

ภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลคติกในเฟด-แบคทีเรียโดยการเพาะเชื้อแบบผสม
ของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

นางสาวฐิติมา นุธิรงค์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2554

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.

OPTIMAL CONDITIONS FOR LACTIC ACID PRODUCTION IN FED-BATCH BY
MIXED CULTURES OF LACTIC ACID BACTERIA

Miss Thitima Nuthirong

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติกในเฟด-แบดจ์
	โดยการเพาะเชื้อแบบผสมของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย
โดย	นางสาวจิตติมา นุธิรงค์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. ธนาวดี ลีจากภัย

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธีเนียนัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร. ธนาวดี ลีจากภัย)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธีเนียนัน)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. ชมรณี ตัญเต็มวงศ์)

ฐิติมา นุธิรงค์ : ภาวะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติกในเฟด-แบตช์โดยการเพาะเชื้อแบบผสมของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย.(OPTIMAL CONDITIONS FOR LACTIC ACID PRODUCTION IN FED-BATCH BY MIXED CULTURES OF LACTIC ACID BACTERIA) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ. ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์,อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร. ธนาวดี ลี้จากภัย, 107 หน้า.

ทำการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกจากแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกด้วยการออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียลเพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อผสมระหว่าง *Pediococcus acidilactici* TISTR 783 และ *Lactobacillus halotolerans* TISTR 939 โดยกำหนดปัจจัยอิสระทั้งสิ้นในการทดลองนี้เป็นความเข้มข้นของกลูโคส(20 40 และ 60 กรัมต่อลิตร) ความเข้มข้นของยีสต์สกัด (2.5 7.5 และ 12.5 กรัมต่อลิตร) ค่าพีเอช (5.5 6.5 7.5) และอุณหภูมิ(30 37 และ 45 องศาเซลเซียส) พบว่าปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) คือ ความเข้มข้นของกลูโคสและความเข้มข้นของยีสต์สกัด เมื่อศึกษาด้วยการออกแบบทดลองแบบแฟคทอเรียลและพื้นผิวตอบสนอง วิเคราะห์ความแปรปรวนของสมการพบว่าค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจเท่ากับ 0.95 ($R^2 = 0.95$) ทำนายค่าการผลิตกรดแลกติกสูงสุดจากสมการเป็น 42.29 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้เข้มข้นของกลูโคส 50 กรัมต่อลิตรและเข้มข้นของยีสต์สกัด 8 กรัมต่อลิตร พบว่ามีการผลิตกรดแลกติกตรงตามค่าสมการทำนาย เมื่อผลิตกรดแลกติกด้วยกระบวนการแบบเฟด-แบตช์ในถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร สำหรับการผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมดังกล่าวปริมาตร 1 ลิตร อัตราการกวน 50 รอบต่อนาที ควบคุมค่าพีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ภาวะคงที่ตลอดการทดลอง เมื่อเชื้อเข้าสู่ช่วงปลายระยะเอ็กโปเนนเชียล ชั่วโมงที่ 10 จึงเติมสารละลายความเข้มข้นของกลูโคสจากแป้งมันไฮโดรไลซ์และความเข้มข้นของยีสต์สกัด 800 มิลลิตรให้มีความเข้มข้นของกลูโคสและยีสต์สกัดในอาหารทดลองเป็น 50 และ 8 กรัมต่อลิตร พบว่ามีค่าการผลิตกรดแลกติกเป็น 42.30 กรัมต่อลิตรดังสมการทำนาย

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....
 สาขาวิชา..จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม...ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
 ปีการศึกษา...2554.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5272292323 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS : FACTORIAL DESIGN / LACTIC ACID BACTERIA / LACTIC ACID PRODUCTION / MIXED CULTURE / RESPONSE SURFACE METHODOLOGY

THITIMA NUTHIRONG : OPTIMAL CONDITIONS FOR LACTIC ACID PRODUCTION IN FED-BATCH BY MIXED CULTURES OF LACTIC ACID BACTERIA. ADVISOR : ASSOC. CHARNWIT KOSITANONT,Ph.D., CO-ADVISOR : THANAWADEE LEEJARKPAI,Ph.D., 107 pp.

Factorial design was used in screening for factors that affect lactic acid production by mixed culture of *Pediococcus acidilactici* TISTR 783 and *Lactobacillus halotolerans* TISTR 939 in modified MRS medium using four parameters. These parameters were glucose concentrations (20, 40, 60 g/L), yeast extract concentrations (2.5, 7.5, 12.5 g/L), pH (5.5, 6.5, 7.5) and temperature (30, 37, 45 °C). The results were analyzed using analysis of variance (ANOVA). It was shown that glucose concentration and yeast extract concentration were significant for lactic acid production and the interaction between the two variables was existed ($P < 0.01$). The value of coefficient of determination (R^2) was 0.95, indicated the 95% confident of the model. From the validation experiments, the maximum lactic acid yield of 42.29 g/L was obtained by adding 5 % (w/v) glucose and 8 g/L yeast extract into modified MRS medium .Scaling up to a 2 l bioreactor with working volume of 1 l at agitation rate 50 rpm with the controlled pH of 6.5 and 30 °C. In fed-batch production, at late-exponential phase was at 10th hour,a solution of hydrolyzed starch and yeast extract which was added 800 ml. Concentration of glucose and yeast extract were 50 and 8 g/l respectively in the experiment medium. The lactic acid yield of 42.30 g/L was obtained.

Department : Microbiology..... Student's Signature

Field of Study : Industrial Microbiology..... Advisor's Signature

Academic Year : 2011..... Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ ดร. ธนาวดี ลีจากภัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษาและข้อคิดต่างๆในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน ที่กรุณารับเป็นประธาน ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธานีวัน และรองศาสตราจารย์ ดร.สมรณี ต้อยเต็มวงศ์ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณคณะบัณฑิตวิทยาลัย สหสาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมที่ให้ความเอื้อเฟื้อสถานที่ทำงานวิจัยรวมทั้งเครื่องมือทำงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกและเป็นกำลังใจในการทำวิจัยนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆทุกคนบนภาควิชาจุลชีววิทยาที่ช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้องทุกคนที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจในการทำงานวิจัยตลอดมาจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ณ
 บทที่	
1.บทนำ.....	1
2.วรรณกรรมปริทัศน์.....	3
2.1 ความรู้เบื้องต้นของกรดแลคติก.....	3
2.2 การผลิตกรดแลคติก.....	4
2.2.1 การสังเคราะห์ทางเคมี.....	4
2.2.2 การผลิตโดยจุลินทรีย์.....	5
2.3 การประยุกต์ใช้ทางด้านอุตสาหกรรม.....	6
2.3.1 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม.....	6
2.3.2ด้านการแพทย์.....	6
2.3.3.อุตสาหกรรมพอลิเมอร์.....	6
2.3.4.อุตสาหกรรมอื่น ๆ.....	7
2.4 จุลินทรีย์ผลิตกรดแลคติก.....	7
2.4.1 กรดแลคติกจากการผลิตของรา.....	7
2.4.2 กรดแลคติกจากการผลิตของแบคทีเรีย.....	8
2.5 สกุลของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	11
2.5.1 <i>Lactobacillus</i>	11
2.5.2 <i>Streptococcus</i>	13

	หน้า
2.5.3 <i>Pediococcus</i>	13
2.5.4 <i>Leuconostoc</i>	13
2.5.5 <i>Lactococcus</i>	14
2.5.6 <i>Carnobacterium</i>	14
2.5.7 <i>Enterococcus</i>	14
2.5.8 <i>Tetragenococcus</i>	15
2.5.9 <i>Aerococcus</i>	15
2.5.10 <i>Oenococcus</i>	15
2.5.11 <i>Weissella</i>	15
2.5.12 <i>Vagococcus</i>	15
2.6 วิธีการผลิตกรดแลกติกจากแบคทีเรียสร้างกรดแลกติก.....	16
2.6.1 แบคทีเรียโฮโมเฟออร์เมนส์เททีฟ (Homofermentative bacteria).....	16
2.6.2 แบคทีเรียเฮเทอโรเฟออร์เมนส์เททีฟ (Heterofermentative bacteria)	18
2.7 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์.....	20
2.7.1 เอนไซม์ย่อยโปรตีน (Proteolytic enzyme)	20
2.7.2 เอนไซม์ย่อยสารประกอบลิปิด (Lipolysis)	20
2.7.3 เอนไซม์ย่อยสลายน้ำตาลแลคโตส (Lactose metabolism).....	20
2.7.4 สารแบคทีริโอซิน (bacteriocin)	20
2.8 ปัจจัยการผลิตกรดแลกติกโดยแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก.....	22
2.8.1 สายพันธุ์และการปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์.....	22
2.8.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	22
2.8.3 ตัวกระตุ้นและตัวยับยั้งการผลิตกรดแลกติก.....	25
2.9 การทดลองที่เกี่ยวข้องต่อการผลิตกรดแลกติกโดยแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก	27
2.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	30
2.10.1 การจัดการทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial design)	30
2.10.2 พื้นผิวตอบสนอง (Response surface methology ,RSM)	32

	หน้า
2.10.3 การวิเคราะห์หสัมการถดถอย (Linear regression)	34
2.10.4 การนำหลักการจัดการทดลองแบบแฟคทอเรียล และทฤษฎีพื้นผิว ตอบสนองศึกษาสร้างกรดแลกติกโดยแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก.....	36
3 อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	38
อุปกรณ์.....	38
เคมีภัณฑ์.....	40
วิธีดำเนินงานวิจัย.....	42
3.1 จุลินทรีย์.....	42
3.2 การเก็บรักษา.....	42
3.3 ขั้นตอนการย่อยแป้งมันสำปะหลัง.....	42
3.3.1 การเตรียมแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส.....	42
3.3.2 การเตรียมแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์กลูโคสอะไมเลส....	43
3.4 เตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก.....	43
3.5 คัดเลือกจุลินทรีย์และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก.....	43
3.5.1 ศึกษาการเจริญและประสิทธิภาพการผลิตกรดแลกติกของกล้าเชื้อ เดี่ยว.....	43
3.5.2 ศึกษาการเจริญและประสิทธิภาพการผลิตกรดแลกติกของกล้าเชื้อ ผสม.....	44
3.6 หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดแลกติกในระดับขวดทดลองโดยใช้วิธี ทางสถิติ.....	44
3.7 ผลิตกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร.....	46
3.8 วิธีการวิเคราะห์	46
3.8.1 การหาการเจริญของแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกในการทดลอง.....	46
3.8.2 การหาปริมาณกรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC.....	46
3.8.3 การหาปริมาณกลูโคสที่เหลือด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (Glucose oxidase)	47

	หน้า
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	48
4.1 ผลการศึกษาลักษณะของเชื้อบนอาหารแข็ง MRS.....	48
4.2 ผลการศึกษาลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	49
4.3 คัดเลือกจุลินทรีย์และหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก.....	50
4.3.1 ศึกษาการเจริญและประสิทธิภาพการผลิตกรดแลกติกของกล้าเชื้อเดี่ยว.....	50
4.3.2 ศึกษาการเจริญและประสิทธิภาพการผลิตกรดแลกติกของกล้าเชื้อผสม.....	56
4.4 หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดแลกติกในระดับขวดทดลองโดยใช้วิธีทางสถิติ.....	58
4.5 ผลิตกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร.....	64
4.5.1 การผลิตกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์แบบแบตช์.....	64
4.5.2 การผลิตกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์แบบเฟด-แบตช์.....	65
5 สรุปผลการทดลอง.....	68
รายการอ้างอิง.....	71
ภาคผนวก.....	77
ภาคผนวก ก	78
ภาคผนวก ข	80
ภาคผนวก ค	81
ภาคผนวก ง	87
ภาคผนวก จ	90
ภาคผนวก ฉ	93
ภาคผนวก ช	105
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	107

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คุณสมบัติของกรดแลคติก.....	4
2.2	คุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 12 สกุล.....	10
2.3	การแบ่งกลุ่มของสมาชิกในสกุล <i>Lactobacillus</i>	12
2.4	แสดงการสร้างแบคทีเรียโอสินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก.....	21
2.5	บทบาทของสารขนาดเล็ก (microelement) ต่อการผลิตกรดแลคติก.....	27
2.6	ปริมาณกรดแลคติก และวัตถุดิบในกระบวนการหมักของแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก.....	28
2.7	ผลที่เป็นไปได้ทั้งหมดของ full factorial design.....	31
2.8	เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของ full factorial design.....	32
2.9	ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์และภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกด้วยวิธีการหมัก.....	37
3.1	กำหนดค่าปัจจัยเพื่อออกแบบการทดลองแฟคทอเรียลสำหรับผลิตกรดแลคติก	45
3.2	ออกแบบการทดลองแฟคทอเรียลสำหรับผลิตกรดแลคติกในระดับขวดทดลอง	45
3.3	ชนิดและปริมาณสารทดสอบปริมาณกลูโคสด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส.....	47
4.1	ลักษณะของแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกบนอาหารแข็ง MRS อายุเชื้อ 16 ชั่วโมง	48
4.2	ลักษณะของแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกภายใต้กล้องจุลทรรศน์.....	49
4.3	ปริมาณกรดแลคติกที่ได้จากการออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียลและนำไปใช้ในการสร้างพื้นผิวตอบสนองและค่าทำนายการเกิดกรดแลคติก.....	59
4.4	วิเคราะห์ความแปรปรวน(ANOVA)ของปริมาณกรดแลคติกจากการออกแบบการทดลองแฟคทอเรียล.....	61
ง.1	แสดงปริมาณสารละลายมาตรฐานกรดแลคติกเพื่อทำกราฟมาตรฐาน.....	87
ง.2	แสดงพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานกรดแลคติก.....	89
จ.1	คำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งและ specific growth rate determination ของเชื้อผสมระหว่าง <i>P. acidilactici</i> TISTR 783 และ <i>Lb. halotolerans</i> TISTR 939 ในการผลิตกรดแลคติกในถังปฏิกรณ์แบบแบตช์.....	90

ตารางที่	หน้า	
จ.2	ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและ specific growth rate determination ของเชื้อผสมระหว่าง <i>P. acidilactici</i> TISTR 783 และ <i>Lb. halotolerans</i> TISTR 939 ในการผลิตกรดแลคติกในถังปฏิกรณ์แบบเฟด-แบตช์.....	91
ฉ.1	ค่า OD ₆₆₀ ที่ได้จากการวัดการเจริญของกล้าเชื้อ <i>P. acidilactici</i> TISTR 783 ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 1 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร.....	93
ฉ.2	ค่า OD ₆₆₀ ที่ได้จากการวัดการเจริญของกล้าเชื้อ <i>Lb. halotolerans</i> TISTR 939 ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 1 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร.....	94
ฉ.3	ค่า OD ₆₆₀ ที่ได้จากการวัดการเจริญของกล้าเชื้อ <i>L. lactis</i> TISTR 1401 ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 1 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร.....	95
ฉ.4	ค่า OD ₆₆₀ ที่ได้จากการวัดการเจริญของกล้าเชื้อ <i>P. acidilactici</i> TISTR 783 ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 3 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร.....	97
ฉ.5	ค่า OD ₆₆₀ ที่ได้จากการวัดการเจริญของกล้าเชื้อ <i>Lb. halotolerans</i> TISTR 939 ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 3 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร.....	98
ฉ.6	ค่า OD ₆₆₀ ที่ได้จากการวัดการเจริญของกล้าเชื้อ <i>L. lactis</i> TISTR 1401 ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 3 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร.....	99
ฉ.7	ค่า OD ₆₆₀ ที่ได้จากการวัดการเจริญของกล้าเชื้อ <i>P. acidilactici</i> TISTR 783 ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร.....	101
ฉ.8	ค่า OD ₆₆₀ ที่ได้จากการวัดการเจริญของกล้าเชื้อ <i>Lb. halotolerans</i> TISTR 939 ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร.....	102
ฉ.9	ค่า OD ₆₆₀ ที่ได้จากการวัดการเจริญของกล้าเชื้อ <i>L. lactis</i> TISTR 1401 ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร.....	103
ช.1	ปริมาณกรดแลคติกของกล้าเชื้อ <i>P. acidilactici</i> TISTR 783 ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร.....	105
ช.2	ปริมาณกรดแลคติกของกล้าเชื้อ <i>Lb. halotolerans</i> TISTR 939 ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร.....	106
ช.3	ปริมาณกรดแลคติกของกล้าเชื้อ <i>L. lactis</i> TISTR 1401 ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร.....	106

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	สูตรโครงสร้างทางเคมีของกรดแลกติก.....	3
2.2	กลไกการเกิดกรดแลกติก.....	5
2.3	กระบวนการเกิดกรดแลกติกแบบ homofermentative ของแบคทีเรียผลิตกรด แลกติก.....	17
2.4	กระบวนการเกิดกรดแลกติก แบบ heterofermentative ของแบคทีเรียผลิตกรด แลกติก.....	19
2.5	ลักษณะกลไกการยับยั้งแบบ Feedback inhibition.....	26
2.6	แผนภาพพื้นผิวตอบสนองแบบ 2 มิติ “ contour plot ”	33
2.7	แผนภาพพื้นผิวตอบสนองแบบ 3 มิติ “ Surface plot ”	33
4.1	การเจริญของ <i>P. acidilactici</i> TISTR 783 ใช้ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร.....	50
4.2	การเจริญของ <i>Lb. halotolerans</i> TISTR 939 ใช้ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร.....	51
4.3	การเจริญของ <i>L. lactis</i> TISTR 1401 ใช้ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร.....	52
4.4	เปรียบเทียบปริมาณการผลิตกรดแลกติกของกล้าเชื้อเดี่ยว <i>P. acidilactici</i> TISTR 783 ใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร.....	53
4.5	เปรียบเทียบปริมาณการผลิตกรดแลกติกของกล้าเชื้อเดี่ยว <i>Lb. halotolerans</i> TISTR 939 ใช้ปริมาณ กล้าเชื้อ 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร.....	54
4.6	เปรียบเทียบปริมาณการผลิตกรดแลกติกของกล้าเชื้อเดี่ยว <i>L. lactis</i> TISTR 1401 ใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร.....	55

ภาพที่	หน้า
4.7	เปรียบเทียบปริมาณการผลิตกรดแลกติกของกล้าเชื้อเดี่ยวและกล้าเชื้อผสม อายุเชื้อ 10 ชั่วโมง..... 57
4.8	แผนภาพพื้นผิวตอบสนองของแสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของกลูโคสและ ปริมาณยีสต์สกัดต่อการผลิตกรดแลกติก..... 63
4.9	ผลการเจริญและปริมาณกลูโคสของเชื้อผสมระหว่าง <i>P. acidilactici</i> TISTR 783 และ <i>Lb. halotolerans</i> TISTR 939 ในการผลิตกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์ แบบแบตช์..... 64
4.10	ผลการเจริญและปริมาณกลูโคสของเชื้อผสมระหว่าง <i>P. acidilactici</i> TISTR 783 และ <i>Lb. halotolerans</i> TISTR 939 ในการผลิตกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์ แบบเฟด-แบตช์..... 66
ค.1	กราฟมาตรฐานของกรดแลกติกเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟี ชนิดของเหลวสมรรถนะสูง(HPLC) 81
ค.2	กราฟมาตรฐานกลูโคสเมื่อวิเคราะห์ด้วย Enzyme colorimetric test ; Glucose oxidase reagent..... 82
ค.3	กราฟการเจริญของกล้าเชื้อ <i>P. acidilactici</i> TISTR 783..... 83
ค.4	กราฟการเจริญของกล้าเชื้อ <i>Lb. halotolerans</i> TISTR 939..... 84
ค.5	กราฟการเจริญของกล้าเชื้อ <i>L. lactis</i> TISTR 1401..... 85
ค.6	กราฟการเจริญของกล้าเชื้อผสมระหว่าง <i>P. acidilactici</i> TISTR 783 และ <i>Lb. halotolerans</i> TISTR 939..... 86
ง.1	โครมาโตแกรมของกรดแลกติกความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร..... 87
ง.2	โครมาโตแกรมของกรดแลกติกความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร..... 88
ง.3	โครมาโตแกรมของกรดแลกติกความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร..... 88
ง.4	โครมาโตแกรมของกรดแลกติกความเข้มข้น 0.4 กรัมต่อลิตร..... 88
จ.1	ค่า specific growth rate determination ของเชื้อผสมระหว่าง <i>P. acidilactici</i> TISTR 783 และ <i>Lb. halotolerans</i> TISTR 939 ในการผลิตกรดแลกติกใน ถังปฏิกรณ์แบบแบตช์ 92

ภาพที่		หน้า
จ.2	ค่า specific growth rate determination ของเชื้อผสมระหว่าง <i>P. acidilactici</i> TISTR 783 และ <i>Lb. halotolerans</i> TISTR 939 ในการผลิตกรดแลคติกในถังปฏิกรณ์แบบเฟด-แบตช์.....	92

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

HPLC	=	โครมาโตกราฟีชนิดเหลวประสิทธิภาพสูง
OD ₆₆₀	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร
OD ₅₂₀	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร
MRS	=	de Man Rogosa and Sharpe

บทที่ 1

บทนำ

กรดแลกติกเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีประโยชน์และความต้องการใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิดเพื่อเป็นสารตั้งต้นในการผลิตผลิตภัณฑ์ชนิดอื่น เช่น สารเพิ่มความเปรี้ยวในอาหาร (acidulant) ใช้ในอุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมสิ่งทอ เป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดอินทรีย์ชนิดอื่น ช่วยปรับสมดุลระหว่างกรดต่างในอาหารรวมถึงเป็นสารตั้งต้นในการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ (degradable plastic) เช่น พอลิแลกติกแอซิด ความต้องการของกรดแลกติกจึงมีปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปีซึ่งประเทศไทยยังไม่สามารถผลิตเพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศ

กลุ่มจุลินทรีย์ผลิตกรดแลกติกเป็นหัวใจสำคัญในการผลิตกรดแลกติก นิยมใช้ รา แบคทีเรีย และยีสต์ ผ่านกระบวนการหมักของจุลินทรีย์เหล่านี้เพื่อสร้างกรดแลกติกเป็นสารตั้งต้นในการผลิตทางอุตสาหกรรมหลายชนิด ลดกระบวนการสังเคราะห์โดยวิธีทางเคมีไม่ให้ปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมและย่อยสลายวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีมากพอในประเทศกสิกรรม เพื่อปรับปรุงสารตั้งต้นที่มีในประเทศให้เป็นสินทรัพย์และลดปัญหาขยะทางกสิกรรมได้อีกด้วย

ดังนั้นหากมีการส่งเสริมกระบวนการหมักให้มีประสิทธิภาพที่ดียิ่งขึ้น คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีการผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณสูง เลือกวัตถุดิบในการผลิต รวมถึงนำวิธีการทางสถิติมาประยุกต์ใช้เพื่อส่งเสริมการผลิตกรดแลกติกให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น สามารถช่วยลดต้นทุนและระยะเวลาอันเป็นผลดีต่อการกระบวนการการผลิต

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติก โดยใช้วิธีการสถิติช่วยลดเวลาในการทดลองและทำนายความสามารถในการผลิตกรดแลกติกจากแบคทีเรียเพื่อปริมาณ กรดแลกติกที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสำหรับเป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมต่างๆ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่จำเป็นต่อการผลิตกรดแลกติก
2. เพื่อเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ดีในสภาวะที่กำหนด

3. เพื่อวิเคราะห์ความสามารถของจุลินทรีย์ต่อการผลิตกรดแลกติกเพื่อพัฒนาเป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมต่อไป

ขั้นตอนการวิจัย

1. วิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกจากแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก
2. หาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติก
3. นำวิธีทางสถิติทำนายความสามารถในการผลิตกรดแลกติกจากแบคทีเรีย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

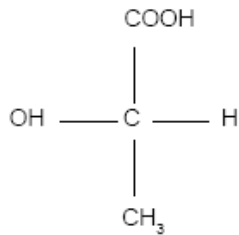
ทราบภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกจากแบคทีเรียอย่างมีประสิทธิภาพเพื่อใช้พัฒนาเป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 2

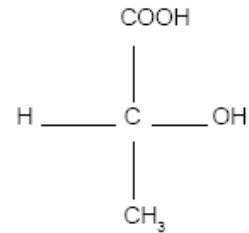
วรรณกรรมปริทัศน์

2.1. ความรู้เบื้องต้นของกรดแลกติก

กรดแลกติก (lactic acid) เป็นกรดอินทรีย์ที่พบทั่วไปในธรรมชาติ โดยพบได้ในมนุษย์ สัตว์ พืช และจุลินทรีย์ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1780 โดยนักเคมีชาวสวีเดน ซึ่งพบในนมเปรี้ยว (Litchfield, 1996) กรดแลกติกมีชื่อทางเคมี 2-hydroxypropanoic acid หรือ 2-hydroxypropionic acid ที่ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) มีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ และมีสูตรโครงสร้างทางเคมี 2 แบบ (optically isomers) ดังนี้



L (+)-lactic acid



D (-)-lactic acid

รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของกรดแลกติก

ที่มา: Ratledge และ Kristiansen (2001)

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของกรดแลกติก

คุณสมบัติ	
Molecular weight	90.08
Melting point, D(-) หรือ L(+)	52.8-54.0 °C
Boiling point, DL	82 °C at 0.5 mmHg 122 °C at 14 mmHg

ที่มา: Vickroy (1985)

นอกจากนี้กรดแลกติกสามารถเกิดผลึกแบบ monoclinic เมื่อมีความบริสุทธิ์สูงที่ไม่มีสี กรดชนิดนี้เมื่อละลายน้ำจะเป็นสีเหลือง และระเหยได้ยากในสารละลายที่มีความเข้มข้นของกรดแลกติกตั้งแต่ 20 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป

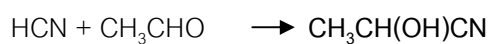
2.2 การผลิตกรดแลกติก

กรดแลกติกสามารถผลิตได้ 2 วิธีคือ การผลิตด้วยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีและการผลิตโดยจุลินทรีย์

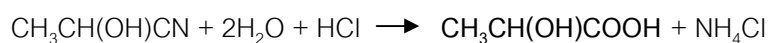
2.2.1 การสังเคราะห์ทางเคมี

การผลิตด้วยวิธีการทางเคมี แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 นำกรดไซยานิกมาทำปฏิกิริยากับแอสिटัลดีไฮด์ ได้เป็นแลกโทไนโทรล ดังนี้

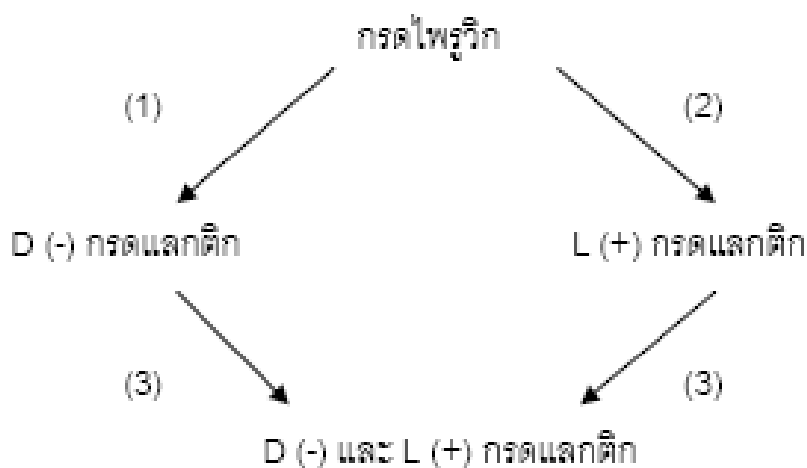


ขั้นตอนที่ 2 นำแลกโทไนโทรลที่ได้มาทำปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสกับกรดเกลือ ได้กรดแลกติกและเกลือแอมโมเนียม ดังนี้



2.2.2 การผลิตโดยจุลินทรีย์

การผลิตกรดแลกติกจากรา นิยมใช้ราตระกูล *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp. เป็นต้น เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตกรดแลกติกแบบ L (+)-lactic acid ปริมาณสูงในขณะที่การผลิตกรดแลกติกจากแบคทีเรียสามารถผลิตได้ทั้งในรูป L (+)-lactic acid D (-)-lactic acid หรือ DL-lactic acid ขึ้นอยู่กับเชื้อจุลินทรีย์มีเอนไซม์ชนิดใดตามภาพ ต่อไปนี้



รูปที่ 2.2 กลไกการเกิดกรดแลกติก

(1) คือ เอนไซม์ D-แลกเตตดีไฮโดรจีเนส (2) คือ เอนไซม์ L-แลกเตตดีไฮโดรจีเนส

(3) คือ เอนไซม์แลกเตตราเซเมส

ที่มา: Vickroy (1985)

จากภาพอธิบายกลไกการเกิดกรดแลกติกจากจุลินทรีย์ทั้ง รา และแบคทีเรีย พบว่ากรดไพรูวิกจะถูกเปลี่ยนเป็น D (-) กรดแลกติก และ L (+) กรดแลกติก โดยเอนไซม์ D-แลกเตตดีไฮโดรจีเนส และ เอนไซม์ L-แลกเตตดีไฮโดรจีเนส ตามลำดับ ซึ่ง D (-) กรดแลกติก และ L (+) กรดแลกติกจะถูกเปลี่ยนเป็น D (-) และ L (+) กรดแลกติก โดยเอนไซม์แลกเตตราเซม (lactamase)

2.3 การประยุกต์ใช้ทางด้านอุตสาหกรรม

ส่วนใหญ่มักพบในอุตสาหกรรมอาหาร แต่ยังมีนอกเหนือจากนั้นกรดแลคติกยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ในอุตสาหกรรมได้หลากหลาย ดังนี้

2.3.1 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

นิยมใช้กรดแลคติกเป็นส่วนประกอบของอาหารและเครื่องดื่มโดยตรงเพื่อปรุงแต่งอาหารและเครื่องดื่มให้เกิดรสเปรี้ยว เพราะให้รสเป็นกรดเล็กน้อย ไม่มีกลิ่นฉุนรุนแรง สามารถป้องกันการเสียของอาหารและเครื่องดื่ม อาจมีการใช้ร่วมกับกรดชนิดอื่นเพื่อให้ประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น เช่น ในน้ำมะเขือเทศมีการเติมกรดแลคติกเพื่อป้องกันการเจริญของ *Lactobacillus coagulan* (Davidson, 1997) หรือในอาหารแปรรูปและผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ด้วย (Vickroy, 1985)

2.3.2 ด้านการแพทย์

กรดแลคติกสามารถนำมาใช้เป็นสารที่ช่วยในการปรับพีเอช และผลิตพลาสติกย่อยสลายทางชีวภาพ(biodegradable) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของกรดแลคติก นำมาประยุกต์ใช้เป็นสารตั้งต้นในการทำเปลือกอ่อน และไหมเย็บแผลชนิดที่ย่อยสลายได้เอง(Laopaiboon *et al.*, 2010)

แม้กระทั่งใช้เป็นสารห้ามเลือดในระหว่างการถอนฟัน นอกจากนี้ ยังใช้ในรูปแบบเกลือของแคลเซียมไตรไฮเดรต (calciumlactate trihydrate) เป็นแหล่งแคลเซียม สำหรับผู้ป่วยที่เป็นโรคขาดแคลเซียม และใช้ในการผลิตยาแก้อักเสบ (anti-inflammatory) ในรูปของเอทิลแลคเตต(ethyl lactate)

2.3.3. อุตสาหกรรมพอลิเมอร์

ใช้กรดแลคติกเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตพอลิแลคเตต (polylactate) โดยใช้กรดแลคติกเป็นสารตั้งต้นในการผลิตไดแลกไทล์ จากนั้นจะถูกพอลิเมอไรซ์เป็นพอลิแลคเตตที่มีคุณสมบัติที่ดีคือ แข็งแรงและทนต่อความร้อน สูง สามารถผนึกปิดได้ด้วยความร้อน นอกจากนี้ยังมีความยืดหยุ่นที่ดี มีความโปร่งแสงที่ดีสามารถรองรับการพิมพ์หลากหลายข้อความ ทนต่อการพบบางรวมถึงป้องกันกลิ่นและรสชาติได้เหมาะต่อการสร้างบรรจุภัณฑ์ นิยมใช้แทนพลาสติกที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีเพื่อเป็นการช่วยรักษาสภาพแวดล้อมได้ (ติยะภรณ์, 2549)

2.3.4. อุตสาหกรรมอื่น ๆ

กรดแลกติกสามารถใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ ได้ในบางส่วน เช่น

อุตสาหกรรมเคมี ผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้แก่ พรอพิลีนไกลคอล (propylene glycol) เอสเทอร์(ester) เป็นต้น (Liu *et al.*, 2006)

อุตสาหกรรมพอกหนัง ใช้กรดแลกติกช่วยละลายและชะสารประกอบจำพวกแคลเซียมออกจากหนังสัตว์ (Rojan *et al.*, 2005)

อุตสาหกรรมสิ่งทอ กรดแลกติกช่วยในการย้อม พิมพ์ลายผ้า (Waites *et al.*, 2001) และ ช่วยทำให้เกิดความเงางามของผ้าไหม และผ้าไหมสังเคราะห์

อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ใช้กรดแลกติกเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) (Rojan *et al.*, 2005)

ทางด้านการเกษตรใช้พอลิแลกเตตเป็นฟิล์มช่วยรักษาความชื้นและความร้อนในดิน (Bozoglu และ Ray, 1996) ควบคุมพีเอชในการผลิตสารเคลือบฟิล์ม (film coating bath) รวมทั้งการผลิตเรซิน ของฟีนอลฟอร์มัลดีไฮด์ (phenol-formaldehyde)

2.4 จุลินทรีย์ผลิตกรดแลกติก

2.4.1 กรดแลกติกจากการผลิตของรา

การผลิตกรดแลกติกจากราดังกล่าวต้องมีภาวะให้อากาศที่ดี เนื่องจากความต้องการอากาศในการเจริญแตกต่างจากแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก (Lactic acid bacteria, LAB) รวมทั้งมีความต้องการสารอาหารน้อยกว่าแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก มีความสามารถในการทนต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง สามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณมาก แต่ปัญหาที่พบในการเลี้ยงมักเกิดการเกาะกันเป็นกลุ่ม (clump) ของราเส้นสาย จำเป็นต้องเลี้ยงในระบบ airlift bioreactor เพื่อป้องกันปัญหาดังกล่าว

รวมทั้งได้มีการปรับปรุงภาวะในการเลี้ยงเพื่อความสามารถในการผลิตกรดแลกติก เช่น มีการผลิตกรดแลกติกที่มีความบริสุทธิ์มากขึ้นเมื่อใช้ *Rhizopus* MK-96-1196 และการเกิด

esterificationของกรดแลกติกด้วย n-butanol เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักดั้งเดิม ซึ่งทำให้ลดปัญหาการยับยั้งจากการเติม CaSO_4 ได้ (Liu *et al.*, 2006)

2.4.2 กรดแลกติกจากการผลิตของแบคทีเรีย

ชนิดของแบคทีเรียสร้างกรดแลกติก

เมื่อใช้ความสามารถในการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียกรดแลกติกชนิดต่างๆมาพิจารณาสามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติกออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ (Axelsson, 1998) ดังนี้

1. กระบวนการโฮโมเฟอร์เมนเทชัน

แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดแลกติกได้ 70-90 เปอร์เซ็นต์ด้วยวิถีไกลโคไลซิส ซึ่งน้ำตาลกลูโคสจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของไพรูเวต และมีเอนไซม์แลกเตตดีไฮโดรจีเนสเปลี่ยนไพรูเวตไปเป็นแลกเตต เรียกแบคทีเรียกรดแลกติกชนิดนี้ว่าแบคทีเรียโฮโมแลกติก (homolactic bacteria) โดยกลูโคส 1 โมล จะได้แลกเตต 2 โมล

มีการใช้น้ำตาลผ่านวิถี Glycolysis (Embden-Meyerhof-Parnas Pathway) ในการหมักและได้กรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายเพียงชนิดเดียว ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่มที่มีกระบวนการแบบ homofermentation ได้แก่ *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* และ *Tetragenococcus*

2. กระบวนการเฮเทโรเฟอร์เมนเทชัน

แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลกติกได้น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้น จะได้เป็นเอทานอล กรดแอซีติก และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์โดยวิถีฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase)

จากการใช้น้ำตาลผ่านวิถี 6-phosphogluconate หรือ phosphoketolase จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายหลายชนิด เช่น เอทานอล อะซิเตท คาร์บอนไดออกไซด์ และกรดแลกติกเป็นแบคทีเรียกรดแลกติก กลุ่มที่มีกระบวนการแบบ heterofermentation ได้แก่ *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* และบางกลุ่มของ *Lactobacillus*

ในการจัดกลุ่มหมวดหมู่ (classification) ของแบคทีเรียกรดแลกติกอาศัย
คุณลักษณะสำคัญต่างๆดังต่อไปนี้เป็นเกณฑ์ในการจัดลำดับหมวดหมู่

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ต่างๆ เช่น รูปร่างของเซลล์และการ
จัดเรียงตัวของเซลล์

กระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส (glucose fermentation) ว่าเป็นชนิด
homofermentation หรือ heterofermentation

ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

การจัดเรียงตัวของกรดแลกติกที่สร้างขึ้นว่าเป็นชนิด D, L หรือทั้งสองชนิด

การอาศัยความแตกต่างของลำดับเบสของ RNA ในไรโบโซม (rRNA) เปรียบเทียบ
ลักษณะเพื่อการจัดจำแนกและใช้ศึกษาถึงความสัมพันธ์กันของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ทำให้สามารถ
จัดแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกได้เป็น 12 สกุล คือ *Aerococcus*, *Carnobacterium*,
Enterococcus, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*,
Tetragenococcus, *Vagococcus*, *Oenococcus* และ *Weissella*

ตารางที่ 2.2 คุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 12 สกุล

ลักษณะการเจริญ	รูปร่างแบบ		รูปร่างแบบกลม							
	ท่อน		Lactoc		Leucon		Streptoc		Tetra	Wei
เจริญ	Ca.	Lb.	Aero.	Ent.	Vagoc.	Oenoc.	Pedioc.	Streptoc	Tetra	Wei
การเรียงตัว	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
CO ₂ จาก	- ^e	±	-	-	-	+	-	-	-	+
กลูโคส										
เจริญที่ 10 ^o ซ	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
เจริญที่ 45 ^o ซ	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
เจริญที่	ND	±	+	+	-	±	±	-	+	±
6.5%NaCl										
เจริญที่ 18%	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
NaCl										
เจริญที่ พีเอช	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
4.4										
เจริญที่ พีเอช	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
9.6										
ลักษณะกรด	L	D,DL,L	L	L	L	D	L,DL	L	L	D,DL
แลกติก										

ที่มา : Axelsson (1998)

หมายเหตุ : + ผลการทดสอบเป็นบวก, - ผลการทดสอบเป็นลบ, ± ผลไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับสายพันธุ์, ND ไม่สามารถระบุได้ แสดงชื่อตัวย่อ ของเชื้อแบคทีเรียตามตารางที่ 2 ดังนี้

Ca.	: <i>Carnobacterium</i>	Vagoc.	: <i>Vagococcus</i>
Lb.	: <i>Lactobacillus</i>	Leucon.	: <i>Leuconostoc</i>
Aero.	: <i>Aerococcus</i>	Oenoc.	: <i>Oenococcus</i>
Ent.	: <i>Enterococcus</i>	Pedico.	: <i>Pediococcus</i>
Lactoc.	: <i>Lactococcus</i>	Streptoc.	: <i>Streptococcus</i>
Tetra.	: <i>Tetragenococcus</i>	Wei.	: <i>Weissella</i>

2.5 สกุลของแบคทีเรียกรดแลคติก

2.5.1 *Lactobacillus*

แบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อนหรือทวงรีเปอร์เซ็นต์ G+C โดยทั่วไปจะต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ต่อโมล พบได้ทั่วไปในแหล่งที่มีคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นสารอาหารหลักที่เชื้อต้องการ เช่น นม รวมถึงในแหล่งธรรมชาติต่างๆ เช่น ในเยื่อเมือกของมนุษย์ สัตว์ พืช แหล่งน้ำทิ้งและในผลิตภัณฑ์อาหารหมักหรืออาหารที่กำลังจะเน่าเสีย

เนื่องจาก *Lactobacillus* เป็นสกุลที่ใหญ่ มีสมาชิกมากมายจึงได้มีการจัดกลุ่มของ *Lactobacilli* ออกเป็น 3 กลุ่มโดยอาศัยหลักเกณฑ์ทางชีวเคมี สรีระวิทยาและความสัมพันธ์ทางพันธุศาสตร์มาใช้ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้

กลุ่ม A : Obligately homofermentative lactobacilli แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะเปลี่ยนน้ำตาลเฮกไซส(C₆)ให้เป็นกรดแลคติกโดยผ่านEmbden-Meyerhof-Pamas(EMP) ได้มากกว่า 85%

นอกจากนี้แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีเอนไซม์ fructose 1,6 bisphosphate-aldolase แต่ไม่มีเอนไซม์ phosphoketolase ดังนั้นจึงไม่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลเพนโทสได้

กลุ่ม B: Facultatively homofermentative lactobacilli แบคทีเรียในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะใช้น้ำตาลเฮกไซส(C₆)ผ่านวิธี EMP ได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลคติก และสามารถผลิตเอนไซม์ทั้ง

fructose 1,6 bisphosphate-aldolase และ phosphoketolase แต่ในภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส เอนไซม์ในวิถี phosphogluconate จะถูกกดไว้

กลุ่ม C : Obligately heterofermentative lactobacilli แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะใช้น้ำตาลเฮกโซสผ่านวิถี phosphogluconate ได้ผลิตภัณฑ์เป็นแลคเตท เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณเท่าๆกัน นอกจากนี้แบคทีเรียก็ยังสามารถใช้น้ำตาลเพนโทสผ่านวิถีนี้ได้เช่นกัน

ตารางที่ 2.3 การแบ่งกลุ่มของสมาชิกในสกุล *Lactobacillus*

สมบัติของ <i>Lactobacillus</i> sp.	กลุ่ม A	กลุ่ม B	กลุ่ม C
หมักน้ำตาลเพนโทส(C ₅)	-	-	+
สร้าง CO ₂ จากกลูโคส	-	-	+
สร้าง CO ₂ จากกลูโคเนท	-	+	+
สร้าง FDP adolase	+	+	-
สร้าง phosphoketolase	-	+	+
ตัวอย่างของกลุ่ม	<i>Lb.</i> <i>acidophilus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. brevis</i>
	<i>Lb. delbruckii</i>	<i>Lb. sake</i>	<i>Lb.</i> <i>buchneri</i>
	<i>Lb. helviticus</i>		<i>Lb. reuteri</i>

ที่มา: Axelsson (1998)

หมายเหตุ : + ผลการทดสอบเป็นบวก, - ผลการทดสอบเป็นลบ

2.5.2 *Streptococcus*

มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8-1.2 ไมครอน มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C อยู่ระหว่าง 34-46 เปอร์เซ็นต์ มักพบอยู่เป็นสายหรือคู่ ไม่สร้างสปอร์และต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนในการเจริญ

ปัจจุบันประกอบด้วย 39 สายพันธุ์ มีหลายชนิดที่พบว่าเป็นปรสิตในมนุษย์หรือสัตว์ บางชนิดเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในผลิตภัณฑ์นม เช่น การทำนมเปรี้ยวและโยเกิร์ต เช่น *Streptococcus thermophilus* และ *S. lactis* เป็นต้น

2.5.3 *Pediococcus*

มีรูปร่างกลมและมีขนาด 0.36-1.43 ไมครอน มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C อยู่ระหว่าง 34-44 เปอร์เซ็นต์ ไม่สร้างสปอร์และแคปซูล มีการแบ่งตัวในลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน โดยแบ่งตัวครั้งที่ 2 ในทิศด้านขวามือของการแบ่งตัวครั้งแรก ทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็นเซลล์ 4 เซลล์ติดกัน (tetrad formation)

เจริญได้ดีในอาหารที่มีสารอาหารอุดมสมบูรณ์ เช่น de Man Rogosa and Sharpe (MRS) ภายใต้ภาวะไร้อากาศ แบคทีเรียจะหมักน้ำตาลกลูโคสได้เป็นกรดแลคติกชนิด DL หรือ L

นอกจากนี้แบคทีเรียยังสามารถใช้น้ำตาลเพนโทส น้ำตาลโมเลกุลคู่และไตรแซคคาไรด์ได้ เช่น อะราบิโนส มอลโทส และมอลโตโทไรโอสตามลำดับ แบคทีเรียในสกุลนี้บางชนิดทำให้เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์และไวน์เสีย ปัจจุบันประกอบด้วยสมาชิก 6 สายพันธุ์

2.5.4 *Leuconostoc*

แบคทีเรียในสกุลนี้มีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* และสกุล *Pediococcus* ในแง่ของสรีระวิทยา รูปร่างของเซลล์ไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับภาวะในการเจริญ สามารถจำแนกได้เมื่อเจริญในน้ำนม เซลล์จะมีรูปร่างกลมและการจัดเรียงตัวแบบเดี่ยว อยู่เป็นคู่หรือสายโซ่สั้นถึงปานกลางมีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C อยู่ระหว่าง 37-40 เปอร์เซ็นต์

ผลิตภัณฑ์กรดแลคติกชนิด D (-) เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์และสารหอมระเหยจากการหมักกลูโคส (glucose fermentation) จึงช่วยสร้างกลิ่น รส ในอาหารหมักดอง บางชนิดสามารถ

สร้างเมือก คือ เด็กซ์แทรน (dextran) ออกมารอบๆผนังเซลล์ได้ จากการศึกษาถึงลำดับเบสของ 16s rRNA แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมร่วมกับ *Lb. confusus*, *Lb. kandleri*, *Lb. viridescens* และ *Leuconostoc mesenteroides* ปัจจุบันมีสมาชิกทั้งหมด 8 สายพันธุ์

2.5.5 *Lactococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสายโซ่ มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G+C อยู่ระหว่าง 34-43 เปอร์เซ็นต์เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม แอนแอโรบ สามารถหมักน้ำตาลแลคโตสในนมให้เป็นกรดแลคติกชนิด L(+) ที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส นิยมใช้เป็นก๊าด้าเชื้อ (starter culture) ในการหมักนมและผลิตภัณฑ์นมอื่นๆ พบได้ในแหล่งต่างๆเช่น ผักกาด ถั่ว หนุ่ย น้ำมันฝรั่งและน้ำมันดิบ จากการศึกษาทางด้านพันธุกรรมพบว่าแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีพลาสมิดที่เกี่ยวข้องกับการใช้แลคโตส เคซีนและซีเทรทในนม ปัจจุบันประกอบด้วยสมาชิก 5 สายพันธุ์

2.5.6 *Carnobacterium*

เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งตรงยาว มักพบอยู่เดี่ยวๆ หรือเป็นคู่และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-0.7 ไมครอนและยาว 1.1-3.0 ไมครอน มีเปอร์เซ็นต์ G+C อยู่ระหว่าง 31.6-37.2 เปอร์เซ็นต์ สามารถหมักน้ำตาลเฮกไซส(C₆)ให้เป็นกรดแลคติกชนิด L(+) เอทานอล กรดอะซิติก และคาร์บอนไดออกไซด์

นอกจากนี้ยังสามารถผลิตอะซิโตอิน (acetoin) หรือกรดฟอรัมิกได้ในปริมาณต่างๆกัน ภายใต้ภาวะที่มีการให้อากาศ แต่ในภาวะที่ไม่มีอากาศ จะมีการผลิตกรดฟอรัมิกเพียงอย่างเดียว ปัจจุบันประกอบด้วยสมาชิก 6 สายพันธุ์

2.5.7 *Enterococcus*

มีรูปร่างเป็นรูปไข่ มักพบว่ามีการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวๆ หรือแบบสายโซ่สั้นๆ มีเปอร์เซ็นต์ G+C อยู่ระหว่าง 37-40 เปอร์เซ็นต์ สร้างกรดแลคติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลัก จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียในสกุลนี้ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนใน

การเจริญ และบางสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสเทียม (pseudocatalase) ได้ ปัจจุบันประกอบด้วยสมาชิก 5 สปีชีส์

2.5.8 *Tetragenococcus*

แบคทีเรียในสกุลนี้แยกตัวออกมาจากสกุล *Pediococcus* (ก่อนหน้านี้นี้คือ *P. halophilus*) โดยมีลักษณะพิเศษคือสามารถเจริญได้ในอาหารที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 18 เปอร์เซ็นต์ และมีลำดับเบสบน 16s rRNA ใกล้เคียงกับแบคทีเรียในสกุล *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าสกุลเดิม

2.5.9 *Aerococcus*

มีลักษณะการแบ่งตัวใกล้เคียงกับ *Pediococcus* มีสองชนิดคือ *A. viridans* และ *A. urinae* ได้รายงานว่า *A. viridans* เป็นสาเหตุให้กุ้งลอบสเตอร์เกิดโรคและเกี่ยวข้องกับเกิดติดแบคทีเรียในมนุษย์ (Vandevoorde et al., 1992)

2.5.10 *Oenococcus*

มีสมาชิกในสกุลนี้เพียงชนิดเดียวคือ *Oenococcus oeni* แยกตัวมาจาก *Leu. Oenos* โดยมีคุณสมบัติการทนกรดและเอทานอลในปริมาณสูงและจากการศึกษาของ พบว่า *Oenococcus* มีลำดับเบสบน 16s rRNA ต่างจากชนิดอื่นๆของ *Leuconostoc* อย่างชัดเจน

2.5.11 *Weissella*

แบคทีเรียในสกุลนี้มีรูปร่างเป็นแบบกลมและแบบท่อนปนกัน มีสมาชิก 7 สายพันธุ์และยังมีลักษณะที่คล้ายคลึงกับ *Leuconostoc* sp.

2.5.12 *Vagococcus*

เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกเพียงชนิดเดียวที่เคลื่อนที่ได้ ปัจจุบันมีสมาชิกอยู่ 2 ชนิดคือ *Vagococcus fluvialis* และ *V. salmoniarum* ซึ่งเป็นชนิดที่แยกได้จากปลาแซลมอน

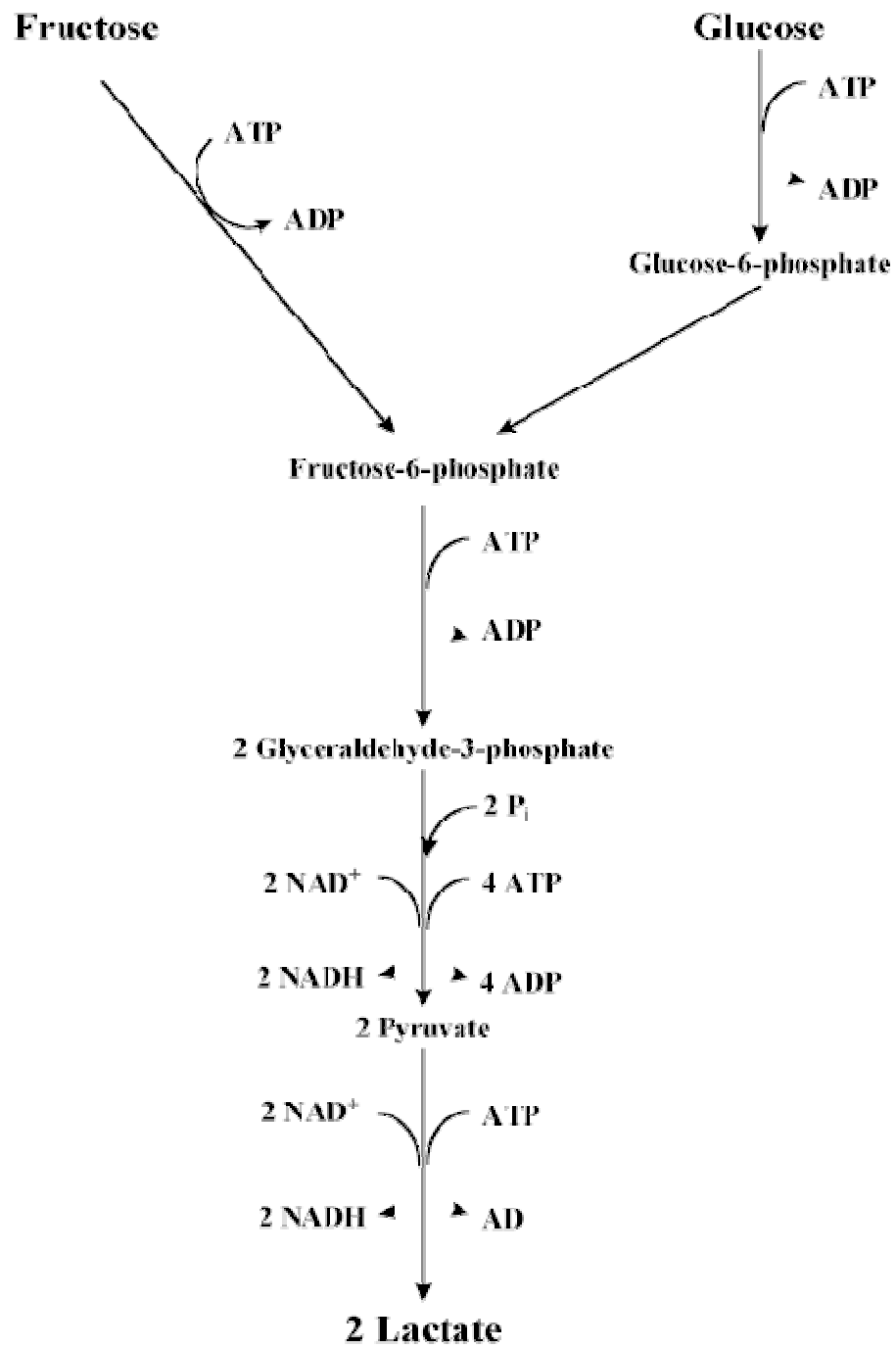
2.6 วิธีการผลิตกรดแลกติกจากแบคทีเรียสร้างกรดแลกติก

วิธีการผลิตกรดแลกติกจากแบคทีเรียสร้างกรดแลกติก เป็นกระบวนการหมักกรดแลกติก โดยทั่วไป มีแหล่งที่มาจากจุลินทรีย์จากธรรมชาติ แต่ในบางครั้งทางโรงงานอุตสาหกรรมจะมีการคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียเพื่อให้ได้คุณสมบัติตามต้องการ สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการในกระบวนการหมักกรดแลกติกได้จากค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำ

2.6.1 แบคทีเรียโฮโมเฟอร์เมนต์เททีฟ (Homofermentative bacteria)

เป็นการนำน้ำตาลแลคโตสเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียกรดแลกติกโดยอาศัยกลไกและเอนไซม์ที่อยู่ในบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ที่เรียกว่า Phosphoenol Pyruvate Dependent Phosphotransferase System (PEP-PTS) เกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟตของ Phosphoenol Pyruvate ในกระบวนการไกลโคไลซิส Lactose phosphate จะถูกเอนไซม์ phospho-β-galactosidase ย่อยเป็น Galactose-6-phosphate กับกลูโคส ซึ่งกลูโคสจะผ่านเข้าสู่กระบวนการต่างๆของ Embden-Meyerhof-Parnas Pathway (EMP Pathway)

น้ำตาลกลูโคสสามารถเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียกรดแลกติกโดยอาศัยเอนไซม์PEP-PTS ทำให้กลูโคสอยู่ในรูป Glucose-6-phosphate ซึ่งจะเข้าสู่วิถีEMP ได้เป็นแลคเตทในที่สุด ส่วนน้ำตาลกาแลคโตสจะสามารถซึมผ่านเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ได้เลย หลังจากถูกเติมหมู่ฟอสเฟตโดยเอนไซม์Galactokinase ได้เป็น Galactose-1-phosphate แบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่มีกระบวนการหมักแบบนี้ได้แก่ *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei* และ *Lb. plantarum*

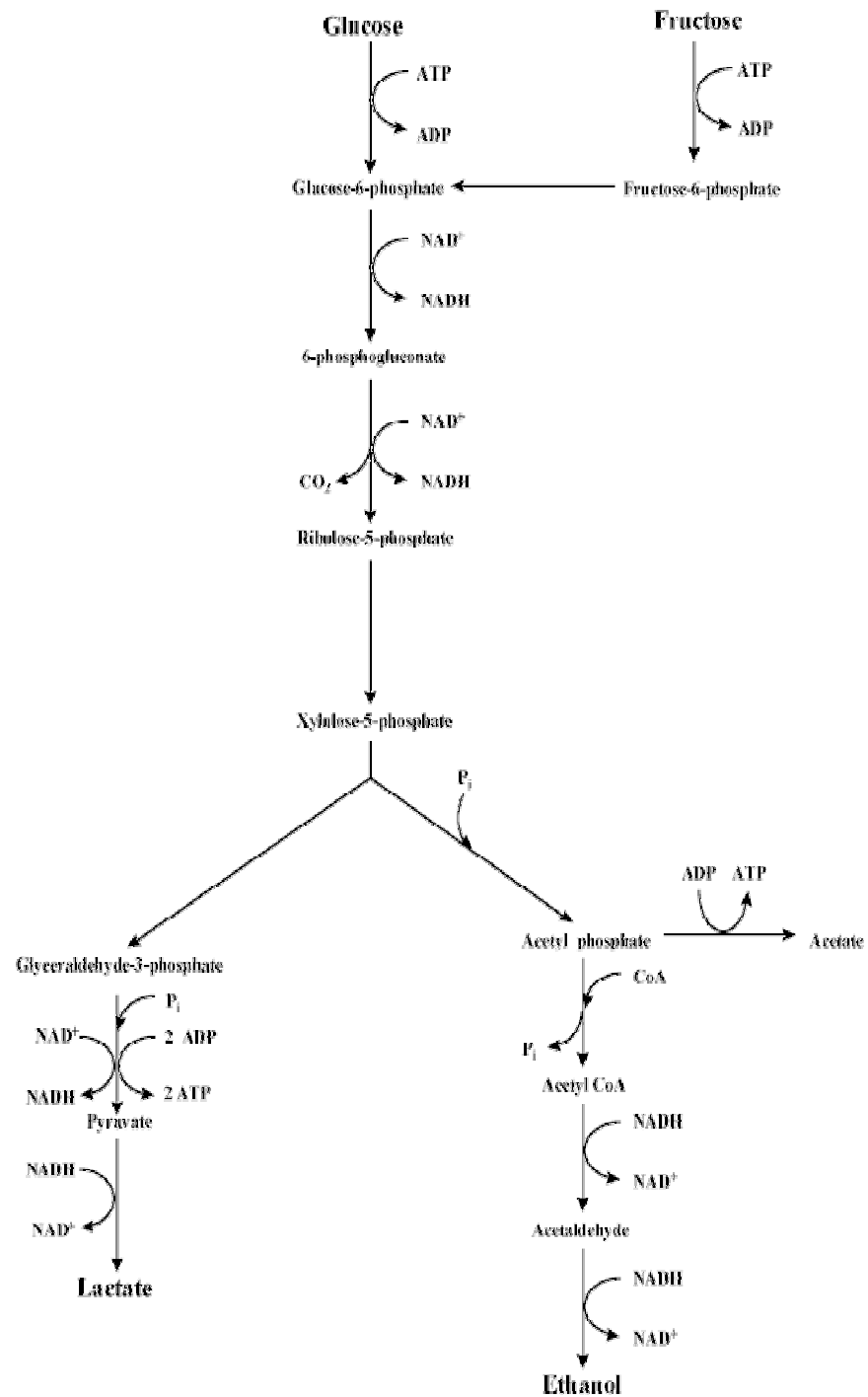


รูปที่ 2.3 กระบวนการเกิดกรดแลกติกแบบ homofermentative ของแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก

ที่มา : ดัดแปลงจาก Wee *et al* (2006)

2.6.2 แบคทีเรียเฮเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ (Heterofermentative bacteria)

เป็นกระบวนการเกิดกรดแลกติก และผลิตภัณฑ์อื่นร่วมด้วยเช่น กรดอะซิติก เอทานอล และ คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น โดยแบคทีเรียในกลุ่ม heterofermentation แบคทีเรียกรดแลกติกในกลุ่มนี้ จะไม่มีเอนไซม์ Aldolase ซึ่งเป็นเอนไซม์หนึ่งในกระบวนการ Glycolysis จึงต้องออกซิไดซ์ Glucose -6-phosphate ได้เป็น 6-phosphogluconate จากนั้นเกิดปฏิกิริยากำจัดหมู่คาร์บอกซิล (decarboxylation) จะแตกตัวเป็น Triose-phosphate และ Acetyl phosphate โดยเอนไซม์ phosphoketolase โดยที่ Triose phosphate จะเปลี่ยนเป็นแลคเตทได้ ส่วน acetyl phosphate จะเปลี่ยนเป็น อะซีตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) และเอทานอล นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลกติกอาจใช้กระบวนการอื่น ๆ ในการสร้างผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และ กรีเซอรอล เป็นต้น แบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่มีกระบวนการหมักแบบนี้ ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides*



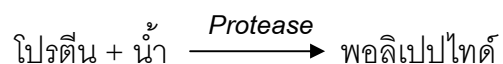
รูปที่ 2.4 กระบวนการเกิดกรดแลกติก แบบ heterofermentative ของแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก

ที่มา : ดัดแปลงจาก Wee *et al* (2006)

2.7 ความสามารถในการสร้างเอนไซม์

2.7.1 เอนไซม์ย่อยโปรตีน (Proteolytic enzyme)

สารประกอบของโปรตีนสามารถแตกพันธะเปปไทด์ (peptide) ผ่านกระบวนการแตกตัวของน้ำ(hydrolysis) ดังนี้



2.7.2 เอนไซม์ย่อยสารประกอบลิปิด (Lipolysis)

สารประกอบของไขมันสามารถแตกพันธะลิปิด (lipid) เกิดเป็น กรดไขมันและกลีเซอรอล ดังนี้



2.7.3 เอนไซม์ย่อยสลายน้ำตาลแลคโตส (Lactose metabolism)

แบคทีเรียสามารถผลิต β - galactosidase , glycolases และ lactate dehydrogenase (LDH) ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงสารประกอบของน้ำตาลแลคโตส เอนไซม์ดังกล่าวทำหน้าที่สร้างกรดแลคติก เพิ่มการตกตะกอนของโปรตีนจากการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้หลักของ isoelectric point(pI)มีค่าเท่ากับความเป็นกรด-ด่างของสิ่งแวดล้อมภายนอก แก๊ซของค้ประกอบอนุภาคแคลเซียม ฟอสฟอรัสและเหล็กในสารตั้งต้น โดยเฉพาะน้ำนม และเป็นแหล่งสร้างพลังงานในกระบวนการหายใจ

2.7.4 สารแบคทีริโอซิน (bacteriocin)

แบคทีริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก นับเป็นคุณลักษณะที่ดีในการป้องกันการบุกรุกของแบคทีริโอไฟจัส(bacteriophage) เสริมความแข็งแรงในการเจริญโดยปราศจากสิ่งรบกวนซึ่งส่งผลต่อการตายของกล้าเชื้อ (stater culture) แบคทีเรียผลิตกรดแลคติกสามารถสร้างแบคทีริโอซินนี้ได้เฉพาะชนิด ดังนี้

ตารางที่ 2.4 แสดงการสร้างแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตภัณฑ์

แบคทีเรียผลิตภัณฑ์	แบคเทอริโอซิน
<i>L. acidophilus</i>	Acidolin
<i>L. acidophilus</i>	Acidophilin
<i>L. acidophilus</i>	Lactacin B
<i>L. acidophilus</i>	Lactacin F
<i>L. bulgaricus</i>	Bulgarin
<i>L. plantarum</i>	Plantaricin SIK-83
<i>L. plantarum</i>	Plantaricin A
<i>L. plantarum</i>	Lactolin
<i>L. plantarum</i>	Plantaricin B
<i>L. helveticus</i>	Lactolin 27
<i>L. helveticus</i>	Helveticin J
<i>L. reuteri</i>	Reuterin
<i>L. brevis</i>	Lactobrevin
<i>L. brevis</i>	Lactobacillin

ที่มา: Vandevoorde *et al.*, 1992

ส่วนใหญ่มักพบการสร้างแบคเทอริโอซินนี้ใน *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Streptococcus*

แบคเทอริโอซินที่รู้จักทั่วไปคือ nisin จาก *Lactococcus lactis* สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค *Listeria* sp. เช่น nisin A, sakacin A, และ carnobacteriocin BM1 (Martinez-Cuesta *et al.*, 2000)

2.8 ปัจจัยการผลิตกรดแลกติกโดยแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก

2.8.1 สายพันธุ์และการปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์

สายพันธุ์มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกที่เหมาะสมในการเจริญในภาวะต่างๆ พัฒนาแบคทีเรียทนต่อการเปลี่ยนแปลงค่ากรด-ด่าง เนื่องจากต้องการพัฒนาแบคทีเรียที่เลี้ยงยากให้สามารถเจริญได้ดี ทนต่อค่ากรด-ด่างที่ต่ำ

มีการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมได้ง่ายเพื่อสะดวกต่อการปรับปรุงสายพันธุ์ และมีการเจริญอย่างรวดเร็วจากการกลายพันธุ์ของ *Lactobacillus delbueckii* ที่เลี้ยงยาก (fastidious microorganism) ร่วมกับ *Bacillus amyloliquefaciens* โดยกรดไนตริก เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบส สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสร้างกรดแลกติกแบบ L-form ได้ และลดความต้องการอาหารเพิ่มเติม (Rojan et al.,2005)

2.8.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อมีส่วนประกอบที่ส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดมีความเหมาะสมต่อจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน เนื่องจากมีความต้องการสารอาหารที่ต่างกัน ตลอดจนความเหมาะสมของภาวะการเลี้ยงแบคทีเรีย มีการศึกษาปัจจัยของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุและวิตามิน ในอาหารได้ดังนี้

- แหล่งคาร์บอน

เนื่องจากแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกสามารถใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลได้หลากหลาย จึงได้มีการศึกษาหาแหล่งน้ำตาลที่สามารถทดแทนการใช้กลูโคสที่มีราคาแพง เป็นสารตั้งต้นที่ให้ราคาถูกตามวัตถุประสงค์ต่างๆ โดยเฉพาะจากผลผลิตทางกลีกรรม

มีการใช้น้ำแป้งเป็นสารตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถทดแทนกลูโคสเพื่อสร้างกรดแลกติกได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Guyot et al., 2000) เช่น *Lb. amylophilus* JCM 1125 ผลิตกรดแลกติกได้ 53.4 กรัมต่อลิตร จากความเข้มข้นของน้ำแป้ง 100 กรัมต่อลิตร (Yumotoและ Ikeda, 1995)

Lb. plantarum NCIM 2084 ผลิตรวดแลกดิกได้ 72.9 g/L เมื่อใช้ ความเข้มข้นของน้ำแป้ง 100 กรัมต่อลิตร (Krishnan *et al.*, 1998) เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาข้างต้นของ *Lb. amylophilus* JCM 1125 พบว่าการใช้แบคทีเรียต่างสายพันธุ์ระหว่างการทดลองกันย่อมส่งผลต่อการใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตรวดแลกดิกได้ปริมาณแตกต่างกัน

Lb. amylophilus NRRL B4437 ผลิตรวดแลกดิก 29 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของน้ำแป้ง ข้าวโพด 45 กรัมต่อลิตร และ *L. amylovorus* สามารถผลิตรวดแลกดิกได้ 92.5 กรัมต่อลิตร จากน้ำแป้ง 120 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบ submerged fermentation (Mercier *et al.*, 1992)

Lb. delbrueckii NCIM 2025 และ *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23842 ที่สร้างเอนไซม์อะไมเลส (amylase) ร่วมกัน ใช้ น้ำแป้ง (ความเข้มข้นของแป้ง 50 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) จะมีการเติมอาหารเพียงเล็กน้อยแต่สามารถผลิตรวดแลกดิก 40 กรัมต่อลิตร (John *et al.*, 2008) แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการส่งเสริมซึ่งกันและกันเพื่อความอยู่รอด

การใช้น้ำแป้งเป็นสารตั้งต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถทดแทนกลูโคสเพื่อสร้างกรวดแลกดิกได้ อย่างมีประสิทธิภาพ (Guyot *et al.*, 2000) โดย *L. amylophilus* NRRL B4437 ผลิตรวดแลกดิก 29 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของน้ำแป้งข้าวโพด 45 กรัมต่อลิตร และ *L. amylovorus* สามารถผลิตรวดแลกดิกได้ 92.5 กรัมต่อลิตร จากน้ำแป้ง 120 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบ submerged fermentation (Mercier *et al.*, 1992)

นอกจากนี้ ของเหลือทิ้งจากการเกษตรสามารถทดแทนการใช้กลูโคสที่มีราคาแพง เพื่อต้นทุนการผลิตที่ลดลง พร้อมทั้งลดปัญหาการเกิดความเข้มข้นสูงของกลูโคสที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ส่งผลต่อการผลิตรวดแลกดิกได้ เช่น ลิกโนเซลลูโลสที่ย่อยแล้ว (lignocelluloses hydrolyzates) หรือเฮมิเซลลูโลสที่ย่อยแล้ว (hemicellulose hydrolyzates) ชังข้าวโพด (corn cob) และ ก้านข้าวโพด (corn stalks) กากน้ำตาลจากหัวบีท (beet molasses) ชานอ้อยคั้นน้ำบดละเอียด (sugarcane press mud) (Xavier และ Lonsane, 1994) กากมันสำปะหลัง (cassava bagasse) (Rojan *et al.*, 2005) เซลลูโลส (cellulose) น้ำล้างจากกากน้ำตาล (molasses spent wash) เส้นใยข้าวโพดที่ย่อยแล้ว (corn fiber hydrolyzates) (Saha และ Nakamura, 2003) และ รำข้าวสาลี (wheat bran) (Naveena *et al.*, 2005)

การใช้วัตถุดิบที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบจำเป็นต้องมีการย่อยแป้ง(saccharification) เพื่อให้เกิดอนุพันธ์ของน้ำตาลเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ แต่จะเสียเวลาในการทำปรับปรุงวัตถุดิบก่อนการหมัก(pre-treatment) จึงมีแนวคิดว่าแบคทีเรียสร้างกรดแลกติกที่สามารถสร้างเอนไซม์ในการย่อยแป้งเพื่อลดเวลาในกระบวนการย่อยแป้งดังกล่าวนี้ พบว่าแบคทีเรียสร้างกรดแลกติกมีอะไมเลส(amylase)ย่อยแป้งได้ เช่น *Lb. plantarum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. amylovorus*, *Lb. cellobiosus*, *Streptococcus bovis*, และ *Pediococcus damnosus* (Axelsson, 1998)

- แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก เนื่องจากเป็นแบคทีเรียเลี้ยงยาก (fastidious microorganism) จำเป็นต้องมีแหล่งอาหารเพื่อการเจริญเพียงพอต่อการสังเคราะห์สารภายในเซลล์ เอนไซม์และเสริมความแข็งแรงให้แก่แบคทีเรีย

การทำการปรับปรุงข้าวโพดโดยการใช้ hot lime-treatment(การเกิดยิปซัมแบบร้อน) จะมีการสูญเสียสารอาหารไป ต้องมีเติมแหล่งไนโตรเจนเพิ่มจากยีสต์สกัด(yeast extract) 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เพื่อเพียงพอต่อการเจริญของแบคทีเรียผสมระหว่าง *P. pentosaceus* และ *Lb. acidophilus* อัตราส่วน 3:1 (Escamilla et al., 2000)

Lactococcus lactis IO-1 มีการเติมยีสต์สกัด(yeast extract)แต่กลับทำให้ผลิตกรดแลกติกลดลงเมื่อเทียบกับอาหารใช้น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานที่มีการเติมยีสต์สกัด(yeast extract) ในปริมาณเท่ากัน(Laopaiboon et al., 2010)

Lactobacillus plantarum NCIM 2084 มีการเติมแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติม เช่น เปปไทน์(Peptone) 1 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด (yeast extract) 0.5 กรัมต่อลิตรและ สารจากเนื้อวัว (beef extract) 1 กรัมต่อลิตร พบว่ามีการผลิตกรดแลกติกได้เป็น 99.92, 99.92 และ 99.79 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ(Chauhan,2007) แสดงถึงการใช้เปปไทน์ทดแทนยีสต์สกัดได้

การใช้ แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อทดแทนโซเดียมไนเตรทสามารถเพิ่มปริมาณการผลิตกรดแลกติกสูงถึง 260 เปอร์เซ็นต์ (Altaf et al., 2006) ทั้งนี้

ขึ้นกับกระบวนการในการหมัก และการแลกเปลี่ยนสารอาหารที่แบคทีเรียผลิตกรดแลกติกต้องการด้วย

การเติมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยถั่วเลนทิลแดง(red lentil-RL) และ ยีสต์ขนมปัง (Baker's yeast cells-YC) สามารถทดแทนการเติมเปปไทน์(peptone) และยีสต์สกัด(yeast extract)ได้ (Altaf *et al.*, 2006)

- แร่ธาตุและวิตามิน

การมีวิตามินบีจะช่วยให้การเจริญของแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก การเติมไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) และโซเดียมอะซิเตต(CH_3COONa) ในน้ำอินทผลัม(date juice) มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก (Nancib *et al.*, 2005)

เนื่องจากแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกมีขีดจำกัดในการผลิตวิตามินในเซลล์(Nancib *et al.*, 2005) จำเป็นต้องเติมวิตามินบีและกรดอะมิโนเพิ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกสูง เพราะมีแหล่งฟอสฟอรัสที่เป็นองค์ประกอบในนิวคลีโอไทด์ การเติมเฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกจากอนุพันธ์ของเหล็ก สามารถลดปฏิกิริยา รีดักชันของ NADH ไม่ให้เปลี่ยนแปลงเป็น NAD ในไซโตโครมบี (cytochrome b) ที่มีผลต่อการถ่ายทอดอิเล็กตรอน ทำให้การผลิตกรดแลกติกลดลง

รวมทั้งการเติม ไตรโซเดียมซิเตรต ($Na_3C_6H_5O_7$) และไดโซเดียมซัคซิเนต ($C_4H_4Na_2O_4 \cdot 6H_2O$) มีผลทำให้การผลิตกรดแลกติกลดลง (Fitzpatrick และ O'Keeffe, 2001) เนื่องจากสารดังกล่าวเมื่อแตกตัวเป็นไอออน จะเป็นสารในวิถีการสร้างกรดไตรคาร์บอกซิลิก(TCA cycle) เปลี่ยนแปลงเป็นไอโซซิเตรต(isocitrate) และ ฟูมาเรต(fumarate) ได้

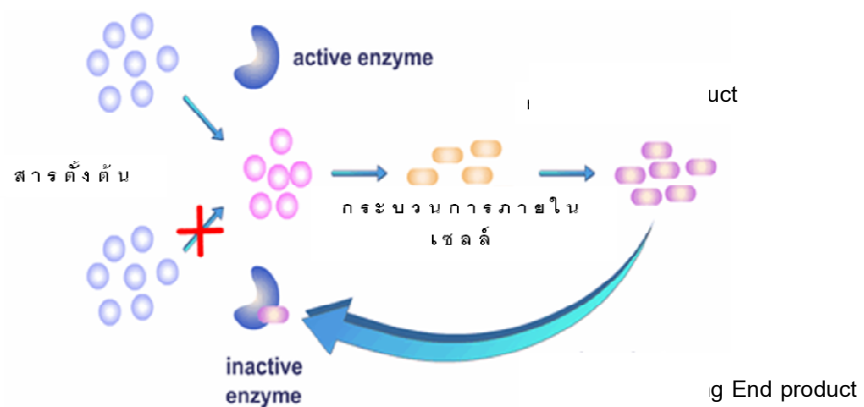
2.8.3 ตัวกระตุ้นและตัวยับยั้งการผลิตกรดแลกติก

ตัวยับยั้งทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ ความร้อน รังสี เพื่อการลดประสิทธิภาพการผลิตกรดแลกติกจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ นอกจากนี้ยังมีการใช้สารเคมีเพื่อรบกวนการปลดปล่อยเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนส(Lactate dehydrogenase, LDH) สำหรับผลิตกรดแลกติกได้ เช่น สารละลายอินทรีย์ที่รบกวนการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น เอทานอล อะซิโตน เป็นต้น หรือสารไอโอโนฟอรั

(ionophore) ซึ่งเป็นสารที่ไม่ยอมให้มีการไหลผ่านสารของผนังชั้นเซลล์ ไม่มีการปลดปล่อยเอนไซม์แลคเตทไฮโดรจีเนส ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้

ความร้อนมีผลต่อการผลิตเอนไซม์ ส่วนใหญ่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิไม่เกิน 40 - 45 °C ทั้งนี้เนื่องจากที่อุณหภูมิสูง เอนไซม์จะถูกทำลายทำให้เสียสภาพธรรมชาติ (denature) ของโครงสร้างโปรตีน โดยเฉพาะ lactate dehydrogenase

เมื่อมีการเติมซินนามัลดีไฮด์ (cinnamaldehyde) เสริมฤทธิ์การต่อต้านแบคทีเรียที่เรียกว่าโวกได้ เกิดการผลิตกรดแลคติกโดยปราศจากการบูกรุกจากการทำลายของแบคทีเรียโวกเมื่อกรดแลคติกที่ได้จากการหมักเมื่อมีความเข้มข้นมากเกินไป เกิดยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์เพื่อย่อยสลาย เป็นลักษณะการยับยั้งแบบ Feedback inhibition (Lee K.,2007)



รูปที่ 2.5 ลักษณะกลไกการยับยั้งแบบ Feedback inhibition

ที่มา : <http://scholar.hw.ac.uk/site/biology/graphics/ah0106feedbackinhibition02.gif>

เลี้ยง *Lactobacillus helveticus* (ATCC 15009) ยีสต์สกัด (Yeast extract) และแลคตามีน (Lactamine AA) พบว่ากรณีการจัดภาวะแบบ batch bioreactor จะสามารถผลิตกรดแลคติกได้ดีกว่าปกติ

น้ำเสียจากโรงงานผลิตชาเขียว ในกระบวนการหมักไซเลจ (silages) สามารถลดค่าความเป็นกรด-ด่าง และเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์กรดแลคติกให้สูงขึ้นได้เนื่องจาก มีความร้อนเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Kondo et al.,2004)

สามารถพิจารณาบทบาทของสารขนาดเล็กที่นิยมใช้ในการส่งเสริมหรือยับยั้งการผลิตกรดแลกติก ดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 2.5 บทบาทของสารขนาดเล็ก (microelement) ต่อการผลิตกรดแลกติก

Trace element	หน้าที่
แคลเซียมไอออน (Ca^{2+})	สำคัญต่อการเจริญของแบคทีเรียและกระบวนการหมัก
เฟอร์ริก ไอออน เฟอร์รัส ไอออน ($\text{Fe}^{2+}, \text{Fe}^{3+}$)	เป็นองค์ประกอบในเอนไซม์ต่างๆ บริเวณ active site
คลอไรด์ไอออน (Cl^-)	แพร่สารอาหารโดยเฉพาะน้ำตาล เข้าสู่เซลล์ผ่านกระบวนการขนส่งโดยไม่ใช้พลังงาน (passive diffusion)
คอปเปอร์ไอออน (Cu)	เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์และโปรตีน ใช้ในกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน เมื่อมีการสะสมปริมาณมากจะทำให้เกิดพิษระดับเซลล์ขึ้น
โซเดียมไอออน (Na^+)	เสมือนศูนย์กลางในการแลกเปลี่ยนสารประจุบวก

ที่มา : Jones และ Greenfield, 1984

นอกจากนี้ยังมี ซัลเฟอร์ โปแทสเซียม และแมงกานีส ซึ่งเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ มีบทบาทต่อการผลิตกรดแลกติก เช่น ซัลเฟอร์ เป็นองค์ประกอบในกรดอะมิโน cysteine และ methionine รวมทั้งสามารถทำงานร่วมกับ carboxylases ได้

ในขณะที่โพแทสเซียมควบคุมการเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรด-ด่าง เพิ่มการทนต่อสารพิษมากขึ้น และมีการรับ Zn^{2+} และ Co^{2+} เข้าสู่เซลล์ และการพบแมงกานีสที่ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ป้องกันภาวะจากสิ่งแวดล้อม และมีความสามารถในการรับน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ (Jones และ Greenfield, 1984)

2.9 การทดลองที่เกี่ยวข้องต่อการผลิตกรดแลกติกโดยแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก

สรุปการใช้วัตถุดิบเพื่อเป็นแหล่งอาหารของแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกมีบทบาทต่อการผลิตกรดแลกติก ดังนี้

ตารางที่ 2.6 ปริมาณกรดแลกติก และวัตถุดิบในกระบวนการหมักของแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก

วัตถุดิบ	แบคทีเรียผลิตกรดแลกติก	ปริมาณกรดแลกติก (หน่วย)	อ้างอิง
แป้งสาลี	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 19435	0.77 -1 กรัมต่อกรัม	Hofvendahl <i>et al.</i> , 1999
ข้าวบาเลย์	<i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-441	0.87 -0.98 กรัมต่อกรัม	Linko และ Javanainen, 1996
รำข้าวสาลี	<i>L. amylophilus</i> GV 6	> 0.90 กรัมต่อกรัม	Vishnu <i>et al.</i> , 2002 Altaf <i>et al.</i> , 2006
กากมันสำปะหลัง	<i>L. delbrueckii</i> NCIM 2025,	0.90 -0.98 กรัมต่อกรัม	John <i>et al.</i> , 2006

ตารางที่ 2.6 (ต่อ)

วัตถุดิบ	แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก	ปริมาณกรดแลคติก	อ้างอิง
แป้งข้าวโพด	<i>L. amylovorus</i> NRRL B-4542	0.935 กรัมต่อกรัม	Nagarjun <i>et al.</i> , 2005
แป้งสาลีผสมรำข้าว	<i>Lactobacillus sp.</i>	129 กรัมต่อลิตร	Yun <i>et al.</i> , 2004
เชลลูโลส	<i>L. bulgaricus</i> NRRL B-548	> 80 กรัมต่อลิตร	Venkatesh, 1997
	<i>Lactobacillus coryniformis</i> ssp. <i>torquens</i>	0.89 กรัมต่อกรัม	Yanez <i>et al.</i> , 2003
	ATCC 25600		
กลูโคส	<i>Lactobacillus lactis</i> BME5-18M	161.2 กรัมต่อลิตร	Bai <i>et al.</i> , 2004

2.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ

2.10.1 การจัดการทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial design)

Factorial design เป็นการจัดการทดลอง ไม่ใช่แผนการทดลอง เพื่อศึกษาปัจจัย (factor) ต่างๆได้ในเวลาเดียวกันรวมเพื่อศึกษาปฏิริยาสัมพันธ์ (interaction) ของแต่ละปัจจัยพร้อมกัน เช่น ความเข้มข้นของสารเคมี อัตราเร็วในการกวาด เป็นต้น เพื่อหาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกัน และมีปฏิริยาสัมพันธ์กัน

การเลือกปัจจัยการทดลองมีความสำคัญดังนี้ (Box และ Hunter, 2005)

1. ใช้การทดลองน้อย
2. การตีความค่อนข้างง่าย โดยใช้การบวกลบคูณหาร เท่านั้น
3. ทำการทดลองเพิ่มเติมได้อย่างเหมาะสมในกรณีที่ต้องการข้อมูลเพิ่มเติม
4. กรณีเป็นปัจจัยแบบเชิงปริมาณ ถึงแม้ว่าจะไม่กำหนดช่วงที่ต้องการได้ตลอดช่วงที่สนใจ แต่ก็ เป็นข้อมูลที่กำหนดทิศทางการทดลองต่อไปได้
5. เป็นพื้นฐานที่สำคัญในการทดลองแบบ Fractional Factorial Design

อย่างไรก็ตามการจัดการทดลองแบบนี้อาจคลาดเคลื่อน หากมีปัจจัยและระดับต่างๆมากเกินไปเนื่องจากเกิดความแปรปรวนในตัวอย่งการทดลอง ผู้ทดลองควรพยายามทำให้มีระดับปัจจัยน้อยที่สุดในแต่ละปัจจัยเพื่อแก้ไขปัญหาคความแปรปรวนในตัวอย่งการทดลอง

แบบ Fractional factorial design

เป็นวิธีที่ผู้ทำการทดลองไม่ต้องทำการทดลองให้ครบทุกเงื่อนไขการเปลี่ยนแปลงค่าของทุกปัจจัย แต่ความแม่นยำของผลก็ไม่เท่ากับ full factorial ในเชิงทฤษฎี แต่ในทางปฏิบัติถึงเราจะสามารถดำเนินการทดลองด้วยวิธี full factorial แต่อาจจะได้ผลที่แย่กว่า fractional factorial ก็ได้ เนื่องจากจำนวนปัจจัยที่มากย่อมควบคุมการทดลองได้ยากเพิ่มขึ้น ทำให้ความผิดพลาดมีมากขึ้น

การทดลองจะมีเพียงปัจจัยหลัก และเพียงความสัมพันธ์เท่านั้น เมื่อความสัมพันธ์ สูงขึ้นก็ยังมีโอกาสจะมีนัยสำคัญน้อยลง จึงได้นำเอาหลักการนี้ไปใช้ประโยชน์เพื่อลดขนาดของการทดลอง แต่ต้องสูญเสียความสามารถในการแยกแยะผลกระทบ หากมีความสัมพันธ์ที่ไม่สามารถแยกแยะออกกันชัดเจน

fractional factorial แบบ 2^{k-1} design เมื่อออกแบบการทดลองแล้วมีขนาดการทดลองเท่ากับแบบ full factorial design จึงนำหลักการที่ว่ายิ่งอันดับ ความสัมพันธ์สูงเท่าใดก็จะมี ความสำคัญน้อยเท่านั้น และจะเอา ปัจจัยหลักบางตัวเข้าแทนที่ Interaction ดังกล่าว จะได้ขนาดทดลองครึ่งหนึ่งของ full factorial เสมอ

fractional factorial แบบ 2^{k-p} design ออกแบบการทดลองกรณีมีปัจจัยมากกว่า 3-5 ปัจจัย โดยใช้ค่า p ที่มากกว่า 1 ในการออกแบบเมื่อมีปัจจัยตั้งแต่ 6 ตัวขึ้นไป โดยข้อกำหนดง่าย ๆ คือ เมื่อมีการออกแบบ ควรจะให้จำนวน ทดลองเริ่มต้นที่ 8 ปัจจัย ไม่ควรเกิน 32 การทดลอง

แบบ Full factorial design

เป็นวิธีการทดลองที่ผู้ทำการทดลองจะต้องทำการทดลองให้ครบทุกเงื่อนไขการเปลี่ยนแปลงค่าของทุกปัจจัย และวิเคราะห์ผลกระทบต่อตัวแปรตอบสนองทุกกรณี ดังนี้

ตารางที่ 2.7 ผลที่เป็นไปได้ทั้งหมดของ full factorial design

ปัจจัยหลัก	ความสัมพันธ์ของ คู่ปัจจัย	ความสัมพันธ์ทั้งหมด ของปัจจัย
A	AB	ABC
B	AC	
C	BC	

การจัดการทดลองแบบแฟคทอเรียล full factorial design นิยมใช้ 2 ลักษณะคือ

2-Level full factorial design(การจัดการทดลองแบบแฟคทอเรียล 2 ระดับ) โดยกำหนดให้แต่ละปัจจัยเปลี่ยนแปลงได้ 2 ระดับ เราจะต้องทำการทดลองทั้งหมดเท่ากับ 2^k โดยที่ k คือจำนวนปัจจัยหลัก (Main effect) เช่นในการทดลองมี 3 ปัจจัย ต้องมีจำนวนรอบการทดลอง $2^3 = 8$ การทดลอง

3-Level full factorial design(การจัดการทดลองแบบแฟคทอเรียล 3 ระดับ) โดยกำหนดให้แต่ละปัจจัยเปลี่ยนแปลงได้ 3 ระดับ เราจะต้องทำการทดลองทั้งหมดเท่ากับ 3^k โดยที่ k คือจำนวนปัจจัยหลัก (Main effect) เช่นในการทดลองมี 3 ปัจจัย ต้องมีจำนวนรอบการทดลอง $3^3 = 27$ การทดลอง

ตารางที่ 2.8 เปรียบเทียบข้อดีและข้อเสียของ full factorial design

ข้อดี	ข้อเสีย
<ul style="list-style-type: none"> • สามารถแยกแยะการเกิดผลกระทบได้ทั้งหมด 	<ul style="list-style-type: none"> • ต้องทำการทดลองให้ครบทุกแบบ การทดลอง สิ้นเปลืองทรัพยากร และใช้เวลามาก
<ul style="list-style-type: none"> • วิเคราะห์ ปัจจัยหลัก และความสัมพันธ์ได้ทั้งหมด 	<ul style="list-style-type: none"> • ประสบปัญหาในการป้องกันความคลาดเคลื่อนของการปรับเปลี่ยนค่าของปัจจัยได้

2.10.2 พื้นผิวตอบสนอง (Response surface metholody, RSM)

พื้นผิวตอบสนองเป็นวิธีการทางสถิติเพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆที่พิจารณาในระบบทดลอง สามารถหาสูตรหรือภาวะที่เหมาะสมจากความสัมพันธ์เหล่านั้นตามรูปแบบจำลองทั่วไป ดังนี้

เมื่อกำหนดค่า Y เป็นค่าการตอบสนองหรือตัวแปรตาม

$$Y = f(X_1 + X_2 + \dots + X_k) + E$$

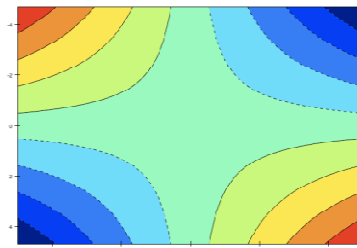
$X_1 + X_2 + \dots + X_k$ เป็นตัวแปรที่สนใจหรือตัวแปรต้น

E เป็นค่าคลาดเคลื่อนของข้อมูล

ความสัมพันธ์ของแบบจำลองมักใช้สมการลำดับที่หนึ่ง (First order) หรือสมการลำดับที่สอง (Second order) หรือแบบจำลองพหุนามในเมียด (Polynomial model) เป็นตัวอธิบาย โดยมีการใช้วิธีกำลังสองน้อยที่สุด (The least square method) เพื่อประมาณค่าของปัจจัยต่างๆ เป็นแบบจำลองที่แสดงการตอบสนองที่เหมาะสมจึงถูกเรียกว่าแบบจำลองการตอบสนองที่เหมาะสม (Fitted response function) ดังนี้

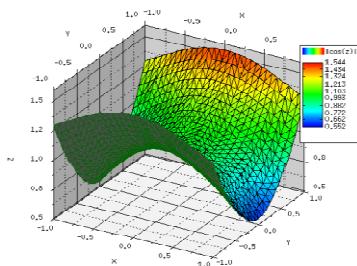
$$\hat{Y} = b_0 + b_1X_1 + \dots + b_nX_n$$

แผนภาพพื้นผิวตอบสนองแบบ 2 มิติ (contour plot) เป็นอนุกรมของเส้นหรือกราฟซึ่งมีค่าแน่นอนและคงที่สอดคล้อง กับระดับปัจจัยที่เปลี่ยนไปหากมีการสร้างเป็นรูปแบบสามมิติจะเรียกว่า “ Surface plot ”



รูปที่ 2.6 แผนภาพพื้นผิวตอบสนองแบบ 2 มิติ “ contour plot ”

ที่มา: http://rgm2.lab.nig.ac.jp/RGM_results/rsm:contour.lm/contour.lm_002_big.png



รูปที่ 2.7 แผนภาพพื้นผิวตอบสนองแบบ 3 มิติ “ Surface plot ”

ที่มา: http://ijs.academicdirect.org/A17/059_070_files/image002.jpg

ขั้นตอนการทำพื้นผิวตอบสนอง

ในการสร้างพื้นผิวตอบสนองประกอบด้วยขั้นตอนหลัก ดังนี้

- ก. เลือกแผนการทดลองที่เหมาะสม
- ข. สร้างสมการถดถอยหาความสัมพันธ์อิทธิพลของปัจจัย โดยโปรแกรมทางสถิติ เช่น SAS หรือSPSS
- ค. สร้างแผนภาพพื้นผิวจากสมการที่หาได้โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ เช่น MINITAB หรือSTATISTICA
- ง. ตรวจสอบภาวะความเหมาะสม
- จ. นำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าทำนาย
- ฉ. ถ้าแบบจำลองไม่เหมาะสมต้องทำแบบจำลองใหม่

2.10.3 การวิเคราะห์สมการถดถอย (Linear regression)

สมการถดถอยศึกษาอิทธิพลของตัวแปรต้นที่มีผลต่อตัวแปรตาม โดยสามารถทำนายระดับความสำคัญของปัจจัยเชิงปริมาณที่มีต่อตัวแปรตามได้เมื่อการทดลองมีการวางแผนเป็นวิธีการทางสถิติเพื่อทำนายปรากฏการณ์ของตัวแปรตามมีสัมประสิทธิ์การถดถอย (b) เป็นตัวบ่งชี้อิทธิพลของตัวแปรอิสระที่มีต่อตัวแปรตาม

สาเหตุการวิเคราะห์สมการถดถอยเนื่องมาจากการหาภาวะที่เหมาะสมนั้นต้องทำการทดลองปริมาณมากจึงจำเป็นต้องศึกษากับกลุ่มตัวอย่างที่สามารถอ้างอิงไปสู่ประชากรทั้งหมด พร้อมทั้งระดับความสัมพันธ์ของปัจจัยต่อปัจจัยร่วมอื่นๆ และระดับความสำคัญของปัจจัยนั้นๆ ที่มีผลต่อตัวแปรตาม

สมการถดถอยแบบง่าย (Simple linear regression)

- สมการถดถอยเชิงเส้นแบบง่าย(Simple linear regression)

เป็นการพิจารณาตัวแปรต่อเนื่องที่สามารถควบคุมได้โดยผู้ทดลอง มี 2 ตัวแปร เรียกว่า bivariate data ให้ค่าเป็นผลของแปรตาม หากตัวแปรต้นสัมพันธ์กับตัวแปรตามในลักษณะเส้นตรงแล้ว ให้แบบจำลองทั่วไป ดังนี้

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X + E$$

เมื่อกำหนดค่า β_0 เป็นค่าคงที่

β_1 เป็นค่าสัมประสิทธิ์เส้นตรง

E เป็นค่าความคลาดเคลื่อนแบบสุ่ม

เมื่อใช้วิธีกำลังสองน้อยที่สุดประมาณค่าของปัจจัยในแบบจำลองจะได้สมการ ดังนี้

$$\hat{y} = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1 x$$

นำสมการมาพิจารณาร่วมกับสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ(Coefficiency of determination; R^2) โดยทั่วไปสมการมักใช้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจอย่างน้อย 0.75 หากสูงกว่า 0.90 ถือว่าดีมาก (ค่า R^2 มีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1) หากค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจมีค่าสูงยิ่งสูงเท่าใด ความแม่นยำของสมการที่ใช้ทำนายมักสูงตามไปด้วย

ในการวิเคราะห์สมการถดถอยต้องทดสอบสมมติฐานและแสดงค่า F-ratio (อัตราส่วนของค่ากำลังสองเฉลี่ย (MS-ratio)) นั้นเองหรือ P-value โดยมีการยอมรับหรือปฏิเสธสมมติฐาน (Hypothesis) ดังนี้

$$H_0: \beta_0 = \beta_1 = 0 \quad \dots \text{ยอมรับสมมติฐาน} \quad (R^2=0)$$

$$H_0: \beta_0 \neq \beta_1 \neq 0 \quad \dots \text{ปฏิเสธสมมติฐาน} \quad (R^2 \neq 0)$$

จากสมการเมื่อมีการยอมรับสมมติฐานแสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างกันตัวแปรต้นและตัวแปรตาม หากมีการปฏิเสธสมมติฐานแสดงว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างกันตัวแปรต้นและตัวแปรตาม หรือเป็นการทดสอบค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) แสดงอิทธิพลของตัวแปรต้นที่มีต่อตัวแปรตาม

- สมการถดถอยแบบหลายตัวแปร (Multiple linear regression)

เมื่อศึกษาตัวแปรมากกว่า 2 ตัวแปร เรียกว่า multivariate data ผู้ทดลองไม่สามารถควบคุมปัจจัยได้ทั้งหมด ซึ่งให้ค่าเป็นผลของแปรตามลักษณะเส้นตรงแล้ว ให้แบบจำลองทั่วไปดังนี้

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + E$$

เมื่อกำหนดค่า β_0 เป็นค่าคงที่

β_i เป็นค่าสัมประสิทธิ์เส้นตรงของตัวแปร X_i

E เป็นค่าความคลาดเคลื่อนแบบสุ่ม

เมื่อนำมาทดสอบการยอมรับหรือปฏิเสธสมมติฐาน (Hypothesis) ได้ ดังนี้

$$H_0: \beta_0 = \beta_1 = \dots = \beta_k = 0 \quad \dots \text{ยอมรับสมมติฐาน} \quad (R^2=0)$$

$$H_0: \beta_0 \neq \beta_1 \neq \dots \neq \beta_k \neq 0 \text{ อย่างน้อยหนึ่งค่า} \quad \dots \text{ปฏิเสธสมมติฐาน} \quad (R^2 \neq 0)$$

จากสมการเมื่อมีการยอมรับสมมติฐานแสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างกันตัวแปรต้นและตัวแปรตาม หากมีการปฏิเสธสมมติฐานแสดงว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างกันตัวแปรต้นและตัวแปรตามหรือเป็นการทดสอบค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) แสดงอิทธิพลของตัวแปรต้นทั้งหมดที่มีต่อตัวแปรตาม

2.10.4 การนำหลักการจัดการทดลองแบบแฟคทอเรียล และทฤษฎีพื้นผิวตอบสนอง ศึกษาสร้างกรดแลกติกโดยแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก

การนำหลักการจัดการทดลองแบบแฟคทอเรียล และทฤษฎีพื้นผิวตอบสนอง ทำให้ผู้ทดลองสามารถจัดการทดลองอย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้วิธีทางสถิติเพื่อลดระยะเวลาในการทดลอง เป็นที่นิยมในการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารหรือการเจริญที่เพิ่มมูลค่าต่ออุตสาหกรรม และพัฒนาหลักการเพื่อการอยู่รอดของแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกให้มีคุณสมบัติดั้งเดิมหรือลดต้นทุนการผลิต เช่น

หาความเหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนจากวัตถุดิบราคาต่ำ ใช้ทฤษฎีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology ,RSM) วิเคราะห์การเติมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเติมถั่วเลนทิลแดง(red lentil-RL)และยีสต์ขนมปัง(Baker's yeast cells-YC)และแป้งเพื่อทดแทนการเติมเปปไทน์(peptone) และยีสต์สกัด(yeast extract)ได้(Altaf *et al.*,2007)พบว่าสามารถทดแทนกันได้ ไม่มีผลกระทบต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติก

ตัวอย่างกากมันสำปะหลังที่ย่อยแล้วเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีการใช้ Plackett–Burmanร่วมศึกษากับพื้นผิวตอบสนอง พร้อมทั้งเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของยีสต์สกัด(yeast extract)และเปปไทน์(peptone) เปรียบการผลิตกรดแลกติกโดย *L. delbrueckii* สายพันธุ์เดิมและสายพันธุ์กลาย(John *et al.*,2008)

การผลิตกรดแลกติกมีผลจากความเข้มข้นของเปปไทน์(peptone) และยีสต์สกัด(yeast extract) (John *et al.*,2008) หากต้องการได้กรดแลกติกปริมาณมากต้องใช้ปริมาณแบคทีเรีย(inoculum density)และ เปปไทน์(peptone) เพิ่มขึ้นเพื่อให้มีแหล่งไนโตรเจนที่เพียงพอต่อการเจริญของแบคทีเรีย

การนำหลักการจัดการทดลองแบบแฟคทอเรียล และทฤษฎีพื้นผิวตอบสนองหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตและยืนยันสมการทำนายสามารถสรุปความเหมาะสมต่อการเจริญและสร้างกรดแลกติกได้ดังนี้

ตารางที่ 2.9 ชนิดของแบคทีเรียและภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกด้วยวิธีการหมัก

แบคทีเรีย	ชนิดการหมัก	pH	อุณหภูมิ (°ซ)	สารตั้งต้น (g/l)	กรด แลคติก (g/l)	Yield (g/g)	ปริมาณการ ผลิต (g/l h)	อ้างอิง
<i>L. lactis</i> IO-1 ⁽¹⁾	Batch	6.0	37	9.4*	N/A	0.96	1.38	Sirisansaneeyakul <i>et al.</i> , 1998
<i>L. rhamnosus</i> ⁽²⁾	Batch	5.5	40	80.0*	67.0	0.84	2.48	Berry <i>et al.</i> , 1999
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> ⁽²⁾	Batch	6.0	45	30.0*	27.8	0.89	2.78	Siebold <i>et al.</i> , 1995
<i>L. delbrueckii</i> ⁽²⁾	Immobilized continuous	6.3	42	100.0*	51.4	0.76	20.10	Gonçalves <i>et al.</i> , 1992

หมายเหตุ: ⁽¹⁾ *L.* หมายถึง *Lactococcus*, ⁽²⁾ *L.* หมายถึง *Lactobacillus*, * หมายถึง น้ำตาลกลูโคส, N/A ไม่มีข้อมูล

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ และวิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์

1. กล้องจุลทรรศน์(microscope) รุ่น CH30RF200 บริษัท Olympus optical co.Ltd., Taiwan
2. กระตุงอคูมิเนียม
3. เครื่องกวนแม่เหล็ก(magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 บริษัท PMC, USA
4. เครื่องแก้วของบริษัท Pyrex, USA
5. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ รุ่น Genesys20 บริษัท Thermo Spectronic Unicam, USA
6. เครื่องชั่ง รุ่น P2002-S และ AG285 บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
7. เครื่อง Sonicator รุ่น SONOREX RX100 บริษัท สยามแอนด์โก. กรุงเทพ. ประเทศไทย
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง(centrifuge) รุ่น Avanti J-301 บริษัท Beckman Coulter Inc., USA
9. ตัวหมุน(rotor) รุ่น JA-30.50Ti บริษัท Beckman Coulter Inc., USA
10. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ(bench-top centrifuge) รุ่น Spectrafuge 7M บริษัท National Labnet Ltd.,USA
11. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ(deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น MDF-U332 บริษัท Sanyo Electric, Japan
12. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ(deep freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส รุ่น ULT1786 บริษัท Forma Scientific, USA
13. ถังปฏิกรณ์(reactor) รุ่น Marubishi Model MDL, Japan
14. ไมโครปิเปต(micropipette) ขนาด P20, P100, P200, P1000 และ P10000 ไมโครลิตร บริษัท Gilson, France
15. เครื่องปั่นผสม(vortex mixer) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries, USA
16. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง(pH meter) รุ่น Seven Easy บริษัท Mettler Toledo, Switzerland
17. ตู้อบความร้อน(hot air oven) รุ่น Contherm series Five บริษัท Contherm Scientific Ltd., New Zealand
18. ตู้อบความร้อน(hot air oven) รุ่น UL-80 บริษัท Memmert GmbH, Germany

19. ตู้ปั๊มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส รุ่น BE800 บริษัท Memmert, Germany
20. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ(autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 บริษัท Tomy Seiko, Ltd., Japan
21. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE(poly tetra fluoro ethylene) รูขนาด 0.2 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-13JP บริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan
22. กระดาษกรองไนลอน(nylon membrane) ขนาด 47 มิลลิเมตร รูขนาด 0.45 ไมโครเมตร บริษัท Whatman, USA
23. ครอบกึ่งปิดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิเมตร บริษัท Nissho Nipro., Japan
24. ตู้เขี่ยเชื้อแบบISSCO laminar flow รุ่น BVT-124 บริษัท International Scientific Supply, USA และรุ่น Clean model. V4 บริษัท LAB Service, Thailand
25. เครื่องโครมาโตกราฟีชนิดเหลวประสิทธิภาพสูง(High Performance Liquid Chromatography: HPLC) รุ่น LC1100 บริษัท Agilent, USA
26. คอลัมน์สำหรับวิเคราะห์กรดแลกติก รุ่น Aminex HPX-87H ion exclusion organic acid column ขนาด 300 X 7.8 มิลลิเมตร บริษัท Biorad , USA
27. เครื่องผลิตน้ำปลอดประจุ รุ่น Milli-Q series Synthesis บริษัท Millipore, USA
28. ผ้าขาวบางที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว



ถังปฏิกรณ์ (Marubishi Model MDL, Japan)



เครื่องโครมาโตกราฟีชนิดเหลวประสิทธิภาพสูง
(LC1100 Model , Agilent, USA)

เคมีภัณฑ์

1. แป้งมันสำปะหลังตรานิวเกรด (New Grade) บริษัทไทยวาฟูดโปรดักส์, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย
2. เปปโตน (peptone) เครื่องหมายการค้า Bacto บริษัท Becton Dickinson, France
3. ผงสกัดจากเนื้อ (beef extract) เครื่องหมายการค้า Kemma บริษัท RCI Labscan Ltd., ประเทศไทย
4. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท BioSpringer., France
5. กลูโคส (glucose) บริษัท Merck, USA
6. ทวีน80 (tween 80) บริษัท Merck, USA
7. แอมโมเนียมซิเตรท (ammonium citrate: $(\text{NH}_4)_2\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7$) บริษัท Carlo ERBA Reagent., France
8. โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate: CH_3COONa) บริษัท Merck, USA
9. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide: NaOH) บริษัท Merck, USA
10. แมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulfate: $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7(\text{H}_2\text{O})$) บริษัท Merck, USA
11. แมงกานีสซัลเฟต (manganese sulfate: $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) บริษัท Merck, USA
12. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (di-potassium phosphate: K_2HPO_4) บริษัท Merck, USA
13. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride: NaCl) บริษัท Merck KGaA, Germany
14. กรดแลคติก (lactic acid) HPLC grade บริษัท Sigma-Aldrich, USA
15. น้ำตาลกลูโคส (glucose) HPLC grade บริษัท Merck, USA
16. ชุดทดสอบปริมาณกลูโคสด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส บริษัท ไบโอเทค. กรุงเทพฯ, ประเทศไทย
17. เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (termamyl) ชนิด E บริษัท EAC ., ประเทศไทย
เอนไซม์อะไมโลกลูโคไซด์ (amylglucosidase:AMG) ≥ 300 U/mL บริษัท Sigma-Aldrich, USA
18. อะซิโตรไนไตรท์ (acetonitrile: CH_3CN) HPLC grade บริษัท SK chemicals, Korea
19. อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Tryptic Soy Broth (TSB) เครื่องหมายการค้า Difco บริษัท Becton Dickinson, France
20. กรดซัลฟูริก (sulfuric acid: H_2SO_4) บริษัท Merck, USA

21. แบเรียมคลอไรด์ (*barium chloride*: BaCl_2) บริษัท Merck, USA
22. ไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid: HCl) บริษัท Merck, USA
23. แคลเซียมคาร์บอเนต (calcium carbonate : CaCO_3) บริษัท Carlo ERBA Reagent.,
France
24. สีสบรอมครีซอลเพอเพิล (bromocresol purple, BCP) บริษัท Carlo ERBA Reagent.,
France
25. กลีเซอรอล (glycerol) บริษัท Research organic Inc.,USA
26. ภู่นผง

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 จุลินทรีย์

ทำการศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้แบคทีเรียผลิตกรดแลกติก 3 สายพันธุ์ คือ *Pediococcus acidilactici* TISTR 783, *Lactobacillus haloterans* TISTR 939 และ *Lactococcus lactis* TISTR 1401

3.2 การเก็บรักษา

การเก็บรักษาแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกในการทดลองนี้ แบ่งออกเป็น 3 ลักษณะ คือ

ลักษณะแรก ใช้ดูปเปียเชื้อลาก(streak) ลงบนอาหารแข็งเคียง MRS (de Man Ragosa and Sharpe) ในหลอดทดลอง บ่มในภาวะ microaerophile อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาเขี่ยลากเชื้อลงอาหารใหม่ทุก 1 สัปดาห์

ลักษณะที่สอง เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ในฟลาสก์ปริมาตรสุทธิ 100 มิลลิลิตร บ่มในภาชนะนี้ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง ผสมกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำมาเขี่ยลากเชื้อลงอาหารใหม่ทุก 3 เดือน

ลักษณะที่สาม เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ในฟลาสก์ปริมาตรสุทธิ 100 มิลลิลิตร บ่มในภาชนะนี้ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง ผสมกลีเซอรอล 40 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำมาเขี่ยลากเชื้อลง อาหารใหม่ทุก 6 เดือน

3.3 ขั้นตอนการย่อยแป้งมันสำปะหลัง(ดัดแปลงจาก สุวิชา กัลยาณมิตร, 2548)

3.3.1 การเตรียมแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ชั่งแป้งมันสำปะหลัง 120 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร คนให้ทั่วแล้วปรับพีเอชเป็น 5.5 เติมเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Termamyl Type E, EAC., ประเทศไทย) ปริมาตร 129.6 ไมโครลิตร บ่มในอ่างน้ำเดือดนาน 2 ชั่วโมง ทดสอบว่าแป้งถูกไฮโดรไลซ์หมดหรือไม่ โดยการทดสอบกับสารละลายไอโอดีน สังเกตหากเกิดสีน้ำตาลแดงอิฐหรือสีน้ำตาลแดงแสดงว่าแป้งถูกไฮโดรไลซ์หมดแล้ว ปรับปริมาตรสารละลายเป็น 1 ลิตร เพื่อนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในขั้นตอนต่อไป

3.3.2 การเตรียมแป้งมันสำปะหลังที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส

นำน้ำแป้งที่ถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจากข้อ 3.3.1 มาปรับค่าพีเอช เป็น 4.5 ก่อนนำไปไฮโดรไลซ์ต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Amyloglucosidase ≥ 300 U/mL, Sigma-Aldrich, USA) ปริมาตร 132 ไมโครลิตร บ่มในอ่างที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง เพื่อให้ได้สารละลายกลูโคส นำมากรองผ่านผ้าขาวบางที่หนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นปรับ ปริมาตรเป็น 1 ลิตร นำน้ำแป้งไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.4 เตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก

เตรียมกล้าเชื้อ *Pediococcus acidilactici* TISTR 783 *Lactobacillus halotolerans* TISTR 939 และ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 โดยเชื้อขึ้นอาหารแข็ง MRS บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ microaerophile 24 ชั่วโมง นำเชื้อแต่ละชนิดนำมาเลี้ยงในฟลาสก์ ปริมาตรสุทธิ 100 มิลลิลิตร บรรจุอาหารเหลว MRS 50 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS อีกครั้งที่สภาวะเดียวกันจน ครบ 16 ชั่วโมง ทำการเจือจางเชื้อแต่ละชนิดใน 0.85% NaCl วัดค่าความขุ่นของเชื้อที่ 660 นาโนเมตร (OD_{660}) ให้มีค่าประมาณ 0.5

3.5 คัดเลือกจุลินทรีย์และหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

3.5.1 ศึกษาการเจริญและประสิทธิภาพการผลิตกรดแลกติกของกล้าเชื้อเดี่ยว

เตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกวิธีข้อ 3.4 ถ้ายกกล้าเชื้อเดี่ยวของ *P. acidilactici* TISTR 783, *Lb. halotolerans* TISTR 939 และ *L. lactis* TISTR 1401 ในฟลาสก์ แต่ละฟลาสก์ปริมาตรสุทธิ 100 มิลลิลิตร บรรจุอาหารเหลว MRS 50 มิลลิลิตร ใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 10 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายกรดแลกติก

3.5.2 ศึกษาการเจริญและประสิทธิภาพการผลิตกรดแลกติกของกล้าเชื้อผสม

เลือกปริมาณกล้าเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ดีจากวิธีข้อ 3.5.1 ถ่ายกล้าเชื้อใน ฟลาสก์ปริมาตรสุทธิ 100 มิลลิลิตร บรรจุอาหารเหลว MRS 50 มิลลิลิตร ถ่ายกล้าเชื้อแต่ละชนิดตามที่กำหนด ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กล้าเชื้อผสมระหว่าง *P. acidilactici* TISTR 783 และ *Lb. halotolerans* TISTR 939 อัตราส่วน 1:1 (v/v)

กลุ่มที่ 2 กล้าเชื้อผสมระหว่าง *P. acidilactici* TISTR 783 และ *L. lactis* TISTR 1401 อัตราส่วน 1:1 (v/v)

กลุ่มที่ 3 กล้าเชื้อผสมระหว่าง *Lb. halotolerans* TISTR 939 และ *L. lactis* TISTR 1401 อัตราส่วน 1:1 (v/v)

กลุ่มที่ 4 กล้าเชื้อผสมระหว่าง *P. acidilactici* TISTR 783, *Lb. halotolerans* TISTR 939 และ *L. lactis* TISTR 1401 อัตราส่วน 1:1 :1 (v/v/v)

นำลักษณะกล้าเชื้อดังกล่าวเลี้ยงในอาหารเหลว MRS 50 มิลลิลิตรในฟลาสก์ปริมาตรสุทธิ 100 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 10 ชั่วโมงวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายกรดแลกติก

3.6 หาภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดแลกติกในระดับขวดทดลองโดยใช้วิธีทางสถิติ

เลือกรูปแบบกล้าเชื้อที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดจากข้อ 3.5.2 มาทดสอบหาภาวะที่เหมาะสมด้วยการออกแบบการทดลองแฟคทอเรียล โดยเลี้ยงกล้าเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน มีความเข้มข้นกลูโคส 20 40 และ 60 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน 2.5 7.5 และ 12.5 กรัมต่อลิตร ในสูตรอาหาร MRS เดิม 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในฟลาสก์ปริมาตรสุทธิ 100 มิลลิลิตร ที่ระดับพีเอช 5.5 6.5 และ 7.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.1 กำหนดค่าปัจจัยเพื่อออกแบบการทดลองแฟคทอเรียลสำหรับผลิตภัณฑ์

ปัจจัยในการทดลอง	กำหนดค่าการทดลอง		
	ค่าต่ำสุด	ค่ากลาง	ค่าสูงสุด
	-1	0	+1
ความเข้มข้นกลูโคส (X_1) กรัมต่อลิตร	20	40	60
ความเข้มข้นยีสต์สกัด (X_2) กรัมต่อลิตร	2.5	7.5	12.5
ระดับพีเอช (X_3)	5.5	6.5	7.5
อุณหภูมิ (X_4) องศาเซลเซียส	30	37	45

หมายเหตุ กำหนดค่าแต่ละปัจจัยเป็น -1, 0 และ +1 เป็น ค่าต่ำสุด ค่ากลางและค่าสูงสุดตามลำดับ ความเข้มข้นกลูโคส เป็น X_1 , ความเข้มข้นยีสต์สกัด เป็น X_2 , ระดับพีเอช เป็น X_3 และอุณหภูมิ เป็น X_4

ตารางที่ 3.2 ออกแบบการทดลองแฟคทอเรียลสำหรับผลิตภัณฑ์ในระดับขดทดลอง

ที่	ปัจจัยในการทดลอง				ที่	ปัจจัยในการทดลอง			
	X1	X2	X3	X4		X1	X2	X3	X4
1	0	0	0	0	15	-	-	+	-
2	0	0	-	-	16	-	+	0	0
3	0	0	+	+	17	-	+	-	-
4	0	-	0	-	18	-	+	+	+
5	0	-	-	+	19	+	0	0	+
6	0	-	+	0	20	+	0	-	0
7	0	+	0	+	21	+	0	+	-
8	0	+	-	0	22	+	-	0	0
9	0	+	+	-	23	+	-	-	-
10	-	0	0	-	24	+	-	+	+
11	-	0	-	+	25	+	+	0	-
12	-	0	+	0	26	+	+	-	+
13	-	-	0	+	27	+	+	+	0
14	-	-	-	0					

เก็บตัวอย่างวัดการเจริญจากความขุ่นของเชื้อที่ OD_{660} วิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายกรดแลกติก และตรวจสอบน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของปัจจัยโดยโปรแกรม SPSS และสร้างแผนภาพพื้นผิวตอบสนอง (Response surface methodology) โดยโปรแกรม STATISTICA (Version 8.0, StatSoft Inc., Tulsa, USA)

3.7 ผลิตรกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร

เลือกภาวะของการผลิตที่เหมาะสมบนพื้นผิวตอบสนองจากข้อ 3.6 ทำการทดสอบการผลิตกรดแลกติก ในอาหารเหลว MRS ที่ปรับปรุงตามข้อ 3.6 ปริมาตร 1.8 ลิตร ในถังปฏิกรณ์ รุ่น Marubishi Model MDL, Japan ปริมาตรสุทธิ 2 ลิตร ภาวะการเติมแป้งมันไฮโดรไลซ์โดยปรับความเข้มข้นเป็น 50 กรัมต่อลิตรแบบเฟด-แบตช์ที่เหมาะสม โดยตั้งระบบถังหมัก ไม่มีการให้อากาศแต่มีการวนที่ 50 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง จนครบ 40 ชั่วโมง

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเวลากับน้ำหนักเซลล์แห้ง วิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC และตรวจสอบน้ำตาลกลูโคสที่เหลือ

3.8 วิธีการวิเคราะห์

3.8.1 การหาการเจริญของแบคทีเรียผลิตรกรดแลกติกในการทดลอง

นำตัวอย่างที่ได้จากการทดลองมาวัดค่าความขุ่นที่ OD_{660} แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งกับค่าความขุ่นที่ OD_{660} หรือกราฟมาตรฐานระหว่างจำนวนเซลล์แบคทีเรียผลิตรกรดแลกติก (cfu/mL) กับค่าความขุ่นที่ OD_{660} (ภาคผนวก)

3.8.2 การหาปริมาณกรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC

นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสมาทำการเจือจางให้ความเข้มข้นเป็น 0.1 เท่า นำมากรองผ่านชุดกรองสำเร็จรูปชนิด PTFE ซีดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC รุ่น LC1100 บริษัท Agilent

เพื่อหาปริมาณกรดแลคติกจากการคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานกรดแลคติก(ภาคผนวก) ใน
ภาวะดังต่อไปนี้

คอลัมน์	Biorad Aminex HPX-87H ion exclusion organic acid column ขนาด 300 มิลลิเมตร x 7.8 มิลลิเมตร
สารละลายตัวพา	กรดซัลฟูริก 3 มิลลิโมลาร์
อุณหภูมิ	45 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล	0.9 มิลลิลิตรต่อนาที
ปริมาณวิเคราะห์	20 ไมโครลิตร
เครื่องตรวจวัด	RI detector

3.8.3 การหาปริมาณกลูโคสที่เหลือด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส(Glucose oxidase)

นำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดส่วนใสมาทำการ
วิเคราะห์ปริมาณกลูโคสด้วยชุดทดสอบปริมาณกลูโคสด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส(บริษัท ไบโอ
เทค. กรุงเทพ. ประเทศไทย) ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 3.3 ชนิดและปริมาณสารทดสอบปริมาณกลูโคสด้วยเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส

ชนิดของสาร	สารละลายblank (ไมโครลิตร)	สารละลายมาตรฐาน กลูโคส 1กรัมต่อลิตร (ไมโครลิตร)	สารตัวอย่าง (ไมโครลิตร)
สารละลายมาตรฐาน	-	10	-
สารตัวอย่าง	-	-	10
น้ำยาทดสอบ	1,000	1,000	1,000

นำสารละลาย blank สารละลายมาตรฐานและสารตัวอย่างมาบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส
นาน 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร(OD₅₂₀) เพื่อคำนวณปริมาณกลูโคสดังสมการ
ต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณกลูโคส(กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่าง} \times \text{dilution factor}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงสารละลายมาตรฐานกลูโคส}}$$




บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาลักษณะของเชื้อบนอาหารแข็ง MRS

ศึกษาลักษณะโคโลนีของ *P. acidilactici* TISTR 783 *Lb. halotolerans* TISTR 939 และ *L. lactis* TISTR 1401 ด้วยการ cấyเชื้อบนอาหารแข็ง MRS บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 16 ชั่วโมง ได้ผลดังต่อไปนี้




ตารางที่ 4.1 ลักษณะของแบคทีเรียผลิตรกรดแลคติกบนอาหารแข็ง MRS อายุเชื้อ 16 ชั่วโมง

แบคทีเรีย	สี	ขอบ	ผิวหน้า	การยกตัว	ภาพของแบคทีเรีย
<i>P. acidilactici</i> TISTR 783	ขาว	เรียบ	เรียบ	นูน	
<i>Lb. halotolerans</i> TISTR 939	ครีม	เรียบ	เรียบ	นูน	
<i>L. lactis</i> TISTR 1401	ครีม	เรียบ	เรียบ	แบน	

4.2 ผลการศึกษาลักษณะของเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ศึกษาลักษณะของเชื้อ *P. acidilactici* TISTR 783 *Lb. halotolerans* TISTR 939 และ *L. lactis* TISTR 1401 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยการย้อมสีแบบแกรม(Gram Staining) ในช่วงเวลาที่ 16 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS พบว่าเชื้อทั้งสามชนิดเป็นแกรมบวก และมีการเรียงตัวและรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์แตกต่างกัน ดังนี้

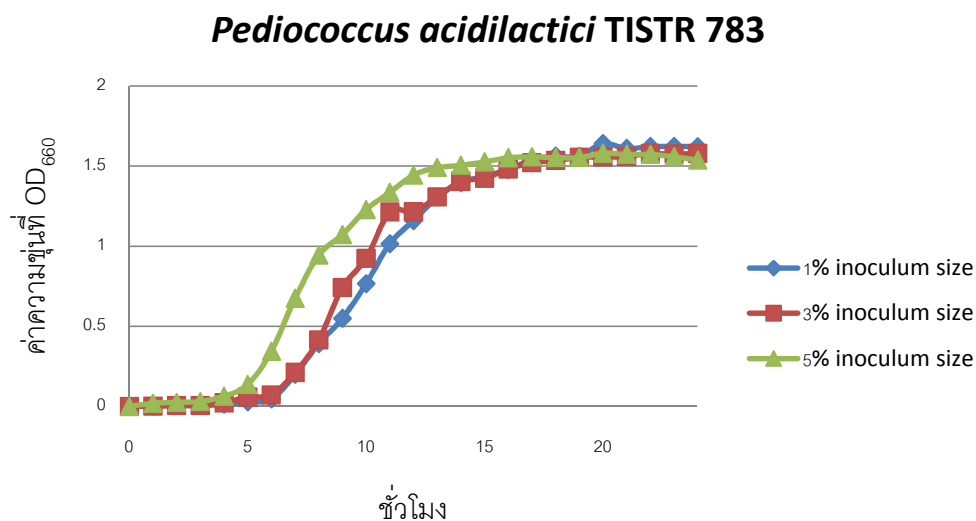
ตารางที่ 4.2 ลักษณะของแบคทีเรียผลิตภัณฑ์กรดแลคติกภายใต้กล้องจุลทรรศน์

แบคทีเรีย	ลักษณะเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์	ภาพของแบคทีเรีย (กำลังขยาย 1,000 เท่า)
<i>P. acidilactici</i> TISTR 783	แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม (cocci) เรียงตัวแบบสองเซลล์ติดกัน(diplococci)และเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น(staphylococci)	
<i>Lb. halotolerans</i> TISTR 939	แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน (rod) ไม่มีสปอร์	
<i>L. lactis</i> TISTR 1401	แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม (cocci) เรียงตัวแบบสองเซลล์ติดกัน(diplococci) สี่เซลล์ติดกัน(tetrad)และเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น(staphylococci)	

4.3 คัดเลือกจุลินทรีย์และหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

4.3.1 ศึกษาการเจริญและประสิทธิภาพการผลิตกรดแลกติกของกล้าเชื้อเดี่ยว

จากการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกทั้งสามด้วยการวัดค่าความขุ่นที่ OD₆₆₀ เทียบกับระยะเวลา เมื่อเตรียมกล้าเชื้อ *Pediococcus acidilactici* TISTR 783 *Lactobacillus halatolerans* TISTR 939 และ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ในพลาสติกแต่ละพลาสติกปริมาตรสุทธิ 100 มิลลิลิตร บรรจุอาหารเหลว MRS 50 มิลลิลิตร ใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร ปั่นเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ได้ผลการเจริญดังต่อไปนี้



รูปที่ 4.1 การเจริญของ *P. acidilactici* TISTR 783 ใช้ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร

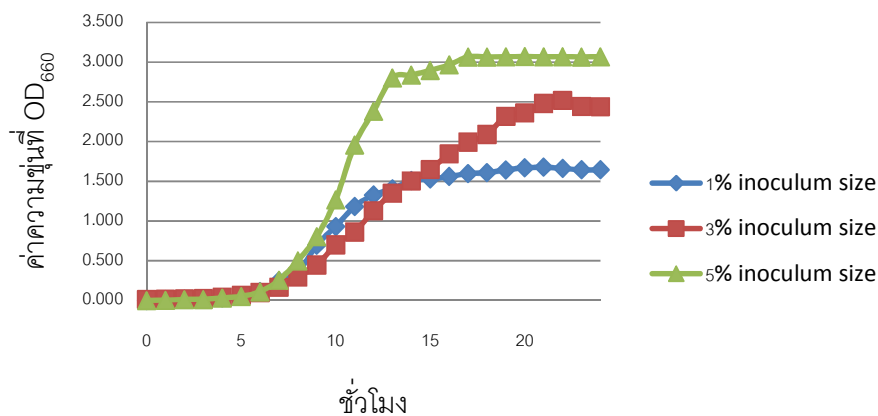
ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 1 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร มีผลต่อการเจริญ จะมีการเจริญของกล้าเชื้อเดี่ยวอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่ช่วงระยะเอ็กโปเนนเชียลตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึง 12 เข้าสู่ช่วงปลายของระยะเอ็กโปเนนเชียล ณ ชั่วโมงที่ 12 มีการเจริญ 14.52 log cfu/ml

ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 3 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร มีผลต่อการเจริญ จะมีการเจริญของกล้าเชื้อเดี่ยวอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่ช่วงระยะเอ็กโปเนนเชียลตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึง 13 เข้าสู่ช่วงปลายของระยะเอ็กโปเนนเชียล ณ ชั่วโมงที่ 13 มีการเจริญ 16.40 log cfu/ml

ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร มีผลต่อการเจริญ จะมีการเจริญของกล้าเชื้อเดี่ยวอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่ช่วงระยะเอ็กโปเนนเชียลตั้งแต่ชั่วโมงที่ 5 ถึง 12 เข้าสู่ช่วงปลายของระยะเอ็กโปเนนเชียล ณ ชั่วโมงที่ 12 มีการเจริญ 18.11 log cfu/ml

พบว่าการเจริญของ *P. acidilactici* TISTR 783 เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร เข้าสู่ช่วงปลายระยะเอ็กโปเนนเชียลในชั่วโมงที่ 12 13 และ 12 ตามลำดับ รวมทั้งเรียงลำดับปริมาณเชื้อซึ่งแปรผันตามความขุ่นที่ OD_{660} ได้เป็น $5 > 3 > 1$ เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร

Lactobacillus haloterans TISTR 939



รูปที่ 4.2 การเจริญของ *Lb. haloterans* TISTR 939 ใช้ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร

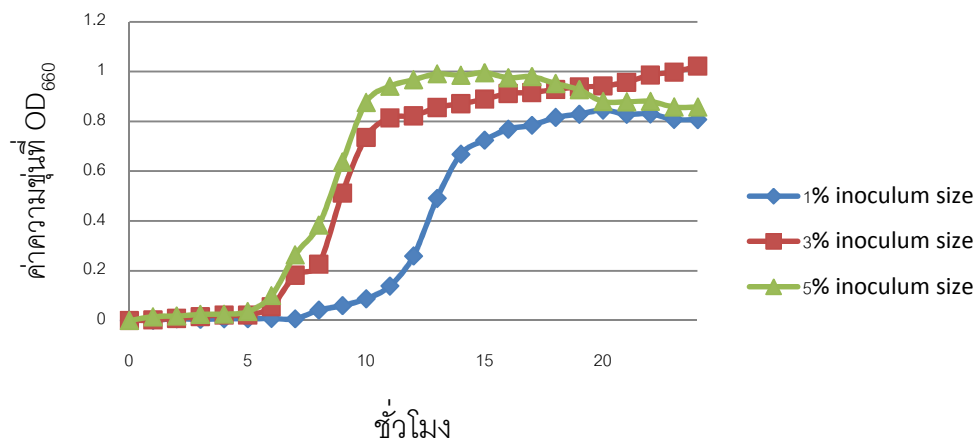
ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 1 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร มีผลต่อการเจริญ จะมีการเจริญของกล้าเชื้อเดี่ยวอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่ช่วงระยะเอ็กโปเนนเชียลตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึง 12 เข้าสู่ช่วงปลายของระยะเอ็กโปเนนเชียล ณ ชั่วโมงที่ 12 มีการเจริญ 6.28 log cfu/ml

ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 3 เพอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร มีผลต่อการเจริญ จะมีการเจริญของกล้าเชื้อเดี่ยวอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่ช่วงระยะเอ็กโปเนนเชียลตั้งแต่ชั่วโมงที่ 7 ถึง 19 เข้าสู่ช่วงปลายของระยะเอ็กโปเนนเชียล ณ ชั่วโมงที่ 19 มีการเจริญ 9.80 log cfu/ml

ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 5 เพอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร มีผลต่อการเจริญ จะมีการเจริญของกล้าเชื้อเดี่ยวอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่ช่วงระยะเอ็กโปเนนเชียลตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึง 13 เข้าสู่ช่วงปลายของระยะเอ็กโปเนนเชียล ณ ชั่วโมงที่ 13 มีการเจริญ 11.41 log cfu/ml

พบว่าการเจริญของ *Lb. halotolerans* TISTR 939 เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 1 3 และ 5 เพอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร เข้าสู่ช่วงปลายระยะเอ็กโปเนนเชียลในชั่วโมงที่ 12 19 และ 13 ตามลำดับ รวมทั้งเรียงลำดับปริมาณเชื้อซึ่งแปรผันตามความขุ่นที่ OD_{660} ได้เป็น $5 > 3 > 1$ เพอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร

Lactococcus lactis TISTR 1401



รูปที่ 4.3 การเจริญของ *L. lactis* TISTR 1401 ใช้ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 1 3 และ 5 เพอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร

ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 1 เพอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร มีผลต่อการเจริญ จะมีการเจริญของกล้าเชื้อเดี่ยวอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่ช่วงระยะเอ็กโปเนนเชียลตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 ถึง 14 เข้าสู่ช่วงปลายของระยะเอ็กโปเนนเชียล ณ ชั่วโมงที่ 14 มีการเจริญ 8.73 log cfu/ml

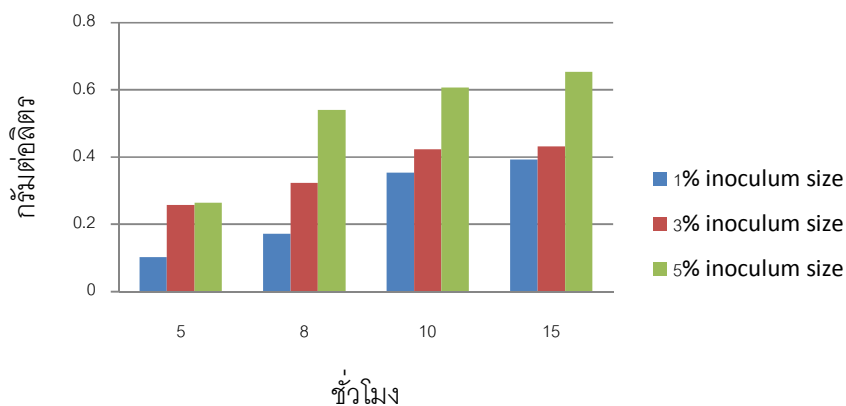
ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 3 เพอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร มีผลต่อการเจริญ จะมีการเจริญของกล้าเชื้อเดี่ยวอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่ช่วงระยะเอ็กโปเนนเชียลตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึง 10 เข้าสู่ช่วงปลายของระยะเอ็กโปเนนเชียล ณ ชั่วโมงที่ 10 มีการเจริญ 9.62 log cfu/ml

ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 5 เพอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตรมีผลต่อการเจริญ จะมีการเจริญของกล้าเชื้อเดี่ยวอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่ช่วงระยะเอ็กโปเนนเชียลตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึง 10 เข้าสู่ช่วงปลายของระยะเอ็กโปเนนเชียล ณ ชั่วโมงที่ 10 มีการเจริญ 11.44 log cfu/ml

พบว่า การเจริญของ *L. lactis* TISTR 1401 เมื่อใช้ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 1 3 และ 5 เพอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร เข้าสู่ช่วงปลายระยะเอ็กโปเนนเชียลในชั่วโมงที่ 14 14 และ 10 ตามลำดับ รวมทั้งเรียงลำดับปริมาณเชื้อซึ่งแปรผันตามความขุ่นที่ OD_{660} ได้เป็น $5 > 3 > 1$ เพอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร

เมื่อนำตัวอย่างกล้าเชื้อเดี่ยว *P. acidilactici* TISTR 783 และ *L. lactis* TISTR 1401 ชั่วโมงที่ 5 , 8 , 10 และ 15 ตัวอย่างกล้าเชื้อเดี่ยว *Lb. halotolerans* TISTR 939 ชั่วโมงที่ 6, 10 , 13 และ 20 มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC สามารถคำนวณการผลิตกรดแลคติกจากเบคทีเรียผลิตกรดแลคติกทั้งสาม ได้ผลดังนี้

Pediococcus acidilactici TISTR 783



รูปที่ 4.4 เปรียบเทียบปริมาณการผลิตกรดแลคติกของกล้าเชื้อเดี่ยว *P. acidilactici* TISTR 783 ใช้ปริมาณกล้าเชื้อ 1 3 และ 5 เพอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร

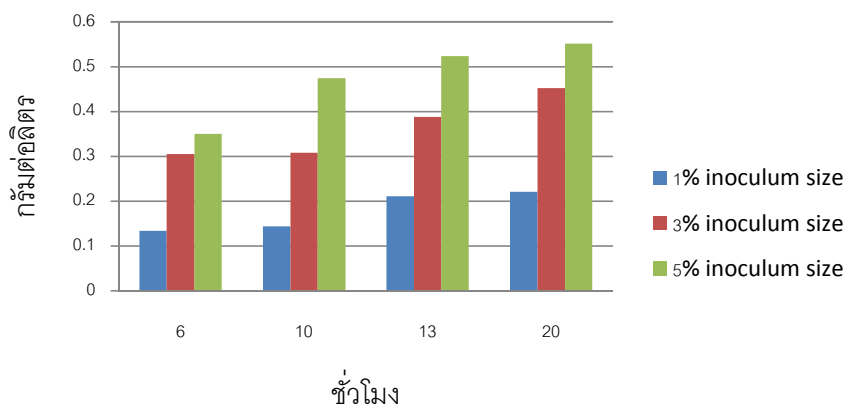
ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 1 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกใน ชั่วโมงที่ 5, 8, 10 และ 15 เป็น 1.0, 1.7, 3.5 และ 3.9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 3 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกใน ชั่วโมงที่ 5, 8, 10 และ 15 เป็น 2.5, 3.2, 4.2 และ 4.3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกใน ชั่วโมงที่ 5, 8, 10 และ 15 เป็น 2.6 5.4 6.0 และ 6.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

พบว่าการผลิตกรดแลกติกของกล้าเชื้อเดี่ยว *P. acidilactici* TISTR 783 เมื่อพิจารณา จาก 4 ช่วงเวลา พบว่า กล้าเชื้อเดี่ยว *P. acidilactici* TISTR 783 เรียงลำดับปริมาณแลกติกที่เกิดขึ้นจากปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว เป็น $5 > 3 > 1$ เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร

Lactobacillus haloterans TISTR 939



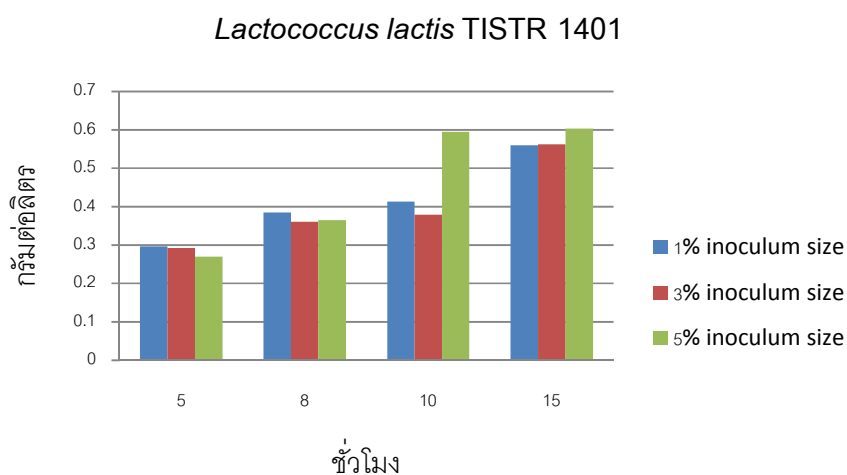
รูปที่ 4.5 เปรียบเทียบปริมาณการผลิตกรดแลกติกของกล้าเชื้อเดี่ยว *Lb. halotolerans* TISTR 939 ใช้ปริมาณ กล้าเชื้อ 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร

ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 1 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกใน ชั่วโมงที่ 6, 10, 13 และ 20 เป็น 1.3, 1.4, 2.1 และ 2.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 3 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกใน ชั่วโมงที่ 6, 10, 13 และ 20 เป็น 3.1, 3.1, 3.8 และ 4.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกใน ชั่วโมงที่ 6, 10, 13 และ 20 เป็น 3.5, 3.7, 5.2 และ 5.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

พบว่าการผลิตกรดแลกติกของก๊าล้าเชื้อเดี่ยว *Lb. halotolerans* TISTR 939 เมื่อพิจารณาจาก 4 ช่วงเวลา พบว่า ก๊าล้าเชื้อเดี่ยว *Lb. halotolerans* TISTR 939 เรียงลำดับปริมาณแลกติกที่เกิดขึ้นจากปริมาณก๊าล้าเชื้อเดี่ยว เป็น $5 > 3 > 1$ เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร



รูปที่ 4.6 เปรียบเทียบปริมาณการผลิตกรดแลกติกของก๊าล้าเชื้อเดี่ยว *L. lactis* TISTR 1401 ใช้ปริมาณก๊าล้าเชื้อ 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร

ปริมาณก๊าล้าเชื้อเดี่ยว 1 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกใน ชั่วโมงที่ 5, 8, 10 และ 15 เป็น 2.9, 3.8, 4.1 และ 5.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปริมาณก๊าล้าเชื้อเดี่ยว 3 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกใน ชั่วโมงที่ 5, 8, 10 และ 15 เป็น 2.9, 3.6, 3.7 และ 5.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ปริมาณก๊าล้าเชื้อเดี่ยว 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกใน ชั่วโมงที่ 5, 8, 10 และ 15 เป็น 2.7, 3.6, 5.9 และ 6.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

การผลิตกรดแลกติกของก๊าล้าเชื้อเดี่ยว *L. lactis* TISTR 1401 เมื่อพิจารณาจาก 4 ช่วงเวลา พบว่า ก๊าล้าเชื้อเดี่ยว *L. lactis* TISTR 1401 เรียงลำดับปริมาณแลกติกที่เกิดขึ้นจากปริมาณก๊าล้าเชื้อเดี่ยวเป็น $5 > 3 > 1$ เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร

พิจารณาการเจริญและปริมาณกรดแลกติกจากก๊าล้าเชื้อเดี่ยวของ *P. acidilactici* TISTR 783 *Lb. halotolerans* TISTR 939 และ *L. lactis* TISTR 1401 ปริมาณก๊าล้าเชื้อเดี่ยว 5

เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร และชั่วโมงที่ 10 ถูกเลือกเป็นภาวะที่ใช้สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป เนื่องจากได้ปริมาณกรดแลกติกในช่วงเวลาอันรวดเร็ว

เนื่องจากกรดแลกติกจัดเป็นเมตาโบไลต์ปฐมภูมิ (primary metabolite) เมื่อปริมาณกล้ำเชื้อที่มีปริมาณสูงจะส่งผลให้มีการผลิตกรดแลกติกมากขึ้นจากเดิม (Lu *et al*, 2010) จึงควรเลือกลักษณะของกล้ำเชื้อที่ดีที่สุดในการทดลอง คือ ปริมาณกล้ำเชื้อปริมาตรต่อปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตรเพื่อกระบวนการผลิตกรดแลกติกในขั้นต่อไป

4.3.2 ศึกษาการเจริญและประสิทธิภาพการผลิตกรดแลกติกของกล้ำเชื้อผสม

หลังจากเตรียมกล้ำเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกเพื่อศึกษาการเจริญและประสิทธิภาพการผลิตกรดแลกติกของกล้ำเชื้อผสมของแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกทั้งสาม คือ กล้ำเชื้อ *Pediococcus acidilactici* TISTR 783 *Lactobacillus halotolerans* TISTR 939 และ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ในพลาสติกแต่ละพลาสติกปริมาตรสุทธิ 100 มิลลิลิตร บรรจุอาหารเหลว MRS 50 มิลลิลิตร ถ่ายกล้ำเชื้อแต่ละชนิดตามที่กำหนด ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กล้ำเชื้อผสมระหว่าง *P. acidilactici* TISTR 783 และ *Lb. halotolerans* TISTR 939 อัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

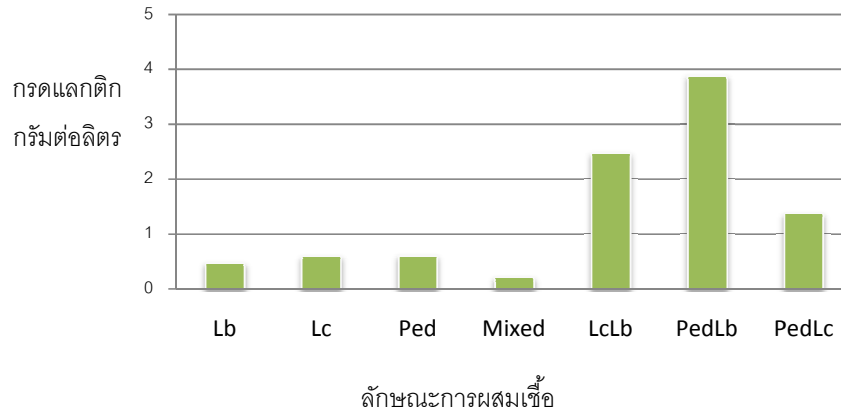
กลุ่มที่ 2 กล้ำเชื้อผสมระหว่าง *P. acidilactici* TISTR 783 และ *L. lactis* TISTR 1401 อัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

กลุ่มที่ 3 กล้ำเชื้อผสมระหว่าง *Lb. halotolerans* TISTR 939 และ *L. lactis* TISTR 1401 อัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

กลุ่มที่ 4 กล้ำเชื้อผสมระหว่าง *P. acidilactici* TISTR 783, *Lb. halotolerans* TISTR 939 และ *L. lactis* TISTR 1401 อัตราส่วน 1:1 :1 (ปริมาตรต่อปริมาตรต่อปริมาตร)

ใช้ปริมาณกล้ำเชื้อผสม 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างชั่วโมงที่ 10 มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC สามารถคำนวณการผลิตกรดแลกติกจากกล้ำเชื้อผสม ของแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกทั้งสาม ได้ผลดังนี้

เปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติก



รูปที่ 4.7 เปรียบเทียบปริมาณการผลิตกรดแลกติกของกล้าเชื้อเดี่ยวและกล้าเชื้อผสม อายุเชื้อ 10 ชั่วโมง

หมายเหตุ แสดงชื่อตัวย่อของกล้าเชื้อเดี่ยวและกล้าเชื้อผสม ดังนี้

Ped : *P. acidilactici* TISTR 783

Lb : *Lb. halotolerans* TISTR 939

Lc : *L. lactis* TISTR 1401

Mixed : Ped Lb Lc

LcLb : Lb Lc

PedLb : Ped Lb

PedLc : Ped Lc

ปริมาณกรดแลกติกของกล้าเชื้อเดี่ยวของ *P. acidilactici* TISTR 783 *Lb. halotolerans* TISTR 939 *L. lactis* TISTR 1401 เป็น 6.1 4.7 และ 5.9 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับปริมาณกรดแลกติกของกล้าเชื้อผสมตามชื่อตัวย่อ คือ Mixed LcLb PedLb และ PedLc สามารถผลิตกรดแลกติกได้เป็น 2.1, 24.7, 38.8 และ 13.7 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

กล้าเชื้อผสมระหว่าง *P. acidilactici* TISTR 783 และ *Lb. halotolerans* TISTR 939 อัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) เมื่ออายุเชื้อ 10 ชั่วโมง มีการผลิตกรดแลคติกมากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มของกล้าเชื้อเดี่ยวและกล้าเชื้อผสม แม้ว่า *Lb. halotolerans* TISTR 939 จะสามารถผลิตเอทานอลได้แต่เป็นปริมาณเล็กน้อยคือ 3.6 ต่อลิตร ขณะที่ปริมาณกรดแลคติกเป็น 34.9 กรัมต่อลิตร (Borch และ Molin., 1989) จึงเลือกเป็นกล้าเชื้อสำหรับการผลิตกรดแลคติก

การเลือกใช้กล้าเชื้อผสมเป็นรูปแบบกล้าเชื้อในกระบวนการหมักนั้นมีข้อดีต่อกระบวนการหมัก เช่น Wee *et al.* (2006) ใช้ *Lactobacillus brevis* และ *Lactobacillus pentosus* เป็นกล้าเชื้อผสมเลี้ยงในอาหารที่มีลิกโนเซลลูโลสที่ถูกไฮโดรไลซ์แล้วเป็นสารตั้งต้นในการผลิตกรดแลคติก พบว่าสามารถยับยั้งสภาวะที่เป็นอันตรายต่อเซลล์หรือกระทบต่อการผลิตกรดแลคติกได้และสามารถส่งเสริมประสิทธิภาพของกระบวนการหมักให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น (John *et al.*, 2007)

Lee (2007) เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตกรดแลคติกของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ATCC 12315 *Lactobacillus casei* NRRL-B1445 *Lactobacillus delbrueckii* NRRL-B445 *Lactobacillus helveticus* NRRL-B1937 และ *Lactobacillus casei* NRRL-B1922 ใช้ corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่ากล้าเชื้อผสมมีความต้องการแหล่งไนโตรเจนน้อยกว่าเชื้อเดี่ยว

ดังนั้นพิจารณาจากปริมาณกรดแลคติกที่เกิดขึ้นในระยะเวลาที่เท่ากันจึงเลือกกล้าเชื้อผสมระหว่าง *P. acidilactici* TISTR 783 และ *Lb. halotolerans* TISTR 939 อัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และระยะเวลาการหมัก 10 ชั่วโมง เป็นรูปแบบกล้าเชื้อและระยะเวลาในการทดลองขั้นต่อไป

4.4 หามภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดแลคติกในระดับขวดทดลองโดยใช้วิธีทางสถิติ

เมื่อวิเคราะห์กรดแลคติกที่เกิดขึ้นจากกล้าเชื้อผสมของ *Pediococcus acidilactici* TISTR 783 และ *Lactobacillus halotolerans* TISTR 939 ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตรเลี้ยงกล้าเชื้อในอาหารเหลว MRS 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในพลาสติกปริมาตรสุทธิ 100 มิลลิลิตร

ออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียลเพื่อนำไปสร้างพื้นผิวตอบสนองด้วยการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลูโคส 20 40 และ 60 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน 2.5 7.5 และ 12.5 กรัมต่อลิตร ที่ระดับพีเอช 5.5 6.5 และ 7.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกได้ ดังนี้

ตารางที่ 4.3 ปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากการออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียลและนำไปใช้ในการสร้างพื้นผิวตอบสนองและค่าทำนายการเกิดกรดแลกติก

ลำดับ	ปัจจัย				กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	ค่าทดลอง	ค่าทำนาย
1	0	0	0	0	28.8	26.7
2	0	0	-	-	2.2	1.8
3	0	0	+	+	23.9	22.4
4	0	-	0	-	2.6	2.5
5	0	-	-	+	24.4	22.9
6	0	-	+	0	22.1	20.8
7	0	+	0	+	2.3	2.9
8	0	+	-	0	31.7	31.6
9	0	+	+	-	39.4	38.2
10	-	0	0	-	15.7	15.8
11	-	0	-	+	8.9	8.6
12	-	0	+	0	3.4	3.2
13	-	-	0	+	16.3	16.1
14	-	-	-	0	9.9	8.98
15	-	-	+	-	5.7	5.2
16	-	+	0	0	1.9	1.8

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

ลำดับ	ปัจจัย				กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	ค่าทดลอง	ค่าทำนาย
17	-	+	-	-	2.7	2.6
18	-	+	+	+	1.6	1.4
19	+	0	0	+	3.4	3.2
20	+	0	-	0	5.7	5.6
21	+	0	+	-	3.3	3.2
22	+	-	0	0	19.9	18.7
23	+	-	-	-	8.4	8.6
24	+	-	+	+	1.2	1.1
25	+	+	0	-	5.7	5.6
26	+	+	-	+	2	1.8
27	+	+	+	0	3	2.9

หมายเหตุ กำหนด X₁ เป็น ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)

X₂ เป็น ปริมาณยีสต์สกัด (กรัมต่อลิตร)

X₃ เป็น ระดับพีเอช

X₄ เป็น อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)

พบว่าปริมาณกรดแลกติกสูงสุดในการทดลองและค่าทำนายเกิดในภาวะเดียวกันเมื่อให้ความเข้มข้นของกลูโคสและยีสต์สกัดเป็น 40 และ 12.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ระดับพีเอช 7.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

นำข้อมูลของปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากการทดลองมาทำพื้นผิวตอบสนอง เมื่อออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียลที่มีปัจจัย 4 ปัจจัย ระยะเวลา 10 ชั่วโมง ด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และใช้ Student's t-test ที่ระดับนัยสำคัญ(P<0.01) ดังนี้

ตารางที่ 4.4 วิเคราะห์ความแปรปรวน(ANOVA)ของปริมาณกรดแลกติกจากการออกแบบการทดลองแฟคทอเรียล

ข้อมูล	df	Sum of squares	F-value	P-value	
model	14	1060.87	16.84	0.0003*	Sig.
X ₁	1	590.34	6.41	.0322	
X ₂	1	98.82	5.88	.0423	
X ₃	1	24.09	8.46	.0176	
X ₄	1	7.264	6.63	.0743	
X ₁ ²	1	102.48	12.41	.0479*	Sig.
X ₂ ²	1	103.82	11.31	.0851*	Sig.
X ₃ ²	1	24.68	2.44	.9911	
X ₄ ²	1	17.49	2.84	.6834	
X ₁ X ₂	1	18.49	3.88	.8808	
X ₁ X ₃	1	22.45	5.23	.5348	
X ₁ X ₄	1	2.63	6.63	.2344	
X ₂ X ₃	1	19.62	2.21	.2513	
X ₂ X ₄	1	15.93	8.66	.1589	
X ₃ X ₄	1	12.73	0.12	.6400	
Residual	12	650.79			
Total	26	1711.68			

หมายเหตุ *Sig. = significant at $p > 0.01$, $R^2 = 0.9515$, Adjusted $R^2 = 0.8950$

จากตารางพบว่า ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ(R^2)เท่ากับ 0.9515 อิทธิพลของปัจจัย (F-value) เท่ากับ 16.84 แสดงความสัมพันธ์ของปัจจัยรวมมีผลต่อการผลิตกรดแลกติกและสมการถดถอยอย่างมีนัยสำคัญ รวมทั้งมีปัจจัยที่มีผลต่อการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ 2 ปัจจัย

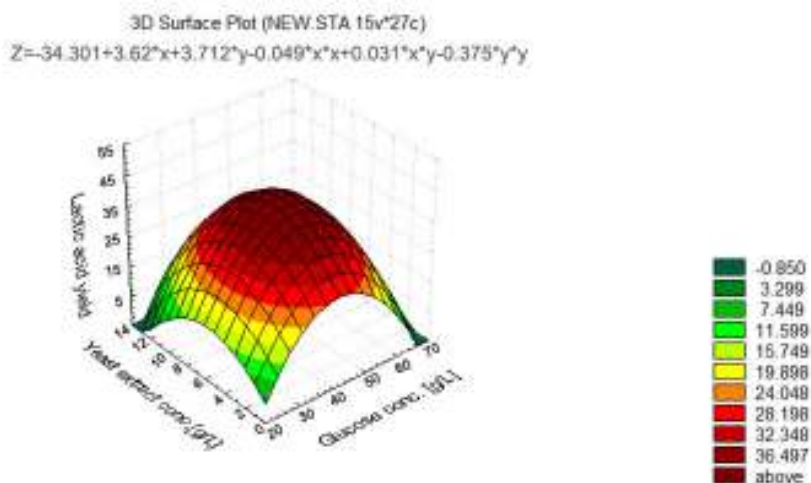
คือ ความเข้มข้นของกลูโคสและความเข้มข้นของยีสต์สกัดรวมทั้งวิเคราะห์สมการถดถอยหรือสมการทำนายรวมได้ ดังนี้

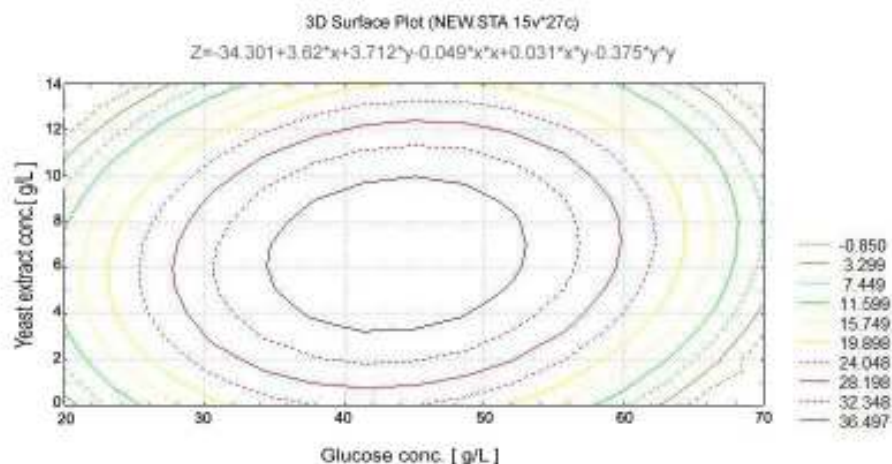
$$Y = -0.020662x_1^2 + 0.003154x_2^2 - 0.0014436x_3^2 + 0.015613x_4^2 + 0.005480x_1x_2 + 0.088710x_1x_3 + 0.026183x_1x_4 + 0.637847x_2x_3 - 0.123914x_2x_4 - 0.206450x_3x_4 + 17.467587$$

จากสมการกำหนด Y เป็นปริมาณกรดแลกติก(กรัมต่อลิตร) X_1 เป็นความเข้มข้นของกลูโคส(กรัมต่อลิตร) X_2 เป็นปริมาณยีสต์สกัด(กรัมต่อลิตร) X_3 เป็นระดับพีเอช X_4 เป็น อุณหภูมิ(องศาเซลเซียส)

จากการทดลองสามารถนำข้อมูลของปริมาณกรดแลกติกวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เพื่อช่วยจำแนกว่าปัจจัยใดมีความสำคัญต่อการผลิตกรดแลกติก ในขณะที่สมการถดถอยใช้สร้างแบบจำลองแสดงความสัมพันธ์เชิงปริมาณของปัจจัยที่สำคัญได้

เมื่อพิจารณาค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (Coefficient of Determination; R^2) หากสมการมีค่า R^2 ยิ่งสูงเท่าใด ความแม่นยำของการนำสมการไปใช้เพื่อทำนายหรือคาดคะเนผลลัพธ์ย่อมมีสูงมากยิ่งขึ้น โดยค่า R^2 ในการทดลองนี้มีค่า 0.9515 สามารถทำนายความสามารถในการผลิตกรดแลกติกในแบบจำลองได้แม่นยำ 95.15 เปอร์เซ็นต์ในสมการและได้แผนภาพพื้นผิวตอบสนองแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย ดังนี้





รูปที่ 4.8 แผนภาพพื้นผิวตอบสนองของแสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของกลูโคสและปริมาณยีสต์สกัดต่อการผลิตกรดแลกติก

พิจารณาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของกลูโคสและปริมาณยีสต์สกัดที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกบนแผนภาพพื้นผิวตอบสนอง พบว่าปริมาณกรดแลกติกสัมพันธ์กับความเข้มข้นของกลูโคสและยีสต์สกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS มีช่วงความเข้มข้นของกลูโคส 35 ถึง 53 กรัมต่อลิตร และช่วงความเข้มข้นของยีสต์สกัดเป็น 3.8 ถึง 9.6 กรัมต่อลิตร ทำให้สามารถผลิตกรดแลกติกได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเลือกแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมรวมทั้งเลือกใช้ยีสต์สกัดที่มีวิตามินและกรดอะมิโนช่วยเสริมการเจริญของแบคทีเรียผลิตกรดแลกติก (Ohkouchi และ Inoue, 2006; Lu *et al.*, 2010) และสามารถสร้างสมการทำนายสำหรับปัจจัยทั้งสองได้ ดังนี้

$$Y = -0.049X_1^2 - 0.375X_2^2 + 0.031X_1X_2 + 3.62X_1 + 3.712X_2 - 34.301$$

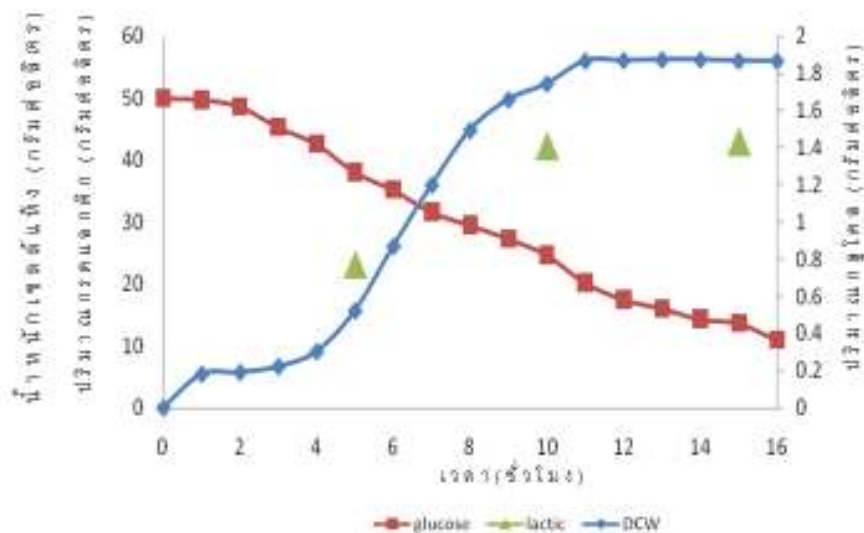
จากสมการกำหนดให้ Y เป็นปริมาณกรดแลกติกที่เกิดขึ้น X_1 เป็นความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร) และ X_2 เป็นความเข้มข้นของยีสต์สกัด (กรัมต่อลิตร) จากนั้นแทนค่าในสมการทำนายเพื่อเลือกปริมาณกรดแลกติกมากที่สุดจากสมการทำนาย พบว่าความเข้มข้นของกลูโคสและยีสต์สกัด เป็น 50 และ 8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณกรดแลกติกจากสมการคำนวณมีค่า 42.29 กรัมต่อลิตร จึงทวนสอบสมการด้วยการทดลองตามภาวะที่กำหนดในระดับฟลasks ควบคุมพีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างช่วงเวลาที่ 10 นาทีวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC พบว่าปริมาณกรดแลกติกจากการทดลองมีค่า 42.0 กรัมต่อลิตรเป็นปริมาณใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากสมการทำนาย รวมทั้งเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากอาหารเหลว MRS สูตรเดิม มีความเข้มข้นของกลูโคสและยีสต์สกัดเป็น 20 และ 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ควบคุมพีเอช อุณหภูมิ และชั่วโมงเก็บตัวอย่างเดียวกัน พบว่าปริมาณกรดแลกติกเป็น 35.02 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกจากอาหาร MRS สูตรปรับปรุงและสูตรเดิมพบว่า ปริมาณกรดแลกติกมีค่าเพิ่มขึ้น 1.2 เท่า

4.5 ผลิตรกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์ขนาด 2 ลิตร

4.5.1 การผลิตรกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์แบบแบตช์

เลือกภาวะของการผลิตที่เหมาะสมบนพื้นผิวตอบสนอง ทำการทดสอบการผลิตกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์ รุ่น Marubishi Model MDL, Japan ปริมาตรสุทธิ 2 ลิตร บรรจุอาหารเหลว MRS ปริมาตร 1 ลิตรที่ปรับปรุงความเข้มข้นของกลูโคสให้เป็น 50 กรัมต่อลิตรจากแป้งมันไฮโดรไลซ์และยีสต์สกัด 8 กรัมต่อลิตร ควบคุมค่าพีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและการกวน 50 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อหาการเจริญของเชื้อและปริมาณกลูโคสทุก 1 ชั่วโมง จนครบ 16 ชั่วโมง วิเคราะห์ตัวอย่างเพื่อหาปริมาณกรดแลกติกในชั่วโมงที่ 5 10 และ 15 ได้ผลดังต่อไปนี้



รูปที่ 4.9 ผลการเจริญและปริมาณกลูโคสของเชื้อผสมระหว่าง *P. acidilactici* TISTR 783 และ *Lb. halotolerans* TISTR 939 ในการผลิตรกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์แบบแบตช์ (◆ = น้ำหนักเซลล์แห้ง, ■ = ปริมาณกลูโคส, ▲ = ปริมาณแลกติก)

ผลการเจริญของเชื้อผสมระหว่าง *P. acidilactici* TISTR 783 *Lb. halotolerans* TISTR 939 จะมีการเจริญของเชื้อผสมอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่ช่วงระยะเอ็กโปเนนเชียลตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 ถึง 10 เข้าสู่ช่วงปลายของระยะเอ็กโปเนนเชียล ณ ชั่วโมงที่ 10 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง 1.74 กรัมต่อลิตร

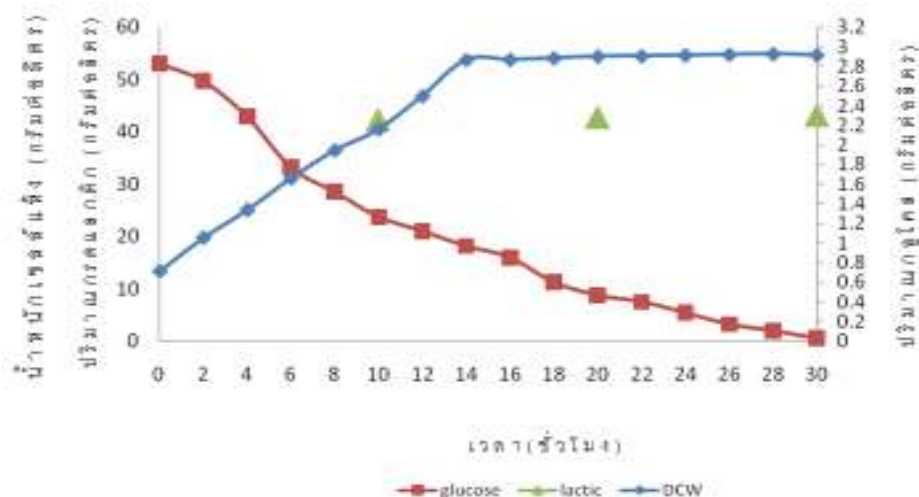
ปริมาณกลูโคสในอาหาร MRS สูตรปรับปรุงที่มีเชื้อผสมระหว่าง *P. acidilactici* TISTR 783 และ *Lb. halotolerans* TISTR 939 เริ่มต้นมีค่า 50.42 กรัมต่อลิตรได้ลดลงอย่างรวดเร็วตลอดช่วง 13 ชั่วโมงแรก และลดลงอย่างต่อเนื่องจนเหลือ 10.98 กรัมต่อลิตรเมื่อครบระยะเวลาการหมัก ณ ชั่วโมงที่ 16 รวมทั้งได้ปริมาณกรดแลกติกที่ชั่วโมงที่ 5 10 และ 15 เป็น 23.1 42.3 และ 43.0 กรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยปริมาณกรดแลกติกชั่วโมงที่ 10 และ 15 ไม่แตกต่างกันนัก

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกจาก Laopaiboon *et al.* (2010) ใช้กล้าเชื้อเดี่ยวของ *Lactococcus lactis* IO-1 เลือกกระบวนการหมักแบบแบดชีในอาหารเหลว MRS ผสมชานอ้อยที่ถูกลบด้วยกรด นาน 75 ชั่วโมง มีความเข้มข้นของกลูโคสและไซโลสเป็น 25 และ 7 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ได้ปริมาณกรดแลกติก 10.85 กรัมต่อลิตร รวมทั้ง Olusegun *et al.* (2008) ใช้กล้าเชื้อเดี่ยวของ *P. acidilactici* FLE01 เลือกกระบวนการหมักแบบแบดชีในอาหารเหลว MRS สูตรปรับปรุง นาน 24 ชั่วโมง มีปริมาณกลูโคสเป็น 45 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณกรดแลกติก 17.6 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบแล้วพบว่าปริมาณกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์แบบแบดชีนี้มีปริมาณกรดแลกติกมากกว่าและใช้ช่วงเวลาอันรวดเร็วกว่า รวมถึงการใช้กล้าเชื้อผสมสามารถให้ปริมาณกรดแลกติกได้ดีกว่าการใช้กล้าเชื้อเดี่ยวอีกด้วย

4.5.2 การผลิตกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์แบบเฟด-แบดซ์

เลือกภาวะของการผลิตที่เหมาะสมบนพื้นผิวตอบสนอง ทำการทดสอบการผลิตกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์ รุ่น Marubishi Model MDL, Japan ปริมาตรสุทธิ 2 ลิตร บรรจุอาหารเหลว MRS ปริมาตร 1 ลิตรที่ปรับปรุงความเข้มข้นของกลูโคสให้เป็น 50 กรัมต่อลิตรจากแป้งมันไฮโดรไลซ์และยีสต์สกัด 8 กรัมต่อลิตร ควบคุมค่าพีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและการกวน 50 รอบต่อนาที เมื่อกระบวนการหมักดำเนินไปจนเชื้อเข้าสู่ช่วงปลายระยะเอ็กโปเนนเชียล ชั่วโมงที่ 10 จึงเติมสารละลายกลูโคสจากแป้งมันไฮโดรไลซ์และความเข้มข้นของยีสต์สกัดปริมาตร 800 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นของกลูโคสและยีสต์สกัดในอาหารรวมเป็น 50 และ 8 กรัมต่อลิตร กำหนดเป็นชั่วโมงที่ 0 สำหรับการผลิตกรดแลกติกแบบเฟด-แบดซ์

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเวลากับน้ำหนักเซลล์แห้ง วิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกและตรวจสอบน้ำตาลกลูโคสที่เหลือทำการเก็บตัวอย่างเพื่อหาการเจริญของเชื้อและปริมาณกลูโคสทุก 2 ชั่วโมง จนครบ 30 ชั่วโมง วิเคราะห์ตัวอย่างเพื่อหาปริมาณกรดแลกติกได้ ดังต่อไปนี้



รูปที่ 4.10 ผลการเจริญและปริมาณกลูโคสของเชื้อผสมระหว่าง *P. acidilactici* TISTR 783 และ *Lb. halotolerans* TISTR 939 ในการผลิตกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์แบบเฟด-แบตช์ (◆ = น้ำหนักเซลล์แห้ง, ■ = ปริมาณกลูโคส, ▲ = ปริมาณแลกติก)

ผลการเจริญของเชื้อผสมระหว่าง *P. acidilactici* TISTR 783 *Lb. halotolerans* TISTR 939 จะมีการเจริญของเชื้อผสมอย่างรวดเร็ว น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มต้นมากกว่าการผลิตกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์แบบแบตช์ เข้าสู่ช่วงระยะเอ็กโปเนนเชียลตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง 14 เข้าสู่ช่วงปลายของระยะเอ็กโปเนนเชียล ณ ชั่วโมงที่ 14 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.87 กรัมต่อลิตร

พบว่าปริมาณกลูโคสในอาหาร MRS สูตรปรับปรุงที่มีเชื้อผสมระหว่าง *P. acidilactici* TISTR 783 และ *Lb. halotolerans* TISTR 939 ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรกและลดลงอย่างต่อเนื่องจนเหลือ 0.06 กรัมต่อลิตรเมื่อครบระยะเวลาการหมัก ณ ชั่วโมงที่ 30 รวมทั้งได้ปริมาณกรดแลกติกที่ชั่วโมงที่ 10 20 และ 30 มีปริมาณกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์แบบเฟด-แบตช์เป็น 42.3 42.8 และ 43.2 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณกรดแลกติกไม่แตกต่างกันนัก

Nelson *et al.* (2008) ใช้ก้านเชื้อเดี่ยว *P. acidilactici* NRRL B-5627 เลือกระบวนการหมักแบบเฟด-แบตช์ในอาหารเหลว MRS นาน 120 ชั่วโมง มีปริมาณกลูโคสเป็น 60 กรัมต่อลิตร

ได้ปริมาณกรดแลกติก 130 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกกับกระบวนการหมักแบบ เฟด-แบตช์นี้ พบว่าปริมาณกรดแลกติกจากกล้าเชื้อเดี่ยว *P. acidilactici* NRRL B-5627 มีปริมาณกรดแลกติกมากกว่า แต่ใช้ระยะเวลาในกระบวนการหมักมากกว่าซึ่งทำให้สูญเสียเวลาและ ต้นทุนในการผลิตกรดแลกติกเพิ่มมากขึ้น

เปรียบเทียบผลการเจริญของกล้าเชื้อผสมในกระบวนการหมักที่แตกต่างกัน พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งจากกระบวนการหมักแบบเฟด-แบตช์มีค่ามากกว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ จากการผลิตกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์แบบแบตช์ ทำให้มีปริมาณกล้าเชื้อมากกว่า ไม่ต้องเตรียม กล้าเชื้อทำให้สามารถผลิตกรดแลกติกได้ต่อเนื่องและเข้าสู่ช่วงระยะเอ็กโปเนนเชียลด้วยปริมาณ กล้าเชื้อที่มากกว่ากระบวนการหมักแบบแบตช์

