การใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อผลิตกรดแลคติกจากเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1

THE USE OF AGRICULTURAL WASTE AS A NITROGEN SOURCE FOR LACTIC ACID PRODUCTION FROM *Bacillus coagulans* D-DSM1

ทัตพิชา หงษ์แปด

วีรญา ขวัญมา

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

THE USE OF AGRICULTURAL WASTE AS A NITROGEN SOURCE FOR LACTIC ACID PRODUCTION FROM *Bacillus coagulans* D-DSM1

TADPICHA HONGPAD
VEERAYA KWANMA

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE (BIOTECHNOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อผลิตกรดแลคติกจากเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1 The use of agricultural waste as a nitrogen source for lactic acid production from *Bacillus coagulans* D-DSM1
ชื่อนักศึกษา	นางสาวทัตพิชา หงษ์แปด รหัสนักศึกษา 57050689 นางสาววีรญา ขวัญมา รหัสนักศึกษา 57050763
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2560
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.นิลเนตร อัศวะศิริจินดา

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) ประจำปีการศึกษา 2560

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ประธานกรรมการ	
ผศ.ดร.ดวงกมล เรือนงาม กรรมการ	
ดร.นิลเนตร อัศวะศิริจินดา กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อผลิตกรดแลคติกจากเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1

ชื่อนักศึกษา นางสาวทัตพิชา หงษ์แปด รหัสนักศึกษา 57050689

นางสาววีรญา ขวัญมา รหัสนักศึกษา 57050763

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา ชีววิทยา

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ปีการศึกษา 2560

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.นิลเนตร อัศวะศิริจินดา

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ต้องการเพิ่มมูลค่าให้แก่วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีอยู่มากในประเทศไทย จึงนำกากเนื้อในปาล์มที่หีบน้ำมันแล้วและรำข้าวที่มักใช้เป็นอาหารสัตว์มาใช้ในการผลิตกรดแลคติกจากแบคทีเรีย *Bacillus coagulans* D-DSM1 โดยใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากกากเนื้อในปาล์มและรำข้าวเป็นแหล่งของเหลือทิ้งที่มีโปรตีนสูง ซึ่งเมื่อนำไปเทียบกับแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นๆ แล้วพบว่า กากเนื้อในปาล์มที่หีบน้ำมันแล้วและรำข้าวสามารถใช้เลี้ยงเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1 ได้และให้ผลผลิตกรดแลคติกของเชื้อจุลินทรีย์ที่สูงที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นกากเนื้อในปาล์มที่หีบน้ำมันแล้วความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณกรดแลคติกที่เชื้อจุลินทรีย์ผลิตได้สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คือ 0.45 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลพลอยได้ 0.10 กรัมต่อกรัมกลูโคส ซึ่งการศึกษานี้มีความเป็นไปได้ที่จะสามารถผลิตกรดแลคติกโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

คำสำคัญ : กรดแลคติก, กากเนื้อในปาล์ม, รำข้าว, วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร, *Bacillus coagulans* D-DSM1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	The use of agricultural waste as a nitrogen source for lactic acid production from *Bacillus coagulans* D-DSM1
Students	Miss Tadpicha Hongpad Student ID 57050689
	Miss Veeraya Kwanma Student ID 57050763
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2017
Advisor	Dr. Nilnate Assavasirijinda

Abstract

This study aims to increase value-added products from agricultural waste in Thailand. The palm kernel meal and rice bran are commonly used as animal feed. However, this study used palm kernel meal and rice bran as a nitrogen source for lactic acid production from *Bacillus coagulans* D-DSM1 because the palm kernel meal and the rice bran contain a high protein content. The study showed that the palm kernel meal and the rice bran can be used for *Bacillus coagulans* D-DSM1 growth and the highest yield of lactic acid production was obtained when the palm kernel meal was used at a concentration of 150 g/L. The lactic acid concentration and yield when cultivated at 46 ° C for 48 hr were 0.45 g/L and 0.10 g/g glucose, respectively. This is the first study showing that the palm kernel meal and rice bran, which are abandoned agricultural waste in Thailand, could be used as nitrogen sources for lactic acid production.

Keywords : Lactic acid, Palm kernel meal, Rice bran, Agricultural waste, *Bacillus coagulans* D-DSM1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน ขอขอบพระคุณ ดร.นิลเนตร อัศวะศิริจินดา อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ให้การช่วยเหลือ ให้คำปรึกษา และให้คำแนะนำมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ประธานกรรมการ และ ผศ.ดร.ดวงกมล เรือนงาม กรรมการ ที่กรุณาตรวจทานและพิจารณาโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ในสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ในคณะวิทยาศาสตร์ของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่คอยให้การช่วยเหลือ ให้คำแนะนำตลอดการทำโครงงานพิเศษ

ขอขอบพระคุณบิดา มารดาของข้าพเจ้าและสมาชิกกลุ่มโครงงานพิเศษทุกท่านที่ให้กำลังใจมาโดยตลอด และขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกๆ ท่านที่คอยอบรม สั่งสอน และให้ความรู้จนทำให้สมาชิกกลุ่มมีความรู้ ความสามารถในการจัดทำโครงงานพิเศษจนสำเร็จ

ทัตพิชา หงษ์แปด

วีรญา ขวัญมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .....ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ข
กิตติกรรมประกาศ.....ค
สารบัญ.....ง
สารบัญตาราง.....ช
สารบัญรูป.....ซ
คำย่อ/สัญลักษณ์ .....ญ
บทที่ 1 บทนำ.....1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ.....1
1.2 วัตถุประสงค์.....2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ.....2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3
2.1 กรดแลคติก 3
2.1.1 ความเป็นมาของกรดแลคติก.....3
2.1.2 คุณสมบัติของกรดแลคติก.....3
2.1.3 การผลิตกรดแลคติก.....4
2.1.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก.....6
2.1.5 การนำกรดแลคติกไปใช้ประโยชน์.....8
2.2 วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร.....8
2.2.1 กากเนื้อในปาล์มที่หีบน้ำมันแล้ว.....8
2.2.2 รำข้าวที่หีบน้ำมันแล้ว.....13
2.3 เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยโปรตีน.....15
2.3.1 เอนไซม์อัลคาเลส.....15
2.4 เชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus coagulans* D-DSM1 15
2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 16
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย..... 18
3.1 เครื่องมืออุปกรณ์และเครื่องแก้ว.....18
3.1.1 เครื่องมือ 18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1.2 เครื่องแก้ว 19
3.2 สารเคมี 19
3.3 เชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus coagulans* D-DSM1 20
3.3.1 อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง 20
3.3.2 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ 20
3.4 การเตรียมหัวเชื้อบริสุทธ์ 20
3.5 การเตรียมแหล่งไนโตรเจน 21
3.5.1 การเตรียมอาหารสำหรับการทดสอบแหล่งไนโตรเจน 21
3.5.2 การย่อยแหล่งไนโตรเจนจากของเหลือทิ้งทางการเกษตร 21
3.6 การเพาะเลี้ยงเชื้อ 22
3.6.1 การวัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ช่วง Late log phase 22
3.6.2 การหาแหล่งไนโตรเจน 22
3.6.3 การหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม 23
3.6.4 การหาแหล่งคาร์บอน 23
3.6.5 การหาความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสม 24
3.7 การวิเคราะห์ 24
3.7.1 การวิเคราะห์ไนโตรเจน 24
3.7.2 วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติกโดยการไตเตรต 25
3.7.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 25
3.7.4 การวิเคราะห์ผลพลอยได้ของกรดแลคติก 26
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 27
4.1 ผลการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1 27
4.2 ผลการวิเคราะห์แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1 28
4.3 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนจากของเหลือทิ้งทางการเกษตรต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1 29
4.4 ผลการวิเคราะห์แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1 31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.5 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1 32
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 37
เอกสารอ้างอิง 38
ภาคผนวก 43
ภาคผนวก ก 44
ภาคผนวก ข 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 สมบัติทางกายภาพของกรดแลคติก....4
2.2 ตารางแสดงอนุกรมวิธานของปาล์มน้ำมัน....10
2.3 เปรียบเทียบปริมาณเปอร์เซ็นต์ไขมันได้จากการสกัดน้ำมันจากเมล็ดปาล์มน้ำมัน ด้วยการใช้สารเคมีกับการสกัดด้วยวิธีการหีบน้ำมัน....12
2.4 ส่วนประกอบทางเคมีของกากเนื้อในปาล์ม....13
3.1 รายชื่อรุ่น ยี่ห้อ เครื่องมือและอุปกรณ์ในการดำเนินงานวิจัย....18
4.1 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดแลคติกโดยเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1 โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 50, 80 และ 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ชั่วโมงที่ 24....35
4.2 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดแลคติกโดยเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1 โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 50, 80 และ 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ชั่วโมงที่ 48....36
ข1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส ที่ความเข้มข้น 200 ,400 ,600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร....46
ข2 ค่าวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรของสารละลายมาตรฐานกลูโคส....47
ข3 ผลการไทเทรตของสารละลายมาตรฐานกรดแลคติก....48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 โครงสร้างของกรดแลคติกแบบ L(+) และ D(-)..... 4
4.1 กราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1 ในอาหารเหลว GYC เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 45 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ..... 27
4.2 กราฟเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Bacillus coagulans* D-DSM1 ในอาหารเหลวที่ใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ..... 28
4.3 กราฟเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Bacillus coagulans* D-DSM1 ในอาหารเหลวโดยใช้แหล่งไนโตรเจนจากของเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ..... 29
4.4 กราฟเปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติก(กรัมต่อลิตร) เมื่อใช้กากเนื้อในปาล์มและรำข้าวเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10, 50, 100, 150, 200 และ 300 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ..... 30
4.5 กราฟเปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนปริมาณไนโตรเจนเมื่อใช้กากเนื้อในปาล์มและรำข้าวเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10, 50, 100, 150, 200 และ 300 กรัมต่อลิตร..... 30
4.6 กราฟเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Bacillus coagulans* D-DSM1 ในอาหารเหลวโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ..... 31
4.7 กราฟเปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร) โดยเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1 ในอาหารเหลวโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ..... 32
4.8 กราฟเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Bacillus coagulans* D-DSM1 ในอาหารเหลวโดยใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50, 80, 100, 120 และ 150 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ..... 33
4.9 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ในอาหารเหลวโดยใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50, 80, 100, 120 และ 150 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ..... 34
4.10 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร) โดยเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1 ในอาหารเหลวโดยใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50, 80, 100, 120 และ 150 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ..... 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

หน้า

ข1 กราฟมาตรฐานกลูโคส.....47
ข2 กราฟมาตรฐานกรดแลคติก.....49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
GYC	อาหารมาตรฐานสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมมีพืชเศรษฐกิจที่สำคัญหลายชนิดโดยปาล์มและข้าวเป็นสินค้าเกษตรหลักที่มีมูลค่าการส่งออกอันดับ 1-5 ของประเทศไทย (กรุงเทพธุรกิจ, 2561) ปาล์มเป็นพืชเศรษฐกิจหลักของประเทศไทย โดยมีมูลค่าการส่งออกในปี 2560 อยู่ที่ 169.75 ล้านบาท (กระทรวงพาณิชย์, 2560) โดยส่วนใหญ่ส่งออกในรูปแบบน้ำมันปาล์มเป็นหลัก ผลิตภัณฑ์จากปาล์มสร้างรายได้มหาศาลประมาณ 11,815 ล้านบาท ในขณะที่ความต้องการใช้น้ำมันปาล์มในประเทศมีประมาณ 1,769,587 ตัน (Research office of agricultural economics, 2015) จึงมีวัสดุเหลือทิ้งและชีวมวลหลายชนิดเกิดขึ้นจากกระบวนการผลิต หนึ่งในนั้นคือกากเนื้อในปาล์ม โดยกากเนื้อในปาล์มหลังจากหีบน้ำมันแล้วสามารถใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ได้ (ปิน, 2558) ข้าวเป็นอาหารหลักสำหรับมนุษย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศแถบเอเชีย ปัจจุบันประเทศไทยมีพื้นที่นาข้าวประมาณ 62 ล้านไร่ทั่วประเทศ ให้ผลผลิตข้าวเปลือก 31 ล้านตันต่อปี หรือ 20.5 ล้านตันข้าวสาร (วารีรัตน์, 2560) จึงเกิดการแปรรูปข้าวขึ้นมากมายหนึ่งในนั้นคืออุตสาหกรรมน้ำมันรำข้าว รำข้าวจึงเป็นผลพลอยได้ที่สำคัญ สามารถใช้ในการผลิตโปรตีนสำหรับเป็นผลิตภัณฑ์อาหารของมนุษย์ (Capellini และคณะ, 2017) เนื่องจากรำข้าวหลังจากสกัดน้ำมันออกไปแล้วยังมีโปรตีนเหลืออยู่ถึง 10 – 15 เปอร์เซ็นต์ (สุคันธรส, 2560)

ในปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตกรดแลคติกโดยการใช้จุลินทรีย์ซึ่งสามารถนำไปผลิต Polylactic acid ซึ่งเป็นหนึ่งในสารเคมีแพลตฟอร์ม (chemical building block) และสามารถนำไปผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพหรือ Biodegradable plastic (Datta R และคณะ, 2001) โดยทั่วไปในการผลิตกรดแลคติกจากจุลินทรีย์ไม่ได้ใช้เพียงน้ำตาลเท่านั้นแต่ยังต้องการสารอาหารอื่นๆ ได้แก่ กรดอะมิโน เปปไทด์ และวิตามิน อีกด้วย (Wang และคณะ, 2011) ในงานวิจัยส่วนใหญ่ใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งอาหารสำหรับจุลินทรีย์ ซึ่งการใช้สารสกัดจากยีสต์ส่งผลให้ต้นทุนในการผลิตสูง (Nancib และคณะ, 2005) ดังนั้นจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อทดแทนการใช้สารสกัดจากยีสต์ เช่น กากถั่วเหลือง (Nguyen และคณะ, 2013), เมล็ดฝ้าย (Li และคณะ, 2013) และ เปลือกถั่วลิสง (Wang และคณะ, 2011) สิ่งสำคัญจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจำพวกนี้คือมีสารอาหารที่แบคทีเรียผลิตกรดแลคติกต้องการจึงสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตได้ (Abdel-Rahman และคณะ, 2011) ดังนั้นกากเนื้อในปาล์มและรำข้าวจึงถูกเลือกมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนให้แก่แบคทีเรียเพื่อผลิตแลคติกในการทดลองนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. ศึกษาการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในประเทศไทย คือ กากเนื้อในปาล์ม และ รำข้าว มาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรดแลคติก

2. ทดสอบความสามารถในการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1 ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่ม Thermotolerant ในอาหารที่ใช้แหล่งไนโตรเจนจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1. หาวิธีการย่อยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรคือ กากเนื้อในปาล์มและรำข้าวเพื่อให้เชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1 สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งสารอาหารได้

2. ตรวจสอบปริมาณกรดแลคติกที่เชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1 ผลิตได้จากการใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรแต่ละชนิดเป็นแหล่งไนโตรเจน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนให้กับเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1 ในการผลิตกรดแลคติกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดแลคติก

2.1.1 ความเป็นมาของกรดแลคติก

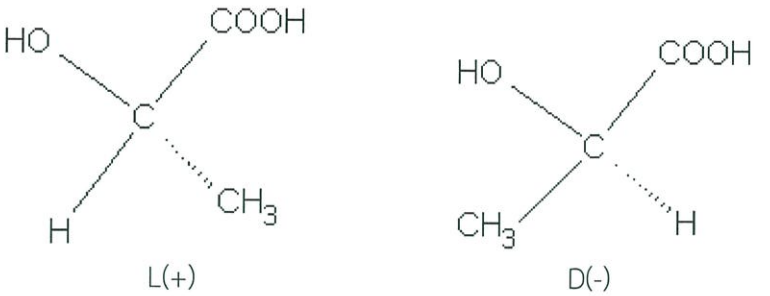
กรดแลคติกถูกค้นพบครั้งแรกโดยนักเคมีชาวสวีเดนชื่อว่า Carl Wilhelm Scheele ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1780 ซึ่งพบว่าเป็นกรดที่ทำให้นมหมักมีรสเปรี้ยว ซึ่งต่อมา Louis Pasteur, Joseph Lister และ Max Delbrück รายงานผลการวิจัยว่าแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้ (Benninga, 1990)

กรดแลคติกถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมอื่นๆ ซึ่งมักใช้เป็นสารป้องกันการเน่าเสียหรือใช้สำหรับปรับความเป็นกรดของอาหารและเครื่องดื่ม โดยในปี ค.ศ 1881 ได้มีการผลิตแลคติกขึ้นในทางการค้าโดยกระบวนการหมัก ซึ่งผลิตอยู่ในรูปของแคลเซียมแลคเตท แต่ยังไม่ประสบความสำเร็จ (Underkofler และ Hickey, 1954) จึงมีการพัฒนาต่อเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น อุตสาหกรรมทอผ้า การฟอกหนัง การผลิตเครื่องสำอางค์และเคมีภัณฑ์ ซึ่งในปัจจุบันกรดแลคติกถือเป็น 1 ใน 30 ของสารเคมีแพลตฟอร์ม (Chemicals building block) ที่มีศักยภาพที่ผลิตได้จากชีวมวลและรู้จักกันดีว่าเป็นพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ จึงมีการนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตโพลิเมอร์ชนิดต่างๆ เพื่อลดการใช้โพลิเมอร์จากปิโตรเคมี ส่งผลให้เกิดความต้องการใช้แลคติกเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน

2.1.2 คุณสมบัติของกรดแลคติก

กรดแลคติกมีชื่อทางเคมีว่า 2-hydroxypropionic acid หรือ 2-hydroxypropanoic acid ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ที่มีคาร์บอน 3 อะตอม คาร์บอน 1 อะตอมที่อยู่ส่วนปลายเป็นส่วนของหมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl group) ส่วนอะตอมของคาร์บอนอีกปลายหนึ่งเป็นหมู่เมทิล (Methyl group) หรือหมู่ไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbon) และอะตอมของคาร์บอนที่อยู่ตรงกลางมีหมู่แอลกอฮอล์ ซึ่งในปี ค.ศ 1971 Holton และคณะ ได้มีการแบ่งโครงสร้างของกรดแลคติกออกเป็นสองโครงสร้างตามคุณสมบัติการหักเหของลำแสง คือ L(+) และ D(-) (Litchfield, 1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของกรดแลคติก

ที่มา : Narayanan และคณะ (2004)

กรดแลคติคสามารถละลายได้ในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ที่ละลายในน้ำ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ คุณสมบัติอื่นๆ ของกรดแลคติกสรุปได้ดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 2.1 สมบัติทางกายภาพของกรดแลคติก

น้ำหนักโมเลกุล	90.08
จุดหลอมเหลว D(-) หรือ L(+) DL (ในสัดส่วนต่าง)	52.8 - 54 องศาเซลเซียส 16.8 - 33 องศาเซลเซียส
จุดเดือด DL	82 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 0.5 มม.ของปรอท 122 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 14 มม.ของปรอท
ค่าคงที่ของการแตกตัว (K_a ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส)	1.37×10^{-4}
ค่าความร้อนของการเผาไหม้ (DH_c)	1361 กิโลจูลต่อโมล
ค่าความร้อนจำเพาะ (C_p ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส)	190 กิโลจูลต่อโมลองศาเซลเซียส

ที่มา : Narayanan และคณะ (2004)

2.1.3 การผลิตกรดแลคติก

สามารถผลิตได้ 2 วิธี คือ กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีและกระบวนหมักทางชีวภาพ (Narayanan และคณะ, 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.1 กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี

ในทางการค้าทำได้โดยการเติมไฮโดรเจนไซยาไนด์ลงในอะซีทัลดีไฮด์เพื่อให้เกิดแลคโตไนไทรล์ปฏิกิริยานี้เกิดขึ้นในสภาวะที่เป็นของเหลวที่ความดันบรรยากาศสูงซึ่งทำให้บริสุทธิ์โดยกระบวนการกลั่น จากนั้นไฮโดรไลซ์แลคโตไนไทรล์ไปเป็นกรดแลคติก โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นหรือกรดซัลฟิวริกเพื่อสร้างเกลือแอมโมเนียและกรดแลคติก จากนั้นกรดแลคติกจะถูกเอสเทอร์ริไฟด์ในกระบวนการเอสเทอร์ริฟิเคชั่นด้วยเมทานอลเพื่อผลิตเมทิลแลคเตทซึ่งจะถูกแยกออกและทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่นและถูกไฮโดรไลซ์ด้วยน้ำภายใต้ตัวเร่งปฏิกิริยาที่เป็นกรดเพื่อผลิตกรดแลคติกและสามารถนำเมทานอลกลับมาใช้ใหม่ได้ แสดงโดยปฏิกิริยาต่อไปนี้ (Narayanan และคณะ, 2004)

1. การเติมไฮโดรเจนไซยาไนด์

CH_3CHO + HCN $\xrightarrow{\text{ตัวเร่ง}}$ $CH_3CHOHCN$

อะซีทัลดีไฮด์ ไฮโดรเจนไซยาไนด์ แลคโตไนไทรล์

2. การไฮโดรไลซิสโดยกรดซัลฟิวริก

$CH_3CHOHCN + H_2O + 1/2H_2SO_4 \rightarrow CH_3CHOHCOOH + 1/2(NH_4)_2SO_4$

แลคโตไนไทรล์ กรดซัลฟิวริก กรดแลคติก เกลือแอมโมเนียม

3. กระบวนการเอสเทอร์ริฟิเคชั่น

$CH_3CHOHCOOH + CH_3OH \rightarrow CH_3CHOHCOOCH_3 + H_2O$

กรดแลคติก เมทานอล เมทิลแลคเตท

4. การไฮโดรไลซิสโดยน้ำ

$CH_3CHOHCOOCH_3 + H_2O \rightarrow CH_3CHOHCOOH + CH_3OH$

เมทิลแลคเตท กรดแลคติก เมทานอล

กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีจะได้กรดแลคติกที่เป็น Racemic mixture คือเป็นกรดแลคติกที่มีทั้งโครงสร้างที่เป็นแบบ L(+) และแบบ D(-) โดยมีสัดส่วนที่ไม่แน่นอนจึงทำให้มีข้อจำกัดในการใช้และไม่สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมได้

2.1.3.2 กระบวนการหมักทางชีวภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นการผลิตโดยวิธีการหมัก จากสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่ได้จากผลิตผลทางการเกษตร โดยใช้แบคทีเรียแลคติกเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแลคติก ซึ่งกรดแลคติกที่ได้จะนำไปผ่านกระบวนการต่างๆ เพื่อสกัดแยกเอากรดแลคติกออกจากน้ำหมัก

1. กระบวนการหมักและการ Neutralization

$C_6H_{12}O_6$ + $Ca(OH)_2$ $\xrightarrow{\text{กระบวนการหมัก}}$ $(2CH_3CHOHCOO^-)\,Ca^{2+} + 2H_2O$

คาร์โบไฮเดรต แคลเซียมไฮดรอกไซด์ แคลเซียมแลคเตท

2. การไฮโดรไลซิสโดยกรดซัลฟิวริก

$2(CH_3CHOHCOO^-)\,Ca^{2+} + H_2SO_4 \longrightarrow 2CH_3CHOHCOOH + CaSO_4$

แคลเซียมแลคเตท กรดซัลฟิวริก กรดแลคติก แคลเซียมซัลเฟท

3. กระบวณการเอสเทอร์ริฟิเคชั่น

$CH_3CHOHCOOH + CH_3OH \longrightarrow CH_3CHOHCOOCH_3 + H_2O$

กรดแลคติก เมทานอล เมทิลแลคเตท

4. การไฮโดรไลซิสโดยน้ำ

$CH_3CHOHCOOCH_3 + H_2O \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + CH_3OH$

เมทิลแลคเตท กรดแลคติก เมทานอล

น้ำหมักที่มีแคลเซียมแลคเตทถูกกรองเพื่อกำจัดเซลล์แบคทีเรีย คาร์บอนที่ผ่านการย่อยระเหย และละลายตะกอนด้วยกรดซัลฟิวริกเพื่อให้ได้กรดแลคติกและแคลเซียมซัลเฟต แคลเซียมซัลเฟตที่ไม่ละลายน้ำจะถูกแยกออกโดยการกรอง ซึ่งจะได้กรดแลคติกจากกระบวนการจะถูกทำปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชั่นกับเมทานอล และไฮโดรไลซิสด้วยน้ำ เพื่อทำให้กรดแลคติกบริสุทธิ์

ซึ่งในปัจจุบันการผลิตกรดแลคติกโดยวิธีการหมักทางชีวภาพเป็นวิธีที่กำลังได้รับความนิยมอย่างมากเพราะกรดแลคติกที่ได้มีความบริสุทธิ์ สามารถใช้ทรัพยากรเหลือทิ้งมาผลิตได้ และจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในกระบวนการสามารถใช้ได้ทั้งราและแบคทีเรีย

2.1.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก

ตัวแปรที่สำคัญในการผลิตกรดแลคติกในกระบวนการหมัก คือ อุณหภูมิ, พีเอช, สายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์, แหล่งไนโตรเจน และแหล่งคาร์บอน เช่น ความเข้มข้นของสารตั้งต้นในปฏิกิริยา,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แร่ธาตุ แมกนีเซียม, เหล็ก และ แมงกานีส ในรูปของเกลือ ($MgSO_4$, $FeSO_4$ และ $MnSO_4$) โดยแร่ธาตุนี้สามารถได้รับเมื่อต้องการปรับสภาพอาหารให้ได้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบมาตรฐาน เช่น De man Rogosa หรือ MRS (เปปโตน 10 กรัมต่อลิตร, สารสกัดจากเนื้อ 10 กรัมต่อลิตร, สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร, กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร, ไตรแอมโมเนียมซิเตรท 2 กรัมต่อลิตร, โซเดียมอะซิเตรท 5 กรัมต่อลิตร, K_2HPO_4 2 กรัมต่อลิตร, $MgSO_4$ $7H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร และ $MnSO_4$ $4H_2O$ 0.2 กรัมต่อลิตร) ในกระบวนการผลิตกรดแลคติกต้องการสารตั้งต้นที่มีปริมาณไนโตรเจนที่จำเป็นเป็นส่วนประกอบในปริมาณที่สูง วิตามินในกลุ่มของวิตามินบีที่อยู่ในสารสกัดจากยีสต์มีความสำคัญเพราะทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ในปฏิกิริยาของเอนไซม์ สารสกัดยีสต์ที่เติมไปในสารตั้งต้นของปฏิกิริยาจะมีปริมาณของไนโตรเจน, วิตามินและแหล่งไนโตรเจนอื่นที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตซึ่งอยู่ในรูปของสารประกอบและประกอบอยู่ในสารสกัดยีสต์กว่า 8 - 12 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่เป็นองค์ประกอบ (สารประกอบอินทรีย์และสารประกอบอนินทรีย์), 50 - 75 เปอร์เซ็นต์ เป็นองค์ประกอบของโปรตีน, 3 - 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นองค์ประกอบของไนโตรเจนที่ใช้ในกระบวนการหมัก, 4 - 13 เปอร์เซ็นต์ เป็นองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรต และมีของเหลวเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่น้อยมาก

เชื้อรา แบคทีเรีย รวมถึงเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการดัดแปลงยีนที่หลากหลายสายพันธุ์ถูกนำมาใช้เป็นแหล่งผลิตกรดแลคติกโดยแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB) เป็นจุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้มากกว่า โดยแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก, ไม่ต้องการออกซิเจนในการเติบโต ขับกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในกระบวนการหมักเมื่อให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสม แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกส่วนมากจัดอยู่ในกลุ่มของโฮโมเฟอร์เมนเททีฟหรือเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟในกระบวนการหมัก โดยแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกชนิดโฮโมเฟอร์เมนเททีฟจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดแลคติกเพียงชนิดเดียว แต่แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกชนิดเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟจะให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น เอทานอล, ไดแอซีทิล, ฟอร์เมต, อะซิโทอินหรือกรดอะซิติกและคาร์บอนไดออกไซด์พร้อมด้วยกรดแลคติก ซึ่งแบคทีเรียชนิดโฮโมเฟอร์เมนเททีฟที่ใช้ผลิตแลคติกส่วนใหญ่ คือ *Lactococcus lactis, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus helveticus* และ *Lactobacillus casei*

โดยอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อมีผลต่อประสิทธิภาพของเชื้อจุลินทรีย์ โครงสร้างของน้ำตาลหรือสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาและผลผลิต แบคทีเรียผลิตกรดแลคติกสามารถจำแนกตามการเจริญได้ที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ กลุ่มที่ชอบเจริญเติบโตที่อุณหภูมิสูง โดยเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 46 - 62 องศาเซลเซียส หรือกลุ่มที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 20 - 45 องศาเซลเซียส

ไฮโดรเจนไอออน (พีเอช) ของอาหารมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการหมักและยังส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตด้วย เชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่มีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีเมื่ออยู่ในสภาวะใกล้พีเอช 7 เนื่องจากส่วนใหญ่จะไม่สามารถเติบโตภายใต้สภาวะที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นเบสสูง โดยกระบวนการหมักจะสมบูรณ์และมีอัตราที่เร็ว มีช่วงพีเอชที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 5.5 - 6.0 ในขณะที่แบคทีเรียมีช่วงการเจริญเติบโตที่พีเอช 3 - 8 ซึ่งในกระบวนการหมักค่าพีเอชสามารถควบคุมโดยการไทเทรตด้วยเบสหรือการสกัด, การดูดซับหรือกระบวนการอิเล็กโทรไดอะลิซิส ส่งผลกับการเพิ่มความเข้มข้นกรดแลคติก และค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณของผลพลอยได้จำพวกเกลือโดยการศึกษาของ Hofvendahl และ Hagerdal ในปี ค.ศ. 2000 รายงานว่าการไทเทรตเบสเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพทำให้ได้ผลผลิตของกรดแลคติกมีความเข้มข้นที่สูง โดยในกระบวนการหมักค่าพีเอชที่เหมาะสมควรอยู่ระหว่าง 5 - 7 (Msuya และคณะ, 2017)

2.1.5 การนำกรดแลคติกไปใช้ประโยชน์

กรดแลคติกถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างหลากหลายในอุตสาหกรรมต่างๆ ใช้เพิ่มความเป็นกรดในอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมการฟอกหนัง ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ ผู้ดำเนินกิจการต้องการใช้แลคติกที่มีต้นทุนต่ำเพื่อแข่งขันกับกรดอินทรีย์ที่มีราคาถูกกว่า หรือในงานขนาดเล็กกรดแลคติกถูกใช้ในการปรับความเป็นกรดด่างของกระดาษแก้วที่ใช้เป็นบรรจุภัณฑ์สำหรับอาหาร ใช้ในการผลิตสารซักล้าง และอื่นๆ

ในทางเภสัชกรรมและเครื่องสำอางหลายสูตรทั้งในครีมขี้ผึ้ง โลชั่น ครีมป้องกันการเกิดสิว สารฮิวเมกเตนท์ สารละลายพาเรนเทอรอล และอื่นๆ แคลเซียมแลคเตทสามารถนำมาใช้ในการรักษาภาวะขาดแคลเซียม พอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพถูกนำมาใช้งานทางการแพทย์ เช่น การเย็บศัลยกรรมกระดูก การควบคุมการใช้ยา เป็นต้น

กรดแลคติกเอสเทอร์เช่น เอทิล/บิวทิลแลคเตท สามารถใช้เป็นตัวทำละลายสีเขียว คือ เป็นส่วนประกอบที่มีจุดหลอมเหลวสูง ไม่เป็นพิษ และสามารถย่อยสลายได้ กรดแอลแลคติกที่มีโพลีเมอไรเซชันต่ำสามารถช่วยในการปล่อยสารควบคุมหรือเป็นฟิล์มคลุมดินที่ย่อยสลายได้สำหรับการใช้งานทางการเกษตรที่มีขนาดใหญ่ (Datta, 1995)

พอลิเมอร์ของกรดแลคติกเป็นเทอร์โมพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ มีลักษณะโปร่งแสง และการย่อยสลายสามารถปรับองค์ประกอบและน้ำหนักโมเลกุล โดยคุณสมบัติเหล่านี้ใกล้เคียงกับพลาสติกที่ได้จากปิโตรเลียมซึ่งสามารถนำไปใช้ผลิตถุงขยะหรือพลาสติกที่ใช้ในการเกษตร (Ohara, 2003)

