

การศึกษาจลนศาสตร์ของการหมักสร้างกรดแลคติกจากกากน้ำตาล

โดยสายพันธุ์ท้องถิ่น *Lactobacillus mali* N 1692

สุจิตา อยู่สำราญ¹⁾ ศวรรณี เหลืองสุนทรชัย¹⁾ สาวิตรี วัฏญูไพศาล¹⁾ และ จันทพร ผลากรกุล^{2),*}

1) ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

2) ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ *

*Corresponding author. Tel: 66-9-135-3253; Fax: 66-2-587-0024; E-mail: cpk@kmitnb.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตกรดแลคติกแบบ batch fermentation ด้วยเชื้อ *Lactobacillus mali* N 1692 ซึ่งเป็นเชื้อที่ถูกคัดแยกมาจากกากน้ำตาลและสามารถผลิตกรดแลคติกชนิด L (+) เท่านั้น ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS สูตรปกติกับ MRS สูตรดัดแปลงที่มีการใช้กากน้ำตาล 80 g/l แทนการใช้กลูโคส 20 g/l โดย (1) ศึกษาผลของการปรับเปลี่ยนองค์ประกอบทางเคมีของอาหารหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก (2) ศึกษาผลของการเปรียบเทียบปริมาณบัฟเฟอร์ Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) ที่มีผลต่อการรักษา pH (3) ศึกษาผลกระทบของปริมาณสารตั้งต้น (substrate inhibition) ต่อการผลิตกรดแลคติก

จากการศึกษาพบว่า (1) องค์ประกอบทางเคมีของอาหารหมักที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลคติกด้วยเชื้อ *L. mali* N 1692 คือ อาหารหมักสูตรดัดแปลงที่มีการเติมกากน้ำตาล (molasses) แทนการใช้กลูโคสในอาหารสูตรปกติ โดยไม่มีการเติม meat extract (สูตรอาหารที่ 3) ซึ่งสามารถผลิตกรดแลคติกได้ถึง 23.23 g/l มีค่าผลผลิตกรดแลคติกต่อหน่วยสับสเตรท ($Y_{P/S}$) เท่ากับ 0.67 ค่าการใช้สับสเตรท (%Substrate conversion) เท่ากับ ร้อยละ 72.61 และมีอัตราเร็วในการสร้างผลิตภัณฑ์ ($r_{p,avg}$) เท่ากับ $0.17 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (2) ปริมาณบัฟเฟอร์ Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) ที่เหมาะสมสำหรับการหมักเพื่อผลิตกรดแลคติกจากองค์ประกอบทางเคมีของอาหารที่เหมาะสม คือ ความเข้มข้น 20 g/l ซึ่งมีค่าการใช้สับสเตรท (%Substrate conversion) เท่ากับ ร้อยละ 74.07 ซึ่งสูงกว่าบัฟเฟอร์ K_2HPO_4 ที่ความเข้มข้นอื่น ส่วนค่า pH ที่ได้ค่อนข้างคงที่ และมีค่าสูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่นเช่นกัน ส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณที่เพิ่มขึ้น (3) เมื่อปรับความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเป็น 45 g/l พบว่า ค่าปริมาณกรดแลคติกที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรที่ไม่ได้มีการปรับความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น แสดงว่า ไม่พบผลกระทบของปริมาณสารตั้งต้นต่อการผลิตกรดแลคติก (substrate inhibition) ของเชื้อ *L. mali* N 1692 แต่พบว่า เมื่อปริมาณสารตั้งต้นเพิ่มขึ้นจะมีผลทำให้ค่า $Y_{P/S}$ ที่ได้สูงขึ้นด้วย

คำสำคัญ : Lactic acid, Lactic acid bacteria, molasses, *Lactobacillus mali* N 1692

1. บทนำ

กรดแลคติกเป็นกรดที่นิยมนำมาเติมลงในอาหารเพื่อใช้เป็นสารให้กลิ่นรสและควบคุมความเป็นกรดต่างของอาหาร รวมทั้งใช้เพื่อป้องกันการเน่าเสียของอาหาร

[2] เนื่องจากการผลิตกรดแลคติกเพื่อใช้ในประเทศไทยไม่เพียงพอ จึงต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศเป็นจำนวนมากถึงปีละหลายแสนกิโลกรัม ดังนั้นถ้ามีการพัฒนาให้สามารถผลิตกรดแลคติก โดยกระบวนการหมักจากเชื้อ

แบบที่เรียลแลคติกสายพันธุ์ที่สร้างกรดได้สูง และใช้วัตถุดิบที่หาง่ายราคาถูก เช่น กากน้ำตาล เป็นต้น จะเป็นการช่วยลดค่าใช้จ่ายของประเทศได้เป็นจำนวนมาก อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าแก่ผลผลิตโดยการนำวัตถุดิบที่เหลือใช้จากอุตสาหกรรมแปรรูปผลผลิตทางการเกษตรที่มีราคาถูกมาเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้อีกด้วย

การผลิตกรดแลคติกโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีการคัดเลือกสายพันธุ์เพิ่มเติมจากวัตถุดิบที่จะนำมาใช้ในกระบวนการหมัก สามารถทำให้มีการผลิตกรดได้อย่างมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น เพราะสารตั้งต้น (substrate) มีสถานะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์กรดแลคติกซึ่งต้องการวิตามินและสารอาหารเร่งการเจริญเติบโตบางชนิดที่จำเป็น [3] อีกทั้งยังช่วยลดการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นและสามารถลดค่าใช้จ่ายในการสั่งซื้อเชื้อจุลินทรีย์เพื่อนำมาใช้ในกระบวนการผลิตกรดแลคติกได้อีกด้วย ในการทดลองครั้งนี้ได้ทำการผลิตกรดแลคติกจากเชื้อ *Lactobacillus mali* N 1692 สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย โดยทำการคัดแยกมาจากกากน้ำตาล [6] โดยศึกษาการผลิตกรดแลคติกด้วยสูตรอาหาร MRS และ MRS สูตรดัดแปลงที่มีการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการใช้กลูโคส เพื่อเปรียบเทียบพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของการผลิตกรด และสูตรอาหารผสมกากน้ำตาลที่ให้ปริมาณผลผลิตกรดแลคติกต่อหน่วยสับสเตรทสูงที่สุดเพื่อเป็นแนวทางในการนำสูตรอาหารมาพัฒนาต่อในถังหมัก (Bioreactor) และนำไปสู่การพัฒนาในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ คือ *Lactobacillus mali* N 1692 ซึ่งเป็นเชื้อที่คัดแยกมาจากกากน้ำตาล [6] โดยได้รับความอนุเคราะห์มาจาก รศ.ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เป็นแบบที่เรียกลุ่ม “โฮโมแลคติก หรือ โฮโมเฟอร์เมนเททีฟ” สายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) Lactic เท่านั้น

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหาร DE MAN ROGOSA SHARPE (MRS) และ MRS ดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 80 g/l (มีความเข้มข้นของกลูโคสในกากน้ำตาล 20 g/l)

2.2.1 สูตรอาหารหมักที่ใช้ในการศึกษาผลของ

การปรับเปลี่ยนองค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหารหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก

ในการศึกษานี้จะทำการหมักเชื้อ *L. mali* N 1692 ด้วยสูตรอาหารหมัก 5 สูตร เพื่อพิจารณาเลือกสูตรอาหารที่ดีที่สุดจากความสามารถในการผลิตกรดแลคติกสูงสุด โดยสูตรอาหารต่าง ๆ ที่ใช้ในการหมัก แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ในการหมัก ทั้ง 5 สูตร

ชื่อสาร	สูตรที่ 1 MRS สูตรปกติ (g/l)	สูตรที่ 2 MRS สูตร ดัดแปลง (g/l)	สูตรที่ 3 MRS สูตร ดัดแปลง (g/l)	สูตรที่ 4 MRS สูตร ดัดแปลง (g/l)	สูตรที่ 5 MRS สูตร ดัดแปลง (g/l)
Peptone	10.0	5.0	10.0	0.0	5.0
Meat extract	10.0	10.0	0.0	0.0	0.0
Yeast extract	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
D (+) glucose	20.0	-	-	-	-
Molasses	-	80.0	80.0	80.0	80.0
Tween 80	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Diammonium citrate	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Sodium acetate	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Magnesium sulphate	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Manganese sulphate	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
Dipotassium hydrogen phosphate	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

2.2.2 สูตรอาหารหมักที่ใช้ในการเปรียบเทียบปริมาณบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการรักษา pH

บัฟเฟอร์ที่ใช้ คือ Dipotassium hydrogen phosphate (K_2HPO_4) หลังจากทดลองหมักเชื้อ *L. mali* N 1692 โดยใช้สูตรอาหารต่าง ๆ ครบทั้ง 5 สูตรแล้ว ให้พิจารณาเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสม ต่อการผลิตกรดแลคติกเพียงหนึ่ง

สูตรมาทำการหมักในครั้งต่อไป โดยปรับปริมาณ K_2HPO_4 ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 5 10 15 และ 20 g/l

2.2.3 สูตรอาหารหมักที่ใช้ในการศึกษาผลกระทบ

ของปริมาณสารตั้งต้นต่อการผลิตกรดแลคติก

โดยเปรียบเทียบจากปริมาณซูโครสเริ่มต้นหลังจากเลือกปริมาณบัฟเฟอร์ K_2HPO_4 ที่เหมาะสมจากการหมักในข้อ

2.2.2 มาทำการหมักครั้งต่อไปโดยปรับปริมาณความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นให้มีค่า 45 g/l เปรียบเทียบกับอาหารหมักที่ไม่ได้มีการปรับปริมาณความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

นำเชื้อ *L. mali* N 1692 ที่เจริญบนอาหารแข็งเอียง (MRS agar) หลังจากบ่มในตู้อบ (Mettler model 500 D 06061) ที่อุณหภูมิ $37^\circ C$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาทำเป็นเซลล์แขวนลอยในน้ำเกลือ (0.9% NaCl) และเจือจางลงจนมีความขุ่น (วัดค่า Optical Density ; OD ที่ 620 นาโนเมตร) เท่ากับ 0.5 ± 0.05 ซึ่งจะทำให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น $10^8 - 10^9$ CFU/ml จากนั้นเติมสารแขวนลอยของเชื้อดังกล่าวปริมาณ 5 ml ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 1000 ml ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 500 ml หรือเทียบเท่ากับการใช้หัวเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.3.2 การหมัก

ทำการหมักเพื่อผลิตกรดแลคติกด้วย Erlenmeyer flask ขนาด 1000 ml โดยควบคุมอุณหภูมิระหว่างการหมักที่ $35^\circ C$ โดยทำการทดลองในสูตรอาหารหมัก MRS และ MRS ดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 80 g/l (มีความเข้มข้นของกลูโคสในกากน้ำตาล 20 g/l) เป็นสับสเตรตแทนการใช้กลูโคส โดยทำการหมักทั้งหมด 5 สูตร สูตรละ 2 ขั้ว

2.3.3 การเก็บตัวอย่าง

ดูของเหลวที่ได้จากการหมักมาครั้งละ 10 ml โดยเริ่มเก็บตัวอย่างตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 และทุก ๆ 3 – 4 ชั่วโมงเป็น

ระยะเวลานานประมาณ 5 – 6 วัน จนกว่าค่าความขุ่นของเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase รวมทั้งปริมาณกรดและค่า pH ก่อนข้างคองที่ แล้วนำมาวัดค่าต่าง ๆ ดังนี้

1) วัดการเจริญของเซลล์ โดยดูจากความขุ่นด้วยเครื่อง Spectrophotometer (OD_{620} nm) (Spectronic 21, Milton)

2) วัดปริมาณกรด เพื่อหาปริมาณผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้น (Product; P) ด้วยการไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน [4]

3) วัดปริมาณความเข้มข้น ของน้ำตาลกลูโคสด้วย DNS method และซูโครสด้วยวิธีไฮโดรไลซ์ด้วยกรด HCl ตามด้วย DNS method [7]

4) วัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter (pH/ion meter F-24, Horiba)

3. ผลการทดลอง

3.1 การศึกษาผลของการปรับเปลี่ยนองค์ประกอบทางเคมีของสูตรอาหารหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก โดยเชื้อ *L. mali* N 1692

ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ได้จากการหมักเชื้อ *L. mali* N 1692 ด้วยสูตรอาหารทั้ง 5 สูตร แสดงดังตารางที่ 2

3.2 การศึกษาผลของการเปรียบเทียบ ปริมาณบัฟเฟอร์ K_2HPO_4 ที่มีผลต่อการรักษา pH โดยเชื้อ *L. mali* N 1692 ในสูตรอาหารที่เหมาะสม (สูตร 3 : MRS สูตรดัดแปลงเติมกากน้ำตาล 80 g/l แทนการใช้กลูโคสในอาหารสูตรปกติ โดยไม่มีการเติม meat extract)

ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ได้จากการหมักเชื้อ *L. mali* N 1692 ด้วยสูตรอาหารที่ 3 ที่มีความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ K_2HPO_4 ต่าง ๆ กันแสดงดังตารางที่ 4 และค่า $Y_{P/S}$ $Y_{P/X}$ $Y_{X/S}$ %Substrate conversion $r_{P,max}$ และ $r_{P,avg}$ ที่ได้จากการหมักเชื้อ *L. mali* N 1692 ด้วยสูตรอาหารที่ 3 ที่มีความ

เข้มข้นของบัพเฟอร์ K_2HPO_4 ต่างๆ กันแสดงดังตารางที่ 5 และปริมาณกรดแลคติกที่ได้แสดงดังภาพที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ได้จากการหมักเชื้อ *L. mali* N 1692 ด้วยสูตรอาหารทั้ง 5 สูตร

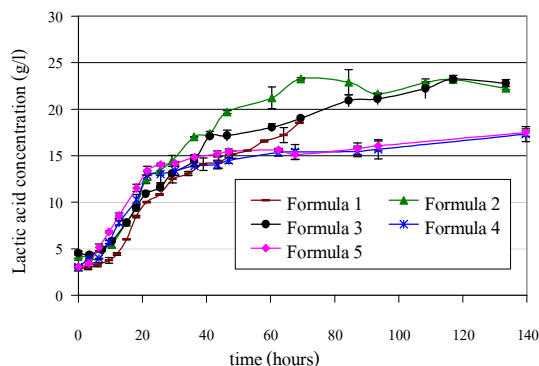
สูตรอาหารที่	t_0	ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น (g/l)		t_f (hours)	ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ t_f (g/l)		ความเข้มข้นของกรดแลคติกที่ t_f (g/l)	ค่าการเจริญโดยดูจากความขุ่นที่ t_f (OD ₆₂₀ nm)	ค่า pH ที่ t_f
		กลูโคส	ซูโครส		กลูโคส	ซูโครส			
1	0	20.58	-	69	3.93	-	18.54	1.16	3.92
2	0	15.28	22.15	69.4	9.90	5.54	23.27	1.70	4.04
3	0	15.49	22.88	117	8.63	1.88	23.23	1.11	3.81
4	0	14.69	22.86	139.7	3.77	17.45	17.33	1.35	4.04
5	0	15.32	22.60	139.7	4.19	18.04	17.49	1.34	4.02

เมื่อ t_0 เป็นเวลาเริ่มต้นของการเก็บตัวอย่าง มีหน่วยเป็นชั่วโมง
 t_f เป็นเวลาสุดท้ายของการเก็บตัวอย่าง มีหน่วยเป็นชั่วโมง

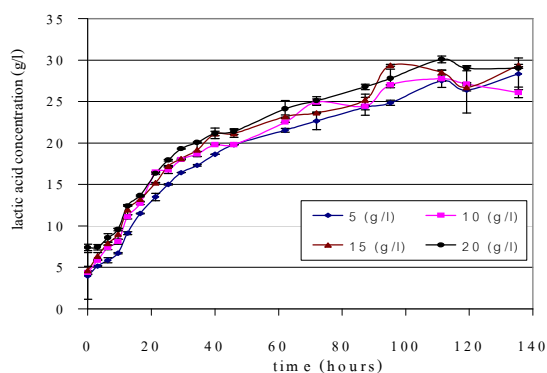
ตารางที่ 3 ค่า $Y_{P/S}$ $Y_{P/X}$ $Y_{X/S}$ %Substrate conversion $r_{P,max}$ และ $r_{P,avg}$ ที่ได้จากการหมักเชื้อ *Lactobacillus mali* N 1692 ด้วยสูตรอาหารทั้ง 5 สูตร

สูตรอาหารที่	t_f (hours)	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	%Substrate conversion	$r_{P,max}$ (g·l ⁻¹ ·h ⁻¹)	$r_{P,avg}$ (g·l ⁻¹ ·h ⁻¹)
1	69	0.07	0.94	13.61	80.90	0.82	0.23
2	69.4	0.07	0.87	11.68	58.77	0.77	0.19
3	117	0.04	0.67	17.68	72.61	0.48	0.17
4	139.7	0.06	0.88	14.65	43.49	0.79	0.14
5	139.7	0.06	0.92	14.92	41.35	0.55	0.14

เมื่อ t_f เป็นเวลาสุดท้ายของการเก็บตัวอย่าง มีหน่วยเป็นชั่วโมง
 $Y_{P/S}$ เป็นค่าผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อการใช้สารตั้งต้น
 $Y_{P/X}$ เป็นค่าการสร้างผลิตภัณฑ์ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์
 $Y_{X/S}$ เป็นค่าการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ต่อการใช้สารตั้งต้น
 $r_{P,max}$ เป็นอัตราการสร้างกรดแลคติกสูงสุด (g·l⁻¹·h⁻¹)
 $r_{P,avg}$ เป็นอัตราการสร้างกรดแลคติกโดยเฉลี่ย (g·l⁻¹·h⁻¹)
 % Substrate conversion เป็นความสามารถในการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์



ภาพที่ 1 แสดงความเข้มข้นของกรดแลคติกที่ได้จากการหมัก (P) ด้วยสูตรพร้อมแสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จากการทดลอง 2 ซ้ำอาหารทั้ง 5 สูตร

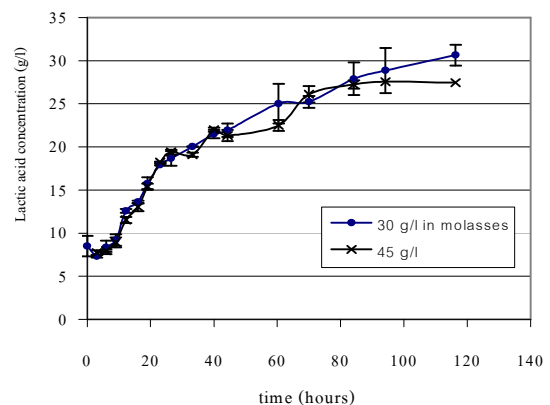


ภาพที่ 2 แสดงความเข้มข้นของกรดแลคติก (P) ที่ได้จากการหมักด้วยสูตรอาหารที่ 3 (MRS สูตรดัดแปลงเติมน้ำตาลความเข้มข้น 80 g/l แทนการใช้กลูโคสในสูตรอาหารปกติ โดยไม่มีการเติม meat extract) และมีการเติมบัฟเฟอร์ K_2HPO_4 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พร้อมแสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ

3.3 การศึกษาผลกระทบของปริมาณสารตั้งต้นต่อการผลิตกรดแลคติก (Substrate Inhibition) ของเชื้อ *L. mali* N 1692 โดยเปรียบเทียบจากปริมาณซูโครสเริ่มต้น ในสูตรอาหารหมักที่เหมาะสม (สูตรที่ 3 :

MRS สูตรดัดแปลงเติมน้ำตาลความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตรแทนการใช้กลูโคสในอาหารสูตรปกติ โดยไม่มีการเติม meat extract) และปริมาณบัฟเฟอร์ K_2HPO_4 ที่เหมาะสมที่สุด (20 g/l)

ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ได้จากการหมักเชื้อ *L. mali* N 1692 ด้วยสูตรอาหารที่ 3 และมีความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ K_2HPO_4 20 g/l โดยปรับความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเป็น 45 g/l เปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่ไม่ได้ปรับและค่า $Y_{P/S}$ $Y_{P/X}$ $Y_{X/S}$ %Substrate conversion $r_{P,max}$ และ $r_{P,avg}$ ที่ได้จากการหมักเชื้อ *L. mali* N 1692 ด้วยสูตรอาหารที่ 3 และมีความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ K_2HPO_4 20 g/l โดยปรับความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเป็น 45 g/l เปรียบเทียบกับสูตรอาหาร ที่ไม่ได้ปรับความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นแสดงดังตารางที่ 6 และปริมาณกรดแลคติกที่ได้แสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงความเข้มข้นของกรดแลคติก (P) ที่ได้จากการหมักด้วยสูตรอาหารที่ 3 (MRS สูตรดัดแปลงเติมน้ำตาลความเข้มข้น 100 g/l แทนการใช้กลูโคสในสูตรอาหารปกติ โดยไม่มีการเติม meat extract) และมีการเติมบัฟเฟอร์ K_2HPO_4 20 g/l โดยปรับความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเป็น 45 g/l เปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่ไม่ได้ปรับความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น พร้อมแสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จากการทดลอง 2 ซ้ำ

4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. จากการทดลองพบว่าการปรับปริมาณ Peptone มีผลต่อค่า $Y_{P/S}$ โดยปริมาณ Peptone ในสัดส่วนที่เหมาะสม (5 g/l) จะทำให้ได้ค่า $Y_{P/S}$ สูง (ดังตารางที่ 3)
2. สูตรอาหารหมักดัดแปลงสูตรที่ 3 และ 5 มีแนวโน้มของการผลิตกรดแลคติกสูง เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารหมักสูตรดัดแปลงอื่น ๆ แสดงว่า meat extract ไม่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก
3. สูตรอาหารดัดแปลงสูตรที่ 5 มีค่า $Y_{P/S}$ ใกล้เคียงกับอาหารหมักสูตรที่ 1 (MRS สูตรปกติ)

เนื่องจาก อาหารหมักสูตรที่ 5 มีสัดส่วนของ Peptone ที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่มีค่า %Substrate conversion ต่ำกว่ามาก อาจเป็นเพราะว่าในกากน้ำตาลมีน้ำตาลหลายชนิดจึงทำให้เชื้อสามารถนำน้ำตาลไปใช้ได้ยากกว่าการมีน้ำตาลเพียงชนิดเดียว และมีค่า $r_{P,max}$, $r_{P,avg}$ ต่ำกว่าสูตรที่ 1 อาจเป็นเพราะว่าสูตรที่ 5 ใช้เวลาในการหมักนานกว่า ในอุตสาหกรรมหมักใช้ระยะเวลาประมาณ 72 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มอัตราการผลิต

4. MRS สูตรดัดแปลงจะให้ค่า $r_{P,max}$ และ $r_{P,avg}$ ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับอาหารสูตรปกติ

ตารางที่ 4 ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ได้จากการหมักเชื้อ *L. mali* N 1692 ด้วยสูตรอาหารที่ 3 (MRS สูตรดัดแปลงเติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 80 g/l แทนการใช้กลูโคสในอาหารสูตรปกติโดยไม่มีการเติม meat extract) ที่มีความเข้มข้นของบัฟเฟอร์ K_2HPO_4 ต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้นของ K_2HPO_4 (g/l)	t_0	ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น (g/l)		t_f (hours)	ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ t_f (g/l)		ความเข้มข้นของกรดแลคติกที่ t_f (g/l)	ค่าการเจริญโดยดูจากความขุ่นที่ t_f (OD _{620 nm})	ค่า pH ที่ t_f
		กลูโคส	ซูโครส		กลูโคส	ซูโครส			
5	0	22.13	26.28	135.5	11.07	4.53	28.35	1.92	3.82
10	0	20.64	27.02	111.3	12.01	2.57	27.74	1.56	3.95
15	0	20.28	27.46	95.15	9.48	2.97	29.36	1.32	4.12
20	0	19.38	26.14	111.3	9.23	2.57	30.08	1.32	4.13

เมื่อ t_0 เป็นเวลาเริ่มต้นของการเก็บตัวอย่าง มีหน่วยเป็นชั่วโมง
 t_f เป็นเวลาสุดท้ายของการเก็บตัวอย่าง มีหน่วยเป็นชั่วโมง

ตารางที่ 5 ค่า $Y_{P/S}$ $Y_{P/X}$ $Y_{X/S}$ % Substrate conversion $r_{P,max}$ และ $r_{P,avg}$ ที่ได้จากการหมักเชื้อ *L. mali* N 1692 ด้วยสูตรอาหารที่ 3 (MRS สูตรดัดแปลงเติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 80 g/l แทนการใช้กลูโคสในอาหารสูตรปกติ โดยไม่มีการเติม meat extract) ที่มีความเข้มข้นของบัพเฟอร์ K_2HPO_4 ต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้น ของ K_2HPO_4 (g/l)	t_f (hours)	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	% Substrate conversion	$r_{P,max}$ (g·l ⁻¹ ·h ⁻¹)	$r_{P,avg}$ (g·l ⁻¹ ·h ⁻¹)
5	135.5	0.04	0.74	13.11	67.77	0.69	0.21
10	111.3	0.04	0.71	15.64	69.40	0.70	0.24
15	95.15	0.05	0.70	19.80	73.94	0.66	0.26
20	111.3	0.06	0.67	18.16	74.07	0.63	0.21

เมื่อ t_f เป็นเวลาสุดท้ายของการเก็บตัวอย่าง มีหน่วยเป็นชั่วโมง
 $Y_{P/S}$ เป็นค่าผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อการใช้สารตั้งต้น
 $Y_{P/X}$ เป็นค่าการสร้างผลิตภัณฑ์ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์
 $Y_{X/S}$ เป็นค่าการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ต่อการใช้สารตั้งต้น
 $r_{P,max}$ เป็นอัตราการสร้างกรดแลคติกสูงสุด (g·l⁻¹·h⁻¹)
 $r_{P,avg}$ เป็นอัตราการสร้างกรดแลคติกโดยเฉลี่ย (g·l⁻¹·h⁻¹)

% Substrate conversion เป็นความสามารถในการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์

ตารางที่ 6 ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ได้จากการหมักเชื้อ *L. mali* N 1692 ด้วยสูตรอาหารที่ 3 (MRS สูตรดัดแปลงเติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 100 g/l แทนการใช้กลูโคสในอาหารสูตรปกติ โดยไม่มีการเติม meat extract) และมีความเข้มข้นของบัพเฟอร์ K_2HPO_4 20 g/l โดยปรับความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเป็น 45 g/l เปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่ไม่ได้ปรับความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น

ความเข้มข้น ของซูโครส เริ่มต้น (g/l)	t_0	ความเข้มข้นของ น้ำตาลเริ่มต้น ที่วัดได้ (g/l)		t_f (hours)	ความเข้มข้นของ น้ำตาลที่ t_f (g/l)		ความเข้มข้นของ กรดแลคติก ที่ t_f (g/l)	ค่าการเจริญ โดยดูจาก ความขุ่นที่ t_f (OD ₆₂₀ nm)	ค่า pH ที่ t_f
		กลูโคส	ซูโครส		กลูโคส	ซูโครส			
30 *	0	19.55	27.07	116.3	8.07	8.45	30.65	1.51	3.89
45 **	0	20.31	38.74	116.3	12.04	21.04	27.45	1.10	3.63

เมื่อ t_0 เป็นเวลาเริ่มต้นของการเก็บตัวอย่าง มีหน่วยเป็นชั่วโมง
 t_f เป็นเวลาสุดท้ายของการเก็บตัวอย่าง มีหน่วยเป็นชั่วโมง

ตารางที่ 7 ค่า $Y_{P/S}$ $Y_{P/X}$ $Y_{X/S}$ % Substrate conversion $r_{P,max}$ และ $r_{P,avg}$ ที่ได้จากการหมักเชื้อ *L. mali* N 1692 ด้วยสูตรอาหารที่ 3 (MRS สูตรดัดแปลงเติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 100 g/l แทนการใช้กลูโคสในอาหารสูตรปกติ โดยไม่มีการเติม meat extract) และมีความเข้มข้นของบัพเฟอร์ K_2HPO_4 20 g/l โดยปรับความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเป็น 45 g/l เปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่ไม่ได้ปรับความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น

ความเข้มข้นของ ซูโครส (g/l)	t_f (hours)	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$	% Substrate conversion	$r_{P,max}$ ($g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$)	$r_{P,avg}$ ($g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$)
30 *	116.3	0.05	0.71	13.55	66.90	1.04	0.22
45 **	116.3	0.04	0.98	25.44	43.98	0.74	0.22

เมื่อ t_f เป็นเวลาสุดท้ายของการเก็บตัวอย่าง มีหน่วยเป็นชั่วโมง $Y_{P/S}$ เป็นค่าผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อการใช้สารตั้งต้น
 $Y_{P/X}$ เป็นค่าการสร้างผลิตภัณฑ์ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ $r_{P,max}$ เป็นอัตราการสร้างกรดแลคติกสูงสุด ($g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$)
 $Y_{X/S}$ เป็นค่าการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ต่อการใช้สารตั้งต้น $r_{P,avg}$ เป็นอัตราการสร้างกรดแลคติกโดยเฉลี่ย ($g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$)
 % Substrate conversion เป็นความสามารถในการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์

หมายเหตุ *เป็นปริมาณความเข้มข้นของซูโครสที่มีอยู่ในกากน้ำตาล**เป็นปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสที่เพิ่มเติมจากที่มีอยู่ในกากน้ำตาลโดยใช้น้ำตาลซูโครสปรับความเข้มข้นให้มีค่า 45 g/l

ตารางที่ 8 ตารางเปรียบเทียบค่า $Y_{P/S}$ ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ในอาหารหมักสูตรต่าง ๆ

เชื้อจุลินทรีย์	สูตรอาหารหมัก	$Y_{P/S}$
<i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> [1]	MRS ปกติ (สำเร็จรูป)	0.45
	MRS ดัดแปลง (ใช้ casein hydrolysate แทน peptone)	0.45
<i>L. delbrueckii</i> [5]	Beet molasses	0.79 (pH 4.95)
		0.83 (pH 5.33)
		0.88 (pH 5.85)
		0.91 (pH 5.90)
<i>L. mali</i> N 1692 (this work)	MRS ปกติ (สำเร็จรูป)	0.94
	MRS ดัดแปลงเติมกากน้ำตาลแทนการใช้กลูโคส และ ลด peptone ลงครึ่งหนึ่ง	0.87
	MRS ดัดแปลงเติมกากน้ำตาลแทนการใช้กลูโคส และ ไม่มีการเติม meat extract	0.67
	MRS ดัดแปลงเติมกากน้ำตาลแทนการใช้กลูโคส และ ไม่มีการเติม meat extract และ peptone	0.88
	MRS ดัดแปลงเติมกากน้ำตาลแทนการใช้กลูโคส และ ไม่มีการเติม meat extract และ ลด peptone ลงครึ่งหนึ่ง	0.92

5. ปริมาณบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม K_2HPO_4 สำหรับการหมัก เพื่อผลิตกรดแลคติกคือ บัฟเฟอร์ K_2HPO_4 ที่มีความเข้มข้น 20 g/l เนื่องจากมีค่า %Substrate conversion สูงกว่าบัฟเฟอร์ K_2HPO_4 ที่ความเข้มข้นอื่นซึ่งส่งผลให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นดูได้จากตารางที่ 5

6. เมื่อปรับความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้นเป็น 45 g/l พบว่าปริมาณกรดแลคติกที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสูตรที่ไม่ได้มีการปรับความเข้มข้นของซูโครสเริ่มต้น แสดงว่าไม่พบผลกระทบของปริมาณสารตั้งต้นต่อการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. mali* N 1692 แต่พบว่าเมื่อปริมาณสารตั้งต้นเพิ่มขึ้นจะมีผลทำให้ค่า $Y_{P/S}$ ที่ได้สูงขึ้นด้วย ดังแสดงผลในตารางที่ 7

7. จากตารางที่ 8 จะเห็นว่า เมื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารที่เหมือนกัน คือ MRS สูตรปกติ พบว่าเชื้อ *L. mali* N 1692 มีค่า $Y_{P/S}$ สูงกว่าเชื้ออื่น ๆ แสดงว่า เชื้อนี้มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ได้ดี อย่างไรก็ตามค่า $Y_{P/S}$ จะมีค่ามากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ องค์ประกอบของอาหารหมัก และสภาวะของการหมัก เช่น pH ซึ่งจะเห็นว่า เมื่อค่า pH สูงขึ้นจะทำให้ค่า $Y_{P/S}$ สูงขึ้นด้วย

5. เอกสารอ้างอิง

1. กรองจิตต์ ช้างแก้ว (2541) ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มี

อิทธิพลต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ

Lactobacillus sp. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต.

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร

ลาดกระบัง, กรุงเทพฯ ๙.

2. ปทุมพร ฉิมอเนก (2536) กรดแลคติกกับอาหารของชาวเอเชีย. อาหาร, 23:295-298.

3. สาโรจน์ ศิริคันสนียกุล (2544) การผลิตกรดแลคติกในอุตสาหกรรม. ส่งเสริมเทคโนโลยี, 28: 88-94.

4. AOAC (1984) Official Methods of Analysis. 13th ed. Wasington D.C.

5. Monteagudo, J.M.; Rodriguez, L.; Rincon, J. and Ruertes, J. (1997) Kinetics of lactic acid bacteria fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* grown on beet molasses. *Journal Chem. Tech. Biotechnol.* 68: 271-276.

6. Seki, M.; Kaneuchi, C.; Kumnuanta, J.; Tantirungij, M.; Ohmomo, T.; and Komagata, K. (1989) Identification of lactic acid bacteria isolated from fermented cane molasses at alcohol plants in Thailand. *Bull. JFCC.* 5: 80-88.

7. Wang, N. S. Sucrose assay by the dinitrosalicylic colorimetric methods. <http://www.engr.umd.edu/~nsw/ench485/lab9d.htm>, University of Maryland [22/09/2003] last dated accessed.