เปรียบเทียบปริมาณกรดแลกติกของกล้าเชื้อผสมในกระบวนการหมักที่แตกต่างกัน พบว่าปริมาณกรดแลกติกจากกระบวนการหมักแบบแบตช์และเฟด-แบตช์มีปริมาณไม่แตกต่างกัน นับตั้งแต่ชั่วโมงที่ 10 สามารถเลือกกระบวนการหมักแบบแบตช์เพื่อระยะเวลาอันรวดเร็วใน กระบวนการหมัก หรือเลือกกระบวนการหมักแบบเฟด-แบตช์เพื่อลดขั้นตอนในการเตรียมกล้าเชื้อ ผสมได้

นอกจากนี้ยังสามารถลดขั้นตอนในการขั้นตอนการย่อยแป้งมันสำปะหลัง เมื่อเลือกกล้า เชื้อผสมที่มีเอนไซม์ย่อยแป้งมันสำปะหลัง เช่น John *et al.* (2008) ใช้กล้าเชื้อผสม *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2025 และ *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 28342 เลือกกระบวนการ หมักแบบแบตช์ ใช้น้ำแป้งมันสำปะหลัง ได้ปริมาณกรดแลกติก 40 กรัมต่อลิตรจากปริมาณกลูโคส เป็น 50 กรัมต่อลิตรที่ได้จากเอนไซม์อะไมเลสของ *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 28342 ทำให้กระบวนการหมักมีประสิทธิภาพและลดขั้นตอนการย่อยแป้งมันสำปะหลังได้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

กรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์ที่สำคัญต่ออุตสาหกรรมหลายด้าน สามารถนำคุณสมบัติของกรดแลคติกไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลายทำให้ความต้องการของกรดแลคติกมีปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปี แลคติกส่วนใหญ่เกิดจากกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ซึ่งจุลินทรีย์ผลิตกรดแลคติกเป็นหนึ่งในจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดแลคติก ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นปริมาณกรดแลคติกที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก เลือกจุลินทรีย์ที่มีการผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณสูงและนำวิธีการทางสถิติมาประยุกต์ใช้เพื่อนำ กรดแลคติกที่ได้จากกระบวนการหมักไปใช้เป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมต่อไป

ศึกษาการคัดเลือกจุลินทรีย์และหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก เมื่อศึกษาการเจริญและประสิทธิภาพการผลิตกรดแลคติกของก๊าล่าเชื้อเดี่ยวในอาหาร MRS อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า การเจริญจากก๊าล่าเชื้อเดี่ยวของ *P. acidilactici* TISTR 783 *Lb. halotolerans* TISTR 939 และ *L. lactis* TISTR 1401 ชั่วโมงที่ 10 ถูกเลือกเป็นภาวะที่ใช้สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป เนื่องจากได้ปริมาณกรดแลคติกในช่วงเวลาอันรวดเร็ว พิจารณาปริมาณกรดแลคติกจากปริมาณก๊าล่าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตรของก๊าล่าเชื้อ *P. acidilactici* TISTR 783 *Lb. halotolerans* TISTR 939 และ *L. lactis* TISTR 1401 เป็น 5.9 6.0 และ 5.2 กรัมต่อลิตร จึงเลือกปริมาณก๊าล่าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตรและชั่วโมงที่ 10 เป็นภาวะในการทดลองต่อไป เมื่อศึกษาการเจริญและประสิทธิภาพการผลิตกรดแลคติกของก๊าล่าเชื้อผสมพบว่าก๊าล่าเชื้อผสมระหว่าง *P. acidilactici* TISTR 783 และ *Lb. halotolerans* TISTR 939 อัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาณก๊าล่าเชื้อผสม 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร ในอาหารเหลว MRS อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ชั่วโมงที่ 10 มีปริมาณกรดแลคติกสูงสุด 38.8 กรัมต่อลิตรเทียบกับรูปแบบก๊าล่าเชื้อผสมทั้งหมด จึงเลือกรูปแบบก๊าล่าเชื้อผสมระหว่าง *P. acidilactici* TISTR 783 และ *Lb. halotolerans* TISTR 939 อัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาณก๊าล่าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตรและชั่วโมงที่ 10 เป็นภาวะในการทดลองต่อไป

จากนั้นศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตกรดแลคติกในระดับขวดทดลองโดยใช้วิธีทางสถิติด้วยการออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียลกำหนดปัจจัย 4 ปัจจัยคือความเข้มข้นของกลูโคส ความเข้มข้นของยีสต์สกัด ระดับพีเอช และอุณหภูมิ เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลูโคส 20 40 และ 60 กรัมต่อลิตร และ ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน 2.5 7.5 และ 12.5 กรัมต่อลิตรใน

อาหาร MRS ที่ระดับพีเอช 5.5 6.5 และ 7.5 ปมที่อุณหภูมิ 30 37 และ 45 องศาเซลเซียส ได้การแบบทดลอง 27 แบบ นำปริมาณกรดแลกติกที่เกิดจากกล้าเชื้อผสมระหว่าง *P. acidilactici* TISTR 783 และ *Lb. halotolerans* TISTR 939 อัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ปริมาณกล้าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตรและชั่วโมงที่ 10 เปรียบเทียบกันด้วยวิธีการทางสถิติพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ 2 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของกลูโคสและความเข้มข้นของยีสต์สกัด ได้สมการทำนายความสัมพันธ์ของปัจจัยทั้งสี่ที่มีต่อการผลิตกรดแลกติกเป็น

$$Y = -.020662x_1^2 + .003154x_2^2 - .0014436x_3^2 + .015613x_4^2 + .005480x_1x_2 + .088710x_1x_3 + .026183x_1x_4 + .637847x_2x_3 - .123914x_2x_4 - .206450x_3x_4 + 17.467587$$

และได้สมการทำนายความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของกลูโคสและความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่มีต่อการผลิตกรดแลกติกเป็น

$$Y = -.049X_1^2 - .375X_2^2 + .031X_1X_2 + 3.62X_1 + 3.712X_2 - 34.301$$

กำหนด Y เป็นปริมาณกรดแลกติก(กรัมต่อลิตร) X_1 เป็นความเข้มข้นของกลูโคส(กรัมต่อลิตร) X_2 เป็นปริมาณยีสต์สกัด(กรัมต่อลิตร) X_3 เป็นระดับพีเอช X_4 เป็น อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ(R^2)เท่ากับ 0.9515 แสดงว่าสมการดังกล่าวสามารถอธิบายตัวแปรในค่าตอบสนองเป็น 95 เปอร์เซ็นต์

ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติกคือความเข้มข้นของกลูโคสและยีสต์สกัด 50 และ 8 กรัมต่อลิตร ควบคุมพีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณกรดแลกติกจากสมการทำนายและการทดลองเป็น 42.29 และ 42.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับซึ่งมีความแม่นยำสูงในการทำนาย รวมทั้งปริมาณกรดแลกติกมีค่าเพิ่มขึ้น 1.2 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเหลว MRS สูตรเดิม

ในศึกษาการผลิตกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์แบบแบตช์ บรจุอาหารเหลว MRS ปริมาตร 1 ลิตรที่ปรับปรุงความเข้มข้นของกลูโคสจากแป้งมันไฮโดรไลซ์และยีสต์สกัด 50 และ 8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ควบคุมค่าพีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและการกวน 50 รอบต่อนาที ได้ปริมาณกรดแลกติกที่ชั่วโมงที่ 10 เป็น 42.3 กรัมต่อลิตร

จากนั้นศึกษาการผลิตกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์แบบเฟด-แบตช์บรจุอาหารเหลว MRS ปริมาตร 1 ลิตรที่ปรับปรุงความเข้มข้นของกลูโคสจากแป้งมันไฮโดรไลซ์และยีสต์สกัด 50 และ 8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ควบคุมค่าพีเอช 6.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและการกวน 50 รอบต่อนาที จนกระทั่งชั่วโมงที่ 10 จึงเติมสารละลายกลูโคสจากแป้งมันไฮโดรไลซ์และความเข้มข้นของยีสต์สกัดปริมาตร 800 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นของกลูโคสและยีสต์สกัดในอาหารรวมเป็น

50 และ 8 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณกรดแลกติกที่ชั่วโมงที่ 10 จากปริมาณกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์แบบเฟด-แบตช์เป็น 42.3 กรัมต่อลิตร

เมื่อพิจารณาปริมาณกรดแลกติกของกล้าเชื้อผสมในกระบวนการหมักแบบแบตช์และเฟด-แบตช์ พบว่าปริมาณกรดแลกติกจากกระบวนการหมักแบบแบตช์และเฟด-แบตช์มีปริมาณไม่แตกต่างกันนับตั้งแต่ชั่วโมงที่ 10 คือ 42.3 กรัมต่อลิตร จึงเลือกกระบวนการหมักแบบแบตช์เพื่อระยะเวลาอันรวดเร็วในกระบวนการหมักได้

ข้อเสนอแนะ

1. ออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล หากต้องการเปลี่ยนแปลงปัจจัยชนิดโคซินิดหนึ่ง จะต้องทำการทดลองใหม่ทั้งหมด เพื่อสมการทำนายและพื้นผิวตอบสนองที่ถูกต้องต่อภาวะใหม่นั้นๆ
2. กรดแลกติกที่ได้จากการวิจัยนี้อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ต้องทำให้มีความบริสุทธิ์หากนำไปเป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมต่อไป
3. อาจเลือกกล้าเชื้อผสมที่มีเอนไซม์อะไมเลสเพื่อลดขั้นตอนในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ติยะภรณ์ เหลืองพิพัฒน์. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงของ *Lactococcus lactis* IO- 1 โดยวิธี Taguchi. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2549.

สุวิชา กัลยาณมิตร. การหมักกรดแลกติกจากแป้งมันสำปะหลังของเซลล์ตรึงเชื้อรา *Rhizopus oryzae* KPS 106 ในถังหมักแบบลอยตัว. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2548.

ภาษาอังกฤษ

Altaf M., Naveena B.J., Reddy G. Screening of inexpensive nitrogen sources for production of L (+) lactic acid from starch by amylolytic *Lactobacillus amylophilus* GV6 in single step fermentation. Food Technol Biotechnol. 4(2005) : 235–239.

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

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

Axelsson L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In, S. Salminen and A. Von Wright (eds). Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects, 2nd edition, 1-72. New York : Marcel Dekker, Inc, 1998.

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

- Berry A. R., Franco C. M. M., Zhang W., Middelberg A. P. J. Growth and lactic acid production in batch culture of *Lactobacillus rhamnosus* in a defined medium. Biotechnology Letters. 21(1999) : 163-167.
- Box G. E. P., Hunter W. G. & Hunter J. S. Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery, 2nd ed. New York : Wiley, 2005.
- Bozoglu T. F. and Ray B. Lactic Acid Bacteria: Current Advances in Metabolism, Genetics and Applications. NewYork : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1996.
- Chauhan K., Trivedi U., Pate K.C. Statistical screening of medium components by Plackett-Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus* sp. KCP01 using date juice. Bioresource Technology. 98(2007) : 98-103.
- Davidson B. M. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. In Dole, M. P., Beuchat, L. R. and Montrille T. J., eds., Chemical Preservatives and Natural Antimicrobial Compounds, 524-525. Washington D. C : ASM Press, 1997.
- Escamilla M.L., Valdés S.E., Soriano J., Tomasini A. Effect of some nutritional and environmental parameters on the production of diacetyl and on starch consumption by *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus acidophilus* in submerged cultures. Journal of Applied Microbiology. 88(2000) : 142-53.
- Fitzpatrick J.J., O'Keeffe U. Influence of whey protein hydrolyzate addition to whey permeate batch fermentations for producing lactic acid. Process of Biochemistry. 37(2001) : 183-186.
- Guyot J.P., Calderon M., Morlon-Guyot J. Effect of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18010T. Journal of Applied Microbiology. 88(2000) : 176-182.
- Hofvendahl K., Akerberg C., Zacchi G., Hahn-Hägerdal B. Simultaneous enzymatic wheat starch saccharification and fermentation to lactic acid by *Lactococcus lactis*. Applied Microbiology and Biotechnology. 52(1999) : 163–169.
- John R.P., Nampoothiri K.M., Pandey A . Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. Applied Microbiology and Biotechnology. 74(2007) : 524– 534.

- John R.P., Gangadharan D., Nampoothiri K.M. Genome shuffling of *Lactobacillus delbrueckii* mutant and *Bacillus amyloliquefaciens* through protoplasmic fusion for l-lactic acid production from starchy wastes. Bioresource Technology 99(2008) : 8008-8015.
- Jones R. P., Greenfield P. F.. A review of yeast ionic nutrition: growth and fermentation requirements. Process Biochemistry. 19(1984.) : 48-60.
- Kondo M., Naoki N., Kazumi K., Yokota H. Enhanced lactic acid fermentation of silage by the addition of green tea waste. Journal of the Science of Food and Agriculture. 84(2004) : 728-734.
- Krishnan S., Bhattacharya S., Karanth N.G. Media optimization for production of lactic acid by *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 using response surface methodology. Food Biotechnology. 12(1998) : 105-121.
- Laopaiboon P., Thani A., Leelavatcharamas V., Laopaiboon L. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. Bioresource Technology. 101(2010) : 1036-1043.
- Lee K. Comparison of fermentative capacities of lactobacilli in single and mixed culture in industrial media. Process Biochemistry. 40(2005) : 1559-1564.
- Lee K. Enhanced production of lactic acid by an adapted strain of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* . World Journal of Microbiology and Biotechnology. 23(2007) : 1317–1320.
- Linko Y., Javanainen P. Simultaneous liquefaction saccharification and lactic acid fermentation on barley starch. Enzyme and Microbial Technology. 19(1996) : 118-123.
- Litchfield J.H. Microbial production of lactic acid. Advances in Applied Microbiology. 42(1996) : 45–95.
- Liu T., Miura S., Yaguchi M., Arimura T., Park E.Y., Okabe M. Scale-up of L-lactic acid production by mutant strain *Rhizopus* sp. MK-96-1196 from 0.003 m³ to 5 m³ in airlift bioreactors. Journal of Bioscience and Bioengineering. 101(2006) : 9-12.

- Lu Z., He F., Shi Y., Lu M., Yu L. Fermentative production of L(+)-lactic acid using hydrolyzed acorn starch, persimmon juice and wheat bran hydrolysate as nutrients. Bioresource Technology. 101(2010) : 3642-3648.
- Mercier P., Yerushalami L., Rouleau D., Dochania D. Kinetics of lactic acid fermentations on glucose and corn by *Lactobacillus amylophilus*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 55(1992) : 111 –121.
- Nagarjun P.A., Rao R.S., Rajesham S., Rao LV. Optimization of lactic acid production in SSF by *Lactobacillus amylovorus* NRRL B-4542 using Taguchi methodology. Journal of Microbiology. 43(2005) : 38–43.
- Nancib A., Nancib N., Meziane-cherif D., Boubendir A., Fick M., Boudrant J. Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. rhamnosus. Bioresource Technology. 96(2005) : 63-67.
- Naveena B.J., Altaf M.d., Bhadriah K., Reddy G. Selection of medium components by Plackett – Burman design for production of L (+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using wheat bran. Bioresource Technology. 96(2005) : 85-90.
- Ohkouchi Y, Inoue Y. Direct production of L(+)-lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011. Bioresource Technology. 97(2006): 1554-1562.
- Ratledge, C. and B. Kristiansen. Basic Biotechnology. vol 3. 2nd ed. Cambridge : Cambridge University Press, 2001.
- Rojan P.J, Nampoothiri K.M., Nair A.S., Pandey A. L(+)-lactic acid production using *Lactobacillus casei* in solid-state fermentation. Biotechnology Letters. 27(2005) : 1685-1688.
- Saha B.C., Nakamura L.K. Production of mannitol and lactic acid by fermentation with *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. Biotechnology and Bioengineering. 82(2003) : 865-871.

- Siebold, M., Frieling P. V., Joppien R., Rindfleisch D., Schügerl K., Röper H. Comparison of the production of lactic acid by three different Lactobacilli and its recovery by extraction and electro dialysis. Process Biochemistry. 30(1995) : 81-95.
- Sirisansaneeyakul S., Hipolito C.N., Kobayashi G., Lertsiri S., Luangpituksa S., Varavinit S., Ishizaki A. Kinetic modeling of lactic acid fermentation from sago starch using *Lactococcus lactis* IO-1. The Annual Reports of ICBiotech. 21(1998) : 504-524.
- Vandevoorde L., Vande Woestyne M., Bruyneel B., Christiaens H., Verstraete W. Critical factors governing the competitive behaviour of lactic acid bacteria in mixed cultures. In: Wood BJB, Holzapfel WH. The Lactic Acid Bacteria. Vol. 1, The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. London : Chapman & Hall, 1992.
- Venkatesh KV. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to lactic acid. Bioresource Technology. 62(1997) : 91–98.
- Vickroy, T. B. Comprehensive Biotechnology: The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine. In Moo-young M. (ed.), Lactic Acid, 761-774. New York : Pergamon Press, 1985.
- Vishnu C., Seenayya G., Reddy G. Direct fermentation of various pure and crude starchy substrates to L (+) lactic acid using *Lactobacillus amylophilus* GV6. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 18(2002) : 429–433.
- Waite, M. J., Morgan, N. L., Rockey, J. S. and Higton G. Industrial Microbiology. London : Alackwell Science Ltd, 2001.
- Wee Y., Kim J., Ryu H. Biotechnological production of lactic acid and Its recent applications. Food Technology. 44(2006) : 163-172.
- Xavier S., Lonsane B.K. Sugarcane press mud as a novel and inexpensive substrate for production of lactic acid in a solid state fermentation system. Applied Microbiology and Biotechnology. 41(1994) : 291–295.

- Yanez R., Molfes AB., Alonso JL., Parajo JC. Production of D (-) lactic acid from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation using *Lactobacillus coryniformis* sub sp. *torquens*. Biotechnology Letters. 25(2003) : 1161 –1164.
- Yumoto I., Ikeda K. Direct fermentation of starch to L (+)-lactic acid using *Lactobacillus amylophilus*. Biotechnology Letters. 17(1995) : 543-546.
- Yun J.S., Wee Y.J., Kim J.N., Ryu H.W. Fermentative production of DL-lactic acid from amylase treated rice and wheat bran's hydrolyzate by a novel lactic bacterium *Lactobacillus* sp. Biotechnology Letters. 18(2004) : 1613 –1616.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS

เปปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
ทวิน 80	1	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	2	กรัม
โซเดียมอะซิเตท	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.1	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต	0.05	กรัม
ไดโทแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	2	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ปรับค่าพีเอชเป็น 6.5 ± 0.2

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS

เปปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	5	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
ทวีน 80	1	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	2	กรัม
โซเดียมอะซิเตท	5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.1	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต	0.05	กรัม
ไดโทแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	2	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอล 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ปรับค่าพีเอชเป็น 6.5 ± 0.2

ภาคผนวก ข
สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

กลีเซอรอล 20 %

นำกลีเซอรอล 85 เปอร์เซ็นต์ 23.53 มิลลิลิตร ผสมในน้ำกลั่น 76.47 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไป
นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

กลีเซอรอล 40 %

นำกลีเซอรอล 85 เปอร์เซ็นต์ 47.06 มิลลิลิตร ผสมในน้ำกลั่น 57.94 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไป
นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์

นำเกลือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์

นำสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 2 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เก็บ
ในขวดสีชา

0.85% โซเดียมคลอไรด์

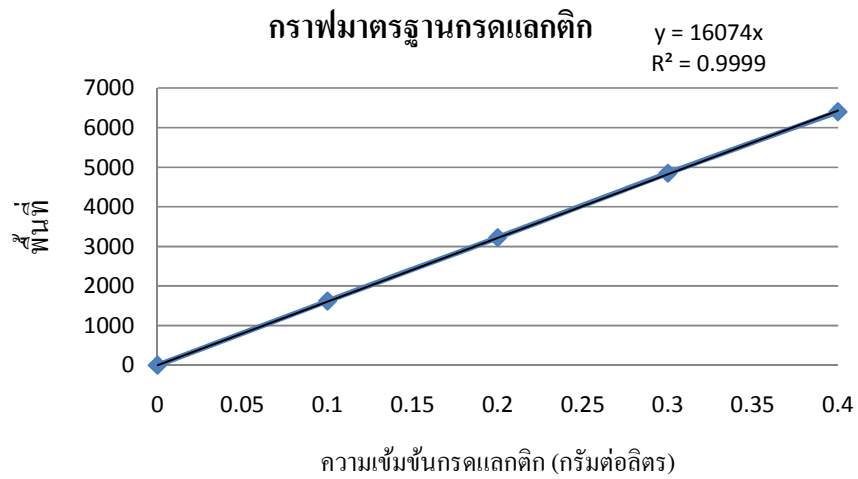
ละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ
ด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก

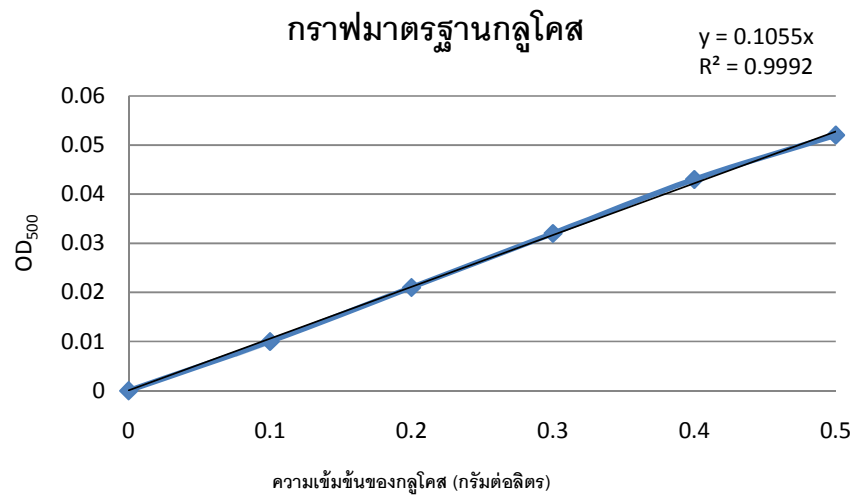
สารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์

นำสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 165.6 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำปลอดประจุเป็น 1,000
มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองในลอน รูขนาด 0.45 ไมโครเมตร

ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐาน



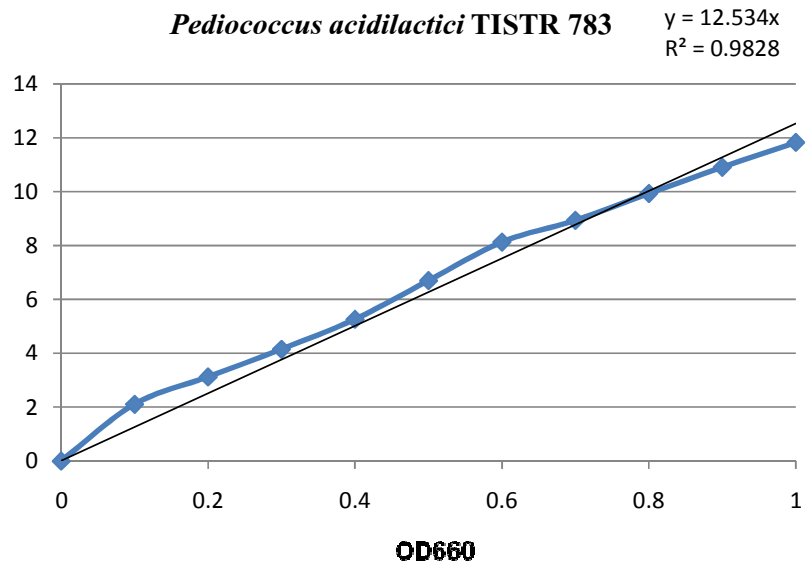
รูปที่ ค.1 กราฟมาตรฐานของกรดแลกติกเมื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟฟีชนิดของเหลวสมรรถนะสูง(HPLC)
ความชัน เท่ากับ 16074
ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ(R^2) เท่ากับ 0.9999



รูปที่ ค.2 กราฟมาตรฐานกลูโคสเมื่อวิเคราะห์ด้วย Enzyme colorimetric test ; Glucose oxidase reagent

ความชัน เท่ากับ 0.1055

ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ(R^2) เท่ากับ 0.9992

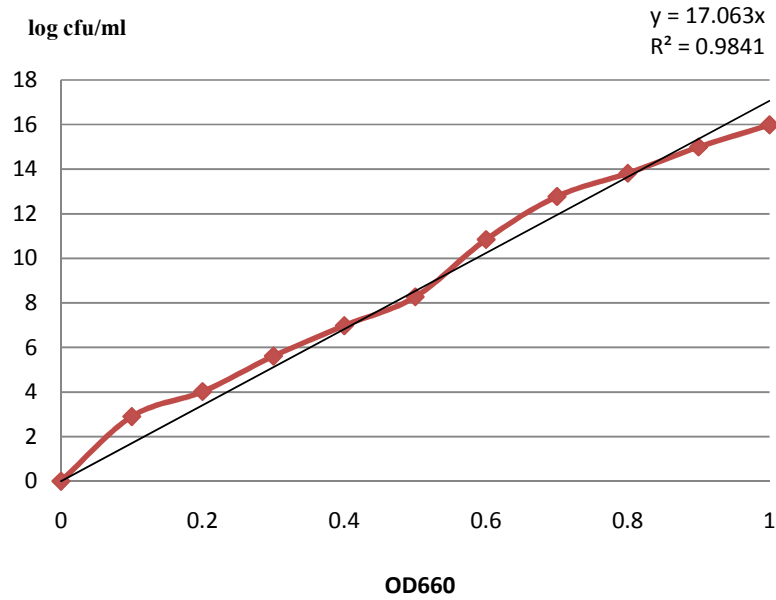


รูปที่ ๓.3 กราฟมาตรฐานการเจริญของกล้าเชื้อ *P. acidilactici* TISTR 783

ความชัน เท่ากับ 12.534

ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ(R^2) เท่ากับ 0.9828

Lactobacillus haloterans TISTR 939

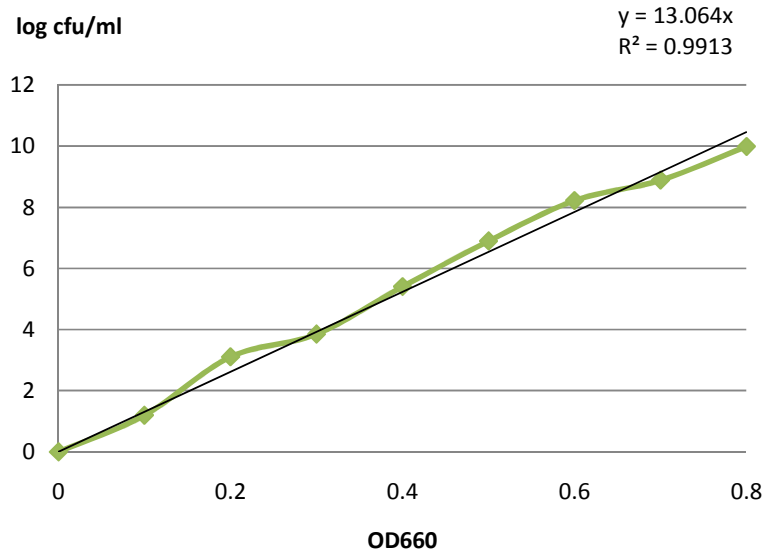


รูปที่ ค.4 กราฟมาตรฐานการเจริญของกล้าเชื้อ *Lb. halotolerans* TISTR 939

ความชัน เท่ากับ 17.063

ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ(R^2) เท่ากับ 0.9841

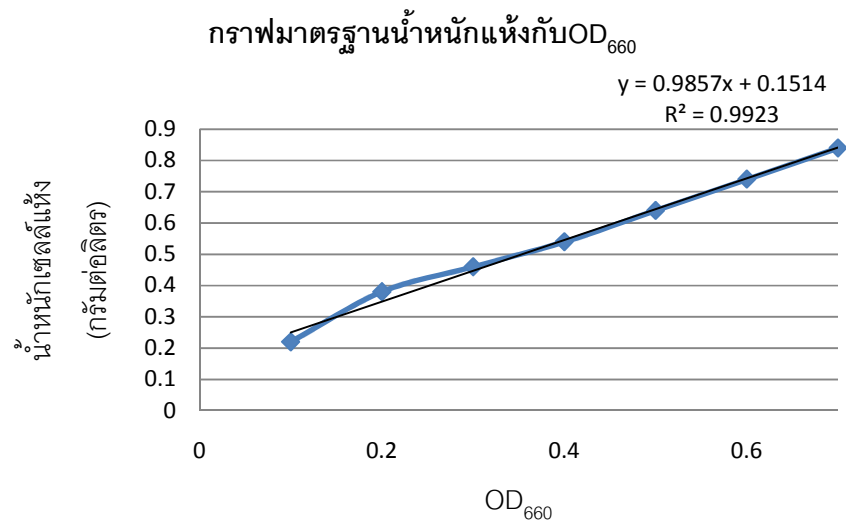
Lactococcus lactis TISTR 1401



รูปที่ ๕.5 กราฟมาตรฐานการเจริญของก๊าส์เชื้อ *L. lactis* TISTR 1401

ความชัน เท่ากับ 13.064

ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ(R^2) เท่ากับ 0.9913



รูปที่ ค.6 กราฟมาตรฐานการเจริญของกล้าเชื้อผสมระหว่าง *P. acidilactici* TISTR 783 และ *Lb. halotolerans* TISTR 939

ความชัน เท่ากับ 0.9857

ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ(R^2) เท่ากับ 0.9923

ภาคผนวก ง

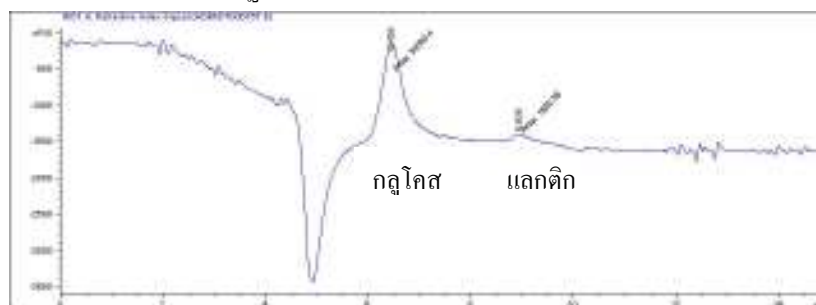
โครมาโตแกรมของกรดแลกติกที่นำมาทำกราฟมาตรฐาน

เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสความเข้มข้น 0.1 , 0.2 , 0.3 และ 0.4 กรัมต่อลิตร จากสารละลายมาตรฐานแลกติก 10 กรัมต่อลิตรและมี internal standard เป็นกลูโคสความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร ดังนี้

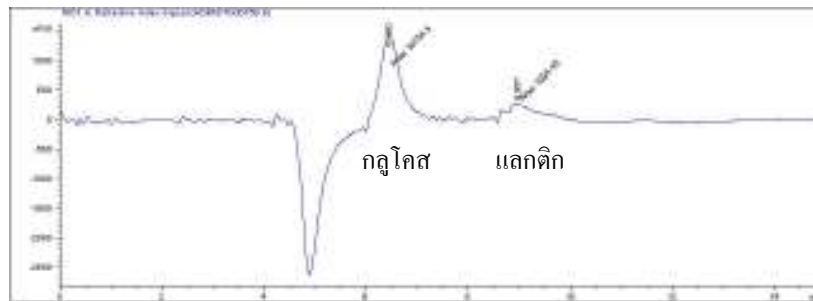
ตารางที่ ง.1 แสดงปริมาณสารละลายมาตรฐานกรดแลกติกเพื่อทำกราฟมาตรฐาน

ความเข้มข้นกรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	สารละลายมาตรฐาน แลกติก 10 กรัมต่อลิตร (ไมโครลิตร)	สารละลายมาตรฐาน กลูโคส 5 กรัมต่อ ลิตร (ไมโครลิตร)	น้ำปราศจากไอออน (ไมโครลิตร)
0.4	40	60	900
0.3	30	60	910
0.2	20	60	920
0.1	10	60	930

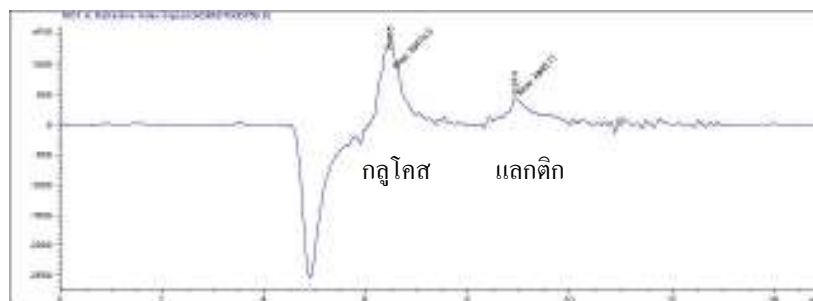
สามารถสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่กับความเข้มข้นของกรดแลกติก ได้ผลดังนี้



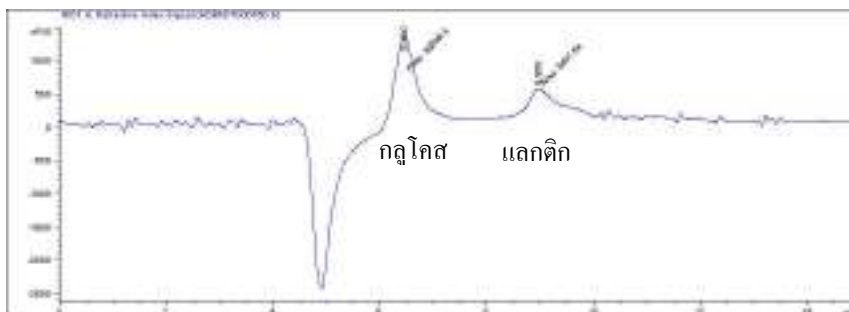
รูปที่ ง.1 โครมาโตแกรมของกรดแลกติกความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร



รูปที่ ง.2 โครมาโตแกรมของกรดแลกติกความเข้มข้น 0.2 กรัมต่อลิตร



รูปที่ ง.3 โครมาโตแกรมของกรดแลกติกความเข้มข้น 0.3 กรัมต่อลิตร



รูปที่ ง.4 โครมาโตแกรมของกรดแลกติกความเข้มข้น 0.4 กรัมต่อลิตร

สามารถสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่กับความเข้มข้นของกรดแลกติก ได้ผลดังนี้
 ตารางที่ ง.2 แสดงพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานกรดแลกติก

ความเข้มข้นแลกติก (กรัมต่อลิตร)	พื้นที่ (nRIU)
0.4	6401.6
0.3	4848.7
0.2	3224.5
0.1	1620.4
0	0

กำหนดให้ ค่ารีเทนชันไทม์ของกลูโคสและแลกติกเป็น 6.882 และ 9.331 ตามลำดับ

ภาคผนวก จ

ตารางแสดงค่า specific growth rate determination ของกล้าเชื้อผสมระหว่าง *P. acidilactici*

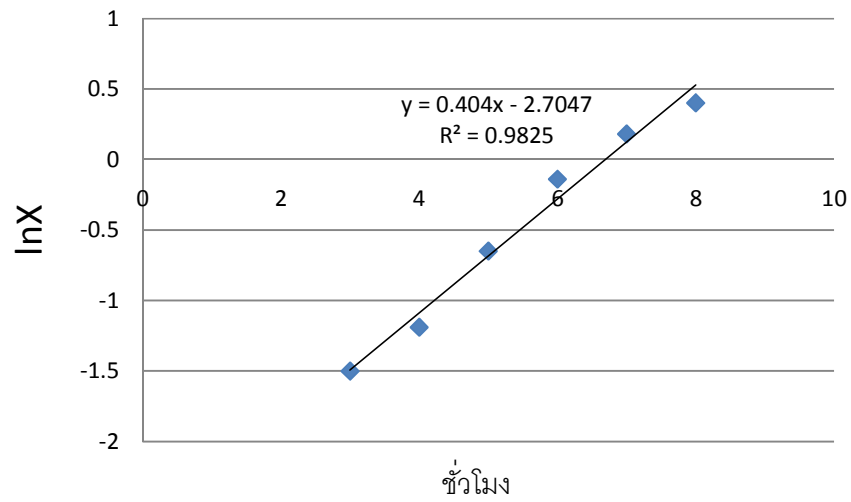
TISTR 783 และ *Lb. halotolerans* TISTR 939 ในอาหาร MRS สูตรปรับปรุง

ตารางที่ จ.1 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและ specific growth rate determination ของเชื้อผสมระหว่าง *P. acidilactici* TISTR 783 และ *Lb. halotolerans* TISTR 939 ในการผลิตกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์แบบแบตช์

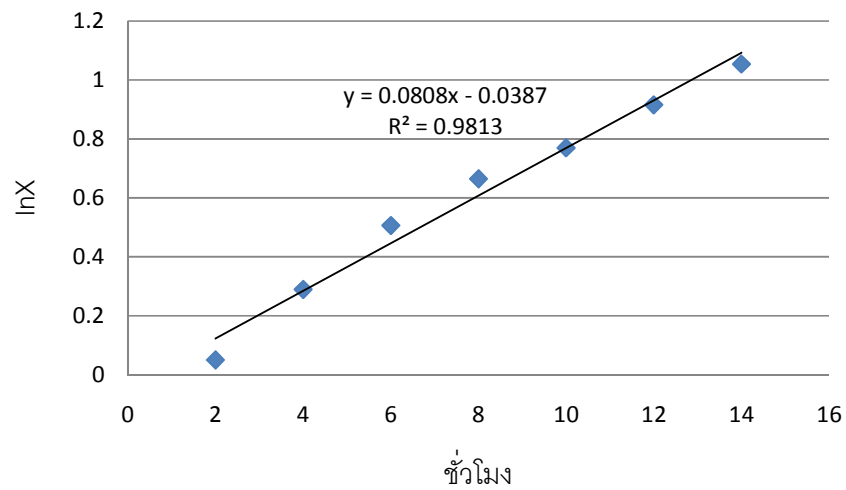
เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ln(X)	μ (ชั่วโมง ⁻¹)
0	0.152	-1.884	-
1	0.181	-1.707	0.216
2	0.191	-1.654	0.216
3	0.223	-1.501	0.506
4	0.304	-1.190	0.985
5	0.523	-0.649	1.083
6	0.870	-0.139	0.779
7	1.200	0.182	0.521
8	1.495	0.402	0.307
9	1.660	0.507	0.151
10	1.745	0.557	0.119
11	1.868	0.625	0.067
12	1.870	0.626	0.004
13	1.875	0.629	0.002
14	1.874	0.628	-0.003
15	1.868	0.625	-0.003
16	1.868	0.625	-1.000

ตารางที่ จ.2 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งและ specific growth rate determination ของเชื้อผสมระหว่าง *P. acidilactici* TISTR 783 และ *Lb. halotolerans* TISTR 939 ในการผลิตกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์แบบเฟด-แบตช์

เวลา	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ln(X)	μ (ชั่วโมง ⁻¹)
0	0.710	-0.342	-
2	1.052	0.051	0.298
4	1.337	0.290	0.227
6	1.660	0.507	0.183
8	1.944	0.665	0.129
10	2.160	0.770	0.128
12	2.499	0.916	0.142
14	2.868	1.054	0.065
16	2.871	1.055	0.003
18	2.886	1.060	0.006
20	2.904	1.066	0.004
22	2.908	1.067	0.002
24	2.915	1.070	0.002
26	2.922	1.072	0.002
28	2.929	1.075	-0.001
30	2.917	1.070	-0.502



รูปที่ จ.1 ค่า specific growth rate determination ของเชื้อผสมระหว่าง *P. acidilactici* TISTR 783 และ *Lb. halotolerans* TISTR 939 ในการผลิตกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์แบบแบตช์



รูปที่ จ.2 ค่า specific growth rate determination ของเชื้อผสมระหว่าง *P. acidilactici* TISTR 783 และ *Lb. halotolerans* TISTR 939 ในการผลิตกรดแลกติกในถังปฏิกรณ์แบบเฟด-แบตช์

ภาคผนวก ฉ
ตารางแสดงค่าการเจริญ

ตารางที่ ฉ.1 ค่า OD₆₆₀ ที่ได้จากการวัดการเจริญของกล้าเชื้อ *P. acidilactici* TISTR 783 ปริมาณกล้า

เชื้อเดี่ยว 1 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร

เวลา	OD ₆₆₀			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	0	0	0.000	0	0.000
1	0.002	0.002	0.002	0.002	0.000
2	0.005	0.004	0.005	0.005	0.001
3	0.006	0.003	0.005	0.005	0.002
4	0.017	0.011	0.014	0.014	0.004
5	0.03	0.026	0.028	0.028	0.003
6	0.08	0.009	0.045	0.045	0.050
7	0.213	0.185	0.199	0.199	0.020
8	0.382	0.399	0.391	0.391	0.012
9	0.496	0.602	0.549	0.549	0.075
10	0.68	0.852	0.766	0.766	0.122
11	0.924	1.105	1.015	1.015	0.128
12	1.094	1.224	1.159	1.159	0.092
13	1.238	1.374	1.306	1.306	0.096
14	1.323	1.470	1.397	1.397	0.104
15	1.362	1.509	1.436	1.436	0.104
16	1.413	1.544	1.479	1.479	0.093
17	1.482	1.598	1.540	1.540	0.082

ตารางที่ ๑.1 (ต่อ)

เวลา	OD ₆₆₀			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
18	1.51	1.613	1.562	1.562	0.073
19	1.509	1.612	1.561	1.561	0.073
20	1.675	1.607	1.641	1.641	0.048
21	1.652	1.568	1.610	1.610	0.059
22	1.666	1.577	1.622	1.622	0.063
23	1.658	1.587	1.623	1.623	0.050
24	1.652	1.590	1.621	1.621	0.044

ตารางที่ ๑.2 ตารางที่ ค่า OD₆₆₀ ที่ได้จากการวัดการเจริญของกล้าเชื้อ *Lb. halotolerans* TISTR 939

ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 1 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร

เวลา	OD ₆₆₀			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	0	0	0.000	0.000	0.000
1	0.012	0.014	0.012	0.013	0.001
2	0.014	0.016	0.018	0.016	0.001
3	0.017	0.016	0.018	0.017	0.001
4	0.034	0.035	0.035	0.035	0.001
5	0.056	0.058	0.054	0.056	0.001
6	0.116	0.114	0.111	0.114	0.001
7	0.248	0.246	0.247	0.247	0.001
8	0.352	0.35	0.354	0.352	0.001
9	0.698	0.699	0.691	0.696	0.001

ตารางที่ ๑.๒ (ต่อ)

เวลา	OD ₆₆₀			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
10	0.931	0.936	0.926	0.931	0.004
11	1.178	1.182	1.186	1.182	0.003
12	1.322	1.326	1.335	1.328	0.003
13	1.402	1.408	1.405	1.405	0.004
14	1.511	1.508	1.507	1.509	0.002
15	1.528	1.526	1.529	1.528	0.001
16	1.56	1.558	1.562	1.560	0.001
17	1.598	1.596	1.593	1.596	0.001
18	1.608	1.612	1.604	1.608	0.003
19	1.644	1.642	1.642	1.643	0.001
20	1.67	1.662	1.677	1.670	0.006
21	1.677	1.672	1.681	1.677	0.004
22	1.662	1.663	1.660	1.662	0.001
23	1.64	1.645	1.649	1.645	0.004
24	1.645	1.638	1.651	1.645	0.005

ตารางที่ ๑.๓ ค่า OD₆₆₀ ที่ได้จากการวัดการเจริญของกล้ำเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ปริมาณกล้ำเชื้อ

เดียว 1 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร

เวลา	OD ₆₆₀			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	0	0	0	0	0
1	0.001	0.002	0.003	0.001	0.001
2	0.008	0.006	0.006	0.007	0.001

ตารางที่ ๓.3 (ต่อ)

เวลา	OD ₆₆₀			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
3	0.006	0.002	0.002	0.004	0.002
4	0.011	0.002	0.002	0.007	0.004
5	0.011	0.005	0.005	0.0065	0.006
6	0.01	0.003	0.003	0.008	0.004
7	0.022	0.061	0.061	0.0065	0.005
8	0.033	0.086	0.086	0.0415	0.028
9	0.084	0.09	0.09	0.0595	0.037
10	0.173	0.104	0.104	0.087	0.004
11	0.326	0.192	0.192	0.1385	0.049
12	0.584	0.398	0.398	0.259	0.095
13	0.734	0.602	0.602	0.491	0.132
14	0.779	0.67	0.67	0.668	0.093
15	0.79	0.748	0.748	0.7245	0.077
16	0.824	0.745	0.745	0.769	0.030
17	0.862	0.77	0.77	0.7845	0.056
18	0.871	0.787	0.787	0.816	0.065
19	0.886	0.806	0.806	0.829	0.059
20	0.818	0.84	0.84	0.846	0.057
21	0.819	0.842	0.842	0.829	0.016
22	0.797	0.819	0.819	0.8305	0.016
23	0.797	0.818	0.818	0.808	0.016
24	0.011	0.002	0.002	0.8075	0.015

ตาราง ๓.4 ค่า OD₆₆₀ ที่ได้จากการวัดการเจริญของกล้าเชื้อ *P. acidilactici* TISTR 783 ปริมาณกล้า

เชื้อเดี่ยว 3 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร

เวลา	OD ₆₆₀			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	0	0	0.000	0	0.000
1	0.003	0.002	0.004	0.003	0.001
2	0.006	0.006	0.006	0.006	0.000
3	0.007	0.006	0.005	0.006	0.001
4	0.022	0.024	0.020	0.022	0.002
5	0.06	0.058	0.056	0.058	0.002
6	0.072	0.074	0.070	0.072	0.002
7	0.214	0.208	0.214	0.212	0.003
8	0.42	0.418	0.410	0.416	0.005
9	0.742	0.746	0.738	0.742	0.004
10	0.923	0.924	0.925	0.924	0.001
11	1.216	1.214	1.212	1.214	0.002
12	1.218	1.216	1.214	1.216	0.002
13	1.308	1.312	1.304	1.308	0.004
14	1.416	1.398	1.404	1.406	0.009
15	1.422	1.416	1.437	1.425	0.011
16	1.486	1.482	1.481	1.483	0.003
17	1.523	1.522	1.521	1.522	0.001
18	1.538	1.536	1.534	1.536	0.002
19	1.556	1.555	1.554	1.555	0.001
20	1.556	1.555	1.563	1.558	0.004

ตารางที่ ๓.4 (ต่อ)

เวลา	OD ₆₆₀			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
21	1.561	1.563	1.559	1.561	0.002
22	1.578	1.576	1.586	1.58	0.005
23	1.573	1.578	1.577	1.576	0.003
24	1.58	1.586	1.574	1.58	0.006

ตาราง ๓.5 ค่า OD₆₆₀ ที่ได้จากการวัดการเจริญของกล้าเชื้อ *Lb. halotolerans* TISTR 939 ปริมาณ
กล้าเชื้อเดี่ยว 3 เปอร์เซนต์ปริมาตรต่อปริมาตร

เวลา	OD ₆₆₀			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	0.013	0.015	0.014	0.014	0.001
1	0.016	0.018	0.017	0.017	0.001
2	0.018	0.021	0.020	0.020	0.002
3	0.024	0.025	0.025	0.025	0.001
4	0.040	0.046	0.043	0.043	0.004
5	0.065	0.069	0.067	0.067	0.003
6	0.100	0.104	0.102	0.102	0.003
7	0.168	0.169	0.169	0.169	0.001
8	0.292	0.3	0.296	0.296	0.006
9	0.443	0.448	0.446	0.446	0.004
10	0.697	0.703	0.700	0.700	0.004
11	0.863	0.863	0.863	0.863	0.000
12	1.118	1.14	1.129	1.129	0.016
13	1.348	1.35	1.349	1.349	0.001

ตารางที่ ๑.5 (ต่อ)

เวลา	OD ₆₆₀			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
14	1.508	1.5	1.504	1.504	0.006
15	1.648	1.65	1.649	1.649	0.001
16	1.848	1.84	1.844	1.844	0.006
17	1.998	1.99	1.994	1.994	0.006
18	2.098	2.08	2.089	2.089	0.013
19	2.288	2.35	2.319	2.319	0.044
20	2.318	2.4	2.359	2.359	0.058
21	2.408	2.55	2.479	2.479	0.100
22	2.718	2.68	2.878	2.520	0.027
23	2.418	2.47	2.444	2.444	0.037
24	2.428	2.45	2.439	2.439	0.016

ตารางที่ ๑.6 ค่า OD₆₆₀ ที่ได้จากการวัดการเจริญของกล้ำเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ปริมาณกล้ำเชื้อ
เดี่ยว 3 เปรอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร

เวลา	OD ₆₆₀			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	0	0	0	0	0.000
1	0.004	0.002	0.003	0.003	0.001
2	0.008	0.01	0.009	0.009	0.001
3	0.018	0.016	0.014	0.016	0.002
4	0.022	0.018	0.026	0.022	0.004
5	0.023	0.022	0.021	0.022	0.001
6	0.054	0.058	0.056	0.056	0.002
7	0.188	0.178	0.18	0.182	0.005

ตารางที่ ๖.6 (ต่อ)

เวลา	OD ₆₆₀			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
8	0.224	0.226	0.228	0.226	0.002
9	0.508	0.512	0.516	0.512	0.004
10	0.734	0.736	0.738	0.736	0.002
11	0.814	0.816	0.812	0.814	0.002
12	0.822	0.822	0.822	0.822	0.000
13	0.856	0.854	0.858	0.856	0.002
14	0.877	0.876	0.86	0.871	0.010
15	0.883	0.886	0.898	0.889	0.008
16	0.908	0.916	0.912	0.912	0.004
17	0.916	0.914	0.918	0.916	0.002
18	0.931	0.928	0.925	0.928	0.003
19	0.942	0.936	0.936	0.938	0.003
20	0.94	0.941	0.945	0.942	0.003
21	0.958	0.963	0.95	0.957	0.007
22	0.988	0.986	0.984	0.986	0.002
23	0.997	0.998	0.999	0.998	0.001
24	1.022	1.016	1.028	1.022	0.006

ตารางที่ ๗.7 ค่า OD₆₆₀ ที่ได้จากการวัดการเจริญของกล้ำเชื้อ *P. acidilactici* TISTR 783 ปริมาณกล้ำเชื้อเดี่ยว 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร

เวลา	OD ₆₆₀			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	0	0	0.000	0	0.000
1	0.018	0.020	0.018	0.019	0.001
2	0.021	0.028	0.024	0.025	0.004
3	0.028	0.033	0.030	0.031	0.003
4	0.061	0.066	0.063	0.064	0.003
5	0.139	0.134	0.136	0.137	0.003
6	0.36	0.328	0.343	0.344	0.016
7	0.707	0.643	0.674	0.675	0.032
8	0.961	0.928	0.944	0.945	0.017
9	1.068	1.078	1.072	1.073	0.005
10	1.235	1.223	1.228	1.229	0.006
11	1.334	1.340	1.336	1.337	0.003
12	1.443	1.446	1.444	1.445	0.002
13	1.495	1.488	1.491	1.492	0.004
14	1.505	1.506	1.505	1.506	0.001
15	1.526	1.528	1.526	1.527	0.001
16	1.553	1.552	1.552	1.553	0.001
17	1.558	1.558	1.557	1.558	0.001
18	1.555	1.553	1.553	1.554	0.001
19	1.558	1.551	1.554	1.555	0.004
20	1.58	1.582	1.580	1.581	0.001
21	1.543	1.607	1.574	1.575	0.032
22	1.525	1.623	1.573	1.574	0.049
23	1.52	1.600	1.559	1.560	0.040
24	1.508	1.567	1.537	1.538	0.030

ตารางที่ ๘.8 ค่า OD₆₆₀ ที่ได้จากการวัดการเจริญของกล้าเชื้อ *Lb. halotolerans* TISTR 939 ปริมาณกล้าเชื้อเดี่ยว 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร

เวลา	OD ₆₆₀			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	0	0	0	0	0.000
1	0.005	0.004	0.003	0.004	0.001
2	0.011	0.012	0.013	0.012	0.001
3	0.013	0.016	0.013	0.014	0.002
4	0.032	0.028	0.036	0.032	0.004
5	0.05	0.053	0.053	0.052	0.002
6	0.116	0.098	0.116	0.11	0.009
7	0.238	0.254	0.276	0.256	0.019
8	0.498	0.508	0.494	0.5	0.007
9	0.798	0.806	0.808	0.804	0.005
10	1.266	1.252	1.286	1.268	0.017
11	1.96	1.956	1.958	1.958	0.002
12	2.376	2.388	2.382	2.382	0.005
13	2.798	2.802	2.806	2.802	0.004
14	2.836	2.847	2.831	2.838	0.008
15	2.886	2.89	2.912	2.896	0.014
16	2.972	2.961	2.965	2.966	0.005
17	3.066	3.041	3.091	3.066	0.024
18	3.064	3.061	3.073	3.066	0.006
19	3.067	3.072	3.065	3.068	0.003
20	3.076	3.073	3.067	3.072	0.004
21	3.071	3.068	3.065	3.068	0.003
22	3.08	3.06	3.070	3.07	0.008
23	3.068	3.072	3.058	3.066	0.007

ตารางที่ ๘.๘ (ต่อ)

เวลา	OD ₆₆₀			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
24	3.068	3.072	3.064	3.068	0.004

ตารางที่ ๘.๙ ค่า OD₆₆₀ ที่ได้จากการวัดการเจริญของกล้าเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ปริมาณกล้าเชื้อ
เดียว 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร

เวลา	OD ₆₆₀			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
0	0	0	0	0	0.006
1	0.019	0.011	0.015	0.015	0.000
2	0.018	0.018	0.018	0.018	0.004
3	0.022	0.027	0.025	0.025	0.001
4	0.026	0.025	0.026	0.026	0.004
5	0.039	0.033	0.036	0.036	0.006
6	0.104	0.096	0.100	0.100	0.001
7	0.264	0.263	0.264	0.264	0.006
8	0.386	0.381	0.384	0.384	0.004
9	0.635	0.639	0.637	0.637	0.003
10	0.876	0.876	0.876	0.876	0.000
11	0.942	0.94	0.941	0.941	0.001
12	0.967	0.968	0.968	0.968	0.001
13	0.99	0.992	0.991	0.991	0.001
14	0.991	0.98	0.986	0.986	0.008
15	0.999	0.992	0.996	0.996	0.005
16	0.979	0.972	0.976	0.976	0.005

ตารางที่ ๑.๑ (ต่อ)

เวลา	OD ₆₆₀			ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบน มาตรฐาน
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3		
17	0.983	0.977	0.980	0.980	0.004
18	1.004	0.9	0.952	0.952	0.074
19	0.998	0.857	0.928	0.928	0.100
20	0.89	0.87	0.880	0.880	0.014
21	0.878	0.88	0.879	0.879	0.001
22	0.879	0.882	0.881	0.881	0.002
23	0.857	0.859	0.858	0.858	0.001
24	0.857	0.858	0.858	0.858	0.001

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงปริมาณกรดแลกติก

ตารางที่ ข.1 ปริมาณกรดแลกติกของก้ำเชื้อ *P. acidilactici* TISTR 783 ปริมาณก้ำเชื้อเดี่ยว 1
3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร

ชั่วโมง	ปริมาณกรดแลกติก(กรัมต่อลิตร)		
	เชื้อใช้ % Inoculum size		
	1%	3%	5%
5	1.0	2.5	2.6
8	1.7	3.2	5.4
10	3.5	4.2	6.0
15	3.9	4.3	6.5

ตารางที่ ข.2 ปริมาณกรดแลกติกของก้ำเชื้อ *Lb. halotolerans* TISTR 939 ปริมาณก้ำเชื้อเดี่ยว 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร

ชั่วโมง	ปริมาณกรดแลกติก(กรัมต่อลิตร)		
	เชื้อใช้ % Inoculum size		
	1%	3%	5%
6	1.3	3.1	3.5
10	1.4	3.1	3.7
13	2.1	3.8	5.2
20	2.2	4.5	5.5

ตารางที่ ข.3 ปริมาณกรดแลกติกของก้ำเชื้อ *L. lactis* TISTR 1401 ปริมาณก้ำเชื้อเดี่ยว 1 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร

ชั่วโมง	ปริมาณกรดแลกติก(กรัมต่อลิตร)		
	เชื้อใช้ % Inoculum size		
	1%	3%	5%
5	2.9	2.9	2.7
8	3.8	3.6	3.6
10	4.1	3.7	5.9
15	5.6	5.6	6.0

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว ฐิติมา นุธิรงค์ เกิดเมื่อวันที่ 3 กันยายน พ.ศ. 2529 สำเร็จการศึกษาระดับ
วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ในปีการศึกษา 2551 และเข้ารับการศึกษต่อในระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา
ทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552
ปัจจุบันอาศัยอยู่บ้านเลขที่ 999/194 หมู่ 6 ตำบลเทพารักษ์ อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ
10270

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานการประชุมวิชาการระดับนานาชาติในงาน
The 1st ASEAN Plus Three Graduate Research Congress 2012 ระหว่างวันที่ 1-2 มีนาคม
พ.ศ. 2555 ณ จังหวัดเชียงใหม่ ในหัวข้อเรื่อง " Proceedings of OPTIMAL CONDITIONS FOR
LACTIC ACID PRODUCTION BY MIXED CULTURES OF LACTIC ACID BACTERIA"