2.2 วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

2.2.1 กากเนื้อในปาล์มที่หีบน้ำมันแล้ว

ปาล์มน้ำมันเป็นพืชที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา ในปี พ.ศ.1977 มีการรายงานว่าพบครั้งแรกในแถบแอฟริกาตะวันตก และปี พ.ศ.2306 ได้มีการให้ชื่อวิทยาศาสตร์ *Elaeis guineensis* โดย Jacquin จากนั้นชาวโปรตุเกสได้ริเริ่มนำปาล์มน้ำมันเข้ามาปลูกในทวีปเอเชียที่สวนพฤกศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้ง

ประเทศอินโดนีเซีย เมืองโบกอร์ ราวปี พ.ศ. 2391 จากนั้นได้แพร่กระจายพันธุ์มายังเกาะสุมาตรา ในช่วงปี พ.ศ.2396-2400 ในปี พ.ศ.2448 มีการค้นพบต้น Dura ที่ถนนทางเข้าไร่ยาสูบใน Deli และได้ตั้งชื่อว่า “Deli Dura” และเริ่มปลูก Deli Dura เป็นการค้าอย่างจริงจังเมื่อ ปี พ.ศ. 2454 และปี พ.ศ.2461 มีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันในพื้นที่ตอนเหนือของเกาะสุมาตรา 22,500 ไร่ สำหรับประเทศมาเลเซียได้เริ่มปลูกปาล์มน้ำมันครั้งแรกที่สวนพฤกษศาสตร์ สิงคโปร์ ในราวปี พ.ศ. 2413 ต่อมาก็ได้รับความสนใจ และมีการค้นคว้าวิจัยครั้งแรกที่กรมวิชาการเกษตรในรัฐ Selangor การปลูกปาล์มน้ำมันเป็นการค้าครั้งแรกในประเทศมาเลเซียเริ่มในปี พ.ศ. 2472 ที่ Ulu Remis Estate ของรัฐ Selangor จนถึงปัจจุบัน ประเทศอินโดนีเซียและมาเลเซียมีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันประมาณ 49.17 และ 29.32 ล้านไร่ ตามลำดับ ปาล์มน้ำมันถูกนำเข้ามาปลูกในประเทศไทยตั้งแต่ปี 2472 ที่สถานีทดลองยางคอหงส์ จังหวัดสงขลา และสถานีกสิกรรมพลิ้ว จังหวัดจันทบุรีโดยปลูกเป็นปาล์มประดับ และมีการส่งเสริมการปลูกเป็นพื้นที่ใหญ่เริ่มเมื่อปี 2511 โดยโครงการนิคมสร้างตนเองพัฒนาภาคใต้ จังหวัดสตูล เนื้อที่ประมาณ 20,000 ไร่ และโครงการบริษัทอุตสาหกรรม น้ำมันและสวนปาล์มจำกัด (สวนเจียรวานิช) ตำบลปลายพระยา อำเภออ่าวลึก จังหวัดกระบี่ ประมาณ 20,000 ไร่ หลังจากนั้นจึงมีการขยายพื้นที่ปลูกมากขึ้น

ประเทศไทยมีผลผลิตน้ำมันปาล์มดิบเป็นอันดับ 3 ของโลก โดยมีผลผลิตเฉลี่ยประมาณ 2 ล้านตันต่อปี หรือคิดเป็น 1.2 เปอร์เซ็นต์ ของผลผลิตน้ำมันปาล์มดิบโลกพื้นที่เพาะปลูกปาล์มน้ำมันและโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มดิบของไทยส่วนใหญ่อยู่ในภาคใต้ คิดเป็น 85 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันทั่วประเทศ อย่างไรก็ตามในช่วงปี 2551 - 2555 มีการขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันไปยังภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคตะวันออกเฉียงเหนือมากขึ้น ซึ่งเป็นไปตามยุทธศาสตร์ของรัฐในการขยายพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันเพื่อสนับสนุนแผนพลังงานทดแทนและพลังงานทางเลือกของประเทศ ทั้งนี้ในปี 2559 ไทยมีพื้นที่ปลูกปาล์มน้ำมันทั้งสิ้น 4.7 ล้านไร่ และมีผลผลิตปาล์มน้ำมัน 11.2 ล้านตัน (ชาย และคณะ, 2547)

2.2.1.1 ลักษณะของปาล์มน้ำมัน

ปาล์มน้ำมันมี 2 ชนิด ที่นำมาใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์ปาล์มน้ำมันในปัจจุบัน ชนิดแรกได้แก่ ปาล์มน้ำมัน (Elaeis guineensis Jacq.) เป็นพันธุ์ปลูกเพื่อการค้า มีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมในทวีปแอฟริกาตอนกลางและตะวันตก คำว่า Elaeis มีความหมายตรงกับคำ elaion ซึ่งแปลว่าน้ำมัน ส่วนคำว่า guineensis หมายความถึงประเทศ Guinea อยู่ในทวีปแอฟริกาตะวันตก ลักษณะที่เด่นชัดของปาล์มน้ำมัน *E. guineensis* คือ ให้ผลผลิตทะลาย, น้ำหนักต่อผล, เปลือกนอกต่อผล และ ผลผลิตน้ำมันสูง ส่วนอีกชนิดหนึ่งคือ ปาล์มน้ำมัน *Elaeis oleifera* มีถิ่นกำเนิด อยู่ทางเหนือของลุ่มแม่น้ำอเมซอนของอเมริกาใต้ ติดต่อไปถึงอเมริกากลางและคอสตาริก้า ลักษณะต้นเตี้ยและต้านทานต่อโรคตาเน่า (Lethal bud rot) เปอร์เซ็นต์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Unsaturated fatty acid) ค่าไอโอดีนสูง (Iodine value) ประมาณ 77 - 78 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งมีวิตามินเอและวิตามินอีสูง แต่ให้ผลผลิตและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณน้ำมันต่ำกว่าปาล์ม น้ำมัน *E. guineensis* ปัจจุบันมีประโยชน์สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ โดยการผสมข้ามระหว่าง 2 สายพันธุ์ และผสมกลับกับปาล์มน้ำมัน *E. guineensis* เพื่อให้ได้ปาล์มน้ำมันลูกผสมที่รวมลักษณะที่ดีของทั้งสองชนิด (Interspecific hybrid) ซึ่งสามารถจำแนกทางอนุกรมวิธานได้เป็นดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 2.2 ตารางแสดงอนุกรมวิธานของปาล์มน้ำมัน

Class	Angiospermae
Subclass	Monocotyledon
Order	Palmales
Family	Arecaceae
Sub-family	Cocoideae
Genus	Elaeis
Species	Guineensis
ชื่อวิทยาศาสตร์	Elaeis guineensis
ชื่อสามัญ	Oil palm

ที่มา : ชาย และคณะ (2547)

2.2.1.2 การผลิตน้ำมันปาล์ม

กระบวนการผลิตน้ำมันปาล์ม ประกอบด้วย 2 กระบวนการหลัก คือ

1. กระบวนการสกัดน้ำมันปาล์ม (Mill processing) หลังการเก็บเกี่ยวทะลายปาล์มน้ำมันจะมีการขนส่งผลผลิตเข้าสู่โรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม ซึ่งมีกระบวนการสกัด น้ำมัน 2 แบบ คือ แบบมาตรฐาน (หีบน้ำมันแยก) และแบบหีบน้ำมันผสม โดยโรงงานแบบมาตรฐานเป็นโรงงานที่มีกำลังการผลิตสูงประมาณ 30 - 80 ตันต่อชั่วโมง และน้ำมันที่ได้จัดเป็นน้ำมันเกรดเอ เนื่องจากมีการแยกชนิดของน้ำมันปาล์ม สำหรับโรงงานแบบหีบน้ำมันผสมเป็นโรงงานที่มีกำลังการผลิตค่อนข้างต่ำ และน้ำมันที่สกัดได้เป็นน้ำมันผสมระหว่างน้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันเมล็ดในปาล์ม ดังนั้นในที่นี้จะกล่าวถึงวิธีการสกัดน้ำมันแบบที่นิยมใช้โดยทั่วไปมาตรฐาน

โรงงานสกัดน้ำมันแบบมาตรฐาน กระบวนการผลิตจะมี 4 ขั้นตอน คือ

1. การอบทะลายด้วยไอน้ำ (Sterilization) อบที่อุณหภูมิ 130 - 135 องศาเซลเซียส ความดัน 2.5 - 3 บาร์ นาน 50 - 75 นาที การอบทะลายจะช่วยหยุดปฏิกิริยาไลโปไลซีสที่ทำให้เกิดกรดไขมันอิสระในผลปาล์ม และช่วยให้ผลปาล์มอ่อนนุ่มหลุดจากขั้วผลได้ง่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การแยกผล (Stripping) เป็นการส่งทะลายเข้าเครื่องแยกผลปาล์มออกจากทะลาย สำหรับทะลายเปล่าจะถูกแยกออกไป จากนั้นนำผลปาล์มไปย่อยด้วยเครื่องย่อยผลปาล์มเพื่อให้ส่วนเปลือกแยกออกจากเมล็ด

3. การสกัดน้ำมัน (Oil extraction) นำส่วนเปลือกอบที่อุณหภูมิ 90 - 100 องศาเซลเซียส นาน 20 - 30 นาที จากนั้นผ่านเข้าเครื่องหีบแบบเกลียวอัดคู่จะได้น้ำมันปาล์มดิบที่มีองค์ประกอบคือ น้ำมันประมาณ 66 เปอร์เซ็นต์ น้ำ 24 เปอร์เซ็นต์ และของแข็ง 10 เปอร์เซ็นต์

4. การทำความสะอาดน้ำมันปาล์มดิบ (Clarification) นำน้ำมันปาล์มดิบที่ได้จากการสกัดส่งเข้าถังกรองเพื่อแยกน้ำและของแข็งออก จากนั้นนำเข้าเครื่องเหวี่ยงเพื่อทำความสะอาดอีกครั้ง และไล่น้ำออกเพื่อทำให้แห้ง ส่งเข้าถังเก็บน้ำมันสำหรับรอการกลั่นหรือจำหน่ายต่อไป น้ำมันปาล์มดิบที่ได้แยกเป็นสองส่วนคือ ส่วนบนมีลักษณะเป็นของเหลวสีส้มแดง (Crude palm oil olein) ประมาณ 30 - 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนล่างมีลักษณะเป็นไขสีเหลืองส้ม (Crude palm oil stearin) ประมาณ 50 - 70 เปอร์เซ็นต์ สำหรับกากผลปาล์มจะถูกนำมาแยกเส้นใยออกจากเมล็ด นำเมล็ดที่ได้มาอบแห้งและทำความสะอาด จากนั้นนำเข้าเครื่องกะเทาะเพื่อแยกกะลาออก และนำเมล็ดในมาอบแห้งให้มีความชื้นไม่เกิน 7 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นบรรจุกระสอบเพื่อรอจำหน่ายหรือหีบน้ำมันต่อไป น้ำมันปาล์มดิบและน้ำมันเมล็ดในปาล์มที่ได้จากกระบวนการการสกัดสามารถส่งเข้าสู่โรงงานเพื่อทำให้บริสุทธิ์ หรือจะนำไปแยกส่วน (Fractionation) ก่อนก็ได้ ซึ่งจะได้น้ำมันปาล์มที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันไป (ชาย และคณะ, 2547)

กากปาล์มน้ำมันเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันปาล์ม โดยทั่วไปมีอยู่หลายชนิดและมีคุณภาพแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับกรรมวิธีในการสกัดน้ำมัน เช่น กากเนื้อในเมล็ดปาล์ม (Palm kernel cake, PKC) เป็นส่วนที่เหลือจากการหีบน้ำมัน ส่วนเนื้อในเมล็ดปาล์มที่เหลือจากการแยกน้ำมันปาล์มออกจากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันเป็นผลพลอยได้ที่มีโปรตีนรวมปานกลางและเยื่อใยรวมสูง คือ มีโปรตีนรวม 14 - 16 เปอร์เซ็นต์ ไนโตรเจนฟรีเอกซ์แทรก 50 - 60 เปอร์เซ็นต์ ผนังเซลล์ 60 - 66 เปอร์เซ็นต์ และลิกโนเซลลูโลส 40 - 44 เปอร์เซ็นต์ (ทวีศักดิ์, 2529; สุมิตรา, 2543; สายันต์, 2547) ซึ่งในงานวิจัยหลายงานมักจะนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์

2.2.1.3 องค์ประกอบของกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมัน

FAO (1988) รายงานว่ากากเนื้อในปาล์มที่ผ่านกรรมวิธีสกัดแตกต่างกันจะมีเปอร์เซ็นต์ของส่วนประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน โดยการสกัดด้วยสารเคมี (Solvent extracted type) จะมีเปอร์เซ็นต์ไขมันที่ได้ต่ำกว่าวิธีการหีบน้ำมัน (Expeller pressed type) ดังนั้นกากเนื้อในปาล์มที่ได้มาจากวิธีการสกัดด้วยสารเคมีจึงมีคุณภาพดีกว่าการหีบน้ำมัน ซึ่งสอดคล้องกับ จินดา, 2548; Chin, 2001; Alimon, 2004; Sundu และ Dingle, 2003 และ Boateng และคณะ, 2008 พบว่าการสกัดกากเนื้อในปาล์มด้วยสารเคมีมีเปอร์เซ็นต์ไขมันต่ำกว่าวิธีการหีบน้ำมัน ปริมาณไขมันของกาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื้อในปาล์มที่เหลือจากวิธีการสกัดด้วยสารเคมีมีค่าประมาณอยู่ในช่วง 0.5 - 3 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไขมันเหลือจากวิธีการหีบน้ำมันอยู่ช่วงประมาณ 4 - 9 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 เปรียบเทียบปริมาณเปอร์เซ็นต์ไขมันได้จากการสกัดน้ำมันจากเมล็ดปาล์มน้ำมันด้วยการใช้สารเคมีกับการสกัดด้วยวิธีการหีบน้ำมัน

วิธีการสกัดน้ำมัน	แหล่งที่มาของข้อมูล				
	จินดา (2548)	Chin (2001)	Alimon (2004)	Sunda และ Dingle (2003)	Boateng และคณะ (2008)
สกัดด้วยสารเคมี	0.73	0.50-3.00	1.00-2.00	0.50-3.00	0.95
สกัดด้วยการหีบน้ำมัน	9.12	5.00-12.00	4.00-8.00	5.00-12.00	7.83

แต่อย่างไรก็ตาม กากเนื้อในปาล์มจัดเป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่มีคุณค่าทางอาหารสูง และยังไม่พบสารพิษ Aflatoxin (Olowafemi, 2009; Sue, 2004) กากเนื้อในปาล์มที่ได้จากการสกัดน้ำมันด้วยวิธีการหีบน้ำมันมีเปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง 88 - 94 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนหยาบ 14.50 -19.60 เปอร์เซ็นต์ เยื่อใยหยาบ 13 – 20 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 5 - 8 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 3 - 12 เปอร์เซ็นต์ ไนโตรเจนฟรีแอกแทรกซ์ 46.70 - 58.80 เปอร์เซ็นต์ และ Neutral detergent fiber 66.80 – 78.90 เปอร์เซ็นต์ (Alimon, 2004) ซึ่งผลการวิเคราะห์สอดคล้องและใกล้เคียงกับผลการทดลองของ จินดา, 2548; Chin, 2001; Wing Keong, 2004 ; Dairo และ Fasuyi, 2008 และ Sue, 2004 ดังตารางที่ 2.4

นอกจากนี้ Chin (2001) รายงานว่ากากเนื้อในปาล์มที่ได้จากวิธีการสกัดด้วยการใช้สารเคมีมีเปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง โปรตีนหยาบ เยื่อใยหยาบ ไขมัน เถ้า ไนโตรเจนฟรีแอกแทรกซ์ และ Neutral detergent fiber มีค่าเท่ากับ 89.00, 15.30, 14.30, 2.90, 4.10, 63.40 และ 66.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีผลสอดคล้องกับ จินดา, 2548 และ Zahari และคณะ, 2003 ที่มีคุณค่าอาหารใกล้เคียงกัน ดังตารางที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 ส่วนประกอบทางเคมีของกากเนื้อในปาล์ม

