการหมักในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพระบบ air-lift โดยใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน จากผลการทดลองพบว่า *R.oryzae* NRRL 395 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด คือ 102 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 3 ลิตร และงานวิจัยของ Miura และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วย *Rhizopus* sp. MK-96-1196 ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ air-lift มักมีปัญหาในเรื่องค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำหมักบริเวณด้านบนของถัง เนื่องจากอากาศถูกอัดผ่านโดยแรงดันจากบริเวณฐานด้านล่างของเครื่องของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพและปัญหาทางด้านสัณฐานของราซึ่งมักเกิดการตรึงกันเองและเจริญแบบกลุ่มก้อนเพื่อแก้ไขปัญหาที่พบในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ air-lift Tay และ Yang (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก ด้วยการตรึง *R.oryzae* NRRL 395 ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ rotating fibrous-bed bioreactor (RFB) โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการตรึงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้ สามารถใช้ควบคุมสัณฐานของรา ทำให้มีอัตราการเจริญและผลผลิตสูง อย่างไรก็ตาม อย่างไรก็ดี ที่ผ่านมายังพบว่ากระบวนการหมักด้วยเซลล์ตรึงยังคงประสบปัญหาเรื่องการซึมผ่านของออกซิเจนและอาหาร (oxygen and substrate diffusion) ภายในเซลล์ตรึงต่ำ ซึ่งเป็นผลมาจากเซลล์ตรึงมีขนาดใหญ่ขึ้นและมีความหนาแน่นมากขึ้นเมื่อทำการหมักในระยะยาว นักวิจัยหลายกลุ่มจึงพยายามที่จะพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเซลล์ตรึงเพื่อช่วยลดปัญหาการซึมผ่านของออกซิเจนและอาหาร นอกเหนือไปจากเพื่อควบคุมสัณฐานของราเส้นใย โดยในกลุ่มวิจัยของผู้วิจัยได้มีการพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิตเพื่อใช้ในการควบคุมสัณฐาน และพบว่าเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบนี้ช่วยเพิ่มอัตราผลผลิตกรดแลกติกเมื่อเทียบกับการหมักในถังกวนในระบบแบตช์ ข้อดีข้อสำคัญประการหนึ่งของเซลล์ตรึง คือ โดยทั่วไปเซลล์ตรึงมักมีความเสถียรมากกว่าเซลล์แขวนลอย จึงเหมาะสำหรับกระบวนการผลิตในระยะยาว เช่น กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง จากงานวิจัยของ นวกร (2551) พบว่าการผลิตกรดแลกติกโดยวิธีตรึงเซลล์ *R.oryzae* NRRL 359 ในเครื่อง

ปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติก ที่ภาวะรอบการกวนเท่ากับ 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าแอกติวิตี้ของแลกเตดดีไฮโดรจีเนส (LDH) มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของกลูโคสที่อยู่ในน้ำหมัก โดยพบว่าเมื่อกลูโคสหมดลง แอกติวิตี้ของแลกเตดดีไฮโดรจีเนส (LDH) มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเข้มข้นของกลูโคสที่อยู่ในน้ำหมัก โดยพบว่าเมื่อกลูโคสหมดลง แอกติวิตี้ของ LDH จะลดลงพร้อมกับปริมาณความเข้มข้นของกรดแลกติกที่ไม่เพิ่มขึ้นอีกต่อไป ดังนั้น จึงเกิดแนวความคิดว่า หากเติมกลูโคสและสารอาหารที่มีความจำเป็นต่อการผลิตกรดแลกติกและเพื่อรักษาแอกติวิตี้ของเซลล์ให้ไว้ได้ จะช่วยยืดระยะเวลาในกระบวนการผลิตให้นานขึ้น และจะสามารถที่จะผลิตกรดแลกติกได้มากขึ้น กล่าวคือ การผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง เป็นกระบวนการที่ช่วยรักษาอัตราการเจริญและแอกติวิตี้ของเซลล์ในช่วง exponential growth ให้นานขึ้น เมื่อนำมาควรรวมกับระบบเซลล์ที่ประสิทธิภาพจะสามารถป้องกันการเกิด cell wash out ได้ จากที่กล่าวมาเห็นได้ว่ากระบวนการหมักแบบต่อเนื่องในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติกมีหัวใจสำคัญคือความเสถียรของเซลล์ ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จะศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องด้วยวิธีทีโมสแตท และศึกษาจากจลนศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง และจะศึกษาผลของปัจจัย เช่น อัตราการป้อนอาหาร สูตรอาหารป้อน dilution factor การกวน และการให้อากาศ เป็นต้น ทั้งนี้ เพื่อพัฒนาการผลิตกรดแลกติก สำหรับเป็นพื้นฐานที่จะนำไปพัฒนาเพื่อใช้ในภาคอุตสาหกรรมภายในประเทศในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง โดย *Rhizopus oryzae*

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยกระบวนการหมักแบบเบดซ์โดยเปรียบเทียบระหว่างการหมักในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดกวน (stirred-tank bioreactor) และชนิดเบดสติก (static bed bioreactor) ในสภาวะที่ 30 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 6.0 (ในระยะเวลาสร้างผลิตภัณฑ์) 700 รอบต่อนาที 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที จากนั้นจึงทำการศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกแบบเบดซ์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติก เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์การผลิต

กรดแลกติก (μ_p) ในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ และจึงนำมาใช้ในการผลิตกรดแลกติกด้วยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง โดยทำการแปรปัจจัย เช่น อัตราการเจือจาง สูตรอาหารในการป้อน การกวน และการให้อากาศในระยะสร้างผลิตภัณฑ์

1.4 วิธีการดำเนินการวิจัย

1.4.1 ศึกษา ค้นคว้า และรวบรวมข้อมูล

1.4.2 หมักกรดแลกติกแบบเบตซ์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบตซ์ผลิตโดย *R. oryzae* NRRL395

1.4.2.1 เตรียมหัวเชื้อ ถ่ายสปอร์ *R. oryzae* ลงในอาหารวุ้น potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน จากนั้นเขี่ยสปอร์จากอาหารวุ้น PDA ลงในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร นับความเข้มข้นของสปอร์ด้วย haemocytometer แล้วปรับความเข้มข้นของสปอร์เป็น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

1.4.2.2 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *R. oryzae* อาหารที่ใช้มี 2 ชนิด ได้แก่ อาหารเพื่อการเจริญ (growth medium) และอาหารเพื่อสร้างกรดแลกติก (production medium) อาหารเพื่อการเจริญประกอบด้วยกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร อาหารเพื่อสร้างกรดแลกติกประกอบด้วยกลูโคส 70 กรัมต่อลิตร ยูเรีย 0.3 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 0.6 กรัมต่อลิตร MgSO_4 0.25 กรัมต่อลิตร และ ZnSO_4 0.088 กรัมต่อลิตร (Thongchul, 2005)

1.4.2.3 เตรียมเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบตซ์และการหมักกรดแลกติก เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้มีพื้นที่สำหรับการตรึงเซลล์ซึ่งประกอบด้วยโครงร่างตาข่ายเหล็กสแตนเลสที่ยึดติดกับฝาบนของถัง โดยผ้าขนหนูรอบโครงร่างตาข่าย นำเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบตซ์พร้อมอุปกรณ์วัดต่างๆ ที่มีอาหารเพื่อการเจริญปริมาตร 4 ลิตร บรรจุอยู่ไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 45 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อภายในถังเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เทียบวัด หัววัดออกซิเจน (DO probe) แล้วเริ่มควบคุมอุณหภูมิภายในถังที่ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมหัวเชื้อ *R. oryzae* เข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร 10 มิลลิลิตร ลงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ปั่นกวนที่ 700 รอบต่อนาที ให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยถ่ายน้ำหมักในถังออกแล้วเติมอาหารเพื่อการผลิตกรดแลกติกที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 4 ลิตรลงในถัง จากนั้นควบคุมที่ภาวะเดิม และควบคุมค่ากรด-เบสที่ 6.0 ด้วย NaOH 5 โม

ลาร์ ทากการหมักนาน 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์แล้วคำนวณหาค่าจลนพลศาสตร์ ค่าสัมประสิทธิ์การผลิตกรดแลกติก (μ_p) โดยตัวอย่างน้ำหมักจะนำไปเซนตริฟิวก์ จากนั้นนำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก กรดฟูมาริก เอทานอล และกลูโคสที่เหลือด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโทกราฟี (HPLC) เมื่อสิ้นสุดการหมักทากการเก็บเกี่ยวเซลล์จากโครงร่างตาข่าย เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

1.4.3 หมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่องในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติดโดย *R. oryzae* NRRL395

1.4.3.1 ทำการทดลองเหมือนในข้อ 1.4.1 1.4.2 และ 1.4.3 โดยในระยะสร้างผลิตภัณฑ์เมื่อกลูโคสกำลังจะหมดให้เริ่มป้อนอาหารแบบต่อเนื่อง โดยทำการป้อนเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ และในขณะเดียวกันทำการถ่ายน้ำหมักจากถังด้วยอัตราการไหลเท่ากับอัตราการป้อนอาหาร และนอกจากนี้เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักจะทำการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธีเจลดาคัล

1.4.3.2 ศึกษาความเสถียรของเซลล์ตรึงโดยแปรปัจจัยที่มีผลต่อการหมักแบบต่อเนื่อง ได้แก่ ค่า dilution factor อัตราป้อนของอาหาร สูตรอาหารป้อน การกวน และการให้อากาศในระยะสร้างผลิตภัณฑ์

1.4.4 วิเคราะห์ผลการทดลอง สรุปผลงานวิจัย และเขียนวิทยานิพนธ์

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

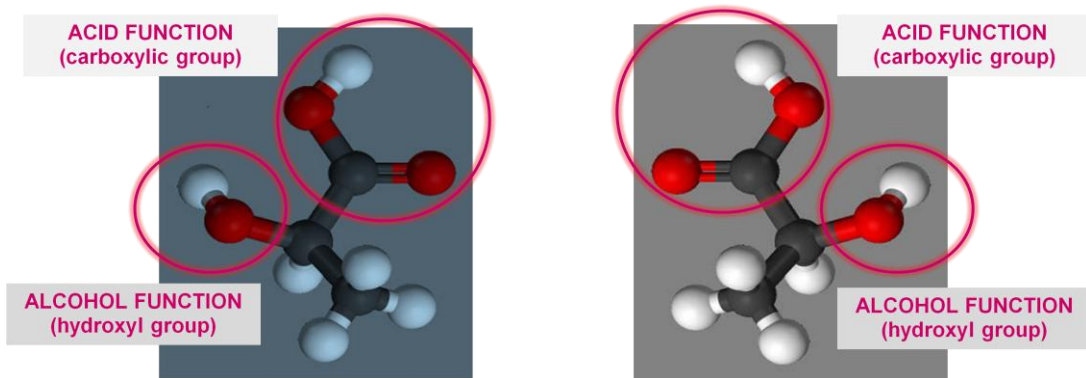
ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่องโดย *R. oryzae* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดแลกติก

กรดแลกติก (Lactic acid) เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง ชื่อทางเคมี คือ 2-hydroxypropanoic acid และมีสูตรทางเคมีคือ $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ โดยกรดแลกติกถูกแบ่งออกเป็น 2 ไอโซเมอร์ คือ กรดแอล(+)-แลกติก และ กรดดี(-)-แลกติก โดยจะแตกต่างกันตรงการจับของหมู่ไฮดรอกซีที่มาเกาะตรงตำแหน่งของไครัลคาร์บอนอะตอม ดังรูป 2.1



กรดดี(-)-แลกติก

กรดแอล(+)-แลกติก

รูปที่ 2.1 โครงสร้างของกรดดี (-) และแอล (+) -แลกติก

จากความแตกต่างของโครงสร้างทางเคมีของกรดแลกติกชนิดแอล (+)-ไอโซเมอร์ และ ชนิดดี (-)-ไอโซเมอร์ ทำให้กรดแลกติกสองไอโซเมอร์นี้มีคุณสมบัติแตกต่างกัน โดยกรดแลกติกชนิดแอล (+)-ไอโซเมอร์ จะมีจุดเดือดเท่ากับ 82-85 องศาเซลเซียส และจุดหลอมเหลว 16.8-33 องศาเซลเซียส ซึ่งจะต่ำกว่ากรดดีแลกติก ที่มีจุดเดือดเท่ากับ 103 องศาเซลเซียส และจุดหลอมเหลว 52.8-53.6 องศาเซลเซียส (Budavari และคณะ, 1989; Honten และคณะ, 1971)

กรดแลกติกที่มีความบริสุทธิ์สูงจะไม่มีสี สามารถละลายในน้ำ เอทานอล อะซีโตน และ อีเทอร์ได้ แต่ไม่ละลายในคลอโรฟอร์ม ปิโตรเลียมอีเทอร์และคาร์บอนไดซัลไฟด์ (Lockwook, 1965) คุณสมบัติต่างๆของกรดแลกติกแสดงในตารางที่ 2.1

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 LD 50:3543 mg/kg
Synonyms	2-hydroxypropanoic acid; 1-hydroxyethanecarboxylic acid; Alpha-hydroxypropionic acid
สมบัติทางกายภาพและทางเคมี (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 การนำกรดแลกติกมาประยุกต์ใช้

กรดแลกติกได้รับการจำแนกโดยองค์การอาหารและยา สหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration, FDA) สำหรับใช้เป็นสารเติมแต่งอาหารและมันถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร และยา โดย 90 เปอร์เซ็นต์ของการผลิตกรดแลกติกทั่วโลกนั้นมาจากกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ ส่วนที่เหลือถูกผลิตขึ้นจากการสังเคราะห์ โดยการเจริญเติบโตทาง

การตลาดกรดแลกติกทั่วโลกเพิ่มขึ้นทุกปี ในปี 2006 มีการผลิตกรดแลกติกประมาณ 68,000 ตันต่อปี และคาดว่าจะมีการเจริญเติบโตอีกระหว่าง 10-15 เปอร์เซ็นต์ต่อปี

2.2.1 ด้านอุตสาหกรรมอาหาร (Food industry)

กรดแลกติกถูกนำมาประยุกต์ใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ผลิตภัณฑ์จำพวกขนมปัง เครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ นม ขนมหวาน และอื่นๆ ซึ่งประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ของกรดแลกติกทั้งหมดที่ผลิตได้ ถูกนำมาใช้ทางด้านนี้ โดยกรดแลกติกถูกใช้ในการเป็นสารเพิ่มความเปรี้ยวในอาหาร (acidulant) และทำหน้าที่เป็นทั้งสารควบคุมค่าพีเอช อีกทั้งช่วยในการถนอมอาหาร เนื่องจากสภาวะความเป็นกรดจะเป็นการป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมอาหารยังมีการใช้กรดแลกติกเป็นสารในการเพิ่มรสชาติ (flavoring agent) อีกด้วย ยกตัวอย่างเช่น

- อาหารจำพวกเนื้อสัตว์ กรดแลกติกถูกใช้ในรูปของโซเดียม หรือ โพแทสเซียมแลกเตส ซึ่งจะช่วยยืดอายุการเก็บรักษา และยังช่วยควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogenic bacteria) นอกจากนี้ยังเป็นตัวเพิ่ม และรักษารสชาติของอาหาร
- ในด้านการทำลูกกวาด (Confectionery) กรดแลกติกนำมาใช้เป็นสารเพิ่มความเปรี้ยวในอุตสาหกรรมลูกกวาด ซึ่งพบว่ากรดแลกติกนั้นเป็นสารเพิ่มความเปรี้ยวที่ดีมากกว่ากรดซิตริก เนื่องจากการเปลี่ยนกลับของน้ำตาลจะเกิดขึ้นได้น้อยกว่า และนอกจากนี้กรดแลกติกยังให้ความเปรี้ยวที่คงทน มีความกลมกล่อม และให้กลิ่นรสมากกว่าอีกด้วย
- มะกอกดอง แดงกวาดอง กะหล่ำปลี จะถูกนำมาแช่ในสารละลายเกลือ โดยกรดแลกติกนั้นจะช่วยในการถนอมอาหาร เพิ่มรสชาติของผักดอง อีกทั้งยังช่วยทำให้น้ำเกลือมีความใสยิ่งขึ้น นอกจากนี้มีรายงานว่า เกลือแคลเซียมแลกเตตนั้นมีการนำมาใช้ในผัก และผลไม้กระป๋องอีกด้วย

2.2.3 อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม (Beverages Industry)

- เครื่องดื่ม กรดแลกติกถูกนำมาใช้เป็นสารเพิ่มความข้นหนืด ช่วยเพิ่มรสชาติที่ดีใน น้ำอัดลม และน้ำผลไม้ โดยที่ยังรสชาติเฉพาะตัวของเครื่องดื่มนั้นๆ มีหลายเหตุผล ในการนำกรดแลกติกมาใช้มากกว่ากรดซิตริก ยกตัวอย่างเช่น การนำกรดแลกติก มาใช้เป็นบัฟเฟอร์ ยังสามารถช่วยพัฒนากลิ่น รส ของเครื่องดื่มให้ดียิ่งขึ้น ยกตัวอย่างการนำไปใช้ เช่น น้ำอัดลม น้ำแร่ น้ำผลไม้ เป็นต้น

2.2.4 อุตสาหกรรมเภสัชกรรม (Pharmaceutical industry)

กรดแลกติกถูกใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตยา และยังเป็นสารที่ช่วยในการปรับค่าพีเอชในยา นอกจากนี้กรดแลกติกสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของยาในการละลายน้ำ โดยถูกใช้เป็นสาร ตัวกลางเพื่อช่วยให้ตัวยาสวมกันได้ดีขึ้น ช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในการเตรียม วิตามิน อนุพันธ์ของกรดแลกติกถูกนำมาใช้ในการรักษาโรค เช่น โรคขาดแคลเซียม ในกระดูกและ ฟัน โรคโลหิตจาง เป็นต้น

2.2.5 อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง (Cosmetic industry)

กรดแลกติกถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง โดยเป็นส่วนผสมของครีมหรือโลชั่น สำหรับทาเพื่อให้ความชุ่มชื้นแก่ผิว และช่วยในการฟื้นฟูสภาพผิว นอกจากนี้ยังถูกใช้ช่วยในการ ปรับค่าพีเอชให้กับเครื่องสำอาง กรดแลกติกยังมีคุณสมบัติใช้เป็นสารช่วยให้ผิวขาวขึ้น โดยมีกลไก การยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส และยังใช้ในการป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ใน เครื่องสำอาง

2.2.6 อุตสาหกรรมพอลิเมอร์ (Polymer industry)

ปัจจุบันกรดแลกติกถูกนำมาใช้เป็น โมนอเมอร์ ในการผลิตพอลิแลกติกแอซิด (Polylactic acid; PLA) เป็นพลาสติกที่สามารถแตกสลายตัวได้ทางชีวภาพ (Biodegradable) และพลาสติก ชีวภาพสลายตัวได้ทางชีวภาพ (Compostable) เพื่อทดแทนพลาสติกที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจาก อุตสาหกรรมปิโตรเคมี PLA อยู่ในกลุ่มของอะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์ โดยมีคุณสมบัติ เป็นเทอร์โมอ

พลาสติก (Thermoplastic) มีความแข็งแรงสูง และเป็นพอลิเมอร์ที่มีค่ามอดูลัสสูง สามารถมีการย่อยสลายอย่างง่าย ด้วยกระบวนการไฮโดรไลซิส ของพันธะเอสเทอร์ โดยอัตราการย่อยสลายนั้นขึ้นกับขนาดและรูปร่างของพลาสติก อัตราส่วนของไอโซเมอร์ และอุณหภูมิในการไฮโดรไลซิส การย่อยสลายของPLA นั้นขึ้นอยู่กับ เวลา อุณหภูมิ น้ำหนักมวล โมเลกุลของสารปนเปื้อน และความเข้มข้นของตัวแคตาไลสต์ ตัวแคตาไลสต์และ โอลิโกเมอร์จะเป็นตัวที่ช่วยลดอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาในการย่อยสลาย อีกทั้งจะช่วยเพิ่มอัตราการย่อยสลายอีกด้วย (Vijayakumar และคณะ, 2008)

พอลิแลคติกแอซิดชนิดพอลิเมอร์เอกพันธ์ (Homopolymer) มีค่าอุณหภูมิเปลี่ยนสภาพแก้ว (glass-transition) และอุณหภูมิการหลอมเหลว เท่ากับ 55 และ 175 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พอลิแลคติกที่มีน้ำหนักมวลโมเลกุลสูงนั้นจะมีคุณสมบัติ คือ มีความใส มันวาว เป็นพอลิเมอร์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ โดยมีคุณสมบัติเหมือนกับพอลิสตีลีน

PLA ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ได้แก่ วัสดุก่อสร้าง เช่น ฉนวนกันความร้อน ผนังกัน วัสดุทางการแพทย์ และการประมง เช่น ฟิล์มคลุมพีช เชือกอวน และแห นอกจากนี้ยังถูกนำมาใช้เป็นบรรจุภัณฑ์อาหาร เช่น ถาดอาหาร หรือฟิล์มห่ออาหาร นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้ในการผลิตอุปกรณ์ทางการแพทย์ เช่น วัสดุซ่อมแซมกระดูกชิ้นเล็กๆ วัสดุเย็บแผล เนื่องจากพลาสติกชีวภาพสามารถย่อยสลายได้ง่าย

Cargill Dow LLC, บริษัท ผู้ผลิตพอลิแลคติกแอซิดหลักของสหรัฐอเมริกา รายงานว่า PLA ของตลาดโลกอาจจะขยายไปยัง 5,000,000 ตันต่อปีภายในปี 2010 ซึ่งความต้องการของตลาดที่มากขึ้น จึงเป็นเหตุผลที่จะต้องพัฒนากระบวนการผลิตให้รองรับกับความต้องการ

2.2.7 ด้านอื่นๆ

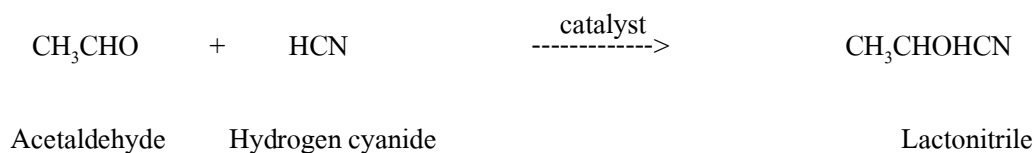
ใช้ในการผลิตคัทหมึก แลกเกอร์ ใช้ในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด และสารฆ่าเชื้อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ เป็นต้น

2.3 การผลิตกรดแลกติก

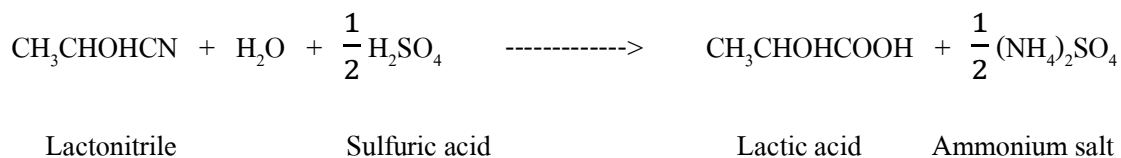
2.3.1 กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี

ในอุตสาหกรรม กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีโดยส่วนใหญ่ นั้น จะทำการสังเคราะห์จาก Lactonitrile โดยนำ HCN มาทำปฏิกิริยากับ Acetaldehyde ได้ผลิตภัณฑ์เป็น Lactonitrile ตามขั้นตอนที่ 1 หลังจากนั้น นำ Lactonitrile มาผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิส โดยใช้กรดซัลฟิวริก หรือ กรดไฮโดรคลอริก ได้เป็นกรดแลกติกและเกลือแอมโมเนียม ตามขั้นตอนที่ 2

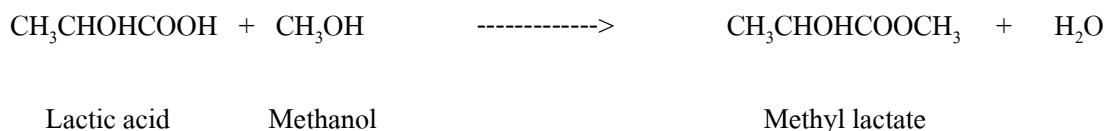
ขั้นตอนที่ 1 :



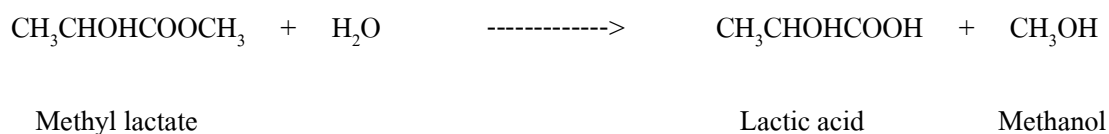
ขั้นตอนที่ 2 :



ขั้นตอนที่ 3 :



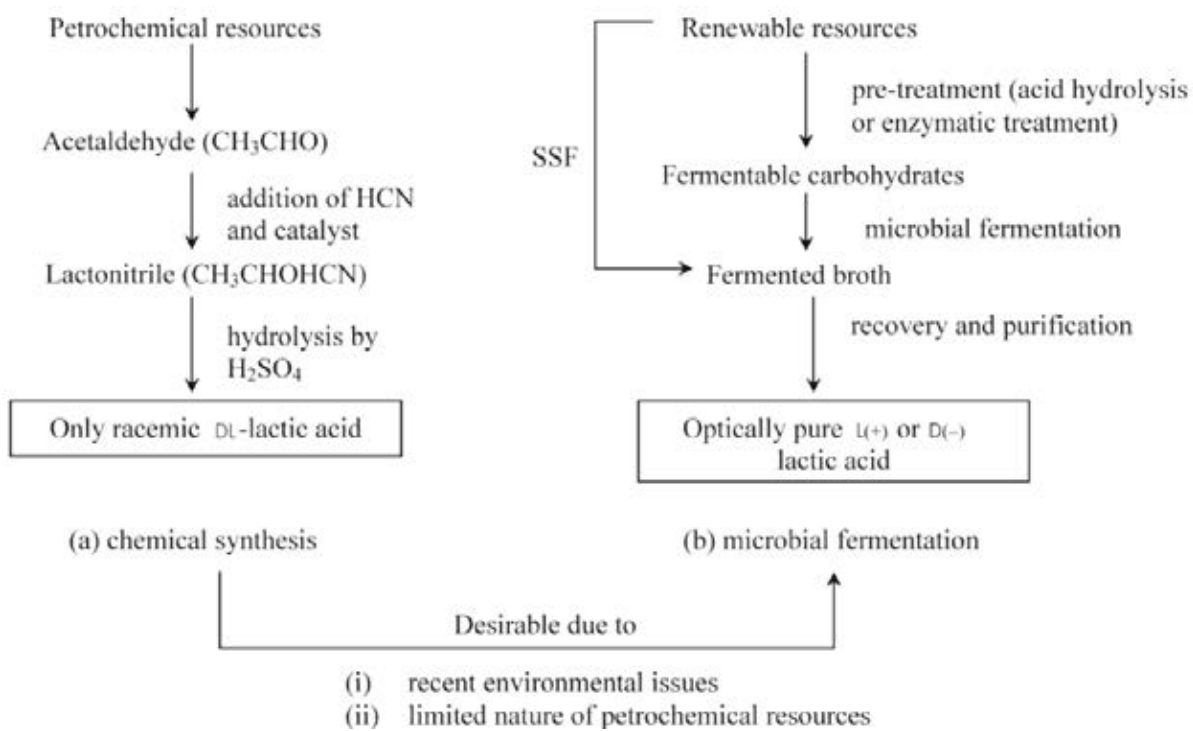
ขั้นตอนที่ 4 :



ที่มา : Narayanan และคณะ (2004)

หลังจากนั้นกรดแลกติกที่ได้จะนำมาผ่านปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน (Esterification) ด้วยเมทานอล ได้เป็นเมทิลแลกเตตตามขั้นตอนที่ 3 จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่น และผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้เป็นกรดแลกติก และเมทานอลตามขั้นตอนที่ 4 นอกจากนี้กรดแลกติกสามารถที่จะสังเคราะห์ทางเคมีได้ด้วยกระบวนการอื่นๆ เช่น การสังเคราะห์โดยใช้ Propene เป็นสารตั้งต้น (Vaidya และคณะ, 2005) ปฏิกิริยาออกซิเดชันของ Propylene glycol ปฏิกิริยาระหว่าง Acetaldehyde กับคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำภายใต้อุณหภูมิและความดัน ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ Chloropropionic acid และปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำตาลด้วยเบส (Varadarajan และ Miller, 1999) เป็นต้น

แต่อย่างไรก็ตามการสังเคราะห์ทางเคมีนั้นก็ยังมีข้อเสีย ได้แก่ การสังเคราะห์ทางเคมีนั้นจะใช้สถานะรุนแรงในการทำปฏิกิริยา นอกจากนี้วัตถุดิบที่ใช้ยังเป็นสารเคมีที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ซึ่งปัจจุบันพบว่ามีราคาสูงขึ้นเรื่อยๆ และไม่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งกรดแลกติกที่สังเคราะห์ได้ยังอยู่ในรูปของไอโซเมอร์ผสม ขณะที่กรดแลกติกที่สามารถนำมาใช้ในอาหารและเภสัชกรรมนั้น ต้องเป็นกรดแลกติกชนิดแอล เนื่องจากกรดแลกติกชนิดดี นั้นไม่สามารถเมแทบอลิซึมได้ในร่างกายมนุษย์ เพราะในร่างกายมนุษย์นั้นไม่มีเอนไซม์ ดีแลกเตทดีไฮโดรจีเนส จึงเป็นสาเหตุให้ปริมาณกรดแลกติกในเลือดนั้นมีปริมาณสูง และเกิดภาวะที่เป็นกรดสูง (Hyper-acidity) และนอกจากนี้การนำกรดแลกติกไอโซเมอร์ผสมไม่เหมาะที่จะใช้ในการสังเคราะห์พอลิแลกติกแอซิด เพราะพลาสติกที่ผลิตได้นั้นจะมีเสถียรภาพต่ำ เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกโดยการสังเคราะห์ทางเคมี และกระบวนการหมัก แสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (a) และกระบวนการหมัก (b)

ที่มา : Vijayakumar และคณะ, 2008

2.3.2 กระบวนการหมัก

2.3.2.1 กระบวนการหมักโดยแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลกติก ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (Homofermentative) คือ จะผลิตกรดแลกติกเพียงอย่างเดียวเท่านั้น โดยแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Lactobacillus* sp. และ *Lactococcus* sp. เป็นต้น กลุ่มที่ 2 คือ กลุ่มเฮเทอโรโรเฟอร์เมนเททีฟ (Heterofermentative) คือ นอกจากจะมีการผลิตกรดแลกติกแล้ว แบคทีเรียในกลุ่มนี้ยังสามารถผลิตผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ (Hofvendahl และ Hahn-Hagerdal, 2000) แสดงผังรูปที่ 2.3 และตารางที่ 2.2 แสดงแบคทีเรียในกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ และ เฮเทอโรโรเฟอร์เมนเททีฟ ของแบคทีเรียแลกติก และชนิดไอโซเมอร์ของกรดแลกติกที่ผลิตได้

ตารางที่ 2.2 แสดงแบคทีเรียแลคติกในกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ และ เฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ และ ชนิดไอโซเมอร์ของกรดแลคติก

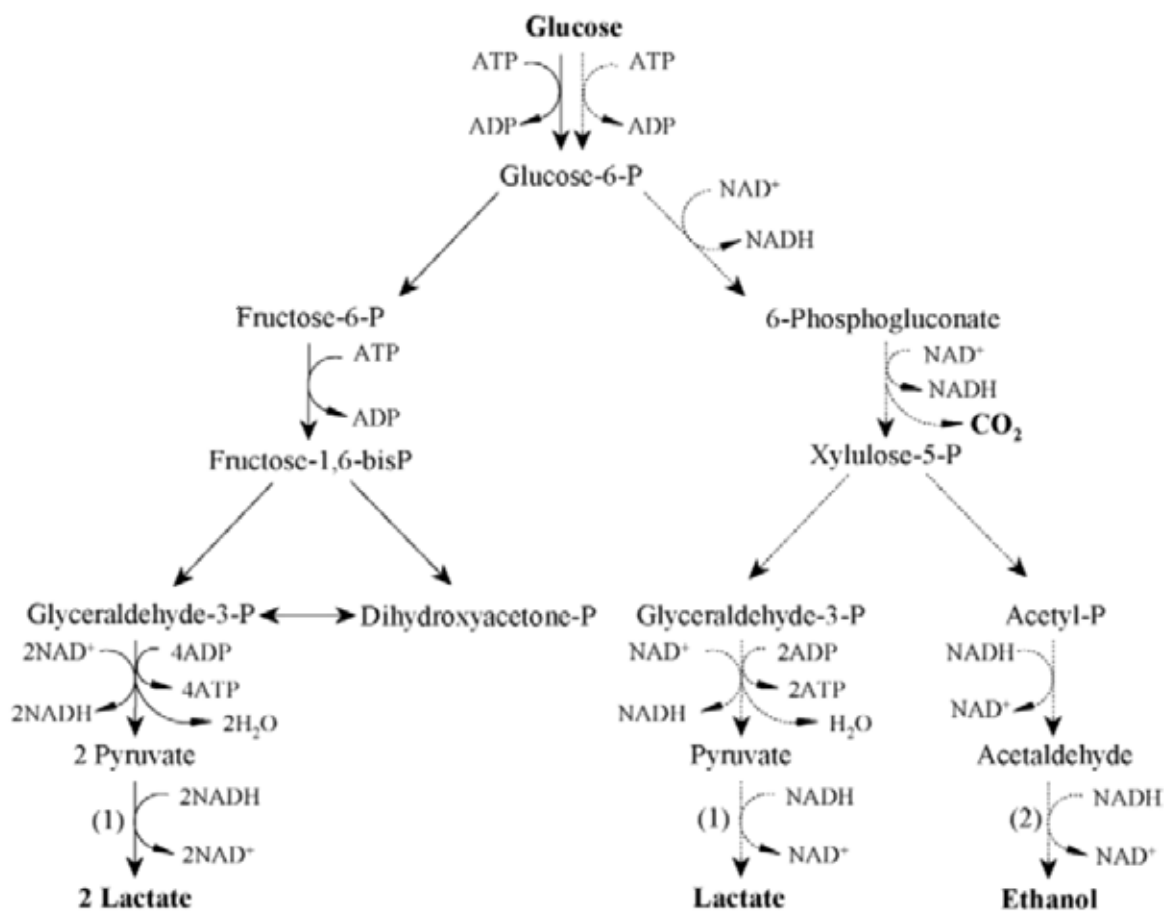
Genera and species	Homofermentative	Heterofermentative	Configuration of lactic acid
<i>Lactobacillus</i>			
<i>L. delbrueckii</i>	+	-	D(-)
<i>L. lactis</i>	+	-	D(-)
<i>L. bulgaricus</i>	+	-	D(-)
<i>L. casei</i>	+	-	L(+)
<i>L. plantarum</i>	+	-	DL
<i>L. curvatus</i>	+	-	DL
<i>L. brevis</i>	-	+	DL
<i>Sporolactobacillus</i>			
<i>S. inulinus</i>	+	-	D(-)
<i>Streptococcus</i>			
<i>S. faecalis</i>	+	-	L(+)
<i>S. cremoris</i>	+	-	L(+)
<i>S. lactis</i>	+	-	L(+)
<i>Leuconostoc</i>			
<i>L. mesenteroides</i>	-	+	D(+)
<i>L. dextranicum</i>	-	+	D(+)
<i>Pediococcus</i>			
<i>P. damnosus</i>	+	-	DL
<i>Bifidobacterium</i>			
<i>B. bifidum</i>	-	+	L(+)

ที่มา : Vijayakumar และคณะ, 2008

แบคทีเรียในกลุ่มของโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ จะใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และเข้าสู่วิถี Emden-Meyerhof pathway (EMP) โดยการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นไพรูเวท จากนั้นจึงเปลี่ยนไพรูเวท

เป็นกรดแลกติก โดยกลูโคส 1 โมเลกุลนั้น สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 2 โมเลกุล ในงานวิจัยของ Michelson และคณะ (2006) พบว่า *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 และ *Lactobacillus delbrueckii* spp. *Lactis* DSM 20073 สามารถผลิตกรดแลกติก โดยให้อัตราการผลิตกรดแลกติกสูงถึง 9.9 และ 5.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ในการผลิตกรดแลกติกแบบไม่ต่อเนื่อง โดยใช้สารอาหารที่ประกอบด้วย กลูโคส 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 ซึ่งพบว่าแบคทีเรียกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ สามารถเจริญเติบโตได้ในระยะเวลาอันสั้น และผลิตกรดแลกติกได้สูง (Thomas และคณะ, 1979) โดยงานวิจัยดังกล่าวได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hujanen และคณะ (2001) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติก แบบไม่ต่อเนื่อง โดย *Lactobacillus casei* NRRL B-441 พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 118.6 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้นกลูโคส 160 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้ความเข้มข้นกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร พบว่า อัตราการผลิตกรดแลกติกอยู่ที่ 4.4 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ที่ชั่วโมงที่ 15 ของกระบวนการผลิต

แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความต้องการวิตามิน และกรดอะมิโนหลายชนิดในการเจริญ อีกทั้งไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจำพวกแป้ง และเซลลูโลสได้เนื่องจากไม่มีเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย ส่งผลให้ต้องมีการเพิ่มขึ้นตอนในการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ หรือ กรดก่อนนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมัก ซึ่งจะเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิตให้สูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่ากรดแลกติกที่ได้จากแบคทีเรียในในกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟนั้นจะอยู่ในรูปของไอโซเมอร์ผสม หรือ กรดแอล (+) และ ดี (-) แลกติก ทำให้เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมักจึงต้องทำการแยกไอโซเมอร์ผสมของกรดแลกติก ออกจากกันก่อนที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ ต่อไป



รูปที่ 2.3 เมแทบอลิซึมการผลิตกรดแลกติกแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (เส้นทึบ) และเฮเทอโรโรเฟอร์เมนเททีฟ (เส้นประ) จากแลกติกแอซิดแบคทีเรีย

ที่มา : Wee และคณะ, 2006

หมายเหตุ P = phosphate, ADP = adenosine 5'-diphosphate, ATP = adenosine 5'-triphosphate,

NAD^+ = nicotinamide adenine, NADH = nicotinamide adenine dinucleotide,

(1) = lactate dehydrogenase, (2) = alcohol dehydrogenase

ตารางที่ 2.3 การผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรียแลกติก

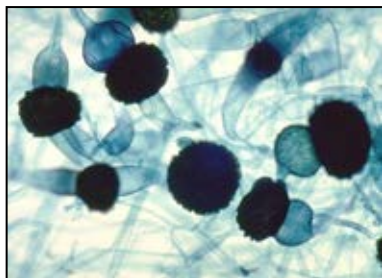
Microorganism	Lactic acid concentration	Yield	Productivity	Reference
	(g/L)	(g/g)	(g/L/h)	
<i>Enterococcus faecalis</i>	95.7	0.94	4.0	Wee et.al, 2004
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> NC1MB 8130	90.0	0.97	3.8	Kutzanmanidis et.al, 2002
<i>Lactobacillus paracasei</i>	88-106	0.91-0.95	3.31-3.67	Richter et.al, 1994
<i>Lactobacillus lactis</i>	109	0.93	1.09	Hofvendahl et.al, 1997
<i>Enterococcus faecalis</i> RKY1	102	0.97	4.87	Oh et.al, 2005
<i>L. plantarum</i> ATCC 21028	41.0	0.97	1.0	Fu et.al, 1999
<i>L. casei</i> NRRL B-441	82.0	0.91	5.6	Hujanen et.al, 1996
<i>L. bulgaricus</i> NRRL B-548	38.7	0.90	3.5	Burgos-Rubio et.al, 2000
<i>L. helveticus</i> ATTC 15009	65.5	0.66	2.7	Schepers et.al, 2002
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 10863	67.0	0.84	2.5	Berry et.al, 1999
<i>L. amylovorus</i> ATCC 33622	93.0	0.52	2.0	Javanainen et.al, 1995
<i>S. thermophilus</i>	18.0	0.50	5.9	Audet et.al, 1988

ที่มา : คัดแปลงจาก Vijayakumar และคณะ, 2008

2.3.2.2 กระบวนการหมักโดยรา

ราที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้นั้น เป็นราในجنัส *Rhizopus*, *Mucor* และ *Monilia* เช่น *Rhizopus arrhizus*, *R. chinensis*, *R. delmar*, *R. elegans*, *R. japonicas*, *R. oryzae* และ *R. stolonifer* เป็นต้น โดยในอุตสาหกรรมการผลิตกรดแลกติกนั้นนิยมใช้ *R. oryzae* การนำ *R. oryzae* มาใช้ในการผลิตกรดแลกติกนั้น เนื่องจากสามารถผลิตกรดแลกติกบริสุทธิ์จากแป้ง น้ำตาล รวมทั้งวัตถุดิบทางการเกษตรที่เหลือใช้ ที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อราสามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลส ที่สามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลได้ (Wee และคณะ, 2006) ในสภาพที่มีอากาศ โดยสามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ เช่น กลีโอะแอมโมเนีย หรือ ไนเตรต และนอกจากนี้พบว่าราสามารถที่จะเจริญเติบโตได้โดยไม่ต้องมีวิตามิน หรือ กรดอะมิโนเสริมในกระบวนการหมักเหมือนแบคทีเรีย จึงทำให้กระบวนการหมักด้วย *R. oryzae* นั้นมีต้นทุนการผลิตทั้งด้านวัตถุดิบ และกระบวนการแยกบริสุทธิ์ หลังกระบวนการหมักต่ำกว่าการหมักด้วยแบคทีเรีย นอกจากนี้กระบวนการผลิตกรดแลกติกจากราสามารถผลิตที่อุณหภูมิสูง และพีเอชต่ำ จึงช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ รวมถึงการหมักกรดแลกติกแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเททิฟ การหมักกรดแลกติกจากรา โดยการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้น ในสภาพที่มีอากาศ จะมีการผลิตกรดแลกติก 1.5 โมลต่อโมลของกลูโคส เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักกรดแลกติกโดย *Lactobacillus* sp. กับ *R. oryzae* ในตารางที่ 2.4

R. oryzae ถูกจัดอยู่ใน Order Mucorales, Family Mucoraceae เป็นราเส้นใย โดยสายใยนั้นไม่มีผนังกัน มีอับสปอร์ลักษณะกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4-11 ไมโครเมตร ลักษณะกลม รูปไข่ (Ellis, 1997) แสดงดังรูป 2.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตที่ 35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญเติบโตได้ คือ 5-7 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญเติบโตได้คือ 44-49 องศาเซลเซียส



รูปที่ 2.4 ลักษณะของรา *Rhizopus oryzae*

ตารางที่ 2.4 เปรียบเทียบกระบวนการผลิตกรดแลกติกระหว่าง *Lactobacillus sp.* และ *Rhizopus oryzae*

	<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
Substrates medium	can't use starch and pentoses require complex growth nutrients	can 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., fumarate, ethanol, 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 fermentation cell morphology

ที่มา : Thongchul, 2005

งานวิจัยของ Mirdamadi และคณะ, 2002 ทำการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติก
ระหว่างแบคทีเรีย และเชื้อรา (ตารางที่ 2.5) พบว่า สายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูง คือ
Rhizopus oryzae PTCC 5263, *Lactobacillus plantarum* PTCC 1058 และ *Lactobacillus bulgaricus*
PTCC 1332 สายพันธุ์ *Lactobacillus sp.* โดยจะผลิตกรดแลกติกไอโซเมอร์ผสม ซึ่งมีกรดแลกติกอยู่

ประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ *R. oryzae* PTCC 5263 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 160 กรัมต่อลิตร $Y_{P/S}$ เท่ากับ 84 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการผลิตกรดแลกติก 4.10 กรัมต่อลิตรชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับ *L. plantarum* PTCC 1058 ซึ่งสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 27 กรัมต่อลิตร $Y_{P/S}$ เท่ากับ 15 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.56 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ *L. bulgaricus* PTCC 1332 ผลิตกรดแลกติกได้ 30 กรัมต่อลิตร $Y_{P/S}$ เท่ากับ 16.67 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.62 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 180 กรัมต่อลิตร ทำการหมักแบบขวดเขย่าแบบไม่ต่อเนื่อง

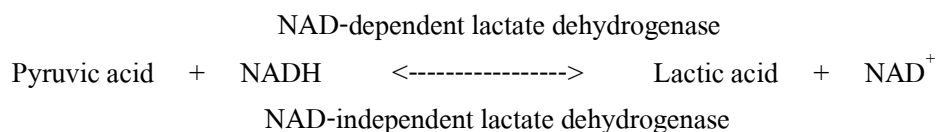
ตารางที่ 2.5 เปรียบเทียบผลการผลิตกรดแลกติกระหว่าง *Lactobacillus* sp. และ *R. oryzae*

Glucose concentration (g/L)	<i>R. oryzae</i> ATCC 5263			<i>L. bulgaricus</i> ATCC 1332			<i>L. plantarum</i> ATCC 1058		
	Production	Productivity	Yield	Production	Productivity	Yield	Production	Productivity	Yield
	(g/L)	(g/L/h)	(%)	(g/L)	(g/L/h)	(%)	(g/L)	(g/L/h)	(%)
40	33	1.37	83.3	35.8	1.50	89.55	38.10	1.60	95.67
60	49	2.00	81.0	51.8	2.20	86.34	55.90	2.33	93.24
80	64	2.60	80.0	76.6	2.10	95.83	77.80	2.40	97.31
100	80	3.30	80.0	89.6	2.00	89.68	89.10	2.80	89.19
120	106	3.40	85.0	76.6	1.60	63.39	100.00	2.10	83.33
140	116	3.80	82.0	63.6	1.33	45.46	66.60	1.40	47.57
160	133	4.00	83.0	50.0	1.00	31.25	42.00	0.87	26.25
180	160	4.10	84.0	30.0	0.62	16.67	27.00	0.56	15.00
200	85	3.50	42.0	17.0	0.35	11.76	15.00	0.31	7.50

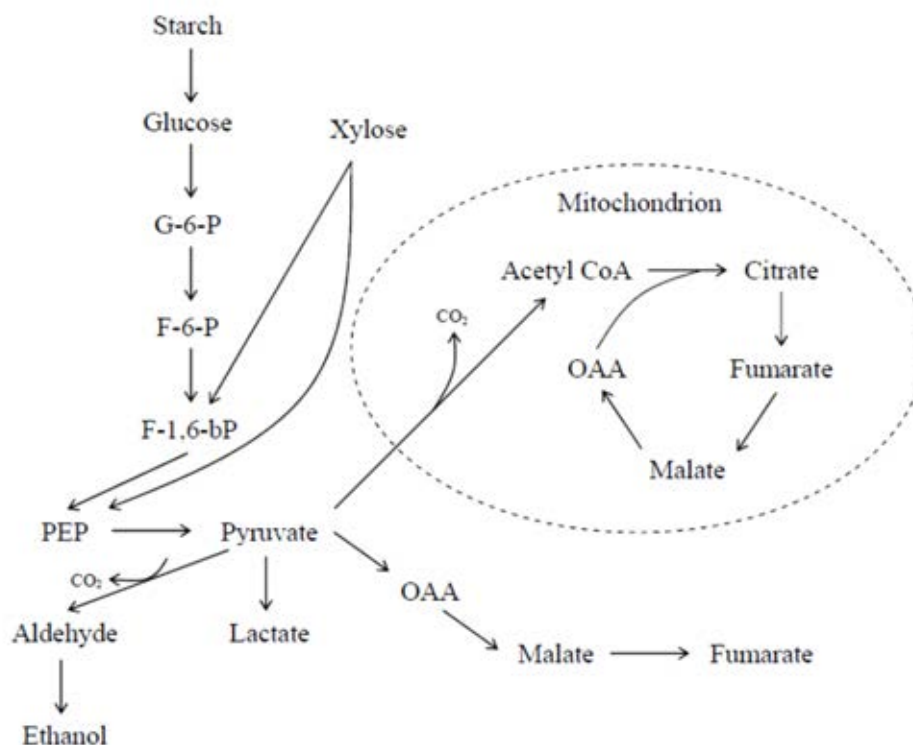
ที่มา : Mirdamadi และคณะ, 2002

2.4 วิถีเมแทบอลิซึมของ *Rhizopus oryzae*

จากงานวิจัยของ Wright และคณะ (1996) ได้ทำการศึกษาแบบจำลองวิถีเมแทบอลิซึมของ กลูโคส และได้พัฒนาแบบจำลองของ *R. oryzae* จากทฤษฎีควบคุมวิถีเมแทบอลิซึมภายใต้สภาวะ คงที่ โดยทำการติดตาม(¹⁴C)-กลูโคสในวิถีไกลโคไลซิส และวัฏจักร TCA ดังรูปที่ 2.5 พบว่า *R. oryzae* สามารถใช้แป้งเป็นสารตั้งต้นได้โดยตรง เนื่องจาก *R. oryzae* สามารถที่จะสร้างเอนไซม์อะไมเลสมาย่อยโมเลกุลของแป้งได้ โดยเอนไซม์จะเปลี่ยนแป้งเป็นกลูโคส และเปลี่ยนกลูโคสเป็น ไพรูเวท ตามลำดับ โดยวิถี Emden-Meyerhof pathway (EMP) นอกจากนี้ยังพบว่า ราชังสามารถใช้ไซโลสเป็นสารตั้งต้นได้ โดยเปลี่ยนไซโลสเป็นไพรูเวท โดยวิถีเพนโตสฟอสเฟต (HMP) ในสภาวะ ที่มีกลูโคส และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อสูง เราสามารถเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็น แลกเตทด้วย NAD-dependent lactate dehydrogenase (Pritchard, 1973) โดยมี NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน ขณะเดียวกันถ้าในภาวะที่มีปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อหมด หรือ เมื่อเรามีการสร้างสปอร์เกิดขึ้น ค่าแอกติวิตีของแลกเตทดีไฮโดรจีเนสจะลดลง และจะเกิดการเปลี่ยนแลกเตทกลับมาเป็นไพรูเวทได้ด้วยเอนไซม์ NAD-independent lactate dehydrogenase ดังสมการ



นอกจากนี้ไพรูเวทที่เกิดขึ้นนั้นยังถูกนำเข้าสู่วัฏจักร TCA ในไมโทคอนเดรียเพื่อสร้าง เซลล์ และพลังงาน หรือเปลี่ยนเป็นกรดฟูมาริก ในภาวะที่ถูกจำกัดด้วยอากาศ เชื้อราจะทำการเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นเอทานอลด้วยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ดังนั้นการผลิตกรดแลกติกในกระบวนการหมักด้วยเชือรานั้น นอกจากได้กรดแลกติกแล้วยังอาจได้ผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น เอทานอล กรดฟูมาริก และคาร์บอนไดออกไซด์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมในการหมัก เพราะฉะนั้นการรักษาระดับออกซิเจนที่ละลายในระบบนั้นมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อกระบวนการผลิตกรดแลกติก (Bai และคณะ, 2003)



