การผลิตกรดแอล(+)แลกติกจากกากมันสำปะหลังโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae*

นางสาวปริฉัตร พฤกษะวัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

L(+)-LACTIC ACID PRODUCTION FROM CASSAVA PULP BY *Rhizopus oryzae*

Miss Parichat Phrueksawan

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตกรดแอล(+)แลกติกจากกากมันสำปะหลังโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae*
โดย	นางสาวปริฉัตร พฤกษะวัน
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร. ณัฏฐา ทองจุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร. ศรินทิพ สุกใส

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร. ณัฏฐา ทองจุล)

.... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ ดร. ศรินทิพ สุกใส)

.... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์)

.... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ ดร. สุวัฒนา พฤกษะศรี)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริฉัตร พฤกษะวัน : การผลิตกรดแอล(+)แลกติกจากกากมันสำปะหลังโดยเชื้อรา *Rhizopus oryzae*. (L(+)-LACTIC ACID PRODUCTION FROM CASSAVA PULP BY *Rhizopus oryzae*) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อาจารย์ ดร.ณัฏฐา ทองจุล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อาจารย์ ดร. ศรินทิพ สุกใส, 131 หน้า.

ในงานวิจัยศึกษาการผลิตกรดแอลแลกติกจากกากมันสำปะหลังโดยรา *R. oryzae* NRRL 395 โดยการหมักแบบอาหารแข็งระดับขวดเขย่า โดยศึกษาผลของค่าความเป็นกรด-ด่าง (มีและไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0) ความเร็วรอบการเหวี่ยง (0 80 และ 150 รอบต่อนาที) และเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่เติมเสริม (40 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์) ใส่ลงไปในกากมันสำปะหลังที่ใช้สำหรับการหมัก พบว่า ภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ รอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 ให้ผลผลิตกรดแลกติกสูงที่สุด (206.20 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น) การเพิ่มเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่เติมเสริมส่งผลให้มีการผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับภาวะที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง และการเพิ่มรอบการเหวี่ยง นอกจากนี้พบว่า การควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 ช่วยส่งเสริมการทำงานของอะไมเลสที่ราสร้างขึ้นเพื่อใช้ในการย่อยแป้งในกากมันสำปะหลัง ทำให้ปริมาณแป้งที่เหลืออยู่ในกากมันสำปะหลังที่ชั่วโมงการหมักสิ้นสุดน้อยกว่าในภาวะที่ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 การเติมยูเรียที่ความเข้มข้นสูงๆ (0.3 และ0.5 กรัมต่อลิตร) ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการทำงานของกลูโคอะไมเลสเพิ่มขึ้น ในส่วนการทดลองการเติมเอนไซม์ ได้แก่ กลูโคอะไมเลส (3.85 และ 7.70 ยูนิตต่อกรัมแห้งกากกมันเริ่มต้น) และเซลลูเลส (45 92.50 และ 182.50 ยูนิตต่อกรัมแห้งกากมันเริ่มต้น) ลงไปเพื่อช่วยให้มีการผลิตกรดแลกติกสูงขึ้น พบว่า การเติมกลูโคอะไมเลส 3.85 ยูนิตร่วมกับเซลลูเลส 45 ยูนิต(ต่อกรัมแห้งกากมันเริ่มต้น)เพิ่มลงไป ช่วยเพิ่มปริมาณผลผลิตกรดแลกติกสูงสุด คือ 463.18 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น เมื่อเทียบกับการหมักภาวะอื่นๆ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เพียงพอต่อการย่อยแป้งและเซลลูโลสในกากมันสำปะหลังที่ใช้สำหรับการหมักผลิตกรดแลกติก ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นว่าในการหมักแบบอาหารแข็งเมื่อมีการเสริมกลูโคอะไมเลสและเซลลูเลสลงไป ขั้นตอนในการเปลี่ยนกลูโคสเป็นกรดแลกติกเป็นขั้นตอนที่ควบคุมอัตราการผลิตกรดแลกติกโดยรา *R. oryzae*

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต ปริฉัตร พฤกษะวัน

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ณัฏฐา ทองจุล

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ศรินทิพ สุกใส

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

507 23487 23 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORDS: LACTIC ACID/*Rhizopus oryzae*/SOLID STATE FERMENTATION

PARICHAT PHRUEKSAWAN : L(+)-LACTIC ACID PRODUCTION FROM CASSAVA PULP BY *Rhizopus oryzae*. THESIS ADVISOR : NUTTHA THONGCHUL,Ph.D., THESIS CO-ADVOSOR : SARINTIP SOOKSAI,Ph.D., 131 pp.

L-lactic acid production from cassava pulp by solid culture of *Rhizopus oryzae* NRRL 395 was studied in a shaken flask. The effects of pH (controlled at 6.0 and without pH control), shaking speed (without shaking, 80 rpm, and 150 rpm), and additional free water (40%, 60%, and 80% of initial total weight) added into the solid substrate on lactic acid production were investigated. The highest lactic acid production (206.20 mg per initial dry weight of cassava pulp) was obtained when the solid cassava pulp was humidified by free water (80% of initial dry weight of pulp). The culture was shaken at 80 rpm, and the pH was controlled at 6.0. Increasing the amount of free water content and the shaking speed as well as controlling the culture pH at 6.0 led to an increase in lactic acid production. Additionally, pH control at 6.0 promoted amylases that were secreted by *R. oryzae* to hydrolyze starch in cassava pulp which eventually led to the less amount of starch remained in the pulp at the end of the cultivation when compared with the culture without pH control. More cell biomass was found while less lactic acid was produced when urea (0.3 and 0.5 g/L) was added into the cassava pulp substrate. In addition, more glucoamylase was secreted and higher starch hydrolysis rate was observed when more nitrogen was present. The extra commercial enzymes including cellulase (45, 92.50, and 182.50 U/g initial dry pulp) and glucoamylase (3.85 and 7.70 U/g initial dry pulp) added into the solid state culture helped enhance lactic acid production. The maximum lactic acid production of 463.18 mg/g initial dry pulp was obtained when 45 U of cellulase and 3.85 U of glucoamylase (per g initial dry pulp) were added into the solid pulp substrate. This result evidently indicated that such the amount of enzymes were sufficient for starch and cellulose hydrolysis for use in lactic acid production. This implied that lactic acid production by *R. oryzae* was the rate controlling step in the solid state culture when extra enzymes were present.

Field of Study : Biotechnology Student's Signature : ....

Academic Year : 2010 Advisor's Signature : ....

Co-advisor's Signature : ....

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจากอาจารย์ ดร. ณัฏฐา ทองจุล ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและ อาจารย์ ดร. ศรินทิพ สุกใส อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ซึ่งได้ให้แนวความคิด คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยรวมทั้งตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ ผู้วิจัยขอขอบ พระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์ และอาจารย์ ดร. สุวัฒนา พฤกษะศรี ที่กรุณาเข้าร่วมเป็นกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์และช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณะผู้บริหารและบุคคลากรทุกท่านในสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือและความสะดวกในด้านอุปกรณ์ สถานที่และสารเคมีในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ที่ให้ความช่วยเหลือทั้งด้านวิชาการและการปฏิบัติการในห้องปฏิบัติการตลอดการทำวิจัย

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่สนับสนุนค่าใช้จ่ายด้านสารเคมีที่ใช้ปฏิบัติการในงานวิจัยนี้

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณคุณพ่อเป็นอย่างสูง ที่สนับสนุนด้านการเงินในการศึกษาทุกๆด้าน ขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้กำลังใจ คำปลอบใจ และการเข้าใจเรื่องต่างๆ ตลอดในช่วงเวลาการศึกษา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย		ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		จ
กิตติกรรมประกาศ		ฉ
สารบัญ		ช
สารบัญตาราง		ญ
สารบัญภาพ		ฏ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ		ณ
บทที่		
1	บทนำ	1
	1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	5
	1.3 ขอบเขตงานวิจัย	5
	1.4 วิธีดำเนินการวิจัย	6
	1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
	2.1 กรดแลกติก	7
	2.2 ประโยชน์ของกรดแลกติก	9
	2.3 การผลิตกรดแลกติก	10
	2.3.1 กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี	10
	2.3.2 การผลิตกรดแลกติกด้วยกระบวนการหมักโดยแบคทีเรีย	12
	2.3.3 การผลิตกรดแลกติกด้วยกระบวนการหมักโดยรา	13
	2.4 ลักษณะและวิถีเมแทบอลิซึมของ *Rhizopus oryzae*	16
	2.5 การหมักแบบอาหารแข็ง	19
	2.5.1 จุดเด่นของการหมักแบบอาหารแข็ง	26
	2.5.2 การหาปริมาณเซลล์ทางอ้อม	31
	2.5.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ในการหมักแบบอาหารแข็ง	33
	2.6 กากมันสำปะหลัง	37

บทที่		หน้า
	2.6.1 โครงสร้างของแป้ง	38
	2.6.2 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยโมเลกุลของแป้ง	39
	2.6.3 ส่วนประกอบอื่นๆของไฟเบอร์ ในกากมันสำปะหลัง	40
	2.7 ถังหมักสำหรับการหมักแบบอาหารแข็ง	42
3	อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	50
	3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	50
	3.1.1 วัสดุอุปกรณ์	50
	3.1.2 สารเคมี	51
	3.2 จุลินทรีย์และการเตรียมกล้าเชื้อ	52
	3.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย	52
	3.2.2 วิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์	52
	3.2.3 การเตรียมกล้าเชื้อในระยะ Conidia	52
	3.3 สูตรอาหารที่ใช้ในการหมัก	54
	3.3.1 อาหารสำหรับการงอกของสปอร์	54
	3.3.2 อาหารสำหรับกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง	54
	3.4 วิธีดำเนินการวิจัย	54
	3.4.1 ผลของปริมาณน้ำที่เติมเสริมลงในอาหารแข็ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และรอบการเหวี่ยง	55
	3.4.2 การศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน	55
	3.4.3 ศึกษาผลเชิงบวกของการเสริมเซลลูเลสและกลูโคอะไมเลสในการหมักกรดแลกติกบนกากมันสำปะหลังต่อจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมัก	56
	3.5 วิธีการวิเคราะห์	57
	3.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก กรดฟูมาริก เอทานอล ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่องเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC)	57
	3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณแอลฟา – อะไมเลส	57
	3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคอะไมเลส	58
	3.5.4 การวิเคราะห์ปริมาณแป้งที่เหลืออยู่ในกากมันสำปะหลัง	58
	3.5.5 การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ทางอ้อม	58

บทที่		หน้า
4	ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	60
	4.1 เปรียบเทียบปริมาณน้ำที่เติมเสริมในอาหารแข็ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และรอบการเหวี่ยง	60
	4.2 การหมักโดยเติมแหล่งไนโตรเจน	77
	4.3 ศึกษาอิทธิพลของกลูโคอะไมเลสและเซลลูเลส	87
5	สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	97
รายการอ้างอิง		99
ภาคผนวก		119
ภาคผนวก ก		120
ภาคผนวก ข		124
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์		131

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คุณสมบัติของกรดแลกติก..	8
2.2	ผลิตภัณฑ์สารอินทรีย์ สารชีวภาพ และอื่นๆ ที่ได้จากการหมักแบบบนอาหารแข็ง..	24
2.3	เอนไซม์ที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง..................................	25
2.4	แสดงข้อดีและข้อเสียของกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง............................	29
2.5	5 เปรียบเทียบผลผลิตไซลาเนสจากกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งกับอาหารเหลวของรา 34 สายพันธุ์..	30
2.6	การประยุกต์ใช้การหมักแบบอาหารแข็งในทางชีวภาพ..................................	36
2.7	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้ถังหมักชนิดต่างๆ...............	47
3.1	แสดงปัจจัยกายภาพและทางเคมีที่ศึกษาต่อต่อจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแอล(+)แลกติกจากกากมันสำปะหลัง..	54
3.2	แสดงภาวะในการหมักที่มีการเสริมกลูโคอะไมเลส (glucoamylase) และเซลลูเลส (cellulase) ต่อจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแอล(+)แลกติกจากกากมันสำปะหลัง..	55
ข.1	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดแลกติกและเอทานอลกับกลูโคส และปริมาณน้ำหมักที่เก็บได้หลังจากการนำไปปั่นเหวี่ยงแยกส่วนของเหลวออกจากของแข็ง	125
ข.2	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลกับน้ำหนักแห้งของกากมันหลังการหมัก...	126
ข.3	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณแอลฟา-อะไมเลสและปริมาณน้ำหมักที่เก็บได้หลังจากการนำไปปั่นเหวี่ยงแยกส่วนของเหลวออกจากของแข็งกับน้ำหนักแห้งของกากมันหลังการหมัก...	127
ข.4	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณกลูโคอะไมเลสและปริมาณน้ำหมักที่เก็บได้หลังจากการนำไปปั่นเหวี่ยงแยกส่วนของเหลวออกจากของแข็งกับน้ำหนักแห้งของกากมันหลังการหมัก...	128
ข.5	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณชีวมวลที่ได้หลังการหมัก....	129

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของกรดดี (-)-และแอล (-)-แลกติก..	7
2.2	เปรียบเทียบการผิตกรดแลกติกจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีและกระบวนการหมัก..	12
2.3	เมแทบอลิซึมการผลิตกรดแลกติกแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟด้วยวิถี glycolysis, Embden-Meyerhof-Parnas...	15
2.4	ลักษณะของรา *Rhizopus oryzae* ที่เจริญอยู่บนอาหารสังเคราะห์.................	16
2.5	ลักษณะอับสปอร์และสปอร์ของรา *R. oryzae*...	16
2.6	ลักษณะทางสัณฐานของรา..	17
2.7	กระบวนการเมแทบอลิซึมของกลูโคสในรา *R. oryzae*..................................	19
2.8	โครงสร้างของอะไมโลส (amylose)..	38
2.9	โครงสร้างของอะไมโลเพติน (amylopectin)...	39
2.10	ถังหมักแบบคอลัมน์ (column reactor)...	43
2.11	ถังหมักแบบ Koji-type reactor..	44
2.12	ถังหมักแบบ packed-bed..	45
2.13	ถังหมักแบบ Fluidised bed...	46
2.14	ถังหมักแบบ rotating drum..	47
3.1	ลักษณะของ Haemacytometer...	53
4.1	ลักษณะการเจริญของ *R. oryzae* บนกากมันสำปะหลัง ที่ชั่วโมงที่ 0 12 และ 24 ในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 เปอร์เซ็นต์ (แถวบน) 60 เปอร์เซ็นต์ (แถวกลาง) และ 80 เปอร์เซ็นต์ (แถวล่าง)..	61
4.2	ลักษณะการเจริญของ *R. oryzae* ที่ปกคลุมทั่วกากมัน ในภาวะการเลี้ยงแบบไม่มีการเขย่า..	61
4.3	ลักษณะการเจริญของ *R. oryzae* บนกากมันสำปะหลัง ที่ชั่วโมงที่ 168 ในภาวะที่ไม่มีการเขย่า (แถวบน) กับในภาวะที่ 150 รอบต่อนาที (แถวล่าง).........	61
4.4	แสดงปริมาณชีวมวล ณ เวลาใดๆ ของ *R. oryzae* ในภาวะการเลี้ยงต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส...	62
4.5	จลนพลศาสตร์การผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังโดยแปรเปอร์เซ็นต์ปริมารน้ำที่เติมเสริมและความเร็ว	

	รอบการเหวี่ยง มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส......	64
4.6	จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลัง ที่ความเร็วรอบการเหวี่ยง 0 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส A คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 เปอร์เซ็นต์ B คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 60 เปอร์เซ็นต์ C คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์......	65
4.7	จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลัง ที่ความเร็วรอบการเหวี่ยง 150 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส A คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 เปอร์เซ็นต์ B คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 60 เปอร์เซ็นต์ C คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์......	66
4.8	จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลัง ที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส......	67
4.9	จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลัง ที่ความเร็วรอบการเหวี่ยง 0 รอบต่อนาที ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส A คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 เปอร์เซ็นต์ B คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 60 เปอร์เซ็นต์ C คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์......	69
4.10	จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลัง ที่ความเร็วรอบการเหวี่ยง 150 รอบต่อนาที ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส A คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 เปอร์เซ็นต์ B คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 60 เปอร์เซ็นต์ C คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์......	70
4.11	จลนพลศาสตร์การผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังโดยแปรเปอร์เซ็นต์ปริมารน้ำที่เติมเสริมและความเร็วรอบการเหวี่ยง มีและไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส......	71

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.12 แอคติวิตีของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ *R. oryzae* ผลิตขึ้นในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 0 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.. 73
4.13 แอคติวิตีของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ *R. oryzae* ผลิตขึ้นในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 150 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.. 74
4.14 แอคติวิตีของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ *R. oryzae* ผลิตขึ้นในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 0 รอบต่อนาที ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.................................. 75
4.15 แอคติวิตีของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ *R. oryzae* ผลิตขึ้นในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 150 รอบต่อนาที ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส........................... 76
4.16 จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทธานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่านาทีควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 เติมยูเรียเข้าไป A คือ 0.1 กรัมต่อลิตร B คือ 0.3 กรัมต่อลิตร C คือ 0.5 กรัมต่อลิตร.. 78
4.17 จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติก และเอทธานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 สารสกัดยีสต์เข้าไป A คือ 0.1 กรัมต่อลิตร B คือ 0.3 กรัมต่อลิตร C คือ 0.5 กรัมต่อลิตร.. 79
4.18 ปริมาณชีวมวลของ *R. oryzae* ในภาวะการเลี้ยงที่ไม่มีและมีแหล่งไนโตรเจนได้แก่ยูเรีย และสารสกัดยีสต์ที่ความเข้มข้นต่างๆ... 80
4.19 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลง ในระหว่างการหมักที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน.. 82

4.20 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลง ในระหว่างการหมักที่มีสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน........ 83
4.21 แสดงจลนพลศาสตร์การผลิตกรดแลกติกในภาวะที่ไม่มีและมีแหล่งไนโตรเจน.. 84
4.22 แสดงการผลิตกลูโคอะไมเลสและอะไมเลสของ *R. oryzae* ในภาวะที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน........ 85
4.23 แสดงการผลิตกลูโคอะไมเลสและอะไมเลสของ *R. oryzae* ในภาวะที่มีสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน........ 86
4.24 จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เติมกลูโคอะไมเลสในอาหารแข็ง A คือ 3.85 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น B คือ 7.70 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น........ 88
4.25 จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เติมเซลลูเลสในอาหารแข็ง A คือ 45 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น B คือ 92.5 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น C คือ 182.5 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น........ 89
4.26 จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เติมกลูโคอะไมเลส 3.85 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้นร่วมกับเซลลูเลส 45 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น........ 90
4.27 จลนพลศาสตร์การผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสโดยมีการเสริมกลูโคอะไมเสลและเซลลูเลสเข้าไป........ 91

4.28	แอคติวิตีของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ *R. oryzae* ผลิตขึ้นในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสโดยมีการเสริมกลูโคอะไมเลส 3.85และ 7.70 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้นเข้าไป......................................	92
4.29	แอคติวิตีของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ *R. oryzae* ผลิตขึ้นในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสโดยมีการเสริมเซลลูเลส 45 92.5 และ 182.5 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้นเข้าไป..	93
4.30	แอคติวิตีของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ *R. oryzae* ผลิตขึ้นในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสโดยมีการเสริมกลูโคอะไมเสล 3.85 และ เซลลูเลส 45 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้นเข้าไป.........................	94
4.31	แสดงปริมาณชีวมวลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสโดยมีการเสริมกลูโคอะไมเสลและเซลลูเลสเข้าไป.....................	95
4.32	ลักษณะการเจริญเติบโตของรา *R. oryzae* ในภาวะที่มีการเติมอะไมเลสในอาหารแข็ง (แถวบน) เปรียบเทียบกับภาวะที่ไม่มีการเติมอะไมเลส (แถวล่าง)...	96
ก.1	กราฟมาตรฐานกลูโคส..	120
ก.2	กราฟมาตรฐานกลูโคอะไมเลส..	121
ก.3	กราฟมาตรฐานกลูโคซามีน..	123

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	เปอร์เซ็นต์
ml	มิลลิลิตร
L	ลิตร
mg	มิลลิกรัม
g	กรัม
g/L	กรัมต่อลิตร
w/v	น้ำหนักต่อปริมาตร
h	ชั่วโมง
M	โมลาร์
U	หน่วยของเอนไซม์
g/g	กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมซับสเตรท
rpm	รอบต่อนาที

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กรดแลกติก($C_3H_6O_3$) เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร นอกจากนั้น อนุพันธ์ของกรดแลกติกหลายชนิดได้นำมาใช้ในอุตสาหกรรมเคมี สิ่งทอ และด้านเภสัชกรรม นอกจากนี้ จากงานวิจัยเบื้องต้น พบว่ากรดแลกติกซึ่งผลิตได้จากการหมัก (Bio-based) สามารถใช้เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์สารเคมีและพอลิเมอร์ได้หลายชนิด เช่น พอลิเอสเทอร์ (Polyester) อิพอกไซด์ (Epoxides) พอลิแอคริลิกแอซิด (Polyacrylic acid) รวมทั้งพอลิแลกติกแอซิด (polylactic acid) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ (Biodegradable) และยังเข้ากันได้ดีกับร่างกาย (Biocompatible) (Yu และ Hang, 1989; Tay และ Yang, 2000; Thongchul และ Yang, 2003; Thongchul, 2005; lactic, 2010 : online ; purac, 2010 : online) ในปัจจุบันได้มีการนำกรดแลกติกมาใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิแลกติกแอซิด เพื่อทดแทนพลาสติกจากปิโตรเคมี ทำให้แนวโน้มความต้องการและราคาในตลาดโลกเพิ่มขึ้น ในปี พ.ศ.2546 มีรายงานว่าปริมาณการผลิตกรดแลกติกทั่วโลกประมาณ 100,000 ตันต่อปี (Skory, 2004)

กรดแลกติกสามารถผลิตได้ 2 วิธี คือ กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีและกระบวนการหมัก ซึ่งพบว่ากระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีนั้นกรดแลกติกที่ผลิตได้จะอยู่ในรูปไอโซเมอร์ผสม (Racemic mixture) และใช้ภาวะรุนแรงในกระบวนการสังเคราะห์ก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Narayanan และคณะ, 2004) อีกทั้งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตยังมาจากปิโตรเคมี ซึ่งในปัจจุบันมีราคาสูงขึ้นเรื่อยๆ (Kadam และคณะ, 2005) สำหรับการผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมักนั้นสามารถใช้ได้ทั้งแบคทีเรียและรา ในส่วนของแบคทีเรียนิยมใช้แบคทีเรียแลกติกชนิดโฮโมเฟอร์เมนเททีฟซึ่งจะใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งผลิตกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์เพียงอย่างเดียว ตัวอย่างของแบคทีเรียชนิดโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ เช่น *Lactobacillus* sp.และ *Lactococcus* sp. เป็นต้น ซึ่งพบว่าแบคทีเรียพวกโฮโมเฟอร์เมนเททีฟสามารถเจริญเติบโตได้ในระยะเวลาสั้น ให้ผลผลิตกรดแลกติกในปริมาณสูง (Thomas และคณะ, 1979) และกระบวนการหมักสามารถทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน ในงานวิจัยของ Michelson และคณะ (2006) พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Lactis* DSM 20073 ให้อัตราการผลิตกรดแลกติกสูงถึง 9.9 และ 5.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ ในการหมักแบบแบตช์โดยใช้สารอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส 126 กรัมต่อลิตร Yeast autolysate 185.7 มิลลิลิตรต่อลิตร KH_2PO_4 0.25 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 0.024 กรัมต่อลิตร $MgCl_2$ 0.03 กรัมต่อลิตร $MgSO_4{\cdot}7H_2O$

0.08 กรัมต่อลิตร และ Microelements solution 2.3 มิลลิลิตรต่อลิตร และจากงานวิจัยของ ของ Rojan และคณะ (2005) พบว่า แบคทีเรีย *Lactobacillus casei* NCIMB 3254 ให้ผลผลิตกรดแลกติกสูงถึง 2.9 กรัมต่อ 5 กรัมของกากอ้อยเริ่มต้น ซึ่งคิดเป็นการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแลกติก 97 เปอร์เซ็นต์ ณ ภาวะที่มีความชื้น 72 เปอร์เซ็นต์ ในการหมักบนอาหารแข็งโดยใช้กากอ้อยเป็นตัวค้ำจุนสำหรับให้แบคทีเรียเจริญ และเสริมน้ำแป้งมันสำปะหลังที่ถูกย่อยด้วยแอลฟา-อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส (คิดเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 3 กรัม) แต่เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องการไวตามินและกรดอะมิโนหลายชนิดในการเจริญและไม่สามารถใช้พวกแป้งได้โดยตรงเนื่องจากไม่มีเอนไซม์ที่จะใช้ในการย่อย อีกทั้งยังพบว่ากรดแลกติกที่ได้จากแบคทีเรียพวกโฮโมเฟอร์เมนเททีฟนั้นอยู่ในรูปของไอโซเมอร์ผสมหรือกรดแอล (+) และดี (-) แลกติกทำให้เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมักจึงต้องแยกไอโซเมอร์ผสมของกรดแลกติกให้บริสุทธิ์ก่อนนำไปใช้ในการผลิตพอลิแลกติกแอซิดเพราะในการสังเคราะห์พลาสติกชีวภาพจำเป็นต้องใช้ไอโซเมอร์บริสุทธิ์ของกรดแลกติก เพื่อให้ได้พลาสติกที่มีคุณภาพ ในส่วนของการหมักด้วยรานั้น ราที่สามารถผลิตกรดแลกติกเป็นราในจีนัส *Rhizopus Mucor* และ *Monilia* ซึ่งในการผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้ *R. oryzae* เนื่องจากสามารถผลิตกรดแอลแลกติกบริสุทธิ์จากแป้ง น้ำตาล รวมทั้งวัสดุการเกษตรที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบรวมทั้งกากน้ำตาลซึ่งมีราคาถูก เนื่องจากรามีอะไมเลสที่สามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล (Wee และคณะ, 2006) และไม่ต้องการไวตามินและกรดอะมิโนเสริมในกระบวนการหมัก ทำให้กระบวนการหมักด้วย *R. oryzae* มีต้นทุนการผลิตทั้งด้านวัตถุดิบและกระบวนการแยกบริสุทธิ์หลังกระบวนการหมักที่ต่ำกว่าการหมักด้วยแบคทีเรีย เนื่องจากเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้นทำให้มีนักวิจัยหลายกลุ่มให้ความสนใจที่จะนำ *R. oryzae* มาใช้ในกระบวนการผลิตกรดแลกติก (Hang และคณะ, 1989; Park และคณะ, 1998; Sun และคณะ, 1999; Bai และคณะ, 2003; Martak และคณะ, 2003; Lin และคณะ, 2007)

รามีการดำรงชีพแบบ saprophyte คือ หลั่งเอนไซม์ออกนอกเซลล์ เพื่อย่อยสลายสารอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่และซับซ้อนให้ได้เป็นโมเลกุลที่เล็กที่สุดแล้วจึงดูดซับเข้าไปภายในเซลล์ และในธรรมชาตินั้นพบว่าราส่วนมากชอบที่จะเจริญเติบโตบนอาหารที่มีลักษณะค่อนข้างแข็งที่มีปริมาณความชื้นเล็กน้อยที่เพียงพอต่อขบวนการเมแทบอลิซึม ราก็สามารถที่จะเจริญได้ จากลักษณะทางธรรมชาติดังกล่าว ทำให้มีนักวิจัยหลายกลุ่มสนใจศึกษาการนำรามาใช้ประโยชน์ในการผลิตเอนไซม์ต่างๆ โดยใช้วัตถุดิบทางการเกษตรมาเป็นแหล่งอาหาร ด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง เนื่องจากมีภาวะที่ราชอบในการเจริญเติบโตและความสามารถในการสร้างเอนไซม์แล้วหลั่งออกมานอกเซลล์ ทำให้ช่วยลดขั้นตอนในการแปรสภาพวัตถุดิบ เช่น ขั้นตอนในการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์หรือกรดก่อนนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักส่งผลให้

การผลิตผลิตภัณฑ์มีต้นทุนที่ต่ำลง และยังเป็นเทคโนโลยีที่มีต้นทุนต่ำ ใช้ปริมาณน้ำน้อย ผลิตภัณฑ์ที่เก็บเกี่ยวได้มีความเข้มข้นมากกว่าการหมักแบบอาหารเหลว ทำให้ลดขั้นตอนการทำให้ผลิตภัณฑ์เข้มข้นก่อน ใช้พลังงานต่ำ และยังเกิดของเสียน้อยด้วย อาหารที่ใช้ในกระบวนการหมักมีองค์ประกอบที่ไม่ซับซ้อนและหาได้ง่ายอีกทั้งสามารถเป็นสารอาหารและเป็นแหล่งที่ราเกาะติดได้โดยตรง ดังตัวอย่างงานวิจัยของ Akapan และ Adelaja (2004) ที่ศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดย *Aspergillus oryzae* จากรำข้าว ซึ่งเสริมด้วยแป้งมันสำปะหลัง โปรตีนถั่วเหลือง KH_2PO_4 $MgSO_4.7H_2O$ $ZnSO_4.7H_2O$ กากถั่วลิสง สารสกัดจากยีสต์ และ $CaCO_3$ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง พบว่า ในอาหารแข็งที่ประกอบด้วยรำข้าว 10 กรัม แป้งมันสำปะหลัง 1 กรัม และ โปรตีนถั่วเหลือง 3 กรัม ให้ผลผลิตของอะไมเลสสูงสุดที่ 634 ± 2.26 ยูนิตต่อกรัม จากผลการทดลองสรุปได้ว่า เมื่อเติมแป้งมันสำปะหลัง และโปรตีนถั่วเหลืองลงไปในอาหารจะช่วยเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์ได้

Gutarra และคณะ (2005) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิ ปริมาณแหล่งอาหาร ได้แก่ น้ำมันมะกอก กากน้ำตาล สารสกัดจากข้าวโพด และสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตไลเปสในการหมักแบบอาหารแข็ง Babassu cake โดย *Penicillium simplicissimum* ในถังหมักแบบ Tray-type bioreactor และ Packed-bed bioreactor พบว่าน้ำมันมะกอก และกากน้ำตาลสามารถช่วยเพิ่มผลผลิตของเอนไซม์ได้ เมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณความชื้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณแหล่งคาร์บอน 6.25 เปอร์เซ็นต์ พบว่าในถังหมักแบบ Packed-bed bioreactor ให้ผลผลิตมากกว่าในถังหมักแบบ Tray-type bioreactorจากงานวิจัยของ Patidar และคณะ (2005) พบว่าปัจจัยที่ควบคุมการผลิตไคติเนส (Chitinase) โดย *Beauveria feline* RD 101 ด้วยการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้รำข้าวสาลีเป็นตัวค้ำจุนและแหล่งคาร์บอน ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ขนาดของกล้าเชื้อ และความชื้นของตัวค้ำจุน Shakar และ Mulimani (2007) เปรียบเทียบการผลิตแอลฟากาแลคโทซิเดส (α-Galactosidase) โดย *Aspergillus oryzae* แบบอาหารแข็งชนิดต่างๆ ได้แก่ Red gram plant waste รำข้าวสาลี รำข้าวเจ้า Chickpea plant waste Red gram flour Red gram husk เปลือกสับปะรด เปลือกแอปเปิล เปลือกส้ม Groundnut cake กากน้ำตาล และ Carob pod พบว่าเมื่อใช้ Red gram plant waste เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับรำข้าวเจ้า สามารถให้ผลผลิตเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 4.37±0.11 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้งของแหล่งคาร์บอนการหมักแบบอาหารแข็ง

Sun และ Xu (2008) ได้ศึกษาการปัจจัยต่างๆ ภายใต้ภาวะการหมักแบบอาหารแข็งที่มีผลต่อการผลิต whole-cell synthetic lipase (WCSL) โดยรา *Rhizopus chinensis* ใช้แป้งสาลีผสมกับรำข้าวสาลี ในอัตราส่วน 3 ต่อ 2 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) โดยใช้สารละลายที่ประกอบด้วย

(หน่วยน้ำหนักต่อน้ำหนัก) $K_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ 0.2 กรัม และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 กรัม เป็นตัวกำหนดปริมาณความชื้น พบว่า ซับสเตรททั้งสองสนับสนุนการเจริญเติบโตของราและการสร้างเอนไซม์ได้ดี โดยมีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดอยู่ที่ 24447 ยูนิตต่อกิโลกรัมซับสเตรท ที่ปริมาณความชื้น 70 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5 โดยมีการเติมเปปโทนเสริมเข้าไป 2 เปอร์เซ็นต์ ในหน่วยน้ำหนักต่อน้ำหนัก และเติมน้ำมันมะกอกเป็นตัวชักนำ ไป 2 เปอร์เซ็นต์ ในหน่วยปริมาตรต่อน้ำหนัก (inducer) หลังจากเพาะเลี้ยงไป 72 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณที่มากกว่าในเลี้ยงในภาวะที่มีแต่ซับสเตรทอย่างเดียว ถึง 15.27 เท่า

นอกจากจะนำไปใช้ในกระบวนการผลิตเอนไซม์อย่างแพร่หลายแล้ว ยังมีนักวิจัยบางกลุ่มสนใจนำไปใช้ในการผลิตเคมีภัณฑ์ ดังเช่น Oda (2002) ศึกษาการหมักกรดแลกติกแบบอาหารแข็ง พบว่า *R. oryzae* IFO 4707 ให้ผลผลิตกรดแลกติกสูงสุด 10 มิลลิกรัมต่อกรัมแหล่งคาร์บอนดิบ ภายใน 6 วัน โดยแหล่งคาร์บอนที่ศึกษา ได้แก่ กากมันฝรั่งซึ่งประกอบด้วยแป้ง เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และเพคติน โดย *R. oryzae* IFO 4707 สร้างอะไมเลสเพื่อย่อยกากมันฝรั่งได้อย่างรวดเร็วโดยเปลี่ยนแป้งในกากเป็นกลูโคสแล้วนำไปผลิตกรดแอล(+)แลกติกได้ภายใน 1 วัน สังเกตได้จากค่าความเป็นกรด-ด่างที่ลดลง นอกจากนี้ จากการศึกษาส่วนประกอบต่างๆ ในกากมันฝรั่งก่อนและหลังหมัก พบว่า ปริมาณแป้งในกากมันฝรั่งเริ่มต้นที่ 33.4 เปอร์เซ็นต์มวลแห้งถูกนำไปใช้อย่างต่อเนื่อง จนเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักมีปริมาณแป้งเหลืออยู่ในกากมันฝรั่งเพียง 7.6 เปอร์เซ็นต์มวลแห้ง ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 77.25 ของปริมาณแป้งที่ถูกนำไปใช้ต่อปริมาณแป้งเริ่มต้น จากงานวิจัยของ Soccol (1994) พบว่า *R. oryzae* NRRL 395 สามารถผลิตกรดแอล(+)แลกติกได้สูงสุด 1.44 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยทำการหมักบนกากอ้อยที่มีสารละลายกลูโคสและ $CaCO_3$ ใน glass column reactor ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่อัตราการให้อากาศ 1.21 กรัมต่อชั่วโมงต่อคอลัมน์ เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักในอาหารเหลวในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในอาหารที่มีองค์ประกอบ (ต่อลิตร) ได้แก่ กลูโคส 120 กรัม $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 กรัม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 กรัม $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04 กรัม ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 125 กรัมต่อลิตรต่อนาที อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าได้ผลผลิตของกรดแอล(+)แลกติกน้อยกว่า (1.38 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

Ruengruglikit และ Hang (2003) ศึกษาการผลิตกรดแอล(+)แลกติกแบบอาหารแข็งจากซังข้าวโพด (corncobs) ที่ผ่านการย่อยด้วย 0.1 N NaOH (ซังข้าวโพด 5 กรัมต่อ 0.1 N NaOH 100 มิลลิลิตร) โดยใช้กล้าเชื้อระยะ conidia ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ของ *R. oryzae* NRRL 395 โดยแปรปริมาณซังข้าวโพดที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและตัวค้ำจุน ปริมาณ $CaCO_3$ และ Rapidase Pomaliq พบว่าได้ผลผลิตกรดแอล(+)แลกติกสูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง (299.4$\pm$6.8 กรัม

กรดแอล(+)แลกติกต่อกิโลกรัมของซังข้าวโพดแห้ง ในหน่วยกิโลกรัม) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณของซังข้าวโพดแห้ง 5 กรัม ปริมาณ $CaCO_3$ 0.2 กรัม และปริมาณเอนไซม์ Rapidase Pomaliq 0.5 มิลลิลิตร ต่อ 0.1 N NaOH 100 มิลลิลิตร

จากข้อมูลดังที่ได้กล่าวมาของรา *R. oryzae* ที่สามารถสร้างอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการตัดพันธะไกลโคซิดิก ซึ่งจะถูกสร้างแล้วปล่อยออกมาพร้อมกับการเจริญเติบโตทำให้ราสามารถที่จะใช้กลูโคสที่ได้จากแป้งซึ่งถูกย่อยด้วยเอนไซม์ที่ราสร้างขึ้นได้เองเปลี่ยนเป็นกรดแอลแลกติกและผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้ อีกทั้งตามลักษณะการเจริญเติบโตของราในธรรมชาตินั้นมักชอบเจริญและใช้เส้นใยเกาะพันยึดเหนี่ยวกับตัวค้ำจุนที่มีลักษณะค่อนข้างแข็ง สามารถที่เจริญเติบโตในภาวะที่มีน้ำน้อยจนไปถึงน้ำมาก ผู้วิจัยได้เล็งเห็นแนวทางที่จะนำข้อดีดังกล่าวของรามาประยุกต์ร่วมใช้กับเทคนิคการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้ตัวค้ำจุน ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่มีต้นทุนต่ำ ใช้ปริมาณน้ำน้อย พลังงานต่ำ และยังเกิดของเสียน้อยด้วย อาหารที่ใช้ในกระบวนการหมักมีองค์ประกอบที่ไม่ซับซ้อนและหาได้ง่ายอีกทั้งสามารถเป็นสารอาหารและเป็นแหล่งที่ราเกาะติดได้โดยตรง ซึ่งตัวค้ำจุนในการหมักอาจเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อได้ในขณะเดียวกันด้วย ทำให้ลดขั้นตอนในการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์หรือกรดก่อนนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักส่งผลให้การผลิตกรดแลกติกมีต้นทุนที่ต่ำลง และในปัจจุบันพบว่าประเทศไทยมีผลผลิตมันสำปะหลังเป็นจำนวนมากในแต่ละปี ซึ่งมันสำปะหลังจะถูกแปรรูปเป็นแป้ง มันอัดเม็ด และมันเส้น กากมันสำปะหลังที่เหลือจากกระบวนการแปรรูปยังคงมีปริมาณแป้งอยู่เป็นจำนวนมาก ผู้วิจัยเล็งเห็นแนวทางในการนำกากมันสำปะหลังมาใช้เป็นตัวค้ำจุนและแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลกติกแทนการนำไปแปรรูปเป็นอาหารสัตว์ที่นิยมทำกันในปัจจุบัน ซึ่งนอกจากช่วยลดปัญหาการกำจัดวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ในทางอ้อมยังเพิ่มมูลค่าให้กับสินค้าเกษตรของประเทศอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

ศึกษาผลของปัจจัยทางกายภาพและเคมีต่อจลนพลศาสตร์ของการหมักกรดแอล(+)แลกติก บนอาหารแข็งกากมันสำปะหลังโดย *Rhizopus oryzae*

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยกระบวนการหมักบนอาหารแข็งโดยใช้กากมันสำปะหลังในระดับขวดเขย่า โดยเปรียบเทียบ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่เติมเสริม ความเร็วรอบการเหวี่ยง นำภาวะที่ได้มาศึกษาผลของปัจจัยทางเคมี ได้แก่ ธาตุอาหารเสริมจำพวกแหล่งไนโตรเจนในกระบวนการหมัก จากนั้นนำไปศึกษาผลเชิงบวกของการเสริมเซลลูเลส (Cellulase)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และกลูโคอะไมเลส (Glucomylase) ในการหมักกรดแลกติกบนกากมันสำปะหลังสดต่อจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมัก

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

1.4.1 ศึกษาผลของปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่เติมเสริม ความเร็วรอบการเหวี่ยง

1.4.2 ศึกษาผลของปัจจัยทางเคมี ได้แก่ ธาตุอาหารเสริมในกระบวนการหมักต่อจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรด แอล(+)แลกติกจากกากมันสำปะหลังสด

1.4.3 ศึกษาผลเชิงบวกของการเสริมเซลลูเลส (Cellulase) และกลูโคอะไมเลส (Glucomylase) ในการหมักกรดแลกติกบนกากมันสำปะหลังสดต่อจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมัก

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถผลิตกรดแลกติกในปริมาณสูงจากการใช้กากมันสำปะหลังด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดแลกติก

กรดแลกติก (Lactic acid) เป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่ง ชื่อทางเคมี คือ 2-hydroxypropanoic acid มีสูตรทางเคมี คือ $C_3H_6O_3$ กรดแลกติกถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในผลิตภัณฑ์นมในปี ค.ศ. 1780 โดยนักเคมีชาวสวีเดน กรดชนิดนี้มี 2 ไอโซเมอร์ คือ กรดดี(-)-แลกติก และกรดแอล (+)-แลกติก (Litchfield, 1996) ซึ่งแตกต่างกันที่การวางตัวของหมู่ไฮดรอกซีตรงตำแหน่งของไครัลคาร์บอนอะตอม แสดงในภาพที่ 2.1

กรดดี (-)-แลกติก กรดแอล (+)-แลกติก

ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของกรดดี (-)-และแอล (-)-แลกติก

ความแตกต่างทางโครงสร้างทางเคมีของกรดแลกติกทั้งชนิดดี(-)- และแอล(+)-ไอโซเมอร์ทำให้ไอโซเมอร์ทั้งสองชนิดนี้มีคุณสมบัติแตกต่างกัน เช่น จุดเดือดและจุดหลอมเหลว โดยกรดดีแลกติกที่มีจุดเดือดที่ 103 องศาเซลเซียส และจุดหลอมเหลวที่ 52.8-53.6 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่ากรดแอลแลกติกซึ่งมีจุดเดือดที่ 82-85 องศาเซลเซียส และจุดหลอดเหลวที่ 16.8-33 องศาเซลเซียส (Budavari และคณะ, 1989; Honten และคณะ, 1971)

กรดแลกติกที่มีความบริสุทธิ์สูงจะไม่มีสี สามารถละลายในน้ำ เอทานอล อะซีโตนและอีเทอร์ได้ แต่ไม่ละลายในคลอโรฟอร์ม ปิโตรเลียมอีเทอร์และคาร์บอนไดซัลไฟด์ (Lockwook, 1965) ตารางที่ 2.1 แสดงคุณสมบัติต่างๆ ของกรดแลกติก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของกรดแลกติก

ลักษณะของกรดแลกติก	
CAS number	50-21-5, 79-33-4(L), 10326-41-7(D)
EINECS number	200-018-0
สูตร	$CH_3CH(OH)COOH$
มวลโมเลกุล	90.08
H.S. code	2918.11
Toxicity	Oral rat LD50:3543 mg/kg
Synonyms	2-hydroxypropanoic acid; 1-hydroxyethanecarboxylic acid; Ethylidenelactic acid; Alpha-hydroxypropionic acid
สมบัติทางกายภาพและสมบัติทางเคมี (99%)	
Physical State	Colorless to slightly yellow, syrupy liquid
จุดหลอมเหลว	17 องศาเซลเซียส
จุดเดือด	122 องศาเซลเซียส
Specific gravity	1.2
Solubility in water	Miscible
NFP Aratings	Health 3, Flammability 1, Reactivity 1
Flash point	112 องศาเซลเซียส
Stability	Stable under ordinary conditions

ที่มา : ดัดแปลงจาก Vaidya และคณะ (2005)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 ประโยชน์ของกรดแลกติก

ด้านอาหาร กรดแลกติกเป็นกรดที่พบมากในผลิตภัณฑ์นม อาหารหมักดอง มักถูกนำไปใช้เป็นสารที่ให้รสเปรี้ยว และสารปรับค่าพีเอชในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม เนื่องจากสมบัติความเป็นกรด จึงนิยมนำไปใช้ในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในผลิตภัณฑ์อาหารหลายประเภท รวมถึงใช้เป็นสารกันเสียและป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์

ด้านเภสัชกรรม กรดแลกติกถูกนำไปใช้ในการปรับค่าพีเอชและเป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์ยา เป็นสารเติมแต่งเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในการเตรียมไวตามิน เป็นส่วนประกอบของยาเพื่อเพิ่มคุณสมบัติในการละลายน้ำ เป็นสารตัวกลางเพื่อช่วยให้ตัวยาผสมกันได้ดีขึ้น นอกจากนี้ อนุพันธ์ของกรดแลกติกยังถูกนำมาใช้ในการรักษาโรค เช่น โรคโลหิตจาง โรคขาดแคลเซียมในกระดูกและฟัน ได้อีกด้วย

ด้านเครื่องสำอาง กรดแลกติกเป็นส่วนผสมในครีมหรือโลชั่นสำหรับทาเพื่อเพิ่มความชุ่มชื้นให้กับผิว เป็นสารที่ผสมในเครื่องสำอางเพื่อกระตุ้นให้เกิดการหลุดลอกของผิวหนัง ใช้เป็นสารช่วยให้ผิวขาวขึ้นโดยอาศัยกลไกการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส และยังใช้เพื่อควบคุมค่าพีเอชและป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ในเครื่องสำอาง

ด้านการฟอกหนังและทอผ้า กรดแลกติกถูกนำไปใช้ในการฟอกหนังให้นิ่มในอุตสาหกรรมฟอกหนัง ในอุตสาหกรรมทอผ้าจะช่วยในการย้อมและพิมพ์ให้สีติดแน่นนานยิ่งขึ้น

ด้านอุตสาหกรรมพลาสติก กรดแลกติกเป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตพลาสติกชีวภาพ (พอลิแลกติกแอซิด) ที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติและสามารถเข้ากันได้ดีกับร่างกายมนุษย์ เพื่อนำมาใช้ทดแทนพลาสติกที่สังเคราะห์จากผลิตภัณฑ์ของอุตสาหกรรมปิโตรเคมี โดยพอลิแลกติกสามารถนำไปใช้ในด้านต่างๆ ได้แก่ วัสดุทางการเกษตรและประมง เช่น ฟิล์มคลุมพืช กระถามต้นไม้ เชือกอวนและแห วัสดุก่อสร้าง เช่น ฉนวนกันความร้อน ผนังกั้นหรือถุง วัสดุสำนักงาน เช่น ซองเอกสาร แฟ้มใส ปกหนังสือ เป็นต้น ตลอดจนถูกนำมาใช้เป็นบรรจุภัณฑ์อาหาร เช่น ถาดอาหารหรือฟิล์มห่อหุ้มอาหาร ผลิตอุปกรณ์เครื่องมือแพทย์ เช่น วัสดุเย็นแผล วัสดุซ่อมแซมกระดูกชิ้นเล็ก ๆ เนื่องจากพสาสติกชีวภาพสามารถย่อยสลายได้ง่าย

ด้านอื่น ๆ กรดแลกติกสามารถนำไปใช้ในการผลิตแลกเกอร์ หมึก ใช้ในการผลิตน้ำยาทำความสะอาด และสารฆ่าเชื้อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ เป็นต้น

จากการสำรวจการผลิตกรดแลกติกทั่วโลก พบว่า มีการผลิตกรดแลกติกถึง130,000-150,000 ตันต่อปี (Wee และคณะ, 2006) มีการคาดการว่าในแต่ละปีการผลิตกรดแลกติกในตลาดโลกจะเติบโต 10-15 เปอร์เซ็นต์ ต่อปี (Wassewar และคณะ, 2005) และมีแนวโน้มความต้องการสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง San (2008) รายงานไว้ว่าในช่วงระยะเวลาระหว่างปี 2008 ถึง 2012 คาดว่าในตลาดผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจะใช้กรดแลกติกเพิ่มขึ้นถึง 2467×10^3 ตัน และ 2296×10^3 ตันในตลาดอาหาร อีกทั้งในปัจจุบันมีความต้องการนำกรดแลกติกใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตพลาสติกชีวภาพมากขึ้น อย่างเช่นในแถบยุโรปที่คาดการณ์ไว้ว่าในปี 2015 ต้องการกรดแลกติก 67×10^3 ตันในอุตสาหกรรมผลิตพลาสติกชีวภาพ บริษัทต้นแบบการผลิตพอลิแลกติกแอซิด (polylactic acid) ของสหรัฐอเมริกา รายงานว่าในปี 2010 ตลาดพอลิแลกติกแอซิด (polylactic acid) มีเป้าหมายต้องการกรดแลกติกถึง 5,000,000 ตัน (Vijayakumar และคณะ, 2008) โดยมีราคาประมาณ 1.59 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม ที่ความเข้มข้นของกรดแลกติกเท่ากับ 88 เปอร์เซ็นต์

2.3 การผลิตกรดแลกติก

2.3.1 กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี

ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดแลกติกโดยวิธีทางเคมี นิยมใช้การสังเคราะห์ผ่าน Lactonitrile โดยนำ HCN มาทำปฏิกิริยากับ Acetaldehyde ได้เป็น Lactonitrile ตามขั้นตอนที่ 1 จากนั้นนำ Lactonitrile ที่ได้มาผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสโดยใช้กรดซัลฟูริกหรือกรดไฮโดรคลอริก ได้เป็นกรดแลกติกและเกลือแอมโมเนียม ตามขั้นตอนที่ 2 จากนั้นกรดแลกติกที่ได้จะถูกนำไปผ่านปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชั่น (Esterification) ด้วยเมทานอลได้เป็นเมททิวแลกเตทตามขั้นตอนที่ 3 แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ด้วยการกลั่นและผ่านปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ได้เป็นกรดแลกติกและเมทานอลตามขั้นตอนที่ 4

ขั้นตอนที่ 1:

$$CH_3CHO + HCN \xrightarrow{\text{catalyst}} CH_3CHOHCN$$

acetaldehyde hydrogen cyanide lactonitrile

ขั้นตอนที่ 2:

$$CH_3CHOHCN + H_2O + \tfrac{1}{2}H_2SO_4 \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + \tfrac{1}{2}(NH_4)_2SO_4$$

lactonitrile sulfuric acid lactic acid ammonium salt

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนที่ 3:

$$CH_3CHOHCOOH + CH_3OH \longrightarrow CH_3CHOHCOOCH_3 + H_2O$$

lactic acid methanol methyl lactate

ขั้นตอนที่ 4:

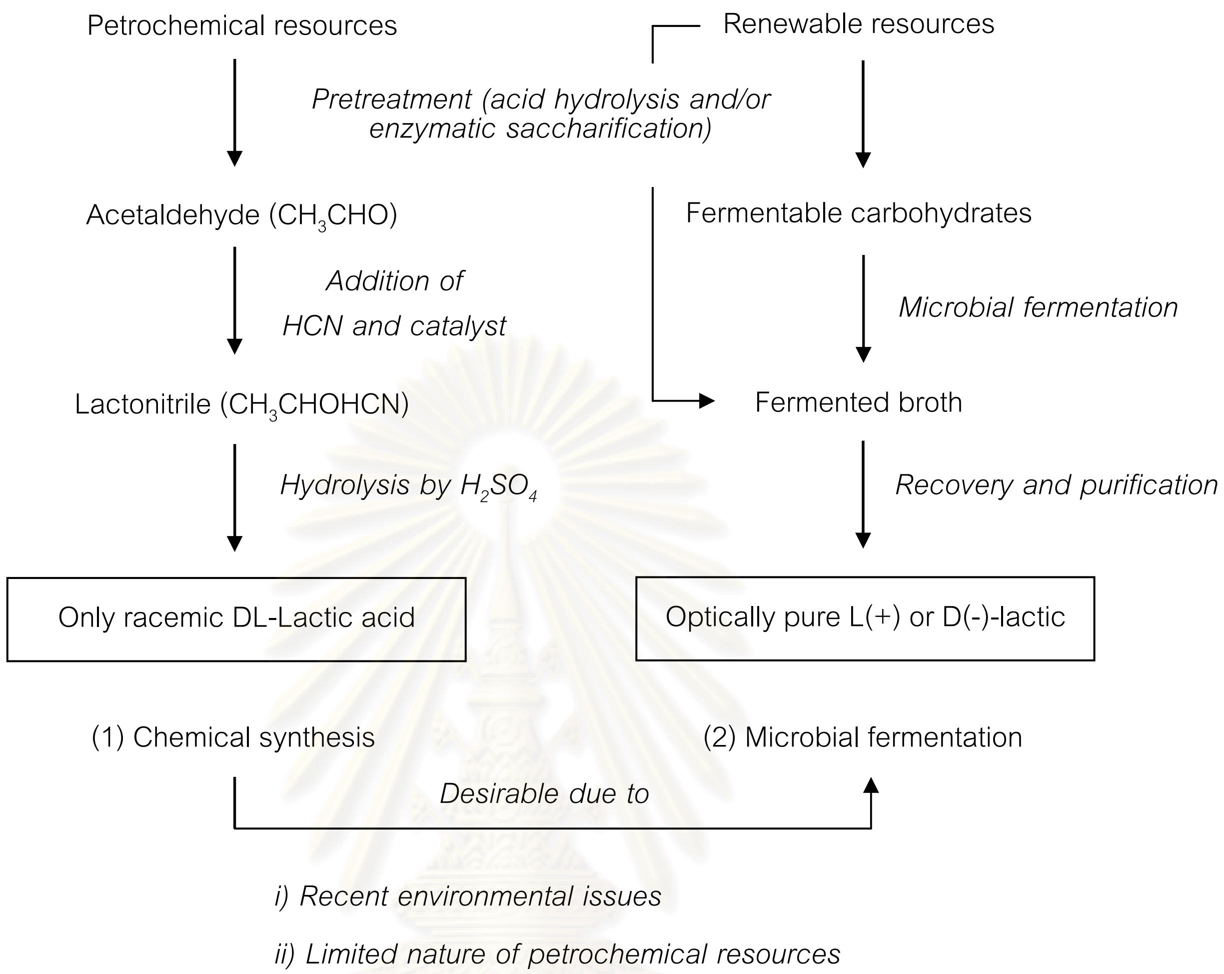
$$CH_3CHOHCOOCH_3 + H_2O \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + CH_3OH$$

methyl lactate lactic acid methanol

ที่มา : Narayanan และคณะ (2004)

นอกจากที่กล่าวไปแล้วข้างต้น เรายังสามารถผลิตกรดแลกติกโดยวิธีทางเคมีผ่านกระบวนการอื่นๆ ได้อีก ได้แก่ การสังเคราะห์โดยใช้ Propene เป็นสารตั้งต้น (Vaidya และคณะ, 2005) ปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยด่าง (Varadarajan และ Miller, 1999) ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ propylene glycol ปฏิกิริยาระหว่าง Acetaldehyde กับคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ ภายใต้อุณหภูมิและความดัน และปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ Chloropropionic acid เป็นต้น

การผลิตกรดแลกติกโดยวิธีทางเคมีมีข้อเสีย ได้แก่ การใช้ภาวะรุนแรงในการทำปฏิกิริยา วัตถุดิบที่ใช้เป็นสารตั้งต้นได้มาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ซึ่งนับวันจะมีราคาสูงขึ้นเรื่อยๆ และยังก่อให้เกิดปัญหามลพิษภายหลัง นอกจากนี้ กรดแลกติกที่สังเคราะห์ได้ยังอยู่ในรูปของไอโซเมอร์ผสม ทำให้ต้องมีการทำให้กรดแลกติกมีความบริสุทธิ์ก่อนการนำไปใช้เพื่อการบริโภค ทั้งนี้เนื่องจากกรดแลกติกที่เป็นประโยชน์สำหรับสิ่งมีชีวิตและสามารถใช้ในอาหารและเภสัชกรรมมีเพียงชนิดแอลไอโซเมอร์เท่านั้น เนื่องจาก สิ่งมีชีวิตไม่สามารถเมทาบอไลซ์กรดดี-แลกติกได้ เพราะขาดเอนไซม์ชนิดดีแลกเตทดีไฮโดรจีเนส ดังนั้นหากบริโภคกรดแลกติกที่มีปริมาณกรดดี-แลกติกปนเปื้อนในปริมาณมาก อาจส่งผลให้มีปริมาณกรดดี-แลกติกสะสมในกระแสโลหิตสูง เกิดภาวะความเป็นกรดสูงในร่างกาย (Hyper-acidity) นอกจากนี้แล้ว ในการสังเคราะห์พอลิแลกติกแอซิดยังต้องการกรดแลกติกบริสุทธิ์เพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตพอลิเมอร์ชนิดนี้อีกด้วย จากที่กล่าวมาข้างต้น เห็นได้ว่าการสังเคราะห์ทางเคมีมีข้อจำกัดหลายประการหากยังคงนำมาใช้เพื่อในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป และเมื่อเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกโดยการสังเคราะห์ทางเคมีและกระบวนการหมัก แสดงดังภาพที่ 2.2 พบว่า การผลิตกรดแลกติกด้วยกระบวนการหมักโดยการใช้จุลินทรีย์ จะให้ผลผลิตกรดแลกติกในรูปของดี หรือแอลอย่างเดียว หรืออยู่ในรูปของดีแอล ขึ้นอยู่กับลักษณะของจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ ในขณะที่การผลิตกรดแลกติกทางเคมี จะให้กรดแลกติกรูปของไอโซเมอร์ผสมเพียงอย่างเดียว



ภาพที่ 2.2 เปรียบเทียบการผิตกรดแลกติกจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (1) และกระบวนการหมัก (2) ที่มา: Wee และคณะ, 2006

2.3.2 การผลิตกรดแลกติกด้วยกระบวนการหมักโดยแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลกติกแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่เป็นโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ คือ จะผลิตกรดแลกติกเพียงอย่างเดียว ตัวอย่างของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Lactobacillus* sp. *Bacillus* sp. และ *Lactococcus* sp. เป็นต้น อีกกลุ่มคือ แบคทีเรียพวกเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟซึ่งนอกจากจะผลิตกรดแลกติกแล้วยังผลิตผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ (Hofvendahl และ Hahn-Hagerdal, 2000) ดังแสดงในภาพที่ 2.3 แบคทีเรียพวกโฮโมเฟอร์เมนเททีฟจะใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแล้วเข้าวิถี Emden-Meyerhof pathway (EMP) โดยการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวทจากนั้นจึงเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นกรดแลกติก โดยกลูโคสหนึ่งโมเลกุลสามารถผลิตกรดแลกติกได้สองโมเลกุล แต่บางครั้งถ้าภาวะในระหว่างการหมักแปรผันไม่เหมาะ เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นของสารอาหารอันมีสาเหตุจากการกวนอย่างไม่ทั่วถึงในถังหมัก ก็

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

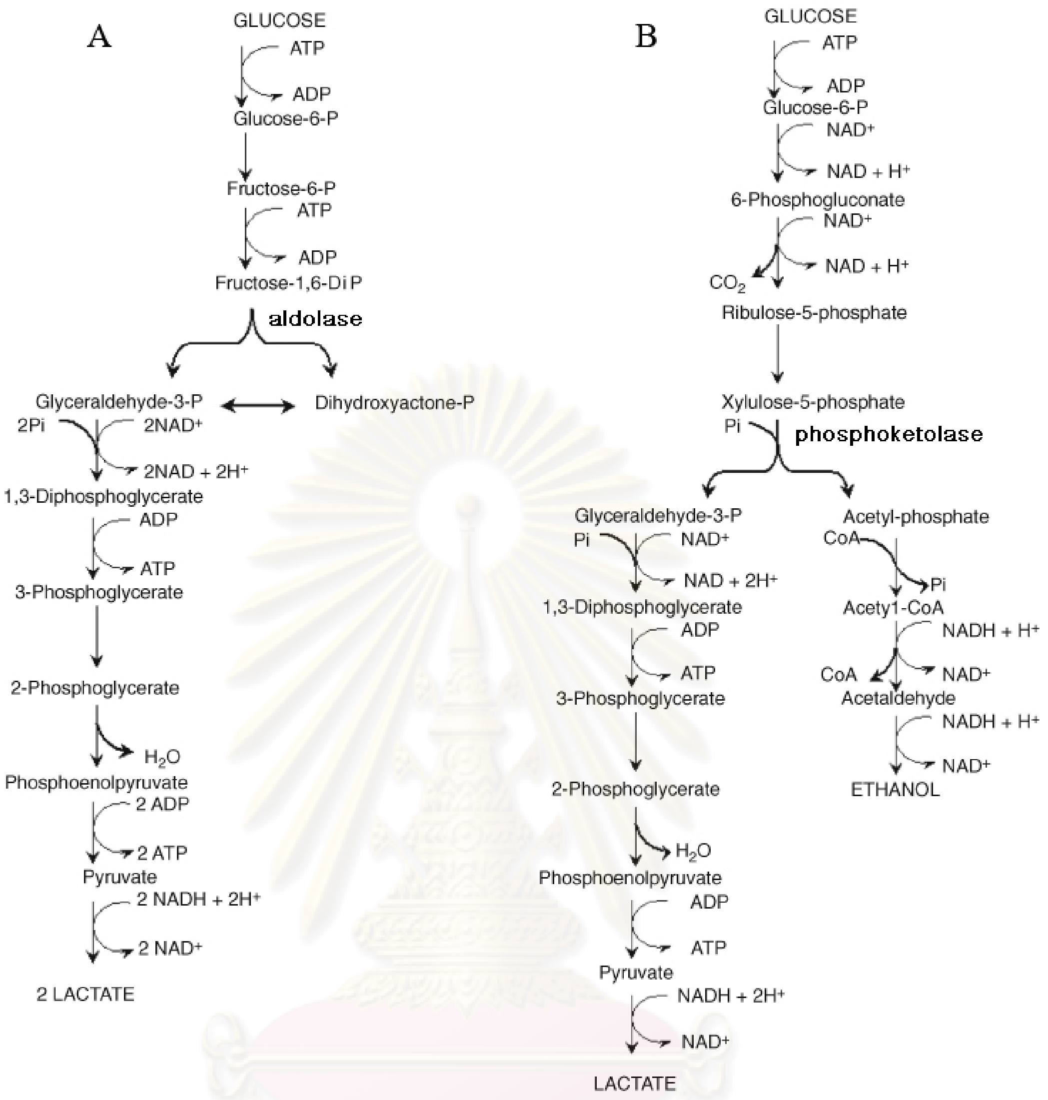
สามารถทำให้แบคทีเรียโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ เปลี่ยนวิถีของการสังเคราะห์ไปเป็นแบบ phosphoketolase (PK) ได้ ทำให้ผลผลิตของกรดแลกติกลดลง (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2547 : 102) ส่วนพวกเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ กลูโคสหนึ่งโมเลกุลสามารถผลิตกรดแลกติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ อย่างละหนึ่งโมเลกุลออกมาด้วยการเข้าสู่วิถี phosphoketolase (PK) ในงานวิจัยของ Zhao และ Ding (2007) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจาก *Bacillus coagulans* B179 ทำการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 36.2 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 40 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

Michelson และคณะ (2006) พบว่า แบคทีเรีย *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 และ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Lactis* DSM 20073 ให้อัตราการผลิตกรดแลกติกสูงถึง 9.9 และ 5.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ ในการหมักแบบไม่ต่อเนื่องโดยใช้สารอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคส 126 กรัมต่อลิตร Yeast autolysate 185.7 มิลลิลิตรต่อลิตร KH_2PO_4 0.25 กรัมต่อลิตร K_2HPO_4 0.024 กรัมต่อลิตร $MgCl_2$ 0.03 กรัมต่อลิตร $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ 0.08 กรัมต่อลิตร และ Microelements solution 2.3 มิลลิลิตรต่อลิตร แต่เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องการไวตามินและกรดอะมิโนหลายชนิดในการเจริญและไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจำพวกแป้งและเซลลูโลสได้เนื่องจากไม่มีเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยทำให้ต้องเพิ่มขั้นตอนในการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์หรือกรดก่อนนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักส่งผลให้การผลิตกรดแลกติกมีต้นทุนที่สูง อีกทั้งยังพบว่ากรดแลกติกที่ได้จากแบคทีเรียพวกโฮโมเฟอร์เมนเททีฟนั้นอยู่ในรูปของไอโซเมอร์ผสมหรือกรดแอล (+) และดี (-) แลกติกทำให้เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการหมักจึงต้องแยกไอโซเมอร์ผสมของกรดแลกติกออกจากกันก่อนนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ ต่อไป

2.3.3 การผลิตกรดแลกติกด้วยกระบวนการหมักโดยรา

ราที่สามารถผลิตกรดแลกติกเป็นราที่อยู่ในจีนัส *Rhizopus Mucor* และ *Monilia* เช่น *Rhizopus arrhizus R. Delmar R. elegans R. japonicus R. oryzae R. stolonifer* และ *R. chinensis* เป็นต้น สำหรับการผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้ *R. oryzae* เนื่องจากราสามารถผลิตกรดแอลแลกติกบริสุทธิ์จากแป้ง น้ำตาล รวมทั้งวัสดุการเกษตรที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบรวมทั้งกากน้ำตาลซึ่งมีราคาถูก เนื่องจากรามีอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่สามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล (Wee และคณะ, 2006) ในภาวะที่มีอากาศ สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เช่นเกลือแอมโมเนียมหรือไนเตรต อีกทั้งไม่ต้องการไวตามินหรือกรดอะมิโนเสริมในกระบวนการหมักเหมือนแบคทีเรีย จึงทำให้กระบวนการหมักด้วย *R. oryzae* มีต้นทุนการผลิตทั้งด้านวัตถุดิบและกระบวนการแยกบริสุทธิ์หลังกระบวนการหมักที่ต่ำกว่าการหมักด้วยแบคทีเรีย นอกจากนี้กระบวนการหมักกรดแลกติกจากราสามารถผลิตที่อุณหภูมิ

สูงและพีเอชต่ำ ซึ่งจะช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ รามีการหมักแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ การหมักกรดแลกติกโดยราเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้นในสภาวะที่มีการให้อากาศจะให้กรดแลกติก 1.5 โมลต่อโมลของกลูโคส งานวิจัยของ Mirdamadi และคณะ (2002) ได้ทำการเปรียบเทียบการผลิตกรดแลกติกระหว่างแบคทีเรียและรา พบว่า สายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลกติกได้สูงได้แก่ *R. oryzae* PTCC 5263 *Lactobacillus plantarum* PTCC 1058 และ *L. bulgaricus* PTCC 1332 โดยสายพันธุ์ *Lactobacillus* sp. จะผลิตกรดแลกติกที่เป็นไอโซเมอร์ผสมโดยมีกรดดีแลกติกอยู่ประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง *R. oryzae* PTCC 5263 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 160 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 84 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 4.10 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เทียบกับ *L. plantarum* PTCC 1058 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 27 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 15 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.56 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ *L. bulgaricus* PTCC 1332 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 30 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 16.67 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.62 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตร ทำการหมักในระดับขวดเขย่าแบบไม่ต่อเนื่อง แต่เนื่องจากลักษณะสัณฐานวิทยาของราที่เป็นเส้นใย ทำให้กระบวนการหมักกรดแลกติกด้วยอาหารเหลวด้วยเซลล์แขวนลอยของ *R. oryzae* ในถังกวนมักจะประสบปัญหาเรื่องเส้นใยราพันรอบแกนหมุนและใบพัด และเจริญเติบโตเกาะกลุ่มกันเป็นก้อนตรงส่วนใดส่วนหนึ่งของถังหมัก ทำให้เกิดปัญหาถ่ายเทอากาศและอาหารภายในถังหมักซึ่งจะส่งผลโดยตรงต่อการเจริญของรา และลักษณะสัณฐานของ *R. oryzae* ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักจะมีผลต่อการผลิตกรดแลกติก ถึงแม้จะมีวิธีการยึดตรึงเซลล์จึงถูกนำมาใช้ในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานของรา แต่ก็ต้องทำการออกแบบแม่แบบที่จะใช้สำหรับตรึงเซลล์ ซึ่งเป็นอีกขั้นตอนที่ยุ่งยากและวัสดุที่เลือกมาทำแม่แบบต้องไม่ส่งผลอันตรายกับเซลล์ ดังนั้นการหมักแบบอาหารแข็งซึ่งเป็นกระบวนการหมักที่สามารถใช้วัตถุดิบทางการเกษตรมาทำหน้าที่เป็นตัวยึดเกาะให้กับรา *R. oryzae* ได้โดยตรงและยังเป็นแหล่งอาหารในตัวที่ราสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ ออกมาซึ่งนอกจากจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการออกแบบแม่แบบสำหรับใช้ในการตรึงเซลล์แล้ว ยังช่วยลดขั้นตอนการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์หรือกรดก่อนนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักและทำให้ผลิตภัณฑ์เข้มข้นก่อนนำไปทำให้บริสุทธิ์ เนื่องจากการหมักแบบอาหารแข็งใช้น้ำในระบบน้อยทำให้ผลผลิตที่ได้จึงมีความเข้มข้นสูงกว่าการหมักแบบอาหารเหลว



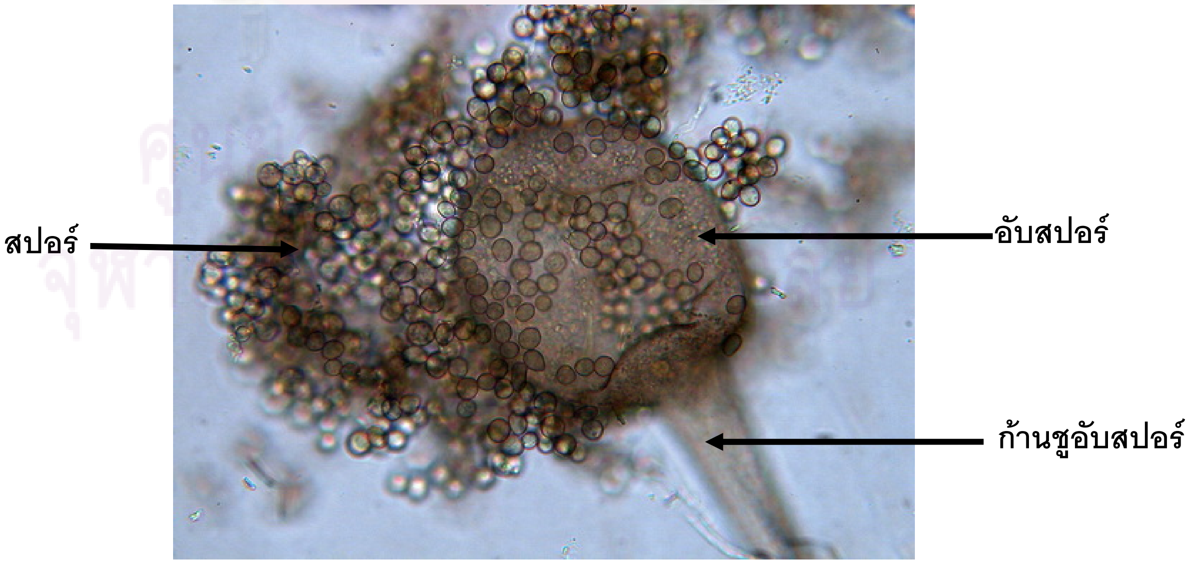
ภาพที่ 2.3 เมแทบอลิซึมการผลิตกรดแลกติกแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟด้วยวิถี glycolysis, Embden-Meyerhof-Parnas (A) และเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟด้วยวิถี phosphoketolase (B) จากแลกติกแอซิดแบคทีเรีย ที่มา : http://textbookofbacteriology.net/lactics_2.html

หมายเหตุ (P = phosphate, ADP = adenosine 5'-diphosphate, ATP = adenosine 5'-riphosphate, NAD^+ = nicotinamide adenine dinucleotide, NADH = nicotinamide adenine dinucleotide)

2.4 ลักษณะและวิถีเมแทบอลิซึมของ *Rhizopus oryzae*

รา *R. oryzae* ถูกจัดอยู่ใน Order Mucorales Family Mucoraceae เส้นใยไม่มีผนังกั้น เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่จะสร้างสปอร์สีดำ ดังแสดงในรูปที่ 2.4 มีอับสปอร์ลักษณะค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40-350 ไมโครเมตรอยู่ที่ปลายก้านชูอับสปอร์ซึ่งมีสีน้ำตาลเข้มจนถึงสีน้ำตาลอมดำ สปอร์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4-11 ไมโครเมตรลักษณะกลม หรือรูปไข่ (Ellis, 1997) แสดงดังภาพที่ 2.5 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต คือ 35 องศาเซลเซียส อุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญเติบโตได้ คือ 5-7 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญเติบโตได้ คือ 44-49 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 2.4 ลักษณะของรา *Rhizopus oryzae* ที่เจริญอยู่บนอาหารสังเคราะห์



ภาพที่ 2.5 ลักษณะอับสปอร์และสปอร์ของรา *R. oryzae* ที่มา: www.flickr.com

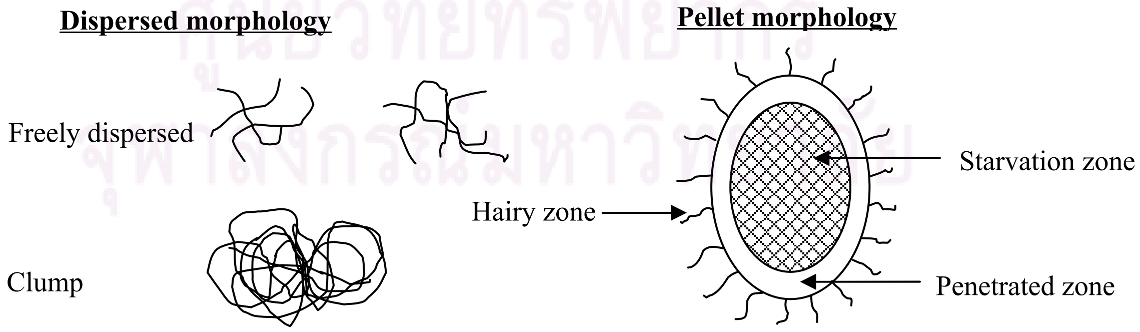
ในกระบวนการหมักในอาหารเหลวลักษณะทางสัณฐานของราจะถูกกำหนดโดยสภาวะแวดล้อมภายในถังหมัก เช่น อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ อัตราการให้อากาศ อัตราการกวน เป็นต้น ลักษณะทางสัณฐานทั่วไปของราแบ่งเป็น 2 กลุ่มได้แก่ Disperse mycelia และ Pellets (ภาพที่ 2.6) ซึ่ง Disperse mycelia ยังแบ่งเป็น Freely disperse และ Mycelial clumps โดยลักษณะการเจริญแบบ Freely disperse ประกอบไปด้วยเส้นใย (Hyphal) มากกว่า 3 สาย มาเรียงซ้อนทับกัน ซึ่งลักษณะการเรียงแบบนี้นับเป็น 1 Loop เมื่อเส้นใยมาเรียงซ้อนทับกันมากกว่า 3 Loop เรียกว่า Clumps หรือ การเจริญแบบกลุ่มก้อน

ลักษณะการเจริญแบบ Pellets แบ่งได้เป็น

The outer zone หรือ Hairy zone เป็นส่วนที่อยู่บริเวณรอบนอกของ Pellets มีลักษณะคล้ายขน ซึ่งขนเหล่านี้ทำหน้าที่ในการดูดซึมแร่ธาตุอาหารและอากาศเพื่อใช้ในการเจริญของเซลล์และผลิตกรดแลกติก

Penetrated zone เป็นโซนที่อยู่ถัดเข้ามาอีกชั้นของ Pellets ในโซนนี้แร่ธาตุอาหารและอากาศสามารถซึมผ่านเข้าถึงเซลล์ได้ ทำให้เซลล์เกิดกิจกรรมในการผลิตสารเมแทบอลิซึม ซึ่งขนาดของโซนขึ้นกับความหนาแน่นของ Pellets อัตราการเจริญและความเข้มข้นของอากาศที่ละลายในอาหาร

Starvation zone เป็นโซนที่อยู่บริเวณด้านในสุดของ Pellets ที่โซนนี้แร่ธาตุอาหารและอากาศไม่สามารถซึมผ่านเข้าถึงเซลล์บริเวณนี้ได้ทำให้เซลล์ถูกจำกัดในเรื่องของการถ่ายเทอาหารและอากาศ เมื่ออยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมเซลล์จะผลิตผลิตภัณฑ์อื่น เช่น เอทานอล และเกิด Autolysis (Cui และคณะ 1998)



ภาพที่ 2.6 ลักษณะทางสัณฐานของรา

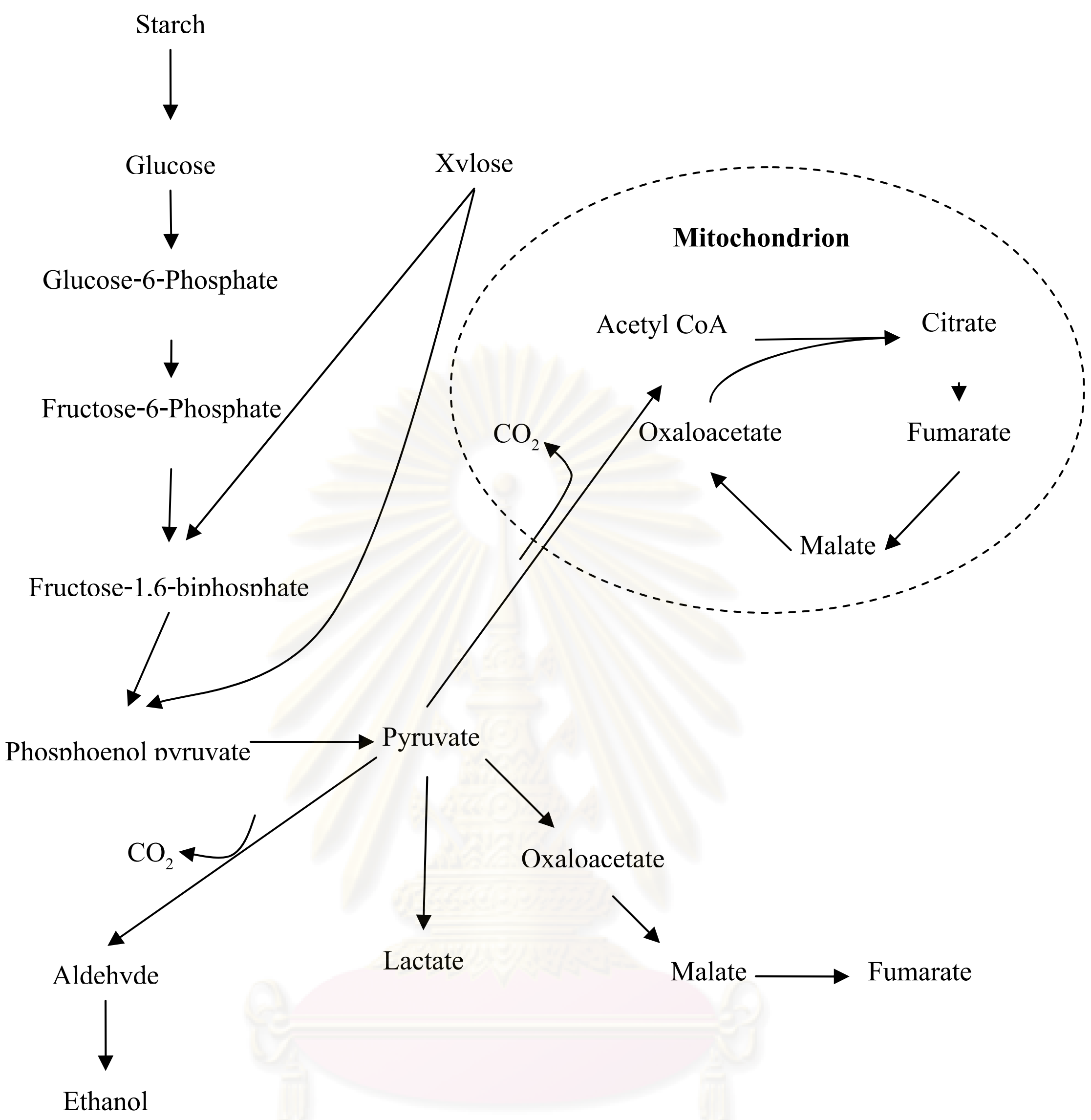
ที่มา : ดัดแปลงจาก Thongchul, 2005

ในงานวิจัยของ Wright และคณะ (1996) ได้ศึกษาแบบจำลองวิถีเมแทบอลิซึมของกลูโคส และพัฒนาแบบจำลองวิถีเมแทบอลิซึมของรา *R. oryzae* จากทฤษฎีการควบคุมวิถีเมแทบอลิซึม (Metabolic control theory) ภายใต้ภาวะที่ปัจจัยที่ถูกควบคุมต่างๆ คงที่ ด้วยการติดตาม (^{14}C)-กลูโคสในวิถีไกลโคไลซีสและวัฏจักร TCA ดังรูปที่ 2.7 พบว่า รา *R. oryzae* สามารถใช้แป้งเป็นแหล่งอาหารได้โดยตรง เนื่องจากในรามีอะไมเลสเพื่อใช้ในการย่อยโมเลกุลของแป้งโดยเปลี่ยนแป้งเป็นกลูโคส จากนั้นจึงเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวท โดยวิถี Emden-Meyerhof pathway (EMP) นอกจากนี้ รายังสามารถใช้น้ำตาลไซโลสเป็นสารตั้งต้นโดยเปลี่ยนไซโลสเป็นไพรูเวทโดยวิถีเพนโตสฟอสเฟต (HMP) ถ้าอยู่ในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสและปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงราจะเปลี่ยนไพรูเวตเป็นแลกเตทด้วย NAD- dependent แลกเตทดีไฮโดรจีเนส (Pritchard, 1973) โดยมี NADH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน แต่ในสภาวะที่ปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อหมด หรือเมื่อรามีการสร้างสปอร์ ค่าแอกติวิตีของแลกเตทดีไฮโดรจีเนสจะลดลง จะเกิดการปลี่ยนแลกเตทกลับมาเป็นไพรูเวทได้ด้วย NAD-independent แลกเตทดีไฮโดรจีเนส ดังสมการ

$$\text{Pyruvic acid} + \text{NADH} \underset{\text{NAD-independent lactate dehydrogenase}}{\overset{\text{NAD-dependent lactate dehydrogenase}}{\longleftrightarrow}} \text{Lactic acid} + \text{NAD}^{+}$$

นอกจากนี้ไพรูเวทที่เกิดขึ้นยังถูกนำเข้าสู่วัฏจักร TCA ในไมโทคอนเดรียเพื่อสร้างเซลล์และพลังงานหรือเปลี่ยนเป็นกรดฟูมาริก สำหรับในภาวะที่ถูกจำกัดด้วยอากาศ ราจะเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นเอทานอลด้วยแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ดังนั้นในการผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมักด้วยรานอกจากได้กรดแลกติกแล้วยังอาจได้ผลิตภัณฑ์อื่น เช่น กรดฟูมาริก คาร์บอนไดออกไซด์ และเอทานอลขึ้นกับสภาวะที่ใช้ในการ ดังนั้นการรักษาระดับออกซิเจนที่ละลายภายในถังหมักจึงมีความสำคัญต่อกระบวนการผลิตกรดแลกติก (Bai และคณะ, 2003)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2.7 กระบวนการเมแทบอลิซึมของกลูโคสในรา *R. oryzae*

ที่มา : Thongchul, 2005

2.5 การหมักแบบอาหารแข็ง

การหมักแบบอาหารแข็ง (solid state fermentation) หมายถึง การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บนอาหารแข็งที่มีความชื้น ในสภาวะที่ไม่มีน้ำอิสระ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา จำนวนมากมายที่สามารถเจริญอยู่บนอาหารแข็งซึ่งถูกค้นพบและนำไปประยุกต์เข้าสู่กระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง วัตถุดิบที่นำมาใช้ในการหมักมีมากมายหลากหลาย สามารถแบ่งได้สองประเภทหลัก คือ inert materials เป็นพวกที่มีไว้สำหรับให้พวกจุลินทรีย์ใช้เป็นที่ยึดเกาะเท่านั้น และ non-inert materials หรือ support- substrate เป็นพวกที่ไม่ได้มีหน้าที่เป็นที่ยึดเกาะให้กับจุลินทรีย์อย่างเดียว แต่ยังเป็นแหล่งสารอาหารด้วย วัตถุประเภทนี้มักเป็นพวกที่มีแป้งหรือลิกโนเซลลูโลส

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เป็นองค์ประกอบ มักเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเกษตรกรรมเป็นหลัก หรือของเหลือทิ้งจากโรงงานเกษตร เช่น พวกธัญพืชและ byproduct การหมักแบบอาหารแข็งถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ มากมาย เช่น antibiotics, surfactants, biocides and enzymes อย่างไรก็ตามมีรายงานที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์พวกลิกนิโนไลติกบ้างที่ใช้พวก inert supports ด้วยการหมักแบบอาหารแข็ง ถึงแม้ว่าในการเก็บผลผลิตนั้นจะทำได้ง่ายกว่าการใช้พวก natural supports เพราะเป็นผลิตภัณฑ์ที่ออกมานอกเซลล์ จึงง่ายต่อการแยกออกมาจากตัวค้ำจุนและมีสิ่งที่ปนเปื้อนน้อยกว่า แต่อาหารที่ใช้นั้นมีราคาแพงมาก ดังนั้นการใช้พวก natural support เช่น ของที่เหลือจากการเกษตรกรรม จึงช่วยลดต้นทุนด้านวัตถุดิบ และยังเป็นการเปลี่ยนมูลค่าของที่มีมูลค่าต่ำให้เป็นของที่มีมูลค่าสูงได้ เช่น การผลิตเอนไซม์ เป็นต้น แต่การหมักแบบอาหารแข็งมักไม่เป็นที่นิยมใช้ในการผลิตตัวเซลล์หรือใช้ในการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ เนื่องจากการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อโดยตรงทำได้ยาก และเชื้อบางส่วนเจริญอยู่ในอาหารแข็ง ซึ่งยากต่อการแยกออกจากกัน ทำให้เก็บเกี่ยวตัวเซลล์ได้น้อย ในส่วนของการติดตามการเจริญเติบโตต้องใช้วิธีการติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อทางอ้อมแทน เช่น การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีน (glucosamine) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเส้นใยรา (mycelia) เออกอสเตอรอล (ergosterol) ATP หรือ กรดนิวคลีอิก (nucleic acids) และการวัดกิจกรรมทางชีวภาพ เช่น กิจกรรมเอนไซม์ (enzymatic activity) อัตราการหายใจ (respiration)

อย่างไรก็ตามราเส้นใย (filamentous fungi) ก็ยังเป็นกลุ่มที่น่าสนใจที่สุดในพวกราทั้งหลาย เนื่องจากลักษณะสัณฐานวิทยาเหมาะสมในการเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง ช่วงระยะเวลาในการเจริญของรานั้น จะมีการสร้างและปล่อยเอนไซม์ออกมา มีการสร้างผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าที่ได้จากการกระบวนการเมแทบอไลท์ ซึ่งเป็นการใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพต่ำ เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง การหมักแบบอาหารแข็งส่วนใหญ่นิยมใช้ในการผลิตเอนไซม์ อาหารสัตว์และผลิตภัณฑ์ต่างๆ ในทางเภสัชกรรมและเกษตรกรรม ดังแสดงผลิตภัณฑ์ในตารางที่ 2.2 และ 2.3 และตัวอย่างในงานวิจัย Lu และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตกรดซิติก (citric acid) ด้วย *Aspergillus niger* ภายใต้กระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้ถังหมักแบบ packed-bed มี Kumara (หรือ sweet potato) ซึ่งเป็นพวกพืชหัวใต้ดิน มาทำการสับให้เป็นชิ้นเล็กๆ ทรงลูกบาศก์เพื่อนำมาใช้เป็นซับสเตรท สามารถผลิตกรดซิตริก 0.82 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักเปียก kumara ต่อชั่วโมง

Kumar และ Lonsane (1990) ได้ศึกษาอิทธิพลของปัจจัยทางกายภาพได้แก่ ปริมาณความชื้น ระยะเวลาในการนึ่งฆ่าเชื้อ อัตราส่วนของกล้าเชื้อ และ อัตราส่วนระหว่างรำข้าวสาลีเปียกชื้นกับปริมาตรขวดเขย่าที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง และสารอาหาร ได้แก่ ความเข้มข้นของยูเรีย

และ $MgSO_4$ ที่มีต่อการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก(gibberellic acid) โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นซับสเทรตร่วมกับเชื้อ *Gibberella fujikuroi* P-3 พบว่า ปริมาณความชื้น 50 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการนึ่งฆ่าเชื้อ 45 นาที อัตราส่วนของกล้าเชื้อ 20 เปอร์เซ็นต์ และ อัตราส่วนระหว่างความหนารำข้าวสาลีเปียกชื้นกับปริมาตรขวดเขย่าที่ 0.024 (เซนติเมตรต่อมิลลิลิตร)ที่เหมาะสมสุดให้ผลผลิตกรดจิบเบอเรลลิกสูงสุด คือ 365 1,039 1,053 1,116 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม DMB ตามลำดับ การเติมยูเรียในปริมาณ 70 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ เป็นปริมาณที่เหมาะสม โดยให้กรดจิบเบอเรลลิกสูงสุด 991 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม DMB ส่วนปริมาณที่เหมาะสมของ $MgSO_4$ อยู่ที่ 0.007 กรัมเปอร์เซ็นต์ ให้กรดจิบเบอเรลลิก 1024 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม DMB

Sharma และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตกรดกลูโคนิก (gluconic acid) ใช้กากชาทำหน้าที่เป็นตัวค้ำจุนและกากน้ำตาลเป็นอาหารด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง ด้วยเชื้อ *Aspergillus niger* (ARNU-4) ที่ดัดแปลงให้มีความทนทานต่อพวกโลหะ โดยทำการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ เช่น ปริมาณความชื้น อุณหภูมิ การให้อากาศ และขนาดของกล้าเชื้อ พบว่า ปริมาณความชื้น 70 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 2.5 ลิตรต่อนาที และขนาดของกล้าเชื้อ 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดที่สามารถเก็บผลผลิตของกรดกลูโคนิกเท่ากับ 76.3 กรัมต่อลิตร

Aikat และ Bhattacharyya (2000) ได้ศึกษาการผลิตโปรติเอส (protease) ด้วย *Rhizopus oryzae* โดยใช้รำข้าวสาลี 10 กรัม ผสมกับสารละลาย Czapek Dox 60 มิลลิลิตร ที่มีองค์ประกอบ (ต่อลิตร) ได้แก่ $NaNO_3$ 2.5กรัม KH_2PO_4 1.0 กรัม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 กรัม และ KCl 0.5 กรัม โดยบรรจุใส่ลงในจานเพาะเชื้อ (Petri dish) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 9 วัน สามารถเก็บเกี่ยวโปรติเอส 60 ยูนิตต่อกรัมรำข้าวสาลี โดยใช้น้ำกลั่นเป็นสารชะล้างโปรติเอสออกมา

Soni และคณะ (2003) ใช้จุลินทรีย์ 2 ตัวได้แก่ *Bacillus* sp. AS-1ในการผลิตแอลฟา-อะไมเลส และ *Aspergillus* sp. ในการผลิตกลูโคอะไมเลสโดยใช้ถังหมักแบบถาด ซึ่งแต่ละถาดจะบรรจุรำข้าวสาลี 100 กรัมที่เติมน้ำกลั่นลงไป 125 มิลลิลิตร ปรับให้หนา 1 เซนติเมตร เป็นอาหารหลัก ในการผลิตแอลฟา-อะไมเลสจะใช้อาหารหลักร่วมกับการเติมสารอาหารเสริม ได้แก่ กลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อน้ำหนักถั่วเหลืองบด (soybean meal) 0.5 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อน้ำหนัก และ 0.01 M $MnSO_4$ นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับการผลิตกลูโคอะไมเลส ใช้อาหารหลักร่วมกับแลคโทส 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อน้ำหนัก ถั่วเหลืองบด 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อน้ำหนัก และ 0.01 M $CaCl_2$ นำไปเลี้ยงที่อุณหภมิ 32 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 96 ชั่วโมง สามารถเก็บเกี่ยวแอลฟา-อะไมเลสได้ 198950 ยูนิตต่อกรัมแห้งของรำข้าวสาลี และกลูโคอะไมเลส 3426 ยูนิตต่อกรัมแห้งของรำข้าวสาลี ที่ชั่วโมงที่ 48 และ 96 ตามลำดับ

Selvakumar และคณะ (1998) ศึกษาการผลิตกลูโคอะไมเลสด้วยการหมักแบบอาหารแข็งด้วย *Aspergillus niger* โดยใช้กากชาที่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นซับสเตรท โดยใช้กากชาแห้ง 25 กรัม ร่วมกับการเติมสารละลายที่ประกอบด้วยแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ KH_2P0_4 3.5 กรัม $MgS0_4.7H_20$ 0.5 กรัม $MnS0_4.7H_20$ 2.8 มิลลิกรัม $FeS0_4.7H_20$ 8.7 มิลลิกรัม $ZnS0_4 \cdot 7H_20$ 2.5 มิลลิกรัม และ $CaCl_2$ 3.5 มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งของซับสเตรท ค่าความเป็นกรด-ด่างและความชื้นเริ่มต้น 4.5 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตของกลูโคอะไมเลส 198.4 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้งของกากชา ที่ชั่วโมงที่ 96

ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดแลกติก ราเส้นใยในตระกูล *Rhizopus sp.* เช่น *R. oryzae* และ *R. arrhizus* ได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากราสามารถผลิตกรดแอลแลกติกบริสุทธิ์ในสภาวะที่มีอากาศจากแป้ง น้ำตาล รวมทั้งวัสดุการเกษตรที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์เช่นเกลือแอมโมเนียมหรือไนเตรต และรามีเอนไซม์อะไมเลสที่สามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ทำให้ช่วยลดขั้นตอนในการแปรสภาพวัตถุดิบ เช่น ขั้นตอนในการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์หรือกรดก่อนนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมัก อีกทั้งไม่ต้องการไวตามินหรือกรดอะมิโนเสริมในกระบวนการหมักเหมือนแบคทีเรีย ซึ่งลักษณะดังที่ได้กล่าวมาเหมาะสมอย่างมากในการนำรา *Rhizopus* sp. มาใช้ในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่มีต้นทุนต่ำที่สามารถใช้วัตถุดิบทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอนได้โดยตรง ส่งผลให้การผลิตผลิตภัณฑ์มีต้นทุนที่ต่ำลง และใช้ปริมาณน้ำน้อย ผลิตภัณฑ์ที่เก็บเกี่ยวได้มีความเข้มข้นมากกว่าการหมักแบบอาหารเหลว ทำให้ลดขั้นตอนการทำให้ผลิตภัณฑ์เข้มข้นก่อน และกระบวนการแยกบริสุทธิ์หลังกระบวนการหมักที่ต่ำกว่าการหมักด้วยแบคทีเรีย ใช้พลังงานต่ำ และยังเกิดของเสียน้อยด้วย อาหารที่ใช้ในกระบวนการหมักมีองค์ประกอบที่ไม่ซับซ้อนและหาได้ง่ายอีกทั้งสามารถเป็นสารอาหารและเป็นแหล่งที่ราเกาะติดได้โดยตรง จึงทำให้กระบวนการหมักด้วย *Rhizopus* sp. มีความเป็นไปได้อย่างมากที่จะนำไปปรับปรุงและพัฒนาเพื่อให้เป็นอีกทางในการผลิตกรดแลกติก ซึ่งในปัจจุบันมีแนวโน้มต้องการที่สูงขึ้น ดังเช่นในงานวิจัยของ Oda และคณะ (2002) ศึกษาการหมักกรดแลกติกแบบอาหารแข็ง พบว่า *R. oryzae* IFO 4707 ให้ผลผลิตกรดแลกติกสูงสุด 10 มิลลิกรัมต่อกรัมแหล่งคาร์บอนดิบภายใน 6 วัน โดยแหล่งคาร์บอนที่ศึกษา ได้แก่ กากมันฝรั่งซึ่งประกอบด้วยแป้ง เซลลูโลส เฮมิ

เซลลูโลส และเพคติน โดยเชื้อ *R. oryzae* IFO 4707 สร้างอะไมเลสเพื่อย่อยกากมันฝรั่งได้อย่างรวดเร็วโดยเปลี่ยนแป้งในกากเป็นกลูโคสแล้วนำไปผลิตกรดแอล(+)แลกติกได้ภายใน 1 วัน สังเกตได้จากค่าความเป็นกรด-ด่างที่ลดลง นอกจากนี้ จากการศึกษาส่วนประกอบต่างๆ ในกากมันฝรั่งก่อนและหลังหมัก พบว่า ปริมาณแป้งในกากมันฝรั่งเริ่มต้นที่ 33.4 เปอร์เซ็นต์มวลแห้งถูกนำไปใช้อย่างต่อเนื่อง จนเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักมีปริมาณแป้งเหลืออยู่ในกากมันฝรั่งเพียง 7.6 เปอร์เซ็นต์มวลแห้ง ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 77.25 ของปริมาณแป้งที่ถูกนำไปใช้ต่อปริมาณแป้งเริ่มต้น

Ruengruglikit และ Hang (2003) ศึกษาการผลิตกรดแอล(+)แลกติกแบบอาหารแข็งจากซังข้าวโพด (corncobs) ที่ผ่านการย่อยด้วย 0.1 N NaOH (ซังข้าวโพด 5 กรัมต่อ 0.1 N NaOH 100 มิลลิลิตร) โดยใช้กล้าเชื้อระยะ conidia ที่ความเข้มข้น 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตรของ *R. oryzae* NRRL 395 โดยแปรปริมาณซังข้าวโพดที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและตัวค้ำจุน ปริมาณ $CaCO_3$ และ Rapidase Pomaliq พบว่าได้ผลผลิตกรดแอล(+)แลกติกสูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง (299.4$\pm$6.8 กรัมกรดแอล(+)แลกติกต่อกิโลกรัมของซังข้าวโพดแห้ง) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณของซังข้าวโพดแห้ง 5 กรัม ปริมาณ $CaCO_3$ 0.2 กรัม และปริมาณเอนไซม์ Rapidase Pomaliq 0.5 มิลลิลิตร ต่อ 0.1 N NaOH 100 มิลลิลิตรที่ใช้ในการย่อยซังข้าวโพดแห้ง

จากงานวิจัยของ Soccol (1994) พบว่า *R. oryzae* NRRL 395 สามารถผลิตกรดแอล(+)แลกติกได้สูงสุด 1.44 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยทำการหมักบนกากอ้อยที่มีสารละลายกลูโคสและ $CaCO_3$ ใน glass column reactor ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่อัตราการให้อากาศ 1.21 กรัมต่อชั่วโมงต่อคอลัมน์ เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักในอาหารเหลวในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในอาหารที่มีองค์ประกอบ (ต่อลิตร) ได้แก่ กลูโคส 120 กรัม $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 กรัม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25 กรัม $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04 กรัม ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 125 กรัมต่อลิตรต่อนาที อัตราการกวน 400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าได้ผลผลิตของกรดแอล(+)แลกติก น้อยกว่า (1.38 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.2 ผลิตภัณฑ์สารอินทรีย์ สารชีวภาพ และอื่นๆ ที่ได้จากการหมักแบบบนอาหารแข็ง

Substrates	Microorganisms	Processes/products	References
Cassava bagasse; cassava crude	*Rhizopus sp.*	Protein enrichment; growth kinetics; biotransformation of cassava crude	Soccol และคณะ (1994), (1995), (1996), (1997)
Cassava bagasse	*Aspergillus niger*	Citric acid	Vandenberghe และคณะ (1999),(2000) Kolicheski และคณะ (1997) Soccol และคณะ (1994), (1998) Barbosa และคณะ (1997)
Sugarcane bagasse	*Rhizopus oryzae*	Lactic acid	Beaux และคณะ (1997)
Cassava bagasse Coffee residues	*Pleurotus ostrreatus* *Lentinus edodes* *Flamulina velutipes* *Pleurotus ostreatus*	Mushrooms production	Leifa และคณะ (2000) Fan และคณะ (1999), (2001) Bramorski และคณะ (1998)
Cassava bagasse and coffee husks	*Klyveromyces marxianus*; *Ceratocystis filbriata* and *Rhizopus* sp.	Aroma production	Christen และคณะ (2000) Soares และคณะ (2000) Medeiros และคณะ (2000) Brand และคณะ (2000) Soccol และคณะ (1997)
Sugarcane bagasse	*Molus prunifolia Borkh*	Plant cell culture	Radjiskumar และคณะ (2001)
Coffee husk	*Gibberella fugikuroi*	Hormones (gibberellic acid)	Machado และคณะ (2000), (2002)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Soccol และคณะ (2003)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 เอนไซม์ที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง

Substrates	Microorganisms	Enzymes	References
Rice straw	*Trichoderma reesei*	Cellulase	Eun และคณะ(2006)
	Bacillus licheniformis	Hemicellulase Protease	
		Endo-β-glucanase	
Barley	*Talaromyces emersonii*	Xylanase	McCarthy และคณะ (2005)
Corn silage	*Thermoascus*	Endoglucanase	Colombatto และคณะ(2004)
Corn stalk	*aurantiacus*	Celobiohydrolase	
	Fusarium oxysporum	β-Glucosidase	
		Xylanase, β -Xylosidase	Panagiotou และคณะ
		CMCase	(2003)
Corn straw	*Penicillium decumbens*	Cellulase, xylanase	Yang และคณะ (2001)
Alfalfa	*Gliocladium* spp.	Endoglucanase	Hodrova และคณะ (1998)
	Orpinomyces joyonii	β-Glucosidase	
	Caecomyces communis	Cellulase, hemicellulase	Hill และคณะ (2001)
Forage silage	*Streptomyces*	Cellulase	
	Achromogenes	Cellulase, hemicellulase	Romero และคณะ (1999)
Wheat straw	*Neurospora crassa*	Lignin peroxidase	Peiji และคณะ (1997)
	Several fungi	Ligninase	
Sugarcane	*Trichoderma reesei*		Zadrazil และ Puniya
bagasse	*Phanerochaete*		(1995)
	chrysosporium		
	Coriolus versicolor		
	Streptomyces		
	viridosporus		
	White rot fungi		

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.3 เอนไซม์ที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง (ต่อ)

Substrates	Microorganisms	Enzymes	References
Sugarcane bagasse, wheat straw, corn cobs, rice husks, peanut shells, *etc*	*Phanerochaete chrysosporium*	Cellulase, xylanase	El-Nasser และคณะ (1997)
Soy husks	*Coriolus versicolor*	Glucanase Cellulase	Jha และคณะ (1995)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Graminha และคณะ (2008)

2.5.1 จุดเด่นของการหมักแบบอาหารแข็ง

ในปัจจุบันเทคโนโลยีการหมักแบบอาหารแข็งนิยมนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ กรดอินทรีย์ต่างๆ เป็นจำนวนมาก ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบอาหารเหลว การหมักแบบอาหารแข็งมีข้อเด่นกว่าการหมักแบบอาหารเหลวอยู่หลายข้อ ดังแสดงในตารางที่ 2.4 และสอดคล้องกับงานวิจัย Ashokkumar (2001) ได้ศึกษาเปรียบเทียบอิทธิพลของส่วนประกอบอาหารที่มีต่อการผลิตเบต้า-ฟรุคโตฟูราโนซิเดส (β-fructofuranosidase) ภายใต้การหมักแบบอาหารเหลวและอาหารแข็งด้วยรา *Aspergillus niger* โดยส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ในการหมักแบบอาหารเหลว (ต่อลิตร) คือ $(NH_4)_2SO_4$ 45 กรัม KH_2PO_4 23 กรัม $FeSO_4$ 0.1 กรัม $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ 7 กรัม ซูโครส 50 กรัม ยูเรีย 11 กรัม และสารสกัดยีสต์ 5 กรัม มีค่ากรด-ด่างเริ่มต้น 5.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วใช้กล้าเชื้อที่มีความเข้มข้นของสปอร์ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 190 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง ส่วนองค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการหมักแบบอาหารแข็ง คือ กากอ้อย 10 กรัม ที่ผสมกับอาหารที่ใช้ในการหมักแบบอาหารเหลวปริมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมด ค่ากรด-ด่างเริ่มต้น 5.0 ใช้กล้าเชื้อที่มีความเข้มข้นของสปอร์ 10^7 สปอร์ต่อกรัมของกากอ้อย นำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง พบว่าอัตราการผลิตของเบต้า-ฟรุคโตฟูราโนซิเดสที่ได้จากการหมักแบบของแข็ง คือ 81.8 ยูนิตต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ชั่วโมง 72 มากกว่าการหมักแบบอาหารเหลวที่ได้ 18.3 ยูนิตต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ชั่วโมง 120 ซึ่งมากกว่าถึง 5 เท่า

Sandhya และคณะ (2005) แสดงให้เห็นชัดเจนว่าผลผลิตเอนไซม์โปรติเอส (protease) จากกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งดีกว่าการหมักแบบอาหารเหลว โดยใช้ของเหลือจากเกษตรกรรมหลายชนิดมาเป็นซับสเตรท พบว่า รำข้าวสาลีเป็นแหล่งอาหารที่เหมาะสมและดีที่สุดในการผลิตโปรติเอสด้วยรา *A. oryzae* NRRL1808 ได้ผลผลิตโปรติเอสจากการหมักแบบอาหารแข็ง 31.2 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้งของซับสเตรท และได้จากการหมักแบบอาหารเหลว 8.7 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้งของซับสเตรท ซึ่งน้อยกว่าการหมักแบบอาหารแข็ง 3.5 เท่า

Nair และคณะ (2008) ทำการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตไซลาเนส (xylanase) ด้วยรา 34 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตไซลาเนสได้โดยคัดเลือกจาก clear zone ของราที่เจริญอยู่บนอาหาร Czapek's agar ระหว่างการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้รำข้าวสาลีและเติมสารละลายเกลือแร่ธาตุที่มีองค์ประกอบ (ต่อลิตร) ดังนี้ KCl 0.5 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัม $(NH_4)_2HPO_4$ 2.5 กรัม NaH_2PO_4 0.5 กรัม $CaCl_2.2H_2O$ 0.01 กรัม$FeSO_4.7H_2O$ 0.01 กรัม $ZnSO_4.7H_2O$ 0.002 กรัม และ birch wood xylan 1.0 กรัม เป็นการเพิ่มความชื้นให้กับซับสเตรทกับการหมักแบบอาหารเหลวโดยใช้อาหารเหมือนกัน ยกเว้น รำข้าวสาลี พบว่า ทั้ง 34 สายพันธุ์สามารถให้ผลผลิตไซลาเนสจากการหมักแบบอาหารแข็งมากกว่าการหมักแบบอาหารเหลว ดังแสดงในตารางที่ 2.5 ซึ่งสอดคล้องกับผลของ Malarvizhi (2003) ที่สามารถเพิ่มผลผลิตของไซลาเนสด้วยเชื้อ *Ganoderma lucidum* จากการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นประมาณ 30 เท่าเมื่อเทียบกับผลผลิตที่ได้จากการหมักแบบอาหารเหลว

Vintila และคณะ (2009) ทำการศึกษาเปรียบเทียบอัตราการผลิตและประสิทธิภาพของกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งกับแบบอาหารเหลวมีข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเซลลูเลสโดยรา *Trichoderma* 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *T. viride* ATCC13.631 กับ *T. viride* CMGB1 และคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลผลิตเอทานอลในสภาวะที่อุณหภูมิสูงได้ดี พบว่า การใช้ *T. viride* ATCC13.631 ในการหมักแบบอาหารแข็งให้ประสิทธิภาพสูงถึง 660 เปอร์เซ็นต์ และด้วย *T. viride* CMGB1 ให้ค่าประสิทธิภาพ 455 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่ามากกว่าการหมักแบบอาหารเหลวทั้งคู่ แต่ *T. viride* CMGB1 ให้ผลผลิตเซลลูเลส 158 FPU ซึ่งมากกว่า *T. viride* ATCC13.631 ที่ให้ผลผลิตเซลลูเลส 99 FPU ในการหมักแบบอาหารแข็งในระดับห้องปฏิบัติการ และพบว่าเซลลูเลสสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดอยู่ที่ 3.18 FPU/ml ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ค่ากรด-ด่าง 4.8 แต่ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ลดลงอยู่ที่ 2.56 และ 1.87 FPU/ml เมื่ออุณหภูมิอยู่ที่ 40 องศาเซลเซียสและ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แต่ยีสต์ที่คัดเลือกได้มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งยีสต์ทุกสายพันธุ์จะถูกยับยั้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองที่ได้มานั้น สรุปได้ว่า การ

ผลิตเซลลูเลสด้วยการหมักแบบอาหารแข็งนั้น มีค่าการใช้จ่ายที่ถูกกว่าการหมักแบบอาหารเหลว เอนไซม์ที่ได้สามารถนำไปใช้ย่อยพวกลิกโนเซลลูโลสได้ดี

Yang และ Wang (1999) ทำการศึกษาอิทธิพลของการหมักแบบอาหารแข็งและอาหารเหลวที่มีต่อการผลิตโปรติเอส (protease) และอะไมเลส (amylase) ด้วย *Streptomyces rimosus* TM-55 ในส่วนของการหมักแบบอาหารเหลวนั้น พบว่าโปรติเอสมีแอคติวิตีที่ชั่วโมง 12 และสูงสุดที่ 166 และค่ากรด-ด่างลดลงจาก 6.7 ไปเป็น 6.1 หลังชั่วโมงที่ 24 และเพิ่มขึ้นถึง 8.2 ที่ชั่วโมงที่ 480 แต่ละกรัมของแป้งให้ผลผลิตของโปรติเอส 17.4 ยูนิต (แต่ละมิลลิลิตรของของเหลวที่ได้จากการหมักจะสนับสนุนให้เกิดการผลิตโปรทิเอส 0.4 ยูนิต) ส่วนอะไมเลสเริ่มสร้างชั่วโมงที่ 6 และสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 แต่ละกรัมของแป้งสนับสนุนการผลิตอะไมเลส 691.3 ยูนิต (แต่ละมิลลิลิตรของของเหลวที่ได้จากการหมักจะสนับสนุนให้เกิดการผลิตอะไมเลส 15.9 ยูนิต) ส่วนการหมักแบบอาหารแข็ง พบว่าโปรติเอสเริ่มมีแอค ติวิตีที่ชั่วโมง 24 และสูงสุดที่ 232 แต่ละกรัมของแป้งให้ผลผลิตของโปรทิเอส 26.7 ยูนิต (หนึ่งกรัมของซับสเตรทแห้งสนับสนุนให้เกิดการผลิตโปรติเอส 15.8 ยูนิต) ส่วนอะไมเลสเริ่มสร้างชั่วโมงที่ 24 และสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 180 แต่ละกรัมของแป้งสนับสนุนการผลิตอะไมเลส 2642.7 ยูนิต (หนึ่งกรัมแห้งของซับสเตรทสนับสนุนให้เกิดการผลิตอะไมเลส1565 ยูนิต) ซึ่งค่าที่ได้มานี่บ่งบอกถึงความแตกต่างในการผลิตโปรติเอสและอะไมเลสระหว่างการหมักแบบอาหารแข็งกับการหมักแบบอาหารเหลว อย่างมีนัยสำคัญอย่างมาก อาหารเลี้ยงเชื้อในการหมักแบบอาหารเหลวประกอบด้วยแป้ง 22.4 ถึง 23.6 กรัมต่อลิตร ส่วนการหมักแบบของแข็ง มีแป้งอยู่ในซับสเตรทประมาณ 103.8 ถึง 166 กรัมต่อลิตร (ความหนาแน่นส่วนใหญ่ของอาหารแข็งอยู่ระหว่าง 0.5-0.8 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรในน้ำหนักเปียกที่มีความชื้นอยู่ที่ 65 เปอร์เซ็นต์) ดังนั้นอัตราการผลิตต่อกรัมแป้งของโปรติเอสและอะไมเลสในการหมักแบบอาหารแข็งเท่ากับ 53.4 และ 282.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าการหมักแบบอาหารเหลว ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของซับเสตรทสูงในการหมักแบบอาหารแข็งสนับสนุนการสร้างเอนไซม์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Chahal (1985) ที่ผลิตเซลลูเลสด้วย *Trichoderma reesei* พบว่าอัตราการผลิตเซลลูเลสต่อกรัมซับสเตรทในการหมักแบบอาหารแข็งเท่ากับ 72 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าการหมักแบบอาหารเหลว อัตราการผลิตอะไมเลสในการหมักแบบอาหารแข็งมากกว่าในอาหารเหลวถึง 2.82 เท่า

ตารางที่ 2.4 แสดงข้อดีกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งและอาหารเหลว

การหมักแบบอาหารแข็ง	การหมักแบบอาหารเหลว
– สามารถใช้วัตถุดิบเป็นสารอาหารและเป็นแหล่งที่จุลินทรีย์เกาะติดได้โดยตรง – สามารถใช้แม่แบบ (matrices) หรือตัวค้ำจุนได้มากมายกว้างขวาง เช่น ขนาด กลไกการต้านทาน ความพรุน – มีต้นทุนต่ำ – ใช้พลังงานในกระบวนการผลิตน้อย – กระบวนการเก็บเกี่ยวผลผลิตมีราคาไม่สูง (ในกรณีที่จำเป็นต้องมีการสกัดผลผลิตออกมาคือใช้สารละลายในปริมาณน้อยและราคาในการเก็บเกี่ยวต่ำกว่าการหมักแบบอาหารเหลว) – ใช้น้ำในปริมาณน้อย ทำให้มีเกิดน้ำเสียน้อยด้วย – มีศักยภาพกำลังการผลิตสูง (potential higher volumetric productivity) – ควบคุมการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ง่าย – อาหารที่ใช้ในกระบวนการหมักมีองค์ประกอบที่ไม่ซับซ้อนและหาได้ง่าย	– เนื่องจากส่วนมากอาหารที่ใช้อยู่ในรูปของสารละลายสมบูรณ์ทำให้ซับสเตรทสัมผัสกับเชื้อได้อย่างทั่วถึงเท่ากันทุกบริเวณ – ติดตามการเจริญเติบโตและการคำนวณหาปริมาณมวลชีวภาพได้ง่าย – ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างได้ง่าย – การให้อากาศทำได้ง่าย เนื่องจากในระบบมีน้ำปริมาณมากทำให้ออกซิเจนละลายได้ดี – มีการถ่ายเทความร้อนที่ดี – ใช้ระยะเวลาในการหมักน้อย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.5 เปรียบเทียบผลผลิตไซลาเนสจากกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งกับอาหารเหลวของรา 34 สายพันธุ์

Serial No.	Name of Strain	Xylanase IU / gram dried substrate	
		Solid state fermentation	Submerge fermentation
1	*Aspergillus niger* SBS3	724	33
2	*A. niger* SBS6*A.*	689	35
3	*niger* SBS8	644	35
4	*A. niger* SBS14	742	24
5	*A. niger* SBS19	630	39
6	*A. niger* SBS24	639	38
7	*A. niger* SBS28	408	39
8	*A. niger* SBS47	735	32
9	*A. niger* SBS57	753	27
10	*A. niger* SBS66	719	22
11	*Aspergillus flavus* SBS 44	738	31
12	*A. flavus* SBS65	191	6
13	*A. flavus* SBS68	650	30
14	*Aspergillus fumigatus* SBS58	608	38
15	*A. fumigatus* SBS62	613	38
16	*A. fumigatus* SBS63	587	20
17	*Aspergillus ochraceous* SBS4	489	10
18	*A. ochraceuos* SBS16	639	32
19	*A. ochraceous* SBS35	590	36
20	*Aspergillus sydowii* SBS45	543	40
21	*Penicillium* sp. SBS2	751	2
22	*Penicillium* sp. SBS10	554	27
23	*Penicillium* sp. SBS32	591	1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.5 เปรียบเทียบผลผลิตไซลาเนสจากกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งกับอาหารเหลวของรา 34 สายพันธุ์ (ต่อ)

Serial No.	Name of Strain	Xylanase IU / gram dried substrate	
		Solid state fermentation	Submerge fermentation
24	*Penicillium* sp.SBS52	696	15
25	*Penicillium citrinum* SBS 22	40	29
26	*P citrinum* SBS26	739	30
27	*P. citrinum* SBS51	215	16
28	*P citrinum* SBS53	221	12
29	*Penicillium janthenellum* SBS18	666	26
30	*Trichderma* sp.SBS56	325	35
31	*Trichoderma*sp. SBS60	564	24
32	*Trichoderma*sp. SBS64	361	7
33	*Trichoderma* sp.SBS67	625	17
34	*Gliocladium* sp.SBS13	428	34

ที่มา : ดัดแปลงจาก Nair และคณะ (2008)

2.5.2 การหาปริมาณเซลล์ทางอ้อม

ชีวมวลของรา (fungal biomass) เป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญอย่างเห็นได้ชัดสำหรับการวิเคราะห์ในกระบวนการหมัก แต่การวิเคราะห์ปริมาณชีวมวลของราโดยตรงในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งนั้น เป็นสิ่งที่ทำได้ยุ่งยากมาก เนื่องจากเส้นใยของราเจริญสอดแทรกเข้าไปในบริเวณช่องว่างของอาหารแข็ง ทำให้ยากต่อการแยกออกจากกันได้ ดังนั้น วิธีการติดตามชีวมวลของราในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งจึงนิยมใช้การวิเคราะห์ทางอ้อม โดยการวิเคราะห์องค์ประกอบที่มีอยู่ในเส้นใย (mycelia) เช่น กลูโคซามีน (glucosamine) เออกอสเตอรอล (ergosterol) ATP หรือ กรดนิวคลีอิก (nucleic acids) และยังได้มีการใช้วิธีการวัดทางกิจกรรมทางชีวภาพ เช่น กิจกรรมเอนไซม์ (enzymatic activity) อัตราการหายใจ (respiration rate) หรือ

อัตราการบริโภคสารอาหาร (nutrient consumption rate) จากการรายงานของ Desgranges,(1991) ได้ยืนยันว่า วิธีการวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีน เป็นตัวบ่งชี้ชีวมวลที่ดี

กลูโคซามีน ($C_6H_{13}NO_5$) เป็นน้ำตาลอะมิโนและเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญตัวหนึ่งในการสังเคราะห์ทางชีวเคมีของไกลโคซีเลทโปรตีนและลิปิด กลูโคซามีนเป็นส่วนหนึ่งที่อยู่ในโครงสร้างของโพลีแซคคาไรด์ ไคโตซานและไคตินที่พบอยู่ในผนังเซลล์ของรา

Sparringa และ Owens (1999) ได้ศึกษาการเจริญเติบโตของ *Rhizopus oligosporus* NRRL2710 ในภาวะที่มีส่วนประกอบอาหารและขนาดของไมซีเลียมเพลเล็ท (Mycelial pellets) ที่แตกต่างกัน โดยใช้กลูโคซามีนเป็นตัวบ่งชี้ถึงปริมาณชีวมวลของราด้วยวิธีของ Ride (1972) พบว่าขนาดของ mycelial pellets ที่มีขนาดใหญ่ ราสามารถเจริญเติบโตได้มากกว่าในระยะเวลาที่เท่ากัน โดยขนาดของ mycelial pellets ที่เลี้ยงในอาหารเหลว sabouraud dextrose ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางต่ำกว่า 5 มิลลิเมตรให้ปริมาณของกลูโคซามีน 51 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งชีวมวล ในขณะที่ขนาดของ mycelial pellets ที่อยู่ระหว่าง 16-35 มิลลิเมตรให้ปริมาณกลูโคซามีน 107 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งชีวมวล โดยใช้เวลาเลี้ยง 72 ชั่วโมงเท่ากัน และพบว่าองค์ประกอบของอาหารก็มีผลต่อการเจริญเติบโต โดยราเจริญเติบโตบนอาหารแข็ง sabouraud dextrose ได้ดีกว่า soymilk โดยวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนที่ได้จากราที่เจริญอยู่บนอาหารแข็ง sabouraud dextrose ได้ 111 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งชีวมวลและ 82 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้งชีวมวลจากราที่เจริญบนอาหารแข็ง soymilk ใช้เวลาเลี้ยง 24 ชั่วโมง ซึ่งถือว่าการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคซามีนเหมือนกับการวิเคราะห์ปริมาณราโดยตรง ซึ่งอาจจะมีอัตราการผันผวนไปบ้าง 4 เปอร์เซ็นต์สำหรับ mycelial pellets และ 11 เปอร์เซ็นต์สำหรับ mycelium ที่เจริญอยู่บนอาหารวุ้นโดยการคำนวณเปลี่ยนปริมาณกลูโคซามีนให้เป็นปริมาณชีวมวล คือ 1 กรัมกลูโคซามีน เท่ากับ 12 กรัมชีวมวล

Scotti และคณะ (2001) ใช้วิธีการวัดปริมาณกลูโคซามีนในการหาปริมาณชีวมวลของ *Cunninghamella elegans* ที่เจริญเติบในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็งและการหมักแบบอาหารเหลวที่สามารถเก็บเซลล์ได้โดยตรง พบว่าปริมาณกลูโคซามีนที่วิเคราะห์ได้ มีปริมาณเกือบคงที่ทุกช่วงระยะเวลาการหมัก และปริมาณกลูโคซามีนที่วิเคราะห์ได้จากเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลวและอาหารแข็งมีค่าใกล้เคียงกัน กลูโคซามีนจึงเป็นตัวบ่งชี้ถึงปริมาณชีวมวลทางอ้อมที่ดี

2.5.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ในการหมักแบบอาหารแข็ง

2.5.3.1 ปริมาณความชื้นของซับสเตรท

ปริมาณความชื้นเป็นปัจจัยที่สำคัญมากต่อกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง เพราะตัวแปรนี้มีผลต่อการเจริญเติบโต การสังเคราะห์ชีวสาร และการปลดปล่อยสารเมแทบอไลท์ ปริมาณความชื้นที่ต่ำเป็นต้นเหตุให้ความสามารถในการละลายของสารอาหารที่อยู่ในซับสเตรทลดลง ลดระดับการบวมน้ำและเพิ่ม แรงตึงผิวของน้ำ (water tension) ให้สูงขึ้น ซึ่งจะทำให้เซลล์ได้ปริมาณสารอาหารที่จะนำไปใช้เป็นสารตั้นต้นในการสร้างผลิตภัณฑ์และเพื่อการเจริญเติบได้น้อยลงตามไปด้วย แต่ถ้าปริมาณความชื้นสูงมากเกินไป จะทำให้ ความมีรูพรุน (porosity) ลดลง ทำให้การเคลื่อนที่ของออกซิเจนถูกจำกัด รา *R.oryzae* เป็นราต้องการอากาศในการเจริญเติบโต จึงส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์ อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนแบคทีเรียที่ไม่ต้องการ ปริมาณความชื้นที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และลักษณะรูปแบบของอาหารแข็งที่ใช้

Oriol และคณะ (1988) แสดงผลการทดลองปัจจัยความชื้นที่มีผลต่อการเจริญของ *Aspergillus niger* ในสภาวะการหมักแบบอาหารแข็ง โดยใช้แป้งมันสำปะหลังดิบและชานอ้อย ที่มีปริมาณความชื้นเริ่มต้นที่แตกต่างกัน พบว่า ปริมาณเซลล์ การบริโภคซับสเตรท และการเปลี่ยนแปลงของซับสเตรท (Substrate conversion: consumed substrate/initial substrate) เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณความชื้นเริ่มต้นของซับสเตรทเพิ่มขึ้น โดยในการทดลองที่ปริมาณความชื้นของซับสเตรท 42 เปอร์เซ็นต์ซึ่งเป็นค่าต่ำสุดที่ใช้ในการทดลอง ได้น้ำหนักแห้งของรา 0.123 กรัม ต่อกรัมแห้งเริ่มต้นของซับสเตรท มีอัตราการนำไปใช้ซับสเตรทอยู่ที่ 0.233 กรัมต่อกรัมแห้งเริ่มต้นของซับสเตรท และ การเปลี่ยนซับสเตรท 33.2 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ความชื้นเริ่มต้นของซับสเตรทที่ใช้สูงสุดในการทดลองคือ 70 เปอร์เซ็นต์ ได้ปริมาณน้ำหนักแห้งของรา 0.339 กรัม ต่อกรัมแห้งเริ่มต้นของซับสเตรท มีอัตราการการนำไปใช้ซับสเตรทอยู่ที่ 0.558 กรัมต่อกรัมแห้งเริ่มต้นของซับสเตรท และการเปลี่ยนซับสเตรท 79.5 เปอร์เซ็นต์

Corona และคณะ (2005) ได้ศึกษาถึงอิทธิพลของ water activity ต่อการเจริญเติบโตของ *Gibberella fujikuroi* และการผลิตกรดจิบเบอเรลลิก (gibberellic acid) พบว่าค่าของค่าวอเตอร์แอคติวิตี (water activity, a_w) มีผลต่อการเจริญเติบโตของ *Gibberella fujikuroi* อย่างเห็นได้ชัด พบว่าอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งถึงช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของรามากที่สุดอยู่ที่ค่าวอเตอร์แอคติวิตีระหว่าง 0.985-0.995 และเริ่มมีแนวโน้มลดลงหลังจากนั้น และ

พบว่าผลผลิตของกรดจิบเบอเรลลิกสูงสุด ในสภาวะที่มีค่าวอเตอร์แอคติวิตีอยู่ที่ 1- 0.98 ซึ่งเป็นจุดเดียวกับการเจริญเติบโตของราสูงสุดเช่นกัน

2.5.3.2 **การให้อากาศและการแพร่ของสารอาหาร** (aeration and nutrients diffusion)

ในการหมักแบบอาหารแข็ง ลักษณะโครงสร้างทางกายภาพของของแข็งและสถานะของเหลว(liquid phase)ในระบบมีอิทธิพลต่อการแพร่ของก๊าซและสารอาหาร การแพร่ของก๊าซมีหลักการการให้อากาศที่จำเป็นอยู่ 2 หลักการ คือ การให้ออกซิเจนเข้าไปสู่ในกระบวนการเมแทบอลิซึมในเซลล์และการกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์ ความร้อน ไอน้ำ และสารที่ระเหยได้ที่ผลิตขึ้นระหว่างการเมแทบอลิซึมออกไป การแลกเปลี่ยนของออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่างสถานะของแข็งกับสถานะก๊าซนั้นเกิดขึ้นทั้งส่วนข้างในและข้างนอกของอนุภาค ขึ้นอยู่กับปริมาณของพื้นที่ผิวหน้าที่สัมผัสกันระหว่างสองสถานะ (phase) เช่น ช่องว่างระหว่างโครงสร้างภายในขนาดของรูพรุนและขนาดของชิ้นส่วนซับสเตรท การเพิ่มอากาศสามารถทำได้โดยการให้อากาศที่ปลอดเชื้อและการกวน หรือเพิ่มความชื้นให้กับซับสเตรท แต่โดยทั่วไป การแพร่ของก๊าซสามารถเพิ่มขึ้นได้ด้วยเพิ่มขนาดของรูพรุนและลดขนาดชิ้นส่วนซับสเตรท การแพร่ของสารอาหารเกิดขึ้นที่เกิดขึ้นระหว่างอนุภาค (intraparticular level) ของตัวค้ำจุน ประกอบด้วยการแพร่ของสารอาหารไปสู่เซลล์และการย่อยซับสเตรทด้วยเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นมา โดยการย่อยจะเกิดขึ้นที่บริเวณผิวหน้าของซับสเตรทเป็นหลัก กระบวนการแพร่ของสารอาหาร มีความสำคัญมากในแบคทีเรียและยีสต์ในการหมักแบบอาหารแข็ง แต่มักไม่ค่อยเกิดปัญหามากนักในการเลี้ยงราเพราะไมซีเลียมสามารถเจริญเข้าไปข้างในโครงสร้างของแข็งได้

2.5.3.3 **อุณหภูมิ**

อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นในการหมักแบบอาหารแข็งเป็นผลที่เกิดจากกิจกรรมทางเมแทบอลิซึม (metabolic activity) หากการกำจัดความร้อนที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมดังกล่าวไม่เพียงพอ จะส่งผลกระทบต่อการงอกของสปอร์ การเจริญเติบโตของราและการสร้างผลิตภัณฑ์โดยตรง การหมักแบบอาหารแข็งมีการถ่ายเทความร้อนที่ต่ำมาก เพราะถูกจำกัดด้วยตัวซับสเตรทที่ใช้ การถ่ายเทความร้อนทั้งหมด (overall heat transfer) ขึ้นอยู่กับอัตราการถ่ายเทความร้อนข้างในและข้างนอกของอนุภาค และอัตราการถ่ายเทความร้อนตรงส่วนที่เป็นผิวหน้าของอนุภาคกับบริเวณส่วนที่อยู่ในสถานะก๊าซ การควบคุมอุณหภูมิเป็นสิ่งที่ยากมากในการหมักแบบอาหารแข็งมากกว่าการหมักแบบอาหารเหลว ดังนั้นวิธีการที่ใช้ในการควบคุมอุณหภูมิในการหมักแบบอาหารเหลวจึงไม่เหมาะสมต่อการหมักแบบอาหารแข็ง การให้อากาศอย่างเป็นระบบและเหมาะสมเป็นวิธีการหลักที่ใช้ในการควบคุมอุณหภูมิของซับสเตรท แต่อัตราการให้อากาศที่สูงจะมีผลต่อการลด water activity ของซับสเตรทโดยสูญเสียไปทางการระเหยกลายเป็นไอ การกวนก็สามารถช่วยควบคุม

อุณหภูมิได้เช่นกัน สำหรับ *R. oryzae* NRRL395 นั้น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก คือ 27 องศาเซลเซียส เมื่อใช้มันฝรั่งเป็นแหล่งคาร์บอน (Liu และคณะ, 2005) ซึ่งอุณหภูมิที่นิยมใช้ในงานวิจัยอยู่ในช่วง 27 – 35 องศาเซลเซียส (Zhou และคณะ, 2000; Huang และคณะ, 2005b; Efremenko และคณะ, 2006)

2.5.3.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

การวัดและการควบคุมตัวแปรตัวนี้ในการหมักแบบอาหารแข็งเป็นสิ่งที่ยากมาก เช่นเดียวกับการควบคุมอุณหภูมิ อย่างไรก็ตาม ซับสเตรทที่นำมาใช้นั้นส่วนมากจะมีความต้านทานผลกระทบนี้อยู่แล้ว เนื่องจากส่วนประกอบที่ซับซ้อนทางเคมีของตัวซับสเตรทเอง ซึ่งในกรณีนี้การควบคุมค่ากรด-ด่าง จึงไม่สำคัญมาก เมื่อใดที่สามารถควบคุมปัจจัยตัวนี้ได้โดยการเติมสารละลายบัฟเฟอร์ (buffering solutions) ที่อยู่ในสถานะของเหลวเข้าไป แต่วิธีการนี้อาจใช้ไม่ได้ดีเมื่อมีการขยายขนาดให้ใหญ่ขึ้น เนื่องจากซับสเตรทมากขึ้น ทำให้ความหนา หรือซับสเตรทรวมตัวกันเป็นก้อนมากขึ้น อาจทำให้สารละลายบัฟเฟอร์ที่ใส่ลงไปกระจายไม่เท่ากันทุกบริเวณ ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม คือ 5.0 – 6.0 (Huang และคณะ, 2003) Tay และ Yang (2002) รายงานว่า ปริมาณของกรดแลกติก เอทานอลและกรดฟูมาริกจะลดลงเมื่อค่าพีเอชลดลงจาก 6.0 เป็น 4.0 ซึ่ง Miura และคณะ (2003) สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 93 กรัมต่อลิตรที่พีเอช 6.0 – 6.5 Rosenberg และ Kristofikova (1995) พบว่า ค่าพีเอชในช่วง 4.8-6.0 ไม่มีผลต่อการผลิตผลิตภัณฑ์อื่นเช่นกรดมาลิกและกรดฟูมาริก เป็นต้น

Ellaiah และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อการผลิตกลูโคอะไมเลส ด้วย *Aspergillus sp.* A3 โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอนแล้วทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเบื้องต้นให้อยู่ในช่วง 3.0-7.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาณความชื้น 80 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.0 ให้ผลผลิตกลูโคอะไมเลสได้มากสุด คือ 109 ยูนิตต่อกรัม และพบว่าเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างสูงหรือต่ำกว่าค่าที่เหมาะสม จะส่งผลต่อการผลิตกลูโคอะไมเลสโดย *Aspergillus sp.* A3 เนื่องจากกิจกรรมทางเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ไวต่อการในการเปลี่ยนแปลงค่ากรด-ด่าง

2.5.3.5 การประยุกต์ใช้การหมักแบบอาหารแข็ง

การหมักแบบอาหารแข็งถูกนำไปใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ ทางอุตสาหกรรม เช่น การผลิตอาหารสัตว์ที่มีคุณค่าทางอาหารสูงขึ้น ไคโตซาน สารประกอบพวกอะโรมาติก เป็นต้น ดังแสดงผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ในตารางที่ 2.6 นอกจากนี้แล้ว ยังมีการประยุกต์เพื่อนำมาใช้งานในด้าน

อื่นๆ อีก เช่น นำมาใช้ในการบำบัดและการย่อยสลายสารประกอบที่มีอันตรายทางชีวภาพ (bioremediation and biodegradation) การทำลายพิษทางธรรมชาติ (biological detoxification) ที่มีอยู่ในของเสียทางเกษตรกรรม การแปรรูปของเสียทางชีวภาพของชีวมวล เช่น กากหรือเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร การเปลี่ยนแปลง (biotransformation) วัสดุที่มีมูลค่าหรือคุณภาพต่ำให้มีราคาและคุณภาพที่สูงขึ้น เช่น การเพิ่มสารอาหารเข้าไปในรำข้าวโพดเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ นำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารอินทรีย์ เอนไซม์ และผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรม เป็นต้น

ตารางที่ 2.6 การประยุกต์ใช้การหมักแบบอาหารแข็งในทางชีวภาพ

Sector	Application	Examples	References
Agro-Food Industry	Biotransformation of crop residues	Traditional food fermented (Koji, sake, ragi, tempeh), protein enrichment and single cell protein production, mushrooms production.	Pandey และคณะ (1988), Fan และคณะ (1999)
	Food additives	Aroma compounds, dyestuffs, essential fat and organic acids	Medeiros และคณะ (2000), Soares และคณะ (2000)
Environmental control	Bioremediation and biodegradation of hazardous compounds	Caffeinated residues, pesticides, polychlorinated biphenyls (PCBs)	Leifa และคณะ (2000), Ried และคณะ (2000), Sera และคณะ (2000)
	Biological detoxification of agro-industrial wastes	Coffee pulp, cassava peels, canola meal, coffee husk	Soccol และคณะ (2001), Fan และคณะ (2001)

ตารางที่ 2.6 การประยุกต์ใช้การหมักแบบอาหารแข็งในทางชีวภาพ (ต่อ)

Sector	Application	Examples	References
Industrial fermentation	Enzymes production	Amylases, amyloglucosidase, cellulases, proteases, pectinases, xylanases, glucoamylases	Germanoและคณะ (1998), Castilho และคณะ (2000), Souza และคณะ (2001)
	Bioactive products Organic acid production	Mycotoxins, gibberellins, alkaloids, antibiotics, hormones, Citric acid, fumaric acid, fumaric acid, itaconic acid, lactic acid	Vandenberghe และคณะ (2000), Soccol และคณะ (1994), (1998)
	Biofuel	Ethanol production	Yang และคณะ (2008), Vintila และคณะ (2009)
	Miscellaneous compounds	Pigments, biosurfactants, vitamins, Xantham	Makkar และคณะ (1999), Stedansky และคณะ (1999), Shih และคณะ (2008)

2.6 กากมันสำปะหลัง

มันสำปะหลัง (cassava, tapioca, manioc, mandioca หรือ yuca) มีชื่อสามัญหรือชื่อที่เรียกทั่วไปเป็นภาษาอังกฤษว่า cassava หรือ tapioca ในประเทศบราซิลและอาร์เจนตินา เรียกว่า madioca ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของมันสำปะหลังเป็นไม้พุ่มยืนต้น มีอายุอยู่ได้หลายปี ลักษณะลำต้นสูงแตกต่างกันตามพันธุ์ และสภาพแวดล้อมโดยอาจสูงถึง 1-5 เมตร ลักษณะของใบมันสำปะหลังเป็นแบบใบเดี่ยว (single leaf) สีของใบแตกต่างกันตามพันธุ์เช่นเดียวกับสีของลำต้น ระบบรากของมันสำปะหลังสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ได้แก่ รากจริง (true or wiry root) และรากสะสม (modified or storages roots) รากสะสมนี้จะเจริญกลายเป็นหัวมันสำปะหลัง โดยทั่วไปในต้นมันสำปะหลังต้นหนึ่งจะมีรากสะสมอาหารหรือหัวอยู่ประมาณ 5-20 หัวต่อต้น มันสำปะหลังเป็นพืชที่เก็บสะสมอาหารไว้ในราก เมื่อพืชมีการสร้างอาหารจากใบและส่วนเป็นสีเขียวแล้ว จะสะสมในรูปของคาร์โบไฮเดรต คือ แป้ง ไว้ในราก จะเห็นว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่ในราก

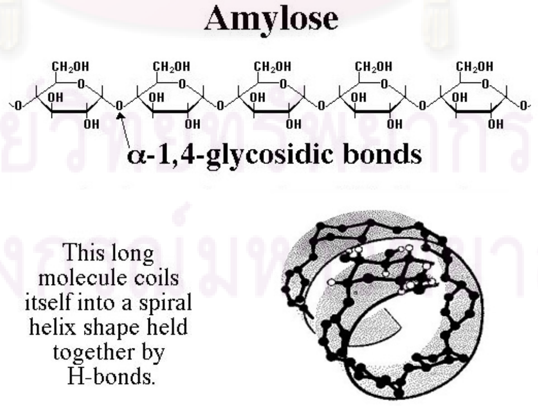
นั้นนอกจากน้ำแล้วคือแป้ง ซึ่งมีถึงร้อยละ 70-80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหัวมันสำปะหลังถูกนำเข้าสู่กระบวนการเพื่อเปลี่ยนให้เป็นแป้งมันสำปะหลังดิบจะมีส่วนที่เป็นกากที่เหลือออกมา

กากมันสำปะหลัง (cassava pulp) เป็นของแข็งที่เหลือจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง (ประมาณ 1 ถึง 1.5 ล้านตันกากแห้งต่อปี) และยังคงมีแป้งเป็นองค์ประกอบหลักอยู่สูง (ประมาณร้อยละ 50-60 โดยน้ำหนักแห้ง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณภาพหัวมันและกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังของโรงงาน) รองลงมาคือพวกเส้นใย (fiber) อยู่ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

2.6.1 โครงสร้างของแป้ง

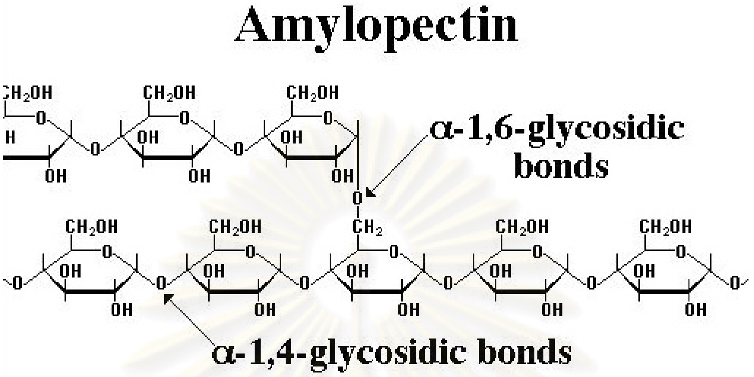
แป้ง (starch) เป็นโฮโมโพลีแซ็คคาไรด์ (Homopolysaccharide) ที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืช ประกอบด้วยหน่วยย่อย คือ กลูโคส ซึ่งจะถูกเก็บสะสมไว้ที่ส่วนต่างๆ ของพืช ได้แก่ ราก ลำต้นใต้ดิน ผล และเมล็ด ในธรรมชาติจะพบอยู่ในรูปเม็ดแป้ง แป้งประกอบด้วยพอลิเมอร์ 2 ชนิด ได้แก่

1. อะไมโลส (amylose) มีอยู่ในแป้งประมาณ 10-25% ประกอบด้วยกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1, 4-ไกลโคซิดิก เป็นสายยาวไม่แตกกิ่งหรือแขนง ดังแสดงในภาพที่ 2.8 จึงขดเป็นเกลียว helix อะไมโลสเป็นผงสีขาว ไม่มีรสหวาน เมื่ออยู่ในน้ำจะมีสีขุ่นขาว ทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนให้สีน้ำเงินเข้ม เกิดจากการที่โมเลกุลของไอโอดีนแทรก (intercalate) เข้าไประหว่างเกลียว helix ของอะไมโลส ทำให้เกิดสีม่วงขึ้นมา



ภาพที่ 2.8 โครงสร้างของอะไมโลส(amylose)

2. อะไมโลเพกติน (amylopectin) ประกอบด้วยกลูโคสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1, 4-ไกลโคซิดิก และมีการแตกกิ่งที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1, 6 -ไกลโคซิดิก ทำให้มีโครงสร้างเป็นกิ่ง ดังแสดงในภาพที่ 2.9 เมื่อทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนจะให้สีม่วงแดง เนื่องจากมีการแตกกิ่งจำนวนมาก ทำให้ไอโอดีนที่แทรกซึมเข้าไปติดได้ในปริมาณน้อย ทำให้เกิดสีม่วงแดงขึ้นมา



ภาพที่ 2.9 โครงสร้างของอะไมโลเพติน (amylopectin)

2.6.2 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยโมเลกุลของแป้ง

เอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งได้คือ อะไมเลส เป็นเอนไซม์ที่มีหลายชนิด สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มใหญ่ๆได้ 3 กลุ่ม ได้แก่

2.6.2.1.แอลฟา-อะไมเลส (α-amylase)

ชื่อตามระบบ α-1,4-glucan-4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1 เป็นพวกเอนโดเอนไซม์ (endoenzyme) ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายพันธะแอลฟา-1, 4 กลูโคซิดิก ระหว่างโมเลกุลกลูโคสภายในส่วนของอะไมโลสและอะไมโลเพคติดภายในโมเลกุลของแป้ง ได้เป็นพวกโอลิโกแซคคาไรค์(oligosaccharide) และแอลฟา–ลิมิท-เด็กตริน (α-limit-dextrins) ออกมา

2.6.2.2.บีตา-อะไมเลส (β-amylase)

ชื่อตามระบบ α-1,4-glucan maltohydrolase, EC 3.2.1.2 มีความจำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกของแป้งที่ตำแหน่งแอลฟา-1,4ในลักษณะการตัดสายพอลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบจากปลายสาย ด้านไม่มีหมู่รีดิวซ์ เข้าไปสู่ภายในสายครั้งละ 2 หน่วยของโมเลกุลกูลโคส และจะหยุดปฏิกิริยาทันทีที่พบพันธะแอลฟา-1,6 ไกลโคซิดิก

2.6.2.3. แกมมา-อะไมเลส (λ-amylase) หรือกลูโคอะไมเลส (glucoamylase) หรืออะมิโลกลูโคซิเดส (amiloglucosidase)

ชื่อตามระบบ λ-1,4-glucan glucohydrolase, EC 3.2.1.3 เป็นพวกเอ็กโซเอนไซม์ (exoenzyme) มีความจำเพาะเจาะจงต่อการย่อยสลายพันธะพันธะ α-1, 4 และ α-1, 6 กลูโคซิดิก โดยจะทำการตัดโมเลกุลของกลูโคสที่ตำแหน่งปลายของอะไมโลสและอะไมโลเพคติด ในลักษณะการตัดสายพอลิเมอร์อย่างเป็นระเบียบจากปลายสาย ด้านไม่มีหมู่รีดิวซ์เข้าไปสู่ภายในสายครั้งละหน่วยของโมเลกุลกูลโคส ดังนั้นผลผลิตที่ได้จะเป็นกลูโคสเพียวอย่างเดียว

2.6.3 ส่วนประกอบอื่น ๆของไฟเบอร์ ในกากมันสำปะหลัง

2.6.3.1 เซลลูโลส (Cellulose) พบในผนังเซลล์ (cell wall) ของพืช เป็นพอลิเมอร์ของ β–D-กลูโคส เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 ไกลโคซิดิก ซึ่งต่างจากพอลิเมอร์ของอะไมโลสและอะไมเพกติน พันธะ β-1, 4 ไกลโคซิดิก ทำให้พอลิเมอร์ของเซลลูโลสมีลักษณะยืดออกไปเป็นเส้นตรง ในขณะที่พันธะ α-1, 4-ไกลโคซิดิก จะทำให้เกิดการขดเป็นวง (helix) นอกจากนี้การเกิดพันธะอินเตอร์- และ อินตรา- เชน ไฮโดรเจน (inter- and intra-hydrogen bond) ทำให้เซลลูโลสมีความแข็งแรง และทนแรงดึงได้สูง เซลลูโลสจะถูกสลายด้วยเซลลูเลสซึ่งจะได้เป็นกลูโคสออกมา

2.6.3.2 เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์พืช ประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลเชิงเดี่ยว (monosaccharide) ชนิดต่างๆ ตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปเป็นจำนวน 100 โมเลกุลที่มีคุณสมบัติในการละลายเหมือนกันคือ ละลายได้ในสารละลายด่าง น้ำตาลเชิงเดี่ยวนี้แบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ เพนโทแซนส์ (pentosans) และ เฮกโซแซนส์ที่ไม่ใช่เซลลูโลส (non cellulose hexosans) น้ำตาลเชิงเดี่ยวที่พบมากในเฮมิเซลลูโลสคือ ดี-ไซแลนส์ (D-xylans)และ ดี-กลูโค-ดีแมนแนนส์ (D-gluco-D-mannans) และมีไซด์เชนส์เป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยวชนิดอื่นๆ เช่น แอล-อะราบิโนส์ (L-arabinoses)

2.6.3.3 ลิกนิก (lignin) เป็นสารประกอบพอลิเมอร์ไม่มีรูปผลึก จะเกาะกันอยู่ในชั้นระหว่างเส้นใย (middle lamella) ซึ่งทำหน้าที่ ยึดเกาะเส้นใยเข้าด้วยกัน และมีบางส่วนผสมอยู่ในเส้นใยด้วย โครงสร้างพื้นฐานของลิกนินคือ ฟีนิลโพรเพน (phenylpropane) หรือสาร ประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีคาร์บอน 9 อะตอม ประมาณร้อยละ 65–67เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มักพบอยู่รวมกับเซลลูโลส ลิกนินไม่ละลายน้ำ ไม่มีสมบัติทางการยืดหยุ่น เพราะฉะนั้นจึงทำ ให้พืชที่มีลิกนินมากมีความแข็งแรงทนทาน เมื่อพืชตายลิกนินจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ลิกเนส (Lignase) หรือลิกนินเนส(Ligninase)

เนื่องจากองค์ประกอบส่วนใหญ่ของกากมันสำปะหลัง คือ คาร์โบไฮเดรท จึงมีความเป็นไปได้สูงในการนำกากมันสำปะหลังกลับมาใช้ประโยชน์ โดยการแปรรูปกากมันสำปะหลังให้เป็นสารละลายน้ำตาลกลูโคส เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตพวกสารอินทรีย์ต่างๆ และ

เอนไซม์ ได้มีการรายงานการนำกากมันสำประหลังมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น รายงานของ Kosugi และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังด้วยยีสต์*Saccharomyces cerevisiae* Kyokai no.7 (strain K7) โดยการย่อยแป้งที่อยู่ในกากมันโดยใช้เอนไซม์ทางการค้า ได้แก่ แอลฟา-อะไมเลส กลูโคอะไมเลส และเซลลูเลสในการย่อยเส้นใยเซลลูโลส เพื่อเปลี่ยนให้เป็นกลูโคส พบว่า สามารถได้กลูโคส 37.2 กรัมต่อลิตร จากการใช้กากมันสำปะหลัง 5 เปอร์เซ็นต์ ในหน่วยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้ผลผลิตเอทานอล 0.50 กรัมต่อกรัมซับสเตรท อัตราการผลิต 0.77 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง คิดเป็นค่า $Y_{p/s}$ เท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์

Hong และคณะ (2001) ทำการศึกษาการผลิตไฟเทส (phytase) โดยใช้กากมันสำปะหลังร่วมกับการเติมแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ (กรัมต่อกิโลกรัมกากมันสำปะหลัง) K_2HPO_4 0.1 $MgSO_4$ 0.5 KCl 0.5 และ $FeSO_4$ 0.1 ด้วย *Aspergillus niger* PD ภายใต้การหมักแบบบนอาหารแข็ง ในภาวะที่มีความชื้น 65 เปอร์เซ็นต์ ได้ผลผลิตไฟเทส 6.73 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

Rattanachomsri และคณะ (2009) ใช้ crude multi-activity enzyme ซึ่งประกอบด้วยเซลลูเลส เพกทิเนส และเฮมิเซลลูเลสที่ได้จาก *Aspergillus niger* BCC17849 มาช่วยย่อยเส้นใยที่เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างในกากมันสำปะหลัง เพื่อทำให้แป้งที่อยู่ด้านในหลุดออกมา ทำให้ได้กลูโคสและไซโลสในปริมาณ 716 และ 67 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักกากมันสำปะหลัง แล้วนำน้ำตาลที่ได้ไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *Candida tropicalis* BCC7755 สามารถผลิตเอทานอลได้ 14.3 กรัมต่อลิตรจากกากมันสำปะหลัง 4 เปอร์เซ็นต์ในหน่วยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้อัตราการผลิต 0.48 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 93.7% ของผลผลิตตามทฤษฎีของแป้งและเซลลูโลสทั้งหมด หรือเท่ากับ 85.4% ของน้ำตาลทั้งหมดที่สามารถนำไปใช้ในการหมักได้ตามทฤษฎี

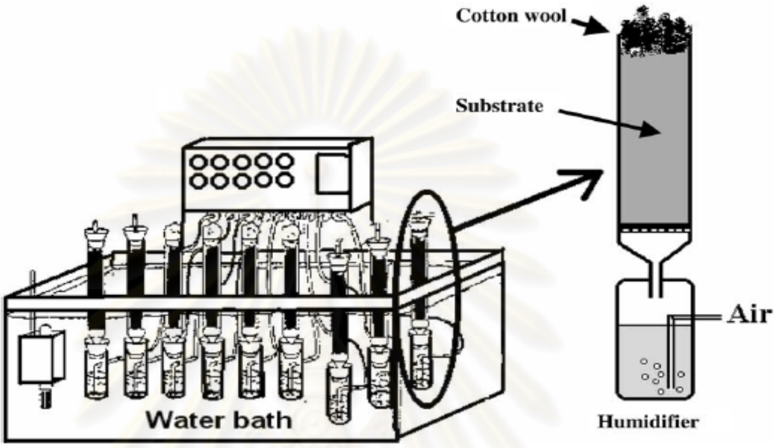
Pothiraj และคณะ (2006) ศึกษาการผลิตเซลลูเลสโดย *Rhizopus stolonifer* *Aspergillus niger* และ *Aspergillus terreus* โดยใช้กากมันสำปะหลัง 20 กรัมใส่น้ำกลั่น 60 มิลลิลิตรเพื่อให้มีปริมาณความชื้นอยู่ที่ 75 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *R. stolonifer* สามารถนำเซลลูโลสไปใช้ถึง 94 เปอร์เซ็นต์ภายใน 10 วัน รองลงมาคือ *A. niger* และ *A. terreus* นำไปใช้ 89 และ 88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และแอคติวิตีของเซลลูเลสสูงสุดจาก *R. stolonifer* อยู่ที่ 0.44 IU/ml และ *A. niger* and *A. terreus* มีแอคติวิตีเท่ากับ 0.12 and 0.1 IU/ml ตามลำดับ จากการผลการทดลองแอคติวิตีที่สูงของ *R.stolonifer* อาจเนื่องมาจากกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหารที่เหมาะสมสำหรับราชนิดนี้ ทำให้รามีการเจริญเติบโตได้ดี ส่งผลให้มีการผลิตเซลลูเลสออกมาเพื่อย่อยเซลลูโลสเพื่อให้ได้สารอาหารที่สามารถนำไปใช้ในกระบวนการเมทาบอลิซึมได้

2.7 ถังหมักสำหรับการหมักแบบอาหารแข็ง

ความแตกต่างระหว่างการหมักแบบอาหารแข็งกับการหมักแบบอาหารเหลวที่เห็นได้อย่างชัดเจนคือ ปริมาณของเหลวที่อยู่ในกระบวนการและซับสเตรท ในการหมักแบบอาหารแข็งการถ่ายเทเคลื่อนที่ของก๊าซระหว่างอนุภาคอยู่ในปริมาณต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบอาหารเหลว ยังรวมถึงลักษณะของตัวค้ำจุนที่แตกต่างกันออกไป เช่น ขนาดของซับสเตรท รูปแบบโครงสร้างและส่วนประกอบที่หลากหลาย ความพรุนของซับสเตรท การต้านท้านเชิงกล (mechanical resistance) ความสามารถในการซึมน้ำของซับสเตรท และปัจจัยอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ ปริมาณน้ำ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของรา ซึ่งปัจจัยที่กล่าวมาทั้งหมดนี้มีอิทธิพลต่อการออกแบบถังหมักและระบบการควบคุมค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ อย่างมาก รวมถึงกลไกการกวน และระดับความต้องการการปลอดเชื้อของกระบวนการหมัก มีส่วนที่ต้องคำนึงถึงการออกแบบถังหมักเช่นกัน ในขั้นตอนการพัฒนาการหมักแบบอาหารแข็งนั้น จุดประสงค์หลักในการออกแบบถังหมักก็เพื่อให้มีการปฏิบัติงานที่ดี ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับถังหมักที่ใช้ในการหมักแบบอาหารเหลวแล้ว การศึกษาวิจัยและการปรับปรุงถังหมักที่ใช้ในการหมักแบบอาหารแข็งยังด้อยพัฒนากว่ามาก ซึ่งการออกแบบถังหมักแบบอาหารแข็งในอุดมคติ ควรมีลักษณะดังนี้ (1) มีระบบที่สมบูรณ์แบบในการควบคุมอุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ และความชื้น (2) มีการออกแบบระบบการป้องกันการปนเปื้อนได้อย่างมีประสิทธิภาพ (3) สามารถทำให้ทุกบริเวณพื้นที่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถที่จะเจริญเติบโตได้ดีเท่าๆกันในทุกๆบริเวณ (4) มีระบบที่สามารถกำจัดสิ่งที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้ดีและเร็ว (5) มีความปลอดภัยในการปฏิบัติงานและอำนวยความสะดวกในการขยายขนาด ซึ่งถ้าสามารถออกแบบถังหมักประสิทธิภาพการทำงานสูงสำหรับการหมักแบบอาหารแข็ง ก็จะเป็นการส่งเสริมและพัฒนาการผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ออกมาได้ในปริมาณและคุณภาพที่สูงขึ้น

ปัจจุบันถังหมักที่ใช้ในกรรมวิธีการหมักแบบอาหารแข็งนี้ มีหลายชนิด โดยส่วนมากมักขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์และขนาดของการหมักโดยตรง มีนักวิจัยที่ใช้ถังหมักแบบอาหารแข็งผลิตผลิตภัณฑ์ ต่างๆ มากมาย ดังแสดงในตารางที่ 2.7 และตัวอย่างในงานวิจัยของ Vandenberghe และคณะ (2004) ที่ศึกษาการผลิตกรดซิติก โดย *Aspergillus niger* LPB 21ในถังหมักแบบต่างๆ ได้แก่ พบว่า สามารถผลิตกรดซิติก 309, 263 และ269 กรัมต่อกิโลกรัมแห้งของกากมันสำปะหลังที่ใช้เป็นอาหารสำหรับการหมัก ในถังหมักแบบ column fermentors, a tray bioreactor และ horizontal drum bioreactor ตามลำดับ ซึ่งผลผลิตของกรดซิติกที่ได้แตกต่างกันนั้น เนื่องมาจากถังหมักแต่ละชนิดมีความสามารถในการควบคุมปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น การให้อากาศได้แตกต่างกัน ซึ่งถังหมักที่นิยมใช้กันทั่วไป ได้แก่

ถังหมักแบบคอลัมน์ (column reactor) เป็นถังหมักที่ประกอบด้วยคอลัมน์หลายๆอัน ที่จะถูกบรรจุด้วยอาหารก่อนที่จะลงเชื้อ แล้วนำไปวางไว้ใน water bath เพื่อควบคุมอุณหภูมิ ไอน้ำที่เป็นตัวเพิ่มความชื้นนั้นจะผ่านเข้าไปในแต่ละคอลัมน์ นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในระดับห้องปฏิบัติการ ดังแสดงลักษณะของถังหมักในภาพที่ 2.10



ภาพที่ 2.10 ถังหมักแบบคอลัมน์ (column reactor)

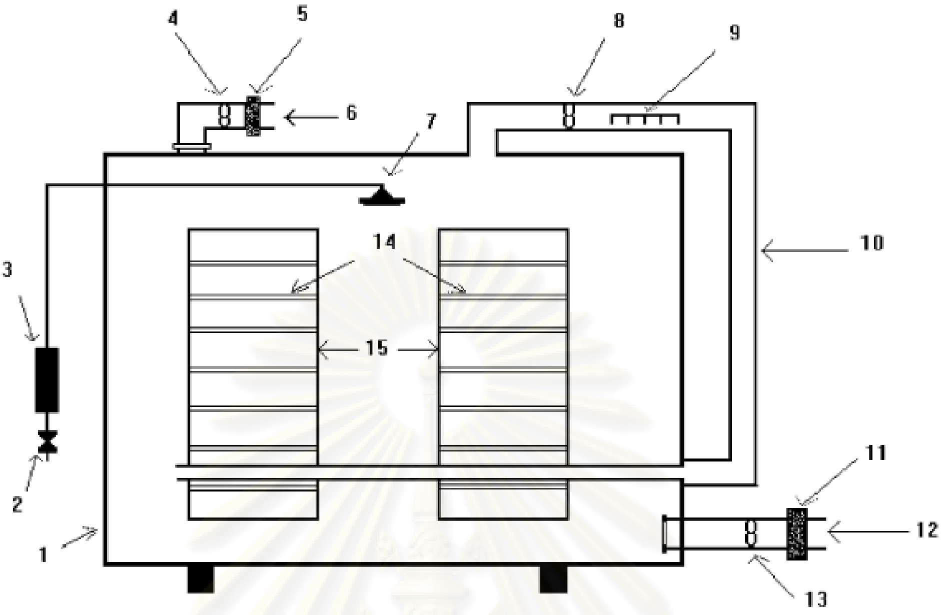
ถังหมักแบบถาด (Tray Fermentor) สามารถทำได้จากไม้ ไม้ไผ่ โลหะหรือพลาสติก ส่วนล่างของถาดเป็นชั้นของตะแกรงเพื่ออากาศไหลผ่านได้ง่ายสะดวกและเป็นส่วนที่ให้ซับสเตรทเกาะ แต่ละชั้นของถาดมีความความสูงประมาณ 30-50 มิลลิเมตร ซึ่งระหว่างชั้นแต่ละชั้น ควรมีช่องว่างที่ห่างกันอย่างเหมาะสม ถังหมักจะถูกตั้งไว้ในห้องที่ปลอดเชื้อเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น อากาศที่ปลอดเชื้อจะถูกเป่าเข้าสู่ห้องเพื่อเพิ่มออกซิเจนให้กับจุลินทรีย์ในการเจริญเติบโต ความชื้นและอุณหภูมิ จะถูกควบคุมที่ตัวห้อง

ประโยชน์ของถังหมักชนิดนี้ คือ ตัวถังที่ออกแบบมีโครงสร้างง่าย ไม่ซับซ้อน และลงทุนต่ำ การถ่ายเทออกซิเจนในส่วนที่เป็นของแข็งเกิดขึ้นโดยอาศัยหลักการแพร่แทนที่การให้พลังงานในการเคลื่อนที่ ความหนาของอาหารแข็งที่ใส่ลงในถาดที่ถูกจำกัดด้วยความสูงที่ไม่มากนักของถาด ทำให้อุณหภูมิ ปริมาณความชื้น และการถ่ายเทออกซิเจนทุกๆบริเวณมีค่าใกล้เคียงกัน แต่ต้องการพื้นที่ในบริเวณกว้างมาก ตัวอย่างถังหมักแบบนี้ที่เป็นที่นิยม ได้แก่ Koji-type reactor ดังแสดงในภาพที่ 2.11

Prado และคณะ (2005) ได้ศึกษาการผลิตกรดซิติกด้วย *Aspergillus niger* LPB 21โดยใช้กากมันสำปะหลังที่ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส กับกากมันสำปะหลัง โดยผสมในอัตราส่วนต่าง ๆ ทำการหมักโดยใช้ถังหมักแบบ tray พบว่าได้ผลผลิตกรดซิติกสูงที่สุด 26.9

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักแห้งของกากมันสำปะหลัง ในสภาวะที่มีการใช้กากมันสำปะหลังที่ผ่านความร้อนแล้วอย่างเดียว



ภาพที่ 2.11 ถังหมักแบบ Koji-type reactor

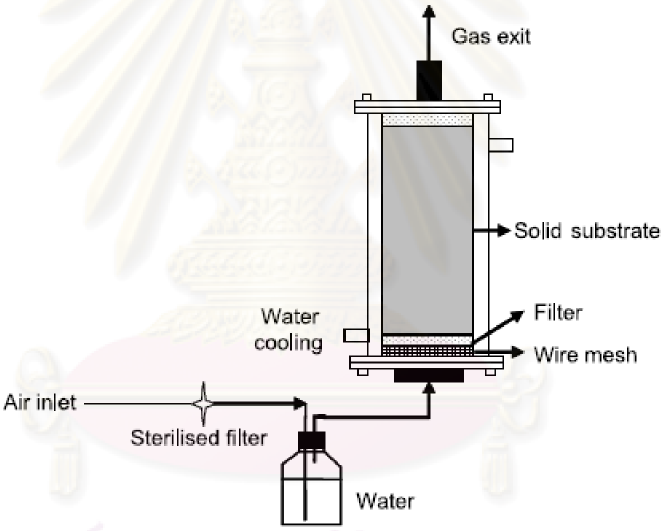
(1) Koji room, (2) water valve, (3) UV tube, (4, 8, 13) air blowers, (5, 11) air filters, (6) air outlet, (7) humidifier, (9) heater, (10) air recirculation, (12) air-inlet, (14) trays, (15) tray holders

ถังหมักแบบ packed-bed มีลักษณะเด่นคือมีระบบการอัดป้อนอากาศจากด้านล่างเข้าไปผ่านตะแกรงขึ้นสู่ด้านบนผ่านชั้นของอาหารแข็งที่อยู่ภายใน โดยทั่วไปรูปแบบของถังหมักจะประกอบด้วยคอลัมน์ที่เป็นแก้วหรือพลาสติกเพื่อไว้สำหรับบรรจุอาหารแข็งไว้บนตะแกรง ซึ่งจะมีระบบให้ความชื้นกับอาหารแข็งด้วยอากาศที่ชื้นอย่างต่อเนื่อง และยังสามารถทำการติดตั้งแจ๊คเกต (jacket) เพื่อให้น้ำไหลเวียนในการควบคุมอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการหมัก ดังแสดงในภาพที่ 2.12 ถังหมักชนิดนี้สามารถที่จะทำให้ปลอดเชื้อได้โดยไอน้ำร้อนที่ได้จากอ่างทำน้ำร้อน (water bath) ที่เตรียมไว้สำหรับทำอากาศชื้น เป่าเข้าสู่ภายในถัง และควรตั้งถังหมักไว้ในห้องที่สะอาดเพื่อลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น ถังหมักชนิดนี้ใช้ได้ง่ายไม่ยุ่งยาก ซับสเตรทที่มีคลักษณะเป็นเม็ดๆหรือเป็นชิ้นๆ จะถูกนำไปใส่ในภาชนะซึ่งอยู่ในระบบปิด จากนั้นจึงใส่กล้าเชื้อจุลินทรีย์ลงไป ในเรื่องของลักษณะของซับสเตรทได้มีแนวคิดในการปรับปรุงให้ซับสเตรทอยู่กับที่ ซึ่งจุดประสงค์ในการปรับปรุงเพื่อต้องการให้ซับสเตรทสัมผัสกับอากาศอย่างสม่ำเสมอ ไม่ลอยวนเวียนแล้วไปรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนอยู่ที่บริเวณส่วนใดส่วนหนึ่งในถังหมัก อย่างไรก็ตาม ถัง

หมักชนิดนี้มีข้อเสียคือ การเจริญเติบโตของเชื้อในแต่ละจุดไม่เท่ากัน การกำจัดความร้อนที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมทำได้ไม่ค่อยดีโดยเฉพาะความร้อนที่เคลื่อนที่มาจากข้างล่างซึ่งจะถูกนำมาพร้อมกับอากาศที่ถูดอัดเข้ามาแล้วถูกปล่อยออกขึ้นไปสู่ข้างบน ซึ่งมีผลไปถึงปัญหาในการขยายขนาด

Lu และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตกรดซิติก โดย *Aspergillus niger* ในถังหมัก packed-bed โดยใช้ Kumar หรือ sweet potato ที่ถูกหั่นจนมีลักษณะเป็นลูกบาศก์เป็นซับสเตรท พบว่า อัตราการผลิตกรดซิติกโดยรวมเท่ากับ 0.82 กรัมต่อกิโลกรัม Kumara ต่อชั่วโมง

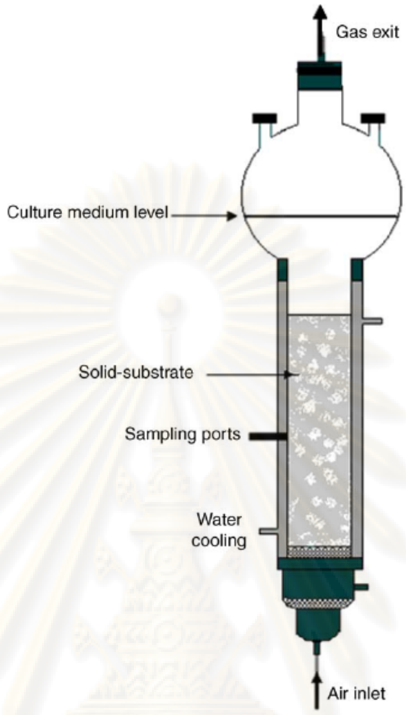
Aikat และคณะ (2001) ศึกษาการผลิตโปรติเอส โดย *Rhizopus oryzea* ในถังหมัก packed-bed โดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสามารถผลิตโปรติเอสได้สูงถึง 6381 ยูนิต เมื่อใช้รำข้าวสาลี 20 กรัมน้ำหนักแห้ง



ภาพที่ 2.12 ถังหมักแบบ packed-bed

ถังหมักแบบ Fluidised bed มีรูปร่างทรงกระบอกที่มีตะแกรงทำด้วยเส้นลวดหรือจานที่มีรูพรุนอยู่ด้านล่าง มีการติดตั้งเครื่องกวนไว้สำหรับช่วยกระจายอาหารแข็งที่นอนก้น มีการให้อากาศที่กรองแล้วจากด้านล่างด้วยอัตราเร็วที่เหมาะสม ดังแสดงในรูปที่ 2.13 ถังหมักชนิดนี้มีข้อดีคือ ทำให้สามารถเพิ่มพื้นที่ผิวของอาหารแข็งในการหมัก สามารถสร้างระบบที่ควบคุมการเติมน้ำ สารอาหาร และกรด-ด่าง ได้ง่าย นอกจากนี้ยังสามารถระบายความร้อนและอากาศเสียที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักได้ง่าย นอกจากนี้อนุภาคของอาหารแข็งสามารถอยู่ในสภาพแขวนลอยได้เนื่องจากการดันของอากาศจากด้านล่าง แต่ถ้าอาหารแข็งมีลักษณะจับตัวบนผนักถังหมัก

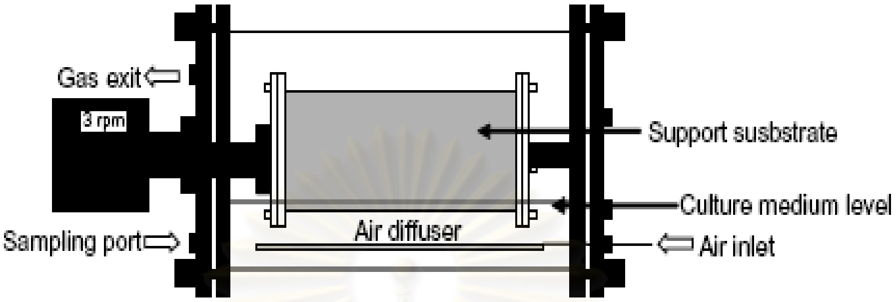
จะต้องมีการเพิ่มความเร็วในการหมุนเวียนภายในให้เร็วขึ้น แต่ข้อเสียของถังหมักแบบนี้ก็คือสิ้นเปลืองพลังงานสูงกว่าถังหมักแบบอื่น และมีข้อจำกัดของขนาดของถังหมักในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม



ภาพที่ 2.13 ถังหมักแบบ Fluidised bed

ถังหมักแบบ rotating drum ประกอบด้วยส่วนที่เป็นถังทรงกระบอก ที่ตั้งอยู่ในแนวขวางขนานกับพื้นราบและแกนไว้สำหรับหมุน ดังแสดงในภาพที่ 2.14 สามารถใส่ซับสเตรทได้ในปริมาณสองในสามส่วนของถัง พื้นที่หนึ่งในสามที่เหลือไว้เป็นพื้นที่สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ การหมุนของถังหมักจะช่วยทำให้อาหารแข็งผสมเข้าด้วยกันอย่างทั่วถึง โดยทำงานสัมพันธ์กับระบบการให้อากาศ อีกทั้งความร้อนที่เกิดจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ สามารถที่จะระเหยออกไปด้วยโครงของภาชนะที่เย็นซึ่งเกิดในระหว่างที่ถังหมุนอย่างช้าๆ ทำให้ซับสเตรทที่อยู่ข้างในพลิกกลับไปมาโดยสัมผัสกับผิวของภาชนะ ทำให้ความร้อนค่อยๆ ถูกระบายออกไป อย่างไรก็ตาม ถังหมักชนิดนี้มีผลเสียในเรื่องของแรงเฉือนจากการหมุน (shear forces) ซึ่งอาจทำลายโครงสร้างของรา เช่น ไมซีเลี่ยม สปอร์แรงเกียม เป็นต้น ซึ่งจะเป็นปัญหาอย่างมากในการผลิตที่ต้องการชีวมวล ความชื้นที่อยู่ซับสเตรทค่อนข้างระเหยออกเร็วทำให้ต้องมีหัวฉีดพ่นละอองน้ำเพื่อรักษาความชื้นของซับสเตรท ต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น ถ้าต้องการขยายขนาดในการผลิต เนื่องจากต้องออกแบบถังให้มีขนาดใหญ่ขึ้น การหมุนเคลื่อนที่อย่างต่อเนื่องตลอดเวลาของถังหมัก มักทำให้

ซับสเตรทที่มีความชื้นเกาะรวมกันเป็นก้อน และบริเวณส่วนที่เป็นช่วงต่อ เช่น บริเวณรอยต่อทางเข้าออกของอากาศ อาจเป็นแหล่งที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อที่ไม่ต้องการได้



ภาพที่ 2.14 ถังหมักแบบ rotating drum

ถังหมักแบบ Swing solid state เป็นถังหมักที่คล้ายกับ rotary แต่แตกต่างตรงที่การคลุกเคล้าเคลื่อนที่ของซับสเตรทไม่ได้มาจากการหมุนของถัง แต่ด้วยการเขย่าแทน

ถังหมักแบบ Stirred vessel เป็นถังปิดทรงกระบอกที่ตั้งตรงมี stirrer เคลื่อนไหวอยู่ข้างใน ปัญหาที่พบในการใช้ซับสเตรทในปริมาณมาก คือ จะเคลื่อนที่ได้ไม่เท่าเทียมกัน เป็นเหตุให้โครงสร้างซับสเตรทเกิดความเสียหาย ถูกทำลายไป

ตารางที่ 2.7 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้ถังหมักชนิดต่าง ๆ

Microorganism/ biocatalyst	Substrate	Product	Type of bioreactor	References
Aspergillus niger	Buckweed seed	Spores	Packed bed column	Kashyap และคณะ (2002)
A. niger	Cassava bagasse	Citric acid	Column fermenter	Di Luccio และคณะ (2004)
Bacillus subtilis	Rice bran	Iturin A	Tray	John และคณะ (2006)
B. thuringiensis	Wheat bran and bean cake powder	Bt wet powder	Cylindrical steel container	Vimala Devi และคณะ (2005)

ตารางที่ 2.7 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้ถังหมักชนิดต่างๆ (ต่อ)

Microorganism/ biocatalyst	Substrate	Product	Type of bioreactor	References
Mortierella alpina	Rice bran	Polyunsaturated fatty acid	Column reactor	Vandenberghe และคณะ (2000)
Penicillium simplicissimum	Olive oil cake + sugarcane bagasse	Lipase	Fixed bed reactor	Anisha และคณะ (2008)
Thermoascus auranticus	Wheat straw	Cellulase	Perforated drum bioreactor	Xiong และคณะ (2007)
Lipase from *Rhizomucor miehei*	-	Hexyl laurate	Packed-bed bioreactor	Babitha และคณะ (2007)
Erwinia sp.	Sucrose + free and calcium alginate immobilized cells	Palatinose	Packed bed reactor	Kota และคณะ (1999)
Microbial biofilm developed without prior inoculation	Clay beads + glucose-based synthetic wastewater	Organic acids and hydrogen	Horizontal packed-bed Bioreactor	Hama และคณะ (2007)
Lipase producing *R. Oryzae*	Cuboidal polyurethane foam biomass support particles	Bio-diesel fuel	Packed-bed reactor	Sukumaran และคณะ (2005

ตารางที่ 2.7 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้ถังหมักชนิดต่างๆ (ต่อ)

Microorganism/ biocatalyst	Substrate	Product	Type of bioreactor	References
Hydrogen producing sludge	Carbohydrate substrates enriched polyethylene-octane elastomer immobilized anaerobic sludge	Hydrogen and ethanol	Fluidized-bed and packed-bed reactor	Singhania และคณะ (2007)
Clostridium tyrobutyricum JM1	Polyurethane foam enriched with glucose medium	Biological hydrogen	Fixed-bed bioreactor	Wu และคณะ (2007)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Singhania และคณะ (2009)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัท	ประเทศ
กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)	Alphaphot-2 YS2	Nikon Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
แผ่นนับเม็ดเลือดแดง (Heamacytometer)	Neubauer Bright Line	Bocco Co., Ltd.	เยอรมัน
เครื่องชั่งแบบละเอียด (Electronic balance)	FX-180	A&D Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
เครื่องชั่งแบบหยาบ (Electronic balance)	FX-3000	A&D Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)	F-13	Horiba	ญี่ปุ่น
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบหมุน (Rotary incubator shaker)	G-25	New Brunswick Scientific Co., Inc.	สหรัฐอเมริกา
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบซ้ายขวา (Reciprocal incubator shaker)	HT	Infors AG	สวิตเซอร์แลนด์
เครื่องไฮเปอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography)	Shimadzu LC-6A	Shimadzu Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow hood)	NK system clean bench	International Scientific Supply	ไทย

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัท	ประเทศ
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-Visible Recording spectrophotometer)	KC4	Bio-tek Instruments,INC	สหรัฐอเมริกา
ตู้อบแห้ง (Oven)	UL-80	Memmert Co., Ltd.	เยอรมัน
มาตรตรวจวัดความเป็นกรดด่าง (pH combination electrode)	405-DPAS-SC-K85/225	Mettler toledo	สวิตเซอร์แลนด์
เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer)	Vortex-Genie No.2	Scientific Industries Inc.	สหรัฐอเมริกา
เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)	KT-30 SD	ALP Co., Ltd.	ญี่ปุ่น

3.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
Acetic acid ($C_2H_4O_2$)	Merck	เยอรมัน
Ammonium sulfamate ($H_6N_2O_3S$)	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์
3,5-Dinitrosalicylic acid ($C_7H_4N_2O_7$)	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์
Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	สยามชัยเคมิคอล	ไทย
Hydrochloric acid (HCl)	Merck	เยอรมัน
Iron(III) chloride anhydrous ($FeCl_3$)	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์
3-Methyl-2-benzothiazolinone hydrazone ($C_8H_{10}ClN_3S$)	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์
4-Nitrophenyl-α-D-glucopyranoside ($C_{12}H_{15}NO_8$)	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์
Sodium acetate anhydrous ($C_2H_3NaO_2$)	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
Sodium bisulfate anhydrous ($NaHSO_4$)	Fluka	สวิตเซอร์แลนด์
Sodium hydroxide (NaOH)	Merck	เยอรมัน
Sodium nitrite ($NaNO_2$)	Sigma	เยอรมัน
Sodium tetraborate, 99% ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$)	Sigma	เยอรมัน
Starch from potato	Sigma	เยอรมัน
Urea $(NH_2)_2CO$	Merck	เยอรมัน
Yeast extract (สารสกัดจากยีสต์)	Difco	สหรัฐอเมริกา

3.2 จุลินทรีย์และการเตรียมกล้าเชื้อ

3.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาการผลิตกรดแลกติก คือ *Rhizopus oryzae* NRRL 395 จาก Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.2 วิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์

ใช้เข็มเขี่ยสปอร์ของรา *R. oryzae* NRRL 395 ลากลงบนอาหารวุ้น Potato dextrose agar หรือ PDA ประกอบด้วย มันฝรั่ง 50 กรัมต่อลิตร กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และวุ้น 18 กรัมต่อลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อทุกๆ เดือน

3.2.3 การเตรียมกล้าเชื้อในระยะ Conidia

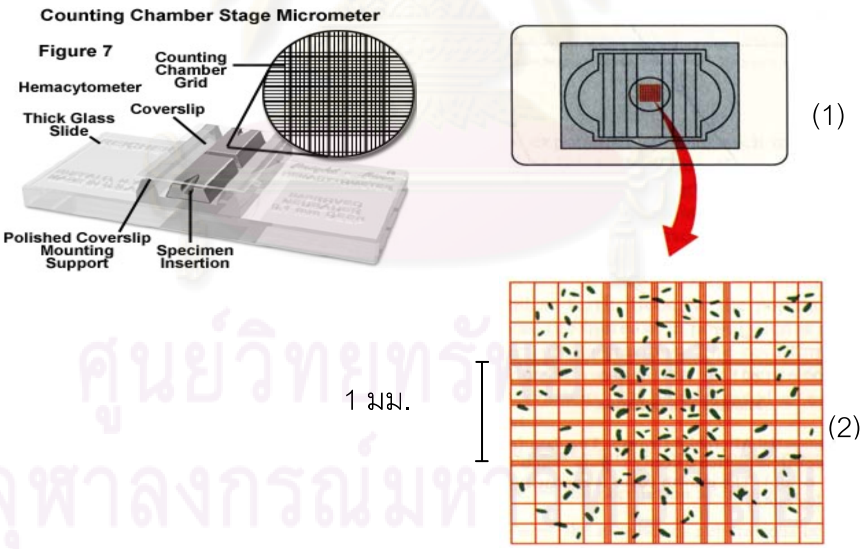
เลี้ยงรา *R. oryzae* NRRL 395 บนอาหารเลี้ยงวุ้น PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 7 วัน เมื่อราเจริญเต็มที่แล้วใช้เข็มเขี่ยสปอร์ ใส่น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร เขี่ยสปอร์ให้กระจาย ปิเปตสปอร์แขวนลอยมาประมาณ 20 ไมโครลิตร ถ่ายลงบน Haemacytometer ที่ปิดด้วย Cover slip นับจำนวนสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า ตามแนวเส้น ดังรูปที่ 3.1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การคำนวณหาความเข้มข้นโดยใช้ haemacytometer

ปริมาตรใน 25 ช่องใหญ่ (400 ช่องเล็ก)	= 0.1	ลูกบาศก์มิลลิเมตร
สมมติค่าเฉลี่ยจำนวนสปอร์ใน 1 ช่องใหญ่	= X	เซลล์
ใน 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด	(X)x25	เซลล์
ใน 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด	(X)x25x10	เซลล์
ใน 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีจำนวนเซลล์ทั้งหมด	(X)x25x10x1000	เซลล์
	$= 25(X)x10^{4}$	

โดยนับจำนวนสปอร์ตามแนวเส้นทั้งหมด 5 ช่อง นำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยเพื่อคำนวณความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอย จากนั้นเตรียมสปอร์แขวนลอยที่ความเข้มข้น 10^{7} สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตรเทลงในอาหารเหลวสำหรับการงอกของสปอร์ปริมาตร 90 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที นาน 4 ชั่วโมง



รูปที่ 3.1 ลักษณะของ Haemacytometer (1) ภาพที่มองจากด้านบนของ chamber มีตารางอยู่กลางสไลด์ (2) ภาพขยายของตารางที่กำลังขยาย 10 เท่าประกอบด้วยสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดใหญ่แต่ละด้านยาว 1 มิลลิเมตร ภายในมีสี่เหลี่ยมจัตุรัสเล็กบรรจุอยู่ 25 ช่องแต่ละช่องมีเส้น 3 เส้นล้อมรอบโดยแต่ละด้านยาว 0.2 มิลลิเมตร ภายในมีสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาดเล็กบรรจุอยู่อีก 16 ช่อง

ที่มา : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, (2551)

3.3 สูตรอาหารที่ใช้ในการหมัก

3.3.1 อาหารสำหรับการงอกของสปอร์ (spore germination medium)

กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร

สารสกัดจากยีสต์ 2 กรัมต่อลิตร

3.3.2 อาหารสำหรับกระบวนการหมักแบบอาหารแข็ง

อาหารเลี้ยงรา *R. oryzae* NRRL 395 ที่ใช้ในงานวิจัย คือ กากมันสำปะหลัง 7.5 กรัม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที มาเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในปริมาณต่างๆ ตามที่คำนวณในภาคผนวก ข ข้อที่ 1 ในส่วนของการศึกษาแหล่งไนโตรเจน จะใช้สารละลายของสารสกัดจากยีสต์และยูเรียความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 กรัมต่อลิตร แทนน้ำกลั่น

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

ส่วนของการทดลองได้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนหลัก โดยส่วนแรกทำการศึกษาผลของปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณน้ำที่เติมเสริม ความเร็วรอบการเหวี่ยง และปัจจัยทางเคมี ได้แก่ ธาตุอาหารเสริมในกระบวนการหมัก และส่วนที่ 2 ทำการศึกษาผลเชิงบวกของการเสริมเซลลูเลส (Cellulase) และกลูโคอะไมเลส (Glucomylase) ที่มีต่อจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแอล(+)แลกติกจากกากมันสำปะหลัง ดังแสดงภาวะต่างๆ ที่ศึกษาในตารางที่ 3.1 และตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 แสดงปัจจัยกายภาพและทางเคมีที่ศึกษาต่อต่อจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแอล(+)แลกติกจากกากมันสำปะหลัง

ส่วนที่ 1	เปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่เติมเสริม	ความเร็วรอบการเหวี่ยง (รอบต่อนาที)	การควบคุมค่ากรด-ด่าง	ธาตุอาหารเสริม
ชุดที่ 1.1	40, 60, 80	0	/	-
ชุดที่ 1.2		0	-	-
ชุดที่ 1.3		150	/	-
ชุดที่ 1.4		150	-	-
ชุดที่ 1.5	เลือกภาวะที่เหมาะสมที่สุดจากชุดที่ 1.1-1.4 มาใช้ศึกษา			/

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.2 แสดงภาวะในการหมักที่มีการเสริมกลูโคอะไมเลส (glucoamylase) และเซลลูเลส (cellulase) ต่อจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแอล(+)แลกติกจากกากมันสำปะหลัง

ส่วนที่ 2	เปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่เติมเสริม	ความเร็วรอบการเหวี่ยง (รอบต่อนาที)	การควบคุมค่ากรด-ด่าง	ธาตุอาหารเสริม	เอนไซม์ที่เสริม
ชุดที่ 2.1	เลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุดจากชุดการทดลองในส่วนที่ 1 มาใช้ศึกษา				กลูโคอะไมเลส
ชุดที่ 2.2					เซลลูเลส
ชุดที่ 2.3					กลูโคอะไมเลสร่วมกับเซลลูเลส

3.4.1 ผลของปริมาณน้ำที่เติมเสริมลงในอาหารแข็ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และรอบการเหวี่ยง

ทำการหมักในระดับขวดเขย่า โดยใส่หัวเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.3 ที่มีความเข้มข้นของสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในกากมันสำปะหลังฆ่าเชื้อ 7.5 กรัม ในข้อ 3.3.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยแปรปริมาณน้ำที่เติมเสริมลงกากมันสำปะหลัง โดยการเติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในปริมาตรต่างๆโดยคิดเทียบจากน้ำหนักรวมทั้งหมดให้ได้ปริมาตรที่มีอยู่ในระบบทั้งหมดคิดเป็น 40 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเร็วรอบการเหวี่ยง 0 80 และ 150 รอบต่อนาที เลี้ยงนาน 7 วัน เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง นำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และบันทึกน้ำหนักตัวอย่างเปียก ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกส่วนใสออกจากอาหารแข็งและเส้นใยรา วัดปริมาตรส่วนใสแล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส กรดแลกติก กรดฟูมาริก และเอทานอล ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) และวิเคราะห์แอคติวิตี้ของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ราสร้างขึ้น ส่วนอาหารแข็งและเส้นใยรานำไปแช่แข็งก่อนการทำระเหิดแห้งด้วยเครื่อง Freeze drier จากนั้นนำอาหารแข็งและเส้นใยราแห้งไปบันทึกน้ำหนักแห้ง ตัวอย่างแห้งนำไปวิเคราะห์ปริมาณแป้งที่เหลือในอาหารแข็ง และปริมาณเซลล์แห้งในรูปของไคติน

3.4.2 การศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน

นำสภาวะการหมักที่ได้ผลผลิตกรดแลกติกที่มากสุดจากข้อ 3.4.1 มาทำการเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจนที่เสริมเข้าไปในกระบวนการหมักระหว่าง ยูเรีย และสารสกัดจากยีสต์ โดยทำให้เป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 กรัมต่อลิตร แทนปริมาณน้ำกลั่น

จากนั้นใส่หัวเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.3 ที่มีความเข้มข้นของสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในกากมันสำปะหลังฆ่าเชื้อ 7.5 กรัม ในข้อ 3.3.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง นำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และบันทึกน้ำหนักตัวอย่างเปียก ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกส่วนใสออกจากอาหารแข็งและเส้นใยรา วัดปริมาตรส่วนใสแล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส กรดแลกติก กรดฟูมาริก และเอทานอล ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) และวิเคราะห์แอคติวิตี้ของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ราสร้างขึ้น ส่วนอาหารแข็งและเส้นใยรานำไปแช่แข็งก่อนการทำระเหิดแห้งด้วยเครื่อง Freeze drier จากนั้นนำอาหารแข็งและเส้นใยราแห้งไปบันทึกน้ำหนักแห้ง ตัวอย่างแห้งนำไปวิเคราะห์ปริมาณแป้งที่เหลือในอาหารแข็ง และปริมาณเซลล์แห้งในรูปของไคติน

3.4.3 ศึกษาผลเชิงบวกของการเสริมเซลลูเลสและกลูโคอะไมเลสในการหมักกรดแลกติกบนกากมันสำปะหลังต่อจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมัก

ศึกษาจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักกรดแลกติกบนกากมันสำปะหลังที่เสริมเซลลูเลสและกลูอะไมเลสในกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่างๆ กันในระดับขวดเขย่า ในส่วนของกลูโคอะไมเลส จะทำการเติมเอนไซม์ที่ผ่านการกรองด้วยกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตทเพื่อกำจัดจุลินทรีย์และตะกอนต่างๆ ในปริมาตร 3.85 และ 7.70 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้นพร้อมกับการใส่หัวเชื้อ ส่วนการเติมเซลลูเลสทำการเติมเอนไซม์ที่ผ่านการกรองแล้วเช่นกันในปริมาตร 45 92.5 และ 182.5 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิที่อยู่ในช่วง 50-55 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที เมื่อเริ่มต้นการหมักเติมหัวเชื้อเริ่มต้นที่เตรียมโดยวิธีในข้อ 3.3.2 ที่มีความเข้มข้นของสปอร์ 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเซลลูเลส และอะไมเลสที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในกากมันสำปะหลังฆ่าเชื้อ 7.5 กรัม นำไปเลี้ยงในภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.4.1 หรือ 3.4.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง นำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และบันทึกน้ำหนักตัวอย่างเปียกก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกส่วนใสออกจากอาหารแข็งและเส้นใยรา วัดปริมาตรส่วนใสแล้วนำไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส กรดแลกติก กรดฟูมาริก และเอทานอล ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) และวิเคราะห์แอคติวิตีของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ส่วนอาหารแข็งและเส้นใยรานำไปแช่แข็งก่อนการทำระเหิดแห้งด้วยเครื่อง Freeze drier จากนั้นนำอาหารแข็งและเส้นใยราแห้งไปบันทึกน้ำหนักแห้ง ตัวอย่างแห้งนำไปวิเคราะห์ปริมาณแป้งที่เหลือในอาหารแข็ง และปริมาณเซลล์แห้งในรูปของไคติน

3.5 วิธีการวิเคราะห์

3.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก กรดฟูมาริก เอทานอล ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่องเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC)

นำตัวอย่างส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสมาทำการเจือจางให้ความเข้มข้นเป็น 0.1 เท่า นำมากรองผ่านกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตทฉีดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเครื่องไฮเพอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) เพื่อหาปริมาณกรดแลกติก กรดฟูมาริก เอทานอล และกลูโคส

คอลัมน์	Biorad Aminex HPX-87H ion exclusion organic acid column ขนาด 300 มิลลิเมตร x 7.8 มิลลิเมตร
สารละลายตัวพา	กรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้น 0.005 mM
อุณหภูมิ	45 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	0.6 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจวัด	RI detector (Shimadzu รุ่น RID-6A)
เวลาที่อยู่ในคอลัมน์	25 นาที

คำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแลกติก กรดฟูมาริก เอทานอล และกลูโคสที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร

3.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณแอลฟา - อะไมเลส

นำตัวอย่างส่วนใส 125 ไมโครลิตร เติมลงในน้ำแป้งความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ที่ละลายอยู่ในสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 ปริมาตร125 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ในส่วนของชุดควบคุมจะใส่แค่น้ำแป้งเท่านั้น หลังจากบ่มน้ำแป้งแล้ว 30 นาที นำมาเติมสารละลาย DNSA 500 มิลลิลิตรลงไป แล้วค่อยเติมตัวอย่างส่วนใสลงไปในส่วนของชุดควบคุม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการลดอุณหภูมิให้เย็นทันที นาน 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ เข้าสู่สมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานที่แสดงในภาคผนวก ก. ข้อที่ 1 คำนวณปริมาณกลูโคสที่ได้ออกมา นำกลับไปคำนวณค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ในหน่วยยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น ดังแสดงการคำนวณในภาคผนวก ข ข้อที่ 4

3.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคอะไมเลส

นำตัวอย่างส่วนใส 125 ไมโครลิตร เติมลงในสารละลาย 4-ไนโตรฟีนิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ที่ละลายอยู่ในสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.0 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ในส่วนของชุดควบคุมจะใส่สารละลายโซเดียมเตตระโบเรตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 575 มิลลิลิตรลงไปด้วย นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาในส่วนของชุดตัวอย่างด้วยการเติมสารละลายโซเดียมเตตระโบเรตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ เข้าสู่สมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานที่แสดงในภาคผนวก ก ข้อที่ 2 คำนวณปริมาณไนโตรฟีนอล (ρ-nitrophenol) ที่ได้ออกมา เพื่อนำกลับไปคำนวณค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ในหน่วยมิลลิกรัมต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น ดังแสดงการคำนวณในภาคผนวก ข ข้อที่ 5

3.5.4 การวิเคราะห์ปริมาณแป้งที่เหลืออยู่ในกากมันสำปะหลัง

นำสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.25 โมลาร์ 9 มิลลิลิตรใส่ลงกากมันแห้ง 1 กรัม นำไปย่อยที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 60 นาทีด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ทำให้เย็นลง แล้วนำไปปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อแยกส่วนของแข็งออกจากของเหลว นำส่วนของเหลวที่ได้ไปทำการเจือจาง 10 เท่า วัดปริมาณกลูโคสที่ได้ด้วยเครื่องมือ YSI แล้วนำผลที่ได้มาคำนวณให้อยู่ในหน่วย มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น ดังแสดงการคำนวณในภาคผนวก ข ข้อที่ 3

3.5.5 การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ทางอ้อม

โดยใช้วิธีการวิเคราะห์กลูโคซามีนซึ่งเป็นหน่วยย่อยของไคตินที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ของราเป็นตัวแทนในการบ่งชี้ปริมาณเซลล์แห้ง ขั้นตอนในการวิเคราะห์ แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

3.5.5.1 การสกัดเอาไคตินออกจากผนังเซลล์ของรา

นำสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 10 โมลาร์ 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในกากมันแห้งหนัก 0.1 กรัม ที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลองที่มีฝาปิด บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที จากนั้นนำมาเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการไล่ออกซิเจนโดยใช้ก๊าซไนโตรเจนประมาณ 1 นาที นำไปย่อยที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ด้วยหม้อนึ่งความดันไอ เพื่อให้ได้ส่วนที่เป็นไคตินออกมา ทำให้เย็นลงถึงอุณหภูมิห้องด้วยน้ำประปา

3.5.5.2 การวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคซามีน

นำส่วนสารละลายไคตินที่ได้จากข้อ 3.5.5.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในช่วง 5.0 ถึง 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียวไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10 โมลาร์ ปรับปริมาตรจนได้ 10 มิลลิลิตร ดูดสารละลายเจือจางไคตินมา 0.5 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลายต่างๆ ตามภาคผนวก ก ข้อที่ 3 โดยจะทำการเติมสารละลายโซเดียมไนเตรต 0.5 มิลลิลิตร ตามด้วยสารละลายโซเดียมไบซัลเฟต 0.5 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยนำไปไว้ที่ตู้บ่มใช้ความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวียงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ดูดตัวอย่างที่ได้มา 0.6 มิลลิลิตร นำมาเติมสารละลายแอมโมเนียมซัลฟาเมตลงไป แล้วนำไปไว้ในตู้บ่มใช้ความเร็ว 150 รอบต่อนาที นาน 5 นาที จากนั้นน้ำมาเติมสารละลาย 3-เมทิล-2-เบนโซไทโซลิโนน ไฮดราโซนท ไฮโดรคลอไรด์ (MBTH) 0.2 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ทำให้เย็นลง แล้วเติมสารละลายเฟอริคคลอไรด์ 0.2 มิลลิลิตร ลงไป ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที นำส่วนของเหลวไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน ที่แสดงในภาคผนวก ก ข้อที่ 3 เพื่อคำนวณเป็นปริมาณกลูโคซามีน ออกมา ดังแสดงในภาคผนวก ข ข้อที่ 6

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

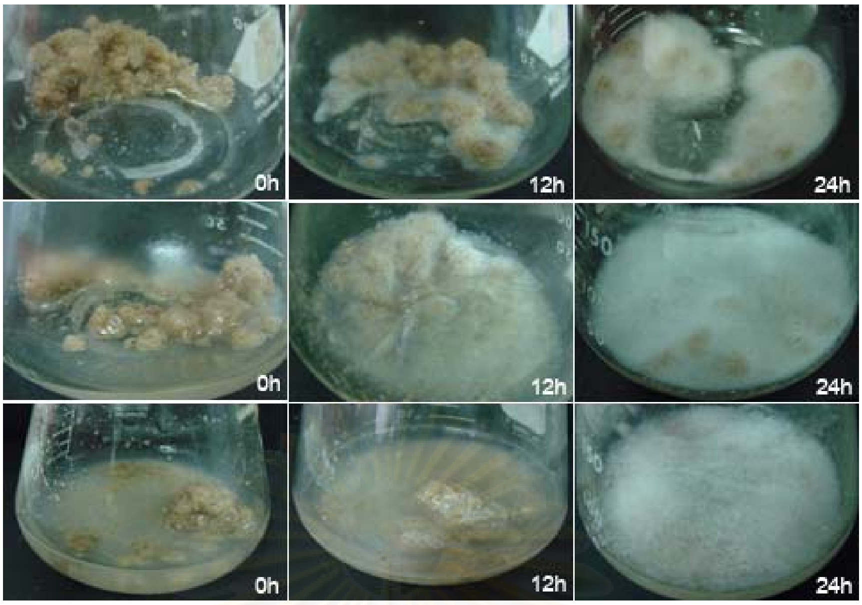
บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

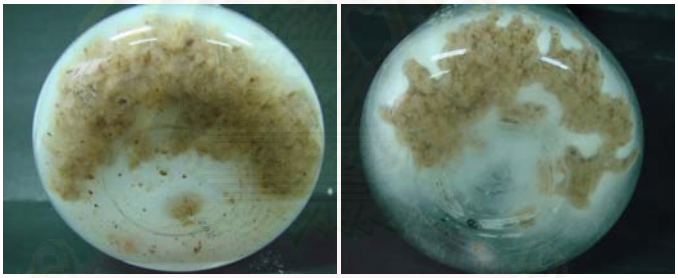
ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งในระดับขวดเขย่าจากกากมันสำปะหลังซึ่งทำหน้าที่เป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและวัสดุยึดเกาะสำหรับเส้นใยรา โดยแปรปัจจัยทั้งกายภาพและเคมี ได้แก่ ปริมาณน้ำที่เติมเสริมลงในอาหารแข็งกากมันก่อนเติมหัวเชื้อ ค่าความเป็นกรด-ด่าง รอบการเหวี่ยง แหล่งไนโตรเจนเสริมในอาหารแข็งกากมัน การเสริมเอนไซม์ 2 ชนิดก่อนการหมักและระหว่างการหมัก โดยเอนไซม์ทั้งสองชนิด ได้แก่ เซลลูเลส และกลูโคอะไมเลส

4.1 เปรียบเทียบปริมาณน้ำที่เติมเสริมในอาหารแข็ง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และรอบการเหวี่ยง

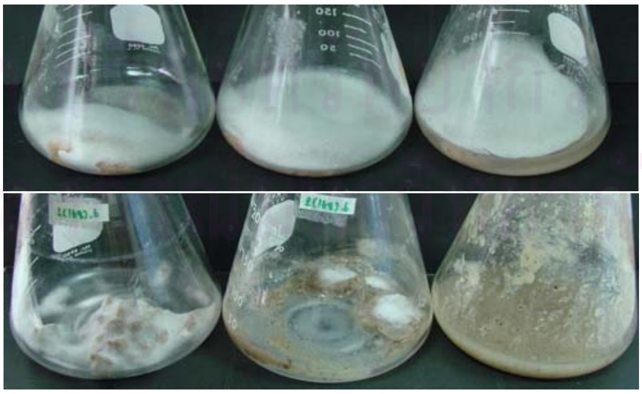
ศึกษาและเปรียบเทียบจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลกติกระดับขวดเขย่าโดยการหมักแบบอาหารแข็งที่ใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ราจะมีการเจริญเติบโตอย่างสังเกตได้ชัดจากชั่วโมงที่ 0 ถึง 24 ดังแสดงในภาพที่ 4.1 จากนั้นอัตราการเจริญจะลดลงและราจะนำสารอาหารไปใช้ในการดำรงชีวิตและสร้างผลิตภัณฑ์มากกว่าเพื่อการเจริญเติบโต ในการเลี้ยงแบบภาวะที่อยู่นิ่งไม่มีการเขย่านั้น ไมซีเลียของราจะเจริญอยู่บนบริเวณผิวหน้าอย่างเห็นได้ชัด โดยมีลักษณะเป็นเส้นใยฟูอยู่ที่ผิว และมีบางส่วนที่เจริญแทรกซึมเข้าไปในกากมัน ดังแสดงในภาพที่ 4.2 แต่เมื่อนำไปเลี้ยงในภาวะที่รอบการเหวี่ยง 150 รอบต่อนาที พบว่า ภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริมลงไป 80 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ลักษณะของอาหารเป็นแบบกึ่งของเหลว กล่าวคือ มีน้ำอยู่ในปริมาณมาก ทำให้ไมซีเลียของราเจริญอยู่ในอาหารกึ่งของเหลวผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกับอาหารแทนที่จะปกคลุมอยู่บริเวณผิวหน้า ดังแสดงในภาพที่ 4.3 ซึ่งต่างจากในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ที่ไมซีเลียของราบางส่วนยังเจริญปกคลุมอยู่บนบริเวณผิวหน้าของกากมัน และเมื่อนำกากมันแห้งหลังการหมักที่ผ่านการระเหิดแห้งโดยใช้ความเย็น(Lyophilize) มาทำการศึกษาหาปริมาณเซลล์ทางอ้อม โดยใช้กลูโคซามีนที่เป็นส่วนย่อยของไคตินซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์รา พบว่า ค่าที่ได้ในแต่ละชั่วโมงนั้นไม่ค่อยแตกต่างกันมากนัก แต่มีแนวโน้มในการเจริญในช่วงระยะแรก แล้วจะค่อยๆ คงที่ในชั่วโมงท้ายๆ ดังแสดงในภาพที่ 4.4



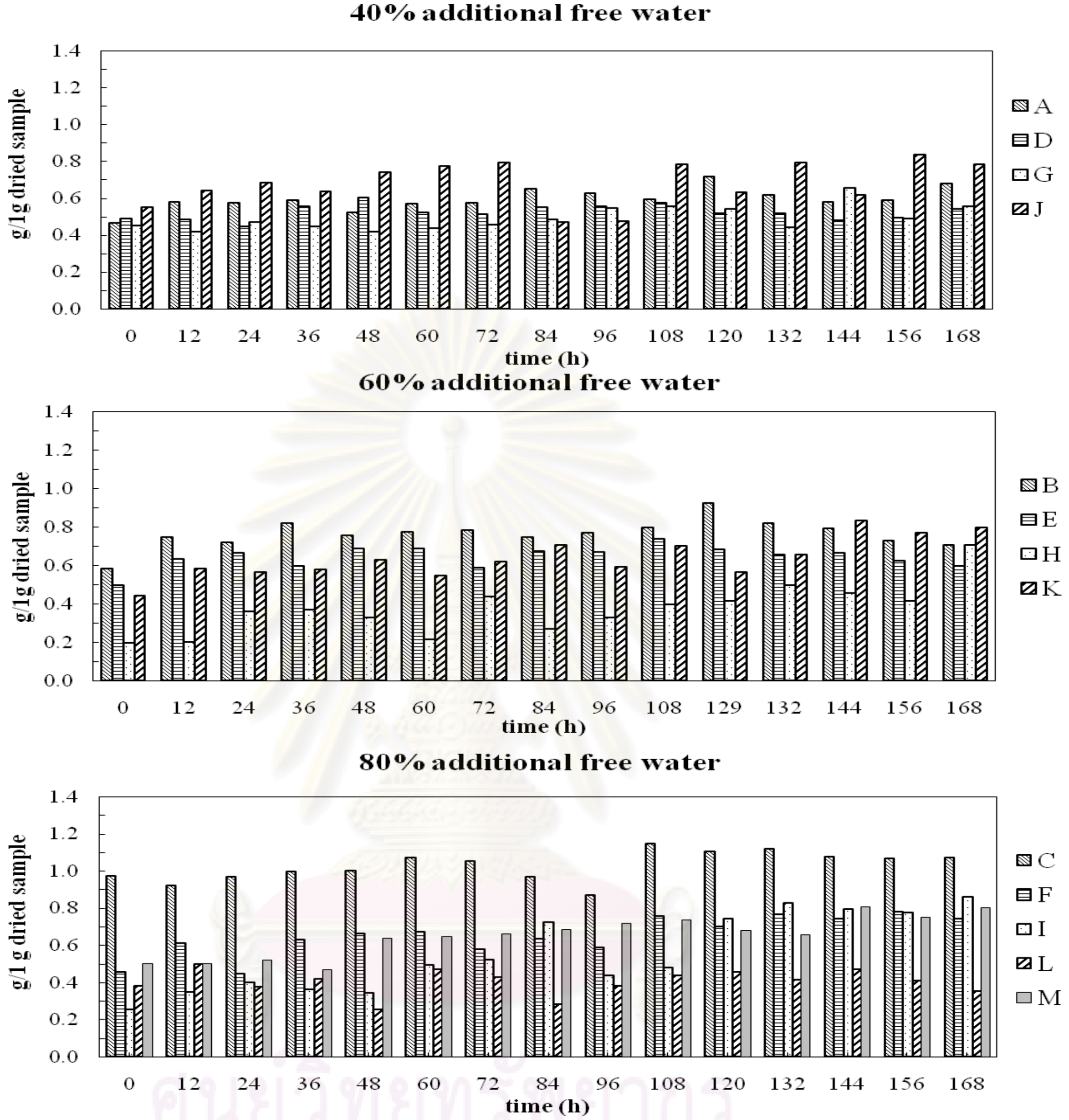
ภาพที่ 4.1 ลักษณะการเจริญของ *R. oryzae* บนกากมันสำปะหลัง ที่ชั่วโมงที่ 0 12 และ 24 ในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 เปอร์เซ็นต์ (แถวบน) 60 เปอร์เซ็นต์ (แถวกลาง) และ 80 เปอร์เซ็นต์ (แถวล่าง)



ภาพที่ 4.2 ลักษณะการเจริญของ *R. oryzae* ที่ปกคลุมทั่วกากมัน ในภาวะการเลี้ยงแบบไม่มีการเขย่า



ภาพที่ 4.3 ลักษณะการเจริญของ *R. oryzae* บนกากมันสำปะหลัง ที่ชั่วโมงที่ 168 ในภาวะที่ไม่มีการเขย่า (แถวบน) กับในภาวะที่รอบการเหวี่ยง 150 รอบต่อนาที (แถวล่าง)



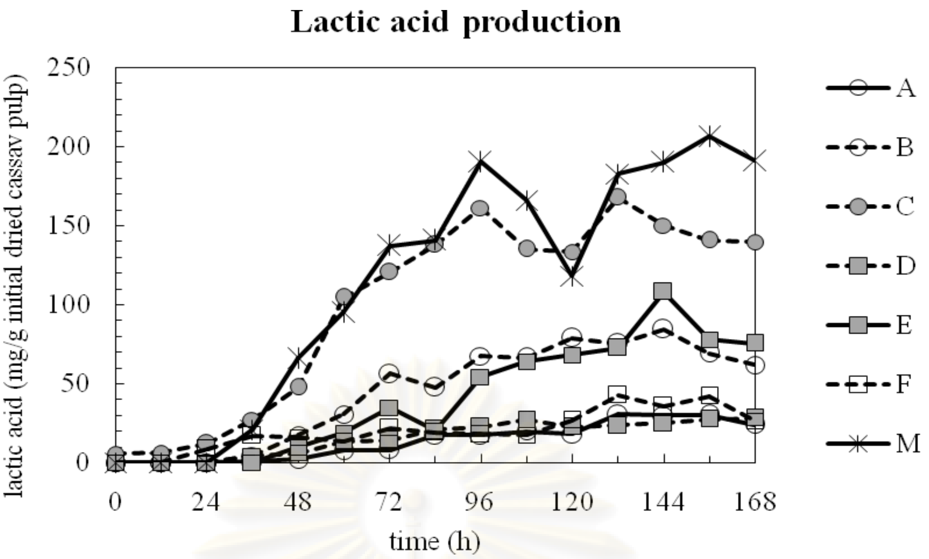
ภาพที่ 4.4 แสดงปริมาณชีวมวล ณ เวลาใดๆ ของ *R. oryzae* ในภาวะการเลี้ยงต่างๆ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

- shaking at 0 rpm, control pH 6.0 (A,B,C)
- shaking at 150 rpm, control pH 6.0 (D,E,F)
- shaking at 0 rpm, no control pH 6.0 (G,H,I)
- shaking at 0 rpm, no control pH 6.0 (J,K,L)
- shaking at 80 rpm, control pH 6.0 (M)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การหมักที่รอบการเหวี่ยง 150 รอบต่อนาที มีผลต่อผลผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้นในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 และ 60 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากทั้งส่วนที่เป็นกากมันและราที่เจริญครอบคลุมอยู่มีการเคลื่อนที่เกาะกลุ่มไปพร้อมๆ กัน แต่สำหรับภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ที่มีลักษณะของอาหารแบบกึ่งของเหลว มีน้ำอยู่ในระบบมากทำให้ขณะที่ทำการเขย่าอยู่นั้น อาหารและราบางส่วน จะติดอยู่ข้างๆ ขวด ซึ่งบ่งบอกได้ว่าความเร็วในระดับนี้รุนแรงเกินไปสำหรับการหมักที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแรงที่เกิดขึ้นนี้ อาจทำให้เกิดแรง ที่เรียกว่า "แรงเฉือน"ขึ้น ซึ่งมีผลต่อการเกิดความเสียหายและทำลายเซลล์บางส่วน เนื่องจากลักษณะทางสัณฐานของราเองที่เป็นแบบเซลล์แขวนลอยเมื่อต้องอยู่ในภาวะที่มีแรงมาปะทะสูงๆ ทำให้เส้นใยราขาด แตกหักเป็นชิ้นๆ (Fragmentation) และเสียหายได้จึงมีแนวโน้มเป็นไปได้ว่าแทนที่เซลล์จะสร้างผลิตภัณฑ์ เซลล์จึงต้องเปลี่ยนวิถีเมแทบอลิซึมเป็นสร้างเซลล์และรักษาสภาพแทนผลกระทบที่เกิดขึ้นระหว่างเซลล์รากับแรงที่เกิดการจากการกวนผสม (mixing) นั้น เป็นหลักการทางเชิงกลของการแตกหักของไมซีเลีย เนื่องจากแรงเฉือนที่มากเกินไป (Piccoli-Valle, 2003) ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองโดยลดรอบการเหวี่ยงลงเหลือ 80 รอบต่อนาที พบว่า ผลผลิตกรดแลกติกที่ได้มีปริมาณสูงกว่าทุกภาวะที่การหมักทั้งแบบไม่มีการเขย่าและเขย่า โดยควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ดังแสดงในภาพที่ 4.5 และยังพบว่าการเขย่ายังช่วยลดปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นด้วย ดังแสดงในภาพที่ 4.6 ถึง 4.8 เนื่องจากรา *R. oryzae* เป็นราที่ต้องการอากาศในการเจริญ Tay และ Yang (2002)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.5 จลนพลศาสตร์การผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังโดยแปรเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่เติมเสริมและความเร็วรอบการเหวี่ยง มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

40% additional free water, 0rpm, control pH (A)

60% additional free water, 0rpm, control pH (B)

80% additional free water, 0rpm, control pH (C)

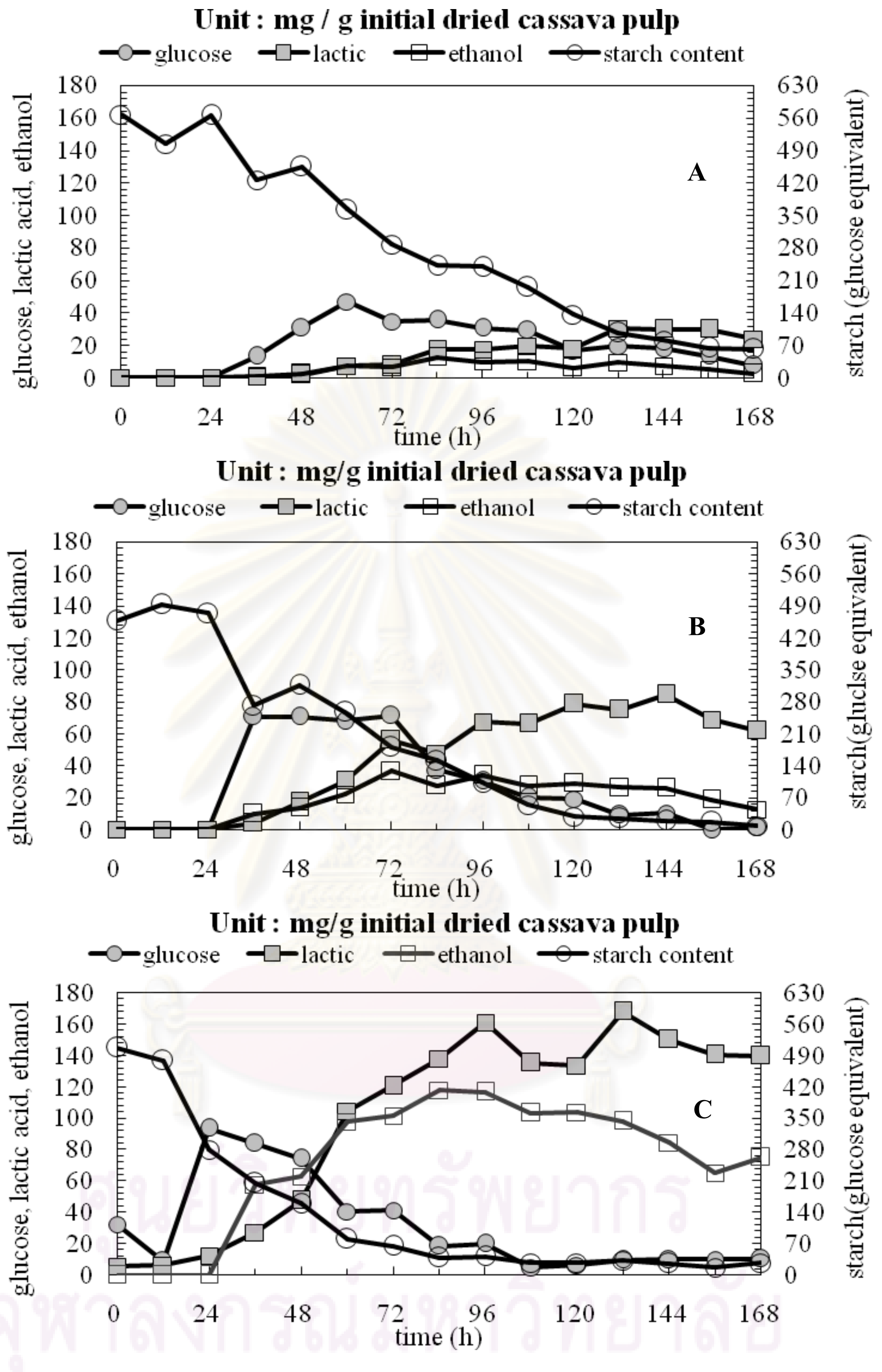
40% additional free water, 150rpm, control pH (D)

60% additional free water, 150rpm, control pH (E)

80% additional free water, 150rpm, control pH (F)

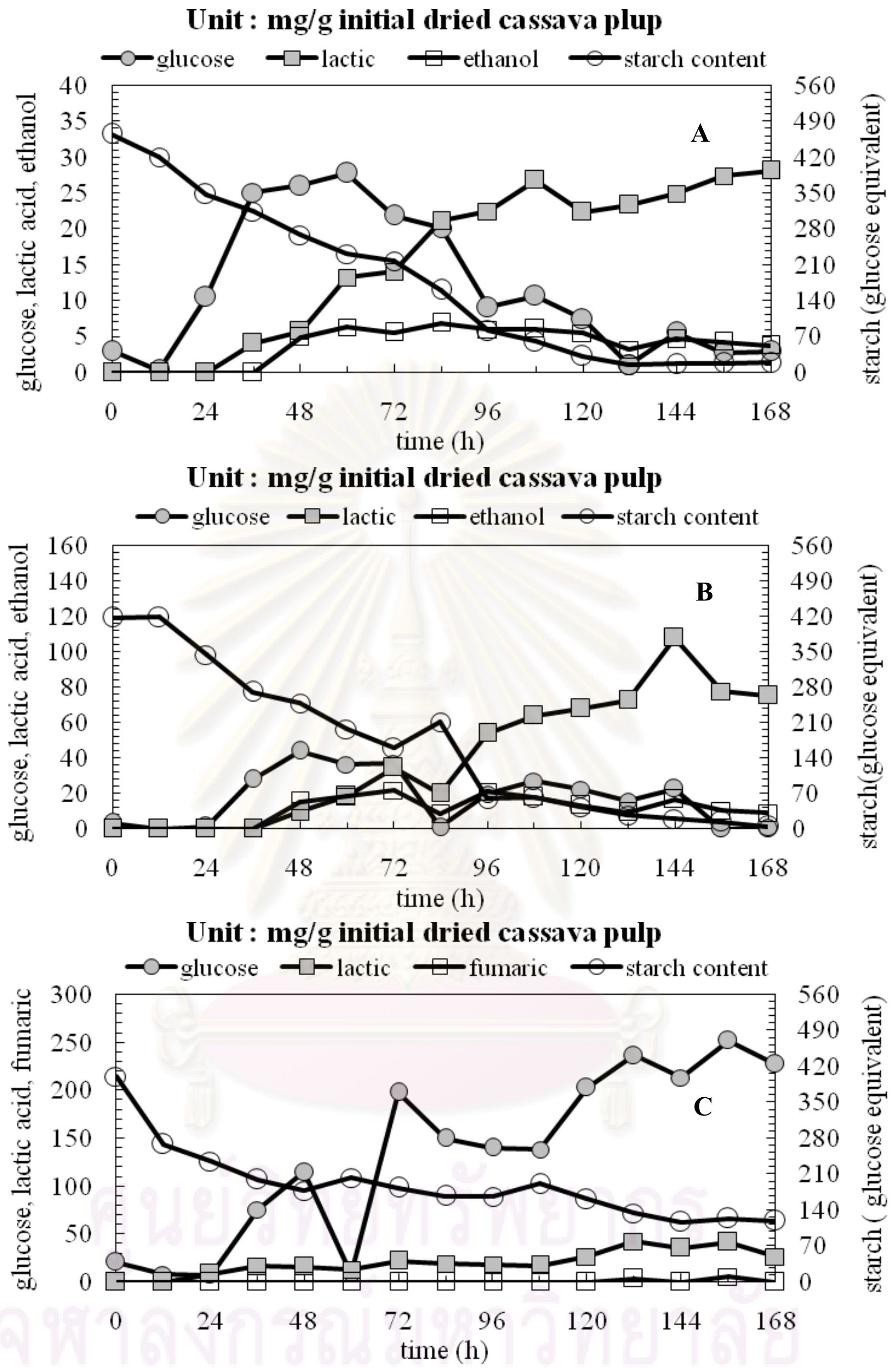
80% additional free water, 80rpm, control pH (M)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



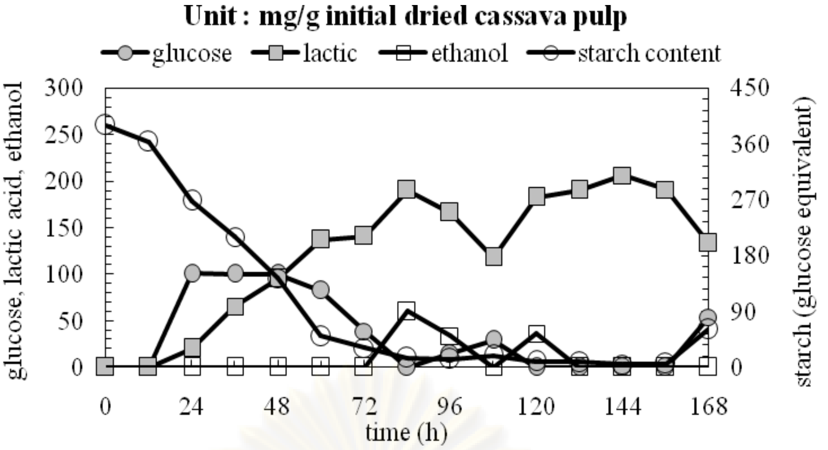
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4.6 จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลัง ที่ความเร็วรอบการเหวี่ยง 0 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส A คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 เปอร์เซ็นต์, B คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 60 เปอร์เซ็นต์, C คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4.7 จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลัง ที่ความเร็วรอบการเหวี่ยง 150 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส A คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 เปอร์เซ็นต์, B คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 60 เปอร์เซ็นต์, C คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์



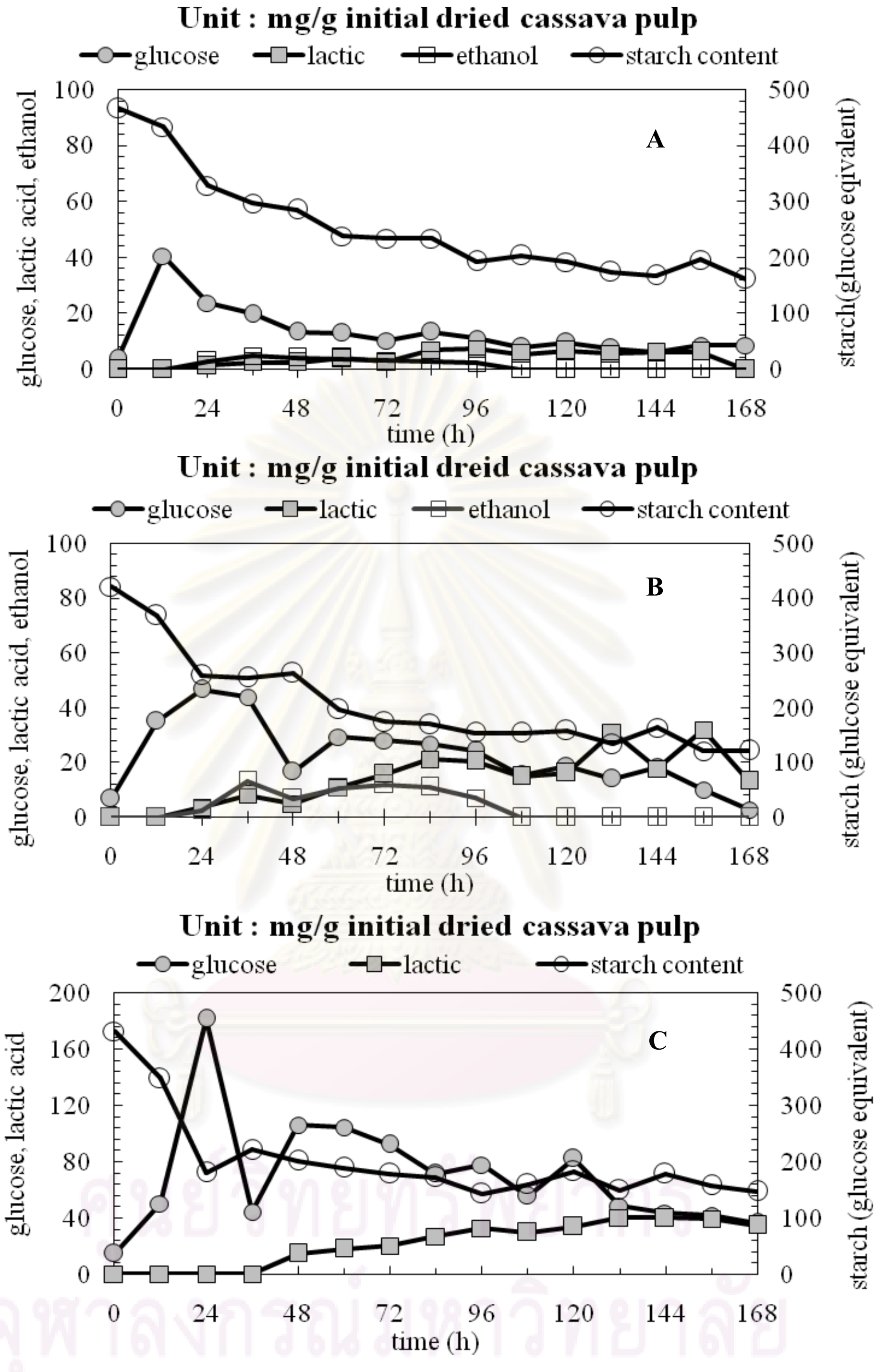
ภาพที่ 4.8 จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลัง ที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการผลิตกรดแลกติกของราอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับการหมักที่ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างดังแสดงในภาพที่ 4.9 และ 4.10 กับการหมักภาวะที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างอย่างชัดเจน โดยค่าความเป็นกรด-ด่างมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ จากค่าเริ่มต้นประมาณ 4.5 ไปจนถึง 2.0 เนื่องจากรามีการเจริญเติบโตและกระบวนการเมแทบอลิซึม ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงความสมดุลของไฮโดรเจนไอออน ที่นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร (Gulati และคณะ, 1999; Cheilas และคณะ, 2000; Elibol และ Ozer, 2000; Martak และคณะ, 2003) อีกทั้งรามีการผลิตและปลดปล่อยกรดแลกติกออกมา ทำให้เมื่อถึงภาวะที่มีความเป็นกรดด่างไม่เหมาะสมจึงมีอัตราการผลิตลดลง ซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกอยู่ที่ 5.0 – 6.0 (Huang และคณะ, 2003) Tay และ Yang (2002) รายงานว่า ปริมาณของกรดแลกติก เอทานอลและกรดฟูมาริกจะลดลงเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงจาก 6.0 เป็น 4.0 ซึ่ง Miura และคณะ (2003) สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 93 กรัมต่อลิตรที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 – 6.5 Rosenberg และ Kristofikova (1995) พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 4.8 - 6.0 ไม่มีผลต่อการผลิตผลิตภัณฑ์อื่น เช่น กรดมาลิกและกรดฟูมาริก เป็นต้น Miura และคณะ (2003) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกด้วยรากลายพันธุ์ *Rhizopus* sp. MK-96-1196 ในถังหมักแบบ Air-lift โดยใช้แป้งข้าวโพด 120 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน โดยได้เปรียบเทียบค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 4.5 - 6.5 พบว่า ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 93 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 87 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 2.60 กรัมต่อลิตรต่อ

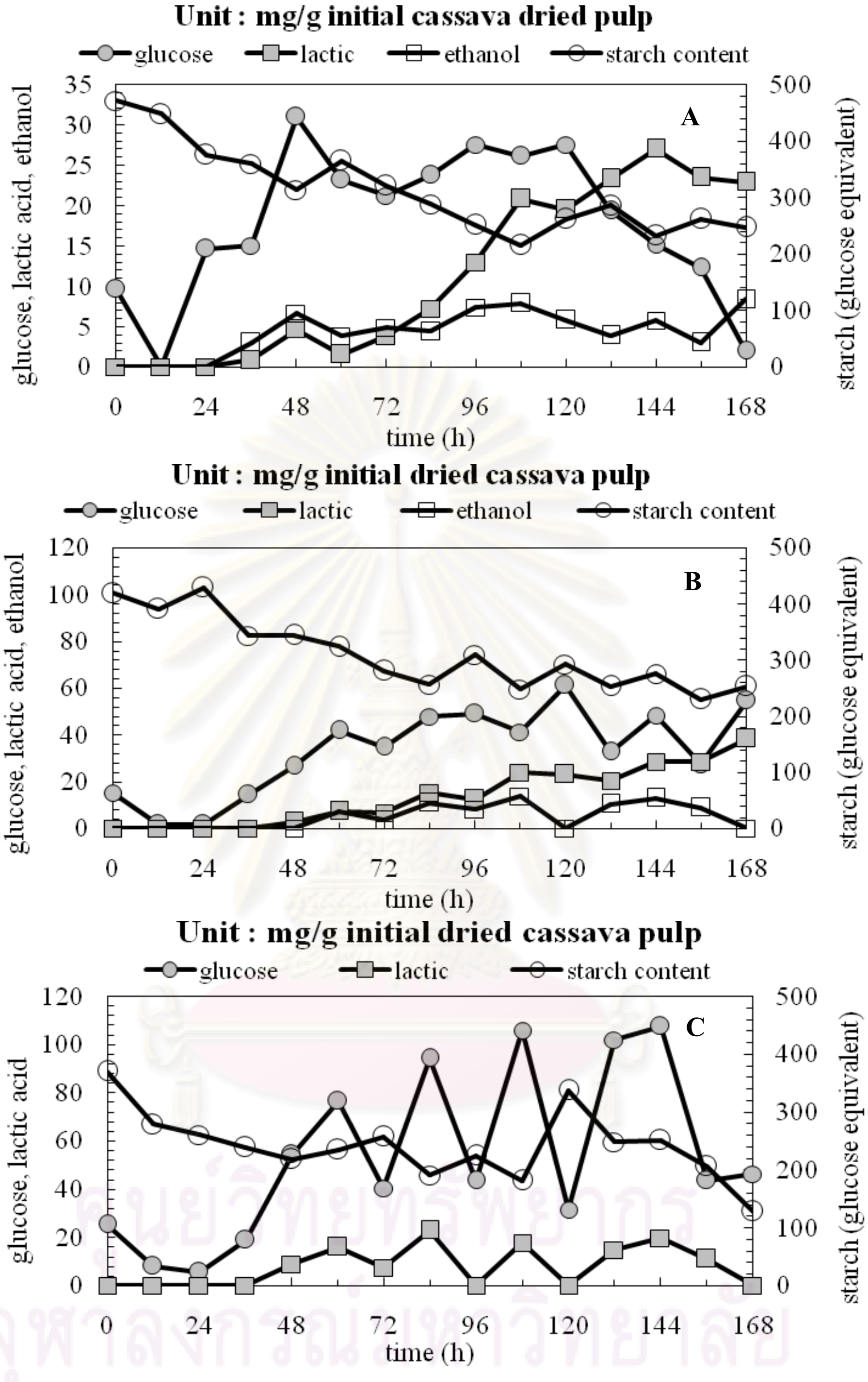
ชั่วโมงเทียบกับที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 สามารถผลิตกรดแลกติกเท่ากับ 78 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า $Y_{P/S}$ เท่ากับ 73 เปอร์เซ็นต์และอัตราการผลิตกรดแลกติก 1.1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

การศึกษาถึงปริมาณน้ำที่เติมเสริมที่แตกต่างกัน โดยการเติมน้ำอิสระเข้าไปในปริมาณที่แตกต่างกันเพื่อให้ได้ปริมาณน้ำที่เติมเสริม เป็น 40 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับน้ำหนักรวมทั้งหมด พบว่า ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ให้ผลผลิตกรดแลกติกมากกว่าที่ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 60 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ในทุกๆ ภาวะ ดังแสดงในภาพที่ 4.11 จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำที่เติมเสริม การผลิตกรดแลกติกจะเพิ่มขึ้น หลังจากที่สปอร์เกิดการงอก เส้นใยของราจะยืดขยายสังเกตได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และเห็นได้อย่างชัดเจนที่ชั่วโมงที่ 24 ดังภาพที่ 4.1 เส้นใยที่เจริญนี้จะมาล้อมรอบส่วนที่เป็นของแข็งและเม็ดแป้ง ซึ่งในระหว่างการหมัก แป้งจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ที่ราสร้างแล้วหลั่งออกมาและจะถูกแทนที่ด้วยเส้นใยของราทำให้รวมตัวเป็นก้อนเดียวกับกากมัน คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ดีส่วนหนึ่งนั้นหายไปจากอาหารที่ใช้หมักผ่านทางกระบวนการหายใจซึ่งออกไปในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ การละลายน้ำและการแพร่กระจายอย่างรวดเร็วและเป็นเนื้อเดียวกันของคาร์โบไฮเดรต ทำให้เอนไซม์ที่ราผลิตสามารถเข้าไปย่อยสลายแป้งให้กลายเป็นกลูโคสได้ดี มีแนวโน้มที่น่าเชื่อได้ว่าอาหารหมักที่อยู่ในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริมสูงความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตและเอนไซม์ลดลง และเป็นการทำให้ซับเสตรทเกิดอาการบวมน้ำ ซึ่งเป็นการง่ายต่อการนำซับสเตรทไปใช้ของจุลินทรีย์ (Xavier, 1994) สอดคล้องกับผลการทดลองปริมาณน้ำที่เติมเสริม 60 และ 40 เปอร์เซ็นต์ที่ให้ผลผลิตกรดแลกติกน้อยลง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

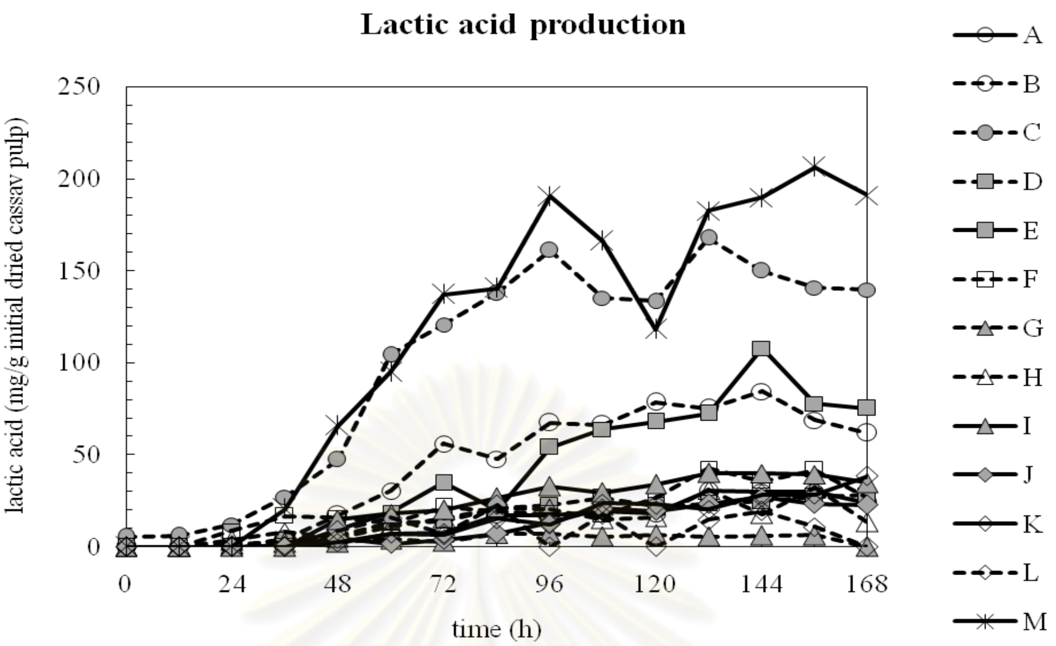


ภาพที่ 4.9 จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลัง ที่ความเร็วรอบการเหวี่ยง 0 รอบต่อนาที ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส A คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 เปอร์เซ็นต์, B คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 60 เปอร์เซ็นต์, C คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4.10 จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลัง ที่ความเร็วรอบการเหวี่ยง 150 รอบต่อนาที ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส A คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 เปอร์เซ็นต์, B คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 60 เปอร์เซ็นต์, C คือ ปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์



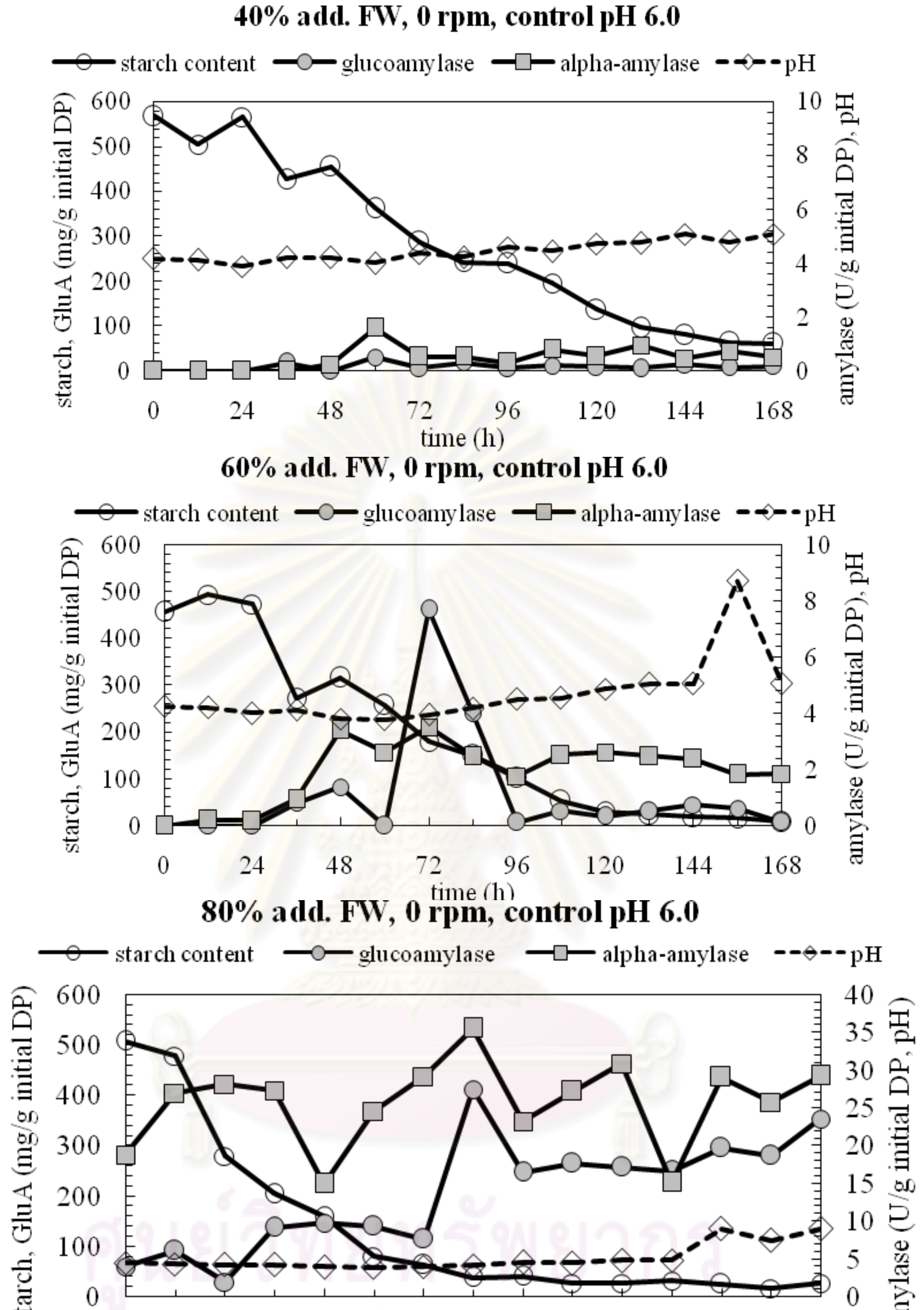
ภาพที่ 4.11 จลนพลศาสตร์การผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังโดยแปรเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่เติมเสริมและความเร็วรอบการเหวี่ยง มีและไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

40% additional free water, 0rpm, control pH	(A)
60% additional free water, 0rpm, control pH	(B)
80% additional free water, 0rpm, control pH	(C)
40% additional free water, 150rpm, control pH	(D)
60% additional free water, 150rpm, control pH	(E)
80% additional free water, 150rpm, control pH	(F)
40% additional free water, 0rpm, No control pH	(G)
60% additional free water, 0rpm, No control pH	(H)
80% additional free water, 0rpm, No control pH	(I)
40% additional free water, 150rpm, No control pH	(J)
60% additional free water, 150rpm, No control pH	(K)
80% additional free water, 150rpm, No control pH	(L)
80% additional free water, 80rpm, control pH	(M)

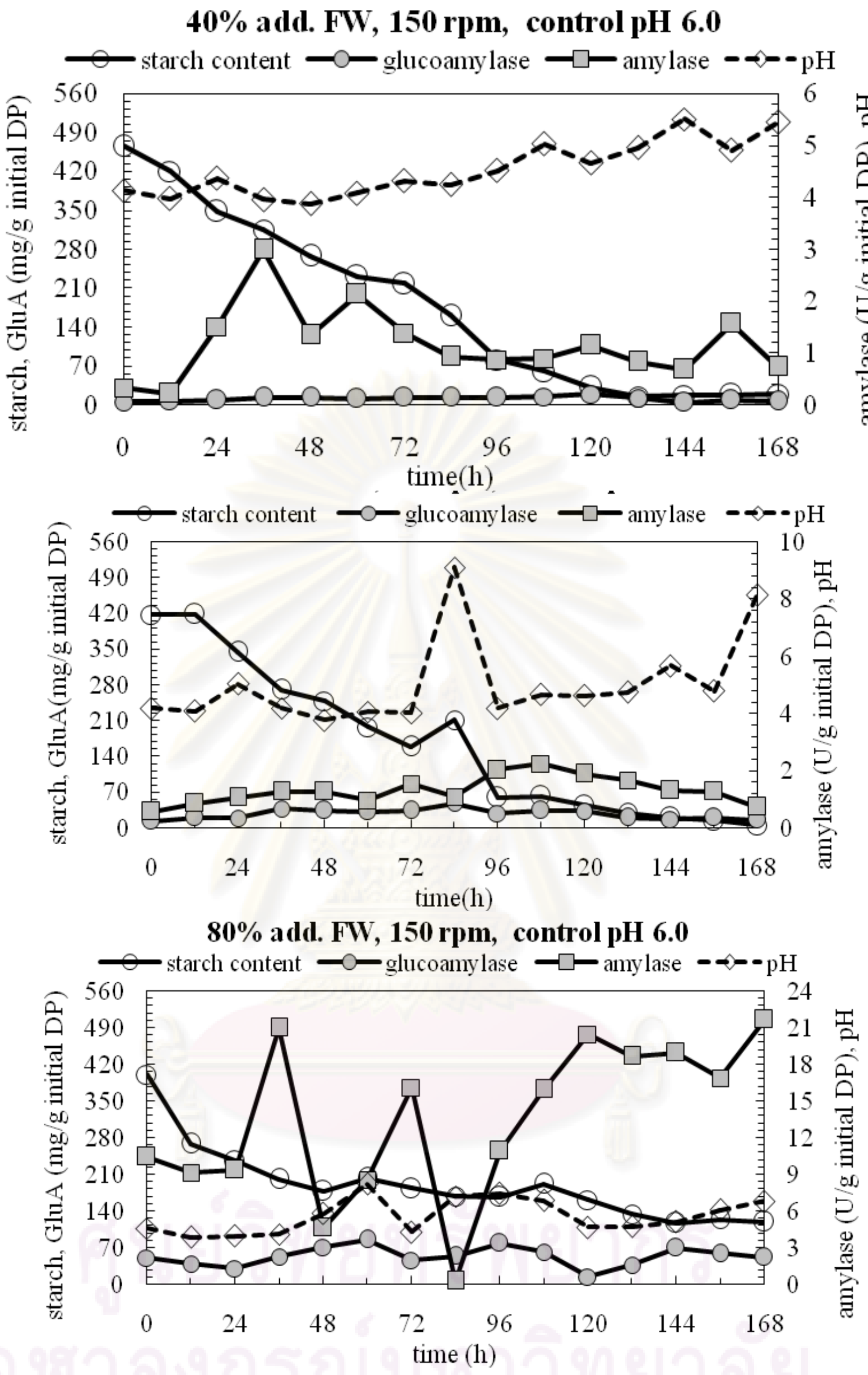
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อทำการศึกษาแอคติวิตีของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส พบว่า *R. oryzae* สามารถสร้างและปล่อยอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสเพื่อย่อยแป้งในกากมันสำปะหลังเป็นกลูโคสเพื่อนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม ดังแสดงในภาพที่ 4.12 ถึง 4.15 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในภาวะที่ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง แป้งที่เหลืออยู่ในกากมัน (รายงานโดยใช้ปริมาณกลูโคสเทียบเท่า) ยังคงมีอยู่ในปริมาณมาก บ่งบอกได้ถึงผลของค่าความเป็นกรด-ด่างที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยเฉพาะอะไมเลส ทำให้ไม่สามารถทำการย่อยแป้งที่มีอยู่ในกากมันออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้มีอาหารที่จะนำไปใช้ในการสร้างกรดแลกติกได้น้อย ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณกรดแลกติกที่สามารถผลิตในภาวะที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ได้มากกว่าภาวะที่ไม่มีการควบคุม

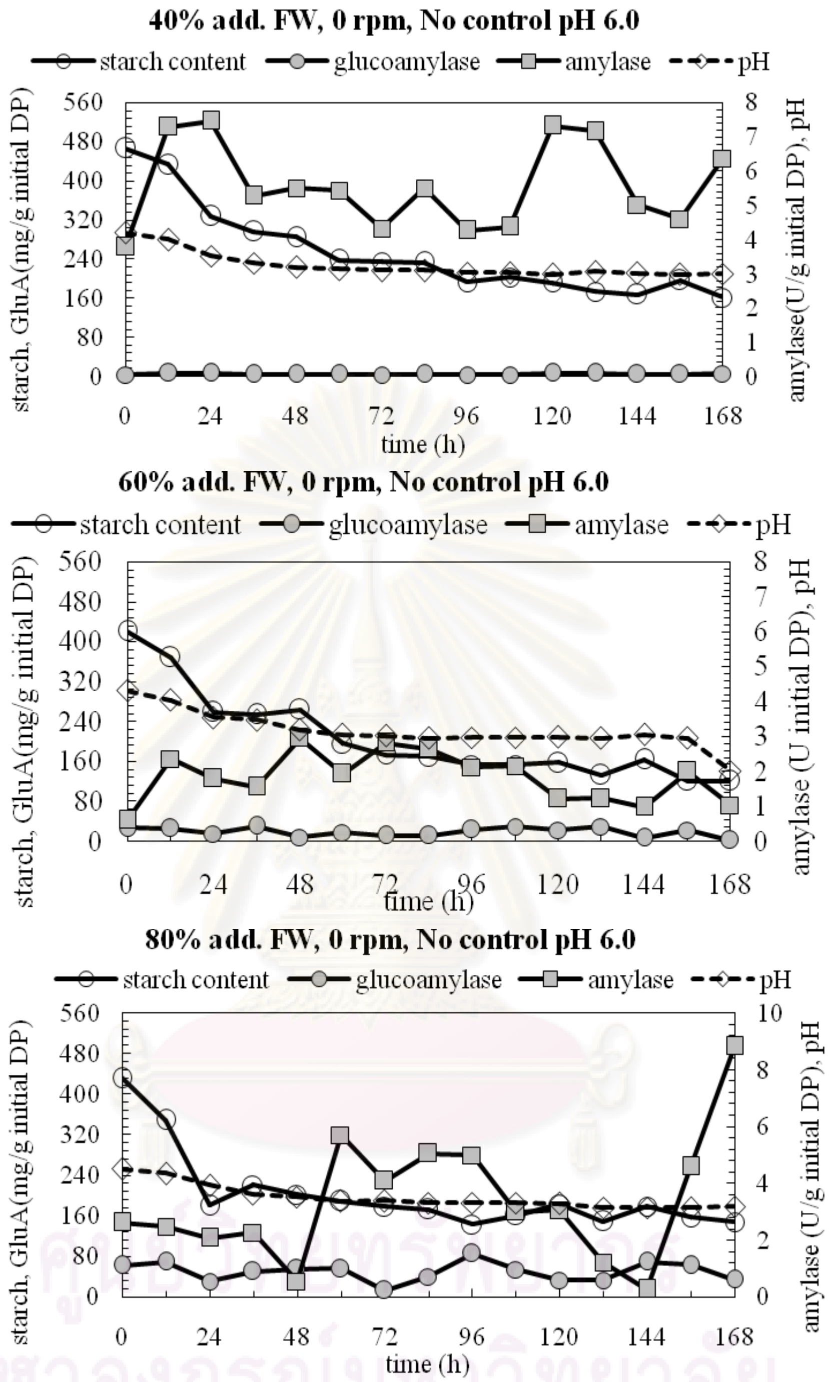
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.12 แอคติวิตีของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ *R. oryzae* ผลิตขึ้นในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 0 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

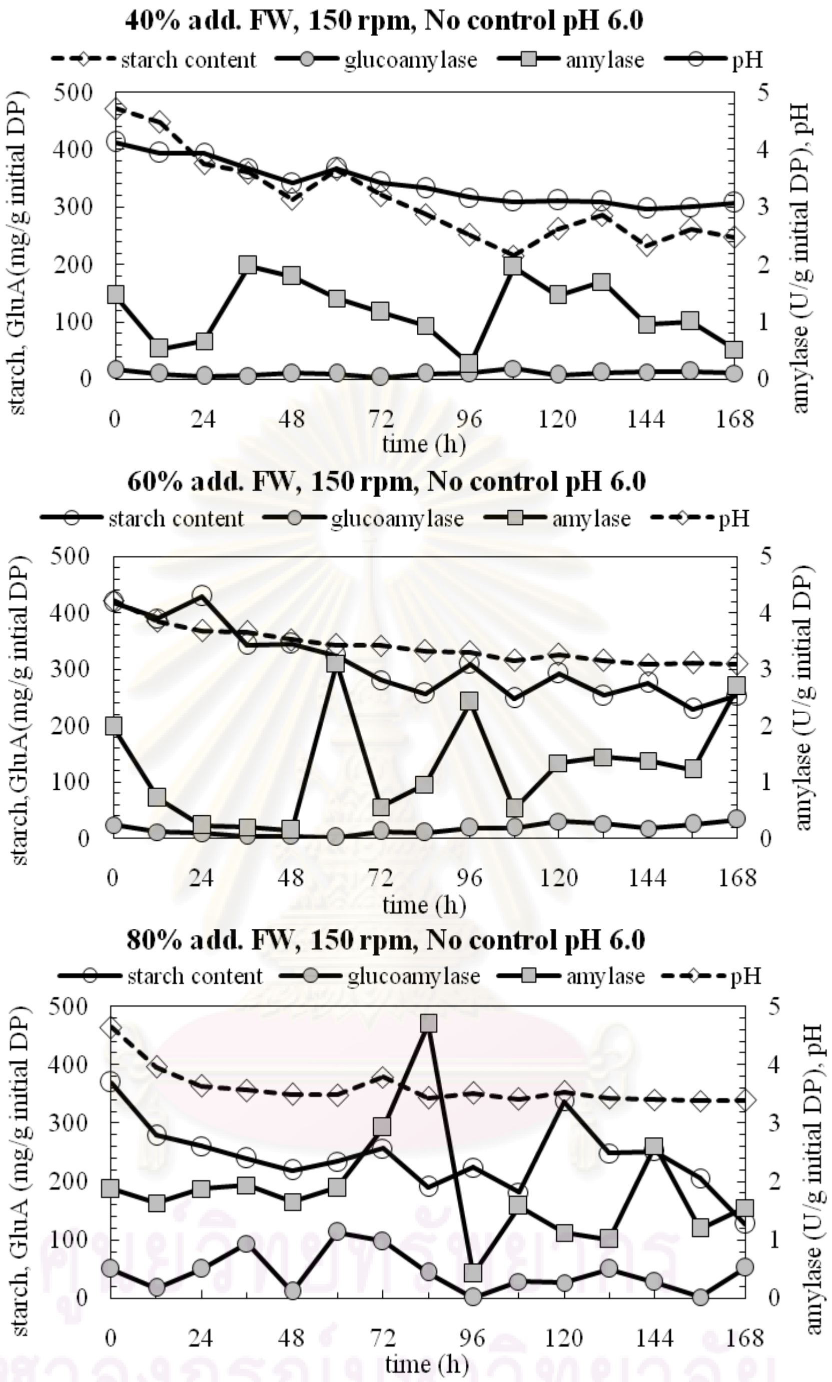


ภาพที่ 4.13 แอคติวิตีของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ *R. oryzae* ผลิตขึ้นในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 150 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.14 แอคติวิตีของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ *R. oryzae* ผลิตขึ้นในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 0 รอบต่อนาที ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.15 แอคติวิตีของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ *R. oryzae* ผลิตขึ้นในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 40 60 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 150 รอบต่อนาที ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

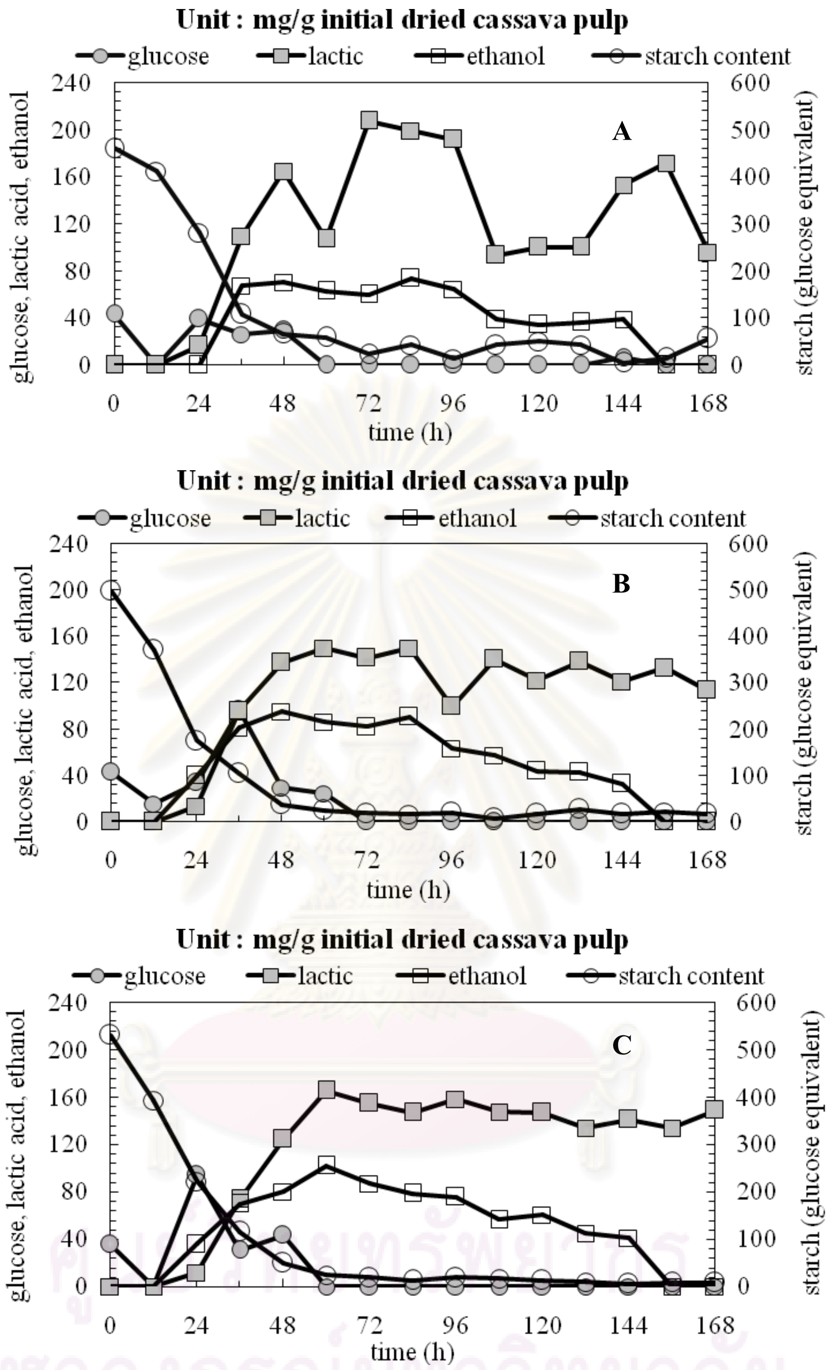
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การหมักโดยเติมแหล่งไนโตรเจน

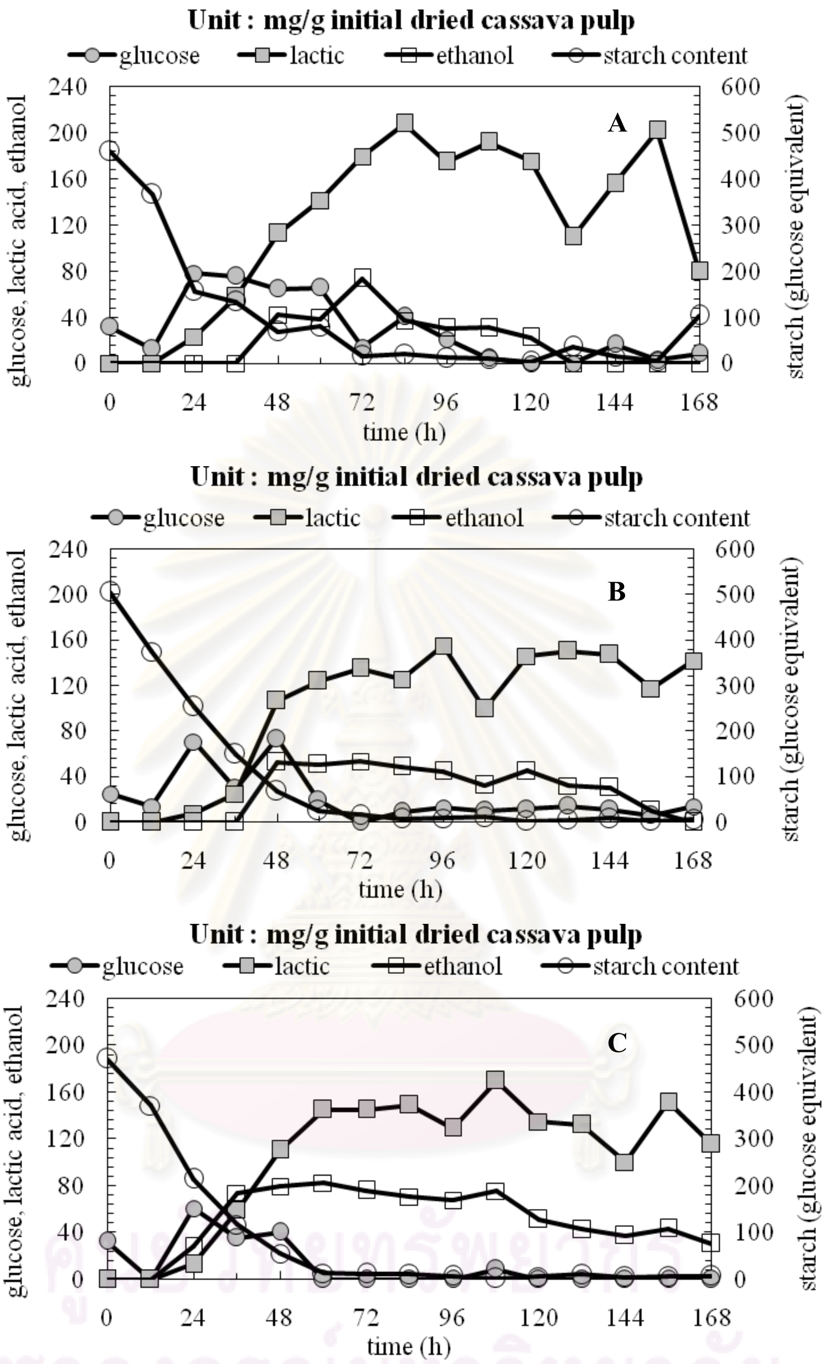
จากผลการทดลองใน 4.1เห็นได้ว่าภายใต้ภาวะการหมักดังกล่าวข้างต้นให้ปริมาณเซลล์และกรดแลกติกที่ผลิตได้ในปริมาณค่อนข้างน้อย และอัตราการนำไปใช้ของแหล่งคาร์บอนในกากมันค่อนข้างต่ำ ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่า แหล่งไนโตรเจนในภาวะการหมักใน 4.1 อาจมีปริมาณไม่เพียงพอที่จะนำไปผลิตเป็นเซลล์ ซึ่งท้ายที่สุดแล้วปริมาณเซลล์ที่มีน้อยส่งผลต่อการผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณที่ไม่สูงนัก ผู้วิจัยจึงปรับปรุงสูตรอาหารแข็งโดยทำการเติมแหล่งไนโตรเจนลงในอาหารแข็ง เมื่อทำการเปรียบเทียบแหล่งไนโตรเจน 2 ชนิด ได้แก่ ยูเรียและสารสกัดยีสต์ ที่ความเข้มข้น 0.1 0.3 และ 0.5 กรัมต่อลิตร พบว่า ที่ความเข้มข้นของยูเรีย 0.1 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตกรดแลกติกมากที่สุดเท่ากับ 207.63 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการหมักโดยเติมสารสกัดยีสต์ที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตรที่ให้ผลผลิตของกรดแลกติกสูงสุด 208.15 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้งเริ่มต้นของกากมัน และพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนสูงขึ้นมากกว่า 0.1 กรัมต่อลิตร ผลผลิตกรดแลกติกลดลงกว่าในภาวะที่ไม่มีการเสริมแหล่งไนโตรเจนและภาวะที่เติมแหล่งไนโตรเจนเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 4.16 และ 4.17 จากผลการทดลองเห็นได้ชัดว่าแหล่งไนโตรเจนที่เติมเข้าช่วยสนับสนุนให้รานำแหล่งคาร์บอนในกากมันไปใช้ในการเจริญเติบโตของรามากกว่าที่จะสนับสนุนให้ราผลิตกรดแลกติก ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ทางอ้อมด้วยกลูโคซามีนและปริมาณของแหล่งคาร์บอนในกากมันที่ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบกับการหมักในภาวะที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน ซึ่งพบว่า เมื่อปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้น ราจะเจริญเติบโตได้ดีขึ้น โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีในการสนับสนุนการเจริญเติบโตของราในการหมักแบบอาหารแข็งกากมันสำปะหลังมากกว่าสารสกัดยีสต์ ดังแสดงในภาพที่ 4.18

Mitchell และคณะ (1988) พบว่า ยูเรียมีประโยชน์ต่อการเจริญของ *Rhizopus oligosporus* เมื่อทำการผสมแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) และ ยูเรีย 0.25 เปอร์เซ็นต์ในอาหาร ทำให้อัตราการเจริญของ colony radial เป็น 1.01 มิลลิเมตรต่อชั่วโมง

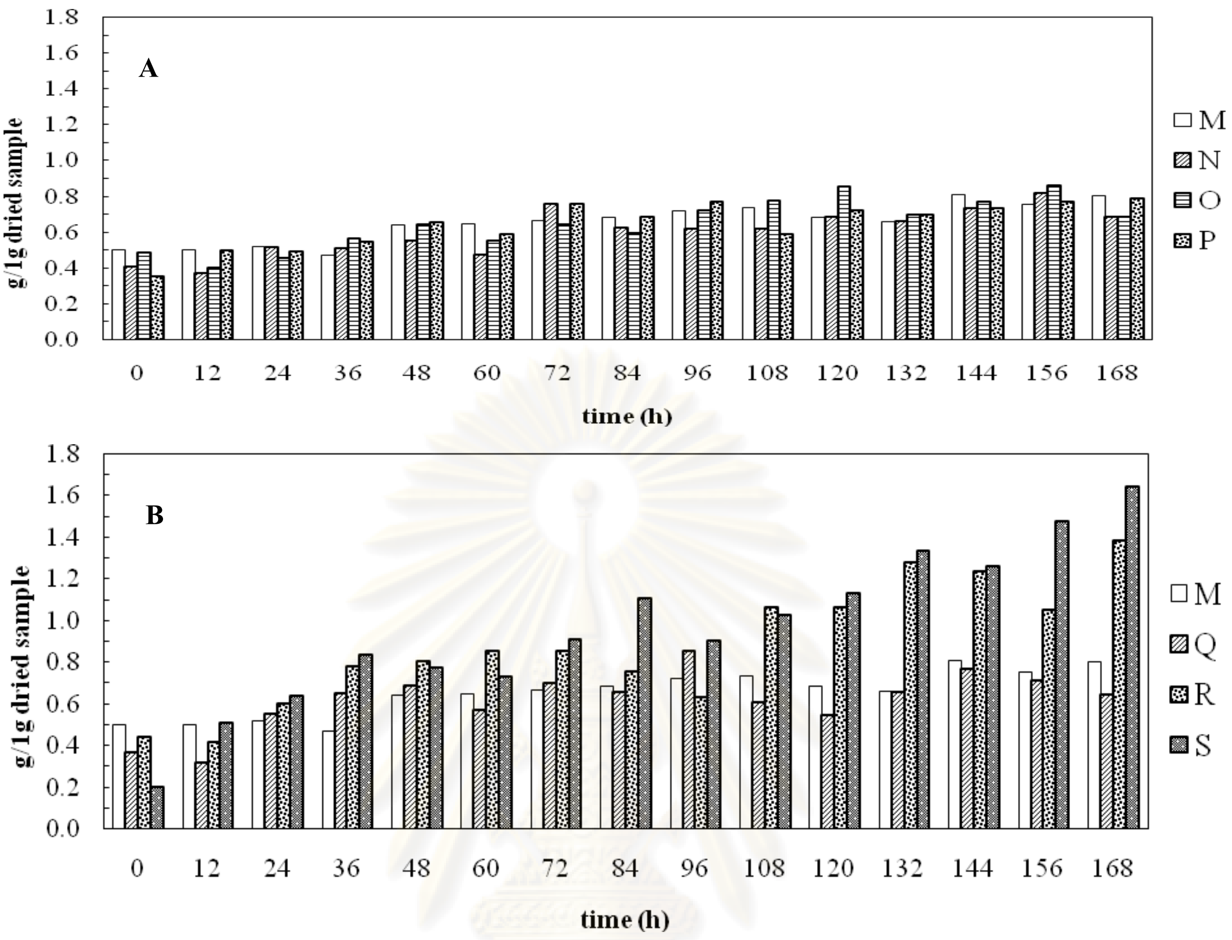
Adejoye และคณะ (2006) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ต่อการเจริญเติบโตของ *Pleurotus florida* เมื่อเทียบผลระหว่างการเติมยูเรียกับสารสกัดยีสต์ พบว่า ยูเรียให้น้ำหนักแห้งของไมซีเลีย 135.25 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ขณะที่สารสกัดยีสต์ ให้น้ำหนักแห้งของไมซีเลีย 116.65 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร แสดงให้เห็นว่ายูเรียสนับสนุนการเจริญเติบโตของ *Pleurotus florida* มากกว่าสารสกัดยีสต์



ภาพที่ 4.16 จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาทีควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 เติมยูเรียเข้าไป A คือ 0.1 กรัมต่อลิตร B คือ 0.3 กรัมต่อลิตร C คือ 0.5 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 4.17 จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติก และเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 สารสกัดยีสต์เข้าไป A คือ 0.1 กรัมต่อลิตร B, คือ 0.3 กรัมต่อลิตร C, คือ 0.5 กรัมต่อลิตร

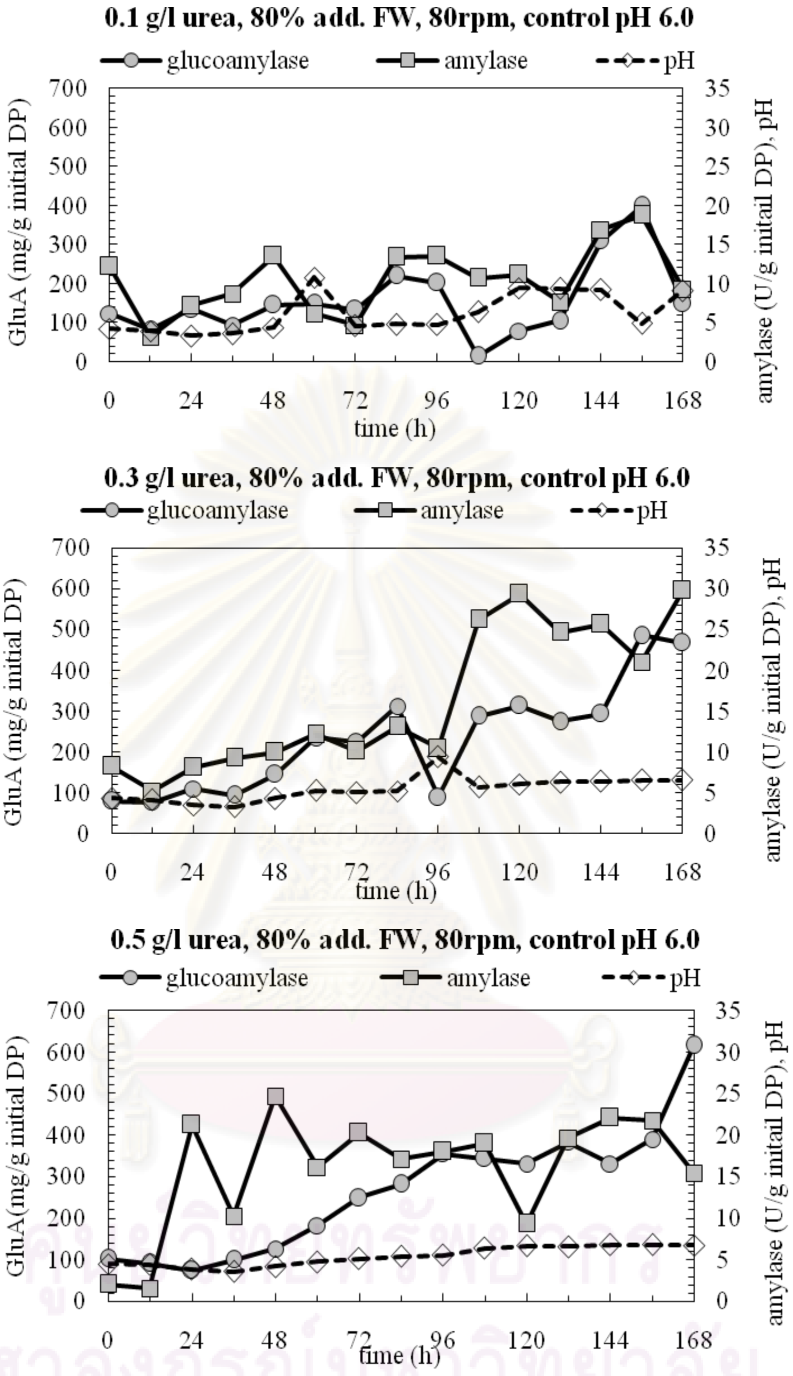


ภาพที่ 4.18 ปริมาณชีวมวลของ *R. oryzae* ในภาวะการเลี้ยงที่ไม่มีและมีแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ยูเรีย และสารสกัดยีสต์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

- 80% additional free water, 80rpm, control pH (M)
- 0.1 g/l yeast extract, 80% additional free water, 80rpm, control pH (N)
- 0.3 g/l yeast extract, 80% additional free water, 80rpm, control pH (O)
- 0.5 g/l yeast extract, 80% additional free water, 80rpm, control pH (P)
- 0.1 g/l urea, 80% additional free water, 80rpm, control pH (Q)
- 0.3 g/l urea, 80% additional free water, 80rpm, control pH (R)
- 0.5 g/l urea, 80% additional free water, 80rpm, control pH (S)

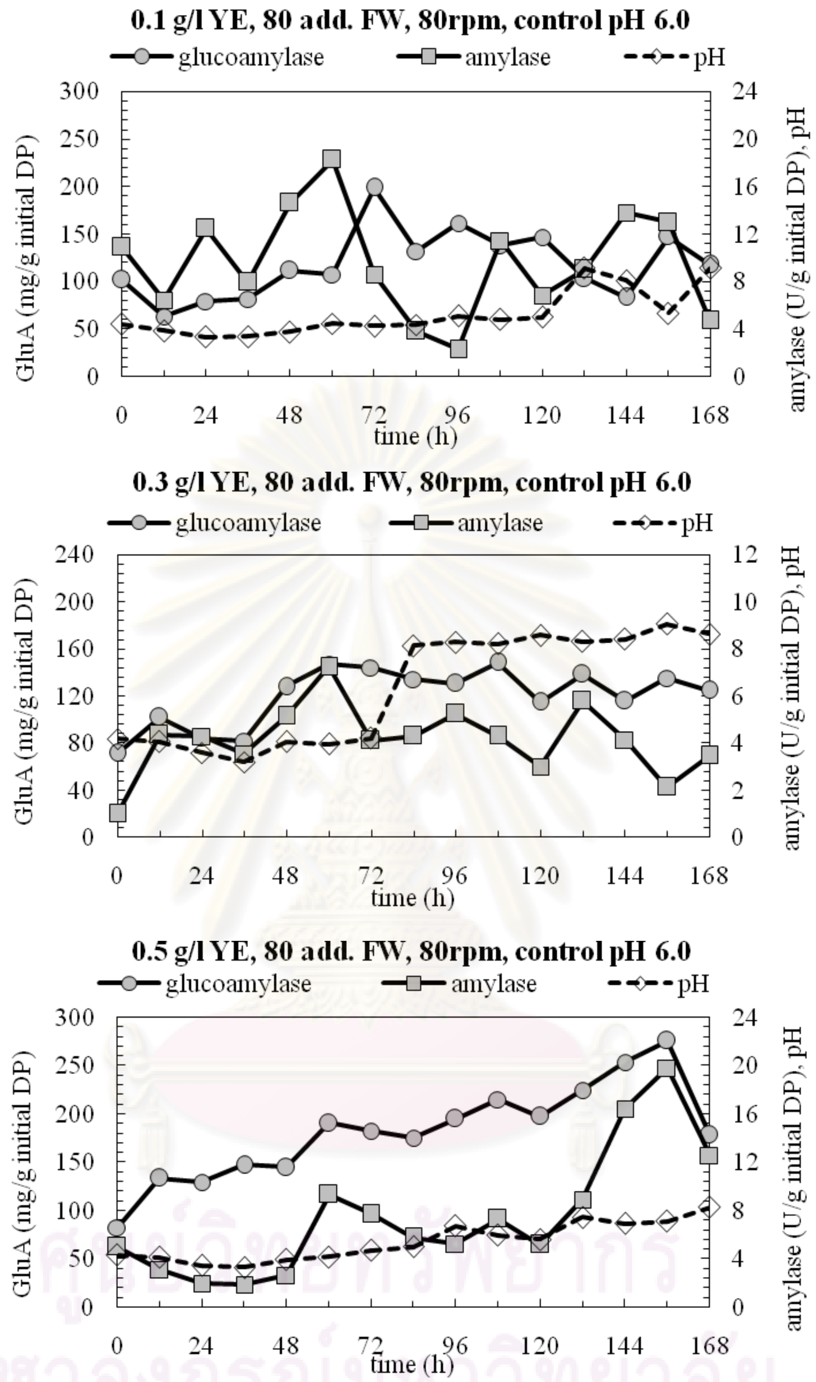
จากผลการทดลอง สังเกตได้ว่าค่าความเป็นกรด-ด่างมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อแหล่งคาร์บอนหมด ดังแสดงในภาพที่ 4.19 และ 4.20 อาจเป็นเพราะว่า แหล่งไนโตรเจนที่เติมเข้าไปทั้งยูเรียและสารสกัดยีสต์ เมื่อเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสแล้วจะถูกปล่อยออกมาในรูปของแอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์ (Juillard และคณะ, 1988; Tinson และคณะ, 1982) ซึ่งการเกิดแอมโมเนียนั้นจะทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงหรือชักนำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้นระยะหนึ่ง (Tinson และคณะ, 1982 ; Spinnler และ Corrieu, 1989; Latrille และคณะ, 1992) ในช่วงแรกที่มีแหล่งคาร์บอนอยู่นั้นราเลือกนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างผลผลิต ซึ่งระหว่างที่ราเจริญอย่างรวดเร็ว แอมโมเนียจะถูกนำไปใช้มากกว่าอัตราการไฮโดรไลซีสของยูเรียทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง รวมถึงกรดแลกติกที่ราผลิตออกมาด้วย แต่เมื่อแหล่งคาร์บอนเริ่มหมด จึงเหลือแหล่งไนโตรเจนแหล่งเดียวที่นำไปใช้ การเจริญเติบโต ทำให้แอมโมเนียที่เกิดขึ้นมีปริมาณมากขึ้นจึงมีแนวโน้มชักนำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งเป็นค่าที่ไม่เหมาะต่อการผลิตกรดแลกติกของรา *R. oryzae* ซึ่งอยู่ที่ 4.0-6.0 เมื่อเทียบกับปริมาณผลผลิตกรดแลกติกกับการหมักในภาวะที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนแล้วผลผลิตที่ได้ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 4.21

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



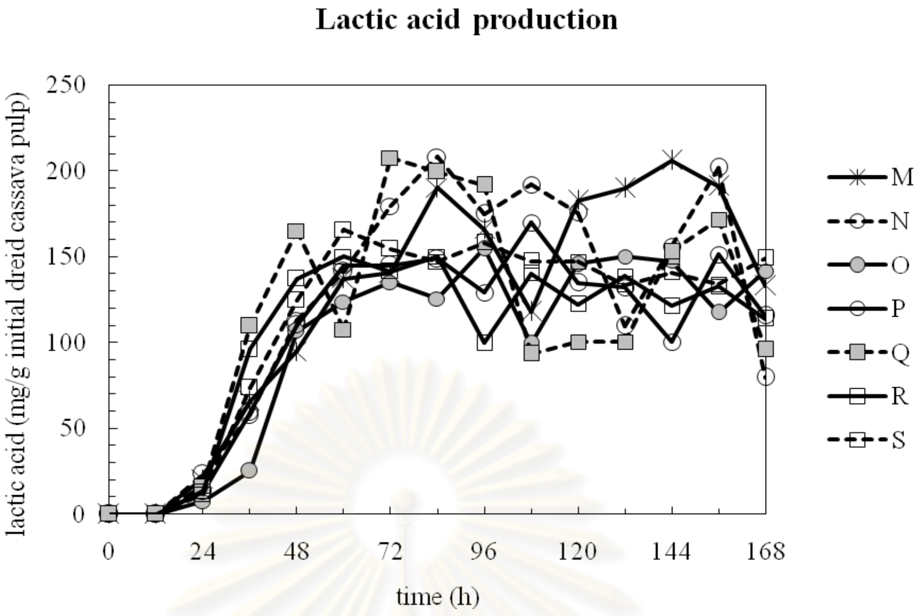
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4.19 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลง ในระหว่างการหมักที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน



ภาพที่ 4.20 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลง ในระหว่างการหมักที่มีสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



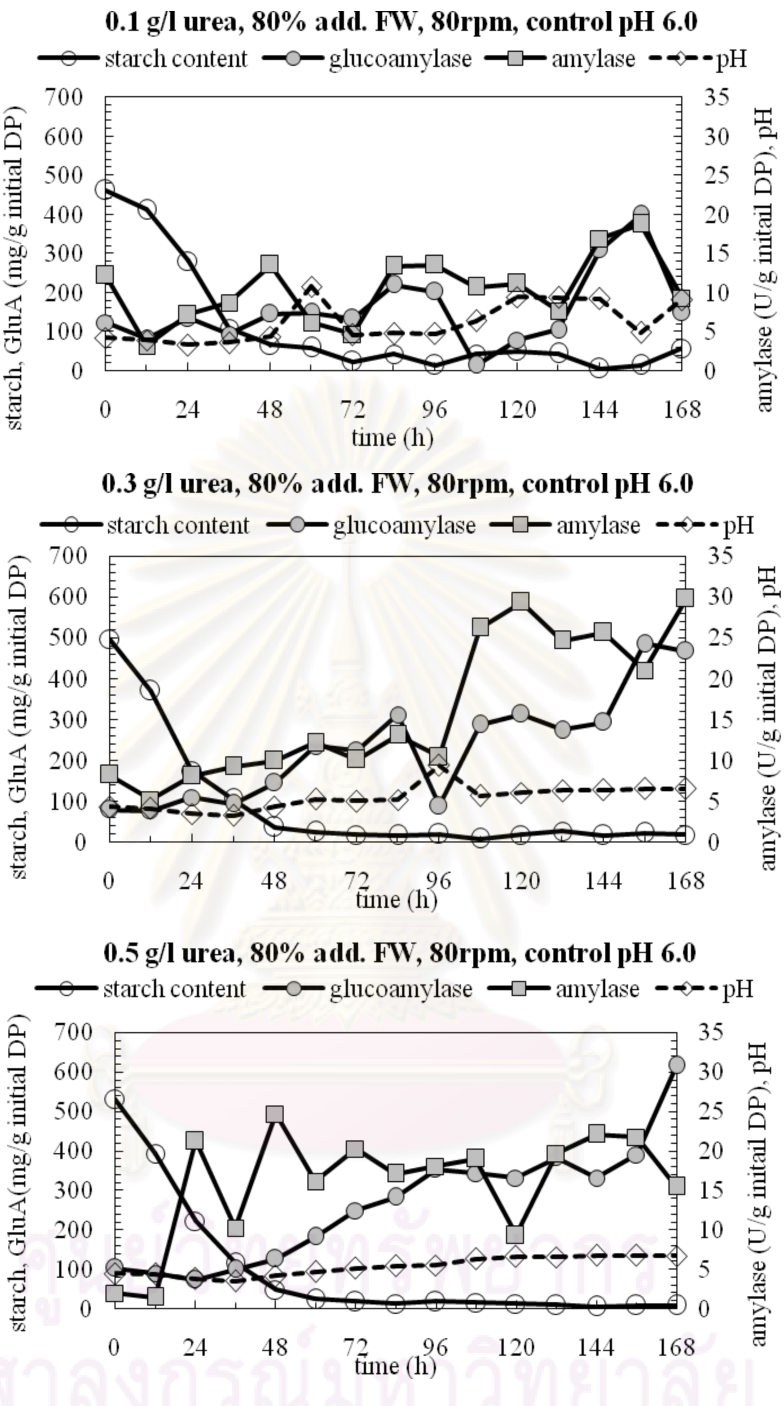
ภาพที่ 4.21 แสดงจลนพลศาสตร์การผลิตกรดแลกติกในภาวะที่ไม่มีและมีการเสริมแหล่งไนโตรเจน

—✳—	80% additional free water, 80rpm, control pH	(M)
–⊖–	0.1 g/l yeast extract, 80% additional free water, 80rpm, control pH	(N)
—●—	0.3 g/l yeast extract, 80% additional free water, 80rpm, control pH	(O)
—⊖—	0.5 g/l yeast extract, 80% additional free water, 80rpm, control pH	(P)
–■–	0.1 g/l urea, 80% additional free water, 80rpm, control pH	(Q)
—□—	0.3 g/l urea, 80% additional free water, 80rpm, control pH	(R)
–⊟–	0.5 g/l urea, 80% additional free water, 80rpm, control pH	(S)

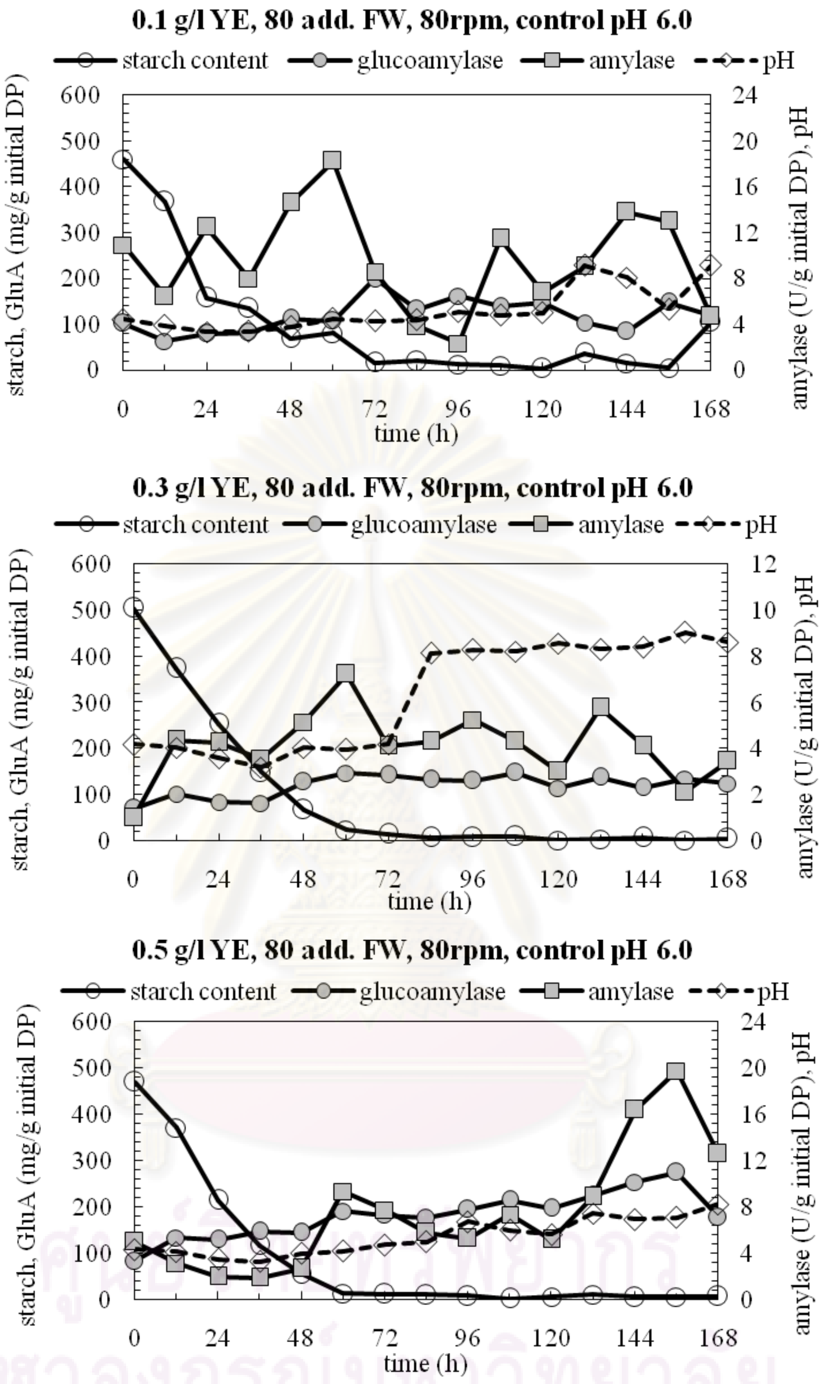
ในการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคอะไมเลสและอะไมเลส พบว่า มีปริมาณมากกว่าการหมักในภาวะแบบไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน ทำให้พบว่า ปริมาณแป้งที่อยู่ในกากมันนั้น ถูกย่อยเปลี่ยนเป็นกลูโคสอย่างรวดเร็ว ดังแสดงในภาพที่ 4.22 และ 4.23

Zambare (2010) ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตกลูโคอะไมเลสด้วยรา *Aspergillus oryzae* ภายใต้การหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้รำข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าในส่วนการทดลองการเติมแหล่งไนโตรเจนเข้าไปนั้น ยูเรียสามารถเพิ่มผลผลิตกลูโคอะไมเลสถึง 10 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับการไม่ใส่แหล่งไนโตรเจน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



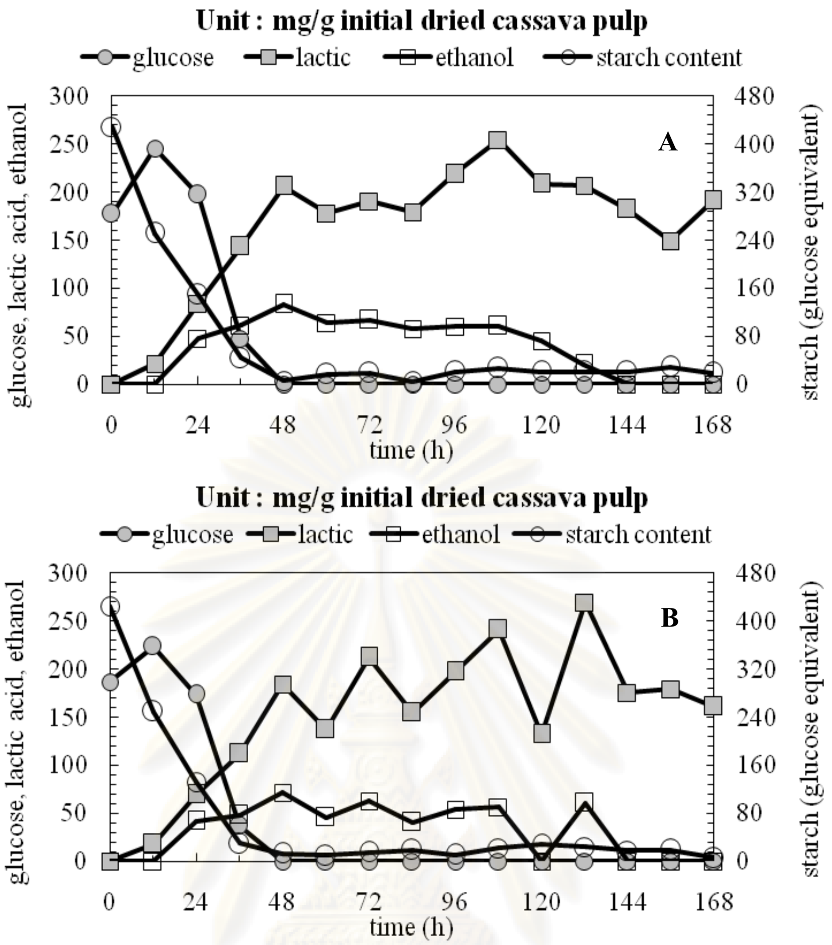
ภาพที่ 4.22 แสดงการผลิตกลูโคอะไมเลสและอะไมเลสของ *R. oryzae* ในภาวะที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน



ภาพที่ 4.23 แสดงการผลิตกลูโคอะไมเลสและอะไมเลสของ *R. oryzae* ในภาวะที่มีสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน

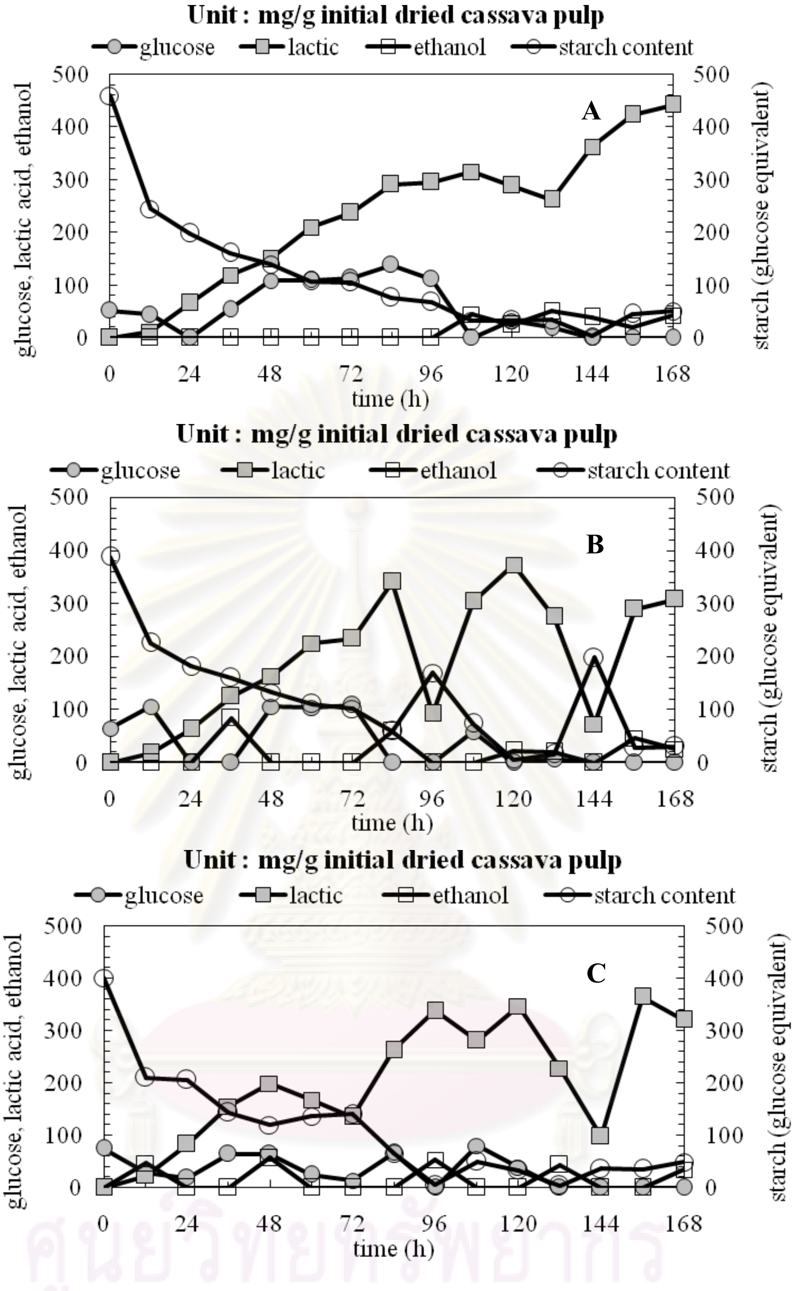
4.3 ศึกษาอิทธิพลของกลูโคอะไมเลสและเซลลูเลส

ผลการทดลองใน 4.1 และ 4.2 ชี้ให้เห็นว่าหากต้องการเพิ่มผลผลิตและอัตรการผลิตกรดแลกติกโดยการหมักแบบอาหารแข็ง จำเป็นต้องมีแหล่งคาร์บอนที่เพียงพอสำหรับ *R. oryzae* ที่จะนำไปใช้ในการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์กรดแลกติก จากอัตราการลดลงของแหล่งคาร์บอนที่ไม่สูงนักในผลการทดลองใน 4.1 และการเพิ่มขึ้นของอัตราการนำแหล่งคาร์บอนไปใช้ในการทดลอง 4.2 เมื่อมีการเติมแหล่งไนโตรเจนซึ่งส่งผลให้มีปริมาณเซลล์มากขึ้น แสดงถึงความเป็นไปได้ในการเกิดภาวะ substrate limitation ในการผลิตกรดแลกติกจากกากมัน ดังนั้น ผู้วิจัยจึงทดลองเติมเอนไซม์เซลลูเลสและกลูโคอะไมเลสลงในอาหารแข็งกากมัน โดยมุ่งหวังว่า เอนไซม์ดังกล่าวจะช่วยเร่งอัตราการเปลี่ยนแป้งและเซลลูโลสในกากมันเพื่อเป็นกลูโคส ซึ่งราจะนำไปใช้ในการผลิตกรดแลกติกได้โดยตรง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การใช้ปริมาณกลูโคอะไมเลส 3.85 ยูนิตต่อกรัมแห้งกากมันเริ่มต้นร่วมกับเซลลูเลส 45 ยูนิตต่อกรัมแห้งกากมันเริ่มต้นเพียงพอต่อการย่อยแป้งและเซลลูโลสที่มีอยู่ในกากมันสด 7.5 กรัม เนื่องจากได้ปริมาณกรดแลกติกไม่แตกต่างจากการใช้เอนไซม์ในปริมาณมาก จากการทดลองในส่วนของการเติมกลูโคอะไมเลสเพิ่มเข้าไปอย่างเดียวมีผลต่อปริมาณกลูโคสอย่างมาก พบว่ามีกลูโคสตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 12 เมื่อเปรียบเทียบกับภาวะที่ไม่มีการเติมกลูโคอะไมเลสเพิ่มเข้าไป และลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป ซึ่งสอดคล้องกับผลผลิตของกรดแลกติกที่มีแนวโน้มการผลิตเพิ่มขึ้นต่อเนื่องจนถึงที่ชั่วโมง 48 หลังจากนั้นการผลิตกรดแลกติกค่อยข้างที่จะคงที่เนื่องจากกลูโคสถูกนำไปใช้หมดอย่างรวดเร็วหลังชั่วโมงที่ 48 ดังแสดงในภาพที่ 4.24 จากการศึกษาการเติมเซลลูเลสเข้าไป พบว่ามีปริมาณกลูโคสผลิตออกมาอย่างต่อเนื่อง ทำให้รามีปริมาณกลูโคสที่เพียงพอในการใช้ผลิตกรดแลกติก ดังแสดงในภาพที่ 4.25 ในการทดลองในส่วนของที่มีการเสริมทั้งกลูโคอะไมเลสและเซลลูเลสเข้าไปนั้น พบกลูโคสมีปริมาณสูงในระยะแรกสอดคล้องกับผลที่ได้จากส่วนการทดลองที่มีแต่การเติมกลูโคสอย่างเดียว ดังแสดงในภาพที่ 4.26 แต่มีปริมาณที่มากกว่าอันเนื่องมาจากการทำงานของเซลลูเลสที่ไปทำการย่อยเซลลูโลสที่อยู่ในกากมันทำให้ได้พวกออลิโกเมอร์ออกมาอีกจำนวนหนึ่งและอาจจะไปทำให้เม็ดแป้งที่แทรกซึมหรือถูกห่อหุ้มด้วยเซลลูโลสนั้นหลุดออกมาด้วย ทำให้มีสารตั้งต้นที่จะทำการเปลี่ยนเป็นกลูโคสเพิ่มขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกที่ได้มีแนวโน้มที่จะได้ปริมาณที่มากกว่าซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของกลูโคส ดังแสดงในภาพที่ 4.27



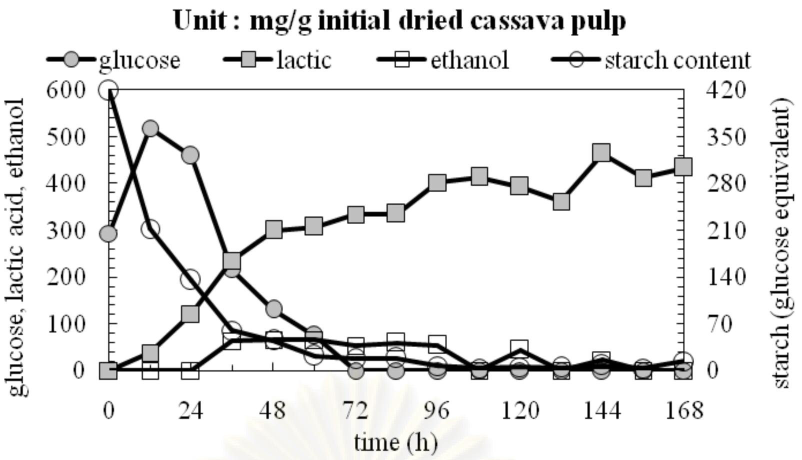
ภาพที่ 4.24 จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เติมกลูโคอะไมเลสในอาหารแข็ง A คือ 3.85 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น, B คือ 7.70 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



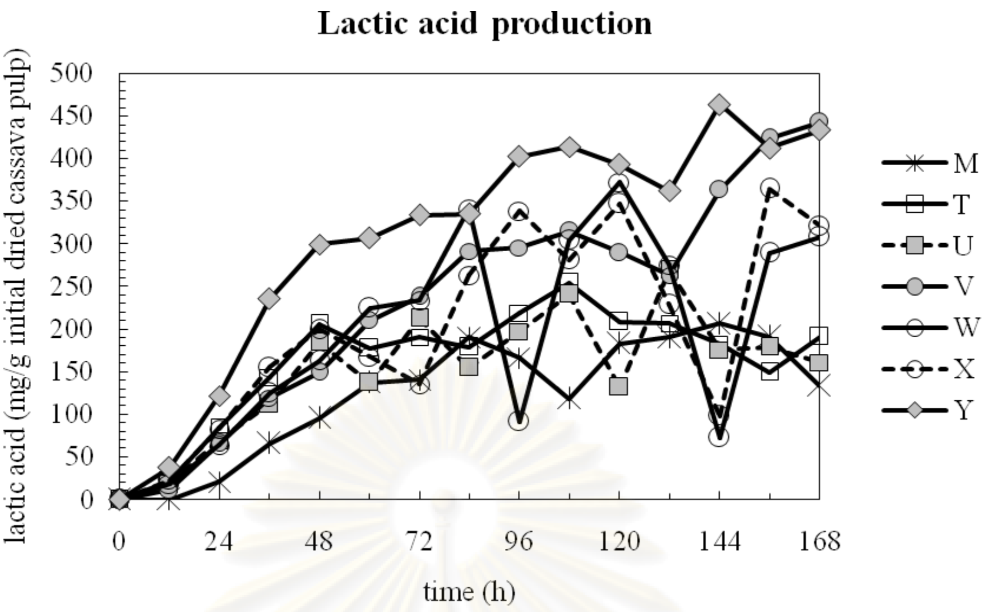
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4.25 จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เติมเซลลูเลสในอาหารแข็ง A คือ 45 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น, B คือ 92.5 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น, C คือ 182.5 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น



ภาพที่ 4.26 จลนพลศาสตร์การผลิตกลูโคส กรดแลกติกและเอทานอลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เติมกลูโคอะไมเลส 3.85 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้นร่วมกับเซลลูเลส 45 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.27 จลนพลศาสตร์การผลิตกรดแลกติกของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีการเสริมกลูโคอะไมเลสและเซลลูเลสเข้าไป

80% additional free water, 80rpm, control pH (M)

3.85 unit glucoamylase / g initial dried cassava pulp (T)

7.70 unit glucoamylase / g initial dried cassava pulp (U)

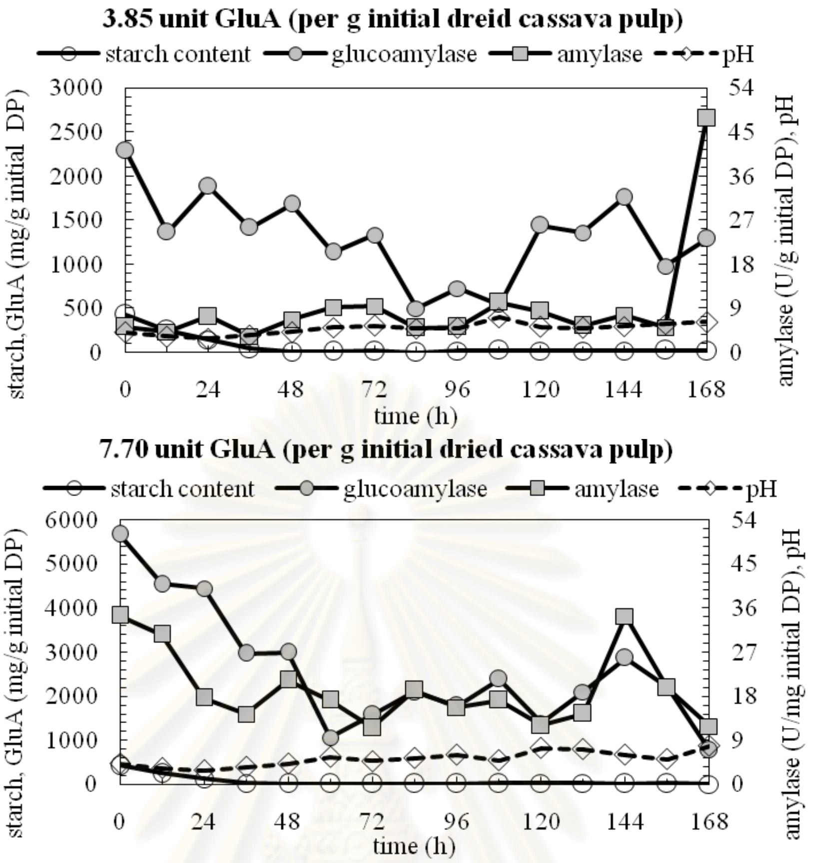
45 unit cellulase / g initial dried cassava pulp (V)

92.5 unit cellulose / g initial dried cassava pulp (W)

182.5 unit cellulase / g initial dried cassava pulp (X)

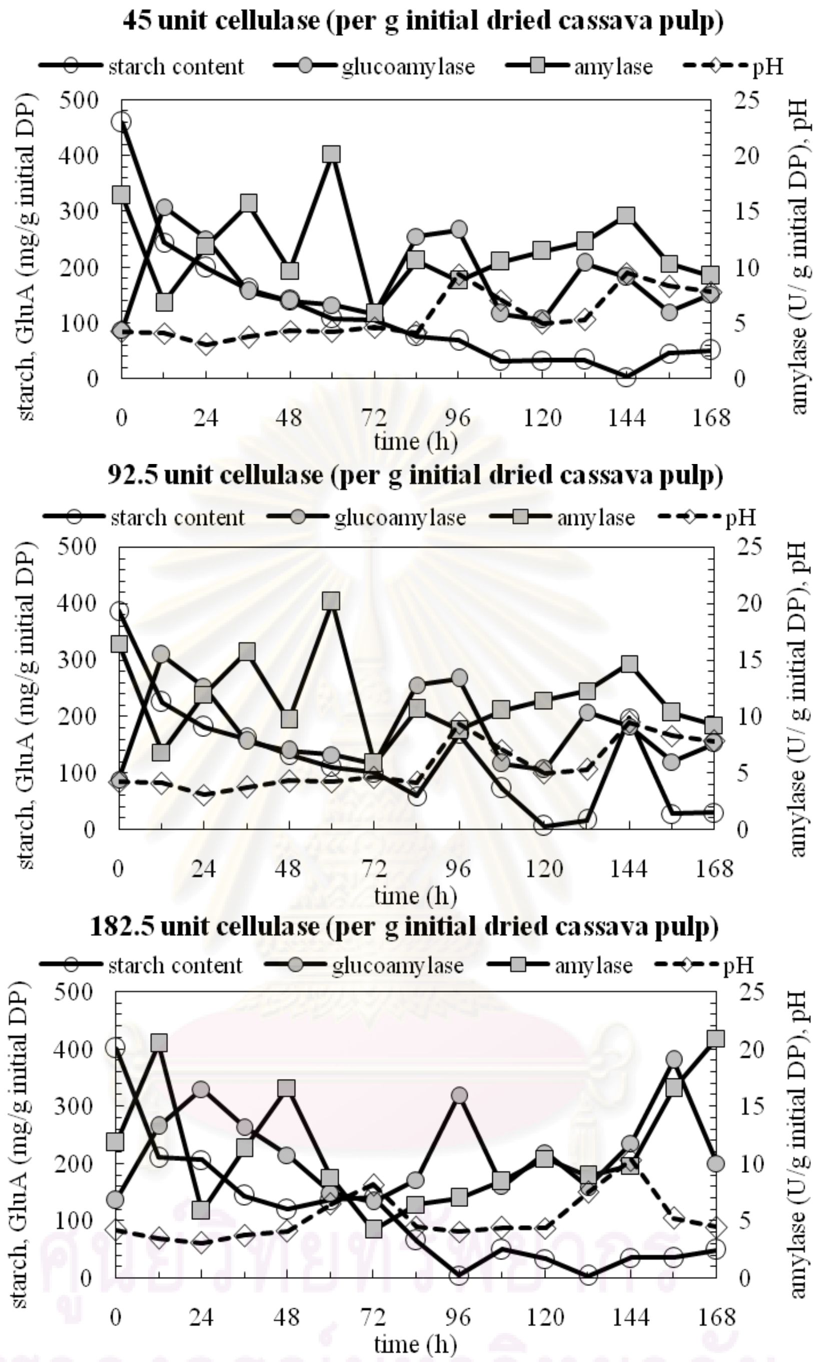
3.85 unit glucoamylase / g initial dried cassava pulp + 45 unit cellulase / g initial dried cassava pulp (Y)

การศึกษาแอคติวิตีของกลูโคอะไมเลสและอะไมเลส พบว่าแอคติวิตีของอะไมเลสมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับในสภาวะที่ไม่มีการเติมเอนไซม์เสริมเข้าไป ซึ่งอาจจะเป็นไปได้ว่าปริมาณแป้งที่มีมากขึ้นไปชักนำให้รามีการสร้างอะไมเลสเพิ่มขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 4.28- 4.30



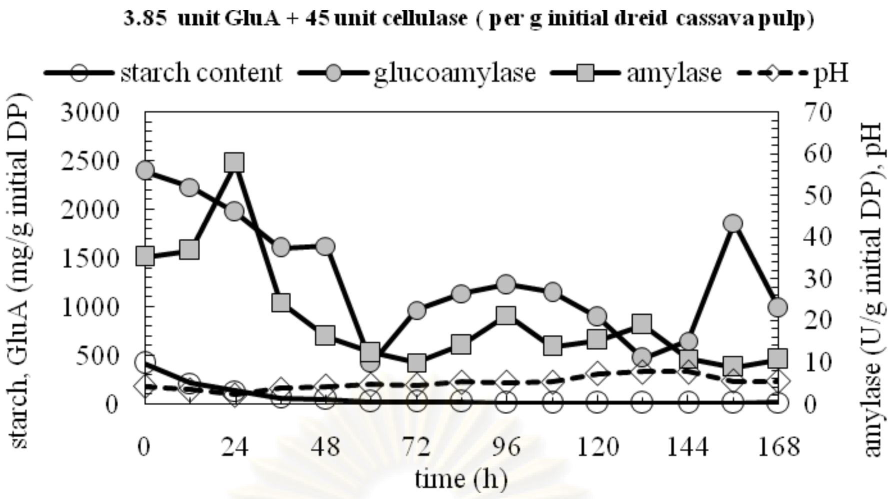
ภาพที่ 4.28 แอคติวิตีของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ *R. oryzae* ผลิตขึ้นร่วมกับกลูโคอะไมเลสที่เสริมลงไป ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสโดยมีการเสริมกลูโคอะไมเลส 3.85และ 7.70 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



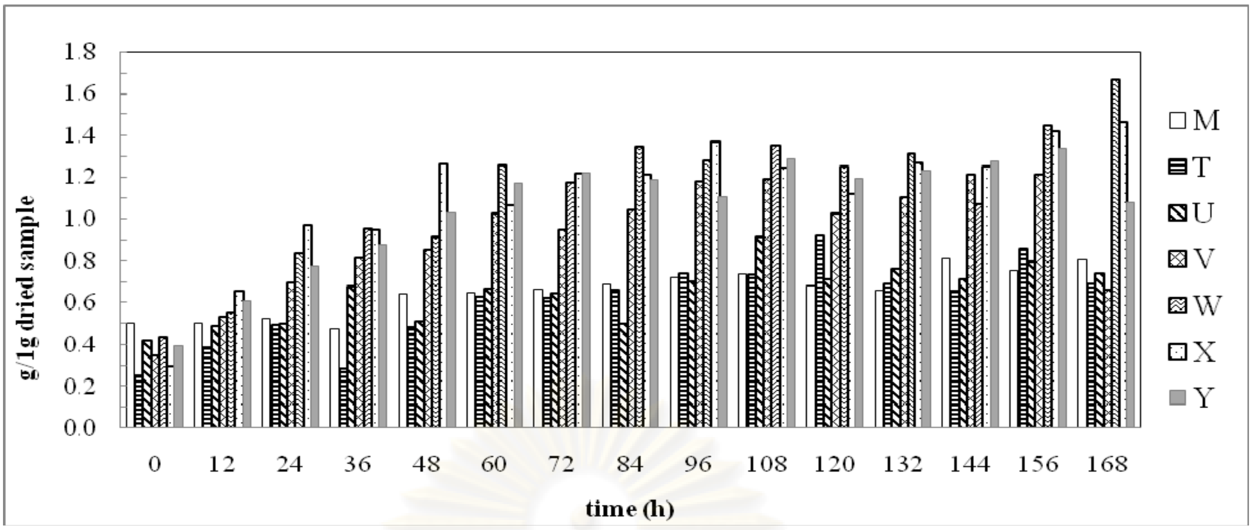
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4.29 แอคติวิตีของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ *R. oryzae* ผลิตขึ้นในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีการเสริมเซลลูเลส 45 92.5 และ 182.5 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้นเข้าไป



ภาพที่ 4.30 แอคติวิตีของอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสที่ *R. oryzae* ผลิตขึ้นร่วมกับกลูโคอะไมเลสที่เสริมลงไป ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสโดยมีการเสริมกลูโคอะไมเลส 3.85 และ เซลลูเลส 45 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้นเข้าไป

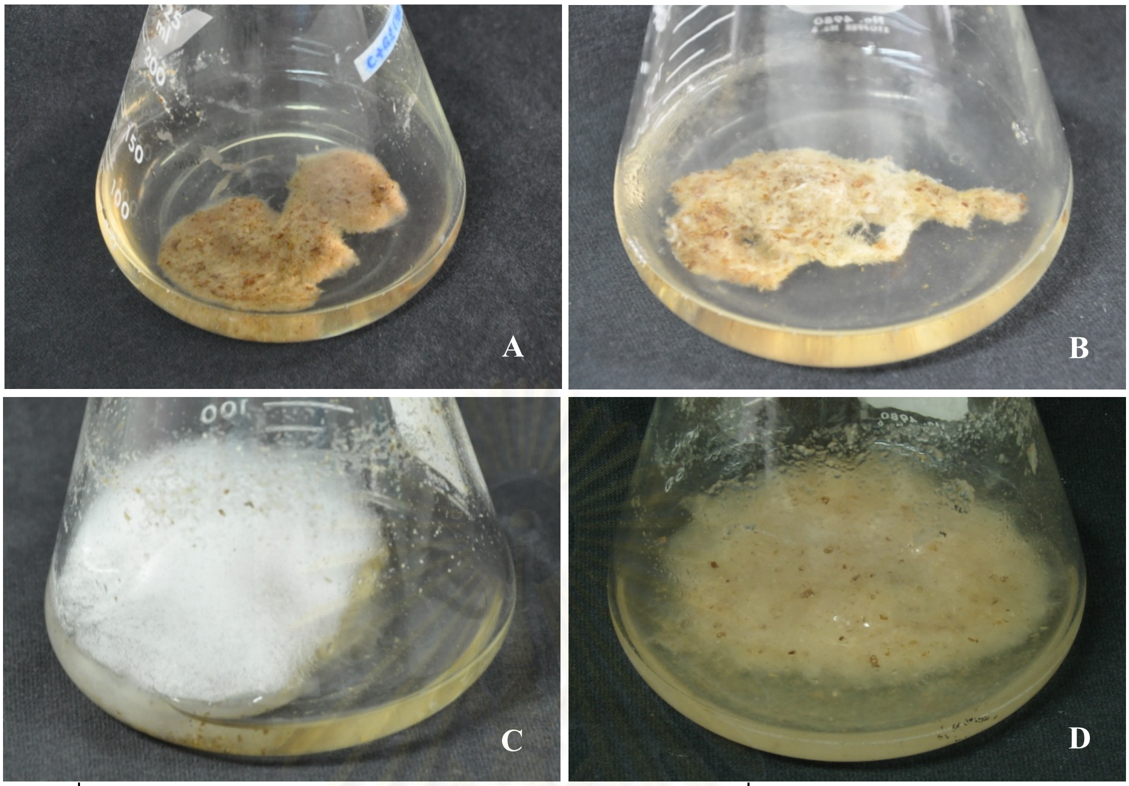
จากการศึกษาปริมาณเซลล์ แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มการเจริญเติบโตของราที่เพิ่มขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 4.31 โดยพบว่าในภาวะที่มีการเติมเซลลูเลสลงไปนั้น เซลล์จะรวมตัวเกาะกับกากมันเป็นก้อนซึ่งแยกออกจากน้ำอย่างเห็นได้ชัดดังแสดงในภาพที่ 4.32 แสดงให้เห็นว่าเซลลูเลสที่เสริมเข้าไปย่อยเซลลูโลสซึ่งเป็นส่วนของไฟเบอร์ที่อยู่ในกากมันกลายเป็นกลูโคสซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณซับสเตรทที่รานำไปใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์ ทำให้ปริมาณเซลล์ที่วิเคราะห์ได้จากชุดการทดลองนี้พบได้มากกว่าชุดการทดลองอื่น และเป็นการสนับสนุนผลของปริมาณเซลลูเลส 18.5 ไมโครลิตร เพียงพอต่อการย่อยเซลลูโลสที่อยู่ในกากมันสด 7.5 กรัม เพราะปริมาณเซลล์ที่วิเคราะห์ได้ใกล้เคียงกันในทุกๆ ภาวะที่มีการเสริมเซลลูเลสเข้าไป นอกจากนี้ลักษณะการเจริญของราบนพื้นผิวของกากมันดังในภาพที่ 4.32 ชี้ให้เห็นว่า การเจริญในลักษณะ surface culture ซึ่งเป็นหลักการของการหมักแบบอาหารแข็งส่งผลเอื้อต่อการผลิตกรดแลกติกโดย *R. oryzae*



ภาพที่ 4.31 แสดงปริมาณชีวมวลของ *R. oryzae* ในการหมักแบบอาหารแข็งด้วยกากมันสำปะหลังในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสโดยมีการเสริมกลูโคอะไมเลสและเซลลูเลสเข้าไป

- 80% additional free water, 80rpm, control pH (M)
- 3.85 unit glucoamylase / g initial dried cassava pulp (T)
- 7.70 unit glucoamylase / g initial dried cassava pulp (U)
- 45 unit cellulase / g initial dried cassava pulp (V)
- 92.5 unit cellulose / g initial dried cassava pulp (W)
- 182.5 unit cellulase / g initial dried cassava pulp (X)
- 33.85 unit glucoamylase / g initial dried cassava pulp + 45 unit cellulase / g initial dried cassava pulp (Y)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.32 ลักษณะการเจริญเติบโตของรา *R. oryzae* ในภาวะที่มีการเติมอะไมเลสในอาหารแข็ง (แถวบน) เปรียบเทียบกับภาวะที่ไม่มีการเติมอะไมเลส (แถวล่าง)

A คือ 3.85 unit glucoamylase + 45 unit cellulase (per g initial dried cassava pulp), 80% additional free water, 80 rpm, control pH 6.0

B คือ 45 unit cellulase / g initial dried cassava pulp, 80% additional free water, 80 rpm, control pH 6.0

C คือ 0.5 g/l urea, 80% additional free water, 80 rpm, control pH 6.0

D คือ 80% additional free water, 80 rpm, control pH 6.0

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยนี้พบว่า เราสามารถนำกากมันสำปะหลังที่เป็นวัสดุเหลือใช้ทางเกษตรกรรม มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมักแบบอาหารแข็งด้วยรา *R. oryzae* เพื่อผลิตกรดแลกติก ซึ่งนับว่าเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้น

ศึกษาและคัดเลือกเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่เติมเสริม ค่าความเป็นกรด – ด่าง และรอบการเหวี่ยง

เมื่อเพิ่มปริมาณน้ำที่เติมเสริม มีผลให้การผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้น การใช้อัตรารอบการเหวี่ยงในระดับต่างๆ มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก โดยอัตรารอบการเหวี่ยงที่มากเกินไปชักนำให้ผลผลิตกรดแลกติกลดลง และภาวะที่ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 ให้ผลผลิตกรดแลกติกที่ต่ำและส่งผลให้แอคติวิตีของเอนไซม์ลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริมลงไป 80 เปอร์เซ็นต์ รอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 ให้ผลผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด คือ 206.20 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น

ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน

การเติมแหล่งไนโตรเจนเสริมลงไปไม่ส่งเสริมการผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้น การใช้สารสกัดยีสต์และยูเรียที่ความเข้มข้นต่ำ ให้ผลผลิตกรดแลกติกสูงกว่าภาวะที่เติมลงไปในความเข้มข้นสูง และพบว่าการใช้ยูเรียที่ความเข้มข้นสูง เป็นแหล่งไนโตรเจนส่งเสริมการเจริญเติบโตของราและการผลิตกลูโคอะไมเลสอย่างเห็นได้ชัด โดยการเลี้ยงในภาวะที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ รอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 เติมยูเรียและสารสกัดยีสต์ที่ความเข้มข้น 0.10 กรัมต่อลิตรให้ผลผลิตสูงสุดคือ 207.63 และ 208.15 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น ตามลำดับ และสังเกตความแตกต่างได้ชัดเจนว่า การใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนมีผลช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *R. oryzae* ได้ดีกว่าสารสกัดจากยีสต์ ภาวะที่มีการเติมยูเรียที่ความเข้มข้น 0.3 และ 0.5 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตชีวมวลสูงสุด คือ 1.39 และ1.64 กรัมต่อหนึ่งกรัมตัวอย่างแห้ง ขณะที่ภาวะที่เติมสารสกัดยีสต์ที่ความเข้มข้น 0.3 และ 0.5 กรัมต่อลิตร ให้ผลผลิตชีวมวลสูงสุด คือ 0.86 และ 0.79 กรัมต่อหนึ่งกรัมตัวอย่างแห้งตามลำดับ

ศึกษาอิทธิพลของกลูโคอะไมเลสและเซลลูเลส

ภาวะที่มีการเติมเซลลูเลสลงไปให้ผลผลผลิตกรดแลกติกสูงกว่าภาวะที่มีการเติมกลูโคอะไมเลสลงไปเพียงอย่างเดียว เนื่องจากเซลลูเลสไปทำการย่อยเซลลูโลสที่อยู่ในกากมันทำให้ได้พวกออลิโกเมอร์ออกมาอีกจำนวนหนึ่ง และอาจจะไปทำให้เม็ดแป้งที่แทรกซึมหรือถูกห่อหุ้มด้วยเซลลูโลสนั้นหลุดออกมาด้วย ทำให้มีสารตั้งต้นที่จะทำการเปลี่ยนเป็นกลูโคสเพิ่มขึ้นจะเห็นกลูโคสเป็นระยะๆ ทำให้รามีปริมาณซับสเตรทที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกได้อย่างต่อเนื่อง การใช้ปริมาณกลูโคอะไมเลส 3.85 และเซลลูเลส 45 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น เพียงพอต่อการย่อยแป้งและเซลลูโลสที่มีอยู่ในกากมันสด 7.5 กรัม โดยให้ผลผลิตกรดแลกติก คือ 254.30 และ 442.35 มิลลิกรัมต่อกรัมแห้งกากมันเริ่มต้น ตามลำดับ โดยปริมาณกรดแลกติกที่ได้ไม่แตกต่างจากการใช้กลูโคอะไมเลส 7.70 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้นและเซลลูเลส 92.50 และ 182.50 ยูนิตต่อกรัมแห้งกากมันเริ่มต้น และภาวะที่มีการเติมกลูโคอะไมเลส 3.85 ร่วมกับเซลลูเลส 45 ยูนิตต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้นให้ผลผลิตกรดแลกติกสูงที่สุด คือ 463.18 มิลลิกรัมต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้น เมื่อเทียบกับผลของการหมักในภาวะปกติและภาวะที่มีการเติมกลูโคอะไมเลสหรือเซลลูเลสเพียงอย่างเดียว

ข้อเสนอแนะ

1. จากผลการทดลองในงานวิจัยนี้ พบว่าการเติมกลูโคอะไมเลส และเซลลูเลสเพิ่มลงไปทำให้มีปริมาณกรดแลกติกเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีสารตั้งต้นเพิ่มขึ้น ดังนั้นในงานวิจัยต่อไปควรศึกษาเกี่ยวกับการศึกษาเมแทบอลิซึมของราระหว่างกลไกการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลด้วยเอนไซม์ที่ราสร้างขึ้นและกลไกการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแลกติก เพื่อให้ทราบว่ากลไกใดเป็นกลไกจำกัดในการผลิตกรดแลกติก

2. ในระหว่างการหมักพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการผลิตกรดแลกติกของราอย่างเห็นได้ชัดเจน โดยภาวะที่มีค่าความเป็นกรดที่ต่ำมาก (<4.00) และค่าความเป็นด่างสูงมาก (>6.50) ปริมาณกรดแลกติกจะน้อยอย่างชัดเจน จึงควรออกแบบระบบการเติมกรดหรือด่างเพื่อควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างให้คงที่อยู่ระหว่าง 5.00-6.50 ให้เท่ากันทุกบริเวณ โดยเฉพาะการขยายขนาดการหมัก ถังหมักที่นำมาใช้ควรมีการออกแบบหรือระบบควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างและการคลุกเคล้าซับสเตรท ให้มีความเป็นเนื้อเดียวกันที่ดี

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. บทปฏิบัติการที่ 7 การนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (MicrobialPopulation), 2551. [online].แหล่งที่มา: http://science.kmutt.ac. th/class/mic291/ mic291lab7.doc [2551, September 1]

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล. เทคโนโลยีชีวภาพอาหาร การหมัก และสิ่งแวดล้อม.1. 1. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2547.

ภาษาอังกฤษ

Abd-Aziz, S., Hung, G. S., Hassan, M. A., Karim, M. I. A. and Samat, N., Indirect method for quantification of cell biomass during solid state fermentation of palm kernel cake based on protein content. Asian Journal of Scientific Research 1 (2008) : 385-393.

Adejoye, O. D., Adebayo-Tayo, B. C., Ogunjobi, A. A., Olaoye, O. A. and Fadahunsi, F.I., Effect of carbon, nitrogen and mineral sources on growth of *Pleurotus florida*, a Nigeria edible mushroom. African Journal of Biotechnology 5 (2006) : 1355-1359.

Akpan, I. and Adelaja, F. A., Production and stabilization of amylase preparations from rice bran solid medium. World Journal of Microbiology and Biotechnology 20 (2004) : 47-50.

Altaf, Md., Naveena, B. J., Venkateshwar, M., Kumar, E. V. and Reddy, G., Single step fermentation of starch to L(+)-lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using inexpensive nitrogen sources to replace peptone and yeast extract – Optimization by RSM. Process Biochemistry 41 (2006) : 465-472.

Altaf, Md., Naveena, B. J. and Reddy, G., Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L(+)-lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. Bioresource Technology 98 (2007) : 498-503.

Aidoo, K. E., Hendry, R. and Wood, B. J. B., Estimation of fungal growth in a solid state fermentation system. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 12 (1981) : 6-9.

Aikat, K. and Bhattacharyya, B. C., Protease extraction in solid state fermentation of wheat bran by a local strain of *Rhizopus oryzae* and growth studies by the soft gel technique. Process Biochemistry 35 (2000) : 907-914.

Aikat, K. and Bhattacharyya,B. C., Protease production in solid state fermentation with liquid medium recycling in a stacked plate reactor and in a packed bed reactor by a local strain of *Rhizopus oryzae*. Process Biochemistry 36 (2001) : 1059-1068.

Arasaratnam, V., Senthuran, A. and Balasubramaniam, K., Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. Enzyme and Microbial Technology 19 (1996) : 482-486.

Aráujo, Á. A., Pastore, G. M. and Berger, R. G., Production of coconut aroma by fungi cultivation in solid state fermentation. Applied Biochemistry and Biotechnology 98-100 (2002) : 747-751.

Arzumanov, T., Jenkins, N. and Roussos, S., Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. Process Biochemistry 40 (2005) : 1037-1042.

Ashokkumar, B., Kayalvizhi, N. and Gunasekaran, P., Optimization of media for β-fructofuranosidase production by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. Process Biochemistry 37 (2001) : 331-338.

Babu, K. R. and Satyanarayana, T., α-Amylase production by thermophilic *Bacillus coagulans* in solid state fermentation. Process Biochemistry 30 (1995) : 305-309.

Bai, D. M., Jia, M. Z., Zhao, X. M., Ban, R., Shen, F., Li, X. G. and Xu, S. M., L(+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* R1021in a stirred tank fermentor. Chemical Engineering Science 58 (2003) : 785-791.

Barros, L., Baptista, P., Estevinho, L. M. and Ferreira, I. C. F. R., Bioactive properties of the medicinal mushroom *Leucopaxillus giganteus* mycelium obtained in the presence of different nitrogen sources. Food Chemistry 105 (2007) : 179-186.

Barton, L. L., Lineback, D. R. and Georgi, C. E., The influence of nitrogen and carbon sources on the production of glucoamylase by *Aspergilli*. The Journal of General and Applied Microbiology 15 (1969) : 327-344.

Bhargav, S, Panda, B. P, Ali, M. and Javed, S., Solid state fermentation : an overview. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly 22 (2008) : 49-70.

Bhatti, H. N., Rashid, M. H., Nawaz, R., Asgher, M., Perveen, R. and Jabbar, A., Optimization of media for enhanced glucoamylase production in solid-state fermentation by *Fusarium solani*. Food Technology and Biotechnology 45 (2007) : 51-56.

Biesebeke, R. te, Biezen, N. van . Heerikhuisen, M., Franken, A., Punt, P. J. and van der Hondel, C. A. M. J. J., Branching mutants of *Aspergillus oryzae* with improved amylase and protease production on solid substrates. Applied Microbiology and Biotechnology 69 (2005) : 44-50.

Blandino, A., Iqbalsyah, T., Pandiella, S.S., Cantero, D. and Webb, C., Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid state fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology 58 (2002) : 164-169.

Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, A. and Heckelman, P.E.(eds.)., The merck index.11^{th} Ed., 5214. Merck, Rahway,NJ. (1989)

Bulut, S., Elibol, M. and Ozer, D., Effect of different carbon sources on L(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. Biochemical Engineering Journal 21 (2004) : 33-37.

Cavalcante, R. S., Lima, H. L. S., Pinto, G. A. S., Gava, C. A. T. and Rodrigues, S., Effect of moisture on *Trichoderma conidia* production on corn and wheat bran by solid state fermentation. Food and Bioprocess Technology 1 (2008) :100-104.

Chahal, D.S., Solid state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulase production. Applied and Environmental Microbiology 49 (1985) : 205-210.

Chinn, M. S., Nokes, S. E. and Strobel, H. J., Influence of moisture content and cultivation duration on *Clostridium thermocellum* 27405 end-product formation in solid substrate cultivation on Avicel. Bioresource Technology 99 (2008) : 2664-2671.

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

Corona, A., Sáez, D. and Agosin, E., Effect of water activity on gibberellic acid production by *Gibberella fujikuroi* under solid-state fermentation conditions. Process Biochemistry 40 (2005) : 2655-2658.

Couto, S. R. and Sanroma, M. A., Application of solid state fermentation to food industry - A review. Journal of Food Engineering 76 (2006) : 291-302.

Cui, Y.Q., van der Lans, R.G.J.M. and Luyben, K.Ch.A.M., Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. Biotechnology and Bioengineering 57 (1998) : 409-419.

Desgranges, C., Vergoignan, C., Georges, M. and Durand, A., Biomass estimation in solid state fermentation I. Manual biochemical methods. Applied Microbiology and Biotechnology 35 (1991) : 200-205.

Elisashvili, V., Penninckx, M., Kachlishvili, E., Tsiklauri, N., Metreveli, E., Kharziani, T. and Kvesitadz, G., *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. Bioresource Technology 99 (2008) : 457-462.

Ellaiah, P., Adinarayana, K., Bhavani, Y., Padmaja, P. and Srinivasulu, B., Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. Process Biochemistry 38 (2002) : 615-620.

Ellis, D.H., Zygomycetes, Microbiology and Microbial Infections 9 (1997) : 247-277.

Facciotti, M. C. R., Wuhstrack, G. H., Tonso, A., Chiquetto, M. L. and Schmidell, W., Effect of yeast extract on glucoamylase synthesis by *Aspergillus amamori* NRRL 3112. Biotechnology Letters 13 (1991) : 547-552.

Feng, X. M., Eriksson, A. R. B. and Schnürer, J., Growth of lactic acid bacteria and *Rhizopus oligosporus* during barley tempeh fermentation. International Journal of Food Microbiology 104 (2005) : 249-256.

Fujio, Y. and Morita, H., Improved glucoamylase production by *Rhizopus* sp. A-I 1 using metal-ion supplemented liquid medium. Journal of Fermentation and Bioengineering 82 (1996) : 554-557.

Gervais, P., Bensoussan, M. and Grajek, W., Water activity and water content: comparative effects on the growth of *Penicilium roqueforti* on solid substrate. Applied Microbiology and Biotechnology 27 (1988) : 389-392.

Gervais, P. and Molin, P., The role of water in solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal 13 (2003) : 85-101.

Ghaly, A. E., Tango, M. S. A., and Adams, M. A., Enhanced lactic acid production from cheese whey with nutrient supplement addition. Agricultural Engineering International : the CIGR Journal of Scientific Research and Development (2003) : 1-20.

Gkargkas, K., Mamm, D., Nedev, G., Topakas, E., Christakopoulos, P., Kekos, D. and Macris, B. J., Studies on a *N*-acetyl-ß-D-glucosaminidase produced by *Fusarium oxysporum* F3 grown in solid state fermentation. Process Biochemistry 39 (2004) :1599-1605.

Grajek, W. and Gervais, P., Influence of water activity on the enzyme biosynthesis and enzyme activities produced by *Trichoderma viride* TS in solid state fermentation. Enzyme and Microbial Technology 9 (1987) : 658-661.

Graminha, E. B. N., Goncalves, A. Z. L., Pirota, R. D. P. B., Balsalobre, M. A. A., Silva, D.R. and Gomes, E., Enzyme production by solid state fermentation : Application to animal nutrition. Animal Feed Science and Technology 144 (2008) : 1-22.

Gullóna, B., Yáñeza, R., Alonso, J. L. and Parajó, J.C., L-Lactic acid production from apple pomace by sequential hydrolysis and fermentation. Bioresource Technology 99 (2008) : 308-319.

Gustavo, V. -G., Ernesto, F. -T., Cristobal N. A., Sergio de Jesus, R. -G., Gerardo D. -G. and Augur, C., Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. Biochemical Engineering Journal 13 (2003) : 157-167.

Gutarra, M. L. E., Cavalcanti, E. D. C., Castilho, L. R., Freire, D. M. G. and Sant'anna Jr. G. L., Lipase production by solid state fermentation. Applied Biochemistry and Biotechnology 121–124 (2005) : 105–116.

Hallsworth, J. E. and Magan, N., Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*. Journal of Invertebrate Pathology 74 (1999) : 261-266.

Hang, Y. D., Hamamci, H. and Woodams, E. E., Production of L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae* immobilized in calcium alginate gels. Biotechnology Letters 11(1989) : 119-120.

Hana, B. Z., Ma, Y., Rombouts, F. M. and Nout, M. J. R., Effects of temperature and relative humidity on growth and enzyme production by *Actinomucor elegans* and *Rhizopus oligosporus* during sufu pehtze preparation. Food Chemistry 81 (2003) : 27-34.

Hakil, M., Voisinet, F., Viniegra, G. G. and Augur, C., Caffeine degradation in solid state fermentation by *Aspergillus tamari* : effects of additional nitrogen sources. Process Biochemistry 35 (1999) : 103-109.

Hofvendahl, K. and Hahn-Hagerdal, B., Factor affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. Enzyme and Microbial Technology 26 (2000) : 87-107.

Hong, K., Ma, Y. and Li, M. Q., Solid state fermentation of phytase from cassava dregs. Applied Biochemistry and Biotechnology 91–93 (2001) : 777-785.

Hölker, U. and Lenz, J., Solid state fermentation - are there any biotechnological advantages? Current Opinion in Microbiology 8 (2005) : 301-306.

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

Huang, L. P., Jin, B., Lant, P. and Zhou, J. T., Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. Biochemical Engineering Journal 23 (2005) : 265-276.

Hujanen, M. and Linko, Y. Y., Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei*. Applied Microbiology and Biotechnology 45 (1996) : 307-313.

Ikasari, L. and Mitchell, D. A., Protease production by *Rhizopus oligosporus* in solid state fermentation. World Journal of Microbiology and Biotechnology 10 (1994) : 320-324.

Ikasari, L. and Mitchell, D. A., Oxygen uptake kinetics during solid state fermentation with *Rhizopus oligosporus*. Biotechnology Techniques 12 (1998) : 171-175.

Jin, B., Huang, L. P. and Lant, P., *Rhizopus arrhizus* - a producer for simultaneous saccharification and fermentation of starch waste materials to L(+)-lactic acid. Biotechnology Letters 25 (2003) : 1983-1987.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Jin, B., Yin, P. H., Ma, Y. H. and Zhao, L., Production of lactic acid and fungal biomass by *Rhizopus* fungi from food processing waste streams. The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 32 (2005) : 678-686.

John, R. P., Nampoothiri, K. M. and Pandey, A., Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. Process Biochemistry 41 (2006) : 759–763.

John, R. P., Nampoothiri, K. M. and Pandey, A., Fermentative production of lactic acid from biomass : an overview on process developments and future perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology 74 (2007) : 524-534.

Judith, L. S. L., Maria, C. A. F. and Nei, P. Jr., Xylanase production by *Aspergillus awamori* in solid state fermentation and influence of different nitrogen sources. Applied Biochemistry and Biotechnology 91-93 (2001) : 681-189.

Kadam, S. R., Patil, S. S. and Bastawde, K. B., Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. Process Biochemistry 41(2005) : 120-126.

Kosugi, A., Kondo, A., Ueda, M., Murata, Y., Vaithanomsat, P., Thanapase, W., Arai, T. and Mori, Y. Production of ethanol from cassava pulp *via* fermentation with a surface-engineered yeast strain displaying glucoamylase . Renewable Energy 34 (2009) : 1354-1358.

Kumar, P. K. R. and Lonsane, B. K., Solid state fermentation : physical and nutritional factors influencing gibberellic acid production. Applied Microbiology and Biotechnology 34 (1990) : 145-148.

Li, Y., Chen, J., Liang, D. F. and Lun, S. Y., Effect of nitrogen source and nitrogen concentration on the production of pyruvate by *Torulopsis glabrata*. Journal of Biotechnology 81 (2000) : 27-34.

Liao, W., Liu, Y., Frear, C. and Chen, S. L., A new approach of pellet formation of a filamentous fungus – *Rhizopus oryzae*. Bioresource Technology 98 (2007) : 3415-3423.

Lin, J., Zhou, M., Zhao, X., Luo, S. and Lu, Y., Extractive fermentation of L-lactic acid with immobilized *Rhizopus oryzae* in a three-phase fluidized bed. Chemical Engineering and Processing 46 (2007) : 369-374.

Litchfield, J. H., Microbiological production of lactic acid. Advances in Applied Microbiology 42 (1996) : 45-95.

Lockwook, L.B., Lactic acid. Annals of the New York Academy of Science 119 (1965) : 354-867.

Lu, M. Y., Brooks, J. D. and Maddox, I. S., Citric acid production by solid state fermentation in a packed-bed reactor using *Aspergillus niger*. Enzyme and Microbial Technology 21 (1997) : 392-397.

Liu, Y., Wen, Z., Liao, W., Liu, C. and Chen, S., Optimization of the process for the production of L(+)-lactic acid from cull potato by *Rhizopus oryzae*. Engineering in Life Sciences 5 (2005) : 343-349.

Vandenberghe, L. P. S. , Soccol, C. R. , Prado, F. C. and Pandey, A., Comparison of citric acid production by solid state fermentation in flask, column, tray, and drum bioreactors. Applied Biochemistry and Biotechnology 118 (2004) : 293-303.

Luis, N. B. J., Hugo, J. I., Enrique, B. A., Ramiro, R. M. and Octavio, P. L., An optimization study of solid state fermentation : xanthophylls extraction from marigold flowers. Applied Microbiology and Biotechnology 65 (2004) : 383-390.

Mamma, D., Kourtoglou, E. and Christakopoulos, P., Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. Bioresource Technology 99 (2008) : 2373-2383.

Malarvizhi, K., Murugesan, K. and Kalaichelvan, P. T., Xylanase production by *Ganoderma lucidum* on liquid and solid state fermentation. Indian Journal of Experimental Biology 41 (2003) : 620-626.

Marlida, Y., Saari, N., Hassan, Z. and Radu, S., Improvement in raw sago starch degrading enzyme production from *Acremonium* sp. endophytic fungus using carbon and nitrogen sources. Enzyme and Microbial Technology 27 (2000) : 511–515.

Marin-Cervantes, M. C., Matsumoto, Y., Ramırez-Coutino, L., Rocha-Pino, Z., Viniegra, G. and Shirai, K., Effect of moisture content in polyurethane foams as support for solid-substrate fermentation of *Lecanicillium lecanii* on the production profiles of chitinases. Process Biochemistry 43 (2008) : 24-32.

Martak, J., Scholosser, S., Sabolova, E., Kristofikova, L. and Rosenberg, M., Fermentation of lactic acid with *Rhizopus arrhizus* in a stirred tank reactor with a periodical bleed and feed operation. Process Biochemistry 38 (2003) : 1573-1583.

Mirdamadi, S., Sadeghi, H., Sharafi, N., Fallahhpour, M., Mohseni F. A. and Bakhtiari, M.R., Comparision of lactic acid isomers produced by fungal and bacterial strains. Iranian Biomedical Journal 2 (2002) : 69-75.

Mitchell, D. A., Doelle, H. W. and Greenfield, P. F., Agar plate growth studies of *Rhizopus oligosporus* and *Aspergillus oryzae* to determine their suitability for solid state fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology 28 (1988) : 598-602.

Mitchell, D. A., Krieger, N., Stuart, D. M. and Pandey, A., New developments in solid state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. Process Biochemistry 35 (2000) : 1211-1225.

Mitchell, D. A., Berovic, M. and Krieger, N., Overview of solid state bioprocessing. Biotechnology Annual Review 8 (2002) : 183-225.

Michelson, T., Kask, K., Jõgi, E., Talpsep, E., Suitso, I. and Nurk, A., L(+)-Lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 and its comparison with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. lactis DSM 20073. Enzyme and Microbial Technology 39 (2006) : 861-867.

Miura, S., Arimura, T., Itoda, N., Dwiarti, L., Feng, J. B., Bin, C. H. and Okabe, M., Production of L-lactic acid from corncob. Journal of Bioscience and Bioengineering 97 (2004) : 153-157.

Mussatto, S. I., Fernandes, M., Dragone, G., Mancilha, I. M. and Roberto, C., Brewer's spent grain as raw material for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. Biotechnology Letters 29 (2007) : 1973-1976.

Nahar, S., Hossain, F., Feroza, B. and Halim, M. A., Production of glucoamylase by *Rhizopus* sp. in liquid culture. Pakistan Journal of Botany 40 (2008): 1693-1698.

Nair, S. G., Sindhu, R. and Shashidhar, S., Fungal xylanase production under solid state and submerged fermentation conditions. African Journal of Microbiology Research 2 (2008) : 82-86.

Narayanan, N., Roychoudhury, P. K. and Srivastava, A., L(+)-lactic acid fermentation and its product polymerization. Electronic Journal of Biotechnology 7 (2004) : 167-179.

Naveena, B. J., Altaf, M., Bhadrayya, K., Madhavendra, S. S. and Reddy, G., Direct fermentation of starch to L(+)-lactic acid in SSF by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using wheat bran as support and substrate : medium optimization using RSM. Process Biochemistry 40 (2005) : 681-690.

Niladev, K. N. Sukumara, R. K. and Prema, P., Utilization of rice straw for laccase production by *Streptomyces psammoticus* in solid state fermentation. The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 34 (2007) : 665-674.

Norouzian, D., Akbarzadeh, A., Scharer, J. M. and Young, M. M., Fungal glucoamylases. Biotechnology Advances 24 (2006) : 80-85.

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

Oguntoyinbo, F. A., Identification and functional properties of dominant lactic acid bacteria isolated at different stages of solid state fermentation of cassava during traditional *gari* production. World Journal of Microbiology and Biotechnology 23 (2007) : 1425-1432.

Oh, H., Wee, Y. J., Yun, J. S., Han, S. H., Jung, S. W. and Ryu, H. W., Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. Bioresource Technology 96 (2005) : 1492-1498.

Ong, L. G. A., Abd-Aziz, S., Noraini, S., Karim, M. I. A., and Hassan, M. A., Enzyme production and profile by *Aspergillus niger* during solid substrate fermentation using palm kernel cake as substrate. Applied Biochemistry and Biotechnology 118 (2004) : 73-79.

Ooijkaas, L. P., Tramper, J. and Buitelaar, R. M., Biomass estimation of *Coniothyrium minitans* in solid state fermentation. Enzyme and Microbial Technology 22 (1998) : 480-486.

Oriol, E., Raimbaul, M., Roussos, S. and Gustavo, V. G., Water and water activity in the solid state fermentation of cassava starch by *Aspergillus niger*. Applied Microbiology and Biotechnology 27 (1988) : 498-503.

Pandey, A., Improvements in solid-state fermentation for glucoamylase production. Biological Wastes 34 (1990) : 1-19.

Pandey, A., Ashakumary, L., Selvakumar, P. and Vijayalakshmi, K. S., Influence of water activity on growth and activity of *Aspergillus niger* for glycoamylase production in solid state fermentation. World Journal of Microbiology and Biotechnology 10 (1994) : 485-486.

Pandey, A., Soccol, C. R. and Mitchell, D., New developments in solid state fermentation : I-bioprocesses and products. Process Biochemistry 35 (2000) : 1153-1169.

Pandey, A., Solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal 13 (2003) : 81-84.

Panesa, P. S., Kennedy, J. F., Gandhi, D. N. and Bunko, K., Bioutilisation of whey for lactic acid production. Food Chemistry 105 (2007) : 1-14.

Papagianni, M., Nokes, S. E. and Filer, K., Production of phytase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state fermentation. Process Biochemistry 35 (1999) : 397-402.

Park, E. Y., Kosakai, Y. and Okabe, M., Efficient production of L-(+)-lactic acid using mycelial cotton-like flocs of *Rhizopus oryzae* in an air-lift bioreactor. Biotechnology Progress 14 (1998) : 699-704.

Park, E. Y., Anh, P. N. and Okuda, N., Bioconversion of waste office paper to L(+)-lactic acid by the filamentous fungus *Rhizopus oryzae*. Bioresource Technology 93 (2004) : 77-83.

Patidar, P., Agrawal, D., Banerjee, T. and Patil, S., Chitinase production by *Beauveria felina* RD 101: optimization of parameters under solid substrate fermentation conditions. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21 (2005) : 93-95.

Pedersen, H. and Nielsen, J., The influence of nitrogen sources on the α-amylase productivity of *Aspergillus oryzae* in continuous cultures. Applied Microbiology and Biotechnology 53 (2000) : 278-281.

Prado, F. C., Vandenberghe, L. P. S., Woiciechowski, A. L., Rodrígues-León, J. A. and Soccol C. R., Citric acid production by solid-state fermentation on a semi-pilot scale using different percentages of treated cassava bagasse. Brazilian Journal of Chemical Engineering 22 (2005) : 547-555.

Pinto, F. S. T., Flôres, S. H., Ayub, M. A. Z. and Hertz, P. F., Production of cyclodextrin glycosyltransferase by alkaliphilic *Bacillus circulans* in submerged and solid state cultivation. The journal Bioprocess and Biosystems Engineering 30 (2007) : 377-382.

Pothiraj, C., Balaji, P. and Eyini, M. Enhanced production of cellulases by various fungal cultures in solid state fermentation of cassava waste. African Journal of Biotechnology 5 (2006) : 1882-1885.

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

Rattanachomsri, U., Tanapongpipat, S., Eurwilaichitr, L. and Champreda, V. Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol fermentation by Candida tropicalis. Journal of Bioscience and Bioengineering 107 (2009) : 488-493.

Rhodes, L. and Broderick, A., Bioconversion of nitrogen supplemented wheat pollard and bran by filamentous fungi. Biological Wastes 30 (1989) : 101-109.

Ride, J.P. and Drysdale, R.B., A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. Physiological and Molecular Plant Pathology 2 (1972) : 7-15.

Robinson, T. and Nigam, P., Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal 13 (2003) : 197-203.

Roche, N., Venague, A., Desgranges, C. and Durand, A., Use of chitin measurement to estimate fungal biomass in solid state fermentation. Biotechnology Advances 11 (1993) : 677-683.

Rodriguez, J. A., Mateos, J. C., Nungaray, J., González, V., Bhagnagar, T., Roussos, S., Cordova, J. and Baratti, J., Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. Process Biochemistry 41 (2006) : 2264-2269.

Ronald, H. W. M., Robert, R. B., Gerrit, E. and Ruud, A. W., Lactic acid production from xylose by the fungus *Rhizopus oryzae*. Applied Microbiology and Biotechnology 72 (2006) : 861-868.

Romero, S.M., Patriarca, A., Pinto, V. F. and Vaamonde, G., Effect of water activity and temperature on growth of ochratoxigenic strains of *Aspergillus carbonarius* isolated from Argentinean dried vine fruits. International Journal of Food Microbiology 115 (2007) : 140-143.

Rosenberg, M. and L. Kristofikova., Physiological restriction of the l-lactic acid production by *Rhizopus arrhizus*. Acta Biotechnologica 15 (1995) : 367-374.

Ruengruglikit, C. and Hang, Y. D., L(+)-lactic acid production from corncobs by *Rhizopus oryzae* NRRL 395. Swiss Society of Food Science and Technology 36 (2003) : 573-575.

Saito, K., Takakuwa, N. and Oda, Y., Purification of the extracellular pectinolytic enzyme from the fungus *Rhizopus oryzae* NBRC 4707. Microbiological Research 159 (2004) : 83-86.

Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G. and Pandey, A., Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid state fermentation. Process Biochemistry 40 (2005) : 2689–2694.

Sautour, M., Dantigny, P., Divies, C. and Bensoussan, M., A temperature-type model for describing the relationship between fungal growth and water activity. International Journal of Food Microbiology 67 (2001) : 63-69.

Scotti, C. T., Vergoignan, C., Feron, G. and Durand, A., Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid state cultivation conditions. Biochemical Engineering Journal 7 (2001) : 1–5.

Selvakumar, P., Ashakumary, L. and Pandey, A., Biosynthesis of glucoamylase from *Aspergillus niger* by solid state fermentation using tea waste as the basis of a solid substrate. Bioresource Technology 65 (1998) : 83-85.

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

Skory, C.D., Lactic acid production by *Rhizopus oryzae* transformants with lactate dehydrogenase activity. Applied Microbiology and Biotechnology 64 (2004) : 237-242.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Sharma, A., Vivekananda, V. and Singh, R. P., Solid state fermentation for gluconic acid production from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* ARNU-4 employing tea waste as the novel solid support. Bioresource Technology 99 (2008) : 3444-3450.

Shankar, S. K. and Mulimani, V. H., α-Galactosidase production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation. Bioresource Technology 98 (2007) : 958-961.

Shoj, H., Sugimoto, T., Hosoi, K., Shibata, K., Tanabe, M., and Kawatsura, K., Simultaneous production of glucoamylase and acid-stable α-amylase using novel submerged culture of *Aspergillus kawachii* NBRC 4308. Journal of Bioscience and Bioengineering 103 (2007) : 203-205.

Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R. and Pandey, A., Recent advances in solid state fermentation. Biochemical Engineering Journal 44 (2009) : 13-18.

Soccol, C .R., Iloki, I., Marin, B. And Raimbaults, M., Comparative production of alpha-amylase, glucoamylase and protein enrichment of raw and cooked cassava by *Rhizopus* strains in submerged and solid state fermentations. Journal of Food Science & Technology 31 (1994) : 320-323.

Soccol, C. R. and Vandenberghe, L. P. S., Overview of applied solid state fermentation in Brazil. Biochemical Engineering Journal 13 (2003) : 205-218.

Soletto, D., L. Binaghi, Lodi, A., Carvalho, J. C. M. and Converti, A., Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. Aquaculture 243 (2005) : 217-224.

Soni, S. K., Kaura, A. and Gupta, J. K., A solid state fermentation based bacterial α-amylase and fungal glucoamylase system and its suitability for the hydrolysis of wheat starch. Process Biochemistry 39 (2003) : 185-192.

Sparringa, R. A., Owens, J. D., Glucosamine content of tempe mould, *Rhizopus oligosporus*. International Journal of Food Microbiology 47 (1999) : 153-157.

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

Stajic, M., Persky, L., Friesem, D., Hadar, Y., Wasser, S. P., Nevo, E. and Vukojevi, J., Effect of different carbon and nitrogen sources on laccase and peroxidases production by selected *Pleurotus* species. Enzyme and Microbial Technology 38 (2006) : 65-73.

Sun, Y., Li, Y. L. and Bai, S., Modeling of continuous L(+)-lactic acid production with immobilized *R. oryzae* in an airlift bioreactor. Biochemical Engineering Journal 3 (1999) : 87-90.

Sun, S. Y. and Xu, Y., Solid-state fermentation for 'whole-cell synthetic lipase' production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. Process Biochemistry 43 (2008) : 219-224.

Suresh, P. V. and Chandrasekaran, M., Utilization of prawn waste for chitinase production by the marine fungus *Beauveria bassiana* by solid state fermentation. World Journal of Microbiology and Biotechnology 14 (1998) : 655-660.

Suresh, P. V. and Chandrasekaran, M., Impact of process parameters on chitinase production by an alkalophilic marine *Beauveria bassiana* in solid state fermentation. Process Biochemistry 34 (1999) : 257-267.

Szendefy, J., Szakacs, G. and Christopher, L., Potential of solid state fermentation enzymes of *Aspergillus oryzae* in biobleaching of paper pulp. Enzyme and Microbial Technology 39 (2006) : 1354-1360.

Tay, A. and Yang, S. T., Production of L(+)-lactic acid from glucose and starch by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* in a rotating fibrous-bed bioreactor. Biotechnology and Bioengineering 80 (2002) :1–12.

Terebiznik, M. R. and Pilosof, A. M. R., Biomass estimation in solid state fermentation by modeling dry matter weight loss. Biotechnology Techniques 13 (1999) : 215-219.

Thomas, T.D., Ellwood, D.C. and Longyear, M.C., Change from homo-and heterolactic fermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat cultures. Journal Bacteriology 138 (1979) : 109-117.

Thongchul N., Lactic acid production by immobilized *Rhizopus oryzae* in a rotating fibrous bed bioreactor. PhD thesis. Program in Chemical engineering. The Ohio State University. Columbus, Ohio, 2005.

Tung, T. Q., Miyata, N. and Iwahori, K., Growth of *Aspergillus oryzae* during treatment of cassava starch processing wastewater with high content of suspended solids. Journal of Bioscience and Bioengineering 97 (2004) : 329-335.

Vaidya, A. N., Pandey, R. A., Mudliar, S., Kumar, M. S., Chakrabarti, T. and Devotta, S., Production and recovery of lactic acid for polylactide-an overview. Critical Reviews in Environmental Science and Technology 35 (2005) : 429-467.

Vandenberghe, L. P. S., Soccol, C.R., Prado, F. C. and Pandey, A., Comparison of citric acid production by solid state fermentation in flask, column, tray, and drum bioreactors. Applied Biochemistry and Biotechnology 118 (2004) : 293-303.

Varadarajan, S. and Miller, D.J., Catalytic upgrading of fermentation-derived organic acids. Biotechnology Progress 15 (1999) : 845-854.

Vijayakuma, J., Aravindan, R., and Viruthagiric, T., Recent trends in the production, purification and application of lactic acid. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly 22 (2008) : 245-264.

Vintila, T., Dragomirescu, M., Jurcoane, S., Vintila, D., Caprita, R. and Maniu, M., Production of cellulase by submerged and solid-state cultures and yeasts selection for conversion of lignocellulose to ethanol. Biotechnological Letters 14 (2009) : 4275-4281.

Wassewar, K.L., Separation of lactic acid: recent advances. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly 19 (2005) : 159-172.

Wee, Y. J., Kim, J. N. and Ryu, H. W., Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. Food Technology and Biotechnology 44 (2006) : 163-172.

Wright, B.E., Longacre, A. and Reimers, J., Models of metabolism in *Rhizopus oryzae*. Journal of Theoretical Biology 182 (1996) : 453-457.

Yang, S. S. and Wang, J. Y., Protease and amylase production of *Streptomyces rimosus* in submerged and solid state cultivations. Botanical Bulletin of Academia Sinica. A Quarterly Journal Containing Scientific Contributions from the Institute of Botany, Academia Sinica. Shanghai 40 (1999) : 259-265.

Yang, S., Huang, Z., Jiang, Z. and Li, L., Partition and purification of a thermostable xylanase produced by *Paecilomyces thermophila* in solid state fermentation using aqueous two-phase systems. Process Biochemistry 43 (2008) : 56-61.

Yao, W. Y., Wu, X., Zhu, J., Sun, B. and Miller, C., Utilization of protein extract from dairy manure as a nitrogen source by *Rhizopus oryzae* NRRL 395 for L-lactic acid production. Bioresource Technology 101 (2010) : 4132-4138.

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

Yin, P. M, Yahiro, K., Ishigaki, T., Park, Y. and Okabez, M., L(+)-lactic acid production by repeated batch culture of *Rhizopus oryzae* in air-lift bioreactor. Journal of Fermentation and Bioengineering 85 (1998) : 96-100.

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

Zambare, V., Solid state fermentation of *Aspergillus oryzae* for glucoamylase production on agro residues. International Journal of Life Sciences 4 (2010) : 16-25.

Zhang, Z. Y., Jin, B. and Kelly, J. M., Production of lactic acid and byproducts from waste potato starch by *Rhizopus arrhizus* : role of nitrogen sources. World Jounal of Microbiology and Biotechnology 23 (2007) : 229-236.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Zhao, D. and Ding, X. Studies on the low-salt Chinese potherb mustard (*Brassica juncea*, Coss.) pickle. I-The effect of a homofermentative L(+)-lactic acid producer *Bacillus coagulans* on starter culture in the low-salt Chinese potherb mustard pickle fermentation. Food Science and Technology 41(2008) : 474-482.

Zhou, Y., Du, J. and Tsao, G.T., Mycelial pellet formation by *Rhizopus oryzae* ATCC52311. Applied Biochemistry and Biotechnology 84-86(2000) : 779-789.

Zhu, Y. P., Yin, L. J., Cheng, Y. Q., Yamaki, K., Mori, Y., Su, Y. C. and Li, L. T., Effects of sources of carbon and nitrogen on production of α-glucosidase inhibitor by a newly isolated strain of *Bacillus subtilis* B2. Food Chemistry 109 (2008) : 737-742.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

1. การหาแอคติวิตีแอลฟา-อะไมเลส

หลักการ

$$\text{polysaccharide} \xrightarrow{\alpha\text{-amylase}} \text{glucose}$$

สารเคมี A : สารละลาย 1% (w/v) แป้งมันฝรั่งใน 0.1 M sodium acetate buffer pH 6.0

B : สารละลาย DNSA

วิธีการตรวจวัดหาค่ากิจกรรมของแอลฟา-อะไมเลส

ตัวอย่าง

1. ตัวอย่างปริมาตร 125 ไมโครลิตร
2. เติมสารละลาย A ปริมาตร 125 ไมโครลิตร
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที
4. เติมสารละลาย B 500 ไมโครลิตร
5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

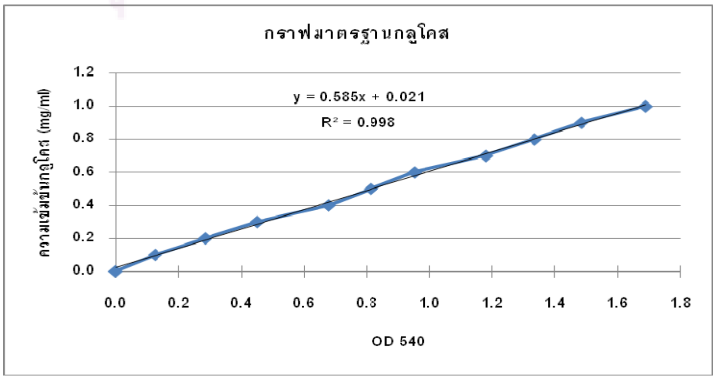
ชุดควบคุม

1. สารละลาย A ปริมาตร 125 ไมโครลิตร
2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที
3. เติมสารละลาย B 500 ไมโครลิตร
4. ตัวอย่างปริมาตร 125 ไมโครลิตร
5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

เทียบหาปริมาณกลูโคสกับกราฟมาตรฐาน และนำไปคำนวณค่าแอคติวิตีของอะไมเลสตามภาคผนวก ข ข้อ 4

วิธีเตรียมกราฟมาตรฐานกลูโคส

สารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้นระหว่าง 1-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรแทนสารตัวอย่าง และทำตามขั้นตอนข้างบน แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสง



ภาพที่ ก.1 กราฟมาตรฐานกลูโคส

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค่าแอคติวิตีจำเพาะของเอนไซม์ 1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ทั้งหมดที่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของโพลีแซคคาไรด์ 1 ไมโครโมลภายใน 1 นาที รายงานเป็นปริมาณเอนไซม์ต่อกรัมกากมันแห้งเริ่มต้นในหน่วยมิลลิกรัม

2. การหาแอคติวิตีกลูโคอะไมเลส

หลักการ

$$\rho - \text{Nitrophenyl} - \alpha - \text{D} - \text{glucopyranoside (PNPG)} \xrightarrow{\text{Glucoamylase}} \rho - \text{nitrophenol (PNG)}$$

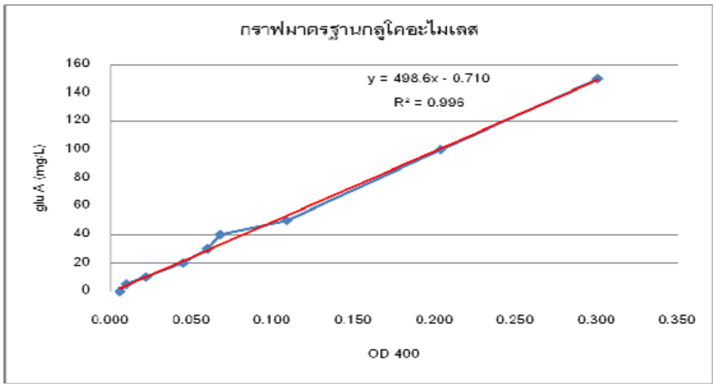
สารเคมี A: 0.1 % (w/v) 4-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside ใน0.1 M sodium acetate buffer pH 5.0

B: 0.1M sodium tetraborate

ขั้นตอนการวิเคราะห์

ตัวอย่าง	ชุดควบคุม
1. ตัวอย่างปริมาตร 125 ไมโครลิตร	1. ตัวอย่างปริมาตร 125 ไมโครลิตร
2. เติมสารละลาย A ปริมาตร 250 ไมโครลิตร	2. เติมสารละลาย A ปริมาตร 250 ไมโครลิตร
3. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง	3. เติมสารละลาย B 575 ไมโครลิตร
4. เติมสารละลาย B 575 ไมโครลิตร	4. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที	5. บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตร	6. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตร

เตรียมสารละลายมาตรฐานโดยใช้ กลูโคอะไมเลสความเข้มข้นระหว่าง 0-200 มิลลิกรัมต่อลิตร มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย 4-nitrophemyl-α-D-glucopyranoside และเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกลูโคอะไมเลสกับค่าการดูดกลืนแสง



ภาพที่ ก.2 กราฟมาตรฐานกลูโคอะไมเลส

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. การหาปริมาณชีวมวล

หลักการ

$$\text{Chitin (in cell wall)} \xrightarrow{\text{acid hydrolysis}} \text{N-Acetyl-D-glucosamine}$$

สารเคมี A : 5% (w/v) sodium bisulphate

B : 5% (w/v) sodium nitrate

C : 12.5% (w/v) ammonium sulfamate

D : 0.5 % (w/v) 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrozone hydrochloride (MBTH)

F : 0.5% (w/v) feric chloride

ขั้นตอนการวิเคราะห์

1. สารละลายไคตินที่ผ่านการย่อยด้วยกรด 0.5 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลาย A และ B อย่างละ 0.5 มิลลิลิตร

3. นำไปเขย่าให้เข้ากันนาน 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง

4. แบ่งสารละลายที่ได้จากข้อ 3. 0.6 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลาย C 200 ไมโครลิตร

5. นำไปเขย่าให้เข้ากันนาน 5 นาที เติมสารละลาย D 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

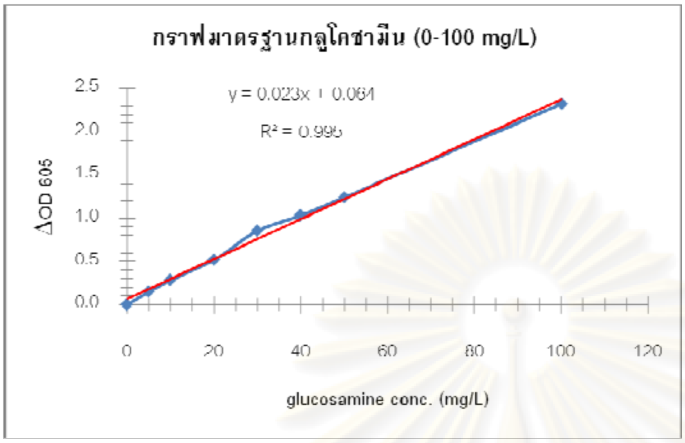
6. บ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที แล้วทำให้เย็น

7. เติมสารละลาย F 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง

8. วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร เทียบหาปริมาณกลูโคซามีนกับกราฟมาตรฐาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เตรียมสารละลายมาตรฐานโดยใช้ กลูโคซามีนความเข้มข้นระหว่าง 0-1000 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วเลือกแค่ช่วง log phase มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสง



ภาพที่ ก.3 กราฟมาตรฐานกลูโคซามีน

ในการคำนวณนำปริมาณกลูโคซามีนที่ได้จากการวัดค่าดูดกลืนแสงมาคำนวณเพื่อเทียบเป็นปริมาณชีวมวล โดยกลูโคซามีน 150 มิลลิกรัม เท่ากับ1 กรัมของชีวมวล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การคำนวณ

1. การหาเปอร์เซ็นต์ปริมาณน้ำที่เติมเสริม

สูตรที่ใช้ในการคำนวณ % additional free water = (5+x)/(7.5+5+x)

เช่นถ้าต้องการให้มีเปอร์เซ็นต์น้ำที่เติมเสริมเท่ากับ 80

แทนค่า 0.8 = (5+x)/ (7.5+5+x)

0.8(7.5+5+x) = (5+x)

6+4+0.8x = 5+x

10-5 = x-0.8

5 = 0.2x

X = 25

หมายเหตุ

X = ปริมาณน้ำที่ต้องใส่เพิ่มลงไป หน่วย มิลลิลิตร

7.5 = น้ำหนักกากมันสำประหลังสดที่ใช้ หน่วย กรัม

5 = ปริมาตรของกล้าเชื้อที่ใส่ลงไป หน่วย มิลลิลตร

2. การหาค่า yield ($Y_{p/s}$)

ตัวอย่างการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ควบคุมค่ากรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ทุกๆ 12 ชั่วโมง ไม่มีการเขย่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ ข .1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดแลกติกและเอทานอลกับกลูโคส และปริมาณน้ำหมักที่เก็บได้หลังจากการนำไปปั่นเหวี่ยงแยกส่วนของเหลวออกจากของแข็ง

h	Concentration (g/L)			amount of
	glucose	lactic	ethanol	liquid (ml)
0	1.9305	0.0000	0.0000	33.0
12	1.7475	0.6505	0.0000	12.5
24	5.8072	1.1957	0.0000	26.0
36	6.0175	3.9448	0.0000	25.0
48	5.6696	5.3796	0.0000	26.5
60	4.5764	7.6254	0.0000	27.0
72	2.2200	8.0468	0.0000	26.2
84	0.0000	10.5736	3.3402	27.0
96	0.8685	9.9615	2.0325	25.0
108	1.6514	6.6839	0.0000	26.5
120	0.0000	10.7475	2.1296	25.5
132	0.0000	10.5502	0.0000	27.0
144	0.0000	11.2475	0.0000	27.5
156	0.0000	11.0167	0.0000	26.0
168	3.0717	7.5870	0.0000	26.3

นำความเข้มข้นของสารที่ได้ในหน่วย กรัมต่อลิตร ไปคูณ กับ ปริมาณของเหลวที่ได้ ตัวอย่างเช่น กรดแลกติกชั่วโมงที่ 24 จะได้ 1.1957 (g/l) × 26 (ml) = 31.0882 mg จากนั้นนำค่าที่ได้ในหน่วยมิลลิกรัมนี้ไปหารด้วยน้ำแห้งของกากมันสำปะหลังแห้งเริ่มต้น ซึ่งมีค่าเท่า 1.5 กรัม เมื่อกากมันสำปะหลังมีความชื้น 80 เปอร์เซ็นต์ จะได้ 31.0882 (mg) / 1.5 (g) = 20.7255 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักกากมันแห้งเริ่มต้นในหน่วยมิลลิกรัม

3. การหาปริมาณแป้งที่เหลือในกากมันสำปะหลัง

ตัวอย่างการหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ที่เปอร์เซ็นต์น้ำอิสระที่ใส่เข้าไปเมื่อเทียบกับน้ำหนักรวมทั้งหมด เท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ ควบคุมค่ากรด-ด่าง 6.0 ทุกๆ 12 ชั่วโมง ไม่มีการเขย่า

ตารางที่ ข.2 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำตาลกับน้ำหนักแห้งของกากมันหลังการหมัก

h	Dextrose (g/l)	Dried pulp after fermented (g)	conc. Dextrose (g/1 g FD)
0	59.100	1.2871	0.5910
12	60.800	1.1801	0.6080
24	46.400	0.9039	0.4640
36	38.000	0.8092	0.3800
48	33.300	0.7166	0.3330
60	18.300	0.6572	0.1830
72	14.300	0.6747	0.1430
84	8.760	0.6665	0.0876
96	9.210	0.6630	0.0921
108	6.340	0.6297	0.0634
120	6.210	0.6610	0.0621
132	7.600	0.6312	0.0760
144	6.230	0.6214	0.0623
156	3.820	0.6607	0.0382
168	5.770	0.7065	0.0577

นำความเข้มข้นของน้ำตาลที่ได้จากการวัดจากเครื่อง YSI ในหน่วย กรัมต่อลิตร คูณกับ 0.01 เพื่อให้อยู่ในหน่วยกรัมต่อหนึ่งกรัมกากมันแห้ง ตัวอย่างเช่น ที่ชั่วโมงที่ 24 จะได้ 46.400 × 0.01 = 0.4640 g/1g dried pulp จากนั้นนำค่าที่ได้ไปคูณกับน้ำหนังแห้งของกากมันที่ได้หลังจากการหมัก ได้ 0.9039 × 0.4640 = 0.419 กรัมน้ำตาล นำไปหารด้วยน้ำหนักแห้งเริ่มต้น 0.419/1.5 = 0.2796 กรัมน้ำตาลต่อน้ำหนักกากมันแห้งเริ่มต้น

4. วิธีการคำนวณค่าแอคติวิตีของแอลฟา-อะไมเลส

ตัวอย่าง การหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่ากรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ทุกๆ 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีการเติมสารละลายยูเรียเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน

ตารางที่ ข.3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณแอลฟา-อะไมเลสและปริมาณน้ำหมักที่เก็บได้หลังจากการนำไปปั่นเหวี่ยงแยกส่วนของเหลวออกจากของแข็งกับน้ำหนักแห้งของกากมันหลังการหมัก

h	OD 400			mg/ml	Free water	U / g initial
	Blank	Sample	Difference		(ml)	dry pulp
0	0.535	0.669	0.134	3.9756	24.8	12.1722
12	0.608	0.629	0.021	1.3236	19.2	3.1374
24	0.948	1.023	0.075	2.5950	22.3	7.1443
36	0.726	0.818	0.092	2.9850	23.5	8.6602
48	0.537	0.690	0.153	4.4280	24.8	13.5573
60	0.414	0.463	0.050	2.0022	24.8	6.1302
72	0.548	0.578	0.031	1.5576	24.2	4.6536
84	0.548	0.699	0.151	4.3734	24.8	13.3902
96	0.504	0.667	0.163	4.6542	23.5	13.5029
108	0.429	0.570	0.140	4.1238	21.0	10.6913
120	0.400	0.547	0.147	4.2876	21.0	11.1160
132	0.434	0.524	0.090	2.9460	21.0	7.6378
144	0.443	0.656	0.213	5.8242	23.5	16.8974
156	0.437	0.670	0.233	6.2844	24.2	18.7756
168	0.422	0.549	0.127	3.8040	19.8	9.2987

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ต่างกันระหว่างตัวอย่างกับชุดควบคุมที่ได้ ไปคำนวณในสมการ y=0.585x+0.021 ที่ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของกลูโคสในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิตรออกมา ตัวอย่างเช่นในชั่วโมงที่ 48 จะได้ y= (0.585 × 0.153)+0.021 แล้วนำไปคูณกับจำนวนเท่าที่เจือจาง จะได้เท่ากับ 4.4280 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร จากนั้นนำค่าที่ได้ไปหารด้วยนำหนักโมเลกุลของกลูโคสเพื่อให้อยู่ในหน่วยไมโครโมล ได้ (4.4280/180) × 10^{6} = 24600 และเวลาที่ใช้การบ่มคือ 30 นาที ได้ 24600/30 = 820 ไมโครโมลต่อลิตรต่อนาที หรือ ยูนิต

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จากนั้นนำไปคูณกับปริมาณน้ำอิสระที่แยกออกมาได้ แล้วหารด้วยน้ำหนักแห้งของกากมันเริ่มต้นที่ใช้ จะได้ (820 ×24.8)/1.5 = 13.5573 ยูนิตต่อกรัมน้ำหนักกากมันแห้งเริ่มต้น

5. วิธีการคำนวณค่าแอคติวิตีของกลูโคอะไมเลส

ตัวอย่าง การหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่ากรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ทุกๆ 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีการเติมสารละลายยูเรียเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

ตารางที่ ข.4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณกลูโคอะไมเลสและปริมาณน้ำหมักที่เก็บได้หลังจากการนำไปปั่นเหวี่ยงแยกส่วนของเหลวออกจากของแข็งกับน้ำหนักแห้งของกากมันหลังการหมัก

h	OD 400			GluA	Free water	GluA	mg/int. DP
	Blank	Sample	Difference	(mg/)l	(ml)	(mg)	
0	0.121	0.138	0.016	7.4338	24.8	184.3582	122.9055
12	0.123	0.137	0.014	6.2704	19.2	120.3917	80.2611
24	0.118	0.137	0.020	9.0958	22.3	202.8363	135.2242
36	0.123	0.136	0.013	5.938	23.5	139.5430	93.0287
48	0.122	0.141	0.019	8.7634	24.8	217.3323	144.8882
60	0.134	0.153	0.019	8.9296	24.8	221.4541	147.6361
72	0.123	0.141	0.018	8.2648	24.2	200.0082	133.3388
84	0.128	0.156	0.028	13.2508	24.8	328.6198	219.0799
96	0.127	0.154	0.027	12.9184	23.5	303.5824	202.3883
108	0.138	0.142	0.003	0.952	21.0	19.9920	13.3280
120	0.138	0.151	0.013	5.6056	21.0	117.7176	78.4784
132	0.136	0.152	0.016	7.4338	21.0	156.1098	104.0732
144	0.122	0.163	0.041	19.7326	23.5	463.7161	309.1441
156	0.120	0.171	0.051	24.7186	24.2	598.1901	398.7934
168	0.137	0.161	0.024	11.2564	19.8	222.8767	148.5845

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ต่างกันระหว่างตัวอย่างกับชุดควบคุมที่ได้ ไปคำนวณในสมการ y= 498.6x - 0.71 ที่ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อให้ได้ปริมาณกลูโคอะไมเลส ตัวอย่างเช่นในชั่วโมงที่ 48 จะได้ y = (498.6 × 0.019) – 0.71 เท่ากับ 8.7634 จากนั้นนำไปคูณกับปริมาณน้ำ

อิสระที่แยกออกมาได้ แล้วหารด้วยน้ำหนักแห้งของกากมันเริ่มต้นที่ใช้ จะได้ (8.7634 × 24.8)/1.5 เท่ากับ 144.8882 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักกากมันแห้งเริ่มต้น

6. วิธีการคำนวณหาปริมาณเซลล์แห้ง

ตัวอย่าง การหมักแบบอาหารแข็งโดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณน้ำที่เติมเสริม 80 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเร็วรอบการเหวี่ยง 80 รอบต่อนาที ควบคุมค่ากรด-ด่างเท่ากับ 6.0 ทุกๆ 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีการเติมสารละลายยูเรียเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน

ตารางที่ ข.5 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณชีวมวลที่ได้หลังการหมัก

h	Aver. OD 650	Δ OD 650	conc.(mg/L)	amt.(g/1g)
blank	0.152			
0	0.343	0.191	5.536	0.369
12	0.326	0.174	4.768	0.318
24	0.407	0.255	8.304	0.554
36	0.441	0.289	9.768	0.651
48	0.454	0.302	10.362	0.691
60	0.415	0.263	8.630	0.575
72	0.458	0.306	10.522	0.701
84	0.443	0.291	9.855	0.657
96	0.512	0.360	12.870	0.858
108	0.427	0.275	9.159	0.611
120	0.405	0.253	8.217	0.548
132	0.443	0.291	9.855	0.657
144	0.482	0.330	11.565	0.771
156	0.463	0.311	10.725	0.715
168	0.440	0.288	9.725	0.648

นำค่าการดูดกลืนแสงที่ต่างกันระหว่างตัวอย่างกับชุดควบคุมที่ได้ ไปคำนวณในสมการ $y = 0.023x + 0.064$ ที่ได้จากการสร้างกราฟมาตรฐาน เพื่อให้ได้ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคซามีน ตัวอย่างเช่นในชั่วโมงที่ 48 จะได้ $y = (0.023 \times 0.302) + 0.064$ เท่ากับ 10.362 มิลลิกรัมต่อลิตร นำค่าที่ได้ไปคูณกับการเจือจางให้ความเข้มข้นเป็น 0.1 เท่า สองครั้ง จะได้ 1036.232 มิลลิกรัมต่อลิตร นำค่าที่ได้คูณกับ 0.01 เพื่อให้ได้ปริมาณกลูโคซามีนอยู่ในหน่วย มิลลิกรัมต่อ 0.1 กรัม

น้ำหนักกากมันแห้ง แล้วหารด้วย 0.1 ได้ (1036.232 × 0.01)/0.1 ได้ปริมาณกลูโคซามีนเท่ากับ 103.623 มิลลิกรัมต่อหนึ่งกรัมน้ำหนักกากมันแห้ง นำค่าปริมาณกลูโคซามีนที่ได้ ไปใช้ในการคำนวณหาปริมาณชีวมวล โดยใช้ กลูโคซามีน 150 มิลลิกรัม เท่ากับ 1 กรัมของชีวมวล เพราะฉะนั้น 103.623/150 จึงได้ปริมาณชีวมวลเท่ากับ 0.691 กรัมต่อหนึ่งกรัมน้ำหนักกากมันแห้ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปริฉัตร พฤกษะวัน เกิดวันที่ 23 สิงหาคม พ.ศ. 2526 ที่จังหวัดพิจิตร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เมื่อปีการศึกษา 2548 ต่อมาได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550

การเสนอผลงานวิจัย

Phrueksawan, P., Sooksai, S. and Thongchul, N., Direct production of L(+)-lactic acid from Cassava Pulp by solid state fermentation of *Rhizopus oryzae*. Poster presentation and proceedings. The 21^{st} Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology. “TSB 2009 : Biotechnology: A Solution to the Global Economic Crisis?”. 24-25 September, 2009, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย