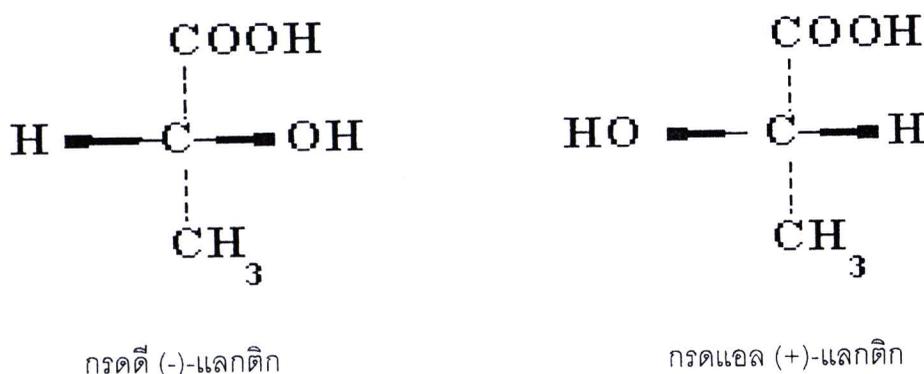


## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 กรดแลกติก

กรดแลกติก (Lactic acid) เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง ชื่อทางเคมี คือ 2-hydroxypropanoic acid มีสูตรทางเคมี คือ  $C_3H_6O_3$  กรดแลกติกถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในผลิตภัณฑ์นมในปี ค.ศ. 1780 โดยนักเคมีชาวสวีเดน กรดชนิดนี้มี 2 ไอโซเมอร์ คือ กรดดี(-)-แลกติก และกรดแอล(+)-แลกติก (Litchfield, 1996) ซึ่งแตกต่างกันที่การวางตัวของหมู่ไฮดรอกซีตรงตำแหน่งของไครัลคาร์บอนอะตอม แสดงในภาพที่ 2.1



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

ความแตกต่างทางโครงสร้างทางเคมีของกรดแลกติกทั้งชนิดดี(-)- และแอล(+)-ไอโซเมอร์ ทำให้ไอโซเมอร์ทั้งสองชนิดนี้มีคุณสมบัติแตกต่างกัน เช่น จุดเดือดและจุดหลอมเหลว โดยกรดดีแลกติกที่มีจุดเดือดที่ 103 องศาเซลเซียส และจุดหลอมเหลวที่ 52.8-53.6 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่ากรดแอลแลกติกซึ่งมีจุดเดือดที่ 82-85 องศาเซลเซียส และจุดหลอมเหลวที่ 16.8-33 องศาเซลเซียส (Budavari และคณะ, 1989; Honten และคณะ, 1971)

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

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของกรดแล็กติก

<b>ลักษณะของกรดแล็กติก</b>	
CAS number	50-21-5, 79-33-4(L), 10326-41-7(D)
EINECS number	200-018-0
สูตร	$\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$
มวลโมเลกุล	90.08
H.S. code	2918.11
Toxicity	Oral rat LD50:3543 mg/kg
Synonyms	2-hydroxypropanoic acid; 1-hydroxyethanecarboxylic acid; Ethylidenelactic acid; Alpha-hydroxypropionic acid
<b>สมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมี (99%)</b>	
Physical State	Colorless to slightly yellow, syrupy liquid
จุดหลอมเหลว	17 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	122 องศาเซลเซียส
Specific gravity	1.2
Solubility in water	Miscible
NFP Aratings	Health 3, Flammability 1, Reactivity 1
Flash point	112 องศาเซลเซียส
Stability	Stable under ordinary conditions

ที่มา : ดัดแปลงจาก Vaidya และคณะ (2005)

## 2.2 ประโยชน์ของกรดแลกติก

**ด้านอาหาร** กรดแลกติกเป็นกรดที่พบมากในผลิตภัณฑ์นม อาหารหมักดอง มักถูกนำไปใช้เป็นสารที่ให้รสเปรี้ยว และสารปรับค่าพีเอชในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม เนื่องจากสมบัติความเป็นกรด จึงนิยมนำไปใช้ในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์อาหารหลายประเภท รวมถึงใช้เป็นสารกันเสียและป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์

**ด้านเภสัชกรรม** กรดแลกติกถูกนำไปใช้ในการปรับค่าพีเอชและเป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์ยา เป็นสารเติมแต่งเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในการเตรียมวิตามิน เป็นส่วนประกอบของยาเพื่อเพิ่มคุณสมบัติในการละลายน้ำ เป็นสารตัวกลางเพื่อช่วยให้ตัวยาผสมกันได้ดีขึ้น นอกจากนี้ อนุพันธ์ของกรดแลกติกยังถูกนำมาใช้ในการรักษาโรค เช่น โรคโลหิตจาง โรคขาดแคลเซียมในกระดูกและฟัน ได้อีกด้วย

**ด้านเครื่องสำอาง** กรดแลกติกเป็นส่วนผสมในครีมหรือโลชั่นสำหรับทาเพื่อเพิ่มความชุ่มชื้นให้กับผิว เป็นสารที่ผสมในเครื่องสำอางเพื่อกระตุ้นให้เกิดการหลุดลอกของผิวหนัง ใช้เป็นสารช่วยให้ผิวขาวขึ้นโดยอาศัยกลไกการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส และยังใช้เพื่อควบคุมค่าพีเอชและป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ในเครื่องสำอาง

**ด้านการฟอกหนังและทอผ้า** กรดแลกติกถูกนำไปใช้ในการฟอกหนังให้นุ่มในอุตสาหกรรมฟอกหนัง ในอุตสาหกรรมทอผ้าจะช่วยในการย้อมและพิมพ์ให้สีติดแน่นนานยิ่งขึ้น

**ด้านอุตสาหกรรมพลาสติก** กรดแลกติกเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตพลาสติกชีวภาพ (พอลิแลกติกแอซิด) ที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติและสามารถเข้ากันได้ดีกับร่างกายมนุษย์ เพื่อนำมาใช้ทดแทนพลาสติกที่สังเคราะห์จากผลิตภัณฑ์ของอุตสาหกรรมปิโตรเคมี โดยพอลิแลกติกสามารถนำไปใช้ในด้านต่างๆ ได้แก่ วัสดุทางการแพทย์และประมง เช่น ฟิล์มคลุมพืช กระถางต้นไม้ เชือกถักและแห วัสดุก่อสร้าง เช่น ฉนวนกันความร้อน ผงนึ่งกันหรือถุง วัสดุสำนักงาน เช่น ซองเอกสาร แฟ้มใส่ ปกหนังสือ เป็นต้น ตลอดจนถูกนำมาใช้เป็นบรรจุภัณฑ์อาหาร เช่น ถาดอาหารหรือฟิล์มห่อหุ้มอาหาร ผลิตภัณฑ์เครื่องมือแพทย์ เช่น วัสดุเย็บแผล วัสดุซ่อมแซมกระดูกชิ้นเล็ก ๆ เนื่องจากพลาสติกชีวภาพสามารถย่อยสลายได้ง่าย

**ด้านอื่น ๆ** กรดแลกติกสามารถนำไปใช้ในการผลิตแลกเกอร์ หมึก ใช้ในการผลิตน้ำยาทำความสะอาด และสารฆ่าเชื้อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ เป็นต้น

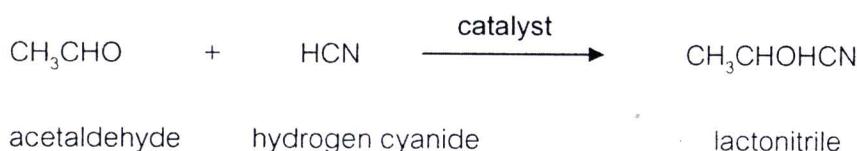
จากการสำรวจการผลิตกรดแลกติกทั่วโลก พบว่า มีการผลิตกรดแลกติกถึง 130,000-150,000 ตันต่อปี (Wee และคณะ, 2006) มีการคาดการณ์ว่าในแต่ละปีการผลิตกรดแลกติกในตลาดโลกจะเติบโต 10-15 เปอร์เซ็นต์ ต่อปี (Wassewar และคณะ, 2005) และมีแนวโน้มความต้องการสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง San (2008) รายงานไว้ว่าในช่วงระยะเวลาระหว่างปี 2008 ถึง 2012 คาดว่าในตลาดผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจะใช้กรดแลกติกเพิ่มขึ้นถึง  $2467 \times 10^3$  ตัน และ  $2296 \times 10^3$  ตันในตลาดอาหาร อีกทั้งในปัจจุบันมีความต้องการนำกรดแลกติกใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตพลาสติกชีวภาพมากขึ้น อย่างเช่นในแถบยุโรปที่คาดการณ์ไว้ว่าในปี 2015 ต้องการกรดแลกติก  $67 \times 10^3$  ตันในอุตสาหกรรมผลิตพลาสติกชีวภาพ บริษัทต้นแบบการผลิตพอลิแลกติกแอซิด (polylactic acid) ของสหรัฐอเมริกา รายงานว่าในปี 2010 ตลาดพอลิแลกติกแอซิด (polylactic acid) มีเป้าหมายต้องการกรดแลกติกถึง 5,000,000 ตัน (Vijayakumar และคณะ, 2008) โดยมีราคาประมาณ 1.59 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม ที่ความเข้มข้นของกรดแลกติกเท่ากับ 88 เปอร์เซ็นต์

## 2.3 การผลิตกรดแลกติก

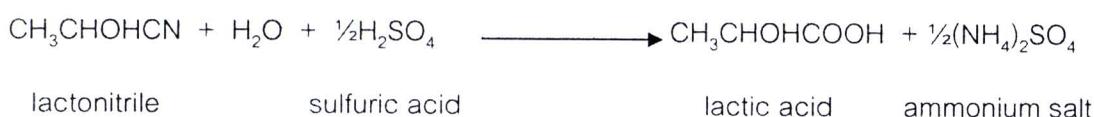
### 2.3.1 กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี

ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดแลกติกโดยวิธีทางเคมี นิยมใช้การสังเคราะห์ผ่าน Lactonitrile โดยนำ HCN มาทำปฏิกิริยากับ Acetaldehyde ได้เป็น Lactonitrile ตามขั้นตอนที่ 1 จากนั้นนำ Lactonitrile ที่ได้มาผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสโดยใช้กรดซัลฟูริกหรือกรดไฮโดรคลอริก ได้เป็นกรดแลกติกและเกลือแอมโมเนียม ตามขั้นตอนที่ 2 จากนั้นกรดแลกติกที่ได้จะถูกนำไปผ่านปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน (Esterification) ด้วยเมทานอลได้เป็นเมทิลแลกเตตตามขั้นตอนที่ 3 แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่นและผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ได้เป็นกรดแลกติกและเมทานอลตามขั้นตอนที่ 4

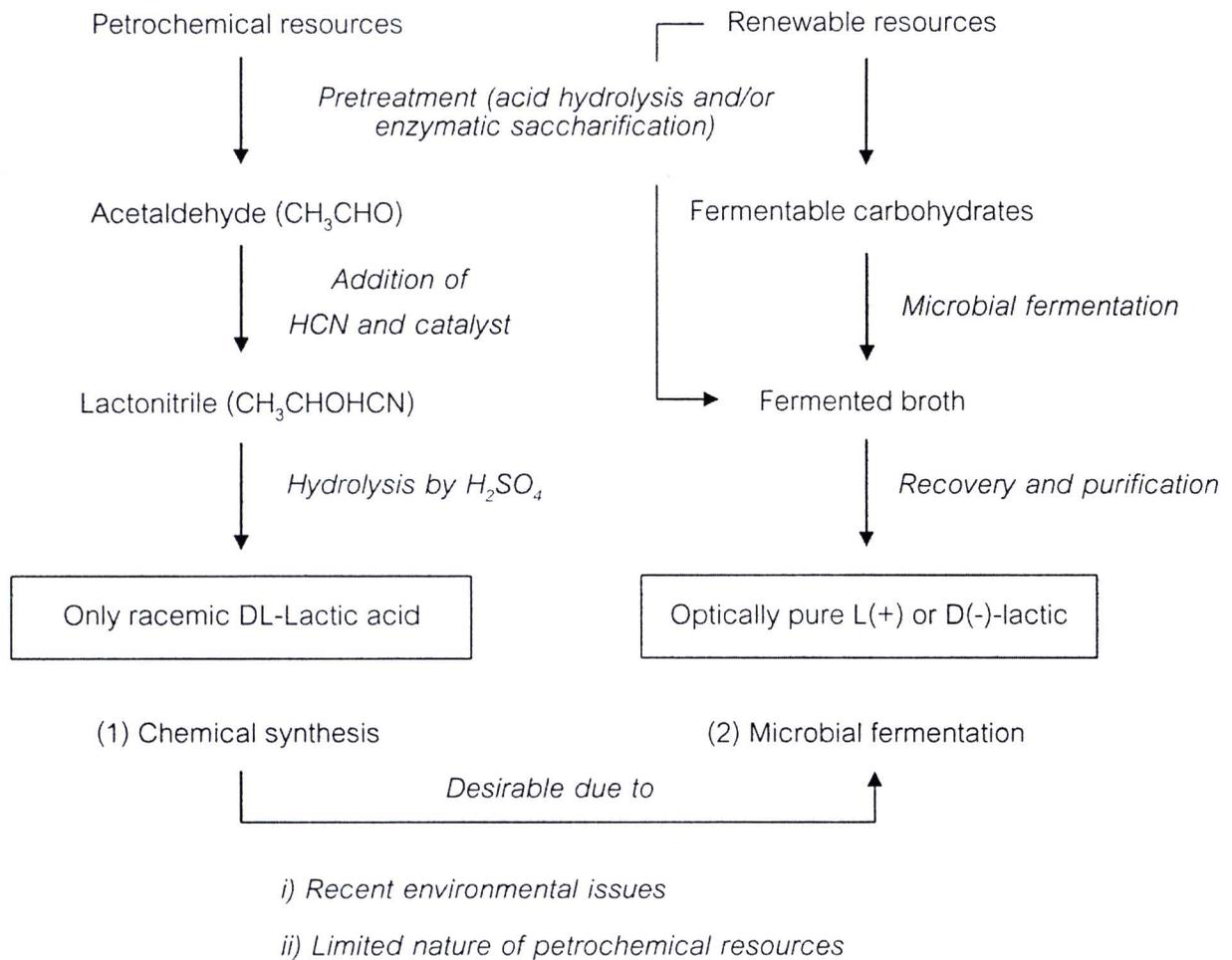
#### ขั้นตอนที่ 1:



#### ขั้นตอนที่ 2:







ภาพที่ 2.2 เปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (1) และกระบวนการหมัก (2) ที่มา: Wee และคณะ, 2006

### 2.3.2 การผลิตกรดแลกติกด้วยกระบวนการหมักโดยแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลกติกแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่เป็นโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ คือ จะผลิตกรดแลกติกเพียงอย่างเดียว ตัวอย่างของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Lactobacillus* sp. *Bacillus* sp. และ *Lactococcus* sp. เป็นต้น อีกกลุ่มคือ แบคทีเรียพวกเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟซึ่งนอกจากจะผลิตกรดแลกติกแล้วยังผลิตผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ (Hofvendahl และ Hahn-Hagerdal, 2000) ดังแสดงในภาพที่ 2.3 แบคทีเรียพวกโฮโมเฟอร์เมนเททีฟจะใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแล้วเข้าวิถี Emden-Meyerhof pathway (EMP) โดยการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวทจากนั้นจึงเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นกรดแลกติก โดยกลูโคสหนึ่งโมเลกุลสามารถผลิตกรดแลกติกได้สองโมเลกุล แต่บางครั้งถ้าภาวะในระหว่างการหมักแปรผันไม่เหมาะสม เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นของสารอาหารอันมีสาเหตุจากการกวนอย่างไม่ทั่วถึงในถังหมัก ก็



สามารถทำให้แบคทีเรียโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ เปลี่ยนวิถีของการสังเคราะห์ไปเป็นแบบ phosphoketolase (PK) ได้ ทำให้ผลผลิตของกรดแลกติกลดลง (สาโรจน์ ศิริคันสนีย์กุล, 2547 : 102) ส่วนพวกเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ กลูโคสหนึ่งโมเลกุลสามารถผลิตกรดแลกติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ อย่างละหนึ่งโมเลกุลออกมาด้วยการเข้าสู่วิถี phosphoketolase (PK) ในงานวิจัยของ Zhao และ Ding (2007) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจาก *Bacillus coagulans* B179 ทำการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 36.2 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ กลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

