การพัฒนาเทคนิคการหมักที่ให้ผลผลิตสูงสำหรับกรดดี-แล็กติกที่มีความบริสุทธิ์เชิงแสงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวน

นายกล้า จันทนวัลย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

DEVELOPING OF THE FERMENTATION TECHNIQUE WITH HIGH YIELD FOR OPTICALLY PURE D-LACTIC ACID IN A STIRRED TANK BIOREACTOR

Mr. Kla Jantawon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Department of Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนาเทคนิคการหมักที่ให้ผลผลิตสูงสำหรับกรดดี-แล็กติกที่มีความบริสุทธิ์เชิงแสงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวน
โดย	นายกล้า จันทนวัลย์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฏฐา ทองจุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	Kentaro Kodama, Ph.D.

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

……... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฏฐา ทองจุล)

……อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(Kentaro Kodama, Ph.D.)

……กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์)

……กรรมการ
(อาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส)

……กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร. สุวัฒนา พฤกษะศรี)

กล้า จันทนวัลย์ : การพัฒนาเทคนิคการหมักที่ให้ผลผลิตสูงสำหรับกรดดี-แล็กติกที่มีความบริสุทธิ์เชิงแสงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวน. (DEVELOPING OF THE FERMENTATION TECHNIQUE WITH HIGH YIELD FOR OPTICALLY PURE D-LACTIC ACID IN A STIRRED TANK BIOREACTOR) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. ณัฏฐา ทองจุล, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: Kentaro Kodama, Ph.D., 85 หน้า.

ในงานวิจัยนี้เราใช้แบคทีเรีย *Sporolactobacillus laevolacticus* SK5-2 และ *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *nakayamae* CU72-1 ในการผลิตกรดดี-แล็กติกที่ให้ผลผลิตและความบริสุทธิ์เชิงแสงสูงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวน แบคทีเรีย SK5-2 ทำการหาสภาวะในการเลี้ยงคือ เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้น ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ เวลาในการเลี้ยงในช่วงการเจริญของแบคทีเรียในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ หาอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศที่เหมาะสม และหาด่างที่ใช้ควบคุมความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเลี้ยง ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมที่ได้คือ เลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้นเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อ เวลาในการเลี้ยงในช่วงการเจริญในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 6 ชั่วโมง อัตราการกวน 300 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที และใช้ $CaCO_3$ เป็นด่างควบคุมความเป็นกรด-ด่างทั้งกระบวนการ ใช้อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลาทั้งสิ้น 36 ชั่วโมง ใช้น้ำตาลกลูโคส 125.08 กรัมต่อลิตร ได้กรดดี-แล็กติก 114.93 กรัมต่อลิตร yield ที่ได้ 0.92 กรัมของกรดดี-แล็กติกที่ได้ต่อกรัมของกลูโคสที่ใช้ไป productivity 3.83 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง 100 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรีย CU72-1 ทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงคือ เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้น ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ และด่างที่ใช้ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งสภาวะเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ 24 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ 10 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเลี้ยงเชื้อ และใช้ $CaCO_3$ เป็นด่างที่ใช้ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง เลี้ยงในสภาวะไม่มีอากาศ อัตราการกวนที่ใช้ 200 รอบต่อนาทีตลอดการทดลองและใช้อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสโดยแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ใช้เวลา 54 ชั่วโมงในการผลิตกรดดี-แล็กติกจากกลูโคส 121.41 กรัมต่อลิตรได้กรดดี-แล็กติก 110.42 กรัมต่อลิตร ค่า yield 0.91 กรัมของกรดดี-แล็กติกที่ได้ต่อกรัมของกลูโคสที่ใช้ไป productivity 3.68 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง 100 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรีย SK5-2 ใช้เวลาทั้งกระบวนการผลิตได้เร็วกว่าแบคทีเรีย CU72-1 ถึง 18 ชั่วโมง จากนั้นได้นำแบคทีเรียทั้ง 2 ตัวมาทำการเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนที่ใช้โดย SK5-2 พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือใช้สารสกัดจากยีสต์ 15 กรัมต่อลิตรกับ NH_4Cl 4 กรัมต่อลิตร พบว่า yield ที่ได้ 0.92 กรัมของกรดดี-แล็กติกที่ได้ต่อกรัมของกลูโคสที่ใช้ไป productivity 3.83 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนแบคทีเรีย CU72-1 ให้ผลการทดลองที่ดีทั้งเปปโทน 10 กรัมต่อลิตรและ NH_4Cl 10 กรัมต่อลิตร ได้ yield ของทั้ง 2 แหล่งไนโตรเจนคือ 0.92 และ 0.94 กรัมของกรดดี-แล็กติกที่ได้ต่อกรัมของกลูโคสที่ใช้ไปตามลำดับ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่อ อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5372559023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY
KEYWORDS : D-LACTIC ACID BACTERIA / SCREENING / FERMENTATION / BIOREACTOR

KLA JANTAWON : DEVELOPING OF THE FERMENTATION TECHNIQUE WITH HIGH YIELD FOR OPTICALLY PURE D-LACTIC ACID IN A STIRRED TANK BIOREACTOR. ADVISOR : ASST.PROF.NUTTHA THONGCHUL, Ph.D., CO-ADVISOR : KODAMA KENTARO, Ph.D., 85 pp.

In this study, D-lactic acid producing bacteria *Sporolactobacillus laevolacticus* SK5-2 and *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *nakayamae* CU72-1 were used to produce D-lactic acid for high productivity and optical purity in a stirred tank bioreactor. In case of SK5-2 the effects of inoculum age, inoculum size, preculture time, agitation speed, aeration rate and neutralizing agent on lactic acid production were investigated. The optimal operating conditions to achieve high lactic acid productions are as follows: 5% inoculums size grown for 6 h in a shaken flask, seeding precultured in the fermentor for 6 h at 300 rpm and 1.0 vvm air using $CaCO_3$ as the neutralizing agent. Under these operating conditions, SK5-2 gave 114.93 g/L D-lactic acid from the initial glucose of 125.08 g/L with the production yield of 0.92 g/g glucose, the productivity 3.83 g/L·h, and the optical purity of 100% ee within 36 h. For CU72-1, the influence of inoculum size and age as well as the neutralizing agent of lactic acid production were studied. It was found that with 10% inoculum size that was cultured in the flask for 24 h transferring into the fermentor operated at 200 rpm using $CaCO_3$ for pH control, the highest D-lactic acid of 110.42 g/L with the yield of 0.91 g/g glucose, the productivity of 3.68 g/L·h, and the optical purity of 100 %ee was obtained within 54 h. From this study, SK5-2 gave the higher productivity compared with that obtained from CU72-1 with the corresponding shorter fermentation time due to the ability of catalase positive strain that could uptake some glucose for energy production required in lactic acid fermentation. Later, the inexpensive nitrogen sources were screened for substituting yeast extract and peptone. The results indicated that with yeast extract 15 g/L and NH_4Cl 4 g/L, the high D-lactic acid yield of 0.92 g/g glucose with the final titer of 114.93 g/L and the productivity of 3.83 g/L·h were obtained in the condition using SK5-2. While for CU72-1, it was found that NH_4Cl could be able to substitute peptone with the slightly lower lactate yield.

Department : Biotechnology
Academic Year : 2013

Student's Signature .....
Advisor's Signature .....
Co-advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณัฏฐา ทองจุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักและ Dr. Kentaro Kodama ที่ให้คำปรึกษาในเรื่องต่าง ให้ความรู้ การวางแผนงานวิจัย ชี้แนะแนวทางในการแก้ไขปัญหา แสดงให้เห็นความสำคัญของงานวิจัยที่ทำ แนะนำเทคนิคและการแก้ปัญหารวมไปถึงอุปการะอาหารหลายมื้อ ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช รองศาสตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวณิชย์ อาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส และอาจารย์ ดร. สุวัฒนา พฤกษะศรี กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่าน ที่กรุณามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำความรู้ และตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธืฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ และนักวิจัยทุกท่าน ในสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้และสอนวิธีการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ต่างๆ ทำให้งานวิจัยฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ นักวิจัย เจ้าหน้าที่ เพื่อนๆ พี่ๆ และ น้องๆ ทุกคนในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลืองานวิจัย ตลอดจนคำปรึกษาถึงปัญหาต่างๆในทุกเรื่อง

ขอกราบขอบพระคุณทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนงานวิจัยในเรื่องค่าใช้จ่ายต่างๆ เช่น สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และน้องทุกคนในครอบครัว ที่คอยเป็นกำลังใจสนับสนุนด้านการเงิน และช่วยเหลือทุกเรื่องตลอดจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญรูป ..... ฎ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ..... ฏ

บทที่

1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... 4

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 4

1.4 วิธีดำเนินงานวิจัย 4

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 5

2.1 กรดแล็กติก (Lactic acid) 5

2.2 ประโยชน์ของกรดแล็กติก 6

2.3 กระบวนการหมักกรดแล็กติกโดยจุลินทรีย์ 7

2.4 แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแล็กติก 11

2.5 แบคทีเรียที่ผลิตกรดแล็กติกสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ตามการกระบวนการหมักโดยน้ำตาล..... 14

2.6 แบคทีเรียที่ผลิตกรดแล็กติกแบ่งเป็น 3 กลุ่มโดยความต่างของแล็กเทตดีไฮโดรจีเนส 15

2.7 แบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกสกุล *Sporolactobacillus* 16

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแล็กติก 18

บทที่ หน้า

3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 33
3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี 33
3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย 35
3.3 วิธีการวิเคราะห์สารตัวอย่าง 37

4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง 40
4.1 หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดดี-แล็กติกโดยแบคทีเรีย *S. laevolacticus* (SK5-2) 40
4.2 หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดดี-แล็กติกโดยแบคทีเรีย *S. nakayamae* subsp. *nakayamae* (CU72-1) 50
4.3 การหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมทดแทนสารสกัดจากยีสและเปปโทน 53

5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 58
รายการอ้างอิง 60
ภาคผนวก 63
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และการเตรียมสารเคมี 64
ภาคผนวก ข สูตรการคำนวณ 67
ภาคผนวก ค ข้อมูลผลการทดลอง 68
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 86

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของกรดแล็กติก	6
2.2	แสดงการหมักของแบคทีเรียชนิดต่างๆและไอโซเมอร์ที่ได้	15
2.3	การเจริญของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแล็กติกที่อุณหภูมิต่างๆ	19
2.4	สารควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างในการหมักกรดแล็กติก	20
2.5	สารควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างในการหมักกรดแล็กติก	22
2.6	แสดงกระบวนการหมักกรดแล็กติก	27
4.1	ผลจากการแปรเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้นในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร	39
4.2	ผลจากการแปรปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 5 ลิตร	42
4.3	ผลจากการแปรเวลาในการเลี้ยงในช่วงการเจริญ(preculture)ที่ใช้ใน ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร	43
4.4	ผลจากการแปรแปรค่าอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศใน ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร	45
4.5	ผลจากการเปลี่ยนสารควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้ $Ca(OH)_2$ NaOH และ NH_4OH แทน $CaCO_3$	47
4.6	ผลจากการแปรเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้น ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร	49
4.7	ผลจากการแปรปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร	50
4.8	ผลจากการเปลี่ยนสารควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้ $Ca(OH)_2$ NaOH และ NH_4OH แทน $CaCO_3$ ของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลส	51
4.9	ผลจากการใช้แหล่งไนโตรเจนที่ปริมาณต่างๆของแบคทีเรีย ที่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสได้	52
4.10	ผลจากการใช้แหล่งไนโตรเจนที่ปริมาณต่างๆของแบคทีเรีย ที่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสได้	53
4.11	เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างระดับขวดเขย่าและระดับถังปฏิกรณ์ ชีวภาพขนาด 5 ลิตรเลี้ยงที่สภาวะเหมาะสม	55

ตารางที่ หน้า

ค.1 แสดงผลการทดลองทั้งหมดของ *Sporolactobacillus laevolacticus* SK5-2 83

ค.2 แสดงผลการทดลองทั้งหมดของ *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *nakayame* CU72-1 84

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของกรดแล็กติก	5
2.2	แสดงการผลิตกรดแล็กติกด้วยวิธีทางเคมีและการหมักของจุลินทรีย์	9
2.3	แสดงการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟและเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ	14
2.4	การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์	23
2.5	การหมักแบบคีโมสแตท	25
2.6	การหมักแบบเทอไบโดสแตท	26
2.7	ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน	29
2.8	ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift	30
2.9	ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Bubble column	31
4.1	สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเพื่อหาเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้น	40
4.2	การหมักกรดแล็กติกโดยใช้เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้น 6 ชั่วโมง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	40
4.3	การหมักกรดแล็กติคโดยใช้เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้น 12 ชั่วโมง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	41
4.4	สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเพื่อหาปริมาณการใช้หัวเชื้อเริ่มต้น	42
4.5	สภาวะที่เลี้ยงเพื่อหาระยะเวลาในการเลี้ยงในช่วงการเจริญ	44
4.6	สภาวะที่ใช้เลี้ยงเพื่อหาอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ	46
4.7	สภาวะที่ใช้เลี้ยงเพื่อหาสารควบคุมความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม	48
4.8	สภาวะที่ใช้เลี้ยงเพื่อหาเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรีย CU72-1	50
4.9	สภาวะที่ใช้เลี้ยงเพื่อหาปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรีย CU72-1	51
4.10	สภาวะที่ใช้เลี้ยงเพื่อหาสารควบคุมความเป็นกรด-ด่างของแบคทีเรีย CU72-1	52
4.11	เวลาที่ใช้ในการผลิตกรดดี-แล็กติกของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์	54
ค.1	กราฟการหมักโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซนต์	67
ค.2	กราฟการหมักโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซนต์	67
ค.3	กราฟการหมักโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 2 เปอร์เซนต์	68
ค.4	กราฟการหมักโดยใช้เวลาในช่วงการเจริญ 3 ชั่วโมง	68
ค.5	กราฟการหมักโดยใช้เวลาในช่วงการเจริญ 6 ชั่วโมง	69
ค.6	กราฟการหมักโดยอัตราการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที	69

ค.7 กราฟการหมักโดยอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที
อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที..... 70
ค.8 กราฟการหมักโดยอัตราการกวน 450 รอบต่อนาที
อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที 70
ค.9 กราฟการหมักโดยอัตราการกวน 150 รอบต่อนาที
อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที..... 71
ค.10 กราฟการหมักโดยอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที
อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที..... 71
ค.11 กราฟการหมักโดยอัตราการกวน 450 รอบต่อนาที
อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที 72
ค.12 กราฟการหมักโดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เป็นด่าง
ควบคุมค่าตวามเป็นกรด-ด่าง 72
ค.13 กราฟการหมักโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นด่าง
ควบคุมค่าตวามเป็นกรด-ด่าง 73
ค.14 กราฟการหมักโดยใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นด่าง
ควบคุมค่าตวามเป็นกรด-ด่าง 73
ค.15 กราฟการหมักโดยใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นด่าง
ควบคุมค่าตวามเป็นกรด-ด่าง 74
ค.16 กราฟการหมักโดยใช้สารสกัดจากยีสต์ 15 กรัมต่อลิตร
และแอมโมเนียมคลอไรด์ 4 กรัมต่อลิตร..... 74
ค.17 กราฟการหมักโดยใช้สารสกัดจากยีสต์ 7.5 กรัมต่อลิตร
และแอมโมเนียมคลอไรด์ 4 กรัมต่อลิตร..... 75
ค.18 กราฟการหมักโดยใช้สารสกัดจากยีสต์ 7.5 กรัมต่อลิตร
และแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร..... 75
ค.19 กราฟการหมักโดยใช้เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้น 24 ชั่วโมง..... 76
ค.20 กราฟการหมักโดยใช้เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้น 48 ชั่วโมง..... 76
ค.21 กราฟการหมักโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 2 เปอร์เซนต์..... 77
ค.22 กราฟการหมักโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซนต์..... 77
ค.23 กราฟการหมักโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซนต์..... 78
ค.24 กราฟการหมักโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นด่าง
ควบคุมค่าตวามเป็นกรด-ด่าง 78

ค.25 กราฟการหมักโดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เป็นด่างควบคุมค่าตวามเป็นกรด-ด่าง 79
ค.26 กราฟการหมักโดยใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นด่างควบคุมค่าตวามเป็นกรด-ด่าง 79
ค.27 กราฟการหมักโดยใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นด่างควบคุมค่าตวามเป็นกรด-ด่าง 80
ค.28 ใช้เปปโทน 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนรวมกับสารสกัดจากยัสต์ 20 กรัมต่อลิตร 81
ค.29 ใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนรวมกับสารสกัดจากยัสต์ 20 กรัมต่อลิตร 81
ค.30 แสดงปริมาณไนโตรเจนที่ใช้ไปในกระบวนการหมักในการศึกษาปริมาณไนโตรเจนที่ใช้ของแบคทีเรีย SK5-2 82
ค.31 แสดงปริมาณไนโตรเจนที่ใช้ไปในกระบวนการหมักในการศึกษาปริมาณไนโตรเจนที่ใช้ของแบคทีเรีย CU72-1 82

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์	ความหมาย
mg	มิลลิกรัม
g	กรัม
kg	กิโลกรัม
ml	มิลลิลิตร
L	ลิตร
g/L	กรัมต่อลิตร
g/L.h	กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง
°C	องศาเซลเซียส
µl	ไมโครลิตร
M	โมลาร์ร์
h	ชั่วโมง
mole	โมล
PLA	พอลิแล็กติกแอซิด
PDLA	พอลิดี-แล็กติกแอซิด
PLLA	พอลิแอล-แล็กติกแอซิด
rpm	รอบต่อนาที
%ee	ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง
sp.	Species
subsp.	Subspecies
L.	*Lactobacillus*
S.	*Sporolactoacillus*

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

พลาสติกที่เราใช้กันอย่างแพร่หลายอยู่ในปัจจุบันนั้นผลิตมาจากสารตั้งต้นทางปิโตรเลียม พลาสติกชนิดนี้มีความแข็งแรงทนทานแต่ด้วยคุณสมบัตินี้ทำให้มันใช้เวลาในการย่อยสลายนานมากจึงทำให้เกิดการสะสมในสิ่งแวดล้อมทำให้เกิดมลพิษได้ ประกอบกับแหล่งปิโตรเลียมนั้นเป็นแหล่งทรัพยากรธรรมชาติที่ไม่สามารถหาทดแทนได้และกำลังจะหมดไป ซึ่งผลกระทบดังกล่าวเป็นแรงผลักดันให้เกิดงานวิจัยเพื่อหาวัตถุดิบทางเลือกเพื่อนำมาทดแทนพลาสติกจากปิโตรเลียม โดยงานวิจัยที่กำลังเป็นที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งได้แก่ งานวิจัยด้านพลาสติกชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพอลิแล็กติกแอซิด ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพและไม่มีความเป็นพิษ พอลิเมอร์ชนิดนี้ผลิตจากการสังเคราะห์ทางเคมีของกรดแอลหรือดี-แล็กติกบริสุทธิ์ ที่เรียกว่าพอลิแล็กติกแอซิด หรือ PLA โดยที่ผ่านมาได้มีความมุ่งหวังให้มีการนำ PLA ไปใช้ทดแทนพลาสติกที่มาจากปิโตรเคมี เพื่อช่วยลดปัญหาด้านแหล่งวัตถุดิบที่ลดลงและราคาของปิโตรเคมีที่สูงขึ้น และผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Bustos และคณะ, 2004; Fukushima และคณะ, 2004; สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2547) ในระยะแรกของการพัฒนาพลาสติกจากพอลิแล็กติกแอซิด เริ่มจากการนำกรดแอล-แล็กติกที่มีความบริสุทธิ์เชิงแสงมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์เป็นสารตั้งต้น เนื่องจากกรดแอ็ล-แล็กติกบริสุทธิ์สามารถหาได้ง่ายกว่าและมีอยู่ทั่วไปอยู่แล้ว ซึ่งพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้มีอุณหภูมิเหลวอยู่ระหว่าง 170 - 180 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิเหลวของพอลิแอล-แล็กติกแอซิดมีค่าค่อนข้างต่ำ เมื่อนำไปขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์จึงทำได้ค่อนข้างยาก และเมื่อขึ้นรูปแล้วผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณสมบัติเชิงกล และเชิงความร้อนที่ด้อยกว่าผลิตภัณฑ์พลาสติกจากปิโตรเคมี อย่างไรก็ดี เมื่อนำกรดดี-แล็กติกที่มีความบริสุทธิ์เชิงแสงสูงมาสังเคราะห์เป็นพอลิเมอร์ร่วมกับกรดแอล-แล็กติก เกิดเป็นโครงสร้าง stereocomplex จะทำให้เกิดพอลิเมอร์ที่มีอุณหภูมิเหลวสูงถึง 220 - 230 องศาเซลเซียส ซึ่งมากกว่าพอลิแอล-แล็กติกแอซิด ถึง 50 – 60 องศาเซลเซียสเลยทีเดียว (Sawai et al., 2007) จากค่าอุณหภูมิเหลวที่เพิ่มขึ้น ทำให้เอื้อต่อการนำพอลิเมอร์ดังกล่าวมาขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ อีกทั้งผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณสมบัติเชิงกล และเชิงความร้อนเทียบเท่ากับพลาสติกที่ใช้งาน

กันอยู่ในปัจจุบัน การพัฒนาโครงสร้าง stereocomplex ของพอลิแล็กติกแอซิด ผลักดันให้มีการพัฒนาการผลิตกรดดี-แล็กติกอย่างจริงจังในระดับอุตสาหกรรม จากเดิมในอดีตที่การผลิตไอโซเมอร์ชนิดนี้ของกรดแล็กติกไม่เป็นที่แพร่หลายเท่าไรนัก

การที่จะไปถึงขั้นระดับอุตสาหกรรมนั้นเราจะต้องทำการขยายสเกลการผลิตจากในระดับขวดเขย่ามาเป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นชนิดถังกวน ส่วนกระบวนการหมักนั้นจะมีการหมักแบบแบต เฟดแบต และการหมักแบบต่อเนื่อง ซึ่งการหมักแต่ละแบบจะให้ผลผลิตที่ต่างกันออกไป ดังงานวิจัยของ Tashiro และคณะ (2011) ซึ่งใช้แบคทีเรียผลิตกรดแล็กติก *Lactobacillus delbrueckii supsp. Lactis* QU 41 ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่ม thermotolerant โดยสามารถผลิตกรดดี-แล็กติกได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่านั้น และได้หาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 1 ลิตร (ปริมาตรน้ำหมัก 0.4 ลิตร) แบบแบตช์ พบว่าได้ปริมาณกรดดี-แล็กติก 20.1 กรัมต่อลิตรและมีความบริสุทธิ์เชิงแสงสูงถึง 99.9 เปอร์เซ็นต์ โดยควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 6 โดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นเริ่มต้นของกลูโคสเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ปริมาณหัวเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) จากนั้นนำไปทำการหมักแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่อัตราการเจือจาง 0.87 ต่อชั่วโมง ได้ผลผลิตกรดดี-แล็กติก 18 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกจากนี้ มีงานวิจัยของ Wang และคณะ (2011) ซึ่งศึกษาการผลิตกรดดี-แล็กติกจากแบคทีเรีย *Sporolactobacillus sp.* CASD โดยใช้ peanut meal เป็นแหล่งไนโตรเจน คณะผู้วิจัยศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 30 ลิตร พบว่าภาวะที่เหมาะสมอยู่ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.5-6 โดยมี $CaCO_3$ เป็นตัวควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง ในการหมักเริ่มต้นเป็นการหมักแบบแบตช์ โดยใช้กลูโคสเริ่มต้นที่ 120 กรัมต่อลิตร ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ (ต่อปริมาตร) หลังจากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มโดยเปลี่ยนการผลิตเป็นแบบเฟดแบตช์ ซึ่งกระบวนการนี้ให้ผลผลิตของกรดดี-แล็กติกที่ 207 กรัมต่อลิตร มีความบริสุทธิ์เชิงแสง 99.3 เปอร์เซ็นต์ (Wang et al.,2011) และยังมีงานวิจัยของ Sawai และคณะ(2011) โดยใช้วิธีการหมักแบบต่อเนื่องโดยมีแผ่นเมมเบรนเป็นตัวกรองเซลล์ พบว่าค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงที่ได้ออกมานั้นมีค่าเพิ่มขึ้นสูงสุดถึง 98 เปอร์เซ็นต์ โดยในการทดลองนี้เมื่อใช้เวลาในการหมักมากขึ้นค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงก็จะเพิ่มขึ้นและคงที่ตลอดการทดลอง (Sawai et al.,2011) และงานวิจัยของ Mimitsuka และคณะ(2012) มีความต้องการที่จะลดปริมาณการใช้แหล่งไนโตรเจนคือสารสกัดจากยีสซึ่งมีราคาแพงให้น้อยลง

โดยใช้วิธีการหมักแบบต่อเนื่องและมีเมมเบรนในการกรอง โดยใช้แบคทีเรียดี-แล็กติก *Sporolactobacillus laevolacticus* ได้ผลว่าในช่วงชั่วโมงที่ 0-140 จะใช้สารสกัดจากยีส 5 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงที่ 140-233 จะลดปริมาณลงมาเหลือ3 กรัมต่อลิตรและที่ 233-812 ชั่วโมงจะใช้ที่ 1 กรัมต่อลิตร yield และค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงที่ได้คือ 97 เปอร์เซ็นต์และ 99 เปอร์เซ็นต์(Mimitsuka et al.,2012) และสุดท้าย งานวิจัยของ Nguyen และคณะ(2012) โดยงานวิจัยนี้ได้ใช้สาหร่าย *Hydrodictyon reticulatum* เป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้วิธีการ simultaneous saccharification and co-fermentation และใช้*แบคทีเรีย Lactobacillus coryniformis subsp. torquens* ในการผลิตกรดดี-แล็กติก การวิธีการนี้พบว่าได้ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงที่สูงถึง 99.5 เปอร์เซ็นต์แต่ว่าค่า yield ที่ได้ค่อนข้างต่ำ 45.9 เปอ์เซนต์ จากงานวิจัยนี้จะเห็นว่ายังมีแหล่งคาร์บอนอื่นที่สามารถใช้ได้อีกนอกจาก กากน้ำตาล แป้ง เป็นต้น (Nguyen et al.,2012)

จากงานวิจัยดังกล่าวข้างต้น เห็นได้ว่า การผลิตกรดดี-แล็กติก และการขยายส่วนการผลิตประกอบไปด้วยปัจจัยหลายๆ อย่างที่มีส่วนเกี่ยวข้อง ตั้งแต่ปัจจัยทางชีวภาพ ได้แก่ ชนิดของจุลินทรีย์ที่เลือกใช้ การพัฒนาและเก็บรักษาสายพันธุ์ให้มีความเสถียรต่อภาวะ ไม่เกิดการกลายพันธุ์ มีความสามารถในการเจริญในอาหาร minimal medium เป็นต้น และปัจจัยทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ตัวควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง อัตราการกวน และการรักษาภาวะมีอากาศ/กึ่งมีอากาศ/ไร้อากาศ ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อให้ได้ซึ่งผลผลิตกรดดี-แล็กติกในปริมาณและคุณภาพสูง และคุ้มทุน โดยปัจจัยที่เป็นที่นิยมศึกษากัน ได้แก่ การพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตกรดในปริมาณสูง การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาถูก เช่น วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (Tashiro et al.,2011) ซึ่งคาดว่าจะนำไปสู่ต้นทุนการผลิตกรดดี-แล็กติกที่ลดลง และท้ายที่สุดราคาของพอลิแล็กติกแอซิดที่สามารถเทียบเคียงกับราคาของพลาสติกที่ใช้กันในปัจจุบันได้ อย่างไรก็ดี งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดดี-แล็กติกในมุมมองเรื่องการพัฒนากระบวนการและขั้นตอนการผลิตเพื่อรองรับการขยายส่วนการผลิตไปสู่ระดับอุตสาหกรรมยังไม่เป็นที่แพร่หลายนัก ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ จึงมุ่งศึกษาและพัฒนากระบวนการหมักกรดดี-แล็กติก โดยเริ่มจากการศึกษาพัฒนาขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อ จนถึงเทคนิคการหมัก และปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการออกแบบขยายส่วนการผลิต ทั้งนี้ เพื่อนำผลการวิจัยที่ได้ไปพัฒนาต่อยอดการขยายส่วนการผลิตต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

หาสภาวะที่เหมาะสม พัฒนาเทคนิคการหมักเพื่อผลิตกรดดี-แล็กติกให้ได้ผลผลิตสูงและพัฒนาสูตรอาหารเพื่อผลิตกรดดี-แล็กติก โดยใช้แหล่งไนโตรเจนราคาถูก

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดดี-แล็กติกในระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนขนาด 5 ลิตร ได้แก่ เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ เวลาในการเลี้ยงไรขั้นตอนการเจริญ อัตราการกวน อัตราการให้อากาศ และสารควบคุมค่าความเป็ดกรด-ด่าง และศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนราคาถูกเพื่อทดแทนแหล่งไนโตรเจนที่ใช้อยู่คือสารสกัดจากยีส

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

1.4.1 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้นที่ส่งผลต่อจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดดี-แล็กติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน ขนาด 5 ลิตร

1.4.2 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ส่งผลต่อจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดดี-แล็กติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน ขนาด 5 ลิตร

1.4.3 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของเวลาในการเลี้ยงขั้นตอนการเจริญ (preculture) ที่ส่งผลต่อจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดดี-แล็กติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน ขนาด 5 ลิตร

1.4.4 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศที่ส่งผลต่อจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดดี-แล็กติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน ขนาด 5 ลิตร

1.4.ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของสารควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่ส่งผลต่อจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดดี-แล็กติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน ขนาด 5 ลิตร

1.4.6 ศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนเพื่อมาใช้แทนสารสกัดจากยีส

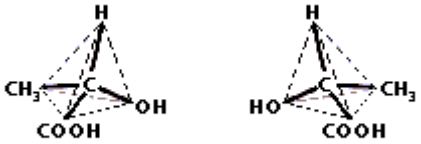
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดดี-แล็กติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนขนาด 5 ลิตร สภาวะที่ได้นี่จะนำไปทำการทดลองในขนาดสเกลที่ใหญ่ขึ้นจนไปถึงระดับอุตสาหกรรม และแหล่งในโตรเจนที่ได้จะช่วยลดต้นทุนในการผลิตได้

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดแล็กติก (Lactic acid)

กรดแล็กติกเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีชื่อทางเคมีว่า 2-Hydroxypropanoic acid สูตรทางเคมี คือ $CH_3CHOHCOOH$ กรดแล็กติกมี 2 ไอโซเมอร์ คือ กรดดี-แล็กติก และกรดแอล-แล็กติก พบได้ในธรรมชาติ 3 ชนิดคือ กรดแอล-แล็กติก กรดดี-แล็กติก และกรดดีแอล-แล็กติก ความแตกต่างระหว่างกรดดี-แล็กติกและแอล-แล็กติก คือ การจับกันของหมู่ไฮดรอกซีที่มาเกาะตรงตำแหน่งของไครัลคาร์บอนอะตอม ดังรูป 2.1



Leavo-lactic acid Dextro-lactic acid

รูปที่ 2.1 โครงสร้างของกรดแอล-แล็กติก (+) และกรดดี-แล็กติก (-)

จากความแตกต่างของโครงสร้างของแอล(+)ไอโซเมอร์และดี(-)ไอโซเมอร์ ทำให้กรดแล็กติกทั้ง 2 ไอโซเมอร์มีคุณสมบัติต่างกันโดยจุดเดือดจะอยู่ที่ 82-85 องศาเซลเซียสและจุดหลอมเหลวของกรดแอล-แล็กติกจะอยู่ที่ 16.8-33 องศาเซลเซียส ส่วนกรดดี-แล็กติก จุดเดือดและจุดหลอมเหลวจะอยู่ที่ 103 องศาเซลเซียส และ 52.8-53.6 องศาเซลเซียสตามลำดับ กรดแล็กติกที่มีความบริสุทธิ์สูงจะไม่มีสี สามารถละลายได้ในน้ำ เอทานอล และอะซีโตน แต่ไม่ละลายในคลอโรฟอร์ม ปิโตรเลียมอีเทอร์ และคาร์บอนไดซัลไฟด์ (Lockwood และคณะ 1965, Budavari และคณะ, 1989; Holten และคณะ, 1971; Reddy และคณะ, 2008) คุณสมบัติของกรดแล็กติกทั้งหมดได้แสดงในตารางที่ 2.1

กรดแล็กติกพบได้ง่ายในธรรมชาติ เช่นอาหารจำพวกอาหารหมักดอง และยังมีการนำไปประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่างๆ นอกจากนี้กรดแอล-แล็กติกยังสามารถพบได้ในร่างกายมนุษย์ สัตว์และสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติด้วย ส่วนกรดดี-แล็กติกนั้นจะพบได้น้อยในธรรมชาติ มีจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดที่สามารถผลิตได้ กรดชนิดนี้เมื่ออยู่ในร่างกายมนุษย์ระบบเมแทบอลิซึม

จะไม่สามารถกำจัดได้ องค์การอนามัยโลกจึงมีการกำหนดว่ามนุษย์บริโภคกรดดี-แล็กติกได้ไม่เกิน 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักร่างกาย 1 กิโลกรัมต่อวัน (Lee, 2007; สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2547)

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของกรดแล็กติก

สูตรเคมี	$C_3H_6O_3$
ชื่อเคมี	2-Hydroxy-propanoic acid
น้ำหนักโมเลกุล	90.08
จุดหลอมเหลว	L : 53°C D : 53°C
จุดเดือด	122°C at 14 mm Hg 82°C at 0.5 mm Hg
Dissociation constant, Ka at 25°C	1.37×10^{4}
Acidity (p*K*a)	3.85
Heat of combustion, H_c	1361 KJ/mole
Specific heat, C_p at 20 °C	190 J/mole/°C

(ที่มา : ดัดแปลงจาก Narayanan และคณะ, 2004; ประเสริฐศักดิ์, 2011)

2.2 ประโยชน์ของกรดแล็กติก

กรดแล็กติกเป็นกรดอินทรีย์ที่มีประโยชน์สามารถนำมาประยุกต์ได้อย่างหลากหลาย โดยองค์การอาหารและยา สหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration, FDA) สำหรับนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งอาหารและถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหารและยา นอกจากนี้ยังมีการนำกรดแล็กติกมาใช้ในอุตสาหกรรม เคมี เวชภัณฑ์ พลาสติก เครื่องสำอาง และการแพทย์ โดยส่วนมากกรดแล็กติกที่นำมาใช้จะผลิตจากการหมักของแบคทีเรีย และส่วนที่เหลือผลิตขึ้นจากการสังเคราะห์ทางเคมี กรดแล็กติกยังเป็นที่ต้องการมากขึ้นทุกปีจนถึงปัจจุบัน

2.2.1 อุตสาหกรรมอาหาร

แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแล็กติกได้ ถูกนำมาใช้ในกระบวนการผลิตนมเปรี้ยวและโยเกิร์ต เมื่อรับประทานเข้าไปแบคทีเรียจำพวกนี้จะมีคุณสมบัติเป็น probiotic ทำให้ระบบย่อยอาหารและระบบภูมิคุ้มกันดีขึ้น นอกจากนี้กรดแล็กติกยังสามารถช่วยยืดระยะเวลาของผลิตภัณฑ์อาหารหรือใช้ในการถนอมอาหารและเครื่องดื่ม เช่นการหมักดอง เป็นต้น

2.2.2 อุตสาหกรรมเวชภัณฑ์

อุตสาหกรรมด้านเวชภัณฑ์ได้นำกรดแล็กติกมามีส่วนในขั้นตอนการเตรียมยาและการขนส่งยาไปยังเป้าหมาย

2.2.3 อุตสาหกรรมด้านการแพทย์

ได้มีการนำกรดแล็กติกมาทำเป็นวัสดุปลูกถ่าย เช่น ไหมละลาย อวัยวะเทียม วัสดุปิดแผล วัสดุเย็บแผล หรืออุปกรณ์ยึดกระดูก เนื่องจากพอลิแล็กติกแอซิดเป็นเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ และสามารถเข้ากับเนื้อเยื่อได้

2.2.4 อุตสาหกรรมเคมี

กรดแล็กติกยังสามารถนำมาใช้ในกระบวนการทางเคมี ใช้เป็นตัวทำละลายในผลิตภัณฑ์จำพวกยาทาเล็บ แล็กเกอร์ เนื่องจากไม่เป็นอันตรายต่อวิ่งแวดล้อมและไม่เกิดการกัดกร่อน

2.2.5 อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

กรดแล็กติกมาใช้ในการควบคุมค่าค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นส่วนผสมอยู่ในครีมทาผิวและมอยเจอร์ไรเซอร์ในเครื่องสำอาง ให้ความชุ่มชื่นแก่ผิวและช่วยฟื้นฟูสภาพผิว นอกจากนี้กรดแล็กติกยังมีคุณสมบัติใช้เป็นสารผิวขาวขึ้น โดยมีกลไกการยับยั้งการทำงานของไทโรซิเนส และยังใช้ในการป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในเครื่องสำอางอีกด้วย

2.2.6 อุตสาหกรรมพลาสติก

ปัจจุบันได้มีการนำกรดแล็กติกมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตพอลิแล็กติกแอซิดหรือพลาสติกชีวภาพ เป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติโดยอาศัยจุลินทรีย์ในการย่อยเพื่อทดแทนพลาสติกที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี ในการสร้างพลาสติกชีวภาพนั้นต้องการกรดแล็กติกที่มีความบริสุทธิ์สูงมาก พลาสติกชีวภาพที่ได้ออกมาต้องทนความร้อนได้สูง เพื่อที่สามารถใช้งานได้หลากหลายมากขึ้น

2.3 กระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักกรดแล็กติกนั้นจะเป็นจุลินทรีย์กลุ่มราและแบคทีเรีย และยังมีการสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีด้วย

2.3.1 กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี

กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีเริ่มจากการเติม Hydrogencyanide ทำปฏิกิริยากับ Acetaldehyde จะได้ Lactonitrile ดังขั้นตอนที่ 1 จากนั้นจะเข้าสู่กระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรดซัลฟิวริก ได้เป็นกรดแล็กติกและเกลือแอมโมเนียม ดังขั้นตอนที่ 2 หลังจากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการทำบริสุทธิ์โดยกระบวนการเอสเทอร์ริฟิเคชั่น (Esterification) ด้วย Methanol ได้ Methyl lactate ดังขั้นตอนที่ 3 และผ่านขั้นตอนการไฮโดรไลซิสด้วยน้ำได้กรดแล็กติก ดังขั้นตอนที่ 4

ขั้นตอนที่ 1 : การเติมไฮโดรเจนไซด์ยาไนด์ (Hydrogen cyanide)

$CH_3CHO + HCN \longrightarrow CH_3CHOHCN$

Acetaldehyde Hydrogen cyanide Lactonitrile

ขั้นตอนที่ 2 : การไฮโดรไลซิสด้วยกรดซัลฟิวริก (Hydrolysis by H_2SO_4)

$CH_3CHOHCN + H_2O + 1/2H_2SO_4 \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + ½(NH_4)_2SO_4$

Lactonitrile Sulphuric acid Lactic acid Ammonium salt

ขั้นตอนที่ 3 : การเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น (Esterification)

$CH_3CHOHCOOH + CH_3OH \longrightarrow CH_3CHOHCOOCH_3 + H_2O$

Lactic acid Methanol Methyl lactate

ขั้นตอนที่ 4 : การไฮโดรไลซิสด้วยน้ำ (Hydrolysis by H_2O)

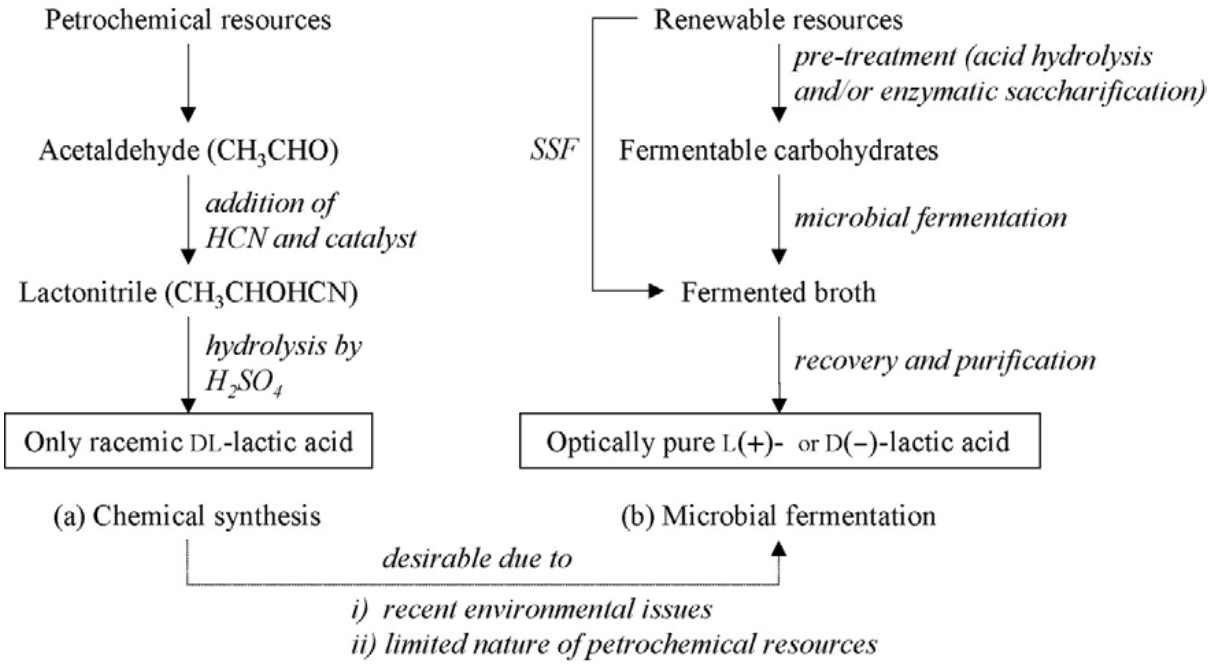
$CH_3CHOHCOOCH_3 + H_2O \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + CH_3OH$

Methyl lactate Lactic acid Methanol

ที่มา : Narayanan และคณะ (2004)

แต่การสังเคราะห์ด้วยวิธีการทางเคมีนั้นยังมีข้อเสีย คือ การสังเคราะห์ทางเคมีนั้นจะใช้สภาวะที่รุนแรงในการทำปฏิกิริยา สารเคมีที่ใช้ยังเป็นสารเคมีที่อันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม อีกทั้งยังมีราคาที่สูงอีกด้วย และกรดแล็กติกที่ได้จากการสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีนั้นจะเป็นกรดแล็กติกที่อยู่ในรูปไอโซเมอร์ผสมทั้งแอล-แล็กติกและดี-แล็กติก รูปที่ 2.2 ซึ่งไม่สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยาได้ เนื่องจากกรดแล็กติกที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและยานั้น คือ กรดแล็กติกชนิดแอล เพราะว่ากรดแล็กติกชนิดดีนั้นไม่มีความจำเพาะต่อระบบเมแทบอลิซึมของร่างกาย เนื่องจากร่างกายไม่มีเอนไซม์ดี-แล็กเตทดีไฮโดรจีเนส ทำให้เกิดการสะสมของกรดใน

ร่างกายและในกระแสเลือดทำให้เกิดภาวะที่เป็นกรดสูง นอกจากนั้นกรดแล็กติกแบบไอโซเมอร์ผสมนี้ไม่เหมาะที่จะนำไปสังเคราะห์พอลิแล็กติกแอซิด เพราะพลาสติกที่ผลิตได้ออกมานั้นจะมีความเสถียรต่ำ



รูปที่ 2.2 แสดงการผลิตกรดแล็กติกด้วยวิธีทางเคมีและการหมักของจุลินทรีย์

2.3.2 กระบวนการหมักโดยรา

ราสามารถผลิตกรดแอล-แล็กติกบริสุทธิ์ได้ทั้งจากน้ำตาลและแป้ง ซึ่งเป็นแหล่งวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีราคาถูกและหาได้ง่าย รายังสามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสที่มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล เพื่อนำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญเติบโต และเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแล็กติก แต่รานั้นต้องการอากาศจำนวนมากทั้งในการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแล็กติก ส่งผลให้กระบวนการผลิตกรดแล็กติกโดยรานั้นมีต้นทุนสูง และกระบวนการหมักของราเป็นแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนต์เทชั่น (Heterofermentation) ซึ่งสามารถผลิตกรดแล็กติกและมีผลิตภัณฑ์ข้างเคียงออกมา เช่น กรดฟูมาริก แอลกอฮอล์ และคาร์บอนไดออกไซด์อีกด้วย และการนำราไปเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนนั้นค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากรามีรูปร่างเป็นเส้นใย อาจจะไปเกาะตามส่วนต่างๆของถัง ทำให้การถ่ายเทออกซิเจนเข้าสู่เซลล์เป็นไปได้ยาก ส่งผลให้ปริมาณกรดที่ผลิตได้นั้นมีปริมาณน้อย

2.3.3 กระบวนการหมักโดยแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจะมีวิธีการและกระบวนการเลี้ยงที่แตกต่างจากรา เนื่องจากแบคทีเรียไม่ต้องการอากาศจำนวนมากเหมือนรา การเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเป็นไปได้ง่าย เนื่องจากแบคทีเรียเป็นเซลล์เดี่ยว และต้นทุนการผลิตไม่สูงเท่าการเลี้ยงโดยใช้รา

กระบวนการหมักกรดแล็กติกของจุลินทรีย์มี 4 ขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 : กระบวนการหมักและการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง (Fermentation and neutralization)

$C_6H_{12}O_6$ + $Ca(OH)_2$ ⟶ $(2CH_3CHOHCOO^-)Ca^{2+}$ + $2H_2O$

Carbohydrate Calcium hydroxide Calcium lactate

ขั้นตอนที่ 2 : การไฮโดรไลซิสด้วยกรดซัลฟิวริก (Hydrolysis by H_2SO_4)

$(2CH_3CHOHCOO^-)Ca^{2+}$ + H_2SO_4 ⟶ $2CH_3CHOHCOOH$ + $CaSO_4$

Calcium lactate Sulphuric acid Lactic acid Calcium sulphate

ขั้นตอนที่ 3 : การเกิดปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น (Esterification)

$CH_3CHOHCOOH$ + CH_3OH ⟶ $CH_3CHOHCOOCH_3$ + H_2O

Lactic acid Methanol Methyl lactate

ขั้นตอนที่ 4 : การไฮโดรไลซิสด้วยน้ำ (Hydrolysis by H_2O)

$CH_3CHOHCOOCH_3$ + H_2O ⟶ $CH_3CHOHCOOH$ + CH_3OH

Methyl lactate Lactic acid Methanol

การหมักโดยจุลินทรีย์ปัจจุบันมีข้อดีคือ เราสามารถนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแล็กติกได้ เช่น แป้ง กากน้ำตาล เซลลูโลสเป็นต้น ซึ่งช่วยในการลดต้นทุนการผลิต นอกจากนี้แบคทีเรียยังสามารถผลิตได้ทั้งกรดแอล-แล็กติกและกรดดี-แล็กติก ที่ความบริสุทธิ์เชิงแสงสูงถึง 90 เปอร์เซนต์จากกรดแล็กติกที่ได้จากการหมักของแบคทีเรีย

2.4 แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแล็กติก

แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแล็กติกได้คือแบคทีเรียจำพวก *Aerococcus Carnobacterium Enterococcus Lactococcus Lactobacillus Leuconostoc Oenococcus Pediococcus Streptococcus Tetragenococcus Vagococcus* และ *Weissella* ซึ่งแบคทีเรียพวกนี้จัดอยู่ในไฟลัมน์ (Phylum) ของ Firmicutes แบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกส่วนใหญ่ที่พบได้มาก คือ *Lactobacillus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแท่งหรือทรงกลม ไม่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสได้และไม่สร้างสปอร์ ไม่มีระบบ Cytochome และสามารถทนค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำๆ ได้ดี ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 5.5-6.5 ไม่ต้องการออกซิเจนปริมาณมาก หากแต่ต้องการอาหารที่สมบูรณ์ในการเจริญเติบโต ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียพวกนี้มีข้อจำกัดในการสังเคราะห์สารอาหารบางอย่าง เช่น กรดนิวคลีอิก กรดอะมิโน และเปปไทด์ แบคทีเรียพวกนี้มีมากถึงกว่า 80 สปีชี่ส์ ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียไม่ก่อโรค สามารถพบได้ตามธรรมชาติ เช่น อาหารหมักดอง เนื้อสัตว์หมัก เครื่องในสัตว์ดิน เปลือกไม้ นม เนยแข็ง และเครื่องดื่มแปรรูปจากนม เป็นต้น และยังพบได้ในร่างกาย เช่น บริเวณเยื่อบุทางเดินอาหาร หรือช่องคลอด เป็นต้น (Reddy และคณะ, 2008) ซึ่งมีทั้งหมด 12 สกุล ตามลักษณะที่แตกต่างกันออกไป ได้แก่

2.4.1 *Aerococcus*

กลุ่มนี้มีลักษณะการแบ่งตัวลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน โดยแบ่งตัวครั้งที่ 2 ในทิศด้านขวามือของครั้งแรก ทาให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็นเซลล์ 4 เซลล์ติดกันคล้ายจตุรัส (Tetrad formation) ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *A. viridians* และ *A. urinae* ซึ่งเปลี่ยนแปลงจาก *P. homari* และ *P. urinae–equi* ตามลำดับ (Stlies และ Holzapfel, 1997)

2.4.2 *Carnobacterium*

เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนเรียวหรือท่อนตรงขนาดสั้น มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-0.7 ไมครอน และยาว 1.1-3.0 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ มักไม่พบการเรียงเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแอล-แล็กติก อะซีติก เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ จากการหมักเฮกโซส มี 6 สปีชีส์ คือ *C. divergens C. piscicola C. mobile C. funditum* และ *C. alterfunditum* มี mol %G+C ระหว่าง 31.6 - 37.2 % (Stlies และ Holzapfel, 1997)

2.4.3 *Enterococcus*

เซลล์มีลักษณะรูปไข่ จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว หรือสายโซ่สั้นๆ ผลิตกรดแอล-แล็กติก สามารถเจริญในช่วงอุณหภูมิ 10 หรือ 45 องศาเซลเซียส ประกอบด้วย 5 กลุ่ม ได้แก่ *Enterococcus*

faecalis Ent. avium Ent. gallinarum และ *Ent. cecorum* มี mol %G+C ระหว่าง 37-40 % (Devriese และ Pot, 1995)

2.4.4 *Lactococcus*

เซลล์มีลักษณะรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 - 1 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวเป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแอล-แล็กติก สามารถพบได้ใน ผักกาด ถั่ว และหญ้า ปัจจุบันประกอบด้วย 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Lactococcus lactis* ssp. *lactic Lc. lactis* ssp. *cremoris Lc. lactis* ssp. *hordniae Lc. garvieae Lc. plantarum Lc. raffinolactis* และ *Lc. piscium* มี mol %G +C ระหว่าง 34-43 % (Teuber, 1995)

2.4.5 *Lactobacillus*

เป็นแบคที่เรียกรดแล็กติกที่พบได้มากที่สุด มีความหลากหลายด้านฟีโนไทป์ สรีรวิทยาและชีวเคมี เนื่องจากความแตกต่างของ mol %G+C ภายในสูง คือระหว่าง 32- 53 % เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งซึ่งแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ Obligately homofermentative lactobacilli Facultatively heterofermentative lactobacilli และ Obilgately heterofermentative lactobacilli

2.4.6 *Leuconostoc*

เซลล์มีสัณฐานขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ในอาหารที่มีกลูโคสเซลล์มีลักษณะยืดออกคล้ายกลุ่ม *Lactobacilli* หากเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีนมเป็นองค์ประกอบ เซลล์จะมีรูปร่างกลม การจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว อยู่เป็นคู่หรือเป็นสายโซ่สั้นถึงปานกลาง ผลิตกรดดี-แล็กติก เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และสารหอมระเหยจากการหมักกลูโคส (Heterofermentative) ช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดอง ปัจจุบันประกอบด้วย 8 สปีชีส์คือ *Leuconostoc mesenteroides Leuc. lactis Leuc. gelidum Leuc. carnosum Leuc. pseudomesenteroides Leuc. citreum Leuc. argentinum* และ *Leuc. fallax* มี mol %G+C ระหว่าง 37-40 % (Dellaglio และคณะ, 1995)

2.4.7 *Oenococcus*

ประกอบด้วยสปีชีส์เดียวคือ *Oenococcus oeni* มีคุณสมบัติการทนกรดและเอทานอลในปริมาณที่สูง (Dellaglio และคณะ, 1995)

2.4.8 *Pediococcus*

เซลล์มีลักษณะรูปร่างกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36-0.143 ไมครอน มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือนกับ *Aerococcus* ในภาวะไม่มีอากาศ ผลิตกรดแล็กติกชนิด ดีแอลและแอล-แล็กติก

จากกระบวนการหมักโดยกลูโคส ปัจจุบันประกอบด้วย 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Pediococcus acidilactici P. damonosus P. dextrinicus P. inopinatus P. parvulus* และ *P. pentosaceus* มี mol %G+C ระหว่าง 34-44 % (Simson และ Taguchi, 1995)

2.4.9 *Streptococcus*

เซลล์มีลักษณะรูปร่างกลมหรือรูปไข่ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8-1.2 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นสายโซ่ หรือคู่ ผลิตกรดแอล-แล็กติก เป็นโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20-42 องศาเซลเซียส มี mol %G+C ระหว่าง 34 -46 % (Hardie และ Whiley, 1995)

2.4.10 *Tetragenococcus*

การแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* เนื่องจากเดิม คือ สปีชีส์ *P. halophilus* ได้จัดจำแนกใหม่จากการเจริญในอาหารซึ่งมีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 18 % และมีลำดับเบสบน 16s rRNA gene ใกล้เคียงกับเชื้อสกุล *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าสกุลเดิม (Stlies และ Holzapfel, 1997)

2.4.11 *Vagococcus*

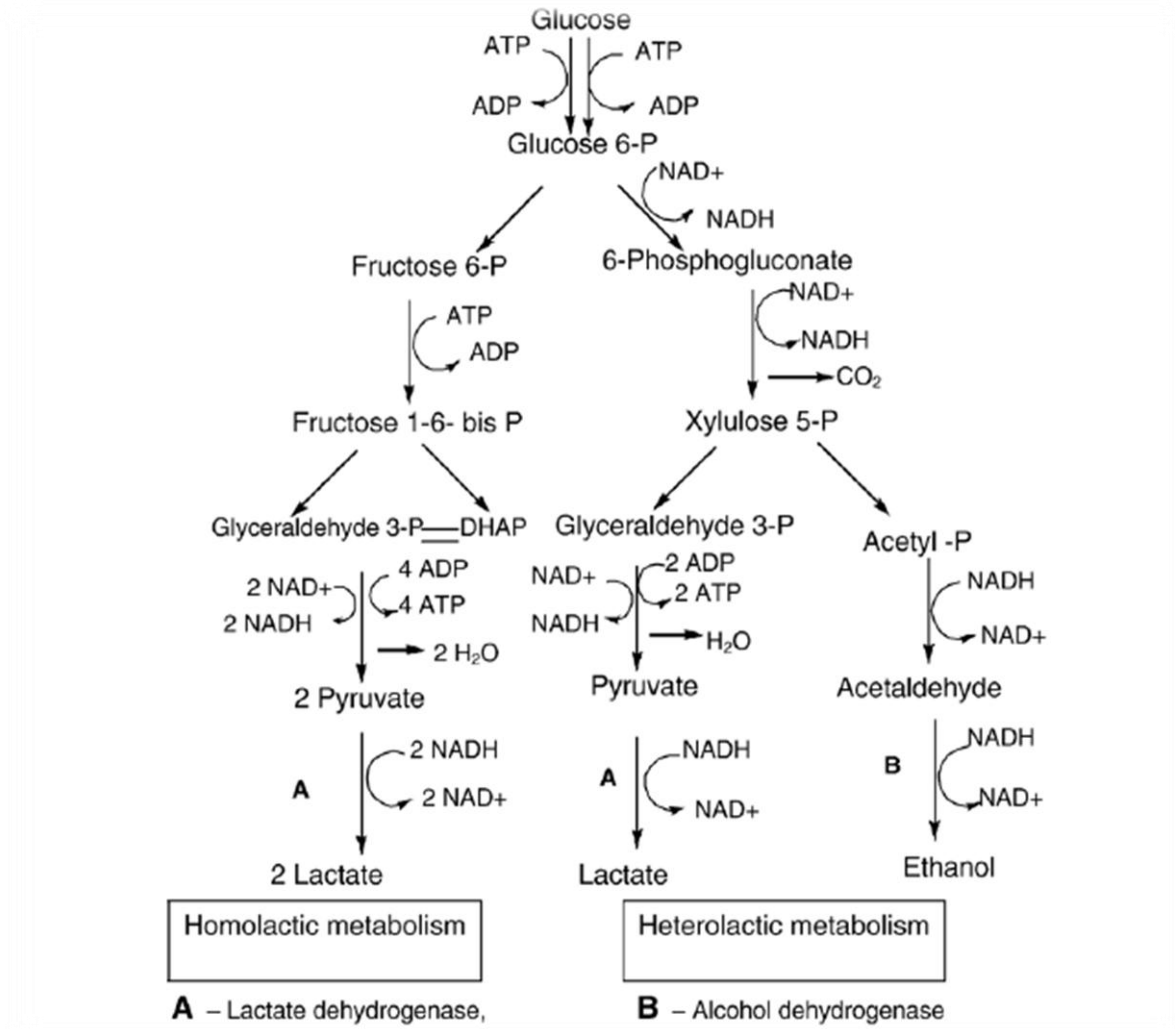
เป็นแบคทีเรียที่สามารถเคลื่อนที่ได้ ยกเว้นบางสายพันธุ์ ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *Vagococcus fluvialis* ซึ่งเดิมอยู่ใน *Streptococcus* และ *V. salmoninarum* (Stlies และ Holzapfel, 1997)

2.4.12 *Weissella*

มีลักษณะคล้าย *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* รูปร่างเซลล์เป็นแท่งและกลม แต่มีลักษณะแตกต่างคือ ขาดกรดอะมิโนบางชนิดที่ผนังเซลล์ คือกรดแอสปาติก และกรดไดอะมิโนพิมิลิก ประกอบด้วยแบคทีเรีย 7 สปีชีส์ ซึ่งเดิมอยู่ในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* คือ *Leuc. paramesenteroides* (*Weissella paramesenteroides*) *Lactobacillus confusus* (*W. confusus*) *Lb. halotolerans* (*W. halotoleran*) *Lb. kandleri* (*W. kandleri*) *Lb. minor* (*W. minor*) และ *Lb. viridescens* (*W. viridescen*) (Stlies และ Holzapfel, 1997)

2.5 กระบวนการหมักของแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติก แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มดังนี้

แบคทีเรียกลุ่ม โฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (Homofermentative) แบคทีเรียกลุ่มนี้จะผลิตกรดแล็กติกออกมาอย่างเดียวโดยสามารถผลิตกรดแล็กติก 2 โมลและพลังงานในรูป ATP จำนวน 2 โมล จากกลูโคส 1 โมล ผ่านวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis pathway) โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้ ได้แก่ *Lactobacillus sp.* และ *Lactococcus sp.* เป็นต้น ส่วนอีกกลุ่ม คือ แบคทีเรียกลุ่ม เฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (Heterofermentative) แบคทีเรียกลุ่มนี้จะใช้กลูโคส 1 โมลเปลี่ยนเป็นกรดแล็กติกและพลังงานในรูป ATP อย่างละ 1 โมลและยังมีเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์อย่างละ 1 โมลออกมาด้วย ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 แสดงการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟและเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ

2.6 แบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มตามเอนไซม์แล็กเทตดีไฮโดรจีเนส

แบคทีเรียแล็กติกนั้นสามารถผลิตกรดแล็กติกได้ 3 ชนิดคือ แอล-แล็กติก ดี-แล็กติก และดีแอล-แล็กติก ขึ้นกับเอนไซม์แล็กเทตดีไฮโดรจีเนสที่มีอยู่ในเซลล์แบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่มีเอนไซม์แอล-แล็กเตทดีไฮโดรจีเนสจะสามารถผลิตกรดแอล-แล็กติก ส่วนแบคทีเรียที่มีเอนไซม์ดี-แล็กเตทดีไฮโดรจีเนสจะผลิตกรดดี-แล็กติกออกมา และยังมีแบคทีเรียบางกลุ่มที่สามารถผลิตกรดแล็กติกได้ทั้ง 2 ไอโซเมอร์คือกรดดีแอล-แล็กติก เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีทั้งเอนไซม์แอล-แล็กเตทดีไฮโดรจีเนสและดี-แล็กเตทดีไฮโดรจีเนส กลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตไอโซเมอร์ต่างกันแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงการหมักของแบคทีเรียชนิดต่างๆและไอโซเมอร์ที่ได้

Genera and species	Fermentative	Isomer of lactic acid
Lactobacillus		
L. brevis	Heterofermentative	DL
L. bulgaricus	Homofermentative	D(-)
L. casei	Homofermentative	L(+)
L. curvatus	Homofermentative	DL
L. delbrucekii	Homofermentative	D(-)
L. lactis	Homofermentative	D(-)
L. plantarum	Homofermentative	DL
Sporolactobacillus		
S. inulinus	Homofermentative	D(-)
S. laevolacticus	Homofermentative	D(-)
S. nakayamae	Homofermentative	D(-)
Streptococcus		
S. cremoris	Homofermentative	L(+)
S. faecalis	Homofermentative	L(+)
S. lactis	Homofermentative	L(+)
Leuconostoc		
L. dextranicum	Heterofermentative	D(-)
L. mesenteroides	Heterofermentative	D(-)

Genera and species	Fermentative	Isomer of lactic acid
P. damnosus	Homofermentative	DL
Bifidobacterium		
B. bifidum	Heterofermentative	L(+)

ที่มา : Vijayakuma และคณะ, 2008, ประเริฐศักดิ์, 2011, พิมทอง, 2011

2.7 แบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกสกุล *Sporolactobacillus*

แบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกส่วนมากจะเป็นพวก *Lactobacillus sp.* ที่สามารถผลิตกรดดี-แล็กติกได้แล้วนั้นยังพบว่ามีแบคทีเรียอยู่อีกสกุลที่สามารถผลิตกรดดี-แล็กติกได้คือ *Sporolactobacillus* เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง สร้างสปอร์ไม่ผลิตคะตะเลส ส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่ได้ จัดอยู่ใน Phylum *Firmicutes* Class *Bacilli* Order *Bacillales* Family *Sporolactobacillaceae* ผนังเซลล์ประกอบด้วย *meso*-diaminopimelic acid มีโมลเปอร์เซ็นต์ GC 43-50 เปอร์เซ็นต์ เช่น *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *nakayamae S. nakayamae* subsp. *racemicus S. inulinus S. terrae S. kofuensis S. lactosus S. laevolacticus S. putidus* และ *S. vineae* เป็นต้น (Chang และคณะ, 2008; Yanagida และคณะ, 1997)

2.7.1 *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *nakayamae*

สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15-40 °C และที่ความเข้มข้น 3-7 % NaCl ผลิตกรดได้จาก Maltose galactose sucrose trehalose แต่ไม่สามารถผลิตกรดจาก Arabinose ribose xylose rhamnose lactose cellobiose melibiose salicin และ starch มีโมลเปอร์เซ็นต์ GC 43-47 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถแยกเชื้อได้จากดิน (Yanagida และคณะ, 1997)

2.7.2 *Sporolactobacillus terrae*

สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15-40 °C และที่ความเข้มข้น 3-5 % NaCl ผลิตกรดได้จาก Trehalose galactose sucrose และ inulin แต่ไม่สามารถผลิตกรดจาก Ribose xylose rhamnose lactose sorbitol arabinose melibiose และ starch มีโมลเปอร์เซ็นต์ GC 43-46 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกเชื้อได้จากดิน (Yanagida และคณะ, 1997)

2.7.3 *Sporolactobacillus kofuensis*

สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 25-40 °C และที่ความเข้มข้น 3-7 % NaCl ผลิตกรดได้จาก Galactose maltose sucrose raffinos mannitol และ inulin แต่ไม่สามารถผลิตกรดจาก Arabinose ribose xylose rhamnose cellobiose lactose และ sorbitol มีโมลเปอร์เซ็นต์ GC 43 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกเชื้อได้จากดิน (Yanagida และคณะ, 1997)

2.7.4 *Sporolactobacillus lactosus*

สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15-45 °C และที่ความเข้มข้น 3-4 % NaCl ผลิตกรดได้จาก Galactose lactose melibiose trehalose สายพันธุ์นี้ส่วนใหญ่ผลิตกรดได้จาก Maltose sucrose raffinose inulin มีโมลเปอร์เซ็นต์ GC 43-46 เปอร์เซ็นต์ สามารถแยกเชื้อได้จากดิน (Yanagida และคณะ, 1997)

2.7.5 *Sporolactobacillus putidus*

โคโลนีมีลักษณะกลมขนาด 1-2 มิลลิเมตร เจริญได้ที่อุณหภูมิ 30-45°C เจริญได้ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.5-5.5 ไม่สร้าง Oxidase และคะตะเลส ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเทรต กรดผลิตได้จาก Galactose D-glucose D-fructose D-mannose mannitol maltose sucrose และ trehalose มีองค์ประกอบ Fatty acid คือ Iso-C16:0 anteiso-C15:0 anteiso-C17:0 มี Menaquinone 7 มีโมลเปอร์เซ็นต์ GC 47 เปอร์เซ็นต์ แยกเชื้อได้จากน้ำส้มบูด (Fujita และคณะ, 2010)

2.7.6 *Sporolactobacillus vineae*

สามารถเจริญได้ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง 6-7 เจริญที่อุณหภูมิ 25-40 °C เจริญที่ความเข้มข้น 7 %NaCl สามารถสร้างกรดได้จากกลูโคส Fructose mannose และ sorbitol ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเทรต ไม่ผลิตคะตะเลส และออกซิเดส มีองค์ประกอบ Fatty acid คือ Iso-C15:0 anteiso-C15:0 anteiso-C17:0 มี Menaquinone 7 มีโมลเปอร์เซ็นต์ GC 47 เปอร์เซ็นต์ คัดแยกเชื้อได้จากดินในไร่องุ่นจากประเทศเกาหลี (Chang และคณะ, 2008)

2.8 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตกรดแล็กติก

ในการผลิตกรดแล็กติกจากจุลินทรีย์นั้นปัจจัยที่สำคัญ คือ เชื้อสายของจุลินทรีย์ ขั้นตอนและวิธีในการเลี้ยง สภาวะที่เลี้ยง และอาหารที่ใช้เลี้ยงจุลินทร์ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะส่งผลถึงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ รวมไปถึงผลผลิตและอัตราการผลิตกรดแล็กติกของจุลินทรีย์อีกด้วย

2.8.1 สายพันธุ์ของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์จะสามารถผลิตกรดแล็กติกได้ในปริมาณไม่เท่ากัน รวมไปถึงไอโซเมอร์ของกรดแล็กติกที่ผลิตออกมาก็จะไม่เหมือนกันขึ้นอยู่กับเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสในเซลล์ของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์จำพวกโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ จะสามารถผลิตกรดแล็กติกได้ดีกว่าจุลินทรีย์จำพวกเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ

2.8.2 สภาวะที่เลี้ยง

2.8.2.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เช่น แบคทีเรียในกลุ่มมีโซไฟล์ (Mesophile) จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิในช่วง 28-45 องศาเซลเซียส ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มเทอโมไฟล์ (Thermophile) สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 45-62 องศาเซลเซียส การเลือกใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมจะทำให้แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตได้ดี เมื่อมีการเจริญเติบโตดีการผลิตกรดแล็กติกก็จะดีด้วย โดยทั่วไปแบคทีเรียที่ผลิตกรดแล็กติกจะสามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 37-45 องศาเซลเซียส เช่น *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* IFO 3202 เจริญและผลิตกรดแล็กติกได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Tanaka และคณะ, 2006) และยังมี *Sporolactobacillus* sp. Strain CASD มีการเจริญเติบโตและให้ผลผลิตกรดแล็กติกที่ดี ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส (Zhao และคณะ, 2010) การที่แบคทีเรียสามารถเจริญได้ดีในภาวะที่มีอุณหภูมิสูงนั้น จะเป็นข้อได้เปรียบเมื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาดใหญ่เนื่องจากในอุตสาหกรรมจะมีอุณหภูมิที่สูงจะสามรถประหยัดค่าหล่อเย็นได้เป็นการลดต้นทุนการผลิต อีกทั้งที่อุณหภูมิสูงจะมีการปนเปื้อนค่อนข้างยาก ตัวอย่างแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง ดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 การเจริญของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแล็กติกที่อุณหภูมิต่างๆ

สายพันธุ์	อุณหภูมิ (°C)	แหล่งคาร์บอน	กรดแล็กติก (g/L)	Yield	Productivity (g/L.h)
L. casei NRRL B-441	37	Hydrolysate barley starch	140	0.98	-
	41	Hydrolysate barley starch	117	0.82	-
L. paracasei No 8	30	Sweet sorghum	-	-	1.5
	36	Sweet sorghum	-	-	1.9
	44	Sweet sorghum	-	-	2.2
L. amylophilus ATCC 49845	28	Starch	29	0.58	0.44
	35	Starch	30	0.60	0.33
L. casei NRRL B-441	30	Glucose	80	0.89	3.2
	37	Glucose	80	0.89	5.6
	45	Glucose	42	0.47	1.2
L. rhamnosus ATCC 10863	30	Glucose	67	0.74	3.3
	37	Glucose	70	0.78	3.3
	45	Glucose	75	0.83	3.3
Lc. lactis sp. *lactis* ATCC 19435	30	Maltose	3.2	0.70	1.0
	37	Maltose	4.0	0.80	1.1
	30	Glucose	60	1.3	2.2
	34	Glucose	65	1.5	2.8
	37	Glucose	60	1.5	2.3
	40	Glucose	50	1.2	1.5

หมายเหตุ : *L.*, *Lactobacillus*; *Lc.*, *Lactococcus* (ที่มา : ประเสริฐศักดิ์, 2011)

2.8.2.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

นอกจากอุณหภูมิแล้วปัจจัยอีกอย่างหนึ่งที่มีความสำคัญซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโต คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในการผลิตกรดแล็กติกค่าความเป็นกรด-ด่างจะมีการเปลี่ยนแปลง เนื่องจากเมื่อเวลาผ่านไปแบคทีเรียจะผลิตกรดแล็กติกออกมาเมื่อผลิตออกมาสะสมมากขึ้นจะทำให้น้ำหมักเกิดภาวะความเป็นกรดมากเกินไป ซึ่งแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกโดยทั่วไปแล้วจะสามารถอยู่ในสภาวะความเป็นกรดได้จนถึงค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 4.5 ถ้าต่ำกว่านี้แบคทีเรียจะไม่สามารถเจริญและอาจตายได้ การควบคุมค่าค่าความเป็นกรด-ด่างในระบบจึงเป็นสิ่งสำคัญอีกอย่างในกระบวนการผลิตกรดแล็กติก โดยทั่วไปแล้วค่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 5.5-6.8 ดังตารางที่ 2.4 ทำการควบคุมโดยใช้สารเคมี เช่น $CaCO_3$ $Ca(OH)_2$ NaOH และ NH_4OH เป็นต้น การควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างให้คงที่จะส่งผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแล็กติกได้มีประสิทธิภาพอีกด้วย (Hofvendahl และ Hagerdal, 2000; Vaidya และคณะ, 2005)

ตารางที่ 2.4 สารควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างในการหมักกรดแล็กติก

สายพันธุ์	แหล่งคาร์บอน	pH	สารควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง	กรดแล็กติก (g/L)	Yield	Productivity (g/L.h)
L. amylophilus ATCC 49845	Glucose	6.5	NaOH	-	-	1.2
	Glucose	7.1	NaOH	-	-	1.0
L. delbrueckii IFO 3534	Cellulose	4.2	$CaCO_3$	15	0.30	-
	Cellulose	5.0	$CaCO_3$	26	0.52	-
	Cellulose	5.9	$CaCO_3$	18	0.36	
L. delbrueckii sp. *bulgaricus* ATCC 11842	Sorghum	6.5	NH_3	-	-	2.3
	Sorghum	6.0	NH_3	-	-	4.5
L. delbrueckii sp. *bulgaricus* ATCC 55163	Whey	6.0	NH_4OH	50	0.64	-
L. delbrueckii sp. *bulgaricus* NRRL B-548	Cellulose	4.2	NH_4OH	27	0.27	0.23
	Cellulose	5.0	NH_4OH	52	0.58	0.43
L. rhamnosus ATCC 10863	Glucose	7.5	NH_4	-	-	17
	Glucose	6.3	NH_4	-	-	23
L. rhamnosus ATCC 7469	Glucose	6.2	$CaCO_3$	26	0.81	2.6
Lc. lactis sp. *lactis* ATCC 19435	Hydrolysate wheat	6.0	NaOH	96	0.76	3.0
Lc. lactis sp. *lactis biovar diacetylactis* CNRZ 2125	Lactose + Citrate	5.0	NaOH	7.0	0.13	0.83
	Lactose + Citrate	6.5	NaOH	38	0.73	7.7
L. salivarius sp. *salivarius* ATCC 11742	Soy molasses	5.6	NaOH	5.5	0.85	-
	Soy molasses	6.4	NaOH	4.9	0.82	-

หมายเหตุ : *L., Lactobacillus*; *Lc*., *Lactococcus* (ที่มา : ประเสริฐศักดิ์, 2011)

2.8.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

สารอาหารเป็นสิ่งสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิดรวมไปถึงจุลินทรีย์ด้วย ถ้าในกระบวนการหมักมีสารอาหารที่เพียงพอและเหมาะสมจะทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดีและสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ออกมาได้จำนวนมาก สารอาหารที่เหมาะสมจะมีความแตกต่างกันขึ้นกับกระบวนการและวิธีการหมักที่ใช้ โดยทั่วไปแล้วจะมีสารอาหารหลัก เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และเกลืออนินทรีย์ เป็นต้น โดยปริมาณความเข้มข้นของอาหารที่ใช้นั้นขึ้นกับจำนวนจุลินทรีย์ ขนาดของการหมักและวิธีการหมักที่ใช้

2.8.3.1 แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นสารอาหารหลักสำคัญของจุลินทรีย์ ช่วยในการสร้างเซลล์และพลังงานของจุลินทรีย์

กลูโคส (Glucose) เป็นแหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้มากที่สุดเพราะเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวแบคทีเรียจึงสามารถนำไปใช้ได้เลยโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการย่อยต่างๆก่อนเข้าสู่ระบบเมแทบอลิซึม โดยการหมักของจุลินทรีย์กลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวท จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดแล็กติกและผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น ฟูมาริก และเอทานอล เป็นต้น

นอกจากกลูโคสแล้วยังมีแหล่งคาร์บอนอื่นๆอีกเช่น แล็กโทส ไซโลส อะราบิโนส หางนม กากน้ำตาล เซลลูโลส และแป้ง เป็นต้นที่สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้แต่บางชนิดต้องผ่านกระบวนการย่อยเพื่อให้เป็นโมเลกุลเล็กเสียก่อนเพื่อให้แบคทีเรียนำไปใช้ได้ง่ายเนื่องจากแบคทีเรียบางชนิดไม่มีเอนไซม์ที่สามารถย่อยได้ แหล่งคาร์บอนอื่นๆที่นำมาใช้ดังตารางที่ 2.5

2.8.3.2 แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบของอาหารที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งนอกจากแหล่งคาร์บอนแล้วจุลินทรีย์ยังต้องการแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโน แหล่งไนโตรเจนมีทั้งที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น สารสกัดจากยีส เปปโทน เป็นต้น และสารอนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมฟอตเฟต เป็นต้น โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์จะสามารถเจริญได้ดีในแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ นอกจากนี้ยังมีวัตถุดิบทางการเกษตรนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อเป็นการลดต้นทุนได้อีกด้วย เช่น ถั่วเหลืองและน้ำแช่ข้าวโพด เป็นต้น

ตารางที่ 2.5 แสดงการใช้แหล่งคาร์บอนที่ใช้ผลิตกรดแล็กติก

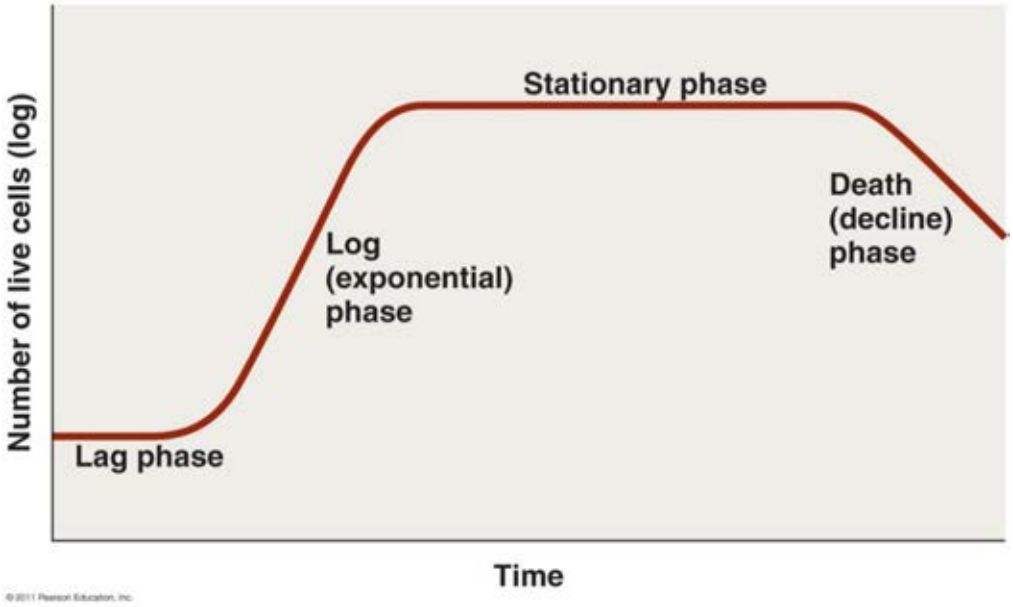
Carbon source (g/l)	Microorganisms	Optical purity D-Lactic acid (%)	Reference
Lactose (100 g/l)	*L. bulgaricus*	99.9	Benthin and Villadsen (1995)
Glucose (10 g/l)	*L. delbrueckii* *L. coryniformis* subsp. *torquens* *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* *Leuc. carnosum* *Leuc. fallax*	87.2 92.2 95.7 91.5 94.0 86.1	Manome *et al.* (1998)
Filter paper (33 g/l)	*L. coryniformis* subsp. *torquens*	100.0	Yáñez *et al.* (2003)
Rice starch (100 g/l, converted value as maltose)	*L. delbrueckii*	97.5	Fukushima *et al*. (2004)
Rice bran (100 g/l)	*L. delbrueckii*	95.0	Tanaka *et al*. (2006)
Sugarcane molasses (119 g/l) Sugarcane juice (133 g/l) Sugar beet juice (105 g/l)	*L. delbrueckii* *L. delbrueckii* *L. delbrueckii*	97.1 98.3 97.5	Calabia and Tokiwa (2007*)*
Rice powder (100 g/l, converted value as maltose)	*L. delbrueckii* LD 0028	97.5	Lee (2007)
Glucose (100 g/l)	*L. plantarum* NCIMB 8826 Δ*ldhL1*/pCUSαA	99.7	Okano *et al*. (2009b)
Raw corn starch (100 g/l)	*L. plantarum* NCIMB 8826 Δ*ldhL1*/pCUSαA	99.6	Okano *et al*. (2009b)
Cellooligisaccharides (2 g/l)	*L. plantarum* NCIMB 8826 Δ*ldhL1*/pCUSαA	99.5	Okano *et al*. (2010)
Hydrolyzed cane sugar (150 g/l)	*L. lactis* NCIM2368	98.0	Joshi *et al*. (2010)

หมายเหตุ : *L., Lactobacillus*; *Leuc., Leuconostoc.* (ที่มา : ดัดแปลงจาก Pramkaew, 2010)

2.8.4 จลนพลศาสตร์ของการหมัก

ในการหมักนั้นเราจำเป็นต้องศึกษาถึงไคเนติกส์ของการหมักด้วย จะทำให้เราได้รู้ช่วงการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ อัตราการใช้สารตั้งต้น การใช้อากาศ การสร้างผลิตภัณฑ์ และการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรดด่างในระบบได้

จุลินทรีย์จะแบ่งเป็น 4 ช่วงใหญ่ๆตั้งแต่เริ่มเจริญเติบโตจนตายดังนี้ ช่วงระยะปรับตัว (lag phase) เป็นช่วงที่แบคทีเรียกำลังปรับตัวกับสภาพแวดล้อมและเตรียมที่จะเจริญเติบโต โดยในการหมักระดับอุตสาหกรรมต้องการที่ให้ช่วงนี้ใช้เวลาสั้นที่สุดเพื่อลดต้นทุนการผลิต จากนั้นจะเข้าสู่ช่วงการเจริญ (log phase) เป็นช่วงที่แบคทีเรียเพิ่มจำนวนเมื่อแบคทีเรียเจริญได้สูงสุดถึงระดับหนึ่งจะเข้าสู่ช่วงการเจริญคงที่ (stationary phase) จากนั้นเซลล์จะเข้าสู่ช่วงการตาย (death phase) ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์

เมื่อจุลินทรีย์ได้เข้าสู่ช่วง log phase จุลินทรีย์จะมีการเจริญเติบโตแบบทวีคูณซึ่งการเจริญเติบโตในช่วงนี้นอกจากความเข้มข้นเซลล์จะเพิ่มขึ้นแล้ว อัตราการเพิ่มของความเข้มข้นของเซลล์ก็เพิ่มขึ้นด้วย นั่นคือเซลล์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สามารถเพิ่มจำนวนตัวเองได้ นอกจากมันจะเป็นตัวทำให้เกิดปฏิกิริยาแล้ว มันยังเพิ่มจำนวนของตัวเร่งปฏิกิริยาด้วย เมื่อจำนวนของเซลล์เพิ่มขึ้น

อัตราการเกิดปฏิกิริยาก็เพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นหากสภาวะแวดล้อมอื่นๆ คงที่ อัตราการเพิ่มของเซลล์ จะแปรผันตามความเข้มข้นของเซลล์ในขณะนั้น ดังความสัมพันธ์

$$dx/dt \propto x$$

ความสัมพันธ์แปรผันตามนี้ สามารถเปลี่ยนเป็นสมการโดยแทนด้วยค่าคงที่ μ

$$dx/dt = \mu x \qquad \text{.....(1)}$$

เมื่อ x = ความเข้มข้นของเซลล์

t = เวลา (ชั่วโมง)

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate)

เมื่อใส่ลอกาลิทึมในสมการที่ (1) จะได้

$$ln\ X_1 = ln\ X_0 + \mu t \qquad \text{.....(2)}$$

เมื่อนำสมการ (2) มาวาดกราฟจะได้กราฟเส้นตรง ซึ่งมีค่าความลาดเอียง (slope) เท่ากับอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max})

กระบวนการหมักสามารถแบ่งออกได้ 3 ประเภทหลัก แบ่งตามวิธีการเลี้ยง

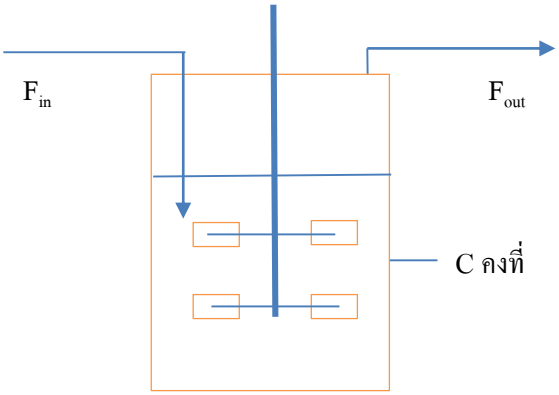
1.การหมักแบบแบตช์ (Batch fermentation) เป็นการหมักที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบระบบปิด จะไม่มีการเติมอาหารเข้าไปและดึงเอาอาหารออกมา การหมักแบบนี้ปริมาตรจะคงที่ขณะที่เซลล์จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตไปเรื่อยๆ ในปี 2013 Nguyen และคณะได้ทำการใช้ *Hydrodictyon reticulatum* ตากแห้ง มาเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดดี-แล็กติกโดยใช้แบคทีเรีย *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* ด้วยวิธี SSF ในการหมักแบบแบตช์พบว่า yield ที่ได้ 45.8 เปอร์เซ็นต์ และ productivity 2.38 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยมีค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง 95.8-99.6 เปอร์เซ็นต์ ในปี 2003 Yanez และคณะได้ทำการทดลองผลิตกรดดี-แล็กติกโดยใช้แบคทีเรีย *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* โดยการหมักแบบแบตช์และ SSF ที่อุณหภูมิ

39 องศาเซลเซียสและค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.4 ผลการทดลองได้ yield 89 เปอร์เซ็นต์ และ produvtivity 0.5 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและไม่พบกรดแอล-แล็กติกในน้ำหมักเลย

2.การหมักแบบเฟดแบตช์ (Fed-batch fermentataion) การหมักประเภทนี้จะมีการเติมอาหารลงไปในระบบโดยการเติมนั้นจะเป็นการเติมแบบต่อเนื่องหรือเติมไปทีเดียวปริมาณเยอะ หลังจากเติมเข้าไปแล้วจะไม่มีการนำอาหารออกมาจากระบบ ซึ่งจะต่างจากการหมักแบบแบตช์คือปริมาตรจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณอาหารที่เติมเข้าไป ในปี 2011 Wang และคณะได้ทำการหมักกรดดี-แล็กติกโดยใช้แบคทีเรีย*Sporolactobacillus* sp. CASD ด้วยวิธี SSF กับการหมักแบบเฟดแบตช์ พบว่าความเข้มข้นของกรดดี-แล็กติกที่ได้เมื่อสิ้นสุดกระบวนการนั้นสูงถึง 207 กรัมต่อลิตร productivity ที่ได้ 3.8 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง yiled 93 เปอร์เซ็นต์ และความบริสุทธิ์เชิงได้ 99.3 เปอร์เซ็นต์ การหมักประเภทนี้จะให้ค่าความเข้มข้นสุดท้ายที่สูง

3.การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) เป็นการหมักที่มีการเติมอาหารเข้าสู่ระบบพร้อมทั้งมีการดึงอาหารออกจากระบบโดยอัตราการเติมเข้าและนำออกนั้นจะเท่ากัน จะส่งผลให้ปริมาตรอาหารในถังปฏิกรณ์ชีวภาพคงที่แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

3.1 คีโมสแตท (Chemostat) การหมักแบบนี้จะมีการกำหนดอัตราการเติมอาหารเข้าและดึงอาหารออกไว้ค่าหนึ่งคงที่ ส่วนอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์จะแปรตามอัตราการไหลเข้าและออกของอาหาร ดังรูป 2.5



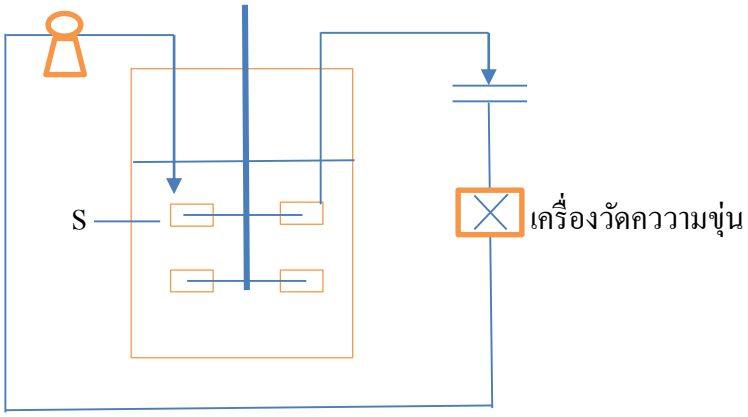
F_{in} = อาหารที่ป้อนเข้า

F_{out} = อาหารที่นำออก

C = ความเข้มข้น

รูปที่ 2.5 การหมักแบบคีโมสแตท

3.2 เทอไบโดสแตท (Turbidostat) การหมักแบบนี้จะกำหนดค่าความเข้มข้นของเซลล์ไว้ค่าหนึ่งที่ต้องการโดยวัดจากค่าความขุ่น โดยตัววัดความขุ่นจะถูกติดตั้งไว้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งจะเป็นตัวควบคุมอัตราการไหลเข้าและออกของของเหลวภายในระบบ ดังรูป 2.6



กำหนดให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์ค่าหนึ่ง = X

C = ความเข้มข้นของอาหาร

รูปที่ 2.6 แสดงการหมักแบบเทอไบโดสแตท

ในปี 2011 Tashiro และคณะได้ใช้แบคทีเรีย *Lactobacillus delbrucekii* subsp. *lactis* QU 41 ผลิตกรดดี-แล็กติกโดยใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องควบคุมอุณหภูมิที่ 43 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6 พบว่าได้กรดดี-แล็กติกมีความบริสุทธิ์เชิงแสงสูงถึง 99.9 เปอร์เซ็นต์ yiled ที่ได้ 1.03 และ productivity 18.0 ที่อัตราการเจือจาง 0.84 ความเข้มข้นของกรดดี-แล็กติกที่ได้คือ 20.7 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ตารางที่ 2.6 แสดงกระบวนการหมักกรดแล็กติก ในปีเดียวกัน Sawai และคณะได้ทำการใช้การหมักแบบต่อเนื่องควบคู่กับระบบ Membrane-Integrated Fermentation มาผลิตกรดดี-แล็กติกโดยใช้แบคทีเรีย *Sporolactobacillus laevolacticus* ในการเพิ่มค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง จากผลการทดลองพบว่าเมื่อระยะเวลาการหมักที่นานขึ้นแบคทีเรียจะปล่อยเอนไซม์ออกมาเพื่อเปลี่ยนกรดแอล-แล็กติกไปเป็นกรดดี-แล็กติกได้ ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงที่ได้ 99.9 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลา 350 ชั่วโมง productivity 12 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากนั้นในปีถัดมา 2012 Mimitsuka และคณะได้ทำการทดลองโดยใช้วิธีเดียวกันในลดการใช้แหล่งไนโตรเจนโดยพบว่าเมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโตจนช่วงเวลาหนึ่งแบคทีเรียจะใช้แหล่งไนโตรเจนน้อยลงจึงสามารถความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ป้อนเข้าไปได้

ตารางที่ 2.6 แสดงเทคนิคการหมักแต่ละแบบ

Microorganism	Fermentation mode	Lactic acid (g/l)	Productivity (g/L.h)	Reference
Lactobacillus casei SU No 22 +	Fed-batch, coimmobilization	47.0	2.0	Roukas และคณะ 1998
Enterococcus faecalis RKY1	Batch Repeated batch, cell-recycle *via* membrane	95.7 93.2	4.0 6.4	Oh และคณะ 2003
Lactobacillus rhamnosus ATCC 10863	Batch Continuous, cell-recycle *via* membrane	120.0 92.0	2.1 57.0	Kwon และคณะ 2001
Lactobacillus casei ssp. *rhamnosus* ATCC 11443	Continuous, cell-recycle *via* immobilization	22.4	9.0	Cotton และคณะ 2001
Lactobacillus delbrueckii NRRL B445	Fed-batch, *in situ* removal *via* solvent extraction	23.1	0.2	Iyer และคณะ 1999
Lactococcus lactis IO-1 JCM 7638	Batch, *in situ* removal *via* electrodialysis	39.0	0.9	Nomura และคณะ 1998
Lactobacillus rhamnosus IFO 3863	Batch Continuous, *in situ* removal *via* electrodialysis	98.0 20.0	1.9 8.2	Min-Tian และคณะ 2005
Lactobacillus helveticus CNRZ 303	Continuous, cell-recycle *via* membrane	55.0	7.1	Jeantet และคณะ 1996
Lactobacillus delbrueckii CECT 286	Continuous, *in situ* removal *via* ion-exchange resin	26.1	10.4	Monteagudo และคณะ 1999

(ที่มา : Wee และคณะ, 2006)

ข้อดีและข้อเสียของการหมักแต่ละแบบ

1. การหมักแบบแบตช์ (Batch fermentation)

   ข้อดี

   - มีการปนเปื้อนยากเพราะเป็นระบบปิด
   - การควบคุมระบบเป็นไปได้ง่ายและไม่ซับซ้อน

ข้อเสีย

- จะต้องทำการเตรียมอาหารและหัวเชื้อใหม่ทุกครั้งซึ่งอาจเป็นการสิ้นเปลืองทั้งเวลาและค่าใช้จ่าย
- เนื่องจากต้องเริ่มระบบใหม่ทุกครั้งจุลินทรีย์จึงต้องมีการปรับตัวอาจจะทำให้ใช้เวลาก่อนที่จุลินทรีย์จะเข้าสู้ช่วงการเจริญ

2. การหมักแบบเฟดแบตช์ (Fed-batch fermentation)

ข้อดี

- เมื่อเติมอาหารลงไปเซลล์สามารถเจริญได้เลยไม่ต้องผ่านช่วงการปรับตัว
- ลดปัญหาการยับยั้งจากสารอาหาร (Substrate inhibition)

ข้อเสีย

- การเติมอาหารลงไปจะเติมได้ในปริมาตรที่จำกัดเนื่องจากไม่มีการนำอาหารในระบบออกมาและพื้นที่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่จำกัด
- ในการหมักที่มีการควบคุมความเป็นกรดด่าง เมื่อระยะเวลาในการหมักมากขึ้นและของเหลวในระบบไม่มีการถ่ายเทออก จะส่งผลให้ไอออนที่สะสมอยู่ในระบบมีปริมาณมากขึ้นเซลล์จะเกิดภาวะเครียด

3. การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation)

ข้อดี

- ลดปัญหาการยับยั้งจากสารอาหาร (Substrate inhibition)
- อาหารในระบบจะใหม่อยู่ตลอดไม่เกิดการสะสมของสารที่เป็นอันตรายต่อจุลินทรีย์ในระบบ
- ให้ผลผลิตที่สม่ำเสมอความสามารถในการผลิตดีในด้านพลังงาน ปริมาณ และพลังงานที่ใช้
- การควบคุมปริมาตรในระบบให้คงที่ช่วยลดการสะสมของไอออนและภาวะความเครียดของเซลล์ได้
- เนื่องจากมีการเติมเข้าและนำออกปริมาตรถังปฏิกรณ์ชีวภาพจึงไม่เป็นอุปสรรคในการเติมอาหาร

ข้อเสีย

- การควบคุมอัตราการเติมเข้าและนำออกนั้นทำได้ยากและมีความซับซ้อน
- อาจเกิดการปนเปื้อนได้ง่ายเนื่องจากมีการเติมอาหารเข้าและดึงอาหารออกจากระบบตลอดเวลา

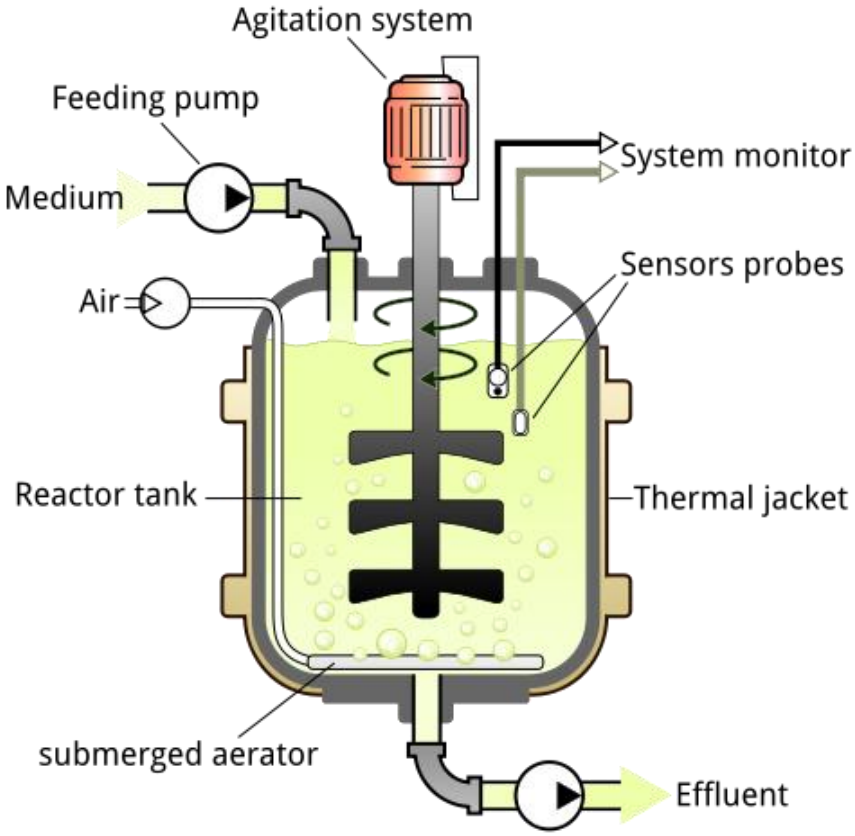
- การหมักประเภทนี้ใช้เวลาที่นานอาจจะเกิดการกลายพันธุ์ของจุลินทรีย์ได้

2.8.5 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพนั้นถูกออกแบบมาเพื่อใช้เลี้ยงจุลินทรีย์หรือเนื้อเยื่อ โดยสามารถควบคุมให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมได้ เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง อัตราการกวน อัตราการให้อากาศ เป็นต้น เพื่อให้จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยสามารถควบคุมให้ภายในระบบปลอดเชื้ออยู่ตลอดกระบวนการหมัก

2.8.5.1 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน (Stirred Tank Bioreactor)

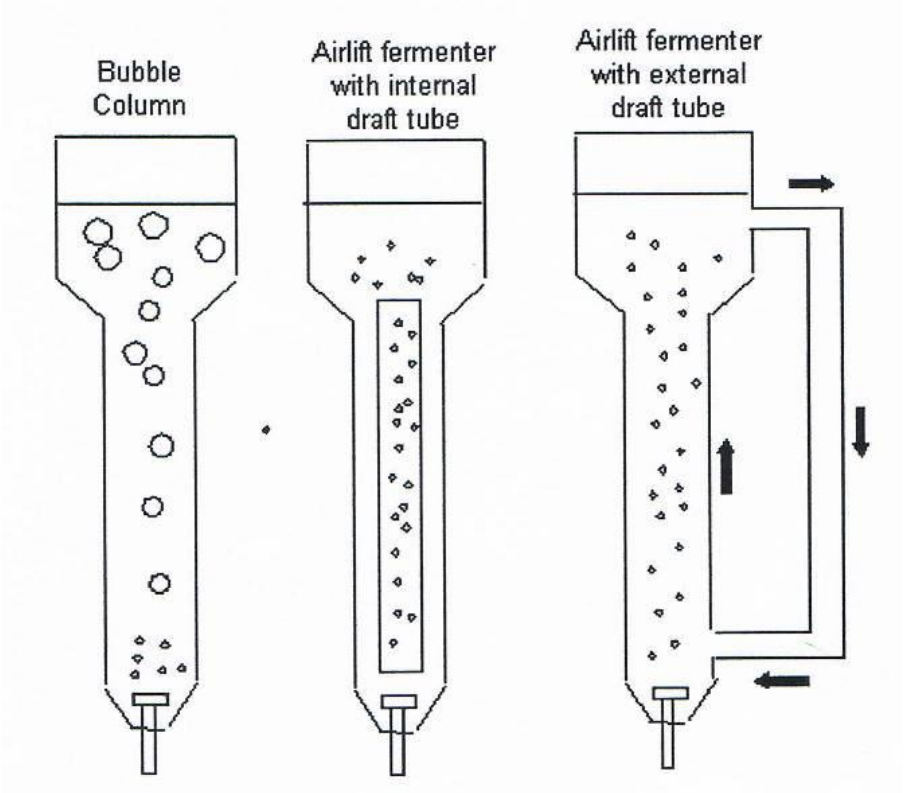
ถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้มีการใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่างๆ เนื่องจากการออกแบบที่ง่ายและมีการควบคุมที่ไม่ซับซ้อน มีส่วนประกอบหลักอยู่ 3 อย่างคือ 1. ใบกวน 2. แกนของใบกวน 3. รูให้อากาศ ใบพัดจะสามารถตีฟองอากาศให้มีขนาดเล็กช่วยให้การถ่ายเทออกซิเจนระหว่างเซลล์กับอากาศเป็นไปได้ดีขึ้น ดังรูป 2.8



