



การผลิตกรดแลคติกจากเชื้อรา *Rhizopus* sp. โดยใช้วิธีการหมักแบบแข็ง
บนเปลือกมันสำปะหลัง

**Lactic Acid Production from *Rhizopus* sp. by Solid State Fermentation
on Cassava Peel**

สุณิษา พลรักษ์
Sunisa Polrak

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Microbiology
Prince of Songkla University**

2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตกรดแลคติกจากเชื้อรา *Rhizopus* sp. โดยใช้วิธีการหมักแบบ
 แข็งบนเปลือกมันสำปะหลัง
 ผู้เขียน นางสาวสุณิษา พลรัมย์
 สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
 (ดร.วิไลลักษณ์ สุวะโซโน)

.....ประธานกรรมการ
 (ดร.สมพร มุลมั่งมี)

.....กรรมการ
 (รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันทโชติ)

.....กรรมการ
 (ดร.วิไลลักษณ์ สุวะโซโน)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
 หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

.....
 (รองศาสตราจารย์ ดร. วีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(3)

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณ
บุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ดร.วิไลลักษณ์ สุวะโซโน)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ.....

(นางสาวสุณิษา พลรักษ์)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวสุณิษา พลรัมย์)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. โดยใช้วิธีการหมักแบบแข็งบนเปลือกมันสำปะหลัง
ผู้เขียน	นางสาวสุณิษา พลรักษ์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2556

บทคัดย่อ

คัดเลือกเชื้อราย่อยแบ่งจากตัวอย่างมันสำปะหลังตากแห้งและดินจำนวน 36 ตัวอย่าง โดยใช้อาหาร cassava starch agar ได้เชื้อราทั้งหมด 112 ไอโซเลท จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และเปรียบเทียบกับ *Rhizopus oryzae* TISTR 3535 พบว่า เชื้อราทั้งหมดมีลักษณะใกล้เคียงกับ *Rhizopus* spp. ศึกษาความสามารถในการผลิตกรดโดยอาศัยหลักการเปลี่ยนสีของ Bromocresol purple ที่เติมลงในอาหารพบว่าทั้งหมด ให้ผลการสร้างกรดได้ดี จากนั้นทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง พบว่า ไอโซเลท C018, C019, C021, C032 และ C035 ให้ค่า extracellular enzyme production ratio (EPR) เท่ากับ 1.58, 1.46, 1.21, 1.38 และ 1.55 ตามลำดับ จึงได้นำเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท ไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกโดยวิธีการหมักแบบแข็ง (solid state fermentation) บนเปลือกมันสำปะหลัง พบว่าไอโซเลท C035 ให้ผลการศึกษาคีที่ดีที่สุดในทุกพารามิเตอร์ ซึ่งต่อมาไอโซเลท C035 นี้จัดจำแนกได้เป็น *Rhizopus* sp โดยใช้วิธีทางอณูพันธุศาสตร์ (molecular method) จึงได้คัดเลือกเชื้อรานี้เพื่อผลิตกรดแลกติกโดยจัดสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมัก ดังนี้ ใช้ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้น 150 g/kg, แหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมซัลเฟต (NH₄)₂SO₄, ขนาดอนุภาคของเปลือกมันสำปะหลัง 5 mm และค่าความชื้นเริ่มต้น 70% ผลการศึกษา พบว่าเชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 57.60 mg/g วิเคราะห์ โดย Reflectometer RQflec10 Merck Germany

Thesis Title	Lactic Acid Production from <i>Rhizopus</i> sp. by Solid State Fermentation on Cassava Peel
Author	Miss Sunisa Polrak
Major Program	Microbiology
Academic Year	2013

ABSTRACT

Cassava starch hydrolysis fungi were screened from 36 samples of cassava solid waste and soil by using cassava starch agar. One hundred and twelve isolates were obtained. Based on morphological study as well as comparison with the *Rhizopus oryzae* TISTR 3535, all isolates were similar to *Rhizopus* spp. The ability of acid production was carried out on the basis of Bromocresol purple color changing which was added in the medium. The result showed that all isolates could produce acid. The cassava starch hydrolysis was tested, the isolate C018, C019, C021, C032 and C035 revealed an extracellular enzyme production ratio (EPR) as 1.58, 1.46, 1.21, 1.38 and 1.55 respectively. Then these 5 isolates were selected for optimizing the conditions that suitable for lactic acid production by solid state fermentation on cassava peel. The result showed that the isolate C035 provided the best results for all parameters. Subsequently, the isolate C035 was identified as *Rhizopus* sp. by molecular method. Thus, this isolate was selected for lactic acid production in which the suitable fermentation conditions were as followed: 150g/ kg cassava starch, 3 g/kg of ammonium sulfate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, used as nitrogen source, 5 mm particle size of cassava peel and the initial moisture content of 70%. The result exhibited that the fungal could produce 57.60 mg/g of lactic acid analyzed by Reflectometer RQflec10 Merck Germany.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เพราะได้รับความกรุณาจากบุคคลหลายท่านและจากหลายหน่วยงาน ข้าพเจ้าจึงขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้ ดังนี้

ขอขอบพระคุณ ดร. วิไลลักษณ์ สุวะโซโน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ ให้คำปรึกษา และชี้แนะแนวทางอันเป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์ ตรวจสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.สมพร มุลมั่งมี นักวิจัยอาวุโส จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ดวงพร คันธโชติ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และชี้แนะแนวทางอันเป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ให้สถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกคนที่คอยช่วยเหลือ และให้คำแนะนำงานด้านเอกสารต่างๆ

ขอขอบพระคุณ พี่น้อง เพื่อนๆ ภาควิชาจุลชีววิทยาหลายๆ ท่านที่คอยช่วยเหลือให้คำแนะนำ เป็นที่ปรึกษา และคอยเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว สำหรับกำลังใจที่ดี และให้การสนับสนุนการศึกษา รวมทั้งให้คำปรึกษาในทุกๆ เรื่องด้วยดีเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สุณิษา พลรักษ์

สารบัญ

	หน้า
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(12)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(14)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	23
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย	
วัสดุและอุปกรณ์	24
วิธีการทดลอง	26
3 ผลการทดลอง	33
4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	54
บรรณานุกรม	59
ภาคผนวก	68
ประวัติผู้เขียน	86

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติของกรดแลกติก	6
2	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Rhizopus</i> spp. ที่แยกได้ เปรียบเทียบกับ <i>Rhizopus oryzae</i> TISTR 3535	35
3	ความสามารถในการสร้างกรดของเชื้อรา <i>Rhizopus</i> spp. ที่แยกได้	36
4	จำนวนเชื้อราที่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้	38
5	ปริมาณกรดแลกติกซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Reflectometer RQflec 10 Merck Germany และปริมาณกรดทั้งหมด ของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท	42
6	ปริมาณกรดแลกติก ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Reflectometer RQflec 10 Merck Germany และปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้น 100, 150 และ 200 กรัม	45
7	ปริมาณกรดแลกติก ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Reflectometer RQflec 10 Merck Germany และปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ความชื้นเริ่มต้น 65%, 70% และ 75%	48
8	ปริมาณกรดแลกติกซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Reflectometer RQflec 10 Merck Germany และปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 1.0, 2.0, และ 5.0 มิลลิเมตร	51
9	ปริมาณกรดแลกติกซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Reflectometer RQflec 10 Merck Germany และปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ในถุงพลาสติกทนร้อน	53
10	การผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา <i>Rhizopus oryzae</i> ด้วยวิธีการหมักแบบต่างๆ	58
11	วิธีการเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 200, 400, 600, 800, 1000 µg/ml สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี 3, 5- Dinitrosalicylic acid assay	74
12	ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่ได้จากการหมักแบบแข็งของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท	77
13	เปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดที่ได้จากการหมักแบบแข็งของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท	77
14	กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ที่ได้จากการหมักแบบแข็ง ของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท	78

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
15	ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ปริมาณแป้งเริ่มต้น 100, 150 และ 200 กรัม	78
16	เปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ปริมาณแป้งเริ่มต้น 100, 150 และ 200 กรัม	79
17	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α -amylase) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ปริมาณแป้งเริ่มต้น 100, 150 และ 200 กรัม	79
18	ค่าความเป็นกรดต่าง(pH) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ความชื้นเริ่มต้น 65%, 70% และ 75%	80
19	เปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ความชื้นเริ่มต้น 65%, 70% และ 75%	80
20	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ความชื้นเริ่มต้น 65%, 70% และ 75%	81
21	ค่า pH ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 1.0, 2.0, และ 5.0 มิลลิเมตร	81
22	เปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 1.0, 2.0, และ 5.0 มิลลิเมตร	82
23	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 1.0, 2.0, และ 5.0 มิลลิเมตร	82
24	ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ในถุงพลาสติกทนร้อน	83
25	เปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ในถุงพลาสติกทนร้อน	83
26	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ในถุงพลาสติกทนร้อน	84

รายการรูป

รูปที่	หน้า
1 ลักษณะของต้นมันสำปะหลัง	3
2 ลักษณะของหัวมันสำปะหลัง	3
3 สูตรโครงสร้างของกรดแลกติก	5
4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	13
5 การเจริญของเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. บนอาหารแข็ง PDA	13
6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง macroscopic และ microscopic morphology ของเชื้อรา <i>Rhizopus oryzae</i> TISTR 3535	34
7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง macroscopic และ microscopic morphology ของเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. C018 ที่แยกได้	34
8 Neighbor-joining tree แสดงไฟโลจีนีของสายดีเอ็นเอของเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างมันสำปะหลัง สายดีเอ็นเอไอโซเลต C035 โดยแสดงค่า Bootstrap (1,000 ซ้ำ) มากกว่า 50% ใช้ <i>Backusella circina</i> และ <i>Backusella lamprospora</i> เป็น out group สเกล บาร์ 5%	35
9 การสร้างกรดของเชื้อรา <i>Rhizopus</i> spp. โดยดูการเปลี่ยนสีของ brom cresol purple จากสีน้ำตาลเป็นสีเหลือง แสดงถึงการสร้างกรดเปรียบเทียบกับชุดควบคุม	37
10 การย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อรา <i>Rhizopus</i> spp.	39
11 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่ได้จากการหมักแบบแข็งของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท	40
12 เปอร์เซ็นต์ทั้งหมดที่ได้จากการหมักแบบแข็งของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท	41
13 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ที่ได้จากการหมักแบบแข็งของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท	42
14 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp ไอโซเลท C035 ที่ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้น 100, 150 และ 200 กรัม	43
15 เปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. C035	44
16 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> spp. ไอโซเลท C035 ที่ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้น 100, 150 และ 200 กรัม	45

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
17 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ความชื้นเริ่มต้น 65%, 70% และ 75%	46
18 เปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ความชื้นเริ่มต้น 65%, 70% และ 75%	47
19 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ความชื้นเริ่มต้น 65%, 70% และ 75%	48
20 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 1.0, 2.0, และ 5.0 มิลลิเมตร	49
21 เปอร์เซ็นต์กรดแลกติกของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 1.0, 2.0, และ 5.0 มิลลิเมตร	50
22 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 1.0, 2.0, และ 5.0 มิลลิเมตร	50
23 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ในถุงพลาสติกทนร้อน	51
24 เปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ในถุงพลาสติกทนร้อน	52
25 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ในถุงพลาสติกทนร้อน	53
26 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส	75
27 แสดงการหมักแบบแข็ง (solid state fermentation) ในฟลาสก์	85
28 แสดงการหมักแบบแข็ง (solid state fermentation) ในถุงพลาสติกทนร้อน	85

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

°	=	องศา
ml	=	มิลลิลิตร
g/l	=	กรัมต่อลิตร
g/kg	=	กรัมต่อกิโลกรัม
u/ml	=	ยูนิตต่อมิลลิลิตร
mg/g	=	มิลลิกรัมต่อกรัม
mm	=	มิลลิเมตร
nm	=	นาโนเมตร
mg	=	มิลลิกรัม
g	=	กรัม
kg	=	กิโลกรัม
cm	=	เซนติเมตร
EPR	=	Extracellular enzyme production ratio
PDA	=	Potato dextrose agar
N	=	Normality

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เพราะได้รับความกรุณาจากบุคคลหลายท่านและจากหลายหน่วยงาน ข้าพเจ้าจึงขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้ ดังนี้

ขอขอบพระคุณ ดร. วิไลลักษณ์ สุวะโซโน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ ให้คำปรึกษา และชี้แนะแนวทางอันเป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์ ตรวจสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.สมพร มุลมั่งมี นักวิจัยอาวุโส จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ดวงพร คันธโชติ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และชี้แนะแนวทางอันเป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยา ที่ให้สถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกคนที่คอยช่วยเหลือ และให้คำแนะนำงานด้านเอกสารต่างๆ

ขอขอบพระคุณ พี่น้อง ภาควิชาจุลชีววิทยาหลายๆ ท่านที่คอยช่วยเหลือให้คำแนะนำ เป็นที่ปรึกษา และคอยเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว สำหรับกำลังใจที่ดี และให้การสนับสนุนการศึกษา รวมทั้งให้คำปรึกษาในทุกๆ เรื่องด้วยดีเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สุณิษา พลรักษ์

สารบัญ

	หน้า
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(11)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(13)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	23
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย	
วัสดุและอุปกรณ์	24
วิธีการทดลอง	26
3 ผลการทดลอง	33
4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	54
บรรณานุกรม	59
ภาคผนวก	68
ประวัติผู้เขียน	86

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติของกรดแลกติก	6
2	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Rhizopus</i> spp. ที่แยกได้ เปรียบเทียบกับ <i>Rhizopus oryzae</i> TISTR 3535	35
3	ความสามารถในการสร้างกรดของเชื้อรา <i>Rhizopus</i> spp. ที่แยกได้	36
4	จำนวนเชื้อราที่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้	38
5	ปริมาณกรดแลกติกซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Reflectometer RQflec 10 Merck Germany และปริมาณกรดทั้งหมด ของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท	42
6	ปริมาณกรดแลกติก ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Reflectometer RQflec 10 Merck Germany และปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้น 100, 150 และ 200 กรัม	45
7	ปริมาณกรดแลกติก ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Reflectometer RQflec 10 Merck Germany และปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ความชื้นเริ่มต้น 65%, 70% และ 75%	48
8	ปริมาณกรดแลกติกซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Reflectometer RQflec 10 Merck Germany และปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 1.0, 2.0, และ 5.0 มิลลิเมตร	51
9	ปริมาณกรดแลกติกซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Reflectometer RQflec 10 Merck Germany และปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ในถุงพลาสติกทนร้อน	53
10	การผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา <i>Rhizopus oryzae</i> ด้วยวิธีการหมักแบบต่างๆ	58
11	วิธีการเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 200, 400, 600, 800, 1000 µg/ml สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี 3, 5- Dinitrosalicylic acid assay	74
12	ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่ได้จากการหมักแบบแข็งของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท	77
13	เปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดที่ได้จากการหมักแบบแข็งของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท	77
14	กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ที่ได้จากการหมักแบบแข็ง ของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท	78

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
15	ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ปริมาณแป้งเริ่มต้น 100, 150 และ 200 กรัม	78
16	เปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ปริมาณแป้งเริ่มต้น 100, 150 และ 200 กรัม	79
17	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α -amylase) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ปริมาณแป้งเริ่มต้น 100, 150 และ 200 กรัม	79
18	ค่าความเป็นกรดต่าง(pH) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ความชื้นเริ่มต้น 65%, 70% และ 75%	80
19	เปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ความชื้นเริ่มต้น 65%, 70% และ 75%	80
20	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ความชื้นเริ่มต้น 65%, 70% และ 75%	81
21	ค่า pH ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 1.0, 2.0, และ 5.0 มิลลิเมตร	81
22	เปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 1.0, 2.0, และ 5.0 มิลลิเมตร	82
23	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 1.0, 2.0, และ 5.0 มิลลิเมตร	82
24	ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ในถุงพลาสติกทนร้อน	83
25	เปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ในถุงพลาสติกทนร้อน	83
26	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ในถุงพลาสติกทนร้อน	84

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะของต้นมันสำปะหลัง	3
2	ลักษณะของหัวมันสำปะหลัง	3
3	สูตรโครงสร้างของกรดแลกติก	5
4	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	13
5	การเจริญของเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. บนอาหารแข็ง PDA	13
6	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง macroscopic และ microscopic morphology ของเชื้อรา <i>Rhizopus oryzae</i> TISTR 3535	34
7	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง macroscopic และ microscopic morphology ของเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. C018 ที่แยกได้	34
8	Neighbor-joining tree แสดงไฟโลจีนีของสายดีเอ็นเอของเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างมันสำปะหลัง สายดีเอ็นเอไอโซเลต CO35 โดยแสดงค่า Bootstrap (1,000 ซ้ำ) มากกว่า 50% ใช้ <i>Backusella circina</i> และ <i>Backusella lamprospora</i> เป็น out group สเกล บาร์ 5%	35
9	การสร้างกรดของเชื้อรา <i>Rhizopus</i> spp. โดยดูการเปลี่ยนสีของ brom cresol purple จากสีน้ำตาลเป็นสีเหลือง แสดงถึงการสร้างกรดเปรียบเทียบกับชุดควบคุม	37
10	การย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อรา <i>Rhizopus</i> spp.	39
11	ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่ได้จากการหมักแบบแข็งของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท	40
12	เปอร์เซ็นต์ทั้งหมดที่ได้จากการหมักแบบแข็งของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท	41
13	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ที่ได้จากการหมักแบบแข็งของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท	42
14	ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp ไอโซเลท C035 ที่ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้น 100, 150 และ 200 กรัม	43
15	เปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. C035	44
16	กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> spp. ไอโซเลท C035 ที่ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้น 100, 150 และ 200 กรัม	45

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
17 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ความชื้นเริ่มต้น 65%, 70% และ 75%	46
18 เปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ความชื้นเริ่มต้น 65%, 70% และ 75%	47
19 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ความชื้นเริ่มต้น 65%, 70% และ 75%	48
20 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 1.0, 2.0, และ 5.0 มิลลิเมตร	49
21 เปอร์เซ็นต์กรดแลกติกของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 1.0, 2.0, และ 5.0 มิลลิเมตร	50
22 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ที่ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 1.0, 2.0, และ 5.0 มิลลิเมตร	50
23 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ในถุงพลาสติกทนร้อน	51
24 เปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ในถุงพลาสติกทนร้อน	52
25 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035 ในถุงพลาสติกทนร้อน	53
26 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส	75
27 แสดงการหมักแบบแข็ง (solid state fermentation) ในฟลาสก์	85
28 แสดงการหมักแบบแข็ง (solid state fermentation) ในถุงพลาสติกทนร้อน	85

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

°	=	องศา
ml	=	มิลลิลิตร
g/l	=	กรัมต่อลิตร
g/kg	=	กรัมต่อกิโลกรัม
u/ml	=	ยูนิตต่อมิลลิลิตร
mg/g	=	มิลลิกรัมต่อกรัม
mm	=	มิลลิเมตร
nm	=	นาโนเมตร
mg	=	มิลลิกรัม
g	=	กรัม
kg	=	กิโลกรัม
cm	=	เซนติเมตร
EPR	=	Extracellular enzyme production ratio
PDA	=	Potato dextrose agar
N	=	Normality

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำตั้งเรื่อง

กรดแลกติก เป็นกรดอินทรีย์ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางทางอุตสาหกรรมต่างๆ อาทิ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมฟอกหนัง และอุตสาหกรรมสิ่งทอ (Soccol *et al.*, 1994; Yin *et al.*, 1997; Naranong and Poocharoen, 2001) นอกจากนี้ในปัจจุบันยังพบว่ากรดแลกติกได้ถูกนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการผลิตกรดพอลิแลกติก (Polylactic acid) (Ohara, 1994) ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ในการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เพื่อทดแทนพลาสติกที่ได้จากการสังเคราะห์โดยวิธีการทางเคมี ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาในการย่อยยาวนานและยังก่อให้เกิดปัญหาทางสิ่งแวดล้อมตามมา (Datta *et al.*, 1995) ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความต้องการกรดแลกติกที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ (Yin *et al.*, 1997) ในประเทศไทย ก็เช่นกันความต้องการใช้เพิ่มมากขึ้น และเนื่องจากประเทศไทย ยังไม่สามารถตั้งโรงงานผลิตกรดแลกติกได้เองจึงต้องพึ่งการนำเข้าจากต่างประเทศ สูญเสียเงินมหาศาล แม้ปัจจุบันมีบริษัท พูแรค (ประเทศไทย) จำกัด ได้มาตั้งโรงงานผลิตกรดแลกติก ที่จังหวัดระยอง เมื่อปี 2548 แต่ก็ยังเป็นบริษัทต่างชาติขนาดใหญ่ เพื่อใช้วัตถุดิบที่มีในประเทศไทย (Press, 2551)

ประเทศไทย เป็นประเทศเกษตรกรรม มีพืชผลทางการเกษตรที่สามารถปลูกทดแทนได้ตลอดทั้งปี โดยเฉพาะมันสำปะหลัง ซึ่งจัดเป็นพืชทางเศรษฐกิจ มีการปลูกกระจายอยู่ทั่วทุกภาคในประเทศไทย (กรมวิชาการเกษตร, 2537) ดังนั้นการใช้มันสำปะหลังในการผลิตกรดแลกติกมีความเป็นไปได้สูง เนื่องจากมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็น คาร์โบไฮเดรตสูง เฉลี่ย 65-70 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง จึงเหมาะสำหรับการนำมาใช้ประโยชน์ โดยการแปรรูปให้เป็นสารละลายน้ำตาลกลูโคส เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีให้กับจุลินทรีย์ นอกจากนี้เปลือกมันสำปะหลังจากโรงงานอุตสาหกรรมแป้ง และจากเกษตรกรเป็นวัสดุเหลือใช้ที่มีปริมาณมาก ถึง 1 ล้านตันต่อปี หากไม่มีการจัดการอย่างถูกวิธีเชื้อจุลินทรีย์ในธรรมชาติจะทำการย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ในวัสดุเหลือใช้ต่างๆ ส่งผลให้เกิดมลพิษทางอากาศจากกลิ่นไม่พึงประสงค์ หรือหากมีการชะล้างในฤดูฝน จะก่อให้เกิดการปนเปื้อนลงในแหล่งน้ำและดิน อีกทั้งยังเป็นแหล่งเพาะพันธุ์ของเชื้อโรคสู่ชุมชนอีกด้วย ดังนั้นหากนำเปลือกมันสำปะหลังมาใช้เป็นวัสดุหมัก จะเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่า และช่วยเหลือเกษตรกรในเรื่องของราคาที่ตกต่ำตลอดทั้งปี (อรรถวิท, 2547)

การพัฒนาวิธีการใช้ประโยชน์จากเปลือกมันสำปะหลัง โดยกรรมวิธีหมักแบบแข็ง (solid state fermentation) ซึ่งมีต้นทุนการผลิตต่ำ วัสดุหมักที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ซึ่งหาง่ายและราคาถูก เครื่องมือที่ใช้เป็นแบบง่าย ๆ และไม่ยุ่งยากในการทำงาน

ไม่สิ้นเปลืองพื้นที่ใช้สอย ใช้น้ำในปริมาณน้อย วัสดุหมักที่ใช้มีสารอาหารอย่างเข้มข้น และมีความชื้นต่ำ ซึ่งช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้ (Pandey *et al.*, 2003)

จุลินทรีย์ โดยเฉพาะเชื้อรา *Rhizopus oryzae* มีรายงานว่า เป็นเชื้อราที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากแป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง (Yu and Hang, 1989) แล้วให้กรดแลกติกในรูป L(+)-lactic acid (Yin *et al.*, 1997) หากต้องการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เชื้อรา ซึ่งมีคุณสมบัติที่ดีหลายประการ เช่น ต้องการสารอาหารไม่ซับซ้อน กระบวนการเก็บเกี่ยวไม่ยุ่งยาก (Zhang *et al.*, 2007) และกรดแลกติกที่ได้อยู่ในรูป L(+)-lactic acid ที่มีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งทำให้เหมาะแก่การนำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตพอลิแลกติก (Hang, 1989) ซึ่งในปัจจุบันทั่วโลกต่างให้ความสนใจ อีกทั้งยังช่วยลดต้นทุนการนำเข้ากรดแลกติกจากต่างประเทศ และเป็นการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีปริมาณมาก อีกทั้งยังช่วยลดปัญหาทางสิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย และเนื่องจากประเทศไทย ตั้งอยู่ในพื้นที่เขตร้อนจึงมีทรัพยากรจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติอย่างอุดมสมบูรณ์ที่สามารถแยก และนำมาใช้ประโยชน์ในกระบวนการหมักเพื่อให้ได้กรดแลกติก (Richard *et al.*, 1986)

การศึกษานี้จึงได้ทำการแยกเชื้อราและนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์ในการผลิตกรดแลกติก ลดต้นทุนการผลิต โดยใช้วิธีการหมักแบบแข็ง (solid state fermentation) ซึ่งมีข้อดีดังที่กล่าวมา

1.2 การตรวจเอกสาร

1.2.1 มันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นพืชหัวชนิดหนึ่ง มีชื่อเรียกหลายชื่อด้วยกันตามภาษาต่างๆ ได้แก่ cassava, yucca, mandioca, manioc, madioc, tapioc เป็นต้น เดิมทีคนไทยเรียกว่า มันไม้ มันสำโรง ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เรียกว่า มันเตี้ย ภาคใต้เรียกว่า มันเทศ (เรียกมันเทศว่า มันหลา) ปัจจุบันคนส่วนใหญ่เรียก มันสำปะหลัง มันสำปะหลังเป็นไม้พุ่ม และมีอายุอยู่ได้หลายปี ความสูงของต้นแตกต่างกันตามพันธุ์ และสภาพแวดล้อม อาจสูง 1-5 เมตร ทุกส่วนของต้นมันสำปะหลังมียางสีขาว ต้นมันสำปะหลังจัดเป็นไม้เนื้ออ่อน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-6 ซม. ใบมันสำปะหลังเป็นแบบใบเดี่ยว (simple leaf) ใบจะเกิดหมุนเวียนรอบลำต้น ก้านใบ อาจมีสีเขียวหรือสีแดง มีช่อดอกเป็นแบบ panicle มีดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่บนต้นเดียวกัน (monoecious plant) แต่แยกกันอยู่คนละดอกในช่อเดียวกัน ช่อดอกจะเกิดตรงปลายยอดของลำต้นหรือกิ่ง มีผลแบบ capsule มีระบบรากแบบ adventitious root system จำนวนหัวจะมี 5-15 หัว ขนาดความยาว 15-100 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลาง 3-15 ซม. ขนาดของรากขึ้นอยู่กับอายุ พันธุ์ ดิน และสภาพภูมิอากาศ (รูปที่ 1

และ 2) (Purseglove, 1977; กรมวิชาการเกษตร, 2537; กองแผนงานและวิชาการ. 2526; ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง, 2534)



รูปที่ 1 ลักษณะของต้นมันสำปะหลัง



รูปที่ 2 ลักษณะของหัวมันสำปะหลัง

มันสำปะหลัง เป็นพืชที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจไทยมาก มีการปลูกกระจายอยู่ทั่วทุกภาคในประเทศไทย มีปัญหาเรื่องโรคและแมลงศัตรูรบกวน สามารถขึ้นได้ในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ซึ่งไม่สามารถปลูกพืชชนิดอื่นได้ แต่ก็ยังสามารถปลูกมันสำปะหลังได้ นอกจากนี้ยังเป็นพืชที่ทนแล้งได้ดี หลังจากมันสำปะหลังตั้งตัวแล้วแม้จะไม่มีการรดน้ำติดต่อกันระยะยาวนานเป็นเดือน มันสำปะหลังก็ไม่ตาย แต่ต้นจะทิ้งใบและหยุดการเจริญเติบโต พอได้ฝนก็จะลำเลียงแป้งจากหัวมาสร้างยอด และใบเจริญเติบโตต่อไป เกษตรกรจะเก็บเกี่ยวมันสำปะหลังเมื่ออายุประมาณ 6-12 เดือน หรือนานกว่านี้ ยิ่งทิ้งไว้นานๆ ผลผลิตก็ยิ่งเพิ่มมากขึ้น เมื่อราคาไม่ดีหรือไม่มีแรงงานจะขุดหัวก็รื้อต่อไปได้ ไม่เหมือนพืชไร่ชนิดอื่น ซึ่งเมื่อถึงอายุเก็บเกี่ยวก็ต้องเก็บเกี่ยว ไม่เช่นนั้นจะเสียหาย ด้วย

คุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นจึงทำให้เกษตรกรนิยมปลูกมันสำปะหลังกันอย่างแพร่หลาย (กรมวิชาการเกษตร, 2537)

ในประเทศไทยมีการใช้ประโยชน์จากมันสำปะหลังมากขึ้นในปัจจุบัน ทั้งนี้เนื่องจากหัวมันสำปะหลัง มีปริมาณแป้งสูงถึง 75-80 เปอร์เซ็นต์ (กรมวิชาการเกษตร, 2537) จึงเป็นอาหารประเภทแป้งหรือคาร์โบไฮเดรตที่ให้พลังงานสำหรับมนุษย์และสัตว์ได้เป็นอย่างดี ตลอดจนใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ประโยชน์ที่ได้จากหัวมันสำปะหลัง มีดังนี้ คือ

1. ใช้เป็นอาหารของมนุษย์ โดยใช้เป็นอาหารหลักและอาหารเสริม มันสำปะหลังที่ผลิตได้ในโลกประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ ใช้เป็นอาหารของมนุษย์ โดยอาจจะใช้ต้ม ทอด ปิ้ง นึ่ง ย่าง อบ เชื่อม และหั่นฝอยคลุกน้ำมัน หรือเครื่องเทศแล้วทอด หรือนำมาทำเป็นแป้งและแปรรูปเป็นอาหารชนิดต่างๆ ตลอดจนนำมาผานเป็นแผ่นบาง ๆ (Chip) แล้วทอด ไขมันของมันสำปะหลังสามารถนำมารับประทานเป็นผักสด โดยต้มจิ้มน้ำพริก นำมาแกง (ห่อหมก) หรือปรุงเป็นซूप

2. ใช้ทำแป้ง โดยแป้งมันสำปะหลังใช้เป็นอาหารของมนุษย์โดยตรง และใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมกระดาษ การทำกระดาษ การทอผ้า และการผลิตน้ำตาลกลูโคส ในบรรดาประเทศที่ปลูกมันสำปะหลังมากๆ เช่น บราซิล ไนจีเรีย อินโดนีเซีย และไทย เป็นต้น ประเทศไทยเป็นประเทศเดียวที่ใช้มันสำปะหลังมาผลิตเป็นแป้งมากที่สุด ถือได้ว่าเป็นผู้ผลิตแป้งมันสำปะหลังรายใหญ่ที่สุดของโลก โดยมีกำลังความสามารถการผลิตมากกว่า 2 ล้านตันต่อปี มีเทคโนโลยีการผลิตแป้งมันสำปะหลังสูงที่สุดในบรรดาทุกๆ ประเทศ และได้มีการถ่ายทอดเทคโนโลยีไปสู่ประเทศเพื่อนบ้าน แป้งมันสำปะหลัง จึงถือได้ว่าเป็น "แป้งไทย" เป็นแป้งที่มีคุณภาพสูงและราคาถูกที่สุด

3. ใช้หมักทำแอลกอฮอล์ เบียร์ และขนมปัง ในบางประเทศ อย่างเช่น บราซิล กำลังใช้หัวมันสำปะหลังหมักเป็นแอลกอฮอล์ เพื่อใช้แทนน้ำมันเบนซินสำหรับเครื่องยนต์

4. ใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยทำเป็นมันเส้น มันสำปะหลังอัดเม็ด และกากมันสำปะหลัง ซึ่งใช้เป็นแหล่งพลังงานผสมในอาหารสัตว์ใช้เป็นอาหารสัตว์ ทั้งที่เป็นหัวสด กากที่เหลือจากการทำแป้ง และเปลือกของหัวใช้เป็นอาหารสัตว์ ในรูปไบโสดนำมาตากแห้งปนผสมกับอาหารชั้นเลี้ยงสัตว์ และเป็นอาหารผสม ลำต้นของมันสำปะหลังสามารถนำมาใช้ทำรั้วบ้าน รั้วสวนและล้อมคอกสัตว์เลี้ยงของชาวบ้านในชนบท

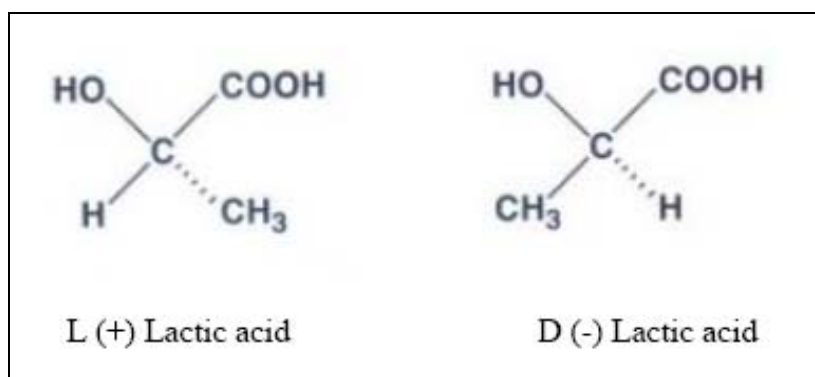
นอกจากนี้มันสำปะหลังยังสามารถนำมาผลิตพลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้ (biodegradable plastic) ซึ่งในปัจจุบันได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งจากนักวิทยาศาสตร์ ตลอดจนนักอุตสาหกรรมชั้นนำทั่วโลก โดยพลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้นั้นผลิตมาจากวัตถุดิบที่สามารถผลิตทดแทนขึ้นใหม่ได้ในธรรมชาติ (renewable resource) ซึ่งก็คือ พืชพวกมันสำปะหลัง ข้าวโพด อ้อย รวมถึงใช้พลังงานในกระบวนการผลิตต่ำ และสามารถย่อยสลายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำได้ด้วยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ โดยพลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้นั้น จะมีคุณสมบัติในการใช้งานได้

เทียบเท่า พลาสติกจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีแบบดั้งเดิม (commodity plastics) และสามารถทดแทนการใช้งานที่มีอยู่ได้ (Tonukari, 2004; Sriroth *et al.*, 2000)

1.2.2 กรดแลกติก (Lactic acid)

1.2.2.1 คุณสมบัติของกรดแลกติก

กรดแลกติก (Lactic acid) จัดเป็นกรดอินทรีย์ที่พบได้โดยทั่วไป (Zhang *et al.*, 2007) สามารถพบกรดแลกติกได้ตามธรรมชาติ ในนมเปรี้ยว, กากน้ำตาล, ผลไม้, อาหารหมัก, เบียร์, ไวน์ และขนมปัง เป็นต้น (Datta *et al.*, 1995) คำว่า Lactic มาจากภาษาละติน คือ คำว่า *Lac* ซึ่งแปลว่า นม (milk) เป็นกรดที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ระเหยได้ยาก และมีความสามารถในการกักความร้อนเล็กน้อย โดยมีชื่อทางเคมีว่า 2-hydroxypropanoic acid หรือ 2 hydroxypropionic acid ($C_3H_6O_3$) (John *et al.*, 2009) เป็นกรดอินทรีย์ที่มี hydroxyl group (OH) อยู่ด้วย มีสูตรโมเลกุล $CH_3CH(OH)COOH$ มีโครงสร้าง 2 รูปแบบ ซึ่งเป็น optical isomer ซึ่งกันและกัน คือ L(+)-lactic acid และ D(-)-lactic acid (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างของกรดแลกติก (Narayanan *et al.*, 2004)

L(+)-lactic acid หรือ Levorotatory lactic acid เป็นรูปที่อยู่ในกระบวนการชีวเคมีของสิ่งมีชีวิตทุกชีวิต รวมทั้งมนุษย์ พบได้ทั่วไป ทั้งในเลือด, ตับ, ไต, ต่อมไขมัน, กล้ามเนื้อ และของเหลวในร่างกายของทั้งมนุษย์และสัตว์ มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นในเลือดและกล้ามเนื้อภายหลังการออกกำลังกายอย่างหนัก มีค่า pKa 3.79 มวลโมเลกุล 90.08 จุดหลอมเหลว 53°C (ตารางที่ 1) ตกผลึกได้ในกรด acetic หรือ chloroform สามารถประกอบเป็นเกลือกับโลหะได้หลายชนิด เกลือของกรดแลกติกรูปแอล สามารถละลายน้ำได้ มากกว่าเกลือของกรดแลกติกรูปผสมแอล และดี (racemic form) เนื่องจากเป็นรูปที่พบได้ทั่วไปในร่างกายสิ่งมีชีวิต จึงมีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากมาย (Narayanan *et al.*, 2004)

D(-)-lactic acid หรือ Dextrorotatory lactic acid เป็นกรดแลกติกในรูปที่ไม่พบในกระบวนการชีวเคมีของมนุษย์ แต่สามารถพบในกระบวนการชีวเคมีของจุลินทรีย์ มีค่า pKa 3.83 มวลโมเลกุล 90.08 จุดหลอมเหลว 52.8 °C (ตารางที่ 1) ละลายในน้ำ, alcohol, acetone, ether และ glycerol ไม่ละลายใน chloroform ตกผลึกได้ในสารละลาย ether และ Isopropyl ether โดยทั่วไปจะพบ D(-)-lactic acid ในกระบวนการชีวเคมีของจุลินทรีย์เท่านั้น ทารกแรกเกิดจนถึง 6 เดือน ไม่ควรรับประทานอาหารที่มี D(-)-lactic acid เป็นองค์ประกอบ เพราะจะทำให้เกิดอาการป่วยได้ (Narayanan *et al.*, 2004)

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของกรดแลกติก

คุณสมบัติของกรดแลกติก	ค่าที่วัดได้
มวลโมเลกุล (Molecular weight)	90.08
จุดหลอมเหลว (Melting point)	16.8 °C
จุดเดือด (Boiling point)	82.0 °C ที่ 0.5 mmHg 122.0 °C ที่ 14 mmHg
ค่าคงที่การแตกตัว (Dissociation constant) (pKa ที่ 25 °C)	1.37×10^{-4}
ความร้อนจากการเผาไหม้ (Heat of combustion)	1361 KJ/mol
ความจุความร้อนจำเพาะ (Specific heat)	190 J/mol. °C

ที่มา: Narayanan *et al.*, 2004

1.2.2.2 ประโยชน์ของกรดแลกติก

1. ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและส่วนที่เกี่ยวข้องกับอาหาร (Food and food-related industries)

กรดแลกติกที่ผลิตได้ทั้งหมดประมาณ 85% ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากกรดแลกติกเป็นกรดที่เป็นที่ยอมรับกันทั่วไปว่าปลอดภัย หรือ Generally Recognized as Safe (GRAS) ซึ่งประกาศโดยองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา โดยใช้เป็นสารเพิ่มความเป็นกรดในอาหาร (acidulant) เป็นสารช่วยทำให้เกิดความสมดุลระหว่างความเป็นกรดต่างในอาหาร (buffer) ช่วยในการถนอมอาหาร ใช้เป็นตัวจับสารชนิดอื่น (chelating agent) เป็นสารเพิ่มกลิ่นและรสชาติ (flavor enhancer) ที่พบโดยทั่วไป คือ ในอาหารหมักดอง, ขนมหวาน, ขนมปัง, เครื่องดื่มทั่วไป เครื่องดื่มหรืออาหารที่ดัดแปลงจากนม (dairy products) เบียร์ และไวน์ เป็นต้น ช่วยให้เนื้อสัมผัสของอาหารมีสภาพดีขึ้น และใช้ในการขนส่งผลิตภัณฑ์อาหารสดจำพวก เป็ด ไก่ และปลา ช่วยยืดอายุ ลดกลิ่น และช่วยควบคุมโรคติดต่อที่ปนเปื้อนในอาหาร นอกจากนี้ มากกว่า

50% ของกรดแลกติกถูกนำมาใช้ในลักษณะผสมกับน้ำมัน (Emulsifying agent) ในรูปของเกลือของกรดไขมัน (Datta, *et al.*, 1995; Reddy, *et al.*, 2008)

2. ใช้ในอุตสาหกรรมที่ไม่ใช่อาหาร (Non-food uses)

กรดแลกติกถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอางและโลชั่น สمانผิว ช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นให้ผิวหนัง ใช้ในการปกป้องผิวหนังจากแสง ให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวหนัง และในช่วยรักษาสิว (Wee, *et al.*, 2006) ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยา ใช้เป็นสารต้านทานฟันผุ และใช้ในการรักษาการขาดแคลเซียม (Holland, *et al.*, 1986; Dunn, *et al.*, 1988) นอกจากนี้ กรดแลกติกยังถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิต cellophane ซึ่งต้องการกรดแลกติกที่มีรูปแบบ (isomeric form) ที่แน่นอน (Datta, *et al.*, 1995; Van Ness, 1981) ทั้งนี้กรดแลกติกได้ถูกนำมาใช้เป็นสารเพิ่มความเหนียวในอุตสาหกรรมการฟอกหนัง และทอผ้า มีการใช้กรดแลกติกสำหรับการแช่และ decalcification ของหนังสัตว์ และอุตสาหกรรมการทอผ้าจะใช้กรดแลกติกช่วยในการย้อม และพิมพ์ เพื่อให้สีติดแน่นนานยิ่งขึ้น (Ruter, 1975) แต่อย่างไรก็ตามในอุตสาหกรรมประเภทนี้ มักจะใช้กรดอินทรีย์ เพราะมีราคาถูกกว่า ดังนั้น ถ้าหากว่ามีการพัฒนาการผลิตกรดแลกติกให้ได้ปริมาณสูงขึ้นและราคาถูก น่าจะเป็นการประยุกต์ใช้อีกรูปแบบหนึ่ง เป็นการเปิดตลาดของกรดแลกติกให้กว้างมากยิ่งขึ้น

3. ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสารสังเคราะห์โพลิเมอร์ (Lactic acid polymer)

กรดแลกติกถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตโพลิเมอร์เป็นครั้งแรก ในปี ค.ศ.1932 โดยบริษัท Carothers แต่มีคุณภาพไม่ดี (Holen, 1971) โครงการจึงถูกชะงักไว้ จนกระทั่งปี ค.ศ.1954 บริษัท Dupont ได้จดทะเบียนสิทธิบัตรของสารโพลิเมอร์ของกรดแลกติก ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง แต่อย่างไรก็ตามสารโพลิเมอร์ชนิดนี้จะละลายเมื่อถูกน้ำ การผลิตจึงถูกระงับลงอีกครั้ง จนกระทั่งในปี ค.ศ.1972 บริษัท Ethicon ได้ผลิตสารโพลิเมอร์ระหว่างกรดแลกติก และกรดไกลโคลิก (glycolic acid) ปรากฏว่าใช้ได้ผลดี ปัจจุบันนี้ได้ถูกนำมาใช้เป็นเส้นใยในการเย็บแผล การผลิตสารโพลิเมอร์จากกรดแลกติกนั้น ต้องใช้สารตั้งต้นที่มีความบริสุทธิ์สูง และสามารถทนความร้อนได้สูง ปกติจะใช้กรดแลกติกที่อยู่ในรูป L(+)-lactic acid นอกจากนี้แล้วยังพบว่าสัดส่วนของกรดแลกติกในรูป L(+)-lactic acid และรูป D(-)-lactic acid จะต้องมีสัดส่วนที่แน่นอน ไม่เช่นนั้นแล้วจะทำให้สารโพลิเมอร์ที่ได้มีคุณสมบัติไม่ดี สารโพลิเมอร์ของกรดแลกติกถูกนำมาใช้ในด้าน การแพทย์และการเกษตรอย่างกว้างขวาง กล่าวคือนำมาใช้ในการเป็นตัวควบคุมของยาในตัวผู้ป่วย (controlled drug release) โดยยาจะถูกฝังอยู่ใน microcapsule ที่ทำจากสารโพลิเมอร์ของกรดแลกติก ยาจะค่อยๆ หลั่งออกมาซึ่งทำให้ยาอยู่ในตัวผู้ป่วยนานขึ้น สามารถที่จะออกฤทธิ์ได้ดีขึ้น และยังช่วยลดอาการข้างเคียงของการใช้ยาอีกด้วย ในด้านการเกษตร สารโพลิเมอร์ของกรดแลกติกถูกนำมาใช้ในการควบคุมการหลั่งของปุ๋ยและยาฆ่าแมลง (controlled release of fertilizers and pesticides) นอกจากนี้ยังพบสารโพลิเมอร์ของกรดแลกติกในเครื่องอุปโภคจำพวกภาชนะ และกระดาษ สารโพลิเมอร์ของกรดแลกติกนี้สามารถที่จะถูกย่อยสลายโดยทางชีวภาพ และสามารถ

ที่จะทนความร้อนสูงได้ด้วย (biodegradable thermoplastics) จึงเป็นการช่วยให้สภาพแวดล้อมของโลกไม่เกิดการเสียหาย (Piskin, *et al.*, 1994)

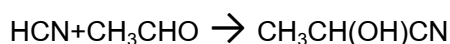
1.2.2.3 การสังเคราะห์กรดแลคติก (Synthesis of lactic acid)

กรดแลคติกถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในนมเปรี้ยว โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวสวีเดน ที่ชื่อว่า Scheele ในปี ค.ศ 1780 (Holen, *et al.*, 1971) ต่อมาในปี ค.ศ 1857 Pasteur พบว่า กรดแลคติกเกิดจากกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ ไม่ได้เป็นส่วนประกอบในน้ำนม (Wee, *et al.*, 2006) ในปัจจุบันสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 2 วิธี ดังนี้ (Narayanan, *et al.*, 2004)

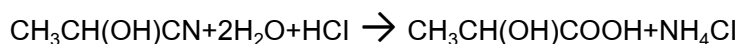
1. การสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical synthesis)

วิธีการสังเคราะห์กรดแลคติกทางเคมีถูกนำมาใช้ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1963 ในประเทศญี่ปุ่นและสหรัฐอเมริกา ซึ่งทั้ง 2 ประเทศ สามารถผลิตกรดแลคติกรวมกันได้ถึง 50% ของปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ทั้งหมดในโลก ซึ่งวิธีการที่ผลิตแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

ขั้นที่ 1: นำสารตั้งต้น ซึ่งได้แก่ Hydrogen cyanide (HCN) และ Acetaldehyde (CH_3CHO) มาทำปฏิกิริยากัน ที่ความดันบรรยากาศ หรือภายใต้ความร้อนสูง เกิดเป็นสารประกอบ Lactonitrile ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CN}$) ดังสมการ



ขั้นที่ 2: นำ lactonitrile ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CN}$) ที่ได้มาทำปฏิกิริยา hydrolysis กับกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ได้เป็นกรดแลคติก ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$) และเกลือแอมโมเนีย (NH_4Cl) ซึ่งเป็นผลพลอยได้ ดังสมการ



ทั้งนี้ขั้นตอนการผลิตจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับบริษัทผู้ผลิต เช่น บริษัท Monsanto (อเมริกา) ผลิตโดยใช้ acetaldehyde และกรด HCN ในขณะที่บริษัท Mushashino (ญี่ปุ่น) จะซื้อ lactonitrile จากบริษัทอื่นเพื่อนำมาผลิต หลังจากนั้นจะนำกรดแลคติกที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยทำให้เป็น methyl lactate ซึ่งจะถูกนำมาทำปฏิกิริยา hydrolysis ได้เป็นกรดแลคติก ส่วน methanol, HCN และสารเจือปนอื่น จะถูกกำจัดโดยการกรองผ่านผงคาร์บอน, การทำ ion exchange และการสกัดด้วยตัวทำละลาย กรดแลคติกที่สังเคราะห์ได้นี้จะอยู่ในรูปทั้ง D(-)-lactic acid และ L(+)-lactic acid ซึ่งสัดส่วนการผลิตได้นั้นไม่สามารถบอกได้จึงทำให้วิธีการนี้ไม่เป็นที่นิยมในปัจจุบัน

2. การสังเคราะห์ทางชีวภาพ (Biosynthesis)

การผลิตกรดแลคติกโดยวิธีนี้ต้องอาศัยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria, LAB) โดยที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรมอยู่ในจีนัส *Lactobacillus* ซึ่งอยู่ใน Family *Lactobacteriaceae* นอกจากกรดแลคติกจะสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียแล้ว ยังมีราเส้นสายอีก ที่สามารถผลิตกรด

แลกดิกได้ดี นั่นคือ เชื้อรา *Rhizopus* spp. ซึ่ง *Rhizopus* spp. สามารถผลิตกรดแลกดิกที่ อยู่ในรูป L(+)-lactic acid ได้ภายใต้สิ่งแวดล้อมที่มีการจำกัดไนโตรเจน เปรียบเทียบระหว่างการหมักโดยแบคทีเรียและการหมักโดยเชื้อราพบว่า *Rhizopus* spp. ต้องการเพียงเกลืออนินทรีย์เท่านั้น นอกจากนี้ *Rhizopus* spp. ยังสามารถทนต่อสิ่งแวดล้อมที่มีค่าพีเอชต่ำ ๆ ไม่จำเป็นต้องมีการรักษา ระดับพีเอชซึ่งแตกต่างกับแบคทีเรีย นอกจากนี้เชื้อรา *Rhizopus* spp. ยังเป็นพวกที่ย่อยแป้งได้ (amylolytic fungi) ที่สามารถผลิตกรดแลกดิก จากวัตถุดิบจำพวกแป้งได้โดยตรง ตัวอย่าง เช่น *Rhizopus* NRRL 395 สามารถหมักข้าวบาเลย์, แป้งมันสำปะหลัง, แป้งข้าวโพด, ข้าวโอ๊ต และข้าว ให้เป็นกรดแลกดิกในรูป L(+)-lactic acid ได้ (Axelsson, 1998; Alonso, et al., 2009; Davidson, et al., 1995; Vickroy, 1985, และ Wang, et al., 2010) *Rhizopus* spp. จึงเป็นเชื้อราที่มีความน่าสนใจ และเหมาะสำหรับการผลิตกรดแลกดิก แตกต่างจาก LAB ตรงที่กรดแลกดิกที่ผลิตโดยเชื้อรา *Rhizopus* spp. จะได้กรดแลกดิกที่อยู่ในรูป L(+)-lactic acid เท่านั้น (Yin et al., 1997; Mirdamadi, et al., 2002)

1.2.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกดิก

การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกดิกสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

1. NAD⁺-enzymetic lactate dehydrogenase: เป็นการวิเคราะห์ทางเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อ stereoisomer ของกรดแลกดิก โดยใช้เอนไซม์ lactate dehydrogenase
2. Non-enzymetic method: เป็นการทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยนกรดแลกดิกให้เป็น acetaldehyde และนำ acetaldehyde ที่เกิดขึ้นมาวิเคราะห์ด้วย Gas chromatography
3. การไตเตรต (Titration): นำมาไตเตรตกับเบสแก่ เช่น NaOH แต่วิธีนี้จะให้ผลที่ถูกต้องเมื่อตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์นั้นไม่มีกรดชนิดอื่นเจือปน
4. โครมาโทกราฟีกระดาษ (Paper Chromatography)
5. Thin layer chromatography
6. Liquid chromatography
7. HPLC: วิธีนี้สามารถแยกคู่ isomer ของกรดแลกดิกได้ (Friedemann, et al., 1927; Stark, et al., 1951; Taylor, 1996; Lee, et al., 2001)

1.2.3 กระบวนการหมัก (fermentation)

การหมักเป็นวิทยาศาสตร์ประยุกต์ที่นำเอาจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์โดยการนำจุลินทรีย์มาเลี้ยงให้เติบโตบนวัสดุหมัก (substrate) โดยอาศัยการจัดการสภาพแวดล้อมให้เหมาะสม เพื่อกระตุ้นให้จุลินทรีย์เจริญเติบโต และเอื้อให้จุลินทรีย์สร้างน้ำย่อยหรือเอนไซม์ เพื่อเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบให้เป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆ ทั้งนี้สิ่งที่ต้องการจากกระบวนการอาจเป็นเซลล์ของจุลินทรีย์

เอง, เอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นหรือผลิตภัณฑ์ที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้นในสภาพแวดล้อมนั้น ๆ เช่น กรดซิตริก หรือกรดมะนาว

ปัจจุบันเทคโนโลยีการหมักนำมาใช้ เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์หลากหลายชนิดในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งเป็นประโยชน์และเป็นที่ต้องการของมนุษย์ เช่น เอนไซม์, วิตามิน, ไวน์, เบียร์, กรดอะมิโน, กรดอินทรีย์, ยาปฏิชีวนะ และวัคซีน

การหมักสามารถแบ่งตามปริมาณน้ำหรือของเหลวที่เติม ได้เป็น 3 ประเภท คือ

1. การหมักแบบแข็ง (solid state fermentation) หรือเรียกอีกอย่างว่า การหมักบนอาหารแข็ง เป็นการหมักที่ต้องการปริมาณน้ำเพียงเล็กน้อย เพื่อปรับให้วัสดุหมักที่แห้งมีความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์
2. การหมักในสภาพกึ่งเหลว (semi solid fermentation) เป็นการหมักที่มีอาหารหมักเป็นของเหลวแต่มีของแข็งแขวนลอยอยู่ในบางส่วน
3. การหมักในอาหารเหลว (submerged fermentation) เป็นการหมักที่อาหารเป็นของเหลว

1.2.4 การหมักแบบแข็ง (solid-state fermentation; SSF)

การหมักแบบแข็ง เป็นกระบวนการหมักที่อาศัยการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บนวัสดุหรืออาหารแห้งในสภาพซึ่งไม่มีน้ำอิสระ (free liquid) อยู่ในระบบ อย่างไรก็ตามน้ำที่อยู่ในระบบจะอยู่ในรูปของความชื้น (moisture) ที่ถูกดูดซับอยู่กับวัสดุเท่านั้น ดังนั้น ระบบการหมักแบบแห้งนี้จึงไม่รวมการหมักกวัสดูที่เป็นของแข็งในอาหารเหลวหรือการหมักในรูปของของเหลวชั้น ในระบบการหมักแห้งแบบนี้ปริมาณความชื้นหรือปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์จะนำไปใช้ (a_w , available water) จึงค่อนข้างต่ำ

วัสดุหมักที่ใช้ในการหมักแบบแข็งนั้นส่วนใหญ่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งหาง่ายและราคาถูก เช่น ช้างข้าวโพด, กากมันสำปะหลัง และรำข้าว เป็นต้น (Sreenath, *et al.*, 2001)

ปัจจุบันการหมักแบบแข็งได้รับความสนใจมากขึ้น เนื่องจากกระบวนการหมักแบบแข็ง มีข้อดีหลายอย่าง และมีการนำมาประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ หลากหลาย ตัวอย่างเช่น การผลิตเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ไลเปส, แอลฟาอะไมเลส และเอนไซม์เพคทีเนส นอกจากนี้การหมักแบบแข็งยังมีการประยุกต์ใช้ในการผลิตกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลกติก, กรดซิตริก เป็นต้น (Singhania, *et al.*, 2009; Couto and Sanromon, 2006; Pandey, *et al.*, 2000)

Soccol *et al.* (1994) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 จากซานอ้อย เปรียบเทียบผลของการหมักให้ได้กรดแลกติกในรูปแอล L (+)-lactic acid ระหว่างการหมักแบบเปียก (submerged) และการหมักแบบแข็ง (solid state fermentation) พบว่าการหมักแบบแข็งจะให้ปริมาณกรดแลกติกที่สูงกว่า คือ 137.0 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การหมัก

แบบเปียกผลิตได้ 93.8 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ Soccol *et al.* (1994) ยังได้ศึกษาความสามารถของเชื้อรา *Rhizopus spp.* ในการเจริญเติบโตบนแป้งมันสำปะหลังดิบ และความสามารถในการผลิตเอนไซม์ amylase จำนวน 19 สายพันธุ์ โดยการหมักแบบแข็ง (solid state fermentations) พบว่ามีเพียง 3 สายพันธุ์ ที่เติบโตได้อย่างมีนัยสำคัญ และการผลิตเอนไซม์ glucoamylase บนมันสำปะหลังสดให้ผลสูงกว่าบนมันสำปะหลังสุก หลังจาก 48 ชั่วโมงของการหมัก พบว่าปริมาณโปรตีนของมันสำปะหลังเพิ่มขึ้นจาก 1.75 เปอร์เซ็นต์ เป็น 11.3 เปอร์เซ็นต์ และผลพลอยได้ของการหมักคือ กรดฟูมาริก, กรดแลกติก และเอทานอล

John *et al.*, (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดยใช้ชานอ้อยและกากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบด้วยวิธีการหมักแบบแข็ง (solid state fermentation) ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และใช้ *Lactobacillus delbrueckii* เป็นหัวเชื้อ หลังจากหมักเป็นเวลา 5 วัน ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 249 mg/gds

Rojan *et al.* (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดย *Lactobacillus casei* ด้วยวิธีการหมักแบบแข็ง (solid state fermentation) โดยใช้ชานอ้อยเป็นวัตถุดิบในการหมักภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 2.9 กรัม/5 กรัม สับสเตรทเริ่มต้น และมีประสิทธิภาพการเปลี่ยนรูปของน้ำตาลเป็นกรดแลกติก 97 เปอร์เซ็นต์ ที่ความชื้นเริ่มต้นของสับสเตรท 72 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ Naveena *et al.* (2005) รายงานถึงปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากการหมักแบบแข็ง โดยใช้รำข้าวสาลีซึ่งมีปริมาณแป้งอยู่ 54.4 เปอร์เซ็นต์เป็นวัตถุดิบ คือ 0.89-2.30 กรัม/ 10 กรัม ต่อมา Oda *et al.* (2002) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* โดยใช้กากมันฝรั่ง ซึ่งมีปริมาณแป้งอยู่ 33.1 เปอร์เซ็นต์ ในสภาพการหมักแบบแข็ง พบว่าให้ปริมาณกรดแลกติก 10.3 มิลลิกรัมต่อกรัมในวันที่หกของการหมัก ส่วน Saito *et al.*, (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ด้วยวิธีการหมักแบบแข็ง โดยใช้กากมันฝรั่งที่ย่อย โดยเอนไซม์ pectinolytic ซึ่งกากมันฝรั่งมีปริมาณแป้งอยู่ 28 เปอร์เซ็นต์ ให้ปริมาณกรดแลกติก เท่ากับ 8.03 มิลลิกรัมต่อกรัม

1.2.5 ข้อดีของการหมักแบบแข็ง

1. ใช้ต้นทุนต่ำ เนื่องจากสับสเตรทที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร
2. มีความชื้นในระบบต่ำ จึงช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้ โดยเฉพาะยีสต์และแบคทีเรีย ทำให้ไม่มีความจำเป็นต้องฆ่าเชื้อก่อนทำการหมัก
3. เครื่องมือที่ใช้ไม่แตกต่างจากที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เป็นเครื่องมือแบบง่ายๆ และไม่ยุ่งยากในการทำงาน ใช้อุปกรณ์น้อยและใช้เทคโนโลยีอย่างง่าย ๆ ไม่ซับซ้อน
4. ไม่ต้องเพิ่มความชื้น และสารอาหารให้แก่ระบบเนื่องจากความชื้น และสารอาหารมีอยู่อย่างเพียงพอในสับสเตรท
5. ไม่จำเป็นต้องมีการเพิ่มอากาศให้กับระบบ เนื่องจากมีการไหลเวียนของอากาศระหว่างอนุภาคของสับสเตรท

6. สามารถใช้เชื้อตั้งต้นในรูป spore suspension ได้ และไม่จำเป็นต้องใช้เชื้อตั้งต้นในรูปกล้าเชื้อปริมาณมาก

7. มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย และใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีการเจริญต่ำ เนื่องจากเส้นใยฉีกขาดได้

8. ผลผลิตที่ได้จากการหมักอาจมีปริมาณสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว และอาจมีการผลิตสาร metabolite บางอย่างที่แตกต่างไปจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

9. สามารถขจัดของแข็งจากการหมักได้โดยตรง ด้วยตัวทำละลายหรือทำให้อยู่ในสภาพเยือกแข็ง ก่อนทำการสกัด (Bhargav, *et al.*, 2008; Singhania, *et al.*, 2009; Pandey, *et al.*, 2003; Couto and Sanromon, 2006)

1.2.6 สมบัติของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกในอุตสาหกรรม (Vickroy, 1985)

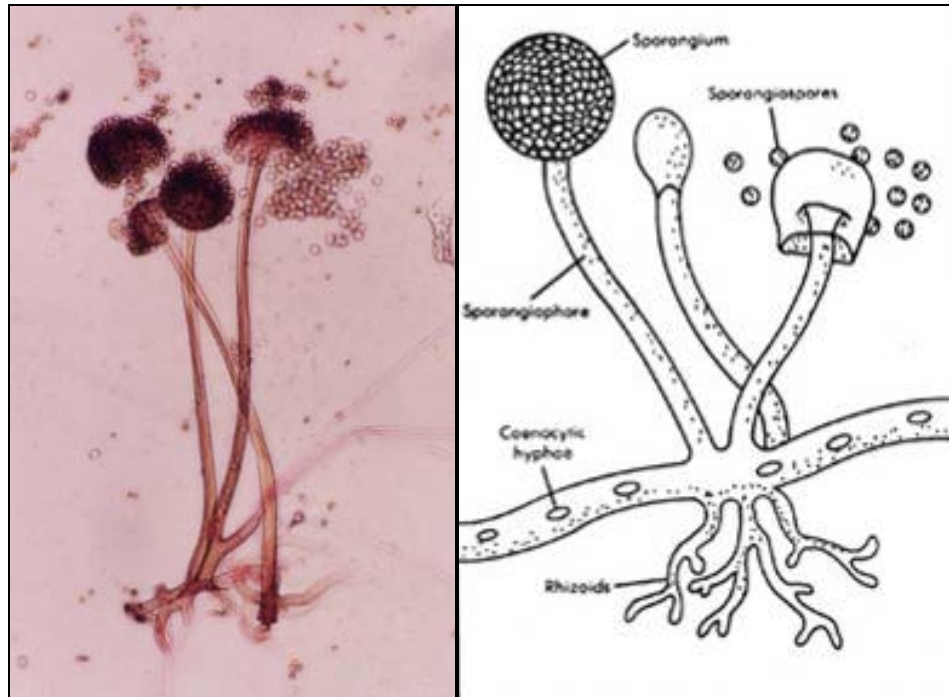
1. สามารถใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกได้ และวัตถุดิบดังกล่าวสามารถหาได้ตลอดทั้งปี
2. มีความต้องการปริมาณไนโตรเจน วิตามิน และกรดอะมิโนน้อย
3. สามารถผลิตกรดแลกติกได้ดีในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงและค่าความเป็นกรดต่างต่ำ (pH 4 - 7) ซึ่งจะช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้
4. มีอัตราการเจริญต่ำ แต่ให้ปริมาณการผลิตกรดแลกติกที่สูง
5. สามารถผลิตกรดแลกติกได้ดีในสภาพที่มีปริมาณออกซิเจนน้อย และกรดแลกติกที่ผลิตได้ควรจะเป็นรูป L(+)-lactic acid

1.2.7 ลักษณะของเชื้อรา *Rhizopus* spp.