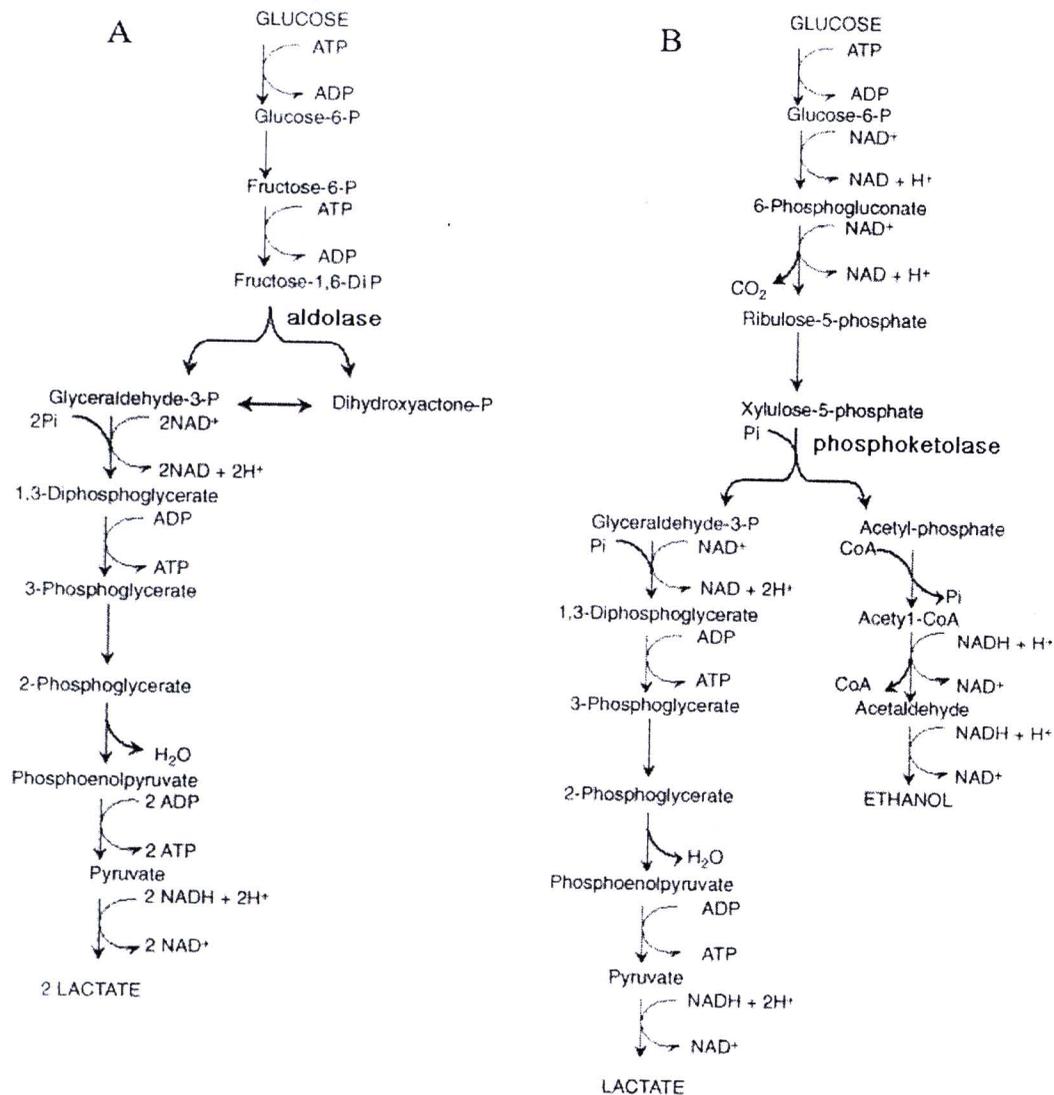
Michelson และคณะ (2006) พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Lactis* DSM 20073 ให้อัตราการผลิตกรดแลกติกสูงถึง 9.9 และ 5.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ ในการหมักแบบไม่ต่อเนื่องโดยใช้สารอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส 126 กรัมต่อลิตร Yeast autolysate 185.7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

### 2.3.3 การผลิตกรดแลกติกด้วยกระบวนการหมักโดยรา

ราที่สามารถผลิตกรดแลกติกเป็นราที่อยู่ในจีนัส *Rhizopus Mucor* และ *Monilia* เช่น *Rhizopus arrhizus* *R. Delmar* *R. elegans* *R. japonicus* *R. oryzae* *R. stolonifer* และ *R. chinensis* เป็นต้น สำหรับการผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้ *R. oryzae* เนื่องจากราสามารถผลิตกรดแอลแลกติกบริสุทธิ์จากแป้ง น้ำตาล รวมทั้งวัสดุการเกษตรที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบรวมทั้งกากน้ำตาลซึ่งมีราคาถูก เนื่องจากรามีอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่สามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล (Wee และคณะ, 2006) ในภาวะที่มีอากาศ สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เช่นเกลือแอมโมเนียมหรือไนเตรด อีกทั้งไม่ต้องการวิตามินหรือกรดอะมิโนเสริมในกระบวนการหมักเหมือนแบคทีเรีย จึงทำให้กระบวนการหมักด้วย *R. oryzae* มีต้นทุนการผลิตทั้งด้านวัตถุดิบและกระบวนการแยกบริสุทธิ์หลังกระบวนการหมักที่ต่ำกว่าการหมักด้วยแบคทีเรีย นอกจากนี้กระบวนการหมักกรดแลกติกจากราสามารถผลิตที่อุณหภูมิ



สูงและพีเอชต่ำ ซึ่งจะช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ รมมีการหมักแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ การหมักกรดแลกติกโดยราเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้นในสภาวะที่มีการให้อากาศจะให้กรดแลกติก 1.5 โมลต่อโมลของกลูโคส งานวิจัยของ Mirdamadi และคณะ (2002) ได้ทำการเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกระหว่างแบคทีเรียและรา พบว่า สายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลกติกได้สูงได้แก่ *R. oryzae* PTCC 5263 *Lactobacillus plantarum* PTCC 1058 และ *L. bulgaricus* PTCC 1332 โดยสายพันธุ์ *Lactobacillus* sp. จะผลิตกรดแลกติกที่เป็นไอโซเมอร์ผสมโดยมีกรดดีแลกติกอยู่ประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง *R. oryzae* PTCC 5263 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 160 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า  $Y_{P/S}$  เท่ากับ 84 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 4.10 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เทียบกับ *L. plantarum* PTCC 1058 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 27 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า  $Y_{P/S}$  เท่ากับ 15 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.56 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ *L. bulgaricus* PTCC 1332 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 30 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า  $Y_{P/S}$  เท่ากับ 16.67 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.62 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตร ทำการหมักในระดับขวดเขย่าแบบไม่ต่อเนื่อง แต่เนื่องจากลักษณะสัณฐานวิทยาของราที่เป็นเส้นใย ทำให้กระบวนการหมักกรดแลกติกด้วยอาหารเหลวด้วยเซลล์แขวนลอยของ *R. oryzae* ในถังกวนมักจะประสบปัญหาเรื่องเส้นใยราพันรอบแกนหมุนและใบพัด และเจริญเติบโตเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนตรงส่วนใดส่วนหนึ่งของถังหมัก ทำให้เกิดปัญหาถ่ายเทอากาศและอาหารภายในถังหมักซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อการเจริญของรา และลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักจะมีผลต่อการผลิตกรดแลกติก ถึงแม้จะมีวิธีการยัดตริงเซลล์จึงถูกนำมาใช้ในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานของรา แต่ก็ต้องทำการออกแบบแม่แบบที่จะใช้สำหรับตริงเซลล์ ซึ่งเป็นอีกขั้นตอนที่ยุ่งยากและวัสดุที่เลือกมาทำแม่แบบต้องไม่ส่งผลอันตรายกับเซลล์ ดังนั้นการหมักแบบอาหารแข็งซึ่งเป็นกระบวนการหมักที่สามารถใช้วัตถุดิบทางการเกษตรมาทำหน้าที่เป็นตัวยัดเกาะให้กับรา *R. oryzae* ได้โดยตรงและยังเป็นแหล่งอาหารในตัวที่ราสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ ออกมาซึ่งนอกจากจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการออกแบบแม่แบบสำหรับใช้ในการตริงเซลล์แล้ว ยังช่วยลดขั้นตอนการย่อยแบ่งด้วยเอนไซม์หรือกรดก่อนนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักและทำให้ผลิตภัณฑ์เข้มข้นก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์ เนื่องจากการหมักแบบอาหารแข็งใช้น้ำในระบบน้อยทำให้ผลผลิตที่ได้จึงมีความเข้มข้นสูงกว่าการหมักแบบอาหารเหลว

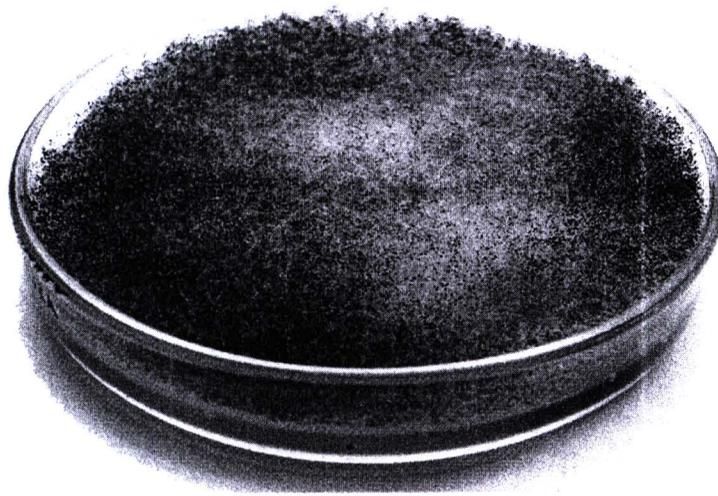


ภาพที่ 2.3 เมแทบอลิซึมการผลิตกรดแลกติกแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟด้วยวิถี glycolysis, Embden-Meyerhof-Parnas (A) และเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟด้วยวิถี phosphoketolase (B) จากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ที่มา : [http://textbookofbacteriology.net/lactics\\_2.html](http://textbookofbacteriology.net/lactics_2.html)

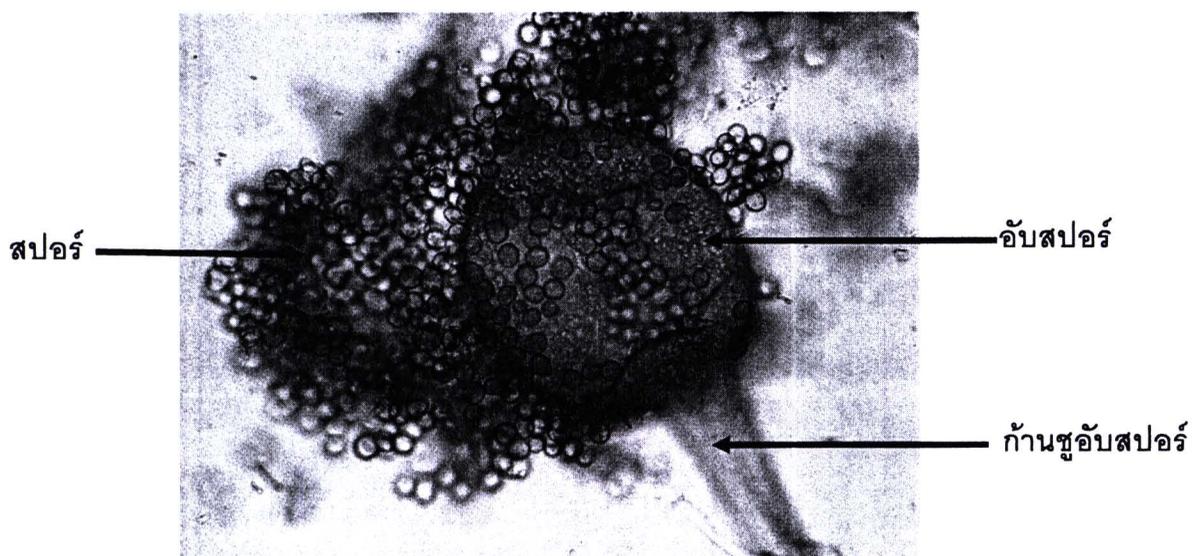
หมายเหตุ (P = phosphate, ADP = adenosine 5'-diphosphate, ATP = adenosine 5'-triphosphate, NAD<sup>+</sup> = nicotinamide adenine dinucleotide, NADH = nicotinamide adenine dinucleotide)

#### 2.4 ลักษณะและวิถีเมแทบอลิซึมของ *Rhizopus oryzae*

รา *R. oryzae* ถูกจัดอยู่ใน Order Mucorales Family Mucoraceae เส้นใยไม่มีผนังกันเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่จะสร้างสปอร์สีดำ ดังแสดงในรูปที่ 2.4 มีอับสปอร์ลักษณะค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40-350 ไมโครเมตรอยู่ที่ปลายก้านชูอับสปอร์ซึ่งมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงสีน้ำตาลอมดำ สปอร์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4-11 ไมโครเมตรลักษณะกลม หรือรูปไข่ (Ellis, 1997) แสดงดังภาพที่ 2.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต คือ 35 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญเติบโตได้ คือ 5-7 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญเติบโตได้ คือ 44-49 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 2.4 ลักษณะของรา *Rhizopus oryzae* ที่เจริญอยู่บนอาหารสังเคราะห์



ภาพที่ 2.5 ลักษณะอับสปอร์และสปอร์ของรา *R. oryzae* ที่มา: [www.flickr.com](http://www.flickr.com)

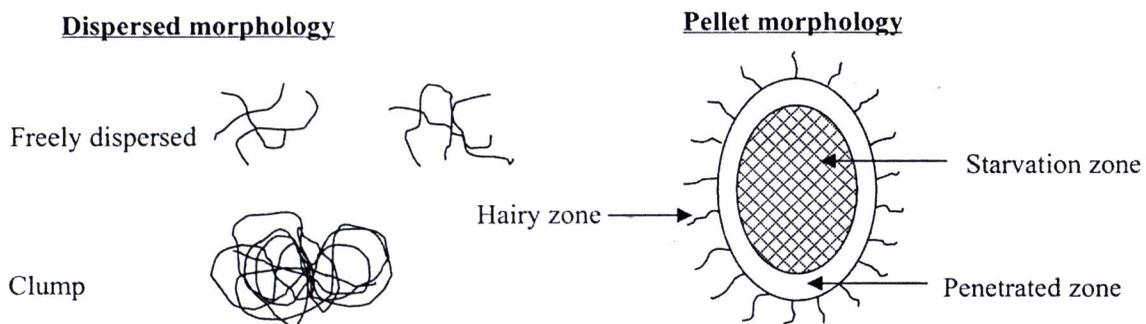
ในกระบวนการหมักในอาหารเหลวลักษณะทางสัณฐานของราจะถูกกำหนดโดยสภาวะแวดล้อมภายในถังหมัก เช่น อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ อัตราการให้อากาศ อัตราการกวน เป็นต้น ลักษณะทางสัณฐานทั่วไปของราแบ่งเป็น 2 กลุ่มได้แก่ Disperse mycelia และ Pellets (ภาพที่ 2.6) ซึ่ง Disperse mycelia ยังแบ่งเป็น Freely disperse และ Mycelial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

### ลักษณะการเจริญแบบ Pellets แบ่งได้เป็น

The outer zone หรือ Hairy zone เป็นส่วนที่อยู่บริเวณรอบนอกของ Pellets มีลักษณะคล้ายขน ซึ่งขนเหล่านี้ทำหน้าที่ในการดูดซึมแร่ธาตุอาหารและอากาศเพื่อใช้ในการเจริญของเซลล์และผลิตกรดแลกติก

Penetrated zone เป็นโซนที่อยู่ถัดเข้ามาอีกชั้นของ Pellets ในโซนนี้แร่ธาตุอาหารและอากาศสามารถซึมผ่านเข้าถึงเซลล์ได้ ทำให้เซลล์เกิดกิจกรรมในการผลิตสารเมแทบอลิซึม ซึ่งขนาดของโซนขึ้นกับความหนาแน่นของ Pellets อัตราการเจริญและความเข้มข้นของอากาศที่ละลายในอาหาร

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

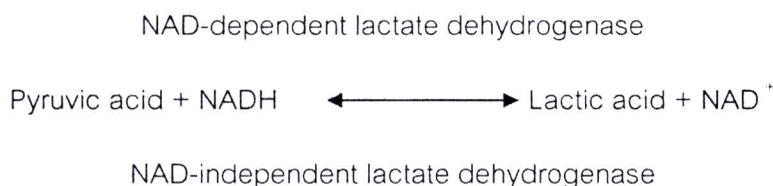


ภาพที่ 2.6 ลักษณะทางสัณฐานของรา

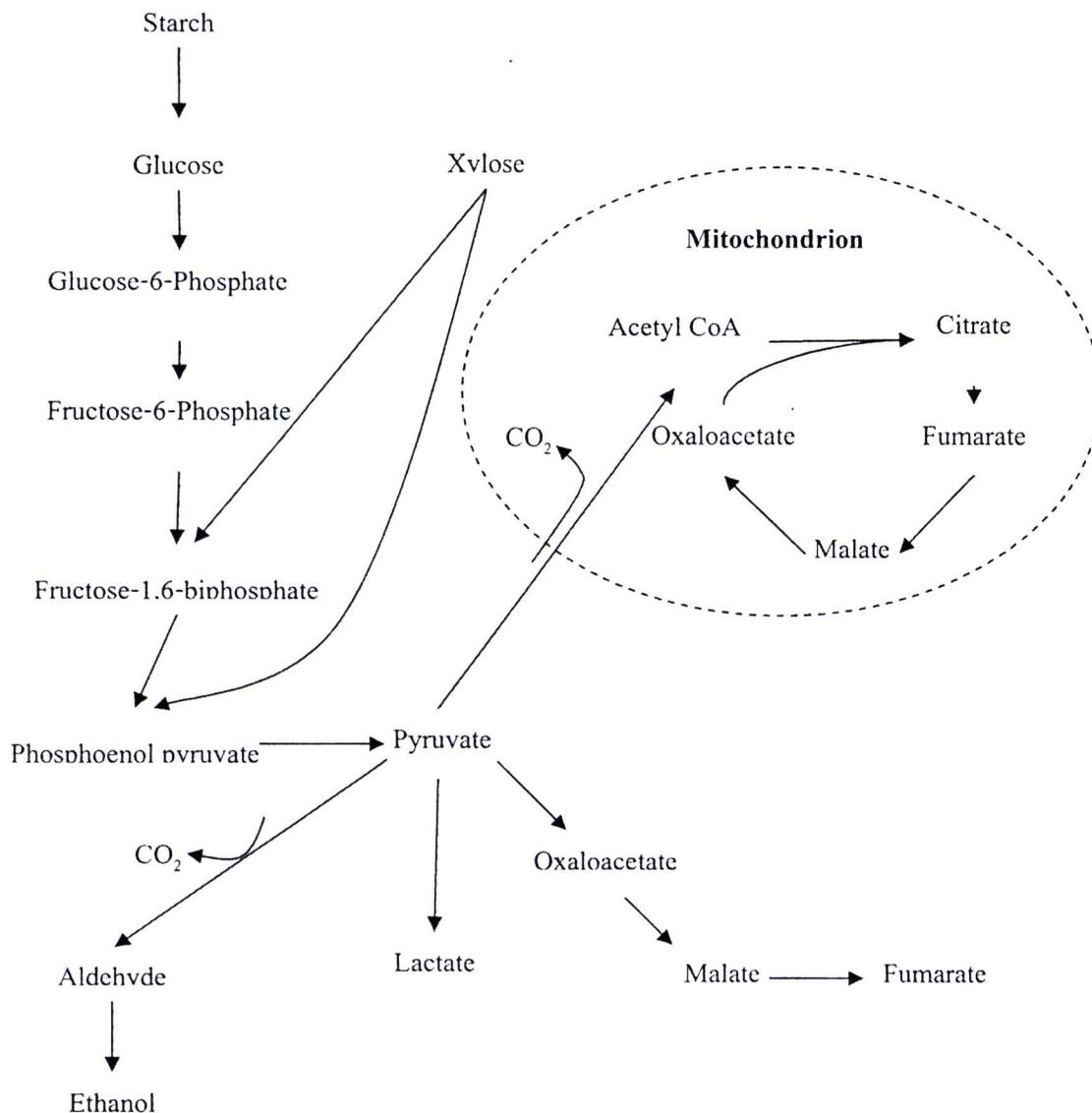
ที่มา : ดัดแปลงจาก Thongchul, 2005



ในงานวิจัยของ Wright และคณะ (1996) ได้ศึกษาแบบจำลองวิถีเมแทบอลิซึมของกลูโคส และพัฒนาแบบจำลองวิถีเมแทบอลิซึมของรา *R. oryzae* จากทฤษฎีการควบคุมวิถีเมแทบอลิซึม (Metabolic control theory) ภายใต้ภาวะที่ปัจจัยที่ถูกควบคุมต่างๆ คงที่ ด้วยการติดตาม ( $^{14}\text{C}$ )-กลูโคสในวิถีไกลโคไลซิสและวัฏจักร TCA ดังรูปที่ 2.7 พบว่า รา *R. oryzae* สามารถใช้แป้งเป็นแหล่งอาหารได้โดยตรง เนื่องจากในรามืออะไมเลสเพื่อใช้ในการย่อยโมเลกุลของแป้งโดยเปลี่ยนแป้งเป็นกลูโคส จากนั้นจึงเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวท โดยวิถี Emden-Meyerhof pathway (EMP) นอกจากนี้ รายังสามารถใช้น้ำตาลไซโลสเป็นสารตั้งต้นโดยเปลี่ยนไซโลสเป็นไพรูเวทโดยวิถีเพนโตสฟอสเฟต (HMP) ถ้าอยู่ในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสและปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงราจะเปลี่ยนไพรูเวทเป็นแลคเตทด้วย NAD- dependent แลกเตทดีไฮโดรจีเนส (Pritchard, 1973) โดยมี NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน แต่ในสภาวะที่ปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อหมด หรือเมื่อรามีการสร้างสปอร์ ค่าแอกติวิตีของแลคเตทดีไฮโดรจีเนสจะลดลง จะเกิดการเปลี่ยนแลคเตทกลับมาเป็นไพรูเวทได้ด้วย NAD-independent แลกเตทดีไฮโดรจีเนส ดังสมการ



นอกจากนี้ไพรูเวทที่เกิดขึ้นยังถูกนำเข้าสู่วัฏจักร TCA ในไมโทคอนเดรียเพื่อสร้างเซลล์และพลังงานหรือเปลี่ยนเป็นกรดฟูมาริก สำหรับในภาวะที่ถูกจำกัดด้วยอากาศ ราจะเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นเอทานอลด้วยแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ดังนั้นในการผลิตกรดแลคติกโดยกระบวนการหมักด้วยรานอกจากได้กรดแลคติกแล้วยังอาจได้ผลิตภัณฑ์อื่น เช่น กรดฟูมาริก คาร์บอนไดออกไซด์ และเอทานอลขึ้นกับสภาวะที่ใช้ในการ ดังนั้นการรักษาระดับออกซิเจนที่ละลายภายในถังหมักจึงมีความสำคัญต่อกระบวนการผลิตกรดแลคติก (Bai และคณะ, 2003)



ภาพที่ 2.7 กระบวนการเมแทบอลิซึมของกลูโคสในรา *R. oryzae*

ที่มา : Thongchul, 2005

## 2.5 การหมักแบบอาหารแข็ง

การหมักแบบอาหารแข็ง (solid state fermentation) หมายถึง การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บนอาหารแข็งที่มีความชื้น ในสถานะที่ไม่มีน้ำอิสระ แบบที่เรีย ยีสต์ และรา จำนวนมากมายที่สามารถเจริญอยู่บนอาหารแข็งซึ่งถูกค้นพบและนำไปประยุกต์เข้าสู่กระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง วัสดุที่นำมาใช้ในการหมักมีมากมายหลากหลาย สามารถแบ่งได้สองประเภทหลัก คือ inert materials เป็นพวกที่มีไว้สำหรับให้พวกจุลินทรีย์ใช้เป็นที่ยึดเกาะเท่านั้น และ non-inert materials หรือ support- substrate เป็นพวกที่ไม่ได้มีหน้าที่เป็นที่ยึดเกาะให้กับจุลินทรีย์อย่างเดียว แต่ยังเป็นแหล่งสารอาหารด้วย วัสดุประเภทนี้มักเป็นพวกที่มีแป้งหรือลิกโนเซลลูโลส

เป็นองค์ประกอบ มักเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเกษตรกรรมเป็นหลัก หรือของเหลือทิ้งจากโรงงานเกษตร เช่น พวงกตพืชและ byproduct การหมักแบบอาหารแข็งถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ มากมาย เช่น antibiotics, surfactants, biocides and enzymes อย่างไรก็ตามมีรายงานที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์พวกกลูโคสในไลติกบั๋งที่ใช้พวก inert supports ด้วยการหมักแบบอาหารแข็ง ถึงแม้ว่าในการเก็บผลผลิตนั้นจะทำได้ง่ายกว่าการใช้พวก natural supports เพราะเป็นผลิตภัณฑ์ที่ออกมาออกเซลล์ จึงง่ายต่อการแยกออกมาจากตัวค้ำจุณและมีสิ่งที่เป็นปนเปื้อนน้อยกว่า แต่อาหารที่ใช้มีราคาแพงมาก ดังนั้นการใช้พวก natural support เช่น ของที่เหลือจากการเกษตรกรรม จึงช่วยลดต้นทุนด้านวัตถุดิบ และยังเป็น การเปลี่ยนมูลค่าของที่มีมูลค่าต่ำให้เป็นของที่มีมูลค่าสูงได้ เช่น การผลิตเอนไซม์ เป็นต้น แต่การหมักแบบอาหารแข็งมักไม่เป็นที่นิยมใช้ในการผลิตตัวเซลล์หรือใช้ในการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ เนื่องจากการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยตรงทำได้ยาก และเชื้อบางส่วนเจริญอยู่ในอาหารแข็ง ซึ่งยากต่อการแยกออกจากกัน ทำให้เก็บเกี่ยวตัวเซลล์ได้น้อย ในส่วนของการติดตามการเจริญเติบโตต้องใช้วิธีการติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อทางอ้อมแทน เช่น การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน (glucosamine) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเส้นใยรา (mycelia) ออกออสเตอรอล (ergosterol) ATP หรือ กรดนิวคลีอิก (nucleic acids) และการวัดกิจกรรมทางชีวภาพ เช่น กิจกรรมเอนไซม์ (enzymatic activity) อัตราการหายใจ (respiration)

อย่างไรก็ตามราเส้นใย (filamentous fungi) ก็ยังเป็นกลุ่มที่น่าสนใจที่สุดในพวงกตทั้งหลาย เนื่องจากลักษณะสัณฐานวิทยาเหมาะสมในการเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง ช่วงระยะเวลาในการเจริญของรานั้น จะมีการสร้างและปล่อยเอนไซม์ออกมา มีการสร้างผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าที่ได้จากการกระบวนการเมแทบอลิท์ ซึ่งเป็นการใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพต่ำ เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง การหมักแบบอาหารแข็งส่วนใหญ่นิยมใช้ในการผลิตเอนไซม์ อาหารสัตว์ และผลิตภัณฑ์ต่างๆ ในทางเภสัชกรรมและเกษตรกรรม ดังแสดงผลิตภัณฑ์ในตารางที่ 2.2 และ 2.3 และตัวอย่างในงานวิจัย Lu และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตกรดซิตริก (citric acid) ด้วย *Aspergillus niger* ภายใต้กระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้ถังหมักแบบ packed-bed มี Kumara (หรือ sweet potato) ซึ่งเป็นพวงกตพืชหัวใต้ดิน มาทำการสับให้เป็นชิ้นเล็กๆ ทรงลูกบาศก์ เพื่อนำมาใช้เป็นซับสเตรท สามารถผลิตกรดซิตริก 0.82 กรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักเปียก kumara ต่อชั่วโมง

Kumar และ Lonsane (1990) ได้ศึกษาอิทธิพลของปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ ปริมาณความชื้น ระยะเวลาในการนึ่งฆ่าเชื้อ อัตราส่วนของกล้าเชื้อ และ อัตราส่วนระหว่างรำข้าวสาลีเปียกชื้นกับปริมาตรขวดเขย่าที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง และสารอาหาร ได้แก่ ความเข้มข้นของยูเรีย

และ  $MgSO_4$  ที่มีต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก (gibberellic acid) โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นซัพสเตรต ร่วมกับเชื้อ *Gibberella fujikuroi* P-3 พบว่า ปริมาณความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการนึ่งฆ่าเชื้อ 45 นาที อัตราส่วนของกล้าเชื้อ 20 เปอร์เซ็นต์ และ อัตราส่วนระหว่างความหนาแน่นรำข้าวสาลี เปียกขึ้นกับปริมาตรขวดเขย่าที่ 0.024 (เซนติเมตรต่อมิลลิลิตร) ที่เหมาะสมสุดให้ผลผลิตกรดจิบเบอเรลลิกสูงสุด คือ 365 1,039 1,053 1,116 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม DMB ตามลำดับ การเติมยูเรีย ในปริมาณ 70 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ เป็นปริมาณที่เหมาะสม โดยให้กรดจิบเบอเรลลิกสูงสุด 991 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม DMB ส่วนปริมาณที่เหมาะสมของ  $MgSO_4$  อยู่ที่ 0.007 กรัมเปอร์เซ็นต์ ให้กรดจิบเบอเรลลิก 1024 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม DMB

Sharma และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดกลูโคนิก (gluconic acid) ใช้กากชาทำหน้าที่เป็นตัวค้ำจุนและกากน้ำตาลเป็นอาหารด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง ด้วยเชื้อ *Aspergillus niger* (ARNU-4) ที่ดัดแปลงให้มีความทนทานต่อพวกโลหะ โดยทำการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ เช่น ปริมาณความชื้น อุณหภูมิ การให้อากาศ และขนาดของกล้าเชื้อ พบว่า ปริมาณความชื้น 70 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 2.5 ลิตรต่อนาที และขนาดของกล้าเชื้อ 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่สามารถเก็บผลผลิตของกรดกลูโคนิกเท่ากับ 76.3 กรัมต่อลิตร

Aikat และ Bhattacharyya . (2000) ได้ศึกษาการผลิตโปรติเอส (protease) ด้วย *Rhizopus oryzae* โดยใช้รำข้าวสาลี 10 กรัม ผสมกับสารละลาย Czapek Dox 60 มิลลิลิตร ที่มีองค์ประกอบ (ต่อลิตร) ได้แก่  $NaNO_3$  2.5 กรัม  $KH_2PO_4$  1.0 กรัม  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 กรัม และ KCl 0.5 กรัม โดยบรรจุใส่ลงในจานเพาะเชื้อ (Petri dish) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน สามารถเก็บเกี่ยวโปรติเอส 60 ยูนิตต่อกรัมรำข้าวสาลี โดยใช้น้ำกลั่นเป็นสารชะล้างโปรติเอสออกมา

Soni และคณะ (2003) ใช้จุลินทรีย์ 2 ตัว ได้แก่ *Bacillus* sp. AS-1 ในการผลิตแอลฟา-อะไมเลส และ *Aspergillus* sp. ในการผลิตกลูโคอะไมเลส โดยใช้ถังหมักแบบถาด ซึ่งแต่ละถาดจะบรรจุรำข้าวสาลี 100 กรัมที่เติมน้ำกลั่นลงไป 125 มิลลิลิตร ปรับให้หนา 1 เซนติเมตร เป็นอาหารหลัก ในการผลิตแอลฟา-อะไมเลสจะใช้อาหารหลักร่วมกับการเติมสารอาหารเสริม ได้แก่ กลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อน้ำหนักถั่วเหลืองบด (soybean meal) 0.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อน้ำหนัก และ 0.01 M  $MnSO_4$  นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับการผลิตกลูโคอะไมเลส ใช้อาหารหลักร่วมกับแลคโทส 1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อน้ำหนัก ถั่วเหลืองบด 1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อน้ำหนัก และ 0.01 M  $CaCl_2$  นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 96 ชั่วโมง สามารถเก็บเกี่ยวแอลฟา-อะไมเลสได้ 198950 ยูนิตต่อกรัมแห้งของรำข้าวสาลี และกลูโคอะไมเลส 3426 ยูนิตต่อกรัมแห้งของรำข้าวสาลี ที่ชั่วโมงที่ 48 และ 96 ตามลำดับ

Selvakumar และคณะ (1998) ศึกษาการผลิตกลูโคอะไมเลสด้วยการหมักแบบอาหารแข็งด้วย *Aspergillus niger* โดยใช้กากชาที่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นซบสเตรท โดยใช้กากชาแห้ง 25 กรัม ร่วมกับการเติมสารละลายที่ประกอบด้วยแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.5 กรัม  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 กรัม  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.8 มิลลิกรัม  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  8.7 มิลลิกรัม  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2.5 มิลลิกรัม และ  $\text{CaCl}_2$  3.5 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม น้ำหนักแห้งของซบสเตรท ค่าความเป็นกรด-ด่างและความชื้นเริ่มต้น 4.5 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นำไปหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตของกลูโคอะไมเลส 198.4 ยูนิตต่อกรัม น้ำหนักแห้งของกากชา ที่ชั่วโมงที่ 96

ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดแลคติก ราเส้นใยในตระกูล *Rhizopus sp.* เช่น *R. oryzae* และ *R. arrhizus* ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถผลิตกรดแลคติกบริสุทธิ์ในสภาวะที่มีอากาศจากแป้ง น้ำตาล รวมทั้งวัสดุการเกษตรที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เช่นเกลือแอมโมเนียมหรือไนเตรต และรามิเอนไซม์อะไมเลสที่สามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ทำให้ช่วยลดขั้นตอนในการแปรรูปวัตถุดิบ เช่น ขั้นตอนในการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์หรือกรดก่อนนำมาใช้เป็นตัววัตถุดิบในกระบวนการหมัก อีกทั้งไม่ต้องการไวตามินหรือกรดอะมิโนเสริมในกระบวนการหมักเหมือนแบคทีเรีย ซึ่งลักษณะดังที่ได้กล่าวมาเหมาะสมอย่างมากในการนำรา *Rhizopus sp.* มาใช้ในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่มีต้นทุนต่ำที่สามารถใช้วัตถุดิบทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอนได้โดยตรง ส่งผลให้การผลิตผลิตภัณฑ์มีต้นทุนที่ต่ำลง และใช้ปริมาณน้ำน้อย ผลิตภัณฑ์ที่เก็บเกี่ยวได้มีความเข้มข้นมากกว่าการหมักแบบอาหารเหลว ทำให้ลดขั้นตอนการทำให้ผลิตภัณฑ์เข้มข้นก่อน และกระบวนการแยกบริสุทธิ์หลังกระบวนการหมักที่ต่ำกว่าการหมักด้วยแบคทีเรีย ใช้พลังงานต่ำ และยังเกิดของเสียน้อยด้วย อาหารที่ใช้ในกระบวนการหมักมีองค์ประกอบที่ไม่ซับซ้อนและหาได้ง่ายอีกทั้งสามารถเป็นสารอาหารและเป็นแหล่งที่ราเกาะติดได้โดยตรง จึงทำให้กระบวนการหมักด้วย *Rhizopus sp.* มีความเป็นไปได้อย่างมากที่จะนำไปปรับปรุงและพัฒนาเพื่อให้อีกทางในการผลิตกรดแลคติก ซึ่งในปัจจุบันมีแนวโน้มต้องการที่สูงขึ้น ดังเช่นในงานวิจัยของ Oda และคณะ (2002) ศึกษาการหมักกรดแลคติกแบบอาหารแข็งพบว่า *R. oryzae* IFO 4707 ให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงสุด 10 มิลลิกรัมต่อกรัมแหล่งคาร์บอนดิบภายใน 6 วัน โดยแหล่งคาร์บอนที่ศึกษา ได้แก่ กากมันฝรั่งซึ่งประกอบด้วยแป้ง เซลลูโลส เฮมิ

เซลลูโลส และเพคติน โดยเชื้อ *R. oryzae* IFO 4707 สร้างอะไมเลสเพื่อย่อยกากมันฝรั่งได้อย่างรวดเร็วโดยเปลี่ยนแป้งในกากเป็นกลูโคสแล้วนำไปผลิตกรดแอล(+)แลกติกได้ภายใน 1 วัน สังเกตได้จากค่าความเป็นกรด-ด่างที่ลดลง นอกจากนี้ จากการศึกษาส่วนประกอบต่างๆ ในกากมันฝรั่งก่อนและหลังหมัก พบว่า ปริมาณแป้งในกากมันฝรั่งเริ่มต้นที่ 33.4 เปอร์เซ็นต์มวลแห้งถูกนำไปใช้อย่างต่อเนื่อง จนเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักมีปริมาณแป้งเหลืออยู่ในกากมันฝรั่งเพียง 7.6 เปอร์เซ็นต์มวลแห้ง ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 77.25 ของปริมาณแป้งที่ถูกนำไปใช้ต่อปริมาณแป้งเริ่มต้น

Ruengruglikit และ Hang (2003) ศึกษาการผลิตกรดแอล(+)แลกติกแบบอาหารแข็งจากซังข้าวโพด (corncoobs) ที่ผ่านการย่อยด้วย 0.1 N NaOH (ซังข้าวโพด 5 กรัมต่อ 0.1 N NaOH 100 มิลลิลิตร) โดยใช้กล้าเชื้อระยะ conidia ที่ความเข้มข้น  $10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตรของ *R. oryzae* NRRL 395 โดยแปรปริมาณซังข้าวโพดที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและตัวค้ำจุณ ปริมาณ  $\text{CaCO}_3$  และ Rapidase Pomaliq พบว่าได้ผลผลิตกรดแอล(+)แลกติกสูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง ( $299.4 \pm 6.8$  กรัมกรดแอล(+)แลกติกต่อกิโลกรัมของซังข้าวโพดแห้ง) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณของซังข้าวโพดแห้ง 5 กรัม ปริมาณ  $\text{CaCO}_3$  0.2 กรัม และปริมาณเอนไซม์ Rapidase Pomaliq 0.5 มิลลิลิตร ต่อ 0.1 N NaOH 100 มิลลิลิตรที่ใช้ในการย่อยซังข้าวโพดแห้ง

จากงานวิจัยของ Soccol (1994) พบว่า *R. oryzae* NRRL 395 สามารถผลิตกรดแอล(+)แลกติกได้สูงสุด 1.44 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยทำการหมักบนกากอ้อยที่มีสารละลายกลูโคสและ  $\text{CaCO}_3$  ใน glass column reactor ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่อัตราการให้อากาศ 1.21 กรัมต่อชั่วโมงต่อคอลัมน์ เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักในอาหารเหลวในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในอาหารที่มีองค์ประกอบ (ต่อลิตร) ได้แก่ กลูโคส 120 กรัม  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.1 กรัม  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25 กรัม  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.04 กรัม ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 125 กรัมต่อลิตรต่อนาที่ อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที่ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าได้ผลผลิตของกรดแอล(+)แลกติก น้อยกว่า (1.38 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)



ตารางที่ 2.2 ผลิตภัณฑ์สารอินทรีย์ สารชีวภาพ และอื่นๆ ที่ได้จากการหมักแบบบนอาหารแข็ง

Substrates	Microorganisms	Processes/products	References
Cassava bagasse; cassava crude	<i>Rhizopus sp.</i>	Protein enrichment; growth kinetics; biotransformation of cassava crude	Soccol และคณะ (1994), (1995), (1996), (1997)
Cassava bagasse	<i>Aspergillus niger</i>	Citric acid	Vandenberghe และคณะ (1999),(2000) Kolicheski และคณะ (1997) Soccol และคณะ (1994), (1998) Barbosa และคณะ (1997)
Sugarcane bagasse	<i>Rhizopus oryzae</i>	Lactic acid	Beaux และคณะ (1997)
Cassava bagasse	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Mushrooms	Leifa และคณะ (2000)
Coffee residues	<i>Lentinus edodes</i> <i>Flamulina velutipes</i> <i>Pleurotus ostreatus</i>	production	Fan และคณะ (1999), (2001) Bramorski และคณะ (1998)
Cassava bagasse and coffee husks	<i>Klyveromyces marxianus;</i> <i>Ceratocystis filbriata</i> and <i>Rhizopus sp.</i>	Aroma production	Christen และคณะ (2000) Soares และคณะ (2000) Medeiros และคณะ (2000) Brand และคณะ (2000) Soccol และคณะ (1997)
Sugarcane bagasse	<i>Molus prunifolia</i> <i>Borkh</i>	Plant cell culture	Radjiskumar และคณะ (2001)
Coffee husk	<i>Gibberella fugikuroi</i>	Hormones (gibberellic acid)	Machado และคณะ (2000), (2002)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Soccol และคณะ (2003)

ตารางที่ 2.3 เอนไซม์ที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง

Substrates	Microorganisms	Enzymes	References
Rice straw	<i>Trichoderma reesei</i>	Cellulase	Eun และคณะ(2006)
	<i>Bacillus licheniformis</i>	Hemicellulase Protease Endo- $\beta$ -glucanase	
Barley	<i>Talaromyces emersonii</i>	Xylanase	McCarthy และคณะ (2005)
Corn silage	<i>Thermoascus</i>	Endoglucanase	Colombatto และคณะ(2004)
Corn stalk	<i>aurantiacus</i>	Celobiohydrolase	Panagiotou และคณะ (2003)
	<i>Fusarium oxysporum</i>	$\beta$ -Glucosidase Xylanase, $\beta$ -Xylosidase CMCase	
Corn straw	<i>Penicillium decumbens</i>	Cellulase, xylanase	Yang และคณะ (2001)
Alfalfa	<i>Gliocladium spp.</i>	Endoglucanase	Hodrova และคณะ (1998)
	<i>Orpinomyces joyonii</i>	$\beta$ -Glucosidase	
	<i>Caecomyces communis</i>	Cellulase, hemicellulase	
Forage silage	<i>Streptomyces</i>	Cellulase	Romero และคณะ (1999)
	<i>Achromogenes</i>	Cellulase, hemicellulase	
Wheat straw	<i>Neurospora crassa</i>	Lignin peroxidase	Peiji และคณะ (1997)
	Several fungi	Ligninase	
Sugarcane bagasse	<i>Trichoderma reesei</i>		Zadrazil และ Puniya (1995)
	<i>Phanerochaete</i>		
	<i>chrysosporium</i>		
	<i>Coriolus versicolor</i>		
	<i>Streptomyces</i>		
	<i>viridosporus</i>		
	White rot fungi		

### ตารางที่ 2.3 เอนไซม์ที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง (ต่อ)

Substrates	Microorganisms	Enzymes	References
Sugarcane bagasse, wheat straw, corn cobs, rice husks, peanut shells, etc	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Cellulase, xylanase	El-Nasser และคณะ (1997)
Soy husks	<i>Coriolus versicolor</i>	Glucanase Cellulase	Jha และคณะ (1995)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Graminha และคณะ (2008)

#### 2.5.1 จุดเด่นของการหมักแบบอาหารแข็ง

ในปัจจุบันเทคโนโลยีการหมักแบบอาหารแข็งนิยมนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ กรดอินทรีย์ต่างๆ เป็นจำนวนมาก ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว การหมักแบบอาหารแข็งมีข้อเด่นกว่าการหมักแบบอาหารเหลวอยู่หลายข้อ ดังแสดงในตารางที่ 2.4 และสอดคล้องกับงานวิจัย Ashokkumar (2001) ได้ศึกษาเปรียบเทียบอิทธิพลของส่วนประกอบอาหารที่มีต่อการผลิตเบต้า-ฟรุคโตฟูรานซิเดส ( $\beta$ -fructofuranosidase) ภายใต้การหมักแบบอาหารเหลวและอาหารแข็งด้วยรา *Aspergillus niger* โดยส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ในการหมักแบบอาหารเหลว (ต่อลิตร) คือ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  45 กรัม  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  23 กรัม  $\text{FeSO}_4$  0.1 กรัม  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  7 กรัม ซูโครส 50 กรัม ยูเรีย 11 กรัม และสารสกัดยีสต์ 5 กรัม มีค่ากรด-ด่างเริ่มต้น 5.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วใช้กล้าเชื้อที่มีความเข้มข้นของสปอร์  $10^5$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 190 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง ส่วนองค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการหมักแบบอาหารแข็ง คือ กากอ้อย 10 กรัม ที่ผสมกับอาหารที่ใช้ในการหมักแบบอาหารเหลวปริมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมด ค่ากรด-ด่างเริ่มต้น 5.0 ใช้กล้าเชื้อที่มีความเข้มข้นของสปอร์  $10^7$  สปอร์ต่อกรัมของกากอ้อย นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง พบว่าอัตราการผลิตของเบต้า-ฟรุคโตฟูรานซิเดสที่ได้จากการหมักแบบของแข็ง คือ 81.8 ยูนิตต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ชั่วโมง 72 มากกว่าการหมักแบบอาหารเหลวที่ได้ 18.3 ยูนิตต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ชั่วโมง 120 ซึ่งมากกว่าถึง 5 เท่า

Sandhya และคณะ (2005) แสดงให้เห็นชัดเจนว่าผลผลิตเอนไซม์โปรติเอส (protease) จากกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งดีกว่าการหมักแบบอาหารเหลว โดยใช้ของเหลือจากเกษตรกรรมหลายชนิดมาเป็นซับสเตรท พบว่า รำข้าวสาลีเป็นแหล่งอาหารที่เหมาะสมและดีที่สุดในการผลิตโปรติเอสด้วยรา *A. oryzae* NRRL1808 ได้ผลผลิตโปรติเอสจากการหมักแบบอาหารแข็ง 31.2 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้งของซับสเตรท และได้จากการหมักแบบอาหารเหลว 8.7 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้งของซับสเตรท ซึ่งน้อยกว่าการหมักแบบอาหารแข็ง 3.5 เท่า

Nair และคณะ (2008) ทำการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตไซลานเนส (xylanase) ด้วยรา 34 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตไซลานเนสได้โดยคัดเลือกจาก clear zone ของราที่เจริญอยู่บนอาหาร Czapek's agar ระหว่างการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้รำข้าวสาลีและเติมสารละลายเกลือแร่ธาตุที่มีองค์ประกอบ (ต่อลิตร) ดังนี้ KCl 0.5 กรัม  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5 กรัม  $(NH_4)_2HPO_4$  2.5 กรัม  $NaH_2PO_4$  0.5 กรัม  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.01 กรัม  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01 กรัม  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.002 กรัม และ birch wood xylan 1.0 กรัม เป็นการเพิ่มความชื้นให้กับซับสเตรทกับการหมักแบบอาหารเหลวโดยใช้อาหารเหมือนกัน ยกเว้น รำข้าวสาลี พบว่า ทั้ง 34 สายพันธุ์สามารถให้ผลผลิตไซลานเนสจากการหมักแบบอาหารแข็งมากกว่าการหมักแบบอาหารเหลว ดังแสดงในตารางที่ 2.5 ซึ่งสอดคล้องกับผลของ Malavizhi (2003) ที่สามารถเพิ่มผลผลิตของไซลานเนสด้วยเชื้อ *Ganoderma lucidum* จากการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นประมาณ 30 เท่าเมื่อเทียบกับผลผลิตที่ได้จากการหมักแบบอาหารเหลว

Vintila และคณะ (2009) ทำการศึกษาเปรียบเทียบอัตราการผลิตและประสิทธิภาพของกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งกับแบบอาหารเหลวมีข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเซลลูเลสโดยรา *Trichoderma* 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *T. viride* ATCC13.631 กับ *T. viride* CMGB1 และคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลผลิตเอทานอลในสภาวะที่อุณหภูมิสูงได้ดี พบว่าการใช้ *T. viride* ATCC13.631 ในการหมักแบบอาหารแข็งให้ประสิทธิภาพสูงถึง 660 เปอร์เซ็นต์ และด้วย *T. viride* CMGB1 ให้ค่าประสิทธิภาพ 455 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่ามากกว่าการหมักแบบอาหารเหลวทั้งคู่ แต่ *T. viride* CMGB1 ให้ผลผลิตเซลลูเลส 158 FPU ซึ่งมากกว่า *T. viride* ATCC13.631 ที่ให้ผลผลิตเซลลูเลส 99 FPU ในการหมักแบบอาหารแข็งในระดับห้องปฏิบัติการ และพบว่าเซลลูเลสสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดอยู่ที่ 3.18 FPU/ml ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่ากรดต่าง 4.8 แต่ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ลดลงอยู่ที่ 2.56 และ 1.87 FPU/ml เมื่ออุณหภูมิอยู่ที่ 40 องศาเซลเซียสและ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แต่ยีสต์ที่คัดเลือกได้มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งยีสต์ทุกสายพันธุ์จะถูกยับยั้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองที่ได้มานั้น สรุปได้ว่า การ

ผลิตเซลล์ด้วยการหมักแบบอาหารแข็งนั้น มีค่าการใช้จ่ายที่ถูกกว่าการหมักแบบอาหารเหลว เอนไซม์ที่ได้สามารถนำไปใช้ย่อยพวกลิกโนเซลลูโลสได้ดี

Yang และ Wang (1999) ทำการศึกษาอิทธิพลของการหมักแบบอาหารแข็งและอาหารเหลวที่มีต่อการผลิตโปรติเอส (protease) และอะไมเลส (amylase) ด้วย *Streptomyces rimosus* TM-55 ในส่วนของการหมักแบบอาหารเหลวนั้น พบว่าโปรติเอสมีแอกติวิตีที่ชั่วโมง 12 และสูงสุดที่ 166 และค่ากรด-ด่างลดลงจาก 6.7 ไปเป็น 6.1 หลังชั่วโมงที่ 24 และเพิ่มขึ้นถึง 8.2 ที่ชั่วโมงที่ 480 แต่ละกรัมของแป้งให้ผลผลิตของโปรติเอส 17.4 ยูนิต (แต่ละมิลลิตรของของเหลวที่ได้จากการหมักจะสนับสนุนให้เกิดการผลิตโปรติเอส 0.4 ยูนิต) ส่วนอะไมเลสเริ่มสร้างชั่วโมงที่ 6 และสูงสุดที่ ชั่วโมงที่ 48 แต่ละกรัมของแป้งสนับสนุนการผลิตอะไมเลส 691.3 ยูนิต (แต่ละมิลลิตรของของเหลวที่ได้จากการหมักจะสนับสนุนให้เกิดการผลิตอะไมเลส 15.9 ยูนิต) ส่วนการหมักแบบอาหารแข็ง พบว่าโปรติเอสเริ่มมีแอกติวิตีที่ชั่วโมง 24 และสูงสุดที่ 232 แต่ละกรัมของแป้งให้ผลผลิตของโปรติเอส 26.7 ยูนิต (หนึ่งกรัมของซบสเตรทแห้งสนับสนุนให้เกิดการผลิตโปรติเอส 15.8 ยูนิต) ส่วนอะไมเลสเริ่มสร้างชั่วโมงที่ 24 และสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 180 แต่ละกรัมของแป้งสนับสนุนการผลิตอะไมเลส 2642.7 ยูนิต (หนึ่งกรัมแห้งของซบสเตรทสนับสนุนให้เกิดการผลิตอะไมเลส 1565 ยูนิต) ซึ่งค่าที่ได้มานี้บ่งบอกถึงความแตกต่างในการผลิตโปรติเอสและอะไมเลสระหว่างการหมักแบบอาหารแข็งกับการหมักแบบอาหารเหลว อย่างมีนัยสำคัญอย่างมาก อาหารเลี้ยงเชื้อในการหมักแบบอาหารเหลวประกอบด้วยแป้ง 22.4 ถึง 23.6 กรัมต่อลิตร ส่วนการหมักแบบของแข็ง มีแป้งอยู่ในซบสเตรทประมาณ 103.8 ถึง 166 กรัมต่อลิตร (ความหนาแน่นส่วนใหญ่ของอาหารแข็งอยู่ระหว่าง 0.5-0.8 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรในน้ำหนักเปียกที่มีความชื้นอยู่ที่ 65 เปอร์เซ็นต์) ดังนั้นอัตราการผลิตต่อกรัมแป้งของโปรติเอสและอะไมเลสในการหมักแบบอาหารแข็งเท่ากับ 53.4 และ 282.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าการหมักแบบอาหารเหลว ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของซบสเตรทสูงในการหมักแบบอาหารแข็งสนับสนุนการสร้างเอนไซม์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Chahal (1985) ที่ผลิตเซลล์ด้วย *Trichoderma reesei* พบว่าอัตราการผลิตเซลล์ต่อกรัมซบสเตรทในการหมักแบบอาหารแข็งเท่ากับ 72 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าการหมักแบบอาหารเหลว อัตราการผลิตอะไมเลสในการหมักแบบอาหารแข็งมากกว่าในอาหารเหลวถึง 2.82 เท่า

ตารางที่ 2.4 แสดงข้อดีกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งและอาหารเหลว

การหมักแบบอาหารแข็ง	การหมักแบบอาหารเหลว
<ul style="list-style-type: none"> <li>- สามารถใช้วัตถุดิบเป็นสารอาหารและเป็นแหล่งที่จุลินทรีย์เกาะติดได้โดยตรง</li> <li>- สามารถใช้แม่แบบ (matrices) หรือตัวค้ำจุนได้มากมายกว้างขวาง เช่น ขนาด กลไกการต้านทาน ความพรุน</li> <li>- มีต้นทุนต่ำ</li> <li>- ใช้พลังงานในกระบวนการผลิตน้อย</li> <li>- กระบวนการเก็บเกี่ยวผลผลิตมีราคาไม่สูง (ในกรณีที่ต้องมีการสกัดผลผลิตออกมาคือใช้สารละลายในปริมาณน้อยและราคาในการเก็บเกี่ยวต่ำกว่าการหมักแบบอาหารเหลว)</li> <li>- ใช้น้ำในปริมาณน้อย ทำให้มีเกิดน้ำเสียน้อยด้วย</li> <li>- มีศักยภาพกำลังการผลิตสูง (potential higher volumetric productivity)</li> <li>- ควบคุมการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ง่าย</li> <li>- อาหารที่ใช้ในกระบวนการหมักมีองค์ประกอบที่ไม่ซับซ้อนและหาได้ง่าย</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- เนื่องจากส่วนมากอาหารที่ใช้อยู่ในรูปของสารละลายสมบูรณ์ทำให้ซับซ้อนผสมผสานกับเชื้อได้อย่างทั่วถึงเท่ากันทุกบริเวณ</li> <li>- ติดตามการเจริญเติบโตและการคำนวณหาปริมาณมวลชีวภาพได้ง่าย</li> <li>- ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างได้ง่าย</li> <li>- การให้อากาศทำได้ง่าย เนื่องจากในระบบมีน้ำปริมาณมากทำให้ออกซิเจนละลายได้ดี</li> <li>- มีการถ่ายเทความร้อนที่ดี</li> <li>- ใช้ระยะเวลาในการหมักน้อย</li> </ul>

ตารางที่ 2.5 เปรียบเทียบผลผลิตไซลานเนสจากกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งกับอาหารเหลวของรา 34 สายพันธุ์

Serial No.	Name of Strain	Xylanase IU / gram dried substrate	
		Solid state fermentation	Submerge fermentation
1	<i>Aspergillus niger</i> SBS3	724	33
2	<i>A. niger</i> SBS6A.	689	35
3	<i>niger</i> SBS8	644	35
4	<i>A. niger</i> SBS14	742	24
5	<i>A. niger</i> SBS19	630	39
6	<i>A. niger</i> SBS24	639	38
7	<i>A. niger</i> SBS28	408	39
8	<i>A. niger</i> SBS47	735	32
9	<i>A. niger</i> SBS57	753	27
10	<i>A. niger</i> SBS66	719	22
11	<i>Aspergillus flavus</i> SBS 44	738	31
12	<i>A. flavus</i> SBS65	191	6
13	<i>A. flavus</i> SBS68	650	30
14	<i>Aspergillus fumigatus</i> SBS58	608	38
15	<i>A. fumigatus</i> SBS62	613	38
16	<i>A. fumigatus</i> SBS63	587	20
17	<i>Aspergillus ochraceous</i> SBS4	489	10
18	<i>A. ochraceuos</i> SBS16	639	32
19	<i>A. ochraceous</i> SBS35	590	36
20	<i>Aspergillus sydowii</i> SBS45	543	40
21	<i>Penicillium</i> sp. SBS2	751	2
22	<i>Penicillium</i> sp. SBS10	554	27
23	<i>Penicillium</i> sp. SBS32	591	1

ตารางที่ 2.5 เปรียบเทียบผลผลิตไซลานเนสจากกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งกับอาหารเหลวของรา 34 สายพันธุ์ (ต่อ)

Serial No.	Name of Strain	Xylanase IU / gram dried substrate	
		Solid state fermentation	Submerge fermentation
24	<i>Penicillium</i> sp.SBS52	696	15
25	<i>Penicillium citrinum</i> SBS 22	40	29
26	<i>P citrinum</i> SBS26	739	30
27	<i>P. citrinum</i> SBS51	215	16
28	<i>P citrinum</i> SBS53	221	12
29	<i>Penicillium janthenellum</i> SBS18	666	26
30	<i>Trichoderma</i> sp.SBS56	325	35
31	<i>Trichodermasp.</i> SBS60	564	24
32	<i>Trichodermasp.</i> SBS64	361	7
33	<i>Trichoderma</i> sp.SBS67	625	17
34	<i>Gliocladium</i> sp.SBS13	428	34

ที่มา : ดัดแปลงจาก Nair และคณะ (2008)

### 2.5.2 การหาปริมาณเซลล์ทางอ้อม

ชีวมวลของรา (fungal biomass) เป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญอย่างเห็นได้ชัดสำหรับการวิเคราะห์ในกระบวนการหมัก แต่การวิเคราะห์ปริมาณชีวมวลของราโดยตรงในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งนั้น เป็นสิ่งที่ทำได้ยุ่งยากมาก เนื่องจากเส้นใยของราเจริญสอดแทรกเข้าไปในบริเวณช่องว่างของอาหารแข็ง ทำให้ยากต่อการแยกออกจากกันได้ ดังนั้น วิธีการติดตามชีวมวลของราในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งจึงนิยมใช้การวิเคราะห์ทางอ้อม โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบที่มีอยู่ในเส้นใย (mycelia) เช่น กลูโคซามีน (glucosamine) เออกอสเตอรอล (ergosterol) ATP หรือ กรดนิวคลีอิก (nucleic acids) และยังได้มีการใช้วิธีการวัดทางกิจกรรมทางชีวภาพ เช่น กิจกรรมเอนไซม์ (enzymatic activity) อัตราการหายใจ (respiration rate) หรือ

อัตราการบริโภคสารอาหาร (nutrient consumption rate) จากการรายงานของ Desgranges,(1991) ได้ยืนยันว่า วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีน เป็นตัวบ่งชี้ที่เชื่อถือได้

กลูโคซามีน ( $C_6H_{13}NO_5$ ) เป็นน้ำตาลอะมิโนและเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญตัวหนึ่งในการสังเคราะห์ทางชีวเคมีของไกลโคซิลเลทโปรตีนและลิปิด กลูโคซามีนเป็นส่วนหนึ่งที่อยู่ในโครงสร้างของโพลีแซคคาไรด์ ไคโตซานและไคตินที่พบอยู่ในผนังเซลล์ของรา

Sparringa และ Owens (1999) ได้ศึกษาการเจริญเติบโตของ *Rhizopus oligosporus* NRRL2710 ในภาวะที่มีส่วนประกอบอาหารและขนาดของไมซีเลียมเพลเล็ต (Mycelial pellets) ที่แตกต่างกัน โดยใช้กลูโคซามีนเป็นตัวบ่งชี้ถึงปริมาณชีวมวลของราด้วยวิธีของ Ride (1972) พบว่าขนาดของ mycelial pellets ที่มีขนาดใหญ่ รางสามารถเจริญเติบโตได้มากกว่าในระยะเวลาที่เท่ากัน โดยขนาดของ mycelial pellets ที่เลี้ยงในอาหารเหลว sabouraud dextrose ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางต่ำกว่า 5 มิลลิเมตรให้ปริมาณของกลูโคซามีน 51 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งชีวมวล ในขณะที่ขนาดของ mycelial pellets ที่อยู่ระหว่าง 16-35 มิลลิเมตรให้ปริมาณกลูโคซามีน 107 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งชีวมวล โดยใช้เวลาเลี้ยง 72 ชั่วโมงเท่ากัน และพบว่าองค์ประกอบของอาหารก็มีผลต่อการเจริญเติบโต โดยราเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง sabouraud dextrose ได้ดีกว่า soymilk โดยวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนที่ได้จากราที่เจริญอยู่บนอาหารแข็ง sabouraud dextrose ได้ 111 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งชีวมวลและ 82 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งชีวมวลจากราที่เจริญบนอาหารแข็ง soymilk ใช้เวลาเลี้ยง 24 ชั่วโมง ซึ่งถือว่าการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนเหมือนกับการวิเคราะห์ปริมาณราโดยตรง ซึ่งอาจจะมีอัตราการผันผวนไปบ้าง 4 เปอร์เซ็นต์สำหรับ mycelial pellets และ 11 เปอร์เซ็นต์สำหรับ mycelium ที่เจริญอยู่บนอาหารวุ้นโดยการคำนวณเปลี่ยนปริมาณกลูโคซามีนให้เป็นปริมาณชีวมวล คือ 1 กรัมกลูโคซามีน เท่ากับ 12 กรัมชีวมวล

Scotti และคณะ (2001) ใช้วิธีการวัดปริมาณกลูโคซามีนในการหาปริมาณชีวมวลของ *Cunninghamella elegans* ที่เจริญเติบโตในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งและการหมักแบบอาหารเหลวที่สามารถเก็บเซลล์ได้โดยตรง พบว่าปริมาณกลูโคซามีนที่วิเคราะห์ได้ มีปริมาณเกือบคงที่ทุกช่วงระยะเวลาการหมัก และปริมาณกลูโคซามีนที่วิเคราะห์ได้จากเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลวและอาหารแข็งมีค่าใกล้เคียงกัน กลูโคซามีนจึงเป็นตัวบ่งชี้ถึงปริมาณชีวมวลทางอ้อมที่ดี



### 2.5.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ในการหมักแบบอาหารแข็ง

#### 2.5.3.1 ปริมาณความชื้นของซับสเตรท

ปริมาณความชื้นเป็นปัจจัยที่สำคัญมากต่อกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง เพราะตัวแปรนี้มีผลต่อการเจริญเติบโต การสังเคราะห์ชีวสาร และการปลดปล่อยสารเมแทบอลิท์ ปริมาณความชื้นที่ต่ำเป็นต้นเหตุให้ความสามารถในการละลายของสารอาหารที่อยู่ในซับสเตรทลดลง ลดระดับการบวมน้ำและเพิ่มแรงตึงผิวของน้ำ (water tension) ให้สูงขึ้น ซึ่งจะทำให้เซลล์ได้ปริมาณสารอาหารที่จะนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการสร้างผลิตภัณฑ์และเพื่อการเจริญเติบโตได้น้อยลงตามไปด้วย แต่ถ้าปริมาณความชื้นสูงมากเกินไป จะทำให้ ความมีรูพรุน (porosity) ลดลง ทำให้การเคลื่อนที่ของออกซิเจนถูกจำกัด รา *R.oryzae* เป็นราต้องการอากาศในการเจริญเติบโต จึงส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนแบคทีเรียที่ไม่ต้องการ ปริมาณความชื้นที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และลักษณะรูปแบบของอาหารแข็งที่ใช้

Oriol และคณะ (1988) แสดงผลการทดลองปัจจัยความชื้นที่มีผลต่อการเจริญของ *Aspergillus niger* ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้แป้งมันสำปะหลังดิบและขาน้อย ที่มีปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่แตกต่างกัน พบว่า ปริมาณเซลล์ การบริโภคซับสเตรท และการเปลี่ยนแปลงของซับสเตรท (Substrate conversion: consumed substrate/initial substrate) เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณความชื้นเริ่มต้นของซับสเตรทเพิ่มขึ้น โดยในการทดลองที่ปริมาณความชื้นของซับสเตรท 42 เปอร์เซ็นต์ซึ่งเป็นค่าต่ำสุดที่ใช้ในการทดลอง ได้น้ำหนักแห้งของรา 0.123 กรัม ต่อกรัมแห้งเริ่มต้นของซับสเตรท มีอัตราการนำไปใช้ซับสเตรทอยู่ที่ 0.233 กรัมต่อกรัมแห้งเริ่มต้นของซับสเตรท และการเปลี่ยนซับสเตรท 33.2 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ความชื้นเริ่มต้นของซับสเตรทที่ใช้สูงสุดในการทดลองคือ 70 เปอร์เซ็นต์ ได้ปริมาณน้ำหนักแห้งของรา 0.339 กรัม ต่อกรัมแห้งเริ่มต้นของซับสเตรท มีอัตราการนำไปใช้ซับสเตรทอยู่ที่ 0.558 กรัมต่อกรัมแห้งเริ่มต้นของซับสเตรท และการเปลี่ยนซับสเตรท 79.5 เปอร์เซ็นต์

Corona และคณะ (2005) ได้ศึกษาถึงอิทธิพลของ water activity ต่อการเจริญเติบโตของ *Gibberella fujikuroi* และการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก (gibberellic acid) พบว่าค่าของค่าวอเตอร์แอคทิวิตี (water activity,  $a_w$ ) มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Gibberella fujikuroi* อย่างเห็นได้ชัด พบว่าอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งถึงช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของรามากที่สุดอยู่ที่ค่าวอเตอร์แอคทิวิตีระหว่าง 0.985-0.995 และเริ่มมีแนวโน้มลดลงหลังจากนั้น และ

พบว่าผลผลิตของกรดไขมันเบอร์ลิกสูงที่สุด ในสภาวะที่มีค่าวอเตอร์แอกติวิตีอยู่ที่ 1- 0.98 ซึ่งเป็นจุดเดียวกับการเจริญเติบโตของราสูงสุดเช่นกัน

### 2.5.3.2 การให้อากาศและการแพร่ของสารอาหาร (aeration and nutrients diffusion)

ในการหมักแบบอาหารแข็ง ลักษณะโครงสร้างทางกายภาพของของแข็งและสถานะของเหลว(liquid phase)ในระบบมีอิทธิพลต่อการแพร่ของก๊าซและสารอาหาร การแพร่ของก๊าซมีหลักการการให้อากาศที่จำเป็นอยู่ 2 หลักการ คือ การให้ออกซิเจนเข้าไปสู่ในกระบวนการเมแทบอลิซึมในเซลล์และการกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์ ความร้อน ไอน้ำ และสารที่ระเหยได้ที่ผลิตขึ้นระหว่างการเมแทบอลิซึมออกไป การแลกเปลี่ยนของออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่างสถานะของแข็งกับสถานะก๊าซนั้นเกิดขึ้นทั้งส่วนข้างในและข้างนอกของอนุภาค ขึ้นอยู่กับปริมาณของพื้นที่ผิวหน้าที่สัมผัสกันระหว่างสองสถานะ (phase) เช่น ช่องว่างระหว่างโครงสร้างภายในขนาดของรูพรุนและขนาดของชิ้นส่วนชั้นสเตรท การเพิ่มอากาศสามารถทำได้โดยการให้อากาศที่ปลอดเชื้อและการกวน หรือเพิ่มความชื้นให้กับชั้นสเตรท แต่โดยทั่วไป การแพร่ของก๊าซสามารถเพิ่มขึ้นได้ด้วยเพิ่มขนาดของรูพรุนและลดขนาดชิ้นส่วนชั้นสเตรท การแพร่ของสารอาหารเกิดขึ้นที่ เกิดขึ้นระหว่างอนุภาค (intraparticulate level) ของตัวค้ำจุณ ประกอบด้วยการแพร่ของสารอาหารไปสู่เซลล์และการย่อยชั้นสเตรทด้วยเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมา โดยการย่อยจะเกิดขึ้นที่บริเวณผิวหน้าของชั้นสเตรทเป็นหลัก กระบวนการแพร่ของสารอาหาร มีความสำคัญมากในแบคทีเรียและยีสต์ในการหมักแบบอาหารแข็ง แต่มักไม่ค่อยเกิดปัญหามากนักในการเลี้ยงราเพราะไม่ซีเลียมสามารถเจริญเข้าไปข้างในโครงสร้างของแข็งได้

### 2.5.3.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นในการหมักแบบอาหารแข็งเป็นผลที่เกิดจากกิจกรรมทางเมแทบอลิซึม (metabolic activity) หากการกำจัดความร้อนที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมดังกล่าวไม่เพียงพอ จะส่งผลกระทบต่อการทำงานของสปอร์ การเจริญเติบโตของราและการสร้างผลิตภัณฑ์โดยตรง การหมักแบบอาหารแข็งมีการถ่ายเทความร้อนที่ต่ำมาก เพราะถูกจำกัดด้วยตัวชั้นสเตรทที่ใช้ การถ่ายเทความร้อนทั้งหมด (overall heat transfer) ขึ้นอยู่กับอัตราการถ่ายเทความร้อนข้างในและข้างนอกของอนุภาค และอัตราการถ่ายเทความร้อนตรงส่วนที่เป็นผิวหน้าของอนุภาคกับบริเวณส่วนที่อยู่ในสถานะก๊าซ การควบคุมอุณหภูมิเป็นสิ่งที่ยากมากในการหมักแบบอาหารแข็งมากกว่าการหมักแบบอาหารเหลว ดังนั้นวิธีการที่ใช้ในการควบคุมอุณหภูมิในการหมักแบบอาหารเหลวจึงไม่เหมาะสมต่อการหมักแบบอาหารแข็ง การให้อากาศอย่างเป็นระบบและเหมาะสมเป็นวิธีการหลักที่ใช้ในการควบคุมอุณหภูมิของชั้นสเตรท แต่อัตราการให้อากาศที่สูงจะมีผลต่อการลด water activity ของชั้นสเตรทโดยสูญเสียไปทางการระเหยกลายเป็นไอ การกวนก็สามารถช่วยควบคุม

อุณหภูมิได้เช่นกัน สำหรับ *R. oryzae* NRRL395 นั้น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกคือ 27 องศาเซลเซียส เมื่อใช้มันฝรั่งเป็นแหล่งคาร์บอน (Liu และคณะ, 2005) ซึ่งอุณหภูมิที่นิยมใช้ในงานวิจัยอยู่ในช่วง 27 – 35 องศาเซลเซียส (Zhou และคณะ, 2000; Huang และคณะ, 2005b; Efremenko และคณะ, 2006)

### 2.5.3.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

การวัดและการควบคุมตัวแปรตัวนี้ในการหมักแบบอาหารแข็งเป็นสิ่งที่ยากมาก เช่นเดียวกับการควบคุมอุณหภูมิ อย่างไรก็ตาม ขั้วสเตรทที่นำมาใช้นั้นส่วนมากจะมีความต้านทานผลกระทบนี้อยู่แล้ว เนื่องจากส่วนประกอบที่ซับซ้อนทางเคมีของตัวขั้วสเตรทเอง ซึ่งในกรณีนี้การควบคุมค่ากรด-ด่าง จึงไม่สำคัญมาก เมื่อใดที่สามารถควบคุมปัจจัยตัวนี้ได้โดยการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ (buffering solutions) ที่อยู่ในสถานะของเหลวเข้าไป แต่วิธีการนี้อาจใช้ไม่ได้ดีเมื่อมีการขยายขนาดให้ใหญ่ขึ้น เนื่องจากขั้วสเตรทมากขึ้น ทำให้ความหนา หรือขั้วสเตรทรวมตัวกันเป็นก้อนมากขึ้น อาจทำให้สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใส่ลงไปกระจายไม่เท่ากันทุกบริเวณ ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมคือ 5.0 – 6.0 (Huang และคณะ, 2003) Tay และ Yang (2002) รายงานว่า ปริมาณของกรดแลกติก เอทานอลและกรดฟูมาริกจะลดลงเมื่อค่าพีเอชลดลงจาก 6.0 เป็น 4.0 ซึ่ง Miura และคณะ (2003) สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 93 กรัมต่อลิตรที่พีเอช 6.0 – 6.5 Rosenberg และ Kristofikova (1995) พบว่า ค่าพีเอชในช่วง 4.8-6.0 ไม่มีผลต่อการผลิตผลิตภัณฑ์อื่นเช่นกรดมาลิกและกรดฟูมาริก เป็นต้น

Ellaiyah และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อการผลิตกลูโคอะไมเลส ด้วย *Aspergillus* sp. A3 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนแล้วทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเบื้องต้นให้อยู่ในช่วง 3.0-7.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาณความชื้น 80 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.0 ให้ผลผลิตกลูโคอะไมเลสได้มากที่สุด คือ 109 ยูนิตต่อกรัม และพบว่าเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างสูงหรือต่ำกว่าค่าที่เหมาะสม จะส่งผลต่อการผลิตกลูโคอะไมเลสโดย *Aspergillus* sp. A3 เนื่องจากกิจกรรมทางเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ไวต่อการในการเปลี่ยนแปลงค่ากรด-ด่าง

### 2.5.3.5 การประยุกต์ใช้การหมักแบบอาหารแข็ง

การหมักแบบอาหารแข็งถูกนำไปใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ ทางอุตสาหกรรม เช่น การผลิตอาหารสัตว์ที่มีคุณค่าทางอาหารสูงขึ้น ไคโตซาน สารประกอบพวกอะโรมาติก เป็นต้น ดังแสดงผลิตภัณฑ์ต่างๆ ในตารางที่ 2.6 นอกจากนี้แล้ว ยังมีการประยุกต์เพื่อนำมาใช้งานในด้าน

อื่นๆ อีก เช่น นำมาใช้ในการบำบัดและการย่อยสลายสารประกอบที่มีอันตรายทางชีวภาพ (bioremediation and biodegradation) การทำลายพิษทางธรรมชาติ (biological detoxification) ที่มีอยู่ในของเสียทางเกษตรกรรม การแปรรูปของเสียทางชีวภาพของชีวมวล เช่น กากหรือเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร การเปลี่ยนแปลง (biotransformation) วัสดุที่มีมูลค่าหรือคุณภาพต่ำให้มีราคาและคุณภาพที่สูงขึ้น เช่น การเพิ่มสารอาหารเข้าไปในรำข้าวโพดเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ นำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารอินทรีย์ เอนไซม์ และผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรม เป็นต้น

#### ตารางที่ 2.6 การประยุกต์ใช้การหมักแบบอาหารแข็งในทางชีวภาพ

Sector	Application	Examples	References
Agro-Food Industry	Biotransformation of crop residues	Traditional food fermented (Koji, sake, ragi, tempeh), protein enrichment and single cell protein production, mushrooms production.	Pandey และคณะ (1988), Fan และคณะ (1999)
	Food additives	Aroma compounds, dyestuffs, essential fat and organic acids	Medeiros และคณะ (2000), Soares และคณะ (2000)
Environmental control	Bioremediation and biodegradation of hazardous compounds	Caffeinated residues, pesticides, polychlorinated biphenyls (PCBs)	Leifa และคณะ (2000), Ried และคณะ (2000), Sera และคณะ (2000)
	Biological detoxification of agro-industrial wastes	Coffee pulp, cassava peels, canola meal, coffee husk	Soccol และคณะ (2001), Fan และคณะ (2001)

## ตารางที่ 2.6 การประยุกต์ใช้การหมักแบบอาหารแข็งในทางชีวภาพ (ต่อ)

Sector	Application	Examples	References
Industrial fermentation	Enzymes production	Amylases, amyloglucosidase, cellulases, proteases, pectinases, xylanases, glucoamylases	Germanoและคณะ (1998), Castilho และคณะ (2000), Souza และคณะ (2001)
	Bioactive products	Mycotoxins, gibberellins,	Vandenberghе และคณะ (2000), Soccol และคณะ (1994), (1998)
	Organic acid production	alkaloids, antibiotics, hormones, Citric acid, fumaric acid, fumaric acid, itaconic acid, lactic acid	
	Biofuel	Ethanol production	Yang และคณะ (2008), Vintila และคณะ (2009)
	Miscellaneous compounds	Pigments, biosurfactants, vitamins, Xanthan	Makkar และคณะ (1999), Stedansky และคณะ (1999), Shih และคณะ (2008)

### 2.6 กากมันสำปะหลัง

มันสำปะหลัง (cassava, tapioca, manioc, mandioca หรือ yuca) มีชื่อสามัญหรือชื่อที่เรียกทั่วไปเป็นภาษาอังกฤษว่า cassava หรือ tapioca ในประเทศบราซิลและอาร์เจนตินา เรียกว่า madioca ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลังเป็นไม้พุ่มยืนต้น มีอายุอยู่ได้หลายปี ลักษณะลำต้นสูงแตกต่างกันตามพันธุ์ และสภาพแวดล้อมโดยอาจสูงถึง 1-5 เมตร ลักษณะของใบมันสำปะหลังเป็นแบบใบเดี่ยว (single leaf) สีของใบแตกต่างกันตามพันธุ์เช่นเดียวกับสีของลำต้น ระบบรากของมันสำปะหลังสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ รากจริง (true or wiry root) และ รากสะสม (modified or storages roots) รากสะสมนี้จะเจริญกลายเป็นหัวมันสำปะหลัง โดยทั่วไปในต้นมันสำปะหลังต้นหนึ่งจะมีรากสะสมอาหารหรือหัวอยู่ประมาณ 5-20 หัวต่อต้น มันสำปะหลังเป็นพืชที่เก็บสะสมอาหารไว้ในราก เมื่อพืชมีการสร้างอาหารจากใบและส่วนเป็นสีเขียวแล้ว จะสะสมในรูปของคาร์โบไฮเดรต คือ แป้ง ไว้ในราก จะเห็นว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่ในราก

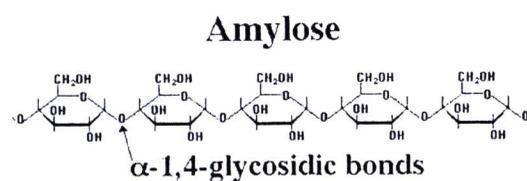
นั่นนอกจากน้ำแล้วคือแป้ง ซึ่งมีถึงร้อยละ 70-80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหัวมันสำปะหลังถูกนำเข้าสู่กระบวนการเพื่อเปลี่ยนให้เป็นแป้งมันสำปะหลังดิบจะมีส่วนที่เป็นกากที่เหลือออกมา

กากมันสำปะหลัง (cassava pulp) เป็นของแข็งที่เหลือจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง (ประมาณ 1 ถึง 1.5 ล้านตันกากแห้งต่อปี) และยังคงมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักอยู่สูง (ประมาณร้อยละ 50-60 โดยน้ำหนักแห้ง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณภาพหัวมันและกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังของโรงงาน) รองลงมาคือพวกเส้นใย (fiber) อยู่ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

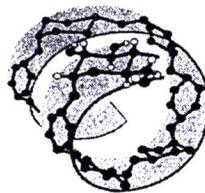
### 2.6.1 โครงสร้างของแป้ง

แป้ง (starch) เป็นโฮโมโพลีแซ็กคาไรด์ (Homopolysaccharide) ที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช ประกอบด้วยหน่วยย่อย คือ กลูโคส ซึ่งจะถูเก็บสะสมไว้ที่ส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ ราก ลำต้นใต้ดิน ผล และเมล็ด ในธรรมชาติจะพบอยู่ในรูปเม็ดแป้ง แป้งประกอบด้วยพอลิเมอร์ 2 ชนิด ได้แก่

1. อะไมโลส (amylose) มีอยู่ในแป้งประมาณ 10-25% ประกอบด้วยกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -1, 4-ไกลโคซิดิก เป็นสายยาวไม่แตกกิ่งหรือแขนง ดังแสดงในภาพที่ 2.8 จึงจัดเป็นเกลียว helix อะไมโลสเป็นผงสีขาว ไม่มีรสหวาน เมื่ออยู่ในน้ำจะมีสีขุ่นขาว ทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนให้สีน้ำเงินเข้ม เกิดจากการที่โมเลกุลของไอโอดีนแทรก (intercalate) เข้าไประหว่างเกลียว helix ของอะไมโลส ทำให้เกิดสีม่วงขึ้นมา



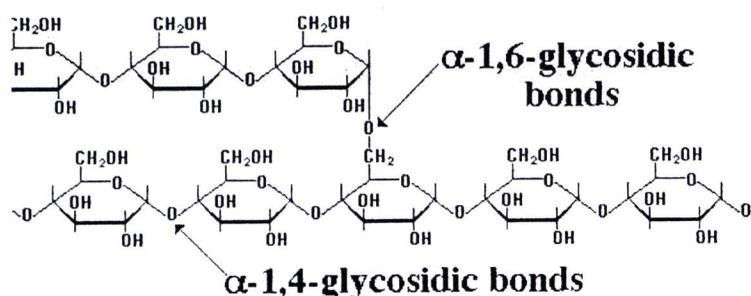
This long molecule coils itself into a spiral helix shape held together by H-bonds.



ภาพที่ 2.8 โครงสร้างของอะไมโลส(amylose)

2. อะไมโลเพกติน (amylopectin) ประกอบด้วยกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -1, 4-ไกลโคซิดิก และมีการแตกกิ่งที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -1, 6-ไกลโคซิดิก ทำให้มีโครงสร้างเป็นกิ่ง ดังแสดงใน ภาพที่ 2.9 เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนจะให้สีม่วงแดง เนื่องจากมีการแตกกิ่งจำนวนมาก ทำให้ไอโอดีนที่แทรกซึมเข้าไปติดได้ในปริมาณน้อย ทำให้เกิดสีม่วงแดงขึ้นมา

## Amylopectin



ภาพที่ 2.9 โครงสร้างของอะไมโลเพกติน (amylopectin)

### 2.6.2 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยโมเลกุลของแป้ง

เอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งได้คือ อะไมเลส เป็นเอนไซม์ที่มีหลายชนิด สามารถแบ่ง ออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆได้ 3 กลุ่ม ได้แก่

#### 2.6.2.1. แอลฟา-อะไมเลส ( $\alpha$ -amylase)

ชื่อตามระบบ  $\alpha$ -1,4-glucan-4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1 เป็นพวกเอนโดเอนไซม์ (endoenzyme) ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายพันธะแอลฟา-1, 4 กลูโคซิดิก ระหว่าง โมเลกุลกลูโคสภายในส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพกตินภายในโมเลกุลของแป้ง ได้เป็นพวกโอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) และแอลฟา-ลิมิต-เดกซ์ทริน ( $\alpha$ -limit-dextrins) ออกมา

#### 2.6.2.2. บีตา-อะไมเลส ( $\beta$ -amylase)

ชื่อตามระบบ  $\alpha$ -1,4-glucan maltohydrolase, EC 3.2.1.2 มีความจำเพาะเจาะจงต่อ การย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกของแป้งที่ตำแหน่งแอลฟา-1,4 ในลักษณะการตัดสายพอลิเมอร์ อย่างเป็นระเบียบจากปลายสาย ด้านไม่มีหมู่อิทธิพลเข้าไปสู่ภายในสายครั้งละ 2 หน่วยของโมเลกุล กลูโคส และจะหยุดปฏิกิริยาทันทีที่พบพันธะแอลฟา-1,6 ไกลโคซิดิก

2.6.2.3. แกมมา-อะไมเลส ( $\gamma$ -amylase) หรือกลูโคอะไมเลส (glucoamylase) หรืออะมิ โลกลูโคซิเดส (amiloglucosidase)

ชื่อตามระบบ  $\lambda$ -1,4-glucan glucohydrolase, EC 3.2.1.3 เป็นพวกเอ็กโซเอนไซม์ (exoenzyme) มีความจำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายพันธะพันธะ  $\alpha$ -1, 4 และ  $\alpha$ -1, 6 กลูโคซิดิก โดยจะทำการตัดโมเลกุลของกลูโคสที่ตำแหน่งปลายของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน ในลักษณะการตัดสายพอลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบจากปลายสาย ด้านไม่มีหมู่อิทธิพลเข้าไปสู่ภายในสายครั้งละหน่วยของโมเลกุลกลูโคส ดังนั้นผลผลิตที่ได้จะเป็นกลูโคสเพียงอย่างเดียว

### 2.6.3 ส่วนประกอบอื่นๆของไฟเบอร์ ในกากมันสำปะหลัง

2.6.3.1 เซลลูโลส (Cellulose) พบในผนังเซลล์ (cell wall) ของพืช เป็นพอลิเมอร์ของ  $\beta$ -D-กลูโคส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4 ไกลโคซิดิก ซึ่งต่างจากพอลิเมอร์ของอะไมโลสและอะไมโลเพคติน พันธะ  $\beta$ -1, 4 ไกลโคซิดิก ทำให้พอลิเมอร์ของเซลลูโลสมีลักษณะยืดออกไปเป็นเส้นตรง ในขณะที่พันธะ  $\alpha$ -1, 4-ไกลโคซิดิก จะทำให้เกิดการขดเป็นวง (helix) นอกจากนี้การเกิดพันธะอินเตอร์- และ อินตรา- เซน ไฮโดรเจน (inter- and intra-hydrogen bond) ทำให้เซลลูโลสมีความแข็งแรง และทนแรงดึงได้สูง เซลลูโลสจะถูกสลายด้วยเซลลูเลสซึ่งจะได้เป็นกลูโคสออกมา

2.6.3.2 เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช ประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลเชิงเดี่ยว (monosaccharide) ชนิดต่างๆ ตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปเป็นจำนวน 100 โมเลกุลที่มีคุณสมบัติในการละลายเหมือนกันคือ ละลายได้ในสารละลายต่าง น้ำตาลเชิงเดี่ยวนี้แบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ เพนโทแซนส์ (pentosans) และ เฮกโซแซนส์ที่ไม่ใช่เซลลูโลส (non cellulose hexosans) น้ำตาลเชิงเดี่ยวที่พบมากในเฮมิเซลลูโลสคือ ดี-ไซแลนส์ (D-xylans) และ ดี-กลูโค-ดีแมนแนนส์ (D-gluco-D-mannans) และมีไซต์เซนส์เป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยวชนิดอื่นๆ เช่น แอล-อะราบิโนส (L-arabinoses)

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

เนื่องจากองค์ประกอบส่วนใหญ่ของกากมันสำปะหลัง คือ คาร์โบไฮเดรต จึงมีความเป็นไปได้สูงในการนำกากมันสำปะหลังกลับมาใช้ประโยชน์ โดยการแปรรูปกากมันสำปะหลังให้เป็นสารละลายน้ำตาลกลูโคส เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตพวกสารอินทรีย์ต่างๆ และ

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

Hong และคณะ (2001) ทำการศึกษาการผลิตไฟเทส (phytase) โดยใช้กากมันสำปะหลัง ร่วมกับการเติมแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ (กรัมต่อกิโลกรัมกากมันสำปะหลัง)  $K_2HPO_4$  0.1  $MgSO_4$  0.5  $KCl$  0.5 และ  $FeSO_4$  0.1 ด้วย *Aspergillus niger* PD ภายใต้การหมักแบบบนอาหารแข็ง ในภาวะที่มีความชื้น 65 เปอร์เซ็นต์ ได้ผลผลิตไฟเทส 6.73 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

Rattanachomsri และคณะ (2009) ใช้ crude multi-activity enzyme ซึ่งประกอบด้วย เซลลูเลส เพกทิเนส และเฮมิเซลลูเลสที่ได้จาก *Aspergillus niger* BCC17849 มาช่วยย่อยเส้นใยที่เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างในกากมันสำปะหลัง เพื่อให้แป้งที่อยู่ด้านในหลุดออกมา ทำให้ได้กลูโคสและไซโลสในปริมาณ 716 และ 67 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักกากมันสำปะหลัง แล้วนำน้ำตาลที่ได้ไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *Candida tropicalis* BCC7755 สามารถผลิตเอทานอลได้ 14.3 กรัมต่อลิตรจากกากมันสำปะหลัง 4 เปอร์เซ็นต์ในหน่วยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้อัตราการผลิต 0.48 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 93.7% ของผลผลิตตามทฤษฎีของแป้งและเซลลูโลสทั้งหมด หรือเท่ากับ 85.4% ของน้ำตาลทั้งหมดที่สามารถนำไปใช้ในการหมักได้ตามทฤษฎี

Pothiraj และคณะ (2006) . ศึกษาการผลิตเซลลูเลสโดย *Rhizopus stolonifer* *Aspergillus niger* และ *Aspergillus terreus* โดยใช้กากมันสำปะหลัง 20 กรัมใส่น้ำกลั่น 60 มิลลิลิตรเพื่อให้มีปริมาณความชื้นอยู่ที่ 75 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *R. stolonifer* สามารถนำเซลลูโลสไปใช้ได้ถึง 94 เปอร์เซ็นต์ภายใน 10 วัน รองลงมาคือ *A. niger* และ *A. terreus* นำไปใช้ 89 และ 88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และแอกติวิตีของเซลลูเลสสูงสุดจาก *R. stolonifer* อยู่ที่ 0.44 IU/ml และ *A. niger* and *A. terreus* มีแอกติวิตีเท่ากับ 0.12 and 0.1 IU/ml ตามลำดับ จากการผลการทดลองแอกติวิตีที่สูงของ *R.stolonifer* อาจเนื่องมาจากกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหารที่เหมาะสมสำหรับราชนิดนี้ ทำให้รามีการเจริญเติบโตได้ดี ส่งผลให้มีการผลิตเซลลูเลสออกมาเพื่อย่อยเซลลูโลสเพื่อให้ได้สารอาหารที่สามารถนำไปใช้ในกระบวนการเมทาบอลิซึมได้

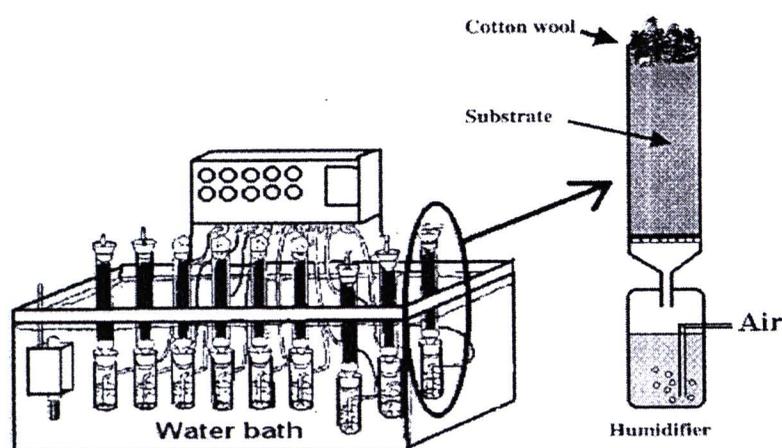


## 2.7 ถังหมักสำหรับการหมักแบบอาหารแข็ง

ความแตกต่างระหว่างการหมักแบบอาหารแข็งกับการหมักแบบอาหารเหลวที่เห็นได้อย่างชัดเจนคือ ปริมาณของเหลวที่อยู่ในกระบวนการและชั้นสเตรท ในการหมักแบบอาหารแข็งการถ่ายเทเคลื่อนที่ของก๊าซระหว่างอนุภาคอยู่ในปริมาณต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ การหมักแบบอาหารเหลว ยังรวมถึงลักษณะของตัวค้ำจุนที่แตกต่างกันออกไป เช่น ขนาดของชั้นสเตรท รูปแบบโครงสร้างและส่วนประกอบที่หลากหลาย ความพรุนของชั้นสเตรท การต้านทานเชิงกล (mechanical resistance) ความสามารถในการซึมน้ำของชั้นสเตรท และปัจจัยอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ ปริมาณน้ำ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา ซึ่งปัจจัยที่กล่าวมาทั้งหมดนี้มีอิทธิพลต่อการออกแบบถังหมักและระบบการควบคุมค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ อย่างมาก รวมถึงกลไกการกวน และระดับความต้องการการปลอดเชื้อของกระบวนการหมัก มีส่วนที่ต้องคำนึงถึงการออกแบบถังหมักเช่นกัน ในขั้นตอนการพัฒนาการหมักแบบอาหารแข็งนั้น จุดประสงค์หลักในการออกแบบถังหมักก็เพื่อให้มีการปฏิบัติงานที่ดี ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับถังหมักที่ใช้ในการหมักแบบอาหารเหลวแล้ว การศึกษาวิจัยและการปรับปรุงถังหมักที่ใช้ในการหมักแบบอาหารแข็งยังต้องพัฒนามากกว่ามาก ซึ่งการออกแบบถังหมักแบบอาหารแข็งในอุดมคติ ควรมีลักษณะดังนี้ (1) มีระบบที่สมบูรณ์แบบในการควบคุมอุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ และความชื้น (2) มีการออกแบบระบบการป้องกันการปนเปื้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ (3) สามารถทำให้ทุกบริเวณพื้นที่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถที่จะเจริญเติบโตได้ดีเท่าๆกันในทุกๆบริเวณ (4) มีระบบที่สามารถกำจัดสิ่งที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้ดีและเร็ว (5) มีความปลอดภัยในการปฏิบัติงานและอำนวยความสะดวกในการขยายขนาด ซึ่งถ้าสามารถออกแบบถังหมักประสิทธิภาพการทำงานสูงสำหรับการหมักแบบอาหารแข็ง ก็จะเป็นการส่งเสริมและพัฒนาการผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ออกมาได้ในปริมาณและคุณภาพที่สูงขึ้น

ปัจจุบันถังหมักที่ใช้ในกรรมวิธีการหมักแบบอาหารแข็งนี้ มีหลายชนิด โดยส่วนมากมักขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์และขนาดของการหมักโดยตรง มีนักวิจัยที่ใช้ถังหมักแบบอาหารแข็งผลิตผลิตภัณฑ์ ต่างๆ มากมาย ดังแสดงในตารางที่ 2.7 และตัวอย่างในงานวิจัยของ Vandenberghe และคณะ (2004) ที่ศึกษาการผลิตกรดซิตริก โดย *Aspergillus niger* LPB 21 ในถังหมักแบบต่างๆ ได้แก่ พบว่า สามารถผลิตกรดซิตริก 309, 263 และ 269 กรัมต่อกิโลกรัมแห้งของกากมันสำปะหลังที่ใช้เป็นอาหารสำหรับการหมัก ในถังหมักแบบ column fermentors, a tray bioreactor และ horizontal drum bioreactor ตามลำดับ ซึ่งผลผลิตของกรดซิตริกที่ได้แตกต่างกันนั้น เนื่องมาจากถังหมักแต่ละชนิดมีความสามารถในการควบคุมปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น การให้อากาศ ได้แตกต่างกัน ซึ่งถังหมักที่นิยมใช้กันทั่วไป ได้แก่

ถังหมักแบบคอลัมน์ (column reactor) เป็นถังหมักที่ประกอบด้วยคอลัมน์หลายๆอัน ที่จะถูกบรรจุด้วยอาหารก่อนที่จะลงเชื้อ แล้วนำไปวางไว้ใน water bath เพื่อควบคุมอุณหภูมิ ใอน้ำที่เป็นตัวเพิ่มความชื้นนั้นจะผ่านเข้าไปในแต่ละคอลัมน์ นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในระดับห้องปฏิบัติการ ดังแสดงลักษณะของถังหมักในภาพที่ 2.10



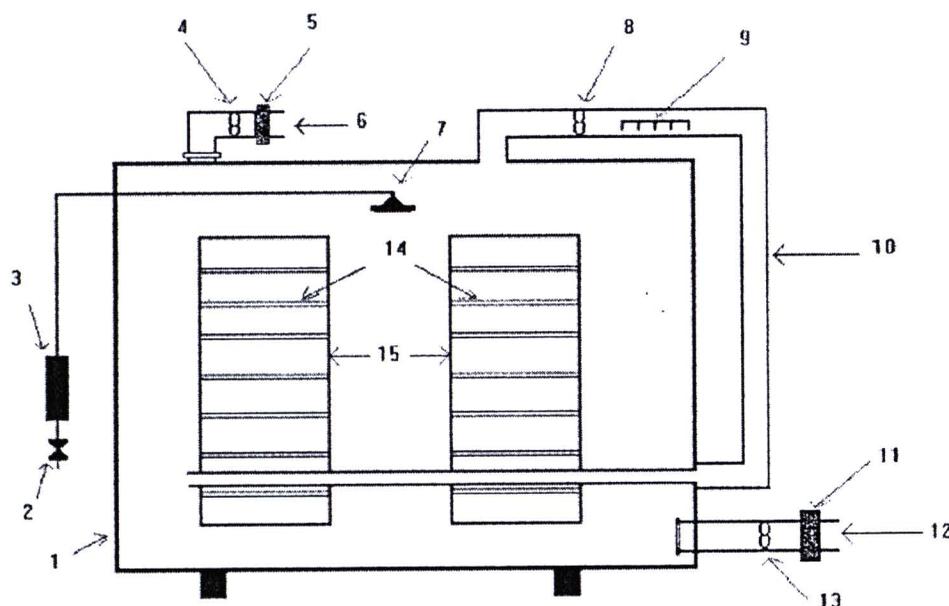
ภาพที่ 2.10 ถังหมักแบบคอลัมน์ (column reactor)

