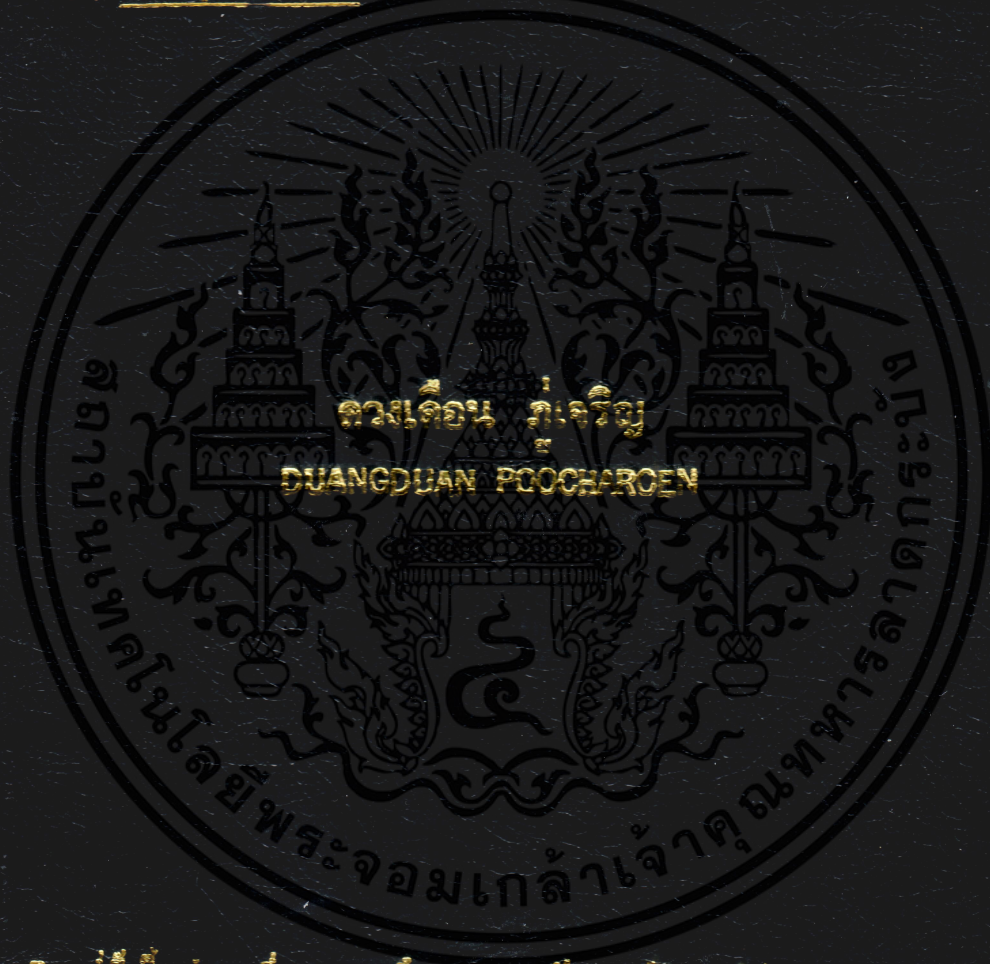


ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ

Rhizopus oryzae NRRL 395 จากแป้งมันสำปะหลัง

FACTORS INFLUENCING LACTIC ACID PRODUCTION
BY Rhizopus oryzae NRRL 395 FROM CASSAVA STARCH



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ศึกษ

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2544

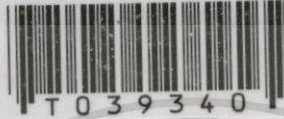
ISBN 974-648-081-2

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ

Rhizopus oryzae NRRL 395 จากแป้งมันสำปะหลัง

FACTORS INFLUENCING LACTIC ACID PRODUCTION

BY *Rhizopus oryzae* NRRL 395 FROM CASSAVA STARCH



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2544

ISBN 974-648-081-2

เลขที่ 39340

สงวนลิขสิทธิ์ ห้ามการได้เผยแพร่เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

**FACTORS INFLUENCING LACTIC ACID PRODUCTION
BY *Rhizopus oryzae* NRRL 395 FROM CASSAVA STARCH**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2001

ISBN 974-648-081-2

บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 จากแป้งมันสำปะหลัง

FACTORS INFLUENCING LACTIC ACID PRODUCTION BY
Rhizopus oryzae NRRL 395 FROM CASSAVA STARCH

ชื่อนักศึกษา นางสาวดวงเดือน ภูเจริญ

รหัสประจำตัว 39065204

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.นवलพรรณ ณ ระนอง

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.ดร.คุณณี	ธนะบริพัฒน์	
ผศ.ดร.นवलพรรณ	ณ ระนอง	
ผศ.ดร.ตะวัน	สุชน้อย	
นายมงคล	เพ็ญสายใจ	

วัน / เดือน / ปี ที่สอบ 30 มกราคม 2544 เวลา 13.00 - 15.00 น.

สถานที่สอบ ณ ห้อง 424 ห้องประชุม-สัมมนา

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(รศ.ดร.บุญวัฒน์ อีตชู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 19 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Rhizopus oryzae*

NRRL 395 จากแป้งมันสำปะหลัง

นักศึกษา

นางสาวดวงเดือน ภูเจริญ

รหัสประจำตัว

39065204

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

พ.ศ.

2544

อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร.นवलพรรณ ณ ระนอง

บทคัดย่อ

การศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 โดยมีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ทำการหาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก โดยหาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง แหล่งไนโตรเจน โปแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และปริมาณสปอร์เริ่มต้น จากผลการศึกษาพบว่าอาหารสูตรคัดแปลงที่เหมาะสมที่สุด ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) แป้งมันสำปะหลัง 120 แอมโมเนียมซัลเฟต 3.0 โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.25 ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.04 และมีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 ปริมาณสปอร์เริ่มต้น 2×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในระดับพลาสติกแบบเขย่าให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 68.32 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่าผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.59 กรัมต่อกรัมสับสเตรต อัตราการเกิดกรดแลกติก (productivity) เท่ากับ 0.57 กรัมต่อลิตรชั่วโมง และค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.038 ต่อชั่วโมง ระดับถังหมักขนาด 5 ลิตรให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 54.62 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่าผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.49 กรัมต่อกรัมสับสเตรต อัตราการเกิดกรดแลกติก (productivity) เท่ากับ 0.56 กรัมต่อลิตรชั่วโมง และค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.060 ต่อชั่วโมง

Thesis Title	Factors Influencing Lactic Acid Production by <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 from Cassava Starch
Student	Miss Duangduan Poocharoen
Student ID.	39065204
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2001
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Nuanphan Naranong

ABSTRACT

Production of lactic acid by *Rhizopus oryzae* NRRL 395 from raw cassava starch as a sole carbon source was studied. Various concentrations of raw cassava starch, nitrogen source, KH_2PO_4 and initial spore concentrations were determined for maximum production of lactic acid. From the experimental results, the optimization of modified medium to be consisted of the following compositions (g/l): raw cassava starch 120; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.0; KH_2PO_4 1.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04 and initial pH of 6.0. An inoculated spore concentration was 2×10^5 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. The lactic acid yield, productivity and specific growth rate were 0.59 g/g, 0.57 g/lh and 0.038 h^{-1} , respectively. In a 5-l jar fermentor, the maximum lactic acid production was 54.62 g/l on day 4 of cultivation at the agitation speed of 400 rpm and the aeration rate of 1.5 vvm at 30 °C. The lactic acid yield, productivity and specific growth rate were 0.49 g/g, 0.56 g/lh and 0.060 h^{-1} , respectively.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างดี ด้วยคำแนะนำ และคำปรึกษาที่มีประโยชน์
อย่างมาก ตลอดจนการตรวจทานวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์จาก ผศ.ดร.นवलพรรณ ณ ระนอง
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณ รศ.ดร. คุณณี ธนะบริพัฒน์ ประธานกรรมการวิทยานิพนธ์ ผศ.ดร.
ตะวัน สุขน้อย กรรมการวิทยานิพนธ์ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกภาควิชา และ อาจารย์ มงคล เพ็ญสาย
ใจ กรรมการวิทยานิพนธ์ผู้ทรงคุณวุฒิภายในภาควิชา ที่ตรวจทานแก้ไขและให้คำปรึกษาแนะนำ
เพื่อความถูกต้องสมบูรณ์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้แก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่ได้ให้ทุน
สนับสนุนการทำวิจัยครั้งนี้ (ระหว่างปีการศึกษา 2540)

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ได้ให้ทุนสนับสนุนการทำรูปเล่มวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ นักศึกษาทุกคน และบุคคลอื่น ๆ ที่มีได้เอ่ยนามในที่นี้
ตลอดจน พี่ น้อง ทุกคนในครอบครัวที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมา

สุดท้ายขอขอบคุณ คุณสุนทร วัฏฐานุรักษ์ และ คุณ. ปิยสุนทร วัฏฐานุรักษ์ กำลั้งใจที่
มีค่าอย่างยิ่งแก่ผู้วิจัย

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอบแต่บิดา และมารดา
ของผู้วิจัยเองที่ได้ให้ความรัก กำลั้งใจ และความเสียสละแก่ผู้วิจัยตลอดมา

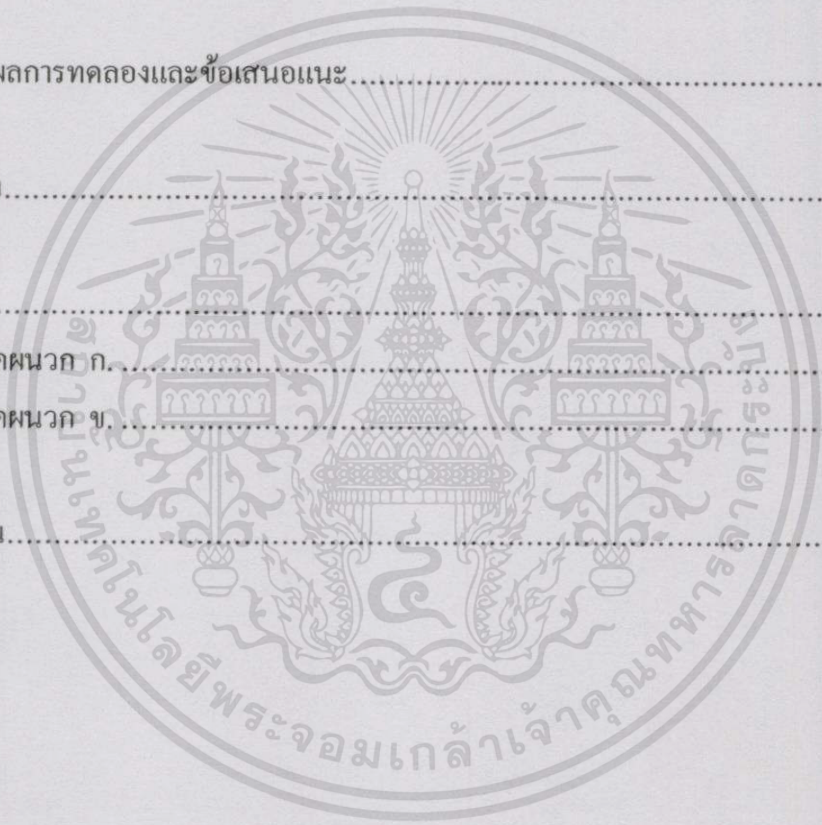
ดวงเดือน ภูเจริญ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง.....	VI
สารบัญภาพ.....	X
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 โครงสร้างและคุณสมบัติของกรดแลกติก.....	3
2.2 การผลิตกรดแลกติก.....	5
2.3 เชื้อราที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดแลกติก.....	8
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก.....	10
2.5 การหมักในอาหารเหลวแบบแบดซ์.....	13
2.6 ประโยชน์ของกรดแลกติก.....	20
2.7 แป้งมันสำปะหลัง.....	22
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	27
3.1 เชื้อจุลินทรีย์.....	27
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	27
3.3 สารสำหรับเตรียมอาหารและสารเคมีภัณฑ์.....	28
3.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	29
3.5 วิธีดำเนินการวิจัย.....	29
3.6 การวิเคราะห์.....	32

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....	37
4.1 ผลการศึกษาการย่อยแป้งมันสำปะหลัง.....	37
4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในระดับฟลาस्कเงย่า.....	41
4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในระดับถังหมักแบบแบตช์.....	64
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	83
บรรณานุกรม.....	85
ภาคผนวก.....	90
ภาคผนวก ก.....	91
ภาคผนวก ข.....	92
ประวัติผู้เขียน.....	95



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 คุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติก.....	4
2.2 การใช้กรดแลกติกในอาหารชนิดต่าง ๆ	21
2.3 ประโยชน์ของสารอนุพันธ์กรดแลกติกในทางการค้า.....	22
4.1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยกรดชนิดต่าง ๆ.	39
4.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกรดแลกติกในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นระดับต่างๆกัน.....	42
4.3 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร.....	43
4.4 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร.....	43
4.5 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร.....	43
4.6 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร.....	44
4.7 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตร.....	44
4.8 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกรดแลกติกในอาหารที่มีแอม โมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นระดับต่างๆกัน.....	47
4.9 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0 กรัมต่อลิตร... ..	48
4.10 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร...	48
4.11 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 2.0 กรัมต่อลิตร...	48
4.12 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 3.0 กรัมต่อลิตร...	49
4.13 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกรดแลกติกในอาหารที่มีโพแทสเซียมได ไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นระดับต่างๆกัน.....	52

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.14 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในอาหารที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เข้มข้น 0 กรัมต่อลิตร.....	53
4.15 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในอาหารที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร.....	53
4.16 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในอาหารที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เข้มข้น 0.6 กรัมต่อลิตร.....	54
4.17 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในอาหารที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร.....	54
4.18 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกรดแลกติกในอาหารที่มีปริมาณสปอร์เริ่มต้น ระดับต่างๆกัน.....	57
4.19 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในอาหารที่มีปริมาณสปอร์เริ่มต้น 2×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร.....	58
4.20 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในอาหารที่มีปริมาณสปอร์เริ่มต้น 2×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร.....	58
4.21 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในอาหารที่มีปริมาณสปอร์เริ่มต้น 2×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร.....	59
4.22 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในอาหารที่มีปริมาณสปอร์เริ่มต้น 2×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร.....	59
4.23 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในระดับพลาสติกเย้า.....	62

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.24 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในระดับถึงหมักที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม.....	68
4.25 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในระดับถึงหมักที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม.....	68
4.26 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในระดับถึงหมักที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม.....	69
4.27 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในระดับถึงหมักที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม.....	71
4.28 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในระดับถึงหมักที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม.....	71
4.29 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในระดับถึงหมักที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม.....	72
4.30 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในระดับถึงหมักที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม.....	74
4.31 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในระดับถึงหมักที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม.....	74
4.32 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในระดับถึงหมักที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม.....	75

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.33	แสดงปริมาณกรดแลกติก อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และอัตราการเกิดกรดแลกติก (productivity) ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในระดับถึงหมักที่มีอัตราการกวน และอัตราการให้อากาศระดับต่าง ๆ กัน.....77
4.34	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกรดแลกติกในระดับถึงหมักที่มีอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศระดับต่าง ๆ กัน.....78
4.35	แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในระดับถึงหมัก.....81



สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 แสดงสูตร โครงสร้างของกรดแลกติก.....	3
2.2 การผลิตกรดแลกติกโดยแบคทีเรีย.....	6
2.3 การผลิตกรดแลกติกและสารอื่น ๆ โดยเชื้อรา.....	7
2.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์จุลินทรีย์กับเวลา.....	14
2.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) กับปริมาณความเข้มข้นของ สารอาหาร (S).....	17
2.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $1/[S]$ กับ $1/\mu$	18
2.7 โครงสร้างของอะไมโลส และอะไมโลเพคติน.....	23
3.1 การผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....	36
4.1 โครมาโตแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยกรด ไฮโดรคลอริก.....	40
4.2 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในอาหารที่มี แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นระดับต่างๆกัน.....	45
4.3 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในอาหารที่มี แอม โมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นระดับต่างๆกัน.....	50
4.4 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในอาหารที่มี โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นระดับต่างๆกัน.....	55
4.5 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในอาหารที่มี ปริมาณสปอร์เริ่มต้นระดับต่างๆกัน.....	60
4.6 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในระดับฟลาตส์เขย่า.....	63
4.7 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในระดับถังหมักที่ อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศระดับต่างๆกัน.....	70
4.8 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในระดับถังหมักที่ อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศระดับต่างๆกัน.....	73
4.9 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในระดับถังหมักที่ อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศระดับต่างๆกัน.....	76
4.10 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย <i>Rhizopus oryzae</i> NRRL 395 ในระดับถังหมัก.....	82

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
ข1 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับปริมาณกรดแลกติก.....	92
ข2 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์.....	93
ข3 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมด.....	94



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

กรดแลกติกเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่ถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมต่างๆ ทั้งในรูปของสารประกอบ และอนุพันธ์ของกรดแลกติก โดยมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณการผลิตทั้งหมดจะถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อใช้เป็นวัตถุกันเสีย และทำให้เกิดรสเปรี้ยว นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมยา เครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ซึ่งมีคุณสมบัติในด้านความยืดหยุ่นและทนร้อน ดังนั้นปริมาณความต้องการใช้กรดแลกติกจึงมีมาก ในประเทศสหรัฐอเมริกามีความต้องการที่จะใช้กรดแลกติกถึง 25 ล้านปอนด์ และครึ่งหนึ่งต้องนำเข้าจากต่างประเทศ (Cheng *et al.*, 1991) อย่างไรก็ตามประเทศสหรัฐอเมริกาและญี่ปุ่นยังคงเป็นประเทศที่ผลิตกรดแลกติกรวมได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณทั้งหมดในตลาด ครึ่งหนึ่งของกรดแลกติกจะถูกผลิตขึ้นโดยกระบวนการหมัก อีกครึ่งหนึ่งจะถูกผลิตโดยการสังเคราะห์ทางเคมี (Siebold *et al.*, 1995) ปัจจุบันกระบวนการหมักซึ่งเป็นวิธีทางชีวภาพกำลังได้รับความสนใจ เนื่องจากสามารถให้วัตถุดิบ ซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมได้ เช่น น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) ที่เหลือทิ้งจากโรงงานแปรรูปข้าวโพด หรือหางนม ที่เป็นผลพลอยได้จากการผลิตเนย ในกระบวนการหมักโดยทั่วไปจะใช้แบคทีเรีย ที่เรียกว่า Lactic Acid Bacteria (LAB) (Prescott and Dunn, 1959) ซึ่งกรดแลกติกที่ผลิตได้จะอยู่ในรูป D (-) lactic acid L (+) lactic acid หรือ DL (-) lactic acid ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย แต่มีข้อจำกัดคือ ความเข้มข้นของกรดแลกติกที่สูงจะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโต และการผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรีย ในงานวิจัยต่อมาได้มีการรายงานถึงการใช้ *Rhizopus oryzae* ซึ่งเป็นเชื้อราที่ผลิตกรดแลกติกได้สูงพอๆ กับแบคทีเรียแต่สามารถทนต่อสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรดได้ดีกว่า (Hang *et al.*, 1989) โดยกรดแลกติกที่ผลิตขึ้นจะอยู่ในรูป L (+) lactic acid ซึ่งนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดี เช่น มีจุดหลอมเหลวที่สูง สามารถนำเข้าสู่ร่างกายโดยไม่เป็นอันตรายเพราะเป็นรูปเดี่ยวที่สามารถสังเคราะห์ได้ในร่างกายมนุษย์ ข้อดีอีกประการคือสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด เช่น กลูโคส ฟรักโทส ซูโครส แล็กโทส และแป้ง สำหรับประเทศไทยยังไม่มีการผลิตกรดแลกติกขึ้นเองภายในประเทศ ในแต่ละปีจึงมีการนำเข้ากรดแลกติกมูลค่าหลายล้านบาท และมีปริมาณการใช้สูงขึ้นทุกปี ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะพัฒนาการผลิตกรดแลกติกขึ้นเพื่อทดแทนการนำเข้าบางส่วน โดยการศึกษาการนำวัตถุดิบราคาถูก และหาได้ง่าย เช่น แป้งมันสำปะหลัง ซึ่งมีปริมาณมากภายในประเทศมาปรับปรุงให้เป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติก

นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มคุณค่าทางเศรษฐกิจของแป้งมันสำปะหลังอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันสำปะหลัง โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* NRRL 395
- 1.2.2 ศึกษาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมของสิ่งแวดล้อมที่มีต่อการผลิตกรดแลกติก
- 1.2.3 ศึกษาการผลิตกรดแลกติกในระดับฟลาस्कแบบเขย่าและในระดับถังหมักแบบเบดซ์

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดยกระบวนการหมักจากเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตกรดแลกติก (L (+) lactic acid) ได้สูง โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ ตลอดจนศึกษาหาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมของสิ่งแวดล้อมที่มีต่อการเจริญเติบโต และการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Rhizopus oryzae* NRRL 395

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 สามารถนำแป้งมันสำปะหลังที่มีปริมาณมากภายในประเทศมาใช้ให้เกิดประโยชน์
- 1.4.2 เป็นแนวทางในการลดต้นทุนการผลิต
- 1.4.3 เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการขยายกำลังการผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรม

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติก

น้ำหนักโมเลกุล	90.08
จุดหลอมเหลว D(-) หรือ L(+)	52.8 - 54 องศาเซลเซียส
DL (ในสัดส่วนต่างๆ)	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 (H_c)	1361 กิโลจูลต่อโมล
ค่าความร้อนจำเพาะ (C_p ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส)	190 กิโลจูลต่อโมล องศาเซลเซียส ($KJ/mol^\circ C$)

ที่มา : Holten *et al.* (1971) ; Lockwood (1965)

กรดแลกติกเป็นกรดอินทรีย์ที่สังเคราะห์ได้ด้วยความเข้มข้นต่ำ กรดแลกติกความเข้มข้นสูงจะเป็นอันตรายทั้งภายนอกและภายในร่างกาย เมื่อกรดสัมผัสกับผิวหนังจะเหมือนถูกไฟลวก เมื่อกรดถูกดวงตาสามารถทำให้ตาบอดได้ (Foster, 1972)

การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกสามารถวิเคราะห์ได้ โดยวัดปริมาณเอนไซม์ที่เกิดในการหมักที่สามารถจำเพาะต่อ stereoisomer ของกรดแลกติก ที่เรียกว่า NAD⁺ linked lactate dehydrogenase ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์ทางอ้อม (Sindney and Nathan, 1962) หรือโดยวิธี Non-enzymetic methods (Freidmann and Greaser, 1933) ซึ่งเป็นวิธีที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยนกรดแลกติกให้เป็นอะเซตาลดีไฮด์ และนำอะเซตาลดีไฮด์มาวิเคราะห์ด้วย ก๊าซโครมาโทกราฟีวิธี Colorimetric determination (Barker and Summerson, 1941) เป็นวิธีเปลี่ยนกรดแลกติก เป็นอะเซตาลดีไฮด์ โดยการให้ความร้อนภายหลังเติมกรดซัลฟิวริก และทำปฏิกิริยากับ พาราไฮดรอกซีไดฟีนิล จะเกิดสารประกอบที่มีสีม่วง วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ในกรณีที่สารตัวอย่างไม่มีปัจจัยอื่นๆ มาเกี่ยวข้อง นิยมหาปริมาณกรดโดยการไทเทรตสารละลายโดยใช้เบสแก่ เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sindney and Nathan, 1962) ในการวิเคราะห์กรดปริมาณน้อยๆ ที่ต้องการทั้งปริมาณและคุณภาพ สามารถใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) หรือ Nuclear Magnetic Resonance (NMR) ซึ่งให้ผลการวิเคราะห์ที่แม่นยำเที่ยงตรง Yumoto and Ikeda (1995) ได้วิเคราะห์หาปริมาณกรดแลกติกที่เกิดจากการหมักแป้งของเชื้อ *Lactobacillus amylophilus* โดยใช้ HPLC ซึ่งสามารถวิเคราะห์กรดแลกติกที่มีความบริสุทธิ์ 92.5 เปอร์เซ็นต์ และสามารถแยก L(+) และ D(-) lactic acid ออกจากกันได้

2.2 การผลิตกรดแลกติก

2.2.1 การผลิตโดยปฏิกิริยาทางเคมี (Lipinsky and Sinclair, 1986)

วิธีนี้ถูกนำไปใช้ตั้งแต่ปี 1963 แบ่งได้เป็น 2 ขั้นตอน คือ

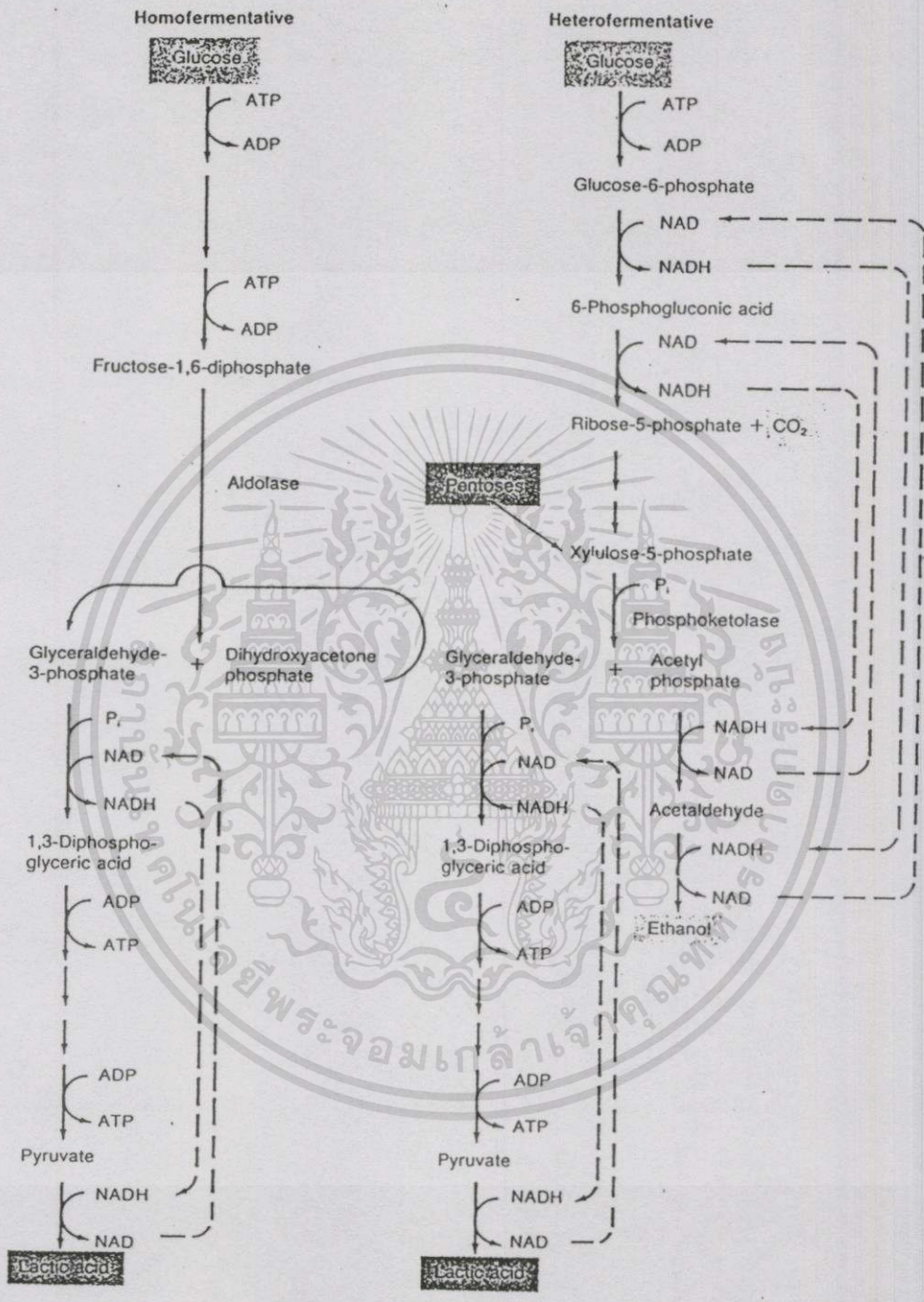
ขั้นแรก : นำกรด HCN มาทำปฏิกิริยากับ acetaldehyde ได้เป็น lactonitrile

ขั้นสอง : นำ lactonitrile ที่ได้มาทำปฏิกิริยา hydrolysis กับกรด HCl ได้เป็นกรดแลกติกและเกลือแอมโมเนียม จากนั้นนำกรดแลกติกที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยทำให้เป็นอนุพันธ์เอสเตอร์ คือ เมทิลแลกเตด แล้วกลั่นเอาอนุพันธ์เอสเตอร์นี้ออกมา และสุดท้ายจึงทำการ hydrolyzed เมทิลแลกเตดได้เป็นกรดแลกติก นอกจากนี้ยังสามารถแยกกรดแลกติก โดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายได้ด้วย

การผลิตกรดแลกติกโดยการสังเคราะห์ทางเคมีนี้ มีข้อเสียคือ ใช้วัตถุดิบราคาแพง และสามารถผลิตได้เฉพาะรูปผสมเอเลและดี (racemic form) เท่านั้น แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า การทำให้กรดแลกติกมีความบริสุทธิ์นั้นง่ายกว่ากรดแลกติกที่ได้จากกระบวนการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์ (Xuan, 1996)