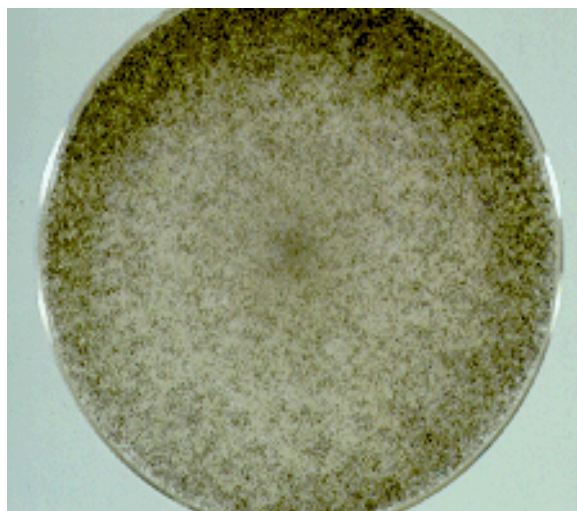
Rhizopus spp. เป็นราเส้นสาย จัดอยู่ในคลาสไซโกไมซีตีส (Zycomycetes) พบได้ทั่วไปในดิน ผัก ผลไม้ มูลสัตว์ และอาหารจำพวกแป้ง มีการดำรงชีวิตแบบอิสระ บางชนิดทำให้อาหารเน่าเสีย แต่บางชนิดสามารถนำไปใช้ในกระบวนการทางอุตสาหกรรมได้

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา มีลักษณะเป็นเส้นใยที่ไม่มีผนังกัน จะสร้างผนังกัน เฉพาะตรงส่วนที่จะกลายเป็นสปอร์แรงเจียม (sporangium) สปอร์แรงเจียฟออร์ (sporangiophore) เกิดขึ้นตรงส่วนที่จะสร้างไรซอยด์ (rhizoid) สปอร์แรงเจียม (sporangium) มีขนาดใหญ่ มีสีดำ และมีคอลัมเมลลา (collumella) เจริญเติบโตได้ดีในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศต้องการไมซีเลียม (mycelium) สองสายที่แตกต่างกัน เมื่อนิวเคลียสมาผสมกันได้ไซโกต (zygote) จะเจริญเป็นไซโกสปอร์ (zygospore) ที่มีผนังหนา สีดำ และทนทานต่อสภาพแวดล้อม มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบไม่อาศัยเพศ โดยการสร้างสปอร์ เรียกว่า sporangiospore และ แบบอาศัยเพศ โดยการสร้างสปอร์ เรียกว่า zygospore (รูปที่ 4) การเจริญบนอาหาร PDA เส้นใยเป็นปุยสีขาวเกาะตัวกัน

อย่างหลวมๆ แล้วเปลี่ยนเป็นสีเทาน้ำตาลหรือสีเทาดำ เมื่อมีการสร้างสปอร์ (รูปที่ 5) (Schipper, 1984)



รูปที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Rhizopus* sp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์



รูปที่ 5 การเจริญของเชื้อรา *Rhizopus* sp. บนอาหารแข็ง PDA

ที่มา: http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Zygomycetes/Rhizopus/

1.2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus sp.*

1. สายพันธุ์จุลินทรีย์ (Microorganisms)

โดยทั่วไปจะต้องคัดเลือกใช้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลกติกได้ ปริมาณที่สูงและคงที่ ใช้เวลาในการหมักสั้น และสามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย และควรเป็นแหล่งคาร์บอนที่หาง่าย ราคาถูก (Hofvendahl and Hahn, 2000) จากรายงานการวิจัยต่างๆ พบว่าเชื้อรา *Rhizopus spp.* เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ดี

Soccol *et al.* (1994) ได้คัดเลือกเชื้อรา *Rhizopus spp.* จำนวน 19 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อราสายพันธุ์ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด คือ 65 กรัมต่อลิตร

Yin *et al.* (1997) ศึกษาการผลิตกรดแลกติก จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* พบว่าเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 เป็นเชื้อราที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุด โดยสามารถผลิตกรดแลกติก 85 กรัมต่อลิตร จากการหมักในพลาสติก และ 102 กรัมต่อลิตร จากการหมักในถังหมัก

Skory *et al.* (1998) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ภายใต้สภาวะที่มีการจำกัดออกซิเจน พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 40 กรัมต่อลิตร ภายใน 70 ชั่วโมง

Hang (1989) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 พบว่าเชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้ประมาณ 354.8 กรัมต่อกิโลกรัม ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Yu *et al.* (1989) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงจนครบ 72 ชั่วโมง เชื้อราสามารถผลิตกรดได้มาก โดยสามารถผลิตได้มากที่สุดเท่ากับ 430 กรัมต่อกิโลกรัม

Oda *et al.* (2002) ได้ศึกษาคัดเลือกเชื้อรา *Rhizopus oryzae* จำนวน 38 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อรา *R. oryzae* IFO 4707 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุด คือ 10 มิลลิกรัมต่อกรัม เมื่อใช้กากมันฝรั่งสดเป็นแหล่งสับสเตรท

2. สารอาหาร (Nutrients)

สารอาหารมีความจำเป็นในกระบวนการหมัก โดยแหล่งคาร์บอน, ไนโตรเจน, ฟอสฟอรัส, ซัลเฟอร์ และเกลืออื่นๆ มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการสร้างผลผลิต โดยทั่วไปเชื้อรา *Rhizopus spp.* มีความต้องการสารอาหารน้อยกว่าเมื่อเทียบกับแบคทีเรีย (Zhang, *et al.*, 2007) โดยความเข้มข้นของสารอาหารขึ้นอยู่กับธรรมชาติของซัสสเตรท, สายพันธุ์ และวิธีการที่ใช้ในการหมัก โดยสารอาหารที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติก ได้แก่

3. แหล่งคาร์บอน (Carbon source)

แหล่งคาร์บอนเป็นสารอาหารที่มีความจำเป็นต่อกระบวนการหมัก โดยคาร์บอนเป็นธาตุที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน ซึ่งในกระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน โดยประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลกติกจะขึ้นกับชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และความบริสุทธิ์ของคาร์โบไฮเดรตที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ดังนั้น ในการผลิตกรดแลกติกจะต้องเลือกแหล่งคาร์บอนที่มีความเหมาะสม ทั้งชนิดและปริมาณความเข้มข้น รวมถึงราคาต้นทุน ซึ่งต้องคุ้มค่า

สารตั้งต้นหรือแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติก ได้แก่ น้ำตาลชนิดต่างๆ ทั้ง น้ำตาลซูโครส, กลูโคส หรือ ฟรุคโตส สารจำพวกคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ ซึ่งอาจเป็นผลพลอยได้จากการเกษตร หรือจากอุตสาหกรรมอาหาร เช่น แป้งมันฝรั่ง, แป้งข้าวโพด, กากน้ำตาล หรือน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตนม

สารตั้งต้นที่นำมาใช้ในการผลิตกรดแลกติกอาจต้องผ่านกระบวนการย่อยสลายให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส, มอลโทส, ซูโครส หรือ แล็กโทส ก่อนโดยการใช้เอนไซม์หรือกรดบางชนิด ทั้งนี้สารตั้งต้นที่จะนำมาใช้ผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรมจะต้องมีปริมาณมาก หาได้ง่าย และราคาถูก เพื่อความคุ้มค่าและประหยัดต้นทุนการผลิต

Hang (1989) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากข้าวโพดบด ด้วยเชื้อ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 พบว่าเชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้ประมาณ 354.8 กรัมต่อกิโลกรัม ภายหลังจากเพาะเลี้ยง 96 ชั่วโมง

Yu *et al.* (1989) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยผลผลิตทางการเกษตรแต่ละชนิด เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* หลังจาการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง และเติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 10 กรัม พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงต่อไปจนครบ 72 ชั่วโมง เชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกจากแหล่งคาร์บอนต่างๆ ได้มากน้อยตามลำดับดังนี้ คือ แป้งข้าว, แป้งข้าวโพด, แป้งมันสำปะหลัง, แป้งข้าวบาเลย์ และ แป้งข้าวโอ๊ต มีปริมาณการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 430, 400, 340, 280 และ 110 กรัมต่อกิโลกรัม สับสเตรท ตามลำดับ

Soccol *et al.* (1994) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้ซานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 พบว่าเชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 137 กรัมต่อลิตร

Yang *et al.* (1995) ใช้ xylose เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลกติก โดยใช้เชื้อรา *Rhizopus spp.* พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ดี

Yin *et al.* (1997) ได้ศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของสับสเตรทต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 พบว่าเมื่อใช้แป้งข้าวโพดที่ถูกย่อยบางส่วนด้วย

กรดไฮโดรคลอริก หรือเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่มีความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับเชื้อรา พบว่าเชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 98.2 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 72 ชั่วโมง

Du *et al.* (1998) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลกลูโคส โดยใช้ *Rhizopus oryzae* ATCC 5231 พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกที่มีความเข้มข้น 69 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 78 กรัมต่อลิตร

Zhou *et al.*, (1999) ศึกษาผลของสารอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิต L(+)-lactic acid โดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ATCC 5231 จากการทดลองในฟลาस्कเยย่า พบว่าองค์ประกอบอาหารที่เหมาะสม มีผลต่อการเพิ่มอัตราการผลิตกรดแลกติก เช่นเดียวกับการควบคุมอากาศที่เหมาะสม พบว่าช่วยให้อัตราการผลิตกรดแลกติกสูงขึ้น โดยอัตราการผลิตกรดแลกติกสูงสุดที่ 2.58 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 94 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณกรดแลกติกที่มีความเข้มข้น 83 กรัมต่อลิตร หลังจากการหมักเป็นเวลา 32 ชั่วโมง

Naranong and Poocharoen (2001) ศึกษาการผลิตแลกติกโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 จากแป้งมันสำปะหลัง พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 68.32 กรัมต่อลิตร

Oda *et al.* (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* จากกากมันฝรั่ง พบว่าจาก 38 สายพันธุ์ ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* พบว่า เมื่อหมักเป็นเวลา 6 วัน *Rhizopus oryzae* IFO 4707 เป็นสายพันธุ์ที่มีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วที่สุด และพบว่าเชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งอย่างมีประสิทธิภาพ

Miura *et al.*, (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากซังข้าวโพด พบว่า *Rhizopus MK - 96 - 1196* สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 100 กรัมต่อลิตร

Ruengrunlikit and Hang (2003) ศึกษาการผลิต L(+) -lactic acid จากซังข้าวโพด โดย *Rhizopus oryzae* NRRL-395 พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 299.4 กรัมต่อกิโลกรัมของซังข้าวโพดแห้ง หลังจากการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเติม 0.2 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตรแคลเซียมคาร์บอเนต

Bulut *et al.* (2004) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันในการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* และใช้น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลซูโครส, กากน้ำตาล และรำข้าวสาลีเป็นซับสเตรท พบว่าเชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกสูงสุดเมื่อเติมน้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวในอาหาร และพบว่ารำข้าวสาลีเป็นสารอาหารที่ไม่เหมาะสมสำหรับการหมักในครั้งนี้

John *et al.* (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้ชานอ้อยและกากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 249 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมซับสเตรท

Maas *et al.* (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากไซโลส โดยใช้เชื้อรา *Rhizopus oryzae* พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ระหว่าง 0.41 และ 0.71 กรัมต่อกรัม และยังพบว่าการเจริญ

เติบโตของ *Rhizopus oryzae* CBS 112.07 ในอาหารที่มีความเข้มข้นของไซโลสเริ่มต้น สูงกว่า 40 กรัมต่อลิตร มีผลต่อการใช้สับสเตรทและอัตราการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา

Zhang *et al.*, (2007) ศึกษาผลการผลิตกรดแลกติกโดย *Rhizopus arrhizus* โดยใช้แป้งมันฝรั่งเป็นสับสเตรท พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 36.4 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 32 ชั่วโมง

4. แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen source)

แหล่งของไนโตรเจนมีความจำเป็นต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโน, พิวรีน, ไพริมิดีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันบางชนิด ตัวอย่างของแหล่งไนโตรเจน ที่เป็นเกลืออนินทรีย์ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรท ส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ ได้แก่ peptone, yeast extract และ corn steep liquor เป็นต้น โดยแอมโมเนียมซัลเฟต จัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีการใช้อย่างแพร่หลายมากที่สุด มีการรายงานเกี่ยวกับความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ใช้ในการหมักกรดแลกติก โดยเชื้อรา *Rhizopus* spp. ในงานวิจัยต่างๆ อยู่ที่ระหว่าง 1.0-4.0 กรัมต่อลิตร (Yu and Hang, 1989; Soccol, *et al.*, 1994; Yin, *et al.*, 1997; Zhou, *et al.*, 1999) และทั้งนี้เนื่องจากเชื้อราสามารถใช้แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนีย ได้ดีกว่ารูปไนเตรต เชื้อราบางชนิดใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียหรืออินทรีย์ไนโตรเจน แต่จะไม่ใช้ในรูปไนเตรต เช่น *Absidia* sp., *Mucor* sp., *R. nigricans* และ *R. oryzae* เป็นต้น เพราะเกลือไนเตรตอาจมีผลต่อการเกิดสภาวะเป็นด่างในอาหารทำให้ค่าพีเอชสูงขึ้น ในการผลิตกรดแลกติกแอมโมเนียมซัลเฟต ถือว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความเหมาะสมมากกว่า แอมโมเนียมไนเตรต, ยูเรีย, peptone, yeast extract และ corn steep liquor (Yin *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1999)

Yin *et al.* (1997) ศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 พบว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสม คือ 1.35 กรัมต่อลิตร และพบว่าถ้าปริมาณความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตน้อยกว่า 1.35 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้การเจริญและปริมาณการผลิตกรดแลกติกของเชื้อราลดลง

ในขณะที่ Zhou *et al.* (1999) พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ATCC 52311 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน คือ แอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 0.10 กรัมต่อลิตร โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 56.8 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะการหมักในถังหมักแบบ bubble column เป็นเวลา 47 ชั่วโมง

Tay and Yang (2000) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งข้าวโพดที่ผ่านการย่อยโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ที่ตรึงบน cotton fiber พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก คือ แอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้น 0.30 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ปริมาณ

กรดแลกติกเท่ากับ 69 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณสับสเตรทที่ถูกใช้ไป และคิดเป็นอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.81 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ในขณะที่ Zhang *et al.* (2007) ได้รายงานผลของแหล่งไนโตรเจนต่อผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus arrhizus* โดยใช้แป้งมันฝรั่งเป็นสับสเตรท แหล่งไนโตรเจนต่างๆ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต, แอมโมเนียมไนเตรท, ยูเรีย, yeast extract และ peptone โดยประเมินร่วมกับอัตราส่วนต่างๆ ของคาร์บอนไนโตรเจน (C:N) พบว่าอาหารหมักที่ประกอบด้วย C:N ratio ต่ำจะช่วยเพิ่มการผลิตกรดแลกติก, ซีวมวล และเอทานอล ในขณะที่ C:N ratio สูง จะผลิตกรดฟูมาริก และจากแหล่งไนโตรเจนทั้งหมด พบว่า แอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 36.4 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็น 91 เปอร์เซ็นต์ จากการใช้แอมโมเนียมไนเตรท 0.909 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 32 ชั่วโมง

5. เกลืออนินทรีย์

เกลืออนินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกส่วนใหญ่ คือ KH_2PO_4 , MgSO_4 , ZnSO_4 และ $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ โดยทั่วไปจะใช้ KH_2PO_4 ประมาณ 0.15-0.60 กรัมต่อลิตร, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ประมาณ 0.15-0.75 กรัมต่อลิตร, และ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ประมาณ 0.04-0.09 กรัมต่อลิตร สำหรับความจำเป็นของ $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ สำหรับการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อรา *Rhizopus spp.* ถือว่าต่ำมากคือ ประมาณ 0.01 กรัมต่อลิตร ซึ่ง Zhou *et al.* (1999) กล่าวว่า Fe^{2+} ไม่จำเป็นในการหมักของเชื้อ *Rhizopus oryzae* ในขณะที่ Wang *et al.* (2005) รายงานว่าการเพิ่มระดับของ phosphate จาก 0.1 ถึง 0.6 กรัมต่อลิตร ของ KH_2PO_4 ทำให้สามารถผลิตกรดแลกติกที่มีความเข้มข้นสูงสุดประมาณ 85-71 กรัมต่อลิตร ส่วน Zhou *et al.* (1999) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของฟอสเฟตจาก 0.2 ถึง 0.6 กรัมต่อลิตร ของ KH_2PO_4 มีผลเพียงเล็กน้อยต่อการผลิตกรดแลกติก

วิเชียรและคณะ (2544) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* DMKU12 จากแป้งมันสำปะหลัง พบว่าเมื่อเติม KH_2PO_4 เข้มข้น 0.3-1.2 กรัมต่อลิตร เชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 67.7-69.2 กรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ KH_2PO_4 มากกว่านี้ก็ไม่ทำให้การผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้นแต่อย่างใด แต่พบว่าการเพิ่มความเข้มข้น

KH_2PO_4 ทำให้การผลิตเอธิลแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้น เมื่อศึกษาผลของการเติม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ต่อ

การผลิตกรดแลกติกนั้น พบว่าความเข้มข้นของ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ระหว่าง 0-0.75 กรัมต่อลิตร ไม่มีผลทำให้การผลิตกรดแลกติกของเชื้อราแตกต่างกัน คือ เชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 92-95 กรัมต่อลิตร และพบว่าปริมาณ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ความเข้มข้น 0.04 กรัมต่อลิตร มีผลให้เชื้อราผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด คือ 98.9 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้ความเข้มข้นของ

ZnSO₄·7H₂O น้อยกว่าหรือมากกว่านี้มีผลทำให้เชื้อราผลิตกรดแลกติกลดลง

วิเชียรและคณะ (2548) ศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันสำปะหลังที่ทำให้เหลวด้วยเอนไซม์แอลฟาอะมัยเลส โดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* DMKU12 ในระดับฟอสฟอรัสเขย่า พบว่าการผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสับสเตรตเพิ่มขึ้นจนถึงความเข้มข้น 186 กรัมต่อลิตร เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความจำเป็นต่อการผลิตกรดแลกติก โดยพบว่าที่ความเข้มข้นระหว่าง 3.2-6.4 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตสูงสุด แคลเซียมคาร์บอเนตมีบทบาทสำคัญต่อการผลิตกรดแลกติก เนื่องจากแคลเซียมไปช่วยปรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้สูงขึ้น ซึ่งมีผลทำให้เชื้อสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะมัยเลส การเติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 40-50 กรัมต่อลิตร ทำให้เชื้อราผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด การเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และซิงค์ซัลเฟตมีผลต่อการผลิตกรดแลกติก ส่วนแมกนีเซียมซัลเฟตไม่มีผล จากการวิเคราะห์ด้วยเอนไซม์ L-lactate dehydrogenase พบว่ากรดแลกติกที่เชื้อราผลิตได้ อยู่ในรูป L (+) -lactic acid โดยเชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 100 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลังที่ทำให้เหลว 174 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 3.2 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.3 กรัมต่อลิตร ซิงค์ซัลเฟต 0.04 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.75 กรัมต่อลิตร และแคลเซียมคาร์บอเนต 50 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง

Zhou *et al.* (1999) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลกลูโคสของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ATCC 52311 พบว่าความเข้มข้นของ KH₂PO₄ ประมาณ 1.50-12 มิลลิโมล ไม่มีผลทำให้การผลิตกรดแลกติกของเชื้อรามีปริมาณที่แตกต่างกัน และพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ KH₂PO₄ เท่ากับ 1.53, 4.5 7.5 และ 12 มิลลิโมล เชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 60.5, 62.5, 62.2 และ 60.3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และพบว่าถ้าไม่มีการเติม KH₂PO₄ มีผลทำให้การงอกของสปอร์และการผลิตกรดแลกติกของเชื้อราลดลง

6. ค่าความเป็นกรดต่าง (pH)

การผลิตกรดแลกติกในกระบวนการหมักจากเชื้อจุลินทรีย์จำเป็นต้องมีการควบคุมค่าพีเอชให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญ ซึ่งจะมีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยทั่วไปนิยมใช้ผงแคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารปรับพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Yu and Hang (1989) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวเป็นสับสเตรท พบว่าเมื่อมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ภายหลังจากการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การเติมแคลเซียมคาร์บอเนตมีผลต่ออัตราการใช้สับสเตรทและปริมาณกรดแลกติกที่เพิ่มขึ้น คือในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน มีอัตราการใช้สับสเตรทเพิ่มขึ้น 200 กรัมต่อกิโลกรัมสับสเตรท และปริมาณกรดแลกติกเพิ่มขึ้น 180 กรัมต่อกิโลกรัมสับสเตรท ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอน อัตราการใช้สับสเตรทเพิ่มขึ้น

350 กรัมต่อกิโลกรัมสับสเตรท และปริมาณกรดแลกติกเพิ่มขึ้น 300 กรัมต่อกิโลกรัมสับสเตรท เมื่อเปรียบเทียบกับสถานะที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Dominguez and Vazquez (1999) ศึกษาผลการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน ในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ATCC 52311 พบว่าเมื่อมีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 5 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เวลา 0 ชั่วโมง และเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 3 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ ในแต่ละช่วง ระยะเวลาที่แตกต่างกัน คือ 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง พบว่าการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต ลักษณะดังกล่าวมีผลทำให้สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด คือ 67.5 กรัมต่อลิตร จากปริมาณ น้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ในการผลิตกรดแลกติก ผลของค่า pH เป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณ กรดแลกติกที่ผลิตได้ โดยทั่วไปค่า pH จะอยู่ในช่วง 5.0-6.0 (Huang, *et al.*, 2003)

ธนภูมิ และคณะ (2551) ศึกษาผลของค่าพีเอชต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* KPS 106 ในถังหมักแบบลอยตัวขนาด 3 ลิตร โดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองจากการทดลองแบบ central composite design ของ 2 ปัจจัย 3 ระดับ ในการหาค่าพารามิเตอร์ที่ดีที่สุด จากสมการควอดราติก กำลังสองและวิธีพื้นผิวตอบสนอง พบว่าค่า pH ที่เหมาะสมเท่ากับ 5.85 โดยให้กรดแลกติก เท่ากับ 89.37 กรัมต่อลิตร ภายหลังจากหมักเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งคิด เป็นประสิทธิภาพการแปรผันเป็นกรดแลกติกเท่ากับ 1.08

วิเชียร และคณะ (2548) พบว่าเชื้อรา *Rhizopus oryzae* KPS 106 สามารถ ผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุด คือ 95.9 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นค่า Yp/s เท่ากับ 0.75 เมื่อควบคุมค่า pH ตลอดการหมักให้มีค่าเท่ากับ 7

Yang *et al.* (1995) พบว่าการผลิตกรดแลกติก เอทานอล และกรดฟูมาริกจะลดลง เมื่อค่าพีเอชลดลงจาก 6.0-4.0 ในขณะที่ Miural *et al.*, (2003) พบว่า ค่า pH เริ่มต้น ที่ 4.5 เชื้อรา *Rhizopus* spp. MK - 96 - 1196 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 100 กรัมต่อลิตร

Neutralizing agents ตัวอย่างเช่น แคลเซียมคาร์บอเนต, โซเดียมคาร์บอเนต และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ถูกใช้เพื่อเป็นตัวควบคุมระดับของค่าค่า pH ในระหว่างการหมัก โดย Neutralizing agents ที่นิยมใช้มากที่สุด คือ แคลเซียมคาร์บอเนต (Oda, *et al.*, 2002; Yin, *et al.*, 1997; Yu and Hang, 1989; Zhou, *et al.*, 1999)

Hang (1989) พบว่าเมื่อมีการใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารปรับค่า pH ใน การผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ในปริมาณที่มาก แนวน้ำของการผลิตกรด แลกติกก็จะมากขึ้นตามไปด้วย

Dominguez and Vazquez (1999) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลกลูโคส โดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ATCC 52311 พบว่า ค่า pH เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3.5-6 ไม่มี

ผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยช่วงค่า pH ดังกล่าวให้ปริมาณกรดแลกติกระหว่าง 69.9-72.1 กรัมต่อลิตร และพบว่าในช่วงค่า pH นี้เชื้อราที่มีลักษณะการเจริญที่คล้ายคลึงกัน

Tay and Yang (2000) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งข้าวโพดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ATCC 52311 ที่ถูกตรึงบน cotton fiber ภายในถังหมักแบบ fibrous bed bioreactor พบว่าค่า pH มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก คือ ที่ค่า pH เท่ากับ 4 ให้อัตราการผลิตกรดแลกติก เท่ากับ 0.037 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่ค่า pH เท่ากับ 5 ให้อัตราการผลิตกรดแลกติก เท่ากับ 0.56 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และที่ค่า pH เท่ากับ 6 ให้อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.80 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

7. อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงที่สุด เมื่อใช้กลูโคสเป็นสับสเตรท (Lockwood, et al., 1979)

สุภัตรา และคณะ (2548) ทำการแยกและคัดเลือกเชื้อ *Rhizopus* spp. จากตัวอย่างลูกแป้งและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากลูกแป้งที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูง โดยอาศัยหลักการเปลี่ยนสีของ brom cresol ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งละลายน้ำเป็นแหล่งอาหาร พบว่าเชื้อ *Rhizopus* spp. จำนวน 29 สายพันธุ์ มี 8 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ดี ที่ 30 องศาเซลเซียส และจากจำนวนนี้มี 6 สายพันธุ์ ที่ยังคงสร้างกรดได้ดีที่ 40 องศาเซลเซียส เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตกรดอินทรีย์ พบว่ากรดอินทรีย์ที่ผลิตจากเชื้อราที่ทดสอบส่วนใหญ่เป็นกรดอะซิติกและแลกติก โดยสายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุดคือ *Rhizopus* spp. สายพันธุ์ MKU ซึ่งผลิตได้ 0.79 เปอร์เซ็นต์ภายหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สุใจและศิริประภา (2549) ศึกษาการเพิ่มผลผลิตกรดแลกติกจากเวย์โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก คือ ความเข้มข้นของเวย์ ร้อยละ 90 (ปริมาตรต่อปริมาตร) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส การผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 6.51 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 72 ผลผลิตกรดแลกติก 0.195 กรัมต่อกรัมของซบสเตรท อัตราการผลิตกรดแลกติก 0.090 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง การผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส กวนใบพัด อัตราความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที ควบคุมค่าพีเอชที่ 6.5 พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 8.16 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมงผลผลิตกรดแลกติก 0.212 กรัมต่อกรัมของซบสเตรท และอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.170 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Yu and Hang (1989) พบว่าเชื้อรา *Rhizopus oryzae* สามารถผลิตแลกติก ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนได้ปริมาณสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ปริมาณกรดแลกติกเท่ากับ 445 กรัมต่อกิโลกรัมสับสเตรท ภายหลังจากการหมักเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Huang *et al.* (2003) พบว่า *Rhizopus arrhizus* DAR 36017 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 22-38 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของกรดแลกติกที่ได้จะมีระดับสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม Liu *et al.* (2005) พบว่าที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติกจากมันฝรั่งโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ทั้งนี้ในงานวิจัยโดยทั่วไป อุณหภูมิที่ใช้ในการหมักจะอยู่ในช่วง 27- 35 องศาเซลเซียส (Yin, *et al.*, 1997; Yu and Hang.,1989; Yang, *et al.*,1995; Zhou, *et al.*, 1999; Huang, *et al.*, 2003; Du, *et al.*, 1998)

8. ลักษณะและรูปร่างของเชื้อ

ปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งของการใช้เชื้อราในกระบวนการหมัก คือ รูปร่างของเส้นใย เนื่องจากเชื้อรามีเส้นใยที่เจริญได้หลายรูปแบบ โดยบางรูปแบบช่วยส่งเสริมการผลิตกรดแลกติก ตัวอย่างเช่น รูป pellet และ รูป flocs แต่บางรูปแบบก็ก่อให้เกิดปัญหาในกระบวนการหมัก ซึ่งรูปร่างที่ก่อให้เกิดปัญหามากที่สุด คือ รูป clump เนื่องจากมีการเจริญเป็นกลุ่มก้อน จึงทำให้พื้นที่การถ่ายเทออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อกับเซลล์ลดลง ดังนั้นการควบคุมรูปร่างของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* จึงมีความจำเป็น

Du *et al.* (1998) พบว่าลักษณะของเส้นใยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ที่เพาะเลี้ยงแบบ batch ในถังหมักแบบ bubble column fermentor นั้นมี 2 แบบ คือ filamentous และ pellet ซึ่งการเกิดลักษณะรูปร่างของเส้นใยแบบนี้ขึ้นกับค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นและการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต เมื่อค่าความเป็นกรดต่างในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เส้นใยของเชื้อราเจริญเป็นแบบ filamentous และสามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 62.5 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิต เท่ากับ 1.46 กรัมต่อชั่วโมงต่อกรัม ภายหลังจากการหมักเป็นเวลา 27 ชั่วโมง ส่วนอาหารที่มีค่าความเป็นกรดต่าง เท่ากับ 2 เส้นใยของเชื้อราเจริญเป็นแบบ pellet ให้ปริมาณการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 66 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 1.53 กรัมต่อชั่วโมงต่อกรัม ภายหลังจากการหมักเป็นเวลา 43 ชั่วโมง โดยสาเหตุที่เส้นใยของเชื้อราแบบ pellet ใช้ระยะเวลาการหมักนานกว่าเส้นใยแบบ filamentous เนื่องจากช่วงระยะ lag phase ของการเกิดรูปร่างเส้นใยแบบ pellet ใช้เวลานานกว่า โดยใช้ระยะเวลา 21 ชั่วโมง ในขณะที่รูปร่างแบบ filamentous มีระยะ lag phase เพียง 10 ชั่วโมง

Park *et al.* (1998) ได้ศึกษาการใช้เชื้อรา *Rhizopus oryzae* ที่มีรูปร่าง mycelial cotton like flocs โดยใช้ mineral support และ polyethylene oxide เป็นตัวช่วยรักษารูปร่างเชื้อเริ่มต้นในการผลิตกรดแลกติกในถังหมักแบบ air lift bioreactor โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 120 กรัมต่อลิตร เป็นสับสเตรท พบว่าให้ผลผลิตกรดแลกติก เท่ากับ 104.6 กรัมต่อลิตร โดยใช้ระยะเวลาในการหมัก 60 ชั่วโมง

Yin *et al.* (1998) ได้ศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของสปอร์ต่อรูปร่างของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ในระดับฟลอสก์เฮยา โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อ preculture medium ที่ประกอบด้วย

