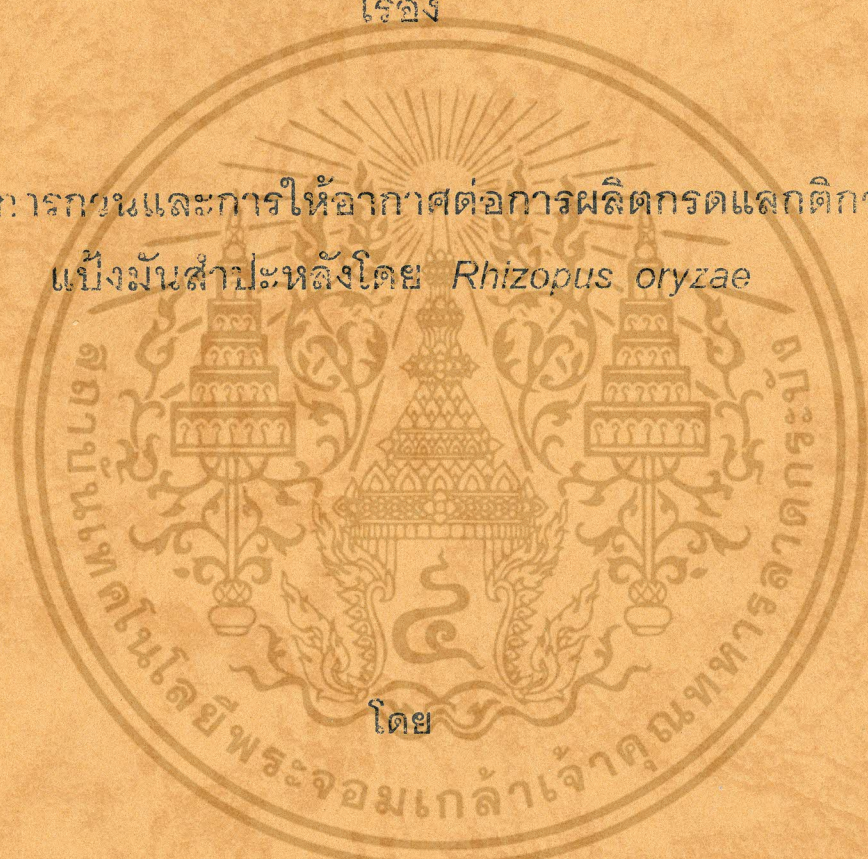


รายงานการวิจัย

เรื่อง

ผลของการรบกวนและการให้อากาศต่อการผลิตกรดแลกติกจาก  
แป้งมันสำปะหลังโดย *Rhizopus oryzae*



โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์นवलพรรณ ณ ระนอง

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานการวิจัย

เรื่อง

ผลของการกวนและการให้อากาศต่อการผลิตกรดแลกติกจาก  
แป้งมันสำปะหลังโดย *Rhizopus oryzae*

RCH  
QD  
305  
.A2  
๑๖๓๓๒๕  
ฉ.๘

สงวน.....  
เลขทะเบียน..... 115175  
วัน,เดือน,ปี. 11 ก.พ. 2553

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์นวลพรรณ ณ ระนอง

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีงบประมาณ 2543

b.11216219  
i.....

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องผลของการกวนและการให้อากาศต่อการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันสำปะหลังโดย *Rhizopus oryzae* ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินของคณะวิทยาศาสตร์ประจำปีงบประมาณ 2543 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ผู้ทำการวิจัยขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณ คุณพัชรินทร์ ชาวสวย และคุณมัทธนา พงษ์ไทย ที่ให้ความช่วยเหลือในการจัดพิมพ์รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์จนสำเร็จด้วยดี



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ	ก
สารบัญ	ข
บทคัดย่อ	ค
บทนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	11
ผลการทดลองและวิจารณ์	18
สรุปผลการทดลอง	38
เอกสารอ้างอิง	39



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของการกวนและการให้อากาศต่อการผลิตกรดแลกติก  
จากแป้งมันสำปะหลังโดย *Rhizopus oryzae*  
Effects of Agitation and Aeration on Lactic acid Production  
From Cassava starch by *Rhizopus oryzae*

บทคัดย่อ

ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจาก เชื้อ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 โดยใช้แป้งมันสำปะหลัง (ที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติก ประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 120 กรัมต่อลิตร  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3.0 กรัมต่อลิตร  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0 กรัมต่อลิตร  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25 กรัมต่อลิตร  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.04 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 ความเข้มข้นของสปอร์ที่เหมาะสมคือ  $2 \times 10^5$  สปอร์ต่อมล. การเพาะเลี้ยงในฟลาสก์แบบเขย่าให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 68.32 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 5 วัน บนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. ผลได้กรดแลกติกและอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.59 กรัมต่อกรัมสับสเตรตและ 0.57 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อศึกษาผลการให้อากาศและการกวนที่มีต่อการผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ อัตราการให้อากาศ 3 ระดับ (0.5 1.0 และ 1.5 วีวีเอ็ม) ร่วมกับอัตราการกวน 3 ระดับ (200, 300 และ 400 รอบต่อนาที) พบว่าได้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 54.62 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30 °ซ. อัตราการกวน 400 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม ผลได้กรดแลกติกและอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.49 กรัมต่อกรัมสับสเตรต และ 0.56 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ตามลำดับ

คำสำคัญ : กรดแลกติก *Rhizopus oryzae* แป้งมันสำปะหลัง

Abstract

Lactic acid production by *Rhizopus oryzae* NRRL 395 from raw cassava starch (partially hydrolyzed with hydrochloric acid) as a sole carbon source was studied. An optimized medium for lactic acid production contained : raw cassava starch, 120 g/l;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3.0 g/l;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1.0 g/l ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.25 g/l ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.04 g/l ; an initial pH of 6.0. The optimum inoculated spore concentration was  $2 \times 10^5$  spores/ml. The maximum lactic acid production in shake flasks was 68.32 g/l on day 5 with the shaking speed of 200 rpm at 30 °C. Lactic acid yield and productivity were 0.59 g/g substrate and 0.57 g/lh, respectively. Three aeration rates (0.5, 1.0 and 1.5 vvm) and three agitation rates (200, 300 and 500 rpm) were used to study the effects of aeration and agitation on lactic acid production in a 5-litre fermenter. The maximum lactic acid production was 54.62 g/l on day 4 of cultivation at 30 °C with the agitation speed of 400 rpm and the aeration rate of 1.5 vvm. The lactic acid yield was 0.49 g/g substrate with the productivity of 0.56 g/lh.

Key words : Lactic acid, *Rhizopus oryzae*, cassava starch

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทนำ

### ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

กรดแลกติกเป็นกรดอินทรีย์ที่ใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา เครื่องสำอาง ตลอดจนนำมาใช้ผลิตพลาสติกที่เรียกว่า พอลิแลกติกแอซิด (polylactic acid , PLA) ซึ่งเป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้โดยวิธีทางชีวภาพ และสามารถนำมาใช้ทดแทนพลาสติกที่ย่อยสลายได้ยากที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน การผลิตกรดแลกติกสามารถผลิตได้โดยวิธีทางเคมี และกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลกติกได้แก่ แบคทีเรียแลกติก (lactic acid bacteria) เช่น *Lactobacillus delbrueckii* *L. casei* *L. salivarius* (siebold และคณะ , 1995) และราในสกุล *Rhizopus* spp. (Yu และ Hang , 1989; Yin และคณะ , 1997) การผลิตกรดแลกติกจากแบคทีเรียแลกติกจะได้กรดแลกติกรูป L(+) และ D(-) การเพาะเลี้ยงเชื้อทำได้ยากและต้องใช้สารอาหารที่สมบูรณ์และราคาแพง ดังนั้นจึงมีการศึกษาการผลิตกรดแลกติกจาก *Rhizopus* โดยเฉพาะ *R. oryzae* ซึ่งเป็นราที่เจริญเร็ว ผลิต L(+) -lactic acid และที่สำคัญคือสามารถใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตกรดแลกติกได้หลายชนิด เช่น น้ำตาล แป้ง วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เป็นต้น *R. oryzae* NRRL 395 เป็นราที่สามารถผลิตกรดแลกติกจากข้าวเจ้าและข้าวโพดได้ดีรองลงมาคือมันสำปะหลัง (Yu และ Hang , 1989). เนื่องจากประเทศไทยมีแป้งมันสำปะหลังมากและมีราคาถูก ดังนั้นถ้าสามารถนำแป้งมันสำปะหลังมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 จะเป็นการเพิ่มคุณค่าทางเศรษฐกิจของแป้งมันสำปะหลังให้สูงขึ้นและสามารถผลิตกรดแลกติกเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมภายในประเทศได้ในอนาคต

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อนำแป้งมันสำปะหลังมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลกติกในอาหารเหลว
2. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในระดับฟลาสก์เชย่า
3. เพื่อศึกษาการผลิตกรดแลกติกในถังหมัก

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำแป้งมันสำปะหลังที่มีราคาถูกมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อลดต้นทุนการผลิตกรดแลกติก
2. สามารถผลิตกรดแลกติกเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมภายในประเทศและลดการนำกรดแลกติกเข้าจากต่างประเทศ
3. เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการขยายการผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## การตรวจเอกสาร

### โครงสร้างและสมบัติของกรดแลกติก

กรดแลกติกเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง มีชื่อทางเคมีว่า 2-hydroxypropanoic acid หรือ 2-hydroxypropionic acid สูตรโมเลกุลคือ  $C_3H_6O_3$  กรดแลกติกที่พบมี 2 ไอโซเมอร์ (isomer) คือ L(+)-lactic acid และ D(-)-lactic acid ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างของกรดแลกติก  
ที่มา : Merck (1983)

กรดแลกติกที่มีความบริสุทธิ์สูงจะไม่มีสี กรดแลกติกสามารถละลายน้ำ เอทานอล อะซีโตน อีเทอร์ ไม่ละลายในคลอโรฟอร์ม ปีโตรเลียมอีเทอร์และคาร์บอนไดซัลไฟด์ (Lockwood , 1965) สมบัติทางกายภาพของกรดแลกติกแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สมบัติทางกายภาพของกรดแลกติก

น้ำหนักโมเลกุล	90.08
จุดหลอมเหลว D(-) หรือ L(+)	52.8-54 องศาเซลเซียส
จุดเดือด D,L	82 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 0.5 มม. ของปรอท 122 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 14 มม. ของปรอท
ค่าคงที่ของการแตกตัว	$1.37 \times 10^{-4}$
( $K_a$ ที่อุณหภูมิ 25° องศาเซลเซียส)	
ค่าความร้อนของการเผาไหม้ ( $H_c$ )	1361 กิโลจูลต่อโมล
ค่าความร้อนจำเพาะ	190 กิโลจูลต่อโมล องศาเซลเซียส ( $KJ/mol^\circ C$ )
( $C_p$ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส)	

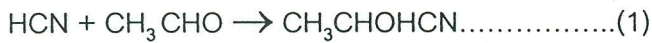
ที่มา : Lockwood (1965) ; Holten และคณะ (1971)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

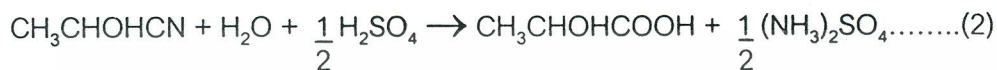
## การผลิตกรดแลกติก

1. การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีทางเคมี แบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนคือ

ขั้นตอนที่ 1 นำ hydrogen cyanide (HCN) ทำปฏิกิริยากับ acetaldehyde ได้ lactonitrile ดังสมการที่ 1



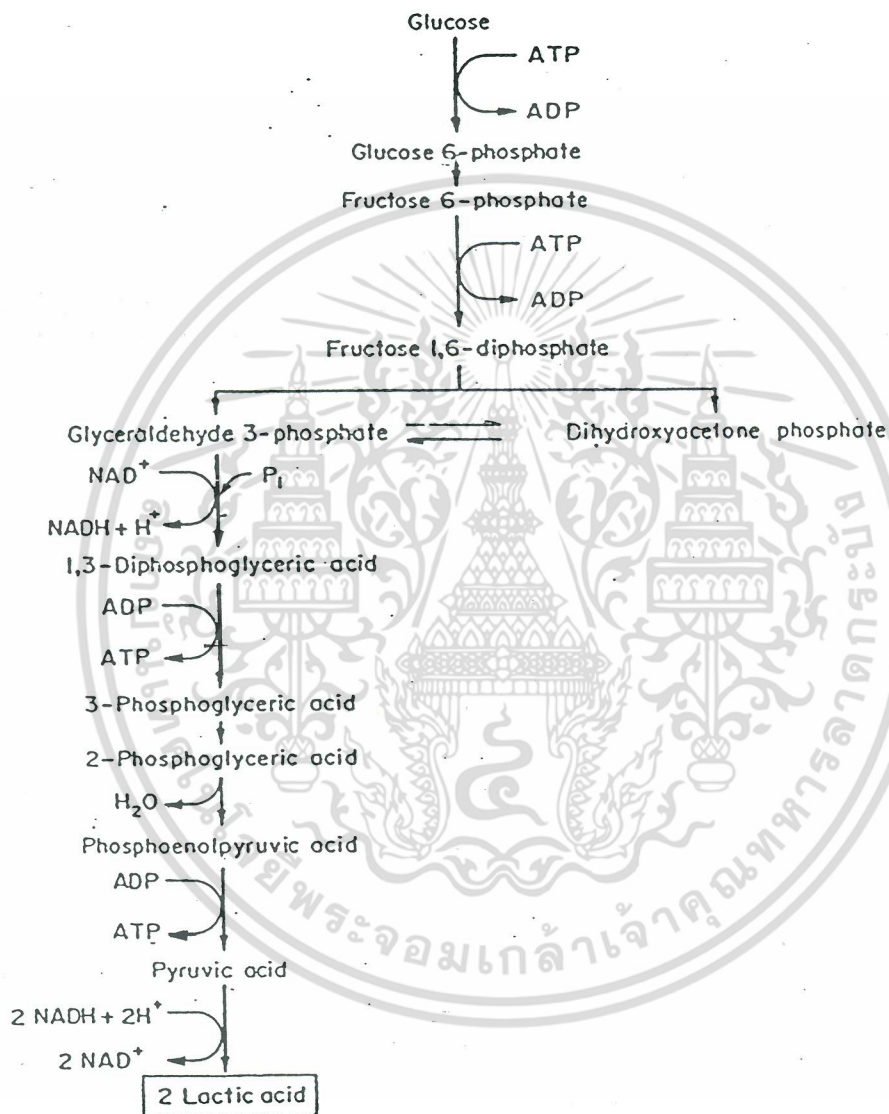
ขั้นตอนที่ 2 นำ lactonitrile มาย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือกรดซัลฟิวริกจะได้กรดแลกติกและเกลือแอมโมเนียมซึ่งเป็นของเหลือทิ้ง ดังสมการที่ 2



ขั้นตอนที่ 3 นำกรดแลกติกที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยทำเป็นอนุพันธ์เอสเทอร์คือ เมทิลแลกเตต นำเมทิลแลกเตตมากลั่นและย่อยจะได้กรดแลกติก สำหรับสารปนเปื้อนชนิดอื่น ๆ จะถูกกำจัดออกโดยการนำมาผ่านถ่างกัมมันต์ และการแลกเปลี่ยนประจุ (Lipinsky และ Sinclair, 1986)

## 2. การผลิตกรดแลกติกจากจุลินทรีย์

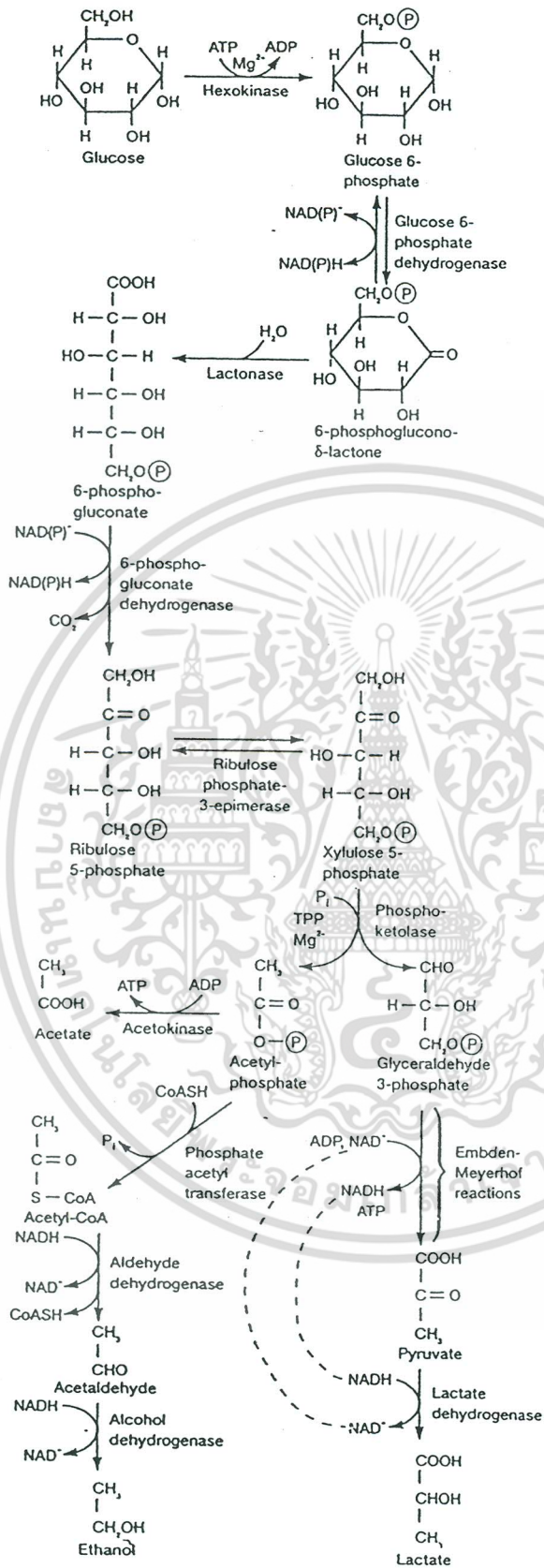
แบคทีเรีย แบคทีเรียที่สำคัญสามารถผลิตกรดแลกติกได้ คือแบคทีเรียกรดแลกติก (lactic acid bacteria) สามารถแบ่งตามการผลิตกรดแลกติกได้ 2 กลุ่มคือ แบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่ม homofermentative ซึ่งจะผลิตกรดแลกติกเพียงอย่างเดียว ตัวอย่างเช่น *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* *L. delbrueckii* *L. salivarius* (Siebold และคณะ , 1995) และ *Lactococcus cremoris* (Bibal และคณะ , 1991) วิธีในการหมักเพื่อผลิตกรดแลกติกคือ Embden-Meyerhof-Parnas pathway หรือ EMP pathway ดังแสดงในรูปที่ 2 และแบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่ม heterofermentative แบคทีเรียแลกติกกลุ่มนี้นอกจากจะผลิตกรดแลกติกแล้วยังผลิตเอทานอล กลีเซอรอล กรดอะซิติก และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ตัวอย่างเช่น *Lactobacillus casei* *L. delbrueckii* *L. salivarius* (Siebold และคณะ, 1995) *L. brevis* *L. hilgardii* *L. suebicus* *L. vaccinostereus* (Warriner และ Morris , 1995) และ *Leuconostoc mesenteroides* วิธีในการหมักเพื่อผลิตกรดแลกติก คือ phosphoketolase pathway ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 2 วิธีของ Homolactic fermentation

ที่มา : Prescott และคณะ (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 วิธีของ Heterolactic fermentation

ที่มา : Prescott และคณะ (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ohara และ Yahata (1996) พบว่า *Bacillus* sp. SHO-1 *B. cereus* *B. thuringiensis* สามารถผลิตกรดแลกติกได้ทั้งในสภาพที่มีอากาศและไม่มีอากาศ โดยให้ปริมาณกรดแลกติก ระหว่าง 12.0-16.4 กรัมต่อลิตร ในอาหาร glucose-polypepton S medium

รา ราที่ผลิตกรดแลกติกพบใน Chytridiomycetes Oomycetes และ Zygomycetes เช่น *Allomyces* *Sapromyces* และ *Apodachlya* โดยจะผลิตกรดแลกติกในสภาพที่มีอากาศ สำหรับราที่ผลิตกรดแลกติกในสภาพไม่มีอากาศคือ *Blastocladia* *Mindiniella* (Griffin, 1994) นอกจากนี้ยังพบใน *Fusarium* *Aspergillus* และยีสต์ในสกุล *Saccharomyces cerevisiae* *Hansenula* (Prescott และ Dunn , 1982) และ *Rhizopus* (Lockwood,1975) *Rhizopus oryzae* เป็นสายพันธุ์ที่ผลิต L(+)-lactic acid ได้จากข้าวโพด (Hang , 1989) ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักของ *R. oryzae* นอกจากจะได้ออกกรดแลกติกแล้วพบว่ามีเอทานอลเกิดขึ้นด้วย (Griffin , 1994) ในปีค.ศ.1995 Soccol และคณะได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจาก *Rhizopus* 19 สายพันธุ์ พบว่า *R. oryzae* NRRL 395 ผลิตกรดแลกติกสูงสุด 65 กรัมต่อลิตร และพบว่ามีกรดฟูมาริก และเอทานอลเกิดขึ้นในปริมาณเล็กน้อย *R. oryzae* NRRL 395 เป็นราที่น่าสนใจสำหรับนำมาผลิตกรดแลกติก เนื่องจากสามารถเจริญได้ดีและใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิดได้หลายชนิด เช่น น้ำตาลกลูโคส (Soccol และคณะ , 1995) น้ำตาลไซโลส (Yang และคณะ 1995) และคาร์โบไฮเดรตจากผลผลิตทางการเกษตรหลายชนิด (Yu และ Hang , 1989) การเพาะเลี้ยงสามารถทำได้ทั้งในอาหารเหลวและอาหารแข็ง (Soccol และคณะ , 1994)

#### การผลิตกรดแลกติกจาก *Rhizopus oryzae*

Hang (1989) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากข้าวโพด พบว่า *R. oryzae* NRRL 395 ผลิตกรดแลกติกได้ 354 กรัมต่อข้าวโพด 1 กิโลกรัม หรือประมาณ 44 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณข้าวโพดที่ถูกเชื้อราใช้ อาหารเหลวที่ใช้ประกอบด้วยข้าวโพดบด 150 กรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงในฟลาस्कเขย่าที่อุณหภูมิ 30<sup>o</sup>ซ. บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 240 รอบต่อนาที ต่อมา

Yu และ Hang (1989) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจาก *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารเหลวโดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นวัสดุทางการเกษตร เช่น ข้าวบาร์เลย์ ข้าวเจ้า ข้าวโพด ข้าวโอ๊ต และมันสำปะหลัง โดยใช้แหล่งคาร์บอน 100 กรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงเชื้อในฟลาस्कเขย่าที่ความเร็ว 240 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30<sup>o</sup>ซ. เป็นเวลา 96 ชม. พบว่าข้าวโพดและข้าวเจ้าให้ผลผลิตกรดแลกติกสูงสุดคือ 420-440 กรัม ต่อแหล่งคาร์บอน 1 กิโลกรัม นอกจากนี้ยังพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกของราชชนิดนี้คือ 30<sup>o</sup>ซ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Soccol และคณะ (1994) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* NRRL 398 ในอาหารแข็งและอาหารเหลว พบว่าในอาหารเหลวที่มีกลูโคส 120 กรัมต่อลิตร และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตหลังจากเลี้ยงเชื้อได้ 24 ชั่วโมง ให้กรดแลกติก 93.8 กรัมต่อลิตร และอัตราการผลิตกรดแลกติก 1.38 กรัมต่อลิตรชั่วโมง สำหรับอาหารแข็งเขานำเชื้อราไปเลี้ยงในคอลัมน์แก้วที่ภายในบรรจุด้วยขานอ้อยที่ชุ่มด้วยอาหารเหลวที่มีน้ำตาลกลูโคส 180 กรัมต่อลิตร พบว่าผลิตกรดแลกติกได้ 137 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 1.43 กรัมต่อลิตรชั่วโมง

Soccol และคณะ (1995) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจาก *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  3.2 กรัมต่อลิตร  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.6 กรัมต่อลิตร  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.75 กรัมต่อลิตร และ  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.04 กรัมต่อลิตร อาหารมีพีเอชเท่ากับ 6.0 โดยเปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อในสภาพที่มีออกซิเจนจำกัด ( $\text{O}_2$ -limited condition) กับสภาพที่มีอากาศ พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาพที่มีอากาศและเติม  $\text{CaCO}_3$  (หลังจากเชื้อเจริญได้ 24 ชม.) ได้ปริมาณกรดแลกติก 65 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 72 ของการเจริญและพบว่ามีเอทานอลและกรดฟูมาริกเกิดขึ้นเล็กน้อยแต่เมื่อเลี้ยงในสภาพที่มีออกซิเจนจำกัดและเติม  $\text{CaCO}_3$  พบว่าเชื้อจะผลิตกรดแลกติกปริมาณเล็กน้อย แต่พบเอทานอล 36 กรัมต่อลิตร และกรดฟูมาริก 3 กรัมต่อลิตร

Yin และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจาก *R. oryzae* NRRL 395 โดยใช้แป้งข้าวโพดที่ถูกย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกและแป้งข้าวโพดที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดแลกติกประกอบด้วยแป้งข้าวโพด (ที่ถูกย่อยบางส่วน) 120 กรัมต่อลิตร  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.35 กรัมต่อลิตร  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.25 กรัมต่อลิตร  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.15 กรัมต่อลิตร และ  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.04 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกในถังหมัก แบบ stirred tank bioreactor กับ air-lift bioreactor พบว่าจะให้ผลผลิตกรดแลกติก 82 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงและ 95 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยงตามลำดับ

### ประโยชน์ของกรดแลกติก

1. อุตสาหกรรมอาหาร กรดแลกติกและเกลือของกรดแลกติกนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพราะเป็นกรดที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ และพบในอาหารประเภทหมักดอง นมเปรี้ยวได้กรอกิมจิ ฯลฯ ในอาหารบางประเภทนิยมเติมกรดแลกติกเพื่อเป็นสารให้กลิ่นรส ควบคุมความเป็นกรดเป็นด่าง และป้องกันการเน่าเสีย (ปทุมพร , 2536) ดังแสดงในตารางที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ตารางที่ 1 การใช้กรดแลกติกในอาหารชนิดต่าง ๆ

อาหาร	ควบคุมกลิ่นรส	ควบคุมความเป็นกรดเป็นด่าง	การถนอมอาหาร
ขนมปังจากข้าวไรย์	+	+	+
เบียร์	-	+	+
ขนมลูกกวาด	+	+	-
ผลิตภัณฑ์นม	+	+	+
เนยเทียม	+	+	+
ของหมักดอง	+	-	+
เครื่องดื่ม	+	-	+
เครื่องปรุงรส	+	-	+

ที่มา : ปทุมพร (2536)

ในการถนอมอาหารจะใช้กรดแลกติกร่วมกับกรดแอซิดิกเพื่อให้มีฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์มากขึ้น กลิ่นของกรดแลกติก เช่นไซเดียมและโพแทสเซียมแลกเตต นิยมเติมในอาหารแปรรูปประเภทเนื้อ ไก่ และอาหารทะเล เพื่อยืดอายุการเก็บ Adams และ Hall (1988) รายงานว่า กรดแลกติกสามารถป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella enteritidis* และ *E. coli* ในเนื้อสัตว์ได้นอกจากนี้แคลเซียมแลกเตตเป็นสารที่นิยมเติมในเครื่องดื่ม กลิ่นแร่และเครื่องดื่มที่เสริมแคลเซียมเนื่องจากกลิ่นนี้อยู่ในรูปเหมือนกับแลกเตตที่ร่างกายสังเคราะห์ขึ้น โดยที่แลกเตตจะให้พลังงานอย่างรวดเร็ว และพบว่าให้พลังงานเร็วกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสประมาณ 2-10 เท่า กรดแลกติกมีรสที่นุ่มนวลกว่ากรดซิตริกจึงไม่ไปดับกลิ่นรสของอาหารชนิดนั้น ๆ และยังมีคุณสมบัติในการควบคุมจุลินทรีย์ได้ดีกว่ากรดซิตริกด้วย (รวิวรรณ , 2533)

2. อุตสาหกรรมอื่น ๆ กรดแลกติกใช้เป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอางและยาบางชนิด เพื่อเป็นตัวปรับความเป็นกรดเป็นด่างของยา เป็นส่วนประกอบในการผลิตไหมละลายที่ใช้เย็บแผล ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพคือพอลิแลกติกแอซิด กรดแลกติกยังใช้ในอุตสาหกรรมการฟอกย้อมเสื้อผ้า โดยช่วยให้สีติดผ้าได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่ากรดแลกติกยังนำไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดอินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เช่น กรดโพธิโอนิก กรดแอซิดิก เป็นต้น (Alidemirci และคณะ,1993) การนำอนุพันธ์ของกรดแลกติกมาใช้ในทางการค้าแสดงในตารางที่ 2

### แป้งมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นพืชหัวมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Manihot esculenta* Crantz หัวมันสำปะหลังที่ปอกเปลือกแล้วจะประกอบด้วย น้ำ 65 เปอร์เซ็นต์ แป้ง 32 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 1 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 0.47 เปอร์เซ็นต์ เส้นใย 0.8 เปอร์เซ็นต์ และเถ้า 0.4 เปอร์เซ็นต์ (Knight , 1969)

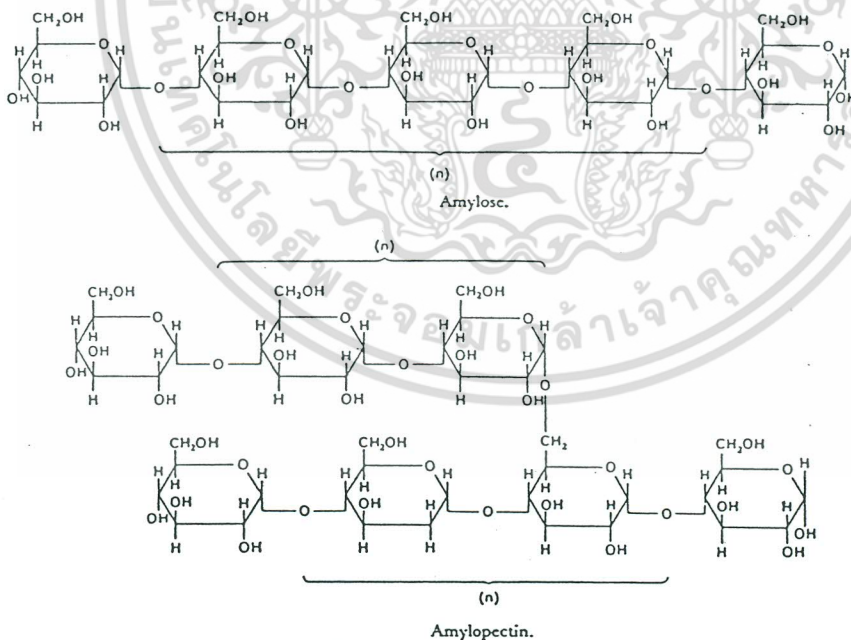
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับบุคลากรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ตารางที่ 2 การนำอนุพันธ์ของกรดแลคติกมาใช้ประโยชน์

สารอนุพันธ์	การใช้ประโยชน์
แคลเซียมแลคเตต	การรักษาโรคขาดแคลเซียมของฟัน
คอปเปอร์แลคเตต	เป็นน้ำยาใช้ชุบโลหะด้วยไฟฟ้า
ไอออนแลคเตต	รักษาโรคโลหิตจาง
โซเดียมแลคเตต	เป็นสารเคลือบปิดเพื่อป้องกันความชื้นและการถูกกัดกร่อนของวัสดุ
เอ็น-บิวทิลแลคเตต	เป็นตัวทำละลายในน้ำยาซักเงา
เอทิลแลคเตต	เป็นตัวทำละลายของไนโตรเซลลูโลสและเซลลูโลสอะซิเตต
เมทิลแลคเตต	เป็นตัวทำละลายของเซลลูโลสอะซิเตต

ที่มา : Altkinson และ Mavituna (1991)

ลักษณะของแป้งโดยทั่วไปมีพอลิแซคคาไรด์ 2 ชนิด คืออะไมโลส (amylose) ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสที่ต่อกันเป็นสายโซ่ยาวด้วยพันธะ  $\alpha$ -(1-4) glucosidic มีความยาวประมาณ 1,100-1,400 หน่วยกลูโคสและอะไมโลเพกติน (amylopectin) ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ  $\alpha$ -(1-4) glucosidic และมีการแตกแขนงทุก 25 หน่วยของกลูโคส โดยตำแหน่งที่แตกแขนงต่อด้วยพันธะ  $\alpha$ -(1-6) glucosidic (Reed , 1975) แป้งมันสำปะหลังมีอะไมโลสประมาณ 17 เปอร์เซ็นต์ และอะไมโลเพกติน 83 เปอร์เซ็นต์ (Knight, 1969)



## รูปที่ 4 โครงสร้างของอะไมเลสและอะไมโลเพกติน

ที่มา : Knight (1969)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การไฮโดรไลซ์แป้งมันสำปะหลัง มีดังนี้

1. การไฮโดรไลซ์แป้งด้วยกรด เป็นกระบวนการที่ใช้ความร้อนร่วมกับกรดชนิดต่าง ๆ เช่น กรดไฮโดรคลอริก (HCl) กรดคาร์บอนิก ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ) กรดซัลฟิวริก ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) และกรดไนตริก ( $\text{HNO}_3$ ) โดยการเติมกรดลงในสารละลายแป้งให้มีค่าพีเอชระหว่าง 1.5-2.0 จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่  $121^\circ\text{C}$ . ภายใต้อุณหภูมิ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 20-30 นาที วิธีนี้มีข้อเสียคือ ถ้าเพิ่มการไฮโดรไลซ์ให้ได้น้ำตาลกลูโคสมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์จะเกิดสารพวก hydrol ที่มีรสขมและสารละลายมีสีคล้ำ การไฮโดรไลซ์แป้งด้วยกรดเป็นการย่อยพันธะแบบไม่เฉพาะเจาะจงและพบว่าสามารถย่อยพันธะ  $\alpha$ -(1-4) glucosidic ได้เร็วกว่าพันธะ  $\alpha$ -(1-6) glucosidic สารละลายที่ได้จะประกอบด้วยเดกซ์ทริน มอลโทสและกลูโคส (Lloyd และ Nelson , 1984)

2. การไฮโดรไลซ์แป้งด้วยเอนไซม์ เป็นการย่อยแป้งที่มีความจำเพาะเจาะจงโดยใช้เอนไซม์ในกลุ่มอะไมเลสที่สำคัญ ได้แก่ แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ในการไฮโดรไลซ์แป้งต้องใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดร่วมกัน คือ แอลฟาอะไมเลสย่อยแป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่ง  $\alpha$ -(1-4) glucosidic ทำให้ได้น้ำตาลรีดิทซ์และเดกซ์ทรินที่มีสายโซ่กลูโคสขนาดต่าง ๆ กัน สำหรับกลูโคอะไมเลสหรือแกมมาอะไมเลส สามารถย่อยแป้งอย่างสมบูรณ์จากปลายนอนรีดิทซ์ที่ตำแหน่ง  $\alpha$ -(1-3) ,  $\alpha$ -(1-4) และ  $\alpha$ -(1-6) glucosidic ทีละหน่วย ถ้าการย่อยแป้งสมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียว (Knight , 1969 ; Warren , 1996) ดังนั้นการไฮโดรไลซ์แป้งโดยใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิด จึงจำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิและพีเอชให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด

ประโยชน์ของแป้งมันสำปะหลัง (กล้าณรงค์ , 2521)

1. อุตสาหกรรมกระดาษ แป้งมันสำปะหลังใช้ในการฉาบผิวกระดาษเพื่อเพิ่มความเหนียวและความเรียบให้กับผิวหน้ากระดาษ ทำให้กระดาษมีความสวยงาม แข็งแรงมากขึ้นและป้องกันการซึมของน้ำหมึกและน้ำ

2. อุตสาหกรรมสิ่งทอ แป้งมันสำปะหลังใช้ชุบด้ายให้มีความลื่น ด้ายไม่มีขนเวลาทอ ในงานพิมพ์ลายผ้าแป้งมันสำปะหลังช่วยให้ผ้ามีความมันคง แข็งแรง ทนทานต่อการใช้งาน นอกจากนี้ช่วยเพิ่มความสม่ำเสมอของสีพิมพ์ และป้องกันการเปื้อนของผ้าพิมพ์ตลอดจนเพิ่มความเงางาม และความคงทนของเนื้อผ้า

3. อุตสาหกรรมอาหาร ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นส่วนผสมในการทำขนมสำเร็จรูป ก๋วยเตี๋ยว วุ้นเส้น และสาหร่าย เป็นส่วนผสมของซอสเพื่อให้ข้น ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตผงชูรสตลอดจนใช้ในการผลิตน้ำตาลกลูโคส และฟรักโทส เพื่อนำไปใช้ในการผลิตน้ำตาลอัดลม และอาหารกระป๋อง ปัจจุบันมีการนำมาผลิตแอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง

4. อุตสาหกรรมไม้อัด ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นส่วนผสมของกาวที่ใช้ทำไม้อัดเพื่อให้ไม้อัดมีความเรียบตลอดแผ่นและมีความแข็งแรงทนทาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

### 1. เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาการผลิตกรดแลกติก คือ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ได้รับจาก Northern Regional Research Laboratory , Peoria , Illinois ประเทศสหรัฐอเมริกา

### 2. เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ	Gallenkamp รุ่น SGM 300
เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์	Shimadzu รุ่น UV-1601
หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave)	Hirayama รุ่น HA-3D
เครื่องวัดพีเอช	TOA pH meter รุ่น HM-7E
ตู้อบความร้อน (hot air oven)	WTB binder รุ่น FD 53
เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)	Chermile รุ่น ZK 380
ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar air flow)	Faster รุ่น Bio 48
กล้องจุลทรรศน์	Nikon รุ่น YS2-H
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	Satorius รุ่น B-31005
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	Satorius รุ่น A-2005
เครื่องนับเม็ดเลือด (haemocytometer)	Bocco
ชุดกรองมิลลิพอร์	Millipore Bedford รุ่น MA 01730
ไมโครปิเปตต์ (micropipette)	Pipetman
โถดูดความชื้น (desiccator)	Wertheim รุ่น ZK 380
ถังหมักขนาด 5 ลิตร (fermenter)	B-Braun Biotech International
เครื่องแก้วต่าง ๆ	Pyrex

### 3. สารเคมี

แอมโมเนียมซัลเฟต  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  ของ Merck  
 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต  $(\text{KH}_2\text{PO}_4)$  ของ Merck  
 แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรต  $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$  ของ Merck  
 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต  $(\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$  ของ Merck  
 ไดไนโตรซาลิไซลิกแอซิด (3,5-Dinitrosalicylic acid) ของ Sigma  
 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของ Merck  
 โพแทสเซียมโซเดียมตาเตรต  $[\text{COOK}(\text{CHOH})_2\text{COONa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$  ของ Merck  
 น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) ของ Difco

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลูโคส (glucose anhydrous) ของ Fluka

กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของ Merck

ลิเทียมแลกเตต ( $C_3H_5O_3Li$ ) ของ Merck

คอปเปอร์ซัลเฟต ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) ของ BDH chemicals

แคลเซียมไฮดรอกไซด์ [ $Ca(OH)_2$ ] ของ AJAX chemicals

พาราไฮดรอกซีไดฟีนิล (p-hydroxydiphenyl) ของ Fluka

แคลเซียมคาร์บอเนต ( $CaCO_3$ ) ของ Merck

ฟีนอล ( $C_6H_5OH$ ) ของ Farmitalia carloerba

แป้งมันสำปะหลังตราปลา 4 ดาว ของ อี.ที.ซี เลียบตงจัน จำกัด

#### 4. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ดัดแปลงจาก Hang และคณะ (1989) โดยอาหาร 1

ลิตร ประกอบด้วย

แหล่งคาร์บอน	120.0	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	2.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.25	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.04	กรัม
ปรับพีเอชเริ่มต้น 6.0		

นำส่วนผสมละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.0 นำอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ใส่ลงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเย็น เติมสปอร์แขวนลอยของราจากนั้นนำไปบ่มบนเครื่องเขย่า ในการศึกษาการผลิตกรดแลกติกจะเติมแคลเซียมคาร์บอเนต (ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่  $150^{\circ}C$ . เป็นเวลา 3 ชั่วโมง) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาตร 3 กรัมต่อพลาสติก หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อรักษาค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ระหว่างพีเอช 5-6

#### 5. การเตรียมสปอร์แขวนลอยของรา

เลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 บนอาหารแข็ง PDA เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้ราสร้างสปอร์ ทำการถ่ายสปอร์ของราออกจากอาหารแข็งโดยเติมสารละลายทวิน 80 (0.05 เปอร์เซ็นต์) ชูด สปอร์ให้หลุดออกจากเส้นใยด้วยหลอดเขี่ยเชื้อ กรองเส้นใยออกโดยผ่านสำลีที่ฆ่าเชื้อแล้ว นับจำนวนสปอร์ด้วยเครื่องนับเม็ดเลือด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 6. การศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในระดับฟลาस्कเซย่า

### 6.1 ศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง

นำแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังนี้คือ 50 100 120 150 และ 180 กรัม ต่อ ลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3 นอร์มอล ลงไปในสารละลายแป้งมันสำปะหลังจนมีค่า พีเอชเท่ากับ 2.0 นำไปให้ความร้อนด้วยหม้อน้ำอัดไอที่อุณหภูมิ 121°C. เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรในข้อ 4 ต่อไป เติมสารแขวนลอยของสปอร์จากข้อ 5 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละฟลาस्क โดยปรับให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้น  $2 \times 10^5$  สปอร์ต่อมิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C. บนเครื่องเซย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อหาค่าพีเอช ปริมาณกรดแลกติก น้ำตาลรีดิวิซ์และน้ำหนักเซลล์แห้ง

### 6.2 ศึกษาแหล่งของไนโตรเจน

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ทำให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดจากข้อ 6.1 โดยเติมแหล่งไนโตรเจนเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือแอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต ยีสต์สกัดและน้ำแช่ข้าวโพด หลังจากเติมสปอร์แขวนลอยของราและปรับให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ  $2 \times 10^5$  สปอร์ต่อมิลลิลิตรแล้ว นำไปบ่มบนเครื่องเซย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C. เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุกวันเพื่อหาค่าพีเอช ปริมาณกรดแลกติก น้ำตาลรีดิวิซ์ น้ำหนักแห้ง

### 6.3 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

เมื่อทราบแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกจากข้อ 6.2 แล้วจากนั้นนำมาศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแหล่งไนโตรเจนเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 1.0 2.0 และ 3.0 กรัมต่อลิตร ทำการฆ่าเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่ออาหารเย็นเติมสปอร์แขวนลอยในอาหารแต่ละฟลาस्क (ให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้นระหว่าง  $2 \times 10^5$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร) นำไปบ่มบนเครื่องเซย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°C. เก็บตัวอย่างทุกวันจนครบ 5 วัน เพื่อหาค่าพีเอช ปริมาณกรดแลกติก น้ำตาลรีดิวิซ์ และน้ำหนักแห้ง

### 6.4 ศึกษาความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรที่ได้จากข้อ 6.3 โดยใช้ความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่าง ๆ กันคือ 0.3 0.6 และ 1.0 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการฆ่าเชื้อแล้ว เติมสปอร์แขวนลอยในอาหารแต่ละฟลาस्क (ให้มีจำนวนสปอร์เริ่มต้น  $2 \times 10^5$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร) นำไปบ่มบนเครื่องเซย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°C. เก็บตัวอย่างเพื่อหาค่าพีเอช ปริมาณกรดแลกติก น้ำตาลรีดิวิซ์ และน้ำหนักแห้งทุกวันจนครบ 5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 6.5 ศึกษาปริมาณสปอร์เริ่มต้น

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรที่ได้จากข้อ 6.4 มาศึกษาปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยให้ปริมาณสปอร์เริ่มต้นเป็น  $2 \times 10^4$   $2 \times 10^5$   $2 \times 10^6$  และ  $2 \times 10^7$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$ . เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างเพื่อหาค่าพีเอช ปริมาณกรดแลกติก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักรวมทุกวัน

## 7. ศึกษาการเจริญและการผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์เขย่า

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อตามสูตรอาหารที่ใช้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดจากข้อ 6.4 และเติมสารแขวนลอยสปอร์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยให้มีปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยให้มีปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด (ข้อ 6.5) บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$ . เป็นเวลา 7 วัน เก็บตัวอย่างทุก 6-12 ชั่วโมง เพื่อหาค่าพีเอช ปริมาณกรดแลกติก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักรวม

## 8. ศึกษาอัตราการกวนและการให้อากาศที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในถังหมัก

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากสูตรที่เหมาะสมจากข้อ 6.4 ปริมาตร 2.5 ลิตร ใส่ลงในถังหมักขนาดความจุ 5 ลิตร จากนั้นทำการฆ่าเชื้อที่  $121^{\circ}\text{C}$ . นาน 40 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อเย็นเติม สปอร์แขวนลอยและปรับให้มีปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 6.5 ทำการศึกษ้อัตราการกวนที่ระดับต่าง ๆ กันคือ 200 300 และ 400 รอบต่อนาที โดยใช้อัตราการให้อากาศที่ 0.5 1.0 และ 1.5 วีวีเอ็ม (วีวีเอ็ม หมายถึง ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที) โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$ . เติมแคลเซียมคาร์บอเนต (ที่ฆ่าเชื้อแล้ว) 60 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 6-12 ชั่วโมง เพื่อหาค่าพีเอช ปริมาณกรดแลกติก น้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักรวม

## 9. ศึกษาการเจริญและการผลิตกรดแลกติกในระดับถังหมัก

ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรที่เหมาะสม โดยใช้อัตราการกวนและการให้อากาศที่ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดจากข้อ 8 มาศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญและการผลิตกรดแลกติกโดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 6-12 ชั่วโมง เพื่อหาค่าพีเอช ปริมาณกรดแลกติก น้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักรวม

## 10. การวิเคราะห์

### 10.1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก (Barker , 1957)

#### สารเคมี

- สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 20 เปอร์เซ็นต์ และ 4 เปอร์เซ็นต์
- ผงแคลเซียมไฮดรอกไซด์
- กรดซัลฟิวริกเข้มข้น
- สารละลายพาราไฮดรอกซีไดฟีนิล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ละลายพาราไฮดรอกซีไดฟีนิล

1.5 กรัม ในสารละลายไฮเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100.0 มิลลิลิตร

- สารละลายลิเทียมแลกเตตมาตรฐาน

#### วิธีการ

- นำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลอง เดิมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 20 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เดิมผงแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 1 กรัม เขย่าแรง ๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

- นำสารละลายที่ได้ไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยง (ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 5 นาที นำน้ำใสปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองหลอดใหม่ เดิมคอปเปอร์ซัลเฟต 4 เปอร์เซ็นต์ 1 หยด จากนั้นนำหลอดทดลองไปแช่ในอ่างน้ำแข็งเดิมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดอย่างช้า ๆ เขย่าให้ผสมกัน แช่ในน้ำเดือด 5 นาที ตั้งทิ้งให้เย็น

- หยดสารละลายพาราไฮดรอกซีไดฟีนิล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ลงในหลอดสารละลาย 2 หยด ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C. เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปแช่ในน้ำเดือดเป็นเวลา 90 วินาที ตั้งทิ้งให้เย็น

- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นแบลนด์ นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายลิเทียมแลกเตต

- ทำกราฟมาตรฐานของสารละลายลิเทียมแลกเตต นำสารละลายมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ใส่ลงในหลอดทดลองและดำเนินการเช่นเดียวกับตัวอย่าง เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของลิเทียมแลกเตต

## 10.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Bernfeld , 1955)

### สารเคมี

- สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS reagent) ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เติมนิพแทสเซียมตาเตรต 30 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

### วิธีการ

- นำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

- นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลานำมาทำให้เย็นจากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็นแบลนด์ ค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

- ทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ใช้สารละลายมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส (ความเข้มข้น 0.2-2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ใส่ลงในหลอดทดลองและดำเนินการเช่นเดียวกับตัวอย่าง เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

## 10.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี phenol-sulfuric acid (Dubois และคณะ , 1956)

### สารเคมี

- กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

- สารละลายฟีนอลเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ละลายฟีนอล 5 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

### วิธีการ

- เติมน้ำตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาล 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

- เติมน้ำละลายฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแช่หลอดลงในน้ำเย็น

- เติมน้ำกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเขย่าหลอดอีกครั้ง ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 20 นาที

- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส (ความเข้มข้น 20-100 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร) ใส่ลงในหลอดทดลอง และดำเนินการเช่นเดียวกับตัวอย่าง เขียนกราฟระหว่างค่าการ ดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

10.4 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (ดัดแปลงจากวิธีของ Rosenberg และคณะ , 1992)

นำตัวอย่างปริมาตร 20 มิลลิลิตร กรองเอาเซลล์ออกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ล้าง เซลล์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 2 โมลาร์ จนหมดเกลี้ยงแคลเซียมคาร์บอเนต จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 80°C. จนน้ำหนักคงที่ ชั่งหาน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น

10.5 การหาค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ

นำตัวอย่างมาวัดค่าพีเอชโดยใช้เครื่องวัดพีเอชของ TOA รุ่น HM-74



## ผลการทดลองและวิจารณ์

### 1. ผลการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อและสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในฟลาซก์เขย่า

#### 1.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง

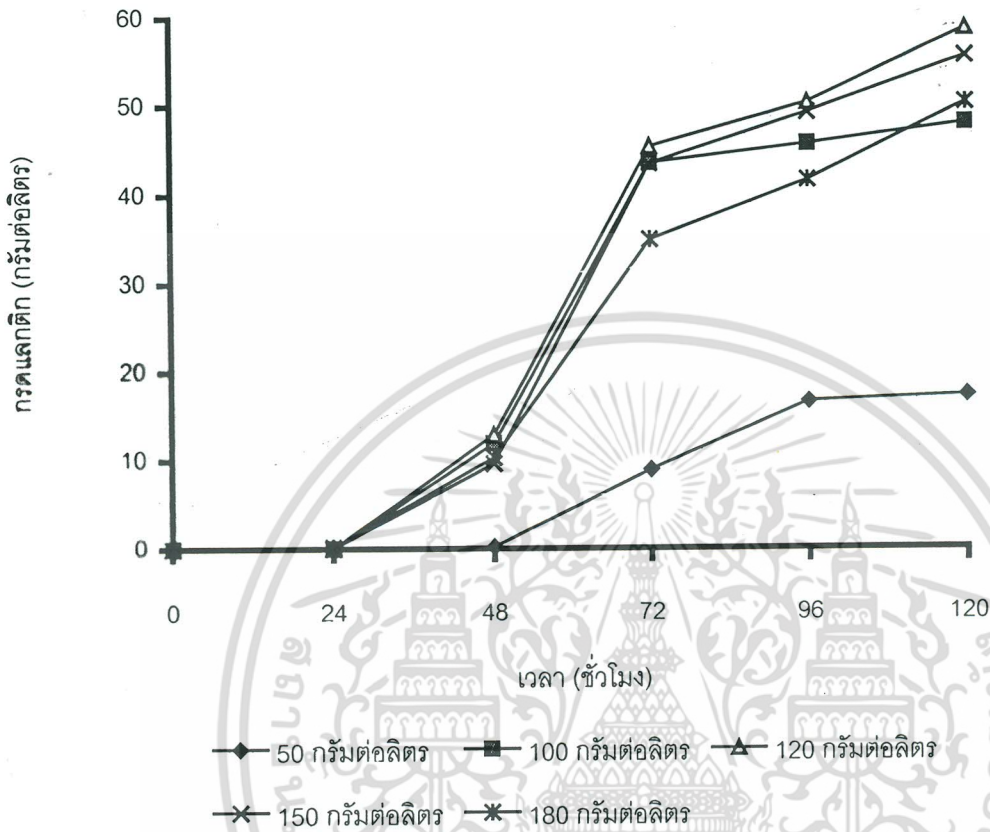
จากการเลี้ยงเชื้อ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่ดัดแปลงจาก Hang และคณะ (1989) ที่เติมแป้งมันสำปะหลัง (ที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก) ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลทำให้การผลิตกรดแลกติกสูงขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 5 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 120 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด คือ 58.57 กรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 6.06 กรัมต่อลิตร สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 50 และ 100 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดแลกติก 17.30 และ 47.92 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 4.49 และ 5.10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มปริมาณแป้งมันสำปะหลังเป็น 150 และ 180 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่เชื้อผลิตได้น้อยกว่าที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง 120 กรัมต่อลิตร คือ 55.41 และ 50.20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 5.14 และ 4.83 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

การเพิ่มปริมาณแป้งมันสำปะหลังมากขึ้นเป็นการเพิ่มปริมาณของแหล่งคาร์บอนซึ่งมีผลต่อการเจริญของเชื้อ คือ ทำให้เชื้อเจริญได้ดีและมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงขึ้น ซึ่งมีผลต่อการผลิตกรดแลกติกสูงขึ้นด้วย แต่ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังมากกว่า 120 กรัมต่อลิตร พบว่าการเจริญของเชื้อลดลง และส่งผลต่อการผลิตกรดแลกติกลดลง อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่มากเกินไปจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ดังนั้นปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* NRRL 395 คือ 120 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาของ Yin และ คณะ (1997) พบว่าเมื่อใช้แป้งข้าวโพด ที่ถูกย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลกติกโดย *R. oryzae* ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยแป้งข้าวโพด 120 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 3.0 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.15 กรัมต่อลิตร และซิงค์ซัลเฟต 0.04 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดแลกติก 95.10 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ปริมาณกรดแลกติกสูงกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบของแป้งมันสำปะหลังแตกต่างจากแป้งข้าวโพดจึงมีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

#### 1.2 ผลการศึกษาแหล่งของไนโตรเจน

จากการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจน ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง (ที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก) 120 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนผลการศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดย *Rhizopus oryzae* NRRI 359 ในอาหารที่มี  
น้ำมันสำหรับความเข้มข้นต่างๆ กัน

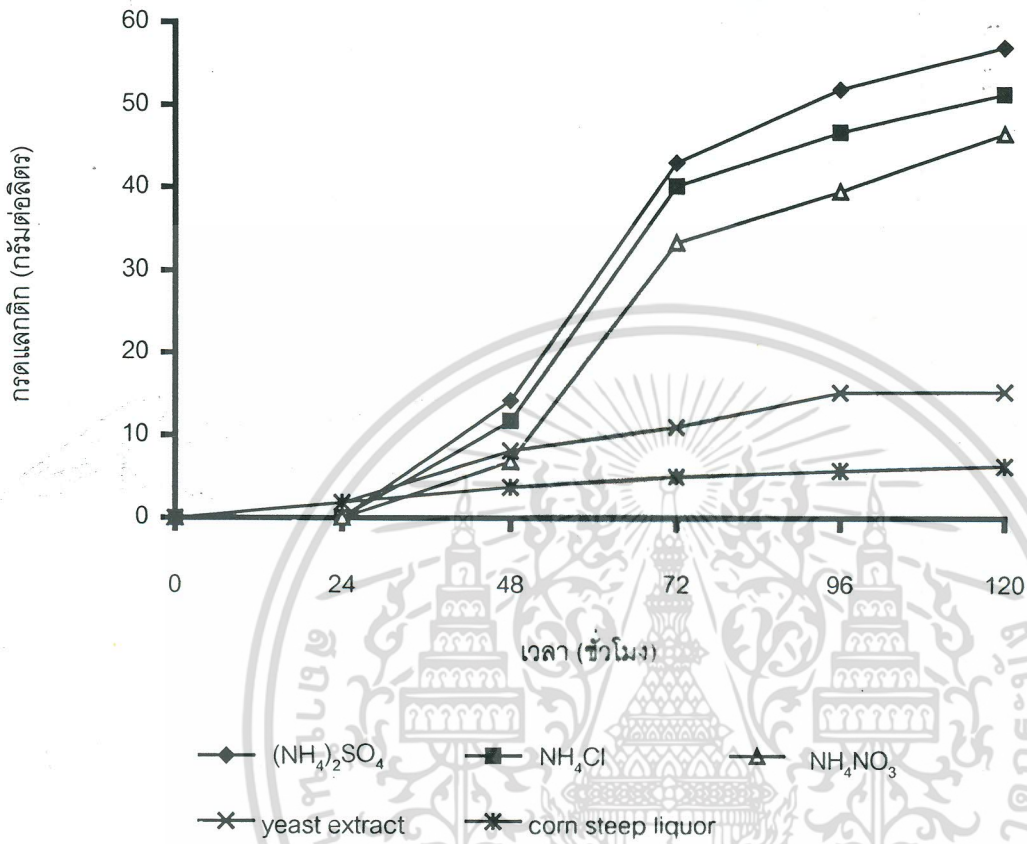
แสดงในรูปที่ 6 พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดคือ 57.00 กรัมต่อลิตร ในขณะที่แอมโมเนียมคลอไรด์และแอมโมเนียมไนเตรต ให้ปริมาณกรดแลกติก 51.30 และ 46.50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับยีสต์สกัดและน้ำแช่ข้าวโพด ให้ปริมาณกรดแลกติกค่อนข้างต่ำคือ 15.30 และ 6.30 กรัม ตามลำดับ

จากผลการศึกษา พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์จะให้ปริมาณกรดแลกติกสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ และแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นเกลืออนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* NRRL 395 ซึ่งผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาการผลิตกรดแลกติกจาก *R. oryzae* NRRL 395 เมื่อใช้แป้งข้าวโพดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสเป็นแหล่งคาร์บอน โดย Yin และคณะ (1997) พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดและให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดถึง 95.0 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือพอลิเปปไทน์ให้ปริมาณกรดแลกติก 90.0 กรัมต่อลิตร ส่วนยีสต์สกัดและน้ำแช่ข้าวโพดให้ปริมาณกรดแลกติก 85.0 และ 67.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่ายูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ใช้เพื่อผลิตกรดแลกติกได้ (Yang และคณะ, 1995)

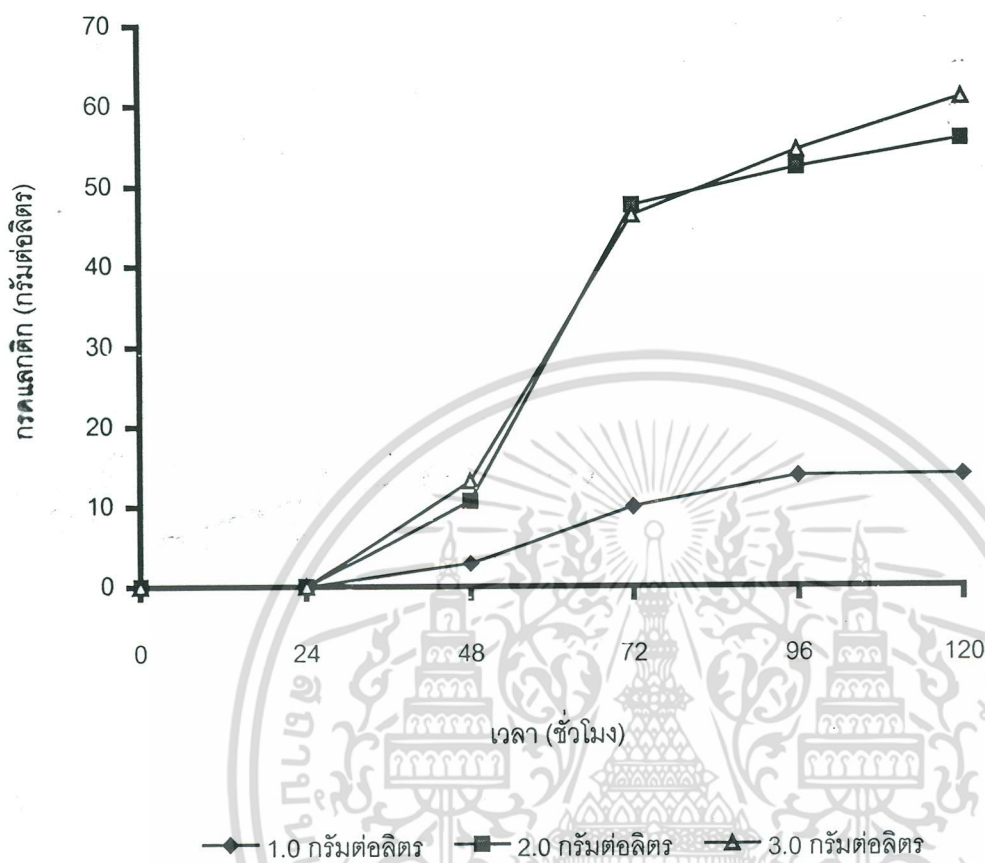
### 1.3 ผลการศึกษาค่าความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

จากการศึกษาค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกในอาหารเหลวที่ใช้แป้งมันสำปะหลัง (ที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก) 120 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 3.0 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดคือ 60.68 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 7) เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 2.0 กรัมต่อลิตร พบว่ามีการผลิตกรดแลกติก 55.70 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 1.0 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดแลกติกผลิตได้เท่ากับ 13.93 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาถึงน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 3.0 กรัมต่อลิตรเชื้อราเจริญได้ดีที่สุด โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 10.22 กรัมต่อลิตร

แหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมจะส่งผลให้เชื้อราเจริญได้ดีและมีผลต่อการผลิตกรดแลกติกได้สูงขึ้น ดังนั้นปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* NRRL 395 คือ 3.0 กรัมต่อลิตร โดยผลการทดลองที่ได้ใกล้เคียงกับ Soccol และคณะ (1995) และ Kosakai และคณะ (1997) โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลกลูโคส 120 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 3.02 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อผลิตกรดแลกติก Hamamci และ Ryu (1994) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* ที่ถูกตรึงโดยอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 2.0 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.65 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 6 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดย *R. oryzae* NRRL 355 ในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างๆ กัน



รูปที่ 7 แสดงปรลมาณกรดแลกดกที่ผลลตโดย *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารทลมี แอมมอเนลยมชลเฟตชมช้นต่งต่ง กน

เอกสารนลเป็นเอกสารทลสงวนवलสำหรับกรใชงานเพอลการศลษาเท่านน ไมอนุญาตให้เนาไปใชประโยชน์ด้นการค้  
ไมวากรณลใด ๆ ทงลน อลทงห้ามมิให้ดัดแปลงเนอลหา และตองอ้างองถึงเจ้าของเอกสารทลคร้งทลมีการเนาไปใช

0.25 กรัมต่อลิตร ต่อมา Yin และคณะ (1997) ทำการเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารเหลวที่มีแป้งข้าวโพด (ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดคือแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 1.35 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด สำหรับแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งของสารอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของราและการผลิตกรดแลกติก และที่สำคัญคือมีราคาถูก

#### 1.4 ผลการศึกษาความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

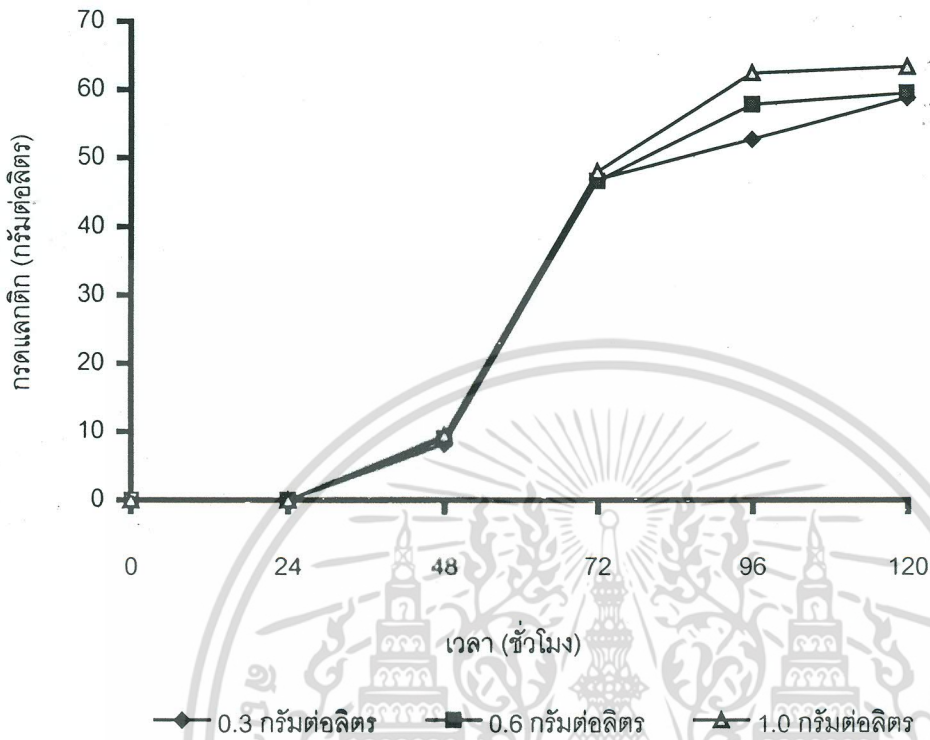
ผลการผลิตกรดแลกติกจาก *R. oryzae* ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 120 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 3.0 กรัมต่อลิตร มาศึกษาความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตต่าง ๆ กันคือ 0.3 0.6 และ 1.0 กรัมต่อลิตร พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัม ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดคือ 63.33 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 8) ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.6 และ 0.3 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดแลกติก 59.47 และ 58.80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่าอยู่ระหว่าง 9.25 ถึง 10.99 กรัมต่อลิตร

จากผลการทดลองที่ได้แตกต่างจาก Hamamci และ Ryu (1994) และ Soccol และคณะ (1995) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตกรดแลกติกและเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0.25 และ 0.65 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับ Yin และคณะ (1997) ทำการศึกษาการผลิตกรดแลกติกจาก *R. oryzae* ในอาหารเหลวที่มีแป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.25 กรัมต่อลิตร แร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญของราที่เป็นเกลืออนินทรีย์ได้แก่ แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ซัลเฟอร์ แคลเซียมและคลอไรด์ สำหรับโพแทสเซียมเป็นธาตุที่สำคัญ เนื่องจากเป็นส่วนประกอบของเส้นใยและสปอร์ของรา และมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ปริมาณที่นิยมเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ระหว่าง 1.0-4.0 กรัมต่อลิตร นิยมใช้ในรูปของเกลือโพแทสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $K_2HPO_4$ ) หรือโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $KH_2PO_4$ ) (Stanbury และคณะ , 1995)