แหล่งที่มาของข้อมูล	ส่วนประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์)					
	วัตถุแห้ง	โปรตีนหยาบ	เยื่อใยหยาบ	ไขมัน	เถ้า	ไนโตรเจนฟรีแอกแทรกซ์
การสกัดน้ำมันโดยการหีบน้ำมัน						
จินดา (2548)	-	14.46	26.29	9.21	4.53	45.51
Perez และคณะ (2000)	91.40	9.70	24.90	12.10	2.90	-
	92.70	14.60	12.10	9.10	4.30	59.90
Chin (2001)	93.00	14.80	15.70	9.80	4.20	55.50
	89.10	16.00	16.80	10.60	4.10	52.50
Alimon (2004)	88.00-94.50	14.50-19.60	13.00-20.00	5.00-8.00	3.00-12.00	46.70-58.80
Sue (2004)	91.00	14.00	23.00	8.00	6.00	-
Wing Keong (2004)	-	16.86	15.12	6.82	6.58	54.62
Dairo และ Fasuyi (2008)	91.80	20.40	15.47	8.63	7.56	49.00
Sekoni และคณะ (2008)	94.00	14.00-21.00	21.00-23.00	-	6.00	-
การสกัดน้ำมันโดยการใช้สารเคมี						
จินดา (2548)	-	16.15	16.03	0.73	7.91	59.91
Chin (2001)	89.00	15.30	14.30	2.90	4.10	63.40
Zahari และคณะ (2003)	-	17.20	17.10	1.50	4.30	-

ที่มา : สายชล และวรพงษ์ (2553)

2.2.2 รำข้าวที่หีบน้ำมันแล้ว

ภูมิภาคเอเชียเป็นแหล่งเพาะปลูกข้าวที่สำคัญของโลก มีผลผลิตคิดเป็นสัดส่วนประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของผลผลิตโลก แต่หลายประเทศเน้นใช้ผลิตเพื่อการบริโภคภายในประเทศเป็นหลัก โดยเฉพาะจีนซึ่งเป็นผู้บริโภครายใหญ่สุดของโลก ทำให้การค้าข้าวในตลาดโลกมีสัดส่วนเพียง 8-9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปอร์เซ็นต์ ของผลผลิตทั้งหมด หรือเฉลี่ยประมาณ 42-43 ล้านตันข้าวสารในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา ปัจจุบันมีประเทศผู้ส่งออกหลัก คือ ไทย อินเดีย และเวียดนาม ไทยมีพื้นที่นาข้าวประมาณ 60 ล้านไร่ ทั่วประเทศ มีผลผลิตข้าวเปลือกประมาณ 30-32 ล้านตันต่อปี หรือประมาณ 20 ล้านตันข้าวสาร โดยการปลูกข้าวของไทยสัดส่วนประมาณ 85 เปอร์เซ็นต์ ของผลผลิตทั้งหมดเน้นพึ่งน้ำฝน มีช่วงเวลาเพาะปลูกในฤดูฝนเดือน ก.ค. - ก.ย.ของทุกปี และเก็บเกี่ยวในช่วงปลายปี เรียกว่า “ข้าวนาปี” ซึ่งได้ผลผลิตทั้งข้าวเจ้า ข้าวหอมมะลิ และ ข้าวเหนียว ส่วนอีก 15 เปอร์เซ็นต์ เป็นข้าวที่ปลูกนอกฤดูเพาะปลูกปกติโดยอาศัยน้ำจากระบบชลประทานเรียกว่า “ข้าวนาปรัง” มักเป็นการเพาะปลูกข้าวเจ้าในภาคเหนือและกลาง การบริโภคข้าวของไทยมีประมาณปีละ 10 ล้านตันข้าวสาร หรือครึ่งหนึ่งของผลผลิตข้าวสารทั้งหมด ที่ผ่านมาการบริโภคในประเทศมีอัตราการเติบโตต่ำแต่เป็นตลาดที่ค่อนข้างแน่นอน ทำให้ผู้ส่งออกข้าวบางรายหันมาทำตลาดในประเทศเพิ่มขึ้นเพื่อลดความเสี่ยงจากความผันผวนของตลาดส่งออก ปัจจุบันการค้าข้าวสารบรรจุถุงผ่านช่องทางร้านค้าสมัยใหม่ (Modern trade) มีสัดส่วนถึง 65 - 70 เปอร์เซ็นต์ของข้าวสารที่จำหน่ายในประเทศ (เชฐชุดา, 2561)

2.2.2.1 การผลิตน้ำมันรำข้าว

1. การสกัดด้วยตัวทำละลาย

เริ่มจากการให้ความร้อนแก่รำข้าวเพื่อให้สุกและหยุดการเจริญเติบโตของค่ากรดไขมันที่ไม่เป็นประโยชน์ ก่อนจะนำไปสกัดน้ำมันด้วยสารทำลายเพื่อที่จะได้แยกน้ำมันออกมาจากรำข้าว และใช้พลังงานไอน้ำที่มีความร้อนสูงจะขจัดสารตกค้างในน้ำมันรำข้าวให้บริสุทธิ์ก่อนจะนำไปบรรจุในถังเพื่อรักษาคุณภาพทางโภชนาการก่อนจำหน่าย ขณะที่รำสกัดน้ำมันจะมีค่าโปรตีนและไฟเบอร์ที่สูงนั้นจะผ่านกรรมวิธีอบแห้งและร่อนหาสิ่งตกค้างก่อนที่จะบรรจุถุงเพื่อจำหน่าย

2. การสกัดด้วยภาวะเหนือวิกฤติ

ระบบการสกัดแบบ Supercritical เป็นกระบวนการของการแยกองค์ประกอบหนึ่งหรือสารสกัดหนึ่งออกจากองค์ประกอบส่วนอื่นๆ โดยการแยกสสารหรือองค์ประกอบที่ไม่พึงประสงค์ออกจากผลิตภัณฑ์ เช่น การแยกสารคาเฟอีนออกจากเมล็ดกาแฟ หรือการแยกเก็บเฉพาะองค์ประกอบที่ต้องการ เช่น น้ำมันหอมระเหย

3. การบีบเย็น

น้ำมันสกัดเย็นเป็นน้ำมันที่ผลิตผ่านกระบวนการบีบสกัดโดยใช้ความร้อนต่ำ พืชผักผลไม้หลายชนิดสามารถใช้วิธีการสกัดเย็นเพื่อให้ได้น้ำมันออกมา แต่ไม่ใช่น้ำมันสกัดเย็นทั้งหมดจะเหมาะสมสำหรับการนำไปปรุงอาหารได้ น้ำมันสกัดเย็นจึงเหมาะสมที่จะนำไปทำเป็นน้ำมันสลัดหรือใช้ปรุงรายการอาหารที่ใช้ความร้อนต่ำเพื่อรักษาสารสชาติของน้ำมัน ซึ่งผู้บริโภคควรจะคำนึงเกี่ยวกับจุดกำเนิดควันของน้ำมันนั้นๆ เพราะน้ำมันสกัดเย็นบางชนิดไม่สามารถทนต่อความร้อนสูง และเมื่อน้ำมันผ่านการปรุงอาหารที่ใช้อุณหภูมิสูง ความละเอียดอ่อน และซับซ้อนของรสชาติจะจางหายไป ดังนั้นน้ำมันสกัดเย็นจึงนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพหรือกระทั่งผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

http://www.ceoriceoil.com/productions/ (19 มิถุนายน 2561)

รำข้าวเป็นผลพลอยได้จากการสีข้าวเปลือกที่มีผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่าเป็น Nutraceutical หรือ สารอาหารที่มีผลต่อสุขภาพ โดยเฉพาะการป้องกันโรคเรื้อรัง มีงานวิจัยเกี่ยวกับรำข้าวจำนวนมาก และควรที่จะได้เผยแพร่เนื่องจากประเทศไทยมีการผลิตข้าวส่งออกสู่ตลาดโลกจำนวนมาก รำข้าวมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีน้ำตาลอ่อนซึ่งเป็นเยื่อหุ้มข้าวที่ถูกขัดออกระหว่างกระบวนการสีข้าวเปลือก ปัจจุบันมีการนำรำข้าวมาใช้ประโยชน์น้อยกว่าคุณค่าที่มีส่วนใหญ่นำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์และเป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำมันรำข้าวเพื่อใช้บริโภคในครัวเรือน ผลงานวิจัยที่ทำในต่างประเทศโดยศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพของรำข้าวจากแหล่งรำข้าว 3 ประเทศ (Marini และคณะ, 2003) พบว่ารำข้าวของประเทศไทยมีคุณภาพและสามารถใช้แหล่งวัตถุดิบอ้างอิงได้

รำข้าวมีองค์ประกอบหลายชนิดได้แก่ โปรตีน ประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ ไขมันประมาณ 15 – 30 เปอร์เซ็นต์ เส้นใย 6 – 20 เปอร์เซ็นต์ และคาร์โบไฮเดรตซึ่งอาจปริมาณสูงถึง 50 เปอร์เซ็นต์ องค์ประกอบของรำข้าวต่างชนิดจะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของข้าวเปลือก ข้าวเปลือกของข้าวชนิดเดียวกันอาจให้รำข้าวแตกต่างกันตามกระบวนการสีข้าว ดังนั้นการทำให้คงสภาพ (Stabilization) และวิธีการเก็บรักษาจึงมีผลต่อส่วนประกอบและคุณค่าของรำข้าว

2.3 เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยโปรตีน

2.3.1 เอนไซม์อัลคาเลส

เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิด *Bacillus licheniformi* ทำหน้าที่เป็นเอนโดเปปติเดส คือ เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเปปไทด์อย่างอิสระ ภายในโซ่โมเลกุลของโปรตีนได้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ เอนโดเปปติเดสมีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนสูง เนื่องจากมีความจำเพาะต่อสับเสตรทที่เป็นเปปไทด์โมเลกุลใหญ่หลายชนิดทำให้สามารถย่อยโปรตีนได้อย่างรวดเร็ว (ปราณี, 2547) โดยทำงานระหว่างพีเอช 6.5 และ 8.5 และมีอุณหภูมิที่เหมาะสม อยู่ที่ 55 - 60 องศาเซลเซียส

2.4 เชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus coagulans* D-DSM1

Bacillus coagulans เป็นแบคทีเรียที่ทนความร้อนสูง สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 45 – 80 องศาเซลเซียส สามารถทนต่อความรุนแรงต่างๆ เช่น ค่าพีเอชต่ำ หรือสภาวะที่ไม่มีการเติมอากาศ นอกจากนี้ในทางการผลิตกรดแลคติก *B. coagulans* สามารถใช้ประโยชน์จากแหล่งคาร์บอนราคาถูกและให้กรดแลคติกที่มีความบริสุทธิ์สูง อย่างไรก็ตามแบคทีเรีย *B. coagulans* DSM1 เป็นสายพันธุ์ที่ให้กรดแอลแลคติกบริสุทธิ์ จึงมีการตัดต่อพันธุกรรมเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดดีแลคติกบริสุทธิ์ได้ ซึ่งได้เป็นสายพันธุ์ *Bacillus coagulans* D-DSM1 (Zhang และคณะ, 2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Bai และคณะ (2016) ใช้จุลินทรีย์ *Sporolactobacillus inulinus* YBS1-5 ในการผลิตกรดแลคติกจากของเหลือทิ้งการเกษตรเพื่อลดต้นทุนวัตถุดิบ โดยผลิตกรดแลคติกโดยใช้กากเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงอย่างเดียว เพื่อการใช้งานที่มีประสิทธิภาพกากเมล็ดฝ้ายถูกย่อยด้วยเอนไซม์และนำมาใช้ในการหมักกรดแลคติกในเวลาเดียวกัน และใช้ไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือของข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตกรดดีแลคติกภายใต้สภาวะที่เหมาะสมมีความเข้มข้นกรดดีแลคติกสูง (107.2 กรัมต่อลิตร) ที่ได้จากถังหมักแบบ 7 ลิตร ซึ่งมีผลผลิตเฉลี่ย 1.19 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและให้ผลผลิต 0.85 กรัมต่อกรัมกลูโคส ความบริสุทธิ์ของกรดแลคติกในน้ำหมักเท่ากับ 99.2 เปอร์เซ็นต์

Wang และคณะ (2015) ใช้จุลินทรีย์ *Sporolactobacillus* SP. สายพันธุ์ CASD ในผลิตกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งพบว่ากากถั่วลิสงเป็นแหล่งอาหารที่ดีกว่า สารสกัดจากยีสต์, กากถั่วเหลือง, เปปโตน, ข้าวโพด, สารสกัดจากเนื้อและแอมโมเนียมซัลเฟตในการผลิตกรดดีแลคแตทกากถั่วลิสง ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์และใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการหมักดีแลคเตทในเวลาเดียวกัน การผลิตกรดแลคติกสูงมากถึง 207 กรัมต่อลิตร โดยใช้แป้งถั่วลิสง 40 กรัมต่อลิตร ในการหมักโดยใช้ถังหมัก 30 ลิตร โดยเฉลี่ย 3.8 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีความบริสุทธิ์เท่ากับ 99.3 เปอร์เซ็นต์

ปิ่น (2559) ใช้กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมันซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมปาล์มน้ำมันที่มีศักยภาพสูงสามารถนำมาเป็นอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องได้ดี โดยมีโปรตีนรวม 13-18 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 8-23.7 เปอร์เซ็นต์ และเยื่อใย 12-17 เปอร์เซ็นต์ ระดับที่เหมาะสมของการใช้เลี้ยงโคสามารถใช้กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมันได้จนถึง 50 เปอร์เซ็นต์โดยไม่มีผลต่อสมรรถภาพของสัตว์ ขณะที่ระดับเหมาะสมในสูตรอาหารแพะสามารถใช้กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมันได้ 15-35 เปอร์เซ็นต์

Li และคณะ (2017) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการลดต้นทุนการผลิตแลคติกโดยรำข้าวสาลีซึ่งจัดเป็นของเหลือทิ้งราคาถูกในอุตสาหกรรมการสีข้าว โดยเลือกนำมาใช้เป็นวัตถุดิบหลักขั้นตอนแรกสารอาหารจะถูกเก็บเกี่ยวจากรำข้าวสาลีโดยกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์โปรตีเอส จากนั้นไฮโดรไลเซทจะถูกเตรียมจากตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอสหลังจากผ่านการปรับสภาพด้วยกรดและผ่านขั้นตอนเอนไซม์เมติคแซคคาริฟิเคชั่น การใช้สารอาหารและไฮโดรไลเซทร่วมกันเป็นแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนสำหรับการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์ *S. inulinus* YB1-5 ผลที่ตามมาคือ ระดับกรดแลคติกอยู่ที่ 99.5 กรัมต่อลิตร, ด้วยประสิทธิภาพในการผลิตเฉลี่ย 1.94 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลผลิตที่ได้ 0.89 กรัมต่อกรัมกลูโคส นอกเหนือจากนี้เมื่อใช้ Fed-batch simultaneous saccharification และกระบวนการหมักจะอยู่ที่ 40 องศาเซลเซียส โดยมี 20 เปอร์เซ็นต์ของแข็งโดยน้ำหนักต่อปริมาตร ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส 20 เอฟพียูต่อกรัม และได้ความเข้มข้นของกรดแลคติก, ผลผลิตที่ได้, ประสิทธิภาพในการผลิตและความบริสุทธิ์เท่ากับ 87.3 กรัมต่อลิตร, 0.65 กรัมต่อกรัมกลูโคส, 0.81 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 99.1 เปอร์เซ็นต์, ตามลำดับ การศึกษานี้มีขั้นตอนที่เป็นไปได้ซึ่งสามารถช่วยในการผลิตกรดแลคติกโดยใช้ของเสียทางการเกษตรโดยที่ไม่ต้องใช้สารอาหารจากภายนอกใดๆ เพิ่มเข้าไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนันตเดช และคณะ (2555) การศึกษาผลการใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันทดแทนข้าวโพดบดในอาหารข้นต่อการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะและนิเวศวิทยาในกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมือง ใช้โคพื้นเมืองเพศผู้ที่ผ่าตัดฝังท่ออาหารถาวรที่กระเพาะรูเมน (Rumen fistulated animal) จำนวน 5 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย 317±21 กก. ให้ได้รับหญ้าพลิแคททูลั่มแห้งแบบเต็มที่ (Ad libitum) เสริมด้วยอาหารข้นที่มีกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมัน 0, 25, 50, 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ทดแทนข้าวโพดบดในสูตรอาหาร โดยใช้แผนการทดลองแบบ 5x5 ลาตินสแควร์ (5x5 Latin squares design) พบว่าปริมาณการกินได้ของหญ้าพลิแคททูลั่มแห้งเพิ่มขึ้นในรูปแบบเป็นเส้นตรง ขณะที่ปริมาณอาหารข้น และปริมาณอาหารทั้งหมดที่โคกินได้ลดลงเมื่อระดับกากเนื้อใน เมล็ดปาล์มน้ำมันที่ใช้ทดแทนข้าวโพดบดในสูตรอาหารเพิ่มขึ้น สัมประสิทธิ์การย่อยได้ของวัตถุแห้ง และอินทรียวัตถุของโคที่ได้รับอาหารข้นที่ใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันทดแทนข้าวโพดบด 0, 25 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ในขณะที่สัมประสิทธิ์การย่อยได้ของวัตถุแห้ง และอินทรียวัตถุ มีแนวโน้มลดลง เมื่อใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันทดแทน ข้าวโพดบด 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้การใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันทดแทนข้าวโพดบดในระดับ 75 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ยังมีผลทำให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียไนโตรเจน ความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยง่ายทั้งหมดในกระเพาะรูเมน และ จำนวนประชากรของโปรโตซัวทั้งหมดในกระเพาะรูเมนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P0.05$) ดังนั้นจึงสามารถใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันทดแทนข้าวโพดบดในอาหารข้นได้ไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเสริมให้แก่โคพื้นเมืองไทยที่ได้รับหญ้าพลิแคททูลั่มแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และเครื่องแก้ว

3.1.1 เครื่องมือ

ตารางที่ 3.1 รายชื่อรุ่น ยี่ห้อ เครื่องมือและอุปกรณ์ในการดำเนินงานวิจัย

เครื่องมือ	รุ่น	ผู้ผลิต
กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)		
เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge)	MiniSpin plus	Eppendorf AG, Germany
เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge)		
เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer)		
หม้อนึ่งอัดความดันไอ (Autoclave)	ES - 315	TOMY KOGYO, Japan
เครื่องชั่ง (Analytical balances) 4 ตำแหน่ง	PA214	OHOUS Corp, NJ USA
เครื่องชั่ง (Analytical balances) 2 ตำแหน่ง	ARC120	OHAUS, USA
ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow cabinet)	TL2448	Holten, Denmark
ตู้บ่มสภาวะเขย่า (Incubator shaker)		
ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)	memmert 854	Schwabach w., GERMANY
ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	ED/FD	BINDER, Thailand
ตู้แช่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Freezer)		
ปิเปตอัตโนมัติ (Autopipette)	P20, P200 และ P1000	Gilson, USA
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	UV-1280	Shimadzu, Japan
ไมโครเวฟ (Microwave)	ER-G23SC(W)	TOSHIBA, Thailand

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2 เครื่องแก้ว

1.ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask)

2.หลอดทดลอง (Test Tube)

3.กระบอกตวง (Cylinder)

4.บีกเกอร์ (Beaker)

5.ตะเกียงแอลกอฮอล์

6.จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

7.ชุดไทเทรต

8.ทิป (Micropipette tip)

9.หลอดเซนติฟิวส์ 1.5 มล. (Microcentrifuge tube 1.5 ml)

10.คิวเวตต์ (Cuvette)

11.กระบอกตวง

12.ช้อนตักสาร

3.2 สารเคมี

1. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid ; HCl)
2. กลีเซอรอล (Glycerol ; $C_3H_8O_3$)
3. สารละลายไดไนโตรซาลิไซลิกแอซิด (3,5-Dinitrosalicylic acid ; DNS)
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide ; NaOH)
5. สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมพาทาเลต (KHP)
6. สารละลายกรดแลคติก (Lactic acid ; $C_3H_6O_3$)
7. วุ้น (Agar)
8. น้ำกลั่น (Distilled water)
9. น้ำตาลกลูโคส (Glucose)
10. สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)
11. น้ำกลั่น (Distilled water)
12. โพแทสเซียมไนเตรต (Potassium Nitrate ; KNO_3)
13. แอมโมเนียมคลอไรด์ (Ammonium Chloride ; NH_4Cl)
14. แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate; $(NH_4)_2SO_4$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15. แอมโมเนียมไนเตรต (Ammonium Nitrate; NH_4NO_3)

16. แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Ammonium dihydrogen phosphate; $(NH_4)_2HPO_4$)

17. แมกนีเซียมไนเตรต (Magnesium Nitrate; $Mg(NO_3)_2$)

18. โพแทสเซียมไนเตรต (Potassium Nitrate; KMO_3)

19. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)

20. เพปโตน (Peptone)

21. สารสกัดเนื้อสัตว์ (Beef extract)

22. ทริปโตน (Tryptone)

23. Skim milk

24. เอนไซม์อัลคาเลส (Alcalase enzyme)

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus coagulans* D-DSM1

3.3.1 อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง

ใช้สูตรอาหารแข็ง GYC (ภาคผนวก ก) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1

3.3.2 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์

นำห่วงเขี่ยเชื้อที่เผาไฟแล้วแตะเชื้อที่เจริญแล้วจากจานเลี้ยงเชื้อจากนั้นขีดบนอาหาร GYC ในจานเพาะเชื้อด้วยเทคนิค Cross streak plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียสจนได้โคโลนีเดี่ยวซึ่งเป็นเชื้อบริสุทธิ์

3.4 การเตรียมหัวเชื้อบริสุทธิ์

1. เลือกโคโลนีเชื้อบริสุทธิ์ที่เหมาะสมจากจานเลี้ยงเชื้อที่บ่ม 36 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส ย้ายลงในหลอดอาหารเหลว GYC ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. เมื่อครบ 24 ชั่วโมงดูดเชื้อลงในฟลาสก์ 125 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว GYC 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส ต่ออีก 24 ชั่วโมง

3. วัดการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เลือกฟลาสก์ที่เจริญดีที่สุดและใช้เป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์

3.5 การเตรียมแหล่งไนโตรเจน

3.5.1 การเตรียมอาหารสำหรับการทดสอบแหล่งไนโตรเจน

อาหารควบคุม ใช้อาหารเหลว GYC (ภาคผนวก ก) และใช้สารต่างๆ ดังนี้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับทดสอบโดยใช้ทดแทนสารสกัดยีสต์ในปริมาตรเท่ากัน (10 กรัมต่อลิตร) ดังนี้

แหล่งไนโตรเจนที่มีในห้องปฏิบัติการ

1. แอมโมเนียมคลอไรด์ (Ammonium Chloride; NH_4Cl)
2. แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammoium sulfate; $(NH_4)_2SO_4$)
3. แอมโมเนียมไนเตรต (Ammonium Nitrate; NH_4NO_3)
4. แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Ammonium dihydrogen phosphate ; $(NH_4)_2HPO_4$)
5. แมกนีเซียมไนเตรต (Magnesium Nitrate; $Mg(NO_3)_2$)
6. โพแทสเซียมไนเตรต (Potassium Nitrate; KNO_3)
7. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)
8. เพปโตน (Peptone)
9. สารสกัดเนื้อสัตว์ (beef extract)
10. ทริปโตน (Tryptone)
11. Skim milk

แหล่งไนโตรเจนจากของเหลือทิ้งทางการเกษตร

1. กากเนื้อในปาล์มที่หีบน้ำมันแล้ว (บริษัท สุขสมบูรณ์น้ำมันปาล์ม จำกัด)
2. รำข้าวที่หีบน้ำมันแล้ว (บริษัท ซีอีโอ อกริฟู้ด จำกัด)

3.5.2 การย่อยแหล่งไนโตรเจนจากของเหลือทิ้งทางการเกษตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีของเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกหรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้มีค่าอยู่ระหว่าง 6 - 8 จากนั้นนำไปย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส โดยเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และใช้ปริมาตรเอนไซม์ของเอนไซม์ในอัตราส่วนของเหลือทิ้งทางการเกษตร 100 กรัมต่อเอนไซม์ 20 ไมโครลิตร โดยความเข้มข้นของเอนไซม์เท่ากับ 2.4 เอยู-เอต่อกรัม (AU-A/g)

3.6 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.6.1 การวัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ช่วง Late log phase

1. เลือกโคโลนีเชื้อบริสุทธิ์ที่เหมาะสมจากจานเลี้ยงเชื้อที่บ่ม 36 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส ย้ายลงในหลอดอาหารเหลว GYC ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. เมื่อครบเวลานำเชื้อออกมาวัดการเจริญเติบโตด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3. เลือกเชื้อจากหลอดอาหารที่เจริญดีที่สุดเป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์จากนั้นดูดเชื้อลงในฟลาสก์ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว GYC 100 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. วัดการเจริญเติบโตของเชื้อด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุกๆ 2 ชั่วโมง จากนั้นเลือกช่วง Late log phase เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลอง

3.6.2 การทดสอบแหล่งไนโตรเจน

1. เตรียมหัวเชื้อบริสุทธิ์ ตามวิธีในข้อ 3.3

2. เตรียมอาหารชุดควบคุม (GYC) และอาหารสำหรับทดสอบโดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

3. ย่อยแหล่งไนโตรเจนจากของเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยเอนไซม์อัลคาเลสตามวิธีในข้อ 3.5.2

4. ใส่หัวเชื้อบริสุทธิ์ลงในฟลาสก์อาหารแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. วัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.3 การหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

1. เตรียมหัวเชื้อบริสุทธิ์ ตามวิธีในข้อ 3.3

2. เตรียมอาหารชุดควบคุม (GYC และ YC) (ภาคผนวก ก) และอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนจากของเหลือทิ้งทางการเกษตร (กากเนื้อในปาล์ม, รำข้าว) ที่ความเข้มข้น 10, 50, 100, 150, 200, 300 กรัมต่อลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

3. ย่อยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีของเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ตามวิธีในข้อ 3.5.2

4. ใส่หัวเชื้อบริสุทธิ์ลงในฟลาสก์อาหารแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. วัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

6. วิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติกโดยการไทเตรตและวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjejdahl ตามวิธีในข้อ 3.7.2 และ 3.7.1 ตามลำดับ

3.6.4 การทดสอบแหล่งคาร์บอน

1. เตรียมหัวเชื้อบริสุทธิ์ ตามวิธีในข้อ 3.5

2. เตรียมอาหารชุดควบคุม (GYC, GC) (ภาคผนวก ก) และอาหารสำหรับทดสอบโดยใช้กากเนื้อในปาล์มที่ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร และใช้แหล่งคาร์บอนอื่นๆ ที่มีในห้องปฏิบัติการทดแทนความเข้มข้นกลูโคสในอาหาร GYC ดังนี้

1.1 ฟรัคโทส	50 กรัมต่อลิตร
1.2 มอลโทส	50 กรัมต่อลิตร
1.3 ซูโครส	50 กรัมต่อลิตร
1.4 ไซโลส	50 กรัมต่อลิตร
1.5 แลคโทส	50 กรัมต่อลิตร
1.6 กลูโคส	50 กรัมต่อลิตร

โดยเตรียมในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

3. ย่อยอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนจากของเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วยเอนไซม์อัลคาเลสตามวิธีในข้อ 3.5.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น และไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ใส่หัวเชื้อบริสุทธิ์ลงในฟลาสก์อาหารแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. วัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

6. เก็บตัวอย่างและวัดปริมาณกรดแลคติกโดยวิธีการไทเทรตตามวิธีในข้อ 3.7.2

3.6.5 การหาความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสม

1. เตรียมหัวเชื้อบริสุทธิ์ ตามวิธีในข้อ 3.3

2. เตรียมอาหารชุดควบคุม (GYC) และอาหารทดสอบโดยใช้กากเนื้อในปาล์มเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร และใช้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 50, 80, 100, 120, 150 กรัมต่อลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

3. ย่อยอาหารด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ตามวิธีในข้อ 3.5.2

4. ใส่หัวเชื้อบริสุทธิ์ลงในฟลาสก์อาหารแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. วัดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ที่ชั่วโมงที่ 24 และ 48

6. เก็บตัวอย่างและวัดปริมาณกรดแลคติกโดยการไทเทรตตามวิธีในข้อ 3.7.2 ที่ชั่วโมงที่ 0, 24 และ 48

7. วัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS ตามวิธีในข้อ 3.7.3 ที่ชั่วโมงที่ 0, 24 และ 48

3.7 การวิเคราะห์

3.7.1 การวิเคราะห์ไนโตรเจน

การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนโดยวิธี Kjeldahl (Kjeldahl, 1883)

1. ดูดตัวอย่างลงในหลอด 2 มิลลิลิตร ใส่ Kjeldahl catalyst 1 tablet

2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 25 มิลลิลิตร

3. เปิดเครื่องย่อยแล้วตั้งหลอดย่อยในเครื่องสวมเครื่องดักจับไอกรดลงบนส่วนของหลอดย่อย ใช้เวลาย่อยประมาณ 1 ชั่วโมงหรือจนกว่าตัวอย่างจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. จากนั้นนำเข้าเครื่องกลั่นโปรตีนโดยตวงคาร์บอลิก 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร พร้อมหยดอินดิเคเตอร์ซึ่งจะทำให้กลายเป็นสารละลายสีแดงออกชมพูวางไว้บริเวณแพลตฟอร์มของตัวเครื่อง จากนั้นนำหลอดย่อยประกอบเข้ากับเครื่องกลั่น ปล่อยให้เครื่องทำงานเป็นเวลา 5 นาที

5. เอาขวดรูปชมพู่และหลอดย่อยจากเครื่อง นำสารละลายในขวดรูปชมพู่ไปไทเทรตกับสารละลายไฮโดรคลอลิกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนได้สารละลายสีชมพูอ่อน

6. การคำนวณปริมาณไนโตรเจน

ปริมาณร้อยละไนโตรเจน = (14 x (v1xv2) x Normality of HCL(mol/L) x 100)/(waight of sample (g) x 1000)

v1 = ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ไทเทรตตัวอย่าง

v2 = ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ไทเทรต Blank

3.7.2 วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติกโดยการไทเทรต

1. นำตัวอย่างส่วนใสที่ทำการปั่นเหวี่ยงเอาเซลล์จุลินทรีย์ออกไปแล้วมา 2 มิลลิลิตรใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. เจือจางส่วนใสด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3. หยดฟีนอล์ฟทาลีนลงในฟลาสก์ 2 หยด จากนั้นไทเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล

4. คำนวณหาเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข)

3.7.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) โดยวิธี 3,5– dinitrosalicylic acid method (DNS method) (Miller, 1959)

1. เจือจางตัวอย่างให้อยู่ในช่วงที่สามารถวัดได้
2. ดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองและใส่สารละลาย DNS ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
3. ต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที จากนั้นทิ้งให้เย็น
4. นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส (ภาคผนวก ข)

3.7.4 การวิเคราะห์ผลพลอยได้ของกรดแลคติก

ผลได้ = ปริมาณกรดแลคติก/ปริมาณน้ำตาลกลูโคสชั่วโมงที่ 0 - ปริมาณน้ำตาลกลูโคสชั่วโมงที่ 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

4.1 ผลการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1

จากการทดลองเพื่อหาการเจริญเติบโตที่เหมาะสมของเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus coagulans* D-DSM1 สำหรับใช้หาสภาวะในการผลิตกรดแลคติก โดยทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารมาตรฐาน GYC และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 45 ทำให้ได้กราฟการเจริญเติบโตออกมาดังรูปที่ 4.1