รูปที่ 2.7 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวน

2.8.5.2 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift (Air-lift Bioreactor)

ถังชนิดนี้จะใช้อากาศทำให้เกิดการหมุนวน (Circulation) ในระบบ โดยถังชนิดนี้จะไม่มีใบพัดจะเกิดการถ่ายเทมวลระหว่าง ของเหลว-ก๊าซ หรือ ของแข็ง-ของเหลว-ก๊าซ ที่เกิดจากการไหลวนของอากาศในระบบ ถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดนี้จะแตกต่างจากถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิด Bubble column ในด้านโครงสร้างโดยถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Bubble column นั้นจะมีจะเป็น vessel โดยอาหารจะถูกส่งไปยังท่อดังกล่าวทำให้เกิดการผสมของสารภายในระบบแต่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift นั้น การไหลเวียนของของไกลนั้นจะขึ้นกับลักษณะของถังปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งจะมีทางการเคลื่อนที่ของก๊าซ-ของเหลว-ของแข็ง ให้มีการเคลื่อนที่จากล่างขึ้นบนแล้วจากบนลงล่าง ทำให้เกิดการผสมของสารในระบบ ดังรูปที่ 2.8

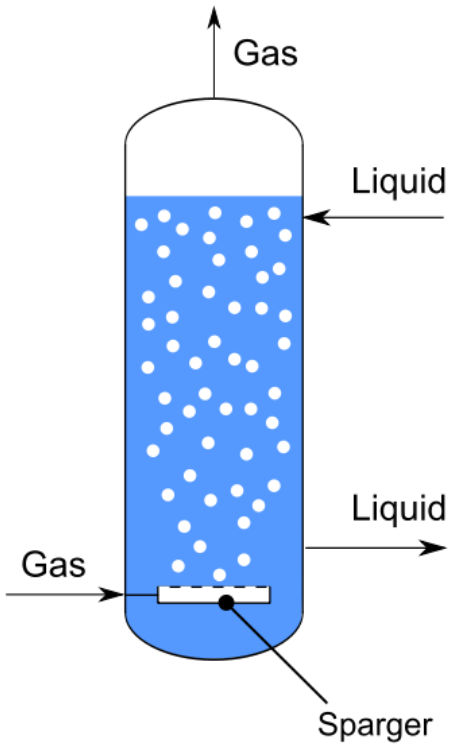


รูปที่ 2.8 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift

2.8.5.3 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Bubble column (Bubble column bioreactor)

ถังชนิดนี้จะคล้ายกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Air-lift มีลักษณะเป็นแก้วทรงกระบอก มีตัวจ่ายอากาศอยู่ทางด้านล่างของถังแต่จะไม่มีท่อบังคับอากาศ (Draft tube) ดังรูปที่ 2.9 ฟองอากาศที่ออกมานั้นจะเคลื่อนที่ไปในของเหลว หรือของเหลว-ของแข็ง ถังชนิดนี้มี

ประสิทธิภาพในการถ่ายเทความร้อนและมวลได้ดีเยี่ยม และใช้ค่าใช้จ่ายในการบำรุงรักษาที่ต่ำ (Kantarci และคณะ, 2005)



รูปที่ 2.9 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบ Bubble column

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัท	ประเทศ
กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)	Alphaphot-2 YS2-H	Nikon	ญี่ปุ่น
เครื่องชั่งแบบละเอียด (Electronic balance)	ML204/01	Metter Toledo AG	สวิตเซอร์แลนด์
ครื่องชั่งแบบหยาบ (Electronic balance)	ML3002E/01	Metter Toledo AG	สวิตเซอร์แลนด์
เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter)	AB15	Fisher Sciencetific, Ltd.	สิงค์โปร์
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบหมุน (Rotary incubator shaker)	G25	New Brunswick Scienctific Co., Inc.	สหรัฐอเมริกา
เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer)	K-550-GE	Scienctific Industries, Inc	สหรัฐอเมริกา
เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)	KT-40L	ALP Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
เครื่องไฮเปอร์ฟอร์มานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography)	Shimadzu LC-6A	Shimadzu Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar flow hood)	NK system Clean bench	International Sciencific Supply	ไทย
ตู้อบแห้ง (Oven)	UL-80	Memmert Co., Ltd.	เยอรมัน
เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)	MC-15A	Tomy Seiko Co., Ltd.	ญี่ปุ่น

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัท	ประเทศ
เครื่องกลั่นไนโตรเจน	K-350	Bushi, Ltd.	สวิตเซอร์แลนด์
ถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร		B.E. Marubishi, Ltd.	ไทย

3.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
Agar (วุ้นผงตราเงือก)	พัฒนสินเอ็นเตอร์ไพรส์	ไทย
Calcium carbonate ($CaCO_3$)	Sigma	เยอรมัน
Copper sulfate ($CuSO_4.5H_2O$)	Fluka	ฝรั่งเศส
Hydrochloric acid (HCl)	Merck	เยอรมัน
Magnesium sulfate ($MgSO_4.7H_2O$)	Merck	เยอรมัน
Sodium hydroxide (NaOH)	แกรนด์ เคมิคอล	ไทย
Sulfuric acid (H_2SO_4)	Merck	เยอรมัน
Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	สยามชัยเคมิคอล	ไทย
Iron sulfate heptahydrate ($FeSO_4.7H_2O$)	Merk	เยอรมัน
Magnesiumsulfate heptahydrate ($MgSO_4.7H_2O$)	Riedel-de Haen	เยอรมัน
Potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4)	Riedel-de Haen	เยอรมัน
Potassium phosphate dibasic (K_2HPO_4)	Riedel-de Haen	เยอรมัน
Ammonium choride (NH_4Cl)	Riedel-de Haen	เยอรมัน
Hydrogenperoxide (H_2O_2)	Merck	เยอรมัน
Sodium choride (NaCl)	Sigma	เยอรมัน
Ammonium hydroxide (NH4OH)	Merck	เยอรมัน
Calcium hydroxide (CaH2O2)	Fluka	ฝรั่งเศส
Yeast extract	Bio springer	ฝรั่งเศส
Peptone	Fluka	ฝรั่งเศส
Ethanol (C_2H_6O)	Merck	เยอรมัน
Boric acid (H_3BO_3)	Merk	เยอรมัน
Potassium nitrate (KNO_3)	Fluka	ฝรั่งเศส

3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

3.2.1.1 แบคทีเรียที่สามารถผลิตคะตะเลส (catalase) ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารวุ้นเอียง GYP ในภาวะที่มีอากาศ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียว เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นทำการย้ายเชื้อลงในอาหารเหลว GYP โดยการใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดอาหารเหลวมาส่วนหนึ่งจากนั้นทำการล้างเชื้อแบคทีเรียในอาหารวุ้นเอียงจนหมดจากนั้นดูดอาหารเหลวที่มีเชื้ออยู่ลงไปในขวดเขย่าที่มีอาหารเหลว GYP อยู่และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

3.2.1.2 แบคทีเรียที่ไม่สามารถผลิตคะตะเลส โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารวุ้นเอียง GYP ในภาวะที่ไม่มีอากาศโดยเลี้ยงในถุงซิปล้อคและมีถุง anaerobic gas pack เพื่อให้ในถุงบ่มนั้นเป็นสภาพไม่มีอากาศ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียว เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นทำการย้ายเชื้อลงในอาหารเหลว GYP ตามข้อ 3.2.1.1 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในภาวะไม่มีอากาศ เป็นเวลา 26 ชั่วโมงในถุงที่มี anaerobic gas pack

3.2.2 การเตรียมถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน ขนาด 5 ลิตร

3.2.2.1 แบคทีเรียที่สามารถผลิตคะตะเลส เตรียมถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวนพร้อมอุปกรณ์ต่างๆ ทำการเทียบวัด (calibrate) pH probe ก่อนที่จะต่อกับถังปฏิกรณ์ชีวภาพ บรรจุอาหารเพื่อการเจริญ (preculture) ปริมาตร 1.5 ลิตร จากนั้นทำการปิดช่องทางที่อากาศสามารถเข้าได้ เช่น ช่องเก็บตัวอย่าง ช่องให้อากาศ เป็นต้น เหลือไว้แต่ช่องที่ผ่าน condenser เพื่อให้อากาศออก ทำการหุ้มฟอยล์ในจุดต่างๆที่ไม่ควรให้ไอน้ำเข้าไป เช่น บริเวณที่ต่อสายไฟกับ probe ปลายสายของสายเก็บตัวอย่าง ปลายสายช่องให้อากาศ เป็นต้น จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 45 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อภายในถังเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง หากยังไม่ใช้ในทันทีให้ทำการปิดช่องจาก condenser เพื่อป้องกันการปนเปื้อนทำการต่อสายน้ำหล่อเย็นและสายไฟเข้า probe ให้ครบถ้วนรวมทั้งสายอากาศด้วย ที่ช่องอากาศออกจาก condenser ให้จุ่มลงในสารละลาย $CuSO_4$ จากนั้นเปิดเครื่องหล่อเย็นและ เริ่มควบคุมอุณหภูมิภายในถังที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วเทียบวัดหัววัดออกซิเจน (DO probe) โดยการฉีดแก๊สไนโตรเจนเข้าไปในถังประมาณ 15 นาทีหรือจนค่า pO_2 เป็น 0 และรออีก 10 นาที จากนั้นทำการปรับค่าและทำการฉีดอากาศเข้าไปในทั้งและรอให้ค่า pO_2 นิ่งแล้วค่อยปรับค่า เมื่อทำการตั้งค่าทุกอย่างเรียบร้อยแล้วเริ่มเติมหัวเชื้อลงไป 10% ของปริมาตรอาหารที่ใช้

3.2.2.2 แบคทีเรียที่ไม่สามารถผลิตคะตะเลส เตรียมถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวนพร้อมอุปกรณ์ต่างๆ ตามข้อ 3.2.2.1 บรรจุอาหารเพื่อผลิต (ferment) ปริมาตร 3 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 45 นาที เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อภายในถังเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง เริ่มควบคุมอุณหภูมิ

ภายในถังที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วเทียบวัดหัววัดออกซิเจน จากนั้นเริ่มเติมหัวเชื้อลงไป 10% ของปริมาตรอาหารที่ใช้ ตามข้อ 3.2.2.1

3.2.3 หาภาวะที่เหมาะสมของเวลาในการเลี้ยงของแบคทีเรียที่สามารถผลิตคะตะเลส

3.2.3.1 แปรเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้น ทำการเตรียมถังปฏิกรณ์ชีวภาพตามข้อ 3.2.2.1 จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อเริ่มต้นในข้อ 3.2.1.1 ที่เลี้ยงเป็นเวลา 6 หนึ่งการทดลองและ 12 ชั่วโมงอีกหนึ่งการทดลอง เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เป็นเวลา 5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา 5 ชั่วโมงแล้ว ทำการหยุดการกวนและปิดการให้อากาศ จากนั้นทำการเติมอาหารเพื่อการผลิต อีก 1.5 ลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ไม่ให้อากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.2.3.2 แปรปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ ทำการเตรียมถังปฏิกรณ์ชีวภาพตามข้อ 3.2.2.1 จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อเริ่มต้นในข้อ 3.2.1.1 โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อ 2 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ หนึ่งสภาวะต่อหนึ่งการทดลอง เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เป็นเวลา 5 ชั่วโมง ทำการหยุดการกวนและปิดการให้อากาศจากนั้นทำการเติมอาหารเพื่อการผลิต อีก 1.5 ลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ไม่ให้อากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.2.3.3 แปรเวลาในการเลี้ยงในช่วงการเจริญในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ทำการเตรียมถังปฏิกรณ์ชีวภาพตามข้อ 3.2.2.1 จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อเริ่มต้นในข้อ 3.2.1.1 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที แปรค่าเวลา 3 และ 6 ชั่วโมงหนึ่งสภาวะต่อหนึ่งการทดลอง ทำการหยุดการกวนและปิดการให้อากาศจากนั้นทำการเติมอาหารเพื่อการผลิต อีก 1.5 ลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ไม่ให้อากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.2.3.4 แปรค่าอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ ทำการเตรียมถังปฏิกรณ์ชีวภาพตามข้อ 3.2.2.1 จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อเริ่มต้นในข้อ 3.2.1.1 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แปรค่าอัตราการกวนโดยใช้ 150 300 และ 450 รอบต่อนาที แปรค่าอัตราการให้อากาศที่ 0.5 และ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ชั่วโมง ทำการหยุดการกวนและปิดการให้อากาศจากนั้นทำการเติมอาหารเพื่อการผลิต อีก 1.5 ลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ไม่ให้อากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.2.3.5 เปลี่ยนสารควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้ $Ca(OH)_2$ NaOH และ NH_4OH แทน $CaCO_3$ โดยที่ $Ca(OH)_2$ NaOH และ NH_4OH จะใช้การฟีดเข้าไปเพื่อควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างหนึ่งตัวคัวคุมต่อหนึ่งการทดลอง

3.2.3.6 เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมงเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส และกรดแล็กติก

3.2.4 หาภาวะที่เหมาะสมของเวลาในการเลี้ยงของแบคทีเรียที่ไม่สามารถผลิตคะตะเลส

3.2.4.1 แปรเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้น ทำการเตรียมถังปฏิกรณ์ชีวภาพตามข้อ 3.2.2.2 จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อเริ่มต้นในข้อ 3.2.1.2 ที่เลี้ยงเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงหนึ่งสภาวะต่อหนึ่งการทดลอง จากนั้นทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ไม่ให้อากาศ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.2.4.2 แปรปริมาณในการใช้หัวเชื้อเริ่มต้น ทำการเตรียมถังปฏิกรณ์ชีวภาพตามข้อ 3.2.2.2 จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อเริ่มต้นในข้อ 3.2.1.2 โดยใช้ปริมาณ 2 5 และ 10 เปอร์เซนต์หนึ่งสภาวะต่อหนึ่งการทดลอง ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ไม่ให้อากาศ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.2.4.3 เปลี่ยนสารควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้ $Ca(OH)_2$ NaOH และ NH_4OH แทน $CaCO_3$ โดยที่ $Ca(OH)_2$ NaOH และ NH_4OH จะใช้การฟีดเข้าไปเพื่อควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างหนึ่งตัวคัวคุมต่อหนึ่งการทดลอง

3.2.4.4 เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมงเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส และกรดแล็กติก

3.2.5 **ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดดี-แล็กติกจากแหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นและชนิดที่แตกต่างกัน**

เมื่อได้ภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงที่ให้ค่าการผลิตกรดแล็กติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงสูงในข้อ 3.2.3 และ 3.2.4 แล้ว นำภาวะที่ได้มาทำการหาแหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นและชนิดที่ต่างกัน

3.2.5.1 แบคทีเรียที่สามารถสร้างคะตะเลสได้ นำภาวะการเลี้ยงที่ได้จากการทำการทดลองข้อ 3.2.3 มาทำการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตกรดแล็กติกโดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ 7.5 กรัมต่อลิตรกับแอมโมเนียมคลอไรด์ 4 กรัมต่อลิตร และใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ 7.5 กรัมต่อลิตรกับแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร 1 ภาวะต่อหนึ่งการทดลอง

3.2.5.2 แบคทีเรียที่ไม่สามารถสร้างคะตะเลสได้ นำภาวะการเลี้ยงที่ได้จากการทำการทดลองข้อ 3.2.4 มาทำการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตกรดแล็กติก โดยเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนจากเปปโทน 10 กรัมต่อลิตร มาเป็นแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร

3.3 วิธีการวิเคราะห์สารตัวอย่าง

3.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแล็กติก อะซิติก เอทานอล และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในน้ำหมักด้วยเครื่อง HPLC

นำน้ำหมักที่ได้จากกระบวนการหมักระดับขวดเขย่ามาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์และแคลเซียมคาร์บอเนตออกไป และดูดสารละลายส่วนใสด้านบนมาเจือจาง 100 เท่า หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตท

คอลัมน์ (Column) Biorad Aminex HPX-87H ion exclusion organic acid column ขนาด 300 มิลลิเมตร × 7.8 มิลลิเมตร

สารละลายตัวพา (Mobile phase) 0.005 mM กรดซัลฟิวริก

อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

อัตราการไหล (Flow rate) 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที

เครื่องตรวจวัด (Detector) Refractive index detector ของ Shimadzu รุ่น RID-6A

เวลาที่วิเคราะห์ 25 นาที

ปริมาตรสารที่วิเคราะห์ 15 ไมโครลิตร

ความเข้มข้นสารมาตรฐาน 0.25 0.50 1.00 1.50 และ 2.00 กรัมต่อลิตร

ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	สารละลายเทียบมาตรฐาน (µl)	น้ำบริสุทธิ์ (µl)
0.25	125	875
0.5	250	750
1.0	500	500
1.5	750	250
2.0	1000	-

นำค่าที่วิเคราะห์ได้มาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแล็กติก กรดอะซิติก เอทานอล และปริมาณน้ำกลูโคสที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร

3.3.2 การวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของกรดแล็กติกในน้ำหมักด้วยเครื่อง HPLC

นำน้ำหมักที่ได้จากกระบวนการหมักระดับขวดเขย่ามาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และดูดส่วนใสมาเจือจาง 100 เท่า หลังจากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตท

คอลัมน์ (Column) Sumi Chiral OA-5000 ขนาด 150 มิลลิเมตร x 4.6 มิลลิเมตร

สารละลายตัวพา (Mobile phase) 1 mM คอปเปอร์ซัลเฟต

อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

อัตราการไหล (Flow rate) 1 มิลลิลิตรต่อนาที

เครื่องตรวจวัด (Detector) UV detector 254 nm

เวลาที่วิเคราะห์ 30 นาที

ปริมาตรสารที่วิเคราะห์ 15 ไมโครลิตร

ความเข้มข้นสารมาตรฐาน 0.25 0.50 1.00 1.50 และ 2.00 กรัมต่อลิตร

ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	สารละลายเทียบมาตรฐาน (µl)	น้ำบริสุทธิ์ (µl)
0.25	5	995
0.5	10	990
1.0	20	980
1.5	30	970
2.0	40	960

คำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดดี และแอล-แล็กติกโดยค่า Retention time ของกรดแอล-แล็กติก ประมาณ 18.9 นาที และค่า Retention time ของกรดดี-แล็กติกประมาณ 24.1 นาที

3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแล็กติกและน้ำตาลกลูโคสโดยเครื่อง Biochemistry analyzer (YSI)

นำน้ำหมักที่ได้จากกระบวนการหมักระดับขวดเขย่ามาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และดูดส่วนใสมาเจือจาง 100 เท่า

3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนของน้ำหมักโดยวิธีเจลดาห์ล (Kjeldahl protein)

ดูดน้ำหมักปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ในขวดกลั่นและเติมโปรแตสเซียมซัลเฟตและคอปเปอร์ซัลเฟตที่มีอัตราส่วน 95:5 ลงไป 7 กรัม จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริก 15 มิลลิลิตร และนำไปย่อยบนเตาหลุมเป็นเวลา 45 นาที สารที่ได้จะมีลักษณะใสสีเขียว รออุณหภูมิลงประมาณ 15 นาที และนำมาเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร พร้อมกับนำสารละลาย 4 %กรดบอริกปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่หยดอินดิเคเตอร์ 3 หยด มาประกอบเข้ากับเครื่องกลั่นไนโตรเจน หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จะเกิดเป็นสารละลายสีดำ และนำสารละลายที่ได้หลังจากเข้าเครื่องกลั่นมาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก 0.097 โมลาร์ร์ และบันทึกปริมาตรกรดที่ใช้เพื่อคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ เป็นการพัฒนาเทคนิคการหมักเพื่อผลิตกรดดี-แล็กติกในถังปฏิกรณ์ชีวภาพชนิดถังกวน ขนาด 5 ลิตร โดยใช้แบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *Sporolactobacillus laevolacticus* (SK5-2) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตคะตะเลส และ *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *nakayamae* (CU72-1) ซึ่งไม่สามารถผลิตคะตะเลส โดยหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดดี-แล็กติกจากการแปรค่าปัจจัยควบคุมการผลิต ได้แก่ เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ ปริมาณของหัวเชื้อที่ใช้ เวลาในการเลี้ยงในช่วงการเจริญในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ อัตราการกวน อัตราการให้อากาศ และชนิดของด่างที่ใช้ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง

4.1 หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดดี-แล็กติกโดย *S. laevolacticus* (SK5-2)

แบคทีเรียที่สามารถผลิตคะตะเลสได้ที่นำมาใช้ในการผลิตกรดดี-แล็กติกคือ *Sporolactobacillus laevolacticus* (SK5-2) ซึ่งได้มาจากการแยกเชื้อจากนางสาวบุษบาทิพย์ ประเสริฐศักดิ์(2011)

4.1.1 แปรเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้น

จุดประสงค์ของการศึกษาปัจจัยนี้ คือต้องการเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในระยะ log phase โดยเมื่อนำหัวเชื้อดังกล่าวถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ จะส่งผลให้ระยะ lag phase สั้นลง เนื่องจาก เซลล์มีแอคติวิตีสูงในช่วง log phase ได้ผลการทดลองแสดงในตาราง 4.1

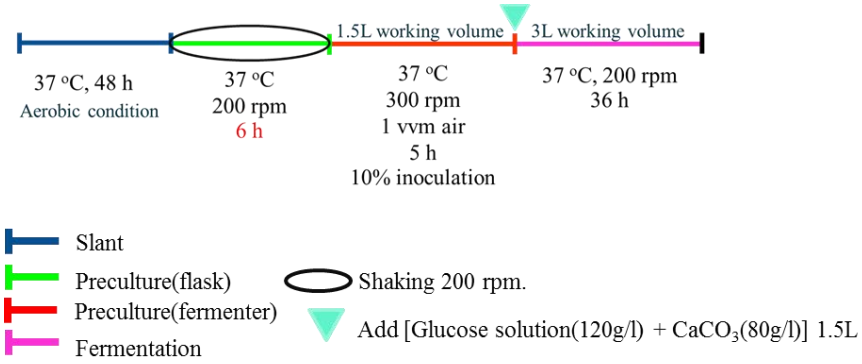
ตารางที่ 4.1 ผลจากการแปรเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้นในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

Inoculum age (h)	Initial glucose (g/l)	Lactic acid (g/l)	Yield (g/g glucose)	Productivity (g/l.h)	Optical purity (%)
6	124.70	114.00	0.91	3.80	89.01
12	122.00	109.00	0.89	3.00	100.00

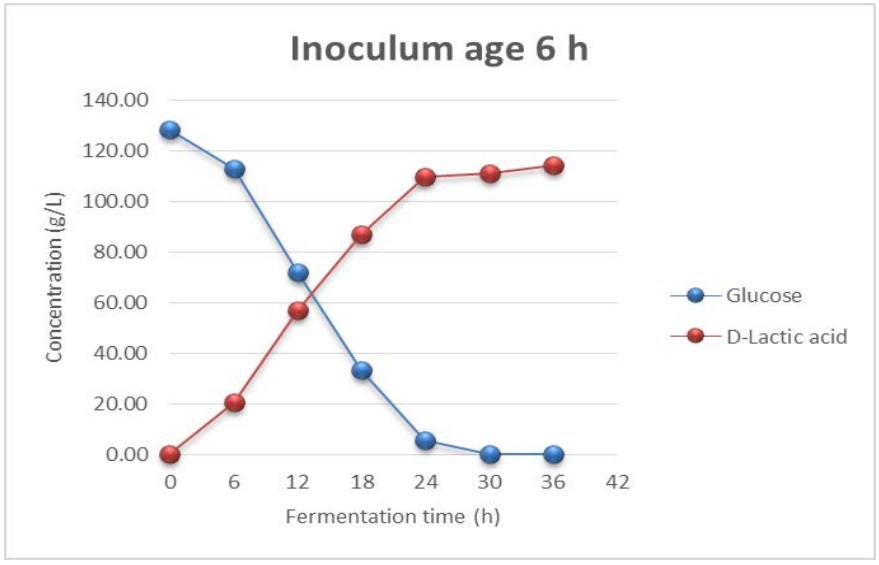
จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าค่า yield และ productivity ที่ได้ของเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อที่ 6 และ 12 ชั่วโมงมีค่าต่างกันไม่มาก แต่เมื่อดูจากกราฟรูปที่ 4.2 แล้วในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของช่วงการผลิตแบคทีเรียจะมีอัตราการใช้กลูโคสที่ช้าและจะเพิ่มขึ้นหลังจาก 6 ชั่วโมงไปถึง24ชั่วโมงจนกลูโคสหมดและการผลิตกรดแล็กติกก็เพิ่มขึ้นในอัตราเดียวกัน

ในขณะที่การเลี้ยงที่ 12 ชั่วโมง แบคทีเรียมีการใช้กลูโคสที่เร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 เมื่อเทียบกับที่การเลี้ยงที่ 6 ชั่วโมงแล้ว การเลี้ยงหัวเชื้อที่ 12 ชั่วโมงนั้นแบคทีเรียอาจจะเข้าสู่ช่วงกลางหรือปลายของ log phase

แล้วหรืออาจจะผลิตกรดมาตั้งแต่หัวเชื้อแล้วซึ่งเราไม่ต้องการให้เป็นแบบนั้นอีกทั้งในช่วงการผลิตกรดนั้นที่ชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 12 นั้นมีการชะลอการผลิต แบคทีเรียอาจจะใช้กลูโคสไปในการซ่อมแซมเซลล์หรือสร้างเซลล์ได้ จึงทำการเลือกเวลาในการเลี้ยงที่ 6 ชั่วโมงเป็นเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อดังรูปที่ 4.1 ระยะเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อที่สั้นจะทำให้นำไปใช้ได้เร็วและลดเวลาในการใช้ในกระบวนการผลิตได้

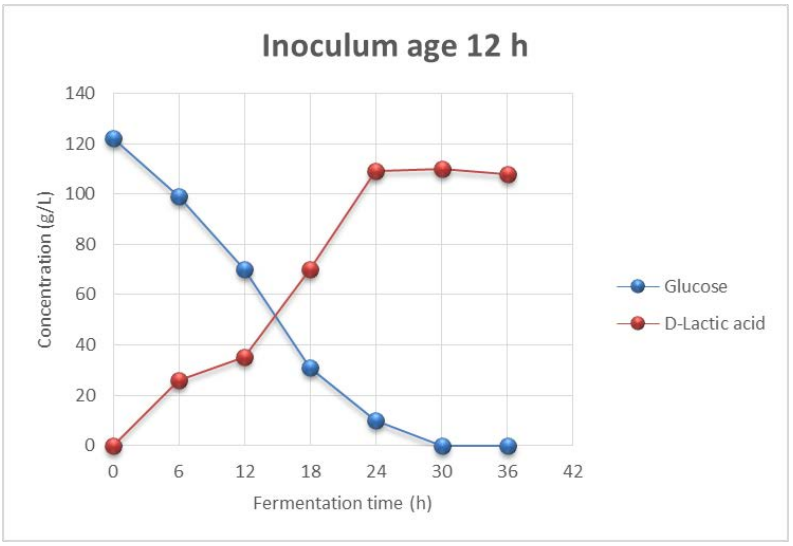


รูปที่ 4.1 สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเพื่อหาเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้น



รูปที่ 4.2 การหมักกรดแล็กติกโดยใช้เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้น 6 ชั่วโมง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ทั้งนี้ แบคทีเรียที่จะนำไปเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นจะต้องมีสภาพแข็งแรง และสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะที่เลี้ยงและอาหารได้แล้วพร้อมต่อการแบ่งตัวหรืออยู่ในช่วง log phase แล้ว (Neves et al., 2000; Hamdy et al., 2011)



รูปที่ 4.3 การหมักกรดแล็กติกโดยใช้เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้น 12 ชั่วโมง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4.1.2 แปรปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

เช่นเดียวกับการเตรียมหัวเชื้อในระดับขวดเขย่า การผลิตหัวเชื้อในช่วงนี้ต้องการเพิ่มจำนวนหัวเชื้อในระยะ log phase ให้มากขึ้นสำหรับนำไปใช้ในการผลิตกรดดี – แล็กติก ในช่วงการเจริญนี้เราต้องการให้แบคทีเรียใช้กลูโคสไปในการสร้างเซลล์อย่างเดียวไม่ต้องการให้ผลิตกรดออกมาในกระบวนการ จึงต้องหาเวลาในการเลี้ยงที่เหมาะสมเช่นเดียวกับการเลี้ยงหัวเชื้อในระดับขวดเขย่า จากการอ้างอิงจากงานวิจัยในระดับขวดเขย่า(ประเสริฐศักดิ์ 2011)แล้วเราจะใช้เวลาในการเลี้ยงที่ 3 ชั่วโมงและ 6 ชั่วโมง เนื่องจากในการทดลองการหาเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ เวลาที่ 12 ชั่วโมงอาจจะนานเกินไปจะทำให้แบคทีเรียเข้าสู่ช่วง stationary และ dead phase

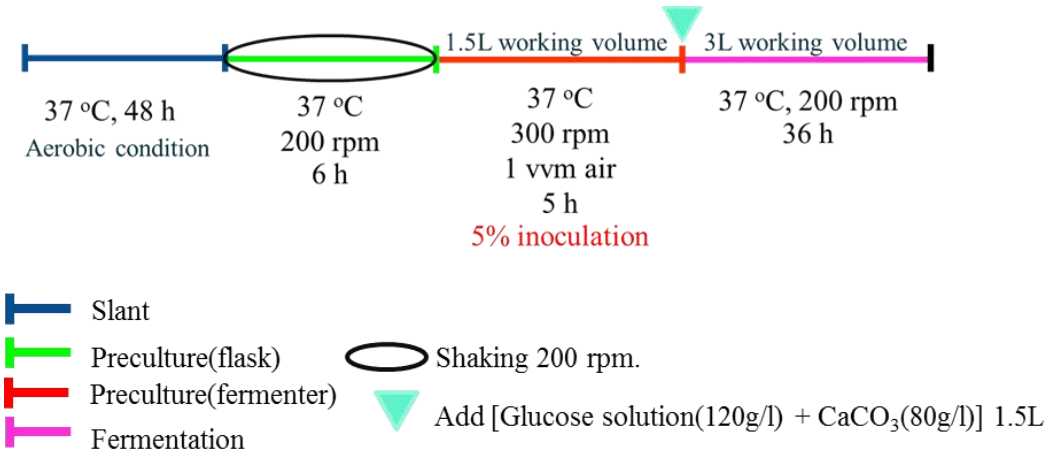
ในการผลิตกรดดี-แล็กติกโดยใช้เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 6 ชั่วโมง ในเครื่องเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการแปรปริมาณหัวเชื้อที่ใช้เป็น 2 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเพื่อการเจริญ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีเป็นเวลา 6 ชั่วโมงจากนั้นทำการเติมอาหารเพื่อการผลิตลงไปและเลี้ยงต่ออีก 48 ชั่วโมง โดยลดอัตราการกวนเหลือ 200 รอบต่อนาทีและไม่ให้อากาศ ความเป็นกรด-ด่าง 6.8 สารที่ใช้ควบคุมความเป็นกรด-ด่างที่ใช้คือ $CaCO_3$ 80 กรัมต่อลิตร โดยใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่ 120 กรัมต่อลิตร ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลจากการแปรปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

Inoculum size (%)	Initial glucose (g/l)	Lactic acid (g/l)	Yield (g/g glucose)	Productivity (g/l.h)	Optical purity (%)
2	127.00	107.00	0.84	4.45	100.00
5	120.40	107.90	0.90	3.59	99.67
10	124.70	114.00	0.91	3.80	89.01