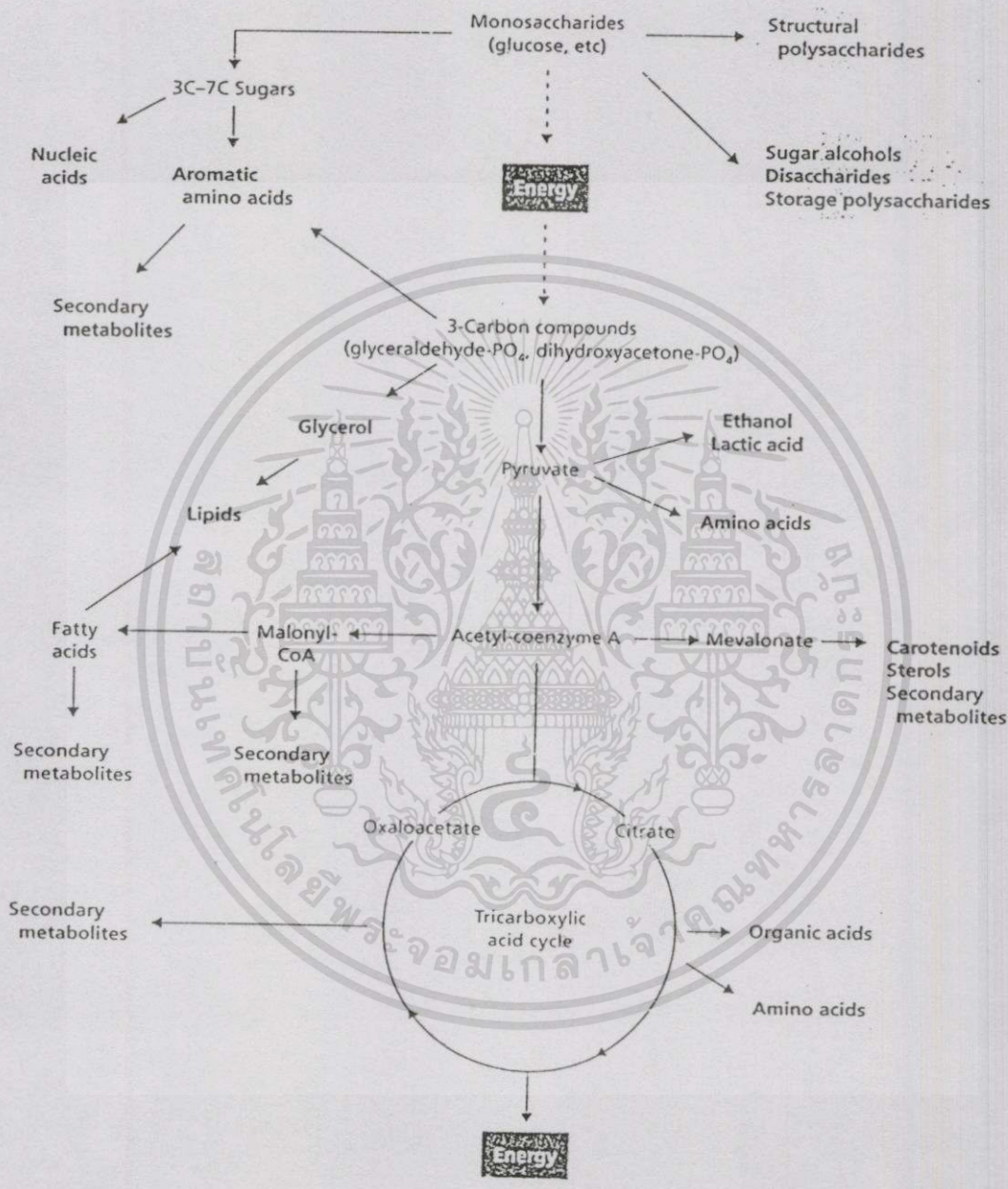
2.2.2 การผลิตโดยปฏิกิริยาทางชีวเคมีผ่านการหมักโดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตกรดแลกติกในอุตสาหกรรม ส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Homofermentative ซึ่งจะผลิตกรดแลกติกเพียงอย่างเดียว ตัวอย่างเช่น จีโนส *Lactobacillus Streptococcus* และ *Pediococcus* ส่วนแบคทีเรียในกลุ่ม Heterofermentative นอกจากจะผลิตกรดแลกติกแล้ว ยังผลิตกรดแอซีติก CO_2 เอทานอล และกลีเซอรอล เป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียงด้วย (McDonale *et al.*, 1987) นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อราบางชนิดในจีโนส *Rhizopus* และ ยีสต์ *Saccharomyces* สามารถผลิตกรดแลกติกได้เช่นกัน แต่การผลิตจะเป็นแบบ Heterofermentative ได้กรดแลกติกร่วมกับกรดชนิดอื่นๆ เช่น กรดซิทริก กรดทาทาริก กรดซัคซินิก และกรดฟูมาริก รวมถึงเอทานอลอีกเล็กน้อย จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลกติกจะเกิดกระบวนการหมักจากสารคาร์โบไฮเดรต ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นกลูโคส และสารตั้งต้นในวิถีไกลโคไลซิส ได้กรดแลกติก ตามภาพที่ 2.2 และ 2.3 ตามลำดับ จุลินทรีย์กลุ่ม Homofermentative จะใช้น้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล ไปเป็นกรดแลกติก 2 โมเลกุล แต่กลุ่ม Heterofermentative จะใช้น้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล ไปเป็นกรดแลกติก 1 โมเลกุล เท่านั้น (Brock and Mandigan, 1988) กรดแลกติกสามารถผลิตได้จากน้ำตาลหลายชนิด เช่น กลูโคส มอลโทส ซูโครส หรือแลคโทส ตลอดจนวัสดุที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรม เช่น เปลือกมันฝรั่ง รำข้าว กากน้ำตาลและหางนม นอกจากนี้ยังสามารถใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกลง เช่น แป้งจากมันฝรั่ง แป้งข้าวโพด และแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งสามารถย่อยได้โดยเอนไซม์หรือกรดบางชนิด เช่น กรดไฮโดรคลอริกได้เป็นน้ำตาลมอลโทส หรือกลูโคส ก่อนที่จะหมักได้กรดแลกติก ในปัจจุบันพบว่า การผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรมโดยการหมัก 70 เปอร์เซ็นต์เป็นการหมักแบบแบดซ์



ภาพที่ 2.2 การผลิตกรดแลกติกโดยแบคทีเรีย
 ที่มา : Brock and Mandigan (1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.3 การผลิตกรดแลกติกและสารอื่นๆ โดยเชื้อรา
 ที่มา : Deacon (1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในกระบวนการหมักแบบที่เรียกลักษณะนี้ มีข้อจำกัด คือ

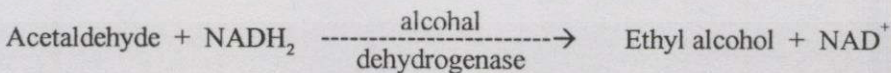
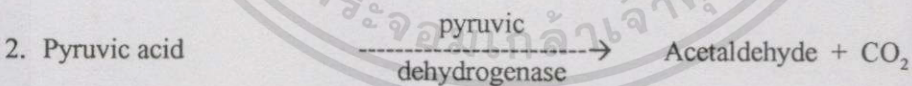
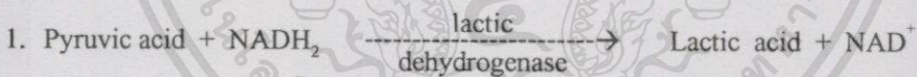
1. สามารถผลิตกรดแลกติกโดยผ่านกระบวนการหมักกลูโคส หรือน้ำตาลจากแป้งข้าวโพคเท่านั้น
2. ไม่สามารถทนต่อพีเอชที่เป็นกรดสูงได้ (ค่าพีเอช ที่เหมาะสมคือ 5-7)
3. ต้องการสารอาหารพิเศษ คือวิตามินบีในขณะทำการหมัก

ในกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อรา มีข้อดีคือ

1. เชื้อราสามารถใช้วัตถุดิบราคาถูก เช่น แป้ง เป็นแหล่งคาร์บอนได้อย่างดี
2. สามารถทนต่อพีเอชที่เป็นกรดสูงได้ (ค่าพีเอชน้อยกว่า 6.0 ลงมา)
3. ไม่ต้องการสารอาหารพิเศษในขณะทำการหมัก

2.3 เชื้อราที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดแลกติก (Deacon, 1997)

กรดแลกติกที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักโดยเชื้อรา โดยทั่วไปในการเพาะเลี้ยงจะต้องใช้สภาวะที่มีอากาศแต่การผลิตกรดแลกติกจะใช้วิถีของ Embden - Meyerhof Pathway (EMP) ซึ่งเป็นวิธีที่ไม่ต้องการออกซิเจน โดยน้ำตาลกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นสารเมแทบอลิต์ในวิถี Glycolysis ได้พลังงาน (ATP) 2 โมเลกุล และกรดไพรูวิก 2 โมเลกุล ต่อมากรดไพรูวิกจะถูกรีดิวซ์เป็นกรดแลกติกโดยการเร่งปฏิกิริยาของ Lactate Dehydrogenase ขณะเดียวกันพบว่า กรดไพรูวิกบางส่วนถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล ดังแสดงในสมการ



เชื้อราที่ผลิตกรดแลกติก ตัวอย่างเช่น *Allomyces* และ *Apoduchlya* หรือเชื้อราพวก aquatic fungi เช่น *Blastocladia* และ *Aquilinderella fermentans* นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อราพวก Obligate aerobes สามารถหมักน้ำตาล โดยผ่าน EMP ได้เช่นกัน ตัวอย่างเช่น *Mucor rouxii* และ *Rhizopus oryzae* ซึ่งให้ผลผลิตสุดท้ายของกระบวนการหมัก เป็นกรดแลกติก คาร์บอนไดออกไซด์ และเอทานอล

กรดแลกติกจากเชื้อรา พบครั้งแรกในปี ค.ศ.1894 โดย Eijkmann จากเชื้อ *Mucor rouxii* ต่อมา Boullanger ได้ทำการจดสิทธิบัตรการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Rhizopus* ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1911 และในปีค.ศ. 1934 Kanel ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Rhizopus japonicus* ต่อมาได้มีการศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Rhizopus* สายพันธุ์ต่างๆ ดังนี้คือ *Rhizopus oryzae* *R. Stolonifer* *R. salebrosus* *R. arrhizus* *R. chinensis* *R. pseudochinensis* *R. elegans* *R. tritici* *R. shanghaiensis* และเชื้อราจีนัส *Monilia* ที่ผลิตกรดแลกติกและกรดซัคซินิก (Lockwood and Moyer, 1938)

Prescott and Dunn (1982) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Hansenula* จากเมล็ดมะกอกฝรั่ง และในขั้นตอนของการผลิต Kefir และ Koumiss ในแถบประเทศรัสเซีย มีการหมักที่เป็นการผลิตกรดแลกติกและเอทานอลของยีสต์ *Torula Candida* และ *Saccharomyces kefir* โดยมีนมวัว และนมแพะเป็นวัตถุดิบ

Hang et al. (1989) ได้ศึกษาการผลิต L(+) lactic acid โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตระหว่างการใช้เชื้ออิสระกับสภาพตรึง (immobilize) ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* โดยใช้ Calcium alginate gels ซึ่งเลี้ยงในอาหารหมักที่ศึกษาโดย Lockwood et al. (1936) พบว่าการผลิตกรดแลกติกแบบแบตช์ โดยใช้เชื้ออิสระจะมีปริมาณที่ลดลงตามลำดับ กล่าวคือในครั้งที่ 1 ของการหมักสามารถผลิตกรดได้ 60.2 กรัมต่อลิตร และลดลงเหลือ 12.3 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงครั้งที่ 5 และในการเลี้ยงครั้งที่ 9 ไม่มีการผลิตกรดแลกติกเกิดขึ้น ในขณะที่การผลิตในสภาพตรึงเชื้อ สามารถผลิตได้ในช่วงเวลาที่ยาวนานถึง 18 วัน โดยในครั้งที่ 1 ผลิตกรดแลกติกได้ 50.2 กรัมต่อลิตร และสูงสุดในครั้งที่ 5 คือ 62.4 กรัมต่อลิตร และในการเลี้ยงครั้งที่ 9 ยังคงผลิตได้ถึง 46.9 กรัมต่อลิตร

Rosenberg et al. (1992) ได้ศึกษาการสร้างสารพอลิอัล และกรดไขมัน ในระหว่างการหมักเพื่อผลิตกรดแลกติก จากเชื้อ *Rhizopus arrhizus* โดยใช้น้ำตาลเป็นสับสเตรต ในขณะที่เดียวกันสามารถผลิตกรดแกมมาลิโนลินิกได้อีกด้วย โดยเซลล์จะใช้ออกซิเจนเพื่อการผลิตกรดแลกติกและสารพอลิอัล ในช่วงใกล้สิ้นสุดการผลิตกรดแลกติก น้ำตาลที่เป็นสับสเตรตหมดลงก็จะเริ่มสร้างกรดแกมมาลิโนลินิก โดยใช้สารพอลิอัลเป็นสับสเตรต ซึ่งสารพอลิอัลส่วนใหญ่จะเป็นกลีเซอรอล

Soccol et al. (1995) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติก จากกลูโคสของเชื้อราจีนัส *Rhizopus* 19 สายพันธุ์ พบว่ามี 4 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูง คือ *R. arrhizus* MUCL 16179 *R. arrhizus* MUCL 28425 *R. delemar* ATCC 34612 และ *R. oryzae* NRRL 395 โดยพบว่า *R. oryzae* NRRL 395 ผลิตกรดแลกติกสูงสุดถึง 65 กรัมต่อลิตร ในสถานะที่มีออกซิเจน และมีการควบคุมความเป็นกรดเป็นด่างด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) โดยเติมในชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก โดยพบกรดฟูมาริก และเอทานอลเกิดขึ้นเล็กน้อย ส่วนในสถานะที่ไม่มีออกซิเจนพบว่าจะมีกรดแลกติกเกิดขึ้นน้อยมาก และมีเอทานอลเกิดขึ้นแทน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

2.4.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอน ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ในการสังเคราะห์เซลล์ ส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศ จะใช้แหล่งคาร์บอน ประมาณ 50-55 เปอร์เซ็นต์ในการสังเคราะห์เซลล์ ในกระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมใช้ คาร์โบไฮเดรต เป็นแหล่งคาร์บอน และต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมทั้งชนิด และปริมาณความเข้มข้น (Stanbury *et al.*, 1995)

Lockwood *et al.* (1936) ได้ศึกษาพบว่า *Rhizopus oryzae* เป็นเชื้อราสายพันธุ์ที่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในอาหารเหลว และเปลี่ยนเป็นกรดแลกติกรูปแลค (L (+) lactic acid) จำนวนมาก เมื่อทำการหาสภาวะและสูตรอาหารที่เหมาะสมเพื่อผลิตกรดแลกติก พบว่าอาหารที่เหมาะสมประกอบด้วย (W/V) 15% glucose 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.06% KH_2PO_4 0.025% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ 5% CaCO_3 ซึ่งเติมลงไปเพื่อควบคุมความเป็นกรดเป็นด่าง ในสภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

Hang (1989) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งข้าวโพดของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 พบว่ามีค่าเฉลี่ยการผลิตเป็น 44 เปอร์เซ็นต์ ที่สภาวะความเข้มข้นของแป้งข้าวโพด 15 กรัมต่อลิตร โดยเขาที่ความเร็ว 240 รอบต่อนาที หมักเป็นเวลา 96 ชั่วโมง และเติม CaCO_3 หลังการหมักแล้ว 24 ชั่วโมง ซึ่งก่อนหน้านั้น Yu and Hang (1989) ได้รายงานถึงการผลิตกรดแลกติกจากการหมักแป้งข้าวโอ๊ต ข้าวบาร์เลย์ ข้าวเจ้า ข้าวโพด และแป้งมันสำปะหลัง โดยผลผลิตกรดแลกติกจะมีปริมาณมากเมื่อใช้ ข้าวเจ้า ข้าวโพด และแป้งมันสำปะหลัง เป็นแหล่งคาร์บอน คิดเป็นผลผลิตต่อการใช้สับสเตรต 56 55 และ 74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Soccol *et al.* (1994) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในอาหารแข็งโดยใช้ถัสดำแบบคอลลัมน์ ซึ่งอาหารแข็งประกอบด้วยขานอ้อยที่ถูกทำให้ชื้นด้วยสารละลายอาหารที่มีกลูโคส 180 กรัมต่อลิตร และแคลเซียมคาร์บอเนต โดยเลี้ยงเปรียบเทียบกับสภาวะอาหารเหลว พบว่าในอาหารแข็งสามารถผลิตกรดแลกติกสูงถึง 137 กรัมต่อลิตร มีอัตราการเกิดกรดแลกติกเท่ากับ 1.43 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ให้ปริมาณกรดฟูมาริกมากถึง 20.24 กรัมต่อลิตร และไม่มีเอทานอลเกิดขึ้น ส่วนในอาหารเหลวที่มีกลูโคส 120 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดแลกติก 93.8 กรัมต่อลิตร แต่ให้ปริมาณกรดฟูมาริกเล็กน้อยคือ 2.1 กรัมต่อลิตร และมีการผลิตเอทานอลในปริมาณน้อยมาก

Yang *et al.* (1995) พบว่า เชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 สามารถตรึงตัวเองเป็น Pellet ขนาด 1 มิลลิเมตรเมื่อใช้ไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเมื่อแยก pellet นี้ออกมาโดยใช้คอลลัมน์ PVP (poly-4-vinylpyridine) สามารถนำไปหมักเพื่อผลิตกรดแลกติกซ้ำได้ถึง 22 วัน

Kosakai *et al.* (1997) ได้ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตกรดแลกติก โดยการเติม mineral support 3 กรัมต่อลิตร และ polyethylene oxide 5 ppm ในอาหารเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus oryzae* พบว่าจะทำให้เส้นใยมีการกระจายตัวเพิ่มขึ้น ซึ่งลักษณะสัณฐานวิทยาที่เหมาะสมแก่การถ่ายเทมวลสาร ทำให้เชื้อได้รับอาหารและออกซิเจนอย่างพอเพียง ซึ่งมีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตสาร ทำให้ผลผลิตกรดแลกติกในระดับถังหมักที่มีกลูโคส 120 กรัมต่อลิตร เพิ่มสูงถึง 103.6 กรัมต่อลิตร โดยจะเพิ่มขึ้น 1.7 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่เติม mineral support และ polyethylene oxide ซึ่งให้ปริมาณกรดแลกติก 62.5 กรัมต่อลิตร

Yin *et al.* (1997) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดยใช้การหมักในอาหารเหลวของเชื้อ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ที่มีแป้งข้าวโพดที่ขยี้ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ถังหมัก Air-Lift พบว่าในสูตรอาหารที่มีแป้งข้าวโพด 120 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$ 1.35 กรัมต่อลิตร และแร่ธาตุอีกเล็กน้อย ให้ผลผลิตกรดแลกติก 102 กรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อเลี้ยงเปรียบเทียบในสูตรอาหารเดียวกันในถังหมัก Stirred Tank กับ Air-Lift นาน 4 วัน จะให้ผลผลิตกรดแลกติก 82 และ 92 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2.4.2 แหล่งไนโตรเจน

เซลล์จลินทรีย์ มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบประมาณ 8-10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง เชื้อราจะนำไนโตรเจนไปใช้ในการสังเคราะห์องค์ประกอบที่สำคัญภายในเซลล์เพื่อการเจริญเติบโต และการสร้างผลิตภัณฑ์ ประสิทธิภาพของการสร้างผลผลิตที่ดีแสดงให้เห็นถึงการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม เชื้อราสามารถใช้ได้ทั้งสารประกอบอินทรีย์ในโตรเจน และสารประกอบอนินทรีย์ในโตรเจน โดยทั่วไปจะสามารถใช้เกลือแอมโมเนียได้ดี ในการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา นิยมใช้สารประกอบอนินทรีย์ในโตรเจนพวกเกลือแอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมไนเตรต และแอมโมเนียมซัลเฟต สำหรับการใส่โซเดียมไนเตรต เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าทำให้เชื้อราเจริญเติบโตช้า (Prescott and Dunn, 1959) ส่วนแหล่งอินทรีย์ในโตรเจนนิยมใช้ ยูเรีย ซึ่งพบว่า ทำให้เชื้อราเจริญเติบโตได้ดีพอๆ กับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต (Waksman and Foster, 1938)

Waksman and Hutchings (1937) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเชื้อราจีส *Rhizopus* โดยใช้แหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันคือ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรต และแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต พบว่า เชื้อราใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีที่สุด

Yin *et al.* (1997) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 โดยใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อศึกษาแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ พบว่าเชื้อราใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เป็นแหล่งไนโตรเจนให้กรดแลกติกสูงสุด 95 กรัมต่อลิตร ขณะที่น้ำแช่ข้าวโพด ยีสต์สกัด และโพลีเปปไทด์ ให้กรดแลกติก 67 85 และ 90 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2.4.3 แร่ธาตุ

แร่ธาตุมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา ในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ของกระบวนการเมแทบอลิซึมสารคาร์โบไฮเดรต แร่ธาตุจะถูกเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในรูปของสารอนินทรีย์ การเพิ่มผลผลิตของกรดแลกติก ส่วนหนึ่งขึ้นอยู่กับ การควบคุมความเข้มข้นของแร่ธาตุให้เหมาะสม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์เชื้อรา และแหล่งอาหารที่ใช้ด้วย ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อการผลิตกรดแลกติกส่วนใหญ่เป็นอาหารสังเคราะห์ จึงจำเป็นต้องเติมแร่ธาตุลงไป ในอาหารโดยตรง ซึ่งแร่ธาตุหลักที่ใช้ได้แก่ แมกนีเซียม โพแทสเซียม และสังกะสี แต่การใช้สังกะสีที่ความเข้มข้นที่สูงจะทำให้เกิดสารพิษและการฆ่าเหล่าในเชื้อรา (Bilgrami and Verma, 1981)

Ward *et al.* (1936) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อราจีนิส *Rhizopus* จากสูตรอาหาร ซึ่งมีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และแมกนีเซียมซัลเฟต เป็นส่วนประกอบ และในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อรา เพื่อศึกษาการผลิตกรดแลกติกของ Waksman and Hutchings (1937) มีการใช้โคโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และเฟอร์ริกคลอไรด์ เป็นแหล่งแร่ธาตุ

Waksman and Foster (1938) ได้ศึกษาแหล่งแร่ธาตุที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก ที่แตกต่างกันคือ เหล็ก ทองแดง แมงกานีส สังกะสี โมลิบดีนัม และโบรอน พบว่า สังกะสีมีผลต่อการเจริญเติบโต และการผลิตกรดแลกติกของเชื้อราจีนิส *Rhizopus* มากที่สุด

2.4.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญ การสร้างสปอร์และการสืบพันธุ์ของเชื้อรา อุณหภูมิที่เหมาะสมโดยทั่วไป จะอยู่ในช่วง 25-40 องศาเซลเซียส สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Rhizopus oryzae* คือที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อราเจริญเร็วมาก แต่ผลผลิตกรดแลกติกต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Prescott and Dunn, 1959)

2.4.5 พีเอช

การควบคุมพีเอช ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ จะมีผลทำให้ผลผลิตสูงขึ้น การควบคุมพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อทำได้โดยการเติมสารประกอบบางอย่างลงไป เพื่อทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณการผลิตกรดแลกติกจะอยู่ในช่วง 5.6 ถึง 6.5 การควบคุมค่าพีเอช มีส่วนสำคัญที่จะช่วยให้การผลิตกรดแลกติกดำเนินต่อไปได้ สารเคมีที่เติมลงไปเพื่อควบคุมค่าพีเอช ได้แก่ แคลเซียมคาร์บอเนต โซเดียมไฮดรอกไซด์ และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (Yang *et al.*, 1995) ในการศึกษาของ Waksman and Foster (1938) พบว่าในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตเพื่อควบคุมความเป็นกรดเป็นด่าง จะมีผลทำให้ปฏิกิริยาในวิถีไกลโคไลซิสช้าลง และผลผลิตกรดแลกติกต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

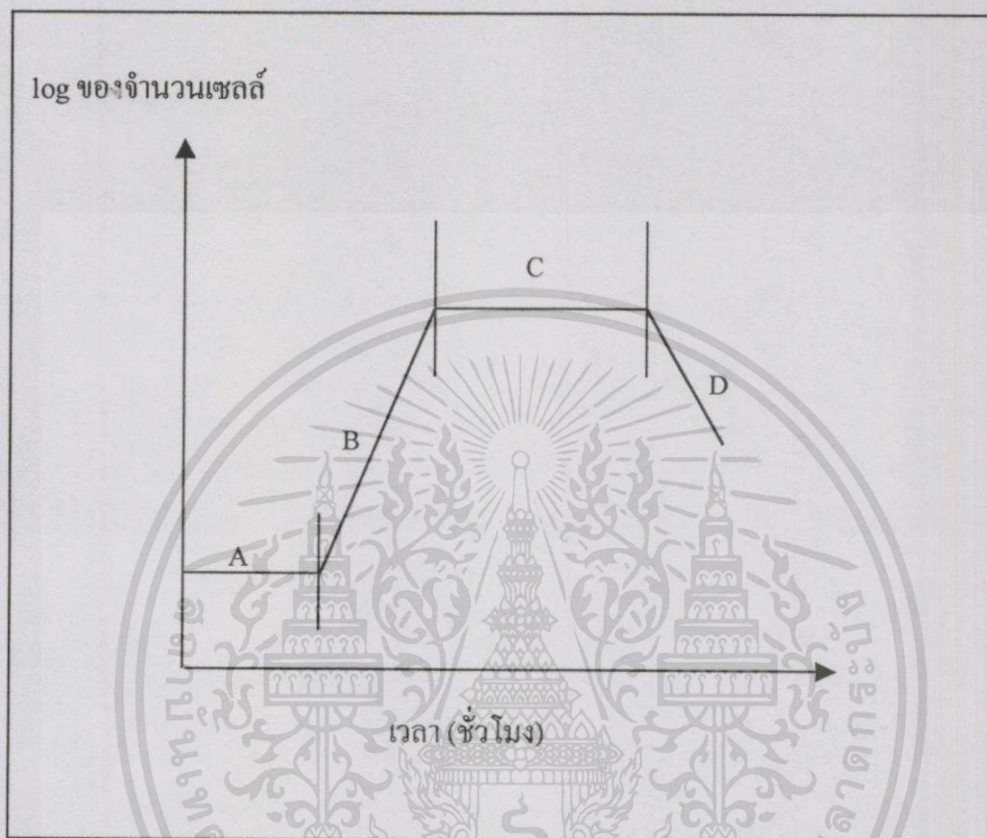
2.4.6 ปริมาณออกซิเจน

เชื้อราโดยทั่วไปใช้ออกซิเจนในการควบคุมอัตราการเจริญ และการผลิตสารเมแทบอลิต์ ออกซิเจนมีความสำคัญมากในกระบวนการหมักในอาหารเหลว ส่วนประกอบของอาหารบางอย่าง เช่น แป้ง หรือพอลิแซ็กคาไรด์อื่นๆ จะทำให้เกิดความหนืดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีผลต่อการให้อากาศ และการกวนผสม เนื่องจากอัตราการส่งผ่านออกซิเจนเข้าสู่เซลล์จะลดลง ดังนั้นในการใช้แป้งที่ความเข้มข้นสูงๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ควรทำการย่อยแป้งให้อยู่ในรูปที่เซลล์นำไปใช้ได้ทันที ซึ่งอาจใช้กรดหรือเอนไซม์

Soccol *et al.* (1994) ได้ศึกษาพบว่าในสภาวะไร้อากาศ การผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 จะลดลง และพบการผลิตเอทานอล ส่วนในสภาวะที่มีอากาศ ผลผลิตส่วนใหญ่ คือกรดแลกติก โดยมีกรดฟูมาริก และเอทานอล เกิดขึ้นเล็กน้อย

2.5 การหมักในอาหารเหลวแบบแบตช์ (Batch Fermentation)

batch fermentation เป็นกระบวนการหมักที่ทำโดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบปิด ซึ่งมีการเติมจุลินทรีย์จำนวนแน่นอนครั้งเดียวลงไป ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่กำหนดปริมาตรที่แน่นอน ไม่มีการเติมหรือการดึงอาหารออกมาในระหว่างการเพาะเลี้ยง จึงทำให้สภาพภายในถังหมักมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา (unsteady state) ซึ่งอัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะลดลงเป็นศูนย์เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อหมดลงหรือมีการสะสมของเสียที่เป็นพิษเกิดขึ้น การเพาะเลี้ยงแบบแบตช์นั้นสามารถทำกันในพลาสติกหรือในถังหมักก็ได้ โดยควบคุมให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม และเมื่อพิจารณาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์จุลินทรีย์ตามระยะเวลาของการหมักแบบแบตช์สามารถแบ่งรูปแบบการเจริญของจุลินทรีย์ ดังแสดงในภาพที่ 2.4



- A = Lag phase
 B = Log หรือ Exponential phase
 C = Stationary phase
 D = Death phase

ภาพที่ 2.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์จุลินทรีย์กับเวลา

ที่มา : Scragg (1991)

2.5.1 Lag phase

ระยะนี้เริ่มหลังจากมีการใส่เชื้อจุลินทรีย์ลงในอาหาร เป็นช่วงระยะเวลาที่เซลล์ต้องใช้ในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ ช่วงนี้เซลล์จะมีการขยายขนาดใหญ่ขึ้น และสังเคราะห์โพรโทพลาสต์ใหม่ แบคทีเรียจะมีการสังเคราะห์เอนไซม์ หรือ โคเอนไซม์ เพื่อใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม ส่วนเชื้อราที่อยู่ในรูปสปอร์ จะต้องใช้เวลาเพื่อให้สปอร์งอกเป็นโยรา ถ้าอยู่ในรูป pellet จะต้องใช้เวลาให้ pellet แยกออก และแพร่ไปทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งช่วงนี้เซลล์จุลินทรีย์จะยังไม่แบ่งตัว ไม่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่น้ำหนักของเซลล์อาจมีการเปลี่ยนแปลงได้ ระยะของ lag phase จะใช้เวลานานหรือน้อยขึ้นอยู่กับอายุของเซลล์จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ ความเหมาะสมของสภาพแวดล้อม และวิธีการเพาะเลี้ยง

2.5.2 Log phase หรือ Exponential phase

ระยะนี้เป็นระยะที่เซลล์มีการแบ่งตัว และเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ เซลล์จะมีองค์ประกอบทางเคมี กระบวนการเมแทบอลิซึม และสรีระวิทยาอื่นๆที่เหมือนกัน เป็นระยะที่เซลล์มีประสิทธิภาพสูงสุด อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ จะขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของสารอาหาร และสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ และค่าพีเอช เป็นต้น

ในระยะ log phase พบว่าในช่วงระยะเวลาสั้นๆ (dt) และการเพิ่มปริมาณของเซลล์ (dx) จะสัมพันธ์กับค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และความเข้มข้นของเซลล์ (x) ที่มีอยู่ในช่วงเวลานั้น ดังสมการ

$$\frac{dx}{dt} = \mu \cdot x \quad \dots \dots \dots (1)$$

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt}$$

x = ปริมาณเซลล์จุลินทรีย์ ($g\ l^{-1}$)

t = เวลา (h)

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, h^{-1})

เมื่ออินทิเกรต สมการที่ (1) จะได้

$$x_t = x_0 e^{\mu t} \quad \dots \dots \dots (2)$$

x_0 = ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น

x_t = ความเข้มข้นของเซลล์หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา t ชั่วโมง

e = ฐานของ natural logarithm

โดยค่า μ เป็นค่าคงที่เมื่อเซลล์อยู่ในช่วง log phase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อใส่ natural logarithm ในสมการ (2) จะได้

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu t$$

ดังนั้นเมื่อเขียนกราฟระหว่าง natural logarithm ของความเข้มข้นของเซลล์ กับเวลา จะได้กราฟเส้นตรงซึ่งมีความลาดเอียง (slope) เท่ากับอัตราการเจริญจำเพาะ (μ)

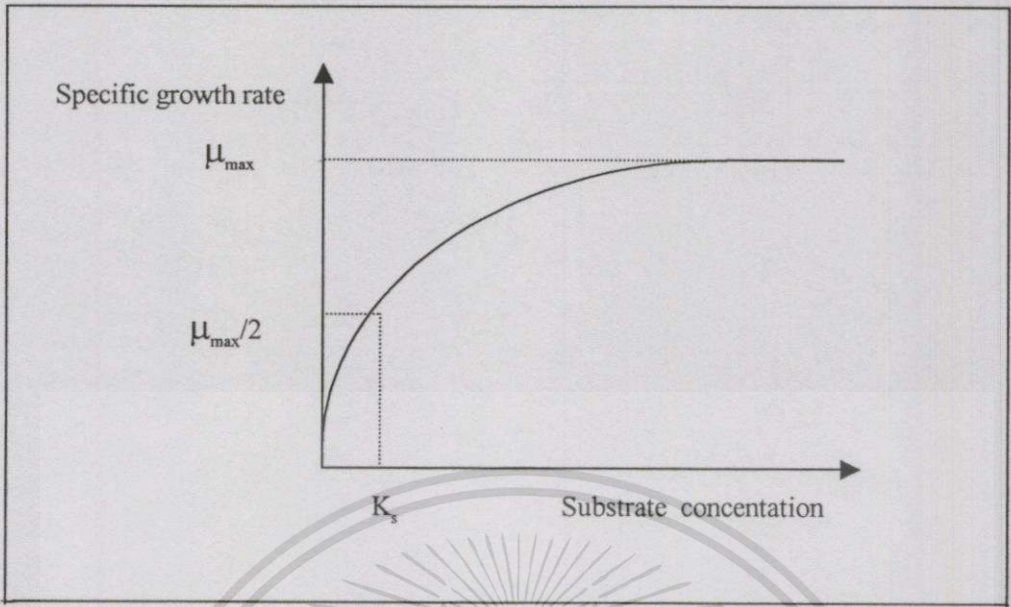
โดยทั่วไปค่า Specific growth rate จะขึ้นอยู่กับปัจจัย 3 อย่าง คือ ความเข้มข้นของสารอาหารที่จำกัด (limiting substrate, S) อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (Maximum specific growth rate, μ_{max}) และค่า substrate specific constant (K_s) ดังสมการ

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \dots\dots\dots(3)$$

$$\begin{aligned} \text{หรือ } r_x &= \frac{dx}{dt} \\ &= \mu_{max} \frac{S \cdot X}{K_s + S} \end{aligned}$$

- μ = อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate, h^{-1})
- μ_{max} = อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (Maximum specific growth rate, h^{-1})
- S = ความเข้มข้นของสารอาหาร ($g l^{-1}$)
- K_s = ความเข้มข้นของสารอาหารที่ทำให้อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ (μ) มีค่าเป็นครึ่งหนึ่งของอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของเชื้อนั้นๆ
($K_s = \mu_{max}/2$)
- r_x = อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ ($kg \text{ cells } m^{-3} h^{-1}$)

โดยสมการที่ 3 นี้เรียกว่าสมการโมนอด (Monod equation) ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญกับความเข้มข้นของสารอาหารในการเพาะเลี้ยงแบบแบดช์ ดังแสดงในภาพที่ 2.5 ซึ่งค่า K_s จะมีความสัมพันธ์กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์และสารอาหาร ค่า K_s โดยทั่วไปจะมีค่าต่ำ แสดงให้เห็นว่าจุลินทรีย์มีสัมพรรคภาพ (affinity) ต่อสับสเตรตสูงคืออัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะเริ่มลดลงก็ต่อเมื่อความเข้มข้นของสับสเตรตลดลงถึงระดับที่ต่ำมาก ส่วนอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของเชื้อ จะมีค่าแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์และสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง เช่น อุณหภูมิ เป็นต้น

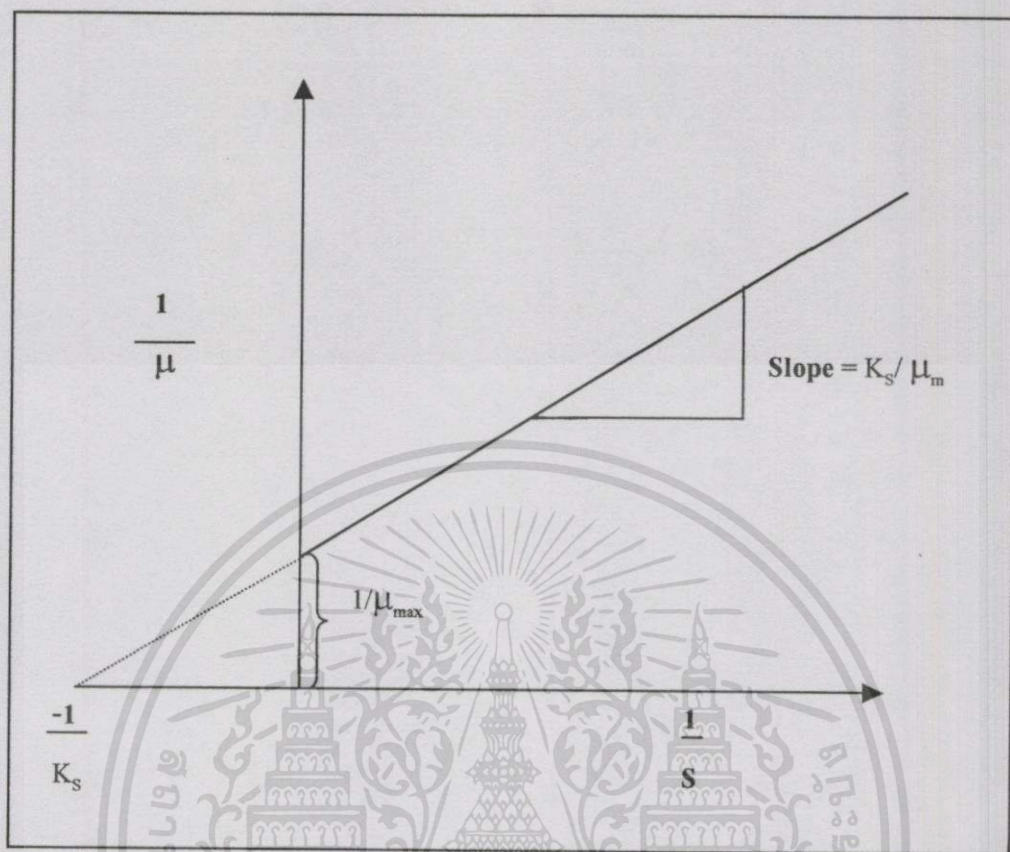


ภาพที่ 2.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) กับปริมาณความเข้มข้นของสารอาหาร (S)
ที่มา : Wang *et al.* (1979)

จากสมการของโมนอด อาจเขียนใหม่ให้คล้ายกับสมการ Lineweaver - burk ในปฏิกิริยาของเอนไซม์ ได้เป็นสมการ ดังนี้

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{\mu_m}$$

เมื่อสร้างกราฟระหว่าง $1/\mu$ กับ $1/[S]$ จะได้เส้นตรงที่มีความชันเท่ากับ K_s/μ_m และค่าที่ตัดแกน Y เท่ากับ $1/\mu_m$ ค่าที่ตัดแกน X เท่ากับ $-1/K_s$ ดังแสดงในภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $1/[S]$ กับ $1/\mu$

ที่มา : McNeil and Harvey (1990)

ในระยะ log phase เซลล์จุลินทรีย์จะมีการใช้สารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตของเซลล์คือการเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนแปลงขนาดของเซลล์ ขณะที่การสลายของสารอาหารบางประเภทในอาหาร จะใช้เป็นแหล่งพลังงานในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์เพื่อสร้างผลผลิตต่างๆ ซึ่งประสิทธิภาพของการเปลี่ยนสารอาหาร ไปเป็นเซลล์ หรือผลิตภัณฑ์ แสดงดังสมการ

$$\frac{dx}{dt} = -Y_{x/s} \frac{ds}{dt}$$

$Y_{x/s}$ คือ ปริมาณของเซลล์จุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น (ΔX) ต่อปริมาณสับสเตรคที่ถูกใช้ไป (ΔS) ในช่วงเวลาหนึ่ง

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S}$$

และ

$$\frac{dp}{dt} = -Y_{p/s} \frac{ds}{dt}$$

$Y_{p/s}$ คือ ปริมาณผลผลิตที่เพิ่มขึ้น (Δp) ต่อปริมาณสับสเตรคที่ถูกใช้ไป (ΔS) ในช่วงเวลาหนึ่ง

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta p}{\Delta S}$$

2.5.3 Stationary phase

หลังจากจุลินทรีย์เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในระยะ log phase ไปได้ระยะหนึ่งแล้ว อัตราการเจริญจะค่อยๆ ลดลง เข้าสู่ระยะ stationary phase ในระยะนี้อัตราการเจริญจะเท่ากับศูนย์ เป็นช่วงที่เซลล์มีปริมาณค่อนข้างคงที่ที่จุดสูงสุด นั่นคือ อัตราการเจริญจะเท่ากับอัตราการตายรวมกับการแตกสลายของเซลล์ การที่เซลล์ไม่เพิ่มปริมาณขึ้นอีกนั้นเกิดจากสารอาหารถูกใช้ไปจนหมด หรือมีการสะสมสารพิษที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ จุลินทรีย์ยังคงมีชีวิตอยู่โดยอาศัยอาหารที่เก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ จุลินทรีย์บางชนิดมีการสร้างสปอร์ขึ้นในระยะนี้

2.5.4 Death phase

เป็นระยะที่จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มลดลง อาจเนื่องมาจากการตายของเซลล์และการย่อยตัวเอง (autolysis) โดยเอนไซม์ภายในเซลล์ อัตราการตายของเซลล์จุลินทรีย์ จะใช้เวลาต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สแกนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการหมักแบบแบคทีเรียใช้ในการผลิตเซลล์จุลินทรีย์ในปริมาณมาก และการผลิตสารจากกระบวนการสร้างและสลายปฐมภูมิและทุติยภูมิ ในการผลิตเซลล์จะต้องปรับสภาพอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะกับการเจริญของจุลินทรีย์มากที่สุด สำหรับการผลิตสารจากกระบวนการสร้างและสลายปฐมภูมินั้นจะต้องปรับสภาพแวดล้อมเพื่อให้ระยะของ exponential phase นาน เพื่อให้มีการสะสมของผลิตภัณฑ์จากกระบวนการมากขึ้น และในกรณีที่ต้องการผลิตภัณฑ์จากกระบวนการสร้างและสลายทุติยภูมิจะต้องปรับสภาพแวดล้อมเพื่อให้ระยะของ exponential phase ต่ำลง และระยะของ stationary phase นานขึ้น หรือลดอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ในช่วง log phase เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์มีการสร้างสารจากกระบวนการสร้างและสลายทุติยภูมิเร็วขึ้น

ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ในปัจจุบันจะใช้วิธีการหมักในอาหารเหลว กระบวนการนี้มีข้อดี คือ ค่าใช้จ่ายด้านแรงงานต่ำ อัตราการผลิตกรดแลกติกสูง และสามารถควบคุมสภาวะต่างๆ ได้ดี การหมักในอาหารเหลวนิยมเลี้ยงจุลินทรีย์ ภายในถังหมัก (Bioreactor) ซึ่งถูกสร้างด้วยวัสดุพิเศษ นิยมสร้างขึ้นด้วยเหล็กกล้าไร้สนิม ที่ทนต่อความดันไอได้ดี และทนต่อการกัดกร่อนของกรดที่จะทำลายผิวด้านในถัง ซึ่งทำให้ไอออนของโลหะหลุดออกมาปนเปื้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้สูญเสียสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติก ขนาดและรูปร่างของถังหมักจะต้องออกแบบให้เหมาะสมกับงานที่ใช้ ถังหมักที่ใช้กันมีหลายขนาดตั้งแต่ขนาดความจุ 1-2 ลิตร ซึ่งนิยมใช้กันมากในห้องปฏิบัติการ จนถึงขนาด 5 10 25 50 และมากกว่า 100 ลิตร ซึ่งใช้ในการศึกษาการหมักในระดับขยายสเกลจากห้องปฏิบัติการสู่ระดับอุตสาหกรรม (วราวุฒิ และรุ่งนภา, 2532) ในการสร้างถังหมักที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา ต้องคำนึงถึงลักษณะการเจริญของเชื้อ เนื่องจากมักพบปัญหาการเจริญอย่างรวดเร็วของเชื้อจะแพร่กระจายทั่วบริเวณผิวหน้าของถังหมัก และภายในท่อและวาล์ว อาจทำให้เกิดการอุดตันภายในท่อ การฟุ้งกระจายของสปอร์และเจริญบริเวณแผ่นกรองอากาศจะทำให้แผ่นกรองเสื่อมสภาพเร็ว การเจริญของเชื้อที่ปกคลุมบริเวณเครื่องมือวัดจะทำให้ประสิทธิภาพการวัดของเครื่องมือชนิดนั้นๆ ลดลง ถังหมักจะต้องออกแบบเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีอุปกรณ์ที่จะควบคุมสภาวะภายในถังหมักให้เหมาะสม

2.6 ประโยชน์ของกรดแลกติก

2.6.1 อุตสาหกรรมอาหาร

กรดแลกติกและเกลือของกรดแลกติกนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเป็นกรดที่สามารถเกิดขึ้นได้ตามธรรมชาติ โดยเฉพาะในอาหารหมักประเภทหมักคอง นมเปรี้ยว ไข่กรอก และกิมจิ ในอาหารบางประเภทยานิยมเติมกรดแลกติก เพื่อเป็นสารให้กลิ่นรส ควบคุมความเป็นกรดเป็นด่างของอาหาร และป้องกันการเน่าเสีย ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 การใช้กรดแลกติกในอาหารชนิดต่างๆ

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

ที่มา : ปทุมพร (2536)

ในการถนอมอาหารกรดแลกติกจะใช้ร่วมกับกรดแอซิติก ทำให้มีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์มากขึ้น กลิ่นของกรดแลกติก เช่น โซเดียม และโพแทสเซียมแลคเตต นิยมเติมในอาหารแปรรูปประเภท เนื้อ ไข่ และอาหารทะเล เพื่อยืดอายุการเก็บ Adams and Hall (1988) ได้รายงานว่ากรดแลกติกสามารถป้องกันไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของเนื้อสัตว์จากเชื้อ *Salmonella enteritidis* และเชื้อ *E.coli* ได้ นอกจากนี้แคลเซียมแลคเตตยังเป็นสารที่นิยมเติมในเครื่องดื่ม กลีโอเร่ และเครื่องดื่มเสริมแคลเซียม เพื่อใช้เป็นแหล่งของแคลเซียม เช่น นม เนื่องจากกลิ่นนี้อยู่ในรูปเหมือนกับแลคเตตที่สังเคราะห์ในร่างกาย โดยที่แลคเตตจะปลดปล่อยพลังงานอย่างรวดเร็วผ่านทางเนื้อเยื่อของกล้ามเนื้อ และเร็วกว่าการให้พลังงานของกลูโคสประมาณ 2-10 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกรดซิตริก กรดแลกติกมีรสที่นุ่มนวลกว่าทำให้ไม่ไปบดบังกลิ่นรสหอมของอาหารนั้นๆ และมีคุณสมบัติในการควบคุมจุลินทรีย์ได้ดีกว่า (รวีวรรณ, 2533)

2.6.2 อุตสาหกรรมอื่นๆ

กรดแลกติกใช้เป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอาง และยาบางชนิด เพื่อใช้เป็นตัวปรับความเป็นกรดเป็นด่างของยา เป็นส่วนประกอบในการผลิตไหมละลายที่ใช้ในการเย็บแผล ในอุตสาหกรรมพลาสติกจะใช้ L (+) lactic acid ในการสร้าง Polylactic Acid (PLA) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ ที่ใช้ในการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Soccol et al., 1994) อุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น การฟอกย้อมเสื้อผ้า ช่วยให้สีย้อมติดผ้าได้ดี นอกจากนั้นกรดแลกติกยังนำไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดอินทรีย์อื่นๆ เช่น กรดโพรพิโอนิก และกรดแอซิติก เป็นต้น (Alidemirci et al., 1993) การใช้อนุพันธ์ของกรดแลกติกในทางการค้า แสดงตามตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ประโยชน์ของสารอนุพันธ์กรดแลกติกในทางการค้า

สารอนุพันธ์	การใช้
แคลเซียมแลกเตต	รักษาโรคขาดแคลเซียมของฟัน
คอปเปอร์แลกเตต	เป็นน้ำยาที่ใช้ชุบโลหะด้วยไฟฟ้า
ไอออนแลกเตต	รักษาโรคโลหิตจาง
โซเดียมแลกเตต	เป็นตัวอบ หรือเคลือบปิด ป้องกันความชื้น และป้องกันการถูกกัดกร่อนของวัสดุ
เอ็น-บิวทิลแลกเตต	เป็นตัวทำละลายในน้ำมันชักเงา
เอทิลแลกเตต	เป็นตัวทำละลายของไนโตรเซลลูโลสและเซลลูโลสอะซิเตต
เมทิลแลกเตต	เป็นตัวทำละลายของเซลลูโลสอะซิเตต

ที่มา : Altkinson and Mavituna (1991)

2.7 แป้งมันสำปะหลัง

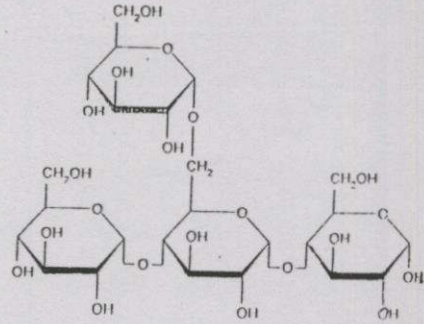
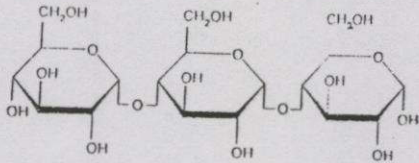
แป้งมันสำปะหลังผลิตจากส่วนหัวของมันสำปะหลัง มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Manihot esculenta Crantz* ในหัวมันสำปะหลัง มีแป้งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ถึง 75.77 เปอร์เซ็นต์ แป้งจัดเป็นสารจำพวกน้ำตาล โมเลกุลใหญ่ เป็นพอลิเมอร์ ของ α -D-glucose ประกอบไปด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ 2 ชนิด คือ อะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพคติน (amylopectin) ดังแสดงในภาพที่ 2.7 ซึ่งอะไมโลสประกอบด้วย โมเลกุลของกลูโคสที่ต่อกันเป็นลูกโซ่แถวยาวๆ ด้วย α -(1-4) glucosidic bond ไม่มีการแตกแขนง มีความยาวประมาณ 1,100-4,400 หน่วยกลูโคส มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ ทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนให้สีน้ำเงิน ส่วนอะไมโลเพคตินประกอบด้วย หน่วยของโมเลกุลกลูโคสที่ต่อกันด้วย α -(1-4) glucosidic bond ซึ่งมีการแตกแขนงทุก 25 หน่วยของกลูโคส ตรงตำแหน่งที่แตกแขนงต่อกันด้วย α -(1-6) glucosidic bond ละลายน้ำให้ colloidal solution และทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนให้สีน้ำตาล (Reed, 1975) แป้งมันสำปะหลังจัดว่ามีระดับอะไมโลสต่ำที่สุดในบรรดาแป้งด้วยกันคือมีประมาณ 16-18 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือเป็นอะไมโลเพคติน น้ำหนักโมเลกุลของอะไมโลส และอะไมโลเพคติน จะมีประมาณ 2.1×10^5 และ 3×10^5 ตามลำดับ (Johnson and Raymond, 1965) เมื่อเปรียบเทียบกับองค์ประกอบของแป้งมันสำปะหลังกับแป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียว และแป้งข้าวโพด พบว่า แป้งมันสำปะหลังจะมีองค์ประกอบของแป้งมากที่สุด คือ 86.2 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเส้นใยมากที่สุด คือ 2.2 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณโปรตีนในระดับที่ต่ำ คือ 1.1 เปอร์เซ็นต์ รองจากปริมาณโปรตีนของแป้งข้าวโพด (Wuleung et al., 1972)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรเวศน์บุรีรัมย์ ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อะไมโลเพคติน (Amylopectin)

อะไมโลส (Amylose)



ภาพที่ 2.7 โครงสร้างของอะไมโลส และอะไมโลเพคติน

ที่มา : Collins (1987)

ลักษณะโดยทั่วไปของแป้งมันสำปะหลัง (Whisler and Paschall 1965)

1. ลักษณะปรากฏ : แป้งในสภาวะที่แห้งจะมีสีขาว
2. ขนาด : โดยทั่วไปเมื่อนำไปผ่านตะแกรง 140 mesh (United States Number) จะต้องมีแป้งตกค้างอยู่ไม่เกิน 1 เปอร์เซ็นต์
3. กลิ่น : แป้งควรจะไม่มีกลิ่น ถ้ามีกลิ่นเปรี้ยวแสดงว่าเกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์
4. พีเอช : แป้งปกติจะมีพีเอชประมาณ 6.2 - 6.5
5. ความชื้น : ความชื้นของแป้งควรจะมีความประมาณ 12.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 61 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส ที่ความชื้นสูงถึง 18 เปอร์เซ็นต์อาจมีราขึ้น และทำให้แป้งเป็นก้อน และสีจะเปลี่ยนไป
6. เถ้า : แป้งที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์และเก็บรักษาที่สะอาดจะมีเถ้าต่ำกว่า 0.2 เปอร์เซ็นต์ ถ้ามากกว่านี้แสดงว่ามีทรายหรือฝุ่นละอองติดมา
7. สี : ส่วนที่สำคัญคือ สีของ paste ซึ่งโดยทั่วไปจะโปร่งแสง ถ้า paste มีสีฟ้าหรือสีเทาแสดงว่ามีธาตุเหล็กปนเปื้อนอยู่
8. การปนเปื้อน : สารปนเปื้อนส่วนใหญ่ ได้แก่ เปลือก ไฟเบอร์ ฝุ่นและแมลง แป้งควรมีการปนเปื้อนน้อยที่สุด
9. เนื้อเยื่อ (pulp) : ควรมี pulp หรือ root fiber ต่ำ
10. Acid Factor : Acid Factor คือ ปริมาณของกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล ที่ใช้ (หน่วยเป็นมิลลิลิตร) ในการไทเทรตกับน้ำแป้ง 25 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 3.0 ค่า Acid Factor ของแป้งไม่ควรเกิน 2.6
11. Cold Viscosity : ถ้ามีค่าสูงจะทำให้การกวนแป้งที่มีความเข้มข้นสูงทำได้ยาก
12. Hot Viscosity : ควรจะมี Viscosity ต่ำและมีความใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับบริการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.1. การแยกสลายแป้งด้วยน้ำ (Starch hydrolysis)

ในสภาวะปกติที่อุณหภูมิห้อง แป้งจะมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ เนื่องจากเม็ดแป้งจะมีการพอลิเมอร์ไรซ์ของลูกโซ่อะไมโลส หรืออะไมโลเพคตินอย่างใดอย่างหนึ่งด้วยพันธะไฮโดรเจน ทำให้เกิดสถานะต้านทานต่อการย่อยสลาย เมื่อนำแป้งมาละลายน้ำและเพิ่มความร้อน โมเลกุลของน้ำจะสามารถเข้าไปในโมเลกุลของแป้งได้ เพราะที่อุณหภูมิสูง ความร้อนสามารถแยกพันธะไฮโดรเจนออกทำให้ OH-group ที่อยู่ภายในโมเลกุลมีโอกาสจับกับน้ำแล้วพองตัวขึ้น ทำให้ความหนืดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และเกิดความใสมากขึ้น จนโมเลกุลแป้งพองตัวเต็มที่ และแตกออกทำให้ความหนืดลดลง เรียกอาการที่ปรากฏนี้ว่าการเกิดเจลาตินในเซชัน (gelatinization) อุณหภูมิที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์นี้เรียกว่าอุณหภูมิเจลาตินในเซชัน (gelatinization temperature) ปกติจะอยู่ที่อุณหภูมิ 55-80 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับชนิดของแป้ง สภาวะดังกล่าวจะทำให้ปฏิกิริยาต่างๆ ทั้งทางเคมี และทางกายภาพ รวมถึงกระบวนการย่อยแป้งกระทำได้ง่ายขึ้น เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเรื่อยๆ จะทำให้โมเลกุลของแป้งพองตัวเต็มที่และเบียดกันแน่น จนได้สารละลายที่เหนียวข้น (paste) การเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นต่อไป โมเลกุลของแป้งจะแตกออก ปล่อยอะไมโลสและอะไมโลเพคตินแพร่กระจายออกมา โมเลกุลของแป้งจะแตกตัวหมดโดยสมบูรณ์ที่อุณหภูมิประมาณ 100-160 องศาเซลเซียส (Knight, 1969)

การแยกสลายแป้งด้วยน้ำ มีกระบวนการสองขั้นตอนคือ

1. Liquefaction เป็นขั้นตอนเพื่อลดความหนืดของแป้งที่เจลาตินในซ้แล้ว โดยการย่อยโมเลกุลของแป้งแบบสุ่ม (random hydrolysis) ของลูกโซ่กลูโคส เมื่อการไฮโดรไลซ์เกิดขึ้นจะทำให้แยกเป็นเส้นสายสั้นๆ มีขนาดของโมเลกุลเล็กลง และมีความหนืดลดลง

2. Saccharification เป็นการไฮโดรไลซ์แป้งให้เป็นโมเลกุลของน้ำตาล ดังนั้นหลังการย่อยแล้วจะได้ monosaccharide หรือ disaccharide ซึ่งจะเกิดเป็นกลูโคส มอลโทส หรือ มอลโทไทรโอส

การย่อยแป้งทั้งสองกระบวนการ จะให้น้ำตาลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ กันขึ้นอยู่กับตัวเร่ง (catalyst) ที่ใช้ในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ซึ่งปกติจะใช้กรดหรือเอนไซม์ดังรายละเอียดต่อไปนี้ (Grace, 1977)

1. การย่อยแป้งด้วยกรด เป็นกระบวนการที่ใช้ความร้อนร่วมกับกรดชนิดต่างๆ กรดที่นำมาย่อยแป้ง เช่น กรดไฮโดรคลอริก (HCl) กรดคาร์บอนิก (H_2CO_3) กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) และ กรดไนตริก (HNO_3) โดยการทำให้สารละลายแป้งถูกปรับให้มีค่าเป็นกรดเป็นด่างเท่ากับ 1.5 - 2.0 แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้อุณหภูมิ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 20-30 นาที การย่อยแป้งด้วยกรดมีข้อเสีย คือ ถ้าเพิ่มการไฮโดรไลซ์ให้ได้กลูโคสมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งทั้งหมด จะเกิดสารพวก hydrol ทำให้มีรสขม และเกิดผลึกสีค่อนข้างดำ นอกจากนี้ยังต้องใช้เครื่องมือที่ทนกรดได้ดีอีกด้วย การย่อยแป้งด้วยกรดที่ความเข้มข้นของแป้งค่าประมาณร้อยละ 1 กรดจะสามารถย่อยแป้ง เป็นกลูโคสอย่างสมบูรณ์ แต่ถ้าความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้นของแป้งสูงขึ้นจะได้ปริมาณกลูโคสลดต่ำลง การย่อยแป้งด้วยกรดเป็นการย่อยอย่างไม่จำเพาะ และสามารถย่อยพันธะแอลฟา 1,4 ได้เร็วกว่าพันธะแอลฟา 1,6 การย่อยแป้งด้วยกรดอย่างไม่สมบูรณ์ จะได้สารละลายผสมของเดกซ์ทริน ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ มอลโทส และกลูโคส (Lloyd and Nelson, 1984)

2. การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ เป็นการย่อยที่มีความจำเพาะซึ่งจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของเอนไซม์ โดยเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล จะอยู่ในกลุ่มเอนไซม์อะไมเลส ที่สำคัญ ได้แก่ แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส โดยแอลฟาอะไมเลสจะย่อยแป้งให้เป็นเดกซ์ทริน ส่วนกลูโคอะไมเลสจะย่อยเดกซ์ทรินให้เป็นน้ำตาลมอลโทส และกลูโคส การใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้จำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิและพีเอชให้เหมาะสม เพื่อให้การทำงานของเอนไซม์มีประสิทธิภาพสูงสุด เอนไซม์เหล่านี้ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นต้องเก็บในขวดสีชาและที่อุณหภูมิค่าประสิทธิภาพของเอนไซม์จะตกลงถ้าเก็บไว้นานเกินไป (คุณฉวี, 2537)

กระบวนการ liquefaction และ saccharification อาจทำได้โดยใช้กรดหรือใช้เอนไซม์เพียงอย่างเดียว หรือใช้กรดร่วมกับเอนไซม์ก็ได้ การตรวจหาการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล จะใช้วิธีหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซิ่ง ซึ่งน้ำตาลรีดิวซิ่งนี้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณได้หลายวิธี เช่น วิธีของ A.O.A.C. (1975) วิธีของ Somogyi และ Nelson (Krzeczowska and Urbank, 1975) หรือวิธี Enzyme method (Kunst *et al.*, 1984) และวิธี Saccharification ของ Bernfeld (1955) ที่เรียกว่า DNS method

2.7.2 ประโยชน์ของแป้งมันสำปะหลัง (กล้าณรงค์, 2521)

2.7.2.1 อุตสาหกรรมกระดาษ จะใช้แป้งมันสำปะหลังในการจับผิวกระดาษเพื่อเพิ่มความเหนียว และความเรียบให้กับผิวหน้ากระดาษ ทำให้กระดาษมีความสวยงาม แข็งแรงมากขึ้น และป้องกันการซึมของน้ำหมึกและน้ำ ในกระดาษบางประเภทจะใช้เป็นตัวยึด และเพิ่มความหนาของกระดาษ

2.7.2.2 อุตสาหกรรมสิ่งทอ ใช้ในการชุบด้ายให้มีความลื่น เรียบ ไม่มีขนเวลาทอ และเพิ่มประสิทธิภาพในการยืดหยุ่นที่ลื่นขึ้น ในงานพิมพ์ผ้าทำให้ผ้าที่ทอมีความมันคง แข็งแรง ทนทานต่อการใช้งาน นอกจากนั้นจะใช้แป้งเพิ่มความสม่ำเสมอของสีพิมพ์ และป้องกันการเปรอะเปื้อนของผ้าพิมพ์ ตลอดจนใช้เพิ่มความเงางาม และความคงทนของเนื้อผ้า

2.7.2.3 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ในอาหารประเภทขนมสำเร็จรูป ก๋วยเตี๋ยว วุ้นเส้น และสาเก จะใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นส่วนผสมเพื่อลดต้นทุนการผลิต ใช้เพิ่มความข้นของซอส เพิ่มความแข็งให้ลูกกวาด เพิ่มความคงสภาพของไอศกรีม นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตผงชูรสและอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลกลูโคส และฟรักโทส ซึ่งนำไปใช้ในน้ำอัดลม และอาหารกระป๋อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สแกนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.2.4 อุตสาหกรรมไม้อัด ใช้เป็นส่วนผสมของกาวที่เป็นส่วนประกอบของไม้อัด ทำให้ไม้อัดมีความเสมอกันตลอดแผ่น และมีคุณภาพแข็งแรงทนทาน

2.7.2.5 อุตสาหกรรมแอลกอฮอล์ ปัจจุบันการผลิตแอลกอฮอล์จากแป้งมันสำปะหลัง เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง กำลังได้รับความสนใจ โดยมันสำปะหลัง 1 ตัน สามารถผลิตเป็นเอทานอลได้ 95 เปอร์เซ็นต์ หรือประมาณ 180 ลิตร



บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาคือ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 จากห้องปฏิบัติการของ Northern Regional Research Laboratory Peoria Illinois ประเทศสหรัฐอเมริกา จากนั้นจัดเก็บในสภาพ stock culture ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในอาหารผิวเอียงพีดีเอ (PDA) (ภาคผนวก ก.) โดยถ่ายเชื้อทุกๆ 3 เดือน

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

	บริษัทผู้ผลิต
- เครื่องเขย่า (Shaker)	Gallenkamp รุ่น SGM 300
- เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	Shimadzu รุ่น UV-1601
- เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)	TOA pH meter รุ่น HM-7E
- กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)	Nikon รุ่น YS2-H
- หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave)	HIRAYAMA รุ่น HA-3D
- เครื่องผสมหลอดทดลอง (Mixer)	Vortex Genie 2 รุ่น G-560E
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	WTB binder รุ่น FD53
- ชุดกรองมิลลิพอร์	Millipore Bedford รุ่น MA 01730
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	Sartorius รุ่น B-31005
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	Sartorius รุ่น A-2005
- ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow)	FASTER รุ่น Bio 48
- แผ่นนับเม็ดเลือด (Haemocytometer)	Bocco รุ่น Neubauer Bright Line
- กระดาษกรองเบอร์ 4	Whatman International Ltd.
- ถังหมักขนาด 5 ลิตร และชุดควบคุมการทำงาน	B. Braun Biotech International รุ่น BIostat-B
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)	Chermile รุ่น ZK 380
- ไมโครปิเปตต์ (Micropipette)	Nichiryo รุ่น 5000
- โถดูดความชื้น (Desiccator)	Wertheim รุ่น GL32
- เครื่องแก้วต่างๆ	Pyrex

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 สารสำหรับเตรียมอาหารและสารเคมีภัณฑ์

	บริษัทผู้ผลิต
- แอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$	Merck
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	Merck
- แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต $(MgSO_4 \cdot 7H_2O)$	Merck
- ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต $(ZnSO_4 \cdot 7H_2O)$	Merck
- ไดไนโตรซาลิไซลิกแอซิด (3, 5-Dinitrosalicylic acid)	Sigma
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	Merck
- โพแทสเซียมโซเดียมคาเตรต เตตระไฮเดรต $[COOK(CHOH)_2COONa \cdot 4H_2O]$	JT. Baker
- กลูโคส (D+) - Glucose Anhydrous	Fluka
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl)	Merck
- กรดไนตริก (HNO ₃)	Merck
- กรดซัลฟิวริก (H ₂ SO ₄)	Merck
- ทวิน 80 (tween 80)	Merck
- ลิเทียมแลกเตต $(C_3H_5O_3Li)$	Merck
- คอปเปอร์ซัลเฟต $(CuSO_4 \cdot 5H_2O)$	BDH chemicals
- แคลเซียมไฮดรอกไซด์ $[Ca(OH)_2]$	AJAX chemicals
- พาราไฮดรอกซีไดฟีนิล (<i>p</i> -Hydroxydipheny)	Fluka
- แคลเซียมคาร์บอเนต $(CaCO_3)$	Merck
- ฟีนอล (C_6H_5OH)	Farmitalia carloerba
- แป้งมันสำปะหลัง (cassava starch) ตราปลา 4 คาว	อี. ที. ซี. เอียบตงจัน จำกัด