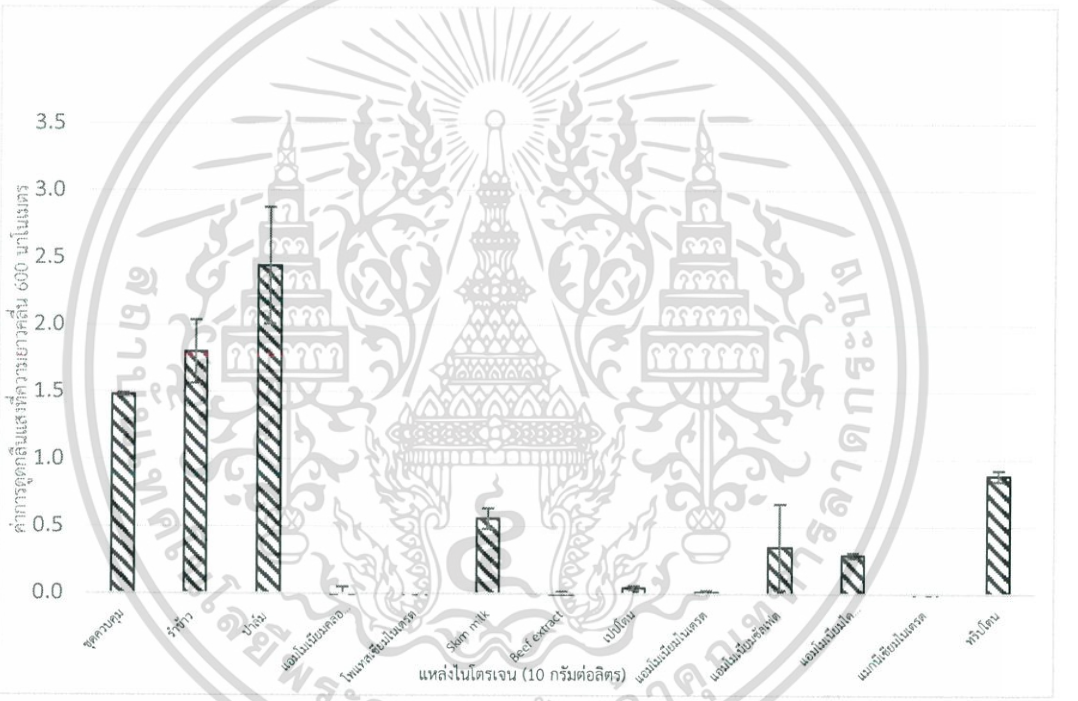
รูปที่ 4.1 กราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1 ในอาหารเหลว GYC เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 45 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

เมื่อพิจารณาจากกราฟการเจริญเติบโตทำให้ทราบว่าการเจริญเติบโตที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ *Bacillus coagulans* D-DSM1 สำหรับนำมาใช้หาสภาวะในการผลิตกรดแลคติกคือชั่วโมงที่ 36 ดังนั้นจึงเลือกใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่ชั่วโมงนี้เป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการวิเคราะห์แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1

ในการทดลองได้ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันเพื่อหาการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด โดยวิเคราะห์จากแหล่งไนโตรเจนในห้องปฏิบัติการ 11 ชนิด ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ (ชุดควบคุม) , แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl), แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH_4) $_2SO_3$), แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3), แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($NH_4H_2PO_3$), แมกนีเซียมไนเตรท ($Mg(NO_3)_2$), โพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3), เพปโทน, สารสกัดจากเนื้อ, ทริปโตน และ Skim milk และแหล่งไนโตรเจนที่มาจากของเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ กากเนื้อในปาล์มที่หีบน้ำมันแล้ว และ รำข้าวที่หีบน้ำมันแล้ว โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.2



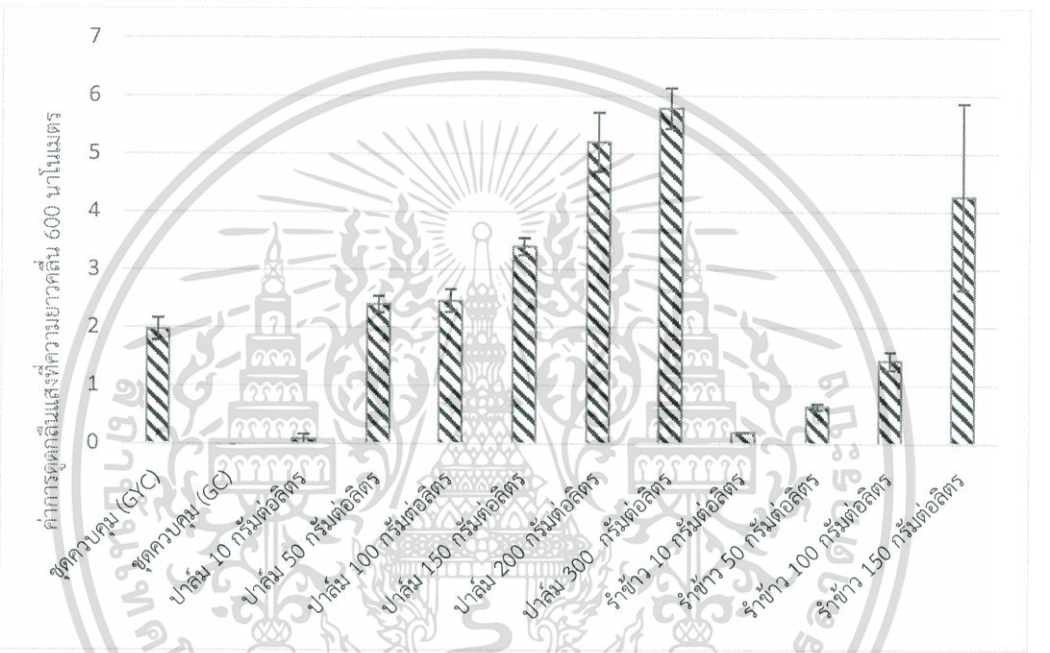
รูปที่ 4.2 กราฟเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Bacillus coagulans* D-DSM1 ในอาหารเหลวที่ใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

เมื่อพิจารณาจากกราฟแล้วพบว่า แหล่งไนโตรเจนจากของเหลือทิ้งทางการเกษตร คือ กากเนื้อในปาล์มที่หีบน้ำมันแล้วและรำข้าว ให้การเจริญเติบโตที่สูงเมื่อเทียบกับชุดควบคุมและแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ จากห้องปฏิบัติการ ดังนั้นจึงทำการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจากของเหลือทิ้งทางการเกษตรในการทดลองถัดไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนจากของเหลือทิ้งทางการเกษตรต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1

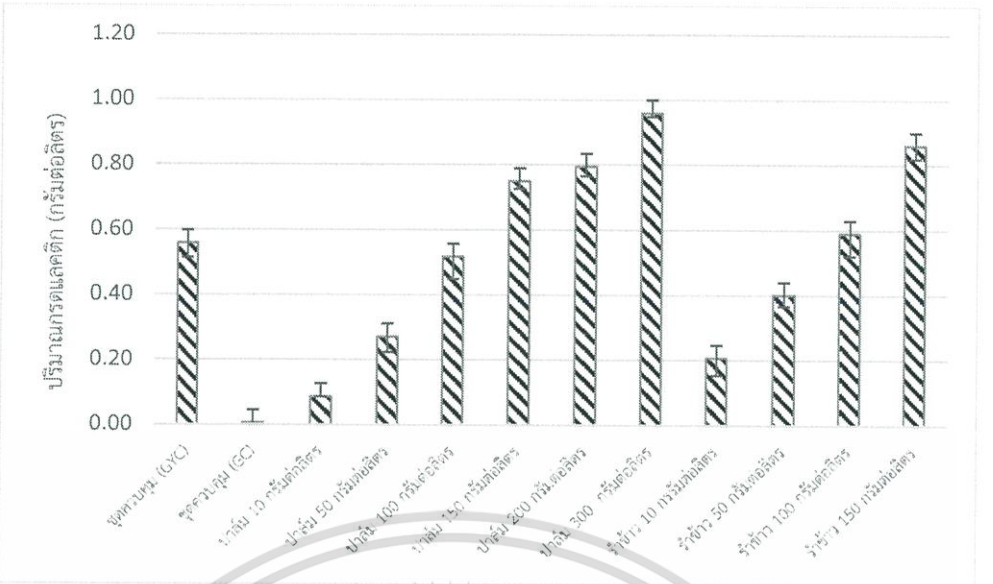
เพื่อให้ทราบความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนมีผลอย่างไรต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์จึงได้ทำการทดลองโดยเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus coagulans* D-DSM1 ในอาหารที่มีกากเนื้อในปาล์มและรำข้าวเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นแตกต่างกันตั้งแต่ 10, 50, 100, 150, 200 และ 300 กรัมต่อลิตร และใช้อาหารมาตรฐาน GYC และอาหาร GC เป็นชุดควบคุม โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ผลการทดลองเป็นดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 กราฟเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Bacillus coagulans* D-DSM1 ในอาหารเหลวโดยใช้แหล่งไนโตรเจนจากของเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

จากการทดลองพบว่าอาหารที่มีรำข้าวความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตรและ 300 กรัมต่อลิตร ไม่สามารถใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อได้เนื่องจากมีปริมาณของรำข้าวมากเกินไปจนเกิดการดูดน้ำจากในฟลาสก์อาหาร และเมื่อพิจารณาจากกราฟจะเห็นได้ว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากเนื้อในปาล์ม 300 กรัมต่อลิตรให้การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่สูงที่สุด และเมื่อนำไปวัดปริมาณกรดแลคติกโดยการไทเทรตได้ผลดังรูปที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 กราฟเปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติก(กรัมต่อลิตร) เมื่อใช้กากเนื้อในปาล์มและรำข้าวเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10, 50, 100, 150, 200 และ 300 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เชื้อสามารถใช้ผลิตกรดแลคติกได้ดีคือ กากเนื้อในปาล์ม 300 กรัมต่อลิตรและรำข้าว 150 กรัมต่อลิตร

แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ไนโตรเจนด้วยวิธี Kjeldahl พบว่าความเข้มข้นที่มีเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนสูงที่สุดคือ กากเนื้อในปาล์มที่หีบน้ำมันแล้ว 150 กรัมต่อลิตร ดังที่แสดงในรูปที่ 4.5

รูปที่ 4.5 กราฟเปรียบเทียบปริมาณไนโตรเจนปริมาณไนโตรเจนเมื่อใช้กากเนื้อในปาล์มและรำข้าวเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10, 50, 100, 150, 200 และ 300 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองในการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรเมื่อมีการใช้แหล่งไนโตรเจนจากธรรมชาติในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้เกิดความขุ่นซึ่งรบกวนการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนได้ เพราะฉะนั้นผลที่น่าเชื่อถือกว่าคือปริมาณไนโตรเจนที่ย่อยได้และนำไปวิเคราะห์ไนโตรเจนด้วยวิธี Kjeldahl ซึ่งเป็นปริมาณไนโตรเจนที่เชื้อสามารถนำไปใช้ได้จริง ดังนั้นกากเนื้อในปาล์มที่หีบน้ำมันแล้ว 150 กรัมต่อลิตรจึงถูกเลือกนำไปใช้ในการทดลองถัดไป

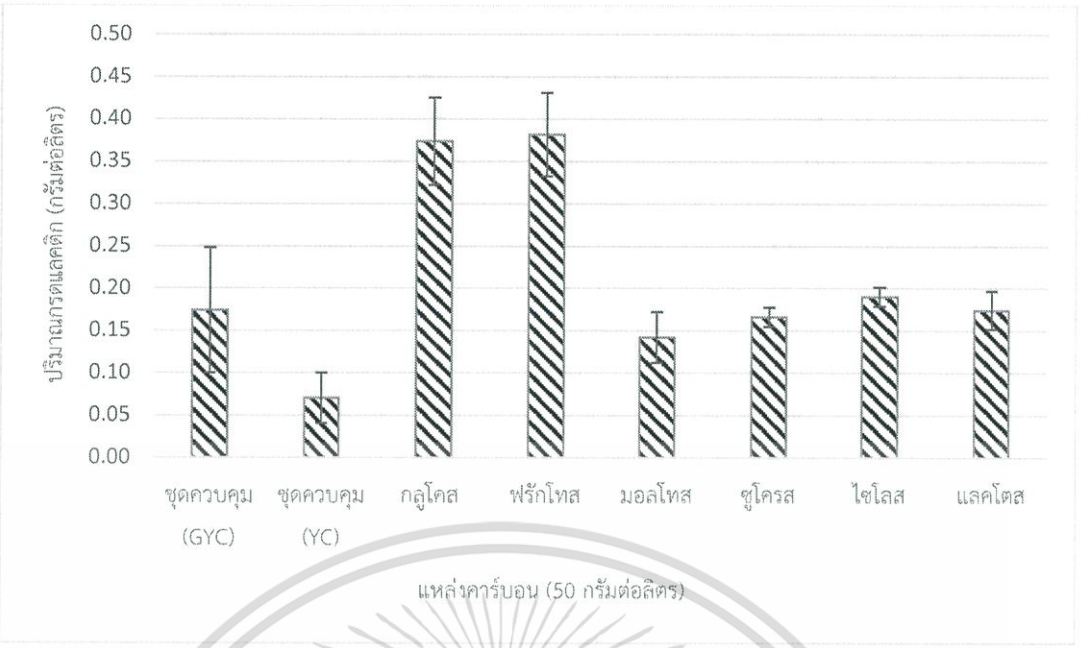
4.4 ผลการวิเคราะห์แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1

ในการทดลองได้ทำการเลี้ยงเชื้อโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันเพื่อหาการเจริญเติบโตที่ดีที่สุด โดยวิเคราะห์จากแหล่งคาร์บอนในห้องปฏิบัติการ 6 ชนิด ได้แก่ กลูโคส, ฟรักโทส, มอลโทส, ซูโครส, ไซโลสและแลคโตส ใช้อาหารสูตรมาตรฐาน GYC และอาหาร YC เป็นชุดควบคุม โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ได้ผลการทดลองดังรูปที่ 4.6

รูปที่ 4.6 กราฟเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Bacillus coagulans* D-DSM1 ในอาหารเหลวโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน ที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

เมื่อพิจารณาจากราฟพบว่าแหล่งคาร์บอนที่ให้การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Bacillus coagulans* D-DSM1 สูงที่สุดคือน้ำตาลซูโครสแต่ในขณะเดียวกันแหล่งคาร์บอนที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ผลิตกรดแลคติกได้มากที่สุดคือ ฟรักโทสและกลูโคส ดังรูปที่ 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 กราฟเปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร) โดยเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1 ในอาหารเหลวโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

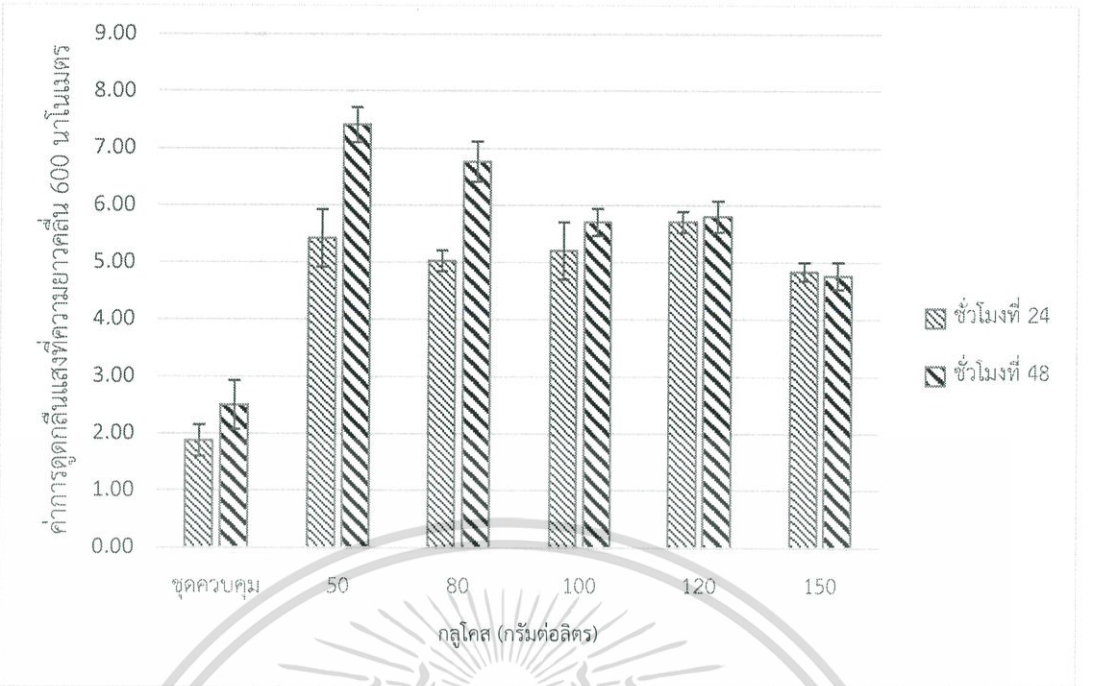
เพื่อหาสภาวะที่เชื้อสามารถผลิตกรดแลคติกได้ดีที่สุด กลูโคสและฟรักโทสจึงเป็นตัวเลือกที่ดีสำหรับการทดลองแต่เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสมีราคาถูก สามารถหาได้ทั่วไปในห้องปฏิบัติการ จึงถูกเลือกนำมาใช้ในการทดลองถัดไป

4.5 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1

4.5.1 ผลการวิเคราะห์ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1

เพื่อให้ทราบว่าความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น มีผลอย่างไรต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จึงได้ทำการทดลองโดยทำการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus coagulans* D-DSM1 และใช้ความเข้มข้นของกลูโคสตั้งแต่ 50, 80, 100, 120 และ 150 กรัมต่อลิตร โดยทำการเก็บผลที่ชั่วโมงที่ 24 และ 48 จากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ผลการทดลองเป็นดังที่แสดงในรูป 4.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



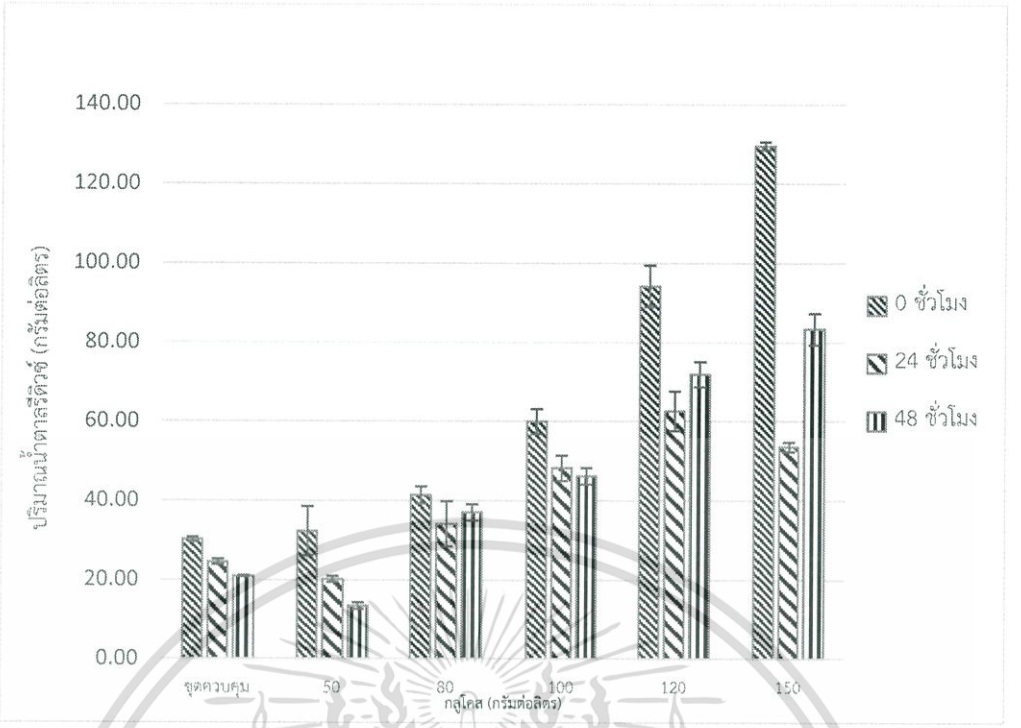
รูปที่ 4.8 กราฟเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ *Bacillus coagulans* D-DSM1 ในอาหารเหลวโดยใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50, 80, 100, 120 และ 150 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

เมื่อพิจารณาจากกราฟพบว่าความเข้มข้นที่เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดีคือ 50 กรัมต่อลิตร และ 80 กรัมต่อลิตร คือเชื้อมีการเจริญเติบโตต่อไปจนถึงชั่วโมงที่ 48 ในขณะที่ความเข้มข้นอื่นๆ ไม่มีความแตกต่างกัน เป็นไปได้ว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลสูง เชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถทนต่อแรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) จากน้ำตาลได้จึงไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้

4.5.2 การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

เพื่อให้ทราบถึงการใช้กลูโคสของเชื้อจุลินทรีย์จึงได้ทำการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ชั่วโมงที่ 0, 24 และ 48 จากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ได้ผลการทดลอง ดังที่แสดงในรูป 4.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



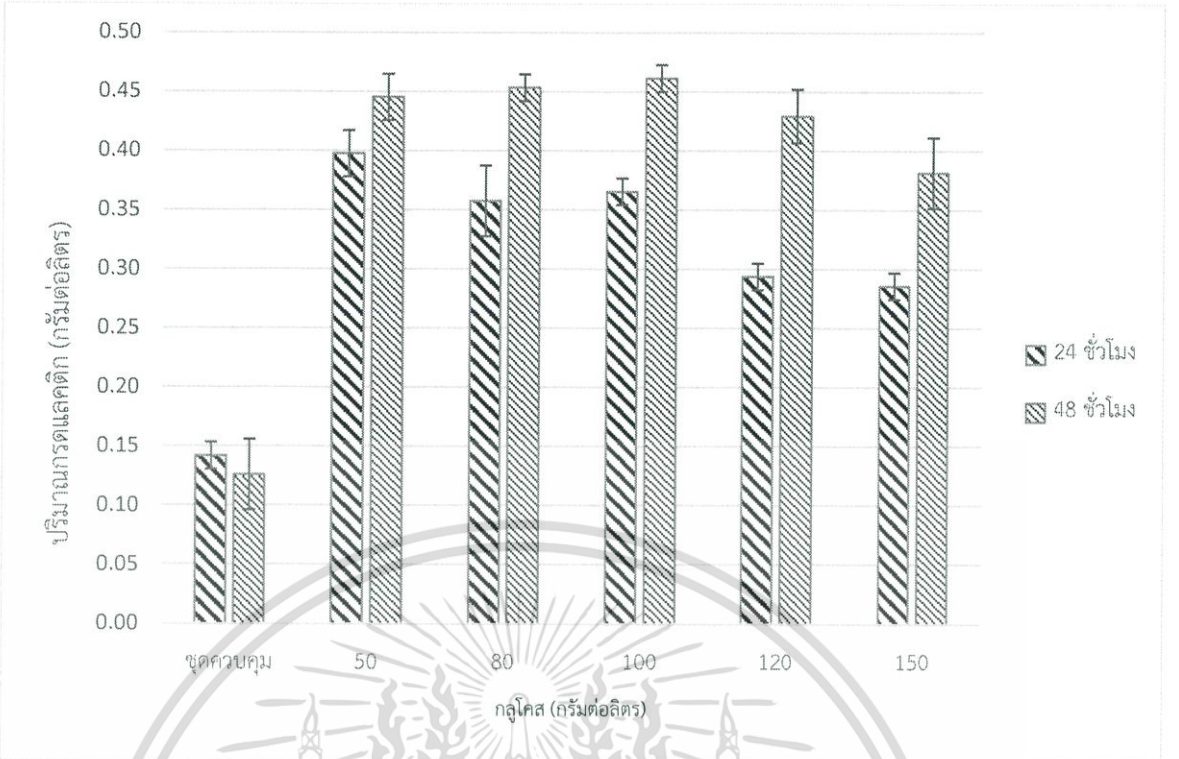
รูปที่ 4.9 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ในอาหารเหลว โดยใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50, 80, 100, 120 และ 150 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 24 และ 48 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

เมื่อพิจารณาจากกราฟพบว่าที่ชั่วโมงที่ 0 น้ำตาลมีปริมาณสูงที่สุดในแต่ละความเข้มข้นและลดลงมาในชั่วโมงที่ 24 และเมื่อเทียบกับชุดควบคุมพบว่าน้ำตาลลดลงอีกในชั่วโมงที่ 48 ในขณะที่น้ำตาลความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตรและ 150 กรัมต่อลิตรมีปริมาณน้ำตาลที่ขึ้นสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อจุลินทรีย์ผลิตน้ำตาลตัวอื่นๆ นอกเหนือจากกลูโคสที่ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นมา และการวัดน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS ไม่สามารถระบุชนิดของน้ำตาลได้ จึงทำให้กราฟในชั่วโมงที่ 48 สูงขึ้น

4.5.2 การวัดปริมาณกรดแลคติก

เพื่อให้ทราบว่าความเข้มข้นของกลูโคสมีผลอย่างไรต่อปริมาณกรดแลคติกที่เชื้อผลิตได้จึงได้ทำการวัดปริมาณกรดแลคติกด้วยการไทเทรตที่ชั่วโมงที่ 24 และ 48 จากการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ได้ผลการทดลองดังที่แสดงในรูปที่ 4.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 กราฟแสดงผลการเปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติก (กรัมต่อลิตร) โดยเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1 ในอาหารเหลวโดยใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50, 80, 100, 120 และ 150 เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 46 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

ตารางที่ 4.1 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดแลคติกโดยเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1 โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 50, 80 และ 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ชั่วโมงที่ 24

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.002	2	.001	1.810	.243
Within Groups	.004	6	.001		
Total	.006	8			

ตารางที่ 4.2 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดแลคติกโดยเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1 โดยใช้กลูโคสความเข้มข้น 50, 80 และ 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน ที่ชั่วโมงที่ 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	2	.000	.704	.531
Within Groups	.002	6	.000		
Total	.002	8			

เมื่อพิจารณาจากกราฟพบว่าความเข้มข้นที่ให้ปริมาณกรดสูงที่ชั่วโมงที่ 24 คือ 50 กรัมต่อลิตร, 80 กรัมต่อลิตร และ 100 กรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีทางสถิติ (One-way Anova) พบว่า sig > 0.05 เพราะฉะนั้นปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตโดยเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1 ทั้งสามความเข้มข้นจึงไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับชั่วโมงที่ 48 ค่า sig > 0.05 ดังนั้นความเข้มข้นของกลูโคสที่เชื้อสามารถใช้ผลิตกรดแลคติกได้ดีที่สุด คือ กลูโคสความเข้มข้น 50, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อคิดเป็นผลพลอยได้ที่กลูโคสความเข้มข้น 50, 80 และ 100 กรัมต่อลิตรมีผลพลอยได้ 0.02, 0.10, 0.03 กรัมต่อกรัมกลูโคส ตามลำดับ ดังนั้นเพื่อหาสภาวะที่เชื้อสามารถผลิตกรดแลคติกได้มากที่สุดความเข้มข้นที่ควรนำมาใช้ คือ กลูโคส 80 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองเพื่อหาสภาวะที่ผลิตกรดแลคติกที่ได้ดีที่สุดโดยเชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus coagulans* D-DSM1 พบว่าช่วงที่เชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตที่เหมาะสมคือชั่วโมงที่ 36 จึงเลือกใช้เชื้อที่ชั่วโมงนี้เป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นทำการทดสอบแหล่งไนโตรเจนเพื่อหาแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด จากทั้งที่มีในห้องปฏิบัติการและจากของเหลือทิ้งทางการเกษตร พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้ดีที่สุดคือแหล่งไนโตรเจนจากของเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ กากเนื้อในปาล์มที่หีบน้ำมันแล้วและรำข้าวที่หีบน้ำมันแล้ว และเพื่อให้ทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดแลคติกจึงมีการวิเคราะห์ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน โดยเริ่มตั้งแต่ ความเข้มข้น 10, 50, 100, 150, 200 และ 300 กรัมต่อลิตร และถึงแม้ว่ากากเนื้อในปาล์มที่หีบน้ำมันแล้วความเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตรจะให้การเจริญเติบโตที่ดีที่สุดแต่เมื่อนำไปวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนด้วยวิธีคเจดาห์ลพบว่าความเข้มข้นที่มีไนโตรเจนมากที่สุดคือกากเนื้อในปาล์มที่หีบน้ำมันแล้ว 150 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเลือกใช้กากเนื้อในปาล์มที่หีบน้ำมันแล้วความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด

ต่อมาทำการวิเคราะห์เพื่อหาแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดโดยใช้แหล่งคาร์บอนที่มีในห้องปฏิบัติการ พบว่าที่แหล่งคาร์บอนที่ให้การเจริญเติบโตที่ดีที่สุดคือ ซูโครส แต่ในขณะเดียวกันแหล่งคาร์บอนที่ให้ปริมาณกรดแลคติกสูงที่สุดคือกลูโคสและฟรักโทส และเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกจึงเลือกกลูโคสมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด จากนั้นทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น โดยเริ่มตั้งแต่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร 80 กรัมต่อลิตร 100 กรัมต่อลิตร 120 กรัมต่อลิตร และ 150 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นที่สามารถให้ปริมาณกรดแลคติกได้มากที่สุด คือ กลูโคส 80 กรัมต่อลิตร โดยคิดเป็นผลพลอยได้ 0.10 กรัมต่อกรัมกลูโคส จึงสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *Bacillus coagulans* D-DSM1 คือ ใช้กากเนื้อในปาล์มความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนและใช้กลูโคสความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. หลังจากทดสอบแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนควรทำการหาปริมาณกรดแลคติกทุกครั้ง

2. ของเหลือทิ้งทางการเกษตรควรบดอย่างละเอียด เพื่อง่ายต่อการใช้งานและใช้ประโยชน์ได้ดียิ่งขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงพานิชย์. 2560. **ตลาดส่งออก 15 อันดับแรกของไทยรายประเทศ**, แหล่งที่มา: http://www.ops3.moc.go.th/infor/menucomth/stru1_export/export_topn_re/report.asp, 10 มิถุนายน 2561

กรุงเทพธุรกิจ. 2561. **5 พืชเศรษฐกิจ ปี 2561 แนวโน้มเติบโต 3.2 เปอร์เซ็นต์**, แหล่งที่มา: http://www.bangkokbiznews.com/news/detail/795970, 24 มิถุนายน 2561

การผลิตน้ำมันรำข้าว, แหล่งที่มา: http://www.ceoriceoil.com/productions/, 19 มิถุนายน 2561

จินดา สนิทวงศ์ ณ อยุธยา. 2548. **การใช้กากปาล์มน้ำมันเป็นอาหารโค-กระบือ** กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ชาย โพธิวิส และคณะ. 2547. **ปาล์มน้ำมัน**: เอกสารวิชาการ ลำดับที่ 16/2547. กรุงเทพฯ: กรมวิชาการเกษตร สถาบันวิจัยพืชสวน.

เชฐชุดา เชื้อสุวรรณ. 2561. **อุตสาหกรรมข้าว**, แหล่งที่มา: https://www.krungsri.com/bank/getmedia/578889e0-fc28-4e20-bc48-31f0dbe04a3d/IO_Rice_2018_TH.aspx, 19 มิถุนายน 2561

ปราณี อ่านเปรื่อง, **เอนไซม์ทางอาหาร**. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2547. 442 หน้า. ศูนย์หนังสือแห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปิ่น จันจุฬา. 2558. **การพัฒนาและการใช้ประโยชน์ผลพลอยได้จากการปลูกปาล์มน้ำมันและอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มเพื่อเป็นอาหารสัตว์**. วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ 2(1) : 2 - 16

ทวีศักดิ์ นิยมบัณฑิต. 2529. **ผลการใช้กากปาล์มน้ำมันชนิดกะเทาะเปลือกในอาหารสุกรรุ่น-ขุน**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วารีรัตน์ เพชรสีช่วง. 2560. **อุตสาหกรรมข้าว**, แหล่งที่มา: https://www.krungsri.com/bank/getmedia/a4914ee7-5d26-47f5-b572-11013a2b9cce/IO_Rice_201705_TH.aspx, 10 พฤษภาคม 2561

สมพงษ์ เทศประสิทธิ์. 2526. **การใช้กากปาล์มน้ำมันในอาหารโครุ่น**. วารสารสงขลานครินทร์ 5(3): 221 – 225

สายชล เลิศสุวรรณ และ วรพงษ์ นลินานนท์. 2553. **การลดปริมาณเยื่อใยรวมในกากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมัน โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส และผลของการใช้กากเนื้อเมล็ดในปาล์มน้ำมันที่ผ่านการลดปริมาณเยื่อใยรวม ระดับต่างๆในอาหารไก่เบตง**. รายงานการวิจัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร, ชุมพร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

สายันต์ ปานบุตร. 2547. **การใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันและเศษเหลือจากรวงข้าวหมักยูเรียเสริมกากน้ำตาลในอาหารแพะเพศผู้**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา

สุคันธรส ธาดากิตติสาร. 2560. **โปรตีนจากรำข้าวสกัดไขมัน**, แหล่งที่มา: http://www3.rdi.ku.ac.th/?p=41404, 19 มิถุนายน 2561

สุมิตรา สำเภาพล. 2543. **การใช้เศษเหลือจากรวงข้าวผสมกากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันหมักด้วยยูเรียเป็นอาหารพื้นฐานสำหรับแพะ**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์,สงขลา

อนันตเดช แย้มหอม. 2555. **ผลการใช้กากเนื้อในเมล็ดปาล์มน้ำมันทดแทนข้าวโพดบดในอาหารข้นต่อการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ และนิเวศวิทยาในกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมืองไทย**. แก่นเกษตร 40 : 343-35834

Abdel-Rahman, M.A, Tashiro, Y., Sonomoto, K., 2011. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. J. Biotechnol. 156, 286–301.

