รหัสโครงการ SUT3-304-48-24-32

รายงานการวิจัย

การศึกษาการผลิตกรดแลคติคจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ *Lactococcus lactis* เสริมด้วยสารสกัดยีสต์เหลือทิ้งจากโรงงานผลิตเบียร์

(Lactic acid production from cassava starch by *Lactococcus lactis* supplemented with Brewer's yeast extract)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนทร กาญจนทวี

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปีงบประมาณ พ.ศ. 2548

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มีนาคม 2553

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาการผลิตกรดแลคติคจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ *Lactococcus lactis* เสริมด้วยสารสกัดยีสต์เหลือทิ้งจากโรงงานผลิตเบียร์ ได้ทำการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมกระบวนการทางชีวภาพ อาคารปฏิบัติการ 2, อาคารปฏิบัติการ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และ ห้องปฏิบัติการสาขาเทคโนโลยีชีวภาพอาหาร มหาวิทยาลัย University of Natural Resources and Applied Life Sciences เมืองเวียนนา ประเทศออสเตรียซึ่งสามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2548 ที่สนับสนุนเพื่อให้เกิดงานวิจัยและสร้างองค์ความรู้ใหม่

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุนทร กาญจนทวี
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
19 มีนาคม 2553

บทคัดย่อภาษาไทย

ในปัจจุบันกรดแลคติคถือว่ามีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมหลากหลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมพอลิเมอร์ ดังนั้นจึงมีความต้องการเป็นอย่างมาก กรดแลคติคสามารถผลิตได้โดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค ในกระบวนการหมัก น้ำตาล (กลูโคสฉ จะถูกนำมาใช้เป็นวัตถุดิบ เนื่องจากสามารถผลิตกรดแลคติคได้ดี อย่างไรก็ตามการใช้น้ำตาลไม่คุ้มทุน เนื่องจากมีราคาแพง จึงมีการศึกษาแหล่งสารอาหารทดแทนเพื่อลดต้นทุนการผลิต ในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาแป้งมันสำปะหลังมาใช้ในกระบวนการหมัก อีกทั้งลดต้นทุนการผลิตในด้านแหล่งไนโตรเจน ซึ่งเปลี่ยนไปใช้ brewer's yeast extract ที่เป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตเบียร์ ทั้งนี้ได้ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตกรดแลคติคเพียงอย่างเดียว จึงมีการทดลองใช้แหล่งคาร์บอนเป็นแป้งมันสำปะหลังกับสูตรอาหารอื่นๆและมีการใช้ brewer's yeast extract แทนการใช้สารสกัดจากยีสต์ทางการค้า ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติค ทั้งนี้จากการศึกษาวิจัยพบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติคของเชื้อ *L. lactis* คือ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 6.0 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที อีกทั้งองค์ประกอบทางเคมีของอาหารเลี้ยงเชื้อในกระบวนการหมักคือ อาหารสูตรดัดแปลงที่มีการใช้กลูโคสไซรัปที่ได้จากการที่แป้งมันสำปะหลังถูกย่อย (pretreatment) ให้เป็นโมเลกุลเล็กลงก่อน ร่วมกับการเติม brewer's yeast extract แทนการใช้กลูโคสในสูตรอาหาร MRS และสารสกัดยีสต์ทางการค้า โดยสามารถผลิตกรดแลคติคได้ 31.32 กรัมต่อลิตร เมื่อไม่มีการควบคุม pH แต่ปริมาณกรด แลคติคมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 49 กรัมต่อลิตรเมื่อมีการควบคุมค่า pH ที่ 6.0 ในกระบวนการหมักแบบกะ และได้พัฒนากระบวนการผลิตเป็นแบบกึ่งกะที่มีการป้อนอาหารในถังหมักเพื่อเพิ่มสารอาหารให้กับเชื้อ *L. lactis* ซึ่งได้ผลการทดลองว่าสามารถผลิตกรดแลคติค ปริมาณ 96.34 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการป้อนอาหาร 0.1 กรัมต่อวินาที ซึ่งถือว่าเป็นกระบวนการผลิตกรดแลคติคได้สูงสุดในงานวิจัยนี้ สำหรับสารสกัดยีสต์จากโรงงานเบียร์นั้นสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ 33 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับต้นทุนของสารสกัดยีสต์ทางการค้า ทั้งนี้ผลที่ได้นี้สามารถนำไปต่อยอดและประยุกต์ใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ ลดต้นทุนการผลิตได้อีกทางหนึ่งและเพื่อเกิดประโยชน์สูงสุดต่อไป

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Lactic acid has various applications especially, polymer industry. Poly-lactic acid has been attracting much attention. Normally, Lactic acid bacteria are microorganisms which have the ability to synthesize organic acids, especially, lactic acid. In conventional production processes, sugar (glucose or sucrose) have been more frequently used than renewable resource because of their higher yield and simplicity of the processes. However, these are economically unfavourable because pure sugar is expensive. To reduce nutrient cost for lactic acid production, cassava starch was chosen as a carbon source and brewer's yeast extract as a nitrogen source in this study. Therefore, *L. lactis* strain was selected because it is in good agreement with objectives and is capable to produce only lactic acid as a major end product. The optimum conditions for lactic acid production were obtained at temperature of 30°C, pH 6.0 and agitation speed of 200 rpm. Glucose syrup (cassava starch product) was treated by enzymatic hydrolysis before it was used in the experiment. The supplementation with brewer's yeast extract was also used as a raw material for fermentation by *L. lactis*. From the experimental data under glucose syrup supplemented with brewer's yeast extract were found 31.32 g/L and 49 g/L of lactic acid by non-controlled pH and controlled pH at 6.0 in batch fermentation, respectively. In addition, fermentation kinetics studies were subsequently investigated in fed-batch process with different feeding rates of nutrient. The experimental data showed that feeding rate at 0.1 g/s resulted in the highest lactic acid concentration of 96.34 g/L. Notwithstanding these challenges, the cost of carbon source and nitrogen source can be reduced. The nitrogen source cost for producing (1 kilograms) commercial yeast extract can be reduced by 33 %.This finding revealed that these nutrients are the most promising substrate for commercial lactic acid production.

สารบัญเรื่อง

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค
สารบัญเรื่อง ..... ง
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญภาพ ..... ซ
คำอธิบายสัญลักษณ์ ..... ฎ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 กรดแลคติค 1
1.2 กระบวนการผลิตกรดแลคติค 3
1.2.1 การผลิตโดยวิธีทางเคมี 3
1.2.2 การผลิตโดยกระบวนการทางชีวภาพ (Fermentation processes) 4
1.3 แบคทีเรียกรดแลคติค 6
1.4 วัตถุดิบหรือแหล่งคาร์บอน 9
1.4.1 มันสำปะหลัง 9
1.4.2 แป้งมันสำปะหลัง 10
1.5 แหล่งไนโตรเจนในกระบวนการผลิตกรดแลคติคโดยกระบวนการทางชีวภาพ 13
1.5.1 สารสกัดยีสต์ทางการค้า (Commercial yeast extract) 13
1.5.2 สารสกัดยีสต์เหลือทิ้งจากโรงงานผลิตเบียร์ 14
1.6 อิทธิพลจากสิ่งแวดล้อมต่อกระบวนการหมักกรดแลคติค 14
1.7 การผลิตโดยกระบวนการทางชีวภาพของกรดแลคติค (Fermentation processes) 15
1.7.1 กระบวนการหมักแบบกะ (Batch fermentation) 15
1.7.2 กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) 16
1.7.3 กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation) 16
1.8 จุดประสงค์ของโครงการวิจัย 17
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย 18
2.1 อุปกรณ์และสารเคมี 18

2.2 เชื้อจุลินทรีย์ 18
2.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ 19
2.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยา 19
2.2.3 การเตรียมกล้าเชื้อ 20
2.3 ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในกระบวนการหมักกรดแลคติค 20
2.4 การเตรียมสารสกัดยีสต์เหลือทิ้งจากโรงงานผลิตเบียร์ 21
2.5 การศึกษาอิทธิพลจากสภาวะต่างๆในกระบวนการหมักกรดแลคติค 21
2.6 การศึกษากระบวนการหมักกรดแลคติคในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 21
2.6.1 กระบวนการหมักแบบกะ 22
2.6.2 กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ 22
2.7 การวิเคราะห์ 23
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล 25
3.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค 25
3.2 การศึกษาผลจากปัจจัยต่างๆที่มีผลการกระบวนการหมักกรดแลคติคโดยเชื้อ *Lactococcus lactis* 30
3.2.1 ผลของ pH ในกระบวนการหมักกรดแลคติคโดยเชื้อ *Lactococcus lactis* 31
3.2.2 ผลของอุณหภูมิในกระบวนการหมักกรดแลคติคโดยเชื้อ *Lactococcus lactis* 35
3.2.3 ผลของอัตราการกวนในกระบวนการหมักกรดแลคติคโดยเชื้อ *Lactococcus lactis* 40
3.3 การศึกษาผลของการปรับเปลี่ยนองค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติคโดยเชื้อ *Lactococcus lactis* 44
3.3.1 ผลของน้ำตาลต่างๆในการผลิตกรดแลคติค 44
3.3.2 ผลความเข้มข้นของกลูโคสในการผลิตกรดแลคติค 47
3.3.3 ผลของแป้งมันสำปะหลังในการผลิตกรดแลคติค 50
3.3.4 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อกระบวนการผลิตกรดแลคติคโดยเชื้อ *Lactococcus lactis* 57
3.3.5 กระบวนการหมักกรดแลคติคจากแป้งมันสำปะหลังที่เสริมด้วยแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารสกัดจากยีสต์ที่ได้จากโรงงานผลิตเบียร์ 66
3.4 กระบวนการหมักกรดแลคติคโดยถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 71
3.4.1 กระบวนการหมักกรดแลคติคภายใต้สภาวะที่ไม่มีการควบคุม pH แบบกะ 71

3.4.2 กระบวนการหมักกรดแลคติคภายใต้สภาวะที่มีการควบคุม pH แบบกะ 73
3.4.3 การหมักแบบกึ่งกะ 75
3.4.4 ผลของการแปรผันค่า feeding rate ในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ 75
บทที่ 4 บทสรุป 78
4.1 สรุปผลการทดลอง 78
4.2 ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต 79
ภาคผนวก ก 81
ภาคผนวก ข 82
ภาคผนวก ค 83
ภาคผนวก ง 84
ภาคผนวก จ 85
ภาคผนวก ฉ 86
บรรณานุกรม 87
ประวัติผู้วิจัย 96

สารบัญตาราง

ตาราง 1 โครงสร้างทางเคมีและสมบัติของกรด L-แลคติค 2
ตาราง 2 คุณลักษณะของแป้งมันสำปะหลัง (มอก 274-2521) 11
ตาราง 3 แสดงผลการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆโดย *Lactococcus lactis* 27
ตาราง 4 ตารางสรุปพารามิเตอร์ต่างๆในกระบวนการผลิตกรดแลคติคโดย *Lactococcus lactis* ในการศึกษาผลของ pH เริ่มต้น 34
ตาราง 5 ตารางสรุปพารามิเตอร์ต่างๆในกระบวนการผลิตกรดแลคติคโดย *Lactococcus lactis* ในการศึกษาผลของอุณหภูมิ 39
ตาราง 6 ตารางสรุปพารามิเตอร์ต่างๆในกระบวนการผลิตกรดแลคติคโดย *Lactococcus lactis* ในการศึกษาผลของ อัตราการกวน 42
ตาราง 7 แสดงการเปรียบเทียบการผลิตกรดแลคติคจากแหล่งคาร์บอนต่างๆโดยเชื้อ *Lactococcus lactis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีการดัดแปลง โดยที่มีแหล่งคาร์บอนปริมาณ 20 กรัมต่อลิตรและแหล่งไนโตรเจนคือ commercial yeast extract ปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร 46
ตาราง 8 แสดงตัวอย่างการผลิตกรดแลคติคที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารประกอบที่มีส่วนประกอบจำพวกแป้ง (Starchy materials) 50
ตาราง 9 แสดงตัวอย่างการผลิตกรดแลคติคที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังต่างๆกันทั้งแป้งมันสำปะหลังและแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว 55
ตาราง 10 แสดงต้นทุนของสารอาหารชนิดต่างๆที่ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลอง 59
ตาราง 11 ตารางสรุปสูตรอาหารที่มีการศึกษาอิทธิพลของสารอาหารต่างๆและแสดงค่าความเข้มข้นของเซลล์และกรดแลคติคที่ผลิตได้ 66
ตาราง 12 ตารางแสดงการเปรียบเทียบอัตราการป้อนอาหารในกระบวนการหมักกรดแลคติคโดยเชื้อ *Lactococcus lactis* 77
ตาราง 13 ตารางแสดงการเปรียบเทียบกระบวนการหมักกรดแลคติคด้วยกระบวนการหมักแบบกะที่มีการควบคุม pH ที่ 6.0 และกระบวนการหมักแบบกึ่งกะที่อัตราการป้อนอาหาร 0.1 กรัมต่อวินาที 78

สารบัญภาพ

รูปภาพ 1 แสดงลักษณะโครงสร้างทางเคมีของกรดแลคติค (L-(+)-lactic acid และ D-(-)-lactic acid)... 2
รูปภาพ 2 แผนผังการผลิตกรดแลคติคโดยวิธีทางเคมี 4
รูปภาพ 3 แสดง Catabolic pathways ของแบคทีเรียกรดแลคติคในกระบวนการผลิตกรดแลคติค Homofermentation (A) heterofermentation (B) และ mixed acid fermentation (C). 5
รูปภาพ 4 ลักษณะโครงสร้างภายในของแป้งมันสำปะหลัง 11
รูปภาพ 5 แสดงแผนผังในการผลิตแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว (Hydrolyzed cassava starch) 12
รูปภาพ 6 อุปกรณ์ในการทดลองกระบวนการหมัก (Fermentation processes) 23
รูปภาพ 7 (ก) แสดงโคโลนีที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ ซึ่งเป็นโคโลนีที่เป็นโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียกรดแลคติค (*Lactococcus lactis*) 26
รูปภาพ 8 แสดงการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาของ API 50 CHL test kit ที่ใช้เชื้อทดสอบคือ *Lactococcus lactis* 29
รูปภาพ 9 กราฟแสดงdry cell weight ของกระบวนการหมักที่ค่า pH เริ่มต้นเริ่มต้นต่างกันของเชื้อ..... 32
รูปภาพ 10 กราฟแสดงปริมาณ reducing sugar ที่ถูกใช้ไปในกระบวนการหมักที่ค่า pH เริ่มต้นต่างกันของเชื้อ *Lactococcus lactis* 33
รูปภาพ 11 กราฟแสดงปริมาณกรดแลคติคที่ถูกผลิตในกระบวนการหมักที่ค่า pH เริ่มต้นต่างกันของเชื้อ *Lactococcus lactis* 34
รูปภาพ 12 กราฟแสดงdry cell weight ของกระบวนการหมักที่อุณหภูมิต่างกันของเชื้อ *Lactococcus lactis* 36
รูปภาพ 13 กราฟแสดงปริมาณ reducing sugar ที่ใช้ไปในกระบวนการหมักที่อุณหภูมิต่างกันของเชื้อ *Lactococcus lactis* 38
รูปภาพ 14 กราฟแสดงปริมาณกรดแลคติคที่ผลิตขึ้นในกระบวนการหมักที่อุณหภูมิต่างกันของเชื้อ *Lactococcus lactis* 39
รูปภาพ 15 กราฟแสดง dry cell weight ของกระบวนการหมักที่อัตราการกวนต่างกันของเชื้อ *Lactococcus lactis* 40
รูปภาพ 16 กราฟแสดงปริมาณ reducing sugar ที่ใช้ไปในกระบวนการหมักที่อัตราการกวนต่างกันของเชื้อ *Lactococcus lactis* 41

รูปภาพ 17 กราฟแสดงปริมาณกรดแลคติคที่ถูกผลิตขึ้นในกระบวนการหมักที่อัตราการกวนต่างกันของเชื้อ *L. lactis* 43
รูปภาพ 18 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นกับค่า specific growth rate (μ)..... 48
รูปภาพ 19 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นกับความเข้มข้นของ Substrate (Reducing sugar) 48
รูปภาพ 20 กราฟแสดงการเปรียบเทียบอัตราการผลิตกรดแลคติคที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างกัน..... 49
รูปภาพ 21 กราฟแสดงความเข้มข้นของกรดแลคติคที่ผลิตได้และความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซิ่ง ในกระบวนการหมักที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่างกัน..... 53
รูปภาพ 22 กราฟแสดงการเปรียบเทียบอัตราการผลิตกรดแลคติค ที่แหล่งไนโตรเจนต่างๆ โดยเชื้อ *Lactococcus lactis* 60
รูปภาพ 23 แสดงกระบวนการผลิตกรดแลคติคโดยกระบวนการหมักจากเชื้อ *Lactococcus lactis* ด้วยสูตรที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนมีเพียงส่วนประกอบอื่นๆบนพื้นฐานอาหาร MRS..... 61
รูปภาพ 24 แสดงกระบวนการผลิตกรดแลคติคโดยกระบวนการหมักจากเชื้อ *Lactococcus lactis s* ด้วยสูตรที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนมีเพียงส่วนประกอบอื่นๆบนพื้นฐานอาหาร MRS..... 62
รูปภาพ 25 แสดงกระบวนการผลิตกรดแลคติคโดยกระบวนการหมักจากเชื้อ *Lactococcus lactis* ด้วยสูตรที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนมีเพียงส่วนประกอบอื่นๆบนพื้นฐานอาหาร MRS..... 63
รูปภาพ 26 แสดงกระบวนการผลิตกรดแลคติคโดยกระบวนการหมักจากเชื้อ *Lactococcus lactis* ด้วยสูตรอาหาร MRS..... 63
รูปภาพ 27 ขั้นตอนการผลิตเบียร์ในระดับอุตสาหกรรม..... 66
รูปภาพ 28 แสดงกระบวนการผลิตกรดแลคติคจากน้ำตาลกลูโคสเสริมด้วย brewer's yeast extract โดยเชื้อ *Lactococcus lactis* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที..... 68
รูปภาพ 29 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแหล่งไนโตรเจนที่เป็น commercial yeast extract และ brewer's yeast extract ที่มีกลูโคสไซรัปเป็นแหล่งคาร์บอน ในกระบวนการผลิตกรดแลคติคด้วยเชื้อ *Lactococcus lactis*..... 69

รูปภาพ 30 แสดงปริมาณกรดแลคติค ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซิ่ง และความเข้มข้นของเซลล์ที่ผลิตได้จากระบวนการหมักที่ใช้กลูโคสไซรัปเป็นแหล่งคาร์บอนและ brewer's yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ในสภาวะที่ไม่มีการควบคุม pH โดยเชื้อ *Lactococcus lactis* 72
รูปภาพ 31 แสดงปริมาณกรดแลคติค น้ำตาลรีดิวซิ่ง และความเข้มข้นของเซลล์ที่ผลิตได้จากระบวนการหมักที่ใช้กลูโคสไซรัปเป็นแหล่งคาร์บอนและ brewer's yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ในสภาวะที่มีการควบคุม pH โดยเชื้อ *Lactococcus lactis* 76
รูปภาพ 33 โครมาโตแกรมของกรดแลคติคหลังจากทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC..... 83
รูปภาพ 34 กราฟมาตรฐานของกรดแลคติค 84
รูปภาพ 35 กราฟมาตรฐานของ reducing sugar 85
รูปภาพ 36 กราฟมาตรฐานของความเข้มข้นเซลล์ (dry cell weight)..... 86

คำอธิบายสัญลักษณ์

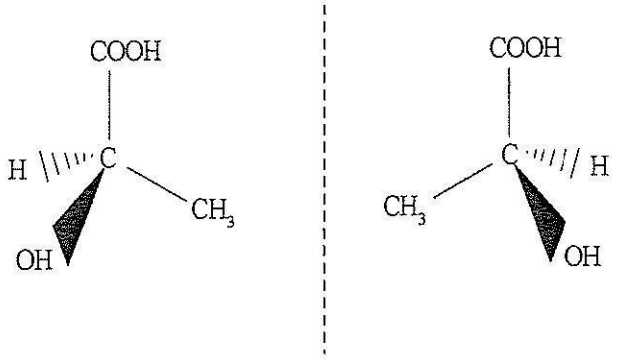
g/L	กรัมต่อลิตร
h	ชั่วโมง
OD	ค่าการดูดกลืนแสง
UV	แสงอุลตราไวโอเลต
$Y_{P/S}$	ปริมาณผลผลิตต่อหน่วยสับเสตรทที่ถูกใช้ไป (yield of product)
$Y_{X/S}$	ปริมาณเซลล์ต่อหน่วยสับเสตรทที่ถูกใช้ไป (yield of biomass)

บทที่ 1 บทนำ

1.1 กรดแลคติค

กรดแลคติคเป็นกรดอินทรีย์ที่มีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับหลายอุตสาหกรรม กรดแลคติคพบเป็นครั้งแรกในนมเปรี้ยวโดยนักเคมีชาวสวีเดนเมื่อปี ค.ศ. 1780 ซึ่งภายหลังได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวางและพบว่าสามารถผลิตได้สองแนวทาง โดยปริมาณสองในสามส่วนผลิตได้มาจากกระบวนการหมัก ส่วนที่เหลือผลิตจากกระบวนการทางเคมี กรดแลคติคที่ผลิตได้มานั้นประมาณ 85 % ใช้กันอยู่ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้กรดแลคติคทำหน้าที่เป็นตัวปรับสภาพกรดในอาหาร เพื่อให้เกิดรสชาติของความเปรี้ยวที่พึงประสงค์ของอาหารและเครื่องดื่ม ตลอดจนการใช้ในอาหารแปรรูป อีกทั้งยังถูกใช้เป็นสารกันบูดเพื่อป้องกันการเสียของผลิตภัณฑ์อาหารได้ นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้กรดแลคติคในเวชภัณฑ์ อุตสาหกรรมเท็กซ์ไทล์ และใช้เป็นส่วนผสมของแลกเกอร์และสารพอลิเมอร์ได้อีกด้วย (ศิริศันสนียกุล, 2547) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในปัจจุบันมีการศึกษาค้นคว้าเป็นอย่างมาก นั่นคือ นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยได้โดยธรรมชาติ ที่เรียกว่า พอลิแลกเทต (polylactate) เพื่อใช้ทดแทนพลาสติกที่ผลิตได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี (Wee *et al.*, 2006)

กรดแลคติคมีชื่อสากล (IUPAC systematic name) ในภาษาอังกฤษ คือ lactic acid หรือ 2-hydroxypropanoic acid โดยที่โครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยหมู่ carboxylic acid หมู่ hydroxyl คาร์บอนจำนวน 3 อะตอม ไฮโดรเจนจำนวน 6 อะตอมและ ออกซิเจนจำนวน 3 อะตอม (แสดงดังรูปภาพ 1) หากมีการสูญเสียโปรตรอนนี้จะทำให้เกิดแล็คเตทไอออน ($CH_3CH(OH)COO^-$) ขึ้นได้ โดยปกติกรดแลคติคจะมี 2 isomer เชิงแสง คือ L-form และ D-form โดยประกอบด้วย L-(+)-lactic acid D-(-)-lactic acid และ DL-lactic acid โดยที่แต่ละชนิดมีคุณสมบัติเฉพาะทางเคมี ดังตารางที่ 1



รูปภาพ 1 แสดงลักษณะโครงสร้างทางเคมีของกรดแลคติค (L-(+)-lactic acid และ D-(-)-lactic acid) (Gupta *et al.*, 2007)

ตาราง 1 โครงสร้างทางเคมีและสมบัติของกรด L-แลคติค (ศิริศันสนียกุล, 2547)

คุณสมบัติ	ค่า
สูตรเคมี	$CH_3CHOHCOOH$
น้ำหนักโมเลกุล	90.08
จุดหลอมเหลว	L: 53 °C
	D: 53 °C
	D/L: 16.8 °C
จุดเดือด	122 °C
$[\alpha]_D^{20}$	$+3.3^{\circ}$ (5%, H_2O)
ความหนาแน่น	1.294 กรัมต่อมิลลิลิตร (20 °C)

ปัจจุบันการนำกรดแลคติคไปใช้ด้านต่างๆ มีความต้องการอย่างมากในประเทศไทย ทั้งในด้านพลาสติกชีวภาพ เคมีภัณฑ์และเครื่องสำอาง จึงต้องมีการค้นคว้าวิจัยเพื่อสามารถผลิตและตอบสนองต่อความต้องการดังกล่าวได้ ด้วยเหตุนี้มีการพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์และกระบวนการหมัก เพื่อให้สามารถผลิตกรดแลคติค โดยกระบวนการหมักจากเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค (Lactic acid bacteria) ที่สามารถผลิตกรดแลคติคได้เป็นผลผลิตหลัก และสามารถใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูก และหาได้ง่าย มีตลอดทั้งปีได้ เช่น แป้งมันสำปะหลัง เป็นต้น ซึ่งถือได้ว่าเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ และส่งเสริมทางการเกษตรได้อีกทางหนึ่ง อีกทั้งในปัจจุบันมีการคำนึงถึงสิ่งแวดล้อมมากขึ้น และมีการสร้างสิ่งทดแทนพลาสติกที่มีอย่างมากที่ใช้กันอยู่ทั่วไปในชีวิตประจำวัน โดยที่ส่วนใหญ่ได้มาจากการสังเคราะห์ทางเคมีจากสารตั้งต้นที่มาจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ปริมาณการใช้งานพอลิเมอร์ ชนิดต่างๆ เพิ่มปริมาณขึ้นอย่างต่อเนื่องและได้ก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมหลายอย่างตามมา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง

ปัญหาในการกำจัดหลังการใช้งาน สำหรับพลาสติกต่างๆต้องใช้เวลาในการย่อยสลายตามธรรมชาติเป็นเวลานาน และผลลัพธ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายนี้ ทำให้เกิดแก๊สต่างๆที่ส่งผลเสียต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมได้ ทางหนึ่งของการแก้ปัญหาคือการใช้พอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ หรือ biodegradable polymer หรือ biopolymer ซึ่งมีอยู่หลายชนิด ทั้งที่ได้จากจากธรรมชาติ เช่น แป้ง หรือจากการสังเคราะห์ทางเคมี อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนี้มีการผลิตพอลิเมอร์ที่เรียกว่า พอลิแลคติคแอซิด (polylactic acid) หรือ PLA ซึ่งสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ ซึ่งมีกรดแลคติคเป็นสารตั้งต้น ก่อนจะนำกรดแลคติคที่ได้มาต่อกันเป็นสายโซ่ยาวให้เป็น PLA โดยกระบวนการพอลิเมอไรเซชั่น (polymerization) ทั้งยังสามารถขึ้นรูปด้วยกระบวนการผลิตที่ใช้ทั่วไปให้เป็นผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ โดยมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ในท้องตลาด มีราคาไม่แพงนัก และที่สำคัญผลิตได้จากพืชผลทางการเกษตรต่างๆ ซึ่งในปัจจุบันได้การพัฒนาทั้งการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์พลาสติกนี้ และศึกษาถึงประสิทธิภาพในการย่อยสลายด้วยธรรมชาติ เพื่อให้สามารถนำมาใช้ได้จริงในชีวิตประจำวันต่อไป

1.2 กระบวนการผลิตกรดแลคติค

การศึกษาการผลิตกรดแลคติคมีขึ้นเป็นครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมีการผลิตเกลือแคลเซียมแล็คเตตมาใช้ทดแทนการนำเข้าทราเทตที่เป็นส่วนผสมของผงฟูในขณะนั้น (Wee *et al.*, 2006) ต่อมาได้มีการพัฒนากระบวนการผลิตกรดแลคติคในระบบอุตสาหกรรม เพื่อหาสภาวะและวัตถุดิบที่เหมาะสม อีกทั้งศึกษาวิธีการผลิตที่ให้ได้ผลผลิตสูงสุด โดยปัจจุบันได้พบว่าสามารถมีการผลิตกรดแลคติคได้เป็น 2 แนวทาง คือ การผลิตทางเคมีและการผลิตทางชีวภาพ (Narayanan *et al.*, 2004a)

1.2.1 การผลิตโดยวิธีทางเคมี

กระบวนการผลิตกรดแลคติคโดยวิธีทางเคมีนั้น เกิดขึ้นจากอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของพรอพีนด้วยกรดไนตริก และใช้ไนโตรเจนเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่มีแก๊สออกซิเจนร่วมด้วย ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่เรียกว่า กรดแอลฟา-ไนตราโตพรอพิโอนิก ซึ่งจะสามารถถูกไฮโดรไลซ์ต่อไปได้เป็นกรดแลคติคและกรดไนตริก และอีกวิธีหนึ่งคือเริ่มจากแลกโตรไนไทต์ ไฮโดรเจนไซยาไนด์จะถูกเติมลงในอะเซททิลดีไฮด์ โดยปฏิกิริยาจะเกิดในสภาวะที่เป็นของเหลวและที่ความดันสูง ส่วนแลกโตรไนไทต์ที่เหลือจะถูกทำให้บริสุทธิ์และนำกลับมาใช้ใหม่ จากนั้นปฏิกิริยาจะเกิดการไฮโดรไลซ์ไปเป็นกรดแลคติค โดยกรดไฮโดรคลอริกหรือกรดซัลฟูริก ส่งผลให้ได้เกลือแอมโมเนียมกับกรดแลคติคขึ้น ดังแสดงดังรูปภาพที่ 2 จากปฏิกิริยากระบวนการทางเคมีจะได้กรด

แลคติคชนิด racemic mixture ซึ่งตรงกันข้ามกับการผลิตโดยกระบวนการทางชีวภาพ (Narayanan *et al.*, 2004a)

(a) Addition of Hydrogen Cyanide

$$\underset{\text{Acetaldehyde}}{CH_3CHO} + \underset{\text{Hydrogen cyanide}}{HCN} \xrightarrow{\text{Catalyst}} \underset{\text{Lactonitrile}}{CH_3CHOHCN}$$

(b) Hydrolysis by H_2SO_4

$$\underset{\text{Lactonitrile}}{CH_3CHOHCN} + H_2O + \tfrac{1}{2}\underset{\text{Sulphuric acid}}{H_2SO_4} \longrightarrow \underset{\text{Lactic acid}}{CH_3CHOHCOOH} + \tfrac{1}{2}\underset{\text{Ammonium salt}}{(NH_4)_2SO_4}$$

(c) Esterification

$$\underset{\text{Lactic acid}}{CH_3CHOHCOOH} + \underset{\text{Methanol}}{CH_3OH} \longrightarrow \underset{\text{Methyl lactate}}{CH_3CHOHCOOCH_3} + H_2O$$

(d) Hydrolysis by H_2O

$$\underset{\text{Methyl lactate}}{CH_3CHOHCOOCH_3} + H_2O \longrightarrow \underset{\text{Lactic acid}}{CH_3CHOHCOOH} + \underset{\text{Methanol}}{CH_3OH}$$

รูปภาพ 2 แผนผังการผลิตกรดแลคติคโดยวิธีทางเคมี (Narayanan *et al.*, 2004a)

1.2.2 การผลิตโดยกระบวนการทางชีวภาพ (Fermentation processes)

แบคทีเรียกรดแลคติคแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ตามผลิตผลที่ได้ จากกระบวนการหมักกลูโคส และ path way ที่ใช้ (Narayanan *et al.*, 2004a) ได้แก่

1. Homofermentation เป็นแบคทีเรียกรดแลคติคที่หมักกลูโคสโดยใช้ glycolysis pathway ไปเป็นกรดแลคติคเป็นส่วนใหญ่ สามารถผลิตกรดแลคติคได้ประมาณ 85% จากน้ำตาลกลูโคส (Sun *et*

al., 1999) โดยที่ 1 โมลของน้ำตาลกลูโคสสามารถเปลี่ยนหรือเมแทบอไลซ์ ไปเป็นผลิตภัณฑ์คือกรดแลคติคจำนวน 2 โมล พร้อมกับได้ 2 ATPs (ดังรูปภาพ 3)

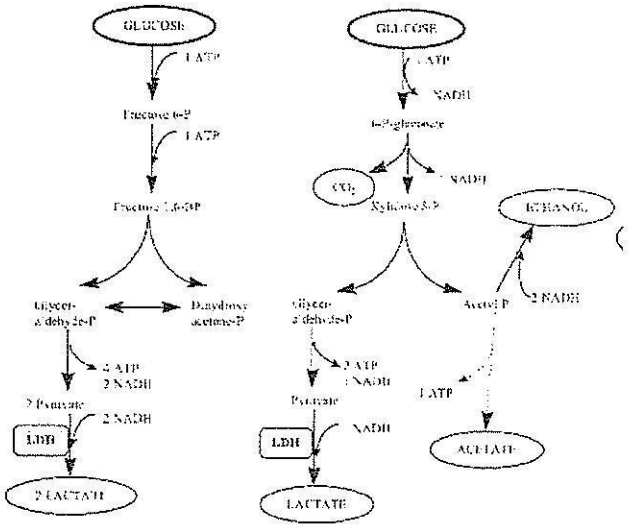
$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CH_3CHOHCOOH$$

น้ำตาลกลูโคส กรดแลคติค

2. Heterofermentation เป็นกลุ่มที่หมักกลูโคสโดยใช้ 6-phosphogluconate/ phosphoketolase pathway สามารถผลิตกรดแลคติคได้เพียง 50% และผลิตไปเป็นสารหลายชนิดได้แก่ กรดแลคติค เอธานอล คาร์บอนไดออกไซด์ ในสัดส่วน 1:1:1 และยังมีกรดอื่น ๆ เช่น กรดอะซีติค กรดฟอร์มิค โดยที่จากน้ำตาลกลูโคส 1 โมล ผลิตกรดแลคติคได้ 1 โมล เอทานอล 1 โมล คาร์บอนไดออกไซด์ 1 โมล และได้ 1 ATP (ดังรูปภาพ 3) และพบว่า *L. casei* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติคในกลุ่มนี้ (วิสุทธิแพทย์, 2542)

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + C_2H_5OH + CO_2$$

น้ำตาลกลูโคส กรดแลคติค เอทานอล แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์



รูปภาพ 3 แสดง Catabolic pathways ของแบคทีเรียกรดแลคติคในกระบวนการผลิตกรดแลคติค Homofermentation (A) heterofermentation (B) และ mixed acid fermentation (C). P = 5 phosphate, BP = 5 bisphosphate, LDH = 5 lactate dehydrogenase, PFL = 5 pyruvate formate lyase, and PDH = 5 pyruvate dehydrogenase (Hofvendahl and Hagerdal, 2000).

