การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 ด้วยวิธีการกลายพันธุ์เพื่อการผลิตกรดแลกติกโดยวิธีการหมักแบบแข็ง

Strain Improvement of *Rhizopus oryzae* C018 by Mutation for Lactic Acid Production by Solid State Fermentation

ซัฟรา หะยีหะมะ

Saffra Hayihama

เลขหมู่ QK600.473.T6 ซ64 2559
Bib Key 418149
18 JUL 2017

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Microbiology
Prince of Songkla University
2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 ด้วยวิธีการกลายพันธุ์เพื่อการผลิตกรดแลกติกโดยวิธีการหมักแบบแข็ง

ผู้เขียน นางสาวซัฟรา หะยีหะมะ

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

....
(ดร.วิไลลักษณ์ สุวะโซโน)

คณะกรรมการสอบ

....ประธานกรรมการ
(ดร.สมพร มูลมั่งมี)

....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาทร)

....กรรมการ
(ดร.วิไลลักษณ์ สุวะโซโน)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ..
(ดร.วิไลลักษณ์ สุวะโซโน)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ....ซัฟรา หะยีหะมะ..
(นางสาวซัฟรา หะยีหะมะ)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ......ซัฟรา หะยีหะมะ......
(นางสาวซัฟรา หะยีหะมะ)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 ด้วยวิธีการกลายพันธุ์เพื่อการผลิตกรดแลกติกโดยวิธีการหมักแบบแข็ง
ผู้เขียน นางสาวซัฟรา หะยีหะมะ
สาขาวิชา จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2558

บทคัดย่อ

กรดแลกติกมีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร ยา เครื่องสำอางและอื่นๆ มีรายงานว่าเชื้อรา *Rhizopus* spp. สามารถผลิตกรดแลกติกได้ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 สายพันธุ์ดั้งเดิม ให้ดียิ่งขึ้นด้วยการทำให้กลายพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต (UV) สารเคมี ethyl methane sulfonate (EMS) และทั้งสองวิธีร่วมกัน (UV ร่วมกับ EMS) พบว่าได้เชื้อรากลายพันธุ์จากรังสี UV, EMS และ UV ร่วมกับ EMS เท่ากับ 35, 37 และ 10 ไอโซเลท ตามลำดับ เมื่อนำเชื้อรากลายพันธุ์ทั้งหมดไปศึกษาความสามารถในการผลิตกรดและการย่อยแป้งมันสำปะหลัง พบว่าทั้งหมดสามารถผลิตกรดได้ดี ผลการทดสอบการย่อยแป้งมันสำปะหลัง พบว่าเชื้อรากลายพันธุ์จากรังสี UV (UV 333) จากสารเคมี EMS (EMS 132) และจาก UV ร่วมกับ EMS (CB 135) ให้ผลการย่อยแป้งได้ดี โดยให้ค่า extracellular enzyme production ratio (EPR) เท่ากับ 1.87, 1.62 และ 1.57 ตามลำดับ จึงได้นำเชื้อรากลายพันธุ์ทั้ง 3 ไอโซเลทไปศึกษาหาค่าพีเอช (pH) ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดด้วยวิธีการหมักแบบแข็ง โดยใช้เปลือกมันสำปะหลังบ่มที่ 28 องศาเซลเซียส พบว่าที่พีเอช (pH) 6.0 เชื้อรากลายพันธุ์ทั้งสามไอโซเลท คือ UV 333, EMS 132 และ CB 135 ให้ปริมาณกรดทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 72.9, 57.6 และ 40.5 มิลลิกรัมต่อกรัมตามลำดับ จากนั้นจึงนำเชื้อรากลายพันธุ์ทั้ง 3 ไอโซเลทมาศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเพิ่มปริมาณวัสดุหมักให้มากขึ้น โดยนำมาหมักในถาดพลาสติกขนาด 12×24 เซนติเมตร จัดสภาวะการหมักที่เหมาะสม โดยปรับค่าพีเอช (pH) เริ่มต้นเท่ากับ 6.0 พบว่าเชื้อรากลายพันธุ์ไอโซเลท CB 135, UV 333 และ EMS 132 ให้ปริมาณกรดแลกติก ซึ่งวิเคราะห์ด้วย HPLC เท่ากับ 3.482, 2.932 และ 2.743 มิลลิกรัมต่อกรัมตามลำดับ

Thesis Title Strain Improvement of *Rhizopus oryzae* C018 by Mutation for
Lactic Acid Production by Solid State Fermentation
Author Miss Saffra Hayihama
Major Program Microbiology
Academic Year 2015

ABSTRACT

Lactic acid has been used extensively in food, pharmaceutical, cosmetics and many industrial fields. *Rhizopus* spp. have been reported as promising filamentous fungi that can produce lactic acid. The aim of this study was to increase the lactic acid production by mutation of a *Rhizopus oryzae* C018 wild type strain. The *Rhizopus oryzae* C018 wild type was treated by ultraviolet (UV), ethyl methane sulfonate (EMS) and the combination of UV plus EMS and 35, 37 and 10 isolates of the mutant were obtained respectively. All the mutants were investigated for the ability of acid production and cassava starch hydrolysis. Acid production was enhanced by all mutants. The mutants by UV (designated as UV 333), EMS (designated as EMS 132) and the combination (designated as CB 135) expressed the highest cassava starch hydrolysis with extracellular enzyme production ratio (EPR) of 1.87, 1.62 and 1.57 respectively. Those three mutants were investigated for optimum pH for acid production using cassava peel by solid state fermentation, incubated at 28°C.The results found that at pH 6.0 three mutants exhibited the highest total acid production of 72.9, 57.6 and 40.5 milligram/gram, respectively. Scale up evaluation by increasing the substrate of fermentation, and incubation at the initial pH 6.0 revealed that CB 135, UV 333 and EMS 132 expressed the highest lactic acid production of 3.482, 2.932 and 2.743 milligram/gram, respectively by HPLC analysis.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เพราะได้รับความกรุณาจากบุคคลหลายท่านและจากหลายหน่วยงาน ข้าพเจ้าจึงขอขอบพระคุณ ณ ที่นี่ ดังนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.วิไลลักษณ์ สุวะโชโน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้ความรู้ ให้คำปรึกษา และชี้แนะแนวทางอันเป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์ ตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.สมพร มูลมั่งมี นักวิจัยอาวุโส จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.พิมลศรี มิตรภาพอาทร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา และชี้แนะแนวทางอันเป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ภาคจุลชีววิทยา ที่ให้สถานที่ อุปกรณ์ และสารเคมีในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ และเจ้าหน้าที่ภาคจุลชีววิทยาทุกคนที่คอยช่วยเหลือ และในคำแนะนำงานด้านเอกสารต่างๆ

ขอขอบพระคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ภาคจุลชีววิทยาทุกๆ ท่านที่คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ เป็นที่ปรึกษา และคอยเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่และครอบครัว สำหรับกำลังใจที่ดี และให้การสนับสนุนการศึกษา รวมทั้งให้คำปรึกษาในทุกๆ เรื่องด้วยดีเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

ซัฟรา หะยีหะมะ

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการรูป	(12)
บทที่	
1 บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	37
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการวิจัย	
วัสดุและอุปกรณ์	38
วิธีการทดลอง	40
3 ผลการทดลอง	49
4 สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	83
ข้อเสนอแนะ	92
บรรณานุกรม	93
ภาคผนวก ก	109
ภาคผนวก ข	110
ภาคผนวก ค	114
ภาคผนวก ง	128
ภาคผนวก จ	130
ประวัติผู้เขียน	131

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณสมบัติของกรดแลกติก	8
2	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 เปรียบเทียบกับเชื้อรา *Rhizopus oryzae* TISTR 3535	49
3	การสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 บนอาหาร Cassava starch agar	52
4	การผลิตกรดและการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV ทั้ง 35 ไอโซเลทบนอาหาร Cassava starch agar เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	54
5	การผลิตกรดและการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี EMS ที่ความเข้มข้นต่างกันทั้ง 37 ไอโซเลท บนอาหาร Cassava starch agar เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	60
6	การผลิตกรดและการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV ร่วมกับสารเคมี EMS ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรทั้ง 10 ไอโซเลท บนอาหาร Cassava starch agar เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	67
7	อัตรา Survival rate และ Dead rate ของเชื้อรากลายพันธุ์ด้วยรังสี	71
8	อัตรา Survival rate และ Dead rate ของเชื้อรากลายพันธุ์ด้วยสารเคมี EMS	72
9	อัตรา Survival rate และ Dead rate ของเชื้อรากลายพันธุ์ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV และสารเคมี EMS	72
10	ค่า C/N Ratio ของเปลือกมันสำปะหลัง	82
11	การผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ	86

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

12 ปริมาณธาตุอาหารในเปลือกมันสำปะหลังเก่าและใหม่ 87

13 การศึกษาปริมาณ C/N Ratio ในเปลือกมันสำปะหลัง 88

14 การผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ด้วยวิธีการหมักแบบต่าง ๆ 90

15 ผลทดสอบอัตราการรอดชีวิต (Survival rate) ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV (UV 333) 114

16 ผลทดสอบอัตราการรอดชีวิต (Survival rate) ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 สายพันธุ์กลายด้วยสารเคมี EMS (EMS 132) 115

17 ผลทดสอบอัตราการรอดชีวิต (Survival rate) ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 สายพันธุ์กลายที่ได้จากการใช้สองวิธีร่วมกัน (CB 135) 116

18 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 สายพันธุ์ดั้งเดิม (Wild type strain) ที่พีเอช (pH) เท่ากับ 6.0 117

19 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 สายพันธุ์ดั้งเดิม (Wild type strain) ที่พีเอช (pH) เท่ากับ 7.0 117

20 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 สายพันธุ์ดั้งเดิม (Wild type strain) ที่พีเอช (pH) เท่ากับ 8.0 118

21 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 สายพันธุ์ดั้งเดิม (Wild type strain) ที่พีเอช (pH) เท่ากับ 9.0 118

22 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 สายพันธุ์ดั้งเดิม (Wild type strain) ที่พีเอช (pH) เท่ากับ 10.0 119

23 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV (UV 333) ที่พีเอช (pH) เท่ากับ 6.0 119

24 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV (UV 333) ที่พีเอช (pH) เท่ากับ 7.0 120

25 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV (UV 333) ที่พีเอช (pH) เท่ากับ 8.0 120

26 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV (UV 333) ที่พีเอช (pH) เท่ากับ 9.0 121

27 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV (UV 333) ที่พีเอช (pH) เท่ากับ 10.0 121

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
28	ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี EMS (EMS 132) ที่พีเอช (pH) เท่ากับ 6.0	122
29	ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี EMS (EMS 132) ที่พีเอช (pH) เท่ากับ 7.0	122
30	ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี EMS (EMS 132) ที่พีเอช (pH) เท่ากับ 8.0	123
31	ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี EMS (EMS 132) ที่พีเอช (pH) เท่ากับ 9.0	123
32	ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี EMS (EMS 132) ที่พีเอช (pH) เท่ากับ 10.0	124
33	ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการใช้สองวิธีร่วมกัน (CB 135) ที่พีเอช (pH) เท่ากับ 6.0	124
34	ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการใช้สองวิธีร่วมกัน (CB 135) ที่พีเอช (pH) เท่ากับ 7.0	125
35	ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการใช้สองวิธีร่วมกัน (CB 135) ที่พีเอช (pH) เท่ากับ 8.0	125
36	ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการใช้สองวิธีร่วมกัน (CB 135) ที่พีเอช (pH) เท่ากับ 9.0	126
37	ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการใช้สองวิธีร่วมกัน (CB 135) ที่พีเอช (pH) เท่ากับ 10.0	126
38	ผลทดสอบเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ UV 333, EMS 132 และ CB 135 ที่พีเอช (pH) เท่ากับ 6.0	127
39	ปริมาณกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ UV 333, EMS 132 และ CB 135 วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC	127

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะของต้นมันสำปะหลัง	3
2	ลักษณะของหัวมันสำปะหลัง	3
3	สูตรโครงสร้างของ กรดแอล(+)-แลกติก และ กรดดี(-)-แลกติก	7
4	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Rhizopus* spp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	17
5	การเจริญของเชื้อรา *Rhizopus* spp. บนอาหารแข็ง PDA	17
6	การนับสปอร์เชื้อราโดยใช้สไลด์ Haemacytometer	42
7	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง Macroscopic และ Microscopic morphology ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* TISTR 3535	48
8	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง Macroscopic และ Microscopic morphology ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018	49
9	Neighbor-joining tree แสดงไฟโลจีนี่ของสายดีเอ็นเอเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างมันสำปะหลัง สายดีเอ็นเอไอโซเลท CO18 โดยแสดงค่า Bootstrap (1,000 ซ้ำ) มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ใช้ *Backusella circina* และ *Backusella lamprospora* เป็น Out group สเกลบาร์ 5 เปอร์เซ็นต์	50
10	การผลิตกรดของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 บนอาหารโดยดูจากการเปลี่ยนสีของ BCG จากสีเขียวเป็นสีเหลือง ความเข้มของสีเหลืองเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่บ่ม (ภาพ ข-ง) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ก)	51
11	การสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 (ภาพ ก-ค)	53
12	การผลิตกรดของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV ที่ความแตกต่างของระยะทางที่สัมผัสระยะเวลาบ่ม 72 ชั่วโมง	57
13	การสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV ที่ความแตกต่างของระยะทางที่สัมผัสระยะเวลาบ่ม 72 ชั่วโมง	58
14	การผลิตกรดของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี EMS ที่ความเข้มข้นต่างกันระยะเวลาบ่ม 72 ชั่วโมง	64
15	การสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี EMS ที่ความเข้มข้นต่างกันระยะเวลาบ่ม 72 ชั่วโมง	65

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
16	การผลิตกรดของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV ร่วมกับสารเคมี EMS ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรระยะเวลาบ่ม 72 ชั่วโมง	69
17	การสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV ร่วมกับสารเคมี EMS ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรระยะเวลาบ่ม 72 ชั่วโมง	70
18	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา Macroscopic และ Microscopic morphology ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์	73
19	ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคซามีน (มิลลิกรัมต่อกรัม) ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์โดยการใช้รังสี UV (UV 333) สารเคมี EMS (EMS 132) และสองวิธีร่วมกัน (CB 135) ที่ระยะเวลาการหมัก 168 ชั่วโมง	74
20	ค่าพีเอช (pH) ที่มีผลต่อการผลิตกรดของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 สายพันธุ์ดั้งเดิม (Wild type strain) ที่ระยะเวลาหมัก 168 ชั่วโมง	76
21	ค่าพีเอช (pH) ที่มีผลต่อการผลิตกรดของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์โดยการใช้รังสี UV (UV 333) ที่ระยะเวลาหมัก 168 ชั่วโมง	77
22	ค่าพีเอช (pH) ที่มีผลต่อการผลิตกรดของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ด้วยการใช้สารเคมี EMS (EMS 132) ที่ระยะเวลาหมัก 168 ชั่วโมง	78
23	ค่าพีเอช (pH) ที่มีผลต่อการผลิตกรดของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ด้วยการใช้รังสี UV ร่วมกับสารเคมี EMS (CB 135) ที่ระยะเวลาหมัก 168 ชั่วโมง	79
24	ปริมาณกรดแลกติก (มิลลิกรัมต่อกรัม) ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ (UV 333) ที่ระยะเวลาการหมัก 168 ชั่วโมง วิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC	80
25	ปริมาณกรดแลกติก (มิลลิกรัมต่อกรัม) ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ (EMS 132) ที่ระยะเวลาการหมัก 168 ชั่วโมง วิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC	81
26	ปริมาณกรดแลกติก (มิลลิกรัมต่อกรัม) ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ (CB 135) ที่ระยะเวลาการหมัก 168 ชั่วโมง วิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC	81

27 เปรียบเทียบถังหมักแบบเก่า (50 กิโลกรัม) และถังหมักที่พัฒนาใหม่ (1,000 กิโลกรัม) ชื่อ “ FERMSOSTAT ” 92
28 กราฟมาตรฐานของ Reducing sugar โดยวิธี DNS 128
29 กราฟมาตรฐานของ Total sugars โดยวิธี Phenol-sulfuric acid 128
30 กราฟมาตรฐานของ Glucosamine (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) 129
31 การหมักแบบแข็งโดยใช้ถาด (Solid state fermentation on tray) 130
32 การเจริญของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 บนวัสดุหมัก 130

บทที่ 1

บทนำ

1.1 บทนำต้นเรื่อง

กรดแลกติก เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีการผลิตและนำมาใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมอย่างกว้างขวาง อาทิ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเคมี อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมฟอกหนัง และอุตสาหกรรมสิ่งทอ (Soccol *et al.*, 1994; Yin *et al.*, 1997) นอกจากใช้ด้านอุตสาหกรรมแล้ว ปัจจุบันกรดแลกติกยังถูกนำมาใช้เป็นตัวตั้งต้นในการผลิตกรดพอลีแลกติก (Polylactic acid) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของกรดแลกติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เพื่อแทนที่การใช้พลาสติกที่ได้จากการสังเคราะห์โดยวิธีการทางเคมี ที่ใช้ระยะเวลานานในการย่อยสลายและยังก่อให้เกิดปัญหาทางสิ่งแวดล้อมตามมา (Datta *et al.*, 1995) ซึ่งพอลิเมอร์ของกรดแลกติกที่ผลิตได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ เช่น ไหมเย็บแผล การทำศัลยกรรมกระดูก ส่วนในอุตสาหกรรมอาหารมีการใช้กรดแลกติกเป็นสารปรับความเป็นกรดด่าง เป็นวัตถุกันเสียในอาหาร ในด้านเภสัชกรรมนิยมใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง ครีม และเป็นส่วนผสมของครีมเพื่อป้องกันสิว เป็นต้น (Laskin, 1985) ปริมาณความต้องการกรดแลกติกทั่วโลกสูงถึง 259,000 ตันในปี 2012 และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปี ชี้ให้เห็นถึงความต้องการกรดแลกติกที่เพิ่มมากขึ้น (Yin *et al.*, 1997) ในส่วนของประเทศไทยก็มีต้องการกรดแลกติกเพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกัน แต่เนื่องจากประเทศไทยยังไม่สามารถตั้งโรงงานผลิตกรดแลกติกได้เอง จึงจำเป็นต้องพึ่งการนำเข้ากรดแลกติกจากต่างประเทศ ทำให้สูญเสียเม็ดเงินจำนวนมหาศาล ถึงแม้ปัจจุบันมีบริษัท พูแรค (ประเทศไทย) จำกัด ได้มาตั้งโรงงานผลิตกรดแลกติก ที่จังหวัดระยอง เมื่อปี 2548 แต่ก็เป็นบริษัทต่างชาติขนาดใหญ่ ตั้งขึ้นเพื่อใช้วัตถุดิบที่มีในประเทศไทย (Press, 2551)

ประเทศไทย เป็นประเทศเกษตรกรรม ซึ่งมีพืชผลทางการเกษตรที่สามารถปลูกทดแทนได้ตลอดทั้งปี โดยเฉพาะมันสำปะหลังซึ่งจัดเป็นพืชทางเศรษฐกิจ มีการปลูกกระจัดกระจายอยู่ทั่วทุกภาคในประเทศไทย (กรมวิชาการเกษตร, 2537) โดยเฉพาะในพื้นที่ที่ไม่สามารถปลูกพืชชนิดอื่นได้ดี ทั้งนี้เพราะมันสำปะหลังเป็นพืชที่ปลูกง่าย ทนทานต่อสภาพดินฟ้าอากาศแห้งแล้ง ใช้ต้นทุนในการปลูกต่ำประกอบกับมีศัตรูพืชน้อย และองค์ประกอบส่วนใหญ่ของมันสำปะหลังเป็นคาร์โบไฮเดรทสูงถึง 65-70 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง จึงมีความเป็นไปได้ในการนำมาใช้ประโยชน์โดยการแปรรูปให้เป็นสารละลายน้ำตาลกลูโคส เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์ นอกจากนี้เปลือกมันสำปะหลังจากโรงงานอุตสาหกรรมแป้ง เป็นวัสดุ

เหลือใช้ที่มีปริมาณมากถึง 1 ล้านตันต่อปี ดังนั้นหากนำเปลือกมันสำปะหลังมาใช้เป็นวัสดุหมัก จะเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่า และช่วยเหลือเกษตรกรในเรื่องของราคาที่ตกต่ำตลอดทั้งปี (อรรถวิท, 2547)

การใช้ประโยชน์จากเปลือกมันสำปะหลัง โดยกรรมวิธีการหมักแบบแข็ง (Solid-state fermentation, SSF) ซึ่งมีต้นทุนการผลิตต่ำ วัสดุหมักที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร หาง่ายและราคาถูก เครื่องมือที่ใช้เป็นแบบง่าย ๆ และไม่ยุ่งยากในการทำงาน ไม่สิ้นเปลืองพื้นที่ใช้สอย ใช้น้ำปริมาณน้อย (Pandey *et al.*, 2003) และเป็นกระบวนการหมักที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ โดยอาศัยน้ำซึ่งอยู่ในรูปของความชื้นที่ถูกดูดซับในวัสดุหมัก (Moo-Young *et al.*, 1983) ดังนั้นการหมักชนิดนี้จึงมักจะเหมาะกับการใช้จุลินทรีย์ประเภทราซึ่งสามารถเจริญได้ในวัสดุหมักที่มีความชื้นต่ำ (Ogawa *et al.*, 1995) ข้อดีของการหมักแบบแข็ง คือ สามารถหมักโดยใช้ถังหมักขนาดเล็กและปริมาณวัสดุหมักน้อย ลดค่าใช้จ่ายที่เกิดขึ้นหลังจากการหมัก ให้ผลิตภัณฑ์สูงกว่า ขั้นตอนการหมักไม่ซับซ้อน ใช้พลังงานต่ำ เกิดของเสียจากการหมักน้อย (Cannel and Moo-Young, 1980) ทั้งยังช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้

สำหรับจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในกระบวนการหมักคือเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากจากสุณิษาและวิไลลักษณ์ (2557) ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างมันสำปะหลังตากแห้ง *Rhizopus oryzae* C018 เป็นเชื้อราที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส ความชื้น 50-85 เปอร์เซ็นต์ ค่าพีเอช (pH) ประมาณ 6.0 มีรายงานว่าเชื้อรา *Rhizopus* spp. เป็นเชื้อราที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากแป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง (Yu and Hang, 1989) แล้วให้กรดแลกติกในรูป แอล(+)แลกติก (Yin *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังมีข้อดีหลายประการ เช่น มีความสามารถในการใช้แป้งเป็นแหล่งอาหารและเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลเพื่อใช้ในการผลิตกรดแลกติก (Hang, 1989; Bigelis and Acora, 1992) เชื้อราชนิดนี้มีความปลอดภัยสูงในเชิงโภชนาการเนื่องจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักหลายชนิดเกิดจากบทบาทจากการเจริญของราในกลุ่มนี้ นอกจากนี้เชื้อราในกลุ่มนี้สามารถเจริญได้ในที่มีออกซิเจนจำกัด เจริญได้ดีในที่มีอุณหภูมิสูง และใช้สารอาหารง่าย ราคาถูกซึ่งเหมาะกับกระบวนการหมักแบบแข็ง เป็นการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีปริมาณมาก เพื่อลดปัญหาทางสิ่งแวดล้อม

การศึกษานี้จึงมุ่งพัฒนาเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 โดยใช้วิธีการกลายพันธุ์และหาสภาวะพีเอช (pH) ที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติก โดยใช้เปลือกและแป้งมันสำปะหลังเป็นวัสดุในการหมัก ด้วยวิธีการหมักแบบแข็ง (Solid state fermentation: SSF) ซึ่งมีข้อดีดังที่กล่าวข้างต้น

1.2 การตรวจเอกสาร

1.2.1 มันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นพืชหัวชนิดหนึ่ง มีชื่อเรียกด้วยกันหลายภาษาต่าง ๆ ได้แก่ Cassava, Yucca, Manioc, Tapioca เป็นต้น

ชื่อสามัญ	Cassava, Tapioca plant
ชื่อวิทยาศาสตร์	*Manihot esculenta* (L.) *Crantz*
ชื่อท้องถิ่น	มันสำโรง, มันไม้
วงศ์	EUPHORBIACEAE

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก จุไรรัตน์ (2556)

มันสำปะหลังจัดเป็นไม้พุ่ม มีลำต้นตั้งตรง เป็นไม้เนื้ออ่อนที่มีความสูงของลำต้นประมาณ 1-5 เมตร มีการแตกกิ่ง กิ่งที่แตกจากลำต้นหลักเรียกว่า “กิ่งชุดแรก” ส่วนกิ่งที่แตกจากกิ่งชุดแรกเรียกว่า “กิ่งชุดที่สอง” ทุกส่วนของต้นเมื่อนำมาสับจะมีน้ำยางสีขาวไหลออกมา และรากสะสมอาหารเป็นแท่งหนาอยู่ใต้ดิน มีประมาณ 5-10 รากต่อต้น ระบบรากเป็นแบบรากฝอย รากจะเกิดจากข้อของลำต้นที่ใช้ปลูกและขยายใหญ่เป็นหัว โดยหัวมันสำปะหลังเมื่อนำมาตัดตามขวางจะมีส่วนประกอบดังนี้ คือ เปลือกชั้นนอก เปลือกชั้นใน และส่วนสะสมแป้งหรือที่เรียกว่าไส้กลางส่วนอีกข้อมูลหนึ่งระบุว่ารากมันสำปะหลังจะมีอยู่ด้วยกัน 2 ชนิด คือ รากจริง และรากสะสมอาหาร เรียกว่าหัว ที่มีปริมาณแป้งประมาณ 15-40 เปอร์เซ็นต์ รากสะสมอาหารจะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-15 เซนติเมตร และยาวประมาณ 15-100 เซนติเมตร องค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นคาร์โบไฮเดรทสูงถึง 65-70 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแห้ง สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์ได้

รูปที่ 1 ลักษณะของต้นมันสำปะหลัง

รูปที่ 2 ลักษณะของหัวมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังมีแหล่งกำเนิดแถบที่ลุ่มเขตร้อน (Lowland tropics) มีหลักฐานแสดงว่าปลูกกันในโคลัมเบียและเวเนซูเอลา มานานกว่า 3,000 – 7,000 ปีมาแล้ว สันนิษฐานว่าแหล่งกำเนิดมันสำปะหลังมี 4 แหล่งด้วยกันคือ แถบประเทศกัวเตมาลาและเม็กซิโก, ทางทิศตะวันตกเฉียงเหนือของทวีปอเมริกาใต้, ทางทิศตะวันออกของประเทศโบลิเวียและทางทิศตะวันตกเฉียงเหนือ ของประเทศอาร์เจนตินา, ทางทิศตะวันออกของประเทศบราซิล ในทวีปเอเชียมีการนำมันสำปะหลังมาปลูกครั้งแรกที่ประเทศฟิลิปปินส์ในคริสตวรรษที่ 17 โดยชาวสเปนได้นำมาจากเม็กซิโกและในเวลาต่อมาก็มีการปลูกที่ อินโดนีเซีย และเมื่อ พ.ศ. 2337 ได้มีการนำมันสำปะหลังจากแอฟริกามาปลูกที่อินเดียเพื่อใช้ในการทดลอง สำหรับประเทศไทยไม่มีหลักฐานที่แน่นอนว่ามีการนำมันสำปะหลังเข้ามาปลูกเมื่อใดคาดว่าคงเข้ามาในระยะเดียวกันกับการเข้าสู่ศรีลังกาและฟิลิปปินส์ คือประมาณ พ.ศ. 2329–2383 มันสำปะหลังเดิมเรียกกันว่ามันสำโรง มันไม้ ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกว่ามันต้นเตี้ย ทางภาคใต้เรียกว่ามันเทศ

มันสำปะหลังเป็นพืชอาหารที่สำคัญเป็นอันดับ 5 ของโลก รองจากข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าว และมันฝรั่ง ซึ่งมีมูลค่าการส่งออก พ.ศ.2552 กว่า 51,641 ล้านบาท หรือคิดเป็นร้อยละ 5.2 ของมูลค่าการส่งออกสินค้าภาคการเกษตร สมาคมการค้ามันสำปะหลังไทยรายงานว่าปี พ.ศ.2558-2559 ผลผลิตมันสำปะหลังเฉลี่ยต่อไร่สูงถึง 3.731 ตันต่อไร่ เนื่องจากเป็นพืชที่มีการปลูกกระจัดกระจายอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย มีปัญหาเรื่องโรคและแมลงศัตรูพืชน้อย สามารถขึ้นได้ในดินที่มีความอุดมสมบูรณ์ต่ำ ทนแล้งได้ดี จัดเป็นพืชอาหารที่สำคัญของประเทศในเขตร้อน โดยเฉพาะประเทศต่าง ๆ ในทวีปแอฟริกาและทวีปอเมริกาใต้ ในทวีปเอเชียประเทศอินโดนีเซียและอินเดียมีการบริโภคมันสำปะหลังกันเป็นจำนวนมาก ปริมาณผลผลิตที่ได้ในแต่ละปีร้อยละ 60 ใช้เป็นอาหารของมนุษย์ ร้อยละ 27.5 ใช้ทำเป็นอาหารสัตว์ และร้อยละ 12.5 ใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ มันสำปะหลังเป็นพืชที่ทำรายได้ให้เกษตรกรมากเป็นอันดับที่ 4 รองจากยางพารา อ้อย และข้าว ผลผลิตมันสำปะหลัง ภายในประเทศนำไปใช้ทำมันเส้นและมันอัดเม็ดร้อยละ 45-50 ใช้แปรรูปเป็นแป้งร้อยละ 50-55 ประเทศไทยเป็นประเทศที่ส่งผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังออกมากที่สุดในโลก ประเทศที่ไทยส่งผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังในรูปของมันอัดเม็ดไปขายมากที่สุดคือ ประเทศในกลุ่มประชาคมยุโรป (เนเธอร์แลนด์ สเปน เยอรมัน โปรตุเกส) เกาหลีใต้และญี่ปุ่น ส่วนในรูปของแป้งมันสำปะหลัง ประเทศญี่ปุ่นสั่งซื้อ มากที่สุด รองลงมาคือ ฮ่องกง สหรัฐอเมริกา มาเลเซีย สิงคโปร์ และไต้หวัน

ในประเทศไทยมีการใช้ประโยชน์จากมันสำปะหลังมากขึ้นในปัจจุบัน ให้พลังงานสำหรับมนุษย์และสัตว์เป็นอย่างดี ตลอดจนใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ

ส่วนอุตสาหกรรมที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบหลักในการแปรรูป

1. ใช้เป็นอาหารของมนุษย์ โดยใช้เป็นแหล่งอาหารเสริมและอาหารหลัก โดย 95 เปอร์เซ็นต์ของมันสำปะหลังใช้เป็นอาหารของมนุษย์ โดยอาจจะใช้ต้ม ทอด ปิ้ง นึ่ง ย่าง อบ เชื่อม และหั่นฝอย หรือผลิตสารเสริมในอาหารได้แก่ ผงชูรส (Monosodium glutamate), ไลซีน (กรดอะมิโนที่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นเองได้) ส่วนปริมาณผลผลิตมันสำปะหลังในประเทศไทย คือ 25,107,758 ตัน (สมาคมการค้ามันสำปะหลังไทย, 2552) ซึ่งจากผลผลิตที่มากขึ้นทำให้ปริมาณการแปรรูปสูงขึ้นและทิ้งของเสียที่เป็นเปลือกมันสำปะหลังจำนวนมาก

2. ใช้ทำแป้ง โดยแป้งมันสำปะหลังใช้เป็นอาหารของมนุษย์โดยตรงและใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมทำกาว ทำกระดาษ ทอผ้า ทำน้ำตาลกลูโคส และสารให้ความหวาน ซึ่งได้แก่ กลูโคสเหลว (ใช้เป็นวัตถุในการผลิตลูกกวาดและเครื่องดื่มหลายชนิด), กลูโคสผง (แบ่งเป็น เดกซ์โตส โมโนไฮเดรส (ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารกระป๋อง) และเดกซ์โตส แอนไฮดรัส (ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตยา), และซอร์บิทอล (ใช้ในอุตสาหกรรมยาสีฟันและเครื่องสำอาง) เป็นต้น ประเทศไทยเป็นประเทศเดียวที่ใช้มันสำปะหลังเป็นแป้งมากที่สุด ถือได้ว่าเป็นผู้ผลิตแป้งมันสำปะหลังรายใหญ่ที่สุดของโลก มีกำลังการผลิตมากกว่า 2 ล้านตันต่อปี

3. ใช้หมักทำแอลกอฮอล์ เบียร์ และขนมปัง ในบางประเทศ อย่างเช่น บราซิล กำลังใช้หัวมันสำปะหลังหมักเป็นแอลกอฮอล์ เพื่อใช้แทนน้ำมันเบนซินสำหรับเครื่องยนต์

4. ใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยทำเป็นมันเส้น มันสำปะหลังอัดเม็ด และกากมันสำปะหลังซึ่งใช้เป็นแหล่งพลังงานผสมในอาหารสัตว์ ลำต้นสามารถนำมาทำเป็นรั้วบ้าน รั้วสวน และล้อมคอกสัตว์เลี้ยงของชาวชนบท

นอกจากนี้มันสำปะหลังยังสามารถนำมาผลิตพลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้ (Biodegradable plastic) ซึ่งในปัจจุบันได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งจากนักวิทยาศาสตร์ ตลอดจนนักอุตสาหกรรมชั้นแนวหน้าทั่วโลก โดยพลาสติกชีวภาพย่อยสลายได้นั้นผลิตมาจากวัตถุดิบที่สามารถผลิตทดแทนขึ้นใหม่ได้ในธรรมชาติ (Renewable resource) ซึ่งก็คือ พืชพวกมันสำปะหลัง ข้าวโพด อ้อย รวมถึงใช้พลังงานในกระบวนการผลิตต่ำ และสามารถย่อยสลายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำได้ด้วยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ โดยพลาสติกย่อยสลายได้นั้นจะมีคุณสมบัติในการใช้งานได้เทียบเท่าพลาสติกจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีแบบดั้งเดิม (Commodity plastics) และสามารถทดแทนการใช้งานที่มีอยู่ได้ (Tonukari, 2004; Sriroth *et al.*, 2000)

1.2.2 แป้งมันสำปะหลัง

อุตสาหกรรมมันสำปะหลังของประเทศไทย ประกอบด้วยการผลิตมันสำปะหลัง อุตสาหกรรมแปรรูปมันสำปะหลัง และอุตสาหกรรมต่อเนื่องที่ใช้ผลิตภัณฑ์จากการแปรรูป ผลผลิตหลักของอุตสาหกรรมแปรรูปมันสำปะหลัง คือมันเส้น มันอัดเม็ด และแป้งมันสำปะหลัง แม้การส่งออกหลักมีมูลค่าเพียง 47,800 ล้านบาท แต่ผลิตภัณฑ์หลักที่ใช้ในประเทศทำให้เกิดอุตสาหกรรมต่อเนื่องมูลค่ามากกว่า 300,000 ล้านบาท เช่น อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมผงชูรส และอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น นอกจากเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมเดิมที่มีอยู่ ความต้องการมันสำปะหลังเพื่อผลิตพลังงาน และผลิตภัณฑ์ใหม่ๆ เช่น ไบโอพลาสติก (Bioplastic) กรดแลกติก (Lactic acid) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น นับได้ว่าอุตสาหกรรมมันสำปะหลังมีความสำคัญต่อระบบเศรษฐกิจและสังคมของประเทศ (สมาคมการค้ามันสำปะหลังไทย, 2552)

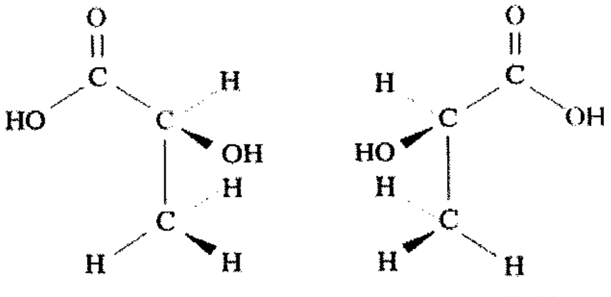
ในประเทศไทย อุตสาหกรรมแป้งถือได้ว่าเป็นอุตสาหกรรมแปรรูปทางการเกษตรกรรมหลัก แป้งที่ผลิตมากที่สุด คือ แป้งมันสำปะหลัง ปัจจุบันมีโรงงานอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังที่จดทะเบียนกับสมาคมอุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังไทยอยู่ 89 โรงงาน จากการสำรวจในช่วงปี พ.ศ.2558

แป้งเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน ในอัตราส่วน 6:10:5 มีสูตรเคมีโดยทั่วไป คือ ($C_6H_{10}O_5$) เป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส ซึ่งประกอบด้วย Anhydroglucose unit เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ Glucosidic linkage ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ทางด้านตอนปลายของสายพอลิเมอร์ มีหน่วยกลูโคสที่มีหมู่แอลดีไฮด์ (Aldehyde group) เรียกว่า Reducing end group แป้งประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคส 2 ชนิด คือ พอลิเมอร์เชิงเส้น อะมิโลส (Amylose) และพอลิเมอร์เชิงกิ่ง อะมิโลเพกทิน (Amylopectin) วางตัวในแนวรัศมี แป้งจากแหล่งที่ต่างกันจะมีอัตราส่วนของอะมิโลสและอะมิโลเพกทินที่แตกต่างกัน ทำให้สมบัติของแป้งแต่ละชนิดแตกต่างกัน

1.2.3 กรดแลกติก

1.2.3.1 คุณสมบัติของกรดแลกติก

กรดแลกติก เป็นกรดอินทรีย์ที่พบได้โดยทั่วไป (Zhang *et al.*, 2007) ที่มีคาร์บอน 3 อะตอม คาร์บอน 1 อะตอมที่อยู่ส่วนปลายเป็นส่วนของหมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl group) ส่วนอะตอมของคาร์บอนอีกปลายหนึ่งเป็นหมู่เมทิล (Methyl group) หรือหมู่ไฮโดรคาร์บอน (Hydrocarbon) และอะตอมของคาร์บอนที่อยู่ตรงกลางเป็นหมู่แอลกอฮอล์ สามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ ในนมเปรี้ยว กากน้ำตาล ผลไม้ อาหารหมักทุกชนิด เป็นต้น (Datta *et al.*, 1995) กรดแลกติก มีอยู่ 2 รูปแบบ เป็น Optical isomer คือ กรดแอล(+)-แลกติก และ กรดดี(-)-แลกติก



รูปที่ 3 สูตรโครงสร้างของ กรดแอล(+)-แลกติก และ กรดดี(-)-แลกติก
ที่มา: Litchfield (1996)

แอล(+)แลกติก (Levorotary lactic acid: L(+)Lactic acid) เป็นรูปที่อยู่ในกระบวนการชีวเคมีของสิ่งมีชีวิตทุกชีวิต รวมทั้งมนุษย์ พบได้ทั่วไปทั้งในเลือด ตับ ไต ต่อมไธมัส กล้ามเนื้อ และของเหลวในร่างกายมนุษย์และสัตว์ มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นในเลือดและกล้ามเนื้อภายหลังการออกกำลังกายอย่างหนัก มีค่า pKa 3.79 มวลโมเลกุล 90.08 จุดหลอมเหลว 53 องศาเซลเซียส ตกผลึกได้ในกรดอะซีติกหรือคลอโรฟอร์ม สามารถประกอบเป็นเกลือกับโลหะได้หลายชนิด เกลือของกรดแลกติกรูปแอล(+)-แลกติก สามารถละลายน้ำได้มากกว่าเกลือของกรดแลกติกรูปผสมแอลและดี (Racemic form) เนื่องจากเป็นรูปที่พบได้ทั่วไปในร่างกายสิ่งมีชีวิต จึงมีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างมากมาย (Narayanan *et al.*, 2004)

ดี(-)แลกติก (Dextrorotatory lactic acid: D(-)Lactic acid) เป็นกรดแลกติกในรูปที่ไม่พบในกระบวนการชีวเคมีของมนุษย์ แต่สามารถพบในกระบวนการชีวเคมีของจุลินทรีย์ มีค่า pKa 3.83 มวลโมเลกุล 90.08 จุดหลอมเหลว 52.8 องศาเซลเซียส ละลายในน้ำ, แอลกอฮอล์ อะซีโตน อีเธอร์ และกลีเซอรอล ไม่ละลายในคลอโรฟอร์ม ตกผลึกได้ในสารละลายอีเธอร์และไอโซโพรพิล อีเธอร์ โดยทั่วไปจะพบ ดี(-)-แลกติก ในกระบวนการชีวเคมีของจุลินทรีย์เท่านั้น (Narayanan *et al.*, 2004) กรดแลกติกมีคุณสมบัติ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 คุณสมบัติของกรดแลกติก

คุณสมบัติของกรดแลกติก	ค่าที่วัดได้
มวลโมเลกุล (Molecular weight)	90.08
จุดหลอมเหลว (Melting point)	16.8 องศาเซลเซียส
- ดี(-), แอล(+)	
- ดีแอล (Racemic) ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนผสม	16.8-33.0 องศาเซลเซียส
จุดเดือด (Boiling point)	82.0 องศาเซลเซียส (0.5 มิลลิเมตรปรอท) 122.0 องศาเซลเซียส (14 มิลลิเมตรปรอท)
ค่าคงที่การแตกตัว (Dissociation constant) (pKa ที่ 25 องศาเซลเซียส)	1.37×10^{-4}
ความร้อนจากการเผาไหม้ (Heat of combination)	1361 กิโลจูลต่อโมล
ความจุความร้อนจำเพาะ (Specific heat)	190 จูลต่อโมล องศาเซลเซียส

ที่มา: Holten *et al.*, 1971 และ Lockwood (1975)

1.2.3.2 ประโยชน์ของกรดแลกติก

1. อุตสาหกรรมอาหารและส่วนที่เกี่ยวข้องกับอาหาร (Food and food-related industries) กรดแลกติกที่ผลิตได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากกรดแลกติกเป็นกรดที่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย หรือ Generally recognized as safe (GRAS) ซึ่งประกาศโดยองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา โดยมักใช้เป็นสารช่วยให้เกิดความสมดุลระหว่างความเป็นกรดด่างในอาหาร (Buffer) เป็นสารเพิ่มความเป็นกรดในอาหาร (Acidulant) เพื่อป้องกันการเน่าเสีย เป็นสารเพิ่มกลิ่นและรสชาติ (Flavor enhancer) พบทั่วไปในอาหารหมักดอง ขนมปัง ขนมหวาน. เครื่องดื่มหรืออาหารที่ดัดแปลงจากนม (Dairy products) เช่น เบียร์ และไวน์ เป็นต้น, เครื่องดื่มทั่วไป ช่วยให้เนื้อสัมผัสของอาหารมีสภาพดีขึ้น และใช้เป็นตัวจับสารตัวอื่น (Chelating agent) ใช้ในการขนส่งผลิตภัณฑ์อาหารสดจำพวกเป็ด ไก่ และปลา ช่วยยืดอายุ ลดกลิ่น และช่วยควบคุมโรคติดต่อที่ปนเปื้อนในอาหาร นอกจากนี้ยังใช้เกลือของกรดแลกติกเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น โซเดียมแลกเตทและโพแตสเซียมแลกเตท เป็นเกลือของกรดแลกติก นิยมเติมในอาหารแปรรูปประเภทเนื้อ ไก่และอาหารทะเล เพื่อยืดอายุการเก็บ แคลเซียมแลกเตทเป็นสารที่นิยมเติมในเครื่องดื่มเกลือแร่และเครื่องดื่มเสริมแคลเซียม (Calcium enriched drink) เพื่อใช้เป็นแหล่งของแคลเซียมและมากกว่า

50 เปอร์เซ็นต์ถูกนำมาใช้ในลักษณะผสมกับน้ำมัน (Emulsifying agent) ในรูปเกลือของกรดน้ำมัน (Datta *et al*., 1995; Reddy *et al*., 2008)

2. อุตสาหกรรมที่ไม่ใช่อาหาร (Non-food uses) กรดแลกติกถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยา ใช้เป็นสารต้านทานฟันผุและใช้ในการรักษาการขาดแคลเซียม (Holland *et al*., 1986; Dunn *et al*., 1988) ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอางและโลชั่นสมานผิว ใช้ในการป้องกันผิวหนังจากแสงแดด ช่วยเพิ่มความชุ่มชื้นให้ผิวหนังให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวหน้าและช่วยในการรักษาสิว (Wee *et al*., 2006) นอกจากนี้กรดแลกติกยังถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิต Cellophane ซึ่งต้องการกรดแลกติกที่มีรูปแบบที่แน่นอน (Isomeric form) (Datta *et al*., 1995; Van ness, 1981) กรดแลกติกสามารถนำไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิตทางเคมี และชีวภาพของการผลิตกรดอินทรีย์ตัวอื่นๆ นอกจากนี้ยังสามารถนำอนุพันธ์ของกรดแลกติกไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นๆ อีกมากมาย เช่น อุตสาหกรรมการชุบโลหะ การผลิตสีอุตสาหกรรมอิเล็กทรอนิกส์ เป็นต้น ทั้งนี้กรดแลกติกได้ถูกนำมาใช้เป็นสารเพิ่มความเป็นกรดในอุตสาหกรรมฟอกหนัง และทอผ้า มีการใช้กรดแลกติกสำหรับการแช่และ Decalcification ของหนังสัตว์ และอุตสาหกรรมการทอผ้า มีการใช้กรดแลกติกช่วยในการย้อมและพิมพ์ เพื่อให้สีติดแน่นนานยิ่งขึ้น (Ruter, 1975) แต่อย่างไรก็ตาม ในอุตสาหกรรมประเภทนี้มักใช้กรดอนินทรีย์เพราะมีราคาถูกกว่า ดังนั้น ถ้าหากว่ามีการพัฒนาการผลิตกรดแลกติกให้ได้ปริมาณสูงขึ้นและราคาถูก น่าจะเป็นการประยุกต์ใช้ในอีกรูปแบบหนึ่ง เพื่อเปิดตลาดของกรดแลกติกให้กว้างมากยิ่งขึ้น เพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการของโรงงานอุตสาหกรรมซึ่งขยายตัวอย่างรวดเร็ว ซึ่งความต้องการกรดแลกติกทั่วโลกมีประมาณ 130,000 -150,000 เมตริกตันต่อปี โดยมีแนวโน้มความต้องการเพิ่มขึ้น 500,000 เมตริกตันต่อปี สำหรับประเทศไทยยังไม่มีโรงงานการผลิตกรดแลกติก จึงจำเป็นต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ มีรายงานว่าอัตราการซื้อขายกรดแลกติก เข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 1.40 ดอลล่าร์สหรัฐต่อกิโลกรัม (Chem. Mark. Rep, 1999) ซึ่งราคามีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นทุกปีและเมื่อเทียบกับปริมาณการนำไปใช้ประโยชน์ก็มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน

3. อุตสาหกรรมการผลิตสารสังเคราะห์พอลิเมอร์ (Lactic acid polymer) กรดแลกติกถูกนำมาใช้ในกระบวนการผลิตพอลีแลกติก แอซิด (Polylactic acid : PLA) ซึ่งเป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Litchfield, 1996) เนื่องจากมีสมบัติที่มีความเหนียวสูงและสามารถย่อยสลายได้จึงนิยมนำไปใช้กันมาก และปัจจุบันเป็นที่สนใจมากที่จะนำ PLA มาใช้แทนผลิตภัณฑ์พลาสติกเพื่อเป็นการรักษาสิ่งแวดล้อม เนื่องจากพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายทางชีวภาพได้ชนิดอื่น เช่น Polycaprolactone (PCL), Polytetramethylene (PTT) เป็นต้น สังเคราะห์จากผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมปิโตรเคมี แต่ในขณะที่ PLA สามารถสังเคราะห์ได้จากกรดแลกติกซึ่งสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักที่สามารถใช้วัตถุดิบจากแหล่งธรรมชาติได้ (Hakkarainen *et al*., 2000)