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อลดปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้มาเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ ค่า yield ที่ได้ไม่แตกต่างกับการใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 10 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อลดมาถึง 2 เปอร์เซ็นต์พบว่าค่า yield ที่ได้ลดลงมาถึง 0.84 จาก 0.90 และ 0.91 ที่ 5 เปอร์เซ็นต์และ 10 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งที่ 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นอาจจะน้อยเกินไปทำให้แบคทีเรียนำกลูโคสไปใช้ในการสร้างเซลล์ส่วนหนึ่ง ในการทดลองนี้ปริมาณหัวเชื้อที่ใช้ให้แบคทีเรียเจริญเติบโตและผลิตกรดดี-แล็กติก ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ ก็เพียงพอเพราะที่10 เปอร์เซ็นต์ ได้ให้ผลผลิตที่ใกล้เคียงกัน

ปริมาณหัวเชื้อที่ใช้มากน้อยก็มีผลต่อกระบวนการผลิตและค่าใช้จ่าย ควรเลือกปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตเพื่อให้การเจริญที่เร็วและไม่ทำให้แบคทีเรียใช้กลูโคสไปใช้อย่างอื่นในช่วงการผลิตและยังช่วยลดต้นทุนได้ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 5 เปอร์เซ็นต์ รูปที่ 4.4 ซึ่งให้ค่า yield ที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับปริมาณหัวเชื้อที่ใช้



รูปที่ 4.4 สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเพื่อหาปริมาณการใช้หัวเชื้อเริ่มต้น

ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ดีจะใช้ในช่วง 3 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณอาหารที่ใช้ (Neves et al., 2000; Hamdy et al., 2011) การที่ใช้ปริมาณหัวเชื้อน้อยเกินไปจะทำให้แบคทีเรียใช้เวลานานในการเจริญเติบโต ทำให้มีช่วง log phase ที่ยาว แต่ถ้าใช้ปริมาณมากเกินไปจะทำให้แบคทีเรียเจริญเร็วเกินไปและ

อาจนำกลูโคสที่ใช้ไปสร้างกรดได้ซึ่งเราไม่อยากให้แบคทีเรียที่ใช้เป็นหัวเชื้อนำกลูโคสไปในสร้างกรด ควรให้อยู่ในช่วงกำลังแบ่งตัว ไม่ว่าจะเป็นอายุของหัวเชื้อเริ่มต้นหรือความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้นจะส่งผลโดยตรงต่อค่า yield ดังนั้นเราจึงให้ความสำคัญกับค่า yield เป็นอันดับแรก

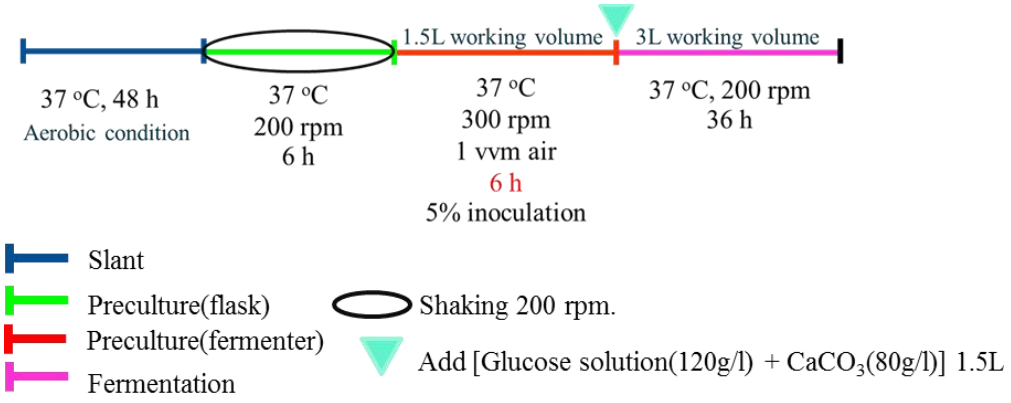
4.1.3 แปรเวลาในการเลี้ยงในช่วงการเจริญ (preculture) ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

หลังจากได้ปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมแล้ว ทำการแปรเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อในช่วงการเจริญในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยในการผลิตกรดดี-แล็กติกโดยใช้เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้น 6 ชั่วโมง ในเครื่องเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเพื่อการเจริญ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ในช่วงการเจริญนี้จะทำการเลี้ยงที่ 3 และ 6 ชั่วโมงจากนั้นทำการเติมอาหารเพื่อการผลิตลงไปและเลี้ยงต่ออีก 48 ชั่วโมง โดยลดอัตราการกวนเหลือ 200 รอบต่อนาทีและไม่ให้อากาศ ความเป็นกรด-ด่าง 6.8 สารที่ใช้ควบคุมความเป็นกรด-ด่างที่ใช้คือ $CaCO_3$ 80 กรัมต่อลิตร โดยใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่ 120 กรัมต่อลิตร ได้ผลการทดลองแสดงในตาราง 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลจากการแปรเวลาในการเลี้ยงในช่วงการเจริญ(preculture)ที่ใช้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

Preculture time (h)	Initial glucose (g/l)	Lactic acid (g/l)	Yield (g/g glucose)	Productivity (g/l.h)	Optical purity (%)
3	123.58	112.34	0.91	3.74	100.00
6	125.08	114.93	0.92	3.83	100.00

จากการแปรค่าเวลาในการเลี้ยงในช่วงการเจริญพบว่าเมื่อใช้เวลาในการเลี้ยงที่ 3 และ 6 ชั่วโมง yield ที่ได้มีค่าไม่แตกต่างกันมากนักคือ 0.91 และ 0.92 ตามลำดับ แต่เวลาที่ใช้ในช่วงการผลิตนั้นจะต่างกันอาจเนื่องมาจากที่ 3 ชั่วโมงนั้นเป็นเวลาที่ค่อนข้างน้อยไปในการเลี้ยงในขั้นการเจริญแบคทีเรียอาจจะอยู่ในช่วง lag phase และการได้ค่า productivity ที่น้อยกว่านั้นแสดงให้เห็นว่าเวลาในการผลิตกรดที่ 3 ชั่วโมงจะใช้เวลามากกว่าที่ 6 ชั่วโมงดังนั้นเราจึงใช้เวลาในการเลี้ยงในช่วงนี้ ที่ 6 ชั่วโมง รูปที่ 4.5 และกราฟแสดงการหมัก



รูปที่ 4.5 สภาวะที่เลี้ยงเพื่อหาระยะเวลาในการเลี้ยงในช่วงการเจริญ

การเลี้ยงในช่วงนี้ต้องการให้แบคทีเรียอยู่ในช่วงที่พร้อมจะผลิตกรดเมื่อสิ้นสุดกระบวนการนี้เพื่อที่เมื่อเติมอาหารสำหรับผลิตกรดแล้วแบคทีเรียจะไม่มีการเจริญเติบโตและไม่ใช้กลูโคสไปทำอย่างอื่นนอกจากการผลิตกรดอย่างเดียวเราจึงใช้เวลาในการเลี้ยง 6 ชั่วโมง

4.1.4 แปรค่าอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ

อัตราการกวนมีผลต่อการเจริญเติบโตอย่างมากเพราะช่วยให้การถ่ายเทมวลและความร้อน ได้ดี แต่การกวนที่แรงและเร็วเกินไปนั้นจะส่งผลต่อเซลล์เพราะการกวนจะทำให้เกิดแรงเฉือนซึ่งจะเป็นอันตรายต่อเซลล์ได้ เราจึงต้องศึกษาอัตราการกวนให้เหมาะสม และอัตราการให้อากาศก็มีผลต่อการเจริญเช่นกันเราต้องให้อากาศในอัตราที่เหมาะสมไม่มากหรือน้อยเกินไป

ในการผลิตกรดดี-แล็กติกโดยใช้เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้น 6 ชั่วโมง ในเครื่องเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเพื่อการเจริญ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แปรค่าอัตราการกวนที่ 150 300 และ 450 รอบต่อนาที แปรค่าอัตราการให้อากาศที่ 0.5 และ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมงจากนั้นทำการเติมอาหารเพื่อการผลิตลงไปและเลี้ยงต่ออีก 48 ชั่วโมง โดยลดอัตราการกวนเหลือ 200 รอบต่อนาทีและไม่ให้อากาศ ความเป็นกรด-ด่าง 6.8 สารที่ใช้ควบคุมความเป็นกรด-ด่างที่ใช้คือ $CaCO_3$ 80 กรัมต่อลิตร โดยใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่ 120 กรัมต่อลิตร ได้ผลการทดลองแสดงในตาราง 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลจากการแปรค่าอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

Agitation speed (rpm)	Aeration rate (vvm)	Initial glucose (g/l)	Lactic acid (g/l)	Yield (g/g glucose)	Productivity (g/l.h)	Optical purity (%)
150	0.5	122.46	105.75	0.86	3.53	100.00
300		125.20	102.22	0.82	4.25	100.00
450		117.89	108.50	0.92	3.52	100.00
150	1	128.33	105.34	0.82	3.00	100.00
300		125.08	114.93	0.92	3.83	100.00
450		120.58	103.51	0.86	4.31	100.00

จากการทำการทดลองแปรค่าอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศพบว่าที่อัตราการกวน 450 รอบต่อนาทีอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีและที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาทีอัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ได้ yield ที่ดีที่สุดที่ 0.92 จากการทดลองจะเห็นว่าอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศจะมีความสัมพันธ์กัน การใช้อัตราที่เหมาะสมจะทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตดี ที่อัตราการกวน 300 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีจะได้ yield ที่ค่อนข้างต่ำ อาจจะมาจากการให้อากาศที่ต่ำเกินไปเพราะว่าแบคทีเรียต้องการอากาศที่เพียงพอในการเจริญเติบโตด้วย แต่เมื่อทำการเพิ่มความเร็วรอบการกวนเป็น 450 รอบต่อนาที พบว่าให้ผลที่ดีขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างอัตราการกวนที่ 150 และ 300 รอบต่อนาทีโดยให้อากาศที่ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที พบว่าอัตราการกวนที่ 150 รอบต่อนาทีอาจจะต่ำเกินไปทำให้แบคทีเรียเจริญค่อนข้างช้า เมื่อเพิ่มอัตราการกวนเป็น 300 รอบต่อนาทีพบว่าค่า yield ที่ได้สูงขึ้นแต่เมื่อทำการเพิ่มอัตราการกวนเป็น 450 รอบต่อนาทีพบว่า yield มีค่าลดลง อาจเนื่องมาจากสภาวะนี้เป็นสภาวะที่ให้อากาศและอัตราการกวนเยอะที่สุดแบคทีเรียในสภาวะนี้เจริญเติบโตได้ดีแต่เมื่อทำการเติมอาหารเพื่อการผลิตลงไปทำให้แบคทีเรียมีการปรับตัวโดยในช่วงแรกแบคทีเรียจะยังคงใช้น้ำตาลกลูโคสไปในการสร้างเซลล์อยู่จึงทำให้ค่า yield ลดต่ำลงเมื่อเทียบกับสภาวะที่ใช้อัตราการกวน 300 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศที่ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที การที่จะเลือกใช้อัตราการกวนและอัตราการให้อากาศนั้นต้องเลือกให้มีความเหมาะสมกันเพื่อที่จะได้ผลผลิตที่มากที่สุดในเวลาที่น้อยที่สุด

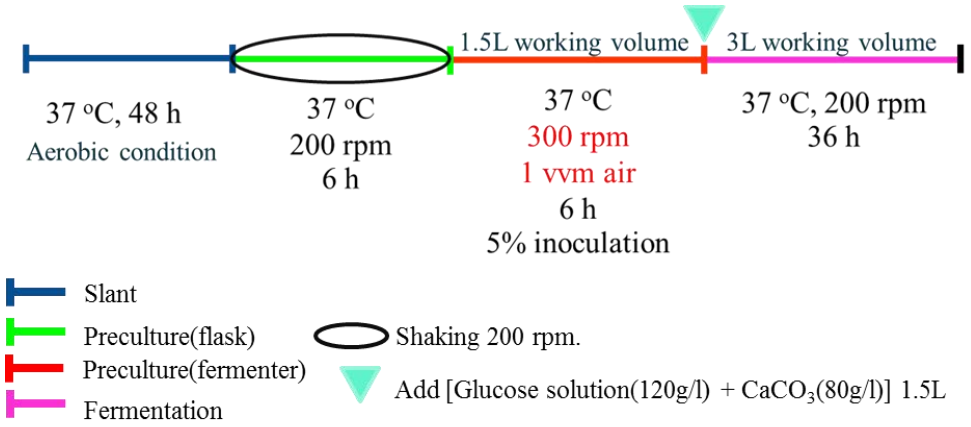
ส่วนที่อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที และให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ผลของ yield ได้ค่อนข้างน้อยเนื่องจากการกวนที่ช้าเกินไปจะทำให้การถ่ายเทมวลและความร้อนได้ไม่ดีเท่าที่ควร และเนื่องจากด่างที่ใช้ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างคือ $CaCO_3$ ซึ่งไม่ละลายน้ำ การที่กวนช้าเกินไปจะทำให้ $CaCO_3$ นอนก้นถังได้และไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ที่อัตราการกวนที่ 450 รอบต่อนาที และให้อากาศที่ 1 ปริมาตรน้ำหมักต่อปริมาตรอากาศต่อนาทีนั้น การกวนที่แรงเกินไปทำให้เกิดแรงเฉือนขึ้นทำให้เป็น

อันตรายต่อเซลล์แบคทีเรียได้แบคทีเรียจะนำกลูโคสไปใช้ในการซ่อมแซมเซลล์ส่วนหนึ่งจึงทำให้ค่า yield ที่ได้ลดลง

ในงานวิจัยของ Qin และคณะ, 2002 นั้นได้ทำการศึกษาผลของอัตราการให้อากาศของการหมักกรดแล็กติกจาก *Bacillus* sp. Na-2 โดยใช้อัตราการกวนที่ 200 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศที่ 0, 0.5 และ 1.25 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการให้อากาศจะทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตและผลิตกรดแล็กติกได้มากขึ้น แต่ที่การให้อากาศที่ 0.5 และ 1.25 นั้นได้ผลผลิต yield ที่ 0.92 และ 0.90 แสดงให้เห็นว่าการให้อากาศมากเกินไปไม่ได้ช่วยให้การผลิตกรดแล็กติกได้มากขึ้นเราจึงต้องทำการหาอัตราการให้อากาศที่เหมาะสมเพื่อให้แบคทีเรียผลิตกรดแล็กติก ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในงานวิจัยของ Boontawan และคณะ, 2001 ได้มีการแปรค่าอัตราการกวนโดยใช้อัตราการกวนที่ 100, 200 และ 300 รอบต่อนาที พบว่าที่อัตราการกวน 100 รอบต่อนาทีนั้นให้ผลผลิต yield ที่ต่ำกว่าอัตราการกวนที่ 200 และ 300 รอบต่อนาทีซึ่งให้ค่าใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าอัตราการกวนที่ต่ำจะส่งผลต่อการเจริญและการผลิตกรดแล็กติกด้วยเนื่องจากอัตราการกวนส่งผลต่อค่าการถ่ายเทมวล การถ่ายเทความร้อนและการละลายของออกซิเจนซึ่งแต่ละปัจจัยล้วนมีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกกรดของแบคทีเรียทั้งสิ้น

อัตราการกวนและอัตราการให้อากาศที่ 300 รอบต่อนาทีและ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาทีจะให้ yield เท่ากันกับที่ 450 รอบต่อนาทีและ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที แต่ให้ค่า productivity ที่สูงกว่าจึงได้นำค่านี้ไปทำการทดลองในขั้นต่อไปรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 สภาวะที่ใช้เลี้ยงเพื่อหาอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศ

4.1.5 เปลี่ยนสารควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้ $Ca(OH)_2$ NaOH และ NH_4OH แทน $CaCO_3$

จากการวิจัยในระดับขวดเขย่า (ประเสริฐศักดิ์ 2011) ได้ใช้ $CaCO_3$ เป็นตัวควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง เนื่องจาก $CaCO_3$ เป็นควบคุมที่ดีและสะดวกในการนำไปใช้ อีกทั้งยังสามารถแยกออกจากน้ำหมักได้

ง่าย แต่ในระดับอุตสาหกรรมการนำ $CaCO_3$ มาใช้อาจจะมีขั้นตอนที่ยากเนื่องจากปริมาณที่ใช้มีจำนวนมาก ดังนั้นขั้นตอนการเตรียม การฆ่าเชื้อและการนำไปใช้จนถึงการแยกออกจากน้ำหมักอาจมีขั้นตอนที่ซับซ้อนและทำได้ยาก จึงต้องสารควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่สามารถเติมเข้าไปในระบบได้และควบคุมความเป็นกรด-ด่างได้ดี คือ $Ca(OH)_2$ NH_4Cl และ NaOH ซึ่งทั้ง 3 ตัวนี้มีการใช้เป็นตัวควบคุมความเป็นกรด-ด่างในการผลิตกรดแล็กติกในงานวิจัยหลายๆงาน

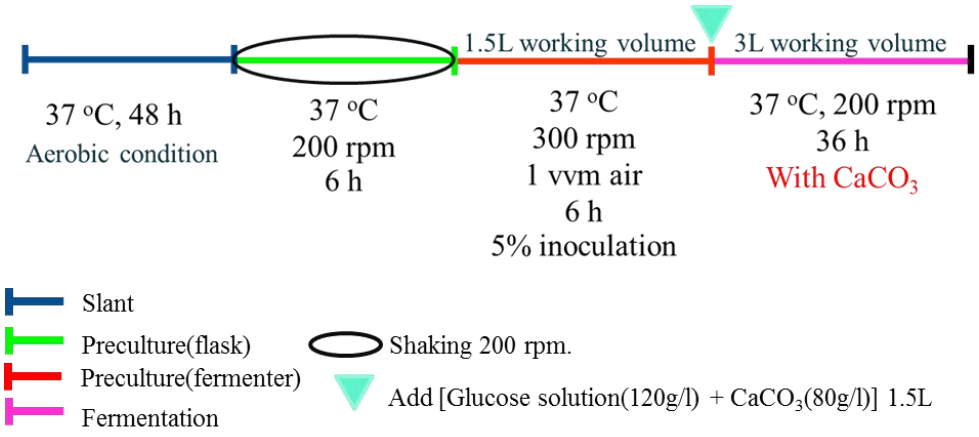
ในการผลิตกรดดี-แล็กติกโดยใช้เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้น 6 ชั่วโมง ในเครื่องเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเพื่อการเจริญภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมงจากนั้นทำการเติมอาหารเพื่อการผลิตลงไปและเลี้ยงต่ออีก 48 ชั่วโมง โดยลดอัตราการกวนเหลือ 200 รอบต่อนาทีและไม่ให้อากาศ ความเป็นกรด-ด่าง 6.8 ในการทดลองนี้จะใช้ $Ca(OH)_2$ NaOH และ NH_4OH เป็นสารในการควบคุมความเป็นกรด-ด่างแทน $CaCO_3$ สารทั้ง 3 ตัวจะค่อยๆเติมเข้าไปเพื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เหมาะสมโดยใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่ 120 กรัมต่อลิตร ได้ผลการทดลองแสดงในตาราง 4.5

ตารางที่ 4.5 ผลจากการเปลี่ยนสารควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้ $Ca(OH)_2$ NaOH และ NH_4OH แทน $CaCO_3$

Neutralizer	Initial glucose (g/l)	Lactic acid (g/l)	Yield (g/g glucose)	Productivity (g/l.h)	Optical purity (%)
5M $Ca(OH)_2$	122.68	94.3	0.77	3.92	100.00
7M NH_4OH	123.17	61	0.50	1.69	100.00
10M NaOH	137.16	91.44	0.67	2.54	100.00
$CaCO_3$(add)	125.08	114.93	0.92	3.83	100.00

จากผลการทดลองเมื่อเปลี่ยนสารควบคุมความเป็นกรด-ด่างจากแคลเซียมคาร์บอเนตมาเป็น 5 โมลาร์ร์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ 7 โมลาร์แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ และ 10 โมลาร์โซเดียมไฮดรอกไซด์พบว่าค่า yield ที่ได้คือ 0.77 0.50 และ 0.67 กรัมกรดแล็กติกต่อกรัมกลูโคสซึ่งน้อยกว่าเมื่อเทียบกับแคลเซียมคาร์บอเนต 0.92 กรัมกรดแล็กติกต่อกรัมกลูโคส เมื่อใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงหลังจากเติมอาหารเพื่อการผลิต (ferment) ไปแล้วพบว่าแบคทีเรียหยุดการใช้กลูโคสลงและไม่ทำการใช้กลูโคสอีก อาจจะมาจากสาเหตุ คือ แบคทีเรียไม่สามารถทนความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ในปริมาณมากได้เพราะเมื่อแบคทีเรียผลิตกรดออกมาค่าความเป็นกรด-ด่างในถังจะลดลงระบบก็จะเติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เข้าไปเมื่อเติมเข้าไปมากขึ้นแบคทีเรียอาจทนไม่ได้และตาย นอกจากนี้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ยังเป็นสารที่มีกลิ่นฉุนเมื่อสูดดมไปมากๆอาจเป็น

อัตราต่อระบบหายใจได้ ส่วนโซเดียมไฮดรอกไซด์และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ แบคทีเรียสามารถใช้กลูโคสได้จนหมดและผลิตกรดดี-แล็กติกได้ 91.44 และ 94.30 ตามลำดับ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นด่างแก่ที่ความเข้มข้นสูงเมื่อเติมเข้าไปในถึงหมักในช่วงแรกที่เติมลงไปอาจจะไปทำให้แบคทีเรียตายได้ แคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำเมื่อผสมน้ำแล้วถ้าตั้งทิ้งไว้จะตกตะกอนต้องมีการกวนตลอดและเวลาเติมผ่านสายยางจะทำได้ลำบากเนื่องจากอาจจะเกิดการอุดตันได้ทำให้ประสิทธิภาพในการควบคุมความเป็นกรด-ด่างได้ไม่ดีเท่าที่ควร ในการทดลองนี้แคลเซียมคาร์บอเนตก็ยังเป็นสารควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่ดี รูปที่ 4.7 การทดลองของ Nakano และคณะ ทำการทดลองใช้สารควบคุมความเป็นกรด-ด่างคือแคลเซียมไฮดรอกไซด์ แคลเซียมคาร์บอเนต และโซเดียมไฮดรอกไซด์ในการผลิตกรดดี-แล็กติกโดยใช้สารตั้งต้นคือข้าวหักและใช้แบคทีเรีย *Lactobacillus delbrueckii* ในการผลิตกรดดี-แล็กติก พบว่าสารที่ดีที่สุดในการทดลองนี้ที่ทำให้แบคทีเรียเจริญได้ดีและใช้กลูโคสจากข้าวหักได้มากคือแคลเซียมไฮดรอกไซด์ซึ่งโดยได้อัตราในการผลิตกรดดี-แล็กติกของ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์และโซเดียวไฮดรอกไซด์คือ 3.59, 1.51 และ 1.40 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงตามลำดับ และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ยังใช้ความเข้มข้นที่น้อยกว่าแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์และโซเดียมไฮดรอกไซด์ถึงครึ่งหนึ่งอีกด้วย



รูปที่ 4.7 สภาวะที่ใช้เลี้ยงเพื่อหาสารควบคุมความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม

ค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ค่าความเป็นกรด-ด่างที่สูงหรือต่ำเกินไปจะทำให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้ไม่ดีหรือใช้เวลาในการเจริญเติบโตนานขึ้น ในสภาวะที่เป็นกรดจะมีปริมาณไฮโดรเจนไอออนสูงจะส่งผลต่อตัวเซลล์แบคทีเรียด้วย ค่าความเป็นกรด-ด่างจะส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์และการขนส่งสารอาหารภายในเซลล์ด้วย และที่ความเป็นกรด-ด่างไม่เหมาะสมอาจทำให้ช่วง lag phase ของแบคทีเรียนานขึ้น (Panesar et al., 2010)

4.2 หาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดดี-แล็กติกโดย *S. nakayamae* subsp. *nakayamae* (CU72-1)

แบคทีเรียที่ไม่สามารถผลิตคะตะเลสได้ที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ในการผลิตกรดดี-แล็กติกคือ *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *nakayamae* (CU72-1) ซึ่งได้มาจากการแยกเชื้อจากนางสาวบุษบา ทิพย์ ประเสริฐศักดิ์

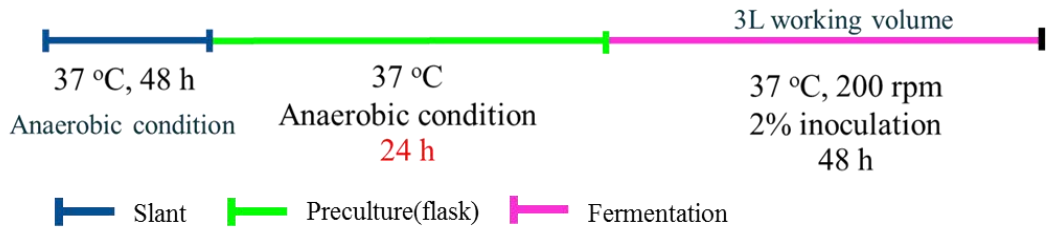
4.2.1 แปรเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้น

ในการผลิตกรดดี-แล็กติกโดยแปรเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะที่เลี้ยงแบบไม่ให้อากาศในถุง anaerobic โดยมี anaerobic gas pack ใส่ไปเพื่อให้อยู่ในสภาวะ anaerobic จากนั้นทำการใส่หัวเชื้อเริ่มต้นในปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเพื่อการผลิตภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาทีและไม่มีการให้อากาศ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 สารที่ใช้ควบคุมความเป็นกรด-ด่างที่ใช้คือ $CaCO_3$ 80 กรัมต่อลิตร โดยใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่ 120 กรัมต่อลิตร ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ผลจากการแปรเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้นในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

Inoculum age (h)	Initial glucose (g/l)	Lactic acid (g/l)	Yield (g/g glucose)	Productivity (g/l.h)	Optical purity (%)
24	129.01	114.2	0.89	2.89	100.00
48	126.45	107.07	0.85	2.54	100.00

จากการแปรค่าเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักแล้วการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้นที่เวลา 24 ชั่วโมงจะให้ผลที่ดีกว่าการเลี้ยงที่ 48 ชั่วโมง โดย yield ที่ได้คือ 0.89 และ 0.85 ตามลำดับ การใช้เวลาบ่มที่นานแบคทีเรียอาจจะผ่านช่วงการเจริญและเข้าสู่การผลิตกรดแล็กติกแล้วซึ่งเราไม่ต้องการให้เป็นสำหรับหัวเชื้อเริ่มต้นควรจะอยู่ในช่วงการเจริญเพื่อที่เวลานำไปเติมลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแล้วแบคทีเรียสามารถเจริญต่อได้เลยลดเวลาการปรับตัวของแบคทีเรีย การใช้เวลาเลี้ยงมากเกินไปแบคทีเรียอาจเข้าสู่ช่วง stationary phase และ dead phase ได้ เมื่อแบคทีเรียตายจึงนำกลูโคสซึ่งควรจะนำมาผลิตกรดแล็กติกไปสร้างเซลล์แทนจึงทำให้ผลผลิตกรดที่ได้ออกมาต่ำลง ดังนั้นจึงใช้เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 24 ชั่วโมงไปใช้ในการทดลองต่อไป รูปที่ 4.8



รูปที่ 4.8 สภาวะที่ใช้เลี้ยงเพื่อหาเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรีย CU72-1

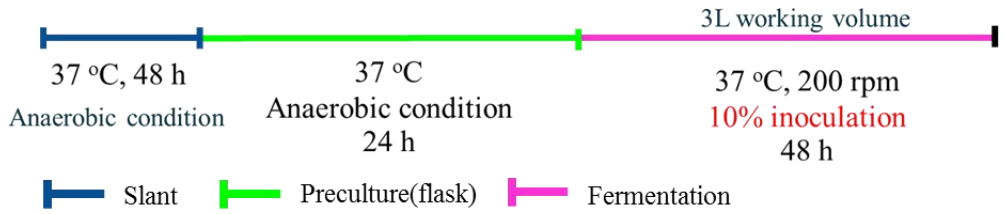
4.2.2 แปรปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น

ในการผลิตกรดดี-แล็กติกโดยแปรเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 24 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะที่เลี้ยงแบบไม่ให้อากาศในถุง anaerobic โดยมี anaerobic gas pack ใส่ไปเพื่อให้อยู่ในสภาวะ anaerobic แปรปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 2 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเพื่อการผลิต ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาทีและไม่มีการให้อากาศ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 สารที่ใช้ควบคุมความเป็นกรด-ด่างที่ใช้คือ $CaCO_3$ 80 กรัมต่อลิตร โดยใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่ 120 กรัมต่อลิตร ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ผลจากการแปรปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

Inoculum size (%)	Initial glucose (g/l)	Lactic acid (g/l)	Yield (g/g glucose)	Productivity (g/l.h)	Optical purity (%)
2	129.01	114.2	0.89	2.89	100.00
5	121.76	110.04	0.90	2.98	100.00
10	121.41	114.41	0.94	3.17	100.00

เมื่อเราได้เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อมาแล้วขั้นต่อไปจะเป็นการหาปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ใช้จากการทดลองได้ใช้ที่ 2 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ พบว่าเมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อที่ 2 และ 5 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ ปริมาณกรดแล็กติกและค่า yield ที่ได้ไม่แตกต่างกันคือ 0.89 และ 0.90 ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นมาที่ 10 เปอร์เซ็นต์ ค่า yield ที่ได้เพิ่มขึ้นมาเป็น 0.94 แสดงให้เห็นว่าเมื่อใช้ปริมาณหัวเชื้อเพิ่มขึ้นแบคทีเรียสามารถเพิ่มจำนวนได้เร็วขึ้นและใช้เวลาในการใช้กลูโคสน้อยลง ปริมาณหัวเชื้อเพิ่มขึ้นเวลาในช่วงการผลิตจะลดลงตามลำดับ ซึ่งที่ 10 เปอร์เซ็นต์จะใช้เวลา 30 ชั่วโมงในการที่แบคทีเรียใช้กลูโคสจนหมดรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 สภาวะที่ใช้เลี้ยงเพื่อหาปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรีย CU72-1

4.2.3 เปลี่ยนสารควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้ $Ca(OH)_2$ NaOH และ NH_4OH แทน $CaCO_3$

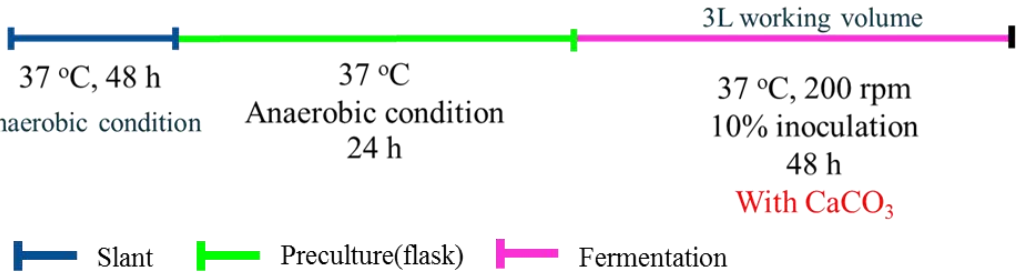
ในการผลิตกรดดี-แล็กติกโดยแปรเวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 24 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะที่เลี้ยงแบบไม่ให้อากาศในถุง anaerobic โดยมี anaerobic gas pack ใส่ไปเพื่อให้อยู่ในสภาวะ anaerobic แปรปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นที่ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเพื่อการผลิตภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาทีและไม่มีการให้อากาศ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8 แปรสารที่ใช้ควบคุมความเป็นกรด-ด่างที่ใช้คือ $Ca(OH)_2$ NaOH และ NH_4OH แทน $CaCO_3$ โดยใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่ 120 กรัมต่อลิตร ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ผลจากการเปลี่ยนสารควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้ $Ca(OH)_2$ NaOH และ NH_4OH แทน $CaCO_3$ ของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลส

Neutralizer	Initial glucose (g/l)	Lactic acid (g/l)	Yield (g/g glucose)	Productivity (g/l.h)	Optical purity (%)
5M $Ca(OH)_2$	106.90	78.50	0.73	1.63	100.00
7M NH_4OH	117.53	46.15	0.39	1.53	100.00
10M NaOH	112.63	83.35	0.74	2.77	100.00
$CaCO_3$(add)	121.41	110.42	0.91	3.68	100.00

จากผลการทดลองเมื่อเปลี่ยนสารควบคุมความเป็นกรด-ด่างจากแคลเซียมคาร์บอเนตมาเป็น 5 โมลาร์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ 7 โมลาร์ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ และ 10 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ จากตารางที่ 4.8 แสดงให้เห็นว่า แคลเซียมไฮดรอกไซด์และโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ผลการผลิตกรดดี-แล็กติกที่ใกล้เคียงกันคือ 0.73 และ 0.74 แต่แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ให้ผลที่ค่อนข้างต่ำอาจเนื่องจากแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ไม่สามารถทนต่อแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ในปริมาณมากได้ จากผลการทดลองได้กรดดี-แล็กติกที่ต่ำอาจเนื่องมาจากเซลล์นำกลูโคสไปใช้อย่างอื่น เช่นการซ่อมแซมเซลล์ให้สามารถอยู่ในสภาพที่มีแอมโมเนียมากได้ หรือนำไปสร้างเซลล์ใหม่ทำให้กลูโคสที่ต้องนำมาผลิตกรดนั้นมีปริมาณน้อยลงจึงทำให้ผลิตกรดออกมาได้น้อยลง ส่วนแคลเซียมคาร์บอเนตให้ค่า yield ที่มากที่สุดเมื่อเทียบกับแคลเซียมไฮดรอก

ไซด์และโซเดียมไฮดรอกไซด์ เนื่องจากว่าแคลเซียมคาร์บอเนตเราได้ทำการเติมไปในระบบอยู่แล้วตั้งแต่แรกจึงสามารถทำการจับกับกรดแล็กติกได้ในทันทีทำให้การควบคุมความเป็นกรด-ด่างมีประสิทธิภาพ ส่วนแคลเซียมไฮดรอกไซด์ก็เป็นตัวควบคุมความเป็นกรด-ด่างที่ดีอีกตัวหนึ่งดังในการทดลองของ Nakano ที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 4.1.5 จึงใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง รูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 สภาวะที่ใช้เลี้ยงเพื่อหาสารควบคุมความเป็นกรด-ด่างของแบคทีเรีย CU72-1

4.3 การหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมแทนสารสกัดจากยีสต์และเปปโทน

4.3.1 แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสได้

แบคทีเรียต้องการแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตชนิดและความเข้มข้นที่แตกต่างกันมีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ในการทดลองนี้เราจะใช้สารอินทรีย์มาแทนแหล่งไนโตรเจนที่มาจากสารอินทรีย์ซึ่งมีราคาแพง ในการทดลองนี้ได้นำข้อมูลจากงานวิจัยในระดับขวดเขย่า(ประเสริฐศักดิ์ 2011)มาเทียบผลและหาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ พบว่าที่การใช้สารสกัดจากยีสต์ 7.5 และแอมโมเนียมคลอไรด์ 4 และ 10 กรัมต่อลิตร นั้นแบคทีเรียมีการใช้กลูโคสจนหมดและให้ค่า yield ที่สูงจึงนำทั้ง 2 สภาวะนี้มาทำในงานวิจัยนี้

ตารางที่ 4.9 ผลจากการใช้แหล่งไนโตรเจนที่ปริมาณต่างๆของแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสได้

Nitrogen source (g/l)	Initial glucose (g/l)	Lactic acid (g/l)	Yield (g/g glucose)	Productivity (g/l.h)	Optical purity (%)
YE 15 + NH_4Cl 4	125.28	114.93	0.92	3.83	100.00
YE 7.5 + NH_4Cl 4	119.38	95.89	0.80	1.99	100.00
YE 7.5 + NH_4Cl 10	116.90	97.25	0.83	2.02	100.00

พบว่าเมื่อลดปริมาณสารสกัดจากยีสต์ลงทำให้ค่า yield และ productivity ลดลงไปด้วยแต่เมื่อใช้สารสกัดจากยีสต์ในปริมาณที่เท่ากันแต่เพิ่มแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์คือแอมโมเนียมคลอไรด์เข้าไปพบว่าผลผลิตกรดแล็กติกมีค่าใกล้เคียงกัน ดังตารางที่ 4.9 แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากยีสต์มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแล็กติกของแบคทีเรียมากกว่าแอมโมเนียมคลอไรด์ เนื่องจากสารสกัดจากยีสต์มีเบสพิวรีน ไพริมีดีนและวิตามินบีเป็นส่วนประกอบซึ่งแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์จะไม่มีวิตามินบีประกอบอยู่วิตามินบีเป็นสารสำคัญในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเช่นกันถ้ามีแหล่งไนโตรเจนอย่างเดียวแบคทีเรียอาจไม่สามารถเจริญได้และการที่มีปริมาณน้อยไปก็จะทำให้แบคทีเรียเจริญและผลิตกรดได้ไม่ดีเช่นกัน แต่การที่ใช้แอมโมเนียมคลอไรด์นั้นถ้าใช้ในปริมาณมากจะไม่ดีเนื่องจากแอมโมเนียมไอออนอาจไปทำอันตรายต่อเซลล์ โดยทำให้มีสภาวะความเป็นด่างมากขึ้นทำให้การผลิตกรดแล็กติกต่ำลงได้ (Leejeerajumnean et al., 2000) แต่การใส่ไนโตรเจนไปในปริมาณมากนั้นอาจจะไปยับยั้งการเจริญเติบโตและการสร้างกรดแล็กติกได้เช่นกัน (Bolner de Lima et al., 2009)

จากรูปที่ ข.30 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียจะใช้ไนโตรเจนในปริมาณที่ค่อนข้างน้อย อาจเนื่องจากในการรักษาสภาพของตัวมันเองให้อยู่ในภาวะที่สามารถผลิตกรดดี-แล็กติกได้จำเป็นต้องใช้ กรดอะมิโนและวิตามิน ซึ่งถ้าสารอาหารจำพวกนี้มีปริมาณน้อยเกินไปจะส่งผลให้ความสามารถในการผลิตกรดดี-แล็กติกลดต่ำลงไปด้วย

4.3.2 แบคทีเรียที่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสได้

ในการทดลองนี้ได้นำข้อมูลจากงานวิจัยในระดับขวดเขย่า(ประเสริฐศักดิ์ 2011)มาเทียบผลและหาปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ พบว่าที่การใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตรแทนเปปโทน 10 กรัมต่อลิตร นั้นแบคทีเรียมีการใช้กลูโคสจนหมดและให้ค่า yield ที่สูงจึงสภาวะนี้มาทำในงานวิจัยนี้

ตารางที่ 4.10 ผลจากการใช้แหล่งไนโตรเจนที่ปริมาณต่างๆของแบคทีเรียที่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสได้

Nitrogen source (g/l)	Initial glucose (g/l)	Lactic acid (g/l)	Yield (g/g glucose)	Productivity (g/l.h)	Optical purity (%)
YE 20 + peptone 10	121.41	110.42	0.91	3.68	100.00
YE 20 + NH_4Cl 10	113.74	107.93	0.94	2.99	100.00

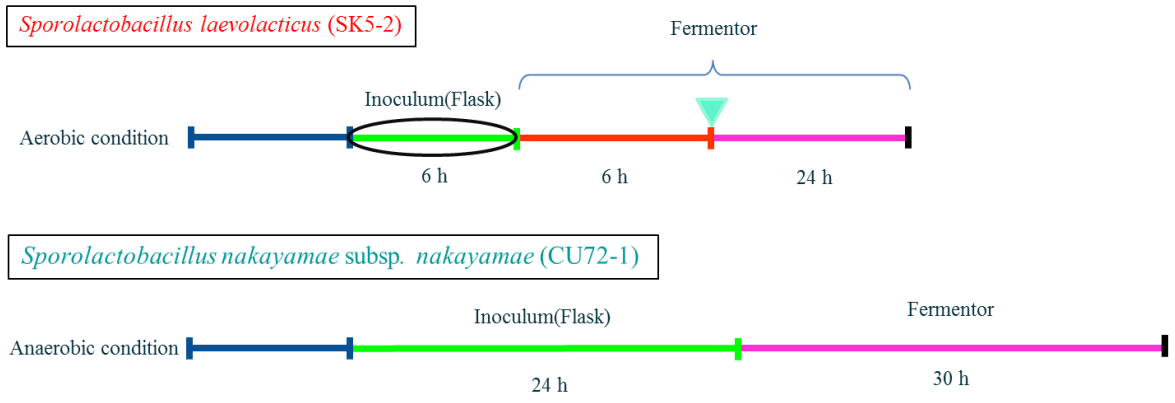
จากตารางที่ 4.10 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเปลี่ยนมาใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ แล้วค่า yield ที่ได้จะใกล้เคียงกับตอนใช้เปปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนเนื่องจากเปปโทน ไม่มีส่วนประกอบของวิตามินบี (Loginova et al., 2001)เหมือนในสารสกัดจากยีสต์ เช่นเดียวกับแอมโมเนียมคลอไรด์และสอดคล้องกับผล

การทดลองของแบคทีเรียที่สามารถผลิตคะตะเลสได้ ค่าผลผลิตที่ได้จะใกล้เคียงกันเมื่อปริมาณสารสกัดจากยีสต์เท่ากัน เนื่องจากแบคทีเรียบางตัวไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนและวิตามินได้ (Hujanen and Linko, 1995)เราจึงต้องใส่เข้าไปซึ่งในสารสกัดจากยีสต์ก็มีทั้งพิวรีน ไพริมีดีนและวิตามินบีซึ่งจำเป็นต่อการเจริญและการผลิตกรดแล็กติกแต่แบคทีเรียในการทดลองนี้ไม่สามารถผลิตได้ แต่เปปโทนก็ยังเป็นแหล่งอาหารที่ดีกว่าแอมโมเนียมคลอไรด์เพราะนอกจากจะเป็นแหล่งไนโตรเจนแล้วเปปโทนยังมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วย ปริมาณการใช้ไนโตรเจนแสดงดังรูปที่ ข.31

ในงานวิจัยของ Nancib และคณะ(2005) พบว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเทียบกับเปปโทนพบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตให้ค่าการผลิตกรดแล็กติกที่มากกว่าการใช้เปปโทนโดยใช้แบคทีเรีย *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* NRRL-B445 ในกระบวนการหมัก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่แอมโมเนียมคลอไรด์ได้ให้ผลผลิตกรดแล็กติกที่สูงกว่าการใช้เปปโทน

จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากยีสต์ยังคงเป็นสาระสำคัญและจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและผลิตกรดแล็กติกของแบคทีเรียไม่ควรแต่ด้วยราคาที่แพงถ้าเราสามารถหาสารอื่นมาทดแทนหรือลดการใช้โดยที่ไม่ทำให้ผลผลิตที่ได้ลดลงจะเป็นการลดต้นทุนการผลิตลงไปได้

จากการทดลองของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ เมื่อนำสภาวะในการเลี้ยงที่ให้ผลผลิตดีที่สุดของทั้ง 2 สายพันธุ์มาเปรียบเทียบกันพบว่าแบคทีเรีย *Sporolactobacillus laevolacticus* (SK5-2) ในการเลี้ยงที่สภาวะที่มีอากาศโดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ 6 ชั่วโมงในเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ปริมาณหัวเชื้อที่ใช้ 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารเพื่อการเจริญ อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ใช้เวลาช่วงการเจริญในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 6 ชั่วโมง ใช้เวลาในการผลิตกรดแล็กติกโดยแบคทีเรียสามารถใช้กลูโคสจนหมดที่ 24 ชั่วโมง โดยใช้ $CaCO_3$ เป็นสารควบคุมความเป็นกรด-ด่างซึ่งใช้เวลาทั้งกระบวนการผลิตน้อยกว่าแบคทีเรีย *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *nakayamae* (CU72-1) โดยใช้เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้น 24 ชั่วโมงในสภาวะไร้อากาศ ใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหาร ใช้ $CaCO_3$ เป็นสารควบคุมความเป็นกรด-ด่าง แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถใช้กลูโคสจนหมดในเวลา 30 ชั่วโมงในขั้นตอนการผลิตกรดดี-แล็กติก โดยเวลาที่ใช้ทั้งกระบวนการของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ดังรูปที่ 4.11 และผลผลิตที่ได้ดังตารางที่ 4.11



รูปที่ 4.11 เวลาที่ใช้ในการผลิตกรดดี-แล็กติกของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *Sporolactobacillus laevolacticus* (SK5-2) สามารถผลิตกรดดี-แล็กติกได้ดีและใช้เวลาที่น้อยกว่าแบคทีเรีย *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *nakayamae* (CU72-1) เนื่องจาก *S. laevolacticus* สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศทำให้การเจริญเติบโตได้ดีและเร็วกว่า *S. nakayamae* subsp. *nakayamae* โดยใช้เวลาทั้งกระบวนการน้อยกว่าถึง 18 ชั่วโมง และผลผลิตที่ได้ก็ใกล้เคียงกัน ถ้าสามารถเวลาในการผลิตในกระบวนการได้จะทำให้ประหยัดค่าใช้จ่าย ลดต้นทุนการผลิตได้

ตารางที่ 4.11 เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างระดับขวดเขย่าและระดับถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร เลี้ยงที่สภาวะเหมาะสม

Bacteria strain	Initial glucose (g/l)	Lactic acid (g/l)	Yield (g/g glucose)	Productivity (g/l.h)	Optical purity (%)
SK5-2 (fermenter)	125.08	114.93	0.92	3.83	100.00
CU72-1 (fermenter)	121.41	110.42	0.91	3.68	100.00
SK5-2 (flask)	119.99	118.78	0.98	1.65	99.18
CU72-1 (flask)	118.60	103.84	0.87	1.44	98.92

ผลการทดลองเมื่อนำมาเทียบกับงานวิจัยระดับขวดเขย่าแสดงในตารางที่ 4.11 พบว่าค่า productivity ของการทดลองในระดับขวดเขย่ามีค่าที่ต่ำเนื่องจากในขวดเขย่าการควบคุมสภาวะเป็นไปได้ยากเมื่อแบคทีเรียอยู่ในสภาวะที่ไม่ใช่สภาวะที่เหมาะสมทำให้ใช้เวลานานกว่าการเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพซึ่งสามารถควบคุมสภาวะได้ดีกว่า

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดดี-แล็กติกให้ได้ผลผลิตและค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงสูงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวนขนาด 5 ลิตร ของแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์คือ *Sporolactobacillus laevolacticus* (SK5-2) และ *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *nakayamae* (CU72-1) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงแบคทีเรีย SK5-2 คือใช้เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ 6 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อที่ใช้คือ 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารที่ใช้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ระยะเวลาช่วงการเจริญในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 6 ชั่วโมง ใช้อัตราการกวน 300 รอบต่อนาทีและอัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที ระยะเวลาในการผลิตกรดดี-แล็กติก แบคทีเรียใช้กลูโคสจนหมดที่ 24 ชั่วโมง ใช้อัตราการกวนที่ 200 รอบต่อนาทีไม่มีการให้อากาศ ใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสทั้งกระบวนการ ด่างที่ใช้ควบคุมความเป็นกรด-ด่างคือ $CaCO_3$ 80 กรัมต่อลิตรโดยเติมลงไปในอาหาร ใช้น้ำตาลกลูโคส 125.08 กรัมต่อลิตร ได้กรดดี-แล็กติก 114.93 กรัมต่อลิตร yield ที่ได้ 0.92 กรัมของกรดดี-แล็กติกที่ได้ต่อกรัมของกลูโคสที่ใช้ไป productivity 3.83 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง 100 เปอร์เซ็นต์

แบคทีเรีย CU72-1 สภาวะที่ดีที่สุดคือ ใช้เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อ 24 ชั่วโมง ปริมาณหัวเชื้อที่ใช้ 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรน้ำหมัก ด่างควบคุมความเป็นกรด-ด่างคือ $CaCO_3$ 80 กรัมต่อลิตรเติมลงไปในอาหาร เลี้ยงแบบไม่ให้อากาศ อัตราการกวน 200 รอบต่อนาทีและใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสทั้งกระบวนการ ใช้กลูโคส 121.41 กรัมต่อลิตรได้กรดดี-แล็กติก 110.42 กรัมต่อลิตร ค่า yield 0.91 กรัมของกรดดี-แล็กติกที่ได้ต่อกรัมของกลูโคสที่ใช้ไป productivity 3.68 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง 100 เปอร์เซ็นต์

ต่อมานำแบคทีเรีย SK5-2 และ CU72-1 มาทำการเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่ใช้โดย SK5-2 ได้แหล่งไนโตรเจนและปริมาณที่ใช่คือ สารสกัดจากยีสต์ 15 กรัมต่อลิตรผสมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ 4 กรัมต่อลิตรโดยใช้สภาวะที่ได้กล่าวไปข้างต้นในการเลี้ยง พบว่า yield ที่ได้ 0.92 กรัมของกรดดี-แล็กติกที่ได้ต่อกรัมของกลูโคสที่ใช้ไป productivity 3.83 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลผลิตที่ดีกว่าการที่ลดปริมาณสารสกัดจากยีสต์เหลือ 7.5 กรัมต่อลิตรและใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ 4 กรัมต่อลิตร กับการใช้สารสกัดจากยีสต์ 7.5 กรัมต่อลิตรและแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตรซึ่งได้ค่า yield และ productivity ที่ 0.80 และ 1.99 กับ 0.83 และ 2.02 ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่า

ส่วนแบคทีเรีย CU72-1 ได้ทำการเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนจากเปปโทน 10 กรัมต่อลิตรมาใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเปลี่ยนมาใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ผลของค่า yield ไม่แตกต่างกันมากเมื่อเทียบกับเปปโทนคือแอมโมเนียมคลอไรด์ yield 0.94 กรัมของกรดดี-แล็กติกที่ได้ต่อกรัม

ของกลูโคสที่ใช้ไปและเปปโทนได้ 0.92 กรัมของกรดดี-แล็กติกที่ได้ต่อกรัมของกลูโคสที่ใช้ไปดังนั้น แบคทีเรียสายพันธุ์นี้สามารถใช้แอมโมเนียมคลอไรด์แทนเปปโทนได้ซึ่งแอมโมเนียมคลอไรด์มีราคาถูกกว่า เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตอีกด้วย

แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์เมื่อนำมาเปรียบเทียบกระบวนการผลิตแล้วพบว่าแบคทีเรีย SK5-2 ใช้เวลาทั้งกระบวนการในการผลิตกรดดี-แล็กติกได้เร็วกว่าแบคทีเรีย CU72-1 ถึง 18 ชั่วโมงเนื่องจากแบคทีเรียแล็กติกส่วนใหญ่ที่พบในธรรมชาติจะไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศเนื่องจากในกระบวนการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะทำให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ขึ้นมาซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์แบคทีเรียซึ่งเอนไซม์ที่สามารถสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้คือเอนไซม์คะตะเลสซึ่งแบคทีเรียไม่สามารถผลิตได้จึงต้องเลี้ยงแบบไม่ให้อากาศ แต่แบคทีเรีย SK5-2 สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้จึงสามารถเจริญได้ในสภาวะที่อากาศซึ่งข้อดีของมันคือจะเจริญได้เร็วกว่าเพราะว่าระบบเมแทบอลิซึมของการเจริญแบบมีอากาศนั้นจะให้พลังงานที่มากกว่าแบบไม่มีอากาศหลายเท่า เมื่อมีพลังงานมากและมีสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญจึงทำให้แบคทีเรียเจริญได้ไวและสามารถผลิตกรดได้ดีอีกด้วย

จากผลการทดลองโดยการเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์เพื่อผลิตกรดดี-แล็กติกในสภาวะที่ได้จากการทำการทดลองเมื่อเทียบกับในระดับขวดเขย่าแล้วพบว่าให้ผลที่ดีกว่ามากทั้ง yield, productivity, ความเข้มข้นของกรดดี-แล็กติกที่ได้รวมถึงค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงที่ได้เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับในระดับขวดเขย่าแสดงให้เห็นว่าการที่เลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกวนซึ่งเราสามารถควบคุมสภาวะได้จะเป็นข้อได้เปรียบในการเลี้ยง นอกจากจะช่วยให้แบคทีเรียเจริญได้ดีแล้วยังให้ผลผลิตที่สูงและค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงที่สูงอีกด้วย

ข้อเสนอแนะ

1. จากสภาวะที่เหมาะสมที่ได้ของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถนำไปเพิ่มขนาดการผลิตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีขนาดใหญ่ขึ้นไปได้เพื่อเป็นการต่อยอดไปในระดับอุตสาหกรรมพร้อมทั้งหาข้อดีและแก้ไขข้อด้อยของการขยายขนาดการหมักก่อนถึงระดับอุตสาหกรรม
2. สารควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างที่ใช้คือ $CaCO_3$ ต้องหาวิธีการนำไปใช้เมื่อทำการขยายขนาดให้ใหญ่ขึ้น
3. เพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสจากเดิม 120 กรัมต่อลิตร เป็น 150 กรัมต่อลิตรเพื่อเป็นการเพิ่มผลผลิตกรดแล็กติก
4. ประยุกต์ใช้กระบวนการหมักแบบ Fed-batch และ Continuous มาใช้ในกระบวนการผลิต

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

บุษบาทิพย์ ประเสริฐศักดิ์. 2554. การคัดเลือกแบคทีเรียและภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดดี-แล็กติก. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Abdel-Rahman, M.A., Tashiro, Y. and Sonomoto, K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. Journal of Biotechnology 156 (December 2011) : 286-301.

Abdel-Rahman, M.A., Tashiro, Y. and Sonomoto, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. Biotechnology Advances. Available online 24 April 2013.

Bustos, G., Moldes, A.B., Alonso, J.L., Viazquez, M. Optimization of d-lactic acid production by *Lactobacillus coryniformis* using response surface methodology. Food Microbiology 21 (April 2004) : 143–148.

Lee, C.W. Production of D-Lactic Acid by Bacterial Fermentation of Rice. Fibers and Polymers 8 (October 2007) : 571-578.

Datta R., Tsai S., Bonsignore P., Moon S.H., Frank J.H. Technology and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives. FEMS Microbiology Review 16 (February 1995) : 221–231

Fukushima, K., Sogo, K., Miura, S. and Kimura, Y. Production of D-(-)-lactic acid bacterial fermentation of rice starch. Macromolecular Bioscience 4 (November 2004) : 1021-1027.

Fukushima K., Chang Y.H., Kimura Y. Enhanced stereocomplex formation of poly(L-lactic acid) and poly(D-lactic acid) in the presence of stereoblock poly(lactic acid). Macromolecular Bioscience 7 (June 2007) : 829–835

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

Ilmen, M., Koivuranta, K., Ruohonen, L., Suominen, P., Penttila, M. Efficient production of L-(+)-lactic acid from xylose by *Pichia stipitis*. Applied and Environmental Microbiology 73 (January 2007) : 117–123.

Jan, P., Teixeira, M.J. and Neijssel. D(-)Lactic acid production by suspended and aggregated

continuous cultures of *Bacillus laevolacticus*. Applied Microbiology and Biotechnology 34 (June 1990) : 149-153.

John, R.P., Anisha, G.S., Nampoothiri, K.M. and Pandey, A. Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. Biotechnology Advances 27 (April 2009) : 145-152.

Kempe, L.L. and West, R.E. The Effect of Agitation on the Rate of Acid Formation by *Lactobacillus delbrueckii.* Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering 1 (December 1959) : 335-348.

Leejeerajumnean, A., Ames, J.M. and Owens, J.D. Effect of ammonia on the growth of *Bacillus* species and some other bacteria. Letters in Appiles Microbiology 30 (May 2000) : 385-389.

Lockwood, L., Yoder, D.E. and Zienty, M. Lactic acid. Annals of the New York Academy of Sciences 119 (July 1965) : 854.

Nakano, S., Ugwu, C.U. and Tokiwa, Y. Efficient production of D-(-)-lactic acid from broken rice by *Lactobacillus delbrueckii* using Ca(OH)2 as a neutralizing agent. Bioresource Technology 104 (January 2012) : 791-794.

Nancib, N., Nancib, A. Boudjelal, A., Benslimane, C., Blanchard, F. and Boudrant, J. The effect of supplementation by different nitrogen sources on production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. Bioresource Technology 78 (June 2001) : 149-153.

Nguyen, C.M., Kim, J.S., Song, J.K., Choi, G.J., Choi, Y.H., Jang, K.S. and Kim, J.C. D-Lactic acid production from dry biomass of *Hydrodictyon reticulatum* by simultaneous saccharification and co-fermentation using *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*. Biotechnology Letters 34 (December 2012) : 2235-2240.

Oshiro M., Shinto H., Tashiro Y., Miwa N., Sekiguchi T., Okamoto M., Ishizaki A., Sonomoto K. Kinetic modeling and sensitivity analysis of xylose metabolism in Lactococcus lactis IO-1 . Journal of Bioscince and Bioengineering 108 (November 2009) : 376–384

Panesar, P.S., Kennedy, J.F., Knill, C.J. and Kosseva, M. Production of L(+) Lactic Acid using *Lactobacillus casei* from Whey. Brazilian Archives of Biology and Technology 53 (January 2010) : 219-226.

Russell, J.B. and Dombrowski, D.B. Effect of pH on the Efficiency of Growth by Pure Cultures of

Rumen Bacteria in Continuous Culture. Applied and Environmental Microbiology 39 (March 1980) : 604-610.

Singhvi M., Joshi D., Adsul M., Varma A., Gokhale D. D-(-)-Lactic acid production from cellobiose and cellulose by Lactobacillus lactis mutant RM2-24. Green Chemistry 12 (December 2010) : 1106–1109

Tanaka T., Hoshina M., Tanabe S., Sakai K., Ohtsubo S., Taniguchi M. Production of D-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. Bioresource Technology 97 (January 2006) : 211–217

Tashiro Y., Kaneko W., Sun Y., Shibata K., Inokuma, K., Zendo T., Sonomoto K. Continuous D-(-)-lactic acid production by a novel thermotolerant Lactobacillus delbrueckii subsp lactis QU41. Applied Microbiology and Biotechnology 89 (mar 2011) : 1741–1750

Wang, L., Zhao, B., Liu, B., Yang, C., Yu, B., Li, Q., Ma, C., Xu, P. and Ma, Y. Efficient production of L-lactic acid from cassava powder by *Lactobacillus rhamnosus*. Bioresource Technology 101 (October 2010) : 7895-7901.

Wang, L., Zhao, B., Le, F., Xu, K., Ma, C., Tao, F., Li, Q., Xu, P. Highly efficient production of D-(-)-lactate by *Sporolactobacillus* sp. CASD with simultaneous enzymatic hydrolysis of peanut meal. Applied Microbiology and Biotechnology 89 (February 2011) : 1009–1017.

Wee, Y.J., Kim, J.N. and Ryu, H.W. Biotechnological Production of Lactic Acid and Its Recent Applications. Food Technology and Biotechnology 44 No. 2 (April 2006) : 163-172.

Xu T.T., Bai Z.Z., Wang L.J., He B.F. Breeding of D(–)-lactic acid high producing strain by low-energy ion implantation and preliminary analysis of related metabolism. Applied Biochemical and Biotechnolo-logy 160 (January 2008) : 314 – 321

Yanez, R., Moldes, A.B., Alonso, J.L. and Parajo, J.C. Production of D(-)-lactic acid from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation using *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens.* Biotechnology Letters 25 (June 2003) : 1161-1164.

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

Zhao, B., Wang, L., Li, F., Hua, D., Ma, C., Ma, Y. and Xu, P. Kinetics of D-lactic acid production by *Sporolactobacillus* sp. strain CASD using repeated batch fermentation. Bioresource Technology 101 (August 2010) : 6499-6505.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และการเตรียมสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1.1 อาหาร GYP

กลูโคส	10	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัมต่อลิตร
เปปโทน	5	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.25	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	0.25	กรัมต่อลิตร
Salt solution	10	มิลลิลิตรต่อลิตร
$CaCO_3$	5	กรัมต่อลิตร
วุ้น	20	กรัมต่อลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 6.8 ด้วย NaOH และปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

1.2 Salt solution

$MgSO_4.7H_2O$	400	มิลลิกรัม
$MnSO_4.5H_2O$	20	มิลลิกรัม
$FeSO_4.7H_2O$	20	มิลลิกรัม
NaCl	20	มิลลิกรัม

หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร

1.3 10 % Skim milk

ชั่ง Skim milk 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส 10 นาที

1.4 อาหาร Preculture ของแบคทีเรียไม่ผลิตคะตะเลส

กลูโคส	10	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัมต่อลิตร
เปปโทน	5	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.25	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	0.25	กรัมต่อลิตร
Salt solution	10	มิลลิลิตรต่อลิตร
$CaCO_3$	5	กรัมต่อลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 6.8 ด้วย NaOH และปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส, 15 นาที

1.5 อาหาร Fermentation ของแบคทีเรียไม่ผลิตคะตะเลส

กลูโคส	120	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์	20	กรัมต่อลิตร
เปปโทน	10	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.5	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	0.5	กรัมต่อลิตร
Salt solution	20	มิลลิลิตรต่อลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 6.8 ด้วย NaOH และปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร โดยมีการเติม$CaCO_3$ 4 กรัม หลังจากนั้นทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

1.6 อาหาร Preculture ของแบคทีเรียผลิตคะตะเลส

กลูโคส	10	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์	15	กรัมต่อลิตร
NH_4Cl	4	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.5	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	0.5	กรัมต่อลิตร
$CaCO_3$	5	กรัมต่อลิตร
Salt solution	20	มิลลิลิตรต่อลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 6.8 ด้วย NaOH และปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตรหลังจากนั้นทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

1.7 อาหาร Fermentation ของแบคทีเรียผลิตคะตะเลส

อาหาร Fermentation ประกอบด้วย กลูโคส 120 กรัมต่อลิตร และมีการเติม $CaCO_3$ 4 กรัม หลังจากนั้นทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2. สารเคมีและวิธีการเตรียมสารเคมี

2.1 0.005 mM H_2SO_4

ดูดสารละลาย Conc. H_2SO_4 ปริมาตร 556 µl ละลายในน้ำ 2 ลิตร และนำมากรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 µm หลังจากนั้นเข้าเครื่อง Sonicate ระยะเวลา 30 นาที

2.2 1 mM $CuSO_4$

ชั่ง $CuSO_4$ 0.5 กรัม ละลายในน้ำ 2 ลิตร และนำมากรองด้วยเมมเบรนขนาด 0.45 µmหลังจากนั้นเข้าเครื่อง Sonicate ระยะเวลา 30 นาที

2.3 สารละลายมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์กรดแล็กติก กลูโคส เอทานอล และกรดอะซิติก (ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร)

ชั่งกลูโคส และ Lactate.$5H_2O$ อย่างละ 0.1 และ 0.1712 กรัม ตามลำดับ หลังจากนั้นเติมเอทานอล และกรดอะซิติก ปริมาตร 105.3 และ 95 ไมโครลิตร ตามลำดับ พร้อมปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

2.4 32% NaOH

นำ NaOH 320 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

2.5 4% Boric acid

นำกรดบอริก 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

2.6 K_2SO_4 : $CuSO_4.5H_2O$

นำ K_2SO_4 95 กรัม ผสมกับ $CuSO_4.5H_2O$ 5 กรัม

ภาคผนวก ข

สูตรการคำนวณ

สูตรการคำนวณ

1. ค่า Yield

$$\text{Yield} = \frac{\text{(กรดแล็กติกที่ได้ (กรัมต่อลิตร))}}{\text{(กลูโคสเริ่มต้น - กลูโคสสุดท้าย (กรัมต่อลิตร))}}$$

2. ค่า Productivity (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

$$\text{Productivity} = \frac{\text{(กรดแล็กติกที่ได้ (กรัมต่อลิตร))}}{\text{(เวลาในการหมักกรดแล็กติก (ชั่วโมง))}}$$

3. ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง (%ee)

$$\text{ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง} = \frac{\text{(พื้นที่กรดดี-แล็กติก - พื้นที่กรดแอล-แล็กติก)}}{\text{(พื้นที่กรดดี-แล็กติก + พื้นที่กรดแอล-แล็กติก)}} \times 100$$

4. ค่า Nitrogen

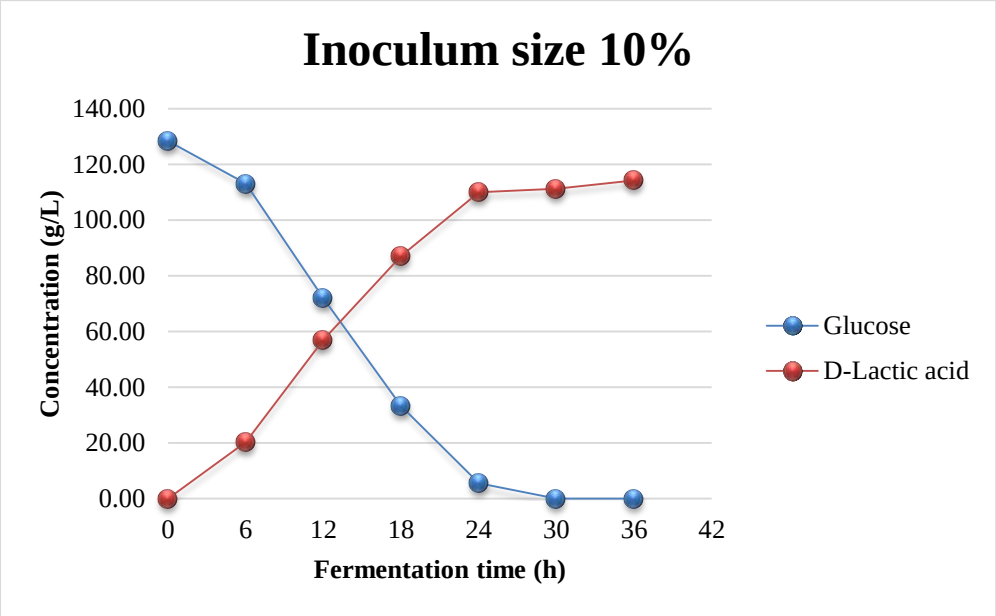
$$\text{ไนโตรเจน} = (V_{\text{HCl จากการไทเทรตตัวอย่าง}} - V_{\text{HCl จากการไทเทรต Blank}}) \times 0.014007 \times 0.0974 \text{ N HCl}$$

5. % Nitrogen

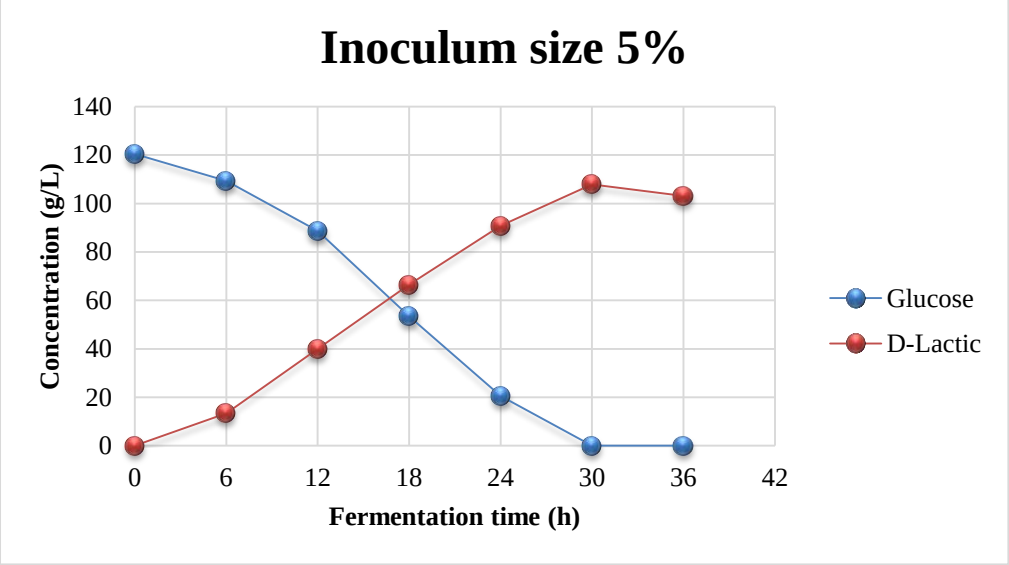
$$\%\text{ Nitrogen} = \frac{\text{ค่าไนโตรเจน} \times 100}{\text{ปริมาตรสารตัวอย่าง}}$$

ภาคผนวก ค

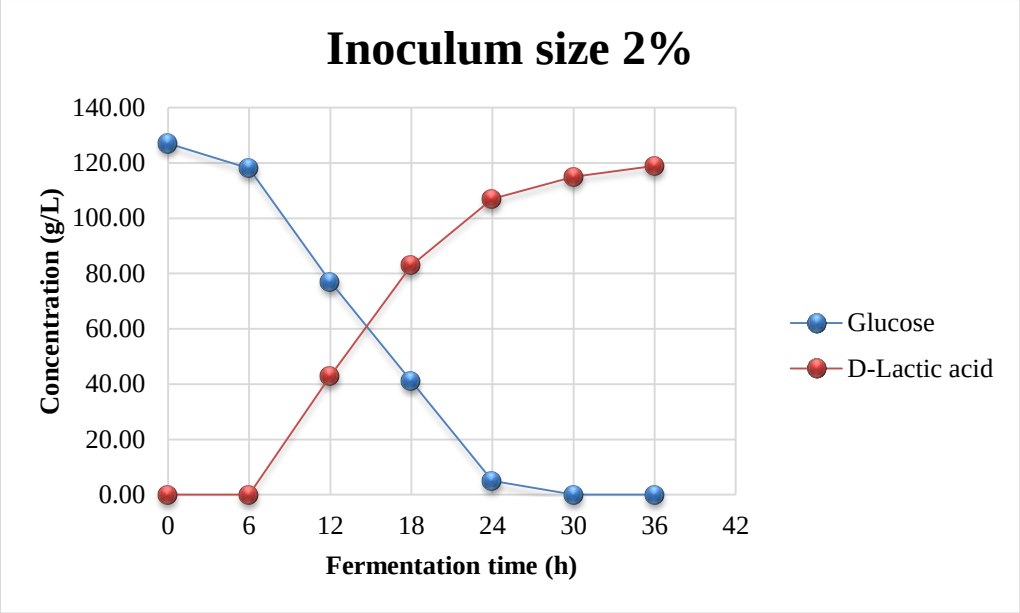
กราฟ Kinetic ของการหมักกรดดี-แล็กติกโดยแบคทีเรีย SK5-2



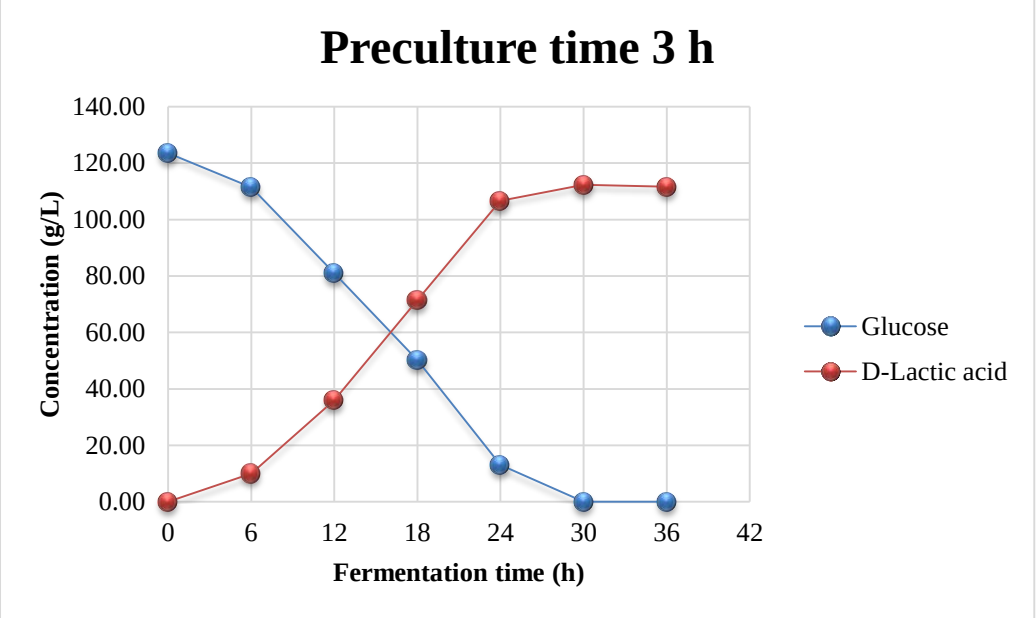
รูปที่ ค.1 กราฟการหมักโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซนต์



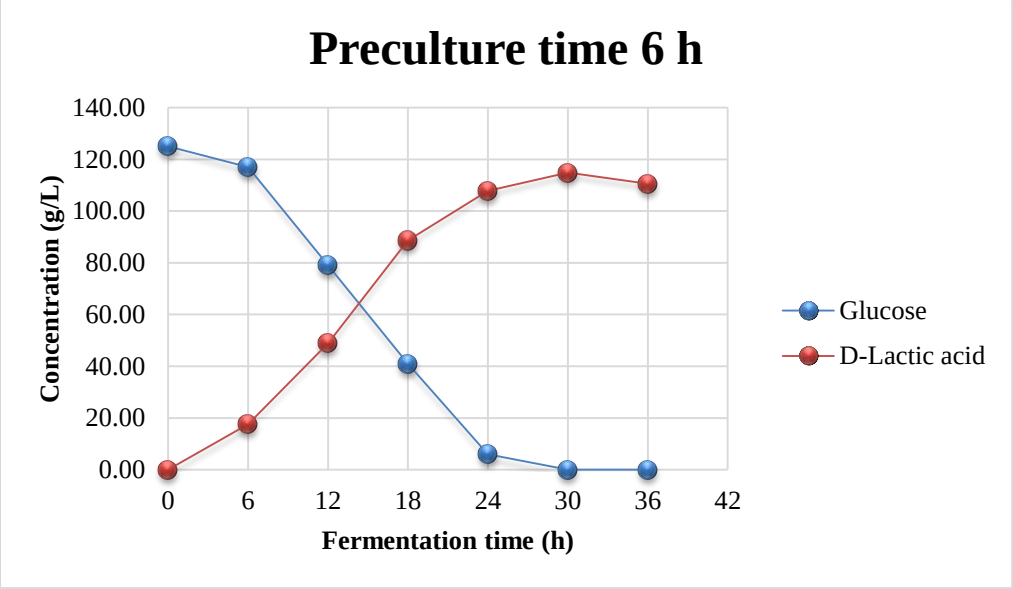
รูปที่ ค.2 กราฟการหมักโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซนต์



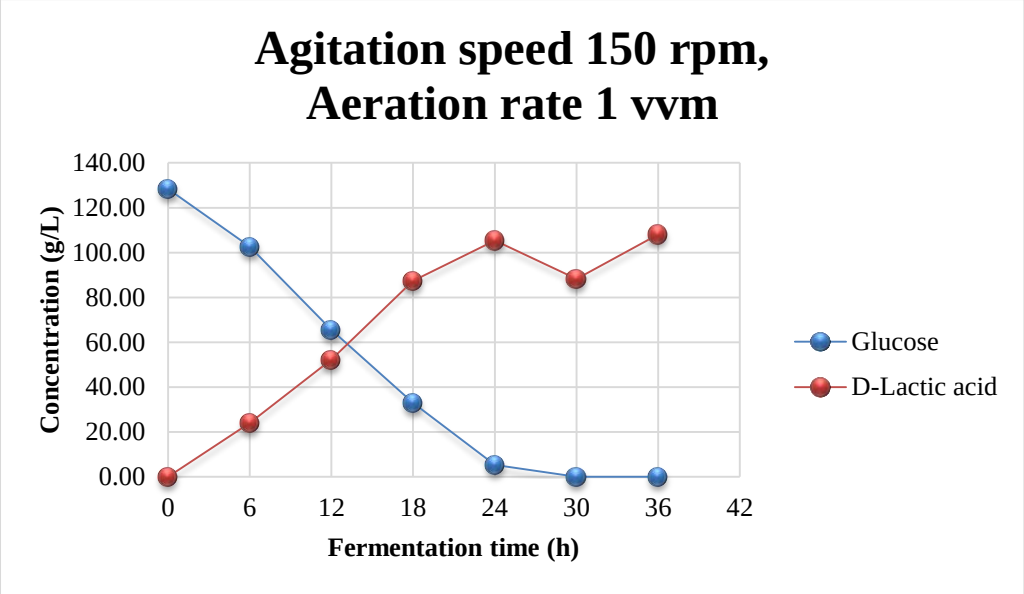
รูปที่ ค.3 กราฟการหมักโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 2 เปอร์เซนต์



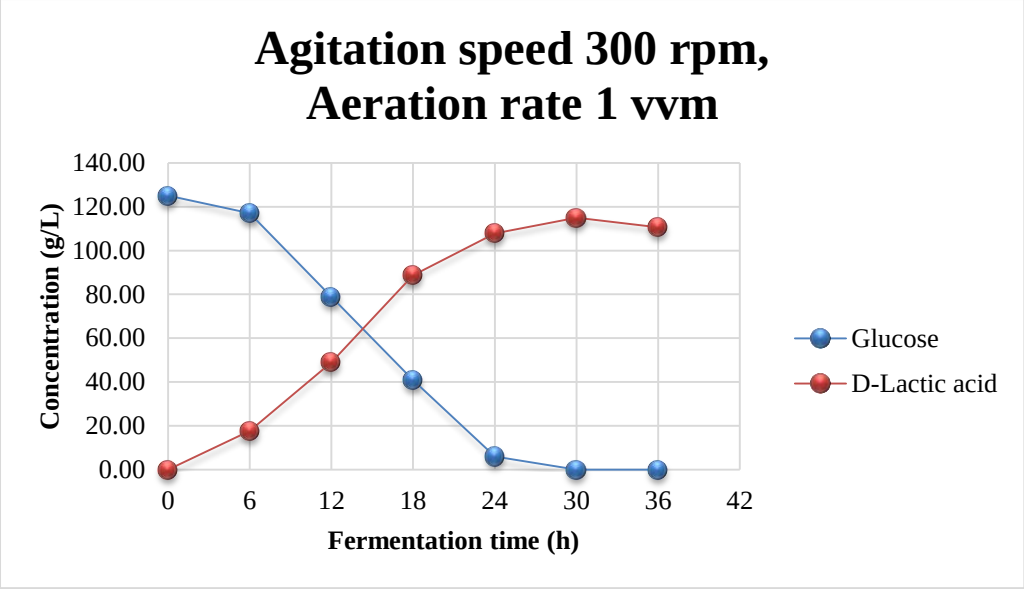
รูปที่ ค.4 กราฟการหมักโดยใช้เวลาในช่วงการเจริญ 3 ชั่วโมง



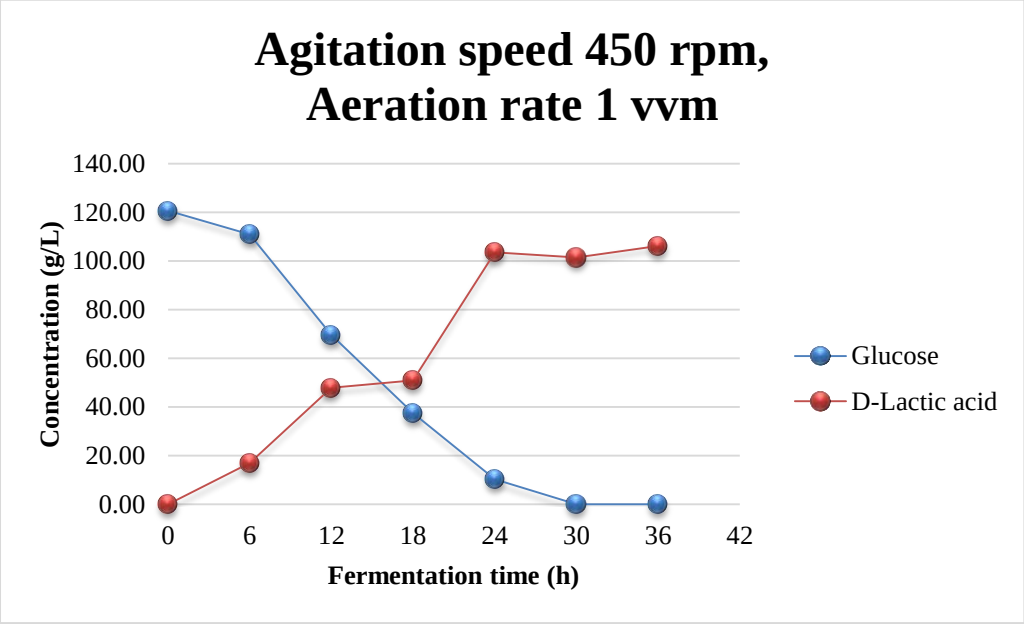
รูปที่ ค.5 กราฟการหมักโดยใช้เวลาในช่วงการเจริญ 6 ชั่วโมง



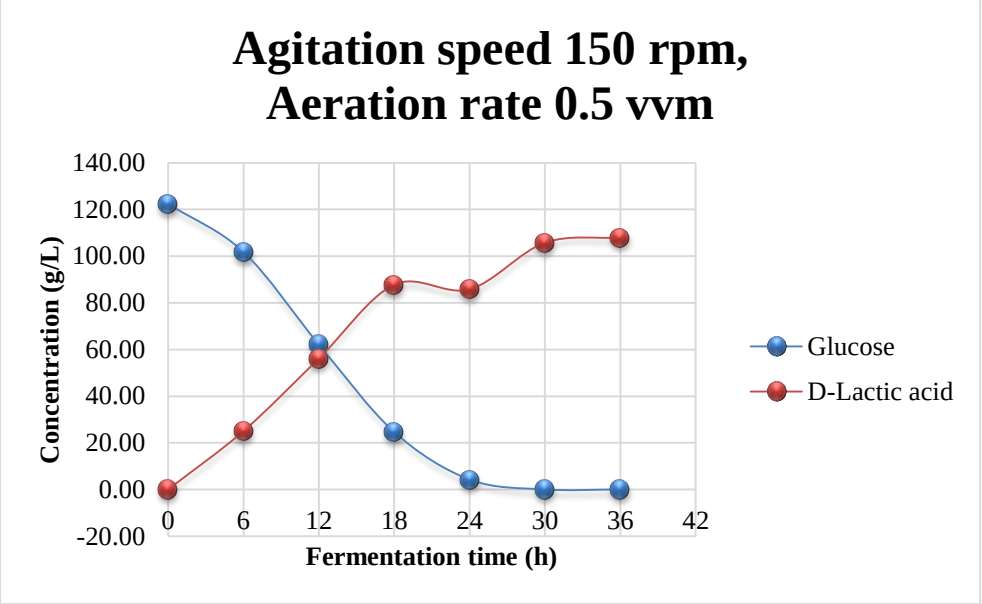
รูปที่ ค.6 กราฟการหมักโดยอัตราการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที



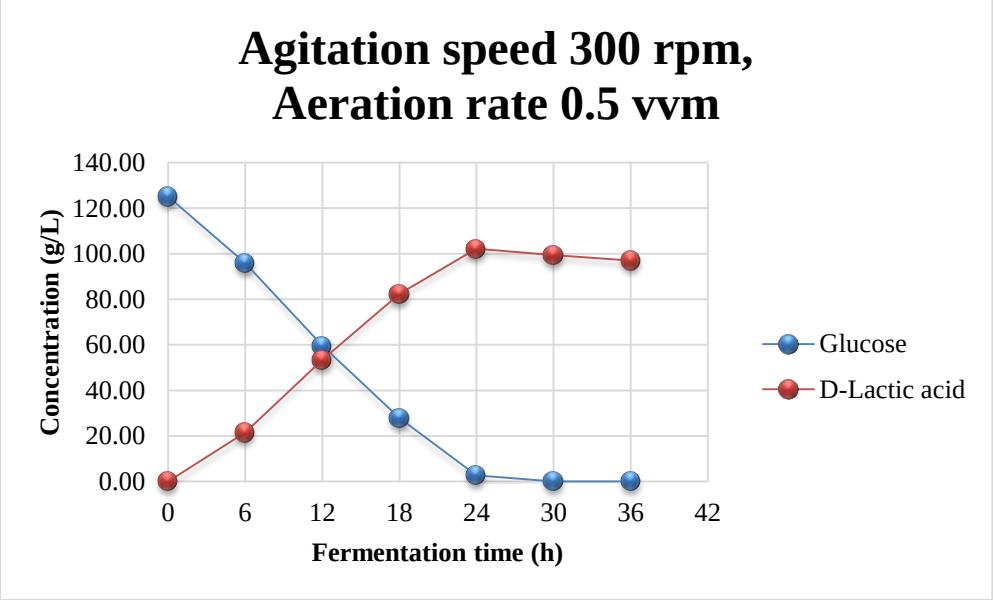
รูปที่ ค.7 กราฟการหมักโดยอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที



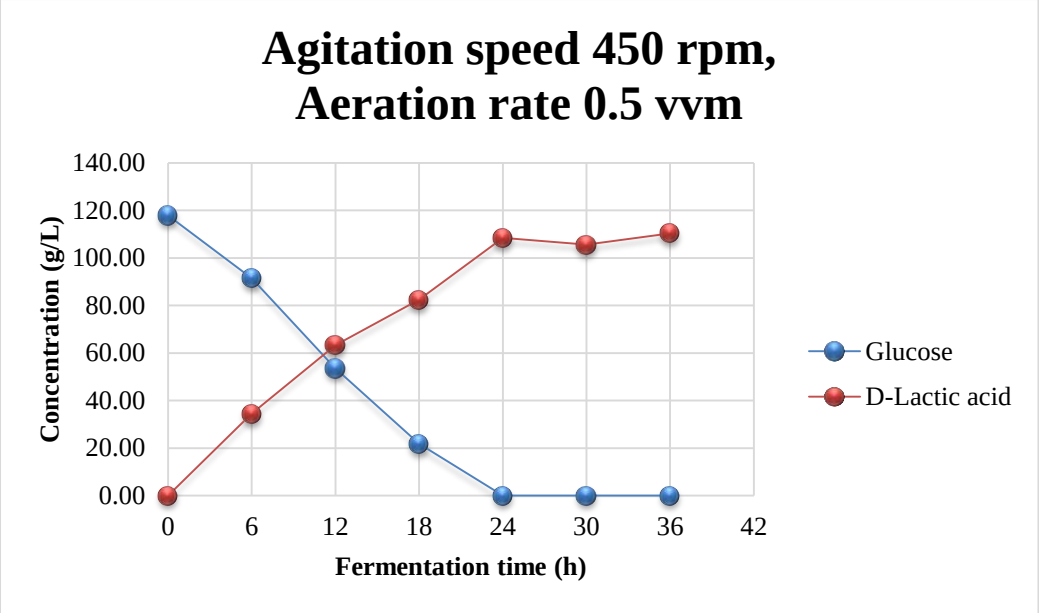
รูปที่ ค.8 กราฟการหมักโดยอัตราการกวน 450 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที



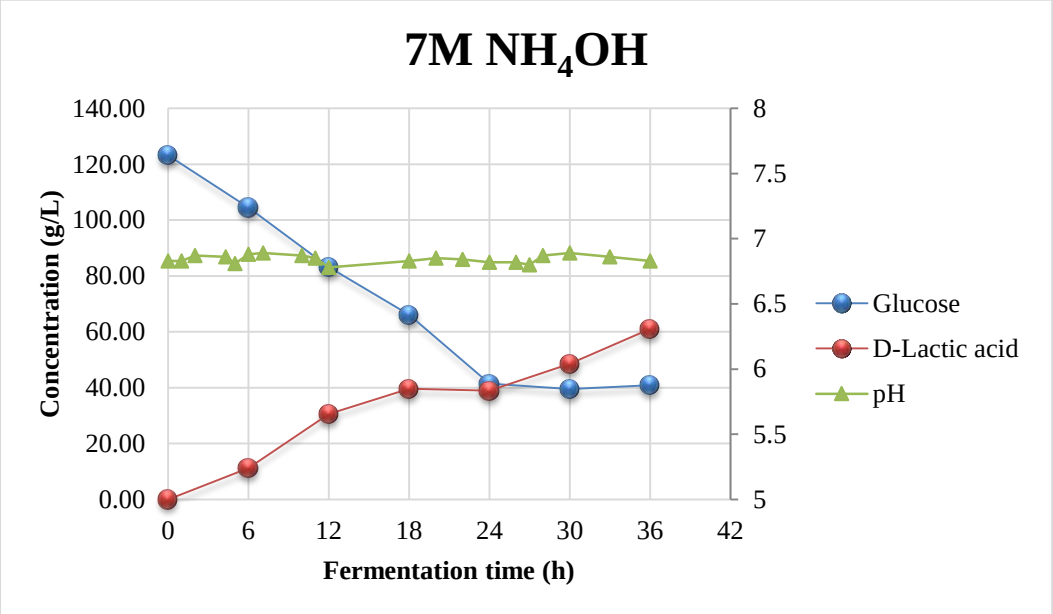
รูปที่ ค.9 กราฟการหมักโดยอัตราการกวน 150 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที



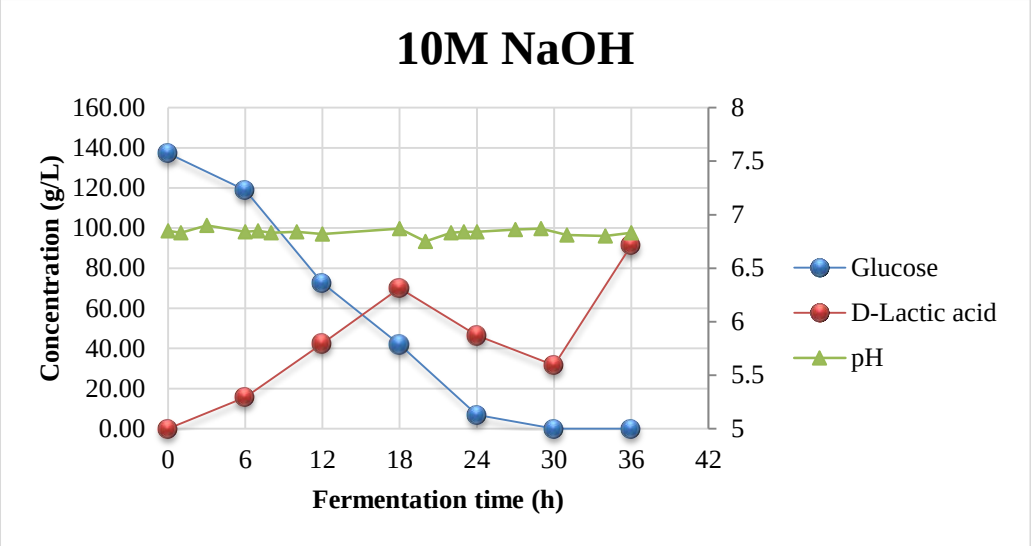
รูปที่ ค.10 กราฟการหมักโดยอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที



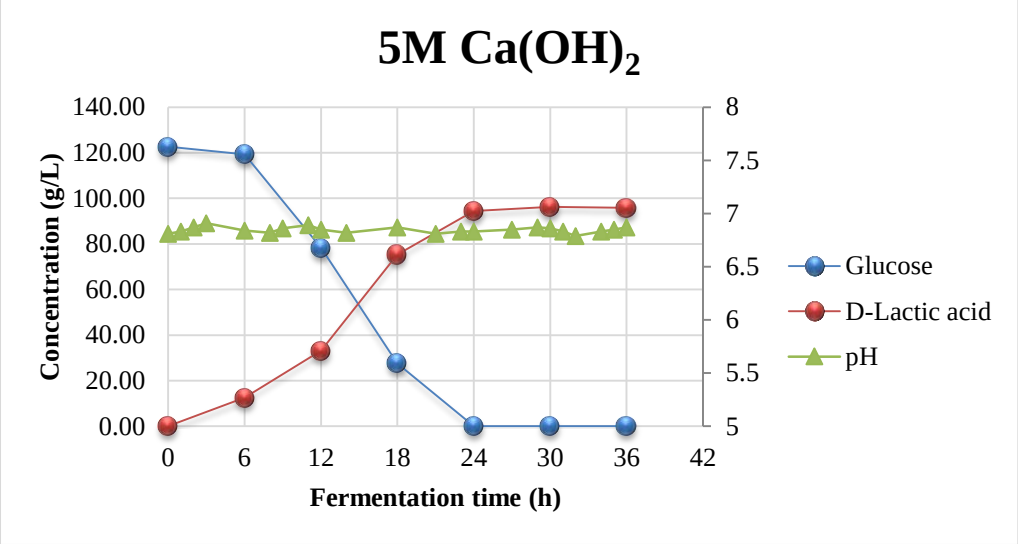
รูปที่ ค.11 กราฟการหมักโดยอัตราการกวน 450 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักต่อนาที



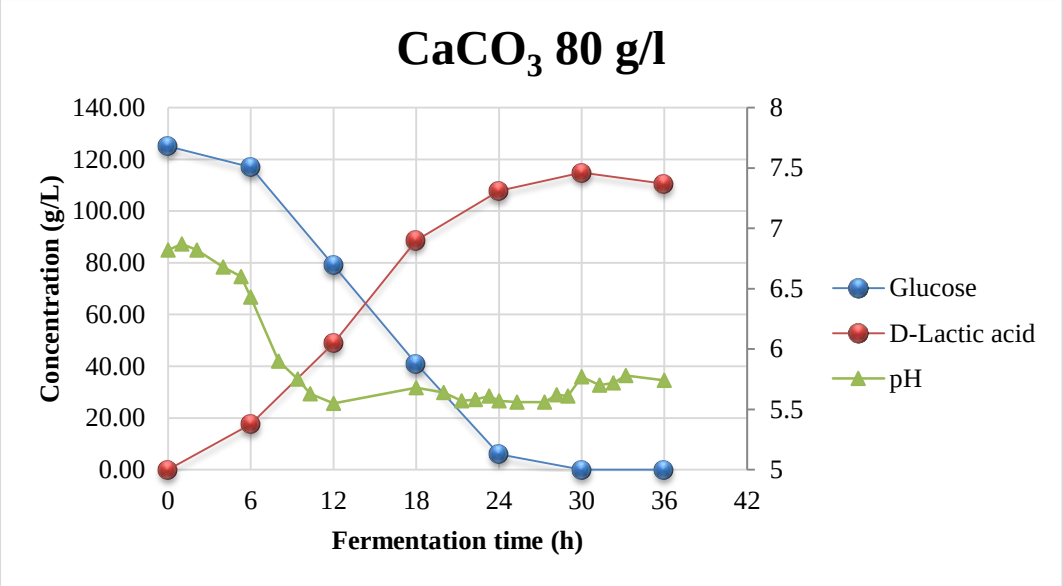
รูปที่ ค.12 กราฟการหมักโดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เป็นด่างควบคุมค่าตวามเป็นกรด-ด่าง



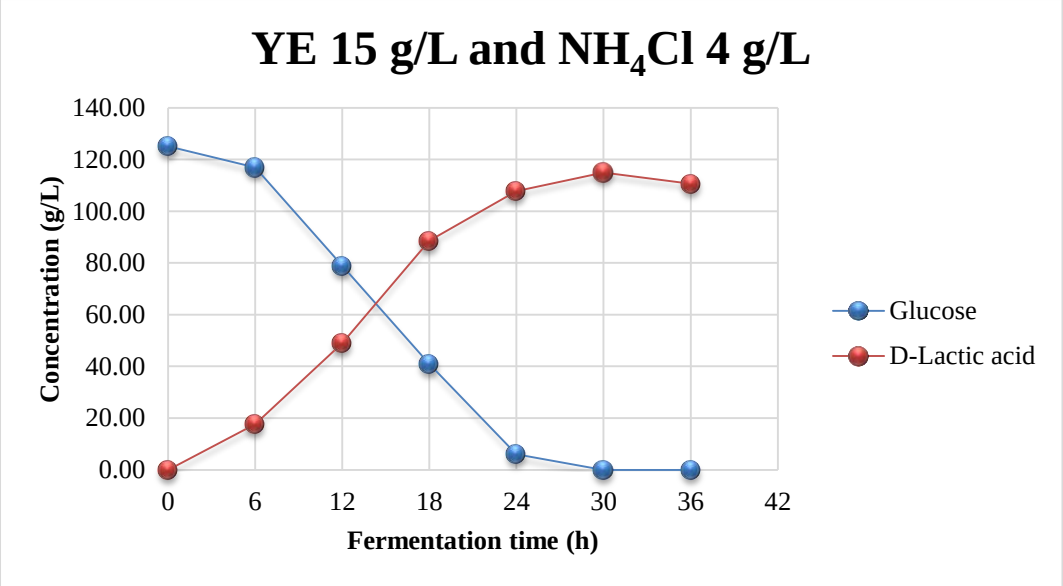
รูปที่ ค.13 กราฟการหมักโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นด่างควบคุมค่าตวามเป็นกรด-ด่าง



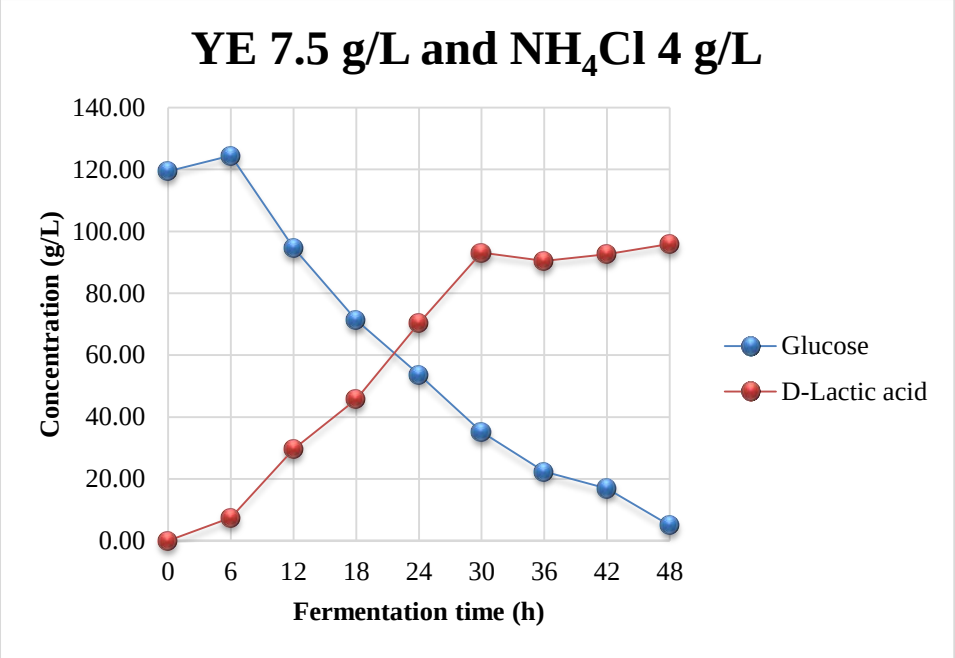
รูปที่ ค.14 กราฟการหมักโดยใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นด่างควบคุมค่าตวามเป็นกรด-ด่าง



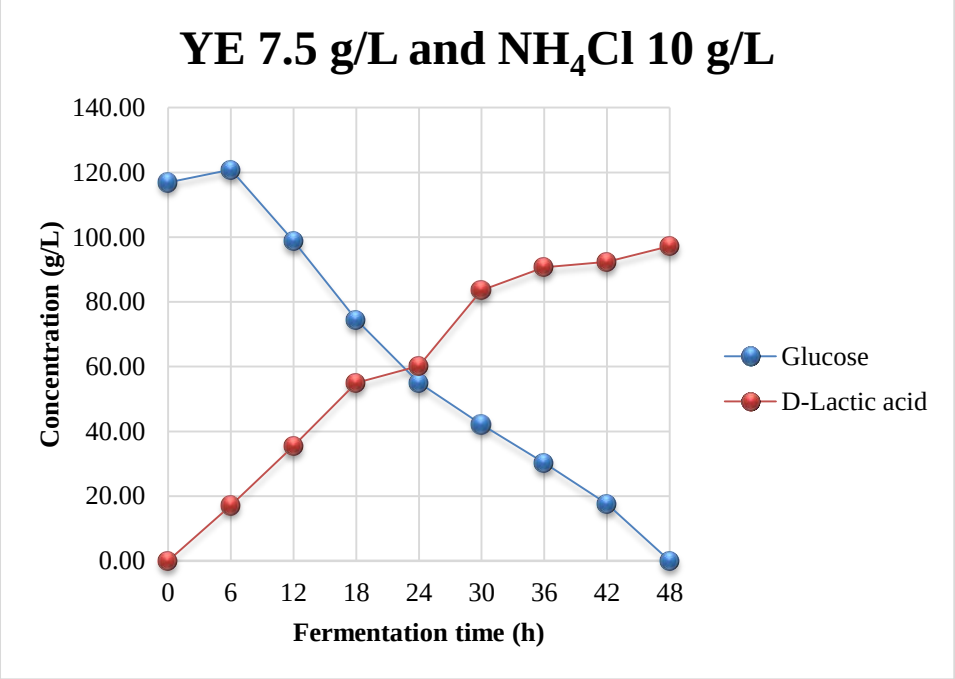
รูปที่ ค.15 กราฟการหมักโดยใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นด่างควบคุมค่าตวามเป็นกรด-ด่าง



รูปที่ ค.16 กราฟการหมักโดยใช้สารสกัดจากยีสต์ 15 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมคลอไรด์ 4 กรัมต่อลิตร

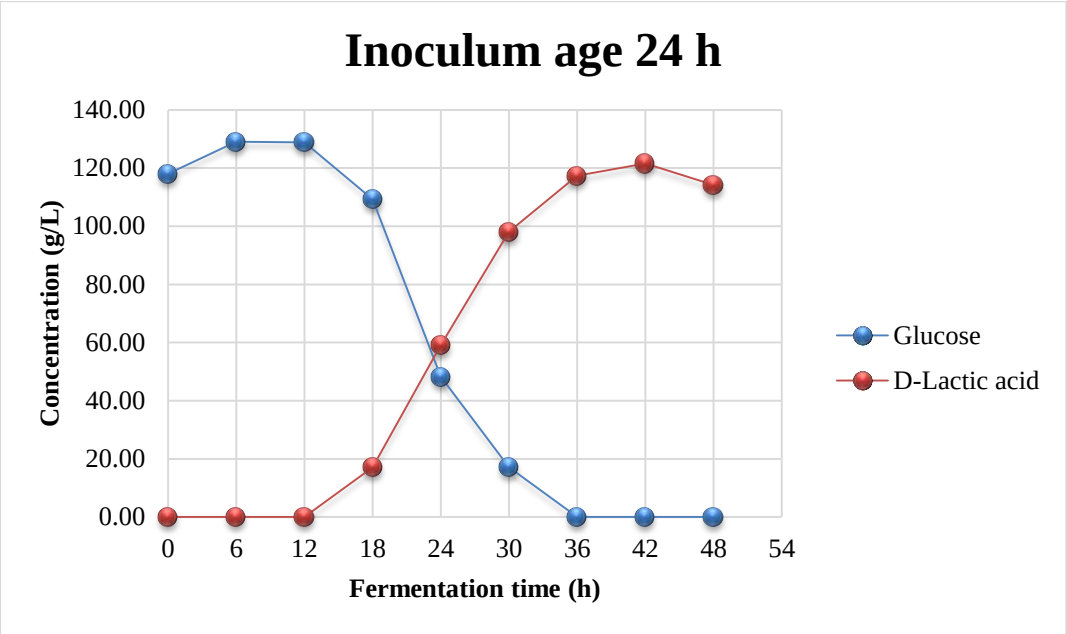


รูปที่ ค.17 กราฟการหมักโดยใช้สารสกัดจากยีสต์ 7.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมคลอไรด์ 4 กรัมต่อลิตร

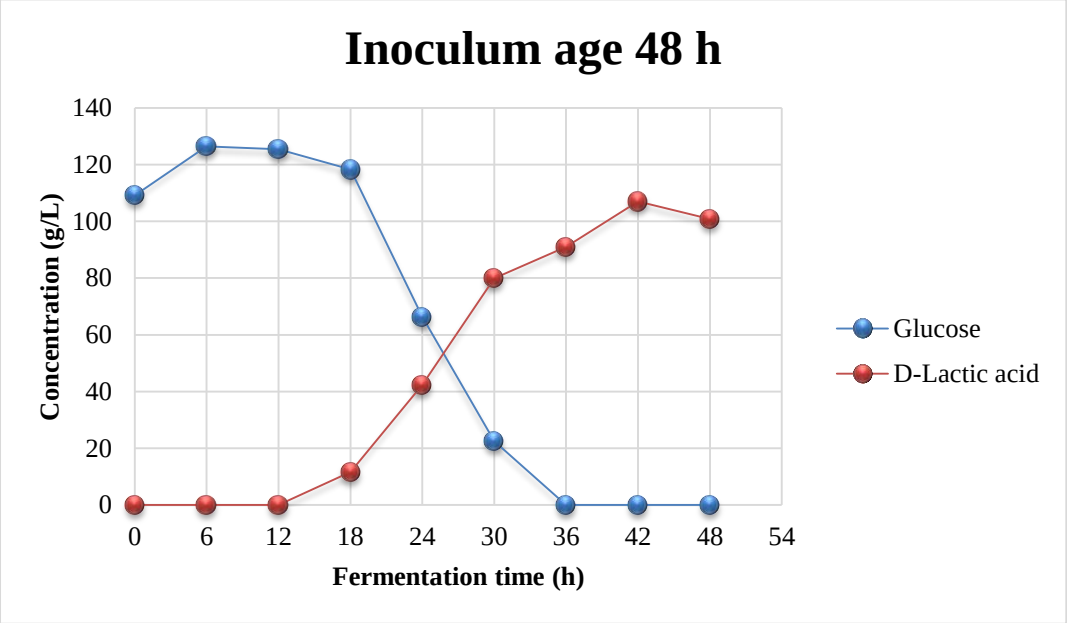


รูปที่ ค.18 กราฟการหมักโดยใช้สารสกัดจากยีสต์ 7.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร

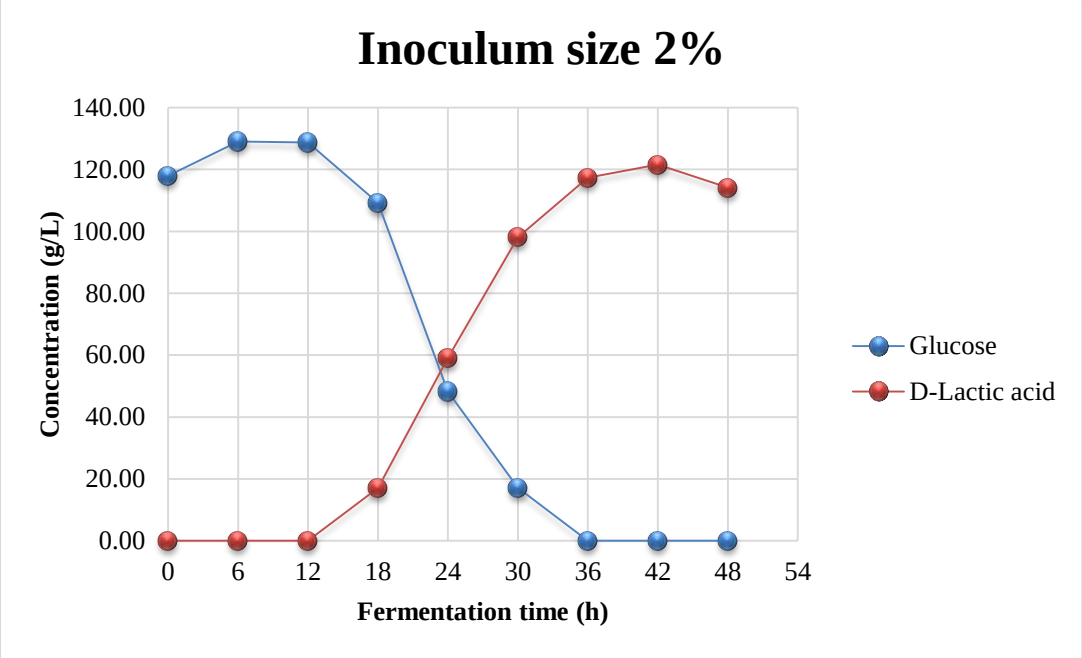
กราฟ Kinetic ของการหมักกรดดี-แล็กติกโดยแบคทีเรีย CU72-1



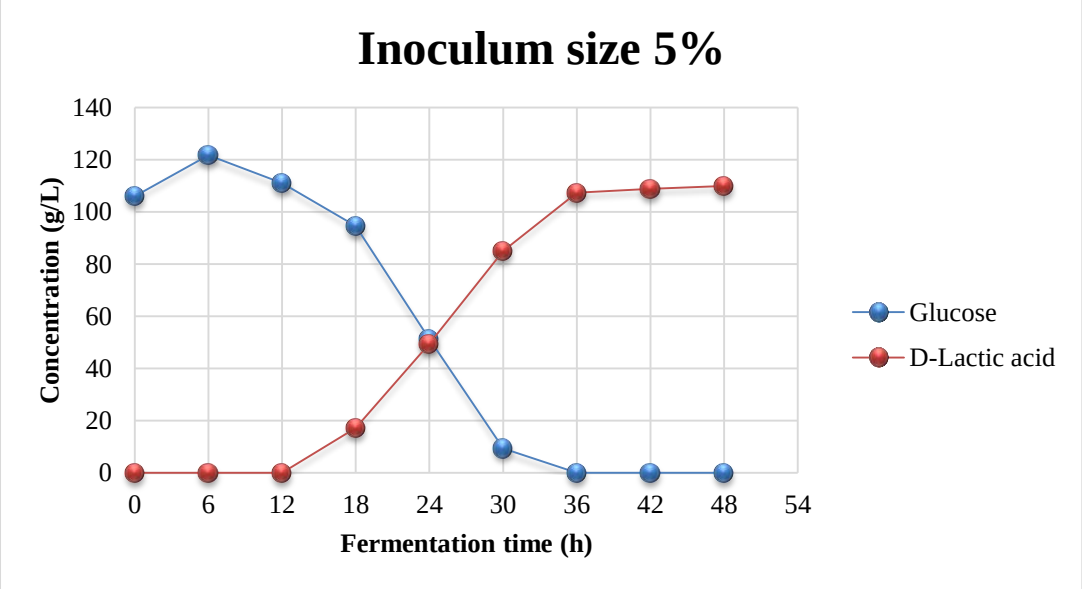
รูปที่ ค.19 กราฟการหมักโดยใช้เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้น 24 ชั่วโมง



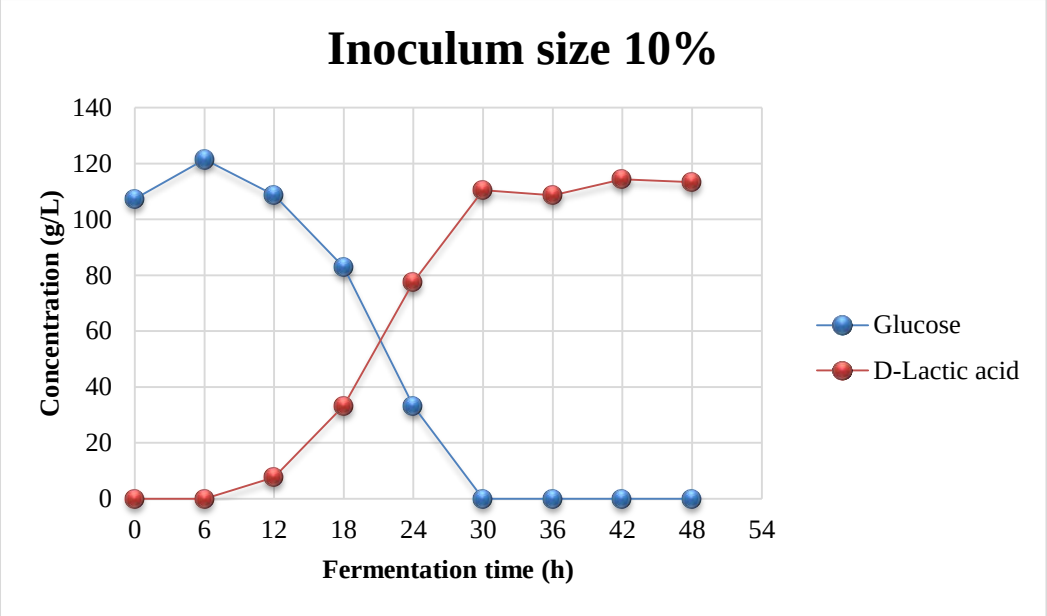
รูปที่ ค.20 กราฟการหมักโดยใช้เวลาในการเลี้ยงหัวเชื้อเริ่มต้น 48 ชั่วโมง



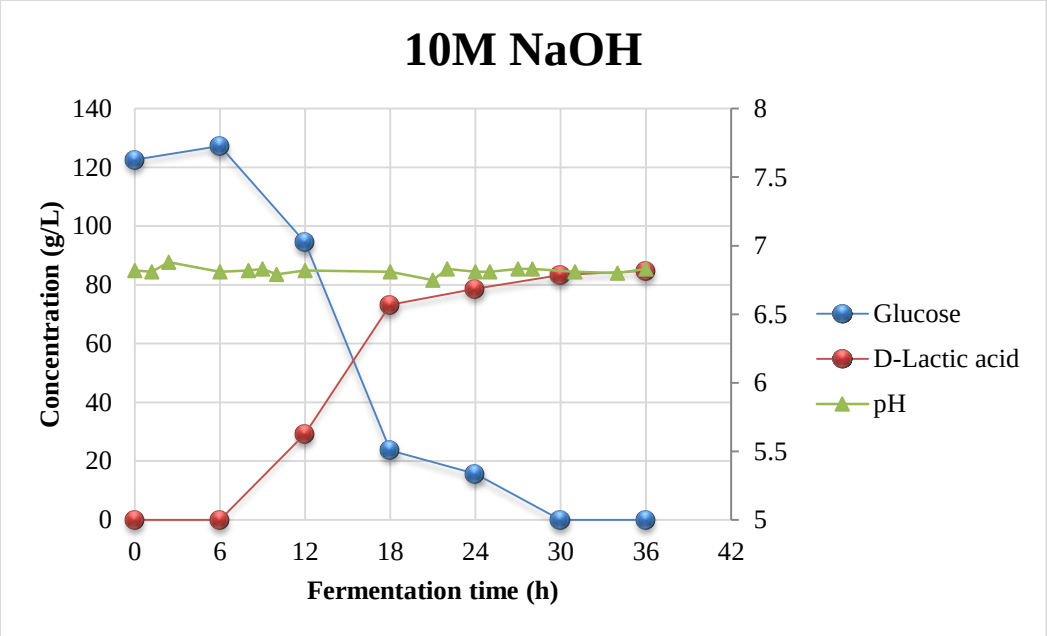
รูปที่ ค.21 กราฟการหมักโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 2 เปอร์เซนต์



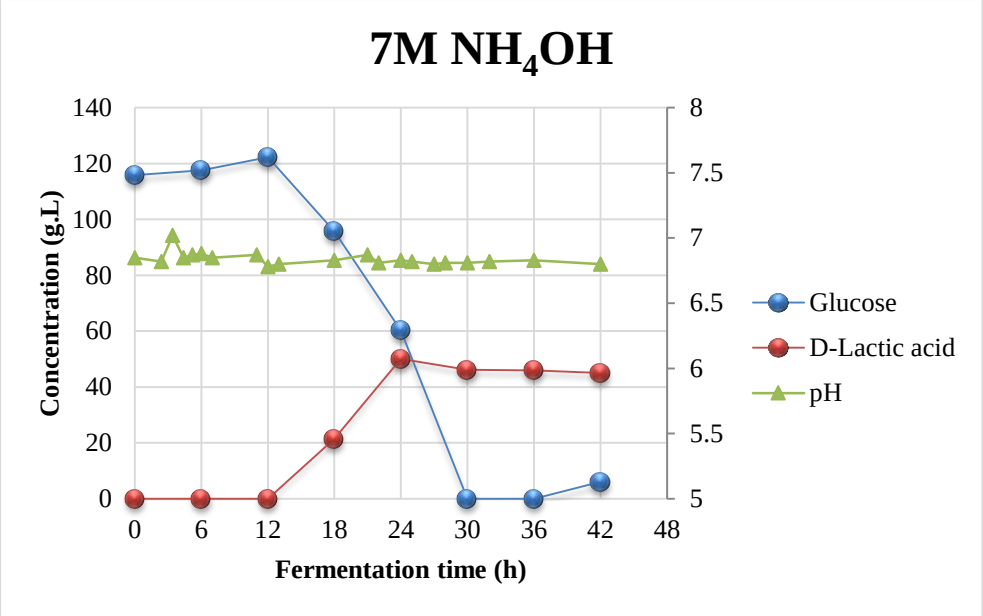
รูปที่ ค.22 กราฟการหมักโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซนต์



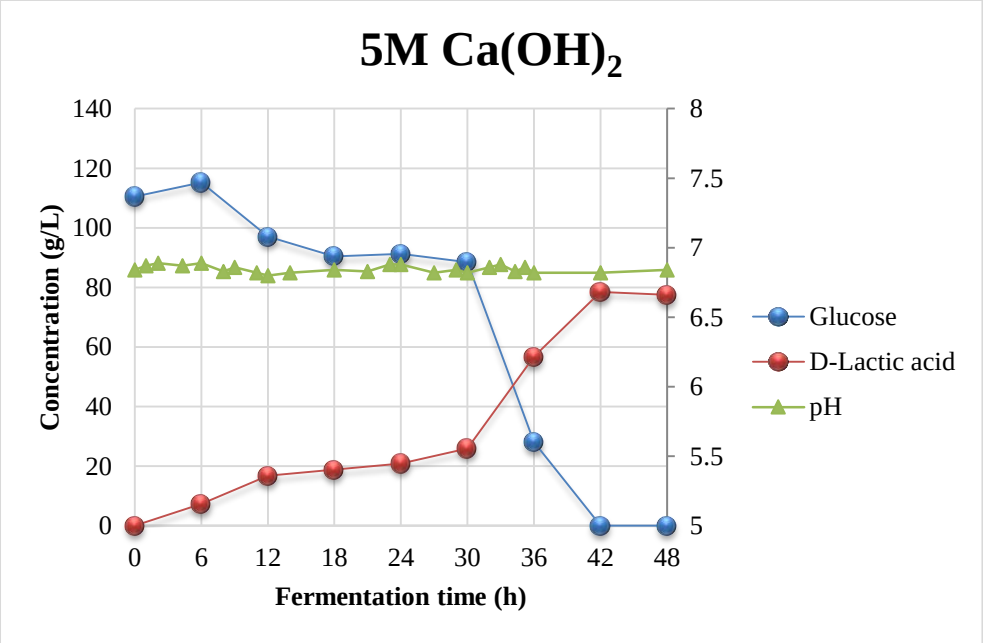
รูปที่ ค.23 กราฟการหมักโดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซนต์



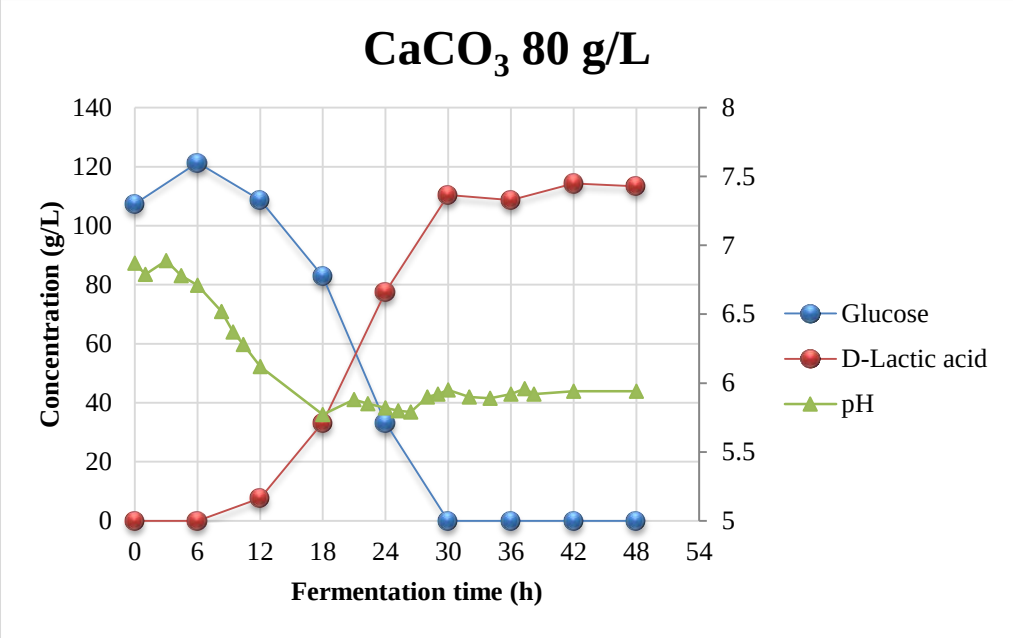
รูปที่ ค.24 กราฟการหมักโดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นด่างควบคุมค่าตวามเป็นกรด-ด่าง



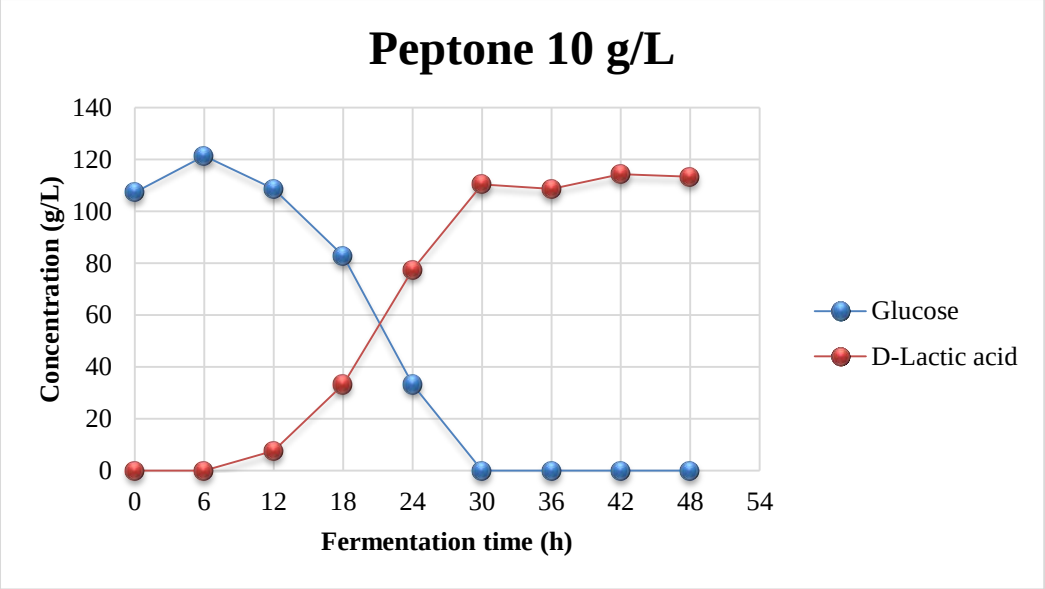
รูปที่ ค.25 กราฟการหมักโดยใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์เป็นด่างควบคุมค่าตวามเป็นกรด-ด่าง



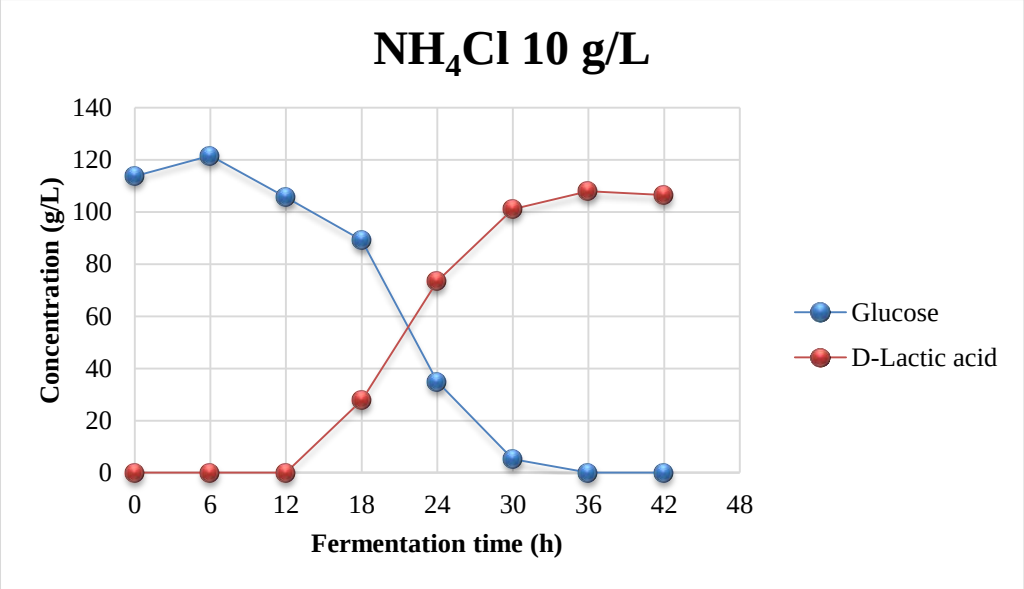
รูปที่ ค.26 กราฟการหมักโดยใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นด่างควบคุมค่าตวามเป็นกรด-ด่าง



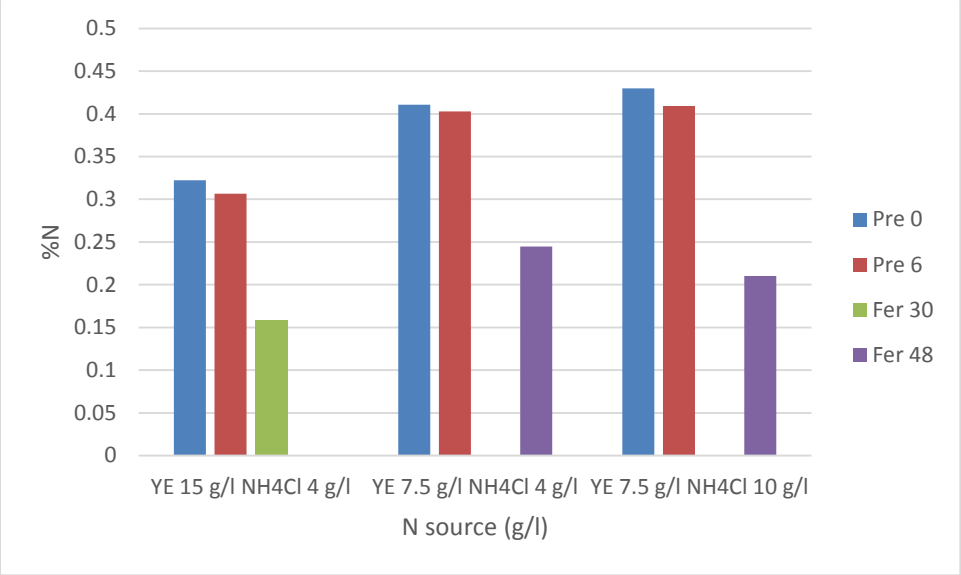
รูปที่ ค.27 กราฟการหมักโดยใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นด่างควบคุมค่าตวามเป็นกรด-ด่าง



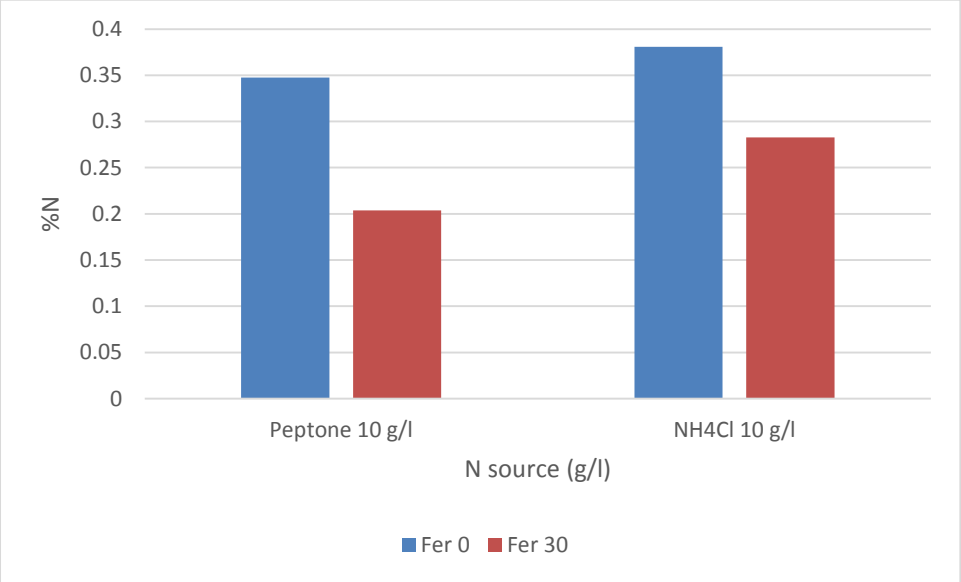
รูปที่ ค.28 ใช้เปปโทน 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนรวมกับสารสกัดจากยัสต์ 20 กรัมต่อลิตร



รูปที่ ค.29 ใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจนรวมกับสารสกัดจากยัสต์ 20 กรัมต่อลิตร



รูปที่ ค.30 แสดงปริมาณไนโตรเจนที่ใช้ไปในกระบวนการหมักในการศึกษาปริมาณไนโตรเจนที่ใช้ของแบคทีเรีย SK5-2



รูปที่ ค.31 แสดงปริมาณไนโตรเจนที่ใช้ไปในกระบวนการหมักในการศึกษาปริมาณไนโตรเจนที่ใช้ของแบคทีเรีย CU72-1

ตารางที่ ค.1 แสดงผลการทดลองทั้งหมดของ *Sporolactobacillus laevolacticus* SK5-2

Flask		Fermentor				Result				
Inoculum age (h)	Inoculum size (%)	Preculture time (h)	Agitation speed (rpm)	Aeration rate (vvm)	Neutralizing agent	Glucose (g/l)	D-lactic acid (g/l)	Yield (g/g glucose)	Productivity (g/l.h)	Optical purity (%)
6	10	5	300	1	$CaCO_3$	124.70	114.00	0.91	3.80	89.01
12	10	5	300	1	$CaCO_3$	122.00	109.00	0.89	3.00	100.00
6	5	5	300	1	$CaCO_3$	120.40	107.90	0.90	3.59	99.67
6	2	5	300	1	$CaCO_3$	127.00	107.00	0.84	4.45	100.00
6	5	3	300	1	$CaCO_3$	123.58	112.34	0.91	3.74	100.00
6	5	6	300	1	$CaCO_3$	125.08	114.93	0.92	3.83	100.00
6	5	6	150	1	$CaCO_3$	128.33	105.34	0.82	3.00	100.00
6	5	6	450	1	$CaCO_3$	120.58	103.51	0.86	4.31	100.00
6	5	6	150	0.5	$CaCO_3$	122.46	105.75	0.86	3.53	100.00
6	5	6	300	0.5	$CaCO_3$	125.20	102.22	0.82	4.25	100.00
6	5	6	450	0.5	$CaCO_3$	117.89	108.50	0.92	3.52	100.00
6	5	6	300	1	$Ca(OH)_2$	122.68	94.30	0.77	3.92	100.00
6	5	6	300	1	NH_4OH	123.17	61.00	0.50	1.69	100.00
6	5	6	300	1	NaOH	137.16	91.44	0.67	2.54	100.00

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8

ตารางที่ ค.2 แสดงผลการทดลองทั้งหมดของ *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *nakayame* CU72-1

Flask		Fermentor			Result				
Inoculum age (h)	Inoculum size (%)	Agitation speed (rpm)	Aeration rate (vvm)	Neutralizing agent	Glucose (g/l)	D-lactic acid (g/l)	Yield (g/g glucose)	Productivity (g/l.h)	Optical purity (%)
24	2	200	-	$CaCO_3$	129.01	117.38	0.91	2.89	100.00
48	2	200	-	$CaCO_3$	126.45	90.98	0.72	2.52	98.92
24	5	200	-	$CaCO_3$	121.76	107.46	0.88	2.98	100.00
24	10	200	-	$CaCO_3$	121.41	110.42	0.91	3.68	100.00
24	10	200	-	$Ca(OH)_2$	110.45	78.50	0.71	1.63	100.00
24	10	200	-	NH_4OH	117.53	46.15	0.39	1.53	100.00
24	10	200	-	NaOH	112.63	83.35	0.74	2.77	96.63

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส, ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.8

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายกล้า จันทนวัลย์ เกิดวันที่ 17 ตุลาคม พ.ศ. 2528 ที่จังหวัดนนทบุรี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ในปีการศึกษา 2550 ต่อมาได้เข้ารับการศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยา ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553

การเสนอผลงานวิจัย

Jantawon, K., Kodama, K. and Thongchul, N. Enchanced production of an optically purified d-lactic in a stirred tank fermentor. The 14thTSAE National Conference and the 6th TSAE International Conference “TSAE 2013”. 1-4 April 2013, Hua Hin Grand Hotel & Plaza, Prachuap Khiri Khan, Thailand.