สำหรับการผลิตกรดแลคติคโดยกระบวนการหมักนั้น พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติคได้เป็นชนิด L หรือ D ได้อย่างใดอย่างหนึ่ง ซึ่งมีความสำคัญมากไม่ว่าจะเป็นการนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นของอุตสาหกรรมต่างๆ และเป็นสารตั้งต้นหรือวัตถุดิบในการผลิตพลาสติกชีวภาพ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาและเน้นไปที่กระบวนการหมักมากกว่าการผลิตทางเคมี อีกทั้งข้อเสียของการผลิตทางเคมี จะมีการใช้สารละลายอินทรีย์ สภาวะ และการจัดการที่ซับซ้อน และอาจทำให้เกิดมลพิษจากการใช้สารละลายต่างๆดังกล่าว แต่ในกระบวนการหมักนั้นมีการใช้เชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ และดำเนินกระบวนการหมักภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ไม่มีการใช้ความร้อนหรือความดันสูง มีความปลอดภัย และเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม

1.3 แบคทีเรียกรดแลคติค

กรดแลคติคเป็นสารอินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร ยา เครื่องสำอาง การฟอกหนัง และปัจจุบันได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในการนำกรดแลคติคมาใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อการผลิตพลาสติคที่สามารถย่อยสลายได้ด้วยจุลินทรีย์ กรดแลคติคที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้มาจากกระบวนการหมักของแบคทีเรียแลคติค อีกทั้งจุลินทรีย์สามารถใช้ผลิตสารต่างที่ก่อให้เกิดประโยชน์ได้มากมายหลายชนิด ดังนั้นจากการที่แป้งมันสำปะหลังมีปริมาณมากในประเทศไทยจึงได้มีการนำเอาจุลินทรีย์มาใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์ โดยจะมีการผลิตกรดแลคติคจากแบคทีเรียกรดแลคติค (Lactic acid bacteria) โดยจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะใช้วัตถุดิบพวกแป้งและแป้งจะถูกย่อยสลายเป็นกลูโคส (วิจิตรศิริ, 2004) เพื่อให้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลคติคต่อไป นอกจากนี้แล้วประเทศไทยยังมีความหลากหลายของจุลินทรีย์อันจะนำไปสู่การค้นพบสายพันธุ์แบคทีเรีย ดังนั้น การค้นหาแลคติคแอสิดแบคทีเรีย และการศึกษาคุณสมบัติด้านสรีระวิทยา พันธุศาสตร์ ชีวเคมี ตลอดจนกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง อาทิเช่น เทคนิคการหมัก การปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ จึงมีความสำคัญยิ่งต่ออุตสาหกรรมการผลิตกรดแลคติคในประเทศไทย

จุลินทรีย์ที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางแบ่งใหญ่ๆออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ รา และแบคทีเรียกรดแล็คติ (Litchfield, 1996) ในการศึกษาการผลิตกรดแลคติคในรานิยมใช้สายพันธุ์ยกตัวอย่างคือ *Rhizopus* ที่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสปั่นแหล่งคาร์บอนในสภาวะมีออกซิเจนเพื่อผลิตกรดแลคติค การผลิตกรดแลคติคโดย *R. oryzae* นี้มีข้อดีคือต้องการสารอาหารไม่มากนักเพื่อใช้ในการผลิต L(+)-แลคติคแอซิด แต่มีความจำเป็นต้องใช้อากาศเนื่องจากเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ใช้อากาศ (obligate aerobe) (Tay and Yang, 2002) ในกระบวนที่กล่าวมานี้มีอัตราการผลิตกรดแลคติคที่ต่ำอาจเนื่องมากจากมีอัตรา

เกิดปฏิกิริยาต่ำจากการจำกัดของการถ่ายเทมวล (mass transfer limitation) นอกจากนั้นยังอาจเกิดผลพลอยได้ ยกตัวอย่างเช่น กรดฟูมาริก และเอทานอล สำหรับกลุ่มจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติคอีกชนิดหนึ่ง คือ แบคทีเรียกรดแลคติคนั้นมีการศึกษาอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีข้อได้เปรียบมากกว่าจุลินทรีย์จำพวกรา โดยที่สามารถผลิตกรดแลคติคได้เป็นผลผลิตหลักในระบบ ผลผลิตสูง ไม่จำเป็นต้องมีการควบคุมระบบที่ยุ่งยาก เนื่องจากกระบวนการหมักไม่มีการใช้ออกซิเจน (anaerobic condition) เช่นเดียวกับงานวิจัยนี้ คือมีการศึกษากระบวนการผลิตกรดแลคติคจากแบคทีเรียกรดแลคติค เพื่อให้เกิดผลลัพธ์ที่มีประสิทธิภาพและเกิดความคุ้มทุนต่อไป

แบคทีเรียแลคติค หรือ แลคติคแอซิดแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียที่พบมากในอาหารประเภทอาหารหมัก เช่น แหนม ผักดอง ผลไม้ดอง ไส้กรอกเปรี้ยว ผลิตภัณฑ์นม เช่น เนยแข็ง นมเปรี้ยวหรือโยเกิร์ต และยังพบได้ในร่างกายคน และสัตว์ เช่นระบบทางเดินหายใจ และระบบทางเดินอาหาร อวัยวะสืบพันธุ์ ในระดับอุตสาหกรรมมีการใช้แบคทีเรียแลคติคเป็นหัวเชื้อตั้งต้นเพื่อเติมลงไปในอาหาร มีผลต่อกลิ่น รส และเนื้อสัมผัส ของอาหาร แบคทีเรียแลคติคเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ท่อนสั้น หรือยาว ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ต้องการอากาศเล็กน้อยในการเจริญ (microaerophile) บางชนิดสามารถเจริญได้ในที่ๆ ไม่มีอากาศ (strictly anaerobe) ให้ผลผลิตหลักจากการหมักย่อยน้ำตาล คือ กรดแลคติค พลังงานจากกระบวนการหมักโมโนแซคคาร์ไรด์ ไดแซคคาร์ไรด์ พอลีแอลกอฮอล์ และแป้ง สามารถผลิตกรดแลคติคจากน้ำตาล hexose ผ่านวิถี Embden-Meyerhof และจาก น้ำตาล pentose โดยวิถี 6-phosphogluconate/phosphoketolase (Salminen and von Wright, 1998) ไม่สร้างเอนไซม์ catalase แต่สามารถเจริญบนผิวหน้าอาหารวุ้นซึ่งสัมผัสกับอากาศได้ เนื่องจากมีเอนไซม์ peroxidase ซึ่งใช้ในการกำจัด H_2O_2 สามารถที่จะแบ่งแยกหรือจัดหมวดหมู่ได้ อีกทั้งสามารถเจริญได้ในอาหารประเภทซับซ้อน มีความต้องการออกซิเจนหลายระดับ (ต้องการหรือไม่ต้องการ) (Stiles and Holzapfel, 1997) นอกจากนี้แล้วแบคทีเรียกลุ่มนี้ขาดความสามารถในการสร้าง cytochromes และ porphyrins ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญในกระบวนการหายใจ ในการเจริญนั้นมีความต้องการอาหารที่ซับซ้อน ที่รวมถึงกรดอะมิโนต่างๆและวิตามิน เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ทำให้สามารถผลิตหรือสร้างพลังงานได้น้อย ทำให้เจริญได้ช้า เมื่อปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจนในการเจริญ สำหรับในระหว่างกระบวนการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติคนั้นมีการใช้อาหาร เกิดการเจริญและสร้างกรดขึ้น ซึ่งผลนี้จะทำให้น้ำหมักอยู่ในสภาวะที่เป็นกรด เป็นการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มอื่นๆที่ไม่สามารถเจริญในสภาวะเช่นนี้ได้อีกด้วย

Lactococcus lactis

Lactococcus lactis จะมีความเกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์จำพวกนม เนย โดยมีการหมักวัตถุดิบเหล่านี้ได้เป็นผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว โยเกิร์ต ต่างๆ ลักษณะของแบคทีเรียชนิดนี้จะมีรูปร่างกลม เป็นคู่และสายสั้น ขนาดประมาณ 0.5 - 1.5 ไมโครเมตร ไม่มีการสร้างสปอร์และไม่เคลื่อนที่ ในกระบวนการหมักมีรูปแบบคือ homo-fermentation ที่สามารถผลิตกรดแลคติคชนิด L ได้เพียงอย่างเดียว สำหรับลักษณะเฉพาะของเชื้อชนิดนี้จะสามารถผลิตกรดแลคติคชนิด L ได้มากกว่า 96% (Akerberg *et al.*, 1998) โดยที่หลังจากที่เจริญเติบโตแล้วจะมีการสร้างกรดแลคติคออกมาทำให้อยู่ในสภาวะที่เป็นกรดทำให้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ไม่สามารถเจริญได้ ถ้าอยู่ในร่างกายมนุษย์จะทำให้สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้ และถ้าอยู่ในอาหารจะทำให้สามารถถนอมอาหารได้ เชื้อที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียไม่สามารถเจริญได้เช่นกัน ด้วยสาเหตุนี้ งานวิจัยนี้จึงได้มีความสนใจที่จะศึกษารูปแบบกระบวนการหมัก เพื่อที่จะสามารถผลิตกรดแลคติคได้โดยมีการใช้สารอาหาร คือแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีอยู่ตามพื้นที่ เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดนั่นเอง

L.lactis สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนในปริมาณน้อย และสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนหรือ anaerobic condition โดยการ homo-fermentative metabolism ซึ่งจากการรายงานได้กล่าวไว้ว่าผลผลิตที่ได้จะมีแต่ L(+) lactic acid เท่านั้น แต่ก็ยังมีบางรายงานที่เสนอว่า D(+) lactic acid ก็สามารถสร้างได้ในห้องปฏิบัติการที่สภาพอาหารแบบ pH ต่ำ (Cock and de Stouvenel, 2006) สำหรับกระบวนการเมตาบอลิซึมการใช้น้ำตาลของ *L. lactis* นั้นเกิดขึ้นได้โดย น้ำตาลจะเข้าสู่ phosphoenol pyruvate (PEP)-dependent phosphotransferase system (PTS) เปลี่ยนไปเป็น galactose-6-phosphate และเกิดเป็นกรดแลคติคเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในที่สุด (Hickey *et al.*, 1986) สำหรับการศึกษาจากรายงานทั้งในและต่างประเทศเกี่ยวกับเชื้อ *L. lactis* นี้ มีอย่างมากมาย โดยที่มีการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา และพันธุศาสตร์ เพื่อพัฒนาเกี่ยวกับสายพันธุ์ และศึกษากระบวนการผลิต และการแยกให้บริสุทธิ์ต่อไป Kenji และคณะ (2007) ได้มีการสนใจเกี่ยวกับการใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งโดยเชื้อ *Lactococcus lactis* IL 1403 ร่วมกับเชื้อ *Streptococcus bovis* 148 ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส เพื่อช่วยในการย่อยวัตถุดิบแป้ง ซึ่งผลการทดลองได้ว่าสามารถผลิตกรดแลคติคได้ 0.09 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อีกทั้งทำการวิเคราะห์สารต่างๆในกระบวนการหมักโดยใช้เครื่อง HPLC ที่วิเคราะห์ทั้งน้ำตาลที่เหลืออยู่และกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้น พบว่ามีการสะสมของน้ำตาลมอลโตสระหว่างการหมักเป็นผลให้ประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลคติคได้ไม่ดีเท่าที่ควร และเมื่อมีการควบคุมปริมาณของน้ำตาลในน้ำหมัก ก็สามารถเพิ่มอัตราการผลิตจาก 0.09 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เป็น 1.31 กรัมต่อ

ลิตรต่อชั่วโมง (99.2 % ของกรดแลคติค) (Kenji *et al.*, 2007) สำหรับการใช้วัตถุดิบจำพวกแป้ง เช่น wheat flour hydrolysate โดย *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 อีกงานวิจัยหนึ่งที่ได้มีการศึกษาคือ Hofvendahl (1998) ได้มีการศึกษาในการปรับปรุงสูตรอาหาร ในการทดลองได้มีการใช้ wheat flour hydrolysate โดยที่ไม่มีการเติมสารอาหารอื่นลงไปถังหมัก เพื่อหมักในลักษณะที่เรียกว่า simultaneous saccharification and fermentation หรือย่อว่า SSF มีการแปรผันค่า pH เริ่มต้น อุณหภูมิ และความเข้มข้นของแป้ง ซึ่งผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า ขั้นตอนในการหมักเร็วกว่า เนื่องจากในกระบวนการหมักโดยทั่วไป จะประกอบด้วย 2 ขั้นตอนที่มีการเตรียมวัตถุดิบก่อนที่ถ่ายเชื้อลงไป และค่า pH อุณหภูมิ มีผลต่อประสิทธิภาพการหมักกรดแลคติค (Hofvendahl, 1998a) ถ้าไม่อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจะทำให้การอัตราผลิตกรดแลคติคต่ำ และจากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องแล้วนั้น ทำให้ทราบถึงกระบวนการหมักได้ดีขึ้น และพัฒนาระบบเพื่อที่จะหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว ต้องมีการทดลองหาสภาวะเหมาะสมสำหรับแบคทีเรียนั้นๆ เพื่อให้เกิดผลที่ต้องการมากที่สุด ทั้งยังส่งเสริมกระบวนการผลิตที่จะศึกษา และป้องกันไม่ให้เกิดผลพลอยได้อื่นๆที่ไม่ต้องการ เนื่องจากหากมีการปนเปื้อนด้วยสารต่างๆมาก จะมีผลต่อกระบวนการแยกให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป และเพิ่มต้นทุนการผลิตเป็นอย่างมาก

1.4 วัตถุดิบหรือแหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนจะมีอิทธิพลต่อการสร้างมวลเซลล์หรือผลผลิต แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในกระบวนการผลิตกรดแลคติคนั้นจำเป็นต้องคำนึงถึงต้นทุนการผลิต เนื่องจากต้นทุนการผลิตประมาณร้อยละ 60 เป็นค่าวัตถุดิบที่ใช้เป็นสารตั้งต้น (Bulut *et al.*, 2004) ดังนั้นจึงควรเลือกใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูก ในงานวิจัยได้มีความสนใจที่จะมีการใช้มันสำปะหลังเป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตกรดแลคติค โดยที่ลักษณะที่สำคัญของมันสำปะหลัง ทางกายภาพ การนำไปประยุกต์ใช้ จะมีการกล่าวในหัวข้อต่อไป

1.4.1 มันสำปะหลัง

มันสำปะหลัง เป็นพืชดั้งเดิมของชาวพื้นเมืองในเขตร้อนของทวีปอเมริกา ตั้งแต่อเมริกากลาง คือ ตอนใต้ของประเทศเม็กซิโกลงไปถึงประเทศบราซิล ซึ่งเป็นพวกอเมริกันอินเดียน มันสำปะหลังจัดเป็นพืชหัวชนิดหนึ่ง ชื่อวิทยาศาสตร์ *Manihot esculenta* (L.) Crantz มีชื่อสามัญเรียกหลายชื่อตามภาษาต่าง ๆ ที่ได้ยินกันมากได้แก่ Cassava, Yuca, Mandioa, Manioc, Tapioca สำหรับประเทศไทยมันสำปะหลังเป็นพืชสำคัญอย่างหนึ่ง เพราะผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังเป็นสินค้าออกสำคัญของประเทศ

กสิกร จึงนิยมปลูกมันสำปะหลังกันทั่วประเทศ และปลูกกันมาก ในภาคตะวันออกและตะวันออก-เฉียงเหนือ หัวมันสำปะหลังที่ปลูกได้นอกจากจะใช้เป็นวัตถุดิบส่งให้โรงงานทำแป้งมัน สาคู และโรงงานทำอาหารสัตว์ โดยทำเป็นเส้นหรืออัดเม็ดแล้ว ยังใช้สำหรับบริโภคเป็นอาหารอีกด้วย มันสำปะหลังเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ดีในที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นประเทศที่ผลิตมากจึงเป็นประเทศที่อยู่ในบริเวณเส้นศูนย์สูตรระหว่างเส้นรุ้งที่ 20 องศาเหนือและใต้ ประเทศที่ปลูกมากได้แก่ บราซิล อินโดนีเซีย ไนจีเรีย แซร์ ไทย และอินเดีย สำหรับประเทศไทยผลิตมันสำปะหลังได้มากเป็นอันดับ 5 ของโลก คือ ผลิตได้ประมาณ 7 เปอร์เซ็นต์ของทั้งหมด ประเทศไทยมีการปลูกมันสำปะหลังทั่วประเทศ แต่ที่ปลูกเป็นการค้าจำนวนมากเพื่อส่งเข้าโรงงานอุตสาหกรรมมันสำปะหลัง ได้แก่ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคตะวันออก จังหวัดที่เป็นแหล่งปลูกมันสำปะหลังที่สำคัญ ได้แก่ นครราชสีมา ชลบุรี ระยอง ปราจีนบุรี ชัยภูมิ เนื้อที่เพาะปลูกของ 5 จังหวัดนี้เมื่อรวมกันแล้วประมาณ 55 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่เพาะปลูกมันสำปะหลัง โดยเฉพาะจังหวัดนครราชสีมา ถือว่ามีพื้นที่การและปริมาณผลผลิตมันสำปะหลังมากที่สุดในประเทศไทย (http://www.kanchanapisek.or.th)

1.4.2 แป้งมันสำปะหลัง

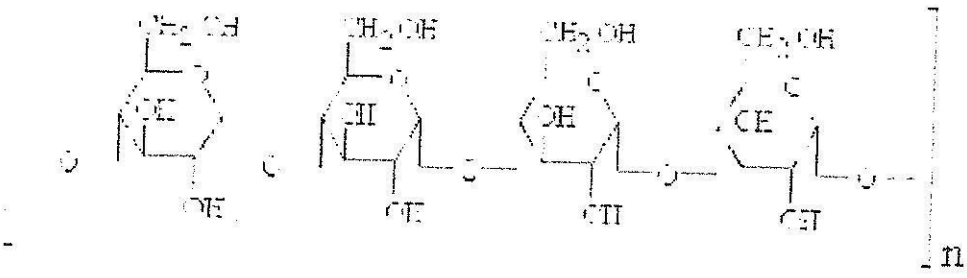
ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีวัตถุดิบจากการเกษตรมากมาย ซึ่งวัสดุเหล่านี้มีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการหมักกรดแลคติคได้ มันสำปะหลังถือได้ว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญอย่างยิ่งของประเทศไทย ดังนั้นจึงพบเห็นมันสำปะหลังปลูกอยู่ทั่วไปกระจายไปทุกภาคและผลิตเป็นแป้งมันสำปะหลังถือได้ว่าเป็นผู้ผลิตรายใหญ่รายหนึ่งในโลก ในประเทศไทยมีการใช้มันสำปะหลังเป็นอาหารจำนวนน้อยมาก ส่วนมากนิยมนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์แป้ง โดยมีการผลิตแป้งโดยใช้หัวมันสำปะหลังสดมาล้างน้ำ แล้วนำไปบดให้ละเอียด จะได้น้ำแป้งและกาก จากน้ำแป้งก็ทำการแยกแป้งออกจากน้ำโดยการทิ้งไว้ให้แป้งตกตะกอน หรือเข้าเครื่องแยกโดยตรง แป้งที่ได้นำมาทำให้แห้งโดยใช้ความร้อนแล้วบดให้ละเอียด เป็นแป้งมันสำปะหลังเฉลี่ย 0.20 กิโลกรัม และได้กากมันสำปะหลัง 0.4-0.9 กิโลกรัม ประเทศไทยสามารถผลิตแป้งมันสำปะหลังได้ประมาณปีละ 400,000 ตัน ส่งออกจำหน่ายต่างประเทศราว 200,000 ตัน และใช้บริโภคภายในประมาณ 150,000-200,000 ตัน (ศรีรอต *et al.*, 2542) แป้งมันสำปะหลังจึงถือได้ว่าเป็น"แป้งไทย" เป็นแป้งที่คนไทยสามารถผลิตได้มากที่สุด และเป็นแป้งที่มีคุณภาพสูงและราคาถูกที่สุด แป้งมันสำปะหลังสามารถนำไปใช้เป็นอาหารคนและใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น การทำกาว อุตสาหกรรมกระดาษ สิ่งทอ เป็นต้น อุตสาหกรรมการผลิตแป้งมันสำปะหลัง นับว่าเป็นอุตสาหกรรมหลักของประเทศไทยในปัจจุบัน ดังนั้นการวิจัยเพื่อเพิ่มมูลค่าให้แก่แป้งมันสำปะหลังจึงมีความจำเป็น ซึ่งเป็นผลดีต่อเกษตรกรผู้ปลูกและเศรษฐกิจของประเทศไทย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจเกี่ยวกับแป้งมันสำปะหลัง อีกทั้ง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี

ตั้งอยู่ที่ จ. นครราชสีมา ที่เป็นศูนย์กลางแหล่งใหญ่ที่สุดในการผลิตแป้งมันสำปะหลังของประเทศไทย ลักษณะทั่วไปของแป้งมันสำปะหลังต้องมีผงละเอียด มีสีขาว หรือสีครีมอ่อน ไม่เกิดการหมัก ไม่เหม็นอับหรือมีกลิ่นน่ารังเกียจ ไม่มีแมลงและสารแปลดปลอมอื่นๆ ซึ่งต้องมีคุณลักษณะตามตาราง 2 แป้งมันสำปะหลังแบ่งออกเป็น 3 ชั้นคุณภาพ คือ ชั้นคุณภาพ 1 2 และ 3 ส่วนลักษณะโครงสร้างของแป้งมันสำปะหลังแสดงดังรูปภาพ 4

ตาราง 2 คุณลักษณะของแป้งมันสำปะหลัง (มอก 274-2521) (ธรรมปัญญา, 2534)

คุณภาพ		ชั้น 1	ชั้น 2	ชั้น 3
ความชื้น	ไม่เกิน	13	14	14
แป้ง*	ไม่น้อยกว่า	97.5	96	94
เถ้า*	ไม่เกิน	0.15	0.3	0.5
เถ้าที่ไม่ละลายในกรด*	ไม่เกิน	0.05	0.10	0.15
โปรตีน*	ไม่เกิน	0.3	0.3	0.3
เยื่อ (ลบ.ซม./50 กรัมก่อนอบแห้ง)	ไม่เกิน	0.2	0.5	1.0
ความเป็นกรด-ด่าง	ไม่เกิน	4.5-7	3.5-7	3.0-7
ความละเอียด				
แป้งที่ค้างบนตะแกรงขนาด 150 ไมโครเมตร	ไม่เกิน	1	3	5

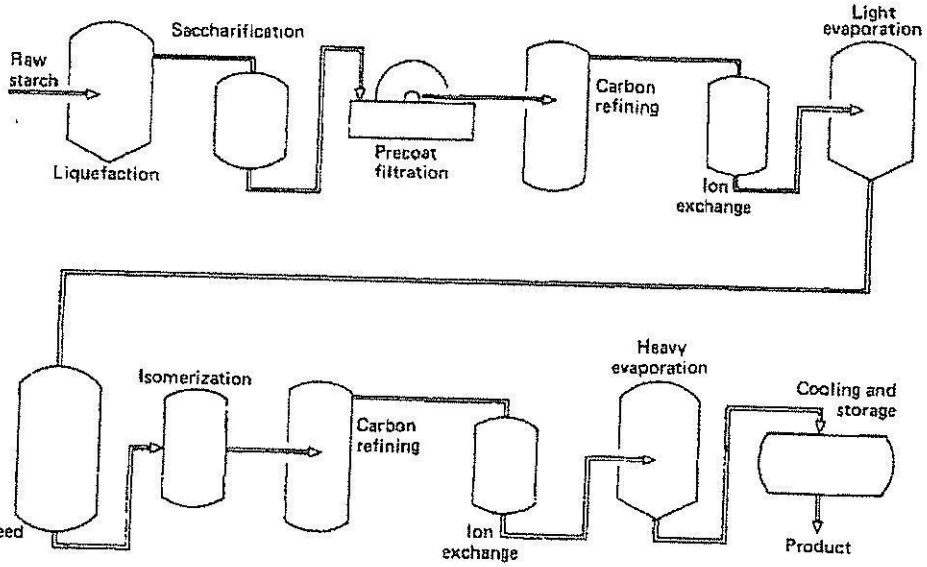
* คำนวณจากน้ำหนักแห้ง (เป็นร้อยละ)



รูปภาพ 4 ลักษณะโครงสร้างภายในของแป้งมันสำปะหลัง (Tonukari, 2004)

เนื่องจากแป้งมันสำปะหลังมีปริมาณแป้ง ซึ่งมีโมเลกุลขนาดใหญ่ ทำให้ยากต่อกระบวนการผลิตสารหรือผลผลิตต่างๆ หากมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างบางส่วน จะทำให้สามารถใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในกระบวนการผลิตสารต่างๆ ได้หลากหลาย ดังนั้น ถ้าทำการย่อยแป้งมันสำปะหลังก่อน

กระบวนการผลิต ถือว่าเป็นการลดระยะเวลาอีกทั้งลดต้นทุนในระบบการผลิตกรด แลคติคได้อีกด้วย ซึ่งกระบวนการย่อยแป้งมันสำปะหลังนั้น ทำได้จากนำแป้งมันสำปะหลังมาผสมกับน้ำแล้วนำมาปรับ pH แล้วเติมเอนไซม์เช่น อะไมเลส เพื่อช่วยในการย่อยหรือตัดพันธะ (liquefaction (hydrolysis) ทำให้แป้งก็มีสายโมเลกุลสั้นลง เกิดลักษณะที่ใสขึ้น (วิชชาชู, 2551) และจะเข้าสู่กระบวนการหมักต่อไป



รูปภาพ 5 แสดงแผนผังในการผลิตแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว (Hydrolyzed cassava starch) (Anne Anthony and Titus, 2009)

ในการผลิตกรดแลคติคหากมีแหล่งคาร์บอนที่ดี เหมาะแก่การเมแทบอไลซ์โดยเชื้อจุลินทรีย์แล้วนั้น จะส่งผลถึงความสามารถในการสร้างผลผลิตและส่งเสริมการผลิตกรดแลคติคหลังสิ้นสุดกระบวนการหมัก กระบวนการหมักโดยทั่วไปนิยมใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอน แต่อย่างไรก็ตามต้องคำนึงถึงการปนเปื้อนของสารพิษต่างๆ เนื่องจากส่งผลโดยเชื้อต่อจุลินทรีย์ ไม่เหมาะกับการผลิตสารบางอย่าง สำหรับปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเลือกใช้แหล่งคาร์บอน ยกตัวอย่างเช่น ราคาถูก ความบริสุทธิ์ และสามารถหาได้ตลอดทั้งปี ซึ่งแป้งมันสำปะหลังตรงตามเป้าหมายที่วางไว้ และเป็นสินค้าทางเกษตร มีการนำมาใช้เพื่อก่อให้เกิดการเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ให้สูงขึ้น ขณะที่มีการสร้างผลผลิตที่มีความสำคัญ และจากการพัฒนาการใช้วัตถุดิบนี้ สามารถที่จะเป็นต้นแบบนำร่องในระดับอุตสาหกรรมได้ด้วย

1.5 แหล่งไนโตรเจนในกระบวนการผลิตกรดแลคติคโดยกระบวนการทางชีวภาพ

การผลิตกรดแลคติคโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถใช้วัตถุดิบและเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ได้ เป็นอีกแนวทางหนึ่ง ที่ทำให้กระบวนการผลิตกรดแลคติคโดยวิธีการทางชีวภาพ (Fermentation process) มีประสิทธิภาพมากขึ้น เนื่องจากสามารถใช้วัตถุดิบทางการเกษตรและมีราคาถูกให้เกิดประโยชน์สูงสุด จึงทำให้ลดต้นทุนการผลิตและค่าใช้จ่ายต่างๆ อีกนัยหนึ่งสำหรับในงานวิจัยนี้ได้มีการใช้แบคทีเรียกรดแลคติคเสมือนโรงงานในการผลิตกรดแลคติค ดังนั้นจึงต้องคำนึงถึงสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมในการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ และจากการค้นคว้าข้อมูลที่รายงานไว้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติคส่วนมากมีความต้องการสารอาหารสูง (Stainer *et al.*, 1986) นั่นคือ ต้องการแหล่งอาหารที่ซับซ้อนเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโต ทั้งยังต้องการแหล่งคาร์บอนที่เป็นสารตั้งต้น แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ และสารอื่นๆ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่จำเป็นเพื่อก่อให้เกิดการพัฒนากระบวนการผลิตกรดแลคติคที่ยั่งยืนต่อไป

1.5.1 สารสกัดยีสต์ทางการค้า (Commercial yeast extract)

ในกระบวนการหมักกรดแลคติคแหล่งคาร์บอนส่วนมากคือน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลแลคโตส ซึ่งจะต้องมีการเติมแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารสกัดยีสต์ทางการค้า (commercial yeast extract) (Hujanen and Linko, 1994) การเติมแหล่งไนโตรเจนในปริมาณ 10 กรัมต่อลิตรนั้น (Nanci *et al.*, 2005) มีผลต่อการสนับสนุนการผลิตกรดแลคติคและอัตราการเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์ โดยที่สารสกัดจากยีสต์นี้เป็นสารที่มีไนโตรเจนในปริมาณมาก ทั้งยังประกอบด้วยวิตามินและสารส่งเสริมการเจริญเติบโตอื่นๆ ดังนั้นจึงเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นสารอาหารสำหรับแบคทีเรียกรดแลคติคเพื่อผลิตกรดแลคติค สำหรับ commercial yeast extract เป็นผลิตภัณฑ์จากยีสต์ที่หมดสภาพแล้ว เกิดกระบวนการย่อยสลายเซลล์ตัวเอง ได้จากการใช้สารเคมีหรือเอนไซม์ ยีสต์สกัดที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายตัวเองเรียกว่า yeast autolysate ประกอบด้วยโปรตีนเป็นหลักและองค์ประกอบอื่นๆ อีกทั้งมีกระบวนการผลิตที่มีการแยกเอาผนังเซลล์ส่วนที่ไม่ละลายออกด้วยวิธีการกรองเรียกว่า " autolysed yeast extract " และจากการศึกษาวิจัยมาก่อนหน้านี้ พบว่าอัตราการผลิตกรดแลคติคเพิ่มขึ้นเมื่อมีการเติมสารสกัดยีสต์ลงไปในกระบวนการหมัก (Lund *et al.*, 1992) ทั้งยังมีการวิเคราะห์องค์ประกอบต่างๆ โดยที่องค์ประกอบของสารสกัดยีสต์นี้ประกอบด้วย ไนโตรเจน 8-12 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 50-75 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 4-13 เปอร์เซ็นต์ และไขมันอีกเล็กน้อย (Saksinchai *et al.*, 2001) และจากข้อมูลเหล่านี้ จึงสรุปได้ว่าสารสกัดยีสต์ (commercial yeast extract) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด

1.5.2 สารสกัดยีสต์เหลือทิ้งจากโรงงานผลิตเบียร์

สำหรับแหล่งไนโตรเจนนั้น การทดลองนี้จะใช้สารสกัดยีสต์ทางการค้า เนื่องจากมีการศึกษาจากรายงานวิจัยอื่นๆพบว่า เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้ได้ และผลิตกรดแลคติคได้ดีที่สุดอีกด้วย แต่ด้วยเหตุผลที่สารสกัดยีสต์นี้ทางการค้ามีราคาค่อนข้างสูง ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงไม่ก่อให้เกิดความคุ้มทุน จึงได้มีการศึกษาหาสารทดแทนยีสต์สกัดนี้ เพื่อให้สามารถใช้แทนและก่อให้เกิดการผลิตกรดแลคติคได้เทียบเท่า ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาวิจัยทางเลือกอื่น ในการที่จะนำยีสต์สกัดจากโรงงานผลิตเบียร์มาใช้เป็นแหล่งสารอาหารในการผลิตกรดแลคติคในอนาคต แต่อย่างไรก็ตามการพัฒนาแหล่งไนโตรเจนต่างๆขึ้นมาใช้แทนสารสกัดยีสต์ทางการค้าซึ่งมีราคาแพงนั้น ได้มีงานวิจัยออกมาอย่างแพร่หลาย (Hujanen and Linko, 1996) รวมถึงงานวิจัยนี้ซึ่งมีจุดมุ่งหมายที่จะลดต้นทุนการผลิตกรดแลคติค หาแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูกกว่า อีกทั้งยังมีความเป็นไปได้ในการที่จะนำเอาของเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตเบียร์มาก่อให้เกิดประโยชน์ และเป็นการลดปริมาณของเหลือทิ้งอีกทางหนึ่ง

การหาแหล่งไนโตรเจนมาทดแทนนั้น จำเป็นต้องคำนึงถึงสารอาหารภายในว่ามีครบถ้วนมากน้อยเพียงใด สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติค เป็นที่รู้กนดีอยู่แล้วว่า ต้องการสารอาหารที่หลากหลายพร้อมกับมีสารส่งเสริมการเจริญ (growth factor) และแร่ธาตุต่างๆ ในบางงานวิจัยมีการใช้วิตามินบีแทนสารสกัดยีสต์ทางการค้า ซึ่งสามารผลิตกรดแลคติคได้ใกล้เคียงกัน (Hujanen and Linko, 1996)ในหัวข้อนี้ได้มีการกล่าวถึงเฉพาะ brewer's yeast extract ซึ่งเป็นเซลล์ยีสต์ที่ตายแล้ว มีของกากของเสียที่มีสารอาหารสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งโปรตีน พร้อมทั้งมีเอนไซม์ และส่วนประกอบอื่นๆภายในเซลล์ (Guilloux-Benatier and Chassagne, 2003) ซึ่งผลที่ได้จะมีลักษณะมีสีเหลือง ปริมาณโปรตีนมากกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ความชื้นน้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ เถ้า น้อยกว่า 8 เปอร์เซ็นต์ (Tanguler and Erten, 2008) นอกจากสารเหล่านี้แล้วยังประกอบไปด้วยวิตามินและแร่ธาตุอีกมากหลังจากการทำระเหยแห้ง เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการนำมาใช้เสริมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ถือว่าเป็นวัตถุดิบที่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับแบคทีเรียกรดแลคติค

1.6 อิทธิพลจากสิ่งแวดล้อมต่อกระบวนการหมักกรดแลคติค

pH ในกระบวนการหมักถือเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติค หากพบว่า pH ไม่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ จะส่งผลให้ความเข้มข้นของผลผลิต (yield) ต่ำ และเกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อีกทางหนึ่ง จากข้อมูลทางวิชาการ (Bai *et al.*, 2004) ระบุไว้ว่า pH ที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติคอยู่ระหว่าง 5.0-7.0 เช่นเดียวกับแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* sp. จะมีค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ที่ 5.7 นอกจากนี้ pH ยังมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในของจุลินทรีย์อีกด้วย *S. bovis* สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ดี ที่ pH 5.0 อีกทั้งที่ pH นี้จะเกี่ยวข้องและส่งเสริมการทำงาน

ของกิจกรรม เอนไซม์ H^+-ATPase activity ของเซลล์อีกด้วย ในอีกด้านหนึ่งจากการศึกษางานวิจัยอื่นๆ (Xu *et al.*, 2010) พบว่า อุณหภูมิเป็นปัจจัยหลักที่จะส่งผลต่อกระบวนการหมัก และการเจริญของจุลินทรีย์เช่นเดียวกับ pH สำหรับ *Lactobacillus amylophilus* จะสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส ทั้งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ส่งเสริมความสามารถในการสร้างกรดแลคติคที่ 25-35 องศาเซลเซียส (Yumoto and Ikeda, 1995)

1.7 การผลิตโดยกระบวนการทางชีวภาพของกรดแลคติค (Fermentation processes)

การหมักจากชีวโมเลกุล ในปัจจุบันนั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กระบวนการใหญ่ ๆ คือการหมักแบบกะ (batch fermentation) การหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation) และการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation)

1.7.1 กระบวนการหมักแบบกะ (Batch fermentation)

การหมักแบบกะนั้น สารอาหารทั้งหมดจะถูกเตรียมไว้ก่อนที่จะมีการเติมแบคทีเรียกรดแล็คติคลงไปและจะไม่มีการเติมสารอาหารอื่น ๆ ลงไปในระหว่างที่การหมักดำเนินไป โดยที่การหมักแบบกะเป็นที่นิยมในการผลิตเนื่องจากเป็นระบบที่ควบคุมและสามารถจัดการระบบได้ง่าย (Bai *et al.*, 2004) ได้มีการศึกษาในกระบวนการหมักแบบกะโดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้น พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติคได้ 15.20 กรัมต่อลิตร และมีค่า productivity 1.34 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (Yun and Ryu, 2001) โดยสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ส่วนมากที่ใช้คือ *Lactobacillus* sp. ดังเช่นสายพันธุ์ *L. delbruecki* มีความสามารถในการใช้น้ำตาลในข้าวโพด ซึ่งสามารถเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์ขึ้น และสำหรับการศึกษาการหมักจากหางนมโดยเชื้อ *L. bulgaricus* นั้นก็สามารถผลิตกรดแลคติคโดยกระบวนการหมักแบบกะเช่นกัน (Madigan *et al.*, 2000) อีกทั้งโดยทั่วๆไป อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเชื้อจะอยู่ระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส ซึ่งโดยที่กระบวนการหมักแบบนี้จะมีการศึกษาอย่างกว้างขวางโดยมีการใช้สารตั้งต้นที่แตกต่างกัน ทั้งสามารถใช้ของเหลือทิ้งทางการเกษตร ของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม แต่อย่างไรก็ตาม ในกระบวนการหมักแบบกะนี้ ก็มีปัญหาเกิดขึ้นได้ อันเนื่องมาจาก ไม่มีการเติมและถ่ายออกของน้ำหมัก หลังจากที่เชื้อมีการเจริญและสร้างกรดแลคติคขึ้น ทำให้ในน้ำหมักมีการสะสมกรดแลคติคที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นเรื่อยๆ มีผลต่อการเจริญ และเกี่ยวกับทางด้านสรีรวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติค อาจเกิดการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ หรือที่เรียกว่า Product inhibition ได้ ดังนั้น จึงจะต้องมีการพัฒนาและปรับปรุงในกระบวนการหมัก เพื่อให้สร้างกรดแลคติคได้ยาวนานและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต เพื่อส่งผลถึงการผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.7.2 กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation)

กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องจะมีการเติมอาหารลงไปในระบบและจะมีการนำเอาน้ำหมักบางส่วนออก โดยที่อัตราการป้อนอาหารเข้าถังหมักต่อปริมาตรของน้ำหมักในถังหมักเรียกว่าอัตราการเจือจาง (Dilution rate, D) ซึ่งจะมีหน่วยเป็น ชม$^{-1}$ มีงานวิจัยที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับการหมักแบบต่อเนื่อง เช่น Gonzalez และคณะ (1996) ได้มีการศึกษาการผลิตกรดแลคติคโดยเชื้อ *Lactobucillus casei* subsp. *cusei* DSM 20011 และ *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquensDSM 20004* ด้วย chemostat ที่มีการแปรผันค่า dilution rates ซึ่งผลพบว่า dilution rate มีผลต่อรูปแบบกระบวนการหมัก แต่สำหรับอัตราการผลิตและอัตราการเปลี่ยนของสารตั้งต้นไม่มีการเปลี่ยนแปลง และเมื่อได้มีการเติมวัตถุดิบครั้งที่สองลงในถังหมักพบว่า อัตราการผลิตกรดแลคติคยาวนานขึ้น และมีค่า Productivity สูงขึ้น ส่งผลให้ความเข้มข้นสุดท้ายของการหมักของกรดแลคติคสูงขึ้นเช่นกัน (Antonio *et al.*, 1996)

อย่างไรก็ตามการหมักกรดแลคติคแบบต่อเนื่องนี้อาจจะก่อให้เกิดการสูญเสียทั้งกรดแลคติคและแบคทีเรียกรดแลคติคออกจากระบบไปในระหว่างที่มีการถ่ายน้ำหมักออกจากระบบด้วยเช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ต่ำและมีอัตราการเจือจางที่สูง นอกเหนือจากปัญหาดังกล่าวแล้วการควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดสภาวะคงตัว (steady state) ของทั้ง chemostat และ turbidostat ระหว่างกระบวนการหมักพบว่ามีความยุ่งยากมาก โดยที่ chemostat เป็นการควบคุมระบบให้เกิดสภาวะคงตัว (steady state) ของปริมาตรน้ำหมักโดยการควบคุมอัตราการป้อนของสารอาหารและอัตราการถ่ายน้ำหมักออกจากระบบให้เท่ากัน ส่วน turbidostat เป็นการควบคุมอัตราการไหลของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมเพื่อให้เซลล์ที่เพาะเลี้ยงมีความเข้มข้นคงที่ ซึ่งจะต้องอาศัยระบบการควบคุมที่ซับซ้อน มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนได้ง่ายกว่าการใช้ระบบการหมักแบบกะ และไม่เป็นที่นิยมในการกระบวนการผลิตกรดแลคติคในระดับอุตสาหกรรมปัจจุบัน (Doran, 1995;Stanbury and Whitaker, 1984)

1.7.3 กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation)

ในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะนั้น สารอาหารจะถูกป้อนเข้าสู่ระบบเป็นครั้งคราวหรือต่อเนื่องก็ได้ แต่จะไม่มีการถ่ายเอาน้ำหมักออกจากระบบในระหว่างการหมัก ซึ่งจะเป็นการผสมผสานระหว่างการหมักแบบกะและแบบต่อเนื่อง สำหรับกระบวนการหมักนี้ พบว่ามีงานวิจัยมีการศึกษา (Roukas and Kotzekidou, 1998) ทั้งนี้เนื่องจากสามารถผลิตกรดแลคติคได้ปริมาณสูง เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักแบบกะ และการจัดการระบบไม่ยุ่งยากซับซ้อนมากนัก อีกทั้งสามารถลดความเป็นกรดของกรดแลคติคที่สะสมอยู่ในถังหมักต่อแบคทีเรียกรดแลคติคได้อีกด้วย ขณะที่มีการป้อนอาหารจะเป็นการเจือจางหรือลดความเป็นกรดในน้ำหมักได้ (Ding and Tan, 2006) สำหรับกระบวนการผลิต

กรดแลคติคโดยวิธีนี้ได้มีการศึกษา เช่น ในงานที่มีการใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* และมีการแปรผันอัตราการป้อนเข้าของสารอาหารสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ผลการทดลองพบว่า ค่าความเข้มข้นกรดแลคติคสูงสุด เท่ากับ 210 กรัมต่อลิตร โดยที่สารตั้งต้นคือน้ำตาลกลูโคส พร้อมกับเติมสารสกัดจากยีสต์ 1 เปอร์เซ็นต์ในระว่างการหมัก ทั้งยังพบว่า ความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด 4.3 กรัมต่อลิตรและค่า productivity 2.14 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งได้เปรียบเทียบกับกระบวนการหมักแบบกะพบว่ามีการปรับปรุงพัฒนาการผลิตกรดแลคติค 68.6 เปอร์เซ็นต์ และทำให้เซลล์มีค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงขึ้น 59.7 เปอร์เซนต์ (Zheng *et al.*, 2006) จากการศึกษากระบวนการผลิตกรดแลคติคจากที่กล่าวมาข้างต้นนั้น ได้มีการค้นคว้าวิจัยที่มีการใช้กระบวนการหมักแบบกะ กึ่งกะ ต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้จึงได้มีการทดลองศึกษากระบวนการหมักแบบกึ่งกะพร้อมทั้งแบบกะ เพื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิต และผลิตกรดแลคติคให้ได้ผลผลิตสูง และเกิดประโยชน์สูงสุด

1.8 จุดประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการผลิตกรดแลคติค เช่น pH อุณหภูมิ ชนิด ผลการใช้แหล่งสารอาหาร และปริมาณแหล่งคาร์บอนจากแป้งมันสำปะหลัง ชนิดและปริมาณแหล่งอาหารเสริมจากสารสกัดยีสต์ โดยเชื้อ *Lactococcus lactis*
2. เพื่อศึกษากระบวนการผลิตกรดแลคติคในถังหมักแบบกึ่งกะ ที่มีการศึกษาศึกษาอิทธิพลของอัตราการป้อน (feeding rate) และนำมาเปรียบเทียบกับกระบวนการผลิตแบบกะ จากการใช้แป้งมันสำปะหลังและสารสกัดจากยีสต์จากโรงงานผลิตเบียร์โดย เชื้อ *Lactococcus lactis*

บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

สำหรับอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยนี้ จะเป็นเครื่องมือที่มีอยู่แล้วบางส่วน ณ ห้องปฏิบัติการกระบวนการทางชีวภาพ อาคารปฏิบัติการ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ยกตัวอย่างเครื่องมือที่ใช้เช่น

1. Laminar flow (BIOHAZARD V5 ประเทศเบลเยียม)
2. Spectrophotometer (Pharmacia Biotech Ultraspec 3000 UV/Vis Spectrophotometer ประเทศสหรัฐอเมริกา)
3. pH meter (Sartorius PB-10 ประเทศเยอรมัน)
4. Hot plate stirrer (BIOSAN MSH 300 ประเทศลัสเวีย)
5. Autoclave (Astell ประเทศอังกฤษ)
6. High performance liquid chromatography (Agilent 1200 series ประเทศสหรัฐอเมริกา)
7. Incubator shaker (N-BIOTEK NB-205 ประเทศสหรัฐอเมริกา)
8. Fermenter 2 ลิตร (Satorious รุ่น Biostat B ประเทศเยอรมัน)
9. Microcentrifuge (DENVILLE 260D ประเทศสหรัฐอเมริกา)
10. เครื่องชั่ง (Sartorius BP3100P ประเทศเยอรมัน)
11. เครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ (Julabo F25 ประเทศเยอรมัน)

2.2 เชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ คือ *Lactococcus lactis* MM 12 ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลคติคที่คัดแยกได้จากตัวอย่างแป้งหมักขนมจีน อ.เมือง จ.นครราชสีมา การเก็บรวบรวมตัวอย่างและการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค เก็บรวบรวมตัวอย่าง ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างและเจือจางจนได้ความเข้มข้นที่ ต้องการ นำสารละลายตัวอย่างมาแยกแบคทีเรียกรดแลคติคโดยใช้อาหารแข็ง MRS ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติค คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียกรด แลคติคที่สร้างกรดได้มาเขี่ยบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่จนได้

โคโลนีที่บริสุทธิ์ จากนั้นนำไปศึกษา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมแกรมเพื่อดูรูปร่างของเซลล์ตลอดจนการสร้างแคตาเลส การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติคโดยศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและการสร้างกรดจากการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ (Adnan and Tan, 2007) และเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ถูกเก็บรักษาไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีการเติมกลีเซอรอล 10 เปอร์เซ็นต์ ณ อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และเมื่อต้องการนำมาใช้ จึงมีการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ เพื่อให้เซลล์สามารถปรับตัวกับสภาวะการหมักได้

2.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหาร de Man, Rogosa and Sharpe (MRS medium) โดยสูตรอาหารดังกล่าวมีส่วนประกอบ (กรัมต่อลิตร) ดังต่อไปนี้ แหล่งคาร์บอน คือน้ำตาลกลูโคสปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร แหล่งไนโตรเจนคือ commercial yeast extract ปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร sodium acetate 5 กรัมต่อลิตร triammonium citrate 2 กรัมต่อลิตร $Na_2HPO_4.2H_2O$ 2 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.4H_2O$ 0.1 กรัมต่อลิตร $MnSO_4.4H_2O$ 0.05 กรัมต่อลิตร และ Tween 80 1 มิลลิลิตร (Xiaodong *et al.*, 1997) อาหารเหลวดังกล่าวจะถูกปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริค ก่อนที่จะนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.2.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยา

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคให้ได้โคโลนีเดี่ยว หลังจากบ่มไว้ 24-48 ชั่วโมง โดยเขี่ยเชื้อจากอาหารวุ้น MRS จากนั้นทำการ spread plate อีกครั้ง และทำการทดสอบดังนี้

(1) โดยทำการย้อมสีแกรม (Gram's staining) ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติคเป็นแบคทีเรียจำพวกแกรมลบ ผลที่ได้ควรจะติดสีม่วงของ สารละลายคริสตัลไวโอเลต จากนั้นทำการสเมียร์เชื้อลงแผ่นแก้ว และนำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ (Phase contrast microscopy) เพื่อดูลักษณะโคโลนี ขนาด และรูปร่าง เพื่อบ่งบอกและชี้ชัดได้ว่าเป็นแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว (Mugula *et al.*, 2003)

(2) ทางด้านชีวเคมี ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส การสร้างเอนไซม์คะตาเลส เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ มีลักษณะพื้นฐานคือ ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส ซึ่งต่างจากแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ การทดสอบ ดังนี้ คือ ทำการสเมียร์เชื้อลงบนแผ่นแก้ว จากนั้นหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3% ลงบนเชื้อ และสังเกตผล และการผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ โดยใช้ Duram tube เพื่อศึกษาลักษณะการหมักว่าเป็นแบบ homo- หรือ hetero-fermentation (Marino *et al.*, 2003)

(3) ศึกษาความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตหรือความสามารถในการเมแทบอไลซ์น้ำตาล 49 ชนิด (API 50 CHL kit, BioMerieux, Marcy-l'Etolite, France) เริ่มจากการแยกเชื้อให้ได้โคโลนี่เดี่ยวบริสุทธิ์ และถ่ายลงในอาหารทดสอบและปิดหน้าแต่ละช่อง (strip) ด้วย mineral oil เพื่อให้อยู่ในสภาวะไม่มีออกซิเจน ทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ครบเวลาจึงทำการอ่านผลการทดลองจากการเปลี่ยนสีของอาหารทดสอบ (หากผลเป็นบวกอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง) (Badis *et al.*, 2004)

2.2.3 การเตรียมกล้าเชื้อ

เมื่อทดสอบเชื้อด้วยกระบวนการดังกล่าว จึงนำเชื้อ *Lactococcus lactis* ที่เจริญบนอาหารวุ้น MRS medium หลังจากบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเขี่ยเชื้อจากอาหารเหลวจากข้างต้น มาเลี้ยงบนจานอาหารวุ้น MRS โดยการเขี่ยเชื้อ (streak plate) ก่อนที่จะนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเขี่ยเชื้อจากจานอาหารวุ้นดังกล่าวมาใส่ในหลอดอาหารวุ้น และ บ่มที่สภาวะเดียวกัน จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อเก็บไว้ใช้งานต่อไป เมื่อต้องการใช้งานจะทำการขีดเชื้อลงในอาหาร MRS ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในขวดปริมาตร 250 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเตรียมไว้สำหรับถ่ายลงสำหรับกระบวนการหมักต่อไป

2.3 ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในกระบวนการหมักกรดแลคติค

การศึกษาหัวข้อนี้จะมีการใช้อาหาร MRS ดัดแปลง ที่มีการแทนที่แหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคสเป็นสารชนิดอื่นๆ เช่น น้ำตาลชนิดต่างๆ คือ น้ำตาลฟรุกโตส อะราบิโนส ซูโครส แมนนิทอล ทรีฮาโลส และแลคโตส จากบริษัท HIMEDIA analytical grade ประเทศอินเดีย) แป้งมันสำปะหลัง แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว (ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสเพียงอย่างเดียว (α-amylase from *Bacillus licheniformis* (Sigma–Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา หน่วยที่ใช้คือ 0.5 unit/mg แป้ง บ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง) และกลูโคสไซรัป (ย่อยด้วย 2 เอนไซม์ คือ อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan; 0.75 unit/mg starch บ่มไว้ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)) สำหรับแหล่งไนโตรเจนมีการแทนที่ยีสต์สกัดทางการค้าด้วย เพปโตน (บริษัท HIMEDIA analytical grade ประเทศอินเดีย) หางนม corn steep liquor เซลล์ยีสต์ และสารสกัดยีสต์เหลือทิ้งจากโรงงานผลิตเบียร์ (จากโรงงานบุญรอดบริวเวอรี่ จังหวัดขอนแก่น) ทั้งนี้ในกระบวนการหมักกรดแลคติคจะดำเนินงานโดยใช้ shake flask ขนาดปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 150 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจน และทำการเก็บ

ตัวอย่างเป็นระยะๆเพื่อนำไปวิเคราะห์ผลการทดลอง เพื่อที่จะทราบว่าการทดลองสิ้นสุดลง ณ เวลาใด หลังจากได้ผลการทดลองจะนำมาพิจารณาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถผลิตกรดแลคติคได้สูงที่สุด เพื่อที่จะนำข้อมูลเหล่านี้ไปใช้ในกระบวนการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ที่ขนาดใหญ่ขึ้นต่อไป โดยในการทดลองนี้ทุกการทดลองจะมีการศึกษากระบวนการหมักตามรูปแบบที่กล่าวข้างต้นจำนวน 2 ซ้ำ

2.4 การเตรียมสารสกัดยีสต์เหลือทิ้งจากโรงงานผลิตเบียร์

นำยีสต์ที่เหลือทิ้งจากโรงงานบียร์เข้าสู่กระบวนการทำยีสต์สกัด เพื่อสกัดสารอาหาร วิตามิน ในเซลล์ยีสต์ออกมา โดยเริ่มจากนำ brewer's yeast ที่ได้จากโรงงานเบียร์มาเติมน้ำและทำให้เกิดกระบวนการย่อยตัวเอง (เกิดปฏิกิริยา autolysis) และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการ autolysis ตามกระบวนการของผู้วิจัยที่ได้ศึกษามาก่อน (Saksinchai *et al.*, 2001) จะได้ออกมาเป็นลักษณะผง เพื่อนำไปใช้ได้ และวิเคราะห์ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและปริมาณโปรตีน โดยวิธี Kjeldahl method (Güebel *et al.*, 1991)

2.5 การศึกษาอิทธิพลจากสภาวะต่างๆในกระบวนการหมักกรดแลคติค

ในการทดลองมีการแปรผันปัจจัยต่างๆ เช่น pH อุณหภูมิ และความเร็วในการกวน โดยมีการแปรผันค่าต่างๆ เพื่อที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลคติค โดยเชื้อ *L. lactis* สำหรับ pH จะทำการทดลองที่ pH 6.0 อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการกวนที่ 200 รอบต่อนาที ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนประกอบตามข้างต้น ทั้งนี้ผลที่ได้ในหัวข้อนี้ จะมีการพัฒนาไปใช้ในถังหมักปฏิกรณ์ชีวภาพ ที่มีการควบคุมอย่างดี ระดับการผลิตสูงขึ้น และน่าเชื่อถือมากขึ้น

2.6 การศึกษากระบวนการหมักกรดแลคติคในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

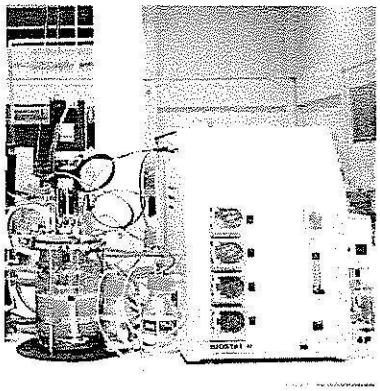
การศึกษาการหมักกรดแลคติคในงานวิจัยนี้ จะใช้การหมักแบบกึ่งกะ ที่นำผลจากการทดลองหัวข้อที่ผ่านมามาพัฒนาในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะนี้ โดยจุดประสงค์หลักในการศึกษาการหมักนั้น เพื่อเป็นการวางพื้นฐานสำหรับการพัฒนากระบวนการผลิตในระดับที่ใหญ่ขึ้นต่อไป

2.6.1 กระบวนการหมักแบบกะ

เตรียมอาหาร MRS ดัดแปลงปริมาตร 1.5 ลิตร ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาดปริมาตร 2 ลิตร (Sartorius, รุ่น Biostat B ประเทศ Germany) เมื่อกล้าเชื้อที่เตรียมไว้โดยบ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายลงไปในถังหมัก ที่มีความเข้มข้นของเซลล์ให้ได้ 10 เปอร์เซ็นต์ ในกระบวนการหมักโดยใช้ถังหมักแบบนี้ต้องมีการควบคุมด้วยเครื่องควบคุมเฉพาะ มีการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ตามที่ต้องการ การแสดงค่า pH ที่มีการเปลี่ยนแปลงในระบบ pH probe อีกทั้งเครื่องควบคุมจะมีการเชื่อมต่อกับปั๊มที่ทำหน้าที่ดูดด่างลงในถังหมักเพื่อควบคุมค่า pH และอัตราการกวนที่สามารถระบุได้ ระหว่างดำเนินการหมักสำหรับการควบคุมค่า pH ให้คงที่นั้นจะมีการเตรียมสารละลายด่างแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5 โมล่าร์ โดยที่หลังจาก pH probe เกิดการตอบสนองและแสดงการลดลงของ pH ปั๊มจะดูดด่างนี้ลงไป โดยที่ไม่เปลี่ยนปริมาตรในถังหมักมากนัก เนื่องจากด่างที่ใช้มีความเข้มข้นสูง เพื่อที่จะควบคุมปริมาตรในการหมัก ทั้งนี้ควบคุมอุณหภูมิให้ได้ 30 องศาเซลเซียส โดยเครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ เซลล์สามารถเจริญและสร้างผลผลิตเกิดขึ้นได้ จากนั้นทำการเก็บตัวอย่าง โดยดูดน้ำหมักมาครั้งละ 10 มิลลิลิตร โดยเริ่มเก็บตัวอย่าง ตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 0 และทุกๆ 3-4 ชั่วโมงเป็นระยะเวลาประมาณ 4-5 วัน จนกว่าค่าความขุ่น (การเจริญ) ของเชื้อเริ่มคงที่ (เข้าสู่ระยะ stationary phase) รวมทั้งเมื่อค่า pH มีค่าคงที่ หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์สารต่างๆต่อไป

2.6.2 กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ

ในการหมักแบบกึ่งกะจะสามารถแบ่งออกเป็นสองส่วนคือ ส่วนแรกเป็นการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ดัดแปลงปริมาตร 1.2 ลิตร และเติมกล้าเชื้อที่มีความเข้มข้นของเซลล์ 10 เปอร์เซนต์ เช่นเดียวกับแบบกะ พร้อมกันกับการเตรียมอาหารสำหรับการป้อนในขั้นตอนกึ่งกะ โดยมีการใช้แหล่งคาร์บอนกลูโคสไซรัป (ความเข้มข้นของกลูโคสจากความเข้มข้นเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร) ที่มีความเข้มข้น 5 เท่า และเสริมด้วยสารสกัดยีสต์เหลือทิ้งจากโรงงานผลิตเบียร์ที่ความเข้มข้น 5 เท่า คือ 50 กรัมต่อลิตร เพื่อที่จะควบคุมปริมาตรของน้ำหมักไม่ให้เปลี่ยนแปลงไปมากนัก อีกทั้งควบคุมระบบการหมักคล้ายกับแบบกะ ที่มีการควบคุมค่า pH ตลอดการหมักให้เท่ากับ 6.0 และหลังจากที่กระบวนการหมักแบบกะดำเนินไปได้ประมาณ 18 ชั่วโมง (อาหารเริ่มหมดลง ขณะที่เซลล์อยู่ในระยะการเจริญแบบทวีคูณ (exponential phase)) จึงเริ่มป้อนอาหารที่เตรียมไว้แล้วลงไป เข้าสู่การหมักแบบกึ่งกะ ทั้งนี้มีการแปรผันการป้อนสารอาหารที่แตกต่างกันระหว่าง 0.01-0.3 กรัมต่อวินาที จากนั้นจะทำการศึกษากระบวนการหมักพร้อมทั้งจลนศาสตร์การหมัก เพื่อเปรียบเทียบหารูปแบบที่มีการผลิตกรดแลคติคได้สูงและคุ้มทุนที่สุด



รูปภาพ 6 อุปกรณ์ในการทดลองกระบวนการหมัก (Fermentation processes)

2.7 การวิเคราะห์

นำตัวอย่างที่เก็บได้จากถังปฏิกรณ์ชีวภาพ นำมาปั่นเหลี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที โดยเครื่องปั่นเหวี่ยง เพื่อแยกเซลล์และส่วนใสที่เป็นตัวอย่างที่ต้องการนำมาวิเคราะห์ ดังนี้คือ

(1) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic (DNS) method ตามวิธีของ Miller (Miller, 1959) โดยที่จะนำเอาน้ำหมักที่ปั่นเหวี่ยงกรองเอาส่วนใสมา 0.5 มิลลิลิตร และเติม 3, 5-dinitrosalicylic acid reagent 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองแก้ว จากนั้นนำไปต้มให้ความร้อนเพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสี เป็นการเกิดปฏิกิริยาของน้ำตาลกับสารละลายที่เติมลงไปดังกล่าวเป็นเวลา 5 นาที และนำไปวิเคราะห์ผลหาค่าความขุ่นของตัวอย่างโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร พร้อมกับทำกราฟมาตรฐานของน้ำตาลโดยแปรผันความเข้มข้นระหว่าง 0.2-1.0 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดจะถูกนำมาเปรียบเทียบกับกราฟความเข้มข้นน้ำตาลมาตรฐาน (ในที่นี้ใช้น้ำตาลกลูโคส) ที่ทราบความเข้มข้นแล้ว เพื่อให้ได้กราฟมาตรฐานและเทียบกับค่าที่ได้จากตัวอย่างที่ต้องการ

(2) ความเข้มข้นของเซลล์ในน้ำหมักได้ถูกวัดโดยใช้เครื่องวัดความเข้มของการดูดกลืนแสง หรือ spectrophotometer (UV–vis Spectrometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยตัวอย่างน้ำหมักจะถูกนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำส่วนที่เป็นอาหารเหลว (Supernatant) ทิ้งไป ก่อนที่จะเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้มีปริมาตรเท่าเดิม และ ทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร (OD_{600}) และ เปลี่ยนเป็นความเข้มข้นของเซลล์ (Dry Cell Weight, DCW) ตามสมการ (Narayanan *et al.*, 2004b) โดยที่ OD เท่ากับ 1 มีค่าเท่ากับ 0.34 กรัมต่อลิตรของเซลล์แห้ง

$$C_x = 0.34 \times OD_{600}$$

กราฟมาตรฐาน (standard calibration curve) สามารถสร้างได้โดย ทำการกรองแบคทีเรียกรดแลคติค ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผ่านกระดาษกรองขนาดรูพรุน 13 มิลลิเมตร, 0.2 ไมโครเมตร (Whatman, England) ร่วมกับการใช้สุญญากาศดูดออก และนำกระดาษกรองที่มีเซลล์ติดอยู่ไปอบเพื่อระเหยน้ำออกที่อุณหภูมิ ที่ผ่านการอบให้แห้ง และ ชั่งน้ำหนักมาแล้ว จากนั้นนำกระดาษกรองดังกล่าวไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Mondragón-Parada *et al.*, 2006) ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวัดความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติคนี้ อยู่ที่ ± ร้อยละ 5 ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% อีกทั้งสามารถวัดเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ด้วยการทำ viable cell count ที่มีการเจือจางความเข้มข้นของเซลล์ต่างกัน บ่มในอาหารที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และนับโคโลนีที่เกิดขึ้น โดยค่าที่ออกมาจะเป็นค่า CFU/ml (colony forming unitต่อมิลลิลิตร) (Ghofar *et al.*, 2005)

(3) การวิเคราะห์กรดอินทรีย์ชนิดต่างๆที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักกรดแลคติค โดยที่ตัวอย่างน้ำหมักจะถูกกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอนเพื่อกำจัดเซลล์แบคทีเรีย ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ส่วนตัวอย่างในด้านตัวทำละลายอินทรีย์จะถูกฉีดเข้าเครื่องวิเคราะห์โดยตรง ซึ่งการวิเคราะห์เชิงปริมาณของกรดแลคติค ได้ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC) ที่ใช้ detector เป็น UV detectors คอลัมน์ที่ใช้แยกสารจะเป็นประเภท ion exchange column (Aminex HPX-87H, Biorad, Hercules, CA) และถูกวิเคราะห์ด้วย UV ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร จากนั้นทำ การคำนวณปริมาณของกรดแลคติคเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายตัวอย่างมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ใช้อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และมี 0.005 N H_2SO_4 เป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) เพื่อเป็นตัวนำพาตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์เกิดการแยกสาร ที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ที่อัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที เป็นเวลา 40 นาที (Wee *et al.*, 2004)

ซึ่งผลที่ได้สามารถนำมาใช้หาค่าผลได้ (yield) ค่า productivity และชีวมวล (biomass) สำหรับค่าการเจริญจำเพาะ (μ) สามารถหาได้จากสูตร 1/X.(dX/dt) โดยที่ X คือความเข้มข้นของเซลล์ และ t คือเวลา

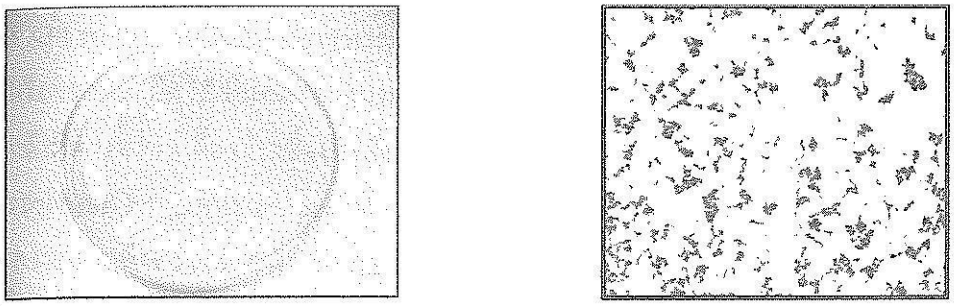
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค

อย่างไรก็ตามกระบวนการทางชีวภาพที่ผลิตกรดแลคติคโดยใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคแทนที่การผลิตโดยใช้กระบวนการทางเคมีนั้น แบคทีเรียกรดแลคติคจะมีกระบวนการที่เรียกว่า bioconversion ที่มีการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้น (น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลซูโครส เป็นต้น) เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการ สำหรับกระบวนการผลิตกรดแลคติคด้วยกระบวนการเคมีและทางชีวภาพนั้นล้วนแต่สามารถผลิตกรดแลคติคเพื่อวัตถุประสงค์ที่หลากหลาย แต่สำหรับกระบวนการทางชีวภาพนั้นมีข้อได้เปรียบมากกว่ากระบวนการทางเคมีมากมาย ตัวอย่างเช่น สามารถมีการใช้สารตั้งต้นที่มีราคาถูก เมื่อเปรียบเทียบกับสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตทางเคมี ใช้อุณหภูมิต่ำในกระบวนการผลิต ดังนั้นจึงก่อให้เกิดการประหยัดพลังงานที่ใช้ในการดำเนินงาน เป็นต้น (Narayanan *et al.*, 2004a) ดังนั้นตามเหตุผลดังกล่าวในงานวิจัยนี้จึงเลือกที่จะศึกษากระบวนการผลิตกรดแลคติคโดยกระบวนการทางชีวภาพ หรือเรียกว่าโดยกระบวนการหมักนั่นเอง

ในการแยกแบคทีเรียกรดแลคติค *L. lactis* ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ โดยดูดเชื้อที่อยู่ในอาหารเหลว MRS มาเจือจางในสารละลายฟอสเฟตบัปเฟอร์ โดยเจือจางลดลงทีละ 10 เท่า และดูดแต่ละความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารวุ้น MRS และใช้เทคนิค spread plate เพื่อให้เชื้อเจริญกระจายตัวในอาหารวุ้น ทำการบ่มประมาณ 24-48 ชั่วโมง จะสังเกตุเห็นเชื้อแบคทีเรียขึ้นบน plate และทำการเขี่ยเชื้อดังกล่าวจำนวน 1 ลูป บนอาหารวุ้น MRS ใหม่อีกครั้งหนึ่ง โดยใช้เทคนิคขีดเชื้อ streak plate ที่จะสามารถแยกโคโลนี่เดี่ยวๆ หลังจากการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 24-48 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน จะได้เชื้อบริสุทธิ์ ที่พร้อมจะนำไปทดสอบต่อไป ทั้งนี้จากผลการทดลอง ได้ทำการแยกเชื้อ *L. lactis* MM12 และทำการทดสอบทางสัณฐานวิทยา (รูปร่าง, ขนาด, ลักษณะโคโลนี, การติดสีย้อม ฯลฯ) ทางสรีรวิทยา (สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ) และทดสอบทางด้านชีวเคมี (ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส การใช้สารตั้งต้น คือ แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ และการใช้น้ำตาลที่หลากหลาย) เพื่อศึกษาสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติคนี้ เพื่อให้สามารถผลิตกรดแลคติคได้ตามต้องการ ผลพบว่าเป็นสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติคที่มีความสามารถในการเจริญเติบโต และสามารถผลิตกรดแลคติคได้

(ก) (ข)



รูปภาพ 7 (ก) แสดงโคโลนีที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ ซึ่งเป็นโคโลนีที่เป็นโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียกรดแลคติค (*L. lactis*)
(ข) แสดงลักษณะ รูปร่าง และการติดสีย้อมของแบคทีเรียกรดแลคติค (แสดงการติดสีม่วงของ crystal violet แสดงความเป็นแบคทีเรียแกรมบวก)

เมื่อทำการคัดเลือกเชื้อที่นำมาศึกษา เพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคนั้นสามารถที่จะแยกแบคทีเรียออกเป็นโคโลนีเดี่ยว ซึ่งมีความสำคัญต่อการจำแนกชนิดและนำไปใช้ในกระบวนการต่างๆ เนื่องจากโคโลนีเดี่ยวนั้นบ่งบอกว่าแบคทีเรียนี้เป็นเชื้อบริสุทธิ์และมีเพียงสายพันธุ์เดียว ไม่มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ตัวอื่น การนำไปใช้ต่อจึงสามารถทำได้สะดวก และไม่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนในกระบวนการหมักได้ อีกทั้งเมื่อได้โคโลนีเดี่ยว จะต้องทำการศึกษารายละเอียดของเชื้อแต่ละชนิด เมื่อทำการศึกษาพบว่า เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้นี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ดูได้จากการติดสีแกรมสีม่วงของคริสตัลไวโอเลต สามารถดูลักษณะ รูปร่าง และขนาดได้จากกล้องจุลทรรศน์ เป็นพื้นฐานส่วนหนึ่งที่สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้ แสดงดังรูปภาพ 7

ในการศึกษาข้างต้นยังไม่สามารถบอกหรือสรุปได้ว่าโคโลนีเดี่ยวๆที่แยกได้ดังกล่าว เป็น *L. lactis* ข้อมูลยังไม่เพียงพอมากนัก ด้วยเหตุนี้จึงต้องมีการศึกษาถึงลักษณะของโคโลนี รูปร่าง เพื่อเทียบกับข้อมูลพื้นฐานที่มีการศึกษามาแล้ว โดยที่จะมีขนาดโคโลนีประมาณ 2-3 มิลลิเมตร *L. lactis* นั้น ลักษณะของโคโลนีที่สามารถมองเห็นบนอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ MRS ชนิดแข็งนั้นจะมองเห็นเป็นโคโลนีสีขาว กลมนูน และเป็นวาว และถ้านำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อความชัดเจนนั้น จะมีลักษณะเป็นรูปร่างกลมคล้ายไข่ อีกทั้งเมื่อมีการทดสอบความสามารถในการหมัก ซึ่งสามารถเจริญได้ดี โดยวัดจากค่าความขุ่น มีความสามารถในการใช้น้ำตาลได้ดี และทำการทดสอบด้วยหลอดดักแก๊ส Duram's tube พบว่าไม่เกิดแก๊ส จากผลเหล่านี้เป็นคุณสมบัติบางอย่างของ *L. lactis* ที่มีความสามารถในการผลิตกรดแลคติคเป็นผลผลิตหลัก อย่างไรก็ตามต้องมีการศึกษาความสามารถในการใช้น้ำตาลหรือ

ทางชีวเคมีในส่วนต่อไป เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองให้น่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น โดยชุดทดสอบทางชีวเคมี API 50 CHL ที่เป็นชุด kit เฉพาะสำหรับทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติค สามารถบ่งบอกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติคได้ ที่แสดงค่าความเชื่อมั่นออกมาเป็นเปอร์เซนต์ ที่เทียบเคียงกับเชื้ออ้างอิงในระบบ ถ้ามีความใกล้เคียงกับเชื้ออ้างอิงมาก นั่นหมายความว่าเชื้อที่สนใจเป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน สามารถบ่งบอก genus และ species ได้ ทั้งยังมีความแม่นยำและเป็นที่ยอมรับสูง หลักการคือศึกษาการหมักของน้ำตาลทั้งหมด 49 ชนิด ใน API 50 CH Strip ระหว่างการบ่มคาร์โบไฮเดรตถูกหมักกลายเป็นกรด ซึ่งมีผลให้ pH ลดลง สังเกตได้จากการเปลี่ยนสีของ indicator ผลชีวเคมีที่ได้ใช้นำมาวิเคราะห์สายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์เป็น *L. lactis* MM12 นั่นเอง ที่มีการทดสอบโดยน้ำตาลชนิดต่างๆ 49 ชนิด ได้ผลดังนี้

ตาราง 3 แสดงผลการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆโดย *Lactococcus lactis*

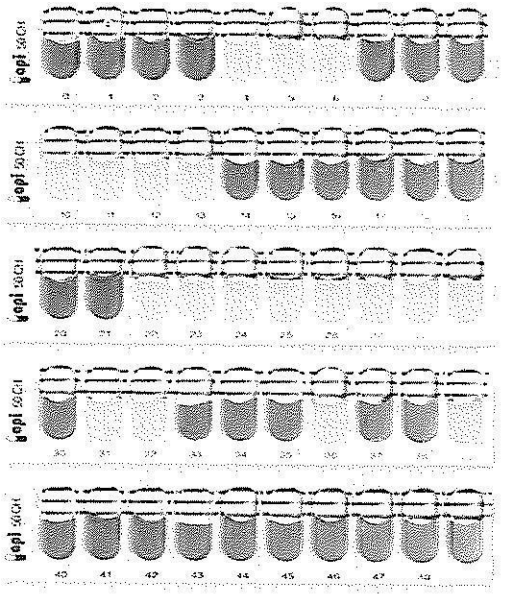
ชนิดของน้ำตาลที่นำมาทดสอบ	การใช้น้ำตาล
Glycerol	-
Erythritol	-
D-arabinose	-
L-arabinose	+
D-ribose	+
D-xylose	+
L-xylose	-
D-adonitol	-
Methyl-βD-Xylopyranoside	-
D-galactose	+
D-glucose	+
D-fructose	+
D-mannose	+
L-sorbose	-
L-rhamnose	-
Dulcitol	-
Inositol	-

ตาราง 4 แสดงผลการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ โดย *Lactococcus lactis* (ต่อ)

ชนิดของน้ำตาลที่นำมาทดสอบ	การใช้น้ำตาล
D-mannitol	-
D-sorbitol	-
Methyl-αD-Mannopyranoside	-
Methyl-αD-Glucopyranoside	-
N-acetylglucosamine	+
Amygdalin	+
Arbutin	+
Esculin	+
Salicin	+
D-cellobiose	+
D-maltose	+
D-lactose (bovine origin)	+
D-melibiose	-
D-saccharose (sucrose)	+
D-trehalose	+
Inulin	-
D-melezitose	-
D-raffinose	-
Amidon (starch)	+
Glycogen	-
Xylitol	-
Gentiobiose	+
D-turanose	-
D-lyxose	-
D-tagatose	-
D-fucose	-

ตาราง 4 แสดงผลการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆโดย *Lactococcus lactis* (ต่อ)

ชนิดของน้ำตาลที่นำมาทดสอบ	การใช้น้ำตาล
F-fucose	-
D-arabitol	-
L-arabitol	-
potassium gluconate	-
potassium 2-ketogluconate	-
potassium 5-ketogluconate	-



รูปภาพ 8 แสดงการเปลี่ยนแปลงปฏิกิริยาของ API 50 CHL test kit ที่ใช้เชื้อทดสอบคือ *L. lactis*

จากการคัดแยกเชื้อจะได้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคหลายชนิด แต่สำหรับ *L. lactis* MM12 นี้จะถูกนำมาใช้ในการทดลองต่อไป เนื่องจากได้มีการศึกษาทบทวนวรรณกรรมจากวารสารอื่นๆว่าสามารถที่จะใช้แป้งเป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดแลคติคได้ (Pattrarakulwanit *et al.*, 2544) ทั้งยังเพื่อให้ตรงตามชื่อหัวข้อเรื่องงานวิจัยนี้อีกด้วย จากการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆของเชื้อ *L. lactis* MM12 สามารถสรุปผลการทดลองโดยการวิเคราะห์ด้วยระบบคอมพิวเตอร์ด้วยโปรแกรม apiweb™ และอ้างอิงที่

แน่นอน พบว่า เปอร์เซ็นต์ในการบ่งบอกชนิดของเชื้อหรือเชื้อที่เราทดสอบคล้ายกับ *L. lactis* ที่เป็นเชื้ออ้างอิง ถึง 99.6 เปอร์เซ็นต์ แสดงผลเป็นดีมาก และมีค่า T-test เท่ากับ 0.95 ที่เชื่อถือได้ทางสถิติ อย่างมีนัยสำคัญ

ตาราง 5 สรุปผลการทดลองจาก API 50 CH tested kit.

Significant strains	Performance of identification	% identity	T-test
L. lactis	Very food identification	99.6	0.95

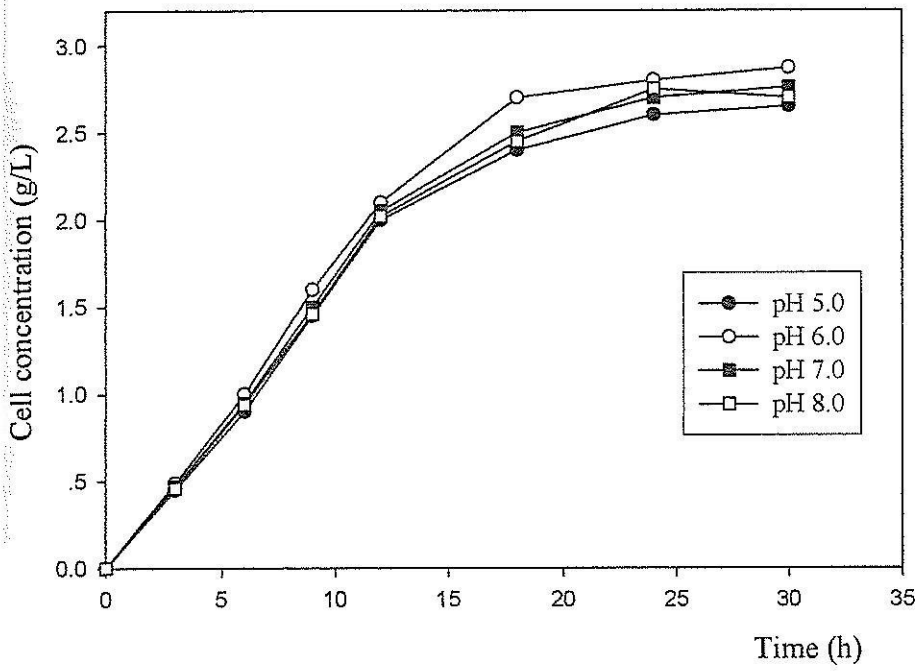
ในงานวิจัยนี้ต้องการใช้สารตั้งต้นเป็นแป้งมันสำปะหลัง แบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังได้จะเกิดประโยชน์เป็นอย่างมาก เนื่องจากแป้งมันสำปะหลังมีคาร์โบไฮเดรตสูงมาก เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารของเชื้อจุลินทรีย์ในการเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆตามชนิดของจุลินทรีย์นั้นๆ ทั้งยังสามารถหาได้ และแหล่งผลิตหลักอยู่ที่จังหวัดนครราชสีมา สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติคนั้นบางชนิดสามารถที่จะย่อยแป้งมันสำปะหลังได้เพื่อที่จะเกิดกระบวนการเมแทบอลิซึมและสร้างผลผลิตเป็นกรดแลคติคที่ต้องการ โดยนับว่าเป็นผลดีต่อกระบวนการหมัก ในงานวิจัยนี้มีความต้องการที่จะพัฒนาผลิตกรดแลคติคในกระบวนการที่แตกต่างและก่อให้เกิดความคุ้มทุนสูงสุด ดังนั้นจึงต้องการแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ดี พร้อมทั้งผลิตกรดแลคติคได้ดีด้วย โดยมีกรดแลคติคเป็นผลผลิตหลักเพียงอย่างเดียว (Homofermentative) โดยเฉพาะ สายพันธุ์ *L. lactis* จากเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคจากการคัดเลือกดังข้างต้นนั้น สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ เพื่อพัฒนาในการศึกษาการผลิตกรดแลคติคจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อดังกล่าว เสริมด้วยสารสกัดยีสต์เหลือทิ้งจากโรงงานผลิตเบียร์ที่เป็นจุดประสงค์หลักของงานวิจัยและเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตอีกด้วย

3.2 การศึกษาผลจากปัจจัยต่างๆที่มีผลการกระบวนการหมักกรดแลคติคโดยเชื้อ *Lactococcus lactis*

สำหรับอุณหภูมิและ pH นั้นถือเป็นปัจจัยหลักในการศึกษาว่ามีผลต่อกระบวนการผลิตกรดแลคติคโดยกระบวนการหมัก เพื่อที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมทั้งสำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคและการผลิตกรดแลคติคในระบบ

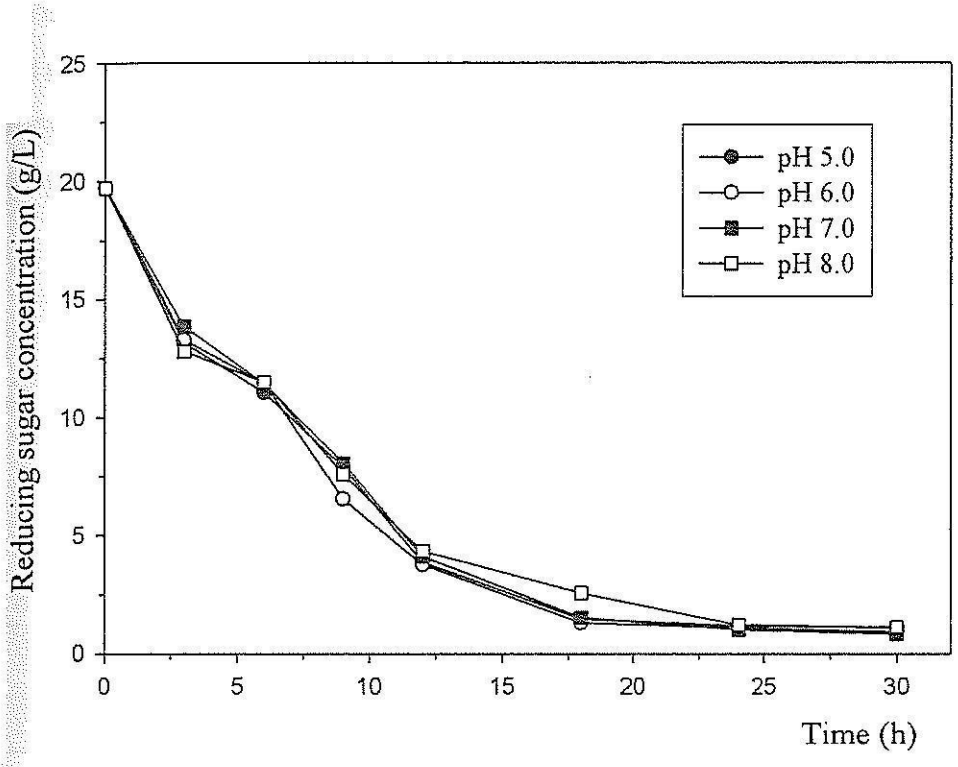
3.2.1 ผลของ pH ในกระบวนการหมักกรดแลคติคโดยเชื้อ *Lactococcus lactis*

