

การคำนวณหาปัจจัยทางวิศวกรรมที่เหมาะสมต่อการหมักกรดแอล-แลกติก

ทำการออกแบบขยายสเกลการหมักกรดแอล-แลกติก โดยใช้ค่า $K_L a$ เป็นปัจจัยคงที่ในการคำนวณ โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อค่า $K_L a$ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ได้แก่ ค่า Reynolds' number (Re) ความเร็วไหลใบพัดกวน (u_r) กำลังมอเตอร์ต่อปริมาตร (P/V) และอัตราการไหลวนของน้ำหมักภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ (F/V) ทำการคำนวณเพื่อหาค่าอัตราการกวน และการให้อากาศในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร โดยกำหนดให้ปัจจัยแต่ละปัจจัยเป็นค่าคงที่ในการขยายสเกลจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร เป็นขนาด 90 ลิตร

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

การหมักกรดแอล-แลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด

รูปที่ 1 แสดงลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* เมื่อเจริญในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด หลังจากเติมหัวเชื้อ เมื่อสปอร์เกิดการงอกและเซลล์เริ่มเจริญเติบโต ในระหว่างนั้นสปอร์ที่งอกและเซลล์เส้นใยที่เจริญเติบโตจะเข้าไปติดในวัสดุสำหรับตรึงเซลล์ซึ่งได้แก่ ผ่าขนหนู ซึ่งการที่สปอร์และเซลล์เส้นใยที่เติบโตทั้งหมดเข้าไปยึดเกาะที่ผ่าขนหนูที่ตรึงไว้กับ โครงสแตนเลส ส่งผลให้ไม่มีเซลล์เจริญแบบอิสระในน้ำหมัก หรือที่บริเวณพื้นผิวอื่นในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเลย เมื่อเทียบกับการเลี้ยงราเส้นใยในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนที่ใช้กันทั่วไป ดังนั้น จึงทำให้ง่ายต่อการทำงานและควบคุมภาวะการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดเบดสติดนี้ นอกจากนี้ ผลการทดลองที่ได้ยังบ่งชี้ว่า ผ่าขนหนูเป็นพื้นผิวตรึงที่เหมาะสมสำหรับ *R. oryzae* ทั้งนี้โดยอาศัยแรงเหนือนจากการปั่นกวนเป็นตัวเสริมสร้างความแข็งแกร่งในการยึดเกาะกับวัสดุตรึง

ถึงแม้ว่าจะมีงานวิจัยที่ผ่านมากว่าถึงความสะดวกในการเลี้ยงราเส้นใยให้อยู่ในรูปของ pellet อย่างไรก็ดี เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างทำการหมัก การเลี้ยงราเส้นใยตามรูปที่ 1 ส่งผลดีมากกว่าการเลี้ยงในรูปของ pellet เนื่องจาก การปั่นกวนและการให้อากาศทำให้เกิดแรงเหนือนที่บริเวณผิวของแผ่นของราเส้นใยที่เกาะเป็นเชือกบางๆ ที่บริเวณผ่าขนหนูในการเลี้ยงแบบระยชะยาว เมื่อเทียบกับการเลี้ยงแบบ pellet ซึ่งมักประสบปัญหาเรื่องความหนาแน่นและขนาดของ pellet ที่เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาที่เลี้ยงนานขึ้น ซึ่งในที่สุดแล้วจะส่งผลเชิงลบต่อการผลิตกรดแอล-แลกติก เนื่องจาก พบภาวะการขาดออกซิเจนที่บริเวณศูนย์กลางของ pellet นั้นเอง

ในการหมักด้วยเซลล์ตรึงของ *R. oryzae* พบว่าอัตราการถ่ายเทออกซิเจนเพิ่มขึ้นอย่างมากตามอัตราการปั่นกวนที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามการเพิ่มอัตราการให้อากาศโดยคงอัตราการปั่นกวนไว้ไม่ได้ช่วยเพิ่มอัตราการถ่ายเทออกซิเจนได้มากนัก (ตารางที่ 1) เมื่อเปรียบเทียบสัมประสิทธิ์การ

ถ่ายเทออกซิเจน (K_{La}) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติกเทียบกับค่าที่ได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนที่ควบคุมภาวะการปั่นกวนและการให้อากาศเท่ากัน จะพบว่าอัตราการถ่ายเทของออกซิเจนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติกจะมีค่ามากกว่าในถังกวน (จากข้อมูลงานวิจัยเบื้องต้น) ซึ่งทำให้ผลผลิตกรดแลกติกเพิ่มสูงขึ้นไปด้วย ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาหลายผลงาน ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความสามารถในการควบคุมสัณฐานของ *R. oryzae* อย่างมีประสิทธิภาพซึ่งช่วยเพิ่มอัตราการถ่ายเทออกซิเจน ดังตัวอย่างงานวิจัยของ Thongchul and Yang (2003) ซึ่งได้หาค่าสัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนในการหมักด้วยเซลล์แขวนลอยในถังกวน เทียบกับการหมักด้วยเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ โดยพบว่าค่า K_{La} เพิ่มขึ้นถึง 3 เท่าในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดเคลื่อนที่ (0.36 min^{-1}) เมื่อเทียบกับค่าที่ได้ในถังกวน (0.13 min^{-1}) ที่ควบคุมที่ภาวะเดียวกัน (กำลังมอเตอร์ต่อปริมาตร และความเร็วปลายใบพัดกวน) นอกจากนี้ยังพบว่าในถังปฏิกรณ์ชีวภาพสำหรับเซลล์ตรึงมักจะทำให้ผลผลิตเซลล์ที่ความหนาแน่นสูง ซึ่งส่งผลให้ผลผลิตของกรดแลกติกสูงขึ้นตามไปด้วย

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

การปรับสภาพกากมันสำปะหลังโดยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน

จากรูปที่ 3(ก) พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาจาก 15 นาทีเป็น 30 นาที สามารถแยกน้ำตาลออกมาจากกากมันได้มากขึ้น แต่เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นไปจนถึง 60 นาที พบว่าไม่มีผลต่อปริมาณกลูโคสทั้งหมดที่ปรากฏในสารละลายที่แยกออกมาภายหลังการปรับสภาพกากมันด้วยวิธีนี้ โดยจะได้ yield ของกลูโคสประมาณ 0.5 กรัมต่อกรัมกากมันแห้ง และจะเห็นได้ว่าที่ปริมาณความเข้มข้นของกากมัน 5% จะได้ yield ของกลูโคสที่มากกว่าปริมาณความเข้มข้นของกากมัน 6.7% สำหรับในกรณีปริมาณความเข้มข้นของกากมัน 10 % และ 20% (ไม่แสดงผลการทดลอง) เนื่องจากได้ค่าจาก 10% ใกล้เคียงกับ 6.7% และปริมาณความเข้มข้นของกากมัน 20 % นั้นไม่สามารถแยกสารละลายที่ออกมาจากกากมันได้ จากนั้นนำกากมันที่ผ่านการปรับสภาพในแต่ละชุดการทดลอง (5% 6.7% และ 20%) ไปทำการย่อยด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไป



การปรับสภาพกากมันสำปะหลังด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับการใช้สารละลายแอลคาไลน์

จากรูปที่ 3(ข) พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์จาก 0.1 N ถึง 1.0 N จะได้ yield ของกลูโคสเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ และการเพิ่มความเข้มข้นของกากมัน จาก 5% เป็น 6.7 % จะได้ yield ของกลูโคสเพิ่มขึ้นเช่นกัน แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาจาก 15 ถึง 60 นาที น้ำตาลที่ปรากฏในของเหลวที่แยกออกมาภายหลังการปรับสภาพกากมันด้วยวิธีนี้สามารถแยกออกมาจากกากมันได้มากขึ้น จะได้ yield ของกลูโคสที่ใกล้เคียงกันประมาณ 0.4-0.5 กรัมต่อกรัมกากมันแห้ง และพบว่าภาวะที่ได้ yield ของกลูโคสสูงที่สุดคือประมาณ 0.541 กรัมต่อกรัมกากมันแห้ง ที่ภาวะความเข้มข้นของกากมัน 6.7 % ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N และระยะเวลาที่ใช้ในการปรับสภาพ 60 นาที จึงถือว่าเป็นภาวะที่เหมาะสมของการปรับสภาพด้วยวิธีนี้ เพื่อนำไปทำการย่อยด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนต่อไป นอกจากนี้ ยังพบว่าสารละลายที่แยกออกมาภายหลังการปรับสภาพมีลักษณะหนืดเล็กน้อย เนื่องจากการบวมของแกรนูลแป้งที่ถูกปลดปล่อยออกมาหลังจากที่มีการปรับสภาพด้วยสารแอลคาไลน์ที่อุณหภูมิสูง (Wyman et al., 2005) แต่อย่างไรก็ตามการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นมากเกินไปจะส่งผลให้สารละลายที่ได้มีค่าพีเอชสูง หากจะนำไปใช้ในการหมัก ต้องมีการปรับค่าให้เป็นกลาง ส่งผลให้เกิดเกลือในสารละลายมากเกินไป อาจส่งผลเชิงลบต่อการหมักกรดแลกติกโดย *R.oryzae*

การย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน

ขั้นตอนแรกนำกากมันที่ปรับสภาพแล้วมาย่อยด้วยเซลล์ูลเอส ที่ความเข้มข้น 5.61 และ 33.15 ยูนิต/กรัมกากมันแห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดไปย่อยต่อด้วยอะไมเลสที่ความเข้มข้น 16.8 และ 33.6 ยูนิต/กรัมกากมันแห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสระยะเวลา 15 และ 30 นาที ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4 ถึง 6

จากรูปที่ 4 ถึง 6 เมื่อทำการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน เป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที โดยใช้ความเข้มข้นของกากมัน 5 % 6.7% และ 20% ตามลำดับ พบว่าความเข้มข้นของเซลล์ูลเอสและเวลาในการบ่มมีผลต่อการย่อย เห็นได้จากปริมาณของกลูโคสที่ออกมาภายหลังการย่อย ซึ่งถ้าใช้ความเข้มข้นของเซลล์ูลเอสที่มากและใช้ระยะเวลาในการบ่มที่นานขึ้น จะได้ yield ของกลูโคสในปริมาณที่มากขึ้นด้วย แต่พบว่าความเข้มข้นของอะไมเลสและเวลาในการบ่มไม่มีผลต่อการย่อย คือ เมื่อใช้ความเข้มข้นของอะไมเลสที่มากและใช้ระยะเวลาในการบ่มที่นานขึ้น จะได้ yield ของกลูโคสในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่..... - 8 ต.ค. 2556
เลขทะเบียน..... 245504

จากผลการทดลองที่ได้ ดังนั้นการย่อยกากมันด้วยอะไมเลสที่ 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง นาน 15 นาที จึงเพียงพอสำหรับกากมันแห้งที่ผ่านการปรับสภาพมาแล้ว (รูปที่ 4(ก) 5(ก) และ 6(ก)) นอกจากนี้จะเห็นได้ว่า เมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของกากมันจาก 5% เป็น 6.7% และ 20% ตามลำดับ ทำให้ yield ของกลูโคสทั้งหมดมีความเพิ่มขึ้นด้วยเมื่อใช้ภาวะในการย่อยด้วยเอนไซม์เหมือนกัน โดยที่ปริมาณกากมันเข้มข้น 20% ให้ yield ของกลูโคสสูงที่สุด จากรูปที่ 4(ก) 5(ก) และ 6(ก) จึงสามารถเลือกภาวะที่เหมาะสมสำหรับย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันต่อด้วยเซลลูเลส และอะไมเลส ได้ดังนี้ เริ่มจากปริมาณความเข้มข้นของกากมันสด 20% ปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดัน เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นย่อยต่อด้วยเซลลูเลส 33.15 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง นาน 6 ชั่วโมง แล้วย่อยต่อด้วยอะไมเลส 16.8 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง นาน 15 นาที โดยได้ yield ของกลูโคสสูงที่สุดประมาณ 0.6 กรัมต่อกรัมของกากมันแห้ง เมื่อเปรียบเทียบผลของการย่อยด้วยเซลลูเลสและอะไมเลส จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นของเซลลูเลสที่ใช้ในการย่อยกากมัน และเวลาที่ใช้มีผลต่อ yield ของกลูโคสที่ได้ กล่าวคือ เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์มากขึ้น และเวลาที่ใช้ในการย่อยนานขึ้น จะให้ค่า yield ของกลูโคสสูงขึ้น ในขณะที่ความเข้มข้นของอะไมเลสและเวลาที่ใช้ จะไม่ส่งผลต่อ yield ของกลูโคสมากนัก

การย่อยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์

จากรูปที่ 7 พบว่าความเข้มข้นของเซลลูเลสและเวลาในการบ่มมีผลต่อการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีนี้เช่นเดียวกันกับการนำกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดัน เห็นได้จากปริมาณของกลูโคสที่ได้ในสารละลายที่ออกมาภายหลังการย่อย หากความเข้มข้นของเซลลูเลสมากขึ้นและใช้ระยะเวลาในการบ่มที่นานขึ้น จะได้ yield ของกลูโคสในปริมาณที่มากขึ้นตามไปด้วย แต่พบว่าความเข้มข้นของอะไมเลสและเวลาในการบ่มไม่มีผลต่อการย่อยเช่นเดียวกับที่พบในการย่อยกากมันที่ปรับสภาพด้วยความร้อนสูงภายใต้ความดัน แต่อย่างไรก็ตาม ค่า yield ของกลูโคสที่ได้นั้นสูงสุดอยู่ที่ประมาณ 0.16 กรัมต่อกรัมของกากมันแห้ง ซึ่งยังคงน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการย่อยกากมันที่ผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน (ประมาณ 0.6 กรัมต่อกรัมของกากมันแห้ง) ซึ่งน้อยกว่าเกือบ 4 เท่า ผลการทดลองที่ได้ อาจอธิบายได้จากการปรับสภาพด้วยวิธีใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันควบคู่กับการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป ทำให้กากมันที่ได้มีค่าพีเอชสูง ก่อนทำการย่อยด้วยเอนไซม์ต้องมีการปรับค่าพีเอชให้อยู่ที่ค่าที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์แต่ละตัว การปรับพีเอชส่งผลให้มีปริมาณเกลือที่ปนในกากมันในจำนวนค่อนข้างมาก เกลือดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์แต่

ละชนิดที่ใช้ก็อาจจะเป็นได้ นอกจากนี้แล้ว ยังพบว่า การปรับสภาพกากมันก่อนนำไปย่อยด้วย เอนไซม์นับเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากการปรับสภาพกากมันจะช่วยทำให้ โครงสร้างลิกโนเซลลูโลสถูกทำลาย ทำให้เอนไซม์เข้าถึงแกรนูลของแป้งที่อยู่ภายใน โครงสร้าง ของกากมันได้ง่ายขึ้น (Thongchul et al., 2010)

การหมักกรดแอล-แลกติกแบบเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติดจากแหล่งคาร์บอนชนิด ต่างๆ

การทดลองนี้ ได้ศึกษาและเปรียบเทียบลักษณะพื้นฐานและจลนพลศาสตร์ของ กระบวนการหมักกรดแลกติกโดย *R. oryzae* โดยการใช้ซับสเตรตต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการ ใช้ ความร้อนสูงภายใต้ความดัน สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่าน การปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ สารละลาย ที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และสารละลายแป้ง

ลักษณะพื้นฐานของ *R. oryzae* ที่ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด

ในกระบวนการหมักแบบอาหารเหลว *R. oryzae* สามารถเจริญเติบโต โดยมีลักษณะ พื้นฐานที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างด้วยกัน ยกตัวอย่างเช่น ขนาดของสปอร์เริ่มต้น (initial spore inoculum size) ซับสเตรตที่ใช้ ค่าพีเอช อัตราการปั่นกววน อัตราการให้อากาศ และ อุณหภูมิ เป็นต้น (Zhang et al., 2007) ในงานวิจัยนี้ได้ใช้ซับสเตรตที่แตกต่างกันมาเป็นแหล่ง คาร์บอนสำหรับใช้ในกระบวนการหมักกรดแลกติกโดย *R. oryzae* ที่ตรึงอยู่บนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิด ฝ้ายขนหนู

เมื่อพิจารณาถึงลักษณะพื้นฐานของ *R. oryzae* ในระยะการเจริญเติบโต (growth phase) ที่ เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง (รูปที่ 8) พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตเป็นตัวเซลล์แบบลักษณะเส้นใย โดยจัดวางตัวเป็นชั้นๆ เกาะอยู่บนเส้นใยของผ้า ซึ่งจะมีรูปร่างหน้าตาเหมือนกัน แต่ต่างกันที่ ปริมาณเซลล์ที่เกาะอยู่บนเส้นใย และสีของตัวเซลล์ โดยจะขึ้นอยู่กับแต่ละภาวะของแหล่งคาร์บอน ที่ใช้ กรณีภาวะที่ใช้ซับสเตรตกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เซลล์มีสีขาวนวล แต่มีปริมาณที่ไม่มากนักเมื่อเทียบกับภาวะอื่น ดังแสดงในรูปที่ 8(ก) ส่วนภาวะที่ใช้ซับสเตรตเป็นสารละลายที่ได้จากการ ย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพด้วยการ ใช้ ความร้อนสูงภายใต้ความดันเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น (รูปที่ 8(ข) และ 8(ค)) พบว่า เซลล์มีสีน้ำตาล

เนื่องจากสีของอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต และอาหารที่ใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการปรับสภาพและการย่อย เซลล์มีการเจริญเติบโตค่อนข้างมาก ซึ่งสังเกตจากปริมาณของเซลล์ที่เกาะอยู่บนผ้าในจำนวนที่มากพอควร ส่งผลให้อาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต มีปริมาณน้อย เนื่องจากถูกเซลล์ดูดน้ำเข้าไปเป็นจำนวนมาก คาดว่าน่าจะมาจากการที่สารอาหารที่ใช้ในการเป็นอาหารสำหรับการเจริญเติบโตและอาหารสำหรับการสร้างผลิตภัณฑ์นั้นมีโปรตีนอยู่ค่อนข้างมาก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Thongchul et al. (2010) พบว่ากากมันสำปะหลังประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 5.3 % ทำให้สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังมีปริมาณของโปรตีนสูงเช่นกัน ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณของแหล่งไนโตรเจนอีกทางหนึ่ง ส่งผลให้ช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์ในปริมาณที่มากขึ้น (Yao et al., 2010) ส่วนภาวะที่ซบสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด (รูปที่ 8(ง) และ 8(จ)) พบว่า เซลล์มีสีน้ำตาลเข้ม และน้ำตาลสัมตามลำดับ เนื่องจากสีของอาหารที่ใช้เช่นกัน และในระหว่างการหมักนั้นจะมีปริมาณของฟองเกิดขึ้นเป็นปริมาณมาก โดยจะเกิดเป็นฟองลอยขึ้นมากอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา จวบจนกระทั่งฟองคงที่ซึ่งใช้เวลานานประมาณ 24 ชั่วโมง และภาวะที่ซบสเตรทเป็นสารละลายแป้ง (รูปที่ 8(ฉ)) พบว่า เซลล์มีสีขาวขุ่น แต่จะขาวกว่าการใช้กลูโคส เนื่องจากสีของสารละลายแป้ง และในช่วงเริ่มต้นกระบวนการหมักนั้น สารละลายแป้งที่ใช้จะเกิดเจลาตินในเซชัน ทำให้น้ำหมักมีความหนืดค่อนข้างสูง และเนื่องจากสารละลายแป้งที่มีลักษณะเป็นเจล จึงไปเกาะกับเส้นใยผ้าฝ้ายที่เตรียมไว้สำหรับให้เซลล์ขึ้นไปเกาะในขณะเจริญเติบโต จึงส่งผลให้เซลล์เกาะตัวบนผ้าฝ้ายแบบไม่แน่นนัก แต่เมื่อทำการหมักไประยะหนึ่งประมาณชั่วโมงที่ 24 พบว่า สารละลายแป้งมีความหนืดลดลง อาจมาจากการที่มีการปั่นกววนของใบพัดทำให้โมเลกุลของแป้งสั่นลง อีกทั้ง *R. oryzae* มีเอนไซม์ในกลุ่มอะไมโลไลติกมาช่วยย่อยโมเลกุลของแป้งให้มีขนาดเล็กลงความหนืดของอาหารจึงลดลง (Wee et al., 2006)