พอลีแลกติก แอซิด (Polylactic acid: PLA) มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตพอลิเมอร์เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ.1932 โดยบริษัท Carothers แต่มีคุณภาพไม่ดี (Holten, 1971) โครงการจึงถูกระงับไว้ จนกระทั่งปี ค.ศ.1954 บริษัท Dupont ได้จดทะเบียนสิทธิบัตรของสารพอลิเมอร์ของกรดแลกติกที่มีน้ำหนักมวลโมเลกุลสูง แต่อย่างไรก็ตามสารพอลิเมอร์ชนิดนี้จะละลายเมื่อถูกน้ำ การผลิตจึงถูกระงับลงอีกครั้ง จนกระทั่งในปี ค.ศ.1972 บริษัท Ethicon ได้ผลิตสารพอลิเมอร์ระหว่างกรดแลกติกและกรดไกลโคลิก (Glycolic acid) ปรากฏว่าใช้ได้ผลดี ปัจจุบันนี้ได้ถูกนำมาใช้เป็นเส้นใยในการเย็บแผล การผลิตสารพอลิเมอร์จากกรดแลกติกนั้นต้องใช้สารตั้งต้นที่มีความบริสุทธิ์สูง และสามารถทนความร้อนได้สูง ปกติจะใช้กรดแลกติกที่อยู่ในรูป แอล(+)แลกติก นอกจากนี้แล้ว ยังพบว่าสัดส่วนของกรดแลกติกรูปแอล(+)แลกติก และรูปดี(-)แลกติก จะต้องมีสัดส่วนที่แน่นอน ไม่เช่นนั้นแล้วจะทำให้สารพอลิเมอร์ที่ได้มีคุณสมบัติไม่ดี สารพอลิเมอร์ของกรดแลกติกถูกนำมาใช้ในทางการแพทย์และการเกษตรอย่างกว้างขวาง คือถูกนำมาใช้ในการเป็นตัวควบคุมยาในผู้ป่วย (Controlled drug release) โดยยาจะถูกฝังอยู่ในไมโครแคปซูล ที่ทำจากสารพอลิเมอร์ของกรดแลกติก ยาจะค่อย ๆ หลั่งออกมาซึ่งทำให้ยาอยู่ในตัวผู้ป่วยนานยิ่งขึ้น สามารถที่จะออกฤทธิ์ได้ดียิ่งขึ้น และยังช่วยลดผลข้างเคียงจากการใช้ยาอีกด้วย ในด้านการเกษตร สารพอลิเมอร์ของกรดแลกติกถูกนำมาใช้ในการควบคุมการหลั่งของปุ๋ยและยาฆ่าแมลง (Controlled release of fertilizers and pesticides) นอกจากนี้ยังพบสารพอลิเมอร์ของกรดแลกติกในเครื่องอุปโภคจำพวกภาชนะ และกระดาษ สารพอลิเมอร์ของกรดแลกติกนี้สามารถที่จะถูกย่อยสลายโดยทางชีวภาพ และสามารถที่จะทนความร้อนสูงได้ด้วย (Biodegradable thermoplastics) จึงเป็นการช่วยให้สภาพแวดล้อมของโลกไม่เกิดการเสียหาย (Piskin *et al.*, 1994)

1.2.3.3 การสังเคราะห์กรดแลกติก (Synthesis of lactic acid)

กรดแลกติกพบครั้งแรกในนมเปรี้ยว โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวสวีเดน ที่ชื่อว่า Scheele ในปี ค.ศ.1780 (Holten *et al.*, 1971) ต่อมาในปี ค.ศ.1857 Luis Pasteur พบว่า กรดแลกติกเกิดจากกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ ไม่ได้เป็นส่วนประกอบในน้ำนม (Wee *et al.*, 2006) และในปี ค.ศ.1881 ได้มีการผลิตกรดแลกติกขึ้นเป็นการค้าโดยกระบวนการหมัก โดยผลิตในรูปของแคลเซียมแลกเตท แต่ยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร จึงมีการพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม (Underkofler and Hickey, 1954) ในปัจจุบันสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 2 วิธี คือ

1. การสังเคราะห์กรดแลกติกทางเคมี (Chemical synthesis)

วิธีการสังเคราะห์กรดแลกติกทางเคมีถูกนำมาใช้ ตั้งแต่ปี ค.ศ.1963 ในประเทศญี่ปุ่นและสหรัฐอเมริกา ซึ่งทั้ง 2 ประเทศ สามารถผลิตกรดแลกติกได้รวมกันถึง 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ทั้งหมดในโลก ซึ่งกระบวนการผลิตแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน (Narayanan *et al.*, 2004) คือ

ขั้นตอนที่ 1 นำสารตั้งต้น ซึ่งได้แก่ ไฮดรอเจน ไซยาไนด์ (Hydrogen cyanide : HCN) และอะซีตัลดีไฮด์ (Acetaldehyde: CH_3CHO) มาทำปฏิกิริยากัน ที่ความดันบรรยากาศหรือภายใต้ความร้อนสูงจนเกิดเป็นสารประกอบแลกโตไนไตรล์ (Lactonitrile: $CH_3CH(OH)CN$) ดังสมการ

$$HCN + CH_3CHO \longrightarrow CH_3CH(OH)CN$$

ขั้นตอนที่ 2 นำแลกโตไนไตรล์ (Lactonitrile: $CH_3CH(OH)CN$) ที่ได้มาทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) กับกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ได้เป็นกรดแลกติก ($CH_3CH(OH)COOH$) และเกลือแอมโมเนีย (NH_4Cl) ซึ่งได้ผลดังสมการ

$$CH_3CH(OH)CN + 2H_2O + HCl \longrightarrow CH_3CH(OH)COOH + NH_4Cl$$

ทั้งนี้ขั้นตอนการผลิตจะแตกต่างกันไปขึ้นกับบริษัทผู้ผลิต เช่น บริษัท Monsanto (อเมริกา) ผลิตโดยใช้อะซีตัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) และไฮดรอเจน ไซยาไนด์ (Hydrogen cyanide) ในขณะที่บริษัท Mushashino (ญี่ปุ่น) จะซื้อ แลกโตไนไตรล์ (Lactonitrile) จากบริษัทอื่นเพื่อนำมาผลิต หลังจากนั้นจะนำกรดแลกติกที่ได้มาทำบริสุทธิ์ โดยทำให้เป็นเมทิล แลกเตท (Methyl lactate) ซึ่งจะถูกนำมาทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ได้เป็นกรดแลกติก ส่วนเมทานอล (Methanol) ไฮดรอเจน ไซยาไนด์ (Hydrogen cyanide) และสารเจือปนอื่น จะถูกกำจัดโดยการกรองผ่านผงคาร์บอน การทำโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion Exchange Chromatography) และการสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extract)

ซึ่งกรดแลกติกที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีจะมีโครงสร้างผสมกันระหว่างโครงสร้างรูป แอล(+) และโครงสร้างรูป ดี(-) ที่มีสัดส่วนไม่แน่นอน ทำให้ไม่สามารถนำไปใช้ทางอุตสาหกรรมได้ ในปัจจุบันวิธีการนี้จึงไม่เป็นที่นิยม

2. การสังเคราะห์กรดแลกติกทางชีวภาพ (Biosynthesis)

การผลิตกรดแลกติกโดยวิธีนี้ต้องอาศัยจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแลกติก (Lactic acid bacteria: LAB) โดยที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรมอยู่ในจีนัส Lactobacillus ซึ่งอยู่ในแฟมิลี่

Lactobacteriaceae ส่วนใหญ่ใช้แบคทีเรียแลกติกพวก Homo-fermentative จะผลิตกรดแลกติกเพียงอย่างเดียว อีกกลุ่มคือ Hetero-fermentative ซึ่งนอกจากจะผลิตกรดแลกติกแล้วยังได้ผลผลิตเป็นกรดแอซิติก คาร์บอนไดออกไซด์ เอธานอล และกลีเซอรอล อีกด้วย (Rosenberg *et al.*, 1992) นอกจากกรดแลกติกจะสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียแล้ว ยังมีกลุ่มราเส้นสายอีก ที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ดี คือ เชื้อรา *Rhizopus* spp. ซึ่ง *Rhizopus* spp. สามารถผลิตกรดแลกติกที่อยู่ในรูปแอล(+)แลกติก ได้ภายใต้สิ่งแวดล้อมที่มีไนโตรเจนจำกัด และเชื้อรา *Rhizopus* ssp. จัดเป็น Hetero-fermentative เปรียบเทียบระหว่างการหมักโดยแบคทีเรียและการหมักโดยเชื้อรา พบว่า *Rhizopus* spp. ต้องการแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์คือ แอมโมเนียมซัลเฟตหรือยูเรีย ทำให้กรดแลกติกที่ได้ไม่มีสีและมีความบริสุทธิ์สูง (Prescott and Dunn, 1959) นอกจากนี้ *Rhizopus* spp.ยังสามารถทนต่อสิ่งแวดล้อมที่มีค่าพีเอช (pH) ต่ำๆ ไม่จำเป็นต้องมีการรักษาระดับพีเอช (pH) ซึ่งแตกต่างกับแบคทีเรีย นอกจากนี้เชื้อรา *Rhizopus* spp. ยังเป็นพวกย่อยแป้งได้โดยตรง เช่น *Rhizopus* NRRL 395 สามารถหมักข้าวบาเล่ย์ แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด และข้าวสาลีให้กรดแลกติกในรูปแอล(+)แลกติกได้ (Axelsson, 1998; Alonso *et al.*, 2009; Davidson *et al.*, 1995; Vickroy, 1985 และ Wang *et al.*, 2010) การผลิตกรดแลกติก ของเชื้อราจะผลิตกรดแลกติกโดยเข้ากระบวนการ Emden-meyerhof pathway (EMP) โดยเชื้อราเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นไพรูเวท จากนั้นไพรูเวทเปลี่ยนไปเป็นแลกเตท (Margulies and Vishniac, 1961) จากการศึกษาของ Obayashi *et al.*, (1966) พบว่าเอนไซม์ที่สำคัญและเกี่ยวข้องในการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อรา *Rhizopus* ssp. คือ แลกเตท ดีไฮโดรจีเนส (Lactate dehydrogenase: LDH)

$$\text{ไพรูเวท} + \text{NADH} + \text{H}^{+} \xrightarrow{\text{Lactate dehydrogenase}} \text{แลกเตท} + \text{NAD}^{+}$$

โดยเอนไซม์ แลกเตท ดีไฮโดรจีเนส มี 2 รูปแบบคือ L(+)-Lactate dehydrogenase และ D(-)-Lactate dehydrogenase ซึ่งกรดแลกติกที่ผลิตได้จะอยู่ในรูปแบบใดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์เป็น ดี(-) หรือ แอล(+)-แลกเตท ดีไฮโดรจีเนส (Lejohn, 1971 และ Stanier *et al.*, 1976) นอกจากนี้ เชื้อรา *Rhizopus* spp. มีเอนไซม์ แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (Alcohol dehydrogenase: ADH) ที่เปลี่ยนไพรูเวทเป็นอะซีตัลดีไฮด์ และเปลี่ยนเป็นเอธานอล (Gibbs and Gastel, 1953) ดังนั้นการควบคุมให้เซลล์มีกิจกรรมของเอนไซม์ แลกเตท ดีไฮโดรจีเนสสูงหรือควบคุมให้มีกิจกรรมของแอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนสต่ำ ซึ่งเป็นการเพิ่มความสามารถของเชื้อราให้ผลิตกรดแลกติกได้สูงในช่วงการหมัก *Rhizopus* spp.จึงเป็นเชื้อราที่มีความน่าสนใจและเหมาะสำหรับการผลิตกรดแลกติก แตกต่างจาก LAB ตรงที่กรดแลกติกที่ผลิตโดย

เชื้อรา *Rhizopus* spp. จะได้กรดแลกติกในรูปแอล(+)แลกติกเท่านั้น (Yin *et al.*, 1997; Mirdamadi *et al.*, 2002)

1.2.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก

การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกสามารถทำได้หลายวิธี คือ

1. การไตเตรท (Titration) นำมาไตเตรทกับเบสแก่ เช่น NaOH แต่วิธีนี้จะให้ผลที่ถูกต้องเมื่อตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ไม่มีกรดชนิดอื่นเจือปน
2. NAD^+-enzymatic lactate dehydrogenase เป็นการวิเคราะห์ทางเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อ Stereoisomer ของกรดแลกติก โดยใช้เอนไซม์ Lactate dehydrogenase
3. Non-enzymatic method เป็นการทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (Oxidation) เปลี่ยนกรดแลกติกให้เป็น อะซีตัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) และนำ อะซีตัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) ที่เกิดขึ้นมาวิเคราะห์ด้วย Gas chromatography
4. Paper chromatography
5. Thin layer chromatography
6. Liquid chromatography
7. HPLC วิธีนี้สามารถแยกคู่ไอโซเมอร์ของกรดแลกติกได้ (Friedemann *et al.*, 1927; Stark *et al.*, 1951; Taylor, 1996; Lee *et al.*, 2001)

1.2.4 กระบวนการหมัก

การหมักเป็นวิทยาศาสตร์ประยุกต์ที่นำเอาจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์โดยการนำจุลินทรีย์มาเลี้ยงให้เจริญบนวัสดุหมัก (Substrate) ซึ่งวัสดุหมักที่นิยมใช้มักจะเป็นวัตถุที่เหลือใช้ทางการเกษตร โดยอาศัยการจัดการสภาพแวดล้อมให้เหมะสม เพื่อกระตุ้นให้จุลินทรีย์เจริญและเอื้อให้จุลินทรีย์สร้างน้ำย่อยหรือเอนไซม์ เพื่อเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบให้เป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเข้าใจถึงธรรมชาติของเซลล์จุลินทรีย์ การเจริญเติบโตของเซลล์ (Growth) คือการเพิ่มจำนวนหรือการสร้างเซลล์ใหม่ จุลินทรีย์จะนำโมเลกุลที่เป็นส่วนประกอบในอาหารมาสังเคราะห์เป็นส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ โดยกระบวนการสังเคราะห์เกือบทั้งหมดเป็นปฏิกิริยาชีวเคมี ซึ่งแต่ละขั้นตอนจะมีเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา การทำงานของเอนไซม์ต้องมีสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง นอกจากนี้ยังต้องอาศัยพลังงานเพื่อให้ปฏิกิริยาต่างๆ เกิดขึ้นได้ ดังนั้นในกระบวนการหมักจึงจำเป็นต้องควบคุมปัจจัยต่างๆ ให้เหมาะสมต่อจุลินทรีย์ ทั้งนี้สิ่งที่ต้องการจากกระบวนการอาจเป็นเซลล์ของจุลินทรีย์เอง เอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นหรือผลิตภัณฑ์ที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้นในสภาพแวดล้อมนั้นๆ เช่น กรดแลกติก กรดอะซิติก และกรดซิตริก เป็นต้น ปัจจุบันเทคโนโลยีการหมักนำมาใช้ เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์หลากหลายชนิดในระดับอุตสาหกรรม ซึ่งเป็นประโยชน์

และเป็นที่ต้องการของมนุษย์ เช่น วิตามิน เอนไซม์ ยาปฏิชีวนะ วัคซีน กรดอะมิโน กรดอินทรีย์ และเครื่องดื่มประเภทไวน์ และเบียร์ เป็นต้น

การหมักสามารถแบ่งตามปริมาณน้ำหรือของเหลวที่เติม ได้เป็น 3 ประเภท

1. กระบวนการหมักแบบเหลว (Submerge liquid fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่จุลินทรีย์เจริญอยู่ในรูปแขวนลอยในอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. กระบวนการหมักแบบแข็ง (Solid state fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่ต้องการปริมาณน้ำเล็กน้อย เพื่อปรับให้วัสดุหมักที่แห้งมีความชื้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์
3. กระบวนการหมักแบบกึ่งเหลว (Semi-solid fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่มีอาหารหมักเป็นของเหลว แต่มีของแข็งแขวนลอยอยู่ภายในบางส่วน

1.2.5 กระบวนการหมักแบบแข็ง (Solid state fermentation: SSF)

กระบวนการหมักแบบแข็ง (Solid state fermentation) เป็นกระบวนการที่มีการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในสภาพที่เป็นของแข็งโดยอาศัยน้ำซึ่งอยู่ ในรูปของความชื้น (Moisture) ที่ถูกดูดซับในวัสดุหมัก (Cannel and Moo-Young, 1980) เป็นกระบวนการหมักที่ใช้ตัวค้ำจุนเป็นของแข็ง ดังนั้นระบบการหมักแห้งนี้จึงไม่รวมการหมักวัสดุที่เป็นของแข็งในอาหารเหลวหรือการหมักในรูปของเหลวข้น ในระบบการหมักแห้งนี้ปริมาณความชื้นหรือปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์จะนำไปใช้ (Water activity: a_w) จึงค่อนข้างต่ำ วัสดุหมักที่ใช้ในการหมักแบบแข็งนั้น ส่วนใหญ่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ซึ่งหาง่ายและราคาถูก เช่น ซังข้าวโพด กากมันสำปะหลัง และรำข้าว เป็นต้น (Sreenath *et al.*, 2001) ปัจจุบันการหมักแบบแข็งได้รับความสนใจมากขึ้น เนื่องจากกระบวนการแบบแข็ง มีข้อดีหลายอย่าง และมีการนำมาประยุกต์ใช้ในงานต่างๆ หลากหลาย เช่น การผลิตเอนไซม์ เช่น เอนไซม์ไลเปส เอนไซม์อะไมเลส และเอนไซม์เพคติเนส นอกจากนี้การหมักแบบแข็งยังมีการประยุกต์ใช้ในการผลิตกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลกติก กรดซิตริก เป็นต้น (Singhania *et al.*, 2009; Couto and Sanromon 2006; Pandy *et al.*, 2000)

- Soccol *et al.*, (1994) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 จากชานอ้อย เปรียบเทียบผลการหมักให้ได้กรดแลกติกในรูปแอล(+)แลกติก ระหว่างการหมักแบบเปียกและการหมักแบบแข็ง พบว่าการหมักแบบแข็งให้ปริมาณกรดแลกติกสูงกว่าคือ 137.0 กรัมต่อลิตร
- Oda *et al.*, (2002) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* โดยใช้กากมันฝรั่ง ซึ่งมีแป้งอยู่ 33.1 เปอร์เซ็นต์เป็นวัตถุดิบ ในสภาวะการหมักแบบแข็ง พบว่าให้ปริมาณกรดแลกติก 10.3 มิลลิกรัมต่อกรัม

- Howard *et al.*, (2003) ได้ศึกษาการเลี้ยงเชื้อราในสภาวะแบบแข็ง พบว่ามีข้อดีกว่าการเลี้ยงในสภาวะที่เป็นอาหารเหลว เชื้อราที่นำมาใช้ในกระบวนการหมักคือ *Rhizopus* spp.

- Naveena *et al.*, (2005) รายงานปริมาณกรดแลกติก 0.89-2.30 กรัมต่อ 10 กรัม ที่ได้จากกระบวนการหมักแบบแข็ง โดยใช้รำข้าวสาลี ซึ่งมีแป้งอยู่ 54.4 เปอร์เซ็นต์เป็นวัตถุดิบ

1.2.6 ข้อดีของการหมักแบบแข็ง

1. ใช้ต้นทุนต่ำ เนื่องจากวัสดุหมัก ที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร
2. พื้นที่ไม่มาก ไม่ยุ่งยาก และค่าใช้จ่ายในการลงทุนน้อย
3. ต้องการความชื้นต่ำ ซึ่งช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้ ไม่ต้องเพิ่มความชื้น และสารอาหารให้แก่ระบบเนื่องจากความชื้น และสารอาหารมีอยู่อย่างเพียงพอในวัสดุหมัก
4. เครื่องมือที่ใช้แตกต่างจากที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เป็นเครื่องมือแบบง่ายๆ และไม่ยุ่งยากในการทำงาน ใช้อุปกรณ์น้อยและใช้เทคโนโลยีอย่างง่ายๆ ไม่ซับซ้อน
5. ไม่จำเป็นต้องมีการเพิ่มอากาศให้กับระบบ เนื่องจากมีการไหลเวียนของอากาศระหว่างอนุภาคของวัสดุหมัก
6. สามารถใช้เชื้อตั้งต้นในรูปน้ำเลี้ยงสปอร์ (Spore suspension) ได้
7. เหมาะสมกับจุลินทรีย์ที่ลักษณะเป็นเส้นสาย เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีการเจริญต่ำ
8. ผลผลิตที่ได้จากการหมักอาจมีปริมาณสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว และอาจมีการผลิตสารเมตาบอไลท์บางอย่างที่แตกต่างไปจากการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว
9. สามารถขจัดของแข็งจากการหมักได้โดยตรง ด้วยตัวทำละลายหรือทำให้อยู่ในสภาพเยือกแข็งก่อนทำการสกัด (ทรงศักดิ์, 2543; Bhargav *et al.*, 2008; Couto and Sanromon, 2006; Pandy *et al.*, 2003; Singhania *et al.*, 2009)

1.2.7 สมบัติของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกในอุตสาหกรรม (Vickroy, 1985)

1. สามารถใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกได้ และวัตถุดิบดังกล่าวสามารถหาได้ตลอดทั้งปี
2. มีความต้องการปริมาณไนโตรเจน วิตามิน และกรดอะมิโนน้อย
3. สามารถผลิตกรดแลกติกได้ดีในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงและค่าความเป็นกรด

ต่างต่ำ (พีเอช 4.0-7.0) ซึ่งจะช่วยลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้

4. มีอัตราการเจริญต่ำ แต่ให้ปริมาณการผลิตกรดแลกติกที่สูง

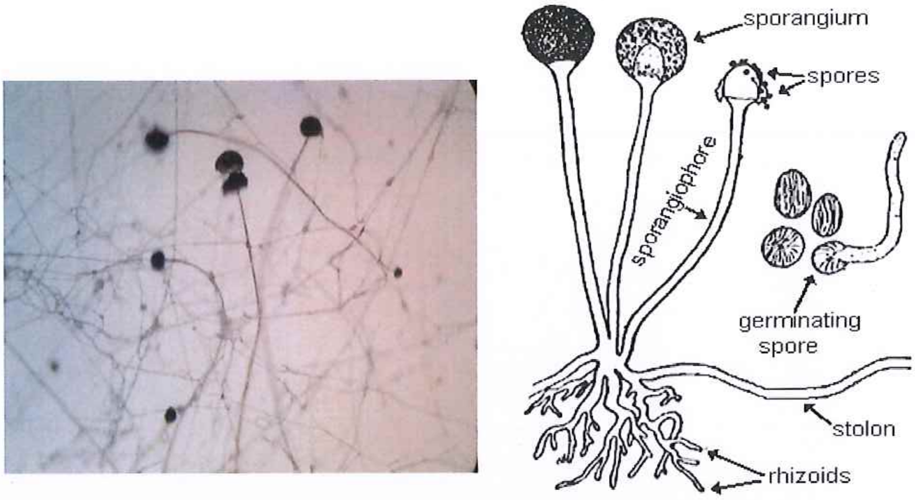
5. สามารถผลิตกรดแลกติกได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจนน้อย และกรดแลกติกที่ได้ควรจะเป็นรูปแอล(+) แลกติก

1.2.8 ลักษณะของเชื้อรา *Rhizopus* spp.

Rhizopus spp. เป็นราเส้นสาย จัดอยู่ในคลาสไซโกไมซีตีส (Zycomycetes) พบได้ทั่วไปในดิน ผัก ผลไม้ มูลสัตว์และอาหารจำพวกแป้ง ส่วนใหญ่แยกได้จากอาหารตะวันออกและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น ลูกแป้ง ข้าวหมาก ราจิเทมเป้ แป้งเชื้อสุรา เป็นต้น และอาหารหมักพื้นเมืองของชาวอินโดนีเซีย ชาวจีนและชาวญี่ปุ่น (นภา. 2534) โดยทั่วไป *Rhizopus* spp. พบมากในลูกแป้งข้าวหมาก และลูกแป้งเหล้า (ชัยวัฒน์, 2520) *Rhizopus* spp. มีการดำรงชีวิตแบบอิสระ บางชนิดทำให้อาหารเน่าเสีย แต่บางชนิดสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมได้

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา มีลักษณะเป็นเส้นใยที่ไม่มีผนังกั้น จะสร้างผนังกั้นเฉพาะตรงส่วนที่จะกลายเป็นสปอร์แรงเจียม (Sporangium) สปอร์แรงจิโอฟอร์ (Sporangiophore) ยาว 1,000 ไมโครเมตร กว้าง 13-15 เซนติเมตร โป่งพองตรงรอยต่อ เกิดขึ้นตรงส่วนที่จะสร้างไรซอยด์ (Rhizoid) สปอร์แรงเจียมมีขนาดใหญ่ มีสีดำ และมีคอลัมเมลลา (Collumella) เจริญเติบโตได้ดีในอุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศต้องการไมซีเลียม (Mycelium) สองสายที่แตกต่างกัน เมื่อนิวเคลียสมาผสมกันได้ไซโกต (Zygote) จะเจริญเป็นไซโกสปอร์ (Zygospore) ที่มีผนังหนา สีดำ และทนทานต่อสภาพแวดล้อม มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบไม่อาศัยเพศ โดยการสร้างสปอร์ เรียกว่า สปอร์แรงจิโอสปอร์ (Sporangiospore) และแบบอาศัยเพศ โดยการสร้างสปอร์ เรียกว่า ไซโกสปอร์ (Zygospore) การเจริญบนอาหาร PDA เส้นใยเป็นปุยสีขาวเกาะตัวอย่างหลวมๆ แล้วเปลี่ยนเป็นสีเทาหรือสีน้ำตาลหรือสีเทาดำเมื่อมีการสร้างสปอร์

Rhizopus spp. มีการใช้เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์หลายชนิดในอุตสาหกรรมการหมัก เช่น ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง ย่อยเพคติน กรดฟูมาริก และกรดแลกติก (Bigelis and Arora, 1992)


sporangium
spores
sporangiophore
germinating spore
stolon
rhizoids

รูปที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Rhizopus* spp. ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

รูปที่ 5 การเจริญของเชื้อรา *Rhizopus* spp. บนอาหารแข็ง PDA

1.2.9 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus* spp.

1. สายพันธุ์จุลินทรีย์ (Microorganisms)

โดยทั่วไปจะต้องคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณที่สูงและคงที่ ใช้เวลาในการหมักที่สั้น สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่หลากหลาย ควรเป็นแหล่งคาร์บอนที่หาได้ง่าย ราคาถูก (Hofvendahl and Hahn, 2000) และเชื้อรา *Rhizopus* spp. สามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น กรดแอล(+)-แลกติก กรดแอซิติก กรดฟอร์มิก และกรดฟูมาริก (Ward *et al.*, 1938) จึงมีความจำเป็นในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการผลิตเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่เราต้องการ จากรายงานต่างๆ ที่รายงานว่า *Rhizopus* spp. เป็นเชื้อราที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ดี

- Hang (1989) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 พบว่าเชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้ประมาณ 354.8 กรัมต่อกิโลกรัม ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

- Yu *et al*., (1989) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* พบว่าหลังจากเพาะเลี้ยงครบ 72 ชั่วโมง เชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้มาก โดยสามารถผลิตได้มากที่สุดเท่ากับ 430 กรัมต่อกิโลกรัม

- Kristofikova *et al*., (1991) ได้คัดเลือกเชื้อรา *Rhizopus* spp. จากทั้งหมด 50 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถผลิตกรดแอล(+)-แลกติกและ γ-ไลโนเลนิก แอซิด พบว่า *Rhizopus arrhizus* CCM 8109 เป็นสายพันธุ์กลายด้วยรังสี UV สามารถผลิตกรดแอล(+)-แลกติกมากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณวัสดุหมัก ที่ถูกใช้ไป และผลิต γ-ไลโนเลนิก แอซิด ได้ 0.4 กรัมต่อลิตร

- Soccol *et al*., (1994) ได้คัดเลือกเชื้อรา *Rhizopus* spp. จำนวน 19 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการผลิตกรดแอล(+)-แลกติกจากน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร พบว่าทุกสายพันธุ์สามารถผลิตกรดฟูมาริกได้ และมีเพียง 4 สายพันธุ์เท่านั้น ที่สามารถผลิตกรดแอล(+)-แลกติก ได้ดีในสภาพเขย่า โดยที่สายพันธุ์ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดแอล(+)-แลกติกได้สูงสุด คือ 65 กรัมต่อลิตร

- Garg and Hang (1995) ได้ศึกษาการผลิตกรดแอล(+)-แลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 โดยใช้กากแครอทเป็นวัสดุหมัก พบว่าเมื่อสิ้นสุดการหมัก 96 ชั่วโมง เชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร

- Yin *et al*., (1997) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* พบว่าเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 เป็นเชื้อราที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุด โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 85 กรัมต่อลิตร จากการหมักในฟลาสก์ และ 102 กรัมต่อลิตร จากการหมักในถังหมัก

- Skory *et al*., (1998) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ภายใต้สภาวะที่มีการจำกัดออกซิเจน พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 40 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 70 ชั่วโมง

- Kitpreechavanich *et al*., (1999) ได้คัดเลือกสายพันธุ์เชื้อรา *Rhizopus* spp. จำนวนทั้งหมด 24 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตกรดแอล(+)-แลกติก จากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ภายใต้การเพาะเลี้ยงแบบเขย่า พบว่าเชื้อรา *Rhizopus oryzae* DMKU 12 เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดแอล(+)-แลกติกสูงที่สุดคือ 52.8 กรัมต่อลิตร จากวัสดุหมัก ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร

- Naranong and Poocharoen (2001) ได้ศึกษาการผลิตกรดแอล(+)-แลกติก จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 โดยทำการหมักในสภาวะเขย่า พบปริมาณกรดแอล(+)-แลกติกสูงสุด 68.32 กรัมต่อลิตร เวลา 5 วัน และทำการหมักในถังหมักพบปริมาณกรดแอล(+)-แลกติกสูงสุด 54.62 กรัมต่อลิตร เวลา 4 วัน
- Oda *et al.*, (2002) ได้ศึกษาคัดแยกเชื้อรา *Rhizopus oryzae* จำนวน 38 สายพันธุ์พบว่าเชื้อรา *Rhizopus oryzae* IFO 4707 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด คือ 10 มิลลิกรัมต่อกรัม เมื่อใช้กากมันฝรั่งสดเป็นวัสดุหมัก
- Ruengruglikit and Hang (2003) ได้ศึกษาการผลิตกรดแอล(+)-แลกติก จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นวัสดุหมัก พบปริมาณของกรดแอล(+)-แลกติกเท่ากับ 299.4 กรัมต่อกิโลกรัม ภายในเวลา 48 ชั่วโมง
- Muira *et al.*, (2004) ศึกษาการผลิตกรดแอล(+)-แลกติก จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* MK-96-1196 โดยใช้ซังข้าวโพดเป็นวัสดุหมัก พบปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 24 กรัมต่อลิตร
- Zhang *et al.*, (2009) รายงานการผลิตกรดแอล(+)-แลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus arrhizus* พบว่าเชื้อรามีความสามารถผลิตกรดแอล(+)-แลกติกปริมาณสูงสุด 88 กรัมต่อลิตร
- Yen *et al.*, (2010) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติก จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* และพบว่าเชื้อรา *Rhizopus oryzae* มีความสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 43.3 กรัมต่อลิตร
- Sun *et al.*, (2012) ได้ศึกษาการผลิตกรดแอล(+)-แลกติก จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* และพบว่าเชื้อรามีความสามารถผลิตกรดแอล(+)-แลกติก 1,210 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในเวลา 3 วันของการหมัก
- Yuwa-amornpitak and Chookietwattana (2014) ได้ศึกษาการผลิตกรดแอล(+)-แลกติก จากเชื้อรา *Rhizopus microspores* LTH 23 ด้วยการหมักแบบ Batch พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 20 กรัมต่อลิตร ในเวลา 60 ชั่วโมง และการหมักแบบ Fed-batch พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตกรดแลกติกได้ 25 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 10 ชั่วโมงของการหมัก

2. สารอาหาร (Nutrients)

สารอาหารมีความจำเป็นในกระบวนการหมัก โดยแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ และเกลืออื่นๆ มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการสร้างผลผลิต โดยทั่วไปเชื้อรา *Rhizopus* spp. มีความต้องการสารอาหารน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย (Zhang *et al.*, 2007) โดยความเข้มข้นของสารอาหารขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสับสเตรท สายพันธุ์ และวิธีการที่ใช้ในการหมัก

สำนักทรัพยากรการเรียนรู้คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

3. แหล่งคาร์บอน (Carbon sources)

แหล่งคาร์บอนเป็นสารอาหารที่มีความจำเป็นต่อกระบวนการหมัก โดยคาร์บอนเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และพลังงาน ซึ่งในกระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน โดยประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลกติกจะขึ้นกับชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และความบริสุทธิ์ของคาร์โบไฮเดรตที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ดังนั้น ในการผลิตกรดแลกติกจะต้องเลือกแหล่งคาร์บอนที่มีความเหมาะสม ทั้งชนิดและปริมาณความเข้มข้น รวมถึงราคาต้นทุน ซึ่งต้องคุ้มค่า

สารตั้งต้นหรือแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติก ได้แก่ น้ำตาลชนิดต่างๆ ทั้ง น้ำตาลกลูโคส ซูโครส สารอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตอื่นๆ ซึ่งอาจเป็นผลพลอยได้จากการเกษตร หรือจากอุตสาหกรรมอาหาร เช่น แป้งมันฝรั่ง แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวโพด และกากน้ำตาล หรือน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมผลิตนม สารตั้งต้นที่นำมาใช้อาจต้องผ่านกระบวนการย่อยสลายให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคส มอลโตส ซูโครส หรือแลกโตส โดยการใช้เอนไซม์หรือกรดบางชนิด ทั้งนี้เชื้อรา *Rhizopus* spp. จะผลิตกรดแอล(+)-แลกติกได้ช้ามากเมื่อแหล่งคาร์บอนเป็นอินนูลิน แลกโตสและซูโครส เนื่องจากเชื้อรา *Rhizopus* spp.ไม่สามารถสร้างเอนไซม์อินนูเลส (Inulase) ได้ (Selman and Hulchings, 1937; Prescott and Dunn, 1959) และสารตั้งต้นที่จะนำมาใช้ผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรมจะต้องมีปริมาณมาก หาได้ง่ายและราคาถูก เพื่อความคุ้มค่าและประหยัดต้นทุนการผลิต

- นวลพรรณ (2543) พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก 120 กรัมต่อลิตรเป็นวัสดุหมัก เชื้อราสามารถผลิตกรดแอล(+)-แลกติกได้สูงสุด 58.6 กรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของวัสดุหมัก ส่งผลทำให้เชื้อราลดการผลิตกรดแอล(+)-แลกติก กล่าวคือแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก 150 และ180 กรัมต่อลิตร เชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 55.4 และ 50.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

- Hang (1989) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากข้าวโพดบดหมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 พบว่าเชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 354.8 กรัมต่อกิโลกรัม ด้วยเวลา 96 ชั่วโมง

- Yu *et al.*, (1989) ได้ทำการศึกษาการผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยผลผลิตทางการเกษตรแต่ละชนิดเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้มากน้อยตามลำดับ คือ แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลัง แป้งข้าวบาเล่ย์ และแป้งข้าวโอ๊ต มีปริมาณกรดแลกติกเท่ากับ 430, 400, 340, 280 และ 110 กรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ

- Soccal *et al.*, (1994) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้ชานอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 พบว่าเชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 137 กรัมต่อลิตร

- Yang *et al.*, (1995) ใช้ไซโลส (Xylose) เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลกติก โดยใช้เชื้อรา *Rhizopus* spp. พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ดี

- Yin *et al.*, (1997) ได้ศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของวัสดุหมักต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 พบว่าเมื่อใช้แป้งข้าวโพดที่ถูกย่อยสลายบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริก หรือเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่มีความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับเชื้อรา พบว่าเชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 98.2 กรัมต่อลิตรภายในเวลา 72 ชั่วโมง

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

- Woiciechowski *et al.*, (1999) รายงานการผลิตกรดแอล(+)-แลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus* oryzae NRRL 395 โดยใช้ไม้ที่ถูกย่อยสลายด้วยวิธี Steam explosion เป็นวัสดุหมัก ที่ความเข้มข้น 90 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อราสามารถผลิตกรดแอล(+)-แลกติกได้สูงที่สุดคือ 19.13 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 120 ชั่วโมง

- Zhou *et al.*, (1999) ศึกษาผลของสารอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแอล(+)-แลกติก โดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ATCC 5231 จากการทดลองในฟลาสก์เขย่า พบว่าองค์ประกอบอาหารที่เหมาะสม มีผลต่อการเพิ่มอัตราการผลิตกรดแลกติก โดยอัตราการผลิตกรดแลกติกสูงสุดที่ 2.58 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากการความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 94 กรัมต่อลิตร และได้ปริมาณกรดแลกติกที่มีความเข้มข้น 83 กรัมต่อลิตร หลังจากการหมักเป็นเวลา 32 ชั่วโมง

- Naranong and Poocharoen (2001) ได้ศึกษาการผลิตกรดแอล(+)-แลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 จากแป้งมันสำปะหลัง พบปริมาณกรดแอล(+)-แลกติกสูงสุด 68.32 กรัมต่อลิตร

- Oda *et al.*, (2002) ได้ศึกษาคัดแยกเชื้อรา *Rhizopus oryzae* โดยใช้กากมันฝรั่งเป็นวัสดุหมัก พบว่าจาก *Rhizopus oryzae* จำนวน 38 สายพันธุ์ *Rhizopus oryzae* IFO 4707 เป็นสายพันธุ์ที่มีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วและพบว่าเชื้อราสามารถหลั่งเอนไซม์ย่อยแป้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ

- Muira *et al.*, (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้ซังข้าวโพดเป็นวัสดุหมัก พบว่า *Rhizopus oryzae* MK-96-1196 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 100 กรัมต่อลิตร

- Ruengruglikit and Hang (2003) ได้ศึกษาการผลิตกรดแอล(+)-แลกติก จากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 โดยใช้ซังข้าวโพด พบปริมาณของกรดแอล(+)-แลกติกเท่ากับ 299.4 กรัมต่อกิโลกรัม ภายในเวลา 48 ชั่วโมง

- Bulut *et al.*, (2004) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันในการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* และใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครส กากน้ำตาล และรำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกสูงสุด เมื่อเติมน้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร และพบว่ารำข้าวสาลีเป็นแหล่งอาหารที่ไม่เหมาะสมสำหรับการหมักในครั้งนี้

- John *et al.*, (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้ชานอ้อยและกากมันสำปะหลังเป็นวัสดุหมัก พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 249 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

- Maas *et al.*, (2006) ได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากไซโลส โดยใช้เชื้อรา *Rhizopus oryzae* พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้ระหว่าง 0.41 และ 0.71 กรัมต่อกรัม และยังพบว่าการเจริญเติบโตของ *Rhizopus oryzae* CBS 112.07 ในอาหารที่มีความเข้มข้นของไซโลส เริ่มต้นสูงกว่า 40 กรัมต่อลิตร มีผลต่อการใช้วัสดุหมักและอัตราการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา

- Zhang *et al.*, (2007) ศึกษาผลการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อรา *Rhizopus arrhizus* โดยใช้แป้งมันฝรั่งเป็นวัสดุหมัก พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 36.4 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 32 ชั่วโมง

- Saito *et al.*, (2012) ศึกษาผลการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* พบปริมาณกรดแลกติก 6 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมงของการหมัก เมื่อใช้ไซโลสและฟางข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน

- Taskin *et al.*, (2012) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* TS-61 โดยใช้ Chicken feather protein hydrolysate (CFP) เป็นแหล่งคาร์บอน พบปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 38.5 กรัมต่อลิตร และต่ำสุด 28.8 กรัมต่อลิตร

4. แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen sources)

แหล่งไนโตรเจนมีความจำเป็นต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโน พิวรีน ไพริมิดีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันบางชนิด ตัวอย่างของแหล่งไนโตรเจน ที่เป็นเกลืออนินทรีย์ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรท ส่วนที่เป็นสารอินทรีย์ ได้แก่ เปปโตน (Peptone), สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) และ น้ำหมักข้าวโพด (Corn steep liquor) โดยแอมโมเนียมซัลเฟต จัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีการใช้อย่างแพร่หลายมากที่สุด มีรายงานเกี่ยวกับความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ใช้ในการหมักกรดแลกติกโดยเชื้อรา *Rhizopus* spp.

ในรายงานวิจัยต่างๆ ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตอยู่ระหว่าง 1.0-4.0 กรัมต่อลิตร (Yu and Hang, 1989; Soccol *et al.*, 1994; Yin *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1999) และทั้งนี้เนื่องจากเชื้อราสามารถใช้แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนีย ได้ดีกว่ารูปใน

เตรท เชื้อราบางชนิดใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียหรืออินทรีย์ไนโตรเจน แต่จะไม่ใช้ในรูปไนเตรท เช่น *Absidia* sp., *Mucor* sp., *Rhizopus nigricans* และ *Rhizopus oryzae* เป็นต้น เพราะเกลือไนเตรทอาจจะมีผลต่อการเกิดสภาวะเป็นด่างในอาหารทำให้ค่าพีเอช (pH) สูงขึ้น ในการผลิตกรดแลกติก แอมโมเนียมซัลเฟต ถือว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความเหมาะสมมากกว่าแอมโมเนียมไนเตรท ยูเรีย เปปโตน สารสกัดจากยีสต์ และ น้ำหมักข้าวโพด (Yin *et al.*,1997; Zhou *et al.*, 1999) แต่โซเดียมไนเตรท เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ค่อยดีนักสำหรับจุลินทรีย์ทั่วๆ ไป ขณะที่เชื้อรา *Rhizopus oryzae* สามารถใช้โซเดียมไนเตรทได้ แต่การเจริญจะช้ามาก (Lockwood *et al.*,1936)

- นวลพรรณ (2543) รายงานว่าแหล่งไนโตรเจน ที่มีผลต่อการผลิตกรดแอล(+)-แลกติก เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท แอมโมเนียมคลอไรด์ ยูเรีย และเปปโตน และพบว่า แอมโมเนียมซัลเฟต เข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ต่อการผลิตกรดแอล(+)-แลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 โดยเชื้อราสามารถผลิตกรดแอล(+)-แลกติกได้สูงสุด 60.7 กรัมต่อลิตร
- Yin *et al.*, (1997) ศึกษาอิทธิพลความเข้มข้นของแอมโมเนียซัลเฟตที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 พบว่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต ที่เหมาะสม คือ 1.35 กรัมต่อลิตร และพบว่าถ้าปริมาณความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตน้อยกว่า 1.35 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้การเจริญและปริมาณการผลิตกรดแลกติกของเชื้อราลดลง
- Zhou *et al.*, (1999) พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ATCC 52311 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน คือ แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.10 กรัมต่อลิตร โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 56.8 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะการหมักแบบ Bubble column เป็นเวลา 47 ชั่วโมง
- Tay and Yang (2000) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งข้าวโพดที่ผ่านการย่อยโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ที่ตรึงบน Cotton fiber พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก คือ แอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.30 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ปริมาณกรดแลกติกเท่ากับ 69 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณวัสดุหมักที่ถูกใช้ไป และคิดเป็นอัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.81 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง
- Zhang *et al.*, (2007) ได้รายงานผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus arrhizus* โดยใช้แป้งมันฝรั่งเป็นวัสดุหมัก แหล่งไนโตรเจนต่างๆ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมไนเตรท ยูเรีย เปปโตน และสารสกัดจากยีสต์ โดยประเมินร่วมกับอัตราส่วนต่างๆ ของคาร์บอนไนโตรเจน (C/N Ratio) พบว่าอาหารที่ประกอบด้วยอัตราส่วนคาร์บอนไนโตรเจน (C/N Ratio) ต่ำจะช่วยเพิ่มการผลิตกรดแลกติก ชีวมวล และเอทา

นอล ในขณะที่อัตราส่วนคาร์บอนไนโตรเจน (C/N Ratio) สูงจะผลิตกรดฟูมาริค และจากแหล่งไนโตรเจนทั้งหมด พบว่าแอมโมเนียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุด โดยสามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 36.4 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็น 91 เปอร์เซ็นต์ จากการใช้แอมโมเนียมไนเตรท 0.909 กรัมต่อลิตร

- Yao *et al.*, (2010) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 โดยใช้โปรตีนสกัดจาก Dairy manure เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับระดับความเข้มข้นเป็น 6 ระดับ คือ 0.21, 0.42, 0.84, 1.68, 2.52 และ 3.36 กรัมต่อลิตร แล้วพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 2.52 กรัมต่อลิตร สามารถให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 57.7 กรัมต่อลิตร
- Taskin *et al.*, (2012) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* TS-61 โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งไนโตรเจน พบปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 38.5 กรัมต่อลิตร และต่ำสุด 28.8 กรัมต่อลิตร
- Wang *et al.*, (2014) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* BCRC 33071 โดยใช้แอมโมเนียมไบคาร์เนท 2 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 1 เปอร์เซ็นต์ และแอมโมเนียเป็นแหล่งไนโตรเจนพบปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 3.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

5. เกลืออนินทรีย์ (Trace elements)

เกลืออนินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกส่วนใหญ่คือ KH_2PO_4, $ZnSO_4$, $MgSO_4$ และ $Fe_2(SO_4)_3$ โดยทั่วไปจะใช้ KH_2PO_4 ประมาณ 0.15-0.60 กรัมต่อลิตร, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ประมาณ 0.15-0.75 กรัมต่อลิตร และ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ประมาณ 0.04-0.09 กรัมต่อลิตร สำหรับความจำเป็นของ $Fe_2(SO_4)_3$ 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) รายงานว่า การเพิ่มระดับของฟอสเฟตจาก 0.1-0.6 กรัมต่อลิตร ของ KH_2PO_4 ทำให้สามารถผลิตกรดแลกติกที่มีความเข้มข้นสูงสุดประมาณ 85-71 กรัมต่อลิตร ส่วน Zhou *et al.*, (1999) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของฟอสเฟตจาก 0.2-0.6 กรัมต่อลิตร ของ KH_2PO_4 กรัมต่อลิตร ของ KH_2PO_4 มีผลเพียงเล็กน้อยต่อการผลิตกรดแลกติก และ ขณะเดียวกันได้มีรายงานของ Christen *et al.*, (2000) พบว่าโพแทสเซียมเป็นธาตุที่สำคัญ เนื่องจากเป็นส่วนประกอบของเส้นใยและสปอร์ของเชื้อรา และมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ปริมาณที่นิยมเติมลงไปในอาหารอยู่ระหว่าง 1.0-4.0 กรัมต่อลิตร นิยมใช้ในรูปของเกลือโพแทสเซียมโมโนไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) หรือโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

- นวลพรรณ (2543) รายงานว่าเกลือแร่บางชนิดที่มีผลต่อการผลิตกรดแอล(+)-แลกติกของเชื้อรา *Rhizopus* spp. เช่น $CaCO_3$, KH_2PO_4 และ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$

- วิเชียรและคณะ (2544) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* DMKU12 จากแป้งมันสำปะหลังพบว่า เมื่อเติม KH_2PO_4 เข้มข้น 0.3-1.2 กรัมต่อลิตร เชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 67.7-69.2 กรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ KH_2PO_4 มากกว่านี้ก็ไม่ทำให้การผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้นแต่อย่างใด แต่พบว่าการเพิ่มความเข้มข้น KH_2PO_4 ทำให้การผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น เมื่อศึกษาผลของการเติม $MgSO_4\cdot7H_2O$ ต่อการผลิตกรดแลกติกนั้น พบว่าความเข้มข้นของ $MgSO_4\cdot7H_2O$ ระหว่าง 0-0.75 กรัมต่อลิตร ไม่มีผลทำให้การผลิตกรดแลกติกของเชื้อราแตกต่างกัน คือ เชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติกได้เท่ากับ 92-95 กรัมต่อลิตร และพบว่าปริมาณ $ZnSO_4\cdot7H_2O$ ความเข้มข้น 0.04 กรัมต่อลิตร มีผลให้เชื้อราผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด คือ 98.9 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้ความเข้มข้นของ $ZnSO_4\cdot7H_2O$ น้อยกว่าหรือมากกว่านี้ มีผลทำให้เชื้อราผลิตกรดแลกติกลดลง

- วิเชียรและคณะ (2548) ศึกษาองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันสำปะหลังที่ทำให้เหลวด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส โดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* DMKU12 ในระดับฟลาสก์เขย่า พบว่าการผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นสับสเตรทเพิ่มขึ้นจนถึงความเข้มข้น 186 กรัมต่อลิตร เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความจำเป็นต่อการผลิตกรดแลกติก โดยพบว่าที่ความเข้มข้นระหว่าง 3.2-6.4 กรัมต่อลิตรให้ผลผลิตสูงสุด $CaCO_3$ มีบทบาทสำคัญต่อการผลิตกรดแลกติก เนื่องจากแคลเซียมไปช่วยปรับค่าพีเอช (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้สูงขึ้น ซึ่งมีผลทำให้เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส การเติม $CaCO_3$ ความเข้มข้น 40-50 กรัมต่อลิตร ทำให้เชื้อราผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด

- Lockwood *et al.*, (1936) พบว่าเมื่อเติม $ZnSO_4\cdot7H_2O$ เข้มข้ม 10 กรัมต่อลิตร และเติม $CaCO_3$ ด้วย ทำให้เชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ผลิตกรดแอล(+)-แลกติกเพิ่มขึ้น และ Yu and Hang (1989) พบว่าเมื่อเติม $CaCO_3$ เข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ทำให้ปริมาณการผลิตกรดแอล(+)-แลกติกเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่มีการเติม $CaCO_3$

- Yu and Hang (1989) ศึกษาการผลิตกรดแอล(+)-แลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* พบว่าเมื่อมีการเติม $CaCO_3$ เข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด ภายหลังจากการหมัก 24 ชั่วโมง การเติม $CaCO_3$ มีผลต่ออัตราการใช้วัสดุหมักและปริมาณกรดแอล(+)-แลกติกที่เพิ่มขึ้น อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งมันสำปะหลังมีอัตราการใช้วัสดุหมักเพิ่มขึ้น 200 กรัมต่อกิโลกรัมวัสดุหมัก และปริมาณกรดแอล(+)-แลกติกเพิ่มขึ้น 180 กรัมต่อกิโลกรัมวัสดุหมัก ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งข้าว อัตราการใช้วัสดุหมักเพิ่มขึ้น 350 กรัมต่อกิโลกรัมวัสดุหมัก และปริมาณกรดแอล(+)-แลกติกเพิ่มขึ้น 300 กรัมต่อกิโลกรัมวัสดุหมัก เมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่เติม $CaCO_3$ ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

- Garg and Hang (1995) ได้ศึกษาการผลิตกรดแอล(+)-แลกติก จากวัสดุหมักที่เป็นกากแครอท โดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 โดยเปรียบเทียบอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม $CaCO_3$ และไม่เติมที่เริ่มต้นการเพาะเลี้ยง พบว่าภายหลังจากการหมักเสร็จ 96 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีการเติม $CaCO_3$ เชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ให้ปริมาณการผลิตกรดแอล(+)-แลกติกเท่ากับ 24 กรัมต่อลิตร และในสภาวะที่ไม่มีการเติม $CaCO_3$ สามารถผลิตกรดแอล(+)-แลกติกเท่ากับ 19 กรัมต่อลิตร จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 45 กรัมต่อลิตร

- Longacre *et al.*, (1997) ได้ศึกษาอิทธิพลของ CO_3 ต่อการผลิต กรดแอล(+)-แลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* โดยใช้ Na_2CO_3 พบว่าเมื่อใช้ Na_2CO_3 ในปริมาณ 10 มิลลิโมล (1.06 กรัมต่อลิตร) ให้ปริมาณการผลิตกรดแอล(+)-แลกติกมากที่สุด และผลิตภัณฑ์ที่ได้มีกรดชนิดอื่นปนออกมาน้อย ทั้งนั้นเป็นผลมาจาก Na_2CO_3 สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวท คาร์บอกซิเลท (Pyruvate decarboxylase) ได้ ทำให้มีการแบ่งส่วนของไพรูเวทไปผลิตกรดชนิดอื่น เช่น มาเลทและฟูมาเลท น้อยลง ทั้งยังสามารถไปลดการผลิตเอทานอลได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ $CaCO_3$ ในกระบวนการผลิตกรดแอล(+)-แลกติกนั้น ในสภาวะที่มี $CaCO_3$ มากเกินไปนั้น จะมีผลต่อการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์และการทำให้ผลิตภัณฑ์บริสุทธิ์

- Sun *et al.*, (1998) ศึกษาการผลิต กรดแอล(+)-แลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ซึ่งเซลล์ถูกตรึงบน Polyurethane foam sheet ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส 90 กรัมต่อลิตรเป็นวัสดุหมัก และมีการเติมสารละลายเกลือแร่ ที่ประกอบด้วย $(NH_4)_2SO_4$ 25 กรัม, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.45 กรัม, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.45 กรัม และ KH_2PO_4 3 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปริมาณต่างๆ คือ 2, 6.5,10 และ 13 มิลลิลิตร พบว่าถ้ามีการเติมในปริมาณที่มากกว่าหรือเท่ากับ 10 มิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ เชื้อราผลิตกรดแอล(+)-แลกติกสูงสุดคือ 60 กรัมต่อลิตร ภายหลังจากการหมัก 90 ชั่วโมง

- Dominguez and Vazquez (1999) ศึกษาผลการเติม $CaCO_3$ ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่ต่างกันระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus* oryzae ATCC 52311 พบว่าเมื่อมีการเติม $CaCO_3$ ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เวลา 0 ชั่วโมง และเติม $CaCO_3$ ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในแต่ละช่วงระยะเวลา ดังนี้ คือ 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง ซึ่งการเติม $CaCO_3$ ลักษณะดังกล่าวมีผลให้ปริมาณการผลิตกรดแอล(+)-แลกติก สูงที่สุดคือ 67.5 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร ภายหลังการหมักเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

- Zhou *et al.*, (1999) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลกลูโคสของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ATCC 52311 พบว่าความเข้มข้นของ KH_2PO_4 ประมาณ 1.50-12 มิลลิโมล ไม่มีผลทำให้การผลิตกรดแลกติกของเชื้อรามีปริมาณที่แตกต่างกัน และพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ KH_2PO_4 เท่ากับ 1.53, 4.5, 7.5 และ 12 มิลลิโมล เชื้อราสามารถผลิตกรดแลกติก

เท่ากับ 60.5, 62.5, 62.2 และ 60.3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และพบว่าถ้าไม่มีการเติม KH_2PO_4 มีผลทำให้การงอกของสปอร์และการผลิตกรดแลกติกของเชื้อราลดลง

- Zhou *et al*., (1999) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* พบว่าการเพิ่มปริมาณเริ่มต้นของ KH_2PO_4 เพียงเล็กน้อยตั้งแต่ 0.2 – 1.6 กรัมต่อลิตร มีผลต่อชีวมวล และการผลิตกรดแลกติก

- Wang *et al*., (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ปริมาณเชื้อและพบว่าระดับความเข้มข้นของ KH_2PO_4 0.1-0.6 กรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณกรดแลกติกถึง 85 - 71 กรัมต่อลิตร

- Yao *et al*., (2010) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยมีการเติม $CaCO_3$ 50 กรัมต่อลิตร และเกลืออนินทรีย์ชนิดอื่นเช่น KH_2PO_4 0.65 กรัม, $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ 0.25 กรัม, $ZnSO_4$ 0.05 กรัมและ $(NH_4)_2SO_4$ 2 กรัม พบว่าผลิตกรดแลกติกสูงสุด 57 กรัมต่อลิตร

- Yamane and Tanaka (2012) ศึกษาการผลิตกรดแอล(+)-แลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NBRC 5384 โดยใช้การตรึงเซลล์แบบ Crystallization พบว่าการเติม $CaCO_3$ ระหว่างการหมักมีผลทำให้การผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้น และสูงสุดเท่ากับ 231 กรัมต่อลิตร

- Ge *et al*., (2013) ศึกษาความเข้มข้นของ $ZnSO_4$ ต่อการผลิตกรดแลกติกเชื้อรา *Rhizopus oryzae* และกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์แลกเตส ดีไฮโดรจิเนส (LDH) พบว่าความเข้มข้น $ZnSO_4$ ที่ 0.02 เปอร์เซ็นต์ มีกิจกรรมของเอนไซม์แลกเตส ดีไฮโดรจิเนส (LDH) 200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของกรดแลกติกเท่ากับ 137 กรัมต่อลิตร

- Nguyen *et al*., (2013) รายงานการศึกษาการผลิตกรดดี(-) และแอล(+)-แลกติกโดยการหมักแบบ Simultaneous saccharification พบปริมาณกรดแอล(+)-แลกติก สูงสุดเท่ากับ 198.32 กรัมต่อลิตร และกรดดี(-)-แลกติกสูงสุดเท่ากับ 186.40 กรัมต่อลิตร เมื่อเติม $CaCO_3$ 50 เปอร์เซ็นต์

ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* มีผลต่อรูปร่างของเซลล์และความสามารถการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* เพราะรูปร่างของเชื้อรามีผลต่อการถ่ายเทอากาศในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งไปมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมทำให้ปริมาณการผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้นหรือลดลงได้

- นวลพรรณ (2543) รายงานว่า เมื่อใช้สปอร์ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 เข้มข้น $2x10^5$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่าเชื้อราสามารถผลิตกรดแอล(+)-แลกติกได้สูงสุด 66.6 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้กล้าเชื้อสปอร์เข้มข้น $2x10^6$- $2x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร เชื้อราผลิตกรดแลกติกได้ลดลงคือ 32.2 และ 10.9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ภายหลังจากการเพาะเลี้ยง 120 ชั่วโมง

- Yu and Hang (1989) ได้รายงานว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแอล(+)-แลกติก ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* คือ $1x10^7$-$3x10^7$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ถึงแม้ว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นมากกว่านี้ ก็ไม่ได้ทำให้ปริมาณการผลิตกรดแอล(+)-แลกติกเพิ่มมากขึ้นแต่อย่างใด

- Dominguez and Vazquez (1999) ได้ศึกษาความเข้มข้นของสปอร์เริ่มต้นของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ATCC 52311 ต่อการผลิตกรดแอล(+)-แลกติก พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของสปอร์เริ่มต้นที่ต่ำ (สปอร์เข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร) ให้ปริมาณกรดแอล(+)-แลกติกเท่ากับ 60.4 กรัมต่อลิตรภายหลังจากการหมัก 120 ชั่วโมง และเมื่อใช้ความเข้มข้นของสปอร์ที่สูงขึ้น (สปอร์เข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 2.00 มิลลิลิตร) เชื้อราผลิตกรดแอล(+)-แลกติกเพิ่มขึ้นเป็น 70.8 กรัมต่อลิตร ภายหลังจากการหมัก 94 ชั่วโมง

6. อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดแอล(+)-แลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เชื้อราสามารถผลิตกรดแอล(+)-แลกติกได้ปริมาณสูงที่สุด (Lockwood *et al.*, 1936)

- สุภัตรา และคณะ (2548) ทำการแยกและคัดเลือกเชื้อ *Rhizopus* spp. จากตัวอย่างลูกแป้งและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากลูกแป้งที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูง พบว่าเชื้อ *Rhizopus* spp. จำนวน 29 สายพันธุ์ มี 8 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ดีที่ 30 องศาเซลเซียส และจากจำนวนนี้มี 6 สายพันธุ์ ที่ยังคงสร้างกรดได้ดีที่ 40 องศาเซลเซียส โดยสายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดคือ สายพันธุ์ MKU ซึ่งผลิตได้ 0.79 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

- สุขใจและศิริประภา (2549) ศึกษาการเพิ่มปริมาณกรดแลกติกจากเวย์โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก คือ ความเข้มข้นของเวย์ร้อยละ 90 (ปริมาตรต่อปริมาตร) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลิตกรดแลกติกในฟลาส์ก 2 ลิตร อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 6.51 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง และผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร อัตรากรดแลกติกเท่ากับ 8.16 กรัมต่อลิตรที่เวลา 48 ชั่วโมง

- Selman and Hutchings (1937) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแอล(+)-แลกติก ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 28-37 องศาเซลเซียส

- Yu และ Hang (1989) พบว่าเชื้อรา *Rhizopus oryzae* สามารถผลิตกรดแอล(+)-แลกติก ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แป้งข้าวโพดได้ปริมาณสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ปริมาณกรดแอล(+)-แลกติกเท่ากับ 445 กรัมต่อกิโลกรัมวัสดุหมัก ภายหลังจากการหมัก 96 ชั่วโมง

- Huang *et al.*, (2003) พบว่า *Rhizopus arrhizus* DAR 36017 สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 22-38 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของกรดแลกติกที่ได้จะมีระดับสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

- Liu *et al.*, (2005) พบว่าที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติกจากมันฝรั่ง โดยเชื้อรา *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)

- Yuwa-amornpitak and Chookietwattana (2014) ได้ศึกษาสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแอล(+)-แลกติกจากแป้งมันสำปะหลัง จากเชื้อรา *Rhizopus microspores* LTH 23 พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเชื้อราสามารถให้ผลผลิตสูงสุด 20 กรัมต่อลิตร

7. ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)

การผลิตกรดแลกติกในกระบวนการหมักจากเชื้อรา จำเป็นต้องมีการควบคุมค่าพีเอช (pH) ให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญ ซึ่งจะมีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยทั่วไปนิยมใช้ $CaCO_3$ เป็นสารปรับพีเอช (pH) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการผลิตกรดแลกติก ผลของค่าพีเอช (pH) เป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ โดยทั่วไปจะอยู่ในช่วง 5.0-6.0 (Huang *et al.*, 2003)

Neutralizing agents ตัวอย่างเช่น $CaCO_3$, Na_2CO_3, NaoH ถูกใช้เพื่อเป็นตัวควบคุมระดับค่าพีเอช (pH) ในระหว่างการหมักโดยที่นิยมใช้มากที่สุด คือ $CaCO_3$ (Oda *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 1997; Yu and Hang, 1989; Zhou *et al.*, 1999)

- วิเชียร และคณะ (2548) พบว่าเชื้อรา *Rhizopus oryzae* KPS 106 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดคือ 95.9 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นผลได้ผลิตภัณฑ์ (Product yield : Yp/s) เท่ากับ 0.75 เมื่อควบคุมค่าพีเอช (pH) ตลอดการหมักให้มีค่าเท่ากับ 7.0

- ธนภูมิ และคณะ (2551) ศึกษาผลของค่าพีเอชต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* KPS 106 ในถังหมักแบบลอยตัวขนาด 3 ลิตร โดยใช้พื้นที่ผิวตอบสนองจากการทดลองแบบ Central composite design ของปัจจัย 3 ระดับ ในการหาค่าพารามิเตอร์ที่ดีที่สุด พบว่าค่าพีเอช (pH) ที่เหมาะสมเท่ากับ 5.85 โดยให้กรดแลกติก เท่ากับ 89.37 กรัมต่อลิตร ภายหลังการหมักเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

- Hang (1989) พบว่าเมื่อมีการใช้ $CaCO_3$ เป็นสารปรับค่าพีเอช (pH) ในการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ในปริมาณที่มาก แนวโน้มของการผลิตกรดแลกติกก็จะมากขึ้นตามไปด้วย

- Yu and Hang (1989) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* พบว่าเมื่อมีการใช้ $CaCO_3$ เป็นสารปรับค่าพีเอช (pH) ที่ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การเติม $CaCO_3$ มีผลต่อการอัตราการใช้วัสดุหมักและปริมาณกรดแลกติกที่เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่เติม $CaCO_3$ ภายหลังการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

- Kristofikova and Rosenberg (1995) พบว่าค่าพีเอช (pH) ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแอล(+)-แลกติกโดยเชื้อรา *Rhizopus arrhizus* คือพีเอช 5.2-5.8

- Yang *et al.*, (1995) พบว่าการผลิตกรดแลกติก เอทานอล และกรดฟูมาริกจะลดลง เมื่อค่าพีเอช (pH) ลดลงจาก 6.0-4.0

- Dominguez and Vazquez (1999) ได้ศึกษาการเติม $CaCO_3$ ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน ในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ATCC 52311 พบว่าเมื่อมีการเติม $CaCO_3$ ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เวลา 0 ชั่วโมง และเติม $CaCO_3$ ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในแต่ละช่วงเวลาที่แตกต่างกัน คือ 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง พบว่าการเติม $CaCO_3$ ลักษณะดังกล่าวมีผลทำให้สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด คือ 67.5 กรัมต่อลิตร

- Dominguez and Vazquez (1999) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลกลูโคสโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ATCC 52311 พบว่าค่าพีเอช (pH) เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3.5-6.0 ไม่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยช่วงค่าพีเอช (pH) ดังกล่าวให้ปริมาณกรดแลกติกระหว่าง 69.9-72.1 กรัมต่อลิตร และพบว่าที่ช่วงค่าพีเอช (pH) นี้เชื้อรามีลักษณะการเจริญที่คล้ายคลึงกัน

- Tay and Yang (2000) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ATCC 52311 ที่ถูกตรึงบน Cotton fiber ภายในถังหมัก Fibrous bed bioreactor พบว่าค่าพีเอช (pH) มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก คือ ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 4.0 ให้อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.037 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 5.0 ให้อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.56 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 6.0 ให้อัตราการผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 0.80 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

- Muira *et al.*, (2003) พบว่าค่าพีเอช (pH) เริ่มต้นที่ 4.5 เชื้อรา *Rhizopus* spp. MK-96-1196 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 100 กรัมต่อลิตร

- wu *et al.*, (2011) พบว่าการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* TS-61 เพิ่มขึ้นโดยการเติม $CaCO_3$ 50 กรัมต่อลิตรเป็น Neutralizing agent

- Sun *et al.*, (2012) พบว่าเมื่อเพิ่มค่าพีเอช (pH) ให้เท่ากับ 10.0 เชื้อรา *Rhizopus oryzae* สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 1210.02 มิลลิกรัมต่อลิตร

นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อราบางชนิดในสกุล *Mucor rouxii* (Eijkman, 1934) *Aspergillus*, *Penicillium* และ *Fusarium* (Raistrick *et al.*, 1932) ผลิตกรดแลกติกได้เช่นกัน

1.2.10 การกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ (Mutation) คือ การเปลี่ยนแปลงอย่างกะทันหันของสารพันธุกรรมและลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปนี้ สามารถถ่ายทอดจากชั่วอายุหนึ่งไปยังอีกชั่วอายุหนึ่ง การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต ทำให้สิ่งมีชีวิตนั้นมีจีโนไทป์เปลี่ยนแปลงไป สามารถทดสอบได้ในระดับโมเลกุล (Bos, 1996) การเกิดการกลายพันธุ์แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ (Spontaneous mutation) ซึ่งเป็นผลมาจากรังสี สารเคมี อุณหภูมิ ที่มีอยู่ในธรรมชาติกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาทัวโทเมอริกชิพท์ (Tautomeric shif) หรือการก่อให้เกิดไอออน (Ionization) ที่มีอยู่ในธรรมชาติกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของเบสดีเอ็นเอ
2. การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการชักนำ (Induced mutation) เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดจากมนุษย์ใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ (Mutagen) ชักนำให้เกิดขึ้น

สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ (Physical mutagen) ได้แก่อุณหภูมิและรังสีต่างๆ รังสีเป็นสื่อก่อกลายพันธุ์ที่สำคัญในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ รังสีแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

- รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน เช่น รังสีเอ็กซ์, แกมมา, อัลฟา, เบตา, อิเล็กตรอน, นิวตรอน, โปรตอน และอนุภาคอื่นๆ ที่มีการเคลื่อนที่เร็ว รังสีเหล่านี้มีอำนาจในการทะลุทะลวงผ่านสิ่งต่างๆ ได้จากการศึกษาของ วชิราภรณ์ และคณะ (2555) ได้ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลกติกของ *Rhizopus oryzae* ATCC 3165 ด้วยรังสีแกมมา โดยนำสปอร์ของ *Rhizopus oryzae* ฉายรังสีแกมมา ที่ 4 - 6 กิโลเกรย์ ซึ่งทำให้ *Rhizopus oryzae* มีอัตราการรอดชีวิตเพียง 0.1-1.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลาย 22 ไอโซเลท จากทั้งหมด 313 ไอโซเลท ที่รอดชีวิตจากการฉายรังสี สามารถผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณที่สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม และเมื่อนำทั้ง 22 ไอโซเลท มาทดสอบความคงตัวในการผลิตกรดแลกติกในรุ่นที่ 1 ถึงรุ่นที่ 5 พบว่าทั้ง 22 ไอโซเลท มีความคงตัวในการผลิตกรดแลกติก โดยสายพันธุ์ G-118 ผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุด ปริมาณ 60 กรัมต่อลิตร
- รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet: UV) อำนาจทะลุทะลวงผ่านสิ่งต่างๆ ต่ำกว่ารังสีที่ก่อให้เกิดไอออน คือ ผลที่เกิดจากรังสียูวี อาจจะทำให้เกิดโครโมโซมผิดปกติ แต่ประสิทธิภาพน้อยกว่ารังสีเอ็กซ์ กรดนิวคลีอิกสามารถดูดซึมรังสีอัลตราไวโอเลตได้ พลังงานที่ดูดซึมไว้นี้ สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธะ (Bond) ของ

เบสพวกพิวรีนและไพริมิดีน แต่พบว่าไพริมิดีนมีการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายกว่าพิวรีน เช่น รังสียูวีทำให้ไทมิน 2 โมเลกุล ที่อยู่ติดกันบนสายโพลีนิวคลีโอไทด์สายเดียวกันของโมเลกุลดีเอ็นเอมาเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ ทำให้เกิดไทมินไดเมอร์ (Thymine dimer) ขึ้น การเกิดไทมินไดเมอร์ จะทำให้ไทมินไม่สามารถจับคู่กับอะดินินของสายโพลีนิวคลีโอไทด์ตรงข้ามได้ ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดไซโตซินไดเมอร์ (Cytosine dimer) ได้ และมีผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เช่นเดียวกัน ถ้าเกิดปฏิกิริยาการดึงกลุ่มอะมิโน (NH_2) ออกจากโมเลกุลของไซโตซินในไซโตซีนไดเมอร์ (Deamination of cytocine dimer) จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นยูราซิลไดเมอร์ (Uracil dimer) ซึ่งจะมีปฏิกิริยาเหมือนกับไทมินไดเมอร์ ซึ่งทำให้เกิดทรานซิชั่นได้ เช่น คู่เบส G-C ถูกแทนที่ด้วยคู่เบส A-T รังสีก่อให้เกิดไอออนกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ โดยจะทะลุทะลวงผ่านเนื้อเยื่อต่างๆ และทำให้อิเล็กตรอนที่เรียงตัวอยู่วงนอกสุดในโครงสร้างอะตอมหลุดออกไป จะทำให้ได้ไอออนที่มีประจุบวกเกิดขึ้น อิเล็กตรอนที่หลุดออกมานี้เคลื่อนที่ด้วยความเร็วสูงจะชนกับอิเล็กตรอนที่หลุดมาจากอะตอมอื่น ในที่สุดเมื่อพลังงานอิเล็กตรอนเหล่านี้ลดลง อิเล็กตรอนที่เป็นอิสระเหล่านี้จะไปเกาะกับอะตอมอื่นทำให้เกิดไอออนที่มีประจุลบขึ้นมา ดังนั้นอิเล็กตรอนที่หลุดมาจากอะตอมหนึ่งและไปเพิ่มให้ให้กับอีกอะตอมหนึ่ง จึงมีไอออนที่มีประจุบวกและประจุลบเกิดขึ้น ขณะที่รังสีเคลื่อนที่ผ่านไปที่ใด จะทำให้เกิดกลุ่มของไอออนที่มีประจุบวกและประจุลบไอออนเหล่านี้ ต้องเกิดปฏิกิริยาเคมีเพื่อทำประจุให้เป็นกลาง และเพื่อโครงสร้างอะตอมจะได้คงที่ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้ จะมีผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้นได้ ผลที่เกิดจากรังสีก่อให้เกิดไอออนที่พบทั่วไป คือทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซมและโครมาติด บริเวณที่แตกหักนี้จะเกี่ยวข้องกับส่วนที่ต่อกันของน้ำตาลและหมู่ฟอสเฟตและสายโพลีนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอ

- Suntornsuk and Hang (1994) ได้ศึกษาการกลายพันธุ์เชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 โดยรังสี UV ที่ความยาวคลื่น 265 นาโนเมตร พบว่าสามารถแยกเชื้อราสายพันธุ์กลายได้ทั้งหมด 188 สายพันธุ์และพบว่ามีเพียง 38 สายพันธุ์ เท่านั้นที่มีความสามารถในการผลิตกรดแอล(+)-แลกติกเพิ่มขึ้น.

- Skory *et al.*, (1998) ได้ทดลองกลายพันธุ์เชื้อรา *Rhizopus oryzae* NRRL 395 ด้วยสาร N-methyl-N'-nitro-N-Nitrosoguanidine (NTG) เข้มข้น 100 ไมโครกรัม พบว่าสายพันธ์กลาย Mutant-18 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ Alcohol dehydrogenase ต่ำ และที่สภาวะดังกล่าว เชื้อราผลิตกรดแอล(+)-แลกติกเท่ากับ 41 กรัมต่อลิตร โดยใช้ระยะเวลาการหมัก 70 ชั่วโมง

- Yin *et al.*, (2013) ได้ศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ *Rhizopus oryzae* เพื่อเพิ่มการผลิตกรดแลกติกโดยการใช้รังสี UV ที่ความยาวคลื่น 264 นาโนเมตร ระยะห่าง 20 เซนติเมตร พบว่าสายพันธุ์ LA-UN 1 สามารถเพิ่มการผลิตกรดแลกติก 59.5 กรัมต่อลิตร หลังจากเวลา 54 ชั่วโมงของการหมัก

สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี เป็นสารเคมีที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์โดยไปเปลี่ยนโครงสร้างนิวคลีโอไทด์ ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ 2 ชนิด Transition และ Transversion

1. Transition เป็นการแทนที่เบสชนิดหนึ่งด้วยเบสอีกชนิดหนึ่งในกลุ่มเดียวกัน

2. Transversion เป็นการแทนที่เบสกลุ่มพิวรีนด้วยไพริมิดีน หรือกลับกัน สารกลุ่มที่มีหมู่อัลคีล (Alkylating agent) เป็นกลุ่มที่สำคัญที่สุด ที่นิยมนำมาใช้ในการกลายพันธุ์ สารกลุ่มนี้ทำหน้าที่เติมหมู่เอธิลให้กับโมเลกุลของเบสกัวนีน ทำให้มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับเบสอะดินิน ซึ่งจะมีผลทำให้การจับคู่ของเบสกัวนินผิดปกติ แบ่งได้เป็น 7 กลุ่ม คือ Sulphur mustard, Nitrogen mustard, Epoxide, Ethyleneimine, Sulphate, Diazo compound, Nitroso-compound. แต่ละกลุ่มจะมีลักษณะการชักนำที่แตกต่างออกไป ซึ่งสารเคมี Ethyl methane sulfonate (EMS) นิยมใช้ในการชักนำพืชมากที่สุด ตามการศึกษาของ Wattoo *et al.*, (2013) ที่ศึกษาการกลายพันธุ์โดยการชักนำของสารเคมี EMS ในข้าวพบว่าประสิทธิภาพการกลายพันธุ์จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ นอกจากนี้รายงานการใช้สารเคมี EMS ในจุลินทรีย์ยังมีน้อยมาก เพราะมีข้อเสียคือเป็นสารก่อมะเร็ง

สารเคมี Ethyl methane sulfonate (EMS) จัดเป็นสาร Alkylating agent เป็นของเหลวใส ไม่มีสี น้ำหนักโมเลกุล 124 ละลายในน้ำได้ การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการชักนำด้วยสารเคมี EMS คือ การแทนที่คู่เบส (Base substitution) มีด้วยกัน 3 แบบ คือ

- Alkylation เกิดมากที่สุดที่ตำแหน่ง N-7 ของเบสกัวนีน ได้เป็น 7-Ethyl guanine หรือเรียกว่า Alkylated guamine และ Alkylated guamine จะจับคู่กับเบสไธมีน แทนที่จะจับกับเบสไซโทซีนจึงเกิดการกลายแบบ Transition mutation

- Purine หลุดออกไปจากสาย DNA (Depurination) คือ หมู่เอทิลไปจับที่ตำแหน่งต่าง ๆ ของ Purine เกิดการตัดพันธะเคมีที่เชื่อมระหว่างน้ำตาลกับเบส Purine หลุดออกไปจากโมเลกุลของ DNA เกิดการกลายแบบ Transition หรือ Transversion เนื่องจากเซลล์ต้องมีกระบวนการซ่อมแซม DNA

- การขาดของเส้นเดี่ยวหรือเส้นคู่ของ DNA (Single strand or double strand break) เป็นการขาดหายของ Purine ทำให้น้ำตาลไม่คงตัว เกิด Hydrolysis มีการตัดขาดหมู่ฟอสเฟตและน้ำตาล ทำให้เส้นเดี่ยวหรือเส้นคู่ DNA ขาดจากกันได้

- Demirci and Pometto (1992) ศึกษาการเพิ่มผลผลิต ดี(-)-แลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 9649 ที่กลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี EMS พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตได้เท่ากับ 77 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ผลิตได้เท่ากับ 58 กรัมต่อลิตร และนอกจากนี้ ยังพบว่าสายพันธุ์กลายสามารถคงประสิทธิภาพเดิมได้เป็นเวลา 1 ปีครึ่ง เมื่อนำไปเก็บที่อุณหภูมิเยือกแข็ง

- EL-Bondkly and Keera (2007) ศึกษาการกลายพันธุ์ที่มีผลต่อการผลิตไลเปสของเชื้อรา *Penicillium roquefortii* โดยการใช้สารเคมี EMS และรังสี UV พบว่าสายพันธุ์กลายทุกสายพันธุ์ สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตไลเปสได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม

- Kamble and Mulani (2012) ศึกษาผลกระทบต่อการเจริญ Acid Phosphatase, Alkaline phosphatase activity และโปรตีนจากเชื้อราสายพันธุ์กลาย *Tricholoma lascivum* ที่ถูกชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยรังสี UV และสารเคมี EMS พบว่าไอโซเลท TIW และ TIB ที่ถูกชักนำด้วยรังสี UV เป็นเวลา 10 นาที และสารเคมี EMS ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพดีที่สุดและเป็นสายพันธุ์ที่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้

- Radha *et al.*, (2012) ศึกษาการเพิ่มผลผลิตโปรติเอส จากการชักนำเชื้อรา *Aspergillus niger* ให้กลายพันธุ์โดยการใช้สารเคมี EMS โดยใช้การหมักแบบเปียกและแบบแข็ง พบว่าสายพันธุ์กลาย EMS11 ให้ปริมาณโปรติเอสสูงสุด 1094.5 ± 6.11 U/g $^{-1}$ โดยใช้การหมักแบบแข็ง

- Leonard *et al.*, (2013) ได้ชักนำเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ให้กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี EMS เพื่อศึกษา Antibacterial activity พบว่าไอโซเลท CAL220 มีปฏิกิริยายับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas aeruginosa* แต่ไม่มีปฏิกิริยาต่อเชื้อ *Klebsiella pneumonia* หรือ *Proteus vulgaris*

1.2.11 กระบวนการทำ Recovery และ Purification กรดแลกติก

เนื่องจากการสังเคราะห์พอลีแลกติก จำเป็นต้องใช้กรดแลกติกที่มีความบริสุทธิ์สูงเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ เพราะฉะนั้นจึงจำเป็นที่ต้องมีกระบวนการทำกรดแลกติกที่ได้ให้บริสุทธิ์ขึ้น ซึ่งกระบวนการทำบริสุทธิ์กรดแลกติก เป็นกระบวนการที่ประกอบไปด้วยขั้นตอนหลายขั้นตอน มีด้วยกันหลายวิธี ตามการศึกษาของ Vickroy (1985) and Benninga (1990) อธิบายไว้ว่ากระบวนการแรกต้องเริ่มด้วยการเพิ่มอุณหภูมิของของเหลวให้สูงถึง 80-100 องศาเซลเซียส และเพิ่มค่าพีเอช (pH) ประมาณ 10-11 เพื่อให้เซลล์จุลินทรีย์หยุดการเจริญ, โปรตีนจับตัวก้อน สารละลายแคลเซียม และปริมาณน้ำตาลที่เหลือจับกันเพื่อที่จะสามารถกรองเป็นสารสกัดหยาบก่อนจะนำเข้าสู่กระบวนการ Recovery ต่อไป ซึ่งกระบวนการทำมีหลายวิธี เช่น การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction) การดูดซับ (Adsorption) การกลั่นโดยตรง (Direct distillation) การแยกด้วยเยื่อเมมเบรนแบบ Electrodialysis และ การแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion exchange chromatography)

- การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction) ในกระบวนการสกัด ด้วยตัวทำละลาย มีการใช้ Trioctylamine และ Octanol เป็น Extractant และ Diluent ในการสกัดกรดแลกติก ซึ่งร้อยละผลได้ของ กรดแลกติกที่สกัดได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ (Cotano *et al.*, 2009) แต่มีข้อเสียคือ ใช้ตัวทำละลายที่มาสกัดในปริมาณสูง และการสกัดเพียงอย่างเดียวไม่

สามารถทำให้กรดแลกติก มีความบริสุทธิ์สูงพอ ตามการศึกษาของ Järvinen *et al.*, (2000) ที่ทำการสกัดกรดแลกติกโดยใช้ Amine เป็นตัวสกัด และใช้ 1-Dekanol เป็น Diluent สามารถแยกเปอร์เซ็นต์ Yield กรดแลกติกเท่า 50 เปอร์เซ็นต์

- การดูดซับ (Adsorption) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกอินทรีย์สาร สี กลิ่น และรสที่ปนเปื้อน โดยอาศัยสารดูดซับ การทำการดูดซับกรดแลกติกออกจากน้ำหมัก โดยใช้เรซิ่นแลกเปลี่ยนประจุลบ (Amberlite IRA-400 anion exchange resin) ได้ร้อยละผลได้ของกรดแลกติกเท่ากับ 92.11 เปอร์เซ็นต์ (Cao *et al.*, 2002) แต่การทำให้กรดแลกติกบริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธีการดูดซับไม่เหมาะกับการนำไปใช้ในทางปฏิบัติ เนื่องจากตัวดูดซับมีราคาแพง และประสิทธิภาพในการดูดซับจะลดลง หากในกรดแลกติกมีสารอื่นปนเปื้อนสูง

- การแยกด้วยเยื่อเมมเบรนแบบ Electrodialysis (ED) เป็นกระบวนการแยกองค์ประกอบที่มีประจุออกจากสารละลายอิเล็กโตรไลท์ โดยใช้เมมเบรนแลกเปลี่ยนอิออนมาต่ออนุกรมกันและอยู่ระหว่างขั้วบวก (Anode) และขั้วลบ (Cathod) มีความต่างศักย์ ระหว่างขั้วอิเล็กโทรดเป็นแรงขับดันร่วม กับการเลือกผ่านอิออนของเมมเบรน โดนอิออนบวกจะเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนอิออนบวก ส่วนอิออนลบจะเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนอิออนลบ เพื่อให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของอิออนสูงและสารละลายเจือจาง Hongo *et al.*, (1986) ได้มีการนำอิเล็กโตรไดอะไลซิสมาประยุกต์ใช้ในการหมักกรดแลกติก และการแยกกรดแลกติกออกมาอย่างต่อเนื่อง ซึ่งด้วยวิธีการนี้จะได้ร้อยละผลได้ของกรดแลกติกเท่ากับ 91.5 แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือ ใช้ต้นทุนสูงและใช้เวลานาน

- การทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น (Esterification) และ ไฮโดรไลเซชั่น (Hydrolyzation) เป็นการทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น (Esterification) กรดแลกติกด้วยแอลกอฮอล์ แล้วตามด้วยการทำปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชั่น (Hydrolyzation) ซึ่งวิธีนี้จะได้ความบริสุทธิ์ของกรดแลกติก 85-98 เปอร์เซ็นต์ (Cockrem and Johnson, 1993) ตามการศึกษาของภัทรพลและคณะ (2555) ได้ศึกษากระบวนการเพิ่มความบริสุทธิ์ให้แก่กรดแลกติกที่มีอยู่ในน้ำหมักที่ได้จากการหมักกากน้ำตาลด้วยกระบวนการเอสเทอริฟิเคชั่นตามด้วยกระบวนการไฮโดรไลเซชั่น โดยใช้เรซิ่นแลกเปลี่ยนประจุบวก (Cation exchange resin) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยทำการทดลองศึกษาตัวแปร ได้แก่ ปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาที่มีผลต่อร้อยละผลได้และความบริสุทธิ์ของกรดแลกติก จากการทดลองพบว่า ทั้งปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยาและอุณหภูมิที่ใช้ในการทำปฏิกิริยามีผลต่อค่าผลได้และเปอร์เซ็นต์ความบริสุทธิ์ของกรดแลกติก โดยสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ค่าผลได้ของปฏิกิริยาไฮโดรไลเซชั่นสูงสุดเท่ากับ 83.02 เปอร์เซ็นต์และความบริสุทธิ์กรดแลกติกสูงสุด หลังผ่านกระบวนการไฮโดรไลเซชั่นแล้วเท่ากับ 83.66 เปอร์เซ็นต์ เกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 285 องศาเซลเซียส และใช้ปริมาณตัวเร่งปฏิกิริยา 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โดยวิธีการเพิ่มความบริสุทธิ์กรดแลกติกในน้ำหมักด้วยกระบวนการเอสเทอริฟิเคชั่นตามด้วยกระบวนการไฮโดรไลเซชั่นนี้ สามารถเพิ่มความบริสุทธิ์

กรดแลกติกได้ 59.77 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับกรดแลกติกที่มีอยู่ในน้ำหมักเริ่มต้น และ Sun *et al.*, (2006) ศึกษากระบวนการทำบริสุทธิ์กรดแลกติกโดยการทำปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น (Esterification) และ ไฮโดรไลเซชั่น (Hydrolyzation) พบว่ากรดแลกติกมีความบริสุทธิ์สูงสุด 90 เปอร์เซ็นต์และค่า Yield เท่ากับ 89.7 เปอร์เซ็นต์

- การแยกด้วยโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (Ion exchange Chromatography) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลที่มีประจุ หรือโมเลกุลที่มีความสามารถในการแตกตัวให้ประจุออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของค่าประจุ (Net charge) และการดูดซับหรือจับกันแบบผันกลับได้ (Reversible adsorption) ด้วยแรงทางไฟฟ้า (Electrostatic force หรือ Ionic force) ที่แตกต่างกัน ของโมเลกุลที่มีประจุตรงข้ามกับอิออนของ Stationary phase และการจับกันนี้จะสามารถถูกไล่หรือแทนที่ได้ด้วยโมเลกุลอื่นที่มีความสามารถในการจับกับเรซิ่นได้ดีกว่าเข้ามาแข่งขันแย่งจับ โดย Wang-Yu Tong *et al*,. (2004) ได้ศึกษาการทำบริสุทธิ์กรดแลกติกด้วย Paper sludge ใช้การแลกเปลี่ยนประจุแบบ Weak anion exchanger amberlite IRA-92 พบว่าหลังจากการเพิ่มประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการแล้ว จะให้ผลผลิต ประมาณ 82.6 เปอร์เซ็นต์ กรดแลกติกมีความบริสุทธิ์ 96.2 เปอร์เซ็นต์ และการผลิตกรดแลกติก 1.16 กรัม

มีเทคนิคและกระบวนการมากมายที่นำมาประยุกต์ใช้เพื่อทำให้กรดแลกติกมีความบริสุทธิ์สูง แต่เนื่องจากบางขั้นตอนต้องใช้ต้นทุนสูงและใช้เวลานาน ทั้งยังให้ความบริสุทธิ์น้อย

1.3 วัตถุประสงค์ (Objectives)

1. เพื่อศึกษาการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 ด้วยการใช้รังสีอัลตราไวโอเลต (UV) และสารเคมี Ethyl methane sulfonate (EMS)
2. เพื่อศึกษาค่าพีเอช (pH) ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน
3. เพื่อนำเปลือกมันสำปะหลังซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์ เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้งและยังเป็นแนวทางช่วยลดปัญหาทางสิ่งแวดล้อม

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. Acetyl acetone	
3. Ammonium sulphate ($(NH_4)_2SO_4$	Sigma
4. Bromo cresol green	
5. Calcium carbonate ($CaCO_3$)	Merck
6. Ethanol 95%	-
7. Ethyl methane sulfonate (EMS)	
8. Glucosamine hydrochloride	
9. Glucose	Difco
10. Hydrochloric acid (HCL)	-
11. Iodine	Fluka
12. Lacto phenol cotton blue	Merck
13. Para dimethyl aminobenzaldehyde	
14. Potassium hydrogen phthalate ($KHC_8H_4O_4$)	Merck
15. Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Merck
16. Phenolphthalein	Merck
17. Phenol	
18. Magnesium sulphate heptahydrate ($MgSo_4 \cdot 7H_2O$)	Merck
19. Sodium hydroxide (NaOH)	Merck

20. Tween 80	Ajax finechem
21. 3,5-Ditrosalicylic acid solution	Merck
22. Zinc sulphate heptahydrate ($ZnSo_4 \cdot 7H_2O$)	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. Flask	Pyrex
7. Glass beaker	Pyrex
8. Haemacytometer	
9. Hot air oven	WTB binder, BD/ED/FD
10. Laboratory bottle shcott	-
11. Laminar air flow cabinet	Science tech co.,Ltd.
12. Loop	-
13. Microscope	Olympus
14. Microscope slide	Sail brand
15. Microwave	Sanyo
16. Needle	-
17. Pasteur pipette	Pyrex
18. Petri dish	Pyrex
19. pH meter	TQ science instruments
20. Spreader	-
21. Syringe filter	Whatman
22. Test tube	Pyrex
23. Tip	Axygen
24. Volumetric flask	Witeg
25. Vortex mixer	Mettler Toledo PB602-L
26. กล้องถ่ายรูป	Sumsung

27. กระดาษกรอง	Whatman
28. เครื่องชั่งสาร	Mettler Toledo
29. แท่งแก้วคน	-
30. แท่งแก้วรูปตัววี	-
31. น้ำกลั่น	-
32. แป้งมันสำปะหลัง	ช้างสามเศียร
33. มีดตัดวุ้น	
34. ถาดที่ใช้หมัก ขนาด 12×24 เซนติเมตร	
35. ถุงพลาสติกทนความร้อน ขนาด 18×21	

2.4 เชื้อราที่ใช้ศึกษา (Study strains)

1. เชื้อรา *Rhizopus oryzae* TISTR 3535 จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
2. เชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 ได้รับอนุเคราะห์จากสุณิษา และวิไลลักษณ์ (2557)

2.5 วิธีดำเนินการ

ในการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 ด้วยการใช้รังสีอัลตราไวโอเลต (UV) และสารเคมี Ethyl methane sulfonate (EMS) และนำมาทดลองหมักให้ได้กรดแลกติกในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เปลือกมันสำปะหลังเป็นวัสดุหมักในรูปการหมักแบบแข็ง (Solid state fermentation) และศึกษาค่าพีเอช (pH) ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก โดยปฏิบัติดังนี้

2.5.1 การเทียบเคียงเชื้อราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 มาทำ Slide culture ตามวิธีของ Riddell (1950) แล้วนำมาทำการเทียบเคียงชนิดของเชื้อราในเบื้องต้น โดยเปรียบเทียบกับเชื้อรา *Rhizopus oryzae* TISTR 3535 จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เพื่อใช้เป็นสายพันธุ์อ้างอิง

2.5.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหาร Cassava starch agar ดัดแปลงจากวิธีของ Yin *et al.*, (1997) โดยมีองค์ประกอบดังนี้ แป้งมันสำปะหลัง และไม่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส โดยส่วนประกอบของ

อาหารมีดังนี้ (กรัมต่อลิตร) แป้งมันสำปะหลัง 50 กรัม, $(NH_4)_2SO_4$ 3 กรัม, KH_2PO_4 0.25 กรัม, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15 กรัม, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04 กรัม, ผงวุ้น 18 กรัม นำแป้งและส่วนประกอบของอาหารมาผสมจนเข้ากัน เติมน้ำกลั่นลงไปให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นนำเข้า Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 ได้รับความอนุเคราะห์จากสุณิษาและวิไลลักษณ์ (2557) ที่แยกได้จากตัวอย่างมันสำปะหลังตากแห้ง และคัดเลือกแล้วว่าเป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดได้ดีที่สุด ถูกเก็บรักษาไว้ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์ นำมาเลี้ยงในอาหาร Cassava slant บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง จนเส้นใยเจริญ ส่วนเชื้อรา *Rhizopus oryzae* TISTR 3535 นำมาเลี้ยงในอาหาร Potato dextrose agar บ่มที่สภาวะเช่นเดียวกับเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018

2.5.3 การเทียบเคียงเชื้อราระดับชนิดด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

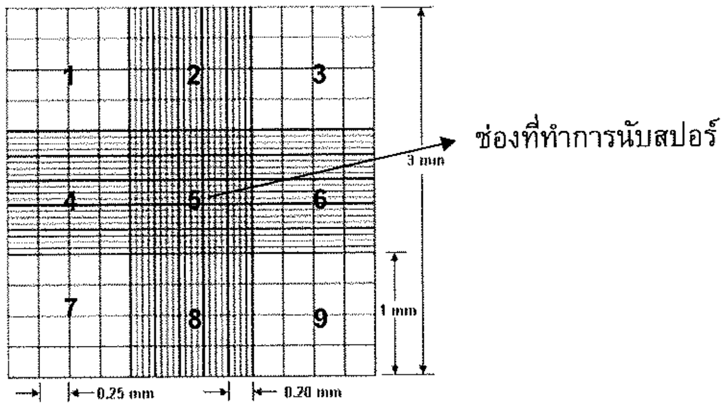
การศึกษาทางชีวโมเลกุลทำโดยการส่งตัวอย่างเพื่อหาลำดับดีเอ็นเอที่ห้องปฏิบัติการ Group of plant microbe interactions, Institute of plant science and resoueces (IPSR) Okayama university ประเทศญี่ปุ่น โดยทำการเพิ่ม rDNA บริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ตำแหน่ง ITS1-5.8S – ITS2 ด้วยคู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 โดยเทคนิคพีซีอาร์ นำปริมาตรสารทั้งหมดที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอใส่ในเครื่องพีซีอาร์ โดยตั้งโปรแกรมอุณหภูมิขั้นต่างๆ ที่ใช้ดังนี้ ขั้นตอน Denaturation อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส 10 นาที, ขั้นตอน Annealing อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 5 วินาที, ขั้นตอน Extention อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 4 นาที รวมทั้งหมด 25 รอบ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ ไปตรวจผลการทำปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิค Agarose gel electrophoresis และนำผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้ไปวิเคราะห์หาลำดับดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง DNA sequencer นำลำดับเบสดีเอ็นเอที่ได้มาตรวจสอบความถูกต้องของสายดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม BioEdit (Hall, 2004) จากนั้นนำไปเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอที่มีในฐานข้อมูล NCBI ด้วยการ BLAST (Basic local alignment search tool) (Johnson *et al.*, 2008) ดาวน์โหลดข้อมูลลำดับเบสดีเอ็นเอที่ใกล้เคียงกับสายดีเอ็นเอไอโซเลท C018 และลำดับดีเอ็นเอของ Out group มาทำ Multiple alignment ด้วยโปรแกรม Muscle (Edgar, 2004) ซึ่งมีอยู่ในโปรแกรม Mega 5.1 จากนั้นนำไปสร้างไฟโลจีนีติกทรีของแต่ละสายดีเอ็นเอไอโซเลท C018 ด้วยชุดโปรแกรม Mega 5.1 (Tamura *et al.*, 2011) โดยโปรแกรมสำหรับสร้างเมทริกซ์ (DNA dist สำหรับดีเอ็นเอ) แล้วนำผลไปสร้างไฟโลจีนีติกทรีโดยวิธี Neighbor-joining ทดสอบความเชื่อมั่นของไฟโลจีนีติกทรีที่ได้ โดยการทดสอบ Bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ จะได้ไฟโลจีนีติกทรีของสายดีเอ็นเอไอโซเลท C018

2.5.4 การเตรียม spore suspension และการนับสปอร์เชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 โดยใช้สไลด์ Haemacytometer

นำเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 ที่เจริญสร้างสปอร์แล้วในอาหาร Cassava slant ตามที่เตรียมจากข้อที่ 2.5.2 ใช้สารละลาย Tween 80 ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ เทราดลงไป แล้วขูดสปอร์โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ แล้วเทลงในฟลาสก์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำมานับสปอร์ ด้วยสไลด์ Haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ให้ได้ความเข้มข้น 1×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

ซึ่งการนับจะนับสปอร์ที่อยู่ในช่องที่ 5 ของทั้ง 2 Chamber โดยนับทั้ง 2 Chamber สุ่มนับ Chamber ละ 5 ช่องในแนวทแยงมุม จากนั้นหาค่าเฉลี่ยของทั้ง 2 Chamber แล้วนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของเชื้อรา ดังนี้

ความเข้มข้นของเชื้อรา = ค่าเฉลี่ยของจำนวนสปอร์ที่นับได้ x 2.5 x 10^5 x ความเข้มข้นที่ใช้นับ



รูปที่ 6 การนับสปอร์เชื้อราโดยใช้สไลด์ Haemacytometer

2.5.5 ทดสอบการผลิตกรดของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018

นำเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 มาทำ Point inoculation ลงในอาหาร Potato dextrose agar บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตัดเฉพาะส่วนปลายของเส้นใยของเชื้อราด้วย Cork borer วางลงตรงกลางอาหาร Cassava starch agar ที่เติม Bromo cresol green ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อดูความสามารถในการผลิตกรดของเชื้อรา จากการเปลี่ยนสีของอาหารที่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อมีการผลิตกรด และระดับของสีเป็นตัวบ่งชี้ปริมาณของกรด

2.5.6 ทดสอบการย่อยแป้งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018

นำเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 มาทำ Point inoculation อาหาร Potato dextrose agar บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนเชื้อราเจริญดี ตัดเฉพาะส่วนปลายของเส้นใยของเชื้อราด้วย Cork borer วางลงตรงกลางอาหาร Cassava starch agar บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นราดด้วยสารละลายไอโอดีน เป็นเวลา 1 นาที แล้ววัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสรอบโคโลนี (Clear zone) การเกิดวงใสแสดงว่าเชื้อราสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้ แล้วจึงคำนวณหาค่า Extracellular enzyme production ratio (EPR) จากสูตรดังนี้

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

โดยมีการกำหนดปฏิกิริยาการสร้างเอนไซม์ตามค่า EPR เป็น 3 ระดับ ดังนี้ (Choi *et al.*, 2005)

Strong reaction: >2 เซนติเมตร
Medium reaction: >1-<2 เซนติเมตร
Weak reaction: < 1 เซนติเมตร

2.5.7 การทำให้กลายพันธุ์ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต (UV) ที่ความแตกต่างของระยะทางที่สัมผัส ตามวิธีของ Bapiraju *et al.*, (2004)

นำเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 มาเลี้ยงในอาหาร Cassava slant บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง จนเส้นใยเจริญ แล้วนำมาเตรียม Spore suspension (ตามข้อ 2.5.4) ดูดมาปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร Spread บนอาหาร Cassava starch agar ที่เติม 0.04 เปอร์เซ็นต์ Bromo cresol green (BCG) นำไปสัมผัสรังสี UV ที่ระยะเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที ระยะห่างจากหลอด UV 10, 20 และ 30 เซนติเมตร เมื่อครบเวลา นำมาบ่มในที่มืดอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ดูการผลิตกรดซึ่งอาหารจะเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และนำแต่ละ Single colony ที่ผลิตกรด ย้ายลงอาหาร Cassava starch agar บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยวิธี Slide culture, คำนวณอัตราการรอดชีวิต (Survival rate and dead rate) และนำแต่ละ Single colony มาทดสอบการย่อยแป้งต่อไป

2.5.8 การทำให้กลายพันธุ์ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 โดยใช้สารเคมี Ethyl methane sulfonate (EMS) ที่ความเข้มข้นต่างกัน ดัดแปลงจากวิธีของ Radha *et al.*, (2012)

นำเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 มาเลี้ยงในอาหาร Cassava slant บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง จนเส้นใยเจริญ แล้วนำมาเตรียม Spore suspension (ตามข้อ 2.5.4) แล้วดูดมาปริมาตร 9 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง เติม 1 มิลลิลิตร ของสารละลาย EMS ความเข้มข้น 100, 200, 300, 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (เตรียมจาก stock 500 µg/ml ใน Phosphate buffer pH 7) นำตัวอย่างที่ผสมกันแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 และ 60 นาที จากนั้นนำมา Spread บนอาหาร Cassava starch agar ที่เติม 0.04 เปอร์เซ็นต์ Bromo cresol green บ่มในที่มืดอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง เพื่อดูการผลิตกรด และนำแต่ละ Single colony ที่ผลิตกรด ย้ายลงอาหาร Cassava starch agar บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยวิธี Slide culture, คำนวณอัตราการรอดชีวิต (Survival rate and dead rate) และนำแต่ละ Single colony มาทดสอบการย่อยแป้งต่อไป

2.5.9 การทำให้กลายพันธุ์ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 โดยใช้รังสี UV ร่วมกับสารเคมี Ethyl methane sulfonate (EMS) ดัดแปลงจากวิธีของ Bapiraju *et al.*, (2004) และ Radha *et al.*, (2012)

นำเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 มาเลี้ยงในอาหาร Cassava slant บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง จนเส้นใยเจริญ แล้วนำมาเตรียม Spore suspension (เตรียมจากข้อ 2.5.4) และเตรียมความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารเคมี EMS (เลือกความเข้มข้นที่ดีที่สุดจากข้อ 2.5.8) ดูด Spore suspension ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมลงในสารเคมี EMS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ดูดมาปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร Spread บนอาหาร Cassava starch agar นำไปสัมผัสรังสี UV นาน 30 นาที (เลือกระยะเวลาที่ดีที่สุดจากข้อ 2.5.7) ระยะห่างจากหลอด UV 30 เซนติเมตร (เลือกระยะห่างจากหลอด UV ที่ดีที่สุดจากข้อ 2.5.7) เมื่อครบเวลาที่ทดสอบ นำไปบ่มในที่มืดอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง เพื่อดูการผลิตกรด และนำแต่ละ Single colony ที่ผลิตกรด ย้ายลงอาหาร Cassava agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยวิธี Slide culture, คำนวณอัตราการรอดชีวิต (Survival rate and dead rate) และทดสอบการย่อยแป้งต่อไป

2.5.10 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ ด้วยวิธี Slide culture technique ตามวิธีของ Riddell (1950)

นำเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 ที่ผ่านการกลายพันธุ์มาทำ Slide culture โดยการใช้ใบมีดที่ปราศจากเชื้อตัดวุ้น PDA เป็นชิ้นเล็กๆ เป็นรูปลูกบาศก์ขนาดประมาณ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร ย้ายชิ้น PDA วางตรงกลางแผ่นสไลด์ ใช้เข็มที่ผ่านการลนไฟฆ่าเชื้อเขี่ยเชื้อราที่เตรียมไว้ไปแตะตรงขอบของชิ้น PDA ทั้ง 4 ด้าน ใช้ปากคีบ คีบกระจกปิดสไลด์จุ่ม Ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ ลนไฟ แล้วปล่อยไว้ให้เย็น ปิดทับบนแผ่นวุ้น จากนั้นใส่น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อลงไปในจานเล็กน้อยเพื่อไม่ให้วุ้นแห้ง ระวังอย่าให้น้ำล้นถึงแผ่นสไลด์ และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-4 วัน จากนั้นดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา โดยทำการหยด Lactophenol cotton blue ลงตรงกลางแผ่นสไลด์ ย้ายแผ่นกระจกปิดสไลด์จากที่เลี้ยงเชื้อไว้ มาปิดทับลงบนแผ่นสไลด์นั้น จากนั้นจึงคีบเอาชิ้น PDA ที่มีเชื้อราเจริญอยู่ออก แล้วหยด Lactophenol cotton blue ลงไป จากนั้นนำแผ่นกระจกปิดสไลด์แผ่นใหม่ปิดทับลงไป แล้วนำมาส่องดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า

2.5.11 การหมักให้ได้กรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากการสัมผัสรังสีอัลตราไวโอเลต (UV), สารเคมี EMS และสองวิธีร่วมกัน โดยใช้วิธีการหมักแบบแข็ง (Solid state fermentation: SSF)

2.5.11.1 การเตรียมอาหารที่ใช้ในการหมัก (Production medium)

เตรียมอาหาร Production medium เตรียมโดยดัดแปลงจากวิธีของ Yin *et al.*, (1997) และไม่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส โดยส่วนประกอบของอาหารมีดังนี้ (กรัมต่อกิโลกรัม) แป้งมันสำปะหลัง 150 กรัม, $(NH_4)_2SO_4$ 30 กรัม, KH_2PO_4 2.5 กรัม, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.5 กรัม, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 กรัม ปรับส่วนผสมให้ได้ 1,000 กรัม ด้วยเปลือกมันสำปะหลังบดขนาด 5 มิลลิเมตร

2.5.11.2 การเตรียม Spore suspension ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้

นำเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ ที่เจริญสร้างสปอร์แล้วในอาหาร Cassava slant เตรียม Spore suspension โดยใช้สารละลาย Tween 80 ความเข้มข้น 0.01 เปอร์เซ็นต์ ขูดสปอร์โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเทลงในฟลาสก์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้ว จากนั้นนำสปอร์มานับด้วยสไลด์ Haemacytometer ให้ได้ความเข้มข้น 1×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ตามข้อ 2.5.4)

2.5.11.3 การศึกษาค่าพีเอช (pH) ที่เหมาะสมในการผลิตกรดโดยใช้วิธีการหมักแบบแข็ง (Solid state fermentation: SSF)

นำแป้งมันสำปะหลังและส่วนประกอบของอาหารที่เตรียมจากข้อ 2.5.11.1 มาผสมจนเข้ากันในถุงพลาสติกขนาด 18×21 แล้วปรับความชื้นเริ่มต้นเป็น 70 เปอร์เซ็นต์ และปรับค่าพีเอช (pH) ของวัสดุหมักให้ได้ 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 ด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปิดปากถุงด้วยจุกสำลีและครอบอีกชั้นด้วยพลาสติก จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำสปอร์เชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ ความเข้มข้น 1×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ตามข้อ 2.5.4) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาคลุกเคล้าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปแผ่ให้กระจายในถาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยรังสี UV แล้ว ขนาดของถาดที่ใช้ในการหมักคือ 12×24 เซนติเมตร แล้วปิดปากถาดด้วยผ้าขาวบาง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส หมักเป็นเวลา 168 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ ต่างๆ ดังนี้ ค่าพีเอช (pH) ด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter), ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acid) ด้วยวิธีการไทเทรต (Titration), น้ำตาลทั้งหมด (Total sugars) ด้วยวิธี Phenol sulfuric acid, น้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) ด้วยวิธี DNS, ปริมาณกลูโคซามีน (Glucosamine)

2.5.11.4 การหมักให้ได้กรดแลกติกที่สภาวะพีเอช (pH) ที่เหมาะสมด้วยวิธีการหมักแบบแข็ง (Solid state fermentation : SSF) ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้

จากการศึกษาข้อ 2.5.11.3 ได้ค่าพีเอช (pH) ที่เหมาะสมคือ 6.0 และทำการหมักให้ได้กรดแลกติกโดยจัดสภาวะที่เหมาะสม (เตรียมจากข้อ 2.5.11.1) คือ ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน, $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน, ความชื้นเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ (สุณิษาและวิไลลักษณ์, 2557) และปรับค่าพีเอช (pH) ของวัสดุหมักให้ได้ 6.0 ด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 นอร์มอล ปิดปากถุงด้วยจุกสำลีและครอบอีกชั้นด้วยพลาสติก จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำสปอร์เชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ ความเข้มข้นสปอร์ 1×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ตามข้อ 2.5.4) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาคลุกเคล้าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปแผ่ให้กระจายในถาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยรังสี UV แล้ว ขนาดของถาดที่ใช้ในการหมักคือ 12×24 เซนติเมตร แล้วปิดปากถาดด้วยผ้าขาวบาง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส หมักเป็นเวลา 168 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ ต่างๆ ดังนี้ ค่าพีเอช (pH) ด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter), น้ำตาลทั้งหมด (Total sugars) ด้วยวิธี Phenol sulfuric acid, น้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) ด้วยวิธี DNS, ปริมาณกลูโคซามีน (Glucosamine) และวิเคราะห์กรดแลกติก ด้วยเครื่อง HPLC

2.5.12 การศึกษาอัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนในเปลือกมันสำปะหลัง (C/N Ratio)

นำเปลือกมันสำปะหลังชั่งน้ำหนัก 10 กรัม ใส่ในฟลาสก์ปิดจุกด้วยสำลี จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปวัดค่าคาร์บอนต่อไนโตรเจน ในเปลือกมันสำปะหลัง (C/N Ratio) ด้วยเครื่อง CHNO/S Analyzer

2.5.13 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกด้วยวิธี HPLC (High performance liquid chromatography) รุ่น HPLC-UV 1100, Agilent technologies, Germany

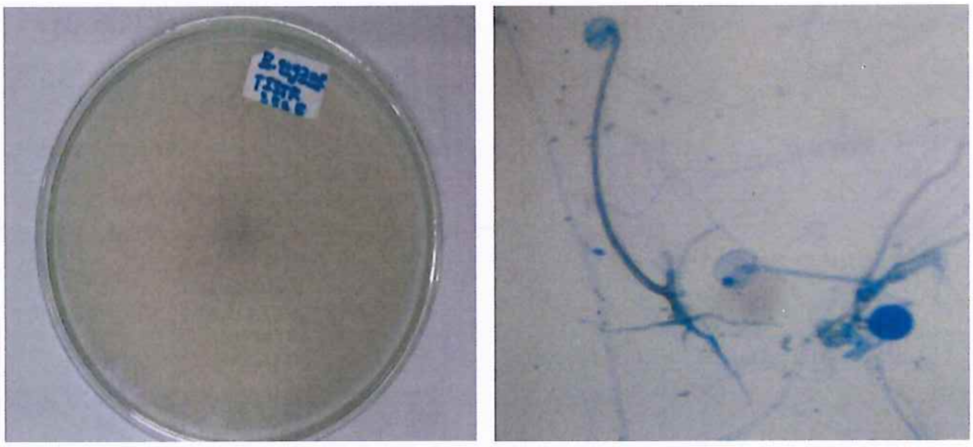
เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณกรดแลกติกคือ เครื่องโครมาโทกราฟีชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง (HPLC-UV 1100, Agilent technologies, Germany) เทคนิคการทดสอบแบบ Reverse phase โดยใช้ Detector variable wavelength UV 210 นาโนเมตร และใช้ Column Hypersil ODS ขนาด 250 x 4.0 มิลลิเมตร บรรจุขนาดอนุภาค 5 ไมครอน Mobile phase ใช้ H_3PO_4 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ อัตราการไหล (Flow rate) 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ฉีด 20 ไมโครลิตร

บทที่ 3

ผลการทดลอง

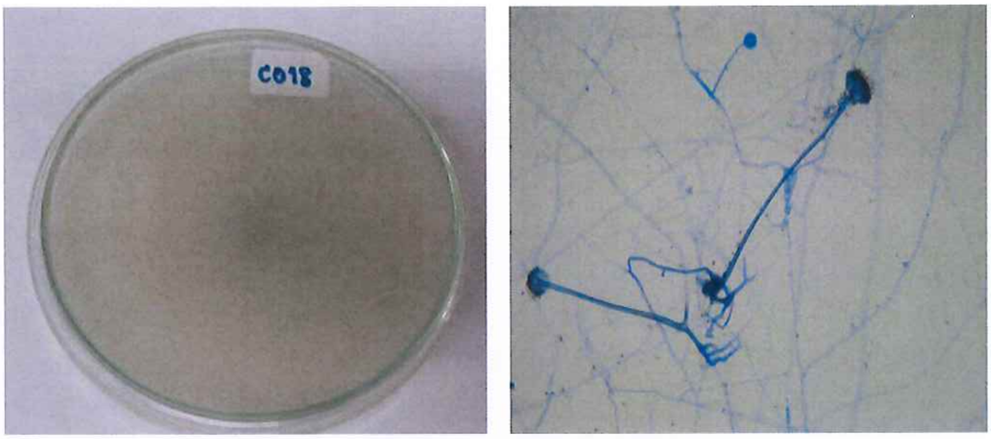
3.1 ผลการเทียบเคียงเชื้อราโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง Macroscopic และ Microscopic morphology และเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา *Rhizopus oryzae* TISTR 3535 พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกับ *Rhizopus* spp. โดยเชื้อราสกุลนี้ มีลักษณะโคโลนี คือ เส้นใยขาวฟู สปอร์มีสีดำน้ำตาล เจริญได้รวดเร็วภายใน 18-24 ชั่วโมง จากการทำ Slide culture พบลักษณะเส้นใยเป็นแบบไม่มีผนังกั้น และ พบ Rhizoid ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อราสกุลนี้ สีของเส้นใยเป็นแบบใสไม่มีสี ชนิดของ Asexual spore เป็นแบบ Sporangiospore ซึ่งผลการศึกษาดังรูปที่ 7, 8 และตารางที่ 2



(ก) (ข)

รูปที่ 7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง Macroscopic (ก) และ Microscopic morphology (ข) ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* TISTR 3535



(ก) (ข)

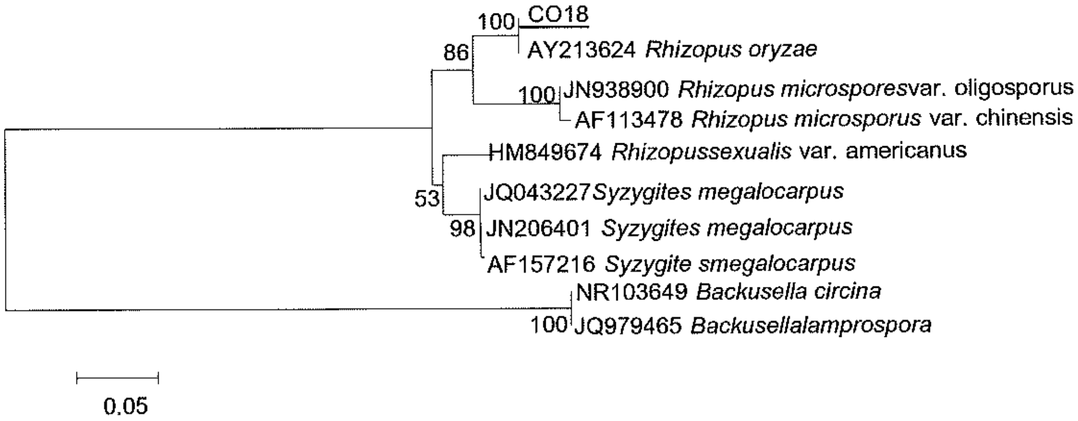
รูปที่ 8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง Macroscopic (ก) และ Microscopic morphology (ข) ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018

ตารางที่ 2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 เปรียบเทียบกับเชื้อรา *Rhizopus oryzae* TISTR 3535

	Macroscopic morphology	Microscopic morphology		
		Somatic structure		Reproductive structure
	ลักษณะและสีของโคโลนี	ชนิดของเส้นใย	สีของเส้นใย	ชนิดของ Asexual spore
Rhizopus oryzae C018	Cottony สีขาว สปอร์สีดำ	ไม่มีผนังกั้น พบ Rhizoid	ไม่มีสี	Sporangiospore
Rhizopus oryzae TISTR 3535	Cottony สีขาว สปอร์สีดำ	ไม่มีผนังกั้น พบ Rhizoid	ไม่มีสี	Sporangiospore

3.2 ผลการเทียบเคียงเชื้อราระดับชนิดด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล

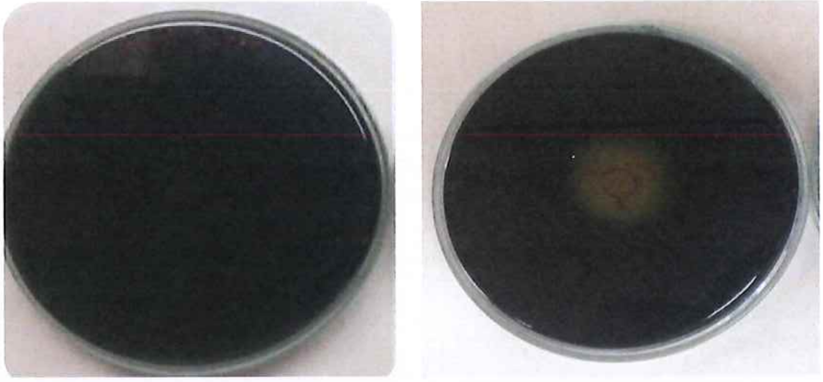
การเทียบเคียงเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 ระดับชนิดด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุล พบว่าเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 มีความใกล้เคียงกับ *Rhizopus oryzae* ที่มีรหัสยีน (AY213624) (Rakeman *et al.*, 2005) โดยมีค่า 28S rRNA sequence identity 100 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในรูปที่ 9


100
CO18
86
AY213624 *Rhizopus oryzae*
100
JN938900 *Rhizopus microsporesvar.* oligosporus
AF113478 *Rhizopus microsporus* var. chinensis
HM849674 *Rhizopussexualis* var. americanus
53
JQ043227*Syzygites megalocarpus*
98
JN206401 *Syzygites megalocarpus*
AF157216 *Syzygite smegalocarpus*
NR103649 *Backusella circina*
100
JQ979465 *Backusellalamprospora*
0.05

รูปที่ 9 Neighbor-joining tree แสดงไฟโลจีนี่ของสายดีเอ็นเอเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างมันสำปะหลัง สายดีเอ็นเอไอโซเลท CO18 โดยแสดงค่า Bootstrap (1,000 ซ้ำ) มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ใช้ *Backusella circina* และ *Backusella lamprospora* เป็น Out group สเกลบาร์ 5 เปอร์เซ็นต์

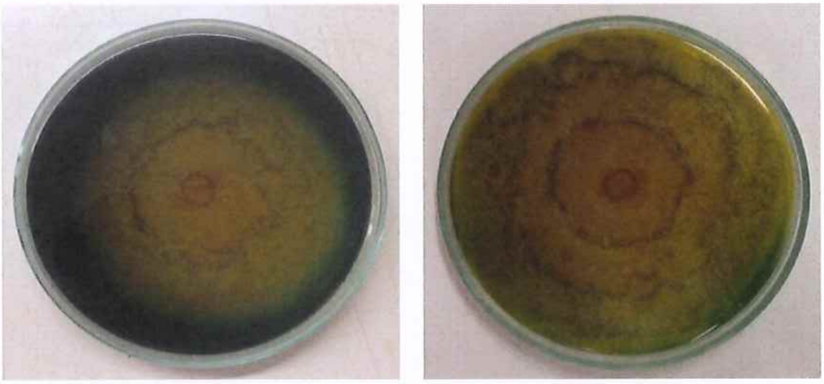
3.3 ผลการทดสอบการผลิตกรดของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018

จากการเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 บนอาหาร Cassava starch agar ที่เติม Bromo cresol green (BCG) ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ โดยดูการเปลี่ยนแปลงสีของ BCG บนอาหาร ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อมีการผลิตกรดเกิดขึ้น ระดับการเปลี่ยนแปลงสีจะเป็นตัวบ่งชี้ปริมาณการผลิตกรดของเชื้อรา พบว่าเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 มีความสามารถในการผลิตกรด โดยสามารถเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเหลือง ซึ่งบ่งชี้ว่าเชื้อราสามารถผลิตกรดได้ โดยระดับการเปลี่ยนสีบนอาหารจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการบ่ม ผลดังรูปที่ 10



ก
(ชุดควบคุม)

ข
(วันที่ 1)



ค
(วันที่ 2)

ง
(วันที่ 3)

รูปที่ 10 การผลิตกรดของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 บนอาหารโดยดูจากการเปลี่ยนสีของ BCG จากสีเขียวเป็นสีเหลือง ความเข้มของสีเหลืองเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่บ่ม (ภาพ ข-ง) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ก)

3.4 ผลการทดสอบการย่อยแป้งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018

จากการเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 บนอาหาร Cassava starch agar และตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดยการราดสารละลายไอโอดีน และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนี พบว่าเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ โดยมีค่า Extracellular enzyme production ratio (EPR) เท่ากับ 1.44 ในวันที่ 3 ของการบ่มดังในตารางที่ 3 และรูปที่ 11

ตารางที่ 3 การสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 บนอาหาร Cassava starch agar

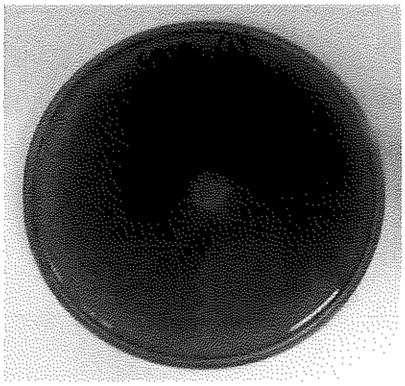
เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและวงใส (เซนติเมตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา (เซนติเมตร)	ค่า EPR
2.3	1.6	1.44 (Medium reaction)

หมายเหตุ

Strong reaction > 2 เซนติเมตร

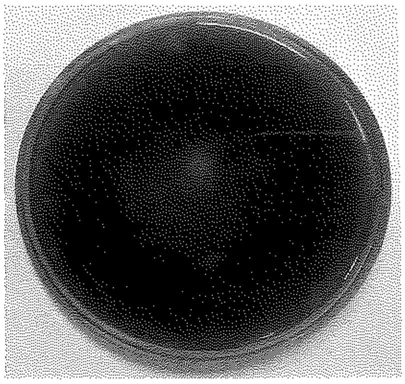
Medium reaction > 1 - < 2 เซนติเมตร

Weak reaction < 1 เซนติเมตร



ก
(วันที่ 1)

ข
(วันที่ 2)



ค

(วันที่ 3)

รูปที่ 11 การสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 (ภาพ ก-ค)

3.5 ผลการทดสอบการผลิตกรดและการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์โดยใช้รังสี UV ที่ความแตกต่างของระยะทางที่สัมผัส

จากการเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 ที่ผ่านรังสี UV ระยะเวลา 15, 30, 45 และ 60 นาที โดยกำหนดระยะห่างจากหลอด UV 10, 20 และ 30 เซนติเมตร บนอาหาร Cassava starch agar ที่เติม Bromo cresol green (BCG) ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ โดยดูอัตราการรอดและการเปลี่ยนแปลงสีของ BCG บนอาหาร พบทั้งหมด 35 ไอโซเลท ที่แสดงความสามารถในการผลิตกรด ผลของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 ที่ผ่านรังสี UV ระยะเวลา 15 นาที พบว่าเชื้อราไม่แสดงความสามารถในการผลิตกรด และที่ระยะเวลา 60 นาที เชื้อราไม่แสดงการรอดชีวิต เนื่องจากสัมผัสรังสี UV เป็นเวลานานทำให้เกิดความเป็นพิษขึ้นในเซลล์

แล้วนำทั้ง 35 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดยการราดสารละลายไอโอดีน และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อรา พบว่าได้เชื้อรากลายพันธุ์ทั้งหมด 35 ไอโซเลท สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ โดยมีค่า Extracellular enzyme production ratio (EPR) ตั้งแต่ 0.5-3 ผลดังตารางที่ 4 และรูปที่ 12-13 โดยเชื้อรากลายพันธุ์ไอโซเลท UV 333 สามารถผลิตกรดได้ในระดับดี และสามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ในระดับปานกลาง (Medium) จึงเลือกไอโซเลท UV 333 เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 4 การผลิตกรดและการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV ทั้ง 35 ไอโซเลท บนอาหาร Cassava starch agar เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การผลิตกรด				การย่อยแป้ง		
ระยะทางที่สัมผัส	ระยะเวลาที่สัมผัส	รหัสไอโซเลท	การผลิตกรด	เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและวงใส (เซนติเมตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา (เซนติเมตร)	ค่า EPR
10 เซนติเมตร	30 นาที	131	++	1	1	1 (Medium)
		132	+++	1	0.7	1.43 (Medium)
		133	+	1.3	1	1.3 (Medium)
		134	+	2	1.7	1.18 (Medium)
		135	+	1	0.5	2 (Medium)
20 เซนติเมตร	30 นาที	231	+++	0.6	0.7	0.9 (Weak)
		232	+	0.3	0.6	0.5 (Weak)
		233	++	1.5	0.9	1.67 (Medium)
		234	+	1.5	0.5	3 (Strong)
30 เซนติเมตร	30 นาที	331	+++	1	0.7	1.42 (Medium)
		332	++	1	0.5	2 (Medium)
		333	+++	1.3	0.8	1.62 (Medium)
		334	+++	1.1	0.7	1.57 (Medium)
		335	++	1	0.8	1.25 (Medium)

		336	+	ND	ND	ND
		337	+	ND	ND	ND
		338	+	ND	ND	ND
		339	+	1.7	1.1	1.56 (Medium)
		3310	+	1.3	0..8	1.63 (Medium)
10 เซนติเมตร	45 นาที	141	++	0.8	0.8	1 (Medium)
		142	+	0.7	0.4	1.75 (Medium)
		143	+	0.5	0.3	1.67 (Medium)
		144	+	0.7	0.5	1.4 (Medium)
		145	+	0.5	0.2	2.5 (Strong)
20 เซนติเมตร	45 นาที	241	++	0.6	0.4	1.5 (Medium)
		242	++	0.8	0.6	1.33 (Medium)
		243	++	0.5	0.2	2.5 (Strong)
30 เซนติเมตร	45 นาที	341	+	ND	ND	ND
		342	+	ND	ND	ND
		343	+	ND	ND	ND
		344	+	ND	ND	ND
		345	+	ND	ND	ND
		346	+	ND	ND	ND
		347	+	ND	ND	ND

		348	+	ND	ND	ND

หมายเหตุ : (การผลิตกรด)

สีเหลืองเข้ม	ให้เครื่องหมายเป็น	+++	แสดงว่าเชื้อราผลิตกรดได้ดี
สีเหลือง	ให้เครื่องหมายเป็น	++	แสดงว่าเชื้อราผลิตกรดได้ปานกลาง
สีเหลืองอ่อน	ให้เครื่องหมายเป็น	+	แสดงว่าเชื้อราผลิตกรดได้น้อย
ไม่เปลี่ยนสี	ให้เครื่องหมายเป็น	_	แสดงว่าเชื้อราไม่สามารถผลิตกรด

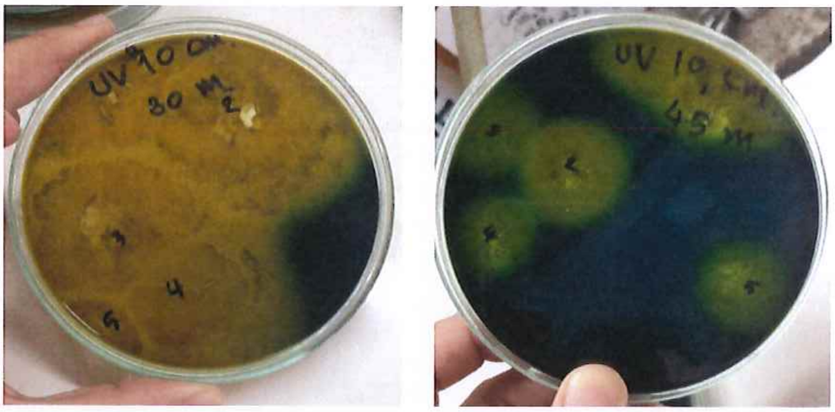
หมายเหตุ : (การสร้างเอนไซม์ย่อยแป้ง)

Strong reaction > 2 เซนติเมตร

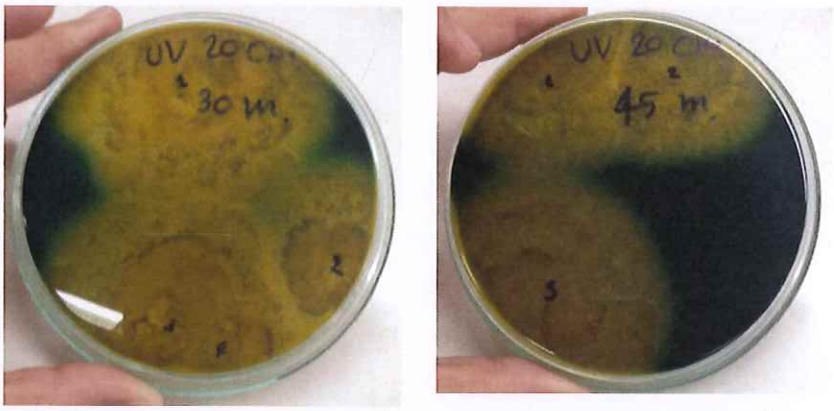
Medium reaction > 1 - < 2 เซนติเมตร

Weak reaction < 1 เซนติเมตร

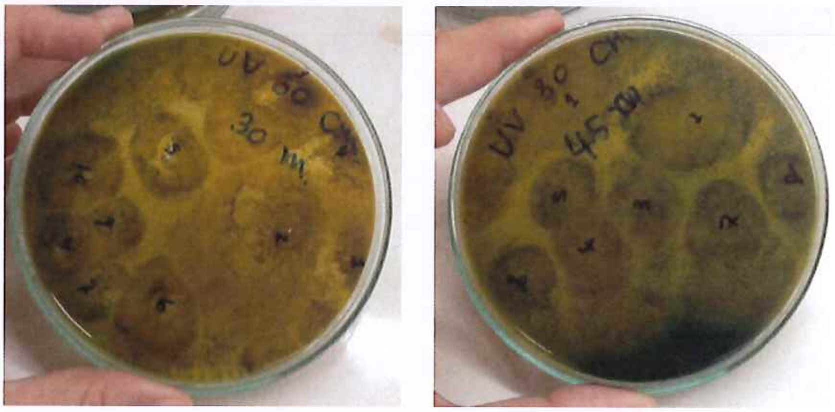
ND = ไม่แสดงการย่อย


UV 10 cm
30 m
UV 10 cm
45 m

ก. 10 เซนติเมตร 30 นาที ข. 10 เซนติเมตร 45 นาที

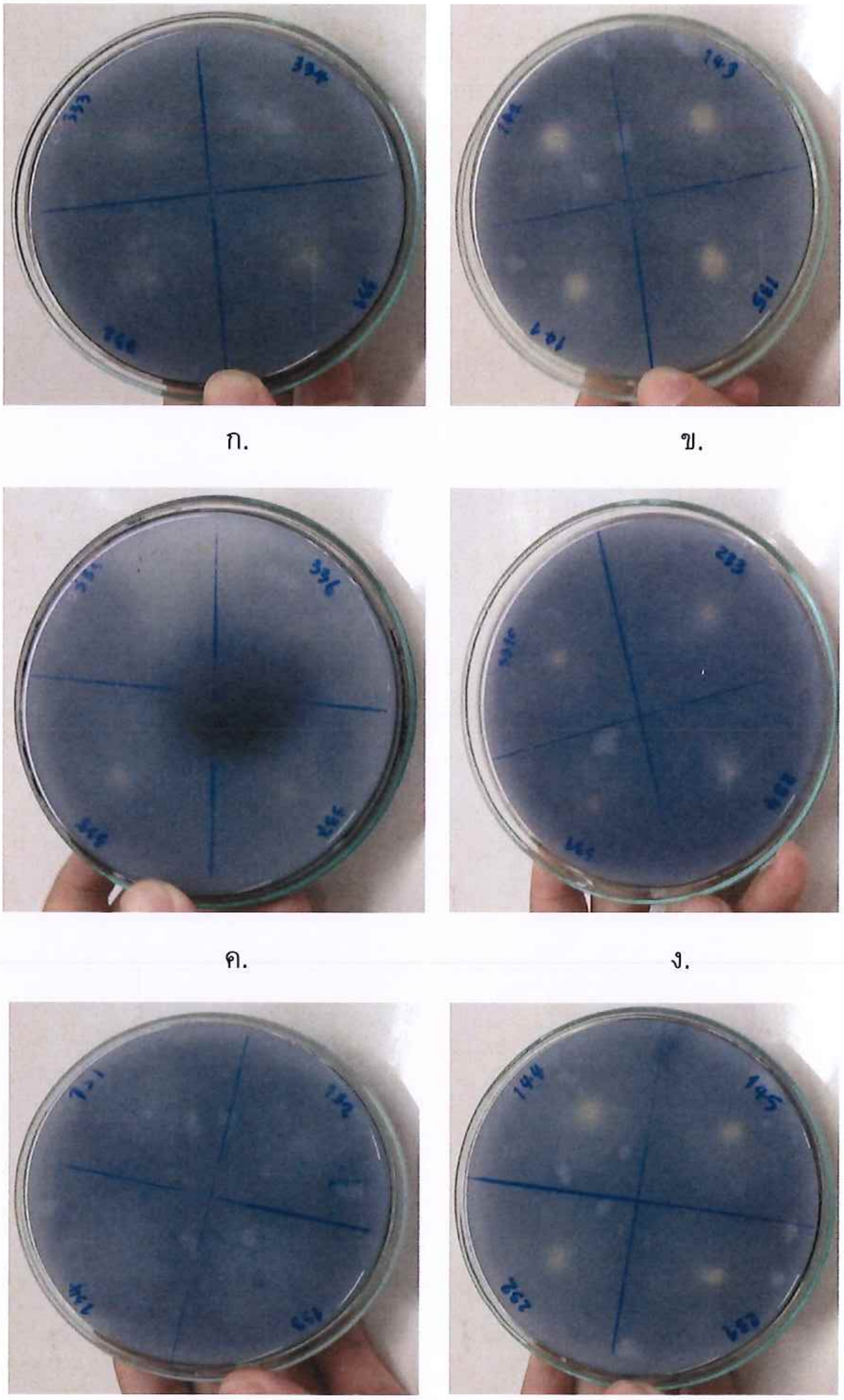

UV 20 cm
30 m
UV 20 cm
45 m

ค. 20 เซนติเมตร 30 นาที ง. 20 เซนติเมตร 45 นาที


UV 30 cm
30 m
UV 30 cm
45 m

จ. 30 เซนติเมตร 30 นาที ฉ. 30 เซนติเมตร 45 นาที

รูปที่ 12 การผลิตกรดของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV ที่ความแตกต่างของระยะทางที่สัมผัส ระยะเวลาบ่ม 72 ชั่วโมง



ก. ข.

ค. ง.

จ. ฉ.

รูปที่ 13 การสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV ที่ความแตกต่างของระยะทางที่สัมผัส ระยะเวลาบ่ม 72 ชั่วโมง

3.6 ผลการทดสอบการผลิตกรดและการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี Ethyl methane sulfonate (EMS) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

จากการเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 และนำมากลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี EMS ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 100 ถึง 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 และ 60 นาที จากนั้นนำเลี้ยงบนอาหาร Cassava starch agar ที่เติม Bromo cresol green (BCG) ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ โดยดูอัตราการรอดและการเปลี่ยนแปลงสีของ BCG บนอาหาร พบทั้งหมด 37 ไอโซเลท ที่แสดงความสามารถในการผลิตกรด และที่ความเข้มข้นของสารเคมี EMS 400 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 60 นาที พบว่าเชื้อราไม่แสดงการผลิตกรด

แล้วนำทั้ง 37 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังโดยการราดสารละลายไอโอดีน และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อรา พบว่าเชื้อรากลายพันธุ์ทั้งหมด สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ โดยมีค่า Extracellular enzyme production ratio (EPR) ตั้งแต่ 0.33-2.14 ผลดังตารางที่ 5 และรูปที่ 14-15 โดยเชื้อรากลายพันธุ์ไอโซเลท EMS 132 สามารถผลิตกรดได้ในระดับดี และสามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ในระดับปานกลาง (Medium) จึงเลือกไอโซเลท EMS 132 เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 5 การผลิตกรดและการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี EMS ที่ความเข้มข้นต่างกันทั้ง 37 ไอโซเลท บนอาหาร Cassava starch agar เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การผลิตกรด				การย่อยแป้ง		
ความเข้มข้นของ EMS	ระยะเวลาที่สัมผัส	รหัสไอโซเลท	การผลิตกรด	เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและวงใส (เซนติเมตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา (เซนติเมตร)	ค่า EPR
100 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	30 นาที	131	+++	2.6	1.9	1.37 (Medium)
		132	+++	2.8	1.5	1.87 (Medium)
		133	+++	2.6	1.7	1.53 (Medium)
		134	+++	2.5	1.5	1.67 (Medium)
		135	+++	0.5	0.8	0.63 (Weak)
	60 นาที	161	+++	ND	ND	ND
		162	+++	ND	ND	ND
		163	+++	ND	ND	ND
200 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	30 นาที	231	++	0.6	0.6	1 (Medium)
		232	++	0.4	0.6	0.67 (Weak)
		233	++	0.5	0.7	0.71 (Weak)
		234	++	1.5	0.7	2.14 (Strong)
		235	++	1.8	1.1	1.64 (Medium)
	60 นาที	261	++	2.1	1.7	1.24 (Medium)

		262	++	2.2	1.9	1.6 (Medium)
		263	+	1.3	1.1	1.18 (Medium)
		264	+	0.5	0.7	0.71 (Weak)
		265	+	0.7	0.8	0.88 (Weak)
300 (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)	30 นาที	331	++	2.3	1.5	1.53 (Medium)
		332	+	0.7	0.4	1.75 (Medium)
		333	+	2	1.4	1.43 (Medium)
		334	++	2.2	2.1	1.05 (Medium)
		335	+	2.1	1.8	1.16 (Medium)
	60 นาที	361	++	ND	ND	ND
		362	++	ND	ND	ND
		363	+	ND	ND	ND
400 (ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร)	30 นาที	431	+	0.2	0.6	0.33 (Weak)
		432	+	0.2	0.5	0.4 (Weak)
		433	+	0.2	0.4	0.5 (Weak)
		434	+	0.2	0.6	0.33 (Weak)
		435	+	ND	ND	ND
		436	+	ND	ND	ND
500 (ไมโครกรัมต่อ	30 นาที	531	+	1.2	1.4	0.86 (Weak)
		532	+	ND	ND	ND

มิลลิลิตร)		533	+	ND	ND	ND
		534	+	ND	ND	ND
		535	+	ND	ND	ND

หมายเหตุ : (การผลิตกรด)

สีเหลืองเข้ม	ให้เครื่องหมายเป็น	+++	แสดงว่าเชื้อราผลิตกรดได้ดี
สีเหลือง	ให้เครื่องหมายเป็น	++	แสดงว่าเชื้อราผลิตกรดได้ปานกลาง
สีเหลืองอ่อน	ให้เครื่องหมายเป็น	+	แสดงว่าเชื้อราผลิตกรดได้น้อย
ไม่เปลี่ยนสี	ให้เครื่องหมายเป็น	_	แสดงว่าเชื้อราไม่สามารถผลิตกรด

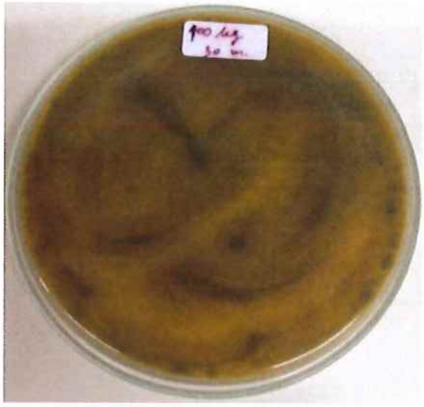
หมายเหตุ : (การสร้างเอนไซม์ย่อยแป้ง)

Strong reaction > 2 เซนติเมตร

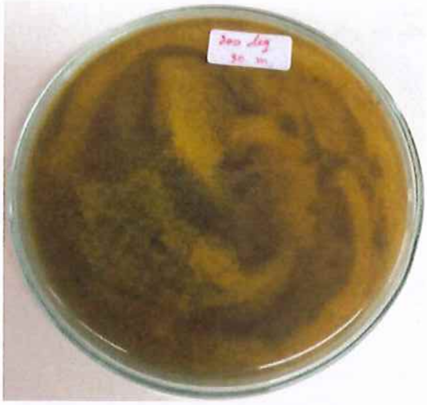
Medium reaction > 1 - < 2 เซนติเมตร

Weak reaction < 1 เซนติเมตร

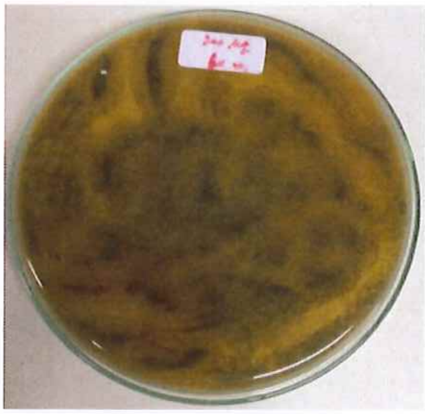
ND = ไม่แสดงการย่อย



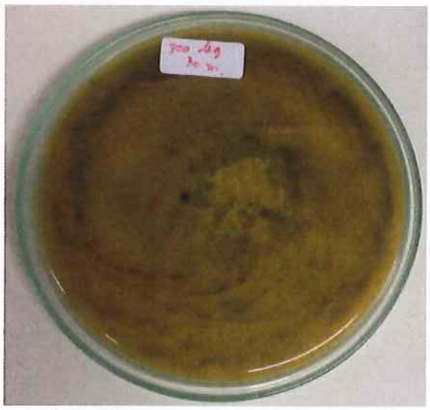
ก. ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม
ต่อมิลลิลิตรเวลา 30 นาที



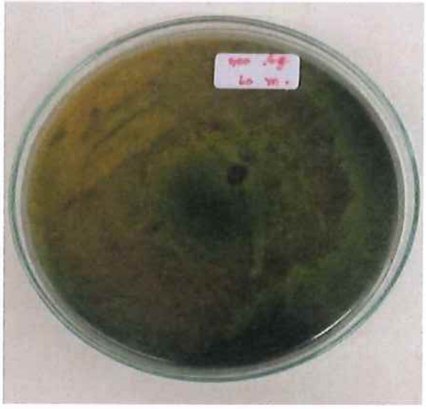
ค. ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม
ต่อมิลลิลิตร เวลา 30 นาที



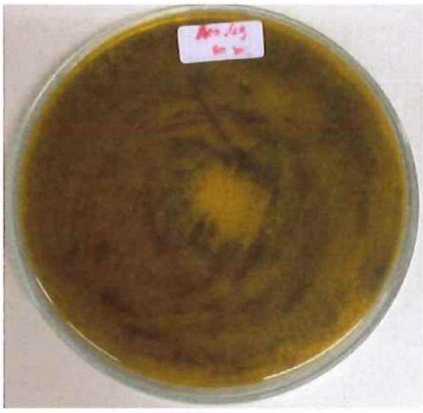
ง. ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม
ต่อมิลลิลิตร เวลา 60 นาที



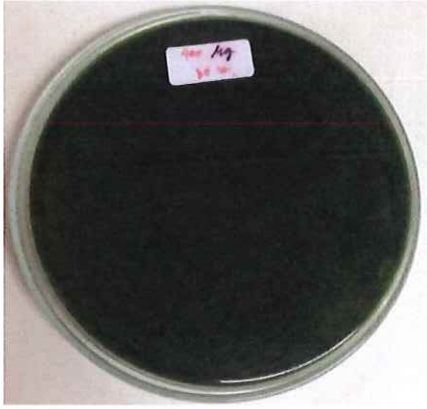
จ. ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม
ต่อมิลลิลิตร เวลา 30 นาที



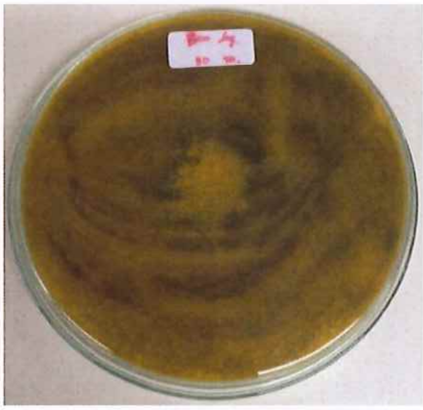
ฉ. ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม
ต่อมิลลิลิตร เวลา 60 นาที



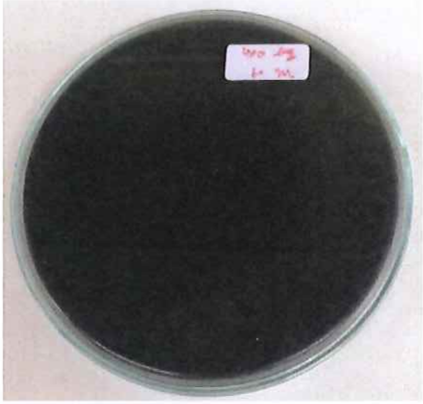
ช. ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัม
ต่อมิลลิลิตร เวลา 30 นาที



ซ. ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัม
ต่อมิลลิลิตรเวลา 60 นาที

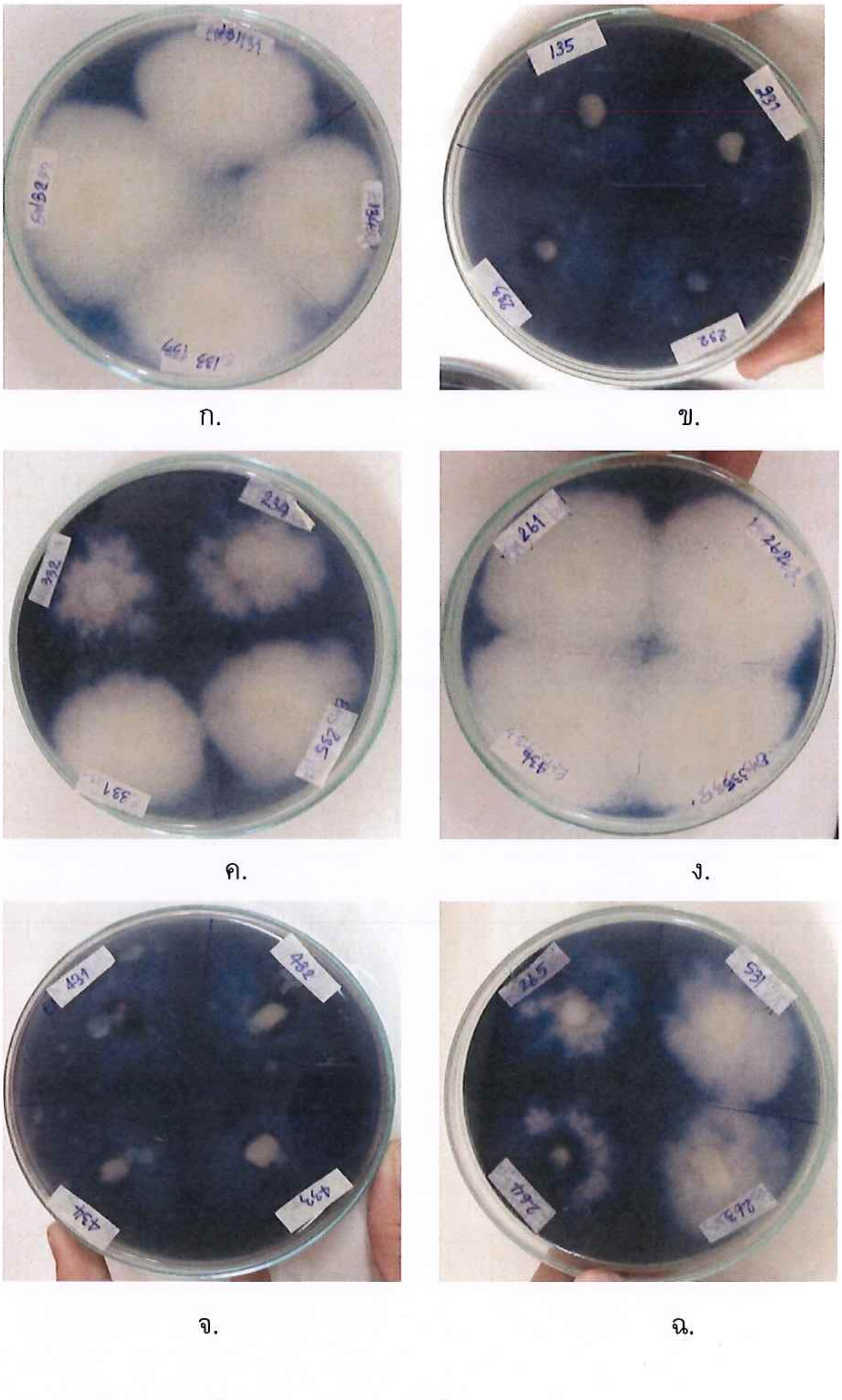


ฎ. ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม
ต่อมิลลิลิตร เวลา 30 นาที



ฏ. ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม
ต่อมิลลิลิตร เวลา 60 นาที

รูปที่ 14 การผลิตกรดของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี EMS ที่ความเข้มข้นต่างกัน ระยะเวลาบ่ม 72 ชั่วโมง


135
239
332
331
261
431
432
434
265
264

ก.

ข.

ค.

ง.

จ.

ฉ.

รูปที่ 15 การสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ โดยใช้สารเคมี EMS ที่ความเข้มข้นต่างกัน ระยะเวลาบ่ม 72 ชั่วโมง

3.7 ผลการทดสอบการผลิตกรดของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลต (UV) ร่วมกับสารเคมี Ethyl methane sulfonate (EMS)

จากการเลี้ยงเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 สัมผัสรังสี UV เป็นเวลา 30 นาที ระยะห่างจากหลอด UV 30 เซนติเมตร แล้วนำมาทดสอบกับสารเคมี EMS ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาเลี้ยงบนอาหาร Cassava starch agar ที่เติม Bromo cresol green (BCG) ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์ โดยดูอัตราการรอดและการเปลี่ยนแปลงสีของ BCG บนอาหาร พบทั้งหมด 10 ไอโซเลทที่แสดงความสามารถในการผลิตกรด

แล้วนำทั้ง 10 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดยการราดสารละลายไอโอดีน และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนีของเชื้อรา พบว่าเชื้อรากลายพันธุ์ทั้งหมด สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ โดยมีค่า Extracellular enzyme production ratio (EPR) ตั้งแต่ 1.25-2.5 ผลดังตารางที่ 6 และรูปที่ 16-17 โดยเชื้อรากลายพันธุ์ไอโซเลท CB 135 สามารถผลิตกรดได้ในระดับดี และสามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ในระดับปานกลาง (Medium) จึงเลือกไอโซเลท CB 135 เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 6 การผลิตกรดและการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV ร่วมกับสารเคมี EMS ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรทั้ง 10 ไอโซเลท บนอาหาร Cassava starch agar เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การผลิตกรด				การย่อยแป้ง		
ความเข้มข้นของ EMS	ระยะเวลาที่สัมผัส	รหัสไอโซเลท	การผลิตกรด	เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีและวงใส (เซนติเมตร)	เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อรา (เซนติเมตร)	ค่า EPR
100 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	30 นาที	131	+++	0.3	0.2	1.5 (Medium)
		132	++	0.3	0.2	1.5 (Medium)
		133	+++	ND	ND	ND
		134	+++	1	0.8	1.25 (Medium)
		135	+++	3	1.9	1.57 (Medium)
200 (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	30 นาที	231	+	1.5	0.7	2.14 (Strong)
		232	+	ND	ND	ND
		233	++	1	0.5	2 (Medium)
		234	+	0.5	0.3	1.67 (Medium)
		235	++	0.5	0.2	2.5 (Strong)

หมายเหตุ : (การผลิตกรด)

สีเหลืองเข้ม	ให้เครื่องหมายเป็น	+++	แสดงว่าเชื้อราผลิตกรดได้ดี
สีเหลือง	ให้เครื่องหมายเป็น	++	แสดงว่าเชื้อราผลิตกรดได้ปานกลาง
สีเหลืองอ่อน	ให้เครื่องหมายเป็น	+	แสดงว่าเชื้อราผลิตกรดได้น้อย
ไม่เปลี่ยนสี	ให้เครื่องหมายเป็น	_	แสดงว่าเชื้อราไม่สามารถผลิตกรด

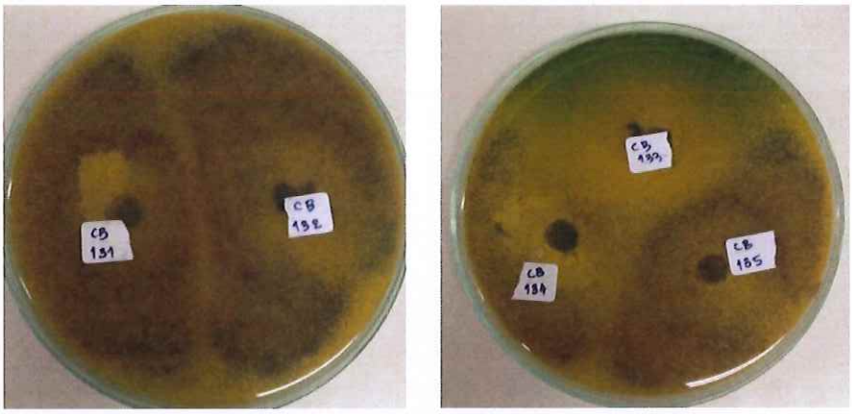
หมายเหตุ : (การสร้างเอนไซม์ย่อยแป้ง)

Strong reaction > 2 เซนติเมตร

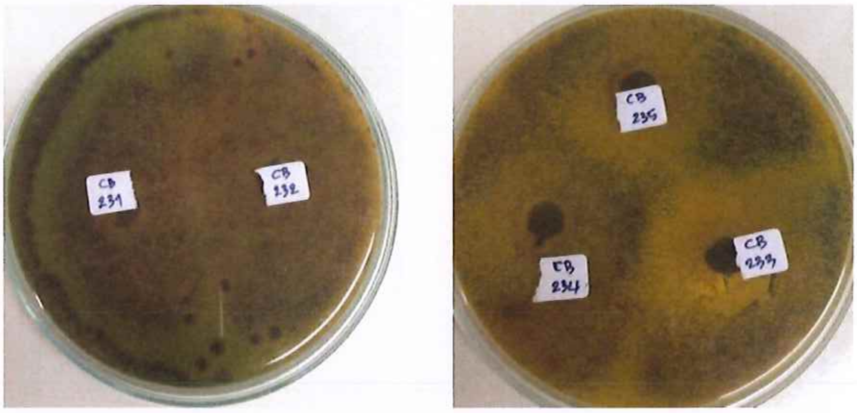
Medium reaction > 1 - < 2 เซนติเมตร

Weak reaction < 1 เซนติเมตร

ND = ไม่แสดงการย่อย

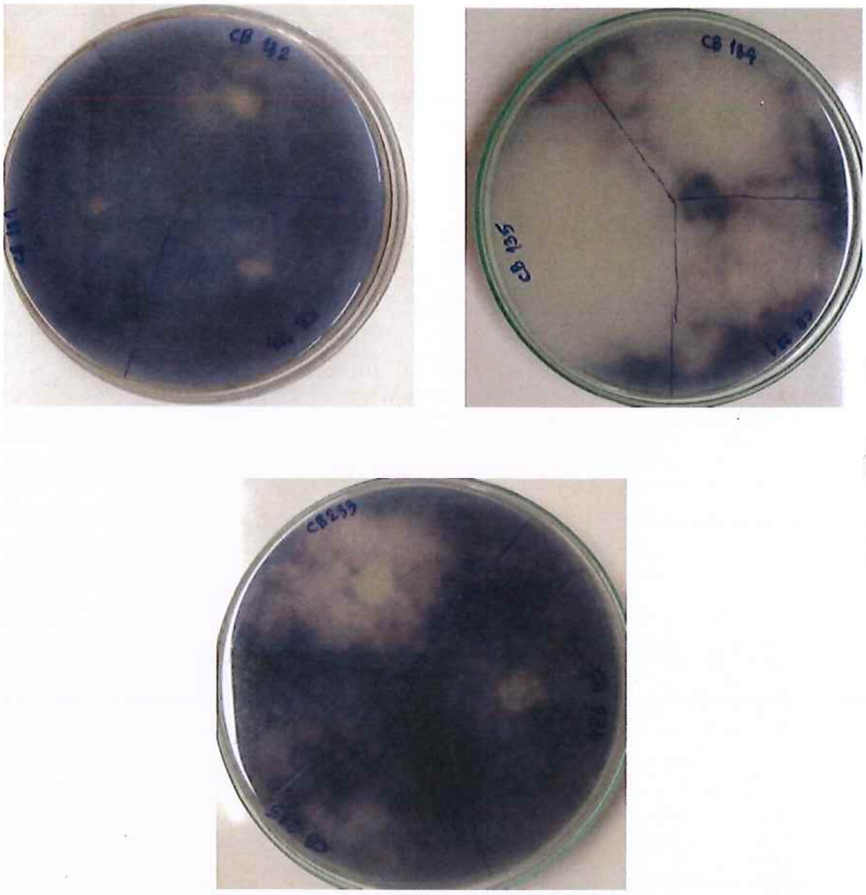

CB 131
CB 132
CB 133
CB 134
CB 135

ก. รังสี UV 30 นาทีและความเข้มข้น EMS 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร


CB 231
CB 232
CB 235
CB 234
CB 233

ข. รังสี UV 30 นาทีและความเข้มข้น EMS 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

รูปที่ 16 การผลิตกรดของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV ร่วมกับสารเคมี EMS ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ระยะเวลาบ่ม 72 ชั่วโมง



ก. รังสี UV 30 นาที และสารเคมี EMS ความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 30 นาที

รูปที่ 17 การสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลังของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV ร่วมกับสารเคมี EMS ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ระยะเวลาบ่ม 72 ชั่วโมง

3.8 อัตราการรอดและตายของเชื้อรากลายพันธุ์ (Survival rate and Dead rate)

การคำนวณอัตรา Survival rate และ Dead rate ของเชื้อราที่รอดหลังจากผ่านการกลายพันธุ์ โดยคำนวณตามสูตรของ Radha *et al.*, (2012) ซึ่งเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการกลายพันธุ์มีอัตรา Survival rate เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ (230 โคโลนี) อัตรา Survival rate ของเชื้อราจะขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่สัมผัสรังสี UV และสารเคมี Ethyl methane sulfonate (EMS) จะเห็นว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาอัตราการรอดก็จะลดลง และพบอัตราการรอดสูงสุดจากการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV คือ 18.70 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอัตราการรอดสูงสุดจากสารเคมี EMS คือ 31.30 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการรอดสูงสุดจากการใช้รังสี UV และสารเคมี EMS ร่วมกันคือ 16.08 เปอร์เซ็นต์ ผลแสดงดังตารางที่ 7, 8 และ 9

$$\text{Survival rate} = \frac{\text{จำนวนของโคโลนีที่ทดสอบ}}{\text{จำนวนของโคโลนีชุดควบคุม}} \times 100$$

ตารางที่ 7 อัตรา Survival rate และ Dead rate ของเชื้อรากลายพันธุ์โดยใช้รังสี UV

ระยะเวลาที่สัมผัส UV (นาที)	ระยะทางที่สัมผัส (เซนติเมตร)	จำนวนโคโลนีหลังสัมผัส UV	Survival rate (เปอร์เซ็นต์)	Dead rate (เปอร์เซ็นต์)
15	10	34	14.78	85.22
	20	38	16,52	83.48
	30	43	18.70	81.30
30	10	20	8.70	91.30
	20	18	7.83	92.17
	30	33	14.35	85.65
45	10	19	8.26	91.74
	20	16	6.95	93.05
	30	23	10	90

ตารางที่ 8 อัตรา Survival rate และ Dead rate ของเชื้อรากลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี EMS

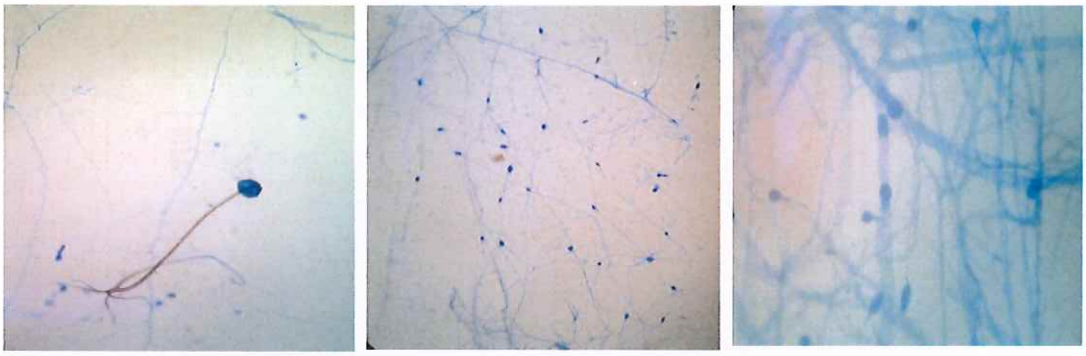
ระยะเวลาที่บ่ม EMS (นาที)	ความเข้มข้น EMS (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	จำนวนโคโลนีหลังบ่ม EMS	Survival rate (เปอร์เซ็นต์)	Dead rate (เปอร์เซ็นต์)
30	100	66	28.70	71.30
	200	50	21.74	78.26
	300	52	22.60	77.40
	400	55	23.91	76.09
	500	27	11.74	88.26
60	100	72	31.30	68.70
	200	63	27.40	72.60
	300	51	22.17	77.83
	400	45	19.57	80.43
	500	31	13.48	86.52

ตารางที่ 9 อัตรา Survival rate และ Dead rate ของเชื้อรากลายพันธุ์ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV และสารเคมี EMS

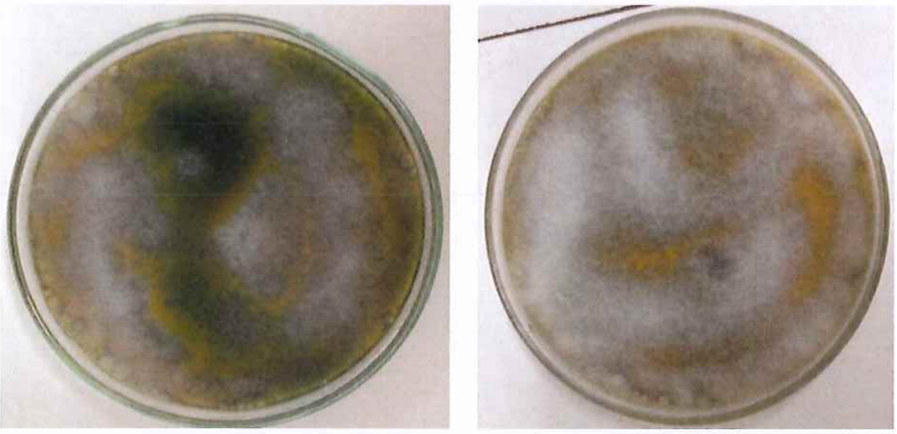
ระยะเวลาที่บ่ม EMS (นาที)	ความเข้มข้น EMS (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	จำนวนโคโลนีหลังบ่ม EMS	Survival rate (เปอร์เซ็นต์)	Dead rate (เปอร์เซ็นต์)
30	100	37	16.08	83.92
	200	23	10	90

3.9 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ทั้งหมดที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยวิธีต่าง ๆ

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์พบว่าโครงสร้างของเชื้อราไม่มีการเปลี่ยนแปลง และเมื่อศึกษาผ่านกล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยาย 40 เท่าพบว่าโครงสร้างไม่มีการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกัน ดังในรูปที่ 18



Microscopic morphology

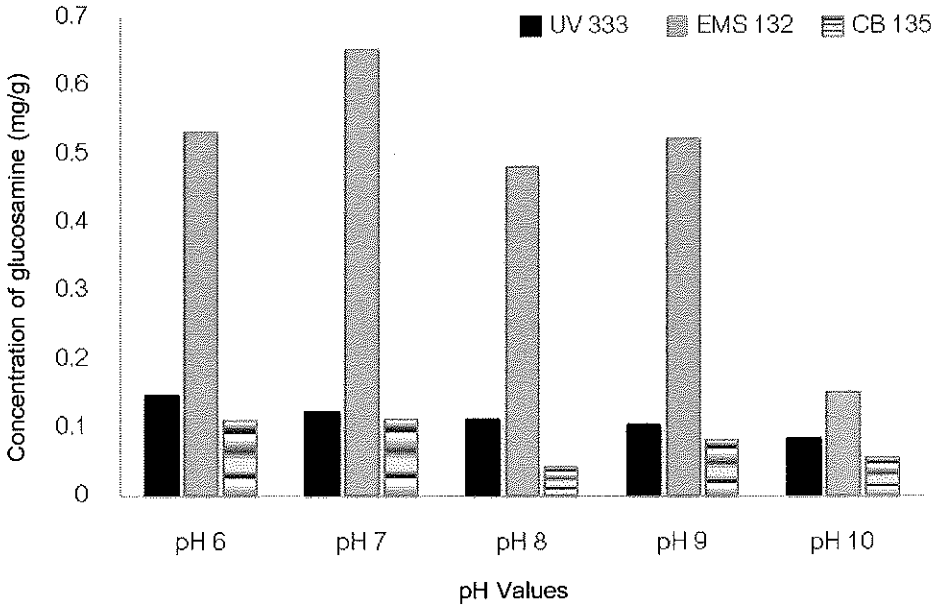


Macroscopic morphology

รูปที่ 18 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา Macroscopic และ Microscopic morphology ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์

3.9 ผลปริมาณกลูโคซามีน (Glucosamine) ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์โดยการใช้รังสี UV (UV 333) สารเคมี EMS (EMS 132) และสองวิธีร่วมกัน (CB 135)

จากการนำเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์โดยการใช้รังสี UV (UV 333) สารเคมี EMS (EMS 132) และสองวิธีร่วมกัน (CB 135) มาหมักแบบแข็ง โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้ความชื้น 70 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณภูมิ 28 องศาเซลเซียส นำมาวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนที่ค่าดูดกลืนแสง 530 นาโนเมตร ซึ่งปริมาณกลูโคซามีนมีความสัมพันธ์กับผนังเซลล์ของเชื้อราและแสดงถึงการเจริญของเชื้อราในระหว่างการหมัก พบว่าการเจริญของเชื้อราต่างกันในค่าพีเอช (pH) ที่แตกต่างกัน โดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี EMS (EMS 132) มีการเจริญดีที่สุด ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 7.0 และเจริญต่ำสุดพบที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 10.0 ในขณะที่เชื้อรากลายพันธุ์โดยการใช้รังสี UV (UV 333) และสองวิธีร่วมกัน (CB 135) มีการเจริญใกล้เคียงกัน การเจริญของเชื้อราในระหว่างการหมักมีค่าแปรผันตามระยะเวลาการหมัก ปริมาณกลูโคซามีนจะสัมพันธ์กับการเจริญ เนื่องจากกลูโคซามีนเป็นองค์ประกอบที่ผนังเซลล์ของรา ดังนั้นหากปริมาณกลูโคซามีนมากขึ้นก็แสดงว่ามีการเจริญของราเพิ่มขึ้นตามไปด้วย แต่ในระหว่างการหมักวัสดุหมักจะสูญเสียความชื้นและแห้งลง ทำให้การเจริญของเชื้อราลดลง ปริมาณกลูโคซามีนจึงลดลงเมื่อครบระยะเวลาการหมัก ผลดังรูปที่ 19

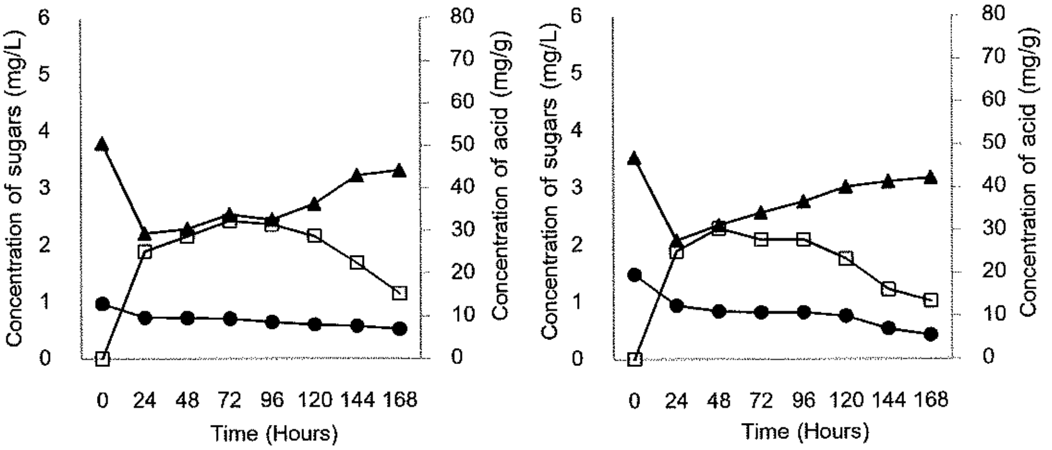


รูปที่ 19 ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคซามีน (มิลลิกรัมต่อกรัม) ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์โดยการใช้รังสี UV (UV 333) สารเคมี EMS (EMS 132) และสองวิธีร่วมกัน (CB 135) ที่ระยะเวลาการหมัก 168 ชั่วโมง

3.10 ผลของค่าพีเอช (pH) ที่มีผลต่อการผลิตกรดของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 สายพันธุ์ดั้งเดิม (Wild type strain) และที่กลายพันธุ์โดยการใช้รังสี UV (UV 333) สารเคมี EMS (EMS 132) และสองวิธีร่วมกัน (CB 135)

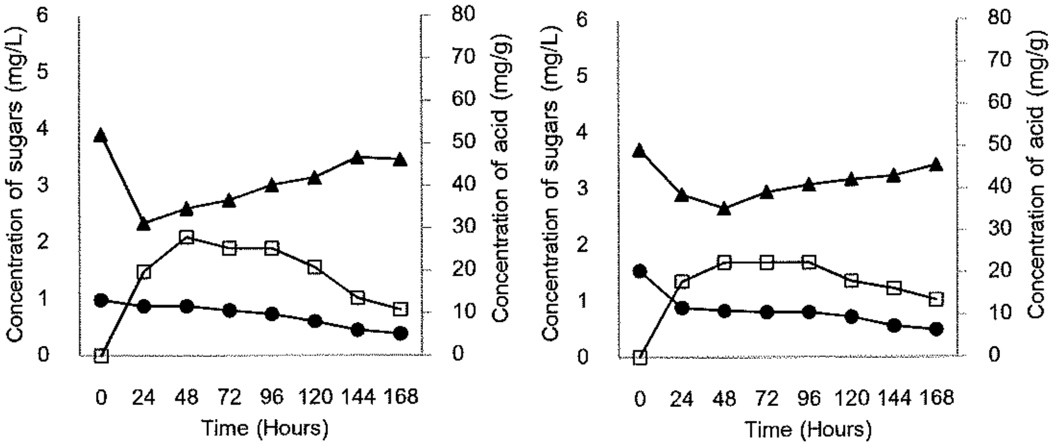
จากการนำเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 สายพันธุ์ดั้งเดิม (Wild type strain) และที่กลายพันธุ์โดยการใช้รังสี UV (UV 333) สารเคมี EMS (EMS 132) และสองวิธีร่วมกัน (CB 135) มาหมักแบบแข็ง โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณภูมิ 28 องศาเซลเซียส และนำสารละลายที่กรองได้มาวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดโดยการทำไทเทรต (Titration) พบว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (Wild type strain) ให้ปริมาณกรดสูงสุดที่ 32.4 มิลลิกรัมต่อกรัม ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 6.0 ส่วนที่กลายพันธุ์โดยการใช้รังสี UV (UV 333) ให้ปริมาณกรดสูงสุดที่ 57.6 มิลลิกรัมต่อกรัม ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 6.0 เชื้อรากลายพันธุ์ด้วยสารเคมี EMS (EMS 132) ให้ปริมาณกรดสูงสุดที่ 72.9 มิลลิกรัมต่อกรัม ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 7.0 รองลงมาคือ 70.2 มิลลิกรัมต่อกรัม ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 6.0 และเชื้อรากลายพันธุ์ด้วยการใช้สองวิธีร่วมกัน (CB 135) ให้ปริมาณกรดสูงสุดที่ 40.5 มิลลิกรัมต่อกรัม ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 6.0 การผลิตกรดของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 มาจากการย่อยแป้งได้น้ำตาลและเปลี่ยนเป็นกรด ซึ่งเกิดจากกิจกรรมเมตาบอลิซึมของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 ผ่านกระบวนการ Emden-meyerhof pathway (EMP) ในระหว่างการหมัก เมื่อค่าพีเอช (pH) เพิ่มขึ้นแนวโน้มการผลิตกรดของเชื้อราจะลดลง ซึ่งเป็นไปตามรายงานว่าเชื้อราสามารถผลิตกรดได้ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 6.0-7.0 เนื่องจากเป็นช่วงที่เอนไซม์ Lactate dehydrogenase สามารถทำงานได้ดี และการทำงานของเอนไซม์จะสูงในช่วงแรกของการเจริญก่อนการสร้างสปอร์ จึงเป็นเหตุผลว่าทำไมการผลิตกรดจึงมีการผลิตสูงในช่วงแรกของการหมัก เมื่อระยะเวลาผ่านไปเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 จะผลิตเอนไซม์ Alcohol dehydrogenase ซึ่งปริมาณของกรดกับแอลกอฮอล์ที่ผลิตขึ้นระหว่างการหมักจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปริมาณอากาศที่ให้ แต่การศึกษาครั้งนี้ไม่มีการควบคุมปริมาณอากาศจึงเป็นไปได้ว่ามีการผลิตแอลกอฮอล์เกิดขึ้น ทำให้ยับยั้งการผลิตกรดในระหว่างการหมัก

ปริมาณการผลิตกรดเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ Lactate dehydrogenase ที่เปลี่ยนวัสดุหมักจากแป้งให้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) พวกกลูโคส ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่เชื้อราสามารถนำไปใช้ในการผลิตกรดได้ ดังนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงสัมพันธ์กับปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้น ส่วนปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugars) เป็นน้ำตาลที่เปลี่ยนจากการย่อยแป้ง มีทั้งกลูโคส ซูโครส และ มอลโตส แต่เชื้อราจะเลือกใช้เฉพาะน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นกลูโคสเท่านั้น เนื่องจากนำไปใช้ประโยชน์ได้ง่ายกว่า ดังนั้นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจึงมีรูปแบบลดลงและเพิ่มขึ้นตามปริมาณการผลิตกรดและการนำไปใช้ของเชื้อรา ผลดังรูปที่ 20, 21, 22 และ 23



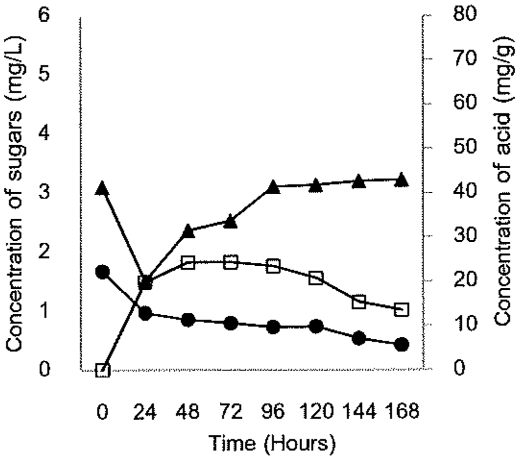
ก. พีเอช (pH) 6.0

ข. พีเอช (pH) 7.0



ค. พีเอช (pH) 8.0

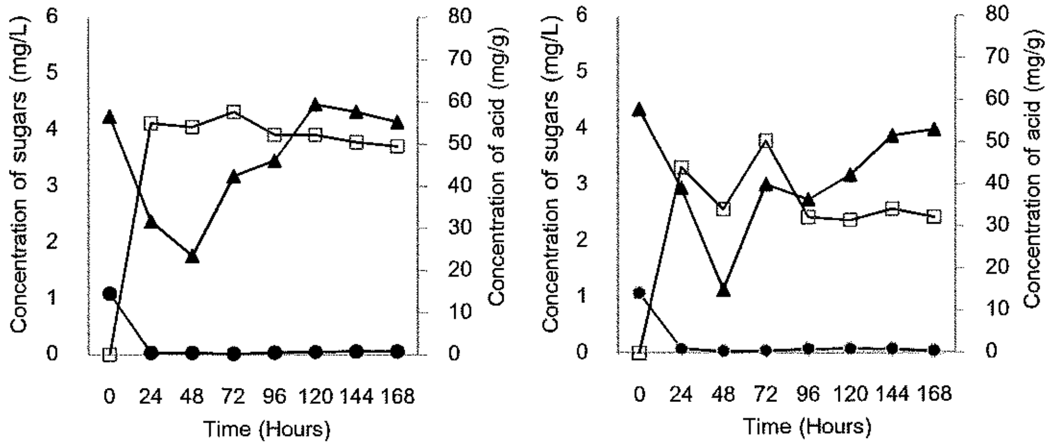
ง. พีเอช (pH) 9.0



จ. พีเอช (pH) 10.0

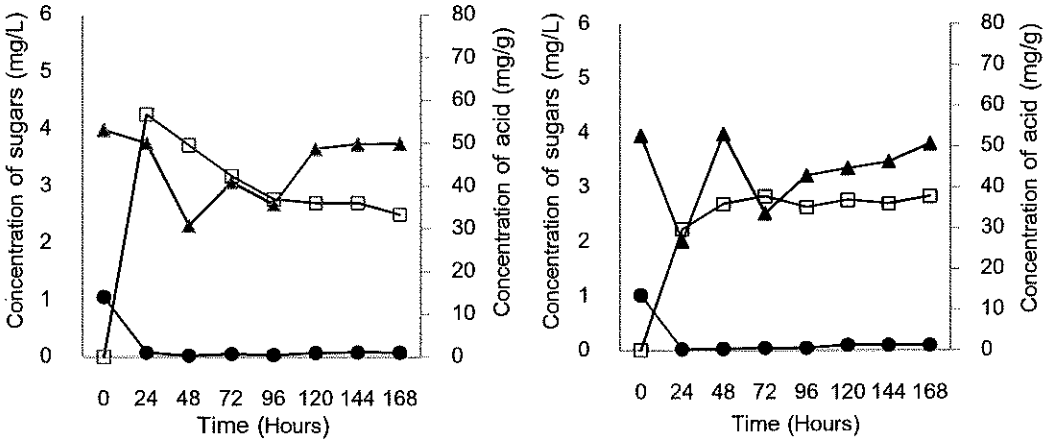
□ กรดทั้งหมด
● น้ำตาลรีดิวซ์
▲ น้ำตาลทั้งหมด

รูปที่ 20 ค่าพีเอช (pH) ที่มีผลต่อการผลิตกรดของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 สายพันธุ์ดั้งเดิม (Wild type strain) ที่ระยะเวลาหมัก 168 ชั่วโมง



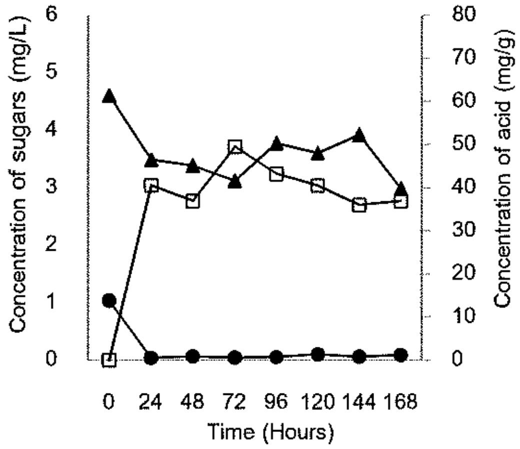
ก. พีเอช (pH) 6.0

ข. พีเอช (pH) 7.0



ค. พีเอช (pH) 8.0

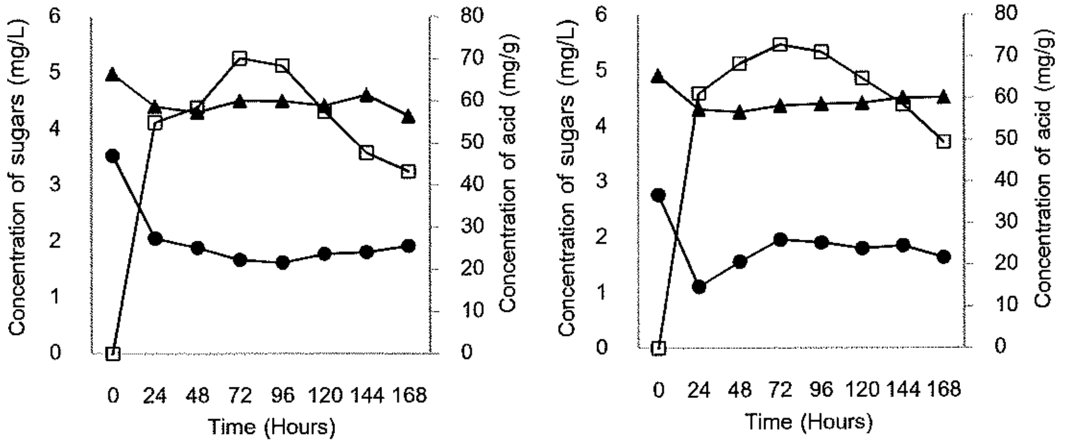
ง. พีเอช (pH) 9.0



จ. พีเอช (pH) 10.0

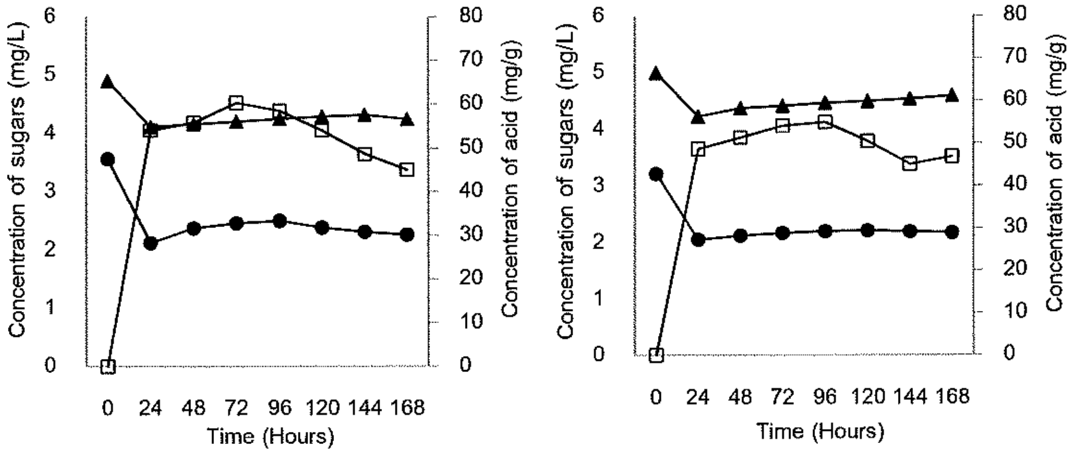
□ กรดทั้งหมด
● น้ำตาลรีดิวซ์
▲ น้ำตาลทั้งหมด

รูปที่ 21 ค่าพีเอช (pH) ที่มีผลต่อการผลิตกรดของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์โดยการใช้รังสี UV (UV 333) ที่ระยะเวลาหมัก 168 ชั่วโมง



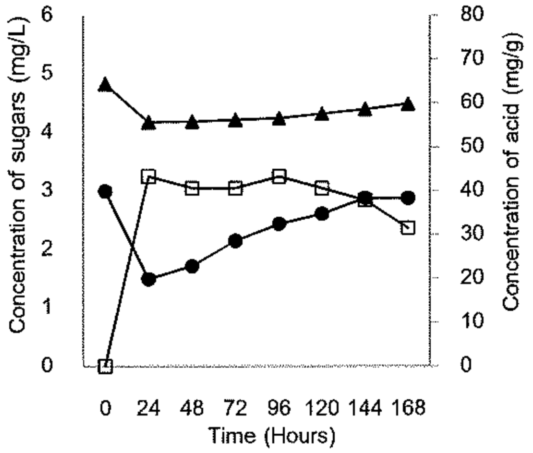
ก. พีเอช (pH) 6.0

ข. พีเอช (pH) 7.0



ค. พีเอช (pH) 8.0

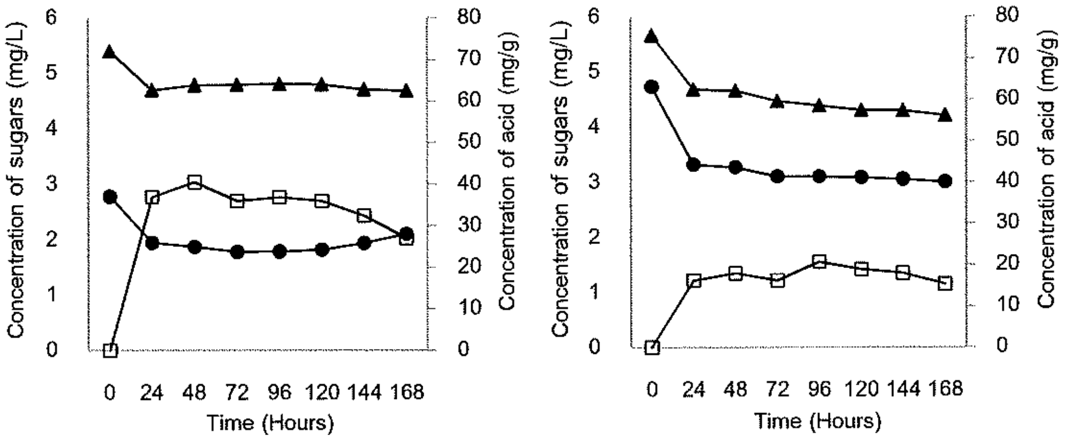
ง. พีเอช (pH) 9.0



จ. พีเอช (pH) 10.0

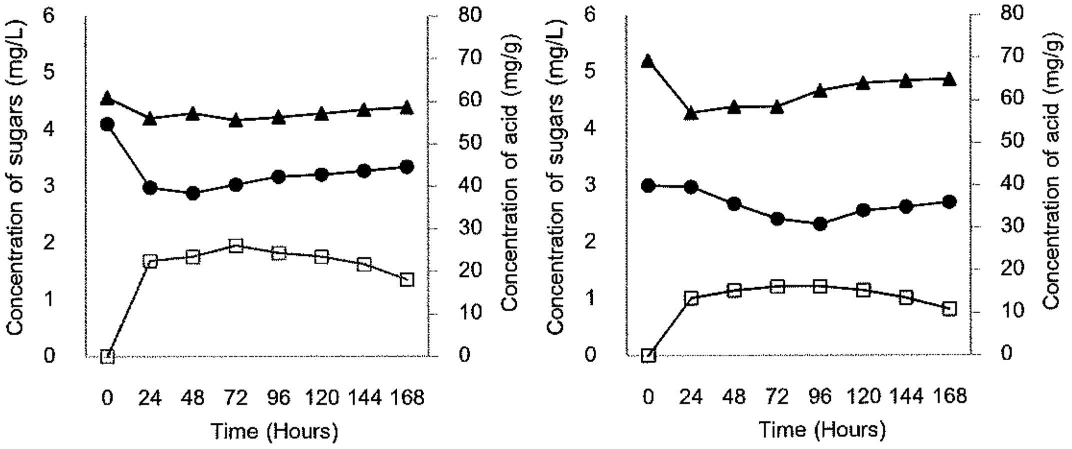
□ กรดทั้งหมด
● น้ำตาลรีดิวซ์
▲ น้ำตาลทั้งหมด

รูปที่ 22 ค่าพีเอช (pH) ที่มีผลต่อการผลิตกรดของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ด้วยการใช้สารเคมี EMS (EMS 132) ที่ระยะเวลาหมัก 168 ชั่วโมง



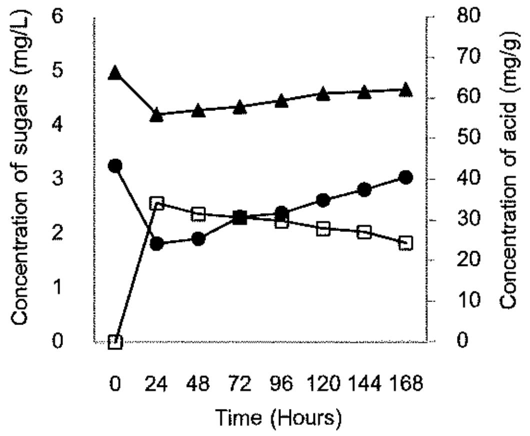
ก. พีเอช (pH) 6.0

ข. พีเอช (pH) 7.0



ค. พีเอช (pH) 8.0

ง. พีเอช (pH) 9.0



จ. พีเอช (pH) 10.0

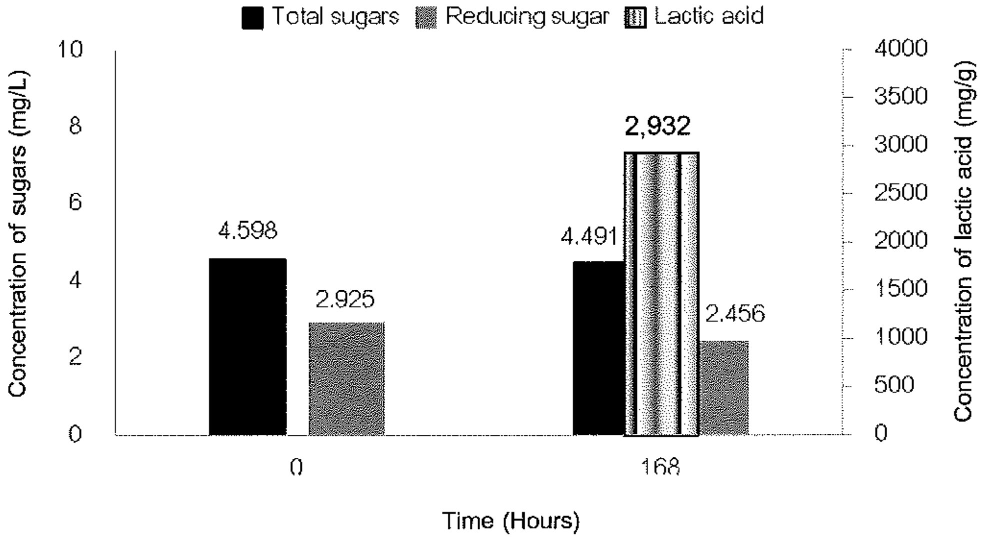
□ กรดทั้งหมด
● น้ำตาลรีดิวซ์
▲ น้ำตาลทั้งหมด

รูปที่ 23 ค่าพีเอช (pH) ที่มีผลต่อการผลิตกรดของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ด้วยการใช้รังสี UV ร่วมกับสารเคมี EMS (CB 135) ที่ระยะเวลาหมัก 168 ชั่วโมง

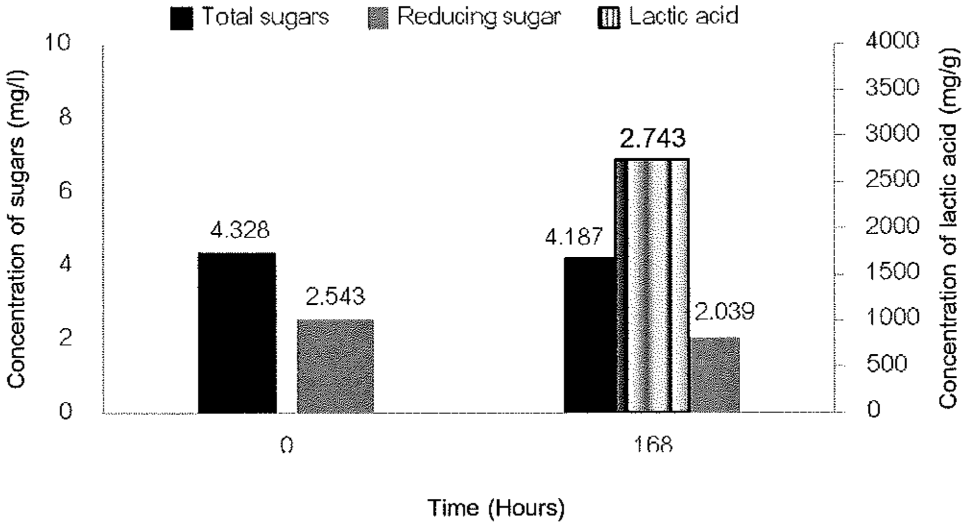
3.16 ผลการผลิตกรดแลกติก (Lactic acid production) วิเคราะห์โดยใช้ HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

จากการนำเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์โดยการใช้รังสี UV (UV 333) สารเคมี EMS (EMS 132) และสองวิธีร่วมกัน (CB 135) มาทำการหมักแบบแข็ง โดยเลือกค่าพีเอช (pH) ที่ให้ผลดีที่สุดคือพีเอช (pH) เท่ากับ 6.0 ใช้ระยะเวลาในการหมัก 168 ชั่วโมง แล้วนำสารละลายที่ได้มาวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC ด้วยเทคนิคการทดสอบแบบ Reverse phase ใช้ Detector variable wavelength UV 210 นาโนเมตร และใช้ Column hypersil ODS ขนาด 250 x 4.0 มิลลิเมตร Mobile phase ใช้ H_3PO_4 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ อัตราการไหล (Flow rate) 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที ปริมาตรที่ฉีด 20 ไมโครลิตร ผลที่ได้คือเชื้อรากลายพันธุ์ CB 135 ให้ปริมาณกรดแลกติกสูงที่สุดเท่ากับ 3.482 มิลลิกรัมต่อกรัม รองลงมาคือเชื้อรากลายพันธุ์ UV 333 ให้ปริมาณกรดแลกติกเท่ากับ 2.932 มิลลิกรัมต่อกรัม และเชื้อรากลายพันธุ์ EMS 132 ให้ปริมาณกรดแลกติกเท่ากับ 2.743 มิลลิกรัมต่อกรัม ผลดังโครมาโตแกรม (ภาคผนวก)

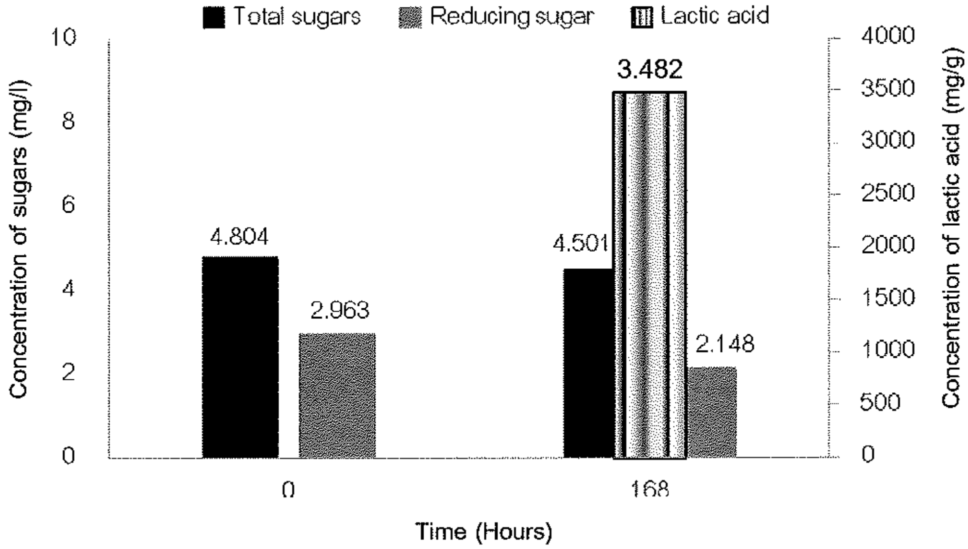
ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนและหลังหมัก โดยการนำสารละลายที่กรองได้มาวิเคราะห์ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 และ 530 นาโนเมตร วิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol sulfuric และความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS ผลดังรูปที่ 24, 25 และ 26



รูปที่ 24 ปริมาณกรดแลกติก (มิลลิกรัมต่อกรัม) ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์โดยใช้รังสี UV (UV 333) ที่ระยะเวลาการหมัก 168 ชั่วโมง วิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC



รูปที่ 25 ปริมาณกรดแลกติก (มิลลิกรัมต่อกรัม) ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี EMS (EMS 132) ที่ระยะเวลาการหมัก 168 ชั่วโมง วิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC



รูปที่ 26 ปริมาณกรดแลกติก (มิลลิกรัมต่อกรัม) ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์โดยใช้รังสี UV และสารเคมี EMS ร่วมกัน (CB 135) ที่ระยะเวลาการหมัก 168 ชั่วโมง วิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC

3.15 ผลทดสอบค่า C/N Ratio ของเปลือกมันสำปะหลัง

ค่า C/N Ratio คือสัดส่วนของคาร์บอนกับไนโตรเจนในวัสดุหมัก ค่า C/N Ratio แคบจะเป็นวัสดุที่ย่อยสลายง่าย ดังนั้นวัสดุที่ย่อยสลายง่ายนอกจากจะมีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบเฉลี่ยน้อยกว่าวัสดุที่ย่อยสลายมากแล้ว ยังมีค่าเฉลี่ยของไนโตรเจนมากกว่าอีกด้วย การสลายตัวให้เป็นชิ้นเล็กลง จำเป็นต้องใช้พลังงานจากจุลินทรีย์มาก เพราะเชื้อราต้องย่อยสลายวัสดุหมักให้เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลเล็กลงจนเป็นอินทรียวัตถุที่สามารถใช้ประโยชน์ได้

อีกอย่างหนึ่งคือ ความอ่อนและความแข็งของวัสดุ ถ้าเป็นวัสดุที่มีเนื้อเยื่ออ่อน การย่อยสลายก็จะเร็วกว่าพวกที่มีเนื้อเยื่อแข็ง จากผลการทดสอบค่า C/N Ratio ของเปลือกมันสำปะหลัง ด้วยเครื่อง CHNO/S Analyzer พบว่าค่า C/N Ratio เปลือกมันสำปะหลัง เท่ากับ 36.90 จัดว่าเป็นค่า C/N Ratio ที่อยู่ในช่วงต่ำ ย่อยสลายได้ง่าย แสดงว่าเปลือกมันสำปะหลังที่ใช้เป็นวัสดุในการหมัก เชื้อราสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนโดยเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสเพื่อใช้ในการผลิตกรดได้ ผลดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ค่า C/N Ratio ของเปลือกมันสำปะหลัง

เปลือกมันสำปะหลัง	เปอร์เซ็นต์ (w/w)
คาร์บอน	38.75
ไนโตรเจน	1.05
C/N Ratio	36.90

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาทำการกลายพันธุ์เชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 สายพันธุ์ดั้งเดิมที่แยกได้จากเปลือกมันสำปะหลัง (สุณิษาและวิไลลักษณ์, 2557) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ เพิ่มการผลิตกรดแลกติก โดยใช้วิธีการกลายพันธุ์ด้วยรังสี UV, ใช้สารเคมี Ethyl methane sulfonate (EMS) และใช้รังสี UV ร่วมกับสารเคมี EMS แล้วนำมาหมักด้วยวิธีการหมักแบบแข็ง (Solid state fermentation) และนำเชื้อรากลายพันธุ์ที่ได้เปรียบเทียบปริมาณการผลิตกรดแลกติกกับเชื้อราสายพันธุ์ดั้งเดิม จากการศึกษาขั้นต้นคือการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้ง Macroscopic และ Microscopic พบว่าเชื้อรากลายพันธุ์ทั้ง 82 ไอโซเลท สามารถจัดเป็น *Rhizopus oryzae* โดยเชื้อราสกุลนี้มีลักษณะของโคโลนี คือ เส้นใยขาวฟู สปอร์มีสีดำถึงน้ำตาล เจริญได้รวดเร็วภายใน 18-24 ชั่วโมง และจากการทำ Slide culture พบลักษณะเส้นใยเป็นแบบไม่มีผนังกั้น และพบ Rhizoid ซึ่งเป็นลักษณะของเชื้อราสกุลนี้ สีของเส้นใยเป็นแบบไม่มีสี ชนิดของสปอร์ไม่อาศัยเพศ (Asexual spore) เป็นแบบสปอร์แรงจิโอสปอร์ (Sporangiospore) นอกจากนี้ยังพบสปอร์แบบอาศัยเพศ (Sexual spore) เป็นแบบไซโกสปอร์ (Zygospore)

มีรายงานว่าเชื้อรา *Rhizopus* spp. มีความสามารถในการผลิตกรดแลกติกเพื่อการค้าได้เป็นอย่างดี เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ทั้งชนิด Extra และ Intra cellular ได้หลายชนิด เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูเลส เพกติเนส อะไมเลส ไลเปส และโปรติเอส (Ghosh and Ray, 2011) มีรายงานว่าพบเอนไซม์ Lactate dehydrogenase ในเชื้อรา *Rhizopus* spp. (Skory, 2000; Hakki and Akkaya, 2001) และในสภาพที่มีออกซิเจนจำกัดเชื้อรา *Rhizopus* spp. สามารถผลิตเอนไซม์ Alcohol dehydrogenase เพื่อเปลี่ยนกรดไพรูวิกไปเป็นเอทานอลได้ จากปรากฏการณ์นี้จึงทำให้ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ลดลง (Skory *et al.*, 1998) นอกจากเอนไซม์ Lactate dehydrogenase แล้วเชื้อราสกุล *Rhizopus* spp. ยังมี Amylolactic enzyme ซึ่งสามารถเปลี่ยนแป้งไปเป็นกรดแลกติกได้โดยตรง (Hang, 1989; Yu and Hang, 1989; Wee *et al.*, 2006) นอกจากนี้ Lockwood (1975) ได้รายงานว่าเชื้อรา *Rhizopus* spp. สามารถที่จะผลิตกรดแลกติกในรูปแอล(+)-แลกติกได้ในปริมาณที่มีความเข้มข้นสูง และการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรามีข้อได้เปรียบคือ เชื้อราต้องการสารอาหารอย่างง่ายๆ สามารถเจริญได้ที่ค่าพีเอช (pH) ประมาณ 6.0-7.0 และจากวัตถุประสงค์ของงานวิจัยในครั้งนี้คือต้องการศึกษาการกลายพันธุ์ของเชื้อ *Rhizopus oryzae* C018 ด้วยการใช้รังสี UV และสารเคมี EMS ที่ค่าพีเอช (pH) แตกต่างกัน เพื่อต้องการให้ผลิตกรดแลกติกให้มีปริมาณสูง

การศึกษาเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 สายพันธุ์ดั้งเดิม มีความสามารถในการสร้างกรดและย่อยแป้งได้ดี จึงทำการหมักด้วยวิธีการหมักแบบแข็ง (Solid state fermentation : SSF) โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน และนำสารละลายที่กรองได้มาวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดโดยการทำไทเทรต (Titration) พบว่าที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 6.0 ให้ปริมาณกรดสูงสุด ในวันที่ 3 ของการหมักเท่ากับ 32.4 มิลลิกรัมต่อกรัม แล้วจึงนำเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยการใช้รังสี UV และสารเคมี Ethyl methane sulfonate (EMS) เพื่อคัดเลือกไอโซเลทที่มีความสามารถดีที่สุดมาศึกษาต่อไป

ผลการคัดเลือกได้เชื้อราทั้ง 82 ไอโซเลทที่ผ่านการชักนำให้กลายพันธุ์ด้วยการใช้รังสี UV และสารเคมี Ethyl methane sulfonate (EMS) โดยศึกษาความสามารถในการผลิตกรด โดยดูจากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเขียวเป็นสีเหลือง ซึ่งการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์บนอาหารหมายถึงเชื้อรามีความสามารถในการผลิตกรดได้ โดยปริชาติและคณะ (2554) กล่าวว่าหากเชื้อจุลินทรีย์สามารถเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเหลือง แสดงถึงความสามารถในการผลิตกรดออกมา แต่ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงสีเหลืองกว้างไม่ได้หมายความถึงความสามารถผลิตกรดได้ปริมาณมาก แต่ดูความเข้มของสีเหลือง และศึกษาความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังสังเกตการสร้างวงใสหลังจากราดด้วยสารละลายไอโอดีน แล้วนำมาหาค่า Extracellular enzyme

ผลการชักนำเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 ให้กลายพันธุ์ด้วยการใช้รังสี UV กำหนดระยะห่างจากหลอด UV 10, 20, 30 เซนติเมตรและกำหนดระยะเวลาที่สัมผัสรังสี UV 15, 30, 45 และ 60 นาที พบว่ามีจำนวน 5 ไอโซเลท คือ UV 132, UV 231, UV 331, UV 333 และ UV 334 ที่สามารถผลิตกรดได้ดีที่สุด เมื่อทำการทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม Bromo cresol green ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์เป็นอินดิเคเตอร์ พบว่าไอโซเลท UV 333 แสดงการย่อยแป้งโดยให้วงใสเท่ากับ 1.3 เซนติเมตร และให้ค่า Extracellular enzyme ระดับปานกลางเท่ากับ 1.62 เมื่อเทียบความสามารถในการย่อยแป้งพบว่าไอโซเลท UV 333 แสดงค่า Extracellular enzyme สูงกว่าไอโซเลทอื่น จึงนำไอโซเลท UV 333 มาศึกษาการหมักให้ได้กรดในสภาวะการหมักแบบแข็ง โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าไอโซเลท UV 333 ให้ปริมาณกรดทั้งหมดเท่ากับ 57.6 มิลลิกรัมต่อกรัมในวันที่ 3 ของการหมัก โดยเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Yin *et al*., (2013) ที่ศึกษาการกลายพันธุ์เชื้อรา *Rhizopus oryzae* ด้วยการใช้รังสี UV ระยะห่าง 20 เซนติเมตรด้วยวิธีการหมักแบบ Batch ซึ่งเป็นวิธีการหมักแบบเปียก พบว่าเชื้อราให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 59.5 กรัมต่อลิตร และการศึกษาของ Kadam *et al*., (2006) ศึกษาการกลายพันธุ์เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 โดยการใช้รังสี UV พบปริมาณกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 135 กรัมต่อลิตรโดยใช้การหมักแบบเปียก ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของ Dumbrepatil *et al*., (2008) ที่ศึกษาการผลิตกรดแลกติกของ *Lactobacillus delbrueckii* mutant Uc-3 และพบปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 166 กรัมต่อลิตร และการศึกษาการ

ผลิตกรดแลกติกของ Mei Bai *et al.*, (2004) ที่ศึกษาการกลายพันธุ์โดยใช้รังสี UV ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกสูงสุด 79.4 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการหมัก 6 ชั่วโมง

ผลการชักนำเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 ให้กลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี EMS ที่ความเข้มข้นตั้ง แต่ 100 ถึง 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 และ 60 นาที พบว่ามีจำนวน 8 ไอโซเลท คือ EMS 131, EMS 132, EMS 133, EMS 134, EMS 135, EMS 161, EMS 162 และ EMS 163 ที่สามารถผลิตกรดได้ดีที่สุด เมื่อทำการทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม Bromo cresol green ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์เป็นอินดิเคเตอร์ พบว่าไอโซเลท EMS 132 แสดงการย่อยแป้งโดยให้วงใสเท่ากับ 2.8 เซนติเมตร ให้ค่า Extracellular enzyme ระดับปานกลางเท่ากับ 1.87 เมื่อเทียบความสามารถในการย่อยแป้งพบว่าไอโซเลท EMS 132 แสดงค่า Extracellular enzyme สูงกว่าไอโซเลทอื่น จึงนำไอโซเลท EMS 132 มาศึกษาการหมักให้ได้กรดในสภาวะการหมักแบบแข็ง โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าไอโซเลท EMS 132 ให้ปริมาณกรดทั้งหมดเท่ากับ 72.9 มิลลิกรัมต่อกรัมในวันที่ 3 ของการหมัก ซึ่งยังไม่มีรายงานการใช้สารเคมี EMS กับเชื้อราเพื่อเพิ่มการผลิตกรดแลกติก แต่มีการนำไปใช้เพื่อผลิตเอนไซม์ไลเปส ตามการรายงานของ EL-Bondkly and keera (2007) รายงานการเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไลเปสโดยใช้สารเคมี EMS ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร พบว่าสามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไลเปสเมื่อใช้น้ำมันโอลีฟเป็นวัสดุหมัก และไม่สามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์ไลเปสเมื่อใช้น้ำมันสกัดจากเมล็ดฝ้ายเป็นวัสดุหมัก และตามการรายงานของ Radha *et al.*, (2012) ที่ศึกษาการกลายพันธุ์ของเชื้อรา *Aspergillus niger* โดยใช้สารเคมี EMS ที่ความเข้มข้น 2-10 มิลลิกรัม ที่ระยะเวลา 30 และ 60 นาทีเพื่อเพิ่มการผลิตโปรติเอส ใช้การหมักแบบแข็งและแบบเปียก พบว่าสายพันธุ์กลาย EMS11 สามารถให้ปริมาณโปรติเอส 1.53 ยูนิตต่อกรัม โดยการใช้วิธีการหมักแบบแข็ง นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้สารเคมีชนิดอื่นมาใช้ในการกลายพันธุ์เช่น NTG (N-methyl N'-nitro-N-nitrosoguandine), Ethidium bromide และ Nitrous acid ตามการศึกษาของ Suntornsuk and Hang (1994) ที่ศึกษาการใช้สารเคมี NTG ชักนำให้เชื้อรา *Rhizopus oryzae* กลายพันธุ์เพื่อเพิ่มการผลิตกรดแลกติกและกลูโคอะไมเลส พบว่าสายพันธุ์กลาย 1N1, 3N4 และ 3N6 สามารถเพิ่มการผลิตกรดแลกติกได้เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม และสายพันธุ์กลาย 3N4 สามารถให้ผลผลิตกลูโคอะไมเลสเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Iftikhar *et al.*, (2010) ยังศึกษาการเพิ่มการผลิตไลเปสของเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* ที่ผ่านการชักนำให้กลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี NTG, Ethidium bromide และ Nitrous acid และพบว่าสายพันธุ์กลาย IIB-63 และ NTG-7 ให้ปริมาณไลเปสสูงที่สุดเท่ากับ 10.37 ± 0.06 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ผลการชักนำเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 ให้กลายพันธุ์โดยใช้รังสี UV ร่วมกับสารเคมี EMS ที่ความเข้มข้นของสารเคมี EMS 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมา Spread บนอาหาร Cassava starch agar และนำไปสัมผัสรังสี UV ที่เวลา 30 นาที ระยะห่างจากหลอด UV 30 เซนติเมตร พบว่ามีจำนวน 4 ไอโซเลท คือ CB 131, CB 133, CB 134 และ CB 135 ที่สามารถผลิตกรดได้ดีที่สุด เมื่อทำการทดสอบด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม Bromo cresol green ความเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์เป็นอินดิเคเตอร์ พบว่าไอโซเลท CB 135 แสดงการย่อยแป้งโดยให้วงใสเท่ากับ 3 เซนติเมตร ให้ค่า Extracellular enzyme ระดับปานกลางเท่ากับ 1.57 เมื่อเทียบความสามารถในการย่อยแป้งพบว่าไอโซเลท CB 135 แสดงค่า Extracellular enzyme สูงกว่าไอโซเลทอื่น จึงนำไอโซเลท CB 135 มาศึกษาการหมักให้ได้กรดในสภาวะการหมักแบบแข็ง โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าไอโซเลท CB 135 ให้ปริมาณกรดทั้งหมดเท่ากับ 40.5 มิลลิกรัมต่อกรัม

มีหลายรายงานที่กล่าวถึง การชักนำเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ให้กลายพันธุ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ เพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิตกรดแลกติก ดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 การผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ

วิธีการหมัก	วิธีการชักนำ	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	อ้างอิง
แบบเปียก	สารเคมี NTG	40 กรัมต่อลิตร	Skory *et al.*, 1998
แบบเปียก	รังสี Gamma	5.1830 กรัมต่อกรัม	จารุรัตน์ และคณะ (2555)
แบบ Batch	รังสี UV และสารเคมี NTG	59.5 กรัมต่อลิตร	Yin *et al.*, 2013
แบบแข็ง (SSF)	รังสี UV	2.932 มิลลิกรัมต่อกรัม	การศึกษาครั้งนี้
	สารเคมี EMS	2.743 มิลลิกรัมต่อกรัม	
	รังสี UV และสารเคมี EMS	3.482 มิลลิกรัมต่อกรัม	

เชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 สายพันธุ์ดั้งเดิมและกลายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตกรดที่ค่าพีเอช (pH) ประมาณ 6.0-7.0 ซึ่งเป็นไปตามการรายงานของ Pritchard (1973) ที่รายงานว่าค่าพีเอช (pH) ที่เหมาะสมต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Lactate dehydrogenase ในเชื้อรา *Rhizopus oryzae* คือ 7.0 ดังนั้นอาจจะเป็นไปได้ว่าค่าพีเอช (pH)

ภายนอกเซลล์เชื้อราก็น่าจะมีส่วนต่อค่ากิจกรรมภายในเซลล์ของเชื้อราด้วย ซึ่งอาจจะรวมไปถึงกระบวนการสังเคราะห์กรดแลกติกภายในเซลล์เชื้อรา ส่วน Hang (1989) ได้รายงานว่าการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus* spp. มักใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นตัวปรับค่าพีเอช (pH) ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีผลทำให้การผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้น และ Taskin *et al.*, (2012) ได้รายงานว่าพีเอช (pH) ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกคือ 5.0-6.0 ถ้าค่าพีเอช (pH) ลดลงถึง 4.0 การผลิตกรดแลกติกก็จะลดลงด้วย

ผลการศึกษาอัตรา Survival rate และ Dead rate ของเชื้อรากลายพันธุ์หลังจากผ่านการชักนำให้กลายพันธุ์ พบว่าอัตรา Survival rate และ Dead rate จะขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่สัมผัสรังสี UV และสารเคมี Ethyl methane sulfonate (EMS) โดยจะเห็นว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาอัตราการรอดก็จะลดลง และพบอัตราการรอดจากการกลายพันธุ์โดยการใช้รังสี UV คือ 14.35 เปอร์เซ็นต์ อัตราการรอดจากสารเคมี EMS คือ 31.30 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการรอดจากการกลายพันธุ์โดยการใช้รังสี UV และสารเคมี EMS คือ 16.08 เปอร์เซ็นต์

ผลการชักนำเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 ให้กลายพันธุ์ แล้วนำมาทดสอบปริมาณกรดทั้งหมดด้วยกระบวนการหมักแบบแข็งที่ไม่ใช้แป้งมันสำปะหลัง (Without cassava starch) โดยใช้เชื้อราสายพันธุ์กลายทั้ง 3 สายพันธุ์ (UV 333, EMS 132, CB 135) เพื่อให้จุลินทรีย์ใช้แหล่งคาร์บอนที่มาจากเปลือกมันสำปะหลัง เนื่องจากมีรายงานว่าเปลือกมันสำปะหลังมีสารอาหารหลากหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ปริมาณธาตุอาหารในเปลือกมันสำปะหลังเก่าและใหม่

ปริมาณธาตุอาหาร	เปลือกมันสำปะหลังเก่า	เปลือกมันสำปะหลังใหม่
ไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์)	0.58	0.71
ฟอสฟอรัส (เปอร์เซ็นต์)	0.05	0.08
โพแทสเซียม (เปอร์เซ็นต์)	0.56	0.59
แคลเซียม (เปอร์เซ็นต์)	0.45	0.24
แมกนีเซียม (เปอร์เซ็นต์)	0.12	0.16
โซเดียม (มก./กก.)	83.27	42.27
ทองแดง (มก./กก.)	2.91	2.65
เหล็ก (มก./กก.)	5956.75	2350.65
แมงกานีส (มก./กก.)	840.45	234.54
สังกะสี (มก./กก.)	13.22	15.47

ที่มา: ศูนย์ค้นคว้าและพัฒนาวิชาการอาหารสัตว์ (2548)

เมื่อนำมาหมักโดยกระบวนการแบบแข็ง พบว่าเชื้อราสามารถให้ปริมาณกรดทั้งหมดสูงสุด 24.3 มิลลิกรัมต่อกรัม จากเชื้อรากลายพันธุ์ด้วยรังสี UV ซึ่งเป็นปริมาณกรดทั้งหมดที่ค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับการหมักที่ใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน เนื่องจากเปลือกมันสำปะหลังยังไม่ได้ผ่านกระบวนการย่อย ทำให้เชื้อจุลินทรีย์นำไปใช้ประโยชน์ได้น้อยเมื่อเทียบกับการใช้แป้งมันสำปะหลังในการหมัก จุลินทรีย์จึงเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลังแทน ทรงศักดิ์ (2543) ศึกษาพบว่าเปลือกมันสำปะหลังที่ไม่ได้ผ่านการหมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* จะมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงถึง 68.41 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง เปลือกมันสำปะหลังที่หมักด้วยเชื้อรา *Rhizopus oligosporus* มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตลดลงต่ำสุดเท่ากับ 53.19 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งจากการนำไปทดสอบค่า C/N Ratio พบค่าคาร์บอนเท่ากับ 38.75 เปอร์เซ็นต์ (w/w) และค่าไนโตรเจน 1.05 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Adelekan and Bamgboye (2009) ศึกษาการผลิตก๊าซชีวภาพโดยใช้เปลือกมันสำปะหลัง พบว่าเปลือกมันสำปะหลังที่ใช้ในการผลิตก๊าซชีวภาพมี 2 ชนิด คือ เปลือกมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยมีค่าคาร์บอนเท่ากับ 46.4 เปอร์เซ็นต์ ค่าไนโตรเจน 1.0 เปอร์เซ็นต์ และเปลือกมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการย่อยมีค่าคาร์บอนเท่ากับ 48.7 เปอร์เซ็นต์ ค่าไนโตรเจน 1.0 เปอร์เซ็นต์ และตามการรายงานของ Sangodoyin and Amori (2013) ที่ศึกษาการผลิตปุ๋ยชีวภาพโดยใช้เปลือกมันสำปะหลังในการหมัก พบว่าสามารถวิเคราะห์ค่าคาร์บอนในเปลือกมันสำปะหลังเท่ากับ 43.6 เปอร์เซ็นต์ (w/w) และไนโตรเจน 0.9 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ซึ่งการใช้วัสดุอินทรีย์ที่มี C/N Ratio แคบจะเกิดการย่อยสลายเร็ว แต่ถ้าใช้วัสดุที่มี C/N Ratio กว้างจะต้องใช้ระยะเวลาการย่อยสลายมากกว่า และตามรายงานอื่นดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 การศึกษาปริมาณ C/N Ratio ในเปลือกมันสำปะหลัง

ปริมาณคาร์บอน (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์)	ค่า C/N Ratio	References
39.0	0.96	40.6	Caroline (1981)
59.31	2.06	28.8	Sudaryanto *et al.*, (2006)
48.7	1	48.7	Adelekan and Bamgboye (2009)
18.96	0.60	32	Oparaku *et al.*, (2013)
44.82	1	44.82	Kortei *et al.* (2014)

ผลการวิเคราะห์กรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (High performance liquid chromatography) ของเชื้อกลายพันธุ์ทั้ง 3 สายพันธุ์คือ UV 333, EMS 132 และ CB 135 นำสารละลายที่ผ่านการกรอง จากการหมักที่ระยะเวลา 168 ชั่วโมงมาวิเคราะห์โดยใช้ 0.1

เปอร์เซ็นต์ H_3PO_4 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และรังสี UV ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร เป็น Detector สามารถวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 3.482 มิลลิกรัมต่อกรัม จากเชื้อรากลายพันธุ์ CB 135 ซึ่งกลายพันธุ์โดยใช้รังสี UV ร่วมกับสารเคมี EMS และรองลงมาคือเชื้อรากลายพันธุ์ UV 333 เท่ากับ 2.932 มิลลิกรัมต่อกรัม และเชื้อรากลายพันธุ์ EMS 132 เท่ากับ 2.743 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามการรายงานของ Suntornsuk and Hang (1994) ได้รายงานว่ามีการใช้ Physical agent หรือสารเคมีเป็นตัวชักนำให้เชื้อรา *Rhizopus oryzae* กลายพันธุ์ ทำให้มีความสามารถในการผลิตกรดแลกติกได้สูงขึ้น อย่างไรก็ตามรังสีจัดเป็น Physical agent อย่างหนึ่งในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ได้ เนื่องจากรังสี UV เป็นรังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน เมื่อเชื้อจุลินทรีย์ถูกชักนำโดยรังสี UV ทำให้เกิดการแตกหักของโมเลกุลดีเอ็นเอและสูญเสียโมเลกุลของเบสไปจากโมเลกุลของนิวคลีโอไทด์ ดีเอ็นเอจึงเกิดการซ่อมแซมตัวเอง โดยสังเคราะห์เบสตัวหนึ่งหรือหลายๆ ตัวในโมเลกุลของดีเอ็นเอขึ้นมาใหม่ ทำให้สายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ผิดรูปไปจากเดิม ส่วนสารเคมีก่อให้เกิดการกลายพันธุ์โดยไปเปลี่ยนโครงสร้างนิวคลีโอไทด์ เช่น การแทนที่คู่เบสแบบ Alkylation เกิดมากที่สุดที่ตำแหน่ง N-7 ของเบสกวานีน, หรือการที่ Purine หลุดออกไปจากสาย DNA (Depurination) เกิดการกลายพันธุ์แบบ Transition หรือ Transversion เนื่องจากเซลล์ต้องมีกระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA)

ผลการศึกษาความคงตัวของเชื้อรากลายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการหมัก เมื่อทดสอบความคงตัวโดยการนำมาหมักอีกครั้งหลังจากการกลายพันธุ์ พบว่าเชื้อรากลายพันธุ์ยังคงมีความสามารถในการผลิตกรดแลกติกอยู่

ผลการศึกษาปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากการหมักแบบแข็งในครั้งนี้ ให้ปริมาณน้อยกว่าการหมักแบบเหลว เมื่อเทียบกับรายงานของธนภูมิและคณะ (2551) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* KPS 106 ในถังหมักแบบลอยตัว พบว่าให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด เท่ากับ 89.87 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง ส่วน Zhang *et al*., (2009) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus arrhizus* ในถังหมักแบบ Bubble column พบว่าเชื้อราให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 88 กรัมต่อลิตร

มีหลายรายงานที่ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* โดยใช้แหล่งคาร์บอนเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร และส่วนใหญ่ใช้วิธีการหมักแบบเหลวซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกในการหมัก และการเก็บเกี่ยวผลผลิตขั้นตอนสุดท้าย ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 การผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ด้วยวิธีการหมักแบบต่าง ๆ

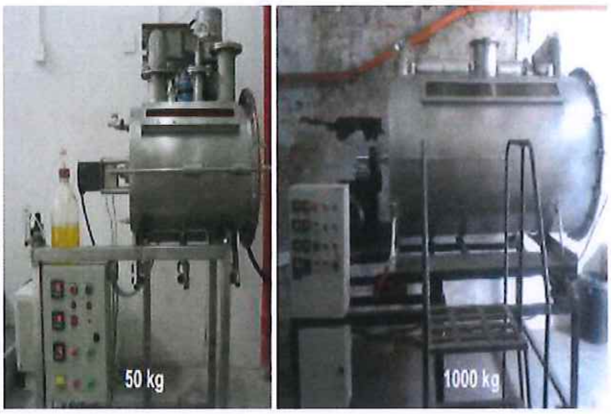
วิธีการหมัก	แหล่งคาร์บอน	ปริมาณกรดแลกติก	อ้างอิง
แบบเหลว	แป้งมันสำปะหลัง	54.62 กรัมต่อลิตร	Naranong and Poocharoen. 2001
Air lift bioreactor	กากมันฝรั่ง	10.3 มิลลิกรัมต่อกรัม	Oda *et al.*, 2002
Air lift bioreactor	กากมันฝรั่ง	8.3 มิลลิกรัมต่อกรัม	Saito *et al.*, 2003
แบบเหลว	ลูกแป้ง	10.5 กรัมต่อลิตร	Kitpreechavanich *et al.*, 2008
Bubble column	แป้งมันฝรั่ง	88 กรัมต่อลิตร	Zhang *et al.*, 2009
แบบ Batch	แป้งมันเทศ	43.3 กรัมต่อลิตร	Wei Yen *et al.*, 2010
แบบเหลว	กากนม	1210 มิลลิกรัมต่อลิตร	Sun *et al.*, 2012
แบบเหลว	กากน้ำตาล	38.5 กรัมต่อลิตร	Taskin *et al.*, 2012
แบบเหลว	ฟางข้าวสาลี	16.6 กรัมต่อลิตร	Saito *et al.*, 2012
แบบเหลว	แป้งมันสำปะหลัง	56.1 กรัมต่อลิตร	Yuwa-amornpitak *et al.*, 2014

เนื่องจากข้อจำกัดของการหมักแบบแข็ง ไม่สามารถที่จะกวนเพื่อให้อากาศได้ ซึ่งออกซิเจน เป็นสิ่งจำเป็นต่อการเจริญของเชื้อรา (Oda *et al.*, 2002) การผสมกันระหว่างวัสดุหมักและเชื้อราอาจไม่ทั่วถึง ทำให้การเจริญเติบโตและใช้วัสดุหมักไม่เต็มศักยภาพ ทำให้ได้รับอากาศน้อย ซึ่งเป็นข้อจำกัดของการหมักแบบแข็ง ตามการรายงานของณัฏฐา (2552) ซึ่งศึกษาการหมักกรดแลกติก ด้วยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* โดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นวัสดุหมักพบว่า อัตราการผลิตกรดแลกติกและเอทานอลด้วยการหมักแบบแข็งมีค่าต่ำกว่าการหมักแบบเหลว แต่ถึงแม้ผลผลิตกรดแลกติกที่ออกมาจะมีปริมาณน้อย แต่การหมักแบบแข็งมีข้อดีคือ ไม่ต้องย่อยวัสดุหมักด้วยกรดหรือเอนไซม์ ซึ่งช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้มาก และการใช้เชื้อราในการหมักแบบแข็งมีข้อได้เปรียบคือ เชื้อราสามารถย่อยแป้งได้ในครั้งเดียว (Amylolytic characteristics) ต้องการสารอาหารไม่ซับซ้อน ราคาถูก และค่าใช้จ่ายในการเก็บเกี่ยวผลผลิตต่ำ นอกจากนี้ มวลชีวภาพที่เหลือยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ เช่น ใช้เป็นตัวดูดซับสารพิษและใช้เติมลงในอาหารสำหรับเลี้ยงสัตว์ (Zhang *et al.*, 2007) ซึ่งการหมักแบบแข็งนี้เคยถูกให้ความหมายถึงระบบเทคโนโลยีที่ต่ำ (Low technology system) แต่ให้ผลผลิตที่มีมูลค่าสูง (Low volume high cost) (Pandy *et al.*, 2000) ซึ่งการศึกษาการหมักแบบแข็งนี้ตามการรายงานของ Oda *et al.*,

(2002) ที่ศึกษาการหมักกรดแลกติดด้วยกากมันฝรั่งด้วยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* IFO 4707 ในถุงพลาสติกให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อกรัม ในวันที่ 6 ของการหมัก สอดคล้องกับการรายงานของ Saito *et al*., (2003) ที่ศึกษาบทบาทของเอนไซม์ Pectinolytic ในการย่อยกากมันฝรั่งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* ด้วยวิธีการหมักแบบแข็ง ซึ่งให้ปริมาณกรดแลกติกเท่ากับ 8.03 มิลลิกรัมต่อกรัม และจากการรายงานของ Rojan *et al*., (2005) ซึ่งศึกษาการผลิตแอล(+) แลกติกโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* และกากมันสำปะหลังเป็นวัสดุหมักด้วยวิธีการหมักแบบแข็ง ซึ่งปริมาณกรดแลกติกที่ได้เท่ากับ 2.9 กรัมต่อ 5 กรัมวัสดุหมัก และตามการศึกษาของ Jonh *et al*., (2006) ทำการศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ด้วยวิธีการหมักแบบแข็งได้กรดแลกติกที่ 249 มิลลิกรัมต่อกรัม ในขณะที่ Meng *et al*., (2012) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Bacillus* sp. WL-S20 โดยใช้ถั่วลิสงเป็นแหล่งไนโตรเจน ได้ปริมาณกรดแลกติก 225 กรัมต่อลิตร และ Tosungnoen *et al*., (2014) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Lactobacillus Plantarum* MSUL 702 พบปริมาณกรดแลกติกสูงสุด 28.71 กรัมต่อลิตร

จากผลการศึกษาต่าง ๆ ที่ผ่านมาจะเห็นว่าการผลิตกรดแลกติกนิยมหมักในสภาพอาหารเหลว และใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งให้ปริมาณกรดแลกติกที่สูงกว่าการหมักแบบแข็ง แต่เป็นที่ทราบกันว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้ง่าย แต่มีราคาค่อนข้างสูง ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้นไปด้วย และการหมักแบบเหลวต้องใช้วัสดุอุปกรณ์มากมาย เช่น ถังหมัก การกวนให้อากาศ การใช้กรดหรือเอนไซม์ เพื่อการย่อยสลายวัสดุหมักก่อนที่จะลงเชื้อราหรือแบคทีเรียลงไป ซึ่งทุกอย่างถือเป็นต้นทุนในการผลิต ซึ่งจะสูงมากเมื่อเทียบกับการหมักแบบแข็ง แม้จะให้ปริมาณกรดแลกติกน้อยกว่า แต่ต้นทุนในการผลิตต่ำ และข้อดีอีกอย่างหนึ่งคือการใช้ถังหมักที่มีกลไกการทำงานไม่ซับซ้อน ผลิตขึ้นได้เองโดยวิธีการง่าย ๆ หรือประยุกต์ใช้จากอุปกรณ์ที่มีอยู่ได้

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการหมักแบบแข็งเพื่อให้สะดวกในการใช้งานมากยิ่งขึ้นโดยการศึกษาของมหาวิทยาลัยประเทศมาเลเซีย ที่คิดค้นประดิษฐ์เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแข็งที่ชื่อ " FERMSOSTAT " ซึ่งเป็นถังหมักแบบพกพา สำหรับหมักจุลินทรีย์ประเภทเชื้อรากับวัสดุหมักที่เป็นของแข็ง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ประโยชน์ของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารแปรรูปและการเกษตร คุณสมบัติของ " FERMSOSTAT " คือ สามารถควบคุมระบบการหมัก อุณหภูมิ อัตราการกวน การเพิ่มปริมาณสารตั้งต้น การเก็บเกี่ยวผลผลิต และมีระบบฆ่าเชื้อในถังหมัก เพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่นระหว่างการหมัก ทั้งยังประหยัดพลังงาน ดูแลจัดการง่าย และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ " FERMSOSTAT " ยังเป็นเทคโนโลยีใหม่ที่ถังหมักถูกพัฒนาให้สามารถหมักวัสดุเหลือทิ้งในปริมาณที่สูงถึง 1,000 กิโลกรัม



รูปที่ 27 เปรียบเทียบถังหมักแบบเก่า (50 กิโลกรัม) และถังหมักที่พัฒนาใหม่ (1,000 กิโลกรัม) ชื่อ " FERMSOSTAT "

ที่มา: http://www.platcomventures.com/techprofile_fermsostat.aspx (2 มีนาคม 2559)

ข้อเสนอแนะ

1. งานวิจัยนี้ให้ความสนใจเกี่ยวกับการหมักเพื่อให้ได้กรดแลกติกจากเชื้อรา โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาเกี่ยวกับกรดแลกติกเพียงอย่างเดียว จึงควรศึกษาการผลิตสารประกอบชนิดอื่น เช่น เอนไซม์ สารปฏิชีวนะ เป็นต้น เนื่องจากเชื้อราที่ใช้ในการศึกษาเป็นเชื้อราที่ถูกชักนำให้กลายพันธุ์ จึงไม่สามารถที่จะจำกัดประสิทธิภาพของเชื้อราได้

2. งานวิจัยนี้ให้ความสนใจเกี่ยวกับการหมักแบบแข็ง เป็นการหมักในระดับห้องปฏิบัติการ จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการหมักในระดับถังหมักและควบคุมขั้นตอนการหมักทุกขั้นตอน เพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตกรดแลกติก

3. งานวิจัยนี้ให้ความสนใจเกี่ยวกับเพิ่มการผลิตกรดแลกติก จึงควรที่จะศึกษาการเพิ่มปริมาณกรดแลกติกโดยใช้วัตถุดิบอื่นในการหมัก และศึกษาการทำบริสุทธิ์กรดแลกติกเพื่อเพิ่มมูลค่า และนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่อไป

บรรณานุกรม

กรมวิชาการเกษตร. 2537. เอกสารวิชาการปลูกพืชไร่. กรมวิชาการเกษตร. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 180 น.

จารุรัตน์ เอี่ยมศิริ, สุชาดา พงษ์พัฒน์, วชิราภรณ์ ผิวล่อง และ สุรศักดิ์ สัจจบุตร. 2555. การกลายพันธุ์เชื้อรา *Rhizopus microsporus* TISTR 3518 ด้วยรังสีแกมมาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันสำปะหลัง. วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร. 43(2)(พิเศษ): 141-144.

จุไรรัตน์ เกิดดอนแฝก. 2556. หนังสือสมุนไพรลดไขมันในเลือด 140 ชนิด. “มันสำปะหลัง” หน้า 154. สืบค้นจาก http://frynn.com (สืบค้นเมื่อ 10 มีนาคม 2558)

ชัยวัฒน์ จาติเสถียร. 2520. การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราและยีสต์ในลูกแป้งสำหรับหมักข้าวหมาก วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ณัฏฐา ทองจุล. 2552. การผลิตกรดแลกติกจากการหมักกากมันสำปะหลังโดยเชื้อรา *Rhizopus Oryzae*. รายงานฉบับสมบูรณ์. สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

ทรงศักดิ์ วัฒนชัยเสรีกุล. 2543. อาหารสัตว์จากกากมันสำปะหลัง ปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต (วิศวกรรมเคมี) สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 241 น.

ธนภูมิ มณีบุญ, วิรัตน์ วาณิชย์ศรีรัตนา, ชัยพร พรมชัยธวัช และวิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2548. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อรา *Rhizopus oryzae* KPS ในถังหมักแบบลอยตัวขนาด 3 ลิตร โดยวิธีพื้นผิวตอบสนอง. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 สาขาวิทยาศาสตร์. กรุงเทพฯ. ฟ

นวลพรรณ ณ ระนอง. 2543. รายงานการวิจัยเรื่องผลของการกวนและการให้อากาศต่อการผลิตกรดแลกติก จากแป้งมันสำปะหลังโดย *Rhizopus oryzae*. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์. คณะวิทยาศาสตร์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรงเทพฯ.

นภา โล่ห์ทอง. 2534. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ปริชาติ ศรีระพันธุ์, วิเชียร ลีลาวัชรมาศ และ ประมุข ภระกูลสุขสถิตย์. 2554. การแยก, คัดเลือก และจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถลดการทำงานของสารยับยั้งทริปซินจากกากถั่วเหลืองดิบ. รายงานผลงานวิจัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

วชิราภรณ์ ผิวล่อง, สุรศักดิ์ สัจจบุตร, สุชาดา พงษ์พัฒน์ และ จารุรัตน์ เอี่ยมศิริ. 2555. การผลิตกรดแลกติกจาก *Rhizopus oryzae* G-118 ที่เพาะเลี้ยงในแหล่งคาร์บอนหลากชนิด. วารสารวิทย์-เกษตร. 43(2) (พิเศษ): 85-88.

วิเชียร กิจปรีชาวนิช, จุฑามาศ สินสุข, สุนีย์ โชตินีรนาท, กล้าณรงค์ ศรีรอด และบุษบา ยงสมิทธ์. 2544. องค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตระดับฟลาสก์จากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae* DMKU 12. ในรายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39 (สาขาวิทยาศาสตร์). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. น. 181-188.

วิเชียร กิจปรีชาวนิช, สุธาสินี ประณีตรัตนานนท์, Yoshihito Shirai และบุษบา ยงสมิทธิ์. 2548. การปรับปรุงสายพันธุ์ *Rhizopus oryzae* และการผลิตกรดแอล(+) แลกติกจากแป้งมันสำปะหลังด้วยการตรึงเซลล์อัลจิเนต. การประชุมวิชาการประจำปี สวทช. 2548 วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทยสู่เศรษฐกิจยุคโมเลกุล 28-30 มีนาคม.

ภัทรพล นามทอง, สมใจ ขจรชีพพันธุ์งาม และประสงค์ วงศ์วิชา. 2554. การทำกรดแลกติกให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการเอสเทอริฟิเคชันและกระบวนการไฮโดรไลซิส. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สุขใจ ชูจันทร์และศิริประภา มั่นตรง. 2549. การศึกษาการเพิ่มผลผลิตกรดแลกติกจากเวย์ โดยใช้เชื้อ *Lacbacillus casei* TISTR 1341 ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต. เอกสารทางวิชาการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุณิษา พลรักษ์ และ วิไลลักษณ์ สุวะโซโน. 2557. การคัดเลือกเชื้อรา *Rhizopus* spp. ที่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังจากตัวอย่างมันสำปะหลังตากแห้งและดิน. การประชุมวิชาการครั้งที่ 8 มหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน. น.1594-1600.

สมาคมมันสำปะหลังไทย. 2552. อุตสาหกรรมมันสำปะหลังไทย สืบค้นจาก http://www.thaitapiocastarch.org : เมื่อวันที่ 1 ตุลาคม 2558

สุภัตรา รัตนะตระกูลเดชา, บุษบา ยงสมิทธิ์, กล้าณรงค์ ศรีรอด และวิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2548. การคัดเลือกเชื้อรา *Rhizopus* sp. ที่ผลิตกรดแลกติกได้จากแป้ง. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 33 สาขาประมง วิทยาศาสตร์ วิศวกรรมศาสตร์ อุตสาหกรรมศาสตร์ ศึกษาศาสตร์ มนุษยศาสตร์ สังคมศาสตร์ การจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม.

ศูนย์ค้นคว้าและพัฒนาวิชาการอาหารสัตว์. 2548. รายงานผลการดำเนินงานโครงการส่งเสริมการใช้มันสำปะหลังเป็นมันสำปะหลัง ในประเทศไทย ปี 2548.

อรรถวิท เตชะวิบูลย์วงศ์. 2547. “นวัตกรรมมันสำปะหลัง” อนาคตที่ก้าวกระโดดของเกษตรกรรมไทย. สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ ข่าวกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.

Adelekan, B. A. and Bamgboye, A. I. 2009. Comparison of biogas productivity of cassava peels mixed in selected ratios with major livestock waste types. African journal of agricultural research. 4(7): 571-577.

Ahmed M. EL-Bondkly and Abeer A. Keera. 2007. UV and EMS induced mutations affecting synthesis of alkaloids and lipase in *Penicillium roquefortii.* Arab journal of biotechnology. 10(2): 2 41-248.

Aidoo, K. E.; Hendry, R.; and Wood, B. J. B. 1981. Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. Journal applied microbiology and biotechnology. 12(1): 6-9.

Ali Demirci and Anthony L. Pometto III. 1992. Enhanced production of D(-)-lactic acid by mutants of *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 9649. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 11(1): 23-28.

Alonso, S., Monica, H., Manuel, R., and Mario, D. 2009. Residual yogurt whey for lactic acid production . Journal of biomass and bioenergy. 34(7): 931-938.

AOAC. 1999. Official methods of analysis of AOAC International. 16th ed. Washington D.C : association of official of analytical chemists.

AOAC. 1975. Official methods of analysis. 12th ed. Washington D.C : association of official of analytical chemists.

Arti Dumbrepatil, Mukund Adsul, Shivani Chaudhari, Jayant Khireand Digambar Gokhale. 2008. Utilization of Molasses Sugar for Lactic Acid Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. delbrueckii Mutant Uc-3 in Batch Fermentation. Applied and Environmental Microbiology Journal. 333–335.

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.

Bapiraju K.V.V.S.N, Sujatha. P, Ellaiah. P, and Ramana. T. 2004. Mutation induced enhanced biosynthesis of lipase. African journal of biotechnology. 3(11): 618-621.

Benninga, H. 1990. A history of lactic acid making. Kluwer Academic Publishers, Nonwell, MA.

Bhargav, S., Panda, B. P., Ali M. and Javed, S. 2008. Solid state fermentation: An overview. Chemical and biochemical engineering quarterly. 22(1): 49.

Bigelis R. and D.K. Acora. 1992. Organic acid of fungi. pp. 357-376. In D.K. Acora, R.P.Richard and K.G.Mukerji (eds.). Hand book of applied mycology. Marcel Dekker. Inc., New York.

Bos, C. J. and D. Stadler. 1996. Mutation. pp. 13-42. In Bos, C. J, eds. Fungal Genetics. volume 13. Marcel Dekker, Inc., New York.

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.

Cannel E. and Moo-Young M. 1980. Solid-state fermentation systems process Biochemistry.15: 2–7.

Cao, X., Yun, H. S., and Koo, Y. M. 2002. Recovery of L-(+)-lactic acid by anion exchange resin Amberlite IRA-400. Biochemical engineering journal. 11: 189-196.

Caroline .C. 1981. Humus production from cassava (Manihot esculenta) peels by Eudrilus eugeniae (Terrestrial oligochete). Jahrgang (82): 145-148.

Chem. Mark. Rep. 1999. In A. Chistina and G. Zacchi. 2000. An economic evalution of the fermentative production of lactic acid from wheat flour. Bioresources and technology journal. 75: 119-126.

Choi, Y. W., Hodgkiss, I. J., and Hyde, K. D. 2005. Enzyme production by entophytes of *Bruces Javanica*. Agricultural Technology Journal. 1: 55-56.

Christen, P., Bramorski, A., Revah, S., and Soccol, C.R. 2000. Characterization of volatile compounds produced by *Rhizopus* sp. strains grown on agro-industrial solid wastes. Bioresources and Technology journal. 71: 211-215.

Chung-Yih Wang, Chi-Tsai Lin , Dey-Chyi Sheu and Chih-Yu Liu. 2014. L-Lactic acid fermentation by culture of *Rhizopus oryzae* using ammonia as neutralizing agent. Journal of the taiwan institute of chemical engineers. 45: 1–5.

Cockrem, M. C. M.,and Johnson, P. D. 1993. (WO/1993/000440) Recovery of lactate esters and lactic acid from fermentation broth. United States patent.

Cory A. Leonard, Stacy D. Brown and J. Russell Hayman. 2013. Random Mutagenesis of the *Aspergillus oryzae* Genome Results in Fungal Antibacterial Activity. International journal of microbiology. 2013: 1-5.

Cotano O, Amnuaypanich S, Grisadanurak N, and Boonmee M. 2009. Selection of amine extractant /diluents system for use in liquid-liquid extraction of lactic acid, Research Cooperation Between Academies and Industries in Thailand, The Thai

Institute of Chemical Engineering and Applied Chemistry 19th ed. Kanchanaburi, Thailand, Nov 26-27: 442-443.

Couto, S., and Sanromon, M. 2006. Application of solid state fermentation to food industry- A review. Journal of food engineering. 76(3): 291-302.

Cuong Mai Nguyen, Gyung Ja Choi, Yong Ho Choi, Kyoung Soo Jang and Jin-Cheol Kim. 2013. D- and L-lactic acid production from fresh sweet potato through simultaneous saccharification and fermentation. Biochemical engineering journal 81: 40–46.

Datta, R., Tsai, S. P., Moon, S., Frank, J. 1995. Technological and economical potential of polylactic acid and lactic acid derivatives. FEMS microbiology reviews journal. 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.

Dominguez, J. M. and M. Vazquez. 1999. Effect of the operation conditions on the L(+)lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. Ciencia e Tecnologia de Alimentos journal. 2(3): 113-118.

Dong-Mei Bai, Xue-Ming Zhao, Xin-Gang Li and Shi-Min Xu. 2004. Strain improvement of *Rhizopus oryzae* for over-production of L(+)-lactic acid and metabolic flux analysis of mutants. Biochemical engineering journal 18: 41–48.

Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P., and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Journal analytical chemistry. 28(3): 350–356.

Du, J., N. Cao., C. S. Gone and G. T. Tsao. 1998. Production of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae* in a bubble column fermenter. Appllied biochemistry and biotechnology journal. 70-72.: 323-329.

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. 149-159.

Edgar, R. C. 2004. Muscle: a multiple sequence aligment method with reduced time and space complexity. BMC bioinformatics journal. 5(1): 113.

Eijkman, C. 1934. Microbiologisches. untersuchungen uber die Arrak fabrikation in Batavia Zentr. Parasitenk. Abt, I. 16: 97. In S. C. Prescott and C. G. Dunn, eds. industrial microbiology. 3rd. McGraw Hill book Co. Inc., New York.

Friedemann, T. E., Cotonio, M. and Shaffer P. A. 1927. The determination of lactic acid. Biochemistry journal. 73(1): 335.

Garg, N. and Y. D. Hang. 1995. Microbial production of organic acids from carrot processing waste. Journal food sciences and technology. 32(2): 119-121.

Ge, C., Pan, R., Zhang, J., Cai, J and Yu, Z. 2013. Effect of $ZnSO_4$ on L-lactic acid production by *Rhizopus oryzae* . 53 (5): 515-520.

Ghosh, B. and Ray, R. R. 2011. Current commercial perspective of *Rhizopus oryzae*: A review. Applied sciences journal. 11: 2470-2486.

Gibbs, M. and Gastel, R. 1953. Glucose dissimilation by *Rhizopus* Arch. Biochemistry biophysics journal. 43: 33-38.

Hakkarainen, M., S. Karlsson and A. C. Albertsson. 2000. Rapid (bio) degradation of polylactide by mixed culture of compost microorganisms low molecular weight products and matrix changes. Polymer journal. 41: 2331-2338.

Hakki, E. E. and Akkaya, M. S. 2001. RT-PCR amplification of *Rhizopus oryzae* lactate dehydrogenase gene fragment. Enzyme and microbial technology journal. 28: 259-264.

Hall, T. 2004. BioEdit version 7.0.0. Distributed by the author, wedsite: www.mbioncsu. Edu/ BioEdit/bioedit. Html. Accessed June 15, 2012.

Hang. YD. 1989. Direct fermentation of corn to L(+)- lactic acid by *Rhizopus oryzae*. Biotechnology journal. 11:299-300.

Hofvendahl, K. and Hahn, B. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. Enzyme and microbial technology journal. 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. Controlled release journal. 4: 155-160.

Holten, C.H., A. Muller and D. Rehbinder. 1971. Lactic acid properties and chemistry of lactic acid and derivatives. VCH Weinheim, Germany.

Hong-Wei Yen , Tsia-Ju Chen , Wei-Chin Pan and Hsien-Jen Wu. 2010. Effects of neutralizing agents on lactic acid production by *Rhizopus oryzae* using sweet potato starch. World journal microbiology and biotechnology. 26: 437–441.

Hongo, M., Nomua, Y. and Iwahara, M. 1986. Novel method of lactic acid production by Electro dialysis fermentation. Applied and environmental microbiology journal. 52: 314-319.

Howard, R.L., E. Abotsl., E.L. Janson van Rensburg and S. Howard. 2003. Lignocelluloses biotechnology: Issues of bioconversion and enzyme production. African journal biotechnology. 2(12): 602-619.

Huang, L.P., Jin, B., Lant, P. and Zhou, J. 2003. Biotechnological production of lactic acid integrated with potato wastewater treatment by *Rhizopus arrhizus*. Journal of chemical technology and biotechnology. 78: 899-906.

Järvinen, M., Myllykoski, L., Keiski R., and Sohlo, J. 2000. Separation of lactic acid from fermented broth by reactive extraction. Bioseparation Journal. 9(3): 163-166.

John, R. P., Nampoothiri, K. M. and Pandey, A. 2006. Solid state fermentation for L-lactic acid production and fermentation of starch waste materials to L(+) lactic acid. Biotechnology letters. 25: 1983-1987.

Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merazhuk, Y., McGinnis, S. and Madden, T. L. 2008. NCBI Blast: A better wed interface. Nucleic acid research 36 (Suppl 2): W5-W9.

Katsuichi Saito, Yasuhiro Hasa and Hideyuki Abe. 2012. Production of lactic acid from xylose and wheat straw by *Rhizopus oryzae*. Journal of bioscience and bioengineering. 114(2): 166-169.

Kitpreechavanich, V., S. Chotineeranat, K. Sriroth, B. Yongsmith, Y. Shirai and Y. Fujio. 1999. L(+)-lactic acid production from tapioca starch by *Rhizopus oryzae*. Biotechnology for sustainable utilization of biological resources in the tropics. 14: 217-225.

Kortei, N. K., Dzogbefia, V. P. and Obodai. M. 2014. Assessing the Effect of Compos ting Cassava Peel Based Substrates on the Yield, Nutritional Quality, and Physical Characteristics of Pleurotus ostreatus (Jacq. ex Fr.) Kummer. Journal biotechnology research international. 2014: 1-9.

Kristofikova, L. and M. Rosenberg. 1995. Changes of γ- linolenic acid content in *Rhiozopus arrhizus* during L(+)-lactic acid fermentation. folia microbiologica journal. 40:189-192.

Laskin, I. A. 1985. Enzyme and immobilized cells in biotechnology. Canada : the Benjamin cummings plublishing company, inc.

Lee, K., So, J. and Heo, T. 2001. Thin layer chromatographic determination of organic acids for rapid identification of bifidobacteria at genus level. Journal microbiological methods. 45(1): 1-6.

Lejohn, H. B. 1971. D(-)+lactate dehydrogenase in fungi. Journal biology and chemistry. 246(7): 2116-2126.

Litchfield, J.H. 1996. Microbiological production of lactic acid. Advances in applied microbiology journal. 42: 45-95.

Liu, Y., Liao, W., Liu, C., Chen, S. 2005. Optimization of L-(+)-lactic acid production using pelletized filamentous *Rhizopus oryzae* NRRL395. Applied biochemistry. And biotechnology journal. 129-132: 844-853.

Lockwood, L. B. 1975. Organic acid production of acids, pp. 140-157. In J. I. Smith and D. R. Berry, eds. filamentous fungi. volume 1. industrial mycology. Edward Arnold, London.

Lockwood, G. E. Ward and O. E. May. 1936. The physiology of *Rhizopus oryzae*. Journal of agricultural research. 53: 849-857.

Longacre, A., M. R. Jacqueline, J. E. gannon and B.E. Wright. 1997. Flux analysis of glucose metabolism in *Rhizopus oryzae* for the purpose of increasing lactate yields. Fungal. Biol. 21: 30-39.

Longfei Yin, Qicheng Ruan and Yongqian Fu. 2013. Strain improvement of *Rhizopus oryzae* for overproduction of lactic acid by random mutations. African journal. microbiology. 7(23): 2970-2975.

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.

Margulies, M. and W. Vishniac. 1961. Dissimilation of glucose by the mix strain of *Rhizopus*. Journal of bacteriology. 81: 1-9.

Mesut Taskin, Nevzat Esim and Serkan Ortucu. 2012. Efficient production of L-lactic acid from chicken feather protein hydrolysate and sugar beet molasses by the newly isolated *Rhizopus oryzae* TS-61. Journal of food and bioproducts processing. 90: 773–779.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical chemistry journal. 31(3): 426-428.

Mirdamadi, S., Sadeghi, H., Sharafi, N., Fallahpour, M., Moshseni 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.

Moo-Young, M., Moreira, A.R. and Tengerdy, R.E. 1983. Principles of solid-substrate fermentation. Smith JE (ed). the filamentous fungi, 4: 117-144.

Naranong, N. and Poocharoen, D. 2001. Production of L-lactic acid from raw cassava starch by *Rhizopus* sp. MK-96-1196 in airlift bioreactor. Journal of bioscience and bioengineering. 96(1): 65-69.

Narayanan, N., Roychoudhury, PK. And Srivastava, A. 2004. L(+) lactic acid fermenta tion and its product polymerization. Electronic journal 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. Journal of bioresource technology. 96: 485-490.

Nuanphan Naranong and Duangduan Poocharoen. 2001. Production of L-Lactic Acid from Raw Cassava Starch by *Rhizopus oryzae* NRRL 395. Kasetsart journal (Nat. Sci.) 35: 164 – 170.

Obayashi, A., H. Yorifuji, T. Yamagata, T. Ijichi and M. Kanie. 1966. Respiration in organic acid forming molds. part I. purification of cytochrome C, co-enzyme Q and L- lactic dehydrogenase from lactate forming *Rhizopus oryzae*. Agricultural. biology and chemistry journal. 30: 171-724.

Oda, Y., K. Saito., H. Yamauchi and M. Mori. 2002. Lactic acid fermentation of potato pulp by the fungus *Rhizopus oryzae*. Current microbiology journal. 45: 1-4.

Ogawa A, Wakisaka Y, Tanaka T, Sakiyama T, and Nakanishi K. 1995. Production of koji acid by membrane-surface liquid culture of *Aspergillus oryzae* NRRL484. Journal fermentation. bioengineering. 80: 41-45.

Oparaku, N. F., Ofomatah, A. C and Okoroigwe, E. C. 2013. Biodigestion of cassava peels blended with pig dung for methane generation. African Journal of Pig Farming.1(2): 023-027.

Pandey, A., Soccol, C. R. and Mitchell, D. 2000. New development in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. Process biochemistry journal. 35: 1153-1169.

Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. Biochemical engineering journal. 13(2-3): 81-84.

Piskin, E., Tuncle, 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: Diadnostic biosensor polymers. Usmani, A. M. and N. Akamal (eds). ACS symposium series 556. American chemical society, Washington, DC. 12: 302-30.

Prescott, S. C. and G. G. Dunn. 1959. Industrial microbiology, 3^{nd} ed. McGraw- Hill, New York.

Press Release. 2551. พูแรค ทุ่มงบ 4,800 ล้านบาท สร้างโรงงานแห่งใหม่ในไทย. http:// www.positioningmag.com PR NEWS Network.htm (Accessed 6 May 2009)

Pritchard, G. G. 1973. Factors affecting the activity and synthesis of NAD-dependent lactate dehydrogenase in *Rhizopus oryzae*. Journal of general microbiology. 78: 125-137.

Radha, S., Himakiran, R., Babu, A., Sridevi, N.B., Prasad, L. and Narasimha, G. 2012. Development of mutant fungal strains of *Aspergillus niger* for enhanced production of acid protease in submerged and solid state fermentation. European journal of experimental biology. 2(5): 1517-1528.

Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B. J., Venkateshwar, M. and Kumar, E. V. 2008. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation- A review. Biotechnology advances journal. 26(1): 22-34.

Riddell, R. W. 1950. Permanent stained mycological preparation obtained by slide culture. Mycologia journal. 42: 265-270.

Rojan, P. J., Nampoothiri, K. M., Nair, A. S and Pandy, A. 2005. L(+)-lactic acid production using *Lactobacillus casei* in solid state fermentation. Biotechnology letters. 27: 1685-1688.

Rosenberg, M., Kristofikova L., B. Proksa and P. Magdolen. 1992. The formation of polyols and fatty acids during L(+)-lactic acid fermentation by *Rhizopus arrhizus*. Biotechnology letters. 14: 45-48.

Ruengruglikit, C and Y.D. Hang. 2003. L(+)-lactic acid production from corncobs by *Rhizopus oryzae* NRRL 395. Food science and technology journal. 36: 573-575.

Ruter, P. 1975. Molasses utilization. Food and agricultural organization of the United nations, Rome.

Sachin R. Kadam, Sudarshan S. Patil, Kulbhushan B. Bastawde, Jayant M. Khire and Digambar V. Gokhale. 2006. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. Journal process biochemistry 41: 120–126.

Sangodoyin, A. Y. and Amori, A. A. 2013. Aerobic composting of cassava peels using cowdung, sewage sludge and poultry manure as supplements. European international journal of science and technology. 2(8).

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 and biotechnology. 30: 440-444.

Selman, A. W. and I. J. Hutchings. 1937. Lactic acid production by species of *Rhizopus*. Journal of the american chemical society. 59: 545-547.

Skory, C. D., S. N. Freer and R. J. Bothast. 1998. Production of L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae* under oxygen limiting condition. Biotechnology letters. 20(2): 191-194.

Skory, C. D. 2000. Isolation and expression of lactate dehydrogenase gene from *Rhizopus oryzae*. Applied and environmental microbiology journal. 66: 2343-2348.

Shigenobu Miura, Tomohiro Arimura, Noriaki Itoda, Lies Dwiarti, Jin Beng Feng, Cui Hong Bin, and Mitsuyasu Okabe. 2004. Production of L-Lactic Acid from Corncob. Journal of bioscience and bioengineering.

Singhania, R., Anil, K. P., Soccol, R. and Pandey, A. 2009. Recent advances in solid state fermentation. Biochemical engineering journal. 44(1): 13-18.

Sirirat Tosungnoena, Kannika Chookietwattana and Somchai Dararat. 2014. Lactic Acid Production from Repeated-Batch and Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cassava Starch Wastewater by Amylolytic *Lactobacillus Plantarum* MSUL 702. APCBEE Procedia. 8: 204 – 209.

Soccol, C.R., Stonoga, V.I., and Raimbault, M. 1994. Production of L-lactic acid by *Rhizopus* sp. World journal of microbiology and biotechnology.10(4): 433-435.

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., Chollakup, R., Chotineeranat, S., Piyachomkwan, K., and Oates, C.G. 2000. Processing of cassava waste for improved biomass utilization. Bioresource technology journal. 71: 63-69.

Stark, B., Goodban, A. E. and Owens, H. S. 1951. Paper chromatography of organic acids. Analytical chemistry. 23(3): 413-415.

Stanier, R. Y., E. A. Adleburge and J. L. Ingraham. 1976. The microbiology world. prentice hall, Englewood cliffs, New York.

Sudaryanto, Y., Hartono, S.B., Irawaty, W., Hindarso, H. and Ismadji, S. 2006. High surface area activated carbon prepared from cassava peel by chemical activation. Bioresource technology journal. 97: 734–739.

Suntornsuk, W. and Y. D. Hang. 1994. Strain improvement of *Rhizopus oryzae* for production of L(+)-lactic acid and glucoamylase. Letters applied microbiology. 19: 249-252.

Sun, Y. L. Li, H. Yang, S. Bai and Z. D. Hu. 1998. Stability of immobilized *Rhizopus oryzae* in repetitive batch productions of L(+)-lactic acid : effect of inorganic salts. Bioprocess bioengineering journal. 19: 155-157.

Sun. J, Zhu.J and Li.W. 2012. L-(+) lactic acid production by *Rhizopus oryzae* using pretreated dairy manure as carbon and nitrogen source. Journal of Biomass and bioenergy. 47: 442 -450.

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.

Tay, A. and S. T. Yang. 2000. Production of L(+)-lactic acid from corn starch using immobilized *Rhizopus oryzae* in fibrous bed bioreactor. Biotechnology bioengineering journal.

Taylor, KACC. 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. Applied biochemistry and biotechnology journal. 56(1): 49-58.

Tehreema Iftikhar, Mubashir Niaz, Muhammad Anjum Zia, Ikram ul Haq. 2010. Production of extracellular lipases by *Rhizopus oligosporus* in a stirred fermentor. Brazilian journal of microbiology. 41: 1124-1132.

Thalisa Yuwa-amornpitak and Kannika Chookietwattana. 2014. Lactic acid production from cassava starch by thermothelerent *Rhizopus microspores* LTH 23. Journal of biological science. 14(4): 284-291.

Tonukari, N. J. 2004. Cassava and the future of starch. Electronic journal of biotechnology. 7: 5-8.

Tsuneo Yamane and Ryohsuke Tanaka. 2012. Highly accumulative production of L(+)-lactate from glucose by crystallization fermentation with immobilized *Rhizopus oryzae*. Journal of bioscience and bioengineering. 115(1): 90-95.

Underkofler, Leland A., and Richard J. Hickey. 1954. Indusrial fermentation. New York : Chemical Publishing Co.

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.

Vichien Kitpreechavanich, Thanapoom Maneeboon, Youichi Kayano and Kenji Sakai. 2008. Comparative characterization of L-lactic Acid-Producing thermotolerant *Rhizopus* Fungi. Journal of bioscience and bioengineering. 106(6): 541–546.

Vickroy, T. B. 1985. In comprehensive biotechnology the 98 principles. Applications and regulations of biotechnology in industry agriculture and medicine. Pregamon Press, Oxford. volume 3: 761-776.

Vishal R. Kamble and R. M. Mulani. 2012. Mutation studies in ECM fungus *Tricholoma lascivum* (Fr.) gillet from Maharashtra. Biosciences international journal: 1(3): 66-73.

Wang-Yu Tong, Xiang-Yang Fu, Sang-Mok Lee, Jie Yu, Jian-Wen Liu, Dong-Zhi Wei and Yoon-Mo Koo. 2004. Purification of L(+)-lactic acid from fermentation broth with paper sludge as a cellulosic feedstock using weak anion exchanger amberlite IRA-92. Biochemical engineering journal. 18: 89–96.

Wang, L., Zhou, 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 journal. 101(20): 7895-7901.

Wanying Yao , Xiao Wu , Jun Zh , Bo Sun and Curtis Miller. 2010. Utilization of protein extract from dairy manure as a nitrogen source by *Rhizopus oryzae* NRRL-395 for L-lactic acid production. Journal of bioresource technology. 101(2010): 4132–4138.

Wang, X., Sun, L., Wei, D. and Wang, R. 2005. Reducing by-product formation in l-lactic acid fermentation by *Rhizopus oryzae*. Journal of industrial microbiology and biotechnology. 32: 38–40.

Ward, G. E., L. B. Lockwood, B. Tabenkin and P. A. Wells. 1938. Rapid fermentation process for dextro-lactic acid. Industrial and engineering chemistry research. 30(11): 1233-1235.

Wattoo, J. I. Aslam, K., Shah, S. M., Shabir, G., Sabar, M., Naveed, S. A., Waheed, Samiullah, R., Muqaddasi, Q. H. and Arif, M. 2013. Ethyle methane sulphonate (EMS) induced mutagenic attempts to create genetic variability in Basmati rice. African journal of water conservation and sustainability. 1(3): 045-048.

Wee, Y.J., J.N. 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.

Woiciechowski, A.L., Soccol, C.R., Ramos, L.P., and Pandey, A. 1999. Experimental designto enhance the production of L-(+)-lactic acid from steam-exploded wood hydrolysate using *Rhizopus oryzae* in a mixed-acid fermentation. Process biochem. 34: 949-955.

Wu, X., Jiang, S., Liu, M., Pan, L., Zheng, Z., Luo, S. 2011. Production of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae* using semicontinuous fermentation in bioreactor. Journal of industrial microbiology and biotechnology. 38: 565-571.

Xiaohong Sun, Qunhui Wang, Wenchao Zhao, Hongzhi Ma and Kazunori Sakata. 2006. Extraction and purification of lactic acid from fermentation broth by esterification and hydrolysis method. Separation and purification technology journal. 49: 43–48.

Yang, C. W., Lu, Z. and Tsao, G. T. 1995. Lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* in a submerged system. Applied biochemistry and biotechnology. 51/52: 57-71.

Yen, H.W. and J.L. Kang. 2010. Lactic acid production directly from starch in a starch controlled fed batch operation using *Lactobacillus amylophilus*. Bioprocess and biosystems engineering journal. 10: 1-7.

Yin, P, Nishina, N, Kosakai, Y, Yahiro, K, Pakr, Y., and Okabe, M. 1997. Enhanced production of (+)-lactic acid from corn starch in a culture of *Rhizopus oryzae* using an air-lift bioreactor. Journal of fermentation and bioengineering. 84(3): 249-253.

Yin, P, T. Ishigaki, Y. Yahiro, Y. S. Park and M. Okabe. 1998. L(+)-lactic acid production by repeated batch culture of *Rhizopus oryzae* using air-lift bioreactor. Journal of fermentation and bioengineering. 85(1): 96-100.

Ying Meng, Yanfen Xue, Bo Yu, Chenghua Gao and Yanhe Ma. 2012. Efficient production of L-lactic acid with high optical purity by Alkaliphilic *Bacillus* sp. WL-S20. Bioresource technology journal. 116: 334–339.

Yu, Y. D. and Y. D. Hang. 1989. kinetics of direct fermentation of agricultural commodities to L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. Biotechnology letters. 11(8): 597-600.

Zhang, Z.Y., Jin, B., Kelly, J.M. 2007. Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. Biochemical engineering journal. 35: 251-263.

Zhan Ying Zhang, Bo Jin and Joan M. Kelly. 2009. Enhancement of L(+)-lactic acid production using acid-adapted precultures of *Rhizopus arrhizus* in a bubble column reactor. Journal of bioscience and bioengineering. 108(4): 344–347.

Zhou, M. Dominguez, N. Cao, J. Du and G. T. Tsao. 1999. Optimization of L-lactic acid production from glucose by *Rhizopus oryzae* ATCC 52311. Applied bioche mistry and biotechnology journal. 77-79: 401-406.

http://www.platcomventures.com/techprofile_fermsostat.aspx (สืบค้นเมื่อ 2 มีนาคม 2559)

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 (กรัมต่อลิตร)

แป้งมันสำปะหลัง	50	กรัม
$(NH_4)_2SO_4$	3	กรัม
KH_2PO_4	0.25	กรัม
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.15	กรัม
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.04	กรัม
Agar	18	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

2. สารเคมีที่ใช้ทดสอบ

2.1 Iodine solution (สำหรับทดสอบการย่อยแป้ง)

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

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

ภาคผนวก ข
การเก็บตัวอย่างและวิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity) โดยวิธี Titration (AOAC, 1999)

การเตรียมสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์

1. NaOH 0.01 นอร์มอล โดยชั่ง NaOH 40 กรัม ใส่ใน Volumetric flask ขนาด 1 ลิตร ละลายในน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร จะได้สารละลาย NaOH 1 นอร์มอล จากนั้นทำการเจือจางโดยดูดสารละลาย NaOH 1 นอร์มอล มา 10 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 990 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย NaOH 0.01 นอร์มอล
2. Phenolphthalein indicator โดยผสม Phenolphthalein crystal 1.0 กรัม กับ Ethanol 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

นำสารละลายส่วนใสที่ได้จากตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดเพื่อไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นหยด phenolphthalein 3 หยด แล้วทำการไทเทรต ด้วย NaOH 0.01 นอร์มอล จนถึงจุดยุติ แล้วคำนวณหาปริมาตรกรดโดยเทียบกับ NaOH มาตรฐาน

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมด} = \frac{\text{ปริมาตร NaOH ที่ใช้} \times \text{ความเข้มข้น NaOH} \times \overset{\text{(มิลลิกรัมสมมูลย์ของกรด)}}{\text{Milliequivalent (mEq)}} \times 100}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)}}$$

การเตรียม NaOH มาตรฐาน (AOAC, 1975)

1. Standard potassium hydrogen phthalate ($KHC_8H_4O_4$) อบที่ 100 องศาเซลเซียส ข้ามคืนแล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บในโถดูดความชื้น

วิธีการวิเคราะห์

$KHC_8H_4O_4$ ชั่ง 0.1 กรัม เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือดเพื่อไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นหยด phenolphthalein 3 หยด แล้วทำการไทเทรต ด้วย NaOH 0.01 นอร์มอล จนถึงจุดยุติ แล้วคำนวณหาปริมาตร NaOH ที่ใช้ไป (ทำ Control เทียบกับน้ำกลั่นที่ไม่มี $KHC_8H_4O_4$ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร)

$$\text{นอร์มอลิตี้} = \frac{\text{น้ำหนัก (กรัม) ของ } KHC_8H_4O_4 \times 1000}{\text{ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของ NaOH} \times 204.229}$$

2. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugars) โดยวิธี Phenol-sulfuric (Dubois *et al.*, 1956)

การเตรียมสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์

1. ชั่ง ฟีนอล 2.5 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เตรียม 98 เปอร์เซ็นต์ กรดซัลฟิวริก จากนั้นเตรียมสารละลายกลูโคส มาตรฐานโดยนำกลูโคส 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง เติม 5 เปอร์เซ็นต์ ฟีนอล 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ปล่อยที่ผิวหน้าของเหลวโดยตรงเพื่อให้ผสมกันได้เร็ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-20 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

1. นำกลูโคส 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

ปิเปตสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติม 5 เปอร์เซ็นต์ ฟีนอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ปล่อยที่ผิวหน้าของเหลวโดยตรงเพื่อให้ผสมกันได้เร็ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อ่างควบคุมอุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-20 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

3. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugar) ด้วยวิธี DNS (Dinitrosalicylic acid) Miller *et al.*, (1959)

การเตรียมสารละลาย DNS สำหรับการวิเคราะห์

1. นำ 3,5-Dinitrosalicylic acid 10 กรัม , เติม ฟีนอล 2 กรัม, Na_2SO_3 0.5 กรัม จากนั้นเติม โพแทสเซียม โซเดียมทาร์เทรต 200 กรัม ละลายใน NaOH 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร คนจนสารละลายทั้งหมดเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

วิธีการวิเคราะห์

ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลาย DNS ที่เตรียมไว้ข้างต้นในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที ปิดปากหลอดเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ แล้วหยุดปฏิกิริยาการเกิดสีด้วยการแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

1. นำกลูโคส 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

ปิเปตสารละลายกลูโคสมาตรฐาน หรือตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ทำ 2 ซ้ำ เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ปิดปากหลอดเพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ จากนั้นแช่หลอดทดลองในอ่างน้ำแข็งทันที เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ความเข้มข้น 0-1 มิลลิกรัม)

4. การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีน (Aidoo *et al.*, 1981)

การเตรียมสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์

1. สารละลาย อะซีติล อะซีโตน เป็นสารละลายอะซีติล อะซีโตน 4 เปอร์เซ็นต์ ใน 1.25 โมลาร์ Na_2Co_3 ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้
2. Erhich's reagent ละลาย พารา-ไดเมทิล ลามิโนเบนโซดีไฮด์ 1.6 กรัม ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 30 มิลลิลิตร และ เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 30 มิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์

นำตัวอย่างที่อบแห้งปริมาณ 0.25 กรัม เติมกรดไฮโดรคลอกริกเข้มข้น 5.0 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 ชั่วโมง เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใส 2.0 มิลลิลิตร เติมลงในหลอดที่มีน้ำกลั่น 1.0 มิลลิลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปรับพีเอช ของสารละลายให้เป็นกลางด้วย NaOH และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำส่วนใสไปวัดหาปริมาณกลูโคซามีน

วิธีการวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน กลูโคซามีน ไฮโดรคลอไรด์

หากราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลายมาตรฐานกลูโคซามีน ไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้นตั้งแต่ 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่สารตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรในหลอดทดสอบ เติมสารละลายอะซิติล อะซิโตน 1 มิลลิลิตร ต้มในน้ำเดือด 20 นาที เติม เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 10 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Erhich's reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 530 นาโนเมตร ถ้าตัวอย่างมีปริมาณกลูโคซามีนอยู่สูง จะต้องเจือจางให้อยู่ในช่วงที่วิเคราะห์ได้ และหาปริมาณกลูโคซามีน โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ภาคผนวก ค
ผลที่ได้จากการทดลอง

ตารางที่ 15 ผลทดสอบอัตราการรอดชีวิต (Survival rate) ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV (UV 333)

ระยะเวลาสัมผัส UV (นาที)	ระยะห่างจากหลอด UV (เซนติเมตร)	ผลการทดสอบ (3 ซ้ำ)	ผลรวมทั้งหมด
15	10	8	34
		11	
		15	
	20	11	38
		15	
		12	
	30	16	43
		13	
		14	
30	10	6	20
		5	
		9	
	20	5	18
		8	
		5	
	30	10	33
		14	
		9	
45	10	6	19
		8	
		5	
	20	6	16
		4	

		6	
	30	9	23
		6	
		8	

ตารางที่ 16 ผลทดสอบอัตราการรอดชีวิต (Survival rate) ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี EMS (EMS 132)

ระยะเวลา (นาที)	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ผลการทดสอบ (3 ซ้ำ)	ผลรวมทั้งหมด
30	100	26	66
		19	
		21	
	200	17	50
		15	
		18	
	300	17	52
		19	
		16	
	400	22	55
		18	
		15	
	500	9	27
		8	
		10	
60	100	22	72
		26	
		24	
	200	18	63
		25	
		17	

	300	19	51
		15	
		17	
	400	14	45
		16	
		15	
	500	10	31
		12	
		9	

ตารางที่ 17 ผลทดสอบอัตราการรอดชีวิต (Survival rate) ของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการใช้สองวิธีร่วมกัน (CB 135)

ระยะเวลาสัมผัสยูวี (นาที)	ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ผลการทดสอบ (3 ซ้ำ)	ผลรวมทั้งหมด
30	100	12	37
		10	
		15	
	200	5	23
		7	
		11	

ตารางที่ 18 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 สายพันธุ์ดั้งเดิม (Wild type strain) ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 6.0

pH=6.0					
Times (ชั่วโมง)	pH	Total acid (มิลลิกรัมต่อกรัม)	Total sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Reducing sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Glucosamine (มิลลิกรัมต่อกรัม)
0	6.0	0	3.800	0.970	0.017
24	5.83	25.2	2.21	0.723	0.025
48	5.65	28.8	2.294	0.719	0.025
72	6.1	32.4	2.546	0.704	0.026
96	5.06	31.5	2.451	0.645	0.027
120	5.24	28.8	2.729	0.603	0.025
144	5.13	22.5	3.231	0.576	0.024
168	5.08	15.3	3.315	0.519	0.024

ตารางที่ 19 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 สายพันธุ์ดั้งเดิม (Wild type strain) ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 7.0

pH=7.0					
Times (ชั่วโมง)	pH	Total acid (มิลลิกรัมต่อกรัม)	Total sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Reducing sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Glucosamine (มิลลิกรัมต่อกรัม)
0	7.0	0	3.534	1.485	0.014
24	6.88	25.2	2.078	0.939	0.017
48	6.41	30.6	2.346	0.837	0.017
72	6.15	27.9	2.566	0.815	0.019
96	5.92	27.9	2.755	0.816	0.02
120	5.68	23.4	3.013	0.75	0.018
144	5.4	16.2	3.1	0.528	0.018
168	5.35	13.5	3.169	0.414	0.017

ตารางที่ 20 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 สายพันธุ์ดั้งเดิม (Wild type strain) ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 8.0

pH=8.0					
Times (ชั่วโมง)	pH	Total acid (มิลลิกรัมต่อกรัม)	Total sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Reducing sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Glucosamine (มิลลิกรัมต่อกรัม)
0	8.0	0	3.910	0.985	0.011
24	7.8	19.8	2.341	0.87	0.018
48	7.65	27.9	2.598	0.869	0.021
72	7.23	25.2	2.742	0.794	0.023
96	6.28	25.2	3.011	0.729	0.026
120	6.23	20.7	3.143	0.6	0.021
144	5.2	13.5	3.496	0.446	0.02
168	5.03	10.8	3.46	0.379	0.02

ตารางที่ 21 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 สายพันธุ์ดั้งเดิม (Wild type strain) ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 9.0

pH=9.0					
Times (ชั่วโมง)	pH	Total acid (มิลลิกรัมต่อกรัม)	Total sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Reducing sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Glucosamine (มิลลิกรัมต่อกรัม)
0	9.0	0	3.700	1.542	0.018
24	8.68	18	2.9	0.882	0.021
48	8.46	22.5	2.654	0.826	0.022
72	8.04	22.5	2.94	0.802	0.019
96	7.75	22.5	3.07	0.799	0.017
120	6.54	18	3.165	0.715	0.018
144	6.14	16.2	3.231	0.551	0.017
168	6.07	13.5	3.418	0.483	0.015

ตารางที่ 22 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 สายพันธุ์ดั้งเดิม (Wild type strain) ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 10.0

pH=10.0					
Times (ชั่วโมง)	pH	Total acid (มิลลิกรัมต่อกรัม)	Total sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Reducing sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Glucosamine (มิลลิกรัมต่อกรัม)
0	10.0	0	3.088	1.666	0.017
24	9.37	19.8	1.499	0.964	0.022
48	8.75	24.3	2.357	0.85	0.024
72	7.72	24.3	2.521	0.789	0.025
96	7.31	23.4	3.098	0.722	0.026
120	6.78	20.7	3.126	0.734	0.022
144	5.58	15.3	3.19	0.529	0.022
168	5.27	13.5	3.217	0.42	0.021

ตารางที่ 23 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV (UV 333) ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 6.0

pH=6.0					
Times (ชั่วโมง)	pH	Total acid (มิลลิกรัมต่อกรัม)	Total sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Reducing sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Glucosamine (มิลลิกรัมต่อกรัม)
0	6.0	0	4.236	1.087	0.012
24	5.65	54.9	2.371	0.035	0.018
48	5.40	54	1.762	0.032	0.021
72	5.06	57.6	3.176	0.016	0.023
96	5.24	52.2	3.456	0.039	0.022
120	4.8	52.2	4.456	0.052	0.022
144	4.51	50.4	4.321	0.059	0.02
168	4.23	49.5	4.141	0.061	0.02

ตารางที่ 24 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV (UV 333) ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 7.0

pH=7.0					
Times (ชั่วโมง)	pH	Total acid (มิลลิกรัมต่อกรัม)	Total sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Reducing sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Glucosamine (มิลลิกรัมต่อกรัม)
0	7.0	0	4.341	1.068	0.010
24	6.15	44.1	2.942	0.073	0.015
48	6.88	34.2	1.131	0.033	0.019
72	6.68	50.4	3.003	0.035	0.017
96	6.41	32.2	2.733	0.065	0.02
120	6.01	31.5	3.168	0.067	0.016
144	5.98	34.2	3.866	0.064	0.017
168	5.67	32.2	3.977	0.031	0.018

ตารางที่ 25 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV (UV 333) ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 8.0

pH=8.0					
Times (ชั่วโมง)	pH	Total acid (มิลลิกรัมต่อกรัม)	Total sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Reducing sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Glucosamine (มิลลิกรัมต่อกรัม)
0	8.0	0	3.980	1.052	0.007
24	7.65	56.7	3.749	0.072	0.012
48	7.23	49.5	2.3	0.02	0.015
72	6.28	42.3	3.066	0.05	0.014
96	6.23	36.9	2.672	0.033	0.017
120	5.85	36	3.65	0.069	0.018
144	5.45	36	3.731	0.077	0.017
168	5.18	33.3	3.74	0.075	0.017

ตารางที่ 26 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV (UV 333) ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 9.0

pH=9.0					
Times (ชั่วโมง)	pH	Total acid (มิลลิกรัมต่อกรัม)	Total sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Reducing sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Glucosamine (มิลลิกรัมต่อกรัม)
0	9.0	0	3.943	1.014	0.006
24	8.96	29.7	2.006	0.018	0.011
48	8.04	35.9	3.978	0.031	0.014
72	7.75	37.8	2.52	0.044	0.015
96	6.54	35.1	3.213	0.045	0.016
120	6.3	36.9	3.349	0.101	0.019
144	6	36	3.468	0.097	0.015
168	5.89	37.8	3.801	0.101	0.013

ตารางที่ 27 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการสัมผัสรังสี UV (UV 333) ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 10.0

pH=10.0					
Times (ชั่วโมง)	pH	Total acid (มิลลิกรัมต่อกรัม)	Total sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Reducing sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Glucosamine (มิลลิกรัมต่อกรัม)
0	10.0	0	4.600	1.035	0.005
24	9.95	40.5	3.482	0.037	0.009
48	9.72	36.9	3.384	0.065	0.011
72	9.31	49.5	3.12	0.044	0.012
96	8.78	43.2	3.77	0.051	0.013
120	8.45	40.5	3.602	0.1	0.015
144	8.12	36	3.918	0.059	0.012
168	7.92	36.9	2.985	0.088	0.01

ตารางที่ 28 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี EMS (EMS 132) ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 6.0

pH=6.0					
Times (ชั่วโมง)	pH	Total acid (มิลลิกรัมต่อกรัม)	Total sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Reducing sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Glucosamine (มิลลิกรัมต่อกรัม)
0	6.0	0	4.985	3.530	0.002
24	6.19	54.9	4.404	2.055	0.004
48	4.77	58.5	4.301	1.885	0.023
72	5.21	70.2	4.506	1.67	0.085
96	4.47	68.4	4.502	1.623	0.097
120	4.21	57.6	4.418	1.781	0.103
144	4.09	47.7	4.612	1.809	0.107
168	4	43.2	4.231	1.918	0.111

ตารางที่ 29 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี EMS (EMS 132) ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 7.0

pH=7.0					
Times (ชั่วโมง)	pH	Total acid (มิลลิกรัมต่อกรัม)	Total sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Reducing sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Glucosamine (มิลลิกรัมต่อกรัม)
0	7.0	0	4.910	2.765	0.023
24	6.56	61.2	4.302	1.108	0.04
48	5.82	68.4	4.254	1.56	0.079
72	5.57	72.9	4.364	1.954	0.114
96	4.6	71.1	4.398	1.901	0.12
120	4.43	64.8	4.417	1.792	0.112
144	4.2	58.5	4.506	1.847	0.094
168	4.14	49.5	4.512	1.633	0.093

ตารางที่ 30 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี EMS (EMS 132) ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 8.0

pH=8					
Times (ชั่วโมง)	pH	Total acid (มิลลิกรัมต่อกรัม)	Total sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Reducing sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Glucosamine (มิลลิกรัมต่อกรัม)
0	8.0	0	4.900	3.560	0.118
24	7.76	54	4.109	2.12	0.127
48	6.42	55.8	4.154	2.371	0.119
72	5.81	60.3	4.199	2.458	0.077
96	5.64	58.5	4.247	2.501	0.058
120	4.3	54	4.29	2.384	0.041
144	4.7	48.6	4.317	2.311	0.035
168	4.23	45	4.239	2.262	0.023

ตารางที่ 31 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี EMS (EMS 132) ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 9.0

pH=9.0					
Times (ชั่วโมง)	pH	Total acid (มิลลิกรัมต่อกรัม)	Total sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Reducing sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Glucosamine (มิลลิกรัมต่อกรัม)
0	9.0	0	4.995	3.210	0.018
24	8.86	48.6	4.224	2.045	0.021
48	7.35	51.3	4.371	2.113	0.043
72	6.54	54	4.41	2.16	0.075
96	5.78	54.9	4.456	2.189	0.061
120	4.44	50.4	4.49	2.2	0.087
144	4.11	45	4.533	2.185	0.11
168	3.87	46.8	4.587	2.167	0.125

ตารางที่ 32 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ด้วยสารเคมี EMS (EMS 132) ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 10.0

pH=10.0					
Times (ชั่วโมง)	pH	Total acid (มิลลิกรัมต่อกรัม)	Total sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Reducing sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Glucosamine (มิลลิกรัมต่อกรัม)
0	10.0	0	4.821	2.987	0.008
24	9.53	43.2	4.167	1.487	0.012
48	8.31	40.5	4.18	1.706	0.013
72	6.82	40.5	4.209	2.139	0.012
96	6.37	43.2	4.235	2.428	0.024
120	5.34	40.5	4.314	2.602	0.028
144	4.6	37.8	4.39	2.87	0.031
168	4.27	31.5	4.481	2.87	0.031

ตารางที่ 33 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการใช้สองวิธีร่วมกัน (CB 135) ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 6.0

pH=6.0					
Times (ชั่วโมง)	pH	Total acid (มิลลิกรัมต่อกรัม)	Total sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Reducing sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Glucosamine (มิลลิกรัมต่อกรัม)
0	6.0	0	5.400	2.780	0.009
24	5.78	36.9	4.701	1.944	0.011
48	4.99	40.5	4.788	1.872	0.015
72	4.03	36	4.8	1.782	0.019
96	4.03	36.9	4.814	1.79	0.023
120	4.06	36	4.807	1.821	0.017
144	4.01	32.4	4.712	1.94	0.014
168	3.67	27	4.688	2.102	0.01

ตารางที่ 34 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการใช้สองวิธีร่วมกัน (CB 135) ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 7.0

pH=7.0					
Times (ชั่วโมง)	pH	Total acid (มิลลิกรัมต่อกรัม)	Total sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Reducing sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Glucosamine (มิลลิกรัมต่อกรัม)
0	7.0	0	5.667	4.734	0.016
24	6.47	16.2	4.684	3.32	0.019
48	6.2	18	4.664	3.271	0.018
72	5.79	16.2	4.472	3.105	0.023
96	5.55	20.7	4.388	3.1	0.02
120	5.17	18.9	4.303	3.087	0.017
144	5.16	18	4.299	3.054	0.01
168	4.53	15.3	4.21	3.002	0.003

ตารางที่ 35 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการใช้สองวิธีร่วมกัน (CB 135) ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 8.0

pH=8.0					
Times (ชั่วโมง)	pH	Total acid (มิลลิกรัมต่อกรัม)	Total sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Reducing sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Glucosamine (มิลลิกรัมต่อกรัม)
0	8.0	0	4.100	4.568	0.002
24	7.29	22.5	4.204	2.977	0.002
48	6.54	23.4	4.291	2.88	0.01
72	5.77	26.1	4.174	3.03	0.007
96	5.61	24.3	4.223	3.171	0.007
120	5.54	23.4	4.287	3.208	0.005
144	4.77	21.6	4.35	3.272	0.002
168	4.12	18	4.391	3.341	0.01

ตารางที่ 36 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการใช้สองวิธีร่วมกัน (CB 135) ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 9.0

pH=9.0					
Times (ชั่วโมง)	pH	Total acid (มิลลิกรัมต่อกรัม)	Total sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Reducing sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Glucosamine (มิลลิกรัมต่อกรัม)
0	9.0	0	5.210	3.000	0.011
24	8.64	13.5	4.286	2.972	0.013
48	7.84	15.3	4.389	2.676	0.015
72	6.57	16.2	4.391	2.406	0.01
96	5.9	16.2	4.671	2.311	0.013
120	5.54	15.3	4.802	2.552	0.011
144	4.78	13.5	4.842	2.613	0.011
168	4.56	10.8	4.87	2.694	0.009

ตารางที่ 37 ผลทดสอบการหมักแบบแข็งของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ที่ได้จากการใช้สองวิธีร่วมกัน (CB 135) ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 10.0

pH=10.0					
Times (ชั่วโมง)	pH	Total acid (มิลลิกรัมต่อกรัม)	Total sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Reducing sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Glucosamine (มิลลิกรัมต่อกรัม)
0	10.0	0	4.980	3.255	0.002
24	9.76	34.2	4.198	1.818	0.003
48	8.56	31.5	4.277	1.907	0.005
72	8.19	30.6	4.341	2.309	0.011
96	8.09	29.7	4.455	2.376	0.014
120	8.04	27.9	4.587	2.614	0.009
144	7.54	27	4.612	2.805	0.007
168	5.6	24.3	4.654	3.031	0.006

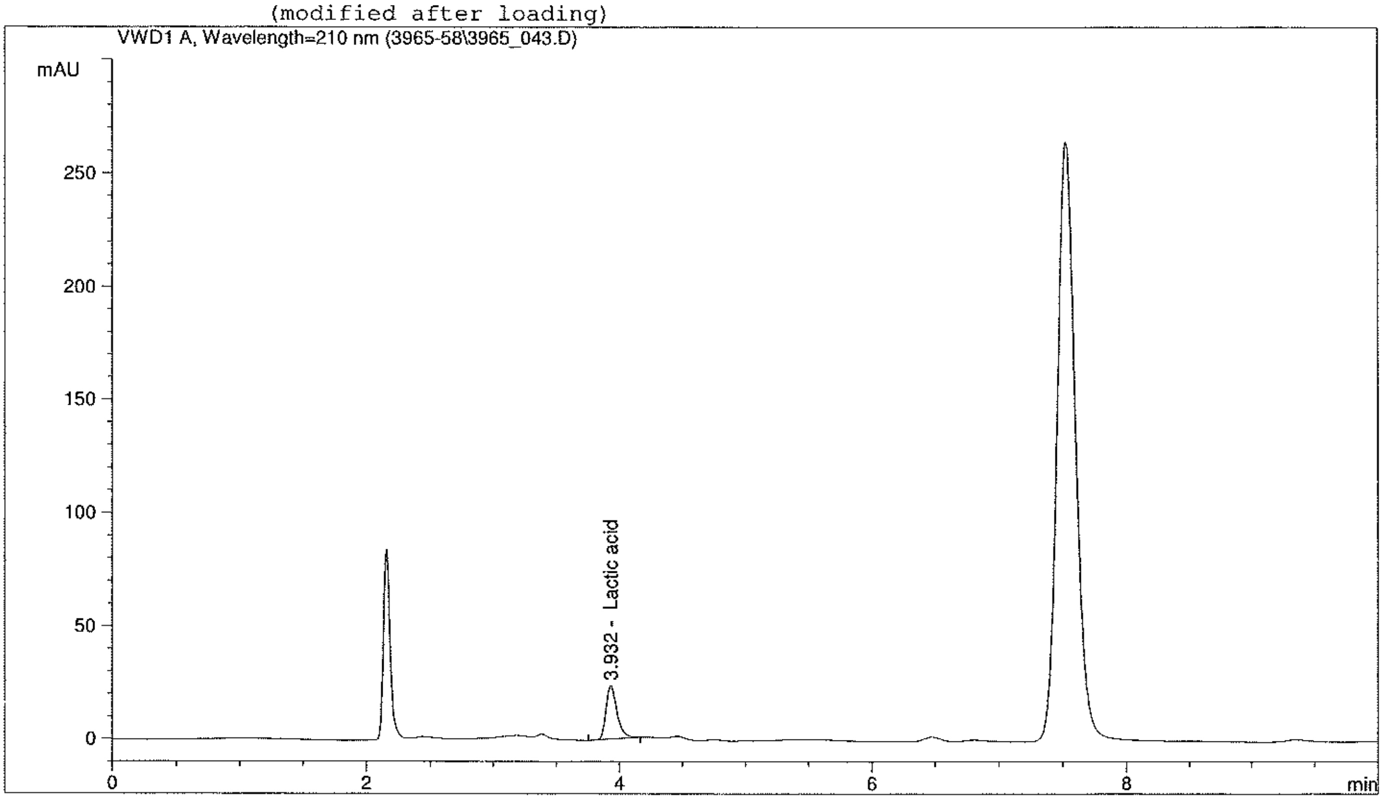
ตารางที่ 38 ผลทดสอบเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ UV 333, EMS 132 และ CB 135 ที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 6.0

UV 333				
Times (ชั่วโมง)	pH	Total sugars (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Reducing sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Glucosamine (มิลลิกรัมต่อกรัม)
ก่อนหมัก (0)	6.0	4.598	2.925	0.042
หลังหมัก (168)	4.46	4.491	2.456	0.231
EMS 132				
Times (ชั่วโมง)	pH	Total sugars (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Reducing sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Glucosamine (มิลลิกรัมต่อกรัม)
ก่อนหมัก (0)	6.0	4.328	2.543	0.029
หลังหมัก (168)	4.31	4.187	2.039	0.289
CB 135				
Times (ชั่วโมง)	pH	Total sugars (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Reducing sugar (มิลลิกรัมต่อลิตร)	Glucosamine (มิลลิกรัมต่อกรัม)
ก่อนหมัก (0)	6.0	4.804	2.963	0.085
หลังหมัก (168)	4.44	4.501	2.148	0.341

ตารางที่ 39 ปริมาณกรดแลกติกของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 กลายพันธุ์ UV 333, EMS 132 และ CB 135 วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC

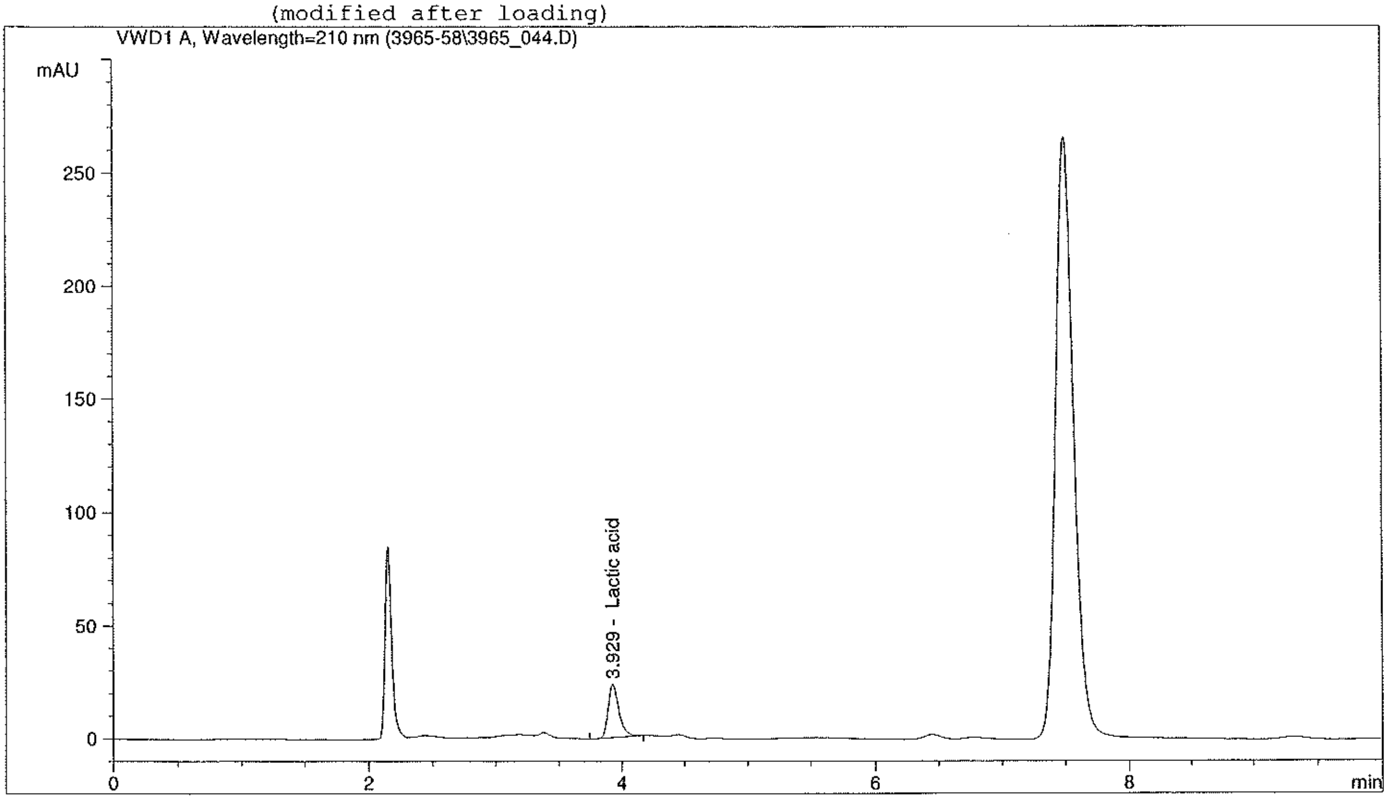
ไอโซเลท	ปริมาณกรดแลกติก
UV 333	2.932.861 ± 2.204 มิลลิกรัมต่อกรัม
EMS 132	2.743.228 ± 4.508 มิลลิกรัมต่อกรัม
CB 135	3.482.030 ± 3.171 มิลลิกรัมต่อกรัม

```
Column: HypersilODS(250x40 mm, 5um)
Flow-rate: 1.00 mL/min,injection volume: 20 uL
Column Temp.: 25 C, UV 210nm
Mobile phase:H3PO4(0.1%, v/v)

=====================================================================
Injection Date  : 10/20/2015 1:06:50 AM          Seq. Line :  17
Sample Name     : UV333X10                        Location : Vial 16
Acq. Operator   : Pimpimol                             Inj :   1
Acq. Instrument : Instrument 1                 Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\3965-58.M
Last changed    : 10/19/2015 4:36:57 PM by Pimpimol
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\3965-58C.M
Last changed    : 10/20/2015 9:42:02 AM by Pimpimol
                  (modified after loading)
```



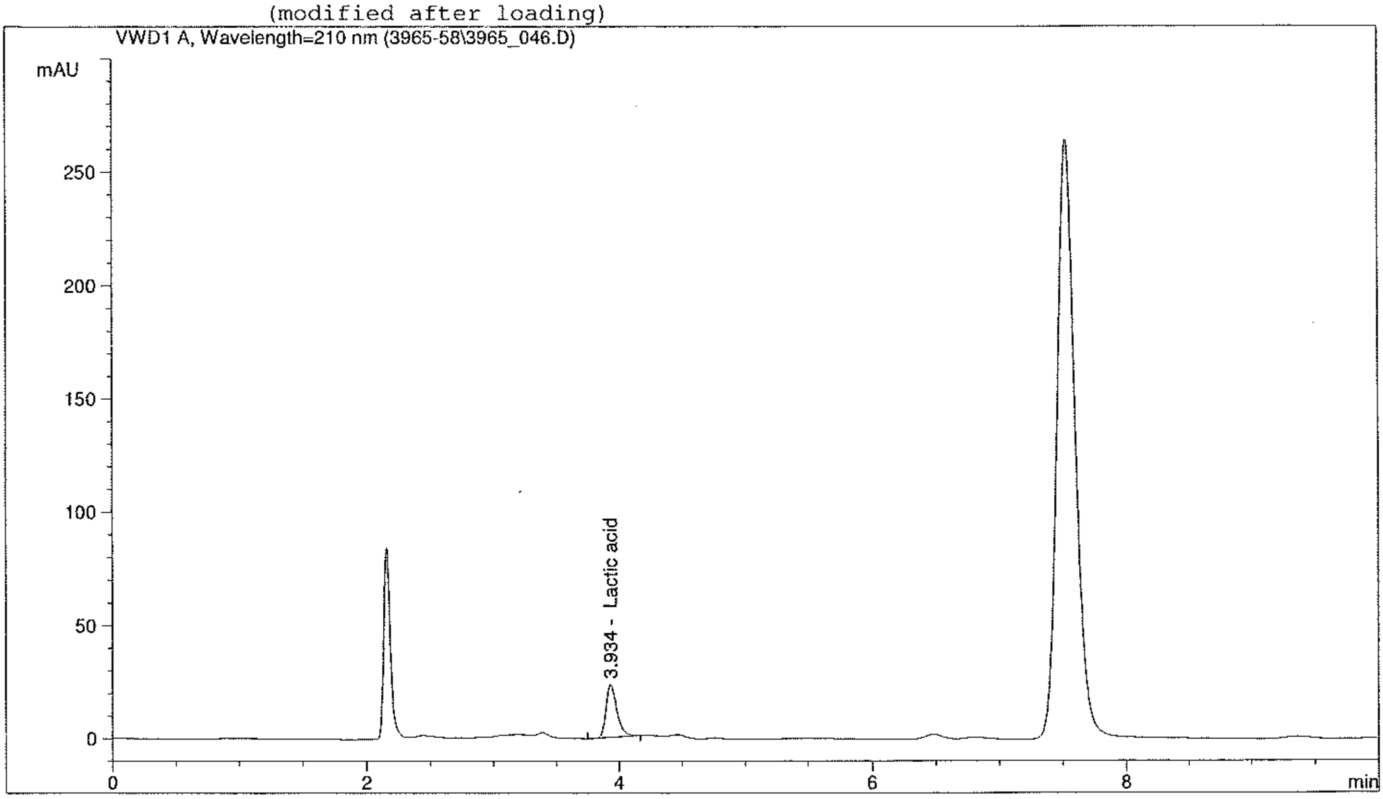
```
=====================================================================
                      External Standard Report
=====================================================================

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      10/20/2015 9:41:02 AM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=210 nm

RetTime  Type     Area     Amt/Area    Amount   Grp   Name
 [min]         mAU   *s                [mg/L]
-------|------|----------|----------|----------|--|------------------
  3.932 PB  +  139.78764    2.09749  293.20376    Lactic acid

Totals :                             293.20376

 Results obtained with enhanced integrator!
=====================================================================
                          *** End of Report ***
```

```
Column: HypersilODS(250x40 mm, 5um)
Flow-rate: 1.00 mL/min,injection volume: 20 uL
Column Temp.: 25 C, UV 210nm
Mobile phase:H3PO4(0.1%, v/v)

=====================================================================
Injection Date  : 10/20/2015 1:18:57 AM          Seq. Line :  17
Sample Name     : UV333X10                        Location : Vial 16
Acq. Operator   : Pimpimol                             Inj :   2
Acq. Instrument : Instrument 1                  Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\3965-58.M
Last changed    : 10/19/2015 4:36:57 PM by Pimpimol
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\3965-58C.M
Last changed    : 10/20/2015 9:42:02 AM by Pimpimol
                  (modified after loading)
```



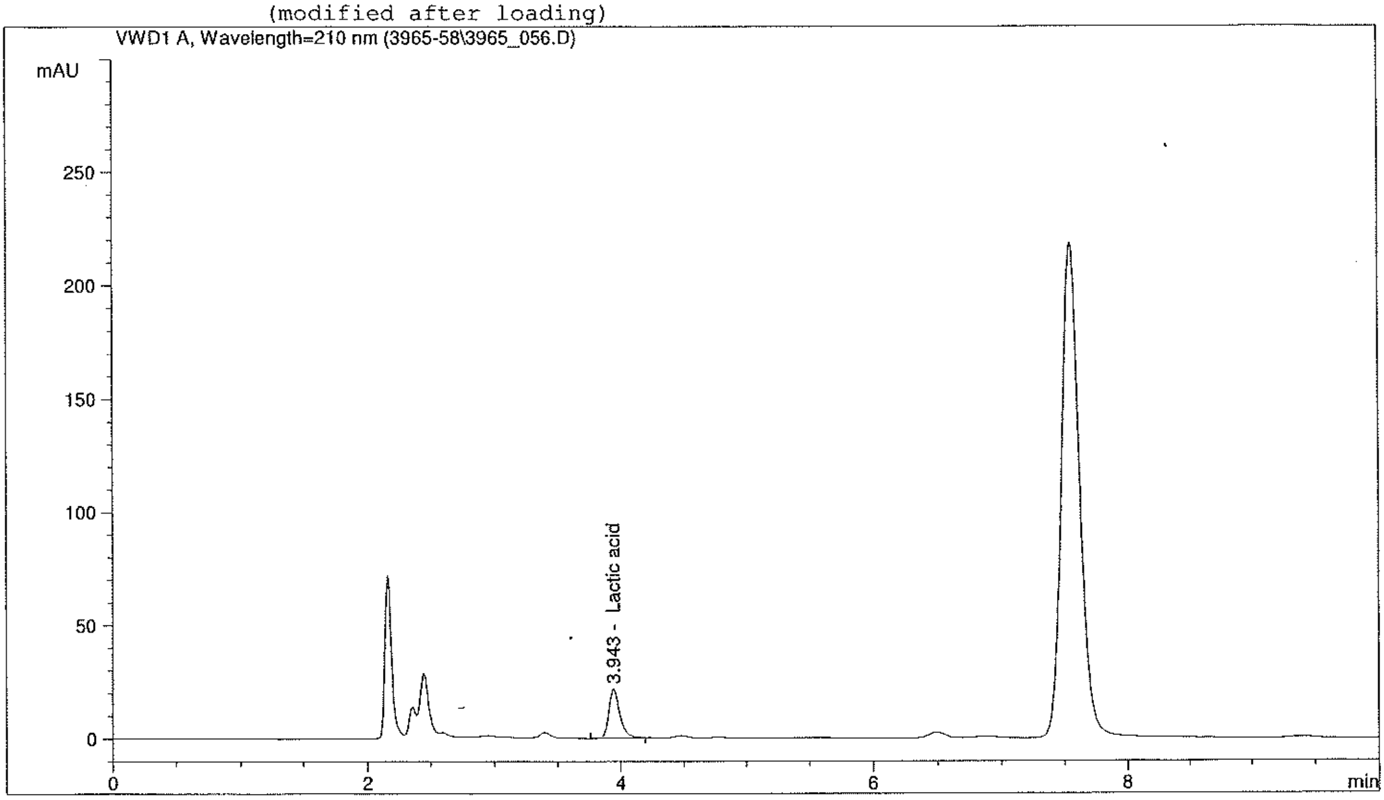
```
=====================================================================
                    External Standard Report
=====================================================================

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      10/20/2015 9:41:02 AM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=210 nm

RetTime  Type     Area     Amt/Area    Amount   Grp   Name
 [min]         mAU   *s                [mg/L]
-------|------|----------|----------|----------|--|------------------
  3.929 PBA +  139.94800    2.09746  293.53577    Lactic acid

Totals :                             293.53577

 Results obtained with enhanced integrator!
=====================================================================
                       *** End of Report ***
```

```
Column: HypersilODS(250x40 mm, 5um)
Flow-rate: 1.00 mL/min,injection volume: 20 uL
Column Temp.: 25 C, UV 210nm
Mobile phase:H3PO4(0.1%, v/v)

=====================================================================
Injection Date  : 10/20/2015 1:43:04 AM          Seq. Line :  17
Sample Name     : UV333X10                        Location : Vial 16
Acq. Operator   : Pimpimol                             Inj :   4
Acq. Instrument : Instrument 1                  Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\3965-58.M
Last changed    : 10/19/2015 4:36:57 PM by Pimpimol
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\3965-58C.M
Last changed    : 10/20/2015 9:42:02 AM by Pimpimol
                  (modified after loading)
```



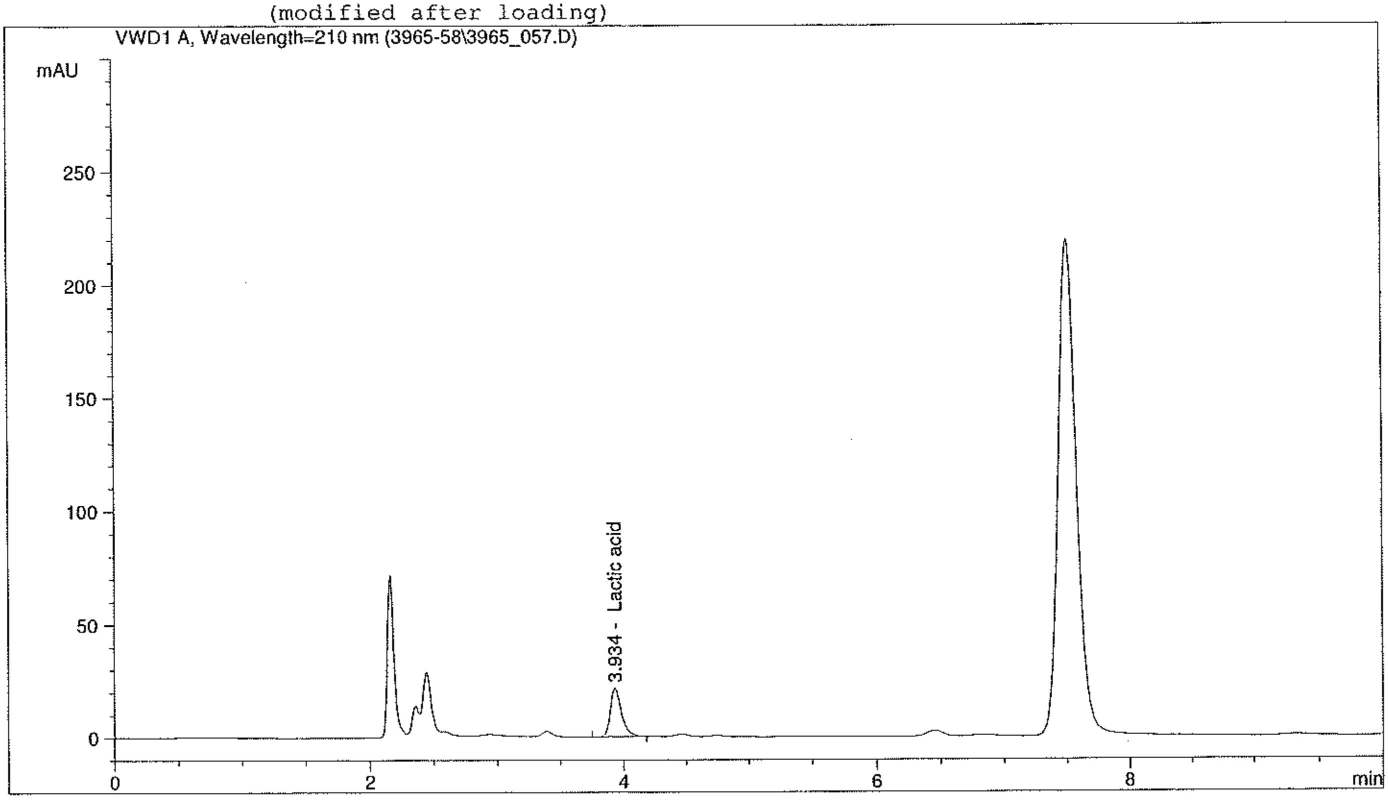
```
=====================================================================
                      External Standard Report
=====================================================================

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      10/20/2015 9:41:02 AM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=210 nm

RetTime  Type     Area      Amt/Area     Amount    Grp   Name
 [min]          mAU   *s                 [mg/L]
-------|------|----------|----------|----------|--|------------------
  3.934 PB  +  139.74657    2.09750  293.11871    Lactic acid

Totals :                             293.11871

 Results obtained with enhanced integrator!
=====================================================================
                        *** End of Report ***
```

```
Column: HypersilODS(250x40 mm, 5um)
Flow-rate: 1.00 mL/min,injection volume: 20 uL
Column Temp.: 25 C, UV 210nm
Mobile phase:H3PO4(0.1%, v/v)

=====================================================================
Injection Date  : 10/20/2015 3:44:28 AM          Seq. Line :  20
Sample Name     : EMS132X10                       Location : Vial 19
Acq. Operator   : Pimpimol                             Inj :   2
Acq. Instrument : Instrument 1                  Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\3965-58.M
Last changed    : 10/19/2015 4:36:57 PM by Pimpimol
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\3965-58C.M
Last changed    : 10/20/2015 9:42:02 AM by Pimpimol
                  (modified after loading)
```



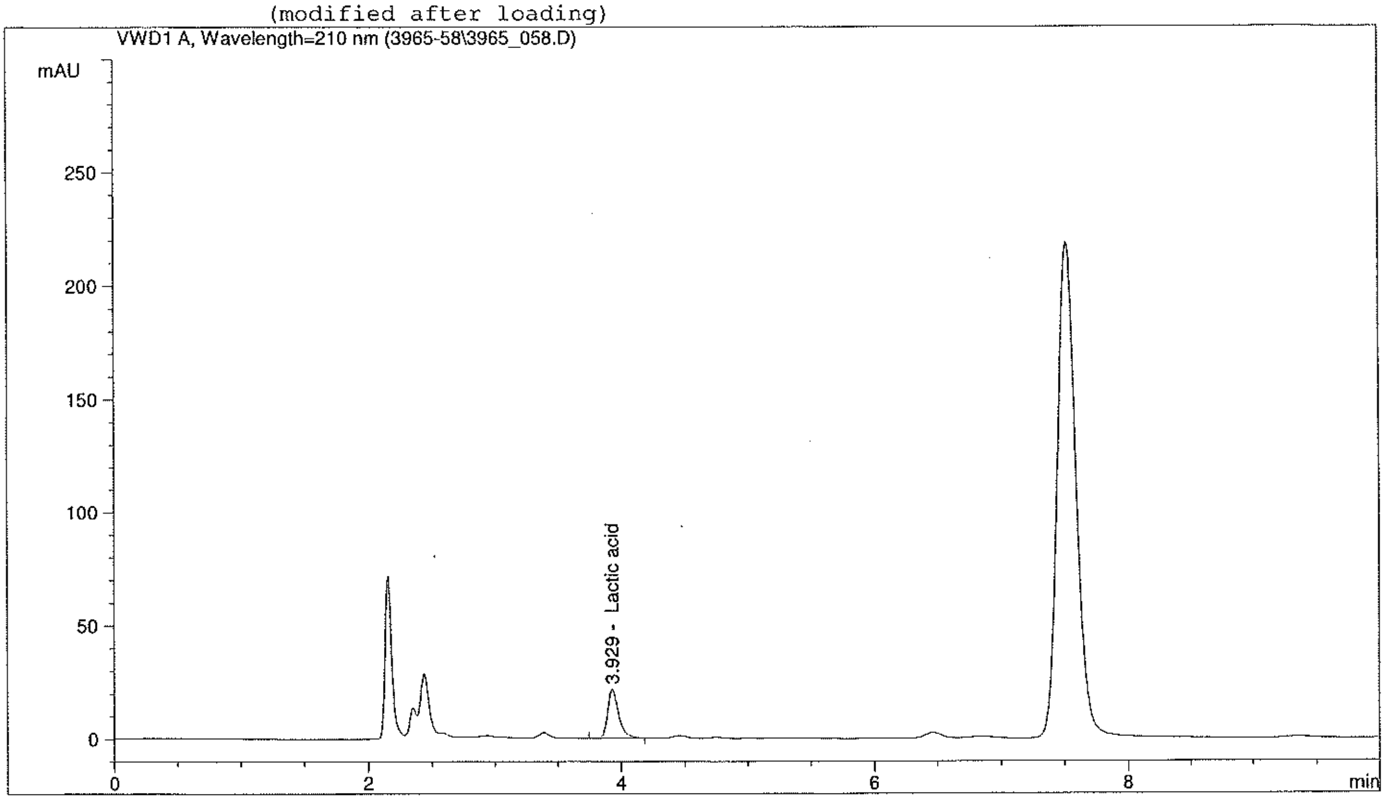
```
=====================================================================
                      External Standard Report
=====================================================================

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      10/20/2015 9:41:02 AM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=210 nm

RetTime  Type     Area     Amt/Area    Amount    Grp   Name
 [min]         mAU   *s                [mg/L]
-------|------|----------|----------|----------|--|------------------
  3.943 PB  +  130.53416    2.09941  274.04452     Lactic acid

Totals :                             274.04452

 Results obtained with enhanced integrator!
=====================================================================
                       *** End of Report ***
```

```
Column: HypersilODS(250x40 mm, 5um)
Flow-rate: 1.00 mL/min,injection volume: 20 uL
Column Temp.: 25 C, UV 210nm
Mobile phase:H3PO4(0.1%, v/v)

=====================================================================
Injection Date  : 10/20/2015 3:56:41 AM          Seq. Line :  20
Sample Name     : EMS132X10                       Location : Vial 19
Acq. Operator   : Pimpimol                             Inj :  3
Acq. Instrument : Instrument 1                  Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\3965-58.M
Last changed    : 10/19/2015 4:36:57 PM by Pimpimol
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\3965-58C.M
Last changed    : 10/20/2015 9:42:02 AM by Pimpimol
                  (modified after loading)
```



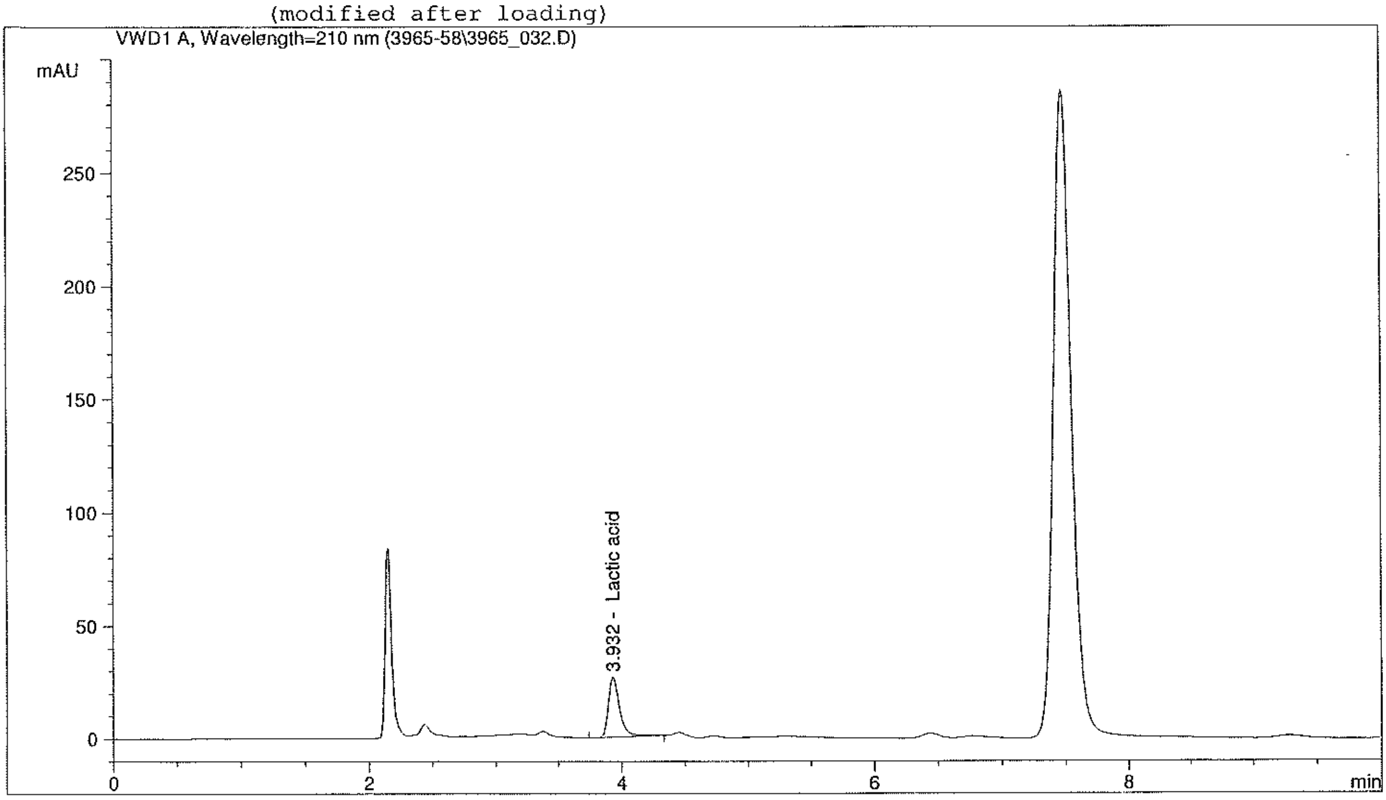
```
=====================================================================
                    External Standard Report
=====================================================================

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      10/20/2015 9:41:02 AM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=210 nm

RetTime  Type     Area      Amt/Area     Amount   Grp   Name
 [min]         mAU    *s                 [mg/L]
-------|------|----------|----------|----------|--|------------------
  3.934 PB  +  130.55173    2.09940  274.08088    Lactic acid

Totals :                             274.08088

 Results obtained with enhanced integrator!
=====================================================================
                      *** End of Report ***
```

```
Column: HypersilODS(250x40 mm, 5um)
Flow-rate: 1.00 mL/min,injection volume: 20 uL
Column Temp.: 25 C, UV 210nm
Mobile phase:H3PO4(0.1%, v/v)

=====================================================================
Injection Date  : 10/20/2015 4:08:52 AM          Seq. Line :  20
Sample Name     : EMS132X10                       Location : Vial 19
Acq. Operator   : Pimpimol                             Inj :   4
Acq. Instrument : Instrument 1                  Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\3965-58.M
Last changed    : 10/19/2015 4:36:57 PM by Pimpimol
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\3965-58C.M
Last changed    : 10/20/2015 9:42:02 AM by Pimpimol
                  (modified after loading)
```



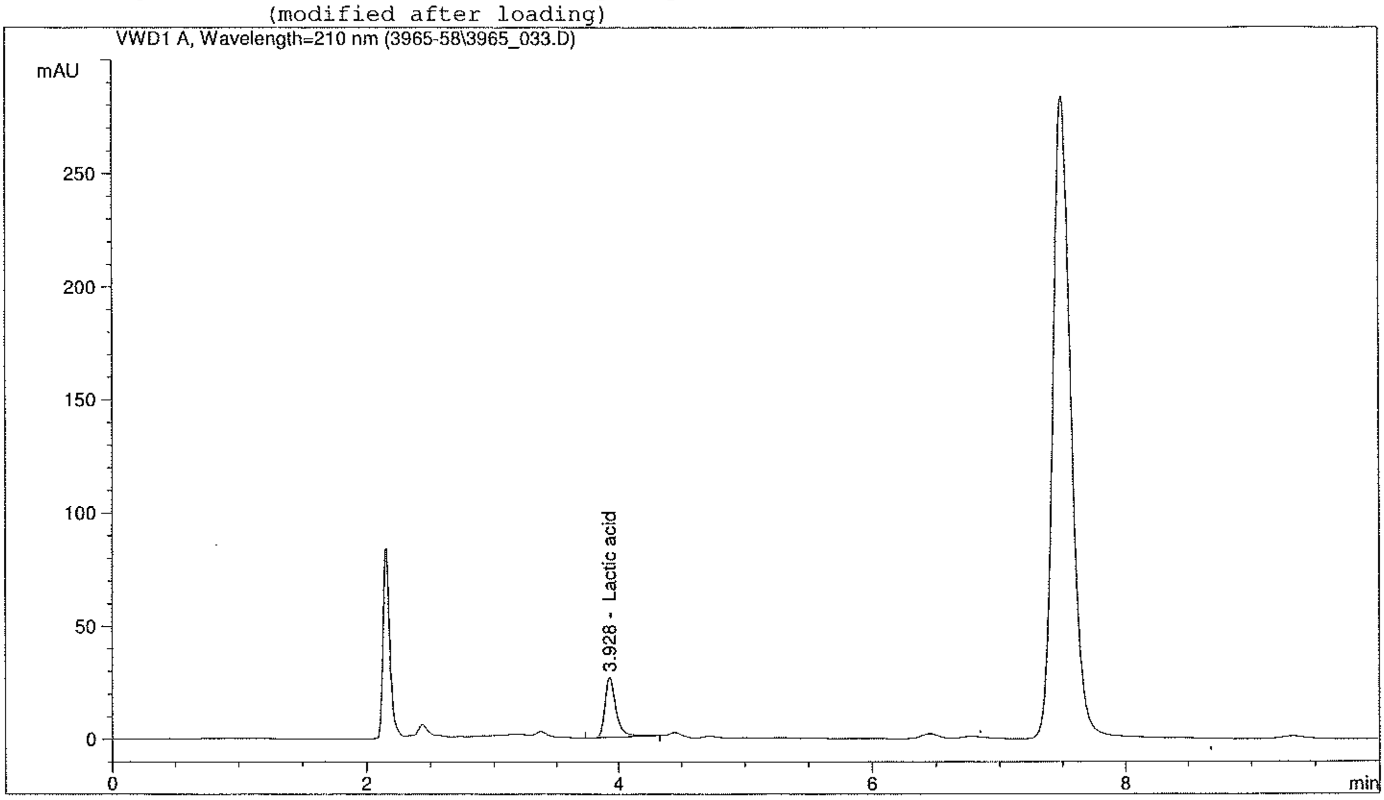
```
=====================================================================
                      External Standard Report
=====================================================================

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      10/20/2015 9:41:02 AM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=210 nm

RetTime  Type     Area      Amt/Area     Amount    Grp   Name
 [min]         mAU   *s                  [mg/L]
-------|------|----------|----------|----------|--|------------------
  3.929 PB  +   130.91977    2.09932  274.84291    Lactic acid

Totals :                              274.84291

 Results obtained with enhanced integrator!
=====================================================================
                        *** End of Report ***
```

```
Column: HypersilODS(250x40 mm, 5um)
Flow-rate: 1.00 mL/min,injection volume: 20 uL
Column Temp.: 25 C, UV 210nm
Mobile phase:H3PO4(0.1%, v/v)

=====================================================================
Injection Date   : 10/19/2015 10:53:54 PM          Seq. Line :  14
Sample Name      : CB135X10                         Location : Vial 13
Acq. Operator    : Pimpimol                              Inj :   2
Acq. Instrument  : Instrument 1                   Inj Volume : 20 µl
Acq. Method      : C:\HPCHEM\1\METHODS\3965-58.M
Last changed     : 10/19/2015 4:36:57 PM by Pimpimol
Analysis Method  : C:\HPCHEM\1\METHODS\3965-58C.M
Last changed     : 10/20/2015 9:42:02 AM by Pimpimol
                   (modified after loading)
```



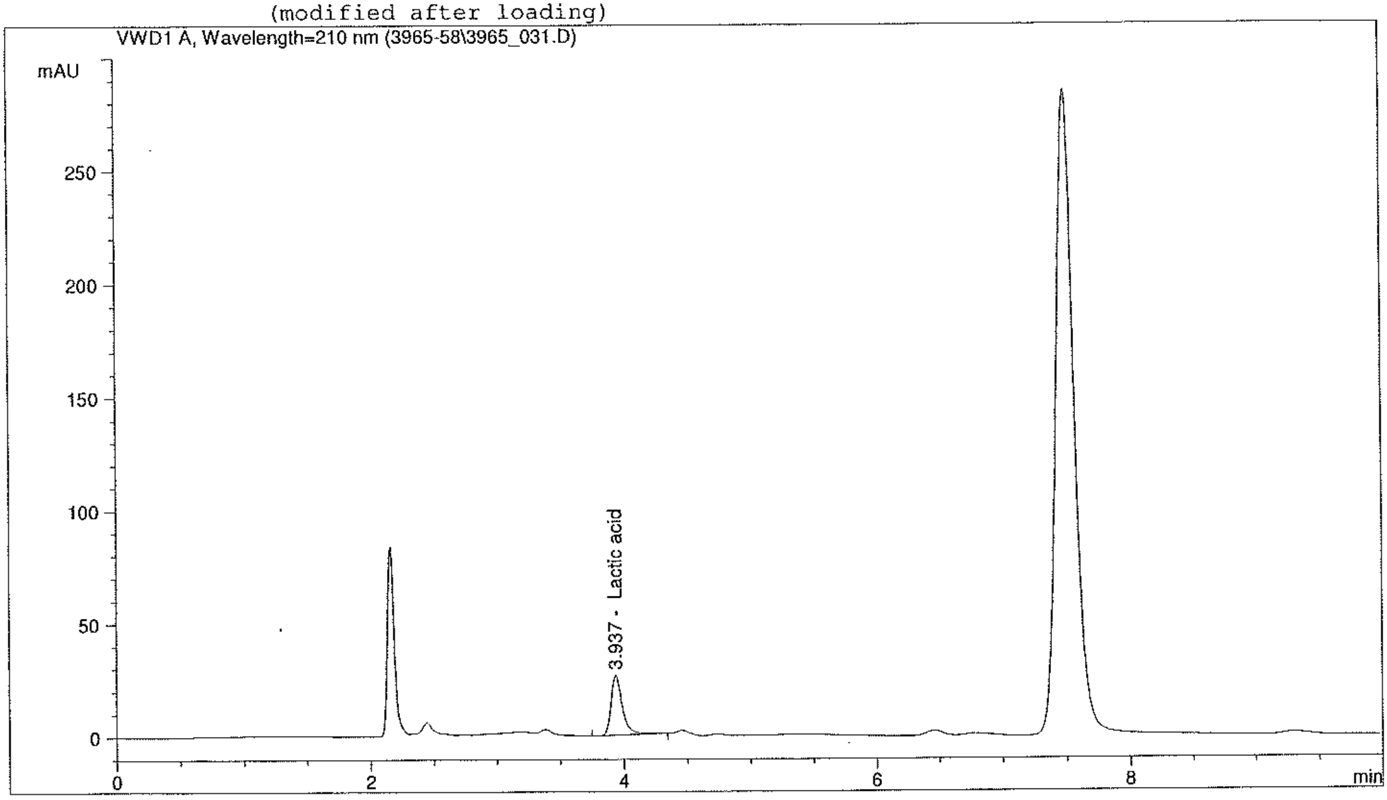
```
=====================================================================
                      External Standard Report
=====================================================================

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      10/20/2015 9:41:02 AM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=210 nm

RetTime  Type     Area      Amt/Area     Amount    Grp   Name
 [min]          mAU    *s               [mg/L]
-------|------|----------|----------|----------|--|-----------------
  3.932 PB  +  166.17628    2.09321  347.84119    Lactic acid

Totals :                             347.84119

 Results obtained with enhanced integrator!
=====================================================================
                       *** End of Report ***
```

```
Column: HypersilODS(250x40 mm, 5um)
Flow-rate: 1.00 mL/min,injection volume: 20 uL
Column Temp.: 25 C, UV 210nm
Mobile phase:H3PO4(0.1%, v/v)

=====================================================================
Injection Date  : 10/19/2015 11:06:03 PM         Seq. Line :  14
Sample Name     : CB135X10                        Location : Vial 13
Acq. Operator   : Pimpimol                             Inj :   3
Acq. Instrument : Instrument 1                  Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\3965-58.M
Last changed    : 10/19/2015 4:36:57 PM by Pimpimol
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\3965-58C.M
Last changed    : 10/20/2015 9:42:02 AM by Pimpimol
                  (modified after loading)
```



```
=====================================================================
                    External Standard Report
=====================================================================

Sorted By                 :      Signal
Calib. Data Modified      :      10/20/2015 9:41:02 AM
Multiplier                :      1.0000
Dilution                  :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=210 nm

RetTime  Type     Area      Amt/Area     Amount    Grp   Name
 [min]         mAU    *s                 [mg/L]
-------|------|----------|----------|----------|--|------------------
  3.928 PB  +   166.46173    2.09317  348.43220    Lactic acid

Totals :                              348.43220

 Results obtained with enhanced integrator!
=====================================================================
                       *** End of Report ***
```

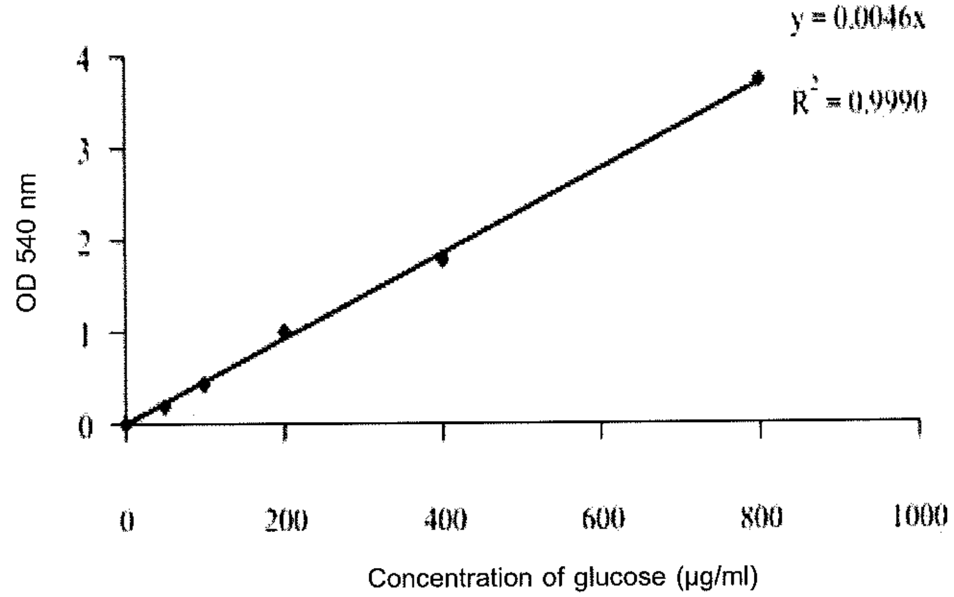
```
Column: HypersilODS(250x40 mm, 5um)
Flow-rate: 1.00 mL/min,injection volume: 20 uL
Column Temp.: 25 C, UV 210nm
Mobile phase:H3PO4(0.1%, v/v)

=====================================================================
Injection Date  : 10/19/2015 10:41:48 PM        Seq. Line :  14
Sample Name     : CB135X10                       Location : Vial 13
Acq. Operator   : Pimpimol                            Inj :   1
Acq. Instrument : Instrument 1                 Inj Volume : 20 µl
Acq. Method     : C:\HPCHEM\1\METHODS\3965-58.M
Last changed    : 10/19/2015 4:36:57 PM by Pimpimol
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\3965-58C.M
Last changed    : 10/20/2015 9:42:02 AM by Pimpimol
                  (modified after loading)
```



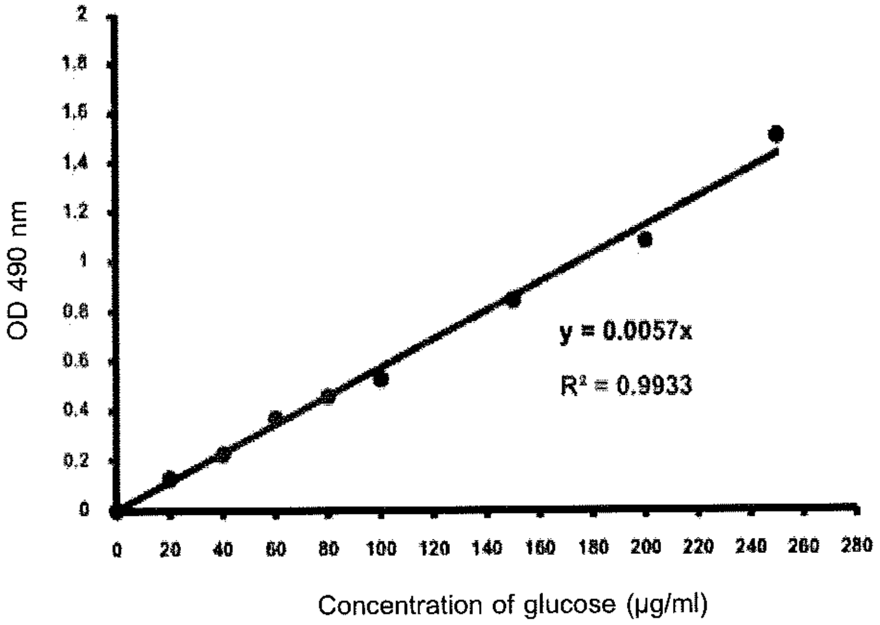
```
=====================================================================
                      External Standard Report
=====================================================================

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      10/20/2015 9:41:02 AM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Do not use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: VWD1 A, Wavelength=210 nm

RetTime  Type     Area      Amt/Area     Amount    Grp   Name
 [min]          mAU   *s                 [mg/L]
-------|------|----------|----------|----------|--|------------------
  3.937 PB  +   166.41512    2.09317  348.33569    Lactic acid

Totals :                              348.33569

 Results obtained with enhanced integrator!
=====================================================================
                       *** End of Report ***
```

ภาคผนวก ง

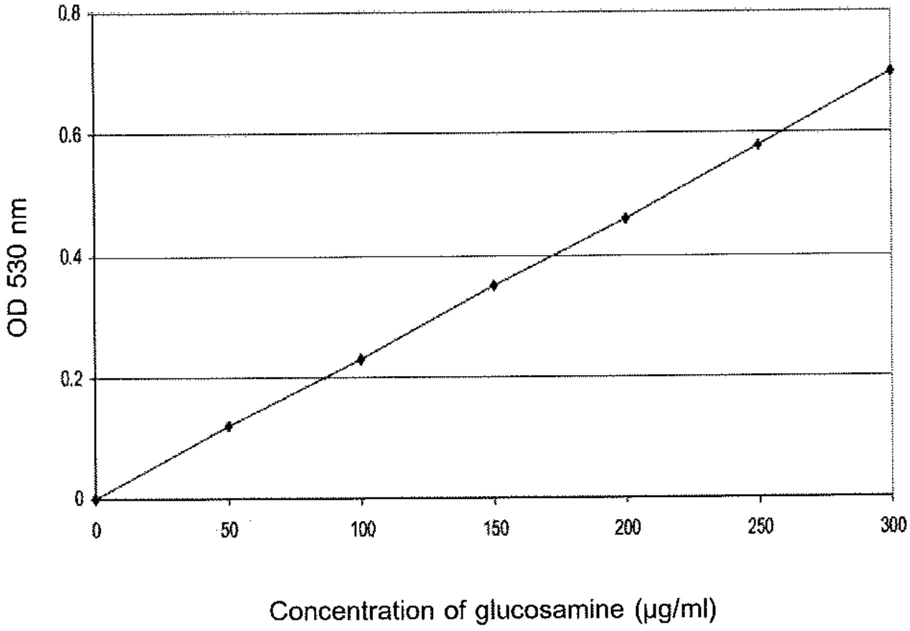
กราฟมาตรฐาน



รูปที่ 28 กราฟมาตรฐานของ Reducing sugar โดยวิธี DNS



รูปที่ 29 กราฟมาตรฐานของ Total sugars โดยวิธี Phenol-sulfuric acid



รูปที่ 30 กราฟมาตรฐานของ Glucosamine (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ภาคผนวก จ

การหมักแบบแข็ง (Solid state fermentation)

รูปที่ 31 การหมักแบบแข็งโดยใช้ถาด (Solid state fermentation on tray)

รูปที่ 32 การเจริญของเชื้อรา *Rhizopus oryzae* C018 บนวัสดุหมัก

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวซัฟรา หะยีหะมะ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5610220019

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาราชภัฏสุราษฎร์ธานี	2555

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา)

ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Saffra Hayihama and Wilailak Suwazono. 2558. The Use of *Rhizopus* sp. mutant for Lactic Acid Production by Solid State Fermentation การประชุมวิชาการนานาชาติ มหาวิทยาลัยขอนแก่น Fervaap 2015 The 6th International conference on fermentation technology value added agricultural products, 29-31 กรกฎาคม 2558, หน้า 336-340.