น้ำตาลกลูโคส และแป้งข้าวโพด เป็นสับเตรทเข้มข้นอย่างละ 50 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่าการใช้สปอร์เริ่มต้น $2 \times 10^3 - 2 \times 10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้เส้นใยเจริญและมีรูปร่างแบบ fluffy mycelia ขณะที่ระดับความเข้มข้น 2×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เส้นใยมีรูปร่างเป็น pellet เมื่อนำเชื้อราที่มีรูปร่างต่าง ๆ กันไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ production medium ที่มีแป้งข้าวโพด 120 กรัมต่อลิตร ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ารูปร่างที่เชื้อรา แบบ pellet ให้ปริมาณการผลิตกรดแลกติกสูงสุด คือ 98.2 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็น Yp/s เท่ากับ 0.82 ในขณะที่เชื้อราที่มีรูปร่างแบบ fluffy mycelia ให้ปริมาณกรดแลกติกอยู่ในช่วงระหว่าง 75.2-85.7 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็น Yp/s เท่ากับ 0.63-0.71

9. ปริมาณเชื้อเริ่มต้น

ปริมาณเชื้อเริ่มต้นมีผลต่อรูปร่างของเซลล์และความสามารถในการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* เพราะรูปร่างของเชื้อรามีผลต่อการถ่ายเทอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณการผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้นหรือลดลงได้

Yu and Hang (1989) พบว่าขนาดของเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* คือ $1 \times 10^7 - 3 \times 10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ถึงแม้ว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นเพิ่มขึ้น ก็ไม่มีผลทำให้ปริมาณการผลิตกรดแลกติกของเชื้อราเพิ่มมากขึ้น

Dominguez and Vazquez (1999) ได้ศึกษาความเข้มข้นของสปอร์เริ่มต้นของเชื้อรา

Rhizopus oryzae ATCC 52311 ต่อการผลิตกรดแลกติก พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของสปอร์เริ่มต้นที่ต่ำ (สปอร์เข้มข้น 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร) เชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติก เท่ากับ 60.4 กรัมต่อลิตร ภายหลังจากการหมัก 120 ชั่วโมง และเมื่อใช้ความเข้มข้นของสปอร์ที่สูงขึ้น (สปอร์เข้มข้น 1×10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2.0 มิลลิลิตร) เชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้เพิ่มขึ้นเป็น 70.8 กรัมต่อลิตร ภายหลังจากการหมักเป็นเวลา 94 ชั่วโมง โดยใช้น้ำตาลเริ่มต้น เท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร

1.3 วัตถุประสงค์ (Objectives)

1.3.1 แยกและคัดเลือกเชื้อราจากเศษวัสดุเหลือทิ้ง (กาก เปลือก รากของมันสำปะหลังและดิน) ที่อยู่ภายในและรอบๆ โรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง และจากบริเวณไร่มันสำปะหลัง ของเกษตรกรภายใน จ.นครราชสีมา และพื้นที่อื่นๆ ในภาคใต้ จำนวน 36 ตัวอย่าง

1.3.2 หาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อราที่แยกได้โดยใช้ แป้งและเปลือกมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบในการหมัก โดยการหมักแบบแข็ง (solid state fermentation)

1.3.2 การหมักให้ได้กรดแลกติกในระดับห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธีการหมักในถุงพลาสติกทนร้อนในรูปของแข็ง (solid state fermentation) โดยใช้แป้งและเปลือกมันสำปะหลัง เป็นวัสดุหมัก

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	บริษัทผู้ผลิต
1. Potato dextrose agar	Difco
2. Cassava starch agar	

2.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1. Agar	Merck
2. Ammonium sulphate ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Sigma
3. Calcium carbonate (CaCO ₃)	-
4. Ethanol 95%	-
5. Glucose	Difco
6. Hydrochloric Acid (HCl)	-
7. Iodine	Fluka
8. Lactophenol	Merck
9. Potassium Hydrogen Phthalate (KHC ₈ H ₄ O ₄)	Merck
10. Potassium dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)	Merck
11. Potassium dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)	Merck
12. Phenolphthalein	Merck
13. Magnesium sulphate heptahydrate (MgSO ₄ • 7H ₂ O)	Merck
14. Sodium hydroxide (NaOH)	Merck
15. Tween 80	Ajax Finechem
16. 3, 5-Ditrosalicylic acid solution	Merck
17. Zinc Sulphate heptahydrate (ZnSO ₄ • 7H ₂ O)	Merck

2.3 วัสดุอุปกรณ์

วัสดุอุปกรณ์	ยี่ห้อ/รุ่น
1. Aluminium foil	Diamond
2. Autoclave	Tomy Es-315, SS320
3. Autopipette	Eppendorf
4. Centrifuge	Gelenkamp
5. Cover slip	Menzel-glaser
6. Dessicator	-
7. Flask	Pyrex
8. Glass beaker	Pyrex
9. Haemocytometer	-
10. Hot air oven	WTB Binder, BD/ED/FD
11. Incubator shaker	MMM medcenter
12. Laboratory bottle Schott	
13. Laminar air flow cabinet	Science tech co., Ltd.
14. Loop	-
15. Microscope slide	Sail brand
16. Microwave	Sanyo
17. Needle	-
18. Pasteur pipette	Pyrex
19. Petri dish	Pyrex
20. pH meter	TQ Science instruments
21. Reflectometer RQflec 10	Merck Germany
22. Spreader	-
23. Syringe filter	Whatman
24. Test tube	Pyrex
25. Tip	Axygen
26. Volumetric flask	Witeg
27. Vortex mixer	Mettler Toledo PB602-L
28. กล้องจุลทรรศน์	Olympus
29. กล้องถ่ายภาพรูป	Samsung

2.3 วัสดุอุปกรณ์

วัสดุอุปกรณ์ (ต่อ)	ยี่ห้อ/รุ่น
30. กระดาษกรอง	Whatman
31. เครื่องชั่งสาร	Mettler Toledo
32. แท่งแก้วคน	-
33. แท่งแก้วรูปตัววี	-
34. น้ำกลั่น	-
35. แป้งมันสำปะหลัง	ช้างสามเศียร
36. มีดตัดวุ้น	-

2.4 เชื้อราที่ใช้อ้างอิง (reference strain)

1. *Rhizopus oryzae* TISTR 3535 จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

2.5 วิธีดำเนินการ (Method)

ในการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกเชื้อราที่ผลิตกรดแลกติก เนื่องจากการใช้เชื้อราที่มีข้อดีต่างๆ ตามที่ได้กล่าวไว้ เมื่อได้เชื้อราที่ดีแล้ว ได้นำมาทดลองหมักให้ได้กรดแลกติกในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้เปลือกมันสำปะหลังเป็นวัสดุหมักในรูปของแข็ง (solid state fermentation) โดยปฏิบัติ ดังนี้

2.5.1 การเก็บตัวอย่างและการแยกเชื้อรา

เก็บตัวอย่าง กาก เปลือก และรากมันสำปะหลัง รวมทั้งดินที่อยู่ภายใน และรอบๆ โรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังและจากบริเวณไร่มันสำปะหลังของเกษตรกรภายใน จ.นครราชสีมา และพื้นที่อื่นๆ ในภาคใต้ จำนวน 36 ตัวอย่าง โดยการใช้ช้อนปราศจากเชื้อตักตัวอย่างประมาณ 10 g ใส่ในถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อปิดปากถุง แล้วนำไปใส่กล่องที่มีฝาปิดมิดชิด นำตัวอย่างกลับสู่ห้องปฏิบัติการ โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.5.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหาร Cassava starch agar ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Yin และคณะ (1997) โดยใช้แป้งมันสำปะหลังแทนแป้งข้าวโพด และไม่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส โดยส่วนประกอบของ

อาหารมีดังนี้ (g/l) แป้งมันสำปะหลัง 50 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g, KH_2PO_4 0.25 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g, ผงวุ้น 15 g ผสมส่วนประกอบของอาหารจนเข้ากัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 5.5 ด้วย 1% sterile calcium carbonate จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.5.3 การแยกเชื้อรา

ซึ่งตัวอย่าง 10 g ใส่ในพลาสติกที่มี 0.85% NaCl ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 90 ml จะได้ความเจือจาง 10^{-1} ทำการเจือจางจนถึงระดับ 10^{-6} จากนั้นเลือกกระดุมความเจือจางที่ 10^{-4} - 10^{-6} เนื่องจากเป็นระดับความเจือจางที่มีปริมาณเชื้อไม่มากหรือน้อยเกินไป โดยดูดตัวอย่างมา 0.1 ml spread plate ลงในอาหาร cassava starch agar ที่เตรียมตามวิธีข้อ 2.5.2 เกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหาร โดยทำ 2 ซ้ำของแต่ละระดับความเจือจาง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28-30 °C เป็นเวลา 3-5 วัน โดยวางจานแบบหงายขึ้นคัดเลือกเชื้อรา โดยดูจากลักษณะของโคโลนีที่คาดว่าจะเป็น *Rhizopus* spp. ซึ่งจะมีลักษณะของโคโลนีที่มีเส้นใยขาวฟู สปอร์มีสีดำ-น้ำตาลเจริญดี และรวดเร็วภายใน 18-24 ชั่วโมง นำเชื้อราที่คัดเลือกได้มาทำให้บริสุทธิ์และเก็บในอาหาร PDA slant เพื่อศึกษาต่อไป

2.5.4 การเทียบเคียงชนิดของเชื้อราที่คัดเลือกได้

2.5.4.1 การเทียบเคียงเชื้อราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อราที่คัดเลือกได้มาทำ slide culture ตามวิธีของ Riddell (1950) โดยการใช้ใบมีดที่ปราศจากเชื้อมาตัดวุ้น PDA เป็นชิ้นเล็กๆ เป็นรูปลูกบาศก์ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ย้ายขึ้น PDA วางตรงกลางแผ่นสไลด์ ใช้เข็มที่ผ่านการลนไฟฆ่าเชื้อเขี่ยเชื้อราที่เตรียมไว้ไปแตะตรงขอบของชิ้น PDA ทั้ง 4 ด้าน ใช้ปากคีบ คีบ coverslip จุ่มแอลกอฮอล์ 95 % ลนไฟ ปล่อยให้เย็น ปิดทับบนแผ่นวุ้น จากนั้นใส่น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อลงไปในจานเล็กน้อย เพื่อไม่ให้วุ้นแห้ง ระวังอย่าให้น้ำล้นถึงแผ่นสไลด์ และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-4 วัน จากนั้นดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา โดยทำการหยด lactophenol cotton blue ลงตรงกลางแผ่นสไลด์ ย้ายแผ่นปิดสไลด์จากที่เลี้ยงเชื้อไว้ มาปิดทับลงบนแผ่นสไลด์นั้น จากนั้นจึงคีบเอาชิ้น PDA ที่มีเชื้อราเจริญอยู่ออก แล้วหยด lactophenol cotton blue ลงไป จากนั้นนำแผ่นปิดสไลด์แผ่นใหม่ ปิดทับลงไป แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า โดยดูลักษณะต่างๆทางสัณฐานวิทยาของรา ทั้ง macroscopic morphology และ microscopic morphology เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการเทียบเคียงชนิดของเชื้อราในเบื้องต้น โดยเปรียบเทียบกับเชื้อรา *Rhizopus oryzae* TISTR 3535 จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิง Reference strain (RS)

2.5.4.2 การเทียบเคียงเชื้อราระดับชนิด

การศึกษาทางชีวโมเลกุลเพื่อเทียบเคียงเชื้อราระดับชนิดของไอโซเลตที่คัดเลือกได้ (C035) ทำโดยการส่งตัวอย่างเพื่อหาลำดับดีเอ็นเอที่ห้องปฏิบัติการ Group of plant-microbe interactions, Institute of Plant Science and Resources (IPSR) Okayama university ประเทศญี่ปุ่น โดยทำการเพิ่ม rDNA บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ตำแหน่ง ITS1 - 5.8S - ITS2 ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 โดยเทคนิคพีซีอาร์ นำปริมาตรสารทั้งหมดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใส่ในเครื่องพีซีอาร์ โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิขั้นต่างๆ ที่ใช้ ดังนี้ ขั้นตอน Denaturation อุณหภูมิ 96°C 10 วินาที, ขั้นตอน Annealing อุณหภูมิ 50°C 5 วินาที, ขั้นตอน Extention อุณหภูมิ 60°C 4 นาที รวมทั้งหมด 25 รอบ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ ไปตรวจผลการทำปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิค Agarose Gel Electrophoresis

ผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากไอโซเลต C035 นำไปวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง DNA sequencer นำลำดับเบสดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้องของสายดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม BioEdit (Hall, 2004) จากนั้นนำไปเปรียบเทียบกับลำดับดีเอ็นเอที่มีในฐานข้อมูล NCBI ด้วยการ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Johnson *et al.*, 2008) ดาวนโหลดข้อมูลลำดับดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกับสายดีเอ็นเอไอโซเลต C035 และลำดับดีเอ็นเอของ out group มาทำ multiple alignment ด้วยโปรแกรม Muscle (Edgar, 2004) ซึ่งมีอยู่ในโปรแกรม Mega 5.1 จากนั้นนำไปสร้างไฟโลจีนีติกทรีของแต่ละสายดีเอ็นเอไอโซเลต C035 ด้วยชุดโปรแกรม Mega 5.1 (Tamura *et al.*, 2011) โดยโปรแกรมสำหรับสร้างแมทริกซ์ (DNAdist สำหรับดีเอ็นเอ) แล้วนำผลไปสร้างไฟโลจีนีติกทรีโดยวิธี Neighbor-joining ทดสอบความเชื่อมั่นของไฟโลจีนีติกทรีที่ได้โดยการทดสอบ bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำจะได้ไฟโลจีนีติกทรีของสายดีเอ็นเอไอโซเลต C035

2.5.5 การคัดเลือกเชื้อราที่สามารถสร้างกรดได้

นำเชื้อราทั้งหมดที่แยกได้มาคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถสร้างกรดได้ โดยนำเชื้อราทั้งหมดมาทำ point inoculation ลงในอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตัดเฉพาะส่วนปลายของเส้นใยของเชื้อราด้วย Cork borer วางลงตรงกลางอาหาร cassava starch agar ที่เติม Bromocresol purple (BCP) ความเข้มข้น 0.04 % บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบความสามารถในการสร้างกรดของเชื้อรา โดยการตรวจการเปลี่ยนสีของ BCP ที่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อมีการสร้างกรด และระดับของสีเป็นตัวบ่งชี้ปริมาณกรด

2.5.6 การคัดเลือกเชื้อราที่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้

นำเชื้อราที่แยกได้มาคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ โดยนำเชื้อราทั้งหมดมาทำ point inoculation ลงในจานอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตัดเฉพาะส่วนปลายของเส้นใยเชื้อราวางลงตรงกลางอาหารเลี้ยงเชื้อ cassava starch agar

ปมเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นรดด้วยสารละลายไอโอดีน แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสรอบโคโลนี (clear zone) การเกิดวงใสแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้ แล้วจึงคำนวณหาค่า Extracellular enzyme production ratio (EPR) จากสูตร ดังนี้

$$EPR = \frac{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณวงใส}}{\text{เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี}}$$

โดยมีการกำหนดปฏิบัติการสร้างเอนไซม์ตามค่า EPR เป็น 4 ระดับ ดังนี้ (Choi, *et al.*, 2005)

- Strong reaction: >2 cm.
- Medium reaction: >1-<2 cm.
- Weak reaction: < 1 cm.

จากเชื้อราทั้งหมดที่แยกได้ ทำการคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยแป้งและการสร้างกรดได้ดีที่สุด จำนวน 5 ไอโซเลทเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป โดยในการศึกษาค้างนี้ ได้ทำการทดลองหมักแบบแข็ง และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่เชื้อราต้องการเพื่อให้ได้กรดแลกติกสูงที่สุด ซึ่งมีรายงานว่า เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความจำเป็นต่อการผลิตกรดแลกติก (Yin, *et al.*, 1997) จึงได้เติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน ส่วนแคลเซียมคาร์บอเนตช่วยปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อช่วยให้เชื้อผลิตกรดแลกติกได้สูงขึ้น ส่วนอุณหภูมิที่เพาะเลี้ยง คือ 28-30 °C ซึ่งเหมาะต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา (วิเชียร และคณะ, 2544) ซึ่งในการวิจัยครั้งนี้ได้ทดลองนำผลวิจัยที่ดีจากที่มีผู้ศึกษาไว้แล้ว และนำมาประยุกต์หรือปรับปรุงเพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ดีที่สุด โดยปฏิบัติ ดังนี้

2.5.7 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกโดยวิธีการหมักแบบแข็งของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท

2.5.7.1 การเตรียม spore suspension

เลี้ยงเชื้อราที่คัดเลือกได้ทั้ง 5 ไอโซเลท (จากข้อ 2.5.5 และ 2.5.6) ให้เกิดสปอร์บนอาหาร PDA slant ปมที่อุณหภูมิ 28-30 °C เป็นเวลา 5-8 วัน เก็บสปอร์โดยเติมน้ำกลั่นปราศจากเชื้อที่ผสม 0.01% Tween 80 ลงไปปริมาตร 10 ml เขี่ยสปอร์ให้กระจายทั่ว แล้วตรวจนับจำนวนสปอร์โดยการหยดตัวอย่างลงบน haemocytometer จากนั้นจึงอาจให้ได้ปริมาณ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการหมัก

2.5.7.2 การเตรียมอาหารที่ใช้ในการหมัก (Production medium)

Production medium เตรียมโดยดัดแปลงจากวิธีของ Yin, *et al.* (1997) โดยมีองค์ประกอบต่างๆดังนี้ (g/kg) แป้งมันสำปะหลัง 120 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g, KH_2PO_4 0.25 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g ปรับส่วนผสมให้ได้ 1000 g ด้วยเปลือกมันสำปะหลังบด (supporter) ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 5.5-6 ด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต ปรับความชื้นให้ได้ ระหว่าง 45-70% โดยเติมน้ำกลั่นตามปริมาตรของเปอร์เซ็นต์ความชื้น นำอาหารดังกล่าวปริมาณ 100 g ใส่ในพลาสติกขนาด 500 ml กลิ้งพลาสติกเพื่อให้วัสดุหมักติดที่ผิวแก้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้น ปิเปิด spore suspension ที่เตรียมไว้ปริมาณ 10 ml (10% inoculum) โดยหยดให้ทั่ววัสดุหมักทำ 3 ซ้ำ นำไปปรมที่อุณหภูมิห้อง และเก็บตัวอย่าง 10 กรัมทุกๆ 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ ค่าความเป็นกรดต่าง (pH), ปริมาณกรดทั้งหมด (Titration), กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง (α -amylase), และปริมาณกรดแลคติก (lactic acid)

2.5.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก โดยวิธีการหมักแบบแข็งของเชื้อราที่คัดเลือกได้

2.5.8.1 การศึกษาปริมาณแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้นที่เหมาะสม

เตรียม spore suspension ของเชื้อราที่ให้ผลการศึกษาดีที่สุดจากข้อ 2.5.7 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการหมัก จากนั้นเตรียมอาหารที่ใช้ในการหมัก (Production medium) ดัดแปลงจากวิธีของ Yin, *et al.*, (1997) ตามวิธีการในข้อ 2.5.7.2 โดยปรับปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เติมลงไปเป็น 100, 150, และ 200 g ผสมกับองค์ประกอบอื่นๆ ดังนี้ (g/kg) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g, KH_2PO_4 0.25 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g ปรับส่วนผสมให้ได้ 1000 g ด้วยเปลือกมันสำปะหลังบด (supporter) ขนาด 5.0 มิลลิเมตร ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 5.5-6 ด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต ปรับความชื้นให้ได้ ระหว่าง 45-70% โดยเติมน้ำกลั่นตามปริมาตรของเปอร์เซ็นต์ความชื้น นำอาหารดังกล่าวปริมาณ 100 g ใส่ใน พลาสติกขนาด 500 ml กลิ้งพลาสติก เพื่อให้วัสดุหมักติดที่ผิวแก้ว นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้น ปิเปิด spore suspension ที่เตรียมไว้ ปริมาณ 10 ml (10% inoculum) โดยหยดให้ทั่ววัสดุหมัก ทำ 3 ซ้ำ นำไปปรมที่อุณหภูมิห้อง และเก็บตัวอย่าง 10 กรัมทุก 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ ค่าความเป็นกรดต่าง (pH), ปริมาณกรดทั้งหมด(Titration), กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง (α -amylase), และปริมาณกรดแลคติก (lactic acid)

2.5.8.2 การศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสม

หาเปอร์เซ็นต์ความชื้นเดิมที่มีอยู่ในเปลือกมันสำปะหลัง หลังจากนั้นคำนวณหาปริมาณน้ำที่ต้องเติมลงไป เพื่อปรับให้มีความชื้นเริ่มต้นเป็น 65%, 70%, และ 75% โดยคำนวณเทียบกับเปอร์เซ็นต์ความชื้นเดิมที่มีอยู่ในเปลือกมันสำปะหลัง

$$\text{ปริมาณน้ำที่เติมลงไป} = \frac{\text{ปริมาณน้ำในเปลือกมันสำปะหลัง} \times \text{เปอร์เซ็นต์ความชื้นที่ต้องการ}}{\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้นของเปลือกมันสำปะหลัง}}$$

เตรียม spore suspension ของเชื้อราที่ให้ผลการศึกษที่ดีที่สุด ตามวิธี

2.5.7.1 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการหมัก จากนั้นเตรียมอาหารที่ใช้ในการหมัก (Production medium) ดัดแปลงจากวิธีของ Yin, *et al.* (1997) โดยมีองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้ (g/kg) แป้งมันสำปะหลัง 150 g (จากผลการศึกษาในข้อ 2.5.8.1), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g, KH_2PO_4 0.25 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g ปรับส่วนผสมให้ได้ 1000 g ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 5.5-6 ด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต ปรับความชื้นเริ่มต้นให้ได้ 65%, 70% และ 75% โดยเติมน้ำตามปริมาณของเปอร์เซ็นต์ความชื้น นำอาหารดังกล่าวปริมาณ 100 g ใส่ในพลาสติก ขนาด 500 ml กลิ้งพลาสติก เพื่อให้วัสดุหมักติดที่ผิวแก้ว นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นเปิด spore suspension ที่เตรียมไว้ ปริมาณ 10 ml (10% inoculum) โดยหยดให้ทั่ววัสดุหมัก นำไปปมที่อุณหภูมิห้อง ทำ 3 ซ้ำ และเก็บตัวอย่าง 10 กรัมทุก 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ ค่าความเป็นกรดต่าง (pH), ปริมาณกรดทั้งหมด (Titration), กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง (α -amylase), และ ปริมาณกรดแลคติก (lactic acid)

2.5.8.3 การศึกษาขนาดอนุภาคของวัสดุหมักที่เหมาะสม

เตรียม spore suspension ของเชื้อราที่ให้ผลการศึกษที่ดีที่สุด ตามวิธี ข้อ 2.5.7.1 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการหมัก จากนั้นเตรียมอาหารที่ใช้ในการหมัก (Production medium) ดัดแปลงจากวิธีของ Yin, *et al.* (1997) โดยปรับปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่เติมลงไปเป็น 150 g ผสมกับองค์ประกอบอื่นๆ ดังนี้ (g/kg) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 g, KH_2PO_4 0.25 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g ปรับส่วนผสมให้ได้ 1000 g ด้วยเปลือกมันสำปะหลังบด (supporter) แต่ใช้ขนาดอนุภาคของมันสำปะหลังบดละเอียดที่กรองผ่านตะแกรงที่แตกต่างกัน คือ 1.0, 2.0, และ 5.0 มิลลิเมตร

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 5.5-6 ด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต ปรับความชื้นให้ได้ ระหว่าง 70% โดยเติมน้ำตามปริมาณของเปอร์เซ็นต์ความชื้น นำอาหารดังกล่าวปริมาณ 100 g ใส่ในพลาสติกขนาด 500 ml กลิ้งพลาสติกเพื่อให้วัสดุหมักติดที่ผิวแก้ว นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้ง

ให้เย็น จากนั้น ปิเปต spore suspension ที่เตรียมไว้ปริมาณ 10 ml (10% inoculum) โดยหยดให้ทั่ววัสดุหมัก ทำ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง และเก็บตัวอย่าง 10 กรัมทุก 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ ค่าความเป็นกรดต่าง (pH), ปริมาณกรดทั้งหมด (Titration), กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง (α -amylase), และปริมาณกรดแลกติก (lactic acid)

2.5.9 ทดลองหมักในถุงพลาสติกทนร้อน

เตรียม spore suspension ของเชื้อราที่ให้ผลการศึกษาคือดีที่สุด ตามวิธีข้อ 2.5.7.1 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการหมัก จากนั้นเตรียมอาหารที่ใช้ในการหมัก (Production medium) ดัดแปลงจากวิธีของ Yin, *et al.* (1997) โดยมีองค์ประกอบต่างๆ ดังนี้ (g/kg) แป้งมันสำปะหลัง 150 g (จากผลการศึกษาในข้อ 2.5.8.1), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 30 g, KH_2PO_4 2.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g ปรับส่วนผสมให้ได้ 1000 g ด้วยเปลือกมันสำปะหลังบดขนาด 5 mm (จากผลการศึกษาในข้อ 2.5.8.3) ผสมส่วนประกอบทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 5.5-6 ด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต ปรับความชื้นเริ่มต้นให้ได้ 70% (จากผลการศึกษาในข้อ 2.5.8.2) โดยเติมน้ำกลั่นตามปริมาตรของเปอร์เซ็นต์ความชื้น ผสมองค์ประกอบต่างๆ ให้เข้ากันนำอาหารดังกล่าว ปริมาตร 100 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกทนร้อน โดยแผ่ววัสดุหมักให้กระจายเต็มพื้นที่ของถุงพลาสติกทนร้อนขนาด 18 X 21 นิ้ว ปิดปากถุงโดยใช้สำลี นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็น จากนั้นปิเปต spore suspension ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 100 ml (10 % inoculum) โดยหยดให้ทั่ววัสดุหมัก นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 วัน ทำ 3 ซ้ำ และเก็บตัวอย่าง 10 กรัมทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน นำไปวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ ค่าความเป็นกรดต่าง (pH), ปริมาณกรดทั้งหมด (Titration), กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง (α -amylase), และปริมาณกรดแลกติก (lactic acid)

บทที่ 3

ผลการทดลอง

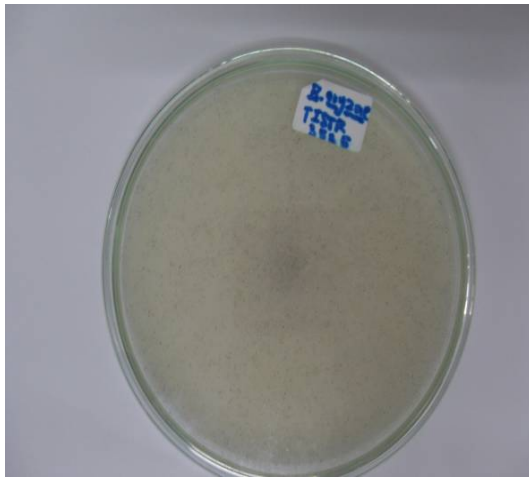
3.1 ผลการคัดแยกและจำแนกเชื้อรา

ผลการคัดแยกเชื้อรา *Rhizopus* spp. ในตัวอย่างกาก, เปลือก และรากมันสำปะหลัง รวมทั้งดิน จำนวน 36 ตัวอย่าง โดยใช้อาหาร cassava starch agar ที่ดัดแปลงมาจากสูตรของ Yin, *et al*, 1997 สามารถแยกเชื้อราได้จำนวน 112 ไอโซเลท โดยแยกได้จากตัวอย่างมันสำปะหลัง และดิน จำนวน 76 และ 36 ไอโซเลท ตามลำดับ โดยในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ได้มีการใช้แป้งมันสำปะหลังแทน แป้งข้าวโพด เนื่องจากมันสำปะหลังมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นคาร์โบไฮเดรตเฉลี่ย 65-70% ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีให้กับจุลินทรีย์ (อรธวิท, 2547) และไม่มีการเติมน้ำตาลกลูโคสในอาหาร สูตรดัดแปลงดังกล่าว ปรากฏว่าเชื้อราสามารถเติบโตได้ดี ลักษณะของโคโลนี มีเส้นใยขาวฟู สปอร์สีดำ-น้ำตาล และเจริญได้รวดเร็ว แสดงให้เห็นว่าอาหารสูตรดัดแปลงนี้สามารถคัดแยกเชื้อรา *Rhizopus* spp. ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารของ Yin, *et al* (1997) สูตรอาหารดัดแปลงนี้สามารถประหยัดค่าใช้จ่ายได้มาก เนื่องจากลดปริมาณการใช้น้ำตาลกลูโคสซึ่งมีราคาแพง และเชื้อราสามารถใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี ซึ่งเป็นการใช้แหล่งวัตถุดิบที่มีอยู่ในท้องถิ่นให้เกิดประโยชน์และช่วยเพิ่มมูลค่าสินค้าเกษตรได้

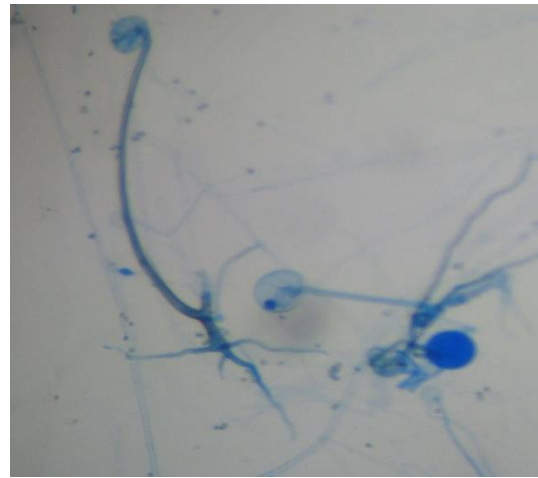
3.2 ผลการเทียบเคียงชนิดของเชื้อราที่คัดเลือกได้

3.2.1 การเทียบเคียงเชื้อราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง macroscopic และ microscopic morphology และเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา *Rhizopus oryzae* TISTR 3535 พบว่าทั้ง 112 ไอโซเลท มีลักษณะใกล้เคียงกับ *Rhizopus* spp. โดยเชื้อราสกุลนี้ มีลักษณะของโคโลนี คือ เส้นใยขาวฟู สปอร์มีสีดำ-น้ำตาล เจริญได้รวดเร็วภายใน 18-24 ชั่วโมง จากการทำ slide culture พบลักษณะเส้นใยเป็นแบบไม่มีผนังกัน และพบ rhizoid ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อราสกุลนี้ สีของเส้นใยเป็นแบบใสไม่มีสี ชนิดของ asexual spore เป็นแบบ sporangiospore ซึ่งผลการศึกษาแสดงดังรูปที่ 6 (ก ข) และ 7 (ก ข) และตารางที่ 2

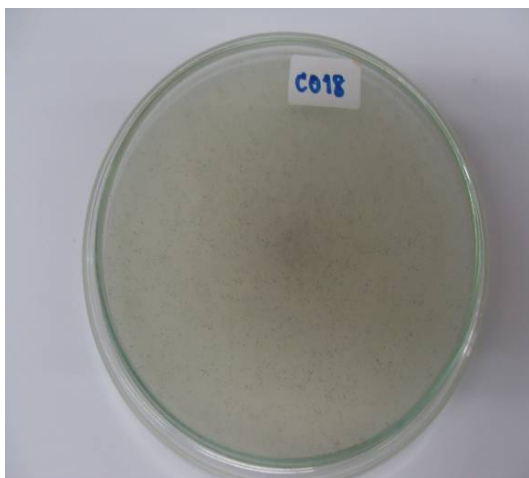


รูปที่ 6 ก. macroscopic morphology

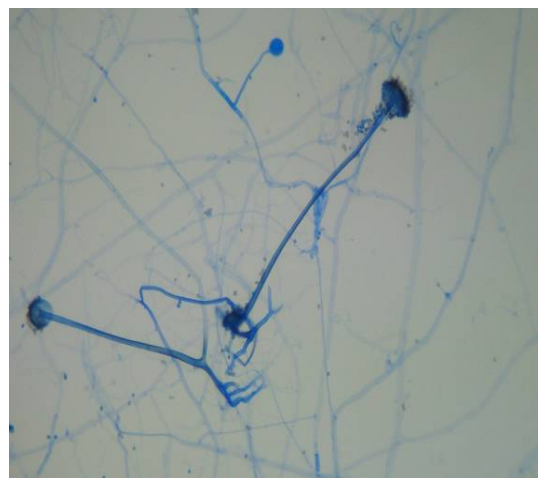


รูปที่ 6 ข. microscopic morphology

รูปที่ 6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง macroscopic และ microscopic morphology ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* TISTR 3535



รูปที่ 7 ก. macroscopic morphology



รูปที่ 7 ข. microscopic morphology

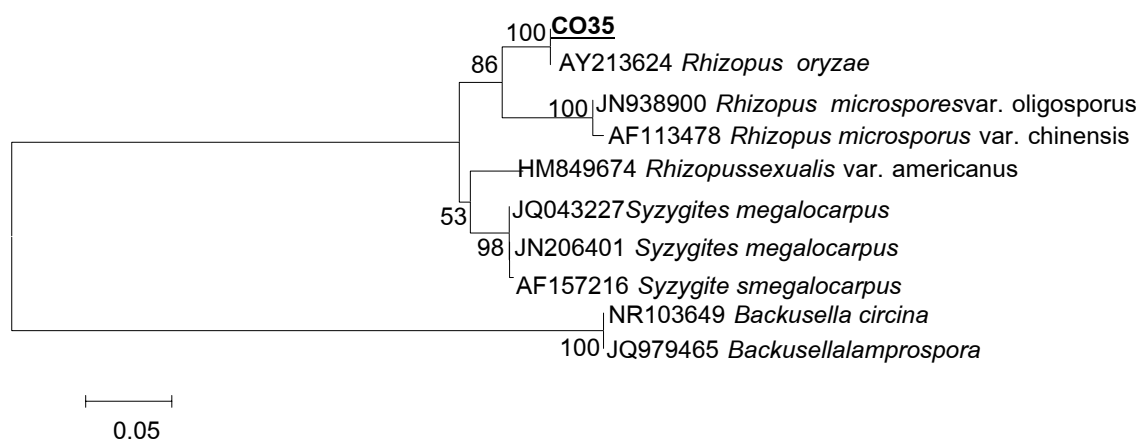
รูปที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง macroscopic และ microscopic morphology ของเชื้อรา *Rhizopus* sp. C018 ที่แยกได้

ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Rhizopus* spp. ที่แยกได้ เปรียบเทียบกับ *Rhizopus oryzae* TISTR 3535

เชื้อรา	Macroscopic morphology	Microscopic morphology		
		Somatic structure	Reproductive structure	
	ลักษณะและสีของโคโลนี	ชนิดของเส้นใย	สีของเส้นใย	ชนิดของ asexual spore
<i>Rhizopus</i> spp. (112 ไอโซเลท)	Cottony สีขาว สปอร์สีดำ	ไม่มีผนังกัน พบ rhizoid	ไม่มีสี	sporangiospore
<i>Rhizopus oryzae</i> TISTR 3535	Cottony สีขาว สปอร์สีดำ	ไม่มีผนังกัน พบ rhizoid	ไม่มีสี	sporangiospore

3.2.2 ผลการเทียบเคียงเชื้อราด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

ผลการเทียบเคียงเชื้อราด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล พบว่าเชื้อรา CO35 มีความใกล้เคียงกับ *Rhizopus oryzae* AY213624 (Rakeman, et al., 2005) มีค่า 28S rRNA sequence identity 100 % ดังแสดงในรูปที่ 8



รูปที่ 8 Neighbor-joining tree แสดงไฟโลจีของสายดีเอ็นเอของเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างมันสำปะหลัง สายดีเอ็นเอไอโซเลต CO35 โดยแสดงค่า Bootstrap (1,000 ซ้ำ) มากกว่า 50% ใช้ *Backusella circina* และ *Backusella lamprospora* เป็น out group สเกลบาร์ 5%

3.3 ผลการสร้างกรดของเชื้อราที่แยกได้

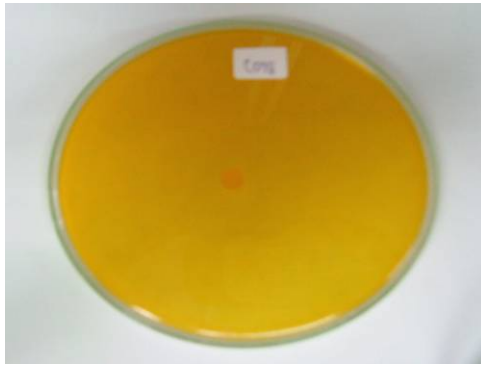
จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราทั้งหมด 112 ไอโซเลท บนอาหาร cassava starch agar ที่เติม Bromocresol purple (BCP) ความเข้มข้น 0.04% โดยดูการเปลี่ยนสีของ BCP ในอาหาร ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง เมื่อมีการสร้างกรด และระดับของสีจะเป็นตัวบ่งชี้ปริมาณกรด พบว่าเชื้อราทั้ง 112 ไอโซเลทมีความสามารถในการสร้างกรด โดยสามารถเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเหลือง ดังรูปที่ 9 ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเชื้อราสามารถผลิตกรดได้ และพบว่าเชื้อราทั้งหมดสร้างกรดได้แตกต่างกัน โดยพบว่าเชื้อรา *Rhizopus* spp. ที่สร้างกรดได้ดี (+++) คือ ให้สีเหลืองเข้ม มีจำนวน 104 ไอโซเลท คิดเป็น 92.86% เชื้อราที่สามารถสร้างกรดได้ปานกลาง (++) คือ ให้สีเหลือง มีจำนวน 5 ไอโซเลท คิดเป็น 4.46% เชื้อราที่สร้างกรดได้น้อย (+) คือ ให้สีเหลืองอ่อน มีจำนวน 3 ไอโซเลท คิดเป็น 2.68 % และไม่พบเชื้อราไม่สามารถสร้างกรด ผลแสดงดังตารางที่ 3 และรูปที่ 9

ตารางที่ 3 ความสามารถในการสร้างกรดของเชื้อรา *Rhizopus* spp ที่แยกได้

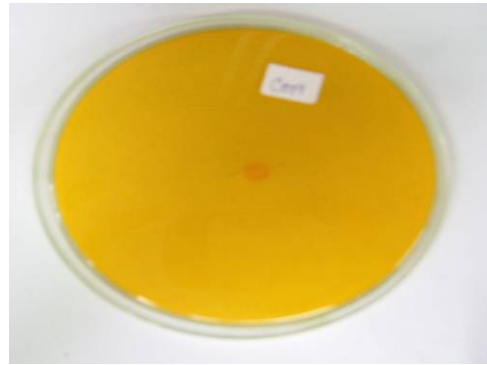
ระดับการเปลี่ยนสีอาหาร	ผลการสร้างกรด	จำนวนไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์
+++	สร้างกรดได้ดี	104	92.86%
++	สร้างกรดได้ปานกลาง	5	4.46%
+	สร้างกรดได้น้อย	3	2.68%
-	ไม่สามารถสร้างกรด	0	0%

หมายเหตุ

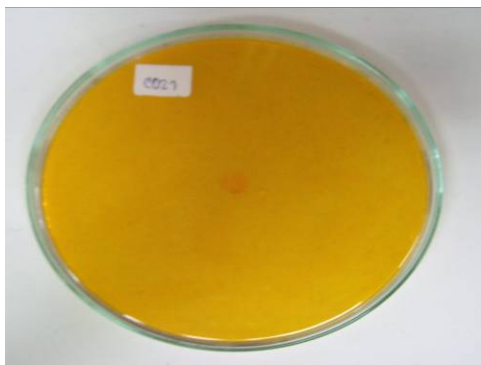
สีเหลืองเข้ม	ให้เครื่องหมายเป็น	+++	แสดงว่าเชื้อรา	สร้างกรดได้ดี
สีเหลือง	ให้เครื่องหมายเป็น	++	แสดงว่าเชื้อรา	สร้างกรดได้ปานกลาง
สีเหลืองอ่อน	ให้เครื่องหมายเป็น	+	แสดงว่าเชื้อรา	สร้างกรดได้น้อย
ไม่เปลี่ยนสี	ให้เครื่องหมายเป็น	-	แสดงว่าเชื้อรา	ไม่สามารถสร้างกรด



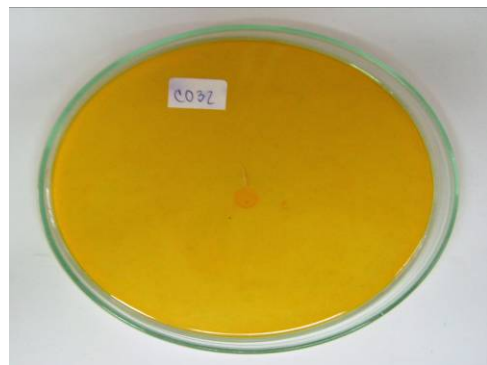
ก. C018



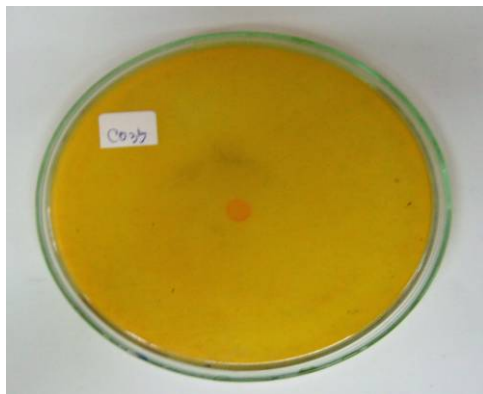
ข. C019



ค. C021



ง. C032



จ. C035



ฉ. Control (อาหารที่ไม่มีการเติมเชื้อ)

รูปที่ 9 การสร้างกรดของเชื้อรา *Rhizopus* spp. โดยดูการเปลี่ยนสีของ Bromocresol purple จากสีน้ำตาลเป็นสีเหลือง แสดงถึงการ สร้างกรด เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

3.4 ผลการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้

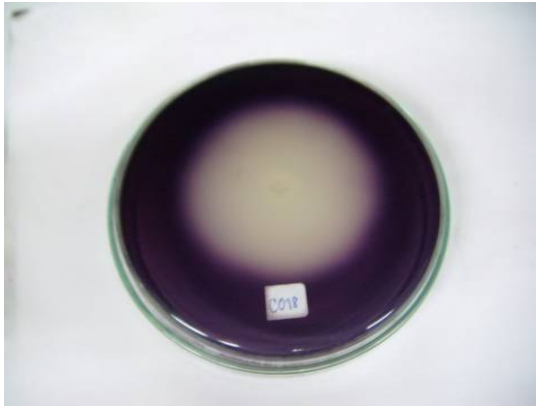
ผลการเพาะเลี้ยงเชื้อราทั้งหมด 112 ไอโซเลท บนอาหาร cassava starch agar และตรวจสอบความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลัง โดยวัดไอโอดีน และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อรา พบว่าเชื้อราทั้งหมดสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ โดยมีค่า EPR ตั้งแต่ 0.58-1.58 และพบว่าเชื้อรารหัส C18, C019, C021, C032, และ C035 มีอัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี และวงใสต่อเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีมากกว่าไอโซเลทอื่นๆ คือ 1.58, 1.46, 1.21, 1.38 และ 1.55 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4 และรูปที่ 10

ตารางที่ 4 จำนวนเชื้อราที่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้

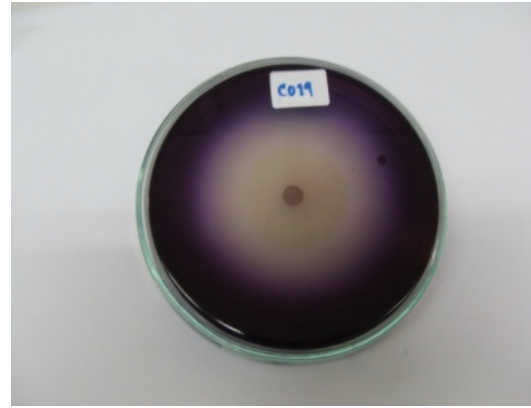
รหัสเชื้อ	แยกจากตัวอย่าง	เส้นผ่านศูนย์กลาง ของโคโลนีและวงใส (ซม.)	เส้นผ่านศูนย์กลาง ของโคโลนีเชื้อรา (ซม.)	ค่า EPR
<i>R.oryzae</i>	สายพันธุ์	3.85	3.27	1.17 (medium)
TISTR 3535	เปรียบเทียบ			
C018	มันสำปะหลัง	6.55	4.15	1.58 (medium)
C019	มันสำปะหลัง	5.95	4.05	1.46 (medium)
C021	มันสำปะหลัง	6.27	5.15	1.21 (medium)
C032	มันสำปะหลัง	5.87	4.25	1.38 (medium)
C035	มันสำปะหลัง	4.70	3.75	1.55 (medium)

หมายเหตุ

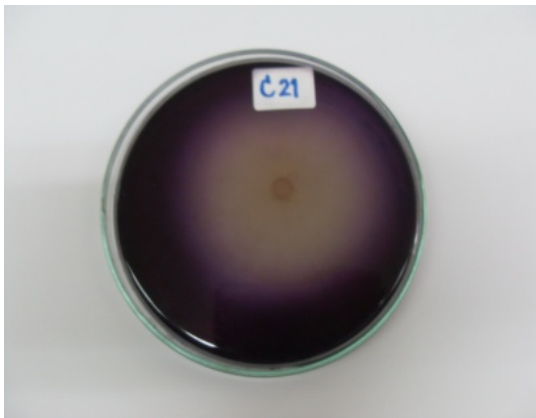
- Strong reaction: >2 cm.
- Medium reaction: >1-<2 cm.
- Weak reaction: < 1 cm.



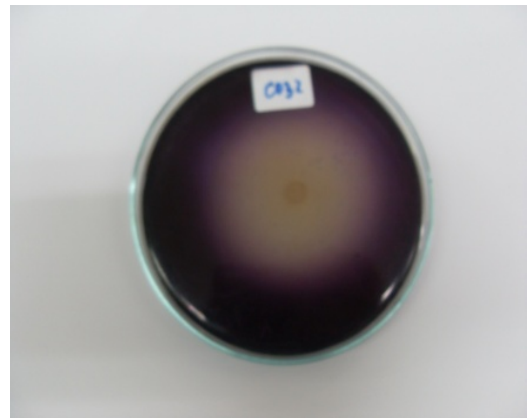
ก. C018



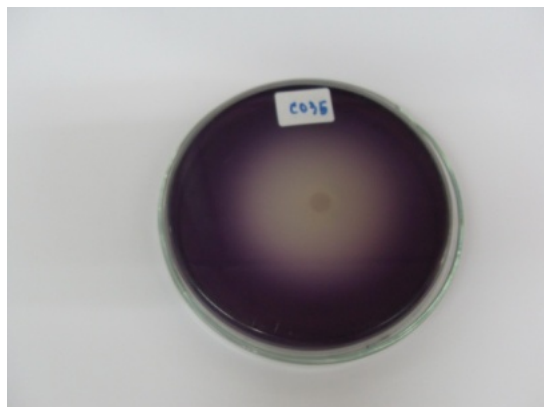
ข. C019



ค. C021



ง. C032



จ. C035

รูปที่ 10 การย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อรา *Rhizopus* spp.

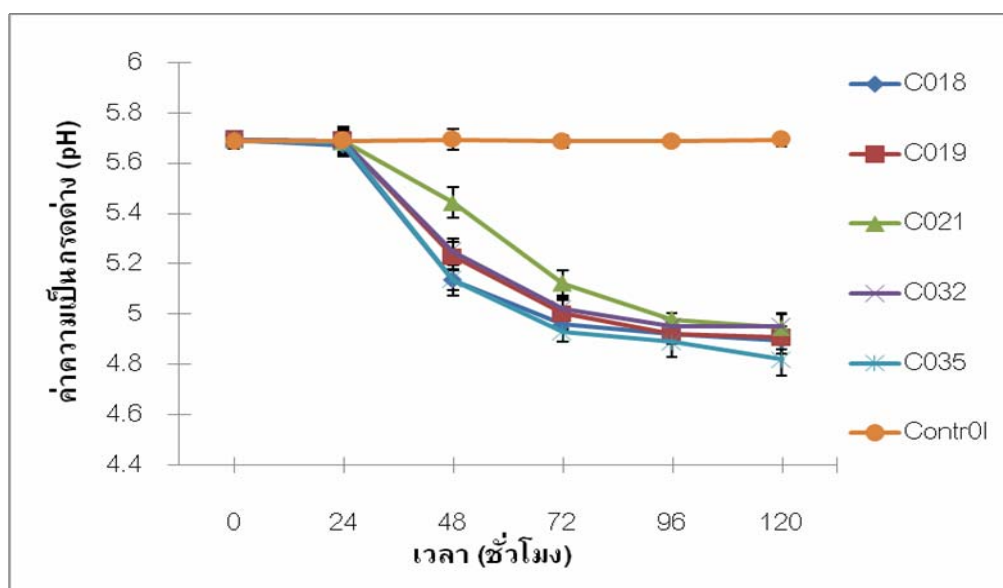
จากเชื้อราทั้งหมดที่แยกได้ ทำการคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการสร้างกรดและย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ดีที่สุด จำนวน 5 ไอโซเลท ได้แก่ C018, C019, C021, C032, C035 โดยเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถสร้างกรดได้ในระดับดี และสามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ในระดับปานกลาง เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.5 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก โดยวิธีการหมักแบบแข็งของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท

จากผลการคัดเลือกเชื้อราที่สามารถผลิตกรดและเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลัง พบว่า เชื้อรา *Rhizopus spp.* ไอโซเลท C018, C019, C021, C032, C035 สามารถสร้างกรดและเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังได้จึงได้นำเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลทไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกโดยวิธีการหมักแบบแข็ง และวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ดังต่อไปนี้

3.5.1 ผลการศึกษาการลดลงของค่าความเป็นกรดต่าง (pH)

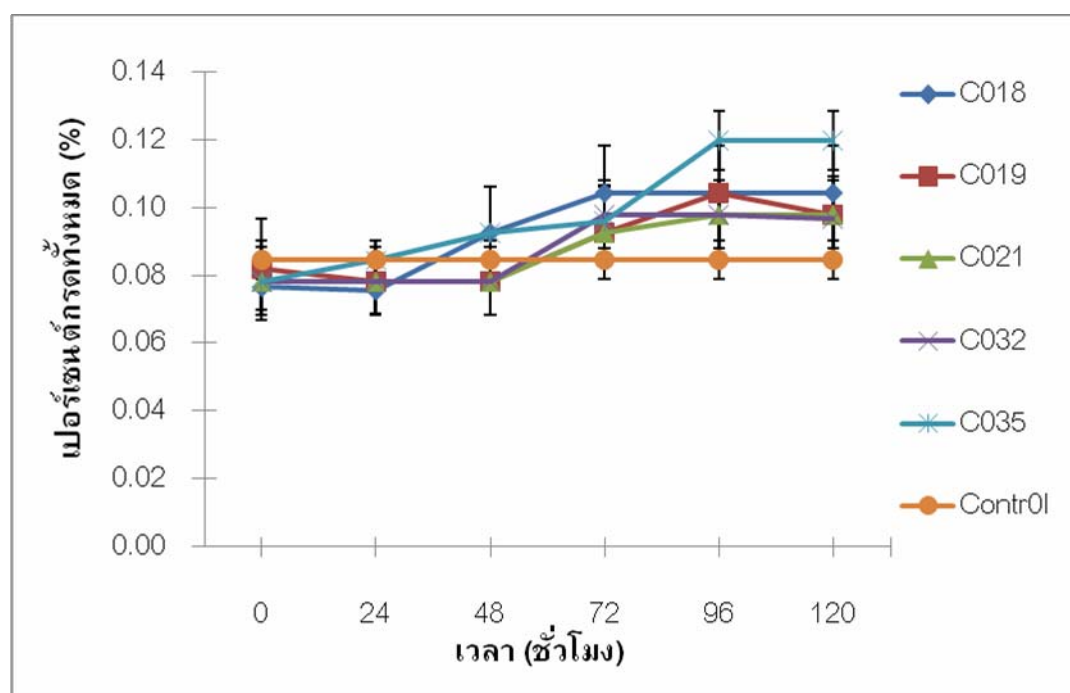
จากการนำเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท ที่คัดเลือกได้มาทดลองหมักแบบแข็งในพลาสติก โดยเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชม. มาวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) พบว่า ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นของทุกไอโซเลท รวมทั้งชุดควบคุม มีค่า 5.69 ในชั่วโมงที่ 0 และเริ่มลดลงในชั่วโมงที่ 48 และมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ ตามระยะเวลาที่ผ่านไป และที่ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมงพบว่าไอโซเลท C035 มีค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ 4.82 ซึ่งลดลงมากกว่าไอโซเลทอื่นๆ ส่วนชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) มีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดการหมักแสดงดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่ได้จากการหมักแบบแข็งของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท

3.5.1 ผลของปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากการหมัก

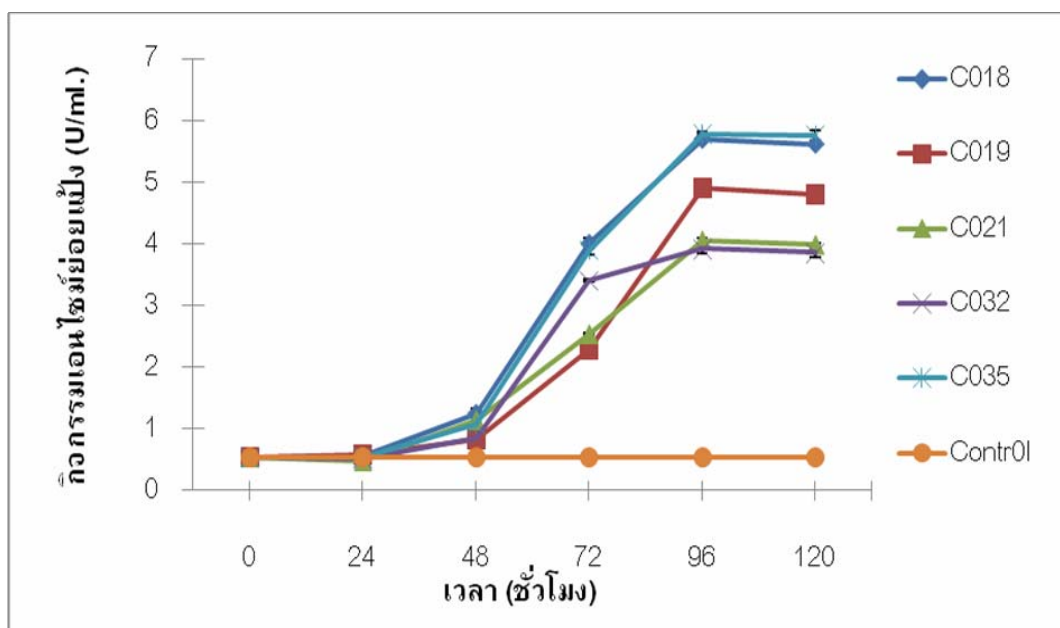
ปริมาณกรดทั้งหมดซึ่งวิเคราะห์ด้วยการไทเทรต (Titration) ของทุกไอโซเลท รวมทั้งชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) มีค่าใกล้เคียงกันในระยะ 24 ชั่วโมงแรก คือ อยู่ที่ประมาณ 0.08% เริ่มเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 48 และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ผ่านมา และที่ระยะเวลากการหมัก 120 ชั่วโมง พบว่า ไอโซเลท C035 ให้ค่าปริมาณกรดสูงสุดที่สุด คือ 0.12% ซึ่งสูงกว่าไอโซเลทอื่นๆ ส่วนชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) มีค่าคงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก แสดงดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 ปริมาณกรดทั้งหมด (%) ที่ได้จากการหมักแบบแข็งของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท

3.5.2 ผลของกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase)

กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ของทุกไอโซเลทรวมทั้งชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) มีค่าคงที่ คือ 0.54 u/ml ในระยะ 24 ชั่วโมงแรกของการหมัก และมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์อยู่ระหว่าง 3.92-5.79 u/ml โดยเริ่มเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 48 และมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 และมีแนวโน้มคงที่ในชั่วโมงที่ 120 ส่วนชุดควบคุมมีค่าคงที่อยู่ที่ 0.54 u/ml ตลอดการหมัก และพบว่าไอโซเลท C018 และ C035 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด คือ 5.70 u/ml และ 5.79 u/ml ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันมากตลอดการหมัก แสดงดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α – amylase) ที่ได้จากการหมักแบบแข็งของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท

3.5.2 ผลของปริมาณกรดแลกติก

ผลของปริมาณกรดแลกติกของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท โดยเก็บตัวอย่างที่อายุการหมัก 120 ชั่วโมง วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Reflectometer RQflec10 Merck Germany ให้ผล ดังนี้ C018, C019, C021, C032 และ C035 เท่ากับ 12.10, 0.70, 0.82, 2.31 และ 13.00 mg/g ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ปริมาณกรดแลกติก ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Reflectometer RQflec 10 Merck Germany และปริมาณกรดทั้งหมด ของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท

	เชื้อรา					
	C018	C019	C021	C032	C035	control
ปริมาณกรดแลกติก (mg/g)	12.10 ± 0.09	0.70 ± 0.09	0.82 ± 0.09	2.31 ± 0.09	13.00 ± 0.17	0.05 ± 0.01
ปริมาณกรดทั้งหมด (%) (จากรูปที่ 12)	0.010 ± 0.01	0.010 ± 0.01	0.010 ± 0.01	0.010 ± 0.01	0.012 ± 0.01	0.08 ± 0.01

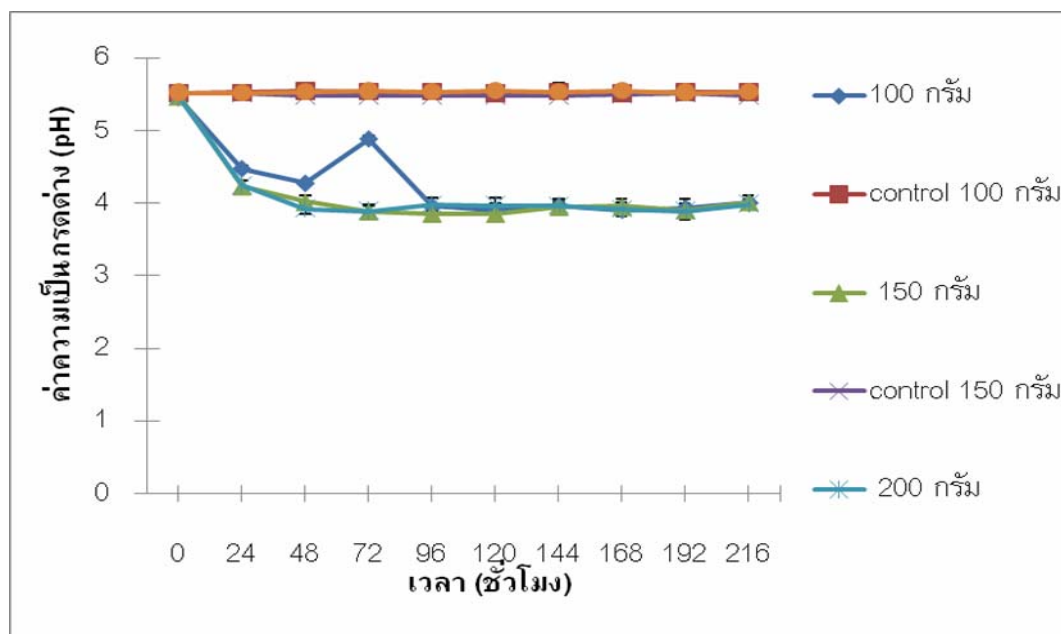
3.6 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก โดยวิธีการหมักแบบแข็งของเชื้อราที่คัดเลือกได้

ผลการคัดเลือกเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท พบว่าไอโซเลท C035 ให้ผลการศึกษาดีที่สุดในทุกพารามิเตอร์ โดยให้ค่าความเป็นกรดต่าง (pH), ปริมาณกรดทั้งหมด เท่ากับ 4.82 และ 0.12% ในชั่วโมงที่ 120 ตามลำดับ และกิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้งสูงสุด เท่ากับ 5.79 U/ml ในชั่วโมงที่ 96 และให้ปริมาณกรดแลกติก เท่ากับ 13 mg/g จึงได้คัดเลือกเชื้อราไอโซเลทนี้มาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตให้ได้กรดแลกติกในปริมาณที่สูงขึ้นต่อไป

3.6.1 ผลการศึกษาปริมาณแป้งนึ่งสำหรับเริ่มต้นที่เหมาะสม

3.6.1.1 ผลการศึกษาการลดลงของค่าความเป็นกรดต่าง (pH)

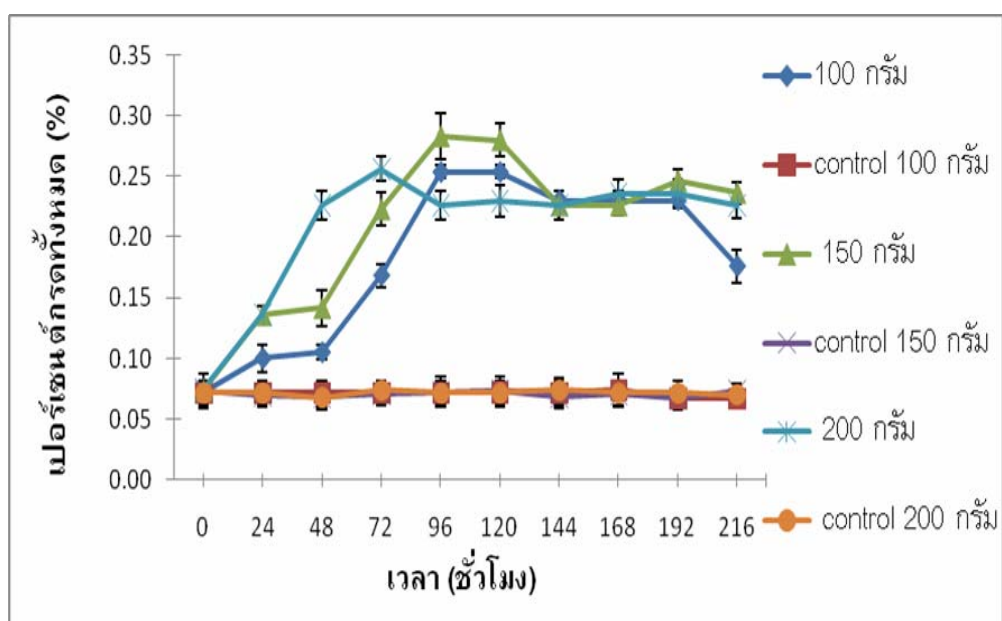
ผลการวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH) พบว่าที่ปริมาณแป้งนึ่งสำหรับเริ่มต้น 150 g/kg ลดลงมากที่สุด คือ จาก 5.48 ในชั่วโมงที่ 0 เป็น 3.85 ในชั่วโมงที่ 96 และ 120 ส่วนชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) มีค่าคงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก คือ 5.51-5.55 ของทุกการทดลอง ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลท C035 ที่ปริมาณแป้งนึ่งสำหรับเริ่มต้น 100, 150 และ 200 กรัม