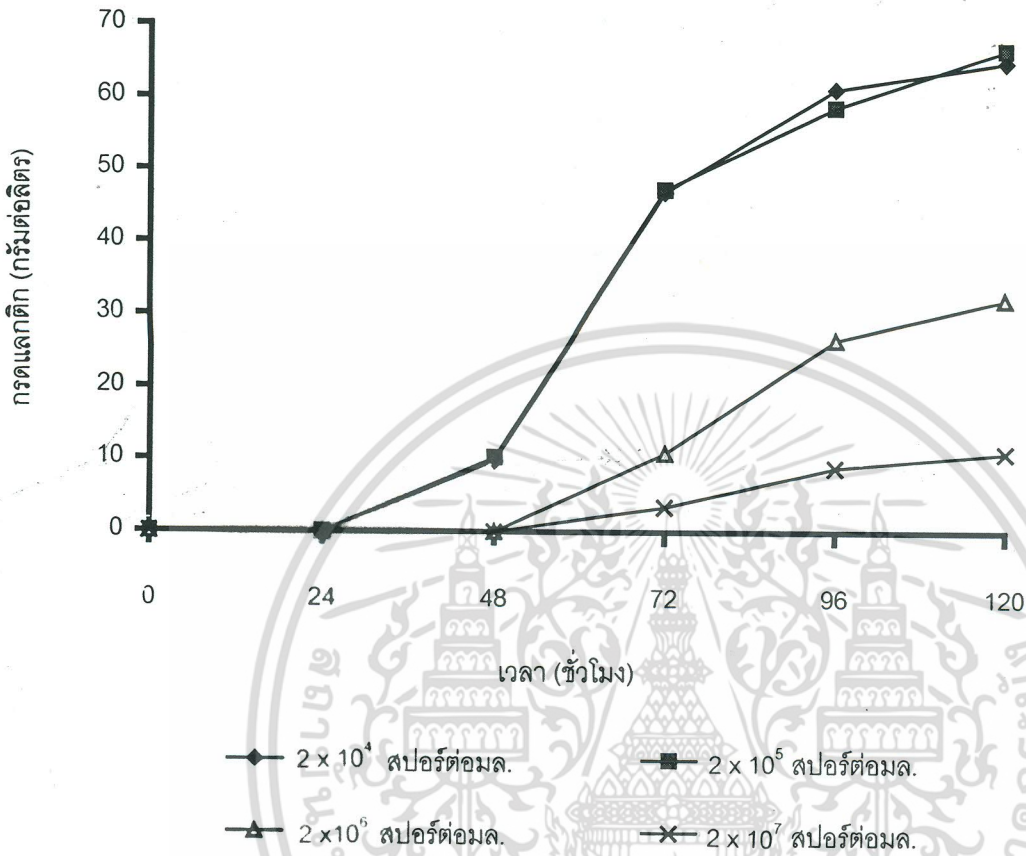
#### 1.5 ผลการศึกษาปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

ผลการศึกษาปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่ใช้คือ  $2 \times 10^4$   $2 \times 10^5$   $2 \times 10^6$  และ  $2 \times 10^7$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้สูตรอาหารที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 120 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 3.0 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.25 กรัมต่อลิตร ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.04 กรัมต่อลิตร โดยอาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 พบว่า ปริมาณสปอร์เริ่มต้น  $2 \times 10^5$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดคือ 66.60 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 9) เมื่อใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้นเป็น  $2 \times 10^4$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดย *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มี โฟสเฟตเชื่อมโยงไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นต่างๆ กัน



รูปที่ 9 ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดย *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีปริมาณสปอร์เริ่มต้นต่างๆ กัน

ปริมาณกรดแลกติก 64.90 กรัมต่อลิตร สำหรับปริมาณสปอร์เริ่มต้นเท่ากับ  $2 \times 10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ได้ปริมาณกรดแลกติก 32.20 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ปริมาณสปอร์เริ่มต้น  $2 \times 10^7$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ให้ปริมาณกรดแลกติกต่ำสุด คือ 10.91 กรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อพิจารณาถึงน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้พบว่าที่สปอร์เริ่มต้น  $2 \times 10^5$  และ  $2 \times 10^4$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ได้น้ำหนักเซลล์แห้งใกล้เคียงกันและมากกว่าที่ใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้น  $2 \times 10^6$  และ  $2 \times 10^7$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร

จากผลการทดลองที่ได้ต่างจากการศึกษาของ Yin และคณะ (1998) พบว่าปริมาณสปอร์เริ่มต้น  $2 \times 10^6$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร จะให้ผลผลิตกรดแลกติกสูงที่สุดคือ 98.2 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งข้าวโพด (ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส) เป็นแหล่งคาร์บอน และปริมาณสปอร์เริ่มต้น  $2 \times 10^5$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร กรดแลกติกจะลดลง คือ 85.7 กรัมต่อลิตร สำหรับ Yu และ Hang (1989) ได้ศึกษาชนิดของสับสเตรตและสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกจาก *R. oryzae* NRRL 395 และใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้น  $1 \times 10^7$  สปอร์ต่อฟลาสก์ โดยพบว่าถ้าเพิ่มปริมาณสปอร์เริ่มต้นจาก  $1 \times 10^7$  สปอร์ต่อฟลาสก์เป็น  $3 \times 10^7$  สปอร์ต่อฟลาสก์ ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณการผลิตกรดแลกติก

การใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่มีความเข้มข้น  $2 \times 10^6$  และ  $2 \times 10^7$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้งน้อยกว่าที่สปอร์เริ่มต้น  $2 \times 10^4$  และ  $2 \times 10^5$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร สามารถอธิบายได้ว่าจำนวนสปอร์ที่มากเกินไป ทำให้การเจริญของราลดลงเนื่องจากได้รับอาหารและออกซิเจนไม่เพียงพอต่อการเจริญ และยังส่งผลต่อการผลิตกรดแลกติกด้วย

ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในอาหารเหลว 1 ลิตร ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 120 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต 3.0 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัม แมกนีเซียมเพปเตเฮปเตไฮเดรต 0.25 กรัม ซิงค์ซัลเฟตเฮปเตไฮเดรต 0.04 กรัม พีเอชเริ่มต้น 6.0 ปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมคือ  $2 \times 10^5$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร

## 2. ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์เขย่า

จากผลการศึกษาการผลิตกรดแลกติกในอาหารเหลวที่เหมาะสมบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิ  $30^{\circ}\text{C}$ . ปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมดและค่าพีเอช แสดงในตารางที่ 4 และรูปที่ 10 พบว่าการใช้น้ำตาลของเชื้อราใน 24 ชั่วโมงแรก เกิดขึ้นช้า มีปริมาณกรดแลกติกเกิดขึ้นเล็กน้อย หลังจากชั่วโมงที่ 36 อัตราการใช้น้ำตาลเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่เดียวกันปริมาณกรดแลกติกก็จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 120 ของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นปริมาณกรดแลกติกเริ่มลดลง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะลดลงเหลือประมาณ 5.71 กรัมต่อลิตร หลังจากชั่วโมงที่ 120 และจะคงที่จนถึงสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง เมื่อดูการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่ามีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ ในช่วง 24 ชั่วโมง

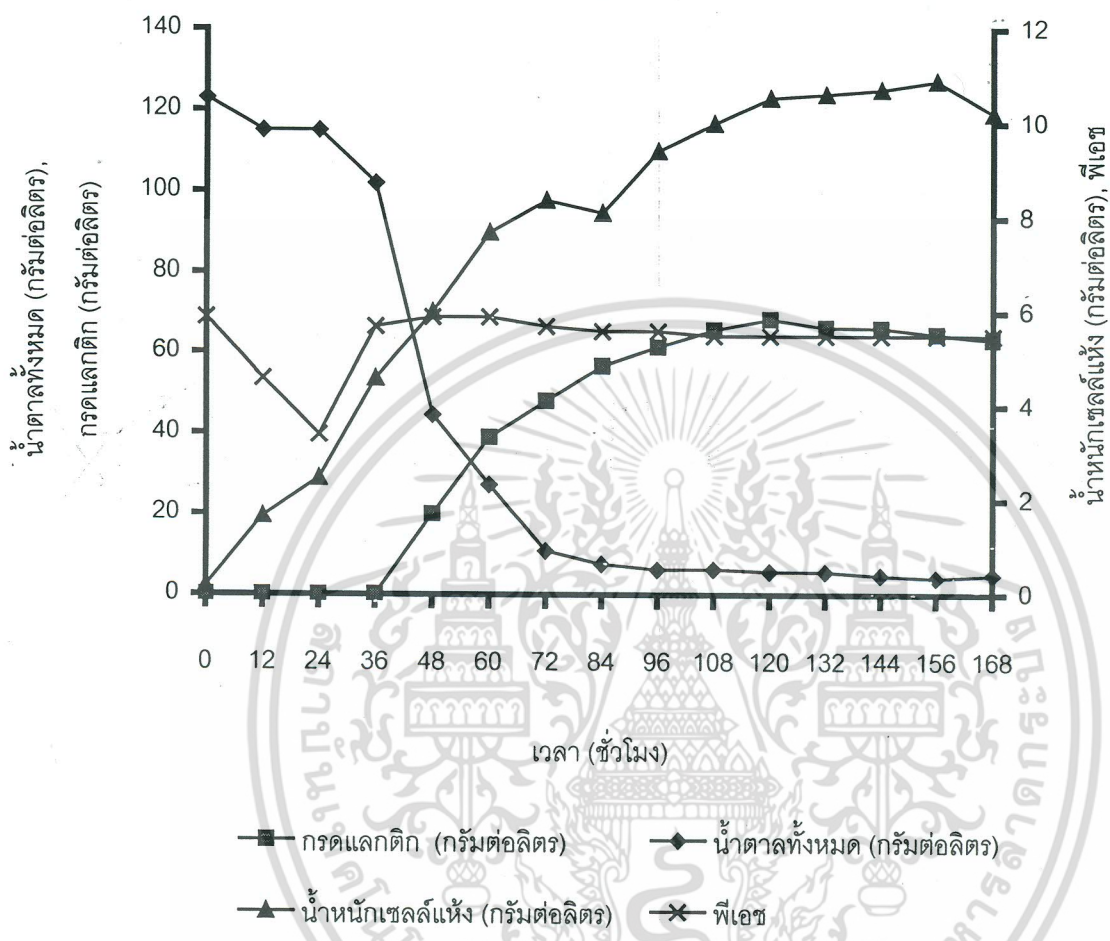
เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น มิอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

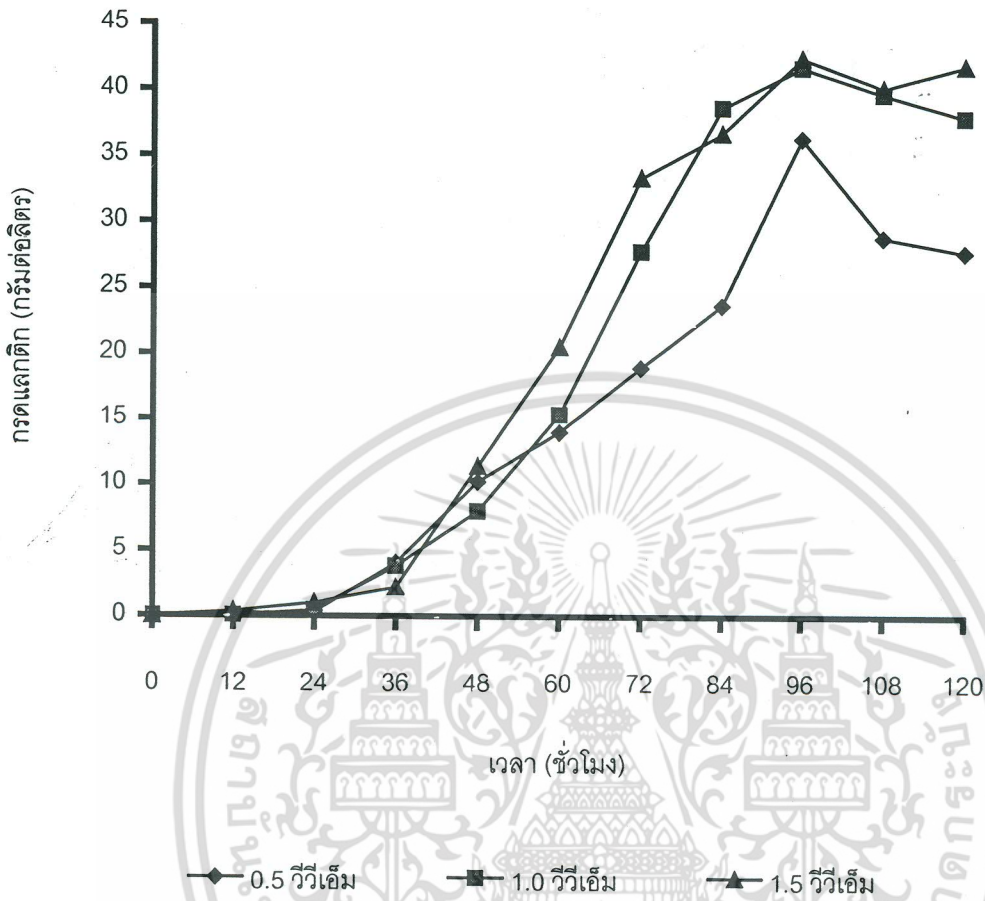
ตารางที่ 4 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช  
เมื่อเลี้ยง *R. oryzae* NRRL 395 ในฟลาสก์เขย่า

เวลา (ชั่วโมง)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
0	0	0.19	123	5.9
12	0.016	1.67	115	4.6
24	0.016	2.48	115	3.4
36	0.06	4.6	102	5.7
48	19.92	6.01	44.61	5.9
60	38.96	7.7	27.22	5.9
72	48.00	8.38	10.78	5.7
84	56.64	8.11	7.64	5.6
96	61.38	9.41	6.27	5.6
108	65.73	10	6.31	5.5
120	68.32	10.54	5.8	5.5
132	66.3	10.62	5.71	5.5
144	66.08	10.72	4.84	5.5
156	64.59	10.9	4.16	5.5
168	63.18	10.21	4.9	5.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 10 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักรเซลลูโลสแห้ง น้ำตาลทั้งหมด ค่าฟิโอส เมื่อเลี้ยง *R. oryzae* NRRL 395 ในพลาสติกเขย่า



รูปที่ 11 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดย *R. oryzae* ในถังหมักที่ใช้อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ระดับต่างๆ กัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญจำเพาะเท่ากับ 0.035 ต่อชั่วโมงและอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.44 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง

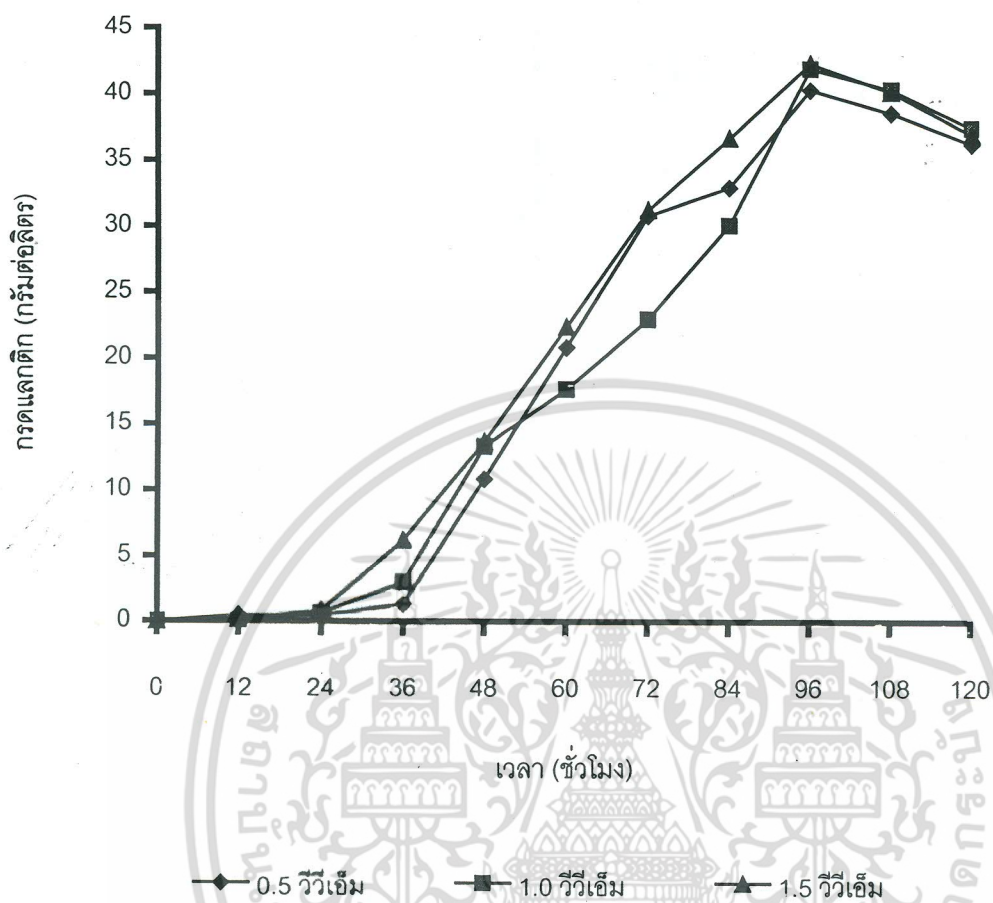
ที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม ให้ปริมาณกรดแลกติก 40.35 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 12) น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 8.55 กรัมต่อลิตร ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ 0.036 ต่อชั่วโมงและอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.42 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม มีปริมาณกรดแลกติกเท่ากับ 41.94 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 12) มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 8.47 กรัมต่อลิตร ค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.042 ต่อชั่วโมง และอัตราการผลิตกรดแลกติก เท่ากับ 0.44 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง ในขณะที่อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม ได้ปริมาณกรดแลกติก 42.32 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 12) น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 8.77 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.046 ต่อชั่วโมงและอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.44 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง

ที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม เชื้อราผลิตกรดแลกติกได้ 44.88 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 13) มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 8.70 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.048 ต่อชั่วโมง และอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.46 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 1.0 วีวีเอ็ม ปริมาณกรดแลกติกเท่ากับ 49.80 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 13) น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 9.86 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.054 ต่อชั่วโมง อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.51 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง สำหรับที่อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม ให้ปริมาณกรดแลกติกเท่ากับ 54.56 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง (รูปที่ 13) มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 9.67 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.060 ต่อชั่วโมง และอัตราการผลิตกรดแลกติกมีค่าเท่ากับ 0.56 กรัมต่อลิตร ชั่วโมง

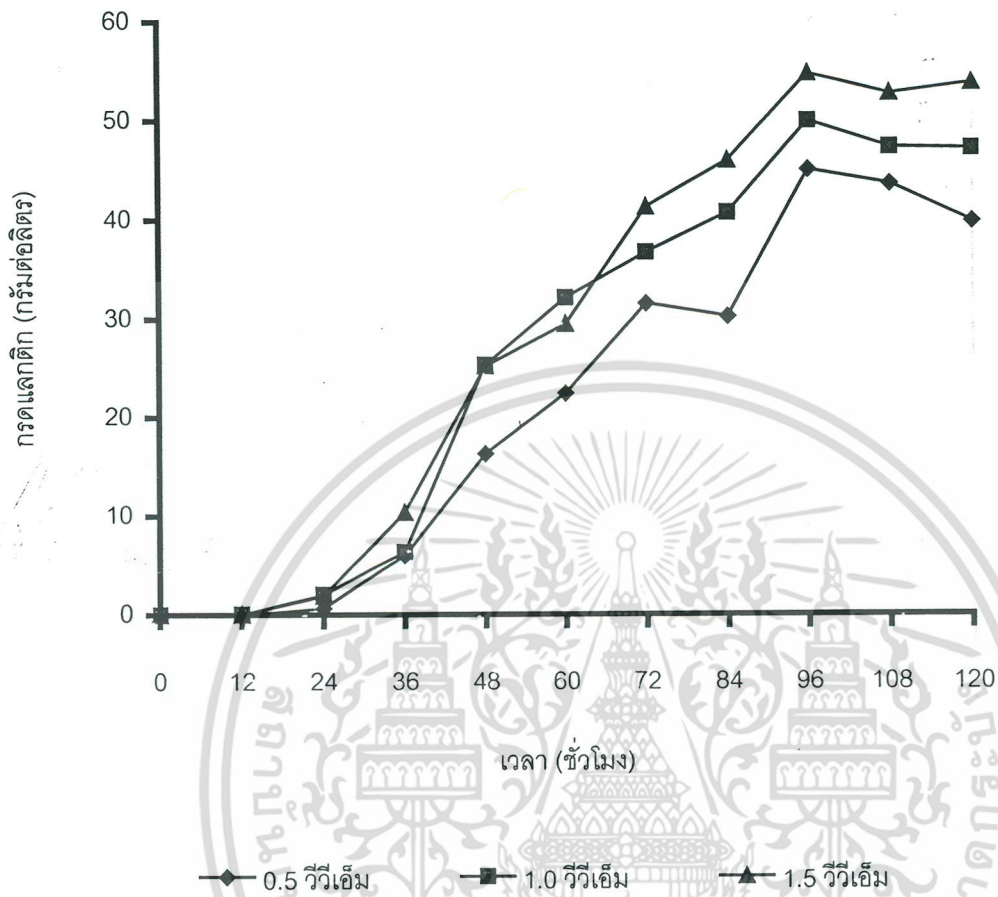
ดังนั้นที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม เป็นสภาวะที่ให้ผลผลิตของกรดแลกติกสูงที่สุดคือ 54.56 กรัมต่อลิตร และพบว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุดคือ 0.060 ต่อชั่วโมง เนื่องจากอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 0.5 เป็น 1.0 และ 1.5 วีวีเอ็ม จะเพิ่มทั้งอัตราการเจริญของเชื้อและการผลิตกรดแลกติก เนื่องจากอัตราการกวนที่สูงจะทำให้ให้อากาศที่ละลายในอาหารเหลวมีมากขึ้น ตลอดจนอัตราการส่งถ่ายสารอาหารมีสูงขึ้นและลักษณะของเส้นใยเชื้อรามีการกระจายตัวดี ทำให้ได้รับอาหารและอากาศอย่างพอเพียง จึงทำให้เชื้อราเจริญดีและมีการผลิตกรดแลกติกสูง ที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที การเพิ่มอัตราการให้อากาศสูงขึ้นพบว่าการผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้นเช่นกัน แต่เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 1.5 วีวีเอ็ม พบว่าไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณกรดแลกติกที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นผลมาจากอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ทำให้ปริมาณอากาศละลายมีน้อยไม่เพียงพอต่อการเจริญของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 12 แสดงปริมาณกรดแล็กติกที่ผลิตโดย *R. oryzae* ในถังหมักที่ใช้อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ระดับต่างๆ กัน



รูปที่ 13 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดย *R. oryzae* ในถังหมักที่ใช้อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ระดับต่างๆ กัน

และพบว่าลักษณะเส้นใยของราเกาะกันเป็นก้อนหรือเป็นกลุ่มบริเวณด้านบนและด้านข้างของ ถังหมัก ทำให้เชื้อบางส่วนไม่ได้รับอากาศและอาหารเพียงพอ ถึงแม้จะเพิ่มอัตราการให้อากาศ จาก 1.0 เป็น 1.5 วีวีเอ็ม ในขณะที่เพิ่มอัตราการหมุนเป็น 300 รอบต่อนาที การเพิ่มอัตราการให้อากาศที่สูงขึ้นมีผลโดยตรงกับอัตราการเจริญจำเพาะ แต่ไม่มีผลต่อการเกิดกรดแลกติก ซึ่งเป็นผลมาจากอัตราการหมุนนี้ไม่สูงเพียงพอที่จะทำให้เส้นใยเชื้อรากระจายตัวอย่างสม่ำเสมอเท่ากับที่ อัตราการหมุน 400 รอบต่อนาที จึงทำให้เชื้อได้รับอากาศและสารอาหารไม่ทั่วถึง การผลิตกรดแลกติกจึงไม่สูงขึ้นเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศ แต่อย่างไรก็ตามยังพบลักษณะการเจริญของเส้นใย เกาะเป็นก้อนบริเวณผิวหน้าและบริเวณข้างถัง ในขณะที่อัตราการหมุนที่ 400 รอบ พบการเจริญของเส้นใยราที่มีลักษณะเกาะเป็นก้อนบริเวณขอบบนของถังและข้างถังน้อยกว่าที่อัตราการหมุน 200 และ 300 รอบต่อนาที

#### 4. ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตกรดแลกติกในถังหมัก

ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* ในถังหมักขนาดความจุ 5 ลิตรที่อัตราการหมุน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม แสดงในตารางที่ 5 และ รูปที่ 14 พบว่าในช่วงเวลา 24 ชั่วโมงแรกของการเจริญ มีปริมาณกรดแลกติกเกิดขึ้นน้อยมาก หลังจากนั้นปริมาณกรดแลกติกเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็วและสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง คือมีปริมาณกรดแลกติก 54.62 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 10.48 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณกรดแลกติกจะลดลงอย่างช้า ๆ และเมื่อสิ้นสุดการหมักมีน้ำตาลทั้งหมดเหลืออยู่ 8.54 กรัมต่อลิตร ดังนั้นการผลิตกรดแลกติกคิดเป็นร้อยละ 45.5 ของปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ผลได้ของกรดแลกติก ( $Y_{ps}$ ) เท่ากับ 0.49 กรัมต่อกรัมสับสเทรต อัตราการผลิตกรดแลกติก เท่ากับ 0.56 กรัมต่อลิตรชั่วโมงและอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.060 ต่อชั่วโมง

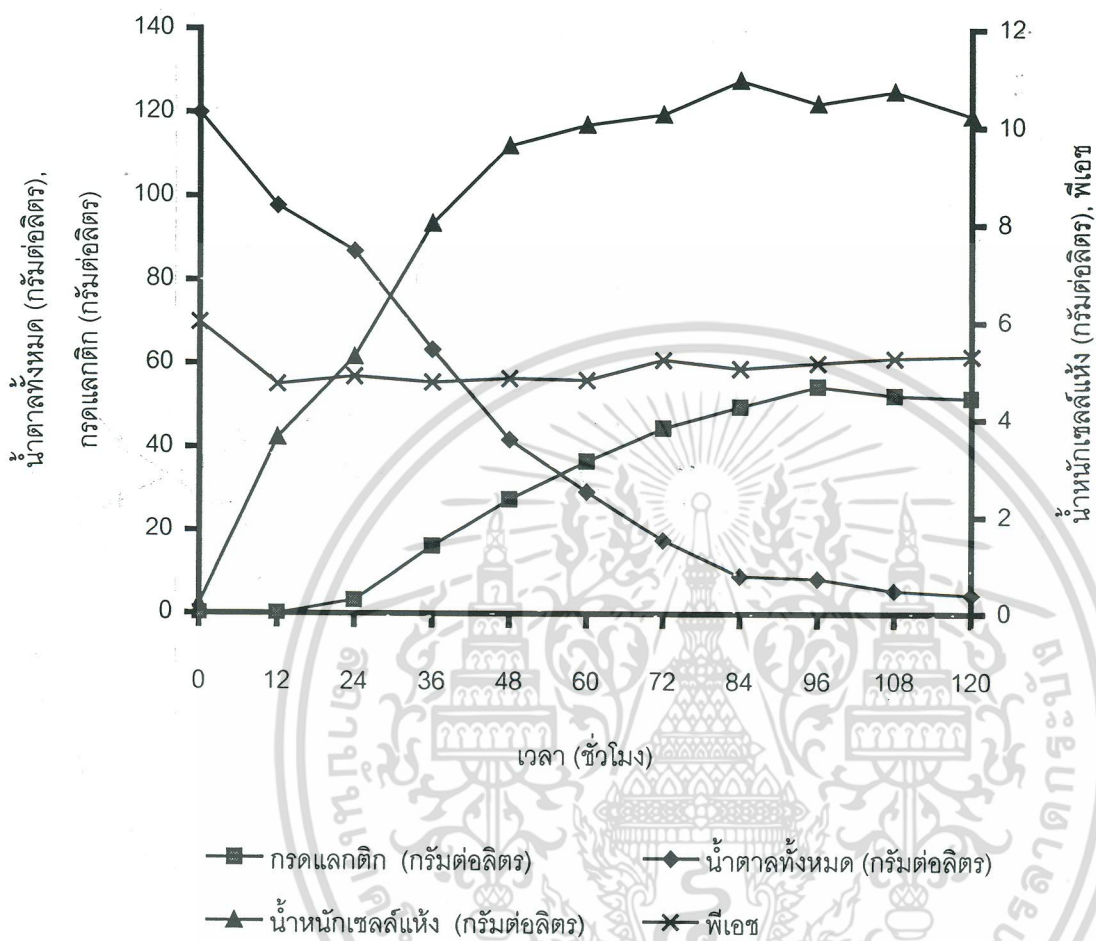
ปริมาณการผลิตกรดแลกติกในถังหมักมีปริมาณต่ำกว่าในฟลาสก์เขย่าทั้ง ๆ ที่อัตราการเจริญจำเพาะสูงกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีเชื้อราบางส่วนรวมตัวเกาะเป็นกลุ่มบริเวณขอบถังหมักและที่บริเวณแบฟเฟิล ทำให้เส้นใยราที่อยู่ข้างในได้รับอาหารและอากาศไม่เพียงพอจึงทำให้การผลิตกรดแลกติกต่ำ ซึ่ง Soccol และคณะ (1995) และ Skory และคณะ (1998) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* ในสภาวะที่มีออกซิเจนและออกซิเจนจำกัด เขาพบว่าในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด การผลิตกรดแลกติกจะลดลงแต่จะมีการผลิตเอทานอลสูงขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นผลจากการหมุนของไบพัด ซึ่งอาจทำให้เส้นใยราบางส่วนถูกตัดขาดการผลิตกรดแลกติกจึงลดลง แต่อย่างไรก็ตามพบว่า การเลี้ยงเชื้อราในถังหมักให้ผลผลิตเร็วกว่าคือ ผลิตกรดแลกติกสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงในขณะที่เมื่อเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์เขย่า การผลิตกรดแลกติกสูงสุดในวันที่ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช เมื่อเลี้ยง *R. oryzae* NRRL 395 ในถังหมักที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม

เวลา (ชั่วโมง)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	พีเอช
0	0	0.19	120	6
12	0.03	3.63	97.82	4.72
24	3.28	5.28	87.06	4.88
36	16.2	8.02	63.42	4.76
48	27.52	9.61	41.89	4.84
60	36.71	10.04	29.41	4.81
72	44.67	10.26	17.66	5.23
84	49.74	10.96	9.17	5.05
96	54.62	10.48	8.54	5.16
108	52.5	10.73	5.67	5.26
120	51.85	10.23	4.59	5.31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 14 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักรเซลลูล์สแห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าฟิโชน เมื่อเลี้ยง *R. oryzae* NRRL 395 ในถังหมักที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วิวี่เอ็ม

Kosakai และคณะ (1997) รายงานว่าการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *R. oryzae* ในถั่วงอกแบบใช้ไบโพดกวน พบปัญหาการเกาะรวมกันของเส้นใยเป็นก้อนที่บริเวณผิวหน้าของอาหารและผนังของถั่วงอก เมื่อเติม mineral support ที่เหมาะสมปริมาณ 3 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ polyethylene oxide 5 พีพีเอ็ม ลงในอาหารที่ผลิตกรดแลกติก พบว่าทำให้การกระจายตัวของเส้นใยดีขึ้น และช่วยลดปัญหาการเกาะกลุ่มของเส้นใย มีผลให้การผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้น 1.7 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติม mineral support และ polyethylene oxide.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 โดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ถูกย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก ประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 120 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 3.0 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.25 กรัมต่อลิตร ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.04 กรัมต่อลิตร พีเอช เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 6.0 และปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมคือ  $2 \times 10^5$  สปอร์ต่อมิลลิลิตร

การเพาะเลี้ยง *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารเหลวที่เหมาะสมในฟลาสก์เขย่าโดยใช้ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าได้ปริมาณกรดแลกติก 68.32 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 120 ของการเพาะเลี้ยงเชื้อ อัตราการเจริญจำเพาะของ *R. oryzae* เท่ากับ 0.038 ต่อชั่วโมง ผลได้ของกรดแลกติกเท่ากับ 0.59 กรัมต่อกรัมสับสเทรต อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.57 กรัมต่อลิตรชั่วโมง

การเพาะเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศจะมีผลต่อการเพิ่มอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อรา และการผลิตกรดแลกติก ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติกในถังหมักคือ ที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 54.62 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง อัตราการเจริญจำเพาะของ *R. oryzae* เท่ากับ 0.060 ต่อชั่วโมง ผลได้กรดแลกติกเท่ากับ 0.49 กรัมต่อกรัมสับสเทรต อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.56 กรัมต่อลิตรชั่วโมง จะเห็นว่า ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ในถังหมักคิดเป็นร้อยละ 80 ของกรดแลกติกที่ผลิตได้เมื่อเลี้ยงเชื้อราในฟลาสก์เขย่า

ดังนั้นถ้าต้องการผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรม โดยใช้ถังหมักควรมีการศึกษาต่อไปถึงชนิดของถังหมักที่เหมาะสม ตลอดจนการปรับปรุงกระบวนการหมักให้เหมาะสมเพื่อที่จะได้ผลผลิตกรดแลกติกที่มากขึ้น

## เอกสารอ้างอิง

- กล้าณรงค์ ศรีรอด. 2521. การพัฒนาผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังในด้านอุตสาหกรรม วิทยาศาสตร์  
การอาหาร 10 (2) : 39-48.
- ปทุมพร ฉิมเอนก. 2536. กรดแลกติกกับอาหารของชาวเอเชีย. วารสารอาหาร 23(1) : 295-298.
- รวิวรรณ วงษ์สมุทร. 2533. กรดแลกติกในอุตสาหกรรมอาหาร. วารสารวิทยาศาสตร์บริการ.  
24 : 7-9.
- Adam, M.R. and Hall, G.J. 1988. Growth inhibition of food borne pathogens by lactic  
acid and acetic acid and their mixture. J. Food Sci. Technol. 23(3) : 287-292.
- Alidemirci, L., Pomtto, A.I. and Kenneth, J.E. 1993. Lactic acid production in a  
mixture-culture biofilm reactor. Appl. Environ. Microbiol. 59(1):203-207.
- Altkinson, B. and Mavituna, F. 1991. Biochemistry Engineering and Biotechnology  
Handbook. Vol 1. Stockton Press.
- Barker, S.B. 1957. Perparation and colorimetric determination of lactic acid. In  
S.P. Colowick and N.O.Kaplan (eds.) : Methods in Enzymology. Vol 3 ,  
pp. 241-246. Academic Press, New York.
- Bernfeld, P. 1995. Amylase  $\alpha$  and  $\beta$ . In S.P. Colowick and N.O. Kaplan (eds) :  
Methods in Enzymology. Vol 3 , pp. 149-158. Academic Press , New York.
- Bibal, B., Vayssier, Y., Goma, G. and Pareilleux, A. 1991. High-concentration  
cultivation of *Lactobacillus cremoris* in a cell-recycle reactor. Biotechnol. Bioeng.  
37 : 746-754.
- Dubois, M., Gilles , K.A. , Hamilton , J.K., Rebers , P.A. and Smith, F. 1956.  
Colorimetric method for determination of sugars and related substances.  
Anal. Chem. 28 : 350-356.
- Griffin, D.H. 1994. Fungal Physiology. 2 nd ed. Wiley-Liss, New York.
- Hamamci, H. and Ryu, D.D.Y. 1994. Production of L(+) – lactic acid using immobilized  
*Rhizopus oryzae*. Appl. Biochem. Biotechnol. 44 : 125 -133.
- Hang, Y.D. 1989. Direct fermentation of corn to L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*.  
Biotechnol. Lett. 11 : 299 -300.

- Hang, Y.D., Hamamci, H. and Woodams, F.E. 1989. Production of L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae* immobilized in calcium alginate gel. *Biotechnol. Lett.* 11 : 119 -120.
- Holten, C.M., Moller , A. and Rehbinder , D.1971. Lactic Acid. *Bergstrveria chemie , Weinherim.*
- Knight, J.W. 1969. *The Starch Industry.* Pergamon Press, Oxford.
- Kosakai, Y., Park , Y.S. and Okabe , M. 1997. Enhancement of L(+)-lactic acid production using mycelial floccs of *Rhizopus oryzae*. *Biotechnol. Bioeng.* 55(3) : 461-470.
- Lipinsky, E.S. and Sinclair, R.G. 1986. Is lactic acid a commodity chemical? *Chem. Eng. Prog.* 82 : 26-32.
- Lloyd, N.E. and Nelson, W.J. 1984. Glucose and Fructose Containing Sweeteners from Starch. *Chemistry and Technology.* Academic Press , Orlando.
- Lockwood, L.B. 1965. Lactic acid. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 119 : 354-867.
- Lockwood, L.B. 1975. Organic acid production. in J.E. Smith and D.R. Berry (eds) : *Filamentous Fungi.* Vol 1, pp 140-157. Edward Arnold, London.
- Merck, 1983. *The Merck Index.* 10 th ed. Merck and Co.Inc.
- Ohara, H. and Yahata, M. 1996. L-Lactic acid production by *Bacillus* sp. in anaerobic and aerobic culture. *J. Ferment. Bioeng.* 81 : 272-274.
- Prescott, S.C. and Dunn, C.G. 1982. *Industrial Microbiology.* 4 th ed. McGraw Hill , New York.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A. 1996. *Microbiology.* Wm.C.Brown Publishers, Dubuque, I.A.
- Reed, G. 1975. *Enzyme in Food Processing.* 2 nd ed. Academic Press, New York.
- Rosenberg, M., Kristofikova, L., Proksa, B. and Magdolen, P. 1992. The fermentation of polyols and fatty acid during L(+)-lactic acid fermentation by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnol. Lett.* 14 : 45-48.
- Siebold, M., Frieling, P.V., Joppien, R., Rindfleisch, Schugerl, K. and Roper, H. 1995. Comparison of the production of lactic acid by three different Lactobacilli and its recovery by extraction and electrodialysis. *Process Biochem.* 30 : 81-95.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Soccol, C.R., Marin, B., Raimbault, M. and Lebeault, J.M. 1994. Potential of solid state fermentation for production of L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41 : 286 -290.
- Soccol, C.R., Stonoga, V.I. and Raimbault, M. 1995. Production of L-lactic acid by *Rhizopus* species. World J. Microbiol. Biotechnol. 10 : 433-435.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A. and Hall, S.J. 1995. Principles of Fermentation Technology. Pergamon Press, Oxford.
- Warren, R.A.J. 1996. Microbial hydrolysis of polysaccharides. Ann. Rev. Microbiol. 50 : 183 -212.
- Warriner, K.S.R. and Morris, J.G. 1995. The effects of aeration on the bioreductive abilities of some heterofermentative lactic acid bacteria. Lett. Appl. Microbiol. 20 : 323 -327.
- Yang, C.W., Lu, Z. and Isao, G.T. 1995. Lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* in a submerged system. Appl. Biochem. Biotechnol. 51 : 57-71.
- Yin, P., Nishina, N., Kosakai, Y., Yahiro, K., Park, Y. and Okabe, M. 1997. Enhanced production of L(+) - lactic acid from corn starch in a culture of *Rhizopus oryzae* using an air-lift bioreactor. J. Ferment. Bioeng. 84(3) : 249 -253.
- Yin, P., Yahiro, K., Ishigaki, T., Park, Y., and Okabe, M. 1998. L(+)-lactic acid production by repeated batch culture of *Rhizopus oryzae* in air-lift bioreactor. J. Ferment. Bioeng. 85(1) : 96 -100.
- Yu, R.C. and Hang, Y.D. 1989. Kinetics of direct fermentation of agricultural commodities to L(+)-lactic by *Rhizopus oryzae*. Biotechnol. Lett. 11(8) : 597-600.

- Soccol, C.R., Marin, B., Raimbault, M. and Lebeault, J.M. 1994. Potential of solid state fermentation for production of L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41 : 286 -290.
- Soccol, C.R., Stonoga, V.I. and Raimbault, M. 1995. Production of L-lactic acid by *Rhizopus* species. World J. Microbiol. Biotechnol. 10 : 433-435.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A. and Hall, S.J. 1995. Principles of Fermentation Technology. Pergamon Press, Oxford.
- Warren, R.A.J. 1996. Microbial hydrolysis of polysaccharides. Ann. Rev. Microbiol. 50 : 183 -212.
- Warriner, K.S.R. and Morris, J.G. 1995. The effects of aeration on the bioreductive abilities of some heterofermentative lactic acid bacteria. Lett. Appl. Microbiol. 20 : 323 -327.
- Yang, C.W., Lu, Z. and Isao, G.T. 1995. Lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* in a submerged system. Appl. Biochem. Biotechnol. 51 : 57-71.
- Yin, P., Nishina, N., Kosakai, Y., Yahiro, K., Park, Y. and Okabe, M. 1997. Enhanced production of L(+) - lactic acid from corn starch in a culture of *Rhizopus oryzae* using an air-lift bioreactor. J. Ferment. Bioeng. 84(3) : 249 -253.
- Yin, P., Yahiro, K., Ishigaki, T., Park, Y., and Okabe, M. 1998. L(+)-lactic acid production by repeated batch culture of *Rhizopus oryzae* in air-lift bioreactor. J. Ferment. Bioeng. 85(1) : 96 -100.
- Yu, R.C. and Hang, Y.D. 1989. Kinetics of direct fermentation of agricultural commodities to L(+)-lactic by *Rhizopus oryzae*. Biotechnol. Lett. 11(8) : 597-600.



สงวนลิขสิทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้