โดยเอนไซม์นี้จะเปลี่ยนไพรูเวท (pyruvate) เป็นอัลดีไฮด์ (aldehyde) ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นเอทานอลแทนกรดแลกติก โดยเอนไซม์ ADH จะทำงานในระยะสั้นๆ ก่อนที่เซลล์จะเริ่มหยุดทำงานและตายในที่สุด (Agger, 1998; Cruz et al., 2001; Cui et al., 1998; Hellendoorn et al., 1998; Kobayashi et al., 1973; Oostra et al., 2001; Pritchard, 1973; Skory, 2004; Sun et al., 1999)

จากที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าการผลิตกรดแลกติกด้วย *R. oryzae* ต้องการการควบคุมสัณฐานของราที่เหมาะสม ซึ่งสามารถควบคุมได้โดยปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพที่เหมาะสม ดังนั้น โครงการวิจัยนี้ จะศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อสัณฐานของรา และการผลิตกรดแลกติก เพื่อนำไปใช้สำหรับการออกแบบกระบวนการในอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

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

วิธีการวิจัย

การหาอัตราการกวนและการให้อากาศที่เหมาะสมในการหมักกรดแอล-แลกติกจากกลูโคสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิตขนาด 5 ลิตร

สายพันธุ์ การเก็บรักษาสายพันธุ์ การเตรียมหัวเชื้อ และอาหารเลี้ยงเชื้อ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ได้แก่ *Rhizopus oryzae* สายพันธุ์ NRRL395 โดยได้รับอนุเคราะห์จาก USDA ประเทศสหรัฐอเมริกา *R. oryzae* NRRL395 เป็นราเส้นใยที่ผลิตกรดแอล-แลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก การเก็บรักษาสายพันธุ์ทำโดยการถ่ายเชื้อจาก stock culture ลงบนอาหารแข็ง PDA (potato dextrose agar) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน แล้วจึงเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยทำเป็นประจำทุกเดือน

การเตรียมหัวเชื้อ ทำได้โดยเก็บ sporangiospores จากเส้นใยราที่เจริญบนอาหารแข็ง PDA ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เพื่อนำมาเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ในน้ำ DI ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปรับความเข้มข้นของสปอร์เป็น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เตรียมสารแขวนลอยที่ความเข้มข้นดังกล่าวเพื่อสำหรับใช้เป็นหัวเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

อาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบด้วย อาหารเพื่อการเจริญ และอาหารเพื่อผลิตกรดแอล-แลกติก โดยอาหารเพื่อการเจริญประกอบด้วย กลูโคส 50 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร อาหารเพื่อผลิตกรดแอล-แลกติกประกอบด้วย กลูโคส 70 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 0.6 กรัมต่อลิตร $MgSO_4$ 0.25 กรัมต่อลิตร $ZnSO_4$ 0.088 กรัมต่อลิตร และยูเรีย 0.3 กรัมต่อลิตร

การหมักกรดแอล-แลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต พัฒนามาจากการดัดแปลงถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวนปริมาตร 5 ลิตร โดยเสริมโครงสแตนเลสซึ่งมีผ้าขนหนูเย็บตรึงไว้สำหรับตรึงสปอร์และเส้นใยรา โดยโครงสแตนเลสจะยึดไว้กับฝาของถังปฏิกรณ์ชีวภาพ การเตรียมถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อใช้งาน โดยเริ่มแรกเตรียมอาหารเพื่อการเจริญ 3 ลิตร ใส่ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 30 นาที หลังจากที่อุณหภูมิภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพลดลง ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส แล้วเริ่มปรับค่ามาตรฐานหัววัดออกซิเจน (DO probe) โดยแก๊สไนโตรเจน (zero 0%DO) และอากาศ (slope 100%DO) หลังจากนั้น ถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร (10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ล งในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ในช่วงของการเจริญ (growth phase) ไม่มีการควบคุมค่าพีเอช หลังจากนั้น 48 ชั่วโมง ถ่ายอาหารเพื่อการเจริญออกจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แล้วเติมอาหารเพื่อการผลิตกรดแอล-แลกติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แล้วควบคุมค่าพีเอชที่ 6.0 ทำการหมักไปจนกลูโคสหมด หรือความเข้มข้นของกรดแอล-แลกติกไม่เพิ่มขึ้น ระหว่างการทดลอง เก็บตัวอย่างทุก 6-8 ชั่วโมง ในการทดลองนี้ได้ศึกษาผลของอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศต่ออัตราการถ่ายเทออกซิเจนสู่น้ำหมัก (K_La) และค่าจลนพลศาสตร์ของการหมักโดยแปรอัตราการกวน (100 300 500 และ 700 รอบต่อนาที) และอัตราการให้อากาศ (0.5 และ 1.0 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

สัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจน

โดยทั่วไป นิยมวัดค่า K_La ก่อนสิ้นสุดขั้นตอนการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยวิธี dynamic gassing out ซึ่งในการทดลองดังกล่าว จะหยุดให้อากาศแล้วลดอัตราการกวนให้ต่ำเพียงแค่ให้สามารถรักษาความเป็นเนื้อเดียวของน้ำหมักไว้ได้ แล้วอ่านค่า DO จากหัววัดออกซิเจน ณ เวลาใดๆ เพื่อนำมาคำนวณหาอัตราที่เซลล์นำออกซิเจนไปใช้ในการเมแทบอลิซึม จากความชันของเส้นตรงจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการละลายของออกซิเจน หรือค่า C_L (ได้จากค่า DO) และเวลา จากนั้นให้อากาศและกวนที่อัตราเท่าเดิม แล้วอ่านค่า DO ณ เวลาใดๆ จนได้ค่าคงที่ นำค่า DO

ที่ได้มาใช้ในการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง $\frac{dC_L}{dt} + OUR$ กับ C_L โดยที่ค่า K_La หาได้จากค่าความชันของเส้นกราฟ (Chotisubha-ananda et al., 2011)

ค่าจลนพลศาสตร์ของการหมัก

ค่า product yield ($Y_{p/s}$ หรือ $Y_{x/s}$ (cell)) คำนวณได้จากอัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นต่อกลูโคสที่ใช้ไป ส่วนค่า productivity คำนวณจากปริมาณของผลิตภัณฑ์สุทธิต่อปริมาตรต่อเวลา

ผลิตภัณฑ์หลักที่เกิดขึ้นจากการหมักโดย *R. oryzae* 3 ชนิด ได้แก่ น้ำหนักแห้งของรา กรดแอล-แลกติก และเอทานอล โดยปริมาณน้ำหนักแห้งหาได้เมื่อสิ้นสุดการหมัก โดยเก็บเกี่ยวเซลล์ราที่ตรึงบนผ้าขนหนู นำไปล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ แล้วนำมาหักลบกับน้ำหนักผ้าขนหนูที่ได้ชั่งน้ำหนักแน่นอนไว้แล้วก่อนการหมัก นำน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้หารด้วยปริมาตรน้ำหมัก (3 ลิตร) ได้เป็นค่าความเข้มข้นของเซลล์

การหาปริมาณกลูโคสที่เหลือ กรดแอล-แลกติก และเอทานอลที่ *R. oryzae* ผลิตขึ้น ทำได้โดยเทคนิคไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี นำตัวอย่างน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยง กรองด้วยเมมเบรนเซลลูโลสอะซิเทต แล้วนำไปเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน ฉีดตัวอย่างเจือจางปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใช้คอลัมน์สำหรับวิเคราะห์กรดอินทรีย์ (Biorad, Aminex HPX-87H ion exclusion; 300mm×7.8mm) รักษาอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 45 องศาเซลเซียส มีสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.005 M เป็นตัวพา ที่อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที โดยอ่านค่าพื้นที่ใต้พีคจาก Refractive index detector แล้วเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2.0 กรัมต่อลิตร

การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับเตรียมกากมันสำปะหลัง

กากมันสำปะหลังสดที่ใช้ในการวิจัย ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท แป้งมันเอี่ยมเฮงอุตสาหกรรม จำกัด และบริษัท เอี่ยมบูรพา จำกัด กากมันสดที่ได้จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนใช้งาน

ทำการปรับสภาพกากมันก่อนนำกากมันก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยมุ่งหวังลดต้นทุนปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในขั้นตอนการย่อยแป้งที่หลงเหลืออยู่ในกากมัน ซึ่งการย่อยกากมันในงานวิจัยนี้ ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่ การปรับสภาพกากมันก่อนการย่อยโดยเทคนิค physicochemical pretreatment และการย่อยแป้งและเซลลูโลส

การปรับสภาพกากมันสำปะหลังก่อนการย่อยโดยเทคนิค physicochemical pretreatment

ในขั้นตอนนี้จะศึกษาผลของการใช้ความร้อนภายใต้ความดันสูง (steam pretreatment) เปรียบเทียบกับการใช้ความร้อนสูงควบคู่กับการเติมสารละลายแอลคาไลน์ (steam with combination of alkaline treatment)

การปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดัน โดยนำกากมันสดมาเติมน้ำให้มีปริมาณของกากมันประมาณ 5 – 20% (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว แปรผันเวลาในการ autoclave ที่ 15 30 45 และ 60 นาที

การปรับสภาพด้วยการใช้ร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับการใช้สารละลายแอคคาไลน์ โดยนำกากมันสดมาเติมสารละลาย NaOH ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.1 0.5 และ 1 N ปริมาณของกากมันที่ใช้อยู่ในช่วง 6.7 – 20% (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลาต่างๆ กัน คือ 15 30 45 และ 60 นาที