3.6.1.2 ผลของปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากการหมัก

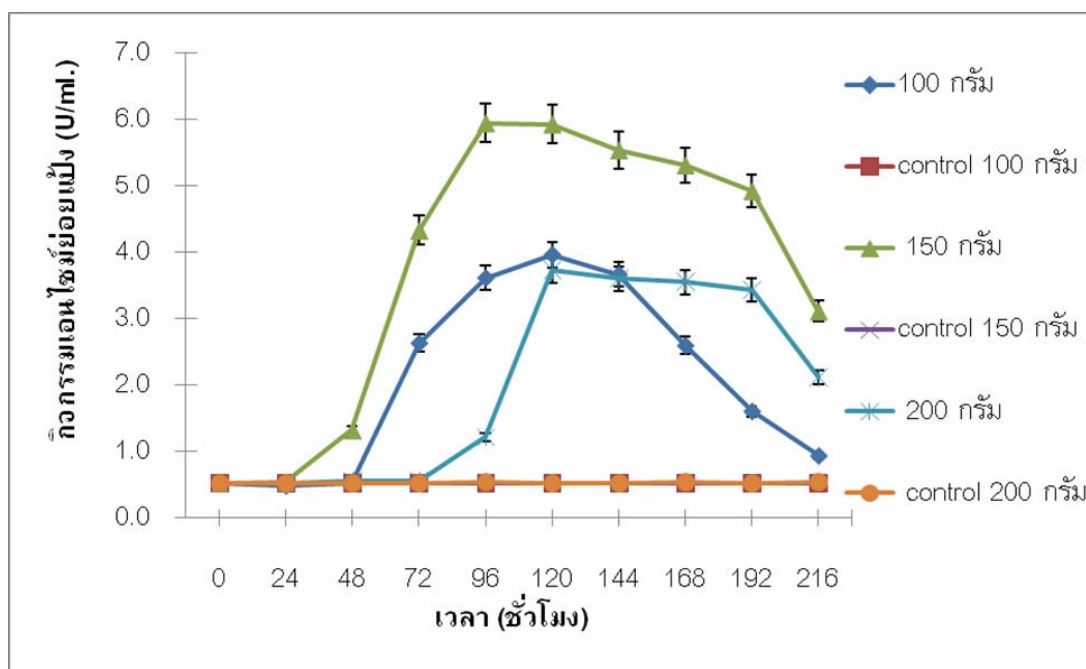
ปริมาณกรดทั้งหมด ซึ่งวิเคราะห์ด้วยการไทเทรท (Titration) พบว่าที่ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 150 กรัม ให้ปริมาณกรดสูงสุด เท่ากับ 0.28% ในชั่วโมงที่ 96 และ 120 ส่วนปริมาณแป้งที่ 100 และ 200 กรัม ให้ปริมาณกรด เท่ากับ 0.25 % และ 0.23 % ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 96 และ 120 เช่นกัน ส่วนชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) มีค่าคงที่อยู่ที่ 0.07% ของทุกการทดลอง ตลอดระยะเวลาการหมัก ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 15



รูปที่ 15 ปริมาณกรดทั้งหมด (%) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลท C035 ที่ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้น 100, 150 และ 200 กรัม

3.6.1.3 ผลของกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase)

กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) พบว่าที่ปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 150 กรัม ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 5.95 U/ml ในชั่วโมงที่ 96 และมีแนวโน้มลดลง ส่วนปริมาณแป้ง 100 และ 200 กรัม ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 3.96 u/ml และ 3.72 u/ml ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 120 และมีแนวโน้มลดลง ในช่วงการหมักที่เหลือ ส่วนชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) มีค่าคงที่อยู่ที่ 0.52 u/ml ตลอดการหมัก ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 16



รูปที่ 16 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus* spp. ไอโซเลท C035 ที่ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้น 100, 150 และ 200 กรัม

3.6.1.4 ผลของปริมาณกรดแลกติก

ปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากการหมักด้วยปริมาณแป้งมันสำปะหลัง เริ่มต้น 100, 150 และ 200 กรัม จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Reflectometer RQflec10 Merck Germany พบว่า ที่ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้น 150 กรัม ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด เท่ากับ 13.82 mg/g ในชั่วโมงที่ 120 ผลแสดงดังตารางที่ 6

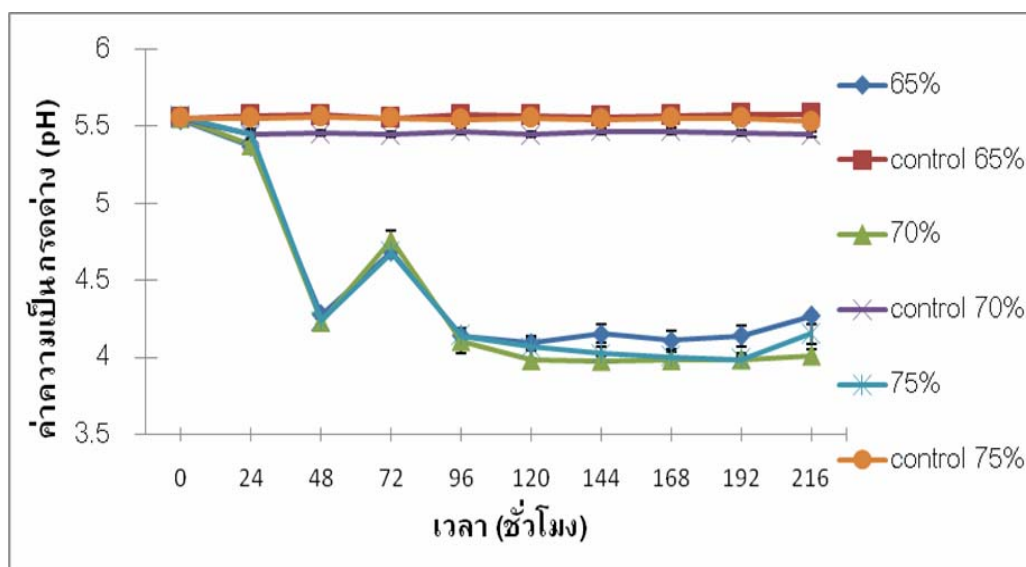
ตารางที่ 6 ปริมาณกรดแลกติก ซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Reflectometer RQflec 10 Merck Germany และปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลท C035 ที่ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้น 100, 150 และ 200 กรัม

	ปริมาณแป้งเริ่มต้น			
	100 (g)	150 (g)	200 (g)	control
ปริมาณกรดแลกติก (mg/g)	10.29 ± 0.10	13.82 ± 0.11	10.12 ± 0.12	0.052 ± 0.01
ปริมาณกรดทั้งหมด (%) (รูปที่ 15)	0.25 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.07 ± 0.01

3.6.2 ผลการศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสม

3.6.2.1 ผลการลดลงของค่าความเป็นกรดต่าง (pH)

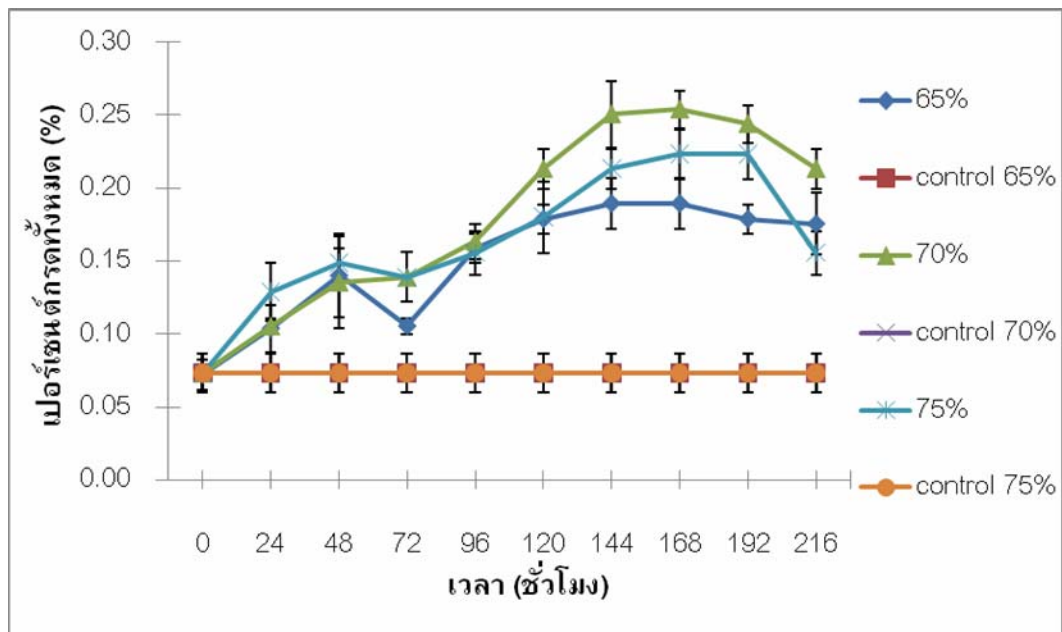
ผลการวัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH) พบว่าที่ความชื้นเริ่มต้น 70% ลดลงจาก 5.55 ในชั่วโมงที่ 0 เป็น 3.98 ในชั่วโมงที่ 120 ซึ่งลดลงมากกว่าค่าความชื้นเริ่มต้นอื่น ๆ ส่วนชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) ค่าความเป็นกรดต่าง อยู่ที่ 5.55-5.58 ตลอดการทดลอง ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 17



รูปที่ 17 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลท C035 ที่ความชื้นเริ่มต้น 65%, 70% และ 75%

3.6.2.2 ผลของปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากการหมัก

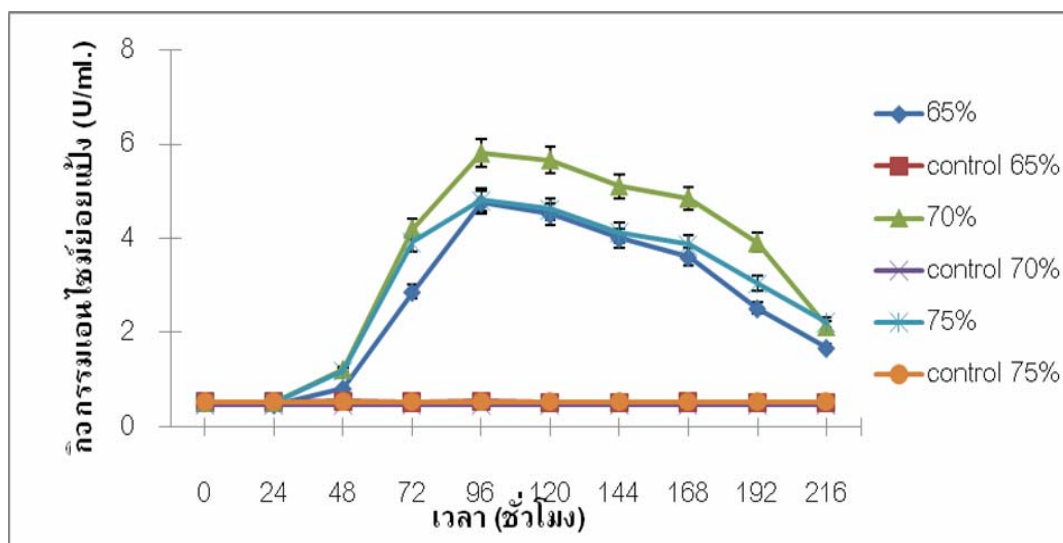
ปริมาณกรดทั้งหมด ซึ่งวิเคราะห์ด้วยการไทเทรต (Titration) พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันในระยะ 24 ชั่วโมงแรกของทุกความชื้น คืออยู่ที่ประมาณ 0.11% และเริ่มเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 48 และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ผ่านไป และความชื้นเริ่มต้น 70% ที่ระยะเวลาการหมัก 144 ชั่วโมงให้ค่าปริมาณกรดสูงที่สุด คือ 0.25% ซึ่งสูงกว่าค่าความชื้นเริ่มต้นอื่น ส่วนชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) ของทุกความชื้น มีค่าคงที่ตลอดการหมักอยู่ที่ 0.07% ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 18



รูปที่ 18 ปริมาณกรดทั้งหมด (%) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลท C035 ที่ความชื้นเริ่มต้น 65%, 70% และ 75%

3.6.2.3 ผลของกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase)

กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) พบว่าที่ความชื้นเริ่มต้น 70% ซึ่งให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ดีที่สุด โดยเริ่มเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งเท่ากับ 1.23 u/ml และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น จนมีค่าสูงสุดในชั่วโมง ที่ 96 ซึ่งเท่ากับ 5.82 u/ml และมีแนวโน้มลดลง ในช่วงเวลาที่เหลือ และที่ความชื้นเริ่มต้น 65 % และ 75% ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในชั่วโมงที่ 96 มีค่าเท่ากับ 4.76 u/ml และ 4.81 u/ml ในชั่วโมงที่ 96 ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) ของแต่ละความชื้น มีค่าคงที่อยู่ที่ 0.53-0.55 u/ml ตลอดการหมัก ผลการทดลองแสดงรูปที่ 19



รูปที่ 19 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α -amylase) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลท C035 ที่ความชื้นเริ่มต้น 65%, 70% และ 75%

3.6.2.3 ผลของปริมาณกรดแลกติก

ปริมาณกรดแลกติก จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Reflectometer RQflec10 Merck Germany พบว่าที่ความชื้นเริ่มต้น 70% ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด เท่ากับ 13.5 mg/g ในชั่วโมงที่ 144 และมีค่าใกล้เคียงกับความชื้นเริ่มต้น 75% (13.0 mg/g) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 7

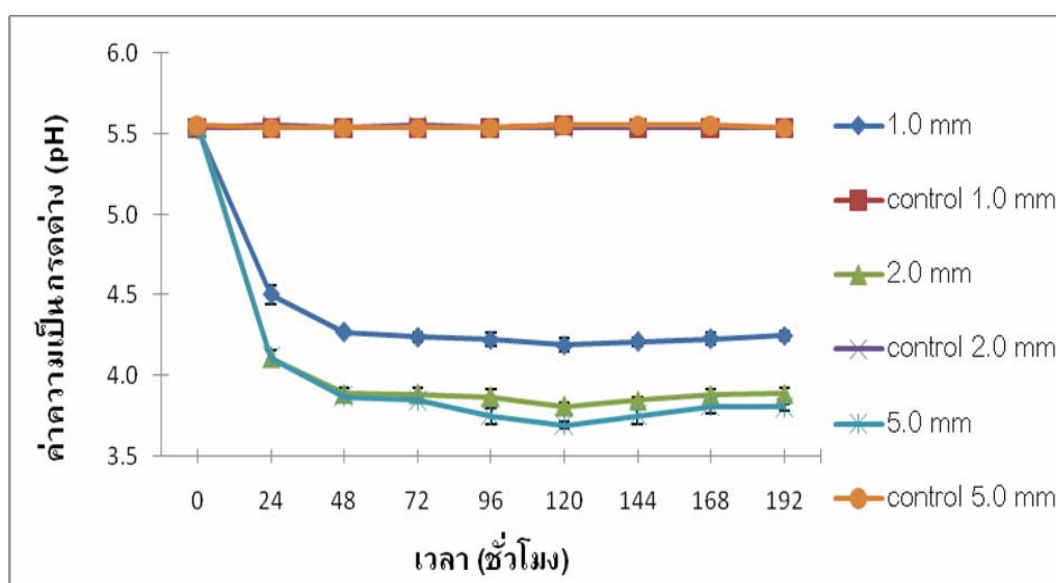
ตารางที่ 7 ปริมาณกรดแลกติกซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Reflectometer RQflec 10 Merck Germany และปริมาณกรดทั้งหมด ที่ได้จากเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลท C035 ที่ ความชื้นเริ่มต้น 65%, 70% และ 75%

	ความชื้นเริ่มต้น			
	65%	70%	75%	control
ปริมาณกรดแลกติก (mg/g)	12.10 ± 0.10	13.50 ± 0.02	13.00 ± 0.15	0.05 ± 0.02
ปริมาณกรดทั้งหมด (%) (รูปที่ 18)	0.019 ± 0.02	0.025 ± 0.02	0.022 ± 0.02	0.07 ± 0.01

3.6.3 ผลการศึกษาขนาดอนุภาคของวัสดุหมักที่เหมาะสม

3.6.3.1 ผลการศึกษาการลดลงของค่าความเป็นกรดต่าง (pH)

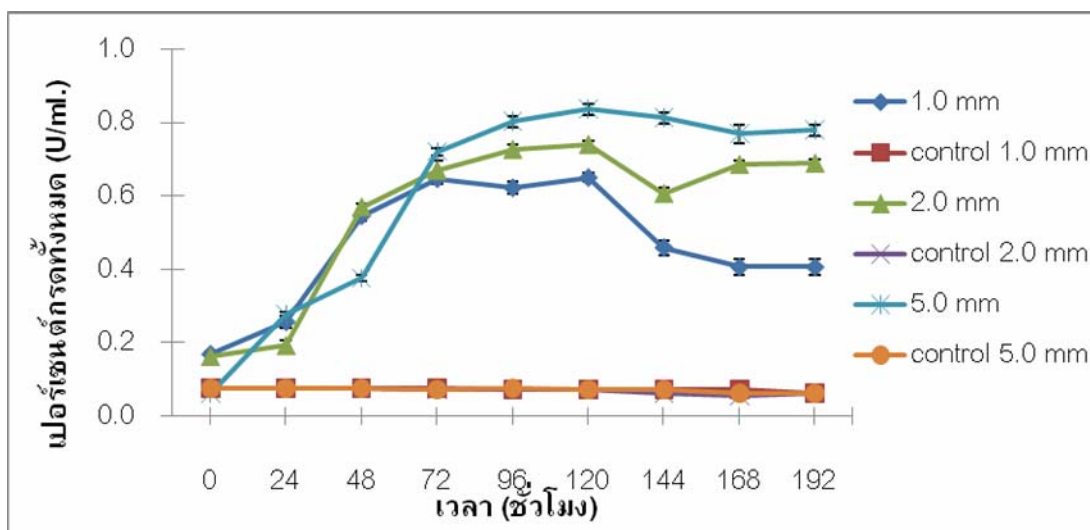
ผลการวัดค่าความเป็นกรดต่าง พบว่าที่ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 5.0 มิลลิเมตร ลดลงจาก 5.54 ในชั่วโมงที่ 0 เป็น 4.11 ในชั่วโมงที่ 24 จากนั้นจะลดลงเรื่อยๆ จนถึง ชั่วโมงที่ 120 ค่าความเป็นกรดต่างลดลงต่ำสุด เท่ากับ 3.71 ซึ่งลดลงมากกว่าขนาดอนุภาคของ วัสดุหมักที่เหลือ โดยที่ขนาดอนุภาควัสดุหมัก 1.0 และ 2.0 มิลลิเมตร ค่าความเป็นกรดต่างลดลง ต่ำสุดเท่ากับ 4.19 และ 3.81 ตามลำดับที่เวลา 120 ชั่วโมง ส่วนชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) ของแต่ละอนุภาค มีค่าคงที่คือ อยู่ที่ 5.53-5.55 ของทุกการทดลอง ตลอดระยะเวลาการหมัก ผลการทดลอง แสดงดังตารางที่ และรูปที่ 20



รูปที่ 20 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลท C035 ที่ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 1.0, 2.0, และ 5.0 มิลลิเมตร

3.6.3.2 ผลของปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากการหมัก

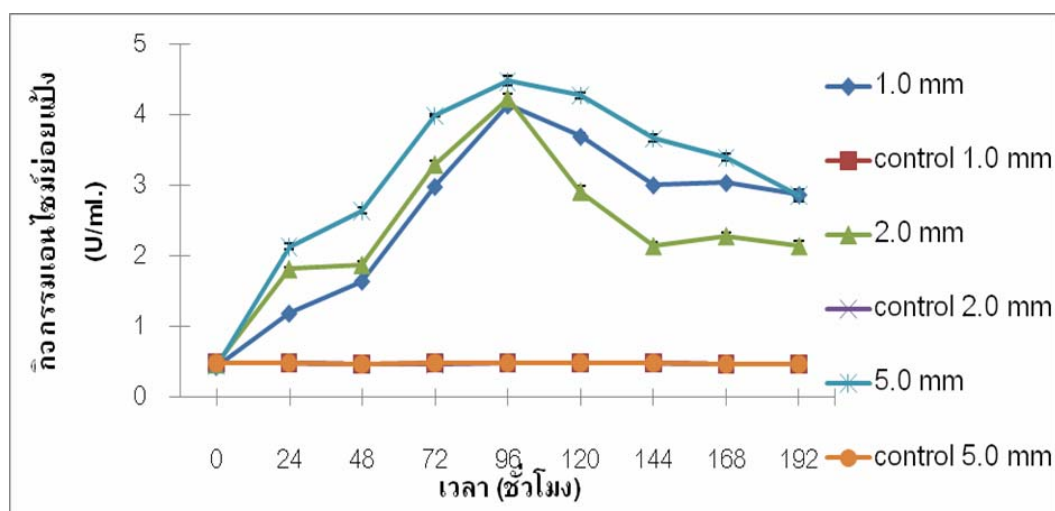
ปริมาณกรดทั้งหมด ซึ่งวิเคราะห์ด้วยการไทเทรต (Titration) พบว่าที่ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 5.0 มิลลิเมตรให้ปริมาณกรดสูงสุดเท่ากับ 0.84% ในชั่วโมงที่ 120 ส่วนขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 1.0 และ 2.0 มิลลิเมตรให้ปริมาณกรด เท่ากับ 0.65% และ 0.74% ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 120 เช่นกัน ส่วนชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) มีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 21



รูปที่ 21 ปริมาณกรดทั้งหมด (%) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลท C035 ที่ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 1.0, 2.0, และ 5.0 มิลลิเมตร

3.6.3.3 ผลของกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase)

กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) พบว่าที่ขนาดอนุภาควัสดุหมัก 5.0 มิลลิเมตรให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์ดีที่สุดในชั่วโมงที่ 24 ซึ่งเท่ากับ 2.10 u/ml และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 ซึ่งเท่ากับ 4.48 u/ml และมีแนวโน้มลดลง ในช่วงเวลาที่เหลือ และที่ขนาดอนุภาควัสดุหมัก 1.0 และ 2.0 มิลลิเมตรให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 4.14 u/ml และ 4.23 u/ml ในชั่วโมงที่ 96 ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุม (ไม่เติมเชื้อ) มีค่าค่อนข้างคงที่อยู่ที่ 0.45-0.48 u/ml ตลอดการหมัก ผลการทดลองแสดงรูปที่ 22



รูปที่ 22 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α -amylase) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลท C035 ที่ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 1.0, 2.0, และ 5.0 มิลลิเมตร

3.6.3.4 ผลของปริมาณกรดแลกติก

ปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากการหมักด้วยขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 1.0, 2.0, และ 5.0 มิลลิเมตร ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Reflectometer RQflec 10 Merck Germany พบว่าที่ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 5.0 มิลลิเมตร ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด เท่ากับ 16.00 mg/g แสดงดังตารางที่ 3.7

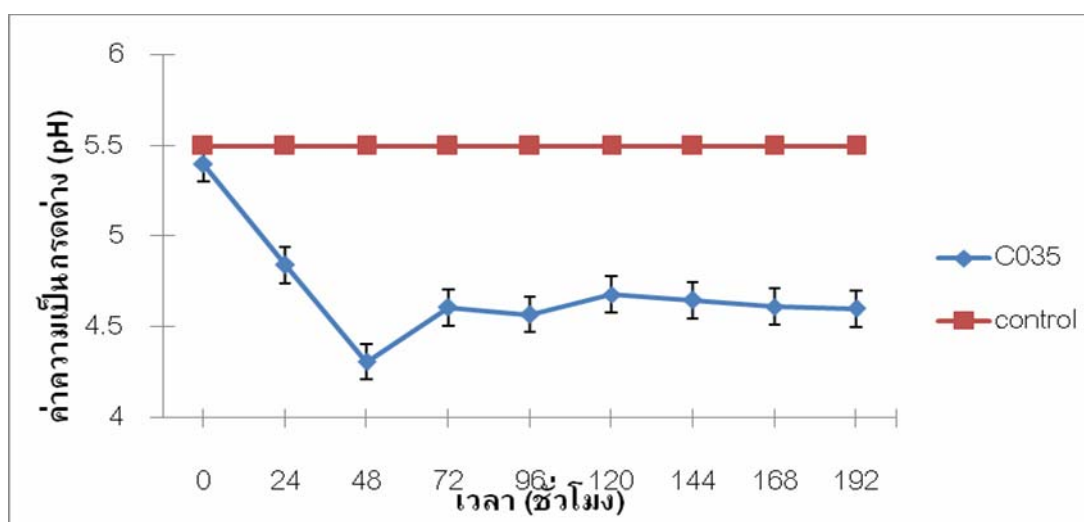
ตารางที่ 8 ปริมาณกรดแลกติกซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Reflectometer RQflec 10 Merck Germany และปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากเชื้อรา *Rhizopus sp.* ไอโซเลท C035 ที่ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 1.0, 2.0, และ 5.0 มิลลิเมตร

	ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก			
	1.0 mm	2.0 mm	5.0 mm	control
ปริมาณกรดแลกติก (mg/g)	9.05 ± 0.09	15.73 ± 0.29	16.00 ± 0.20	0.09 ± 0.01
ปริมาณกรดทั้งหมด (%) (รูปที่ 21)	0.65 ± 0.01	0.65 ± 0.01	0.83 ± 0.01	0.07 ± 0.01

3.6.4 ผลการทดลองหมักในถุงพลาสติกทนร้อน

3.6.4.1 ผลการศึกษาการลดลงของค่าความเป็นกรดต่าง (pH)

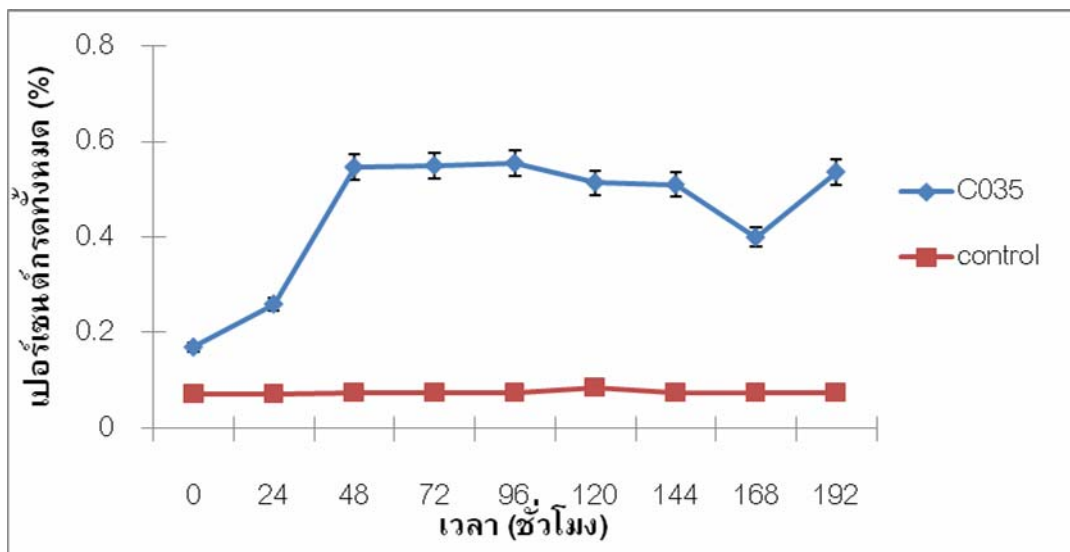
ผลการวัดค่าความเป็นกรดต่าง พบว่ามีค่าลดลงจาก 5.4 ในชั่วโมงที่ 0 เป็น 4.31 ในชั่วโมงที่ 48 ส่วนชุดควบคุมค่าความเป็นกรดต่างอยู่ที่ 5.5 ตลอดระยะเวลาการหมัก ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 23



รูปที่ 23 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus sp.* ไอโซเลท C035 ในถุงพลาสติกทนร้อน

3.6.4.2 ผลของปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากการหมัก

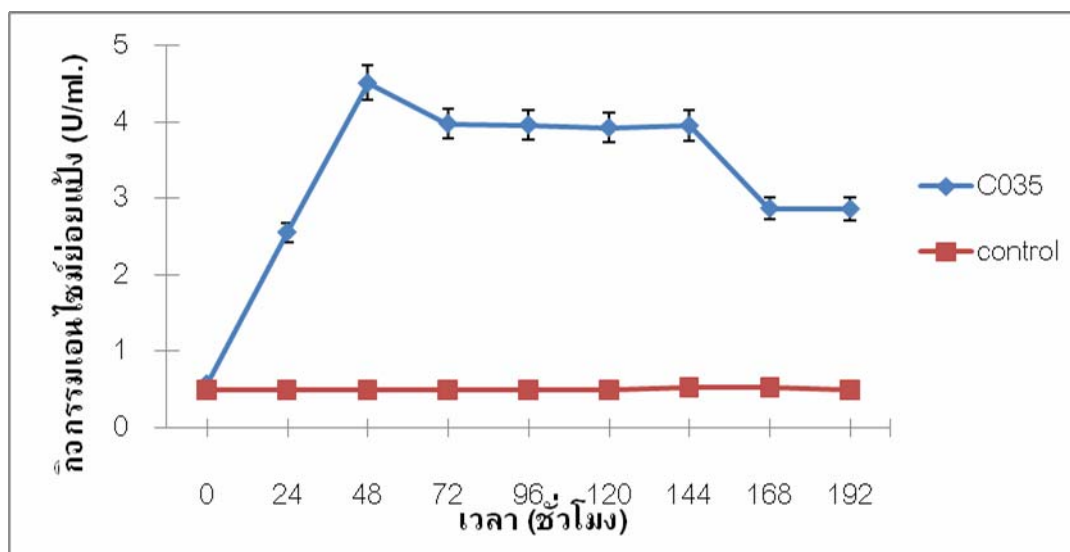
ปริมาณกรดทั้งหมดซึ่งวิเคราะห์ด้วยการไทเทรต (Titration) พบว่า ปริมาณของกรดจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 เท่ากับ 0.17% และเพิ่มสูงสุด เท่ากับ 0.55% ในชั่วโมงที่ 48 หลังจากนั้นจะมีค่าคงที่ และเริ่มลดลงในชั่วโมงที่ 120 ส่วนชุดควบคุม มีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการหมักผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 24



รูปที่ 24 ปริมาณกรดทั้งหมด (%) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลต C035 ในถุงพลาสติกทนร้อน

3.6.4.3 ผลของกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase)

กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์เริ่มเพิ่มขึ้นจาก 0.57 U/ml ในชั่วโมงที่ 0 เป็น 2.56 u/ml ในชั่วโมงที่ 24 และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจนมีค่าสูงสุดในชั่วโมง ที่ 48 ซึ่งเท่ากับ 4.51 u/ml และมีแนวโน้มลดลง ในช่วงเวลาที่เหลือ ส่วนชุดควบคุมมีค่าค่อนข้างคงที่อยู่ที่ 0.5 u/ml ตลอดการหมัก ผลการทดลองแสดงรูปที่ 25



รูปที่ 25 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus* ไอโซเลท C035 ในถุงพลาสติกทนร้อน

3.6.4.5 ผลของปริมาณกรดแลกติก

ปริมาณกรดแลกติก จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Reflectometer RQflec 10 Merck Germany พบว่าให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด เท่ากับ 57.60 mg/g ผลแสดงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ปริมาณกรดแลกติกซึ่งวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Reflectometer RQflec 10 Merck Germany และปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลท C035 ในถุงพลาสติกทนร้อน

	เชื้อรา	
	<i>Rhizopus</i> sp. ไอโซเลท C035	control
ปริมาณกรดแลกติก (mg/g)	57.60 \pm 0.23	0.096 \pm 0.01
ปริมาณกรดทั้งหมด (%) (รูปที่ 24)	0.55 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษา เพื่อแยกเชื้อราและนำมาหมักให้ได้กรดแลกติก ด้วยวิธีการหมักแบบแข็ง (solid state fermentation) โดยใช้วัตถุดิบและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจากการนำตัวอย่าง กาก เปลือกและรำมันสำปะหลัง รวมทั้งดินจำนวน 36 ตัวอย่าง นำมาแยกเชื้อรา โดยเชื้อราเป้าหมายที่ต้องการแยก คือ เชื้อราในกลุ่ม *Rhizopus* spp. ซึ่งได้จำนวน 112 ไอโซเลท ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง macroscopic และ microscopic morphology เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา *Rhizopus oryzae* TISTR 3535 พบว่าทั้ง 112 ไอโซเลทสามารถจัดจำแนกได้เป็น *Rhizopus* spp. โดยเชื้อราสกุลนี้มีลักษณะของโคโลนี คือ เส้นใยขาวฟู สปอร์มีสีดำน้ำตาล เจริญได้รวดเร็วภายใน 18-24 ชั่วโมง และจากการทำ slide culture พบลักษณะเส้นใยเป็นแบบไม่มีผนังกัน และพบ rhizoid ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อราสกุลนี้ สีของเส้นใยเป็นแบบไม่มีสี ชนิดของ asexual spore เป็นแบบ sporangiospore และมีรายงานว่าเชื้อราในสกุลนี้ โดยเฉพาะ *Rhizopus oryzae* มีความสามารถในการผลิตกรดแลกติกเพื่อการค้าได้เป็นอย่างดี เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ทั้งชนิด extra และ intra cellular enzymes ได้หลากหลายชนิด เช่น cellulose, hemicellulase, pectinase, amylase, lipase, protease และเอนไซม์อื่นๆ อีกหลายชนิดที่ถูกผลิตออกมาเป็นการค้า (Ghosh and Ray, 2011) และมีรายงานว่าพบเอนไซม์ Lactate dehydrogenase ในเชื้อรา *Rhizopus oryzae* (Skory, 2000; Hakki and Akkaya, 2001) Lockwood (1979) ได้รายงานว่า เชื้อรา *Rhizopus* spp. สามารถที่จะผลิตกรดแลกติกในรูปแอล (L-lactic acid) ได้ในปริมาณที่มีความเข้มข้นสูง นอกจากนี้เชื้อราสกุล *Rhizopus* spp. เช่น *Rhizopus oryzae*, *R. arrhizus* มีเอนไซม์ amylolytic enzyme ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นกรดแลกติกได้โดยตรง (Hang, 1989; Yu and Hang, 1989; Wee, et al., 2006) และการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อราที่มีข้อได้เปรียบ คือ เชื้อราต้องการสารอาหารอย่างง่าย และเป็นพวกต้องการอากาศอย่างมาก การเพาะเลี้ยงจึงต้องให้อากาศอย่างเต็มที่ (Tay and Yang, 2002) และจากวัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้คือต้องการคัดแยกเชื้อราในสกุลนี้ เพื่อนำไปผลิตกรดแลกติกซึ่งมีรายงานวิจัยออกมาว่า มีการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อราในสกุลนี้หลายรายงาน (Soccol et al., 1994; Naranong and Poocharoen, 2001; Zhang et al., 2007)

ผลการคัดเลือกเชื้อราทั้ง 112 ไอโซเลท โดยศึกษาความสามารถในการสร้างกรดและการย่อยแป้งมันสำปะหลัง พบว่า มีเชื้อรา จำนวน 5 ไอโซเลท คือ C018, C019, C021, C032 และ C035 ให้ผลการทดลองดีที่สุดจึงได้นำ 5 ไอโซเลท มาศึกษาการหมักให้ได้กรดแลกติกในสภาวะการหมักแบบแข็งเพื่อคัดเลือกเพียงหนึ่งไอโซเลท ผลการศึกษา พบว่า ไอโซเลท C035 ให้ผลการศึกษาที่ดีที่สุด โดยให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดของการศึกษาครั้งนี้ จึงได้นำไอโซเลท

C035 มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด ผลการศึกษา พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากการหมักแบบแข็งโดยเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลท C035 ในครั้งนี้ ให้ปริมาณกรดแลกติกที่น้อยกว่าการหมักแบบเปียก โดยเมื่อเทียบกับรายงานของ Naranong และ Poocharoen (2001) ซึ่งศึกษาการผลิตกรดแลกติก จากแป้งมันสำปะหลังดิบที่ผลิต โดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ด้วยวิธีการหมักแบบ shake flasks ซึ่งเป็นวิธีการหมักแบบเปียก ได้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด เท่ากับ 68.32 g/l ในวันที่ 5 ของการหมัก ในขณะที่ Yin และคณะ (1997) รายงานว่าการผลิตกรดแลกติกจากแป้งข้าวโพดโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ด้วยวิธีการหมักแบบ air-lift bioreactor ซึ่งเป็นวิธีการหมักแบบเปียกเช่นกัน ให้ปริมาณกรดแลกติก เท่ากับ 82 g/l ในวันที่ 4 ของการหมัก และจากรายงานของ Jin และคณะ (2003) ซึ่งศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus arrhizus* strain DAR 36017 โดยใช้ของเสียที่เป็นแป้งชนิดต่างๆ พบว่าให้ปริมาณกรดแลกติกอยู่ระหว่าง 19.5-44.3 g/l ในเวลา 40 ชั่วโมงขณะที่ธัญมิ และคณะ (2551) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* KPS 106 ในถังหมักแบบลอยตัว พบว่าให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด เท่ากับ 89.87 g/l ที่เวลา 96 ชั่วโมง ส่วนสุทธาสินี (2545) ได้ศึกษาการพัฒนากระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดแอล (+)-แลกติก จากแป้งมันสำปะหลังด้วยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ในการเพาะเลี้ยงแบบอาหารเหลว ซึ่งให้ปริมาณกรดแลกติก เท่ากับ 95.6 g/l ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับรายงานของวิเชียร และคณะ (2544) ซึ่งได้ศึกษาองค์ประกอบของอาหาร ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกระดับ ฟลาสก์จากแป้งมันสำปะหลังจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* DMKU12 ซึ่งให้ผลผลิตกรดแลกติก เท่ากับ 100 g/l ซึ่งจากที่กล่าวมาทั้งหมด เป็นการหมักให้ได้กรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* และเป็นการหมักแบบเปียกทั้งหมด ซึ่งปริมาณกรดแลกติกที่ได้ มีค่าใกล้เคียงกัน คือ อยู่ระหว่าง 68-100 g/l

ส่วนผลของการศึกษาในครั้งนี้ เป็นการทดลองหมักในสภาวะการหมักแบบแข็ง ซึ่งให้ปริมาณกรดแลกติกเท่ากับ 57.60 mg/g ซึ่งค่อนข้างน้อย เนื่องจากข้อจำกัดของการหมักแบบแข็ง ซึ่งไม่สามารถที่จะกวนเพื่อเพิ่มอากาศได้ ซึ่งออกซิเจนเป็นสิ่งจำเป็นต่อการเจริญของเชื้อรา (Oda, et al., 2002) การผสมกันระหว่างเชื้อรา และวัสดุหมักอาจจะไม่ทั่วถึง ทำให้เชื้อราได้รับอากาศน้อย ทำให้เจริญเติบโต และใช้วัสดุหมักได้ไม่เต็มศักยภาพ ซึ่งเป็นข้อจำกัดของการหมักแบบแข็ง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ ญัญญา (2552) ซึ่งได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากการหมักกากมันสำปะหลัง โดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* พบว่าอัตราผลผลิตของกรดแลกติกและเอทานอล ด้วยวิธีการหมักแบบแข็งมีค่าต่ำกว่าการหมักแบบเหลว แต่ถึงแม้ว่าจะให้ผลผลิตกรดแลกติกในปริมาณที่ต่ำกว่า แต่ข้อดีของการหมักแบบแข็ง คือ วัสดุหมักไม่ต้องการการย่อยด้วยกรดหรือเอนไซม์ ซึ่งถือเป็นการลดต้นทุนการผลิตได้มาก และข้อได้เปรียบของการหมักแบบแข็งจากเชื้อรา ได้แก่ เชื้อราที่มีคุณสมบัติพิเศษ คือ สามารถย่อยแป้งได้ในขั้นตอนเดียว (amylolytic characteristics) และต้องการสารอาหารที่ไม่ซับซ้อน และราคาถูก ค่าใช้จ่ายในกระบวนการเก็บเกี่ยวต่ำ นอกจากนี้มวลชีวภาพที่เหลือยังสามารถนำไปใช้เป็นประโยชน์ด้านอื่นๆ เช่น ใช้เป็นตัวดูดซับสารพิษ และ

ใช้เติมลงในอาหารสำหรับเลี้ยงสัตว์ (Zhang *et al.*, 2007) ซึ่งการหมักแบบแข็งนี้เคยถูกให้ความหมายถึงระบบเทคโนโลยีที่ต่ำ (low technology system) แต่ให้ผลผลิตที่มีมูลค่าสูง (low volume- high cost) (Pandey *et al.*, 2000) ซึ่งการศึกษากการหมักแบบแข็งนี้มีรายงานของ Oda และคณะ. (2002) ซึ่งศึกษากการหมักกรดแลกติกจากกากมันฝรั่ง (potato pulp) ด้วยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* IFO 4707 ในถุงพลาสติก ขนาด 70 x 40 mm ซึ่งให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 10 mg/g ในวันที่ 6 ของการหมัก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Saito และคณะ (2003) ได้ศึกษาบทบาทของ pectinolytic enzyme ในการย่อยกากมันฝรั่งด้วยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ด้วยวิธีการหมักแบบแข็ง ซึ่งให้ปริมาณกรดแลกติกเท่ากับ 8.03 mg/g และจากรายงานของ Rojan และคณะ (2005) ซึ่งศึกษาการผลิต L(+)-lactic acid โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* บนกากมันสำปะหลัง ด้วยวิธีการหมักแบบแข็ง ซึ่งปริมาณกรดแลกติกที่ได้ อยู่ที่ 2.9 g/5 g ที่ความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสม คือ 72% สอดคล้องกับรายงานของ John และคณะ (2006) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ด้วยวิธีการหมักแบบแข็ง ได้กรดแลกติกที่ 249 mg/g ที่ความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสม คือ 72% ซึ่งใกล้เคียงกับผลการทดลองในครั้งนี้ ที่ความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสม คือ 70% ได้ปริมาณกรดแลกติก 57.60 mg/g

ขณะที่ Naveena และคณะ (2005a) รายงานว่า ปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากการหมักแบบแข็ง โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นวัตถุดิบ หมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus amylophilus* อยู่ที่ 0.89-2.30 g/10g ที่ความชื้น 83 % ซึ่งแบคทีเรียนี้ต้องการความชื้นเริ่มต้นสูงกว่าเชื้อรา และเมื่อศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต พบว่า เชื้อแบคทีเรียนี้ ให้ปริมาณกรดแลกติกที่เพิ่มสูงขึ้นเป็น 36 g/100g รำข้าวสาลี (Naveena และคณะ, 2005b)

ส่วนการศึกษ ปริมาณแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้น พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ได้มีค่าสูงสุดเมื่อเติมแป้งมันสำปะหลัง 150 g/kg มีค่าใกล้เคียงกับที่ได้จากการเติมแป้งมันสำปะหลังลงไป 120 g/l (ในขั้นตอนการศึกษาความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสม) โดยเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และก็ยังคงมีปริมาณน้อยกว่าการหมักแบบเปียก ซึ่งปริมาณแป้งที่ศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของ สุรสาธินี (2545) ซึ่งได้ใช้แป้งมันสำปะหลัง 150 g/l ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ แล้วทำการหมักในสภาวะการหมักแบบเปียกด้วยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* DMKU12 และให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด คือ 95.6 g/l และมีรายงานของวิเชียรและคณะ (2544) ซึ่งศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* DMKU12 ในระดับพลาสติกเหลว โดยใช้แป้งมันสำปะหลังที่ทำให้เหลว 174 g/l ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด คือ 100 g/l และมีรายงานถึงปริมาณแหล่งคาร์บอนที่ใช้เพื่อผลิตกรดแลกติก เช่น รายงานของ Yu และคณะ (2008) พบว่าใช้น้ำตาลกลูโคส 118.20 g/l เพื่อเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466 แล้วได้ปริมาณกรดแลกติก เท่ากับ 115.12 g/l ในเวลา 12 ชั่วโมง ขณะที่ Naranong และ Poocharoen (2001) ซึ่งศึกษาการผลิตกรดแลกติก โดยใช้แป้งมันสำปะหลังดิบปริมาณ 120 g/l เพาะเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ด้วยวิธีการหมักแบบ เปียก ได้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด เท่ากับ 68.32 g/l ในวันที่ 5

ของการหมัก ซึ่งปริมาณแป้งที่ใช้สอดคล้องกับรายงานของ Yin และคณะ (1997) ซึ่งใช้แป้งข้าวโพด 120 g/l เป็นแหล่งคาร์บอนเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ในสภาวะการหมักแบบเปียก แล้วให้ปริมาณกรดแลกติก 102 g/l วิเชียร และคณะ (2548) ได้ศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ *Rhizopus oryzae* ด้วยแสงยูวี เพื่อการผลิตกรดแอล (+) แลกติกจากแป้งมันสำปะหลัง รายงานว่าต้องใช้แป้งมันสำปะหลัง 150 g/l ด้วยวิธีการเซลล์ตรึงอัลจิเนต แล้วให้ปริมาณกรดแลกติก 95.9 g/l ในเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งผลการทดลองของวิเชียรสอดคล้องกับ การทดลองในครั้งนี้ แต่สภาวะการหมักแตกต่างกัน ขณะที่ Domínguez และ Vázquez (1999) ศึกษาสภาวะที่มีผลกระทบต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ในสภาวะการหมักแบบเหลว รายงานว่าต้องใช้น้ำตาลกลูโคส 15% เลี้ยงในสภาพให้อากาศต่ำๆ ซึ่งให้ปริมาณกรดแลกติก คือ 1.13 g/l/h

และจากรายงานของ Skory และคณะ (1998) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด ซึ่งต้องใช้น้ำตาลกลูโคส 20 g/l แล้วให้ปริมาณกรดแลกติก 40 g/l ในเวลา 70 ชั่วโมง และเพื่อศึกษาประสิทธิภาพ ของการหมักให้ได้กรดแลกติกในสภาวะการหมักแบบเหลวของเชื้อ *Rhizopus oryzae* เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 120 g/l พบว่าให้ปริมาณกรดแลกติก 104.6 g/l ในชั่วโมงที่ 60 (Park และคณะ 1998) และมีรายงานของ Zhou และคณะ (1999) ได้ศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกจากกลูโคส โดยใช้กลูโคส 94 g/l หมักในสภาพเหลวได้ปริมาณกรดแลกติก 83 g/l ในเวลา 32 ชั่วโมง Oda และคณะ (2003) ได้ศึกษาการหมักแบบเหลว ของเชื้อ *Rhizopus oryzae* หลากหลายสายพันธุ์ โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 5% พบว่าปริมาณกรดแลกติกอยู่ระหว่าง < 0.1-27.7 mg/ml ขณะที่ Bulut และคณะ (2004) ได้ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* พบว่า เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 150 g/l จะได้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด คือ 58 g/l ในสภาวะการหมักแบบเปียก

ส่วนในสภาวะการหมักแบบแข็ง มีรายงานของ Soccol และคณะ (1994) ซึ่งศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ปริมาณถึง 180 g/l แล้วให้ปริมาณกรดแลกติกเท่ากับ 137 g/l ขณะที่ Naveena และคณะ (2005) รายงานถึงปริมาณกรดแลกติกที่ได้ คือ 0.89-2.30 g/10g จากการหมักแบบแข็ง โดยใช้รำข้าวสาลี ซึ่งมีปริมาณแป้งอยู่ 54.4% เป็นวัตถุดิบ หมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus amylophilus* ขณะที่ Oda และคณะ (2002) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* โดยใช้กากมันฝรั่ง ซึ่งมีปริมาณแป้งอยู่ 33.1% ในสภาพการหมักแบบแข็ง พบว่าให้ปริมาณกรดแลกติก 10.3 mg/g ในวันที่หกของการหมัก ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับการทดลองในครั้งนี้มาก ส่วน Saito และคณะ (2003) ศึกษาบทบาทของเอนไซม์ pectinolytic ในการย่อยกากมันฝรั่ง ซึ่งมีปริมาณแป้งอยู่ 28% ด้วยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ด้วยวิธีการหมักแบบแข็ง ซึ่งให้ปริมาณกรดแลกติกเท่ากับ 8.03 mg/g

จากผลการศึกษาต่างๆ ที่ผ่านมาจะเห็นว่าการผลิตกรดแลกติกนิยมหมักในสภาพอาหารเหลว และใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งของคาร์บอน ซึ่งให้ปริมาณกรดแลกติกที่สูงกว่า

การหมักแบบแข็ง แต่เป็นที่ทราบกันว่ากลูโคส ถือเป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้ง่าย แต่มีราคาค่อนข้างแพง ทำให้ต้นทุนในการผลิตสูงมากเช่นกันและในการหมักแบบเหลว ต้องใช้อุปกรณ์ เช่น ถังหมัก การกวนให้อากาศ การใช้กรด หรือเอนไซม์ เพื่อการย่อยสลายวัสดุหมักก่อนที่จะปลูกเชื้อรา *Rhizopus oryzae* หรือ แบคทีเรียลงไป ซึ่งทุกอย่างถือเป็นต้นทุนในการผลิต ซึ่งสูงมากเมื่อเปรียบเทียบกับหมักแบบแข็ง ซึ่งแม้จะได้ปริมาณกรดแลกติกน้อยกว่า แต่ต้นทุนในการผลิตต่ำกว่ามาก ซึ่งข้อดีของการหมักแบบแข็ง คือ ถังหมัก (bioreactor) มีกลไกการทำงานที่ไม่ซับซ้อนผลิตขึ้นได้เองโดยวิธีง่าย ๆ ซึ่งเทคโนโลยีในการหมักแบบแข็งนี้เคยถูกให้ความหมายถึงระบบเทคโนโลยีที่ต่ำ (low technology system) แต่ให้ผลผลิตที่มีมูลค่าสูง (low volume- high cost) (Pandey และคณะ, 2000) ข้อเปรียบเทียบระหว่างการหมักแบบต่าง ๆ เพื่อการผลิตกรดแลกติก แสดงดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 การผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ด้วยวิธีการหมักแบบต่าง ๆ

วิธีการหมัก	แหล่งคาร์บอน	กรดแลกติก (g/l)	อ้างอิง
เซลล์ตรึงบนวัสดุ			
-แคลเซียมแอลจิเนต	กลูโคส	62.4	Hang และคณะ (1989)
-โซเดียมแอลจิเนต	กลูโคส	73.0	Hamamc และ Ryu (1994)
-โพลีเมอร์ซัพพอต	กลูโคส	50.0	Tamada และคณะ (1992)
แบบเหลว			
- jar-fermentor	กลูโคส	65.2	Kosakai และคณะ (1997)
- air-lift bioreactor	กลูโคส	43.2	Park และคณะ (1998)
แบบการสร้าง flocs			
- jar-fermentor	กลูโคส	103.6	Kosakai และคณะ (1997)
- air-lift bioreactor	กลูโคส	104.6	Park และคณะ (1998)
แบบแข็ง			
	กลูโคส	137 g/l	Soccol และคณะ (1994)
	กากมันฝรั่ง	10.3 mg/g	Oda และคณะ (2002)
	กากมันฝรั่ง	8.03 mg/g	Saito และคณะ (2003)
	แป้งมัน	57.60 mg/g	ครั้งนี้
	สำปะหลัง		

บรรณานุกรม

- กรมวิชาการเกษตร. 2537. เอกสารวิชาการปลูกพืชไร่. กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 180 หน้า.
- กองแผนงานและวิชาการ. 2526. มั่นสำปะหลัง : เอกสารวิชาการ เล่มที่ 7. กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 164 หน้า.
- ณัฐฐา ทองจุล. 2552. การผลิตกรดแลกติกจากการหมักกากมันสำปะหลังโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae*. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- ชนภูมิ มณีบุญ, วิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตน, ชัยพร พรหมชัยวัช และวิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2548. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* KPS 106 ในถังหมักแบบลอยตัวขนาด 3 ลิตร โดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46: สาขาวิทยาศาสตร์. กรุงเทพฯ, หน้า 112-119.
- วิเชียร กิจปรีชาวนิช, กล้านรงค์ ศรีรอด, บุษบา ยงสมิทธิ์ และสุพัตรา รัตนตระกูลเดชา. 2548. การปรับปรุงพันธุ์ *Rhizopus oryzae* และการผลิตกรดแอล (+) แลกติก จากแป้งมันสำปะหลังด้วยเซลล์ตรึงอัลจินต. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาวิทยาศาสตร์ สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม.
- วิเชียร กิจปรีชาวนิช, จุฑามาศ สินศุข, สุนีย์ โชติเนีรนาท, กล้านรงค์ ศรีรอด และบุษบา ยงสมิทธิ์. 2548. องค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกระดับฟลาสก์จากแป้งมันสำปะหลัง โดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* DMKU12. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 สาขาวิทยาศาสตร์ สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม.
- วิเชียร กิจปรีชาวนิช, กล้านรงค์ ศรีรอด, บุษบา ยงสมิทธิ์ และ สุพัตรา รัตนตระกูลเดชา. 2538. การคัดเลือกเชื้อรา *Rhizopus* sp. ที่ผลิตกรดแลกติกได้จากแป้ง. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 33 สาขาประมง วิทยาศาสตร์ วิศวกรรมศาสตร์ อุตสาหกรรมเกษตร ศึกษาศาสตร์ มนุษยศาสตร์ สังคมศาสตร์ การจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม.
- วิเชียร กิจปรีชาวนิช, จุฑามาศ สินศุข, สุนีย์ โชติเนีรนาท, กล้านรงค์ ศรีรอด และบุษบา ยงสมิทธิ์. 2544. องค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกระดับฟลาสก์จากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* DMKU12. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39: สาขาวิทยาศาสตร์ สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม. กรุงเทพฯ, หน้า181-188.

- วิเชียร กิจปรีชาวิช, สุทธาสินี ปราณิตรีตนาหนนท์, Yoshihito Shirai และบุษบา ยงสมิทธิ์. 2548. การปรับปรุงสายพันธุ์ *Rhizopus oryzae* และการผลิตกรดแอล (+) แลกติกจากแป้งมันสำปะหลังด้วยเซลล์ตรึงอัลจินต. การประชุมประจำปี สวทช. 2548 วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทยสู่เศรษฐกิจยุคโมเลกุล 28-30 มีนาคม.
- ศูนย์วิจัยพืชไร่ระยอง. 2534. เอกสารวิชาการ มันสำปะหลัง. สถาบันวิจัยพืชไร่ กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 209 หน้า.
- สุขใจ ชูจันทร์และศิริประภา มั่นตรง. 2549. ศึกษาการเพิ่มผลผลิตกรดแลกติกจากเวย์ โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจินต. เอกสารทางวิชาการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- สุทธาสินี ปราณิตรีตนาหนนท์ 2545. การพัฒนากระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดแอล (+)-แลกติกจากแป้งมันสำปะหลังด้วยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ในการเพาะเลี้ยงแบบอาหารเหลว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 143 หน้า.
- สุพัตรา รัตนตระกูลเดชา, บุษบา ยงสมิทธิ์, กล้าณรงค์ ศรีรอด และ วิเชียร กิจปรีชา. 2548. การคัดเลือกเชื้อรา *Rhizopus* sp. ที่ผลิตกรดแลกติกได้จากแป้ง. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 33 สาขาประมง วิทยาศาสตร์ วิศวกรรมศาสตร์ อุตสาหกรรมเกษตร ศึกษาศาสตร์ มนุษยศาสตร์ สังคมศาสตร์ การจัดการทรัพยากร และสิ่งแวดล้อม.
- อรรถวิท เตชะวิบูลย์วงศ์. 2547. “นวัตกรรมมันสำปะหลัง” อนาคตที่ก้าวกระโดดของ เกษตรกรรมไทย. สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ ข้าราชการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. <http://www.most.go.th/news/newspaper/default.asp?GID=658> (accessed 16 March 2009)
- AOAC. 1975. Official Methods of Analysis. The Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. The Association of Official Analytical Chemists. 17: 1-108.
- AOAC. 1999. Official Methods of Analysis. The Association of Official Analytical Chemistry.
- Alonso, S., Monica, H., Manuel ,R., and Mario, D. 2009. Residual yoghurt whey for lactic acidproduction. Biomass and Bioenergy. 34 (7): 931-938.
- Axelsson, L. 1998. Lactic Acid bacteria: classification and physiology. In Salminen, S. and Wright,AV.(eds.) Lactic acid bacteria.New York : Microbiology Functional Aspects. Marcel Dekker, InC. New York.
- Bernfeld, P. 1951. Enzymes of starch degraation and synthesis.Adv.in Enzomol. 12: 380-424.

- Bhargav, S., Panda, B.P., Ali, M. and Javed, S. 2008. Solid-state fermentation: an overview. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 22(1): 49
- Bulut, S., Elibol, M. and Ozer, D. 2004. Effect of different carbon sources on L(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochemical Engineering Journal*. 21, 33-37.
- Choi, Y. W., Hodgkiss, I.J. and Hyde, K. D. 2005. Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. *Journal of Agricultural Technology*. 1, 55-56.
- Couto, S., and Sanromon, M., 2006. Application of solid-state fermentation to food industry--A review. *Journal of Food Engineering*. 76 (3): 291-302.
- Datta, R., Tsai, S. P., Bonsignor, P., Moon, S., Frank, J. 1995. Technological and Economical potential of polylactic acid and lactic acid derivatives. *FEMS Microbial Rev* 16: 221-231.
- Davidson, B. E., Llanos, R. M., Cancilla, M. R., Redman, N. C. and Hillier, A. J. 1995. Current research on the genetics of lactic acid production in lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. 5(8): 763-784.
- Domínguez, J. M., and Vázquez. 1999. Effect of the operation conditions on the L-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 12 113-118.
- Dunn, R. L., English, J. P., Cowasr, D.R. and Tice, T.R. 1988. Preparation and evaluation of lactide/glycolilide copolymers for drug delivery. In: Migliaresi C (ed) *Polymers in Medicine III*. Elsevier, Amaterdam. pp.149-159.
- Du, J. X., Cao, N. J., Gong, C. S., Tsao, G. T., 1998. Production of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae* in a bubble column fermenter. *Appl Biochem Biotechnol*. 70: 323-329.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC bioinformatics* 5(1): 113
- Friedemann, T. E., Cotonio, M. and Shaffer P. A. 1927. The determination of lactic acid. *Journal of Biological Chemistry*. 73(1): 335.
- Ghosh, B. and Ray, R. R. 2011. Current Commercial Perspective of *Rhizopus oryzae*: A Review. *Journal of Applied Sciences*. 11, 2470-2486.
- Hakki, E. E. and Akkaya, M. S. 2001. RT-PCR amplification of *Rhizopus oryzae* lactate dehydrogenase gene fragment. *Enzyme and Microbial Technology*. 28, 259-264.
- Hall, T. 2004. BioEdit version 7.0.0. Distributed by the author, website: [www. mbioncsu. Edu/BioEdit/bioedit. Html](http://www.mbioncsu.edu/BioEdit/bioedit.html). Accessed June 15, 2012

- Hamamci, H. and Ryu, Dewey, D. Y. 1994. Production of L(+)- lactic acid using immobilized *Rhizopus oryzae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 44, 125-133.
- Hang, Y. D. 1989. Direct fermentation of corn to L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. *Biotechnology Letters*. 11, 299-300.
- Hofvendahl, K., and Hahn, B.,. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources¹. *Enzyme and Microbial Technology*. 26 (2-4): 87-107.
- Holland, H. J, Tighe, B.J. and Gould, P. L. 1986. Polymers for biodegradable medicine device I. The potential of polyester as controlled macromolecule release system. *J. Controlled Release*. 4: 155-160.
- Holten, CH., Muller, A., Rehbinder, D. 1971. Lactic acid: properties and chemistry of lactic acid and derivative. Weinheim: Verlag Chemie.
- Holten, C.H. 1971. Lactic acid properties and chemistry of lactic acid and derivatives. Verlag Chemie, Germany
- Huang, L. Jin, P., B., Lant, P. and Zhou, J. T. 2003. Biotechnological production of lactic acid integrated with potato wastewater treatment by *Rhizopus arrhizus*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 78 8: 899-906
- Jin, B., Hung, L. P. and Lant, P. 2003. *Rhizopus arrhizus*- a producer for simultaneous saccharification and fermentation of starch waste materials to L(+)-lactic acid. *Biotechnology letters*. 25, 1983-1987.
- John, R.P., Nampoothiri, K. M. and Pandey, A. 2006. Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*. 41, 759-763.
- John, R.P., Nampoothiri, K. M. and Pandey, A. 2007. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* 74 (3): 524-534.
- John, P., Anisha G. S, Madhavan K. and Pandey, A. 2009. Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. *Biotechnology advances* 27(2): 145-152.

- Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S. and Madden, T. L. 2008. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic acids research* 36 (suppl2):W5-W9
- Kerberg, C. and Zacchi, G. 2000. An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour. *Bioresource Technology* 75(2): 119-126.
- Lee, K., So, J. and Heo, T. 2001. Thin layer chromatographic determination of organic acids for rapid identification of bifidobacteria at genus level. *Journal of Microbiological Methods* 45(1): 1-6.
- Liu, T., Miura, S., Arimura, T., Tei, M.Y., Park, E.Y. and Okabe, M. 2005. Evaluation of L-lactic acid production in batch, fed-batch and continuous cultures of *Rhizopus* sp. MK-96-1196 using an airlift bioreactor, *Biotechnol. Bioproc. Eng.* 10:522–527.
- Lockwood, L. B. 1979. Production of organic acid by fermentation. In *Microbial Technology*, vol.1, eds Pepler, H. J. & Perlarm, D. Academic Press, New York, pp.373-376.
- Lowry, O. H., Rosebrough, A. L. Farr and Randall, N. J. 1951. Protein measurement with the forlin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275
- Maas, R., Bakker, R.R, Eggink, G. and Weusthuis, R. A. 2006. Lactic acid production from xylose by the fungus *Rhizopus oryzae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72 (5): 861-868.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31, 426-428.
- Mirdamadi, S., Sadeghi, H., Sharafi, N., Fallahpour, M., Mohseni F.A., and Bakhtiari. M.R. 2002. Comparison of lactic acid isomers produced by fungal and bacterial strains. *Iranian Biomedical Journal* .6 (2): 69-75.
- Miura, S., Arimura, T., Hoshino, M., Kojima, M., Dwiarti L. and Okabe, M. 2003. Optimization and scale-up of L-lactic acid fermentation by mutant strain *Rhizopus* sp. MK-96-1196 in airlift bioreactor. *J. Biosci. Bioeng.* 96(1): 65-69.
- Naranong, N. and Poocharoen, D. 2001. Production of L-lactic acid from Raw cassava Starch by *Rhizopus oryzae* NRRL 395 .*Kasetsart Journal (Natural Science)* 35: 164-170.
- Narayanan, N., Roychoudhury, PK. and Srivastava, A. 2004. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic journal of biotechnology* 7: 167-178

- Naveena, B. J., Altaf, Md., Bhadriah, K. and Reddy, G. 2005. Selection of medium components by Plackett- Burman design for production of L(+)-lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using wheat bran. *Bioresource Technology*. 96, 485-490.
- Naveena, B. J., Altaf, M. d., Bhadrappa, K., Madhavendra, S. S. and Reddy, G. 2005. Direct fermentation of starch to L(+) lactic acid in SSF by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using wheat bran as support and substrate: medium optimization using RSM. *Process Biochemistry*. 40, 681-690.
- Oda, Y., Saito, K., Yamauchi, H. and Mori, M. 2002. Lactic acid Fermentation of Potato Pulp by the Fungus *Rhizopus oryzae*. *Current Microbiology*. 45, 1-4.
- Oda, Y., Yajima, Y., Konishito, M. and Ohnishi, M. 2003. Differences of *Rhizopus oryzae* strains in organic acid synthesis and fatty acid composition. *Food Microbiology*. 20, 371-375.
- Ohara, H. 1994. Poly-L-lactic acid as biodegradable plastic. *Bioscience Induction*. 52, 642-644.
- Pandey, A., Soccol, C. R. and Mitchell, D. 2000. New development in solid state fermentation: I-bioprocesses and Products. *Process Biochemistry*. 35, 1153-1169.
- Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 13 (2-3): 81-84.
- Park, E. Y., Kosakai, Y. and Okabe, M. 1998. Efficient Production of L(+)-Lactic Acid Using Mycelial Cotton-like Floccs of *Rhizopus oryzae* in an Air- Lift Bioreactor. *Biotechnology. Progress*. 14, 699-704.
- Press Release . 2551. พูแระค ทุ่มงบ 4,800 ล้าันบาท สร้า้งโรงงาานแห่งใหม่ในไทย. <http://www.positioningmag.com> PR NEWS Network.htm (accessed 6 May 2009)
- Piskin, E., Tuncel, A., Denizil, A., Denkbas, E. B., Ayhan, H., Cicek, H. and Xu, K. T. 1994. Non-degradable and biodegradable polymeric particles. Preparation and some selected biomedical application. In: Diagnostic biosensor polymers. Usmani, A. M. and N. Akamal (eds). ACS symposium Series 556. American Chemical Society, Washington, DC. Chapter. 12: 302-30
- Purseglove, J. W. 1977. Tropical Crops : Dicotyledons. Longman Group Ltd Hong Kong.
- Rakeman, J. L., Bui, U., LaFe, K., Chen, Y. C., Honeycutt, R. J., & Cookson, B. T. 2005. Multilocus DNA sequence comparisons rapidly identify pathogenic molds. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(7), 3324-3333.

- Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B. J., Venkateshwar, M. and Kumar, E. V. 2008. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation--A review. *Biotechnology advances*. 26 (1): 22-34.
- Ridell, R. W. 1950. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. *Mycologia*. 42: 265-270
- Richard, J. W., William, M. M and Greenstein, M. 1986. Screening for New Products from Microorganisms. In *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Demain, A. L. and Solomon, N.A. editors. American Society for Microbiology Washington, D. C. pp 24-34.
- Rojan, P. J., Nampoothiri, K. M., Nair, A.S. and Pandey, A. 2005. L(+)-Lactic acid production using *Lactobacillus casei* in solid-state fermentation. *Biotechnology Letters*. 27, 1685-1688.
- Ruengruglikit, C., and Hang, Y.D. 2003. L (+)-lactic acid production from corncobs by *Rhizopus oryzae* NRRL-395. *Food Science and Technology-London*. 36(6): 573-576.
- Ruter, P. 1975. Molasses utilization. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome
- Saito, K., Kawamura, Y. and Oda., Y. 2003. Role of pectinolytic enzyme in the lactic acid fermentation of potato pulp by *Rhizopus oryzae*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 30, 440-444.
- Schipper, M.A.A. 1984. A revision of the genus *Rhizopus*. *Stud Myco*. 25, 1-34.
- Singhania, R., Anil K.P., Soccol, R. and Pandey A., 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. 44(1): 13-18.
- Skory, C. D., Freer, S. N. and Bothast, R. J. 1998. Production of L-lactic by *Rhizopus oryzae* under oxygen limiting conditions. *Biotechnology letters*. 20, 191-194.
- Skory, C. D. 2000. Isolation and expression of lactate dehydrogenase genes from *Rhizopus oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 2343-2348.
- Sodergard, A., and Mikael, S. 2002. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Progress in Polymer Science*. 27(6): 1123-1163.
- Soccol, C. R., Marin, B., Raimbault, M. and Lebeault, J. M. 1994. Potential of solid state fermentation for production of L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. *Applied microbiology and biotechnology*. 41, 286-290.

- Soccol, C.R., Stonoga, V. I., and Raimbault, M. 1994. Production of L-lactic acid by *Rhizopus* species. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.10(4): 433-435.
- Soccol, C. R., Marin, B., Raimbault, M. and Lebeault, J. M. 1994. Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 41(3): 330-336.
- Soccol, C. R., and Luciana, P. S. 2003. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*. 13(2-3): 205-218.
- Sreenath, H. K., Moldes, A., Koegel, R. and Straub, R. 2001. Lactic acid production from agriculture residues. *Biotechnology Letters*. 23(3): 179-184.
- Sriroth, K., Rojanaridpiched, C., Vichukit, V., Suriyapan, P. and Oates, C.G. 2000. Present situation and future potential of cassava in Thailand.
- Stark, J. B., Goodban, A.E. and Owens, H.S. 1951. Paper chromatography of organic acids. *Analytical Chemistry*. 23(3): 413-415.
- Tamada, M., Begum, A. A., Sadi, S. 1992. Production of L(+)-lactic acid by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* with polymer supports prepared by γ ray induced polymerization. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 74, 379-383.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* 28(10): 2031-2739
- Taylor, KACC. 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Applied biochemistry and biotechnology*. 56(1): 49-58.
- 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.
- Tonukari, N. J. 2004. Cassava and the future of starch. *Electronic journal of biotechnology*. 7: 5-8.
- Van Ness, J. H. 1981. Hydroxy carboxylic acid. In: Kirk Othmer Encyclopedia of chemical technology, third edition. J. Wiley & Sons, New York. 13: 80-103
- Vickroy, T. B. 1985. Lactic acid. In M. Moo-Young, ed. *Comprehensive Biotechnology*. 4: 761-776.

- Wang, X., Sun, L., Wei, D., Wang, R. 2005 .Reducing by-product formation in l-lactic acid fermentation by *Rhizopus oryzae*, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 32: 38–40.
- Wang, L., Zhao, B., Liu, B., Yang, C., Yu, B., Li, Q., Ma, C., Xu, P., and Ma, B, 2010. Efficient production of l-lactic acid from cassava powder by *Lactobacillus rhamnosus*. Bioresource Technology. 101(20): 7895-7901.
- Wee, Y-J., Kim, J-N. and Ryu, H-W. 2006. Biotechnological Production of Lactic acid and Its Applications: A Review. Food Technology and Biotechnology. 44, 163-172.
- Yang, C.W., Lu, Z. and Tsao, G. T. 1995. Lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* in a submerged system. Appl. Biochem. Biotechnol. 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 Air-Lift Bioreactor. Journal of Fermentation and Bioengineering. 84, 249-253.
- Yu, R. C. and Hang, Y.D. 1989. Kinetics of direct fermentation of agricultural commodities to L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. Biotechnology. Lett. 11(8): 597-600.
- Yu, L., Lei, T., Ren, X., Pei, X. and Feng, Y. 2008. Response surface optimization of L-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466. Biochemical Engineering Journal. 39, 496-502.
- 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, 597-600.
- Zhang, Z. Y., Jin, B. and Kelly, J. M. 2007. Production of lactic acid and by products from waste potato starch by *Rhizopus arrhizus*: role of nitrogen sources. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 23, 229-236.
- Zhang, Z.Y., Jin, B. and Kelly, J. M. 2007. Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. Biochemical Engineering Journal. 35, 251-263.
- Zhou, Y., Domínguez, J. M., Cao, N, Du, J. and Tsao, G. T. 1999. Optimization of L-lactic Acid production from Glucose by *Rhizopus oryzae* ATCC 52311. Applied Biochemistry and Biotechnology. 77-79, 401-407.
- http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Zygomycetes/Rhizopus.
(Accessed 20 October 2012).

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Potato dextrose agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

1.2 Cassava starch agar (g/l)

แป้งมันสำปะหลัง	50	กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	3	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.25	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.15	กรัม
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.04	กรัม
Agar	18	กรัม

- ละลายส่วนผสมทั้งหมด ด้วยน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรให้ได้ 1000 ml. ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

2. สารเคมีที่ใช้ทดสอบ

2.1 สารละลายไอโอดีนสำหรับทดสอบการย่อยแป้ง

Crystal iodine	1	กรัม
Potassium iodine	2	กรัม
Ethyl alcohol	30	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

ผสม Crystal iodine กับ Potassium iodine เข้าด้วยกัน เติมน้ำเล็กน้อยเพื่อให้ผลึกละลาย แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 300 ml และ Ethyl alcohol 30 ml ผสมให้เข้ากันดี เก็บไว้ในขวดสีชา

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการหาเปอร์เซ็นต์กรด

2.2.1 0.01 N NaOH

ชั่ง NaOH 40 กรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 1 ลิตร ละลายใน น้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1 ลิตร จะได้สารละลาย NaOH 1 N จากนั้นทำการเจือจางโดยดูดสารละลาย NaOH 1 N มา 10 ml เติมลงในน้ำกลั่น 990 ml จะได้สารละลาย NaOH 0.01 N

2.2.2 Phenolphthalein indicator

ผสม Phenolphthalein crystal 1 g กับ Ethanol 95% 100 ml

2.2.3 Standard Potassium hydrogen phthalate (KHC₈H₄O₄)

อบ KHC₈H₄O₄ ที่อุณหภูมิ 100 °C ซ้ำมคั้น นำออกมาเก็บไว้ในโถ ดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แบ่ง KHC₈H₄O₄ มาชั่งครั้งละ 0.1 g 3 ครั้ง ห่อแยกกันไว้

2.2.4 การเทียบมาตรฐาน NaOH

นำ KHC₈H₄O₄ ที่ชั่งไว้ทั้ง 3 ห่อ ใส่ลงในฟลasks ขนาด 250 ml 3 ใบ เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 ml ลงในแต่ละฟลask ต้มให้เดือดเพื่อไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ทิ้งไว้ ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง หยดฟีนอล์ฟทาลีน 3 หยด ลงไปเป็นดัดชนี ทำการไตเตรตด้วย NaOH 0.01 N บันที่ปริมาตรที่ใช้ในการไตเตรตไว้ (ทำcontrol เทียบกับน้ำกลั่นที่ไม่มี KHC₈H₄O₄ จำนวน 50 ml) นำค่าปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ไปคำนวณความเข้มข้นมาตรฐาน โดยใช้สูตร

$$\text{Normality} = \frac{\text{น้ำหนัก (g) ของ KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4 \times 100}{\text{ปริมาตร (ml) ของ NaOH} \times 204.229}$$

ที่มา: AOAC, 1975

2.3 สารเคมีที่ใช้สำหรับตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง

2.3.1 Phosphate buffer pH 7.0

สารละลาย A: 0.2 M NaH₂PO₄·2H₂O (31.2 g ในน้ำกลั่น 1,000 ml)

สารละลาย B: 0.2 M Na₂HPO₄·7H₂O (53.65 g ในน้ำกลั่น 1,000 ml)

ผสมสารละลาย A และ B ให้ได้ pH เท่ากับ 7 โดยใช้ สารละลาย A 39.0 ml และ สารละลาย B 61.0 ml

2.3.2 3, 5-Dinitrosalicylic acid solution

สารละลาย A: 3, 5-Dinitrosalicylic acid (DNS) 1.0% เตรียมโดยชั่ง DNS 10 g ในน้ำกลั่น 250 ml

สารละลาย B : NaOH 16 g ละลายในน้ำกลั่น 200 ml

Potassium sodium (tartrate Rochelle salt) 300 ml

เติมสารละลาย B ที่ละลายลงในสารละลาย A คนให้ละเอียดเข้ากันจนหมด นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนจนกระทั่งได้สารละลายใส จากนั้นเติม Potassium sodium (tartrate Rochelle salt) ลงไปที่ละลายจนหมด ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1,000 ml ด้วยน้ำกลั่นโดยใช้ Volumetric flask เก็บใส่ขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก ข. การเก็บตัวอย่างและวิธีการวิเคราะห์

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างวันละ 10 g ทุกๆ 24 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างเติมน้ำกลั่น 90 ml ตั้งทิ้งไว้ 1-2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปกรองด้วยกระดาษกรอง เอาเฉพาะสารละลายส่วนใส เพื่อใช้วิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ

2. การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) (AOAC, 1995)

นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการเก็บตัวอย่าง มาวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ด้วยเครื่อง pH meter เทียบกับสารละลายบัฟเฟอร์มาตรฐาน (standard buffer) ที่มีค่า 4 และ 7

3. การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของวัสดุหมัก ด้วยวิธี Gravimetric (AOAC, 1999)

1. ออบภาชนะสำหรับใส่ตัวอย่างที่อุณหภูมิ 105 °C นาน 3 ชั่วโมง แล้วนำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วนำมาชั่งหาน้ำหนักแห้ง

2. นำตัวอย่างใส่ในภาชนะที่ทราบน้ำหนักแล้ว ชั่งหาน้ำหนักทั้งหมด

$$(\text{น้ำหนักตัวอย่าง} = \text{น้ำหนักทั้งหมด} - \text{น้ำหนักภาชนะ})$$

3. นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 °C ซ้ำมคืน นำออกจากตู้อบลม ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะถึงอุณหภูมิห้องแล้วชั่งหาน้ำหนัก แล้วหักค่าน้ำหนักของภาชนะออก ผลที่ได้จะเป็นน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง

$$(\text{น้ำหนักแห้งของตัวอย่าง} = \text{น้ำหนักทั้งหมด} - \text{น้ำหนักภาชนะ})$$

4. กำหนดเปอร์เซ็นต์ความชื้น โดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่าง} - \text{น้ำหนักแห้ง}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

4. การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก

การศึกษาในครั้งนี้วิเคราะห์หาปริมาณกรดแลกติกที่เชื้อราผลิตขึ้นได้ด้วยเครื่อง Reflectometer RQflec10 Merck Germany

5. การหาเปอร์เซ็นต์กรดแลกติก (%acidity) โดยวิธี Titration (AOCC, 1999)

นำสารละลายตัวอย่างส่วนใสที่ผ่านการกรอง มา 1 ml ใส่ลงไปในพลาสติก ขนาด 250 ml เติมน้ำกลั่น 50 ml ต้มให้เดือดเพื่อไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง หยดฟีนอล์ฟทาลีน 3 หยด เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ นำมาไตเตรทกับ NaOH 0.01 N (ทำ 3 ซ้ำ) และเทียบกับ control น้ำกลั่น 50 ml บันทึกรายการ NaOH ที่ใช้ทั้ง 3 ครั้ง นำมาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมด โดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรดแลกติก} = \frac{\text{ปริมาตร (ml) ของ NaOH} \times 0.090 \times 100}{\text{ปริมาตร (ml) ของตัวอย่าง}}$$

6. การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งโดยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

นำสารละลายตัวอย่างส่วนใส ไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยการวัด reducing sugar ที่เกิดจากปฏิกิริยาการย่อยแป้งด้วยวิธี Ditrosalicylic acid method (DNS method) (Miller, 1959)

6.1 สารเคมี

6.1.1 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ชั่งกลูโคส 0.1000 g ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml โดยใช้ volumetric flask จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 1.0 mg/ml นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0-1,000 µg/ml ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 วิธีการเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 200, 400, 600, 800, 1000 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี 3, 5-Dinitrosalicylic acid assay

หลอดที่	สารละลายกลูโคส ($\mu\text{g/ml}$) (ml)	น้ำกลั่น (ml)	สารละลายกลูโคส ($\mu\text{g/ml}$) (ml)
1	0	1.0	0
2	0.2	0.8	200
3	0.4	0.6	400
4	0.6	0.4	600
5	0.8	0.2	800
6	1.0	0.0	1,000

6.1 สารเคมี

6.1.2 การเตรียมแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 1 % (w/v)

ซึ่งแป้งมันสำปะหลัง 1 g ละลายในสารละลาย Phosphate buffer pH 7.0 ปริมาตรสุดท้าย เป็น 100 ml โดยใช้ volumetric flask จะได้ แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 1% (w/v)

6.1.3 3, 5-Ditrosalicylic acid solution (ภาคผนวก ก)

6.1.4 สารละลาย Phosphate buffer pH 7.0 (ภาคผนวก ก)

6.2 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี 3, 5-Ditrosalicylic acid

assay

6.2.1 ตูดแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 1 % (w/v) ปริมาตร 0.5 ml ลงในหลอดทดลอง แล้วเติมสารละลายเอนไซม์ที่ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 0.5 ml อุณหภูมิ 40°C 10 นาที

6.2.2 เติมสารละลาย 3, 5-Ditrosalicylic acid ปริมาตร 1ml

6.2.3 นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

6.2.4 แช่หลอดทดลองในอ่างน้ำเย็น 5 นาที

6.2.5 เติมน้ำกลั่น 10 ml ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัด

ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm.

6.2.6 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง นำค่าความเข้มข้นของน้ำตาลที่ได้หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

6.3 การทำกราฟมาตรฐาน

6.3.1 ตูตสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ หรือสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ปริมาตร 1 ml ลงในหลอดทดลอง

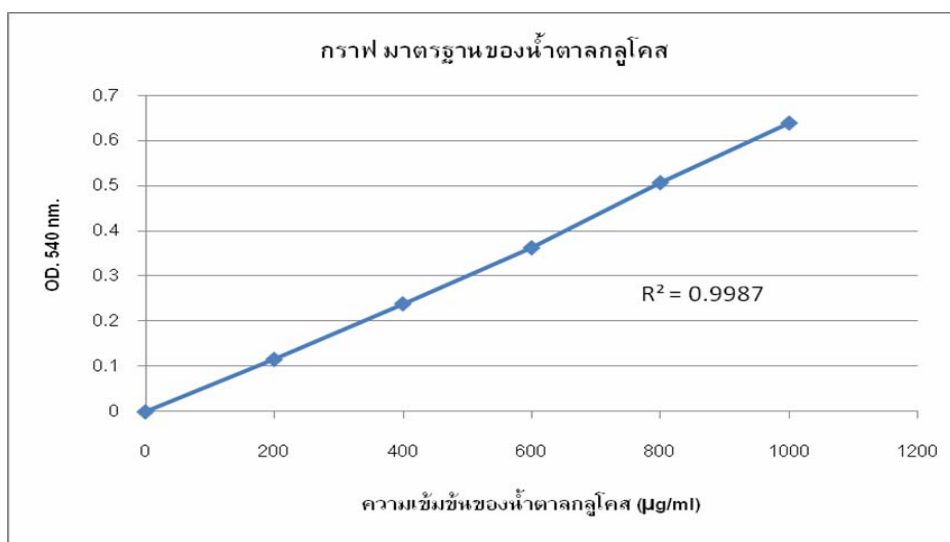
6.3.2 เติมสารละลาย 3,5-Ditrosalicylic acid ปริมาตร 1 ml

6.3.3 นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

6.3.4 แช่หลอดทดลองในอ่างน้ำเย็น 5 นาที

6.3.5 เติมน้ำกลั่น 10 ml ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm.

6.3.6 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ไปเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสกับการดูดกลืนแสง ดังรูปที่ 26



รูปที่ 26 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

6.4 การคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (U/ml)} = \frac{\text{ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส} \times \text{dilution factor}}{\text{มวลโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส}} \times 100$$

หมายเหตุ มวลโมเลกุลของกลูโคสเท่ากับ 180

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์อะไมเลส เท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 1 % แล้วให้น้ำตาลรีดิวซ์เกิดขึ้น 1 ไมโครโมลต่อ 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด ค่าที่คำนวณได้เรียกว่า กิจกรรมของเอนไซม์

ภาคผนวก ค.
ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง

ตารางที่ 12 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ที่ได้จากการหมักแบบแข็งของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท

เวลา (ชั่วโมง)	เชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp.					
	C018	C019	C021	C032	C035	Control
0	5.69	5.69	5.69	5.69	5.69	5.69
24	5.67	5.69	5.69	5.67	5.68	5.68
48	5.13	5.23	5.44	5.26	5.14	5.68
72	4.96	5.00	5.12	5.02	4.93	5.68
96	4.92	4.92	4.98	4.95	4.89	5.68
120	4.90	4.91	4.96	4.95	4.82	5.68

ตารางที่ 13 ปริมาณกรดกรด (%) ทั้งหมดที่ได้จากการหมักแบบแข็งของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท

เวลา (ชั่วโมง)	เชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp.					
	C018	C019	C021	C032	C035	Control
0	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
24	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
48	0.09	0.08	0.08	0.08	0.09	0.08
72	0.10	0.09	0.09	0.10	0.10	0.08
96	0.10	0.10	0.10	0.10	0.12	0.08
120	0.10	0.10	0.10	0.10	0.12	0.08

ตารางที่ 14 กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ที่ได้จากการหมักแบบแข็งของเชื้อราทั้ง 5 ไอโซเลท

เวลา (ชั่วโมง)	เชื้อรา <i>Rhizopus</i> sp.					
	C018	C019	C021	C032	C035	Control
0	0.54	0.54	0.54	0.54	0.54	0.54
24	0.56	0.58	0.48	0.52	0.55	0.54
48	1.26	0.83	1.14	0.86	1.07	0.54
72	4.01	2.28	2.53	3.41	3.91	0.54
96	5.70	4.91	4.05	3.92	5.79	0.54
120	5.62	4.81	3.98	3.85	5.76	0.54

ตารางที่ 15 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลท C035 ที่ปริมาณแป้งเริ่มต้น 100, 150 และ 200 กรัม

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณแป้ง (กรัม/กิโลกรัม)					
	Control		Control		Control	
	100	100	150	150	200	200
0	5.46	5.52	5.48	5.51	5.47	5.53
24	4.48	5.53	4.23	5.53	4.25	5.52
48	4.28	5.55	4.01	5.48	3.92	5.54
72	4.89	5.54	3.88	5.48	3.89	5.54
96	3.96	5.54	3.85	5.48	3.98	5.54
120	3.90	5.52	3.85	5.46	3.97	5.55
144	3.97	5.54	3.93	5.48	3.97	5.53
168	3.91	5.52	3.95	5.46	3.92	5.55
192	3.94	5.53	3.90	5.51	3.89	5.52
216	4.01	5.53	4.01	5.48	3.99	5.53

ตารางที่ 16 ปริมาณกรดทั้งหมด (%) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลท C035 ที่ปริมาณแป้งเริ่มต้น 100, 150 และ 200 กรัม

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณแป้ง (กรัม/กิโลกรัม)					
	100	control 100	150	control 150	200	control 200
0	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
24	0.10	0.07	0.14	0.07	0.14	0.07
48	0.11	0.07	0.14	0.07	0.23	0.07
72	0.17	0.07	0.23	0.07	0.26	0.07
96	0.25	0.07	0.28	0.07	0.23	0.07
120	0.25	0.07	0.28	0.07	0.23	0.07
144	0.23	0.07	0.23	0.07	0.23	0.07
168	0.23	0.07	0.23	0.07	0.24	0.07
192	0.23	0.07	0.24	0.07	0.24	0.07
216	0.18	0.07	0.21	0.07	0.23	0.07

ตารางที่ 17 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลท C035 ที่ปริมาณแป้งเริ่มต้น 100, 150 และ 200 กรัม

เวลา (ชั่วโมง)	ค่ากิจกรรมเอนไซม์การย่อยแป้ง (U/ml)					
	100	control 100	150	control 150	200	control 200
0	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52	0.52
24	0.48	0.52	0.54	0.52	0.50	0.52
48	0.52	0.52	1.31	0.52	0.55	0.52
72	2.63	0.52	4.33	0.52	0.56	0.52
96	3.61	0.52	5.95	0.52	1.21	0.52
120	3.96	0.52	5.93	0.52	3.72	0.52
144	3.67	0.52	5.54	0.52	3.60	0.52
168	2.59	0.52	5.31	0.52	3.55	0.52
192	1.60	0.52	4.92	0.52	3.43	0.52
216	0.93	0.52	3.11	0.52	2.11	0.52

ตารางที่ 18 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลท C035 ที่ความชื้นเริ่มต้น 65%, 70% และ 75%

เวลา (ชั่วโมง)	ความชื้นเริ่มต้น (%)					
	Control		Control		Control	
	65	65	70	70	75	75
0	5.54	5.55	5.55	5.55	5.56	5.55
24	5.37	5.57	5.38	5.45	5.45	5.55
48	4.28	5.58	4.23	5.46	4.24	5.56
72	4.69	5.57	4.76	5.45	4.68	5.55
96	4.14	5.57	4.11	5.46	4.14	5.54
120	4.09	5.58	3.98	5.45	4.07	5.55
144	4.15	5.56	3.98	5.47	4.03	5.54
168	4.11	5.57	3.98	5.47	4.00	5.55
192	4.14	5.58	3.99	5.46	3.99	5.55
216	4.27	5.58	4.01	5.45	4.15	5.53

ตารางที่ 19 ปริมาณกรดทั้งหมด (%) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลท C035 ที่ความชื้นเริ่มต้น 65, 70 และ 75%

เวลา (ชั่วโมง)	ความชื้นเริ่มต้น (%)					
	Control		Control		Control	
	65	65	70	70	75	75
0	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07
24	0.10	0.07	0.11	0.07	0.13	0.07
48	0.14	0.07	0.14	0.07	0.15	0.07
72	0.14	0.07	0.14	0.07	0.14	0.07
96	0.16	0.07	0.16	0.07	0.16	0.07
120	0.18	0.07	0.21	0.07	0.18	0.07
144	0.19	0.07	0.25	0.07	0.21	0.07
168	0.19	0.07	0.25	0.07	0.22	0.07
192	0.18	0.07	0.24	0.07	0.22	0.07
216	0.18	0.07	0.21	0.07	0.16	0.07

ตารางที่ 20 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลท C035 ที่ความชื้นเริ่มต้น 65, 70 และ 75%

เวลา (ชั่วโมง)	ความชื้นเริ่มต้น (%)					
	Control		Control		Control	
	65	65	70	70	75	75
0	0.54	0.54	0.54	0.55	0.53	0.54
24	0.48	0.54	0.54	0.48	0.52	0.55
48	0.82	0.55	1.23	0.48	1.18	0.54
72	2.87	0.54	4.21	0.48	3.92	0.55
96	4.76	0.55	5.82	0.48	4.81	0.54
120	4.52	0.54	5.67	0.48	4.61	0.54
144	4.01	0.53	5.12	0.48	4.13	0.55
168	3.61	0.54	4.87	0.48	3.87	0.55
192	2.52	0.53	3.92	0.48	3.05	0.54
216	1.68	0.53	2.14	0.48	2.23	0.54

ตารางที่ 21 ค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลท C035 ที่ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 1.0, 2.0, และ 5.0 มิลลิเมตร

เวลา (ชั่วโมง)	ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก (mm)					
	Control		Control		Control	
	1.0	1.0	2.0	2.0	5.0	5.0
0	5.53	5.54	5.55	5.55	5.54	5.55
24	4.50	5.54	4.11	5.55	4.11	5.54
48	4.27	5.53	3.89	5.54	3.87	5.54
72	4.24	5.53	3.89	5.55	3.85	5.53
96	4.23	5.54	3.87	5.55	3.75	5.54
120	4.19	5.55	3.81	5.54	3.71	5.54
144	4.21	5.54	3.85	5.53	3.75	5.55
168	4.23	5.53	3.88	5.54	3.81	5.55
192	4.25	5.53	3.89	5.54	3.81	5.54

ตารางที่ 22 ปริมาณกรดทั้งหมด (%) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลท C035 ที่ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 1.0, 2.0, และ 5.0 mm

เวลา (ชั่วโมง)	ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก (mm)					
	Control		Control		Control	
	1.0	1.0	2.0	2.0	5.0	5.0
0	0.17	0.08	0.16	0.08	0.16	0.08
24	0.26	0.07	0.19	0.08	0.28	0.08
48	0.55	0.08	0.57	0.08	0.38	0.08
72	0.64	0.08	0.67	0.07	0.72	0.07
96	0.62	0.07	0.73	0.07	0.8	0.08
120	0.65	0.07	0.74	0.07	0.84	0.07
144	0.46	0.07	0.60	0.06	0.81	0.07
168	0.41	0.07	0.69	0.05	0.77	0.06
192	0.41	0.06	0.69	0.06	0.78	0.06

ตารางที่ 23 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus* ไอโซเลท C035 ที่ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก 1.0, 2.0, และ 5.0 mm

เวลา (ชั่วโมง)	ขนาดอนุภาคของวัสดุหมัก (mm)					
	Control		Control		Control	
	1.0	1.0	2.0	2.0	5.0	5.0
0	0.43	0.48	0.47	0.48	0.44	0.48
24	1.19	0.48	1.81	0.48	2.10	0.48
48	1.64	0.46	1.87	0.46	2.64	0.47
72	2.99	0.48	3.29	0.48	3.99	0.48
96	4.14	0.49	4.23	0.48	4.48	0.48
120	3.70	0.49	2.91	0.49	4.27	0.48
144	3.00	0.48	2.14	0.48	3.67	0.48
168	3.04	0.47	2.25	0.45	3.40	0.46
192	2.87	0.46	2.29	0.46	2.86	0.46

ตารางที่ 24 ค่าความเป็นกรดต่าง ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลท C035 ในถุงพลาสติกทนร้อน

เวลา (ชั่วโมง)	C035	Control
0	5.40	5.50
24	4.84	5.50
48	4.31	5.50
72	4.61	5.50
96	4.57	5.50
120	4.68	5.50
144	4.65	5.50
168	4.61	5.50
192	4.60	5.50

ตารางที่ 25 ปริมาณกรดทั้งหมด (%) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลท C035 ในถุงพลาสติกทนร้อน

เวลา(ชั่วโมง)	C035	Control
0	0.17	0.07
24	0.26	0.07
48	0.55	0.07
72	0.55	0.08
96	0.55	0.08
120	0.51	0.09
144	0.52	0.08
168	0.54	0.08
192	0.54	0.08

ตารางที่ 26 กิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง (α - amylase) ของตัวอย่างที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus* sp. ไอโซเลท C035 ในถุงพลาสติกทนร้อน

เวลา(ชั่วโมง)	C035	Control
0	0.57	0.50
24	2.56	0.50
48	4.51	0.50
72	3.98	0.50
96	3.96	0.51
120	3.93	0.51
144	2.96	0.53
168	2.87	0.53
192	2.87	0.50



รูปที่ 27 แสดงการหมักแบบแข็ง (solid state fermentation) ในพลาสติก



รูปที่ 28 แสดงการหมักแบบแข็ง (solid state fermentation) ในถุงพลาสติกกั้นร้อน