เมื่อพิจารณาลักษณะสัญญาณของ *R. oryzae* ในระยะการสร้างผลิตภัณฑ์ (production phase) ที่เวลาการหมัก 96 ชั่วโมง (รูปที่ 9) พบว่า เซลล์ในแต่ละภาวะมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะภาวะที่ซบสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น (รูปที่ 9(ข) และ 9(ค)) พบว่าเซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เซลล์บางส่วนไม่ได้สัมผัสกับอาหารทำให้เซลล์เจริญเป็นสปอร์ในบริเวณด้านบนของเบดสติก ส่วนภาวะที่ซบสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์และสารละลายที่ได้จากการย่อย

กากมันสำปะหลังด้วยกรด (รูปที่ 9(ง) และ 9(จ)) พบว่า เซลล์มีการเจริญเติบโตมากขึ้นเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามความถี่ของการเกิดฟองในระยะนี้จะมีมากกว่าในระยะของการเจริญเติบโต

เมื่อพิจารณาลักษณะการยึดเกาะของ *R. oryzae* บนเบดสติด้านนอก และด้านใน (รูปที่ 10) และความหนาของเซลล์ (รูปที่ 11) พบว่า เซลล์มีการยึดเกาะบนเบดสติดที่หนาแน่นและมีความหนาที่แตกต่างกันไปในแต่ละภาวะ จะเห็นได้ชัดเจนในกรณีของภาวะที่ซับซ้อนเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 10 (ข) และ 10(ค)) พบว่า เซลล์มีปริมาณมาก และเจริญเติบโต ขยายขนาดเกินบริเวณที่ยึดเกาะของเบดสติด เซลล์มีลักษณะยึดเกาะกันอย่างหลวมๆ ตัวเซลล์มีความหนาพอควร ดังแสดงในรูปที่ 11(ข) และ 11(ค) มีการพองน้ำเนื่องมาจากการที่เซลล์ดูดน้ำเข้าไปในระหว่างกระบวนการหมัก น้ำหนักแห้งของทั้งสองภาวะนี้คือ 57.26 และ 58.09 กรัม ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนคือ 35.12 กรัม กรณีภาวะที่ซับซ้อนเป็นสารละลายแข็ง (รูปที่ 10(ง)) พบว่า เซลล์มีปริมาณมากเช่นกัน มีการเจริญเติบโตของเซลล์ที่มีขนาดค่อนข้างหนา ดังแสดงในรูปที่ 11(ง) แต่ในภาวะนี้เซลล์มีการหลุดออกจากเบดสติดได้ง่าย เนื่องจากมีการเกาะตัวกันอย่างหลวมๆ ปนอยู่กับสารละลายแข็งที่ยังคงมีสภาพเป็นเจล และมีการพองน้ำเช่นกันด้วย กรณีของภาวะที่ซับซ้อนเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด (รูปที่ 10(ง) และ 10(จ)) พบว่า เซลล์มีการเจริญเติบโต เกาะตัวกันอย่างหนาแน่นจึงสังเกตได้ว่าเซลล์มีปริมาณน้อย เจริญอยู่บนเส้นใยผ้าฝ้ายเท่านั้น และมีขนาดไม่หนาเกินไป ดังแสดงในรูปที่ 11(ง) และ 11(จ) ซึ่งภาวะข้างต้นที่ได้กล่าวมานั้นแตกต่างกับภาวะที่ใช้ซับซ้อนกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 10(ค)) ในภาวะนี้เซลล์จะยึดเกาะเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ และเกาะตัวกันอย่างไม่หนาแน่นมากนัก ดังแสดงในรูปที่ 11(ค) ทำให้มีช่องว่างภายในตัวเซลล์ ส่งผลให้การถ่ายเทอาหารและอากาศเข้าสู่ภายในตัวเซลล์มีประสิทธิภาพมากกว่าภาวะอื่นๆ เซลล์จึงสามารถผลิตกรดแลกติกได้มากขึ้น (Chotisubha-anandha et al., 2011)

เมื่อพิจารณาลักษณะเซลล์ *R. oryzae* ที่ตรึงอยู่ด้านในของเบดสติด (รูปที่ 12) พบว่า บริเวณผิวของเซลล์ที่อยู่ด้านในมีลักษณะด้านและแข็งกว่าเซลล์ที่อยู่ด้านนอกของเบดสติด เนื่องมาจากเป็นบริเวณที่อยู่ติดกับอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่าด้านนอกของเบด (Thongchul, 2005; Chotisubha-anandha et al., 2011) กรณีของภาวะที่ซับซ้อนเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด (รูปที่ 12 (ง)

และ 12(จ)) พบว่า ลักษณะที่ค้ำยัน แข็ง และมีการจัดเรียงกันแน่นมากกว่าภาวะอื่นๆ ทั้งนี้อาจมาจากการที่สารละลายมีความเข้มข้นของเกลือสูง ซึ่งการองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นส่งผลโดยตรงต่อรูปร่างและลักษณะของเซลล์ (Zhang et al., 2007) โดยน้ำหนักแห้งของทั้งสองภาวะนี้คือ 64.42 และ 76.81 กรัม ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการใช้ภาวะอื่น จึงเป็นสามารถสรุปได้ว่า เซลล์ที่เกิดในสองภาวะนี้มีการแพ็คตัวอยู่อย่างหนาแน่น และกรณีของภาวะที่ซับซ้อนเป็นสารละลายแข็ง (รูปที่ 12(ฉ)) พบว่า เซลล์มีลักษณะที่นุ่ม ไม่มีความคงตัวของตัวเซลล์ หลุดขาดจากกันง่าย แต่ยังมีบริเวณที่มีความแข็งอยู่บ้างเล็กน้อย เนื่องมาจากการในภาวะนี้มีโมเลกุลของแข็งที่มีลักษณะเป็นเจลมาแทรกอยู่ระหว่างตัวเซลล์กับเส้นใยผ้าฝ้ายที่ยึดตรึง ทำให้เซลล์ไม่มีความคงตัวและหลุดออกจากกันง่าย ทำให้มีตัวเซลล์มีการหลุดออกมาบ้างในขณะที่ทำการเปลี่ยนถ่ายอาหาร และยังคงส่งผลให้ปริมาณของน้ำหนักแห้งของภาวะนี้มีค่ามากกว่าค่าที่เป็นจริงเพราะมีน้ำหนักของโมเลกุลแข็งปะปนไปด้วย คือ 33.77 กรัม

จลนพลศาสตร์ของการหมักกรดแอล-แลคติกจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ โดย *R. oryzae* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติด

จากการเปรียบเทียบจลนพลศาสตร์ของการหมักกรดแลคติกโดย *R. oryzae* ที่อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที การให้อากาศเท่ากับ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที โดยการใช้ซับซ้อนต่างกันเป็นแหล่งคาร์บอน ได้แก่ กลูโคส สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน พร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และสารละลายแข็ง (รูปที่ 13) พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกเท่ากับ 53.61 26.57 25.41 7.63 6.75 และ 33.77 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 75.55%, 41.57% 44.48% 12.56% 12.84% และ 53.10% ตามลำดับ อัตราการผลิตกรดแลคติกเท่ากับ 1.68 0.66 0.64 0.16 0.14 และ 0.70 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ โดยสามารถผลิตเอทานอลคิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 5.65%, 18.68%, 16.38%, 21.32%, 23.84% และ 17.11% ตามลำดับ อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.13 0.49 0.38 0.27 0.26 และ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.2 จากผลทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อความสามารถในการผลิตกรดแลคติกที่แตกต่างกันด้วย เพราะว่าองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในแต่ละภาชนะนั้นไม่เหมือนกัน และ *R. oryzae* เป็นราที่มีอะไมโลไลติกแอกทิวิตี้ กล่าวคือมีอะไมเลสและกลูโคอะ

ไมเลสที่สามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคสได้ (Wee et al., 2006) ความสามารถในการที่รานั้นจะนำเอาไปใช้ในแต่ละภาวะจึงมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกันด้วย

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

จากการทดลองพบว่าซัปสเตอร์ที่สามารถนำมาใช้ในการหมักกรดแลกติกได้ดีถัดมาจากกลูโคสและสารละลายแป้ง คือ สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งซัปสเตอร์ทั้งสองชนิดนี้ให้ปริมาณกรดแลกติกใกล้เคียงกันดังแสดงผลดังตารางที่ 4 คือ 26.57 และ 25.41 กรัมต่อลิตรคิดเป็นค่า $Y_{p/s}$ เท่ากับ 41.57% และ 44.48 อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.66 และ 0.64 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้ประมาณ 0.5 เท่าของการใช้กลูโคส โดย *R. oryzae* นำซัปสเตอร์ทั้งสองชนิดนี้ไปใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ในปริมาณค่อนข้างสูง สังเกตได้จากรูปที่ 10(ข) และ 10(ค) ซึ่งคาดว่าน่าจะมาจากการที่สารละลายมีโปรตีนสูงจึงทำให้ส่งเสริมการเจริญของเซลล์ ทำให้อัตราการถ่ายเทอาหารและอากาศภายในเซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพลดลง และเนื่องจากซัปสเตอร์ดังกล่าวไม่ได้อยู่ในรูปของกลูโคสบริสุทธิ์ โดยมีองค์ประกอบของสารอื่นปะปนอยู่ด้วยซึ่งอาจจะไปส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *R. oryzae* ทำให้ *R.*

oryzae สามารถใช้น้ำตาลหมดไปอย่างรวดเร็ว ซึ่งพบว่าน้ำตาลของทั้งสองภาวะนี้หมดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 72 และ 80 ตามลำดับ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 13(ข) และ 13(ค) ตามลำดับ อีกทั้งการย่อยของกากมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์นี้อาจจะยังไม่เกิดปฏิกิริยาที่สมบูรณ์ เนื่องจากการย่อยด้วยเอนไซม์นี้เป็นการย่อยที่ภาวะไม่รุนแรงส่งผลให้โมเลกุลของแป้งยังอยู่ในรูปของ โอลิโกแซคคาไรด์ (oligosaccharide) ดังนั้น *R. oryzae* จึงต้องสร้างเอนไซม์จำพวกอะไมโลไลติกออกมาย่อยให้ได้ กลายเป็นกลูโคสบริสุทธิ์เพื่อที่จะนำเข้าสู่วิถีเมแทบอลิซึมต่อไป ทำให้เซลล์มีความสามารถผลิตกรดแลกติกได้ในระดับหนึ่ง เมื่อมาพิจารณาตามค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนเท่ากับ 0.033 และ 0.049 ต่อวินาทีตามลำดับ เมื่อทำการหมักเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง แสดงในตารางที่ 4 พบว่าประสิทธิภาพของการถ่ายเทออกซิเจนของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพนั้นมีค่อนข้างต่ำกว่ากากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 57.26 และ 58.09 กรัมตามลำดับ ซึ่งในปริมาณของเซลล์ที่ใกล้เคียงกัน แต่ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนแตกต่างกัน ดังนั้นจึงเห็นได้ว่าการปรับสภาพกากมันนั้นส่งผลให้ค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีค่าที่สูงขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพของการถ่ายเทอาหารและอากาศมีมากขึ้น ส่งผลต่อการเจริญของเซลล์และการผลิตกรดแลกติกให้ได้ในปริมาณสูงในการหมักระยะยาว (Thongchul and Yang, 2006) และจากผลการทดลองในตารางที่ 4 พบว่า ภาวะที่ใช้ซับสเตรทที่เป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน มีน้ำหนักเซลล์แห้งที่ใกล้เคียงกันกับภาวะที่ใช้ซับสเตรทใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน คือ 55.62 กรัม ในขณะที่ ภาวะที่ใช้ซับสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอน ได้น้ำหนักเซลล์แห้งที่มากกว่า คือ 64.42 และ 76.81 กรัม ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน น่าจะมีคุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใกล้เคียงกับสารละลายแป้ง

จากการทดลองพบว่าซับสเตรทที่ *R. oryzae* นำไปใช้เพื่อผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณที่ต่ำ คือ สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ และสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด โดยกรดแลกติกที่ได้มีปริมาณต่ำกว่าการหมักด้วยซับสเตรทชนิดอื่น แสดงผลดังตารางที่ 4 คือสามารถผลิตกรดแลกติกได้เพียง 7.63 และ 6.75 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.16 และ 0.14 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากก่อนนำซับส

เทรทสองชนิดนี้มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนจำเป็นต้องมีการปรับค่าพีเอชให้เหมาะสมด้วยกรดและเบสก่อนที่จะนำไปเข้าสู่การย่อยด้วยเอนไซม์ ดังนั้น จึงส่งผลให้ความเข้มข้นของเกลือในซัสเตรทดังกล่าวมีปริมาณสูง อีกทั้งในการปรับสภาพ ภาวะที่ใช้รุนแรงกว่าภาวะอื่นๆ อาจทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ร่วมอื่นๆ ขึ้นด้วย ซึ่งในกรณีของการย่อยด้วยกรดนั้นอาจก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ร่วมที่ไม่ต้องการ เช่น เฟอร์ฟูรอล และสารประกอบฟีนอลิก เป็นต้น ซึ่งสารดังกล่าวเป็นอันตรายต่อเซลล์ *R. oryzae* และเป็นตัวยับยั้งกระบวนการหมักได้ (Woiciechowski et al., 1999) เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิต ในการทดลองนี้ไม่ได้มีการทดลองเพื่อกำจัดเกลือที่เกิดจากการปรับค่าพีเอชออกจากสารละลายที่ได้จากการย่อยก่อนที่จะนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมัก ส่งผลให้กรดแลกติกที่ได้จากการใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์มาเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นมีปริมาณที่ต่ำ เกิดผลิตภัณฑ์พลอยได้ (กรดฟูมาริก) ในระหว่างการหมักของแหล่งคาร์บอนทั้งสองชนิดด้วยเช่นกัน การใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์มาเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 13(ง)) กรดฟูมาริกเกิดขึ้นในช่วงชั่วโมงที่ 40 ของระยะการเจริญเติบโต และชั่วโมงที่ 24 ของระยะการสร้างผลิตภัณฑ์ ซึ่งสามารถผลิตกรดฟูมาริกสูงสุด 6.20 กรัมต่อลิตร ส่วนสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดมาเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น (รูปที่ 13(จ)) กรดฟูมาริกเกิดขึ้นในช่วงชั่วโมงที่ 24 ของระยะการสร้างผลิตภัณฑ์ ซึ่งสามารถผลิตกรดฟูมาริกสูงสุด 5.51 กรัมต่อลิตร แต่สองภาวะนี้จะเห็นได้ว่า *R. oryzae* มีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าภาวะอื่นๆ ซึ่งเซลล์จะเริ่มโตภายหลังชั่วโมงที่ 24 ของระยะการเจริญเติบโตเป็นต้นไป สังเกตได้จากค่าพีเอชที่เริ่มลดลง เนื่องมาจากเซลล์เริ่มมีการเจริญเติบโตและมีการผลิตกรดแลกติกออกมาจึงทำให้ค่าพีเอชลดลง ในขณะที่ภาวะอื่นนั้นเซลล์จะเริ่มโตตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 ของระยะการเจริญเติบโตเป็นต้นไป นอกจากนี้ ยังพบว่าทั้งสองภาวะนี้มีการผลิตเอทานอลเป็นปริมาณสูงกว่าการผลิตกรดแลกติก ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลเท่ากับ 12.95 และ 12.53 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่า ถึงแม้ว่าจะสามารถใช้ซัสเตรทจำพวกสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์กับสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดมาเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลกติกได้ แต่ก็จำเป็นต้องมีกำจัดสิ่งเจือปน (detoxification) จำพวกสารยับยั้งในกระบวนการหมักเช่น กรดอะซิติก เฟอร์ฟูรอล ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรอล(HMF) และเกลือ เป็นต้น (Zhao et al., 2009) เพื่อที่จะให้เชื่อมีประสิทธิภาพในการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ได้มากขึ้น

จากการทดลองพบว่า การหมักที่ใช้ซัพสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วย เอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันจะสามารถผลิตกรดแลกติกได้ดีกว่าการหมักที่ใช้ซัพสเตรทเป็นสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วย เอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ ทั้งนี้เนื่องมาจากการที่ซัพสเตรทที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงอย่างเดียว ไม่มีการใช้สารเคมีซึ่งในที่นี้คือโซเดียมไฮดรอกไซด์ในระหว่างขั้นตอนการปรับสภาพเข้ามาเกี่ยวข้อง ส่งผลให้ไม่จำเป็นต้องมีการปรับค่าพีเอช ด้วยกรดและเบสเพื่อให้ได้พีเอชที่ต้องการ ก่อนที่จะนำไปเข้าสู่การย่อยด้วยเอนไซม์ต่อไป จึงไม่ก่อให้เกิดปริมาณของเกลือในสารละลายได้ ดังนั้นภาวะที่สารละลายที่ได้จากการย่อยของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น จึงมีความสามารถในการผลิตกรดแลกติกได้มากกว่า ส่งผลให้มีค่า yield และอัตราการผลิตกรดแลกติกที่สูงกว่าเช่นกัน ดังนั้นการนำกากมันสำปะหลังมาประยุกต์ในกระบวนการผลิตกรดแลกติกนั้น พบว่าการที่นำกากมันมาปรับสภาพด้วยเทคนิคการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเพียงอย่างเดียวจะสามารถผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณระดับหนึ่ง (25.41 กรัมต่อลิตร) ไม่มีความจำเป็นต้องใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้าช่วย

ผลการทดลองจากงานวิจัยนี้ เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Thongchul et al. (2010) ซึ่งทำการศึกษาผลิตกรดแลกติก จากกลูโคส สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดและเอนไซม์เป็นแหล่งคาร์บอน (ความเข้มข้นเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร) โดยการตรึงเซลล์ *R. oryzae* NRRL 395 บนเส้นใยผ้าฝ้าย ทำการหมักในขวดเขย่า พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 23.76 4.47 และ 15.43 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า Y_{ps} เท่ากับ 33% 6% และ 2.3% ตามลำดับ อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.46 0.13 และ 0.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ และสามารถผลิตเอทานอลสามารถผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 14.67 16.37 และ 24.25 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า Y_{ps} เท่ากับ 21% 28% และ 31% ตามลำดับ อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.29 0.60 และ 0.30 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ จากผลการทดลองเห็นได้ว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน จะสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุด เนื่องจากกากมันสำปะหลังประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 5.3 % ทำให้สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังมีปริมาณของโปรตีนสูงเช่นกัน ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณของแหล่งไนโตรเจนอีกทางหนึ่ง ส่งผลให้ช่วยสนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์ในระหว่างกระบวนการหมักมากขึ้นแทนที่จะไปสร้างเป็นกรดแลกติก และการทดลองนี้เป็นการหมักในระดับขวดเขย่า ทำให้ประสิทธิภาพของการถ่ายเทออกซิเจนภายในขวดเขย่าไม่เพียงพอและมีการ เนื่องจาก *R. oryzae* เป็นราที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ ดังนั้นออกซิเจนจึงเป็นปัจจัยสำคัญวิถีเมแทบอลิซึมของเซลล์ ถ้าหากมีออกซิเจนไม่เพียงพอสาเหตุจากการกวนที่ไม่ทั่วถึง จะ



เปลี่ยนวิถีไปสร้างเป็นผลิตภัณฑ์อื่น เช่น เอทานอล เป็นต้น (Zhang et al., 2007) ดังนั้น เราสามารถแก้ปัญหาเหล่านี้ได้โดยการทำการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งจะสามารถควบคุมอัตราการปั่นกววนและให้อากาศอย่างทั่วถึง ส่งผลให้การถ่ายเทออกซิเจนและการผสมเป็นเนื้อเดียวกันของอาหารมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tay and Yang (2002) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดย *R. oryzae* NRRL 395 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ rotating fibrous-bed แบบ fed-batch โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้นเริ่มต้น 70 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงคิดเป็น $Y_{P/S}$ เท่ากับ 90% เนื่องจากมีการตรึงเซลล์บนเส้นใยผ้าฝ้าย และมีการให้ออกซิเจนที่ทั่วถึง และงานวิจัยนี้พบว่าเมื่อทำการหมักโดยใช้ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยใช้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 70 กรัมต่อลิตรเช่นกัน พบว่าสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตกรดแลกติก อีกทั้งช่วยลดปริมาณของการผลิตเอทานอลได้อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตาม ชับสเตรทที่มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนก็เป็นอีกปัจจัยสำคัญ ถ้าหากมีองค์ประกอบที่เป็นอุปสรรคต่อการผลิตกรดแลกติก ก็จะส่งผลให้ประสิทธิภาพของการผลิตกรดแลกติกลดลงอีกด้วย โดยจะเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ร่วมคือ เอทานอลและกรดฟumaric แทน (John et al., 2007; Wee et al., 2006; Zhang et al., 2007)