Alimon, A.R., 2004. The nutritive value of palm kernel cake for animal feed. Department of animal science. Palm Oil Development. Malaysian Palm Oil Board (MPOB).

Bai, Z., Gao, Z., Sun, J., Wua, B. and He, B., 2016. D-Lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus* YBS1-5 with simultaneous utilization of cottonseed meal and corncob residue. Bioresource Technology 207, 346–352

Benninga H., 1990. A History of Lactic Acid Making. :43-109, 157-170, 398-457, 155-159.

Boateng, M., Okai, D.B., Baah, J. and Donkoh, A., 2008. Palm kernel cake extraction and utilisation in pig and poultry diets in Ghana. Livestock Research for Rural Development 20 (7)

Capellini, C.M, Giacomini, V., Cuevas, S.M. and Rodrigues, E.C.C., 2017. Rice bran oil extraction using alcoholic solvents: Physicochemical characterization of oil and protein fraction functionality. Industrial Crops & Products 104, 133–143

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Chin, F.Y., 2001. Palm kernel cake (PKC) as a supplement for fattening and dairy cattle in Malaysia.MARDI. Paper presented at 7th Meet. of FAO Regional Working Group on Grazing and Feed Resources for S.E. Asia, Manado, Indonesia (in process of publication).

Dairo, F.A.S. and Fasuyi, A.O., 2008. Evaluation of fermented plam kernel meal and fermented copra meal proteins as substitute for soybean meal protein in laying hens diets. J. of central European agriculture. 9(1): 35 – 44.

Datta, R., 1995. Technological and economical potential of polylactic acid and lactic acid derivatives. FEMS Microbiology Reviews, 16, 221-231.

Datta, R., Henry M., 2006. Lactic acid: recent advances in products, processes and Technologies - a review. J Chem Technol Biotechnol. 81, 1119–29.

FAO., 1988. Non - conventional feed resources in asia and the pacific. advances in availability and utilization. FAO regional office for asia and the pacific, bangkok. :41.

Kjeldahl, J., 1883. New method for the determination of nitrogen in organic 386 substrates. Zeitschrift fur Analytic Chemie. 22, 366-383.

Li, J., Sun, J., Wua, B. and He, B., 2017. Combined utilization of nutrients and sugar derived from wheat bran for d-Lactate fermentation by *Sporolactobacillus inulinus* YBS1-5. Bioresour. Technol. 229, 33-38

Li, Y., Wang, L.M., Ju, J.S., Yu, B. and Ma, Y.H., 2013. Efficient production of polymergrade D-lactate by *Sporolactobacillus laevolacticus* DSM442 with agricultural waste cottonseed as the sole nitrogen source. Bioresour. Technol. 142, 186–191.

Lin, L., Ying, D., Chaitep, S., Vittayapadung, S., 2009. Biodiesel production from crude rice bran oil and properties as fuel. Appl. Energy 86, 681–688.

Litchfield, JH., 1996. Microbiological production of lactic acid. Adv Appl Microbiol. 42, 45-95.

Marini, F., Balestrieri, F., Bucci, R., Magri, A. and Marini, D., 2003. Supervised pattern recognition to discriminate the geographical origin of rice bran oils: a first study. Microchem. J. 74, 239-248.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Anal. Chem., 31(3): 426–428

Msuya, N., Katima, J.H.Y., Masanja E. and Temu, A.K., 2017. Poly (lactic-acid) Product from Monomer to Polymer: A Review. Scifed Journal of Polymer science 1:1.

Nancib, A., Nancib, N., Meziane-Cherif, D., Boubendir, A., Fick, M. and Boudrant, J., 2005. Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. Bioresour. Technol. 96, 63–67.

Nguyen, C.M., Kim, J.S., Nguyen, T.N., Kim, S.K., Choi, G.J., Choi, Y.H., Jang, K.S. and Kim, J.C., 2013. Production of L- and D-lactic acid from waste Curcuma longa biomass through simultaneous saccharification and cofermentation. Bioresour. Technol. 146, 35–43.

Narayanan, N., Roychoudhury, K.P. and Srivastava, A., 2004. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458

Oluwafemi, R.A., 2009. Palm kernel cake (PKC) utilization in monogastric animal feeding – implication for sustainable livestock development. The internet Journal of veterinary medicine. 6(2): 1 – 7.

Ohara, H., 2003. Biorefinery. Appl Microbiol Biotechnol. 62(5-6): 474-7

Research office of agricultural economics. Situation of chief agricultural products and trend in 2015. Thailand: Office of Agricultural Economics, Ministry of Agricultural and Cooperatives; 2014. :1-226. (In Thai)

Sereewatthanawut, I., Prapintip, S. and Watchiraruji, K., 2008. Extraction of protein and amino acids from deoiled rice bran by subcritical water hydrolysis. Bioresource Technology 99(3): 555-61

Srisang, N., Srisang, S. and Wongpitithawat, P., 2017. Production of Biomass Briquette from Residual Bleaching Earth and Empty Palm Bunch. Energy Procedia. 138, 1079–1084

Sue, T.T., 2004. Quality and characteristics of Malaysian palm kernel cakes / expellers. Malaysian palm oil board. 1 – 3.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Sundu, B. and Dingle, J., 2003. Use of enzyme to improve the nutritional value of palm kernel meal and copra meal. Poult. Sci. 11(14): 1–15.

Shih, F.F., Champagne, E.T., Daigle, K. and Zarins, Z., 1999. Use of enzymes in the processing of protein products from rice bran and rice flour. Nahrung 43(1):14–18.

Underkofler, A.L. and Hickey J.R., 1954. Industrial Fermentation. New York ; Chemical Publishing Co.

Wang, L.M., Zhao, B., Li, F.S., Xu, F., Ma, C.Q., Tao, F., Li, Q.G. and Xu, P., 2011. Highly efficient production of D-lactate by *Sporolactobacillus* sp. CASD with simultaneous enzymatic hydrolysis of peanut meal. Appl. Microbiol. Biotechnol. 89, 1009–1017.

Wing Keong, NG., 2004. Researching the use of palm kernel cake in aquaculture feeds. Malaysian plam oil board (MPOB). :19 – 21.

Zahari, W., Sato M.J., Furuichi, S., Azizan, A.R. and Yunus, M., 2003. Commercial processing of oil palm fronds feed in Malaysia. Foragesand feed resources in commercial livestock production systems. The food and agriculture organization of the united nations (FAO).

Zhang, C., Zhou, C., Assavasirijinda, N., Yu, B., Wang L. and Ma, Y., 2017. Non-sterilized fermentation of high optically pure d-lactic acid by a genetically modified thermophilic *Bacillus coagulans* strain. Microb Cell Fact 16:213

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารแข็ง GYC 1 ลิตรประกอบด้วย

สารสกัดยีสต์	10	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	50	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	30	กรัม
วุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2. อาหาร GYC 1 ลิตรประกอบด้วย

สารสกัดยีสต์	10	กรัม
น้ำตาลกลูโคส	50	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	30	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

3. อาหาร YC 1 ลิตรประกอบด้วย

สารสกัดยีสต์	10	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	30	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

4. อาหาร GC 1 ลิตรประกอบด้วย

น้ำตาลกลูโคส	50	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต	30	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

1. นำน้ำตาลกลูโคสไปอบไว้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นทิ้งกลูโคสไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. ชั่งน้ำตาลกลูโคสมา 0.1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 50 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ และปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร
3. เจือจางสารละลายมาตรฐานกลูโคสให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ ข1

ตารางที่ ข1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส ที่ความเข้มข้น 200 ,400 ,600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

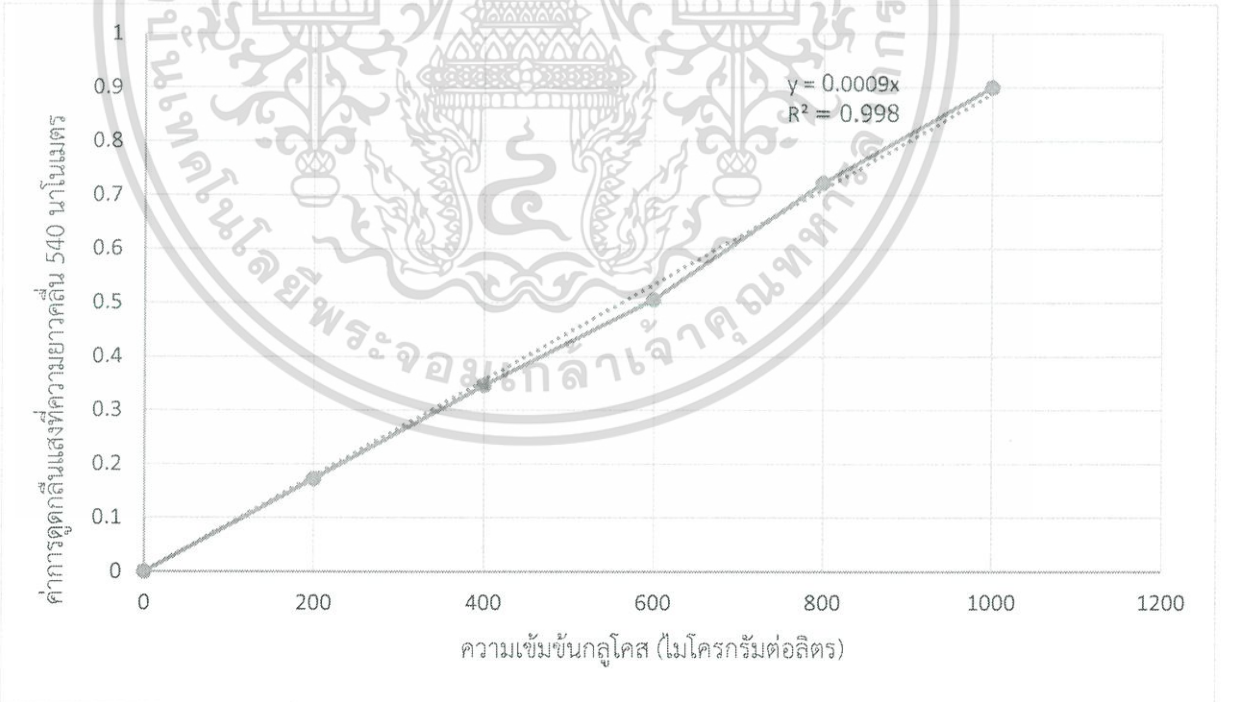
ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0	0	5
200	1	4
400	2	3
600	3	2
800	4	1
1000	5	0

4. นำสารละลายกลูโคสมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่างๆ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และสร้างกราฟมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข2 ค่าวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรของสารละลายมาตรฐานกลูโคส

ความเข้มข้นกลูโคส (ไมโครกรัมต่อลิตร)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0	0	0	0	0
200	0.17	0.175	0.172	0.17
400	0.35	0.327	0.362	0.35
600	0.45	0.53	0.537	0.51
800	0.724	0.712	0.732	0.72
1000	0.901	0.895	0.906	0.90



รูปที่ ข1 กราฟมาตรฐานกลูโคส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การเตรียมสารละลาย DNS

1. ชั่งสาร 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิคปริมาณ 10 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 250 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลายด่างทีละน้อย (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ เตรียมได้โดย ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร)
3. คนสารละลายให้เข้ากันจนหมด จนกระทั่งได้สารละลายใส
4. เติมโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรตลงไปทีละน้อยจนครบ 300 กรัม และปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 1000 มิลลิลิตร เก็บใส่ไว้ในขวดสีชา

3. วิธีทำกราฟมาตรฐานกรดแลคติก

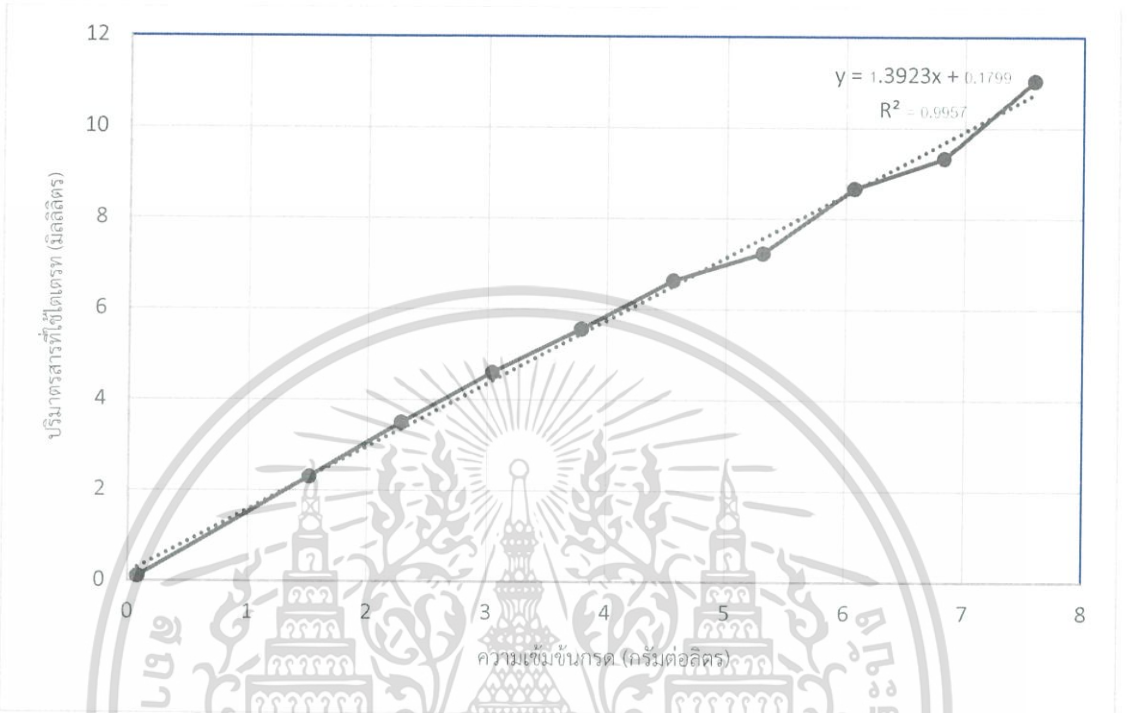
1. เจือจางกรดแลคติกให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์
2. จากนั้นใส่ตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ เจือจางด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
3. หยดฟีนอล์ฟทาลีน 2 หยด จากนั้นไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล
4. นำค่ามาที่ได้มาพล็อตเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานกรดแลคติกโดยเปลี่ยนเปอร์เซ็นต์ให้อยู่ในหน่วยกรัม

ตารางที่ ข3 ผลการไทเทรตของสารละลายมาตรฐานกรดแลคติก

ความเข้มข้นกรด (เปอร์เซ็นต์)	ความเข้มข้นกรด (กรัมต่อลิตร)	1	2	3	ปริมาณสารที่ใช้ไทเทรตเฉลี่ย (มิลลิลิตร)
0.05	0.08	0.1	0.1	0.1	0.10
1	1.52	2.4	2.3	2.2	2.30
1.5	2.28	3.4	3.5	3.6	3.50
2	3.04	4.5	4.7	4.6	4.60
2.5	3.79	5.5	5.4	5.8	5.57
3	4.55	6.7	6.5	6.7	6.63
3.5	5.31	7.2	7.2	7.3	7.23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4	6.07	8.7	8.5	8.8	8.67
4.5	6.83	9.3	9.3	9.4	9.33
5	7.59	11	11.1	11	11.03



รูปที่ ข2 กราฟมาตรฐานกรดแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้