3.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงมาจากวิธีของ Hang *et al.* (1989) (ภาคผนวก ก.)
ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

เป็งมันสำปะหลัง (ที่ย่อยแล้ว)	120	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$	2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.6	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต $(MgSO_4 \cdot 7H_2O)$	0.25	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต $(ZnSO_4 \cdot 7H_2O)$	0.04	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต $(CaCO_3)$	60	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นแคลเซียมคาร์บอเนต $(CaCO_3)$ ผสมเข้าด้วยกัน ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 6.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ $(NaOH)$ แบ่งใส่ฟลาสก์ (baffled flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณ 50 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วเติมสารละลายสปอร์แขวนลอยเพื่อทำการหมักต่อไป แคลเซียมคาร์บอเนต $(CaCO_3)$ นำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 3 กรัมต่อฟลาสก์ โดยเติมหลังจากทำการหมักแล้ว 24 ชั่วโมง

3.5 วิธีดำเนินการวิจัย

3.5.1 การศึกษาการย่อยเป็งมันสำปะหลังด้วยกรด

เป็งมันสำปะหลังจะถูกนำไปทดสอบการย่อยด้วยกรด 3 ชนิด คือ กรดไฮโดรคลอริก (HCl) กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) และกรดไนตริก (HNO_3) โดยเติมกรดที่มีความเข้มข้น 3 นอร์มอล ลงในเป็งที่มีความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ จนมีค่าพีเอชเท่ากับ 2.0 จากนั้นนำไปให้ความร้อน โดยหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที ทิ้งให้เย็นแล้ว นำมาหาค่าตาลรีดิวซ์ ที่ได้จากการย่อยเป็งมันสำปะหลังด้วยกรด นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยเป็งมันสำปะหลังด้วยกรดที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด มาวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลที่ได้จากการย่อย โดยใช้วิธีการ Ascending Paper Chromatography ที่ดัดแปลงมาจาก Hough (1954) โดยเปรียบเทียบสารละลายน้ำตาลตัวอย่างที่ได้กับสารละลายมาตรฐาน ได้แก่ กลูโคส มอลโทส ไอโซมอลโทส มอลโทไตรโอด และไอโซมอลโทไตรโอด

3.5.2 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395

ถ่ายสปอร์ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ที่เจริญบนอาหารผิวแข็งพีดีเอ (PDA) (ภาคผนวก ก.) มาเลี้ยงในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA 60 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 7 วัน จากนั้นถ่ายสปอร์ออกจากพลาสติกด้วยสารละลายฟีน 80 เข้มข้น ร้อยละ 0.05 แล้วกรองเส้นใยออกโดยผ่านสำลีที่วางบนกรวยแก้วที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นับจำนวนสปอร์ด้วย แผ่นนับเม็ดเลือด (Haemocytometer) โดยทำให้สารละลายสปอร์แขวนลอย มีความเข้มข้น 1.0×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เติมสารละลายสปอร์แขวนลอยนี้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จำนวน 1 มิลลิลิตรต่อพลาสติก ซึ่งจะมีปริมาณสปอร์เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเข้มข้น 2×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

3.5.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในระดับพลาสติกเขย่า

3.5.3.1 ศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากสูตรคัดแปลงของ Hang *et al.* (1989) ตามข้อ 3.4 เพื่อศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม โดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดที่เหมาะสมที่ให้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดจากข้อ 3.5.1 มาศึกษาที่ความเข้มข้นต่างๆ กันดังนี้ คือ 50 100 120 150 และ 180 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุกวัน เพื่อวิเคราะห์ค่าพีเอช กรดแลกติก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.5.3.2 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดจากข้อ 3.5.3.1 เพื่อศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน โดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น ต่างๆกันดังนี้คือ 0 1.0 2.0 และ 3.0 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุกวัน เพื่อวิเคราะห์ค่าพีเอช กรดแลกติก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.5.3.3 ศึกษาความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้แป้งมันสำปะหลังและแหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นเหมาะสม ที่ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดจากข้อ 3.5.3.2 เพื่อศึกษาความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) โดยใช้ความเข้มข้นที่ต่างๆกันดังนี้ คือ 0 0.3 0.6 และ 1.0 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุกวัน เพื่อวิเคราะห์ค่าพีเอช กรดแลกติก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.5.3.4 ศึกษาปริมาณสปอร์เริ่มต้น

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้แป้งมันสำปะหลัง แห้งในโตรเจนและโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต(KH_2PO_4) ที่มีความเข้มข้นเหมาะสม ที่ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดจากข้อ

3.5.3.3 มาศึกษาปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตแลกติก โดยให้ปริมาณสปอร์เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีความเข้มข้นต่างกักันดังนี้คือ 2×10^4 2×10^5 2×10^6 และ 2×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุกวัน เพื่อวิเคราะห์ค่าพีเอช กรดแลกติก น้ำตาลรีดิวซ์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.5.3.5 ศึกษาการเจริญของเชื้อและการผลิตกรดแลกติกในระดับฟลาस्कเขย่า

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยใช้สูตรอาหารและปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่มีความเข้มข้นเหมาะสมที่ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดจากข้อ 3.5.3.4 มาศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญของเชื้อที่มีต่อการผลิตกรดแลกติก โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ค่าพีเอช กรดแลกติก น้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.5.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในระดับถังหมักแบบแบคซ์

3.5.4.1 ขั้นตอนการเตรียมถังหมัก

3.5.4.1.1 ทำการปรับค่าพีเอช (pH-Calibration) ของ pH-electrode ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7.00 และสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4.01 ควรตรวจสอบประสิทธิภาพของ pH-electrode ทุกครั้ง จากค่าของ Zero และ Slope ซึ่งควรอยู่ในช่วงที่กำหนดไว้ โดย Zero มีค่าเท่ากับ -30 ถึง +30 mV และค่า Slope มีค่าเท่ากับ 54 ถึง 60 mV/pH

3.5.4.1.2 เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในถังหมัก แล้วปิดส่วนบนของถังหมักให้เรียบร้อย

3.5.4.1.3 ทำการปรับค่า DO-electrode (DO - Calibration) โดยปรับค่า DO ไปที่ 0 เปอร์เซ็นต์ออกซิเจนโดยใช้แก๊สไนโตรเจนเข้าไปแทนที่ และปรับค่า DO ไปที่ 100 เปอร์เซ็นต์ออกซิเจน โดยเป่าอากาศเข้าสู่ถังหมักในสภาวะเดียวกับการทดลองจริงจนปริมาณอากาศในถังหมักคงที่ จึงปรับค่า 100 เปอร์เซ็นต์ออกซิเจน ตรวจสอบค่าของ Zero และ Slope โดย Zero ควรอยู่ในช่วง 0 ถึง +15 nA และค่า Slope ควรอยู่ในช่วง 25 ถึง 200 nA

3.5.4.1.4 ติดตั้ง exhaust cooler ที่ประกอบด้วยขวดพักอากาศ เสียบสายเก็บตัวอย่างที่ประกอบเข้าด้วยกันขวดพักตัวอย่าง เข้ากับท่อเก็บตัวอย่าง และเสียบสายส่งอากาศเข้าท่อส่งอากาศ

3.5.4.1.5 ต่อระบบส่งน้ำ เพื่อเติมน้ำจากถัง Cooler เข้าสู่ Jacket ของถังหมักโดยวิธี

Fill Thermostat

3.5.4.1.6 หนีบสายต่างๆ ที่สามารถจะเป็นทางออกของอาหารขณะทำการฆ่าเชื้อ โดยแรงดันภายในถึงจะออกมาจาก exhaust cooler ที่อยู่ด้านบนถึงหมักส่วนแรงดันภายใน Jacket จะออกมาทางสายท่อด้านข้างถึงหมัก ที่เป็นทางเข้าออกของน้ำหล่อเย็น

3.5.4.1.7 ปิดปลายสายต่างๆ และปลาย electrode ถอดมอเตอร์ไบพัดออก ก่อนนำไปฆ่าเชื้อ ภายในหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วต่อระบบเข้ากับเครื่องควบคุมการทำงาน

3.5.4.1.8 เติมปริมาณสปอร์เริ่มต้นเพื่อทำการหมัก และตั้งสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง ได้แก่ อุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ และอัตราการกวนของไบพัด

3.5.4.2 ศึกษาอัตราการกวนและการให้อากาศที่เหมาะสม

เตรียมถังหมักตามขั้นตอนต่างๆ ตามข้อ 3.5.4.1 โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด จากการทดลองในข้อ 3.5.3 ปริมาตร 2.5 ลิตร ลงในถังหมักขนาดความจุ 5 ลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ทิ้งให้เย็น แล้วทำการหมัก โดยเติมสารละลายสปอร์เริ่มต้นจำนวน 125 มิลลิลิตร (5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v)) โดยทำให้ปริมาณสปอร์เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้น 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาศึกษาอัตราการกวนที่ระดับต่างๆ กันคือ 200 300 และ 400 รอบต่อนาที โดยใช้อัตราการให้อากาศที่ระดับต่างๆ กันคือ 0.5 1.0 และ 1.5 วีวีเอ็ม (วีวีเอ็ม หมายถึง ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที) ควบคุมอุณหภูมิในถังหมักให้คงที่ที่ 30 องศาเซลเซียส เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ที่อบฆ่าเชื้อแล้ว 60 กรัมต่อลิตร ลงในถังหมัก ภายหลังจากการหมักแล้ว 24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลานาน 5 วัน เพื่อวิเคราะห์หาค่าพีเอช ปริมาณกรดแลกติก น้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักรีดแลคต์แห้ง

3.5.4.3 การศึกษาการเจริญของเชื้อและการผลิตกรดแลกติกในระดับถังหมัก

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.5.4.2 โดยใช้อัตราการกวนและอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมที่ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด มาศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญของเชื้อและการผลิตกรดแลกติก โดยจะทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลานาน 7 วัน เพื่อวิเคราะห์หาค่าพีเอช ปริมาณกรดแลกติก น้ำตาลทั้งหมด และน้ำหนักรีดแลคต์แห้ง

3.6 การวิเคราะห์

3.6.1 การวิเคราะห์กรดแลกติก

ตามวิธีของ Baker and Summerson (1941)

สารเคมีที่ใช้

- สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 20 เปอร์เซ็นต์ และ 3 เปอร์เซ็นต์
- ผงแคลเซียมไฮดรอกไซด์ [$\text{Ca}(\text{OH})_2$]
- สารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4)
- สารละลายพาราไฮดรอกซีไดฟีนีล (*p*-Hydroxydipheny) 1.5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยละลายผงพาราไฮดรอกซีไดฟีนีล ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH) 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

- สารละลายลิเทียมแลกเตต($\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3\text{Li}$) มาตรฐาน เตรียมโดยใช้สารละลายลิเทียมแลกเตต ความเข้มข้นต่างๆ กันดังนี้ คือ 20 40 60 80 100 และ 120 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณสารละลายลิเทียมแลกเตตกับค่าดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร(ภาพที่ ข1)

วิธีการ

- นำสารตัวอย่างปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมผงแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ปริมาณ 1 กรัม เขย่าแรงๆ ให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่า ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลานาน 30 นาที

- นำสารละลายที่ได้ไปปั่นที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่ออนาที เป็นเวลานาน 5 นาทีจากนั้นดูดสารละลายที่เป็นส่วนที่ใสมาปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เติมนลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร (หรือ 1 หยด)

- นำหลอดทดลองที่ได้ไปแช่ในอ่างน้ำแข็ง เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร อย่างช้าๆ ด้วยปิเปตต์หรือบิวเรต เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาทีทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

- หยดสารละลายพาราไฮดรอกซีไดฟีนีล 1.5 เปอร์เซ็นต์ 2 หยด เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลานาน 90 วินาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

- นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น Blank

3.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing Sugar)

ตามวิธีการของ Bernfeld (1955)

สารเคมีที่ใช้

- สารละลายกรดไคนโตรซาลิไซลิก (DNS reagent) เตรียมโดยละลาย 1 กรัมของกรดไคนโตรซาลิไซลิก ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตรเติมโพแทสเซียมโซเดียมตาเตรต [$\text{COOK}(\text{CHOH})_2\text{COONa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] 30 กรัม ทำปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

- เติมน้ำตาลละลายกรดไคนโตรซาลิไซลิก ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในสารตัวอย่างที่มี ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมน้ำ กลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ น้ำกลั่นเป็น Blank เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้กลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 0.2-2.0 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณน้ำตาลกลูโคสกับค่าดูดกลืนแสง (ภาพที่ ข2)

3.6.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี phenol - sulfuric acid

ตามวิธีการของ Dubois *et al.* (1956)

สารเคมีที่ใช้

- กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Conc. H_2SO_4)
 - สารละลายฟีนอลเข้มข้นร้อยละ 5 เตรียมโดยละลายฟีนอล (C_6H_5OH) 5 กรัมในน้ำกลั่น เติมน้ำจนมีปริมาตร 100 มิลลิลิตร

วิธีการ

- เติมน้ำตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาล 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองโดยใช้น้ำ กลั่น 1 มิลลิลิตร เป็น Blank
 - เติมน้ำตาลละลายฟีนอลร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแช่หลอดทดลองใน น้ำเย็น
 - เติมน้ำกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้ว เขย่าอีกครั้ง
 - ตั้งทิ้งต่อไปอีกประมาณ 20 นาทีนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโน เมตร เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้กลูโคสมาตรฐานเข้มข้น 20 - 100 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร เขียน กราฟมาตรฐานระหว่างน้ำตาลกลูโคสกับค่าดูดกลืนแสง (ภาพที่ ข3)

3.6.4 การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ คัดแปลงมาจากวิธีของ Rosenberg *et al.* (1992)

นำตัวอย่างปริมาตร 20 มิลลิลิตร มากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 ที่ทราบน้ำหนักเพื่อ แยกส่วนเส้นใยออกจากส่วนน้ำใส ถ้างตะกอนเคลือบคาร์บอนेट ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 โมลาร์ จนกระทั่งตะกอนละลายหมด ถ้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.6.5 การวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง

นำน้ำหมักที่กรองได้มาวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.6.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในระดับขวด เหย้าใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Complete Randomized Design) ส่วนในระดับถังหมักใช้แผนการทดลองแบบ Factorial Experiment in CRD หลังจากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 5 เปอร์เซ็นต์ (สุรพล, 2528)

3.6.7 การวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาล โดยวิธี Ascending Paper Chromatography

ดัดแปลงมาจาก Hough (1954)

สารเคมี

1. สารละลายที่เป็นตัวพา (Solvent) ได้แก่ บิวทานอล / ไพรีดีน / น้ำ (6:4:3 โดยปริมาตร)
2. สารละลายที่ทำให้เกิดสี (Developing solution)

2.1 สารละลายอิมิตัวของซิลเวอร์ไนเตรต เตรียมโดยการเติมสารละลายอิมิตัวของซิลเวอร์ไนเตรต (AgNO_3) 0.1 มิลลิลิตร ในอะซีโตน (Acetone) 20 มิลลิลิตร ถ้าภายหลังจากการเติมได้สารละลายที่ขุ่นขาว ให้เติมน้ำกลั่นที่สะอาดจนได้สารละลายใส

2.2 0.5 โมลาร์ ของ โซเดียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอล เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2.0 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตรเล็กน้อย แล้วจึงเติมเมทานอลให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.3 โซเดียมไทโอซัลเฟตเข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 5.0 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร หรือ ละลายไทโอซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 7.8 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร (สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง)

วิธีการ

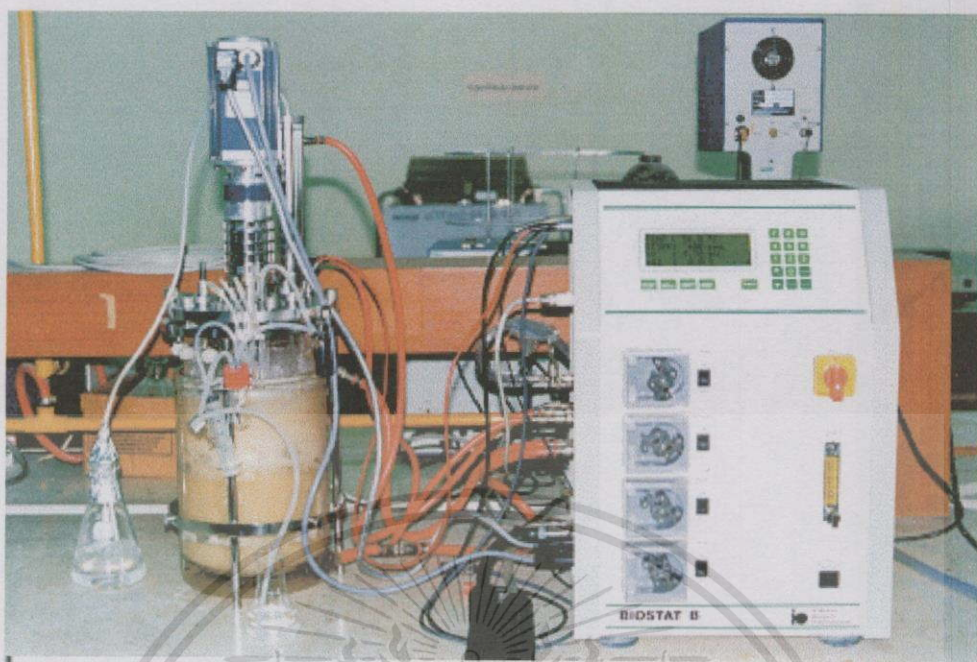
1. หยดสารละลายน้ำตาลตัวอย่างที่ได้จากการย่อยด้วยกรด และสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บนเส้นเดินสอที่ลากบนปลายกระดาษโครมาโตกราฟี เบอร์ 3 (Whatman No. 3) โดยแต้มให้เป็นจุดเล็กๆ

2. นำกระดาษโครมาโตกราฟีจากข้อ 1 มาใส่ในแชมเบอร์ (chamber) ที่มีตัวพา (solvent) ปล่อยให้ตัวพาเคลื่อนที่ซึมไปตามกระดาษ ที่อุณหภูมิห้องนาน 15-25 ชั่วโมง

3. นำกระดาษออกจากแชมเบอร์ไปตากให้แห้งในตู้ควัน (fume hood) ต่อไปนี้จะเรียกว่าโครมาโตแกรม (Chomatogram)

4. จุ่มโครมาโตแกรมที่แห้งในสารละลายอิมิตัวของซิลเวอร์ไนเตรต แล้วจึงทำให้แห้งในตู้ควัน ฟัน 0.5 โมลาร์ ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ในเมทานอล ลงบนโครมาโตแกรม จนเห็นจุดสีน้ำตาลบนกระดาษ แล้วปล่อยให้แห้ง

5. จากนั้นนำโครมาโตแกรมที่แห้ง แช่ในสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟต ความเข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ เพื่อลดสีของฉลากหลัง



ภาพที่ 3.1 การผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 5 ลิตร



ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการศึกษาการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

การศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยกรด โดยใช้กรดที่แตกต่างกัน 3 ชนิด คือ กรดไฮโดรคลอริก(HCl) กรดไนตริก(HNO₃) กรดซัลฟิวริก(H₂SO₄) และตรวจหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นหลังจากการย่อยด้วยกรด โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) เพื่อหาความสามารถในการย่อยแป้ง ซึ่งพบว่าในสารละลายแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ แป้งที่ย่อยด้วยกรดทั้ง 3 ชนิดมีค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใกล้เคียงกัน โดยแป้งที่ย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกมีค่าเฉลี่ยน้ำตาลรีดิวซ์ 17.81 และ 35.65 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แป้งที่ย่อยด้วยกรดไนตริกมีค่าเฉลี่ยน้ำตาลรีดิวซ์ 16.92 และ 33.97 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และแป้งที่ย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกมีค่าเฉลี่ยน้ำตาลรีดิวซ์ 16.50 และ 34.36 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากค่าทางสถิติจะเห็นว่าแป้งที่ย่อยด้วยกรดทั้ง 3 ชนิดมีค่าเฉลี่ยน้ำตาลรีดิวซ์ที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงในตารางที่ 4.1

จากผลการทดลองพบว่าภายหลังการย่อยแป้ง โดยใช้กรดทั้ง 3 ชนิด สารละลายน้ำตาลที่ได้ค่อนข้างขุ่น และเกิดตะกอนแขวนลอยมาก เมื่อนำสารละลายน้ำตาลที่ได้มาวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลโดยวิธี Ascending Paper Chromatography พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จะเป็นสารละลายผสมของน้ำตาลซึ่งได้แก่ กลูโคส มอลโทส มอลโทไตรโอส และน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ ดังแสดงในภาพที่ 4.1 ทั้งนี้เนื่องจากในกระบวนการย่อยแป้งด้วยกรดนั้น จะมีความเฉพาะเจาะจงน้อยกว่าการใช้เอนไซม์ โดยกรดจะย่อยพันธะต่างๆเป็นแบบสุ่มทั่วทั้งโมเลกุล ทำให้แป้งถูกย่อยไม่หมด การย่อยแป้งด้วยกรดอย่างไม่สมบูรณ์ จะได้สารละลายผสมของเดกซ์ทริน(dextrin) ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ มอลโทส และกลูโคส (Lloyd and Nelson, 1984) ในการศึกษาการผลิตกรดอินทรีย์ โดยเชื้อ *Aspergillus terreus* TN-484 ของ Yahiro *et al.* (1997) โดยใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดไนตริกเป็นสับสเตรต เมื่อปรับค่าพีเอชของสารละลายแป้งข้าวโพดให้มีค่าแตกต่างกันด้วยกรดไนตริก แล้วนำไปหาชนิดของน้ำตาลภายหลังการย่อยด้วยวิธี Paper Chromatography พบว่าสารละลายแป้งข้าวโพดที่มีค่าพีเอชต่ำ ความสามารถในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลจะเพิ่มขึ้น คือค่าพีเอช 1.5 แป้งข้าวโพดจะถูกย่อยได้ กลูโคส และมอลโทสเป็นส่วนใหญ่ และค่าพีเอช 2.0 จะพบกลูโคส มอลโทส และโอลิโกแซ็กคาไรด์ ส่วนสารละลายแป้งข้าวโพดที่มีค่าพีเอช 1.0 จะพบเฉพาะ กลูโคส แต่เมื่อนำสารละลายแป้งข้าวโพดที่มีค่าพีเอช 1.0 มาหมักเพื่อผลิตกรดพบว่าจะให้ปริมาณกรดอินทรีย์ต่ำ ซึ่งอาจจะเกิดจากมีองค์ประกอบของสารบางชนิดที่เกิดขึ้นจากการย่อยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ นอกจากนี้ความสามารถในการย่อยแป้งด้วยกรดยังขึ้นอยู่กับปัจจัย

หลายอย่าง เช่น ความเข้มข้นของแป้ง ถ้าความเข้มข้นต่ำประมาณร้อยละ 1 กรดสามารถย่อยแป้งเป็นกลูโคสได้อย่างสมบูรณ์ แต่ถ้าความเข้มข้นของแป้งสูงขึ้น จะได้ปริมาณกลูโคสลดต่ำลง (Mermelstein, 1975) แต่อย่างไรก็ตาม ในการหมักในห้องปฏิบัติการที่มีการใช้แป้งเป็นสับสเตรดที่ประสบปัญหาเรื่องความหนืดของแป้ง นิยมการย่อยแป้งด้วยกรด เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวกรวดเร็วและไม่ยุ่งยากซับซ้อน

ในกระบวนการหมักอาหารเหลวที่ใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น นิยมใช้แป้งในสภาพเจลาตินไนซ์ เนื่องจากแป้งดิบจะมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ และคงทนต่อปฏิกิริยาทางเคมี ทำให้มีความต้านทานต่อการย่อยที่อุณหภูมิห้อง การให้ความร้อนแก่แป้ง จะทำให้โมเลกุลของแป้งเกิดการขยายตัว ทำให้จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายแล้วนำน้ำตาลไปใช้ได้ง่ายขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม แป้งที่มีความเข้มข้นสูงๆ จะมีความหนืดมาก ซึ่งจะให้อัตราการส่งผ่านออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ลดลง ทำให้มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ การย่อยแป้งด้วยการเติมกรด แล้วให้ความร้อนแก่แป้ง จึงเป็นกระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล โดยโมเลกุลของแป้งจะถูกตัดออกเป็นโมเลกุลเล็กๆ และผลผลิตสุดท้ายจะได้กลูโคส ซึ่งเซลล์นำไปใช้ได้ (Bonner *et al.*, 1965)

Huss (1991) ได้ทำการทดลองย่อยแป้งมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปรับสารละลายแป้งมันสำปะหลังให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 1.8 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 3 นอร์มอล นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส สามารถวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด 48.5 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 13 ของการย่อย การใช้ความร้อนที่สูงขึ้น ภายใต้ความดันจะทำให้ลดระยะเวลาการย่อยแป้งได้ Yin *et al.* (1997) ได้ย่อยแป้งข้าวโพดโดยเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 นอร์มอลจนค่าพีเอชของแป้งข้าวโพดเท่ากับ 2.0 นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันเป็นเวลา 20 นาที ทำการศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 โดยใช้แป้งข้าวโพด 120 กรัมต่อลิตรเป็นสับสเตรด ซึ่งจากการศึกษาพบว่าการใช้กรดไฮโดรคลอริกและเอนไซม์ แอลฟาอะไมเลสย่อยแป้งข้าวโพด จะให้ผลผลิตกรดแลกติกใกล้เคียงกัน คือ 95.1 และ 98.2 กรัมต่อลิตรตามลำดับ Menezes (1978) ได้ทดลองใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ย่อยแป้งมันสำปะหลังในอัตราส่วน 3 ต่อ 1 ภายใต้ความดัน พบว่านำมาหมักได้ปริมาณแอลกอฮอล์สูง

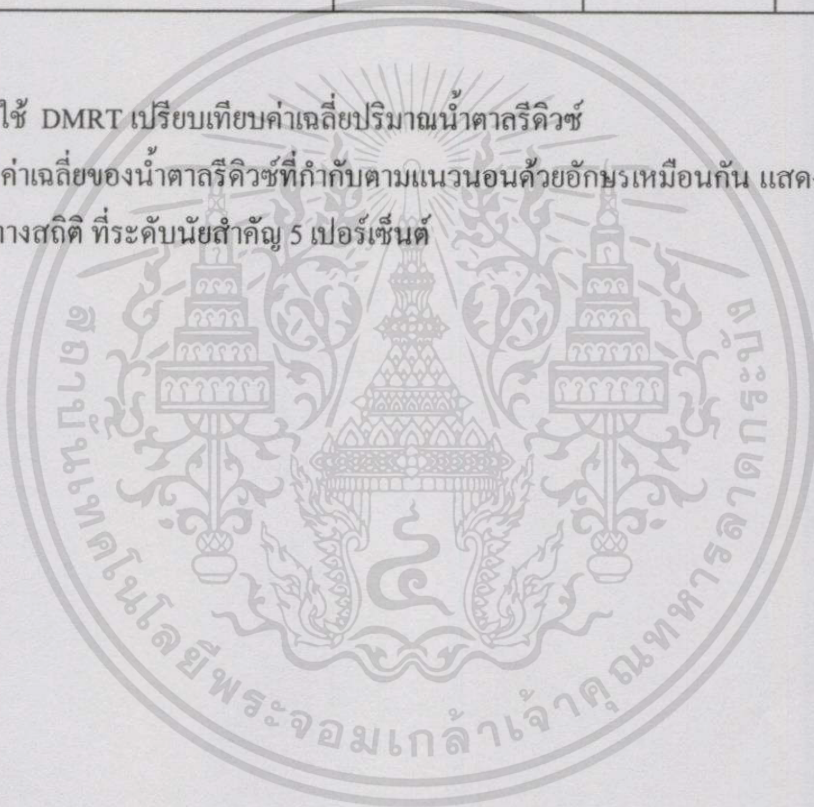
การผลิตน้ำตาลในระดับอุตสาหกรรม ในการย่อยแป้งนิยมใช้กรดไฮโดรคลอริกมากกว่ากรดซัลฟิวริก ทั้งนี้เนื่องจากในกรณีที่มีน้ำมี Ca^{++} เกลือยิบซั่ม ($CaSO_4$) จะตกตะกอน และจะเป็นตะกอนไปจนถึงผลิตภัณฑ์ (กล้าณรงค์, 2538) ในการทดลองนี้จึงใช้กรดไฮโดรคลอริกซึ่งนอกจากจะหลีกเลี่ยงภาวะดังกล่าวซึ่งอาจจะมีผลต่อผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น การใช้กรดไฮโดรคลอริกย่อยแป้งมันสำปะหลัง จะให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าการใช้กรดซัลฟิวริก และกรดไนตริก

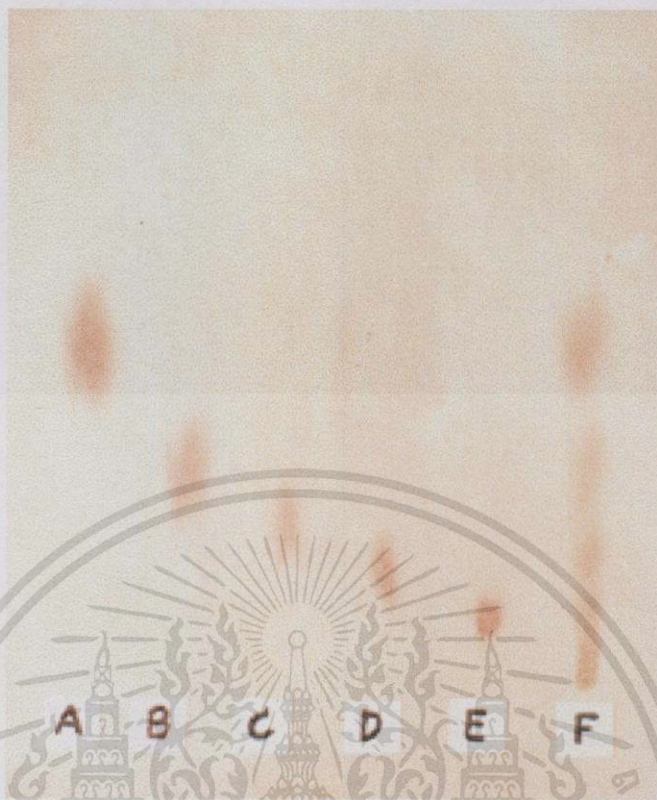
ตารางที่ 4.1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ในการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยกรดชนิดต่างๆ

ชนิดของกรด	กรดไฮโดรคลอริก	กรดไนตริก	กรดซัลฟิวริก
ค่าเฉลี่ยน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด(กรัมต่อลิตร) ที่ความเข้มข้นของแป้ง 5 เปอร์เซ็นต์	17.81 ^a	16.92 ^a	16.50 ^a
ค่าเฉลี่ยน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด(กรัมต่อลิตร) ที่ความเข้มข้นของแป้ง 10 เปอร์เซ็นต์	35.65 ^b	33.97 ^b	34.36 ^b

หมายเหตุ - ใช้ DMRT เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

- ค่าเฉลี่ยของน้ำตาลรีดิวซ์ที่กำกับตามแนวนอนด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับนัยสำคัญ 5 เปอร์เซ็นต์





ภาพที่ 4.1 โครมาโตแกรมแสดงชนิดของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยกรดไฮโดรคลอริก

- A แทน กลูโคส B แทน มอลโทส C แทน ไอโซมอลโทส
 D แทน มอลโทไตรโอส E แทน ไอโซมอลโทไตรโอส
 F แทน สารละลายน้ำตาลตัวอย่าง