ลักษณะการจัดเรียงตัวของเส้นใยของ *R. oryzae* บนวัสดุตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติก

เมื่อจบกระบวนการหมัก ทำการเก็บตัวอย่างเซลล์ตรึงบนวัสดุตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติก ตัดให้ได้ขนาด 2.5×2.5 เซนติเมตร นำไปตรวจสอบลักษณะโดยเครื่อง Scanning Electron Microscope (SEM) พบว่า ลักษณะเส้นใยของ *R. oryzae* ที่เจริญบนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่บริเวณภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติกที่กำลังขยาย 350 เท่า (รูปที่ 14) โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันได้แก่ กลูโคส สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรด และสารละลายแป้ง พบว่าการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 14(ก)) เซลล์มีลักษณะเรียวยาวและลักษณะการเกิดกิ่งเล็ก ๆ (Fragmentation) ภายในหนึ่งสาย ซึ่งไม่แตกต่างกับแหล่งคาร์บอนชนิดอื่นๆ โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 53.61 กรัมต่อลิตร แสดงว่าการใช้กลูโคสบริสุทธิ์เป็นแหล่งคาร์บอนเซลล์จะมีการเจริญเติบโตในลักษณะที่สมบูรณ์ที่สุดและสามารถผลิตกรดแลกติกได้มากที่สุด แต่อย่างไรก็ดีค่าสัมประสิทธิ์ของการถ่ายเทออกซิเจนก็ควรจะสูงตามไปด้วยเพื่อแสดงถึงการถ่ายเทอาหารและอากาศที่เพียงพอ

แต่เมื่อพิจารณาลักษณะเส้นใยของ *R. oryzae* ที่เจริญบนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่บริเวณภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติกที่ก้ำกัวย 750 เท่า พบว่าการใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันเป็นแหล่งคาร์บอน (รูปที่ 15(ข)) เซลล์มีลักษณะอ้วน ยาวแต่บริเวณด้านปลายจะขาดเนื่องจากเซลล์มีการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างหนาแน่น โดยดูจากรูปที่ 10(ค) พบว่าเซลล์นั้นมีปริมาณมาก ทำให้ระยะห่างระหว่างเซลล์และใบพัดมีน้อย ส่งผลเซลล์เกิดการฉีกขาดจากแรงเฉือนจากใบพัดแต่อย่างไรก็ดีที่สภาวะนี้เซลล์ก็ยังสามารถผลิตกรดแลกติกได้ถึง 25.41 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาการใช้สารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ ของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าลักษณะเส้นใยของ *R. oryzae* ที่เจริญบนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่บริเวณภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสติกที่ก้ำกัวย 750 เท่า (รูปที่ 15(ง) และ 15(จ)) เซลล์มีลักษณะที่ลึบแบนและมีผลึกมาเกาะอยู่ตัวเซลล์ และเมื่อทำการเพิ่มก้ำกัวยเป็น 3500 เท่า (รูปที่ 16) พบว่าผลึกที่มาเกาะอยู่บนตัวเซลล์มีลักษณะเป็นรูปแจ็กคล้ายลักษณะของผลึกของเกลือ (Fontana et al., 2011) และเมื่อทำการวิเคราะห์หาธาตุองค์ประกอบของผลึกด้วยเครื่อง Energy Dispersive X-ray spectrometer (EDX) พบว่าประกอบไปด้วยธาตุคาร์บอนประมาณ 52% ออกซิเจนประมาณ 42% และไฮโดรเจนประมาณ 6% ซึ่งผลึกที่เกิดขึ้นนี้ส่งผลให้ความสามารถในการผลิตกรดแลกติกของซบสเตรททั้งสองชนิดนี้มีประสิทธิภาพลดลง เห็นได้ว่า ในภาวะนี้เซลล์ผลิตกรดแลกติกได้เพียง 7.63 และ 6.75 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

เมื่อพิจารณาลักษณะการยึดเกาะของ *R. oryzae* บนเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่บริเวณด้านนอกของเบดสติก แสดงดังรูปที่ 17 เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะของเส้นใยผ้าฝ้ายชนิดผ้าขนหนูที่ไม่มีเซลล์ (รูปที่ 17(ก)) กับเซลล์ที่ตรึงอยู่บนเส้นใย (รูปที่ 17(ข) ถึง รูปที่ 17(จ)) พบว่าเซลล์มีการยึดเกาะที่มั่นคง มีการพันเกี่ยวกันระหว่างเส้นใยของเซลล์และเส้นใยผ้าฝ้าย ทำให้ยากต่อการหลุดออกมาในระหว่างกระบวนการหมัก อันเนื่องจากแรงปั่นกวน การตรึงเซลล์สามารถช่วยเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ในการหมักระยะยาว และใช้พลังงานในการปั่นกวนและการให้อาหารน้อยลง เนื่องจากอาหารที่ใช้ในการหมักมีความหนืดต่ำ เพราะเซลล์ได้ถูกตรึงไว้แล้ว ด้วยเหตุนี้เองยังส่งผลให้การเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ภายหลังเสร็จสิ้นกระบวนการหมักแล้วเป็นไปได้อย่างขึ้น (Thongchul, 2005; Chotisubha-anandha et al., 2011)

เมื่อพิจารณาการใช้สารละลายเป้งเป็นแหล่งคาร์บอน จากรูปที่ 17(ฉ) พบว่าการยึดเกาะของ *R. oryzae* บนเส้นใยผ้าฝ้าย ไม่แน่นหนาเหมือนกับการใช้ซบสเตรทชนิดอื่น เนื่องจากมี

โมเลกุลของแป้งมาเกาะรวมอยู่ด้วย เห็นได้จากมีเม็ดแป้งลักษณะกลมๆ (Chen et al., 2011) แทรกกระจัดกระจายอยู่ระหว่างตัวเซลล์และเส้นใย ทำให้เซลล์นั้นสามารถหลุดออกจากเส้นใยผ้าฝ้ายได้ง่าย ส่งผลต่อการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ภายหลังเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก และยังส่งผลให้น้ำหนักเซลล์แห้งของการใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นมีปริมาณสูงด้วย เนื่องจากมีน้ำหนักของโมเลกุลแป้งเกาะอยู่ที่ตัวเซลล์และบริเวณเส้นใยที่ยึดตรึง แต่อย่างไรก็ตามเซลล์ก็ยังสามารถผลิตกรดแลกติกได้ถึง 33.77 กรัมต่อลิตร

ปัจจัยทางวิศวกรรมที่เหมาะสมต่อการหมักกรดแอล-แลกติก

ลักษณะ และ โครงสร้างของถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการทดลองขนาด 5 ลิตร และขนาด 90 ลิตร ดังนี้

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร			ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร		
เส้นผ่านศูนย์กลางถัง	160	mm	เส้นผ่านศูนย์กลางถัง	400	mm
เส้นผ่านศูนย์กลางใบพัด	64	mm	เส้นผ่านศูนย์กลางใบพัด	160	mm
ความเร็วรอบการกวน	20-1200	rpm	ความเร็วรอบการกวน	120-1200	rpm
อัตราการให้อากาศ	0-13	L/min		>12	m ³ /h
มอเตอร์	0.77	kW	มอเตอร์	2.2	kW

การคำนวณเพื่อขยายสเกล ทำโดยใช้เกณฑ์คงที่ 4 เกณฑ์ ดังต่อไปนี้

เกณฑ์ที่ 1 กำลังมอเตอร์ต่อปริมาตร (P/V) คงที่

โดยสำหรับการปั่นกวนที่รุนแรง (turbulent region) ค่า P/V สามารถอธิบายได้ ดังนี้

$$\frac{P}{V} \propto N_i^3 D_i^2$$

จากการคำนวณ ได้ปัจจัยทางวิศวกรรมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร ดังต่อไปนี้

Property	Small scale, 5 L	Large scale, 90 L
P	1 ($P = 11.52$ W)	15.625 ($P = 180.37$ W)
P_a	1 ($P_a = 10.60$ W)	14.24 ($P_a = 158.73$ W)
P/V	1	1
N_i	1 ($N_i = 700$ rpm = 11.67 s ⁻¹)	0.54 ($N_i = 380$ rpm = 6.34 s ⁻¹)
D_i	1 ($D_i = 64$ mm)	2.5 ($D_i = 160$ mm)

Property	Small scale, 5 L	Large scale, 90 L
F_l	1	8.49
F/V	1	0.54
$N_i D_i$	1 ($N_i D_i = 0.75$ m/s)	1.35 ($N_i D_i = 1.01$ m/s)
Re_i	1 ($Re_i = 47,704.91$)	3.40 ($Re_i = 161,980.04$)

จากผลการคำนวณ จะพบว่าหากออกแบบขยายสเกลโดยใช้กำลังมอเตอร์ต่อปริมาตร เป็นเกณฑ์คงที่ ในการหมักกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร จะต้องใช้อัตราการกวน 380 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เพื่อให้ได้ จลนพลศาสตร์ของกระบวนการเทียบเคียงได้กับค่าที่ได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

เกณฑ์ที่ 2 อัตราการไหลวนของน้ำหมัก (F/V) คงที่

โดยสำหรับการปั่นกวนที่รุนแรง (turbulent region) ค่า F/V สามารถอธิบายได้ ดังนี้

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

เมื่ออัตราการไหลวนของน้ำหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพทั้งสองขนาดมีค่าเท่ากัน จะพบว่า ถึงทั้งสอง จะปั่นกวนที่ความเร็วรอบเดียวกัน คือ 700 รอบต่อนาที อย่างไรก็ตาม การปั่นกวนน้ำหมักในถัง ปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตรที่ความเร็วรอบสูงขนาดนี้ จะก่อให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนได้ เนื่องจาก การปั่นกวนที่ความเร็วรอบสูงเป็นที่มาของการเกิดฟอง ทำให้ต้องมีการใช้สารลดฟอง ซึ่ง หากใช้ในปริมาณมากจะส่งผลต่อค่าการละลายของออกซิเจน และการเมแทบอลิซึมของรา อีกทั้ง การปั่นกวนที่ความเร็วสูง ยังใช้พลังงานสูงมาก ดังนั้น เกณฑ์คงที่นี้จึงไม่เหมาะสำหรับนำไปใช้ในการขยายสเกล

เกณฑ์ที่ 3 ความเร็วปลายใบพัดกวน (u_i) คงที่

ความเร็วปลายใบพัดกวน แปรผันกับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของใบพัดและความเร็ว รอบในการกวน ดังนี้

$$u_i \propto N_i D_i$$

จากการคำนวณ ได้ปัจจัยทางวิศวกรรมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร ดังต่อไปนี้

Property	Small scale, 5 L	Large scale, 90 L
P	1 ($P = 11.52$ W)	6.25 ($P = 72$ W)

Property	Small scale, 5 L	Large scale, 90 L
P_a	1 ($P_a = 10.60$ W)	5.98 ($P_a = 63.36$ W)
P/V	1	0.4
N_i	1 ($N_i = 700$ rpm = 11.67 s ⁻¹)	0.4 ($N_i = 280$ rpm = 4.67 s ⁻¹)
D_i	1 ($D_i = 64$ mm)	2.5 ($D_i = 160$ mm)
F_i	1	6.25
F/V	1	0.4
$N_i D_i$	1 ($N_i D_i = 0.75$ m/s)	1 ($N_i D_i = 0.75$ m/s)
Re_i	1 ($Re_i = 47,704.91$)	2.50 ($Re_i = 119,262.28$)

จากผลการคำนวณ จะพบว่าหากออกแบบขยายสเกลโดยใช้ความเร็วปลายใบพัดกลายเป็นเกณฑ์คงที่ ในการหมักกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร จะต้องใช้อัตราการกวน 280 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เพื่อให้ได้จลนพลศาสตร์ของกระบวนการเทียบเคียงได้กับค่าที่ได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

เกณฑ์ที่ 4 ค่า Reynolds' number (Re_i) คงที่

สำหรับการปั่นกวนที่รุนแรง (turbulent region) ค่า Re_i สามารถอธิบายได้ ดังนี้

$$Re_i \propto N_i D_i^2$$

เมื่อกำหนดให้ค่า Re_i คงที่จากการคำนวณ ได้ปัจจัยทางวิศวกรรมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 90 ลิตร ดังต่อไปนี้

Property	Small scale, 5 L	Large scale, 90 L
P	1 ($P = 11.52$ W)	0.4 ($P = 4.61$ W)
P_a	1 ($P_a = 10.60$ W)	0.31 ($P_a = 3.32$ W)
P/V	1	0.0256
N_i	1 ($N_i = 700$ rpm = 11.67 s ⁻¹)	0.16 ($N_i = 112$ rpm = 1.87 s ⁻¹)
D_i	1 ($D_i = 64$ mm)	2.5 ($D_i = 160$ mm)
F_i	1	2.5
F/V	1	0.16
$N_i D_i$	1 ($N_i D_i = 0.75$ m/s)	0.4 ($N_i D_i = 0.3$ m/s)
Re_i	1 ($Re_i = 47,704.91$)	1 ($Re_i = 47,704.91$)