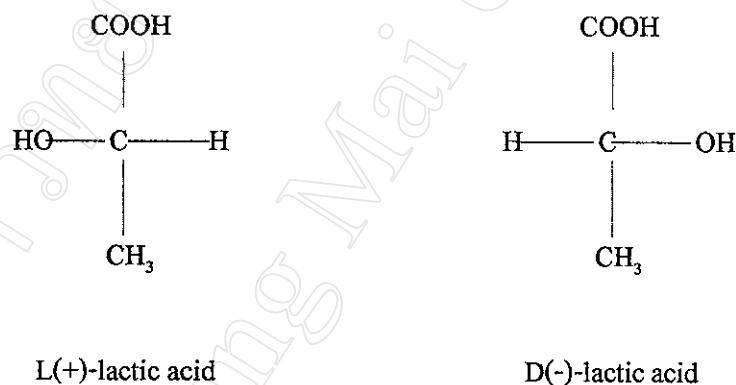


บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. กรดแลกติก

กรดแลกติกมีชื่อทางเคมีว่า 2-hydroxypropanoic acid หรือ 2-hydroxypropionic acid เป็นกรดอินทรีย์ที่มี hydroxyl group (-OH) อยู่ด้วย มีสูตรโมเลกุลเป็น $\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$ โดยทั่วไปจะพบโครงสร้าง 2 รูปแบบซึ่งเป็น optical isomer ซึ่งกันและกันคือ L(+)-lactic acid และ D(-)-lactic acid (รูป 2.1)



รูป 2.1 สูตรโครงสร้างของกรดแลกติก (Vickroy, 1985)

L(+)-lactic acid มีมวลโมเลกุล 90.08 มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 53°C พบได้ในเลือด กล้ามเนื้อ คับ ไต ต่อมไทรอยด์ของคน สัตว์และของเหลวในร่างกาย สามารถผลิตเพิ่มได้ในกล้ามเนื้อและเลือดหลังจากมีการออกกำลังกายอย่างรุนแรง สามารถตกผลึกได้ในกรดอะซิติกหรือคลอโรฟอร์ม และสามารถประกอบเป็นเกลือกับโลหะได้หลายชนิด เกลือของกรดแลกติกรูปแอตละลายน้ำได้มากกว่าเกลือของผสมรูปแอตและดี (racemic form) ส่วน D(-)-lactic acid มีมวลโมเลกุล 90.08 มีจุดหลอมเหลวเท่ากับ 52.8°C ละลายได้ในน้ำ แอลกอฮอล์ อะซิโตน อีเทอร์ และกลีเซอรอล ไม่ละลายในคลอโรฟอร์ม ตกผลึกได้ในสารละลายอีเทอร์และไอโซโพรพิลอีเทอร์มีค่า $[\alpha]^{21.5}$ เป็น -2.6° (C=8) (Merck, 1983) คุณสมบัติของกรดแลกติกแสดงในตาราง 2.1

ตาราง 2.1 คุณสมบัติของกรดแลกติก (Vickroy, 1985)

คุณสมบัติของกรดแลกติก	ค่าที่วัดได้
มวลโมเลกุล	90.08
จุดหลอมเหลว D(-) หรือ L(+)	52.8-54.0°C
DL (ขึ้นกับปริมาณกรดที่ผสม)	16.8-33.0°C
จุดเดือดในรูปผสมของ D และ L	82.0 ที่ 0.5 mm Hg 122.0 ที่ 14 mm Hg
ค่าคงที่ของการแตกตัว (K_a ที่ 25°C)	1.37×10^{-4}
heat of combustion	1361 kJ mol ⁻¹
specific heat (C_p ที่ 20°C)	190 J mol ⁻¹ °C ⁻¹

กรดแลกติกที่มีความบริสุทธิ์สูงสามารถเกิดเป็นผลึกแบบ monoclinic ที่ไม่มีสีได้ กรดชนิดนี้สามารถละลายน้ำได้ทุกอัตราส่วนและระเหยได้ยาก ในสารละลายที่มีกรดแลกติกตั้งแต่ 20% ขึ้นไปจะเกิดปฏิกิริยา self-esterification ระหว่าง functional group ทั้งสองคือ hydroxyl group และ carboxyl group โดยกรดแลกติกอาจจะสร้างพันธะเกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า cyclic dimer (lactide) หรือเกิดเป็น polymer สายตรง ซึ่งสามารถเขียนเป็นสูตรโดยทั่วไปได้ว่า $H[OCH(CH_3)CO]_nOH$ (Vickroy, 1985)

1.1 โครงร่างของกรดแลกติก (configuration of lactic acid)

ในระหว่างกระบวนการหมักน้ำตาลต่างๆ แบคทีเรียแลกติกต่างสปีชีส์จะมีการผลิตกรดแลกติกที่แตกต่างกัน โดยอาจจะผลิตเฉพาะ L-lactic acid, D-lactic acid หรือ ผลิตทั้ง 2 โครงร่างในปริมาณเท่าๆ กัน หรือโครงสร้างใดมากกว่าอีกโครงสร้างหนึ่ง (Garvie, 1980; Kandler และ Weiss, 1986; Schleifer, 1986; Axelsson, 1993) ปริมาณที่วัดได้นั้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณและประสิทธิภาพของเอนไซม์ NAD^+ - dependent lactate dehydrogenase (nLDH) ว่ามีชนิดไหนมากหรือน้อยเพียงใด ดังนั้น ถ้าพบว่า มีทั้ง D- และ L-lactic acid แสดงว่า ต้องมีเอนไซม์ D-nLDH และ L-nLDH ด้วย มีบาง species เช่น *Lb. curvatus* และ *Lb. sake* ที่สามารถผลิตเอนไซม์ racemase ซึ่งสามารถเปลี่ยน L-lactic acid ให้เป็น D-lactic acid ได้ (Garvie, 1980; Axelsson, 1993) ในกรณีดังกล่าว L-lactic acid จะถูกสร้างขึ้นก่อนแล้วถูกเอนไซม์ racemase เปลี่ยนในภายหลังเป็นผลให้มีกรดแลกติกทั้ง 2 ชนิด คือ D- และ L-lactic acid *P. pentosaceus* และ *Lactobacilli* หลายชนิด ที่สามารถเปลี่ยนอัตราส่วนของไอโซเมอร์ต่างๆ ในระหว่างการเติบโตแบบไม่ต่อเนื่อง (batch growth) ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว

L-lactic acid จะถูกสร้างขึ้นเป็นโครงสร้างหลักในระยะแรกของการเจริญ และ D-lactic acid จะถูกสร้างเป็นโครงสร้างหลักในระยะท้ายของ stationary phase สภาพความเป็นกรดต่าง (pH) และความเข้มข้นของไพรูเวทมีอิทธิพลต่อ activity ต่างๆ ของ lactate dehydrogenase ต่างๆ ดังนั้น อัตราส่วนของไอโซเมอร์ต่างๆ จึงแตกต่างกันในแต่ละช่วงของการเจริญ *Lb. casei*, lactococci, enterococci และ streptococci สามารถดำเนินการตามกระบวนการผลิตกรดแลกติกได้โดยใช้ allosteric L-nLDH ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย FDP เช่นกัน (Garvie, 1980; Axelsson, 1993)

เชื้อจุลินทรีย์อาจจะผลิตกรดแลกติกชนิด D-lactic acid หรือ L-lactic acid เพียงอย่างเดียว หรือทั้งสองชนิดผสมกันก็ได้ขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ดังนี้ *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum* และ *L. helveticus* K จะผลิตสารผสมระหว่าง D-lactic acid และ L-lactic acid ส่วน *Leuconostoc mesenteroides* จะผลิตเฉพาะ D-lactic acid และ *Lactobacillus lactis*, *L. casei*, *L. casei* subsp *alactosus* จะผลิตเฉพาะ L-lactic acid (Jehanno *et al.*, 1992) พบว่า *L. amylovorus* จะผลิตสารผสมระหว่าง D- และ L-lactic acid ในสัดส่วนที่เท่ากัน ส่วน *L. amylophilus* จะผลิตเฉพาะ L(+)-lactic acid ได้ yield สูงถึง 90% โดยน้ำหนัก และยังพบอีกว่าสิ่งมีชีวิตพวก fungi บางชนิด เช่น *Rhizopus* โดยเฉพาะ *R. oryzae* สามารถผลิต L-lactic acid (Cheng *et al.*, 1991)

1.2 ความสำคัญของกรดแลกติก

มีการนำกรดแลกติกมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมหลายชนิด

1.2.1 อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม กรดแลกติกจะถูกผลิตขึ้นในอาหารหมักประเภทนมเปรี้ยว ไข่กรอก และกิมจิ นอกจากนี้ยังนิยมเติมในอาหารของชาวยุโรปและเอเชียเพื่อเป็นสารให้กลิ่น รส ควบคุมความเป็นกรดต่างของอาหารและป้องกันการเน่าเสีย (ปทุมพร, 2536) ในตาราง 2.2 ได้แสดงให้เห็นถึงการใช้กรดแลกติกในอาหารชนิดต่างๆ

ตาราง 2.2 การนำกรดแลกติกมาใช้ประโยชน์ในอาหารชนิดต่างๆ

อาหาร	ควบคุมกลิ่นรส	ควบคุมความเป็นกรดต่าง	การถนอมอาหาร
ขนมปังจากข้าวไรย์	+	+	+
เบียร์	-	+	+
ขนมลูกกวาด	+	+	-
ผลิตภัณฑ์นม	+	+	+
เนยเทียม	+	+	+
ของหมักดอง	+	-	+
เครื่องดื่ม	+	-	+
เครื่องปรุงรส	+	-	+

