การผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครส โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* NRRL 395

LACTIC ACID PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH AND SUCROSE BY *Rhizopus oryzae* NRRL 395

จิตต์เรขา ทองมณี

JITREKHA TONGMANEE

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

การผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครส โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* NRRL 395

LACTIC ACID PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH AND SUCROSE BY *Rhizopus oryzae* NRRL 395

จิตต์เรขา ทองมณี

JITREKHA TONGMANEE

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

LACTIC ACID PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH AND SUCROSE BY *Rhizopus oryzae* NRRL 395

JITREKHA TONGMANEE

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
2007

COPYRIGHT 2007
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสโดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* NRRL 395
นักศึกษา	นางจิตต์เรขา ทองมณี
รหัสประจำตัว	45064571
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2550
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

บทคัดย่อ

การผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสโดยการหมักของเชื้อ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 70 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 7.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟตเฮบตะไฮเดรต 0.75 กรัมต่อลิตร ซิงค์ซัลเฟตเฮบตะไฮเดรต 0.04 กรัมต่อลิตรและพีเอชเริ่มต้น 6.0 เชื้อสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 89.93 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็วรอบ 240 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส คิดเป็นอัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_P) เท่ากับ 0.94 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) เป็น 0.67 กรัมต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง130 กรัมต่อลิตรที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสและแอมโมเนียมซัลเฟต 3.0 กรัมต่อลิตร แทนแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมซัลเฟต 7.5 กรัมต่อลิตร ในอาหารสูตรเดียวกัน พบว่าผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 61.89 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 108 ชั่วโมง คิดเป็นผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) เท่ากับ 0.85 กรัมต่อกรัมน้ำตาลและอัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_P) เป็น 0.57 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง การผลิตกรดแลกติกในการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เมื่อใช้อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 77.59 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง โดยมีอัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_P) เป็น 0.81 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) เป็น 0.58 กรัมต่อกรัมน้ำตาล เมื่อศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 แบบเฟดแบตช์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตรและแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร หลังจากเลี้ยงเชื้อได้ 24 ชั่วโมง ทำการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร ในอัตราเร็วต่างๆกัน พบว่าผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 42.26 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง

มีผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) เป็น 0.59 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และอัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_P) เป็น 0.44 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้อัตราการเติมน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อชั่วโมง

Thesis Title	Lactic Acid Production from Cassava Starch and Sucrose by *Rhizopus oryzae* NRRL 395
Student	Mrs. Jitrekha Tongmanee
Student ID.	45064571
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2007
Thesis Advisor	Assoc.Prof.Dr. Nuanphan Naranong

ABSTRACT

Lactic acid production from cassava starch and sucrose by *R. oryzae* NRRL 395 was studied. The optimized medium of lactic acid production contained (g/l) : cassava starch, 60 ; sucrose, 70 ; $(NH_4)_2SO_4$, 7.5 ; KH_2PO_4, 1.0 ; $MgSO_4.7H_2O$, 0.75 ; $ZnSO_4.7H_2O$, 0.04 and initial pH of 6.0. The maximum lactic acid production in shake flasks was 89.93 g/l at 96 h with the shaking speed of 240 rpm at 30°c. The productivity (Q_P) and lactic acid yield ($Y_{P/S}$) were 0.94 g/lh and 0.67 g/g sugar, respectively. When 130 g/l cassava starch (hydrolyzed with amylase) and 3.0 g/l ammonium sulfate were used instead of 60 g/l cassava starch and 7.5 g/l ammonium sulfate in the medium, the lactic acid production was 61.89 g/l at 108 h with lactic acid yield ($Y_{P/S}$) of 0.85 g/g sugar and productivity (Q_P) of 0.57 g/lh. The production of lactic acid in batch culture was investigated in 5 litre stirred-tank fermentor at the agitation speed of 400 rpm with the aeration rate of 1.5 vvm at 30°c. The maximum lactic acid was 77.59 g/l at 96 h with the productivity (Q_P) of 0.81 g/lh and lactic acid yield ($Y_{P/S}$) of 0.58 g/g sugar. Moreover, the lactic acid production by *R. oryzae* NRRL 395 was also studied in fed-batch culture using the medium containing 10 g/l sucrose and 60 g/l cassava starch. After 24 h of cultivation, feed medium containing 60 g/l sucrose was fed at different feeding rates. The highest lactic acid production of 42.26 g/l at 96 h with lactic acid yield ($Y_{P/S}$) of 0.59 g/g sugar and productivity (Q_P) of 0.44 g/lh were obtained at the feeding rate of 10 g sucrose/h.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาให้คำแนะนำ ปรึกษาและตรวจทานแก้ไขจาก อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. อุ่นเรือน เพชราวัลย์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รศ. อรไท สุขเจริญ และ ผศ. วีนา ชูโชติ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่กรุณาแนะนำและตรวจทานแก้ไขให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาให้แก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ และบัณฑิตคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ช่วยเหลืออำนวยความสะดวกให้แก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ที่มีส่วนช่วยเหลือและให้กำลังใจด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ นายภิฒตพงศ์และนางสาวพันธ์พิสุทธิ์ สุวรรณัง และ พี่ น้อง ญาติทุกคน ที่เป็นกำลังใจที่มีค่าอย่างยิ่งแก่ผู้วิจัย

ประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ทำให้ผู้วิจัยมีความมุ่งมั่นพยายามจนสำเร็จการศึกษา

จิตต์เรขา ทองมณี

สารบาญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....III

กิตติกรรมประกาศ.....IV

สารบัญ.....V

สารบัญตาราง.....VII

สารบัญภาพ.....IX

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาของงานวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....1

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....2

บทที่ 2 หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 กรดแลกติก.....3

2.2 การผลิตกรดแลกติก.....3

2.3 การผลิตกรดแลกติกโดยแบคทีเรีย.....5

2.4 การผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อรา.....6

2.5 การผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 6

2.6 ประโยชน์ของกรดแลกติกและสารอนุพันธ์ในอุตสาหกรรม.....9

2.7 แป้งมันสำปะหลัง.....10

2.8 โครงสร้างของเม็ดแป้งมันสำปะหลัง.....11

2.9 การย่อยแป้ง.....13

2.10 การทำงานของเอนไซม์อะไมเลส.....13

2.11 ประโยชน์ของแป้งมันสำปะหลัง.....14

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....15

3.1 เชื้อจุลินทรีย์.....15

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์.....15

สารบาญ (ต่อ)

หน้า

3.3 เคมีภัณฑ์.....16
3.4 วิธีทดลอง.....17
3.5 วิธีวิเคราะห์.....21

บทที่ 4 ผลการทดลอง.....25
4.1 ผลการศึกษาการผลิตกรดแลกติกในอาหารแป้งมันสำปะหลังและ
น้ำตาลซูโครสในระดับฟลาสก์.....25
4.2 ผลการศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วย
เอนไซม์อะไมเลสในระดับฟลาสก์.....41
4.3 ผลการศึกษาการผลิตกรดแลกติกในระดับถังหมัก.....51

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....60

บรรณานุกรม.....62

ภาคผนวก.....68
ภาคผนวก ก.....68
ภาคผนวก ข.....70
ภาคผนวก ค.....73

ประวัติผู้เขียน.....85

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญและการผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสที่อัตราส่วนต่างๆ.....26

4.2 เปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสที่อัตราส่วนต่างๆ.....30

4.3 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญและการผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ.....32

4.4 เปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ.....35

4.5 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญและการผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลซูโครส 70 กรัมต่อลิตร และเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ.....37

4.6 เปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตรและ น้ำตาลซูโครส 70 กรัมต่อลิตรและเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ.....40

4.7 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญและการผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* NRRL 395 ใน อาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ และย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส.....42

4.8 เปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น ระดับต่างๆ และย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส.....46

4.9 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญและการผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสและเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ.....48

4.10 เปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกในอาหารแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์ อะไมเลสและเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ.....51

4.11 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญและการผลิตกรดแลกติก ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 แบบแบตช์ในถังหมัก.....52

4.12 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญและการผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* NRRL 395 ในการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ที่มีอัตราการเติมอาหารที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ.....55

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.13 เปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกในการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ที่มีอัตราการเติมอาหารที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ.....59

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 โครงสร้างของกรดแลกติก.....3

2.2 การผลิตกรดแลกติกจากกลูโคส.....4

2.3 แสดงโครงสร้างของแป้ง.....12

4.1 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีอัตราส่วนของแป้งมันสำปะหลัง และน้ำตาลซูโครส 60 : 40 กรัมต่อกรัม.....27

4.2 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีอัตราส่วนของแป้งมันสำปะหลัง และน้ำตาลซูโครส 50 : 50 กรัมต่อกรัม.....28

4.3 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีอัตราส่วนของแป้งมันสำปะหลัง และน้ำตาลซูโครส 40 : 60 กรัมต่อกรัม.....28

4.4 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีอัตราส่วนของแป้งมันสำปะหลัง และน้ำตาลซูโครส 30 : 70 กรัมต่อกรัม.....29

4.5 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสที่อัตราส่วนต่างๆ.....29

4.6. แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 40 กรัมต่อลิตร.....33

4.7 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 50 กรัมต่อลิตร.....33

4.8 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร.....34

4.9 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 70 กรัมต่อลิตร 34

4.10 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ.....35

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.11 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 5.0 กรัมต่อลิตร.....38

4.12 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 7.5 กรัมต่อลิตร.....38

4.13 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 10.0 กรัมต่อลิตร.....39

4.14 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ ความเข้มข้นระดับต่างๆ.....39

4.15 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 70 กรัมต่อลิตรที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส.....43

4.16 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตรที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส.....44

4.17 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 130 กรัมต่อลิตรที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส.....44

4.18 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 160 กรัมต่อลิตรที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส.....45

4.19 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ใน อาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส.....45

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.20 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสและเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 3.0 กรัมต่อลิตร.....49

4.21 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสและเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 5.0 กรัมต่อลิตร.....49

4.22 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสและเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 7.0 กรัมต่อลิตร.....50

4.23 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสและเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ.....50

4.24 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 แบบแบตช์ในถังหมัก 53

4.25 แสดงการเพาะเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 แบบเฟดแบตช์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร....56

4.26 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 แบบเฟดแบตช์ ที่มีอัตราการเติมอาหาร 5.0 กรัมน้ำตาลซูโครสต่อชั่วโมง.....57

4.27 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 แบบเฟดแบตช์ ที่มีอัตราการเติมอาหาร 7.5 กรัมน้ำตาลซูโครสต่อชั่วโมง.....57

4.28 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL395 แบบเฟดแบตช์ ที่มีอัตราการเติมอาหาร 10.0 กรัมน้ำตาลซูโครสต่อชั่วโมง.....58

4.29 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ที่มีอัตราการเติมอาหารที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ.....58

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของงานวิจัย

ประเทศไทยไม่มีการผลิตกรดแลกติกสำหรับใช้เองจึงต้องนำเข้าจากต่างประเทศทำให้สูญเสียเงินตราออกนอกประเทศเป็นจำนวนมากทุกปี กรดแลกติกมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น การใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อเพิ่มความเป็นกรดและถนอมอาหาร ใช้ในอุตสาหกรรมเคมีเพื่อขจัดหินปูน สกัดโลหะ เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางและอุตสาหกรรมทอผ้า ที่สำคัญคือการนำกรดแลกติกมาผลิตเอทธิลแลกเตท ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม การผลิตพอลิเมอร์ที่ใช้ทางการแพทย์และพลาสติกที่ย่อยสลายได้ กรดแลกติกจึงมีศักยภาพเชิงพาณิชย์อย่างมากในอนาคต เฉพาะในสหรัฐอเมริกามีการใช้กรดแลกติก 50,000 ตันต่อปีและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี (Skory. 2003) การผลิตกรดแลกติกสามารถผลิตได้โดยการสังเคราะห์ทางเคมีหรือโดยกระบวนการหมักทางชีวภาพ กระบวนการหมักทางชีวภาพนิยมใช้แบคทีเรียกรดแลกติกและเชื้อรา สำหรับราสามารถใช้สับสเตรทได้หลายชนิดเช่น กลูโคส แลกโตส กากน้ำตาล และแป้งชนิดต่างๆ เป็นต้น การผลิตกรดแลกติกทางชีวภาพระดับอุตสาหกรรมโดยมากใช้วัตถุดิบที่หาได้ง่ายและมีราคาถูกภายในประเทศเช่น ประเทศฮอลแลนด์มีอุตสาหกรรมการผลิตกรดแลกติกโดยใช้น้ำตาลจากหัวบีท ประเทศบราซิลใช้น้ำตาลจากอ้อยเป็นวัตถุดิบ เป็นต้น (CCA Biochem bv. 1985) สำหรับประเทศไทยมีแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อยเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่สำคัญ สามารถหาได้ง่าย ราคาถูกและมีผลผลิตตลอดปี ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่นำแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลจากอ้อยมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตกรดแลกติกโดยการหมักของเชื้อรา

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 จากแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครส

1.2.2 ศึกษาปริมาณของแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสและอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

1.2.3 เปรียบเทียบผลผลิตกรดแลกติกในระดับฟลาสก์และถังหมัก

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมักของเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 โดยใช้ปริมาณของแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆกัน และปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกปริมาณสูง ในระดับฟลาสก์และระดับถังหมัก

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เป็นการเพิ่มมูลค่าแป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นผลผลิตทางการเกษตรที่ราคาถูกและสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศ

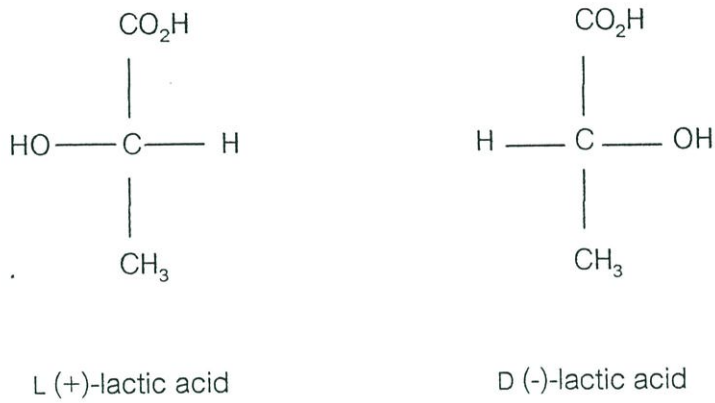
1.4.2 เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรม

1.4.3 เป็นแนวทางสำหรับงานวิจัยขั้นต่อไปในอนาคต

บทที่ 2
หลักการและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดแลกติก

กรดแลกติก (α - hydroxypropionic acid ; milk acid) มีสูตรโมเลกุล $C_3H_6O_3$ มวลโมเลกุล 90.08 มีโครงสร้าง 2 รูปแบบคือ L (+)-lactic acid และ D (-)-lactic acid



L (+)-lactic acid D (-)-lactic acid

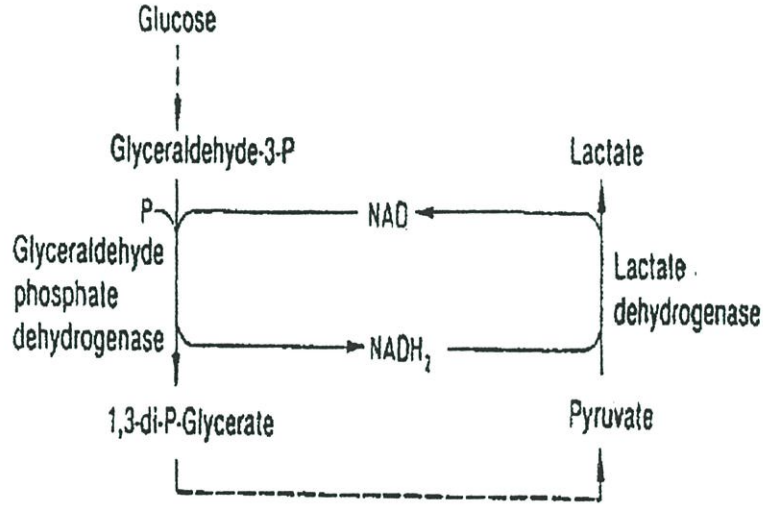
ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของกรดแลกติก (Inskeep. 1952)

สมบัติของกรดแลกติก ไม่มีสีหรือสีเหลืองอ่อน ไม่มีกลิ่น ละลายได้ในน้ำ แอลกอฮอล์ กลีเซอรอลและเฟอร์ฟูรอล ไม่ละลายในคลอโรฟอร์ม ปิโตรเลียมอีเทอร์และคาร์บอนไดซัลไฟด์ กรดแลกติกเชิงพาณิชย์จะอยู่ในแบบไซรัป มีจุดเดือด 122 องศาเซลเซียส (15 มิลลิเมตรปรอท) จุดหลอมเหลว 18 องศาเซลเซียสและมี 4 ชนิดคือ เกรดเทคนิคความเข้มข้นร้อยละ 22 และ 44 เกรดที่ใช้ในอาหารความเข้มข้นร้อยละ 50–80 เกรดสำหรับอุตสาหกรรมพลาสติกความเข้มข้นร้อยละ 50-80 และเกรด USP ความเข้มข้นร้อยละ 85-90 (Richard and Lewis. 1992)

2.2 การผลิตกรดแลกติก

กรดแลกติกเป็นกรดอินทรีย์ชนิดแรกที่ผลิตได้โดยกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ มีการผลิตเชิงพาณิชย์ตั้งแต่ปี ค.ศ.1881 การผลิตกรดแลกติกมี 2 วิธีด้วยกันคือ การผลิตโดยวิธีทางเคมีและโดยกระบวนการหมักทางชีวภาพ ซึ่งทั้งสองวิธีมีอัตราการผลิตเชิงพาณิชย์ร้อยละ 50 และมีการแข่งขันกันในเรื่องราคา การผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมักทางชีวภาพ โดยมากจะใช้แลกติกแอซิดแบคทีเรียซึ่งมีอยู่ 2 ชนิดคือ โฮโมเฟอร์เมนเตทีฟแลกติกแอซิดแบคทีเรียและเฮเทอโร-

เฟอร์เมนเตทีฟแลกติกแอซิดแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดจะให้ผลผลิตที่แตกต่างกันคือ เฮเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟแลกติกแอซิดแบคทีเรีย จะผลิตกรดแลกติกได้น้อยและมีการผลิตสารอื่นๆ เช่น เอทานอล จำนวนมากจึงไม่เหมาะสำหรับการผลิตเชิงพาณิชย์ ส่วนโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ-แลกติกแอซิดแบคทีเรียสามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูง โดยใช้สับสเตรทเพียงเล็กน้อยเพื่อผลิตเซลล์และมีการผลิตสารอื่นๆเล็กน้อย จึงเหมาะสำหรับการผลิตในเชิงพาณิชย์ การผลิตกรดแลกติกโดยจุลินทรีย์เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน กระบวนการเมแทบอลิซึมจะเกิดผ่าน Embden-Meyerhof pathway โดยจะเกิดผ่าน glyceraldehyde-3-P, 1,3-di-P-glycerate และ pyruvate ดังภาพที่ 2.2 ตามทฤษฎีกลูโคส 1 โมล จะถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลกติกได้ 2 โมล ซึ่งจากการทดลองจะได้กรดแลกติกมากกว่าร้อยละ 90 (Crueger and Crueger. 1990)



ภาพที่ 2.2 การผลิตกรดแลกติกจากกลูโคส (Crueger and Crueger. 1990)

แบคทีเรียกรดแลกติกเช่น *Lactobacillus delbrueckii* และ *L. leichmannii* จะใช้กลูโคสเป็นสับสเตรท *L. bulgaricus* ใช้หางนมเป็นสับสเตรทและ *L. pentosus* ใช้ซัลไฟต์เวสต์ลิเคอร์ (sulfite waste liquor) เป็นสับสเตรท

การผลิตกรดแลกติกในกลุ่มของราจะไม่แพร่หลาย โดยพบว่าราที่ผลิตกรดแลกติกได้จะอยู่ในกลุ่ม Mucorals โดยเฉพาะสปีชีส์ต่างๆ ในจีนัส *Rhizopus* เช่น *R . chinensis* , *R. arrhizus* , *R. tririci* , *R. oryzae* , *R. japomicus* และ *R. nigricans* เป็นต้น สามารถผลิตกรดแลกติกได้จากคาร์โบไฮเดรตหลายชนิด เช่น กลูโคส มอลโตส ซูโครส เดกซ์ทรินและแป้งชนิดต่างๆ เป็นต้น

กรดแลกติกที่ผลิตได้อาจเป็นผลผลิตสุดท้ายทั้งหมดหรืออาจมีผลผลิตข้างเคียง เช่น เอทานอล อะซิตอลดีไฮด์หรือกรดซัคซินิกเกิดขึ้นด้วยก็ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อรา (Waksman and Hutchings. 1937)

2.3 การผลิตกรดแลกติกโดยแบคทีเรีย

กรดแลกติกถูกพบครั้งแรกในนมเปรี้ยว โดยเกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลแลกโตสในน้ำนมของเชื้อแบคทีเรีย ที่เรียกว่า แลกติกแอซิดแบคทีเรีย การศึกษาทดลองผลิตกรดแลกติกในช่วงแรกๆ จึงนิยมใช้จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้

Zhang and Cheryan (1991) ทดลองผลิตกรดแลกติกโดยการหมักแบบแบตช์ (batch fermentation) ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus amylovorus* NRRL B 4542 ในอาหารที่มีแป้งข้าวโพด 120 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองแป้งข้าวโพดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส (liquefied corn starch) ร้อยละ 0.055 น้ำหนักต่อน้ำหนักแป้ง เชื้อผลิตกรดแลกติกได้ 96.2 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 20 ชั่วโมง และแป้งข้าวโพดที่ไม่ผ่านการย่อย (raw starch) จะได้กรดแลกติก 92.5 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 39 ชั่วโมง

Yumoto and Ikeda (1995) รายงานการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus amylophius* JCM 1125 โดยใช้อาหารที่มีแป้ง (soluble starch) 50 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่สภาวะไร้อากาศ พบว่าที่อุณหภูมิ 28 และ 35 องศาเซลเซียส เชื้อผลิตกรดแลกติกได้ไม่แตกต่างกัน แต่ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสจะผลิตกรดแลกติกได้น้อย การเติม Na_2CO_3 เพื่อควบคุมค่าพีเอช พบว่าที่พีเอช 5.0 6.0 และ 6.8 เชื้อผลิตกรดแลกติกได้ไม่แตกต่างกัน เมื่อทดลองใช้อาหารที่มีแป้ง 100 กรัมต่อลิตร เชื้อผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 53.4 กรัมต่อลิตรและกรดแลกติกที่ได้เป็น L (+) lactic acid ร้อยละ 92.5

Xiaodong et. al. (1997) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *L. amylovorus* ATCC 33620 ในอาหารที่ประกอบด้วยแป้งชนิดต่างๆ 10 กรัมต่อลิตร คือ แป้งข้าวโพด แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวสาลี แป้งมันสำปะหลังและแป้งมันฝรั่ง ทำการทดลองในฟลาสก์แบบไม่มีอากาศและเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณกรดแลกติก 10.1 7.9 7.8 4.8 และ 4.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทและเติมเปปโตนร้อยละ 1 ในอาหารแทนยีสต์สกัดทำให้ผลผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้นเป็น 7.7 กรัมต่อลิตร

2.4 การผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อรา

ปี ค.ศ. 1894 Eijkmann ได้พบว่า เชื้อรา *Mucor rouxii* (*rouxianus*) สามารถผลิตกรดแลกติกได้ ต่อมาจึงมีการศึกษาทดลองการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ (Ward et. al. 1936)

Kurosawa et. al. (1988) ทดลองผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันฝรั่ง (soluble potato starch) โดยเชื้อ *Aspergillus awamori* Nakazawa IFO 4033 และเชื้อ *Streptococus lactis* IFO 12007 ที่ตรึงเซลล์ร่วมกันในแคลเซียมอัลจิเนต (Ca–alginate gel beads) เชื้อ *A. awamori* สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพื่อย่อยแป้งมันฝรั่งเป็นกลูโคสและเชื้อ *S. lactis* สามารถหมักกลูโคสให้ได้กรดแลกติก การทดลองทำในฟลาสก์โดยใช้อาหารเหลวที่มีแป้งมันฝรั่ง 50 กรัมต่อลิตรเป็นสับสเตรท เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ผลิตกรดแลกติกได้ 25 กรัมต่อลิตร

Soccol et. al. (1994c) ได้ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Rhizopus* 19 สายพันธุ์บนอาหารแข็ง เพื่อศึกษาการผลิตกรดแลกติก กรดฟูมาริก เอทานอลและเอนไซม์อะไมเลส โดยใช้มันสำปะหลังที่มีขนาด 0.8-2.0 มิลลิเมตรเป็นสับสเตรท ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีมันสำปะหลังดิบ (raw cassava) เปรียบเทียบกับอาหารที่มีมันสำปะหลังสุก (cooked cassava) ผลการทดลองพบว่า การใช้มันสำปะหลังดิบเชื้อ *R. oryzae* MUCL 28627 ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสได้สูงสุด 98.00 และ 108.00 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ เมื่อใช้มันสำปะหลังสุก เชื้อ *R. oryzae* MUCL 28168 ผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสได้สูงสุด 178.40 และ 46.22 ยูนิตต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ และเชื้อ *Rhizopus* ทั้ง 19 สายพันธุ์ผลิตกรดแลกติก กรดฟูมาริก และเอทานอลได้ปริมาณเล็กน้อย

Zhou et. al. (1999) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *R. oryzae* ATTC 52311 โดยควบคุมอัตราการให้อากาศใน bubble columm เมื่อใช้อาหารที่มีกลูโคสเริ่มต้น 94 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 83 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 32 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยง คิดเป็นผลผลิตกรดแลกติก 0.88 กรัมต่อกรัมกลูโคสและอัตราการผลิตกรดแลกติกเป็น 2.58 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

2.5 การผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395

การผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ได้มีการศึกษาทดลองกันมาก เพราะเชื้อราสายพันธุ์นี้สามารถใช้สับสเตรทที่เป็นคาร์โบไฮเดรตได้หลากหลายทั้ง ข้าว แป้งและน้ำตาล นอกจากนี้ยังใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงได้ทั้งแบบอาหารเหลวและอาหารแข็ง

Hang (1989) รายงานผลการทดลองผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 จากข้าวโพดบด 15 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่าที่ 240 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 92 ชั่วโมง ข้าวโพดมีกลูโคสเริ่มต้น 818.5 กรัมต่อกิโลกรัม เมื่อทำการทดลองซ้ำ 8 ครั้งสามารถผลิตกรดแลกติกได้ประมาณ 303–390 กรัมต่อกิโลกรัมข้าวโพด (เฉลี่ย 354 กรัมต่อกิโลกรัมข้าวโพด) มีกลูโคสเหลือเฉลี่ยประมาณ 17 กรัมต่อกิโลกรัมข้าวโพด ดังนั้นมีการใช้กลูโคสไปร้อยละ 98 และผลิตกรดแลกติกได้มากกว่า ร้อยละ 44 ของกลูโคสที่ใช้

Yu and Hang (1989) ทดลองผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 จากผลผลิตทางการเกษตรคือ ข้าวบาเลย์ มันสำปะหลัง ข้าวโพด ข้าวโอ๊ตและข้าวเจ้า โดยใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับ Hang (1989) พบว่าอัตราการใช้คาร์โบไฮเดรตและการผลิตกรดแลกติกขึ้นอยู่กับชนิดของสับสเตรท เมื่อใช้ข้าวเจ้าเป็นสับสเตรทเชื้อราผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดประมาณ 450 กรัมต่อกิโลกรัมสับสเตรท รองลงมาคือ ข้าวโพดและมันสำปะหลังได้ผลผลิตกรดแลกติก 400 และ 350 กรัมต่อกิโลกรัมสับสเตรท เมื่อทดลองใช้ข้าวเจ้าที่ร้อยละ 5 10 และ 15 เป็นสับสเตรท พบว่าข้าวเจ้าร้อยละ 5 เชื้อราผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดประมาณ 475 กรัมต่อกิโลกรัมสับสเตรท การทดลองใช้อุณหภูมิเพาะเลี้ยงที่ .23 30 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสจะได้ผลผลิตกรดแลกติกสูงกว่าที่อุณหภูมิอื่นๆ การทดลองใช้แคลเซียมคาร์บอเนตปรับค่าพีเอช พบว่าการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตเชื้อราผลิตกรดแลกติกได้สูงกว่าเมื่อไม่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต นอกจากนี้ได้ศึกษาปริมาณสปอร์เริ่มต้นที่ 1×10^7 ถึง 3×10^7 สปอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งผลผลิตกรดแลกติกที่ได้ไม่มีความแตกต่างกัน

