รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาสูตรอาหารและกระบวนการผลิตกรดแลคติกชนิด L(+)

Study on Media Formulation and Production Processes of L(+) Lactic Acid

โดย

รศ. ดร. อาภรณ์ วงษ์วิจารณ์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย

จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้า ธนบุรี

โครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาสูตรอาหารและกระบวนการผลิตกรดแลคติกชนิด L(+)

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อจะผลิตกรดแลคติกชนิด L(+)ไอโซเมอร์จากกากน้ำตาลโดยใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง จากการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างต่างๆ ได้ทั้งหมด 460 ไอโซเลท และคัดเลือกได้แบคทีเรียแลคติกรหัส SW4-3 ที่สามารถผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) ได้สูงถึง 15.7 กรัม/ลิตร ในอาหารสูตร MRS ที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลและหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 21 ชั่วโมง และในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียรหัส SW4-3 ด้วยคุณสมบัติทางสรีรวิทยา การหมักน้ำตาลด้วยชุดทดสอบ API และการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rDNA พบว่าเป็นแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 เมื่อปรับอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้สูตรอาหารที่มีราคาต่ำลง โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้ fish hydrolysate เป็นแหล่งไนโตรเจน (MF-medium) และวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) และ Response Surface Methodology (RSM) พบว่า *P. pentosaceus* SW4-3 ผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) ได้ 15.2 กรัม/ลิตร ซึ่งไม่ต่างจากเมื่อใช้สูตรอาหาร MRS เดิม โดยสูตรอาหาร MF-medium ประกอบด้วยกากน้ำตาล 48.9 กรัม/ลิตร, fish hydrolysate 40.0 กรัม/ลิตร, yeast extract 1.6 กรัม/ลิตร, beef extract 3.8 กรัม/ลิตร, K_2HPO_4 2 กรัม/ลิตร, CH_3COONa 5 กรัม/ลิตร, $(NH_4)_2C_6H_6O_7$ 2 กรัม/ลิตร, $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัม/ลิตร, $MnSO_4.7H_2O$ 0.05 กรัม/ลิตร และ Tween 80 ในปริมาณ 1 มิลลิลิตร/ลิตร ซึ่งทำให้สามารถลดต้นทุนด้านอาหารลงได้ร้อยละ 72 เมื่อเทียบกับสูตรอาหาร MRS จากการหมักแบบกะโดยใช้อาหาร MF-medium ปริมาตร 1.5 ลิตร ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบ/นาที ในสภาวะไร้อากาศ พบว่า *P. pentosaceus* SW4-3 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μmax) เท่ากับ 0.73 ต่อชั่วโมง และมีอัตราการผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) (L+ productivity) เท่ากับ 0.85 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบต่อเนื่องในสภาวะเดียวกัน โดยแปรผันอัตราการเจือจาง (dilution rate) ต่างๆ กันที่ 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 ต่อชั่วโมง ในอาหาร MF-medium ปริมาตร 1.5 ลิตร ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบ/นาที ในสภาวะไร้อากาศ พบว่าที่อัตราการเจือจาง 0.5 ต่อชั่วโมง มีอัตราการผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) ได้สูงสุดเท่ากับ 4.2 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง และไอโซเมอร์ D(-) เท่ากับ 0.3 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง และที่อัตราการเจือจางเดียวกันนี้ให้อัตราการผลิตกรดแลคติกทั้งหมดเท่ากับ 4.5 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ซึ่งมีความบริสุทธิ์(purity)ของกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) ร้อยละ 93.2 และมีค่าการผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) ต่อหน่วยของสับสเตรท ($Yield_{L\text{-}LA/S}$) เท่ากับร้อยละ 76.9 และมีอัตราการผลิตกรดแลคติก (productivity)ไอโซเมอร์ L(+)

แบบต่อเนื่องสูงสุดที่อัตราเจือจาง 0.5 ต่อชั่วโมง เท่ากับ 4.2 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าอัตราการผลิตกรดแลคติกจากการหมักแบบกะ (0.85 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง) ถึง 5 เท่า

คำสำคัญ: *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 / กรดแลคติก / กากน้ำตาล / น้ำสกัดปลา / พื้นผิวผลตอบสนอง / การหมักแบบต่อเนื่อง

Research Project Study on Media Formulation and Production Processes of L(+) Lactic Acid

Abstract

The aim of this study was at producing L(+)-lactic acid from molasses by continuous fermentation. A total of 460 isolates of lactic acid bacteria were isolated from various kinds of sample. All isolates were tested for L(+)-lactic acid production in MRS broth in which glucose was substituted with molasses and incubated at 37°C for 21 h. The isolate SW4-3 that produced the highest L(+)-lactic acid of 15.7 g/l was selected and identified as *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 by testing for its physiology, carbohydrate fermentation (API test kit) and 16S rDNA sequence analysis. In order to develop a low cost fermentation medium, molasses and fish hydrolysate were tested by using the Response Surface Methodology (RSM) and Central Composite Design (CCD). The result showed that *P. pentosaceus* SW4-3 produced 15.2 g/l L(+)-lactic acid in the developed MF-medium, which composed of 48.9 g/l molasses, 40.0 g/l fish hydrolysate, 1.6 g/l yeast extract, 3.8 g/l beef extract, 2 g/l K_2HPO_4, 5 g/l CH_3COONa, 2 g/l $(NH_4)_2C_6H_6O_7$, 0.2 g/l $MgSO_4.7H_2O$, 0.05 g/l $MnSO_4.7H_2O$ and 1 ml/l Tween 80. The cost of MF-medium was approximately 72% lower than MRS medium. In batch fermentation, *P. pentosaceus* SW4-3 was cultured in a 2 L jar fermenter with a working volume of 1.5 L MF-medium, incubated at 37°C, agitation rates 200 rpm for 21 hour. The results showed that the maximum specific growth rate (μmax) and productivity of L(+)-lactic acid were 0.73 h^{-1} and 0.85 g/l/h, respectively. In continuous fermentation, *P. pentosaceus* SW4-3 was cultured in a 2 L jar fermenter with a working volume of 1.5 L MF-medium, incubated at 37°C, agitation rates 200 rpm. The dilution rates were varied at 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 and 0.6 h^{-1}. From the results, the dilution rate of 0.5 h^{-1} exhibited the highest L(+)-lactic acid productivity of 4.2 g/l/h with the productivity of total lactic acid and D(-)-lactic acid as 4.5 and 0.3 g/l/h, respectively. Yield and purity of L(+)-lactic acid were calculated as 76.9 % and 93.2 %, respectively. In comparison, the L(+)-lactic acid productivity of continuous fermentation (4.2 g/l/h) was 5 times higher than that of batch fermentation (0.85 g/l/h).

Keyword: *Pediococcus pentosaceus* SW4-3/ Lactic acid / Molasses / Fish hydrolysate / Central Composite Designs (CCD) / Response Surface Methodology (RSM) / Continuous fermentation

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณประจำปี 2552-2553 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้ และขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยาจุลชีววิทยา และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ที่สนับสนุนการดำเนินงานในทุกด้าน ขอขอบคุณบุคลากรและนักศึกษาภาควิชาจุลชีววิทยาที่ให้ความช่วยเหลือร่วมมือ กำลังใจและบรรยากาศที่ดีในการวิจัย

คณะผู้วิจัย

ธันวาคม 2554

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูป	ฎ
ประมวลศัพท์และคำย่อ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ	**1**
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	2
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	**3**
2.1 กรดแลคติก	3
2.2 แบคทีเรียแลคติก	5
2.2.1 การจัดกลุ่มของแบคทีเรียแลคติก	7
2.2.1.1 การจำแนกแบคทีเรียแลคติกในระดับจีนัส	7
2.2.1.2.การจำแนกแบคทีเรียแลคติกในระดับสปีชีส์	10
2.2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติก	11
2.2.2.1 แหล่งสารอาหาร	11
2.2.2.2 ความเป็นกรด-ด่าง	15
2.2.2.3 อุณหภูมิ	15
2.2.2.3 ออกซิเจน	16
2.3 การวางแผนการทดลองเชิงสถิติ	16
2.3.1 วิธีการพื้นผิวผลตอบสนอง (Response Surface Methodology)	16

2.3.2 วิธีการ Central Composite Designs (CCD) 17
2.3.3 วิธีการ Plackett and Burman design 17
2.4 จลศาสตร์ของกระบวนการหมัก 18
2.4.1 กระบวนการหมักแบบกะ 18
2.4.2 กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ 21
2.4.3 กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง 22

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 25
3.1 วัตถุดิบและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง 25
3.1.1 วัตถุดิบที่ใช้ในสูตรอาหารทดแทน 25
3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ 25
3.2 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง 26
3.2.1 การคัดแยกแบคทีเรียแลคติก 26
3.2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สร้างกรดได้สูง 26
3.2.3 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดแลคติก L(+) และ D(-) ไอโซเมอร์ด้วยเครื่อง HPLC 27
3.2.4 การจัดจำแนกแบคทีเรียแลตติก 28
3.2.4.1 การจัดจำแนกแบคทีเรียแลตติกในระดับจีนัส 28
3.2.4.2 การทดสอบการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ของแบคทีเรียแลคติกเพื่อจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ 29
3.2.4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียแลคติกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA 29
3.2.5 ศึกษารูปแบบการเจริญและการสร้างกรดของแบคทีเรียแลคติก 31
3.2.6 วิเคราะห์องค์ประกอบของแหล่งอาหารทดแทน 32
3.2.7 การคัดเลือกและทดสอบปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ทดแทนในอาหารกากน้ำตาล 32
3.2.7.1 ศึกษาและคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนที่ส่งเสริมการผลิตกรดแลคติก โดยการทดลองแบบ Plackett-Burman factorial design 32
3.2.7.2 การทดสอบปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมต่อการหมักกรดแลคติกด้วยทดลองแบบ Central Composite Designs (CCD) 34
3.2.7.3 การทดสอบความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ 37
3.2.8 ศึกษากระบวนการหมักกรดแลคติกแบบกะ 37
3.2.9 การศึกษากระบวนการผลิตกรดแลคติกแบบต่อเนื่อง 38

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ **39**
4.1 ผลการคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สร้างกรดแลคติกได้สูง 39
4.1.1 ผลการทดสอบการสร้างกรดของแบคทีเรียแลคติกที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 39
4.1.2 ผลการทดสอบการสร้างกรดของแบคทีเรียแลคติกที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส 49
4.1.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกชนิด L(+) และ D(-) ไอโซเมอร์ 55
4.2.1 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียแลคติกรหัส SW4-3 ในระดับจีนัส 61
4.2.2 ผลการทดสอบการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *Pediococcus* sp. SW4-3 ในระดับสปีชีส์ 61
4.2.3 ผลการพิสูจน์ลำดับเบส (DNA sequencing) ของ *Pediococcus* sp. SW4-3 เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ในระดับสปีชีส์ 64
4.3 ผลการเจริญและการสร้างกรดของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ในอาหาร MRS และอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาล 65
4.4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของแหล่งอาหารทดแทน 67
4.5 การปรับปรุงสูตรอาหารทดแทน 68
4.5.1 ผลการศึกษาและคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตกรดแลคติกโดยการทดลองแบบ Plackett-Burman factorial design 68
4.5.2 ผลการทดสอบปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมต่อการหมักกรดแลคติก โดยการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) 71
4.5.3 ผลการทดสอบความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ 79
4.6 ผลการหมักกรดแลคติกแบบกะ (batch fermentation) 80
4.7 ผลการหมักกรดแลคติกแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) 85

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง **92**
เอกสารอ้างอิง 95
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 102
ภาคผนาก ข วิธีการวิเคราะห์และการคำนวณ 105

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
2. 1	คุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลคติก	4
2. 2	การจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกในระดับจีนัส	8
3. 1	สูตรอาหาร MRS ดัดแปลงที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลในปริมาณที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากัน (ร้อยละ 2)	27
3. 2	ปัจจัยและระดับของปัจจัยในการทดลองแบบ Plackett-Burman factorial design	32
3. 3	แผนผังการแปรผันแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารกากน้ำตาล โดยการทดลองแบบ Plackett-Burman factorial design	33
3. 4	ปัจจัยและระดับของปัจจัยในการวางแผนการทดลองแบบ Central composite designs (CCD)	34
3. 5	แผนผังการแปรผันแหล่งไนโตรเจนในอาหารกากน้ำตาล โดยวางแผนการทดลองแบบ Central composite designs (CCD)	35
4. 1	น้ำหนักเซลล์แห้ง(g/L) และปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติก (g/L) ของแบคทีเรียแลคติกรหัสต่างๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง ที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลในปริมาณที่มีน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับร้อยละ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง	40
4.2	น้ำหนักเซลล์แห้ง(g/L) และปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติก(g/L) ของแบคทีเรียแลคติกเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ดัดแปลง ที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลในปริมาณที่มีน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับร้อยละ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง	49
4.3	เปรียบเทียบปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติก ของแบคทีเรียแลคติกเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลงที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิ 37 และ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง	53
4.4	ค่าเฉลี่ยของกรดอะเซติก กรดแลคติก กรดแลคติกชนิด D(-) และ L(+) ไอโซเมอร์ของแบคทีเรียแลคติกรหัสต่างๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลงที่อุณหภูมิ 37 และ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง	55

4.5 เปรียบเทียบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียแลคติกรหัส SW4-3 และแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Pediococcus* sp. 61

4.6 ผลการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ ของแบคทีเรียแลคติก Pediococcus sp. SW4-3 ด้วยชุดทดสอบน้ำตาลสำเร็จรูป API 50 CHL V5.1 kit 63

4.7 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของแหล่งอาหารทดแทน 68

4.8 ปริมาณกรดแลคติกที่แบคทีเรีย *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ผลิตขึ้นในอาหารกากน้ำตาลและแปรผันแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการทดลองแบบ Plackett-Burman factorial design 69

4.9 ค่าทางสถิติของสมการความสัมพันธ์ของแหล่งไนโตรเจนและการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรีย *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 โดยการทดลองแบบ Plackett-Burman factorial design 70

4.10 ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ มี่เติมในอาหารกากน้ำตาลต่อการสร้างกรดของแบคทีเรียแลคติก Pediococcus pentosaceus SW4-3 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 71

4.11 ผลการหมักกรดแลคติกของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 เมื่อแปรผันแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ในอาหารกากน้ำตาลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในการทดลองแบบ Central Composite Design 72

4.12 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อปริมาณกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ในการทดลองแบบ Central Composite Design 76

4.13 ค่าทางสถิติของสมการความสัมพันธ์ของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อปริมาณกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 77

4.14 เงื่อนไขที่กำหนดในการทำนายปริมาณกรดแลคติก 78

4.15 ปริมาณการผลิตกรดแลคติกที่ได้จากการทำนายปริมาณการใช้กากน้ำตาล fish hydrolysate, yeast extract, peptone และ beef extract และจากการทดลองจริงของแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ในอาหารสูตร MF-medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 79

4.16 เปรียบเทียบราคาสูตรอาหาร MRS และ MF-medium 80

4.17 ผลกรดแลคติกของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 เมื่อหมักแบบกะสภาวะไร้อากาศ (anaerobic) และเติมอากาศ 0.5 vvm (microaerophilic) ในอาหาร MF-medium ที่อุณหภูมิ 37°C 84

4.18 ค่าเฉลี่ยผลผลิตกรดแลคติกในช่วงสภาวะคงตัวของการหมักแบบต่อเนื่องของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ในอาหาร MF-medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบ/นาที ที่อัตราการเจือจางต่างๆ 88

สารบัญรูป

รูป		หน้า
2. 1	Optical active isomeric form ของกรดแลคติก	3
2. 2	วัฏรจักร Embden-Meyerhof Parnas pathway (EMP) หรือ Glycolysis	7
2. 3	กราฟการเจริญของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักแบบกะ	19
2. 4	ค่าคงที่ในการใช้สับสเตรท K_S	20
3. 1	ถังหมักควบคุม B-Bruan, Biostat® B ขนาด 2 ลิตร	38
4. 1	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียแลคติกรหัส SW4-3 บนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	60
4. 2	รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติกรหัส SW4-3 (กำลังขยาย 1000 เท่า)	60
4. 3	ผลการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ ของแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus* sp. SW4-3 ด้วยชุดทดสอบน้ำตาลสำเร็จรูป API 50 CHL V5.1 kit ที่เวลา 48 ชั่วโมง	62
4. 4	ชุดลำดับเบส 16S rDNA จำนวน 594 bp ของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3	64
4. 5	เปรียบเทียบลำดับเบสของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 และ *Pediococcus pentosaceus* P35 (GenBank: AF404739.1)	65
4. 6	ผลการเจริญและการสร้างกรดของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ในอาหาร MRS และอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลในปริมาณที่มีน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) ร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	66
4. 7	กราฟ Response surface ของความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกากน้ำตาลและ fish hydrolysate ต่อปริมาณการผลิตกรดของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24 ชั่วโมง	74
4. 8	กราฟ Response surface แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกากน้ำตาลและ Yeast extract ต่อปริมาณการผลิตกรดของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24 ชั่วโมง	74
4. 9	กราฟ Response surface แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกากน้ำตาลและ Peptone ที่มีผลต่อปริมาณการผลิตกรดของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24 ชั่วโมง	75

4. 10 กราฟ Response surface แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกากน้ำตาลและ Beef extract ที่มีผลต่อปริมาณการผลิตกรดของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24 ชั่วโมง 75

4. 11 ผลการหมักกรดแลคติกแบบกะของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ในอาหาร MF-medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 82

4. 12 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญกับเวลา เพื่อใช้ในการคำนวณหาค่าการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (maximum specific growth rate, μ_{max}) 83

4. 13 ผลการผลิตกรดแลคติกแบบต่อเนื่องของแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ในอาหาร MF mediumที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบ/นาที ที่อัตราการเจือจางต่างๆ 86

4. 14 ผลการหมักโดยเฉลี่ยของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 เมื่อในการหมักแบบต่อเนื่องในอาหาร MF-medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะคงตัว (Steady strate) ที่อัตราการเจือจางต่างๆ 89

4. 15 สรุปผลปริมาณกรดแลคติก อัตราการใช้น้ำตาล อัตราการผลิตกรดแลคติก (Productivity) และ $Yield_{L\text{-}LA/S}$ ของการหมักกรดแลคติกแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางต่างๆ ของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ในอาหาร MF-medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 90

ข. 1 กราฟมาตรฐานของปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ตามวิธีPhenol-Sulfuric (Dubios et al., 1956) 106

ข. 2 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะเซติก 114

ข. 3 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก 115

ข. 4 โครมาโตแกรมแสดง Retention time ของกรดอะเซติกที่เวลา 8.54 นาที และกรดแลคติกที่เวลา 9.38 นาที 115

ข. 5 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกชนิด D(-) ไอโซเมอร์ 116

ข. 6 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกชนิด L(+) ไอโซเมอร์ 117

ข. 7 โครมาโตแกรมแสดง Retention time ของกรดแลคติกไอโซเมอร์ D(-) ที่เวลา 4.12 นาที และกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) ที่เวลา 6.52 นาที 117

ประมวลศัพท์และคำย่อ

RSM	วิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology)
CCD	Central Composite Designs
D	อัตราการเจือจาง (dilution rate) (ต่อชั่วโมง)
P	อัตราผลผลิตที่ได้ต่อเวลา (productivity) (กรัม/ชั่วโมง)
rpm	รอบต่อนาที
μ	อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) มีหน่วยเป็นชั่วโมง$^{-1}$
Y	ปริมาณผลผลิตต่อหน่วยสับสเตรทที่ถูกใช้ไป (yield coefficient) มีหน่วยเป็นกรัม/กรัม
K_S	ค่าคงที่ในการใช้สับสเตรท (substrate utilization constant) ซึ่งมีค่าเท่ากับความเข้มข้นของสับสเตรท เมื่อ μ เท่ากับ $\frac{1}{2}\mu_{max}$
vvm	Air Volume per Medium Volume per Minute
OD	ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง Optical Density
G	แรงโน้มถ่วง Gravity = 9.81 m/s^2

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

กรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีการนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย โดยมีการนำไปใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเครื่องหนังและสิ่งทอ ใช้ในอาหารสัตว์ และการสังเคราะห์แลคติกพอลิเมอร์ (polylactic acid) ซึ่งเป็นพลาสติกที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable plastics) ความต้องการของกรดแลคติกทั่วโลกในแต่ละปีสูงถึง 130000 ถึง 150000 เมตริกตันต่อปี (Mirasol, 1999) และมีแนวโน้มสูงมากขึ้นด้วยการตระหนักถึงสภาพแวดล้อม

กรดแลคติกสามารถแบ่งออกตามโครงสร้างได้เป็น 2 ประเภท คือกรดแลคติกชนิด L(+) และ D(-) โดยมีการศึกษาพบว่ากรดแลคติกชนิด D(-) มีความเป็นพิษต่อมนุษย์ เนื่องจากร่างกายมนุษย์จะมีเพียง L(+) Lactic dehydrogenase (Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000) ที่จะใช้ในกระบวนการเผาผลาญอาหารในร่างกาย (metabolism) จึงทำให้กรดแลคติกชนิด L(+) มีความสำคัญและเป็นที่ต้องการมากกว่า โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหารและยา และในการสังเคราะห์แลคติกพอลิเมอร์ก็ยังต้องการกรดแลคติกที่บริสุทธิ์เพื่อให้พอลิเมอร์สังเคราะห์มีความแข็งแรง กรดแลคติกสามารถผลิตได้จากทั้งการสังเคราะห์จากปฏิกิริยาเคมี และจากกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ การสังเคราะห์ทางเคมีนั้นจะได้กรดแลคติกชนิด DL ผสมกันอย่างไม่แน่นอน แต่กรดแลคติกที่ได้การหมักจะมีความจำเพาะมากกว่า โดยแบคทีเรียแลคติกจะสามารถผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) หรือ D(-) อย่างใดอย่างหนึ่งหรือผสมกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์อีกทั้งแบคทีเรียแลคติก จัดเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่ปลอดภัย (Generally Recognized As Safe; GRAS) มีการนำมาใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารมานานนับศตวรรษ และผลิตภัณฑ์อาหารหมักชนิดต่างๆ ชนิด เช่น ผักและผลไม้ดอง เนื้อสัตว์หมัก เป็นต้น ดังนั้นกรดแลคติกที่มาจากการหมักของแบคทีเรียแลคติกจึงปลอดภัยในการนำมาใช้งานด้านต่างๆ

แบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในการผลิตกรดมีความต้องการสารอาหารที่ซับซ้อน โดยสูตรอาหารที่นิยมใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกในปัจจุบันคือสูตรอาหาร MRS ซึ่งอุดมด้วยสารอาหารหลากหลาย (De Man et al., 1960) แต่สูตรอาหาร MRS ประกอบด้วยสารหลายชนิดที่มีราคาสูง เช่น น้ำตาลกลูโคส peptone, beef extract และ yeast extract จึงไม่เหมาะแก่การผลิตในระดับอุตสาหกรรม การหาแหล่งอาหารราคาถูกอื่นๆ เช่น วัสดุของเหลือจากอุตสาหกรรมการเกษตรมาทดแทนจะสามารถลดต้นทุนการผลิตลงได้ เพราะต้นทุนหลักของการผลิตกรดแลคติกคือวัตถุดิบที่ใช้หมัก นอกจากนี้กรดแลคติกเป็น growth associate product กรดที่เพิ่มมากขึ้นจะไปจำกัดการเจริญและการสร้างกรด (product inhibition) ในที่สุด ซึ่งระดับความเข้มข้นที่มีผลยับยั้งจะแตกต่างกันออกไปในแต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นการควบคุมกระบวนการหมักอาจช่วยยืดระยะของการเจริญและให้ผลผลิตได้ยาวนานขึ้น งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะศึกษาการผลิต

กรดแลคติกและมุ่งไปที่การเพิ่มปริมาณกรดแลคติกชนิด L(+) เริ่มด้วยการคัดแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) ได้สูง และลดต้นทุนการผลิตโดยการพัฒนาสูตรอาหารโดยใช้กากน้ำตาลซึ่งเป็นของเหลือจากอุตสาหกรรมการเกษตรที่มีราคาถูก รวมทั้งศึกษากระบวนการหมักกรดแลคติกแบบต่อเนื่องเพื่อลดปัญหาการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของวัตถุดิบและจากการสะสมของกรดแลคติก

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ที่สร้างกรดแลคติกชนิด (L+) ไอโซเมอร์ได้ปริมาณสูง
2. เพื่อพัฒนาสูตรอาหารสำหรับการผลิตกรดแลคติก โดยใช้กากน้ำตาลซึ่งเป็นวัตถุดิบหรือของเหลือจากอุตสาหกรรมการเกษตร
3. ศึกษากระบวนการหมักแบบต่อเนื่องเพื่อเพิ่มผลผลิตกรดแลคติกชนิด (L+) ไอโซเมอร์ และลดการเกิด Product inhibition

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

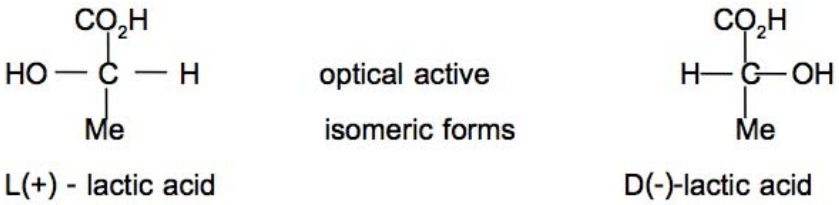
1. คัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) ไอโซเมอร์ได้สูง
2. ศึกษาหาสูตรอาหารที่มีราคาถูกสำหรับผลิตกรดแลคติกโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนราคาถูกที่เป็นของเหลือจากอุตสาหกรรมการเกษตร
3. ศึกษาการหมักกรดแลคติกด้วยกระบวนการแบบต่อเนื่อง

บทที่ 2 ตรวจเอกสาร

2.1 กรดแลคติก

กรดแลคติกจัดเป็นกรดอินทรีย์ประเภท hydroxy acid มีชื่อเรียกตามสูตรโครงสร้างว่า 2-hydroxypropanoic acid หรือ 2-hydroxypropionic acid และมี optical active isomeric form อยู่ 2 แบบ คือ D (dextrorotatory) และ L(levorotatory) form (รูปที่ 2.1) พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆและรวมทั้งจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียแลคติก โดยถูกค้นพบครั้งแรกในนมเปรี้ยวโดยชาวสวีเดน ชื่อ Carl Wilhelm Scheele ในปี 1780 กรดแลคติก ไม่มีกลิ่น ไม่ระเหย มีความปลอดภัย (GRAS, Generally Recognized As Safe) (Datta et al., 1995) กรดแลคติกมีอยู่ 2 ประเภท เมื่อแบ่งตามโครงสร้าง optically stereo-isomers คือ L(+) และ D(-) (รูปที่ 2.1) ซึ่งกรดแลคติก ชนิด D(-) นั้นจะมีความเป็นพิษต่อมนุษย์ เนื่องจากในร่างกายมนุษย์จะมีเพียง L(+)-lactic acid dehydrogenase ในการเมตาบอไลท์กรดแลคติก (Akerberg et al., 1998; Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000) กรดแลคติกชนิด L(+) จึงมีความสำคัญและใช้ประโยชน์ได้กว้างกว่าโดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหาร

กรดแลคติกละลายน้ำได้ดี แต่ไม่ volatile คือ กรดที่มีความบริสุทธิ์สูงจะเกิดเป็นผลึก monoclinic crystals ที่ไม่มีสี และอาจจะอยู่ในรูปของ cylic dimer ที่เรียกว่า lactide หรือ linear polymers ได้ สูตรโครงสร้างทั่วไปเป็น $H[OCH(CH_3)CO]_n OH$ และในสารละลายที่มีกรดแลคติกตั้งแต่ 20% หรือมากกว่าจะเกิด self-esterification เพราะมีหมู่ของ hydroxyl และ carbonyl group อยู่ด้วยกัน นอกจากนี้กรดแลคติกยังสามารถที่จะทำปฏิกิริยากับกรดอินทรีย์อื่นๆ (organic acid) และ organic alcohol ได้และอาจจะตกตะกอนได้ในปฏิกิริยาเคมีหลากหลายชนิด (Holten et al., 1971) คุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลคติกดังแสดงในตารางที่ 2.1



รูปที่ 2. 1 Optical active isomeric form **ของกรดแลคติก (**Holten et al., **1971)**

ตารางที่ 2. 1 คุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลคติก

Properties	
Molecular formula	$C_3H_6O_3$
Molecular weight	90.08 $g.mol^{-1}$
Melting point D(-) or L(+)	52.8-54 °C
Melting point DL	16.8-33 °C
Boiling point	82 °C at 0.5 mmHg 122 °C at 14 mmHg
Acidity (pK_a)	3.86
Heat of combustion (Δ Hc)	1361 $kJ.mol^{-1}$
Specific Heat (C_p at 20 °C)	190 $J.mol^{-1}.°C^{-1}$

ที่มา: Holten et al. (1971)

การผลิตกรดแลคติกในช่วงทศวรรษ 1960 นิยมชนิดที่ทนต่อความร้อนโดยใช้กระบวนการผลิตโดยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี (chemical synthesis) ได้เป็น heat stable lactic acid ทั้งนี้เพื่อจะนำเอาไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิต stearoyl-2-lactylates ที่ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตขนมปัง (baking industry) ต่อมาในช่วงทศวรรษ 1980 การผลิตกรดแลคติกในระดับอุตสาหกรรมได้เปลี่ยนมาเป็น การใช้กระบวนการหมัก (fermentation process) ของจุลินทรีย์ และประมาณ 50% ของกรดแลคติกที่ผลิตได้ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร กรดแลคติกเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่สามารถอยู่รวมกันเป็นของผสมที่เรียกว่า racemic mixture ที่ประกอบด้วย D(-)-lactic acid, L(+)-lactic acid, DL-lactic acid ซึ่งในการผลิตกรดแลคติกโดยกระบวนการหมักนั้นสามารถกำหนด isomeric form แบบใดแบบหนึ่งโดยเฉพาะได้เนื่องจากการเปลี่ยน isomeric form เป็นเรื่องที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ stereospecific lactate dehydrogenase ที่จะเปลี่ยนกรดแลคติกที่ได้ไปเป็น isomeric form แบบใดแบบหนึ่งโดยเฉพาะ ซึ่งสามารถที่จะคัดเลือกได้ตามสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกที่จะนำมาใช้

ประโยชน์ของกรดแลคติก

กรดแลคติกเป็นกรดที่ประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ อย่างแพร่หลาย เช่น ในอุตสาหกรรมอาหาร ใช้ผสมในเครื่องดื่ม ใช้เป็นสารชำระล้างและลดปริมาณจุลินทรีย์ในภาชนะบรรจุอาหาร และใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในอาหารชนิดต่างๆ (Datta et al., 1993; Litchfield, 1996) ในอุตสาหกรรมยาและอุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ กรดแลคติกถูกใช้เป็นสารเพิ่มความชื้น และสารประกอบเอทิลแลคเตต

(ethyl lactate) ใช้เป็นส่วนผสมในยาต้านสิว และเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางอื่นๆ และอุตสาหกรรมเคมีอื่นๆ จากการที่กรดแลคติกมีประโยชน์หลากหลาย ที่ผ่านมาปริมาณความต้องการกรดแลคติกทั่วทั้งโลกสูงถึง 130,000 - 150,000 เมติกตันต่อปี (Mirasol, 1999) และความต้องการมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นถึงร้อยละ 5-8 ต่อปี เพราะสามารถประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆได้หลากหลาย (Wee et al., 2006) ได่แก่

ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร กรดแลคติคสามารถใช้ถนอมอาหาร (food preservation) ใช้เป็นส่วนผสม (food ingredient) ในอุตสาหกรรมผลิตผักดองและ ผลไม้ดองกระป๋อง และใช้ในอุตสาหกรรมผลิต soft drink, Jam และ Jelly กรดแลคติกยังสามารถนำมาสังเคราะห์เป็น stearoyl-2-lactylates ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการทำเบเกอรี่โดยใช้เป็น dough conditioner ที่ทำให้แป้งทำขนมปังทนต่อแรงกวนในการผสมได้ดี นอกจากนั้น calcium stearoyl-2-lactylate (CSL) ยังใช้เป็น softener ในการทำขนมปังและขนมอบกรอบชนิดต่างๆ หรือใช้เป็นสารลดแรงตึงผิว (Emulsifier) เป็นต้น

ประโยชน์ทางการแพทย์ สามารถใช้กรดแลคติกในอุตสาหกรรมการผลิตยา (pharmaceutical industry) สามารถสังเคราะห์เป็น poly (lactic acid) เป็น biodegradable plastic ใช้ทำไหมผ่าตัดชนิดที่ละลาย หรือใช้เป็น biodegradable implant สำหรับการแตกหักร้าว (fractures) ของกระดูก calcium lactate trihydrate ใช้เป็น blood coagulant ในผู้ป่วยที่เลือดไหลไม่หยุดและเป็นสารห้ามเลือดในขณะผ่าตัดในช่องปากและฟัน ethyl lactate ในการผลิตยาแก้อักเสบ (anti-inflammatory drug) นอกจากนี้ยังใช้ในการผลิตเครื่องสำอางค์ (cosmetics industries) เพื่อประโยชน์ต่างๆ อีกด้วย

ประโยชน์ทางการเกษตรกรรม กรดแลคติคสามารถสังเคราะห์เป็น isopropyl lactate เป็นสารที่ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตยาฆ่าแมลง (insecticides) และ ยาปราบวัชพืช (herbicides) และ calcium lactate pentahydrate เป็นสารทำให้มันฝรั่ง ผักและผลไม้แข็งไม่นิ่ม ทำให้ยืดเวลาการสุกเน่าของพืชผลเหล่านี้หลังเก็บเกี่ยว

ประโยชน์ของพลาสติกชีวภาพ ปัจจุบันนิยมใช้กรดแลคติกเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ poly-lactic เช่น ผลิตเป็นตัวหนีบแผล ไหมละลาย และเรซินกระดูกเทียม และใช้เป็นภาชนะบรรจุภัณฑ์ต่างๆ เช่น ถุงใส่ของ กระถางต้นไม้ ผ้าอ้อม

2.2 แบคทีเรียแลคติก

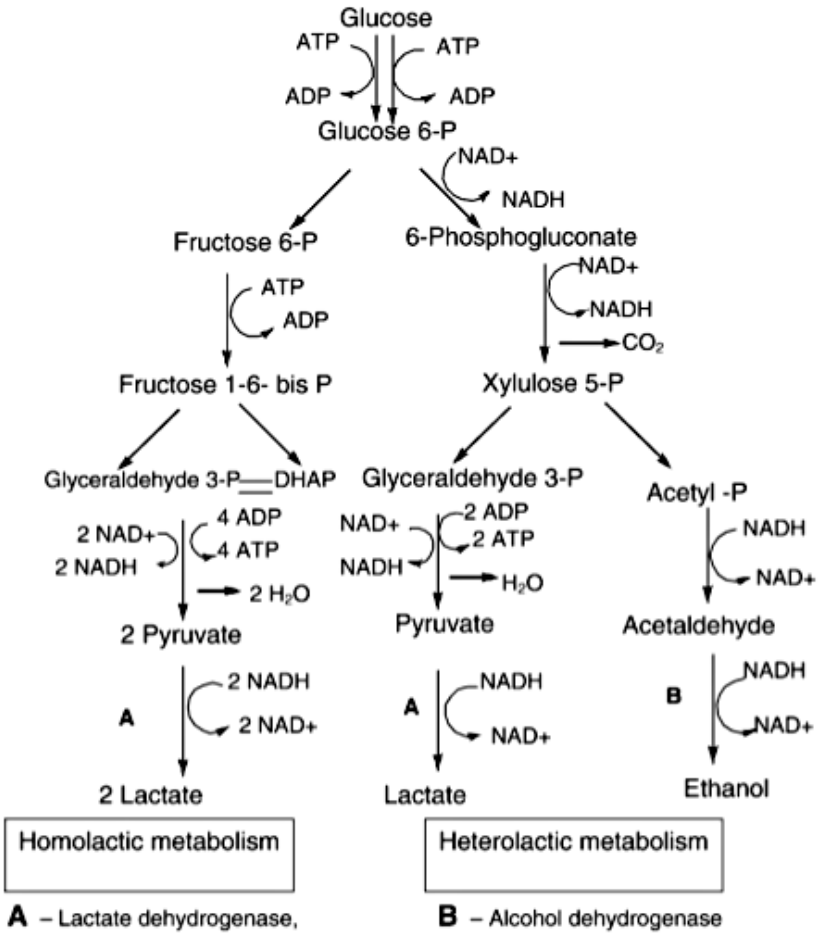
แบคทีเรียแลคติกคือกลุ่มของแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกได้เป็นส่วนใหญ่ในกระบวนการเมแทบอไลท์คาร์โบไฮเดรต ลักษณะโดยทั่วไปคือ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ และไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เจริญได้ค่อนข้างช้าเนื่องจากสามารถผลิตพลังงานได้เพียงเล็กน้อยจากการเมตะบอไลต์

คาร์โบไฮเดรต และเป็นแบคทีเรียที่ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อน มีหลายสายพันธุ์ที่ต้องการกรดอะมิโนและวิตามินหลายชนิด โคโลนีจึงมีขนาดเล็กประมาณ 2-3 มิลลิเมตร เจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่สามารถทนและเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนได้เช่นกัน (Axelsson, 1998) แบคทีเรียแลคติกเป็นที่รู้จักแพร่หลายในการถนอมอาหาร เพราะจะทำให้ค่า pH ของอาหารลดลงมากจนสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ ที่เป็นสาเหตุของอาหารเน่าเสียหรือก่อโรคในคนได้

แบคทีเรียแลคติกสามารถแบ่งแยกกลุ่มได้ตามกระบวนการเมตาบอลิซึม (pathway) ของการย่อยสลายน้ำตาลและการสร้างผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก แอลกอฮอล์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และสารอื่นๆ รูปแบบหรือเส้นทางการย่อยสลายน้ำตาลจะแตกต่างกันออกไปตามสายพันธุ์ของแบคทีเรีย โดยแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ

Homofermentative เป็นกลุ่มแบคทีเรียแลคติกที่ย่อยสลายน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติกได้เป็นส่วนใหญ่ ประมาณร้อยละ 85-95 และมีสารอื่นปะปนอยู่เล็กน้อย น้ำตาลจะถูกย่อยสลายเส้นทาง Embden-Meyerhof Parnas pathway (EMP) หรือ Glycolysis pathway (รูปที่ 2.2) (Reddy et al., 2008) ซึ่งแบคทีเรียแลคติกในกลุ่ม homofermentative นี้ได้แก่ *Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus lactis, Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus curvatus, Streptococcus faecalis* และ *Pediococcus cerevisiae* เป็นต้น

Heterofermentative เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแลคติกที่ย่อยสลายน้ำตาลได้กรดแลคติกประมาณร้อยละ 50 ของผลิตภัณฑ์ทั้งหมด และสารอื่นๆ อีกประมาณร้อยละ 50 ประกอบด้วยกรดอะซิติก หรือเอทานอลร้อยละ 20-25 และคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 20-25 ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่มนี้จะย่อยสลายน้ำตาลโดยใช้เส้นทาง 6-phosphogluconate/phosphoketolase pathway (6-PG/PK) (รูปที่ 2.2) (Reddy et al., 2008) ในการเปลี่ยนกลูโคส 1 โมเลกุล เป็น 1 โมลของกรดแลคติก เอทานอล หรือก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และได้ ATP 1 โมเลกุลต่อ 1 กลูโคส ตัวอย่างของแบคทีเรียแลคติกที่มีวิธีการหมักแบบนี้ ได้แก่ กลุ่ม *Lactobacillus* บางสปีชีส์ และ *Leuconostoc* เป็นต้น



รูปที่ 2. 2 วัฏรจักร Embden-Meyerhof Parnas pathway (EMP) หรือ Glycolysis (Reddy et al., 2008)

2.2.1 การจัดกลุ่มของแบคทีเรียแลคติก

2.2.1.1 การจำแนกแบคทีเรียแลคติกในระดับจีนัส

การจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกในระดับจีนัส อาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี เช่น รูปร่าง ลักษณะการจัดเรียงตัว การหมักน้ำตาลกลูโคส (Glucose fermentation) มี 2 แบบคือ homofermentative และ heterofermentative จากการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และการเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีเกลือเข้มข้นร้อยละ 6 และ 18 และการเจริญที่ระดับ pH 4.2 และ 8.5 โดยปัจจุบันสามารถจำแนกแบคทีเรียแลคติกได้เป็น 12 สกุล ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2. 2 การจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกในระดับจีนัส

Characteristic	Rods		Cocci						
	Carnobacterium	*Lactobacillus*	*Aerococcus*	*Enterococcus*	*Vagococcus*	*Leuconostoc*	*Pediococcus*	*Streptococcus*	*Tetragenococcus*
Tetrad formation	[a]-	-	[a]+	-	-	-	-	-	+
CO_2 from glucose[b]	-	[a]+/-	-	-	-	+	-	-	-
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	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Lacic acid[c]	L	D,L,DL[e]	L	L	L	D	L,DL[e]	L	L

[a] +,positive; -,negative; ± response varies between species; ND, not determined.

[b] Test for homo- or heterofermentative of glucose; negative and positive denotes homofermentative and heterofermentative, respectively.

[c] Configuration of lactic acid produced from glucose.

[d] No growth in 18 % NaCl has been reported.

[e] Production of D ,L , o r DL- lactic acid varies between species.

ที่มา Axelsson (1998)

กลุ่มของแบคทีเรียแลคติกในระดับจีนัส (Genus)

Lactobacillus เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง ไม่สร้างสปอร์ ติดสีแกรมบวกแต่จะเปลี่ยนเป็นแกรมลบเมื่อมีอายุมากขึ้น หรือมีกรดมากขึ้น ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส มีลักษณะเด่นคือต้องการออกซิเจนในการเจริญเพียงเล็กน้อย (microaerophile) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญจะอยู่ในช่วง 30 - 40 องศาเซลเซียส เชื้อกลุ่มนี้ทนกรดและเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดคือที่ระดับ pH 5.5 - 5.8 หรือต่ำกว่า

Carnobacterium เป็นแบคทีเรียรูปแท่ง ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เป็นสายพันธุ์ที่มีการหมักน้ำตาลแบบ heterofermentative ส่วนใหญ่ไม่เจริญที่อุญหภูมิ 45 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์สร้างแก๊สจากการหมักน้ำตาลกลูโคส เดิมจัดอยู่ในกลุ่ม *Lactobacillus* แต่ภายหลังถูกแยกออกมาเนื่องจากแตกต่างตรงที่ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารแอซิเตท (acetate medium) และไม่สามารถสังเคราะห์กรดโอเลอิก (oleic acid) ได้

Lactococcus เป็นแบคทีเรียที่แยกออกมาจากแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus* รูปกลมหรือไข่ อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ หรืออาจต่อกันเป็นสายยาว ติดสีแกรมบวก ไม่มีแคปซูล และเคลื่อนที่ไม่ได้ เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอาหารที่อุดมสมบูรณ์ เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 10 - 30 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส โดยเชื้อในกลุ่ม *Lactococcus lactis* นั้นมีความสำคัญอย่างมากกับเศรษฐกิจ จึงได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวางในคุณสมบัติทั้งทางชีวเคมี ทางสรีรวิทยา และผลกระทบที่มีต่ออาหาร เป็นสายพันธุ์ที่มีความสำคัญและได้ถูกนำมาใชประโยชน์อย่างกว้างขวาง

Streptococcus เชื้อกลุ่มนี้มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 2 ไมโครเมตร มักเรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นสายเมื่อเจริญในอาหารเหลว ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนโดสปอร์ โดยปกติไม่เคลื่อนที่ ส่วนใหญ่เป็นพวก facultative anaerobe

Enterococcus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะค่อนข้างรีอยู่เป็นคู่หรือสายสั้นๆ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส หรือในสารละลายเกลือเข้มข้นร้อยละ 6.5 และในน้ำดี (bile) เข้มข้นร้อยละ 40 เจริญได้ที่ pH 9.6 มีความสามารถทนความร้อนได้ที่ 60 องศาเซลเซียส แบคทีเรีย *Enterococcus* นั้นสร้างกรดแลคติกชนิด L(+) จากน้ำตาลกลูโคสด้วยกระบวนการหมักแบบ homofermentative

Bifidobacterium เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นแท่ง ไม่สร้างสปอร์ ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์ คะตะเลส ต้องการออกซิเจนในปริมาณต่ำในการเจริญ (microaerophile) สามารถในการทนกรดได้และเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด

Leuconostoc เป็นแบคทีเรียรูปกลม รูปรี ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไม่เคลื่อนที่ และไม่สร้างสปอร์ เป็นพวก facultative anaerobe อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 20-30 องศาเซลเซียส เมื่อเจริญในอาหารแข็งโคโลนีมีขนาดเล็กมาก โดยมากมักมีเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร ต้องการกรดอะมิโนและสารเร่งการเจริญ มีคุณสมบัติในการสร้าง D(-)-lactic acid จากกลูโคสซึ่งจะตรงข้ามกับ *Lactococcus* ที่สร้าง L(+)-lactic acid และ *Lactobacillus* ที่สร้าง D(-),L(+)-lactic acid

Weissella เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลมที่แยกกลุ่มออกมาจาก *Leuconostoc paramesenteroides* มีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียสกุล *Leuconostoc* จากรายงานของ Tanasupawat et al. (2000) ได้แยกเชื้อ *Weissella thailandendensis* จากปลาร้าและปลาจ่อม โดยสร้างกรดแลคติกชนิด D(-) ไอโซเมอร์

Oenococcus เป็นแบคทีเรียที่แยกออกมาจากกลุ่ม *Leuconostoc* ติดสีแกรมบวก รูปร่างกลมหรือรี ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไม่เคลื่อนที่ และไม่สร้างสปอร์ มีความสามารถในการเปลี่ยนกรดมาลิคให้เป็นกรดแลคติกได้

Vagococcus ติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม รูปไข่หรือแท่งสั้น อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือสายสั้นๆ ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ ไม่สร้างคะตะเลส เจริญได้ทั้งในที่มีและไม่มีอากาศ ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในอาหารที่มีเกลือเข้มข้นร้อยละ 4 แต่ไม่เจริญในอาหารที่มีเกลือเข้มข้นร้อยละ 6.5

Tetragenococcus เป็นจีนัสที่เปลี่ยนมาจาก *Pediococcus halophilus* ลักษณะส่วนใหญ่จึงเหมือนกัน *Tetragenococcus* เป็นเชื้อที่มีรูปร่างทรงกลม เรียงตัวเป็นสี่เซลล์ (tetrad formation) มีลักษณะพิเศษ คือ สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) สูงถึงร้อยละ 18

Pediococcus ติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม ขนาดประมาณ 0.36-1.43 ไมครอน อยู่เป็นสี่เซลล์ติดกันหรือเป็นคู่ เนื่องจากมีการแบ่งตัวสองระนาบ โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร ไม่สร้างคะตะเลส ไม่เคลื่อนที่และไม่สร้างสปอร์ มีความทนเกลือสูง อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ที่ร 25-40 องศาเซลเซียส เป็นพวก chemoorganotrophs เจริญได้ดีในสภาวะอาหารที่สมบูรณ์ต้องการกรดอะมิโนและสารเร่งการเจริญ

2.2.1.2.การจำแนกแบคทีเรียแลคติกในระดับสปีชีส์

การจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกในระดับสปีชีส์นั้นสามารถทำได้จากความสัมพันธ์ของ DNA โดยการใช้ 16s RNA มาช่วยในการจำแนกทำให้สามารถนำมาใช้ในการเขียนสายวิวัฒนาการเพื่อจัดกลุ่มได้ นอกจากนี้ยังสามารถจัดจำแนกได้โดยอาศัยความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ อีกด้วย

2.2.2 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติก

2.2.2.1 แหล่งสารอาหาร

แบคทีเรียแลคติกแต่ละสายพันธุ์มีสรีรวิทยาต่างกันไป ในการคัดแยกเชื้อจึงขึ้นอยู่กับความต้องการว่าจะต้องการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติอย่างไร ตัวอย่างต่างๆมีเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดรวมอยู่ด้วยกัน แต่อาจแยกแบคทีเรียแลคติกออกมาได้จากคุณสมบัตการสร้างกรด หรือใช้คุณสมบัติในด้านการทนกรดที่แตกต่างกันในการแยกกลุ่มของแบคทีเรียแลคติก เช่น การแยก *Lactobacillus* และ *Pediococcus* ออกจาก *Leuconostoc* อาจใช้อาหารที่มี pH ต่ำกว่า 4.5 เนื่องจาก *Lactobacillus* และ *Pediococcus* สามารถเจริญได้ในสภาวะ pH ต่ำกว่า 4.5 แต่ *Leuconostoc* ไม่สามารถเจริญได้ เป็นต้น (Carr et al., 2002)

อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกโดยทั่วไป ได้แก่ MRS (De Man Rogosa Sharpe medium) (De Man et al.,1960) , APT (All purpose medium with tween 80) และ LBS (Rogasa medium) และอาหารอีกหลายชนิด แต่อาหาร MRS medium เป็นอาหารที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกมากที่สุด (Schwab et al., 1984) เนื่องจากเป็นอาหารที่มีสารอาหารและแร่ธาตุ ที่จะสนับสนุนความต้องการและจำเป็นของเชื้อแบคทีเรียแลคติก อาหาร MRS จึงเป็นอาหารพื้นฐานสำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกโดยทั่วไป และใช้ในการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็น กรด-ด่าง และการทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ทางชีวเคมีอีกด้วย

แบคทีเรียแลคติกต้องการสารอาหารที่ซับซ้อน และอาหาร MRS ที่นิยมใช้เลี้ยงแบคทีเรียแลคติกมีราคาค่อนข้างสูง เนื่องจากมีสารอาหารหลายชนิด บางชนิดมีราคาสูง หากนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาจไม่คุ้มค่า การพิจารณาสูตรอาหารที่ใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกนั้น ควรเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูก มีคุณภาพสม่ำเสมอ หาได้ง่ายตลอดปี สามารถใช้สังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการได้มากและไม่ยุ่งยากในการเก็บเกี่ยวผลผลิต (Stanbury and Whitaker, 1984) นอกจากนี้วัตถุดิบส่วนใหญ่ที่ได้จากของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมแม้จะมีปริมาณมากแต่หากไม่มีการปรับปริมาณสารอาหารให้เพียงพอก็จะไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งต้องการสารอาหาร เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุต่างๆให้เพียงพอต่อการเจริญเติบโต

แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของแบคทีเรียแลคติก เนื่องจากกระบวนการสร้างพลังงานของแบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่จะอยู่ในวิถี Glycolysis (Embden-Meyerhof-Parnas pathway) ซึ่งเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตได้เป็นกรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ (Axelsson, 1998) โดยปกติแหล่งคาร์บอนของแบคทีเรียแลตติกส่วนใหญ่จะเป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลเฮกโซส (hexose) อื่นๆ เช่น แมนโนส กาแลคโตส

และฟรุกโตส เป็นต้น วัตถุดิบจำพวกเซลลูโลส (cellulosic Materials) ซึ่งได้แก่ วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ต่างๆ อาทิ ซังข้าวโพด (corn cob) เปลือกเมล็ดฝ้าย (cotton seed hulls) ฟางหญ้า (straw) เป็นต้น ซึ่งในการใช้ต้องมีขั้นตอนการแปรรูปสารประกอบเซลลูโลส ให้เป็นน้ำตาลกลูโคส โดยใช้เอนไซม์ cellulasess หรือใช้จุลินทรีย์ที่ผลิต cellulase นอกจากน้ำทิ้งจากโรงงานผลิตเยื่อกระดาษ ที่เรียกว่า spent sulfite liquor หรือ sulfite waste liquor มีน้ำตาล pentose ที่ได้มาจากสารประกอบ hemicellulose จากเซลล์ของเนื้อไม้ที่นำเอามาทำเยื่อกระดาษ ซึ่งสามารถนำมาใช้เพาะเลี้ยงแลคติกแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เช่น *Lactobacillus pentosen* และผลิตกรดแลคติกได้ แต่มีปัญหาในขั้นตอนการทำการเก็บเกี่ยวผลผลิต เนื่องจากมีสารประกอบลิกนิน (lignin) อยู่มากในน้ำทิ้งชนิดนี้ จึงทำให้มี Residual lignin ปะปนมากับกรดแลคติก (Datta et al., 1995; Marques et al., 2008) แบคทีเรียแลคติกบางสายพันธุ์สามารถใช้แป้ง (starch) ได้เช่นกัน Altaf และคณะ (2007) ได้ใช้ red lentil และ baker's yeast cell ทดแทน peptone และ yeast extract ในการหมักกรดแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus amylophilus* GV6 ซึ่งมีความสามารถในการเปลี่ยนแป้งเป็นกรดแลคติกได้โดยตรง เขาพบว่า baker's yeast cell ร้อยละ 1, และ red lentil ร้อยละ 0.8 ให้ผลิตกรดแลคติกมากกว่า 13 กรัม/ลิตร และให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงสุดที่ 13.5 กรัม จากแป้ง 15.2 กรัม โดยเรียกแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ที่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลส (α-amylase) ในการย่อยแป้งได้ว่า Amylolytic lactic acid bacteria ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus* และ *Lactococcus* บางสายพันธุ์ พบได้ในอาหารที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก (Sanni et al., 2002) เช่น *Lactobacillus plantarum* ที่แยกได้จาก fufu ผลิตภัณฑ์แป้งมันสำปะหลังในแอฟฟิริกา (Nwankwo et al., 1989) *Lactococcus lactis* ที่แยกได้จากแป้งข้าวไรด์ (Petrov et al., 2008) และจากผลิตภัณฑ์แป้งอื่นๆ เช่น ข้าวโพด มันฝรั่ง ข้าวสาลี (Nakamura, 1981; Chatterjee et al., 1997) ในกระบวนการหมักกรดแลคติกในระดับอุตสาหกรรม หากสามารถใช้วัตถุดิบทางการเกษตรที่มีราคาถูก จะลดต้นทุนการผลิตลงได้มาก

กากน้ำตาล (Molassses)

กากน้ำตาลถือเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูก ลักษณะเป็นของเหลวที่มีลักษณะข้นเหนียวสีน้ำตาลดำ เป็นผลิตผลพลอยได้ (by product) จากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล ซึ่งกรรมวิธีการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยนั้น เริ่มจากการนำอ้อยเข้าหีบจนได้น้ำอ้อย หลังจากกรองเอากากออก น้ำอ้อยที่ได้จึงนำไปเคี่ยว จนผลึกของน้ำตาลทรายตกตะกอนออกมา หลังจากแยกผลึกน้ำตาลทรายออกด้วยหม้อปั่น (centrifuge) จะได้กากน้ำตาล ผลพลอยได้ที่สำคัญจาก การการบวนการผลิตน้ำตาลทรายด้วยวิธีนี้ได้แก่ กากน้ำตาล ขี้ตะกอน (filter cake) และกากอ้อย (bagasses) ซึ่งผลพลอยเหล่านี้มีถึงประมาณ ร้อยละ4- 6 ของปริมาณอ้อยที่ใช้ผลิต ประเทศไทยมีโรงงานผลิตน้ำตาลทรายถึง 46 โรง กากน้ำตาลจึงหาได้ง่ายภายในประเทศ จากรายงานการผลิตน้ำตาลทราย พบว่ามีปริมาณการผลิตกากน้ำตาลทั่วประเทศปี 2552/53 มีมากถึง

2,977,622.59 ตัน และในปี 2553/54 เพิ่มขึ้นเป็น 4,235,015.21 ตัน (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, http://ocsb.go.th/th/cms/index.php?SystemModuleKey=production)

ปัจจุบันมีการนำกากน้ำตาลไปใช้ประโยชน์มากขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์ เนื่องจากเป็นแหล่งคาร์บบอนที่มีราคาถูก (7-8 บาท/กิโลกรัม) กากน้ำตาลที่เหลือจากกระบวนการผลิตน้ำตาลจากอ้อย ยังคงมีปริมาณน้ำตาลหลงเหลืออยู่มากประมาณร้อยละ 50 ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสเป็นส่วนใหญ่ (30-45%) มีน้ำตาลกลูโคส (5-11%) ฟรุคโตส (6-15%) และมีปริมาณไนโตรเจนเหลืออยู่เล็กน้อยประมาณร้อยละ 0.4-1.5 (Stoppok et al., 1996) นอกจากนี้ยังมีโลหะหนัก (iron, zinc, cooper, manganese, magnesium) ซึ่งเป็นข้อด้อยของการใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดแลคติก เพราะโลหะหนักเหล่านี้เป็นพิษ สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Monteagudo et al., 1997) รายงานการวิจัยหลายชิ้นที่มีการลดความเป็นพิษของกากน้ำตาลก่อนนำไปเลี้ยงแบคทีเรีย ซึ่งการลกสารพิษสามารถทำได้หลายวิธี เช่น cation exchange resin, sulphuric acid, tricalcium phosphate, potassium ferricyanide และ EDTA treatment (Kotzamanidis et al., 2002; Roukas, 1998) เป็นต้น แต่การบำบัดก็จะเพิ่มต้นทุนเช่นกัน

Payot และคณะ (1999) ได้ทดลองหมักกรดแลคติกด้วยแบคทีเรีย *Bacillus coagulans* TB/04 ซึ่งเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงประมาณ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งช่วยลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆ โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 120 กรัม/ลิตร พบว่าได้ปริมาณเซลล์ 3.1 กรัม/ลิตร ผลิตกรดแลคติกได้ 55 กรัม/ลิตร และมีค่า specific production rate เท่ากับ 6.1 ค่า specific growth rate เท่ากับ 0.28 ค่า specific consumption sucrose rate เท่ากับ 9.5 กรัม/ชั่วโมง/กรัมของเซลล์ และผลผลิตกรดแลคติก (yield) ร้อยละ 92

Göksungur และคณะ (1997) ใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202 หมักกรดแลคติกจากกากน้ำตาล โดยใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 78.2 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่าในการหมักแบบกะสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 4.83 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง และ 11.20 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง จากการหมักแบบต่อเนื่องที่อัตราเจือจาง (dilution rate.) 0.5 h^{-1}

แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญอับดับสองรองจากคาร์บอน แบคทีเรียแลคติกต้องการแหล่งไนโตรเจนในการสร้างเซลล์ การสืบพันธุ์ และในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ซึ่งแหล่งโปรตีนที่นิยมใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก ในสูตรอาหารต่างๆ คือ สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) เปปโตน (peptone) สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

$[(NH_4)_2SO_4]$ เป็นแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติมได้อีกด้วย แต่หากใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่าแบคทีเรียแลคติกเจริญได้ไม่ดี เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกต้องการกรดอะมิโนหลายชนิด รวมทั้งวิตามินและแร่ธาตุในการเจริญ โดยที่ Calderon และคณะ (2001) ได้ทดสอบแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ในการเจริญของแบคทีเรียแลคติก พบว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ เช่น yeast extract, peptone, beef extract และ corn hydrolysate ทำให้แบคทีเรียแลคติกเจริญได้สูงที่สุด แต่การใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนชนิดเดียวนั้นจะให้ปริมาณการเจริญของแบคทีเรียแลคติกต่ำที่สุด ดังนั้นประสิทธิภาพของการเจริญและการกรดหมักของแบคทีเรียแลคติกนั้น นอกจากจะขึ้นกับปริมาณของไนโตรเจนแล้ว ยังขึ้นกับชนิดของแหล่งไนโตรเจนอีกด้วย (Gao et al., 2008; Petrov et al., 2008) แหล่งคาร์บอนต่างๆ โดยทั่วไป มักมีปริมาณไนโตรเจนไม่เพียงพอและไม่หลากหลายพอแก่ความต้องการของแบคทีเรีย ดังนั้นนอกจากการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมแล้ว ยังจำเป็นต้องมีปริมาณสารอาหารไนโตรเจนให้เพียงพอต่อความต้องการ แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกนอกจาก yeast extract, peptone และ beef extract แล้วยังมีวัตถุดิบอื่นๆ เช่น กากถั่วเหลือง (soy bean meal) น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) หางนม (whey protein) และ โปรตีนจากเศษเหลือของปลา (fish hydrolysate) เป็นต้น

กากถั่วเหลือง (Soy bean meal) เป็นของเหลือจากอุตสาหกรรมการทำน้ำมันถัวเหลืองโดยได้หลังจากหีบเอาน้ำมันออกแล้วจะเหลือเป็นกากถั่วเหลืองป่น กากถั่วเหลืองที่ได้ยังมีสารอาหารอยู่หลายชนิดทั้งโปรตีน กรดอะมิโน วิตามินและเกลือแร่

น้ำแช่ข้าวโพด (Corn steep liquor) เป็นวัตถุดิบเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมข้าวโพด เช่น ข้าวโพดกระป๋อง ซุปข้าวโพด ขนมขบเขี้ยวจากแป้งข้าวโพด เป็นต้น ในน้ำแช่ข้าวโพดจะมีปริมาณกรดอะมิโนค่อนข้างสูงและยังมีคาร์โบไฮเดรตรวมอยู่บ้างเล็กน้อย โดย Beatriz และคณะ (2004) ทดลองใช้ corn steep liquor เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเจริญของแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466 โดยองค์ประกอบของสูตรอาหารประกอบด้วย glucose 118.20 g/l, molasses 37.27 g/l, corn steep liquor 42.54 g/l, Tween80 1.52 ml/l และ $MnSO_4$ 0.30 g/l หลังการหมักเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่ามีการผลิตกรดแลคติกได้ 110 g/l ซึ่งสูงกว่าการใช้สูตรอาหารที่เติม yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนถึงร้อยละ 30.4

หางนม (Whey) เป็นส่วนที่เหลือจากการแยกโปรตีนนม (curd) ออกจากนม ในกระบวนการผลิตชีส ซึ่งมีปริมาณของกรดอะมิโนและน้ำตาลแลคโตสเป็นองค์ประกอบหลักอยู่มาก นอกจากนี้ยังมีวิตามินชนิดต่างๆ หลายชนิด จึงเหมาะสมที่จะใช้เป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก ซึ่ง Ha และคณะ (2003) ได้ศึกษาการหมักกรดแลคติกของ *Lactobacillus casei* KH-1 ในหางนม (whey protein) ในสูตรอาหารมีกลูโคสร้อยละ 2.39 yeast extract ร้อยละ 1.28 และ corn steep liquor ร้อยละ 3.5 พบว่ามีค่า yield ของกรด

แลคติก เท่ากับ 0.312 กรัม/กรัม ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้อาหาร MRS ที่มีค่า yield เท่ากับ 0.382 กรัม/กรัม และอาหารสูตรใหม่นี้มีราคาถูกลง

โปรตีนสกัดจากเศษเหลือของปลา (fish hydrolysate) เป็นแหล่งโปรตีนที่ได้จากการสกัดน้ำต้มปลาซึ่งเป็นของเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมปลากระประป๋อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยมีโรงงานปลากระป๋องทั้งปลาซาร์ดีนและปลาทูน่าอยู่เป็นจำนวนมาก เศษเหลือเหล่านี้จะเป็นส่วนของเครื่องในปลาและเศษเหลือส่วนต่างๆ ซึ่งผ่านการย่อยด้วยความร้อนและเอนไซม์ และระเหยจนเข้มข้น เรียกว่า fish hydrolysate ซึ่งมีโปรตีนสูงเหมาะสำหรับใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดย Aspmo และคณะ (2005) ได้นำโปรตีนสกัดที่ได้จากการนำเครื่องในปลาที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์มาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน yeast extract, peptone และ beef extract ในสูตรอาหาร MRS มาทดลองเลี้ยง *Lactobacillus* พบว่าสามารถใช้ทดแทน yeast extract, peptone และ beef extract และได้ผลผลิตกรดแลคติกได้ดีเท่าเทียมกัน

2.2.2.2 ความเป็นกรด-ด่าง

ความเป็นกรด-ด่าง (pH) เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งแม้แบคทีเรียแลคติกจะทนกรดและเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด ซึ่งสามารถเจริญได้ที่ pH ต่ำกว่า 4.0 หรือในบางสายพันธุ์ก็สามารถเจริญได้ที่สภาวะเบสที่ pH 9.6 แต่โดยทั่วไปค่า pH ที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง pH 5.5 - 6.0 และเนื่องจากแบคทีเรียแลคติกจะชั้นน้ำตาลและเปลี่ยนให้เป็นกรดแลคติก ดังนั้นค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงอย่างรวดเร็ว ปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้นจะไปจำกัดการเจริญของแบคทีเรียแลคติก (product inhibition) เป็นผลให้การสร้างกรดเกิดได้ช้าหรือหยุดลง ซึ่งจะสามารถแก้ไขได้โดยการควบคุมค่า pH โดยใช้เบส หรือการใช้แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) เปลี่ยนกรดแลคติกให้เป็นเกลือแลคเตต (lactate) หรือการใช้กระบวนการอื่นๆ ในการหมัก เช่น การใช้กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch) หรือกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation)

2.2.2.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ซึ่งจะมีผลกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ จึงจำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสมกับจุลินทรีย์สายพันธุ์นั้นๆ สำหรับแบคทีเรียแลคติกนั้นซึ่งสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 5 - 45 องศาเซลเซียส ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดของแบคทีเรียแลคติกแลคติกส่วนใหญ่จะอยู่ระหว่าง 33 - 35 องศาเซลเซียส (Akerberg et al., 1998)

2.2.2.3 ออกซิเจน

แบคทีเรียแลคติกเป็นพวก anaerobic หรือ micro-aerophile ซึ่งเมตะบอไลซ์สารอาหารด้วยกระบวนการ fermentation ในสภาวะที่ไม่มีหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย ดังนั้นในการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกจึงไม่จำเป็นต้องให้อากาศ เพียงแต่มีการกวนให้อาหารเข้ากันได้ดีตลอดระยะเวลาของการหมักก็เพียงพอ

2.3 การวางแผนการทดลองเชิงสถิติ

การวางแผนการทดลองเชิงสถิติ (Statistical Design of Experiments) คือ กระบวนการในการวางแผนการทดลองเพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลที่เหมาะสมที่ สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ทางสถิติ ซึ่งทำให้สามารถหาข้อสรุปที่สมเหตุสมผล (Montgomery, 2001) ซึ่งสิ่งสำคัญและจำเป็นสำหรับการหมักหรือการทดลองมี 2 ประการ คือ การออกแบบการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิติ ซึ่งศาสตร์ทั้งสองนี้มีความเกี่ยวข้องกันอย่างมาก เนื่องจากวิธีการที่ใช้วิเคราะห์ข้อมูลเชิงสถิตินั้นจะขึ้นอยู่กับแผนการทดลองที่ใช้ แบบแผนการทดลองที่นิยมได้แก่

2.3.1 วิธีการพื้นผิวผลตอบสนอง (Response Surface Methodology)

วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) เป็นเทคนิคทางสถิติที่ใช้แผนภาพ surface plot ที่สร้างเป็นแผนภาพ 3 มิติ ในการตรวจสอบความสัมพันธ์ (interaction) ของตัวแปรต่างๆที่อยู่ในการทดลอง เพื่อช่วยในการหาผลตอบสนองที่เหมาะสมที่สุด (optimum response) ให้ได้เร็วที่สุด ลดจำนวนการทดลองที่ซ้ำๆ กันลงไป เพื่อประหยัดทรัพยากรและเวลาที่ใช้ในการทดลอง โดยเฉพาะในสถานการณ์ที่ตัวแปรต้น (input variable) หลายๆ ตัวมีผลต่อคุณสมบัติบางประการหรือปริมาณของผลผลิตที่ได้ ซึ่งจะเรียกคุณสมบัติหรือลักษณะบางประการของผลผลิตนี้ว่าผลตอบสนอง (response) และตัวแปรต้นดังกล่าวมักจะเรียกว่าตัวแปรอิสระ (independent variable) ซึ่งประกอบด้วยตัวแปรร่วมการทดลองหลายปัจจัย การตอบสนองที่เหมาะสมสามารถพิจารณาได้ใน 2 ลักษณะ คือ การตอบสนองมากที่สุด (maximum) หรือการตอบสนองที่ต่ำที่สุด (minimum) ขึ้นอยู่กับการทดลอง ซึ่งการแสดงเรขาคณิตที่ได้รับผลตอบสนองของตัวแปร (response) ถูก plot เป็นฟังก์ชั่นของตัวแปรเหล่านั้นจากความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรดังกล่าวทำให้สามารถพิจารณาผลตอบสนองของตัวแปรและปัจจัยที่สนใจไปพร้อมๆ กันได้ โดยขั้นตอนในการวิเคราะห์พื้นผิวตอบสนองจะประกอบด้วย

1. เลือกแผนการทดลองที่เหมาะสมที่สามารถให้ข้อมูลเพียงพอในการสร้างแผนภาพ surface plot เช่น Central Composite Designs (CCD), Box-Behnken design
2. สร้างสมการ regression ที่ดีที่สุด และสร้าง surface plot จากสมการที่ได้

3. ตรวจสอบ optimization
4. Verification โดยทำ independent run ภายใต้ขอบเขตของแต่ละตัวแปร

2.3.2 วิธีการ Central Composite Designs (CCD)

การวางแผนทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) นี้พัฒนามาจากแผนการทดลองแบบแฟคเทอเรียล (factorial) ที่มีระดับของปัจจัย 2 ระดับ (2k factorial design) หรือแผนการทดลองแบบแฟคเทอเรียลเชิงส่วน (fractional factorial design) เนื่องมาจากว่าเมื่อแผนการทดลองแบบแฟคเทอเรียลที่มีระดับของปัจจัย 2 ระดับนั้นไม่สามารถใช้หาตัวแบบความสัมพันธ์ที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้งหรือตัวแบบความสัมพันธ์อันดับสอง (Second – order model) ซึ่งมีตัวแบบเป็น ดังนี้

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} x_i^2 + \sum \sum_{i<j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

โดยที่แผนการทดลองที่สามารถใช้ได้จะต้องมีระดับของปัจจัยอย่างน้อย 3 ระดับ เช่น แผนการทดลองแบบ 3k แฟคเทอเรียล แต่เนื่องจากแผนการทดลองดังกล่าวจะต้องมีการซ้ำ (replicate) ที่แต่ละระดับของปัจจัย เพื่อใช้ในการสังเกตความเหมาะสมของตัวแบบ (lack of fit test) ซึ่งในกรณีที่มีปัจจัยจำนวนมาก จะทำให้จำนวนครั้งของการทดลองมีมากซึ่งจะทำให้สิ้นเปลืองทรัพยากร การทดลองแบบ Central Composite Designs (CCD) จึงดัดแปลงมาจากการจัดสิ่งทดลองแบบแฟคทอเรียล ซึ่งเป็นการเพิ่มสิ่งทดลองระหว่างระดับของปัจจัย แต่เป็นการลดสิ่งทดลอง เช่น ในการใช้ 3^3 factorial design จะมีสิ่งทดลองทั้งหมด 27 สิ่งทดลอง ในขณะที่การทดลองแบบ CCD 3 ปัจจัย จะมีการทดลองทั้งหมด 2^3 + (2x3+1) โดยที่เทอม (2n+1) เป็นจุดที่เพิ่มขึ้นมาและเพิ่มการทดลองที่จุดกลาง 3-5 ซ้ำ ซึ่งรวมแล้วจะเท่ากับ 20 สิ่งทดลอง ซึ่งมีจำนวนการทดลองน้อยกว่าการทดลองแบบ 3k แฟคเทอเรียล ที่มีจำนวนปัจจัยเท่ากัน รวมทั้งเป็นแผนการทดลองที่ให้ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ค่อนข้างสูง และตัวแบบที่ได้ สามารถใช้หาค่าของระดับต่างๆ ของปัจจัยที่ให้ค่าผลตอบสนองที่เหมาะสมที่สุด แผนการทดลองแบบ 2k แฟคเทอเรียลมีระดับของปัจจัย 2 ระดับ ซึ่งโดยมากจะเรียกว่าระดับต่ำ (low, –) และระดับสูง (high, +) โดยที่แผนการทดลองแบบ CCD จะเพิ่มการทดลองที่จุดศูนย์กลาง หรือที่ระดับ 0 และมีการทดลองตามแนวแกน (axis) ขึ้นมาเพื่อใช้ในการหาตัวแบบความสัมพันธ์อันดับสอง

2.3.3 วิธีการ Plackett and Burman design

ในการทดลองที่มีตัวแปรหรือปัจจัยที่ต้องการศึกษาหลายปัจจัยจะมีอุปสรรคเกี่ยวกับสิ่งทดลอง (treatment) ที่มีเป็นจำนวณมาก เช่น หากจัดสิ่งทดลองแบบ 2^n จะพบว่าถ้ามีปัจจัย 6 ปัจจัยจะมีชุดทดลอง

ทั้งหมด 128 ชุดการทดลอง เป็นต้น จึงยากที่จะทำการทดลองชุดการทดลองทั้งหมดได้ ดังนั้นการวางแผนการทดลองโดยใช้วิธี Plackett and Burman design จะใช้สำหรับการศึกษาเพื่อที่จะคัดเลือก (screening) ว่าปัจจัยใดบ้างที่มีความสำคัญหรือมีอิทธิพลต่อการทดลองที่จะศึกษา กล่าวคือจากแผนการทดลองนี้จะทำให้สามารถวิเคราะห์ถึงผลกระทบหลักของปัจจัยที่ศึกษาเท่านั้น ซึ่งจะช่วยให้สามารถลดจำนวนชุดการทดลองได้ แต่จะมีข้อเสียคือ จะไม่สามารถศึกษาถึงผลของปฏิสัมพันธ์ (interaction) ของปัจจัยต่างๆ ที่มีในการทดลองได้

2.4 จลศาสตร์ของกระบวนการหมัก

การศึกษาจลศาสตร์ของกระบวนการหมักทำให้ทราบถึงธรรมชาติของการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก (fermentation kinetic) เช่น การเจริญของจุลินทรีย์ การเปลี่ยนแปลงของสับสเตรท การเกิดผลผลิต การเปลี่ยนแปลงของ pH และอุณหภูมิ โดยข้อมูลที่ได้จากการศึกษาจลศาสตร์ของการหมักนี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากในการควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการหมัก รวมทั้งการจัดการระบบการหมักให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ โดยกระบวนการหมักกรดแลคติกโดยทั่วไปสามารถแบ่งตามลักษณะของกระบวนการที่ใช้มี 3 วิธีด้วยกันคือ กระบวนการหมักแบบกะ(batch fermentation) กึ่งกะ (fed-batch fermentation) และแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) ซึ่งจะมีจลศาสตร์ที่แตกต่างกันออกไป (Waites et al., 2001)

2.4.1 กระบวนการหมักแบบกะ

กระบวนการหมักแบบกะ (batch fermentation) เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบปิด ที่มีปริมาณสารอาหารจำกัด ไม่มีการเติมอาหารเข้าหรือนำออกจากถังหมัก ทำให้การเจริญของจุลินทรีย์มีลักษณะดังแสดงในรูปที่ 2.3 โดยเมื่อเติมหัวเชื้อจุลินทรีย์ (starter หรือ inoculum) ลงในอาหาร ระยะแรกจะเป็นระยะที่จุลินทรีย์ปรับตัว จะยังไม่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เรียกระยะนี้ว่า lag phase ซึ่งในกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรมจะต้องลดระยะเวลาในช่วงนี้ให้สั้นที่สุดเพื่อลดต้นทุนการผลิต โดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม หลังจากนั้นจุลินทรีย์จะมีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นจนกระทั่งเข้าสู่ระยะ log phase ซึ่งเป็นระยะที่จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญสูงสุดและคงที่ การเจริญของจุลินทรีย์ในระยะ log phase นี้สามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$\frac{dx}{dt}\mu_x \qquad (2.1)$$

เมื่อ x = ความเข้มข้นของมวลเซลล์ (biomass) (กรัม/ลิตร)

t = เวลา (ชั่วโมง)

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) (ต่อชั่วโมง)

Integrate สมการที่ 1

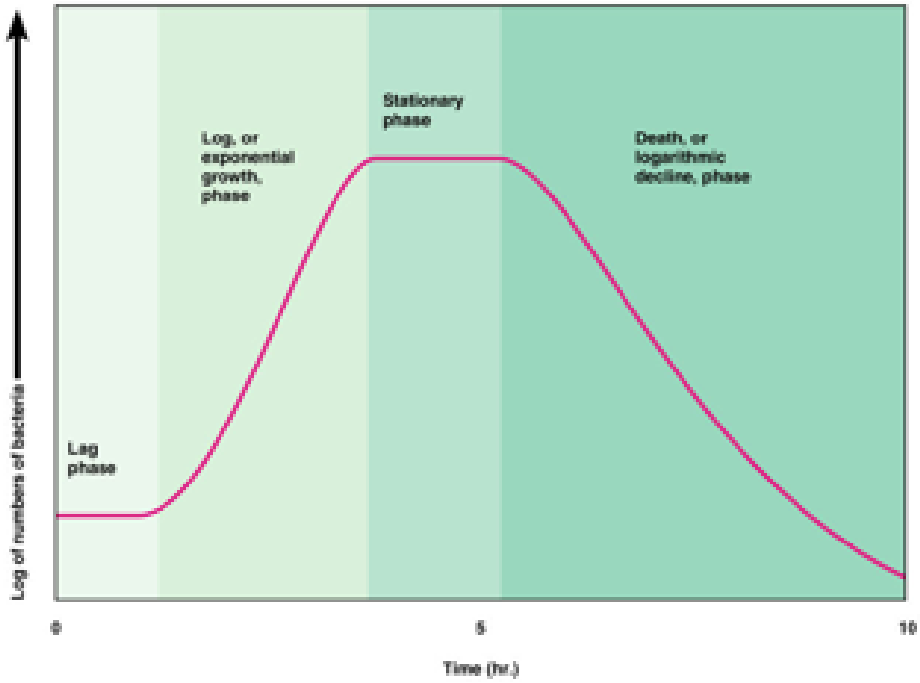
$$x_t = x_0 e^{\mu t} \tag{2.2}$$

เมื่อ x_0 = ความเข้มข้นของมวลเซลล์เริ่มต้น

x_t = ความเข้มข้นของมวลเซลล์หลังจากการหมักเป็นเวลา t ชั่วโมง

ใส่ natural logarithm ในสมการที่ 2.2 จะได้

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu t \tag{2.3}$$



รูปที่ 2. 3 กราฟการเจริญของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักแบบกะ

เมื่อเขียนกราฟระหว่าง natural logarithm ของความเข้มข้นของมวลเซลล์กับเวลา จะได้กราฟเส้นตรงซึ่งมีค่าความชัน (slope) เท่ากับอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) หรือคำนวณได้ดังสมการที่ 2.4

$$\mu_{max} = \frac{\ln x_t - \ln x_0}{t} \tag{2.4}$$

ซึ่งอัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์สูงสุดนี้จะขึ้นกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง รวมทั้งปริมาณสารพิษและสารอาหาร ดังนั้นหลังจากที่จุลินทรีย์เจริญอย่างรวดเร็วไปได้ระยะหนึ่งแล้ว อัตราการเจริญจะค่อยๆลดลงจนกระทั่งหยุดการเพิ่มจำนวน โดยสามารถอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์สูงสุดที่ stationary phase กับความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต้นได้ดังสมการที่ 2.5

$$x = Y(S_R - S_r) \qquad (2.5)$$

เมื่อ x = ความเข้มข้นของมวลเซลล์ที่ผลิตได้

Y = ปริมาณผลผลิตต่อหน่วยสับสเตรทที่ถูกใช้ไป (yield coefficient)

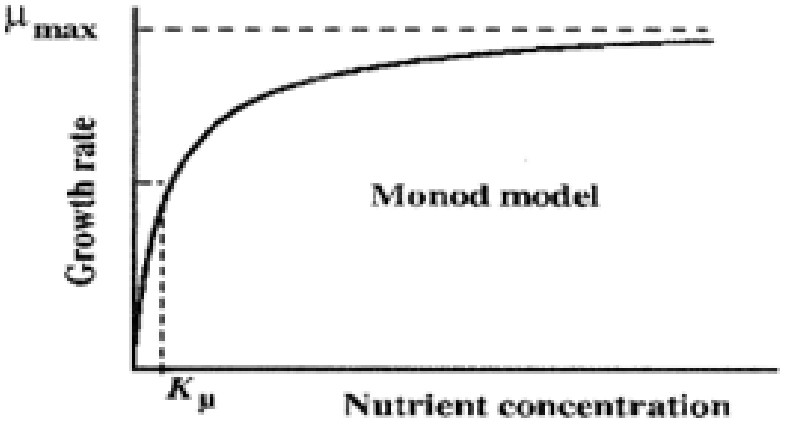
S_R = ความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต้น

S_r = ความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือ

นอกจากนี้การที่จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญลดลงจนกระทั่งหยุดการเจริญ อันเนื่องจากอาหารหมดยังสามารถอธิบายได้ในรูปความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญจำเพาะและความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลืออดังสมการที่ 2.6

$$\mu = \frac{\mu_{max} - S}{K_s + S} \qquad (2.6)$$

เมื่อ K_S = ค่าคงที่ในการใช้สับสเตรท (substrate utilization constant) ซึ่งมีค่าเท่ากับความเข้มข้นของสับสเตรท เมื่อ μ เท่ากับ $\frac{1}{2}\mu_{max}$ (รูปที่ 2.4)



รูปที่ 2. 4 ค่าคงที่ในการใช้สับสเตรท K_S

โดยผลผลิตที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักแบบกะนี้จะสามารถเขียนอธิบายในรูปสมการได้ดังนี้

$$\frac{dp}{dt} = q_p x \qquad (2.7)$$

เมื่อ p = ความเข้มข้นของผลผลิต

q_p = อัตราการผลิตจำเพาะ (specific production rate)

และ

$$q_p = Y_{x/s} . \mu \quad (2.8)$$

เมื่อ $Y_{x/s}$ = ปริมาณผลผลิตต่อหน่วยสับสเตรทที่ถูกใช้ไป (yield coefficient)

2.4.2 กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ

กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่มีลักษณะคล้ายกับการหมักแบบกะ แต่เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อไปได้ระยะหนึ่งจะมีการเติมอาหารเข้าไปเพิ่มในระบบ เพื่อเพิ่มระยะเวลาการเจริญของจุลินทรีย์ในระยะ log phase ให้นานขึ้น โดยการเติมอาหารใหม่ลงไปเป็นระยะๆ จนกว่าจะเต็มภาชนะโดยไม่มีการถ่ายอาหารออก ดังนั้นการเจริญของจุลินทรีย์จะถูกจำกัดโดยความเข้มข้นของสับสเตรท ซึ่งความเข้มข้นของมวลเซลล์ที่เวลาใดๆ จะหาได้จากสมการ

$$X_t = X_0 + Y_{x/s}(S_R - S_r) \quad (2.9)$$

เมื่อ X_t = ความเข้มข้นของมวลเซลล์ภายหลังการหมักเป็นเวลา t ชั่วโมง

X_0 = ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น

เมื่อเริ่มเติมอาหารลงในถังหมักในเวลาที่ x โดยให้อัตราการเจือจางมีค่าต่ำกว่า μ_{max} จะทำให้สับสเตรทที่เข้าสู่ถังหมักถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว ดังนั้น

$$FS_R = \mu(X/Y) \quad (2.10)$$

เมื่อ F = อัตราการเติมอาหาร

X = ปริมาณมวลเซลล์ทั้งหมดในระบบ

จากสับสเตรทที่เติมเข้าไป จะมีค่าเท่ากับสับสเตรทที่จุลินทรีย์ใช้ไป ดังนั้น ds/dt = 0 และแม้ปริมาณมวลเซลล์ทั้งหมด (x) จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลา แต่ความเข้มข้นของมวลเซลล์ (x) จะมีค่าคงที่ นั่นคือ $\mu = D$ สภาวะเช่นนี้เรียกว่า quasi-steady state อย่างไรก็ตามอัตราการเจือจางจะลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นตามลำดับ เนื่องจากปริมาณของอาหารเลี้ยงเชื้อในภาชนะเพิ่มขึ้น

โดยกระบวนการหมักแบบกึ่งกะนี้ จุลินทรีย์จะสามารถเจริญและผลิตผลผลิตที่ต้องการได้มากขึ้น เป็นการลดระยะเวลาในการเตรียมหัวเชื้อและเวลาในการเพิ่มจำนวนของเชื้อ ทำให้กระบวนการหมักรวดเร็วมากยิ่งขึ้น

2.4.3 กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง

กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) เป็นการหมักโดยมีการเติมอาหารใหม่เข้าสู่ถังหมักและในขณะเดียวกันมีการถ่ายอาหารเก่าออกในอัตราที่เท่ากัน ทำให้จุลินทรีย์เจริญเพิ่มจำนวนและเกิดการหมักได้อย่างต่อเนื่อง และในกรณีที่มีการถ่ายอาหารเก่าและเติมอาหารใหม่เข้าสู่ถังหมักอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราที่เหมาะสม จะทำให้เกิดสภาวะที่สมดุลคงที่ (steady state) คือปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่จะเท่ากับปริมาณเซลล์ในอาหารเก่าที่ถ่ายออกมาจากถังหมัก ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของอาหารเข้าสู่ถังหมักกับปริมาตรของถังหมักเรียกว่าอัตราเจือจาง (dilution rate, D) สามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$D = {}^{F}/_{V} \qquad (2.11)$$

เมื่อ D = อัตราการเจือจาง (h^{-1})

F = อัตราการไหลออกของอาหาร

V = ปริมาตรอาหารในถังหมัก

การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเซลล์ในช่วงเวลาใดเวลาหนึ่ง สามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$\frac{dx}{dt} = growth\ rate - wash\ out \qquad (2.12)$$

แต่ที่สภาวะคงที่ (steady state) ความเข้มข้นของเซลล์จะคงที่ ดังนั้น

$$\mu_x = D_x \qquad (2.13)$$

$$\mu = D \qquad (2.14)$$

และที่สภาวะคงที่ ds/dt และ dx/dt จะมีค่าเท่ากับศูนย์ ดังนั้นที่สภาวะคงที่ จะสามารถหาปริมาณมวลเซลล์และความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือได้จากสมการ

$$\bar{x} = Y_{x/s}\left(S_R - \frac{K_s D}{\mu_{max} - D}\right) \qquad (2.15)$$

หรือ $$\bar{x} = Y_{x/s}(S_R - S_r) \quad (2.16)$$

และ $$\bar{S} = \frac{K_s D}{\mu_{max} - D} \quad (2.17)$$

เมื่อ $\bar{x}$ = ความเข้มข้นของมวลเซลล์ที่สภาวะคงที่

$\bar{S}$ = ความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือที่สภาวะคงที่

สมการที่ 2.17 อธิบายถึงกลไกของอัตราการเจือจาง (D) ในการควบคุมอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เมื่ออัตราการเจือจางเพิ่มขึ้นจะทำให้ปริมาณซับสเตรทเพิ่มขึ้น สนับสนุนให้จุลินทรีย์เจริญได้ในอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับอัตราการเจือจาง (D) ซึ่งทำให้เกิดสภาวะคงที่ (steady state) แต่หากอัตราการเจือจางสูงเกินกว่าอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ ก็จะทำให้เซลล์ถูกถ่ายออกมา (wash out) จะทำให้จำนวนเซลล์ในถังหมักลดลงและความเข้มข้นของสับสเตรทในถังหมักจะเพิ่มขึ้น ดังนั้นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบต่อเนื่องจึงเป็นระบบที่จุลินทรีย์สามารถปรับตัวให้อยู่ในสภาวะสมดุลได้เอง (self-balancing system)

จลศาสตร์ของกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องสามารถอธิบายได้จากค่าคงที่ Y, μ_{max} และ K_S โดยค่า Y คือปริมาณผลผลิตต่อหน่วยสับสเตรทที่ถูกใช้ไป ซึ่งจะมีผลต่อความเข้มข้นของเซลล์ที่สภาวะคงที่ ค่า μ_{max} จะมีผลต่ออัตราการเจือจางสูงสุดที่จะใช้ได้ และค่า K_S จะมีผลต่อความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือ ความเข้มข้นของเซลล์ที่ได้ และอัตราการเจือจางจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ s และ x โดยเมื่ออัตราการเจือจางเพิ่มขึ้น s จะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและ x จะลดลงเพียงเล็กน้อย จนกระทั่งอัตราการเจือจางมีค่าเข้าใกล้ μ_{max} จึงจะทำให้ s เพิ่มขึ้นและ x ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับอัตราการเจือจางที่เพิ่มสูงจนเซลล์ถูกชะออก (wash out) จากระบบจนหมด เรียกว่า critical dilution rate ซึ่งสามารถคำนวนได้จากสมการ

$$D_{crit} = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S_R} \quad (2.18)$$

ข้อดีของกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง

การหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่ควบคุมสภาวะต่างๆ ให้คงที่ อัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะปรับตัวไปตามอัตราการเจือจาง จนกระทั่งเกิดสภาวะคงที่ซึ่งจะมีปริมาณเซลล์ สับสเตรท ผลผลิตและสารพิษคงที่ ในสภาวะที่มีการควบคุมปัจจัยต่างๆ ให้คงที่ เช่น อุณหภูมิ pH คงที่ตลอดระยะเวลา แต่ในกระบวนการแบบกะ (batch) ปัจจัยต่างๆ เปลี่ยนแปลงไปตลอดเวลา นอกจากนี้กระบวนการแบบกะยังต้องการแรงงานมากในช่วงการเตรียมอาหาร และการเก็บเกี่ยวผลผลิต ดังนั้นการหมักด้วยกระบวนการแบบต่อเนื่องจึงได้ผลผลิตมากกว่าการหมักแบบกะ

การหมักแบบต่อเนื่องให้ผลผลิตต่อหน่ายเวลา (productivity) สูงกว่ากระบวนการหมักแบบกะ (batch) เนื่องจากในกระบวนการหมักแบบกะจะได้ผลผลิตสูงสุดก็ต่อเมื่อกระบวนการหมักสิ้นสุด แต่การหมักด้วยกระบวนการแบบต่อเนื่องโดยใช้อัตราการเจือจางที่เหมาะสม ภายใต้สภาวะที่คงที่ผลผลิตจะมีค่าสูงสุดและคงที่ตลอดเวลา ทำให้ productivity สูงกว่ามาก

โดยที่ productivity หมายถึงปริมาณผลผลิตที่ได้ต่อหน่วยเวลาของการหมัก และในกระบวนการหมักแบบกะสามารถหาได้สมการดังนี้

$$P_{batch} = \frac{P_{max} - P_0}{T} \qquad (2.19)$$

เมื่อ P_{batch} = ความเข้มข้นของผลผลิตที่ได้ต่อชั่วโมง (กรัม/ชั่วโมง)

P_{max} = ความเข้มข้นสูงสุดของผลผลิตที่ stationary phase

P_0 = ความเข้มข้นเริ่มต้นของผลผลิต

T = ระยะเวลาทั้งหมดตั้งแต่เริ่มการหมักจนถึงเวลาที่ความเข้มข้นของผลผลิตสูงสุด

สำหรับ Productivity ของกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องสามารถหาได้สมการดังนี้

$$P_{count} = D_x \left[1 - \left(t/T\right)\right] \qquad (2.20)$$

เมื่อ P_{cont} = ความเข้มข้นของผลผลิตที่ได้ต่อชั่วโมง (กรัม/ชั่วโมง)

t = ระยะเวลาตั้งแต่เริ่มการหมักจนกระทั่งเข้าสู่สภาวะคงที่

T = ระยะเวลาที่สภาวะคงที่

D = อัตราการเจือจาง (h^{-1})

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 วัตถุดิบที่ใช้ในสูตรอาหารทดแทน

1. กากน้ำตาล (molasses)
2. กากถั่วเหลือง (soybean meal)
3. หางนม (whey)
4. โปรตีนจากการย่อยเศษปลา (fish hydrolysate)
5. น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor)

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง (AND, HF-2000G)
2. เครื่องละเอียดชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Metter Toledo, AB 2045)
3. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (Metrohm, 713)
4. เครื่องเขย่า (Vortex-2 Gene)
5. ตู้ปลอดเชื้อ (Astec, Microflow)
6. หม้อนึ่งความดัน Autoclave (Kokusan, H88L4)
7. ตู้อบลมร้อน Hot Air Oven (Fisher scientific, TSOTEMP)
8. เครื่องหมุนเหวี่ยง Refrigerated centrifuge (Hettich, Rotanta 46R)
9. เครื่องวัดค่าดูดกลืนคลื่นแสง Spectrophotometer (Pharmacia Biotech, NAVASPEC II)
10. เครื่อง High performance liquid chromatography, HPLC (Eprogen)
11. เครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (ABI PRISM modle 310 Genetic Analyzer)
12. เครื่อง Digestion Unit (BUCHI, K424)
13. เครื่อง Distillation (Gerhardt, KI26)
14. ถังหมัก (Fermenter) (B-Bruan, Biostat B)
15. ไมโครปิเปต (Gilson)
16. กล้องจุลทรรศ์ (Olympus E for L International)
17. ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Sanyo)
18. สารเคมี เครื่องแก้วและอุปกรณ์ที่ใช้ในทางจุลชีววิทยา

3.2 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.2.1 การคัดแยกแบคทีเรียแลคติก

สุ่มเก็บตัวอย่างชนิดต่างๆ ได้แก่ผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองประเภทเนื้อ นม แป้ง ผักและผลไม้ เพื่อคัดแยกเชื้อ โดยชั่งตัวอย่าง 25 กรัม เจือจางด้วยสารละลาย NaCl เข้มข้นร้อยละ 0.85 (w/v) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย stomacher จากนั้นเจือจางตัวอย่างด้วยวิธี serial dilution ระดับละ 10 เท่า จนได้ตัวอย่างเจือจางระดับ 10^{-1}-10^{-5} เท่า จากนั้นปิเปตตัวอย่างในแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar ที่ผสม $CaCO_3$ ร้อยละ 1 (w/v) แล้วเกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยวิธีการ spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์จากโคโลนีเดี่ยวที่มีโซนใสโดยรอบ (clear zone) มาย้อมสีแกรมและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศ์เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์และการติดสีแกรม จากนั้นเขี่ยเชื้อที่บริสุทธิ์มาทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase ด้วยสารละลายไฮโดรเจอเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้นร้อยละ 3 เพื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และตรวจสอบว่าเป็นแบคทีเรียแลคติกชนิด homofermentative หรือ heterofermentative ด้วยการทดสอบการสร้างแก๊สเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กำหนดรหัสเชื้อและเก็บรักษาแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ โดยเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงเลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตเชื้อปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอด eppendorf ที่บรรจุ skim milk เข้มข้นร้อยละ 10 (w/v) ปริมาตร 800 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อไว้ศึกษาต่อไป

3.2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สร้างกรดได้สูง

คัดเลือกหาแบคทีเรียแลคติกรหัสที่สร้างกรดได้สูง โดยเขี่ยเชื้อที่คัดแยกได้ (ข้อ 3.2.1) ลงเลี้ยงในหลอดอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 15 ชั่วโมง ปรับความขุ่นของเซลล์ให้ได้ค่า OD = 0.5 ด้วย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นปิเปตเซลล์แขวนลอยที่ปรับความขุ่นแล้ว 100 ไมโครลิตร ลงเลี้ยงในหลอดอาหารเหลว MRS ดัดแปลง ที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลในปริมาณที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากันที่ร้อยละ 2 (ตารางที่ 3.1) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (ร้อยละ 1 v/v) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 21 ชั่วโมง นำอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อมาตกตะกอนด้วยเครื่องเซนตริฟิวซ์ที่ 1000*g* เป็นเวลา 2 นาที และแยกสารละลายส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติกโดยวิธีการไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ภาคผนวก ข) ส่วนของตะกอนล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้งก่อนนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสจนน้ำหนักคงที่ และคำนวณหาน้ำหนักแห้ง ตามวิธีการในภาคผนวก ข.

ตารางที่ 3. 1 สูตรอาหาร MRS ดัดแปลงที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลในปริมาณที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากัน (ร้อยละ 2)

Compositions	**g/L**
Molasses	37.2 g.
Peptone	10.0 g.
Beef extract	10.0 g.
Yeast extract	5.0 g.
Tween 80	1.0 ml.
K_2HPO_4	2.0 g.
Sodium acetate	5.0 g.
Triammonium citrate	2.0 g.
$MgSO_4.7H_2O$	0.2 g.
$MnSO_4.7H_2O$	0.05 g.

นำรหัสเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สร้างได้สูงทที่ 37 องศาเซลเซียส มาทดสอบการสร้างกรดที่อุณหภูมิสูงขึ้นที่ 42 องศาเซลเซียส โดยนำมาเลี้ยงในหลอดอาหารเหลว MRS ดัดแปลง ที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลในปริมาณที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากันที่ร้อยละ 2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และบ่มเป็นเวลา 21 ชั่วโมง วิเคราะห์หากรดและปริมาณเซลล์ด้วยวิธีการเดียวกัน

3.2.3 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดแลคติก L(+) และ D(-) ไอโซเมอร์ด้วยเครื่อง HPLC

การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) และ D(-) และปริมาณกรดอะเซติก เฉพาะของรหัสเชื้อที่พบว่าสร้างกรดได้สูงทั้งที่อุณหภูมิ 37 และ 42 องศาเซลเซียส (ข้อ 3.2.2) ด้วยเครื่อง HPLC (Eprogen) โดยฉีดของเหลวที่ได้จากการเซนตริฟิวซ์อาหารเพาะที่เลี้ยงเชื้อ (ข้อ 3.2.2) ที่ระดับการเจือจาง 50 เท่า ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกชนิด L(+) และ D(-)ใช้ 1mM $CuSO_4$ เป็นตัวพาผ่านคอลัมน์ Specific Chiral Sumi Column ในอัตราไหล (flow rate) 1.0 มิลลิลิตร/นาที และวัดอัตราการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 254 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข) ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะเซติกใช้ 0.2% phosphoric acid เป็นตัวพาผ่านคอลัมน์ชนิด Ion-Exchange ในอัตราไหล (flow rate) เท่ากับ 0.4 มิลลิลิตร/นาที และวัดอัตราการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 210 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข)

นำผลที่ได้มาคำนวณหาร้อยละการผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) ต่อหน่วยของสับสเตรท ($Yield_{L\text{-}LA/S}$) ตาม

สมการ 3.1

$$Yield_{L-LS/S}(\%) = \frac{L(+)-Lactic\ acid\ (g/l)}{Sugar\ consumption\ (g/l)} x\ 100 \qquad 3.1$$

และร้อยละความบริสุทธิ์ (purity) ของกรดแลคติกชนิด L(+) สมการ 3.2

$$Purity\quad (\%) = \frac{L(+)-Lactic\ acid\ (g/l)}{L(+)-Lactic\ acid\ \ (g/l) + D(+)-Lactic\ acid\ (g/l)} x\ 100 \qquad 3.2$$

3.2.4 การจัดจำแนกแบคทีเรียแลตติก

3.2.4.1 การจัดจำแนกแบคทีเรียแลตติกในระดับจีนัส

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกรหัสที่สร้างกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) ได้สูงและเร็ว (ข้อ 3.2.3) มาทดสอบเพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ โดย streak เชื้อบริสุทธิ์ลงบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำโคโลนีที่มี clear zone มาทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ดังนี้

ทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส โดยเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงเลี้ยงในหลอดอาหารเหลว MRS ที่ผสม bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ และมีปริมาตร 10 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตการเจริญของเชื้อจากความขุ่นของอาหารและการเปลี่ยนสีของ bromocresol purple ที่จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองหากมีการเจริญของเชื้อ

ทดสอบความสามารถในการเจริญที่ความเข้มข้นเกลือร้อยละ 6 และ 8 โดยเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในหลอดอาหารเหลว MRS ที่ผสม bromocresol purple ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และเติม NaCl ร้อยละ 6 และ 18 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นสังเกตการเจริญของเชื้อโดยสังเกตจากความขุ่นของอาหารและการเปลี่ยนสีของ bromocresol purple จากสีม่วงเป็นสีเหลือง

ทดสอบความสามารถในการเจริญที่ pH 8.5 โดยเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในหลอดอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ปรับ pH 8.5 ที่เตรียมโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ของ 0.2 M glycine 250 มิลลิลิตร และ 0.2 M NaOH 20 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ในการเตรียมอาหารและใช้ 0.1 M NaOH ในการปรับค่าพีเอช

ทดสอบความสามารถในการเจริญที่ค่า pH 4.2 โดยเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในหลอดอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีพีเอช 4.2 ที่เตรียมโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ของ 0.2 M acetic acid 500 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ในการเตรียมอาหารและใช้ glacial acetic acid ในการปรับค่าพีเอชให้ได้ 4.2

นำผลที่ได้จากการทดสอบข้างต้นไปเปรียบเทียบกับข้อมูลตามตารางที่ 2.1 (Axelsson, 1998) เพื่อจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกตามจีนัส

3.2.4.2 การทดสอบการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ของแบคทีเรียแลคติกเพื่อจัดจำแนกในระดับสปีชีส์

ในการพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียแลคติก *Pediococcus* sp. SW4-3 ในระดับสปีชีส์ โดยทดสอบทั้งการใช้น้ำตาลโดยใช้ชุดทดสอบน้ำตาลสำเร็จรูป API 50 CHL V5.1 kit (bioMerieux, France) และยืนยันผลการทดสอบด้วยการตรวจวิเคราะห์หาลำดับนิวคลิโอไทด์ของ 16S rDNA

ในการทดสอบการใช้น้ำตาลของแบคทีเรียแลคติก ได้ใช้ชุดทดสอบน้ำตาลสำเร็จรูป API 50 CHL V5.1 kit วิธีการโดยนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกรหัสซึ่งสร้างกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) ได้สูงและเร็ว (ข้อ 3.2.3) มาทดสอบ โดยเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์แต่ละรหัสลงเลี้ยงในหลอดอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นปรับปริมาณเชื้อโดยเปรียบเทียบความขุ่นกับ McFerland เบอร์ 2 และปิเปตเชื้อที่ปรับปริมาณแล้วลงในหลอดอาหารที่มากับชุดทดสอบเขย่าให้เข้ากันและปิเปตลงในชุดทดสอบจำนวน 50 ช่อง จากนั้นปิดทับด้วยกลีเซอร์รอล ก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเก็บผลที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยหากอาหารเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นเหลืองแสดงว่ามีการหมักน้ำตาลจนได้กรดเกิดขึ้นจะให้ผลเป็นบวก และหากไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีแสดงว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นั้นๆ ไม่สามารถใช้น้ำตาลชนิดนั้นได้จะให้ผลเป็นลบ ผลการทดสอบที่ได้นำไปเทียบกับฐานข้อมูลของชุดทดสอบ https://apiweb.biomerieux.com

3.2.4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียแลคติกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA

1) ขั้นตอนการสกัดโครโมโซมจากแบคทีเรียแลคติก

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกรหัสซึ่งสร้างกรดแลคติกไอโซเทอร์ L(+) ได้สูงและเร็วที่คัดเลือกไว้จากข้อ 3.2.3 มาทดสอบเพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ โดยเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์แต่ละรหัสลงเลี้ยงในหลอดอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นเก็บเซลล์โดยตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนเซลล์ที่ได้ใส่ในหลอด appendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย TNE บัฟเฟอร์ (1 M Tris-Cl) ที่มีค่า pH เท่ากับ 8.0 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้ตะกอนเซลล์ละลาย จากนั้นตกตะกอนเซลล์ตามวิธีการข้างต้นอีกครั้ง เก็บตะกอนเซลล์โดยรินของเหลวส่วนบนทิ้ง ล้างเซลล์ซ้ำอีกครั้ง เทส่วนใสทิ้ง

นำตะกอนเซลล์ที่ได้มาสกัด Genomic DNA ตามวิธีการของ Lewington et al., (1987) โดยเติมสารละลาย TNE บัฟเฟอร์ ที่ผสมไลโซไซม์ผง (10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ละลายตะกอนเซลล์จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนนำไปบ่มในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 30 - 60 นาที เติมสารละลาย SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10 ในอัตราส่วน 1/10 เท่าของปริมาณสารละลายที่มีอยู่ พลิกหลอดขึ้นลงเบาๆ 3-5 ครั้ง ให้สารละลายเข้ากันแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 และเขย่าให้เข้ากันเป็นเวลาประมาณ 30 วินาที จากนั้นนำสารละลายผสมไปทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ใช้ไมโครปิเปตดูดเก็บส่วนใสด้านบนใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายโซเดียมอะซิเตท ความเข้มข้น 3 โมลาร์ อัตราส่วน 1/10 เท่าของปริมาณของเหลวที่ได้ หลังจากนั้นเขย่าให้เข้ากัน เติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 99.5 ที่แช่เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ลงไปในอัตราส่วน 2-2.5 เท่าของปริมาณสารละลายทั้งหมด พลิกหลอดขึ้นลงเบาๆให้เข้ากันก่อนตกตะกอนดีเอ็นเอ โดยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตะกอนโดยเทส่วนของของเหลวทิ้ง นำตะกอนที่ได้มาล้างด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นพลิกหลอดขึ้นลงเบาๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวซ์ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส รินส่วนของสารละลายทิ้ง ตากตะกอนไว้จนแห้ง จากนั้นละลายตะกอนด้วยสารละลาย TE บัฟเฟอร์ ที่มีค่าพีเอชเท่ากับ 8.0 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์

1) การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ 16s rDNA ด้วยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ 16s rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ 27F : 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' และ 1525R : 5'-AAGGAGGTG(A/T)TCCA(A/G)CC-3' ตามวิธีการของ Lane (1991) ร่วมกับชุดน้ำยาสำเร็จรูป Takara EX *Tag* kit (TaKaRa BIO INC, Japan) เตรียมส่วนผสมที่ใช้ทำปฏิกิริยา ตามรายการต่อไปนี้ ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายแต่ละชนิดใส่ในหลอด microtube ขนาด 0.6 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข 8,9) โดยผสมให้เข้ากันดี แล้วนำหลอดที่บรรจุสารละลายที่เตรียมได้ใส่ลงในเครื่องควบคุมปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส โดยทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สภาวะดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 ระยะ Predenaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นตอนที่ 2 ระยะ Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอนที่ 3 ระยะ Annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.45 นาที ขั้นตอนที่ 4 ระยะ Extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ และขั้นตอนสุดท้ายระยะ Final Extention อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1) ขั้นตอนการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA

นำชิ้นส่วนของ 16s rDNA มาหาลำดับเบส (DNA sequencing) โดยใช้ชุดทำปฏิกิริยา ABI PRISM Big Dye Terminator cycle sequencing version 3.1 แล้วนำเข้าเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (ABI PRISM modle 310 Genetic Analyzer) โดยใช้ไพรเมอร์ 27F : 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' และ 530R : 5'-GGCAGAATGGTAACACCAGAGT-3' (Lane, 1991) และนำมาวิเคราะห์และแก้ไขโดยใช้โปรแกรม Bioedit และเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอที่ได้กับลำดับดีเอ็นเอที่มีในฐานข้อมูลออนไลน์จาก Gene Bank ว่า 16s rDNA ดังกล่าวใกล้เคียงกับ 16s rDNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ใดในฐานข้อมูล

3.2.5 ศึกษารูปแบบการเจริญและการสร้างกรดของแบคทีเรียแลคติก

ศึกษารูปแบบการเจริญและการสร้างกรดของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ เพื่อคำนวณหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติก เพื่อหมักให้ได้กรดแลคติกสูงที่สุดโดยใช้เวลาน้อยที่สุด โดยนำแบคทีเรียแลคติกรหัสที่ทดสอบแล้วว่าสร้างกรดแลคติก ชนิด L(+) ได้สูง ลงเลี้ยงในหลอดอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จึงนำมาปรับปริมาณเชื้อด้วยการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD = 0.5 จากนั้นปิเปตเซลล์แขวนลอยที่ปรับความขุ่นแล้วปริมาตรร้อยละ 1 (v/v) ลงในอาหารแหลว MRS และ MRS ดัดแปลง ที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับร้อยละ 2 ปริมาตร 300 มิลลิลิตรและบรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเก็บผลทุกๆ 4 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการเจริญของแบคทีเรียแลคติกโดยวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียแลคติกด้วยวิธี Total viable plate count และนำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่เก็บได้มาตกตะกอนด้วยเครื่องเซนตริฟิวซ์ที่ 1000*g* เป็นเวลา 2 นาที และแยกสารละลายส่วนใสมาวิเคราะห์ดังนี้

- วิเคราะห์ค่า pH ด้วยเครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (Metrohm, 713)
- วัดปริมาณกรดทั้งหมดด้วยวิธีไตเตรชั่นตามวิธี AOAC. (1990) (ภาคผนวก ข)
- วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-Sulfuric acid method ตามวิธีการของ (Dubios et al., 1956) (ภาคผนวก ข)
- วิเคราะห์ไอโซเมอร์และปริมาณของกรดแลคติกด้วยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข)

3.2.6 วิเคราะห์องค์ประกอบของแหล่งอาหารทดแทน

นำตัวอย่างอาหารทดแทน ได้แก่ กากน้ำตาล fish hydrolysate, whey, corn steep liquor และ soybean meal มาวิเคราะห์คุณสมบัติและองค์ประกอบ ดังนี้

1. วิเคราะห์ค่า pH ด้วยเครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (Metrohm, 713)
2. ปริมาณโปรตีนและปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธี Kjeldahl method (ภาคผนวก ข)
3. วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-Sulfuric acid method (Dubios et al., 1956) (ภาคผนวก ข)
4. ปริมาณเถ้าตามวิธีการ AOAC (1990) (ภาคผนวก ข)

ผลการวิเคราะห์ที่ได้ จะใช้ประกอบในการเลือกชนิดแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมเพียง 1 ชนิด จากทั้งหมดที่จะทดสอบคือ fish hydrolysate, whey, corn steep liquor และ soybean meal คือมีปริมาณโปรตีนมากเพียงพอและมีราคาถูกเพื่อใช้ทดแทนในอาหารกากน้ำตาลต่อไป

3.2.7 การคัดเลือกและทดสอบปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ทดแทนในอาหารกากน้ำตาล

3.2.7.1 ศึกษาและคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนที่ส่งเสริมการผลิตกรดแลคติก โดยการทดลองแบบ Plackett-Burman factorial design

ในการศึกษาผลกระทบของแหล่งไนโตรเจนซึ่งได้แก่ fish hydrolysate, peptone, beef extract และ yeast extract ในอาหารสูตรกากน้ำตาล เพื่อที่จะคัดเลือกหาแหล่งไนโตรเจนที่ส่งเสริมการผลิตกรดแลคติก โดยวางแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman factorial design (Draper, 1988) ซึ่งประกอบด้วย 4 ปัจจัย คือ fish hydrolysate, peptone, beef extract และ yeast extract โดยแต่ละปัจจัยได้กำหนดให้มี 3 ระดับ คือ -1, +1 และค่ากลาง (0) ดังตารางที่ 3.2 ซึ่งจะทำให้ได้ชุดทดลองจำนวน 15 ชุดทดลอง ดังตารางที่ 3.3

ตารางที่ 3. 2 ปัจจัยและระดับของปัจจัยในการทดลองแบบ Plackett-Burman factorial design

Independent Factor	Level		
	-1	**0**	**+1**
Fish hydrolysate (g/L)	1.5	8.25	15
Peptone (g/L)	1.0	5.5	10
Beef extract (g/L)	1.0	5.5	10
Yeast extract (g/L)	0.5	2.75	5

วิธีการทดลอง นำแบคทีเรียแลคติกรหัสที่ทดสอบแล้วว่าสร้างกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) ได้สูง ลงเลี้ยงในหลอดอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง ก่อนนำมาปรับปริมาณเชื้อด้วยการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วย spectrophotometer ที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD = 0.5 จากนั้นปิเปตเซลล์แขวนลอยที่ปรับความขุ่นแล้วในปริมาณร้อยละ 1 (v/v) เติมลงในฟลาสขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวกากน้ำตาลสูตรทดแทนต่างๆ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ตารางที่ 3.3) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการเติมอากาศ เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 1000*g* เป็นเวลา 2 นาที และแยกสารละลายส่วนใสมาวิเคราะห์หากรดทั้งหมดด้วยวิธีไตเตรชั่น (AOAC,1990) (ภาคผนวก ข) วัดปริมาณน้ำตาลตามวิธีการของ (Dubios et al., 1956) (ภาคผนวก ข) และวิเคราะห์ปริมาณของกรดแลคติกและชนิดของไอโซเมอร์ด้วยเครื่อง HPLC

ตารางที่ 3. 3 แผนผังการแปรผันแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารกากน้ำตาล โดยการทดลองแบบ Plackett-Burman factorial design

Run order	Fish hydrolysate	Peptone	Beef extract	Yeast extract
1	15 (+)	10 (+)	1.0 (-)	5.0 (+)
2	1.5 (-)	10 (+)	10 (+)	0.5 (-)
3	15 (+)	1.0 (-)	10 (+)	5.0 (+)
4	1.5 (-)	10 (+)	1.0 (-)	5.0 (+)
5	1.5 (-)	1.0 (-)	10 (+)	0.5 (-)
6	1.5 (-)	1.0 (-)	1.0 (-)	5.0 (+)
7	15 (+)	1.0 (-)	1.0 (-)	0.5 (-)
8	15 (+)	10 (+)	1.0 (-)	0.5 (-)
9	15 (+)	10 (+)	10 (+)	0.5 (-)
10	1.5 (-)	10 (+)	10 (+)	5.0 (+)
11	15 (+)	1.0 (-)	10 (+)	5.0 (+)
12	1.5 (-)	1.0 (-)	1.0 (-)	0.5 (-)
13	8.25 (0)	5.5 (0)	5.5 (0)	2.75 (0)
14	8.25 (0)	5.5 (0)	5.5 (0)	2.75 (0)
15	8.25 (0)	5.5 (0)	5.5 (0)	2.75 (0)

3.2.7.2 การทดสอบปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมต่อการหมักกรดแลคติกด้วยทดลองแบบ Central Composite Designs (CCD)

เพื่อแปรผันปริมาณสารอาหารเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกได้สูงในเวลาที่เร็วที่สุด และใช้ปริมาณสารอาหารน้อยที่สุด โดยวางแผนการทดลองแบบ Central composite designs (CCD) โดยในชุดการทดลอง ได้ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนน้ำตาลกลูโคส และใช้แหล่งไนโตรเจนที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก ที่ได้จากการวางแผนการทดสอบจากการทดลองแบบ Plackett-Burman factorial design (ข้อ 3.2.7.1) โดยแบ่งระดับของปัจจัยหรือความเข้มข้นของปหล่งไนโตรเจนออกเป็น 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ (low, –1) ระดับกลาง (medium, 0) และระดับสูง (high , +1) และ + α โดยกำหนดให้ $\alpha = 2$ (Myer and Montgomery, 2002) ดังตารางที่ 3.4 ซึ่งจะทำให้ได้ชุดการทดลองทั้งหมด 50 ชุดทดลอง ดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3. 4 ปัจจัยและระดับของปัจจัยในการวางแผนการทดลองแบบ Central composite designs (CCD)

Factors	Levels				
	-α	**-1**	**0**	**+1**	**+α**
Molasses (g/L)	20	30	40	50	60
Fish hydrolysate (g/L)	15	25	35	45	55
Peptone (g/L)	2.5	5	7.5	10	12.5
Beef extract (g/L)	2.5	5	7.5	10	12.5
Yeast extract (g/L)	0.5	2	3.5	5	6.5

วิธีการทดลอง นำแบคทีเรียแลคติกรหัสที่ทดสอบแล้วว่าสร้างกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) ได้สูง ลงเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 15 ชั่วโมง จึงปรับปริมาณเซลล์ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD = 0.5 จากนั้นปิเปตเซลล์แขวนลอยที่ปรับความขุ่นแล้วปริมาณร้อยละ 1 (v/v) ใส่ลงในฟลาสขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวกากน้ำตาลสูตรทดแทนต่างๆ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ดังแสดงตารางที่ 3.5 จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการให้อากาศ เมื่อครบ 21 ชั่วโมง ตกตะกอนเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 1000*g* เป็นเวลา 2 นาที แล้วแยกสารละลายส่วนใสมาวิเคราะห์

ปริมาณกรดทั้งหมดด้วยวิธีไตเตรชั่นตามวิธีการ AOAC. (1990) (ภาคผนวก ข) วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-Sulfuric acid method (Dubios et al., 1956) และวิเคราะห์ปริมาณของกรดแลคติกและชนิดของไอโซเมอร์ด้วยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข)

ตารางที่ 3. 5 แผนผังการแปรผันแหล่งไนโตรเจนในอาหารกากน้ำตาล โดยวางแผนการทดลองแบบ Central composite designs (CCD)

Run Order	**Factors**				
	Molasses (g/L)	**Fish hydrolysate (g/L)**	**Yeast extract (g/L)**	**Peptone (g/L)**	**Beef extract (g/L)**
1	40.0	35.0	3.5	7.5	7.5
2	50.0	45.0	5.0	5.0	5.0
3	40.0	35.0	6.5	7.5	7.5
4	20.0	35.0	3.5	7.5	7.5
5	30.0	45.0	2.0	10.0	5.0
6	30.0	25.0	5.0	10.0	10.0
7	50.0	25.0	2.0	10.0	5.0
8	30.0	45.0	5.0	10.0	10.0
9	30.0	45.0	2.0	5.0	5.0
10	40.0	35.0	3.5	7.5	7.5
11	40.0	35.0	3.5	7.5	7.5
12	30.0	25.0	5.0	10.0	5.0
13	50.0	25.0	2.0	5.0	10.0
14	30.0	25.0	5.0	5.0	5.0
15	40.0	35.0	3.5	12.5	7.5
16	40.0	35.0	3.5	7.5	7.5
17	30.0	25.0	2.0	10.0	5.0
18	50.0	45.0	2.0	5.0	10.0
19	30.0	25.0	2.0	10.0	10.0
20	40.0	35.0	3.5	7.5	2.5
21	40.0	35.0	3.5	7.5	7.5
22	30.0	45.0	5.0	10.0	5.0
23	30.0	45.0	5.0	5.0	5.0
24	50.0	45.0	5.0	5.0	10.0
25	50.0	45.0	5.0	10.0	10.0
26	50.0	45.0	2.0	10.0	10.0
27	40.0	35.0	0.5	7.5	7.5

ตารางที่ 3.5 แผนผังสิ่งทดลองในการวางแผนการทดลองแบบ Central composite designs (CCD) (ต่อ)

Run Order	Factor				
	Molasses (g/L)	**Fish hydrolysate (g/L)**	**Yeast extract (g/L)**	**Peptone (g/L)**	**Beef extract (g/L)**
28	40.0	15.0	3.5	7.5	7.5
29	40.0	35.0	3.5	7.5	7.5
30	30.0	45.0	5.0	5.0	10.0
30	30.0	45.0	5.0	5.0	10.0
31	50.0	45.0	2.0	10.0	5.0
32	40.0	35.0	3.5	7.5	7.5
33	50.0	25.0	5.0	5.0	10.0
34	60.0	35.0	3.5	7.5	7.5
35	30.0	45.0	2.0	10.0	10.0
36	40.0	55.0	3.5	7.5	7.5
37	50.0	25.0	5.0	10.0	5.0
38	50.0	25.0	2.0	10.0	10.0
39	30.0	45.0	2.0	5.0	10.0
40	30.0	25.0	5.0	5.0	10.0
41	30.0	25.0	2.0	5.0	5.0
42	30.0	25.0	2.0	5.0	10.0
43	50.0	25.0	5.0	5.0	5.0
44	50.0	25.0	5.0	10.0	10.0
45	40.0	35.0	3.5	7.5	7.5
46	40.0	35.0	3.5	7.5	12.5
47	50.0	45.0	2.0	5.0	5.0
48	40.0	35.0	3.5	2.5	7.5
49	50.0	45.0	5.0	10.0	5.0
50	50.0	25.0	2.0	5.0	5.0

3.2.7.3 การทดสอบความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

ทำการทดลองเพื่อยืนยันผลการทำนายของสูตรอาหารที่มีความเหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกที่ได้จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (ข้อ 3.2.7.2) โดยแบคทีเรียแลคติกรหัสที่ทดสอบแล้วว่าสร้างกรดแลคติกไฮโวเมอร์ L(+) ได้สูง ลงเลี้ยงในหลอดอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 15 ชั่วโมง จึงปรับปริมาณเชื้อด้วยการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD = 0.5 จากนั้นปิเปตเซลล์แขวนลอยที่ปรับความขุ่นแล้วมาปริมาณร้อยละ 1 (v/v) ลงในฟลาสขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลวกากน้ำตาลสูตรที่ได้จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในข้อ 3.2.7.2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการให้อากาศ เมื่อครบ 21 ชั่วโมง ตกตะกอนด้วยเครื่องเซนตริฟิวซ์ที่ 1000*g* เป็นเวลา 2 นาที และแยกสารละลายส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดด้วยวิธีไตเตรชั่นตามวิธีการ AOAC. (1990) (ภาคผนวก ข) วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-Sulfuric acid method ตามวิธีการของ (Dubios et al., 1956) (ภาคผนวก ข) และวิเคราะห์ปริมาณของกรดแลคติกและชนิดของไอโซเมอร์ด้วยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) และเปรียบเทียบค่าที่ได้จริงจากการทดลองกับค่าทำนายที่ได้จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

3.2.8 ศึกษากระบวนการหมักกรดแลคติกแบบกะ

หมักกรดแลคติกแบบกะของแบคทีเรียแลคติกรหัสที่ทดสอบแล้วว่าสร้างกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) ได้สูง (ข้อ 3.2.2) โดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสม ซึ่งได้จากการทดลอง (ข้อ 3.2.7.3) ในถังหมัก (Biostat B) ขนาด 2 ลิตร (รูปที่ 3.1) โดยใช้ปริมาณอาหาร 1.5 ลิตร อัตราการกวน 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในการหมักได้เปรียบเทียบสภาวะไร้อากาศ (anaerobic) และสภาวะมีอากาศเล็กน้อย (microaerophilic) โดยเติมอากาศ (air) ในอัตรา 0.5 vvm ในระหว่างการหมัก และเก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมงเพื่อวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้

- วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดด้วยวิธีไตเตรชั่นตามวิธี AOAC. (1990) (ภาคผนวก ข)
- วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-Sulfuric acid ตามวิธีการของ (Dubios et al., 1956)
- วิเคราะห์ปริมาณและไอโซเมอร์ของกรดแลคติกด้วยเครื่อง HPLC (วิธีการภาคผนวก ข)
- วิเคราะห์การเจริญของแบคทีเรียแลคติกด้วยวิธี total viable plate count ด้วยอาหาร MRS (ภาคผนวก ข)

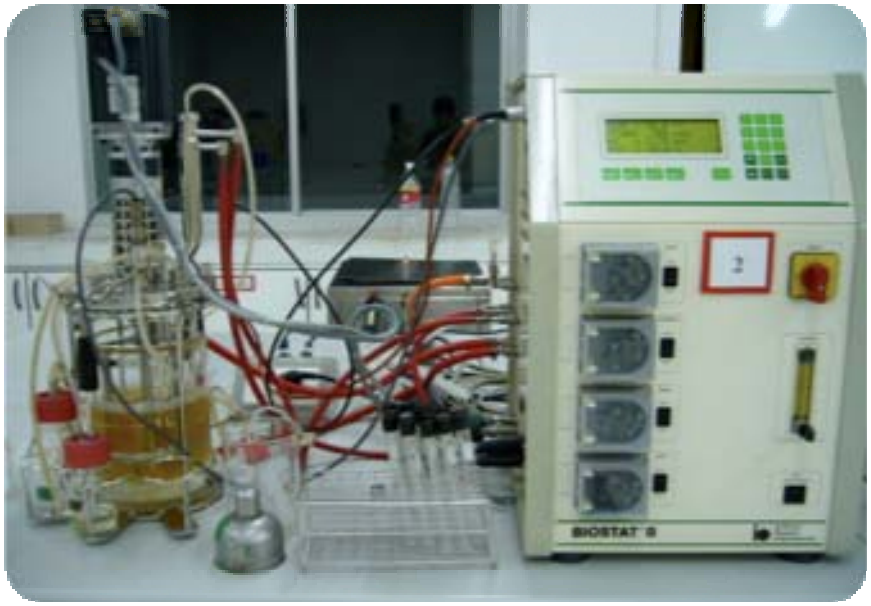
ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ นำมาคำนวณหาอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด specific growth rate (μ_{max}) เพื่อใช้เป็นข้อมูลในกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องต่อไป

3.2.9 การศึกษากระบวนการผลิตกรดแลคติกแบบต่อเนื่อง

ใช้ค่า specific growth rate (μ_{max}) ที่ได้จากข้อ 3.2.8 มาใช้ในเจือจางอาหารในการหมักแบบต่อเนื่อง โดยแปรผันอัตราการเจือจาง (dilution rate, D) ที่อัตราต่างๆ ตั้งแต่ 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 h^{-1} โดยใช้อาหารสูตรที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 3.2.7.3 ปริมาตร 1.5 ลิตร ในถังหมัก (Biostat B) ขนาด 2 ลิตร อัตราการกวน 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อการเจริญเข้าสู่ statonary phase จึงเริ่มเจือจางอาหารที่อัตรา 0.2 h^{-1} เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชั่วโมง จนเข้าสู่สภาวะคงที่ (steady state) และเก็บต่อเนื่องเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 3 residence times ก่อนที่จะเพิ่ม dilution rate เป็น 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 h^{-1} ตามลำดับ เก็บตัวอย่างและทำการวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้

- วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดด้วยวิธีไตเตรชั่นตามวิธี AOAC. (1990) (ภาคผนวก ข)
- วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-Sulfuric acid method ตามวิธีการของ (Dubios et al., 1956) (ภาคผนวก ข)
- วิเคราะห์ปริมาณและไอโซเมอร์ของกรดแลคติกด้วยเครื่อง HPLC (วิธีการภาคผนวก ข)
- วิเคราะห์อัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกด้วยวิธี total viable plate count ด้วยอาหาร MRS

นำผลที่ได้จากการวิเคราะห์มาคำนวณหาค่า yield, productivity, growth rate และเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อที่อัตราการเจือจางอาหาร (dilution rate, D) ต่างๆกัน



รูปที่ 3. 1 ถังหมักควบคุม B-Bruan, Biostat® B ขนาด 2 ลิตร

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์

งานวิจัยนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ตอน ตอนแรกเป็นการคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถใช้กากน้ำตาลซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำตาลซูโครสได้ดี และผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) ไอโซเมอร์ได้สูง ขั้นตอนที่สองเป็นการพิสูจน์เอกลักษณ์สายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ ตอนที่สามเป็นการนำวิธีการทางสถิติมาใช้ในการวางแผนเพื่อปรับปรุงสูตรอาหาร MRS โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้ fish hydrolysate เป็นแหล่งไนโตรเจน มาทดแทนวัตถุดิบเดิมที่มีราคาสูง และเมื่อได้สูตรอาหารที่เหมาะสมและมีราคาถูกสำหรับผลิตกรดแลคติกแล้ว ขั้นตอนที่สี่คือการนำแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มาหมักกรดแลคติกในอาหารปรับปรุงมาด้วยกระบวนการหมักแบบกะและแบบต่อเนื่อง เพื่อต้องการเพิ่มอัตราการผลิตกรดแลคติกให้สูงขึ้นและเพื่อแก้ปัญหาการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากปริมาณวัตถุดิบเข้มข้นสูงในช่วงแรกและจากการสะสมของผลผลิตกรดแลคติกที่เพิ่มขึ้น

4.1 ผลการคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สร้างกรดแลคติกได้สูง

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองประเภทเนื้อ นม แป้ง ผักและผลไม้ นำมาคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจนได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อบริสุทธิ์มาย้อมแกรมและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศ์เพื่อหารูปร่างและการติดสีแกรม ทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase และการหมักในอาหารเหลว MRS เพื่อคัดแยกเอาเฉพาะแบคทีเรียแลคติกชนิด Homofermentative ตามวิธีการดังข้อ 3.2.1 ผลจากการสุ่มเก็บตัวอย่างสามารถคัดแยกจนได้เชื้อแบคทีเรียแลคติกจำนวน 460 ไอโซเลท จึงได้กำหนดรหัสเชื้อ และนำไปทดสอบการสร้างกรดแลคติกที่อุณหภูมิ 37 และ 42 องศาเซลเซียสต่อไป

4.1.1 ผลการทดสอบการสร้างกรดของแบคทีเรียแลคติกที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เนื่องจากงานวิจัยนี้ต้องการใช้กากน้ำตาลซึ่งมีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบหลัก เป็นวัตถุดิบผลิตกรดแลคติก ในขั้นตอนนี้จึงได้ทดสอบการสร้างกรดของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ทั้งหมด 460 ไอโซเลทในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลงที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลในปริมาณที่มีน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับสูตรอาหาร MRS เดิมคือเท่ากับร้อยละ 2 โดยทดสอบในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณอาหาร 10 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 4.1 และจากผลการทดสอบ พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่สร้างกรดแลคติกได้สูงกว่า 20 กรัม/ลิตร มีทั้งหมด 117 ไอโซเลท จึงนำแบคทีเรียแลคติกรหัสต่างๆ ทั้ง 117 ไอโซเลทดังกล่าวนี้ไปทดสอบการสร้างกรดที่อุณหภูมิสูงขึ้นคือ 42 องศาเซลเซียส ต่อไป

ตารางที่ 4. 1 น้ำหนักเซลล์แห้ง(g/L) และปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติก (g/L) ของแบคทีเรียแลคติกรหัสต่างๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง ที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลในปริมาณที่มีน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับร้อยละ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง

Isolates	**Dry weight (g/L)**	**Total acid (g/L)**	**Isolates**	**Dry weight (g/L)**	**Total acid (g/L)**
P1012	2.57±0.95	1.50±0.52^{o}	K54	1.43±0.11	6.61±0.52^{n}
RB 6-1	1.78±0.04	3.00±1.04^{o}	RB 1-6	2.72±0.25	6.61±1.38^{n}
P109	1.78±0.04	3.00±1.38^{o}	P72	2.48±0.25	6.64±1.33^{n}
G1	1.28±0.39	3.30±0.52^{o}	KB31	1.75±0.14	8.41±0.52^{mn}
P142	3.60±0.42	3.30±0.52^{o}	RB 1-7	1.53±0.32	8.41±1.38^{mn}
P101	1.67±0.04	3.30±1.04^{o}	PV102	2.13±0.25	9.01±0.00^{m}
P108	2.55±0.71	3.30±1.38^{o}	P3.3	2.92±0.00	9.01±0.00^{m}
P1011	1.45±0.14	3.60±0.00^{o}	P1.4	3.15±0.14	9.01±0.00^{m}
P139	1.55±0.21	3.60±0.90^{o}	B17.2	2.85±0.21	9.01±0.00^{m}
P107	2.13±0.74	3.90±0.52^{no}	P14.2	3.15±0.14	9.01±1.27^{m}
P116	1.73±0.04	3.90±1.38^{no}	P75	1.20±0.57	9.01±1.56^{m}
T3-0-02	2.70±0.07	4.20±0.52^{no}	W9-1	3.18±0.46	9.46±0.64^{m}
KB14	2.15±0.00	4.20±1.04^{no}	SB19-1	2.35±0.07	9.46±0.64^{m}
PB104	1.55±0.21	4.50±0.00^{no}	P34.2	1.62±0.18	9.46±0.64^{m}
E1	1.00±0.07	4.50±0.90^{no}	K29	2.12±0.11	9.61±1.38^{m}
P133	1.50±0.28	4.50±0.90^{no}	KN11	1.43±0.32	9.61±1.38^{m}
KC31	1.05±0.35	5.10±0.52^{no}	SB12-3	1.33±0.53	9.91±0.00^{lm}
Y3	1.95±0.64	5.10±0.52^{no}	P2.4	1.07±0.03	9.91±0.00^{lm}
E2	0.93±0.11	5.40±0.00^{no}	B21.31	3.03±0.25	9.91±0.00^{lm}
RB 7-1	1.95±0.35	5.40±0.90^{no}	B24	3.15±0.21	9.91±0.00^{lm}
M2-1	3.15±0.14	6.31±0.00^{n}	K68	3.13±0.04	9.91±0.90^{lm}
RB 1-5	2.94±0.00	6.31±0.90^{n}	K210	2.53±0.00	9.91±0.90^{lm}
RB 1-4	2.25±0.11	6.31±0.90^{n}	PB102	2.85±0.21	10.21±1.04^{lm}

อักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan ด้วยโปรแกรม SPSS

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง(g/L) และปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติก (g/L) ของแบคทีเรียแลคติกรหัสต่างๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง ที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลในปริมาณที่มีน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับร้อยละ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง (ต่อ)

Isolates	Dry weight (g/L)	Total acid (g/L)	Isolates	Dry weight (g/L)	Total acid (g/L)
V16.1	2.21±0.62	10.36±0.64^{lm}	P20.12	3.15±0.42	11.11±0.52^{klm}
SW2-1	3.22±0.32	10.36±0.64^{lm}	K28	1.32±0.04	11.11±1.04^{klm}
SB36-4	3.27±0.39	10.36±0.64^{lm}	K51	2.27±0.11	11.11±1.38^{klm}
SB18-4	2.35±0.07	10.36±0.64^{lm}	V9.4	3.28±0.46	11.26±0.64^{kl}
SB18-31	3.20±0.00	10.36±0.64^{lm}	SW2-5	2.43±0.32	11.26±0.64^{kl}
SB14-4	3.40±0.28	10.36±0.64^{lm}	SW2-4	2.73±0.04	11.26±0.64^{kl}
P5	3.05±0.49	10.36±0.64^{lm}	SP96	1.33±0.53	11.26±0.64^{kl}
P1.7	3.03±0.18	10.36±0.64^{lm}	SP87	1.82±1.80	11.26±0.64^{kl}
B21.4	3.13±0.60	10.36±0.64^{lm}	SP84	3.15±0.14	11.26±0.64^{kl}
B11	1.44±0.00	10.36±0.64^{lm}	SP79	3.18±0.00	11.26±0.64^{kl}
B22.4	2.82±0.00	10.36±0.64^{lm}	SP62	2.68±0.11	11.26±0.64^{kl}
P37	2.05±1.28	10.51±0.52^{lm}	S23-1	3.05±0.35	11.26±0.64^{kl}
KH21	2.88±0.04	10.51±1.04^{lm}	S19.1	3.15±0.14	11.26±0.64^{kl}
K58	2.95±0.07	10.51±1.04^{lm}	PV17	1.95±0.07	11.26±0.64^{kl}
PV1	1.67±0.46	10.81±0.00^{lm}	PV13	3.35±0.78	11.26±0.64^{kl}
SS16-1	2.20±0.42	10.81±0.00^{lm}	PK8	2.07±0.25	11.26±0.64^{kl}
SB23-5	2.67±0.04	10.81±0.00^{lm}	PK7	3.40±0.21	11.26±0.64^{kl}
SB23-3	2.53±0.04	10.81±0.00^{lm}	PK6	2.70±0.71	11.26±0.64^{kl}
SB18-1	2.75±0.00	10.81±0.00^{lm}	PK20	3.28±0.46	11.26±0.64^{kl}
PV16	2.15±0.57	10.81±0.00^{lm}	PK2	2.88±0.04	11.26±0.64^{kl}
PV15	2.98±0.25	10.81±0.00^{lm}	PK19	3.23±0.11	11.26±0.64^{kl}
PK18	2.10±0.49	10.81±0.00^{lm}	PK17	2.27±1.24	11.26±0.64^{kl}
P7	2.15±0.07	10.81±0.00^{lm}	PK16	2.35±0.07	11.26±0.64^{kl}
S13.32	2.70±0.14	11.11±0.52^{klm}	PK13	3.30±0.42	11.26±0.64^{kl}
P26.11	2.23±0.53	11.11±0.52^{klm}	PK12	2.13±0.18	11.26±0.64^{kl}

อักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan ด้วยโปรแกรม SPSS

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง(g/L) และปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติก (g/L) ของแบคทีเรียแลคติกรหัสต่างๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง ที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลในปริมาณที่มีน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับร้อยละ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง (ต่อ)

Isolates	Dry weight (g/L)	Total acid (g/L)	Isolates	Dry weight (g/L)	Total acid (g/L)
PK11	2.75±0.14	11.26±0.64^{kl}	P3.4	3.30±0.42	11.71±0.00^{kl}
P25.2	2.35±0.07	11.26±0.64^{kl}	P2	2.81±0.00	11.71±0.00^{kl}
B43.1	2.37±0.39	11.26±0.64^{kl}	P16.1	2.60±0.07	11.71±0.00^{kl}
B22.1	1.12±0.32	11.26±0.64^{kl}	K38	2.36±0.00	11.71±0.00^{kl}
B21	2.27±0.11	11.26±0.64^{kl}	K53	1.98±0.04	11.71±0.90^{kl}
SP103	3.73±0.88	11.26±0.64^{kl}	G2	2.57±0.18	11.71±0.90^{kl}
PK4	2.78±0.74	11.26±0.64^{kl}	F6	3.20±0.35	11.71±0.90^{kl}
V21.3	3.45±0.35	11.41±0.52^{kl}	SP75	2.67±0.39	11.71±1.27^{kl}
FP101	2.12±0.11	11.41±1.04^{kl}	SP106	2.36±0.00	11.71±1.27^{kl}
BS101	2.70±0.42	11.41±1.04^{kl}	SB22-5	2.92±0.00	11.71±1.27^{kl}
K26	1.64±0.00	11.41±1.38^{kl}	SB19-2	2.83±0.07	11.71±1.27^{kl}
K10	2.55±0.49	11.41±1.88^{kl}	SB18-3	3.15±0.14	11.71±1.27^{kl}
SW7-2	3.10±6.08	11.71±0.00^{kl}	SW7-4	2.80±0.07	12.16±0.64^{jkl}
SW7-1	2.75±0.49	11.71±0.00^{kl}	SP99	3.15±0.14	12.16±0.64^{jkl}
SW5-1	3.05±0.49	11.71±0.00^{kl}	SP86	3.05±0.35	12.16±0.64^{jkl}
SW22-7	2.68±0.00	11.71±0.00^{kl}	SP71	3.24±0.00	12.16±0.64^{jkl}
SS17-3	2.48±0.81	11.71±0.00^{kl}	SP117	3.28±0.46	12.16±0.64^{jkl}
SS16-2	3.62±0.74	11.71±0.00^{kl}	SP105	2.22±0.46	12.16±0.64^{jkl}
SP85	2.67±0.18	11.71±0.00^{kl}	SP104	3.12±0.46	12.16±0.64^{jkl}
SP137	2.92±0.00	11.71±0.00^{kl}	SP101	3.28±0.46	12.16±0.64^{jkl}
S35.2	3.95±0.00	11.71±0.00^{kl}	PK1	1.33±0.53	12.16±0.64^{jkl}
PV10	2.67±0.00	11.71±0.00^{kl}	P9	1.67±0.07	12.16±0.64^{jkl}
PK9	0.92±0.00	11.71±0.00^{kl}	B44.1	1.55±0.78	12.16±0.64^{jkl}
PK3	2.90±0.00	11.71±0.00^{kl}	B20.1	1.90±1.06	12.16±0.64^{jkl}
PK14	3.48±0.53	11.71±0.00^{kl}	B2	1.80±0.21	12.16±0.64^{jkl}
PK10	2.83±0.39	11.71±0.00^{kl}	SP102	2.92±0.00	12.16±0.64^{jkl}

อักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan ด้วยโปรแกรม SPSS

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง(g/L) และปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติก (g/L) ของแบคทีเรียแลคติกรหัสต่างๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง ที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลในปริมาณที่มีน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับร้อยละ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง (ต่อ)

Isolates	Dry weight (g/L)	Total acid (g/L)	Isolates	Dry weight (g/L)	Total acid (g/L)
SP100	1.98±1.23	12.16±0.64^{jkl}	SP11-4	2.67±0.46	13.06±0.64^{ik}
K14	2.43±0.18	12.24±1.29^{jkl}	SB20-4	3.03±0.25	13.06±0.64^{ik}
V12.1	2.40±0.35	12.39±1.35^{jkl}	SB20-2	2.20±0.14	13.06±0.64^{ik}
V1	2.10±0.85	12.61±0.00^{jkl}	S22.1	1.98±0.25	13.06±0.64^{ik}
P34.1	1.67±0.18	12.61±0.00^{jkl}	SW23-2	2.15±0.78	13.06±0.64^{ik}
SV17-1	3.00±0.71	12.61±0.00^{jkl}	SP12-4	1.48±0.18	13.06±0.64^{ik}
SP122	1.73±0.04	12.61±0.00^{jkl}	SP136	1.72±0.1	13.06±1.88^{ik}
SB34-1	2.20±0.07	12.61±0.00^{jkl}	RB 8-9	1.73±0.29	13.21±1.38^{ijk}
SB21-2	2.40±0.00	12.61±0.00^{jkl}	RB 6-5	2.03±0.11	13.21±1.38^{ijk}
SB15-4	2.83±0.25	12.61±0.00^{jkl}	SW5-4	0.78±0.04	13.51±0.00^{ijk}
S55.3	3.30±0.57	12.61±0.00^{jkl}	SP8-7	1.53±0.04	13.51±0.00^{ijk}
S54.3	3.15±0.14	12.61±0.00^{jkl}	SP134	0.73±0.11	13.51±0.00^{ijk}
S54.2	3.15±0.28	12.61±0.00^{jkl}	SP127	1.35±0.14	13.51±0.00^{ijk}
S36.1	2.36±0.00	12.61±0.00^{jkl}	SP118	0.80±0.00	13.51±0.00^{ijk}
S35.5	2.90±0.07	12.61±0.00^{jkl}	SP115	0.28±0.04	13.51±0.00^{ijk}
B22.51	3.22±0.11	12.61±0.00^{jkl}	SB36-1	0.53±0.04	13.51±0.00^{ijk}
RB 6-6	3.09±0.00	12.61±0.90^{jkl}	SB21-1	1.12±0.25	13.51±0.00^{ijk}
SP98	2.60±0.28	12.61±1.27^{jkl}	SB19-3	0.26±0.00	13.51±0.00^{ijk}
SP8-5	2.32±0.04	12.61±1.27^{jkl}	S35.3	3.10±0.28	13.51±0.00^{ijk}
P3.1	1.70±0.21	12.61±1.27^{jkl}	SB15-1	2.82±0.39	13.51±1.27^{ijk}
P17.2	2.90±0.28	13.06±0.64^{ik}	RB 6-4	1.85±0.28	13.81±0.52^{ijk}
SW12-2	1.45±0.21	13.06±0.64^{jk}	P71	0.78±0.32	13.81±0.52^{ijk}
SP128	2.17±0.04	13.06±0.64^{ik}	KL26	0.80±0.28	13.81±0.52^{ijk}
SP125	3.35±0.64	13.06±0.64^{ik}	S6	2.20±0.07	13.87±1.37^{ijk}
SP119	2.13±0.25	13.06±0.64^{jk}	SB20-3	0.30±0.57	13.96±0.64^{ij}
SP110	1.62±0.04	13.06±0.64^{ik}	SB13-2	1.83±0.11	13.96±0.64^{ij}

อักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan ด้วยโปรแกรม SPSS

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง(g/L) และปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติก (g/L) ของแบคทีเรียแลคติกรหัสต่างๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง ที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลในปริมาณที่มีน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับร้อยละ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง (ต่อ)

Isolates	Dry weight (g/L)	Total acid (g/L)	Isolates	Dry weight (g/L)	Total acid (g/L)
B6	1.75±0.21	13.96±0.64^{ij}	KL22	2.40±0.14	14.71±0.52^{gij}
SP9-6	2.92±0.00	13.96±0.64^{ij}	KC33	2.73±0.11	14.71±0.52^{gij}
SP10-1	0.72±0.04	13.96±0.64^{ij}	KN24	2.48±0.11	14.71±1.04^{gij}
RB 6-3	2.38±0.00	14.11±0.52^{ij}	KB35	1.93±0.32	14.71±2.08^{gij}
KL23	2.12±0.11	14.11±1.04^{ij}	W4-5	2.22±0.32	14.86±0.64^{gij}
KN22	3.40±0.00	14.11±1.38^{ij}	SB35-2	2.43±0.39	14.86±0.64^{gij}
KL24	0.62±0.25	14.11±1.38^{ij}	B8	2.55±1.13	14.86±0.64^{gij}
V3.6	1.83±0.35	14.41±0.00^{gij}	RB 8-10	2.25±0.35	15.01±0.52^{gi}
SW7-3	1.20±0.00	14.41±0.00^{gij}	KB15	2.30±0.28	15.01±0.52^{gi}
SB36-2	1.60±0.14	14.41±0.00^{gij}	KL16	2.40±0.00	15.01±1.04^{gi}
SB13-3	2.23±0.18	14.41±0.00^{gij}	KC35	1.82±0.11	15.01±1.04^{gi}
S58.3	2.12±0.11	14.41±0.00^{gij}	SP17-1	2.60±0.28	15.31±0.00^{gi}
KL21	0.66±0.00	14.41±0.00^{gij}	KB33	1.73±0.04	15.31±0.00^{gi}
B1	0.63±0.39	14.41±0.00^{gij}	B25.2	2.20±0.07	15.31±0.00^{gi}
T3-2-01	1.32±0.18	14.41±0.90^{gij}	K610	1.67±0.18	15.31±0.90^{gi}
KB34	2.12±0.11	14.41±0.90^{gij}	KC37	2.32±0.04	15.31±0.90^{gi}
K510	1.28±0.39	14.41±0.90^{gij}	KL12	2.10±0.85	15.31±1.56^{gi}
W2-5	1.60±0.42	14.41±1.27^{gij}	SW1-5	3.00±0.71	15.31±4.71^{gi}
SW11-1	1.40±0.14	14.41±1.27^{gij}	KN25	1.98±0.25	15.61±0.52^{gi}
SP123	3.53±0.12	14.41±1.27^{gij}	KN21	2.15±0.78	15.61±0.52^{gi}
SP11-1	0.92±0.46	14.41±1.27^{gij}	RB 8-5	2.67±0.46	15.61±1.04^{gi}
SB22-6	0.71±0.00	14.41±1.27^{gij}	KC36	2.20±0.14	15.61±1.04^{gi}
SB14-3	2.25±0.07	14.41±1.27^{gij}	KC34	1.48±0.18	15.61±1.38^{gi}
SB35-4	3.58±0.00	14.41±2.55^{gij}	RB 8-2	3.03±0.25	15.61±1.88^{gi}
RB 6	2.45±0.07	14.71±0.52^{gij}	B18.1	1.62±0.04	15.76±0.64^{fgi}
KN23	1.28±0.11	14.71±0.52^{gij}	SW12-1	1.45±0.21	15.76±0.64^{fgi}

อักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan ด้วยโปรแกรม SPSS

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง(g/L) และปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติก (g/L) ของแบคทีเรียแลคติกรหัสต่างๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง ที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลในปริมาณที่มีน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับร้อยละ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง (ต่อ)

Isolates	Dry weight (g/L)	Total acid (g/L)	Isolates	Dry weight (g/L)	Total acid (g/L)
SS17-2	1.72±0.11	15.76±0.64^{fgi}	SB21-4	2.12±0.11	17.57±0.64^{ef}
P1.5	2.17±0.04	15.76±0.64^{fgi}	P2.5	2.20±0.07	17.57±0.64^{ef}
B7	3.35±0.64	15.76±0.64^{fgi}	B32.12	0.73±0.11	17.57±0.64^{ef}
B2.V2	2.13±0.25	15.76±0.64^{fgi}	B18.2	1.12±0.25	17.57±0.64^{ef}
RB 8-3	2.90±0.28	15.91±1.38^{fgi}	P1.1	0.63±0.39	17.79±1.35^{ef}
SB23-1	2.98±0.11	16.21±0.00^{fg}	SP17-2	3.43±0.18	17.79±5.47^{ef}
SB22-3	2.90±0.28	16.21±0.00^{fg}	SP130	0.80±0.00	18.02±0.00^{def}
RB 1-8	2.20±0.14	16.21±0.90^{fg}	SB18-5	3.53±0.12	18.02±0.00^{def}
SB 1-1	1.73±0.29	16.21±0.90^{fg}	S35.1	1.60±0.14	18.02±0.00^{def}
RB 8-4	2.03±0.11	16.21±0.90^{fg}	P3.2	2.13±0.25	18.02±0.00^{def}
V24.1	3.10±0.28	16.21±1.27^{fg}	P17.11	1.73±0.04	18.02±0.00^{def}
W2-1	2.40±0.00	16.21±2.65^{fg}	B32.11	1.75±0.21	18.02±0.00^{def}
RB 6-2	2.13±0.25	16.51±1.04^{fg}	SB23-4	1.93±0.32	18.02±1.27^{def}
KC32	1.48±0.18	16.51±2.08^{fg}	B2.21	3.03±0.25	18.02±1.27^{ef}
P2.3	3.10±0.28	16.66±0.64^{efg}	SS31-1	1.53±0.04	18.02±3.82^{def}
V16.2	2.32±0.04	16.66±0.64^{efg}	V22.2	0.26±0.00	18.32±0.52^{def}
S36.3	3.40±0.00	16.66±0.64^{efg}	S3	0.28±0.04	18.47±0.64^{def}
P3	0.28±0.04	16.66±0.64^{fg}	S23.1	2.20±0.07	18.47±0.64^{def}
SW1-2	2.10±0.85	16.66±7.30^{efg}	S2	2.03±0.11	18.47±0.64^{def}
SS16-3	2.30±0.28	17.12±0.00^{efg}	P8	0.30±0.57	18.47±0.64^{def}
P25-2	2.43±0.39	17.12±0.00^{efg}	P17.12	0.78±0.04	18.47±0.64^{def}
PK15	2.40±0.14	17.12±0.00^{efg}	B9	1.48±0.18	18.47±0.64^{def}
B21.22	2.23±0.18	17.12±0.00^{efg}	B10	2.92±0.00	18.47±0.64^{def}
RB 7-2	2.48±0.11	17.12±0.90^{efg}	V6.4	3.28±0.74	18.47±0.64^{def}
B21.1	3.03±0.25	17.12±1.27^{efg}	SP66	1.28±0.39	18.47±0.64^{def}
P17.3	3.23±0.18	17.12±2.55^{efg}	SP131	0.30±0.57	18.47±0.64^{def}

อักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan ด้วยโปรแกรม SPSS

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง(g/L) และปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติก (g/L) ของแบคทีเรียแลคติกรหัสต่างๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง ที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลในปริมาณที่มีน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับร้อยละ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง (ต่อ)

Isolates	Dry weight (g/L)	Total acid (g/L)	Isolates	Dry weight (g/L)	Total acid (g/L)
S5	0.78±0.32	18.47±0.64^{def}	SP109	1.35±0.14	19.82±0.00^{cd}
KB13	2.20±0.28	18.62±0.52^{de}	P16.2	0.80±0.00	19.82±0.00^{cd}
KN14	2.03±0.11	18.62±2.08^{de}	B4	0.53±0.04	19.82±0.00^{cd}
SP80	1.67±0.18	18.92±0.00^{cde}	B22	1.12±0.25	19.82±1.27^{cd}
S17.2	2.60±0.28	18.92±0.00^{cde}	P137	1.23±0.04	2.10±0.52^{o}
B5	2.20±0.07	18.92±0.00^{cde}	P114	2.13±0.04	2.10±1.04^{o}
V5.7	2.10±0.85	18.92±1.27^{cde}	P1313	1.98±0.18	2.40±0.52^{o}
SP65	3.00±0.71	18.92±1.27^{cde}	P1312	0.73±0.11	2.40±0.52^{o}
P1.2	1.73±0.04	18.92±1.27^{cde}	P115	2.87±1.03	2.40±0.52^{o}
B22.2	1.83±0.11	18.92±1.27^{cde}	RB 8-1	1.47±0.17	2.40±1.04^{o}
B20.2	1.60±0.42	18.92±1.27^{de}	P103	1.45±0.07	2.70±0.00^{o}
K35	2.67±0.46	19.22±0.52^{cde}	P1314	1.62±0.25	2.70±0.90^{o}
B18.32	1.98±0.25	19.22±0.52^{cde}	P104	1.90±0.21	2.70±1.80^{o}
B17.3	2.15±0.78	19.22±0.52^{cde}	K98	1.85±0.28	20.12±0.52^{bcd}
SP135	0.26±0.00	19.37±0.64^{cde}	K69	0.78±0.32	20.12±1.38^{bcd}
W4-1	2.82±0.39	19.37±0.64^{cde}	W4-3	3.00±0.71	20.27±0.64^{bcd}
V4.5	3.10±0.28	19.37±0.64^{cde}	V7.1	2.60±0.28	20.27±0.64^{bcd}
V24.2	1.73±0.29	19.37±0.64^{cde}	SW5-3	2.32±0.04	20.27±0.64^{bcd}
V11.2	1.45±0.21	19.37±0.64^{cde}	SW11-4	2.40±0.00	20.27±0.64^{bcd}
SP77	1.72±0.1	19.37±0.64^{cde}	SW1-3	1.82±0.11	20.27±0.64^{bcd}
P6	2.17±0.04	19.37±0.64^{cde}	SP129	2.12±0.11	20.27±0.64^{bcd}
B43.2	3.35±0.64	19.37±0.64^{cde}	SP124	1.28±0.39	20.27±0.64^{bcd}
B3	1.62±0.04	19.37±0.64^{cde}	SP107	0.63±0.39	20.27±0.64^{bcd}
W4-4	0.80±0.28	19.82±0.00^{cd}	SB16-2	2.38±0.00	20.27±0.64^{bcd}
W1-2	1.53±0.04	19.82±0.00^{cd}	SB14-5	2.12±0.11	20.27±0.64^{bcd}
V11.3	0.73±0.11	19.82±0.00^{cd}	SB14-1	0.72±0.04	20.27±0.64^{bcd}

อักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan ด้วยโปรแกรม SPSS

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง(g/L) และปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติก (g/L) ของแบคทีเรียแลคติกรหัสต่างๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง ที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลในปริมาณที่มีน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับร้อยละ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง (ต่อ)

Isolates	Dry weight (g/L)	Total acid (g/L)	Isolates	Dry weight (g/L)	Total acid (g/L)
P1.6	1.83±0.11	20.27±0.64^{bcd}	SB22-2	1.28±0.11	21.17±0.64^{abc}
B22.3	2.20±0.07	20.27±0.64^{bcd}	SB22-1	2.73±0.11	21.17±0.64^{abc}
SB16-1	0.62±0.25	20.27±1.16^{bcd}	SB16-5	1.83±0.35	21.17±0.64^{abc}
RB 4-9	1.98±0.25	20.42±0.52^{bcd}	SB16-4	1.32±0.18	21.17±0.64^{abc}
KN15	2.15±0.78	20.42±0.52^{bcd}	SB15-3	1.20±0.00	21.17±0.64^{abc}
KN13	1.67±0.18	20.42±2.08^{bcd}	SW4-6	1.40±0.14	21.17±0.64^{abc}
SW4-1	2.90±0.28	20.72±0.00^{bcd}	SS30-1	0.53±0.04	21.17±1.91^{abc}
SP8-6	1.72±0.11	20.72±0.00^{bcd}	SP9-8	0.26±0.00	21.17±1.91^{abc}
SB21-5	2.17±0.04	20.72±0.00^{bcd}	K12	0.80±0.28	21.32±0.52^{abc}
SB21-3	3.35±0.64	20.72±0.00^{bcd}	KL15	1.35±0.14	21.32±0.52^{abc}
KL14	2.67±0.46	20.72±0.00^{bcd}	KK29	0.28±0.04	21.32±0.52^{abc}
KK21	2.20±0.14	20.72±0.00^{bcd}	KL13	1.12±0.25	21.32±1.38^{abc}
SS22-4	1.45±0.21	20.72±1.27^{bcd}	K16	0.78±0.32	21.32±1.38^{abc}
SB14-6	1.62±0.04	20.72±1.27^{bcd}	RB 1-9	0.78±0.04	21.32±1.38^{abc}
RB 3-5	3.58±0.00	21.02±0.52^{abc}	K45	1.85±0.28	21.32±2.08^{abc}
K64	2.25±0.07	21.02±0.52^{abc}	SP12-5	2.12±0.11	21.62±0.00abc
KB12	1.73±0.29	21.02±0.52^{abc}	SP12-3	2.38±0.00	21.62±0.00abc
RB 2-4	0.71±0.00	21.02±1.04^{abc}	SB16-3	3.40±0.00	21.62±0.00^{abc}
K36	0.66±0.00	21.02±1.04^{abc}	KK17	0.72±0.04	21.62±0.00^{abc}
KK28	0.92±0.46	21.02±1.38^{abc}	KK15	1.75±0.21	21.62±0.00^{abc}
K37	2.12±0.11	21.02±1.38^{abc}	KH26	1.85±0.28	21.62±0.00^{abc}
SP121	2.82±0.39	21.17±0.64^{abc}	RB 3-4	1.35±0.14	21.62±0.00^{abc}
SP120	2.25±0.35	21.17±0.64^{abc}	SP10-3	0.80±0.00	21.62±0.00^{abc}
SP12-2	2.22±0.32	21.17±0.64^{abc}	SP10-2	0.53±0.04	21.62±0.00^{abc}
SP12-1	2.55±1.13	21.17±0.64^{abc}	RB 5-1	0.62±0.25	21.62±0.90^{abc}
SB35-3	2.45±0.07	21.17±0.64^{abc}	RB 4-3	2.92±0.00	21.62±0.90^{abc}

อักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan ด้วยโปรแกรม SPSS

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง(g/L) และปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติก (g/L) ของแบคทีเรียแลคติกรหัสต่างๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง ที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลในปริมาณที่มีน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับร้อยละ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง (ต่อ)

Isolates	Dry weight (g/L)	Total acid (g/L)	Isolates	Dry weight (g/L)	Total acid (g/L)
K95	0.80±0.28	21.62±0.90^{abc}	RB 2-3	3.53±0.12	22.22±0.52^{ab}
K92	0.78±0.04	21.62±0.90^{abc}	K93	2.13±0.25	22.22±0.52^{ab}
K43	0.73±0.11	21.62±0.90^{abc}	K102	1.75±0.21	22.22±0.52^{ab}
SP17-3	1.95±0.24	21.62±1.27abc	RB 4-8	3.03±0.25	22.22±0.52^{ab}
K46	1.53±0.04	21.62±1.80^{abc}	KH25	1.60±0.14	22.22±1.04^{ab}
K13	3.33±0.25	21.92±0.52ab	K59	1.73±0.04	22.22±1.88^{ab}
RB 3-1	3.28±0.74	21.92±0.52^{ab}	SW9-1	2.40±0.14	22.52±0.00^{ab}
KK26	1.28±0.39	21.92±0.52^{ab}	SS31-3	2.23±0.18	22.52±0.00^{ab}
K57	0.30±0.57	21.92±0.52^{ab}	SP9-4	3.03±0.25	22.52±0.00^{ab}
RB 4-1	2.20±0.07	21.92±0.52^{ab}	RB 1-3	1.53±0.04	22.52±0.00^{ab}
RB 3-6	1.83±0.11	21.92±0.52^{ab}	RB 3-8	3.10±0.28	22.52±0.90^{ab}
RB 3-7	2.03±0.11	21.92±1.04^{ab}	RB 3-2	2.32±0.04	22.52±0.90^{ab}
RB 2-1	1.60±0.42	21.92±1.04^{ab}	RB 2-2	0.26±0.00	22.52±0.90^{ab}
KK25	2.10±0.21	21.92±1.04^{ab}	KN16	0.80±0.00	22.52±0.90^{ab}
KH23	1.60±0.00	21.92±1.04^{ab}	SP11-3	3.23±0.18	22.52±1.27^{ab}
K41	3.60±0.21	21.92±1.04^{ab}	KL116	1.93±0.32	22.52±1.56^{ab}
RB 4-2	2.20±0.28	21.92±1.38^{ab}	RB 5-2	2.30±0.28	22.82±0.52^{ab}
RB 4-7	0.78±0.32	21.92±1.38^{ab}	RB 1-1	2.43±0.39	22.82±0.52^{ab}
RB 4-4	0.28±0.04	21.92±1.38^{ab}	KK27	2.48±0.11	22.82±0.52^{ab}
KN12	2.23±0.04	21.92±1.38^{ab}	K63	1.12±0.25	22.82±1.38^{ab}
K52	2.12±0.11	21.92±1.38^{ab}	SP11-5	0.73±0.11	22.97±0.64^{a}
SW4-3	2.03±0.11	22.07±0.64^{ab}	KK23	2.20±0.07	23.12±0.52^{a}
SS9-1	0.30±0.57	22.07±0.64^{ab}	SB20-1	3.43±0.18	23.42±0.00^{a}
SP8-9	0.78±0.04	22.07±0.64^{ab}	KH24	2.12±0.11	23.42±0.00^{a}
SB15-2	2.92±0.00	22.07±0.64^{ab}	KL11	0.63±0.39	23.42±0.90^{a}
SP17-5	1.48±0.18	22.07±1.91^{ab}	RB4-5	2.40±0.00	23.72±0.52^{a}

อักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan ด้วยโปรแกรม SPSS

4.1.2 ผลการทดสอบการสร้างกรดของแบคทีเรียแลคติกที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส

ด้วยในกระบวนการหมักนั้นจะเกิดความร้อนขึ้นในระหว่างการหมัก ในการวิจัยนี้ จึงได้คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่สามารถเจริญและสร้างกรดได้ดีที่อุณหภูมิสูงที่ 42 องศาเซลเซียส ซึ่งคาดหวังว่าจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการควบคุมความร้อนที่เกิดขึ้นได้ และในขั้นตอนนี้จึงได้ทดสอบเฉพาะแบคทีเรียรหัสที่สามารถสร้างกรดได้สูงกว่า 20.0 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ข้อ 4.1.1) โดยได้เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาล (ร้อยละ 2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง ได้ผลดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง(g/L) และปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติก(g/L) ของแบคทีเรียแลคติกเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ดัดแปลง ที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลในปริมาณที่มีน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับร้อยละ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง

Isolates	Dry weight (g/L)	Total acid (g/L)	Isolates	Dry weight (g/L)	Total acid (g/L)
RB4-1	0.80±0.64	2.10±0.35^{i}	SP8-9	1.75±0.28	8.56±0.64^{fg}
RB4-8	1.30±0.07	2.40±0.71^{i}	RB2-1	1.73±0.25	8.70±0.35^{f}
K57	1.50±0.42	3.50±0.28^{i}	RB3-4	2.20±0.28	8.70±0.71^{f}
SW9-1	1.95±0.07	5.40±0.00^{h}	SB14-6	2.00±0.07	9.01±0.00^{f}
SW4-6	1.58±0.18	5.86±0.64^{h}	SP11-5	1.88±0.53	9.01±0.00^{f}
K16	1.45±0.14	6.00±0.35^{h}	SP12-1	1.60±0.42	9.01±0.00^{f}
SW11-4	1.63±0.11	6.31±0.00^{h}	SS9-1	1.53±0.39	9.01±0.00^{f}
SW5-3	1.28±0.39	7.11±0.14^{gh}	W1-2	1.48±0.04	9.01±0.00^{f}
SB21-3	2.03±0.11	7.21±0.00^{gh}	RB3-1	1.85±0.07	9.30±0.71^{ef}
SS22-4	1.08±0.39	7.56±0.49^{g}	RB4-5	2.03±0.04	9.30±0.35^{ef}
SB16-2	1.55±0.42	8.11±0.00^{fg}	SB14-5	1.85±0.00	9.46±0.64^{e}
RB1-9	1.93±0.18	8.40±0.35^{fg}	SP10-2	1.50±0.35	9.46±0.64^{e}
SP12-2	2.20±0.21	9.46±0.64^{e}	KH25	2.15±0.14	10.50±0.99^{de}
SP8-6	1.93±0.11	9.46±0.64^{e}	KK17	1.63±0.25	10.50±0.35^{de}
SS30-1	1.78±0.11	9.46±0.64^{e}	RB3-5	1.95±0.21	10.50±0.35^{de}
KK25	1.78±0.11	9.60±0.35^{e}	RB4-7	2.30±0.21	10.50±0.35^{de}
K93	2.25±0.42	9.60±0.99^{e}	RB5-2	2.38±0.11	10.50±0.35^{de}

อักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan ด้วยโปรแกรม SPSS

ตารางที่ 4.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง(g/L) และปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติก(g/L) ของแบคทีเรียแลคติกเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ดัดแปลง ที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลในปริมาณที่มีน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับร้อยละ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง (ต่อ)

Isolates	Dry weight (g/L)	Total acid (g/L)	Isolates	Dry weight (g/L)	Total acid (g/L)
KK21	1.58±0.25	9.90±0.64^{e}	KK27	1.93±0.11	10.80±0.64^{d}
RB3-7	2.20±0.28	9.90±0.64^{e}	RB3-8	2.28±0.25	10.80±0.64^{d}
RB4-3	2.02±0.18	9.90±0.64^{e}	SP129	1.85±0.07	10.81±0.00^{d}
RB4-4	2.08±0.11	9.90±0.64^{e}	SW4-3	1.63±0.46	10.81±0.00^{d}
RB3-2	2.05±0.21	9.90±0.00^{e}	K95	1.73±1.24	11.10±0.35^{d}
SP17-3	1.90±0.07	9.91±0.00^{e}	K98	2.05±0.28	11.10±0.35^{d}
SW4-1	1.73±0.04	9.91±0.00^{e}	KL116	1.80±0.49	11.10±0.35^{d}
KH24	2.23±0.25	10.20±0.35^{e}	RB4-2	2.20±0.28	11.10±0.35^{d}
KK29	1.78±0.11	10.20±0.35^{e}	KB12	2.18±0.11	11.20±0.42^{d}
KL13	2.10±0.07	10.20±0.99^{e}	SB16-3	1.58±0.25	11.21±0.57^{d}
SP17-3	1.90±0.07	9.91±0.00^{e}	K98	2.05±0.28	11.10±0.35^{d}
KN13	2.62±0.32	10.20±0.35^{e}	SP10-3	1.95±0.35	11.21±0.57^{d}
RB5-1	2.18±0.11	10.20±0.35^{e}	SP120	1.33±0.04	11.21±0.57^{d}
SB35-3	1.38±0.11	10.26±0.49^{de}	SB21-5	1.72±0.11	11.26±0.64^{d}
SP12-3	1.48±0.18	10.26±0.49^{de}	SS31-3	1.55±0.35	11.26±0.64^{d}
KN15	2.50±0.14	10.30±0.42^{de}	SW1-3	1.23±0.46	11.26±0.64^{d}
SB22-1	2.00±0.21	10.31±0.57^{de}	KH23	2.38±0.11	11.40±0.99^{cd}
SB16-4	1.48±0.25	10.36±0.64^{de}	K12	1.88±0.11	11.40±0.35^{cd}
SP107	1.48±0.53	10.36±0.64^{de}	K13	2.73±1.03	11.40±0.71^{cd}
RB4-9	2.48±0.32	11.40±0.71^{cd}	SB22-2	1.35±0.00	12.16±0.64^{c}
KK26	1.98±0.04	11.50±0.64^{cd}	K92	2.18±0.39	12.30±0.35^{bc}
K36	2.28±0.11	11.70±0.64^{c}	KH26	2.90±0.28	12.30±0.71^{bc}

อักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan ด้วยโปรแกรม SPSS

ตารางที่ 4.2 น้ำหนักเซลล์แห้ง(g/L) และปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติก(g/L) ของแบคทีเรียแลคติกเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ดัดแปลง ที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลในปริมาณที่มีน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับร้อยละ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง (ต่อ)

Isolates	**Dry weight (g/L)**	**Total acid (g/L)**	**Isolates**	**Dry weight (g/L)**	**Total acid (g/L)**
K41	2.23±0.11	11.70±0.64^{c}	KK28	2.43±0.11	12.30±0.71^{bc}
K45	2.28±0.39	11.70±0.64^{c}	RB2-2	2.25±0.28	12.30±0.35^{bc}
KL14	2.48±0.18	11.70±0.00^{c}	RB2-3	2.20±0.35	12.61±0.57^{bc}
RB3-6	2.03±0.25	11.70±0.64^{c}	SP11-3	1.85±0.49	12.61±0.00^{bc}
SB16-5	1.48±0.11	11.71±0.00^{c}	SP12-5	3.63±2.58	12.61±0.00^{bc}
SP9-4	1.80±0.42	11.71±0.00^{c}	SP124	1.78±0.04	12.61±0.00^{bc}
K46	2.43±0.39	12.00±0.71^{c}	RB2-4	2.43±0.11	12.90±0.35^{ab}
K52	2.25±0.42	12.00±0.71^{c}	SB15-2	1.63±0.39	13.06±0.64^{ab}
KK23	2.20±0.35	12.00±0.35^{c}	SP17-5	1.45±0.35	13.06±0.64^{ab}
KL11	2.40±0.21	12.00±0.71^{c}	KK15	2.55±0.07	13.20±0.35^{ab}
KL15	2.38±0.39	12.00±0.35^{c}	SP9-8	2.10±0.07	13.51±0.00^{ab}
KN12	2.70±0.07	12.00±0.71^{c}	P1.6	1.83±0.18	13.96±0.64^{a}
KN16	2.23±0.04	12.00±0.35^{c}	SB20-1	1.80±0.42	14.01±0.70^{a}
B22.3	1.63±0.18	12.11±0.57^{c}	RB1-1	NG	NG
V11-3	1.00±0.14	12.11±0.57^{c}	K64	NG	NG
SB14-1	1.48±0.18	12.16±0.64^{c}	K63	NG	NG
SB15-3	2.62±0.11	12.16±0.64^{c}	K37	NG	NG
SB16-1	1.70±0.28	12.16±0.64^{c}			

อักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบโดยวิธี Duncan ด้วยโปรแกรม SPSS

*NG = No Growth

จากตารางที่ 4.2 พบว่าปริมาณกรดที่แลคทีเรียแต่ละรหัสสร้างขึ้นที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ค่อนข้างมาก และรหัส SB20-1 สร้างกรดได้ 14.01 กรัมต่อลิตรซึ่งสูงกว่ารหัสอื่นๆ และในจำนวนนี้มีแบคทีเรียแลคติกจำนวน 4 รหัสที่ไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ซึ่งได้แก่รหัส RB1-1, K63, K64 และ K37

เมื่อนำผลผลิตกรดของแบคทีเรียแลคติกแต่ละรหัสเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง ที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลในปริมาณที่มีน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากันที่ร้อยละ 2 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 42 องศาเซลเซียส มาเปรียบเทียบกันตามตารางที่ 4.3 พบว่าทุกรหัสเชื้อ สร้างกรดลดลงเมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูงขึ้น อาจเป็นเพราะอุณหภูมิที่สูงถึง 42 องศาเซลเซียสนี้ ไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์และกิจกรรมต่างๆของเซลล์ พลังงานที่สร้างขึ้นถูกใช้ไปในการปรับสภาพ (maintenance) ของเซลล์มากขึ้น หรืออาจทำทำให้โครงสร้างโมเลกุลของของเอนไซม์ต่างๆ ภายในเซลล์แบคทีเรียแลคติกเสื่อมสภาพ (denature) จนทำหน้าเร่งปฏิกิริยาเคมีต่างๆได้ไม่ดี ซึ่งเอนไซม์ต่างๆ จะทำงานได้ดีเฉพาะแค่อุณหภูมิหนึ่งๆ เท่านั้น หากอุณหภูมิเปลี่ยนแปลงไปก็จะทำให้กิจกรรมเอนไซม์ลดลงด้วย สอดคล้องกับรายงานของ Akerberg และคณะ (1998) ที่ทำการหมักกรดแลคติกที่อุณหภูมิ 30 - 40 องศาเซลเซียส และพบว่าแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* ATCC 19435 ที่พวกเขาใช้ สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด 2.8 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 33.5 องศาเซลเซียส เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น *L. lactis* ATCC 19435 ผลิตกรดแลคติกได้ต่ำลงแต่ผลิตกรดอะเซติกและเอทานอลเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้พวกเขายังพบว่าเมื่อหมักที่อุณหภูมิสูงขึ้น อัตราส่วนของกรดแลคติกชนิด D(-) ไอโซเมอร์เพิ่มสูงขึ้นอีกด้วย

ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้เลือกที่จะทดสอบการสร้างกรดของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียแลคติกรหัสที่สร้างกรดได้สูงกว่า 20.0 กรัม/ลิตร ในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลทดแทนน้ำตาลกลูโคสในปริมาณที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากันที่ร้อยละ 2.0 ซึ่งมีทั้งหมดจำนวน 117 รหัสเชื้อ (ข้อ 4.1.1) และวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติก กรดอะเซติก และปริมาณกรดแลคติกชนิด D(-) และ L(+) ไอโซเมอร์ ด้วยเครื่อง HPLC ต่อไป

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติก ของแบคทีเรียแลคติกเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลงที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิ 37 และ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง

Isolates	**Total acid as lactic acid (g/L)**		**Isolates**	**Total acid as lactic acid (g/L)**	
	37 °C	**42 °C**		**37 °C**	**42 °C**
B22.3	20.27±0.64	12.11±0.57	KK25	21.92±1.04	9.60±0.35
K102	22.22±0.52	10.50±0.35	KK26	21.92±0.52	11.50±0.64
K12	21.32±0.52	11.40±0.35	KK27	22.82±0.52	10.80±0.64
K13	21.92±0.52	11.40±0.71	KK28	21.02±1.38	12.30±0.71
K16	21.32±1.38	6.00±0.35	KK29	21.32±0.52	10.20±0.35
K36	21.02±1.04	11.70±0.64	KL11	23.42±0.90	12.00±0.71
K37	21.02±1.38	Not growth	KL116	22.52±1.56	11.10±0.35
K41	21.92±1.04	11.70±0.64	KL13	21.32±1.38	10.20±0.99
K43	21.62±0.90	11.40±0.35	KL14	20.72±0.00	11.70±0.00
K45	21.32±2.08	11.70±0.64	KL15	21.32±0.52	12.00±0.35
K46	21.62±1.80	12.00±0.71	KN12	21.92±1.38	12.00±0.71
K52	21.92±1.38	12.00±0.71	KN13	20.42±2.08	10.20±0.35
K57	21.92±0.52	3.50±0.28	KN15	20.42±0.52	10.30±0.42
K59	22.22±1.88	10.50±0.71	KN16	22.52±0.90	12.00±0.35
K63	22.82±1.38	Not growth	P1.6	20.27±0.64	13.96±0.64
K64	21.02±0.52	Not growth	RB 1-1	22.82±0.52	Not growth
K69	20.12±1.38	11.40±0.35	RB 1-3	22.52±0.00	11.40±0.35
K92	21.62±0.90	12.30±0.35	RB 1-9	21.32±1.38	8.40±0.35
K93	22.22±0.52	9.60±0.99	RB 2-1	21.92±1.04	8.70±0.35
K95	21.62±0.90	11.10±0.35	RB 2-2	22.52±0.90	12.30±0.35
K98	20.12±0.52	11.10±0.35	RB 2-3	22.22±0.52	12.61±0.57
KB12	21.02±0.52	11.20±0.42	RB 2-4	21.02±1.04	12.90±0.35
KH23	21.92±1.04	11.40±0.99	RB 3-1	21.92±0.52	9.30±0.71
KH24	23.42±0.00	10.20±0.35	RB 3-2	22.52±0.90	9.90±0.00
KH25	22.22±1.04	10.50±0.99	RB 3-4	21.62±0.00	8.70±0.71
KH26	21.62±0.00	12.30±0.71	RB 3-5	21.02±0.52	10.50±0.35
KK15	21.62±0.00	13.20±0.35	RB 3-6	21.92±0.52	11.70±0.64
KK17	21.62±0.00	10.50±0.35	RB 3-7	21.92±1.04	9.90±0.64
KK21	20.72±0.00	9.90±0.64	RB 3-8	22.52±0.90	10.80±0.64
KK23	23.12±0.52	12.00±0.35	RB 4-1	21.92±0.52	2.10±0.35

ตารางที่ 4.3 เปรียบเทียบปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติก ของแบคทีเรียแลคติกเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลงที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิ 37 และ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง(ต่อ)

Isolates	Total acid as lactic acid (g/L)		Isolates	Total acid as lactic acid (g/L)	
	37 °C	42 °C		37 °C	42 °C
RB 4-2	21.92±1.38	11.10±0.35	SP12-1	21.17±0.64	9.01±0.00
RB 4-3	21.62±0.90	9.90±0.64	SP12-2	21.17±0.64	9.46±0.64
RB 4-4	21.92±1.38	9.90±0.64	SP12-3	21.62±0.00	10.26±0.49
RB 4-5	23.72±0.52	9.30±0.35	SP12-5	21.62±0.00	12.61±0.00
RB 4-7	21.92±1.38	10.50±0.35	SP120	21.17±0.64	11.21±0.57
RB 4-8	22.22±0.52	2.40±0.71	SP121	21.17±0.64	10.36±0.64
RB 4-9	20.42±0.52	11.40±0.71	SP124	20.27±0.64	12.61±0.00
RB 5-1	21.62±0.90	10.20±0.35	SP129	20.27±0.64	10.81±0.00
RB 5-2	22.82±0.52	10.50±0.35	SP17-3	21.62±1.27	9.91±0.00
SB14-1	20.27±0.64	12.16±0.64	SP17-5	22.07±1.91	13.06±0.64
SB14-5	20.27±0.64	9.46±0.64	SP8-6	20.72±0.00	9.46±0.64
SB14-6	20.72±1.27	9.01±0.00	SP8-9	22.07±0.64	8.56±0.64
SB15-2	22.07±0.64	13.06±0.64	SP9-4	22.52±0.00	11.71±0.00
SB15-3	21.17±0.64	12.16±0.64	SP9-8	21.17±1.91	13.51±0.00
SB16-1	20.27±1.16	12.16±0.64	SS22-4	20.72±1.27	7.56±0.49
SB16-2	20.27±0.64	8.11±0.00	SS30-1	21.17±1.91	9.46±0.64
SB16-3	21.62±0.00	11.21±0.57	SS31-3	22.52±0.00	11.26±0.64
SB16-4	21.17±0.64	10.36±0.64	SS9-1	22.07±0.64	9.01±0.00
SB16-5	21.17±0.64	11.71±0.00	SW1-3	20.27±0.64	11.26±0.64
SB20-1	23.42±0.00	14.01±0.70	SW11-4	20.27±0.64	6.31±0.00
SB21-3	20.72±0.00	7.21±0.00	SW4-1	20.72±0.00	9.91±0.00
SB21-5	20.72±0.00	11.26±0.64	SW4-3	22.07±0.64	10.81±0.00
SB22-1	21.17±0.64	10.31±0.57	SW4-6	21.17±0.64	5.86±0.64
SB22-2	21.17±0.64	12.16±0.64	SW5-3	20.27±0.64	7.11±0.14
SB35-3	21.17±0.64	10.26±0.49	SW9-1	22.52±0.00	5.40±0.00
SP10-2	21.62±0.00	9.46±0.64	V7.1	20.27±0.64	12.11±0.57
SP10-3	21.62±0.00	11.21±0.57	W4-3	20.27±0.64	9.01±0.00
SP107	20.27±0.64	10.36±0.64			
SP11-3	22.52±1.27	12.61±0.00			
SP11-5	22.97±0.64	9.01±0.00			

4.1.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกชนิด L(+) และ D(-) ไอโซเมอร์

ผลการวิเคราะห์ปริมาณการสร้างกรดแลคติก กรดอะเซติก และวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกชนิด D(-) และ L(+)ไอโซเมอร์ของแบคทีเรียแลคติกที่สร้างกรดได้สูงทั้งหมดจำนวน 117 ไอโซเลท จากข้อ 4.1.1 มาด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีการข้อ 3.2.3 ผลดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยของกรดอะเซติก กรดแลคติก กรดแลคติกชนิด D(-) และ L(+) ไอโซเมอร์ของแบคทีเรียแลคติกรหัสต่างๆ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลงที่อุณหภูมิ 37 และ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง

Isolates	Total acid (g/L)	Acetic acid (g/L)	Lactic acid (g/L)	D(-)Lactic acid (g/L)	L(+)Lactic acid (g/L)	L(+)Lactic acid purity (%)
SB16-4	21.17±0.45	4.26	9.26	6.84	3.39	33.11
SW9-1	22.52±0.00	3.19	10.09	8.18	4.04	33.05
W4-3	20.27±0.45	4.45	11.97	8.20	4.07	33.18
SP10-2	21.62±0.00	5.92	15.71	13.74	4.22	23.51
SB14-5	20.27±0.45	1.77	13.08	9.27	4.36	32.00
SP17-3	21.62±0.90	3.46	11.75	7.83	4.47	36.33
SP129	20.27±0.45	3.22	14.41	10.96	4.49	29.07
SP107	20.27±0.45	5.13	14.97	8.56	4.61	35.01
SW4-1	20.72±0.00	3.83	15.97	13.37	4.66	25.83
SB16-1	20.27±1.35	3.16	14.45	12.74	4.67	26.85
SB14-1	20.27±0.45	2.17	9.12	5.19	4.92	48.68
SB22-2	21.17±0.45	3.63	11.03	8.08	5.33	39.74
SP12-5	21.62±0.00	3.02	10.78	6.85	5.55	44.76
K37	21.00±0.09	3.25	9.31	4.85	5.62	53.66
SS22-4	20.72±0.90	2.63	15.11	10.67	5.63	34.55
SB16-5	21.17±0.45	3.26	11.08	5.90	5.69	49.13
KH24	21.90±0.09	2.70	15.86	7.51	5.79	43.52
SB21-3	20.72±0.00	3.67	15.77	11.23	5.83	34.16
SP12-3	21.62±0.00	3.81	10.72	6.82	5.94	46.56
RB4-2	21.90±0.14	1.32	15.86	7.74	5.94	43.43
RB3-8	22.50±0.09	1.40	12.68	7.90	5.95	42.97
SB22-1	21.17±0.45	3.40	14.80	8.97	5.95	39.90
KN14	20.40±0.16	2.17	14.21	7.86	6.20	44.11
KK26	21.90±0.00	2.86	16.43	9.78	6.21	38.82
KK21	20.70±0.05	1.60	16.88	7.82	6.21	44.24
RB4-7	21.90±0.14	1.51	14.08	8.30	6.21	42.80

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยของกรดอะเซติก กรดแลคติก กรดแลคติกชนิด D(-) และ L(+) ไอโซเมอร์ ของแบคทีเรียแลคติกเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง (ต่อ)

Isolates	Total acid (g/L)	Acetic acid (g/L)	Lactic acid (g/L)	D(-)Lactic acid (g/L)	L(+)Lactic acid (g/L)	L(+)Lactic acid purity (%)
SW11-4	20.27±0.45	3.67	14.52	10.43	6.22	37.37
SS9-1	22.07±0.45	2.68	16.98	12.30	6.24	33.66
RB4-1	21.90±0.05	2.74	10.52	4.92	6.33	56.25
SB20-1	23.42±0.00	3.03	12.55	8.18	6.35	43.70
RB3-6	21.90±0.05	1.24	16.63	8.59	6.39	42.67
RB1-1	22.80±0.05	2.22	16.60	7.44	6.40	46.24
V7.1	20.27±0.45	4.48	15.61	6.44	6.41	49.88
SB15-3	21.17±0.45	3.77	15.56	9.89	6.41	39.34
K68	21.00±0.00	1.89	14.32	8.42	6.47	43.47
K92	20.10±0.09	3.13	16.35	8.42	6.47	43.47
K64	22.80±0.10	3.18	16.10	10.85	6.52	37.52
K102	22.20±0.05	1.02	16.96	7.04	6.60	48.38
KN13	20.42±2.08	1.45	16.69	7.09	6.63	48.32
KK28	21.00±0.14	2.74	17.57	9.24	6.65	41.85
KK23	23.40±0.00	2.80	12.38	8.11	6.66	45.07
KL13	20.70±0.00	1.85	17.53	8.84	6.69	43.07
K63	22.80±0.14	2.91	16.69	12.52	6.74	34.99
KH25	22.20±0.10	2.80	15.47	7.57	6.77	47.20
SB15-2	22.07±0.45	3.97	18.18	12.32	6.80	35.55
SB16-3	21.62±0.00	3.87	15.69	8.83	6.80	43.49
RB4-8	22.20±0.05	2.77	16.12	5.59	6.82	54.93
RB3-2	22.50±0.09	2.83	15.98	7.77	6.84	46.82
RB4-9	20.40±0.05	3.25	16.20	7.58	6.88	47.60
K16	21.30±0.05	3.21	12.98	7.04	6.96	49.70
SB21-5	20.72±0.00	3.41	15.65	9.75	6.96	41.66
KK25	21.90±0.10	1.77	15.00	8.66	6.97	44.60
SB35-3	21.17±0.45	3.30	17.07	11.69	7.01	37.50
KL11	22.50±0.16	2.99	18.71	9.09	7.05	43.67
SP120	21.17±0.45	3.42	17.36	11.07	7.07	38.97
KK27	23.10±0.05	2.56	12.77	7.58	7.09	48.34

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยของกรดอะเซติก กรดแลคติก กรดแลคติกชนิด D(-) และ L(+) ของแบคทีเรียแลคติกเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง (ต่อ)

Isolates	Total acid (g/L)	Acetic acid (g/L)	Lactic acid (g/L)	D(-)Lactic acid (g/L)	L(+)Lactic acid (g/L)	L(+)Lactic acid purity (%)
K57	21.90±0.05	2.71	17.78	11.42	7.14	38.47
RB3-1	21.90±0.05	2.70	13.68	7.79	7.15	47.86
K41	21.90±0.14	1.82	15.64	7.04	7.24	50.70
KK29	21.30±0.05	2.81	16.16	8.78	7.26	45.27
RB2-4	21.00±0.10	1.59	15.23	7.09	7.28	50.67
SB16-2	20.27±0.45	3.36	14.39	11.18	7.31	39.53
KK17	21.60±0.09	1.51	16.66	8.83	7.32	45.32
RB1-3	22.50±0.00	3.05	17.26	7.73	7.35	48.76
RB2-2	22.50±0.09	2.69	18.34	8.72	7.36	45.78
SP12-2	21.17±0.45	3.35	12.10	8.43	7.37	46.62
RB5-2	23.40±0.09	2.68	17.62	6.71	7.43	52.54
RB3-5	21.00±0.05	1.20	18.18	7.99	7.48	48.34
KN15	22.50±0.09	2.86	15.78	6.93	7.48	51.91
KB13	21.00±0.05	2.79	15.27	8.84	7.49	45.88
RB5-1	21.60±0.09	3.11	15.95	8.59	7.53	46.70
K13	21.90±0.05	1.68	18.86	8.85	7.55	46.06
KN12	20.40±0.21	1.51	16.44	7.85	7.56	49.05
K12	21.30±0.05	1.67	19.72	7.46	7.60	50.45
K59	22.20±0.19	2.81	16.23	7.45	7.64	50.61
K95	22.20±0.05	2.44	16.40	7.56	7.64	50.27
RB2-3	22.20±0.05	2.90	18.01	8.40	7.65	47.67
SP10-3	21.62±0.00	3.69	16.55	10.93	7.67	41.26
RB4-4	21.90±0.14	1.54	16.30	10.34	7.72	42.75
K46	21.60±0.18	1.91	17.84	7.40	7.73	51.09
SP12-1	21.17±0.45	3.70	12.98	8.24	7.74	48.43
K98	21.60±0.09	3.35	17.79	8.74	7.76	47.03
K45	21.30±0.21	1.05	15.78	8.28	7.82	48.57
KH26	21.60±0.00	2.92	18.70	9.44	7.89	45.51
K43	21.60±0.09	1.65	18.27	8.82	7.96	47.43
RB1-9	21.30±0.14	1.82	17.68	6.50	8.01	55.23

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ยของกรดอะเซติก กรดแลคติก กรดแลคติกชนิด D(-) และ L(+) ของแบคทีเรียแลคติก เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมง (ต่อ)

Isolates	Total acid (g/L)	Acetic acid (g/L)	Lactic acid (g/L)	D(-)Lactic acid (g/L)	L(+)Lactic acid (g/L)	L(+)Lactic acid purity (%)
KB12	20.10±0.05	1.60	17.62	8.43	8.14	49.11
K93	21.60±0.09	2.63	17.53	9.79	8.29	45.87
RB3-4	21.60±0.00	1.42	18.02	7.55	8.32	52.44
KL12	21.30±0.14	2.91	14.96	8.46	8.33	49.62
KN11	21.90±0.14	2.44	15.16	8.46	8.33	49.62
K36	21.00±0.10	1.74	18.66	7.98	8.40	51.28
SP8-6	20.72±0.00	3.51	15.95	8.97	8.41	48.40
SP17-5	22.07±1.35	3.87	18.93	11.55	8.45	42.25
RB2-1	21.90±0.10	1.87	19.78	9.19	8.46	47.94
K52	21.90±0.14	1.76	18.46	9.49	8.52	47.30
P1.6	20.27±0.45	2.37	16.90	10.60	8.54	44.61
RB4-3	21.60±0.09	1.77	20.79	10.97	8.64	44.07
KL14	21.30±0.09	1.52	10.44	1.85	8.65	82.39
KK15	21.60±0.00	1.80	17.55	10.35	8.68	45.63
SP121	21.17±0.45	2.21	15.11	8.71	8.78	50.18
SP11-3	22.52±0.90	3.55	18.01	9.76	9.19	48.50
SP9-4	22.52±0.00	3.19	15.67	9.46	9.22	49.37
RB3-7	21.90±0.10	3.18	16.38	8.61	9.33	52.01
SP11-5	22.97±0.45	3.02	18.90	11.01	9.46	46.22
SW5-3	20.27±0.45	2.88	11.12	2.04	10.06	83.12
SW1-3	20.27±0.45	4.08	11.65	3.83	10.13	72.58
RB4-5	23.70±0.05	2.90	20.47	10.21	10.17	49.89
B22.3	20.27±0.45	4.24	17.85	7.45	10.17	57.71
SB14-6	20.72±0.90	3.98	11.11	2.59	10.79	80.63
SP124	20.27±0.45	4.85	14.13	5.87	11.63	66.47
SS31-3	22.52±0.00	3.71	14.53	3.53	12.20	77.56
SP8-9	22.07±0.45	4.27	15.26	4.18	12.22	74.53
SS30-1	21.17±1.35	3.56	12.79	1.89	12.38	86.74
SW4-6	21.17±0.45	3.70	14.72	3.34	12.71	79.19
SP9-8	21.17±1.35	3.99	15.70	4.16	12.82	75.49
SW4-3	22.07±0.45	3.67	15.77	1.64	15.72	90.56

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดด้วยวิธีการไตเตรท ปริมาณกรดอะเซติก และปริมาณกรดแลคติกชนิด D(-) และ L(+) ไอโซเมอร์ ด้วยเครื่อง HPLC แสดงดังตาราง 4.4 พบว่าผลปริมาณกรดที่ได้ มีความสัมพันธ์กัน โดยที่ผลรวมของปริมาณกรดอะเซติกและกรดแลคติกของแต่ละไอโซเลทจะมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณกรดทั้งหมดที่ได้จากการไตเตรท และเมื่อรวมปริมาณกรดแลคติก D(-) และ L(+) ไอโซเมอร์ เข้าด้วยกัน ค่าที่ได้พอๆ กับปริมาณกรดแลคติกที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC เช่นกัน

ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกด้วยเครื่อง HPLC พบว่าแบคทีเรียแลคติกรหัส SW4-3 สร้างกรดแลคติกชนิด L(+) ไอโซเมอร์ ได้สูงที่สุดคือ 15.72 กรัม/ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลงซึ่งใช้กากน้ำตาลทดแทนน้ำตาลกลูโคสในปริมาณที่มีน้ำตาลทั้งหมดเท่ากันที่ร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 ชั่วโมงนั้น รองลงมาคือเชื้อรหัส SP9-8, SW4-6, SS30-1, SP8-9 และ SS31-3 ซึ่งสร้างกรดแลคติกชนิด L(+) ไอโซเมอร์ ได้ 12.20, 12.22, 12.38, 12.71 และ 12.82 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และเมื่อคำนวณหาค่าความบริสุทธิ์ของกรดแลคติก L(+) ไอโซเมอร์ และเทียบกับกรดแลคติก D(-) ไอโซเมอร์ (สมการที่ 3.2) พบว่าแบคทีเรียแลคติกรหัส SW4-3 สร้างกรดแลคติก L(+) ได้ 15.72 กรัม/ลิตร และชนิด D(-) 1.64 กรัม/ลิตร ซึ่งมีความบริสุทธิ์ของ L(+) ไอโซเมอร์ (L(+)-lactic acid purity) สูงที่สุดคือร้อยละ 90.56 และมีค่าผลผลิตกรดแลคติก L(+) ไอโซเมอร์ ต่อหน่วยสับสเตรท ($Y_{L\text{-}LA/S}$) เมื่อคิดจากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมด (total sugar) 20 กรัม/ลิตร เท่ากับร้อยละ 78.6 รองลงมาคือแบคทีเรียแลคติกรหัส SS30-1 ซึ่งผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) ไอโซเมอร์ ที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 86.74 และมีปริมาณของกรดแลคติก L(+)ไอโซเมอร์12.38 กรัม/ลิตร

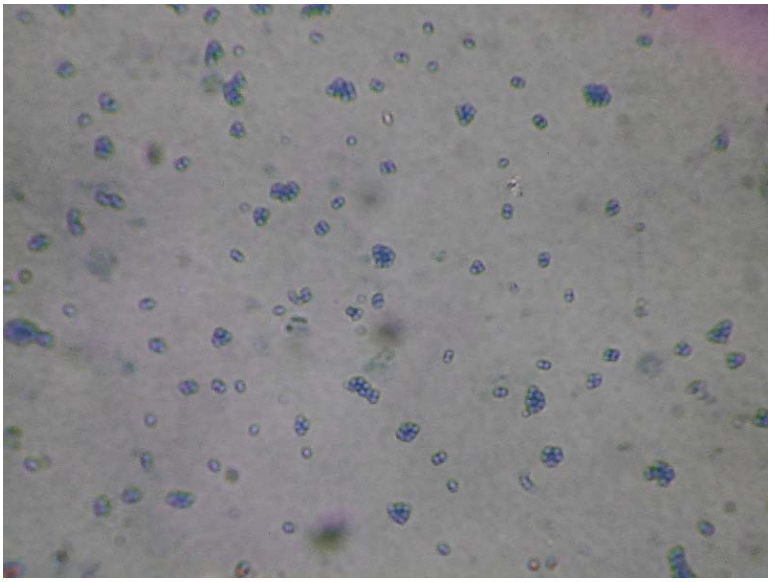
จากผลการทดลองจะเห็นว่าแบคทีเรียแลคติกรหัส SW4-3 เป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการนำมาผลิตกรดแลคติก L(+) ไอโซเมอร์ เนื่องจากสามารถใช้กากน้ำตาลซึ่งเป็นวัสดุของเหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาลทราย ซึ่งมีราคาถูก และยังผลิตกรดแลคติก (L+) ไอโซเมอร์ได้ปริมาณมากและมีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งเป็นข้อดีในแง่ของการแยกและทำให้บริสุทธิ์ ทำได้ได้ง่ายขึ้น โดยมีอัตราการผลิต (Productivity) กรดแลคติก L(+) เท่ากับ 0.75 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง และมีปริมาณการผลิตกรดแลคติก L(+) ต่อหน่วยสับสเตรท ($Yield_{L\text{-}LA/S}$) เมื่อคิดจากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมด 20 กรัม/ลิตร เท่ากับร้อยละ 78.6 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้เลือกแบคทีเรียแลคติกรหัส SW4-3 นี้สำหรับศึกษาหมักกรดแลคติก รวมทั้งการพิสูจน์เอกลักษณ์เพื่อจัดจำแนกสายพันธุ์ต่อไป

4.2 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียแลคติกรหัส SW4-3

ผลการศึกษาลักษณะทางสัญฐานวิทยาของแบคทีเรียแลคติกรหัส SW4-3 เมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็ง MRS agar ผสม $CaCO_3$ เข้มข้นร้อยละ 0.5 (w/v) พบว่าโคโลนีมีสีขาว กลมนูนและมีขนาดใหญ่ ดังรูปที่ 4.1

และหลังจากใช้ loop แตะโคโลนีเดี่ยวมาย้อมสีแกรมและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า พบว่าแบคทีเรียแลคติกรหัส SW4-3 มีรูปร่างกลมเซลล์เรียงตัวเป็นสี่เซลล์ติดกัน ดังรูปที่ 4.2

รูปที่ 4. 1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียแลคติกรหัส SW4-3 บนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4. 2 รูปร่างและการเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติกรหัส SW4-3 (กำลังขยาย 1000 เท่า)

4.2.1 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียแลคติกรหัส SW4-3 ในระดับจีนัส

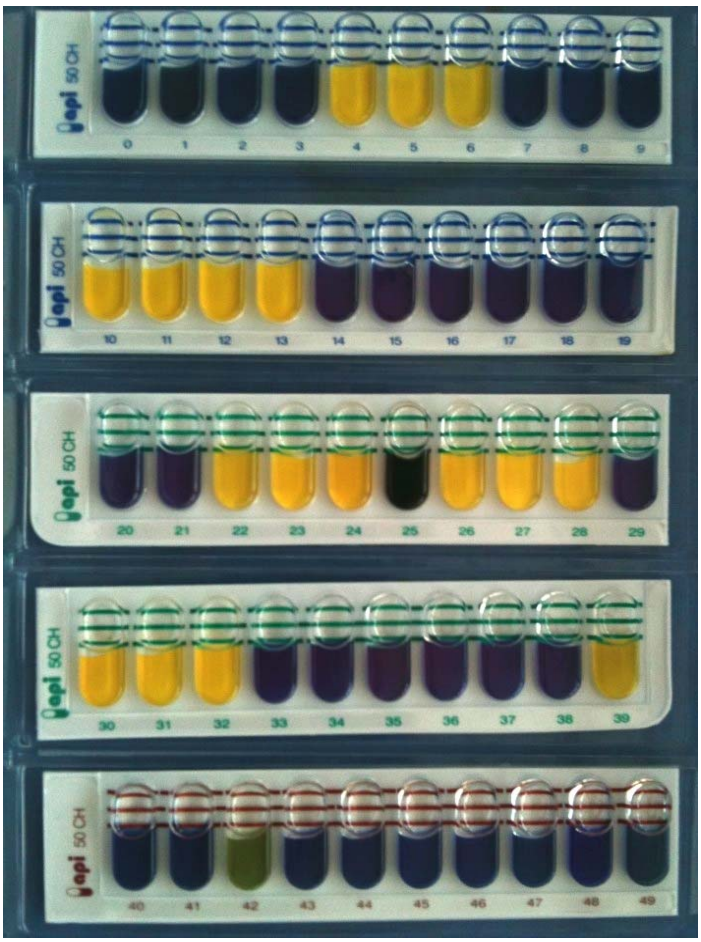
จากการพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียแลคติกรหัส SW4-3 ในระดับจีนัสโดยทดสอบคุณสมบัติทางสรีระวิทยาตามวิธีการที่กล่าวไว้ (ข้อ 3.2.4) และเปรียบเทียบกับข้อมูลอ้างอิงของ Axelsson (1998) (ตารางที่ 2.1) ผลพบว่าแบคทีเรียแลคติกรหัส SW4-3 มีคุณสมบัติตรงกันกับแบคทีเรียแลคติกจีนัส *Pediococcus* sp. ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียแลคติกรหัส SW4-3 และแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Pediococcus* sp.

Characteristics	***Pediococcus sp.***	**SW4-3**
Tetrad formation	-	-
CO_2 from glucose	-	-
Growth at 10°c	+/-	-
Growth at 45°c	+/-	+
Growth in 6.5% NaCl	+/-	+
Growth in 18 % NaCl	-	-
Growth at pH 4.4	+	+
Growth at pH 9.6	-	-
Lactic acid	L-isomer	90.55 % L-isomer

4.2.2 ผลการทดสอบการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *Pediococcus* sp. SW4-3 ในระดับสปีชีส์

ผลการทดสอบการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ในชุดน้ำตาลสำเร็จรูป API 50 CHL V5.1 ผลดังแสดงตามรูปที่ 4.3 และตารางที่ 4.6 และเมื่อเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของชุดทดสอบ https://apiweb.biomerieux.com พบว่าแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus* sp. SW4-3 มีความคล้ายคลึงกับ *Pediococcus pentosaceus* ร้อยละ 99.6 จึงสรุปได้ว่า แบคทีเรียแลคติก *Pediococcus* sp. SW4-3 จัดอยู่ในสปีชีส์ *pentosaceus*



รูปที่ 4. 3 ผลการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ ของแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus* sp. SW4-3 ด้วยชุดทดสอบน้ำตาลสำเร็จรูป API 50 CHL V5.1 kit ที่เวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.6 ผลการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ ของแบคทีเรียแลคติก Pediococcus sp. SW4-3 ด้วยชุดทดสอบน้ำตาลสำเร็จรูป API 50 CHL V5.1 kit

Carbohydrate	SW4-3	Carbohydrate	SW4-3
Control	-	Esculin Fe citrate	-
Glycerol	-	Salicin	+
Erithritol	-	D-Cellobiose	+
D-Arabinose	-	D-Maltose	+
L-Arabinose	+	D-Lactose	-
D-Ribose	+	D-Melibiose	+
D-Xylose	+	D-Saccharose	+
L-Xylose	-	D-Trehalose	+
D-Adonitol	-	Inulin	-
Met-βD-Xylopyranoside	-	D-Melezitose	-
D-Galactose	+	D-Raffinose	+
D-Glucose	+	Amidon/starch	-
D-Fructose	+	Glycogen	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	Gentibiose	+
L-Rhamnose	-	D-Turanose	-
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	+
D-Mannitol	-	D-Fucose	-
D-Sorbitol	-	L-Fucose	-
Met-αD-Mannopyranoside	-	D-Arabitol	-
Met-αD-Glucopyranoside	-	L-Arabitol	-
N-Acetyl-glucosamine	+	K-Gluconate	-
Amygdalin	+	K-2-Ketogluconate	-
Arbutine	+	K-5-Ketogluconate	-

4.2.3 ผลการพิสูจน์ลำดับเบส (DNA sequencing) ของ *Pediococcus* sp. SW4-3 เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ในระดับสปีชีส์

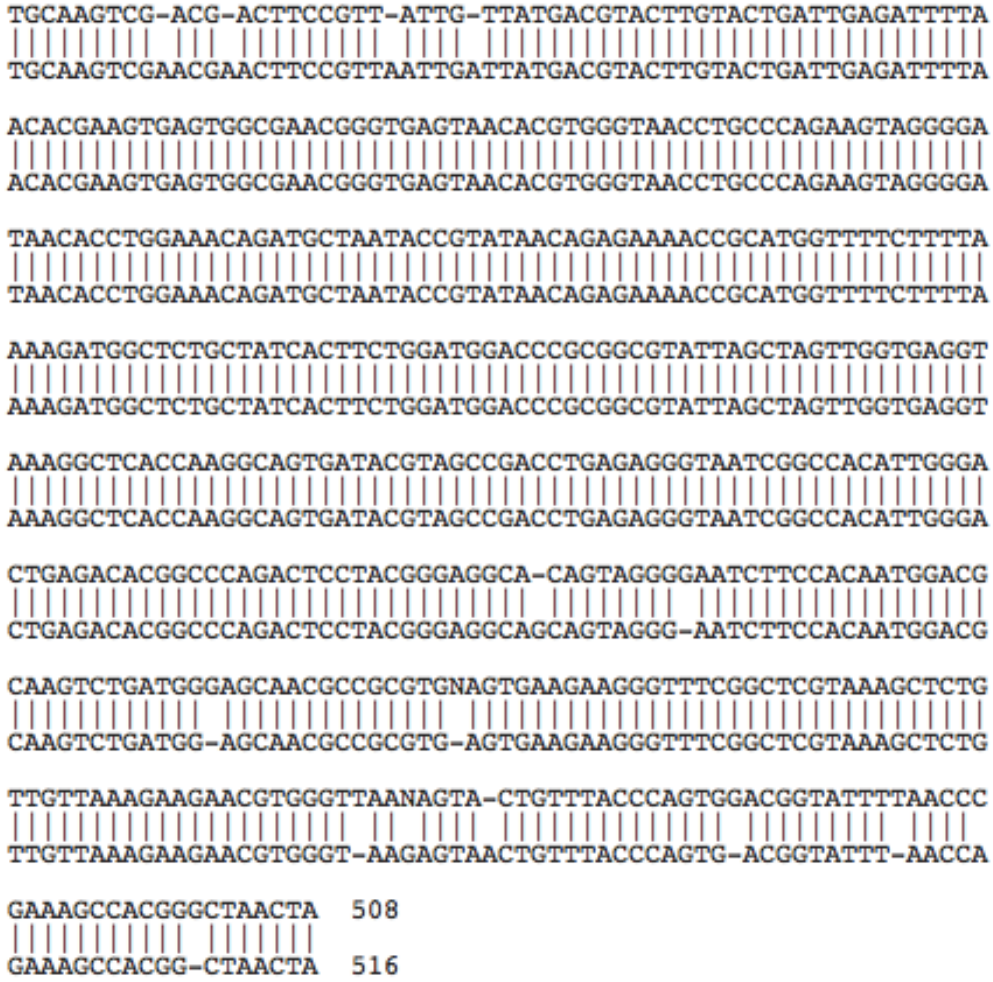
เพื่อทวนสอบเอกลักษณ์ของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ในระดับสปีชีส์ โดยการหาลำดับเบส (DNA sequencing) ของ 16S rDNA และในการเพิ่มชิ้นส่วนของ 16S rDNA ได้ใช้ไพรเมอร์ 27F : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' และ 1525R : 5'-AAGGAGGTG(A/T)TCCA(A/G)CC-3' ร่วมกับชุดน้ำยาสำเร็จรูป Takara EX *Tag* kit (TaKaRa BIO INC, Japan) จากนั้นนำชิ้นส่วนของ 16S rDNA มาหาลำดับเบส (DNA sequencing) โดยใช้ชุดทำปฏิกิริยา ABI PRISM Big Dye Terminator cycle sequencing version 3.1 แล้วนำเข้าเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (ABI PRISM modle 310 Genetic Analyzer) โดยใช้ไพรเมอร์ 27F : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' และ 530R : 5'-GGCAGAATGGTAACACCAGAGT-3' แล้วนำมาวิเคราะห์หาลำดับเบสโดยใช้โปรแกรม Bioedit ซึ่งได้ลำดับดีเอ็นเอที่มีขนาด 594 bp. ดังแสดงในรูปที่ 4.4

> *Pediococcus pentosaceus* SW4-3

NCTGCGCTGCTATCTTGCAAGTCGACGACTTCCGTTATTGTTATGACGTACTTGTACTGATT
GAGATTTTAACACGAAGTGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCAGA
AGTAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGT
TTTCTTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCAGTGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCAC
ATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCACAGTAGGGGAATCTTCCACAA
TGGACGCAAGTCTGATGGGAGCAACGCCGCGTGNAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAA
GCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTTAANAGTACTGTTTACCCAGTGGACGGTATTTTA
ACCCGAAAGCCACGGGCTAACTANGTTGCCAACANCCCGCCGGTAATACNTAAGGTTGGC
CAAGCGTTATNCCGGNATTTTAATTGGGGCNGTAAAGCCGANCCCCAGG

รูปที่ 4. 4 ชุดลำดับเบส 16S rDNA จำนวน 594 bp ของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3

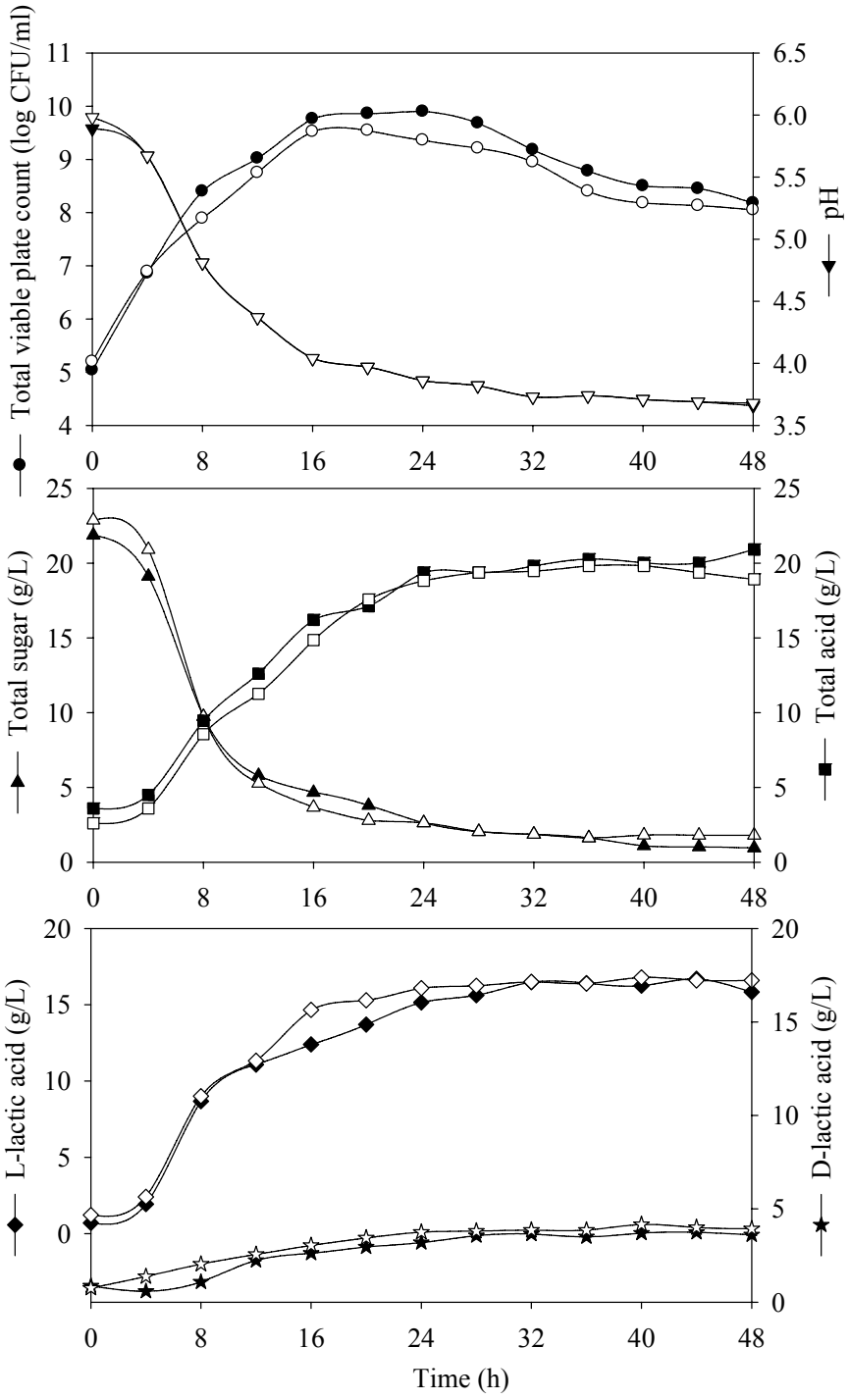
เมื่อนำลำดับเบสที่ได้ไปเทียบกับลำดับดีเอ็นเอ (BLAST) ในฐานข้อมูล Gene Bank (GenBank: AF404739.1) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) พบว่าใกล้เคียงกับของแบคทีรัยแลคติกสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* โดยมีระดับความเหมือนอยู่ที่ร้อยละ 96 ดังรูปที่ 4.5 ซึ่งสอดคล้องกับผลการพิสูจน์การใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ในชุดน้ำตาลสำเร็จรูป API 50 CHL V5.1 (ข้อ 4.2.3) จึงสรุปได้ว่าแบคทีเรียแลคติกรหัส SW4-3 เป็นสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3



รูปที่ 4. 5 เปรียบเทียบลำดับเบสของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 และ *Pediococcus pentosaceus* P35 (GenBank: AF404739.1)

4.3 ผลการเจริญและการสร้างกรดของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ในอาหาร MRS และอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาล

ผลการเปรียบเทียบการเจริญและการสร้างกรดของ *P. pentosaceus* SW4-3 ในอาหาร MRS และอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลในปริมาณที่มีน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากันคือ ร้อยละ 2 ปริมาตร 300 มิลลิลิตรที่บรรจุในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตามวิธีการข้อ 3.2.5 ผลดังแสดงในรูปที่ 4.6



Fill key = MRS medium; Open key = molasses medium

รูปที่ 4. 6 ผลการเจริญและการสร้างกรดของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ในอาหาร MRS และอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลในปริมาณที่มีน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) ร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

จากรูปที่ 4.6 พบว่าแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* SW4-3 สามารถเจริญได้ดีในอาหาร MRS และอาหาร MRS สูตรดัดแปลง ที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาลในปริมาณที่มีน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) เท่ากับร้อยละ 2 โดยที่และต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ทั้งอัตราการเจริญของเซลล์ อัตราการใช้น้ำตาล ค่า pH และการสร้างกรดแลคติก โดยที่ *P. pentosaceus* SW4-3 เจริญในอาหารทั้งสองได้อย่างรวดเร็วนับตั้งแต่ช่วงแรกโดยไม่มี lag phase และเร่มเข้าสู่ log phase ใน ชั่วโมงที่ ที่ 16 ของการเพาะเลี้ยง โดยปริมาณเซลล์สูงสุดในอาหาร MRS สูงกว่าในอาหาร MRS สูตรดัดแปลงเล็กน้อย ($p>0.05$) ซึ่งเท่ากับ 9.9 และ 9.52 logCFU/ml ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 และ 16 ตามลำดับ ซึ่งเป็นผลให้ปริมาณผลิตกรดแลคติกในอาหาร MRS สูตรดัดแปลงเพิ่มขึ้นได้เร็วกว่าในอาหาร MRS โดยปริมาณกรดแลคติกทั้งหมดในอาหาร MRS เท่ากับ 16.2 และ 19.37 g/L และปริมาณกรดลคติกชนิด L(+) ไอโซเมอร์เท่ากับ 12.40 และ15.15 g/L ในชั่วโมงที่ 16 และ 24 ตามลำดับ ส่วนในอาหาร MRS สูตรดัดแปลงมีปริมาณกรดทั้งหมดเท่ากับ 14.86 และ 18.82 และปริมาณกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) เท่ากับ 14.66 และ 16.09 g/L ในเวลาเดียวกันที่ 16 และ 24 ชั่งโมงตามลำดับ

ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารทั้งสองอยู่ที่ 22.87 กรัม/ลิตร จะลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่เริ่มจนเหลือ 2.63 กรัม/ลิตรเท่ากันที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเซลล์และผลผลิตกรดที่เพิ่มขึ้น จะเห็นได้ว่าพบแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* SW4-3 สามารถเจริญได้ดีในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาล (ร้อยละ 2) เทียบเท่าการเจริญในอาหาร MRS ซึ่งมีอัตราการผลิตกรดแลคติก L(+) (Productivity) สูงสุด 0.67 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ที่เวลา 24 ชั่วโมงองการหมัก และปริมาณกรดแลคติกชนิด L(+) ไอโซเมอร์ต่อหน่วยสับสเตรท ($Yield_{L\text{-}LA/S}$) เท่ากับ ร้อยละ 79

4.4 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของแหล่งอาหารทดแทน

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งอาหารทดแทน ซึ่งได้แก่ molasses, soybean meal, fish hydrolysate, corn steep liquor และ whey เพื่อที่จะคัดเลือกหาวัตถุดิบที่มีปริมาณสารอาหารมากพอที่จะใช้ทดแทนในสูตรอาหาร MRS เดิม ผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 4.7

ผลการวิเคราะห์พบว่ากากน้ำตาลซึ่งเป็นของเหลวมีลักษณะข้นหนืด สีดำ มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 53.7 ซึ่งสอดคล้องกับ Wee และคณะ (2004), Teclu และคณะ (2009) และ Albuquerque และคณะ (2007) ที่ระบุว่ากากน้ำตาลมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 50.9, 51.0 และ 54.0 ตามลำดับ ในการทดลองนี้จึงใช้กากน้ำตาลเท่ากับ 37.26 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนกลูโคสในสูตรอาหาร MRS เดิม เพื่อให้อาหาร MRS สูตรดัดแปลงมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับสูตร MRS เดิมคือ 20 กรัม/ลิตร ผลการวิเคราะห์

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ทดแทนในสูตรอาหาร MRS ได้แก่ soybean meal, corn steep liquor, whey และ fish hydrolysate พบว่า soybean meal และ fish hydrolysate มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดใกล้เคียงกันคือร้อยละ 8.00 และ 8.45 ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นปริมาณโปรตีนเท่ากับร้อยละ 50.02 และ 52.79 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Vázquez และคณะ (2004) ที่ระบุว่า fish hydrolysate มีปริมาณไนโตรเจนร้อยละ 8.19-13.13 ซึ่งทั้ง soybean meal และ fish hydrolysate มีปริมาณโปรตีนมากพอที่จะใช้เป็นแหล่งอาหารทดแทนได้ ส่วน corn steep liquor มีลักษณะของเหลวสีเหลืองข้นมีตะกอนมาก เป็นแหล่งอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนรองลงมาคือร้อยละ 1.90 ซึ่งค่อนข้างน้อย หากใช้เป็นแหล่งอาหารทดแทนไนโตรเจนจะต้องใช้ในปริมาณที่มากถึง 161.5 กรัม/ลิตร และ corn steep liquor มีราคาค่อนข้างสูงดังนั้นจึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารทดแทน ส่วน whey เป็นของเหลือจากกระบวนการผลิตเนยแข็ง ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองค่อนข้างใสเป็นแหล่งอาหารที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดต่ำที่ร้อยละ 0.09 ซึ่งเจือจางมากเกินไป ไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นแหล่งอาหารทดแทน หากนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนจะต้องตกตะกอนโปรตีนก่อน (Kotzamanidis et al., 2002) ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปของงานวิจัยนี้จึงได้คัดเลือกใช้ fish hydrolysate เป็นแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารกากน้ำตาลต่อไป

ตารางที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของแหล่งอาหารทดแทน

ปริมาณ (% w/w)	Molasses	Soybean meal	Fish hydrolysate	Corn steep liquor	Whey
Dry Matter	77.0	90.90	70.84	42.05	8.10
Total Sugar	53.7	11.72	14.35	58.11	30.98
Total Nitrogen	0.69	8.00	8.45	1.90	0.09
Protein	4.29	50.02	52.79	11.88	0.57
Ash	9.68	7.18	15.82	6.70	1.03

4.5 การปรับปรุงสูตรอาหารทดแทน

4.5.1 ผลการศึกษาและคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตกรดแลคติกโดยการทดลองแบบ Plackett-Burman factorial design

ในการปรับปรุงสูตรอาหารกากน้ำตาลได้ทดสอบแหล่งไนโตรเจนจำนวน 4 แหล่ง ได้แก่ fish hydrolysate, yeast extract, peptone และ beef extract โดยวางแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman

factorial design เพื่อที่จะวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณกรดแลคติก (Mean Effect) และตัดปัจจัยที่ไม่มีผลต่อปริมาณกรดแลคติก (non significant) ออกไป สำหรับ 4 ปัจจัยนั้น มีจำนวนชุดการทดลองทั้งหมด 15 ชุดทดลอง ในแต่ละชุดการทดลองได้บรรจุอาหารเหลว 100 มิลลิลิตร ในฟลาสขนาด 250 มิลลิลิตร และหมักด้วยแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* SW4-3 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลเป็นดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ปริมาณกรดแลคติกที่แบคทีเรีย *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ผลิตขึ้นในอาหารกากน้ำตาลและแปรผันแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยการทดลองแบบ Plackett-Burman factorial design

Run order	Fish hydrolysate (g/L)	Peptone (g/L)	Beef extract (g/L)	Yeast extract (g/L)	Total acid as Lactic acid (g/L)
1	15 (+)	10 (+)	1.0 (-)	5.0 (+)	18.92
2	1.5 (-)	10 (+)	10 (+)	0.5 (-)	18.02
3	15 (+)	1.0 (-)	10 (+)	5.0 (+)	18.47
4	1.5 (-)	10 (+)	1.0 (-)	5.0 (+)	18.02
5	1.5 (-)	1.0 (-)	10 (+)	0.5 (-)	16.21
6	1.5 (-)	1.0 (-)	1.0 (-)	5.0 (+)	16.66
7	15 (+)	1.0 (-)	1.0 (-)	0.5 (-)	13.96
8	15 (+)	10 (+)	1.0 (-)	0.5 (-)	16.66
9	15 (+)	10 (+)	10 (+)	0.5 (-)	19.82
10	1.5 (-)	10 (+)	10 (+)	5.0 (+)	20.27
11	15 (+)	1.0 (-)	10 (+)	5.0 (+)	18.47
12	1.5 (-)	1.0 (-)	1.0 (-)	0.5 (-)	13.06
13	8.25 (0)	5.5 (0)	5.5 (0)	2.75 (0)	18.02
14	8.25 (0)	5.5 (0)	5.5 (0)	2.75 (0)	18.02
15	8.25 (0)	5.5 (0)	5.5 (0)	2.75 (0)	18.02

ผลการหมักกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* SW4-3 ในอาหารกากน้ำตาลที่แปรผันแหล่ง

ไนโตรเจนต่างๆกัน โดยใช้การทดลองแบบ Plackett-Burman factorial design ตามตารางที่ 4.8 และวิเคราะห์ผลตามสมการ mean effect (สมการที่ 4.1) โดยเลือกใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์แบบ factorial แล้วพบว่าทั้ง 4 ปัจจัย พบว่าแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ดังสมการที่ 4.2 มีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.9569 (ตารางที่ 4.9) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลการทดลองมีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นตัวแทนของชุดข้อมูลได้และสามารถนำความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งไนโตรเจนต่างๆ และปริมาณกรดแลคติกมาวิเคราะห์ผลทางสถิติ ซึ่งสามารถแสดงผลของปัจจัยที่ทำการทดลองที่มีผลต่อการตอบสนองของปริมาณกรดแลคติก ได้ดังตารางที่ 4.10

(สมการที่ 4.1)

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} x_i^2 + \sum\sum_{i<j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

(สมการ 4.2)

Lactic acid (g/L) = +17.38 +0.34A +1.24B +1.16C+1.09D

หมายเหตุ สมการ 4.1 แสดงในเทอมของ Code Value

A หมายถึง Fish hydrolysate B หมายถึง Yeast extract

C หมายถึง Peptone D หมายถึง Beef extract

ตารางที่ 4.9 ค่าทางสถิติของสมการความสัมพันธ์ของแหล่งไนโตรเจนและการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรีย *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 โดยการทดลองแบบ Plackett-Burman factorial design

Response	**Value**	**Response**	**Value**
Std. Dev.	0.50	R^2	0.9569
Mean	17.51	C.V. %	2.87

ตารางที่ 4.10 ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ มี่เติมในอาหารกากน้ำตาลต่อการสร้างกรดของแบคทีเรียแลคติก Pediococcus pentosaceus SW4-3 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Response	**Coefficient**	**F-value**	**p-value**
Model	17.38	49.96	< 0.0001
Fish hydrolysate	0.34	5.45	0.0444
Yeast extract	1.09	73.21	< 0.0001
Peptone	1.24	64.62	< 0.0001
Beef extract	1.16	56.57	< 0.0001

เมื่อทำการวิเคราะห์ผลตามสมการ mean effect โดยเลือกใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์เป็นแบบ factorial แล้วพบว่าทั้ง 4 ปัจจัยหรือไนโตรเจนแต่ละแหล่ง มีผลกระทบต่อปริมาณการสร้างกรดแลคติกของ *P. pentosaceus* SW4-3 โดยที่ค่าความเชื่อมั่นเมื่อใช้ fish hydrolysate, yeast extract, peptone และ beef extract เท่ากับร้อยละ 99.96, 99.99, 99.99 และ 99.99 ตามลำดับ แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของแต่ละปัจจัย (significant) ที่มีผลต่อปริมาณการสร้างกรดแลคติกของ *P. pentosaceus* SW4-3 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Chauhan และคณะ (2007) ที่ได้ทดลองโดยกำหนดให้องค์ประกอบในสูตรอาหาร MRS ร่วมกับแหล่งอาหารอื่นๆ รวมเป็น 15 ปัจจัย และวางแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman factorial design ซึ่งพวกเขาพบว่า yeast extract, peptone และ beef extract มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก ซึ่งมีค่าความเชื่อมั่นเท่ากับร้อยละ 99.92, 99.92 และ 99.79 ตามลำดับ และในขั้นตอนต่อไปของงานวิจัยนี้จึงได้เลือกใช้ fish hydrolysate, yeast extract, peptone และ beef extract เป็นแหล่งไนโตรเจนในสูตรอาหารการน้ำตา และใช้การทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ในการวางแผน

4.5.2 ผลการทดสอบปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมต่อการหมักกรดแลคติก โดยการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD)

ผลการทดสอบเพื่อหาปริมาณแหล่งคาร์บอน (molasses) และแหล่งไนโตรเจน (fish hydrolysate) ทดแทนที่เหมาะสมในอาหาร MRS โดยได้วางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ซึ่งมีปัจจัยที่ศึกษาทั้งหมด 5 ปัจจัย ซึ่งแบ่งเป็นแหล่งคาร์บอน 1 ปัจจัยคือ molasses และแหล่งไนโตรเจน 4 ปัจจัย ได้แก่ fish hydrolysate, yeast extract, peptone และ beef extract และแปรผันปริมาณสารอาหาร (ตารางที่ 3.4) และหมักด้วยแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* SW4-3 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.11

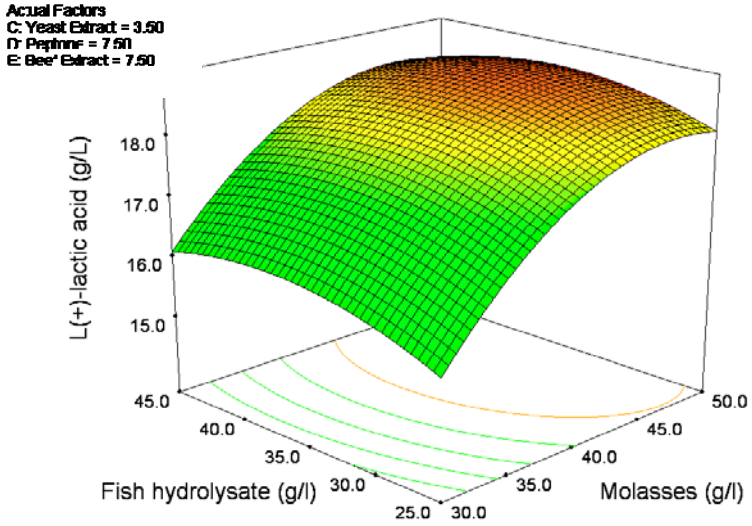
ตารางที่ 4.11 ผลการหมักกรดแลคติกของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 เมื่อแปรผันแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ในอาหารกากน้ำตาลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในการทดลองแบบ Central Composite Design

Run order	Factor (g/l)					D(-)-lactic acid (g/l)	L(+)-lactic acid (g/l)	Predict L(+)-lactic acid (g/l)
	Molasses	Fish hydrolysate	Yeast extract	Peptone	Beef extract			
1	40.0	35.0	3.5	7.5	7.5	2.49	18.50	18.30
2	50.0	45.0	5.0	5.0	5.0	2.26	18.10	17.40
3	40.0	35.0	6.5	7.5	7.5	2.57	16.30	16.00
4	20.0	35.0	3.5	7.5	7.5	2.46	11.30	12.50
5	30.0	45.0	2.0	10.0	5.0	2.78	14.90	15.10
6	30.0	25.0	5.0	10.0	10.0	1.90	15.80	15.40
7	50.0	25.0	2.0	10.0	5.0	1.93	16.30	16.50
8	30.0	45.0	5.0	10.0	10.0	2.19	16.70	15.20
9	30.0	45.0	2.0	5.0	5.0	2.17	14.90	14.50
10	40.0	35.0	3.5	7.5	7.5	2.15	20.30	18.30
11	40.0	35.0	3.5	7.5	7.5	1.51	18.50	18.30
12	30.0	25.0	5.0	10.0	5.0	1.67	14.90	14.40
13	50.0	25.0	2.0	5.0	10.0	1.85	19.00	18.60
14	30.0	25.0	5.0	5.0	5.0	1.92	14.00	14.20
15	40.0	35.0	3.5	12.5	7.5	2.74	18.10	18.10
16	40.0	35.0	3.5	7.5	7.5	3.19	18.50	18.30
17	30.0	25.0	2.0	10.0	5.0	3.25	14.00	13.50
18	50.0	45.0	2.0	5.0	10.0	2.59	19.00	18.10
19	30.0	25.0	2.0	10.0	10.0	2.82	15.80	15.50
20	40.0	35.0	3.5	7.5	2.5	2.89	18.10	16.80

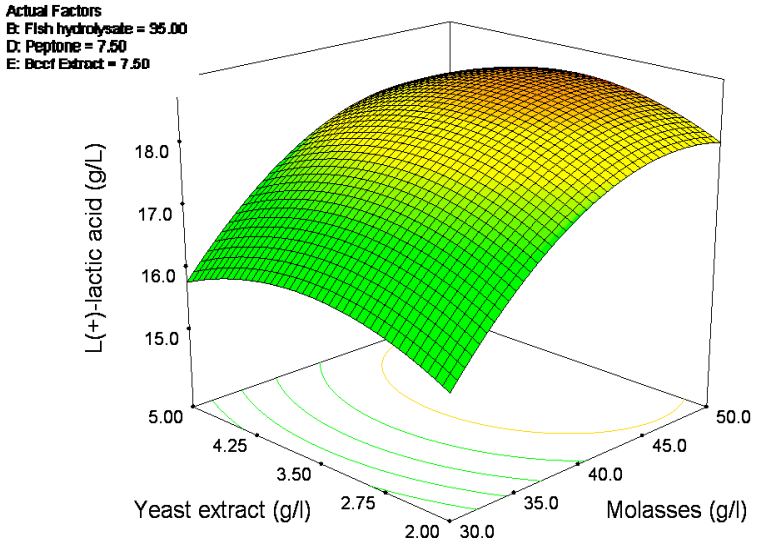
ตารางที่ 4.11 ผลการหมักกรดแลคติกของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 เมื่อแปรผันแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ในอาหารกากน้ำตาลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในการทดลองแบบ Central Composite Design (ต่อ)

Run order	Factor (g/l)					D(-)-lactic acid (g/l)	L(+)-lactic acid (g/l)	Predict L(+)-lactic acid (g/l)
	Molasses	Fish hydrolysat	Yeast extract	Peptone	Beef extract			
21	40.0	35.0	3.5	7.5	7.5	2.81	17.60	18.30
22	30.0	45.0	5.0	10.0	5.0	3.00	13.60	15.50
23	30.0	45.0	5.0	5.0	5.0	2.88	14.90	14.90
24	50.0	45.0	5.0	5.0	10.0	2.90	15.40	17.40
25	50.0	45.0	5.0	10.0	10.0	2.94	16.30	16.90
26	50.0	45.0	2.0	10.0	10.0	2.19	17.60	17.60
27	40.0	35.0	0.5	7.5	7.5	1.96	15.80	15.90
28	40.0	15.0	3.5	7.5	7.5	1.96	15.80	16.30
29	40.0	35.0	3.5	7.5	7.5	2.19	17.60	18.30
30	30.0	45.0	5.0	5.0	10.0	2.48	16.30	15.70
31	50.0	45.0	2.0	10.0	5.0	2.18	17.20	17.70
32	40.0	35.0	3.5	7.5	7.5	2.28	17.60	18.30
33	50.0	25.0	5.0	5.0	10.0	2.29	19.90	18.20
34	60.0	35.0	3.5	7.5	7.5	1.96	18.50	17.20
35	30.0	45.0	2.0	10.0	10.0	2.03	15.80	15.70
36	40.0	55.0	3.5	7.5	7.5	2.10	17.60	17.00
37	50.0	25.0	5.0	10.0	5.0	2.03	16.70	17.20
38	50.0	25.0	2.0	10.0	10.0	2.15	17.60	17.60
39	30.0	45.0	2.0	5.0	10.0	2.03	16.30	16.20
40	30.0	25.0	5.0	5.0	10.0	2.30	16.30	16.20
41	30.0	25.0	2.0	5.0	5.0	2.21	14.00	13.40
42	30.0	25.0	2.0	5.0	10.0	2.37	15.80	16.40
43	50.0	25.0	5.0	5.0	5.0	2.42	15.80	17.00
44	50.0	25.0	5.0	10.0	10.0	2.44	16.70	17.30
45	40.0	35.0	3.5	7.5	7.5	2.31	17.60	18.30
46	40.0	35.0	3.5	7.5	12.5	2.34	17.60	18.70
47	50.0	45.0	2.0	5.0	5.0	2.43	15.80	17.20
48	40.0	35.0	3.5	2.5	7.5	2.45	18.50	18.40
49	50.0	45.0	5.0	10.0	5.0	2.17	19.00	18.00
50	50.0	25.0	2.0	5.0	5.0	2.27	15.80	16.30

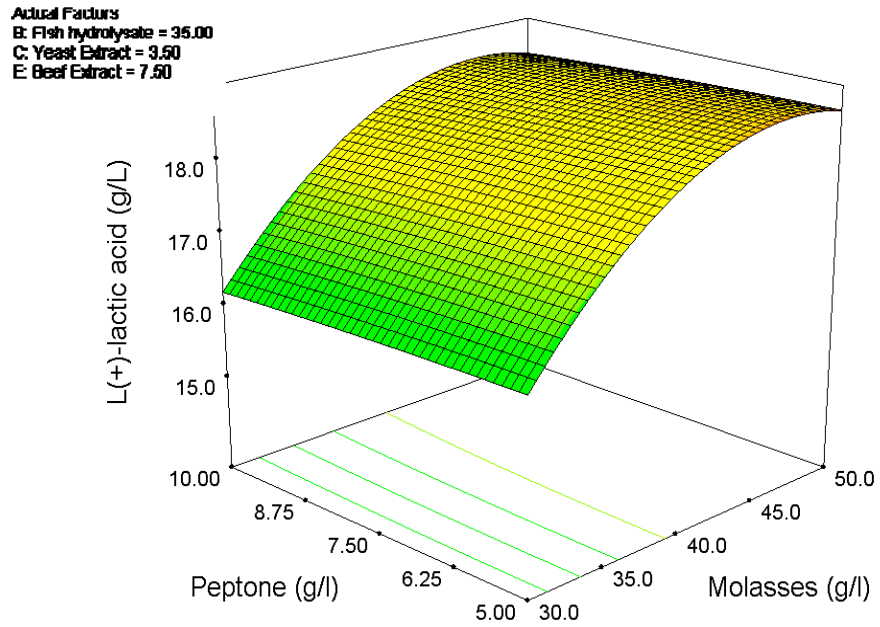
เมื่อนำผลการทดลองในตารางที่ 4.11 มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของแหล่งอาหาร (ตัวแปรอิสระ) และปริมาณกรดแลคติก (ตัวแปรตาม) ในรูปแบบพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface plot) ได้กราฟดังรูปที่ 4.7 - 4.10



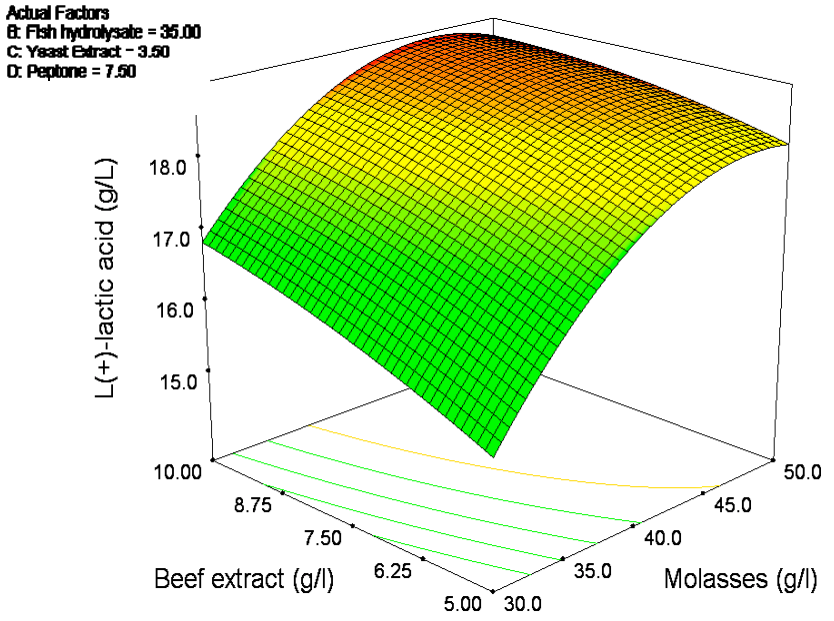
รูปที่ 4. 7 กราฟ Response surface ของความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกากน้ำตาลและ fish hydrolysate ต่อปริมาณการผลิตกรดของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4. 8 กราฟ Response surface แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกากน้ำตาลและ Yeast extract ต่อปริมาณการผลิตกรดของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4. 9 กราฟ Response surface แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกากน้ำตาลและ Peptone ที่มีผลต่อปริมาณการผลิตกรดของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 4. 10 กราฟ Response surface แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกากน้ำตาลและ Beef extract ที่มีผลต่อปริมาณการผลิตกรดของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ที่ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.12 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อปริมาณกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ในการทดลองแบบ Central Composite Design

Source	**Coefficients**	**Standard error**	**F-Value**	***P*-value**
Intercept	18.315	0.380	4.809	< 0.0001
A-Molasses	1.159	0.173	44.652	< 0.0001
B-Fish hydrolysate	0.169	0.173	0.946	0.0339
C-Yeast Extract	0.034	0.173	0.038	0.0847
D-Peptone	-0.079	0.173	0.206	0.0653
E-Beef Extract	0.484	0.173	7.775	0.0093
AB	-0.070	0.194	0.131	0.7196
AC	-0.042	0.194	0.047	0.8293
AD	-0.014	0.194	0.005	0.9427
AE	-0.211	0.194	1.183	0.2858
BC	-0.098	0.194	0.258	0.6156
BD	0.098	0.194	0.258	0.6156
BE	-0.323	0.194	2.781	0.1062
CD	0.014	0.194	0.005	0.9427
CE	-0.239	0.194	1.519	0.2277
DE	-0.267	0.194	1.898	0.1789
A^2	-0.870	0.194	20.122	0.0001
B^2	-0.419	0.194	4.662	0.0392
C^2	-0.588	0.194	9.177	0.0051
D^2	-0.025	0.194	0.017	0.8981
E^2	-0.138	0.194	0.503	0.4838

จากกราฟพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology) ที่ถึงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อปริมาณการสร้างกรดแลคติกของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ซึ่งสามารถนำมาสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์และใช้ทำนายปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับการ

ผลิตกรดแลคติกได้ โดยใช้ความสัมพันธ์ที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้งหรือตัวแบบความสัมพันธ์อันดับสอง (Second – Order Model) เป็นแบบ Quadratic model ซึ่งมีตัวแบบเป็นดังสมการที่ 4.3 ซึ่งเมื่อแทนค่าสัมประสิทธิ์ของตัวแปร (ตารางที่ 4.12) ลงในสมการดังกล่าวจะได้ดังสมการที่ 4.4 ความสัมพันธ์ของค่าตอบสนองกับปัจจัยที่ทำการทดลองและมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) เท่ากับ 0.79 (ตารางที่ 4.13) ซึ่งมากกว่า 0.75 ดังนั้นแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้จึงมีความเหมาะสมในการเป็นตัวแทนของชุดข้อมูลและสามารถใช้เป็นแบบจำลองในการทำนายค่าการตอบสนองได้

(สมการที่ 4.3)

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{k} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} x_i^2 + \sum\sum_{i<j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

(สมการที่ 4.4)

$$\text{L(+)-lactic acid (g/L)} = 18.315 + 1.159A + 0.169B + 0.034C - 0.079D + 0.484E - 0.070AB - 0.042AC - 0.014AD - 0.211AE - 0.098BC + 0.098BD - 0.323BE + 0.014CD - 0.239CE - 0.267DE - 0.870A^2 - 0.419B^2 - 0.588C^2 - 0.025D^2 - 0.138E^2$$

หมายเหตุ สมการ 4.2 แสดงในเทอมของ Code Value

A หมายถึง Molasses

B หมายถึง Fish hydrolysate

C หมายถึง Yeast extract

D หมายถึง Peptone

E หมายถึง Beef extract

ตารางที่ 4.13 ค่าทางสถิติของสมการความสัมพันธุ์ของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อปริมาณกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus pentosaceus* SW4-3

Response	**Value**	**Response**	**Value**
Std. Dev.	1.05	R^2	0.7887
Mean	21.6	C.V. %	4.88

จากนั้นเมื่อวิเคราะห์หาปริมาณแหล่งอาหารต่างๆ ของสูตรอาหารใหม่ ให้เป็นสูตรอาหารที่มีราคาถูกและผลิตสามารถกรดแลคติกได้สูง จึงกำหนดเงื่อนไขแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ให้สูตรอาหารใหม่จะต้องสามารถผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) ได้สูง (maximize) โดยที่ใช้ปริมาณแหล่งอาหารเดิม ได้แก่ yeast

extract, peptone และ beef extract น้อยที่สุด (minimize) เนื่องจากเป็นแหล่งอาหารที่มีราคาสูง และใช้แหล่งอาหารทดแทนคือกากน้ำตาลและ fish hydrolysate เท่าใดก็ได้ (in range) เนื่องจากเป็นแหล่งอาหารที่มีราคาถูก ดังตารางที่ 4.14 แล้วจึงใช้สมการที่ 4.3 คำนวณตามเงื่อนไขที่กำหนด

ตารางที่ 4.14 เงื่อนไขที่กำหนดในการทำนายปริมาณกรดแลคติก

Factor	**Goal**	**Lower Limit**	**Upper Limit**	**Lower Weight**	**Upper Weight**	**Importance**
Molasses	in range	30	50	1	1	3
Fish hydrolysate	in range	0	45	1	1	3
Yeast Extract	minimize	0	5	1	1	3
Peptone	minimize	0	10	1	1	3
Beef Extract	minimize	0	10	1	1	3
Lactic acid	maximize	0	25	1	1	3

ผลการวิเคราะห์แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ (สมการที่ 4.4) ตามเงื่อนไขดังตารางที่ 4.14 พบว่าจุดที่เหมาะสมที่สุดคือใช้กากน้ำตาล 48.85 กรัม/ลิตร (26.23 g Total sugar) ทดแทนน้ำตาลกลูโคส และใช้ Fish hydrolysate 40.0 กรัม/ลิตร (21.12 g Protein) และ Yeast extract ปริมาณ 1.55 กรัม/ลิตร (1.09 g Protein) และ Beef extract ปริมาณ 3.8 กรัม/ลิตร (2.93 g Protein) ทดแทนลงในแหล่งไนโตรเจนเดิมในอาหาร MRS โดยไม่เติมกลูโคสและ peptone (ตารางที่ 4.15) ให้ค่าทำนายปริมาณกรดแลคติก ชนิด L(+) ที่ 15.5 กรัม/ลิตร ซึ่งจะเรียกสูตรอาหารใหม่นี้ว่า MF-medium

สูตรอาหาร MF-medium ที่ได้นั้นไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนจาก peptone เนื่องจาก peptone มีผลต่อปริมาณการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* SW4-3 ไม่มาก ซึ่งสอดคล้องกับ Aspmo และคณะ (2005) ที่รายงานการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* ATCC 15521 ในอาหาร MRS ที่มีแหล่งโปรตีนที่ต่างกันคือ fish hydrolyzed (cod viscera), yeast extract, meat extract และ peptone และพบว่ามีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) เท่ากับ 0.73, 0.43, 0.40 และ 0.33 h^{-1} ตามลำดับ ซึ่ง peptone มีผลการเจริญจำเพาะของ *P. pentosaceus* ATCC 15521 น้อยที่สุด เช่นเดียวกัน

4.5.3 ผลการทดสอบความเหมาะสมของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

เพื่อยืนยันผลการทำนายของสูตรอาหาร MF-medium ที่ได้จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในข้อ 4.5.2 คือ การใช้กากน้ำตาล 48.85 ทดแทนน้ำตาลกลูโคส และใช้ fish hydrolysate, yeast extract และ beef extract ปริมาณ 40.0, 1.55 และ 3.8 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ทดแทนแหล่งไนโตรเจนเดิมในสูตรอาหาร MRS โดยจะให้ค่าทำนายกรดแลคติกชนิด L(+) (predicted L(+)-lactic acid) ที่ 15.5 กรัม/ลิตร ผลการทดลองเป็นดังตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 ปริมาณการผลิตกรดแลคติกที่ได้จากการทำนายปริมาณการใช้กากน้ำตาล fish hydrolysate, yeast extract, peptone และ beef extract และจากการทดลองจริงของแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ในอาหารสูตร MF-medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Run	Molasses (g/L)	Fish hydrolysate (g/L)	Yeast extract (g/L)	Peptone (g/L)	Beef extract (g/L)	Predict L(+)-lactic acid (g/L)	Confirm L(+)-lactic acid (g/L)
1	48.89	40.05	1.55	0.00	3.86	15.50	15.57
2	48.88	40.05	1.55	0.00	3.80	15.50	14.58
3	48.89	40.04	1.54	0.00	3.82	15.50	15.33
Average	48.89	40.05	1.55	0.00	3.83	15.50	15.16±0.42

จากตารางที่ 4.15 ได้พบว่าปริมาณกรดแลคติกจากการหมักจริงกับค่าทำนายจากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์มีค่าใกล้เคียงกันโดยแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นสูงกว่าร้อยละ 95 ($p>0.05$) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสูตรอาหารกากน้ำตาลดังแสดงในตารางที่ 4.15 มีความเหมาะสมสำหรับใช้ผลิตกรดแลคติกจากแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus pentosaceus* SW4-3

เมื่อคำนวณราคาสูตรอาหารใหม่ MF-medium เปรียบเทียบกับสูตรอาหาร MRS (ตารางที่ 4.16) พบว่าสามารถลดต้นทุน จากสูตรอาหาร MRS ซึ่งมีราคา 115.87 บาท/ลิตร เหลือเพียง 32 บาท/ลิตร ลดลงถึง 83.87 บาท หรือลดลงคิดเป็นร้อยละ 72.35 ของสูตรอาหารเดิม

ตารางที่ 4.16 เปรียบเทียบราคาสูตรอาหาร MRS และ MF-medium

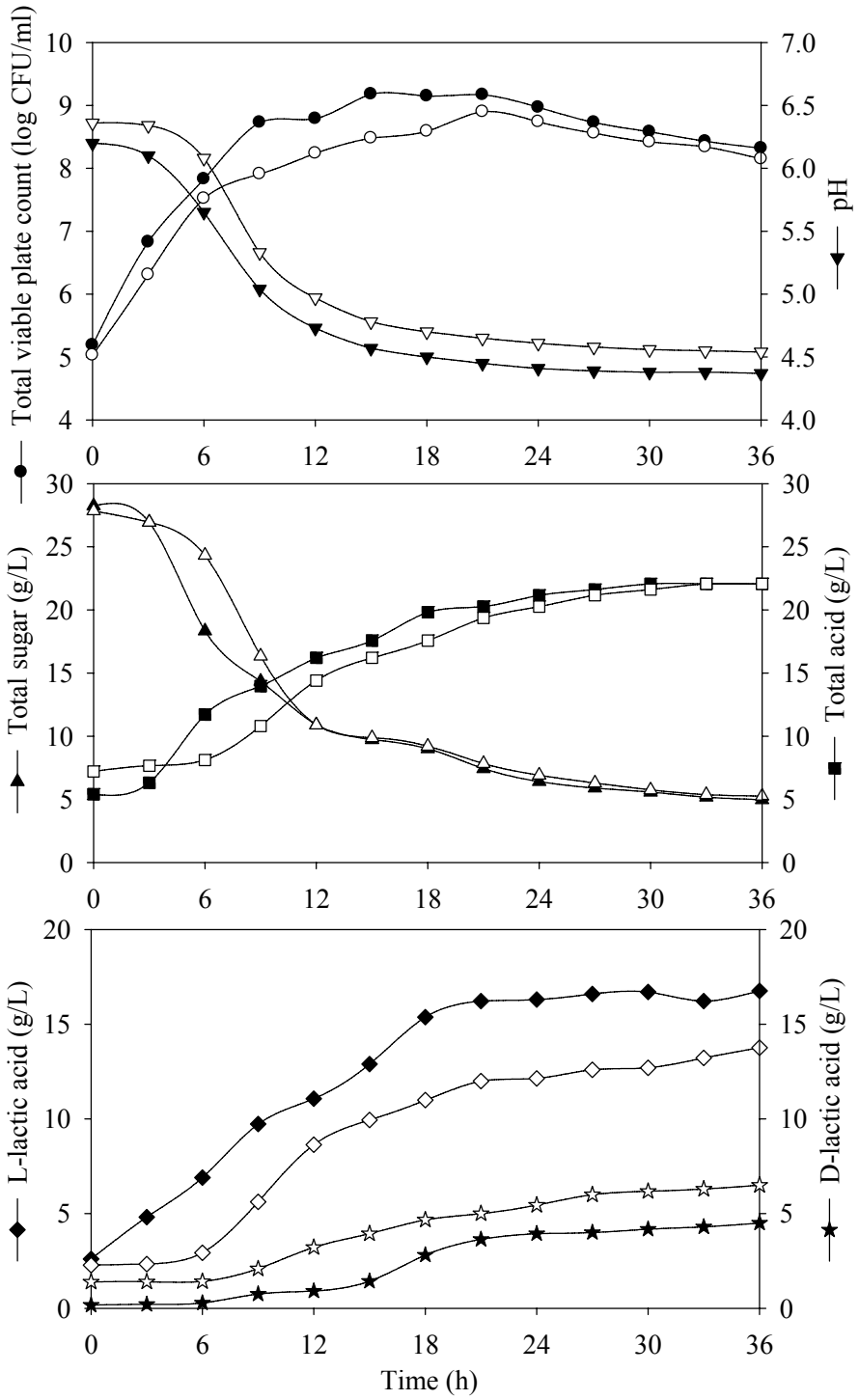
Medium Source	Nutrient unit cost (Bath/Kg)	MRS medium		MF-medium	
		Conc. (g/L)	Cost (Bath/L)	Conc. (g/L)	Cost (Bath/L)
Glucose	520.00	20.00	10.40	-	-
Molasses	6-8 (~7฿)	-	-	48.85	0.34
Fish hydrolysate	16.05	-	-	40.00	0.64
Yeast extract	2000.00	5.00	10.00	1.55	3.10
Peptone	4100.00	10.00	41.00	-	-
Beef extract	4250.00	10.00	42.50	3.76	15.98
Tween 80 (ml/l)	1,158.00	1.00	1.16	1.00	1.16
K_2HPO_4	840.00	2.00	1.68	2.00	1.68
Sodium acetate	642.00	5.00	3.21	5.00	3.21
Triammonium citrate	2880.00	2.00	5.76	2.00	5.76
$MgSO_4.7H_2O$	556.00	0.20	0.11	0.20	0.11
$MnSO_4.7H_2O$	1026.00	0.05	0.05	0.05	0.05
Total cost.	**-**	**-**	**115.87**	**-**	**32.03**

4.6 ผลการหมักกรดแลคติกแบบกะ (batch fermentation)

เพื่อที่จะศึกษาการเจริญและการหมักกรดแลคติกและคำนวณหาค่าการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) และผลการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ในสูตรอาหาร MF-medium โดยเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* SW4-3 ในอาหาร MF-medium 1.5 ลิตร ที่บรรจุในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบ/นาที และเปรียบเทียบในสภาวะไร้อากาศ (anaerobic) และสภาวะเติมอากาศ 0.5 vvm (microaerophilic) ผลที่ได้ดังรูปที่ 4.11 ซึ่งพบว่าทั้งในสภาวะ anaerobic และ microaerophilic แบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* SW4-3 สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วตั้งแต่เติมหัวเชื้อลงไปโดยไม่มี lag phase แต่ในสภาวะ anaerobic เจริญเข้าสู่ช่วง stationary phase เร็วกว่าในสภาวะ microaerophilic ที่ชั่วโมงที่ 8 และชั่วโมงที่ 21

ตามลำดับ และปริมาณเซลล์สูงสุดของ anaerobic จะสูงกว่า microaerophilic คือ 9.15 และ 8.90 logCFU/ml ตามลำดับ อัตราการเพิ่มของกรดในสภาวะ anaerobic รวดเร็วกว่าในสภาวะ microaerophilic เล็กน้อย และเมื่อเทียบปริมาณกรดในสภาวะทั้งสองที่เวลาการหมักเท่ากันที่ 21 ชั่วโมงคือ 20.27 และ 19.37 กรัม/ลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไปปริมาณกรดทั้งสองจะเริ่มใกล้เคียงกัน และสูงสุดเท่ากันคือ 22.07 กรัม/ลิตร เมื่อหมักเป็นเวลา 30 และ 33 ชั่วโมงตามลำดับ ในส่วนของค่า pH ในทั้งสองสภาวะมีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกันคือจะลดต่ำลงอย่างรวดเร็วจนชั่วโมงที่ 15 จากนั้นจะค่อยๆ ลดลงอีกเพียงเล็กน้อยจนไปสิ้นสุดการหมัก เช่นเดียวกับปริมาณน้ำตาลที่ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก จากนั้น อัตราการใช้น้ำตาลจะช้าลงจนสิ้นสุดการหมัก

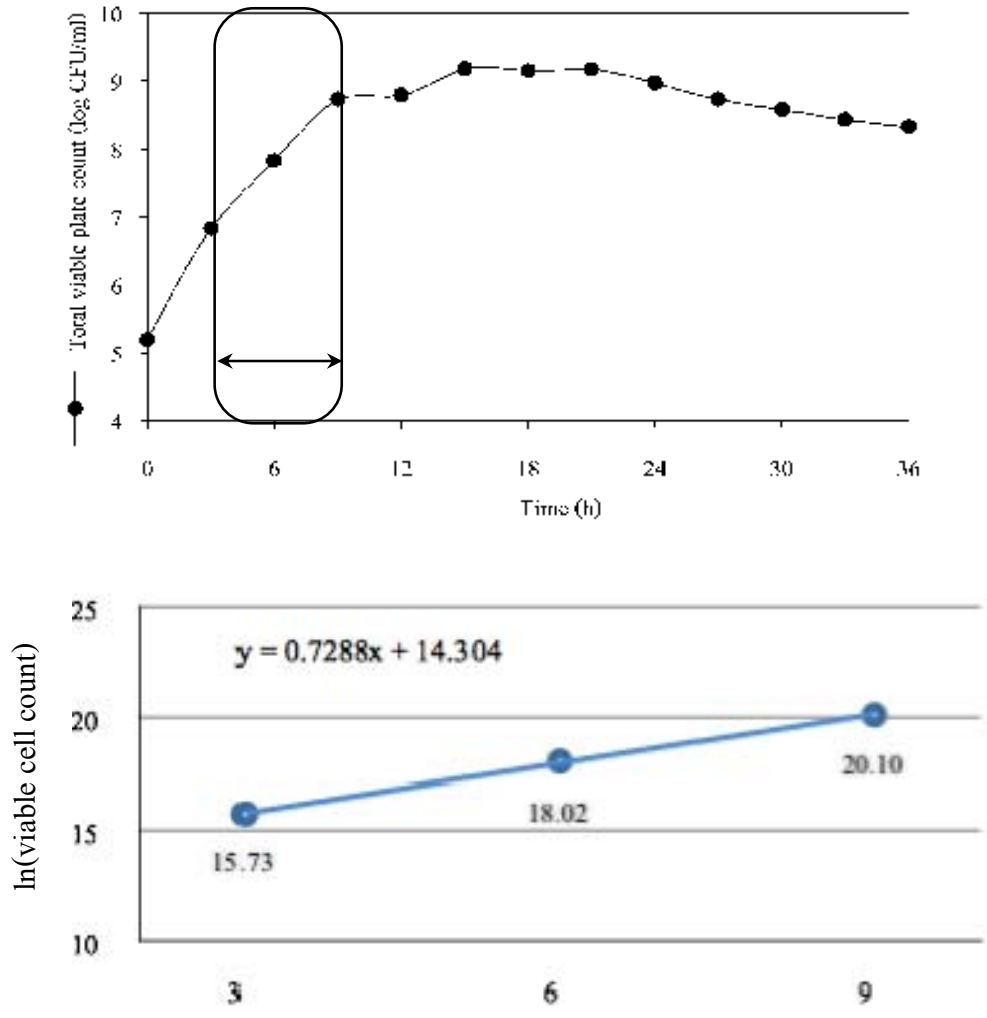
เมื่อวิเคราะห์ชนิดไอโซเมอร์ของกรดแลคติกสูงสุดที่ถูกผลิตขึ้น พบว่าในสภาวะ anaerobic ผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) (16.22 กรัม/ลิตร) ซึ่งสูงกว่าในสภาวะ microaerophilic (12.14 กรัม/ลิตร) แต่ในทางกลับกันปริมาณการผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ D(-)(5.45 กรัม/ลิตร)ในสภาวะ microaerophilic สูงกว่าในสภาวะ anaerobic (3.64 กรัม/ลิตร) นอกจากนี้ยังพบอีกว่าในทั้งสองสภาวะเมื่อเวลาหมักนานขึ้นตั้งแต่ 15 ชั่วโมงขึ้นไป อัตราการผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ D(-) เพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 4.11 เนื่องจากอัตราส่วนของการผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) และ D(-) แปรเปลี่ยนไปตามเวลา ซึ่งตรงกับที่ Aeschlimann และคณะ (1990) ได้รายงานไว้ว่า อัตราส่วนของ L(+)-lactate ต่อ D(-)-lactate ที่ *Lactobacillus helveticus* ผลิตขึ้น แปรผันอยู่ในช่วงร้อยละ 55-70 ขึ้นกับระยะเวลาการหมักและอัตราการเจริญของสายพันธุ์แบคทีเรีย นอกจากนี้ Hjorleifsdottir และคณะ (1990) ยังพบเช่นกันว่าปริมาณการผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ D(-) เพิ่มสูงขึ้น ในช่วง stationary phase จากร้อยละ 4 จนถึงร้อยละ 18



Fill key = Anaerobic condition, Open key = Microaerophilic condition

รูปที่ 4. 11 ผลการหมักกรดแลคติกแบบกะของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ในอาหาร MF-medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เมื่อนำผลการวิเคราะห์มาคำนวณหาค่าการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (maximum specific growth rate, μ_{max}) ซึ่งหาได้จากการประมาณค่าการเจริญจำเพาะสูงสุดของเชื้อ ($\mu \approx \mu_{max}$) ในช่วงแรก log phase ของการเจริญ ซึ่งเป็นช่วงที่มีซับสเตรทไม่จำกัดและยังไม่มีการจำกัดการเจริญของกรดแลคติก โดยเขียนเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า Ln (viable cell count) กับเวลาดังรูปที่ 4.12 ซึ่งการเจริญสูงสุดของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* SW4-3 อยู่ในช่วง 3-9 ชั่วโมงของการหมัก



รูปที่ 4. 12 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญกับเวลา เพื่อใช้ในการคำนวณหาค่าการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (maximum specific growth rate, μ_{max})

จากการคำนวณค่า maximum specific growth rate (μ_{max}) จากความชันกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า ln (viable cell count) กับเวลา (Ahmad and Holland, 1994):

$$dX/d\mathrm{T} = \mu X$$

$$\int \frac{1}{x}.dx = \int \mu.d\mathrm{T}$$

$$\ln(x) = \mu.\mathrm{T} \qquad (y = mx \;;\; m = \mu = slope)$$

From diagram

$$y = 0.723x \quad ; where\ y = \ln(viable\ cell)\ and\ x = time(T)$$

$$\ln(viable\ cell) = 0.723\mathrm{T} \quad So,\ \mu \approx \mu_{max} \approx 0.723\ h^{-1}$$

เมื่อคำนวณค่า kinetic parameter ของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* SW4-3 ที่หมักกรดแลคติกในอาหาร MF-medium ในสภาวะ anaerobic และสภาวะ microaerophilic แล้ว พบว่าแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* SW4-3 ที่เลี้ยงในสภาวะ anaerobic สร้างกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) สูงสุดเท่ากับ 16.22 กรัม/ลิตร ที่ 12 ชั่วโมงของการหมัก โดยมีอัตราการผลิตกรดแลคติก L(+) (Productivity) สูงสุด 0.85 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง และมีปริมาณการผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) ต่อหน่วยสับสเตรท ($Yield_{L\text{-}LA/S}$) เท่ากับ 0.78 กรัม/กรัม ซึ่งสูงกว่าในสภาวะ microaerophilic ที่สร้างกรดแลคติก L(+) สูงสุดเท่ากับ 12.0 กรัม/ลิตร ที่ 21 ชั่วโมงของการหมัก และมีอัตราการผลิตกรดแลคติก L(+) ไอโซเมอร์ (Productivity) สูงสุด 0.58 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง และมีปริมาณการผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) ไอโซเมอร์ต่อหน่วยสับสเตรท ($Yield_{L\text{-}LA/S}$) เท่ากับ 0.60 กรัม/กรัม แต่ในทั้งสองสภาวะมีปริมาณน้ำตาลเหลือใกล้เคียงกันคือ 7.43 และ 7.86 กรัม/ลิตร ซึ่งสรุปได้ว่าแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* SW4-3 เจริญและผลิตกรดแลคติก (Productivity) ที่สภาวะ anaerobic ได้ดีกว่า microaerophilic โดยมีค่า specific growth rate (μ_{max}) เท่ากับ 0.73 h^{-1} และ 0.61 h^{-1} ตามลำดับ และมีอัตราการผลิตกรดแลคติก (Productivity) เท่ากับ 0.85 และ 0.58 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.17

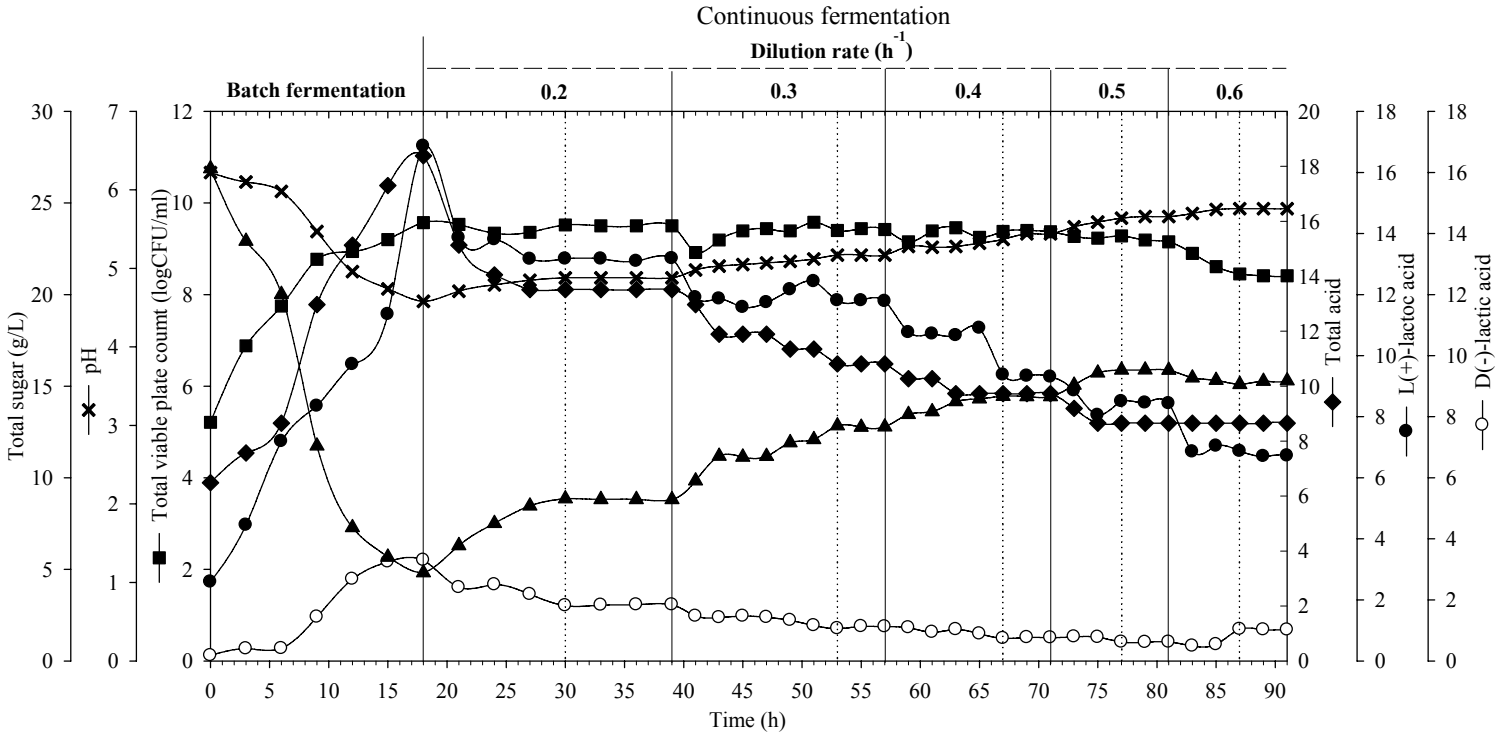
ตารางที่ 4.17 ผลกรดแลคติกของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 เมื่อหมักแบบกะสภาวะไร้อากาศ (anaerobic) และเติมอากาศ 0.5 vvm (microaerophilic) ในอาหาร MF-medium ที่อุณหภูมิ 37°C

Condition	**μ_{max} (h^{-1})**	**Max. $C_{L\text{-}LA}$ (g/l)at 21 h**	**C_{Glc} (g/l) at 21 h**	**$P_{L\text{-}LA}$ (g/l/h)**	**$\%Y_{L\text{-}LA}$ (g/g)**	**Purity (%)**
Anaerobic	0.73	16.22	7.43	0.85	78	81.67
Microaerophilic	0.61	12.0	7.86	0.58	60	70.59

ผลการทดลองแสดงว่า *P. pentosaceus* SW4-3 เป็นแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ โดยมีค่า specific growth rate (μ_{max}) เมื่อเจริญในอาหาร MF-medium ที่สภาวะไร้อากาศ เท่ากับ 0.73 h^{-1} ดังนั้นในขั้นตอนต่อไปของการหมักกรดแลคติกแบบต่อเนื่องได้ใช้สภาวะ anaerobic และกำหนดอัตราการเจือจาง (dilution rate) ในระดับที่ต่ำกว่า 0.73 h^{-1} เพื่อไม่ให้เกิดการ wash out

4.7 ผลการหมักกรดแลคติกแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation)

แบคทีเรียแลคติกเมื่อเจริญจะผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตผลของการหมัก แต่เนื่องจากกรดแลคติกนี้เมื่อสะสมในปริมาณมากจะมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติกเอง (product inhibition) การหมักแบบต่อเนื่องแบบแบบ chemo stat ซึ่งมีการเติมอาหารใหม่ (fresh medium) ลงในถังหมักและดึงอาหารเก่าออกในปริมาณการไหลเข้าและออกที่เท่ากันที่เรียกว่าอัตราการเจือจาง (dilution rate, D) นอกจากจะลดปัญหาด้านการยับยังการเจริญของแบคทีเรียจากการสะสมของกรดที่เพิ่มสูงขึ้นในระหว่างการหมักแล้ว ยังช่วยเวลาและแรงงานที่ต้องใช้ในกระบวนการหมักแบบกะ เพราะในกระบวนการหมักต่อเนื่องแบบ chemo stat มีการเติมอาหารใหม่ (fresh medium) ลงในถังหมักและดึงอาหารเก่าออกในปริมาณการไหลเข้าและออกที่เท่ากันที่เรียกว่าอัตราการเจือจาง (dilution rate, D) ซึ่งในอุดมคตินั้นการหมักที่อัตราการเจือจางสูงสุดที่สามารถทำได้จะเท่ากับอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (maximum specific growth rate, μ_{max}) แต่ในการปฏิบัติจริงโดยทั่วไปแล้วหากกำหนดอัตราการเจือจางให้เท่ากับอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดแล้วจะเกิดการ wash out ดังนั้นอัตราการเจือจางจึงควรต่ำกว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเล็กน้อย ซึ่งจากการทดลองแบบกะ(ข้อ 4.6) พบว่า แบคทีเรียแลคติก *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.73 ในการหมักแบบต่อเนื่องจึงได้แปรผันอัตราเจือจางที่ 0.2 - 0.6 h^{-1} โดยเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* SW4-3 ในอาหาร MF-medium 1.5 ลิตร ในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ในสภาวะไร้อากาศ (anaerobic) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และใช้อัตราการกวนที่ 200 รอบ/นาที และเริ่มหมักในระบบแบบกะเป็นเวลา 18 ชั่วโมงให้มีปริมาณเซลล์สูงสุดก่อน จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นระบบการหมักแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางที่ 0.2 h^{-1} และรอจนเข้าสู่สภาวะคงตัว (steady state) ซึ่งโดยทั่วไปนั้นช่วงเวลาตั้งแต่การเปลี่ยนอัตราการเจือจางจนเข้าสู่สภาวะคงตัวจะใช้เวลาประมาณ 3 Resident time (1 RT = 1/dilution rate) จึงเปลี่ยนอัตราการเจือจางเป็น 0.3 h^{-1} และทำเช่นเดียวกันที่อัตราการเจือจาง 0.4 h^{-1}, 0.5 h^{-1} และ 0.6 h^{-1} ต่อเนื่องไปตามลำดับ เก็บตัวอย่างต่อเนื่องทุกๆ 2-3 ชั่วโมง ผลการหมักแบบต่อเนื่องที่อัตราเจือจางต่างๆ แสดงดังรูปที่ 4.13



รูปที่ 4. 13 ผลการผลิตกรดแลคติกแบบต่อเนื่องของแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ในอาหาร MF mediumที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบ/นาที ที่อัตราการเจือจางต่างๆ

ผลการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 เมื่อหมักแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจาง 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 h^{-1} (รูปที่ 4.13) ซึ่งเมื่อเปลี่ยนการหมักแบบกะไปเป็นการหมักแบบต่อเนื่อง ได้ใช้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมงหรือประมาณ 2.4 resident time จึงเข้าสู่สภาวะคงตัว (steady state) ซึ่งการที่เชื้อสามารถเข้าสู่สภาวะคงตัวได้เร็วเนื่องจากเซลล์ยังมีความสมบูรณ์ โดยตั้งแต่เริ่มเปลี่ยนสู่การหมักแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางที่ 0.6 h^{-1} ที่เวลาจาก 0 ชั่วโมง จนเข้าสู่ steady state ที่ชั่วโมงที่ 12 นั้นปริมาณเซลล์ลดลงจาก 9.57 เป็น 9.50 logCFU/ml ปริมาณกรดทั้งหมดลดลงจาก 18.38 เป็น 13.51 กรัม/ลิตร ค่า pH เพิ่มขึ้นจาก 4.58 เป็น 4.88 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มจาก 4.82 เป็น 8.81 กรัม/ลิตร เนื่องจากเวลาที่แบคทีเรียจะใช้น้ำตาลได้นั้นสั้นลง ปริมาณกรดแลคติกชนิด L(+) และ D(-) ลดลงจาก 16.86 และ 3.30 เป็น 13.18 และ 1.84 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

เมื่อเพิ่มอัตราการเจือจางเป็น 0.3 h^{-1} พบว่าปริมาณเซลล์เฉลี่ยที่สภาวะคงตัวเพิ่มจาก 9.50 เป็น 9.62 logCFU/ml ปริมาณกรดทั้งหมดลดลงจาก 13.51 เป็น 10.81 กรัม/ลิตร ค่า pH เพิ่มขึ้นจาก 4.88 เป็น 5.17 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มจาก 8.81 เป็น 12.78 กรัม/ลิตร ปริมาณกรดแลคติกชนิด L(+) และ D(-) ลดลงจาก 13.28 และ 1.84 เป็น 11.78 และ 1.12 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มอัตราการเจือจางเป็น 0.4 h^{-1} พบว่าปริมาณเซลล์ลดลงจาก 9.62 เป็น 9.37 logCFU/ml ปริมาณกรดทั้งหมดลดลงจาก 10.81 เป็น 9.78 กรัม/ลิตร ค่า pH เพิ่มขึ้นจาก 5.17 เป็น 5.44 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มจาก 12.78 เป็น 14.43 กรัม/ลิตร ปริมาณกรดแลคติกชนิด L(+) และ D(-) ลดลงจาก 11.78 และ 1.12 เป็น 9.30 และ 0.76 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ที่อัตราการเจือจางเป็น 0.5 h^{-1} ปริมาณเซลล์ กรดทั้งหมด ลดลงเป็น 9.15 logCFU/ml และ 8.65 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ค่า pH เพิ่มขึ้นเป็น 5.66 แต่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเพิ่มเป็น 15.87 กรัม/ลิตร ปริมาณกรดแลคติกชนิด L(+) และ D(-) ลดลงจาก 9.30 และ 0.76 เป็น 8.43 และ 0.62 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มอัตราการเจือจางเป็น 0.6 h^{-1} พบว่าปริมาณเซลล์ลดลงมาอยู่ที่ 8.41 logCFU/ml แต่ปริมาณกรดทั้งหมดโดยวิธีการไตเตรทคงที่เท่าเดิมที่ 8.65 กรัม/ลิตร ค่า pH เพิ่มขึ้นจาก 5.66 เป็น 5.76 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลดลงจาก 15.87 เป็น 15.30 กรัม/ลิตร ซึ่งต่างจากที่อัตราการเจือจางอื่นๆที่ผ่านมาที่ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดจะเพิ่มขึ้น แสดงว่าที่อัตราการเจือจาง 0.6 h^{-1} มีอัตราการใช้น้ำตาล (glucose consumption) เพิ่มสูงขึ้น ปริมาณกรดแลคติก ชนิด L(+) ลดลงจาก 8.43 เป็น 6.72 กรัม/ลิตร แต่ปริมาณกรดแลคติกชนิด D(-) เพิ่มขึ้นจาก 0.62 เป็น 1.19 กรัม/ลิตร

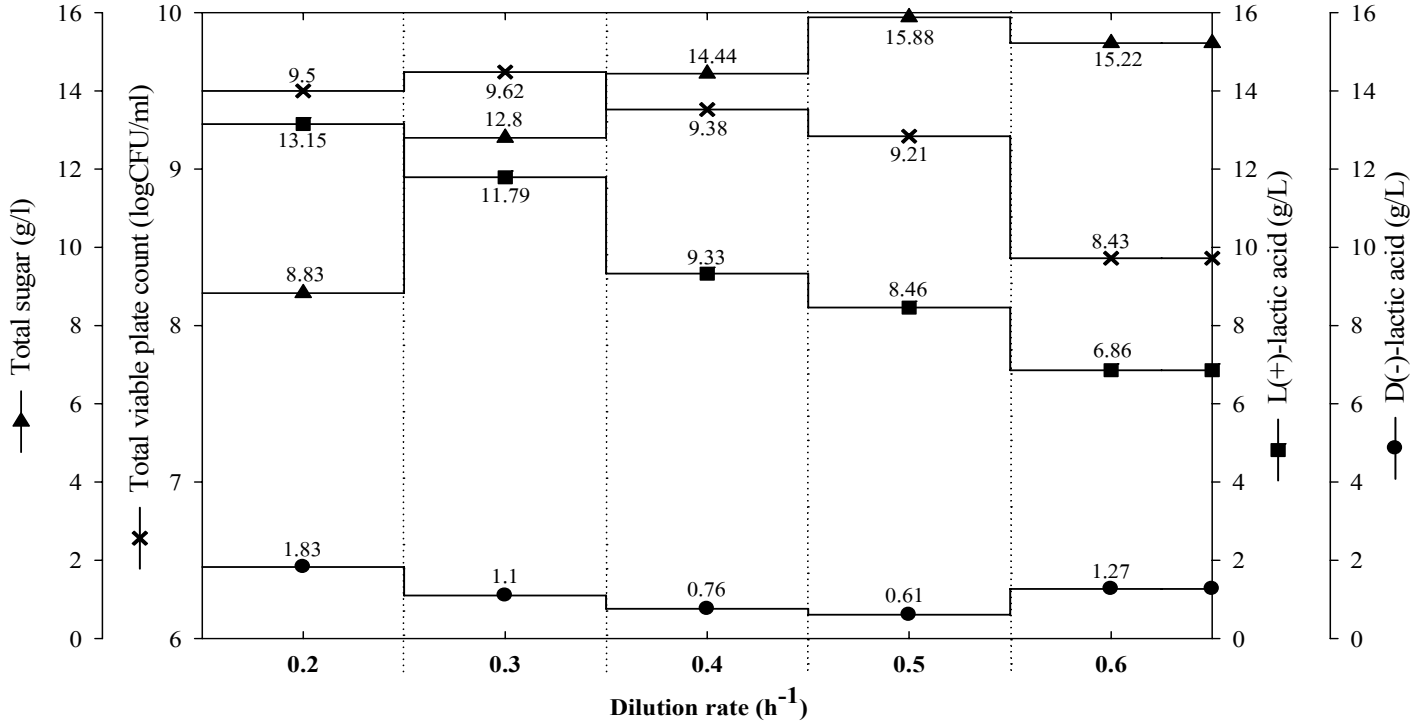
จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่ออัตราการเจือจางเพิ่มขึ้นจาก 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 h^{-1} อัตราการผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) ของ *P. pentosaceus* SW4-3 เพิ่มสูงขึ้นตามลำดับเช่นกันซึ่งเท่ากับ 2.63, 3.54, 3.73 และ 4.23 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มอัตราเจือจางสูงขึ้นจนใกล้จุดวิกฤต (critical dilution rate) ที่ 0.6 h^{-1} ซึ่งแม้แบคทีเรียจะใช้น้ำตาลมากขึ้นก็ตาม แต่อัตราการผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) กลับลดลงเหลือ 4.11 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ซึ่งเป็นไปได้เพราะเมื่อหมักต่อเนื่องติดต่อกันเป็นเวลานาน

พบว่าเซลล์บางส่วนเจริญยึดเกาะบนส่วนประกอบต่างๆภายในถังหมัก (wall growth) ทำให้เซลล์ที่อยู่ด้านในจึงได้รับสารอาหารได้ไม่เพียงพอ ทั้งนี้เพราะแบคทีเรียแลคติกโดยทั่วไปส่วนใหญ่ผลิตสารโพลีแซคคาไรด์และก่อตัวเป็นไบโอฟิล์ม (biofilm) เกาะติดกับพื้นผิวต่างๆได้ นอกจากนี้เซลล์แบคทีเรียเมื่อเจริญในเวลนานๆ ในช่วงหลังมีความอ่อนแอลงมีผลให้ Productivity และ $Yield_{L\text{-}LA/S}$ ลดลง ดังตารางที่ 4.18 และผลการหมักโดยเฉลี่ยแสดงดังรูปที่ 4.14

ตารางที่ 4.18 ค่าเฉลี่ยผลผลิตกรดแลคติกในช่วงสภาวะคงตัวของการหมักแบบต่อเนื่องของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ในอาหาร MF-medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบ/นาที ที่อัตราการเจือจางต่างๆ

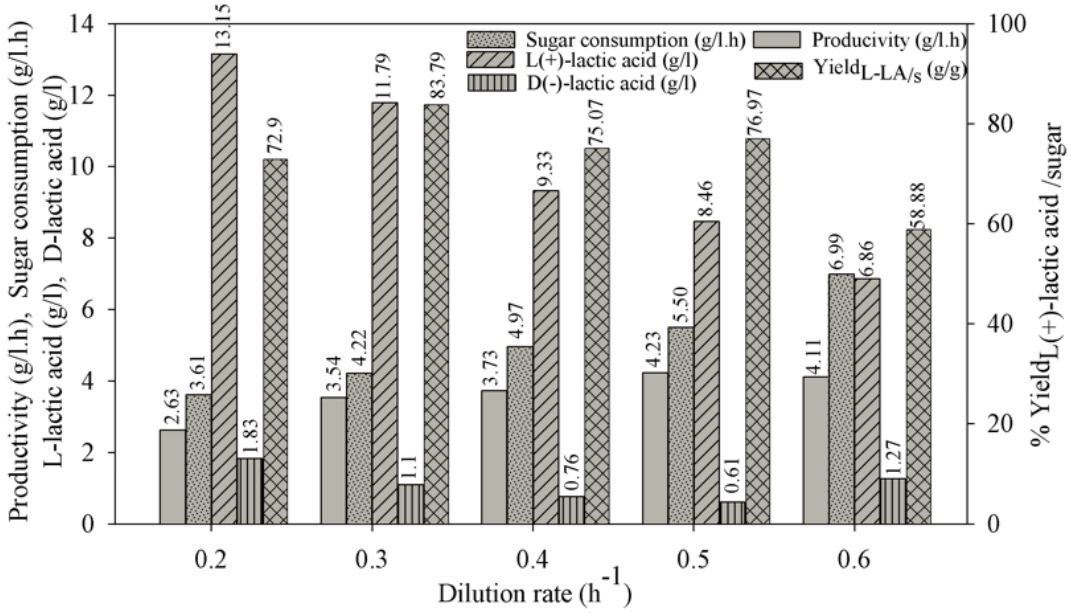
Dilution rate (h^{-1})	**pH**	**Total plate count (logCFU/ml)**	**Total sugar (g/L)**	**Total acid (g/L)**	**D-lactic acid (g/L)**	**L-lactic acid (g/L)**
0.2	4.88	9.50	8.83	13.51	1.83	13.15
0.3	5.17	9.62	12.80	10.81	1.10	11.79
0.4	5.42	9.38	14.44	9.73	0.76	9.33
0.5	5.65	9.21	15.88	8.65	0.61	8.46
0.6	5.76	8.43	15.22	8.65	1.27	6.86

ดังนั้นเมื่อนำผลการทดลองการหมักกรดแลคติกแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจาง 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 h^{-1} มาคำนวณหาค่าต่างๆ และเปรียบเทียบดังรูปที่ 4.14 พบว่าอัตราการใช้สับสเตรท (sugar consumption) ของ *P. pentosaceus* SW4-3 เพิ่มขึ้น และค่าร้อยละของการผลิตกรดแลคติก ชนิด L(+) ต่อหน่วยของสับสเตรท ($Yield_{L\text{-}LA/S}$) ที่อัตราการเจือจาง 0.2, 0.3, 0.4. 0.5 และ 0.6 h^{-1} มีค่าเท่ากับร้อยละ 72.9, 83.79, 75.07, 76.97 และ 58.88 ตามลำดับ



รูปที่ 4. 14 ผลการหมักโดยเฉลี่ยของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 เมื่อในการหมักแบบต่อเนื่องในอาหาร MF-medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะคงตัว (Steady strate) ที่อัตราการเจือจางต่างๆ

แต่เนื่องจากผลการทดลองข้างต้นเป็นผลการทดลองในลักษณะของปริมาณความเข้มข้น การเปรียบเทียบค่าต่างๆ ในแต่ละอัตราการเจือจางจะต้องคำนวณข้อมูลเป็นอัตรา (rate) ดังนั้นเมื่อนำผลการทดลองการหมักกรดแลคติกแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจาง 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 h^{-1} มาคำนวณค่าต่างๆ เปรียบเทียบดังรูปที่ 4.20 พบว่าการใช้สับสเตรท (sugar consumption) ของแบคทีเรีย แลคติก *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 มีอัตราการใช้น้ำตาลมากขึ้นเมื่ออัตราการเจือจางสูงขึ้นเท่ากับ 3.61, 4.22, 4.97, 5.50 และ 6.99 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ตามลำดับ



รูปที่ 4. 15 สรุปผลปริมาณกรดแลคติก อัตราการใช้น้ำตาล อัตราการผลิตกรดแลคติก (Productivity) และ $Yield_{L\text{-}LA/S}$ ของการหมักกรดแลคติกแบบต่อเนื่องที่อัตราการเจือจางต่างๆ ของ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 ในอาหาร MF-medium ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

จากผลสรุปได้ว่าสภาวะที่ดีที่สุดของการผลิตกรดแลคติกแบบต่อเนื่องของ *P. pentosaceus* SW4-3 ในอาหาร MF-medium ปริมาตร 1.5 ลิตร ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบ/นาที คือที่อัตราการเจือจาง 0.5 h^{-1} โดยมีการใช้สับสเตรท (sugar consumption) 5.50 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง มีอัตราการผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) (productivity) เท่ากับ 4.23 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าในการหมักแบบกะ (0.85 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง) ถึง 5 เท่า มีค่าร้อยละของการผลิตกรดแลคติกชนิด L(+)ไอโซเมอร์ต่อหน่วยของสับสเตรท ($Yield_{L\text{-}LA/S}$) เท่ากับร้อยละ 76.79 ใกล้เคียงกับการหมักแบบกะที่มี

$Yield_{L\text{-}LA/S}$ ร้อยละ 78 นอกจากนี้ยังมีการผลิตกรดแลคติกชนิด D(-) (productivity) ต่ำ (0.31 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง) และความบริสุทธิ์ (purity) ของกรดแลคติกชนิด L(+) สูงถึงร้อยละ 93.15 ซึ่งสูงกว่าในการหมักแบบกะ (81.67 %)

ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานวิจัยอื่นๆที่พบว่าการหมักกรดแลคติกแบบต่อเนื่องจะช่วยให้อัตราการผลิตกรดแลคติกสูงขึ้นกว่าการหมักแบบกะ อย่างเช่น Xu และคณะ (2006) รายงานการหมักกรดแลคติกแบบต่อเนื่องของ *Lactobacillus paracasei* ในอาหาร MRS ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส และควบคุม pH ไว้ที่ 6 และเติมอากาศในอัตรา 0.3 vvm และพบว่าเมื่อใช้ dilution rate เท่ากับ 0.30 และ 0.40 h^{-1} ให้ค่า Productivity เท่ากับ 2 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ส่วน Tashiro และคณะ (2011) รายงานว่าในการหมักกรดแลคติกของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* QU 41 ในอาหาร MRS ที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส และควบคุม pH ไว้ที่ 6 ให้ค่า specific growth rate เท่ากับ 0.48 h^{-1} และมี Productivity เท่ากับ 1.3 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง และ Kamoshita และคณะ (1998) พบว่าเมื่อหมักกรดแลคติกแบบต่อเนื่องด้วย *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* IF0 3427 ในอาหาร MRS ได้ค่า specific growth rate เท่ากับ 0.16 h^{-1} และมี Productivity เท่ากับ 6.2 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ซึ่งรายงานไว้ตรงกันว่าการหมักกรดแลคติกแบบต่อเนื่องจะให้อัตราการผลิตกรดแลคติกสูงขึ้นกว่าการหมักแบบกะ

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้แบ่งการศึกษาออกเป็น 4 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถใช้กากน้ำตาลซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำตาลซูโครสได้ดี และผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) ไอโซเมอร์ได้สูง เมื่อได้แบคทีเรียแลคติกที่มีคุณลักษณะที่ดีตามที่ต้องการแล้ว ต่อมาในขั้นตอนที่สองจึงได้ทดสอบเพื่อระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกที่ทำการคัดเลือกได้ ขั้นตอนที่สามเป็นการนำวิธีการทางสถิติมาใช้ในการปรับปรุงสูตรอาหาร MRS โดยใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกคือใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้ fish hydrolysate เป็นแหล่งไนโตรเจน มาทดแทนวัตถุดิบเดิมที่มีราคาแพง จากนั้นเมื่อได้สูตรอาหารที่ดีแล้วจึงศึกษาในขั้นตอนที่สี่คือการหมักกรดแลคติกโดยใช้อาหารสูตรที่ได้รับการปรับปรุงแล้วในกระบวนการหมักแบบกะและแบบต่อเนื่อง เพื่อเพิ่มอัตราการผลิตกรดแลคติกให้สูงขึ้นและลดปัญหาการยับยั้งการเจริญจากการสะสมของกรดแลคติกที่แบคทีเรียสร้างขึ้น ผลการทดลองทั้งหมดสามารถสรุปได้ดังนี้

การคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างต่างๆ ที่สามารถใช้กากน้ำตาลซึ่งมีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำตาลซูโครสได้ดี และผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) ไอโซเมอร์ได้สูง นั้นสามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 460 ไอโซเลท และเมื่อทดสอบหาไอโซเลทที่สามารถผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) ได้สูง พบว่าแบคทีเรียแลคติกรหัส SW4-3 ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำเสียจากโรงงานขนมจีนสามารถผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) ได้สูงที่สุด 15.72 กรัม/ลิตร เมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS ที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาล ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลา 21 ชั่วโมงของการหมัก ส่วนที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส จะสร้างกรดแลคติกได้ต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกรหัส SW4-3 มาจำแนกสายพันธุ์โดยใช้วิธีต่างๆ คือการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยาในสภาวะต่างๆ ได้แก่ การทดสอบการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL v5.1 kit และการหาลำดับเบส (DNA sequencing) เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล Gene bank พบว่าแบคทีเรียแลคติกรหัส SW4-3 ติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม เซลล์เรียงตัวเป็นสี่เซลล์ติดกัน เจริญในอาหารที่ pH 4 อาหารที่มีเกลือเข้มข้นร้อยละ 6.5 และเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียในจีนัส *Pediococcus* sp และผลการหมักน้ำตาลโดยชุดทดสอบสำเร็จรูประบุว่าเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* นอกจากนี้ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสกับฐานข้อมูล Gene Bank พบว่ามีลำดับเบสมีความใกล้เคียงกันแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* ร้อยละ

96 ผลการทดสอบทั้งสามวิธีสอดคล้องกัน ซึ่งสรุปได้ว่าแบคทีเรียแลคติกรหัส SW4-3 เป็นแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus*

ขั้นตอนที่สามเป็นการวิเคราะห์องค์ประกอบและคัดเลือกวัตถุดิบราคาต่ำและเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารทดแทนในอาหารสูตร MRS โดยแหล่งไนโตรเจนที่ได้นำมาวิเคราะห์ทั้งหมด 4 ชนิด คือ soybean meal, corn steep liquor, whey และ fish hydrolysate พบว่ามีปริมาณโปรตีนร้อยละ 50.02, 11.88, 0.57 และ 52.79 ตามลำดับ แต่เนื่องจาก soybean meal มีลักษณะเป็นของแข็งไม่เหมาะกับการหมักแบบ submerge fermentation และ corn steep liquor และ whey มีปริมาณโปรตีนน้อยและมีราคาแพงจึงไม่เหมาะจะนำมาใช้ในการหมักซึ่งต้องการที่จะลดต้นทุน ดังนั้น fish hydrolysate จึงเป็นตัวเลือกที่เหมาะสมที่สุดที่จะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนและใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน ในการทดลองได้นำสถิติวิธี Central Composite Design (CCD) มาใช้ในการวางแผนทดลองเพื่อปรับปรุงสูตรอาหาร MRS และใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) ในการวิเคราะห์ปริมาณกากน้ำตาลและ fish hydrolysate ที่สามารถทดแทน glucose, yeast extract, peptone และ beef extract ในอาหาร MRS ได้ จนได้สูตรอาหารใหม่ (MF-medium) ที่ประกอบด้วย molasses 48.85 g/l, fish hydrolydsate 40 g/l, yeast extract 1.55 g/l, beef extract 3.76 g/l, tween80 1 ml/l, K_2HPO_4 2 g/l, sodium acetate 5 g/l, triammonium citrate 2 g/l, $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 g/l และ $MnSO_4.7H_2O$ 0.05 g/l และได้ค่าทำนายปริมาณกรดแลคติกชนิด L(+) ไอโซเมอร์เท่ากับ 15.5 กรัม/ลิตร และเมื่อเปรียบเทียบราคาสูตรอาหารใหม่ MF-medium กับสูตรอาหาร MRS พบว่าสามารถลดต้นทุนสูตรอาหาร MRS เดิมซึ่งมีราคา 115.87 บาท/ลิตร เหลือเพียง 32 บาท/ลิตร มีราคาลดลง 83.87 บาท หรือลดลงร้อยละ 72.35 ของสูตรอาหาร MRS

เมื่อได้สูตรอาหารที่ใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกแล้ว ขั้นตอนที่สี่คือศึกษาการเจริญและการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* SW4-3 ในอาหารสูตรปรับปรุง (MF-medium) ในกระบวนการหมักแบบกะในอาหาร MF-medium ปริมาตร 1.5 ลิตร ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบ/นาที โดยได้เปรียบเทียบสภาวะไร้อากาศ (anaerobic) และมีอากาศน้อย (microaerophilic) พบว่าที่ชั่วโมงที่ 21 ของการหมักในสภาวะ anaerobic และ microaerophilic ได้ผลผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) ได้ 16.22 กรัม/ลิตร และ 12.0 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และมีอัตราการผลิตกรดแลคติก(Productivity)ไอโซเมอร์ L(+)เท่ากับ 0.58 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง มีปริมาณการผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) ต่อหน่วยสับสเตรท ($Yield_{L\text{-}LA/S}$) เท่ากับ 0.60 กรัม/กรัม และมีอัตราการเจริญจำเพาะ specific growth rate (μ_{max}) เท่ากับ 0.61 h^{-1} ซึ่งต่ำกว่าใน anaerobic ที่ได้ผลผลิตกรดแลคติกชนิด L(+)ไอโซเมอร์ 16.22

กรัม/ลิตร และมีอัตราการผลิตกรดแลคติก (Productivity) ชนิด L(+) ไอโซเมอร์เท่ากับ 0.85 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง มีปริมาณการผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) ต่อหน่วยสับสเตรท ($Yield_{L\text{-}LA/S}$) เท่ากับ 0.78 กรัม/กรัม และมีอัตราการเจริญจำเพาะ specific growth rate (μ_{max}) เท่ากับ 0.73 h^{-1} ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักกรดแลคติกของ *P. pentosaceus* SW4-3 ในอาหาร MF-medium อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบ/นาที คือสภาวะ anaerobic โดยมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) เท่ากับ 0.73 h^{-1}

ในขั้นตอนการผลิตกรดแลคติกแบบต่อเนื่องของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* SW4-3 ในอาหาร MF-medium ปริมาตร 1.5 ลิตร ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวนที่ 200 รอบ/นาที โดยแปรผันอัตราการเจือจาง (dilution rate) ที่ 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 h^{-1} พบว่าอัตราการผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) สูงขึ้นตามลำดับการเพิ่มขึ้นของอัตราการเจือจางอาหารที่ 2.63, 3.54, 3.73, 4.23 และ 4.11 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ตามลำดับ และสูงสุดที่ 4.23 กรัม/ลิตร/ชั่วโมงที่อัตราการเจือจาง 0.5 h^{-1} ซึ่งสูงกว่าในการหมักแบบกะ (Productivity = 0.85 g/l.h) ถึง 5 เท่า แต่เมื่อเพิ่มอัตราเจือจางเป็น 0.6 h^{-1} อัตราการผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) ไอโซเมอร์ได้ลดลงเหลือ 4.03 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ดังนั้นสรุปได้ว่าอัตราเจือจางที่เหมาะสมที่สุดคือ 0.5 h^{-1} โดยมีอัตราการผลิตกรดแลคติก ชนิด L(+) และ D(-) เท่ากับ 4.23 และ 0.31 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ตามลำดับ มีอัตราการใช้สับสเตรท (sugar consumption) 5.50 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง มีร้อยละของการผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) ต่อหน่วยของสับสเตรท ($Yield_{L\text{-}LA/S}$) เท่ากับร้อยละ 76.79 มีความบริสุทธิ์ (purity) ของกรดแลคติกชนิด L(+) ร้อยละ 93.15

เอกสารอ้างอิง

Aeschlimann, A., Di Stasi, L. and Von Stockar, U., 1990, "Continuous Production of Lactic Acid from Whey Permeate by *Lactobacillus helveticus* in Two Chemostats in Series", **Enzyme and Microbial Technology**, Vol. 12, No. 12, pp. 926-932.

Ahmad, M.N. and Holland, C.R., 1994, “Growth kinetics of single-cell protein in batch fermenters”, Journal of Food Engineering, Vol. 26, No. 4, pp. 443-452.

Akerberg, C., Hofvendahl, K., Hahn-Hagerdal, B. and Zacchi, G., 1998, "Modelling the Influence of pH, Temperature, Glucose and Lactic Acid Concentrations on the Kinetics of Lactic Acid Production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in Whole-Wheat Flour", **Applied Microbiology and Biotechnology**, Vol. 49, No. 6, pp. 682-690.

Albuquerque, M.G.E., Eiroa, M., Torres, C., Nunes, B.R. and Reis, M.A.M., 2007, "Strategies for the Development of a Side Stream Process for Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production from Sugar Cane Molasses", **Journal of Biotechnology**, Vol. 130, No. 4, pp. 411-421.

Altaf, M., Naveena, B.J. and Reddy, G., 2007, "Use of Inexpensive Nitrogen Sources and Starch for L(+) Lactic Acid Production in Anaerobic Submerged Fermentation", **Bioresource Technology**, Vol. 98, No. 3, pp. 498-503.

Aspmo, S.I., Horn, S.J. and Eijsink, V.G.H., 2005, "Use of Hydrolysates from Atlantic Cod (*Gadus Morhua* L.) Viscera as a Complex Nitrogen Source for Lactic Acid Bacteria", **FEMS Microbiology Letters**, Vol. 248, No. 1, pp. 65-68.

Association of Official Analytical Chemistry (A.O.A.C.), 1990, **Official Method of Analysis of AOAC International,** 16th ed., VA:AOAC International, Arlington.

Axelsson, L., 1998, "Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology", **Lactic Acid Bacteria**,

Marcel Dekker, New York, pp. 1-72.

Beatriz, R., Ana B.M., Jose, M.D. and Juan C.P., 2004, “Development of Culture Media Containing Spent Yeast Cells of *Debaryomyces hansenii* and Corn Steep Liquor for Lactic Acid Production with *Lactobacillus rhamnosus*”, **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 8, No. 10, pp. 1894-1899.

Calderon, M., Loiseau G. and Guyot J.P., 2001, “Nutritional Requirements and Simplified Cultivation Medium to Study Growth and Energetics of a Sourdough Lactic Acid Bacterium *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 During Heterolactic Fermentation of Starch”, **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 90, No.4, pp. 508-516.

Carr, F.J., Chill, D. and Maida, N., 2002, “The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey”, **Critical Reviews in Microbiology**, Vol. 28, No. 4 pp. 282-310.

Chatterjee, M., Chakrabarty, S.L., Chattopadhyay, B.D. and Mandal, R.K., 1997, "Production of Lactic Acid by Direct Fermentation of Starchy Wastes by an Amylase-Producing *Lactobacillus*", **Biotechnology Letters**, Vol. 19, No. 9, pp. 873-874.

Chauhan, K., Trivedi, U. and Patel, K.C., 2007, "Statistical Screening of Medium Components by Plackett-Burman Design for Lactic Acid Production by *Lactobacillus* sp. Kcp01 Using Date Juice", **Bioresource Technology**, Vol. 98, No. 1, pp. 98-103.

Datta, R., Tsai, S.P., Bonsignore, P., Moon, S.H. and Frank, J.R., 1995, "Technological and Economic Potential of Poly(Lactic Acid) and Lactic Acid Derivatives", **FEMS Microbiology Reviews**, Vol. 16, No. 2-3, pp. 221-231.

De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M., 1960, "A Medium for the Cultivation of *Lactobacilli*", **Journal of Applied Microbiology**, Vol. 23, No. 1, pp. 130-135.

Draper, N.R., 1988, “Plackett Burman Designs”, **Encyclopedia of Statistical Sciences**, John Wiley , New York.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F., 1956, "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances", **Analytical Chemistry**, Vol. 28, No. 3, pp. 350-356.

Gao, M.T., Kaneko, M., Hirata, M., Toorisaka, E. and Hano, T., 2008, "Utilization of Rice Bran as Nutrient Source for Fermentative Lactic Acid Production", **Bioresource Technology**, Vol. 99, No. 9, pp. 3659-3664.

Göksungur, Y., Güvenç, U., 1997, “Batch and Continuous Production of Lactic Acid from Beet Molasses by *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202”, J**ournal of Chemical Technology and Biotechnology**, Vol. 69, No. 4, pp. 399-404.

Ha, M.Y., Kim, S.W., Lee, Y.W., Kim, M.J. and Kim, S.J., 2003, “Kinetic Analysis of Growth and Lactic Acid Production in pH Controlled Batch Cultures of *Lactobacillus casei* KH-1 Using Yeast Extract/ Corn Steep Liquor/ Glucose Medium”, **Bioscience and Bioengineering**, Vol. 96, pp. 134-140.

Hjörleifsdottir, S., Seevaratnam, S., Holst, O. and Mattiasson, B., 1990, "Effects of Complete Cell Recycling on Product Formation by *Lactobacillus casei* spp. *rhamnosus* in Continuous Cultures", **Current Microbiology**, Vol. 20, No. 5, pp. 287-292.

Hofvendahl, K. and Hahn-Hagerdal, B., 2000, "Factors Affecting the Fermentative Lactic Acid Production from Renewable Resources", **Enzyme and Microbial Technology**, Vol. 26, No. 2-4, pp. 87-107.

Holten, C.M., Muller, A. and Rehbinder, D., 1971, **Lactic Acid**, Verlag Chemie, Weinheim/ Bergstr.

Kamoshita, Y., Ohashi, R. and Suzuki, T., 1998, "Improvement of Filtration Performance of Stirred

Ceramic Membrane Reactor and its Application to Rapid Fermentation of Lactic Acid by Dense Cell Culture of *Lactococcus Lactis*", **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Vol. 85, No. 4, pp. 422-427.

Kotzamanidis, Ch., Roukas, T., Skaracis, G., 2002, "Optimization of Lactic Acid Production From Beet Molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130", **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Vol. 18, No.5, pp. 441-448.

Lane, D. J., 1991**, "**16S/23S rRNA Sequencing. *In*: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Ed", **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**. New York, Wiley, pp. 115-175.

Litchfield, J.H., 1996, "Microbiological Production of Lactic Acid", **Advances in Applied Microbiology**, Vol. 42, pp. 45-95.

Lockwood L.B., 1965, "Production of Organic Acids by Fermentation", **Microbial Technology**, Peppler, H.J. and D.Periman (eds), Academic Press, New York., Vol. 1 pp. 355-387.

Marques, S., Santos, J.A.L., GÌrio, F.M. and Roseiro, J.C., 2008, "Lactic Acid Production from Recycled Paper Sludge by Simultaneous Saccharification and Fermentation", **Biochemical Engineering Journal**, Vol. 41, No. 3, pp. 210-216.

Miller, G.L., 1959, "Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar", **Analytical Chemistry**, Vol. 31, No. 3, pp. 426-428.

Mirasol, F., 1999, "Lactic Acid Prices Falter as Competition Toughens", **Chemical Market Reporter**, Vol. 255, p. 16.

Monteagudo, JM., Rodriguez, L., Rincon, J., Fuertes, J., 1997, "Kinetics of Lactic Acid Fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* Grown on Beet Molasses", **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Vol. 68, pp. 271-276.

Montgomery, D.C., 2001, “Design and develop new processes and products” **Design and Analysis of Experiment**, John Wiley , New York.

Myer, R. and Montgomery, D.C., 2002, “Process and Product Optimization Using Designed Experiments” **Response surface methodology**, John Wiley , New York.

Nakamura, L.K., 1981, "*Lactobacillus amylovorus*, a New Starch-Hydrolyzing Species from Cattle Waste-Corn Fermentations", **International Journal of Systematic Bacteriology**, Vol. 31, No. 1, pp. 56-63.

Nwankwo, D., Anadu, E. and Usoro, R., 1989, "Cassava-Fermenting Organisms", **Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, Vol. 5, No. 2, pp. 169-179.

Payot, T., Chemaly, Z. and Fick, M., 1999, "Lactic Acid Production by *Bacillus coagulans*--Kinetic Studies and Optimization of Culture Medium for Batch and Continuous Fermentations", **Enzyme and Microbial Technology**, Vol. 24, No. 3-4, pp. 191-199.

Petrov, K., Urshev, Z. and Petrova, P., 2008, "L(+)-Lactic Acid Production from Starch by a Novel Amylolytic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84", **Food Microbiology**, Vol. 25, No. 4, pp. 550-557.

Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B.J., Venkateshwar, M. and Kumar, E.V., 2008, "Amylolytic Bacterial Lactic Acid Fermentation -- a Review", **Biotechnology Advances**, Vol. 26, No. 1, pp. 22-34.

Sambrook, J. and Russell, D.W., 2001, **Molecular cloning: A Laboratory Manual**, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanni, A.I., Morlon-Guyot, J. and Guyot, J.P., 2002, "New Efficient Amylase-Producing Strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* Isolated from Different Nigerian Traditional Fermented

Foods", **International Journal of Food Microbiology**, Vol. 72, No. 1-2, pp. 53-62.

Schwab, A.H., Leininger, H.V. and Power, E.M., 1984, "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods", **Media, reagents and stains**, American Public Health Association, Washington DC.

Stanbury, P.F. and Whitaker, A., 1984, **Principle of Fermentation Technology**, Pergamon Press, London., pp. 137-152.

Stoppok, E., and Buchholz, K., 1996, "Sugar-Based Raw Materials for Fermentation Applications", **Biotechnology 2nd ed**, H.J. Rehm and G. Reed (Eds), pp. 5-29.

Tanasupawat, S., Shida, O., Okada, S. and Komagata, K., 2000, "*Lactobacillus acidipiscis* sp. Nov. and *Weissella thailandensis* sp. Novel, Isolated from Fermented Fish in Thailand", **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Vol. 50, No. 4, pp. 1479-1485.

Tashiro, Y., Kaneko, W., Sun, Y., Shibata, K., Inokuma, K., Zendo, T. and Sonomoto, K., 2011, "Continuous D-Lactic Acid Production by a Novel thermotolerant *Lactobacillus Delbrueckii* subsp. lactis QU 41", **Applied Microbiology and Biotechnology**, Vol. 89, No. 6, pp. 1741-1750.

Teclu, D., Tivchev, G., Laing, M. and Wallis, M., 2009, "Determination of the Elemental Composition of Molasses and its Suitability as Carbon Source for Growth of Sulphate-Reducing Bacteria", **Journal of Hazardous Materials**, Vol. 161, No. 2-3, pp. 1157-1165.

Vazquez, J.A., Gonzlez, M.P. and Murado, M.A., 2004, "Peptones from Autohydrolysed Fish Viscera for Nisin and Pediocin Production", **Journal of Biotechnology**, Vol. 112, No. 3, pp. 299-311.

Waites, M., Morgan, N.L., Rockey, J.S. and Higton, G., 2001, **Industrial Microbiology : An Introduction**, Blackwell Science, London, pp. 21-124.

Wee, Y.J., Kim, J.N., Yun, J.S. and Ryu, H.W., 2004, "Utilization of Sugar Molasses for Economical

L(+)-Lactic Acid Production by Batch Fermentation of *Enterococcus Faecalis*", **Enzyme and Microbial Technology**, Vol. 35, No. 6-7, pp. 568-573.

Wee, Y.J., Kim, J.N. and Ryu, H.W., 2006, "Biotechnological Production of Lactic Acid and its Recent Applications", **Food Technology and Biotechnology**, Vol. 44, No. 2, pp. 163-172.

Xu, G.Q., Chu, J., Wang, Y.H., Zhuang, Y.P., Zhang, S.L. and Peng, H.Q., 2006, "Development of a Continuous Cell-Recycle Fermentation System for Production of Lactic Acid by *Lactobacillus paracasei*", **Process Biochemistry**, Vol. 41, No. 12, pp. 2458-2463.

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 MRS medium

Peptone	10.0	g.
Beef extract	10.0	g.
Yeast extract	5.0	g.
Glucose	20.0	g.
Tween 80	1.0	ml.
K_2HPO_4	2.0	g.
Sodium acetate	5.0	g.
Triammonium citrate	2.0	g.
MgSO4.7H2O	0.2	g.
MnSO4.7H2O	0.05	g.
Distilled water	1,000.0	ml.
Agar	15.0	g.

pH 6.2 ± 0.2

ชั่งส่วนผสมของสารแต่ละชนิดลงละลายในน้ำกลั่นที่บรรจุอยู่ในบีกเกอร์ คนให้สารทั้งหมดละลาย จากนั้นเติมวุ้นและต้มจนวุ้นละลายดี ก่อนปรับพีเอชและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารเหลว MRS ที่ทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาล

Peptone	10.0	g.
Beef extract	10.0	g.
Yeast extract	5.0	g.
Molasses	37.2	g.
Tween 80	1.0	ml.
K_2HPO_4	2.0	g.

Sodium acetate	5.0	g.
Triammonium citrate	2.0	g.
MgSO4.7H2O	0.2	g.
MnSO4.7H2O	0.05	g.
Distilled water	1,000.0	ml.
Agar	15.0	g.

pH 6.2 ± 0.2

ชั่งส่วนผสมของสารแต่ละชนิดลงละลายในน้ำกลั่นที่บรรจุอยู่ในบีกเกอร์ คนให้สารทั้งหมดละลาย ก่อนปรับพีเอชและนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปริมาณ molasses ที่ใช้เทียบเท่าปริมาณน้ำตาล 20.0 กรัมต่อลิตร

1.3 Skim milk

Skim milk	10.0	g.
Disstilled Water	100.0	ml.

ละลาย skim milk ในน้ำกลั่นจนเข้ากัน จากนั้นนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2. สารเคมี

2.1 สารละลาย 0.3 % H_2O_2

Hydrogen Peroxide	3	กรัม	
Distilled water		100	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันและเก็บไว้ในขวดสีชา

2.2 การเตรียม Phenolphthalein

Phenolphthalein	1	กรัม	
Distilled water		100	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันและเก็บไว้ในขวดสีชา

2.3 สารละลายที่ใช้ในการย้อมสีแกรม

2.1.1 Ammonium oxalate crystal violet

Solution A:	Crystal violet	2.0	กรัม
	Ethyl alcohol	20	มิลลิลิตร
Solution B:	Ammonium oxalate	0.8	กรัม
	Distilled water	80	มิลลิลิตร
	ผสม Solution A และ Solution B เข้าด้วยกัน		

2.1.3 Lugol's Solution

Iodine	1	กรัม
KI	2	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

2.1.2 Counter stain solution (Safranin-O)

Safranin-O	10	มิลลิลิตร
Distilled water	90	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์และการคำนวณ

1. วิธีการการวิเคราะห์หาค่า pH

วิเคราะห์ค่า pH โดยใช้เครื่องวัด pH meter

- นำตัวอย่าง (ของแข็ง) ที่บดละเอียด ปริมาณ 2 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร
- นำไปเขย่าด้วยเครื่อง Shaker ที่ความเร็วรอบ 150 rpm. เป็นเวลานาน 10 นาที
- นำไปวัดค่า pH ด้วยเครื่องวัด pH meter

2. การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์แห้ง

นำ eppendorf ไปอบในเครื่อง Oven ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ข้ามคืนและทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น (Desicator) นำไปชั่งน้ำหนัก อบซ้ำวิธีการเดิมจนน้ำหนักคงที่ จากนั้นปิเปตเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียแลคติกปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาใส่ใน eppendorf ที่อบจนได้น้ำหนักแน่นอน นำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายส่วนใสออกแล้วล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทน้ำกลั่นทิ้ง นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนแห้ง (overnight) นำออกจากตู้อบและปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์

น้ำหนักแห้งของเซลล์ = $W_2 - W_1$

W_2 = น้ำหนักของเซลล์แห้ง + น้ำหนักของ eppendorf

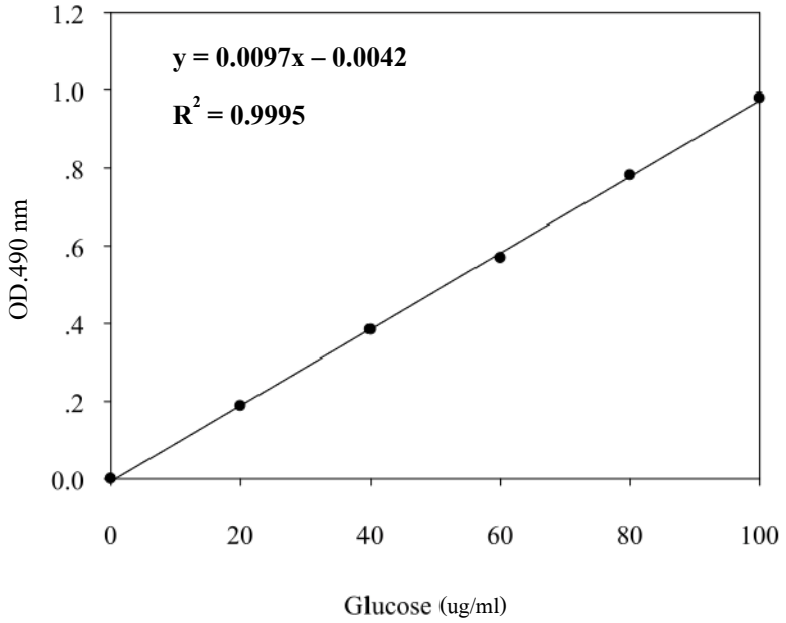
W_1 = น้ำหนักของ eppendorf

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี Phenol-Sulfuric ตามวิธีการของ Dubios et al. (1956)

ชั่งน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 1000 μg/ml แล้วเจือจางให้มีความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 μg/ml จากนั้นปิเปตสารละลายกลูโคสมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง และเติมสารละลายฟีนอลเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex จากนั้นเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที โดยไม่ต้องเขย่า จากนั้นนำไปบ่มต่อในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วเขย่าให้เข้ากันอีกครั้งด้วยเครื่อง vortex ก่อนนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ด้วย Spectrophotometer บันทึกค่าที่ได้เพื่อนำมาสร้างกราฟมาตรฐาน (รูปที่ ข.1)

วิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง

ปิเปตสารละลายกากน้ำตาลที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 2500 เท่า 5000 เท่า และ 8000 เท่า จากนั้นทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับสารละลายกลูโคสมาตรฐาน และบันทึกค่าที่ได้เพื่อนำไปคำนวณปริมาณน้ำตาลจากกราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (รูปที่ ข.1)



รูปที่ ข. 1 กราฟมาตรฐานของปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ตามวิธีPhenol-Sulfuric (Dubios et al., 1956)

4. การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดด้วยวิธีไตเตรชั่น (A.O.A.C., 1990)

4.1 สารเคมีและวิธีการเตรียม

- Phenolpthalein indicator ละลาย Phenolpthalein 1 กรัม ในเอทานอล 100 มิลลิลิตร
- 0.1 N NaOH ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ละลายและปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น โดยใช้ขวดปรับปริมาตร จากนั้นทำการชั่งโพแทสเซียมพทาเลท ($KHC_8H_4O_4$) ที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง อย่างละเอียดประมาณ 0.6-07 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มล. ในขวดแก้วขนาด 250 มล. หยดอินดิเคเตอร์ฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalein indicator) เข้มข้นร้อยละ 1 จำนวน 2 หยด แล้วนำไปไตเตรทกับโซเดียมไฮดรอกไซด์จนกระทั่งเปลี่ยนสีจากไม่มีสีกลายเป็นสีชมพูอ่อน บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

คำนวณความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ดังนี้

$$\text{NaOH (Normality)} = \frac{\text{weight of } KHC_8H_4O_4 \text{ x } 50}{\text{volume of NaOH- Blank x } 204.23}$$

Blank = ปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้เมื่อตัวอย่างเป็นน้ำกลั่น

4.2 วิธีการวิเคราะห์

ปิเปตอาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกที่ครบเวลามา 1.5 มิลลิลิตร ใส่หลอด eppendorf แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตส่วนของของเหลวมา 1 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร เติมน้ำที่ได้ต้มไล่คาร์บอนไดออกไซด์ไว้แล้วปริมาณ 9 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Phenolphalein 3 หยด แล้วไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH จนกระทั่งถึงจุดยุติ โดยสังเกตจากสารละลายใสเปลี่ยนเป็นสีชมพูอมม่วงอ่อนๆ คำนวณปริมาณกรดตามสูตรดังนี้

$$\text{Total Acid as lactic acid (g/100ml)} = \frac{\text{N x V x } 90.08 \text{ x } 100}{\text{v x } 1000}$$

เมื่อ N = ความเข้มข้นของ NaOH ที่ใช้ไตเตรท (Normality)

V = ปริมาตร NaOH ที่ใช้ไตเตรท (ml)

v = ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้ไตเตรท (ml)

5. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl method (AOAC., 1990)

5.1 สารเคมีและวิธีการเตรียม

- Kjeldahl block digester
- Kjeldahl distillation apparatus
- Catalyst โดยการผสม $CuSO_4.5H_2O$ 2 g. และ K_2SO_4 ปริมาณ 10 กรัม
- 40% NaOH โดยการเติมน้ำกลั่น 100 ml. ลงใน 40 g. NaOH
- 0.02N HCl
- 4% Boric acid โดยการเติมน้ำกลั่น 100 ml. ลงใน boric acid 4 g.
- conc.H_2SO_4
- Mixed indicator โดยการผสม bromocresol green 0.01 g. และ methyl red 0.02 g. ละลายใน Ethanol 10 ml. แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

5.2 วิธีการวิเคราะห์

- ชั่งตัวอย่าง 0.2-0.3 กรัม ตัวอย่างที่เป็นของเหลวใช้ปริมาตร 10 ml ใส่ลง distillation flask
- เติม Catalyst 0.5 กรัม พร้อมทั้งลูกแก้ว (Glass bead)
- เติมกรด conc. H_2SO_4 15 มิลลิลิตร
- นำไปย่อยที่เตาย่อยโดยใช้อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส จนได้สารละลายสีฟ้าใส (สีของสารเร่งปฏิกิริยา)
- เมื่อสารละลายเย็นลง เจือจางด้วยน้ำ 50 มิลลิลิตร และนำหลอดดังกล่าวไปต่อเข้ากับชุดเครื่องกลั่น ซึ่งที่ปลายอีกด้านหนึ่งของเครื่องกลั่น ต่อเข้ากับขวดรูปชมพู่ที่บรรจุสารละลายกรดบอริค 25 มิลลิลิตร และมิกซ์อินดิเคเตอร์ไว้แล้ว
- เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 จากท่อส่งภายในของเครื่องกลั่น 50 มิลลิลิตร ทำการกลั่นจนกระทั่งมีสารควบแน่นลงสู่ขวดรูปชมพู่ และทำให้ปริมาตรสารในขวดเป็น 100 มิลลิลิตร (รวมปริมาตรของกรดบอริคที่มีอยู่เดิม 25 มิลลิลิตร)
- ไตเตรทสารละลายในขวดรูปชมพู่ด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูลิคจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีชมพูอ่อน

5.3 การคำนวณปริมาณไนโตรเจนและโปรตีน

1. คำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอน (Standardization) ของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก โดยที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จะเท่ากับ 2 นอร์มอล สามารถคำนวณได้ดังนี้

$$H_2SO_4 \text{ (normality)} = \frac{M \times 1000}{(V_a - V_b) \times 53}$$

เมื่อ M = น้ำหนักที่แน่นอน (กรัม) ของโซเดียมคาร์บอเนต

V_a = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

V_b = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ไตเตรทน้ำกลั่น

1. คำนวณหาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total Kjeldahl Hitrogen, TKN) ซึ่งมีหน่วยเป็น มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถคำนวณได้โดย

$$\text{TKN (mg/l)} = \frac{(A-B) \times M \times 28 \times 1,000}{V}$$

เมื่อ A = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

B = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ไตเตรทน้ำกลั่น

M = ความเข้มข้น (โมลาร์) ของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก

V = ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของน้ำตัวอย่าง

1. การคำนวณหาปริมาณโปรตีน (Total Protein)

$$\text{Total Protein} = \frac{\text{TKN (mg/ml)} \times}{6.25}$$

เมื่อ 6.25 = Factor of conversion protein

6. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าด้วยวิธีการ A.O.A.C. (1990)

วิธีการวิเคราะห์

1. เผาครูซิเบิลที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส ในเตาเผาเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น จนเย็นจึงนำไปชั่งหาน้ำหนัก อบซ้ำขั้นตอนเดิมจนน้ำหนักของครูซิเบิลเปล่าคงที่

2. ชั่งตัวอย่างที่อบแห้งแล้วปริมาณ 0.30 กรัม ใส่ในครูซิเบิลที่รู้น้ำหนักแล้ว นำไปเผาบนเตา (hot plate) จนไม่มีควันคำ แล้วนำไปเผาต่อในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้เถ้าเป็นสีขาว ในกรณีที่ยังมีเถ้าบางส่วนเป็นสีดำอยู่ให้หยดกรดไนตริกลงไป จากนั้นจึงนำไปละลายในน้ำ กรองผ่านกระดาษกรองชนิดปราศจากเถ้า นำส่วนที่กรองได้ (filtrate) ไปทำให้แห้ง ใส่ครูซิเบิลอันเดิมและเผาซ้ำอีกครั้งจนกระทั้งได้เถ้าเป็นสีขาวหมด จากนั้นนำไปทำให้เย็นในโถดูดความชื้น

3. ชั่งหาน้ำหนักของเถ้าที่ได้ เผาซ้ำตามขั้นตอนเดิมจนได้น้ำหนักที่แน่นอนและคำนวณหาปริมาณเถ้า

$$\text{ปริมาณร้อยละเถ้า} = \left(\frac{\text{น้ำหนักครูซิเบิลและตัวอย่างหลังเผา - น้ำหนักครูซิเบิลเปล่า}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา}}\right) \times 100$$

7. การจัดจำแนกจีนัสของแบคทีเรีย

ทำการทดสอบตามข้อ 9.1-9.5 เพื่อตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่สภาวะต่างๆ จากนั้นนำผลที่ได้จากการทดสอบมาเปรียบเทียบผลตามตารางที่ 1.2

7.1 การทดสอบ catalase

ใช้ loop เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงใน MRS broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นหยดสารละลาย 3% H_2O_2 ลงบนแผ่นสไลด์เปล่าจากนั้นหยดเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนหยดน้ำยา 3% H_2O_2 และคนให้ผสมกับ สังเกตผลที่ได้หากเกิดฟองอากาศแสดงว่าเป็น catalase positive กรณีที่ไม่มีฟองอากาศแสดงว่าเป็น catalase negative (แบคทีเรียแลคติกให้ผลเป็น catalase negative)

7.2 การทดสอบการสร้างแก๊ส

ใช้ loop เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในหลอดอาหาร MRS broth ที่มี durham tube อยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อและการเกิดแก๊ส หากอาหารขุ่นและมีแก๊สใน durham tube มากกว่าครึ่งหลอดแสดงว่าเป็นแบคทีเรียแลคติกชนิด heterofermentative bacteria แต่หากอาหารขุ่นแต่ไม่มีการสร้างแก๊สแสดงว่าเป็นแบคทีเรียแลคติกชนิด homofermentative bacteria

7.3 การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน

ใช้ loop เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงใน MRS broth ที่ใช้ bromocresol purple เป็น indicator นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสังเกตความขุ่นและการเปลี่ยนสีของ bromocresol purple หากแบคทีเรียที่ทดสอบสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิดังกล่าวหารจะขุ่นและสีของอาหารจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

7.4 การทดสอบความทนเกลือของแบคทีเรียแลคติก

ใช้ loop เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงใน MRS broth ที่ผสม NaCl ร้อยละ 6 (w/v) และร้อยละ 18 (w/v) และมี bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน การเจริญสังเกตได้จากการเปลี่ยนแปลงสีของ bromocresol purple จากสีม่วงเป็นสีเหลืองและอาหารขุ่น

7.5 การทดสอบการเจริญที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง แตกต่างกัน

เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ค่าพีเอช 8.5 โดยใช้ 0.2 M glycine ปริมาณ 250 มิลลิลิตร และ 0.2 M NaOH ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายบัฟเฟอร์ใช้ในการเตรียมอาหารเหลว MRS และปรับค่าพีเอชของอาหารให้เท่ากับ 8.5 ด้วย 0.1 M NaOH นำไปฆ่าเชื้อที่

อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ค่าพีเอช 4.2 โดยใช้ 0.2 acetic acid 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายบัฟเฟอร์ใช้ในการเตรียมอาหารเหลว MRS และปรับค่าพีเอชของอาหารให้เท่ากับ 4.2 ด้วย glacial acetic acid นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียแลคติกในอาหารเหลว MRS ทั้ง 2 ค่าพีเอช โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญจากความขุ่นของอาหาร

8. วิธีการสกัดโครโมโซม genomic DNA ตามวิธีการของ Sambrook and Russell (2001)

เลี้ยงแบคทีเรียแลคติกในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตเชื้อมา 1.5 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอด eppendorf แล้วนำไปแยกเซลล์ออกโดยปั่นด้วยเครื่อง เซ็นตริฟิวส์ที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที และนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาละลายในบัฟเฟอร์ TES ปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติม lyzozyme (10 mg/ml) 100 ไมโครลิตร และ เติม RNase (10 mg/ml) 2 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยการกลับหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลาย SDS (6 % in TE buffer) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีหลังจากนั้นนำมา vortex เป็นเวลา 10 วินาที แล้วเติม 5M NaCl ปริมาตร 67 ไมโครลิตรนำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แยกเอาส่วนใสใส่หลอดใหม่ สกัดด้วยสารละลายผสมระหว่าง chloroform และ isoamyl alcohol (อัตราส่วน 24:1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เอาเฉพาะส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ สกัดอีกครั้งด้วย chloroform ปริมาตร 700 ไมโครลิตรหลังจากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เอาเฉพาะส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ จากนั้นเติม 1 ต่อ 10 เท่าของ 3M Sodium acetate (pH 5.2) ผสมให้เข้ากันและเติมเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 เท่าของสารละลาย แช่ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ล้างตะกอนดีเอ็นเอเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาต 500 ไมโครลิตร นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้ให้แห้งจากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยวิธี อิเล็คโตรโฟรีซีสใช้อะกาโรสเจลความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ λ*Hind*III เป็นชิ้นดีเอ็นเอมาตรฐาน ตรวจดูแถบดีเอ็นเอบนแผ่นเจลที่ย้อมด้วยเอทธิเดียมโบรไมด์โดยการส่องภายใต้รังสีอัลตร้าไวโอเลตและบันทึกผลโดยการถ่ายภาพ

9. การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ 16s rDNA ด้วยปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction (PCR)

ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของ 16s rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ 27F: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' และ 1525R : 5'-AAGGAGGTG(A/T)TCCA(A/G)CC-3' (Lane, 1991) ร่วมกับชุดน้ำยาสำเร็จรูป Takara EX *Tag* kit (TaKaRa BIO INC, Japan) เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา ตามรายการต่อไปนี้

TaKaRa Ex Taq™ (5units/µl)	0.25	µl
10x *Ex Taq* Buffer (Mg^{2+} free)	5	µl
$MgCl_2$ (25 mM)	4	µl
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4	µl
Template	< 500	ng
Primer 1 (27F : 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')	0.2-1.0	µM
Primer 2 (1525R : 5'-AAGGAGGTG(A/T)TCCA(A/G)CC-3')	0.2-1.0	µM
Sterillized distilled water	Up to 50	µl

ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายแต่ละชนิดใส่ในหลอด microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยผสมให้เข้ากันดีแล้วนำหลอดที่บรรจุสารละลายที่เตรียมได้ใส่ลงในเครื่องควบคุมปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรส โดยทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่สภาวะดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 ระยะ Predenaturation อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นตอนที่ 2 ระยะ Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอนที่ 3 ระยะ Annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.45 นาที ขั้นตอนที่ 4 ระยะ Extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ และขั้นตอนสุดท้ายระยะ Final Extention อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10. ขั้นตอนการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16s rDNA

นำชิ้นส่วนของ 16s rDNA มาทำการหาลำดับเบส (DNA sequencing) โดยใช้ชุดทำปฏิกิริยา ABI PRISM Big Dye Terminator cycle sequencing version 3.1 โดยใช้ไพรเมอร์ 27F: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' หรือ 530R : 5'-GGCAGAATGGTAACACCAGAGT-3' (Lane, 1991) เตรียมส่วนผสมของปฏิกิริยา ตามรายการต่อไปนี้

BigDye terminator	0.5	µl
Sequencing buffer	1.75	µl
Primer 1.6 pmol (forward or reverse)	2	µl
DNA template (250 ng/µl)	1	µl
Milli-Q water	4.75	µl
Total	10	µl

นำเข้าเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ (ABI PRISM modle 310 Genetic Analyzer) โดยสภาวะสำหรับการทำ DNA sequencing มีดังนี้ ขั้นที่ 1 ตั้งอุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส 1 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นที่ 2 ตั้งอุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส 10 วินาที, อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 5 วินาที และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 4 วินาที จำนวน 25 รอบ ขั้นที่ 3 ตั้งอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 7 นาที ตกตะกอน DNA โดยการเติม absolute ethanol ที่ 4 องศาเซลเซียส ปริมาตร 62.5 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 14.5 ไมโครลิตร และ 3M sodium acetate, pH 5.2 ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลานำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 × g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ล้างตะกอนด้วย 70% ethanol ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 × g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ปิเปต ethanol ออกจนหมด ทำการ denature DNA โดยการนำหลอดตัวอย่างใส่ในเครื่อง Heat block ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำหลอดตัวอย่างแช่ลงในน้ำแข็งทันที ตั้งทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิเย็นลง จากนั้นเติม Hi-Di™ formamide ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที ปั่นด้วย vortex mixture เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำหลอดตัวอย่างใส่ในเครื่อง Heat block ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำหลอดตัวอย่างแช่ลงในน้ำแข็งทันที ปิเปตตัวอย่างใส่หลอดในหลอดใหม่ แล้วทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง Automate DNA Sequencer ABI310 PRISM™ Genetic Analyzer (*PE*-Applied Biosystem, USA) จากนั้นนำลำดับเบสที่ได้วิเคราะห์และแก้ไขโดยใช้โปรแกรม Bioedit และเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอที่ได้กับลำดับดีเอ็นเอที่มีในฐานข้อมูลออนไลน์จาก Gene Bank ว่า 16s rDNA ดังกล่าวใกล้เคียงกับ 16s rDNA ของเชื้อตัวใดในฐานข้อมูล

11. การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดอะเซติกและกรดแลคติก ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)

สภาวะสำหรับเครื่อง HPLC

Column : Ion-Exchange (size 250 x 4.6 mm, 0.5 μm) (Q300 Eprogen, USA)

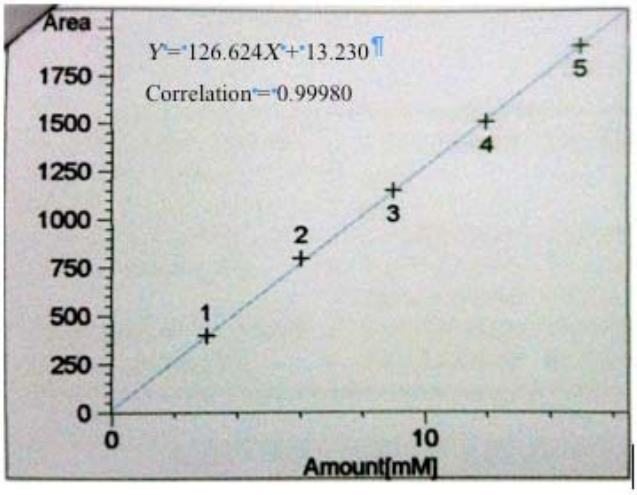
Mobile phase : 0.2% phosphoric acid

Flow rate : 0.4 ml/min

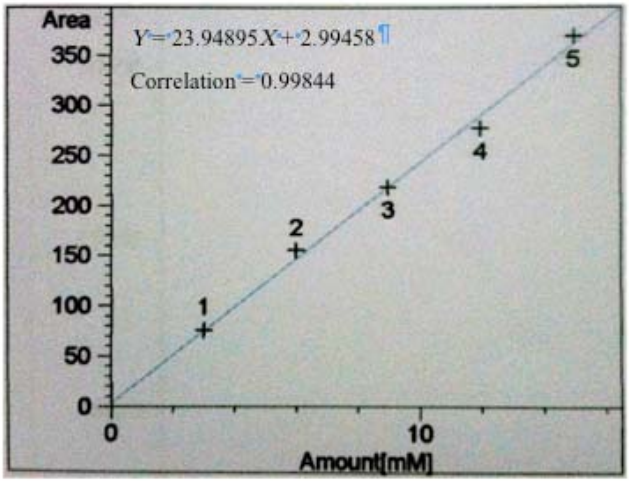
Detector : UV 210 nm

การเตรียมตัวอย่าง

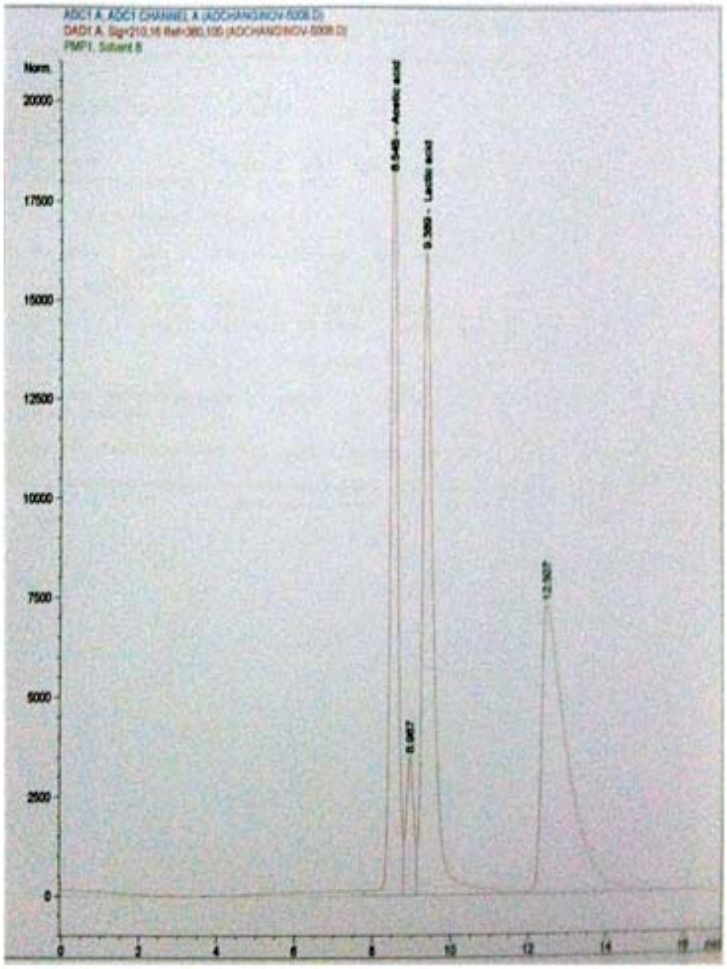
ทำการแยกตะกอนเซลล์ออกจากตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 1000g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำของเหลวส่วนบนมากรองด้วย membrane filter ขนาด 0.2 μm แล้วเจือจางส่วนที่กรองได้ด้วยน้ำกลั่นที่ความเจือจาง 50 เท่า จากนั้นดูดสารละลายที่เจือจางแล้วปริมาตร 20 ไมโครลิตร ฉีดเข้าสู่ column ของเครื่อง HPLC (Eprogen) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของกรดอะเซติกและกรดแลคติก



รูปที่ ข. 2 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะเซติก



รูปที่ ข. 3 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก



รูปที่ ข. 4 โครมาโตแกรมแสดง Retention time ของกรดอะเซติกที่เวลา 8.54 นาที และกรดแลคติกที่เวลา 9.38 นาที

12. การวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) และ D(-) ด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)

สภาวะสำหรับเครื่อง HPLC

Column : Specific Chiral Column (4.6 mm x 15 cm) (QA6100 SumiChiral)

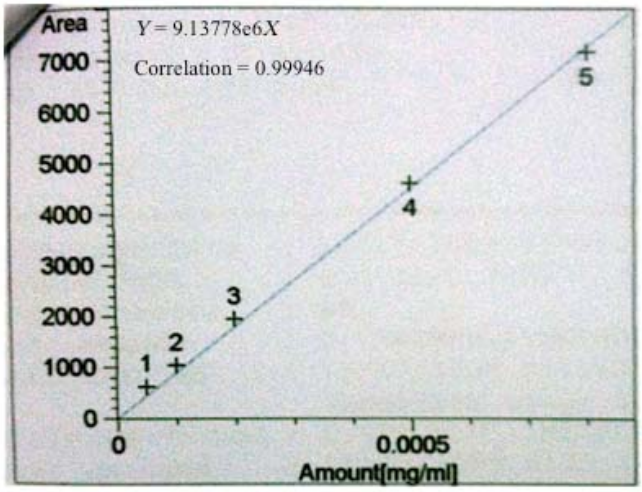
Mobile phase : 1mM $CuSO_4$

Flow rate : 1.0 ml/min

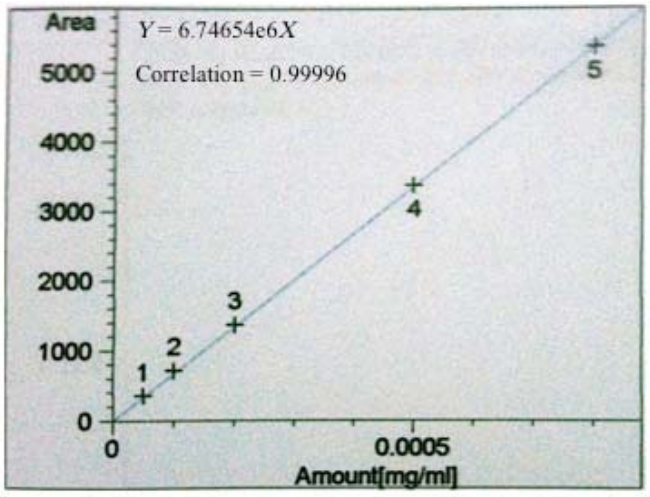
Detector : UV 254 nm

การเตรียมตัวอย่าง

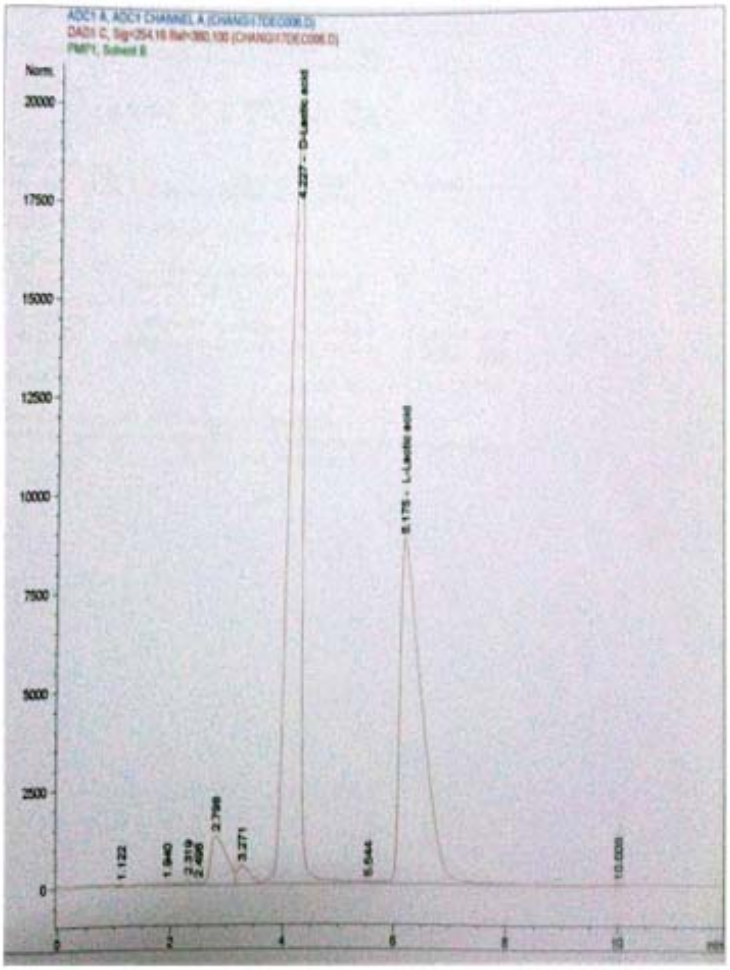
ทำการแยกตะกอนเซลล์ออกจากตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการปั่นเหวี่ยงที่ 1000g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำของเหลวส่วนบนมากรองด้วย membrane filter ขนาด 0.2 μm แล้วเจือจางส่วนที่กรองได้ด้วยน้ำกลั่นที่ระดับความเจือจาง 50 เท่า จากนั้นดูดสารละลายที่เจือจางแล้วปริมาตร 20 ไมโครลิตร ฉีดเข้าสู่ column ของเครื่อง HPLC (Eprogen) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณของกรดแลคติกชนิด L(+) และ D(-) ไอโซเมอร์



รูปที่ ข. 5 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกชนิด D(-) ไอโซเมอร์



รูปที่ ข. 6 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกชนิด L(+) ไอโซเมอร์



รูปที่ ข. 7 โครมาโตแกรมแสดง Retention time ของกรดแลคติกไอโซเมอร์ D(-) ที่เวลา 4.12 นาที และกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) ที่เวลา 6.52 นาที