ที่มา : ปทุมพร, 2536

ในการถนอมอาหารจะใช้กรดแลกติกร่วมกับกรดอะซิติก ทำให้มีฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์ได้มากกว่ากรดเดี่ยว นอกจากนี้ยังใช้เกลือของกรดแลกติกเพื่อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น โซเดียมและโพแทสเซียมแลคเตท เป็น neutral salt ของกรดแลกติกมีรสเค็มเล็กน้อย มี pH เป็นกลางจึงนิยมเติมในอาหารแปรรูปประเภทเนื้อ ไก่ และอาหารทะเลเพื่อยืดอายุการเก็บ นอกจากนี้แคลเซียมแลคเตทเป็นสารที่นิยมเติมในเครื่องดื่มเกลือแร่และเครื่องดื่มเสริมแคลเซียม (calcium enriched drink) เพื่อใช้เป็นแหล่งของแคลเซียม เช่น นม เพราะเกลือนี้อยู่ในรูปเหมือนกับแลคเตทที่สังเคราะห์ในร่างกาย โดยที่แลคเตทจะปลดปล่อยพลังงานอย่างรวดเร็วผ่านทางเนื้อเยื่อของกล้ามเนื้อและเร็วกว่าการให้พลังงานของกลูโคสประมาณ 2-10 เท่า (ทรงอำนาจ, 2539) มีการนำกรดแลกติกมาใช้ในการถนอมอาหารมากกว่า 50% ของปริมาณกรดแลกติกทั้งหมด กรดแลกติกใช้ทำให้อาหารเป็นกรด เนื่องจากกรดชนิดนี้พบในอาหารธรรมชาติหลายชนิด มีรสกรดเล็กน้อย และไม่มีกลิ่นรุนแรง นอกจากนี้ยังถูกนำมาใช้เป็นสารกันบูดอีกด้วย โดยอาจใช้ร่วมกับ propionic acid กรดแลกติกยังใช้ในการผลิต cheese, creamy salad dressing, salami (ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์แช่แข็ง) แยม เยลลี่ ผลิตภัณฑ์จำพวกเบเกอรี่ นอกจากนี้ในเครื่องดื่มประเภท soft drink ก็ได้้นำกรดแลกติกมาใช้ในการผลิตแทนกรดซิตริกและใช้ในการผลิตไวน์ จะเห็นว่า ประโยชน์ของกรดแลกติกในด้านนี้มีมากมาย สามารถแบ่งผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่มที่มีการใช้กรดแลกติกได้เป็น 8 ประเภทใหญ่ๆ ดังนี้ ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม เช่น กาแฟและโกโก้ ผลิตภัณฑ์จากถั่ว เช่น ถั่วหมัก ซีอิ๊ว เตมเป้และถั่วเน่า ผลิตภัณฑ์จากธัญพืช เช่น ขนมจีน ผลิตภัณฑ์จากนม เช่น นมเปรี้ยว เนยชนิด

ต่างๆ ผลิตภัณฑ์จากเนื้อ เช่น ไส้กรอก ผลิตภัณฑ์จากปลา เช่น ปลาร้า ปลาเค็ม-น้ำปลา ผลิตภัณฑ์จากพืชหัว เช่น ขนมนึ่ง ผลิตภัณฑ์จากผักและผลไม้ เช่น กิมจิ ผักกาดดอง (เอกชัย, 2536)

สำหรับในประเทศไทย ได้มีรายงานถึงอัตราการใช้กรดแลกติกในอุตสาหกรรมอาหารชนิดต่างๆ ซึ่งกำหนดโดยกระทรวงสาธารณสุข ดังนี้ มะกอกดอง (ปริมาณกรดแลกติกสูงสุดที่กำหนดให้ใช้คือ 15,000 ppm) น้ำมะเขือเทศเข้มข้น แยมและเยลลี่ ฟังไจที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (ไม่เกิน 5,000 ppm) อาหารเสริมสำหรับเด็กชนิดครบถ้วน (2,000 ppm) อาหารเสริมสำหรับเด็กชนิดแบ่ง (15,000 ppm ในอาหารที่ปราศจากน้ำ) อาหารทารก เนยเทียม สตรอเบอรี่ และ pear ที่ผ่านกรรมวิธีแคนนิง ไอศกรีม แดงกวาดองและผลิตภัณฑ์จากฟังไจเป็นต้น (สุภพงศ์และคณะ, 2528)

1.2.2 ด้านการแพทย์ (Vickroy, 1985) นำกรดแลกติกมาใช้เป็นสารที่ช่วยในการปรับ pH นำมาใช้เตรียมเป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (polymer ของกรดแลกติก) เพื่อใช้สำหรับการต่อกระดูก ใช้ในรูปของ calcium lactate trihydrate เพื่อเป็นแหล่งของแคลเซียมสำหรับผู้ที่เป็นโรคขาดแคลเซียม และใช้ยับยั้งไม่ให้เลือดไหลในการถอนฟันอีกด้วย หรืออาจจะใช้ในรูปแบบของ ethyl lactate เพื่อผลิตยา anti-inflammatory เป็นต้น

1.2.3 อุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น อุตสาหกรรมพลาสติก ผลิตภัณฑ์พลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Cheng *et al.*, 1991) การนำไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิตทางเคมีและชีวภาพของการผลิตกรดอินทรีย์ตัวอื่นๆ เช่น กรดโฟสโฟโนอิก กรดอะซิติก และกรดอะไซลิก เป็นต้น (ทรงอำนาจ, 2539) ใช้เป็นสารควบคุม pH ในการทำให้เกิดแผ่นฟิล์มของการผลิต cellophane ใช้ในการผลิต phenol-formaldehyde resins ใช้เป็น plasticizers ใช้ในการทำผลิตภัณฑ์จากยาง ในอุตสาหกรรมสิ่งทอ การพิมพ์ ใช้เป็น emulsifiers ในการผลิตเครื่องสำอาง ใช้ในการผลิต herbicides fungicides และ pesticides เป็นต้น (Vickroy, 1985) ในตาราง 2.3 ได้แสดงให้เห็นถึงการใช้อนุพันธ์ของกรดแลกติกในทางการค้า

ตาราง 2.3 ประโยชน์ของสารอนุพันธ์กรดแลคติกในทางการค้า

สารอนุพันธ์	การใช้
แอนติโมนีแลคเตท	เป็นตัวผสมสีให้ติดแน่นกับสีย้อม
แคลเซียมแลคเตท	รักษาโรคขาดแคลเซียมของฟัน
คอปเปอร์แลคเตท	เป็นน้ำยาที่ใช้ชุบโลหะด้วยไฟฟ้า
ไอออนแลคเตท	รักษาโรคโลหิตจาง
โซเดียมแลคเตท	เป็นตัวอบหรือเคลือบปิด ป้องกันความชื้นและป้องกันการถูกกัดกร่อนของวัสดุ
เอ็น-บิวทิลแลคเตท	เป็นตัวทำละลายในน้ำมันชักเงา
เอทิลแลคเตท	เป็นตัวทำละลายของไนโตรเซลลูโลสและเซลลูโลสอะซิเตรท
เมทิลแลคเตท	เป็นตัวทำละลายของเซลลูโลสอะซิเตรท

ที่มา : ทรงอำนาจ, 2539

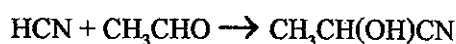
1.3 การผลิตกรดแลคติกในอุตสาหกรรม

ได้มีการสกัดกรดแลคติกเป็นครั้งแรกจากนมเสียที่มีรสเปรี้ยวในปี ค.ศ. 1780 โดย Scheele ต่อมาในปี ค.ศ. 1857 Pasteur พบว่านมที่เสียนั้นเกิดจากการกระทำของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติกในปัจจุบัน นอกเหนือไปจากวิธีการผลิตทางเคมี (เอกชัย, 2536)

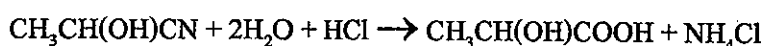
1.3.1 การผลิตโดยวิธีทางเคมี (Vickroy, 1985)

วิธีนี้ถูกนำมาใช้ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1963 ในประเทศญี่ปุ่นและสหรัฐอเมริกา ซึ่งทั้งสองประเทศสามารถผลิตกรดแลคติกรวมกันได้ถึง 50% ของปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ทั้งหมด วิธีนี้แบ่งได้ 2 ขั้นตอนคือ

ขั้นแรก นำกรด HCN มาทำปฏิกิริยากับ acetaldehyde ได้เป็น lactonitrile ดังสมการ



ขั้นที่สอง นำ lactonitrile ที่ได้มาทำปฏิกิริยา hydrolysis กับกรด HCl ได้เป็นกรดแลคติก และเกลือแอมโมเนียม ดังสมการ



ขั้นตอนในการผลิตจะแตกต่างกันไปขึ้นกับบริษัทผู้ผลิต เช่นบริษัท Monsanto (อเมริกา) ผลิตโดยใช้ acetaldehyde และกรด HCN ในขณะที่บริษัท Mushashino (ญี่ปุ่น) จะซื้อ lactonitrile จากบริษัทอื่นเพื่อนำมาผลิตหลังจากนั้นก็จะเป็นการกรดแลคติกที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยทำให้เป็นอนุพันธ์เอสเตอร์ คือ methyl lactate แล้วจึงกลั่นเอาอนุพันธ์เอสเตอร์นี้ออกมา และสุดท้ายจึงทำการ hydrolyzed methyl lactate ได้เป็นกรดแลคติก ส่วนเมทานอล กรด HCN และสารเจือปนอื่นๆ จะถูกกำจัดโดยวิธี combination of steaming carbon treatment และการทำ ion exchange และนอกจากนี้ยังสามารถแยกกรดแลคติกโดยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายได้อีกด้วย

1.3.2 การผลิตโดยใช้จุลินทรีย์และวัตถุดิบผ่านกระบวนการหมัก

จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตกรดแลคติกในอุตสาหกรรม ส่วนใหญ่จะอยู่ในจีนัส *Lactobacillus* โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกได้สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ homofermentative ซึ่งจะผลิตกรดแลคติกเพียงอย่างเดียว และ heterofermentative ซึ่งนอกจากจะได้กรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์แล้วยังได้กรดอะซิติก ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เอทานอลและกลีเซอรอลเป็นผลิตภัณฑ์ข้างเคียงด้วย จุลินทรีย์ในกลุ่ม homofermentative เท่านั้นที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการผลิตกรดแลคติกซึ่งได้แก่เชื้อในจีนัส *Lactobacillus*, *Streptococcus* และ *Pediococcus* โดยสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อที่ผลิตกรดแลคติกในทางอุตสาหกรรมจะใช้อุณหภูมิที่สูงกว่า 40°C และ pH 5-7 เนื่องจากกรดที่สร้างขึ้นจะทำให้จุลินทรีย์อื่นที่ไม่ทนกรดเจริญไม่ได้จึงเป็นการช่วยลดปัญหาจากการปนเปื้อนได้ มีรายงานการศึกษา พบว่า แบคทีเรียแลคติกต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนในการเจริญ เช่น วิตามิน B รวม กรดอะมิโนหลายชนิด นอกจากนี้สารจำพวก growth substances หลายชนิดก็เป็นปัจจัยสำคัญต่ออัตราการผลิตโดยกระบวนการหมัก ได้มีการทดลองถึงความสามารถในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อวัตถุดิบจำพวกสารคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ ได้ผลดังนี้ Gasser(1970) (อ้างโดย เอกชัย, 2536) พบว่า *Lactobacillus bulgaricus*, *L. casei* หรือ *Streptococcus lactis* สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้ *L. delbreuckii* และ *L. leichmannii* สามารถ ferment น้ำตาลกลูโคสได้เพียงชนิดเดียวเท่านั้น หรือ *L. pentosus* สามารถหมักของเสียพวกซัลไฟด์ชนิดเหลวได้

ในปัจจุบัน วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติกในทางการค้าได้แก่ น้ำตาลซูโครส หางนมที่มีน้ำตาลแลคโตส น้ำตาลมอลโตสและน้ำตาลกลูโคส ซึ่งได้จากการ hydrolyzed แป้ง โดยเฉพาะน้ำตาลซูโครสบริสุทธิ์ นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางแม้ว่าจะมีราคาแพงก็ตาม ดังนั้น อุตสาหกรรมการผลิตกรดแลคติกมักจะเกี่ยวข้องกับธุรกิจการผลิตน้ำตาล จะเห็นได้ว่า แนวโน้มของการใช้วัตถุดิบที่ไม่บริสุทธิ์ในการผลิตจะลดลง เนื่องจากจะได้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงซึ่งก่อให้เกิดปัญหาในการทำกรดแลคติกให้บริสุทธิ์ อย่างไรก็ตามได้มีความพยายามที่จะใช้วัตถุดิบจำพวกคาร์โบไฮเดรตโมเลกุล

ใหญ่ๆ จากรายงานวิจัยของ Nakamura และ Crowell (1979) พบว่า เชื้อ *L. amylophilus* สามารถ ferment แป้งข้าวโพดและได้กรดในปริมาณที่สูง แต่ยังมีได้นำมาใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรม หากมีการใช้แป้งข้าวโพดเป็นวัตถุดิบแทนน้ำตาลซูโครสหรือน้ำตาลกลูโคส จะพบว่า สามารถที่จะลดต้นทุนในการผลิตได้อย่างน้อย 0.20 ดอลลาร์ต่อกิโลกรัม (Vickroy, 1985)

1.4 กรดแลกติกในเชิงพาณิชย์

ข้อมูลทางการค้าของกรดแลกติกค่อนข้างที่จะรวบรวมลำบาก ทั้งนี้เนื่องจากการส่งผ่านที่ซับซ้อนของกรดแลกติกจากบริษัทผู้ผลิตไปยังผู้จำหน่ายรายใหญ่และรายย่อยรวมไปถึงผู้บริโภค ทำให้เป็นการยากที่จะรวบรวมตัวเลขและข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการใช้กรดแลกติกที่แน่นอนและถูกต้องได้ ข้อมูลที่มีอยู่ในปัจจุบันเป็นเพียงการรวบรวมข้อเท็จจริงจากบริษัทหลักๆ ในธุรกิจการผลิตกรดแลกติกเท่านั้น (เอกชัย, 2536)

สำหรับในประเทศไทย จากการสำรวจพบว่า มีปริมาณการนำเข้าของกรดแลกติกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2510-2526 โดยมีมูลค่าการนำเข้าในแต่ละปีหลายล้านบาท และปริมาณการใช้ก็สูงขึ้นทุกปี ในปัจจุบันได้มีความพยายามที่จะพัฒนาการผลิตกรดแลกติกเพื่อทดแทนการนำเข้าจากต่างประเทศ และยังคงเป้าหมายในอนาคตไว้ว่า จะต้องผลิตเพื่อการส่งออกได้ ข้อมูลปริมาณการนำเข้าของกรดแลกติก แสดงดังตาราง 2.4

ตาราง 2.4 ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าของกรดแลคติกในประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2510-2526

ปี	กิโลกรัม	บาท
2510	32,393	374,006
2511	43,166	430,849
2512	41,501	578,460
2513	41,097	463,347
2514	56,543	739,266
2515	58,135	579,162
2516	56,167	694,550
2517	75,480	1,269,162
2518	92,639	3,052,970
2519	111,326	3,317,462
2520	123,536	4,101,511
2521	146,077	4,793,541
2522	136,063	4,842,855
2523	156,308	6,225,439
2524	177,097	5,926,440
2525	144,763	5,770,140
2526	179,907	7,248,142

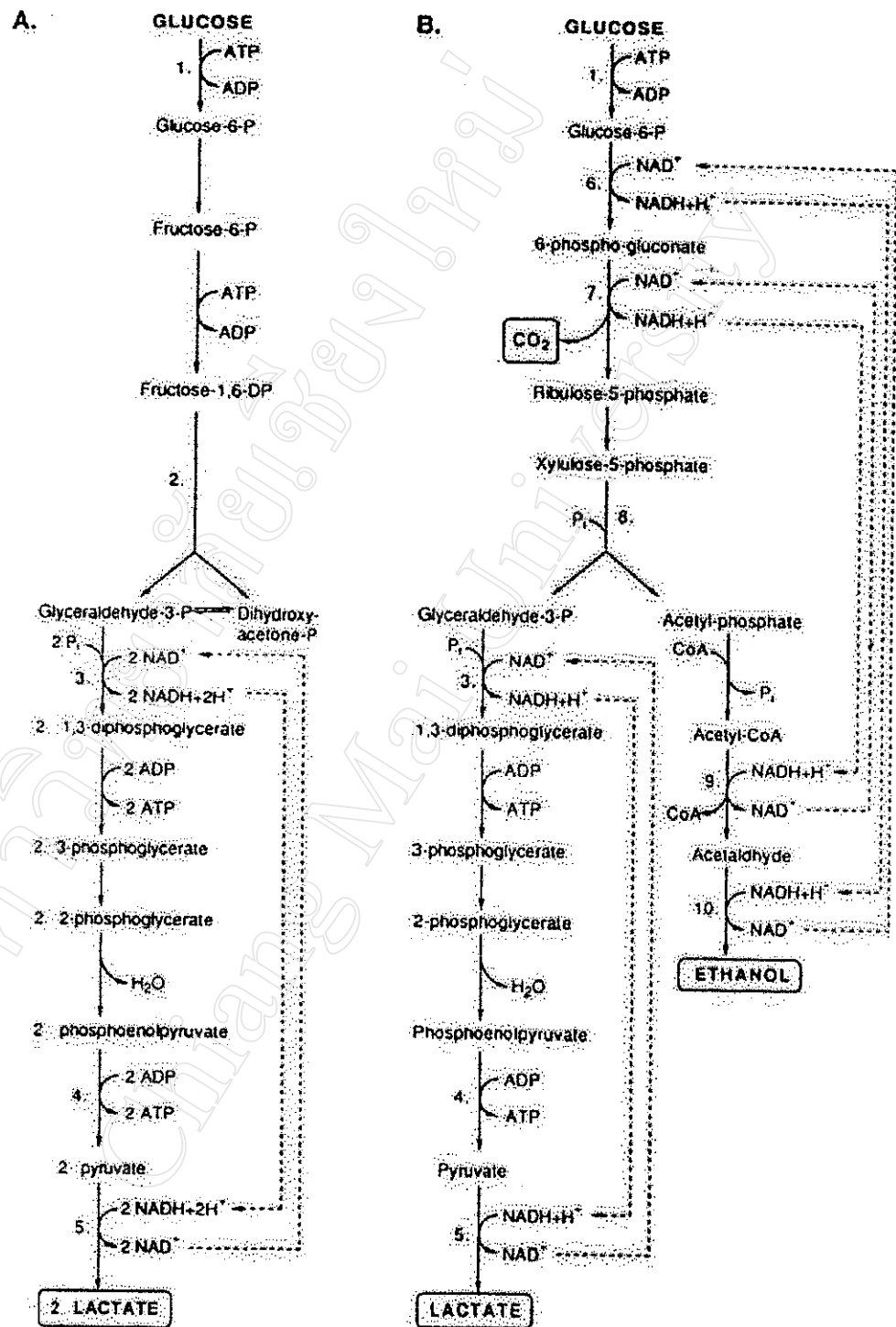
ที่มา : (สุภพงศ์และคณะ, 2528)

2. แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria)

2.1 แบคทีเรียแลคติก คือ แบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่มีความสามารถในการหมักโดยใช้น้ำตาลกลูโคส (Sneath *et al.*, 1986) และสับสเตรตอื่นๆ ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักอาหาร (de Vos, 1996) เป็นแหล่งพลังงานในการผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณสูง แบคทีเรียแลคติก เป็นเชื้อกลุ่มใหญ่ที่พบในธรรมชาติโดยเฉพาะในอาหาร เช่น ผลิตภัณฑ์นม เนื้อหมัก ไข่กรอกเปรี้ยว ผักดอง หมักหมก เครื่องดื่มต่างๆ นอกจากนี้ยังพบในพืช ของเสียวัชระสับพันธุ์ ถ้าใส่เด็กและทางเดินหายใจในคนและสัตว์ แบคทีเรียแลคติก เป็นแบคทีเรียกรัมบวก ส่วนใหญ่ไม่สร้างสปอร์ ยกเว้น *Sporolactobacillus* รูปร่างกลม ท่อนสั้นหรือท่อนยาว ไม่สร้าง catalase หรือสร้าง pseudocatalase เป็น chemo-organotroph ต้องการอาหารที่ซับซ้อน แบคทีเรียแลคติกแบ่งตามลักษณะการเฟอร์เมนเตชันน้ำตาล hexose เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ homofermentative ได้ lactate เป็นผลิตภัณฑ์หลัก และ heterofermentative ได้ lactate, acetate, ethanol, CO₂, formate หรือ succinate แบคทีเรียแลคติก แบ่งเป็น 10 จีนัส ได้แก่ *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* (รวมทั้ง *Tetratogenococcus* และ *Aerococcus*), *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Bacillus* และ *Sporolactobacillus* (Wood and Holzapfel, 1995)

2.2 การจัดชนิดของแบคทีเรียแลคติก เมื่อพิจารณาความสามารถในการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียแลคติก สามารถแบ่งแบคทีเรียแลคติกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

1. พวกที่ใช้น้ำตาลผ่าน Glycolysis (Embden-Meyerhof-Parnas pathway) ในการหมักทำให้ได้กรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายซึ่งเป็นแบคทีเรียแลคติกพวกที่มีเมตาบอลิซึมแบบ homofermentation ดังแสดงในรูป 2.2
2. พวกที่ใช้น้ำตาลผ่าน 6-phosphogluconate/phosphoketolase (6-PG/PK) pathway จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายหลายชนิด เช่น ethanol, acetate, CO₂, และกรดแลคติกจึงเป็นแบคทีเรียแลคติกพวกที่มีเมตาบอลิซึมแบบ heterofermentation ดังแสดงในรูป 2.2



รูป 2.2 แบบที่เรียกละเคติคพวกที่มีเมตาบอลิซึมแบบ homofermentation (A) และ heterofermentation (B)

ได้มีการค้นคว้าเพื่อหาวิธีแยกเชื้อ lactic acid bacteria ทั้ง 2 กลุ่มโดยใช้ selective media จากรายงานของ Sims (Sims, 1968) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด selective medium ที่เติม fusidic acid ลงไปจะส่งเสริมการเจริญของพวก homofermentative lactobacilli ที่พบในผลิตภัณฑ์อาหารจากนม ในช่องปากและมดลูก และจะยับยั้งการเจริญของพวก heterofermentative lactobacilli แต่ในระยะต่อมาพบว่าพวก lactobacilli ที่พบในอาหารจำพวกผักดองจะไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง พวก homofermentative และพวก heterofermentative โดยอาหารชนิดนี้ จึงมีการพัฒนาอาหารชนิดใหม่ คือ อาหาร homofermentative-heterofermentative differential (HHD) medium ในอาหารชนิดนี้จะใช้น้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนและอาศัยความแตกต่างของ pH ที่เกิดขึ้นเนื่องจากปริมาณกรดแลกติกที่ถูกสร้างขึ้น ซึ่งมีผลให้สีโคโลนีของเชื้อแตกต่างกัน กล่าวคือ พวก homofermentative จะให้โคโลนีสีฟ้าหรือสีเขียว ส่วนพวก heterofermentative จะให้โคโลนีสีขาว จากการทดลองโดยใช้เชื้อ 21 สายพันธุ์ ในจีนัส *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* และ *Pediococcus* สามารถตรวจสอบแยกชนิดได้เป็น พวก heterofermentative อยู่ 9 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus fermentum*, *L. brevis*, *L. cellobiosus*, *L. hickgardi*, *L. viridescens*, *Leuconostoc dextranicum*, *Leuconostoc mesenteroides* และ *Leuconostoc paramesenteroides* และเป็นพวก homofermentative อยู่ 12 สายพันธุ์ คือ *Streptococcus lactis*, *S. faecium*, *S. faecalis*, *S. faecalis* subsp. *liquefaciens*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. xylosum*, *L. casei* subsp. *pseudopplantarum*, *L. salivarius* subsp. *salivarius*, *L. salivarius* subsp. *salicinius*, *L. coryniformis* subsp. *torquens* และ *L. coryniformis* subsp. *coryniformis* (McDonald et al., 1987)

2.3 การจัดลำดับหมวดหมู่ของแบคทีเรียแลกติก

การจัดลำดับหมวดหมู่ของแบคทีเรียแลกติกโดย Orla-Jensen (1919) (อ้างโดย Axelsson, 1993) ได้อาศัยคุณลักษณะบางอย่างเป็นเกณฑ์ในการจัด ดังต่อไปนี้

- ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) เช่น รูปร่างของเซลล์ เช่น cocci หรือ rod และการจัดเรียงตัวของเซลล์ เช่น การเกิด tetrad formation
- กระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส (glucose fermentation) ว่าเป็น homofermentation หรือ heterofermentation
- ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ เช่นที่ 10°C และ 45°C
- โครงร่างของกรดแลกติกที่สร้างขึ้นว่าเป็นชนิด D, L หรือทั้งสองชนิด

ซึ่งลักษณะที่สำคัญเหล่านี้ได้ถูกนำมาใช้ในการจัดหมวดหมู่ของแบคทีเรียแลคติกจนถึงปัจจุบัน Orla-Jensen (1919) อ้างโดย Axelsson, 1993 สามารถจัดแบ่งแบคทีเรียแลคติกได้ 4 สกุล คือ *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Streptococcus*

การจัดลำดับหมวดหมู่ในระดับสกุลต่างๆ ของแบคทีเรียแลคติกนั้นยึดถือตาม Bergey's Manual Edition ล่าสุดในปี 1986 คือ *Aerococcus* (A.), *Lactobacillus* (Lb.), *Leuconostoc* (Ln.), *Pediococcus* (P.) และ *Streptococcus* (S.) มีการจัดอนุกรมวิธานของแบคทีเรียแลคติก ในส่วนของ streptococci ใหม่ ดังแสดงใน Bergey's Manual ในปี 1986 (Hardie, 1986b; Schleifer, 1986) ซึ่ง genus *Streptococcus* ถูกแบ่งออกเป็น 3 genus คือ *Enterococcus* (E.), *Lactococcus* (Lc.) และ *Streptococcus sensu stricto* (Schleifer and Kilpper-Balz, 1984, 1987; Schleifer et al., 1985) แต่ต่อมาแบคทีเรียแลคติกที่สามารถเคลื่อนที่ได้ (motile) ซึ่งเป็นลักษณะที่ต่างจาก lactococci ได้ถูกแยกออกมาเป็น genus *Vagococcus* (V.) (Collins et al., 1989) สำหรับสกุลอื่นๆ คือ *Lactobacillus*, *Leuconostoc* และ *Pediococcus* ส่วนใหญ่ยังเหมือนเดิมไม่มีการเปลี่ยนแปลง ยกเว้นมีการแยกสกุลใหม่่ออกมาจากสกุล *Lactobacillus* ซึ่งเป็นพวกแบคทีเรียแลคติกที่มีเซลล์รูปร่างท่อน (rod-shaped) คือ สกุล *Carnobacterium* (C.) (Collins et al., 1987) และมีการยกสปีชีส์ *Pediococcus halophilus* เป็นสกุล (genus) ใหม่ด้วย คือ สกุล *Tetragenococcus* (T.) (Collins et al., 1990) โดยการเปลี่ยนแปลงภายหลังปี 1986 นั้นอาศัยข้อมูลสนับสนุนด้าน chemotaxonomic และด้านพันธุศาสตร์ (genetic) (Axelsson, 1993)

ต่อมาใช้การตรวจสอบถึงระดับสารโมเลกุลใหญ่ (macromolecule) ต่างๆ ในเซลล์เพื่อนำมาพิจารณาถึงความสัมพันธ์และตำแหน่งทางพันธุกรรม (phylogenetic position) ต่างๆ โดยเฉพาะกรดนิวคลีอิกซึ่งสามารถจำแนก species และ subspecies ได้โดยอาศัยการพิจารณาความเหมือนกันของดีเอ็นเอ (DNA-DNA homology) (Johnson, 1984) ในการจำแนก species และสกุล โดยอาศัยความแตกต่างของลำดับเบสของอาร์เอ็นเอในไรโบโซม (rRNA) โดยเฉพาะในส่วน well-conserved region และ less-conserved region ซึ่งมีขนาดประมาณ 1500 base ใน 16S rRNA ของแบคทีเรีย (Lane et al., 1985) การเปรียบเทียบลักษณะดังกล่าวมีความแม่นยำมากในการศึกษาถึงความสัมพันธ์กันของจุลินทรีย์ต่างๆ (Woese, 1987) ทำให้สามารถจัดแบ่งสกุลใหม่ได้ 10 สกุล ดังนี้ *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* และ *Vagococcus* แบคทีเรียแลคติกทั้ง 10 สกุลมีคุณลักษณะแตกต่างกันไป ดังแสดงในตาราง 2.5 (Axelsson, 1993)

ตาราง 2.5 คุณลักษณะที่แตกต่างกันระหว่างแบคทีเรียแลคติก 10 สกุล

Characteristic	Rods			Cocci					
	<i>Carnob.</i>	<i>Lactob.</i>	<i>Aeroc.</i>	<i>Enteroc.</i>	<i>Lactoc.</i> <i>Yogoc.</i>	<i>Leucon.</i>	<i>Pedioc.</i>	<i>Streptoc.</i>	<i>Tetragenoc.</i>
Tetrad formation	-	-	+	-	-	-	+	-	+
CO ₂ from glucose ^b	-	±	-	-	-	+	-	-	-
Growth at 10°C	+	±	+	+	+	+	±	-	+
Growth at 45°C	-	±	-	+	-	-	±	±	-
Growth in 6.5% NaCl	ND ^d	±	+	+	-	±	±	-	+
Growth in 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Growth at pH 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-
Growth at pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Lactic acid ^c	L	D,L,DL ^e	L	L	L	D	L,DL ^e	L	L

^a+, ผลบวก; -, ผลลบ; ±, ขึ้นกับความแตกต่างระหว่าง species; ND, ไม่ระบุ

^b การทดสอบ homo- หรือ heterofermentation จาก glucose; สบจัดเป็น homofermentative และบวกจัดเป็น heterofermentative

^c โครงสร้างกรดแลคติกที่ผลิตจาก glucose.

^d มีรายงานว่า ไม่มีการเจริญใน 8% NaCl

^e การผลิตกรดแลคติก หรือดีแอลแลคติกแตกต่างกันระหว่าง species.

ที่มา : Axelsson (1993)

2.4 การหมักน้ำตาลของแบคทีเรียแลคติก (Sugar fermentation of LAB)

จากการศึกษาถึงรูปแบบการหมักน้ำตาล (sugar fermentation pattern) ของแบคทีเรียแลคติกโดย Axelsson (1993) สามารถแบ่งกลุ่มแบคทีเรียแลคติกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ซึ่งทำให้แบ่งกลุ่มสกุล *Lactobacilli* ออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

ประเภทที่หนึ่ง คือ พวก group I *Lactobacilli* ซึ่งเป็น obligately homofermentative หมายถึง สามารถหมักน้ำตาลด้วยกระบวนการไกลโคไลซิส (Embden-Meyerhof-Parnas Pathway) เท่านั้น

ประเภทที่สอง คือ พวก leuconostocs และ group III lactobacilli ซึ่งเป็น obligately heterofermentative คือ หมักน้ำตาลโดยผ่าน 6-phosphogluconate/phosphoketolase (6-PG/PK) pathway เท่านั้น

ความแตกต่างของ 2 ประเภทนี้สามารถสังเกตได้จากการเปรียบเทียบระดับเอนไซม์สำคัญในแต่ละประเภทว่ามีเอนไซม์สำคัญของกระบวนการไกลโคไลซิส และ 6-PG/PK pathway หรือไม่ คือ fructose-1, 6-diphosphate aldolase (FDP aldolase) และ phosphoketolase ตามลำดับ species ต่างๆ ที่เป็นพวก obligately homofermentative จะสร้าง FDP aldolase อยู่ตลอดเวลา (constitutive) และจะขาด phosphoketolase ซึ่งจะตรงข้ามกับพวก obligately heterofermentation (Kandler, 1983; Kandler และ Weiss, 1986) ซึ่งเป็นเหตุสำคัญที่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการหมักน้ำตาลกลูโคสที่แตกต่างกัน นอกจากนี้พวก group I lactobacilli ก็ไม่สามารถใช้ pentose ต่างๆ และ gluconate ได้ (Axelsson, 1993)

ประเภทที่สาม คือ พวกแบคทีเรียแลคติกที่เหลือทั้งหมด (เช่น group II lactobacilli, enterococci, lactococci, pediococci, streptococci, tetragenococci และ vagococci) ซึ่งอยู่ก้ำกึ่งระหว่าง 2 พวกแรก โดยเหมือนพวก obligately homofermentative เนื่องจากสามารถสร้าง FDP aldolase ได้ตลอดเวลา (constitutive) เป็นผลให้หมักน้ำตาล hexose โดยผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส และพบว่า สามารถหมักน้ำตาล pentose, glucotenate และ pentitols ได้ และสารเหล่านี้จะเป็นตัวกระตุ้นให้สร้าง phosphoketolase ทำให้สามารถเกิดการหมักแบบ heterolactic fermentation ได้ ดังนั้นแบคทีเรียแลคติกประเภทนี้จะทำการหมักน้ำตาล hexose แบบ homofermentative หมักน้ำตาล pentoses และสับสเตรทอื่นๆ บางชนิดแบบ heterofermentative ดังนั้น จึงเรียกการหมักแบบนี้ว่า facultative heterofermentative (Kandler, 1983; Kandler และ Weiss, 1986; Axelsson, 1993)

แลคเตทเป็น end product ที่ถูกผลิตขึ้นในปริมาณมากจากการหมักแลคเตท (lactate fermentation) โดยแบคทีเรียแลคติกซึ่งแบคทีเรียพวกนี้จะมี saccharolytic pathway สูง แต่ขาด anabolic pathway เป็นส่วนใหญ่ จึงทำให้มีความต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนอย่างมากในการเจริญเติบโต ดังนั้นจึงพบแบคทีเรียแลคติกได้จากส่วนต่างๆ ของพืช นมและทางเดินอาหารของสัตว์ โดยส่วนใหญ่แบคทีเรียแลคติกจัดเป็น strictly fermentative แต่แบคทีเรียแลคติกมักจะเป็น aerotolerant ด้วย เช่น streptococci บางชนิด สามารถใช้ออกซิเจนเป็น O_2 -acceptor และ cytochromes ภายใต้สภาวะที่แน่นอน ผลการหมักคาร์โบไฮเดรตไปเป็นแลคเตทของ species ต่างๆ

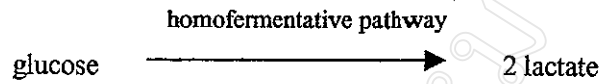
ในสกุล *Lactobacillus*, *Sporolactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Bifidobacterium* ใน 3 pathway (ตาราง 2.6) ดังนี้ (Gottschalk, 1979)

ตาราง 2.6 แบคทีเรียแลกติกพวก homofermentative และ heterofermentative และ โครงสร้าง
ของกรดแลกติก

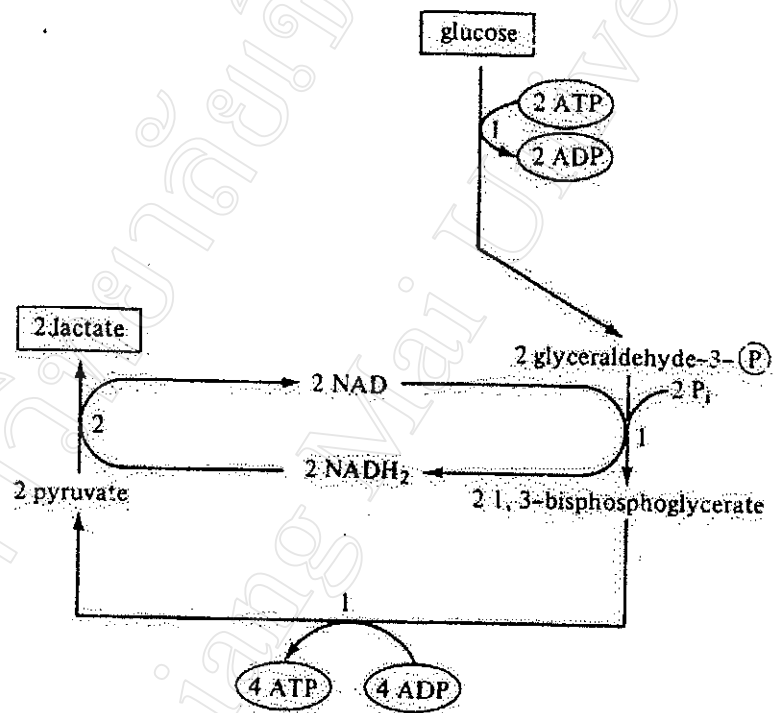
Genera and species	Homofermentative	Heterofermentative	Configuration of lactic acid
<i>Lactobacillus</i>			
<i>L. delbrueckii</i>	+	-	D(-)
<i>L. lactis</i>	+	-	D(-)
<i>L. bulgaricus</i>	+	-	D(-)
<i>L. casei</i>	+	-	L(+)
<i>L. plantarum</i>	+	+	DL
<i>L. curvatus</i>	+	-	DL
<i>L. brevis</i>	-	+	DL
<i>L. fermentum</i>	-	+	DL
<i>Sporolactobacillus</i>			
<i>S. inulinus</i>	+	-	D(-)
<i>Streptococcus</i>			
<i>S. faecalis</i>	+	-	D(-)
<i>S. cremoris</i>	+	-	D(-)
<i>S. lactis</i>	+	-	D(-)
<i>Leuconostoc</i>			
<i>L. mesenteroides</i>	-	+	D(-)
<i>L. dextranicum</i>	-	+	D(-)
<i>Pediococcus</i>			
<i>P. cerevisiae</i>	+	-	DL
<i>Bifidobacterium</i>			
<i>B. bifidum</i>	-	-	L(+)

ที่มา : Gottschalk, 1979

1. Homofermentative pathway (รูป 2.3) ได้แลกเตท 2 mol ต่อกลูโคส 1 mol



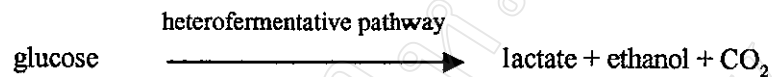
โดยกลูโคสถูกย่อยผ่านทาง Embden-Meyerhof pathway ได้เป็นไพรูเวท (pyruvate) จากนั้น pyruvate จะถูกใช้เป็น O_2 -acceptor โดยตรง ได้แลกเตท 2 mol และ 2 ATP ต่อกลูโคส 1 mol



รูป 2.3 Homofermentative pathway

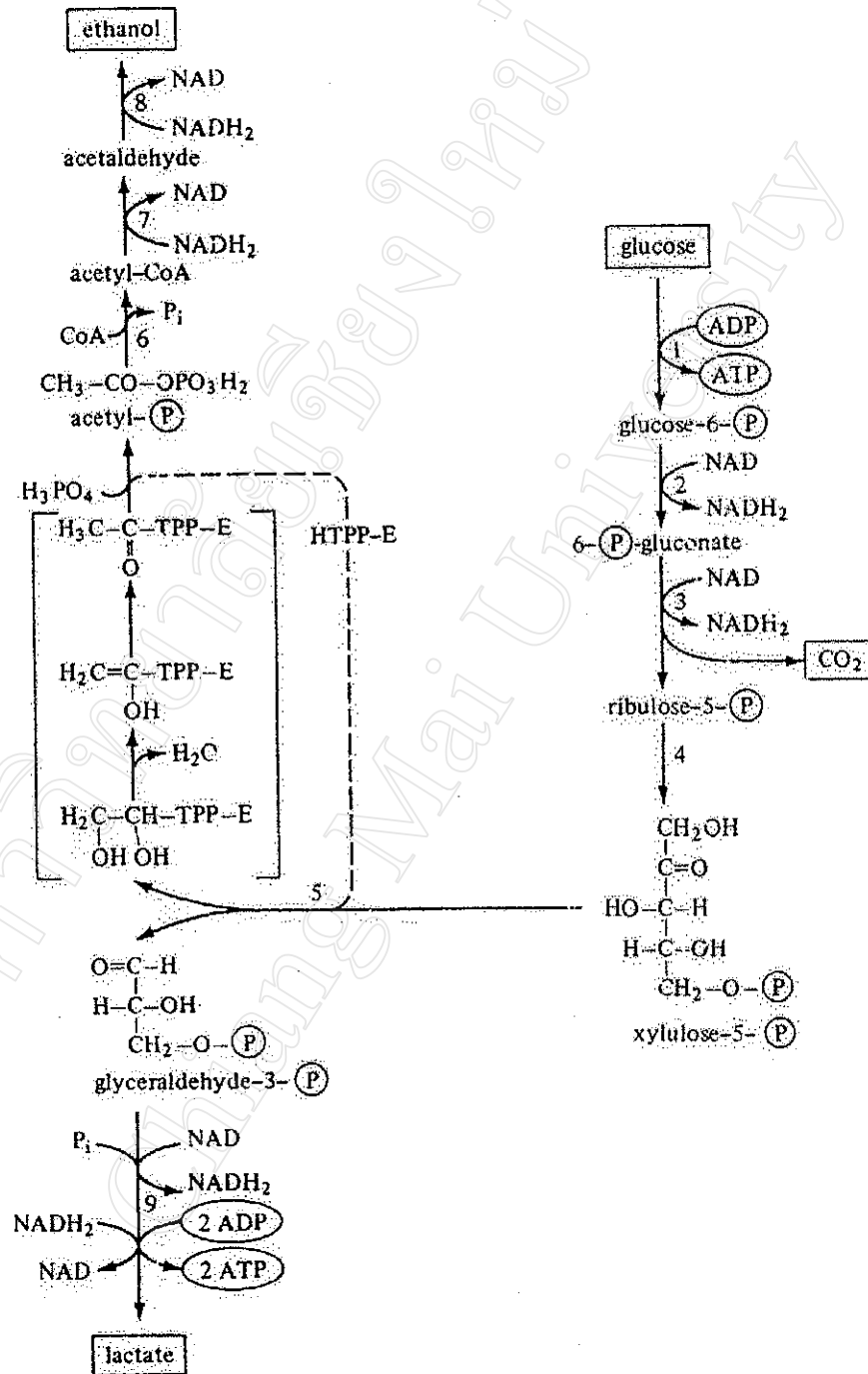
ที่มา: Gottschalk, 1979

2. Heterofermentative pathway (รูป 2.4) ได้แลกเตท เอทานอลและ CO_2 อย่างละ 1 mol ต่อกลูโคส 1 mol



เช่นเดียวกับใน oxidative pentose phosphate cycle นั่นคือ ribulose-5-phosphate ถูกสร้างขึ้นผ่านทาง 6-phosphogluconate จากนั้นเกิด epimerization ได้ xylulose-5-phosphate ซึ่งจะถูกแยกออกเป็น glyceraldehyde-3-phosphate และ acetyl phosphate โดยเอนไซม์ phosphoketolase จากนั้น acetyl phosphate จะถูกเปลี่ยนให้เป็น acetyl-Co A โดยเอนไซม์ phosphotransacetylase และ acetyl-Co A จะถูก reduce โดยเอนไซม์ acetaldehyde dehydrogenase ได้เป็น acetaldehyde และได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นเอทานอล (ethanol) โดยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ส่วน glyceraldehyde-3-phosphate จะถูกเปลี่ยนให้เป็นแลกเตท โดยทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ phosphoketolase เช่นเดียวกับใน homofermentative pathway การหมักแบบ heterofermentative จะได้ 2NADH_2 และได้ 1 ATP จากกลูโคส 1 mol ซึ่งได้ ATP เพียงครึ่งหนึ่งของ homofermentative pathway

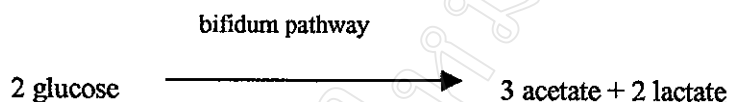
โดยปกติแล้วแบคทีเรียแลกติกพวกที่เป็น homofermentative จะผลิต 1.8 mol lactate ต่อกลูโคส 1 mol ส่วนพวกที่เป็น heterofermentative จะผลิตแลกเตท 0.8 mol และอะซิเตทบ้าง นอกนั้นก็จะเป็นเอทานอลและ CO_2



รูป 2.4 Heterofermentative pathway

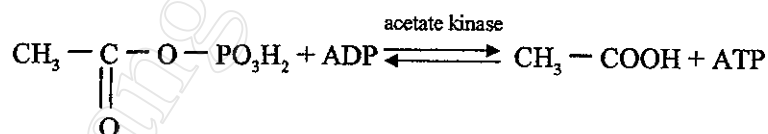
ที่มา: Gottschalk, 1979

3. bifidum pathway (รูป 2.5) ได้อะซิเตทและแลคเตทในอัตราส่วน 3:2 จากกลูโคส 2 mol

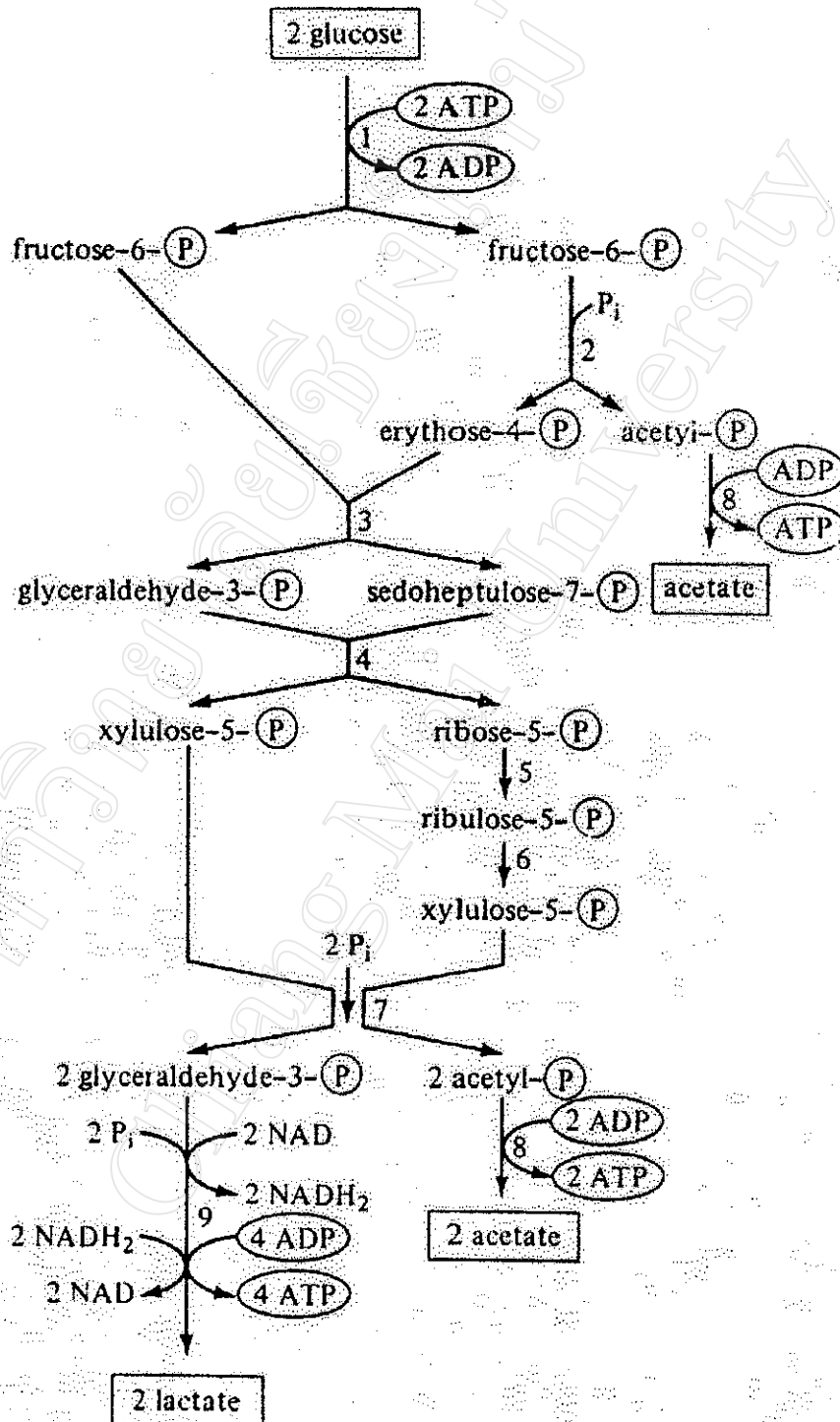


การย่อยสลายกลูโคสโดยแบคทีเรีย *Bifidobacterium bifidum* จะใช้ เอนไซม์ phosphoketolase 2 ตัว เอนไซม์ตัวหนึ่งจะเฉพาะเจาะจง (specific) สำหรับ fructose-6-phosphate และเอนไซม์อีกตัวหนึ่งจะ specific สำหรับ xylulose-5-phosphate โดยมีกลไกของทั้ง 2 ปฏิกริยาที่เหมือนกัน คือ เอนไซม์ fructose-6-phosphate phosphoketolase จะย่อย fructose-6-phosphate ให้เป็น acetyl phosphate และ erythrose-4-phosphate

ลำดับปฏิกริยาที่น่าสนใจ คือ กลูโคส 2 mol ถูกเปลี่ยนให้เป็น acetate 3 mol และ glyceraldehyde-3-phosphate 2 mol โดยปราศจากปฏิกริยาการเติมน้ำ (hydrogenation) และปฏิกริยาการเอาน้ำออก (dehydrogenation) และได้แลคเตท โดยอาศัย glyceraldehyde-3-phosphate และเอนไซม์ lactate dehydrogenase การสังเคราะห์ acetate จาก acetyl phosphate เกิดร่วมกับการสังเคราะห์ ATP จาก ADP โดยเอนไซม์ acetate kinase



ปฏิกริยาดังกล่าวจัดเป็นส่วนสำคัญมากในการสังเคราะห์ acetate สำหรับแบคทีเรียพวก anaerobe ทุกชนิด เนื่องจากจะไม่มีผลต่อการสังเคราะห์ ATP (ATP synthesis) ผ่านทาง substrate-level phosphorylation ผลลัพธ์ที่ได้คือ ATP 2.5 mol ต่อกลูโคส 1 mol ซึ่งสูงกว่า ATP ที่ได้จากทั้ง homo- และ heterofermentative pathway



รูป 2.5 Bifidum pathway

ที่มา: Gottschalk, 1979

2.5 แบคทีเรียแลกติกที่เป็น amylolytic lactic acid bacteria

แบคทีเรียแลกติกที่จัดเป็น amylolytic lactic acid bacteria ซึ่งสามารถเปลี่ยนแป้งให้เป็นกรดแลกติกมีเพียง *Streptococcus bovis*, *S. equinus*, *Lactobacillus amylophilus*, *L. amylovorus*, *L. acidophilus*, *L. cellobiosus* และบาง species ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของสัตว์และพืชที่นำเลี้ยง (Cotta, 1988; Champ *et al.*; 1983; Nakaruma และ Crowell, 1979; Nakamura, 1981; Sen และ Chakrabarty, 1986; Sneath *et al.*, 1986; Cheng *et al.*, 1991; Zhang และ Cheryan, 1991) *Lactobacillus plantarum* A6 (Giraud *et al.*, 1991)

2.6 การศึกษาการหมักกรดแลกติกโดยใช้แป้งเป็นสับสเตรทโดยจุลินทรีย์

ตัวอย่างเช่น การศึกษาการผลิต DL-lactic acid โดย *Lactobacillus amylovorus* (Cheng *et al.*, 1991; Zhang และ Cheryan, 1991) การใช้ *Aspergillus awamori* ที่เป็น amylolytic strain ร่วมกับ *Streptococcus lactis* ผลิต L(+) lactic acid (Kurosawa *et al.*, 1988) การผลิต L(+) lactic acid โดย *Rhizopus oryzae* (Hang, 1989; Suntornsuk และ Hang, 1994) การหมักแป้งไปเป็น L(+) lactic acid โดย *Lactobacillus amylophilus* (Yumoto และ Koji, 1995)

3. อาหารหมักดองและแบคทีเรียแลกติกที่เกี่ยวข้อง (วิเชียร, 2534)

อาหารหมักดองแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ อาหารหมักดองจากพืชและสัตว์ ในตาราง 2.7 ได้แสดงให้เห็นถึงอาหารหมักดองทั่วทุกภาคของไทยที่มีแบคทีเรียแลกติกเกี่ยวข้อง

3.1 อาหารหมักดองจากพืชประกอบด้วย

3.1.1 ผัก ได้แก่ กระเทียมดอง จิงคอง กังฉ่าย ซีเซ็กฉ่าย ใบเมี่ยง คั้งฉ่าย ผักกาดดอง

ผักเสี้ยนดอง หัวไชโป๊ และหน่อไม้ดอง

มีแบคทีเรียแลกติกที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* และ *L. brevis*

3.1.2 ผลไม้ ได้แก่ ท้อดอง มะม่วงดอง และอื่นๆ

มีแบคทีเรียแลกติกที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp. และ *Streptococcus* spp.

3.1.3 โกโก้และกาแฟ

มีแบคทีเรียแลคติกที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* และ *L. collinoides* ในกาแฟ ได้แก่ *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp. และ *Streptococcus* spp.

3.1.4 รัญพืช ได้แก่ ขนมหินหมัก

3.1.5 ถั่วเหลือง ได้แก่ ซีอิ๊ว และเต้าเจี้ยว

มีแบคทีเรียแลคติกที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ *Lactobacillus* spp. และ *Pediococcus halophilus*

3.2 อาหารหมักดองจากสัตว์ ประกอบด้วย

3.2.1 ผลิตภัณฑ์จากนม ได้แก่ นมเปรี้ยว ยาคูลท์ และ โยเกิร์ต (เนยแข็งและเนยเหลว)

มีแบคทีเรียแลคติกที่เกี่ยวข้อง ในนมเปรี้ยว ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* และ *L. bifidus* ในยาคูลท์ ได้แก่ *Lactobacillus casei* ในโยเกิร์ต ได้แก่ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus bulgaricus* ในเนยแข็ง ได้แก่ *Lactococcus cremoris*, *L. Lactis*, *Streptococcus lactis* sub sp. *diactylactis* และ *Leuconostoc* spp.

3.2.2 ผลิตภัณฑ์จากเนื้อ ได้แก่ เนื้อสวรรค์ หมูฮวน แหนมและไส้กรอกเปรี้ยว

มีแบคทีเรียแลคติกที่เกี่ยวข้อง ในไส้กรอกเปรี้ยว ได้แก่ *Pediococcus* spp., *Lactobacillus plantarum* และ *L. brevis*

3.2.3 ผลิตภัณฑ์จากปลา ได้แก่ กะปิ กุ้งจ่อมหรือกุ้งส้ม กุ้งเจ้า ไตปลา น้ำเคย น้ำดู น้ำปลา ปลาจ่อมหรือปลาต้ม ปลาเจ้า ปลาทุเค็ม ปลาแป้งข้าวหมาก ปลาแป้งแดง ปลาร้า ปลาหมัก ส้มผัก และหอยดอง

มีแบคทีเรียแลคติกที่เกี่ยวข้อง ในน้ำปลา น้ำดู ไตปลา ได้แก่ *Pediococcus* spp. ในปลาร้า ปลาเจ้า ปลาจ่อม ปลาต้ม ปลาแป้งแดง ปลาแป้งข้าวหมาก ได้แก่ *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc* spp., *Pediococcus acidolactici* และ *Streptococcus* spp.

ตาราง 2.7 อาหารหมักดองทั่วทุกภาคของไทยที่มีแบคทีเรียแลคติกเกี่ยวข้อง (วิเชียร, 2534)

อาหารหมักดอง		
	พืช	สัตว์
เหนือ	ขนมจีน ใบเมี่ยง ผักดองและผลไม้ดอง	แหนม ปลา ร้า ปลาจ่อม-ปลาต้ม ปลา เจ้า น้ำปลา
ใต้	ขนมจีน กุ้งฝอย ซีอิ๊วกล้วย ต้มกล้วย เกี่ยม กล้วย ผักและผลไม้ดอง หัวไชโป๊ ซีอิ๊ว และเต้าเจี้ยว	หมูฮวน หอยดอง กุ้งจ่อม-กุ้งต้ม น้ำบูดู น้ำเค็ม น้ำปลา ปลาจ่อม-ปลาต้ม ปลา แป้งแดง ปลาแป้งข้าวหมาก ปลาหมัก ไตปลา
ตะวันออก	ขนมจีน กุ้งฝอย เกี่ยมกล้วย ซีอิ๊วกล้วย ต้ม กล้วย ผักและผลไม้ดอง	หอยดอง ปลาจ่อม-ปลาต้ม น้ำปลา
ออกเฉียงเหนือ	ขนมจีน ผักและผลไม้ดอง	ส้มผัก กุ้งจ่อม-กุ้งต้ม ปลาจ่อม-ปลา ต้ม ปลา ร้า แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ปลา เจ้าและน้ำปลา
กลาง	ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว ขนมจีน กุ้งฝอย เกี่ยมกล้วย ซีอิ๊วกล้วย ต้มกล้วย ผักและผลไม้ดอง	กุ้งเจ้า กุ้งจ่อม-กุ้งต้ม ปลาจ่อม-ปลาต้ม ปลา ร้า หอยดอง น้ำปลา นมเปรี้ยว โย เกิร์ต เนยแข็ง

วิเชียร (2539) ได้รายงานไว้ว่า ประเทศในแถบยุโรปผลิตอาหารที่มีการใช้แบคทีเรียแลคติกมากอันดับหนึ่ง เช่น ผลิตภัณฑ์จากนม กล้วยพืช เครื่องดื่มและเนื้อ อันดับสอง ได้แก่ อเมริกาเหนือ อาหารที่ใช้แบคทีเรียแลคติกที่สำคัญ เช่น ผลิตภัณฑ์จากถั่ว พืชหัวและปลา อันดับสาม ได้แก่ แอฟริกาใต้ อาหารที่ใช้แบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์จากพืชหัวมากที่สุด อันดับที่ดี ได้แก่ อเมริกาใต้ อาหารที่มีแบคทีเรียแลคติกเกี่ยวข้อง ได้แก่ เครื่องดื่ม และผลิตภัณฑ์นม ตะวันออกกลางเป็นอันดับห้า ส่วนมากอาหารเป็นผลิตภัณฑ์จากนม อันดับสุดท้าย ได้แก่ เอเชีย ส่วนมากเป็นอาหารจากธัญพืช ถั่วและปลาที่มีแบคทีเรียแลคติกมาเกี่ยวข้อง แบคทีเรียแลคติกที่พบในอาหารหมักดองของไทย แสดงดังตาราง 2.8

ตาราง 2.8 แบคทีเรียแลคติกและแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในอาหารหมักคองของไทย

(Tanasupawat and Komagata, 1995)

ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก	ชนิดของแบคทีเรียที่พบ*
น้ำปลา	12, 14
บูดู	12, 16
ไตปลา	12
ปลาร้า	12, 16, 18
หอยแมลงภู่คอง	12
กุ้งจ่อม	12, 15, 16
ปลาแป๊ะคอง	12
ปลาจ่อม	12, 15, 19
Ching-Chung (fermented small fish)	12
ปลาเง้า	4
ปลาต้ม	1, 4, 11, 19
ต้มฟัก	1, 2, 3, 11
ไข่ปลาคอง	5
แหนม	1, 2, 3, 8, 9, 10, 11
ไส้กรอกเปรี้ยว	1, 2, 4, 9, 11
มัม	2, 20
ผักกาดคอง	1, 4, 11, 13, 19
ผักกุ่มคอง	2, 8
ผักหนามคอง	2
ผักเดี๋ยนคอง	1, 4, 5, 11
แตงกวาคอง	2
ถั่วอกคอง	2, 4
หอมคอง	1, 2, 8
หน่อไม้คอง	1, 5
สะตอคอง	6
ทุเรียนคอง	1
เมี่ยง	1, 7, 8, 17, 20
ข้าวหมาก	2, 11
ขนมจีน	2, 4, 10

*1-*Lactobacillus pentosus* ; 2-*L. plantarum* ; 3-*L. sake* ; 4-*L. fermentum* ; 5-*L. brevis* ; 6-*L. confusus* ; 7-*L. vaccinostercus* ; 8-*Lactobacillus* spp. ; 9-*Leuconostoc* spp. ; 10-*Pediococcus acidilactici* ; 11-*P. pentosaceus* ; 12-*P. halophilus* ; 13-*P. urinaceui* ; 14-*Halobacterium salinarium* ; 15-*Staphylococcus carnosus* ; 16-*S. piscifermentans* ; 17-*Enterococcus casseliflavus* ; 18-*E. faecalis* ; 19-*E. hirae* ; 20-*Enterococcus* spp.

4. การศึกษาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดแลกติก

จันทิรา (2534) ศึกษาการแยกและคัดเลือกรูปแบบที่เรียกลักษณะที่สามารถผลิตกรดแลกติกจากตัวอย่างทั้งหมด 36 ตัวอย่าง แบ่งเป็นอาหารหมักคองจำนวน 30 ตัวอย่าง ตัวอย่างดินจำนวน 4 ตัวอย่าง และตัวอย่างจากอุจจาระสัตว์ที่กินหญ้าจำนวน 2 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ de Man Rogosa Sharpe (MRS) medium ที่มี bromocresol green เป็นอินดิเคเตอร์ ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย peptone 10 g, meat extract 10 g, yeast extract 4 g, tween 80 1 ml, K_2HPO_4 2 g, $MnSO_4$ 0.05 g, triammonium citrate 2 g, sodium acetate 5 g, glucose 20 g, bromocresol green 0.4 ml และปรับ pH เป็น 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ $45^{\circ}C$ เป็นเวลา 1-3 วัน พบว่า สามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 42 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียกรัมลบ 11 ไอโซเลท และแบคทีเรียแลกติก 31 ไอโซเลท ซึ่งแบ่งเป็นแบคทีเรียกรัมบวกรูปทรงกลมจำนวน 25 ไอโซเลท และแบคทีเรียกรัมบวกรูปท่อนจำนวน 6 ไอโซเลท และพบว่า ไอโซเลทหมายเลข 6 ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรัมบวกรูปทรงกลมและเปลี่ยนสีอาหารเหลว MRS ในวันที่ 3 สามารถสร้างกรดได้สูงสุด คือ 3.87 กรัมต่อ 100 ml โดยวิธีไตเตรทด้วย 0.1 N NaOH และยืนยันการสร้างกรดแลกติกโดยใช้โครมาโตกราฟีกระดาษ และพบว่าในระยะเวลา 4 วันแรกมีอัตราการสร้างกรดสูง หลังจากนั้นจะเริ่มคงที่และมีอัตราการสร้างกรดสูงสุดในวันที่ 4 โดยใช้อาหารเหลว MRS ที่มี 5% $CaCO_3$

จงกลณี (2535) ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเซลล์ของแบคทีเรียแลกติก ไอโซเลทที่ 8 ที่แยกได้จากปลาสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 3.39% เมื่อเลี้ยงเชื้อในเวลา 5 วัน โดยอาหาร MRS ที่ pH 7.0 เมื่อนำเชื้อไอโซเลทที่ 8 มาเลี้ยงในอาหารต่างๆ กันได้แก่ MRS medium อาหารน้ำมะพร้าวและอาหารน้ำมะพร้าวที่ใช้ทำวันสวรรค์ พบว่า เชื้อเจริญดีและเพิ่มปริมาณเซลล์ได้มากที่สุดในอาหาร MRS เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 6 วัน

เอกชัย (2536) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยแบคทีเรียแลกติกที่ย่อยแป้งได้ จากการทดลองแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกซึ่งสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ $45^{\circ}C$ เป็นเวลา 1-3 วัน โดยทำการแยกเชื้อจากอาหารหมักคอง ผลิตภัณฑ์อาหารจากนมและผลไม้ที่ทิ้งไว้จนเน่าเสียแล้ว รวมทั้ง 35 ตัวอย่าง ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ de Man Rogosa Sharpe (MRS) medium ที่มี bromocresol green เป็นอินดิเคเตอร์ ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย peptone 10 g, beef extract 10 g, yeast extract 4 g, tween 80 1 ml, K_2HPO_4 2 g, $MnSO_4$ 0.05 g, triammonium citrate 2 g, sodium acetate 5 g, glucose 20 g, bromocresol green 0.4 ml และปรับ pH เป็น 7.0 สามารถแยกเชื้อได้ทั้งสิ้น 29 ไอโซเลท เมื่อนำมาเพาะในอาหาร homofermentative-heterofermentative differential (HHD) medium ซึ่งในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตรประกอบด้วย fructose 2.5 g, KH_2PO_4 2.5

g, trypticase peptone 10 g, phytone peptone 1.5 g, casamino acids 3 g, yeast extract 1 g, tween 80 1 g, 2% bromocresol green 20 ml, agar 20 g และปรับ pH เป็น 7.0 จัดเป็น homofermentative 3 ไอโซเลทซึ่งแยกได้จากไส้กรอกข้าว น้ำปูคองและปลาต้มและสามารถเจริญบนอาหารแข็ง MRS ที่มี 2% (w/v) แป้งข้าวเจ้าในรูปแป้งสุกเป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส และเป็น heterofermentative 26 ไอโซเลท พบเชื้อที่สามารถใช้แป้งข้าวเจ้าในรูปของแป้งสุก 26 ไอโซเลทและทั้ง 29 ไอโซเลทไม่สามารถใช้ในรูปของแป้งดิบได้ เชื้อไอโซเลทที่ 16 ซึ่งแยกได้จากไส้กรอกข้าวและเป็น homofermentative ผลิตรกรดแลกติกได้สูงสุดถูกนำมาตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา พบว่าเป็นแบคทีเรียกรัมบวกพวก coccobacilli ในจีแนส *Pediococcus* สามารถผลิตรกรดแลกติกได้สูงสุดในอาหารเหลว MRS ที่มีน้ำตาลกลูโคส 2% เป็นแหล่งคาร์บอน และมี 2% CaCO_3 มี pH เริ่มต้น 7.0 คือ 1.09% (w/w) เมื่อใช้เชื้อตั้งต้นในปริมาณ 3% บ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 2 วัน ตรวจวัดการสร้างกรดโดยวิธี HPLC ใช้หือ shimadzu คอลัมน์ชนิด SCR-102H ขนาด 8 mm x 30 cm ใช้ 0.1% phosphoric acid เป็น mobile phase, flow rate 1.0 ml / min, detector RI, อุณหภูมิคอลัมน์ 40°C และฉีดตัวอย่างในปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยเทียบกับสารละลายกรดอินทรีย์มาตรฐาน 1% ของกรดแลกติก กรดซิตริกและกรดมาลิก

เขาวเรศ (2537) ศึกษาการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตรกรดแลกติกโดยใช้แป้งเป็นสับสเตรท วิเคราะห์ปริมาณกรดโดยใช้ HPLC คอลัมน์ชนิด SCR-102H ขนาด 8 mm. x 60 cm. มี mobile phase 0.1% phosphoric acid ใช้ flow rate เท่ากับ 10 ml/min ใช้ detector RI อุณหภูมิคอลัมน์ 40°C และฉีดตัวอย่างที่กรองได้ในปริมาตร 5 ไมโครลิตร โดยเทียบกับสารละลายกรดอินทรีย์มาตรฐานกรดแลกติก 1% พบว่าเชื้อไอโซเลทที่ 19 ซึ่งแยกได้จากลูกชิ้นปลาผลิตรกรดแลกติกได้สูงสุด คือ 0.3868% (w/v) เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 6 วัน pH ของอาหาร 6.7

ทรงอำนาจ (2539) ศึกษาการคัดเลือกฟงไจที่แยกได้จากพืชปรกติ (endophytic fungi) จาก stock เก็บเชื้อ ตัวอย่างดิน และคอกไม้ พบว่าไอโซเลทที่ 81 ซึ่งจัดอยู่ในจีแนส *Mucor* sp. 81 เจริญบนอาหาร PDA ที่อุณหภูมิ 30°C สามารถผลิตรกรดแลกติกได้สูงสุด เมื่อนำมาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตรกรดแลกติกในอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลฟรักโทส 120.0 g/l, peptone 3.0 g/l, KH_2PO_4 0.3 g/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 g/l และ CaCO_3 50.0 g/l พบว่าที่อุณหภูมิ 30°C pH เริ่มต้น 6.0 และระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 144 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่ผลิตรกรดแลกติกได้สูงสุดในปริมาณ 49.839 g/l มีค่าเปอร์เซ็นต์ conversion เป็น 45.08%

Giraud et al. (1991) ศึกษาการแยกและสัณฐานวิทยาของ *Lactobacillus plantarum* จากหัวมันสำปะหลัง โดยอาหาร JP2 พบว่า amylolytic enzyme ที่สังเคราะห์ขึ้นเป็น extracellular α -amylase

มี optimum pH เป็น 5.0 และ optimum temperature เป็น 55°C และมีอัตราการเจริญ 0.43 h⁻¹ biomass yield 0.19 g.g⁻¹ และ lactate yield 0.81 g.g⁻¹

Zhang and Cheryan (1991) ศึกษาการหมักโดยตรงจากแป้งข้าวโพดในรูปแป้งเหลว (liquefied starch) ที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย 2-amylase และแป้งดิบไปเป็นกรดแลกติกโดยการหมักแบบร่วน ใช้ *Lactobacillus amylovorus* และวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกโดยวิธี HPLC และ refractive index detector ใช้คอลัมน์ HPX-8714 มีตัวทำละลายคือ 0.01 N H₂SO₄ flow rate 0.8 ml/min อุณหภูมิคอลัมน์ 65°C พบว่าใช้แป้งเหลวความเข้มข้นเริ่มต้น 120 g/l ผลิตกรดแลกติก 96.2 g/l ในเวลา 20 ชั่วโมง และผลิตแลกติกจากแป้งดิบในความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากันได้ 92.5 g/l ในเวลา 39 ชั่วโมง หมักที่อุณหภูมิ 40°C และใช้ 10 M NaOH ในการ neutralize กรด ให้ pH คงที่ที่ 5.5

Yumoto and Koji (1995) ศึกษาการหมักกรดแลกติกจาก soluble starch เหลว (liquefied starch) โดยใช้ *Lactobacillus amylophilus* JCM1125 วิเคราะห์ปริมาณกรดโดยวิธี HPLC และ Spectrophotometric detector ที่ความยาวคลื่น 450 nm อุณหภูมิคอลัมน์ 60°C ใช้ตัวทำละลายคือ 0.75 mM H₂SO₄ มี flow rate 0.8 ml/min พบว่าผลิต L(+) lactic acid 30 กรัม เมื่อใช้ soluble starch 50 กรัม และเมื่อใช้ soluble starch เหลว 100 กรัม ผลิตได้ 53.4 กรัม บ่มที่อุณหภูมิ 28°C ควบคุม pH เป็น 6.8 โดยการเติม 20% Na₂CO₃ ในระหว่างการหมัก และหมักในสภาพไร้ออกซิเจน โดย flush ด้วยแก๊สไนโตรเจน

Hofvendahl and Hahn-Hägerdal (1997) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจาก *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus delbrueckii* ในกระบวนการหมักที่มี pH คงที่ 6.0 และ pH 5.85 พบการผลิต lactate 3.3 g.l⁻¹ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลัก โดยใช้น้ำตาล 80-90% ในขณะที่เชื้อ *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ใช้น้ำตาลน้อยกว่า ผลผลิตเพิ่มขึ้นเมื่อเติม yeast extract 5 g/l และพบว่า *Lactococci* จะผลิต L-lactate ได้ 100% ในอาหารที่มี yeast extract

5. การศึกษาอื่นๆ เกี่ยวกับแบคทีเรียแลกติก

Gassem *et al.*, (1997) ได้ทำการศึกษาการผลิต exopolysaccharide จาก sweet whey และ simulated whey permeate (SWP) โดยการหมักด้วย *Lactobacillus delbrueckii* ssp. bulgaricus สายพันธุ์ RR มีการเติม lactose, KH_2PO_4 , NH_4Cl , casamino acids และ mineral salts บ่มที่อุณหภูมิ 32, 37 และ 44°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ช่วงที่มีการปรับ pH ไปจนถึง 6.2 จะเพิ่มความหนืดและเพิ่มการใช้ lactose มี galactose และ lactic acid ในอาหาร

ผลของการปรับ pH มีมากกว่าสารอาหารหรือแร่ธาตุที่เติมลงไปเสริม พบว่าการหมักจาก SWP จะให้ความหนืดที่ต่ำกว่า เมื่อหมักจาก sweet whey ภายหลังจากการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความหนืดจะลดลงในอาหารที่มีการปรับ pH และพบว่าน้ำหมักจะมีความหนืดสูงที่สุดเมื่อบ่มที่ 32°C และน้อยที่สุดเมื่อบ่มที่ 44°C exopolysaccharide โดยการผลิต บ่งชี้โดยความหนืดที่เพิ่มขึ้น

6. การวิเคราะห์กรดแลกติก

การวิเคราะห์กรดแลกติกมีหลายวิธีดังนี้ (จันทร์รา, 2534)

1. NAD^+ linked lactate dehydrogenase

เป็นวิธีวิเคราะห์ทางเอนไซม์ที่สามารถจำเพาะต่อ stereoisomer ของกรดแลกติก

2. Non-enzymetic method

เป็นวิธีที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันเปลี่ยนกรดแลกติกให้เป็นอะเซตตาลดีไฮด์และนำอะเซตตาลดีไฮด์มาวิเคราะห์ด้วยโครมาโตกราฟฟีก๊าซ

3. การไตเตรท

โดยใช้เบสแก่ไตเตรท เช่น NaOH แต่จะได้ผลที่ถูกต้องก็ต่อเมื่อในตัวอย่างไม่มี factor อื่นเกี่ยวข้อง

4. โครมาโตกราฟฟี กระดาษ

5. Liquid chromatography

6. HPLC

การวิเคราะห์โดยวิธีนี้สามารถแยก enantiomer ของกรดแลกติกได้ และยังสามารถแยก เอสเตอร์ของกรดแลกติกได้อีกด้วย

วิธีการใช้ HPLC เป็นเทคนิคที่ใช้แยกสารผสมแบบโครมาโตกราฟีคอลัมน์ชนิดหนึ่งซึ่งพัฒนามาจากหลักการของโครมาโตกราฟีก๊าซ (Gas chromatography) มีการพัฒนาขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีผู้นิยมใช้มากในปัจจุบัน เช่น ในการวิจัยทางการแพทย์ ชีวเคมี เกษตร เภสัชกรรม อุตสาหกรรม เป็นต้น ในการวิเคราะห์โดย HPLC มีการใช้คอลัมน์ขนาดเล็ก ซึ่งภายในบรรจุด้วยสารแยก ซึ่งเป็นอนุภาคนาโนขนาดเล็กทำให้ต้องใช้ความดันสูง เพื่อให้ mobile phase เคลื่อนที่เร็วขึ้น ข้อได้เปรียบของ HPLC เมื่อเทียบกับโครมาโตกราฟีธรรมดา (Liquid Chromatography; LC) ก็คือสามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว มีความไวสูง แยกสารได้ดี ใช้วิเคราะห์ทั้งปริมาณและคุณภาพ สารตัวอย่างไม่ถูกทำลาย และสามารถเก็บตัวอย่างไว้ได้ ใช้สารตัวอย่างปริมาณน้อย (ไมโครลิตร) และได้โครมาโตแกรมที่ให้ผลถูกต้อง คอลัมน์หลังจากใช้แล้วสามารถนำมาใช้ได้อีกถ้ารักษาอย่างดี คอลัมน์จะมีอายุยาวนาน แต่ข้อเสียอย่างหนึ่งของ HPLC ก็เป็นเครื่องมือที่มีราคาแพง

หลักการทั่วไปของ HPLC คือ ฉีดสารตัวอย่างซึ่งมีความเข้มข้นต่ำ เข้าทาง septum ขณะเดียวกันก็มีการปั๊มตัวทำละลายเข้าสู่คอลัมน์ที่ใช้แยกตลอดเวลาด้วยความเร็วคงที่และเหมาะสม เมื่อสารตัวอย่างผ่านเข้าไปในคอลัมน์ที่บรรจุด้วยตัวแยกที่เหมาะสม องค์ประกอบต่างๆ จะแยกออกจากกัน เมื่อตัวทำละลายหรือ mobile phase ผ่านเข้าเครื่องตรวจวัด (Detector) ก็สามารถวัดปริมาณสารแต่ละชนิดจากการวัดสัญญาณที่เกิดขึ้น เมื่อส่งสัญญาณเข้าเครื่องบันทึก (Recorder) จะได้โครมาโตแกรมที่ได้จากการฉีดสารตัวอย่างที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน (standard) (ชาติชาย, 2535)