ถังหมักแบบถาด (Tray Fermentor) สามารถทำได้จากไม้ ไม้ไผ่ โลหะหรือพลาสติก ส่วนล่างของถาดเป็นชั้นของตะแกรงเพื่ออากาศไหลผ่านได้ง่ายสะดวกและเป็นส่วนที่ให้ซับสเตรทเกาะ แต่ละชั้นของถาดมีความสูงประมาณ 30-50 มิลลิเมตร ซึ่งระหว่างชั้นแต่ละชั้น ควรมีช่องว่างที่ห่างกันอย่างเหมาะสม ถังหมักจะถูกตั้งไว้ในห้องที่ปลอดเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น อากาศที่ปลอดเชื้อจะถูกเป่าเข้าสู่ห้องเพื่อเพิ่มออกซิเจนให้กับจุลินทรีย์ในการเจริญเติบโต ความชื้นและอุณหภูมิ จะถูกควบคุมที่ตัวห้อง

ประโยชน์ของถังหมักชนิดนี้ คือ ตัวถังที่ออกแบบมีโครงสร้างง่าย ไม่ซับซ้อน และลงทุนต่ำ การถ่ายเทออกซิเจนในส่วนที่เป็นของแข็งเกิดขึ้นโดยอาศัยหลักการแพร่แทนที่การให้พลังงานในการเคลื่อนที่ ความหนาของอาหารแข็งที่ใส่ลงในถาดที่ถูกจำกัดด้วยความสูงที่ไม่มากนักของถาด ทำให้อุณหภูมิ ปริมาณความชื้น และการถ่ายเทออกซิเจนทุกๆบริเวณมีค่าใกล้เคียงกัน แต่ต้องการพื้นที่ในบริเวณกว้างมาก ตัวอย่างถังหมักแบบนี้ที่เป็นที่นิยม ได้แก่ Koji-type reactor ดังแสดงในภาพที่ 2.11

Prado และคณะ (2005) ได้ศึกษาการผลิตกรดซิตริกด้วย *Aspergillus niger* LPB 21 โดยใช้กากมันสำปะหลังที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส กับกากมันสำปะหลัง โดยผลผลิตในอัตราส่วนต่าง ๆ ทำการหมักโดยใช้ถังหมักแบบ tray พบว่าได้ผลผลิตกรดซิตริกสูงสุด 26.9

กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งของกากมันสำปะหลัง ในสถานะที่มีการใช้กากมันสำปะหลังที่ผ่านความร้อนแล้วอย่างเดียว



ภาพที่ 2.11 ถังหมักแบบ Koji-type reactor

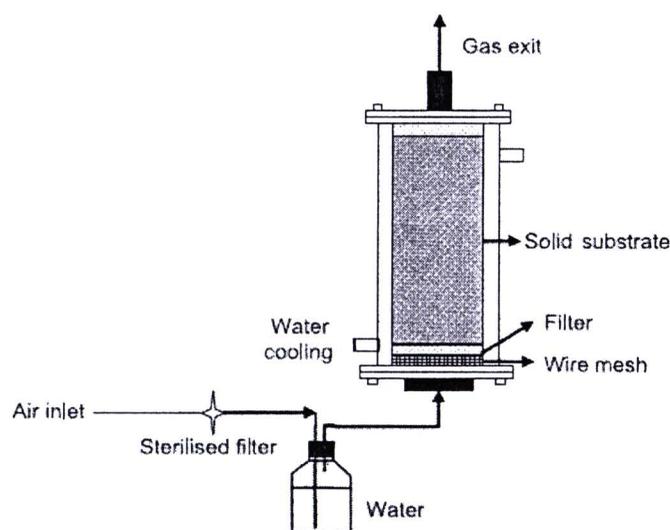
(1) Koji room, (2) water valve, (3) UV tube, (4, 8, 13) air blowers, (5, 11) air filters, (6) air outlet, (7) humidifier, (9) heater, (10) air recirculation, (12) air-inlet, (14) trays, (15) tray holders

ถังหมักแบบ packed-bed มีลักษณะเด่นคือมีระบบการอัดป้อนอากาศจากด้านล่างเข้าไปผ่านตะแกรงชั้นสู่ด้านบนผ่านชั้นของอาหารแข็งที่อยู่ภายใน โดยทั่วไปรูปแบบของถังหมักจะประกอบด้วยคอลัมน์ที่เป็นแก้วหรือพลาสติกเพื่อไว้สำหรับบรรจุอาหารแข็งไว้บนตะแกรง ซึ่งจะมีระบบให้ความชื้นกับอาหารแข็งด้วยอากาศที่ชื้นอย่างต่อเนื่อง และยังสามารถทำการติดตั้งแจ็คเก็ต (jacket) เพื่อให้น้ำไหลเวียนในการควบคุมอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการหมัก ดังแสดงในภาพที่ 2.12 ถังหมักชนิดนี้สามารถที่จะทำให้ปลอดเชื้อได้โดยไอน้ำร้อนที่ได้จากอ่างทำน้ำร้อน (water bath) ที่เตรียมไว้สำหรับทำอากาศชื้น เป่าเข้าสู่ภายในถัง และควรตั้งถังหมักไว้ในห้องที่สะอาดเพื่อลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น ถังหมักชนิดนี้ใช้ได้ง่ายไม่ยุ่งยาก ชับสเตรทที่มีลักษณะเป็นเม็ดๆหรือเป็นชิ้นๆ จะถูกนำไปใส่ในภาชนะซึ่งอยู่ในระบบปิด จากนั้นจึงใส่กล้าเชื้อจุลินทรีย์ลงไป ในเรื่องของลักษณะของชับสเตรทได้มีแนวคิดในการปรับปรุงให้ชับสเตรทอยู่กับที่ ซึ่งจุดประสงค์ในการปรับปรุงเพื่อต้องการให้ชับสเตรทสัมผัสกับอากาศอย่างสม่ำเสมอ ไม่ลอยวนเวียนแล้วไปรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนอยู่ที่บริเวณส่วนใดส่วนหนึ่งในถังหมัก อย่างไรก็ตาม ถัง

หมักชนิดนี้มีข้อเสียคือ การเจริญเติบโตของเชื้อในแต่ละจุดไม่เท่ากัน การกำจัดความร้อนที่เกิดจากกระบวนการหมักแบบอลิซิมทำได้ไม่ค่อยดีโดยเฉพาะความร้อนที่เคลื่อนที่มาจากข้างล่างซึ่งจะถูกนำมาพร้อมกับอากาศที่ดูดอัดเข้ามาแล้วถูกปล่อยออกขึ้นไปสู่ข้างบน ซึ่งมีผลไปถึงปัญหาในการขยายขนาด

Lu และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตกรดซิตริก โดย *Aspergillus niger* ในถังหมัก packed-bed โดยใช้ Kumar หรือ sweet potato ที่ถูกหั่นจนมีลักษณะเป็นลูกบาศก์เป็นชั้นสเตรทพบว่า อัตราการผลิตกรดซิตริกโดยรวมเท่ากับ 0.82 กรัมต่อกิโลกรัม Kumara ต่อชั่วโมง

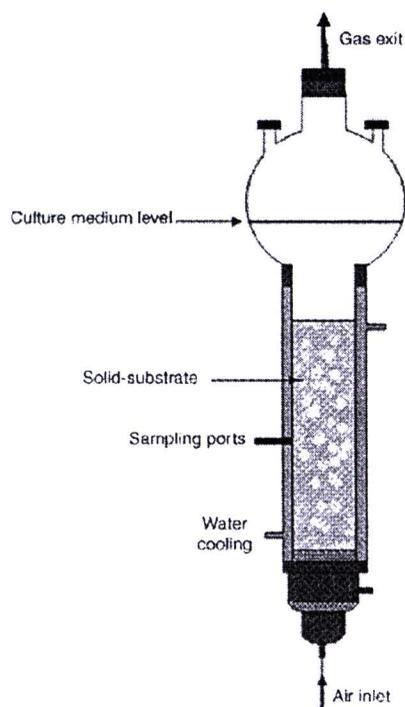
Aikat และคณะ (2001) ศึกษาการผลิตโปรตีนเอส โดย *Rhizopus oryzae* ในถังหมัก packed-bed โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิตโปรตีนเอสได้สูงถึง 6381 ยูนิต เมื่อใช้รำข้าวสาลี 20 กรัมน้ำหนักแห้ง



ภาพที่ 2.12 ถังหมักแบบ packed-bed

ถังหมักแบบ Fluidised bed มีรูปร่างทรงกระบอกที่มีตะแกรงทำด้วยเส้นลวดหรือจานที่มีรูพรุนอยู่ด้านล่าง มีการติดตั้งเครื่องกวนไว้สำหรับช่วยกระจายอาหารแข็งที่นอนก้น มีการให้อากาศที่กรองแล้วจากด้านล่างด้วยอัตราเร็วที่เหมาะสม ดังแสดงในรูปที่ 2.13 ถังหมักชนิดนี้มีข้อดีคือ ทำให้สามารถเพิ่มพื้นที่ผิวของอาหารแข็งในการหมัก สามารถสร้างระบบที่ควบคุมการเติมน้ำ สารอาหาร และกรด-ด่าง ได้ง่าย นอกจากนี้ยังสามารถระบายความร้อนและอากาศเสียที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักได้ง่าย นอกจากนี้อุณหภูมิของอาหารแข็งสามารถอยู่ในสภาพเขว่นลอยได้เนื่องจากการดันของอากาศจากด้านล่าง แต่ถ้าอาหารแข็งมีลักษณะจับตัวบนผนักถังหมัก

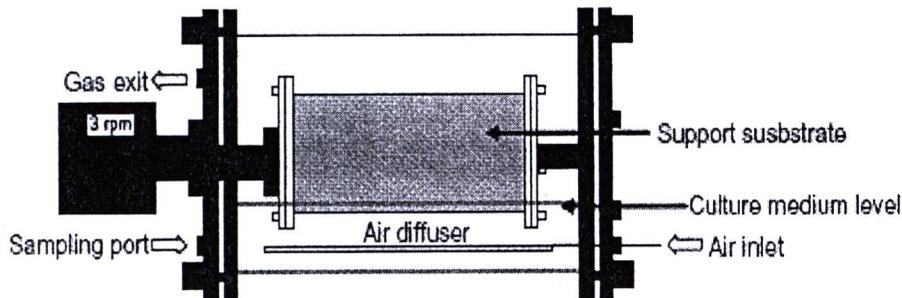
จะต้องมีการเพิ่มความเร็วในการหมุนเวียนภายในให้เร็วขึ้น แต่ข้อเสียของถังหมักแบบนี้ก็คือสิ้นเปลืองพลังงานสูงกว่าถังหมักแบบอื่น และมีข้อจำกัดของขนาดของถังหมักในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม



ภาพที่ 2.13 ถังหมักแบบ Fluidised bed

ถังหมักแบบ rotating drum ประกอบด้วยส่วนที่เป็นถังทรงกระบอก ที่ตั้งอยู่ในแนวขวางขนานกับพื้นราบและแกนไว้สำหรับหมุน ดังแสดงในภาพที่ 2.14 สามารถใส่ซับสเตรทได้ในปริมาณสองในสามส่วนของถัง พื้นที่หนึ่งในสามที่เหลือไว้เป็นพื้นที่สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ การหมุนของถังหมักจะช่วยทำให้อาหารแข็งผสมเข้าด้วยกันอย่างทั่วถึง โดยทำงานสัมพันธ์กับระบบการให้อากาศ อีกทั้งความร้อนที่เกิดจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ สามารถที่จะระเหยออกไปด้วยโครงของภาชนะที่เย็นซึ่งเกิดในระหว่างที่ถังหมุนอย่างช้าๆ ทำให้ซับสเตรทที่อยู่ข้างในพลิกกลับไปมาโดยสัมผัสกับผิวของภาชนะ ทำให้ความร้อนค่อยๆ ถูกระบายออกไป อย่างไรก็ตามถังหมักชนิดนี้มีผลเสียในเรื่องของแรงเฉือนจากการหมุน (shear forces) ซึ่งอาจทำลายโครงสร้างของรา เช่น ไมซีเลียม สปอร์แรงเกียม เป็นต้น ซึ่งจะเป็นปัญหาอย่างมากในการผลิตที่ต้องการชีวมวล ความชื้นที่อยู่ซับสเตรทค่อนข้างระเหยออกเร็วทำให้ต้องมีหัวฉีดพ่นละอองน้ำเพื่อรักษาความชื้นของซับสเตรท ต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น ถ้าต้องการขยายขนาดในการผลิต เนื่องจากต้องออกแบบถังให้มีขนาดใหญ่ขึ้น การหมุนเคลื่อนที่อย่างต่อเนื่องตลอดเวลาของถังหมัก มักทำให้

ชั้นสเตรทที่มีความชื้นเกาะรวมกันเป็นก้อน และบริเวณส่วนที่เป็นช่วงต่อ เช่น บริเวณรอยต่อทางเข้าออกของอากาศ อาจเป็นแหล่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อที่ไม่ต้องการได้



ภาพที่ 2.14 ถังหมักแบบ rotating drum

ถังหมักแบบ Swing solid state เป็นถังหมักที่คล้ายกับ rotary แต่แตกต่างตรงที่การคลุกเคล้าเคลื่อนที่ของชั้นสเตรทไม่ได้มาจากการหมุนของถัง แต่ด้วยการเขย่าแทน

ถังหมักแบบ Stirred vessel เป็นถังปิดทรงกระบอกที่ตั้งตรงมี stirrer เคลื่อนไหวอยู่ข้างใน ปัญหาที่พบในการใช้ชั้นสเตรทในปริมาณมาก คือ จะเคลื่อนที่ได้ไม่เท่าเทียมกัน เป็นเหตุให้โครงสร้างชั้นสเตรทเกิดความเสียหาย ถูกทำลายไป

ตารางที่ 2.7 ผลผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้ถังหมักชนิดต่างๆ

Microorganism/ biocatalyst	Substrate	Product	Type of bioreactor	References
<i>Aspergillus niger</i>	Buckweed seed	Spores	Packed bed column	Kashyap และคณะ (2002)
<i>A. niger</i>	Cassava bagasse	Citric acid	Column fermenter	Di Luccio และคณะ (2004)
<i>Bacillus subtilis</i>	Rice bran	Iturin A	Tray	John และคณะ (2006)
<i>B. thuringiensis</i>	Wheat bran and bean cake powder	Bt wet powder	Cylindrical steel container	Vimala Devi และ คณะ (2005)

ตารางที่ 2.7 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้ถังหมักชนิดต่างๆ (ต่อ)

Microorganism/ biocatalyst	Substrate	Product	Type of bioreactor	References
<i>Mortierella alpina</i>	Rice bran	Polyunsaturated fatty acid	Column reactor	Vandenberghe และ คณะ (2000)
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Olive oil cake + sugarcane bagasse	Lipase	Fixed bed reactor	Anisha และคณะ (2008)
<i>Thermoascus auranticus</i>	Wheat straw	Cellulase	Perforated drum bioreactor	Xiong และคณะ (2007)
Lipase from <i>Rhizomucor miehei</i>	-	Hexyl laurate	Packed-bed bioreactor	Babitha และคณะ (2007)
<i>Erwinia</i> sp.	Sucrose + free and calcium alginate immobilized cells	Palatinose	Packed bed reactor	Kota และคณะ (1999)
Microbial biofilm developed without prior inoculation	Clay beads + glucose-based synthetic wastewater	Organic acids and hydrogen	Horizontal packed-bed Bioreactor	Hama และคณะ (2007)
Lipase producing <i>R. Oryzae</i>	Cuboidal polyurethane foam biomass support particles	Bio-diesel fuel	Packed-bed reactor	Sukumaran และคณะ (2005)

ตารางที่ 2.7 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้ถังหมักชนิดต่างๆ (ต่อ)

Microorganism/ biocatalyst	Substrate	Product	Type of bioreactor	References
Hydrogen producing sludge	Carbohydrate substrates enriched polyethylene- octane elastomer immobilized anaerobic sludge	Hydrogen and ethanol	Fluidized-bed and packed- bed reactor	Singhania และคณะ (2007)
<i>Clostridium</i> <i>tyrobutyricum</i> JM1	Polyurethane foam enriched with glucose medium	Biological hydrogen	Fixed-bed bioreactor	Wu และคณะ (2007)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Singhania และคณะ (2009)