ภายหลังการปรับสภาพนั้น นำตัวอย่างแยกเอาสารละลายออกและนำกากที่ได้อบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ต่อมานำกากมันแห้งที่ได้นั้นไปใช้ในการย่อยด้วยเอนไซม์ต่อไป โดยที่สารละลายที่ได้นั้นนำไปวัดหาปริมาณน้ำตาลที่สูญเสียไปภายหลังการปรับสภาพด้วย

การย่อยเซลลูโลสและแป้งจากกากมันสำปะหลังที่ปรับสภาพแล้ว

นำกากมันที่ผ่านการปรับสภาพมาทำการย่อยส่วนที่เป็นเซลลูโลสและแป้งที่เหลืออยู่ในกากมัน (นำกากมันแห้ง 0.5 กรัม จากนั้นเติมน้ำ DI ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ซึ่งจะมีความเข้มข้นของกากมันอยู่ที่ 6.7 % (น้ำหนักต่อปริมาตร)) ในขั้นตอนแรกจะใช้เซลลูเลส (Accellerase®1500, Genencor, USA, 2,200-2,800 CMCU ต่อกรัม ความถ่วงจำเพาะประมาณ 1.00 กรัมต่อมิลลิลิตร) ความเข้มข้นต่างกันคือ 5.61 และ 33.15 ยูนิต/กรัมกากมันแห้ง เพื่อทำการย่อยสลายเซลลูโลสและทำให้แกรนูลของแป้งที่อยู่ภายในโครงสร้างของเซลลูโลสถูกปลดปล่อยออกมา บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างกันคือ 1 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นจะเข้าสู่ขั้นตอนที่สองคือจะใช้อะไมเลส (Spezyme ethyl, Genencor, USA, 6,700–7,300 AAU ต่อกรัม ความถ่วงจำเพาะประมาณ 1.18–1.22 กรัมต่อมิลลิลิตร) ความเข้มข้นต่างกันคือ 16.8 และ 33.6 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้ง ใส่ลงในสารละลาย ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาต่างกันคือ 15 และ 30 นาที

แปรระยะเวลาในการบ่ม ปริมาณของเซลลูเลส และปริมาณอะไมเลส เพื่อศึกษาถึงผลของความเข้มข้น และ yield ของกลูโคสที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง หลังการย่อยนำตัวอย่างไป

ปั่นเหวี่ยงและแยกสารละลายส่วนใสเก็บไว้สำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักกรดแลกติก โดยปรับพีเอชเป็น 6.0 แบ่งตัวอย่างสารละลายส่วนหนึ่งไว้สำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำตาล และสารประกอบอื่นๆ

โดยกลูโคสที่ปรากฏในของเหลวที่แยกออกมาภายหลังการปรับสภาพกากมันและในส่วนของการละลายที่ได้จากการย่อยจะทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง YSI 2700 Biochemistry Analyzer ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในรูปของกลูโคสที่ปรากฏในของเหลวที่แยกออกมาภายหลังการปรับสภาพกากมันและในส่วนของการละลายที่ได้จากการย่อยหาได้จาก การนำสารละลายที่ได้มาทำปฏิกิริยากับกรดไฮโดรคลอริก 0.25 M จากนั้น autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 60 นาที หลังการจากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงและแยกสารละลายส่วนใสไปทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง YSI 2700 Biochemistry Analyzer

การหมักกรดแอล-แลกติกจากสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง

ทำการหมักแบบเซลล์ตรึงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบเบดสถิต โดยถ่ายหัวเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เทลงไปในอาหารเพื่อการเจริญปริมาตร 3 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้น 6.0 อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ทำการหมักจนครบ 48 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนอาหารเป็นอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ ควบคุมค่าพีเอชที่ 6.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 M ตลอดการหมัก ทำการหมักต่อจนครบ 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 8 ชั่วโมง เมื่อครบ 96 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์และนำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) เพื่อหาปริมาณกรดแอล-แลกติก และผลิตภัณฑ์พลอยได้ รวมทั้งกลูโคสที่เหลือจากการหมัก (Chotisubha-anandha et al., 2011)

อาหารเพื่อการเจริญเติบโต และอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์ที่ใช้ ได้แก่ กลูโคส สารละลายที่ได้จากการย่อยของกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ สารละลายที่ได้จากการย่อยของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันด้วยเอนไซม์ สารละลายที่ได้จากการย่อยของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยการใช้ความร้อนสูงภายใต้ความดันพร้อมกับสารละลายแอลคาไลน์ด้วยเอนไซม์ สารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดและสารละลายแป้ง 50 กรัมต่อลิตรสำหรับอาหารเพื่อการเจริญเติบโต และ 70 กรัมต่อลิตรสำหรับอาหารเพื่อสร้างผลิตภัณฑ์