ในการทดลองนี้มีการแปรผันค่า pH ระหว่าง 5.0-8.0 มีการกวนที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที สำหรับปริมาณเซลล์ของเชื้อ *L. lactis* (biomass) ที่เกิดขึ้นในระบบ ที่มีการศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ในการผลิตกรดแลคติคโดยวิธีการหมักนั้น จากรูปภาพ 9 พบว่าที่ pH 6.0 ค่า biomass ที่ได้มีปริมาณสูงสุดเมื่อเทียบกับที่ pH 5.0, 7.0, และ 8.0 แต่อย่างไรก็ตามในทุกๆการทดลองที่เวลาหลังจาก 18 ชั่วโมง เซลล์เริ่มคงที่ หรือมีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก อาจเนื่องมาจากมีการเมแทบอไลซ์สารอาหารสมบูรณ์แล้ว (Kotzamanidis *et al.*, 2002) สำหรับบางเอนไซม์ภายในเซลล์มีหมู่ ionic ที่ active site ของเอนไซม์นั้นๆ ถ้าสภาวะเหมาะสมสำหรับบริเวณดังกล่าวจะทำให้เอนไซม์ทำงานได้ดี การเจริญของเซลล์ดีขึ้นตามไปด้วย (Yuwono and Kokugan, 2008) และหาก pH ในระบบมีค่า ต่ำกว่า 3.86 ได้มีรายงานว่า ค่า p*Ka* ของแบคทีเรียกรดแลคติคคือ 3.86 หากเซลล์เจริญในสภาวะที่ต่ำกว่าค่า p*Ka* จะส่งผลต่อเมแทบอลิซึมพร้อมทั้งยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้ (Wasewar, 2005) ดังนั้นหากในน้ำหมักมีค่า pH ที่เป็นกรดหรือด่างมากเกินไปจะทำให้มีผลต่ออัตราการเกิดเมแทบอลิซึมและการผลิตกรดแลคติค และจากกราฟนี้จะแสดงให้เห็นว่า *L. lactis* สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วง pH ที่กว้าง คือตั้งแต่ที่ pH 5.0-8.0 (ตามการทดลองนี้) pH ที่ไม่เป็นกรดมากเกินไป (น้อยกว่า 4.5) หรือไม่เป็นด่างมากเกินไป (มากกว่า 8.0) จะไม่มีผลในกระบวนการหมักมากนัก (Bai *et al.*, 2004;Wee *et al.*, 2004) อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ดำเนินการหมักที่มีการควบคุมค่า pH ให้อยู่ที่ 6.0 ในระบบที่มีการควบคุมค่า pH ระหว่างการหมักในหัวข้อต่อไป



รูปภาพ 9 กราฟแสดงdry cell weight ของกระบวนการหมักที่ค่า pH เริ่มต้นเริ่มต้นต่างกันของเชื้อ *L. lactis*

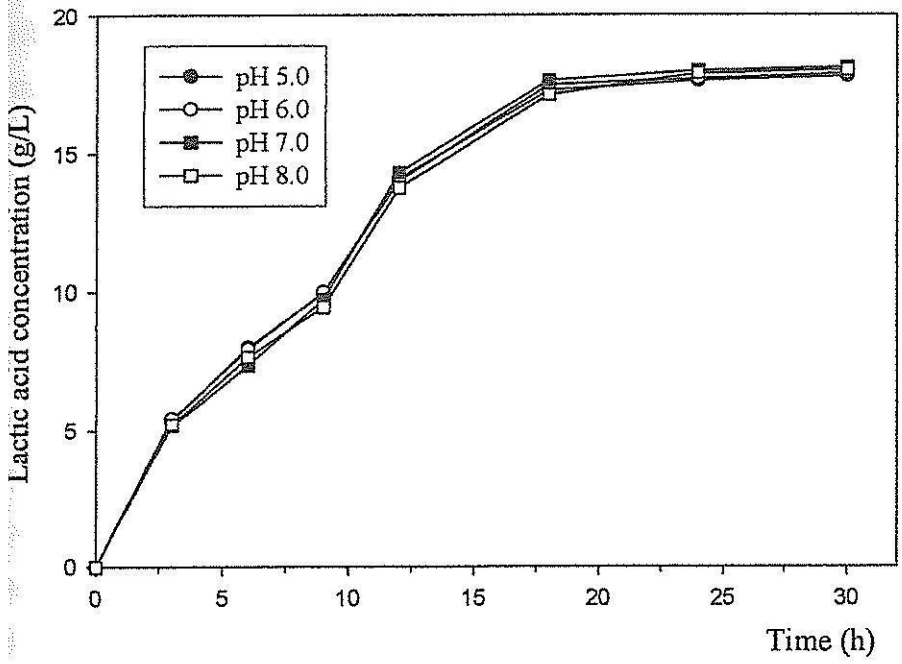
รูปภาพ 10 แสดงถึงการใช้น้ำตาล โดยที่ในการทดลองนี้จะใช้อาหาร MRS ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารของเชื้อ *L. lactis* ซึ่งเมื่อทำการวัดปริมาณการใช้ reducing sugar ที่มีการเปลี่ยนแปลงคือ มีการลดลงเรื่อยๆ ขณะที่มีการแปรผันค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจากกราฟจะพบว่าที่ pH 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 ปริมาณ reducing sugar ลดลงเรื่อยๆตามระยะเวลาที่ผ่านไป โดยเริ่มจากที่ 20 กรัมต่อลิตรจากชั่วโมงที่ 0 (เริ่มต้น) ถึงชั่วโมงที่ 12 พบว่า reducing sugar จะลดลงอย่างรวดเร็ว และหลังจากชั่วโมงที่ 12 เป็นต้นไป ปริมาณ reducing sugar ที่ใช้ไปจะเริ่มลดลงอย่างช้าๆ นั่นคือ *L. lactis* มีการเจริญเริ่มลดลง ส่งผลให้กระบวนการเมแทบอลิซึมที่จะเปลี่ยนแหล่งอาหารหรือแหล่งคาร์บอนซึ่งเป็นน้ำตาลหรือการใช้น้ำตาลลดลงนั่นเอง และการศึกษานี้ก็สอดคล้องกับผลของปริมาณเซลล์ หรือ biomass (รูปภาพ 9)



รูปภาพ 10 กราฟแสดงปริมาณ reducing sugar ที่ถูกใช้ไปในกระบวนการหมักที่ค่า pH เริ่มต้นต่างกันของเชื้อ *L. lactis*

สำหรับการผลิตกรดแลคติคของเชื้อ *L. lactis* สอดคล้องไปตามผลของปริมาณ biomass ที่เกิดขึ้นกับการใช้แหล่งคาร์บอน ทั้งนี้เนื่องจากการที่มี biomass สูง เป็นผลให้การใช้แหล่งคาร์บอนเพิ่มขึ้นไปด้วย ทำให้ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์กรดแลคติค โดยจากชั่วโมงเริ่มต้นชั่วโมงที่ 0 กรดแลคติคจะเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆ จนสิ้นสุดกระบวนการชั่วโมงที่ 30 จะทำการหยุดปฏิกิริยา เนื่องจากเชื้อเริ่มตายลง และไม่มีการสร้างผลิตภัณฑ์อีกต่อไป และสำหรับผลพารามิเตอร์ต่างๆ จากการศึกษาในหัวข้อนี้พร้อมทั้งกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการหมักกับปริมาณกรดแลคติคที่เกิดขึ้น โดยสามารถดูได้จากรูปภาพ 11 และ ตาราง 4 ได้มีการศึกษาจากงานวิจัยต่างประเทศ ซึ่งสามารถระบุได้ว่าความสามารถของเอนไซม์ H+-ATPase ซึ่งเป็นเอนไซมที่เกี่ยวกับการเจริญเติบโตและการใช้แหล่งอาหารต่างๆของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค (Miwa *et al.*, 2000) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Cork และคณะ (2006) พบว่ามีการควบคุมค่า pH ในระหว่างกระบวนการหมักที่ 6.0 จากการเปรียบเทียบค่า volumetric productivity ที่ได้ โดยเชื้อ *Lactococcus lactis* subs *lactis* นั้นแสดงว่าที่ค่า pH ที่เหมาะสมที่จะนำมาทดลองในการผลิตกรดแลคติค (Cock and de Stouvenel, 2006)

ดังนั้นจากการศึกษานี้จึงเลือก ค่า pH ที่เหมาะสมในกระบวนการหมัก คือ ที่ pH 6.0 และในการทดลองศึกษาขั้นต่อไปจะมีการจัดชุดการทดลองที่ pH ดังกล่าว ทั้งนี้ในการศึกษามีความต้องการที่จะหาวิธีการหรือกระบวนการที่จะทำให้ผลิตกรดแลคติคได้เป็นอย่างดี จากนั้นจะมีการนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการผลิตขนาดใหญ่ขึ้นต่อไป



รูปภาพ 11 กราฟแสดงปริมาณกรดแลคติคที่ถูกผลิตในกระบวนการหมักที่ค่า pH เริ่มต้นต่างกันของเชื้อ *L. lactis*

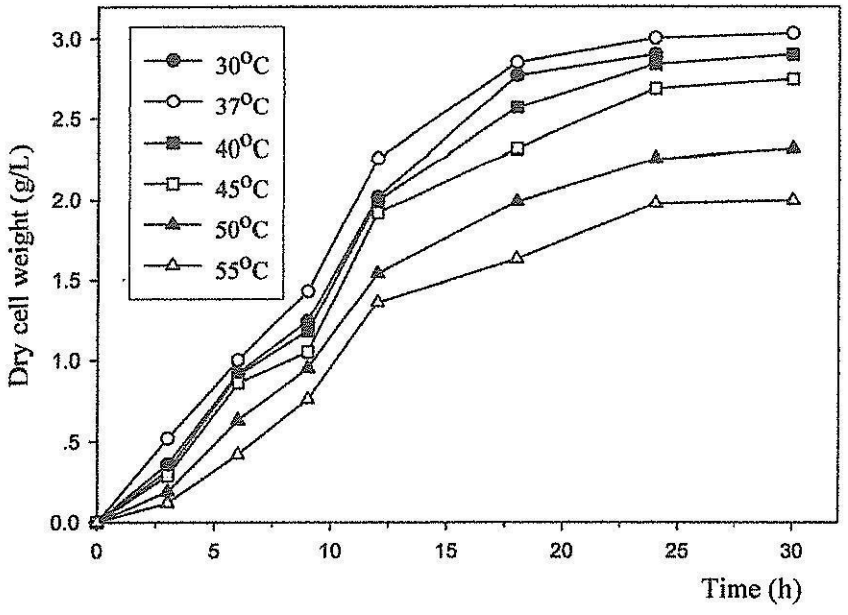
ตาราง 4 ตารางสรุปพารามิเตอร์ต่างๆในกระบวนการผลิตกรดแลคติคโดย *L. lactis* ในการศึกษาผลของ pH เริ่มต้น

ตัวอย่าง	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	Volumetric productivity (g/L/h)
pH 5.0	0.16	0.82	0.96
pH 6.0	0.16	0.83	1.00
pH 7.0	0.16	0.825	0.97
pH 8.0	0.14	0.82	0.96

3.2.2 ผลของอุณหภูมิในกระบวนการหมักกรดแลคติคโดยเชื้อ *Lactococcus lactis*

สำหรับในการทดลองนี้ได้มีการศึกษาผลของอุณหภูมิในกระบวนการหมักกรดแลคติค โดยได้มีการแปรผันอุณหภูมิ ที่ 30, 37, 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ที่ pH 6.0 และมีการกวนที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ทั้งนี้ได้มีการศึกษาอุณหภูมิที่หลากหลาย เนื่องจากทำให้สามารถทราบช่วงและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริบเติบโตของ *L. lactis* ได้ และจากรูปภาพ 12 นั้น เป็นการศึกษาปริมาณ biomass ของเชื้อ *L. lactis* ที่เกิดขึ้น ซึ่งจากความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับ biomass ที่มีการ plot กราฟ เวลาเป็นแกน x และปริมาณ biomass (dry cell weight) ที่มีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร เป็นแกน y โดยจะสังเกตได้ว่าเมื่อเวลาผ่านไป ปริมาณ biomass จะแปรผันตามโดยมีค่าเพิ่มขึ้น จากชั่วโมงเริ่มต้นที่ 0 พบว่า biomass มีปริมาณน้อยมาก และมีการเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆตามทฤษฎีรูปแบบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และหลังจากนั้น ชั่วโมงที่ 6 ถึง ชั่วโมงที่ 12 จะเข้าสู่ระยะ exponential phase หรือ log phase โดยปริมาณ biomass จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ที่มีการเจริญรวดเร็วและสูงสุด จากนั้นจะเริ่มลดลง ทั้งนี้ผลได้สอดคล้องกับกราฟที่แสดงอัตราการเจริญของเซลล์จำเพาะที่เทียบกับเวลาอีกด้วย

จากกราฟจะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นั้นจะมีปริมาณ biomass สูงสุด เชื้อ *L. lactis* นี้จะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ดี เมื่ออุณหภูมิมากกว่า 40 องศาเซลเซียส และในสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว *L. lactis* มีปริมาณมากประมาณ 10^7-10^8 CFU และปริมาณสูงที่สุด ประมาณ 10^9 CFU (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ในระหว่างกระบวนการหมักด้วย และที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณ biomass ต่ำสุด จากผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่า ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมมากที่สุด เนื่องจากมีอุณหภูมิที่สูงเกินไปสำหรับเชื้อ *L. lactis* จะสามารถเจริญเติบโตได้ หรือทำให้เจริญเติบโตได้ไม่ดี ซึ่งผลนี้จะสอดคล้องกับกราฟต่อไปคือกราฟระหว่างระยะเวลาในการหมักกับปริมาณ reducing sugar ที่ถูกใช้ไปในระบบและปริมาณกรดแลคติคที่เกิดขึ้นนั่นเอง



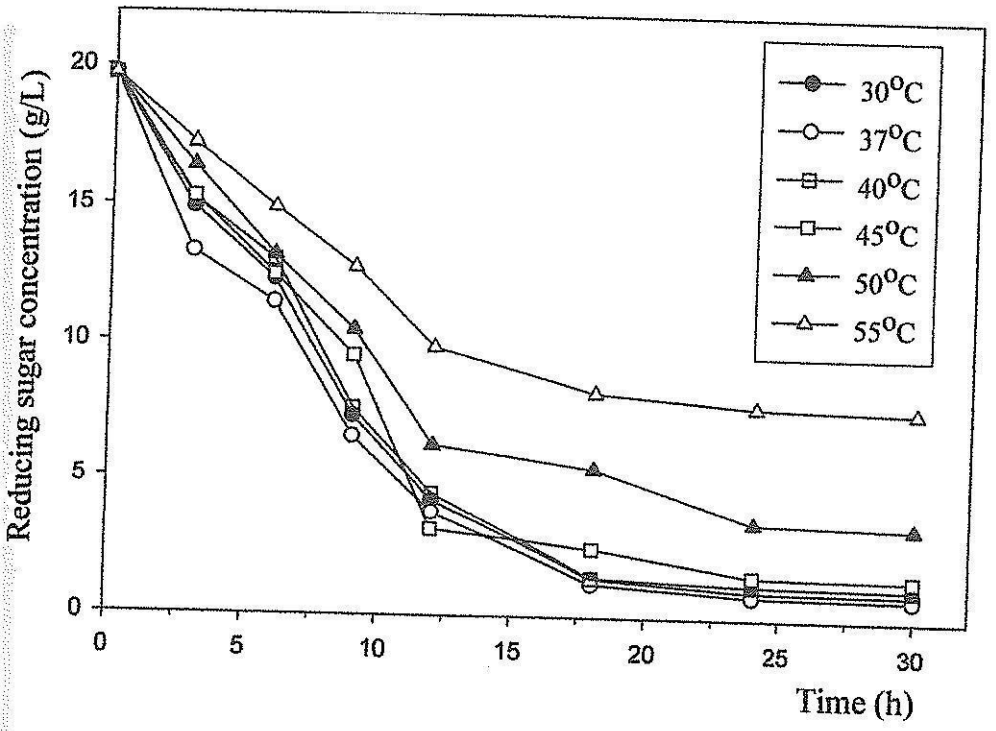
(A)

รูปภาพ 12 กราฟแสดงdry cell weight ของกระบวนการหมักที่อุณหภูมิต่างกันของเชื้อ *L. lactis*

รูปภาพ 13 เช่นเดียวกับ รูปภาพ 10 ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับปริมาณ reducing sugar ที่ใช้ไป ทั้งผลของ pH และอุณหภูมิในกระบวนการหมักที่มีแหล่งคาร์บอนคือน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้นเริ่มต้นคือ 20 กรัมต่อลิตร เมื่อเวลาผ่านไปปริมาณ reducing sugar จะลดลง และใช้หมดไป เมื่อเวลาผ่านไป 30 ชั่วโมง โดยจากกราฟดังกล่าวจะเห็นได้ว่าอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมนั่นคือ อุณหภูมิ ตั้งแต่ 50 องศาเซลเซียสขึ้นไป ปริมาณ reducing sugar ยังเหลือเป็นจำนวนหนึ่งเมื่อสิ้นสุดกระบวนการ หมัก จากรายงานอื่นๆระบุว่าที่อุณหภูมิมากกว่า 50 องศาเซลเซียสและที่ pH ต่ำกว่า 5.0 มีผลต่อการ ทำงานของเอนไซม์สูญเสียไป ทั้งนี้เอนไซม์จะทำงานได้ดี เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม เพื่อการเจริญ ของเซลล์และการสร้างผลิตภัณฑ์ (Bai *et al.*, 2004) อีกทั้งในกระบวนการผลิตกรดแลคติคของ *L. lactis* นั้นจะทำให้เกิดการสร้างผลพลอยได้ (by-product) เกิดขึ้น ซึ่งเป็นสารที่ไม่ต้องการ ไม่ก่อให้เกิดผลดี ทางเศรษฐศาสตร์ ทั้งยังส่งผลไปถึงการแยกผลผลิตออกจากระบบ (Hofvendahl and Hagerdal, 2000) เนื่องจากเป็นการเพิ่มต้นทุนเป็นอย่างมาก จึงต้องมีการควบคุมสภาวะให้ดี เพื่อให้ระบบผลิตกรด แล คติคชนิด L เพียงอย่างเดียว ทั้งนี้ *L. lactis* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติคที่มีคุณสมบัติผลิตกรดแลคติคชนิด L แต่อย่างไรก็ตาม ภายใต้สภาวะที่สารอาหารหมดหรือเหลือน้อย เชื้อแบคทีเรียจะสูญเสีย ความสามารถในการผลิตกรดได้อย่างเดียว (homolactic acid) โดยจะผลิตผลิตภัณฑ์ชนิดอื่น ๆ ด้วย เช่น

ฟอร์เมต หรือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อะซีเทต และเอทานอล จะสังเกตุได้เมื่อเชื้อมีอัตราการเจริญต่ำ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอนที่จำกัด (Fordyce *et al.*, 1984) และอาจเกิดขึ้นได้ในระหว่างการเจริญโดยใช้น้ำตาลมอลโตสอีกด้วย (Garrigues *et al.*, 1997)

ตรงกันข้ามกับที่อุณหภูมิ 30-45 องศาเซลเซียสนั้น *L. lactis* สามารถนำไปใช้ได้หมดโดยดูจากเส้นกราฟเกือบเข้าใกล้ 0 ไม่เหลือในน้ำหมัก ส่งผลไปถึงกระบวนการแยกผลิตภัณฑ์ขั้นตอนสุดท้ายจะทำได้ง่ายตามไปด้วย และที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ปริมาณการนำน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar)ไปใช้ ใกล้เคียงกันมาก อย่างไรก็ตามอุณหภูมิห้องทั่วไปในประเทศไทยอยู่ในช่วงประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสสำหรับกระบวนการหมักในหัวข้อต่อไป เนื่องจากเป็นค่าอุณหภูมิที่ไม่ต้องมีการให้ความร้อน เนื่องจากที่ใกล้เคียงกับอุณหภูมิห้อง การศึกษานี้เป็นการศึกษาในระดับทดลองในห้องปฏิบัติการ ที่มีการใช้เครื่องมือเป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดเล็ก จะเกิดความร้อนระหว่างกระบวนการหมัก จะเกิดไม่มากนัก อีกทั้งมีวารสารที่มีการทดลองที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในการผลิตกรดแลคติคโดยเชื้อ *L. lactis* เช่นเดียวกัน (Akerberg *et al.*, 1998;Hofvendahl, 1998b) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสอาจจะต้องมีการใช้เครื่องทำความร้อนเพื่อให้เพิ่มเป็น 37 องศาเซลเซียส ซึ่งก็นับว่าเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตอีกทางหนึ่ง ตรงกันข้ามกับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสสามารถควบคุมได้ง่าย และไม่ต้องเพิ่มต้นทุนในการให้ความร้อน เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศเขตร้อนอยู่ด้วย และเมื่อจัดชุดการทดลองในห้องปฏิบัติการอุณหภูมิจะอยู่ในช่วง 30 องศาเซลเซียสตามปกติ ซึ่งเมื่อมีการควบคุมสภาวะอื่นๆเช่น pH ที่เหมาะสม อาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ก็จะสามารถดำเนินกระบวนการหมักได้เป็นอย่างดี ตรงตามวัตถุประสงค์เพื่อให้เกิดการผลิตกรดแลคติคตามต้องการ

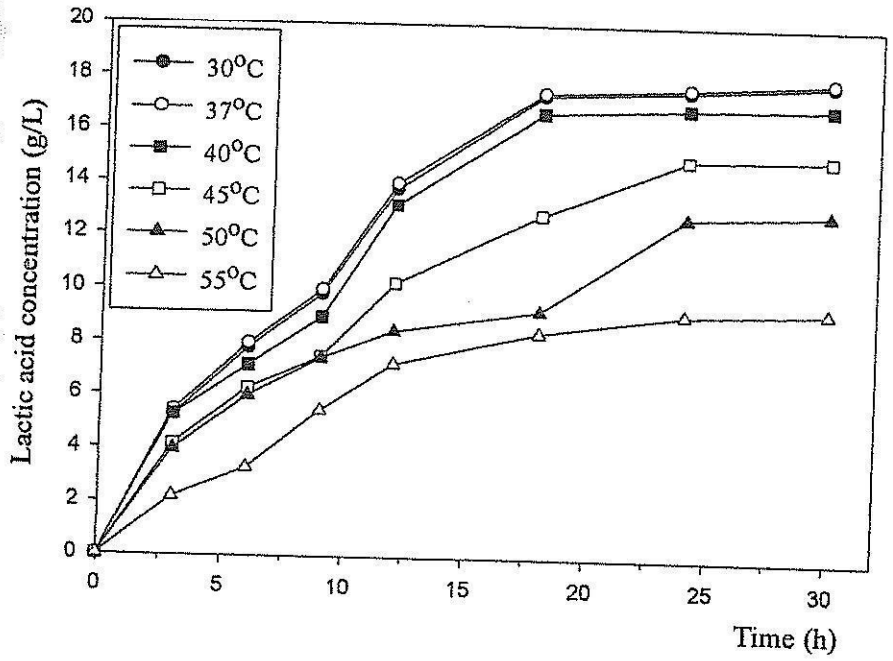


รูปภาพ 13 กราฟแสดงปริมาณ reducing sugar ที่ใช้ไปในกระบวนการหมักที่อุณหภูมิต่างกันของเชื้อ *L. lactis*

จากตาราง 5 และ รูปภาพ 14 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความสามารถในการใช้น้ำตาลใกล้เคียงกับ ที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส แต่การผลิตกรดแลคติคจะน้อยกว่า อาจเนื่องมากจากมีการใช้น้ำตาลเพื่อเจริญ แต่ไม่สร้างผลผลิต อีกทั้งที่อุณหภูมิดังกล่าวอาจมีผลต่อเอนไซม์ของเซลล์ภายในได้ (Tango and Ghaly, 1999) ทำให้ความเข้มข้นของกรดแลคติคที่ผลิตได้มีค่าน้อยกว่าที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าถ้าอุณหภูมิในกระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 50 และ 55 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *L. lactis* สามารถใช้สารอาหารหรือวัตถุดิบเพื่อผลิตกรดแลคติคได้ แต่นำมาใช้ได้น้อย และค่า pH ต่ำกว่า 5.0 ค่า $Y_{P/S}$ และค่า $Y_{X/S}$ รวมกันนั้นควรมีค่าน้อยกว่า 1.00 เนื่องจากในการเจริญและการสร้างผลผลิตของเซลล์แบคทีเรียมีการสูญเสียไปกับการรักษาสภาพเซลล์ (maintenance) สำหรับการผลิตกรดแลคติคโดยเชื้อ *L. lactis* ซึ่งที่สภาวะนี้จะส่งเสริมให้เกิดการสร้างผลพลอยได้อื่นๆ (By-product formation) ขึ้น (Akerberg *et al.*, 1998) ด้วยเหตุผลที่ว่าเกิดจาก proteolytic activity and diacetyl formation ภายในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเชื้อ *L. lactis* (de Giori *et al.*, 1986) นั่นเอง

ตาราง 5 ตารางสรุปพารามิเตอร์ต่างๆในกระบวนการผลิตกรดแลคติคโดย *L. lactis* ในการศึกษาผลของอุณหภูมิ

ตัวอย่าง	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	Volumetric productivity (g/L/h)
30°C	0.15	0.83	0.966
37°C	0.16	0.84	0.97
40°C	0.15	0.82	0.93
45°C	0.147	0.82	0.71
50°C	0.139	0.79	0.53
55°C	0.1	0.77	0.47

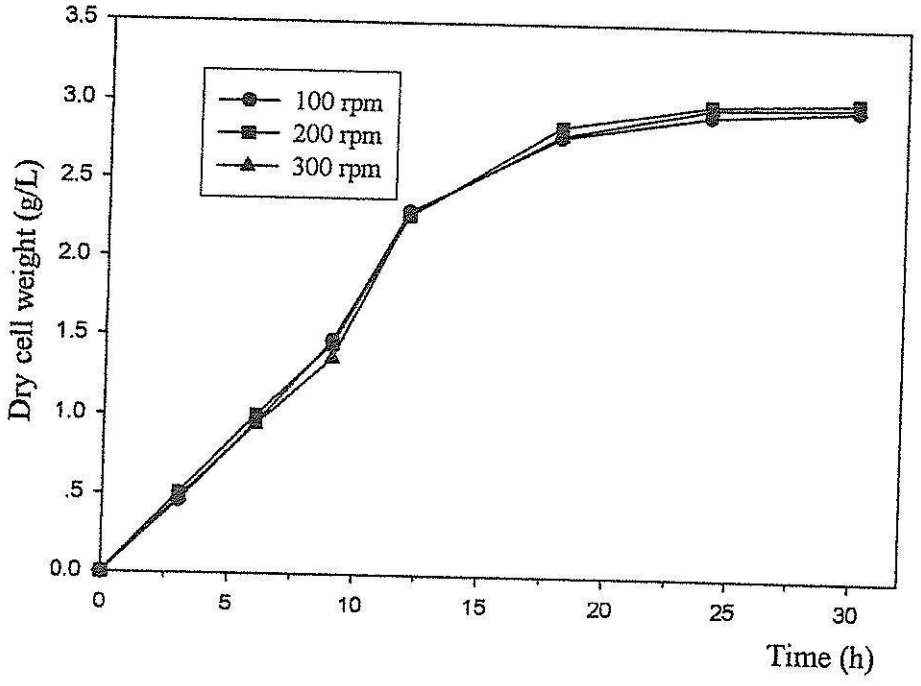


รูปภาพ 14 กราฟแสดงปริมาณกรดแลคติคที่ผลิตขึ้นในกระบวนการหมักที่อุณหภูมิต่างกันของเชื้อ *L. lactis*

ดังนั้น จากการศึกษาทั้ง 2 หัวข้อที่ผ่านมาคือ ผลของ pH และอุณหภูมิต่อการผลิตกรดแลคติค นั้นสามารถแสดงได้ว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและที่ pH 6.0 เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับงานวิจัยนี้ ในทุกค่าพารามิเตอร์ต่างๆ เช่น การใช้แหล่งคาร์บอนและการผลิตกรดแลคติค เป็นต้น และสามารถนำไปใช้ได้สำหรับทุกการทดลองในการศึกษาต่อไปในงานวิจัยนี้

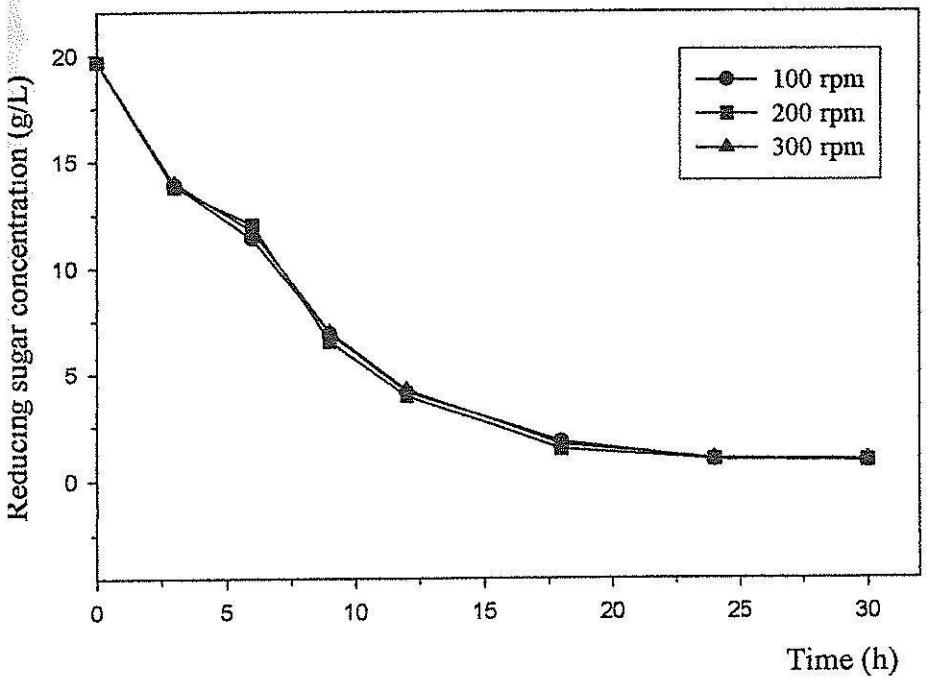
3.2.3 ผลของอัตราการกวนในกระบวนการหมักกรดแลคติคโดยเชื้อ *Lactococcus lactis*

เมื่อทำการศึกษาผลของอัตราการกวนในการผลิตกรดแลคติค ที่ pH เริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการกวนใบพัด 100, 200, และ 300 รอบต่อนาที ดังแสดงในรูปภาพ 15 พบว่าปริมาณ biomass ทั้งสามอัตราการกวนใกล้เคียงกัน แต่อย่างไรก็ตามเมื่ออัตราการกวนสูงขึ้น ได้มีการศึกษาของ Senthuran และคณะ (1999) พบว่าเป็นผลให้ปริมาณ biomass ลดลง เนื่องจากเซลล์ได้รับผลกระทบจากแรงเฉือน (shear force) อันเนื่องมากจากความเร็วในการกวนของใบพัดที่เพิ่มขึ้น (Senthuran *et al.*, 1999) ตรงกันข้ามกับถ้าหากอัตราเร็วในการกวนน้อยทำให้เซลล์สัมผัสกับสารอาหารได้ไม่ดีเช่นเดียวกัน ดังนั้นเป็นเหตุผลให้มีการศึกษาค่าที่เหมาะสมในการจัดชุดการทดลองนี้ตามการทบทวนวรรณกรรมของนักวิจัยผู้อื่นๆที่ได้ทำการศึกษามาแล้ว



รูปภาพ 15 กราฟแสดง dry cell weight ของกระบวนการหมักที่อัตราการกวนต่างกันของเชื้อ *L. lactis*

จาก รูปภาพ 16 การใช้ปริมาณ reducing sugar จะมีค่าลดลงตามระยะเวลาที่ผ่านไป โดยอัตราการลดลงหรือการเปลี่ยนแปลงปริมาณ reducing sugar นั้นจะสัมพันธ์กับกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับปริมาณ biomass เพราะถ้ามีปริมาณ biomass มากก็จะส่งผลให้ดึงสารอาหารมาใช้ได้ดีปริมาณ reducing sugar จะลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่ในกราฟนี้นั้นระหว่างกราฟ 3 เส้นนี้ ค่อนข้างไม่แตกต่างกันเลย และ ตาราง 6 เป็นการเปรียบเทียบอัตราการกวนเป็น 100, 200, 300 รอบต่อนาทีนั้น พบว่าใกล้เคียงกันมาก เนื่องจากว่าอัตราการกวนนั้นอยู่ในช่วงที่เหมาะสม ไม่เร็วหรือช้าเกินไปสำหรับการที่จะผสมเพื่อให้เชื้อ *L. lactis* สามารถสัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อได้นั่นเอง

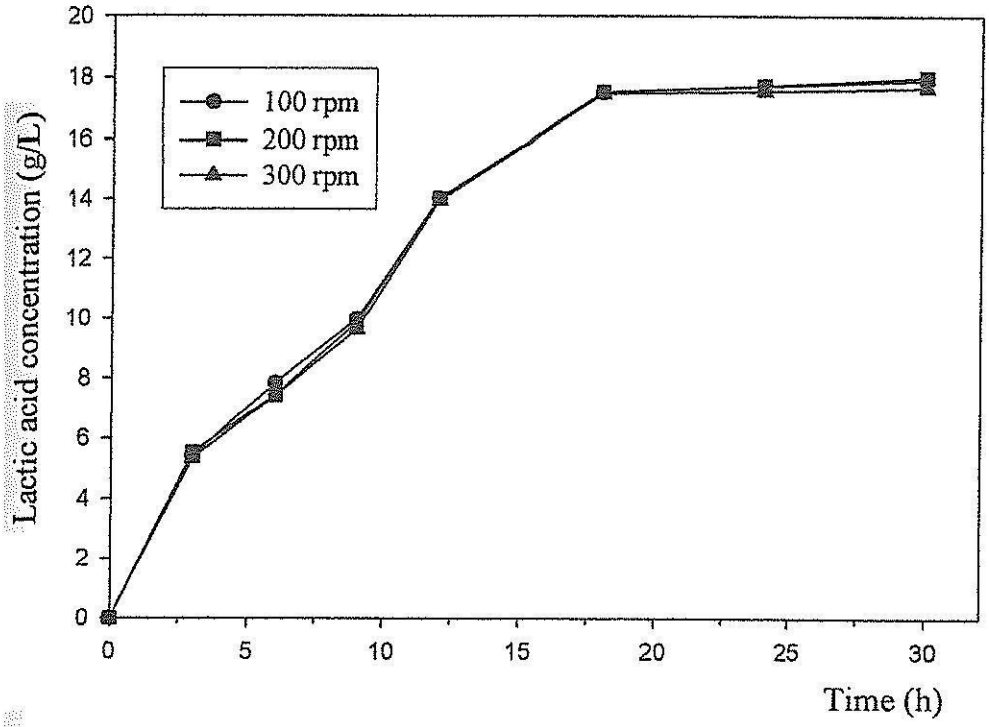


รูปภาพ 16 กราฟแสดงปริมาณ reducing sugar ที่ใช้ไปในกระบวนการหมักที่อัตราการกวนต่างกันของเชื้อ *L. lactis*

ตาราง 6 ตารางสรุปพารามิเตอร์ต่างๆในกระบวนการผลิตกรดแลคติคโดย *L. lactis* ในการศึกษาผลของอัตราการกวน

ตัวอย่าง	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	Volumetric productivity (g/L/h)
100 rpm	0.16	0.825	0.972
200 rpm	0.16	0.83	0.973
300 rpm	0.159	0.82	0.97

จาก รูปภาพ 17 แสดงผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น หรือ เรียกว่า Product yield หมายความว่า จำนวนกรัมของกรดแลคติคที่ผลิตได้ต่อจำนวนกรัมของน้ำตาลกลูโคสหรือสารตั้งต้นที่ถูกใช้ไป นั่นคือ มีค่า $Y_{X/S}$ เป็น 0.16, 0.16 และ 0.159 ค่า $Y_{P/S}$ เป็น 0.945, 0.947, 0.94 และค่า volumetric productivity เป็น 0.972, 0.973, และ 0.97 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับจากที่อัตราการกวน 100, 200, และ 300 รอบต่อนาที โดยจะสามารถสร้างกรดแลคติคได้ปริมาณประมาณ 18 กรัมต่อลิตร ด้วยผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกันนี้ จึงเลือกที่จะใช้ความเร็วรอบที่ 200 รอบต่อนาที เนื่องจากในการทดลองหัวข้อต่อไปมีการใช้แป้งในน้ำหมัก ซึ่งแป้งนี้จะมีการตกตะกอนแยกชั้นได้ หากใช้ที่ 100 รอบต่อนาทีมีการใช้พลังงานที่ต่ำกว่า การผสมไม่ทั่วถึงมากนัก อาจส่งผลต่อการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ต่อไป ทั้งนี้ได้ยึดถือตามวารสารงานวิจัยที่ศึกษามาก่อนที่มีศึกษาคล้ายกับงานวิจัยนี้ โดยใช้แป้งชนิดต่างๆเป็นวัตถุดิบ และใช้เชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84 ในกระบวนการหมัก (Petrov *et al.*, 2008)



รูปภาพ 17 กราฟแสดงปริมาณกรดแลคติคที่ถูกผลิตขึ้นในกระบวนการหมักที่อัตราการกวนต่างกันของเชื้อ *L. lactis*

ในการจัดชุดการทดลองในหัวข้อต่อไป เนื่องจากว่าหัวข้อต่อไปจะมีการปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวัตถุดิบต่างๆ ซึ่งอาจจะมีความหนืดต่างๆกัน ดังนั้นที่ 200 รอบต่อนาที เป็นอัตราการกวนที่ที่จะผสมอาหารให้เข้ากันพร้อมกับให้เชื้อสัมผัสและใช้อาหารได้ดี อีกทั้งในการกวนความเร็วขณะนี้ไม่ก่อให้เกิดความร้อนและใช้พลังงานไม่มากนัก แต่ถ้าใช้อัตราการกวนมากกว่านี้ อาจจะทำให้เกิดความร้อนขึ้นได้และสิ้นเปลืองพลังงานโดยใช่เหตุ อย่างไรก็ตามการที่กวนส่วนประกอบในกระบวนการหมักนั้น ถือว่ามีความสำคัญ เนื่องจากว่าได้มีการศึกษา (Atkinson and Mavituna, 1985) กระบวนการหมักที่ไม่มีการกวนเปรียบเทียบกับมีการกวน พบว่าการที่ตั้งอาหารเลี้ยงเชื้อไว้นิ่งๆ ไม่มีการกวนผสมเซลล์ไม่มีการสัมผัสกับอาหารได้โดยตรง ดังนั้นเซลล์ที่เกิดขึ้น (biomass) จะเกิดการตกตะกอนลงก้นถังหมัก และไม่สามารถใช้อาหารเลี้ยงเชื้อได้เต็มที่ อีกทั้งการนำไปวิเคราะห์ปริมาณ biomass ได้ผลที่ไม่ถูกต้องเนื่องจาก อาหารเลี้ยงเชื้อมีความขุ่นที่ไม่สม่ำเสมอ ถือว่าไม่สามารถที่จะสุ่มตัวอย่างที่เป็นตัวอย่างทั้งหมดจากน้ำหมักได้ แต่ถ้ามีการกวนผสมแล้วนั้นจะเกิดการรวมเป็นเนื้อเดียวกัน

(Homogeneous) ทำให้สุ่มตัวอย่างไปวิเคราะห์และได้ผลเชื่อถือได้ และเป็นตัวแทนของตัวอย่างทั้งหมดของน้ำหมัก

3.3 การศึกษาผลของการปรับเปลี่ยนองค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติคโดยเชื้อ *Lactococcus lactis*