4.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในระดับแป้งข้า้

4.2.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 เพื่อผลิตกรดแลกติก โดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกตามผลการทดลองในข้อ 4.1 เป็นแหล่งคาร์บอน ผลการศึกษาการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่างๆกันคือ 50 100 120 150 และ 180 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีแหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุ ตามสูตรในข้อ 3.4 พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง จะทำให้ปริมาณกรดแลกติกเพิ่มขึ้น โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลัง 50 และ 100 กรัมต่อลิตรจะให้ปริมาณกรดแลกติก 17.30 และ 47.92 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และจากน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อที่เพิ่มขึ้น แสดงว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตสูงขึ้น (ตารางที่ 4.3 และ 4.4) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลัง 120 กรัมต่อลิตรจะให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดคือ 58.57 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.5) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ 150 กรัมต่อลิตร และ 180 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดแลกติกจะลดลงคือ 55.41 กรัมต่อลิตร และ 50.20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.6 และ 4.7) ซึ่งเนื่องมาจากปริมาณที่เพิ่มขึ้นของแป้งมันสำปะหลังที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ และจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ได้ ซึ่งจากการทดลองพบว่าปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตร จะให้น้ำหนักเซลล์แห้งในปริมาณต่ำ ในการศึกษาของ Yin *et al.* (1997) พบว่าความเข้มข้นของแป้งข้าวโพดที่เพิ่มขึ้นมากกว่า 150 กรัมต่อลิตร จะมีผลทำให้ผลผลิตกรดแลกติกลดลง เนื่องจากความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่สูงจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่าแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นต่ำซึ่งจะมีผลต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อได้ ในการทดลองของ Zhang and Cheryan (1991) พบว่าความเข้มข้นของกลูโคสที่สูงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lactobacillus amylovorus* ซึ่งทำให้ปริมาณผลผลิตกรดแลกติกลดลง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องให้แหล่งคาร์บอนในปริมาณที่เหมาะสม

เมื่อพิจารณาจากค่าสถิติ (ตารางที่ 4.2) พบว่าที่ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 120 และ 150 กรัมต่อลิตร จะให้ผลผลิตกรดแลกติกที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 5 เปอร์เซ็นต์ แต่จากผลการทดลองพบว่า แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก เนื่องจากเชื้อมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้ดีและมีการเจริญเติบโตมากกว่า โดยเมื่อพิจารณาจากน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่าจะให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด คือ 6.06 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะส่งผลให้ปริมาณผลผลิตกรดแลกติกสูงสุด คือ 58.57 กรัมต่อลิตร ในช่วงโม่งที่ 120 (ภาพที่ 4.2) และให้ผลได้กรดแลกติก (Y_{ps}) สูงสุดคือ 0.48 กรัมต่อกรัมสับสเตรต ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 120 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนในการศึกษาครั้งต่อไป

จากตารางแสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเห็นว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าต่ำ เนื่องจากกระบวนการย่อยแป้งโดยกรดนั้น การย่อยแขนระหว่างกลูโคส จะเกิดขึ้นแบบสุ่ม (Lloyd and Nelson, 1984) ดังนั้นจะเกิดได้ทั้งสารที่มีโมเลกุลของกลูโคส โมเลกุลเดียวไปจนถึงสารที่มีกลูโคส 4 โมเลกุล หรือมากกว่านั้น ตัวอย่างเช่น กลูโคส มอลโทส มอลโทโทรไอส และเตตระแซกคาไรด์ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 สามารถสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Tominaga and Sato, 1996) ในระหว่างการหมัก ซึ่งเป็น exo-enzyme ที่สามารถย่อยโมเลกุลที่กรดย่อยไม่หมด ไปเป็นกลูโคสซึ่งเซลล์นำไปใช้ได้

เชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 สามารถผลิตกรดแลกติกจากสับสเตรตได้หลายชนิด โดยเฉพาะสามารถใช้น้ำตาลได้เกือบทุกชนิด ไม่ว่าจะเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว หรือโมเลกุลคู่ ซึ่งในการทดลองส่วนใหญ่นิยมใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากพบว่าสามารถให้ปริมาณกรดแลกติกได้สูง แต่อย่างไรก็ตามการใช้แป้งที่มีราคาถูก และหาได้ง่าย ก็สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้เช่นกัน จากผลการทดลองของ Yin *et al.* (1997) พบว่าในปริมาณแป้งข้าวโพด 120 กรัมต่อลิตร แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 98.2 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือแป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก ให้ปริมาณกรดแลกติก 95.1 กรัมต่อลิตร ในขณะที่กลูโคส แมนโนส ฟรักโทส และซูโครส ให้กรดแลกติก 92.0 84.5 88.0 และ 52.4 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าแป้งข้าวโพดที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลกติกคือ 120 กรัมต่อลิตร และผลผลิตกรดแลกติกจะลดลงเมื่อปริมาณแป้งข้าวโพดเริ่มต้นเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของงานวิจัยครั้งนี้ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น และการที่แป้งมันสำปะหลังให้ปริมาณกรดแลกติกน้อยกว่าแป้งข้าวโพด ในปริมาณความเข้มข้นที่เท่าๆ กัน ก็เนื่องมาจากคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของแป้งมีความแตกต่างกัน โดย Menezes (1978) ได้กล่าวว่า แป้งมันสำปะหลังจะหนืดมากกว่าแป้งข้าวโพดที่พองตัวแล้ว ซึ่งความหนืดที่มากจะมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อได้

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกรดแลกติกในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นระดับต่างๆกัน

แป้งมันสำปะหลัง (กรัมต่อลิตร)	50	100	120	150	180
ค่าเฉลี่ยกรดแลกติกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	17.30 ^c	47.92 ^b	58.57 ^a	55.41 ^a	50.20 ^b

หมายเหตุ - ค่าเฉลี่ยของกรดแลกติกที่กำกับตามแนวนอนด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มี ความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อใช้ DMRT ที่ระดับนัยสำคัญ 5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย

Rhizopus oryzae NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	0.15	0.00	14.95	5.87
24	0.69	0.01	9.40	3.42
48	0.68	0.21	10.16	6.88
72	3.66	8.92	9.13	6.75
96	4.19	16.61	6.89	6.67
120	4.49	17.30	6.85	6.53

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย

Rhizopus oryzae NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	0.18	0.00	30.85	5.89
24	1.36	0.02	23.80	3.04
48	3.65	11.90	25.59	6.91
72	4.22	43.52	15.15	6.24
96	5.00	45.64	8.34	5.92
120	5.10	47.92	3.99	5.65

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย

Rhizopus oryzae NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร

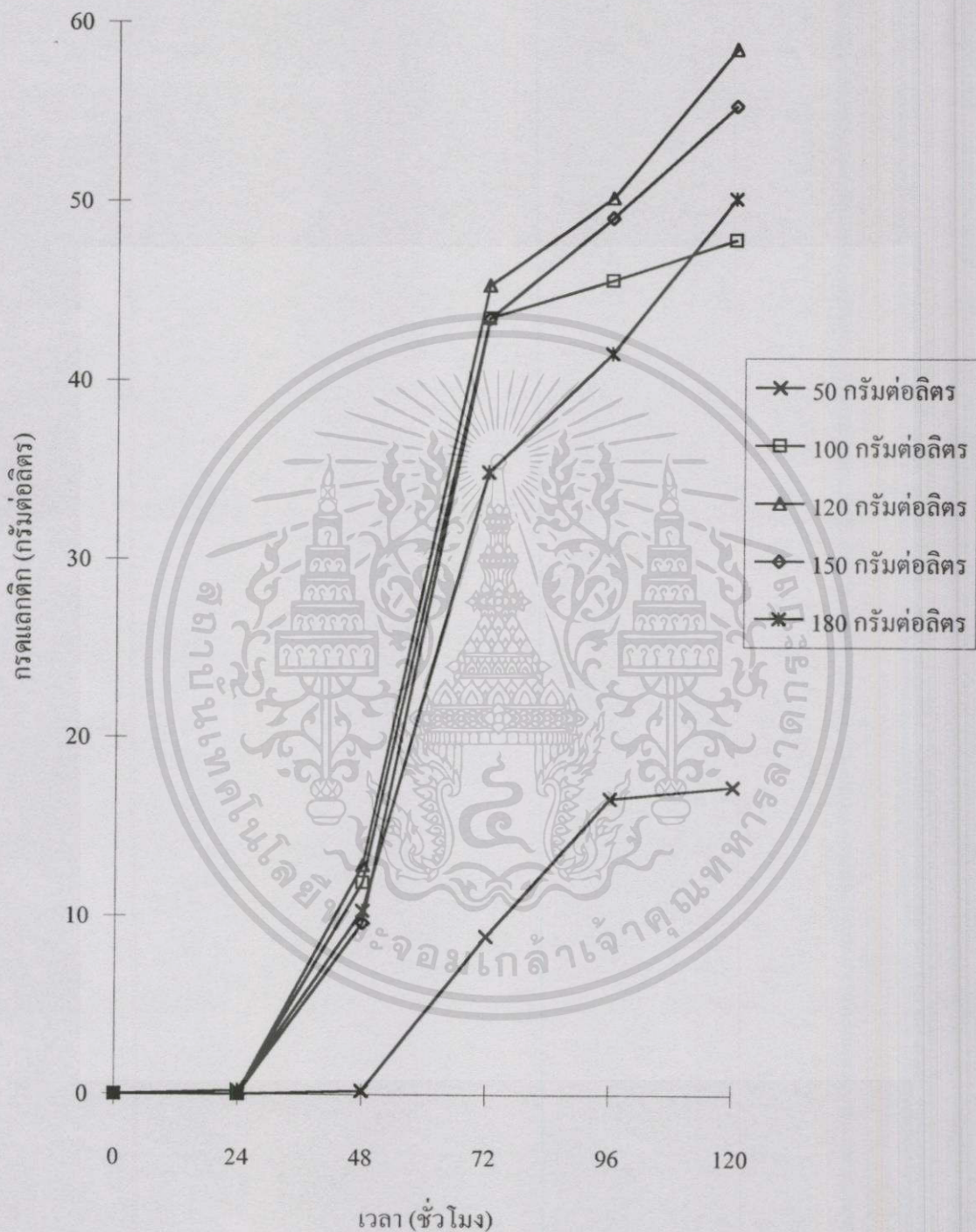
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	0.21	0.00	32.18	5.87
24	1.46	0.02	28.54	3.02
48	3.62	12.89	30.52	6.88
72	4.99	45.35	13.00	5.73
96	5.26	50.24	2.00	5.65
120	6.06	58.57	2.22	5.55

ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	0.32	0.00	41.80	5.89
24	1.81	0.03	32.49	2.98
48	3.48	9.64	33.54	6.84
72	4.16	43.48	31.60	5.92
96	4.80	49.14	24.60	5.77
120	5.14	55.41	13.08	5.45

ตารางที่ 4.7 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	0.37	0.00	48.92	5.89
24	1.76	0.20	43.64	2.96
48	3.26	10.31	45.50	6.66
72	4.24	34.89	42.03	5.72
96	4.75	41.56	43.60	5.67
120	4.83	50.20	42.56	5.63



ภาพที่ 4.2 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีมันงาตามระดับความเข้มข้นเริ่มต้นต่าง ๆ

4.2.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

ผลการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยใช้แป้งมันสำปะหลัง 120 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนคือ แอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$ ความเข้มข้นต่างๆกัน 4 ระดับ คือ 0 1.0 2.0 และ 3.0 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 3.0 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดคือ 60.80 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.12) รองลงมาคือความเข้มข้น 2.0 กรัมต่อลิตร ให้กรดแลกติก 55.70 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.11) และที่ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร ให้กรดแลกติก 13.93 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.10) ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 เพื่อผลิตกรดแลกติกของ Soccol *et al.* (1994) พบว่าจากการใช้กลูโคส 120 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีแอมโมเนียมซัลเฟต เข้มข้น 3.02 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และเค็มแร่ธาตุอีกเล็กน้อย จะให้ปริมาณกรดแลกติก 89 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน ซึ่งในอาหารสูตรเดียวกันนี้ Kosakai *et al.* (1997) ใช้เพื่อทดลองเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในระดับถังหมักแบบแบดช์

แหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญในการเจริญเติบโต ปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม จะช่วยให้เชื้อราเจริญเติบโตและผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณมาก จากการทดลองเมื่อไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน เชื้อราจะเจริญเติบโตน้อยมาก และไม่มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งดูจากน้ำหนักเซลล์แห้งสุดท้ายมีเพียง 0.73 กรัมต่อลิตร ทำให้ผลผลิตกรดแลกติกต่ำมาก คือ 0.14 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีผลทำให้ค่าพีเอชสุดท้ายในน้ำหมักมีค่าสูงถึง 7.4 (ตารางที่ 4.9) โดยปริมาณกรดแลกติกจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของแหล่งไนโตรเจน โดยปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสม คือ 3.0 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 60.80 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.3) เมื่อพิจารณาจากน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่ามีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์มาก เนื่องจากมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือเพียง 2.09 กรัมต่อลิตร ซึ่งเชื้อราจะนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต และสร้างผลิตภัณฑ์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักเซลล์แห้ง จะเห็นว่ามีน้ำหนักเซลล์แห้งสุดท้ายสูงสุด คือ 10.22 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 120 ของการหมัก (ตารางที่ 4.12) และเมื่อพิจารณาจากค่าสถิติ (ตารางที่ 4.8) พบว่าในแต่ละความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมซัลเฟต ให้ผลผลิตกรดแลกติกที่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 5 เปอร์เซ็นต์

จุลินทรีย์สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปสารประกอบอนินทรีย์ (inorganic nitrogen) หรือสารประกอบอินทรีย์ (organic nitrogen) ซึ่งผลได้ของการสร้างผลผลิต ($y_{p/s}$) จะขึ้นกับความสามารถใช้ประกอบไนโตรเจนชนิดใดได้ดี Waksman and Hutchings (1937) ทำการศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดยแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ต่างกัน คือ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และแอมโมเนียมไนเตรด โดยเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus* ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีกลูโคส ร้อยละ 13 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 53.7 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อมา Yin *et al.* (1997) ทำการเลี้ยง *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในอาหารเหลวที่มีแป้งข้าวโพดที่ย่อยแล้วเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 95 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือโพลิเปปโตน ให้กรดแลกติก 90 กรัมต่อลิตร ส่วนยีสต์สกัดและน้ำแช่ข้าวโพด ให้กรดแลกติก 85 และ 67 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อศึกษา ความเข้มข้นต่างๆกัน ของ แอมโมเนียมซัลเฟต พบว่า เมื่อไม่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต เชื้อเจริญเติบโตช้า และให้กรดแลกติกต่ำสุด ซึ่งปริมาณของ แอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมที่สุดที่ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด คือ 1.35 กรัมต่อลิตร โดยแตกต่างจากการทดลองนี้ ซึ่งอาจจะเกิดจากองค์ประกอบทางเคมีของแป้งมีความแตกต่างกัน

สำหรับแหล่งอินทรีย์ในโตรเจน เช่น alanine asparagine glutamic acid glycine และ urea สามารถนำมาผลิตกรดแลกติกได้เช่นกัน (Prescott and Dunn, 1959) แต่ค่อนข้างราคาแพง จึงไม่ค่อยเหมาะสม ในการผลิตกรดแลกติกส่วนใหญ่จึงนิยมใช้เกลือแอมโมเนียม โดยเฉพาะแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งช่วยให้เชื้อราเจริญเติบโตได้ดี และผลิตกรดแลกติกได้ผลผลิตสูง ซึ่งจากงานวิจัยครั้งนี้ เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากจะทำให้เชื้อราเจริญเติบโตแล้ว ยังทำให้เชื้อราเจริญเป็นกลุ่มเส้นใยขนาดเล็ก และกระจายตัวดี ทำให้เชื้อราได้รับอาหารและอากาศเพียงพอ ซึ่งในความเข้มข้นที่เหมาะสม จะทำให้ผลผลิตกรดแลกติกมีค่าเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกรดแลกติกในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นระดับต่างๆกัน

แอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)	0	1.0	2.0	3.0
ค่าเฉลี่ยกรดแลกติกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	0.14 ^d	13.93 ^c	55.70 ^b	60.80 ^a

หมายเหตุ - ค่าเฉลี่ยของกรดแลกติกที่กำกับตามแนวนอนด้วยอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อใช้ DMRT ที่ระดับนัยสำคัญ 5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.9 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย

Rhizopus oryzae NRRL 395 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	0.22	0.00	35.22	5.89
24	0.54	0.12	32.20	4.26
48	0.53	0.13	34.64	7.47
72	0.53	0.14	33.82	7.44
96	0.60	0.16	33.36	7.42
120	0.73	0.14	34.42	7.41

ตารางที่ 4.10 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย

Rhizopus oryzae NRRL 395 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	0.32	0.00	40.15	5.87
24	1.48	0.02	32.72	3.34
48	3.31	2.89	36.15	7.21
72	3.56	9.94	25.50	6.42
96	3.68	13.78	21.66	6.11
120	3.72	13.93	19.31	6.12

ตารางที่ 4.11 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย

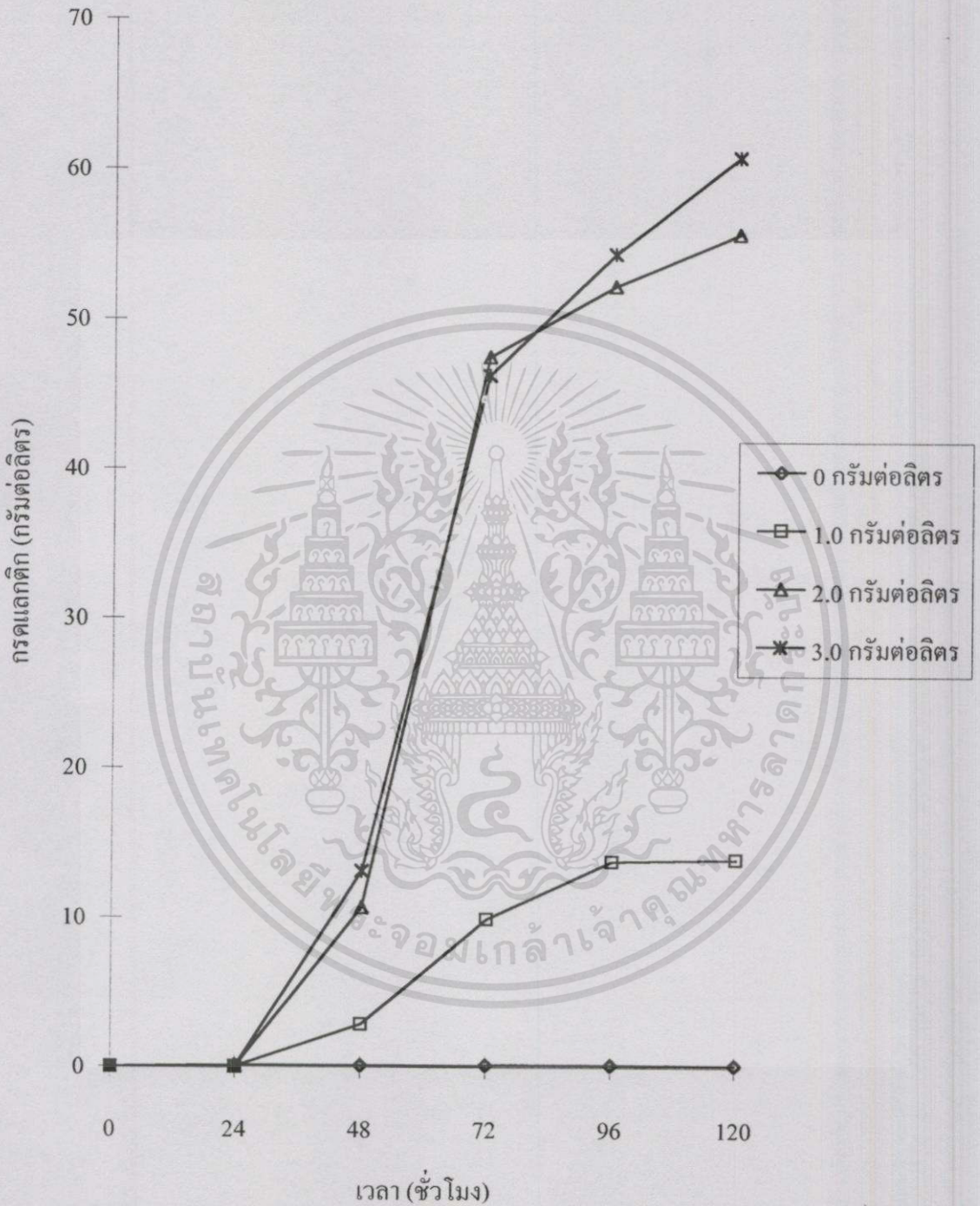
Rhizopus oryzae NRRL 395 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 2.0 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	0.24	0.00	38.47	5.87
24	1.69	0.02	33.46	3.15
48	5.42	10.70	31.59	6.71
72	6.03	47.50	18.26	6.22
96	6.11	52.20	15.68	5.93
120	6.20	55.70	7.69	5.68

ตารางที่ 4.12 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 3.0 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	0.28	0.00	35.13	5.88
24	1.58	0.02	35.00	3.25
48	5.97	13.15	31.71	6.81
72	7.78	46.25	5.39	6.22
96	9.34	54.35	2.84	6.20
120	10.22	60.80	0.09	5.91





ภาพที่ 4.3 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นระดับต่างๆกัน

4.2.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

ผลการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ซึ่งมีแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 3.0 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน เมื่อทำการศึกษาความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้นระดับต่างกัน คือ 0 0.3 0.6 และ 1.0 กรัมต่อลิตร พบว่าอาหารที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 63.33 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.17) รองลงมาคือ ที่ความเข้มข้น 0.6 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดแลกติก 59.47 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.16) และที่ความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณกรดแลกติก 58.80 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.15) ขณะที่ไม่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ให้ปริมาณกรดแลกติกต่ำสุดคือ 10.95 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.14)

จากผลการทดลองจะเห็นว่าเมื่อไม่มีการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณกรดแลกติกมีค่าต่ำ โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งสุดท้าย 1.42 กรัมต่อลิตร การเพิ่มปริมาณของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต โดยแปรผันความเข้มข้นตั้งแต่ 0.3 ถึง 1.0 กรัมต่อลิตร จะทำให้ปริมาณกรดแลกติกเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ขณะที่การใช้น้ำตาลรีวิวิซ์ และปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าใกล้เคียงกัน แต่ที่ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร เชื้อเจริญเติบโตดีกว่าจึงให้ปริมาณกรดแลกติกมากกว่า โดยให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 63.33 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.4) เมื่อพิจารณาจากค่าสถิติ (ตารางที่ 4.13) พบว่าที่ความเข้มข้น 0.3 และ 0.6 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดแลกติกที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 5 เปอร์เซ็นต์ Soccol *et al.* (1994) ได้ศึกษาหาสายพันธุ์ของเชื้อราจีส *Rhizopus* และสภาวะการหมักที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.6 กรัมต่อลิตร เป็นองค์ประกอบ และในสูตรอาหารเพื่อการผลิตกรดแลกติกของ Hang *et al.* (1989) พบว่า โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.6 กรัมต่อลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตกรดแลกติก

Bilgrami and Verma (1981) ได้กล่าวว่า การเพิ่มปริมาณของโพแทสเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มากเกินไปจะทำให้เชื้อราเจริญน้อยลง เนื่องจากจะไปรบกวนการใช้น้ำตาลของเชื้อได้ นอกจากนี้การเติมซิงค์ซัลเฟต (ZnSO_4) เป็นแร่ธาตุอาหารเสริมในปริมาณเล็กน้อยลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะทำให้ผลผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้น (Lockwood and Moyer, 1938)

แร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราจะอยู่ในรูปของสารอนินทรีย์ ซึ่งแร่ธาตุหลักที่ใช้เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม ซัลเฟอร์ แคลเซียมและคลอไรด์ ถ้าสารอาหารที่นำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมีแร่ธาตุต่างๆ เหล่านี้ไม่เพียงพออาจเสริมพวกเหล็ก แมงกานีส คอปเปอร์ ในรูปของสารประกอบที่เหมาะสม ส่วนใหญ่ใช้ในรูปเกลือ แต่ใช้ในปริมาณเพียงเล็กน้อย โดยโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ มักนิยมเติมในช่วงความเข้มข้น 1.0-4.0 กรัมต่อลิตร (Stanbury *et al.*, 1995) การเพิ่มผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตของกรดแลกติกส่วนหนึ่งขึ้นอยู่กับที่การควบคุมความเข้มข้นของแร่ธาตุให้พอเหมาะ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์เชื้อรา และแหล่งอาหารที่ใช้ด้วย ในบรรดาแร่ธาตุดังกล่าว โปแทสเซียมจัดเป็นแร่ธาตุที่มีความสำคัญมาก เนื่องจากเป็นแร่ธาตุส่วนใหญ่ที่เป็นองค์ประกอบของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา และเป็นแร่ธาตุที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต โดยการเติมโปแทสเซียมในอาหารเลี้ยงเชื้อจะใช้ในรูปของฟอสเฟตหรือไนเตรต และเชื้อก็สามารถใช้ฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟตได้ สารประกอบดังกล่าวได้แก่ โปแทสเซียมอโทฟอสเฟต (K_3PO_4) โปแทสเซียมเมตาฟอสเฟต (KPO_3) โปแทสเซียมไพโรฟอสเฟต ($K_4P_2O_7$) โปแทสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) และ โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) โดยทั่วไปมักนิยมใช้ โปแทสเซียมโมโนไฮโดรเจน และไดไฮโดรเจนฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งนอกจากจะเป็นแหล่งของฟอสเฟต และ โปแทสเซียมไอออนแล้ว เกลื่อนี้ยังสามารถใช้เป็นบัฟเฟอร์ ควบคุมความเป็นกรดเป็นด่างที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในน้ำหมัก ซึ่งจะมีผลต่อการเจริญและเมแทบอลิซึมของเชื้อได้ (Bilgrami and Verma, 1981)

ตารางที่ 4.13 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกรดแลกติกในอาหารที่มีโปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ กัน

โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (กรัมต่อลิตร)	0	0.3	0.6	1.0
ค่าเฉลี่ยกรดแลกติกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	10.95 ^c	58.80 ^b	59.47 ^b	63.33 ^a

หมายเหตุ - ค่าเฉลี่ยของกรดแลกติกที่กำกับตามแนวนอนด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อใช้ DMRT ที่ระดับนัยสำคัญ 5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.14 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	0.28	0.00	40.48	5.88
24	1.06	0.47	34.50	3.55
48	1.23	0.70	33.91	7.41
72	1.23	2.42	33.12	6.92
96	1.35	9.94	34.64	6.91
120	1.42	10.95	31.09	6.66

ตารางที่ 4.15 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร

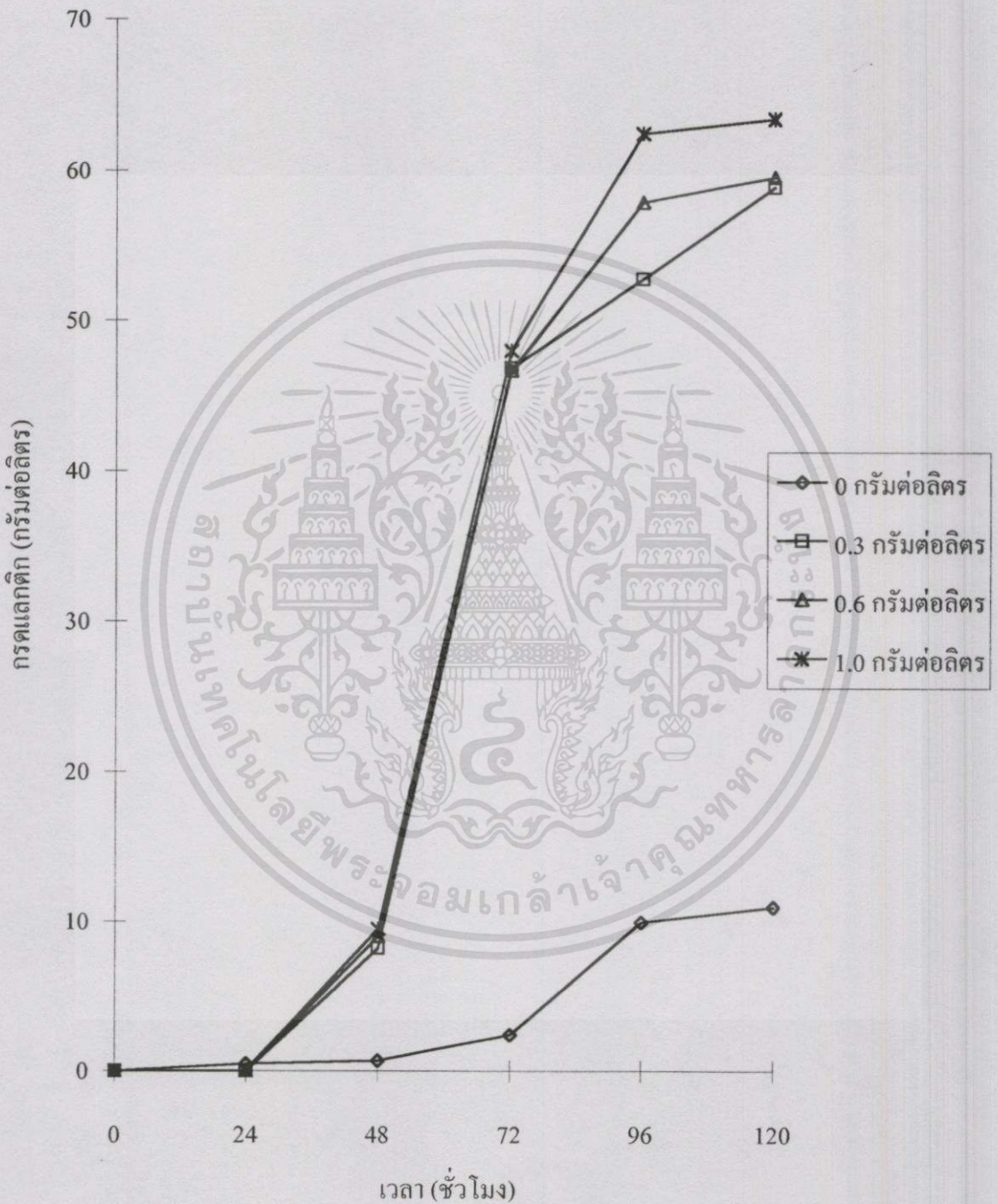
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	0.21	0.00	39.97	5.89
24	1.59	0.01	35.58	3.27
48	3.40	8.23	32.27	6.99
72	5.71	46.84	15.74	6.26
96	6.69	52.72	2.46	6.24
120	9.25	58.80	1.98	6.22

ตารางที่ 4.16 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0.6 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	0.22	0.00	38.94	5.89
24	1.72	0.01	34.40	3.26
48	5.41	9.00	33.20	6.71
72	9.07	46.65	14.71	6.57
96	9.74	57.82	3.44	6.11
120	10.08	59.47	1.64	6.06

ตารางที่ 4.17 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	0.20	0.00	38.52	5.89
24	1.83	0.02	32.07	3.24
48	5.55	9.51	31.96	6.62
72	8.72	48.00	11.28	5.81
96	9.26	62.38	2.12	5.80
120	10.99	63.33	1.57	5.55



ภาพที่ 4.4 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มี โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นระดับต่างๆกัน

4.2.4 ผลการศึกษาปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

ผลการเลี้ยงเชื้อรา เพื่อผลิตกรดแลกติกโดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมที่ปรับปรุงแล้ว เมื่อทำการศึกษาปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก ที่แตกต่างกัน 4 ระดับ คือ 2×10^4 2×10^5 2×10^6 และ 2×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่าปริมาณสปอร์เริ่มต้น 2×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดคือ 66.60 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.20) รองลงมาคือปริมาณสปอร์ 2×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.19) ให้ปริมาณกรดแลกติก 64.90 กรัมต่อลิตร และที่ปริมาณสปอร์เริ่มต้น 2×10^6 ให้ปริมาณกรดแลกติก 32.20 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.21) ส่วนที่ปริมาณสปอร์เริ่มต้น 2×10^7 ให้ปริมาณกรดแลกติกต่ำสุด 10.91 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.22) จากการทดลอง เมื่อพิจารณาจากปริมาณกรดแลกติกจะพบว่า ในช่วงวันแรกของการหมักจะไม่พบการผลิตกรดแลกติก เนื่องจากสปอร์จะต้องใช้เวลาในการเจริญและปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม ช่วงหนึ่งก่อนจึงจะเริ่มผลิตกรดแลกติก Yu and Hang (1989) ได้ศึกษาชนิดของสับสเตรต และสภาวะแวดล้อมที่มีต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ซึ่งใช้เชื้อในรูปแบบสปอร์ปริมาณ 1×10^7 สปอร์ต่อฟลาस्क โดยพบว่าการเพิ่มปริมาณสปอร์เริ่มต้นจาก 1×10^7 เป็น 3×10^7 สปอร์ต่อฟลาस्क ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณการผลิตกรดแลกติก

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราในอาหารเหลวลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) ของเชื้อที่เจริญขึ้นมาจะแตกต่างกันไป ขึ้นกับปัจจัยสำคัญได้แก่ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และความเข้มข้นของสปอร์ที่ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะมีส่วนสำคัญต่อการสร้างผลผลิตของผลิตภัณฑ์ต่างๆ ในอาหารเหลวของเชื้อราอย่างมาก จากการทดลองนี้พบว่า ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของการเจริญของเชื้อรา จะมีลักษณะแตกต่างกัน ขึ้นกับจำนวนสปอร์เริ่มต้น กล่าวคือ เมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นที่มีความเข้มข้น 2×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เชื้อราจะเจริญเป็นกลุ่มเส้นใยขนาดใหญ่ในวันแรก และจะเจริญเป็นกลุ่มเส้นใยกระจายขนาดเล็กในวันต่อมา และเมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นที่มีความเข้มข้น 2×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เชื้อราจะเจริญเป็นกลุ่มเส้นใยขนาดเล็กๆ และกระจายตัวดี ซึ่งเป็นลักษณะการเจริญของเส้นใยที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก เนื่องจากแต่ละเส้นใยได้รับอาหารอย่างทั่วถึง ซึ่งพบว่าเชื้อรามีน้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุดคือ 11.41 กรัมต่อลิตร ส่วนลักษณะของเชื้อรา เมื่อใช้จำนวนสปอร์เริ่มต้นที่มีความเข้มข้น 2×10^6 และ 2×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เชื้อราจะเจริญเป็นกลุ่มเส้นใยาวและรวมกลุ่มกัน ทำให้เส้นใยตรงกลางกลุ่มไม่ได้รับอาหารและออกซิเจนอย่างเพียงพอ จะมีเฉพาะเส้นใยภายนอกที่ได้รับอาหารและออกซิเจน ซึ่งจากผลดังกล่าวทำให้เชื้อมีความสามารถในการผลิตกรดแลกติกลดลง (Hang, 1989) การใช้จำนวนสปอร์ที่มากเกินไปจะทำให้เชื้อได้รับอาหารและออกซิเจนไม่เพียงพอสำหรับใช้ในการเจริญเติบโต เนื่องจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* เป็นเชื้อราที่มีการเจริญที่ต้องการออกซิเจนมาก (Yin *et al.*, 1998) ซึ่งจะเห็นได้จากน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อรามีค่าน้อยลง โดยปริมาณสปอร์

2×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 8.79 กรัมต่อลิตร และปริมาณสปอร์ 2×10^7

สปอร์ต่อมิลลิลิตร ให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 6.61 กรัมต่อลิตร แต่อย่างไรก็ตามลักษณะการเจริญของเส้นใยของเชื้อรา ยังขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนด้วย (Lockwood *et al.*, 1936) การเตรียมปริมาณสปอร์เริ่มต้นต่ออาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่เหมาะสม จึงเป็นปัจจัยสำคัญอีกอย่างหนึ่งสำหรับการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา โดยกรรมวิธีการหมักในอาหารเหลว

เมื่อพิจารณาจากค่าสถิติ (ตารางที่ 4.18) พบว่า ปริมาณสปอร์ 2×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และปริมาณสปอร์ 2×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร มีค่าเฉลี่ยของกรดแลกติกสูงสุดที่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 5 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าการเพิ่มปริมาณสปอร์ดังกล่าวไม่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก แต่ที่ปริมาณสปอร์ 2×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ให้ปริมาณกรดแลกติกมากกว่าเมื่อใช้ปริมาณสปอร์ 2×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร โดยให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 66.60 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.5) จึงเลือกใช้ปริมาณสปอร์ 2×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ในการศึกษาลำดับต่อไป

ในการทดลองของ Yin *et al.* (1998) พบว่าปริมาณสปอร์ที่แตกต่างกันจะมีผลต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 เมื่อใช้แป้งข้าวโพดความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ แอลฟาอะไมเลสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยปริมาณสปอร์ 2×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เชื้อจะเจริญเป็น pellet และให้กรดแลกติกสูงสุด 98 กรัมต่อลิตร ส่วนที่ปริมาณสปอร์ 2×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เชื้อจะเจริญเป็นเส้นใยกระจายตัว ซึ่งจะให้กรดแลกติกรองลงมาคือ 85 กรัมต่อลิตร และที่ปริมาณสปอร์ 2×10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เส้นใยจะเจริญจับตัวเป็นกลุ่มเส้นใย ทำให้ปริมาณกรดแลกติกลดลง คือ 83 กรัมต่อลิตร โดยแตกต่างจากการทดลองนี้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากมีการใช้ชนิดของสับสเตรตที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 4.18 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกรดแลกติกในอาหารที่มีปริมาณสปอร์เริ่มต้นระดับต่างๆกัน

ปริมาณสปอร์เริ่มต้น (สปอร์ต่อมิลลิลิตร)	2×10^4	2×10^6	2×10^6	2×10^7
ค่าเฉลี่ยกรดแลกติกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	64.90 ^a	66.60 ^a	32.20 ^b	10.91 ^c

หมายเหตุ - ค่าเฉลี่ยของกรดแลกติกที่กำกับตามแนวนอนด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อใช้ DMRT ที่ระดับนัยสำคัญ 5 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.19 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีปริมาณสปอร์เริ่มต้น 2×10^4 สปอร์ต่อ มิลลิลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	0.15	0.00	38.42	5.89
24	1.48	0.03	33.70	3.44
48	4.85	9.75	31.90	5.72
72	8.04	46.90	12.62	5.78
96	9.87	61.20	6.15	5.71
120	10.03	64.90	1.87	5.75

ตารางที่ 4.20 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีปริมาณสปอร์เริ่มต้น 2×10^5 สปอร์ต่อ มิลลิลิตร

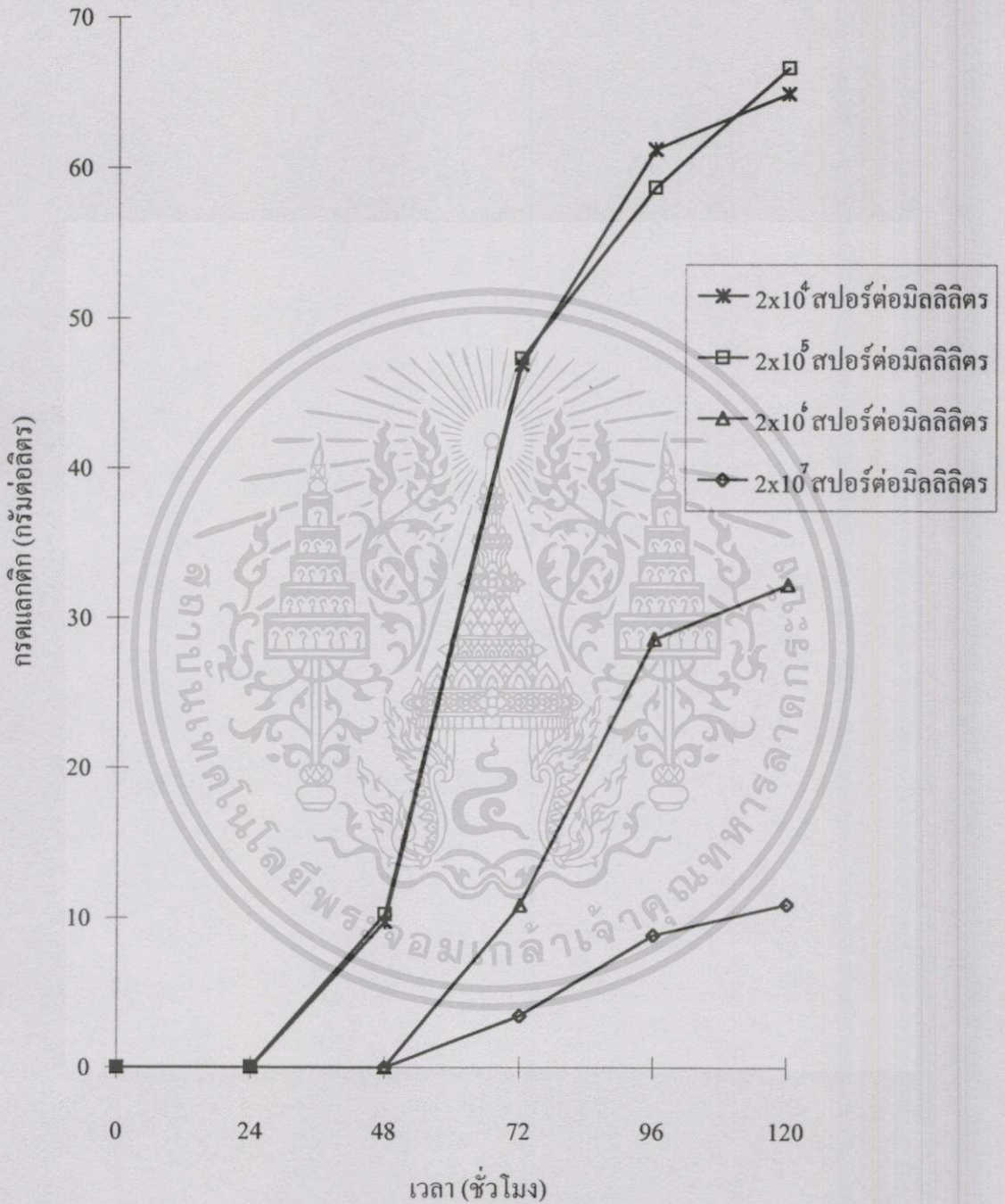
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	0.21	0.00	37.93	5.88
24	1.95	0.02	36.20	3.27
48	6.71	10.24	25.49	6.11
72	9.48	47.30	6.60	5.85
96	9.89	58.70	2.90	5.56
120	10.41	66.60	1.59	5.55

ตารางที่ 4.21 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีปริมาณสปอร์เริ่มต้น 2×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	0.26	0.00	34.03	5.90
24	2.17	0.00	32.91	3.20
48	3.16	0.01	29.28	7.51
72	8.16	10.84	25.92	5.89
96	8.23	28.60	19.60	5.89
120	8.79	32.20	14.50	5.84

ตารางที่ 4.22 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีปริมาณสปอร์เริ่มต้น 2×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	0.29	0.00	35.65	5.90
24	1.77	0.00	34.39	3.18
48	2.99	0.00	33.71	7.35
72	5.88	3.44	29.73	6.48
96	6.03	8.85	27.30	6.34
120	6.61	10.91	25.11	6.23



ภาพที่ 4.5 แสดงปริมาณกรตเลกติกที่ผลิตโดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีปริมาณสปอร์เริ่มต้นระดับต่างๆกัน

4.2.5 ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อและการผลิตกรดแลกติกในระดับพลาสติกเขย่า

จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติก เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในอาหารเหลวที่มีแหล่งอาหารและปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสม บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 7 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลกติก น้ำตาลทั้งหมด น้ำหนักเซลล์แห้ง และความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำหมัก พบว่า อัตราการใช้น้ำตาลเป็นสัดส่วนสัมพันธ์กับการผลิตกรดแลกติก โดยในช่วงแรกของการหมัก สปอร์จะใช้ในการปรับตัวและงอกเป็นใยรา จึงไม่พบการผลิตกรดซึ่งปริมาณกรดแลกติกจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังชั่วโมงที่ 36 และให้ผลผลิตกรดแลกติกสูงสุด 68.32 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 120 โดยน้ำตาลจะถูกใช้อย่างรวดเร็ว และค่อยๆ ลดลงตามลำดับ ปริมาณกรดแลกติกจะเริ่มลดลง หลังจากชั่วโมงที่ 120 และมีน้ำตาลเหลือ 4.90 กรัมต่อลิตร เมื่อการหมักสิ้นสุดลง ดังแสดงในตารางที่ 4.23 และภาพที่ 4.6 การลดลงของกรดแลกติกอาจเนื่องจากการเชื้อมีการนำกรดแลกติกบางส่วนไปใช้ในการสร้างพลังงานในสภาวะที่มีอาหารจำกัด จากการศึกษาทดลองของ Soccol *et al.* (1994) โดยเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในอาหารเหลวที่มีกลูโคส 120 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 89 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 โดยพบกรดฟูมาริก และเอทานอลเกิดขึ้นเล็กน้อย

เมื่อพิจารณาจากค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.90 และลดลงอย่างรวดเร็วเหลือ 4.62 ภายใน 12 ชั่วโมง และเหลือ 3.42 ในชั่วโมงที่ 24 เนื่องจากเชื้อมีการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนทำให้เกิดสภาวะที่เป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Stanbury *et al.*, 1995) ดังนั้นเพื่อควบคุมความเป็นกรดเป็นด่างให้เหมาะสมจึงเติมสารบางอย่างเพื่อควบคุมความเป็นกรดเป็นด่างได้แก่ แคลเซียมคาร์บอเนต ซึ่งจะถูกเติมลงไปหลังชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก ซึ่งจะทำให้ค่าพีเอชของน้ำหมักเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และลดลงจนคงที่ที่ค่าพีเอช 5.5 ตลอดระยะเวลาการหมัก ซึ่งเป็นช่วงค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อรา และการผลิตกรดแลกติก

ปริมาณเซลล์ของเชื้อราเริ่มต้นเท่ากับ 0.19 กรัมต่อลิตร ซึ่งเชื้อจะมีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังชั่วโมงที่ 24 และเพิ่มขึ้นเป็นลำดับในช่วง 48 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง ซึ่งปริมาณกรดแลกติกสูงสุด เมื่อเซลล์มีน้ำหนักแห้ง 10.54 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณกรดจะค่อยๆ ลดลง เนื่องจากปริมาณสารอาหารลดน้อยลง จากการทดลองพบว่าในชั่วโมงที่ 120 ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด คิดเป็นร้อยละ 56 มีค่าผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.59 กรัมต่อกรัมสับสเตรต มีอัตราการเกิดกรดแลกติก (productivity) เท่ากับ 0.57 กรัมต่อลิตรชั่วโมง และค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.038 ต่อชั่วโมง ซึ่งในการทดลองของ Hang *et al.* (1989) พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 13 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน จะให้ผลผลิตกรดแลกติกสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 คิดเป็นร้อยละ 46 และจากสูตรอาหารเดียวกันนี้ เมื่อใช้วิธีการหมักบนผิวอาหารเหลว (surface culture) จะให้ผลผลิตกรดแลกติกคิดเป็นร้อยละ 44 (Lockwood *et al.*, 1936)

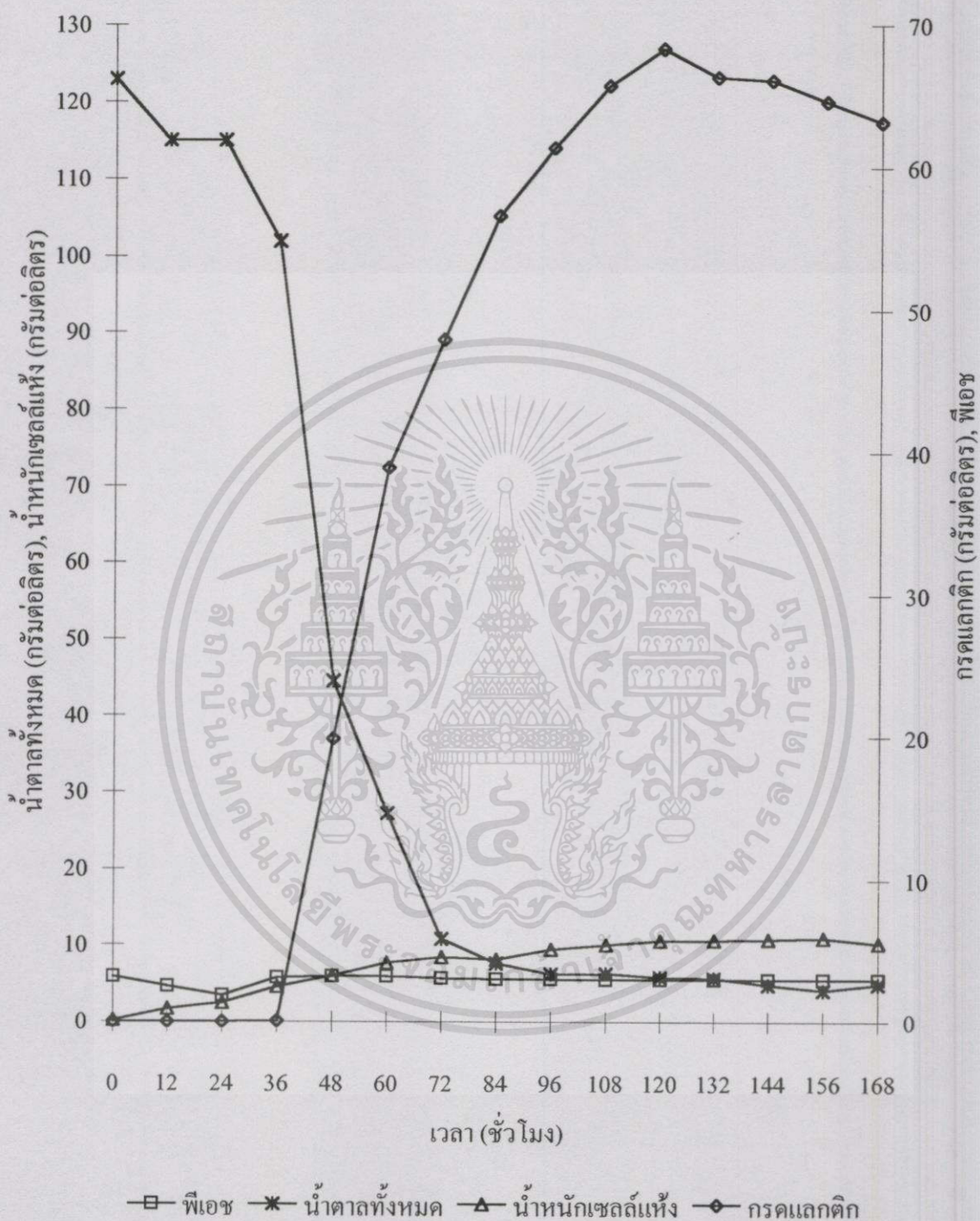
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.23 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิต

โดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในระดับฟลาสก์เขย่า

เวลา (ชั่วโมง)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช ของน้ำหมัก
0	0.00	123	0.19	5.90
4	0.014	119	0.40	5.85
8	0.015	118	0.54	5.33
12	0.016	115	1.67	4.62
24	0.016	115	2.48	3.42
28	0.019	113	2.78	5.68
32	0.026	108	3.41	5.81
36	0.057	102	4.57	5.74
48	19.92	44.61	6.01	5.96
60	38.96	27.22	7.70	5.93
72	48.00	10.78	8.38	5.72
84	56.64	7.64	8.11	5.59
96	61.38	6.27	9.41	5.58
108	65.73	6.31	10.00	5.54
120	68.32	5.80	10.54	5.55
132	66.30	5.71	10.62	5.55
144	66.08	4.84	10.72	5.55
156	64.59	4.16	10.90	5.55
168	63.18	4.90	10.21	5.55



ภาพที่ 4.6 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในระดับฟลาสก์เย้า

4.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในระดับถังหมักแบบแบคทีเรีย

4.3.1 ผลการศึกษาอัตราการกวนและการให้อากาศที่เหมาะสม

เมื่อนำสูตรอาหารที่มีความเหมาะสมที่ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดในระดับฟลาस्कเข้ามาทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติก ในระดับถังหมักแบบแบคทีเรีย โดยศึกษาอัตราการกวนระดับต่างๆกันคือ 200 300 และ 400 รอบต่อนาที และใช้อัตราการให้อากาศระดับต่างๆ กัน คือ 0.5 1.0 และ 1.5 วีวีเอ็ม

จากผลการทดลองพบว่า ในอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม ให้ปริมาณกรดแลกติกต่ำสุด คือ 36.33 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง น้ำหนักเซลล์แห้ง 8.60 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.24) โดยมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ 0.026 ต่อชั่วโมง และอัตราการเกิดกรดแลกติก 0.38 กรัมต่อลิตรชั่วโมง เมื่ออัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม ได้ปริมาณกรดแลกติก 41.68 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง น้ำหนักเซลล์แห้ง 8.40 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.25) โดยมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ 0.030 ต่อชั่วโมง และ อัตราการเกิดกรดแลกติก 0.43 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ในขณะที่อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม ให้ปริมาณกรดแลกติก 42.41 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง น้ำหนักเซลล์แห้ง 8.76 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.26) โดยมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ 0.035 ต่อชั่วโมง และ อัตราการเกิดกรดแลกติก 0.44 กรัมต่อลิตรชั่วโมง เนื่องจากอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม เป็นสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ของเชื้อ ซึ่งพบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญจำเพาะต่ำสุด และมีอัตราการเกิดกรดแลกติกต่ำสุด (ตารางที่ 4.33) และพบว่าในชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก เชื้อจะเริ่มเจริญเกาะกลุ่มบริเวณด้านข้างของถังหมัก และในชั่วโมงที่ 72 ของการหมัก เชื้อจะจับตัวเป็นก้อนมากขึ้นทั้งบริเวณด้านข้างของถังหมัก และบริเวณด้านบนของน้ำหมัก ซึ่งผลจากการเจริญของเชื้อดังกล่าว ทำให้เชื้อบางส่วนไม่ได้รับออกซิเจน และอาหารอย่างเพียงพอ ซึ่งเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 1.0 และ 1.5 วีวีเอ็ม พบว่าปริมาณกรดแลกติก ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ และอัตราการเกิดกรดแลกติกจะสูงขึ้น เนื่องจากเชื้อได้รับออกซิเจนมากขึ้น ในการเพิ่มอัตราการให้อากาศจาก 1.0 เป็น 1.5 วีวีเอ็ม กรดแลกติกที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน แต่พบว่าอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม เชื้อจะมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงกว่า

ในอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม ให้ปริมาณกรดแลกติก 40.35 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง น้ำหนักเซลล์แห้ง 8.55 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.27) ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ 0.036 ต่อชั่วโมง และ อัตราการเกิดกรดแลกติก 0.42 กรัมต่อลิตรชั่วโมง เมื่ออัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม ให้ปริมาณกรดแลกติก 41.94 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง น้ำหนักเซลล์แห้ง 8.47 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.28) โดยมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ 0.042 ต่อชั่วโมง และ อัตราการเกิดกรดแลกติก 0.44 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ในขณะที่อัตรา

การให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม ให้ปริมาณกรดแลกติก 42.32 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง น้ำหนักเซลล์แห้ง 8.77 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.29) โดยมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ 0.046 ต่อชั่วโมง และ อัตราการเกิดกรดแลกติก 0.44 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ซึ่งจากผลดังกล่าวพบว่า ปริมาณกรดแลกติกจะมีค่าใกล้เคียงกัน แต่ค่าอัตราการเจริญจำเพาะจะเพิ่มขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการกวนที่ 200 รอบต่อนาที ที่อัตราการให้อากาศ 1.0 และ 1.5 วีวีเอ็ม พบว่าปริมาณกรดแลกติก และอัตราการเกิดกรดแลกติกจะมีค่าใกล้เคียงกัน แต่ค่าอัตราการเจริญจำเพาะจะเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.33) ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเชื้อ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 เป็นเชื้อราที่เจริญเป็นเส้นใยยาว และจับตัวกันได้ง่าย ในการกวนของไบโพลีที่ระดับต่างๆ จะทำให้เกิดปัญหาการเจริญของเส้นใยที่หนาแน่นบริเวณด้านบนของถังหมัก และด้านข้างของถังหมัก ทำให้ไม่เกิดการหมุนเวียนของเส้นใย เชื้อบางส่วนจึงได้รับอาหารและออกซิเจนไม่เพียงพอ เมื่อพิจารณาจากค่าสถิติ (ตารางที่ 4.34) พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการกวนเป็น 300 รอบต่อนาที ผลผลิตกรดแลกติกมีค่าไม่แตกต่างจากผลผลิตกรดแลกติกที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที เนื่องจากยังพบปัญหาการเจริญของเส้นใยที่หนาแน่น และเส้นใยบางส่วนอาจจะเจริญอุดตันบริเวณท่อให้อากาศ ทำให้ผลผลิตกรดแลกติกไม่เพิ่มขึ้น เนื่องจากเชื้อได้รับออกซิเจนไม่เพียงพอ ในการทดลองของ Soccol *et al.* (1995) พบว่าเชื้อ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 จะผลิตกรดแลกติกได้สูงในสภาพการเลี้ยงที่มีออกซิเจน ส่วนสภาพการเลี้ยงที่มีออกซิเจนจำกัด พบว่าเชื้อจะผลิตเอทานอลแทน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Skory *et al.* (1998) โดยกล่าวว่า การหมักเพื่อผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Rhizopus oryzae* ที่มีออกซิเจนจำกัด จะทำให้กิจกรรมของ alcohol dehydrogenase เพิ่มขึ้น 10 เท่า ของการหมักที่มีออกซิเจน ทำให้เชื้อใช้อาหารเพื่อการผลิตเอทานอลแทนการผลิตกรดแลกติก แต่อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองพบว่าการเพิ่มอัตราการกวนจะทำให้อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เพิ่มขึ้น

เมื่อเพิ่มอัตราการกวนเป็น 400 รอบต่อนาที พบว่าเส้นใยมีการกระจายตัวเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการถ่ายเทมวลสาร ซึ่งได้แก่ ออกซิเจน และอาหารดีขึ้น เนื่องจากอัตราการกวนสูงขึ้น ทำให้ที่อัตราการให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม เชื้อมีการผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้นเล็กน้อย คือ 44.88 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง น้ำหนักเซลล์แห้ง 8.70 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.30) โดยมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเพิ่มขึ้น คือ 0.048 ต่อชั่วโมง และ อัตราการเกิดกรดแลกติกเพิ่มขึ้น คือ 0.46 กรัมต่อลิตรชั่วโมง เมื่อให้อากาศเพิ่มขึ้นเพียงพอต่อการเจริญของเชื้อ คือที่ 1.0 วีวีเอ็ม จะทำให้ปริมาณกรดแลกติกเพิ่มขึ้น คือ 49.80 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง น้ำหนักเซลล์แห้ง 9.86 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.31) โดยมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเพิ่มขึ้น คือ 0.054 ต่อชั่วโมง และ อัตราการเกิดกรดแลกติกเพิ่มขึ้น คือ 0.51 กรัมต่อลิตรชั่วโมง โดยที่อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด คือ 54.56 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง น้ำหนักเซลล์แห้ง 9.67 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4.32) มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด คือ 0.060 ต่อชั่วโมง และ อัตราการเกิดกรดแลกติกสูงสุด คือ 0.56 กรัมต่อลิตรชั่วโมง (ตารางที่ 4.33)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองดังกล่าว จึงพบว่าที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ผลผลิตกรดแลกติกจะเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม แต่เมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม พบว่าไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณกรดแลกติก และที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที พบว่าปริมาณกรดไม่เพิ่มขึ้น แม้ว่าจะมีการเพิ่มปริมาณการให้อากาศ แสดงว่าอัตราการให้อากาศไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณกรดแลกติก แต่พบว่าเชื้อจะมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงขึ้น แสดงว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดี เพราะได้รับออกซิเจนมากขึ้น และเพียงพอที่จะส่งเสริมการเจริญในช่วงแรก หลังจากนั้นการเจริญของเชื้อที่มากขึ้นจะทำให้เชื้อเกาะรวมกันหนาแน่น เชื้อบางส่วนจึงขาดออกซิเจน และอาหาร ทำให้ผลผลิตกรดแลกติกไม่เพิ่มขึ้น ส่วนที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที พบว่าการเพิ่มอัตราการให้อากาศจะมีผลต่อการเจริญ และการผลิตกรดแลกติก เนื่องจากเส้นใยมีการกระจายตัวมากขึ้น ซึ่งจะทำให้ได้รับออกซิเจน และอาหารอย่างเพียงพอ เชื้อจึงมีการเจริญเติบโตมากขึ้น และสร้างกรดแลกติกมากขึ้น Yin *et al.* (1998) ได้กล่าวว่า การเพิ่มอัตราการกวนของไบโพดของถังหมัก ในกระบวนการหมักในอาหารเหลว จะช่วยลดปัญหาการเกาะรวมกันของเส้นใย และการพันของเส้นใยของเชื้อราบริเวณไบโพด นอกจากนั้นจะช่วยลดการอุดตันของเส้นใยที่บริเวณท่อต่างๆ เช่น บริเวณท่อเก็บตัวอย่าง ท่อให้อากาศ และการพันของเส้นใยบริเวณปลาย probe ต่างๆ ซึ่งกรณีดังกล่าวจะทำให้ลดประสิทธิภาพการสร้างผลิตภัณฑ์ และการทำงานของถังหมัก

ในการหมักเพื่อผลิตกรดแลกติกจัดเป็นการหมักในสภาพที่มีอากาศ (Aerobic Fermentation) ดังนั้นเชื้อราจึงจำเป็นต้องได้รับอากาศอย่างค่อนเนื่องในปริมาณที่พอเหมาะ เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ ซึ่งในระหว่างการหมักนี้สามารถให้ปริมาณอากาศได้โดยควบคุมการกวนของไบโพด และการให้อากาศโดยตรง ซึ่งทั้งสองระบบนี้จะช่วยให้มีการแผ่กระจายออกซิเจนในน้ำหมักได้ดี แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และขนาดของถังหมักด้วย (Stanbury and Whitaker, 1984) ซึ่งในถังหมักที่มีเครื่องกวนโดยทั่วไป นิยมใช้อัตราการให้อากาศอยู่ในช่วง 0.5-1.5 วีวีเอ็ม แต่ถ้าใช้อัตราการให้อากาศสูงมากเกินไป ก็อาจจะทำให้อัตราการส่งผ่านออกซิเจนลดลง เนื่องจากฟองอากาศที่เกิดขึ้นปริมาณมากจะท่วมไบโพด ทำให้ไบโพดหมกอยู่ใน gas phase จึงไม่สามารถช่วยส่งผ่านออกซิเจนเข้าไปในสารละลายได้ และเมื่อเพิ่มอัตราการกวนที่สูงมากๆ ก็จะทำให้เกิดฟองได้เช่นกัน และถ้ามีฟองเกิดขึ้นมากๆ จะทำให้อาหารล้นออกจากถังหมักผ่านช่องทางออกของอากาศ หรือช่องทางเก็บตัวอย่าง ทำให้มีการสูญเสียของอาหารเลี้ยงเชื้อ และผลผลิตมีโอกาสเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆ นอกจากนั้นอัตราการกวนที่สูงเกินไปยังไม่เหมาะต่อการเลี้ยงเชื้อรา เพราะเกิดปัญหาการขาดของเส้นใย มีผลทำให้ประสิทธิภาพการสร้างผลผลิตลดลง ในการทดลองจึงใช้อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม ซึ่งเป็นสภาวะที่ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดมาศึกษาความสัมพันธ์ของการเจริญ และการผลิตกรดแลกติกในการทดลองต่อไป ซึ่งสภาวะดังกล่าวใกล้เคียงกับการทดลองของ Soccol *et al.* (1994) ที่ศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

395 โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 120 กรัมต่อลิตร ให้ ปริมาณกรดแลกติก 93 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเลี้ยงในถังหมักแบบ stirred tank ขนาด 5 ลิตร ใน สภาวะอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยให้อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.25 วีวีเอ็ม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.24 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิต โดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในระดับถึงหมักที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และ อัตราการให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม

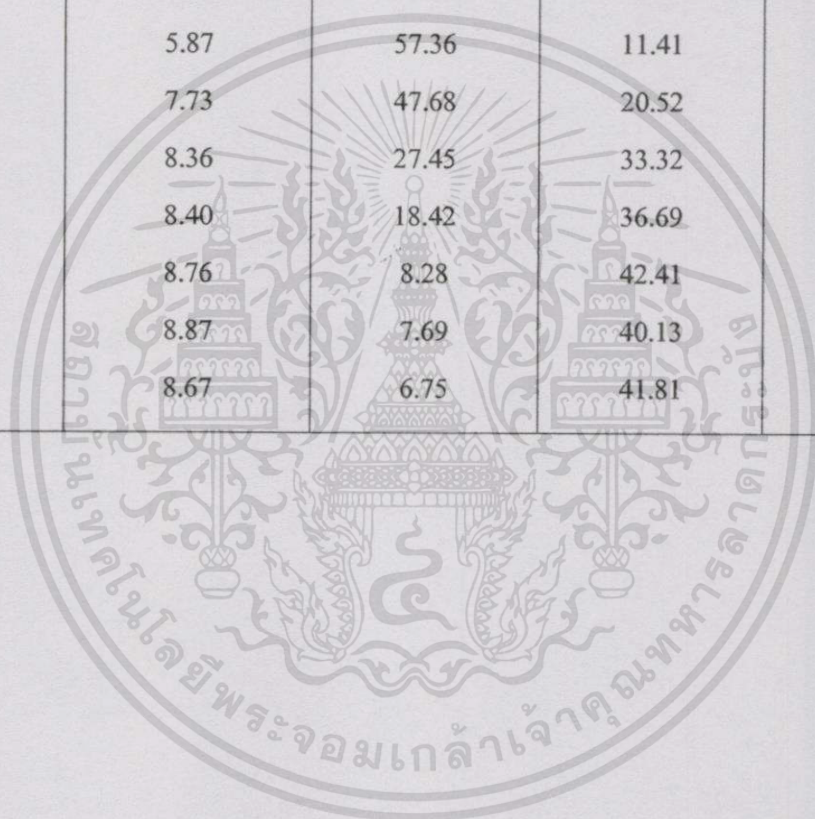
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช ของน้ำหมัก
0	0.23	122	0.00	55.86
12	1.28	119	0.19	4.15
24	2.57	92.62	0.31	4.89
36	3.69	80.03	4.07	5.43
48	4.82	66.72	10.22	5.46
60	5.14	55.57	14.02	5.36
72	7.22	42.29	18.96	5.26
84	7.62	37.33	23.67	5.37
96	8.60	24.51	36.33	5.22
108	8.81	12.38	28.82	5.23
120	8.68	9.02	27.68	5.26

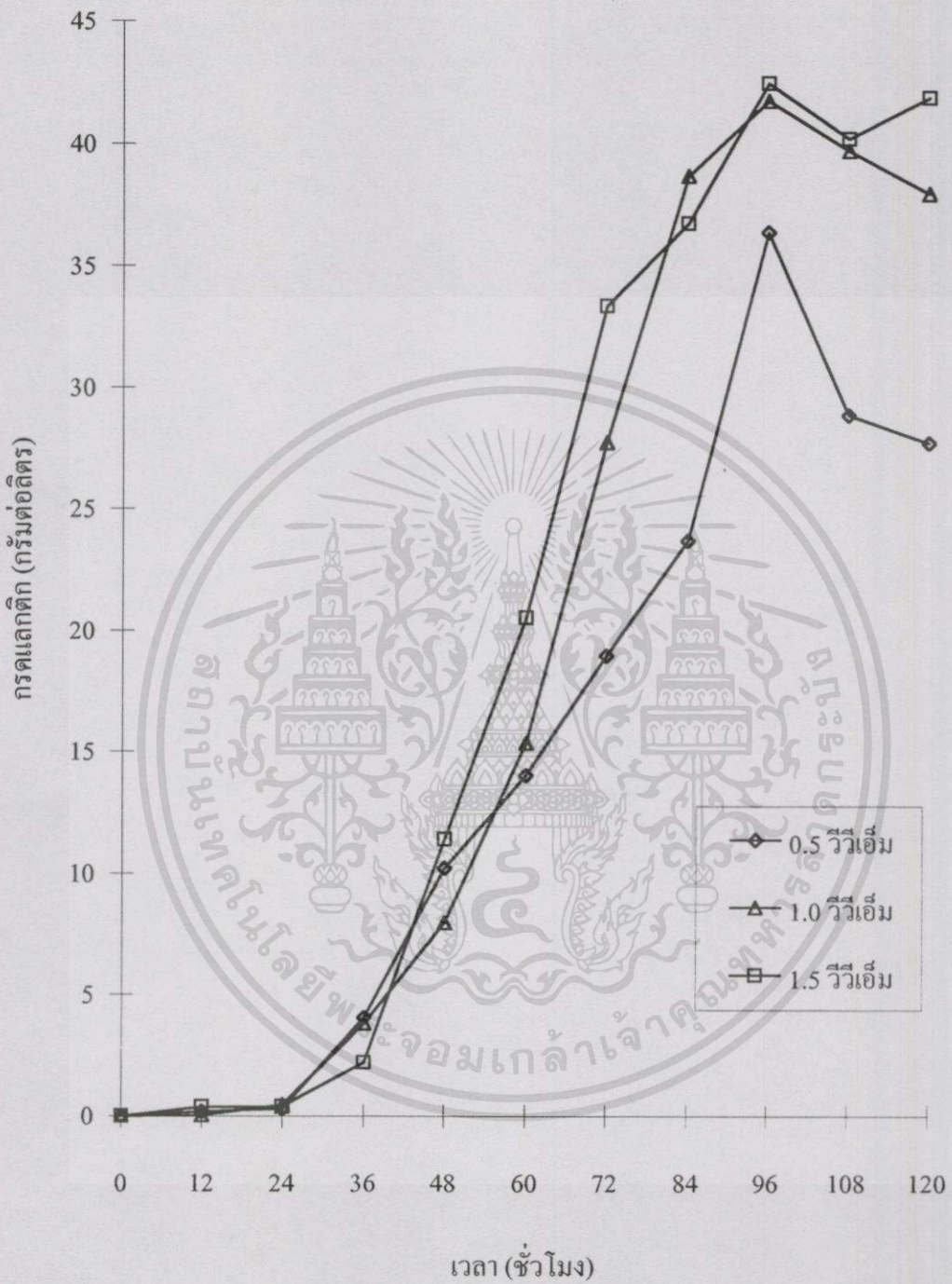
ตารางที่ 4.25 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิต โดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในระดับถึงหมักที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช ของน้ำหมัก
0	0.24	123	0.00	5.92
12	1.48	102	0.04	4.45
24	2.95	96.34	0.46	4.25
36	3.61	76.66	3.82	5.51
48	4.11	58.82	7.96	5.42
60	6.39	42.12	15.35	5.23
72	7.65	20.58	27.73	5.36
84	8.31	10.05	38.63	5.22
96	8.40	7.82	41.68	5.16
108	8.79	6.08	39.65	5.06
120	8.90	5.56	37.89	5.19

ตารางที่ 4.26 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิต โดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในระดับถึงหมักที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และ อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช ของน้ำหมัก
0	0.21	121	0.00	5.91
12	0.39	98.26	0.37	4.90
24	3.04	86.56	0.39	4.55
36	4.82	81.43	2.21	5.08
48	5.87	57.36	11.41	5.30
60	7.73	47.68	20.52	5.33
72	8.36	27.45	33.32	5.40
84	8.40	18.42	36.69	5.47
96	8.76	8.28	42.41	5.36
108	8.87	7.69	40.13	5.06
120	8.67	6.75	41.81	5.22





ภาพที่ 4.7 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในระดับถึงหมักที่ อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศระดับต่างๆกัน

ตารางที่ 4.27 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิต โดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในระดับถึงหมักที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และ อัตราการให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม

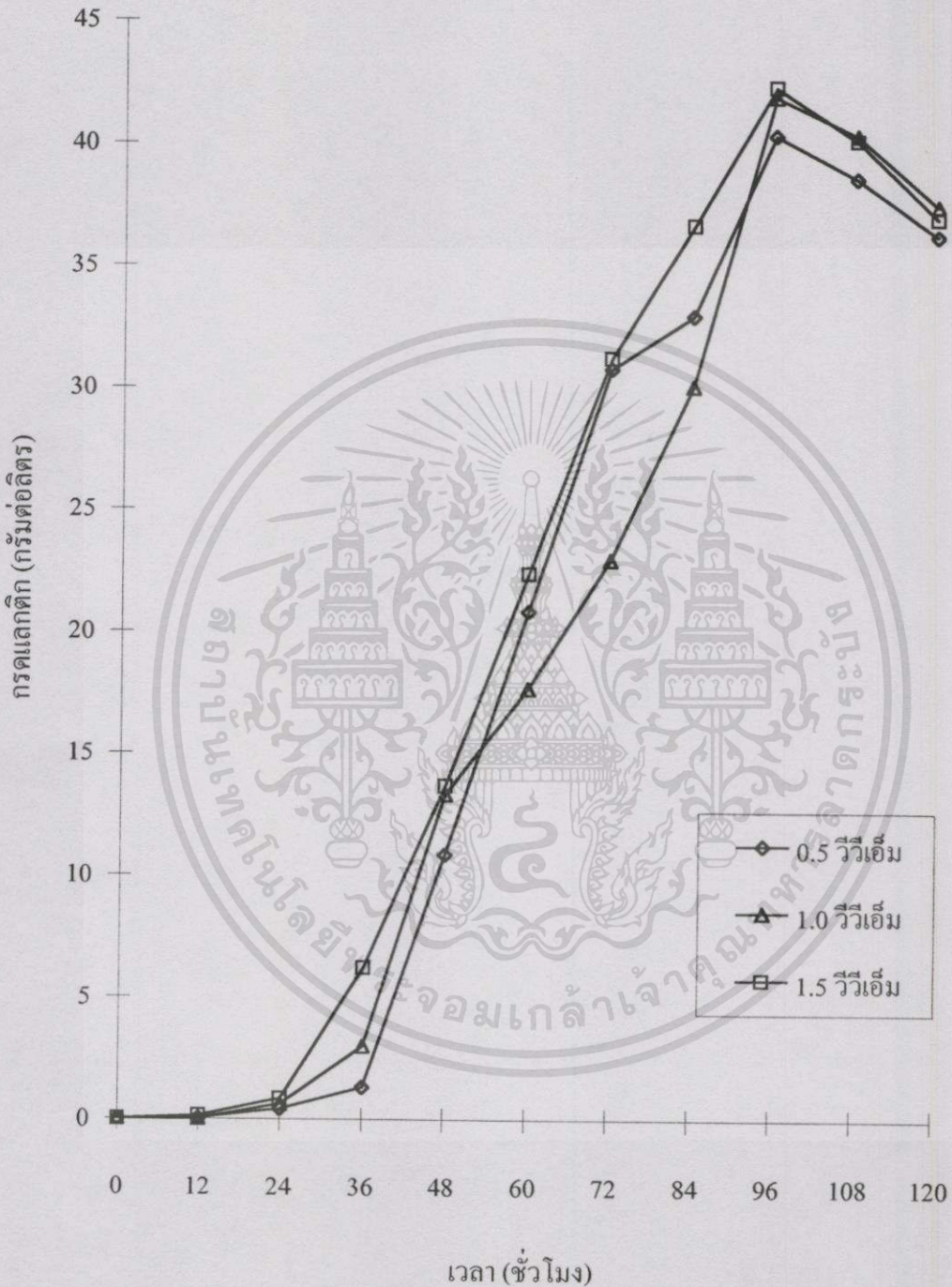
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช ของน้ำหมัก
0	0.23	120	0.00	5.89
12	1.17	112	0.05	4.62
24	3.86	86.72	0.43	4.51
36	4.06	67.75	1.32	5.33
48	5.94	52.62	10.87	5.32
60	6.37	42.95	20.86	5.21
72	8.03	21.56	30.82	5.30
84	8.54	15.98	32.97	5.42
96	8.55	10.96	40.35	5.10
108	8.52	8.25	38.61	5.06
120	8.25	5.67	36.28	5.08

ตารางที่ 4.28 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิต โดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในระดับถึงหมักที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และ อัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช ของน้ำหมัก
0	0.21	120	0.00	5.94
12	1.33	101	0.02	4.96
24	3.57	85.67	0.63	4.64
36	4.71	68.88	3.02	5.56
48	5.54	53.64	13.35	5.47
60	6.31	46.63	17.69	5.38
72	8.23	28.96	22.97	5.31
84	8.24	19.02	30.09	5.26
96	8.47	12.27	41.94	5.27
108	8.64	8.69	40.36	5.21
120	8.55	5.47	37.47	5.10

ตารางที่ 4.29 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิต โดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในระดับตั้งหมักที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และ อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช ของน้ำหมัก
0	0.21	123	0.00	5.91
12	1.38	109	0.14	4.85
24	3.75	88.39	0.85	4.16
36	4.69	78.56	6.24	5.64
48	6.31	54.58	13.69	5.32
60	8.14	48.39	22.39	5.41
72	8.39	32.74	31.25	5.26
84	8.36	22.41	36.68	5.28
96	8.77	13.05	42.32	5.37
108	8.65	9.56	40.16	5.19
120	8.42	6.94	36.98	5.01



ภาพที่ 4.8 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในระดับถึงหมักที่ อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศระดับต่างๆกัน

ตารางที่ 4.30 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิต โดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในระดับถึงหมักที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และ อัตราการให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช ของน้ำหมัก
0	0.20	119	0.00	5.9 ^a
12	0.72	112	0.01	4.89
24	3.75	96.13	0.65	4.67
36	4.64	78.28	5.95	5.58
48	6.81	56.39	16.28	5.65
60	7.85	45.75	22.36	5.41
72	8.30	39.56	31.47	5.36
84	8.48	31.33	30.16	5.29
96	8.70	13.50	44.88	5.22
108	8.79	5.93	43.44	5.23
120	8.49	5.52	39.69	5.30

ตารางที่ 4.31 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิต โดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในระดับถึงหมักที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และ อัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม

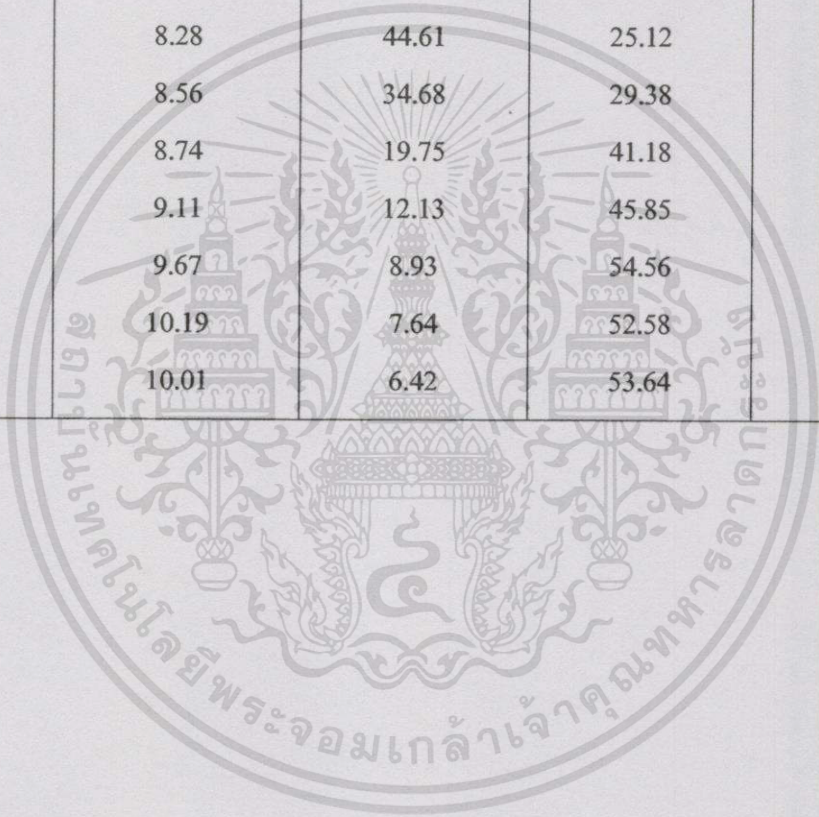
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช ของน้ำหมัก
0	0.19	119	0.00	5.88
12	1.89	109	0.06	4.95
24	5.32	86.93	1.97	4.67
36	5.96	41.56	6.34	5.74
48	7.24	53.58	25.24	5.45
60	8.52	41.57	32.04	5.31
72	8.62	26.28	36.62	5.33
84	8.73	16.28	40.58	5.30
96	9.86	9.02	49.80	5.22
108	9.82	7.10	47.15	5.36
120	9.54	5.26	47.00	5.26

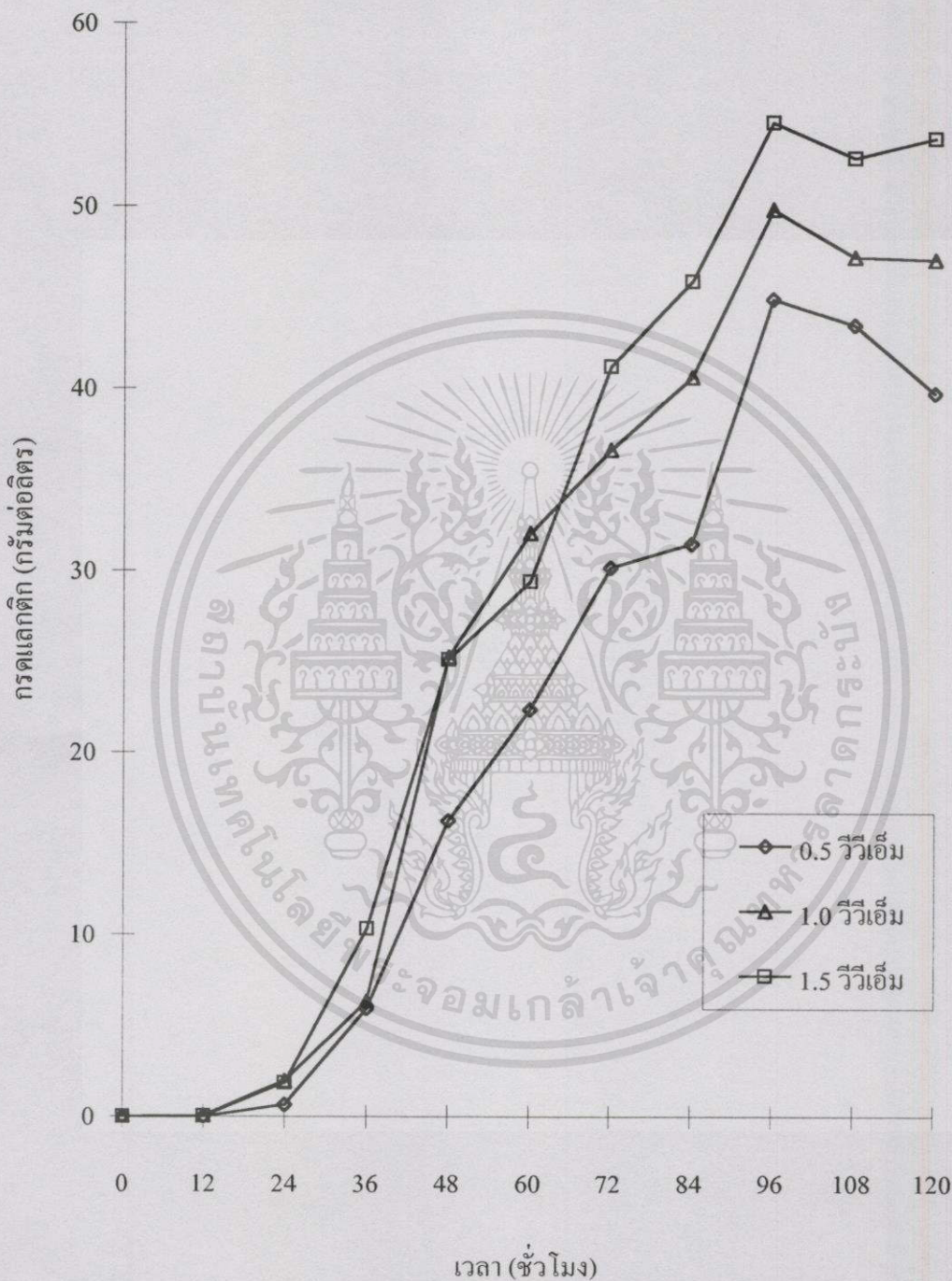
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.32 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิต โดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในระดับถึงหมักที่อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และ อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช ของน้ำหมัก
0	0.23	121	0.00	5.96
12	0.91	96.49	0.02	4.86
24	5.32	82.36	1.86	4.62
36	6.84	67.77	10.32	5.52
48	8.28	44.61	25.12	5.41
60	8.56	34.68	29.38	5.29
72	8.74	19.75	41.18	5.39
84	9.11	12.13	45.85	5.33
96	9.67	8.93	54.56	5.24
108	10.19	7.64	52.58	5.02
120	10.01	6.42	53.64	5.13

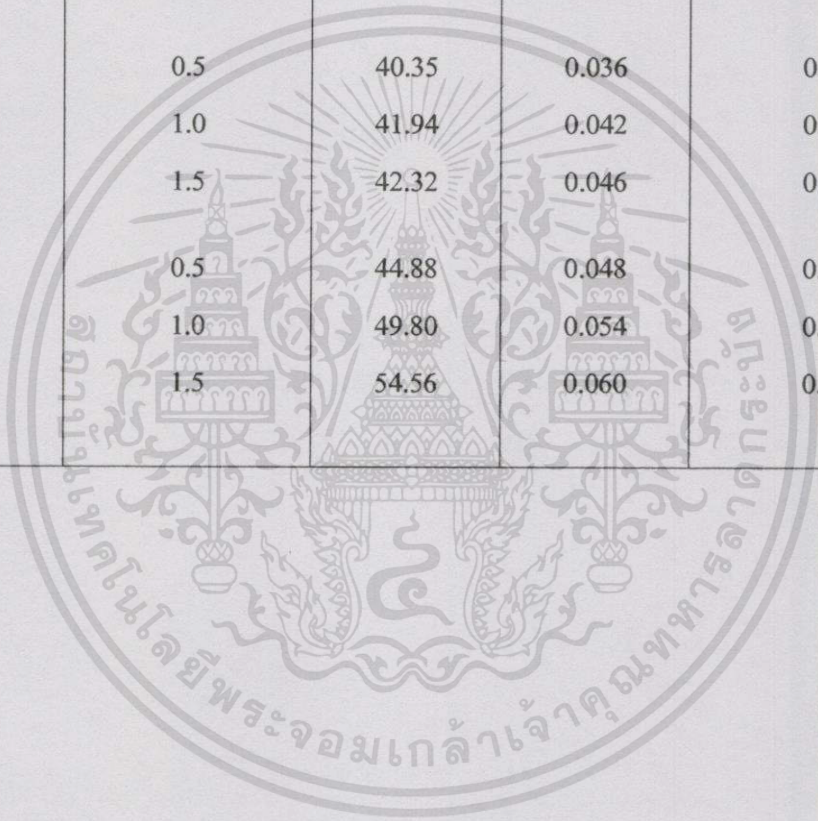




ภาพที่ 4.9 แสดงปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในระดับถึงหมักที่ อัตราการกวน 400 รอบต่ออนาที และอัตราการให้อากาศระดับต่างๆกัน

ตารางที่ 4.33 แสดงปริมาณกรดแลกติก อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และอัตราการเกิดกรดแลกติก (productivity) ที่ผลิตโดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในระดับถึงหมักที่มีอัตราการกวน และ อัตราการให้อากาศระดับต่างๆกัน

อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	อัตราการให้อากาศ (วีวีเอ็ม)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	อัตราการ เจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	อัตราการเกิด กรดแลกติก (กรัมต่อลิตรชั่วโมง)
200	0.5	36.33	0.026	0.38
200	1.0	41.68	0.030	0.43
200	1.5	42.41	0.035	0.44
300	0.5	40.35	0.036	0.42
300	1.0	41.94	0.042	0.44
300	1.5	42.32	0.046	0.44
400	0.5	44.88	0.048	0.46
400	1.0	49.80	0.054	0.51
400	1.5	54.56	0.060	0.56



ตารางที่ 4.34 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของกรดแลกติกในระดับถังหมักที่มีอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศระดับต่างๆกัน

อัตราการกวน (รอบต่อนาที)	อัตราการให้อากาศ (วีวีเอ็ม)	ค่าเฉลี่ยกรดแลกติกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)
200	0.5	36.33 d
200	1.0	41.68 c
200	1.5	42.41 c
300	0.5	40.35 c
300	1.0	41.94 c
300	1.5	42.32 c
400	0.5	44.88 c
400	1.0	49.80 b
400	1.5	54.56 a

หมายเหตุ - ค่าเฉลี่ยของกรดแลกติกที่กำกับในแต่ละคอลัมน์ด้วยอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อใช้ DMRT ที่ระดับนัยสำคัญ 5 เปอร์เซ็นต์

4.3.2 ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อและการผลิตกรดแลกติกในระดับถังหมัก

การศึกษากการผลิตกรดแลกติก จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในระดับถังหมัก โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมของอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศที่ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด จากผลการทดลองในข้อ 4.3.1 คือ อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และ อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ควบคุมพีเอชโดยการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตภายหลังการหมัก 24 ชั่วโมง และไม่มีการเติมสารกำจัดฟอง ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลกติก น้ำตาลทั้งหมด น้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าพีเอช ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า อัตราการใช้ น้ำตาลเป็นสัดส่วนสัมพันธ์กับการผลิตกรดแลกติก โดยกรดแลกติกจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังชั่วโมงที่ 12 และผลิตกรดแลกติกสูงสุด 54.62 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 ดังแสดงในตารางที่ 4.35 ซึ่งจากตารางนี้จะเห็นว่าในวันแรกของการหมัก กรดเกิดขึ้นในปริมาณน้อย อาจเนื่องมาจากสปอร์ของเชื้อจะต้องอาศัยระยะเวลาในการปรับตัว และการงอกเป็นเส้นใย ซึ่งสามารถมองเห็นเป็นเส้นใยชัดเจนในชั่วโมงที่ 24 เชื้อจะใช้น้ำตาลมากขึ้นเพื่อการเจริญเติบโต ซึ่งปริมาณน้ำตาลจะลดลงเรื่อยๆ ในชั่วโมงที่ 96 ที่พบปริมาณกรดสูงสุด น้ำตาลจะเหลือ 8.54 กรัมต่อลิตร และให้น้ำหนักเซลล์แห้งถึง 10.48 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 4.10

ค่าพีเอชเป็นปัจจัยสำคัญของการผลิตกรดแลกติก เมื่อไม่มีการควบคุมค่าพีเอช ปริมาณกรดที่เกิดขึ้นจะยับยั้งการเจริญเติบโต และการผลิตกรดแลกติก ในการทดลองของ Yang et al. (1995) พบว่าเมื่อไม่มีการควบคุมค่าพีเอช จะทำให้ผลผลิตกรดแลกติกมีค่าต่ำ และใช้เวลาการหมักมากกว่า เมื่อมีการควบคุมพีเอช คือ จะให้ปริมาณกรดแลกติก 15 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 5 ของการหมัก และพบว่าการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นตัวควบคุมค่าพีเอช จะทำให้ ค่า pKa สูงถึง 3.86 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และจะต้องใช้ค่าใช้จ่ายที่สูงในการกำจัดโซเดียมไอออนออกจากน้ำหมัก การทดลองครั้งนี้จึงใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเพื่อควบคุมค่าพีเอช โดยเติมในรูปของสารละลายเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะควบคุมค่าพีเอชให้อยู่ในช่วงใกล้เคียงกับค่าพีเอช 5 ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมของการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา

จากการทดลอง พบว่า เซลล์ของเชื้อรามีค่าน้ำหนักแห้งเริ่มต้น เท่ากับ 0.19 กรัมต่อลิตร และจะเพิ่มปริมาณมากขึ้นใน 48 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นจะค่อนข้างคงที่ที่ 10 กรัมต่อลิตร ตลอดระยะเวลาการหมัก เนื่องจากปริมาณอาหารลดน้อยลง โดยในชั่วโมงที่ 96 ของการเพาะเลี้ยง มีปริมาณกรดแลกติกสูงสุดคิดเป็นร้อยละ 47 โดยมีค่าผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.49 กรัมต่อกรัมสับสเตรต มีอัตราการเกิดกรดแลกติก (productivity) เท่ากับ 0.56 กรัมต่อลิตรชั่วโมง และค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.060 ต่อชั่วโมง ซึ่งพบว่า ปริมาณการผลิตกรดแลกติกในระดับถังหมักมีปริมาณต่ำ เนื่องจากมีเชื้อบางส่วนรวมตัวเกาะเป็นกลุ่ม และการหมุนของใบพัดทำให้เส้นใยบางส่วนถูกตัดขาด ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพการผลิตกรดแลกติกลดลง แต่

อย่างไรก็ตาม พบว่าค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) มีค่าสูง ซึ่งอาจจะเกิดจากในระดับถังหมักมีระบบ

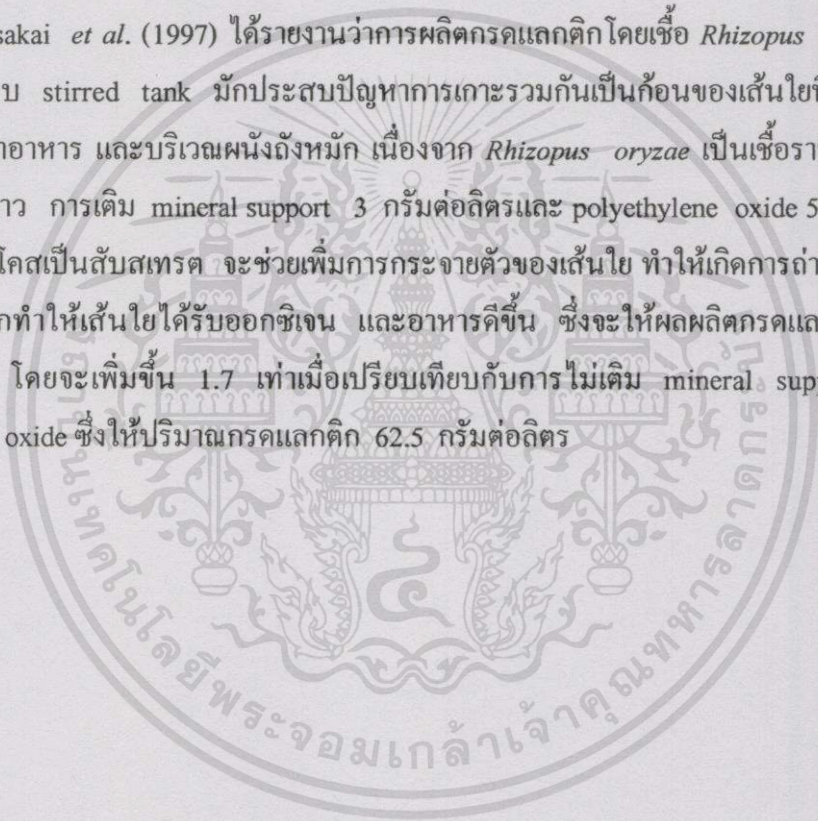
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การควบคุมสภาวะต่างๆ เช่น อุณหภูมิ การกวนและการให้อากาศที่สมบูรณ์และแน่นอน เชื่อจึงมีการปรับตัวในน้ำหมักได้เร็วขึ้น ซึ่งอาหารจะถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว มีผลทำให้เชื่อมีการเจริญอย่างรวดเร็ว และมีการสร้างผลิตภัณฑ์เร็วขึ้น