รูปที่ 2.5 กระบวนการเมแทบอลิซึมของกลูโคสใน *R.oryzae*

ที่มา : Thongchul, 2005

2.5 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตกรดแลกติก

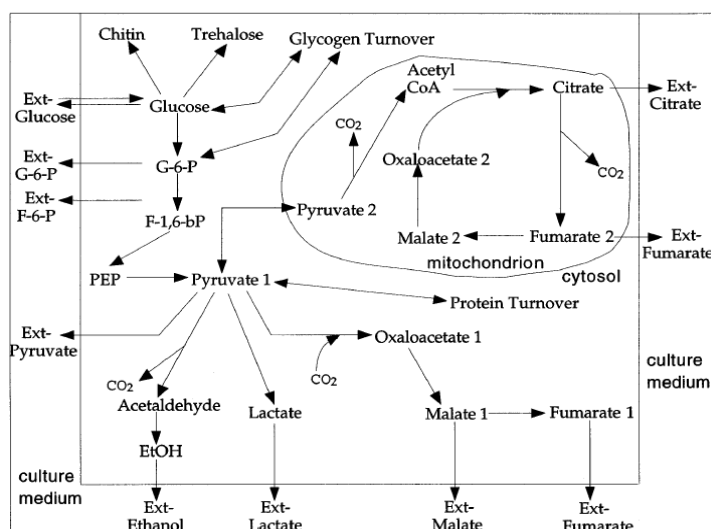
2.5.1 สารอาหาร

สารอาหารเป็นสิ่งจำเป็นต่อการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก เพราะถือเป็นแหล่งสำคัญที่ส่งเสริมให้จุลินทรีย์ได้มีการเจริญเติบโต และสร้างผลิตภัณฑ์ สารอาหารที่เหมาะสมที่สุดในกระบวนการหมักแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันไปขึ้นลักษณะเฉพาะของกระบวนการหมัก แต่โดยทั่วไปสารอาหารสำคัญมีส่วนประกอบดังนี้ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และเกลืออนินทรีย์ เป็นต้น เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต และสร้างผลิตภัณฑ์ โดยความเข้มข้นของ สารอาหารนั้น ขึ้นกับเชื้อจุลินทรีย์ และกระบวนการที่ใช้ในการหมัก

2.5.1.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอน จัดเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์ และสร้างพลังงาน ซึ่งโดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอน ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ในการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอนประมาณ 50-55 เปอร์เซ็นต์ ในการสังเคราะห์เซลล์ (สนใจ ศิริ โภค, 2537)

กลูโคส (Glucose) หรือ D-glucose, Dextrose เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ที่มีสูตรทั่วไปทางเคมี $C_6H_{12}O_6$ เนื่องจากกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ดังนั้นจุลินทรีย์จึงสามารถที่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้โดยตรง โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการย่อยก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก โดยกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวทด้วยวิถี Emden-Meyerhof pathway (EMP) จากนั้นจึงถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลกติก และ ผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น เอทานอล ฟิวเมริก เป็นต้น ดังแผนภาพที่ 2.6



รูปที่ 2.6 แสดงกระบวนการทางเมตาบอลิซึมของกลูโคสใน *R. oryzae*

ที่มา : Longacre et.al, 1996

Bulut และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูโคสที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกโดย *R. oryzae* โดยได้ทำการศึกษาความเข้มข้นกลูโคสตั้งแต่ 25-250 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นกรดแลกติกมีการผลิตเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นกลูโคสเพิ่มขึ้นจนกระทั่งที่ความเข้มข้นกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร ในทางตรงกันข้ามพบว่าความเข้มข้นกรดแลกติกลดลง เมื่อความเข้มข้นกลูโคสมากกว่า 150 กรัมต่อลิตร เนื่องจากในสภาวะที่ความเข้มข้นกลูโคสภายในระบบสูงนั้น จะมีผลในการยับยั้งการสร้างกรดแลกติก โดยสภาวะความเข้มข้น

กลูโคสที่เหมาะสมที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดนั้นคือ ที่ความเข้มข้นกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 60 กรัมต่อลิตร

Yang และคณะ (1995) เปรียบเทียบการใช้กลูโคส และไซโลส เป็นแหล่งคาร์บอน ในการผลิตกรดแลกติกจาก *R. oryzae* ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าไซโลสสามารถที่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลกติกได้ แต่อย่างไรก็ตามอัตราการผลิตกรดแลกติกที่เกิดขึ้นยังช้ากว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยพบว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนค่า $Y_{p/S}$ เท่ากับ 78 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เมื่อใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนค่า $Y_{p/S}$ เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์

Zhang และคณะ (2007) ได้รายงานว่าการผลิตกรดแลกติกโดย *R. oryzae* สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากวัตถุดิบทางการเกษตรได้ เช่น มันฝรั่ง กากมันสำปะหลัง ชังข้าวโพด เป็นต้น ซึ่งการใช้วัตถุดิบทางการเกษตรที่เหลือใช้จะช่วยประหยัดต้นทุนการผลิต อีกทั้งยังช่วยลดปริมาณขยะทางการเกษตรลงอีกด้วย

Bulet และคณะ (2004) ได้ทำการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนจากวัตถุดิบทางการเกษตร 3 แหล่ง ในการผลิตกรดแลกติกโดย *R. oryzae* ได้แก่ กากน้ำตาลจากหัวบีท แครอบพอด และรำข้าวสาลี โดยผลการทดลองพบว่า กากน้ำตาลจากหัวบีท สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 37 กรัมต่อลิตร และเมื่อนำมาผ่านการพาสเจอร์ไรเซชัน สามารถผลิตได้สูงขึ้นเป็น 40 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อทำการเติมแหล่งไนโตรเจน คือ สารสกัดจากยีสต์ลงไป จะทำให้เพิ่มความสามารถในการผลิตกรดแลกติก ให้สามารถผลิตได้สูงสุดถึง 49 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้แครอบพอด ซึ่งเป็นพืชท้องถิ่นหลังทำการสกัด พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 58 กรัมต่อลิตร ขณะที่เมื่อใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตกรดแลกติกสูงสุดได้เพียงแค่ 6 กรัมต่อลิตร เท่านั้น

Oda และคณะ (2002) จากการศึกษาพบว่า *R. oryzae* จำนวน 38 สายพันธุ์ สามารถที่จะเจริญได้เมื่อใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน แต่อย่างไรก็ตามยังมีการผลิตกรดฟูมาริก และเอทานอลออกมารวมด้วย โดยพบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด (10 มิลลิกรัมต่อกรัม fresh matter) ในการหมักกากมันสำปะหลัง ระยะเวลา 6 วัน จากเชื้อ *R. oryzae* IFO 4707 ซึ่งพบว่าสายพันธุ์ IFO 4707 สามารถที่จะลดความแข็งแรง และพีเอชของกากมันสำปะหลัง ได้อย่างรวดเร็วภายใน 1 วัน และค่อยๆเริ่มมีการผลิตกรดแลกติกเกิดขึ้น

2.5.1.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจน เป็นแหล่งอาหารที่จำเป็นในการสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เซลล์จุลินทรีย์มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณ 8-10 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง โดยจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความต้องการไนโตรเจนแตกต่างกันไป แหล่งไนโตรเจนที่จำเป็นในการสังเคราะห์กรดอะมิโน ได้แก่ คาร์โบไฮเดรตบางชนิด เพียวรีน ไพริมิดีน และ โคลแฟกเตอร์ของเอนไซม์บางชนิด ที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อรา แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ อาจใช้ในรูปกรดอะมิโน โปรตีน หรือยูเรีย โดยทั่วไปพบว่าจุลินทรีย์สามารถที่จะเจริญในอาหารที่มีไนโตรเจนอินทรีย์ได้เร็วกว่าอาหารที่มีไนโตรเจนอนินทรีย์ นอกจากนี้ยังมีการนำเอาวัตถุคิบทางเกษตรที่นิยมนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอุตสาหกรรมการหมัก เช่น น้ำแช่ข้าวโพด ถั่วเหลือง เป็นต้น

Yang และคณะ (1995) รายงานว่า *R. oryzae* สามารถที่จะผลิตกรดแลกติกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจนได้ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราการผลิตกรดแลกติกจะลดลง ขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของยูเรีย ยูเรียจะมีผลต่ออัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาณ โดยจะเพิ่มทั้งความหนาแน่นของเซลล์ และอัตราการผลิตกรดแลกติกจำเพาะ นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นของยูเรียต่อการผลิตกรดแลกติก โดยได้ทำการศึกษาความเข้มข้นที่ 0, 1 และ 2 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นยูเรียเริ่มต้น 1 กรัมต่อลิตรนั้น สามารถให้ค่าอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาณสูงสุดที่ 3.5 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากยูเรีย สามารถให้ค่าอัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาณเพียงแค่ว่า 1.2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อพิจารณาความหนาแน่นของเซลล์ ที่ความเข้มข้นยูเรีย 1 กรัมต่อลิตร มีความหนาแน่นของเซลล์ 2-2.9 กรัมต่อลิตร ขณะที่ความเข้มข้นยูเรีย 2 กรัมต่อลิตร มีความหนาแน่นเซลล์ 3.3 กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาค่าอัตราการผลิตกรดแลกติกจำเพาะ พบว่าที่ความเข้มข้นยูเรีย 1 กรัมต่อลิตร (1.2 กรัมต่อชั่วโมงต่อกรัม ของน้ำหนักเซลล์) ให้ค่าสูงสุดรองลงมาคือ 2 (1.07 กรัมต่อชั่วโมงต่อกรัม ของน้ำหนักเซลล์) และ 0 กรัมต่อลิตร (0.62 กรัมต่อชั่วโมงต่อกรัม ของน้ำหนักเซลล์) ตามลำดับ

Yu และคณะ (2007) ศึกษาผลของแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อสัณฐานวิทยาของ *R. oryzae* ในกระบวนการหมักที่อาหารเลี้ยงเชื้อปราศจากแอมโมเนียม-

ไนโตรเจน สันฐานวิทยาของเชื้อราจะอยู่ในรูปแบบ clump ขณะที่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการเติมแอมโมเนียม-ไนโตรเจน พบว่าสันฐานวิทยาของเชื้อราจะอยู่ในรูปแบบ cotton-like floe โดยการเติมแอมโมเนียม-ไนโตรเจนลงไปในการอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นจะช่วยป้องกันการรวมกลุ่มกันของเส้นใยเนื่องจากผนังเซลล์ของราประกอบด้วยไคโตซานในปริมาณสูง ดังนั้นสารอาหารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบจะช่วยส่งเสริมการสังเคราะห์ไคโตซาน ทำให้เส้นใยมีการแผ่ขยายยืดยาว และแข็งแรง ขณะที่ในสภาวะที่คลาดแคลนไนโตรเจนจะชะลอการสังเคราะห์ไคโตซาน ส่งผลทำให้เส้นใยเกิดการเปลี่ยนแปลงเกิดสันฐานวิทยาในรูปแบบ clump และทำให้การผลิตกรดแลกติกอยู่ในปริมาณต่ำ (Borgia และคณะ, 1996; Pochanovanich และ Suntornsuk, 2002; Yu และคณะ, 2007)

2.5.1.3 เกลืออนินทรีย์

เกลืออนินทรีย์ถูกนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานในการผลิตกรดแลกติก โดยส่วนใหญ่ที่ใช้ได้แก่ KH_2PO_4 , MgSO_4 , ZnSO_4 และ $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ เป็นต้น ซึ่งโดยทั่วไปมักจะใช้ KH_2PO_4 ที่ความเข้มข้น 0.15-0.6 กรัมต่อลิตร $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้น 0.15-0.75 กรัมต่อลิตร $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ความเข้มข้น 0.04-0.09 กรัมต่อลิตร และ $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ ถูกใช้ในปริมาณต่ำเพียง 0.01 กรัมต่อลิตร ก็สามารถที่จะผลิตกรดแลกติกโดย *Rhizopus* spp. (Martak และคณะ, 2003; Woiciechowski และคณะ, 1999) จากงานวิจัยของ Zhou และคณะ (1999) พบว่าไม่จำเป็นต้องเติม Fe^{2+} ในการผลิตกรดแลกติกโดยใช้ *R. oryzae* เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ KH_2PO_4 โดยเริ่มต้นจาก 0.2 เป็น 1.6 กรัมต่อลิตร ไม่มีผลต่อผลผลิตกรดแลกติกและน้ำหนักเซลล์ Wang และคณะ (2005) รายงานว่า การเพิ่มความเข้มข้นของ KH_2PO_4 จาก 0.1 เป็น 0.6 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้กรดแลกติกลดลงจาก 85 เป็น 71 กรัมต่อลิตร และปริมาณกรดฟูมาริกลดลงจาก 1.36 เป็น 0.81 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าปริมาณของ KH_2PO_4 มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก นอกจากนี้ยังพบว่า *R. oryzae* ยังต้องการฟอสเฟตในช่วงของการเจริญ Yu และคณะ (2007) รายงานว่าระดับฟอสเฟตใน minimal medium ถูกใช้ในการผลิตกรดแลกติก และขณะเดียวกันก็เป็นส่วนสำคัญในการเจริญเติบโตของเซลล์ จากการศึกษาผลของฟอสเฟตต่อการผลิตกรดแลกติกโดย *R. oryzae* โดยได้ทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ที่ 0.2, 0.3 หรือ 0.4 กรัมต่อลิตร ที่พีเอชประมาณ 4.5 ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่าอัตราการผลิตกรดแลกติกที่ได้

เท่ากับ 2.12, 2.73 และ 2.73 กรัมต่อข้าวโม่ ตามลำดับ เพราะฉะนั้นที่ความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตรของ KH_2PO_4 เป็นปริมาณที่เหมาะสมเพียงพอสำหรับการผลิตกรดแลกติก

2.5.2 สัณฐานวิทยา

ในกระบวนการหมักในอาหารเหลวลักษณะทางสัณฐานของราเส้นใยจะถูกกำหนดโดยสภาวะแวดล้อมในการหมัก เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ อัตราการกวน อัตราการให้อากาศ การถ่ายเทออกซิเจนภายในระบบ สิ่งเหล่านี้ล้วนเป็นตัวแปรในการเปลี่ยนแปลงรูปแบบทางสัณฐานของเชื้อรา และนอกจากนี้ยังส่งผลต่อกระบวนการทางเมแทบอลิซึม และการสร้างผลิตภัณฑ์อีกด้วย โครงสร้างของราเส้นใยโดยทั่วไปจะประกอบด้วย Hyphae (เอกพจน์ : Hypha) ซึ่งจะมีลักษณะเป็นเส้นใย โดยจะมีการเจริญมาจาก Reproductive Spores และเมื่อเส้นใยหลายสายมาสานต่อเนื่องกันมีลักษณะเป็นร่างแห เรียกว่า Mycelium

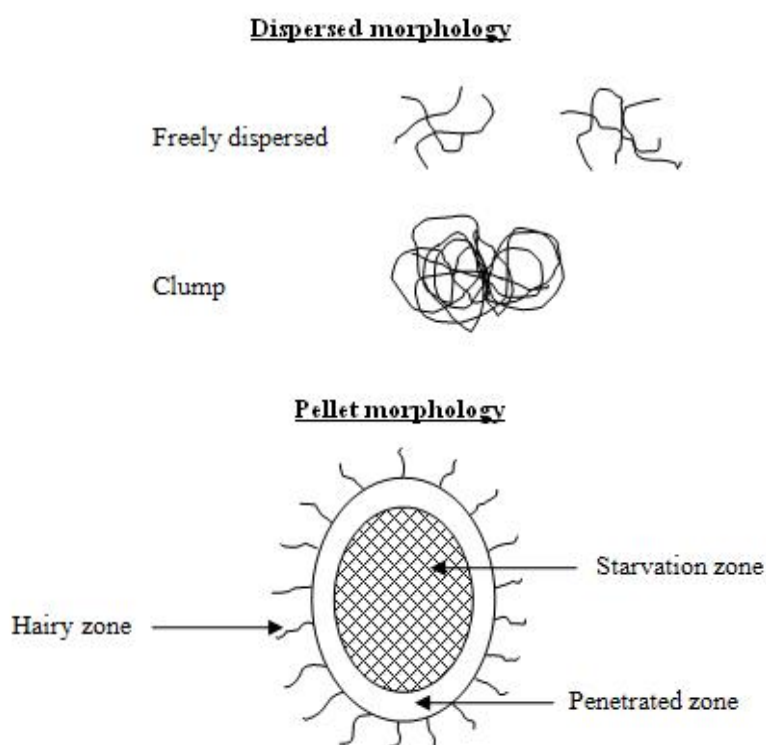
ลักษณะทางสัณฐานทั่วไปใน Submerged Cultures แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ Disperse mycelia และ Pellets โดยลักษณะทางสัณฐานแบบ Disperse mycelia ยังถูกแบ่งออกเป็น Freely disperse และ Mycelial clumps ซึ่งการเจริญแบบ Freely disperse นั้นประกอบไปด้วยเส้นใย (Hyphal) มากกว่า 3 สาย มาเรียงซ้อนทับกัน ซึ่งลักษณะการเรียงแบบนี้จะถูกนับเป็น 1 loop และถ้าเส้นใยมาเรียงซ้อนทับกันมากกว่า 3 loop นั้นจะถูกเรียกลักษณะทางสัณฐานนี้ว่า Clumps หรือ การเจริญแบบกลุ่มก้อน โดยตารางที่ 2.6 แสดงลักษณะสัณฐานแบบต่างๆ ของ *R. oryzae* ที่ส่งผลต่อการผลิตกรดแลกติก

ลักษณะการเจริญแบบ Pellets นั้น แบ่งได้เป็น

- The outer zone หรือ Hairy zone ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่บริเวณรอบนอกของ Pellets โดยมีลักษณะคล้ายขน ซึ่งขนเหล่านี้ทำหน้าที่ในการดูดซึมสารอาหาร แร่ธาตุ และอากาศเพื่อใช้ในการเจริญของเซลล์และผลิตกรดแลกติก
- Penetrated zone เป็นโซนที่อยู่ถัดเข้ามาจากชั้น The outer zone ของ Pellet โดยในโซนนี้สารอาหาร แร่ธาตุ และอากาศ สามารถถูกซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ ทำให้เซลล์ในบริเวณนี้เกิด

กิจกรรมทางเมแทบอลิซึม ซึ่งขนาดของโชนนี้ขึ้นกับความหนาแน่นของ Pellets อัตราการเจริญ และความเข้มข้นของอากาศที่ละลายในอาหาร

○ Starvation zone เป็นโชนที่อยู่บริเวณด้านในสุดของ Pellets แต่อย่างไรก็ตามพบว่า สารอาหาร แร่ธาตุ และอากาศ ไม่สามารถที่จะซึมผ่านเข้าถึงเซลล์ในบริเวณนี้ได้ ทำให้เซลล์ถูก กำจัดการถ่ายเทของอาหาร และอากาศ ส่งผลทำให้เซลล์อยู่ในสถานะที่ไม่เหมาะสม ดังนั้นจะเป็น การกระตุ้นให้เซลล์สร้างผลิตภัณฑ์อื่น เช่น เอทานอล และเกิด Autolysis (Cui และคณะ, 1998)



รูปที่ 2.7 ลักษณะทางสัณฐานของเชื้อรา

ที่มา : ดัดแปลงจาก Thongchul, 2005

ตารางที่ 2.6 ลักษณะพื้นฐานของ *R. oryzae* ที่มีต่อการผลิตกรดแลกติก

Morphology	Process	Cultivation System	Lactic acid			Reference
			Concentration	Productivity	Yield	
			(g/L)	(g/L/h)	(%)	
Cotton flocs	Batch	STR	103.6	1.7	86	Kosakai และคณะ (1997)
Cotton flocs	Batch	ALR	104.6	1.8	87	Park และคณะ (1998)
Cotton flocs	Batch	STR	109	2.73	87	Yu และคณะ (2007)
Cotton flocs	Repeated batch	STR	113	4.03	90	Yu และคณะ (2007)
Small pellets	Batch	BCR	83	2.58	88	Zhou และคณะ (1999)
Small pellets	Batch	STR	60	1	66	Liu และคณะ (2006)
Small pellets	Repeated batch	STR	92	0.7	60	Liu และคณะ (2006)
Small pellets	Repeated batch	STR	74.92	2.9-6.2	74.2	Bai และคณะ (2003)
Small pellets	Repeated batch	STR	60	-	62-74	Yang และคณะ (1995)
Coalesced loose small pellets	Batch	STR	85.7	-	86	Zhang และคณะ (2007)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Zhang และคณะ (2007)

หมายเหตุ

ALR : Air-lift Reactor

BCR : Bubble Column Reactor

STR : Stirred Tank Reactor

Bai และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะทางสัณฐาน และการผลิตกรดแลกติกจาก *R. oryzae* R1021 จากการศึกษาพบว่าปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดสัณฐานแบบ pellet คือ การเติม CaCO_3 ปริมาณความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้น โดยเมื่อทำการเติม CaCO_3 ในช่วงโมงที่ 8 หลังจากทำการเติมเชื้อลงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยลักษณะทางสัณฐานของราจะอยู่ในรูปของ pellet ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0-2.0 มิลลิเมตร ความเข้มข้นกรดแลกติกที่สามารถผลิตได้ในระยะสร้างผลิตภัณฑ์อยู่ที่ 72.62 กรัมต่อลิตร ขณะที่เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณความเข้มข้นสปอร์ที่ส่งผลทำให้เกิดลักษณะทางสัณฐานของรา พบว่าที่ความเข้มข้นสปอร์ 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ส่งผลทำให้เกิดลักษณะทางสัณฐานแบบ pellet ขณะที่ปริมาณความเข้มข้นสปอร์ 1×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรนั้น ส่งผลให้เกิดลักษณะทางสัณฐานแบบ clump โดยความเข้มข้นของกรดแลกติก อยู่ที่ 63.25 และ 51.06 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราเร็วในการกวนและอัตราการให้อากาศส่งผลต่อลักษณะทางสัณฐานของรา โดยเมื่อเพิ่มระดับอัตราการกวนจะส่งผลทำให้จำนวน pellet ต่อปริมาตรเพิ่มขึ้น แต่ในทางตรงกันข้ามพบว่าขนาดของ pellet ลดลง ในขณะที่เมื่อทำการเพิ่มอัตราการให้อากาศพบว่า ขนาดของ pellet เพิ่มขึ้น แต่จำนวน pellet ต่อปริมาตรลดลง

Yu และคณะ (2007) รายงานว่า ใน Submerged cultures ลักษณะทางสัณฐานของ *R. oryzae* สามารถที่จะเจริญได้หลายรูปแบบ เช่น clump, pellet และ floc ทั้งนี้ขึ้นกับความหลายหลายของปัจจัย เช่น ปริมาณความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้น ระยะเวลาและปริมาณการเติม CaCO_3 ในการเลี้ยงแบบเขย่า และ การเติมแร่ธาตุอาหารและ โพลีเอทิลีนออกไซด์ (Bai และคณะ, 2003; Kosakai และคณะ, 1997; Liu และคณะ, 2006; Park และคณะ, 1998; Yin และคณะ, 1998) ซึ่งลักษณะทางสัณฐานของรานั้นส่งผลต่อประสิทธิภาพการถ่ายเทมวล (mass transfer efficiency) อัตราการถ่ายเทมวลนั้นมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานของราโดยเรียงลำดับจากอัตราการถ่ายเทมวลสูงสุดไปต่ำสุดได้ ดังนี้ ลักษณะทางสัณฐานแบบ floc, pellet และ clump ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าปริมาณไนโตรเจนมีผลต่อลักษณะทางสัณฐานของรา ซึ่งการเติมแหล่งไนโตรเจนลงไปจะส่งผลไม่ให้เกิดการรวมกลุ่มกันของเซลล์ก่อให้เกิดลักษณะทางสัณฐานแบบ floc ซึ่งในการผลิตแบบ batch พบว่าความเข้มข้นกรดแลกติกสุดท้าย 109 กรัมต่อลิตร $Y_{p/S}$ 0.87 และอัตราการผลิตกรดแลกติก

2.73 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ขณะที่การผลิตแบบ fed-batch พบว่าความเข้มข้นกรดแลกติกสุดท้าย 113 กรัมต่อลิตร $Y_{p/S}$ 0.90 และอัตราการผลิตกรดแลกติก 4.03 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

2.5.3 การตรึงเซลล์

กระบวนการหมักกรดแลกติกแบบแขวนลอยโดย *R. oryzae* นั้น หลายงานวิจัยรายงานว่า เนื่องด้วยลักษณะทางสัณฐานของรานี้ยากต่อการควบคุม และบ่อยครั้งที่ก่อให้เกิดปัญหาในการเลี้ยงแบบ Submerged fermentation (Thongchul และ Yang, 2004) โดยปัญหาที่เกิดจากลักษณะทางสัณฐานของราเส้นใยที่พบคือ ส่งผลต่อการถ่ายเทมวล การเจริญเติบโต และการสร้างผลิตภัณฑ์ เป็นต้น เนื่องจากเมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตเส้นใยจะมีการกระจายตัวทั่วเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ซึ่งเป็นการเพิ่มความหนืดให้แก่อาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อความหนืดเพิ่มสูงขึ้นจะส่งผลต่อการถ่ายเทออกซิเจนภายในระบบ นอกจากนี้ยังส่งผลทำให้การควบคุมหรือการดำเนินการเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพยากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นในกรณีของการกวน หรือการให้อากาศ ซึ่งเมื่อเส้นใยไปเจริญเติบโตหรือพันเกี่ยวกับใบพัด จะมีผลทำให้มอเตอร์ทำงานหนักขึ้นซึ่งอาจก่อให้เกิดความเสียหายต่อเครื่อง และเซลล์จะเสียหายเมื่อได้รับแรงเฉือนจากใบพัด โดยจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการหมักแบบอิมเมอร์ส และ การสร้างผลิตภัณฑ์ ดังนั้นเพื่อแก้ไขปัญหานี้ในเรื่องของการเปลี่ยนแปลงทางด้านลักษณะทางสัณฐานของรา ดังนั้นจึงมีหลายหลายงานวิจัยที่ให้ความสนใจและทำการศึกษาและพัฒนาเทคนิคการตรึงเซลล์ให้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตกรดแลกติก (Dong และคณะ, 1996;; Tay และ Yang, 2002; Wang และคณะ, 2010 นอกจากนี้ยังพบว่าการตรึงเซลล์ยังเป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลกติก และนอกจากนี้ยังทำให้ง่ายเก็บเกี่ยวผลผลิตภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพอีกด้วย ดังตารางที่

Hang และคณะ (1989) เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์แขวนลอย และการตรึงเซลล์ด้วยวิธี Entrapment ด้วย แคลเซียม-แอลจิเนต (Ca-alginate) โดยกระบวนการ Repeted-batch พบว่าอัตราการผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์แขวนลอยนั้นให้อัตราการผลิตที่สูงกว่าแบบตรึงเซลล์ในรอบแรกของการหมัก ขณะที่ในรอบที่ 2-9 พบว่าเซลล์ขาดเสถียรภาพ และประสิทธิภาพการผลิตลดลง ในทางตรงกันข้ามการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียม-แอลจิเนตนั้นสามารถรักษาเสถียรภาพในการผลิตได้ตลอดระยะเวลาการผลิตเป็นระยะเวลาทั้งหมด 18 วัน 9 รอบ โดยความเข้มข้นกรดแลกติกที่ผลิตได้สูงสุดมากกว่า 62 กรัมต่อลิตร $Y_{p/S}$ สูงกว่า 72 เปอร์เซ็นต์

Dong และคณะ (1996) รายงานว่าวิธีการ Entrapment โดยการใช้ซอเฟลเจล เช่น แคลเซียม-อะจิเนต (Ca-Alginate) นั้น เนื้อเจลจะเป็นตัวจำกัดการส่งผ่านของออกซิเจน ซึ่งจะต้านทานการแพร่กระจายของเจลอาจส่งผลต่ออัตราการหมัก และการผลิตกรดแลกติก โดย Dong และคณะ ได้ทำการศึกษาการตรึงเซลล์ด้วยวิธี Attachment โดยการใช้โฟมโพลียูรีเทน (Polyurethane foam) ที่มีขนาดเป็นทรงลูกบาศก์ 6 มิลลิเมตร ในการตรึงเซลล์ *R.oryzae* โดยขนาดรูของโพลียูรีเทนมีขนาดใหญ่กว่า 100 ไมครอน ดังนั้นจะเป็นการช่วยลดความต้านทานในการแพร่กระจายบริเวณพื้นผิว โดยสปอร์จะเข้าไปจับกับเมทริกซ์ หลังจากนั้นจะเจริญไปเป็นเส้นใยและจะถูกตรึงไว้กับเมทริกซ์ พบว่าค่าความจุ 450 กรัมของน้ำหนักเซลล์ต่อลูกบาศก์ และอัตราการผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้น 3 เท่า โดยเซลล์ที่ถูกตรึง มากไปกว่านั้นเซลล์ที่ถูกตรึงสามารถนำมาใช้ได้อย่างต่อเนื่องในกระบวนการหมักแบบ Repeated-batch มากกว่า 10 ครั้ง

Ganguly และคณะ (2002) รายงานว่า การตรึงเซลล์ด้วย แคลเซียม-อะจิเนต (Ca-Alginate) เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมกันอย่างแพร่หลายในการผลิตกรดแลกติก แต่อย่างไรก็ตามพบว่า มีข้อจำกัดเรื่องการต้านทานการแพร่กระจายของออกซิเจนกับเมทริกซ์ นอกจากนี้การเตรียมเม็ดเจลค่อนข้างจะยุ่งยาก และสิ้นเปลือง ในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอีกด้วย Ganguly และคณะ ได้ศึกษาและพัฒนาการตรึงเซลล์ *R. oryzae* RBU 2-10 ด้วยใยบวบ (*Luffa cylindrica*) ที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว โดยใช้ความเข้มข้นสปอร์เริ่มต้น 3×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้ความเข้มข้น 80.75 กรัมต่อลิตร หลังจาก 48 ชั่วโมงของการหมัก และในการหมักแบบ Repeated-batch พบว่าอัตราการผลิตกรดแลกติก อยู่ในช่วง 1.66-1.84 กรัมต่อลิตรชั่วโมง

Thongchul และ Yang (2004) ได้ทำการเปรียบเทียบการหมักในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถึงกวนกับ ชนิด Rotating Fibrous Bed (RFBB) พบว่าเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Rotating Fibrous Bed สามารถควบคุมลักษณะทางสัณฐานของเราได้ดี และสามารถที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการถ่ายเทออกซิเจนภายในระบบ และการผลิตกรดแลกติก โดยสามารถที่จะผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 137 กรัมต่อลิตร $Y_{p/s}$ 0.83 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิตกรดแลกติกอยู่ที่ 2.1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในกระบวนการผลิตกรดแลกติกแบบ repeated batch

ตารางที่ 2.7 การผลิตกรดแลกติกโดย *R. oryzae* ที่ถูกตรึง

Immobilization support	Operation mode and period	Lactic acid			Reference
		Concentration	Productivity	Yield	
		g/L	g/L/h	%	
Cotton cloth in a rotating bed	Repeated batches and fed-batches	126	2.5	~90	Tay และ Yang (2002)
Rotating disc	5 repeated batches in 8 days	60	1.67	~75	Zhang และคณะ (2004)
Loofa spong	10 repeated batches in 20 days	65.8	1.36	63.6	Ganguly และคณะ (2007)
	Repeated fed-batches for more than 400 hr.	120	1.6	76	Roble และคณะ (2003)
Immobilized Cells in Polyurethane foam cubes	10 repeated batches in 4 days	40	~5	~75	Dong และคณะ (1996)
Immobilized Cells in fluidized bed	Batch	73	1.6	65	Hamamci และ Ryu (1994)
Immobilized Cells in polymer support	Batch	-	-	65	Tamada และคณะ (1992)
Immobilized Cells in calcium alginate	Repeated batches and continuous in 2 weeks	56-64	-	70-80	Li และคณะ (1998a)
	9 repeated batches	62	2.5	72	Hang และคณะ (1989)

ตารางที่ 2.7 การผลิตกรดแลกติกโดย *R. oryzae* ที่ถูกตรึง (ต่อ)

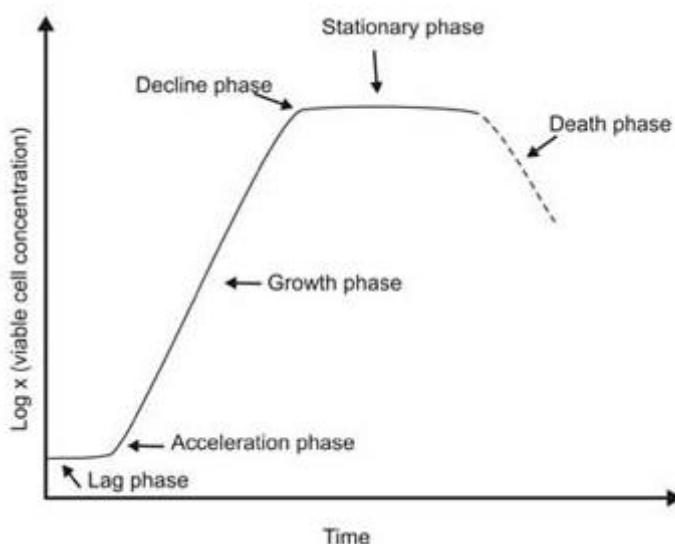
Immobilization support	Operation mode and period	Lactic acid			Reference
		Concentration	Productivity	Yield	
		g/L	g/L/h	%	
Cotton-like flocs on support in ALR	58 h, Batch	104.6	1.8	87	Park และคณะ (1998)
Small cell pellets from growth on xylose	42 Repeated batches in 22 days	60	2.9-6.2	62.74	Yang และคณะ (1995)
Small cell pellets in ATR	9 Batch cycles in 14 days	85.7	1.07	-	Yin และคณะ (1998)
Small cell pellets in bubble column	Batch, 32 hr.	83	2.58	88	Zhou และคณะ (1999)
Biofilm on honeycomb support in bubble column	9 repeated batches in 36 days	68.8	0.72	~80 and up to 93.4	Wang และคณะ (2010)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Wang และคณะ, 2010

2.5.4 จลนพลศาสตร์ของการหมัก

การศึกษาไคเนติกส์ของการหมัก (fermentation kinetics) เป็นสิ่งจำเป็นที่ทำให้เข้าใจธรรมชาติการเปลี่ยนแปลงต่างๆที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมัก เช่น การเจริญของจุลินทรีย์ การเปลี่ยนแปลงของสารตั้งต้น การเกิดผลผลิต การเปลี่ยนแปลงของ pH เป็นต้น

การเติบโตของจุลินทรีย์ในอาหารเหลวแบบแบตช์มีระยะของการเติบโต แบ่งออกได้เป็นระยะการปรับตัว (lag phase) โดยในกระบวนการหมักระดับอุตสาหกรรมจะต้องทำระยะนี้ให้สั้นที่สุดเพื่อลดต้นทุนการผลิต หลังจากนั้นจุลินทรีย์จะมีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้น (log phase) สูงสุดถึงระดับหนึ่ง การเจริญเติบโตของเซลล์จะคงที่ (stationary phase) หลังจากนั้นปริมาณเซลล์ดังกล่าวจะลดลงเมื่อเข้าสู่ระยะการตาย (death phase) ดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 การเติบโตของจุลินทรีย์ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์

เมื่อจุลินทรีย์เข้าสู่ระยะการเติบโตทวีคูณ เป็นช่วงระยะเวลาที่เซลล์จุลินทรีย์มีการเติบโตแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนขึ้นมา สมการแสดงอัตราการเติบโตของจุลินทรีย์ในระยะการเติบโตทวีคูณในระบบของการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จจึงสามารถแสดงได้ดังสมการที่ (1)

$$\frac{dCx}{dt} = \mu Cx \quad \dots\dots\dots(1)$$

เมื่อ C_x = ความเข้มข้นของมวลเซลล์ (biomass)

t = เวลา (ชั่วโมง)

μ = อัตราการเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์ (ต่อชั่วโมง)

เมื่อใส่ลอการิทึมในสมการที่ (1) จะได้

$$\ln X_t = \ln X_0 + \mu t \quad \dots\dots\dots(2)$$

ดังนั้นเมื่อเขียนกราฟระหว่างลอการิทึมของความเข้มข้นของมวลเซลล์กับเวลา จะได้กราฟเส้นตรง ซึ่งมีความลาดเอียง (slope) เท่ากับอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{\max})

กระบวนการหมัก สามารถแบ่งได้เป็น 3 รูปแบบหลักๆ ตามการเลี้ยง

1) การหมักแบบแบตช์ (batch fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพในระบบปิดโดยไม่มีการเปลี่ยนอาหาร เพราะฉะนั้นปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อจะคงที่ ขณะที่เซลล์จุลินทรีย์จะมีการเจริญตามปกติ โดยมีระยะพักตัว (lag phase) ระยะเพิ่มจำนวน (log phase) ระยะคงที่ (stationary phase) และระยะตาย (death phase)

Zhou และคณะ (1999) ทำการผลิตกรดแลกติกแบบแบตช์โดย *R. oryzae* ATCC 52311 ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Bubble Column พบว่าอัตราการผลิตกรดแลกติกสูงสุด 2.58 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 94 กรัมต่อลิตร ขณะที่ความเข้มข้นกรดแลกติกสุดท้าย 83 กรัมต่อลิตร หลังจาก 32 ชั่วโมงของการหมัก

Yan และคณะ (2003) ศึกษาความหลากหลายของแหล่งคาร์โบไฮเดรตในการผลิตกรดแลกติก โดย *Enterococcus faecalis* RKY1 ในกระบวนการผลิตแบบแบตช์ พบว่าการใช้กลูโคส แล็กโทส และมอลโทส เป็นแหล่งคาร์บอนนั้นสามารถที่จะผลิตกรดแลกติกให้ค่า Yield สูงโดย $Y_{P/S}$ 0.96 กรัมแลกติกต่อกรัมแหล่งคาร์บอน ซึ่งค่าอัตราการผลิตกรดแลกติกอยู่ระหว่าง 5.2-6.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าแหล่งคาร์โบไฮเดรตทั้ง 3 แหล่งนี้ สามารถผลิตกรดแลกติกได้ในรูปแอล (+)-ไอโซเมอร์ มากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ของกรดแลกติกทั้งหมด

2) การหมักแบบกึ่งแบตช์ (fed-batch fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมสารอาหารอย่างต่อเนื่องหรือเป็นช่วงๆ หลังจากที่เราใส่เชื้อเข้าไปแล้วโดยไม่มีการถ่ายออก ซึ่งจะ

แตกต่างจากการหมักแบบเบตซ์ ตรงที่ปริมาณอาหารจะเพิ่มขึ้นตามอัตราปริมาณอาหารที่ได้ทำการเติมเข้าไป

Tay และ Yang (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบ Fed-batch โดยการตรึงเซลล์ *R. oryzae* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Rotating Fibrous Bed (RFBR) พบว่าที่สภาวะพีเอช 6 และความเข้มข้นออกซิเจน 90 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตกรดแลกติกได้ Y_{PS} สูงสุดที่ 90 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และอัตราการผลิตกรดแลกติก 2.5 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (467 กรัมต่อชั่วโมงต่อตารางเมตร) เมื่อใช้กลูโคสเป็นสารตั้งต้น ขณะที่เมื่อใช้แป้งข้าวโพดเป็นสารตั้งต้นพบว่าสามารถผลิต Y_{PS} 100 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และอัตราการผลิต 1.65 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นกรดแลกติก 127 กรัมต่อลิตร

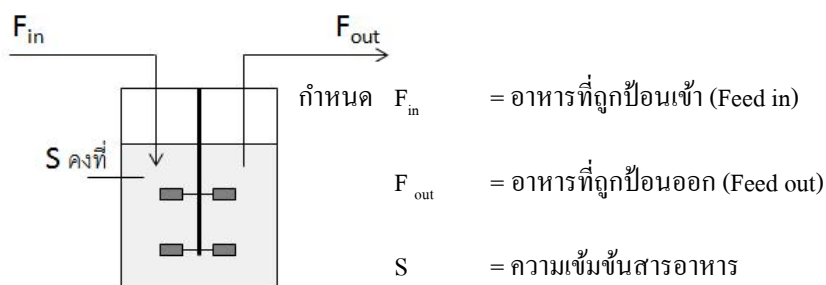
Bai และคณะ (2003) รายงานว่าการเลี้ยงแบบ Fed-batch นิยมใช้ในการหมักจุลินทรีย์เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาที่เกิดจากการยับยั้งของระดับสารอาหารตั้งต้น (Substrate-level inhibition) โดย Bai และคณะ ต้องการพัฒนาความหนาแน่นเซลล์ให้สูงขึ้นในการผลิตกรดแลกติกจาก *Lactobacillus lactis* ด้วยกระบวนการหมักแบบ Fed-batch พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 210 กรัมต่อลิตรชั่วโมง โดยความเข้มข้นกลูโคสที่เหลือภายในระบบน้อยกว่า 0.5 กรัมต่อลิตร Y_{PS} 97 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตกรดแลกติกเฉลี่ย 2.2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง น้ำหนักเซลล์แห้ง 2.7 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้อัตราการไหล 20 มิลลิตรต่อชั่วโมง

Ding และ Tan (2006) ศึกษาความแตกต่างของอัตราการไหลในการผลิตกรดแลกติกแบบ Fed-batch โดย *Lactobacillus casei* โดยได้ศึกษาผลของอัตราการไหลในรูปแบบต่างๆ เช่น การเติมอาหารเป็นระยะๆ (Pulse fed-batch), การควบคุมให้อัตราการไหลคงที่ (Constant feed rate fed-batch), การควบคุมความเข้มข้นกลูโคสที่เหลือภายในระบบให้คงที่ (Constant glucose concentration fed-batch) และ การควบคุมอัตราการไหลแบบเอ็กโปเนนเชียล (Exponential fed-batch) ซึ่งพบว่าอัตราการไหลที่สามารถทำให้การผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดนั้นคือแบบเอ็กโปเนนเชียล โดยอาหารในการเติมประกอบด้วยความเข้มข้นกลูโคส 850 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความเข้มข้นกรดแลกติก 180 กรัมต่อลิตร Y_{PS} 90.3 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักเซลล์แห้ง 4.30 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติก 2.14 กรัมต่อลิตรชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตแบบเบตซ์แล้วพบว่า การผลิตแบบ Exponential fed-batch นั้นสามารถที่จะพัฒนาการผลิต

กรดแลกติกได้ 56.5 เปอร์เซ็นต์ พัฒนาการเพิ่มน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 68.6 เปอร์เซ็นต์ พัฒนาค่าอัตราการผลิตกรดแลกติกได้ 59.7 เปอร์เซ็นต์

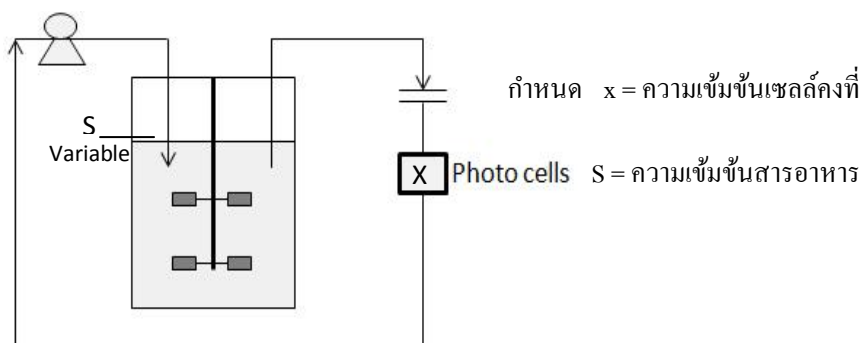
3) การหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมสารอาหารเข้าสู่ระบบ ขณะเดียวกันจะมีการดึงเอาน้ำหมักภายในถังออก โดยใช้อัตราการไหลที่เท่ากัน ซึ่งจะส่งผลให้ปริมาณอาหารภายในระบบคงที่ โดยการควบคุมกิจกรรมของจุลินทรีย์ในถังหมักแบบต่อเนื่องสามารถแบ่งออกได้ 2 แบบ คือ

3.1 คีโมสแตต (Chemostat) เป็นกระบวนการที่ได้ทำการตั้งค่าอัตราการป้อนอาหารเข้าและออกไว้ที่ค่าหนึ่ง ขณะที่อัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จะปรับตามค่าอัตราการไหลที่ใช้ แสดงดังรูปที่ 2.9



รูปที่ 2.9 แผนภาพแสดงการควบคุมอัตราการไหลในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องชนิดคีโมสแตต

3.2 เทอไบโดสแตต (Turbidostat) เป็นกระบวนการที่ค่าความขุ่นของเซลล์จะถูกกำหนดไว้ค่าหนึ่ง และภายในระบบจะติดตั้งเครื่องวัดความขุ่นของเซลล์ ซึ่งจะเป็นตัวควบคุมอัตราการไหลเข้าและออกภายในระบบ แสดงดังรูปที่ 2.10



รูปที่ 2.10 แผนภาพแสดงการควบคุมความเข้มข้นเซลล์ในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง ชนิดเทอไบโอสแตส

Roy และคณะ (1986) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องโดย *Lactobacillus belveticus* สายพันธุ์ *milano* โดยวิธี Entrapment ด้วยแคลเซียม-แอลจิเนต จากหางนม พบว่าอัตราการผลิตกรดแลกติกอยู่ที่ 9.7 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่อัตราการเจือจาง 0.352 ต่อชั่วโมง โดยความเข้มข้นแลกโตสที่ป้อนเข้าเท่ากับ 37.4 กรัมต่อลิตร

Sun และคณะ (1998) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องโดยการตรึงเซลล์ *R. oryzae* บนโพลีเมอร์พอลิยูรีเทน ทรงลูกบาศก์ขนาด 5 มิลลิเมตร ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Air-lift พบว่าอัตราการผลิตกรดแลกติกอยู่ในช่วง 1.0-6.2 กรัมต่อลิตร ในอัตราการเจือจางระหว่าง 0.04-0.2 ต่อชั่วโมง

Cotton และคณะ (2001) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องโดยการตรึงเซลล์ *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus* (ATCC 11443) บน Plastic Composite Support (PCS) พบว่าอัตราการผลิตกรดแลกติกที่ผลิตได้อยู่ที่ 9.0 กรัมต่อลิตรชั่วโมง $Y_{p/S}$ ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตราการเจือจาง 0.4 ต่อชั่วโมง อัตราการกวน 125 รอบต่อนาที

เปรียบเทียบข้อดี และข้อเสียของแต่ละกระบวนการหมัก

1. การหมักแบบแบตช์ (Batch fermentation)

ข้อดี

- เชื้อแข็งแรง ว่องไว ยากต่อการกลายพันธุ์
- การควบคุมระบบให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อทำได้ง่าย

- การควบคุมระบบทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน

ข้อเสีย

- ต้องทำการเตรียมหัวเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ทุกครั้งของแต่ละรอบการหมัก ซึ่งเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิต และสิ้นเปลืองเวลา
- เมื่อใส่หัวเชื้อสู่ระบบ ต้องใช้ระยะเวลาในการให้เชื้อปรับตัวช่วง lag phase

2. การหมักแบบกึ่งแบตช์ (Fed-batch fermentation)

ข้อดี

- ช่วยลดปัญหาจากการยับยั้งของสารอาหาร (Substrate inhibition)
- เมื่อมีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่ระบบ ทำให้เซลล์มีการเจริญเติบโต และสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ได้ในปริมาณสูงขึ้น
- ในการหมักที่ผลิตภัณฑ์เป็นกรดนั้น จะเป็นการช่วยลดโอกาสในการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆ

ข้อเสีย

- ในกระบวนการหมักชนิดนี้ การเติมอาหารเข้าสู่ระบบจะสามารถเติมได้ในระยะหนึ่งเท่านั้น เนื่องจากปริมาณของสารอาหารที่เติมเข้าสู่ระบบจะถูกจำกัดด้วยพื้นที่ว่างของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ
- ในการหมักส่วนใหญ่จะมีการควบคุมค่าพีเอช ซึ่งระยะเวลาในการหมักมากขึ้นปริมาณของเหลวในระบบไม่มีการถ่ายออก จะส่งผลทำให้ปริมาณไอออนภายในระบบสูงขึ้น ซึ่งทำให้เกิดภาวะเครียดต่อเซลล์

3. การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation)

ข้อดี

- ช่วยลดปัญหาจากการยับยั้งของสารอาหาร (Substrate inhibition)
- สามารถควบคุมและรักษาอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ได้

- ความสามารถในการผลิตดีทั้งในแง่ของปริมาณ เวลา พลังงานที่ใช้ สามารถให้ผลผลิตและสม่ำเสมอ
- การควบคุมปริมาตรภายในระบบให้คงที่ ส่งผลทำให้ลดภาวะความเครียดของเซลล์ที่เกิดจากความเข้มข้นของไอออนและผลิตภัณฑ์
- การเติมอาหารเข้าสู่ระบบสามารถเติมได้อย่างต่อเนื่อง โดยไม่ถูกจำกัดในเรื่องของพื้นที่ว่างของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

ข้อเสีย

- การควบคุมระบบค่อนข้างยาก และมีความซับซ้อน ต้องมีการคำนวณอัตราการป้อนสารอาหารให้เหมาะสม เพื่อรักษาสภาวะภายในระบบให้อยู่ในสภาวะคงที่ (Steady state)
- เนื่องจากมีการป้อนอาหารเข้า-ออก อย่างต่อเนื่อง จึงทำให้มีอัตราความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนได้ง่ายกว่าการหมักแบบแบตช์
- การหมักแบบต่อเนื่องใช้ระยะเวลาในการหมักค่อนข้างนาน ดังนั้นจึงอาจก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ และการแทนที่ของจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นได้

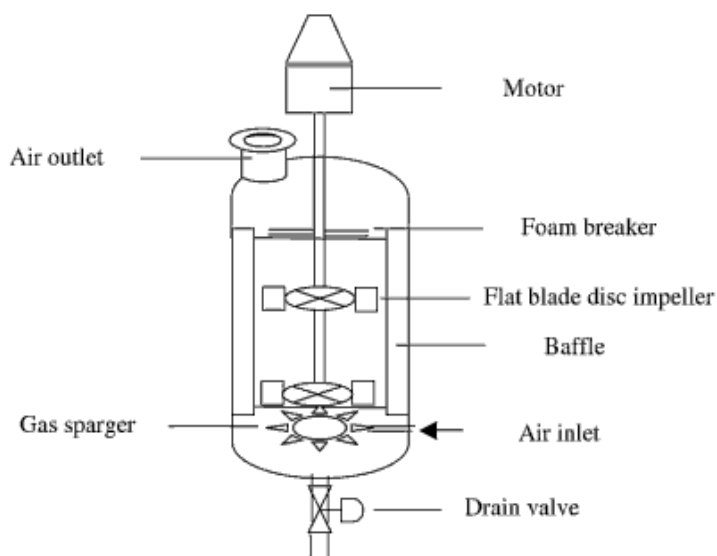
2.5.5 ชนิดของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (Bioreactor) คือ ภาชนะหรืออุปกรณ์ที่ถูกออกแบบมาให้เหมาะสมเพื่อใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ หรือ เนื้อเยื่อ โดยจะสามารถควบคุมระบบภายในตามสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยง และ/หรือ สร้างผลิตภัณฑ์ เช่น อุณหภูมิ พีเอช ปริมาณอากาศ หรือ อัตราการกวน เป็นต้น โดยสามารถที่จะรักษาสภาวะตลอดเชื้อภายในระบบได้

2.5.5.1 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน (Stirred Tank Bioreactor)

โดยทั่วไปการหมักในระดับอุตสาหกรรมใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดปั่นกวน กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจาก การออกแบบที่ง่ายไม่ซับซ้อนและสะดวกต่อการควบคุม ซึ่งเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้จะมีองค์ประกอบหลัก 3 ส่วน คือ 1) ส่วนของ gas sparger ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในการนำอากาศเข้าสู่เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ 2) ส่วนของแกนใบพัด 3) ส่วนใบพัด ซึ่งเมื่อมอเตอร์ทำงาน จะเกิดแรงเฉือนที่ปลายใบพัดกับฟองอากาศ ทำให้ขนาดของ

ฟองอากาศมีขนาดเล็กลง และส่งผลให้ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนต่อพื้นที่ผิว (K_La) เพิ่มขึ้น ดังรูป 2.11



รูปที่ 2.11 ลักษณะเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน (Stirred Tank Bioreactor)

อย่างไรก็ดีการใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้มีข้อจำกัดสำหรับรา โดยเฉพาะ *R. oryzae* เนื่องจาก ในการผลิตกรดแลกติก *R. oryzae* ต้องการอากาศในการเจริญ โดยในภาวะที่ขาดอากาศ *R. oryzae* นำแหล่งคาร์บอนที่ได้เข้าสู่วิถีเมแทบอลิซึมแบบไร้อากาศ (anaerobic pathway) ซึ่งท้ายที่สุดแล้วได้เอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์แทนกรดแลกติก (Bai และคณะ, 2003)

Tay และ Yang (2002) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดย *R. oryzae* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน พบว่าเส้นใยราที่กระจายทั่วไปในถังกวน ติดตามอุปกรณ์วัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากเส้นใยไปพันเกาะบริเวณใบพัดกวน ดังรูป 2.12 ซึ่งส่งผลให้เซลล์เกิดการฉีกขาดและต้องใช้เวลาในการซ่อมแซมตัวเอง อีกทั้งยังก่อให้เกิดแรงบิด (torque) ที่ใบพัดกวนสูงขึ้น หากสูงมากเกินไปอาจก่อให้เกิดความเสียหายได้ นอกจากนี้ เส้นใยที่กระจายโดยทั่วถังกวนส่งผลต่อความหนืดของน้ำหมัก ซึ่งมีผลโดยตรงต่อค่าการละลายของออกซิเจน และสัมประสิทธิ์การถ่ายเทของออกซิเจน (K_La) โดยเมื่อความหนืดสูงขึ้น ค่า K_La จะมีค่าลดลงทำให้ *R. oryzae* เปลี่ยนวิถีเมแทบอลิซึมเป็นวิถีแบบไร้อากาศ ทำให้ได้ผลผลิตกรดแลกติกต่ำลง ซึ่งหากต้องการเพิ่มค่า K_La

ให้สูงขึ้น โดยทั่วไปในเครื่องปฏิกรณ์ชนิดถังกวนอาศัยวิธีการเพิ่มอัตราการกวนและการให้อากาศ ซึ่งต้องอาศัยพลังงานที่เพิ่มขึ้น (high power input) โดยค่า $Y_{P/S}$ และค่า Productivity เท่ากับ 51.1 เปอร์เซ็นต์, 0.59 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง



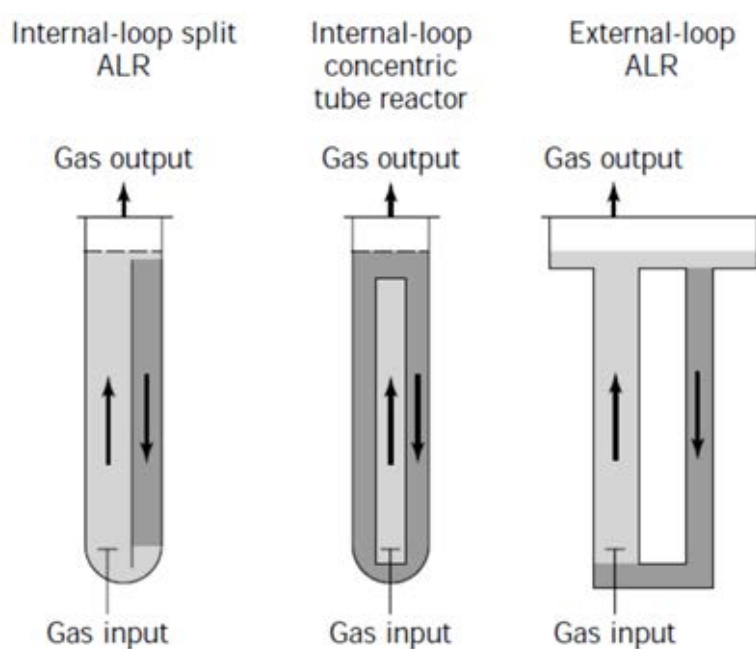
รูปที่ 2.12 การเจริญแบบแขวนลอยของ *R. oryzae* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน
ที่มา : Tay และ Yang, 2002

Bai และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน (Stirred-tank bioreactor) โดยเชื้อราสายพันธุ์กลาย *R. oryzae* R1021 ในสัณฐานวิทยาแบบ pellet พบว่าเมื่อความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดแลกติกได้ความเข้มข้น และ $Y_{P/S}$ เท่ากับ 74.92 กรัมต่อลิตร และ 74.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในสัณฐานวิทยาแบบ pellet ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1.4 มิลลิเมตร แต่ ข้อเสียของสัณฐานวิทยาแบบ pellet ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวนนั้น เนื่องด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้จะมีแรงเฉือนที่สูง ดังนั้นเมื่อเซลล์ได้รับแรงเฉือน จะทำให้เซลล์สูญเสียแอกติวิตี และจะใช้สารอาหารส่วนใหญ่ในการซ่อมแซมเซลล์ แทนการสร้างผลิตภัณฑ์

2.5.5.2 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Air-lift (Air-lift Bioreactor)

เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้จะปราศจากใบพัด โดยการถ่ายเทมวลนั้นเกิดจากการให้อากาศภายในระบบ ฟองอากาศจะเกิดการหมุนวน (circulation) ภายในเครื่องปฏิกรณ์ จึงเกิดการ

ถ่ายเทมวลระหว่าง ก๊าซ-ของเหลว หรือ ก๊าซ-ของเหลว-ของแข็ง ที่เกิดจากการไหลวนของของไหล โดยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Air-lift นั้นแตกต่างกับเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Bubble column ทางด้านโครงสร้างของระบบ โดยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Bubble column จะมีลักษณะเป็น Vessel ซึ่งก๊าซจะถูกส่งผ่านจากทางด้านล่างเครื่องปฏิกรณ์เข้ามายังท่อดังกล่าว และทำให้เกิดการผสมของมวลสารภายในระบบ ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Air-lift รูปแบบการไหลเวียนของของไหลนั้นจะถูกกำหนดโดยการออกแบบเครื่องปฏิกรณ์ ซึ่งจะมีทางสำหรับการเคลื่อนที่ของ ก๊าซ-ของเหลว-ของแข็ง ให้มีการเคลื่อนที่ไปทางด้านบนของเครื่องปฏิกรณ์ ขณะเดียวกันก็จะมีทางแยกสำหรับให้เคลื่อนที่ลงสู่ด้านล่างเครื่องปฏิกรณ์ ทำให้เกิดการผสมระหว่างมวลสารเกิดขึ้น



รูปที่ 2.13 ลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Air-lift ที่มา : Merchuk และ Gluz

Yin และคณะ (1997) ศึกษาการเพิ่มความสามารถในการผลิตกรดแอลแลกติกจาก แป้งข้าวโพด โดยใช้เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Air-lift โดยได้ทำการคัดเลือกรา *Rhizopus* จำนวน 8 สายพันธุ์ และศึกษาหาสภาวะในการผลิตกรดแลกติกที่เหมาะสม พบว่า *R. oryzae* NRRL 395 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ให้ผลผลิตสูงสุด และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติก คือ แป้งข้าวโพด 120 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 1.35 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมซัลเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต และ ซิงค์ซัลเฟต โดยทำการผลิตในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Air-lift 5 ลิตร ภายใต้สภาวะดังกล่าว โดยความเข้มข้นกรดแลกติกสุดท้าย 102 กรัมต่อลิตร Y_{PS} 85 เปอร์เซ็นต์

Miura และคณะ (2003) ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสม และเพิ่มระดับการผลิตกรด แอลแลกติก โดยใช้ *Rhizopus* sp. MK-96-1196 สายพันธุ์กลาย ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Air-lift โดยการศึกษาเริ่มต้นในเครื่องปฏิกรณ์ขนาด 3 ลิตร พบว่าความเข้มข้นสปอร์ที่เหมาะสมอยู่ที่ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ลักษณะทางสัณฐานมีลักษณะเป็น Pellet ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิลิตร ที่พีเอช 6.5 และอัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที สามารถผลิตกรดแลกติกได้มากกว่า 90 กรัมต่อลิตร (จากแป้งข้าวโพดที่ผ่านการย่อย) อัตราการผลิตกรดแลกติก 2.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และได้ทำการศึกษาผลของ Superficial air velocity (V_s) และค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน (K_La) ต่อการผลิตกรดแลกติก โดยใช้เป็นบรรทัดฐานในการเพิ่มระดับการผลิตจาก 3 ลิตร เป็น 100 ลิตร โดยความสัมพันธ์ระหว่างค่า V_s กับ K_La แสดงดังสมการด้านล่าง

$$K_La = 62.3 V_s^{1.00}$$

พบว่า ค่า V_s ที่เหมาะสม 0.8 เซนติเมตรต่อวินาที และเมื่อทำการเพิ่มระดับการผลิตที่ 100 ลิตร พบว่าอัตราการผลิตกรดแลกติก Y_{PS} และอัตราการผลิตกรดแลกติกทั้งสองระดับนั้นมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน

Liu และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกในกระบวนการผลิตแบบเบดซ์ กิ่งเบดซ์ และต่อเนื่อง โดยใช้ *Rhizopus* sp. MK-96-1196 ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Air-lift ขนาด 3 ลิตร พบว่าการผลิตกรดแลกติกในกระบวนการผลิตแบบกิ่งเบดซ์นั้นสามารถที่จะรักษาระดับความเข้มข้นกลูโคสไว้ที่ 30 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตกรดแลกติกได้มากกว่า 140 กรัมต่อลิตร Y_{PS} 83 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การเลี้ยงแบบเบดซ์นั้นพบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดแลกติกได้ที่ความเข้มข้น 121 กรัมต่อลิตร ในกรณีของการผลิตแบบต่อเนื่องนั้นพบว่าอัตราการผลิตกรดแลกติก 1.5 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง Y_{PS} 71 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตราการเจือจาง 0.024 ต่อชั่วโมง อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาต้นทุนการผลิต พบว่า การเลี้ยงแบบกิ่งเบดซ์ และแบบต่อเนื่อง คิดเป็น 88 และ 140 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงแบบเบดซ์ มากกว่านั้น พบว่าการเลี้ยงแบบกิ่งเบดซ์นั้นสามารถผลิตกรดแลกติกได้ความเข้มข้น และ Yield สูง จึงเป็นตัวแปรที่ช่วยลดต้นทุนการผลิตนั่นเอง ดังนั้นจึงเป็นกระบวนการผลิตที่เหมาะสมกับการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดแลกติก

2.5.5.3 เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Bubble Column เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นแก้วจะมีลักษณะเป็นทรงกระบอก คล้ายกับเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Air-lift คือ มีตัวจ่ายอากาศ

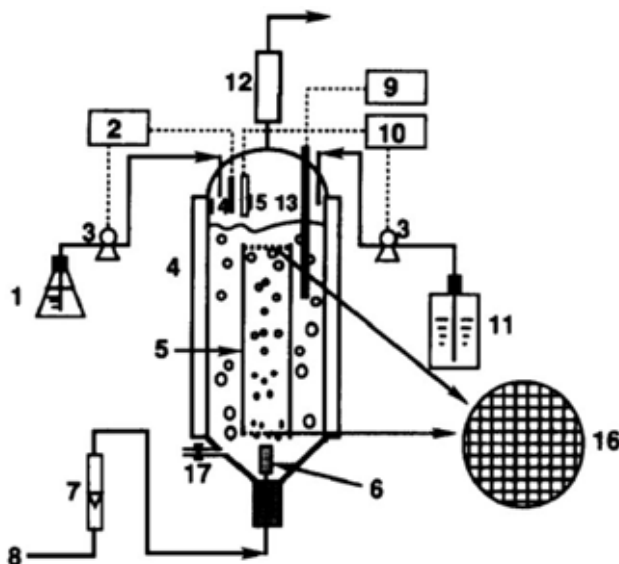
อยู่ด้านล่างของเครื่องปฏิกรณ์ แต่ไม่มีส่วนของท่อบังคับอากาศ (Draft-tube) โดยฟองอากาศที่ถูกจ่ายออกมานั้นจะเคลื่อนที่ไปในของเหลว (liquid) หรือ ของเหลว-ของแข็ง (liquid-solid suspension) ข้อดีของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Bubble Column คือ มีความสามารถในการถ่ายเทความร้อน และถ่ายเทมวลได้ดีเยี่ยม นอกจากนี้ยังใช้ค่าดำเนินการและการบำรุงรักษาต่ำอีกด้วย (Kantarci และคณะ, 2005)

Du และคณะ (1998) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* 2 สัณฐาน คือ mycelial filamentous และ mycelial pellets ใน Bubble Column พบว่าในการเจริญทั้ง 2 สัณฐานนั้น ได้ค่า Yield ในการผลิตกรดแลกติกที่สูง โดยในลักษณะสัณฐานแบบ filamentous นั้น ความเข้มข้นกรดแลกติกสุดท้าย 62 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กลูโคสเริ่มต้น 78 กรัมต่อลิตร หลังจาก 27 ชั่วโมงของการผลิต $Y_{P/S}$ 80 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตกรดแลกติกจำเพาะเฉลี่ย 1.46 ต่อชั่วโมง ขณะที่ในลักษณะสัณฐานแบบ pellet นั้น ความเข้มข้นกรดแลกติกสุดท้าย 66 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กลูโคสเริ่มต้น 76 กรัมต่อลิตร หลังจาก 43 ชั่วโมงของการผลิต $Y_{P/S}$ 86 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตกรดแลกติกจำเพาะเฉลี่ย 1.53 ต่อชั่วโมง

Zhou และคณะ (1999) ได้ทำการผลิตกรดแลกติกในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Bubble Column จาก *Rhizopus oryzae* ATCC 52311 โดยทำการควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที พบว่าลักษณะทางสัณฐานของรา เป็นแบบ pellet ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-2 มิลลิเมตร อัตราการผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดที่ 2.58 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นที่ 94 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นกรดแลกติกสุดท้าย 83 กรัมต่อลิตร หลังจาก 32 ชั่วโมงของการหมัก

2.5.6 การออกแบบและพัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพในการผลิตกรดแลกติก

Yin และคณะ (1998) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด air-lift ที่มีการพัฒนาให้เหมาะสมกับการผลิตกรดแลกติกโดย *R. oryzae* ซึ่งแสดงดังรูป 2.14

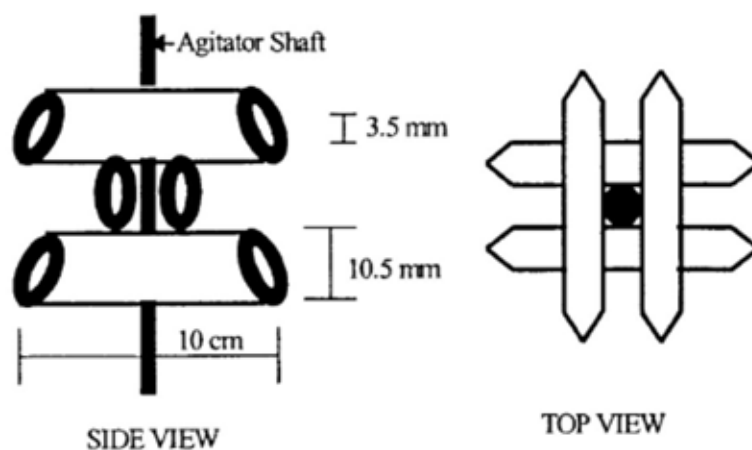


รูปที่ 2.14 แสดงโครงสร้างและองค์ประกอบของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด air-lift 1. ขวดเก็บสารกำจัดฟอง 2. ส่วนควบคุมสารกำจัดฟอง 3. เครื่องอัดอากาศ 4. ส่วนหล่อเย็น 5. Draft-tube 6. เครื่องให้อากาศ 7. เครื่องวัดค่าอัตราการไหล 8. เครื่องอัดอากาศ 9. เครื่องอ่านค่า DO 10. ส่วนควบคุมระดับ 11. ถังใส่น้ำฆ่าเชื้อ 12. ส่วนควบแน่น 13. เครื่องวัดสัญญาณ DO 14. เครื่องวัดสัญญาณฟอง 15. เครื่องวัดสัญญาณระดับ 16. ตะแกรงสแตนเลสตีล 17. ส่วนที่เก็บตัวอย่าง

เครื่องปฏิกรณ์ชนิด Air-lift ประกอบด้วยสามส่วน โดยด้านล่างสุดจะเป็นส่วนที่ให้อากาศเข้า ผ่าน sparger ส่วนที่สอง คือ ส่วนของ draft-tube ซึ่งเป็นส่วนที่ช่วยในการไหลเวียนของของแข็งของเหลว และ อากาศภายในระบบ ส่วนบนสุด คือส่วนที่ให้อากาศออกจากระบบ Okabe และคณะ ได้ออกแบบเครื่องแบบเครื่องปฏิกรณ์นี้ให้แตกต่างจากถังหมัก air-lift อื่นๆ คือ ด้านบน และล่างของ draft-tube จะถูกปิดด้วยลวดสแตนเลส เพื่อช่วยในการเนียนฟองอากาศให้ฟองอากาศมีขนาดเล็ก ซึ่งจะทำให้ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนต่อพื้นที่ ($K_L a$) สูงขึ้น โดยผลการศึกษาพบว่า สันฐานวิทยาของเชื้อรามีลักษณะเป็น pellet ขนาดเล็ก อัตราการผลิตกรดแลกติก 1.07 กรัมต่อ

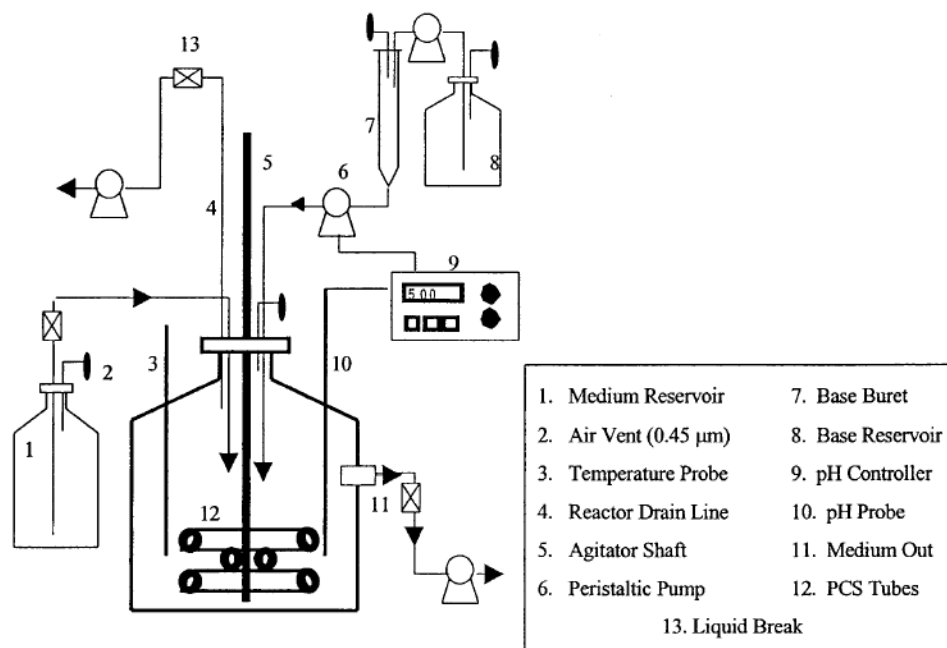
ลิตรต่อชั่วโมง ความเข้มข้นของกรดแลกติก 85.7 กรัมต่อลิตร โดยกระบวนการผลิตแบบ Repeated Batch จำนวน 9 รอบ ในระยะเวลา 14 วัน

Cotton และคณะ (2001) พัฒนาการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องจาก *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* (ATCC 11443) ได้พัฒนาและออกแบบส่วนของ Plastic Composite Support (PCS) มาต่อกับส่วนของแกนใบพัดในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน เพื่อให้เหมาะสมกับการตรึงเซลล์แบคทีเรียให้อยู่ในสถานะของ Biofilm ส่วนประกอบในการขึ้นรูปของ PCS นั้นประกอบด้วย โพลีโพรไพลีน เปลือกถั่วเหลืองบด แป้งถั่วเหลือง สารสกัดจากยีสต์ โปรตีนจากวัว และเกลือแร่ (50, 35, 5, 5 และ 5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อน้ำหนัก) และเปรียบเทียบกับ Plastic Polypropylene (PP) ที่ใช้เป็นตัวควบคุม โดยมีจำนวน 6 ท่อ ความยาวของ PCS และ PP ยาว 10 เซนติเมตร หนา 3.5 มิลลิเมตร และความกว้างเส้นผ่านศูนย์กลางภายนอก 10.5 มิลลิเมตร และนำมาประกอบกับแกนใบพัด ดังรูปที่ 2.15 และติดตั้งดังรูป 2.16



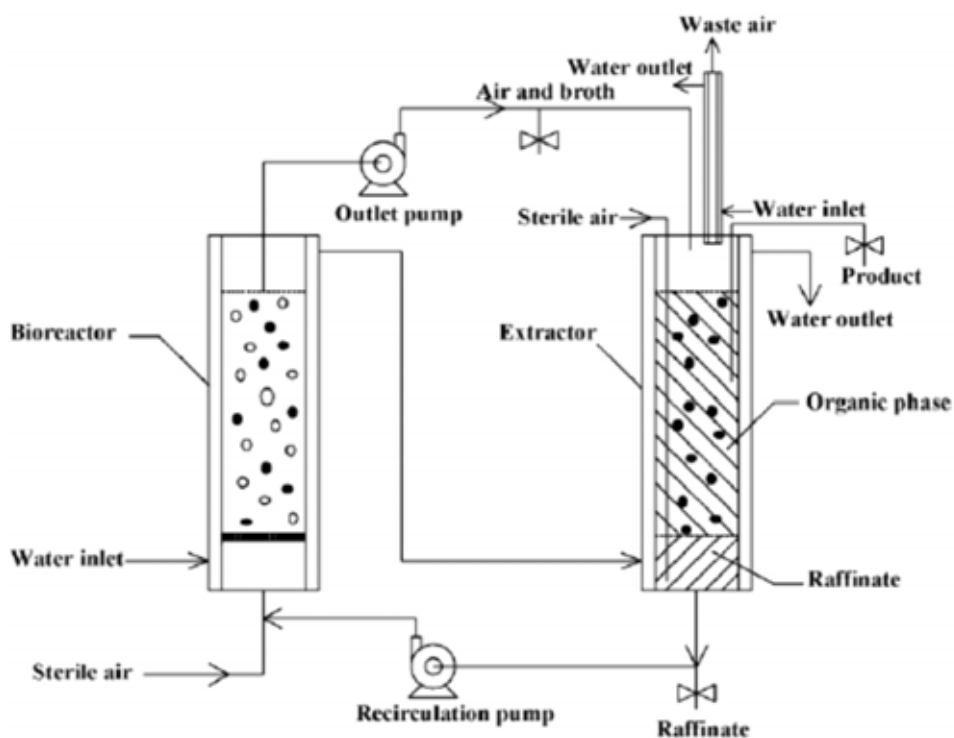
รูปที่ 2.15 Plastic Composite Support (PCS) และ Plastic Polypropylene (PP) ที่นำมาประกอบกับแกนใบพัดของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

พบว่า PCS นั้นจะช่วยกระตุ้นการเกิดลักษณะทางสถานะแบบ Biofilm และเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดแลกติก โดยเมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมคือ PP นั้น อัตราการผลิตกรดแลกติกเฉลี่ย 9.0 และ 5.8 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อใช้อัตราการเจือจาง 0.4 ต่อชั่วโมง ที่รอบการกวน 125 รอบต่อนาที โดยค่า Yield ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์



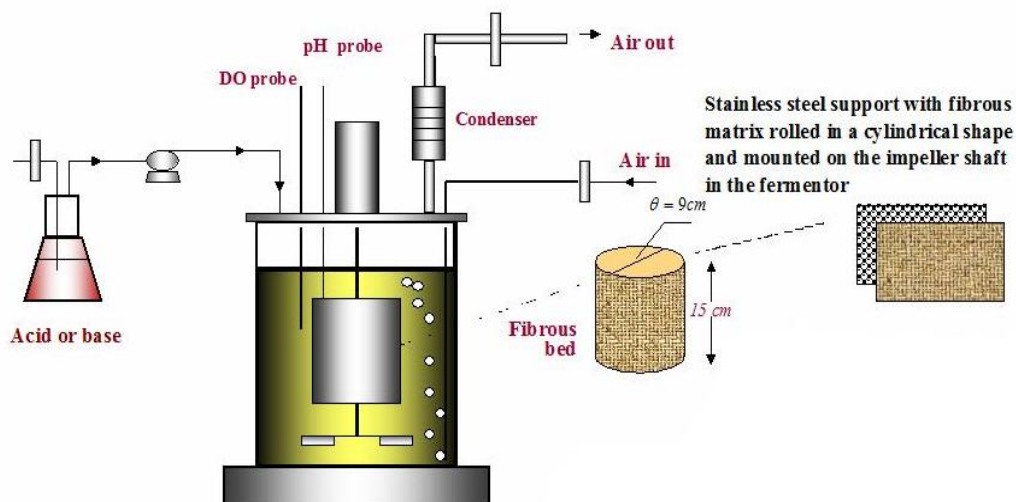
รูปที่ 2.16 แบบการทดลองในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Plastic Composite Support (PCS)

Lin และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดย *R. oryzae* ที่ถูกตรึงด้วย Calcium alginate ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Tree-phase fluidized bed แสดงดังรูป 2.17 โดยภายในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้ประกอบด้วยคอลัมน์แก้ว 2 แท่ง โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 70 มิลลิเมตร และกว้าง 420 มิลลิเมตร เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพประกอบด้วย Water jacket เพื่อควบคุมอุณหภูมิของระบบ และบริเวณด้านล่างของเครื่องปฏิกรณ์นั้นบรรจุ Glass screen เพื่อรองรับเม็ดบีท โดยเติมหัวเชื้อตั้งต้นกับเม็ดบีทลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ที่อัตราการให้อากาศ 1.00 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที หลังจากหมักเป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเติมลงในคอลัมน์ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1,200 มิลลิลิตร และเริ่มกระบวนการหมัก โดยใช้สภาวะในกระบวนการผลิตที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการไหล 3.0 ลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสามารถผลิตกรดแลกติก คิดเป็นค่าอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 11 กรัมต่อลิตรชั่วโมง



รูปที่ 2.17 ลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Tree-phase fluidized bed

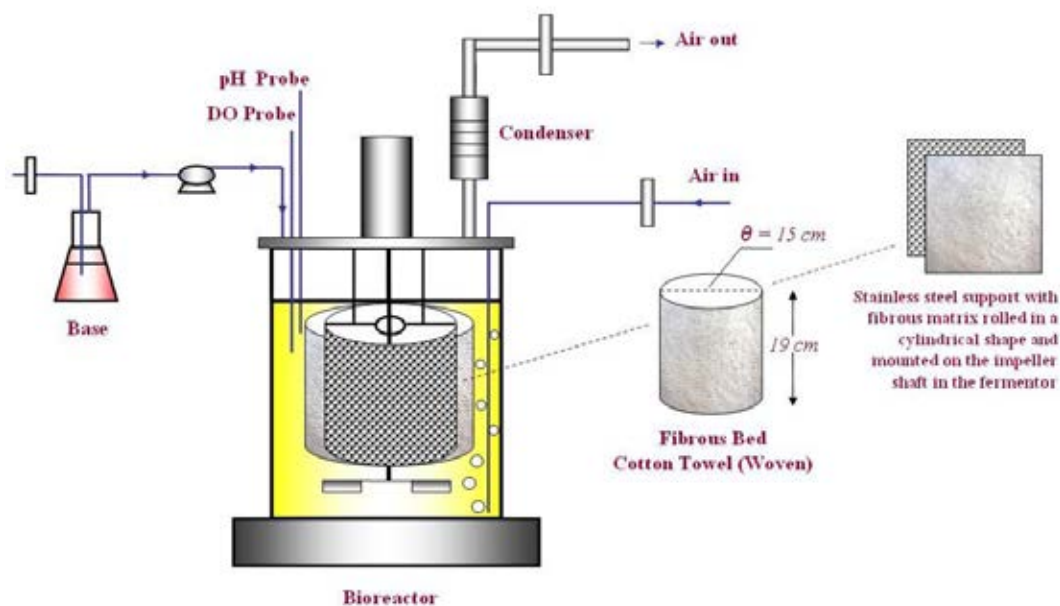
Tay และ Yang (2002) พัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Rotaing-Fibrous Bed (RFB) โดยองค์ประกอบหลักจะคล้ายคลึงกับเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน (Stirred-tank bioreactor) โดยได้มีการออกแบบส่วนของเบด โดยมีโครงสร้างแบบทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร สูง 15 เซนติเมตร ซึ่งทำจากสแตนเลสสตีลยึดติดกับส่วนของแกนไบโพัด และตะแกรงสแตนเลสสตีลหุ้มเป็น โครงร่าง RFB จากนั้นจึงหุ้มด้วยเส้นใยฝ้าย 100 เปอร์เซ็นต์ ดังรูป 2.18



รูปที่ 2.18 ลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Rotating fibrous-bed bioreactor (RFB)

พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดคือ 126 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 แต่เนื่องจากถึงปฏิกรณ์ชนิดนี้ ส่วนของเบดถูกยึดติดกับแกนใบพัด จึงทำให้มีข้อจำกัดในเรื่องอัตราการกวน และการรับน้ำหนักของแกนใบพัด ทำให้มอเตอร์ทำงานหนัก และเป็นข้อจำกัดในการเพิ่มรอบการกวน

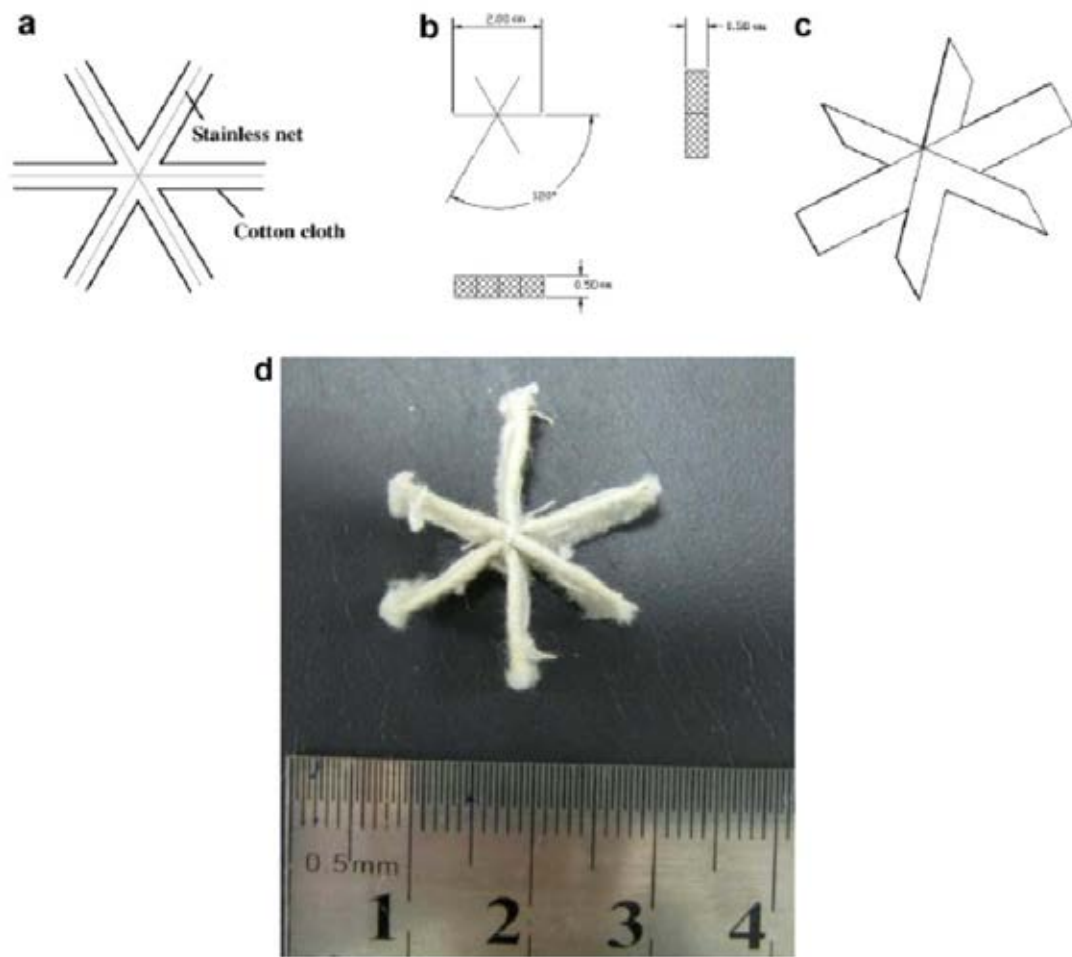
Chotisubha-anandha และคณะ (2011) ได้พัฒนาและออกแบบถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสถิต (static bed bioreactor) โดยได้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิตดัดแปลงจากถังกวน มีโครงสร้างแบบทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 19 เซนติเมตร สูง 15 เซนติเมตร ทำจากสแตนเลสสตีล ยึดอยู่กับฝาของถังหมัก ดังนั้นตัวเบดสถิตจึงไม่เคลื่อนที่ และใช้ตะแกรงสแตนเลสสตีลที่มีขนาดช่องตาข่าย 0.5 x 0.5 ตารางมิลลิเมตร หุ้มเป็น โครงร่างตัวเบดสถิต จากนั้นจึงหุ้มด้วยเส้นใยที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4 สำหรับเป็นตัวยึดเกาะของ *R. oryzae* แสดงดังรูป 2.19



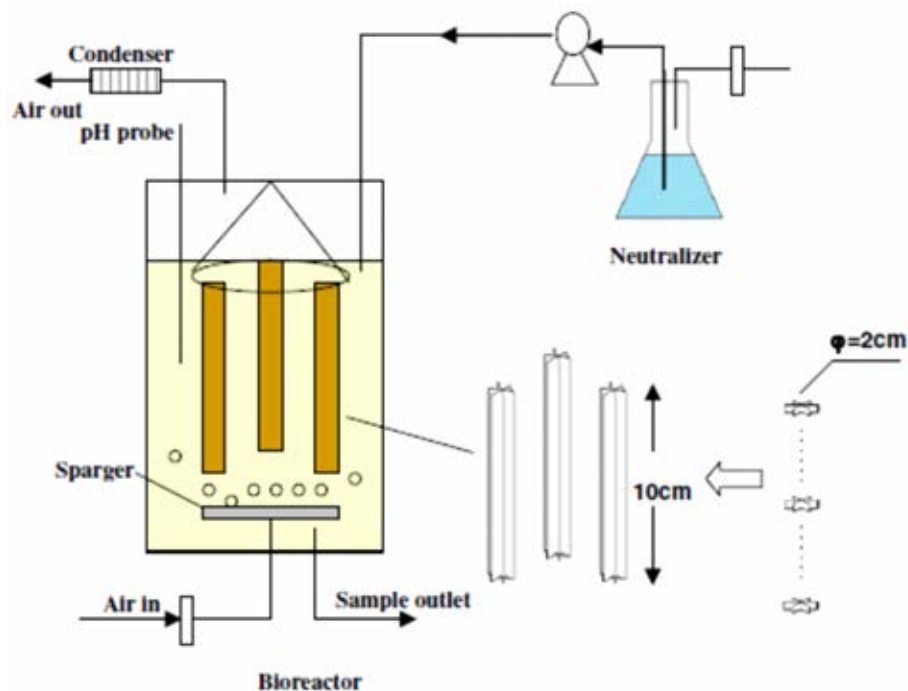
รูปที่ 2.19 ลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสถิต (Static Bed Bioreactor)

ที่มา : Chotisubha-anandha และคณะ, 2011

Wang และคณะ (2010) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดยการทำกรพัฒนาการตรึงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Bubble Column เพื่อควบคุมลักษณะทางสัณฐานของรา และเพิ่มการถ่ายเทออกซิเจนในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อการผลิตกรดแลกติก จึงได้ทำการออกแบบเมทริกซ์ซึ่งมีลักษณะคล้ายเครื่องหมายดอกจันทน์ ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 2 เซนติเมตร หนา 0.5 เซนติเมตร และทำการเย็บหุ้มด้วยผ้าขนหนู ดังรูปที่ 2.20 หลังจากนั้นได้นำตัวเมทริกซ์มาเชื่อมต่อกัน (ด้วยเชือก) ในแนวตั้ง จนกระทั่งยาว 10 เซนติเมตร จำนวน 3 แถว โดยแต่ละแถวจะถูกนำไปประกอบกับเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Bubble Column โดยจะมีลักษณะคล้ายกับรวงผึ้ง (honeycomb) ดังรูปที่ 2.21



รูปที่ 2.20 โครงสร้างเมทริกซ์ที่ใช้ในการตรึงเซลล์ที่มีลักษณะเป็นเครื่องหมายดอกจันท์



รูปที่ 2.21 ลักษณะของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Bubble Column ที่ทำการประกอบกับเมทริกซ์รวงผึ้ง (Honeycomb Matrix)

เนื่องจากตัวเมทริกซ์นั้นถูกหุ้มด้วยผ้าขนหนู ซึ่งเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวสำหรับการยึดเกาะและเจริญ โดยมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ของสปอร์ ที่ใส่เข้าไปนั้นจะทำการยึดเกาะบนตัวเมทริกซ์ภายใน 6-8 ชั่วโมง และหลังจาก 10 ชั่วโมงของการหมักนั้น พบว่าไม่พบเซลล์แขวงลอยในน้ำหมัก จึงกล่าวได้ว่าสามารถทำการตรึงเซลล์นั้นมีประสิทธิภาพ 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการเปรียบเทียบผลกับการผลิตกรดแลกติกแบบแขวงลอยนั้น พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงขึ้นประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ (49.5 กรัมต่อลิตร และ 29.3 กรัมต่อลิตร) และเวลาในการหมักลดลง 33 เปอร์เซ็นต์ (48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง) ในขวดเขย่าที่ใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร มากไปกว่านั้นการพัฒนาการตรึงเซลล์นี้สามารถเพิ่มความสามารถการผลิต ในกระบวนการหมักแบบ Repeated-Batch จำนวน 9 รอบการผลิต ในเวลา 36 วัน ความเข้มข้นกรดแลกติกสูงสุด 68.8 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติก 0.72 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ $Y_{P/S}$ 93.4 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อน้ำหนัก

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัท	ประเทศ
กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)	Alphaphot-2 YS2	Nikon Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ สแกน (Scanning electron microscope)	JSM-5410LV	Jeol	ญี่ปุ่น
เครื่องชั่งแบบละเอียด (Electronic balance)	FX-180	A&D Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
เครื่องชั่งแบบหยาบ (Electronic balance)	FX-3000	A&D Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	AB15	Fisher Scientific Pte Ltd	สิงคโปร์
เครื่องไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโทกราฟี (HPLC)	Shimadzu SCL-10Avp	Shimadzu Corporation	ญี่ปุ่น
เครื่องวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (YSI Select Biochemistry Analyzer)	Model 2700	YSI INC.	สหรัฐอเมริกา
เครื่องวิเคราะห์ไนโตรเจน			
เครื่องกลั่น (Distillation Unit)	K-355	Buchi Co., Ltd.	สวิตเซอร์แลนด์
เครื่องย่อย		Buchi Co., Ltd.	สวิตเซอร์แลนด์
เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)	KT-30 SD	ALP Co., Ltd.	ญี่ปุ่น

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัท	ประเทศ
เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer)	Vortex-Genie No. 2	Scientific Industries Inc.	สหรัฐอเมริกา
เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร (Bioreactor 5 Liters)	Biostat [®] B Plus	Sartorius	เยอรมัน
เครื่องอัดอากาศ (Air compressor)	E104096	Tong Chang Iron Work Co., LTD	ไต้หวัน
เครื่องควบคุมระบบหล่อเย็น (Circulation type hardy cooler)	GT-CRB	GibThai	ญี่ปุ่น
มาตรตรวจวัดความเป็นกรดต่าง (pH combination electrode)	405-DPAS-SC- K85/325	Mettler tobedo	สวิตเซอร์แลนด์
มาตรตรวจวัดออกซิเจนที่ละลาย (Dissolved oxygen electrode)	InPro6820/12/320	Mettler tobedo	สวิตเซอร์แลนด์
ตัวกรองอากาศ (Fillter)	Midisart [®] 2000 (0.20 μ c PTFE)	Sartorius Stedim Biotech	เยอรมัน
ปั๊มไหลวน (Peristaltic pump)	SMP-23	EYELA	สหรัฐอเมริกา
ปั๊มไหลวน (Peristaltic pump)	P-3	Pharmacia Fine Chemical	สหรัฐอเมริกา
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow hood)	NK system clean bench	International Scientific Supply	ไทย
ตู้อบแห้ง (Oven)	UNB-400	Memmert Co., Ltd.	เยอรมัน
แผ่นนับเม็ดเลือดแดง (Heamacytometer)	Neubauer Bright Line	Bocco Co., Ltd.	เยอรมัน

3.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
Antifoam Y-30 Emulsion	Sigma	สหรัฐอเมริกา
Boric acid (H_3BO_3)	Merck	เยอรมัน
Copper sulfate ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์
Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	สยามชัยเคมีคอล	ไทย
Magnesium sulfate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	Carlo erba	อิตาลี
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Merck	เยอรมัน
Potassium sulfate (K_2SO_4)	Merck	เยอรมัน
Potato Dextrose Agar (PDA)	Difco	สหรัฐอเมริกา
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 จุลินทรีย์

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

3.2.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

ใช้เข็ม (needle) เขี่ยสปอร์ *R.oryzae* ลาก (streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Potato Dextrose Agar (PDA) โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อ (subculture) ทุกๆ เดือน

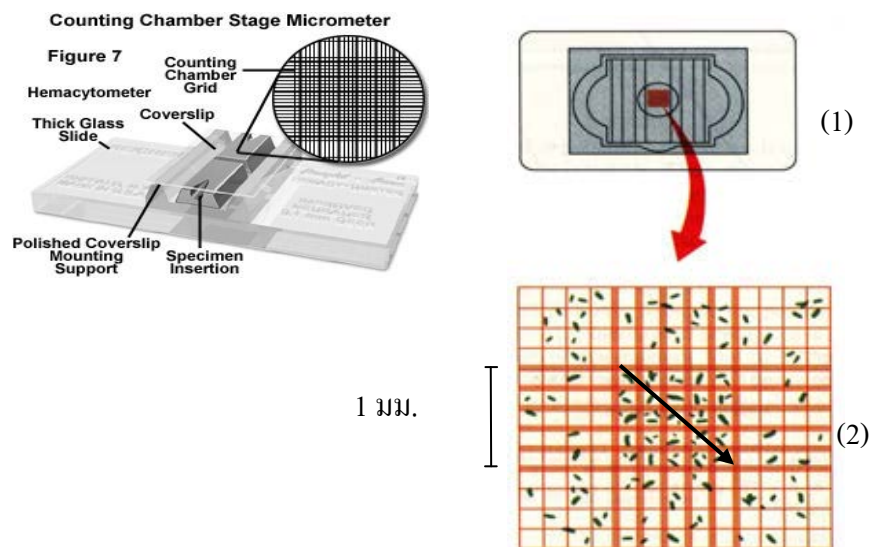
3.2.3 การเตรียมกล้าเชื้อ

เลี้ยงรา *R.oryzae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง PDA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หลังจากใช้เข็มเขี่ยสปอร์ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร และทำการเขี่ยสปอร์ให้กระจาย และทำการปิเปตสปอร์แขวนลอยปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงบน Haemocytometer ที่ปิดด้วย cover slip และนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า นับจำนวนสปอร์ ตามแนวเส้น ดังรูปที่ 3.1

การคำนวณหาความเข้มข้นของสปอร์

ปริมาตรใน 25 ช่องใหญ่ (400 ช่องเล็ก)	= 0.1	ลูกบาศก์มิลลิเมตร
สมมติค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์ใน 1 ช่องใหญ่	= (a)	เซลล์
ใน 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด	= 25(a)	เซลล์
ใน 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด	= $\frac{25(a)}{0.1} = 250(a)$	เซลล์
ใน 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร (มิลลิลิตร) มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด	= 250(a) × 1,000	เซลล์
	= 25(a) × 10 ⁴	เซลล์

โดยนับจำนวนสปอร์ตามแนวเส้นทั้งหมด 5 ช่อง และนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยของสปอร์ (a) เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอย ($25a \times 10^4$) จากนั้นเตรียมสปอร์แขวนลอยที่มีความเข้มข้น 10⁶ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตรทั้งหมด 10 มิลลิลิตร สำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อในเครื่องปฏิบัติการชีวภาพต่อไป



รูปที่ 3.1 ลักษณะของ Haemacytometer (1) ภาพที่มองจากด้านบนของ chamber โดยมีตารางอยู่กลางสไลด์ (2) ภาพกำลังขยายของตารางที่กำลังขยาย 10 เท่า ประกอบด้วย สี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดใหญ่ แต่ละด้านยาว 1 มิลลิเมตร โดย 1 สี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ประกอบด้วย สี่เหลี่ยมจัตุรัสเล็ก 25 ช่อง แต่ละช่องมีเส้น 3 เส้น ล้อมรอบโดยแต่ละด้านยาว 0.2 มิลลิเมตร ภายในมีสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดเล็กบรรจอยู่อีก 16 ช่อง

ที่มา : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, (2551)

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมัก

อาหารเลี้ยงเชื้อ *R.oryzae* NRRL 395 อ้างอิงจากสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในงานวิจัยของ Thongchul (2005) ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อถูกแบ่งออกเป็น 3 ส่วน

1) อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการเจริญ (Growth medium) ประกอบด้วย

กลูโคส	50	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัมต่อลิตร

2) อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ (Production medium) ประกอบด้วย

กลูโคส	70, 100, 150 และ 200	กรัมต่อลิตร
ยูเรีย	0.3	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.6	กรัมต่อลิตร
MgSO_4	0.25	กรัมต่อลิตร
ZnSO_4	0.088	กรัมต่อลิตร

3) อาหารเลี้ยงเชื้อในการหมักแบบต่อเนื่อง

สูตรที่ 1

กลูโคส	70	กรัมต่อลิตร
--------	----	-------------

สูตรที่ 2

กลูโคส	150	กรัมต่อลิตร
--------	-----	-------------

สูตรที่ 3

กลูโคส	150	กรัมต่อลิตร
ยูเรีย	0.3	กรัมต่อลิตร**

สูตรที่ 4

กลูโคส	150	กรัมต่อลิตร
ยูเรีย	0.15	กรัมต่อลิตร**

**หมายเหตุ เต็มทุกๆ 24 ชั่วโมง ของการหมักแบบต่อเนื่อง

3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนหลัก คือ การหมักกรดแลกติกแบบแบตช์ และการหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง โดยการหมักกรดแลกติกแบบแบตช์แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

1. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักกรดแลกติกในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวนและในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติก และศึกษาปัจจัยต่างๆ ในการหมักแบบแบตช์ในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ โดยปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ อัตราการกวน อัตราการให้อากาศ ความเข้มข้นกลูโคส และ
2. การผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติก โดยศึกษาผลของอัตราการเจือจาง อัตราการไหล สูตรอาหารที่ใช้ในการป้อน ต่อจลนพลศาสตร์ของกระบวนการ

3.4.1 การหมักกรดแลกติกแบบแบตช์ (batch process) ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร

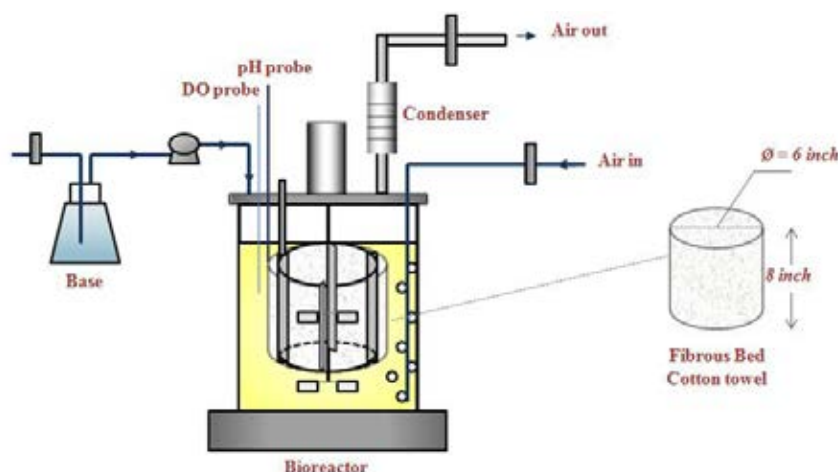
3.4.1.1 การหมักกรดแลกติกในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน (Stirred Tank Bioreactor)

เตรียมเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน โดยก่อนปฏิบัติการต้องทำการฆ่าเชื้อ (Sterilization) เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพพร้อมอุปกรณ์วัดต่างๆ เพื่อให้ปราศจากจุลินทรีย์ และป้องกันการปนเปื้อน (Contamination) โดยก่อนทำการฆ่าเชื้อ ต้องทำการเทียบหัววัดค่ากรด-เบส แล้วทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 45 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อภายในเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เริ่มควบคุมอุณหภูมิภายในที่ 30 องศาเซลเซียส แล้วทำการเทียบหัววัดออกซิเจน (DO probe) จากนั้นทำการถ่ายหัวเชื้อที่มีความเข้มข้นสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยภาวะที่ใช้ในการควบคุมเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพอ้างอิงจาก Chotisubha-ananda et al. (2011) โดยใช้อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยถ่ายน้ำหมักในถังออกแล้วเติมอาหารเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์ที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 4 ลิตร ลงในถัง จากนั้นควบคุมที่ภาวะเดิม ควบคุมค่ากรด-เบสที่ 6.0 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 โมลาร์ และทำการหมักจนกระทั่งกลูโคสหมด หรือความเข้มข้นของกรดแลกติกไม่เพิ่มขึ้น เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก 6 ชั่วโมงเพื่อนำไปวิเคราะห์ โดยตัวอย่างน้ำหมักจะนำไปเจือจาง

และกรองด้วยเยื่อเลือกผ่านเซลลูโลสอะซิเตส (ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน) เพื่อแยกเอาตะกอนออก และนำส่วนใสไปทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก กรดฟูมาริก เอทานอล และกลูโคส ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิด โครมาโทกราฟี (HPLC)

3.4.1.2 การหมักกรดแลกติกในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสถิต (Static Bed Bioreactor)

เตรียมเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสถิต โดยดัดแปลงมาจากเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน โดยตัดผ้าฝ้ายชนิดถัก (ผ้าขนหนู) ขนาด 11×20 นิ้ว และนำมาเย็บตรึงกับโครงร่าง baffle ที่มีอยู่ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน โดยโครงร่าง baffle มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 นิ้ว สูง 8 นิ้ว โดยผ้าขนหนูที่ยึดอยู่กับ baffle จะทำหน้าที่เป็นตัวยึดตรึงราให้เจริญเติบโตอยู่บนผ้าขนหนู ดังแสดงในรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 แผนภาพเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสถิต (Static Bed Bioreactor) (ดัดแปลงมาจาก Tay และ Yang, 2002)

ทำการเทียบหัววัดค่ากรด-เบส แล้วนำเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสถิตพร้อมอุปกรณ์วัดต่างๆ ที่บรรจุอาหารเพื่อการเจริญปริมาณ 4 ลิตร ไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 45 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อภายในเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เริ่มควบคุมอุณหภูมิภายในถังที่ 30 องศาเซลเซียส แล้วทำการเทียบหัววัดออกซิเจน (DO probe) จากนั้นทำการถ่ายหัวเชื้อที่มีความเข้มข้นสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10

มิลลิลิตร ลงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ แปรปัจจัยรอบการกวนที่ 300, 500 และ 700 รอบต่อนาที และ อัตราการการให้อากาศ 0.5 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยถ่ายน้ำหมักในถังออกแล้วเติมอาหารเพื่อการสร้างผลิตภัณฑ์ที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 4 ลิตร ลงในถัง จากนั้นควบคุมที่ภาวะเดิม และควบคุมค่ากรด-เบสที่ 6.0 ด้วย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 โมลาร์ และทำการหมักจนกระทั่งกลูโคสหมด หรือความเข้มข้นของกรด แลกติกไม่เพิ่มขึ้น เก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก 6 ชั่วโมงเพื่อวิเคราะห์แล้วคำนวณหาค่าจลนพลศาสตร์ ค่าสัมประสิทธิ์การผลิตกรดแลกติก (μ_p) โดยตัวอย่างน้ำหมักจะนำไปเจือจางและกรองด้วยเยื่อเลือก ผ่านเซลลูโลสอะซิเตส (ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน) เพื่อแยกเอาตะกอนออก และนำส่วนใสไปทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก กรดฟูมาริก เอทานอล และกลูโคส ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ ลิกวิด โครมาโทกราฟี (HPLC) เมื่อสิ้นสุดการหมักทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยแยกออกจาก baffle และทำการตัดชิ้นส่วนของเซลล์เพื่อนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน เพื่อศึกษา สัณฐานวิทยาของรา

3.4.2 การหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง (Continuous Process) ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร

ทำการทดลองเหมือนในข้อ 3.4.1.2 และเมื่อในระยะเวลาสร้างผลิตภัณฑ์ทำการเก็บตัวอย่าง และนำไปเจือจาง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสในระบบด้วยเครื่อง YSI 2700 Biochemistry Analyzer และนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหลืออยู่ภายในระบบ และเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลภายในระบบ ประมาณ 10-20 กรัมต่อลิตร จะทำการเปลี่ยนการผลิต จากแบบแบตช์ เป็นแบบต่อเนื่อง โดยเริ่มเติมอาหารแบบต่อเนื่องเข้าสู่ระบบ ขณะเดียวกันก็ทำการถ่ายของเหลวภายในระบบออก ด้วยอัตราการไหลที่เท่ากัน และทำการเก็บตัวอย่าง เพื่อวิเคราะห์แล้วคำนวณหา ค่าจลนพลศาสตร์ โดยตัวอย่างน้ำหมักจะนำไปเจือจางและกรองด้วยกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตส (ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน) เพื่อแยกเอาตะกอนออก และนำส่วนใสไปทำการวิเคราะห์ปริมาณกรด แลกติก กรดฟูมาริก เอทานอล และกลูโคส ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิด โครมาโทกราฟี (HPLC) เพื่อดูแนวโน้มการใช้กลูโคสและการผลิตกรดแลกติก จนกระทั่งความเข้มข้นกรดแลกติกมีแนวโน้มลดลง และความเข้มข้นกลูโคสมีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง หรือ เซลล์อยู่ในสภาวะ

หมดประสิทธิภาพ จึงทำการหยุดการผลิต และเมื่อสิ้นสุดการหมักทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยแยกออกจาก baffle และทำการตัดชิ้นส่วนของเซลล์เพื่อนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของรา

3.5 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.5.1 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

โดยเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก แยกเซลล์และฟ้ำออกจาก โครง baffle และนำไปล้างด้วยน้ำสะอาด หลังจากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน หลังจากนั้นทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ประมาณ 45-60 นาที และจึงนำไปชั่งน้ำหนัก และนำค่าที่ได้ไปหักลบกับฟ้ำที่ชั่งหาน้ำหนักไว้ก่อนหน้า และจะได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสุทธิ ของ *R. oryzae* ที่เจริญจากการหมักในแต่ละครั้ง

3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส กรดแลกติก กรดฟูมาริก และเอทานอล ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC)

นำตัวอย่างมาทำการเจือจางในอัตราที่เหมาะสม และนำมากรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตท (ขนาดรูพรุน 0.45 ไมครอน) นิดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) เพื่อหาปริมาณกลูโคส กรดแลกติก กรดฟูมาริก และเอทานอล โดยวิเคราะห์ในสภาวะดังนี้

คอลัมน์	Biorad Aminex HPX-87H ion exclusion organic acid column
	ขนาด 300 มิลลิเมตร × 7.8 มิลลิเมตร
สารละลายตัวพา	กรดซัลฟิวริก เข้มข้น 0.005 มิลลิโมลาร์
อุณหภูมิ	45 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	0.6 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจวัด	RI detector (Shimadzu รุ่น RID-6A)
เวลาที่อยู่ในคอลัมน์	25 นาที

โดยทำการคำนวณหาความเข้มข้นเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส กรดแลกติก กรดแลคติก และ เอทานอลที่ความเข้มข้น 0 - 2 กรัมต่อลิตร

3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธีเจลดาคาลด์ (Kjeldahl protein, A.O.A.C., 1975; ตาลวงษ์, 2550)

นำตัวอย่างน้ำหนักที่ต้องการตรวจสอบปริมาตร 3 มิลลิลิตร และเติมเกลือผสมช่วยเร่งปฏิกิริยา ประกอบด้วย โพรแทสเซียมซัลเฟต และคอปเปอร์ซัลเฟต (95:5) จำนวน 7 กรัม และเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยบนเตาหลุมจนกระทั่งสารละลายใส ประมาณ 35 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และนำไปประกอบเข้ากับเครื่องกลั่นไนโตรเจน และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 32 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 50-60 มิลลิลิตร หรือจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีดำ แล้วกลั่นจับก๊าซแอมโมเนียที่เกิดขึ้น โดยใช้สารละลายกรดบอริกเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 60 มิลลิลิตร และเติมอินดิเคเตอร์ เมทิลเรดเมทิลีนบลู (methyl red methylene blue) ประมาณ 3 หยด กลั่นเป็นเวลา 3:45 นาที แล้วนำสารละลายที่กลั่นได้มาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริกที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนสีเป็นส้มอ่อน แล้วทำการบันทึกปริมาตรกรดที่ใช้ในการไทเทรต แล้วคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน ดังนี้

เปอร์เซ็นต์ใน โตรเจน = (ปริมาตรกรดเกลือ × ความเข้มข้นกรดเกลือ × 1.4) / ปริมาตร
ตัวอย่าง

3.5.4 การหาค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนด้วยวิธี Dynamic method of gassing out

การคำนวณหาค่า $K_L a$ ในสภาวะของการหมักที่เซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ โดยเมื่อสิ้นสุด
กระบวนการหมักจะทำการหยุดการให้อากาศ ซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นของออกซิเจนในของเหลว
(bulk liquid) ค่อยๆ ลดลงอย่างต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตามจะยังคงมีการกวนอยู่ แต่อยู่ในระดับต่ำ
เพื่อให้คงความเป็นเนื้อเดียวกัน และทำการวัดความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารทุกๆ 30
วินาที จนกระทั่งค่าความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหารวัดได้ค่าคงที่ หลังจากนั้นจึงปรับ
อัตราการให้อากาศ และอัตราการกวน ให้เท่ากับสภาวะที่ใช้ในการหมักเริ่มต้น ขณะเดียวกันก็ทำ
การวัดค่าความเข้มข้นของออกซิเจนที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งค่าความเข้มข้นของออกซิเจน
คงที่ และนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายใน
ของเหลว (bulk liquid) กับเวลา อยู่ในเทอมของ $\frac{dCL}{dt}$ เพื่อหาความชัน ซึ่งเท่ากับ อัตราการใช้ของ
ออกซิเจนของเซลล์ (OUR) จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณจากสูตร

$$\frac{dCL}{dt} = OTR - OUR \quad \dots\dots\dots (1)$$

โดยอัตราการถ่ายเทออกซิเจน (OTR) นั้นสามารถหาได้จากสมการ

$$OTR = K_L a \times (C_L^* - C_L) \quad \dots\dots\dots (2)$$

C_L^* คือ ค่าการละลายของออกซิเจนในของเหลว (bulk liquid) (mM) และ $K_L a$ หรือ ค่า
สัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน (min^{-1}) โดยในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ค่า OTR จะเท่ากับ 0

ดังนั้น เมื่อแทนค่า OTR ลงในสมการที่ (1)

จะได้ว่า
$$\frac{dCL}{dt} = - OUR \quad \dots\dots\dots (3)$$

เพราะฉะนั้นจะได้สมการเส้นตรง
$$dCL = - OUR(dt) \quad \dots\dots\dots (4)$$

ดังนั้นเมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (ไม่มีอากาศ) (แกน x) กับ C_L (แกน y) แสดงดังรูปที่ 3.3 โดยส่วนกลับของค่าความชันที่ได้ จะเท่ากับ OUR

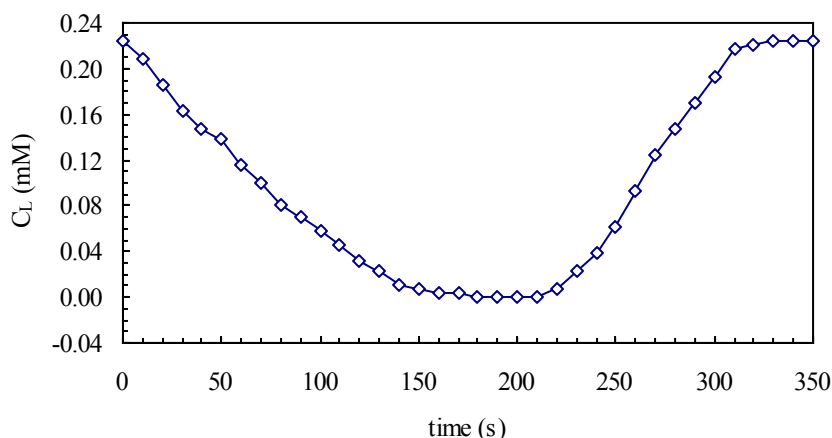
สำหรับค่า $K_L a$ และค่า C^* สามารถหาได้จากความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\frac{dC_L}{dt} + OUR$ กับ C_L โดยเมื่อนำสมการที่ 1 เท่ากับสมการที่ 2 จะได้ว่า

จะได้ว่า
$$\frac{dC_L}{dt} + OUR = K_L a(C_L^* - C_L) \dots\dots\dots (5)$$

เพราะฉะนั้นจะได้สมการเส้นตรง
$$\frac{dC_L}{dt} + OUR = -K_L a(C_L^*) \dots\dots\dots (6)$$

ดังนั้นจะได้จากความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\frac{dC_L}{dt} + OUR$ กับ C_L ซึ่งส่วนกลับของความชันที่ได้ เท่ากับ $K_L a$ ส่วนค่า C^* เท่ากับ จุดตัดแกน Y ต่อ $K_L a$

Oxygen concentration profile



รูปที่ 3.3 ค่าการละลายของออกซิเจนด้วยเทคนิค Gassing out

3.5.5 Scanning electron microscope (SEM)

แบ่งตัวอย่างเซลล์ที่ถูกตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติตมาเล็กน้อย และทำการตัด แบ่งชิ้นส่วนเซลล์ขนาด 0.5×0.5 เซนติเมตร จำนวน 2 ชิ้น ได้แก่ 1) ส่วนด้านใน baffle 2) ส่วน ด้านนอก baffle และนำมาแช่ในสารละลายผสมระหว่างกลูটারัลดีไฮด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ กับ ฟอสเฟต

บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ค่ากรด-เบส 7.2 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 คืน จากนั้นล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ ค่ากรด-เบส 7.2 เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 2 ครั้งและน้ำ DI เป็นเวลา 10 นาที อีก 1 ครั้ง ต่อมาทำการดึงน้ำออกด้วยเอทานอล (30 เปอร์เซ็นต์ 50 เปอร์เซ็นต์ 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาทีต่อครั้ง สุดท้ายใช้ แอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์ (absolute ethanol) เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง เมื่อได้แล้วนำเซลล์ไปทำให้แห้งด้วยวิธี Critical point (Critical point dryer, Balzer model CPD 020) จากนั้นนำไปเคลือบติดด้วยทอง (Sputter coater, Balzer model CPD 020) ขั้นตอนสุดท้ายนำมาวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกน (JEOL, model JSM-5410LV) เพื่อศึกษาคุณโครงสร้างของเส้นใยและลักษณะของ *R. oryzae* ที่ยึดตรึงบนผ้าเส้นใยฝ้าย

บทที่ 4

ผลการทดลอง และวิจารณ์ผลการทดลอง

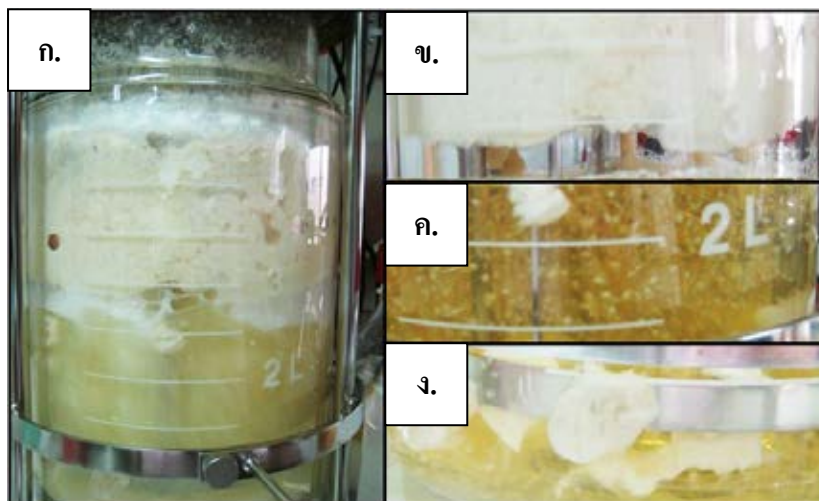
งานวิจัยนี้ ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตกรดแอส-แลกติกโดยเซลล์ตรึงของ *Rhizopus oryzae* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสถิต (static bed bioreactor) ในกระบวนการหมักแบบแบตช์และแบบต่อเนื่อง ในขั้นต้นแรก ทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้ กับเซลล์แขวนลอยในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวนในการหมักกรดแลกติกแบบแบตช์ พร้อมทั้งหาปัจจัยสำคัญที่เป็นตัวควบคุมการผลิตกรดแลกติกในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสถิต จากนั้น ทดสอบความสามารถในการเจริญและผลิตกรดแลกติกเมื่ออยู่ในภาวะเครียด ได้แก่ ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลูโคสสูง และทดสอบความเสถียรของเซลล์ตรึงในการหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง

4.1 การหมักกรดแลกติกแบบแบตช์ (Batch Process) ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

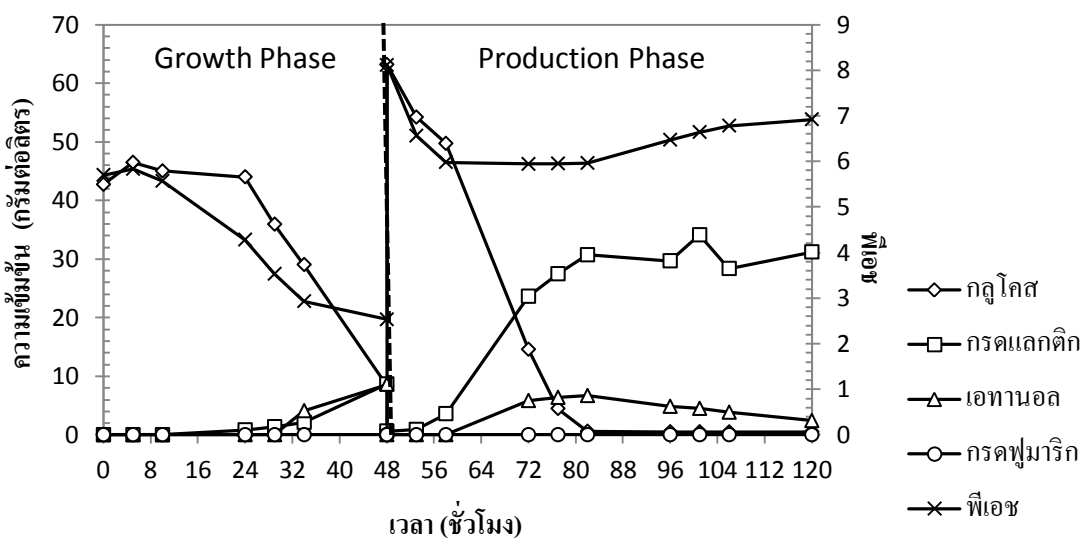
4.1.1 การหมักกรดแลกติกในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน (Stirred Tank Bioreactor)

ในการผลิตกรดแลกติกแบบแขวนลอยโดย *R.oryzae* ในการหมักระยะเพื่อการเจริญ (growth phase) ภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยไม่มีการควบคุมค่าพีเอช เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง และทำการเปลี่ยนอาหารจากอาหารเพื่อการเจริญ เป็นอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ โดยใน ระยะสร้างผลิตภัณฑ์ (production phase) จะควบคุมค่าพีเอชที่ 6 ในระบบ โดยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 โมลาร์ เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าราที่เจริญในน้ำหมัก จะมีการจับกันเป็นกลุ่มก้อน และเริ่มแพร่กระจายไปยังบริเวณเหนือน้ำหมักหมัก โดยราจะจับและเจริญบนผนังของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ (รูปที่ 4.1 ก.) ซึ่งสัณฐานวิทยาของราจากการหมักแบบแขวนลอยนั้น ถูกแบ่งออกเป็น 3 รูปแบบ คือ 1) hard biofilm ซึ่งเป็นส่วนของราที่จับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนหนา เจริญเหนือน้ำหมัก 2) pellet 3) clump ดังรูปที่ 4.1 ข. ค. ง. ตามลำดับ ซึ่งรูปแบบที่ 2 และ 3 นั้นจะเป็นรูปแบบของราที่

เจริญในน้ำหมัก พบว่าการผลิตกรดแลกติกแบบแขวนลอยในเครื่องปฏิกรณ์ชนิดถังกวน เมื่อพิจารณารูปที่ 4.2 พบว่าความเข้มข้นของกรดแลกติกสุดท้ายในระหว่างการสร้างผลิตภัณฑ์เท่ากับ 34.10 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 100 ของการผลิต อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 1.16 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และค่า $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 54.85 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ความเข้มข้นของเอทานอลสุดท้ายในระหว่างการสร้างผลิตภัณฑ์เท่ากับ 6.68 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.29 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และค่า $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 13.98 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อเสร็จสิ้นการหมัก น้ำหนักแห้งของเซลล์เท่ากับ 7.16 กรัมต่อลิตร จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวนไม่สามารถควบคุมสัณฐานวิทยาในการเจริญของราได้ จึงทำให้ราเจริญอย่างอิสระในน้ำหมัก ขณะที่บางส่วนเจริญตามส่วนประกอบของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ เช่น ไบพัด หัววัดค่าการละลายของออกซิเจน (DO probe) หัววัดค่าพีเอช (pH probe) ซึ่งการที่เซลล์ของราไปเจริญบนอุปกรณ์วัดสัญญาณเหล่านี้ส่งผลให้เครื่องแปรผลคลาดเคลื่อนจากค่าความเป็นจริง นอกจากนี้การที่เซลล์ของราเจริญอย่างอิสระในน้ำหมักนั้น ทำให้มีโอกาสดูดการถูกแรงเฉือนจากไบพัด ซึ่งทำให้เซลล์เกิดความเสียหาย ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่จำกัดความสามารถในการผลิตกรดแลกติกของรามากไปกว่านั้นการที่ราเส้นใยกระจายตัวในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพนั้นทำให้น้ำหนักมีความหนืดสูงขึ้น ซึ่งจะส่งผลต่ออัตราการถ่ายเทออกซิเจนในระบบ ซึ่งส่งผลให้กรดแลกติกที่ผลิตได้ค่อนข้างต่ำ และยังเป็นการกระตุ้นให้มีการผลิตเอทานอลให้สูงขึ้นอีกด้วย (Du และคณะ, 1998; Park และคณะ, 1998; Tay และ Yang, 2001; Zang และคณะ, 2008)



รูปที่ 4.1 สัณฐานวิทยาของเซลล์แขวนลอย ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน หลังจาก ที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ในระยะการเจริญ (ก.), รูปแบบของสัณฐานวิทยาที่เจริญ hard biofilm (ข.), pellet (ค.), clump (ง.)



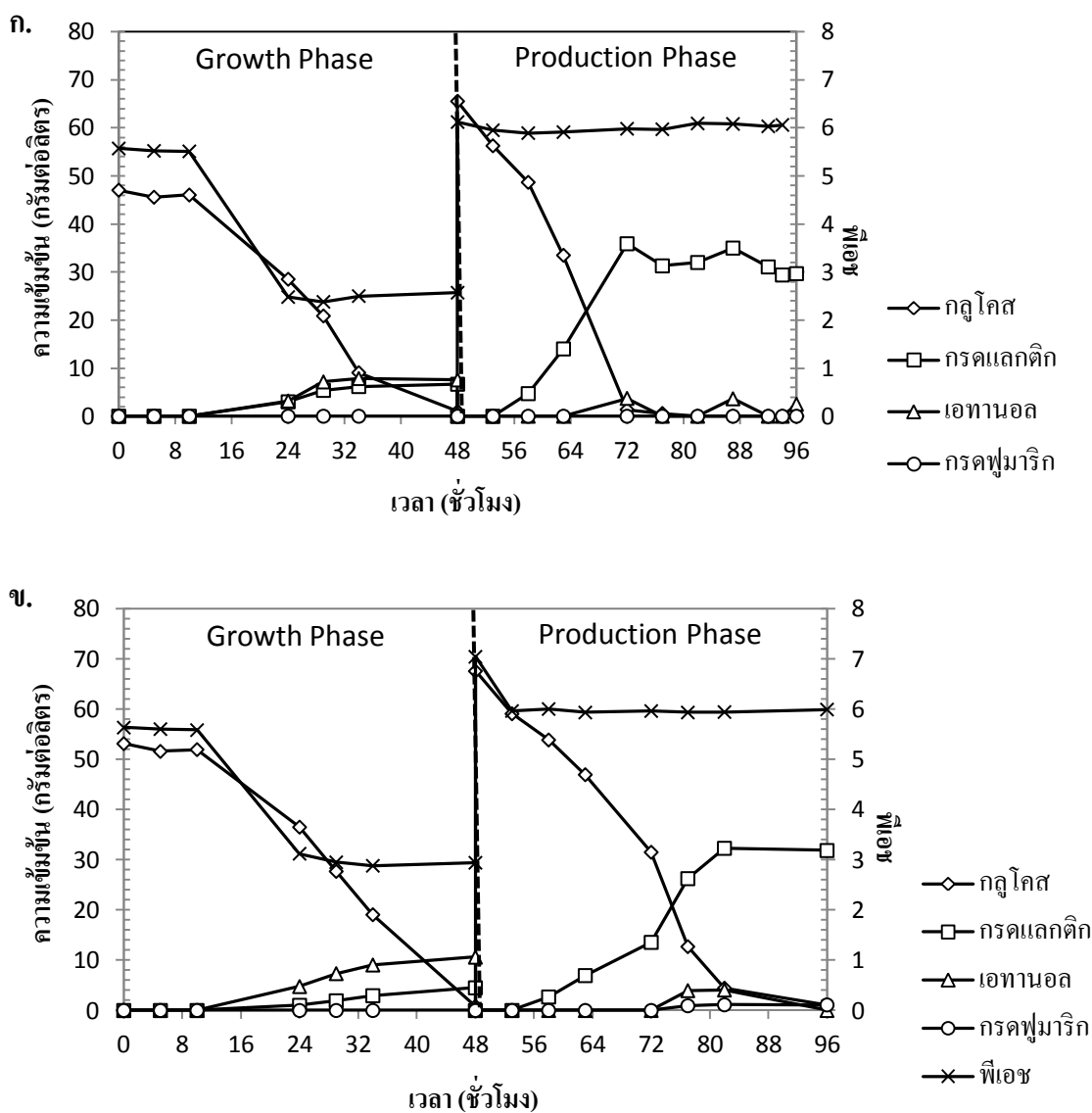
รูปที่ 4.2 การผลิตกรดแลกติกแบบแขวนลอยในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน ที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 (ก.) ปริมาตรอากาศต่อปริมาณอาหารต่อนาที จากผลการทดลองดังกล่าวข้างบน และงานวิจัยที่ผ่านมา พบว่า เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด ถังกวนไม่เหมาะสำหรับการผลิตกรดแลกติกจาก *R. oryzae* ซึ่งพบว่า ที่ผ่านมาได้มีการพัฒนา เทคนิคการตรึงเซลล์ร่าเส้นใยเพื่อแก้ปัญหาลักษณะทางสัณฐานของรา โดยในงานวิจัยนี้ ได้ทำการ

พัฒนาเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสถิตขึ้น โดยดัดแปลงจากเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Rotating Fibrous Bed (Tay และ Yang, 2002)

4.1.2 การหมักกรดแลกติกในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสถิต (Static Bed

Bioreactor)

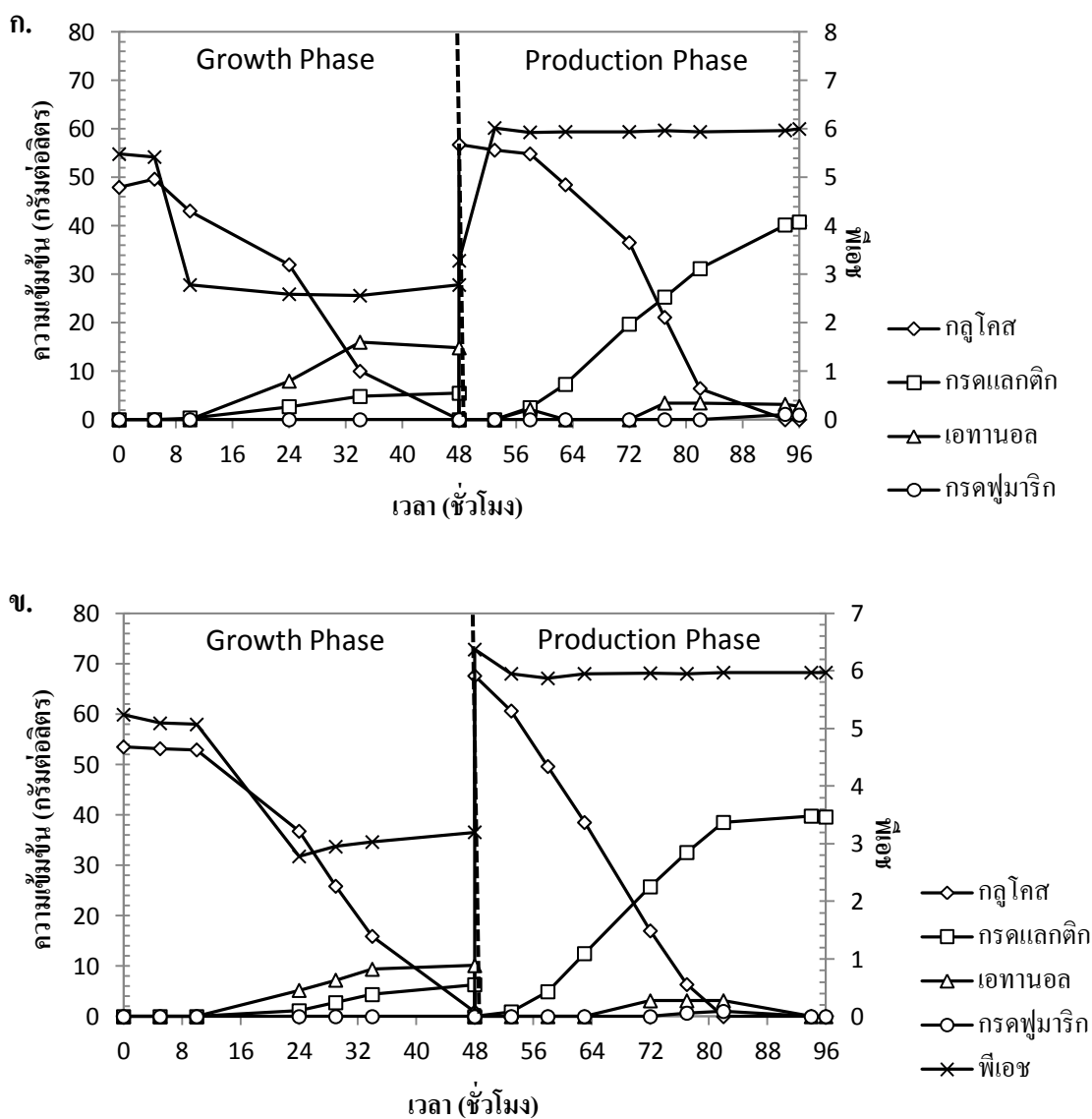
การผลิตกรดแลกติกโดยการตรึงเซลล์ ทำโดยวิธีการเดียวกันกับการหมักในเครื่องปฏิกรณ์ชนิดถังกวน แต่แตกต่างกันโดยได้ทำการตรึงเซลล์บนผ้าฝ้ายชนิดถัก (ผ้าขนหนู) ที่ถูกตรึงไว้กับ baffle ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสถิต โดยได้คัดเลือกทำการแปรปัจจัย 2 ปัจจัย คือ อัตราการให้อากาศ ที่ 0.5 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที และ อัตราการกวน ที่ 300, 500 และ 700 รอบต่อนาที พบว่าที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (รูปที่ 4.3) พบว่าเมื่อสิ้นสุดการหมักความเข้มข้นกรดแลกติกสุดท้ายเท่ากับ 38.34 และ 32.28 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการผลิต อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 1.02 และ 1.12 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{P/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 67.40 และ 58.14 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการผลิตกรดแลกติกจำเพาะเท่ากับ 0.014 และ 0.101 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ขณะที่ความเข้มข้นเอทานอลสุดท้ายในระยะสร้างผลิตภัณฑ์เท่ากับ 6.45 และ 1.13 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.28 และ 0.41 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{P/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 19.52 และ 16.09 (เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาการผลิตกรดฟูมาริก พบว่า ในสถานะที่อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที นั้น ไม่ปรากฏการผลิตกรดฟูมาริก ขณะที่อัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที พบว่าความเข้มข้นกรดฟูมาริกสุดท้ายเท่ากับ 1.1 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดฟูมาริกเท่ากับ 0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{P/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 1.53 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อเสร็จสิ้นการหมัก น้ำหนักแห้งของเซลล์เท่ากับ 10.59 และ 11.78 กรัมต่อลิตร ขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเท่ากับ 0.022 และ 0.021 ต่อวินาที ตามลำดับ



รูปที่ 4.3 การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 (ก.) และ 1.0 (ข.) ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

ที่อัตราการกวนที่ 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที พิจารณารูปที่ 4.4 พบว่าเมื่อสิ้นสุดการหมักความเข้มข้นกรดแลกติกสุดท้ายเท่ากับ 40.78 และ 39.77 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 1.03 และ 1.35 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น Y_{PS} (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 62.75 และ 62.29 (เปอร์เซ็นต์) และอัตราการผลิตกรดแลกติกจำเพาะเท่ากับ 0.029 และ 0.056 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ขณะที่ความเข้มข้นเอทานอลสุดท้าย

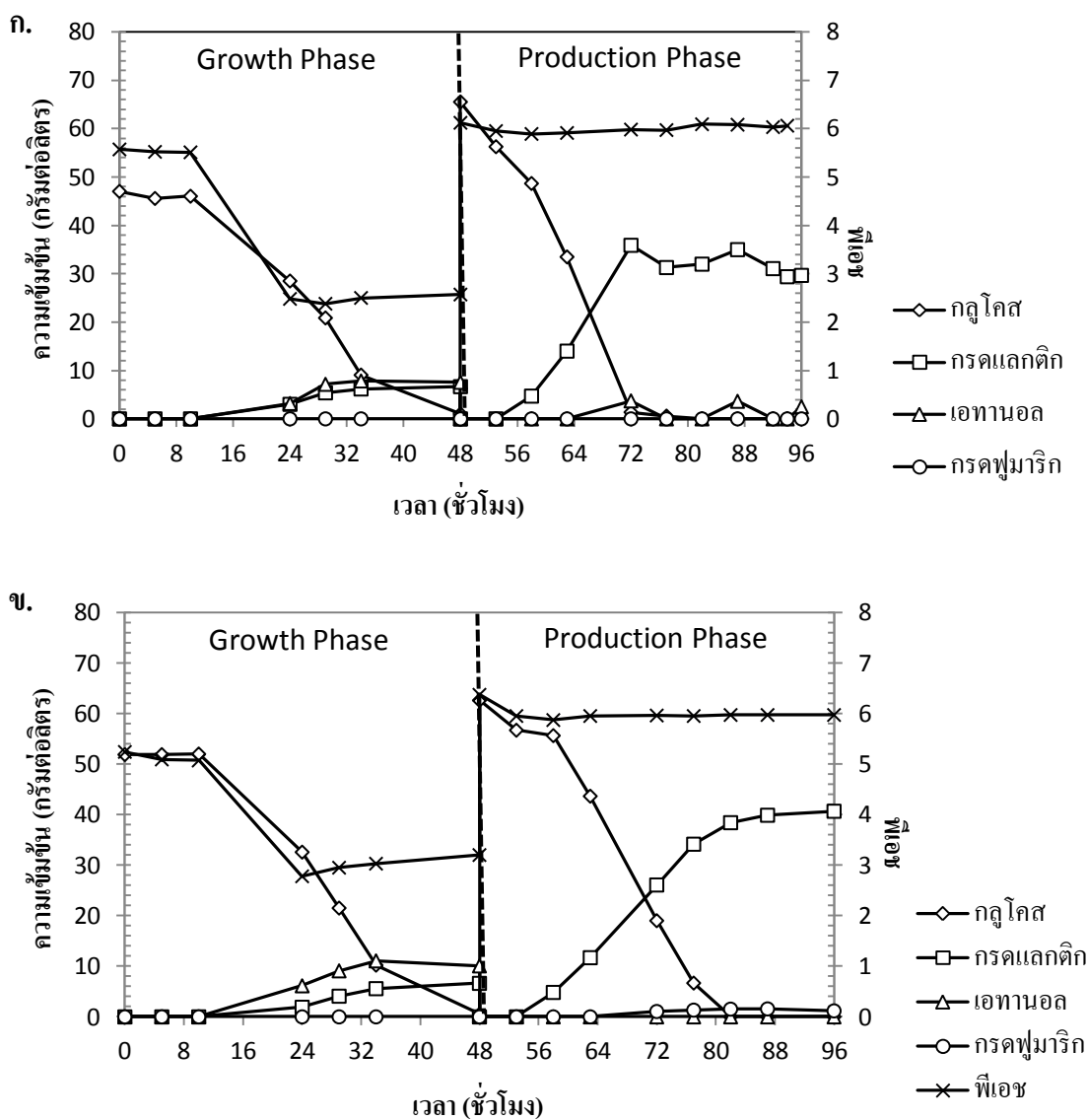
ในระยะสร้างผลิตภัณฑ์เท่ากับ 3.48 และ 3.16 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.21 และ 0.17 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 11.65 และ 8.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาการผลิตกรดฟูมาริกในพบว่าความเข้มข้นกรดฟูมาริกสุดท้ายเท่ากับ 0.96 และ 1.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อัตราการผลิตกรดฟูมาริกเท่ากับ 0.06 และ 0.10 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 4.81 และ 6.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยเมื่อเสร็จสิ้นการหมักน้ำหนักรวมของเซลล์เท่ากับ 10.99 และ 9.94 กรัมต่อลิตร ขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเท่ากับ 0.036 และ 0.033 ต่อวินาที ตามลำดับ



รูปที่ 4.4 การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดที่อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 (ก.) และ 1.0 (ข.) ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

ที่อัตราการกวนที่ 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 และ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที พิจารณารูปที่ 4.5 พบว่าเมื่อสิ้นสุดการหมักความเข้มข้นกรดแลกติกสุดท้ายเท่ากับ 35.88 และ 40.66 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการผลิต อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 2.25 และ 1.55 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น Y_{PS} (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 65.52 และ 60.25 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการผลิตกรดแลกติกจำเพาะเท่ากับ 0.140 และ 0.017 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ขณะที่ความ

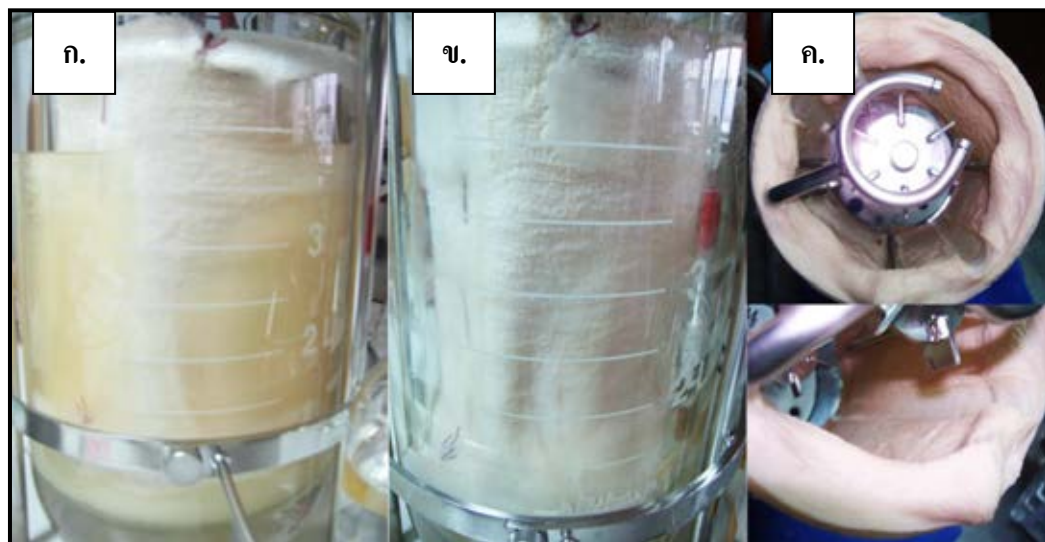
เข้มข้นเอทานอลสุดท้ายในระยะสร้างผลิตภัณฑ์เท่ากับ 3.72 และ 0 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.20 และ 0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 8.45 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาการผลิตกรดฟูมาริกพบว่า ในสภาวะที่อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาณอาหารต่อนาที่ นั้น ไม่ปรากฏการผลิตกรดฟูมาริก ขณะที่อัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาณอาหารต่อนาที่ พบว่าความเข้มข้นกรดฟูมาริกสุดท้ายเท่ากับ 1.19 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดฟูมาริกเท่ากับ 0.03 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 3.49 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อเสร็จสิ้นการหมักน้ำหมักแห้งของเซลล์เท่ากับ 12.26 และ 11.88 กรัมต่อลิตร ขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเท่ากับ 0.088 และ 0.043 ต่อวินาที ตามลำดับ



รูปที่ 4.5 การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเบดชนิดสถิตที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 (ก.) และ 1.0 (ข.) ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาพื้นฐานวิทยาของราในการหมักแบบตรึงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสถิต พบว่าราจะเข้าเกาะและเจริญบนพื้นที่ผิวของผ้าฝ้ายชนิดถัก (ผ้าขนหนู) ดังรูปที่ 4.6 ดังนั้นลักษณะของพื้นฐานวิทยาของราจึงอยู่ในรูป Sheet layer ส่งผลทำให้การถ่ายเทออกซิเจนระหว่างระบบกับเซลล์ค่อนข้างดี เนื่องจากเซลล์ไม่จับกันเป็นกลุ่มก้อนขนาดใหญ่

นอกจากนี้ยังพบว่าราไม่ไปเกาะหรือเจริญตามส่วนประกอบของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ เช่น ใบพัด หัววัดค่าการละลายของออกซิเจน (DO probe) หัววัดค่าพีเอช (pH probe) อีกด้วย



รูปที่ 4.6 สัณฐานวิทยาของ *R.oryzae* ที่ถูกตรึงบนผ้าฝ้ายชนิดถัก (ผ้าขนหนู) ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติด หลังจากที่ตั้งเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ในระยะการเจริญ (ก.), 48 ชั่วโมง ในระยะการเจริญ (ข.), และ เมื่อสิ้นสุดการหมัก (ค.)

ตารางที่ 4.1 ผลของอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศต่อค่าจลนพลศาสตร์ระยะการ
สร้างผลิตภัณฑ์ระหว่างการเลี้ยงโดย *R. oryzae* ที่ถูกตรึง ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติด

อัตราการให้อากาศ (ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อชั่วโมง)	0.5			1.0		
	300	500	700	300	500	700
อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	300	500	700	300	500	700
กรดแลกติก						
ความเข้มข้นสุดท้าย (กรัมต่อลิตร)	38.34	40.78	35.88	32.28	39.77	40.66
$Y_{P/S}$ (%)	67.40	62.75	65.52	58.14	62.29	60.25
อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	1.02	1.03	2.25	1.12	1.35	1.55
อัตราการผลิตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	0.014	0.029	0.140	0.101	0.056	0.017
เอทานอล						
ความเข้มข้นสุดท้าย (กรัมต่อลิตร)	6.45	3.48	3.72	1.13	3.16	0.00
$Y_{P/S}$ (%)	19.52	11.65	8.45	16.09	8.50	0.00
อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.28	0.21	0.20	0.41	0.17	0.00
กรดฟูมาริก						
ความเข้มข้นสุดท้าย (กรัมต่อลิตร)	0.00	0.96	0.00	1.11	1.04	1.19
$Y_{P/S}$ (%)	0.00	4.81	0.00	1.53	6.14	3.49
อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.00	0.06	0.00	0.01	0.10	0.03
น้ำหนักรวมเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	10.59	10.99	12.26	10.59	9.94	11.88
$K_L a$ (ต่อวินาที)	0.022	0.036	0.088	0.021	0.033	0.043

จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดในการแปรปัจจัย 2 ปัจจัย คือ อัตราการกวน และ อัตราการให้อากาศ ตามตารางที่ 4.1 โดยผลการทดลองนั้นพบว่าการเพิ่มอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศนั้น ส่งผลต่ออัตราการผลิตกรดแลกติก และเมื่อพิจารณาทั้ง 6 ภาวะ พบว่าค่าอัตราการผลิตกรดแลกติกสูงสุดในสถานะที่ใช้อัตราการกวนที่ 700 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที และอีกทั้งยังให้ค่าอัตราการผลิตกรดแลกติกจำเพาะสูงสุดอีกด้วย ในทางตรงกันข้ามพบว่าการเพิ่มอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศ มีผลทำให้ลดการผลิตเอทานอล ขณะที่ค่า $K_L a$ จะเพิ่มขึ้น ซึ่งจะสอดคล้อง

กับรายงานของ Thongchul (2005) เมื่อการถ่ายเทของออกซิเจนภายในระบบสูงขึ้น ก็จะจำกัดการผลิตเอทานอล และเมื่อพิจารณาการผลิตกรดฟูมาริกพบว่าทั้ง 6 สถานะนั้น มีปริมาณการผลิตกรดฟูมาริกน้อยมาก และในสถานะที่ใช้อัตราการกวนที่ 300 และ 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที นั้นไม่ปรากฏการผลิตกรดฟูมาริกแต่อย่างใด นอกจากนี้การเพิ่มอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศไม่ส่งผลต่อการเพิ่ม หรือ ลดของน้ำหนักเซลล์แห้ง

4.1.3 การเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกแบบแขวนลอยในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน (Stirred Tank Bioreactor) และแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสถิต (Static Bed Bioreactor)

ตามที่ได้กล่าวมาข้างต้นในหัวข้อ 4.1 พบว่าสัณฐานวิทยาของราในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแขวนลอย จะถูกแบ่งออกเป็น 3 รูปแบบ คือ 1) hard biofilm 2) pellet 3) clump สัณฐานวิทยาดังกล่าวเกิดขึ้นจากการเลี้ยงแบบแขวนลอย โดยการที่เซลล์มีการจับกันเป็นกลุ่มก้อน หรือ pellet นั้นทำให้ยากต่อการควบคุมขนาดของเซลล์ และเป็นการจำกัดการแพร่กระจายอากาศและสารอาหารเข้าสู่เซลล์ส่งผลทำให้การผลิตกรดแลกติกนั้นอยู่ในปริมาณที่ต่ำ อีกทั้ง การที่เซลล์ไปเจริญตามส่วนประกอบต่างๆ ของถังหมัก เช่น baffle ใบพัด เป็นต้น ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เพิ่มความยากในการควบคุมระบบ (Lin และคณะ, 2007; Wang และคณะ, 2010) ดังนั้นหลายงานวิจัยได้แก้ไขปัญหาลักษณะเกี่ยวกับสัณฐานวิทยาแบบแขวนลอยในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน โดยการตรึงเซลล์ ซึ่งผลการทดลองในงานวิจัยนี้ทำการตรึงเซลล์ *R.oryzae* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสถิต พบว่าสามารถที่จะควบคุมสัณฐานวิทยาของราได้จริง โดยราจะเกาะและเจริญบนผ้าฝ้ายชนิดถัก (ผ้าขนหนู) ทำให้ราไม่จับกันเป็นก้อน และลดโอกาสที่เส้นใยจะไปพันเกาะบริเวณใบพัด ซึ่งจะก่อให้เกิดแรงบิด (torque) ที่ใบพัดสูงขึ้น โดยผลการทดลองเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกแบบแขวนลอยในเครื่องปฏิกรณ์ชนิดถังกวนกับการผลิตกรดแลกติกแบบตรึงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสถิต แสดงดังตารางที่ 4.2 ซึ่งจากการทดลองชี้ให้เห็นว่าการผลิตกรดแลกติกแบบตรึงเซลล์นั้นมีความเหมาะสมในการที่จะนำมาพัฒนาในกระบวนการผลิตกรดแลกติกเนื่องจาก 1) ลักษณะสัณฐานวิทยาแบบ sheet layer ซึ่งทำให้เซลล์ไม่จับกันเป็นกลุ่มก้อน ส่งผลทำให้การถ่ายเทออกซิเจนระหว่างน้ำหมักเข้าสู่เซลล์ได้ดี และเนื่องจากกระบวนการดังกล่าวได้ทำการ

ตรึงเซลล์ ทำให้ลดโอกาสที่เซลล์นั้นไปเจริญตามส่วนประกอบต่างๆของถังหมัก ทำให้การดำเนินงานของถังหมักทางกายภาพมีความเป็นเสถียรภาพมากกว่าในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน 2) เมื่อพิจารณาความสามารถการผลิตดังตารางที่ 4.2 พบว่าการตรึงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติกสามารถที่จะผลิตกรดแลกติกได้มากกว่าทั้งในแง่ของความเข้มข้น อัตราการผลิต ค่า $Y_{P/S}$ (เปอร์เซ็นต์) และค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง อีกทั้งยังสามารถลดความสามารถในการผลิตเอทานอลทั้งในแง่ของ ความเข้มข้น อัตราการผลิต และค่า $Y_{P/S}$ (เปอร์เซ็นต์) นั้นแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของอัตราการถ่ายเทออกซิเจนภายในระบบอีกด้วย ดังนั้นจากการศึกษาพบว่าการผลิตกรดแลกติกแบบตรึงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติกนั้นมีความเหมาะสมกับการเจริญของ *R. oryzae* และการผลิตกรดแลกติกเมื่อเทียบกับการผลิตแบบแขวนลอยในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน

ตารางที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบผลการผลิตระหว่างการหมักในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน และแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติก

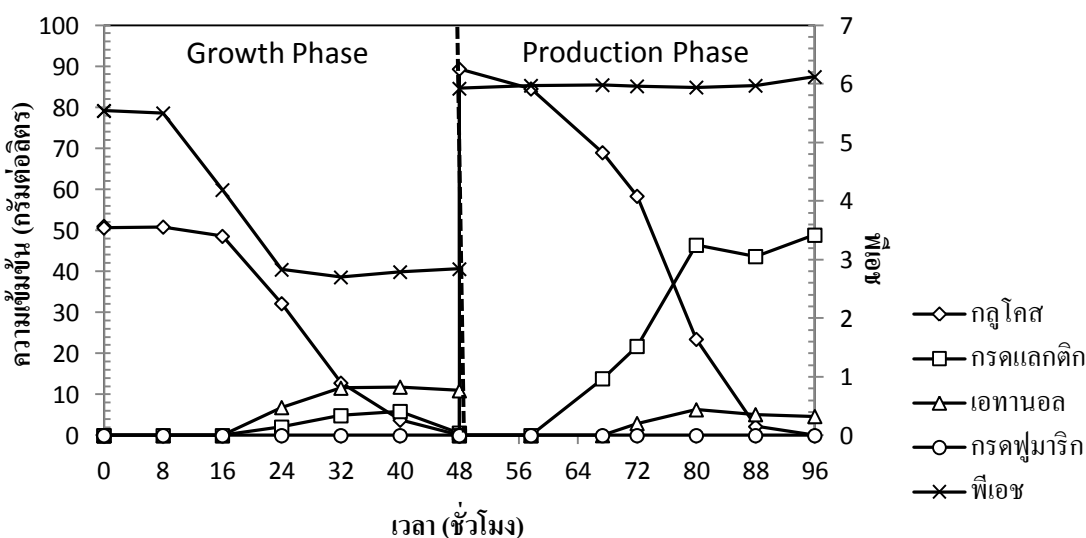
กระบวนการ	การหมักแบบแขวนลอย	การหมักแบบเซลล์ตรึง
กรดแลกติก		
ความเข้มข้นสุดท้าย	34.10	35.88
$Y_{P/S}$ (%)	54.85	65.52
อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	1.16	2.25
เอทานอล		
ความเข้มข้นสุดท้าย	6.68	3.72
$Y_{P/S}$ (%)	13.98	8.45
อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.29	0.20
กรดฟูมาริก		
ความเข้มข้นสุดท้าย	0.00	0.00
$Y_{P/S}$ (%)	0.00	0.00
อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.00	0.00
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	7.16	12.26

ถึงแม้ว่าการผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงโดยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติก เมื่อใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร นั้นจะสามารถให้ค่าอัตราการผลิตกรดแลกติกสูงถึง 2.25 กรัมต่อลิตร แต่ค่าความเข้มข้นกรดแลกติกที่ผลิตได้นั้นเท่ากับ 35.88 กรัมต่อลิตร ซึ่งอยู่ในระดับที่ไม่สูงมากนัก ซึ่งเมื่อเข้าสู่ระยะของ down stream process ปริมาณกรดแลกติกที่เจือจางนั้นจะก่อให้เกิดความไม่คุ้มค่า ดังนั้น เพื่อยกระดับการผลิตให้มีประสิทธิภาพทั้งในแง่ของการพัฒนาการผลิตกรดแลกติก และการควบคุมต้นทุนการผลิต ซึ่งมีหลายงานวิจัยที่ศึกษาปริมาณความเข้มข้นกลูโคสที่ระดับต่างๆ เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นกลูโคสที่เหมาะสมทำให้เราสามารถเจริญเติบโตได้ดี อีกทั้งเพิ่มปริมาณการผลิตกรดแลกติก เนื่องจากสมบัติของจากรานั้นมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดี จึงมีความเป็นไปได้ที่จะทนต่อปริมาณกลูโคสปริมาณสูงในระบบได้

4.1.4 การศึกษาผลของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่อการเพิ่มความสามารถในการผลิตกรดแลกติกโดย *R. oryzae* ที่ถูกตรึง ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติก

การศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นกลูโคสในส่วนของระยะสร้างผลิตภัณฑ์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อใช้สำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์ โดยความเข้มข้นของกลูโคสที่ทำการศึกษาอยู่ที่ 70, 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเซลล์ที่ถูกตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติก ในภาวะอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรต่อนาที่ และ อัตราการกวนที่ 700 รอบต่อนาที่ เมื่อหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นกลูโคสลดลงเหลือ 1.28 กรัมต่อลิตร และลดลงจนเท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร จากความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาความเข้มข้นกรดแลกติกที่ชั่วโมงที่ 72 ของการหมัก พบว่าความเข้มข้นของกรดแลกติกเท่ากับ 35.88 กรัมต่อลิตร และหลังจากนั้นความเข้มข้นของกรดแลกติกก็ลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์ยังคงมีแอกติวิตีที่จะสามารถผลิตกรดแลกติกได้ แต่ภายในระบบเกิดการขาดแคลนกลูโคส เซลล์จึงเปลี่ยนมาใช้กรดแลกติกเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน ดังนั้นเพื่อพัฒนาการผลิตกรดแลกติกให้สามารถผลิตได้สูงขึ้น จึงทำการศึกษการผลิตกรดแลกติกโดยการเพิ่มความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ โดยผลการศึกษาเมื่อเพิ่มความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ระยะการสร้างผลิตภัณฑ์ ในภาวะอัตราการกวน 700 รอบต่อนาที่ และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที่ พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ความเข้มข้นสูงขึ้นเมื่อเทียบกับความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 70 กรัมต่อ

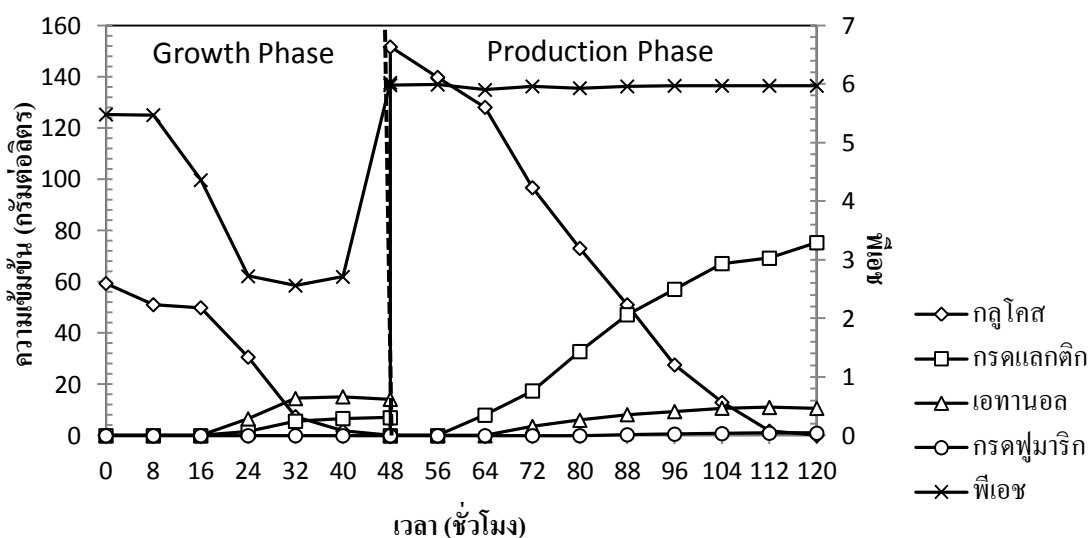
ลิตร เมื่อพิจารณารูปที่ 4.7 พบว่าความเข้มข้นของกรดแลกติกเมื่อเสร็จสิ้นการหมัก เท่ากับ 48.86 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 2.04 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตกรดแลกติกจำเพาะเท่ากับ 0.043 ต่อชั่วโมง ขณะที่ความเข้มข้นเอทานอลสุดท้ายในระยะสร้างผลิตภัณฑ์เท่ากับ 6.30 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.49 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 12.79 เปอร์เซ็นต์ และไม่พบการผลิตกรดฟูมาริกในระบบ นอกจากนี้พบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มสูงขึ้นจากเดิม โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ 16.06 กรัมต่อลิตร และค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน เท่ากับ 0.091 ต่อวินาที โดยใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงทั้งหมด 96 ชั่วโมง จนกระทั่งความเข้มข้นกลูโคสในระบบเท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.7 การผลิตกรดแลกติกแบบครึ่งเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเป็น 150 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถที่จะผลิตกรดแลกติกได้มากกว่าความเข้มข้นกลูโคส 70 และ 100 กรัมต่อลิตร โดยเมื่อพิจารณารูปที่ 4.8 ความเข้มข้นกรดแลกติกเมื่อเสร็จสิ้นการหมัก เท่ากับ 75.27 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติก เท่ากับ 1.67 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 58.05 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตกรดแลกติกจำเพาะ เท่ากับ 0.037 ต่อชั่วโมง ขณะที่ความเข้มข้นเอทานอลสุดท้ายในระยะสร้างผลิตภัณฑ์เท่ากับ 11.04 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 8.72 เปอร์เซ็นต์ และมีการผลิตกรดฟูมาริก โดยความเข้มข้นของกรด

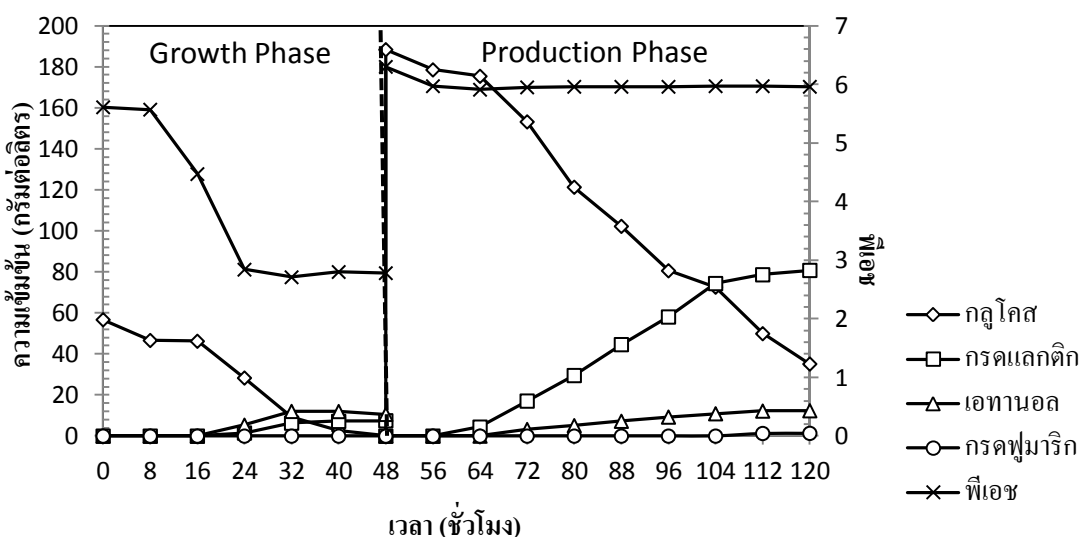
ฟูมาริกสูงสุดท้าย เท่ากับ 0.98 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดฟูมาริกเท่ากับ 0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{P/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 1.65 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 12.61 กรัมต่อลิตร และค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน เท่ากับ 0.041 ต่อวินาที โดยใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงทั้งหมด 120 ชั่วโมง จนกระทั่งความเข้มข้นกลูโคสภายในระบบเท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร ซึ่งการใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตรนั้น จะใช้เวลาในการเลี้ยงมากกว่าการใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ถึง 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4.8 การผลิตกรดแลกติกแบบตรงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะเวลาสร้างผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเป็น 200 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถที่จะผลิตกรดแลกติกได้มากกว่าความเข้มข้นกลูโคส 70 และ 100 กรัมต่อลิตร แต่ความสามารถในการผลิตกรดแลกติกใกล้เคียงกับการใช้ความเข้มข้นกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร โดยเมื่อพิจารณารูปที่ 4.9 ความเข้มข้นกรดแลกติกเมื่อเสร็จสิ้นการหมัก เท่ากับ 80.76 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 1.74 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{P/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 62.07 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิตกรดแลกติกจำเพาะ เท่ากับ 0.032 ต่อชั่วโมง ขณะที่ความเข้มข้นเอทานอลสุดท้ายในระยะเวลาสร้างผลิตภัณฑ์เท่ากับ 12.37 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{P/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 9.06 เปอร์เซ็นต์ และมีการผลิตกรดฟูมาริก โดยความเข้มข้นกรดฟูมาริกสุดท้ายเท่ากับ 1.34 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดฟูมาริกเท่ากับ 0.68 กรัมต่อลิตร คิดเป็น $Y_{P/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 0.68 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 27.02 กรัมต่อลิตร และค่า

สัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน เท่ากับ 0.069 ต่อวินาที โดยใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงทั้งหมด 120 ชั่วโมง จากรูปที่ 4.9 จะเห็นได้ว่าหลังจากชั่วโมงที่ 104 เป็นต้นไปความเข้มข้นกรดแลกติกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยจนเกือบคงที่ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความสามารถการผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* เริ่มคงตัว และเมื่อเสร็จสิ้นการหมักที่ 120 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นกลูโคสภายในระบบเหลือเท่ากับ 35.13 กรัมต่อลิตร



รูปที่ 4.9 การผลิตกรดแลกติกแบบตรงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร

จากการทดลองเมื่อพิจารณาตารางที่ 4.3 จะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นกลูโคสนั้นส่งผลต่อการสร้างผลิตภัณฑ์ให้มากขึ้น ทั้งกรดแลกติก เอทานอล และกรดฟูมาริก เมื่อพิจารณาการผลิตกรดแลกติกนั้นพบว่า การเพิ่มปริมาณกลูโคสในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ในช่วง 70-150 กรัมต่อลิตรนั้น จะช่วยพัฒนาการผลิตกรดแลกติกให้สูงขึ้น ในทางตรงกันข้ามพบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ที่ 200 กรัมต่อลิตรนั้น ไม่ช่วยในการพัฒนาความสามารถในการผลิตกรดแลกติก โดยพบว่าความสามารถในการผลิตกรดแลกติกค่อนข้างใกล้เคียงกับความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นที่ 150 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลาการผลิตที่ 120 ชั่วโมงเท่ากัน พบว่ามีความเข้มข้นกลูโคสที่เหลือเหลือในระบบถึง 35.13 กรัมต่อลิตร ดังนั้นความเข้มข้นกลูโคสที่เหมาะสมอยู่ที่ ความเข้มข้นกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้เนื่องจากสามารถผลิตกรดแลกติกได้ในความเข้มข้นสูงถึงแม้ว่าอัตราการผลิตกรดแลกติกจะไม่สูงมากนัก เมื่อเทียบกับความเข้มข้นกลูโคสที่ 70 และ 100 กรัมต่อลิตร แต่ข้อดีของการผลิตกรดแลกติกได้ความเข้มข้นสูงก็จะช่วยลดต้นทุนในขั้นตอนของ down stream

process นอกจากนี้พบว่าที่ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตรนั้น ไม่พบการหลงเหลือของกลูโคสที่หลงเหลือในระบบอีกด้วย โดยผลการทดลองนี้ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Bulut และคณะ (2004) ซึ่งได้ทำการศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นกลูโคสที่ 25-250 กรัมต่อลิตร ในการผลิตกรดแลกติกโดย *R. oryzae* จากงานวิจัยพบว่าที่ความเข้มข้นกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร ขณะเดียวกันเมื่อเพิ่มความเข้มข้นกลูโคสเป็น 200 และ 250 กรัมต่อลิตร พบว่าความสามารถในการผลิตกรดแลกติกนั้นลดลง เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นกลูโคสสูงมากเกินไปจะส่งผลต่อทำให้ยับยั้งการสร้างผลิตภัณฑ์

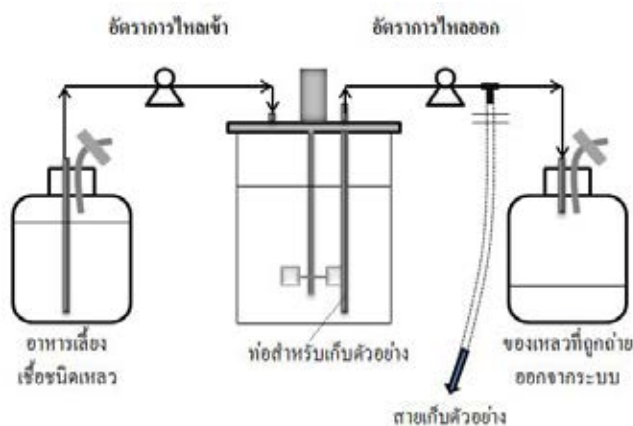
ตารางที่ 4.3 ผลของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่อค่าจลนพลศาสตร์ของการตรึง *R. oryzae* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติก ในระยะการผลิตกรดแลกติก ที่ภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส, พีเอช 6, อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที, อัตราการให้อากาศ 0.5 รอบต่อนาที

ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	70	100	150	200
กลูโคส				
ความเข้มข้นที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	65.52	89.33	151.6	188.38
ความเข้มข้นที่เหลือในน้ำหมัก (กรัมต่อลิตร)	0	0	0	35.13
กรดแลกติก				
ความเข้มข้นสุดท้าย (กรัมต่อลิตร)	35.88	48.86	75.27	80.76
$Y_{P/S}$ (%)	65.52	75	58.05	62.07
อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	2.25	2.04	1.67	1.74
อัตราการผลิตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	0.140	0.043	0.037	0.032
เอทานอล				
ความเข้มข้นสุดท้าย (กรัมต่อลิตร)	3.72	6.30	11.04	12.37
$Y_{P/S}$ (%)	8.45	12.79	8.72	9.06
อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.20	0.49	0.23	0.23
กรดฟูมาริก				
ความเข้มข้นสุดท้าย (กรัมต่อลิตร)	0	0	0.98	1.34
$Y_{P/S}$ (%)	0	0	1.65	0.68
อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0	0	0.01	0.02
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	12.26	16.06	12.61	27.02
$K_L a$ (ต่อวินาที)	0.088	0.091	0.041	0.069

4.2 การหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง (continuous process) ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร

ในระหว่างการเพิ่มจำนวน (exponential phase) ในการผลิตแบบแบดซ์สามารถที่จะรักษาระยะเวลาการผลิตให้นานขึ้นได้ โดยการเติมอาหารเข้าไปในระบบอย่างต่อเนื่อง และในทางตรงกันข้ามจะมีการถ่ายน้ำหมักภายในระบบออก ด้วยอัตราการไหลที่เท่ากัน โดยกระบวนการแบบนี้ เรียกว่า การหมักแบบต่อเนื่อง (continuous process) เพื่อป้องกันภาวะการจำกัดของสารอาหาร (substrate inhibition) และการสะสมของกรดอีกด้วย และถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อถูกเติมลงไปด้วยอัตราการไหลที่เหมาะสมแล้วนั้น จะก่อให้เกิดภาวะคงที่ (steady state)

โดยทำการหมักแบบเดียวกับการผลิตกรดแลกติกแบบแบดซ์โดยการรีจเซิลบนผ้าฝ้ายชนิดถัก (ผ้าขนหนู) ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสตีต จนกระทั่งปริมาณกลูโคสภายในระบบลดลงเหลือประมาณ 10-20 กรัมต่อลิตร จะทำการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเข้าสู่ระบบแบบต่อเนื่อง ขณะเดียวกันจะทำการถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อภายในระบบออก โดยใช้อัตราการไหลเข้า-ออกเท่ากัน ดังแผนภาพในรูปที่ 4.10 จนกระทั่งเซลล์สูญเสียความสามารถในการผลิตกรดแลกติก จึงทำการหยุดการผลิต โดยเลี้ยงในภาวะอัตราการกวน 700 รอบต่อวินาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยได้ทำการศึกษาที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น คือ 70 และ 150 กรัมต่อลิตร ในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ และในระยะการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง

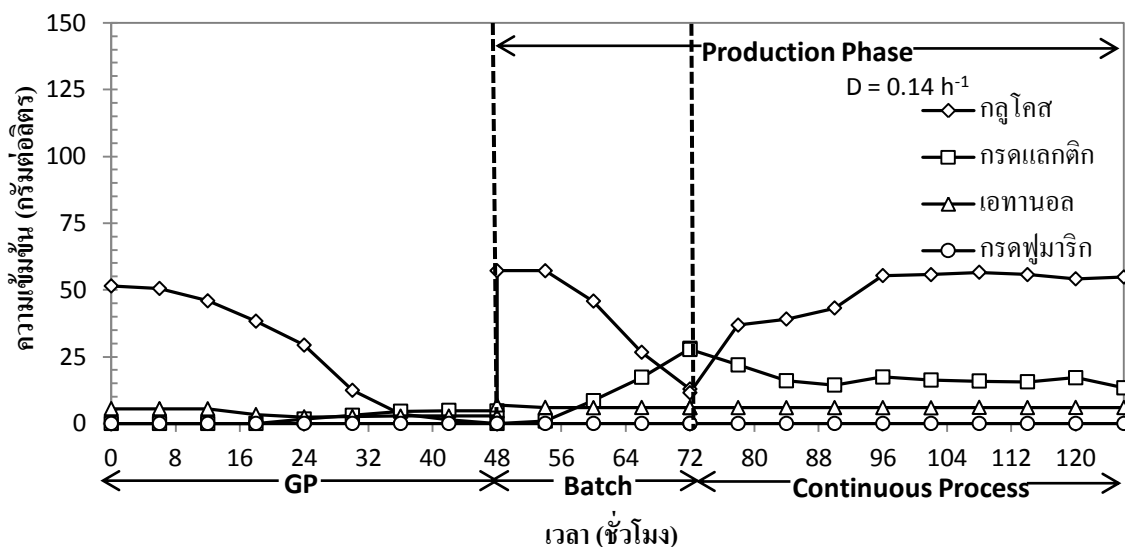


รูปที่ 4.10 แผนภาพแสดงรูปแบบการทำงานของกระบวนการผลิตแบบต่อเนื่อง

4.2.1 การหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่องที่ระดับความเข้มข้นกลูโคสในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ 70 กรัมต่อลิตร

จากการทดลองที่ 4.2 การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงด้วยการผลิตแบบเบตซ์ โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร ในภาวะอัตราการกวน 700 รอบต่อวินาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที พบว่าค่าอัตราการผลิตกรดแลกติกจำเพาะ เท่ากับ 0.140 ต่อชั่วโมง โดยค่าอัตราการเงื้องาง (คำนวณ) และอัตราการไหล (คำนวณ) เท่ากับ 0.140 ต่อชั่วโมง และ 0.56 ลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งจากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร ในภาวะอัตราการกวน 700 รอบต่อวินาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ที่อัตราการเงื้องาง 0.140 ต่อชั่วโมง เมื่อพิจารณารูปที่ 4.11 พบว่าที่ในการผลิตแบบเบตซ์ความเข้มข้นกรดแลกติกสุดท้ายเท่ากับ 28.12 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 1.51 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 60.19 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ความเข้มข้นเอทานอลสุดท้ายเท่ากับ 3.42 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.04 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 1.19 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเลี้ยงแบบเบตซ์ เท่ากับ 72 ชั่วโมง หลังจาก 72 ชั่วโมงของการเลี้ยง พบว่า ปริมาณความเข้มข้นกลูโคสในระบบลดลงเหลือ 12.86 กรัมต่อลิตร จึงเริ่มการผลิตแบบต่อเนื่องโดยการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบด้วยสารละลายกลูโคส 70 กรัมต่อลิตร เข้าสู่ระบบอย่างต่อเนื่อง และขณะเดียวกันจะทำการถ่ายของเหลวภายในระบบออกด้วยอัตราการไหล เท่ากับ 0.56 ลิตรต่อชั่วโมง อย่างต่อเนื่องเช่นเดียวกัน หลังจาก 24 ชั่วโมง ของการผลิตแบบต่อเนื่อง พบว่า ระบบได้เข้าสู่ภาวะคงที่ (steady state) และเมื่อเสร็จสิ้นการผลิตแบบต่อเนื่องพบว่า ช่วงความเข้มข้นของกรดแลกติกอยู่ระหว่าง 13.33-17.37 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 2.23 กรัมต่อชั่วโมงต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 16.83 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ช่วงความเข้มข้นของเอทานอลภายในระบบอยู่ระหว่าง 5.58-6.02 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.05 กรัมต่อชั่วโมงต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 0.25 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าตลอดระยะเวลาการผลิตนั้นไม่พบการผลิตกรดฟูลมาริกเกิดขึ้น โดยเมื่อเสร็จสิ้นการหมักน้ำหมักแห้งของเซลล์เท่ากับ 68.65 กรัมต่อลิตร ขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเท่ากับ 0.079 ต่อวินาที และระยะเวลาในการเลี้ยงทั้งหมดเท่ากับ 126 ชั่วโมง จากรูปที่ 4.11 จะสังเกตเห็นว่าในช่วงการผลิต

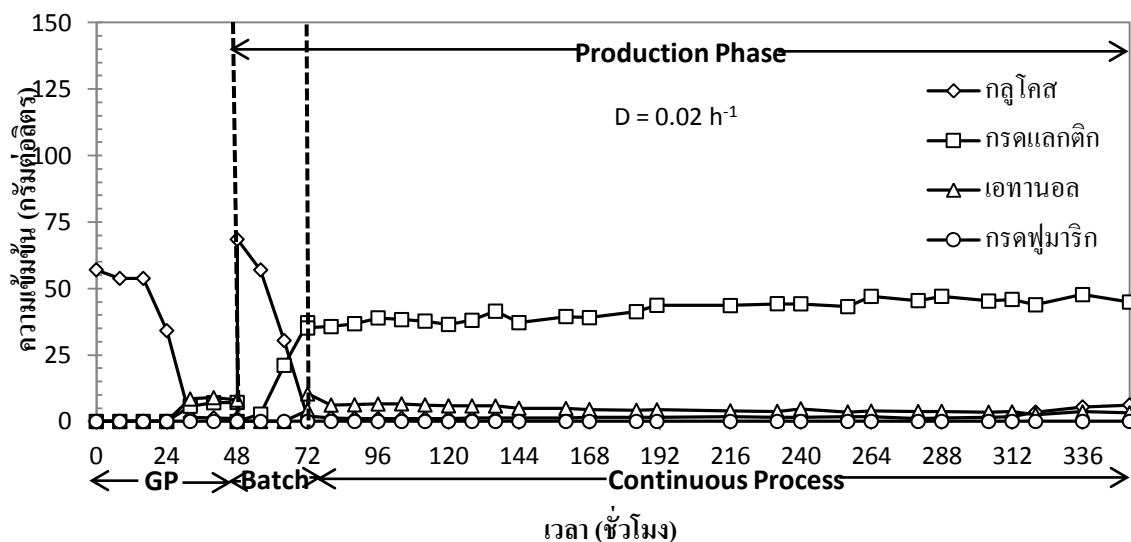
แบบต่อเนื่องกลูโคสมีความเข้มข้นมากกว่ากรดแลกติก ซึ่งปัจจัยหนึ่งมาจากอัตราการเจือจางที่ใช้ในระบบอาจมีค่าสูงเกินไป และจะเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตให้สูงขึ้น



รูปที่ 4.11 การผลิตกรดแลกติกแบบเซมิคอนติจิวในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดแบบต่อเนื่อง อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 70 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.14 ต่อชั่วโมง

ดังนั้นการแก้ปัญหาดังกล่าวโดยลดอัตราการเจือจาง เพื่อเป็นควบคุมปริมาณความเข้มข้นกลูโคสภายในระบบไม่ให้อยู่ในระดับสูงเกินไป โดยทำการลดอัตราการเจือจางจาก 0.14 ต่อชั่วโมง ลดลงเหลือ 0.02 ต่อชั่วโมง หรืออัตราการไหลเท่ากับ 0.08 ลิตรต่อชั่วโมง จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร ในภาวะอัตราการกวน 700 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ที่อัตราการเจือจาง 0.02 ต่อชั่วโมง พบว่าที่ในการผลิตแบบแบตช์ความเข้มข้นกรดแลกติกสุดท้ายเท่ากับ 37.13 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 1.62 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น Y_{PS} (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 57.6 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ความเข้มข้นเอทานอลสุดท้ายเท่ากับ 4.28 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.16 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น Y_{PS} (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 6.06 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเลี้ยงแบบแบตช์ เท่ากับ 72 ชั่วโมง หลังจาก 72 ชั่วโมงของการเลี้ยงพบว่า ปริมาณความเข้มข้นน้ำตาลในระบบลดลงเหลือ 1.21 กรัมต่อลิตร จึงเริ่มการผลิต

แบบต่อเนื่องโดยการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบด้วยสารละลายกลูโคส 70 กรัมต่อลิตร เข้าสู่ระบบอย่างต่อเนื่อง และขณะเดียวกันจะทำการถ่ายของเหลวภายในระบบออกด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 0.08 ลิตรต่อชั่วโมง หลังจาก 0 ชั่วโมง ของการผลิตแบบต่อเนื่องพบว่า ระบบได้เข้าสู่ภาวะคงที่ (steady state) และเมื่อเสร็จสิ้นการผลิตแบบต่อเนื่องพบว่า ช่วงความเข้มข้นของกรดแลกติกอยู่ระหว่าง 37.14-47.70 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.83 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 28.09 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ช่วงความเข้มข้นของเอทานอลภายในระบบอยู่ระหว่าง 3.23-10.36 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.83 กรัมต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 3.29 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าตลอดระยะเวลาการผลิตนั้น ไม่พบการผลิตกรดฟูมาริกเกิดขึ้น โดยเมื่อเสร็จสิ้นการหมักน้ำหนักรวมของเซลล์เท่ากับ 63.67 กรัมต่อลิตร ขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเท่ากับ 0.072 ต่อวินาที และระยะเวลาในการเลี้ยงทั้งหมดเท่ากับ 352 ชั่วโมง จากรูปที่ 4.12 แสดงให้เห็นว่าการลดอัตราการเจือจางจาก 0.14 ต่อชั่วโมง ลดลงเหลือ 0.02 ต่อชั่วโมง สามารถที่จะควบคุมปริมาณความเข้มข้นกลูโคสภายในระบบให้อยู่ในปริมาณความเข้มข้นที่ต่ำตลอดการผลิต และรักษาภาวะคงที่ของปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส แลกติก และเอทานอลไว้ได้อย่างสม่ำเสมอ นอกจากนี้พบว่าความเข้มข้นกรดแลกติกมีความเข้มข้นสูงกว่าอัตราการเจือจางที่ 0.02 ต่อชั่วโมง และสามารถรักษาเสถียรภาพของระบบไว้ได้นานถึง 352 ชั่วโมง



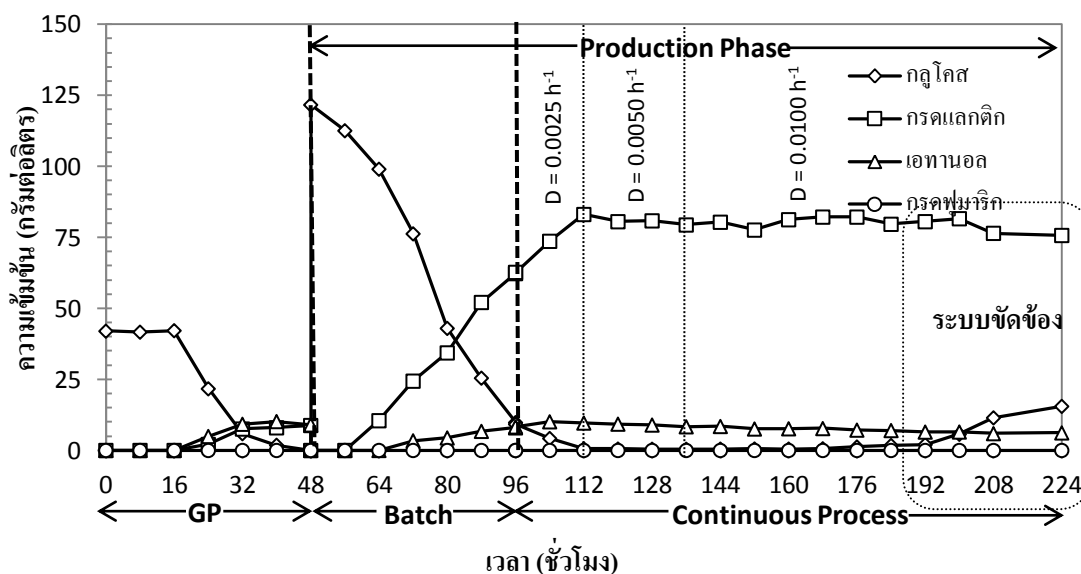
รูปที่ 4.12 การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดแบบต่อเนื่อง อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในกระเพาะผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 70 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.02 ต่อชั่วโมง

แต่อย่างไรก็ตาม การผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร นั้น อัตราการเจือจาง 0.02 ต่อชั่วโมง สามารถผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณความเข้มข้นระหว่าง 37.14-47.70 กรัมต่อลิตร และเพื่อพัฒนาการผลิตกรดแลกติกให้ระบบสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงมากขึ้นนั้น ทางเลือกหนึ่งคือ การเพิ่มปริมาณความเข้มข้นกลูโคสภายในระบบให้สูงขึ้น ซึ่งจากการทดลองการผลิตกรดแลกติกแบบแบตช์ โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงในระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดเมื่อเทียบกับใน 4 ระดับความเข้มข้น คือ 70, 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตร

4.2.2 การหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่องที่ระดับความเข้มข้นกลูโคสในกระเพาะผลิตภัณฑ์ 150 กรัมต่อลิตร

การศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ในภาวะอัตราการกวน 700 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ที่อัตราการเจือจางเริ่มต้น 0.0025 ต่อชั่วโมง หรือ อัตราการไหล 0.01

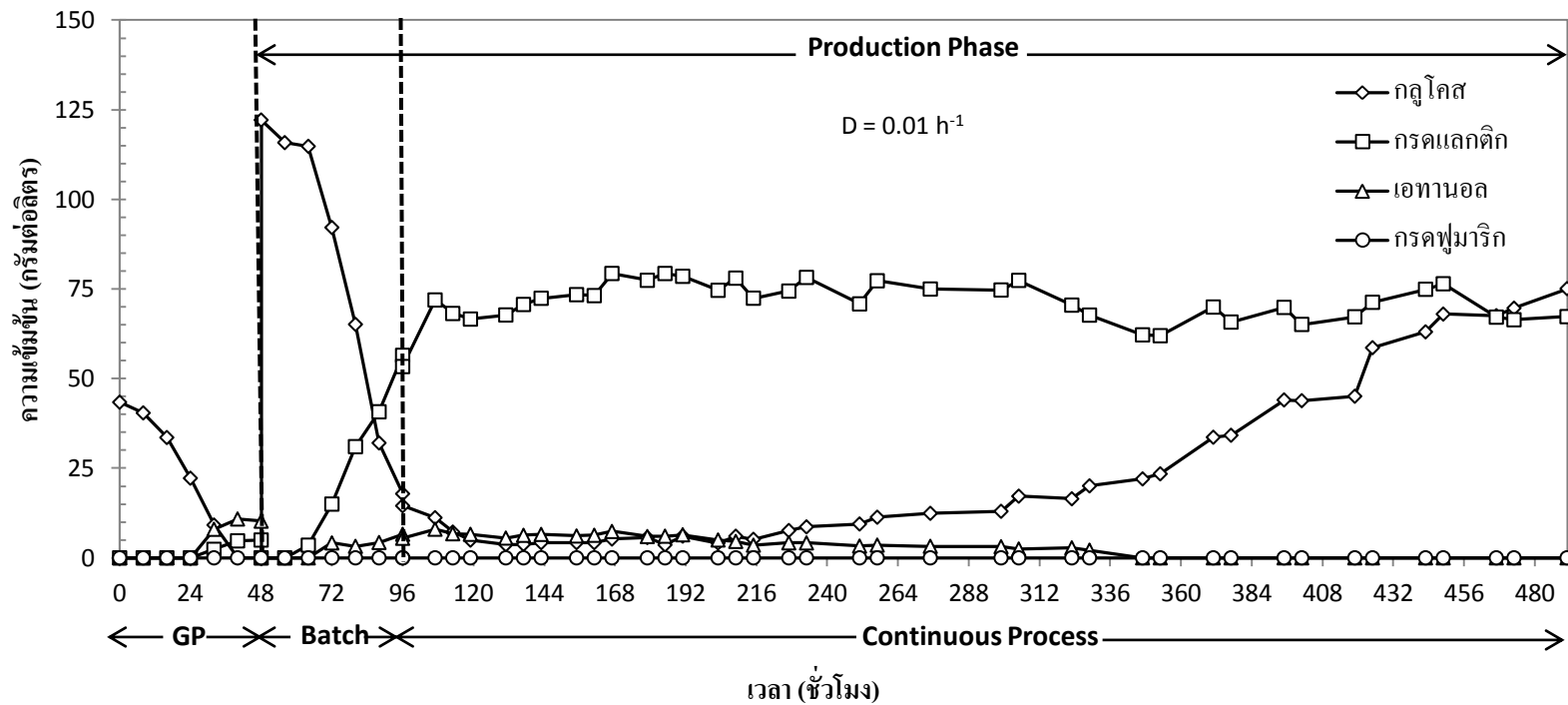
ลิตรต่อชั่วโมง พบว่าที่ในการผลิตแบบเบตซ์ความเข้มข้นกรดแลกติกสุดท้ายเท่ากับ 62.27 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 1.59 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{P/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 57.22 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ความเข้มข้นเอทานอลสุดท้ายเท่ากับ 7.96 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.24 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{P/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 8.26 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเลี้ยงแบบเบตซ์ เท่ากับ 96 ชั่วโมง หลังจาก 96 ชั่วโมงของการเลี้ยง พบว่า ปริมาณความเข้มข้นน้ำตาลในระบบลดลงเหลือ 9.79 กรัมต่อลิตร จึงเริ่มการผลิตแบบต่อเนื่องโดยการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบด้วยสารละลายกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร เข้าสู่ระบบอย่างต่อเนื่อง และขณะเดียวกันจะทำการถ่ายของเหลวภายในระบบออกด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 0.01 ลิตรต่อชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตาม จากรูปที่ 4.13 แสดงให้เห็นว่าหลังจาก 16 ชั่วโมงของการผลิตแบบต่อเนื่อง ปริมาณความเข้มข้นกลูโคสในระบบลดลงอย่างต่อเนื่องเหลือ 0.57 กรัมต่อลิตร และเพื่อป้องกันไม่ให้ปริมาณกลูโคสในระบบอยู่ในภาวะขาดแคลนจึงทำการเปลี่ยนอัตราการเจือจางจาก 0.0025 ต่อชั่วโมง เป็น 0.05 ต่อชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 16 ของการผลิตแบบต่อเนื่อง ซึ่งหลังจากนั้นพบว่าระบบได้เข้าสู่ภาวะคงที่ (steady state) แต่ปริมาณความเข้มข้นกลูโคสยังคงอยู่ในระดับต่ำดังนั้น ในชั่วโมงที่ 40 ของการผลิตแบบต่อเนื่องจึงทำการปรับอัตราการเจือจางให้สูงขึ้น จาก 0.05 ต่อชั่วโมง เป็น 0.01 ต่อชั่วโมง และเมื่อเสร็จสิ้นการผลิตแบบต่อเนื่องพบว่า ช่วงความเข้มข้นของกรดแลกติกอยู่ระหว่าง 77.60-83.08 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.60 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{P/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 54.09 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ช่วงความเข้มข้นของเอทานอลภายในระบบอยู่ระหว่าง 6.48-9.66 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.16 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{P/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 5.38 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าตลอดระยะเวลาการผลิตนั้นไม่พบการผลิตกรดฟumaricเกิดขึ้น โดยเมื่อเสร็จสิ้นการหมักน้ำหนักรวมของเซลล์เท่ากับ 65.93 กรัมต่อลิตร และระยะเวลาในการเลี้ยงทั้งหมดเท่ากับ 192 ชั่วโมง ดังรูปที่ 4.13 ตั้งแต่ชั่วโมง 200 ของการผลิต เป็นต้น ไปนั้นเกิดการของระบบขัดข้อง จึงทำการหยุดการผลิต



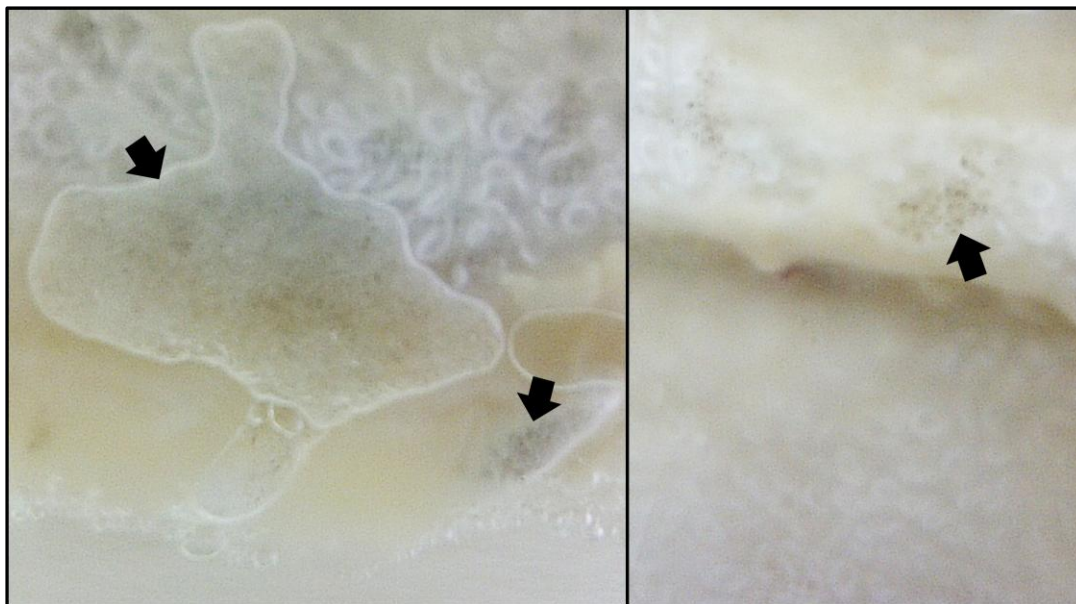
รูปที่ 4.13 การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดแบบต่อเนื่อง อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 70 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.0025 ต่อชั่วโมง

จากการทดลองที่ผ่านมาพบว่าอัตราการเจือจางที่สามารถรักษาช่วงความเข้มข้นกลูโคสได้เหมาะสม และรักษาภาวะคงที่ (steady state) นั้น เท่ากับ 0.01 ต่อชั่วโมง ดังนั้นจึงทำการศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ในภาวะอัตราการกวน 700 รอบต่อวินาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ที่อัตราการเจือจาง 0.01 ต่อชั่วโมง พบว่าที่ในการผลิตแบบเบดซ์ความเข้มข้นกรดแลกติกสุดท้ายเท่ากับ 56.49 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 1.65 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{P/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 55.46 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ความเข้มข้นเอทานอลสุดท้ายเท่ากับ 6.57 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.17 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{P/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 5.00 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเลี้ยงแบบเบดซ์ เท่ากับ 96 ชั่วโมง หลังจาก 96 ชั่วโมงของการเลี้ยง พบว่า ปริมาณความเข้มข้นน้ำตาลในระบบลดลงเหลือ 17.87 กรัมต่อลิตร จึงเริ่มการผลิตแบบต่อเนื่องโดยการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบด้วยสารละลายกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร เข้าสู่ระบบอย่างต่อเนื่อง และขณะเดียวกันจะทำการถ่ายของเหลวภายในระบบออกด้วย

อัตราการไหลเท่ากับ 0.04 ลิตรต่อชั่วโมง หลังจาก 11 ชั่วโมง ของการผลิตแบบต่อเนื่อง พบว่าระบบได้เข้าสู่ภาวะคงที่ (steady state) และเมื่อเสร็จสิ้นการผลิตแบบต่อเนื่อง พบว่าช่วงความเข้มข้นของกรดแลกติกอยู่ระหว่าง 61.97-79.32 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.72 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{P/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 56.24 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ช่วงความเข้มข้นของเอทานอลภายในระบบอยู่ระหว่าง 0.00-7.99 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.04 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{P/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 16.55 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าตลอดระยะเวลาการผลิตนั้นไม่พบการผลิตกรดฟูมาริกเกิดขึ้น โดยเมื่อเสร็จสิ้นการหมักน้ำหมักแห้งของเซลล์เท่ากับ 112.86 กรัมต่อลิตร ขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเท่ากับ 0.056 ต่อวินาที และระยะเวลาในการเลี้ยงทั้งหมดเท่ากับ 449 ชั่วโมง จากรูปที่ 4.14 พบว่าหลังจากชั่วโมงที่ 233 ของการผลิตนั้นปริมาณความเข้มข้นกลูโคสมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตามระบบยังคงรักษาปริมาณความเข้มข้นของกรดแลกติกไว้ได้ในปริมาณสูง จนกระทั่งที่ชั่วโมงที่ 467 ของการผลิตพบว่าปริมาณกลูโคสมีความเข้มข้นมากกว่ากรดแลกติก อีกทั้งระยะท้ายการทดลองพบว่าการเจริญของสปอร์เกิดขึ้น (รูปที่ 4.15) บริเวณจุดอับ (death zone) ซึ่งเป็นจุดที่อากาศและสารอาหารไม่สามารถแพร่เข้าถึง เป็นการบ่งชี้ว่าเซลล์ภายในระบบเริ่มประสิทธิภาพในการผลิต และเซลล์ไม่สามารถที่จะนำกลูโคสภายในระบบไปใช้ได้ทันเหมือนกับช่วงต้นของการผลิตดังนั้นจึงก่อให้เกิดการสะสมของปริมาณกลูโคสในระบบนั่นเอง



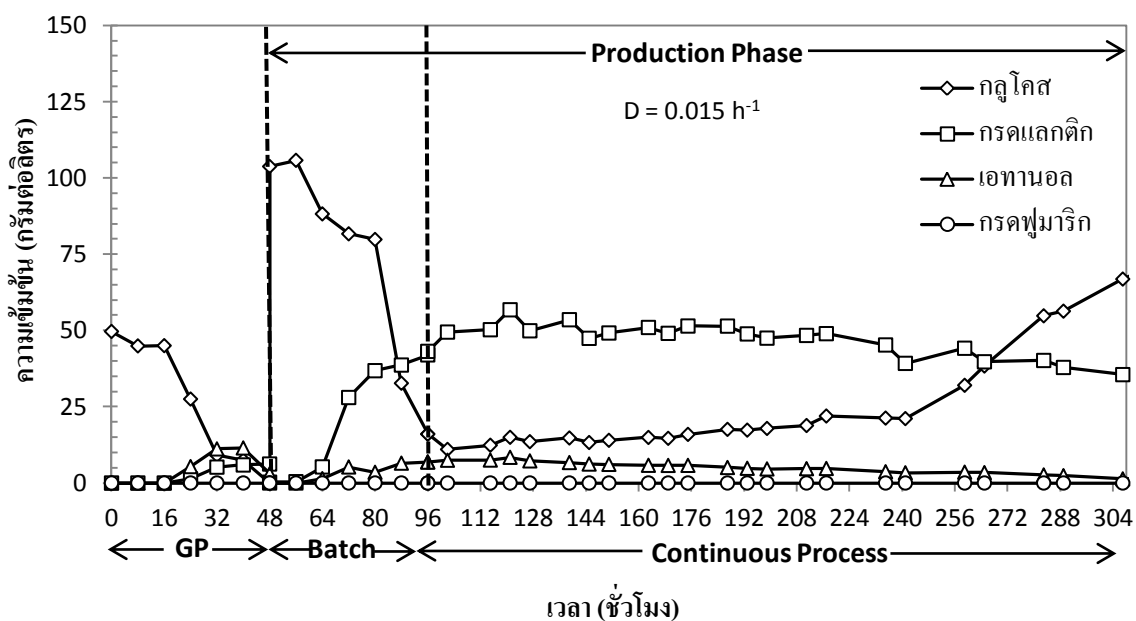
รูปที่ 4.14 การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดแบบต่อเนื่อง อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.01 ต่อ ชั่วโมง



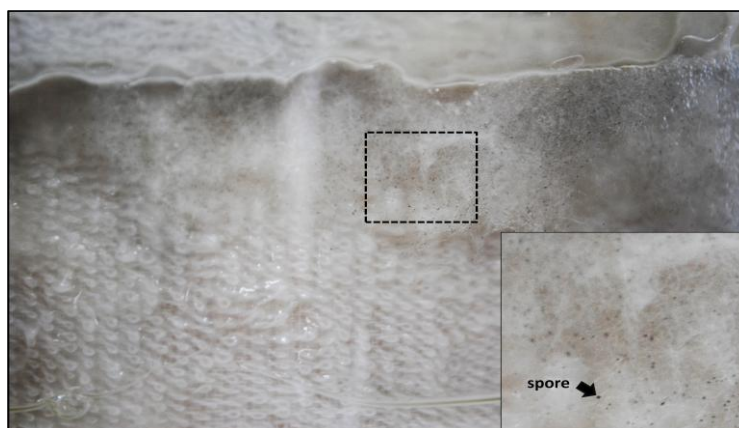
รูปที่ 4.15 การเจริญของสปอร์ *R. oryzae* ระยะท้ายการทดลองที่เจริญบริเวณจุดอับที่อากาศและสารอาหารไม่สามารถเข้าถึง ในการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้อัตราการเจือจางที่ 0.01 ต่อชั่วโมง

จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ในภาวะอัตราการกวน 700 รอบต่อวินาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ที่อัตราการเจือจาง 0.015 ต่อชั่วโมง พบว่าที่ในการผลิตแบบเบดซ์ความเข้มข้นกรดแลกติกสุดท้ายเท่ากับ 41.98 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 1.65 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 50.14 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ความเข้มข้นเอทานอลสุดท้ายในระยะสร้างผลิตภัณฑ์เท่ากับ 6.93 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.17 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 7.09 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเลี้ยงแบบเบดซ์ เท่ากับ 96 ชั่วโมง หลังจาก 96 ชั่วโมงของการเลี้ยง พบว่า ปริมาณความเข้มข้นน้ำตาลในระบบลดลงเหลือ 16.07 กรัมต่อลิตร จึงเริ่มการผลิตแบบต่อเนื่องโดยการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยสารละลายกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร เข้าสู่ระบบอย่างต่อเนื่อง และขณะเดียวกันจะทำการถ่ายของเหลวภายในระบบออกด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 0.06 ลิตรต่อชั่วโมง หลังจาก 6 ชั่วโมงของการผลิตแบบต่อเนื่องพบว่า ระบบได้เข้าสู่ภาวะคงที่ (steady state) และเมื่อเสร็จสิ้นการผลิตแบบต่อเนื่องพบว่า ช่วงความเข้มข้นของกรดแลกติกอยู่ระหว่าง 39.20-56.77 กรัมต่อลิตร อัตราการ

ผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.73 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{P/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 36.77 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ช่วงความเข้มข้นของเอทานอลภายในระบบอยู่ระหว่าง 3.35-8.41 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.08 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{P/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 4.16 เปอร์เซ็นต์และพบว่าตลอดระยะเวลาการผลิตนั้นไม่พบการผลิตกรดฟูมาริกเกิดขึ้น โดยเมื่อเสร็จสิ้นการหมักน้ำหมักแห้งของเซลล์เท่ากับ 111.80 กรัมต่อลิตร ขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเท่ากับ 0.068 ต่อวินาที และระยะเวลาในการเลี้ยงทั้งหมดเท่ากับ 265 ชั่วโมง จากรูปที่ 4.16 พบว่าหลังจากชั่วโมงที่ 211 ของการผลิตนั้นปริมาณความเข้มข้นกลูโคสมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ขณะเดียวกันปริมาณความเข้มข้นของกรดแลกติกมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีปริมาณสูงกว่าความเข้มข้นกลูโคส จนกระทั่งที่ชั่วโมงที่ 283 ของการผลิตพบว่าปริมาณกลูโคสมีความเข้มข้นมากกว่ากรดแลกติก ในระยะท้ายการทดลองพบว่าการเจริญของสปอร์ (รูปที่ 4.17) บริเวณด้านบนของผ้าขนหนู ซึ่งในระยะท้ายนั้นพบว่าของเหลวที่ถูกขังอยู่บริเวณด้านนอก baffle หนึ่ง ไม่เกิดการ mixing เหมือนกับของเหลวที่อยู่บริเวณส่วนด้านในของ baffle จึงส่งผลทำให้เซลล์ที่เจริญอยู่ด้านบนของผ้า (solid state) มีการเจริญเป็นสปอร์ ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่าเซลล์ภายในระบบได้เริ่มหมดประสิทธิภาพในการผลิต และไม่สามารถที่จะนำกลูโคสภายในระบบไปใช้ได้ทันเหมือนกับช่วงต้นของการผลิต เพราะฉะนั้นจึงทำการหยุดการทดลอง

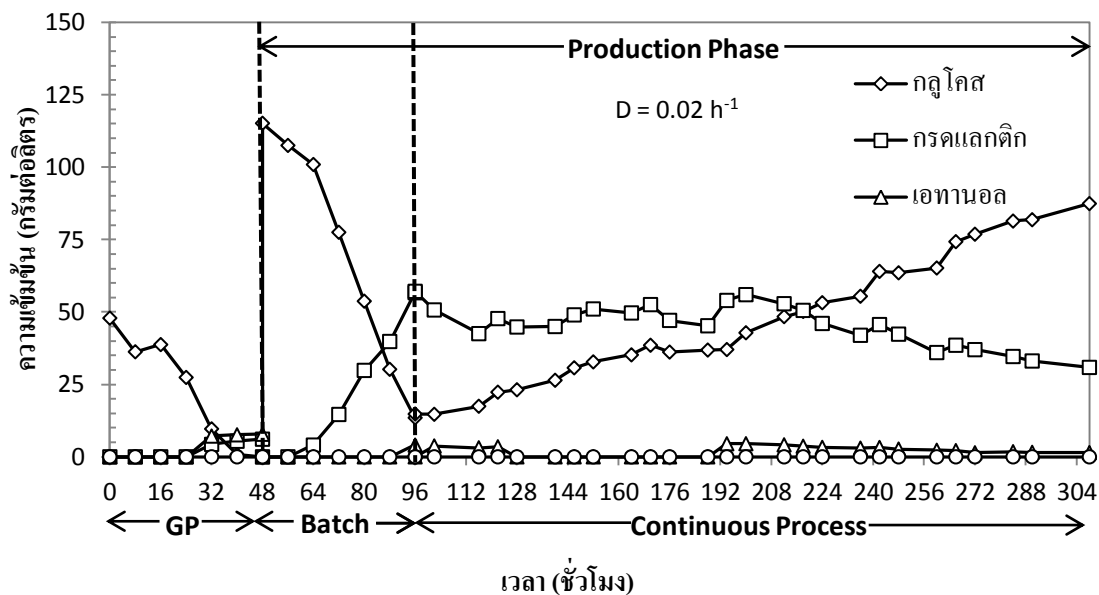


รูปที่ 4.16 การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสถิตแบบต่อเนื่อง อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.015 ต่อชั่วโมง



รูปที่ 4.17 การเจริญของสปอร์ *R. oryzae* ระยะท้ายการทดลองบริเวณด้านบนของผ้าเหนืออาหารเลี้ยงเชื้อ ในการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้อัตราการเจือจางที่ 0.015 ต่อชั่วโมง

จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ในภาวะอัตราการกวน 700 รอบต่อวินาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศ ต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ที่อัตราการเจือจาง 0.02 ต่อชั่วโมง พบว่าที่ในการผลิตแบบเบตซ์ความเข้มข้นกรดแลกติกสุดท้ายเท่ากับ 56.65 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 1.63 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 57.36 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ความเข้มข้นเอทานอลสุดท้ายในระยะสร้างผลิตภัณฑ์เท่ากับ 4.04 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 2.64 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเลี้ยงแบบเบตซ์ เท่ากับ 96 ชั่วโมง หลังจาก 96 ชั่วโมงของการเลี้ยง พบว่า ปริมาณความเข้มข้นกลูโคสในระบบลดลงเหลือ 13.49 กรัมต่อลิตร จึงเริ่มการผลิตแบบต่อเนื่องโดยการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยสารละลายกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร เข้าสู่ระบบอย่างต่อเนื่อง และขณะเดียวกันจะทำการถ่ายของเหลวภายในระบบออกด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 0.08 ลิตรต่อชั่วโมง หลังจาก 20 ชั่วโมง ของการผลิตแบบต่อเนื่องพบว่า ระบบได้เข้าสู่ภาวะคงที่ (steady state) เฉพาะในส่วนของกรดแลกติกเท่านั้น ขณะที่ปริมาณความเข้มข้นกลูโคสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ดังรูปที่ 4.18 ซึ่งสาเหตุดังกล่าวน่าจะมาจากอัตราการเจือจางที่สูงขึ้น จึงทำให้เซลล์ไม่สามารถที่จะใช้กลูโคสไปสร้างผลิตภัณฑ์ได้ทัน และเมื่อเสร็จสิ้นการผลิตแบบต่อเนื่องพบว่า ช่วงความเข้มข้นของกรดแลกติก อยู่ระหว่าง 42.52-55.98 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.98 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 42.88 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ช่วงความเข้มข้นของเอทานอลภายในระบบอยู่ระหว่าง 0.00-4.53 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.03 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 1.5 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าตลอดระยะเวลาการผลิตนั้นไม่พบการผลิตกรดฟูมริกเกิดขึ้น โดยเมื่อเสร็จสิ้นการหมักน้ำหนักรวมของเซลล์เท่ากับ 100.09 กรัมต่อลิตร ขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเท่ากับ 0.104 ต่อวินาที และระยะเวลาในการเลี้ยงทั้งหมดเท่ากับ 218 ชั่วโมง จากรูปที่ 4.18 พบว่าชั่วโมงที่ 224 ของการผลิต เกิดการสะสมกลูโคสภายในระบบอย่างต่อเนื่อง จนกระทั่งปริมาณกลูโคสมีความเข้มข้นมากกว่ากรดแลกติก จึงทำการหยุดการผลิต



รูปที่ 4.18 การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดแบบต่อเนื่อง อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.02 ต่อชั่วโมง

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบผลการหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง โดยการตรึงเซลล์บนเครื่องปฏิกรณ์
ชีวภาพชนิดเบคสติด

ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	70		150			
	0.0200	0.1400	0.0025	0.0100	0.0150	0.0200
อัตราเจือจาง (ต่อชั่วโมง)						
กรดแลกติก						
ช่วงของความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	37.14-47.70	13.33-17.37	77.60-83.08	61.97-79.32	39.20-56.77	42.52-55.98
Y_{PS} (%)	28.09	16.83	54.09	56.24	36.77	42.88
อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.83	2.23	0.60	0.72	0.73	0.98
เอทานอล						
ช่วงของความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	3.23-10.36	5.58-6.02	6.48-9.66	0.00-7.99	3.35-8.41	0.00-4.53
Y_{PS} (%)	3.29	0.25	5.38	16.55	4.16	1.50
อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.10	0.05	0.16	0.32	0.08	0.03
กรดฟูมาริก						
ช่วงของความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Y_{PS} (%)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
ระยะเวลาในการเข้าสู่ Steady state (ชั่วโมง)	0	24	16	11	6	20
ระยะเวลาในการเลี้ยงทั้งหมด (ชั่วโมง)	352	126	192	449	265	218
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	63.67	68.58	65.93	112.86	111.80	100.09
$K_L a$ (ต่อวินาที)	0.072	0.079	N/A	0.056	0.068	0.104

จากตารางที่ 4.4 เมื่อพิจารณาการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องจะเห็นได้ว่าการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสจาก 70 กรัมต่อลิตร เป็น 150 กรัมต่อลิตรนั้นสามารถผลิตกรดแลกติกได้ความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งทั้งนี้ก็ขึ้นกับภาวะของอัตราการเจริญที่ใช้อยู่ โดยจากการทดลองพบว่า ภาวะที่เหมาะสมที่สามารถรักษาเสถียรภาพของเซลล์ และการผลิตกรดแลกติก ได้ดีที่สุด

แต่อย่างไรก็ตามการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องโดยใช้สารละลายกลูโคสเริ่มต้นในอาหารชนิดต่อเนื่อง 150 กรัมต่อลิตร นั้นถึงแม้ว่าจะสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงที่อัตราการเจริญ 0.01 ต่อชั่วโมงนั้น แต่เมื่อพิจารณารูปที่ 4.14 พบว่าหลังจากชั่วโมงที่ 236 พบว่าเกิดการสะสมของกลูโคส และสะสมสูงสุดถึง 68 กรัมต่อลิตร ซึ่งส่งผลต่อต้นทุนการผลิต นอกจากนี้ถ้ามีการปล่อยของเสียออกสู่ระบบจะก่อให้เกิดปัญหาทำให้แหล่งน้ำเน่าเสียซึ่งจะเป็นปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม โดยสาเหตุของการสะสมกลูโคสในระบบในระยะท้ายการผลิตแบบต่อเนื่องนั้น ได้มีการตั้งสมมติฐานว่า ในช่วงระยะเวลาที่ 96-236 ของการหมักนั้นอาจยังมีไนโตรเจนบางส่วนที่ถูกดูดซับอยู่ในเซลล์ ดังนั้นไนโตรเจนจะเป็นตัวชักนำให้กลูโคสส่วนหนึ่งถูกนำไปใช้ในการเจริญเติบโต และสร้างพลังงาน ATP ขณะที่อีกส่วนหนึ่งจะถูกนำไปใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์คือ กรดแลกติก เอทานอล และกรดฟumaric และหลังจาก 236 ชั่วโมงเป็นต้นไป คาดว่าจะเกิดภาวะขาดแคลนไนโตรเจน ดังนั้น ปริมาณกลูโคสที่ถูกนำไปใช้ในการเจริญเติบโต และสร้างพลังงานค่อยๆ ลดลง ขณะที่การสร้างกรดแลกติก และเอทานอล นั้นลดลงไปไม่มากนัก จึงทำให้ปริมาณกลูโคสภายในระบบเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ (ดังรูปที่ 4.14) เพราะฉะนั้นจึงทำการศึกษาผลของไนโตรเจนต่อการผลิตกรดแลกติก และการเจริญเติบโต

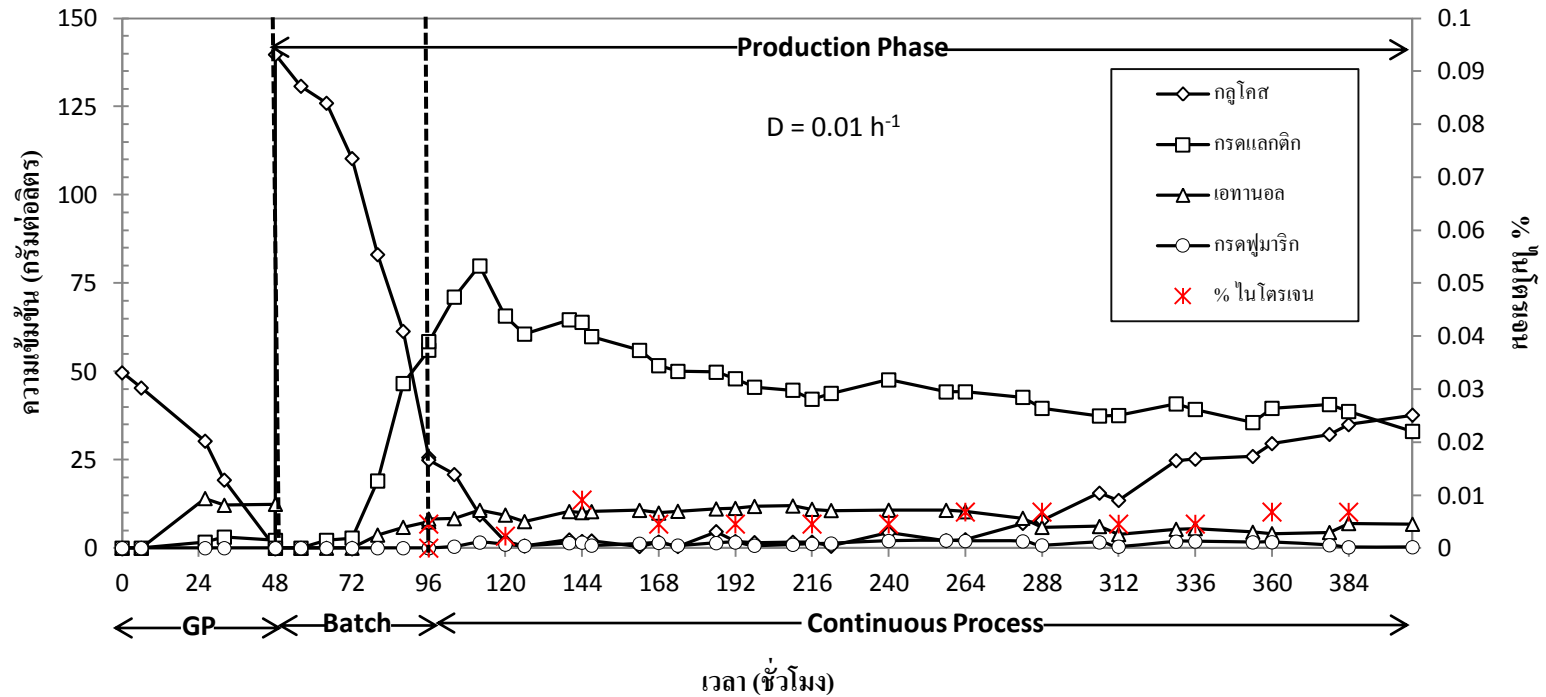
4.2.3 การหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่องที่ระดับความเข้มข้นกลูโคสในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ 150 กรัมต่อลิตร และเติมยูเรียทุก 24 ชั่วโมง ในระยะการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง

ในงานวิจัยของ Wang และคณะ (1995) รายงานว่า *R. oryzae* สามารถผลิตกรดแลกติกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากแหล่งไนโตรเจน แต่อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราการผลิตกรดแลกติก จะลดลงเมื่ออายุของเซลล์เพิ่มขึ้น โดยในสัปดาห์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น ยูเรียส่งผล

ต่ออัตราการผลิตกรดแลกติกเชิงปริมาตร เนื่องด้วยยูเรียจะช่วยเพิ่มทั้งในส่วนความหนาแน่นเซลล์ และอัตราการผลิตกรดแลกติกแบบจำเพาะ ดังนั้นจึงทำการศึกษาผลของการเติมยูเรียลงในระบบ ทุกๆ 24 ชั่วโมง เมื่อเข้าสู่กระบวนการหมักกรดแลกติก แบบต่อเนื่อง

โดยเริ่มต้นจากการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคส เริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร และทำการเติมยูเรีย ความเข้มข้น 0.15 กรัมต่อลิตร ทุกๆ 24 ชั่วโมง เมื่อเข้าสู่กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง ในภาวะอัตราการกวน 700 รอบต่อวินาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ที่อัตราการเจือจาง 0.01 ต่อชั่วโมง พบว่าที่ในการผลิตแบบเบตซ์ความเข้มข้นกรดแลกติกสุดท้ายเท่ากับ 56.05 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 2.34 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 66.13 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ความเข้มข้นเอทานอลสุดท้ายเท่ากับ 7.44 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.17 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 8.70 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบว่าตลอดระยะเวลาการผลิตนั้นไม่พบการผลิตกรดฟูมาริกเกิดขึ้น ระยะเวลาในการเลี้ยงแบบเบตซ์ เท่ากับ 48 ชั่วโมง หลังจาก 96 ชั่วโมงของการเลี้ยง พบว่า ปริมาณความเข้มข้นกลูโคสในระบบลดลงเหลือ 24.92 กรัมต่อลิตร จึงเริ่มการผลิตแบบต่อเนื่องโดยการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบด้วยความเข้มข้นกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร และทำการเติมยูเรีย ความเข้มข้น 0.15 กรัมต่อลิตร ลงสู่ระบบที่ชั่วโมงที่ 0 ของกระบวนการผลิตแบบต่อเนื่อง และทำการเติมยูเรียในทุกๆ 24 ชั่วโมงเข้าสู่ระบบ และขณะเดียวกัน จะทำการถ่ายของเหลวภายในระบบออกด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 0.04 ลิตรต่อชั่วโมง หลังจาก 72 ชั่วโมงของการผลิตแบบต่อเนื่อง พบว่าระบบได้เข้าสู่ภาวะคงที่ (steady state) และเมื่อเสร็จสิ้นการผลิตแบบต่อเนื่อง พบว่าช่วงความเข้มข้นของกรดแลกติกอยู่ระหว่าง 37.43-51.66 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.43 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 31.10 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ช่วงความเข้มข้นของเอทานอลภายในระบบอยู่ระหว่าง 3.88-11.94 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.08 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 5.21 เปอร์เซ็นต์และพบการผลิตกรดฟูมาริกเกิดขึ้น โดยช่วงความเข้มข้นของกรดฟูมาริกอยู่ที่ 0.25-2.14 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดฟูมาริก 0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 0.98 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อเสร็จสิ้นการหมักน้ำหมักแห้งของเซลล์เท่ากับ 103.83 กรัมต่อลิตร ขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเท่ากับ 0.065 ต่อวินาที และระยะเวลาในการเลี้ยงทั้งหมดเท่ากับ

384 ชั่วโมง จากรูปที่ 4.19 พบว่าหลังจากชั่วโมงที่ 264 ของการผลิตนั้นปริมาณความเข้มข้นกลูโคส มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง แต่อย่างไรก็ตามระบบยังคงรักษาปริมาณความเข้มข้นของกรด แลคติกไว้ได้ในปริมาณคงที่ จนกระทั่งที่ชั่วโมงที่ 404 ของการผลิตพบว่าปริมาณกลูโคสมีความเข้มข้นมากกว่ากรดแลคติก จึงทำการหยุดการทดลอง นอกจากนี้เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์ในโตรเจนที่ สะสมภายในระบบตั้งแต่เริ่มทำการเติมยูเรียที่ 0 ชั่วโมงของกระบวนการผลิตแบบต่อเนื่องนั้น พบว่าเปอร์เซ็นต์ในโตรเจนที่คงเหลือภายในระบบนั้นถึงแม้จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแต่เปอร์เซ็นต์ ในโตรเจนอยู่ในระดับต่ำมาก โดยอยู่ในช่วงระหว่าง 0.002-0.009 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น และเมื่อเสร็จ สิ้นการผลิตแล้วนั้นจึงทำการแยกเซลล์ออกจาก baffle พบว่า เกิดการเจริญของราเกิดขึ้น แสดงดัง รูป 4.21 (ข) โดยส่วนของเซลล์ที่เกิดการเจริญขึ้นใหม่นั้นจะมีลักษณะเป็นเซลล์สีขาว หรือ young cell ซึ่งแตกต่างจากกับเซลล์ชั้นก่อนหน้าที่มีลักษณะเป็นเซลล์สีเหลือง หรือ old cell และเมื่อเปรียบเทียบกับ การหมักในภาวะเดียวกันแต่ปราศจากการเติมยูเรียนั้น แสดงดังรูป 4.21 (ก) จะไม่ปรากฏการ เจริญของเซลล์ใหม่เกิดขึ้น และเมื่อพิจารณาภาพตัดขวางในรูปที่ 4.22 (ก) นั้นจะเห็นความแตกต่าง อย่างชัดเจนว่าหากกลูโคสเพียงอย่างเดียวจะขึ้นการเจริญของราที่ถูกตรึงจะถูกแบ่งออกเป็น 2 ชั้น โดยจะไม่เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์ใหม่ (young cell layer) เหมือนกับการเติมยูเรียเข้าสู่ระบบ แสดงในรูปที่ 4.12 (ข) ที่มีการเจริญเพิ่มขึ้นอีกหนึ่งชั้น เป็นชั้นของเซลล์ใหม่ (young cell layer) เพราะฉะนั้นจึงสรุปได้ว่าการเติมยูเรียเข้าสู่ระบบในช่วงกระบวนการผลิตแบบต่อเนื่องนั้นส่งเสริม กระตุ้นให้เซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าในชั่วโมงที่ 0 ของการผลิต แบบต่อเนื่องนั้น ความเข้มข้นกลูโคสจะลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 24-168 ของการผลิต แบบต่อเนื่อง ความเข้มข้นกลูโคสในระบบอยู่ในปริมาณต่ำมาก 0.54-4.34 กรัมต่อลิตร เนื่องจาก กลูโคสที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนนั้นจะถูกชักนำไปใช้ในการสร้าง cell mass อีกทั้งเมื่อเซลล์มีการ เจริญเติบโตหนาขึ้นจะส่งผลให้เกิดการจำกัดของถ่ายเทออกซิเจนภายในระบบก่อให้เกิดภาวะ anaerobic และจะเป็นการกระตุ้นให้เกิดการผลิตเอทานอล (Cao และคณะ, 1996) ซึ่งจะเห็นได้ว่า ปริมาณเอทานอลในช่วงการผลิตแบบต่อเนื่องนั้นมีปริมาณสูง (ช่วงความเข้มข้นเอทานอล 3.88- 11.94 กรัมต่อลิตร) เมื่อเทียบกับการผลิตที่ไม่เติมยูเรีย (ช่วงความเข้มข้นเอทานอล 0.00-7.99 กรัม ต่อลิตร) เพราะฉะนั้นจากปัจจัยเหล่านี้ล้วนส่งผลต่อการผลิตกรดแลคติกทำให้สามารถผลิตกรด แลคติกได้ในปริมาณที่ไม่สูงนัก

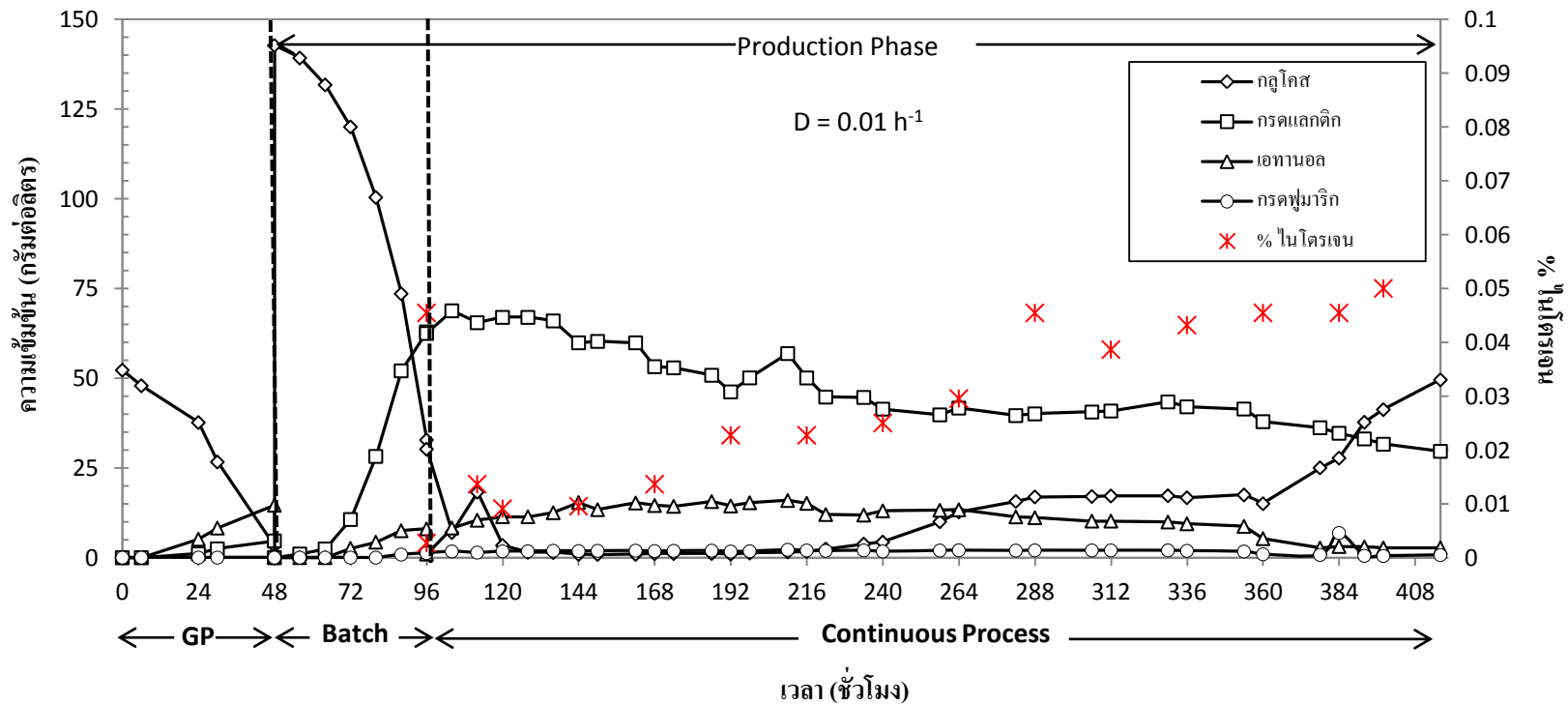


รูปที่ 4.19 การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดแบบต่อเนื่อง อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.01 ต่อ ชั่วโมง และทำการเติมยูเรีย ความเข้มข้น 0.15 กรัมต่อลิตร ทุกๆ 24 ชั่วโมงของการผลิตแบบต่อเนื่อง

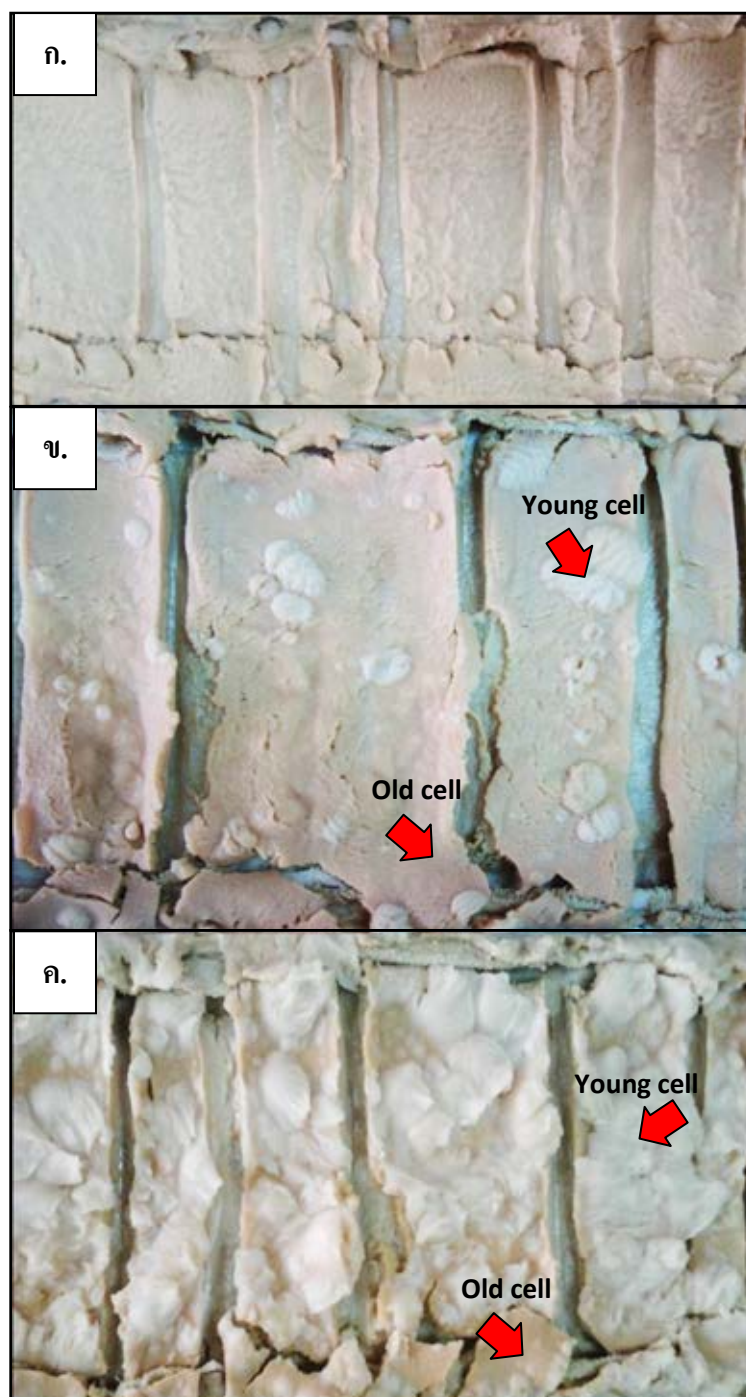
การศึกษาโดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร และทำการเติมยูเรีย ความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร ทุกๆ 24 ชั่วโมง เมื่อเข้าสู่กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง ในภาวะ อัตราการกวน 700 รอบต่อวินาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อ นาที ที่อัตราการเจือจาง 0.01 ต่อชั่วโมง พบว่าที่ในการผลิตแบบเบคส์ความเข้มข้นกรดแลกติกสุด ท้ายเท่ากับ 62.91 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 2.03 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 63.26 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ความเข้มข้นเอทานอลสุดท้ายเท่ากับ 8.02 กรัมต่อ ลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.26 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 12.22 เปอร์เซ็นต์ หลังจาก 96 ชั่วโมงของการเลี้ยง พบว่า ปริมาณความเข้มข้นกลูโคสในระบบ ลดลงเหลือ 32.77 กรัมต่อลิตร จึงเริ่มการผลิตแบบต่อเนื่องโดยการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบด้วย ความเข้มข้นกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร และทำการเติมยูเรีย ความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร ลงสู่ระบบ ที่ชั่วโมงที่ 0 ของกระบวนการผลิตแบบต่อเนื่อง และทำการเติมยูเรียในทุกๆ 24 ชั่วโมงเข้าสู่ระบบ และขณะเดียวกันจะทำการถ่ายของเหลวภายในระบบออกด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 0.04 ลิตรต่อ ชั่วโมง หลังจาก 8 ชั่วโมง ของการผลิตแบบต่อเนื่องพบว่า ระบบ ได้เข้าสู่ภาวะคงที่ (steady state) จนถึงชั่วโมงที่ 42 ของการผลิตแบบต่อเนื่อง โดยมีความเข้มข้นกรดแลกติกอยู่ในช่วง 65.47-68.79 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นพบว่าปริมาณความเข้มข้นกรดแลกติกมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้ อาจมีสาเหตุมาจากปริมาณความเข้มข้นของกลูโคสภายในระบบอยู่ในระดับต่ำ โดยความเข้มข้น ของกลูโคสภายในระบบอยู่ในช่วง 0.87-3.78 กรัมต่อลิตร ซึ่งอาจไม่เพียงพอที่จะนำมาใช้ในการ สร้างกรดแลกติก และเมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานของราเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก (รูปที่ 4.21 (ก)) พบว่า มีการเจริญโตของเซลล์ใหม่เกิดขึ้น โดยเซลล์ที่เจริญโตใหม่ (young cell) นั้นจะมี ลักษณะเป็นเส้นใยสีขาว โดยเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับ รูปที่ 4.21 (ข) ซึ่งจะเห็นได้ว่ารามีการ เจริญมากกว่าการเติมยูเรียความเข้มข้น 0.15 กรัมต่อลิตร นั้นชี้ให้เห็นว่า เมื่อเติมปริมาณความ เข้มข้นยูเรียเพิ่มขึ้น จะส่งเสริมการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเมื่อมีการเติมแหล่ง ไนโตรเจนเข้าสู่ระบบ กลูโคสและยูเรียภายในระบบส่วนใหญ่จะถูกนำไปใช้ในการเจริญเติบโต ของเซลล์ ดังนั้นจึงส่งผลต่อการสร้างผลิตภัณฑ์หลัก คือ กรดแลกติก เพราะฉะนั้นปริมาณการผลิต กรดแลกติกจึงลดลงเรื่อยๆ เนื่องมาจากปริมาณกลูโคสภายในระบบนั้นไม่เพียงพอ จนกระทั่งเข้าสู่ ที่ชั่วโมงที่ 144 ของกระบวนการผลิตแบบต่อเนื่อง ความเข้มข้นของกรดแลกติกเข้าสู่ภาวะคงที่

(steady state) อีกครั้ง โดยความเข้มข้นกรดแลกติกนั้นอยู่ในช่วง 39.57-43.39 กรัมต่อลิตร แต่ขณะเดียวกันพบว่าปริมาณความเข้มข้นของกลูโคสนั้นเริ่มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ดังรูปที่ 4.20 ซึ่งสาเหตุดังกล่าวเนื่องมาจากเซลล์บางส่วนเริ่มเสียแอสตีวิติ จึงทำให้อัตราการใช้กลูโคสนั้นลดลง และเมื่อเสร็จสิ้นการผลิตแบบต่อเนื่องพบว่า การผลิตโดยใช้ภาวะในการเลี้ยงดังกล่าว ส่งผลให้เกิดภาวะคงที่ 2 ช่วง และเมื่อพิจารณารูปที่ 4.22 (ค) จะพบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์ถูกแบ่งออกเป็น 3 ชั้นหลัก ซึ่งแตกต่างจากการผลิตโดยมีการเติมกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องเพียงอย่างเดียว (รูปที่ 4.22 (ก)) ซึ่งเซลล์จะมีเพียง 2 ชั้นหลักเท่านั้น จึงสรุปได้ว่าภาวะคงที่ช่วงที่ 1 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8-42 ของกระบวนการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง จะเกิดขึ้นในชั้นที่ 2 (Secondary layer) โดยช่วงความเข้มข้นของกรดแลกติกอยู่ระหว่าง 65.47-68.79 กรัมต่อลิตรคิดเป็น อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.67 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 46.59 เปอร์เซ็นต์ ช่วงความเข้มข้นของเอทานอลภายในระบบอยู่ระหว่าง 8.25-12.52 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 7.51 เปอร์เซ็นต์ และช่วงความเข้มข้นของกรดฟูมาริกภายในระบบอยู่ระหว่าง 1.4-1.9 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดฟูมาริกเท่ากับ 0.02 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 1.19 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ในภาวะคงที่ช่วงที่ 2 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 144-258 ของกระบวนการผลิตแบบต่อเนื่อง จะเกิดขึ้นในชั้นที่ 3 (Third layer) หรือ เซลล์ใหม่ (young cell layer) โดยช่วงความเข้มข้นของกรดแลกติกอยู่ระหว่าง 39.78-43.39 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.41 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 30.35 เปอร์เซ็นต์ ช่วงความเข้มข้นของเอทานอลภายในระบบอยู่ระหว่าง 8.71-13.33 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 8.13 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 0.11 เปอร์เซ็นต์ และช่วงความเข้มข้นของกรดฟูมาริกภายในระบบอยู่ระหว่าง 1.69-2.03 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดฟูมาริกเท่ากับ 0.02 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 1.42 เปอร์เซ็นต์ โดยเมื่อเสร็จสิ้นการหมักน้ำหมักแห้งของเซลล์เท่ากับ 180.70 กรัมต่อลิตร จากตารางที่ 4.5.2 เมื่อเทียบกับการผลิตโดยปราศการเติมยูเรียหรือแหล่งไนโตรเจนนั้นน้ำหมักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นจากเดิมเกือบ 2 เท่า ขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเท่ากับ 0.059 ต่อวินาที และระยะเวลาในการเลี้ยงทั้งหมดเท่ากับ 384 ชั่วโมง จากรูปที่ 4.20 พบว่าชั่วโมงที่ 392 ของการผลิต เกิดการสะสมกลูโคสภายในระบบอย่างต่อเนื่อง

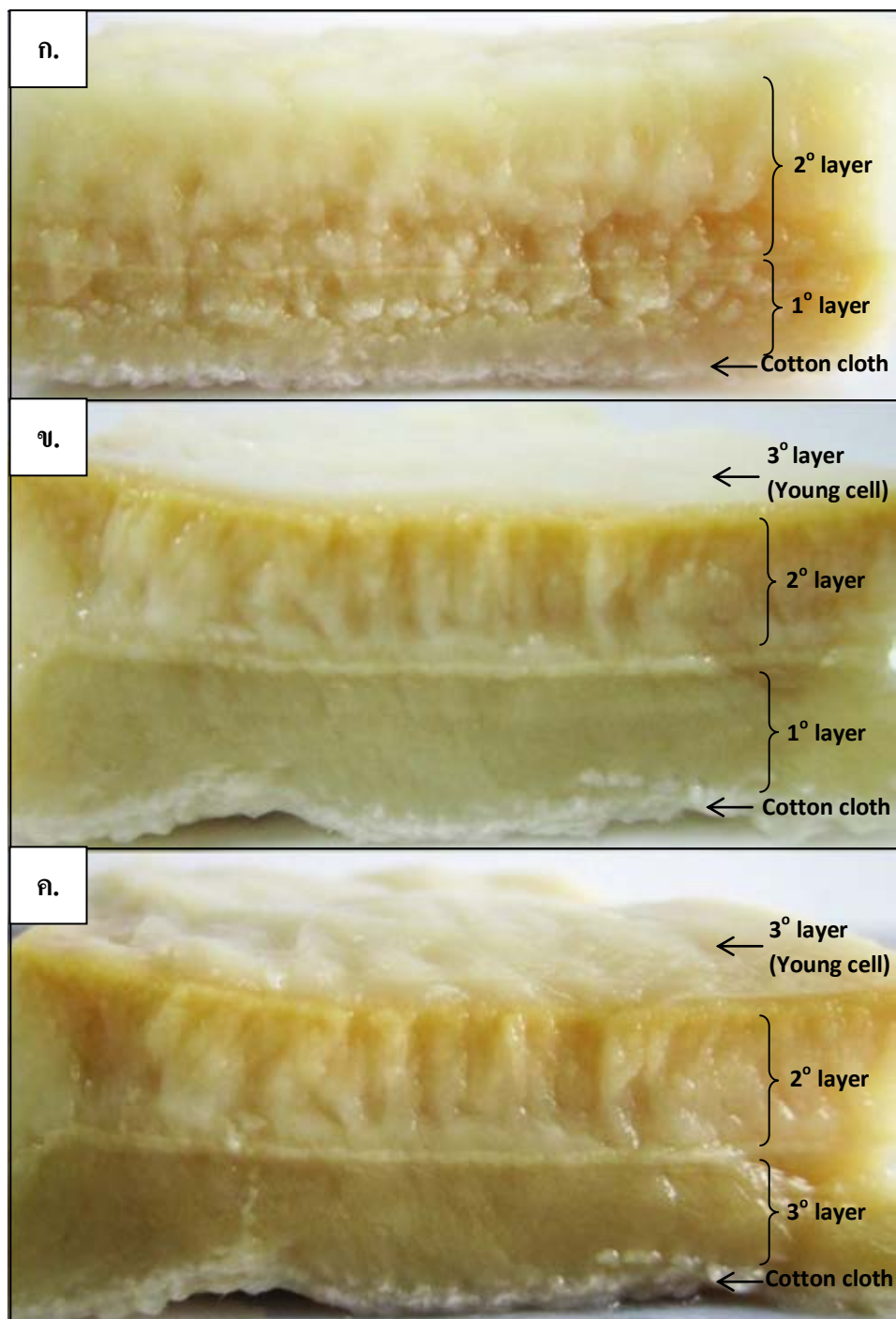
จนกระทั่งปริมาณกลูโคสมีความเข้มข้นมากกว่ากรดแลคติกจึงทำการหยุดการผลิต นอกจากนี้เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนที่สะสมภายในระบบตั้งแต่เริ่มทำการเติมยูเรียที่ 0 ชั่วโมงของกระบวนการผลิตแบบต่อเนื่องนั้น พบว่าเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนที่คงเหลือภายในระบบนั้นถึงแม้จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแต่เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนอยู่ในระดับต่ำ โดยอยู่ในช่วงระหว่าง 0.013-0.050 เปอร์เซ็นต์ โดยแสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการนำไนโตรเจนไปใช้ในการสร้างหรือผลิตเซลล์ใหม่ขึ้นมา



รูปที่ 4.20 การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตั้งในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดแบบต่อเนื่อง อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.01 ต่อ ชั่วโมง และทำการเติมยูเรีย ความเข้มข้น 0.30 กรัมต่อลิตร ทุกๆ 24 ชั่วโมงของการผลิตแบบต่อเนื่อง



รูปที่ 4.21 ลักษณะทางสัณฐานของราที่ถูกตรึงบนผ้าฝ้ายชนิดดัก หลังจากทำการแยกออก เซลล์ออกจาก baffle ในการผลิตแบบต่อเนื่อง ภาวะที่ไม่มีการเติมยูเรีย (ก) เติมยูเรียที่ 0.15 กรัมต่อ ลิตร (ข) และเติมยูเรีย 0.30 กรัมต่อลิตร(ค)



รูปที่ 4.22 ลักษณะทางสัณฐานของรากที่ถูกตรึงบนผ้าฝ้ายชนิดดก ในภาพตัดขวาง ในการผลิตแบบต่อเนื่อง ภาวะที่ไม่มี การ เติมยูเรีย (ก) เติมยูเรียที่ 0.15 กรัมต่อลิตร (ข) และเติมยูเรีย 0.30 กรัมต่อลิตร (ค)

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบผลการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง โดยการตรึงเซลล์บนถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบคสติด ที่อัตราการเจือจาง 0.01 ต่อชั่วโมง

ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	150			
ความเข้มข้นยูเรีย (กรัมต่อลิตร)	0.00	0.15	0.30	
ภาวะคงที่ (Steady state) ครั้งที่	1	1	1	2
กรดแลกติก				
ช่วงของความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	61.97-79.32	37.43-51.66	65.47-68.79	39.57-43.39
$Y_{p/S}$ (%)	56.24	31.10	46.59	30.35
อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.72	0.43	0.67	0.41
เอทานอล				
ช่วงของความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	0.00-7.99	3.88-11.94	8.25-12.52	8.71-13.33
$Y_{p/S}$ (%)	16.55	5.92	7.51	8.13
อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.32	0.08	0.11	0.11
กรดฟูมาริก				
ช่วงของความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	0.00	0.25-2.14	1.40-1.90	1.69-2.03
$Y_{p/S}$ (%)	0.00	0.98	1.19	1.42
อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.00	0.01	0.02	0.02
ระยะเวลาในการเข้าสู่ Steady state (ชั่วโมง)	11	72	8	144
ระยะเวลาในการเลี้ยงทั้งหมด (ชั่วโมง)	449	384	384	
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	112.86	103.83	180.70	
ไนโตรเจน (%)	0.000	0.002-0.009	0.013-0.050	
$K_L a$ (ต่อวินาที)	0.056	0.065	0.059	

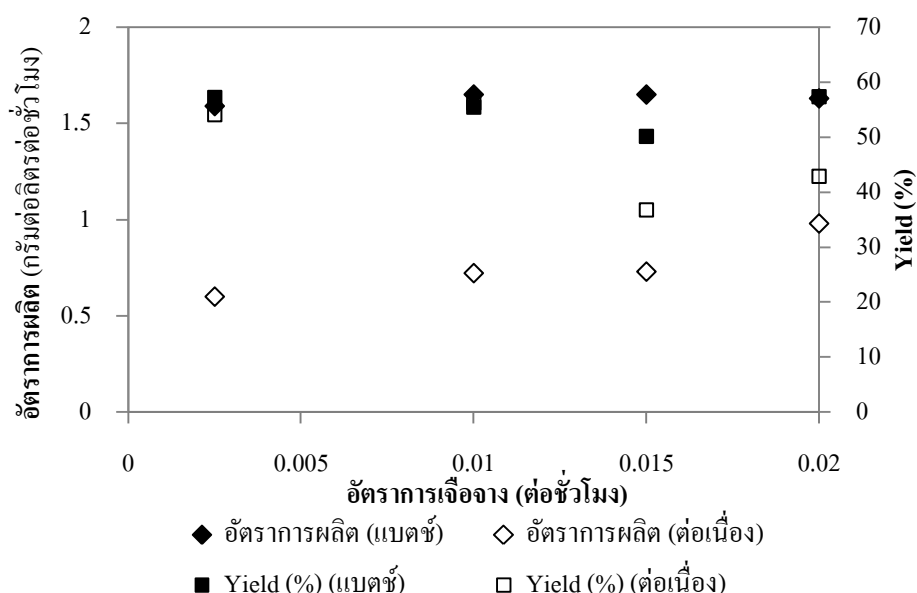
จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง โดยการศึกษา 3 ปัจจัย คือ 1) ปริมาณความเข้มข้นกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อในส่วนระยะสร้างผลิตภัณฑ์และอาหารเลี้ยงเชื้อใน ระยะการผลิตแบบต่อเนื่อง 2) อัตราการเจือจาง 3) ปริมาณไนโตรเจนต่อการผลิตกรดแลกติกแบบ ต่อเนื่อง

จากตารางที่ 4.4 พบว่าเมื่อพิจารณาในส่วนของปริมาณความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร พบว่า อัตราการเจือจางที่เหมาะสม คือ 0.02 ต่อชั่วโมง สามารถที่จะเพิ่ม ความสามารถในการผลิตกรดแลกติกให้ขึ้นมากกว่าที่อัตราการเจือจาง 0.14 ต่อชั่วโมง ประมาณ 3 เท่า ขณะที่ปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลก็สูงขึ้นเช่นกัน และที่สำคัญคือ ระบบสามารถรักษา ภาวะคงที่ (steady state) ภายในระบบได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ของการผลิตแบบต่อเนื่อง และสามารถ รักษาภาวะดังกล่าวได้ยาวนานถึง 352 ชั่วโมง ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่า ภาวะดังกล่าวมีความ เหมาะสมทำให้เกิดเสถียรภาพของระบบและทำให้เซลล์มีประสิทธิภาพที่เหมาะสมในการผลิตกรด แลกติก ซึ่งแตกต่างจากการใช้อัตราการเจือจางที่ 0.14 ต่อชั่วโมง ที่ต้องใช้เวลารวมถึง 24 ชั่วโมงของ การผลิตแบบต่อเนื่อง ระบบถึงจะเข้าสู่ภาวะคงที่ อีกทั้งยังพบว่าเกิดการสะสมของความเข้มข้น กลูโคสภายในระบบ และปริมาณกลูโคสมีความเข้มข้นสูงกว่ากรดแลกติก ซึ่งในการผลิตในเชิง อุตสาหกรรม จะเป็นการที่จะทำให้เกิดความไม่คุ้มทุนเกิดขึ้น แต่อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราการผลิต กรดแลกติกแบบต่อเนื่อง ที่อัตราการเจือจาง 0.02 ต่อชั่วโมง เท่ากับ 0.82 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่ง มีค่าน้อยกว่าอัตราการเจือจางที่ 0.14 ต่อชั่วโมง ซึ่งเป็นผลมาจากสูตรการคำนวณที่ว่า (ค่าเฉลี่ยของ ความเข้มข้นกรดแลกติกเริ่มต้น x อัตราการเจือจาง) ดังนั้นเมื่ออัตราการไหลที่ 0.14 ต่อชั่วโมง มากกว่าที่อัตราการเจือจาง 0.02 ต่อชั่วโมง ถึง 7 เท่า จึงส่งผลทำให้ค่าอัตราการผลิตกรดแลกติกมีค่า ต่ำกว่านั่นเอง ขณะเดียวกันพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนนั้น ไม่ มีความแตกต่างกัน

เมื่อพิจารณาในส่วนของปริมาณความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.4) พบว่าในการผลิตกรดแลกติกแบบแบบต่อเนื่องจะใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงสูงกว่าความ เข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น ถึง 24 ชั่วโมง และเมื่อพิจารณาที่อัตราการเจือจางพบว่า อัตราการเจือจางที่ เหมาะสมสำหรับปริมาณความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นที่ 150 กรัมต่อลิตรนั้น คือที่อัตราการเจือจาง

เท่ากับ 0.01 ต่อชั่วโมง เพราะสามารถที่จะรักษาภาวะภายในระบบให้อยู่ในภาวะคงที่ (steady state) ได้ยาวนานที่สุด ถึง 449 ชั่วโมง โดยยังสามารถที่จะผลิตกรดแลกติกได้ความเข้มข้นในปริมาณสูงระหว่าง 61.97-79.32 กรัมต่อลิตร ขณะที่ค่าอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.72 กรัมต่อลิตรชั่วโมง และคิดเป็น $Y_{P/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 56.24 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้ว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นสูงนั้น จะสามารถที่จะช่วยในการพัฒนาการผลิตกรดแลกติกให้สูงขึ้นได้จริง

แต่อย่างไรก็ตามพบว่าปัญหาหลักของการใช้ความเข้มข้นกลูโคสสูงนั้น คือจะทำให้เกิดปัญหาการสะสมปริมาณกลูโคสภายในระบบให้สูงขึ้น และถ้าระบบใช้อัตราการเจือจางที่สูงขึ้นเท่าไร จะยิ่งเป็นการส่งเสริมการสะสมกลูโคสภายในระบบมากขึ้นเท่านั้น และจะทำให้เกิดการสูญเสียสมดุลภายในระบบ ถ้ามีการสะสมปริมาณกลูโคสภายในระบบมากเกิดไปจะส่งผลให้มีการยับยั้งการผลิตกรดแลกติกอีกด้วย ดังการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง โดยใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจาง 0.02 ต่อชั่วโมง ซึ่งจะพบว่าเกิดการสะสมของกลูโคสตั้งแต่ชั่วโมงแรกที่ทำกรเติมกลูโคสเข้าสู่ระบบ



รูปที่ 4.23 แสดงอัตราการผลิต และ Yield (%) ของกรดแลกติกในการผลิตแบบแบตช์ และแบบต่อเนื่อง ในแต่ละอัตราการเจือจาง ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ที่ 150 กรัมต่อลิตร

จากรูปที่ 4.23 แสดงให้เห็นว่าในภาวะที่ใช้กลูโคสเริ่มต้นในระยะเวลาสร้างผลิตภัณฑ์ 150 กรัมต่อลิตรนั้น เมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตในแต่ละอัตราการเจือจางนั้นพบว่า การผลิตแบบแบคทีเรียให้ค่าอัตราการผลิตสูงกว่าแบบต่อเนื่องอย่างเห็นได้ชัด ขณะที่เมื่อพิจารณาค่า $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) แล้วพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่อัตราการเจือจาง 0.0025 และ 0.01 ต่อชั่วโมง ทั้งนี้สาเหตุที่ค่าอัตราการผลิตกรดแลกติกในการผลิตแบบต่อเนื่องนั้นให้ผลต่ำกว่าในการผลิตแบบแบคทีเรีย เมื่อเราพิจารณาคุณสมบัติการคำนวณ คือ

$$P_{(cont.)} = D(\text{average of } C) \dots\dots\dots(1)$$

$P_{(cont.)}$ = ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ต่อชั่วโมง (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

D = อัตราการเจือจาง (ต่อชั่วโมง)

C = ความเข้มข้นกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)

เมื่อมีการใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในอาหารแบบต่อเนื่องสูง ที่ 150 กรัมต่อลิตร ซึ่งความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นนั้นจะแปรผกผันกับอัตราการเจือจาง ดังนั้นเมื่อใช้ความเข้มข้นสูง อัตราการเจือจางที่ใช้ในระบบจึงอยู่ในอัตราที่ต่ำเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดภาวะการสะสมกลูโคสภายในระบบมากเกินไป เพราะเนื่องจากจะส่งผลให้ไม่เกิดความคุ้มทุนแล้ว ยังมีผลในกรณีของ Glucose inhibition อีกด้วย เพราะฉะนั้นเมื่อกระบวนการการผลิตนั้นใช้อัตราการเจือจางที่ต่ำคือ อยู่ในช่วง 0.0025-0.02 ต่อชั่วโมง โดยเมื่อพิจารณาสมการที่ (1) จะเห็นว่า อัตราการเจือจางนั้นแปรผันตรงกับ อัตราการผลิตกรดแลกติก ดังนั้นเมื่อใช้อัตราการเจือจางที่ต่ำจึงทำให้อัตราการผลิตกรดแลกติกที่ได้นั้น แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาค่า $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) ในภาวะที่อัตราการเจือจางที่ 0.01 ต่อชั่วโมง นั้นกลับพบว่า $Y_{p/S}$ (เปอร์เซ็นต์) ในแบบแบคทีเรียและแบบต่อเนื่องใกล้เคียงกันมากอยู่ที่ 56.24 และ 55.46 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ความเข้มข้นของกรดแลกติกที่ได้แบบต่อเนื่องสามารถที่จะผลิตได้สูงกว่าแบบแบคทีเรีย คือ 72.20 (ค่าเฉลี่ย) และ 56.49 กรัมต่อลิตร และถึงแม้ว่าอัตราการผลิตกรดแลกติกแบบแบคทีเรียจะมากกว่าแบบต่อเนื่อง แต่เมื่อเราพิจารณาระยะเวลาการผลิตร่วมกับเนื้อสารของกรดแลกติกที่ผลิตได้นั้น พบว่าในการผลิตแบบแบคทีเรีนั้น เนื้อสารของกรดแลกติกที่ได้เมื่อเทียบระยะเวลา 449 ชั่วโมง เท่ากับ 1009.60 กรัม ขณะที่ในการผลิตแบบต่อเนื่อง เนื้อสารของกรด

แลกติกที่ผลิตได้เท่ากับ 1019.50 กรัม ซึ่งเป็นการสรุปได้ว่าเนื้อสารกรดแลกติกเมื่อเทียบในระยะเวลาการผลิตที่เท่ากันนั้นการผลิตแบบต่อเนื่องสามารถให้เนื้อสารกรดแลกติกได้มากกว่าแบบแบตช์ อีกทั้งการผลิตแบบต่อเนื่องยังช่วยลดระยะเวลา เนื่องจาก 1 รอบของการผลิตแบบต่อเนื่องเท่ากับ 4.7 แบตช์ (ดังรูป 4.24) ทำให้ช่วยลดขั้นตอนการเตรียมการในขั้น upstream processing แรงงาน และต้นทุนการผลิตอีกด้วย



รูปที่ 4.24 เปรียบเทียบระหว่างการผลิตแบบแบตช์ (ก.) และ แบบต่อเนื่องที่อัตราการเจริญ 0.01 ต่อชั่วโมง (ข.) ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ 150 กรัมต่อลิตร

นอกจากนี้ สมใจ ศิริโชค (2547) กล่าวว่าข้อจำกัดของการผลิตแบบแบตช์ คือ ปริมาณอาหารเริ่มต้นจำกัดทำให้ระบบเกิดภาวะการขาดแคลนสารอาหารต่างๆที่ด้วยสภาพเซลล์นั้น ยังมีแอกติวิตี้ที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ จากสมการ

$$C_t = C_0 e^{\mu t} \quad \dots\dots\dots(2)$$

C_0 = ความเข้มข้นของกรดแลกติกเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

C_t = ความเข้มข้นของกรดแลกติกหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา t ชั่วโมง

t = เวลา (ชั่วโมง)

μ = อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ (specific production rate) (ต่อชั่วโมง)

โดยจากสมการข้างต้นนั้นอาจดูเหมือนว่าเราสามารถที่จะสร้างผลิตภัณฑ์ได้อย่างต่อเนื่อง แต่ในความเป็นจริงแล้วการสร้างผลิตภัณฑ์นั้นถูกจำกัดด้วยสารอาหาร และการสะสมของไอออนต่างๆในระบบ ดังนั้นหลังจากที่เราสร้างผลิตภัณฑ์ไประยะหนึ่งแล้ว อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จะลดลง เนื่องจากข้อจำกัดดังกล่าว เพื่อสามารถยืดระยะเวลาในส่วนของ log phase ให้ยาวนานขึ้น โดยทำการเติมสารอาหารใหม่ลงไปจนเต็มภาชนะ แต่ถ้ามีการถ่ายอาหารเก่าออกจากภาชนะและเติมอาหารใหม่เข้าไปแทนที่ในปริมาณเท่าเดิมด้วยอัตราการไหลที่เหมาะสมอย่างต่อเนื่องจะทำให้เกิดภาวะคงที่ และทำให้เราสามารถที่จะผลิตกรดแลกติกได้อย่างต่อเนื่องจนกระทั่งเซลล์ในจะเสียดสภาพไป ตรงนี้จึงเป็นจุดที่เป็นข้อดีของการผลิตแบบต่อเนื่องนั่นเอง คือสามารถที่จะยืดระยะเวลาการผลิตให้ได้นานขึ้น ถึงแม้ว่าความสามารถทางการผลิตกรดแลกติกที่ได้อาจไม่ได้ดีในแง่ของค่าอัตราการผลิตเมื่อเทียบกับแบบแบตช์ แต่อย่างไรก็ตามการผลิตแบบต่อเนื่องที่ภาวะอัตราการเจือจางที่ 0.01 ต่อชั่วโมง นั้นสามารถเพิ่มความเข้มข้นในการผลิต และค่า Yield อีกทั้งเวลา พลังงานที่ใช้สามารถให้ผลผลิตที่แน่นอน คงที่ สม่าเสมอ และให้ผลผลิตต่อเนื่องตลอดเวลา และลดระยะเวลาในส่วน preculture ลงอีกด้วย

นอกจากนี้ได้ทำการศึกษาสูตรอาหารในการผลิตแบบต่อเนื่องโดยเลือกภาวะที่สามารถรักษาเสถียรภาพการผลิตกรดแลกติกได้ยาวนาน และสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูง คือ ที่ภาวะอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการเจือจางที่ 0.01 ต่อชั่วโมง และใช้ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์เท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร และทำการเติมแหล่งไนโตรเจน คือ ยูเรียลงไปในระบบทุกๆ 24 ชั่วโมงของการผลิตแบบต่อเนื่อง โดยพบว่าที่ความเข้มข้นยูเรีย 0.15 กรัมต่อลิตรนั้น สามารถผลิตกรดแลกติกได้เพียง 37.43-51.66 กรัมต่อลิตรเท่านั้น ขณะเดียวกันพบว่าการผลิตเอทานอลเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกรณีที่ไม่ทำการเติมแหล่งไนโตรเจนในการผลิตแบบต่อเนื่อง โดยอยู่ที่ความเข้มข้น 3.88-11.94 กรัมต่อลิตร และพบว่าเซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้น แต่ไม่มากนัก ขณะเดียวกันเมื่อทำการศึกษาการเติมยูเรียที่ 0.30 กรัมต่อลิตร ลงไปในระบบทุกๆ 24 ชั่วโมงของการผลิตอย่างต่อเนื่องนั้น พบว่าความเข้มข้นของกรดแลกติกที่ผลิตได้นั้นสูงในช่วงภาวะคงที่แรกเป็นเวลา 32 ชั่วโมง อยู่ที่ 65.47-68.79 กรัมต่อลิตร ขณะที่ความเข้มข้นกลูโคสภายในระบบอยู่ในปริมาณที่ต่ำมากเนื่องจากส่วนใหญ่ถูกชักนำให้ไปสร้างเซลล์ จึงส่งผลให้การผลิตกรดแลกติกลดลงอย่างต่อเนื่อง จนถึงใน

ภาวะคงที่ช่วงที่ 2 ความเข้มข้นกรดแลกติกเหลือเพียง 39.57-43.39 กรัมต่อลิตรเท่านั้น ขณะที่ปริมาณความเข้มข้นเอทานอลเพิ่มสูงขึ้นอยู่ที่ 8.71-13.33 กรัมต่อลิตร และจากรูปที่ 4.21 แสดงให้เห็นได้ชัดว่าเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นยูเรียเพิ่มสูงขึ้นจะแปรผันตรงการเจริญของเซลล์ และการเพิ่มขึ้นของการผลิตเอทานอล แต่ปริมาณความเข้มข้นของยูเรียที่ 0.15 และ 0.30 กรัมต่อลิตรนั้น ไม่มีความแตกต่างกันมากในกรณีของการผลิตกรดแลกติก แต่เมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่าแตกต่างกัน 1.74 เท่า โดยงานวิจัยของ Cao และคณะ (1996) รายงานว่าการจำกัดแหล่งไนโตรเจนจะส่งผลทำให้ *Rhizopus* เจริญได้น้อยซึ่งจะช่วยเพิ่มให้เพิ่มการสร้างผลิตภัณฑ์มากขึ้น นอกจากนี้ถ้าเซลล์มีความหนาแน่นสูงจะส่งผลต่อการถ่ายเทออกซิเจนและกระตุ้นการผลิตเอทานอลแทนการสร้างกรดแลกติกนั่นเอง

จากการศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตกรดแอล-แลกติกโดยเซลล์ตรึงของ *Rhizopus oryzae* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสถิต (static bed bioreactor) ในกระบวนการหมักแบบแบตช์และแบบต่อเนื่อง ตั้งแต่ในขั้นตอน การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้ กับเซลล์แขวนลอยในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวนในการหมักกรดแลกติกแบบแบตช์ พร้อมทั้งหาปัจจัยสำคัญที่เป็นตัวควบคุมการผลิตกรดแลกติกในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสถิต รวมถึงการทดสอบความสามารถในการเจริญและผลิตกรดแลกติกเมื่ออยู่ในภาวะเครียด ได้แก่ ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลูโคสสูง และทดสอบความเสถียรของเซลล์ตรึงในการหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง ได้สรุปผลการศึกษาทั้งหมดไว้ในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกในภาวะต่างๆ โดย *R. oryzae* ที่ศึกษาทั้งหมด

ภาวะที่ใช้ในการหมัก	กระบวนการผลิต	D (h ⁻¹)	สารตั้งต้น	C_{Li} (g/L)	Y (%)	P (g/L-h)	$C_{remaining\ glc.}$ (g/L)	ระยะเวลาในการเลี้ยง
แบบแขวงลอยในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน	แบบแบคซ์	-	กลูโคส 70 กรัมต่อลิตร	34.10	54.85	1.16	0.00	120 ชั่วโมง
แบบตรึงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติก								
300 รอบต่อนาที, 0.5 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที	แบบแบคซ์	-	กลูโคส 70 กรัมต่อลิตร	38.34	67.40	1.02	0.00	96 ชั่วโมง
300 รอบต่อนาที, 1.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที	แบบแบคซ์	-	กลูโคส 70 กรัมต่อลิตร	32.28	58.14	1.12	0.00	96 ชั่วโมง
500 รอบต่อนาที, 0.5 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที	แบบแบคซ์	-	กลูโคส 70 กรัมต่อลิตร	40.78	62.75	1.03	0.00	96 ชั่วโมง
500 รอบต่อนาที, 1.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที	แบบแบคซ์	-	กลูโคส 70 กรัมต่อลิตร	39.77	62.29	1.35	0.00	96 ชั่วโมง
700 รอบต่อนาที, 0.5 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที	แบบแบคซ์	-	กลูโคส 70 กรัมต่อลิตร	35.88	65.52	2.25	0.00	96 ชั่วโมง
700รอบต่อนาที, 1.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที	แบบแบคซ์	-	กลูโคส 70 กรัมต่อลิตร	40.66	60.25	1.55	0.00	96 ชั่วโมง
700รอบต่อนาที, 0.5 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที	แบบแบคซ์	-	กลูโคส 100 กรัมต่อลิตร	48.86	75.00	2.04	0.00	96 ชั่วโมง
	แบบแบคซ์	-	กลูโคส 150 กรัมต่อลิตร	75.27	58.05	1.67	0.00	120 ชั่วโมง
	แบบแบคซ์	-	กลูโคส 200 กรัมต่อลิตร	80.76	62.07	1.74	35.13	120 ชั่วโมง
	แบบต่อเนื่อง	0.02	กลูโคส 70 กรัมต่อลิตร	41.60	28.09	0.83	-	352 ชั่วโมง
	แบบต่อเนื่อง	0.14	กลูโคส 70 กรัมต่อลิตร	15.95	16.83	2.23	-	126 ชั่วโมง
	แบบต่อเนื่อง	0.0025	กลูโคส 150 กรัมต่อลิตร	80.69	54.09	0.60	-	192 ชั่วโมง
	แบบต่อเนื่อง	0.01	กลูโคส 150 กรัมต่อลิตร	72.20	56.24	0.72	-	449 ชั่วโมง
	แบบต่อเนื่อง	0.015	กลูโคส 150 กรัมต่อลิตร	48.49	36.77	0.73	-	265 ชั่วโมง
	แบบต่อเนื่อง	0.02	กลูโคส 150 กรัมต่อลิตร	49.34	42.88	0.98	-	218 ชั่วโมง
	แบบต่อเนื่อง	0.01	กลูโคส 150 กรัมต่อลิตร	43.25	31.10	0.43	-	384 ชั่วโมง
			ซูเรีย 0.15 กรัมต่อลิตร*					
	แบบต่อเนื่อง	0.01	กลูโคส 150 กรัมต่อลิตร	66.83	49.56	0.67	-	384 ชั่วโมง
			ซูเรีย 0.30 กรัมต่อลิตร*	41.07	30.35	0.41	-	

จากตารางที่ 4.7 เมื่อเทียบกับในงานวิจัยของ Sun และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดแลกติก แบบต่อเนื่อง ชนิด Pseudo-Steady state โดยการตรึงเซลล์ *R. oryzae* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Air-lift โดยพบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 40-60 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติก อยู่ระหว่าง 1.0-6.2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยทำการแปรอัตราการเจือจางในช่วง 0.04-0.2 ต่อชั่วโมง โดยระยะเวลาในการผลิตทั้งหมด 100 ชั่วโมง ขณะที่การผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง ชนิด Completed-Steady state โดยการตรึงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติก สามารถที่จะผลิตกรดแลกติกได้ความเข้มข้นเฉลี่ยสูงกว่าอยู่ที่ 72.20 กรัมต่อลิตร ถึงแม้ว่าค่าอัตราการการผลิตกรดแลกติกที่ได้นั้นจะน้อยกว่าอยู่ที่ 0.72 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากค่าอัตราการการผลิตกรดแลกติกแปรผันตรงกับค่าอัตราการเจือจาง โดยใช้อยู่ที่ 0.01 ต่อชั่วโมง ซึ่งแตกต่างกับงานวิจัยของ Sun และคณะ ถึง 4-20 เท่า ดังนั้นจึงทำให้ค่าอัตราการการผลิตกรดแลกติกที่ได้นั้นไม่สูงนัก นอกจากนี้ยังพบว่าการตรึงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติกสามารถรักษาเสถียรภาพการผลิตแบบต่อเนื่องได้ยาวนานกว่า 499 ชั่วโมง ขณะที่ในงานวิจัยของ Cotton และคณะ (2001) ได้ทำการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่องจาก *Lactobacillus casei* โดยการใช้ Plastic Composite Support (PCS) ซึ่งพบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 22.36 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติก 9.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็น $Y_{P/S}$ (เปอร์เซ็นต์) เท่ากับ 70.00 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้อัตราการให้อากาศ 125 รอบต่อนาที อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.4 ต่อชั่วโมง

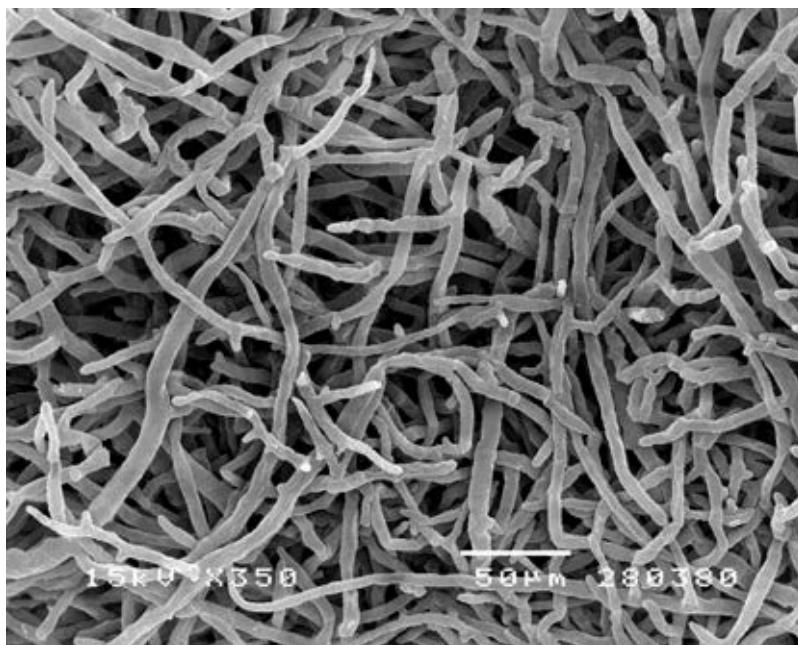
ตารางที่ 4.7 เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกในแต่ละภาวะ

จุลินทรีย์	ภาวะที่ใช้ในการหมัก	กระบวนการผลิต	<i>D</i> (h ⁻¹)	สารตั้งต้น	<i>C</i> (g/L)	<i>Y</i> (%)	<i>P</i> (g/L·h)	อ้างอิง
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> QU 41	แบบแบตช์	ถังกวน	-	กลูโคส	87.40	-	0.52	Tashiro และคณะ, 2011
	แบบต่อเนื่อง	ถังกวน	0.87	กลูโคส	20.70	103.0	18.0	Tashiro และคณะ, 2012
<i>L. plantarum</i> $\Delta IdhL1/pCUS\alpha A$	แบบแบตช์	ถังกวน	-	กลูโคส	73.20	89.0	4.54	Okano และคณะ, 2009a
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	แบบต่อเนื่อง	plastic composite support bilfilm reactor	0.40	กลูโคส	22.36	70.7	8.85	Cotton และคณะ, 2001
<i>R. oryzae</i> NRRL 395	Repeated batches และ fed-batches	Cotton cloth in a rotating bed	-	กลูโคส	126.00	90.0	2.50	Tay และ Yang, 2002
<i>R. oryzae</i>	แบบแบตช์	Immobilized Cells in fluidized bed	-	กลูโคส	73.00	65.0	1.60	Hamamci และ Ryu, 1994
<i>R. oryzae</i> NRRL 395	Repeated batches	Biofilm on honeycomb support in bubble column	-	กลูโคส 80 กรัมต่อลิตร	68.80	80.0-93.4	0.72	Wang และคณะ, 201
<i>R. oryzae</i>	แบบต่อเนื่อง	Immobilized Cells in polyurethane foam cubes	0.04-0.20	กลูโคส 102 กรัมต่อลิตร	40-60	60.0	1.0-6.2	Sun และคณะ, 1999
<i>R. oryzae</i> NRRL 395	แบบแบตช์	Cotton cloth in a static bed	-	กลูโคส 70 กรัมต่อลิตร	35.88	65.52	2.25	งานวิจัยนี้
	แบบแบตช์	Cotton cloth in a static bed	-	กลูโคส 150 กรัมต่อลิตร	75.27	58.05	1.67	งานวิจัยนี้
	แบบต่อเนื่อง	Cotton cloth in a static bed	0.01	กลูโคส 150 กรัมต่อลิตร	72.20	56.24	0.72	งานวิจัยนี้

4.3 วิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวและโครงสร้างของ *R. oryzae* ที่ตรึงบนเส้นใยในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติก

4.3.1 วิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวและโครงสร้างของ *R. oryzae* ในการผลิตแบบเบดซ์

จากการผลิตกรดแลกติกด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติก หลังเสร็จสิ้นการผลิตจะทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร เพื่อนำมาวิเคราะห์โครงสร้างของเซลล์ด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) พบว่าเส้นใยของ *R. oryzae* ที่เจริญบนผ้าฝ้ายชนิดถัก (ผ้าขนหนู) ในการผลิตกรดแลกติก แบบเบดซ์ โดยคัดเลือกนำเอาภาวะที่ให้ผลการผลิตกรดแลกติกดีที่สุดไปทำการวิเคราะห์ คือภาวะที่ใช้อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ที่กำลังขยาย 350 เท่า (รูปที่ 4.25) พบว่าปริมาณเซลล์ค่อนข้างหนาแน่น และมีการเจริญเติบโตดี โดยเซลล์มีลักษณะขนาดที่ค่อนข้างอวบและยาว ขณะเดียวกันเมื่อพิจารณาจะพบว่าเซลล์จะมีการแตกกิ่งเล็กๆ (fragment) ในหลายๆบริเวณในหนึ่งสาย ซึ่งในงานวิจัยของนวกอร์ (2551) รายงานว่า เมื่อเพิ่มอัตราการกวน ในอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมนั้น ส่งผลให้เกิดการแตกกิ่งเล็กๆของเส้นใย และส่งผลต่อการผลิตกรดแลกติกให้เพิ่มสูงขึ้น และค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนสูงตามเพื่อแสดงถึงการถ่ายเทอาหารและอากาศที่เพียงพอ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลอง พบว่าค่าอัตราการผลิตกรดแลกติก และค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนนั้นสูงที่สุดใน 6 ภาวะในการผลิตกรดแลกติกแบบเบดซ์ เท่ากับ 2.25 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.088 ต่อวินาที แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาในส่วนปลายของเส้นใยพบว่า มีลักษณะที่ลีบ และแห้ง ไม่อวบเหมือนช่วงกลางเส้นใย ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากระยะเวลาต่างๆ ของการผลิตนั้นเริ่มเกิดภาวะขาดสารอาหาร เนื่องจากพบว่าปริมาณความเข้มข้นกลูโคสหมดลงหลังจากชั่วโมงที่ 72 ของการผลิต



รูปที่ 4.25 ลักษณะการยึดเกาะของ *R. oryzae* ในการผลิตกรดแลกติกแบบแบตช์ โดยการตรึงเซลล์บนเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดที่กำลังขยาย 350 เท่า ในภาวะอัตราการกวน 700 รอบต่อนาที และอัตราการใช้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที

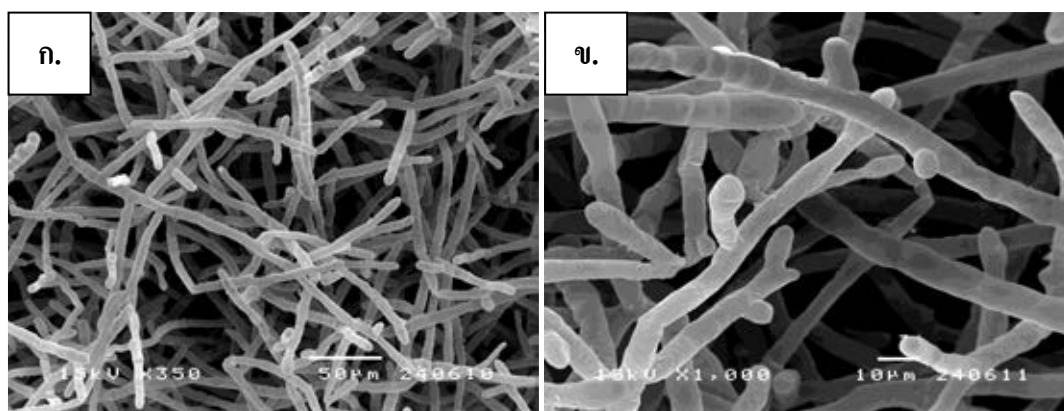
4.3.2 วิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวและโครงสร้างของ *R. oryzae* ในการผลิตแบบต่อเนื่อง

จากการผลิตกรดแลกติกด้วยเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด หลังเสร็จสิ้นการผลิตจะทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร เพื่อนำมาวิเคราะห์โครงสร้างของเซลล์ด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) พบว่าเส้นใยของ *R. oryzae* ที่เจริญบนผ้าฝ้ายชนิดถัก (ผ้าขนหนู) ในการผลิตกรดแลกติก แบบต่อเนื่อง ภาวะที่ใช้อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที อัตราการเจือจางที่ 0.02 ต่อชั่วโมง โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร ที่กำลังขยาย 350 เท่า (รูปที่ 4.26 ก.) พบว่าปริมาณเซลล์หนาแน่น และมีการเจริญเติบโตดี นอกจากนี้ยังมีการแตกกิ่งเล็กๆ (fragment) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าภาวะภายในระบบเหมาะสมซึ่งกระตุ้นให้เซลล์มีการเจริญเติบโต และเมื่อพิจารณาที่กำลังขยาย 1000 เท่า (รูปที่ 4.26 ข.) โดยเส้นใยมีลักษณะอวบ และมีขนาดเส้นใยที่ใหญ่ ขณะเดียวกันเมื่อพิจารณาจะพบว่าเซลล์จะมีการแตกกิ่งเล็กๆ (fragment) ซึ่งแสดงถึงภาวะในการเลี้ยงเหมาะสม ส่งผลให้เกิดการแตกกิ่งเล็กๆของเส้นใย และส่งผลต่อการผลิตกรดแลกติกให้เพิ่มสูงขึ้น และเมื่อพิจารณาส่วนของปลายเส้นใยนั้นพบว่า ยังมีลักษณะอวบ เป็นการชี้ให้เห็นว่า เมื่อภายในระบบมีการเติมกลูโคสอย่างต่อเนื่องส่งผลทำให้เซลล์ไม่อยู่ในภาวะขาดแคลนสารอาหาร ทำให้บริเวณปลายเส้นใยจะมีลักษณะอวบขนาดใหญ่ ซึ่งแตกต่างจากการผลิตแบบแบตช์ซึ่งอยู่ในภาวะขาดแคลนสารอาหารได้อย่างชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาบริเวณเซลล์ด้านนอกของ baffle ที่กำลังขยาย 350 เท่า (รูปที่ 4.27 ก.) ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นถึงลักษณะการเกาะและการเจริญของเซลล์บนผ้าฝ้ายชนิดถัก (ผ้าขนหนู) และเมื่อพิจารณาที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (รูปที่ 4.27 ข.) พบว่าเส้นใยมีลักษณะลีบเล็กและเหี่ยว ซึ่งแตกต่างจากเส้นใยที่อยู่บริเวณด้านใน baffle ที่มีลักษณะอวบและมีขนาดใหญ่กว่า สาเหตุส่วนหนึ่งมาจากบริเวณด้านนอก baffle นั้น เมื่อเซลล์ที่ถูกตรึงบนผ้าฝ้ายเติบโตก็จะมี การขยายและแผ่เส้นใย ทำให้เส้นใยมีความหนาแน่นขึ้นทั้งด้านนอก และด้านใน baffle ซึ่งบริเวณด้านนอกจะมีช่องว่าง (space) ที่แคบกว่าด้านในทำให้เส้นใยที่ขยายตัวถูกบีบติดกับโถแก้วมากขึ้น อีกทั้งเซลล์ที่เจริญบริเวณขอบ baffle ด้านนอก มีการเจริญและขยายตัว ซึ่งจะเป็นตัวจำกัดการถ่ายเทของอากาศและอาหารที่จะแทรกผ่านเข้าไปหล่อเลี้ยงเซลล์ด้านนอก baffle อีกทั้งการที่เซลล์ 2 ฝั่งมีการขยายตัวหนาแน่นนั้นจะส่งผลทำให้เซลล์บริเวณด้านนอก baffle ได้รับการแพร่ผ่านของอากาศและอาหารผ่านความหนาของเซลล์ชั้นในมาสู่เซลล์ชั้นนอกค่อนข้างยากเมื่อเทียบกับเซลล์ด้านใน baffle

ดังนั้นจึงส่งผลให้เส้นใยบริเวณด้านนอก baffle มีลักษณะสลิบลึกมากแตกต่างจากเส้นใยบริเวณด้านใน baffle ที่มีภาวะและการถ่ายเทอากาศ และอาหารที่เหมาะสมกว่านั่นเอง

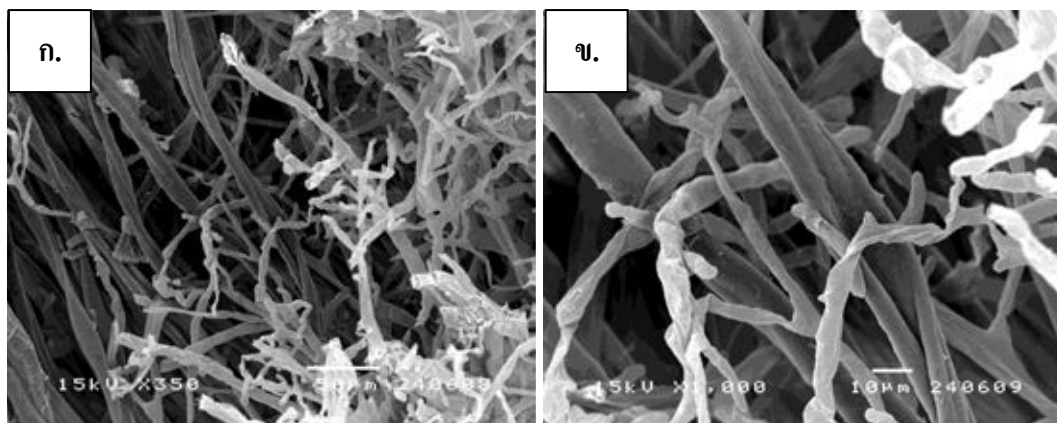
ในการผลิตกรดแลกติก แบบต่อเนื่อง ภาวะที่ใช้อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาณอาหารต่อนาที อัตราการเจือจางที่ 0.01 ต่อชั่วโมง โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ที่กำลังขยาย 350 เท่า และ 1000 เท่า (รูปที่ 4.28) พบว่าลักษณะของเส้นใยค่อนข้างสมบูรณ์มีขนาดอวบ เป็นป่องๆ เมื่อเทียบการกับการผลิตแบบแบตช์ที่ กำลังขยาย 350 เท่า ในรูป 4.25 พบว่าเซลล์มีขนาดสมบูรณ์มากกว่า แต่มีการแตกกิ่งของเส้นใยไม่มากนัก และส่วนที่มีการแตกกิ่งนั้นก็มีการเจริญเติบโตมากขึ้น เพราะมีขนาดของเส้นใยที่ยาวกว่า

สำหรับในการผลิตกรดแลกติก แบบต่อเนื่อง ภาวะที่ใช้อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาณอาหารต่อนาที อัตราการเจือจางที่ 0.01 ต่อชั่วโมง ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร และทำการเติมยูเรียความเข้มข้น 0.30 กรัมต่อลิตร ทุกๆ 24 ชั่วโมง เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมักแล้ว ทำการแยกเซลล์ออกจาก baffle และทำการตัดเซลล์ขนาด 0.5x0.5 เซนติเมตร โดยตัด 2 ชั้น ชั้น 1) ส่วนของ young cell layer 2) ส่วนของ old cell layer เพื่อนำมาวิเคราะห์โครงสร้างของเซลล์ด้วยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) ในส่วนของ young cell layer ในรูปที่ 4.29 (ก) ที่กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าเส้นใยมีลักษณะอวบ อ้วนขนาดใหญ่ อีกทั้งมีการเริ่มแตกกิ่งเป็นปุ่มเล็กๆ ซึ่งแตกต่างจากส่วนของ old cell layer ในรูปที่ 4.29 (ข) จะเห็นได้ว่าเส้นใยจะเหี่ยว และสลิบลึก ซึ่งจะแตกต่างกับเส้นใยที่เจริญใหญ่ในส่วนของ young cell layer จึงกล่าวได้ว่า ในชั้นของ old cell layer นั้น เซลล์ส่วนใหญ่อยู่ในภาวะที่หมดประสิทธิภาพ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อเซลล์ใหม่เจริญเกิดขึ้นจะทำให้ความหนาแน่นเซลล์มากขึ้น และเซลล์ใหม่จะกดทับเซลล์ในชั้น old cell ดังนั้นจึงส่งผลต่อการถ่ายเทอากาศ และสารอาหารเข้าสู่เซลล์ชั้นใน เมื่อเซลล์ขาดแคลนอากาศ และสารอาหารจึงทำให้เส้นใยมีลักษณะรูปทรงที่สลิบลึก และแกร่น อีกทั้งไม่พบการแตกกิ่งก้านได้



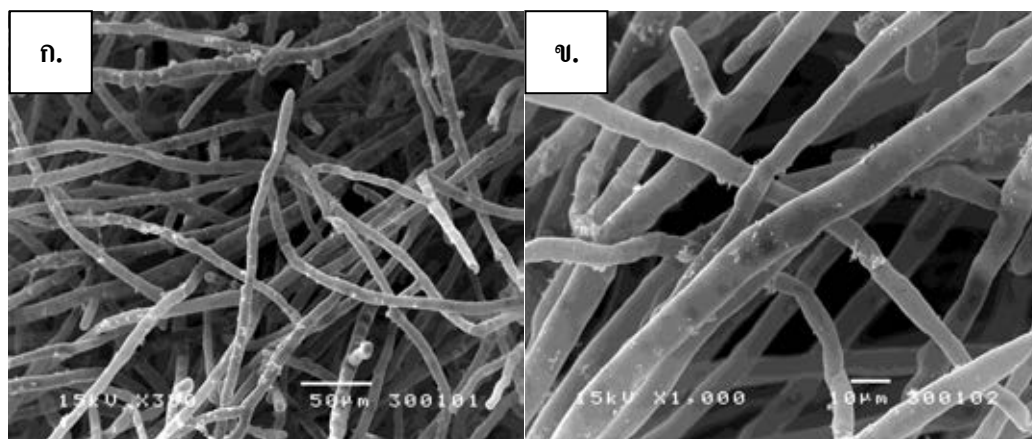
รูปที่ 4.26 ลักษณะการยึดเกาะของ *R. oryzae* ในการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง บริเวณด้านในของbaffle ที่กำลังขยาย 350 เท่า (ก.) และ 1000 เท่า (ข.) ในภาวะอัตราการกวน 700 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ที่อัตราการเจือจาง 0.02 ต่อชั่วโมง โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร

หมายเหตุ บริเวณด้านใน: ส่วนของเซลล์ด้านในของbaffleส่วนที่ติดกับใบพัด



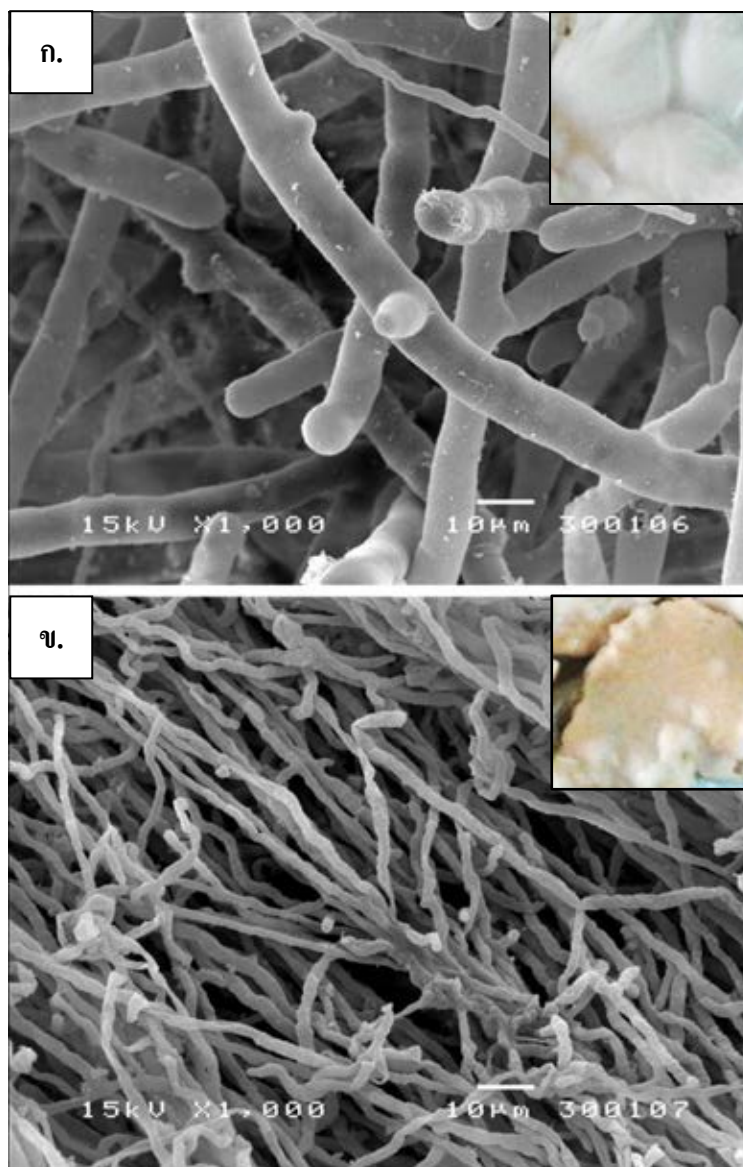
รูปที่ 4.27 ลักษณะการยึดเกาะของ *R. oryzae* ในการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง บริเวณด้านนอกของbaffle ที่กำลังขยาย 350 เท่า (ก.) และ 1000 เท่า (ข.) ในภาวะอัตราการกวน 700 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ที่อัตราการเจือจาง 0.02 ต่อชั่วโมง โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร

หมายเหตุ บริเวณด้านนอก: ส่วนของเซลล์บริเวณด้านที่ติดกับโถแก้ว



รูปที่ 4.28 ลักษณะการยึดเกาะของ *R. oryzae* ในการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง บริเวณด้านในของbaffle ที่กำลังขยาย 350 เท่า (ก.) และ 1000 เท่า (ข.) ในภาวะอัตราการกวน 700 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ที่อัตราการเจือจาง 0.01 ต่อชั่วโมง โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร

หมายเหตุ บริเวณด้านใน: ส่วนของเซลล์ด้านในของbaffle ส่วนที่ติดกับใบพัด



รูปที่ 4.29 ลักษณะการยึดเกาะของ *R. oryzae* ในการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง บริเวณด้านในของbaffle ที่กำลังขยาย 1000 เท่า ชั้นเซลล์เจริญเติบโตใหม่ (young cell layer) (ก.) และ ชั้นเซลล์แก่ (old cell layer) (ข.) ในภาวะอัตราการกวน 700 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ที่อัตราการเงื้องาง 0.01 ต่อชั่วโมง โดยความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร และทำการเติมยูเรีย ความเข้มข้น 0.30 กรัมต่อลิตร ทุกๆ 24 ชั่วโมงของการผลิตแบบต่อเนื่อง

หมายเหตุ บริเวณด้านใน: ส่วนของเซลล์ด้านในของbaffle ส่วนที่ติดกับไบฟัด

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยนี้ พัฒนาเทคนิคและภาวะในการผลิตกรดแลกติก โดยมุ่งเน้นให้เป็นการผลิตที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ทั้งในกรณีของการเพิ่มผลผลิตที่สร้างขึ้น และการรักษาเสถียรภาพของเซลล์ที่ถูกตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติด ซึ่งพบว่า เราสามารถที่จะพัฒนาการเพิ่มผลการผลิตกรดแลกติก และ ประสบความสำเร็จในการรักษาเสถียรภาพของเซลล์ในการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง โดย *R. oryzae* ที่ถูกตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติด ซึ่งนับว่าเป็นการลดต้นทุนการผลิต ในแง่ของ อาหารเลี้ยงเชื้อ พลังงาน ลดแรงงาน อีกทั้ง ยังลดระยะเวลาในช่วง upstream processing และ ระยะเจริญเติบโต อีกด้วย

การหมักกรดแลกติกแบบแบตช์ (Batch Process) ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

จากการเปรียบเทียบการหมักกรดแลกติกแบบแขวนลอยในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถึงกวนกับการหมักกรดแลกติกแบบตรึงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดนั้น พบว่าการตรึงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดมีความเหมาะสมในการเจริญเติบโตของ *R. oryzae* มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลกติก และการถ่ายเทออกซิเจน ได้ดี เมื่อเทียบกับการหมักแบบแขวนลอยในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถึงกวน แต่อย่างไรก็ตามพบว่า ประสิทธิภาพของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดนี้จะขึ้นอยู่กับ อัตราการกวน และอัตราการให้อากาศ โดยภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการหมักกรดแลกติกแบบแบตช์โดยการตรึงเซลล์นั้น อยู่ที่อัตราการให้อากาศที่ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที และอัตราการกวนที่ 700 รอบต่อนาที และนอกจากนี้ งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาปริมาณกลูโคสต่อการผลิตกรดแลกติก โดยพบว่าปริมาณกลูโคสที่เพิ่มขึ้นแปรผันตรงต่อการสร้างกรดแลกติก แต่ถ้ามากเกินไปจะส่งผลต่อการยับยั้งการสร้างผลิตภัณฑ์ โดยระดับความเข้มข้นกลูโคสในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมต่อการพัฒนาการผลิตกรดแลกติก และก่อให้เกิดความคุ้มทุนอยู่ที่ความเข้มข้นกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร

การหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง (continuous process) ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร

จากการเปรียบเทียบการหมักกรดแลกติกโดยการตรึงเซลล์ในเครื่องปฏิกรณ์ชนิดเบดสติดแบบต่อเนื่อง โดยการแปรปัจจัย คือ สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง และอัตราการเจือจางที่แตกต่างกัน พบว่า การเพิ่มปริมาณกลูโคสเริ่มต้นเป็น 150 กรัมต่อลิตรนั้น โดยไม่ทำการเติมไนโตรเจน สามารถที่จะเพิ่มปริมาณการผลิตกรดแลกติกให้เพิ่มขึ้นได้ นอกจากนี้ยังช่วยลดแรงงานในการเปลี่ยนถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อ ขณะที่การเติมกลูโคสร่วมกับแหล่งไนโตรเจน (ยูเรีย) จะเป็นการกระตุ้นให้มีการเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มขึ้นมากกว่าการผลิตกรดแลกติก โดยอัตราการเจือจางที่เหมาะสมอยู่ที่ 0.01 ต่อชั่วโมง ซึ่งเป็นอัตราการเจือจางที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด อีกทั้งยังสามารถรักษาเสถียรภาพของเซลล์ และการผลิตกรดแลกติกได้ในระยะเวลายาวนานที่สุดที่ 449 ชั่วโมง หรือ ประมาณ 19 วัน ซึ่งยาวนานที่สุดเมื่อเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ ในการหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้ *R. oryzae* นั้นแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของเสถียรภาพของเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติด

ข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลองในการหมักกรดแลกติกแบบเบดสติดในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติด เราพบว่า การหมักโดยใช้กลูโคสเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตรนั้น ถึงแม้จะให้อัตราการผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณสูง แต่ค่าความเข้มข้นกรดแลกติกที่ได้นั้นไม่สูงมากนัก อยู่ที่ 35.88 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับการใช้กลูโคสเริ่มต้นที่ 150 กรัมต่อลิตร ที่ถึงแม้ว่าอัตราการผลิตกรดแลกติกที่ได้จะอยู่ในระดับต่ำกว่า แต่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ความเข้มข้นกลูโคสได้มากกว่า ซึ่งจะเป็นผลดีในขั้นตอน downstream processing เพราะจะมีความคุ้มทุนมากกว่า เนื่องจากในขั้นตอนนี้ไม่ว่าจะเป็นส่วนของการแยก หรือ การทำให้บริสุทธิ์นั้น ถ้าความเข้มข้นกรดแลกติกเจือจางมาก ซึ่งจะเกิดการไม่คุ้มทุนเกิดขึ้น ในแง่ของงบประมาณ และระยะเวลาที่ใช้
2. จากการทดลองในการหมักกรดแลกติกแบบต่อเนื่องในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดนั้น พบว่าปัญหาที่พบคือ การพัฒนาค่าอัตราการผลิตกรดแลกติกที่ได้ยังมีค่าน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการหมักแบบเบดสติด และนอกจากนี้ยังพบว่าหลังสิ้นสุดการหมักแบบต่อเนื่องนั้น จะพบ

การสะสมของกลูโคสในปริมาณสูง ซึ่งถ้าถูกปล่อยสู่สิ่งแวดล้อมจะก่อให้เกิดปัญหาน้ำเสีย และต้อง
เพิ่มต้นทุนในการบำบัด น้ำเสียเหล่านี้ ดังนั้นในงานวิจัยถัดไป อาจต้องมีการศึกษาสูตรอาหาร
แบบต่อเนื่องเพิ่มเติม เพื่อหาปริมาณกลูโคส หรือ ยูเรีย ที่ ให้มีสัดส่วนที่เหมาะสม โดยที่สามารถ
พัฒนาการผลิตกรดแลกติกในแง่ของค่าอัตราการการผลิตกรดแลกติก อีกทั้งสามารถควบคุมปริมาณ
กลูโคสในระบบไม่ให้มีการสะสมมากเกินไป ซึ่งอาจแก้ไขได้โดย มีการปรับอัตราการเจือจางใน
ระหว่างการผลิตเมื่อพบว่าเริ่มมีการสะสมกลูโคส หรือ หาระยะเวลาและความเข้มข้นที่เหมาะสม
ของยูเรียในการเติมลงสู่ระบบ

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

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

แคลเลีย ตาลวงษ์. การผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจากยีสต์ *Hansenula polymorpha* โดยใช้กลีเซอรอลจากกระบวนการผลิตไบโอดีเซลเป็นแหล่งคาร์บอน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2550.

นวกกร โชติสุขอนันต์. การผลิตกรดแลกติกโดยวิธีตรึงเซลล์จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ในถังหมักชนิดเบดสติก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2551.

สมใจ ศิริ โภค. จุลชีววิทยอุตสาหกรรม. สถานที่พิมพ์: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ, 2547.

สมใจ ศิริ โภค. เทคโนโลยีการหมัก. สถานที่พิมพ์: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ, 2537.

ภาษาอังกฤษ

Bai, D.M., and others. L(+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* R1021 in a stirred tank fermentor. *Chemical Engineering Science*, 58 (2003) : 758-791.

Bulut, S., Elibol, M. and Ozer, D. Effect of different carbon sources on L(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*, 21 (2004) : 33-37.

Borgia, P. T., Lartchouk, M., Riggle, P. J., Koltin, Y. and Bulawa, C.E. The *chsB* gene of *Aspergillus nidulans* is necessary for normal hyphal growth and development. *Fungal Genetics and Biology*, 21 (1996) : 193-203.

- Cao, N., Du, J., Gong, S. and Tsao, G. T. Simultaneous production and recovery of fumaric acid from immobilized *Rhizopus oryzae* with a rotary biofilm contactor and an adsorption column. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (1996) : 2926-2931.
- Chotisubha-anandha, N., Thitiprasert, S., Tolieng, V. and Thongchul, N. Improved oxygen transfer and increased L-lactic acid production by morphology control of *Rhizopus oryzae* in a static bed bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 63 (2011) : 163-172.
- Cotton, J. C., Pometto III, A. L. and Gvozdenovic-Jeremic, J. Continuous lactic acid fermentation using a plastic composite support biofilm reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57 (2001) : 626-630.
- Cruz, A.J.G., Almeida, R.M.R.G., Araujo, M.L.G.C., Giordano, R.C. and Hokka, C.O. The dead core model applied to beads with immobilized cells in a fed-batch cephalosporin C production bioprocess. *Chemical Engineering Science*, 56 (2001) : 419-425.
- Cui, Y.Q., van der Lans, R.G.J.M. and Luyben, K.Ch.A.M. Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 57 (1998) : 409-419.
- Ding, S. and Tan, Tianwei. L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. *Process Biochemistry*, 41 (2006) : 1451-1451.
- Dong, X. Y., Bai, S. and Sun. Y. Production of L(+)-lactic acid with *Rhizopus oryzae* immobilized in polyurethane foam cubes. *Biotechnology Letters*, 18 (1996) : 225-228.
- Du, J., Cao, N., Gone, C. S. and Tsao, G. T. Production of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae* in a bubble column fermenter. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 70-72 (1998) : 323-329.

- Ellis, D.H. Zygomycetes. *Microbiology and Microbial Infections*, 9 (1997) : 247-277.
- Hang, Y.D. Direct fermentation of corn to L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. *Biotechnology Letters*, 11 (1989) : 299-300.
- Hang, Y.D., Hamamci, H. and Woodams, E.E. Production of L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae* immobilized in calcium alginate gels. *Biotechnology Letters*, 11 (1989) : 119-120.
- Hellendoorn, L., Mulder, H., van den Heuvel, J.C. and Ottengraf, S.P.P. Intrinsic kinetic parameters of the pellet forming fungus *Aspergillus awamori*. *Biotechnology and Bioengineering*, 58 (1998) : 478-485.
- Ho, W. *Kinetics of L(+)-lactic acid production from glucose, xylose, and starch by free cells and immobilized cells of Rhizopus oryzae*. Master's Thesis, The Ohio State University, Columbus, Ohio, 1996.
- Hofvendahl, K. and Hahn-Hagerdal, B. Factor affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, 26 (2000) : 87-107
- Hujanen, M., Linko S., Linko, Y.Y. and Leisola, M. Optimisation of media and cultivation conditions for L(+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56 (2001) : 126-130.
- Ganguly, R., Dwivedi, P. and Singh, R. P. Production of lactic acid with loofa sponge immobilized *Rhizopus oryzae* RBU2-10. *Bioresource Technology*, 98 (2007) : 1246-1251.
- Kantarci, N., Borak, F. and Ulgen, K. O. Bubble column reactors. *Process Biochemistry*, 40 (2005) : 2263-2283.
- Kobayashi, T., Van Dedem, G. and Moo-Young, M. Oxygen transfer into mycelial pellets. *Biotechnology and Bioengineering*, 96 (1973) : 27-45.

- Kosakai, Y., Park, Y. S. and Okabe, M. Enhancement of L(+)-lactic acid production using mycelia flocs of *Rhizopus oryzae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 55 (1997) : 461-470.
- Lin, J., Zhou, M., Zhao, X., Luo, S. and Lu, Y. Extractive fermentation of L-lactic acid with immobilized *Rhizopus oryzae* in a three-phase fluidized bed. *Chemical Engineering and Processing*, 46 (2007) : 369-374.
- Liu, Y., Wen, Z., Liao, W., Liu, C. and Chen, S. Optimization of process for production of L(+)-lactic acid from cull potato by *Rhizopus oryzae*. *Engineering and Life science*, 5 (2005) : 343-349.
- Liu, Y., Liao, W., Liu, C. and Chen, S. Optimization of L(+)-lactic acid production using palletized filamentous *Rhizopus oryzae* NRRL 395. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 126 (2006) : 129-132.
- Longacre, A., Jacqueline, M. R. and James, E. G. Flux analysis of glucose metabolism in *Rhizopus oryzae* for the purpose of increasing lactate yields. *Fungal Genetics and Biology*. 21 (1997) : 30-39
- Martak, J., Schlosser, S., Sabolova, E., Kristofi, L. and Rosenberg, M. Fermentation of lactic acid with *Rhizopus arrhizus* in a stirred tank reactor with a periodical bleed and feed operation. *Process Biochemistry*, 38 (2003) : 1573-1583.
- Miura, S., Arimura, T., Hoshino, M., Kojima, M., Dwiarti, L. and Okabe, M. 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 (2003) : 65-69.

- Michelson, T., Kask, K., Jogi, E., Talpsep, E., Suitso, I. and Nurk, A. L(+)-Lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 and its comparison with *Lactobacillus delbrueckii* spp. *Lactis* DSM 20073. *Enzyme and Microbial Technology*, 39 (2006) : 861-867
- Mirdamadi, S., Sadeghi, H., Sharafi, M., Fallahpour, M., Mohseni F.A. and Bakhtiari, M.R. Comparison of lactic acid isomers produced by fungal and bacterial strains. *Iranian Biomedical Journal*. 2 (2002) : 69-75.
- Miura, S., Arimura, T., Hoshino, M., Kojima, M., Dwiarti, L. and Okabe, M. 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 (2003) : 65-69.
- Narayanan, N., Roychoudhury, P. K. and Srivastava, A. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7 (2004) : 167-197.
- Oda, Y., Saito, K., Yamauchi, H. and Mori, M. Lactic acid fermentation of potato pulp by the fungus *Rhizopus oryzae*. *Current Microbiology*, 45 (2002) : 1-4
- Okabe, M., Ohta, N. and Park, Y. S. Itaconic acid production in an air-lift bioreactor using a modified draft tube. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76 (1993) : 117-122.
- Okano, K., Zhang, Q., Shinkawa, S., Yoshida, S., Tanaka, T., Fukuda, H. and Kondo, A. Efficient production of optically pure d-lactic acid from row corn starch by using a genetically modified l-lactate dehydrogenase gene-deficient and α -amylase-secreting *Lactobacillus plantarum* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (2009) : 262-267.
- Oostra, J., le Comte, E.P., van den Heuvel, J.C., Tramper, J. and Rinzema, A. Intra-particle oxygen diffusion limitation in solid-state fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 75 (2001) : 13-24.

- Park, E.Y., Kosakai, Y. and Okabe, M. Efficient production of L-(+)-lactic acid using mycelia cotton-like floces of *Rhizopus oryzae* in an air-lift bioreactor. *Biotechnology Progress*, 14 (1998) : 699-704.
- Pochanavanich, P. and Suntornsuk, W. Fungal chitosan production and its characterization. *Letters in Applied Microbiology*, 35 (2002) : 17-21.
- Pritchard, G.G. Factors affecting the activity and synthesis of NAD-dependent lactate dehydrogenase in *Rhizopus oryzae*. *Journal of General Microbiology*, 78 (1973) : 125-137.
- Roy, D. and Goulet, J. Continuous production of lactic acid from whey permeate by free calcium alginate entrapped *Lactobacillus helveticus*. *Journal of Dairy Science*, 70 (1987) : 506-513.
- Soccol, C.R., Stonoga, V.I. and Raimbault, M. Production of L(+)-lactic acid by *Rhizopus* species. *World Journal of Biotechnology and Microbiology*, 10 (1994) : 433-435.
- Skory, C.D. Lactic acid production by *Rhizopus oryzae* transformants with modified lactate dehydrogenase activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64 (2004) : 237-242.
- Sun, Y., Li, Y. L. and Bai, S. Modeling of continuous L(+)-lactic acid production with immobilized *R. oryzae* in an airlift bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 3 (1998) : 87-90.
- Tashiro, Y., Kaneko, W., Sun, Y., Shibata, K., Inokuma, K., Zendo, T. and Sonomoto, K. Continuous D-lactic production by a novel thermotolerant *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Lactis* QU 41. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89 (2011) : 1741-1750.

- Tay, A. and Yang, S.T. 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 (2002) : 1-12.
- Thomas, T.D., Ellwood, D.C. and Longyear, M.C. Change from homo- and heterolactic fermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat cultures. *Journal Bacteriology*, 138 (1979) : 109-117.
- Thongchul, N. *Lactic acid production by immobilized Rhizopus oryzae in a rotating fibrous bed bioreactor*. Doctoral dissertation, The Ohio State University, Columbus, Ohio. 2005.
- Thongchul, N., Navankasattusas, S. and Yang, S.-T. Production of lactic acid and ethanol by *Rhizopus oryzae* integrated with cassava pulp hydrolysis. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33 (2010) : 407-416.
- Thongchul, N. and Yang, S. T. Controlling filamentous fungal morphology by immobilization on a rotating fibrous matrix to enhance oxygen transfer and L(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Fermentation Biotechnology*, 862 (2004) : 36-51.
- Vaidya, A. N., Pandey, R. A., Mudliar, S., M. S., Chakrabarti, T. and Devotta, S. Production and recovery of lactic acid for polylactide-an overview. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 35 (2005) : 429-467.
- Varadarajan, S. and Miller, D.J. Catalytic upgrading of fermentation-derived organic acids. *Biotechnology Progress*, 15 (1999) : 845-854.
- Vijayakumar, J., Aravindan, R. and Viruthagiri, T. Recent trends in the production, purification and application of lactic acid. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 22 (2008) : 245-264.

- Wang, x., Sun, L., Wei, D. and Wang, R. Reducing by-product formation in L-lactic acid fermentation by *Rhizopus oryzae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32 (2005) : 38-40.
- Wang, Z., Wang, Y., Yang, S. T., Wang, R. and Ren, H. A novel honeycomb matrix for cell immobilization to enhance lactic acid production by *Rhizopus oryzae*, *Bioresource Technology*, 101 (2010) : 5557-5564.
- Wee, Y.J., Kim, J.N. and Ryu, H.W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Biotechnological Production of Lactic Acid, Food Technol. Biotechnol.*, 44 (2006) : 163–172.
- Woiciechowski, A.L., Soccol, C. R., Ramos, L. P. and Pandey, A. 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 (1999) : 949-955.
- Wright, B.E., Longacre, A. and Reimers, J. Models of metabolism in *Rhizopus oryzae*. *Journal of Theoretical Biology*. 182 (1996) : 453-457.
- Yan, J. S., Wee, Y. J. and Ryu, H. W. Production of optically pure L(+)-lactic acid from various carbohydrate by batch fermentation of *Eenterococcus faecalis* RKY1. *Enzyme and Microbial Technology*, 33 (2003) : 416-423.
- Yang, C.W., Lu, Z. and Tsao, G.T. Lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* in a submerged system. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 51-52 (1995) : 57-71.
- Yin, P., Nishina, N., Kosakai, Y., Yahiro, K., Park, Y. and Okabe, M. 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 (1997) : 249-253.

- Yin, P., Yahiro, K., Ishigaki, T., Park, Y. and Okabe, M. L(+)-lactic acid production by repeated batch culture of *Rhizopus oryzae* in air-lift bioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86 (1998): 96-100.
- Yu, M.C., Wang, R.C., Wang, C.Y., Duan, K.J. and Sheu, D.Y. Enhanced production of L(+)-lactic acid by floc-form culture of *Rhizopus oryzae*. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 38 (2007) : 223-228.
- Zhang, Z. Y., Jin, B. and Kelly, J. M. Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus fungi*. *Biochemical Engineering Journal*, 25 (2007) : 251-263.
- Zhou, Y., Dominguez, J. M., Cao, N., Du, J. and Tsao, G. T. Optimization of L-lactic acid production from glucose by *Rhizopus oryzae* ATCC 52311. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 77-79 (1999) : 401-407.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมสารสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน

1.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล

$$\begin{aligned} \text{สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล} &= 40 \text{ กรัม} \\ \therefore \text{สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล} &= 4 \text{ กรัม} \end{aligned}$$

ดังนั้น นำสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่นแล้วปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร หรือ ทำการเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 100 มิลลิเมตร ต้องละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.4 กรัม

1.2 การเตรียมสารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KHP)

โดย KHP มีมวลโมเลกุล (M.W.) เท่ากับ 204.03 (1 นอร์มอล)

$$\begin{aligned} \text{สารละลาย KHP 0.1 นอร์มอล จะมีสาร KHP} &= 204.23 \times 0.1 \text{ กรัม} \\ &= 20.423 \text{ กรัม} \end{aligned}$$

ดังนั้น นำ KHP 20.423 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร หรือ หากต้องการเตรียมสารละลาย KHP 25 มิลลิลิตร ต้องละลายสารละลาย KHP 0.51 กรัม

1.3 การคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์

โดยนำสารละลาย KHP ที่เตรียมจากข้อ 1.2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ขวดลูกชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมอินดิเคเตอร์ฟีนอล์ฟทาลีน (phenolphthalein) 3 หยด จากนั้นนำมาไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทำเตรียมจากข้อ 1.1 และเมื่อถึงจุดยุติ สารละลายจะเปลี่ยนจากไม่มีสีเป็นสีชมพู บันทึกปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต และทำการคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ ดังนี้

ความเข้มข้นของ NaOH = (ปริมาตรของ KHP × 1000) / M.W. × ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ไทเทรต

1.4 การเตรียมสารละลายมาตรฐานไฮโดรคลอริก (HCl) 0.1 นอร์มอล

เตรียมสารละลายจากกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 37% (W/W)

โดย HCl 1 ลิตร = 1.19 กิโลกรัม

ความหนาแน่น = มวล / ปริมาตร = 1.19 กิโลกรัม / 1000 มิลลิลิตร
; 1 มิลลิลิตร = 1.19 กิโลกรัม

น้ำหนักโมเลกุลของ HCl = 36 ; 1 นอร์มอล = 36 กรัม

1 นอร์มอล HCl = มีเนื้อ HCl = 36 กรัม

ถ้า 0.1 นอร์มอล HCl มีเนื้อ HCl อยู่ = $36 \times 0.1 = 3.6$ กรัม

∴ ถ้าทำการเตรียมจาก HCl 37%

เนื้อสาร HCl 37 กรัม มาจากสารละลาย = 100 กรัม

∴ เนื้อสาร HCl 3.6 กรัม มาจากสารละลาย HCl = $100 \times 3.6 / 37 = 9.73$ กรัม

HCl 1190 กรัม มาจากสารละลาย HCl = $1000 \times 9.73 / 1190 = 8.18$ มิลลิลิตร

ดังนั้น ในการเตรียมสารละลาย 0.1 นอร์มอล HCl ปริมาตร 1 ลิตร ต้องใช้ HCl
เข้มข้น 37 % ปริมาตร 8.18 มิลลิลิตร ละลายในน้ำบริสุทธิ์ 1 ลิตร

1.5 การคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายมาตรฐานไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล

นำ HCl 0.1 นอร์มอล ที่เตรียมจากข้อ 1.4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดลูกชมพู่
ขนาด 250 มิลลิลิตร มาไทเทรตกับ 0.1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทราบความเข้มข้นที่
แน่นอนจากข้อ 1.3 โดยใช้ phenolphthalein เป็นอินดิเคเตอร์ เมื่อถึงจุดยุติสารละลายจะเปลี่ยนจากไม่
มีสีเป็นสีชมพู โดยสูตรคำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของ HCl ดังนี้

$$N_1 V_1 = N_2 V_2$$

เมื่อ	N_1	=	ความเข้มข้นที่แน่นอนของสาร
	V_1	=	ปริมาตรของสาร NaOH ที่ใช้ไทเทรต
	N_2	=	ความเข้มข้นที่แท้จริงของ HCl ที่ต้องการทราบ
	V_2	=	ปริมาตรของ HCl ที่นำมาไทเทรต

1.6 การเตรียมสารละลายกรดบอริก (Boric acid) 4 เปอร์เซ็นต์

ละลายกรดบอริก 40 กรัม ในน้ำบริสุทธิ์ปริมาตร 1 ลิตร อาจใช้ความร้อนช่วยในการละลาย

1.7 การเตรียมอินดิเคเตอร์ (Mixed Indicator)

นำ methyl red 0.001 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ 10 มิลลิลิตร และนำ bromcresol green 0.001 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ 10 มิลลิลิตร และนำมาผสมกันด้วยอัตราส่วน 1:5

ภาคผนวก ข

การคำนวณ

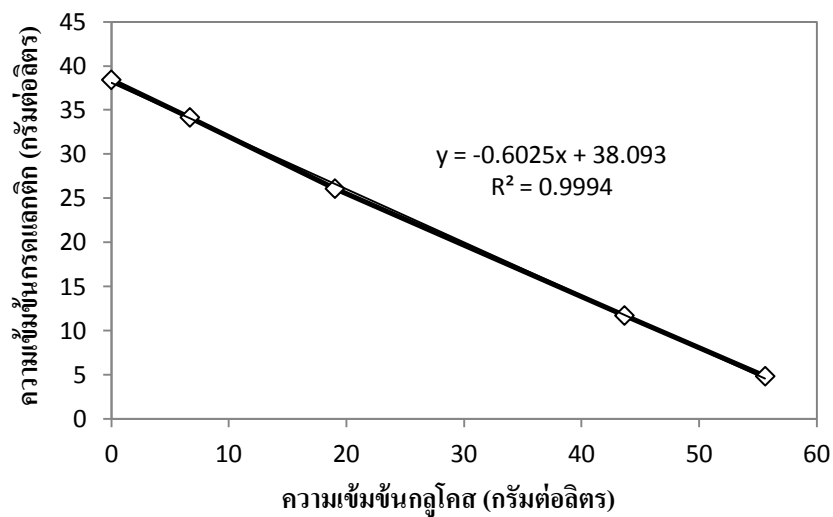
1. การหาค่า Yield ($Y_{p/S}$) (เปอร์เซ็นต์)1.1 การหาค่า Yield ($Y_{p/S}$) (เปอร์เซ็นต์) ในการผลิตแบบแบตช์

ตัวอย่าง การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติด ที่อัตราการให้อากาศ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที ในการผลิตแบบแบตช์

ตารางที่ ข.1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคสกับกรดแลกติกในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์

กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)
62.60	0.00
56.69	0.00
55.62	4.83
43.65	11.70
19.02	26.08
6.68	34.15
0.00	38.40
0.00	39.87
0.00	40.66

รูปที่ ข.1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความเข้มข้นกลูโคสกับกรดแลกติกในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์

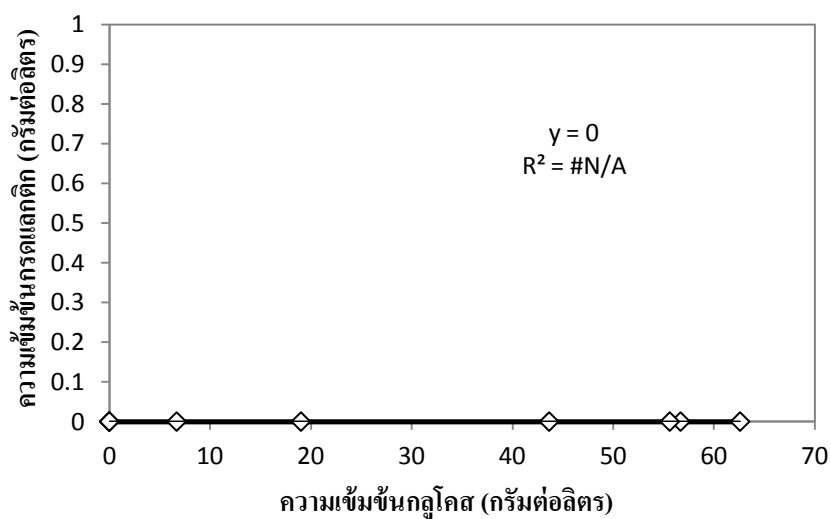


ค่า $Y_{p/s}$ ของกรดแลกติกในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.60 (น้ำหนักร/น้ำหนัก) หรือ 60.25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักรต่อน้ำหนักร)

ตารางที่ ข.2 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคสกับเอทานอลในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์

กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)
62.60	0.00
56.69	0.00
55.62	0.00
43.65	0.00
19.02	0.00
6.68	0.00
0.00	0.00
0.00	0.00
0.00	0.00

รูปที่ ข.2 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความเข้มข้นกลูโคสกับเอทานอลในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์



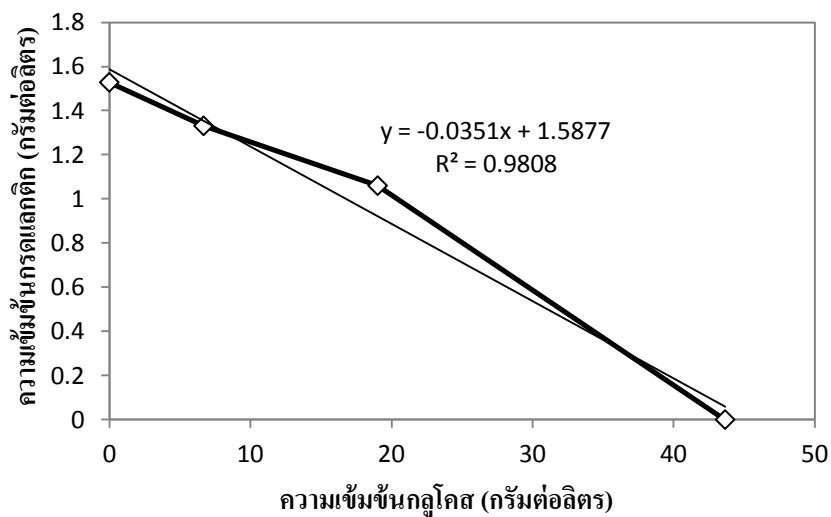
ค่า $Y_{P/S}$ ของเอทานอลในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.00 (น้ำหนัก/น้ำหนัก)
หรือ 0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

ตารางที่ ข.3 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคสกับกรดฟูมาริกในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์

กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	กรดฟูมาริก (กรัมต่อลิตร)
-------------------------	-----------------------------

62.60	0.00
56.69	0.00
55.62	0.00
43.65	0.00
19.02	1.06
6.68	1.33
0.00	1.53
0.00	1.57
0.00	1.19

รูปที่ ข.3 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความเข้มข้นกลูโคสกับกรดฟูมาริกในอาหารเพื่อสร้างผลึกภัณฑ์



ค่า $Y_{p/S}$ ของเอทานอลในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.03 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) หรือ 3.51 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก)

1.2 การหาค่า Yield ($Y_{p/S}$) (เปอร์เซ็นต์) ในการผลิตแบบต่อเนื่อง

ตัวอย่าง การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติก ที่อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ 70 กรัมต่อลิตร ในการผลิตแบบต่อเนื่อง ตารางที่ ข.4 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคสกับกรดแลกติกในอาหารแบบต่อเนื่อง

เวลาการเลี้ยง แบบต่อเนื่อง (ชั่วโมง)	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	ค่า Y_{PS}
0	11.51	27.69	0.200
6	36.82	21.90	0.193
12	39.08	15.98	0.144
18	43.21	14.38	0.135
24	55.34	17.37	0.184
30	55.69	16.25	0.172
36	56.58	15.89	0.170
42	55.70	15.60	0.165
48	54.12	17.12	0.178
54	54.80	13.33	0.140

ค่าเฉลี่ย Y_{PS} ของกรดแลกติกในแต่ละชั่วโมงในการผลิตแบบต่อเนื่อง เท่ากับ 0.1683 หรือ 16.83 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ ข.5 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคสกับเอทานอลในอาหารแบบต่อเนื่อง

เวลาการเลี้ยง	กลูโคส	เอทานอล	ค่า Y_{PS}
---------------	--------	---------	--------------

แบบต่อเนื่อง (ชั่วโมง)	(กรัมต่อลิตร)	(กรัมต่อลิตร)	
0	11.51	3.54	0.025
6	36.82	0.00	0.000
12	39.08	0.00	0.000
18	43.21	0.00	0.000
24	55.34	0.00	0.000
30	55.69	0.00	0.000
36	56.58	0.00	0.000
42	55.70	0.00	0.000
48	54.12	0.00	0.000
54	54.80	0.00	0.000

ค่าเฉลี่ย $Y_{p/s}$ ของเอทานอลในแต่ละชั่วโมงในการผลิตแบบต่อเนื่อง เท่ากับ 0.0025 หรือ 0.25 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ ข.6 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกลูโคสกับกรดฟูมาริกในอาหารแบบต่อเนื่อง

เวลาการเลี้ยง	กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	กรดฟูมาริก (กรัมต่อลิตร)	ค่า $Y_{p/s}$
---------------	-------------------------	-----------------------------	---------------

แบบต่อเนื่อง (ชั่วโมง)			
0	11.51	0.00	0.000
6	36.82	0.00	0.000
12	39.08	0.00	0.000
18	43.21	0.00	0.000
24	55.34	0.00	0.000
30	55.69	0.00	0.000
36	56.58	0.00	0.000
42	55.70	0.00	0.000
48	54.12	0.00	0.000
54	54.80	0.00	0.000

ค่าเฉลี่ย $Y_{P/S}$ ของกรดฟูมาริกในแต่ละชั่วโมงในการผลิตแบบต่อเนื่อง เท่ากับ 0.00 หรือ 0 เปอร์เซ็นต์

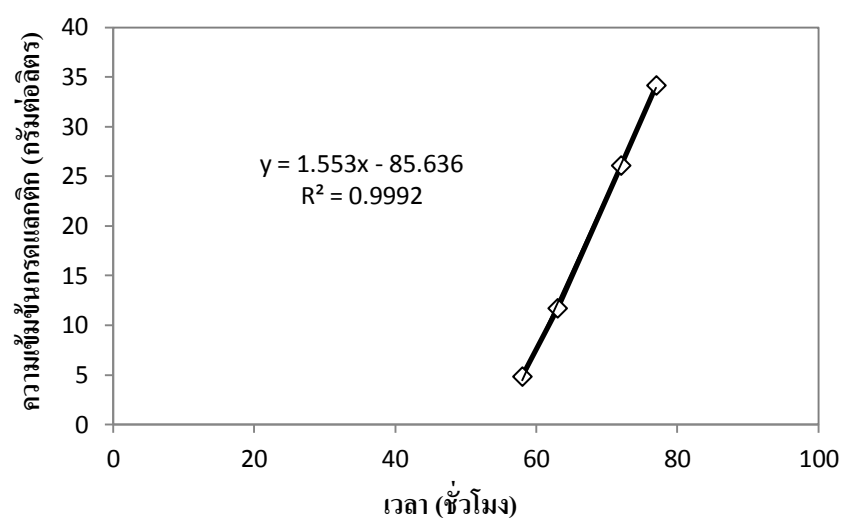
2. การหาค่าอัตราการผลิต (Productivity) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

2.1 การหาค่าอัตราการผลิต (Productivity) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) ในการผลิตแบบแบตช์

ตารางที่ ข.7 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดแลกติกกับเวลาในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์

เวลา (ชั่วโมง)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)
48	0.00
53	0.00
58	4.83
63	11.70
72	26.08
77	34.15
82	38.40
87	39.87
96	40.66

รูปที่ ข.4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดแลกติกกับเวลาในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์

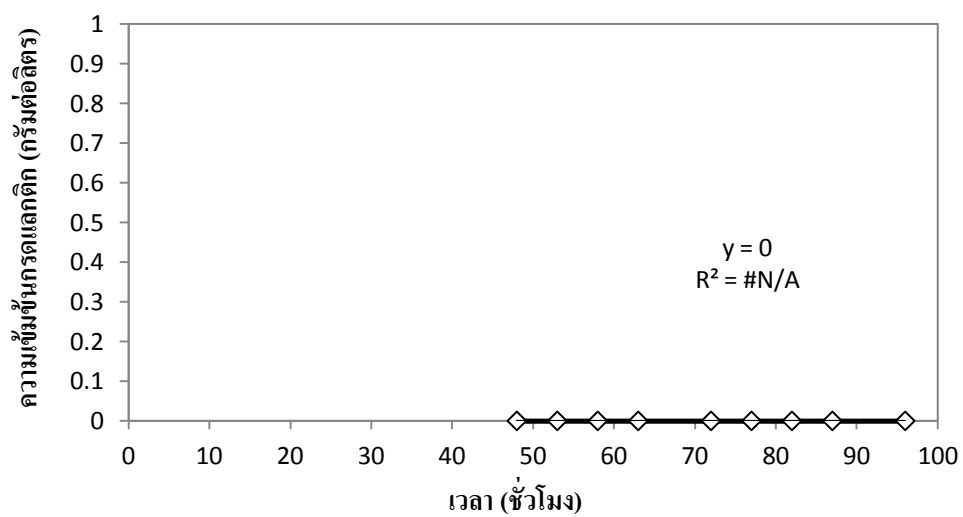


อัตราการผลิตกรดแลกติกในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 1.55 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ตารางที่ ข.8 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอลกับเวลาในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์

เวลา (ชั่วโมง)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)
48	0.00
53	0.00
58	0.00
63	0.00
72	0.00
77	0.00
82	0.00
87	0.00
96	0.00

รูปที่ ข.5 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอลกับเวลาในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์

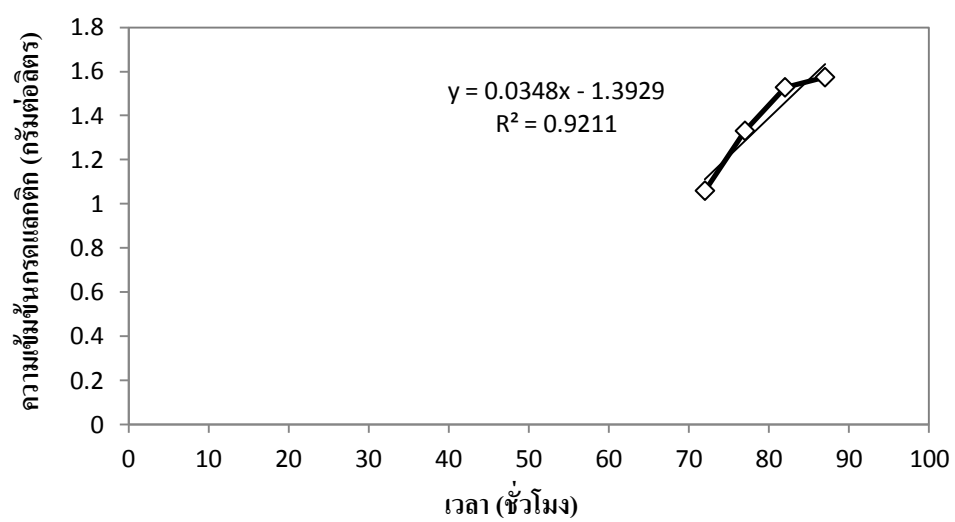


อัตราการผลิตเอทานอลในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ตารางที่ ข.9 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดฟูมาริกกับเวลาในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์

เวลา (ชั่วโมง)	กรดฟูมาริก (กรัมต่อลิตร)
48	0.00
53	0.00
58	0.00
63	0.00
72	1.06
77	1.33
82	1.53
87	1.57
96	1.19

รูปที่ ข.6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดฟูมาริกกับเวลาในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์



อัตราการผลิตเอทานอลในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 0.035 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

2.2 การหาค่าอัตราการผลิต (Productivity) (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) ในการผลิตแบบต่อเนื่อง

ตัวอย่าง การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติก ที่อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที อัตราการกวน 70 รอบต่อนาที ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ 70 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.14 ต่อชั่วโมง ในการผลิตแบบต่อเนื่อง

ตารางที่ ข.10 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดแลกติกกับเวลาในอาหารแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจาง 0.14 ต่อชั่วโมง

เวลาการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (ชั่วโมง)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
0	27.69	3.88
6	21.90	3.07
12	15.98	2.24
18	14.38	2.01
24	17.37	2.43
30	16.25	2.27
36	15.89	2.22
42	15.60	2.18
48	17.12	2.40
54	13.33	1.87

ค่าเฉลี่ยอัตราการผลิตของกรดแลกติกในแต่ละชั่วโมงในการผลิตแบบต่อเนื่องเท่ากับ 2.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ตารางที่ ข.11 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอลกับเวลาในอาหารแบบต่อเนื่องที่อัตราการ
เจือจาง 0.14 ต่อชั่วโมง

เวลาการเลี้ยง แบบต่อเนื่อง (ชั่วโมง)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
0	3.54	0.49
6	0.00	0.00
12	0.00	0.00
18	0.00	0.00
24	0.00	0.00
30	0.00	0.00
36	0.00	0.00
42	0.00	0.00
48	0.00	0.00
54	0.00	0.00

ค่าเฉลี่ยอัตราการผลิตของเอทานอลในแต่ละชั่วโมงในการผลิตแบบต่อเนื่อง
เท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ตารางที่ ข.12 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดฟูมาริกกับเวลาในอาหารแบบต่อเนื่องที่อัตรา
การเจือจาง 0.14 ต่อชั่วโมง

เวลาการเลี้ยง แบบต่อเนื่อง (ชั่วโมง)	กรดฟูมาริก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการผลิต (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
0	0.00	0.00
6	0.00	0.00
12	0.00	0.00
18	0.00	0.00
24	0.00	0.00
30	0.00	0.00
36	0.00	0.00
42	0.00	0.00
48	0.00	0.00
54	0.00	0.00

ค่าเฉลี่ยอัตราการผลิตของกรดฟูมาริกในแต่ละชั่วโมงในการผลิตแบบต่อเนื่อง
เท่ากับ 0.00 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

3. การหาค่าอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะ (Specific production rate ; μ_p)

อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ $\frac{dP}{dt} = \mu P$

เมื่อ dP คือ ค่าที่เพิ่มของผลิตภัณฑ์ในช่วงเวลา dt

$$\frac{dP}{P} = \mu \cdot dt$$

เมื่อ integrate สมการจะได้ $P_t = P_0 \cdot e^{\mu t}$

เมื่อ P_0 = ค่าความเข้มข้นผลิตภัณฑ์ (กรัมต่อลิตร)

P_t = ค่าความเข้มข้นผลิตภัณฑ์ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา t

ชั่วโมง

e = ฐานของ natural logarithm

เมื่อใส่ natural logarithm ในสมการจะได้

$$\ln P_t = \ln P_0 + \mu t$$

เมื่อนำมาเขียนกราฟระหว่าง $\ln P$ กับ t จะได้ความชัน μ

$$\ln P_t = \mu t$$

∴ เมื่อนำมาแทนเข้าสมการเส้นตรง $Y = mX$

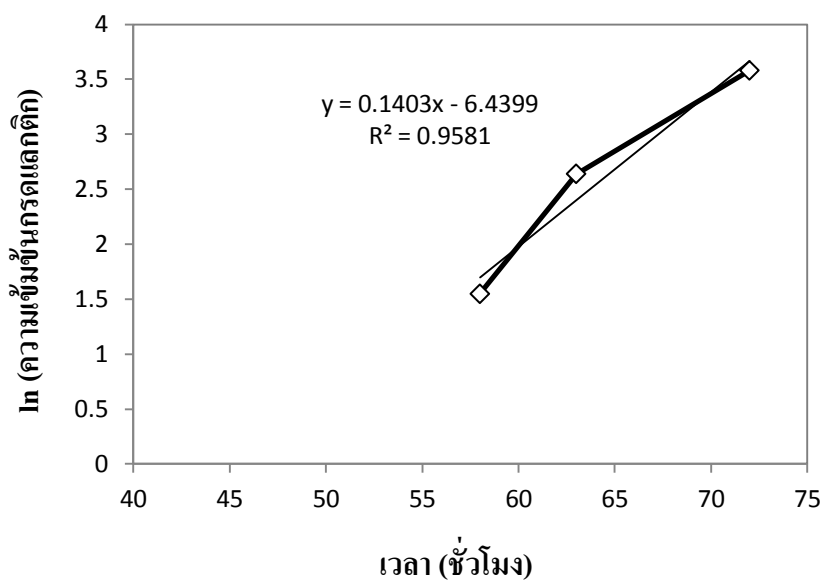
และนำมาเขียนกราฟระหว่างความสัมพันธ์ของ \ln ของความเข้มข้นผลิตภัณฑ์ กับเวลา โดยค่าความชันที่ได้จะเป็นค่าอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะ

ตัวอย่าง การคำนวณค่าอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จำเพาะของกรดแลกติก จากการผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติด ที่อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ 70 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ ข.13 ความสัมพันธ์ระหว่าง \ln ของความเข้มข้นกรดแลกติกกับเวลาในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์

เวลา ;(t) (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นกรดแลกติก ;(P) (กรัมต่อลิตร)	\ln (ความเข้มข้นกรดแลกติก) ; $\ln (P)$
58	4.70	1.55
63	14.00	2.64
72	35.88	3.58
77	31.28	3.44
82	31.98	3.46
87	34.98	3.55
92	31.06	3.43
94	29.38	3.38
96	29.66	3.39

รูปที่ ข.7 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างln ของความเข้มข้นกรดแลกติกกับเวลาในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์



อัตราการผลิตกรดแลกติกจำเพาะในอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 0.14 ต่อชั่วโมง

4. การหาค่าอัตราการเจือจาง (dilution rate, D) (ต่อชั่วโมง) และ อัตราการไหล (feed rate, F) (ลิตรต่อชั่วโมง)

อัตราการเจือจาง (D) เกิดจากความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของอาหารที่เข้าสู่ภาชนะ กับปริมาตรของภาชนะ โดยสามารถเขียนเป็นสมการได้ ดังนี้

$$D = F/V$$

เมื่อ D = อัตราการเจือจาง (ต่อชั่วโมง)
 F = อัตราการไหล (ลิตรต่อชั่วโมง)
 V = ปริมาตรของของเหลว (ลิตร)

จากสมการ Mass Balance

$$\text{Accumulation} = \text{Input} - \text{Output} + \text{Generation} - \text{Consumption}$$

ขณะที่ในการผลิตแบบต่อเนื่อง (Continuous Process) ; Accumulation = 0

; Input = 0

; Consumption = 0

ดังนั้น เมื่อแทนค่าลงในสมการ Mass Balance

$$0 = 0 - \text{Output} + \text{Generation} + 0$$

$$\text{Output} = \text{Generation}$$

$$FP = V\mu_p P$$

$$\therefore \mu_p = F/V$$

$$\therefore \mu_p = F/V = D$$

ดังนั้น ที่สภาวะคงที่ อัตราการผลิตทั้งหมดจำเพาะจะมีค่าเท่ากับอัตราการเจือจาง

ตัวอย่าง การคำนวณค่าอัตราการเจือจางที่จะใช้ในการผลิตกรดแลกติกแบบต่อเนื่อง จาก การผลิตกรดแลกติกแบบเซลล์ตรึงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติด ที่อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที ความเข้มข้นกลูโคส เริ่มต้นในระยะสร้างผลิตภัณฑ์ 70 กรัมต่อลิตร ในปริมาตรที่ผลิตทั้งหมด 4 ลิตร

จากข้อที่ 3 รูปที่ ข.7 คำนวณค่าอัตราการผลิตกรดแลกติกจำเพาะ (μ_p) เท่ากับ 0.14 ต่อ ชั่วโมง

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น เมื่อแทนค่าลงในสมการ } \mu_p &= F/V = D \\ 0.14 &= F/4 = 0.14 \\ F &= 0.56 \text{ ลิตรต่อชั่วโมง} \\ D &= 0.14 \text{ ต่อชั่วโมง} \end{aligned}$$

5. การหาค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน (K_La) ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยวิธี

Dynamic method of gassing out

Dynamic method of gassing out สามารถใช้คำนวณหาค่า K_La ในกรณีที่สภาวะของการหมักยังมีเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ โดยวิธีนี้มีข้อดี เมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ คือ ไม่ต้องใช้ข้อมูลสมมติฐาน แต่เป็นการใช้ข้อมูลจากการทดลองจริง แต่ข้อสำคัญคือ DO probe นั้นต้องให้ข้อมูลที่ถูกต้องจริงๆ โดยในการทดลองนั้นต้องทำการหยุดการให้อากาศก่อน (และลดอัตราการกวนลงเหลือประมาณ 50 รอบต่อนาที เพื่อยังคงให้เกิดการผสมระหว่างมวลสาร) ทำให้ dissolved oxygen concentration (C_L) ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง และเมื่อลดลงถึงจุดจุดหนึ่งจึงมีการให้อากาศอีกครั้ง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของ C_L อยู่ในเทอมของ $\frac{dC_L}{dt}$ และสัมพันธ์กับค่า Oxygen uptake rate (OUR) และค่า Oxygen transfer rate (OTR) ด้วยดังสมการ

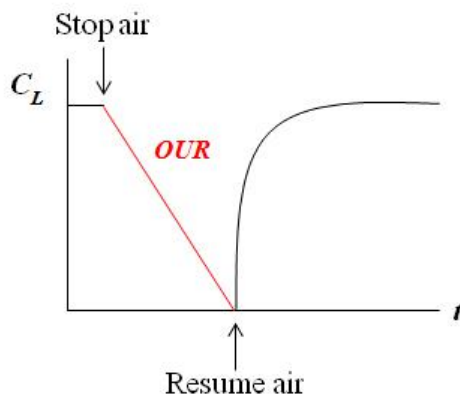
$$\frac{dC_L}{dt} = OTR - OUR$$

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 (ต่อวินาที)

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

ในขณะที่ไม่มีการให้อากาศ $OTR = 0$ นั่นคือ อัตราการเปลี่ยนแปลงของออกซิเจนในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ เท่ากับ อัตราการนำออกซิเจนไปใช้ของเซลล์ และ OUR (mM/S) สามารถหาได้จากค่าความชันจากการเขียนความสัมพันธ์ระหว่างค่า C_L กับ เวลาในช่วงที่ไม่มีการให้อากาศ ดังรูปที่ ข.1



รูปที่ ข.8 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย (C_L) กับเวลา (วินาที) จากแบบจำลองในทางทฤษฎี

ช่วงที่สองที่มีการให้อากาศอีกครั้ง อัตราการเปลี่ยนแปลงของออกซิเจน เท่ากับ อัตราการให้อากาศ ลบ อัตราการนำออกซิเจนไปใช้ของเซลล์

$$\frac{dC_L}{dt} = OTR - OUR \quad \dots\dots\dots (1)$$

โดยอัตราการถ่ายเทออกซิเจน (OTR) นั้นสามารถหาได้จากสมการ

$$OTR = K_L a \times (C_L^* - C_L) \quad \dots\dots\dots (2)$$

C_L^* คือ ค่าการละลายของออกซิเจนในของเหลว (bulk liquid) (mM) และ $K_L a$ หรือ ค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน (min^{-1}) โดยในสถานะที่ไม่มีอากาศ ค่า OTR จะเท่ากับ 0

ดังนั้น เมื่อแทนค่า OTR ลงในสมการที่ (1)

จะได้ว่า
$$\frac{dC_L}{dt} = - OUR \quad \dots\dots\dots (3)$$

เพราะฉะนั้นจะได้สมการเส้นตรง
$$dC_L = - OUR(dt) \quad \dots\dots\dots (4)$$

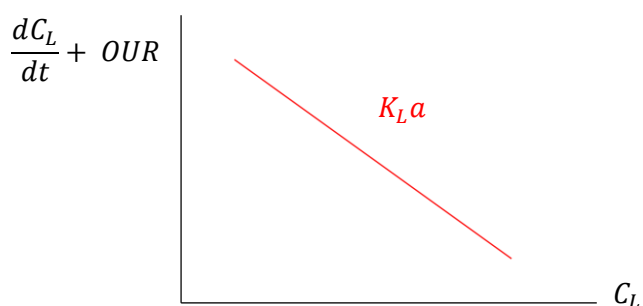
ดังนั้นเมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (ไม่มีอากาศ) (แกน x) กับ C_L (แกน y) แสดงดังรูปที่ ข.8 โดยส่วนกลับของค่าความชันที่ได้ จะเท่ากับ OUR

สำหรับค่า $K_L a$ และค่า C^* สามารถหาได้จากความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\frac{dC_L}{dt} + OUR$ กับ C_L โดยเมื่อนำสมการที่ 1 เท่ากับสมการที่ 2 จะได้ว่า

จะได้ว่า
$$\frac{dC_L}{dt} + OUR = K_L a(C_L^* - C_L) \dots\dots\dots (5)$$

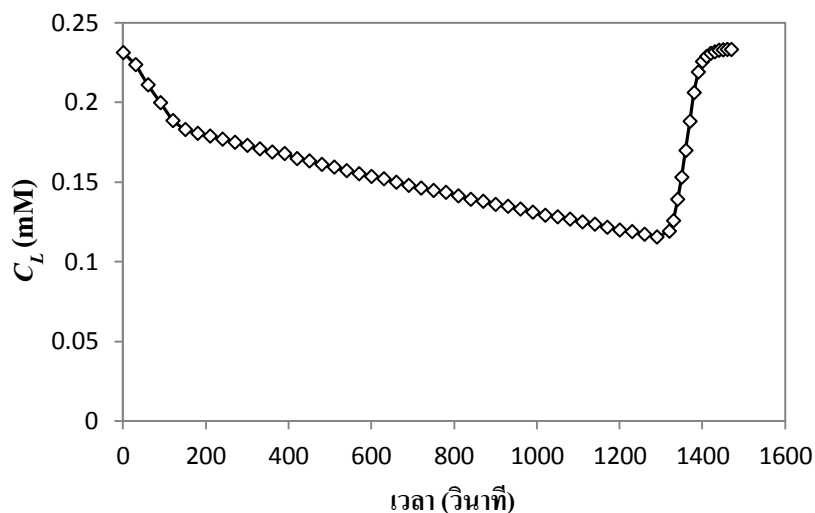
เพราะฉะนั้นจะได้สมการเส้นตรง
$$\frac{dC_L}{dt} + OUR = -K_L a(C_L - C^*) \dots\dots\dots (6)$$

ดังนั้นจะได้จากความสัมพันธ์ระหว่างค่า $\frac{dC_L}{dt} + OUR$ กับ C_L ซึ่งส่วนกลับของความชันที่ได้เท่ากับ $K_L a$ ส่วนค่า C^* เท่ากับ จุดตัดแกน Y ต่อ $K_L a$



รูปที่ ข.9 ความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{dC_L}{dt} + OUR$ กับ C_L จากแบบจำลองในทางทฤษฎี

ในการผลิตกรดแลกติกจาก *R. oryzae* ในอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่ 30°C โดยค่าการอิ่มตัวของออกซิเจน 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าการละลายของน้ำเท่ากับ 0.2436 mM H₂O จากข้อมูลที่ได้กำหนดให้สามารถคำนวณหาค่า C_L ได้จากสมการ $C_L = \frac{DO\% \times 0.2436}{100}$ ได้ผลดังตารางที่ ข.14 และนำมาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง C_L กับ เวลา ดังรูปที่ ข.10

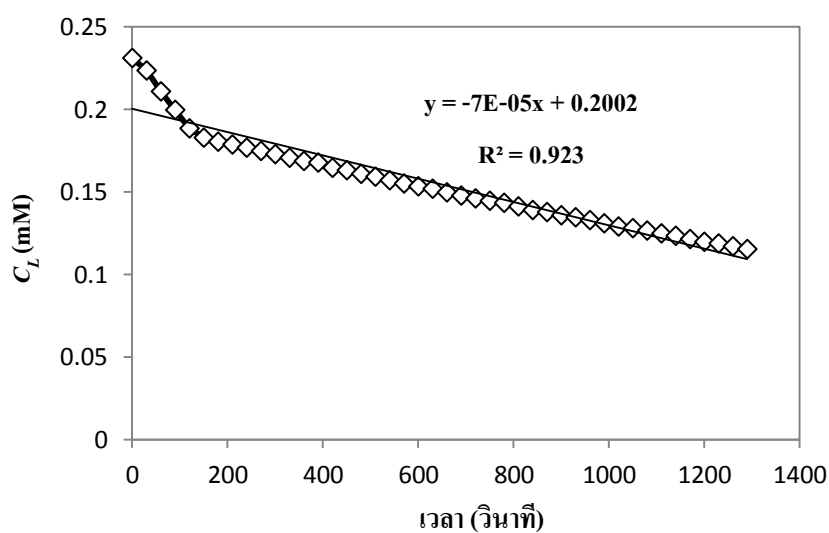


รูปที่ ข.10 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของออกซิเจนที่ละลายในอาหาร (C_L) กับ เวลา (วินาที) ในการทดลอง

การคำนวณหาค่า OUR โดยสามารถคำนวณได้จากค่าความชันของการเขียนความสัมพันธ์ระหว่าง C_L กับเวลา (วินาที) ขณะที่ไม่มีกรให้อากาศนั้น ค่า $OUR = 0$

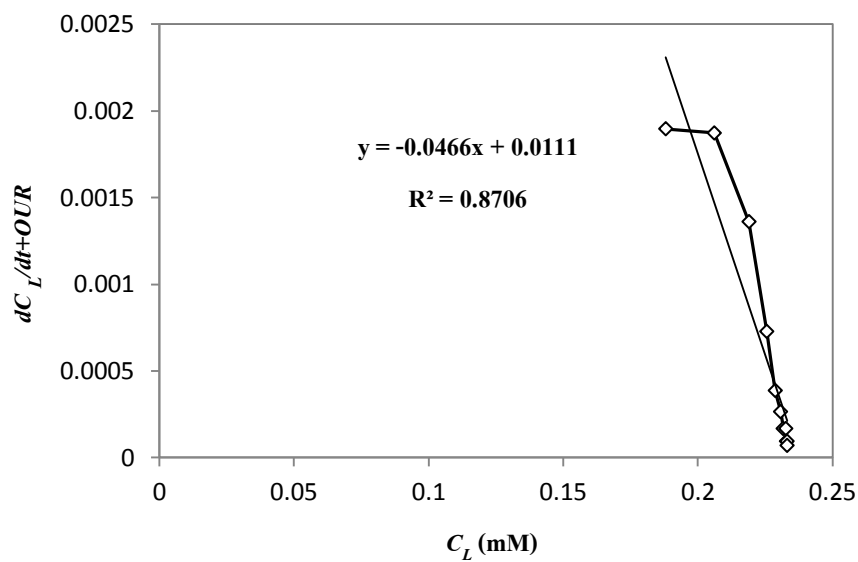
ดังนั้น $\frac{dC_L}{dt} = -OUR$ สามารถเขียนความสัมพันธ์คำนวณหาค่าความชันได้ ดังรูปที่ ข.11

และค่า OUR เท่ากับ 0.00007 mM/S



รูปที่ ข.11 ความสัมพันธ์ระหว่าง C_L กับเวลา (วินาที) ในช่วงที่ไม่ให้อากาศ

การคำนวณหาค่า $K_L a$ จากการเขียนความสัมพันธ์ระหว่าง $dC_L/dt + OUR$ กับ C_L ได้ดังรูปที่ ข.12 และสามารถคำนวณหาค่า $K_L a$ ได้เท่ากับ 0.047 ต่อวินาที



รูปที่ ข.12 ความสัมพันธ์ระหว่าง $dC_L/dt + OUR$ กับ C_L

ตารางที่ ข.14 ค่าการละลายของออกซิเจน (DO) ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายใน
อาหาร (C_L) ต่อเวลา (วินาที)

<i>Time (S)</i>	<i>%DO</i>	<i>C_L (mM)</i>	<i>dC_L/dt</i>	<i>OTR=dC_L/dt+OUR</i>
0	94.90	0.231176	-	-
30	91.80	0.223625	0.000252	-
60	86.60	0.210958	0.000422	-
90	82.00	0.199752	0.000374	-
120	77.40	0.188546	0.000374	-
150	75.10	0.182944	0.000187	-
180	74.10	0.180508	0.000081	-
210	73.40	0.178802	0.000057	-
240	72.60	0.176854	0.000065	-
270	71.80	0.174905	0.000065	-
300	71.00	0.172956	0.000065	-
330	70.10	0.170764	0.000073	-
360	69.30	0.168815	0.000065	-
390	68.90	0.167840	0.000032	-
420	67.60	0.164674	0.000106	-
450	67.00	0.163212	0.000049	-
480	66.10	0.161020	0.000073	-
510	65.40	0.159314	0.000057	-
540	64.50	0.157122	0.000073	-
570	63.70	0.155173	0.000065	-
600	63.00	0.153468	0.000057	-
630	62.40	0.152006	0.000049	-
660	61.50	0.149814	0.000073	-

ตารางที่ ข.14 ค่าการละลายของออกซิเจน (DO) ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายใน
อาหาร (C_L) ต่อเวลา (วินาที) (ต่อ)

<i>Time (S)</i>	<i>%DO</i>	<i>C_L (mM)</i>	<i>dC_L/dt</i>	<i>OTR=dC_L/dt+OUR</i>
690	60.70	0.147865	0.000065	-
720	60.00	0.146160	0.000057	-
750	59.40	0.144698	0.000049	-
780	58.90	0.143480	0.000041	-
810	58.00	0.141288	0.000073	-
840	57.10	0.139096	0.000073	-
870	56.60	0.137878	0.000041	-
900	55.80	0.135929	0.000065	-
930	55.30	0.134711	0.000041	-
960	54.60	0.133006	0.000057	-
990	53.80	0.131057	0.000065	-
1020	53.00	0.129108	0.000065	-
1050	52.60	0.128134	0.000032	-
1080	52.00	0.126672	0.000049	-
1110	51.30	0.124967	0.000057	-
1140	50.70	0.123505	0.000049	-
1170	49.90	0.121556	0.000065	-
1200	49.20	0.119851	0.000057	-
1230	48.80	0.118877	0.000032	-
1260	48.10	0.117172	0.000057	-
1290	47.40	0.115466	0.000057	-
1320	48.90	0.119120	0.000122	0.000192
1330	51.60	0.125698	0.000658	0.000728
1340	57.10	0.139096	0.001340	0.001410

ตารางที่ ข.14 ค่าการละลายของออกซิเจน (DO) ความเข้มข้นของออกซิเจนละลายใน
อาหาร (C_L) ต่อเวลา (วินาที) (ต่อ)

<i>Time (S)</i>	<i>%DO</i>	<i>CL (mM)</i>	<i>dC_L/dt</i>	<i>OTR=dC_L/dt+OUR</i>
1350	62.80	0.152981	0.001389	0.001459
1360	69.70	0.169789	0.001681	0.001751
1370	77.20	0.188059	0.001827	0.001897
1380	84.60	0.206086	0.001803	0.001873
1390	89.90	0.218996	0.001291	0.001361
1400	92.60	0.225574	0.000658	0.000728
1410	93.90	0.228740	0.000317	0.000387
1420	94.70	0.230689	0.000195	0.000265
1430	95.10	0.231664	0.000097	0.000167
1440	95.50	0.232638	0.000097	0.000167
1450	95.60	0.232882	0.000024	0.000094
1460	95.70	0.233125	0.000024	0.000094
1470	95.70	0.233125	0.000000	0.000070

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววารุณี พิมทอง เกิดวันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2528 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2550 ต่อมาได้ทำเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552

การเสนอผลงานวิจัย

Pimtong, V., Boonsombat, R. and Thongchul, N. A static bed bioreactor for immobilization of *Rhizopus oryzae* and L(+)-lactic acid production. Processing in the 23rd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology on “Systems Biotechnology : Quality and Success” February 1-2, 2012, Bangkok, Thailand.