สิ่งที่งานวิจัยนี้ต้องการทำให้เกิดผลสำเร็จ นั่นคือ มีการพัฒนาสูตรอาหารสำหรับ *L. lactis* เพื่อให้เกิดการสร้างผลิตกรดแลคติคในกระบวนการหมักได้ อีกทั้งความสามารถของ *L. lactis* จะมีคุณสมบัติที่เด่นคือ เป็น homofermentative และเกิดกระบวนการ homofermentative pathway ที่มีการสร้างสารชนิดเดียวเป็นผลผลิตหลัก ในที่นี้คือ กรดแลคติค โดยสามารถวิเคราะห์ผลโดยเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ที่มีความถูกต้องแม่นยำ และพบว่าจะไม่มีการสร้างสารตัวอื่นๆ เช่น กรดอะซิติค กรดฟอร์มิค เป็นต้น หรืออาจสร้างในปริมาณที่น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับกรดแลคติคที่ผลิตได้ แต่การที่สามารถวัดผลการทดลองซึ่งมีกรดอะซิติคเกิดขึ้นนั้น อันเนื่องมาจากในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีส่วนประกอบที่เป็น sodium acetate อยู่แล้ว แต่มีเพียงเริ่มต้นกระบวนการหมักเท่านั้น แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปจะมีการผลิตกรดอะซิติคเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ดังนั้นเมื่อเวลาตรวจวัดผลจึงปรากฏเห็นได้ที่ชั่วโมงที่ 0 หลังจากกระบวนการหมักเริ่มขึ้น เชื้อ *L. lactis* มีการใช้สารอาหารในน้ำหมักไปและเมื่อตรวจผลที่ชั่วโมงต่างๆจนสิ้นสุดกระบวนการหมักสามารถผลิตกรดแลคติคเป็นผลิตภัณฑ์หลัก (major product) ในระบบได้ แต่อย่างไรก็ตามในกระบวนการหมักที่อยู่ในสภาวะไม่เหมาะสมหรือมีข้อจำกัดด้านอาหารอาจมีการเปลี่ยนกระบวนการเมแทบอลิซึมเป็นการหมักที่ผลิตสารอื่นนอกเหนือจากกรดแลคติค ทำให้ได้ yield ออกมาต่ำได้

3.3.1 ผลของน้ำตาลต่างๆในการผลิตกรดแลคติค

สำหรับการผลิตกรดแลคติคโดยวิธีการทางชีวภาพนั้นจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลง จากน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส หรือ แลคโตส เป็นต้น ร่วมกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียทำให้เปลี่ยนแปลงไปเป็นผลิตภัณฑ์กรดแลคติคเกิดขึ้น อีกทั้งการใช้พลังงานในการผลิตทางชีวภาพจะมีการใช้น้อยกว่า เนื่องจากมีการใช้กระบวนการปฏิกิริยาภายในของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคนั่นเอง (John *et al.*, 2007) สำหรับลักษณะรูปแบบการเจริญเติบโตที่ได้มีการทดลองเปรียบเทียบภายใต้หลายๆสภาวะการเจริญนั้น มีการสนใจศึกษากระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต หรือกระบวนการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆของเชื้อ *L. lactis* ที่นำมาศึกษา

ในการทดลองนี้จะมีการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่มีผลต่อกระบวนการผลิตกรดแลคติค อีกทั้งศึกษาแหล่งคาร์บอนที่สามารถนำมาแทนน้ำตาลเพื่อเป็นการลดต้นทุนในกระบวนการผลิต จากการศึกษามานั้นพบว่ามีงานวิจัยที่ได้มีการศึกษากระบวนการผลิตกรดแลคติคจากน้ำตาลกลูโคส ซึ่งน้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลประเภทโมโนแซคคาไรด์ (monosaccharide) มีความสำคัญที่สุดในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตด้วยกัน เซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงานหรือสารอาหาร ผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรีย เช่น สายพันธุ์ *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) และ *L. lactis* subs *lactis* มีความสามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีที่สุด (Cock and de Stouvenel, 2006;Wee *et al.*, 2004) เนื่องจากน้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ทำให้จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ทันทีโดยไม่จำเป็นต้องผ่านการย่อยหรือกระบวนการซับซ้อนอื่นๆ มีการใช้และเปลี่ยนเป็นเป็นผลผลิตที่ต้องการ แต่เนื่องจากว่าน้ำตาลกลูโคสนั้นมีราคาค่อนข้างแพง ถือว่าเป็นการเพิ่มต้นทุนการในผลิต จึงไม่เหมาะกับการพัฒนาในระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ได้ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาสารอาหารอื่นที่มีความสามารถในการทดแทนได้ อีกทั้งเป็นการลดต้นทุนการผลิตได้อีกทางหนึ่ง และในงานวิจัยนี้จึงได้มีการศึกษาสารอาหารต่างๆหลายชนิดในการผลิตกรดแลคติค โดยในขั้นต้นจะเป็นการศึกษาการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆของเชื้อ *L. lactis* เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลซูโครส แมนนิทอล น้ำตาลทรีฮาโลส และน้ำตาลแลคโตส ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลชนิดที่มีในแป้งมันสำปะหลังและชนิดที่ไม่มีในแป้ง เนื่องจากเป็นการศึกษาทดลองเพื่อให้ได้ข้อมูลที่หลากหลาย อีกทั้งในอนาคตอาจมีการใช้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาน้ำตาลดังกล่าวให้เกิดประโยชน์ต่อไปได้ ในปริมาณที่ใช้ศึกษาคือ 20 กรัมต่อลิตร และเสริมด้วยแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารสกัดยีสต์ทางการค้า (Selmer-Olsen and Soerhaug) และเพิ่มเติมแร่ธาตุและวิตามินต่างๆ โดยมีอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS เป็นพื้นฐาน เนื่องจากเป็นอาหารที่เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคเจริญเติบโตได้ดีที่สุด ทั้งนี้เพื่อที่จะต้องการเปรียบเทียบกับอาหารมาตรฐาน ซึ่งต้องควบคุมส่วนประกอบต่างๆให้เหมือนกัน เปลี่ยนแปลงเฉพาะพารามิเตอร์ที่ต้องการศึกษาเท่านั้นโดยที่แหล่งคาร์บอนของเชื้อส่วนใหญ่เป็นพวกน้ำตาลเช่น น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และแล็กโตส ถือว่าเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดี ส่วนน้ำตาล อะราบิโนส แมนนิทอล และทรีฮาโลส จะใช้ได้ไม่ค่อยดี ดังแสดงตามผลการทดลองแสดงใน ตาราง 7

จากตาราง 7 พบว่าปริมาณกรดแลคติคที่ *L. lactis* ในการใช้ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลซูโครส แมนนิทอล น้ำตาลทรีฮาโลสและน้ำตาลแลคโตส ผลิตได้เท่ากับ 17.68 17.09 13.18 15.93 12.30 13.01 และ 16.87 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยที่เชื้อ *L. lactis* สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเปลี่ยนเป็นผลิตกรดแลคติคได้สูงสุด รองลงมาคือน้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลแลคโตส สำหรับน้ำตาลแมนนิทอลเชื้อนำไปใช้ได้น้อยที่สุด จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *L. lactis*

สามารถใช้น้ำตาลสำหรับการเจริญเติบโตได้หลากหลายชนิด พบรายงานวิชาการระบุไว้โดยมีการยกตัวอย่างน้ำตาลชนิดอื่นๆเช่น น้ำตาลกาแลคโตส โดยมีกระบวนการเมแทบอลิซึมเป็นดังนี้ คือ น้ำตาลกาแลคโตส จะแพร่ผ่าน lactose–galactose antiport mechanism (Hutkins and Morris, 1987) เพื่อนำเข้าสู่เซลล์ไปใช้ในกระบวนการเมตอบอลิซึมโดยเชื้อ *Lactococcus* strains ที่มีทั้ง β-galactosidase และ β-*P*-galactosidase (Thomas and Crow, 1984) เป็นตัวช่วยที่จะใช้น้ำตาลกาแลคโตสได้

ตาราง 7 แสดงการเปรียบเทียบการผลิตกรดแลคติคจากแหล่งคาร์บอนต่างๆโดยเชื้อ *Lactococcus lactis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีการดัดแปลง โดยที่มีแหล่งคาร์บอนปริมาณ 20 กรัมต่อลิตรและแหล่งไนโตรเจนคือ commercial yeast extract ปริมาณ 15 กรัมต่อลิตร

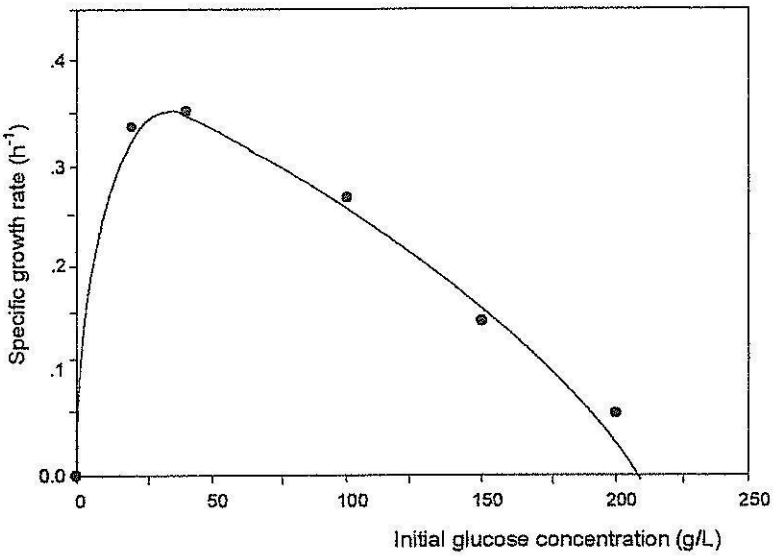
แหล่งคาร์บอน	ความเข้มข้นกรดแลคติค (กรัมต่อลิตร)			
	6 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	18 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
Glucose	9.78	14.54	16.62	17.48
Fructose	7.6	13.96	16.11	17.09
Arabinose	4.94	10.14	12.09	13.18
Sucrose	7.34	12.38	14.14	15.93
Mannitol	5.94	11.34	11.52	12.30
Trehalose	6.8	10.98	12.24	13.01
Lactose	9.44	14.13	15.89	16.87

แต่อย่างไรก็ตามหากน้ำตาลนั้นไม่เหมาะสม เช่น เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถนำไปใช้ในการเจริญและการสร้างผลผลิต ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมและกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆภายใน ทำให้มีความแตกต่างกันในการเจริญและการสร้างผลผลิต อีกนัยหนึ่งจะสรุปได้ว่าเชื้อ *L. lactis* ถือเป็น homofermentative lactic acid bacteria คือสามารถผลิตกรดแลคติคได้เป็นผลิตภัณฑ์หลัก และในปริมาณที่สูง ดังนั้นจึงมีการศึกษาแหล่งคาร์บอนอื่นๆมาทดแทน เพื่อให้มีต้นทุนถูกเช่นเดียวกัน

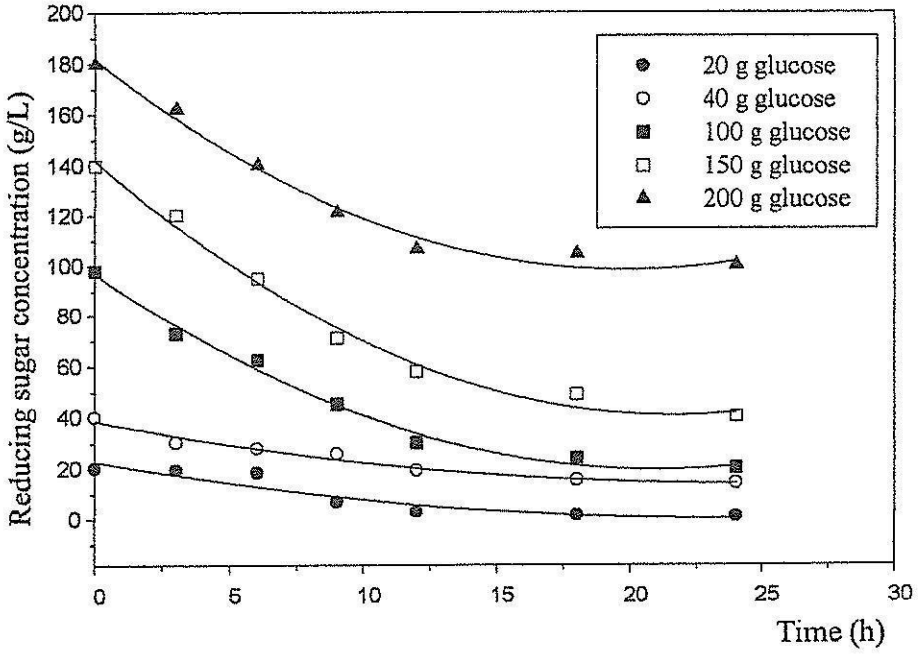
3.3.2 ผลความเข้มข้นของกลูโคสในการผลิตกรดแลคติค

น้ำตาลชนิดต่างๆนั้น มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นสารตั้งต้นหรือแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลคติค และในการทำให้กรดแลคติคมีความบริสุทธ์ มีสารปนเปื้อนจากผลพลอยได้ต่างๆน้อย เนื่องจากสามารถเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดแลคติคได้เกือบทั้งหมด กระบวนการสกัดจึงง่ายกว่า สำหรับการผลิตกรดแลคติคจากวัตถุดิบจำพวกลิกโนเซลลูโลสนั้นมีการศึกษา (Tong *et al.*, 2004) โดยในกระบวนการจะต้องมีการย่อยวัตถุดิบดังกล่าวด้วยวิธีทางเคมีคือ มีการใช้เอนไซม์เพื่อย่อยเซลลูโลสเพื่อให้เป็นโมเลกุลที่เล็กลงหรือเรียกกระบวนการนี้ว่า enzymatic saccharification (Naveena *et al.*, 2005) ให้ได้เป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ เพื่อง่ายต่อการนำไปใช้ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคในกลุ่ม *Lactobacillus* species. แต่อย่างไรก็ตามในการผลิตกรดแลคติคโดยเชื้อจุลินทรีย์ผ่านกระบวนการหมักนั้นมีปัจจัยสำคัญหลายอย่าง เช่น pH อัตราการกวน แหล่งคาร์บอน อุณหภูมิ ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณของหัวเชื้อเริ่มต้น ความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นและรูปแบบกระบวนการหมัก (continuous, fed-batch หรือ batch fermentations) (Tada *et al.*, 2007)

เป็นที่ทราบโดยทั่วกันว่าน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดของจุลินทรีย์ทุกชนิด เนื่องจากสามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ทันที และได้มีการศึกษาถึงผลของความเข้มข้นในกระบวนการผลิตกรดแลคติค โดยมีความเข้มข้นตั้งแต่ 25-200 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อค่าความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสจากเริ่มต้นคือ 25-200 กรัมต่อลิตรนั้น ความเข้มข้นของกรดแลคติคที่ผลิตได้สูงขึ้นตามลำดับ ตรงกันข้ามถ้าหากความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมากกว่า 150 กรัมต่อลิตร (ดัง รูปภาพ 20) การผลิตกรด แลคติคจะลดลงเนื่องจากความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมากเกินไป ดังแสดงใน รูปภาพ 18 ค่า specific growth rate (μ) คือที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร เท่ากับ 0.37 ต่อชั่วโมง ทั้งนี้การผลิตกรดแลคติคจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาล จนกระทั่งที่ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์เริ่มมีการตายลง และตายมากที่สุดที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร สำหรับรูปภาพ 19 แต่อย่างไรก็ตามก็ยังคงเหลือน้ำตาลกลูโคสในน้ำหมัก ซึ่งจะแสดงว่าอาจเกิดวิกฤติการณ์การยับยั้งกระบวนการโดยความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่มากเกินไป (Bulut *et al.*, 2004) เช่นเดียวกับที่มีการศึกษาเกี่ยวกับผลของความเข้มข้นกลูโคส เบื้องต้นว่าอาจเกิดการยับยั้งกระบวนการโดยความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่มากเกินไป (Hamamci and Ryu, 1994)



รูปภาพ 18 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นกับค่า specific growth rate (μ)



รูปภาพ 19 แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นกับความเข้มข้นของ Substrate (Reducing sugar)

ในกระบวนการผลิตกรดแลคติคทางอุตสาหกรรม จำเป็นต้องใช้สารอาหารหรือวัตถุดิบต้นทุนต่ำ เพื่อลดต้นทุนการผลิต ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาทดลองในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อพัฒนาในระดับใหญ่ต่อไป สำหรับแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดแลคติคโดยเชื้อ *L. lactis* ได้รับความสนใจในสารจำพวกที่มีราคาถูก สามารถหาได้ง่าย อีกทั้งเป็นของเหลือทิ้งต่างๆที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ เพราะยังคงมีสารอาหารเหลืออยู่ ซึ่งนับว่ามีประโยชน์เป็นอย่างมาก และถือเป็นการลดขยะเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อสิ่งแวดล้อม และแหล่งคาร์บอนที่จะนำมาใช้นี้ จะต้องอยู่บนพื้นฐานที่หาได้ตลอดทั้งปี เพื่อที่จะสนับสนุนการผลิตในระดับใหญ่และต่อเนื่องต่อไป ในหัวข้อนี้จึงมีการใช้แหล่งคาร์บอนที่มีคุณสมบัติดังได้กล่าวไปข้างต้น เช่น หางนม แป้งที่ละลายน้ำได้ (soluble starch) แป้งมันสำปะหลังและแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว (hydrolyzed cassava starch) ที่เป็นวัตถุดิบทางการเกษตร ที่สามารหาได้ง่ายและผลิตได้ตลอดทั้งปีในประเทศไทย และสำหรับหางนมนั้นเป็นการนำมาศึกษาเพื่อให้เกิดความหลากหลายเท่านั้น เพื่อทำการศึกษาทดลองงานวิจัย แต่ไม่อาจนำมาใช้ในประเทศไทยได้ เนื่องจากไม่ได้เป็นวัตถุดิบที่หาได้ง่ายในประเทศ อีกทั้งสามารถผลิตได้เพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศ ราคาถูกและมีส่วนที่สามารถนำมาพัฒนาให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ได้อีกทางหนึ่ง

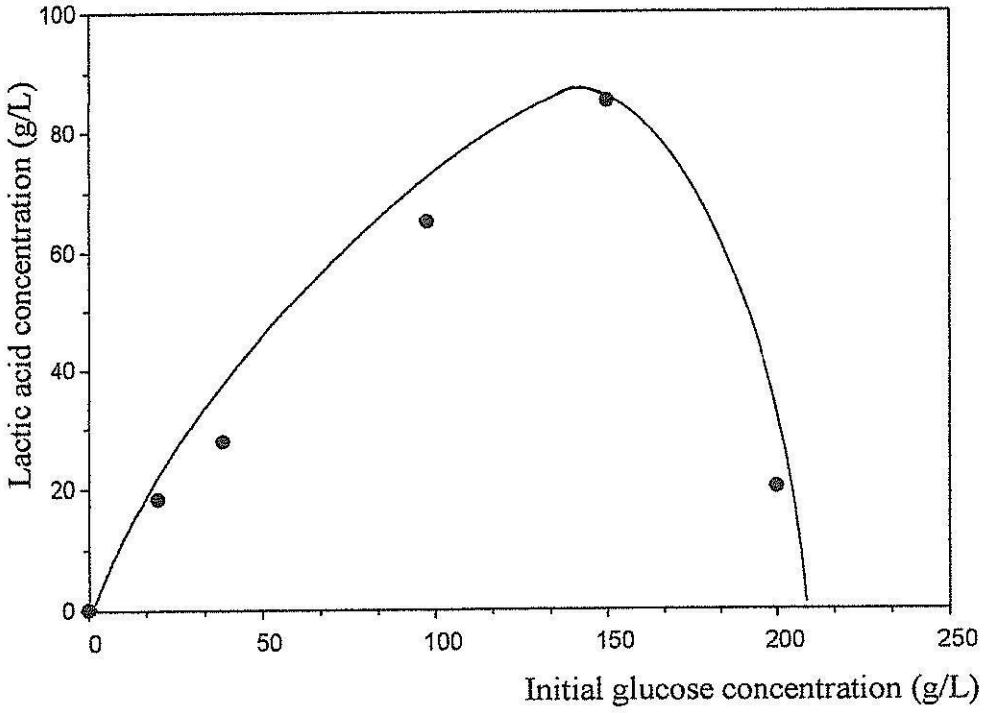
ตาราง 8 แสดงตัวอย่างการผลิตกรดแลคติคที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นสารประกอบที่มีส่วนประกอบจำพวกแป้ง (Starchy materials)

ตัวอย่าง	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	Productivity (g/L/h)	ความเข้มข้นกรดแลคติค (g/L)	References
Starch	0.12 g/g	0.95 g/g	1.25	ไม่ระบุ	(Pattrarakulwanit *et al.*, 2544)
Soluble potato starch	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ	ไม่ระบุ	5.5	(Petrov *et al.*, 2008)
Wheat flour	ไม่ระบุ	0.77 g/g	1.7	95	(Hofvendahl *et al.*, 1999)
Soluble starch	ไม่ระบุ	0.89 g/g	1.31	ไม่ระบุ	(Kenji *et al.*, 2007)

3.3.3 ผลของแป้งมันสำปะหลังในการผลิตกรดแลคติค

อย่างไรก็ตามในการศึกษาหรือปรับปรุงสูตรอาหารสำหรับ *L. lactis* เพื่อที่จะลดต้นทุนการผลิตและใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกนั้น ต้องมีการเปรียบเทียบและอ้างอิงกับสูตรอาหารมาตรฐานสำหรับ

สำหรับผลของความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสนั้นพบว่าความเข้มข้นของกรดแลคติคในกระบวนการหมักจะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้น ดังรูปภาพ 20 แต่เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูงมากเกินไป นั่นคือมีมากเกินพอสำหรับนำไปใช้เจริญเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์จะก่อให้เกิดปฏิกิริยาที่เรียกว่า substrate inhibition (Goncalves *et al.*, 1991) จากน้ำตาลกลูโคสที่เป็นแหล่งคาร์บอนเองดังได้กล่าวไว้ในข้างต้น อันเนื่องจากว่าเกิด osmotic pressure (Gatje and Gottschalk, 1991) จากที่ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลสูงกับที่ที่มีความเข้มข้นต่ำ เกิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ของ *L. lactis* ได้ เชื้อไม่เจริญและตายในที่สุด (Sturr and Marquis, 1992)



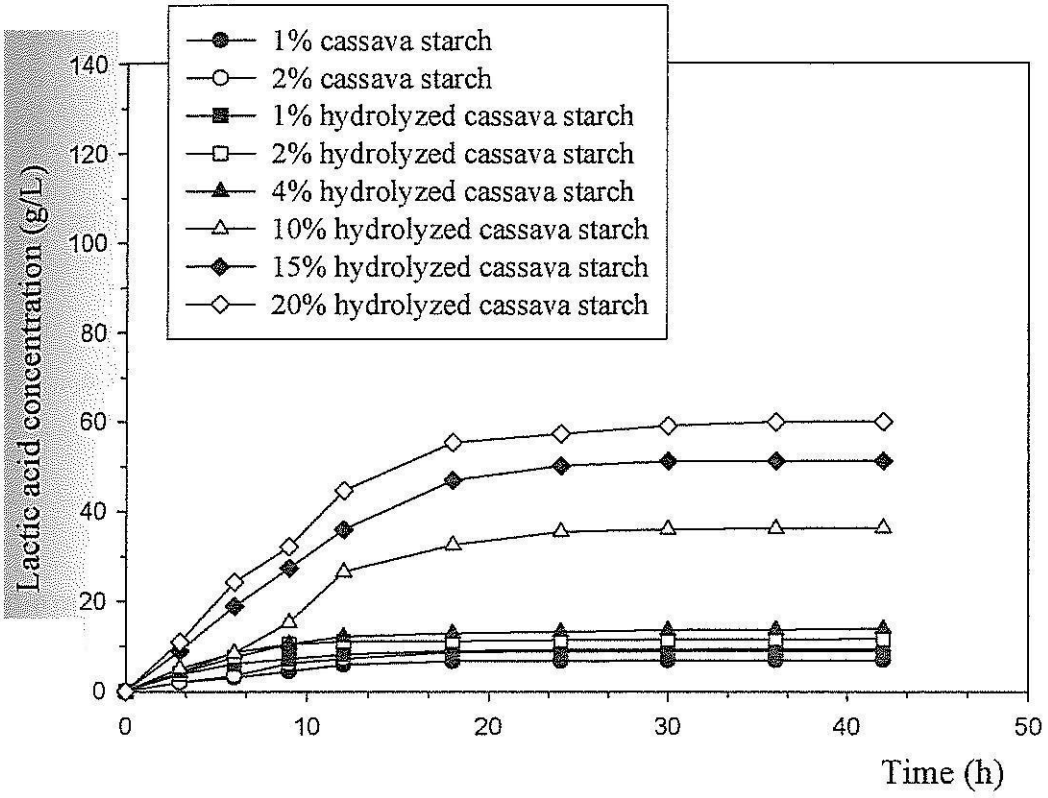
รูปภาพ 20 กราฟแสดงการเปรียบเทียบอัตราการผลิตกรดแลคติคที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างกัน

จากการทดลองดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าการผลิตกรดแลคติคด้วย *L. lactis* ได้รับอิทธิพลจากแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในกระบวนการหมัก ซึ่งเกี่ยวเนื่องสัมพันธ์กับการที่จะเปลี่ยนแปลงไปใช้วัตถุดิบประเภทอื่นๆ ว่าจะต้องมีการควบคุมและศึกษาความเข้มข้นของสารตั้งต้น เพื่อป้องกันการสะสมสารตั้งต้นในกระบวนการจากการที่แบคทีเรียกรดแลคติคนำไปใช้ได้ไม่หมด ทำให้เกิดความไม่คุ้มทุน

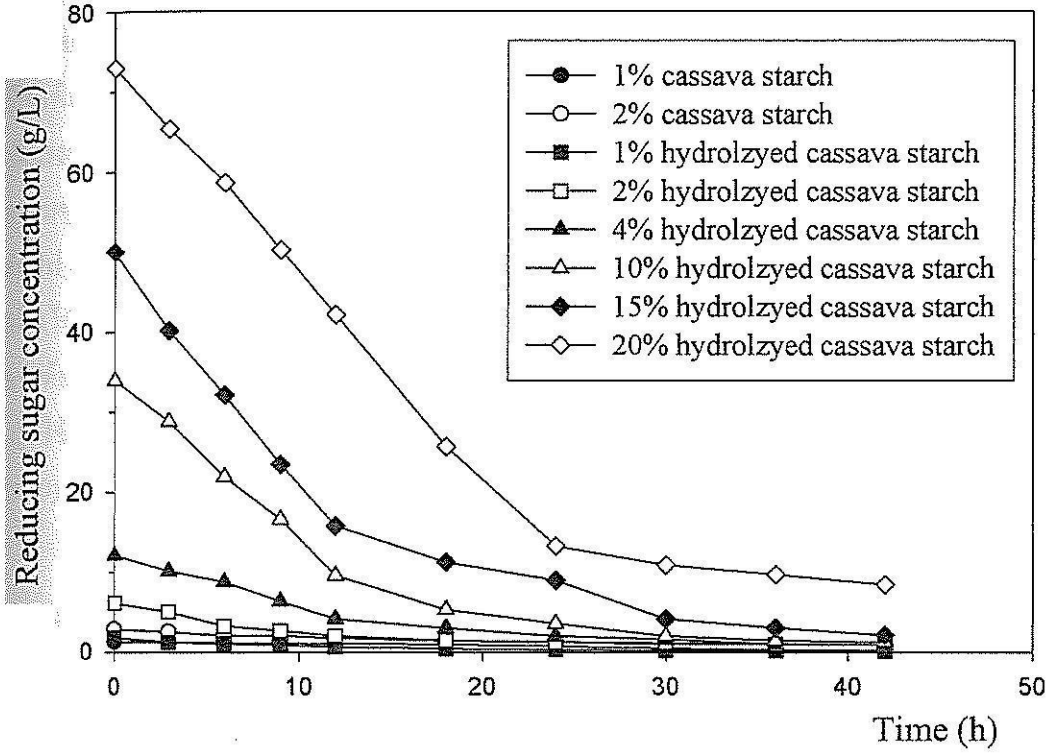
แบคทีเรียกรดแลคติค นั่นคือ อาหาร MRS ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้มีการศึกษาความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสารตั้งต้นหรือแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลคติคด้วยแบคทีเรียกรดแลคติค *L. lactis* เพื่อดูความเป็นไปได้ที่จะใช้แป้งมันสำปะหลังนี้แทนน้ำตาลชนิดต่างๆที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติค ส่งผลให้สามารถลดต้นทุนการผลิตและนำผลผลิตทางการเกษตรมาเพิ่มมูลค่าได้อีกด้วย สำหรับในหัวข้อนี้จะทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ใช้ในกระบวนการหมักด้วยเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว ศึกษาผลของการเจริญและความเข้มข้นของกรดแลคติคที่ผลิตได้ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่สามารถผลิตกรดแลคติคได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยจะทำการแปรผันค่าความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง ดังนี้ คือ ที่ 1, 2, 4, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยที่แป้งมันสำปะหลังที่ใช้ผสมในอาหาร MRS ดัดแปลงโดยมีแป้งนี้เป็นแหล่งคาร์บอนหลักในอาหารเลี้ยงเชื้อและประกอบด้วยสารอาหารต่างๆบนพื้นฐานของอาหาร MRS หรืออาจเรียกว่าอาหาร MRS ดัดแปลง (Modified MRS medium) ทั้งนี้เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อและการสร้างผลผลิตสุดท้ายเป็นกรดแลคติค ซึ่งในอาหาร MRS ดัดแปลงนี้จะมีแหล่งไนโตรเจนพื้นฐานของอาหาร MRS นั่นคือ ยีสต์สกัดทางการค้า หรือ commercial yeast extract เหตุผลที่มีการใช้แหล่งไนโตรเจนข้างต้น เพื่อต้องการทราบผลของความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังมีการแปรผันเทียบกับอาหาร MRS ที่เป็นอาหารเฉพาะของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค สำหรับส่วนประกอบในอาหาร MRS ดัดแปลงนั้นจะมีค่าคงที่ เท่ากันทุกการทดลอง

จาก รูปภาพ 21 แสดงการใช้แป้งมันสำปะหลังในการผลิตกรดแลคติค โดยมี 2 แบบคือ ใช้แป้งมันสำปะหลังโดยตรงที่ไม่ผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแป้ง (ที่ความเข้มข้น 1-2 เปอร์เซ็นต์) และแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้วด้วยเอนไซม์อะไมเลส (Hydrolyzed cassava starch) (ที่ความเข้มข้นแป้ง 1-20 เปอร์เซ็นต์) ที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลใหญ่เป็นโมเลกุลเล็กเพื่อใช้เชื้อ *L. lactis* สามารถนำไปใช้เป็นอาหารได้ง่ายขึ้น จากกราฟจะเห็นได้ว่า hydrolyzed cassava starch เมื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนหลักแล้วนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับแป้งมันสำปะหลังพบว่า สามารถผลิตกรดแลคติคได้ปริมาณที่สูงตามค่าความเข้มข้นของแป้งที่เพิ่มขึ้น และที่ความเข้มข้นของแป้งที่ทำการย่อยแล้วกับที่ไม่ผ่านการย่อย ความเข้มข้น 1-2 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่ผ่านการย่อย พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติคได้ความเข้มข้นระหว่าง 5-11 กรัมต่อลิตร การใช้แป้งมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการย่อยนั้นพบว่า มีความสามารถในการผลิตกรดแลคติคได้ไม่ดี เป็นการทดลองเบื้องต้น ดังนั้นจึงทำการย่อยแป้งมันสำปะหลังเนื่องจากสามารถย่อยให้มีโมเลกุลเล็กลง เชื้อ *L. lactis* สามารถนำไปใช้ได้ง่ายขึ้น อีกทั้งการใช้แป้งมันสำปะหลังทำให้อาหารไม่เป็นเนื้อเดียวกัน และยากต่อการสังเกต เนื่องจากมีความขุ่นมาก ทั้งนี้เชื้อ *L. lactis* MM12 สายพันธุ์นี้มีความสามารถในการย่อยโมเลกุลแป้งเองได้ไม่ดี เพื่อให้ส่งเสริมให้กระบวนการ

หมักและการผลิตดีขึ้น จึงต้องมีการย่อยแป้งมันสำปะหลังก่อนเตรียมในน้ำหมัก ในงานวิจัยนี้เป็นการศึกษากระบวนการผลิตกรดแลคติค เพื่อจะนำไปสู่การพัฒนาในด้านต่างๆ ซึ่งการพัฒนาให้ดียิ่งขึ้นอาจทำได้จากการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ดี ดังเช่นรายงานวิจัยอื่นๆ (Rodtong and Ishizaki, 2003;Xiaodong *et al.*, 1997) อย่างไรก็ตามหากมีความต้องการที่จะพัฒนาให้เกิดการผลิตกรดแลคติคได้ในปริมาณที่สูงขึ้น ดังนั้นจึงมีการทดลองใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นที่สูงขึ้นตามไปด้วย



(ก)



(ข)

รูปภาพ 21 กราฟแสดงความเข้มข้นของกรดแลคติคที่ผลิตได้และความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซิ่ง ในกระบวนการหมักที่มีแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่างกัน

หลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง 20 เปอร์เซ็นต์ หลังจากที่ทำการย่อยแป้งแล้วนั้น สามารถผลิตกรดแลคติคได้มากกว่าการทดลองอื่นๆใน อีกทั้งมีสารอาหารหรือน้ำตาลเหลืออยู่ เชื้อ *L. lactis* โดยไม่สามารถนำไปใช้ได้หมด อีกทั้ง เชื้อนี้มีความสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้น้อยทำให้มีของเหลือตกค้างในถังหมัก ซึ่งถือว่าเกิดของเหลือทิ้ง ไม่เหมาะที่จะนำไปพัฒนาในระดับที่ใหญ่ขึ้นอีก ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังจากความเข้มข้นที่ 15 เปอร์เซ็นต์ โดยเลือกความเข้มข้นของแป้งดังกล่าว และทำการย่อยก่อน (hydrolyzed cassava starch) แสดงดังตาราง 9 ซึ่งถ้ามีการใช้ substrate ได้มากก็เป็นผลสืบเนื่องให้มีการสร้างกรดแลคติคได้สูงสุดเช่นเดียวกัน แต่การที่กรดในระบบสูงทำให้ค่า pH สูงตามไปด้วยแล้วนั้น เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคมีความสามารถทนสภาวะเป็นกรดได้ในระดับหนึ่งแต่เมื่อถ้ากรดมากเกินไป จะไม่สามารถ

เจริญและมีชีวิตอยู่ได้ เป็นผลให้ตายในที่สุด ด้วยเหตุนี้คืออาจเนื่องมากจากเกิดสภาวะ Product inhibition นั่นเอง (Goncalves *et al.*, 1997) จากนี้จะนำไปทดลองในหัวข้อต่อไป แต่อย่างไรก็ตามก็จะมีการใช้กลูโคสไซรัปอีกเช่นกัน กลูโคสไซรัปที่นำมาใช้นี้มีราคาต่ำกว่าการใช้น้ำตาล แต่อย่างไรก็ตามเป็นเพิ่มต้นทุนจากการใช้แป้งมันสำปะหลังโดยตรง แต่เนื่องจากว่า กลูโคสไซรัปถูกย่อยเป็นโมเลกุลเล็กลงเป็นที่เรียบร้อยแล้ว อีกทั้งต่อการนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในกระบวนการหมัก เนื่องจากมีความขุ่นน้อยทำให้วิเคราะห์ได้ง่ายอีกด้วย ทั้งนี้เพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์หรือศึกษาในด้านอื่นๆต่อไป สำหรับในกระบวนการหมักกรดแลคติคที่มีการใช้แป้งมันสำปะหลังนั้นสามารถสร้างกรดแลคติคได้น้อยว่าการที่ใช้น้ำตาลเป็นสารตั้งต้น อย่างไรก็ตามยังถือได้ว่าสามารถผลิตกรดแลคติคได้ แต่อาจต้องมีการพัฒนาการใช้สารอาหารอื่นๆที่ไม่ราคาถูกกว่าและสามารถผลิตกรดแลคติคได้ดีขึ้น เช่น การใช้สารจำพวกเซลลูโลส ฟางข้าว วัตถุดิบเหลือใช้ เป็นต้น (Shen and Agblevor, 2010;Zhao *et al.*, 2010)

ตาราง 9 แสดงตัวอย่างการผลิตกรดแลคติคที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังต่างๆกันทั้งแป้งมันสำปะหลังและแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว

ตัวอย่าง	Productivity (g/L/h)	ความเข้มข้นกรดแลคติค (g/L)
แป้งมันสำปะหลัง 1%	0.28	6.98
แป้งมันสำปะหลัง 2%	0.38	9.10
แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว 1%	0.38	9.49
แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว 2%	0.468	11.71
แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว 4%	0.59	14.01
แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว 10%	0.995	36.47
แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว 15%	1.83	51.4
แป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว 20%	1.78	60.05

ในบางงานวิจัยได้รายงานว่า สำหรับการใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมักนั้นอาจมีการย่อยแป้งดังกล่าวด้วยความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติคได้ ยกตัวอย่างสายพันธุ์ดังต่อไปนี้ *Lactobacillus plantarum* A6 (Giraud *et al.*, 1991), *Lactobacillus amylophilus* (Vishnu *et al.*, 2002) และ *Streptococcus bovis* (Narita *et al.*, 2004) และสำหรับ *Lactococcus lactis* ที่งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาพบว่าสามารถผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยแป้งได้ได้ไม่ดีนัก (คุณสมบัติ amylolytic activity)

เหมือนกับสายพันธุ์ที่กล่าวข้างต้นแต่เป็นสายพันธุ์ที่นิยมนำมาเข้าสู่กระบวนการหมักกรดแลคติคเป็นอย่างมาก เนื่องจากมีอัตราการผลิตกรดแลคติคได้สูงและมีคุณภาพ (L-ไอโซเมอร์) การใช้สายพันธุ์ *Lactococcus lactis* มาเป็นตัวผลิตกรดแลคติคนั้นนับว่าเป็นทางเลือกที่ดีที่สุด ดังนั้นจึงต้องทำการเปลี่ยนโครงสร้างแป้งก่อนด้วย ∝-amylase/ amyloglucosidase เอนไซม์ 2 ชนิดตามสภาวะการย่อยในระเบียบวิธีวิจัยที่กล่าวไว้ในตอนต้นนั่นเอง (Andersen *et al.*, 2009)

จากการที่นำแป้งมันสำปะหลังมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดแลคติค *โดย L. lactis* นั้นนับว่าเป็นการพัฒนาวัตถุดิบให้เกิดประโยชน์ แต่การที่นำแป้งที่ไม่ผ่านการเปลี่ยนแปลงสภาพนั้น ถือว่าแป้งมีโมเลกุลที่ค่อนข้างใหญ่ การนำไปใช้หรือการย่อยของเชื้อแบคทีเรียไม่สามารถทำได้ดีเท่าที่ควร มีรายงานที่มีการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถย่อยแป้งได้เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ด้วยตัวมันเอง (Reddy *et al.*, 2008) แต่ก็ยังไม่เต็มที่เนื่องจากสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณและความเข้มข้นที่น้อย และต้องใช้เวลาในระหว่างกระบวนการหมัก เหตุนี้ถ้าทำการผลิตในถังหมักที่มีระบบควบคุมที่ไม่ดี อาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ตัวอื่นๆ ได้ เพราะในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีอาหารที่สมบูรณ์เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่หลากหลาย เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคที่ย่อยแป้งได้เหล่านี้มีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่า ทำให้เชื้อจุลินทรีย์อื่นๆที่เจริญได้ดีเกิดการแข่งขันทำให้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคที่เราต้องการไม่สามารถเจริญได้นั่นเอง นี่ถือเป็นข้อเสียอย่างหนึ่งที่จะมีการใช้แบคทีเรียกลุ่มเหล่านี้ (Amylolytic lactic acid bacteria) แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่ามีการใช้ย่อยแป้งชนิดอื่นๆ เช่น แป้งสาลี แป้งข้าวโพด (Reddy *et al.*, 2008) พร้อมกับมีการให้ความร้อนเพื่อกระตุ้นให้เอนไซม์ทำงานได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งก็ต้องสูญเสียพลังงานในส่วนนี้ไปด้วย ด้วยเหตุนี้จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาประยุกต์ใช้กับแป้งมันสำปะหลังที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ อีกทั้งการใช้ความเข้มข้นของแป้งที่สูงจะมีปัญหาเมื่อใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้อ เพราะแป้งจะเกิดเป็นเจลทำให้มีความหนืดสูง มีปัญหาในการวิเคราะห์ตัวอย่าง เนื่องจากตัวอย่างที่เก็บในแต่ละเวลาระหว่างกระบวนการหมัก จะมีความหนืดและความข่นมาก ทำให้ผลการทดลองที่วัดด้วยเครื่องมือวิเคราะห์ได้ผลผิดพลาด อย่างไรก็ตามในประเทศไทยนั้นได้มีโรงงานที่ผลิตเกี่ยวกับแป้งมันสำปะหลังโดยที่ผลิตภัณฑ์ออกมาในหลายรูปแบบ เช่น กากมันแห้ง กากมันสด แบะแซ (แป้งมันสำปะหลังที่ถูกย่อยแล้ว) และกลูโคสไซรัป เป็นต้น ซึ่งถ้ามีการพัฒนาผลิตภัณฑ์เหล่านี้ด้วย อาจจะเกิดผลประโยชน์ได้ดีกว่าการที่ใช้แป้งมันสำปะหลังโดยตรง อีกทั้งเป็นตัวเลือกในการผลิตกรดแลคติคโดยวิธีการหมักได้อีกทางหนึ่ง

ในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของแป้งมันสำปะหลังนั้นจะประกอบไปด้วยขั้นตอนต่างๆคือ gelatinization และ liquefaction ด้วยเอนไซม์เพื่อที่จะปรับโมเลกุลใหญ่เป็นโมเลกุลเล็กลงให้เป็นน้ำตาลเพื่อที่เชื้อ *L. lactis* จะสามารถนำไปใช้ได้ง่าย ซึ่งถือว่าประหยัดขั้นตอนและเวลามากกว่า และมี

อีกวิธีหนึ่งคือการใช้ amylolytic lactic acid bacteria ย่อยนั้นไม่เหมาะในทางอุตสาหกรรม ทั้งนี้เนื่องจากมีสายพันธุ์แบคทีเรียที่มีคุณสมบัตินี้อยู่น้อยและแบคทีเรียกรดแลคติคในกลุ่มนี้จะมีคุณสมบัติเป็น heterofermentative นั่นคือสามารถสร้างผลผลิตได้หลากหลาย เช่น สามารถผลิตกรดแลคติค เอทานอล กรดพอร์พิโอนิค เป็นต้น และได้ผลิตภัณฑ์ที่เราต้องการมีปริมาณและความเข้มข้นที่น้อย ระบบการเก็บเกี่ยวผลผลิตทำได้ยากมากเนื่องจากมีหลายผลิตภัณฑ์ และแต่ละตัวมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ใช้กระบวนการแยกคนละแบบ ทำให้เพิ่มต้นทุนการผลิตในส่วนนี้เพิ่มเข้าไป

อีกทั้งมีการทดสอบที่เพื่อเป็นตัวควบคุม (Control) มีส่วนประกอบอื่นๆบนพื้นฐานอาหาร MRS แต่ไม่มีการเติมแป้งมันสำปะหลังให้เกิดการเปรียบเทียบกันในทุกด้าน ซึ่งพบว่าผลผลิตกรดแลคติคที่ได้หลังสิ้นสุดกระบวนการหมักแล้วนั้น มีค่าต่ำคือที่ความเข้มข้นของกรดแลคติคเท่ากับ2.0 กรัมต่อลิตร และหากไม่มีการเติมแป้งมันสำปะหลังและ commercial yeast extract ผลที่ได้คือ ความเข้มข้นของกรดแลคติคต่ำกว่าทุกการทดลองคือ 0.9 กรัมต่อลิตร แสดงได้ว่า เชื้อ *L. lactis* สามารถที่จะเจริญเติบโตโดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นสารอาหารได้เช่นกัน นั่นหมายความว่าแป้งมันสำปะหลังสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของเชื้อนี้ได้ แต่เนื่องจากขาดแหล่งไนโตรเจนเชื้อมีการเจริญและสร้างกรดแลคติคได้ไม่ดี ในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงควรที่จะต้องมีการเติมสารอาหารอื่นๆเพิ่มลงไป เนื่องจากว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคมีความต้องการสารอาหารเสริมต่างๆ เพื่อให้สามารถเจริญเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์ได้สูงสุดนั่นเอง ซึ่งในหัวข้อต่อไปจะเป็นการศึกษาผลของชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคเพื่อให้เกิดส่งเสริมการเจริญของเชื้อและการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุดอีกด้วย

3.3.4 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อกระบวนการผลิตกรดแลคติคโดยเชื้อ *Lactococcus lactis*

ในงานวิจัยนี้ได้มีการนำแป้งมันสำปะหลังมาใช้ให้เกิดประโยชน์จึงนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดแลคติค ซึ่งได้มีการศึกษาในหัวข้อก่อนหน้านี้ว่า สามารถนำมาใช้ได้และก่อให้เกิดการลดต้นทุนการผลิตได้เนื่องจากมีราคาต่ำกว่าการใช้น้ำตาลซึ่งแสดงได้ในหัวข้อผลของแป้งมันสำปะหลังในการผลิตกรดแลคติค อย่างไรก็ตามแหล่งคาร์บอนอย่างเดียวอาจไม่พอ จะต้องมีการลดต้นทุนของแหล่งไนโตรเจนร่วมด้วย ซึ่งจะศึกษาหาแหล่งอื่นๆเพื่อมาทดแทน commercial yeast extract ในกระบวนการหมักกรดแลคติค จากตาราง 10 พบว่า commercial yeast extract และ peptone มีต้นทุนราคาสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นๆ

ได้มีการทดลองเพื่อศึกษาอิทธิพลของสารอาหารที่ถูกเติมลงไปในกระบวนการผลิตกรด แลคติคนั้น ได้มีการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ หางนม และแป้ง ที่มีสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหมือนกับอาหาร MRS แต่มีการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นเริ่มต้น (Yun *et al.*, 2003) และมีการเปลี่ยนแปลงแหล่งไนโตรเจน คือ Commercial yeast extract เพื่อศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่ออาหารผลิตกรดแลคติค โดยแทนที่ด้วยแหล่งไนโตรเจนต่างๆ เช่น ในกรณีที่มีการศึกษามาแล้ว (Hujanen and Linko, 1996) อีกทั้งมีการศึกษาการทดแทนแหล่งไนโตรเจนที่ใกล้เคียงกับวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้มากคือ การแทนที่ commercial yeast extract ด้วย brewer's spent grain ของ Mussatto และคณะ และอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่บนพื้นฐานของอาหาร MRS ที่เป็นอาหารจำเพาะในการเจริญและผลิตกรดแลคติคสำหรับแบคทีเรียกรดแลคติคนั่นเอง ผลการทดลองที่ได้นั้นพบว่าอาหาร MRS ที่มีการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและ commercial yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้นผลิตกรดแลคติคได้มีประสิทธิภาพดีว่าการใช้ brewer's spent grain (Mussatto *et al.*, 2008) นั่นอาจเนื่องมาจากสารอาหารอาจมีไม่พอเพียงกับความต้องการของแบคทีเรีย ซึ่งตรงกับลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติคที่มีคุณสมบัติเป็น fastidious microorganisms คือมีความต้องการสารอาหารต่างๆอย่างหลากหลาย เช่น ต้องการวิตามินชนิดต่างๆ เพื่อให้สามารถเจริญเติบโตได้และมี biological activity สร้างผลิตภัณฑ์เกิดขึ้น (Xu *et al.*, 2008) สำหรับวัตถุดิบจำพวก cellulosic materials เช่น wheat straw, wood , cassava bagasse, และ sugarcane bagasse ได้มีการศึกษามาแล้วว่าสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลคติคโดยกระบวนการหมักได้ แต่อย่างไรก็ตามจะต้องมีการเสริมสารอาหารลงไปเพิ่มเติม (Arasaratnam *et al.*, 1996;Nabil *et al.*, 2001)

ตาราง 10 แสดงต้นทุนของสารอาหารชนิดต่างๆที่ใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลอง (Tellez-Luis *et al.*, 2003)

แหล่งไนโตรเจน	ราคา (ยูโรต่อกิโลกรัม)
Corn steep liquor	36.06
Commercial yeast extract	76.74
Peptone	112.27
Sodium acetate	13.94
Sodium citrate	20.73
K_2HPO_4	30.29
$MgSO_4$	10.58
$MnSO_4$	15.03
$FeSO_4$	11.54

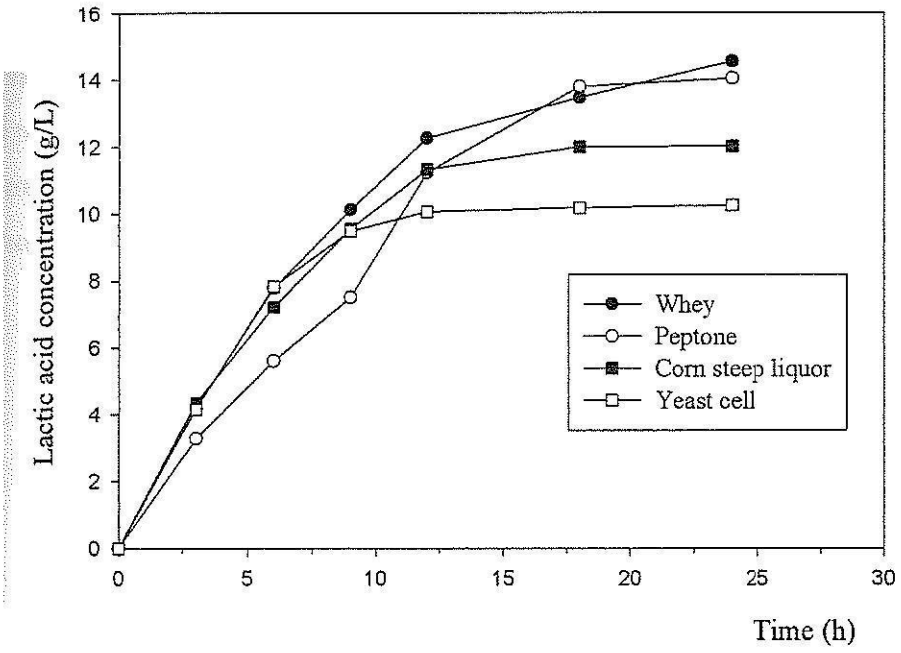
มีงานวิจัยได้มีการศึกษาเปรียบเทียบการแทนที่ของแหล่งไนโตรเจนต่างๆของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ (Hofvendahl *et al.*, 1999) เพื่อเข้าสู่กระบวนการหมักกรดแลคติค อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ยังเป็นการยืนยันอีกครั้งหนึ่งและให้เหตุผลว่าการที่ commercial yeast extract เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น เป็นตัวช่วยส่งเสริมให้กระบวนการหมักโดยเชื้อ *L. lactis* สมบูรณ์ซึ่งมีรายงานต่างประเทศระบุไว้ว่า commercial yeast extract นั้นประกอบด้วยเบสชนิด purine, pyridine bases และ B group vitamins (Amrane and Prigent, 1994) เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ เช่น meat extract, peptone, corn steep liquor เป็นต้น

ในการทดลองที่มีการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ทำการย่อยแล้วรวมกับส่วนประกอบอื่นๆของอาหาร MRS เทียบกับแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว กับ commercial yeast extract เพื่อสร้างกรดแลคติคโดยเชื้อ *L. lactis* นั้นพบว่าอาหารที่มีส่วนประกอบของอาหาร MRS มีความสามารถในการผลิตกรดแลคติคระหว่างกระบวนการหมักได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่มีเพียงส่วนประกอบแร่ธาตุและวิตามินบนพื้นฐานของอาหาร MRS แต่ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนลงไป ทำให้การสร้างกรดแลคติคน้อยที่สุดในการทดลองนี้ คือเท่ากับ 0.9 กรัมต่อลิตร (รูปภาพ 25)นั่นหมายความว่าสารอาหารหลักที่เชื้อ *L. lactis* ต้องการคือ แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตเจน แต่การเติมแร่ธาตุและ

วิตามินอื่นๆลงไปนั้นก็เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพการผลิตที่ดีที่สุดในการศึกษาหัวข้อนี้ แสดงดังรูปภาพ 26 อีกทั้งในรูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. lactis* ในระหว่างการหมักที่มี commercial yeast extract เป็นส่วนประกอบพร้อมกับเติมสารอาหารต่างๆเสริมลงไปนั้นพบว่า เชื้อแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วหลังจากผ่านไปได้ 12 ชั่วโมงจะเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญแบบก้าวกระโดด (log phase) พร้อมๆกับผลิตกรดแลคติคในกระบวนการหมัก ตรงกันข้ามกับถ้าไม่มีการเติม commercial yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนหลัก หรือไม่มีการเติมสารอาหารอื่นๆลงไปส่งเสริมการเจริญ เชื้อ *L. lactis* จะเจริญเติบโตได้ช้ากว่าและยังคงอยู่ในระยะปรับตัว (lag phase) ยาวนานกว่าจะเข้าสู่ระยะ log phase นั่นหมายความว่าระยะเวลาในกระบวนการหมักนานกว่า เนื่องจากจะต้องมีการปรับตัวของเชื้อเพื่อเจริญและนำอาหารเลี้ยงเชื้อไปใช้ได้ โดยที่ไม่มีตัวช่วยเร่งหรือส่งเสริมให้เจริญเติบโตเร็วยิ่งขึ้นนั่นเอง

โดยในหัวข้อศึกษานี้ได้มีการทดลองแหล่งไนโตรเจนต่างๆเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดแลคติคโดยเชื้อ *L. lactis* เช่น whey, peptone, Baker's yeast cells ซึ่งนำมาทดลองในการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรดแลคติค เช่นเดียวกับวารสารอื่น (Altaf *et al.*, 2007) และ corn steep liquor โดยที่ใช้ส่วนประกอบของอาหาร MRS แต่มีการเปลี่ยนแปลงแทนที่ commercial yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนดังที่กล่าวข้างต้น และจากการศึกษาทบทวนวรรณกรรมอื่นๆแล้วนั้นพบว่า ได้มีรายงานจากวารสารวิจัย (Zheng *et al.*, 2006) ที่แสดงถึงว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะสำหรับแบคทีเรียกรดแลคติคนั้นประกอบไปด้วยสารต่างๆที่มีราคาค่อนข้างสูง โดยเฉพาะแหล่งไนโตรเจน ในการทดลองนี้จึงได้มีการศึกษาใช้ Corn steep liquor (CSL) ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกและประสบความสำเร็จแล้วในการผลิตเอทานอล กรดซัคซินิคและเอนไซม์อะราบินาเนส โดยสามารถนำมาทดแทนแหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้อยู่ในปัจจุบันได้ (Tellez-Luis *et al.*, 2003)

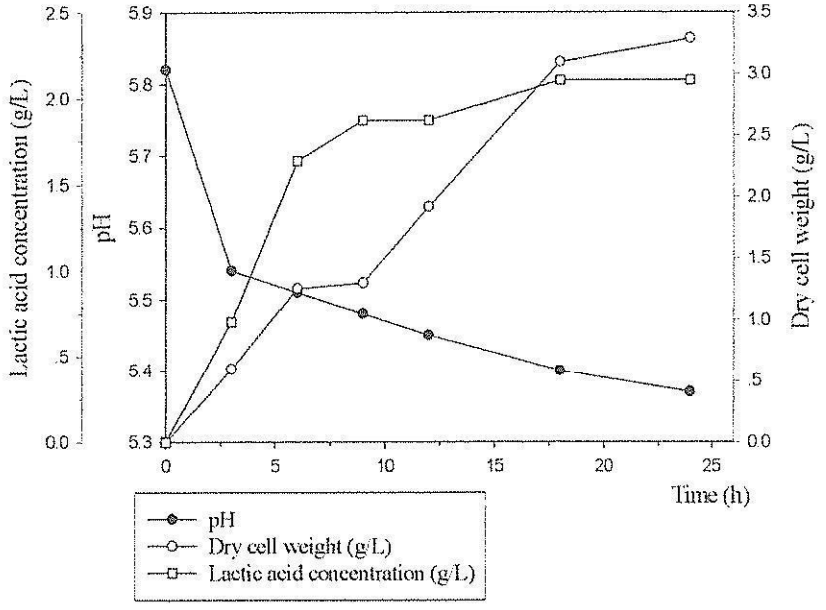
ในกระบวนการหมักที่มีการเปลี่ยนแปลงแหล่งไนโตรเจนต่างๆนั้นสามารถผลิตกรดแลคติคได้น้อยกว่า commercial yeast extract ที่มีการขายทางการค้า โดยความสามารถการผลิตกรดแลคติคเรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อยดังนี้ คือ whey, peptone, corn steep liquor และ yeast cell (ดังรูปภาพ 22) จาก รูปภาพ 22 เนื่องจาก whey, peptone นั้นเป็นมีสารอาหารที่จำเป็นต่อเชื้อจุลินทรีย์อย่างมาก และอุดมสมบูรณ์ ดังนั้นจึงสามารถส่งเสริมการผลิตกรดแลคติคได้ ตรงกันข้ามกับ corn steep liquor และ yeast cell ที่สามารถผลิตกรดแลคติคได้น้อยกว่า แต่อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรีย *L. lactis* สามารถเจริญเติบโต การสร้างผลิตภัณฑ์กรดแลคติคได้ ใกล้เคียงกับการใช้ yeast extract ที่เป็นแหล่งไนโตรเจนหลัก คือที่ความเข้มข้น 18 กรัมต่อลิตร ผลที่ได้นี้มีประโยชน์ในการศึกษาพัฒนาขั้นต่อไปได้ (Nabil *et al.*, 2001)



รูปภาพ 22 กราฟแสดงการเปรียบเทียบอัตราการผลิตกรดแลคติค ที่แหล่งไนโตรเจนต่างๆ โดยเชื้อ *L. lactis*

จากหัวข้อข้างต้นคือการศึกษาปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อโดยมีการเปลี่ยนการใช้แหล่งคาร์บอนหรือสารตั้งต้นหลากหลายชนิดเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดแลคติค อีกทั้งมีการประยุกต์ใช้แหล่งอาหารที่มีราคาถูก ซึ่งเช่นเดียวกันกับการศึกษาแหล่งไนโตรเจนดังในหัวข้อนี้ แต่อย่างไรก็ตามจะต้องมีการศึกษาการทดลองควบคุม เพื่อให้ได้ข้อมูลที่เปรียบเทียบกันได้ว่าปัจจัยอันใดจะมีผลต่อกระบวนการผลิตกรดแลคติคด้วยวิธีการหมักโดย *L. lactis* ซึ่งได้มีการทดลองอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุมมีทั้งหมด 4 สูตร ดังนี้คือ สูตรที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนมีเพียงส่วนประกอบอื่นๆบนพื้นฐานอาหาร MRS สูตรที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนมีเพียงส่วนประกอบอื่นๆบนพื้นฐานอาหาร MRS สูตรที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนมีเพียงส่วนประกอบอื่นๆบนพื้นฐานอาหาร MRS และสูตรอาหาร MRS ซึ่งผลการทดลองที่ได้สามารถดูได้จาก รูปภาพ 23 ถึง รูปภาพ 26 สำหรับ รูปภาพ 23 มีส่วนประกอบอื่นๆที่เป็นพื้นฐานของอาหาร MRS และแหล่งไนโตรเจนที่เป็น commercial yeast extract พบว่าเซลล์สามารถเจริญได้ จากการใช้แหล่งไนโตรเจนและแร่ธาตุต่างๆในอาหาร สามารถผลิตกรดแลคติคได้ที่ความเข้มข้น 2.0 กรัมต่อลิตร เนื่องจากไม่มีแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาล ดังนั้นกราฟจึงไม่แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลรีดิวซิ่งที่เกิดขึ้น

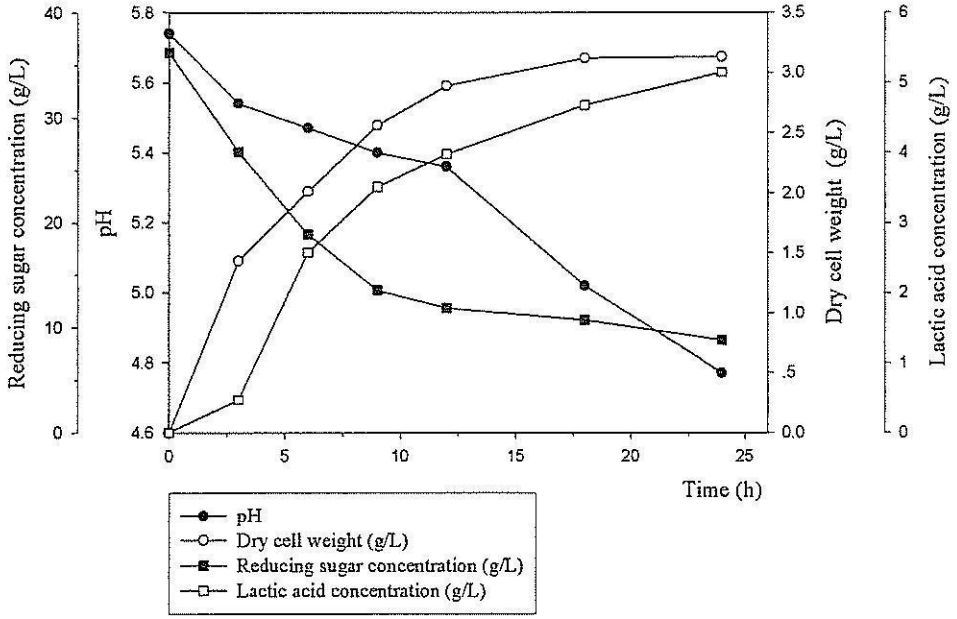
ทั้งนี้สำหรับ biomass นั้นจากกราฟจะเห็นได้ว่าเป็นไปตามรูปแบบการเจริญของ *L. lactis* คือ จาก lag phase หรือช่วงปรับตัวของเซลล์ ซึ่งเกิดในช่วงเร็วมาก อาจถือได้ว่าไม่มีช่วง lad phase exponential phase และ stationary phase ตามลำดับ โดยหลังจากนี้เซลล์เริ่มไม่เจริญและจำนวนเซลล์คงที่ เหตุนี้เนื่องมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *L. lacis* คือมีแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน และยังมีสารเสริมการเจริญต่างๆ ทำให้สามารถเจริญเติบโตการสร้างผลผลิตกรดแลคติคได้



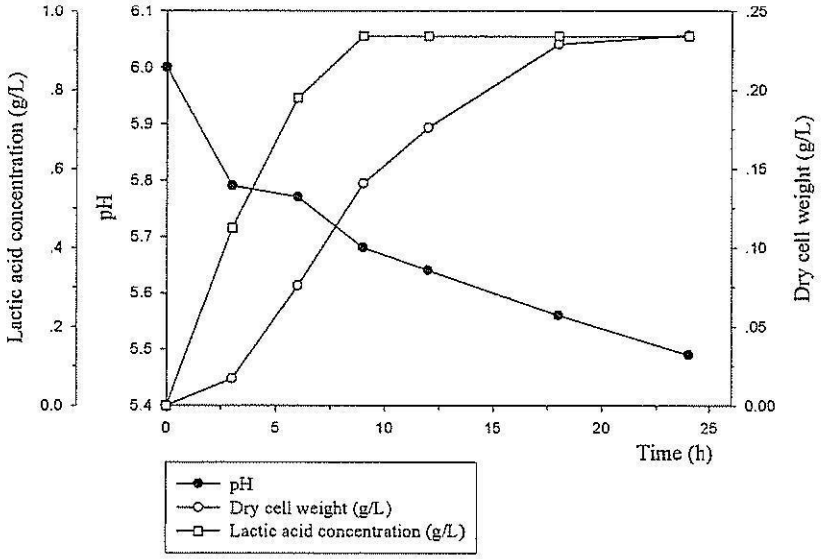
รูปภาพ 23 แสดงกระบวนการผลิตกรดแลคติคโดยกระบวนการหมักจากเชื้อ *L. lactis* ด้วย สูตรที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนมีเพียงส่วนประกอบอื่นๆบนพื้นฐานอาหาร MRS

รูปภาพ 24 เป็นสูตรอาหารที่มีส่วนประกอบพื้นฐานของอาหาร MRS มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสและไม่มีแหล่งไนโตรเจน ผลพบว่าเซลล์สามารถเจริญได้และสร้างกรดแลคติคความเข้มข้น 5.0 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้สามารถผลิตกรดแลคติคได้น้อยกว่าหากมีสารอาหารครบถ้วน เป็นผลจากการขาดแหล่งไนโตรเจน ซึ่งจะมีการทดลองเติมสารอาหารสมบูรณ์ในกราฟต่อไป เพื่อที่จะเปรียบเทียบผลที่เกิดขึ้น และรูปภาพ 25 เป็นการศึกษาผลของทั้งแหล่งคาร์บอน ซึ่งไม่มีน้ำตาลในระบบจึงไม่มีกราฟของน้ำตาลรีดิวซึ่งแสดงไว้ และแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตกรดแลคติค พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติคได้ในปริมาณน้อย สามารถยืนยันได้ว่าแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน มีความสำคัญกับกรบวนการหมักกรดแลคติค การที่มีการใช้สูตรอาหารหรือส่วนประกอบที่เป็นพื้นฐานของอาหาร

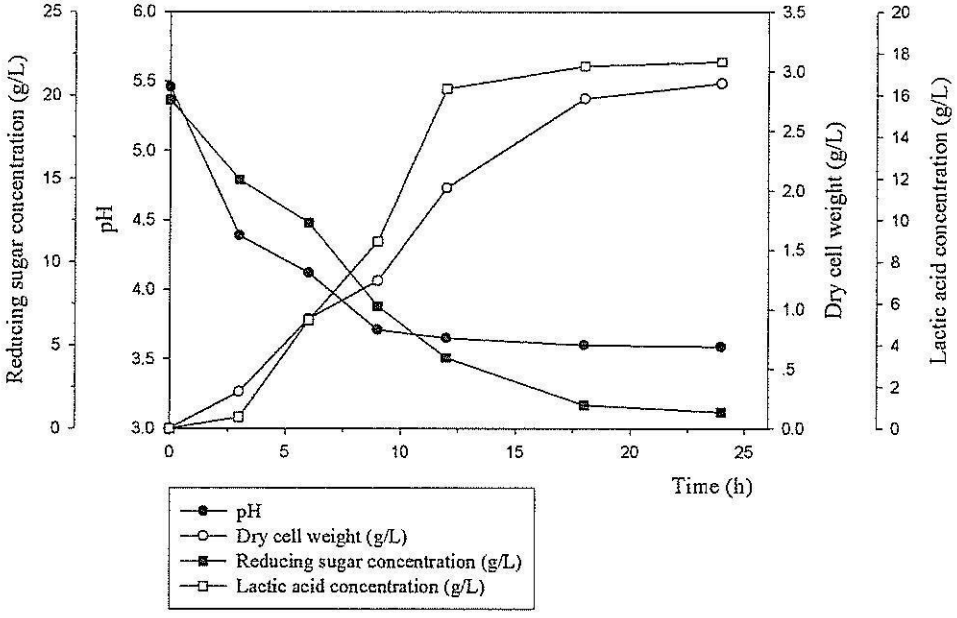
MRS เหมือนกัน เพื่อที่จะให้การชุดการทดลองมีการแปรผันตัวแปรเป็นค่าต่างๆ ที่ต้องการศึกษาเท่านั้น ส่วนอื่นๆเหมือนกันหมด เพื่อให้ข้อมูลถูกต้องมากขึ้น ทั้งนี้ต้องประกอบกันกับทุกส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อส่งเสริมให้แบคทีเรียสามารถเจริญได้อย่างเต็มที่



รูปภาพ 24 แสดงกระบวนการผลิตกรดแลคติคโดยกระบวนการหมักจากเชื้อ *L. lactis* ด้วย สูตรที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนมีเพียงส่วนประกอบอื่นๆบนพื้นฐานอาหาร MRS



รูปภาพ 25 แสดงกระบวนการผลิตกรดแลคติคโดยกระบวนการหมักจากเชื้อ *L. lactis* ด้วย สูตรที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนมีเพียงส่วนประกอบอื่นๆบนพื้นฐานอาหาร MRS



รูปภาพ 26 แสดงกระบวนการผลิตกรดแลคติคโดยกระบวนการหมักจากเชื้อ *L. lactis* ด้วย สูตรอาหาร MRS

จาก ตาราง 11 แสดงให้เห็นว่า แต่อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองนั้น ทำให้พบว่าแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่างกัน ส่งผลต่อความเข้มข้นของกรดแลคติคที่ต่างกันด้วย นั่นคือการที่ใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารประกอบที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ง่าย เช่น น้ำตาลชนิดต่างๆ หรือจะเป็น yeast extract ก็จะทำให้การผลิตกรดแลคติคสูงขึ้นตามไปด้วยดังวารสารวิจัยที่ได้ศึกษามาก่อนนี้ (Nabil *et al.*, 2001) โดยสามารถดูได้จากกราฟที่แสดงการใช้ reducing sugar หรือ substrate ของเชื้อ *L. lactis* นั้น (รูปภาพ 26)จะมีแนวโน้มเป็นไปในทางที่ลดลงเรื่อยๆตามระยะเวลาที่ผ่านไป ทั้งนี้ในสูตรที่ 1 ซึ่งไม่มีแหล่งคาร์บอนที่เป็นสารตั้งต้นหลักในระบบปริมาณเซลล์ที่สามารถวัดได้และความเข้มข้นของกรดที่ผลิตได้มีค่าน้อยกว่าสูตรที่ 2 ที่มีแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพราะเนื่องจากเชื้อ *L. lactis* ไม่มีอาหารที่จะใช้ในการเจริญเติบโตทำให้สามารถสร้างผลผลิตไม่ดีเท่าที่ควร เมื่อเทียบกับสูตรที่ 2 แล้วนั้นปริมาณเซลล์ที่ได้และความเข้มข้นของกรดแลคติคมีค่าเพิ่มขึ้น สำหรับผลการทดลองการเปรียบเทียบของสูตรอาหารทั้ง 2 สูตรนี้ สามารถยืนยันว่าแหล่งคาร์บอนนั้นเป็นสารอาหารหลักที่เชื้อไม่ว่า *L. lactis* หรือสิ่งมีชีวิตใดๆก็ตามมีความต้องการอาหารในการเจริญเติบโต ทั้งจากแหล่งคาร์บอนที่ถูกใช้ในการสร้างเซลล์เพื่อเจริญและสร้างผลผลิตและแหล่งไนโตรเจนที่มีกรดอะมิโน เพปไทด์ (Hujanen and Linko, 1996)ที่เซลล์สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ แต่อย่างไรก็ตามไม่เพียงพอและไม่ดีเท่ากับการเติมแหล่งคาร์บอนลงไป เพื่อเป็นวัตถุดิบหลักในการนำไปใช้สร้างเซลล์ เจริญและสร้างกรดแลคติคในกระบวนการหมัก จากเหตุผลนี้จึงทำการยืนยันอีกขั้นหนึ่งคืออิทธิพลของแหล่งไนโตรเจน โดยเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสูตรอาหารที่ 2 และสูตรอาหารที่ 4 ในสูตรที่ 2 ถึงแม้ว่าจะมีแหล่งคาร์บอนเป็นวัตถุดิบแล้วนั้นหากไม่มีแหล่งไนโตรเจนก็จะทำให้ปริมาณเซลล์และกรดแลคติคที่ถูกผลิตผลิตได้น้อยกว่าอาหารที่มีทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน อีกทั้งในสูตรอาหารที่ 3 นั้นคือ ไม่มีทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติคได้ต่ำที่สุด นั่นคือความสำคัญของอาหารนั้นอยู่ที่แหล่งไนโตรเจนอีกปัจจัยหนึ่งด้วย ซึ่งตรงตามข้อมูลระบุไว้จากวารสารที่อ้างอิงได้ (Nanci *et al.*, 2005) และวิจารณ์ผลในหัวข้อข้างต้นแล้วว่า *L. lactis* มีความต้องการอาหารที่ซับซ้อน

ตาราง 11 ตารางสรุปสูตรอาหารที่มีการศึกษาอิทธิพลของสารอาหารต่างๆและแสดงค่าความเข้มข้นของเซลล์และกรดแลคติคที่ผลิตได้

ตัวอย่าง	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	ส่วนประกอบอื่นๆของอาหาร MRS	ปริมาณ dry cell weight (g/L)	ความเข้มข้นของกรดแลคติค (g/L)
1	-	√	√	2.8	2
2	√	-	√	3	5
3	-	-	√	0.24	0.9
4	√	√	√	3.1	18

หมายเหตุ:

1 = สูตรที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนมีเพียงแหล่งไนโตรเจนและส่วนประกอบอื่นๆบนพื้นฐานอาหาร MRS,

2 = สูตรที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจนมีเพียงแหล่งไนโตรเจนและส่วนประกอบอื่นๆบนพื้นฐานอาหาร MRS,

3 = สูตรที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนมีเพียงส่วนประกอบอื่นๆบนพื้นฐานอาหาร MRS, 4

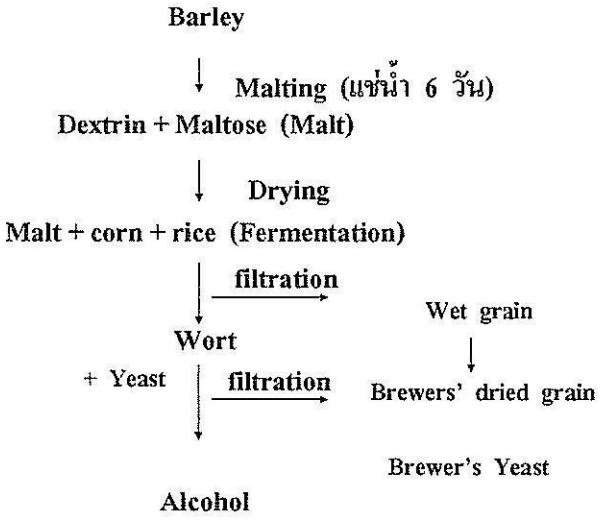
4 = สูตรอาหารที่มีทั้งแหล้งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน และส่วนประกอบอื่นๆบนพื้นฐานอาหาร MRS

ถึงแม้ว่าจะมีการเติมสารอื่นๆที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร MRS ในปริมาณที่น้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงไป ทั้งนี้ต้นทุนการผลิตจะมากถ้าสารอาหารทั้งสองดังกล่าวมีราคาหรือต้นทุนที่สูง แต่ส่วนประกอบอื่นๆใช้ในปริมาณน้อย อย่างด้วยเหตุนี้งานวิจัยนี้ จึงมีการคำนึงถึงและใช้แป้งมันสำปะหลังพร้อมกับหาวิธี ขั้นตอนกระบวนการในการผลิตหรือศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่ทดแทนกับ commercial yeast extract ที่มีคุณสมบัติทดแทนกันได้นั่นเอง

3.3.5 กระบวนการหมักกรดแลคติคจากแป้งมันสำปะหลังที่เสริมด้วยแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารสกัดจากยีสต์ที่ได้จากโรงงานผลิตเบียร์

กากของเสีย (By product) จากโรงงานผลิตเบียร์นั้นเรียกว่ากากส่าประมาณ 500 ตัน/เดือน ถ้าไม่มีการกำจัดกากเหล่านี้จะส่งกลิ่นรบกวน ดังนั้นจึงมีการขนกากไปจากโรงงานทุกวัน เพื่อเอาไปใช้เป็นอาหารสัตว์ แต่เพื่อเพิ่มมูลค่าของกากของเสียจึงมีการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำมาใช้เป็น

แหล่งไนโตรเจนสำหรับกระบวนการผลิตกรดแลคติคได้ด้วย และสำหรับขั้นตอนการผลิตเบียร์ที่เป็นต้นกำเนิดของยีสต์ที่จะนำมาสกัดแสดงดัง



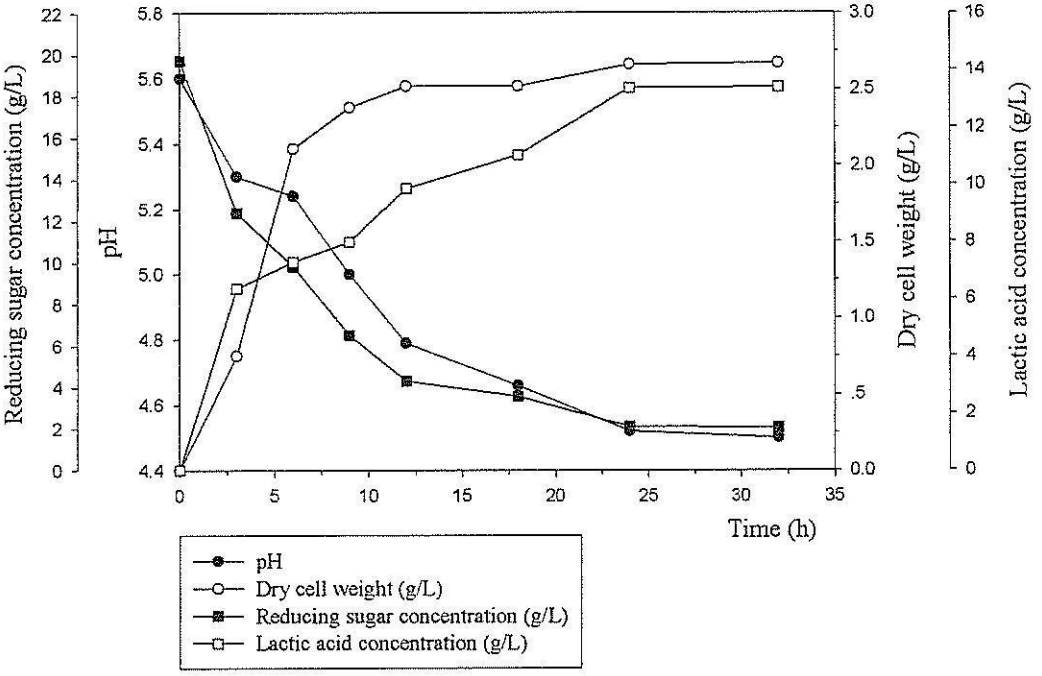
รูปภาพ 27 ขั้นตอนการผลิตเบียร์ในระดับอุตสาหกรรม

Brewer's yeast เป็นส่วนของกากยีสต์ที่หมักกับ wort จนน้ำตาลถูกเปลี่ยนเป็น alcohol และ CO_2 ประกอบด้วยโปรตีน 42-44 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อน้ำหนัก เยื่อใย 3 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อน้ำหนักมีพลังงานและแร่ธาตุสูง ใช้เป็นแหล่งเสริม B รวม และ unidentified growth factors ที่ถือว่าเป็นกากของเสียที่มีประโยชน์อย่างมาก (Tanguler and Erten, 2008)

ในการทดลองมีการใช้ สารสกัดจากยีสต์ที่ได้จากโรงงานผลิตเบียร์ แทนสารสกัดยีสต์ทางการค้า (commercial yeast extract) ที่นิยมใช้ทั่วไป แต่เนื่องจากว่าสารสกัดยีสต์ทางการค้ามีราคาแพงเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิต ทั้งยังไม่เหมาะสมทางเศรษฐกิจสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม และในกระบวนการผลิตเบียร์จะมีของเหลือทิ้งที่เป็นเซลล์ยีสต์ตกตะกอนเป็นจำนวนมาก และไม่ได้ใช้ประโยชน์ แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีสารอาหารอยู่เป็นจำนวนมาก เช่น โปรตีน แร่ธาตุ ต่างๆที่มีอยู่ในตัวเซลล์ของยีสต์เอง ด้วยเหตุนี้จึงได้นำมาเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับเชื้อ *L. lactis* ทั้งนี้มีการนำยีสต์ที่เหลือทิ้งนี้เข้าสู่กระบวนการทำยีสต์สกัด เพื่อสกัดสารอาหาร วิตามิน ในเซลล์ยีสต์ออกมา โดยเริ่มจากนำ brewer's yeast ที่ได้จากโรงงานเบียร์มาเติมน้ำและทำให้เกิดกระบวนการย่อยตัวเอง (เกิดปฏิกิริยา autolysis) และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการ autolysis นั้นจะถูกนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อทำการหยุดปฏิกิริยาของกิจกรรมเอนไซม์ที่เหลืออยู่ในเซลล์ยีสต์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จะแยกเป็น 2 ส่วน ทิ้งส่วน

ใส และเก็บตะกอนไว้ จากนั้นนำไประเหยเอาน้ำออกและเข้าสู่การทำให้แห้งด้วยวิธี spray dry จะได้ออกมาเป็นลักษณะผง เพื่อนำไปใช้ได้ ทั้งนี้มีวารสารวิจัยที่มีการศึกษาเรื่องนี้รายงานว่าสารสกัดจากยีสต์ที่ได้ดังกล่าวสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับจุลินทรีย์ได้ (York and Ingram, 1996) โดยในหัวข้อนี้จึงได้มีการปรับเปลี่ยนใช้สารสกัดจากยีสต์ที่ได้จากโรงงานผลิตเบียร์ (brewer's yeast extract) กับแหล่งคาร์บอนที่เป็นแป้งมันสำปะหลัง คือ กลูโคสไซรัป ซึ่งศึกษาการผลิตกรดแลคติค จากนั้นจะได้นำผลที่ได้ออกมาไปใช้ในการศึกษาจลนศาสตร์การหมักด้านต่างๆ เพื่อให้เกิดกระบวนการที่มีประสิทธิภาพดีในการผลิตกรดแลคติคต่อไป

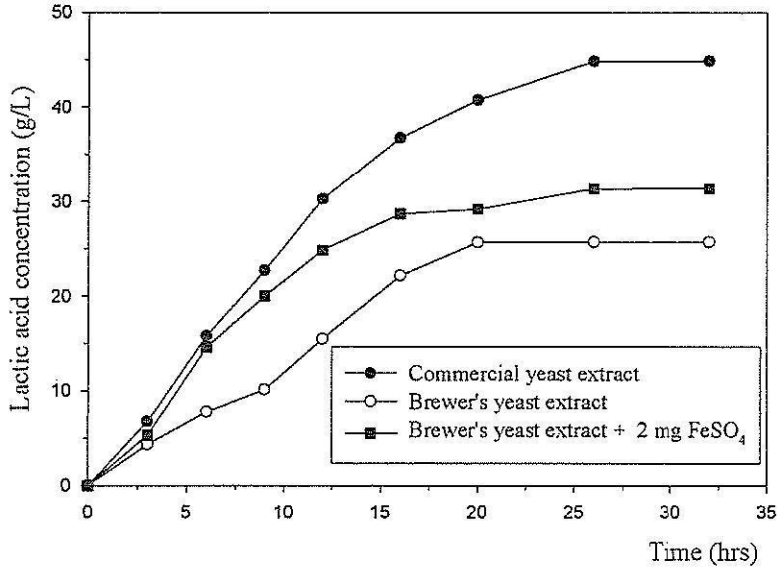
สำหรับ รูปภาพ 28 เป็นการศึกษาวิเคราะห์ค่าต่างๆเช่น pH ปริมาณ reducing sugar ปริมาณ dry cell weight และปริมาณของกรดแลคติค ที่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก จากการที่ใช้ brewer's yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน commercial yeast extract จากเส้นกราฟของทุกค่าพารามิเตอร์ที่ทำการศึกษานั้น พบว่าเป็นไปตามรูปแบบการเจริญของเชื้อ *L. lactis* คือจากเริ่มต้นปริมาณเซลล์มีค่าน้อยมาก และจะเพิ่มขึ้นจนกระทั่ง 2.5 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณ reducing ก็มีค่าลดลงเรื่อยๆ เกือบเข้าใกล้ 0 กรัมต่อลิตร นั่นหมายความว่าเชื้อสามารถนำอาหารไปใช้ได้เกือบทั้งหมด โดยจะเปลี่ยนไปเป็นการสร้างผลิตภัณฑ์กรดแลคติคออกมาปริมาณ 13 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง



รูปภาพ 28 แสดงกระบวนการผลิตกรดแลคติคจากน้ำตาลกลูโคสเสริมด้วย brewer's yeast extract โดยเชื้อ *Lactococcus lactis* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

รูปภาพ 29 จากการทดลองพบว่า brewer's yeast extract เมื่อเสริมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสไซรัปเป็นแหล่งคาร์บอนแล้วนั้น พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติคได้ อีกทั้งมีราคาถูกกว่าถึง 10 เท่า (Nanci *et al.*, 2005) จากการศึกษาของ Saksinchai และคณะ เกี่ยวกับ brewer's yeast extract นั้น แสดงให้เห็นว่า มีสารอาหารจำนวนที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย แต่อย่างไรก็ตามยังคงขาดแร่ธาตุบางอย่าง เช่น ธาตุเหล็ก เป็นต้น เช่นเดียวกับรายงานวิชาการที่มีการเติมเหล็กซัลเฟตลงไป 3 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ ของเชื้อ *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* เป็น 2 เท่า (Saksinchai *et al.*, 2001) ทั้งนี้ในงานวิจัยนี้ได้เพิ่มแร่ธาตุเหล็กลงไป 2 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อส่งเสริมการเจริญและประสิทธิภาพของ brewer's yeast extract เนื่องจากในกระบวนการผลิตเบียร์มีขั้นตอนมากมาย และเมื่อได้ยีสต์ที่เหลือนี้ ก็ต้องผ่านการสกัดและกระบวนการต่างๆ ทำให้แร่ธาตุที่มีอยู่จะละลายออกไปกับน้ำระหว่างการเตรียม อีกทั้งในกระบวนการผลิตกรดแลคติคเชื้อ *L. lactis* ต้องการอาหารหลากหลาย และ commercial yeast extract นั้นอุดมสมบูรณ์ไปด้วยกรดอะมิโน peptidic nitrogen สารส่งเสริมการเจริญ หรือเรียกว่า growth factor และวิตามิน (Amrane and Prigent, 1998) ดังนั้นหากแหล่งไนโตรเจนใดมีสารอาหารและส่วนประกอบใกล้เคียงกับ commercial yeast extract จะสามารถ

ช่วยส่งเสริมความสามารถในการผลิตกรดแลคติคได้ ถือได้ว่าเป็นผลดีและก่อให้เกิดประโยชน์เป็นอย่างมาก และดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่า brewer's yeast extract เป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกประกอบกับใช้กลูโคสไซรัปมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับสร้างกรดแลคติค ซึ่งถือว่ามีต้นทุนที่ต่ำ แต่อย่างไรก็ตามสูตรอาหารดังกล่าวจะยังไม่สามารถเทียบเท่ากับอาหาร MRS ที่ขายทางการค้า เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสารอาหารของสารสกัดยีสต์ทางการค้าและ brewer' yeast extract สำหรับปริมาณไนโตรเจนและโปรตีนพบว่า สารสกัดยีสต์ทางการค้ามีปริมาณไนโตรเจน โปรตีน ประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ และ 50-75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ตรงกันข้ามกับ brewer's yeast extract ที่มี ปริมาณไนโตรเจน 3.9 เปอร์เซ็นต์ และโปรตีนประมาณ 47 เปอร์เซ็นต์ จากผลนี้จะเห็นได้ว่า brewer's yeast tract มีสารอาหารน้อยกว่า แต่อย่างไรก็ตามยังคงมีสารอาหารอยู่ปริมาณที่เพียงพอใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนของการผลิตกรดแลคติคด้วย *L. lactis* ได้ (แต่ผลการทดลองยังไม่ดีเท่ากับการใช้ commercial yeast extract)



รูปภาพ 29 แสดงการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแหล่งไนโตรเจนที่เป็น commercial yeast extract และ brewer's yeast extract ที่มีกลูโคสไซรัปเป็นแหล่งคาร์บอน ในกระบวนการผลิตกรดแลคติคด้วยเชื้อ *L. lactis*

จากการเปรียบเทียบการผลิตกรดแลคติคโดยสารสกัดจากยีสต์จากโรงงานเบียร์พบว่า หากมีการเติมแร่เหล็กลงไป สามารถเพิ่มการผลิตกรดแลคติค ซึ่งแสดงดังรูปภาพ 28 นั้น พบว่าสามารถเพิ่มการผลิตกรดแลคติคได้ ประมาณ 18% ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารสกัดยีสต์จากโรงงานผลิตเบียร์ที่เติมเหล็กลงไป 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับทุกการทดลองในหัวข้อต่อไป อีกทั้งมี

การศึกษารูปแบบกระบวนการหมักต่างๆ เช่นกระบวนการหมักแบบกะ (Batch fermentation) หรือกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (Fed batch fermentation) เพื่อให้ได้ปริมาณความเข้มข้นกรดแลคติคที่มากขึ้นกว่าเดิม เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาการใช้วัตถุดิบประเภทอื่นๆ และนำสูตรอาหารดังกล่าวที่มีการใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนราคาถูกประยุกต์ใช้ในการผลิตสารที่มีประโยชน์อื่นๆ ดังเช่น เอทานอล กรดอินทรีย์ต่างๆ เป็นต้น

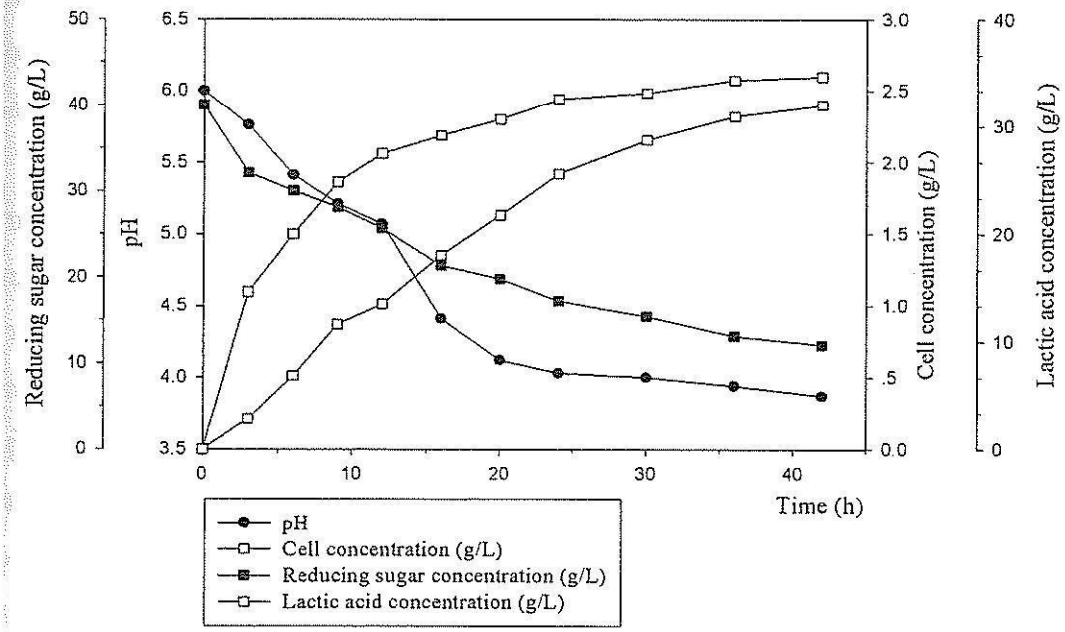
3.4 กระบวนการหมักกรดแลคติคโดยถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตกรดแลคติคในระดับถังหมัก (fermenter) สามารถผลิตกรดแลคติคได้มากกว่าการผลิตในระดับ flask เนื่องจากสามารถควบคุมสภาวะต่างๆคือ ควบคุม pH อุณหภูมิ ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติคของเซลล์ อ้างอิงจากวารสารของ Petrov และคณะ ที่มีการศึกษาผลของกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดแลคติคที่ใช้แป้งเป็นวัตถุดิบ โดยเชื้อ นั้น *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84 ในกระบวนการหมักแบบกะ ในขวดขนาด 500 มิลลิลิตร ที่ค่า pH เริ่มต้น 6.0 พบว่ามีระยะเวลาในกระบวนการหมักประมาณ 165 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และส่วนประกอบต่างๆของสูตรอาหารที่มีการศึกษาต่างๆออกไปก่อให้เกิดผลต่ออัตราการผลิตกรดแลคติคที่เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายด้วย และในการศึกษาการปรับเปลี่ยนสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น ก็เพื่อวัตถุประสงค์ที่จะทำให้เพิ่มอัตราการผลิตกรดแลคติคและเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตให้ดีที่สุด ในอาหารที่มีสารอาหารครบสมบูรณ์ จะส่งเสริมให้การผลิตกรดแลคติคเพิ่มขึ้น 68 เปอร์เซ็นต์ โดยเชื้อสายพันธุ์นี้จะมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ในการย่อยแป้งได้เล็กน้อยโดยที่ความสามารถในการย่อยเป็น 7.5 กรัมต่อลิตรจากแป้งเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ณ สิ้นสุดกระบวนการ (Petrov *et al.*, 2008) ทั้งนี้จากการศึกษาดังกล่าวได้นำเป็นตัวอย่างในการศึกษากระบวนการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพต่อไป

3.4.1 กระบวนการหมักกรดแลคติคภายใต้สภาวะที่ไม่มีการควบคุม pH แบบกะ

แต่จากการศึกษาทดลองอิทธิพลต่อการผลิตกรดแลคติคแล้วนั้น pH นับว่ามีผลมากที่สุดในกระบวนการหมักเมื่อเทียบกับอัตราการกวน อุณหภูมิ เป็นต้น ในการศึกษาหัวข้อนี้ มีการใช้กลูโคสไซรัป (หรือเรียกว่ากลูโคสเหลว ได้จากการนำแป้งมันสำปะหลังผ่านกระบวนการ treatment เพื่อให้ได้น้ำตาลออกมา จากบริษัท Corn product โดยที่กลูโคสไซรัป 100 กรัมมีน้ำตาลกลูโคส 40 กรัม) และน้ำตาลที่ได้นี้ทำให้เชื้อ *L. lactis* สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและสามารถปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ พร้อมเข้าสู่กระบวนการเมแทบอลิซึม เพื่อสร้างกรดแลคติคทันที

สำหรับกระบวนการหมักกรดแลคติคที่ไม่มีการควบคุม pH นั้น ถือว่ามีผลต่อความสามารถในการหมักของเชื้อ *L. lactis* โดยดูได้จาก รูปภาพ 30 และจากความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อนั้น โดยที่ในชั่วโมง 0 ถึง ชั่วโมงที่ 12 นั้น ค่า pH ในกระบวนการหมักมีค่าลดลงเรื่อยๆ และหลังจากชั่วโมงที่ 12 นั้น *L. lactis* มีการเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะการเจริญแบบทวีคูณ (log phase) และหลังจากชั่วโมงที่ 12 ถึง ชั่วโมงที่ 24 นั้นจะมีการใช้แหล่งคาร์บอนหรือสารตั้งต้นน้อยลง เซลล์เริ่มคงที่ การเจริญไม่เพิ่มขึ้น ไม่มีการสร้างกรดในกระบวนการหมัก ค่า pH จึงเริ่มคงที่ คือประมาณ pH 3.80 และความเข้มข้นของกรดแลคติคที่ผลิตได้ คือ 34.65 กรัมต่อลิตร และเริ่มคงที่หลังจากนี้ ผลนี้เช่นเดียวกับการผลิตกรดแลคติคจาก wheat flour hydrolysate ที่ไม่มีการควบคุมค่า pH ระหว่างกระบวนการหมัก โดยที่ pH เริ่มต้นเป็น 5.85 และ pH ลดลงเป็น 3.2 ในชั่วโมงที่ 24 (Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 1997)



รูปภาพ 30 แสดงปริมาณกรดแลคติค ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซิ่ง และความเข้มข้นของเซลล์ที่ผลิตได้จากระบวนการหมักที่ใช้กลูโคสไซรัปเป็นแหล่งคาร์บอนและ brewer's yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ในสภาวะที่ไม่มีการควบคุม pH โดยเชื้อ *L. lactis*

อย่างไรก็ตามในกระบวนการหมักที่ไม่มีการควบคุมค่า pH นั้น พบว่ามีปริมาณน้ำตาลกลูโคสหรือสารตั้งต้นภายในถังหมักอยู่จำนวนมากเนื่องจากว่าการเจริญเติบโตของเชื้อหยุดชะงักลงจากการสะสมของกรดภายในกระบวนการหมัก ซึ่งมีเอกสารอ้างอิงว่าที่ pH ต่ำกว่า 4.0 จะเกี่ยวข้องกับโครงสร้างองค์ประกอบของเซลล์ เช่น เยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์ และของเหลวของในเซลล์ cytoplasm อีกด้วย (Goncalves *et al.*, 1997) ดังนั้นวิธีแก้ไขจึงควรจะมีการควบคุมค่า pH ในระหว่างการหมัก เพื่อให้เชื้อสามารถใช้สารตั้งต้นได้มีประสิทธิภาพมากที่สุด กระบวนการผลิตกรดแลคติคโดยวิธีการหมักที่ไม่มีการควบคุม pH นั้น พบว่าค่าการผลิตกรดแลคติคต่อกรัมของเซลล์ ($Y_{P/X}$) มีค่าน้อยกว่ากระบวนการที่มีการควบคุม pH อันเนื่องมาจากการสะสมของกรดแลคติคในถังหมักส่งผลต่อเซลล์ทำให้เซลล์ตายได้ เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค *L. delbrueckii* UFV H2B20 ที่มีคุณสมบัติเป็น homofermentative organism คือสามารถผลิตกรดแลคติคเป็นผลิตภัณฑ์หลักได้เพียงอย่างเดียว ผลการทดลองแสดงว่ามีความสามารถผลิตกรดแลคติคโดยเปลี่ยนสารตั้งต้นที่เป็นน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดแลคติคได้เกือบทั้งหมดถึง 99% ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็น L-lactic acid ที่เป็นเพียงไอโซเมอร์ชนิดแอล (Idris and Suzana, 2006) เท่านั้น โดยมีความสำคัญมากที่จะนำไปใช้ประโยชน์หรือประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆเป็นอย่างดี

อีกทั้งได้มีการอ้างอิงถึงบทความของ Monteagudo และคณะ ซึ่งได้แสดงลักษณะการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติคโดยระบุแบคทีเรียจะเจริญเข้าสู่ระยะการตาย (death phase) อาจเนื่องมาจากการสะสมของผลผลิตหรือกรดภายในกระบวนการหมักทำให้เซลล์ที่มีชีวิตอยู่เกิดตายลง จากการศึกษากระบวนการหมักที่ไม่มีการควบคุม pH พบว่า pH ในระบบลดลงระหว่างการหมัก เซลล์จะมีการแลกเปลี่ยนประจุ และการสูบเสียความสามารถในการควบคุมการเข้าออกของสารของเยื่อหุ้มเซลล์ เกิดอยู่ในรูปที่ไม่มีประจุของสภาวะในและนอกเซลล์ และกลับเข้าไปในเซลล์ทั้งยังแตกตัวเพราะว่า pH ในเซลล์สูงกว่านอกเซลล์ เซลล์จะมีการใช้ ATP เพื่อปั๊ม proton ออกไปเพื่อรักษาสมดุลภายในเซลล์ (Monteagudo *et al.*, 1997) หลังจากนั้นพลังงานในเซลล์จะหมดลงจากการใช้พลังงานเป็นอย่างมากในการที่จะดำรงชีวิตให้อยู่รอดในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมและก่อให้เกิดการสูญเสียความสามารถในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์เป็นสาเหตุให้เซลล์ตายในที่สุด (Hofvendahl and Hagerdal, 2000)

ถึงแม้ว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีอาหารอุดมสมบูรณ์ ที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ วิตามิน และสารเสริมการเจริญเติบโตต่างๆ และเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ในความเข้มข้นที่สูง ในระหว่างการหมักเมื่อค่า pH ลดต่ำลง เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค รวมทั้ง *L. lactis* ไม่สามารถทนสภาวะดังกล่าวนี้ได้ (ถึงแม้จะเป็นจุลินทรีย์ชนิดที่สามารถทนกรดได้ก็

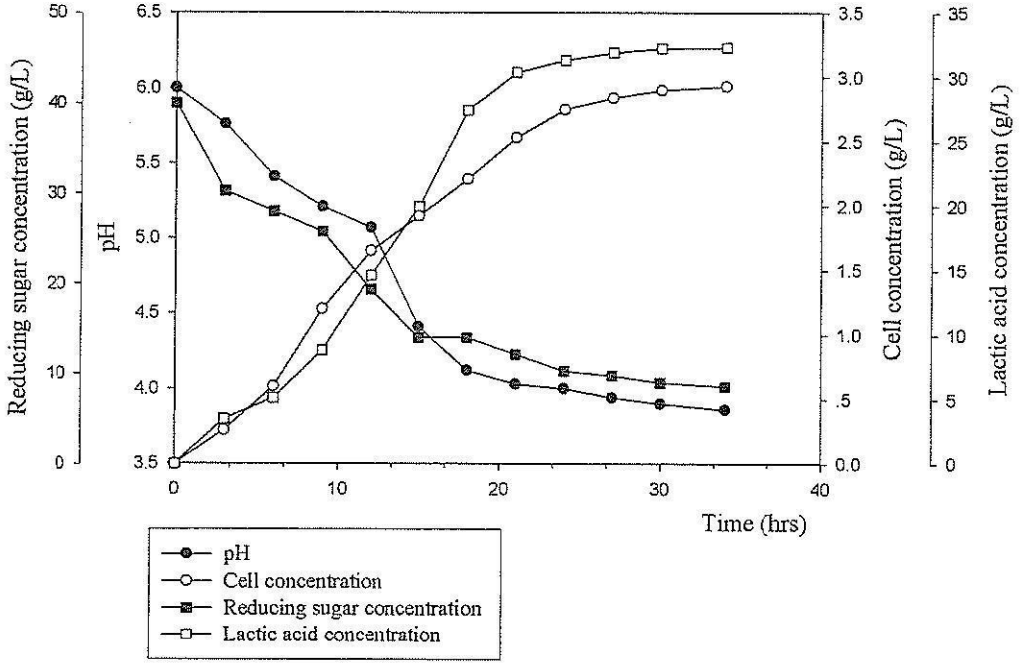
ตาม) เช่นเดียวกับมีรายงายระบุว่ากรดแลคติครบกวนเซลล์ได้เมื่อมีความเข้มข้นที่สูง (Wee *et al.*, 2006) ดังนั้นหากจัดการทดลองให้ค่า pH นั้นอยู่ในระดับหรือในช่วงที่เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค *L. lactis* สามารถเจริญเติบโตและสร้างกรดแลคติคเป็นผลผลิตหลัก ก็จะสามารถยืดอายุและการเจริญของเชื้อต่อไปได้อีก ซึ่งเป็นผลดีเป็นอย่างมาก เพราะ *L. lactis* จะสามารถเจริญในสภาวะที่เหมาะสมนี้ นั่นคือ มีการควบคุมค่า pH ในกระบวนการหมักให้อยู่ที่ pH 6.0 ตลอดการทดลองนั่นเอง

3.4.2 กระบวนการหมักกรดแลคติคภายใต้สภาวะที่มีการควบคุม pH แบบกะ

pH เป็นหนึ่งในปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อกระบวนการผลิตกรดแลคติคโดยการหมักเนื่องจาก catalytic activity ของเอนไซม์และ metabolic activity ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคขึ้นอยู่กับ extracellular pH. (Hutkins and Ponne, 1991) ในกลุ่ม *L. delbrueckii* ค่า pH ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 5.5 ถึง 7.5 ซึ่งมีความเหมาะสมในการะเจริญและสร้างกรดแลคติคขึ้น และในการทดลองงานวิจัยนี้ได้มีการจัดระบบการหมักโดยที่เริ่มต้นด้วย pH 6.0 ในถังหมักปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร ในสภาวะ anaerobic ที่ไม่มีออกซิเจน (รูปภาพ 31)และควบคุม pH เป็น 6.0 พบว่าเวลาในกระบวนการหมักยาวขึ้นเป็น 60 ชั่วโมง แบคทีเรียสามารถนำแหล่งคาร์บอนหรือสารตั้งต้นไปใช้สูงสุดผลิตกรดแลคติคได้อย่างดี มีสารตั้งต้นเหลืออยู่ในกระบวนการหมักน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักที่ไม่มีการควบคุม pH โดยที่กระบวนการหมักจะหยุดลงหลังจากชั่วโมงที่ 24 เนื่องจากเชื้อไม่สามารถทนสภาวะที่เป็นกรดสูงได้

ในการทดลองกระบวนการหมักกรดแลคติคในหัวข้อนี้ จะมีการปรับค่า pH ให้คงที่ ตลอดกระบวนการ และพบว่า pH 6.0 นั้นจะช่วยให้เชื้อ *L. lactis* เจริญดีและส่งเสริมการผลิตกรดแลคติคอีกด้วย หากกระบวนการหมักมีการนำแป้งมันสำปะหลังที่ยังไม่ปรับโครงสร้างจะใช้ระยะเวลานานทั้งแบบที่ควบคุมและไม่ควบคุมค่า pH โดยใช้ระยะเวลาประมาณ 5 วัน จึงสิ้นสุดปฏิกิริยา สำหรับผลของการควบคุมค่า pH และการเสริมสารอาหารในกระบวนการหมักกรดแลคติคนั้นได้มีการศึกษาลักษณะความสามารถในการผลิตกรดแลคติค ซึ่งพบว่า ในกระบวนการหมักกรดแลคติคที่การใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้นหรือเป็นแหล่งคาร์บอนหลักที่มีการควบคุมค่า pH เป็น 6.0 นั้นพบว่าผลผลิต (yield) ของกรดแลคติคที่ผลิตได้เป็น 0.7 กรัมต่อกรัมของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป (รูปภาพ 31)และในกระบวนการหมักที่มีการควบคุมค่า pH นั้นมีประสิทธิภาพรูปแบบกระบวนการผลิตกรดแลคติคที่ดีกว่ากระบวนการหมักที่ไม่มีการควบคุมค่า pH เนื่องจากว่าในระหว่างกระบวนการหมักนั้นจะมีการผลิตกรดเกิดขึ้นทำให้ค่า pH มีค่าลดลงจาก 6.0 เป็น 3.8 ที่เวลาหลังชั่วโมงที่ 24 โดยที่ในถังหมักอยู่ในสภาพที่มีความเป็นกรดสูง เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติคไม่สามารถทนต่อกรดได้ ณ ขณะนั้น จึงทำให้เชื้อตายและหยุดสร้างกรดแลคติค

จาก รูปภาพ 31 จะสังเกตได้ว่าระยะเวลาในกระบวนการหมักยาวนานมากกว่ากระบวนการที่ไม่มีการควบคุมค่า pH ทั้งนี้เนื่องจากหากมีการควบคุม pH ให้ได้ 6.0 (รูปภาพ 31)ตลอดระยะเวลาดำเนินการหมัก ซึ่งเป็นค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *L. lactis* แล้วนั้น จะทำให้เชื้อสามารถเจริญเติบโตต่อไปได้เรื่อยๆ พร้อมกับสร้างผลผลิตออกมาอยู่ตลอด ซึ่งต่างจากกระบวนการที่ไม่มีการควบคุม pH ที่หลังจากดำเนินการหมักไปได้ระยะหนึ่งจะมีการสะสมของกรดแลคติคที่ความเข้มข้นสูงทำให้เชื้อ *L. lactis* เจริญต่อไปไม่ได้ ถ้าควบคุม pH แล้วนั้น ถึงแม้ว่าจะมีการผลิตกรดแลคติคออกมาในน้ำหมักด้วยก็ตาม แต่ก็มีการเติมด่างลงไปเพื่อปรับ pH ให้เป็น 6.0 ดังนั้น ในน้ำหมักก็จะยังมีค่าเหมาะสมต่อการเจริญอยู่ แต่อย่างไรก็ตามถึงระยะเวลาหนึ่ง ในที่นี้จากกราฟคือที่ 60 ชั่วโมง (รูปภาพ 31) อาหารของเชื้อเริ่มหมดลง เมื่อไม่มีอาหารเชื้อก็ไม่เจริญและเริ่มตายลงตามลำดับ จากเหตุผลนี้ถึงแม้ว่าการควบคุม pH ที่ 6.0 จะทำให้ปริมาณกรดแลคติคที่ผลิตได้สูงเพิ่มขึ้นก็ตาม แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการหมักก็จะหยุดเนื่องจากอาหารหมด ดังนั้นในหัวข้อต่อไปจึงจัดการทดลองให้มีการศึกษาถึงกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation) ที่มีการป้อนอาหารเพิ่มลงไปในถังหมัก และแปรผันอัตราการป้อนเพื่อที่จะหาค่าที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติค



รูปภาพ 31 แสดงปริมาณกรดแลคติค น้ำตาลรีดิวซิ่ง และความเข้มข้นของเซลล์ที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักที่ใช้กลูโคสไซรัปเป็นแหล่งคาร์บอนและ brewer's yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนในสภาวะที่มีการควบคุม pH โดยเชื้อ *L. lactis*

3.4.3 การหมักแบบกึ่งกะ

3.4.4 ผลของการแปรผันค่า feeding rate ในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ

กระบวนการหมักกรดแลคติคแบบกะ (batch process) นั้นผลการทดลองพบว่ามีผลผลิตกรดแลคติคต่ำกว่าแบบกึ่งกะ (fed batch process) อาจเนื่องมาจากสาเหตุที่เกิดการยับยั้งจากสารตั้งต้นที่มีความเข้มข้นสูงและผลผลิตที่ได้มีผลยับยั้งต่อเซลล์แบคทีเรีย (Goncalves *et al.*, 1991) ดังนั้นเพื่อที่จะสามารถแก้ไขปัญหาดังกล่าวในการทดลองนี้จึงมีการใช้กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ ในกระบวนการหมักแบบกะจะมีการป้อนอาหารเต็มที่ลงในถังหมักทำให้เซลล์สามารถเมแทบอไลซ์ได้อย่างรวดเร็ว เป็นผลให้เซลล์เจริญได้อย่างรวดเร็วเช่นกัน แต่ตรงกันข้ามกับการสร้างผลิตภัณฑ์ซึ่งต่ำ ดังนั้นในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะจะมีการป้อนอาหารลงไปในระหว่างกระบวนการหมัก ทำให้เซลล์เมแทบอไลซ์อาหารได้อย่างช้าๆ เพื่อใช้ในการเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์ต่อไป

ในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะจะมีการใช้ peristaltic pump เพื่อเติมหรือเพิ่มปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่อง และทำการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ต่างๆเช่น ปริมาณ biomass, reducing sugar, และปริมาณกรดแลคติคที่เกิดขึ้นควบคู่ไปด้วยโดยหลังจากที่เชื้อ *L. lactis* หยุดเจริญเติบโต ในการให้อาหารนั้นจะหยุดลง สำหรับอาหารที่ถูกปั๊มเข้าสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่อัตราการป้อนคงที่นั้นมีค่าอยู่ระหว่าง 0.01 กรัมต่อวินาที 0.3 กรัมต่อวินาที และมีการควบคุมระบบการทำงานให้คงที่ จาก ตาราง 12 ได้มีการแสดงผลของอัตราการป้อนสารอาหารเข้าสู่ระบบในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ ในระหว่างการทดลองนี้ปริมาตรของน้ำหมักเพิ่มขึ้นจากเดิม 1.2 ลิตร ไป 1.9 ลิตร ในระยะสุดท้ายของการหมักการเปลี่ยนแปลงปริมาตรในกระบวนการนี้เนื่องจากสารอาหารที่ป้อนเข้าไปจะมีความเข้มข้นที่สูงเพื่อที่ต้องการให้ปริมาตรของถังหมักมีการเพิ่มขึ้นไม่มากนัก จากการทดลองนี้พบว่าที่อัตราการป้อนที่ 0.1 กรัมต่อวินาทีดีกว่าทุกการทดลอง โดยดูได้จากค่า productivity yield และความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหลือในกระบวนการหมัก

ตาราง 12 ตารางแสดงการเปรียบเทียบอัตราการป้อนอาหารในกระบวนการหมักกรดแลคติคโดยเชื้อ *L. lactis*

อัตรา	อัตราการป้อน 0.01 g/s	อัตราการป้อน 0.02 g/s	อัตราการป้อน 0.1 g/s	อัตราการป้อน 0.2 g/s	อัตราการป้อน 0.3 g/s
ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	3.14	3.36	3.51	3.49	3.46
Productivity (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	2.55	2.75	3.11	3.09	3.04
Yield (%)	89	90.1	91.25	91.17	91.09
ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซิ่งสุดท้าย (กรัมต่อลิตร)	15.4	20.2	25.8	30.5	40.0
ปริมาตรอาหารเริ่มต้น (ลิตร)	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
ปริมาตรอาหารสุดท้าย (ลิตร)	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9

สำหรับความเข้มข้นของกรดแลคติคที่มีค่าต่ำที่สุดคือ 85.5 กรัมต่อลิตร ในระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง จากอัตราการป้อนสารอาหารที่ 0.01 กรัมต่อวินาที อัตราการผลิตกรดแลคติคในการป้อนนี้มีค่าต่ำเมื่อเทียบกับที่อัตราการป้อนอาหารอื่นๆ เป็นที่ชัดเจนแล้วว่าเนื่องจากอัตราการป้อนอาหารต่ำจะทำให้อัตราการผลิตกรดแลคติคต่ำด้วย ดังนั้นจึงมีการใช้อัตราการป้อนที่สูงขึ้นในการทดลอง พบว่าความเข้มข้นของกรดแลคติคสูงขึ้นตามการเพิ่มของอัตราการป้อนอาหาร ทั้งผลการทดลองที่ความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อวินาทีจะสามารถผลิตกรดแลคติคได้มากกว่าที่อัตราการป้อน 0.1 กรัมต่อวินาที แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของกรดที่ผลิตได้ไม่แตกต่างกัน กล่าวคือ 97.42 กรัมต่อลิตร และ 96.34 กรัมต่อลิตร ซึ่งถ้าเลือกใช้อัตราการป้อนที่ 0.2 กรัมต่อวินาที จะทำให้ไม่คุ้มทุนในด้านการผลิตเนื่องจากต้องมีการใช้สารตั้งต้นหรืออาหารมากขึ้น ซึ่งไม่สอดคล้องกับการเพิ่มของผลผลิต เนื่องจากมีการเพิ่มขึ้นไม่มากนัก และสำหรับที่อัตราการป้อน 0.3 กรัมต่อวินาทีนั้น พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติคได้น้อยกว่าอัตราการป้อนที่กล่าวข้างต้น ทั้งนี้อาจเนื่องมากจากมีอัตราการป้อนที่สูงทำให้เซลล์ไม่สามารถใช้อาหารได้อย่างสมบูรณ์ อีกทั้งอาจมีการยับยั้งด้วยความเข้มข้นของสารอาหารตั้งต้นที่สูง หรือเรียกว่า substrate inhibition จากปริมาณน้ำตาลในสารอาหารนั่นเอง ซึ่งอาจมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ (Gatje and

Gottschalk, 1991)ทำให้เกิดปรากฏการณ์ ที่เรียกว่า osmotic ทำให้สารต่างๆในสภาวะแวดล้อมเข้าสู่เซลล์ได้ และส่งผลให้เซลล์เกิดการตายได้นั่นเอง เมื่อเซลล์เริ่มตายจะทำให้ความสามารถในการผลิตกรดแลคติคลดลง ส่งผลต่อค่า productivity ที่ได้ (Hofvendahl and Hagerdal, 2000)

ตาราง 13 ตารางแสดงการเปรียบเทียบกระบวนการหมักกรดแลคติคด้วยกระบวนการหมักแบบกะที่มีการควบคุม pH ที่ 6.0 และกระบวนการหมักแบบกึ่งกะที่อัตราการป้อนอาหาร 0.1 กรัมต่อวินาที

รูปแบบการหมัก	กระบวนการหมักแบบกะ	กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ
ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร)	2.90	3.51
ความเข้มข้นของกรดแลคติค (กรัมต่อลิตร)	31.32	96.34
Productivity (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	2.3	3.11
Yield (%)	88.78	91.25

สำหรับกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ ผลการทดลองที่ดีขึ้น (ตาราง 13) เป็นผลมาจากปริมาณสารอาหารที่เติมลงไปในกระบวนการทดลอง นอกจากนั้นการยับยั้งจากความเข้มข้นของอาหารเริ่มต้น (ปริมาณน้ำตาล หรือปริมาณแหล่งคาร์บอนต่างๆ เช่น ความเข้มข้นของแป้ง หรือความเข้มข้นของสารที่ได้จากแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยแล้ว เป็นต้น) ที่สูงมีน้อย อย่างไรก็ตามการผลิตกรดแลคติคโดยเชื้อ *L. lactis* จะเริ่มหยุดลงในระยะสุดท้ายของกระบวนการหมัก เป็นผลมาจากมีการสะสมปริมาณกรดแลคติคในน้ำหมักที่มากส่งผลให้เกิดการยับยั้งการผลิตและรบกวนเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติค (Goncalves *et al.*, 1997)

บทที่ 4 บทสรุป

4.1 สรุปผลการทดลอง

ด้วยเหตุที่งานวิจัยนี้ได้มีการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค *L. lactis* MM12 เพื่อสร้างกรดแล็ก ติกในกระบวนการหมักนั้น อันเนื่องมากจากเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถผลิตกรดแลคติคชนิด L เพียงอย่างเดียว และสามารถผลิตในปริมาณที่สูงได้ ถึงแม้จะมีปัญหาที่เชื้อ *L. lactis* นี้ไม่มีเอนไซม์อะไมเลสที่มีความสามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ แต่อย่างไรก็ตาม ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแป้งมันสำปะหลังก่อนที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนนั้น ก็จะใกล้เคียงได้กับการที่ใช้น้ำตาลต่างๆเป็นแหล่งคาร์บอน อีกทั้งถ้ามีการใช้ glucose syrup ดังเช่นในงานวิจัยนี้ ซึ่งมีราคาถูกกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาล เชื้อ *L. lactis* ก็สามารถที่จะนำไปใช้ได้ง่าย เนื่องจากมีโครงสร้างเป็นน้ำตาล นำไปใช้ในการเจริญได้และผลิตกรดแลคติคขึ้นมาในที่สุด ซึ่งผลการทดลองนี้ก็ถือเป็นการตอบสนองวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้แล้วว่า สามารถหาวัตถุดิบหรือแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและสร้างกรดแลคติคขึ้นมาได้

สำหรับแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็น brewer's yeast extract ที่ใช้ในกระบวนการหมักที่ศึกษานี้ ก็ถือว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ราคาถูกอีกเช่นกัน การที่มีการประยุกต์ใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนจากวัตถุดิบที่มีราคาถูกหรือเหลือใช้นั้น นับว่าเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์เป็นอย่างมาก และก่อให้เกิดประโยชน์ในการผลิตกรดแลคติคที่เป็นสารที่เป็นความต้องการของท้องตลาด ซึ่งผสมผสานกับเทคโนโลยีชีวภาพและใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติเป็นตัวเปลี่ยนวัตถุดิบเป็นสารที่มีประโยชน์เกิดขึ้น โดยที่ถึงแม้ว่าในการปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการใช้แป้งมันสำปะหลังและ brewer's yeast extract นี้ทดแทนสารประกอบที่จำเป็นต้องซื้อเพื่อผสมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น ให้ผลการผลิตกรดแลคติคน้อยกว่าก็ตาม อีกทั้งกระบวนการหมักแบบกึ่งกะนี้เป็นการเติมอาหารเข้าไปอย่างต่อเนื่อง โดยไม่มีการถ่ายอาหารเลี้ยงออกจากระบบ เพราะฉะนั้นปริมาตรของอาหารในถังหมักจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น อีกทั้งระบบนี้สามารถควบคุมปริมาณของสารตั้งต้นที่เหลือให้มีความเข้มข้นต่ำมากได้ ทั้งยังช่วยลดความเป็นพิษของส่วนประกอบบางอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้ออีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามนับว่าเป็นทางเลือกได้อีกทาง และสามารถนำไปศึกษาต่อเนื่อง ทั้งยังเป็นแนวทางในการวิเคราะห์วิจัยปรับปรุงให้เกิดการเพิ่มความสามารถในการผลิตกรดแลคติคโดยกระบวนการหมักและมีประสิทธิภาพสูงสุดได้ต่อไป

4.2 ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

จากวารสารวิชาการมีรายงานว่าส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความจำเป็นที่จะต้องควบคุมให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโต (Bustos *et al.*, 2004) และการสร้างผลิตภัณฑ์ของเชื้อ *L. lactis* เนื่องจากพบว่าส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อทั้งการเจริญเติบโตและการสร้างกรดแล็กติกในกระบวนการหมักเป็นอย่างมาก โดยปกติและ *L. lactis* เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการสารอาหารในการเจริญที่ซับซ้อนและหลากหลาย อีกทั้งสภาวะแวดล้อมจะต้องมีการควบคุมให้เหมาะสม ถ้าส่วนประกอบสารอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เหมาะสมแล้วนั้น จะก่อให้กระบวนการเมแทบอลิซึมของเชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมที่มีการสร้างกรดแลคติคเพียงอย่างเดียว เปลี่ยน pathway เกิดการสร้างผลพลอยได้อื่นๆที่ไม่ต้องการออกมา (Evangelista *et al.*, 1994) ทั้งยังส่งผลไปถึงกระบวนการแยกกรดแลคติคออกในขั้นตอนสุดท้าย เนื่องจากว่าเมื่อในกระบวนการหมักมีเพียงกรด แลคติคเพียงอย่างเดียว จะสามารถแยกผลิตภัณฑ์ออกได้ง่ายและใช้ขั้นตอนหรือระบบที่ไม่ซับซ้อน ต้นทุนการผลิตต่ำ แต่เมื่อมีสิ่งเจือปนเป็นผลพลอยได้ที่เป็นสารอื่น นอกเหนือจากกรดแลคติคแล้วนั้น จะทำให้กระบวนการแยกผลิตภัณฑ์ดังกล่าว เกิดความยุ่งยากและมีความจำเป็นต้องใช้กระบวนการขั้นตอนเทคนิคที่ซับซ้อน เกิดการเพิ่มต้นทุนการผลิต ซึ่งไม่เป็นผลดีทางเศรษฐกิจและการนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นจากการวิจัยในหัวข้อข้างต้นที่มีการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่างๆในการเจริญเติบโตและการสร้างผลผลิตของ *L. lactis* แล้วนั้น นำมาใช้ในกระบวนการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่อยู่ในระบบปิด ซึ่งสามารถควบคุมได้ตามสภาวะที่ต้องการ และถือเป็นต้นแบบในการพัฒนาระบบและนำไปใช้ศึกษาต่อไปได้ แต่อย่างไรก็ตามในหัวข้อการวิจัยนี้ได้มีการศึกษากระบวนการหมักระบบต่างๆ โดยที่ยังไม่ได้ศึกษาลงลึกถึงกระบวนการแยกผลิตภัณฑ์ออกจากระบบ อย่างไรก็ตามเมื่อมีการควบคุมระบบกระบวนการหมักให้เหมาะสมทั้งด้านแหล่งอาหารและสภาวะการเจริญแล้วนั้น ก็พบว่ากรดแลคติคมีการสะสมในน้ำหมัก จากการผลิตออกมาเรื่อยๆ มีผลทำให้เชื้อแบคทีเรียตายได้ แต่ถ้ามีการแยกกรดแลคติคออกมาจากระบบ ก็จะทำให้เชื้อ *L. lactis* สามารถที่จะใช้แหล่งอาหารพร้อมกับสร้างผลผิตควบคู่กันไป โดยที่มีการป้อนแหล่งอาหารลงไปเรื่อยเพื่อให้เพียงพอต่อการเจริญ กระบวนการที่กล่าวไปแล้วนี้คือประกอบด้วยระบบ Upstream และ Downstream คือมีการผลิตร่วมกับกระบวนการแยกผลผลิตออกจากระบบ สำหรับ Upstream คือกระบวนการผลิตในระบบการหมักดังงานวิจัยนี้ถ้ามีการจัดสร้างระบบแยกผลิตภัณฑ์ (Product recovery) ออกไป โดยที่มีการใช้เทคนิคเยื่อแผ่นที่มีการแยกเฉพาะกรดแลคติคออกไป โดยที่เชื้อ *L. lactis* จะไม่ออกไปจากระบบ และมีการหมุนเวียนน้ำหมักเรื่อยๆ กรดแลคติคก็จะถูกเก็บไว้อีกด้านหนึ่ง เกิดความเข้มข้นมากขึ้นเรื่อยๆ โดยที่ในถังหมักนั้นก็จะมีการป้อน

สารอาหารเรื่อยๆ (Fed-batch system) เชื้อ *L. lactis* ก็จะใช้สารอาหารและเปลี่ยนเป็นกรดแลคติคเช่นนี้ต่อไป จนกระทั่งอาหารเริ่มหมดลง ก็จะหยุดปฏิกิริยาหรือสิ้นสุดกระบวนการนั่นเอง

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าการสะสมของกรดแลคติคในน้ำหมักในปริมาณที่สูงได้ก่อให้เกิดปัญหาหลักคือการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. lactis* ดังนั้นจึงมีการพัฒนาแนวความคิดที่จะทำการแยกกรดแลคติคออกจากระบบในขณะที่กระบวนการหมักกำลังดำเนินไป (extractive fermentation หรือ *in situ* product removal) ซึ่งจะเป็นการพัฒนากระบวนการหมักไปพร้อม ๆ กับการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ ซึ่งจะมีผลดีในด้านต่าง ๆ ดังนี้ 1.) ลดความเป็นพิษของกรดแลคติคที่มีต่อเชื้อลง จะทำให้เชื้อ *L. lactis* สามารถผลิตกรดแลคติคได้มากขึ้น 2). สมดุลของปฏิกิริยาจะไปข้างหน้าคือจากสารตั้งต้นเกิดการเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติคที่เป็นผลผลิตจากกระบวนการหมัก เนื่องจากมีการแยกกรดแลคติคออกจากระบบอยู่ตลอดเวลา 3). การสูญเสียผลิตภัณฑ์จะมีค่าลดลง และ 4). เป็นการลดขั้นตอนของการผลิตลง (Mattiasson and Holst, 1991) ข้อได้เปรียบต่าง ๆ เหล่านี้จะนำไปสู่การลดขนาดของถังหมักลง (เมื่อเปรียบเทียบกับผลิตผลของกรดแลคติคที่เท่ากัน) ทำให้สามารถลดต้นทุนทั้งต้นทุนคงที่และต้นทุนผันแปรต่าง ๆ ลงได้

ภาคผนวก ก

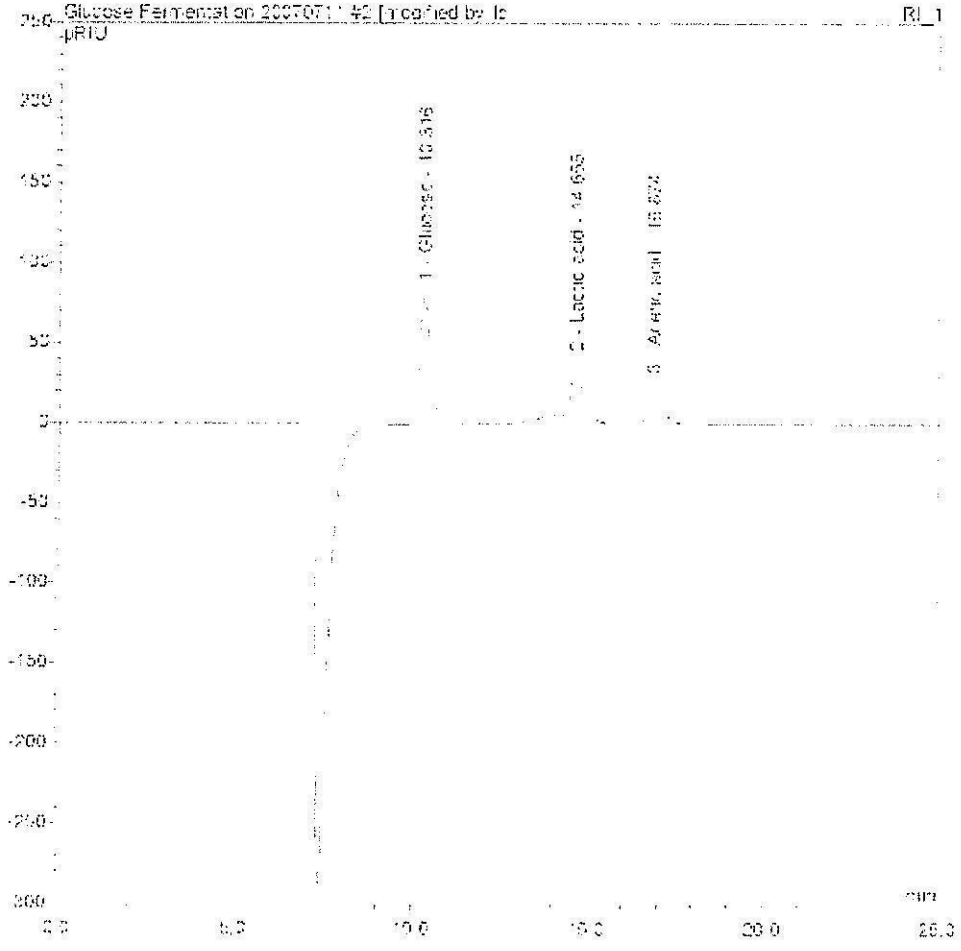
สูตรอาหาร MRS

ประกอบด้วย (หน่วยต่อลิตร):

แหล่งไนโตรเจนคือน้ำตาลกลูโคส	15 กรัม
แหล่งคาร์บอน คือ commercial yeast extract	20 กรัม
Tween 80	1 กรัม
Ammonium citrate ($(NH_4)_2C_6H_6O_7$)	2 กรัม
Sodium acetate ($C_2H_3NaO_2$)	5 กรัม
Magnesium sulphate ($MgSO_4.7H_2O$)	0.1 กรัม
Manganese sulphate ($MnSO_4.4H_2O$)	0.05 กรัม
Dipotassium phosphate (K_2HPO_4)	2 กรัม

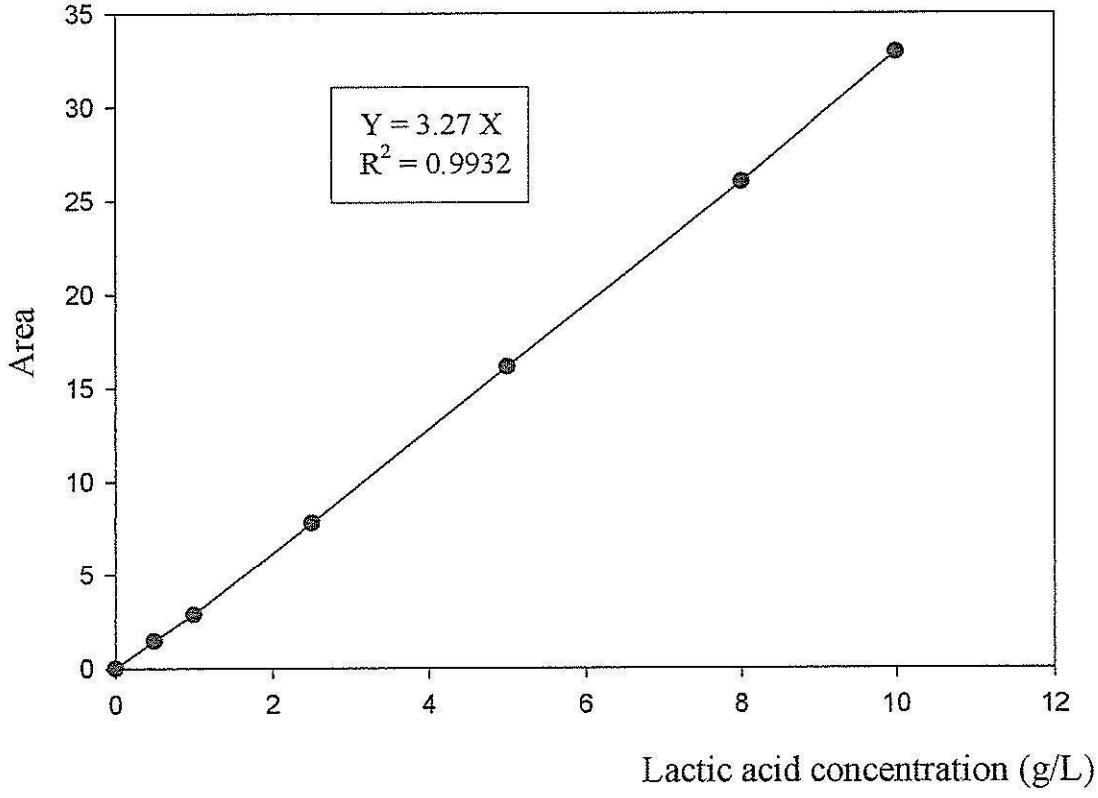
และปรับ pH ให้ได้ 6.0 ก่อนด้วยกรดไฮโดรคลอริค จากนั้นทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข



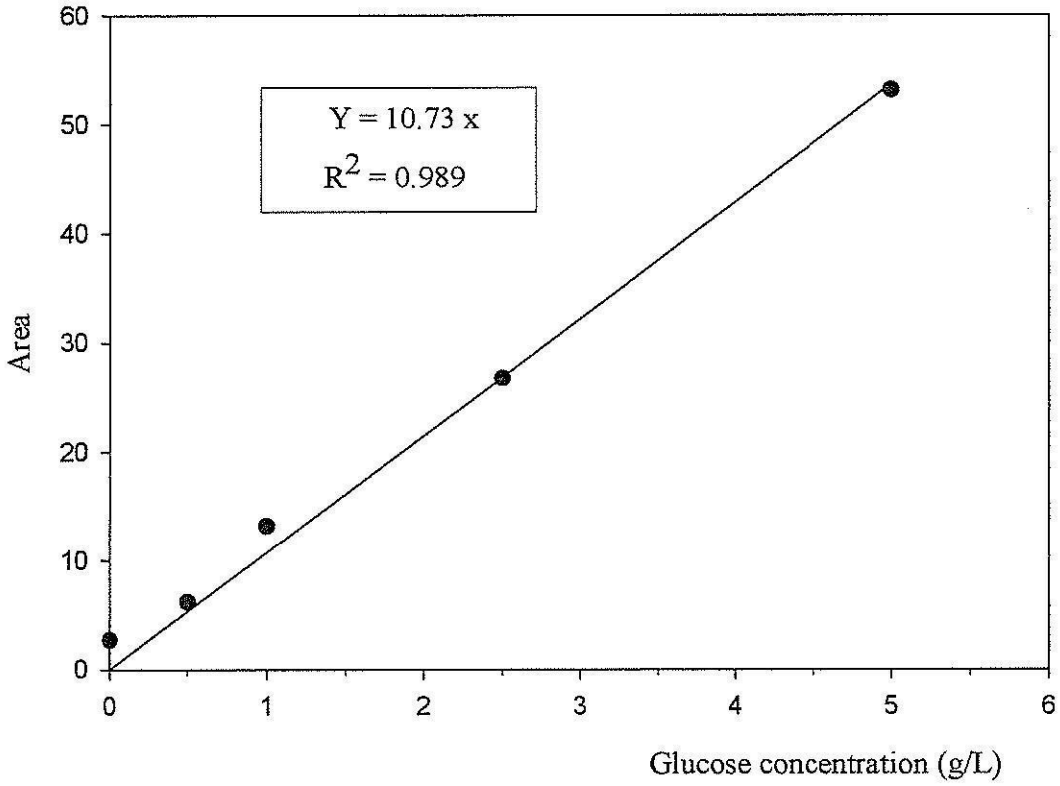
รูปภาพ 32 โครมาโตแกรมของกรดแลคติคหลังจากทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC

ภาคผนวก ค



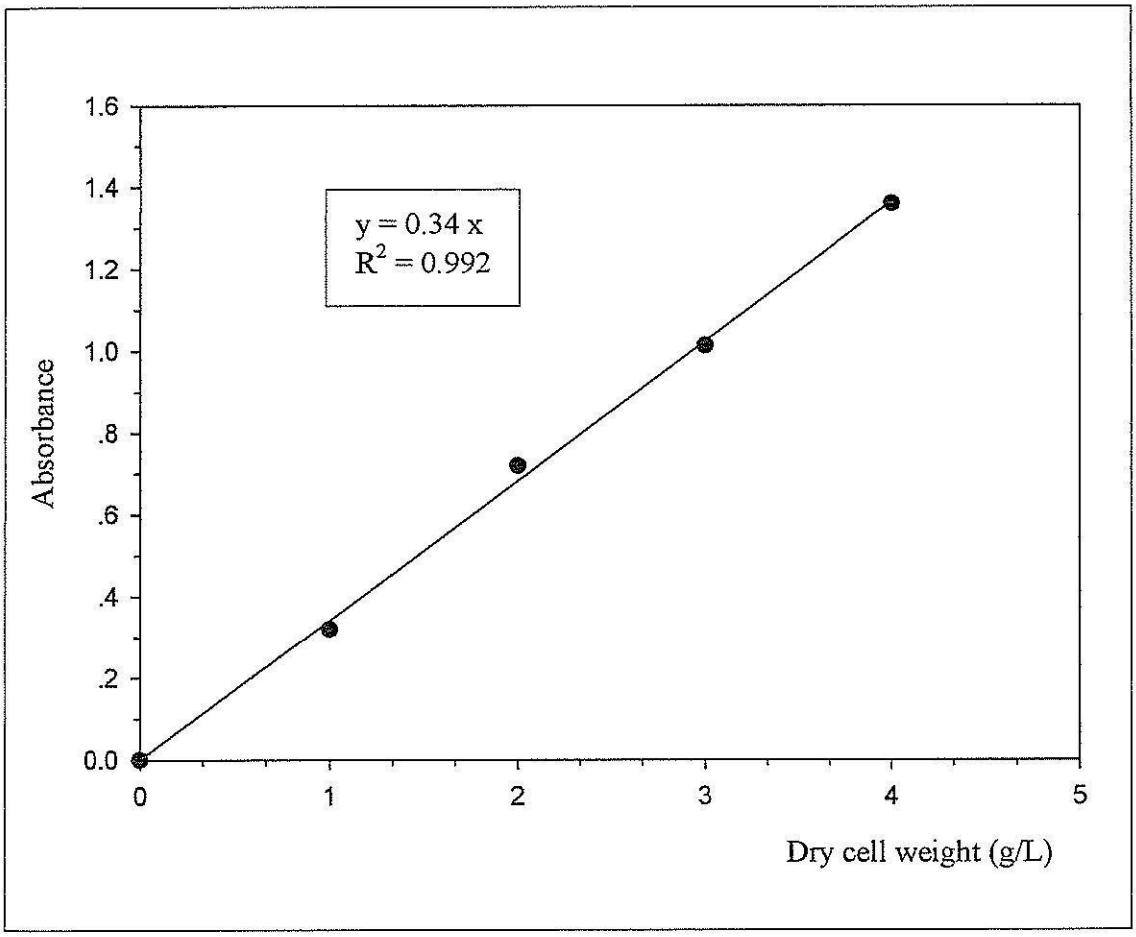
รูปภาพ 33 กราฟมาตรฐานของกรดแลคติค

ภาคผนวก ง



รูปภาพ 34 กราฟมาตรฐานของ reducing sugar

ภาคผนวก จ



รูปภาพ 35 กราฟมาตรฐานของความเข้มข้นเซลล์ (dry cell weight)

ภาคผนวก ฉ

การคำนวณ

1. การหาค่า $Y_{X/S}$

โดยที่ Δx = ผลต่างของ biomass เริ่มต้นกับสุดท้าย

ΔS = ปริมาณ substrate ที่ใช้ไป

$$\therefore \quad P_{X/S} = \frac{\Delta x}{\Delta s}$$

$$= \frac{\text{Biomass (สุดท้าย)} - \text{Biomass (เริ่มต้น)}}{\text{Substrate (เริ่มต้น)} - \text{Substrate (สุดท้าย)}}$$

2. การหาค่า $Y_{P/S}$

โดยที่ ΔP = ปริมาณผลิตภัณฑ์ (lactic acid) ที่ผลิตได้

ΔS = ปริมาณ substrate (reducing sugar) ที่ใช้ไป

$$\therefore \quad Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S}$$

$$= \frac{\text{Lactic acid (สุดท้าย)} - \text{Lactic acid (เริ่มต้น)}}{\text{Substrate (เริ่มต้น)} - \text{Substrate (สุดท้าย)}}$$

3. การหาค่า Volumetric productivity

$$= \frac{\text{Lactic acid concentration (g/L)}}{\text{Time (h)}}$$

4. การหาค่า Specific growth rate (μ) = (1/X) X (dX/dt)

X คือ ความเข้มข้นของเซลล์

(dX/dt) คือความเข้มข้นของเซลล์เทียบกับเวลา

บรรณานุกรม

วิจิตรศิริ, ป., และ บุตรดา, น. (2548). การคัดเลือกจุลินทรีย์จากแหล่งในประเทศไทยที่ผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลัง. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

วิสุทธิแพทย์, จ. (2542). จุลชีววิทยา(*microbiology*). มหาสารคาม: คณะวิทยาศาสตร์: มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

ศิริศันสนียกุล, ส. (2547). เทคโนโลยีชีวภาพอาหาร การหมักและสิ่งแวดล้อม. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Wee, Y. J., Kim, J. N., and Ryu, H. W. (2006). Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. **Food Technology and Biotechnology**. 44: 163-172

Gupta, B., Revagade, N., and Hilborn, J. n. (2007). Poly(lactic acid) fiber: An overview. **Progress in Polymer Science**. 32: 455-482.

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

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

Hofvendahl, K., and Hagerdal, B. H. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme Microbiology Technolology**. 26: 87-107.

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

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

Salminen, S., and von Wright, A. (1998). *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. New York: Marcel Dekker, Inc., .

Stiles, M. E., and Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**. 36: 1-29.

Akerberg, C., Hofvendahl, K., Zacchi, G., and Hahn-Hagerdal, B. (1998). Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid

production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. **Applied Microbiology and Biotechnology** 49: 682-690.

Cock, L. S., and de Stouvenel, A. R. (2006). Lactic acid production by a strain of *Lactococcus lactis* subs *lactis* isolated from sugar cane plants. **Electronic Journal of Biotechnology** 9: 40-45.

Hickey, M. W., Hillier, A. J., and Jago, R. G. (1986). Transport and metabolism of lactose, glucose, and galactose in homofermentative Lactobacilli. **Applied and Environmental Microbiology.** 51: 825-831.

Kenji, O., Sakurako, K., Junya, N., Hideki, F., and Akihiko, K. (2007). Improvement in lactic acid production from starch using α-amylase-secreting *Lactococcus lactis* cells adapted to maltose or starch. **Appl Microbiol Biotechnol** 75: 1007-1013.

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

Tonukari, N. J. (2004). Cassava and the future of starch. **Electronic Journal of Biotechnology** 7: 5-8.

Anne Anthony, O., and Titus, U. N. (2009). Simultaneous effect of divalent cation in hydrolyzed cassava starch medium used by immobilized yeast for ethanol production. **African Journal of Food Science** 3: 217-222.

Stainer, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L., and Painter, P. R. (1986). *The microbial world*. New York: Prentice Hall.

Hujanen, M., and Linko, Y. Y. (1994). Optimization of L(+)-lactic acid production employing statistical experimental design **Biotechnology Techniques**. 8: 325-330.

Nanci, A., Nanci, N., Meziane-Cherif, D., Boubendir, A., Fick, M., and Boudrant, J. (2005). Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. **Bioresource Technology** 96 96: 63-67.

Lund, B., Norddahl, B., and Ahring, B. (1992). Production of lactic acid from whey using hydrolysed whey protein as nitrogen source. **Biotechnology Letters**. 14: 851-856.

Saksinchai, S., Suphantharika, M., and Verduyn, C. (2001). Application of a simple yeast extract from spent brewer's yeast for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis subsp.*

kurstaki: A physiological study. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 17: 307-316.

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

Guilloux-Benatier, M., and Chassagne, D. (2003). Comparison of components released by fermented or active dried yeasts after aging on lees in a model wine. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. 51: 746-751.

Tanguler, H., and Erten, H. (2008). Utilisation of spent brewer's yeast for yeast extract production by autolysis: The effect of temperature. **Food and Bioproducts Processing**. 86: 317-321.

Bai, D., Yan, Z., Wei, Q., Zhao, X., Li, X., and Xu, S. (2004). Ammonium lactate production by *Lactobacillus lactis* BME5-18M in pH-controlled fed-batch fermentations. **Biochemical Engineering Journal**. 19: 47-51.

Xu, Y., Xia, W., Yang, F., Kim, J. M., and Nie, X. (2010). Effect of fermentation temperature on the microbial and physicochemical properties of silver carp sausages inoculated with *Pediococcus pentosaceus*. **Food Chemistry**. 118: 512-518.

Yumoto, J., and Ikeda, K. (1995). Direct fermenttaion of strach to L(+) lactic acid using *Lactobacillus amylophilus* **Biotechnology Letters**. 17: 543-546.

Yun, J. S., and Ryu, H. W. (2001). Lactic acid production and carbon catabolite repression from single and mixed sugars using *Enterococcus faecalis* RKY1. **Process Biochemistry**. 37: 235-240.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J. (2000). *Brock, Biology of micro-organisims* (Vol. 22).

Antonio, G.-V. R., Pinelli, D., Rossi, M., Fajner, D., Magelli, F., and Matteuzzi, D. (1996). Production of (+) and (-) lactic acid isomers by *Lactobacillus casei* subsp. *casei* DSM 20011 and *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004 in continuous fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 81: 548-552.

Doran, P. M. (1995). *Bioprocess Engineering Principles*: Academic Press, London.

Stanbury, P. F., and Whitaker, A. (1984). *Principles of fermentation technology* Oxford [Oxfordshire], New York Pergamon Press.

Roukas, T., and Kotzekidou, P. (1998). Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cell using fed batch culture. **Enzyme Microbiology of Technology**. 22: 199-204.

Ding, S., and Tan, T. (2006). l-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. **Process Biochemistry**. 41: 1451-1454.

Adnan, A. F. M., and Tan, I. K. P. (2007). Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. **Bioresource Technology** 98: 1380-1385.

Xiaodong, W., Xuan, G., and Rakshit, S. K. (1997). Direct fermentative production of lactic acid on cassava and other starch substrates. **Biotechnology Letters**. 9: 841-843.

Mugula, J. K., Narvhus, J. A., and Sørhaug, T. (2003). Use of starter cultures of lactic acid bacteria and yeasts in the preparation of *togwa*, a Tanzanian fermented food. **International Journal of Food Microbiology** 83: 307-318.

Marino, M., Maifreni, M., and Rondinini, G. (2003). Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters** 229: 133-140.

Badis, A., Guetarni, D., Moussa-Boudjema, B., Henni, D. E., Tornadijo, M. E., and Kihal, M. (2004). Identification of cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and evaluation of their technological properties. **Food Microbiology**. 21: 343-349.

Guebel, D. V., Nudel, B. C., and Giulietti, A. M. (1991). A simple and rapid micro-Kjeldahl method for total nitrogen analysis. **Biotechnology Techniques**. 5: 427-430.

Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**. 31: 426-428.

Narayanan, N., Roychoudhury, P. K., and Srivastava, A. (2004b). Isolation of adh mutant of *Lactobacillus rhamnosus* for production of L(+) Lactic acid. **Electronic Journal of Biotechnology**. 7: 72-84.

Mondragón-Parada, M., Nájera-Martínez, M., Juárez-Ramírez, C., Galíndez-Mayer, J., Ruiz-Ordaz, N., and Cristiani-Urbina, E. (2006). Lactic acid bacteria production from whey. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 134: 223-232.

Ghofar, A., Ogawa, S., and Kokugan, T. (2005). Production of L-lactic acid from fresh cassava roots slurried with tofu liquid waste by *Streptococcus bovis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 100: 606-612.

Wee, Y.-J., Kim, J.-N., Yun, J.-S., and Ryu, H.-W. (2004). Utilization of sugar molasses for economical L(+)-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. **Enzyme and Microbial Technology**. 35: 568-573.

Kotzamanidis, C., Roukas, T., and Skaracis, G. (2002). Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 18: 441-448.

Yuwono, S. D., and Kokugan, T. (2008). Study of the effects of temperature and pH on lactic acid production from fresh cassava roots in tofu liquid waste by *Streptococcus bovis*. **Biochemical Engineering Journal**. 40: 175-183.

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

Miwa, T., Abe, T., Fukuda, S., Ohkawara, S., and Hino, T. (2000). Effect of reduced H^+-ATPase activity on acid tolerance in *Streptococcus bovis* mutan. **Anaerobe**. 6: 197-203.

Fordyce, A. M., Crow, V. L., and Thomas, T. D. (1984). Regulation of product formation during glucose or lactose limitation in nongrowing cells of *Streptococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology**. 48: 332-337.

Garrigues, C., Loubiere, P., Lindley, N. D., and Cocaign-Bousquet, M. (1997). Control of shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD^+. **Journal of Bacteriology** 179: 5282-5287.

Tango, M. S. A., and Ghaly, A. E. (1999). Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using *Lactobacillus helveticus* under batch conditions. **Biomass and Bioenergy**. 16: 61-78.

de Giori, G. S., de Valdes, G. F., de Ruiz Holgado, A. P., and de Oliver, G. (1986). Effect of pH and temperature on diacetyl production by lactic acid bacteria **Milchwissenschaft** 41: 80-81.

Senthuran, A., Senthuran, V., Kaul, R. H., and Mattiasson, B. (1999). Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reactor: a step towards optimization. **Journal of Biotechnology**. 73: 61-70.

Petrov, K., Urshev, Z., and Petrova, P. (2008). l(+)-Lactic acid production from starch by a novel amylolytic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84. **Food Microbiology**. 25: 550-557.

Atkinson, B., and Mavituna, F. (1985). *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*. New York: Stockton Press.

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

Selmer-Olsen, E., and Soerhaug, T. (1998). Comparative studies of the growth of *Lactobacillus plantarum* in whey supplemented with autolysate from brewery yeast biomass or commercial yeast extract. **Milchwissenschaft** 53: 367-370.

Hutkins, R. W., and Morris, H. A. (1987). Carbohydrate metabolism by *Streptococcus thermophilus*: a review. **Journal of Food Protein** 50: 876-884.

Thomas, T. D., and Crow, V. L. (1984). Selection of galactose-fermenting *Streptococcus thermophilus* in lactose-limited chemostat cultures. **Applied and Environmental Microbiology**. 48: 186-191.

Tong, W. Y., Fu, X. Y., Lee, S. M., Yu, J., Liu, J. W., Wei, D. Z., and Koo, Y. M. (2004). Purification of L-(+)-lactic acid from fermentation broth with paper sludge as a cellulosic feedstock using weak anion exchanger mberlite IRA-92. **Biochemical Engineering Journal** 18: 89-96.

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

Tada, S., Katakura, Y., Ninomiya, K., and Shioya, S. (2007). Fed-batch coculture of *Lactobacillus kefiranofaciens* with *Saccharomyces cerevisiae* for effective production of kefiran. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 103: 557-562.

Hamamci, H., and Ryu, D. D. Y. (1994). Production of l(+)-lactic acid using immobilized *Rhizopus oryzae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 44: 125-127.

Goncalves, L. D. M., Xavier, A. M. R. B., Almeida, J. S., and Carrondo, M. J. T. (1991). Concomitant substrate and product inhibition kinetics in lactic acid production. **Enzynte. Microb. Technol.**. 13: 316-319.

Gatje, G., and Gottschalk, G. (1991). Limitation of growth and lactic acid production in batch and continuous cultures of *Lactobacillus helveticus*. **Appl Microbiol Biotechnol** 34: 446-449.

Sturr, M. G., and Marquis, R. E. (1992). Comparative acid tolerances and inhibitor sensitivities of isolated F-ATPases of oral lactic acid bacteria. **Appl Environ Microbiol** 58: 2287-2291.

Hofvendahl, K., Akerberg, C., Zacchi, G., and Hahn-Hagerdal, B. (1999). Simultaneous enzymatic wheat starch saccharification and fermentation to lactic acid by *Lactococcus lactis*. . **Applied Microbiology and Biotechnology** 52: 163-169.

Goncalves, L. M. D., Ramos, A., Almeida, J. S., Xavier, A. M. R. B., and Carrondo, M. J. T. (1997). Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 48: 346-350.

Shen, J., and Agblevor, F. A. (2010). Modeling semi-simultaneous saccharification and fermentation of ethanol production from cellulose. **Biomass and Bioenergy**. 34: 1098-1107.

Zhao, B., Wang, L., Ma, C., Yang, C., Xu, P., and Ma, Y. (2010). Repeated open fermentative production of optically pure l-lactic acid using a thermophilic *Bacillus* sp. strain. **Bioresource Technology**. 101: 6494-6498.

Giraud, E., Brauman, A., Kekele, S., Lelong, B., and Raimbault, M. (1991). Isolation and physiological study of an amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 36: 379-383.

Vishnu, C., Seenayya, G., and Reddy, G. (2002). Direct fermentation of pure and crude starchy substrates to L(+)-lactic acid using *Lactobacillus amylophilus* CV6. **World Journal of Microbiology Biotechnology**. 18: 429-433.

Narita, J., Nakahara, S., Fukuda, H., and Kondo, A. (2004). Efficient production of L-(+)- lactic acid from raw starch by *Streptococcus bovis* 148. **Journal of Bioscience Bioengineering** 97: 423-425.

Andersen, A. Z., Carvalho, A. L. c., Neves, A. R., Santos, H., Kummer, U., and Olsen, L. F. (2009). The metabolic pH response in *Lactococcus lactis*: An integrative experimental and modelling approach. **Computational Biology and Chemistry**. 33: 71-83.

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

Yun, J.-S., Wee, Y.-J., and Ryu, H.-W. (2003). Production of optically pure (+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. **Enzyme and Microbial Technology**. 33: 416-423.

Mussatto, S. I., Fernandes, M., Mancilha, I. M., and Roberto, I. C. (2008). Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain. **Biochemical Engineering Journal**. 40: 437-444.

Xu, G.-Q., Chu, J., Zhuang, Y.-P., Wang, Y.-H., and Zhang, S.-L. (2008). Effects of vitamins on the lactic acid biosynthesis of *Lactobacillus paracasei* NERCB 0401. **Biochemical Engineering Journal**. 38: 189-197.

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

Nabil, N., Aicha, N., Amel, B., Chouki, B., Fabrice, B., and Boudrant, J. (2001). The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus*. **Bioresource technology**. 78: 149-153.

Tellez-Luis, S. J., Moldes, A. B., Vazquez, M., and Alonso, J. L. (2003). Alternative media for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* NRRL B-445. **Transaction Institute of Chemical Engineering**. 81: 250-256.

Amrane, A., and Prigent, Y. (1994). Mathematical model for lactic acid production from lactose in batch culture: model development and simulation. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**. 60: 241-246.

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

York, S. W., and Ingram, L. O. (1996). Ethanol production by recombinant *Escherichia coli* KO11 using crude yeast autolysate as a nutrient supplement. **Biotechnology Letters**. 18: 683-688.

Amrane, A., and Prigent, Y. (1998). Lactic acid production rates during the different growth phases of *Lactobacillus helveticus* cultivated on whey supplemented with yeast extract. **Biotechnology Letters**. 20: 379-383.

Hofvendahl, K., and Hahn-Hagerdal, B. (1997). L-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of Lactobacilli and Lactococci. **Enzyme Microbilogy Technology**. 20: 301-307.

Idris, A., and Suzana, W. (2006). Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. **Process Biochemistry**. 41: 1117-1123.

Monteagudo, J. M., Rodr'ıguez, L., Rinc'on, J., and Fuertes, J. (1997). Kinetics of lactic acid fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* grown on beet molasses. **Journal of Chemistry Tecnology Biotechnology** 68: 271-276.

Hutkins, R. W., and Ponne, C. (1991). Lactose uptake driven by galactose efflux in *Streptococcus thermophilus*: evidence for galactose– lactose antiporter. **Applied and Environmental Microbiology**. 57: 941-944.

Bustos, G., Moldes, B., Cruz, J. M., and Domainguez, J. M. (2004). Formulation of Low-Cost Fermentative Media for Lactic Acid Production with *Lactobacillus rhamnosus* Using Vinification Lees as Nutrients. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 52: 801-808.

Evangelista, R. L., Mangold, A. J., and Nikolov, Z. L. (1994). Recovery of lactic acid by sorption: Resin evaluation. **Applied Biochemistry and Biology**. 45: 131-144.

Mattiasson, B., and Holst, O. (1991). *Extractive Bioconversions*: Marcel Dekker, New York.

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นายสุนทร นามสกุล กาญจนทวี

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Sunthorn KANCHANATAWEE

2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 1006 01362 890

3. ตำแหน่งบริหาร/วิชาการ ที่เป็นปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี

อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 044-224745 โทรสาร 044-224750 E-mail: sunthorn@sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญา	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2525	ตรี	วท.บ. (เกียรตินิยม)	อุตสาหกรรมเกษตร	อุตสาหกรรมเกษตร	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	ไทย
2528	โท	M.Sc.	Agricultural Eng.	Food Process Eng.	Asian Inst. of Technology	ไทย
2533	เอก	Ph.D.	Biotechnology	Bioprocessing	Massey University	New Zealand

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

เทคโนโลยีการหมัก (Fermentation Technology) และวิศวกรรมกระบวนการชีวภาพ (Bioprocess Engineering)

7. ประสบการที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและนอกประเทศ: ระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนการวิจัย หัวหน้าโครงการ หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย: ไม่มี

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย:

1. การผลิตอะซิโตนบิวทานอลและเอทธานอลจากกากน้ำตาลอ้อยโดยเชื้อ Clostridium acetobutylicum P262 (ทำเสร็จแล้ว)

2. Effect of enzyme supplement on performance of pigs feed on corn/soy diets. (ทำเสร็จแล้ว และกำลังตีพิมพ์)

3. Evaluation of the performance of the microbial pellet under aerobic condition: investigation into the effect of growth enhances used in microbial pellet. (ทำเสร็จแล้ว ตีพิมพ์ใน Annual Reports of IC Biotech Vol. 20 ปี 1997)

4. An Establishment method for viability test of blue-green algae (Microcystis viridis) treated by ultrasonic sound. (ทำเสร็จแล้ว ตีพิมพ์ใน Annual Reports of IC Biotech Vol. 21 ปี 1998)

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว เรื่อง Characteristic of hydrogen sulfide removal in a carrier-packed biological decolorization system. ตีพิมพ์ปี ค.ศ. 2000 ใน Biochemical Engineering Journal Vol. 5 หน้า 209-217.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ เรื่อง การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแน้นท์โปรตีนในถังหมัก