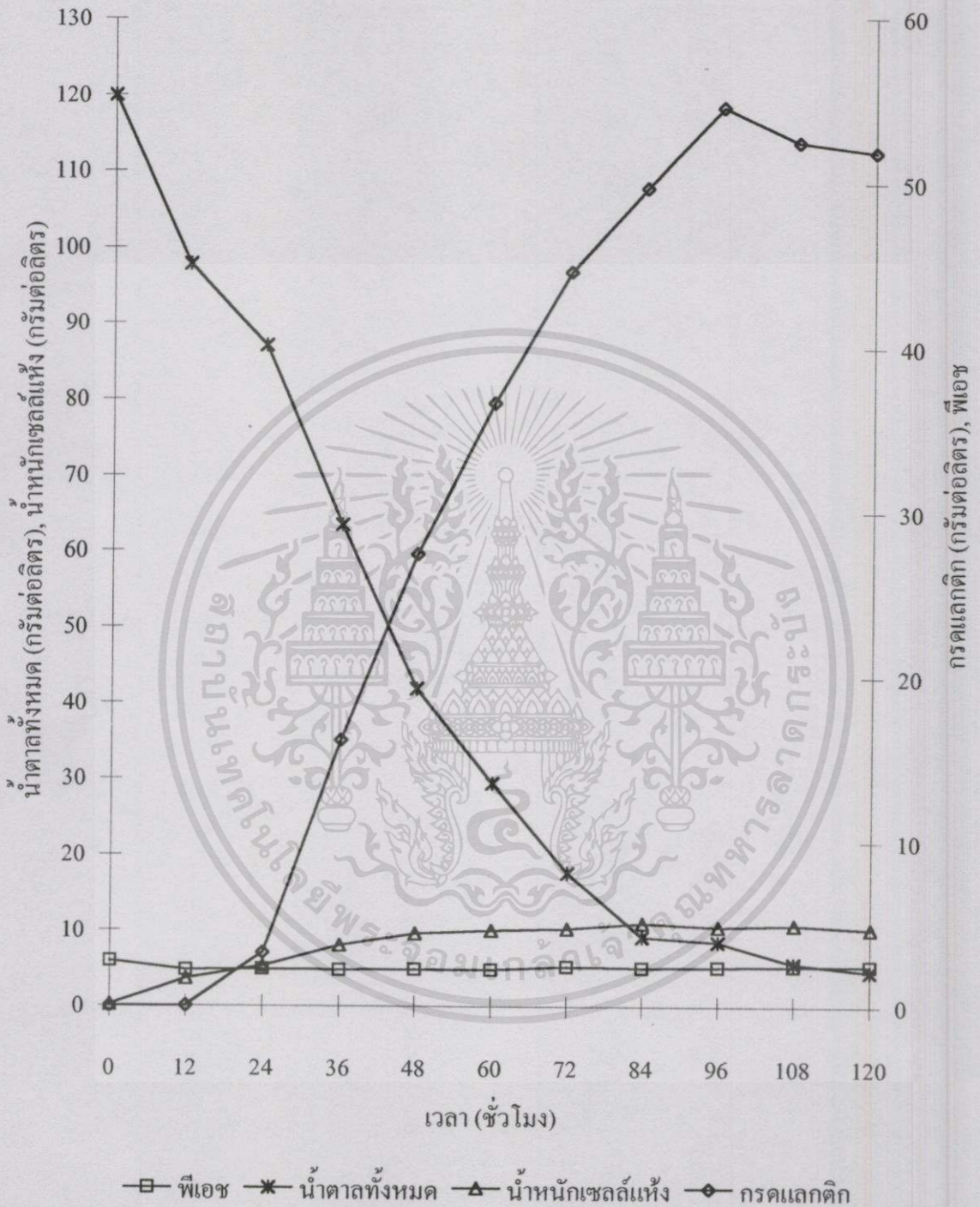
ในการทดลองของ Yin *et al.* (1997) พบว่าปริมาณกรดแลกติกในระดับพลาสติกเขย่าและระดับถังหมักแบบ stirred tank เท่ากับ 95.1 และ 82 กรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยปริมาณกรดแลกติกที่น้อยกว่าอาจเนื่องมาจาก การเกาะรวมกันที่หนาแน่นของเส้นใยบางส่วนที่บริเวณแบฟเฟิล และผนังถัง มีผลทำให้เส้นใยดังกล่าวไม่ได้รับออกซิเจน และอาหารอย่างเพียงพอ ทำให้ผลผลิตกรดแลกติกมีค่าลดลง ซึ่งเมื่อทำการทดลองในระดับถังหมักแบบ air-lift พบว่าจะทำให้ผลผลิตกรดแลกติกสูงขึ้นเท่ากับ 92 กรัมต่อลิตร

Kosakai *et al.* (1997) ได้รายงานว่าการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* โดยใช้ถังหมักแบบ stirred tank มักประสบปัญหาการเกาะรวมกันเป็นก้อนของเส้นใยที่หนาแน่นที่บริเวณผิวหน้าอาหาร และบริเวณผนังถังหมัก เนื่องจาก *Rhizopus oryzae* เป็นเชื้อราที่มีการเจริญของเส้นใยที่ยาว การเติม mineral support 3 กรัมต่อลิตรและ polyethylene oxide 5 ppm ลงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นสับสเตรต จะช่วยเพิ่มการกระจายตัวของเส้นใย ทำให้เกิดการถ่ายเทมวลสารภายในถังหมักทำให้เส้นใยได้รับออกซิเจน และอาหารดีขึ้น ซึ่งจะให้ผลผลิตกรดแลกติก 103.6 กรัมต่อลิตร โดยจะเพิ่มขึ้น 1.7 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกรณีไม่เติม mineral support และ polyethylene oxide ซึ่งให้ปริมาณกรดแลกติก 62.5 กรัมต่อลิตร



ตารางที่ 4.35 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิต โดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในระดับถึงหมัก

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช ของน้ำหมัก
0	0.19	120	0.00	5.95
4	0.53	119	0.018	5.40
8	1.20	110	0.023	4.45
12	3.63	97.82	0.029	4.72
24	5.28	87.06	3.28	4.88
28	6.73	80.11	6.56	4.86
32	7.94	70.87	10.74	4.60
36	8.02	63.42	16.20	4.76
48	9.61	41.89	27.52	4.84
60	10.04	29.41	36.71	4.81
72	10.26	17.66	44.67	5.23
84	10.96	9.17	49.74	5.05
96	10.48	8.54	54.62	5.16
108	10.73	5.67	52.50	5.26
120	10.23	4.59	51.85	5.31



ภาพที่ 4.10 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดย *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในระดับถึงหมัก

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 จากอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ย่อยแป้งมันสำปะหลัง จากการศึกษาพบว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 120 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$ 3.0 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 1.0 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต $(MgSO_4 \cdot 7H_2O)$ 0.25 กรัม ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต $(ZnSO_4 \cdot 7H_2O)$ 0.04 กรัม และ แคลเซียมคาร์บอเนต $(CaCO_3)$ 60 กรัม โดยปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุดคือ 2×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ที่พีเอช 6.0

จากการเลี้ยงเชื้อ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในระดับฟลาस्कแบบเขย่าที่ระดับความเร็ว 200 รอบต่อนาที และอุณหภูมิห้อง (30 ± 2) องศาเซลเซียส ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 68.32 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 120 มีค่าพีเอชสุดท้าย 5.5 น้ำหนักเซลล์แห้ง 10.54 กรัมต่อลิตร มีค่าผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.59 กรัมต่อกรัมสับสเตรต อัตราการเกิดกรดแลกติก (productivity) เท่ากับ 0.57 กรัมต่อลิตรชั่วโมง และค่าอัตราเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.038 ต่อชั่วโมง ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดคิดเป็นร้อยละ 56

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในระดับถังหมักแบบแบตช์ (Batch Fermentation) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดียวกัน ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้ปริมาณสปอร์เริ่มต้นคือ 5×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทำการศึกษาอัตราการกวนที่ 200 300 และ 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.5 1.0 และ 1.5 วิวี่เอ็ม พบว่าอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1.5 วิวี่เอ็ม ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 54.62 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 มีค่าพีเอชสุดท้าย 5.16 น้ำหนักเซลล์แห้ง 10.48 กรัมต่อลิตร มีค่าผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.49 กรัมต่อกรัมสับสเตรต อัตราการเกิดกรดแลกติก (productivity) เท่ากับ 0.56 กรัมต่อลิตรชั่วโมง และค่าอัตราเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.060 ต่อชั่วโมง โดยมีปริมาณกรดแลกติกสูงสุดคิดเป็นร้อยละ 47

ข้อเสนอแนะ

ปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากการทดลองนี้ ก่อนข้างจะมีปริมาณต่ำ และใช้เวลาในการหมักนาน ดังนั้นถ้าจะขยายปริมาณในระดับอุตสาหกรรม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เช่น ทดลองใช้

เอนไซม์แทนการย่อยด้วยกรด และควรเติมหัวเชื้อแทนการใช้สปอร์ เพื่อลดระยะเวลาในการหมัก และช่วยให้เชื้อราปรับตัวในอาหารเร็วขึ้น

ในการใช้ถังหมักแบบใบพัดกวน (stirred tank) โดยวิธีการหมักแบบแบตช์ (batch fermentation) มักประสบปัญหาการเกาะรวมกันที่หนาแน่นของเส้นใยบางส่วนที่บริเวณแบฟเฟิล บริเวณผิวหน้าอาหาร ผงถังหมัก และบริเวณปลาย probe ต่างๆ ซึ่งนอกจากจะทำให้เส้นใยคั่งก่อกว่าไม่ได้รับออกซิเจน และอาหารเพียงพอต่อการเจริญเติบโต และการสร้างผลิตภัณฑ์แล้ว ยังลดประสิทธิภาพการทำงานของเครื่องมือชิ้นด้วย จึงควรศึกษาถึงชนิดของถังหมักแบบอื่นที่เหมาะสมกว่า ตลอดจนวิธีการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมต่อไป



บรรณานุกรม

- กล้าณรงค์ ศรีรอด. 2521. "การพัฒนาผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังในด้านอุตสาหกรรม" วิทยาศาสตร์
การอาหาร. 10 (2) : 39 – 48.
- กล้าณรงค์ ศรีรอด. 2538. "ความรู้เบื้องต้นในการผลิตกลูโคสไซรัปจากแป้งและกากมันสำปะหลัง
เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการ. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการ
เกษตรและอุตสาหกรรม, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- คุณณี ธนะบริพัฒน์. 2537. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะ
วิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ปทุมพร นิมนเณก. 2536. "กรดแลกติกกับอาหารของชาวเอเชีย" วารสารอาหาร. 23(1) : 295-298.
- รวิวรรณ วงษ์สมุทร. 2533. "กรดแลกติกในอุตสาหกรรมอาหาร" วารสารกรมวิทยาศาสตร์บริการ.
24 : 7 – 9.
- วราวุฒิ ครุสงฆ์ และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532. เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ :
สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์
- สุรพล อุปดิลสกุล. 2528. สถิติการวางแผนการทดลองเบื้องต้น. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์
- Adams, M.R. and Hall, G.J. 1988. "Growth Inhibition of Food-Borne Pathogens by Lactic Acid
and Acetic Acids 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.** Stockton Press. Vol.1. 1181-1183.
- Association of Official Analytical Chemists. 1975. **Official Method of Analysis.** 13th ed.
Washington : George Bants Company.
- Baker, S.B. and Summerson, W.H. 1941. "Preparation and Colorimetric Determination of Lactic
Acid." *J. Biol. Chem.* 241-246.
- Bernfeld, P. 1955. "Amylase" in **Method in Enzymology** .Vol.1. New York : Academic Press.
- Bilgrami, K.S. and Verma, R.N. 1981. **Physiology of Fungi.** 2nd ed. Vikas Publishing House
PVT Ltd.
- Bonner, J. and Varner, J.E. 1965. **Plant Chemistry.** Academic Press.

- Brock, T.D. and Mandigan, T.M. 1988. **Biology of Microorganisms**. 5th ed. New York. Prentice Hall. 751-754.
- Cheng, P., Mueller, R.E., Jaeger, S., Bajpai, R. and Iannotti, E.L. 1991. "Lactic Acid Production from Enzyme-Thinned Corn Starch using *Lactobacillus amylovorus*." **J. Ind. Microbiol.** 7 : 27-34.
- Collins, P.M. 1987. **Carbohydrates**. Chapman and Hall Chemistry Sourcebook Ltd.
- Deacon, J.W. 1997. **Introduction to Modern Mycology**. 2nd. Billing and Sons Ltd.
- 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.
- Dutta, K.S., Mukherjee, A. and Chakraborty, P. 1996. "Effect of Product Inhibition on Lactic Acid Fermentation : Simulation and Modelling." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 46 : 410-413.
- Foster, D.S. 1972. "Lactic Acid and Its Derivatives." **Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis**. Vol.15 : 127 pp.
- Freidmann, I.E. and Greaser, J.B. 1933. "The Determination of Lactic Acid." **J. Biol. Chem.** 100 : 291 - 308.
- Grace, M.R. 1977. **Cassava Processing**. Food and Agriculture Organization of The United Nation, Rome. 155 pp.
- Hang, Y.D. 1989. "Direct Fermentation of Corn to L(+)-lactic Acid by *Rhizopus oryzae*." **Biotechnol. Lett.** 11(4) : 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.** 2 (2) : 119-120.
- Holten, C.M., Moller, A. and Reh binder, D. 1971. **Lactic Acid**. Weinherim : Bergstrverla Chemie.
- Hough, L. 1954. "Analysis of Mixtures of Sugar by Paper and Cellulose Column Chromatography" in **Method of Biochemical Analysis**. New York. Interscience Publishers. Vol.1: 205-242.
- Huss, M. 1991. **Saccharification of Cassava Starch Assisted by An Ultrafiltration Reactor**. Master of Science Thesis, Asian Institute of Technology, Thailand.
- Johnson, R.M. and Raymond, W.D. 1965. **The Chemical Composition of Tropical Food Plants**. IV Manioc. Tropical Product Institute, London. 744 pp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารทสวงไว้สาหรับการเขางานเพอการศึกษาเท่านั้น ไม่นอญูชาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิน อีกรั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Knight, J.W. 1969. **The Starch Industry**. Pergamon Press. 187 pp.
- Kosakai, Y., Park, Y.S. and Okabe, M. 1997. "Enhancement of L(+)lactic Acid Production Using Mycelial Flocs of *Rhizopus oryzae*." **Biotechnol. Bioeng.** 55(3) : 461-470.
- Krzeczowska, M. and Urbanek, H. 1975. "Isolation and Some Properties of Glucoamylase from *C. charlicola Lindau*." **Appl. Microbiol.** 30 (7) : 160 – 166.
- Kunst, A., Dracqer, B. and Zieqenborn, J. 1984. In **Method of F azymatic Analysis : Colorimetre Methods with Glucose Oxidase and Peroxidase**. 3nd ed. Weinheim : Verlag Chemie.
- Lipinsky, E.S. and Sinclair, R.G. 1986. "Is Lactic Acid a Commodity Chemical ?" **Chem. Eng. Proc.** 82 : 26-32.
- Lloyd, N.E. and Nelson, W.J. 1984. "Glucose and Fructose Containing Sweeteners from Starch." **Chemistry and Technology**. Orlando. Academic Press.
- Lockwood, L.B. 1965. "Lactic Acid." **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 119 : 354 – 867.
- Lockwood, L.B. and Moyer, A.J. 1938. "The Production of Chemicals by Filamentous Fungi" **Bot. Rev.** 4 : 140 – 164.
- Lockwood, L.B., Ward, G.E. and May, O.E. 1936. "The Physiology of *Rhizopus oryzae*" **J. Agri. Res.** 53 (11) : 849-856.
- McDonald, L.C., McFeeters, R.F., Daeschel, M.A. and Fleming, H.P. 1987. "A Differential Medium for The Enumeration of Homofermentative and Heterofermentative Lactic Acid Bacterial." **Appl. Environ. Microbiol.** 53 (6) : 1382-1384.
- McNeil, B. and Harvey, L.M. 1990. **Fermentation : A Practical Approach**. Oxford : Oxford University Press.
- Merck. 1983. **The Merck Index**. 10th ed. Merck and Co. Inc. : 767-768.
- Mermelstein, N.H. 1975. "Immobilized Enzymes Produce High- Fructose Corn Syrups." **Food Techol.** 29 (6) : 20-26.
- Menezes, T.J.B. 1978. "Saccharification of Cassava for Ethy Alcohol Production." **Proc. Biochem.** 13 (9) : 24 – 26.
- Prescott, S.C. and Dunn, C.G. 1959. **Industrial Microbiology**. 3rd ed. New York. Mc.Graw-Hill.
- Prescott, S.C. and Dunn, C.G. 1982. **Industrial Microbiology**. 4th ed. New York. Mc.Graw-Hill.
- Reed, G. 1975. **Enzyme in Food Processing**. 2nd ed. New York : Academic Press. 250 pp.

- 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 (1) : 45-48.
- Scragg, A. H. 1991. **Bioreactors in Biotechnology : A Practical Approach.** England : Eillis Horwood.
- Stanbury, P.F., and Whitaker, A. 1984. **Principles of Fermentation Technology.** Oxford : Pergamon Press.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A. and Hall, S.J. 1995. **Principles of Fermentation Technology.** Oxford : Elsevier Science.
- Sindney, P.C. and Nathan, O.K. 1962. **Methods in Enzymology.** Academic Press.
- Siebold, M., Frieling, P.V., Joppien, R., Rimdfleisch, D., Roper, H. and Schugerl, K. 1995. "Comparison of The Production of Lactic Acid by Three Different *Lactobacilli* and Its Recovery by Extraction and Electrolysis." **Proc. Biochem.** 30 : 81-95.
- Skory, C.D., Freer, S.N. and Bothast, R.J. 1998. "Production of L-lactic Acid by *Rhizopus oryzae* under Oxygen Limiting Conditions." **Biotechnol. Lett.** 20 (2) : 191-194.
- Soccol, C.R., Marin, B., Raimbault, M. and Leebeault, 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.** 10 : 433-435.
- Tominaga, M. and Sato, K. 1996. "Lactic Acid Fermentation of Saccharified Solution from Rice Flour." **J. Food Sci.** 61 (3) : 627-631.
- Waksman, S.A. and Foster, J.W. 1938. "Respiration and Lactic Acid Production by a Fungus of The Genus *Rhizopus*." **J. Agric. Res.** 57 (12) : 873 - 899.
- Waksman, S.A. and Hutchings, I.J. 1937. "Lactic Acid Production by Species of *Rhizopus*." **J. Am. Chem. Soc.** 59 : 545 - 547.
- Ward, G.E., Lockwood, L.B., May, O.E. and Herrick, H.T. 1936. "Biochemical Studies in The Genus *Rhizopus*. I. The Production of Dextro - Lactic Acid." **J. Am. Chem. Soc.** 58 : 1286 - 1288.
- Wang, D.I.C., Cooney, G.L., Demain, A.L., Dunnill, P., Humphrey, A.E. and Lilly, M.D. 1979. **Fermentation and Enzyme Technology.** New York : John wiley & Sons.

- Whistler, R.L. and Paschall, E.F. 1965. **Starch : Chemistry and Technology**. New York. Academic Press.
- Wuleung, W.T., Butrum, R.R. and Chang, F.H. 1972. **Food Composition Table for Use in East Asia**. Part 1. Department of Health, Education, and Welfare, Maryland, 334 pp.
- Xuan, G. 1996. **The Direct Fermentative Production of Lactic Acid Using Various Starch Sources**. Master of Engineering Thesis, Asian Institute of Technology, Thailand.
- Yahiro, K., Shibata, S., Jia, S., Park, Y.S. and Okabe, M. 1997 "Efficient Itaconic Acid Production from Raw Corn Starch" **J. Ferment. Bioeng.** 84 (4) : 375-377.
- Yang, C.W., Lu, Z and Tsao, T.T. 1995. "Lactic Acid Production by Petlet-Form *Rhizopus oryzae* in a Submerged System." **Appl. Microbiol. 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 Bioreator." **J. Ferment. Bioeng.** 85 : 96 - 100.
- Yu, R.C. and Hang, Y.D. 1989. "Kinetics of Direct Fermentation of Agricultural Commodities to L(+) lactic Acid by *Rhizopus oryzae*." **Biotechnol. Lett.** 11(8) : 579-600.
- Yumoto, I. and Ikeda, K. 1995. "Direct Fermentation of Starch to L(+) lactic Acid using *Lactobacillus amylophilus*." **Biotechnol. Lett.** 17 (5) : 543- 546.
- Zhang, D.X. and Cheryan, M. 1991. "Direct Fermentation of Starch to Lactic Acid by *Lactobacillus amylovorus*." **Biotechnol. Lett.** 13 (10) : 733 - 738.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

1. สูตรอาหารที่ใช้เก็บรักษาเชื้อราและเพิ่มจำนวนเซลล์

ได้แก่ โปเตโตเด็กซ์โตรสอการ์ (Potato Dextrose Agar, PDA)

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

มันฝรั่ง	300	กรัม
(ต้มในน้ำเดือดแล้วกรองเฉพาะส่วนใส)		
กลูโคส	20	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อรา

ของ Hang *et al.* (1989)

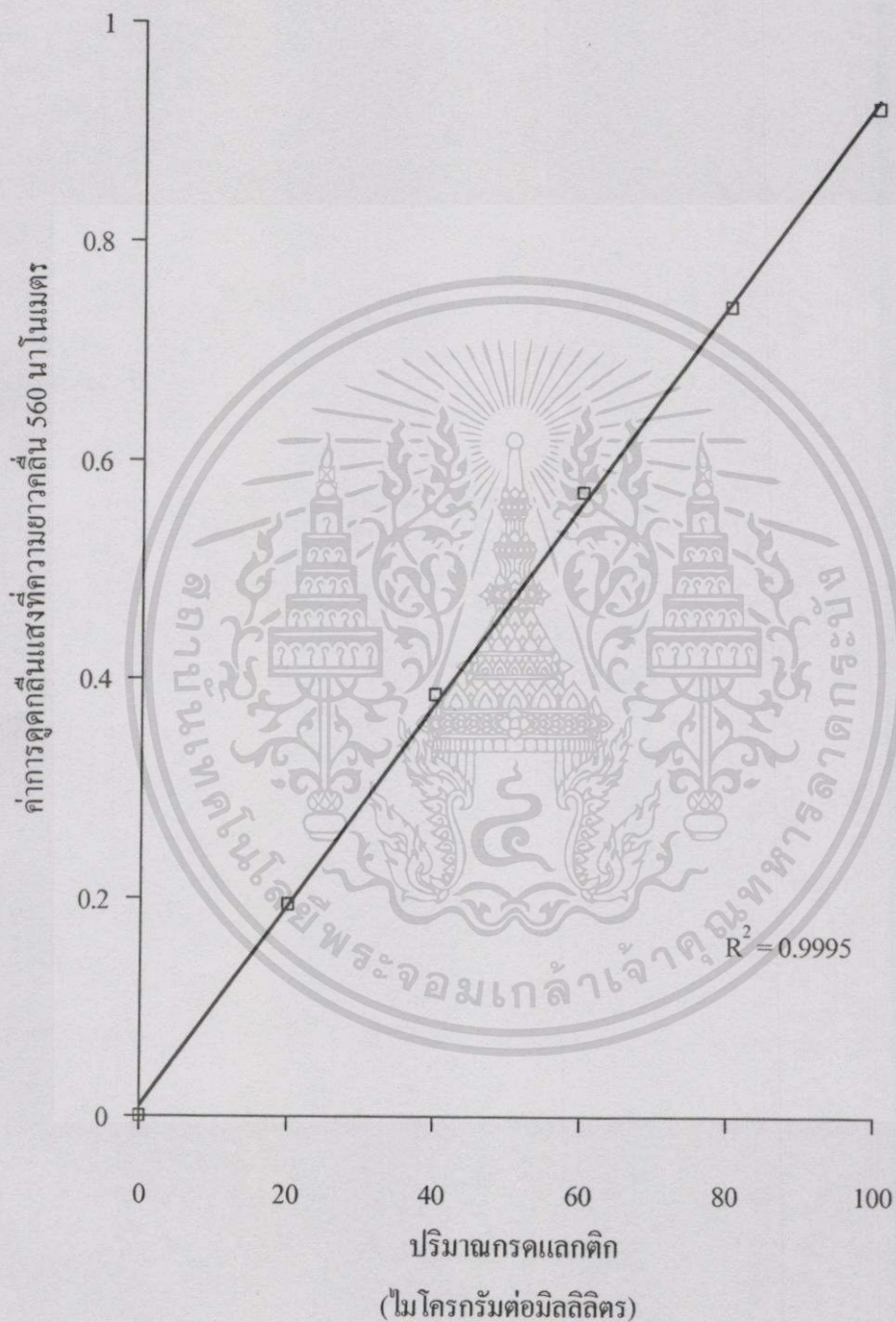
ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

กลูโคส	120	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3)	50	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]	2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.6	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.25	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.04	กรัม

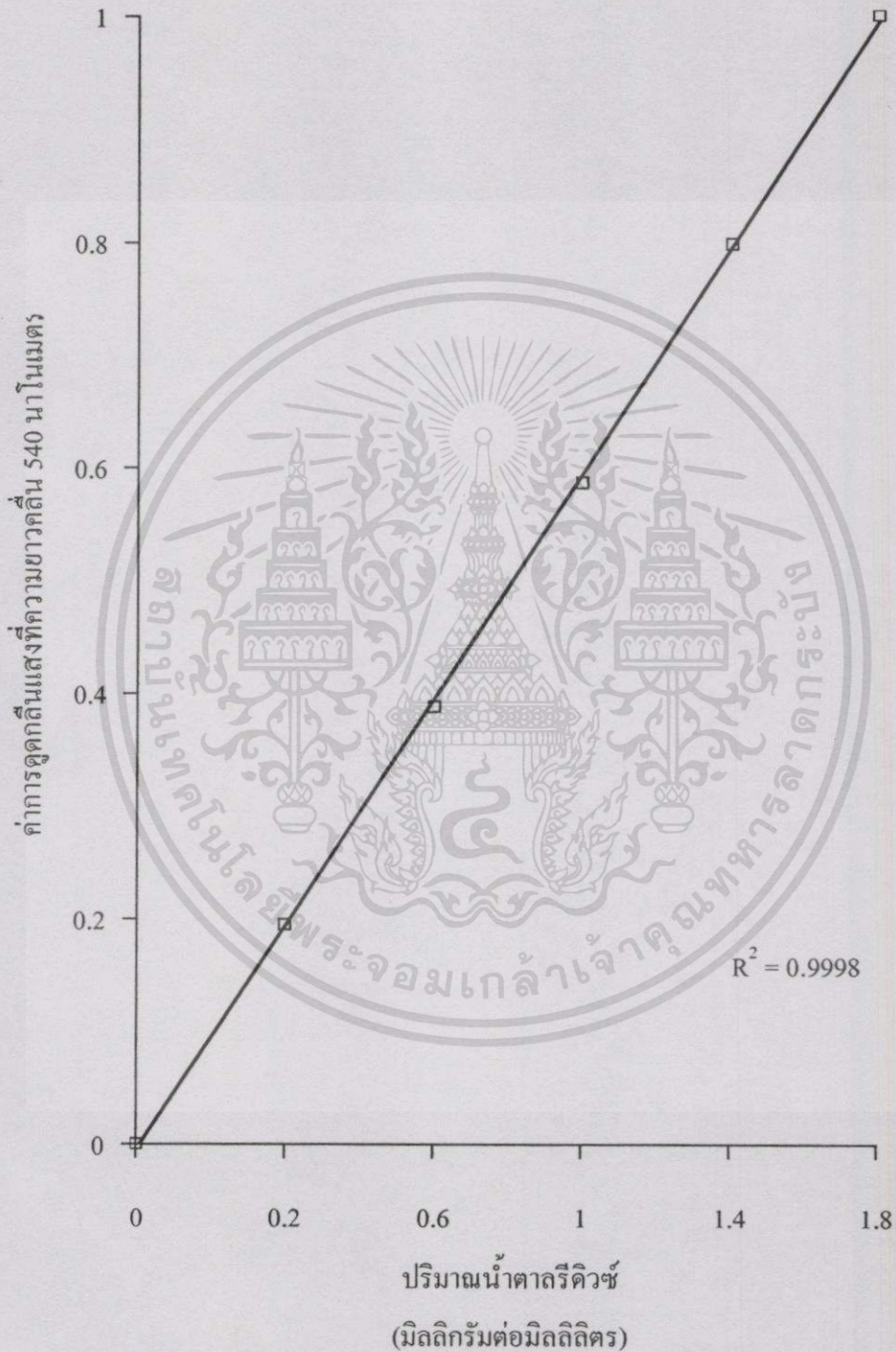
ปรับพีเอชเท่ากับ 6.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

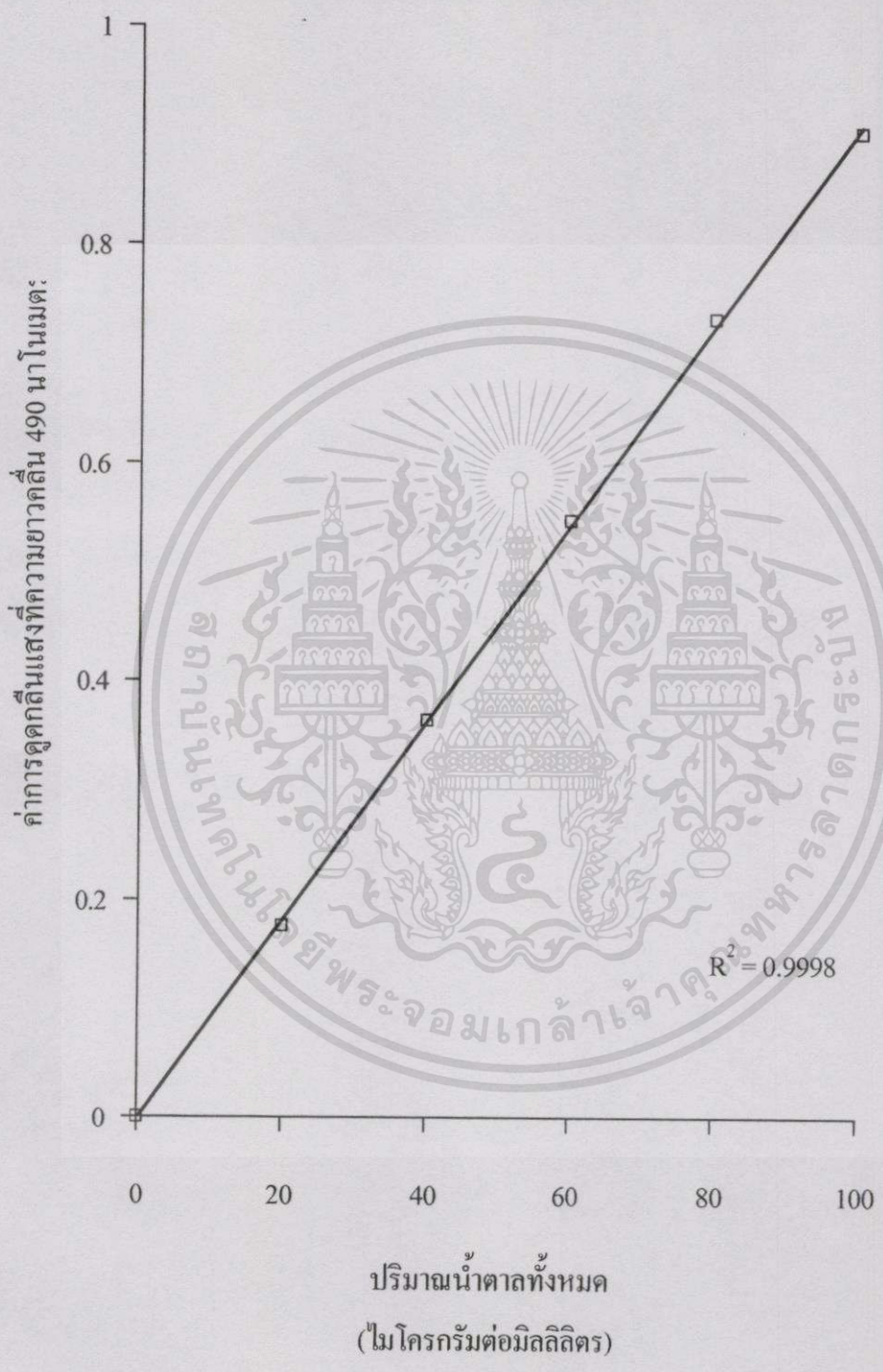
ภาคผนวก ข.



ภาพที่ ข1 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับปริมาณกรดแลกติก



ภาพที่ ข2 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์



ภาพที่ ข3 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวดวงเดือน ภูเจริญ เกิดเมื่อวันที่ 22 กรกฎาคม พ.ศ. 2515 ที่จังหวัดกรุงเทพฯ สำเร็จ การศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา จากมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขต บางเขน ปีการศึกษา 2536

ได้รับทุนการศึกษาจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งชาติ ในการ ศึกษาปริญญาโทที่ คณะวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง เป็นระยะเวลา 1 ปี