Soccol et. al. (1994a) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Rhizopus* 19 สายพันธุ์ทำการทดลองในฟลาสก์ที่มีอาหารประกอบด้วยกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรและสารอาหารอื่นๆ ผลการทดลองมีเชื้อ *Rhizopus* เพียง 4 สายพันธุ์เท่านั้นที่ผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงคือ *R. oryzae* NRRL 395 , *R. arrhizus* MUCL 16179 , *R. delemar* ATCC 34612 และ *R.* arrhizus MUCL 28425 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 65 40 38 และ 33 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และผลิตกรดฟูมาริกได้ 4 30 28 และ 24 กรัมต่อลิตรตามลำดับและผลิตเอทานอลได้เล็กน้อย นอกจากนี้ได้ศึกษาอิทธิพลของอากาศและการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตในการปรับค่าพีเอช ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบมีอากาศและเติมแคลเซียมคาร์บอเนต เชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 65 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง

Soccol et. al. (1994b) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 บนอาหารแข็ง (solid state fermentation) ที่ประกอบด้วยซานอ้อยและสารละลายอาหารที่มีกลูโคสรวม 180 กรัมต่อลิตรในถังหมักแบบคอลัมน์ สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 137 กรัมต่อลิตร คิดเป็น

อัตราการผลิตกรดแลกติก 1.43 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลิตกรดฟูมาริกได้ 20.24 กรัมต่อลิตรและไม่มีการผลิตเอทานอล ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีกลูโคส 120 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดแลกติกได้ 93.8 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตกรดแลกติก 1.38 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลิตกรดฟูมาริกได้ 2.10 กรัมต่อลิตรและมีการผลิตเอทานอลปริมาณเล็กน้อย นอกจากนี้พบว่าออกซิเจนมีความสำคัญต่อการเจริญของเชื้อรา โดยอัตราการให้อากาศ 20 มิลลิลิตรต่อนาที เชื้อราสามารผลิตกรดแลกติกได้สุงสุด

Suntornsuk and Hang (1994) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกและกลูโคอะไมเลส โดยการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *R. oryzae* NRRL 395 เป็น 3 วิธีคือ การใช้แสง UV ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร การใช้สาร N–methyl–N–nitro–N–nitrosoguanidine (NTG) และการใช้แสง UV ร่วมกับ NTG สามารถปรับปรุงได้เชื้อกลายพันธุ์ 38 สายพันธุ์ แล้วทำการเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วยข้าว 5 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 96 ชั่วโมง ผลการทดลองมีเชื้อกลายพันธุ์ 3 สายพันธุ์ที่ใช้ NTG ในการปรับปรุงสายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลกติกได้สูงคือ เชื้อกลายพันธุ์ 1N1 3N4 และ 3N6 ผลิตกรดแลกติกได้ 17.6 17.6 และ 19.8 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์พ่อแม่ผลิตกรดแลกติกได้ 11.2 กรัมต่อลิตร และพบว่าเชื้อกลายพันธุ์ 3N4 เท่านั้นที่ผลิตกลูโคอะไมเลสได้สูงกว่าสายพันธุ์พ่อแม่คือ ผลิตได้ 202 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ในขณะที่สายพันธุ์พ่อแม่ผลิตได้ 131 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

Yin et. al. (1997) รายงานผลการทดลองผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Rhizopus* 8 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเมื่อใช้อาหารเหมาะสมที่ประกอบด้วยแป้งข้าวโพด 120 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 1.35 กรัมต่อลิตรและแร่ธาตุอื่นๆปริมาณเล็กน้อย เมื่อเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เชื้อสามารถผลิตกรดแลกติกได้ร้อยละ 85 ต่อปริมาณแหล่งคาร์บอน การเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบอากาศยกตัว (air-lift bioreactor) ขนาด 3 ลิตร ได้ผลผลิตกรดแลกติก 120 กรัมต่อลิตร เมื่อนำน้ำหมักมาผ่านการทำให้บริสุทธิ์สามารถแยกกรดแลกติกรูปแอลได้ร้อยละ 90 ของน้ำหมัก

Yin et. al. (1998) ศึกษาการเตรียมหัวเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคสและแป้งข้าวโพดอย่างละ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าการใช้สารละลายสปอร์ที่ความเข้มข้น 2×10^3 ถึง 2×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตรอาหาร เชื้อจะเจริญเติบโตเป็นกลุ่มเส้นใย ในขณะที่สารละลายสปอร์ 2×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรอาหารจะได้หัวเชื้อเป็นเพลเลต เมื่อนำเพลเลตไปเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งข้าวโพด 120 กรัมต่อลิตรที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 98.2 กรัมต่อลิตรในระดับฟลาสก์ และ 96.5 กรัมต่อลิตรในถังหมักแบบอากาศยกตัว ที่เวลา 48 ชั่วโมง นอกจากนี้เพลเลตยังสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อีก 9 ครั้ง โดยเมื่อใช้

แป้งข้าวโพดครั้งละ 90 กรัมต่อลิตรสามารถผลิตกรดแลกติกใน 6 ครั้งแรกเฉลี่ย 91 กรัมต่อลิตร และครั้งที่ 7–9 ผลิตกรดแลกติกได้เฉลี่ย 76 กรัมต่อลิตร

Tay and Yang (2002) รายงานผลการศึกษาทดลองใช้ rotating fibrous-bed bioreactor (RFB) เพื่อผลิตกรดแลกติกจากกลูโคสและแป้งข้าวโพดโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ทำการตรึงเซลล์เชื้อรากับผ้าฝ้าย (cotton cloth) เพื่อศึกษาจลนพลศาสตร์และเสถียรภาพของกระบวนการผลิตกรดแลกติก พบว่าพีเอชและออกซิเจนละลาย (DO) มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยสภาวะที่เหมาะสมคือพีเอช 6 และความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในอาหารร้อยละ 90 เชื้อจะผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดร้อยละ 90 โดยน้ำหนักและผลผลิตกรดแลกติกเป็น 2.5 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคสเป็นสับสเตรทในการหมักแบบเฟดแบตช์ เมื่อใช้แป้งข้าวโพดเป็นสับสเตรท เชื้อผลิตกรดแลกติกได้เกือบร้อยละ 100 โดยน้ำหนักและผลผลิตกรดแลกติกเป็น 1.65 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

2.6 ประโยชน์ของกรดแลกติกและสารอนุพันธ์ในอุตสาหกรรม

กรดแลกติกและเกลือของกรดแลกติก สามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้อย่างกว้างขวางคือ

ผลิตภัณฑ์นม	การทำคอตเตสชีส (cottage cheese) จะผสมกรดแลกติกเพื่อช่วยประหยัดเวลาในการผลิต เนื่องจากกรดแลกติกที่เกิดขึ้นเองในกระบวนการหมักจะใช้เวลานานและเสี่ยงต่อการปนเปื้อน
ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์	ใช้กรดแลกติกเป็นตัวทำลายการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาในเนื้อเป็ด เนื้อไก่ เนื้อวัว เนื้อหมูและกุ้งทะเล ในการทำไส้กรอกจะเติมโซเดียมแลกเตทเพื่อลด water activity และป้องกันจุลินทรีย์ นอกจากนี้สามารถใช้โซเดียมแลกเตทในปริมาณสูงได้ดีกว่าโซเดียมคลอไรด์
ผลิตภัณฑ์เบียร์และไวน์	ในกระบวนการแมชชิ่ง (mashing process) และกระบวนการแอซิดิ-ฟิเคชั่น (acidification) ของไวน์และไซเดอร์ที่มีความเป็นกรดน้อยจะใช้กรดแลกติกในการปรับค่าพีเอช เนื่องจากกรดนี้จะไม่ถูกใช้โดยแบคทีเรีย
ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม	ใช้กรดแลกติกแทนกรดซิตริก เพราะกรดแลกติกจะให้รสและกลิ่นที่นุ่มกว่ากรดซิตริกและไม่บดบังกลิ่นรสเดิมของผลิตภัณฑ์ ใช้กรดแลกติกปรับค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์นม เพื่อให้เกิดการย่อยได้

ผลิตภัณฑ์นมเด็กอ่อน	ง่ายและการเติมเฟอร์รัสแลกเตทด้วยจะเป็นการเพิ่มธาตุเหล็กที่ดูดซึมง่ายต่อร่างกาย
ผักและผลไม้กระป๋อง	การเติมแคลเซียมแลกเตทซึ่งเป็นเกลือที่ดีและติดแน่นกับผักและผลไม้จะช่วยป้องกันการทำลายของเพกตินซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เนื้อผักและผลไม้นิ่ม
เครื่องสำอาง	ใช้กรดแลกติกและโซเดียมแลกเตทเป็นสารให้ความชุ่มชื้นกับผิว โดยเป็นส่วนผสมในครีมบำรุงผิว นอกจากนี้ยังใช้เอธิลแลกเตท เป็นสารป้องกันการเกิดสิว
ทางการแพทย์	ใช้กรดแลกติกผลิตเป็นพอลิแลกติกแอซิด (PLA) เพื่อใช้ทำไหมละลาย ทำอวัยวะเทียมและทำไมโครแคปซูลบรรจุยาเพื่อเป็นตัวช่วยในการแพร่กระจายยา (Drug Delivery System : DDS)

นอกจากนี้กรดแลกติกยังมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมยาสูบ โลหะ เคมีเกษตร สิ่งทอ การฟอกหนังและอื่นๆ (CCA Biochem bv. 1985)

2.7 แป้งมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า มานิฮอท เอสคูเลนตา (*Manihot esculenta* Grantz) มีชื่อตามแหล่งที่ปลูกเช่น คาซซาวา (cassava) มานิออค (manioc) แมนดิโอคา (mandioca) ทาพิโอคา (tapioca) เป็นต้น มันสำปะหลังเป็นพืชที่ทนความแห้งแล้งได้ดีจึงปลูกได้ตามเขตร้อนต่างๆทั่วโลก เช่น ฟิลลิปปินส์ ไนจีเรีย บราซิล มาเลเซีย และประเทศไทย เป็นต้น (Van Beynum and Roels. 1985) สำหรับประเทศไทยมีการปลูกมันสำปะหลังมากทางภาคตะวันออกและตะวันออกเฉียงเหนือและเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีผลผลิตตลอดปีและราคาถูก

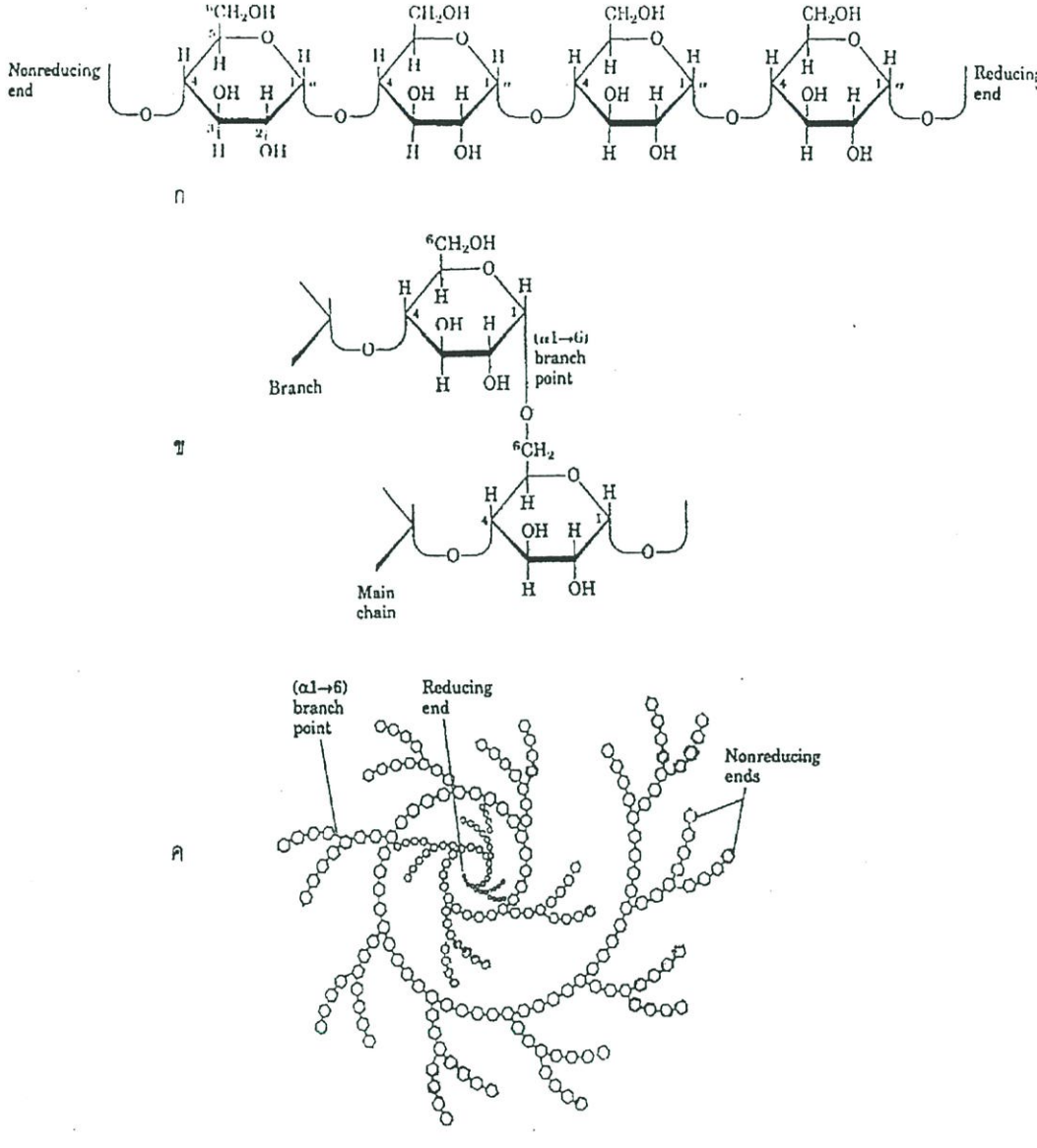
แป้งเป็นองค์ประกอบที่สะสมอยู่ในส่วนต่างๆของพืชเช่น หัว ลำต้น เมล็ด ในหัวมันสำปะหลังมีองค์ประกอบของแป้งอยู่ประมาณร้อยละ 77 ไขมันร้อยละ 0.02 โปรตีนร้อยละ 0.01 และเถ้าร้อยละ 0.2 ต่อน้ำหนักแห้ง แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนในอัตราส่วน 6 : 10 : 5 $(C_6H_{10}O_5)_n$ อยู่ในรูปแบบโมเลกุลกลูโคสยูนิตที่ต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์ด้วยพันธะกลูโคไซด์ กลูโคสยูนิตที่ปลายสายพอลิเมอร์จะมีหมู่อัลดิไฮด์ที่เรียกว่า รีดิวซิงเอนด์ (reducing end group) สายพอลิเมอร์กลูโคสของแป้งจะมีโครงสร้าง 2 รูปแบบ คือ อะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพกติน (amylopectin)

อะไมโลสเป็นสายพอลิเมอร์แบบเส้นตรงประกอบด้วย ดีกลูโคส (D-glucose) ประมาณ 500 โมเลกุลขึ้นไปเชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา 1,4 กลูโคไซด์ (α -1,4-glucocidic bond) ส่วน

อะไมโลเพกตินประกอบด้วย ดีกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะแอลฟา 1,4 กลูโคไซด์ และแอลฟา 1,6 กลูโคไซด์ (α-1,6-glucocidic bond) ที่ต่อกันแบบโซ่แขนงซึ่งมีกลูโคสยูนิตประมาณ 20-25 โมเลกุลต่อโซ่แขนง ในโมเลกุลอะไมโลเพกตินมีกลูโคสยูนิตที่ต่อกันด้วยพันธะแอลฟา1,6 กลูโคไซด์ประมาณร้อยละ 5 อัตราส่วนของอะไมโลสต่ออะไมโลเพกตินขึ้นอยู่กับชนิดของแป้งและแหล่งที่เพาะปลูก แป้งมันสำปะหลังมีอะไมโลสประมาณร้อยละ 17 และอะไมโลเพกตินประมาณร้อยละ 83 (Schenck and Hebeda. 1992)

2.8 โครงสร้างของเม็ดแป้งมันสำปะหลัง

แป้งมันสำปะหลังมีลักษณะเป็นผงละเอียด สีขาว มีความบริสุทธิ์สูง และมีสิ่งปนเปื้อนต่ำ มีสตาร์ชมากกว่าร้อยละ 95 มีโปรตีนและไขมันน้อยกว่าร้อยละ 1 ฟอสฟอรัสน้อยกว่าร้อยละ 0.4 เมื่อตรวจดูลักษณะของเม็ดแป้งด้วยกล้องจุลทรรศน์จะมีรูปร่างเป็นเม็ดกลมหรือรูปไข่ อาจมีรอยบุ๋มที่ปลายข้างหนึ่งของเม็ด เม็ดแป้งมีขนาดโดยเฉลี่ยประมาณ 12-15 ไมโครเมตร ภายในเม็ดแป้งประกอบด้วยอะไมโลสและอะไมโลเพกติน ที่มีการเรียงตัวเป็น 2 แบบ แบบแรกโมเลกุลของอะไมโลสและอะไมโลเพกตินมีการเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ มีแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลสูงเรียกว่า ส่วนผลึก (crystalline region) เป็นส่วนที่มีการดูดน้ำและเกิดการพองตัวได้ต่ำ แบบที่สอง โมเลกุลของอะไมโลสและอะไมโลเพกตินมีการเรียงตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบ มีแรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลต่ำ เป็นส่วนที่มีการดูดน้ำได้ดีและเกิดการพองตัวได้ง่าย เรียกว่าส่วนอสัณฐาน (amorphous region) การเกิดปฏิกริยาของเม็ดแป้งกับน้ำ เมื่อเม็ดแป้งที่แขวนลอยอยู่ในน้ำได้รับความร้อน พลังงานความร้อนจะทำลายพันธะไฮโดรเจนในโครงสร้างของเม็ดแป้ง ทำให้โมเลกุลของน้ำสามารถเข้าไปจับกับหมู่ไฮดรอกซิลที่เป็นอิสระของเม็ดแป้ง เม็ดแป้งจะเริ่มพองขึ้น แป้งที่มีอะไมโลสสูงจะมีกำลังการพองตัวต่ำกว่าแป้งที่มีอะไมโลสต่ำ เนื่องจากโครงสร้างของอะไมโลสที่เป็นเส้นตรงทำให้เกิดพันธะระหว่างโมเลกุลได้ดี แป้งมันสำปะหลังมีอะไมโลสต่ำ เมื่อได้รับความร้อนจะมีค่ากำลังการพองตัวสูงจึงให้ความหนืดสูงเรียกว่า เกิดเจลาทิไนซ์ แป้งมันสำปะหลังมีอุณหภูมิในการเกิดเจลาทิไนซ์ช่วง 58-70 องศาเซลเซียสและพลังงานที่ใช้ในกระบวนการเจลาทิไนเซชันประมาณ 14-17 จูลต่อกรัม (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2546 ; Schenck and Hebeda. 1992)



ภาพที่ 2.3 แสดงโครงสร้างของแป้ง

ก. อะไมโลสสายพอลิเมอร์แบบเส้นตรงประกอบด้วย ดีกลูโคส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟา 1,4 กลูโคไซด์ (α-1,4-glucocidic bond)

ข. อะไมโลเพกตินประกอบด้วย ดีกลูโคส ที่ต่อกันด้วยพันธะแอลฟา 1,4 กลูโคไซด์ และ แอลฟา 1,6 กลูโคไซด์ที่ต่อกันแบบโซ่แขนง

ค. สายพอลิเมอร์ของแป้งที่ประกอบด้วยอะไมโลสและอะไมโลเพกติน

ที่มา : Lehninger et. al. (1993)

2.9 การย่อยแป้ง

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรทที่ประกอบด้วยอะไมโลสและอะไมโลเพกตินก่อนนำมาใช้เป็นสับสเตรท อาจต้องทำการย่อยด้วยเอนไซม์ก่อนตามขั้นตอนดังนี้

1. Gelatinization เป็นการนำแป้งมาละลายน้ำแล้วให้ร้อนขึ้นที่อุณหภูมิ 50-78 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่าขึ้นอยู่กับชนิดของแป้ง แป้งซึ่งมีสมบัติที่ไม่ละลายน้ำ เมื่อได้รับความร้อนเม็ดแป้งจะแตกออกมาละลายกับโมเลกุลของน้ำเกิดเป็นเจลซึ่งมีความหนืดสูง

2. Liquefaction/Dextrinization เป็นการลดความหนืดของแป้งสุก เมื่อแป้งเกิดเป็นเจลอย่างสมบูรณ์จึงปรับสภาวะพีเอชและอุณหภูมิของแป้งสุกให้เหมาะสม แล้วจึงเติมเอนไซม์อะไมเลส ซึ่งเอนไซม์มีการทำงานแบบ endo-type enzyme ย่อยอะไมโลสและอะไมโลเพกตินในโมเลกุลแป้งแบบสุ่ม (random) ที่พันธะแอลฟา 1,4 กลูโคไซด์ ทำให้แป้งลดความหนืดลงอย่างรวดเร็ว ได้ผลผลิตส่วนใหญ่เป็น maltodextrin ที่มีกลูโคส 2-6 หน่วย

3. Saccharification เป็นการย่อย maltodextrin โดยเอนไซม์ เบตาและแกรมมาอะไมเลส ได้ผลผลิตเป็น มอลโทสหรือกลูโคส

การย่อยแป้ง ผลผลิตสุดท้ายที่ได้อาจเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ เช่น กลูโคส มอลโทส โอลิโกแซกคาไรด์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ ผลผลิตน้ำตาลที่ได้จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้เป็นสับสเตรทได้ง่าย (ปราณี อ่านเปรื่อง. 2535 ; Schenck and Hebeda. 1992)

2.10 การทำงานของเอนไซม์อะไมเลส

อะไมเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ซึ่งย่อยสลายพันธะกลูโคไซด์ของสายพอลิแซคคาไรด์เช่น แป้ง ไกลโคเจนและโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นต้น อะไมเลสแบ่งได้เป็น 3 ชนิดตามกลไกการทำงานคือ

1. แอลฟาอะไมเลส (1,4-α-D–glucan glucanohydrolase ; EC 3.2.1.1) เป็นเอนโด-เอนไซม์ สามารถย่อยสลายพันธะแอลฟา 1,4 กลูโคไซด์ แบบสุ่มภายในสายพอลิแซคคาไรด์ ได้ผลผลิตเป็นกลูแคนและลิมิตเด็กซ์ทริน ที่มีหน่วยกลูโคสประมาณ 2–6 หน่วยและเป็น α-configulation จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตแอลฟาอะไมเลสได้ เช่น *Bacillus subtilis* , *B. licheniformis* , *Aspergillus oryzae* เป็นต้น

2. เบตาอะไมเลส (1,4-α-D–glucan maltohydrolase ; EC 3.2.1.2) เป็นเอนโดเอนไซม์ สามารถย่อยสลายพันธะแอลฟา 1,4 กลูโคไซด์ แบบพันธะเว้นพันธะ จากปลายที่ไม่มีคุณสมบัติรีดิวซ์ (non–reducing end) ของสายพอลิแซคคาไรด์ ได้ผลผลิตเป็นมอลโทสที่เป็น

3. แกรมมาอะไมเลส หรือกลูโคอะไมเลส หรืออะไมโลกลูโคซิเดส (1,4-α-D–glucan glucohydrolase ; EC 3.2.1.3) เป็นเอกโซเอนไซม์สามารถย่อยสลายพันธะแอลฟา 1,4 และแอลฟา 1,6 กลูโคไซด์ทุกพันธะจากปลายที่ไม่มีคุณสมบัติรีดิวซ์ของสายพอลิแซคคาไรด์ ได้ผลผลิตเป็นกูลโคสที่เป็น β-configulation อัตราการย่อยสลายขึ้นอยู่กับความยาวของสายพอลิแซคคาไรด์ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกลูโคอะไมเลสเช่น *Aspergillus niger* , *A. oryzae*, *Rhizopus* sp. เป็นต้น (Berry and Paterson. 1990)

2.11 ประโยชน์ของแป้งมันสำปะหลัง

ประเทศไทยเป็นประเทศที่ใช้มันสำปะหลังในอุตสาหกรรมแป้งและแป้งแปรรูปมากที่สุด ในปี พ.ศ. 2548 มีการผลิตแป้งมันสำปะหลังประมาณ 2.728 ล้านตัน โดยเป็นการใช้ในประเทศประมาณ 1.1 ล้านตัน และส่งออกไปยังต่างประเทศประมาณ 1.628 ล้านตัน แป้งมันสำปะหลังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆได้หลากหลาย เช่น ใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตอาหาร ในอุตสาหกรรมกระดาษใช้ฉาบกระดาษเพื่อเพิ่มความเหนียวและความเรียบ อุตสากรรมสิ่งทอใช้ชุบด้ายให้มีความลื่นและเรียบ นอกจากนี้มีการใช้แป้งมันสำปะหลังในอุตสาหกรรมการหมักเพื่อผลิตสารต่างๆ เช่น การผลิตกรดมะนาว ผงชูรส การผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง (กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2546) แป้งมันสำปะหลังยังใช้ในงานวิจัยเพื่อผลิตสารสำคัญต่างๆ เช่น กรดโคจิก กรดแลกติก

มีรายงานของ ดวงเดือน ภู่เจริญ (2544) ได้เลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารแป้งมันสำปะหลัง 120 กรัมต่อลิตรที่ย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก เมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 3.0 กรัมต่อลิตร เชื้อราผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 60.80 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาของ Xiaodong et. al. (1997) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *L. amylovorus* ATCC 33620 ในอาหารที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง10 กรัมต่อลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ได้ปริมาณกรดแลกติก 4.8 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ Roble et. al. (2003) รายงานการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันสำปะหลังในถังหมักแบบ circulating loop bioreactor ด้วยการเลี้ยงเชื้อ *A. awamori* และเชื้อ *L. lactis* spp. ร่วมกันโดยการตรึงเซลล์ *A. awamori* บน loofa sponge แบบทรงกระบอกและตรึงเซลล์ *L. lactis* spp. ใน loofa sponge alginate gel cube ทำการหมักแบบเฟดแบตช์ มีการควบคุมอัตราและความถี่การไหลของอาหารในถังหมัก สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 0.76 กรัมต่อกรัมสับสเตรทและอัตราการผลิตกรดแลกติกเป็น 1.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 จากห้องปฏิบัติการ Northern Regional Reserch Laboratory, Peoria, Illinois, USA. ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้นผิวเอียง PDA ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 วัน หลังจากนั้น นำมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 3 เดือน

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

	บริษัทผู้ผลิต
- เครื่องเขย่า (shaker)	IKA Labortechnik รุ่น KS 501 digital
- เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)	Perkin-Elmer รุ่น Lambda 2
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)	Hettich รุ่น Universal
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	Corning pH meter 240
- กล้องจุลทรรศน์ (microscope)	Nikon YS2-H
- เครื่องนึ่งอัดไอ (autoclave)	Hirayama Manufacturing Corporation รุ่น HA-3D
- เครื่องผสมสารละลาย (mixer)	Genie 2 G-560E
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven)	Memmert Model 800
- ชุดกรองมิลลิพอร์	Millipore Bedford MA 01730
- เครื่องชั่งความละเอียด 2 ตำแหน่ง	Satorius LC 6200 S
- เครื่องชั่งความละเอียด 4 ตำแหน่ง	Mettler AT 200
- ไมโครปิเปตต์	Brand Transferpette Digital
- ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar airflow)	Telstar รุ่น Bio-II-A
- เครื่องแก้วต่าง ๆ	Pyrex
- ถังหมักขนาด 5 ลิตรและชุดควบคุมสภาวะ (fermentor)	B.Braun Biotech International รุ่น BIOSTAT-B
- ตู้ดูดความชื้น	Shin-ei type OD-10

3.3 เคมีภัณฑ์

	บริษัทผู้ผลิต
- แอมโมนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]	Merck
- โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	Merck
- แมกนีเซียมซัลเฟตเฮบตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7H_2O$)	Merck
- ซิงค์ซัลเฟตเฮบตะไฮเดรต ($ZnSO_4 . 7H_2O$)	Merck
- ไดไนโตรซาลิไซลิกแอซิด (3,5-Dinitrosalicylic acid)	Sigma
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	Merck
- โพแทสเซียมโซเดียมตาเตรต ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$)	Merck
- กลูโคส (D(+)-Glucose Anhydrous)	Sigma
- โพเตโตเด็กซ์โตรสอการ์ (Potato Dextrose Agar ; PDA)	Sigma
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl)	Merck
- กรดไนตริก (HNO_3)	Merck
- ทวีน 80 (Tween 80)	Merck
- ลิเทียมแลกเตต ($C_3H_5O_3Li$)	Merck
- คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)	BDH Chemicals
- แคลเซียมไฮดรอกไซด์ [$Ca(OH_2)$]	Merck
- กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)	Merck
- พาราไฮดรอกซีไดฟีนิล (p-Hydroxydiphenyl)	Fluka
- แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	Merck
- แป้งมันสำปะหลัง (Cassava starch)	ตงจั่น (ตราปลามังกร)
- น้ำตาลซูโครส (ไม่ฟอกสี)	น้ำตาลเกษตรผล (ตราช้อน)

3.4 วิธีทดลอง

3.4.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา *R. oryzae* NRRL 395

ถ่ายสปอร์ของเชื้อรา *R. oryzae* NRRL 395 ที่เจริญบนอาหารวุ้นผิวเอียง PDA มาเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารวุ้น PDA ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 วัน จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่มีสารละลายทวีน 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงในฟลาสก์แล้วขูดสปอร์ให้หลุดออกจากเส้นใยด้วยลวดเขี่ยเชื้อ (loop) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว กรองเส้นใยผ่านสำลีที่วางบนกรวยแก้วที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำสปอร์แขวนลอยที่ได้มานับจำนวนสปอร์ด้วยแผ่นสไลด์นับเซลล์ (haemacytometer) เติมสปอร์แขวนลอยนี้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยให้มีปริมาณสปอร์เริ่มต้น 4.0×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.4.2 สูตรอาหารและสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ

ดัดแปลงจาก Soccol et. al. (1994a)

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

แหล่งคาร์บอน	100.00	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	80.00	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]	7.00	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.00	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮบตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.75	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮบตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.04	กรัม

ปรับพีเอชเท่ากับ 6.0 ด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1.0 นอร์มอล

นำแหล่งคาร์บอนมาละลายด้วยน้ำกลั่น ถ้าแหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลังต้องต้มแป้งให้สุกเป็นเจลก่อนจึงผสมสารต่างๆเข้าด้วยกัน ยกเว้นแคลเซียมคาร์บอเนต ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรและปรับพีเอชเป็น 6.0 ถ่ายอาหารใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น แล้วจึงใส่สปอร์แขวนลอย โดยให้มีปริมาณสปอร์เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 240 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก12 ชั่วโมง หลังจากการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง จึงเติมแคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง ปริมาณ 4 กรัมต่อฟลาสก์

3.4.3 ศึกษาการผลิตกรดแลกติกในอาหารแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครส โดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในระดับฟลาสก์

3.4.3.1 ศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสที่อัตราส่วนต่างๆต่อปริมาตรอาหาร 1 ลิตร ดังนี้ 60 : 40 50 : 50 40 : 60 และ 30 : 70 กรัมต่อกรัม ตามลำดับ โดยใช้สูตรอาหารและสภาวะการเพาะเลี้ยงตามข้อ 3.4.2 ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ผลดังนี้ วัดค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณกรดแลกติกและน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.4.3.2 ศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

เมื่อได้ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครส ซึ่งให้กรดแลกติกสูงสุดแล้ว นำผลการทดลองมาศึกษาหาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.3.1 และใช้น้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆกันคือ 40 50 60 และ 70 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยใช้สูตรอาหารและสภาวะการเพาะเลี้ยงตามข้อ 3.4.2 ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ผลดังนี้ วัดค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณกรดแลกติกและน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.4.3.3 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

เมื่อได้ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครส ที่ให้กรดแลกติกสูงสุดแล้ว นำผลการทดลองมาศึกษาหาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.3.2 และใช้แหล่งไนโตรเจน คือแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] ที่ความเข้มข้น 5.0 7.5 และ 10.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยใช้สูตรอาหารและสภาวะการเพาะเลี้ยงตามข้อ 3.4.2 ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ผลดังนี้ วัดค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณกรดแลกติกและน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.4.4 ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์ โดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในระดับฟลาสก์

3.4.4.1 ศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่างๆกันคือ 70 100 130 และ 160 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นำแป้งมันสำปะหลังมาละลายน้ำแล้วต้มให้สุกเป็นเจล จากนั้นปรับค่าพีเอชเป็น 6.9 ด้วยสารลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มอล แล้วย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์อะไมเลส (α-amylase (EC 3.2.1.1) Type II-A : จาก *Bacillus* sp. 2,150 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ของ Sigma) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยใช้เอนไซม์ 22 40 74 และ 99 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ นำสารละลายแป้งที่ย่อยแล้วมาเติมสารอาหาร โดยใช้สูตรอาหารและสภาวะการเพาะเลี้ยงตามข้อ 3.4.2 ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ผลดังนี้ วัดค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณกรดแลกติกและน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.4.4.2 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

เมื่อได้ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดแลกติกปริมาณสูงแล้ว นำผลการทดลองมาศึกษาหาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมจากข้อ 3.4.4.1 และใช้แหล่งไนโตรเจน คือแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] ที่ความเข้มข้น 3.0 5.0 และ 7.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ผลดังนี้ วัดค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณกรดแลกติกและน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.4.5 ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร (BIOSTAT B ; B. Braun Biotech International, Germany)

3.4.5.1 การเตรียมถังหมัก

1. ทำการปรับค่าพีเอช (pH-Calibration) ของ pH-probe ในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7.00 และสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 4.01 และตรวจสอบประสิทธิภาพของ pH- probe จากค่า zero และ slope ค่า zero ควรอยู่ในช่วง -30 ถึง +30 mV และค่า slope ควรอยู่ในช่วง 54 ถึง 60 mV / pH

2. เติมอาหารเลี้ยงเชื้อลงในถังหมักแล้วปิดฝาถังหมักให้เรียบร้อยใส่ pH-probe และ DO- probe

3. ติดตั้ง exhaust cooler บนฝาถังหมักและใส่สายยางไว้กับขวดพักอากาศ ต่อสายเก็บตัวอย่างและขวดพักตัวอย่างเข้ากับท่อเก็บตัวอย่าง ต่อสายให้อากาศที่มีตัวกรองติดอยู่เข้ากับท่อส่งอากาศของถังหมัก เติมน้ำเข้าสู่ jacket ของถังหมัก

4. ปิดปลายสายต่างๆที่ต่อออกจากถังหมัก ยกเว้นสายที่ต่อจาก exhaust cooler เพื่อให้เป็นทางระบายความดันที่ออกจากถังหมักขณะทำการฆ่าเชื้อ ถอดมอเตอร์ใบพัดออก

5. นำถังหมักใส่ในเครื่องนึ่งอัดไอ (autoclave) ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 40 นาที จากนั้นนำถังหมักออกมาทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงต่อระบบเข้ากับเครื่องควบคุมการทำงาน

6. ทำการปรับค่า DO-probe (DO–Calibration) โดยเติมแก๊สไนโตรเจนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อและกวนจนกระทั่งค่า DO คงที่จึงปรับค่า DO ให้เป็น 0 เปอร์เซ็นต์ออกซิเจน จากนั้นเปลี่ยนเป็นเติมอากาศแทนแล้วกวนจนกระทั่งค่า DO คงที่จึงปรับค่า DO ให้เป็น 100 เปอร์เซ็นต์ออกซิเจน ตรวจสอบการปรับค่าจาก zero และ slope โดย zero ควรอยู่ในช่วง 0 ถึง +15 nA และค่า slope ควรอยู่ในช่วง 25 ถึง 200 nA

7. ตั้งสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดลอง ได้แก่ อุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ และอัตราการกวนของใบพัด เติมหัวเชื้อเพื่อทำการเพาะเลี้ยง

3.4.5.2 ศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบแบตช์ (Batch)

เตรียมอาหารสูตรเหมาะสม ที่ได้จากการทดลองในระดับฟลาสก์ (ตามข้อ 3.4.3.3) ปริมาตร 2.5 ลิตร ใส่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ (วิธีเตรียมหัวเชื้อตามภาคผนวก ก) ใช้อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.5 วีวีเอ็ม* ควบคุมอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่ 32 ± 2 องศาเซลเซียส หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง จึงเติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่อบฆ่าเชื้อแล้ว 200 กรัม ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงจนครบระยะเวลา 120 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ผลดังนี้ วัดค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณกรดแลกติกและน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.4.5.3 ศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบเฟดแบตช์ (Fed Batch)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้แป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 1.5 ลิตร และเติมสารอาหารต่างๆเช่นเดียวกับข้อ 3.4.5.2 ใส่ในถังหมักขนาด 5 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของอาหาร (วิธีเตรียมหัวเชื้อตามภาคผนวก ก) ใช้อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศที่ 1.5 วีวีเอ็ม* ควบคุมอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงที่ 30 ± 2 องศาเซลเซียส หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 18 ชั่วโมง จึงเติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่อบฆ่าเชื้อแล้ว 70 กรัม และ

หลังจากการเพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง เติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่อบฆ่าเชื้อแล้วอีก 130 กรัม เพื่อปรับค่าพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 24 ชั่วโมง จึงเริ่มเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตรและเติมสารอาหารต่างๆเหมือนอาหารเริ่มต้น ปริมาตร 2.0 ลิตร โดยศึกษาอัตราการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 5.0 7.5 และ 10.0 กรัมน้ำตาลซูโครสต่อชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง จนครบระยะเวลา 120 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ผลดังนี้ วัดค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณกรดแลกติก และน้ำหนักเซลล์แห้ง

วีวีเอ็ม* หมายถึง ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อต่อนาที

3.5 วิธีวิเคราะห์

3.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก ตามวิธีของ Baker and Summerson (1941)

วิธีเตรียมสารเคมี

1. สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 . 5H_2O$) 20 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 20 กรัมในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตรคนจนละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4 . 5H_2O$) 4 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 4 กรัมในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตรคนจนละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3. แคลเซียมไฮดรอกไซด์ [$Ca(OH_2)$]

4. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น ความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 1.84

5. สารละลายพาราไฮดรอกซีไดฟีนิล (p-Hydroxydiphenyl) 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยละลายพาราไฮดรอกซีไดฟีนิล 1.5 กรัมในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิลิตร

6. สารละลายมาตรฐานกรดแลกติก 1,0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมโดยละลายลิเทียมแลกเตต ($C_3H_5O_3Li$) 106.6 มิลลิกรัมด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.1 มิลลิลิตรและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

วิธีวิเคราะห์

1. นำสารละลายตัวอย่างที่เจือจางอย่างเหมาะสม 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 20 เปอร์เซ็นต์ลงไป 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรรวมเท่ากับ 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 1 กรัม เขย่าแรงๆ จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30

นาที ขณะที่ตั้งทิ้งไว้จะทำการเขย่าเป็นครั้งคราว จากนั้นนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

2. ดูดสารละลายส่วนใสมา 1 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดทดลองซึ่งมีสารละลายคอปเปอร์-ซัลเฟต 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.05 มิลลิลิตร นำหลอดทดลองไปแช่ลงในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกที่เข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตรอย่างช้าๆเขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปแช่ในอ่างน้ำเดือด 5 นาทีและทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3. หยดสารละลายพาราไฮดรอกซีไดฟีนิล 2 หยด เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำเดือดนาน 90 วินาทีแล้วทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

4. นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแลกติก โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank

5. เตรียมกราฟมาตรฐานกรดแลกติกโดยใช้สารละลายมาตรฐานกรดแลกติกที่ความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดแลกติกกับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร ดังแสดงภาพในภาคผนวก ข-1

3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total Sugar) โดยวิธี Phenol-Sulphuric ดัดแปลงจากวิธีของ Dubios et. al. (1956)

วิธีเตรียมสารเคมี

1. สารละลายฟีนอล (C_6H_5OH) 5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร เตรียมโดยชั่งฟีนอล 5 กรัมละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น ความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 1.84

วิธีวิเคราะห์

1. นำสารละลายตัวอย่างที่เจือจางอย่างเหมาะสม 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายฟีนอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

2. เติมกรดซัลฟิวริกที่เข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตรแล้วตั้งทิ้งไว้นาน 10 นาที จึงเขย่าแรงๆให้เข้ากัน

3. จากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที จึงนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank

4. เตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสกับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ดังแสดงภาพในภาคผนวก ข-2

3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing Sugar) ตามวิธีของ Bernfeld (1955)

วิธีเตรียมสารเคมี

สารละลายกรดไดไนโตรซาลิกไซลิก (DNS) เตรียมโดยละลาย 3,5-กรดไดไนโตรซาลิกไซลิก 2.5 กรัมลงในโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (4 กรัมต่อ 50 มิลลิลิตร) เติมโพแทสเซียมโซเดียมตาร์เตรต ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$) 75 กรัม คนจนสารละลายหมดจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 250 มิลลิลิตร แล้วเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

วิธีวิเคราะห์

1. นำสารละลายตัวอย่างที่เจือจางอย่างเหมาะสม 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิกไซลิกปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน นำหลอดทดลองไปแช่ลงในอ่างน้ำเดือดนาน 5 นาที จากนั้นจึงตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตรแล้วเขย่าให้เข้ากัน

4. นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank

5. เตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0 200 400 600 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสกับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ดังแสดงภาพในภาคผนวก ข-3

3.5.4 การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 (ดัดแปลงจากวิธีของ Kosakai et. al. (1997)

1. อบกระดาษกรองเบอร์ 4 (ashless) ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้นและชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน

2. นำน้ำหมักมาปั่นแยกส่วนน้ำใสออกจนเหลือตะกอนเส้นใยและแคลเซียมคาร์บอเนต นำตะกอนที่ได้ใส่ฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรเติมกรดไฮโดรคลอริคเข้มข้น 2 นอร์มอลคนจนแคลเซียมคาร์บอเนตละลายหมดจึงนำฟลาสก์แช่ในน้ำเดือด 5 นาที แล้วนำออกมากรองผ่านกระดาษกรองในข้อ 1 ล้างเส้นใยบนกระดาษกรองด้วยน้ำกลั่นจนค่าพีเอชเป็นกลาง จึงนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสจนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ชั่งน้ำหนักเซลล์แห้ง

3.5.5 การวัดค่าพีเอช

นำส่วนใสของน้ำหมักที่ปั่นแยกตะกอนออกแล้วมาวัดค่าพีเอช โดยใช้เครื่องวัดค่าพีเอช (Corning pH meter 240)

3.5.6 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติของผลการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในระดับฟลาสก์และในถังหมักใช้การทดลองแบบ CRD (Complete Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's Multiple Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS for Window เวอร์ชั่น 10

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาการผลิตกรดแลกติกในอาหารแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสในระดับฟลาสก์

4.1.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

การผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่ดัดแปลงจากสูตรของ Soccol et. at. (1994a) โดยศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน คือ แป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครส ที่อัตราส่วนต่างๆกันคือ 60 : 40 50 : 50 40 : 60 และ 30 : 70 กรัมต่อกรัม พบว่าแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสที่อัตราส่วนดังกล่าว จะได้ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดใกล้เคียงกันคือ 113.58 114.99 115.75 และ 115.75 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงครบ 120 ชั่วโมง อาหารที่มีปริมาณแป้งมันสำปะหลังสูงจะมีน้ำตาลทั้งหมดเหลืออยู่มากกว่าตามลำดับ จากการทดลองอัตราส่วนของแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสที่ 60 : 40 กรัมต่อกรัม จะได้กรดแลกติกสูงสุดคือ 56.94 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 84 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.1) คิดเป็นอัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_P) 0.68 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) เป็น 0.59 กรัมต่อกรัมน้ำตาล การเจริญของเชื้อคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 11.72 กรัมต่อลิตรและผลได้ของมวลเซลล์ ($Y_{X/S}$) เป็น 0.116 กรัมต่อกรัมน้ำตาล เมื่อใช้อัตราส่วนของแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสที่ 50 : 50 กรัมต่อกรัม จะได้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 45.80 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 84 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.2) คิดเป็นอัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_P) 0.55 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) เป็น 0.44 กรัมต่อกรัมน้ำตาล น้ำหนักเซลล์แห้งได้ 10.43 กรัมต่อลิตรและผลได้ของมวลเซลล์ ($Y_{X/S}$) เป็น 0.078 กรัมต่อกรัมน้ำตาล เมื่อใช้อัตราส่วนของแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสที่ 40 : 60 กรัมต่อกรัม จะได้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดคือ 35.81 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 84 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.3) คิดเป็นอัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_P) 0.43 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) เป็น 0.32 กรัมต่อกรัมน้ำตาล น้ำหนักเซลล์แห้งได้ 9.09 กรัมต่อลิตรและผลได้ของมวลเซลล์ ($Y_{X/S}$) เป็น 0.065 กรัมต่อกรัมน้ำตาล ในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีอัตราส่วนของแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสที่ 30 : 70 กรัมต่อกรัม จะได้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดคือ 32.56 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 84 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.4) คิดเป็นอัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_P) 0.39 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) เป็น 0.29 กรัมต่อกรัม

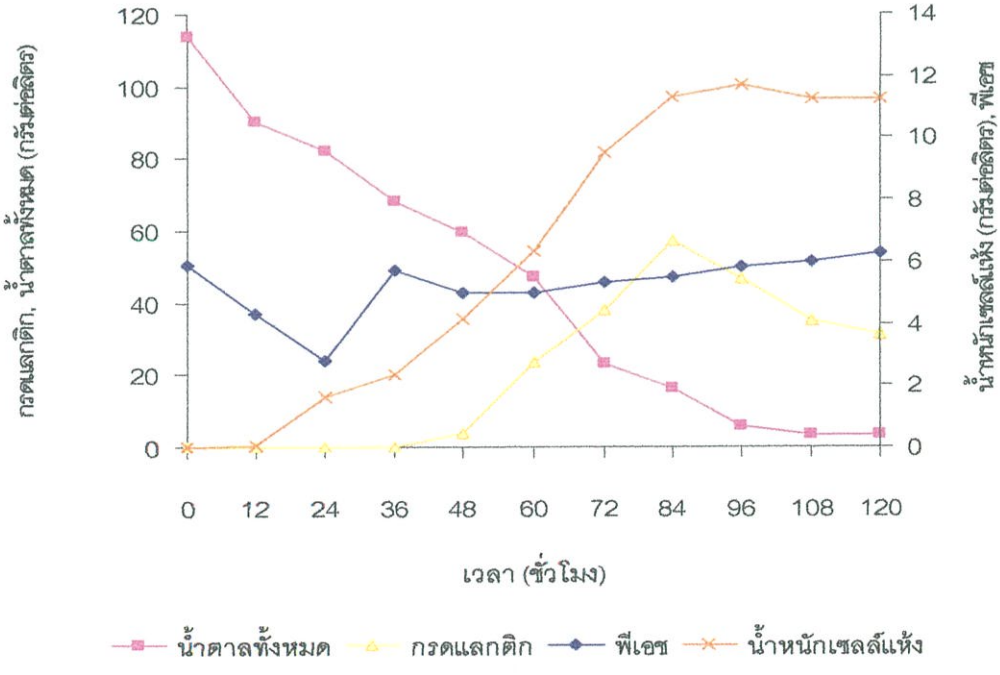
น้ำตาล น้ำหนักเซลล์แห้งได้ 8.60 กรัมต่อลิตรและผลได้ของมวลเซลล์ ($Y_{X/S}$) เป็น 0.065 กรัมต่อกรัมน้ำตาล จากผลการทดลองดังกล่าวการใช้แป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยรวม 100 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลังลดลงและเพิ่มน้ำตาลซูโครส ผลผลิตกรดแลกติกจะลดลง (ภาพที่ 4.5) แสดงว่าเชื้อราสามารถใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี นอกจากนี้ผลได้ของกรดแลกติกและการเจริญของเชื้อที่เกิดจากการใช้น้ำตาลจะลดลงด้วย เมื่อนำผลการทดลองมาคำนวณหาค่าต่างๆ ได้แก่ ผลได้ของกรดแลกติกจากการใช้น้ำตาล ($Y_{P/S}$) ผลได้ของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล ($Y_{X/S}$) และอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ได้ผลตามตารางที่ 4.1 ในการเลี้ยงเชื้ออาหารมีพีเอชเริ่มต้น 5.9-6.0 เมื่อเพาะเลี้ยงได้ 24 ชั่วโมง ค่าพีเอชจะลดลงต่ำสุดที่พีเอช 2.6-2.8 จึงเติม $CaCO_3$ ในอาหารเพื่อปรับค่าพีเอช เมื่อพีเอชของอาหารเพิ่มขึ้น การเจริญของเชื้อจึงเพิ่มขึ้นด้วย พบว่าเชื้อมีการเจริญได้ดีในช่วงพีเอชใกล้ 6.0

แป้งมันสำปะหลังประกอบด้วยอะไมโลสประมาณร้อยละ 17 และอะไมโลเพกตินประมาณร้อยละ 83 (Schenck and Hebeda. 1992) ทั้งนี้เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส มาย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ซึ่งเชื้อราสามารถนำไปใช้ในการเจริญของตัวเซลล์ได้ดี ส่งผลให้มีการผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณสูง Suntornsuk and Hang (1994) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกและเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ของเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่ประกอบด้วยข้าว 5 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที เชื้อราผลิตกรดแลกติกได้ 11.2 กรัมต่อลิตรและผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสได้ 131 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

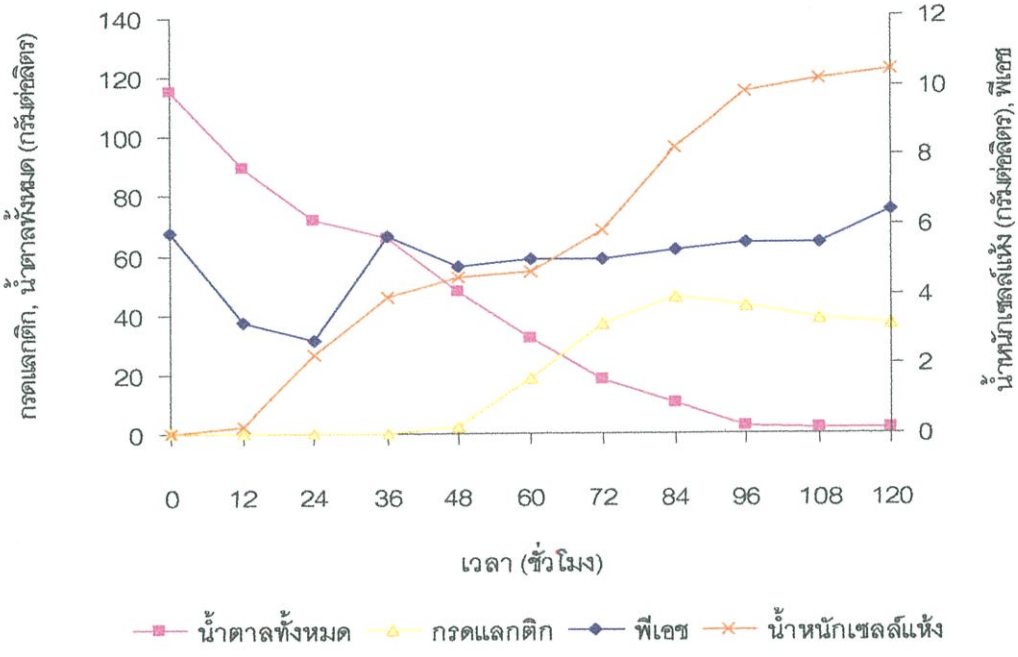
ตารางที่ 4.1 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญและการผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสที่อัตราส่วนต่างๆ

แป้งมันสำปะหลัง : น้ำตาลซูโครส (กรัมต่อกรัม)	Q_P (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	$Y_{P/S}$ (กรัมต่อกรัมน้ำตาล)	$Y_{X/S}$ (กรัมต่อกรัมน้ำตาล)	μ (ต่อชั่วโมง)
60 : 40	0.68	0.59	0.116	0.036
50 : 50	0.55	0.44	0.078	0.045
40 :60	0.43	0.32	0.065	0.058
30 : 70	0.39	0.29	0.065	0.044

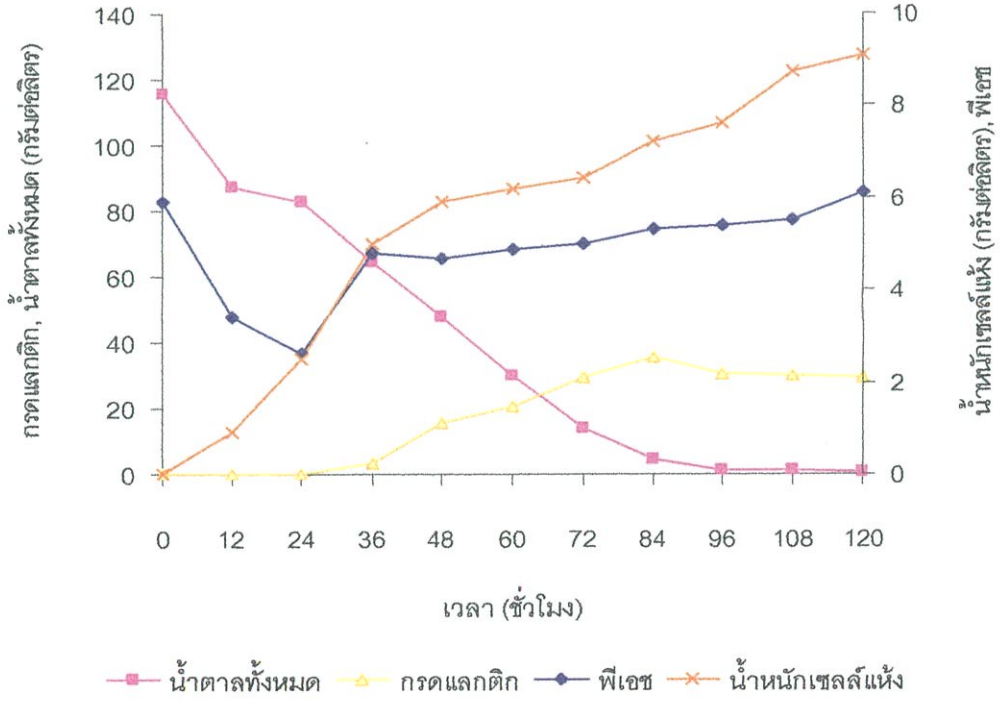
การผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 เชื้อสายพันธุ์นี้สามารถใช้สับสเตรทได้หลายชนิดและสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ไม่ยุ่งยาก โดย Soccol et. al. (1994a) ได้ศึกษาอิทธิพลของอากาศและการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตปรับค่าพีเอช ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร พบว่าการเพาะเลี้ยงแบบมีอากาศและเติมแคลเซียมคาร์บอเนต เชื้อราจะให้ผลผลิตกรดแลกติกสูงสุด 65 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้มีรายงานของ Yu and Hang (1989) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีผลผลิตทางการเกษตรคือ ข้าวเจ้า ข้าวโพด และมันสำปะหลัง เพื่อศึกษาการผลิตกรดแลกติกและอัตราการใช้คาร์โบไฮเดรต พบว่าการผลิตกรดแลกติกขึ้นอยู่กับชนิดของสับสเตรท การใช้ข้าวเจ้า ข้าวโพดและมันสำปะหลัง จะได้ผลผลิตกรดแลกติกเป็น 450 400 และ 350 กรัมต่อกิโลกรัมสับสเตรทตามลำดับ นอกจากนี้เขายังได้ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยงที่ 23 30 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสจะได้ผลผลิตกรดแลกติกสูงกว่าที่อุณหภูมิ 23 และ 37 องศาเซลเซียส การใช้แคลเซียมคาร์บอเนตปรับค่าพีเอช พบว่าการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต เชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงกว่าเมื่อไม่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตในอาหาร จากรายงานของ Xiaodong et. al. (1997) ได้เลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus amylovorus* ATCC 33620 ในอาหารที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 10 กรัมต่อลิตร เชื้อผลิตกรดแลกติกได้ 4.8 กรัมต่อลิตร



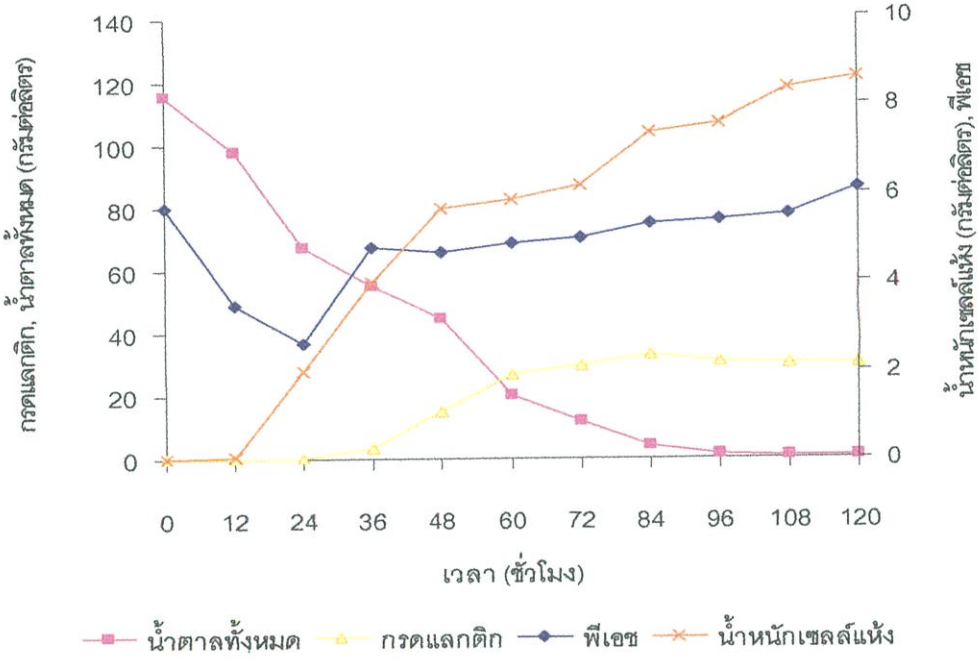
ภาพที่ 4.1 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีอัตราส่วนของแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครส 60 : 40 กรัมต่อกรัม



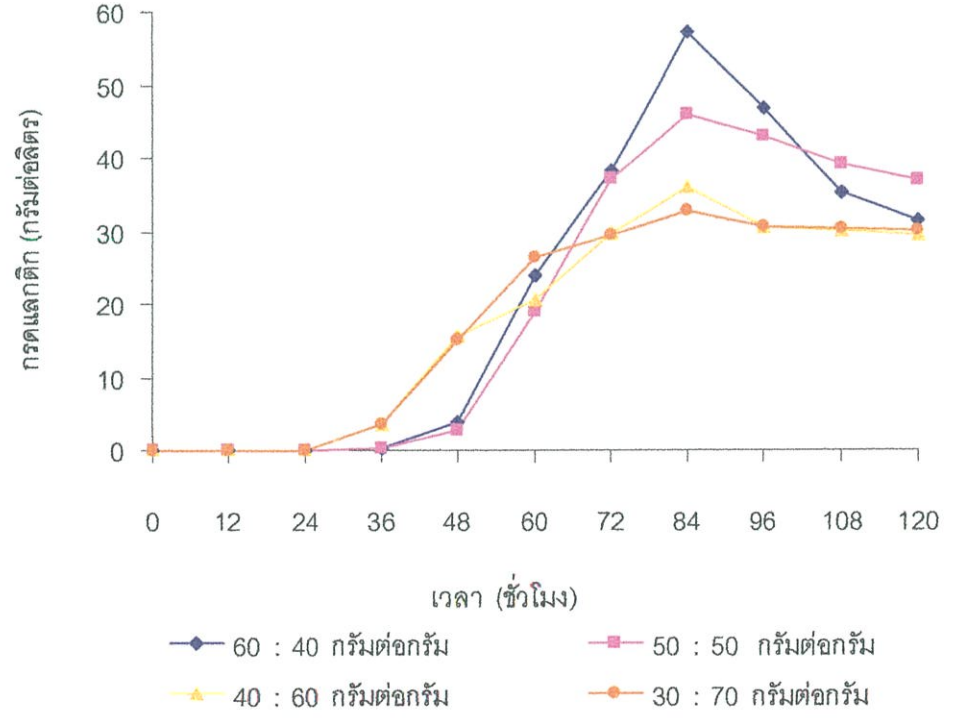
ภาพที่ 4.2 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีอัตราส่วนของแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครส 50 : 50 กรัมต่อกรัม



ภาพที่ 4.3 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีอัตราส่วนของแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครส 40 : 60 กรัมต่อกรัม



ภาพที่ 4.4 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีอัตราส่วนของแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครส 30 : 70 กรัมต่อกรัม



ภาพที่ 4.5 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสที่อัตราส่วนต่างๆ

จากผลการทดลองเมื่อนำปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสที่อัตราส่วนต่างๆ มาเปรียบเทียบกันทางสถิติ พบว่าปริมาณกรดแลกติกสูงสุดที่ระดับการใช้แป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสต่างๆกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ตามตารางที่ 4.2 ในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและหาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส เพื่อดูแนวโน้มการผลิตกรดแลกติก ของเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395

ตารางที่ 4.2 เปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสที่อัตราส่วนต่างๆ

แป้งมันสำปะหลัง : น้ำตาลซูโครส (กรัมต่อกรัม)	60 : 40	50 : 50	40 : 60	30 : 70
กรดแลกติกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	56.94[a]	45.80[b]	35.81[c]	32.56[d]

หมายเหตุ ปริมาณกรดแลกติกที่กำกับตามแนวนอนด้วยอักษรที่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

4.1.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

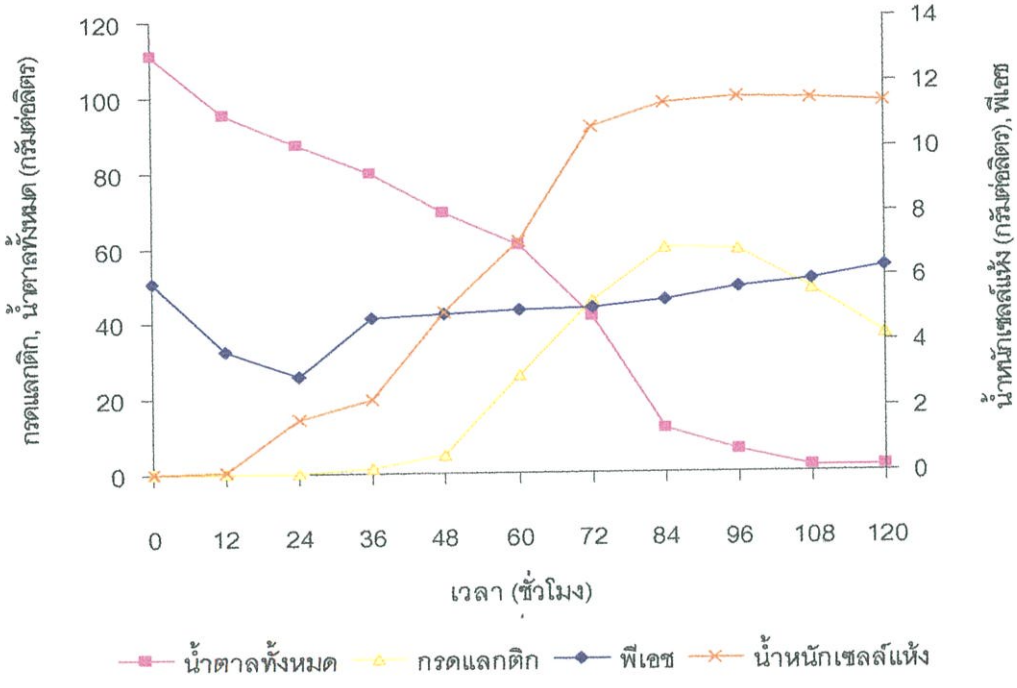
จากผลการทดลองที่ 4.1.1 นำมาศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตรและแปรผันน้ำตาลซูโครสที่ 40 50 60 และ 70 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสที่ 40 กรัมต่อลิตร เชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 59.36 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 84 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.6) คิดเป็นอัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_p) เท่ากับ 0.71 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง การเจริญของเชื้อคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 11.53 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำตาลซูโครส 50 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 65.38 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.7) คิดเป็นอัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_p) เท่ากับ 0.68 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 11.35 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 70.80 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.8) คิดเป็นอัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_p) เท่ากับ 0.74 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง น้ำหนักเซลล์แห้งได้ 11.63 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำตาลซูโครส 70 กรัมต่อลิตร ได้กรดแลกติกสูงสุด 87.74 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.9) คิดเป็นอัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_p) เท่ากับ 0.91 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง การเจริญของเชื้อคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 11.91 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองดังกล่าวการใช้แป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร เมื่อเพิ่มน้ำตาลซูโครส ทำให้แหล่งคาร์บอนโดยรวมเพิ่มขึ้น เมื่อนำผลการทดลองมาคำนวณหาค่าต่างๆ ได้แก่ ผลได้ของกรดแลกติกจากการใช้น้ำตาล ($Y_{P/S}$) ผลได้ของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล ($Y_{X/S}$) และอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ได้ผลตามตารางที่ 4.3 จากผลการทดลองอาหารที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลซูโครส 70 กรัมต่อลิตร จะมีแหล่งคาร์บอนโดยรวมเป็น 130 กรัมต่อลิตร คิดเป็นน้ำตาลทั้งหมด 139.56 กรัมต่อลิตร ผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดที่ 87.74 กรัมต่อลิตรและผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) เท่ากับ 0.70 กรัมต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งสูงกว่าในการทดลองอื่นๆ เมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อราสูงสุดคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 11.91 กรัมต่อลิตรและมีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เป็น 0.042 ต่อชั่วโมง ซึ่งเชื้อรามีการเจริญสูงกว่าในการทดลองอื่นๆเช่นกัน ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลซูโครส 40 กรัมต่อลิตร มีแหล่งคาร์บอนโดยรวมเป็น 100 กรัมต่อลิตร คิดเป็นน้ำตาลทั้งหมด 110.95 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 59.36 กรัมต่อลิตร และมีผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) เป็น 0.60 กรัมต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งผลผลิตกรดแลกติกที่ได้น้อยกว่าในการทดลองอื่นๆ นอกจากนี้เชื้อรามีการเจริญคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 11.53 กรัมต่อลิตรและมีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เป็น 0.030 ต่อชั่วโมง ซึ่งเชื้อรามีการเจริญน้อยกว่าในการทดลองอื่นๆเช่นกัน ดังนั้นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ 139.56 กรัมต่อลิตร เชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 มีการเจริญของตัวเซลล์ที่ดีและส่งผลให้มีการผลิตกรดแลกติกได้

สูง จากรายงานของ Soccol et. al. (1994b) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 บนอาหารแข็งที่ประกอบด้วยซานอ้อยและน้ำตาลกลูโคสรวม 180 กรัมต่อลิตร ในถังหมักแบบคอลัมน์ เชื้อสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 137 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตกรดแลกติก 1.43 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่ใช้อาหารที่มีกลูโคส 120 กรัมต่อลิตร ได้กรดแลกติก 93.8 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตกรดแลกติก 1.38 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

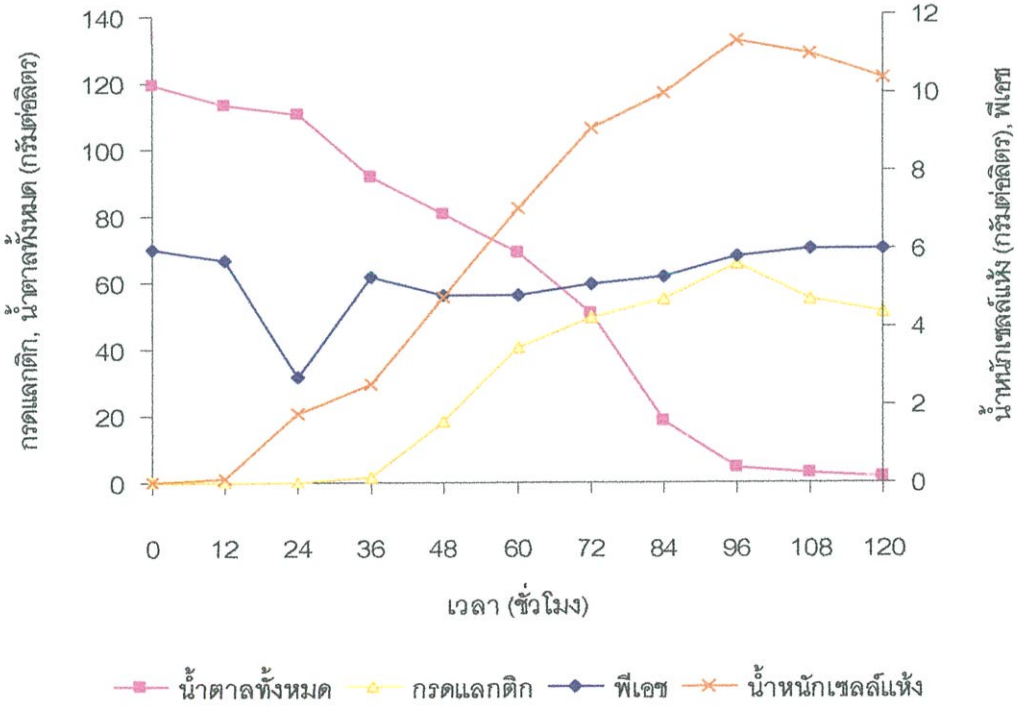
ตารางที่ 4.3 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญและการผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ

น้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)	Q_P (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	$Y_{P/S}$ (กรัมต่อกรัมน้ำตาล)	$Y_{X/S}$ (กรัมต่อกรัมน้ำตาล)	μ (ต่อชั่วโมง)
40	0.71	0.60	0.144	0.030
50	0.68	0.57	0.099	0.032
60	0.74	0.57	0.094	0.037
70	0.91	0.70	0.095	0.042

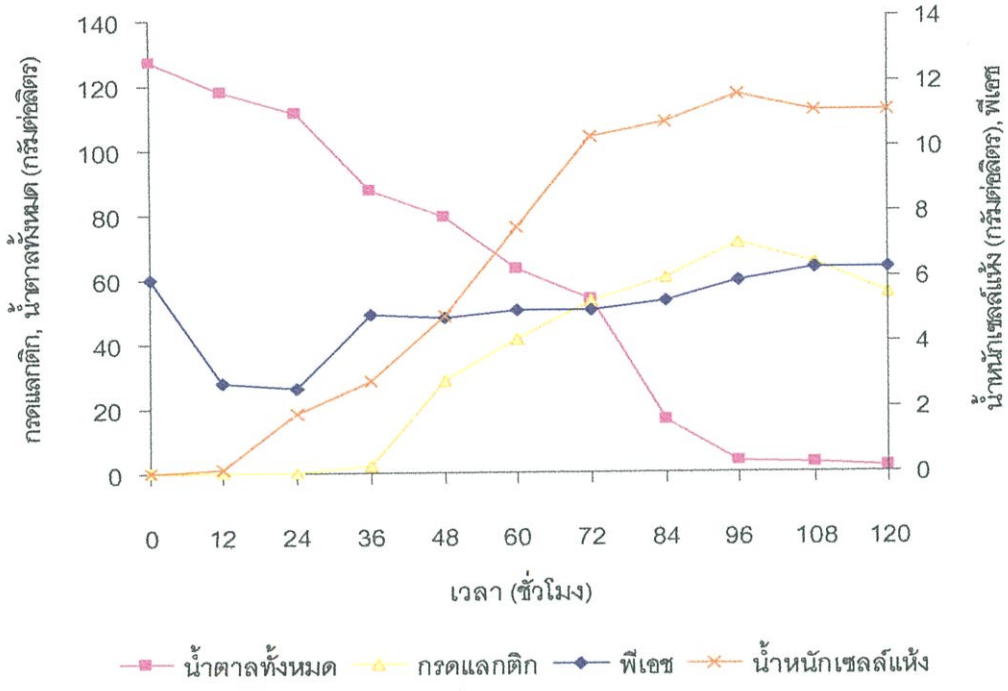
มีรายงานของ Yin et. al. (1997) ที่ใช้น้ำตาล กลูโคส แมนโนส ฟรักโทส และ ซูโครส ในการเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส เชื้อราผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดคือ 92.0 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้แมนโนสและฟรักโทส ได้กรดแลกติก 84.5 และ 88.0 กรัมต่อลิตรตามลำดับ การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครส เชื้อราผลิตกรดแลกติกได้น้อยที่สุดคือ 52.4 กรัมต่อลิตร จากรายงานของ Zhou et. al. (1999) ได้เลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* ATTC 52311 ใน bubble columm โดยใช้อาหารที่มีกลูโคสเริ่มต้น 94 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 83 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้ของกรดแลกติก 0.88 กรัมต่อกรัมกลูโคส และอัตราการผลิตกรดแลกติก 2.58 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง



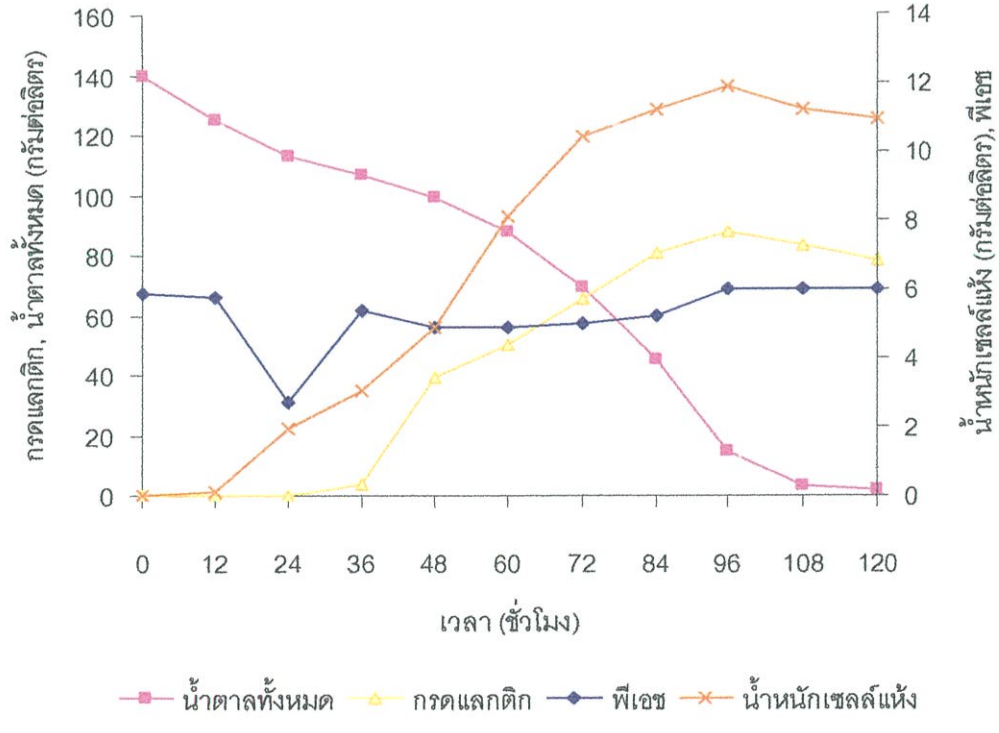
ภาพที่ 4.6 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 40 กรัมต่อลิตร



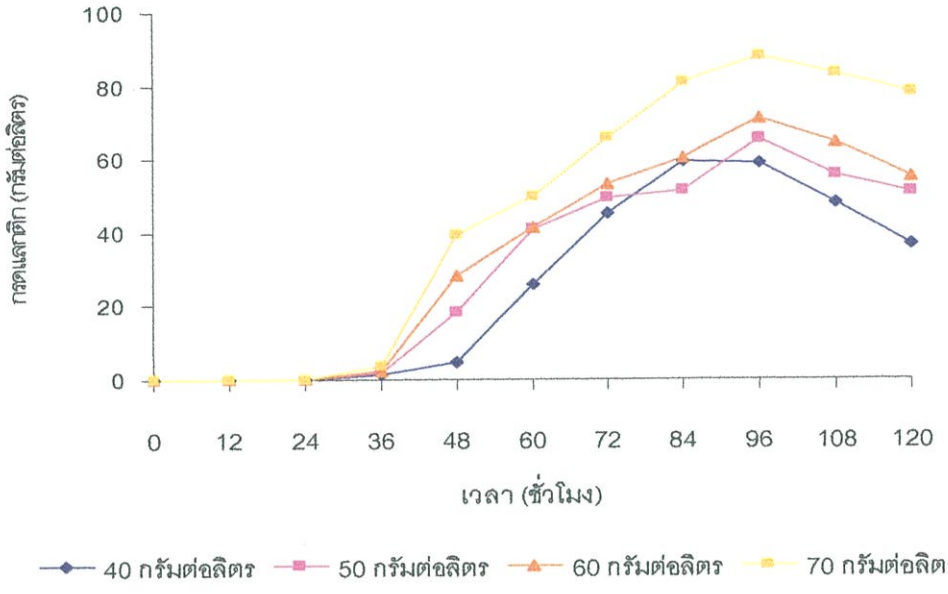
ภาพที่ 4.7 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 50 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.8 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.9 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 70 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.10 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากผลการทดลองเมื่อนำปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร และแปรผันน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ มาเปรียบเทียบกันทางสถิติ พบว่าปริมาณกรดแลกติกสูงสุดที่ระดับการใช้แป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ตามตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นต่างๆ

น้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)	40	50	60	70
กรดแลกติกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	59.36 ^{d}	65.38 ^{c}	70.80 ^{b}	87.74 ^{a}

หมายเหตุ ปริมาณกรดแลกติกที่กำกับตามแนวนอนด้วยอักษรที่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

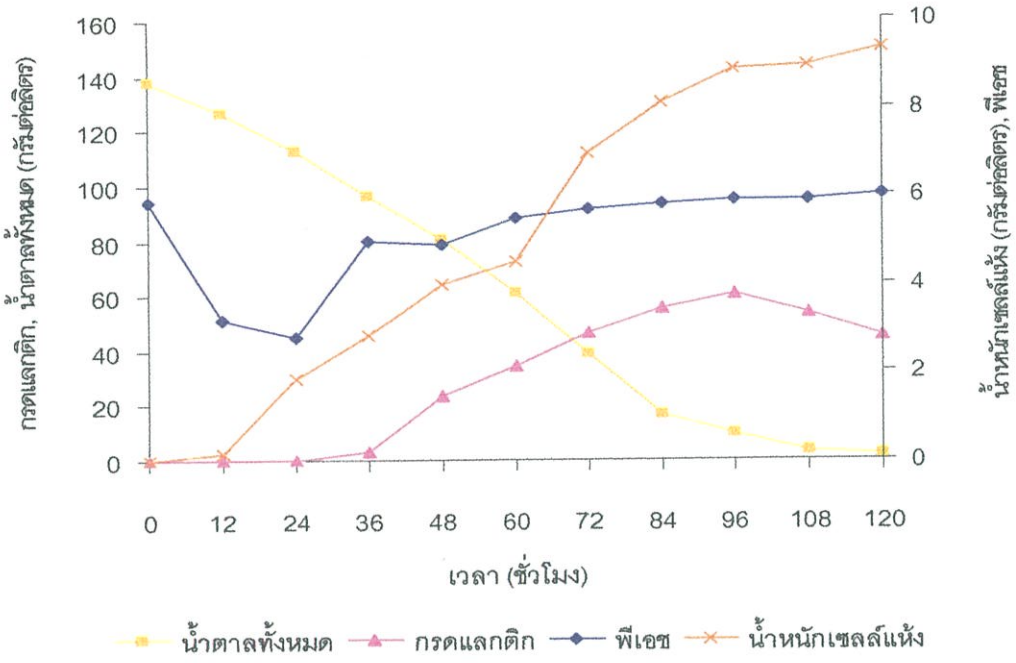
4.1.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในอาหารแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครส

จากการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลซูโครส 70 กรัมต่อลิตร มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 5.0 7.5 และ 10.0 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 7.5 กรัมต่อลิตร เชื้อผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 89.93 กรัมต่อลิตร การเจริญของเชื้อคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง 12.20 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.12) มีผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) เป็น 0.67 กรัมต่อกรัมน้ำตาล อัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_P) เป็น 0.94 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 10.0 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณกรดแลกติก 73.98 กรัมต่อลิตรและน้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 11.21 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.13) มีผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) เป็น 0.54 กรัมต่อกรัมน้ำตาล อัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_P) เป็น 0.77 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 5.0 กรัมต่อลิตร เชื้อราผลิตกรดแลกติกได้ 60.34 กรัมต่อลิตร คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง 8.87 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.11) มีผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) เป็น 0.47 กรัมต่อกรัมน้ำตาลและอัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_P) เป็น 0.63 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากผลการทดลองดังกล่าวเมื่อใช้ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต 7.5 กรัมต่อลิตร จะได้ผลผลิตกรดแลดติกสูงกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ 5.0 และ 10.0 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.14) เมื่อนำผลการทดลองมาคำนวณหาค่าต่างๆ ได้แก่ ผลได้ของกรดแลกติกจากการใช้น้ำตาล ($Y_{P/S}$) ผลได้ของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล ($Y_{X/S}$) และอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ได้ผลตามตารางที่ 4.5 เมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาลในการเจริญและการผลิตกรดแลกติก โดยดูค่าผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) และผลได้ของมวลเซลล์ ($Y_{X/S}$) สูงสุดเป็น 0.67 และ 0.091 กรัมต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 7.5 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 5.0 กรัมต่อลิตร ค่าผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) และผลได้ของมวลเซลล์ ($Y_{X/S}$) เป็น 0.47 และ 0.069 กรัมต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 7.5 และ 10.0 กรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสับสเตรทโดยตรง เชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ต้องการปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่สูงกว่าการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์หรือกรดแล้วเป็นสับสเตรท จุลินทรีย์ส่วนใหญ่สามารถใช้ไนโตรเจนในรูปแบบง่ายๆ เช่น แอมโมเนีย เกลือแอมโมเนีย และไนเตรท สำหรับนำไปสร้างเอนไซม์และโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ โดยทั่วไปเซลล์จุลินทรีย์ประกอบด้วยไนโตรเจนเฉลี่ยประมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักแห้ง ดังนั้นในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์จำเป็นต้องมีแหล่งไนโตรเจนให้เพียงพอต่อการเจริญของเซลล์ Waksman and Hutchings

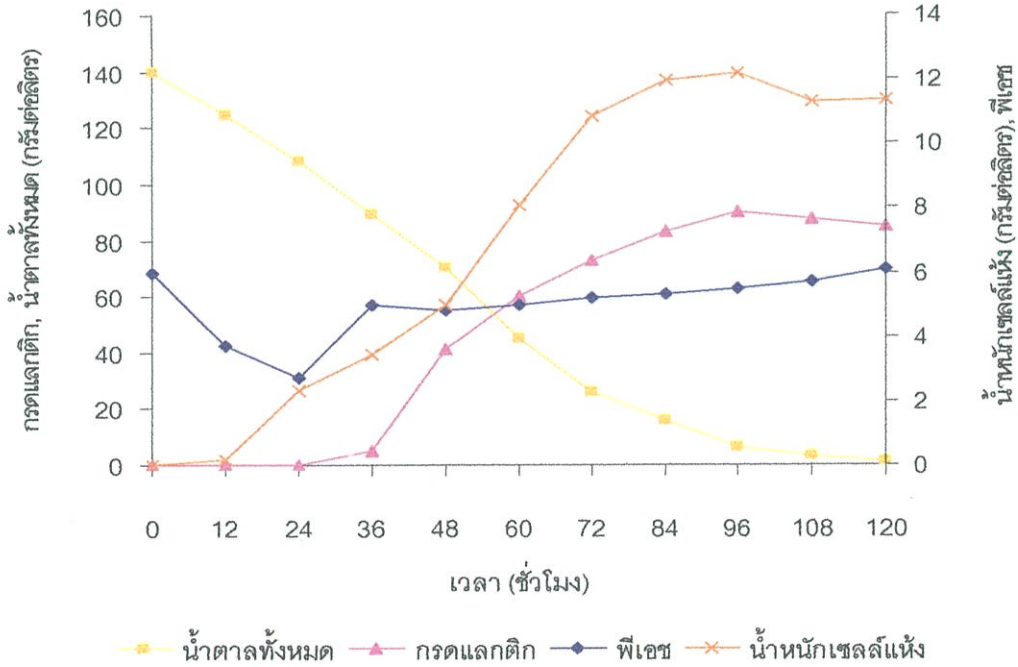
(1937) ได้ผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อราจีนัส *Rhizopus* ในอาหารที่มีกลูโคสร้อยละ 13 และใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์คือ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และแอมโมเนียมไนเตรท พบว่าเชื้อราใช้แอมโมเนียมซัลเฟตได้ดีที่สุด โดยมีการผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดคือ 53.7 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.5 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญและการผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* NRRL 359 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลซูโครส 70 กรัมต่อลิตร และเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

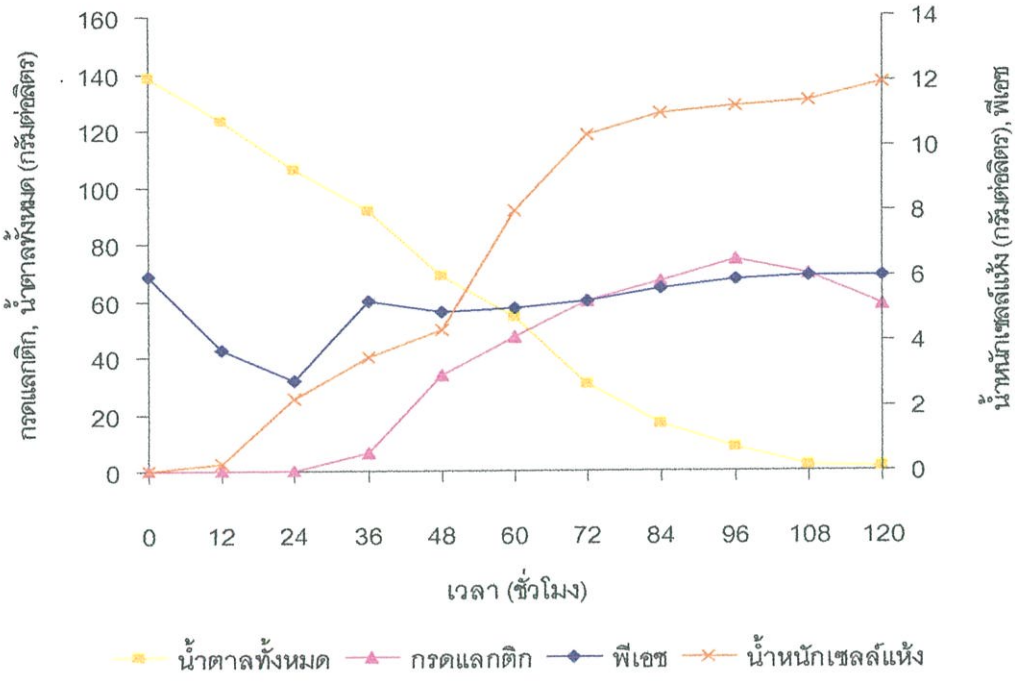
แอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)	Q_P (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	$Y_{P/S}$ (กรัมต่อกรัมน้ำตาล)	$Y_{X/S}$ (กรัมต่อกรัมน้ำตาล)	μ (ต่อชั่วโมง)
5.0	0.63	0.47	0.069	0.036
7.5	0.94	0.67	0.091	0.041
10.0	0.77	0.54	0.086	0.051



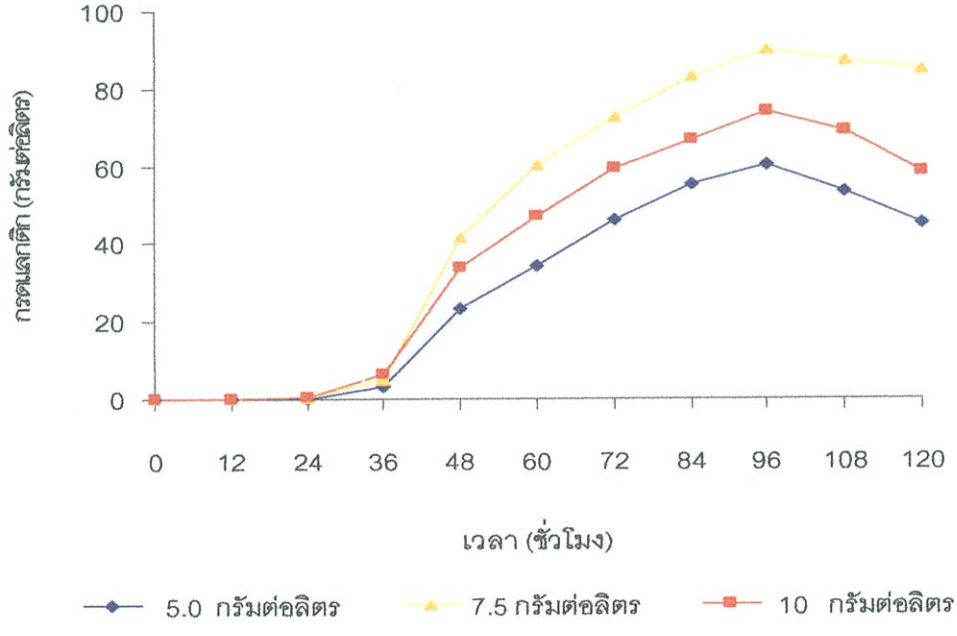
ภาพที่ 4.11 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 5.0 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.12 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 7.5 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.13 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 10.0 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.14 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

เมื่อพิจารณาค่าทางสถิติ ของปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลซูโครส 70 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณกรดแลกติกสูงสุดที่ระดับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ตามตารางที่ 4.6 ดังนั้นความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 7.5 กรัมต่อลิตร จึงเหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อราในอาหารที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลซูโครส 70 กรัมต่อลิตร เพื่อผลิตกรดแลกติกในระดับถังหมักต่อไป

ตารางที่ 4.6 เปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลซูโครส 70 กรัมต่อลิตรและเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

แอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)	5.0	7.5	10.0
กรดแลกติกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	60.34 [c]	89.93 [a]	73.98 [b]

หมายเหตุ ปริมาณกรดแลกติกที่กำกับตามแนวนอนด้วยอักษรที่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

4.2 ผลการศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสในระดับฟลาสก์

4.2.1 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส

จากการศึกษาทดลองเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส (α-amylase (EC 3.2.1.1) Type II-A : จาก *Bacillus* sp. ของ Sigma) โดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 70 100 130 และ 160 กรัมต่อลิตร ผลการศึกษาเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 70 และ 100 กรัมต่อลิตร เชื้อราผลิตกรดแลกติกได้ 35.54 และ 41.65 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4.15 และ 4.16) อัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_p) เป็น 0.49 และ 0.39 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 160 กรัมต่อลิตร จะได้กรดแลกติก 64.17 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.18) อัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_p) เป็น 0.60 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่การใช้แป้งมันสำปะหลัง 130 กรัมต่อลิตร เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์แล้วจะมีน้ำตาลรีดิวซ์เป็น 75.31 กรัมต่อลิตร ซึ่งเชื้อนำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญและผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 68.81 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.17) มีอัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_p) เป็น 0.61 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและมีน้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 6.84 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการทดลองอื่นๆ จากรายงานการทดลองของ ดวงเดือน ภู่เจริญ (2544) ที่ได้ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก พบว่าเมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 58.57 กรัมต่อลิตร เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังเป็น 150 และ 180 กรัมต่อลิตร ปริมาณกรดแลกติกจะลดลงเป็น 55.41 และ 50.20 กรัมต่อลิตรตามลำดับ เมื่อนำผลการทดลองมาคำนวณหาค่าต่างๆ ได้แก่ ผลได้ของกรดแลกติกจากการใช้น้ำตาล ($Y_{P/S}$) ผลได้ของมวลเซลล์จากการใช้น้ำตาล ($Y_{X/S}$) และอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ได้ผลตามตารางที่ 4.7 จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาลในการเจริญและผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา พบว่าแป้งมันสำปะหลัง 70 กรัมต่อลิตรเมื่อย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสแล้วจะมีน้ำตาลรีดิวซ์ 40.55 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้เลี้ยงเชื้อราจะได้ค่าผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) และผลได้ของมวลเซลล์ ($Y_{X/S}$) เป็น 0.95 และ 0.141 กรัมต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ และอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เป็น 0.045 ต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าการทดลองอื่นๆ ดังนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่น้อย เชื้อมีการใช้น้ำตาลในการเจริญได้ดี อย่างไรก็ตามการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสจะได้ผลผลิตกรดแลกติกน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลซูโครส 70 กรัมต่อลิตร ซึ่งเชื้อสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 87.74 กรัมต่อลิตร Zhang and Cheryan (1991) ได้เลี้ยงเชื้อ *L. amylovorus* NRRL B 4542 ในอาหารที่มี

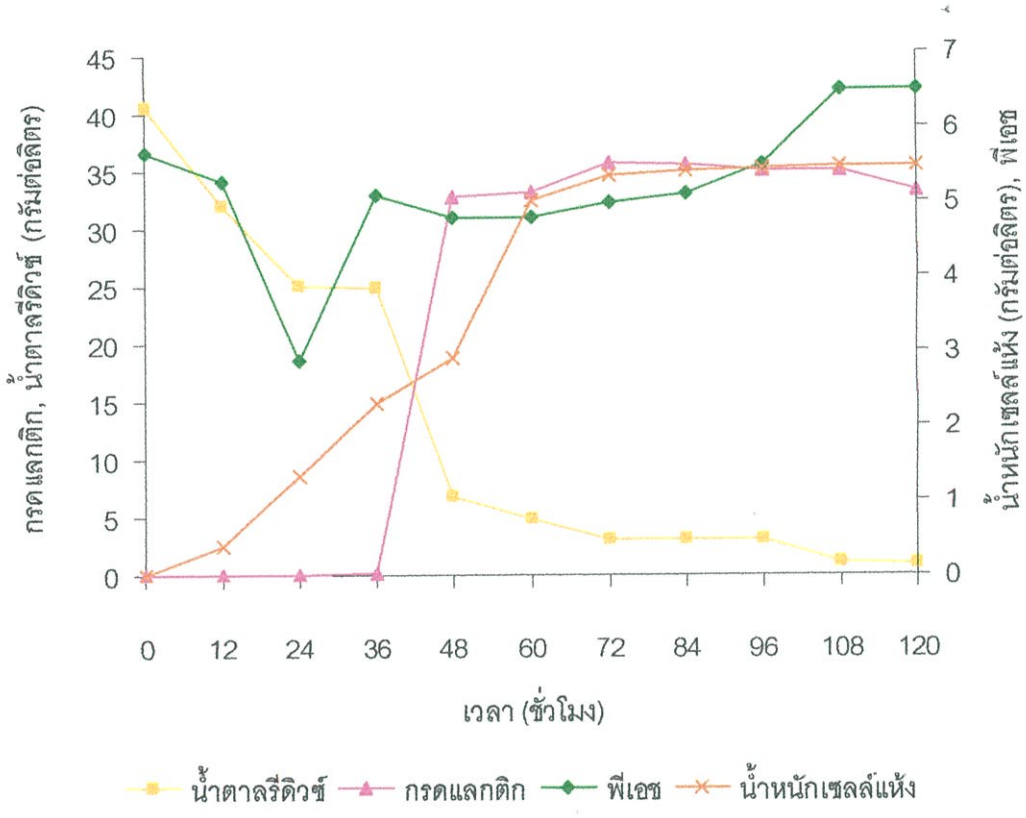
แป้งข้าวโพด 120 กรัมต่อลิตร และย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสร้อยละ 0.055 น้ำหนักต่อน้ำหนักแป้ง เชื้อสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 96.2 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้มีรายงานของ Kurosawa et. al. (1988) ได้ใช้อาหารที่ประกอบด้วยแป้งมันฝรั่ง (soluble potato starch) 50 กรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงเชื้อร่วมของ *A. awamori* Nakazawa IFO 4033 ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพื่อย่อยแป้งมันฝรั่งให้เป็นกลูโคส และเชื้อ *Streptococus lactis* IFO 12007 สามารถหมักกลูโคสให้ได้กรดแลกติก 25 กรัมต่อลิตร มีรายงานการศึกษาของ Yin et. al. (1997) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งข้าวโพด 120 กรัมต่อลิตรและย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส เปรียบเทียบกับการใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก พบว่าผลผลิตกรดแลกติกที่ได้ใกล้เคียงกัน คือ 98.2 และ 95.1 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

ตารางที่ 4.7 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญและการผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ และย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส

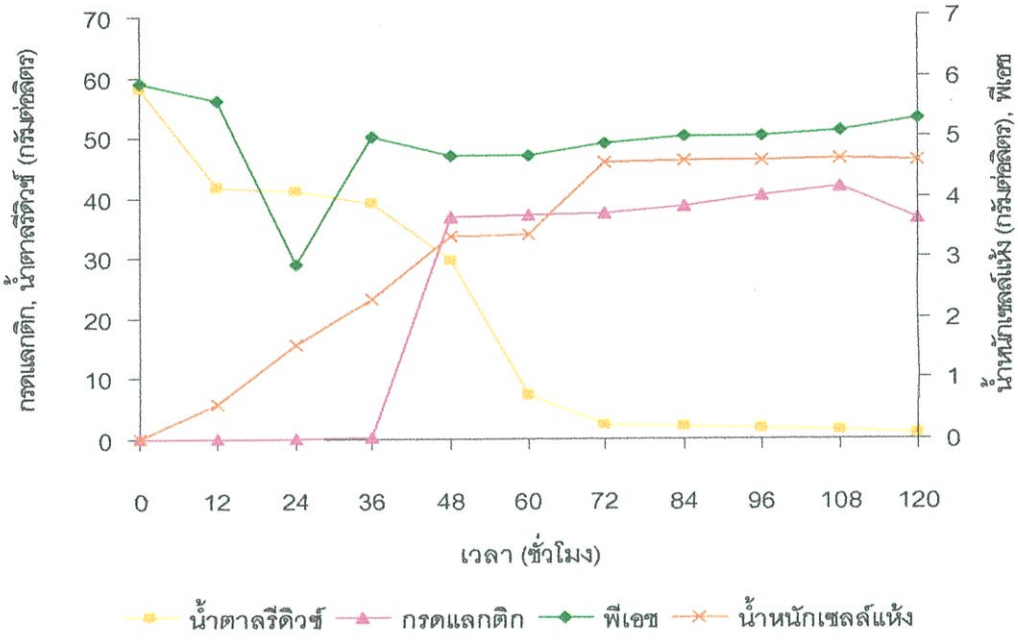
แป้งมันสำปะหลัง (กรัมต่อลิตร)	Q_P (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	$Y_{P/S}$ (กรัมต่อกรัมน้ำตาล)	$Y_{X/S}$ (กรัมต่อกรัมน้ำตาล)	μ (ต่อชั่วโมง)
70	0.49	0.95	0.141	0.045
100	0.39	0.74	0.080	0.026
130	0.61	0.91	0.093	0.034
160	0.60	0.72	0.051	0.033

แป้งมันสำปะหลังเป็นคาร์โบไฮเดรทที่ประกอบด้วยอะไมโลสและอะไมโลเพกติน เมื่อนำมาใช้เป็นสับสเตรทสำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ ต้องนำแป้งมาทำให้สุกก่อนเพื่อให้เม็ดแป้งแตกออกมาละลายกับโมเลกุลของน้ำเกิดเป็นเจลซึ่งมีความหนืดสูง แล้วจึงย่อยแป้งสุกด้วยเอนไซม์หรือกรดอนินทรีย์ การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์จะมีความจำเพาะดีกว่าการย่อยด้วยกรด และผลผลิตน้ำตาลที่ได้จะมีปริมาณที่มากกว่า การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส เป็นการย่อยในขั้น Liquefaction ผลผลิตที่ได้เป็นกลูแคนและลิมิตเด็กซ์ทริน ที่มีหน่วยกลูโคสประมาณ 2–6 หน่วย แล้วอาจใช้เอนไซม์เบตาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสช่วยในการย่อยแป้งต่อไป ซึ่งจะเป็นการย่อยแป้งในขั้น Saccharification เพื่อให้ได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นกูลโคส (Berry and Paterson. 1990) การย่อยแป้งด้วยกรดส่วนใหญ่ใช้กรดไฮโดรคลอริกผลผลิตสุดท้ายเป็น

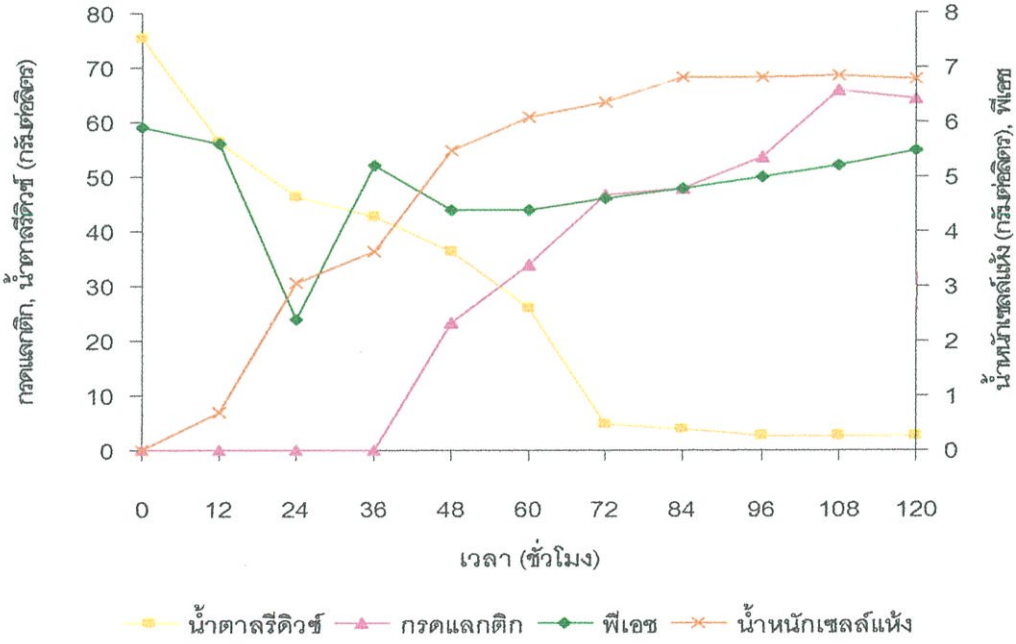
สารละลายผสมของน้ำตาล กูลโคส มอลโทส มอลโทไตรโอสและน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ (ดวงเดือน ภู่เจริญ. 2544) เชื้อราสามารถใช้น้ำตาลเหล่านี้เป็นสับสเตรทได้โดยตรง แต่เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนพวกแป้งและข้าวโดยตรง จะเกิดการชักนำให้เชื้อสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมาย่อยแป้งและข้าวให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพื่อใช้เป็นสับสเตรทในการผลิตกรดแลกติกต่อไป



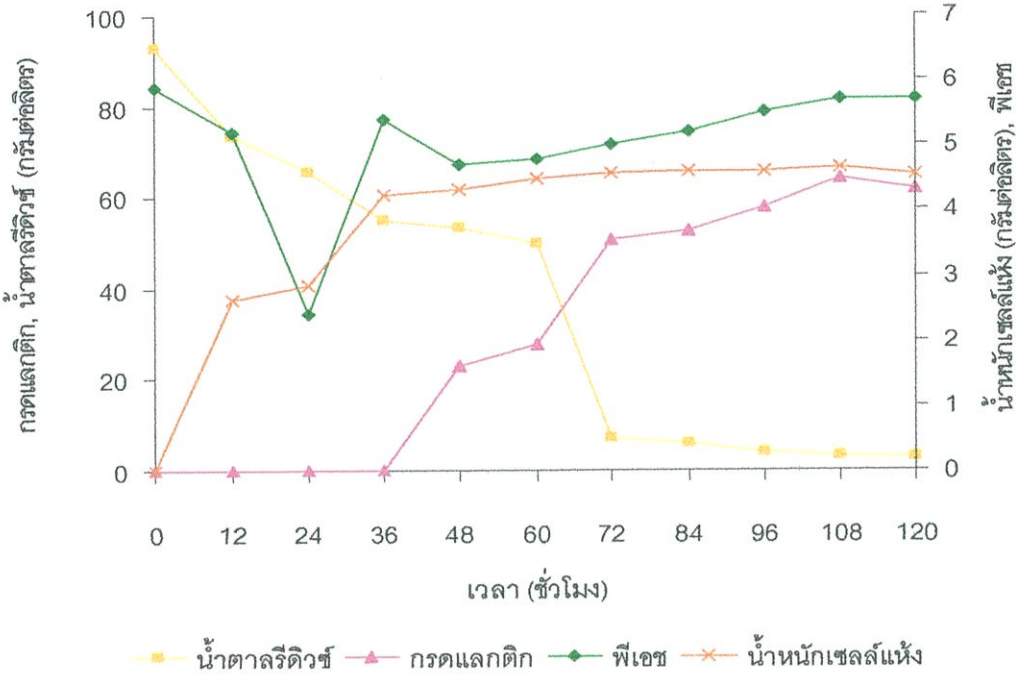
ภาพที่ 4.15 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 70 กรัมต่อลิตร ที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส



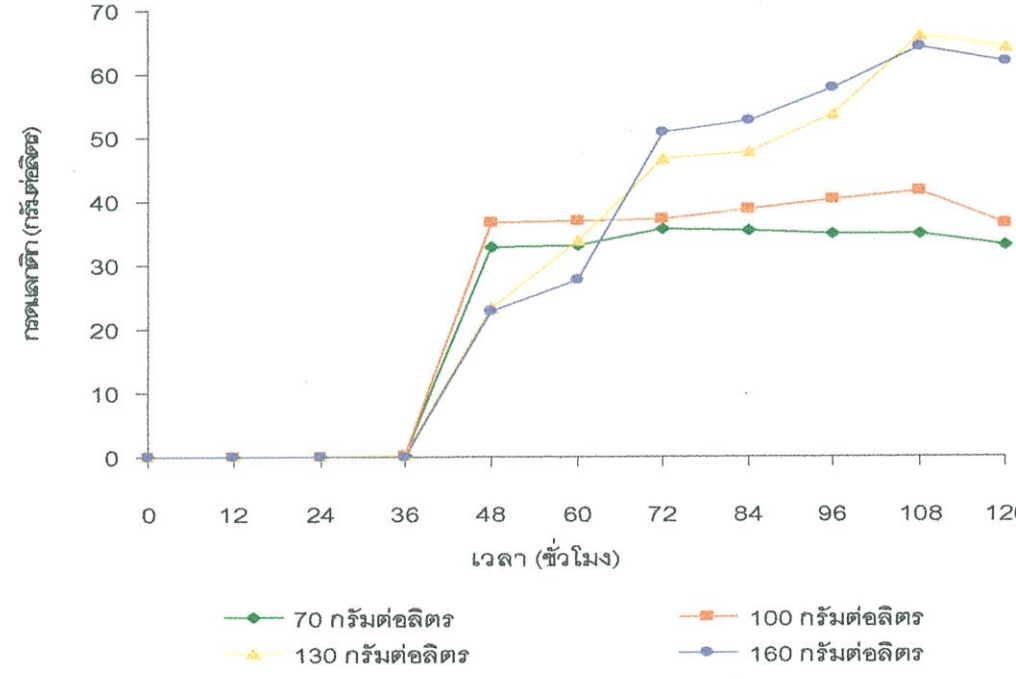
ภาพที่ 4.16 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตรที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส



ภาพที่ 4.17 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 130 กรัมต่อลิตรที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส



ภาพที่ 4.18 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 160 กรัมต่อลิตรที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส



ภาพที่ 4.19 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส

จากผลการทดลองเมื่อนำปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นระดับต่างๆ ที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส มาเปรียบเทียบกันทางสถิติ พบว่าปริมาณกรดแลกติกสูงสุดที่ระดับการใช้แป้งมันสำปะหลังต่างๆกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ตามตารางที่ 4.8 การใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 130 กรัมต่อลิตรและย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อรา เพื่อผลิตกรดแลกติกให้ได้ปริมาณสูงในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ และย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส

แป้งมันสำปะหลัง (กรัมต่อลิตร)	70	100	130	160
กรดแลกติกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	35.54^{d}	41.65^{c}	65.81^{a}	64.17^{b}

หมายเหตุ ปริมาณกรดแลกติกที่กำกับตามแนวนอนด้วยอักษรที่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

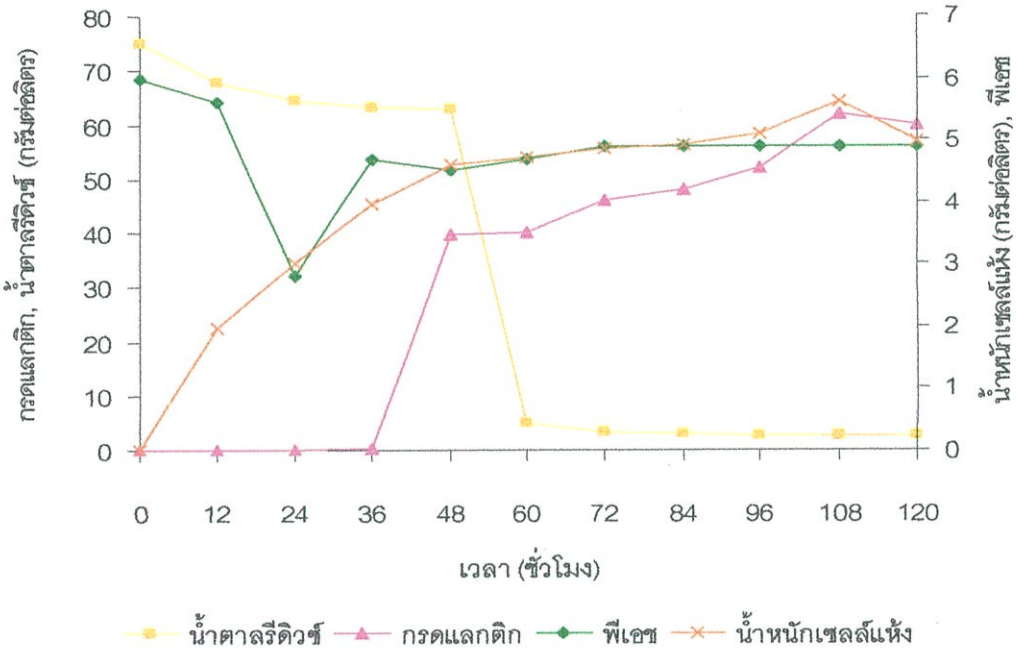
4.2.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในอาหารแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส

การศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารเหลวที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 130 กรัมต่อลิตรและย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส เพื่อหาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 3.0 5.0 และ 7.0 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 3.0 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 61.89 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 108 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.20) มีผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) เป็น 0.85 กรัมต่อกรัมน้ำตาลและอัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_P) เป็น 0.57 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 5.0 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 43.98 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 108 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.21) มีผลได้ของกรดแลกติก($Y_{P/S}$) เป็น 0.61 กรัมต่อกรัมน้ำตาลและอัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_P) เป็น 0.41 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 7.0 กรัมต่อลิตร เชื้อราผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 44.43 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 108 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.22) มีผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) เป็น 0.60 กรัมต่อกรัมน้ำตาลและอัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_P) เป็น 0.41 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากผลการทดลองดังกล่าวเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 3.0 กรัมต่อลิตร จะได้ผลผลิตกรดแลกติกสูงกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 5.0 และ 7.0 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.23) ซึ่งผลการทดลองนี้จะสอดคล้องกับผลการทดลองของดวงเดือน ภู่เจริญ (2544) ที่เลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารแป้งมันสำปะหลัง 120 กรัมต่อลิตรและย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก เมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 3.0 กรัมต่อลิตร เชื้อราผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 60.80 กรัมต่อลิตรและการเจริญของเชื้อคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งได้สูงสุด 10.22 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลการทดลองดีกว่าการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 2.0 และ 1.0 กรัมต่อลิตร เชื้อราผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 55.70 และ 13.93 กรัมต่อลิตรตามลำดับ และการเจริญของเชื้อคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง 6.20 และ 3.72 กรัมต่อลิตรตามลำดับ จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อรา พบว่าแอมโมเนียม-ซัลเฟต 3.0 กรัมต่อลิตร เชื้อรามีการเจริญน้อยที่สุด โดยคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง 5.61 กรัมต่อลิตร ผลได้ของมวลเซลล์ ($Y_{X/S}$) เป็น 0.077 กรัมต่อกรัมน้ำตาลและอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เป็น 0.023 ต่อชั่วโมง ตามตารางที่ 4.9 เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 5.0 และ 7.0 กรัมต่อลิตร เชื้อรามีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากัน คือ 0.034 ต่อชั่วโมง ดังนั้นการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตมากกว่า 3.0 กรัมต่อลิตร เชื้อราสามารถนำไนโตรเจนไปใช้ในการเจริญของเซลล์ได้ดี แต่จะผลิตกรดแลกติกได้น้อย มีรายงานการศึกษาทดลองของ Yin et. al. (1997) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารเหลวที่มีแป้งข้าวโพด 120 กรัมต่อลิตรและย่อยด้วยเอนไซม์

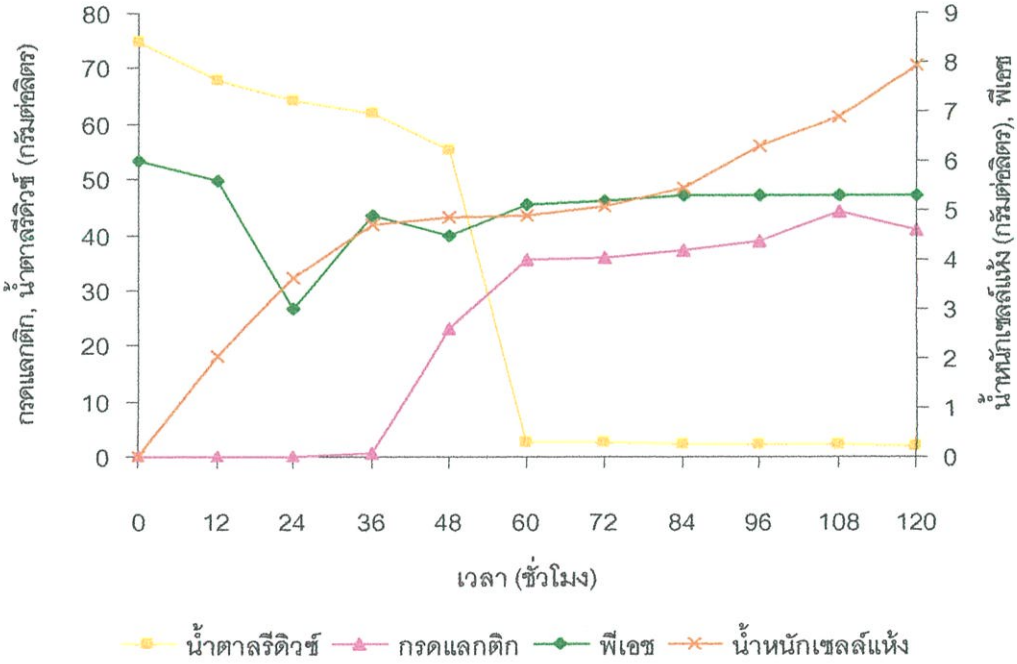
อะไมเลส โดยศึกษาแหล่งไนโตรเจน พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดที่ 95 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำแช่ข้าวโพด ยีสต์สกัด และโพลิเปปโทน ได้ผลผลิตกรดแลกติกเป็น 67 85 และ 90 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบการใช้แป้งข้าวโพดที่ย่อยด้วยเอนไซม์และย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก ในอาหารที่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 1.35 กรัมต่อลิตร พบว่าผลผลิตกรดแลกติกที่ได้ใกล้เคียงกัน คือ 98.2 และ 95.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ Kosakai et. al. ได้เลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารเหลวที่มีกลูโคส 120 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 3.02 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณกรดแลกติก 103.6 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.9 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญและการผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสและเติมแอมโมเนียม-ซัลเฟตที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

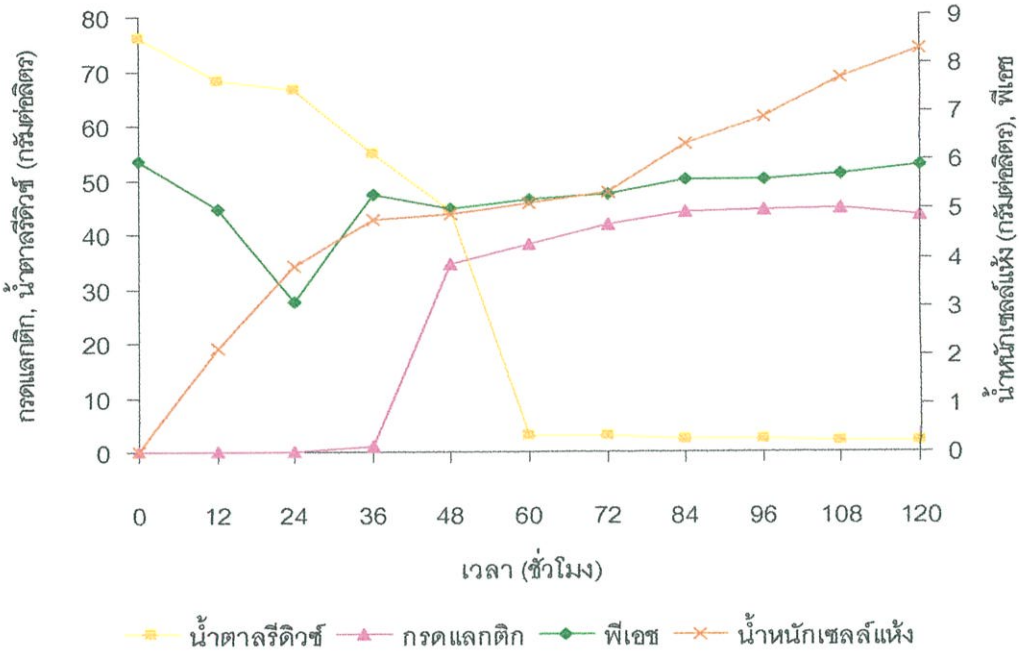
แอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)	Q_P (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	$Y_{P/S}$ (กรัมต่อกรัมน้ำตาล)	$Y_{X/S}$ (กรัมต่อกรัมน้ำตาล)	μ (ต่อชั่วโมง)
3.0	0.57	0.85	0.077	0.023
5.0	0.41	0.61	0.095	0.034
7.0	0.41	0.60	0.105	0.034



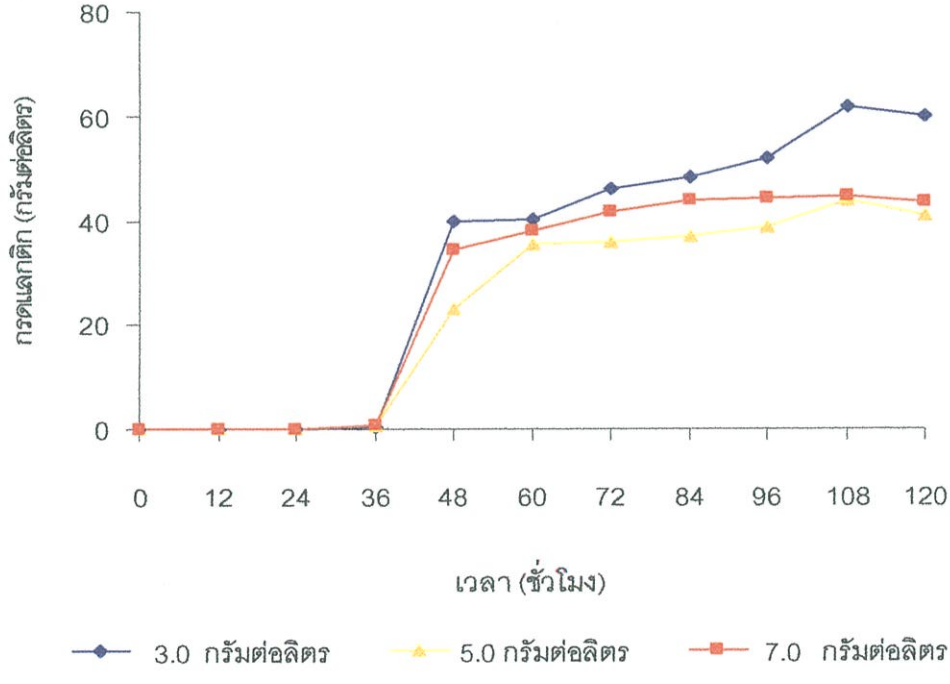
ภาพที่ 4.20 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสและเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 3.0 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.21 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสและเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 5.0 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.22 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสและเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 7.0 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.23 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสและเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

จากผลการทดลองเมื่อนำปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส และเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ มาเปรียบเทียบกันทางสถิติ พบว่าปริมาณกรดแลกติกสูงสุดที่ระดับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 เปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกในอาหารแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสและเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

แอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)	3.0	5.0	7.0
กรดแลกติกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	61.89[a]	43.98[c]	44.43[b]

หมายเหตุ ปริมาณกรดแลกติกที่กำกับตามแนวนอนด้วยอักษรที่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

4.3 ผลการศึกษาการผลิตกรดแลกติกในระดับถังหมัก

4.3.1 ผลการศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบแบตช์ (Batch)

ผลการศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบแบตช์โดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเหมาะสมปริมาตร 2.5 ลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม และอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที ตามสภาวะการทดลองของ ดวงเดือน ภู่เจริญ (2544) จากการทดลองเชื้อสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 77.59 กรัมต่อลิตร การเจริญของเซลล์คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง 11.89 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.24) คิดเป็นผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) 0.58 กรัมต่อกรัมน้ำตาลและอัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_p) เป็น 0.81 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาลพบว่าเชื้อรามีการใช้น้ำตาลในการสร้างเซลล์ได้ดี โดยปริมาณน้ำตาลลดลงเหลือ 15.14 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 60 ชั่วโมง ซึ่งการเจริญของเชื้อราเข้าสู่ช่วงกลางของระยะ log phase และเมื่อการเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase ปริมาณน้ำตาลใกล้หมด เชื้อราจะมีการผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์ซึ่งใช้อาหารสูตรเดียวกัน พบว่าการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์จะได้ปริมาณกรดแลกติกสูงกว่าคือได้ 89.93 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้ของกรด

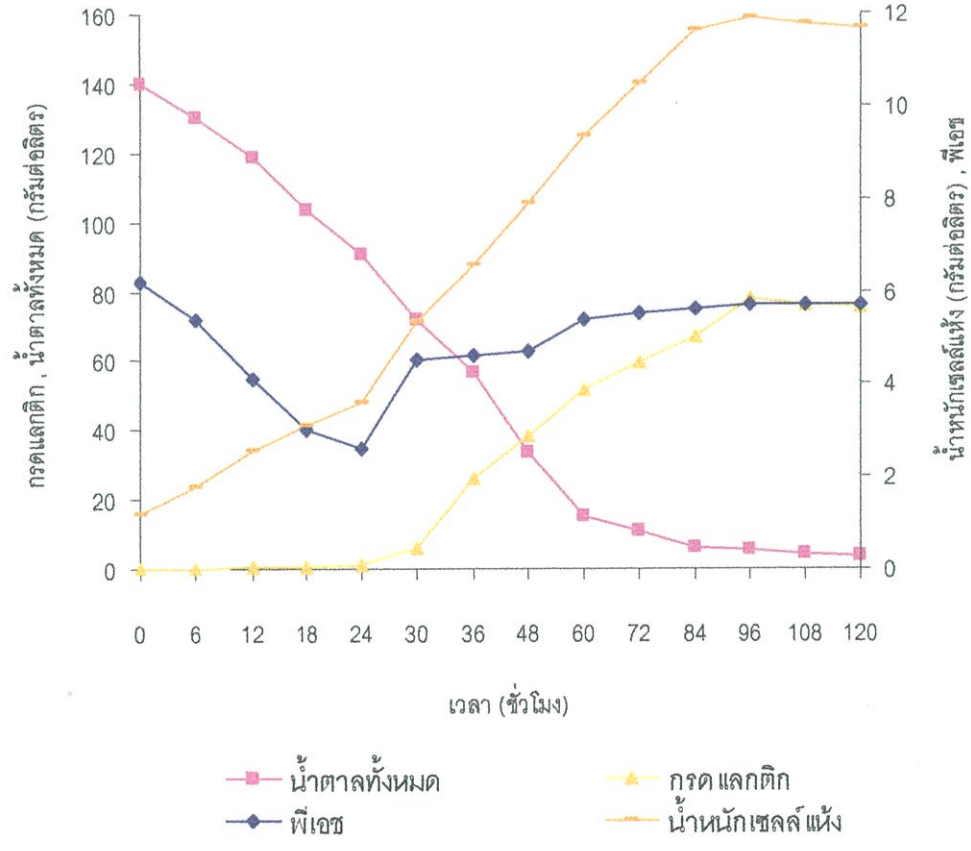
แลกติก ($Y_{P/S}$) 0.67 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และอัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_P) เป็น 0.94 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกจากนี้การเจริญของเซลล์ในระดับฟลาสก์ยังสูงกว่าในระดับถังหมักด้วย โดยการเจริญสูงสุดของเชื้อที่เพาะเลี้ยงในฟลาสก์คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 12.20 กรัมต่อลิตร ผลได้ของมวลเซลล์ ($Y_{X/S}$) เป็น 0.091 กรัมต่อกรัมน้ำตาลและอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เป็น 0.041 ต่อชั่วโมง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงในถังหมัก เชื้อมีการเจริญสูงสุดคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 11.89 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้ของมวลเซลล์ ($Y_{X/S}$) เท่ากับ 0.080 กรัมต่อกรัมน้ำตาลและอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เป็น 0.019 ต่อชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Yin et. al. (1998) ที่ทดลองผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารเหลวที่มีแป้งข้าวโพด 120 กรัมต่อลิตรที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส เมื่อเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์และในถังหมักแบบอากาศยกตัว เชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 98.2 กรัมต่อลิตรในระดับฟลาสก์ และ 96.5 กรัมต่อลิตรในถังหมัก ในการทดลองนี้ใช้ถังหมักแบบใบพัดกวนในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ซึ่งเชื้อมีการเจริญเป็นเส้นใยแผ่กระจายในอาหารเหลว ปกคลุมผิวหน้าอาหารและเกาะที่ผนังถังหมัก ทำให้เซลล์รับออกซิเจนและอาหารได้ไม่เพียงพอต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติก ผลผลิตกรดแลกติกที่ได้จึงน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ จากรายงานของ ดวงเดือน ภู่เจริญ (2544) ที่ทดลองเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในระดับฟลาสก์และถังหมัก ที่มีอาหารแป้งมันสำปะหลัง 120 กรัมต่อลิตรที่ย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก เชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 68.32 กรัมต่อลิตรในระดับฟลาสก์ และ 54.62 กรัมต่อลิตรในถังหมัก และพบว่าการเพาะเลี้ยงในถังหมักเชื้อจะเจริญเป็นเส้นใยแผ่กระจายในอาหารเหลวและเกาะที่ผนังถังหมัก ทำให้การถ่ายเทของออกซิเจนลดลง

ตารางที่ 4.11 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญและการผลิตกรดแลกติก ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 แบบแบตช์ในถังหมัก

Q_P (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	$Y_{P/S}$ (กรัมต่อกรัมน้ำตาล)	$Y_{X/S}$ (กรัมต่อกรัมน้ำตาล)	μ (ต่อชั่วโมง)
0.81	0.58	0.080	0.019

นอกจากนี้ Tay and Yang (2002) ได้รายงานการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในถังหมักแบบ rotating fibrous-bed bioreactor และทำการตรึงเซลล์เชื้อรากับผ้าฝ้าย เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบอิสระ พบว่าการตรึงเซลล์บนผ้าฝ้ายจะทำให้เซลล์ลอยอย่างอิสระในอาหาร จึงง่ายต่อการควบคุมการเพาะเลี้ยง ทำให้ได้ผลผลิตกรดแลกติกสูงและยังง่ายต่อการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักด้วย นอกจากนี้การให้อากาศและการกวน ทำให้

ออกซิเจนละลายในอาหารเพิ่มขึ้นด้วย แสดงให้เห็นว่าการตรึงเซลล์ของเชื้อรา ทำให้การถ่ายเทของออกซิเจนไม่ถูกจำกัดโดยการแพร่ของเส้นใย การเพาะเลี้ยงเชื้อแบบอิสระในอาหารเหลว เชื้อจะเจริญไปทุกๆที่และเกาะตามอุปกรณ์ ในถังหมักซึ่งเป็นปัญหากับระบบต่างๆ ของถังหมัก ทำให้การผลิตกรดแลกติกลดลงด้วย ปัญหาของการเพาะเลี้ยงเชื้อที่เป็นเส้นใยในอาหารเหลวคือ เส้นใยที่กระจายจะทำให้อาหารมีความหนืด การถ่ายเทของออกซิเจนจะลดลง การเพาะเลี้ยงเชื้อราในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด ทำให้เชื้อผลิตกรดแลกติกได้น้อยลง แต่จะเกิดเอนไซม์ alcohol dehydrogenase เพิ่มขึ้น จึงได้เอทานอลเป็นผลผลิตเพิ่มขึ้นด้วย (Skory et. al. 1998) จากการทดลองของ Kosakai et. al. (1997) ได้รายงานการเพาะเลี้ยง *R. oryzae* NRRL 395 ในถังหมักที่มีอาหารกลูโคส 120 กรัมต่อลิตร โดยเติม mineral support 3 กรัมต่อลิตรและ polyethalene oxide 5 พีพีเอ็ม เพื่อช่วยให้เส้นใยมีการรวมกัน ไม่กระจายไปทั่วถังหมัก การถ่ายเทออกซิเจนจึงเพิ่มขึ้น เส้นใยจึงได้รับออกซิเจนและอาหารดีขึ้น ผลผลิตกรดแลกติกที่ได้จึงสูงตามไปด้วย



ภาพที่ 4.24 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 แบบแบตช์ในถังหมัก

4.3.2 ผลการศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบเฟดแบตช์ (Fed Batch)

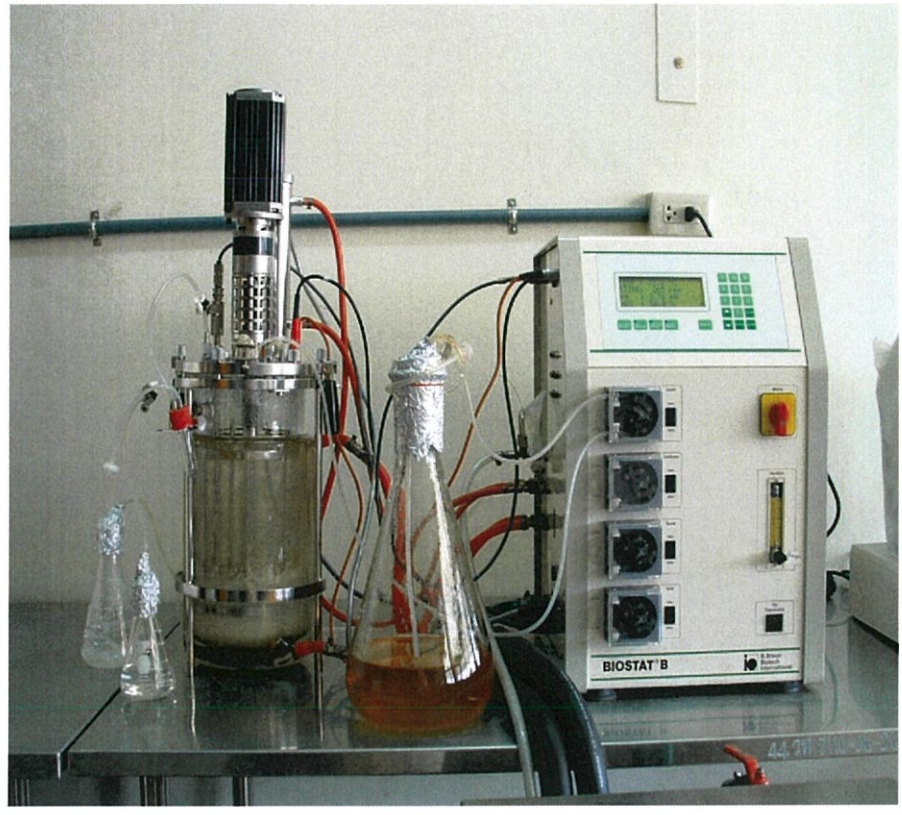
จากการศึกษาทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 แบบเฟดแบตช์ ในถังหมักขนาด 5 ลิตร (ภาพที่ 4.25) มีอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 1.5 ลิตร ประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตรและน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร ใช้สูตรอาหารเหมือนการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบแบตช์ อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จึงเริ่มต้นเติมอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตรและใช้สูตรอาหารเหมือนอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น ปริมาตร 2.0 ลิตร โดยศึกษาอัตราการเติมอาหารที่ 5.0 7.5 และ 10.0 กรัมน้ำตาลซูโครสต่อชั่วโมง เพาะเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง จากผลการทดลองที่อัตราการเติมอาหาร 10.0 กรัมน้ำตาลซูโครสต่อชั่วโมง เชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 42.26 กรัมต่อลิตรที่เวลา 96 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.28) คิดเป็นผลได้ของกรดแลกติก($Y_{P/S}$) 0.59 กรัมต่อกรัมน้ำตาลและอัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_P) เป็น 0.44 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้อัตราการเติมอาหาร 7.5 กรัมน้ำตาลซูโครสต่อชั่วโมง เชื้อราผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 31.99 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.27) คิดเป็นผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) เท่ากับ 0.47 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และอัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_P) เป็น 0.33 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อมีการเติมอาหารที่อัตรา 5.0 กรัมน้ำตาลซูโครสต่อชั่วโมง เชื้อราผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 21.89 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 108 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.26) คิดเป็นผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) เท่ากับ 0.38 กรัมต่อกรัมน้ำตาล และอัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_P) เป็น 0.20 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อราครบ 120 ชั่วโมง พบว่าที่อัตราการเติมอาหาร 10.0 กรัมน้ำตาลซูโครสต่อชั่วโมง จะได้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด (ภาพที่ 4.29) และการเจริญของเชื้อก็สูงด้วย โดยคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 7.24 กรัมต่อลิตรและยังมีการใช้สับสเตรทที่ดีโดยมีน้ำตาลทั้งหมดเหลือ 1.06 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้ของมวลเซลล์ ($Y_{X/S}$) 0.10 กรัมต่อกรัมน้ำตาล ในขณะที่อัตราการเติมอาหารที่ 7.5 และ 5.0 กรัมน้ำตาลซูโครสต่อชั่วโมง การเจริญของเชื้อคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 6.20 และ 5.59 กรัมต่อลิตรตามลำดับและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่เป็น 4.74 และ 14.18 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็นผลได้ของมวลเซลล์ ($Y_{X/S}$) เป็น 0.091 และ 0.098 กรัมต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ (ตารางที่ 4.12) ในระหว่างการเพาะเลี้ยงมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 2 ครั้งคือ ในชั่วโมงที่ 18 และ 48 เพื่อปรับค่าพีเอชโดยแคลเซียมคาร์บอเนตละลายในอาหารได้เล็กน้อย เมื่อเชื้อผลิตกรดแลกติกออกมาในอาหารกรดแลกติกจะจับกับแคลเซียมคาร์บอเนต แล้วปลี่ยนเป็นแคลเซียมแลกเตท ทำให้อาหารมีความเป็นกรดน้อยลง เป็นการควบคุมระดับพีเอชในระหว่างการเพาะเลี้ยงให้อยู่ในช่วงใกล้ 6.0 เพราะที่พีเอชนี้เชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 มีการเจริญได้ดี (Tay and Yang. 2002)

ตารางที่ 4.12 ค่าพารามิเตอร์ของการเจริญและการผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* NRRL 395 ในการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ที่มีอัตราการเติมอาหารที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

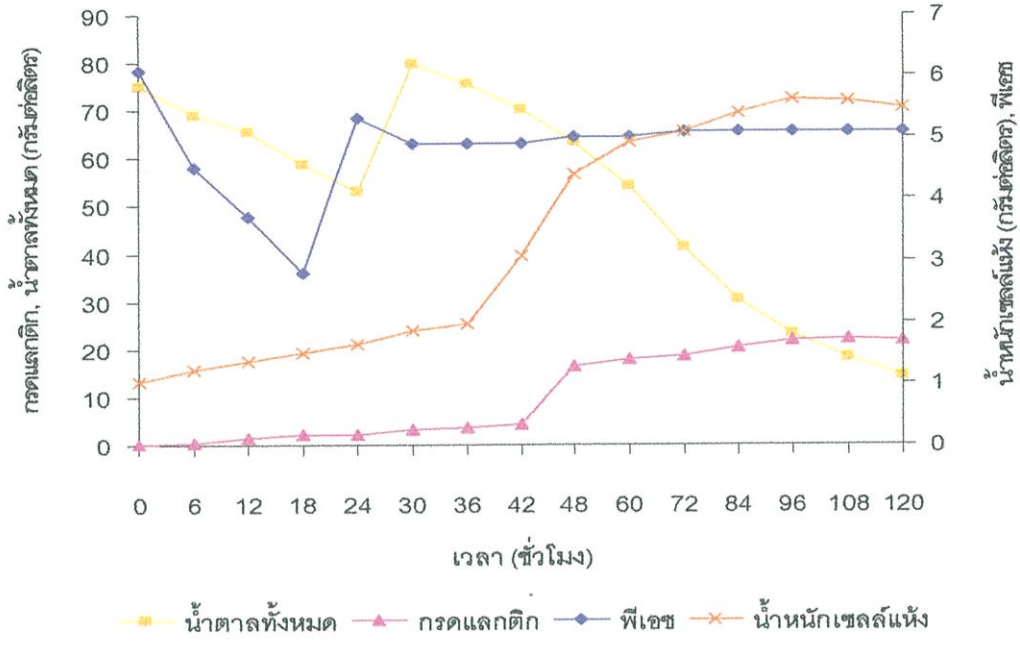
อัตราการเติมอาหาร (กรัมน้ำตาลซูโครสต่อชั่วโมง)	Q_P (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	$Y_{P/S}$ (กรัมต่อกรัมน้ำตาล)	$Y_{X/S}$ (กรัมต่อกรัมน้ำตาล)	μ (ต่อชั่วโมง)
5.0	0.20	0.38	0.098	0.067
7.5	0.33	0.47	0.091	0.065
10.0	0.44	0.59	0.100	0.056

จากการทดลองเมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อรา พบว่าการเติมอาหารในระหว่างการเพาะเลี้ยงทำให้ปริมาณน้ำตาลที่คงอยู่ในถังหมักมีปริมาณสูง จึงทำให้การเจริญของเชื้อราเข้าสู่ระยะ log phase และ stationary phase ช้า เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ การเจริญของเชื้อราเข้าสู่ระยะ log phase หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมงและเข้าสู่ระยะ stationary phase ที่เวลา 84 ชั่วโมง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์เชื้อรามีการเจริญเข้าสู่ระยะ log phase หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมงและเข้าสู่ระยะ stationary phase ที่เวลา 96 ชั่วโมง จึงทำให้ได้ปริมาณกรดแลกติกน้อย ทั้งนี้เพราะเชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงสุดเมื่อการเจริญอยู่ในระยะ stationary phase นอกจากนี้ปริมาณน้ำตาลโดยรวมที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ ยังน้อยกว่าในการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ จึงทำให้เชื้อรามีการเจริญน้อยกว่า การผลิตกรดแลกติกจึงได้น้อยกว่าด้วย และยังพบปัญหาเชื้อรามีการเจริญเป็นเส้นใยในอาหารเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ Roble et. al. (2003) ได้รายงานการทดลองผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันสำปะหลังในถังหมักแบบ circulating loop bioreactor ด้วยการเลี้ยงเชื้อ *A. awamori* และเชื้อ *L. lactis* spp. โดยการตรึงเซลล์ร่วมกัน เพาะเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบตช์ มีการควบคุมอัตราและความถี่การไหลของอาหารในถังหมัก สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 0.76 กรัมต่อกรัมน้ำตาลและอัตราการผลิตกรดแลกติกเป็น 1.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง Tay and Yang (2002) ได้รายงานผลการศึกษาทดลองใช้ rotating fibrous-bed bioreactor ในการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ โดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ที่ตรึงเซลล์บนผ้าฝ้าย เพื่อศึกษาจลนพลศาสตร์และเสถียรภาพของกระบวนการผลิตกรดแลกติก ในอาหารเหลวที่มีกลูโคส 70 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหารเหลวที่มีแป้งข้าวโพด 70 กรัมต่อลิตรที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส และมีออกซิเจนละลาย (DO) ที่ 25 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ใน

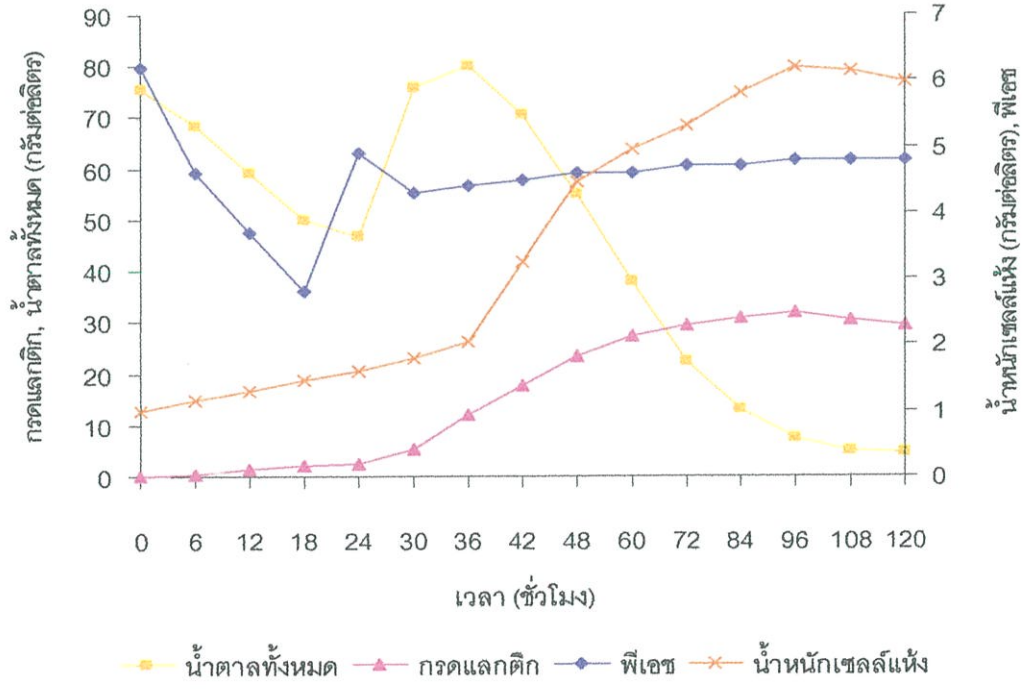
ระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ มีการเติมอาหารเมื่อพบว่าในน้ำหมักมีปริมาณกรดแลกติกสูงมากกว่า 120 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองเมื่อใช้อาหารแป้งข้าวโพดและความเข้มข้นของออกซิเจนละลาย 90 เปอร์เซ็นต์ เชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงกว่าในการทดลองอื่นๆ การเพาะเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 พบว่าออกซิเจนละลาย (DO) มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกอย่างมาก โดยความเข้มข้นของออกซิเจนละลายในอาหารร้อยละ 90 เชื้อราจะผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดร้อยละ 90 โดยน้ำหนัก



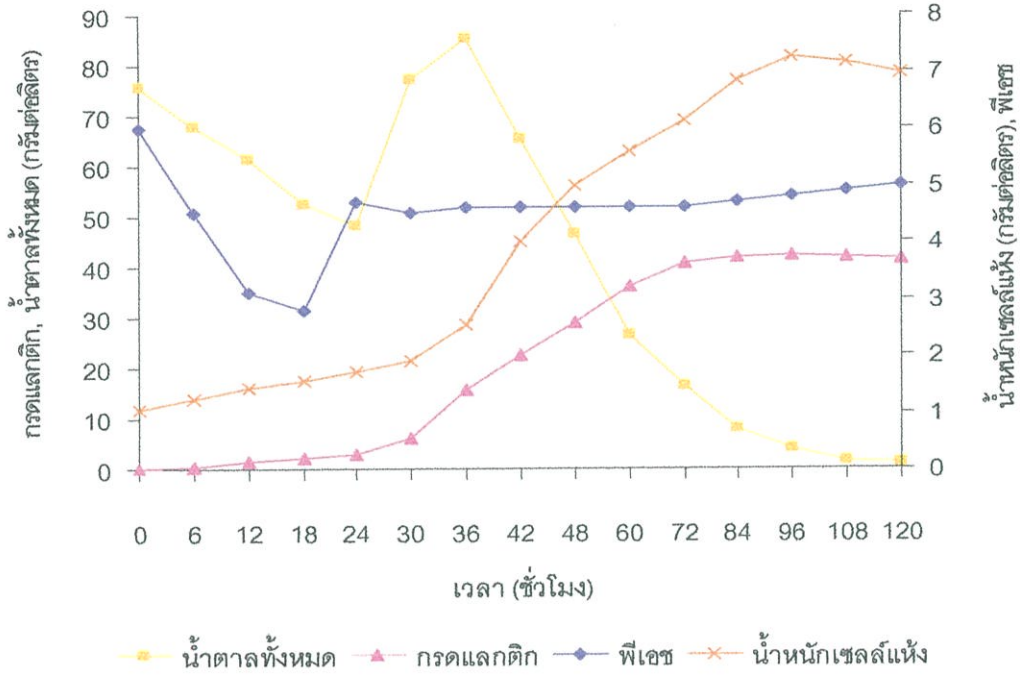
ภาพที่ 4.25 แสดงการเพาะเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 แบบเฟดแบตช์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร



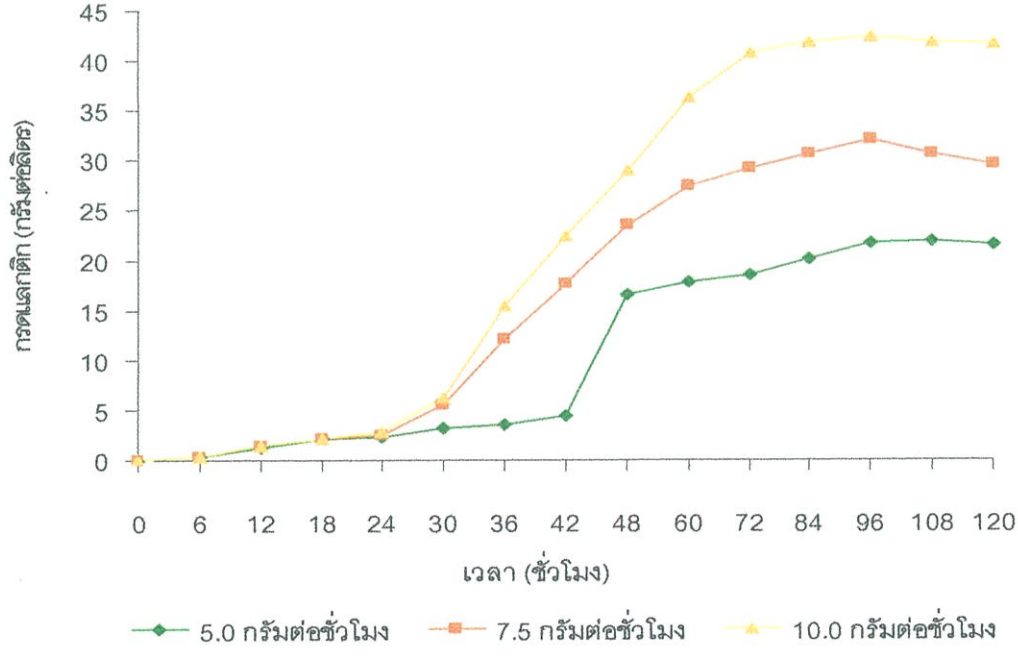
ภาพที่ 4.26 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 แบบเฟดแบตช์ ที่มีอัตราการเติมอาหาร 5.0 กรัมน้ำตาลซูโครสต่อชั่วโมง



ภาพที่ 4.27 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 แบบเฟดแบตช์ ที่มีอัตราการเติมอาหาร 7.5 กรัมน้ำตาลซูโครสต่อชั่วโมง



ภาพที่ 4.28 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 แบบเฟดแบตช์ ที่มีอัตราการเติมอาหาร 10.0 กรัมน้ำตาลซูโครสต่อชั่วโมง



ภาพที่ 4.29 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ที่มีอัตราการเติมอาหารที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

จากผลการทดลองเมื่อนำปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในการหมักแบบเฟดแบตช์ที่มีการอัตราการเติมอาหาร 5.0 7.5 และ 10.0 กรัมน้ำตาลซูโครสต่อชั่วโมง มาเปรียบเทียบกันทางสถิติ พบว่าปริมาณกรดแลกติกสูงสุดที่อัตราการเติมอาหารต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ ตามตารางที่ 4.13 ดังนั้นการเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในการหมักแบบเฟดแบตช์ที่มีอัตราการเติมอาหารที่ 10.0 กรัมน้ำตาลซูโครสต่อชั่วโมง ให้ผลผลิตกรดแลกติกสูงสุดที่ 42.26 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.13 เปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกในการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์ที่มีอัตราการเติมอาหารที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ

อัตราการเติมอาหาร (กรัมน้ำตาลซูโครสต่อชั่วโมง)	5.0	7.5	10.0
กรดแลกติกสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	21.89^{c}	31.99^{b}	42.26^{a}

หมายเหตุ ปริมาณกรดแลกติกที่กำกับตามแนวนอนด้วยอักษรที่ต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาทดลองผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนรวม พบว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 60 กรัม น้ำตาลซูโครส 70 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] 7.5 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 1.0 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟตเฮบตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.75 กรัม ซิงค์ซัลเฟตเฮบตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$) 0.04 กรัม แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) 80 กรัมและพีเอชเริ่มต้น 6.0 ทำการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์แบบเขย่าที่ความเร็วรอบ 240 รอบต่อนาทีและที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง พบว่าเชื้อราผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงสุด 89.93 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง อัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_P) เป็น 0.94 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็นผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) เท่ากับ 0.67 กรัมต่อกรัมน้ำตาล การเจริญของเชื้อคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 12.20 กรัมต่อลิตร ผลได้ของมวลเซลล์ ($Y_{X/S}$) เป็น 0.091 กรัมต่อกรัมน้ำตาลและอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เป็น 0.041 ต่อชั่วโมง

การศึกษาทดลองผลิตกรดแลกติกโดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกคือ แป้งมันสำปะหลัง 130 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] 3.0 กรัมต่อลิตร โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการเพาะเลี้ยงแบบเดียวกัน ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง พบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 61.89 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 108 ชั่วโมง อัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_P) เป็น 0.57 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็นผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) เท่ากับ 0.85 กรัมต่อกรัมน้ำตาล การเจริญของเชื้อคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 5.61 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้ของมวลเซลล์ ($Y_{X/S}$) เท่ากับ 0.077 กรัมต่อกรัมน้ำตาล อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เป็น 0.023 ต่อชั่วโมง ซึ่งปริมาณกรดแลกติกที่ได้น้อยกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารสูตรแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครส

การทดลองเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 แบบแบตช์ในถังหมักขนาด 5 ลิตรและใช้อาหารสูตรเหมาะสมที่ได้จากการทดลองในระดับฟลาสก์ ปริมาตร 2.5 ลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1.5 วีวีเอ็ม และอัตราการกวน 400 รอบต่อนาที ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง เชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 77.59 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง อัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_P) เป็น 0.81 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็นผลได้

ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) เท่ากับ 0.58 กรัมต่อกรัมน้ำตาล การเจริญของเชื้อคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งเป็น 11.89 กรัมต่อลิตร ผลได้ของมวลเซลล์ ($Y_{X/S}$) เท่ากับ 0.080 กรัมต่อกรัมน้ำตาลและอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เป็น 0.019 ต่อชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์ซึ่งจะได้ปริมาณกรดแลกติกสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในถังหมักและการเจริญของเซลล์ในระดับฟลาสก์ยังสูงกว่าด้วย

การศึกษาทดลองเลี้ยงเชื้อแบบเฟดแบตช์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นปริมาตร 1.5 ลิตร ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 60 กรัมต่อลิตร น้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร ใช้สูตรอาหารและสภาวะการเพาะเลี้ยงเหมือนแบบแบตช์ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง โดยศึกษาอัตราการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 5.0 7.5 และ 10.0 กรัมน้ำตาลซูโครสต่อชั่วโมง หลังจากการเพาะเลี้ยงที่ 24 ชั่วโมง จึงเริ่มเติมอาหาร พบว่าการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ 10.0 กรัมน้ำตาลซูโครสต่อชั่วโมง เชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 42.26 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง อัตราการผลิตกรดแลกติก (Q_P) เป็น 0.44 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็นผลได้ของกรดแลกติก ($Y_{P/S}$) เท่ากับ 0.59 กรัมต่อกรัมน้ำตาล การเจริญของเชื้อคิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง 7.24 กรัมต่อลิตร ผลได้ของมวลเซลล์ ($Y_{X/S}$) เท่ากับ 0.100 กรัมต่อกรัมน้ำตาลและอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เป็น 0.056 ต่อชั่วโมง ซึ่งประมาณกรดแลกติกที่ได้น้อยกว่าการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาทดลองเลี้ยงเชื้อ *R. oryzae* NRRL395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณกรดแลกติกที่ได้ค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ทำการย่อยด้วยกรดหรือเอนไซม์ เชื้อสายพันธุ์นี้มีศักยภาพมากสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเพื่อย่อยแป้งเป็นน้ำตาลก่อนแล้วจึงเปลี่ยนเป็นกรดแลกติก ถ้ามีการนำไปใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรมจะลดขั้นตอนและค่าใช้จ่ายในกระบวนการย่อยแป้ง นอกจากนี้ควรมีการปรับปรุงเชื้อให้สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงขึ้นและลดระยะเวลาในการหมักให้สั้นลง เชื้อราสายพันธุ์นี้มีการเจริญเป็นเส้นใยแผ่กระจายในอาหารเหลว ในการทดลองนี้ใช้ถังหมักแบบใบพัดกวนจึงพบปัญหาเส้นใยเชื้อรากระจายปกคลุมโพรบและเกาะที่ผนังถังหมัก อาจทำให้เซลล์รับออกซิเจนและอาหารได้ไม่เพียงพอต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติก จึงควรใช้ถังหมักแบบอื่น เช่น ถังหมักแบบอากาศยกตัว (Air-lift fermentor) หรือใช้การตรึงเซลล์ของเชื้อราเพื่อลดการกระจายของเส้นใย ทำให้ประสิทธิภาพของการหมักเพิ่มขึ้น

บรรณานุกรม

กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2546. **เทคโนโลยีของแป้ง.** พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กัลยา วานิชย์บัญชา. 2544. **การใช้ SPSS for Windows ในการวิเคราะห์ข้อมูล เวอร์ชั่น 7-10.** กรุงเทพฯ : ภาควิชาสถิติ คณะพาณิชยศาสตร์และการบัญชี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ดวงเดือน ภู่เจริญ. 2544. **"ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 จากแป้งมันสำปะหลัง."** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

นวลพรรณ ณ ระนอง. 2540. **ปฏิบัติการเอนไซม์วิทยา.** กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2535. **เอนไซม์ทางอาหาร ตอนที่ 1.** กรุงเทพฯ : ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อรไท สุขเจริญ. 2537. **วิศวกรรมชีวเคมี.** กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Arora, D.K. 1992. **Hand Book of Applied Mycology.** vol 4. India. University of Delhi. 368-370.

Barker, S.B. and Summerson, W.H. 1941. "Preparation and Colorimetric Determination of Lactic Acid." **Journal Biological Chemistry.** 241-246.

Berghofer, E. and Sarhaddar, S. 1988. "Production of Glucose and High Fructose Syrup by Enzymatic Direct Hydrolysis of Cassava Roots." **Process Biochemistry.** 188-194.

Bernfeld, P. 1955. "Amylase" **In Method in Enzymology.** vol. 1. New York : Academic.

Berry, D.R. and Paterson. A. 1990. "Enzymes in the Food Industry." **Enzyme Chemistry, Impact and Applications.** Great Britain : Chapman and Hall. 306-318.

Castro, A., Montano, A., Sanchez, A.H. and Rejano, L. 1998. "Lactic Acid Fermentation and Storage of Blanched Garlic." **International Journal of Food Microbiology.** 39 : 205-211.

CCA Biochem bv. 1985. "Lactic Acid, A Versatile Ingredient." **Food, Flavourings, Ingredients, Processing and Packaging.** 7(11) : 44-45, 62.

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*." **Journal of Industrial Microbiology**. 7 : 27-34.

Chiarini, L., Mara, L. and Tabacchiono, S. 1992. "Influence of Growth Supplements on Lactic Acid Production in Whey Ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 36 : 461-464.

Crueger, W. and Crueger, A. 1990. "Lactic Acid." **Biotechnology : A Textbook of Industial Microbiology**. 2nd ed. Sunderland : Sinauer Associates. 147-148.

Deacon, J.W. 1997. "Metabolism." **Modern Mycology**. 3rd ed. Institute of Cell and Molecular Biology. University of Edinburgl : Billing and Sons. 104-110.

Dong, XY., Bai, S. and Sun, Y. 1996. "Production of L(+)-Lactic Acid with *Rhizopus oryzae* Immobilized in Polyurethane Foam Cubes." **Biotechnology Letters**. 18(2) : 225-228.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamiton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. 1956. "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances." **Analytical Chemistry**. 28 : 350-356.

Elegado, F.B. and Fujio, Y. 1993. "Selection of Raw-Starch Digestive Glucoamylase-Producing *Rhizopus* Strain." **Journal General Applied Microbiology**. 39 : 541-546.

Fujio, Y. and Morita, H. 1996. "Improved Glucoamylase Production by *Rhizopus* sp. A-11 Using Metal-Ion Supplemented Liquid Medium." **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 82(6) : 554-557.

Gerhartz, W. 1990. "Amylase." **Enzymes in Industry. Production and Applications.** New York : VCH. 78-81.

Hang, Y.D. 1989. "Direct Fermentation of Corn to L(+)-Lactic Acid by *Rhizopus oryzae*." **Biotechnology Letters**. 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 Gels." **Biotechnology Letters**. 11(2) : 119-120.

Inskeep, G.C. 1952. "Lactic Acid from Corn Sugar." **Industrial and Engineering Chemistry**. 44(9) : 1955-1966.

Kosakai, Y., Park, Y.S. and Okabe, M. 1997. "Enhancement of L (+) Lactic acid Production Using Mycelial Flocs of *Rhizopus oryzae*." **Biotechnology and Bioengineering**. 55(3) : 461-470.

Kurosawa, H., Ishikawa. H. and Tanaka. H. 1988. "L-Lactic Acid Production from Starch by Coimmobilized Mixed Culture System of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus lactis*." **Biotechnology and Bioengineering**. 31 : 183-187.

Lehninger, A.L. Nelson, D.L. and Cox, M.M. 1993. "Carbohydrates." **Principles of Biochemistry**. 2nd ed. New York : Worth. 305-309.

Lipinsky, E.S. and Sinclair, R.G. 1985. "Is Lactic Acid a commodity Chemical ?" **Chemical Engineering Process**. 85 : 26-32.

Ofuya, C.O. and Obilor, S.N. 1994. "The Effects of Solid-State Fermentation on the Toxic Components of Cassava Peel." **Process Biochemistry**. 29 : 25-28.

Parajo, J.C., Alonso, J.L. and Santos, V. 1996. "Lactic Acid from Wood." **Process Biochemistry**. 31(3) : 271-280

Pazur, J.H. Liu,B. and Miskiel, F.J. 1990. "Comparison of the Properties of Glucoamylases from *Rhizopus niveus* and *Aspergillus niger.*" **Biotechnology and Applied Biochemistry**. 12 : 63-78.

Pinelli, D., Gonzalez-Vara, A., Matteuzzi, D. and Magelli, F. 1997. " Assessment of Kinetic Models for the Production of L and D Lactic Acid Isomers by *Lactobacillus casie* DMS 20011 and *Lactobacillus coryniformis* DMS 20004 in Continuous Fermentation." **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 83(2) : 209-212.

Pryce, J.D. 1969. "A Modification of the Barker–Summerson Method for the Determination of Lactic Acid.". **Analyst**. 49 : 1151-1152.

Richard, J. and Lewis, S. 1992. **Condensed Chemical Dictionary**. USA : Van Nostrand Reinhold. 679.

Rosenberg, M., Kristofikova, L., Proksa, B. and Magdolen, P. 1992. "The Formation of Polyols and Fatty Acids during L-Lactic Acid Fermentation by *Rhizopus arrhizus*." **Biotechnology Letters**. 14(1) : 45-48.

Roble, N.D., Ogbonna, J.C. and Tanaka, H. 2003. "Lactic Acid Production from Raw Cassava Starch in a Circulating Loop Bioreactor with Cells Immobilized in Loofa (Luffa Cylindrica)." **Biotechnology Letters**. 25(13) : 1093-1098.

Salminen, S. and Wright, A.V. 1993. **Lactic Acid Bacteria.** New York : Marcel Dekker. 20-23.

Schenck, F.W. and Hebeda, R.E. 1992. **Strach Hydrolysis Products.** New York : VCH. 23-94.

Siebold, M., Frieling, P.V., Joppien, R., Rindfleisch, D., Schugerl, K. and Roper, H. 1995. "Comparison of the Production of Lactic Acid by Three Different Lactobacilli and Its Recovery by Extraction and Electrodialysis." **Process Biochemistry.** 30(1) : 81-95.

Simonsom, L.G. and Liberta, A.E. 1975. "New Sources of Fungal Dextranase." **Mycologia.** 67 : 845-851.

Skory, C.D., Freer, S.N. and Bothast, R.J.1998. "Production of L-Lactic Acid by *Rhizopus oryzae* under Oxygen Limiting Conditions." **Biotechnology Letters.** 20(2) : 191-194.

Skory, C.D. 2003. "Lactic Acid Production by *Saccharomyces cerevisiae* Expressing a *Rhizopus oryzae* Lactate Dehydrogenase Gene." **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.** 30(1) : 22-27.

Soccol, C.R., Stonoga, V.I. and Raimbault, M. 1994a. "Production of L-Lactic Acid by *Rhizopus* species." **World Journal of Microbiology and Biotechnology.** 10 : 433-435.

Soccol, C.R., Stonoga, V.I., Raimbault, M. and Lebeault, J.M. 1994b. "Potential of Solid State Fermentation for Production of L(+)-Lactic Acid by *Rhizopus oryzae.*" **Applied Microbiolgy and Biotechnology.** 41 : 286-290.

Soccol, C.R., Stonoga, V.I., Raimbault, M. and Lebeault, J.M. 1994c. "Breeding and Growth of *Rhizopus* in Raw Cassava by Solid State Fermentation." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 41 : 330-336.

Stanbury, P.F. and Whitaker, A. 1984. **Principles of Fermentation Technology.** England : Pergamon. 1–24.

Suntornsuk, W. and Hang, Y.D. 1994. "Strain Improvement of *Rhizopus oryzae* for Production of L(+)-Lactic Acid and Glucoamylase." **Letters in Applied Microbiology.** 19 : 249-252.

Tay, A. and Yang, S.T. 2002. "Production of L(+)-Lactic Acid from Glucose and Starch by Immobilized cells of *Rhizopus oryzae* in a Rotating Fibrous Bed Bioreactor." **Biotechnology and Bioengineering.** 80 : 1-12.

Van Beynum, G.M.A. and Roels, J.A. 1985. **Strach Conversion Technology.** New York : Marcel Dekker. 15-46, 114-124.

Waksman, S.A. and Hutchings, I.J. 1937. "Lactic Acid Production by Species of *Rhizopus*." **Journal Series Paper of the Department of Soil Microbiology.** 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." **Journal American Chemistry Societry.** 58 : 1286-1288.

Woiciechowski, A.L., Soccol, C.R., Ramos, L.P. and Pandey, A. 1999. "Experimental Design to Enhance the Production of L-(+)-Lactic Acid from Steam-Exploded Wood Hydrolysate Using *Rhizopus oryzae* in a Mixed-Acid Fermentation." **Process Biochemistry.** 34 : 949-955.

Xavier, S. and Lonsane, B.K. 1994. "Sugar-Cane Pressmud as a Novel and Inexpensive Substrate for Production of Lactic Acid in a Solid-State Fermentation System." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 41: 291-295.

Xiaodong, W., Xuan, G and Rakshit, S.K. 1997. "Direct Fermentation Production of Lactic Acid on Cassava and Other Strach Substrates." **Biotechnology Letters.** 19(9) : 841-843.

Yang, C.W., Lu, Z. and Fsao, T.T. 1995. "Lactic Acid Production by Pellet-Form *Rhizopus oryzae* in a Submerged System." **Applied Biochemistry and Biotechnology.** 51/52 : 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." **Journal of Fermentation and Bioengineering.** 84(3) : 249-253.

Yin, P., Yahiro, K., Ishigaki, T., Park, Y. and Okabe, M. 1998. "L(+)-Lactic Acid Production by Repeated Batch Culture of *Rhizopus oryzae* in Air-Lift Bioreactor." **Journal of Fermentation and Bioengineering.** 85(1) : 96-100.

Yu, R.C. and Hang, Y.D. 1989. "Kinetics of Direct Fermentation of Agricultural Commodities to L(+)-Lactic Acid by *Rhizopus oryzae*." **Biotechnology Letters**. 11(8) : 597-600.

Yumoto, I. and Ikeda, K. 1995. "Direct Fermentation of Starch to L(+)-Lactic Acid Using *Lactobacillus amylophilus*." **Biotechnology Letters**. 17(5) : 543-546.

Zhan, X., Wang, D., Sun X.S., Kim, S. and Fung D.Y.C. 2003. "Lactic Acid Production Using Extrustion-Cooked Grain Sorghum." **Transactions of the ASAE**. 46(2) : 589-593.

Zhang, D.X. and Cheryan, M. 1991. "Direct Fermentation of Starch to Lactic Acid by *Lactobacillus amylovorus*." **Biotechnology Letters**. 13(10) : 733-738.

Zhou, Y., Dominguez, J.M., Cao, N., Du, J. and Tsao, G,T. 1999. "Optimization of L-Lactic Acid Production from Glucose by *Rhizopus oryzae* ATTC 52311" **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 77-79 : 401-407.

ภาคผนวก ก

1. อาหารเลี้ยงเชื้อโพเตโตเด็กโตรสอการ์ (POTATO DEXTROSE AGAR : PDA)

เป็นสูตรอาหารที่ใช้เก็บรักษาเชื้อราเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์และสร้างสปอร์ ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย มันฝรั่ง 200 กรัมต้มในน้ำเดือดและกรองเอาเฉพาะส่วนน้ำใส เติมกลูโคส 20 กรัม และวุ้นผง 15 กรัมลงในส่วนน้ำใสและต้มจนสารละลายหมด จึงบรรจุใส่ฟลาสก์ ปิดฟลาสก์ด้วยจุกสำลีแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จึงนำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

2. การเตรียมหัวเชื้อ

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

แป้งมันสำปะหลัง	60.00	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$]	7.00	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1.00	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮบตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.75	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮบตะไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	0.04	กรัม
แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)	10.00	กรัม

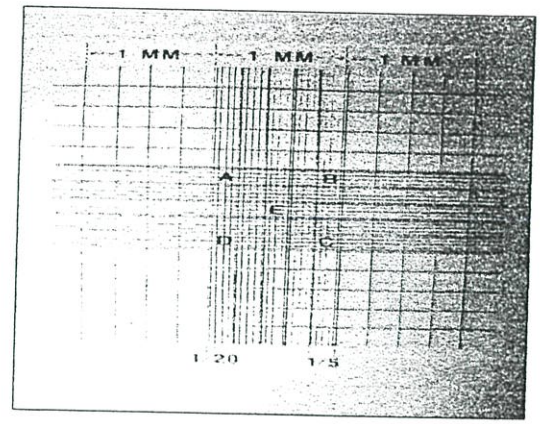
ปรับพีเอชเท่ากับ 6.0 ด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1.0 นอร์มอล

นำแป้งมันสำปะหลังมาต้มให้สุกเป็นเจลก่อนจึงผสมสารต่างๆเข้าด้วยกัน ปรับปริมาตรตามต้องการและปรับพีเอชเป็น 6.0 ถ่ายอาหารใส่ฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตรต่อฟลาสก์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วใส่สปอร์แขวนลอย โดยให้มีปริมาณสปอร์เริ่มต้น 4×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรอาหาร และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมง ปริมาณ 1 กรัมต่อฟลาสก์ และนำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) บนเครื่องเขย่าความเร็ว 240 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3. วิธีนับสปอร์

วัสดุอุปกรณ์

- แผ่นสไลด์นับเซลล์ (haemacytometer) ของ Boeco (Improved Neubauer)
- กล้องจุลทรรศน์
- ที่นับจำนวน
- ไมโครปิเปต



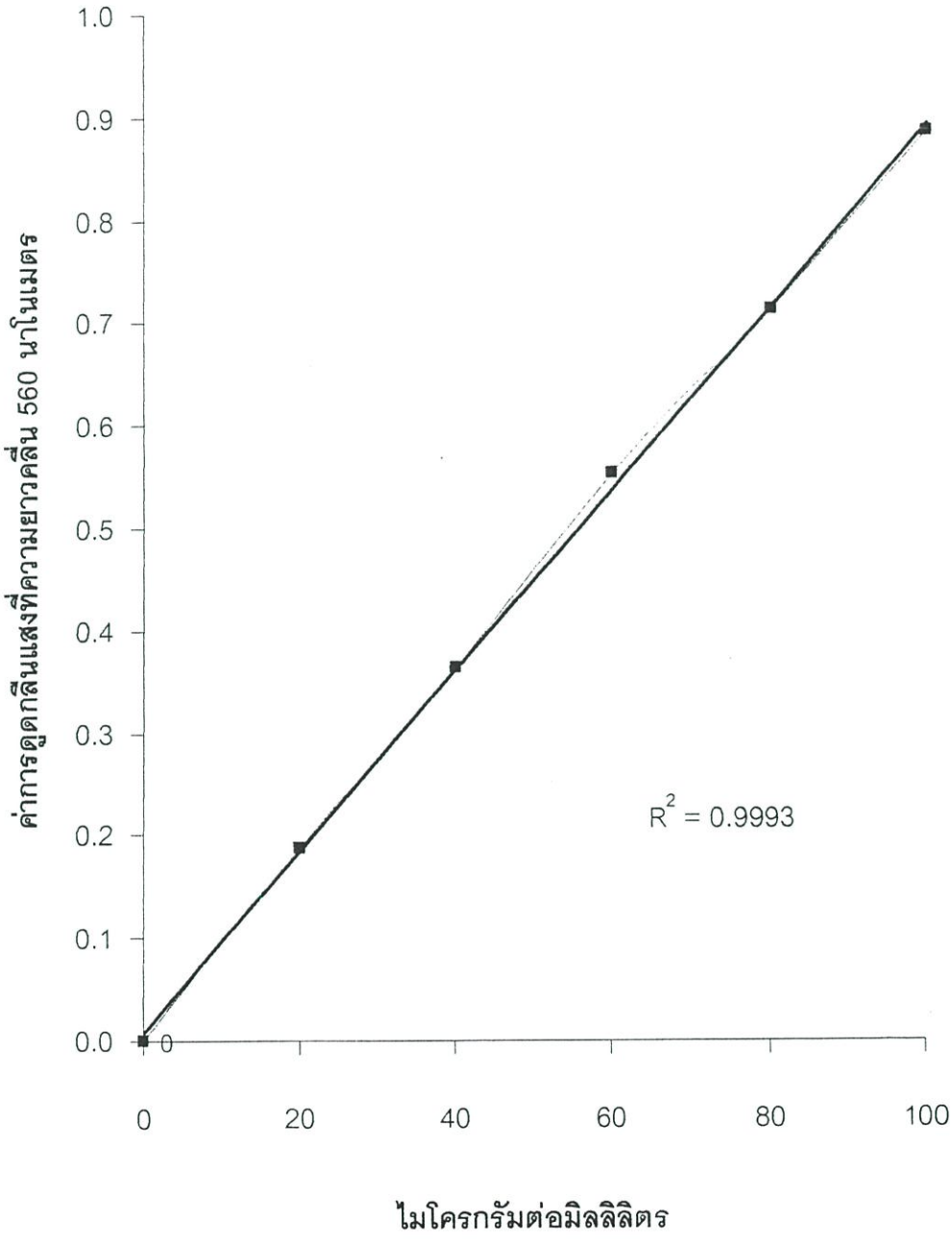
วิธีการนับจำนวนสปอร์

1. วางกระจก (Cover slip) ปิดทับลงบน Chamber ของแผ่นสไลด์นับเซลล์ ให้อยู่ตรงกลางพอดี
2. บรรจุสารละลายสปอร์ที่เจือจางแล้วเข้า Chamber โดยให้ไมโครปิเปต ทำมุมประมาณ 35 องศา ปลายทางปิเปตจ่อระหว่าง Chamber และกระจก ค่อยๆปล่อยให้สารละลายสปอร์ในปิเปตไหลเข้าไปใน Chamber ด้วยความเร็วสม่ำเสมอ
3. ตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที เพื่อให้สปอร์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ และนอนก้นเรียบร้อย
4. ใช้กล้องจุลทรรศน์ Objective lens กำลังขยายต่ำ (x10) และ Occular (x10) หาตารางที่จะนับ จากนั้นจึงเปลี่ยนมาใช้ Objective lens กำลังขยายสูง (x40) และทำการนับจำนวนสปอร์
5. นับสปอร์ใน 5 ช่องจาก 25 ช่องเล็กของสี่เหลี่ยมจตุรัสใหญ่ที่อยู่ตรงกลาง หรือ 30 ช่องใน 400 ช่องเล็ก ช่อง 5 ช่องที่ใช้นับจะเลือกใช้ช่วงที่เขียนอักษร A, B, C, D และ E ไว้ดังรูป หรืออาจนับช่องที่อยู่ในแนวเส้นทะแยงมุมด้านใดด้านหนึ่ง เพื่อไม่ให้การนับสปอร์สับสนและหลีกเลี่ยงการนับซ้ำ
6. เมื่อนับครบ 5 ช่องแล้ว นำจำนวนสปอร์ทั้ง 5 ช่องมารวมกัน แล้วคำนวนหาจำนวนสปอร์ต่อมิลลิลิตร ดังนี้

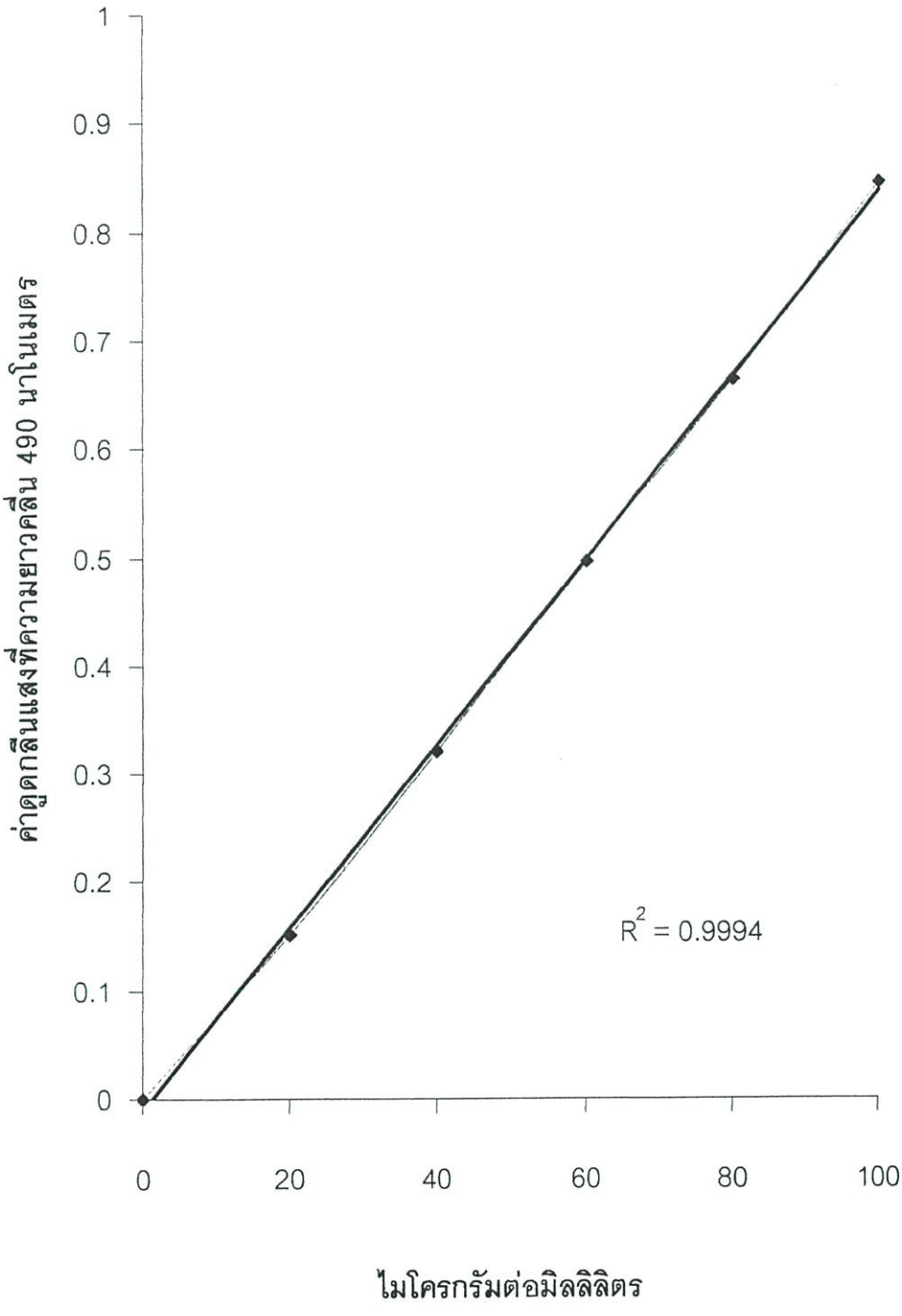
จำนวนสปอร์ใน 5 ช่อง (A, B, C, D, E)	= X	สปอร์
จำนวน 5 ช่องที่ใช้นับมีปริมาตร	= 1/5 x 1/5 x 1/10 x 5	มม^3
	= 1/50	มม^3
จำนวนสปอร์ในปริมาตร 1/50 มม^3	= X	สปอร์
ดังนั้นในปริมาตร 1 มิลลิลิตร (10^3 มม^3)	= 5X x 10^4	สปอร์
จำนวนสปอร์ทั้งหมดตั้งต้น	= 5X x 10^4 x อัตราการเจือจาง	สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

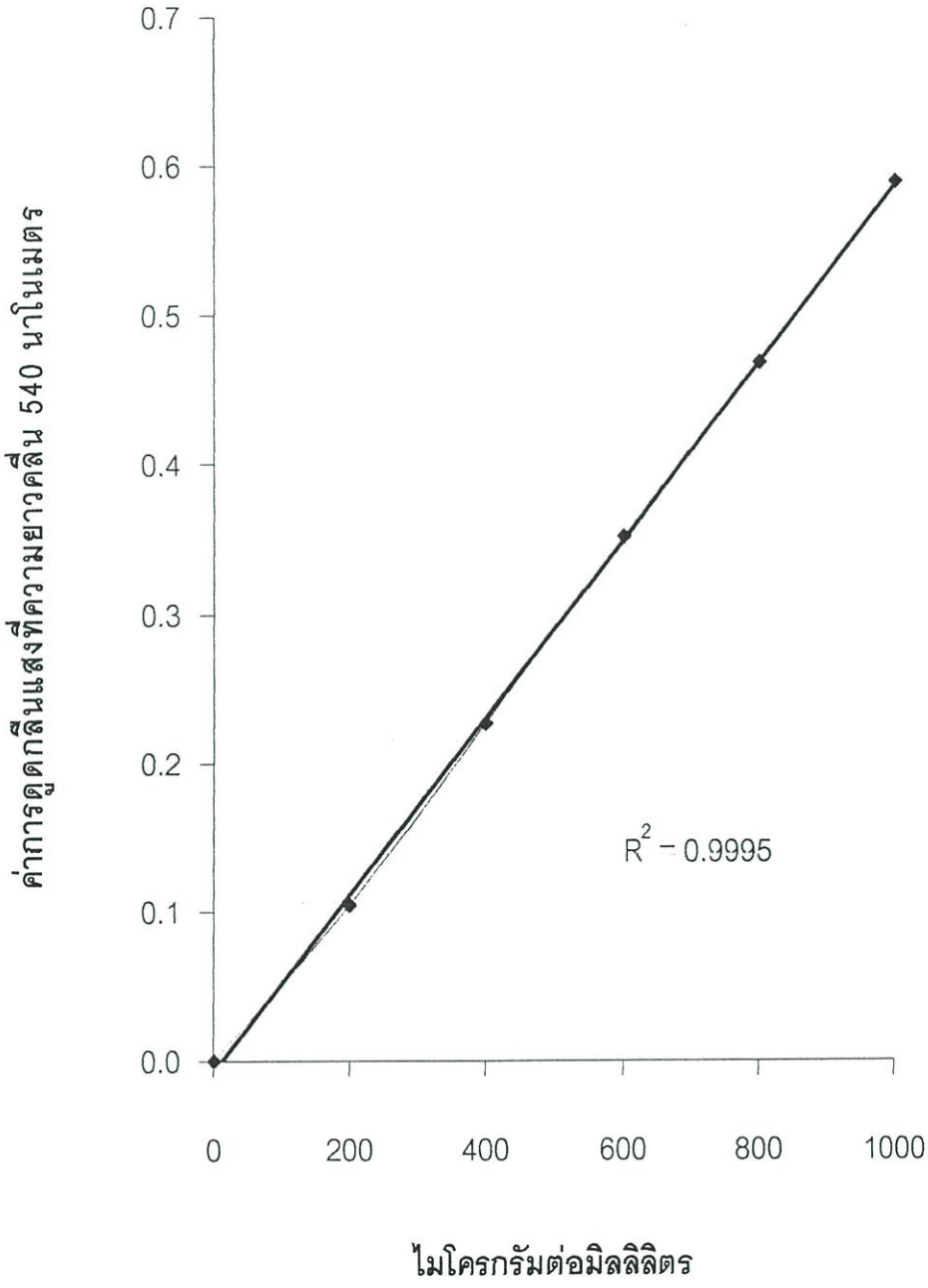
กราฟมาตรฐาน



ภาพที่ ข-1 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับปริมาณกรดแลกติก



ภาพที่ ข-2 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลทั้งหมด



ภาพที่ ข-3 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ภาคผนวก ค

ตารางที่ ค.1 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีอัตราส่วนของแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครส 60 : 40 กรัมต่อกรัม

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	5.9	113.58	0.00	0.00
12	4.3	90.40	0.00	0.06
24	2.8	81.97	0.09	1.65
36	5.7	68.33	0.21	2.35
48	5.0	59.43	3.70	4.12
60	5.0	47.01	23.74	6.32
72	5.3	22.95	38.13	9.54
84	5.5	16.43	56.94	11.30
96	5.8	5.53	46.62	11.72
108	6.0	3.51	35.05	11.28
120	6.3	3.41	31.19	11.27

ตารางที่ ค.2 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีอัตราส่วนของแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครส 50 : 50 กรัมต่อกรัม

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	5.9	114.99	0.00	0.00
12	3.2	89.43	0.00	0.23
24	2.7	71.63	0.05	2.30
36	5.7	65.60	0.15	3.95
48	4.8	47.95	2.68	4.50
60	5.0	31.97	18.87	4.65
72	5.0	17.97	37.07	5.85
84	5.3	10.01	45.80	8.21
96	5.5	2.64	42.78	9.84
108	5.5	1.89	38.80	10.21
120	6.4	1.67	36.79	10.43

ตารางที่ ค.3 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีอัตราส่วนของแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครส 40 : 60 กรัมต่อกรัม

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	5.9	115.75	0.00	0.00
12	3.4	87.06	0.00	0.93
24	2.6	82.96	0.05	2.50
36	4.8	64.23	3.59	5.00
48	4.7	47.95	15.59	5.90
60	4.9	29.98	20.44	6.20
72	5.0	13.64	29.54	6.44
84	5.3	4.58	35.81	7.21
96	5.4	1.17	30.49	7.60
108	5.5	0.85	29.73	8.72
120	6.1	0.82	29.42	9.09

ตารางที่ ค.4 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีอัตราส่วนของแป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลซูโครส 30 : 70 กรัมต่อกรัม

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	5.9	115.75	0.00	0.00
12	3.5	97.95	0.00	0.05
24	2.6	67.00	0.05	1.98
36	4.8	54.86	3.57	3.99
48	4.7	44.26	15.09	5.68
60	4.9	19.96	26.40	5.86
72	5.0	11.84	29.40	6.19
84	5.3	3.64	32.56	7.39
96	5.4	0.92	30.43	7.58
108	5.5	0.83	30.12	8.36
120	6.1	0.75	29.90	8.60

ตารางที่ ค.5 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 40 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	5.9	110.95	0.00	0.00
12	3.8	95.36	0.06	0.07
24	3.0	87.24	0.12	1.66
36	4.8	79.14	1.58	2.30
48	4.9	68.91	4.85	4.98
60	5.0	60.16	25.73	7.12
72	5.1	41.20	45.23	10.68
84	5.3	11.44	59.36	11.38
96	5.7	5.66	58.73	11.53
108	5.9	1.62	48.12	11.48
120	6.3	1.37	36.42	11.38

ตารางที่ ค.6 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 50 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	119.37	0.00	0.00
12	5.7	113.06	0.08	0.08
24	2.7	110.43	0.14	1.78
36	5.3	91.83	1.85	2.51
48	4.8	80.53	18.12	4.77
60	4.8	69.03	40.62	7.05
72	5.1	50.32	49.33	9.11
84	5.3	18.32	55.11	9.99
96	5.8	4.69	65.38	11.35
108	6.0	2.60	55.26	10.99
120	6.0	1.58	50.89	10.38

ตารางที่ ค.7 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 60 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	127.24	0.00	0.00
12	2.8	117.56	0.08	0.09
24	2.6	111.23	0.15	1.86
36	4.9	87.09	2.12	2.82
48	4.8	78.92	28.17	4.86
60	5.0	63.02	41.35	7.56
72	5.0	53.12	53.05	10.36
84	5.3	16.0	59.90	10.77
96	5.9	3.49	70.80	11.63
108	6.3	2.85	64.41	11.12
120	6.3	1.63	55.05	11.13

ตารางที่ ค.8 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 70 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	5.9	139.56	0.00	0.00
12	5.8	125.24	0.14	0.12
24	2.7	113.20	0.16	1.95
36	5.4	106.51	3.76	3.05
48	4.9	99.32	39.26	4.91
60	4.9	87.56	49.85	8.13
72	5.0	69.14	65.63	10.44
84	5.2	45.11	80.68	11.25
96	6.0	14.78	87.74	11.91
108	6.0	3.25	82.91	11.21
120	6.0	1.82	77.86	10.94

ตารางที่ ค.9 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 5.0 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	5.9	138.15	0.00	0.00
12	3.2	126.48	0.08	0.15
24	2.8	112.47	0.13	1.85
36	5.0	96.43	3.36	2.85
48	4.9	80.53	23.26	4.00
60	5.5	60.83	34.43	4.50
72	5.7	38.48	46.18	6.95
84	5.8	16.43	55.04	8.10
96	5.9	9.28	60.34	8.87
108	5.9	3.20	53.20	8.95
120	6.0	1.80	45.05	9.31

ตารางที่ ค.10 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 7.5 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	140.05	0.00	0.00
12	3.7	124.44	0.15	0.18
24	2.7	108.24	0.25	2.30
36	5.0	89.13	5.03	3.45
48	4.8	70.17	41.34	4.96
60	5.0	45.08	60.11	8.10
72	5.2	25.85	72.43	10.85
84	5.3	15.52	83.14	11.98
96	5.5	6.16	89.93	12.20
108	5.7	2.97	87.28	11.28
120	6.1	1.29	84.75	11.37

ตารางที่ ค.11 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 10.0 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	138.29	0.00	0.00
12	3.7	122.98	0.15	0.20
24	2.8	106.06	0.28	2.25
36	5.2	91.18	6.41	3.52
48	4.9	68.86	33.57	4.32
60	5.0	53.83	46.98	8.00
72	5.2	30.34	59.53	10.32
84	5.6	16.48	66.79	10.98
96	5.9	8.40	73.98	11.21
108	6.0	2.15	68.98	11.37
120	6.0	1.20	58.27	11.97

ตารางที่ ค.12 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 70 กรัมต่อลิตรที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	5.9	40.55	0.00	0.08
12	5.3	32.00	0.01	0.38
24	2.9	25.07	0.01	1.34
36	5.1	24.82	0.21	2.31
48	4.8	6.80	32.70	2.91
60	4.8	4.81	32.99	5.03
72	5.0	3.06	35.54	5.37
84	5.1	3.01	35.31	5.41
96	5.5	2.96	34.86	5.45
108	6.5	1.16	34.75	5.46
120	6.5	0.96	33.05	5.47

ตารางที่ ค.13 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตรที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	5.9	58.00	0.00	0.08
12	5.6	41.75	0.01	0.57
24	2.9	40.97	0.01	1.56
36	5.0	39.16	0.20	2.30
48	4.7	29.47	36.78	3.36
60	4.7	7.11	37.01	3.37
72	4.9	2.31	37.24	4.58
84	5.0	2.00	38.59	4.60
96	5.0	1.76	40.18	4.60
108	5.1	1.51	41.65	4.62
120	5.3	0.99	36.33	4.59

ตารางที่ ค.14 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 130 กรัมต่อลิตรที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	5.9	75.31	0.00	0.09
12	5.6	56.35	0.03	0.71
24	2.4	46.27	0.03	3.06
36	5.2	42.60	0.14	3.65
48	4.4	36.24	23.37	5.48
60	4.4	26.11	33.84	6.08
72	4.6	4.86	46.63	6.37
84	4.8	3.79	47.76	6.83
96	5.0	2.78	53.70	6.83
108	5.2	2.70	65.81	6.84
120	5.5	2.59	64.17	6.80

ตารางที่ ค.15 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลัง 160 กรัมต่อลิตรที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	5.9	92.69	0.00	0.09
12	5.2	73.67	0.03	2.62
24	2.4	65.66	0.03	2.84
36	5.4	55.11	0.12	4.24
48	4.7	53.51	22.75	4.31
60	4.8	49.99	27.62	4.48
72	5.0	7.04	50.70	4.56
84	5.2	6.00	52.46	4.58
96	5.5	4.00	57.60	4.58
108	5.7	3.07	64.17	4.65
120	5.7	2.86	61.79	4.55

ตารางที่ ค.16 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสและเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 3.0 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	75.05	0.00	0.10
12	5.6	67.90	0.00	1.98
24	2.8	64.59	0.03	3.00
36	4.7	63.03	0.48	3.95
48	4.5	62.71	39.65	4.60
60	4.7	4.86	40.03	4.72
72	4.9	3.20	45.98	4.85
84	4.9	3.03	48.08	4.92
96	4.9	2.79	51.90	5.08
108	4.9	2.66	61.89	5.61
120	4.9	2.55	59.95	4.98

ตารางที่ ค.17 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสและเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 5.0 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	74.77	0.00	0.09
12	5.6	67.90	0.00	2.05
24	3.0	64.17	0.04	3.62
36	4.9	62.02	0.56	4.70
48	4.5	55.23	23.15	4.84
60	5.1	2.70	35.46	4.89
72	5.2	2.61	35.96	5.08
84	5.3	2.39	37.04	5.44
96	5.3	2.38	38.90	6.31
108	5.3	2.14	43.98	6.88
120	5.3	2.00	40.88	7.92

ตารางที่ ค.18 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 ในอาหารแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสและเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 7.0 กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	75.91	0.00	0.10
12	5.0	68.07	0.00	2.13
24	3.1	66.60	0.05	3.85
36	5.3	54.90	0.83	4.80
48	5.0	44.19	34.33	4.92
60	5.2	2.83	38.00	5.11
72	5.3	2.79	41.61	5.33
84	5.6	2.31	43.93	6.36
96	5.6	2.27	44.21	6.90
108	5.7	2.11	44.43	7.72
120	5.9	2.00	43.36	8.29

ตารางที่ ค.19 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 แบบแบตช์ ในถังหมัก

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	139.90	0	1.18
6	5.4	129.98	0.24	1.76
12	4.1	118.89	0.35	2.56
18	3.0	103.36	0.50	3.12
24	2.6	90.45	1.20	3.62
30	4.5	72.07	6.24	5.34
36	4.6	56.67	26.32	6.56
48	4.7	33.63	38.39	7.89
60	5.4	15.14	51.49	9.36
72	5.5	11.03	59.54	10.49
84	5.6	6.07	67.00	11.65
96	5.7	5.19	77.59	11.89
108	5.7	4.03	76.21	11.75
120	5.7	3.68	75.29	11.70

ตารางที่ ค.20 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 แบบเฟดแบตช์ ที่มีอัตราการเติมอาหาร 5.0 กรัมน้ำตาลซูโครสต่อชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	6.1	74.99	0.0	1.02
6	4.5	69.17	0.4	1.21
12	3.7	65.35	1.31	1.35
18	2.8	58.81	2.13	1.49
24	5.3	53.08	2.26	1.63
30	4.9	79.76	3.15	1.84
36	4.9	75.26	3.54	1.96
42	4.9	69.99	4.41	3.06
48	5.0	63.40	16.46	4.41
60	5.0	54.08	17.77	4.92
72	5.1	41.17	18.45	5.10
84	5.1	30.18	20.13	5.40
96	5.1	23.23	21.78	5.63
108	5.1	17.99	21.89	5.59
120	5.1	14.18	21.56	5.48

ตารางที่ ค.21 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 แบบเฟดแบตช์ ที่มีอัตราการเติมอาหาร 7.5 กรัมน้ำตาลซูโครสต่อชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	6.1	75.62	0	0.99
6	4.6	68.44	0.36	1.17
12	3.7	59.26	1.45	1.30
18	2.8	49.85	2.15	1.45
24	4.9	46.81	2.44	1.60
30	4.3	75.71	5.46	1.79
36	4.4	80.16	12.18	2.05
42	4.5	70.44	17.67	3.25
48	4.6	54.90	23.46	4.46
60	4.6	38.08	27.40	4.97
72	4.7	22.31	29.25	5.31
84	4.7	13.18	30.68	5.81
96	4.8	7.34	31.99	6.20
108	4.8	5.07	30.56	6.14
120	4.8	4.74	29.55	5.99

ตารางที่ ค.22 แสดงปริมาณกรดแลกติก น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช ที่ผลิตโดยเชื้อ *R. oryzae* NRRL 395 แบบเฟดแบตช์ ที่มีอัตราการเติมอาหาร 10.0 กรัมน้ำตาลซูโครสต่อชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช	น้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	6.0	75.82	0	1.05
6	4.5	67.94	0.38	1.25
12	3.1	61.35	1.41	1.42
18	2.8	52.64	2.20	1.57
24	4.7	48.20	2.89	1.71
30	4.5	76.99	6.14	1.92
36	4.6	85.26	15.55	2.54
42	4.6	65.44	22.41	4.01
48	4.6	46.35	28.95	4.97
60	4.6	26.29	36.23	5.59
72	4.6	16.36	40.77	6.13
84	4.7	7.95	41.84	6.82
96	4.8	3.91	42.26	7.24
108	4.9	1.32	41.78	7.13
120	5.0	1.06	41.60	6.95

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางจิตต์เรขา ทองมณี
วัน เดือน ปีเกิด	3 พฤษภาคม 2507
ประวัติการศึกษา	2530 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเคมี มหาวิทยาลัยรามคำแหง
สถานที่ทำงาน	กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี