ศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกจากกากน้ำตาลของ *Lactobacillus mali* NRIC 1692
Potential of *Lactobacillus mali* NRIC 1692 in the Production of Lactic Acid from Sugarcane Molasses

สุธิดา อยู่สำราญ* ศวรรณี เหลืองสุนทรชัย* สาวิตรี วทัญญูไพศาล* และจันทรพร ผลากรกุล**

บทคัดย่อ

การศึกษาศักยภาพของเชื้อ *Lactobacillus mali* NRIC 1692 ในการผลิตกรดแลคติก ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS สูตรปกติกับ MRS สูตรดัดแปลงที่มีการใช้กากน้ำตาล 80 กรัม/ลิตร แทนการใช้กลูโคส 20 กรัม/ลิตร พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลคติกด้วยเชื้อ *L. mali* NRIC 1692 คือ อาหารสูตรที่ 2 (ลด peptone ลง 5 กรัม/ลิตร และทดแทนน้ำตาลกลูโคสด้วยกากน้ำตาล 80 กรัม/ลิตร) ซึ่งสามารถผลิตกรดแลคติกได้ถึง 22 กรัม/ลิตร เมื่อหมักนาน 69 ชั่วโมง มีค่าผลผลิตกรดแลคติกต่อหน่วยสับสเตรท ($Y_{P/S}$) เท่ากับ 0.71 ค่าการใช้ซูโครส (% Substrate conversion) เท่ากับร้อยละ 88 และมีอัตราเร็วในการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด ($r_{P.max}$) เท่ากับ 0.66 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง

คำสำคัญ : กรดแลคติก แบคทีเรียแลคติก กากน้ำตาล *Lactobacillus mali* NRIC 1692

Abstract

Lactic acid production from modified MRS media by the homofermentative organism, *Lactobacillus mali* NRIC 1692, has been studied. The batch fermentation was carried out in a typical MRS medium and four formulas of modified MRS media (glucose was replaced with sugar cane molasses). The results showed that the modified MRS media formula 2 (5 g/l of peptone was reduced, and glucose was replaced with 80 g/l cane molasses) produced the highest amount of lactic acid (22 g/l) after 69 h of fermentation, Yield coefficient for product on substrate ($Y_{P/S}$) was 0.71, substrate conversion of sucrose was 88 % and the maximum rate of lactic acid production ($r_{P.max}$) was 0.66 g/l/h.

Keywords : Lactic acid, Lactic acid bacteria, sugarcane molasses, *Lactobacillus mali* NRIC 1692

1. บทนำ

กรดแลคติกเป็นกรดที่นิยมนำมาเติมลงในอาหารเพื่อใช้เป็นสารให้กลิ่นรสและควบคุมความเป็นกรดเบสของอาหาร รวมทั้งใช้เพื่อป้องกันการเน่าเสียของอาหาร กรดแลคติกที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมักเป็นชนิด L(+) lactic เนื่องจากร่างกายมนุษย์มีเอนไซม์ L-lactate dehydrogenase ที่ย่อยได้เฉพาะ L-lactic แต่ไม่สามารถย่อย D (-) และ DL lactic ได้ [1-2] การบริโภคกรดแลคติกในรูปที่ย่อยไม่ได้ในปริมาณสูงอาจส่งผลให้เกิดภาวะเลือดเป็นกรดได้ [3] ในขณะที่จุลินทรีย์หลายสายพันธุ์สามารถผลิตกรดแลคติกได้ทั้ง L(+) และ D(-) [2] กรดแลคติกยังใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น เป็นองค์ประกอบในเครื่องสำอาง พลาสติก ผงซักฟอก ฯลฯ [1, 4-5] การผลิตกรดแลคติกเพื่อใช้ในประเทศไทยไม่เพียงพอ จึงต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศเป็นจำนวนมากถึงปีละหลายแสนกิโลกรัม [6] และ 90% ของกรดแลคติกที่ผลิตทั่วโลกมาจากการหมักโดยจุลินทรีย์ แบคทีเรียที่ใช้ในอุตสาหกรรมคือ *Lactobacillus delbruckii* โดยการใช้เวย์ (whey) ที่เป็นของเสียจากกระบวนการผลิตเนยแข็งมา

* ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

** ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก [7] ดังนั้นถ้ามีการใช้ประโยชน์สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่เก็บรักษาในประเทศให้สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูง และใช้วัตถุดิบในประเทศที่หาง่ายราคาถูก เช่น กากน้ำตาล จะช่วยลดค่าใช้จ่ายของประเทศได้เป็นจำนวนมาก อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าแก่ผลผลิตโดยการนำวัตถุดิบที่เหลือใช้จากอุตสาหกรรมแปรรูปผลผลิตทางการเกษตรที่มีราคาถูกมาเปลี่ยนเป็น ผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้อีกด้วย

กากน้ำตาลถือเป็นกากของเสียที่เหลือจากการผลิตน้ำตาลและหาได้ง่ายในประเทศ แม้ว่าปัจจุบันมีการนำมาเป็นวัตถุดิบเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์ แต่ก็นับว่าราคาต่อกิโลกรัม (7 - 8 บาท) ยังถูกกว่าน้ำตาลบริสุทธิ์ [8] กากน้ำตาลที่เหลือจากกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยยังคงมีปริมาณน้ำตาลหลงเหลืออยู่ประมาณ 52-65% ซึ่งประกอบด้วยซูโครส 32-45% กลูโคส 5-11% และฟรุคโตส 6-15% ส่วนปริมาณไนโตรเจนมีเหลือเพียงเล็กน้อย 0.4 -1.5% [9]

งานวิจัยนี้ได้รายงานการศึกษาศักยภาพของเชื้อ *Lactobacillus mali* NRIC 1692 ในการสร้างกรดแลคติกเป็นครั้งแรก (แบคทีเรียในสกุลเดียวกันที่เคยมีรายงานการศึกษาการผลิตกรดได้แก่ *L. amylophilus, L. casei, L. plantarum, L. pentosus, L. rhamnosus* เป็นต้น [7]) เมื่อดัดแปลงสูตรอาหารให้ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนแทนการใช้กลูโคส และปรับลดปริมาณแหล่งไนโตรเจนบางชนิดลงเพื่อลดต้นทุน โดยให้มีผลกระทบต่อผลผลิตกรดน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของการผลิตกรด แบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใช้ยังเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) lactic เท่านั้น (homofermentative bacteria) จึงเป็นข้อดีในการนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปแยกและทำให้บริสุทธิ์ได้ง่ายขึ้น เมื่อสามารถพัฒนาไปสู่การผลิตในระดับใหญ่ขึ้นในลำดับต่อไป

2 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 เชื้อจุลินทรีย์

Lactobacillus mali NRIC 1692 ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหาร DE MAN ROGOSA SHARPE (MRS) และ MRS ดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาล ความเข้มข้น 80 กรัม/ลิตร (มีความเข้มข้นของน้ำตาล รีดิวซ์ในกากน้ำตาลประมาณ 20 กรัม/ลิตร)

สูตรอาหารหมักที่ใช้ทดสอบ ทำการหมักเชื้อ *L. mali* NRIC 1692 ในอาหาร 5 สูตร (ตารางที่ 1) ที่เปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีบางชนิดเพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่มีศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกสูง

2.3 การเตรียมหัวเชื้อ

นำเชื้อ *L. mali* NRIC 1692 ที่เจริญบนอาหารวุ้น MRS อายุ 24 ชั่วโมง มาทำให้แขวนลอยในสารละลายน้ำเกลือเข้มข้น 0.85% และเจือจางลงจนมีค่าความขุ่น (OD_{620}) ประมาณ 0.5 เพื่อให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น 10^8-10^9 เซลล์/มิลลิลิตร

2.4 การหมัก

ทำการหมักเพื่อผลิตกรดแลคติกในอาหารหมักสูตรต่างๆ (ตารางที่ 1) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และหัวเชื้อผสมอยู่ 1% ใน Erlenmeyer flask ขนาด 1,000 มิลลิลิตร หมักแบบกะ (batch) โดยไม่เติมอากาศที่อุณหภูมิ 35˚C

2.5 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 - 4 ชั่วโมงเป็นระยะเวลานานประมาณ 5 - 6 วัน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำหมักมาครั้งละ 10 มิลลิลิตร แล้วนำมาวัดค่าต่างๆ ดังนี้

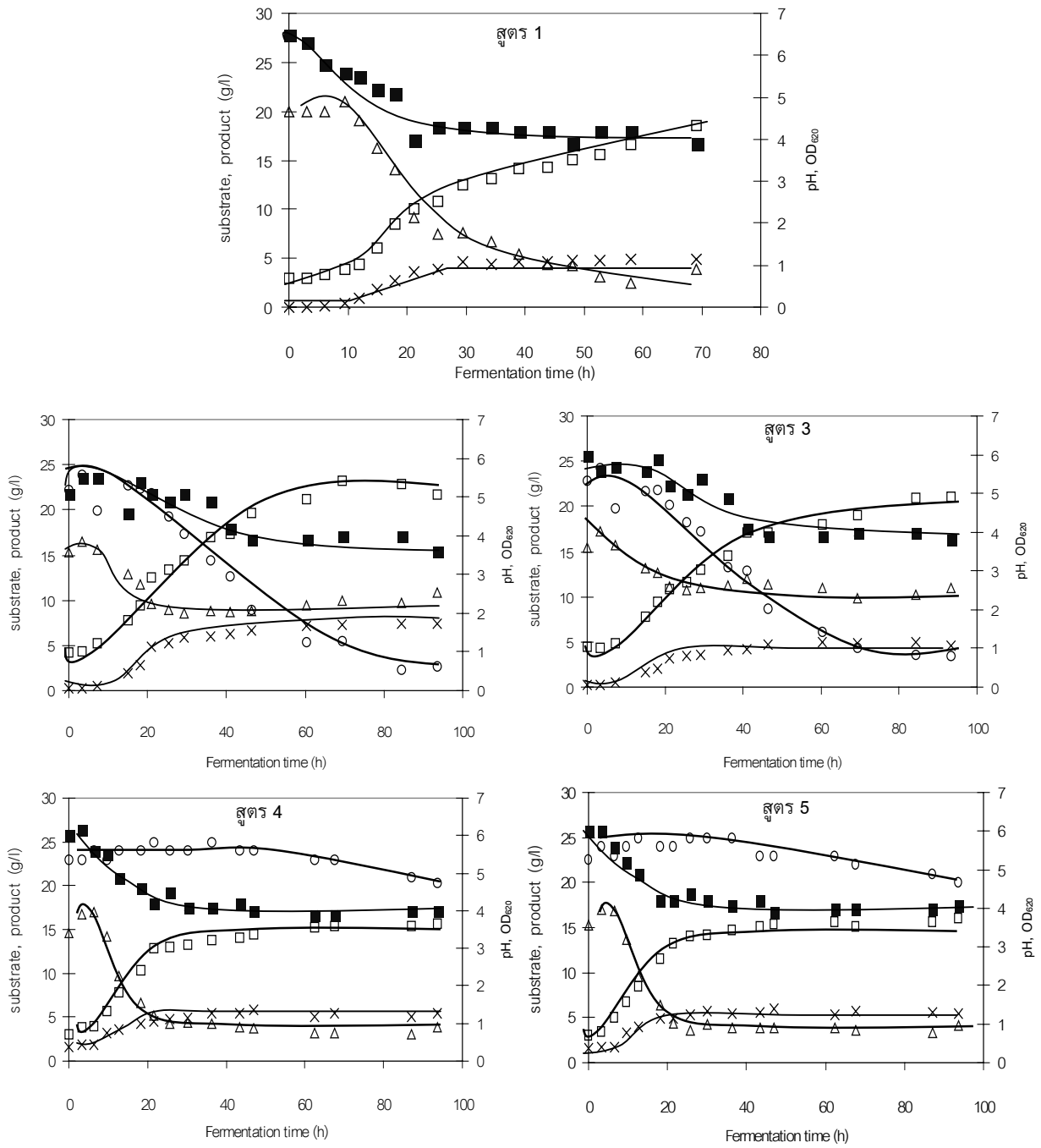
2.5.1 วัดการเจริญของเซลล์ ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (OD_{620}) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Spectronic 21, Milton)

2.5.2 วัดปริมาณกรดที่สร้างขึ้น (Product; P) ด้วยการไทเทรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน [10] และคำนวณเป็นปริมาณกรดแลคติก

2.5.3 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี dinitrosalicylic acid (DNS) [5] และปริมาณซูโครสด้วยการหักออกจากปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ซึ่งหาโดยนำตัวอย่างไปไฮโดรไลซ์ด้วยกรด HCl ก่อนทำปฏิกิริยากับสารละลาย DNS [15]

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

2.6 ทำการทดลองอย่างน้อย 2 ครั้ง ๆ ละ 2 ซ้ำ



รูปที่ 1 การเจริญ ค่า pH การเกิดกรดแลคติก และการใช้น้ำตาลของเชื้อ *L. mali* NRIC 1692 ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างๆ lactic acid Δ reducing sugar O sucrose ■ pH X OD_{620}

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลและการผลิตกรดในอาหารสูตรต่าง ๆ

ผลของการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาล pH ปริมาณกรดแลคติก และการเจริญของเชื้อ หลังการหมักแบบกะในอาหารสูตรต่างๆ ทั้ง 5 สูตรแสดงดังรูปที่ 1

อาหารสูตรที่ 1 ซึ่งเป็นอาหาร MRS ปกติ ที่มักใช้สำหรับเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกโดยทั่วไป และมีน้ำตาลกลูโคส 20 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก พบว่าเชื้อ *L. mali* NRIC1692 เจริญได้สูงสุดที่ประมาณ 25 - 30 ชั่วโมง เช่นเดียวกับ pH ซึ่งลดลงจาก 6.5 มาอยู่ในระดับคงที่ 4 หลังจากหมักนาน 25 - 30 ชั่วโมง ระยะที่สร้าง

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของสูตรอาหารที่ใช้ในการหมัก

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 sulfate	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
- Manganese sulfate	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
- Dipotassium hydrogen phosphate	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

กรดได้เร็วมีเส้นกราฟควบคู่กับระยะ log phase อย่างไรก็ตามเมื่อการเจริญเข้าสู่ระยะ stationary phase การสร้างกรดยังคงดำเนินต่อไปได้แต่มีอัตราเร็วลดลง ปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ลดลงสัมพันธ์กับการเจริญและการสร้างกรดอย่างชัดเจน กล่าวคือในระยะ log phase ปริมาณกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็ว ส่วนระยะ stationary phase กลูโคสลดลงอย่างช้าๆ ควบคู่กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดแลคติก อย่างช้าๆ จนสิ้นสุดระยะเวลาการหมัก

อาหารหมักสูตรที่ 2 เป็นอาหารดัดแปลงที่เติมกากน้ำตาล 80 กรัม/ลิตร แทนกลูโคส และลดปริมาณ peptone ลง 50% ของสูตรปกติ และอาหารหมักสูตรที่ 3 ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนเช่นกัน แต่ไม่เติม meat extract ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ 1) ผลการสร้างกรด การใช้น้ำตาล และการเจริญของเชื้อในอาหารทั้งสองสูตรนี้คล้ายคลึงกัน (รูปที่ 1) กล่าวคือเชื้อมีการเจริญสูงสุดที่ 30 ชั่วโมง ระยะการเจริญของเชื้อตั้งแต่ log phase จนถึง stationary phase ค่อนข้างสัมพันธ์กับการลดลงของน้ำตาลรีดิวซ์ในกากน้ำตาล ในขณะที่ปริมาณการสร้างกรดแลคติกสัมพันธ์กับการลดลงของน้ำตาลซูโครสในกากน้ำตาล และ pH เริ่มคงที่เมื่อลดลงจนถึง 4 ที่ 48 ชั่วโมง จากข้อสังเกตดังกล่าวจึงน่าจะเป็นไปได้ว่าปริมาณของแหล่งโปรตีนส่งผลต่อการเลือกใช้น้ำตาลเพื่อสร้างกรดและสร้างเซลล์ นั่นคือถ้ามีแหล่งไนโตรเจนพอเพียงเชื้อ *L. mali* จะใช้น้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคสและฟรุกโตส) ในการสร้างเซลล์ และใช้น้ำตาลซูโครสในการหมักให้เกิดกรด อย่างไรก็ตามอาหารสูตรที่ 2 ให้ปริมาณกรดแลคติกสูง (22 กรัม/ลิตร) เมื่อหมักนาน 69 ชั่วโมง ในขณะที่อาหารสูตร 3 ต้องหมักนาน 96 ชั่วโมงจึงจะให้ปริมาณกรดในระดับเดียวกัน

อาหารสูตรที่ 4 และ 5 เป็นอาหารดัดแปลงที่ใส่กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนกลูโคสเช่นกัน แต่อาหารสูตร 4 ไม่เติม peptone และไม่เติม meat extract ลงในอาหาร และอาหารสูตร 5 ใส่ peptone เพียงครึ่งหนึ่งของสูตรปกติ และไม่เติม meat extract (ตารางที่ 1) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าแหล่งไนโตรเจนในอาหารสูตรที่ 4 มีน้อยที่สุด และสูตรที่ 5 มีน้อยรองลงมา ผลการเจริญและการสร้างกรด (รูปที่ 1) เป็นไปอย่างรวดเร็วในช่วงระยะเวลาตั้งแต่ 6 - 25 ชั่วโมงของการหมัก ซึ่งสัมพันธ์กับการลดลงอย่างรวดเร็วของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และที่ 25 ชั่วโมงน้ำตาลรีดิวซ์จากเริ่มต้น 15 กรัมต่อลิตรลดลงเหลือ 4.2 และ 3.8 กรัมต่อ/ลิตร ในอาหารสูตร 4 และสูตร 5 ตามลำดับ ส่วนปริมาณน้ำตาลซูโครสไม่แสดงการลดลงอย่างชัดเจนตลอดระยะเวลาการหมัก

จากผลการหมักในอาหารทุกสูตรยังแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *L. mali* NRIC1692 ถูกยับยั้งการเจริญจนเซลล์เข้าสู่ระยะ stationary phase เมื่ออาหารหมักมีค่า pH 4 และเมื่อมีปริมาณกรดแลคติก 13 - 14 กรัม/ลิตร ที่ pH ดังกล่าวยังพบว่าการสร้างกรดยังดำเนินต่อไปได้แม้ว่า

ตารางที่ 2 ค่าปริมาณสับสเตรท และผลผลิตกรดที่ได้จากการหมักเชื้อ *L. mali* NRIC1692 ด้วยสูตรอาหารทั้ง 5 สูตร

อาหารสูตรที่	ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น (g/l)		ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ 96 ชม.		ความเข้มข้นของกรดแลคติก (g/l) ที่ 96 ชม.	ความขุ่นของเซลล์ (OD_{620}) ที่ 96 ชม.	pH ที่ 96 ชม.
	น้ำตาลรีดิวซ์	ซูโครส	น้ำตาลรีดิวซ์	ซูโครส			
*1	20.6 ± 0.2	-	3.9 ± 0.2	-	18.5 ± 0.7	1.2 ± 0.0	3.9 ± 0.0
2	15.3 ± 0.2	22.5 ± 1.5	9.9 ± 0.5	2.7 ± 0.7	22 ± 0.1	1.7 ± 0.1	3.7 ± 0.1
3	15.5 ± 1.4	22.9 ± 2.7	10.9 ± 0.8	3.5 ± 0.3	22 ± 0.6	1.1 ± 0.0	3.8 ± 0.1
4	14.7 ± 0.3	22.9 ± 1.4	3.9 ± 0.2	20.3 ± 0.9	15.7 ± 1.0	1.3 ± 0.1	4.0 ± 0.0
5	15.3 ± 0.2	22.6 ± 1.0	4.1 ± 0.3	20.2 ± 0.7	16.1 ± 0.5	1.3 ± 0.0	4.1 ± 0.1

ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากค่าเฉลี่ยอย่างน้อย 2 ซ้ำ * เก็บตัวอย่างเวลาสุดท้ายที่ 69 ชม.

จะมีอัตราการเพิ่มของปริมาณกรดช้าลง ซึ่งนับว่าเชื้อสามารถทน pH ต่ำได้เนื่องจากเคยมีรายงานว่าการผลิตกรดของเชื้อแบคทีเรียแลคติกโดยทั่วไปจะถูกยับยั้งให้ปริมาณไม่เพิ่มสูงขึ้นที่ pH 5 และมีปริมาณลดลงเมื่อ pH ต่ำกว่า 4.5 [12] นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Monteagudo และคณะ [13] ที่ใช้เชื้อ *L. delbruckii* ในการหมักกากน้ำตาลจากหัวบีท พบว่าปริมาณกรดที่ยับยั้งการเจริญคือ 20 กรัม/ลิตร อย่างไรก็ตามในการทดลองดังกล่าวมีการควบคุมระดับ pH ที่ 5.9 ส่วนงานวิจัยนี้ไม่ได้ควบควบคุมระดับ pH การควบคุมระดับ pH อาจช่วยให้เชื้อทนต่อกรดได้มากขึ้น และเพิ่มผลผลิตได้ดังที่เคยมีรายงานในเชื้อ *L. delbruckii* [13-14] .

3.2 ความเข้มข้นของน้ำตาลและผลผลิตกรดเมื่อสิ้นสุดการหมัก

ค่าความเข้มข้นของสารตั้งต้นก่อนหมัก และหลังหมักและความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์เมื่อสิ้นสุดการหมักแสดงดังตารางที่ 2 ในอาหาร MRS สูตรปกติที่มีเพียงกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (20 กรัม/ลิตร) พบว่าเมื่อสิ้นสุดการหมักเหลือกลูโคสเพียง 3.9 กรัม/ลิตร และได้กรดแลคติก 18.5 กรัม/ลิตร ส่วนอาหารสูตรที่ 2 และ 3 พบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ถูกใช้ไปเพียง 5.4 และ 4.6 กรัม/ลิตร ตามลำดับ แต่ซูโครสถูกใช้ไป 19.8 และ 19.4 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และผลผลิตกรดที่ 96 ชั่วโมง เป็น 22 กรัม/ลิตร เท่ากันทั้ง 2 สูตร ในขณะที่อาหารสูตรที่ 4 และ 5 น้ำตาลรีดิวซ์ถูกใช้ไป 10.8 และ11.2 กรัม/ลิตร และซูโครสถูกใช้ไปเพียง 2.6 และ 2.4 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ผลผลิตกรด ที่ 96 ชั่วโมงเป็น 15.7 และ 16.1 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

ในการผลิตกรดของ homofermentative lactic acid bacteria ส่วนใหญ่แบคทีเรียจะใช้น้ำตาลกลูโคสผ่านวิถี Embden-Mayoerhof โดยกลูโคส 1 โมเลกุลได้เป็นกรดแลคติก 2 โมเลกุล [2] ดังนั้นน้ำตาลกลูโคสจึงน่าจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่แบคทีเรียกลุ่มนี้จะนำไปผลิตกรดได้ง่ายที่สุด แต่ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่านอกจากน้ำตาลกลูโคสแล้ว *L. mali* ยังสามารถหมัก ฟรุคโตส และซูโครสไปเป็นกรดแลคติกได้ อีกทั้งการศึกษาในครั้งนี้ยังได้แสดงให้เห็นว่าปริมาณแหล่งไนโตรเจนมีอิทธิพลต่อชนิดของน้ำตาลที่ใช้เป็นหลักในการผลิตกรดอีกด้วย ผลการทดลองสนับสนุนเกี่ยวกับการใช้แหล่งคาร์บอนอื่นนอกจากกลูโคสเคยมีรายงานไว้ในเชื้อ *L.delbrueckii* ssp. *delbrueckii* ที่สามารถสร้างกรดด้วยกลูโคสได้ดี พอ ๆ กับซูโครส ในขณะที่น้ำตาลผสมระหว่างฟรุคโตสกับกลูโคสให้ผลผลิตสูงสุด [15] อย่างไรก็ตามการศึกษาดังกล่าวไม่ได้มีการปรับเปลี่ยนการใช้แหล่งไนโตรเจน

3.3 พารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของการผลิตกรด

ค่าผลผลิตที่ได้ต่อการใช้สารตั้งต้น ($Y_{P/S}$) อัตราสูงสุด ($r_{P.max}$) และอัตราเฉลี่ย ($r_{P\ avg}$) ในการสร้างผลิตภัณฑ์แสดงในตารางที่ 3 อาหารสูตรที่ 1 ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียวให้ค่า $Y_{P/S}$ 0.94 และความสามารถในการใช้สารตั้งต้น (% substrate conversion) เป็นร้อยละ 80.9 อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์สูงสุด 0.6 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง อัตราการสร้างกรดเฉลี่ย 0.23 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ส่วนในอาหารสูตรดัดแปลงที่ใช้กากน้ำตาลทดแทนกลูโคสและลดสารอาหารบางชนิดอีก 4 สูตรพบว่า สูตรที่ 4 และ 5 ให้ค่า $Y_{P/S}$ สูงสุด คือ 0.95 เท่ากัน แต่มี % substrate conversion ของน้ำตาลทั้งหมดต่ำสุด (35%) ในขณะที่อาหารสูตรที่ 2 และ 3 แม้จะมีค่า

ตารางที่ 3 ค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ที่ได้จากการหมักเชื้อ *L. mali* NRIC1692 นาน 96 ชั่วโมง

อาหารสูตรที่	$Y_{P/S}$	% Substrate conversion		
		Reducing sugar	Sucrose	Total su
1	0.94	80.9		80.9
2	0.71*	35.3	88.0	66.7
3	0.75	29.7	84.7	62.5
4	0.95	73.5	11.4	35.6
5	0.95	73.2	10.6	35.9

* เก็บตัวอย่างเวลาสุดท้ายที่ 69 ชม. คิดจากค่าเฉลี่ยอย่างน้อย 2 ซ้ำ

$Y_{P/S}$ เป็นค่าผลผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อการใช้สารตั้งต้น $r_{P.avg}$ เป็นอัตราการสร้างกรดแลคติกโดยเฉลี่ย (g(l-1(h-1)

$r_{P.max}$ เป็นอัตราการสร้างกรดแลคติกสูงสุด (g(l-1(h-1) % Substrate conversion เป็นความสามารถในการใช้สารตั้งต้น

$Y_{P/S}$ 0.71 และ 0.75 แต่มี % substrate conversion ของน้ำตาลโดยรวมสูงกว่า (66.7 และ 62.5%) และเมื่อหมักในอาหารสูตร 2 สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ถึง 88% นอกจากนี้ยังให้ค่า $r_{P.max}$ สูงสุดคือ 0.66 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ในขณะที่อาหารสูตร 3 ให้ r P.max ต่ำสุดคือ 0.48 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง

Monteagudo และคณะ [13] ได้เปรียบเทียบ $Y_{P/S}$ ของเชื้อ *L. delbrueckii* เมื่อใช้โมลาสจากหัวบีทเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเมื่อควบคุม pH เป็น 4.95 ตลอดการหมัก จะได้ค่า $Y_{P/S}$ 0.79 แต่เมื่อ pH เป็น 5.9 ค่า $Y_{P/S}$ เพิ่มขึ้นเป็น 0.91 ซึ่งค่า $Y_{P/S}$ ของ homofermentative lactobacilli ทั่วไปควรเป็น 0.9 เมื่อเทียบกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าอาหารสูตรที่ 2 ให้ผลผลิตกรดสูงกว่าสูตรอื่นแต่มี $Y_{P/S}$ ต่ำสุดคือ 0.71 นั้นยังนับว่าไม่ต่ำมาก เนื่องจาก pH สุดท้ายเป็น 3.7 ดังนั้นการพัฒนาศักยภาพของ *L. mali* สายพันธุ์นี้ให้ $Y_{P/S}$ เพิ่มขึ้น จึงมีความเป็นได้ถ้ามีการควบคุมระดับ pH ให้สูงกว่า 5 รวมทั้งการควบคุมระดับ pH น่าจะส่งเสริมให้เชื้อใช้น้ำตาลได้เพิ่มขึ้น โดยไม่ทำให้การสร้างกรดชะลอลงเนื่องจากการลดลงของ pH

4. สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาศักยภาพของเชื้อแบคทีเรียแลคติก *L. mali* สายพันธุ์ NRIC 1692 พบว่าสามารถเจริญได้ในอาหารหมักสูตรดัดแปลงที่ใส่กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนน้ำตาลกลูโคสและปรับลดแหล่งไนโตรเจนบางอย่างเพื่อหมักสร้างกรดแลคติกได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารดัดแปลงสูตรที่ 2 ที่มีการลดปริมาณ peptone ลง 5 กรัม/ลิตร ให้ผลผลิตกรดแลคติกสูงที่สุด 22 กรัม/ลิตร หลังหมักไป 69 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าอาหารดัดแปลงสูตรอื่น เมื่อหมักในเวลาเท่ากัน นอกจากนี้ยังพบว่าการลดปริมาณแหล่งไนโตรเจนลงมากไปหรือไม่เติม เช่น อาหารสูตร 4 ที่ไม่เติมทั้ง peptone และ meat extract และอาหารสูตร 5 ที่มีแหล่งไนโตรเจนจาก peptone เพียง* 0.5% จะส่งผลให้เชื้อใช้น้ำตาลดีดีวซ์ เป็นแหล่งคาร์บอนมากและแทบไม่ใช้น้ำตาลซูโครสเลย แต่ถ้ามีแหล่งไนโตรเจนพอเพียง (> 1%) เชื้อสามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ในการสร้างกรดได้ดี และใช้กลูโคสเพื่อการเจริญดังอาหารสูตรที่ 2 และ 3

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ได้สนับสนุนทุนการศึกษาแก่ นางสาวสุธิดา อยู่สำราญ และนางสาวศวรรณี เหลืองสุนทรชัย

เอกสารอ้างอิง

1. สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล. “การผลิตกรดแลคติกในอุตสาหกรรม.” *ว. ส่งเสริมเทคโนโลยี.* 28 (2544) : 88-94.
2. Bigelis, R. and Tsai S-P. “Microorganisms for organic acid production.” In *Food Biotechnology*

Microorganisms. Y.H. Hui and G.G. Khachatourians (Eds). New York : Wiley-VCH, 1995.

3. Buchta, K. "Lactic acid." In *Biotechnology. vol.3.* H.J. Rehm and G. Reed (Eds). Germany : VCH, 1983.
4. ปทุมพร ฉิมอเนก. "กรดแลคติกกับอาหารของชาวเอเชีย." *ว. อาหาร.* 23 (2536) : 295-298.
5. Miller, G. L. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar." *Anal. Chem.* 31 (1959) : 426-428.
6. กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์. *การนำเข้ากรดแลคติกในประเทศไทย.* Available from: http://www.ops2.moc.go.th/trade/trade.html [12 ธันวาคม 2546].
7. Hofvendahl, K. and Hahn-Hagerdal, B. "Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources." *Enzyme and Microbial Technology.* 26 (2000) : 87-107.
8. สกต. อุทัยธานี. *กากน้ำตาล.* Available from : http://www.poompanyathai.com/uthaithani [24 กรกฎาคม 2547].
9. Stoppok, E. and Buchholz, K. "Sugar-based raw materials for fermentation applications." In *Biotechnology.* 2nd ed. H.J. Rehm and G. Reed (Eds). Germany: VCH, 1996.
10. AOAC. *Official Methods of Analysis.* 13th ed. Wasington D.C. 1984.
11. Wang,N.S."Sucrose assay by the dinitrosalicylic colorimetric methods." Available from: http://www.engr.umd.edu/~nsw/ench485/lab9d.htm. University of Maryland. [22/09/2003].
12. Kascak, J.S., Kominek, J. and Roehr, M. "Lactic acid." In *Biotechnology* 2nd ed. H.J. Rehm and G. Reed (Eds). Germany : VCH, 1996.
13. Monteagudo, J. M., et al. "Kinetics of lactic acid bacteria fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* grown on beet molasses." *Journal Chem. Tech. Biotechnol.* 68 (1997) : 271-276.
14. Hanson, T.P. and Tsao, G.T. "Kinetic studies of the lactic acid fermentation in batch and continuos cultures." *Biotechnol. Bioeng.* 14 (1972): 233-252.
15. Suskovic, J., et al . "Lactic acid fermentation kinetics on different carbon sources." *Prehrambeno-Technol Bioteh-nol Rev.* 29 (1991):155-158.