รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากชานอ้อย

โดย นายพัฒนา เหล่าไพบูลย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ.ดร.วิเชียร ลีลาวัชรมาศ มหาวิทยาลัยเกษตรสาสตร์ บางเขน

พฤศจิกายน 2549

สัญญาเลขที่ MRG4680006

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากชานอ้อย

คณะผู้วิจัย สังกัด

1. นายพัฒนา เหล่าไพบูลย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
2. รศ.ดร.วิเชียร ลีลาวัชรมาศ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

สนับสนุนโดยทบวงมหาวิทยาลัย และสำนักงานกองทุนสนันสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ทบวงฯ และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

การศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากชานอ้อย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดย *Lactococcus lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส ไซโลส หรือน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้การเลี้ยงแบบกะ ศึกษาวิถีการใช้น้ำตาลไซโลส เมแทบอลิกซ์ฟลักซ์ของการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตกรดแลคติก สภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยด่างและกรด และการผลิตกรดแลคติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยโดยการแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลกลูโคสผ่านกระบวนการหมักแบบโฮโมแลคติกทั้งในสภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่ำและสูง ส่วนการหมักน้ำตาลไซโลสพบว่า ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสต่ำ (5 และ 10 กรัมต่อลิตร) *Lc. lactis* IO-1 ผลิตกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ในขณะที่กรดแลคติกถูกสร้างเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสสูง (30 และ 50 กรัมต่อลิตร) ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเป็นปัจจัยหลักที่ควบคุมเมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลส ในการผลิตกรดแลคติกในน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสพบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการเจริญแบบ diauxic และในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลผสมพบว่า *Lc. lactis* IO-1 สร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในทุกสภาวะของการทดลอง ซึ่งผลการทดลองที่ได้คล้ายกับเมื่อใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสมที่ความเข้มข้น 15, 25, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ในขณะที่กรดอะซิติกถูกสร้างเป็นผลิตภัณฑ์หลักในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสมที่ความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร สำหรับการศึกษาวิถีการใช้น้ำตาลไซโลสภายใต้สภาวะการหมักแบบกะพบว่า น้ำตาลไซโลสถูกใช้ผ่านวิถีฟอสโฟคีโตเลสและวิถีเพนโตสฟอสเฟตพร้อมกันทุกสภาวะการทดลอง การวิเคราะห์เมแทบอลิกซ์ฟลักซ์ของ *Lc. lactis* IO-1 ในการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลไซโลสพบว่า วิถีฟอสโฟคีโตเลสและวิถีเพนโตสฟอสเฟตเป็นวิถีหลักของคาร์บอนเมแทบอลิซึม ซึ่งผลการทดลองอธิบายด้วยวิถีการใช้น้ำตาลไซโลสและแอคติวิตีของเอนไซม์ที่แตกต่างกันในไพรูเวตเมแทบอลิซึม สำหรับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยสารละลายด่างเพื่อสกัดเอาลิกนินออก จากนั้นนำไปไฮโดรไลซ์ต่อด้วยกรดเพื่อให้ได้สารละลายที่มีน้ำตาลสูง ผลการทดลองพบว่าการใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร สามารถสกัดลิกนินได้ในปริมาณสูงสุดเท่ากับ 322.19 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง พบว่าให้ประสิทธิภาพของการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยสูงสุด (15.95) และที่สภาวะดังกล่าวได้น้ำตาลไซโลส 13.09 กรัมต่อลิตร น้ำตาลกลูโคส 2.66 กรัมต่อลิตร น้ำตาลอะราบิโนส 1.22 กรัมต่อลิตร และกรดอะซิติก 0.06 กรัมต่อลิตร ส่วนการผลิตกรดแลคติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยพบว่าผลได้ของกรดแลคติกสูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.26 กรัมของกรดแลคติกต่อกรัมของน้ำตาลที่ถูกใช้ เมื่อเติมยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 7 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าการลดความเป็นพิษของสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยนอกจากจะทำให้ *Lc. lactis* IO-1 เจริญได้ดีขึ้นแล้ว ยังช่วยเพิ่มความสามารถในการหมักกรดแลคติกด้วย

Study of Lactic Acid Production from Sugar Cane Bagasse

ABSTRACT

The aims of this experiment were to study lactic acid production in the basal medium containing glucose, xylose and the mixtures of the sugars at various concentrations under batch cultures of *Lactococcus lactis* IO-1 and to study metabolic pathway and metabolic flux analysis of xylose utilization on lactic acid production. Optimal conditions of sugar cane bagasse hydrolysis using alkaline and acid treatments and lactic acid production from the treated hydrolysate of sugar cane bagasse supplemented with nitrogen sources at various concentrations were also studied. The results showed that *Lc. lactis* IO-1 demonstrated homolactic fermentation in both low and high glucose concentrations under glucose batch cultures. In xylose batch cultures, acetic acid was mainly produced at low xylose concentrations (5 and 10 g l^{-1}) whereas lactic acid was mainly produced at high xylose concentrations (30 and 50 g l^{-1}). These observations suggested that the principal factor controlling xylose metabolism was xylose concentration. In the mixtures of glucose and xylose, a classical diauxic was observed under batch cultures of *Lc. lactis* IO-1. In glucose fermentation period, lactic acid was produced as a main product at all conditions tested. Similar results were also observed in xylose fermentation period at 15, 25, 30 and 50 g l^{-1} whereas acetic acid was produced as a main product in xylose fermentation period at 2.5, 5 and 10 g l^{-1}. The control of xylose utilization was investigated in batch culture. The results suggested that both phosphoketolase and pentosephosphate pathways may be operating concurrently at all xylose concentrations tested in batch culture. Metabolic flux analysis of *Lc. lactis* IO-1 grown on xylose revealed that the phosphoketolase and pentosephosphate pathways were the central routes of carbon metabolism. These results were discussed in terms of pathways and activities of different-pyruvate converting enzymes. In addition the optimal conditions of sugar cane bagasse hydrolysis were investigated by using alkaline hydrolysis to extract lignin and acid hydrolysis to obtain high sugar solution. The results showed that the highest lignin concentration extracted from the bagasse was 322.19 mg l^{-1} by using 10 % ammonium hydroxide. For acid hydrolysis, optimal conditions to obtain highest efficiency (15.95) of sugar cane bagasse hydrolysis were 0.5 % (v/v) hydrochloric acid at 100 °C for 5 hours. At these conditions, the hydrolysate consisted of 13.09 g xylose l^{-1}, 2.66 g glucose l^{-1}, 1.22 g arabinose l^{-1} and 0.06 g acetic acid l^{-1}. For lactic acid production from the hydrolysate by *Lc. lactis* IO-1, the maximum yield of lactic acid (0.26 g lactic acid g^{-1} sugars utilized) was obtained when the hydrolysate was supplemented with 7 g l^{-1} of yeast extract. In addition, detoxification of sugar cane bagasse hydrolysate could improve not only growth of *Lc. lactis* IO-1 but also lactic acid fermentation.

Executive summary

แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria) แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ homo – และ hetero – fermentative species โดย homo – fermentative species สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเกือบทั้งหมด (มากกว่า 90%) เป็นกรดแลคติก โดยผ่านวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) สำหรับ hetero – fermentative species จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลคติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ด้วยจำนวนโมลที่เท่ากัน โดยผ่านวิถีฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase) แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการปรับปรุงกลิ่น และเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์นม เนื้อ ผัก และอาหารสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Lactococcus* ซึ่งเป็น homolactic acid bacteria มีความสำคัญอย่างยิ่งในการใช้เป็นจุลินทรีย์เริ่มต้น (starter culture) ในผลิตภัณฑ์นมหมัก และผลิตภัณฑ์เนยต่าง ๆ กรดแลคติกที่ได้จากจุลินทรีย์เป็นกรดอินทรีย์ที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้เป็นสารให้ความเปรี้ยว (acidulate) และสารถนอมอาหาร (preservative) ประเภทเนื้อ ปลา และผัก กรดนี้นำมาใช้ในอุตสาหกรรมนมและผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวกับนม อุตสาหกรรมลูกกวาดและขนมโดยใช้เป็น acidifier อุตสาหกรรมเคมีโดยใช้ในรูปกรดโพลิแลคติก (PLA) และพลาสติกที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradable plastic) อุตสาหกรรมการทำสบู่โดยใช้ในรูปโซเดียมแลคเตท (sodium lactate) อุตสาหกรรมการผลิตเซลโลเฟน (cellophane) อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ยาง วงจรอิเล็คทรอนิกส์ (electronic circuits) chip boards และกระดาษ เป็นต้น นอกจากนี้กรดแลคติกถูกนำมาใช้ทำพลาสติกสำหรับผลิตฟีนอลฟอร์มาดีไฮด์เรซิน (phenol-formaldehyde resins) และสามารถทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์และกรดในการทำโพลิเอสเทอร์ (polyester) ซึ่งใช้เป็น plasticizer กรดแลคติกนี้ยังถูกนำมาใช้ทำให้เส้นไหมและไหมสังเคราะห์ (rayon) ให้มีความวาวขึ้น และใช้ในการย้อมสีในอุตสาหกรรมสิ่งทอ

การผลิตกรดแลคติกนิยมผลิตโดยใช้กระบวนการหมักเนื่องจากเป็นกระบวนการที่มีต้นทุนต่ำ ใช้พลังงานน้อย มีความหลากหลายของกลิ่นรส และเป็นวิธีที่ยอมรับของผู้บริโภค

ชานอ้อยเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดหนึ่งพบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งชานอ้อยประกอบด้วยโพลิแซคคาไรด์หลายชนิด เช่น เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส เมื่อไฮโดรไลซ์จะได้น้ำตาลกลูโคสและไซโลสที่น่าจะสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมักกรดแลคติกได้

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ (1) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลกลูโคสและ/หรือไซโลส โดยวิธีการหมักแบบกะโดย *Lactococcus lactis* IO-1 (2) เพื่อหาวิถี (pathway) ของการใช้ไซโลสในการผลิตกรดแลคติก (3) เพื่อหาฟลักซ์ (flux) ของตัวกลาง (intermediate) ผ่านวิถีของการใช้ไซโลสภายใต้สภาวะการเลี้ยงที่แตกต่างกันและ (4) เพื่อศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากชานอ้อยที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ

การศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) พบว่า *Lc. lactis* IO-1 สร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักผ่านกระบวนการหมักแบบโฮโมแลคติกแอซิดเฟอร์เมนท์เทชัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลกลูโคสผ่านวิถีไกลโคไลซีส และพบว่า *Lc. lactis* IO-1 สร้างกรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล เป็นผลพลอยได้ในระหว่างกระบวนการหมัก เมื่อศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) พบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสมีผลต่อการผลิตกรดแลคติกในระหว่างกระบวนการหมักของ *Lc. lactis* IO-1 โดยพบว่าที่

ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 5 และ 10 กรัมต่อลิตร *Lc. lactis* IO-1 สร้างกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ในขณะที่ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 30 และ 50 กรัมต่อลิตร *Lc. lactis* IO-1 สร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักโดยผ่านกระบวนการหมักแบบเฮเทอโรแลคติกแอซิดเฟอร์เมนท์เทชัน หรือมิกแอซิดเฟอร์เมนท์เทชัน สำหรับการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลผสมคือ น้ำตาลกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 2.5, 5, 10, 15, 25, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) พบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการเจริญแบบ diauxic และมีการสร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ยกเว้นเมื่อใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสมที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 15 กรัมต่อลิตร ซึ่งที่สภาวะดังกล่าวนี้ *Lc. lactis* IO-1 สร้างกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก นอกจากนี้ยังพบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูงสุดในน้ำตาลผสมที่ไม่มีผลยับยั้งการใช้น้ำตาลไซโลสมีค่าเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร

การศึกษาวิถีการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตกรดแลคติกโดย *Lc. lactis* IO-1 ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ พบว่า *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลสผ่านวิถีเพนโตสฟอสเฟต และวิถีฟอสโฟคีโตเลสพร้อมกัน เนื่องจากตรวจพบฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต เอนไซม์ทรานส์คีโตเลส และเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลสในสารละลายเซลล์สกัดของ *Lc. lactis* IO-1

การศึกษาเมแทบอลิกซ์ฟลักซ์ในการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลไซโลสพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสมีผลต่อการสร้างแลคเตท โดยปริมาณแลคเตทมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้น และพบว่า น้ำตาลไซโลสถูกนำเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตมากกว่าวิถีฟอสโฟคีโตเลสภายใต้สภาวะที่ศึกษา ยกเว้นเมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร

การศึกษาพรินซิเพิลโนดของไซลูโลส-5-ฟอสเฟตและไพรูเวตพบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสมีผลต่อปริมาณไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่ถูกนำเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลส และพบว่าปริมาณไซลู โลส-5-ฟอสเฟตสูงสุดที่เข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลสเท่ากับ 67 และ 58 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 50 และ 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสยังมีผลต่ออิมิแทบอลิซึมของไพรูเวต และการสร้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมัก โดยพบว่าไพรูเวตที่สร้างขึ้นจะถูกนำไปใช้ในการผลิตแลคเตทเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสที่เพิ่มขึ้น

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยพบว่า การไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้อง สามารถสกัดลิกนินได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 322 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อนำชานอ้อยไปไฮโดรไลซ์ต่อด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง จะให้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์สูงสุดเท่ากับ 15.95 และที่สภาวะดังกล่าวได้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลอะราบิโนส และกรดอะซิติก เท่ากับ 2.66, 13.09, 1.22 และ 0.06 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยพบว่า ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญ และการผลิตกรดแลคติกของ *Lc. lactis* IO-1 โดยพบว่า การเติมยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 7 กรัมต่อลิตร ให้ผลได้ของกรดแลคติกสูงสุดเท่ากับ 0.26 กรัมของกรดแลคติกต่อกรัมน้ำตาลผสมที่ถูกใช้ นอกจากนี้ยังพบว่า สารดูดซับแอมเบอร์ไลซ์สามารถลดความเป็นพิษของสารยับยั้งในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยได้ ส่งผลให้ *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในสารละลายได้เพิ่มขึ้น โดยผลิตภัณฑ์ที่ตรวจพบในระหว่างกระบวนการหมักคือ กรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง "การศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากชานอ้อย" สำเร็จลุล่วงลงได้ คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) ที่ได้ให้การสนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่และอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์และเครื่องมือที่จำเป็นสำหรับการทดลองและวิเคราะห์ด้านต่างๆ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ รศ.ดร. วิเชียร ลีลาวัชรมาศ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นนักวิจัยพี่เลี้ยงในการทำวิจัยในครั้งนี้ และใคร่ขอขอบคุณ คุณอาทิตย์ ธานี คุณวันชนะ สืบไวย คุณนพพร ชุติวิทูรชัย คุณรุ่งรัตน์ โยทองยศ และคุณโสภิดา แสงงาม นักศึกษาภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือในการทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คุณอาทิตย์ ธานี ที่มีส่วนสำคัญในการช่วยเหลือ

สุดท้ายคณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ รศ.ดร. ลักขณา เหล่าไพบูลย์ และ ผศ.ดร. อรุณวดี ชนะวงศ์ ที่คอยช่วยเหลือในทุกๆ ด้านตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยในครั้งนี้ และใคร่ขอขอบคุณผู้ที่มีอุปการคุณทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดความรู้ ประสบการณ์ และให้คำแนะนำอันมีค่าสำหรับการทำงานวิจัยในครั้งนี้

คณะผู้วิจัย

พฤศจิกายน 2549

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 แลคติกแอซิดแบคทีเรีย	4
2.2 ชนิดของกรดแลคติก	7
2.3 ประโยชน์ของกรดแลคติก	7
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างกรดแลคติก	8
2.5 สารตั้งต้นที่สำคัญในการสร้างไพรูเวตและแลคเทต	9
2.6 การขนส่งโมเลกุลของน้ำตาลในแลคติกแอซิดแบคทีเรีย	13
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย	15
2.8 ชานอ้อย	18
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	21
3.1 สารเคมี	21
3.2 เครื่องมือ	22
3.3 อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์	23
3.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง	24
3.5 ชานอ้อยที่ใช้ในการทดลอง	25
3.6 วิธีการทดลอง	25
3.7 วิธีการวิเคราะห์	28
บทที่ 4 ผลการทดลอง	34
4.1 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)	34

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) 40

4.3 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) 47

4.4 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 2.5, 15, และ 25 กรัมต่อลิตร) 58

4.5 การศึกษาวิถีการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตกรดแลคติกโดย *Lc. lactis* IO-1 68

4.6 การวิเคราะห์เมแทบอลิกซ์ฟลักซ์ในการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) 77

4.7 การวิเคราะห์พรินซิเพิลโนด (principal node) ของการใช้น้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดย *Lc. lactis* IO-1 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ 84

4.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย 87

4.9 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากชานอ้อย 99

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง 110

5.1 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) 110

5.2 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) 111

5.3 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) 112

5.4 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 2.5, 15, และ 25 กรัมต่อลิตร) 113

5.5 การศึกษาวิถีการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตกรดแลคติกโดย *Lc. lactis* IO-1 114

5.6 การวิเคราะห์เมแทบอลิกซ์ฟลักซ์ในการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) 115

5.7 การวิเคราะห์พรินซิเพิลโนดของการใช้น้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ โดย *Lc. lactis* IO-1 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ 116

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย	117
5.9 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากชานอ้อย	121
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	125
เอกสารอ้างอิง	127
ภาคผนวก	134
ภาคผนวก ก สูตรการคำนวณค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์	135
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงและน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Lc. lactis* IO-1	138
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส กรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก เอทานอล 2,3-บิวเทนไดออล คาร์บอนไดออกไซด์ และเฟอฟูรอล	140
ภาคผนวก ง กราฟมาตรฐานของลิกนิน โปรตีน และฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต	145
ภาคผนวก จ โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส กรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก 2,3-บิวเทนไดออล และเอทานอล	147
ภาคผนวก ฉ การเผยแพร่ผลงานวิจัย	149

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่อผลได้ของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)	39
ตารางที่ 2	ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสต่อผลได้ของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ ผลได้ของผลิภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)	46
ตารางที่ 3	ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสต่อผลได้ของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)	55
ตารางที่ 4	ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสต่อผลได้ของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)	56
ตารางที่ 5	ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสต่อผลได้ของเซลล์ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลผสม (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)	57
ตารางที่ 6	ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสต่อผลได้ของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร)	64
ตารางที่ 7	ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสต่อผลได้ของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร)	65
ตารางที่ 8	ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสต่อผลได้ของเซลล์ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลผสม (อย่างละ 2.5, 15 และ 50 กรัมต่อลิตร)	66
ตารางที่ 9	ปริมาณฟรุก-1,6-ไดฟอสเฟตและแอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลสในสารละลายเซลล์สกัดของ *Lc. lactis* IO-1 ที่เลี้ยงในน้ำตาลไซโลส ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ	72
ตารางที่ 10	ผลของความเข้มข้นและชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อผลได้ของเซลล์ และผลได้ของผลิตภัณฑ์	106

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	วิถีไกลโคไลซิส	5
ภาพที่ 2	วิถีฟอสโฟคีโตเลส	6
ภาพที่ 3	โครงสร้างของกรดแลคติก	7
ภาพที่ 4	ไพรูเวตที่เกิดขึ้นจากเมแทบอลิซึมของน้ำตาลกลูโคส	10
ภาพที่ 5	ไพรูเวตที่เกิดขึ้นจากเมแทบอลิซึมของน้ำตาลเพนโตส	11
ภาพที่ 6	โพลิออลส์บางชนิดสามารถเปลี่ยนเป็นแลคเตท	11
ภาพที่ 7	กรดอินทรีย์บางชนิดสามารถเปลี่ยนเป็นแลคเตท	12
ภาพที่ 8	กรดอะมิโนบางชนิดสามารถเปลี่ยนเป็นแลคเตท	12
ภาพที่ 9	เมแทบอลิซึมของไพรูเวตในแลคติกแอซิดแบคทีเรีย	13
ภาพที่ 10	เมแทบอลิซึมของน้ำตาลกาแลคโตสในแลคติกแอซิดแบคทีเรีย	14
ภาพที่ 11	การจัดเรียงตัวของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในชานอ้อย	18
ภาพที่ 12	โครงสร้างของเซลลูโลส	19
ภาพที่ 13	โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส	19
ภาพที่ 14	โครงสร้างของลิกนิน	20
ภาพที่ 15	ปฏิกิริยาของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลส ไตรโอสฟอสเฟตไอโซเมอเรส และแอลฟา-กลีเซอโรฟอสเฟตดีไฮโดรจิเนส ในการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลส	30
ภาพที่ 16	ปฏิกิริยาของเอนไซม์อัลโดเลส ไตรโอสฟอสเฟตไอโซเมอเรส และแอลฟา-กลีเซอโรฟอสเฟตดีไฮโดรจิเนส ในการวิเคราะห์ฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต	32
ภาพที่ 17	การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร	35
ภาพที่ 18	การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร	36
ภาพที่ 19	การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร	37
ภาพที่ 20	การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร	38
ภาพที่ 21	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (molar product yields) และอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) ที่ได้จากการเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ	40
ภาพที่ 22	การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร	41
ภาพที่ 23	การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 10 กรัมต่อลิตร	42
ภาพที่ 24	การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 30 กรัมต่อลิตร	44

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 25 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 50 กรัมต่อลิตร 45

ภาพที่ 26 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (molar product yields) และอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ 47

ภาพที่ 27 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและไซโลส อย่างละ 5 กรัมต่อลิตร 49

ภาพที่ 28 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและไซโลส อย่างละ 10 กรัมต่อลิตร 50

ภาพที่ 29 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและไซโลส อย่างละ 30 กรัมต่อลิตร 52

ภาพที่ 30 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและไซโลส อย่างละ 50 กรัมต่อลิตร 53

ภาพที่ 31 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (molar product yields) และอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) เมื่อ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ 55

ภาพที่ 32 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (molar product yields) และอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) เมื่อ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ 56

ภาพที่ 33 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (product yield) และผลได้ของเซลล์ (biomass yield) เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและน้ำตาลไซโลส (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) 58

ภาพที่ 34 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและไซโลส อย่างละ 2.5 กรัมต่อลิตร 60

ภาพที่ 35 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและไซโลส อย่างละ 15 กรัมต่อลิตร 61

ภาพที่ 36 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและไซโลส อย่างละ 25 กรัมต่อลิตร 62

ภาพที่ 37 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (molar product yields) และอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) เมื่อ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ 64

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 38	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (molar product yields) และอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) เมื่อ *Lc. Lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ	65
ภาพที่ 39	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (product yields) และผลได้ของเซลล์ (biomass yield) เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร)	67
ภาพที่ 40	เมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสในวิถีเพนโตสฟอสเฟต	70
ภาพที่ 41	เมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสในวิถีฟอสโฟคีโตเลส	71
ภาพที่ 42	วิถีเพนโตสฟอสเฟต	74
ภาพที่ 43	วิถีฟอสโฟคีโตเลส	75
ภาพที่ 44	วิถีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO1 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะในสูตรอาหารพื้นฐาน	76
ภาพที่ 45	วิถีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ที่เลี้ยงในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร	79
ภาพที่ 46	วิถีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ที่เลี้ยงในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 10 กรัมต่อลิตร	80
ภาพที่ 47	วิถีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ที่เลี้ยงในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 30 กรัมต่อลิตร	82
ภาพที่ 48	วิถีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ที่เลี้ยงในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 50 กรัมต่อลิตร	83
ภาพที่ 49	พรินซิเพิลโนดของไซลูโลส-5-ฟอสเฟตภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสต่าง ๆ กัน	85
ภาพที่ 50	พรินซิเพิลโนดของไพรูเวตภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสต่าง ๆ กัน	86
ภาพที่ 51	ปริมาณลิกนินที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	88
ภาพที่ 52	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส ไซโลส กรดอะซิติก เฟอฟูรอล และประสิทธิภาพที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส	90
ภาพที่ 53	ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส ไซโลส กรดอะซิติก เฟอฟูรอล และประสิทธิภาพที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส	91

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 54 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส ไซโลส กรดอะซิติก เฟอฟูรอล และประสิทธิภาพที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส 92

ภาพที่ 55 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส ไซโลส กรดอะซิติก เฟอฟูรอล และประสิทธิภาพที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส 93

ภาพที่ 56 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส ไซโลส กรดอะซิติก เฟอฟูรอล และประสิทธิภาพที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส 95

ภาพที่ 57 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส ไซโลส กรดอะซิติก เฟอฟูรอล และประสิทธิภาพที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90,(b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส 96

ภาพที่ 58 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส ไซโลส กรดอะซิติก เฟอฟูรอล และประสิทธิภาพที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส 97

ภาพที่ 59 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส ไซโลส กรดอะซิติก เฟอฟูรอล และประสิทธิภาพที่ได้จากการ ไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส 98

ภาพที่ 60 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน 99

ภาพที่ 61 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่มีการเติมยีสต์สกัด (a) 3, (b) 5 และ (c) 7 กรัมต่อลิตร 101

ภาพที่ 62 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่มีการเติมเพปโตน (a) 3, (b) 5 และ (c) 7 กรัมต่อลิตร 102

ภาพที่ 63 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต (a) 3, (b) 5 และ (c) 7 กรัมต่อลิตร 104

ภาพที่ 64 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่มีการเติมยีสต์สกัด เพปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟต อย่างละ 5 กรัมต่อลิตร 105

ภาพที่ 65 ผลของชนิดและปริมาณไนโตรเจนต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของ *Lc. lactis* IO-1 ที่เลี้ยงในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย 107

สารบัญภาพ (ต่อ)

		หน้า
ภาพที่ 66	การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยและเติมยีสต์สกัด 7 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน	108
ภาพที่ 67	การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่ผ่านการลดความเป็นพิษและเติมยีสต์สกัด 7 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน	109
ภาพที่ 68	การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่ผ่านการลดความเป็นพิษและปรับความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสให้เท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยเติมยีสต์สกัด 7 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน	109
ภาพที่ 69	กราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงและน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Lc. lactis* IO-1	139
ภาพที่ 70	กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นของ (a) น้ำตาลกลูโคส (b) น้ำตาลไซโลส และ (c) น้ำตาลอะราบิโนส	141
ภาพที่ 71	กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นของ (d) กรดแลคติก (e) กรดฟอร์มิก และ (f) กรดอะซิติก	142
ภาพที่ 72	กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นของ (g) เอทานอล (h) 2,3-บิวเทนไดออล และ (i) คาร์บอนไดออกไซด์	143
ภาพที่ 73	กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นของเฟอฟูรอล	144
ภาพที่ 74	กราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ (a) ลิกนิน (b) โปรตีน และ (c) ฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต	146
ภาพที่ 75	โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานกลูโคส (9.298) ไซโลส (9.928) อะราบิโนส (10.797) กรดแลคติก (12.449) กรดฟอร์มิก (13.625) กรดอะซิติก (15.161) 2,3-บิวเทนไดออล (18.898) และเอทานอล (21.663)	148
ภาพที่ 76	โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานเฟอฟูรอล (47.888)	148

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อ้อยเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่สร้างรายได้ให้กับประเทศไทย โดยเฉพาะการส่งออกไปยังต่างประเทศในรูปของน้ำตาล ในปี พ.ศ. 2543 พบว่าประเทศไทยส่งน้ำตาลออกไปขายยังตลาดต่างประเทศได้มากถึง 3.82 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่าการส่งออกประมาณ 24,000 ล้านบาท และประเทศไทยยังเป็นผู้ส่งออกน้ำตาลรายใหญ่อันดับ 3 รองจากบราซิล และออสเตรเลีย (นรชัย ลือกุลวัฒนะชัย, 2543)

ภาคตะวันออกเฉียงเหนือซึ่งมีพื้นที่การเพาะปลูกที่ใหญ่ที่สุดของประเทศ สามารถสร้างผลผลิตทางการเกษตรในแต่ละปีได้ในปริมาณที่สูง โดยพบว่าในปี พ.ศ. 2543-2544 มีผลผลิตเฉลี่ยของข้าวโพด มันสำปะหลัง และอ้อย ประมาณ 578, 2,600 และ 8,310 กิโลกรัมต่อไร่ คิดเป็นผลผลิตรวมเท่ากับ 4.50, 18.00 และ 48.61 ล้านตัน ตามลำดับ จากตัวเลขดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าวัสดุเหลือทิ้งที่มาจากการเกษตรนั้นสูงมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งวัสดุเหลือทิ้งที่มาจากอ้อย (ประสิทธิ์ ใจศิล, 2545) อย่างไรก็ตามในช่วงปี 2544–2545 พบว่าอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลมีราคาตกต่ำ เพราะปริมาณผลผลิตอ้อยและน้ำตาลเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่ราคาน้ำตาลในตลาดโลกตกต่ำ ทำให้ประเทศที่เป็นคู่แข่ง (เช่น บราซิล และออสเตรเลีย) ทุ่มตลาดน้ำตาลเพื่อแข่งกับตลาดน้ำตาลของประเทศไทย ส่งผลให้รายได้ของเกษตรกรชาวไร่อ้อยลดลง จากอ้อยราคา 600 บาทต่อตัน เหลือเพียง 530 บาทต่อตัน (ศูนย์วิจัยกสิกรไทย, 2545) ต่อมาในปี พ.ศ. 2546-2547 ประเทศไทยได้ส่งออกน้ำตาลเป็นอันดับ 2 รองจากบราซิล ซึ่งหากเปรียบเทียบราคาจำหน่ายน้ำตาลทรายระหว่างประเทศพบว่า ราคาน้ำตาลทรายในประเทศไทยมีราคาสูงกว่าในบราซิล โดยในไทยจำหน่ายกิโลกรัมละ 13.25-14.25 บาท ในขณะที่บราซิลจำหน่ายในกิโลกรัมละ 12.48-13.37 บาท นอกจากนี้ยังพบว่าราคาน้ำตาลทรายดิบซื้อขายล่วงหน้าของไทยในตลาดต่างประเทศในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ (2546) - มกราคม (2547) มีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง คือจากราคา 860 บาทต่อกระสอบ เหลือ 728 บาทต่อกระสอบ อย่างไรก็ตามหากเปรียบเทียบราคาน้ำตาลทรายในช่วงปี พ.ศ. 2544-2545 กับปี พ.ศ. 2546-2547 พบว่าราคาจำหน่ายน้ำตาลทรายเพิ่มขึ้นจาก 530 บาทต่อตัน เป็น 580 บาทต่อตัน ในขณะที่เกษตรกรชาวไร่อ้อยบางกลุ่มนำกากน้ำตาลมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตปุ๋ยน้ำชีวภาพ ซึ่งในปัจจุบันพบว่าได้รับความนิยมเป็นอย่างมากเพราะเป็นการลดการใช้ปุ๋ยเคมี จากการประเมินผลผลิตทางการเกษตรในช่วงปี พ.ศ. 2544-2545 พบว่าประเทศไทยมีผลผลิตทางการเกษตรประมาณ 116 ล้านตัน และผลผลิตที่มาจากอ้อยมีประมาณ 60 ล้านตัน เมื่อผ่านกระบวนการผลิตน้ำตาลแล้วพบว่าเหลือชานอ้อยประมาณ 3.6 ล้านตัน ซึ่งจากการรายงานดังกล่าวจะเห็นได้ว่าวัสดุเหลือทิ้งที่มาจากอ้อยมีปริมาณสูงมาก ดังนั้นหากสามารถนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านี้มาแปรรูปให้เป็นผลิตภัณฑ์อื่น ๆ จะสามารถสร้างรายได้ให้กับประเทศได้ไม่น้อย อย่างไรก็ตามการสร้างรายได้จำเป็นต้องอาศัยการสนับสนุนและส่งเสริมจากภาครัฐ เพื่อให้เกิดการศึกษาวิจัยการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านี้ต่อไป (www.dede.go.th/dede/index.php)

ชานอ้อยเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีส่วนประกอบของโพลิแซคคาไรด์หลายชนิดเช่น เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส เมื่อนำมาไฮโดรไลซ์จะได้น้ำตาลกลูโคสและไซโลสที่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักได้ (Ingram et al., 1999; Lynd et al., 1999; Aristidou and Penttilä, 2000)

นอกจากนี้ยังพบว่า วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมน้ำมันปาล์มมีประมาณ 30,000,000 ตันต่อปี ถ้าไฮโดรไลซ์จะได้กลูโคสประมาณ 3,000,000 ตันต่อปี และไซโลสประมาณ 2,000,000 ตันต่อปี ซึ่งน้ำตาลเหล่านี้จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (Ishizaki, 1997)

แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกหรือแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria, LAB) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) ไม่สร้างสปอร์ และผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักระหว่างกระบวนการหมักโดยใช้คาร์โบไฮเดรทเป็นแหล่งพลังงาน (Hofvendahl & Hähn-Hagerdal, 2000; Konings et al., 2000) แบคทีเรียกลุ่มนี้พบในน้ำเสีย ในพืช ในอาหาร (ผลิตภัณฑ์นม เครื่องดื่ม เนื้อหมัก และผักดอง) ในระบบลำไส้และทางเดินหายใจของมนุษย์และสัตว์ (Hammes et al., 1991) แลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเกือบทั้งหมด (มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์) เป็นกรดแลคติกผ่านวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway) ในขณะที่วิถีการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสไปเป็นกรดแลคติกยังไม่มีรายงานที่ชัดเจน (Axelsson, 1993; Atlas, 1997; Madigan et al., 1997; Garde et al., 2002)

กรดแลคติกถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร การแพทย์ และการเกษตรกรรม เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่ากรดแลคติกประมาณ 80,000 ตัน ที่ผลิตขึ้นในโลกต่อปี ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ผลิตโดยกระบวนการหมักและส่วนที่เหลือได้จากกระบวนการทางเคมี (Hofvendahl & Hähn-Hagerdal, 2000) ประเทศสหรัฐอเมริกาได้นำกรดแลคติกไปใช้ในการผลิตโพลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางธรรมชาติ (biodegradable polymer) และคาดว่าจะเพิ่มขึ้นจาก 2,100 เมตริกตัน ในปี ค.ศ 1998 เป็น 13,700 เมตริกตัน ในปี ค.ศ. 2003 (Jarvis, 2001) และยังพบว่าความต้องการใช้กรดแลคติกในสหรัฐอเมริกาจะมีมากถึง 49,600 เมตริกตัน ในปี ค.ศ 2003 ซึ่งส่วนใหญ่ถูกนำเข้ามาจากประเทศเนเธอร์แลนด์และสเปน ราคาของกรดแลคติกนั้นขึ้นอยู่กับประเภทของกรดแลคติก (เช่น heat stable หรือ food grade เป็นต้น) โดยราคาจะอยู่ในช่วง 1.29 – 1.93 ดอลลาร์ต่อกิโลกรัม (Lerner, 1996)

ในงานวิจัยนี้จะศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากชานอ้อยโดยใช้ *Lactococcus lactis* IO-1 ซึ่งเป็นโฮโมเฟอร์เมนท์เททีฟแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (homo-fermentative lactic acid bacteria) สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและ/หรือน้ำตาลไซโลสได้ (Kanagachadran, 1998) ดังนั้น *Lc. lactis* IO-1 จึงน่าจะมีศักยภาพในการใช้น้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย ซึ่งส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลกลูโคสและไซโลส วิถีการใช้น้ำตาลไซโลสยังไม่มีรายงานที่ชัดเจน ในขณะที่วิถีการใช้น้ำตาลกลูโคส คือวิถีไกลโคไลซิส ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะศึกษาวิถีของการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตกรดแลคติกจากอาหารสังเคราะห์ และศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ (batch)

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของกลูโคส ไซโลส และ น้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลส โดยวิธีการหมักแบบกะ

1.2.2 เพื่อหาวิถี (pathway) ของการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตกรดแลคติก

1.2.3 เพื่อหาฟลักซ์ (flux) ของตัวกลาง (intermediate) ผ่านวิถีของการใช้น้ำตาลไซโลส ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสต่าง ๆ กัน

1.2.4 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยด่างและกรดไฮโดรคลอริก หรือกรดซัลฟูริก

1.2.5 เพื่อหาชนิดและปริมาณของน้ำตาลจากสารละลายที่ได้หลังจากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย

1.2.6 เพื่อศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากสารละลายที่ได้หลังจากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย โดยการแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

เป็นงานวิจัยประยุกต์เพื่อศึกษาการผลิตกรดแลคติก โดยครอบคลุมถึงการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ไซโลส และน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลส การหาวิถีของการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตกรดแลคติก การวิเคราะห์เมแทบอลิกซ์ฟลักซ์ในการผลิตกรดแลคติก การเปรียบเทียบฟลักซ์ในการผลิตกรดแลคติกภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลต่าง ๆ การศึกษาการสกัดลิกนินด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ การศึกษาอุณหภูมิ ชนิดและปริมาณกรด (กรดไฮโดรคลอริกหรือกรดซัลฟูริก) ที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย การศึกษาชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่ได้หลังจากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย การผลิตกรดแลคติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยโดยการแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ประโยชน์ในเชิงเศรษฐศาสตร์

การศึกษากลไกเบื้องต้นในการผลิตกรดแลคติก เพื่อให้ได้กรดแลคติกในปริมาณสูงจากสารละลายที่ได้หลังจากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย เป็นแนวทางหนึ่งในการประยุกต์ใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรให้เกิดประโยชน์และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรอื่น ๆ ที่มีปริมาณมาก เช่น ฟางข้าวฟางหวาน และกากมันสำปะหลัง เป็นต้น ซึ่งกรดที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านเกษตรและอุตสาหกรรม นอกจากได้กรดแลคติกแล้วยังเป็นการลดปัญหาสิ่งแวดล้อม และในขณะเดียวกันเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรดังกล่าว และเป็นการเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรอีกทางหนึ่งด้วย

1.4.2 ประโยชน์ในเชิงวิชาการ

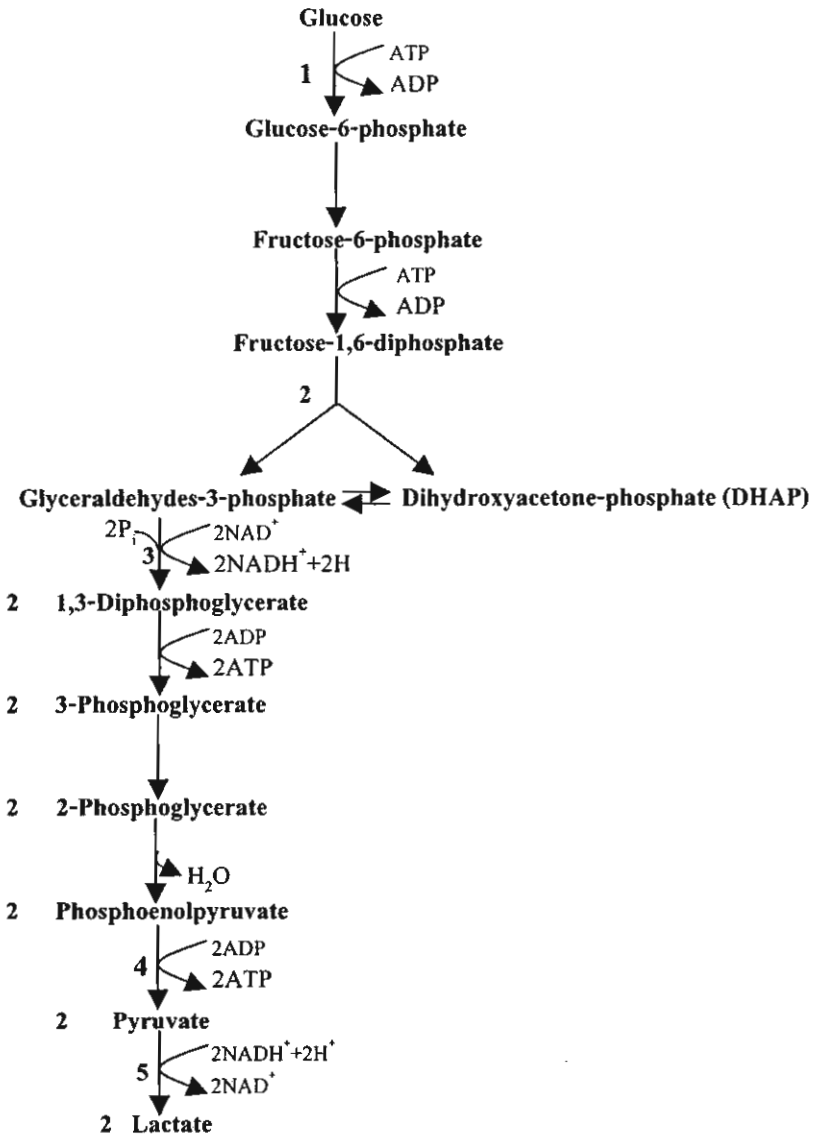
เป็นการเพิ่มพูนความรู้ใหม่ และยังช่วยพัฒนาองค์ความรู้ให้แก่วงการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีของประเทศไทย โดยเฉพาะเรื่องการวิเคราะห์เมแทบอลิกฟลักซ์ เพื่อให้ก้าวทันกับความก้าวหน้าทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสมัยใหม่

บทที่ 2
การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

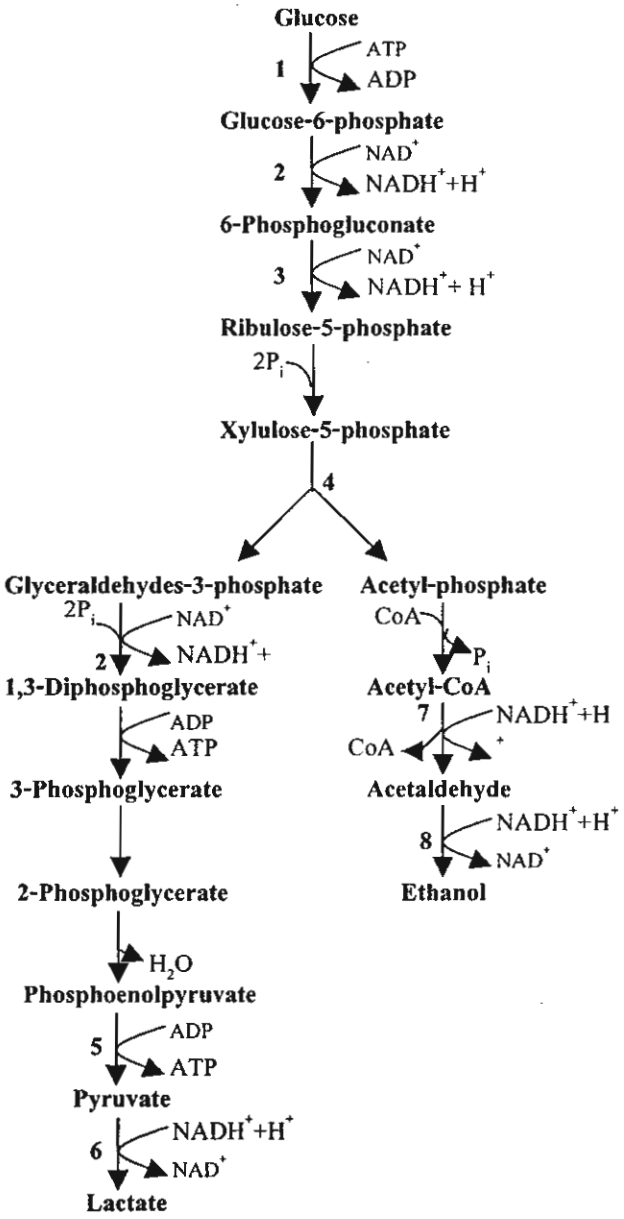
2.1 แลคติกแอซิดแบคทีเรีย

แลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) มีรูปร่างกลม (cocci) หรือแท่ง (rod) เคลื่อนที่ไม่ได้ (nonmotile) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) ไม่ผลิตเอนไซม์คะตาเลส (catalase) เจริญได้ทั้งในที่ไม่มีอากาศ (anaerobic condition) และในที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) ผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักระหว่างกระบวนการหมัก โดยใช้คาร์โบไฮเดรทเป็นแหล่งพลังงาน (Kandler, 1983; Axelsson, 1993; Hofvendahl & Hähn-Hagerdal, 2000; Konings et al., 2000) แลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถพบได้ในอาหารหมักดอง (เช่น เนื้อหมัก ผักดอง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากนมหมัก และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์บางชนิด เป็นต้น) ลำไส้ ปาก และทางเดินอาหารทั้งมนุษย์และสัตว์ (Hammes et al., 1991)

แลคติกแอซิดแบคทีเรียแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือโฮโมแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (homo-lactic acid bacteria) แลกติกแอซิดแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลคติกได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ โดยผ่านวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis/EMP pathway) จำนวนโมลของกรดแลคติกและพลังงานที่ได้มีค่าเท่ากับ 2 โมล (โมลของกรดแลคติกต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้) และ 2 โมล ATP ตามลำดับ (ภาพที่ 1) ส่วนในกลุ่มของเฮเทอโรแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (hetero-lactic acid bacteria) จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลคติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ด้วยจำนวนโมลที่เท่ากัน โดยผ่านวิถีฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase) (Axelsson, 1993) จำนวนโมลของกรดแลคติกและพลังงานที่ได้เท่ากับ 1 โมล (โมลของกรดแลคติกต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้) และ 1 โมล ATP ตามลำดับ (ภาพที่ 2) ตัวอย่างของแลคติกแอซิดแบคทีเรียได้แก่ *Lactocbacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus* และ *Vaganococcus* (Stiles & Hozapfel, 1997)



ภาพที่ 1 วิถีไกลโคไลซิส 1: glucokinase; 2: fructose-1,6-diphosphate aldolase; 3: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; 4: pyruvate kinase; 5: lactate dehydrogenase (Axelsson, 1993)

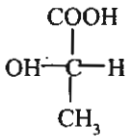


ภาพที่ 2 วิถีฟอสโฟคีโตเลส 1: glucokinase; 2: glucose-6-phosphate dehydrogenase; 3: 6-phosphogluconate dehydrogenase; 4: phosphoketolase; 5: pyruvate kinase; 6: lactate dehydrogenase; 7: acetaldehyde dehydrogenase; 8: alcohol dehydrogenase (Axelsson, 1993)

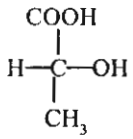
2.2 ชนิดของกรดแลคติก

กรดแลคติกที่ผลิตจากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย มี 2 ชนิด คือ L(+) และ D(-) (ภาพที่ 3) ซึ่งชนิดของกรดแลคติกดังกล่าวที่ผลิตขึ้นโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียจะขึ้นกับจีนัส (genus) และสปีชีส์ (species) ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียเช่น *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus* และ *Vaganococcus* จะผลิตกรดแลคติก L(+) ในขณะที่ *Leuconostoc* และ *Oenococcus* จะผลิตกรดแลคติก D(-) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีแลคติกแอซิดแบคทีเรียบางกลุ่มที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้ทั้ง L(+) และ D(-) เช่น *Lactobacillus*, *Pediococcus* และ *Weissella* (Garvie, 1980; Bottazzi, 1988; Stiles & Holzapfel, 1997 อ้างถึงใน Liu, 2003)

มนุษย์และสัตว์สามารถใช้กรดแลคติกในรูปของ L(+) เท่านั้น เพราะภายในร่างกายของมนุษย์และสัตว์มีเฉพาะเอนไซม์ L-lactate dehydrogenase ดังนั้นมนุษย์และสัตว์จึงไม่สามารถใช้กรดแลคติกในรูปของ D(-) ได้ หากร่างกายมีการสะสมกรดแลคติกชนิด D(-) ในปริมาณมาก (เกิน 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักร่างกาย 1 กิโลกรัม ต่อ 1 วัน) จะส่งผลให้มีการสะสมของกรดแลคติกดังกล่าวในเลือดสูงขึ้น ทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า hyperacidity (Akerberg & Zacchi, 2000)



L(+)-lactic acid



D (-)-lactic acid

ภาพที่ 3 โครงสร้างของกรดแลคติก (optical isomeric form) (Akerberg & Zacchi, 2000)

2.3 ประโยชน์ของกรดแลคติก

กระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดแลคติกด้วยจุลินทรีย์เป็นสิ่งที่จำเป็น และมีความต้องการอย่างมากเพื่อใช้ในการถนอมอาหารเพราะเป็นกระบวนการที่มีต้นทุนต่ำ ใช้พลังงานน้อยในกระบวนการผลิต และการเตรียมวัตถุดิบเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค นอกจากนี้ยังมีความหลากหลายของกลิ่นรส (Oda et al. 2000) จากการสำรวจของ Hofvendahl & Hahn-Hägerdal (2000) พบว่ามีการผลิตกรดแลคติกประมาณ 80,000 ตันทั่วโลก และปริมาณของกรดแลคติก 90 เปอร์เซ็นต์ ได้จากกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ และส่วนที่เหลือได้จากกระบวนการทางเคมี กรดแลคติกถูกนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ เช่น

2.3.1 อาหาร เช่น

1. ใช้ในการแต่งกลิ่น รส และเนื้อสัมผัส (flavour development) ของผลิตภัณฑ์อาหาร
2. ใช้ในการถนอมอาหาร (preservative) ไม่ให้เน่าเสีย
3. ใช้เป็นตัวช่วยปรับสภาพความเป็นกรด (acidulant) ในอาหารบางชนิด

2.3.2 การแพทย์ เช่น

1. ใช้โพลิแลคติกแอซิด (poly lactic acid) ในการทำไหมเย็บแผลที่ละลายได้

2. ใช้เป็นสารตัวกลาง (intermediate) ในอุตสาหกรรมการผลิตยา

3. ใช้เป็นยาแก้อักเสบ (anti-inflamatory drug) โดยใช้ในรูปของเอทิลแลคเตท (ethyl lactate)

4. ใช้เป็นสารช่วยห้ามเลือด (proof coaglulant) โดยใช้ในรูปของแคลเซียมแลคเตทไตรไฮเดรต (calcium lactate trihydrate)

2.3.3 การเกษตรกรรม เช่น

1. ใช้แอมโมเนียมแลคเตท (ammonium lactate) เป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงสัตว์

2. ใช้แคลเซียมแลคเตทไตรไฮเดรต เพื่อยืดอายุผลผลิตทางการเกษตร

3. ใช้ไอโซโพรพิลแลคเตท (isopropyl lactate) ในอุตสาหกรรมการผลิตยาฆ่าแมลง และยาปราบศัตรูพืช

2.3.4 อุตสาหกรรมอื่น ๆ เช่น

1. ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเซลโลเฟน (cellophane)

2. ใช้ในการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ (biodegradable plastic) ในรูปของโพลิแลคติกแอซิด

3. ใช้โซเดียมแลคเตท (sodium lactate) ในอุตสาหกรรมการผลิตสบู่

4. ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตวงจรอิเลคทรอนิกส์

5. ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยาง

6. ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสิ่งทอ (textile)

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างกรดแลคติก

2.4.1 พีเอช

แลคติกแอซิดแบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด (พีเอช 4.5-6.5) Liu (2003) รายงานว่า *Lactobacillus bulgaricus* สามารถผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการใช้น้ำตาลกลูโคสในสภาวะที่เป็นกรด ในขณะเดียวกันเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่เป็นด่าง พบว่า *Lb. bulgaricus* มีการสร้างกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าพีเอชมีอิทธิพลต่อเมแทบอลิซึมของไพรูเวตและการผลิตกรดแลคติกของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Champagne et al., 1989; Bobillo & Marshall, 1992 อ้างถึงใน Liu, 2003) อย่างไรก็ตาม จากการรายงานของ Wee et al. (2004) พบว่า *E. faecalis* RKY1 สามารถผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณสูงจากการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะที่เป็นกลาง (พีเอช 7.0) ซึ่งปริมาณกรดแลคติกที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณกรดแลคติกที่เลี้ยงในสภาวะที่เป็นกรดอ่อน (พีเอช 6.0)

2.4.2 ออกซิเจน

โดยทั่วไปแลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มี และไม่มีออกซิเจน นอกจากนี้ยังพบว่าออกซิเจนมีผลต่อรูปแบบของการหมัก (โฮโม หรือเฮเทอโรเฟอร์เมนท์เทชัน) Condon (1987) รายงานว่าเมื่อเลี้ยง *Leuconostoc* sp. ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน พบว่า *Ln.* sp. มีการผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ในขณะเดียวกันเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจน พบว่า *Ln.* sp. มีการสร้างกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ในขณะที่ Tseng & Montville (1993) รายงานว่าออกซิเจนมีผลต่อไพรูเวตเมแทบอลิซึมของ *Lb. plantarum* ซึ่งออกซิเจนจะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแลคเตทไปเป็นอะซิเทตและคาร์บอนไดออกไซด์ในระหว่างกระบวนการหมัก

นอกจากนี้ Maicas et al. (2002) รายงานว่า เมื่อเลี้ยง *Oenococcus oeni* ในสภาวะที่มีออกซิเจน พบว่า *O. oeni* มีการเจริญที่ค่อนข้างต่ำและออกซิเจนยังมีผลทำให้กระบวนการหมักเปลี่ยนจากโฮโมแลคติกแอซิดเฟอร์เมนท์เทชัน (homo lactic acid fermentation) เป็นเฮเทอโรแลคติกแอซิดเฟอร์เมนท์เทชัน (hetero lactic acid fermentation) ส่งผลให้ปริมาณกรดแลคติกที่สร้างขึ้นมีค่าลดลง

2.4.3 ปริมาณและชนิดของสับสเตรต

ปริมาณและชนิดของสับสเตรตที่ใช้ในกระบวนการหมักของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย มีผลต่อการสร้างผลิตภัณฑ์ โดยพบว่าเมื่อเลี้ยง *Lactococcus lactis* แบบกะในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสอย่างจำกัดพบว่าปริมาณของกรดแลคติกที่ถูกสร้างขึ้นลดลง และมีการสร้างกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และเอทานอลเพิ่มขึ้น ในขณะเดียวกันเมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* ในอาหารที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคสอย่างเพียงพอ พบว่า *Lc. lactis* ผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก (มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์) และมีการผลิตกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และเอทานอลเพียงเล็กน้อย (Thomas et al., 1987) นอกจากนี้ยังพบว่าผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นคล้ายกับผลการทดลองเลี้ยง *Lb. casei* ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ (de Vries et al., 1970; Thomas et al., 1987 และ Yoo et al., 1997) นอกจากการจำกัดปริมาณของสับสเตรตแล้ว ชนิดของสับสเตรตยังมีผลต่อการสร้างกรดแลคติก โดยพบว่า *Lc. lactis* จะผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการใช้น้ำตาลกลูโคส ในขณะเดียวกันเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลมอลโตสและกาแลคโตส พบว่าปริมาณกรดแลคติกที่ถูกสร้างขึ้นลดลงและมีการสร้างกรดอะซิติกเพิ่มขึ้น (Thomas et al., 1980) นอกจากนี้ชนิดของสับสเตรตยังมีผลต่อการผลิตกรดแลคติกในจุลินทรีย์ชนิดอื่น จากการรายงานของ Bulut et al. (2004) พบว่าเมื่อเลี้ยง *Rhizopus oryzae* ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน *R. oryzae* สามารถผลิตกรดแลคติกได้มากกว่า (ประมาณ 3 เท่า) เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยง *R. oryzae* ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

2.4.4 อุณหภูมิ

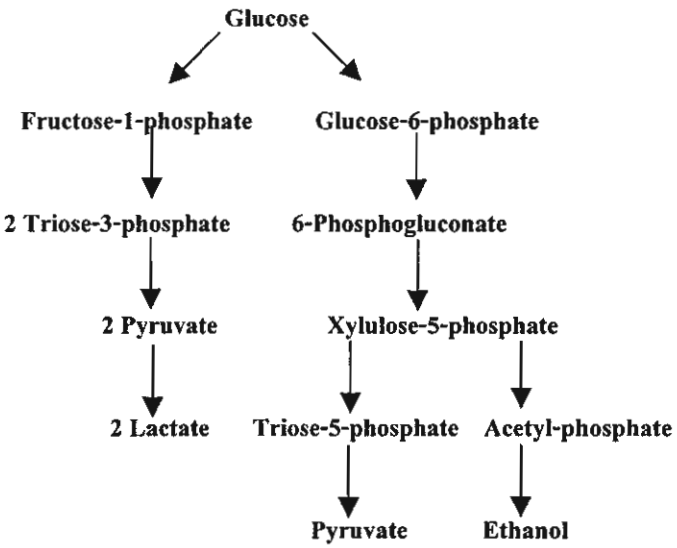
อุณหภูมิมีบทบาทสำคัญในการแสดงออกของเอนไซม์บางชนิดที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดแลคติกในแลคติกแอซิดแบคทีเรีย โดยพบว่าการแสดงออกของเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจิเนส (lactate dehydro genase) ใน *Lb. rhamnosus* ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีค่าลดลง และส่งผลให้การผลิตกรดแลคติกที่สภาวะดังกล่าวลดลงด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยง *Lb. rhamnosus* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (De Figueroa et al., 2001) และจากการรายงานของ Kwon et al. (2000) พบว่า เมื่อเลี้ยง *Lb. rhamnosus* ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส *Lb. rhamnosus* สามารถผลิตกรดแลคติกได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2.5 สารตั้งต้นที่สำคัญในการสร้างไพรูเวตและแลคเตท

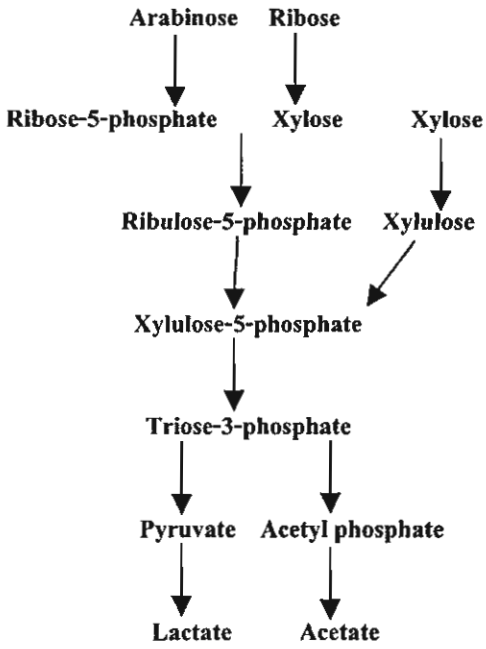
ไพรูเวต (pyruvate) เป็นสารตัวกลางที่สำคัญชนิดหนึ่งก่อนที่จะถูกเปลี่ยนเป็นแลคเตทโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรีย การสร้างไพรูเวตเกิดขึ้นได้จากสารตั้งต้นหลายชนิดและผ่านวิถีที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Lui, 2003) การสร้างไพรูเวตสามารถเกิดขึ้นได้จากวิถีดังต่อไปนี้

2.5.1 วิถีเมแทบอลิคแบบปกติ (Common metabolic pathway)

ไพรูเวตและแลคเตทในวิถีนี้จะถูกสร้างขึ้นจากน้ำตาลเฮกโซส (hexose) เช่น กลูโคส (ภาพที่ 4) หรือน้ำตาลเพนโทส (pentose) เช่น อะราบิโนส ไรโบส และไซโลส (ภาพที่ 5) เป็นต้น โดยพบว่าโฮโมแลคติกแอซิดแบคทีเรียจะใช้น้ำตาลเฮกโซสผ่านวิถีไกลโคไลซิส (ภาพที่ 1) ในขณะที่เฮเทอโรแลคติกแอซิดแบคทีเรียใช้น้ำตาลเฮกโซสผ่านวิถีฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase หรือ 6-phosphogluconate pathway) (ภาพที่ 2) ส่วนการใช้น้ำตาลเพนโทสของแลคติกแอซิดแบคทีเรียจะผ่านวิถีเพนโตสฟอสเฟต (pentosephosphate pathway) (Kandler, 1983; Axelsson, 1993)



ภาพที่ 4 ไพรูเวตที่เกิดขึ้นจากเมแทบอลิซึมของน้ำตาลกลูโคส (Kandler, 1983; Axelsson, 1998)



ภาพที่ 5 ไพรูเวตที่เกิดขึ้นจากเมแทบอลิซึมของน้ำตาลเพนโตส (Kandler, 1983; Axelsson, 1993)

2.5.2 วิถีเมแทบอลิคแบบไม่ปกติ (Uncommon metabolic pathway)

นอกเหนือจากการสร้างไพรูเวตและแลคเตทจากน้ำตาลแล้ว สารดังกล่าวยังถูกสร้างขึ้นได้จากสารตั้งต้นต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

2.5.2.1 โพลิออลส์ (Polyols)

แลคติกแอซิดแบคทีเรียทั่วไปไม่สามารถใช้สารในกลุ่มนี้เพื่อสร้างไพรูเวตและแลคเตทได้ ยกเว้นโพลิออลส์บางชนิดเช่น แมนิทอล (manitol) และซอบิทอล (sorbitol) เป็นต้น (ภาพที่ 6) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า *Lactobacillus plantarum* สามารถใช้สารตั้งต้นในกลุ่มโพลิออลส์ในการสร้างแลคเตทได้ (Jordan & Cogan, 1994)

Manitol → Manitol-1-phosphate → Fructose-6-phosphate → 2 Pyruvate → 2 Lactate

Sorbitol → Sorbitol-1-phosphate → Glucose-6-phosphate → Fructose-6--phosphate → 2 Pyruvate → 2 Lactate

ภาพที่ 6 โพลิออลส์บางชนิดสามารถเปลี่ยนเป็นแลคเตท (Carr & Davies, 1970; de Varies et al., 1970; Carr & Whiting, 1971)

2.5.2.2 กรดอินทรีย์ (Organic acids)

กรดอินทรีย์ถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับแลคติกแอซิดแบคทีเรียบางชนิด เพื่อสร้างกรดแลคติก (Radler, 1975; Pilone, 1975; Kunkee, 1991; Hugenholtz, 1993; Sarantinopoulos et al., 2001) ตัวอย่างกรดอินทรีย์ที่ถูกเปลี่ยนเป็นแลคเตทได้แก่ ทาร์เทรต (tartrate) ฟูมาเลท (fumalate) มาเลท (malate) และ ซิเทต (citrate) เป็นต้น (ภาพที่ 7)

Tartrate ⟶ Oxaloacetate ⟶ Pyruvate ⟶ Lactate + Acetate

Fumalate ⟶ Malate ⟶ Lactate + CO_2

Malate ⟶ Lactate + CO_2

Citrate ⟶ Acetate ⟶ Oxaloacetate ⟶ Pyruvate + CO_2 ⟶ Lactate

ภาพที่ 7 กรดอินทรีย์บางชนิดสามารถเปลี่ยนเป็นแลคเตท (Rader, 1975; Pilone, 1975; Kunkee, 1991; Hugenholtz, 1993; Sarantinopoulos et al., 2001)

2.5.2.3 กรดอะมิโน (Amino acids)

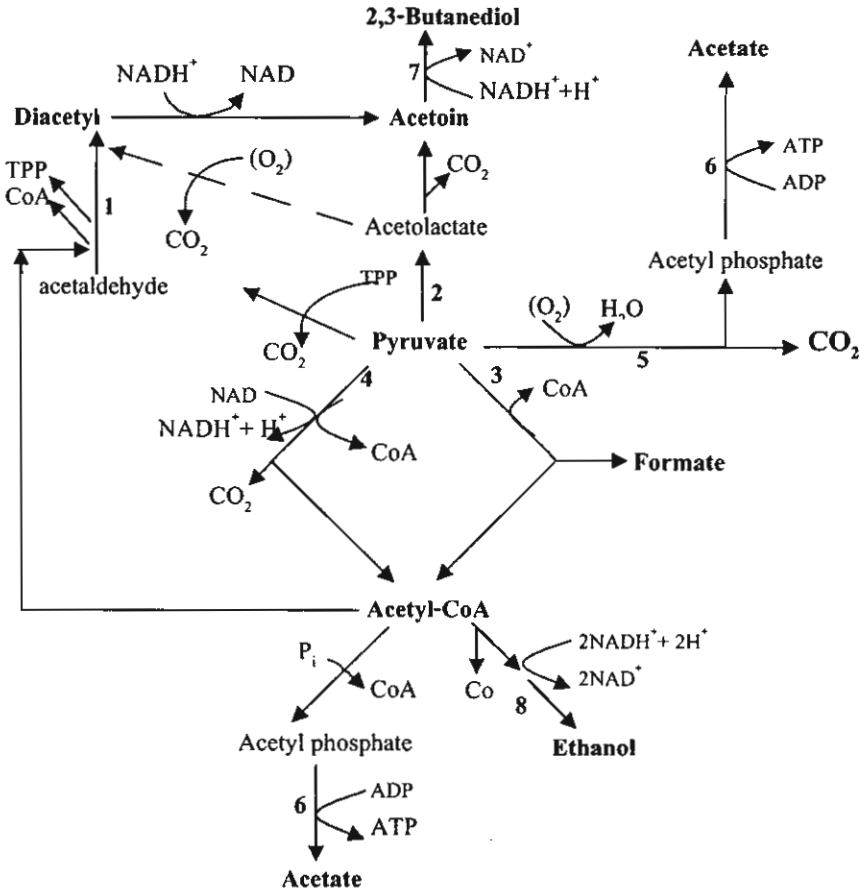
เป็นสารตั้งต้นกลุ่มหนึ่งที่แลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถใช้ในการสร้างแลคเตทโดยอาศัยปฏิกิริยาดีอะมิเนชั่น (deamination) หรือปฏิกิริยาทรานส์อะมิเนชั่น (transamination) (Loubiere et al., 1996; Christensen et al., 1999; Weimer et al., 1999; Yvon & Rijnen, 2001) (ภาพที่ 8)

Serine ⟶ Ammonia ⟶ Pyruvate ⟶ Lactate

Aspartate + amine acceptor (α-ketoglutarate) ⟶ Pyruvate ⟶ Aspartate ⟶ Lactate

ภาพที่ 8 กรดอะมิโนบางชนิดสามารถเปลี่ยนเป็นแลคเตท (Loubiere et al., 1996)

อย่างไรก็ตามไพรูเวตที่ถูกสร้างขึ้นโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถถูกเมแทบอไลท์ไปเป็นผลิตภัณฑ์อื่น นอกเหนือจากปฏิกิริยาข้างต้น เช่น อะซิเทต ฟอร์เมต เอทานอล ไดอะซิติล อะซิโตอิน และ 2,3-บิวเทนไดออล (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 เมแทบอลิซึมของไพรูเวตในแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 1: diacetyl synthase; 2: acetolactate synthase; 3: pyruvate formate lyase; 4: pyruvate dehydrogenase; 5: pyruvate oxidase; 6: acetate kinase; 7: butanediol dehydrogenase; 8: alcohol dehydrogenase; TPP: thiamine pyrophosphate (Axelsson, 1993; Swindell et al., 1996)

2.6 การขนส่งโมเลกุลของน้ำตาลในแลคติคแอซิดแบคทีเรีย

กลไกการขนส่งโมเลกุลของน้ำตาลทั้งที่อยู่ในรูปของโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) หรือโมเลกุลคู่ (disaccharide) ผ่านเข้าสู่เซลล์ในแลคติกแอซิดแบคทีเรียนั้น มีกลไกการขนส่งที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของน้ำตาลและแลคติกแอซิดแบคทีเรีย โดยทั่วไปพบว่ามีกลไกที่สำคัญ 2 กลไก ในการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ในแลคติกแอซิดแบคทีเรียคือ

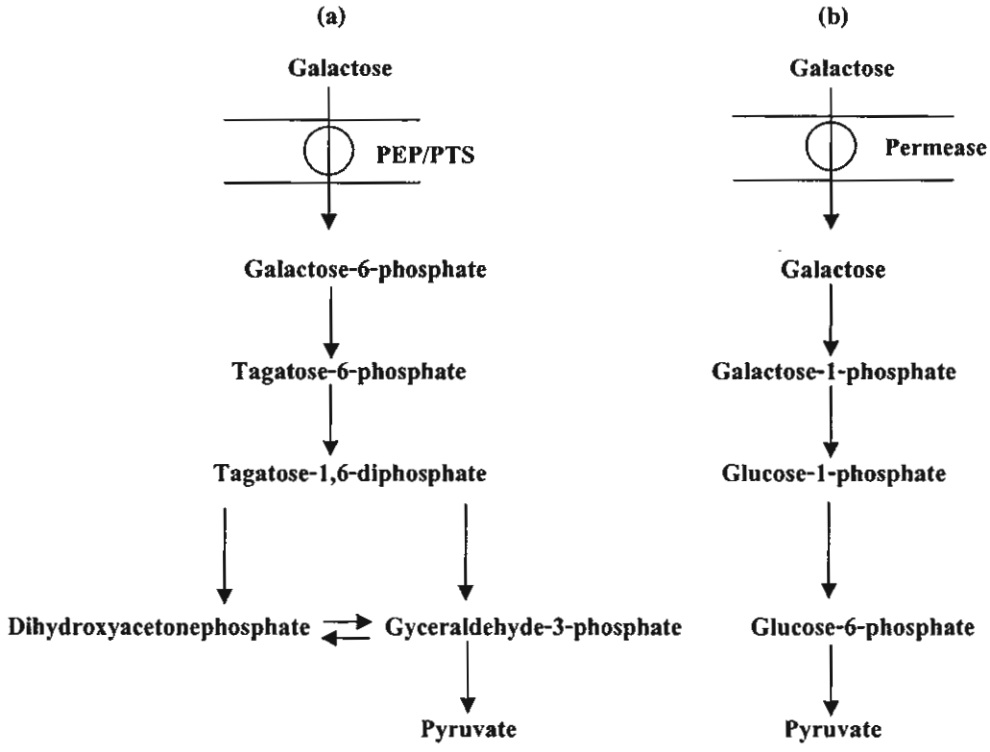
2.6.1 ระบบฟอสโฟอีนอลไพรูเวต-ฟอสโฟทรานส์เฟอร์เรส (Phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system, PEP/PTS)

การขนส่งน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียด้วยวิธีนี้ ส่วนใหญ่จะพบในกลุ่มของ Lactobacilli ซึ่งพบว่าน้ำตาลที่ผ่านเข้าสู่เซลล์จะถูกเติมหมู่ฟอสเฟต โดยกระบวนการฟอสโฟริเลชั่น (phospho

rylation) จากนั้นจึงถูกเมแทบอไลท์ต่อ จากการรายงานของ Lawrence & Thomas (1979) พบว่า การขนส่งน้ำตาลกาแลคโตส (galactose) เข้าสู่เซลล์ของ *Lc. lactis* จะอาศัยกลไก PEP/PTS ซึ่งน้ำตาลกาแลคโตสที่เข้าสู่เซลล์จะอยู่ในรูปของกาแลคโตส-6-ฟอสเฟต (galactose-6-phosphate) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟ-เบตา-ดี-กาแลคโตซิเดส (phospho-β-D-galactosidase, P-β-gal) จากนั้นกาแลคโตส-6-ฟอสเฟต จะถูกเมแทบอไลท์ผ่านวิถีทากาโตส-6-ฟอสเฟต (tagatose-6-phosphate) (ภาพที่ 10a)

2.6.2 ระบบเพอร์มิเอส (Permease system)

น้ำตาลที่ถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธีนี้ จำเป็นต้องอาศัยพลังงานจากเซลล์ในการขนส่งโมเลกุลของน้ำตาลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ส่วนใหญ่จะพบใน *Leuconostocs* และในกลุ่มของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ทนความร้อน (thermophiles) เช่น *Streptococcus thermophilus, Lactobacillus delbruckii, Lactobacillus casei* และ *Lactobacillus acidophilus* (Thompson, 1985) เป็นต้น จากการศึกษาการใช้น้ำตาลกาแลคโตสของ *Lb. casei* พบว่า น้ำตาลกาแลคโตสจะถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยโปรตีนนำพา (carrier protein) ที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ จากนั้นน้ำตาลกาแลคโตสจะถูกเปลี่ยนเป็นกาแลคโตส-1-ฟอสเฟต (galactose-1-phosphate) โดยอาศัยเอนไซม์เบตา-กาแลคโตซิเดส (β-galactosidase, β-gal) จากนั้นกาแลคโตส-1-ฟอสเฟตจะถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคส-1-ฟอสเฟต (glucose-1-phosphate) และกลูโคส-6-ฟอสเฟต (glucose-6-phosphate) แล้วเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิส (Premi et al., 1972) (ภาพที่ 10b)



ภาพที่ 10 เมแทบอลิซึมของน้ำตาลกาแลคโตสในแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (a) : phosphoenolpyruvate-phospho transferase system (PEP/PTS); (b) : permease system (Axelsson, 1993)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

Ishizaki et al. (1989) ศึกษาจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลคติกโดย *Streptococcus* sp. IO-1 ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ผลการทดลองพบว่า *Str.* sp. IO-1 สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดแลคติกได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเลี้ยง *Str* sp. IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส 50 และ 100 กรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสหมดภายใน 27 และ 85.5 ชั่วโมง ตามลำดับ ที่เวลาดังกล่าวพบกรดแลคติก 46.5 และ 91.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการทดลองยังพบว่าการเติมกรดแลคติกในรูปของโซเดียมแลคเตท (10 กรัมต่อลิตร) ในสูตรอาหารพื้นฐาน (ที่มีน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร) มีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ โดยพบว่าปริมาณเซลล์มีค่าลดลง (1.29 กรัมต่อลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (1.75 กรัมต่อลิตร) นอกจากนี้กรดแลคติกยังมีผลทำให้อัตราการเจริญจำเพาะมีค่าลดลงและทำให้เวลาที่ใช้ในการหมักมีค่าเพิ่มขึ้น

Arasaratnan et al. (1996) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลกลูโคส โดย *Lb. delbrueckii* ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ โดยควบคุมที่อุณหภูมิห้อง พีเอช 6.5 ผลการทดลองพบว่าเมื่อเลี้ยง *Lb. delbrueckii* ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน *Lb. delbrueckii* ไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้หมด และพบว่าที่เวลา 72 ชั่วโมง น้ำตาลกลูโคสถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลคติกเพียง 12 กรัมต่อลิตร ในขณะเดียวกันเมื่อมีการเติมยีสต์สกัด (10 กรัมต่อลิตร) ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร พบว่า *Lb. delbrueckii* สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสหมดภายในเวลา 48 ชั่วโมง ที่เวลาดังกล่าวพบกรดแลคติก 22.5 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลคติกได้มากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต

Lopes de Felipe & Hugenholtz (1999) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดย *Lc. lactis* NZ9800 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 ผลการทดลองพบว่าน้ำตาลกลูโคสส่วนใหญ่ (มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์) ถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลคติกโดยผ่านวิถีไกลโคไลซิส

Senthuran et al. (1999) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดย *Lb. casei* ในรูปของเซลล์ตรึง (immobilized cells) และเซลล์อิสระ (free cells) ซึ่งมีน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะซ้ำ (recycle batch) โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าน้ำตาลแลคโตสส่วนใหญ่ถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลคติก และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตกรดแลคติกพบว่า การใช้เซลล์ตรึงรูปจะมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้เซลล์อิสระในทุกสภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตสเท่ากัน อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลคติกของเซลล์ตรึงรูปมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตส และจำนวนครั้งของการใช้เม็ดเซลล์ตรึงรูปเพิ่มขึ้น

Kwon et al. (2000) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลกลูโคสและแลคโตสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์กากถั่วเหลือง โดย *Lb. rhamnosus* ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที และนำสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์กากถั่วเหลืองมาเติมด้วยวิตามินชนิดต่างๆ จากการทดลองพบว่าการเติมวิตามินจะช่วยเพิ่มอัตราผลผลิต (productivity) กรดแลคติก โดยเฉพาะการเติมวิตามินในรูปของกรดแพนโทเทนิก (pantothenic acid) ร่วมกับการเติมซอยโตน (soytone) 19.3 กรัมต่อลิตร เป็น

แหล่งไนโตรเจน พบว่า *E. faecalis* RKY1 สามารถผลิตกรดแลคติกได้มากถึง 125 กรัมต่อลิตร (จากน้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร) และให้ผลได้ (yield) ของกรดแลคติกและอัตราผลผลิตกรดแลคติกสูงสุดเท่ากับ 92 เปอร์เซ็นต์ และ 2.27 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

Guyot & Morlon-Guyot (2001) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกันโดย *Lb. manihotivorans* OND32^T ผลการทดลองพบว่า น้ำตาลกลูโคส มอลโตส เซโลไบโอส ฟรุกโตส และซูโคส ส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้ในการสร้างกรดแลคติก 12.1, 9.1, 11.6, 9.7 และ 10.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลได้ของกรดแลคติกที่สภาวะดังกล่าวมีค่า 0.95, 0.93, 0.96, 0.82 และ 0.83 กรัมกรดแลคติกต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ ในขณะที่ผลได้ของเซลล์มีค่าเท่ากับ 0.07, 0.11, 0.11, 0.08 และ 0.06 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ

Nancib et al. (2001) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตกรดแลคติกโดย *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 38 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ผลอินทผลัม (date) เป็นแหล่งคาร์บอน และในการทดลองมีการใช้แหล่งไนโตรเจน 5 ชนิด คือ ยีสต์สกัด เพปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย และน้ำแช่ฟางข้าวโพด เมื่อเลี้ยง *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* ในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ผลอินทผลัมที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสแตกต่างกัน (10, 20, 40, 60 และ 80 กรัมต่อลิตร) โดยไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน พบว่า *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในสารละลายได้ ปริมาณเซลล์และกรดแลคติกมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในสารละลาย (10-60 กรัมต่อลิตร) และพบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร จะได้เซลล์และกรดแลคติกสูงสุดเท่ากับ 2.24 และ 32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเซลล์และกรดแลคติกที่ได้นี้มีค่าต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ใช้อาหาร MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร) คือมีค่า 5.8 และ 45 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้ยังพบว่าปริมาณเซลล์และกรด แลคติกที่ได้มีค่าต่ำเนื่องจากขาดแหล่งไนโตรเจน ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการนำไปใช้ในการเจริญของเซลล์ จากนั้นจึงมีการเติมยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (0, 5, 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร) ลงในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ผลอินทผลัม (ที่มีน้ำตาลกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร) พบว่าปริมาณเซลล์และกรดแลคติกมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามความเข้มข้นของยีสต์สกัด (0-20 กรัมต่อลิตร) โดยเซลล์และกรดแลคติกสูงสุดมีค่าเท่ากับ 5.81 และ 46 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเติมยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ผลการทดลองยังพบว่าการเติมไนโตรเจนมีผลทำให้เซลล์สามารถใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในสารละลายได้มากขึ้น โดยพบว่าเหลือน้ำตาลกลูโคสเพียง 6.4 กรัมต่อลิตร เมื่อเติมยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือมีค่าน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะอื่น นอกจากนี้จากผลการทดลองเปรียบเทียบชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดแลคติก พบว่าการเติมยีสต์สกัด (20 กรัมต่อลิตร) จะให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด อัตราผลผลิตกรดแลคติก และเปอร์เซ็นต์การใช้สับสเตรต สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นที่ความเข้มข้นเท่ากัน

Yun & Ryu (2001) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกันด้วย *E. faecalis* RKY1 ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 38 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที พบว่าน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และมอลโตส (อย่างละ 150 กรัมต่อลิตร) ส่วนใหญ่ถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลคติกผ่านกระบวนการหมักแบบโฮโมแลคติกแอซิดเฟอร์เมนท์เทชัน อัตราผลผลิตกรดแลคติกจากการใช้น้ำตาลกลูโคส

ฟรุกโตส และมอลโตสมีค่าเท่ากับ 3.56, 4.12 และ 3.54 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ความเข้มข้นของกรดแลคติกที่ได้มีค่าเท่ากับ 139, 144 และ 138 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อเลี้ยง *E. faecalis* RKY1 ในสูตรอาหารที่มีน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสกับฟรุกโตส ฟรุกโตสกับมอลโตส และกลูโคสกับมอลโตส พบว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสหรือฟรุกโตสของ *E. faecalis* RKY1 มีผลไปกดการใช้น้ำตาลมอลโตส ส่งผลให้ *E. faecalis* RKY1 ไม่สามารถใช้น้ำตาลมอลโตสได้หมด และนอกจากนี้ผลการทดลองยังพบว่า ปริมาณกรดแลคติกที่สร้างขึ้นในช่วงที่ *E. faecalis* RKY1 มีการใช้น้ำตาลกลูโคสหรือฟรุกโตส มีผลไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ ทำให้ผลได้และอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์มีค่าลดลง

Garde et al. (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ฟางข้าวสาลี (wheat straw) ที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน โดย *Lb. pentosus* และ *Lb. brevis* ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 33.5 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า *Lb. pentosus* และ *Lb. brevis* สามารถใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในสารละลายได้ และน้ำตาลไซโลส 8.1 กรัมต่อลิตร ถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลคติก 6.7 และ 4.7 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเลี้ยง *Lb. pentosus* และ *Lb. brevis* ร่วมกันจะสามารถผลิตกรดแลคติกได้มากกว่าการใช้เชื้อบริสุทธิ์เพียงชนิดเดียว โดยพบว่าน้ำตาลไซโลสถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลคติกได้มากถึง 95 เปอร์เซ็นต์

Wee et al. (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากกากน้ำตาล (sugar molasses) ด้วย *E. faecalis* RKY1 ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 38 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ผลการทดลองพบว่า เมื่อเลี้ยง *E. faecalis* RKY1 ในสูตรอาหารที่มีกากน้ำตาล 200 กรัมต่อลิตร (น้ำตาลรวมเท่ากับ 102 กรัมต่อลิตร) น้ำตาลถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลคติกได้มากถึง 95.7 กรัมต่อลิตร ผลได้และอัตราผลผลิตกรดแลคติกมีค่าเท่ากับ 94.9 เปอร์เซ็นต์ และ 4 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าเท่ากับ 14.4 กรัมต่อลิตร และยังพบว่าปริมาณกรดแลคติกที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เติม (น้ำตาลรวมเท่ากับ 68 - 170 กรัมต่อลิตร) นอกจากนี้ผลการทดลองยังพบว่า เมื่อเติมยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้น้ำหนักเซลล์แห้งและอัตราผลผลิตกรดแลคติกสูงสุดเท่ากับ 16.1 กรัมต่อลิตร และ 5.3 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราผลผลิตกรดแลคติกและน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าลดลงเมื่อเลี้ยง *E. faecalis* RKY1 ในสูตรอาหารที่มีกากน้ำตาล 333 กรัมต่อลิตร (น้ำตาลรวมเท่ากับ 170 กรัมต่อลิตร) เนื่องจากความเข้มข้นของสับสเตรตและปริมาณกรดแลคติกที่สร้างขึ้น มีผลต่อการเจริญของ *E. faecalis* RKY1

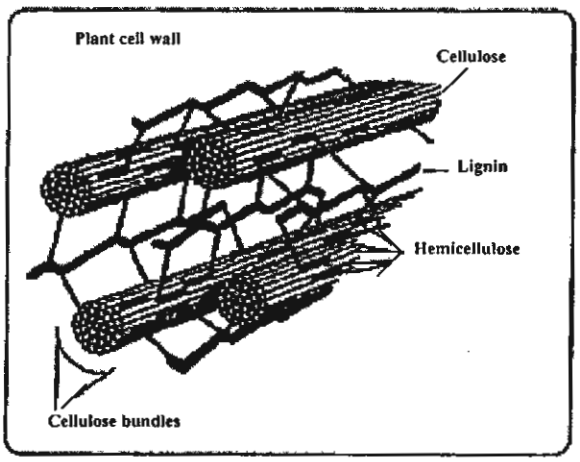
Oh et al. (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วย *Enterococcus faecalis* RKY1 ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 38 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที โดยใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ข้าวสาลี ข้าวบาเลย์ และข้าวโพดด้วยเอนไซม์ เป็นแหล่งคาร์บอน ผลการทดลองพบว่า *E. faecalis* RKY1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและเปลี่ยนเป็นกรดแลคติกได้โดยไม่มีการเติมไนโตรเจน ในกรณีการใช้สารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ข้าวบาเลย์และข้าวสาลีเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าอัตราผลผลิตกรดแลคติกมีค่าสูงถึง 0.88 และ 0.81 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีค่าเท่ากับ 2.29 และ 1.67 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อมีการเติมน้ำแช่ฟางข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจน (10 กรัมต่อลิตร) ลงในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ข้าวสาลีพบว่า *E. faecalis* RKY1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ในสารละลายได้มากขึ้น น้ำหนักเซลล์แห้งและกรดแลคติกที่ถูกสร้างขึ้นมีค่า 11.07 และ

102.7 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่อัตราผลผลิตกรดแลคติกมีค่า 3.8 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกจากนี้ผลการทดลองยังพบว่าการเติมไนโตรเจนจะช่วยลดระยะเวลาในการหมักลงได้ (27 ชั่วโมง) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (33 ชั่วโมง)

2.8 ชานอ้อย (Sugar cane bagasse)

2.8.1 องค์ประกอบทางกายภาพและเคมีของชานอ้อย

ชานอ้อยเป็นส่วนของเส้นใยที่ได้จากลำต้นของอ้อยที่ผ่านการหีบเอาน้ำอ้อยออก ซึ่งประกอบด้วยน้ำ เส้นใยและของแข็งที่ละลายได้เล็กน้อย ปริมาณองค์ประกอบเหล่านี้ขึ้นกับชนิด อายุ สายพันธุ์ และวิธีการเก็บเกี่ยวอ้อย โดยทั่วไปจะพบว่าภายในชานอ้อยจะมีองค์ประกอบ (เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักแห้ง) ต่าง ๆ ดังนี้ คือ เส้นใย 43-45 เปอร์เซ็นต์ ความชื้น 46-52 เปอร์เซ็นต์ และส่วนที่เป็นของแข็งที่ละลายได้ประมาณ 2-6 เปอร์เซ็นต์ สำหรับส่วนที่เป็นเส้นใยของชานอ้อยจะมีส่วนประกอบของเซลลูโลส 50 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 25 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน 25 เปอร์เซ็นต์ ของเส้นใยทั้งหมด (วารสารน้ำตาล, 2541) ภายในโครงสร้างของชานอ้อยจะมีการจัดเรียงตัวดังภาพที่ 11

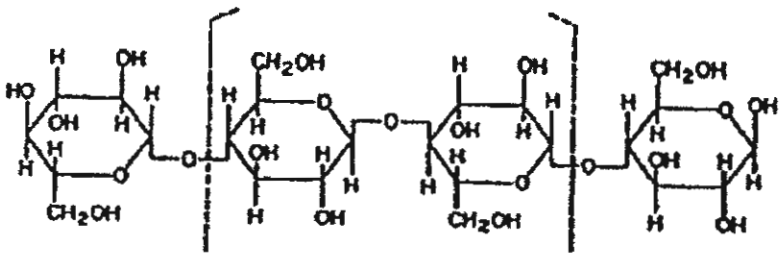


ภาพที่ 11 การจัดเรียงตัวของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในชานอ้อย (http://www.dnp.go.th/bio_com/garbage_fiber.html)

2.8.1.1 เซลลูโลส

เซลลูโลส (cellulose) เป็นสารประกอบโพลิแซคคาไรด์ (polysaccarides) เชิงเส้นตรงซึ่งประกอบด้วยหน่วยซ้ำๆ กันของน้ำตาลกลูโคสประมาณ 2,000-14,000 หน่วย ที่ต่อกันด้วยพันธะเบตา 1→4 ไกลโคซิดิก (β-1,4- glycosidic linkage) มีสูตรโมเลกุลทั่วไปคือ $C_6H_{12}O_6$ เซลลูโลสเป็นโครงสร้างในเนื้อเยื่อพืช โดยพบรวมกับลิกนิน เพนโตแซน (pentosan) กัม (gum) แทนนิน (tannin) ไขมัน (lipid) และสารที่ทำให้เกิดสี (pigment) เป็นต้น เซลลูโลสมีหมู่ไฮดรอกซิล 3 หมู่ สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน และเกิดเป็นลักษณะที่เรียกว่าไฟบริล (fibrils) โครงสร้างของเซลลูโลสมีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบและมีแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลสูง ทำ

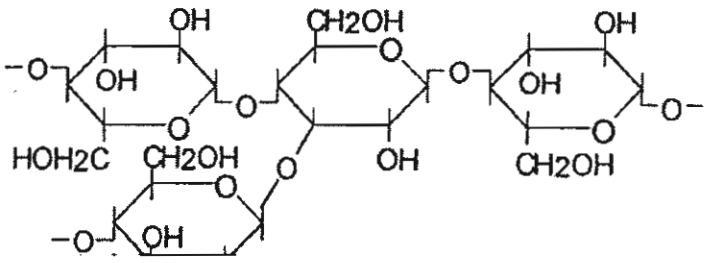
ให้เซลลูโลสมีโครงสร้างที่แข็งแรง (ภาพที่ 12) นอกจากนี้เซลลูโลสยังมีความเป็นผลึกสูง ทำให้อุณหภูมิในการหลอมตัวสูงตามไปด้วย เซลลูโลสมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ในกรดเข้มข้น เช่น กรดไฮโดรคลอริก และกรดซัลฟูริก เป็นต้น โดยเซลลูโลสจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ในสารละลายกรดที่อุณหภูมิห้อง และปฏิกิริยาจะหยุดลงที่อุณหภูมิต่ำ (http://www.dnp.go.th/bio_com/garbagr_fiber.html) นอกจากนี้ยังพบว่าเซลลูโลสจะเกิดการพองตัวในสารละลายด่างเข้มข้นบางชนิด เช่น สารละลายอัลคาไลไฮดรอกไซด์ (alkali hydroxide) ซึ่งทำให้เซลลูโลสสามารถละลายในตัวทำละลายได้ดีขึ้น



ภาพที่ 12 โครงสร้างของเซลลูโลส (http://www.dnp.go.th/bio_com/garbagr_fiber.html)

2.8.1.2 เฮมิเซลลูโลส

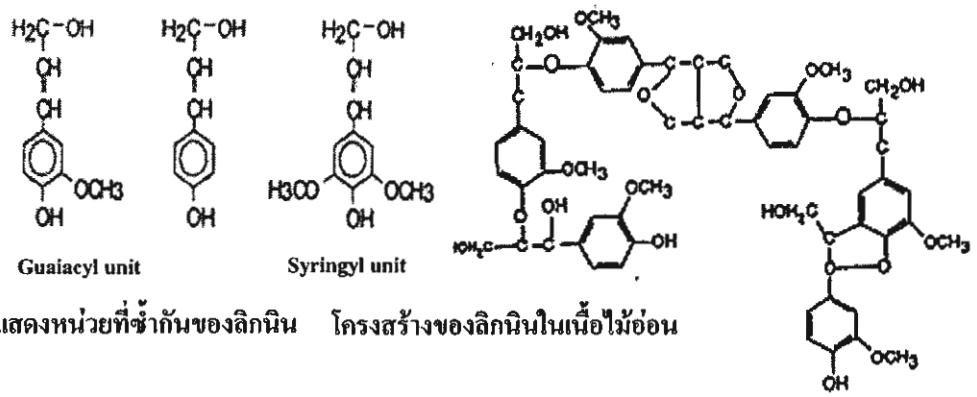
เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นสารประกอบโพลิแซคคาไรด์ชนิดหนึ่ง ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับเซลลูโลส แต่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิด เช่น กลูโคส กาแลกโตส แมนโนส ไซโลส อะราบิโนส รวมทั้งกรดกลูคูโรนิก และกาแลกทูโรนิก ที่เรียงต่อกันด้วยพันธะเบตา 1→4 และเบตา 1→6 ไกลโคซิดิก (β-1,6- glycosidic linkage) (ภาพที่ 13) เฮมิเซลลูโลสพบในเนื้อเยื่อของพืชโดยอยู่รวมกับสารอื่นๆ เช่น ลิกนิน และเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสทำหน้าเป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ มีสูตรทางเคมีคือ $(C_6H_{12}O_5)_{2n}$



ภาพที่ 13 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส (http://www.dnp.go.th/bio_com/garbagr_fiber.html)

2.8.1.3 ลิกนิน

ลิกนิน (lignin) เป็นสารประกอบอะโรมาติกเชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มักพบอยู่รวมกับเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ภายในโครงสร้างของลิกนินประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน รวมกันเป็นหน่อยย่อยหลายชนิด ลิกนินเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำและโครงสร้างไม่มีการขดหยุ่น (ภาพที่ 14) ดังนั้นจึงทำให้พืชที่มีลิกนินมากจะมีความแข็งแรงมาก เมื่อพืชตายลิกนินจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ลิกเนส (lignase) หรือลิกนินเนส (ligninase) ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวสามารถพบได้ในเชื้อราบางชนิด



แสดงหน่วยที่ซ้ำกันของลิกนิน โครงสร้างของลิกนินในเนื้อไม้อ่อน

ภาพที่ 14 โครงสร้างของลิกนิน (http://www.dnp.go.th/bio_com/garbagr_fiber.html)

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1. ไธอะมินไพโรฟอสเฟต (thiamine pyrophosphate)	Sigma, U.S.A
2. อีรีโทรส-4-ฟอสเฟต (erythrose-4-phosphate disodium salt)	Sigma, U.S.A
3. อัลโดเลส (aldolase)	Biochemika, U.S.A
4. โซเดียมแลคเตท (sodium lactate sodium salt)	Sigma, U.S.A
5. กลูตาไธโอน (glutathione reduced form)	Sigma, U.S.A
6. โบวินซีรั่มอัลบูมิน (bovine serum albumin)	Fluka, Switzerland
7. 2,3-บิวเทนไดออล (2,3 butanediol)	Aldrich, Australia
8. ไตรโอสฟอสเฟตไอโซเมอร์เรส (triose phosphate isomerase)	Sigma, U.S.A
9. อัลฟา-กลีเซอโรฟอสเฟตดีไฮโดรจิเนส (alpha-glycerophosphate dehydrogenase)	Sigma, U.S.A
10. เบตา-นิโคตินาไมด์อะดินินไดนิวคลีโอไทด์ (beta-NAD reduced form)	Sigma, U.S.A
11. ฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต (fructose-6-phosphate barium salt)	Sigma, U.S.A
12. ไรโบส-5-ฟอสเฟต (ribose-5-phosphate disodium salt)	Sigma, U.S.A
13. ฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต (fructose-1,6- diphosphate sodium salt)	Sigma, U.S.A
14. ดี(+)-กลูโคส (D(+)-glucose anhydrous)	Fluka, Switzerland
15. ดี(+)-ไซโลส (D(+)-xylose)	Fluka, Switzerland
16. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	Univar, England
17. อาหารไธโอไกลโคเลต (thioglycolate medium)	Difco, Geramany
18. เอ็น-ไกลซิลไกลซิน (N-glycylglycine)	BDH, England
19. แอล(+)-อะราบิโนส (L(+)-arabinose)	Fluka, Switzerland
20. เพปโตน (peptone)	Himedia, India
21. ยีสต์สกัด (yeast extract)	BBL, England
22. แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate)	Sigma, U.S.A
23. เมธิลเอมินไฮโดรคลอไรด์ (methylamine hydrochloride)	Sigma, Switzerland
24. เมธิลออร์เรนจ์ (methyl orange sodium salt)	LABCHEM,Australia
25. ซิลิโคน 510/50 cS (Dow corning 510/50 cS silicone fluid)	BDH, England
26. ซิลิโคน 550 cS (Dow corning 550 silicone fluid)	BDH, England

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
27. กลีเซอรอล (glycerol)	Labchem, Australia
28. โซเดียมฟอร์เมต (sodium formate sodium salt)	Sigma, U.S.A
29. โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate)	Carlo Erba, France
30. เอทานอล (ethanol)	Hipersolv™ BDH, England
31. ฟอลินฟีนอล (folin phenol reagent)	Carlo Erba, France
32. คาร์บอเนตทาร์เตท (carbonate tartrate)	Carlo Erba, France
33. ชุดทดสอบโปรตีน (protein assay dye reagent)	Bio-Rad, U.S.A
34. โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate)	Unilab, Australia
35. ลิกนิน (lignin)	Aldrich, U.S.A
36. ทริส-มาเลท บัฟเฟอร์ (Tris-malate buffer)	Sigma, Switzerland
37. กรดซัลฟูริก	BDH, England
38. แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์	BDH, England
39. เฟอฟูรอล	Aldrich, U.S.A
40. โซเดียมไฮดรอกไซด์	Univar, Australia
41. กรดไฮโดรคลอริก	BDH, England
42. กรดเปอร์คลอริก	Carlo Erba, France
43. ทีอีเอ-อีดีทีเอ (TEA-EDTA)	Sigma, Switzerland
44. โปตัสเซียมคาร์บอเนต	Unilab, Australia
45. สารดูดซับแอมเบอร์ไลซ์	Fluka, France

3.2 เครื่องมือ

ชนิดเครื่องมือ	แบบ-รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
1. สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)	UV-1601	Shimadzu, Japan
2. โครมาโตกราฟีแบบของเหลวแรงดันสูง (high performance liquid chromatography, HPLC)		Shimadzu, Japan
- คอลัมน์ (column)	Aminex HPX-87H	U.S.A
- ปั๊ม (pump)	LC-10AC	Shimadzu, Japan
- ตัวตรวจวัด (detector)	RID-10A	Shimadzu, Japan
3. แก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography, GC)	GC-17A	Shimadzu, Japan
- คอลัมน์	- Molecular sieve-5A	U.S.A
- ตัวตรวจวัด	TCD	Shimadzu, Japan
4. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	pH/ATC electrode	Sartorius, U.S.A
5. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	BP3100S	Sartorius, U.S.A

ชนิดเครื่องมือ	แบบ-รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
6. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	BP3100S	Sartorius
7. ถังหมัก (fermentor)	Biostat-B	B. Braun, Germany
8. หม้อนึ่งไอน้ำ (autoclave)	UM-65 L	สหช่าง, ประเทศไทย
9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)	DENVILLE 260D	Denville,U.S.A
10. ตู้บ่มแบบเขย่า (incubator shaker)	G25-KC	New Brunswick, U.S.A
11. อิเลคโทรดวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH electrode)	Hamilton CH-7402	Hamilton, Switzerland
12. คิวเวต (cuvette)	Hellma quartz glass	Hellma, Australia
13. เข็มฉีดสารสำหรับ HPLC (syringe for HPLC)	SGE	SGE, Australia
14. เข็มฉีดสารสำหรับ GC (syringe for GC)	SGE	SGE, Australia
15. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	pH/ATC electrode	Sartorius, U.S.A

3.3 อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

3.3.1 สูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ประกอบด้วย

ยีสต์สกัด	5	กรัมต่อลิตร
เพปโตน	5	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัมต่อลิตร
น้ำตาลกลูโคส	5, 10, 30 หรือ 50	กรัมต่อลิตร

เตรียมโดยชั่งสารตามปริมาณข้างต้น จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 980 มิลลิลิตร คนให้ละลาย นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้เท่ากับ 6.0 ด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3.3.2 สูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ประกอบด้วย

ยีสต์สกัด	5	กรัมต่อลิตร
เพปโตน	5	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัมต่อลิตร
น้ำตาลไซโลส	5, 10, 30 หรือ 50	กรัมต่อลิตร

เตรียมโดยชั่งสารตามปริมาณข้างต้น จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 980 มิลลิลิตร คนให้ละลาย นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 6.0 ด้วยกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3.3.3 สูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลส ประกอบด้วย

ยีสต์สกัด	5	กรัมต่อลิตร
เพปโตน	5	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์	5	กรัมต่อลิตร
น้ำตาลกลูโคสและไซโลส อย่างละ	2.5, 5, 10, 15, 25, 30 หรือ 50	กรัมต่อลิตร

เตรียมโดยชั่งสารตามปริมาณข้างต้น จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 980 มิลลิลิตร คนให้ละลาย นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 6.0 ด้วยกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3.3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อไธโอไกลโคเลต (thioglycolate medium) ประกอบด้วย

อาหารไธโอไกลโคเลต	25	กรัมต่อลิตร

เตรียมโดยชั่งอาหารไธโอไกลโคเลต 25 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร คนให้ละลาย แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

Lactococcus lactis IO-1 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Peter F. Stanbury มหาวิทยาลัย Hertfordshire ประเทศอังกฤษ

3.4.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

การเก็บรักษาจุลินทรีย์ แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

3.4.1.1 การเก็บแบบไลโอฟิไลซ์ (lyophilization)

Lc. lactis IO-1 ถูกเก็บในหลอดแอมพูล (ampule) ซึ่งอยู่ในสภาพแห้ง และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.1.2 การเก็บในกลีเซอรอล

เลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายเซลล์ผสมกับกลีเซอรอลที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ในอัตราส่วน 1 : 1 (โดยปริมาตร) แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส

3.4.2 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

3.4.2.1 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ก่อนการเตรียมกล้าเชื้อ

นำจุลินทรีย์ที่เก็บในกลีเซอรอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารไธโอไกลโคเลท ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

3.4.2.2 การเตรียมกล้าเชื้อ

ปีเปตเซลล์ที่เลี้ยงในข้อ 3.4.2.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารสูตรพื้นฐาน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยยีสต์สกัด เพปโตน โซเดียมคลอไรด์ อย่างละ 5 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) และ/หรือน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลส (2.5, 5, 10, 15, 25, 30 หรือ 50 กรัมต่อลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที นาน 8 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อลงในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยมีปริมาตรน้ำหมัก (working volume) เท่ากับ 1 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 และอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที

3.5 ชานอ้อยที่ใช้ในการทดลอง

ชานอ้อยสายพันธุ์สุพรรณบุรี 501

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

เลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะ (batch) ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้ปริมาตรน้ำหมัก 1 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ น้ำตาลกลูโคส กรด (กรดแลคติก กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก) เอทานอล 2,3-บิวเทนไดออล และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ HPLC และ GC

3.6.2 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส

เลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้น 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้ปริมาตรน้ำหมัก 1 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ น้ำตาลไซโลส กรด (กรดแลคติก กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก) เอทานอล 2,3-บิวเทนไดออล และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ HPLC และ GC

3.6.3 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)

เลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสกับไซโลสโดยให้ความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิดเท่ากับในการทดลองที่ 3.6.1 และ 3.6.2 คือ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้ปริมาตรน้ำหมัก 1 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส กรด (กรดแลคติก กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก) เอทานอล 2,3-บิวเทนไดออล และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ HPLC และ GC

3.6.4 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลส (2.5, 15, และ 25 กรัมต่อลิตร)

เลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสกับไซโลสโดยให้ความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิดเป็นครึ่งหนึ่งของการทดลองที่ 3.6.1 และ 3.6.2 (ความเข้มข้นของน้ำตาลสุดท้ายเท่ากัน) คือ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้ปริมาตรน้ำหมัก 1 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ น้ำตาลกลูโคส ไซโลส กรด (กรดแลคติก กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก) เอทานอล 2,3-บิวเทนไดออล โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ HPLC และ GC

3.6.5 การศึกษาวิถีการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตกรดแลคติก

เลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้ปริมาตรน้ำหมัก 1 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที จากนั้นเก็บเซลล์ในช่วงกลางของระยะที่มีการเจริญสูงสุด (mid-log phase) เพื่อตรวจหาฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต และเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลส แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปหาวิถีของการใช้น้ำตาลไซโลส

3.6.6 การศึกษาเมแทบอลิกฟลักซ์ในการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลไซโลส

นำข้อมูลผลได้ของผลิตภัณฑ์ (โมลผลิตภัณฑ์ต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้) ที่ได้จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส (ในหัวข้อ 3.6.2) ไปบันทึกและคำนวณในวิถีการใช้น้ำตาลไซโลสที่ได้จากหัวข้อ 3.6.5

3.6.7 การศึกษาพรินซิเพิลโนดของไซลูโลส-5-ฟอสเฟตและไพรูเวต

นำข้อมูลปริมาณของไซลูโลส-5-ฟอสเฟต และไพรูเวตที่ถูกสร้างขึ้นในวิถีของการใช้น้ำตาลไซโลสใต้ภายสภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสต่าง ๆ กันไปบันทึกและคำนวณในพรินซิเพิลโนดของไซลูโลส-5-ฟอสเฟตและไพรูเวต

3.6.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย

3.6.8.1 การสกัดลิกนินจากชานอ้อย

นำชานอ้อยมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นผลไม้แล้วกรองด้วยตะแกรงขนาด 5 มิลลิเมตร นำชานอ้อยที่ผ่านการกรองไปไฮโดรไลซ์ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 8, 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Dominquez et al., 1997) โดยใช้อัตราส่วนชานอ้อยต่อสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 1 ต่อ 100 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เก็บตัวอย่างสารละลายที่ได้แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอาตะกอนออก เก็บเฉพาะส่วนใสเพื่อวิเคราะห์ลิกนิน

3.6.8.2 การไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยสารละลายกรดเจือจาง

ล้างชานอ้อยที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ นำชานอ้อยที่ผ่านการอบแห้งดังกล่าวไปไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก หรือกรดซัลฟูริก ที่ความเข้มข้น 0.5, 2, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (โดย

ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 90, 100, 110 และ 120 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราส่วนชานอ้อยต่อสารละลายกรด 1 ต่อ 15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ดัดแปลงจาก Dominquez et al., 1997) เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (กลูโคส ไซโลส และอะราบิโนส) กรดอะซิติก และเฟอฟูรอล ด้วย HPLC

3.6.9 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย

3.6.9.1 การลดความเป็นพิษของสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย

บรรจุสารดูดซับแอมเบอร์ไลซ์ (amberlite weak base anion-exchanger resin) ลงในคอลัมน์ (2 x 30 เซ็นติเมตร) จากนั้นกระตุ้นคอลัมน์โดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (1 โมลาร์) ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (1 โมลาร์) แล้วล้างคอลัมน์ด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งพีเอชของสารละลายที่ได้ (effluent) มีค่าอยู่ระหว่าง 6.5-7.0 (Dominquez et al., 1997) จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยผ่านลงในคอลัมน์ นำสารละลายที่ผ่านการลดความเป็นพิษไปใช้ในการศึกษาการผลิตกรดแลคติก

3.6.9.2 การผลิตกรดแลคติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย

สารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยในข้อ 3.6.8 (พิจารณาจากประสิทธิภาพของการไฮโดรไลซ์โดยคำนวณจากอัตราส่วนระหว่างน้ำตาลกลูโคส ไซโลส และอะราบิโนสต่อสารยับยั้ง (กรดอะซิติก และเฟอฟูรอล)) นำมาปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมลาร์ (Garde et al., 2001) นำสารละลายที่ปรับพีเอชส่วนหนึ่งไปลดความเป็นพิษ จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 25 นาที จากนั้นนำไปศึกษาการผลิตกรดแลคติกภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ น้ำตาล (กลูโคส ไซโลส และอะราบิโนส) กรด (กรดแลคติก กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก) เอทานอล 2,3-บิวเทนไดออล เฟอฟูรอล และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยใช้เครื่อง สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ HPLC และ GC

3.6.10 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย

เลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย โดยแปรผันแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด คือ ยีสต์สกัด เพปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟต และแปรผันความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 3, 5 และ 7 กรัมต่อลิตร ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้ปริมาตรน้ำหมัก 1 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ น้ำตาล (กลูโคส ไซโลส และอะราบิโนส) กรด (กรดแลคติก กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก) เอทานอล 2,3-บิวเทนไดออล และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ HPLC และ GC

3.7 วิธีการวิเคราะห์

3.7.1 การวัดการเจริญของจุลินทรีย์

3.7.1.1 การวัดความขุ่น (turbidity)

นำตัวอย่างเซลล์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร (Ishizaki, 1990)

3.7.1.2 การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ (dry cell weight)

นำตัวอย่างสารละลายเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซ็นตริฟิวจ์ (centrifuge) แบบตั้งโต๊ะที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาทีเพื่อแยกเอาเซลล์ออก จากนั้นกระจายเซลล์ในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำสารละลายเซลล์ใส่ในแผ่นอะลูมิเนียมที่อบจนน้ำหนักคงที่แล้ว จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ซึ่งน้ำหนักเซลล์แห้งคำนวณได้จาก ผลต่างระหว่างน้ำหนักของแผ่นอะลูมิเนียมพร้อมเซลล์ที่อบจนน้ำหนักคงที่กับน้ำหนักของแผ่นอะลูมิเนียม นำน้ำหนักแห้งของเซลล์ที่ได้กับค่าความขุ่นในข้อ 3.7.1.1 มาสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้ในการคำนวณหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ (ภาคผนวก ข)

3.7.2 การเก็บตัวอย่างสารละลายเพื่อวัดความขุ่นและวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์

เก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร โดย 1 มิลลิลิตร นำไปวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร เพื่อหาน้ำหนักแห้งของเซลล์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข) และ 1 มิลลิลิตร นำไปใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดเอาเฉพาะส่วนใส (supernatant) เก็บที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปวิเคราะห์น้ำตาล (กลูโคส, ไซโลส และอะราบิโนส) กรด (กรดแลคติก กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก) เอทานอล และ 2,3-บิวเทนไดออล โดยใช้ HPLC และที่เวลาต่างๆ ตัวอย่างแก๊สในถังหมักถูกดูดผ่านไซรินจ์ฟิลเตอร์ของถังหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นตัวอย่างแก๊สที่ได้ถูกนำไปวิเคราะห์หาปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักด้วยเครื่อง GC

การวิเคราะห์ด้วย HPLC จะใช้สารตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตรในการวิเคราะห์ และใช้สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.005 โมลาร์ เป็นวัฏภาคไหล (mobile phase) โดยใช้อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้คอลัมน์ Aminex HPX-87H เป็นวัฏภาคนิ่ง (stationary phase) ควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 45 องศาเซลเซียส และใช้ตัวตรวจวัดแบบ RID (refractive index detector) ส่วนในกรณีการวิเคราะห์ด้วย GC จะใช้แก๊สตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตรและใช้แก๊สอาร์กอนเป็นแก๊สนำพาหะ (carrier gas) และใช้คอลัมน์ Molecular sieve 5A ที่ความดัน 100 kPa โดยควบคุมอุณหภูมิของอินเจคเตอร์ คอลัมน์ และตัวตรวจวัด ที่ 100, 100 และ 220 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และใช้ตัวตรวจวัดแบบ TCD (thermal conductivity detector)

3.7.3 การเตรียมสารมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC และ GC

ชั่งกลูโคส 0.2551 กรัม ไซโลส 0.2551 กรัม อะราบิโนส 0.125 กรัม โซเดียมแลคเตท 0.3210 กรัม โซเดียมอะซิเตท 0.3509 กรัม โซเดียมฟอร์เมต 0.1889 กรัม ปิเปตเอทานอล 2,3-บิวเทนไดออล และเฟอฟูรอล ปริมาตร 95, 26 และ 109 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในบีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 2 ขั้นตอน 10 มิลลิลิตร คนให้ละลาย จากนั้นถ่ายลงในขวดปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 25 มิลลิลิตร และปรับ

ปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น 2 ขั้นตอน ซึ่งจะได้สารละลายมาตรฐานกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส กรดแลคติก กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก เอทานอล และ2,3-บิวเทนไดออล และเฟอฟูรอลที่ความเข้มข้น 10, 10, 5, 10, 10, 5, 3, 1 และ 5กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สารละลายมาตรฐานที่ได้นี้ ถูกนำไปเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ก่อนนำไปวิเคราะห์ ด้วยเครื่อง HPLC เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน สำหรับการเตรียมคาร์บอนไดออกไซด์มาตรฐาน เพื่อวิเคราะห์ด้วย GC สามารถเตรียมโดยเจือจางคาร์บอนไดออกไซด์ (90 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0, 0.05, 0.10, 0.20 และ 0.30 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาคผนวก ค)

3.7.4 การวิเคราะห์ปริมาณลิกนิน

3.7.4.1 การเตรียมสารเคมีเพื่อวิเคราะห์ลิกนิน

1. สารละลายฟอลินฟีนอล (Folin phenol reagent)
2. สารละลายคาร์บอเนตทาร์เทต (Carbonate-tartrate reagent)

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 200 กรัม และโซเดียมทาร์เทรต ($NaC_4H_6O_6.2H_2O$) 12 กรัม ละลายในน้ำกลั่นร้อนปริมาตร 750 มิลลิลิตร ถ่ายลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น 2 ขั้นตอน เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในที่มืดเพื่อใช้วิเคราะห์ต่อไป

3.7.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณลิกนินในตัวอย่าง

นำตัวอย่างปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟอลินฟีนอล 1 มิลลิลิตร และสารละลายคาร์บอเนตทาร์เตท 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้เกิดสีน้ำเงิน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 649 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานลิกนิน (Standard Method Committee,1998) (ภาคผนวก ง)

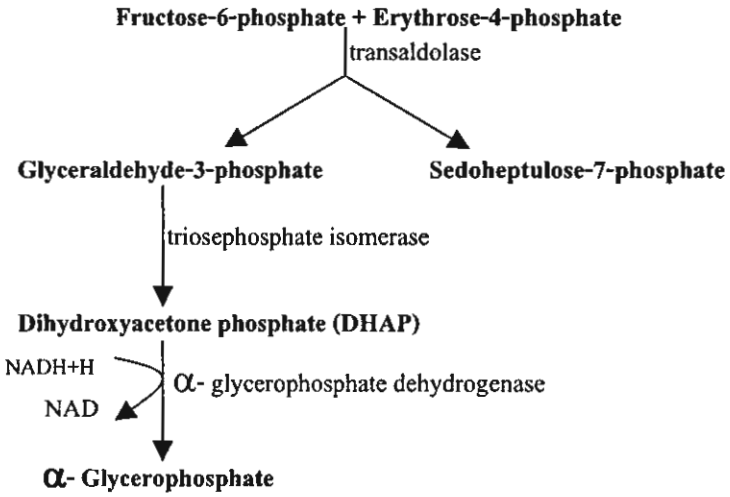
3.7.5 การเตรียมสารละลายเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลส (transaldolase)

เก็บเซลล์ในระยะ mid-log phase ปริมาตร 980 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 18,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ล้างเซลล์ด้วย 0.05 โมลาร์ ทริส-มาเลต บัฟเฟอร์ (พีเอช 7.5) 4 ครั้ง ๆ ละ 800 มิลลิลิตร จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปละลายใน 0.05 โมลาร์ ทริส-มาร์เลตบัฟเฟอร์ (พีเอช 6.0) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำสารละลายเซลล์ที่ได้ไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่องความถี่สูง (sonicator) ที่ 50% pulsar duty cycle โดยใช้ out put power 200 การทำให้เซลล์แตกทำทั้งหมด 6 รอบ ๆ ละ 60 วินาที ในอ่างน้ำแข็ง นำสารละลายเซลล์ที่ได้ไปปั่นแยกที่ความเร็ว 23,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เพื่อเอาเฉพาะส่วนใส ไปวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลส

3.7.5.1 หลักการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลส

การวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลสในเซลล์ของ *Lc. lactis* IO-1 จะอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างฟรุกโตส-6-ฟอสเฟตกับอิริโทส-4-ฟอสเฟต โดยมีเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลสเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Livering, Dijkhuizen, 1986) จากปฏิกิริยาดังกล่าวจะได้กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตเป็นผลิตภัณฑ์ จากนั้นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต จะถูกเปลี่ยนเป็นไดไฮดรอกซีอะซิโตนฟอสเฟตโดยการทำงานของเอนไซม์ไตรโอสฟอสเฟตไอโซเมอเรส (Bruinenberg et al., 1983; Levering, Dijkhuizen, 1986; Hames et al., 1997; Lu, Liao, 1997 อ้างถึงใน Laopaiboon, 2001) ไดไฮดรอกซีอะซิโตนฟอสเฟตที่ถูกสร้างขึ้นจะถูกเปลี่ยนเป็นแอลฟา-กลีเซอ

โรฟอสเฟตโดยการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลีเซอโรฟอสเฟตดีไฮโดรจิเนส (ภาพที่ 15) ซึ่งมีเอ็นเอดีเอชเป็นโคเอนไซม์ (co-enzyme) แอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลสจะถูกวัดทางอ้อมโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงของเอ็นเอดีเอชที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 15 ปฏิกิริยาของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลส ไตรโอสฟอสเฟตไอโซเมอเรส และแอลฟา-กลีเซอโรฟอสเฟตดีไฮโดรจิเนส ในการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลส

3.7.5.2 วิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลส

ติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลสโดยการเติมสารละลายไตรเอทาโนลามิน-เอทิลีนไดอะมินเตตราอะซิติกแอซิด (TEA-EDTA) พีเอช 8.0 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ดี-ฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต (100 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แอลฟา-กลีเซอโรฟอสเฟตดีไฮโดรจิเนส ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไตรโอสฟอสเฟตไอโซเมอเรส ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และสารละลายสกัดเซลล์ (ในข้อ 3.7.5) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในคิวเวท (ขนาด 1400 ไมโครลิตร) 2 คิวเวท โดยคิวเวทหนึ่งเป็นคิวเวทอ้างอิง (reference cuvette) ส่วนคิวเวทหนึ่งเป็นคิวเวทตัวอย่าง (sample cuvette) จากนั้นนำไปปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นปรับค่าดูดกลืนแสงให้เท่ากับศูนย์ นำคิวเวทอ้างอิงที่ประกอบด้วยสารละลายข้างต้นไปเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 240 ไมโครลิตร นำคิวเวทตัวอย่างเติมด้วยสารละลายนิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์แบบรีดิวซ์ (NADH) และน้ำกลั่น ปริมาตร 50 และ 190 ไมโครลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำคิวเวทไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร แล้วนำคิวเวททั้ง 2 ไปเติมสารละลายดี-อิริโทส-4-ฟอสเฟต (50 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้งที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาต่างๆ แอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลสสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 1

วิธีการคำนวณแอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลส

$$\text{แอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลส} = \frac{\Delta \text{Abs } 340 \text{ min} \times V_t}{\varepsilon \times L_p \times V_s \times P_c} \qquad \text{สมการที่ 1}$$

เมื่อ V_t = ปริมาตรทั้งหมดที่ใช้ในการวิเคราะห์ = 0.91 มิลลิลิตร

ε = ค่าสัมประสิทธิ์ (Extinction coefficient) ของ NADH = 6.22 ตารางเซนติเมตรต่อไมโครโมล

L_p = ความกว้างของช่องที่แสงผ่านของคิวเวท = 1 เซนติเมตร

V_s = ปริมาตรของสารละลายเซลล์สกัด = 0.1 มิลลิลิตร

P_c = ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

3.7.6 การวัดปริมาณโปรตีน (Bradford, 1976)

3.7.6.1 หลักการวัดปริมาณโปรตีน

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Bradford (1976) อาศัยหลักการทำปฏิกิริยาระหว่างสารละลายสี (Coomassie Brilliant Blue G-250) กับโปรตีน (soluble protein) จากนั้นนำสารละลายผสม (complex solution) ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่างสามารถคำนวณได้จากการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน กับค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ซึ่งโปรตีนมาตรฐานที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์คือโบวินซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) และแกรมมาโกลบูลิน (gamma globulin) เนื่องจากสารมาตรฐานดังกล่าวสามารถทำปฏิกิริยากับสีที่ใช้ในการวิเคราะห์อย่างสมบูรณ์และไม่เกิดสารรบกวน (interfere) ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา ซึ่งจะเพิ่มความแม่นยำในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

3.7.6.2 วิธีการวัดโปรตีน

1. การเตรียมสารมาตรฐานโปรตีน

ชั่งโบวินซีรั่มอัลบูมิน 5 มิลลิกรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร คนให้ละลาย จากนั้นเทสารละลายที่ได้ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จะได้ความเข้มข้นของสารมาตรฐานโปรตีนเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นเจือจางสารละลายให้ได้ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.3 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

2. การเตรียมสารละลายสี (Coomassie brilliant blue G-250)

เจือจางสารละลายสีด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 ต่อ 4 โดยปริมาตร เก็บในขวดสีชา จากนั้นนำไปเก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส) เพื่อรอใช้ในการวิเคราะห์

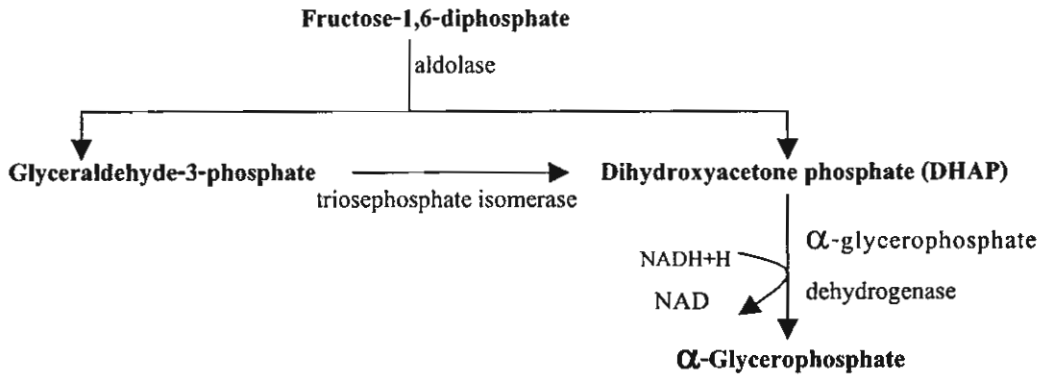
3. การวัดปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง

ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายสี Coomassie brilliant blue G-250 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานโปรตีนโบวินซีรัมอัลบูมิน (ภาคผนวก ง)

3.7.7 การวัดฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต

3.7.7.1 หลักการวัดฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต

การวัดปริมาณฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟตในเซลล์ของ *Lc. lactis* IO-1 จะอาศัยการทำงานของเอนไซม์อัลโดเลสซึ่งจะเปลี่ยนฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต ไปเป็นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตกับไดไฮดรอกซีอะซิโตนฟอสเฟต (Bond et al., 1998) กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตจะถูกไอโซเมอร์ไรซ์เป็นไดไฮดรอกซีอะซิโตนฟอสเฟตโดยการทำงานของเอนไซม์ไตรโอสฟอสเฟตไอโซเมอเรส จากนั้นไดไฮดรอกซีอะซิโตนฟอสเฟตจะถูกเปลี่ยนเป็นแอลฟา-กลีเซอโรฟอสเฟต โดยการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลีเซอโรฟอสเฟตดีไฮโดรจิเนส ซึ่งมีเอ็นเอดีเอชเป็นโคเอนไซม์ (ภาพที่ 16) ปริมาณของฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟตจะถูกวัดทางอ้อม โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของของเอ็นเอดีเอชที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต



ภาพที่ 16 ปฏิกิริยาของเอนไซม์ อัลโดเลส ไตรโอสฟอสเฟตไอโซเมอเรส และแอลฟา-กลีเซอโรฟอสเฟตดีไฮโดรจิเนส ในการวิเคราะห์ฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต

3.7.7.2 วิธีการวัดฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต

ปิเปตตัวอย่างเซลล์ในระยะ mid-log phase ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่วางในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นดูดสารละลายเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวส์ ที่เติมกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 1.69 นอร์มอล ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับเมทิลออเรนจ์ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเททับด้วยซิลิโคนออย (ซิลิโคนออย 550 : 510/50cS อัตราส่วน 1 ต่อ 3 โดยปริมาตร) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เพื่อแยกเอาเซลล์ออกจากน้ำหมัก ดูดเอาเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำหมักและซิลิโคนออยทิ้งไป จากนั้นผสมเซลล์และส่วนกรดเปอร์คลอริกเข้าด้วยกัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที (ทำเช่นนี้ประมาณ 2-3 หลอด เพื่อให้ได้ปริมาตรมากพอที่จะนำไปวิเคราะห์) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ปิเปตส่วนใสปริมาตร 75 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์อีกหลอด ค่อย ๆ เติม 50 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โปตัสเซียมคาร์บอเนตจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีเหลือง (พีเอชมากกว่า 4.5) นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000

รอบต่อนาที นาน 5 นาที เพื่อเอาตะกอนออก ดูดเฉพาะส่วนใส ปริมาตร 200 ไมโครลิตรหรือสารละลายมาตรฐานฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต แล้วเติมสารละลายเอ็นเอดีเอช ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ความเข้มข้น 0.32 มิลลิโมลาร์ ลงในคิวเวท ผสมให้เข้ากันทันที เติมสารละลายผสมระหว่างแอลฟา-กลีเซอโรฟอสเฟตดีไฮโดรจิเนสกับไตรโอสฟอสเฟตไอโซเมอเรส ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนาน 1 นาที เติมสารละลายเอนไซม์อัลโดเลส ปริมาตร 20 ไมโครลิตร เขย่าทันที นำสารที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต (ภาคผนวก ง)

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)

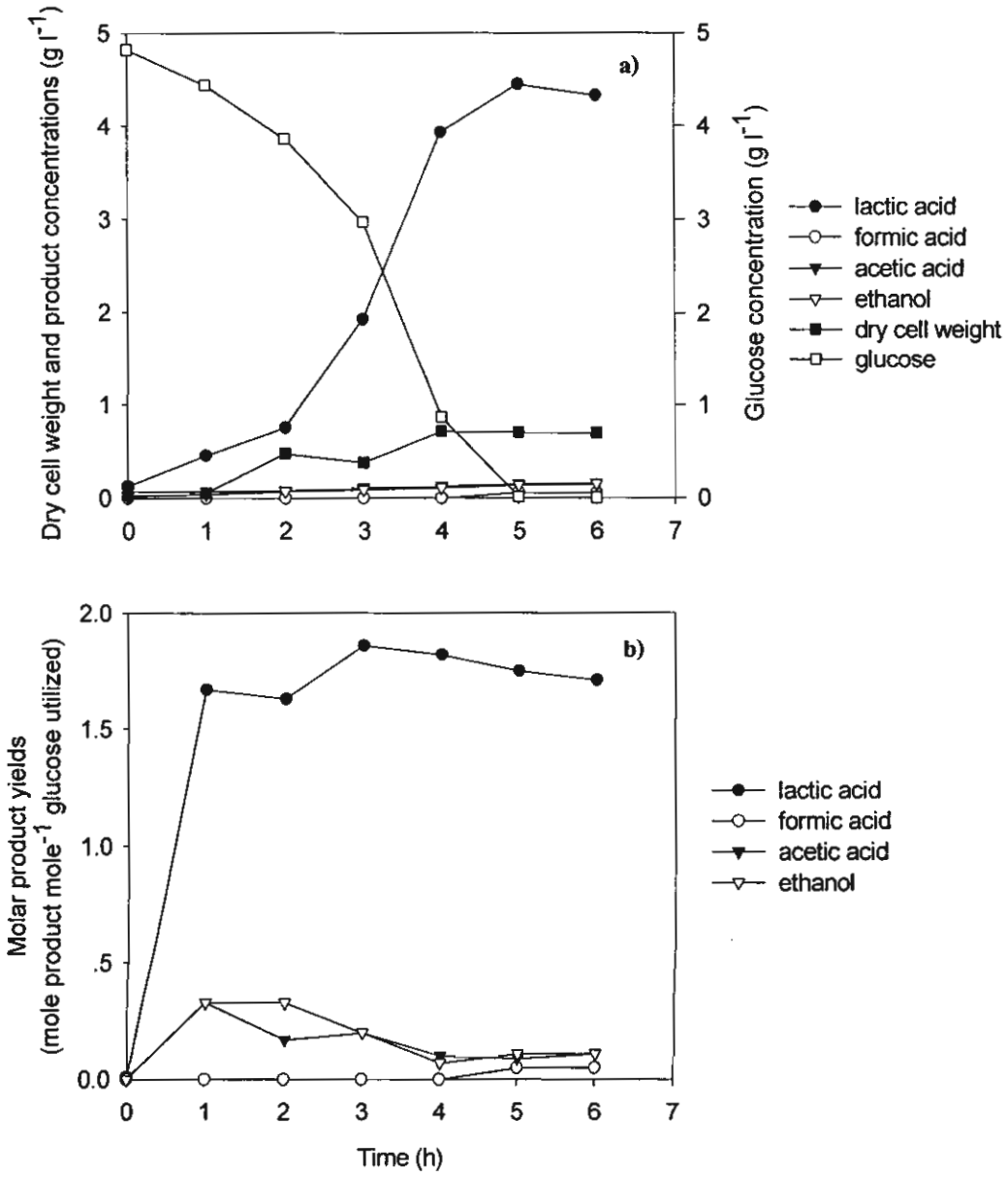
เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสหมดภายในเวลา 5 ชั่วโมง และที่เวลาดังกล่าวมีการผลิตกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล 4.45, 0.06, 0.15 และ 0.14 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 0.72 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 17a) นอกจากนี้พบว่า ผลได้ (yield) ของกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล มีค่าเท่ากับ 1.75, 0.05, 0.09 และ 0.11 โมลต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ตามลำดับ (ภาพที่ 17b)

ในขณะเดียวกันเมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า น้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมดภายในเวลา 9 ชั่วโมง ที่เวลาดังกล่าวมีการผลิตกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล 8.32, 0.16, 0.28 และ 0.29 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 0.97 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 18a) ส่วนผลได้ของกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล ที่เวลาดังกล่าวมีค่าเท่ากับ 1.65, 0.06, 0.08 และ 0.11 โมลต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 18b)

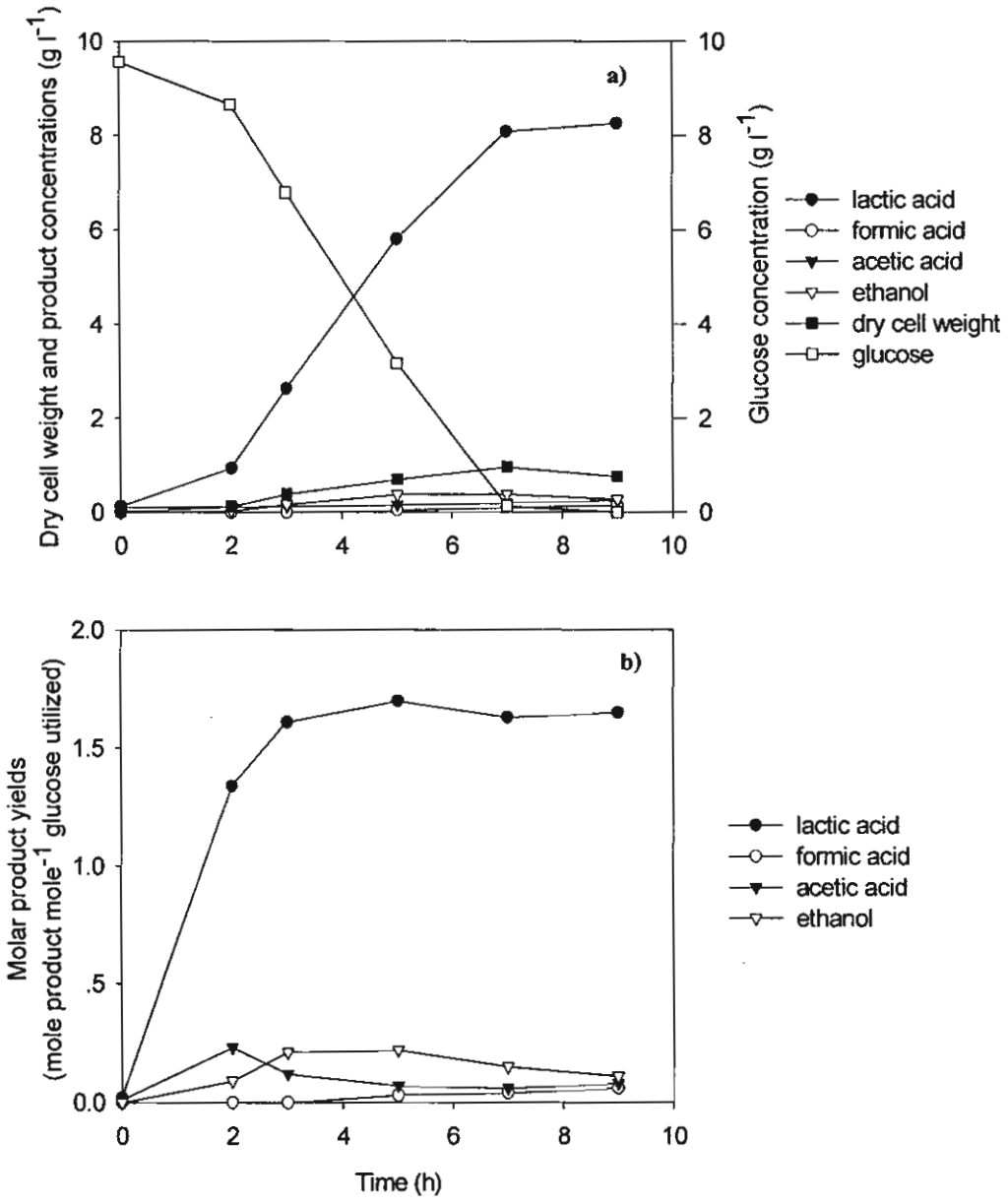
เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสหมดภายในเวลา 20 ชั่วโมง และที่เวลาดังกล่าวมีการผลิตกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล เท่ากับ 24.7, 0.8, 0.67 และ 0.89 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 1.05 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 19a) นอกจากนี้พบว่า ผลได้ของกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล ที่เวลาดังกล่าวมีค่า 1.64, 0.10, 0.07 และ 0.11 โมลต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 19b)

เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าน้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมดภายในเวลา 40 ชั่วโมง ที่เวลาดังกล่าวมีการผลิตกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล 39.8, 1.42, 1.06 และ 1.37 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 1.16 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 20a) และได้ผลได้ของกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล ที่เวลาดังกล่าวมีค่าเท่ากับ 1.59, 0.11, 0.06 และ 0.11 โมลต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 20b)

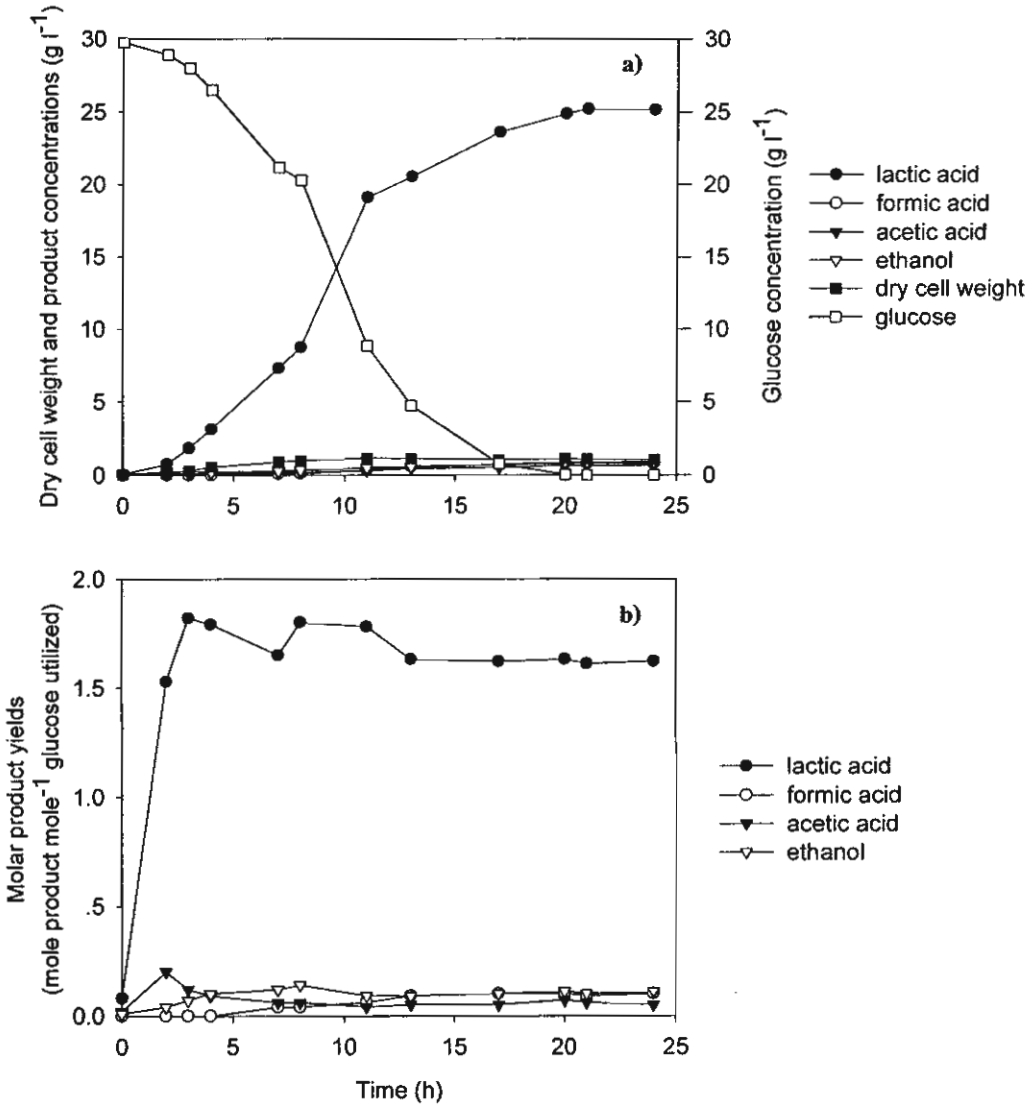
จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกแบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) พบว่า *Lc. lactis* IO-1 ไม่ผลิต 2,3-บิวเทนไดออล นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ผลิตขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักมีค่าต่ำ คือมีค่าเท่ากับ 0.02, 0.08, 3.81 และ 6.68 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



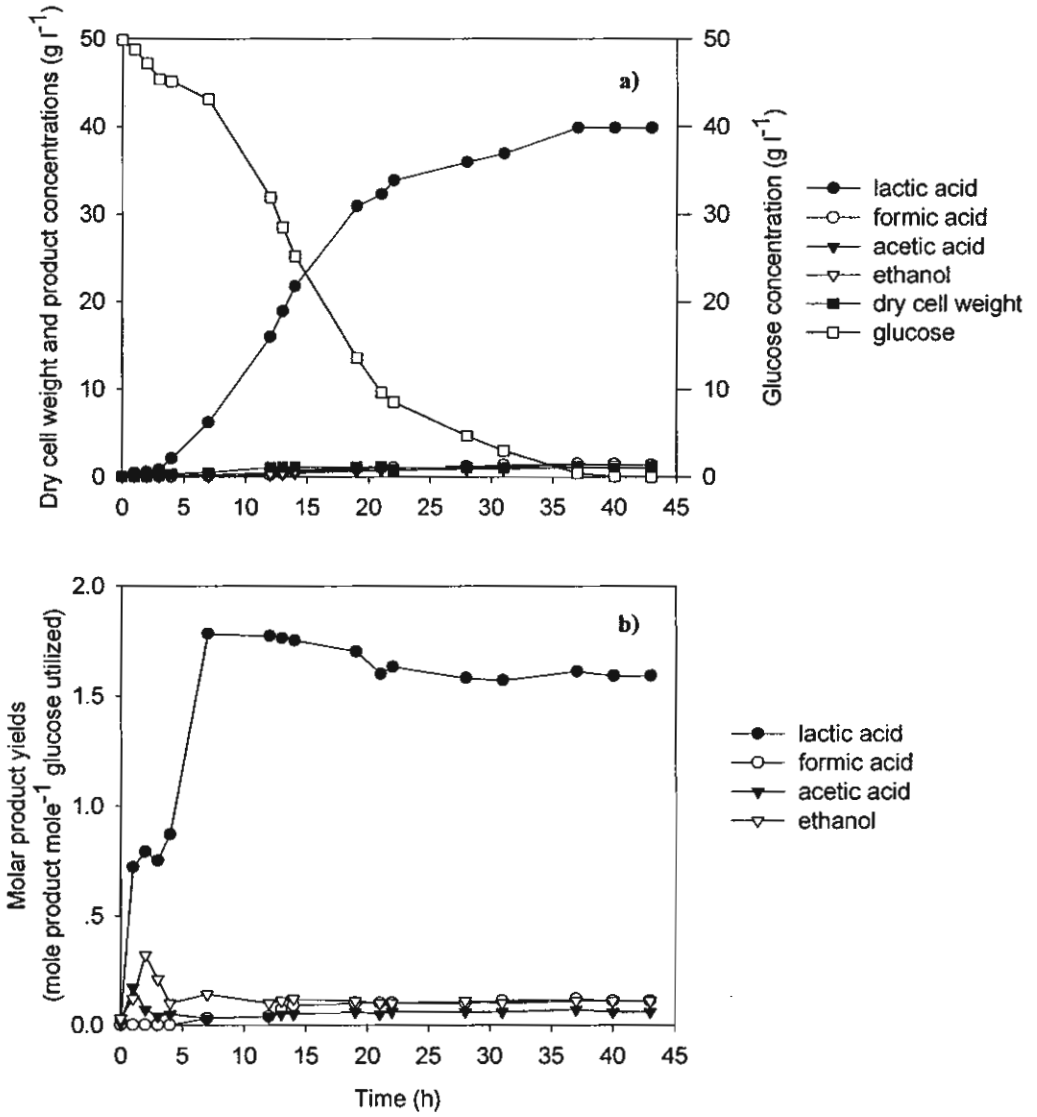
ภาพที่ 17 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร เมื่อ a คือ ความเข้มข้นของเซลล์แห้ง ผลิตภัณฑ์ และน้ำตาลกลูโคส และ b คือ ผลได้ของผลิตภัณฑ์



ภาพที่ 18 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร เมื่อ a คือ ความเข้มข้นของเซลล์แห้ง ผลิตภัณฑ์ และน้ำตาลกลูโคส และ b คือ ผลได้ของผลิตภัณฑ์



ภาพที่ 19 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร เมื่อ a คือ ความเข้มข้นของเซลล์แห้ง ผลิตภัณฑ์ และน้ำตาลกลูโคส และ b คือ ผลได้ของผลิตภัณฑ์



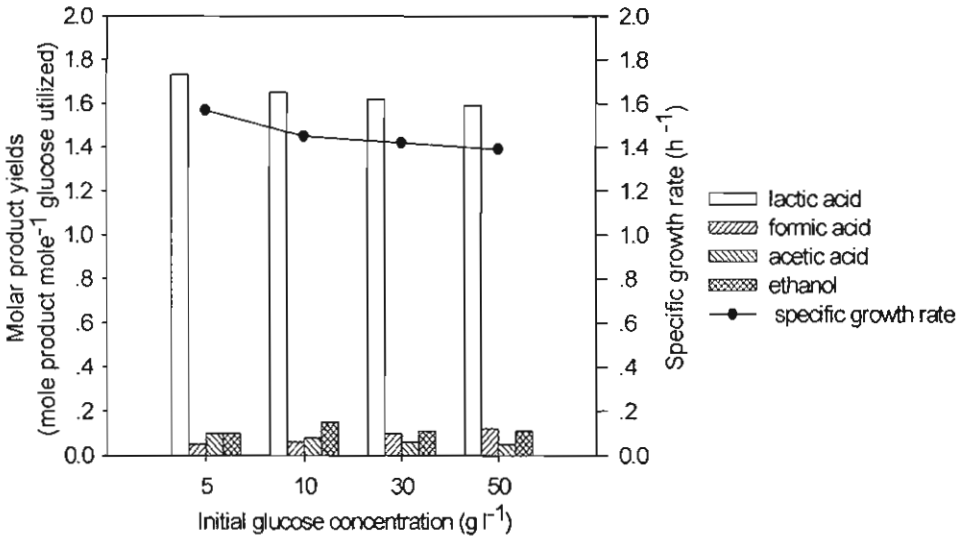
ภาพที่ 20 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร เมื่อ a คือ ความเข้มข้นของเซลล์แห้ง ผลิตภัณฑ์ และน้ำตาลกลูโคส และ b คือ ผลได้ของผลิตภัณฑ์

จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที พีเอช 6.0 ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 21) ผลการทดลองพบว่า ผลได้ของเซลล์และอัตราการเจริญจำเพาะมีค่า 0.14 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ และ 1.57 ชั่วโมง$^{-1}$ ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าผลได้ของเซลล์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้น คือมีค่า 0.1, 0.04 และ 0.02 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ ในขณะเดียวกันอัตราการเจริญจำเพาะมีค่าลดลง 1.45, 1.42 และ 1.39 ชั่วโมง$^{-1}$ ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลได้ (โมลต่อโมลของน้ำตาลกลูโคส

ที่ถูกใช้) ของกรดแลคติก และกรดอะซิติกลดลง ในขณะที่ผลได้ของกรดฟอร์มิกเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เพิ่มขึ้น ส่วนผลได้ของเอทานอลมีค่าเท่ากัน คือ 0.11 โมลต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ จากการทดลองพบเปอร์เซ็นต์ carbon recovery อยู่ในช่วง 87.2-96.5

ตารางที่ 1 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่อผลได้ของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)

กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของเซลล์ (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้)	อัตราการเจริญจำเพาะ ($ชั่วโมง^{-1}$)	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (โมลผลิตภัณฑ์ต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้)				เปอร์เซ็นต์ carbon recovery
			กรดแลคติก	กรดฟอร์มิก	กรดอะซิติก	เอทานอล	
5	0.14	1.57	1.75	0.05	0.09	0.11	96.5
10	0.10	1.45	1.65	0.06	0.08	0.11	91.8
30	0.04	1.42	1.64	0.10	0.07	0.11	90.2
50	0.02	1.39	1.59	0.11	0.06	0.11	87.2

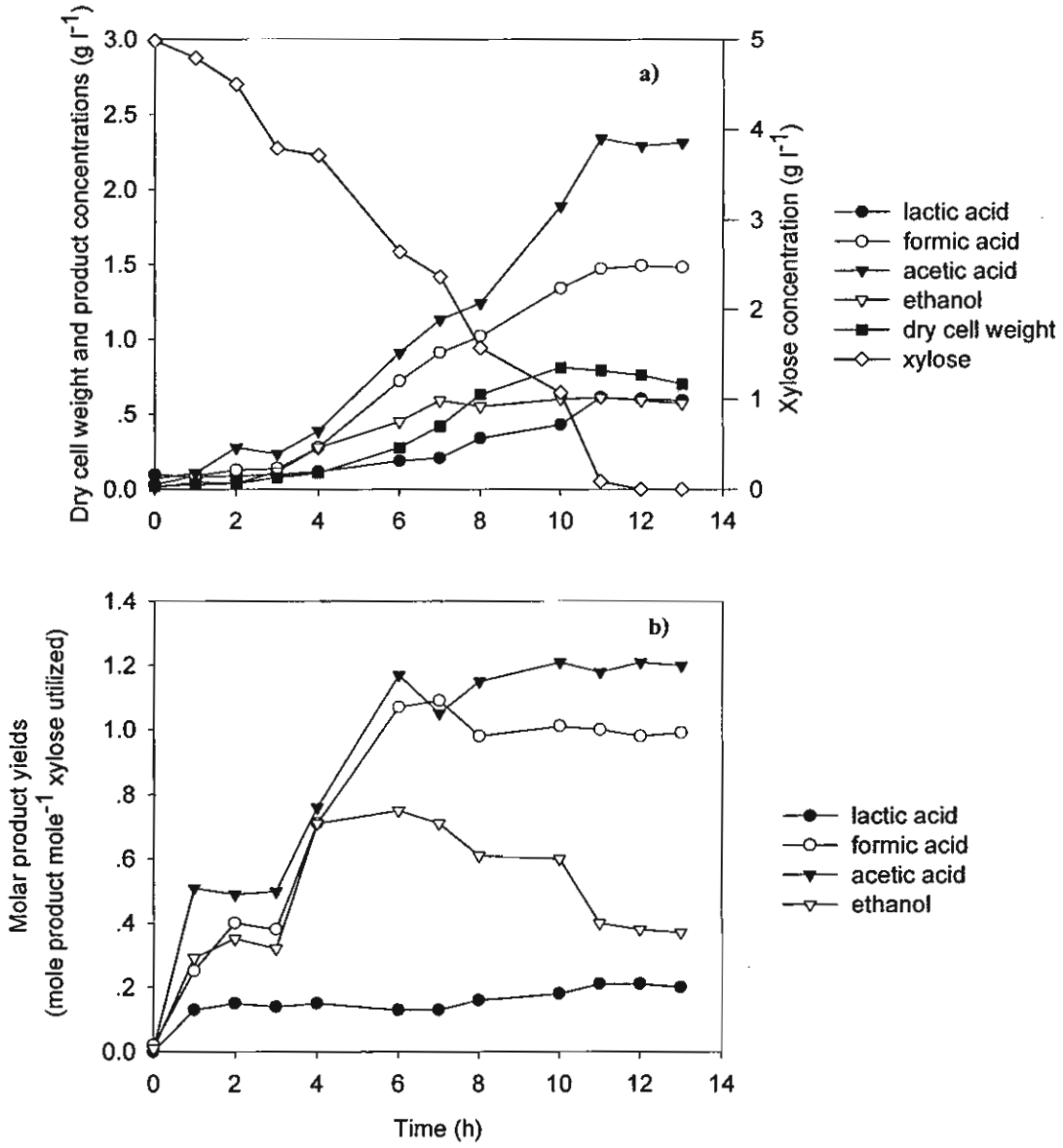


ภาพที่ 21 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (molar product yields) และอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) ที่ได้จากการเลี้ยง *Lc. alctis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ

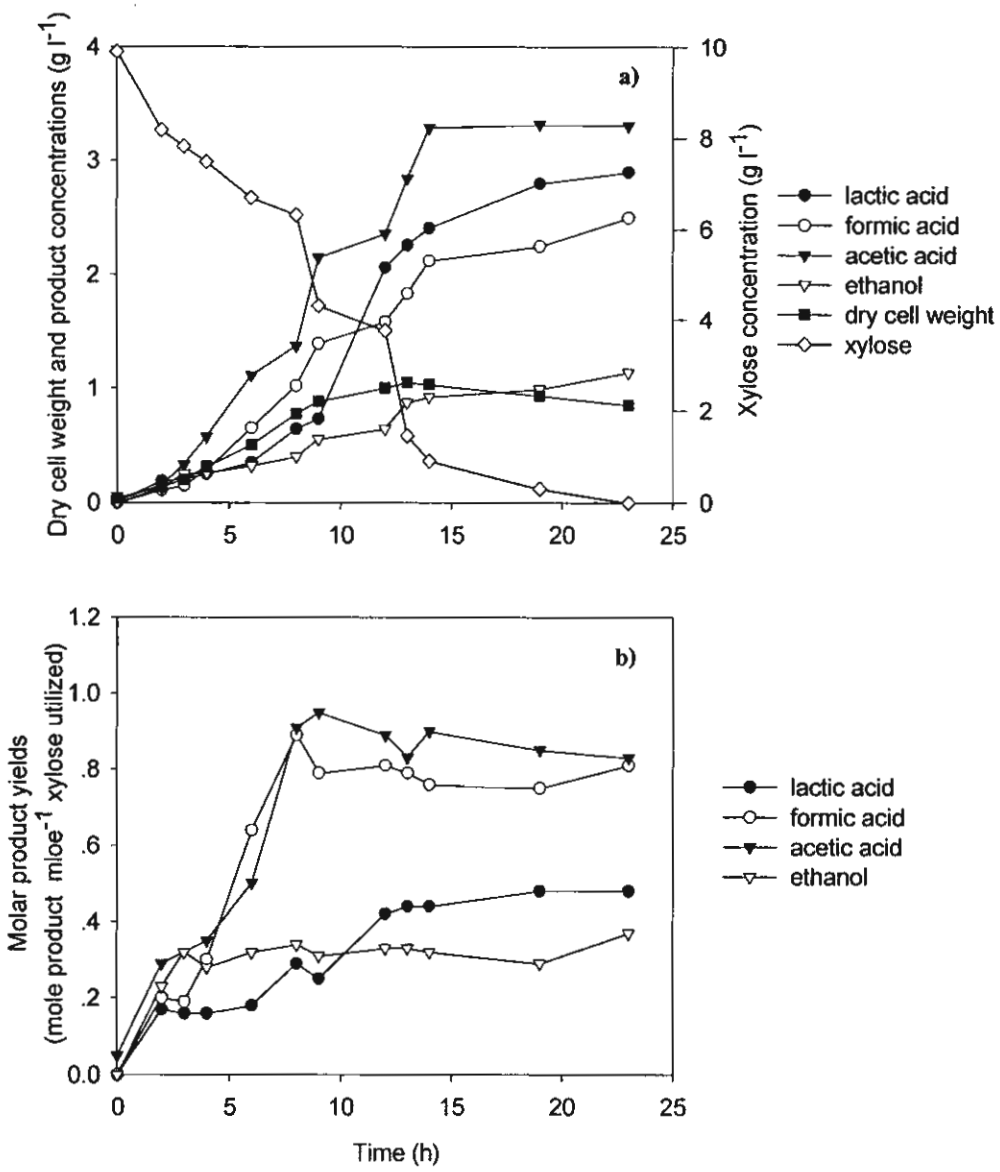
4.2 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)

เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 22) ผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลไซโลสหมดหลังจากชั่วโมงที่ 11 ซึ่งใช้เวลาในการหมักนานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นเดียวกัน (ภาพที่ 17a) และที่เวลาดังกล่าว พบปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล 0.62, 1.52, 2.34 และ 0.61 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 0.70 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 22a) ในขณะที่ผลได้ของกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล ที่เวลาดังกล่าว มีค่าเท่ากับ 0.21, 1.0, 1.18 และ 0.40 โมลต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ตามลำดับ (ภาพที่ 22b)

ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 23) พบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลไซโลสหมดที่ชั่วโมงที่ 23 ซึ่งใช้เวลาในการหมักนานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นเดียวกันถึง 2.5 เท่า (ภาพที่ 18a) ปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอลที่เวลาดังกล่าวมีค่าเท่ากับ 2.90, 2.50, 3.32 และ 1.14 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 0.85 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 23a) ในขณะที่ผลได้ของกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล มีค่า 0.48, 0.81, 0.83 และ 0.37 โมลต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 23b)



ภาพที่ 22 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร เมื่อ a คือ ความเข้มข้นของเซลล์แห้ง ผลิตภัณฑ์ และน้ำตาลไซโลส และ b คือ ผลได้ของผลิตภัณฑ์



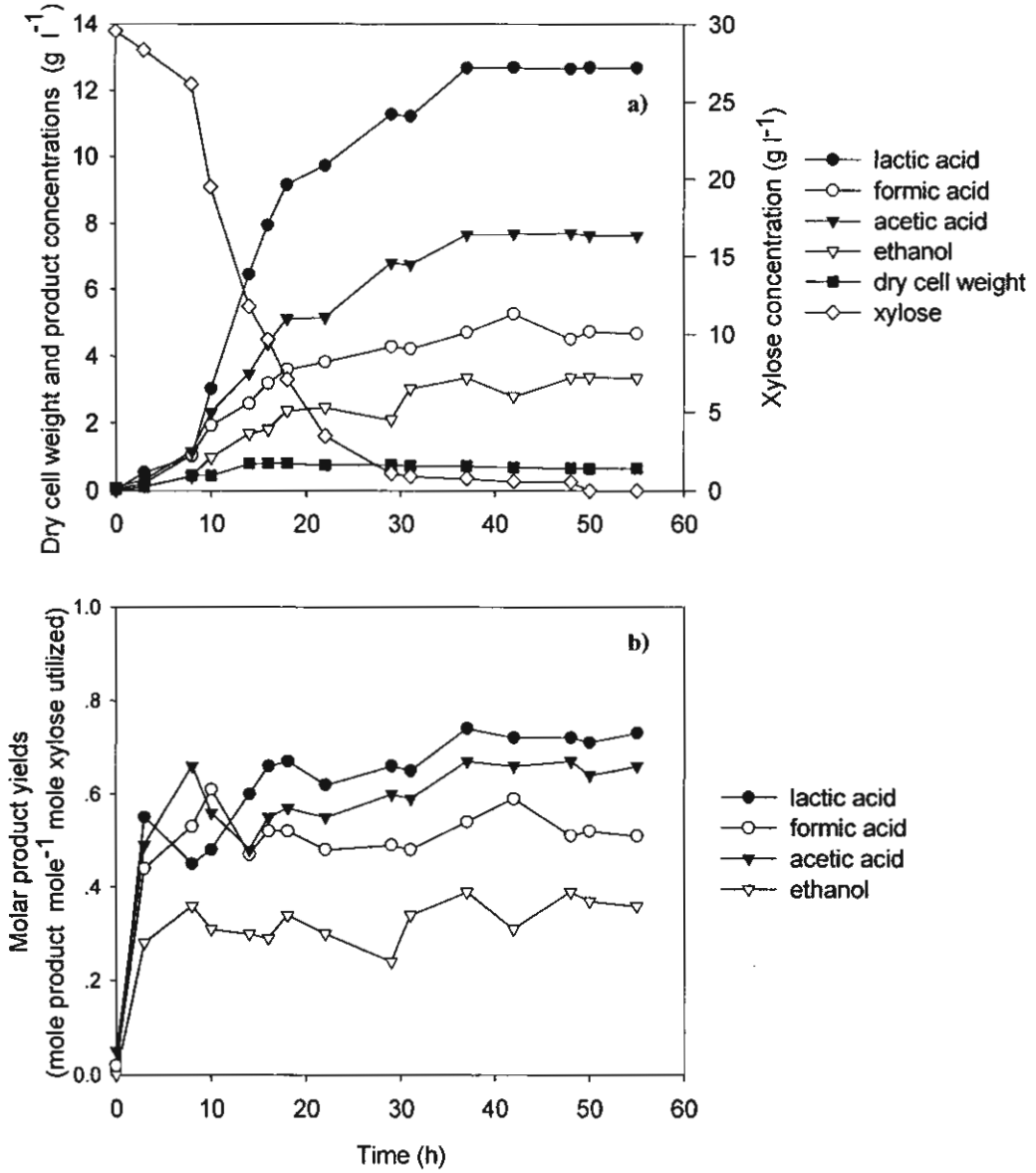
ภาพที่ 23 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 10 กรัมต่อลิตรเมื่อ a คือ ความเข้มข้นของเซลล์แห้ง ผลิตภัณฑ์ และน้ำตาลไซโลส และ b คือ ผลได้ของผลิตภัณฑ์

เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 30 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 24) ผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้อย่างรวดเร็วภายใน 30 ชั่วโมงแรกของการหมักและพบว่าน้ำตาลไซโลสถูกใช้หมดที่เวลา 50 ชั่วโมง ซึ่งใช้เวลาในการหมักนานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นเดียวกันถึง 2.5 เท่า (ภาพที่ 19a) ที่เวลาดังกล่าวมีการผลิตกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล เท่ากับ 12.69, 4.75, 7.64 และ 3.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าว

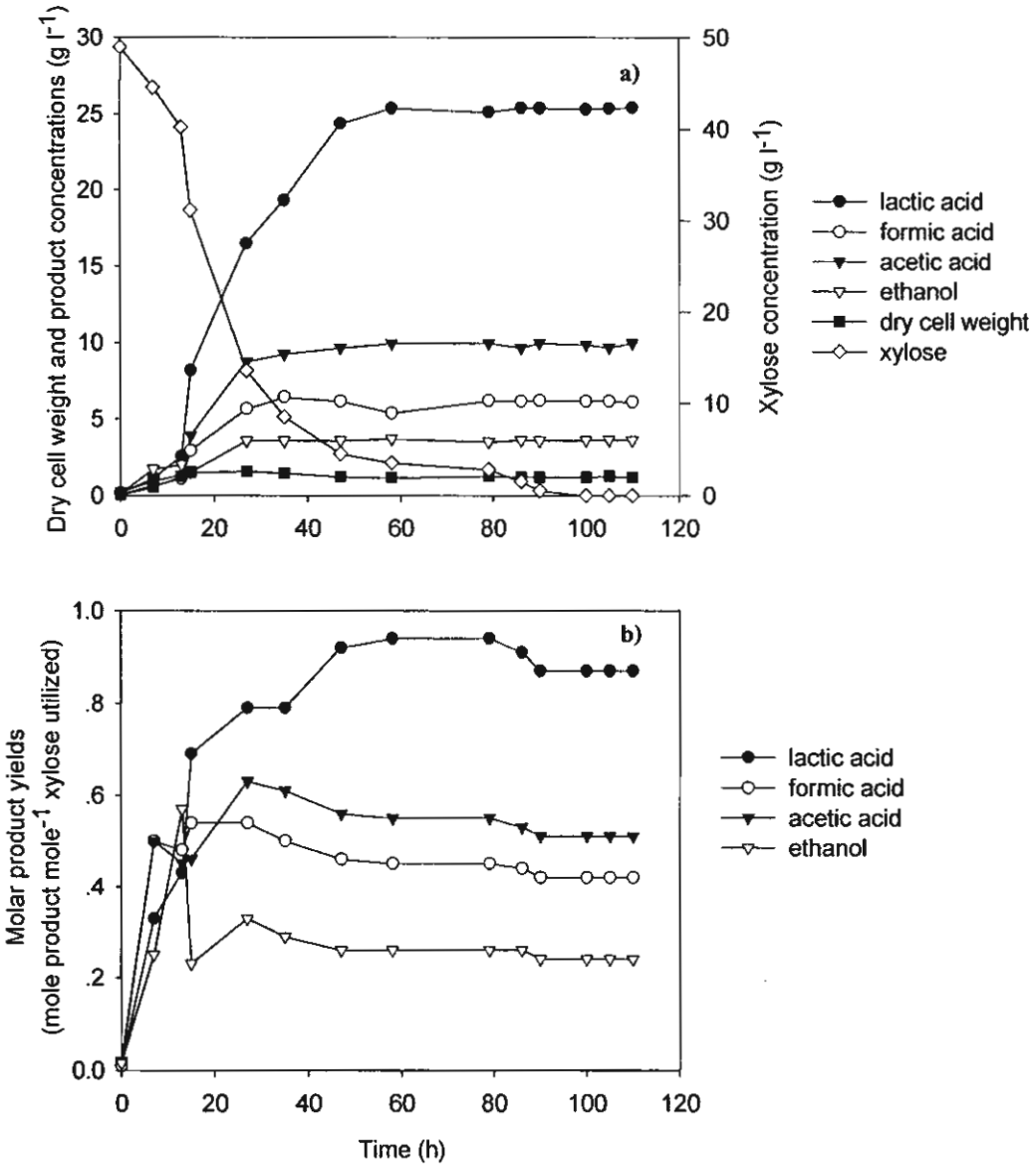
มีค่า 0.82 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 24a) ในขณะที่ผลได้ของกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล ที่เวลาดังกล่าว มีค่าเท่ากับ 0.71, 0.52, 0.64 และ 0.33 โมลต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 24b)

ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 50 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 25) ผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้อย่างรวดเร็วภายใน 50 ชั่วโมงแรกของการหมักและพบว่าน้ำตาลไซโลสถูกใช้หมดที่ 100 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นเดียวกันพบว่า เวลาในการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 นานกว่าเวลาในการใช้น้ำตาลกลูโคสถึง 2.5 เท่า (ภาพที่ 20a) ปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอลมีค่า 25.32, 6.16, 9.87 และ 3.61 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 1.21 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 25a) ในขณะที่ผลได้ของกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล มีค่า 0.84, 0.41, 0.50 และ 0.24 โมลต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 25b)

จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกแบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) พบว่า *Lc. lactis* IO-1 ไม่ผลิต 2,3-บิวเทนไดออล นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ผลิตขึ้นในระหว่างกระบวนการมีค่าต่ำ คือมีค่าเท่ากับ 0.04, 0.90, 5.50 และ 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 24 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 30 กรัมต่อลิตร เมื่อ a คือ ความเข้มข้นของเซลล์แห้ง ผลิตภัณฑ์ และน้ำตาลไซโลส และ b คือ ผลได้ของผลิตภัณฑ์



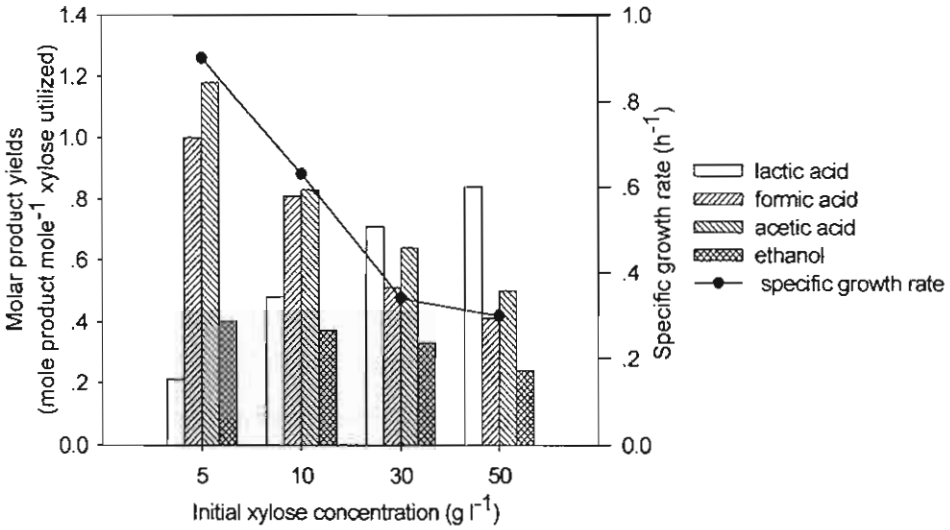
ภาพที่ 25 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 50 กรัมต่อลิตร เมื่อ a คือ ความเข้มข้นของเซลล์แห้ง ผลิตภัณฑ์ และน้ำตาลไซโลส และ b คือ ผลได้ของผลิตภัณฑ์

จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที พีเอช 6.0 ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 26) ผลการทดลองพบว่า ผลได้ของเซลล์และอัตราการเจริญจำเพาะมีค่า 0.14 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลไซโลสที่ใช้ และ 0.90 ชั่วโมง$^{-1}$ ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าผลได้ของเซลล์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้น คือมีค่า 0.09, 0.03 และ 0.02

กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลไซโลสที่ใช้ ในขณะเดียวกันอัตราการเจริญจำเพาะมีค่าลดลง 0.63, 0.34 และ 0.30 ชั่วโมง$^{-1}$ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้คล้ายกับการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในน้ำตาลกลูโคส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) นอกจากนี้พบว่าผลได้ (โมลต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้) ของกรดแลคติกเพิ่มขึ้น ในขณะที่ผลได้ของกรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอลลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสที่ใช้เพิ่มขึ้น จากการทดลองพบเปอร์เซ็นต์ carbon recovery อยู่ในช่วง 87.9-95.0

ตารางที่ 2 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสต่อผลได้ของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)

ไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของเซลล์ (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้)	อัตราการเจริญจำเพาะ (ชั่วโมง$^{-1}$)	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (โมลผลิตภัณฑ์ต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ใช้)				เปอร์เซ็นต์ carbon recovery
			กรดแลคติก	กรดฟอร์มิก	กรดอะซิติก	เอทานอล	
5	0.14	0.90	0.21	1.0	1.18	0.40	95.0
10	0.09	0.63	0.48	0.81	0.83	0.37	93.4
30	0.03	0.34	0.71	0.52	0.64	0.33	91.6
50	0.02	0.30	0.84	0.41	0.50	0.24	87.9



ภาพที่ 26 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (molar product yields) และอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ

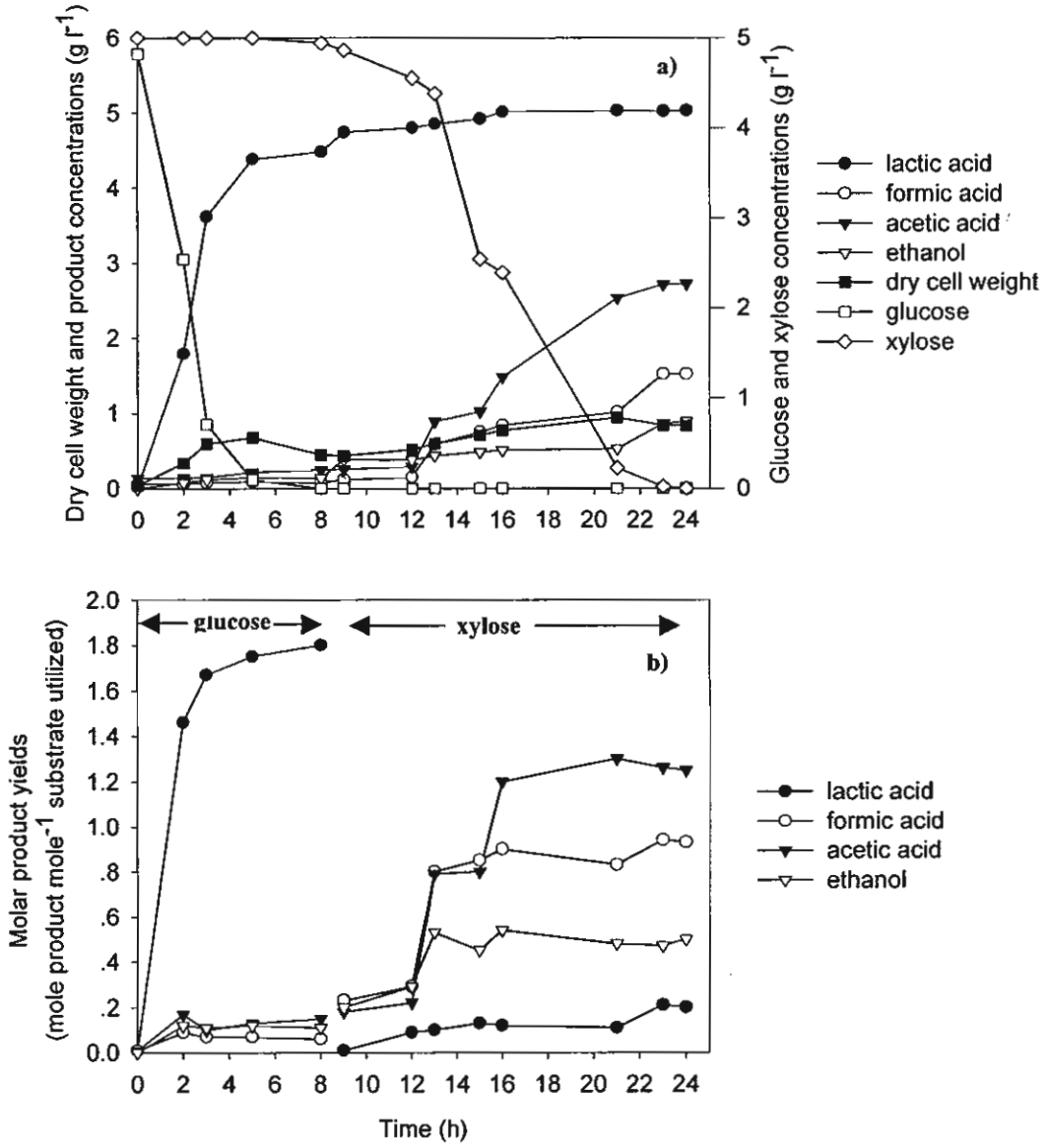
4.3 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)

การทดลองนี้ศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคส และไซโลสที่มีความเข้มข้นอย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร เพื่อจะได้ทราบถึงลักษณะการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของ *Lc. lactis* IO-1 ในสภาวะที่มีแหล่งคาร์บอน 2 ชนิด ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิดเท่ากับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสในหัวข้อ 4.1 และ 4.2 ทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเป็น 2 เท่าของการทดลองที่ 4.1 และ 4.2

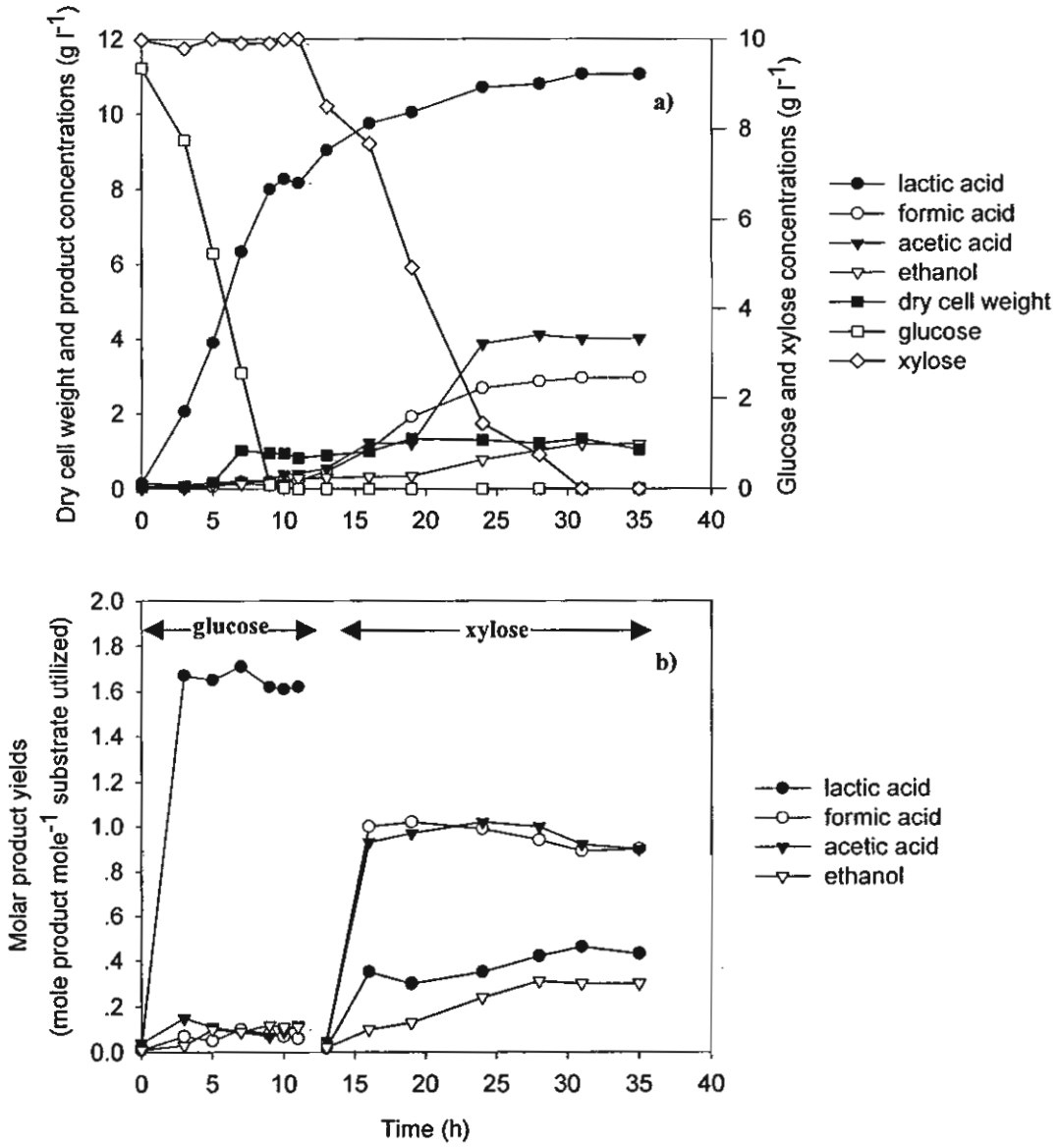
เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสความเข้มข้นอย่างละ 5 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า การเจริญของ *Lc. lactis* IO-1 เป็นแบบ diauxic โดย *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้น้ำตาลกลูโคสก่อนที่จะใช้น้ำตาลไซโลส ซึ่งน้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมดภายในเวลา 5 ชั่วโมง และที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล 4.38, 0.08, 0.22 และ 0.15 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่าเท่ากับ 0.68 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 27a) ผลได้ของกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอลมีค่า 1.75, 0.06, 0.13 และ 0.12 โมลต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 27b) เมื่อน้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมดพบว่า *Lc. lactis* IO-1 เริ่มใช้น้ำตาลไซโลสและน้ำตาลไซโลสหมดที่เวลา 23 ชั่วโมง ที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล 5.02, 1.52, 2.71 และ 0.86

กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 0.94 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 27a) ผลได้ของกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล ในช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลส มีค่าเท่ากับ 0.21, 0.94, 1.20 และ 0.47 โมลต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 27b) และพบว่าในช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลส ปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอลเพิ่มขึ้นจากช่วงที่ใช้น้ำตาลกลูโคส 0.64, 1.44, 2.49 และ 0.71 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณกรดแลคติกที่สร้างขึ้นนี้มีปริมาณต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้กลูโคส (ประมาณ 6.8 เท่า) อย่างไรก็ตามปริมาณปริมาณกรดแลคติกที่เพิ่มขึ้นนี้มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณกรดแลคติกเมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 22a)

เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสอย่างละ 10 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าการเจริญของ *Lc. lactis* IO-1 เป็นแบบ diauxic เช่นเดียวกับการเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 5 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 27a) ภายใต้สภาวะดังกล่าว *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้น้ำตาลกลูโคสหมดภายใน 10 ชั่วโมง ที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล 8.27, 0.22, 0.40 และ 0.28 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 0.95 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 28a) ผลได้ของกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล มีค่าเท่ากับ 1.64, 0.08, 0.12 และ 0.11 โมลต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 28b) เมื่อน้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมด *Lc. lactis* IO-1 เริ่มใช้น้ำตาลไซโลสและหมดที่เวลา 31 ชั่วโมง ที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล เท่ากับ 11.06, 2.95, 4.10 และ 1.20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 1.34 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 28a) ผลได้ของกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล ในช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลส มีค่าเท่ากับ 0.46, 0.89, 0.92 และ 0.3 โมลต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 28b) นอกจากนี้พบว่าเมื่อน้ำตาลไซโลสถูกใช้หมด ปริมาณกรด แลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล เพิ่มขึ้นจากช่วงที่มีการใช้น้ำตาลกลูโคส 2.79, 2.73, 3.70 และ 0.92 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณกรดแลคติกที่สร้างขึ้นมีปริมาณต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้น้ำตาลกลูโคส (ประมาณ 3 เท่า) อย่างไรก็ตามปริมาณกรดแลคติกที่เพิ่มขึ้นนี้มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณกรดแลคติกเมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลไซโลส 10 กรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 23a)



ภาพที่ 27 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและไซโลสอย่างละ 5 กรัมต่อลิตร เมื่อ a คือ ความเข้มข้นของเซลล์แห้ง ผลิตภัณฑ์ และน้ำตาลกลูโคสและไซโลส และ b คือ ผลได้ของผลิตภัณฑ์



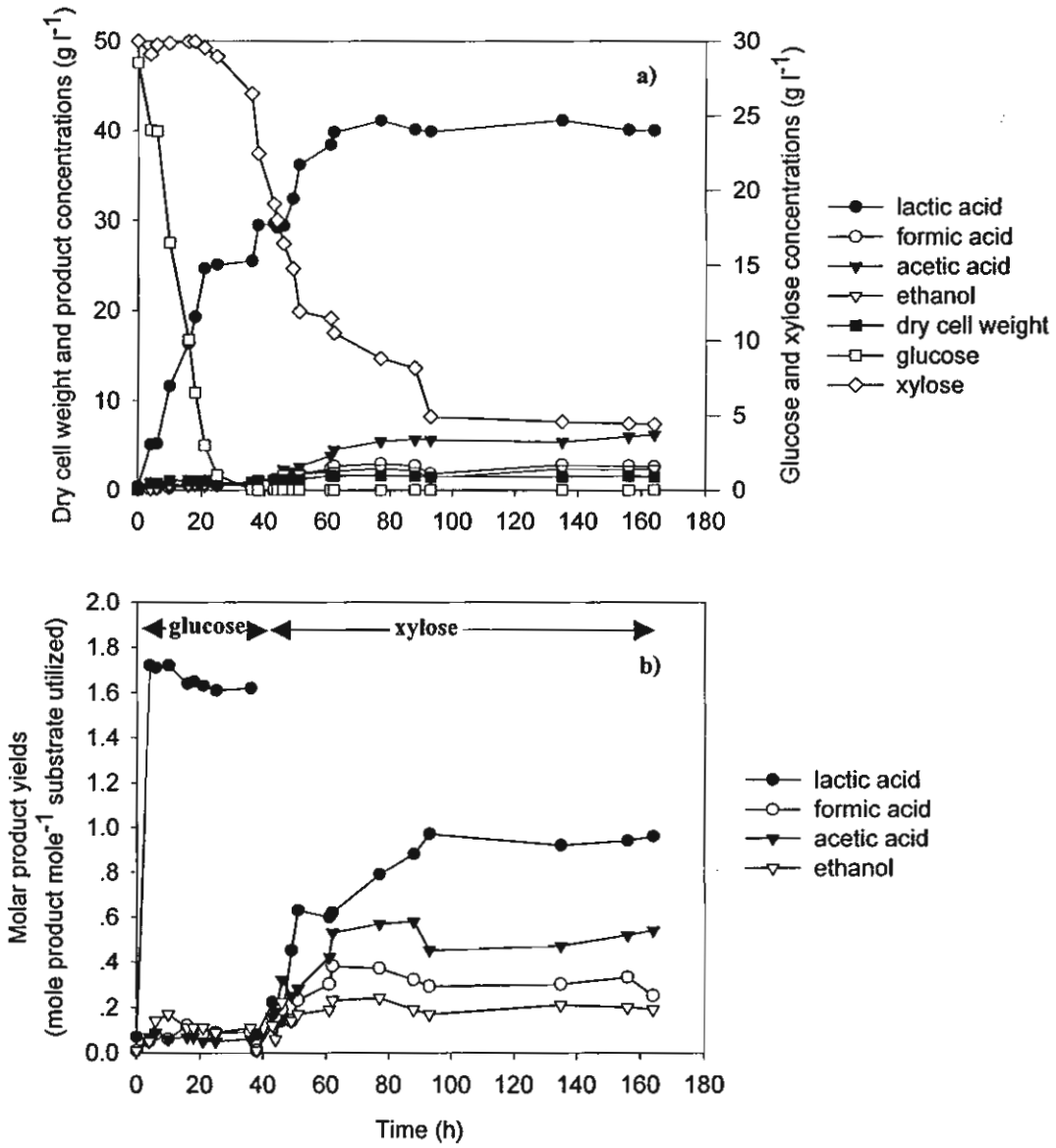
ภาพที่ 28 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและไซโลสอย่างละ 10 กรัมต่อลิตร เมื่อ a คือ ความเข้มข้นของเซลล์แห้ง ผลิตภัณฑ์ และน้ำตาลกลูโคสและไซโลส และ b คือ ผลได้ของผลิตภัณฑ์

เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสอย่างละ 30 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า *Lc . lactis* IO-1 มีการเจริญแบบ diauxic และมีการใช้น้ำตาลกลูโคสก่อนที่จะใช้น้ำตาลไซโลส โดยน้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมดหลังจากชั่วโมงที่ 21 และที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล 24.65, 0.73, 0.80 และ 0.85 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 1.05 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 29a) ผลได้ของกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล มีค่าเท่ากับ 1.63, 0.09, 0.08 และ 0.11 โมลต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 29b) เมื่อน้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมดพบว่า *Lc. lactis* IO-1 เริ่มใช้น้ำตาลไซโลส จนกระทั่งหลังจากชั่วโมงที่ 93 พบว่าปริมาณน้ำตาลไซโลสมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย (จนถึงที่เวลา 164 ชั่วโมง พบปริมาณน้ำตาลไซโลสเหลืออยู่เพียง 4.4 กรัมต่อลิตร) ที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล 39.89, 2.66, 6.38 และ 2.35 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.50 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 29a) ผลได้ของกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล ในช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลส มีค่าเท่ากับ 0.99, 0.25, 0.54 และ 0.19 โมลต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 29b) และพบว่าที่ชั่วโมงที่ 93 *Lc. lactis* IO-1 มีการสร้างกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอลเพิ่มขึ้นจากช่วงที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 15.24, 1.93, 5.58 และ 1.50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณกรดแลคติกที่สร้างขึ้นนี้มีปริมาณต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงที่ *Lc.lactis* IO-1 มีการใช้น้ำตาลกลูโคส (ประมาณ 1.6 เท่า) อย่างไรก็ตามปริมาณกรดแลคติกที่ที่เพิ่มขึ้นมีค่าสูงกว่าปริมาณกรดแลคติกเมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลไซโลส 30 กรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียวประมาณ 2.5 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 24a)

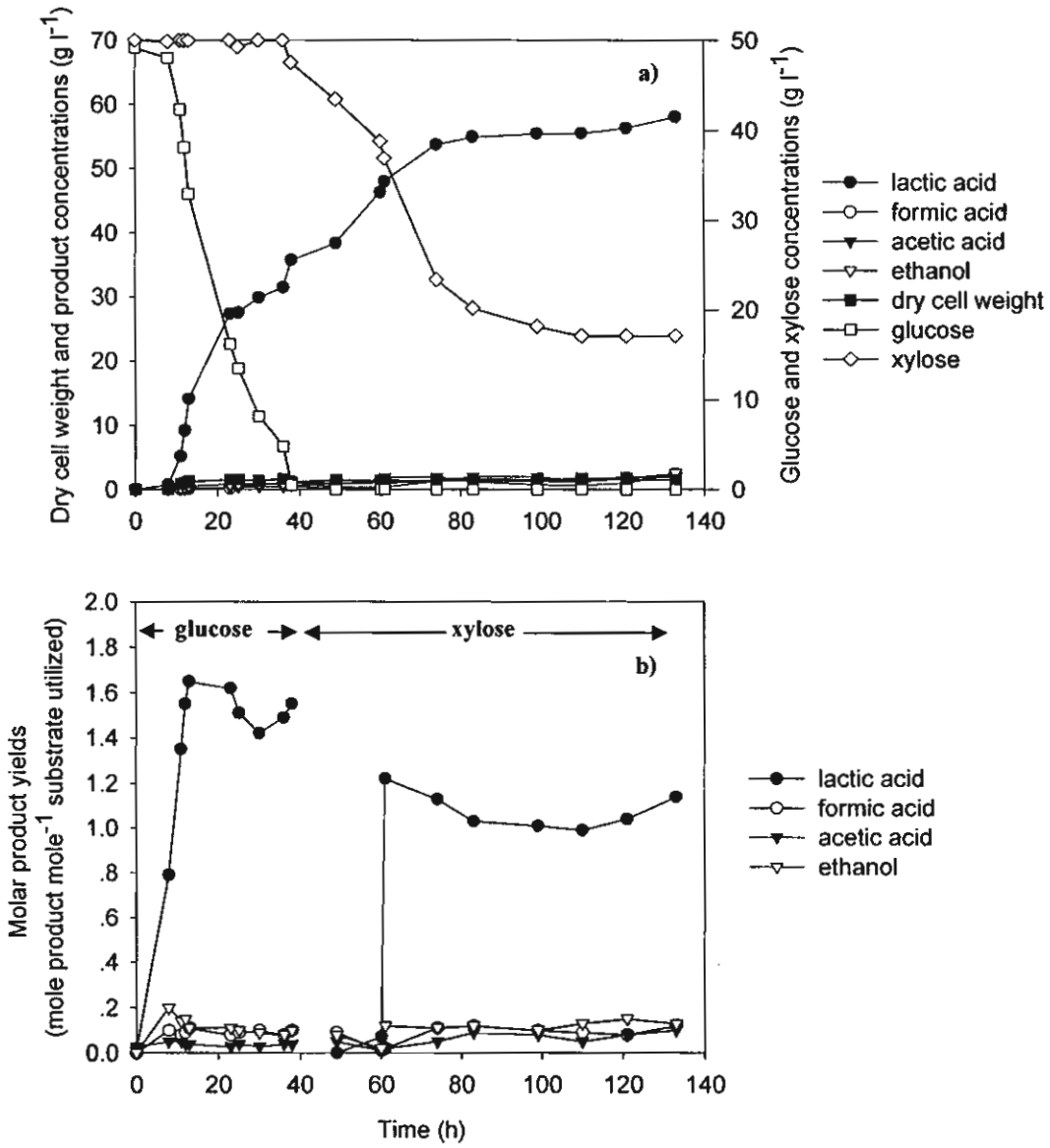
เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสอย่างละ 50 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการเจริญแบบ diauxic และ *Lc. lactis* IO-1 ยังคงใช้น้ำตาลกลูโคสก่อนน้ำตาลไซโลส โดยน้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมดหลังจากชั่วโมงที่ 38 ที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล 38.75, 1.28, 0.67 และ 1.28 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.21 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 30a) ผลได้ของกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล มีค่าเท่ากับ 1.55, 0.10, 0.04 และ 0.10 โมลต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 30b) เมื่อน้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมด น้ำตาลไซโลสจึงเริ่มถูกใช้และที่ชั่วโมงที่ 133 พบว่ามีน้ำตาลไซโลสเหลืออยู่ 17.13 กรัมต่อลิตร ที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล เท่ากับ 61.15, 2.49, 1.96 และ 2.59 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.51 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 30a) ผลได้ของกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล ในช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลส มีค่าเท่ากับ 1.14, 0.12, 0.10 และ 0.13 โมลต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 30b) และพบว่าที่ชั่วโมงที่ 133 ปริมาณกรด แลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอลเพิ่มขึ้นจากช่วงที่ใช้น้ำตาลกลูโคส 22.40, 1.21, 1.29 และ 1.31 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณกรดแลคติกที่สร้างขึ้นนี้มีปริมาณต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงที่ *Lc.lactis* IO-1 มีการใช้น้ำตาลกลูโคส (ประมาณ 1.7 เท่า) อย่างไรก็ตามปริมาณกรดแลคติกที่เพิ่มขึ้นมีค่าสูงกว่าปริมาณกรดแลคติกเมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลไซโลส 50 กรัมต่อลิตร เพียงอย่างเดียวประมาณ 2.9 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 25a)

จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ พบว่า *Lc. lactis* IO-1 ไม่ผลิต 2,3-บิวเทนไดออล ในระหว่างกระบวนการ

หมัก และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ผลิตขึ้นมีค่าต่ำ คือมีค่าเท่ากับ 0.09, 1.14, 8.13 และ 9.65 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 29 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและไซโลสอย่างละ 30 กรัมต่อลิตร เมื่อ a คือ ความเข้มข้นของเซลล์แห้ง ผลิตภัณฑ์ และน้ำตาลกลูโคสและไซโลส และ b คือ ผลได้ของผลิตภัณฑ์



ภาพที่ 30 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและไซโลสอย่างละ 50 กรัมต่อลิตร เมื่อ a คือ ความเข้มข้นของเซลล์แห้ง ผลิตภัณฑ์ และน้ำตาลกลูโคสและไซโลส และ b คือ ผลได้ของผลิตภัณฑ์

จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและไซโลสที่แปรผันความเข้มข้น (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที พีเอช 6.0 ผลการทดลอง พบว่าการใช้น้ำตาลผสมของ *Lc. lactis* IO-1 เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์เฉพาะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 5 และ 10 กรัมต่อลิตร เท่านั้น ในขณะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 30 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่า *Lc. lactis* IO-1 ไม่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสมได้หมด ซึ่งเหลือน้ำตาลไซโลส 4.4 และ 17.13 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

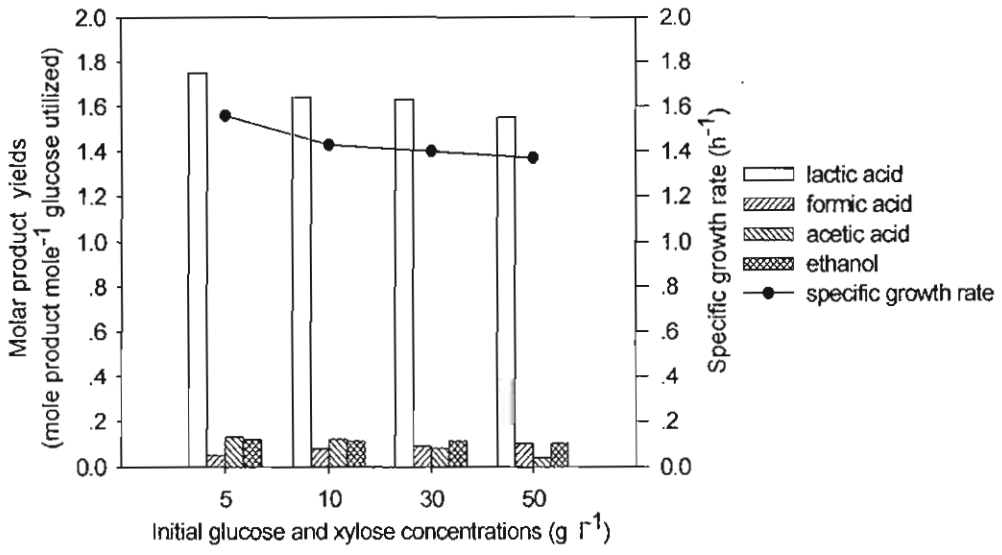
ตารางที่ 3 และภาพที่ 31 แสดงผลได้ของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ ผลได้ของผลิตภัณฑ์และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery ในช่วงของการใช้น้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลส ในขณะที่ตารางที่ 4 และภาพที่ 32 แสดงผลได้ของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ ผลได้ของผลิตภัณฑ์และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery ในช่วงของการใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลส ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมเริ่มต้นอย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร

จากตารางที่ 3 และภาพที่ 31 พบว่าผลได้ของเซลล์สูงสุดมีค่า 0.14 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 5 กรัมต่อลิตร และผลได้ของเซลล์มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลผสมเพิ่มขึ้น คือมีค่า 0.10, 0.04 และ 0.02 กรัมต่อกรัมของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ อัตราการเจริญจำเพาะมีค่า 1.56, 1.43, 1.40 และ 1.37 ชั่วโมง$^{-1}$ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลได้ (โมลต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้) ของกรดแลคติกและกรดอะซิติกลดลง ในขณะที่ผลได้ของกรดฟอร์มิกเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ในน้ำตาลผสมเพิ่มขึ้น ส่วนผลได้ของเอทานอลมีค่าไม่แตกต่างกัน ส่วนเปอร์เซ็นต์ carbon recovery อยู่ในช่วง 83.9-97.1 นอกจากนี้ยังพบว่า ผลได้ของกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอลที่ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลผสมมีค่าใกล้เคียงกันกับค่าที่ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 1)

เมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลผสม (ตารางที่ 4 และภาพที่ 32) พบว่าผลได้ของเซลล์สูงสุดมีค่า 0.05 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 5 กรัมต่อลิตร ผลได้ของเซลล์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลผสมเพิ่มมากขึ้น คือมีค่า 0.04, 0.02 และ 0.01 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการเจริญจำเพาะมีค่าลดลง คือมีค่า 0.76, 0.30 0.26 และ 0.07 ชั่วโมง$^{-1}$ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลได้ (โมลต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้) ของกรดแลคติกมีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่ผลได้ของกรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอลมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสที่ใช้ในน้ำตาลผสมเพิ่มมากขึ้น ส่วนเปอร์เซ็นต์ carbon recovery อยู่ในช่วง 80.0-98.2 ผลการทดลองที่ได้นี้คล้ายกับผลการทดลองของการเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลไซโลสเพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 3 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสต่อผลได้ของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)

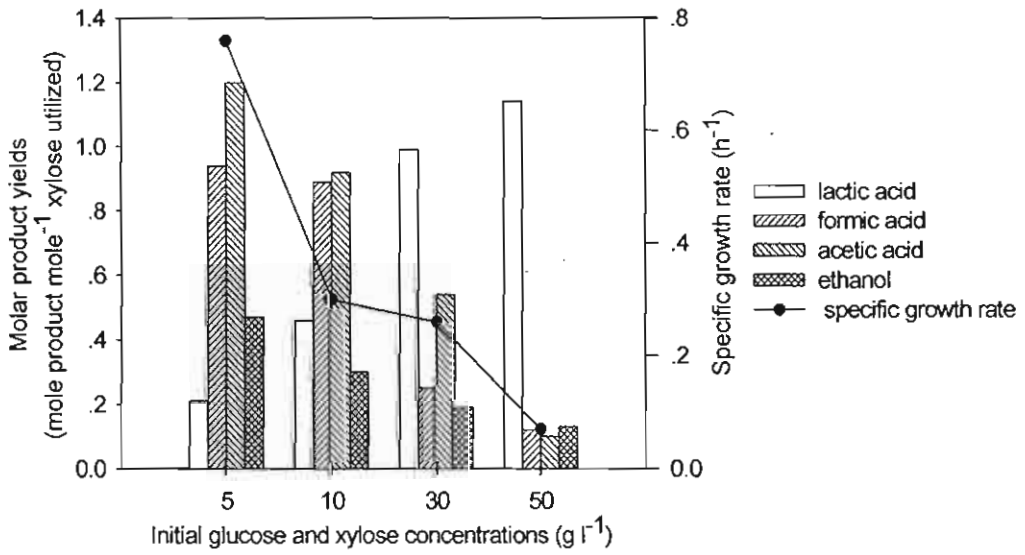
น้ำตาลผสม (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของเซลล์ (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลกลูโคสที่ใช้)	อัตราการเจริญจำเพาะ ($ชั่วโมง^{-1}$)	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (โมลผลิตภัณฑ์ต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้)				เปอร์เซ็นต์ carbon recovery
			กรดแลคติก	กรดฟอร์มิก	กรดอะซิติก	เอทานอล	
5	0.14	1.56	1.75	0.06	0.13	0.12	97.1
10	0.10	1.43	1.64	0.08	0.12	0.11	91.8
30	0.04	1.40	1.63	0.09	0.08	0.11	90.1
50	0.02	1.37	1.55	0.10	0.04	0.10	83.9



ภาพที่ 31 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (molar product yields) และอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) เมื่อ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ

ตารางที่ 4 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสต่อผลได้ของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)

น้ำตาลผสม (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของเซลล์ (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลไซโลสที่ใช้)	อัตราการเจริญจำเพาะ ($ชั่วโมง^{-1}$)	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (โมลผลิตภัณฑ์ต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ใช้)				เปอร์เซ็นต์ carbon recovery
			กรดแลคติก	กรดฟอร์มิก	กรดอะซิติก	เอทานอล	
5	0.05	0.76	0.21	0.94	1.20	0.47	98.2
10	0.04	0.30	0.46	0.89	0.92	0.30	94.2
30	0.02	0.26	0.99	0.25	0.54	0.19	93.6
50	0.01	0.07	1.14	0.12	0.09	0.13	80.0

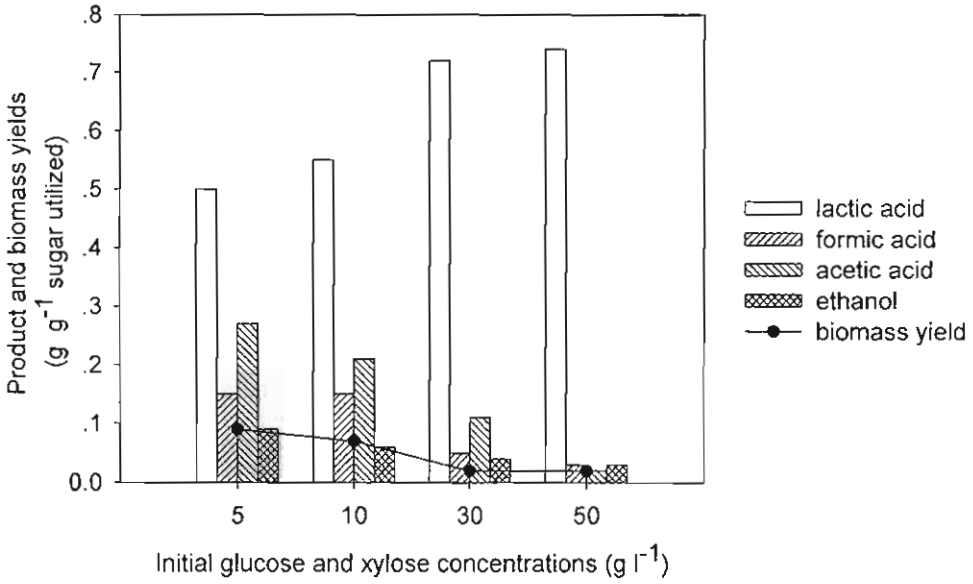


ภาพที่ 32 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (molar product yields) และอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) เมื่อ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ

ผลการทดลองในตารางที่ 5 และภาพที่ 33 พบว่า ผลได้ของเซลล์สูงสุดมีค่า 0.09 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลผสมที่ถูกใช้ และผลได้ของเซลล์มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลผสมเพิ่มขึ้น คือมีค่า 0.07, 0.03 และ 0.02 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลผสมที่ถูกใช้ เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลผสมที่ความเข้มข้นอย่างละ 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลได้ของกรดแลคติก ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 30 และ 50 กรัมต่อลิตร มีค่าใกล้เคียงกันคือ 0.72 และ 0.74 กรัมต่อกรัมของน้ำตาลผสมที่ถูกใช้ ซึ่งสูงกว่าผลได้ของกรดแลคติกที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ส่วนผลได้ (กรัมต่อกรัมของน้ำตาลผสมที่ถูกใช้) ของกรดฟอร์มิกที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 5 และ 10 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากัน คือ 0.15 กรัมต่อกรัมของน้ำตาลผสมที่ถูกใช้ ซึ่งสูงกว่าผลได้ของกรดฟอร์มิกที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ผลได้ของกรดอะซิติกและเอทานอลลดลง เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลผสมเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าเปอร์เซ็นต์ carbon recovery อยู่ในช่วง 82.0 – 97.5 (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสต่อผลได้ของเซลล์ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลผสม (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)

น้ำตาลผสม (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของเซลล์ (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลผสมที่ใช้)	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมของน้ำตาลผสมที่ใช้)				เปอร์เซ็นต์ carbon recovery
		กรดแลคติก	กรดฟอร์มิก	กรดอะซิติก	เอทานอล	
5	0.09	0.50	0.15	0.27	0.09	97.5
10	0.07	0.55	0.15	0.21	0.06	93.0
30	0.03	0.72	0.05	0.11	0.04	91.9
50	0.02	0.74	0.03	0.02	0.03	82.0



ภาพที่ 33 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (product yield) และผลได้ของเซลล์ (biomass yield) เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)

4.4 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร)

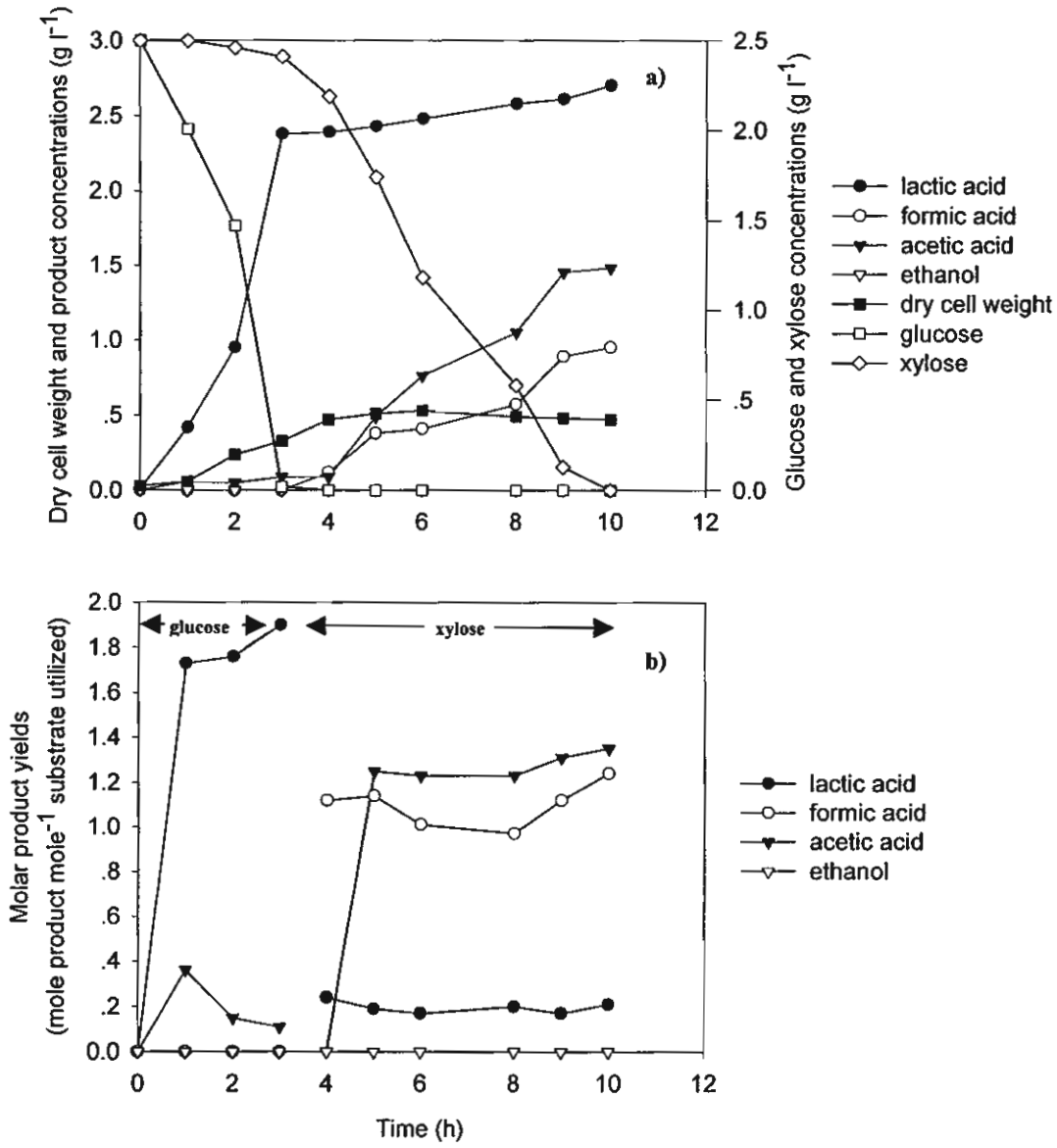
การทดลองนี้ศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคส และไซโลสที่มีความเข้มข้นอย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร เพื่อจะได้ทราบถึงลักษณะการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของ *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน 2 ชนิด ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิดเป็นครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสในหัวข้อ 4.1 และ 4.2 โดยความเข้มข้นรวมของน้ำตาลผสมจะเท่ากับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสในการทดลอง 4.1 และ 4.2

เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสกับน้ำตาลไซโลสอย่างละ 2.5 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า การเจริญของ *Lc. lactis* IO-1 เป็นแบบ diauxic ภายใต้สภาวะดังกล่าว *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสหมดภายในเวลา 3 ชั่วโมง ที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลคติกและกรดอะซิติก 2.38 และ 0.09 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 0.33 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 34a) ผลได้ของกรดแลคติกและกรดอะซิติก มีค่า 1.90 และ 0.11 โมลต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 34b) นอกจากนี้ยังพบว่าภายใต้สภาวะดังกล่าว ไม่มีการสร้างกรดฟอร์มิกและเอทานอลในช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลผสม เมื่อน้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมด *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้น้ำตาลไซโลสและหมดที่เวลา 10 ชั่วโมง ที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก 2.70, 0.95 และ 1.48 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่า 0.48 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 34a) ผลได้ของกรดแลคติก กรดฟอร์มิก และกรดอะ

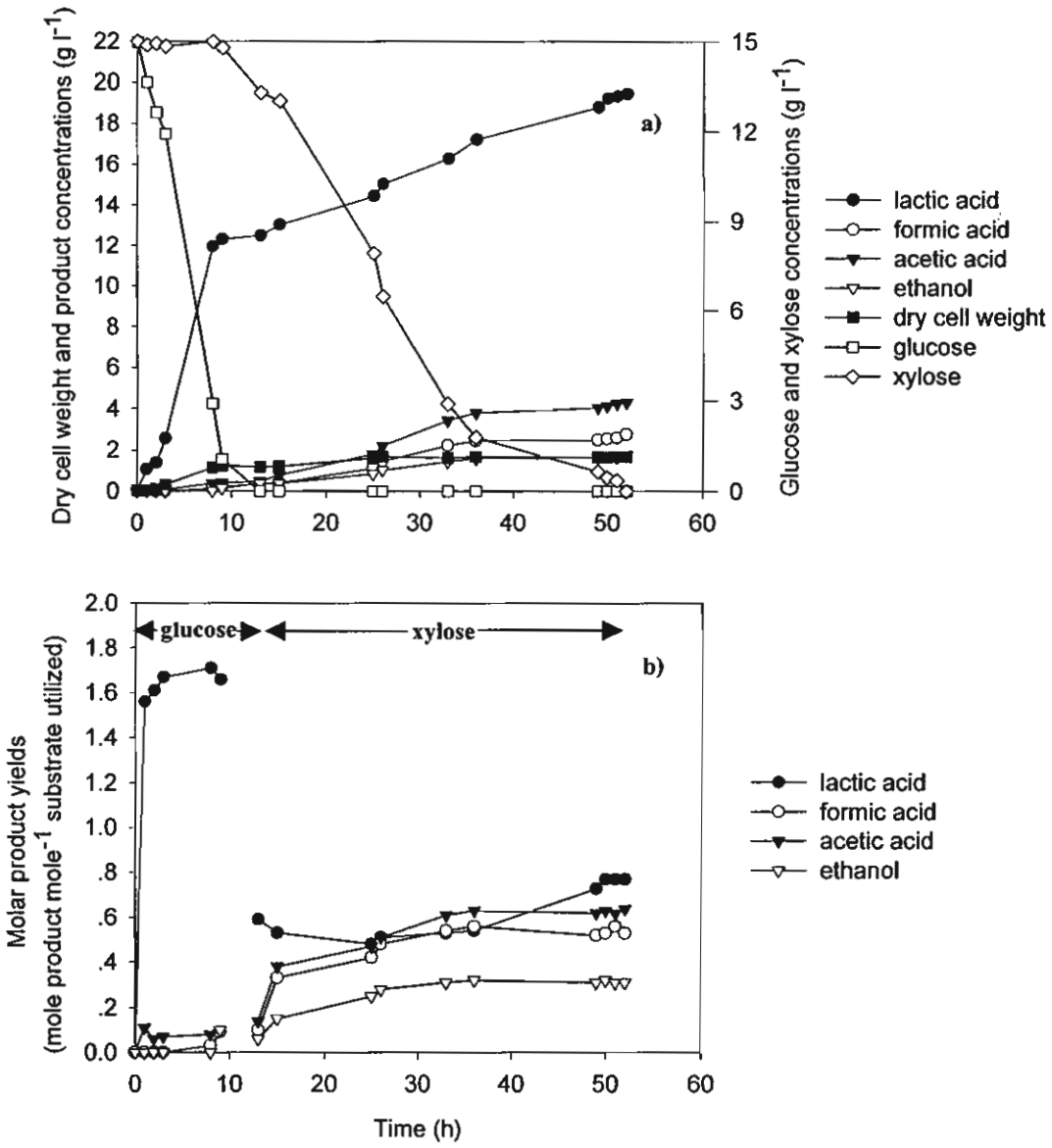
ซิติกในช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้น้ำตาลไซโลสมีค่า 0.21, 1.24 และ 1.35 โมลต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 34b) จากผลการทดลองยังพบว่าปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก ที่เพิ่มขึ้นจากช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้น้ำตาลกลูโคส มีค่า 0.32, 0.95 และ 1.39 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณกรดแลคติกที่เพิ่มขึ้นมีค่าต่ำกว่าปริมาณกรดแลคติกที่ได้จากช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้น้ำตาลกลูโคส ประมาณ 7.4 เท่า อย่างไรก็ตามภายใต้สภาวะการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลผสมที่ความเข้มข้น 2.5 กรัมต่อลิตร ไม่พบการสร้างเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมัก (ภาพที่ 34a)

ผลการทดลองภาพที่ 35 พบว่าเมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสกับไซโลสอย่างละ 15 กรัมต่อลิตร *Lc. lactis* IO-1 มีการเจริญแบบ diauxic และสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสหมดภายในเวลา 13 ชั่วโมง ที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล 12.50, 0.35, 0.48 และ 0.38 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 1.26 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 35a) ผลได้ของกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล มีค่า 1.66, 0.09, 0.10 และ 0.10 โมลต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 35b) จากนั้น *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลสและหมดที่เวลา 52 ชั่วโมง ที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล 19.43, 2.77, 4.31 และ 1.79 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่า 1.69 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 35a) ผลได้ของกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล ในช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้น้ำตาลไซโลส มีค่า 0.77, 0.53, 0.64 และ 0.31 โมลต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 35b) ปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล ที่เพิ่มขึ้นจากช่วงที่มีการใช้น้ำตาลกลูโคส มีค่า 6.93, 2.42, 3.83 และ 1.41 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณกรดแลคติกที่เพิ่มขึ้นมีค่าต่ำกว่าปริมาณกรดแลคติกที่ได้จากช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้น้ำตาลกลูโคส ประมาณ 1.8 เท่า

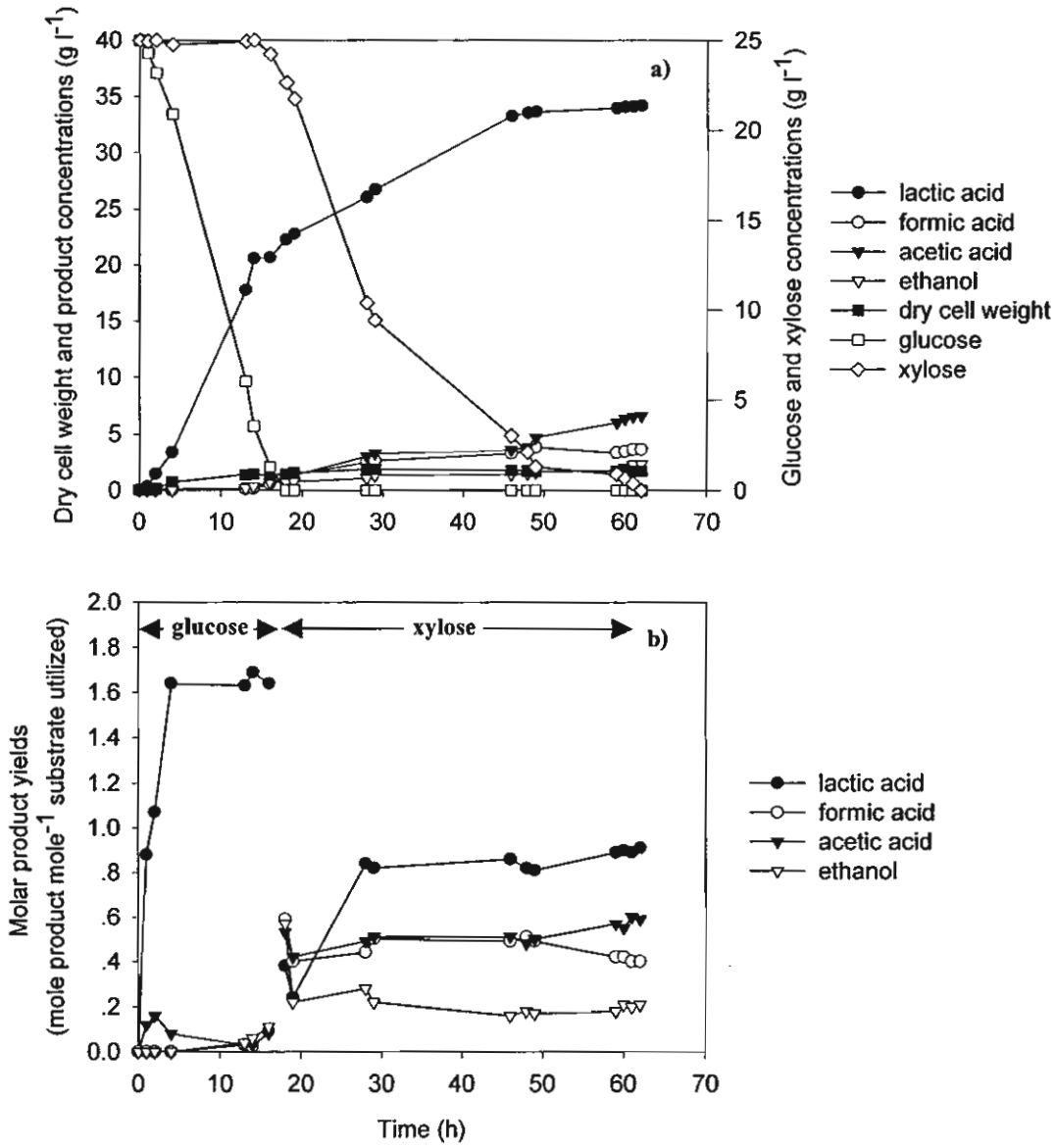
เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสกับไซโลสอย่างละ 25 กรัมต่อลิตร พบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการเจริญแบบ diauxic และสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสหมดหลังจากชั่วโมงที่ 16 ที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล 20.52, 0.55, 0.67 และ0.70 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 1.34 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 36a) ผลได้ของกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล มีค่า 1.64, 0.09, 0.08 และ 0.11 โมลต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 36b) จากนั้น *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลส และหมดที่เวลา 62 ชั่วโมง ที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล 34.2, 3.62, 6.58 และ 2.32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 1.73 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 36a) ผลได้ของกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอลในช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้น้ำตาลไซโลสมีค่า 0.91, 0.40, 0.59 และ 0.21 โมลต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 36b) ปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล ที่เพิ่มขึ้นจากช่วงที่มีการใช้น้ำตาลกลูโคสมีค่า 13.68, 3.07, 5.91 และ 1.62 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณกรดแลคติกที่เพิ่มขึ้นมีค่าต่ำกว่าปริมาณกรดแลคติกที่ได้จากช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลกลูโคส ประมาณ 1.5 เท่า



ภาพที่ 34 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและไซโลสอย่างละ 2.5 กรัมต่อลิตร เมื่อ a คือ ความเข้มข้นของเซลล์แห้ง ผลิตภัณฑ์ และน้ำตาลกลูโคสและไซโลส และ b คือ ผลได้ของผลิตภัณฑ์



ภาพที่ 35 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและไซโลสอย่างละ 15 กรัมต่อลิตร เมื่อ a คือ ความเข้มข้นของเซลล์แห้ง ผลิตภัณฑ์ และน้ำตาลกลูโคสและไซโลส และ b คือ ผลได้ของผลิตภัณฑ์



ภาพที่ 36 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและไซโลสอย่างละ 25 กรัมต่อลิตร เมื่อ a คือ ความเข้มข้นของเซลล์แห้ง ผลิตภัณฑ์ และน้ำตาลกลูโคสและไซโลส และ b คือ ผลได้ของผลิตภัณฑ์

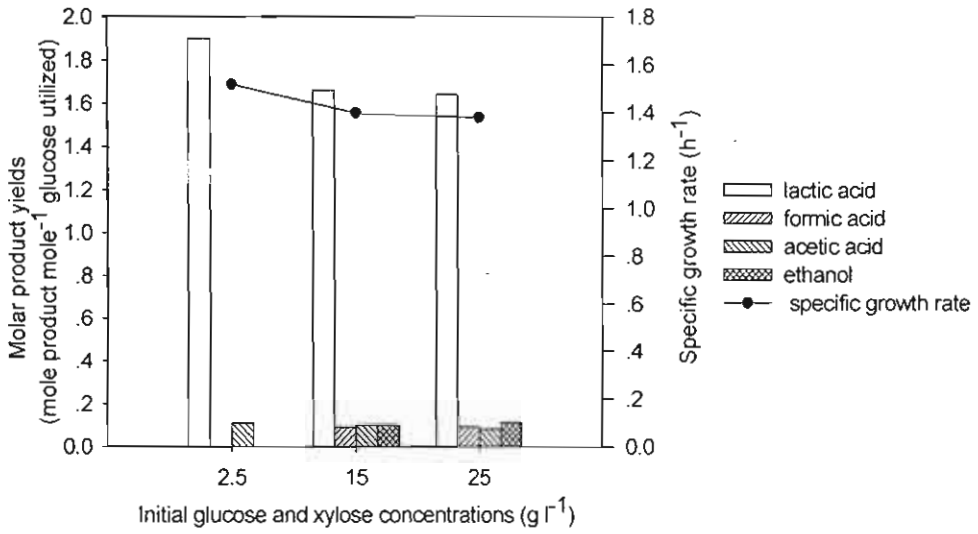
จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร) โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที พีเอช 6.0 ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ ผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลผสมได้หมดภายใต้ทุกสภาวะของการทดลอง (ภาพที่ 34-36) ตารางที่ 6 และภาพที่ 37 แสดงผลได้ของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery ในช่วงการใช้น้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลผสม ในขณะที่ตารางที่ 7 และภาพที่ 38 แสดงผลได้ของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery ในช่วงการใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร)

จากตารางที่ 6 และภาพที่ 37 พบว่า ผลได้ของเซลล์สูงสุดมีค่า 0.13 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 2.5 กรัมต่อลิตร และผลได้ของเซลล์มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลผสมเพิ่มขึ้น คือมีค่า 0.08 และ 0.05 กรัมต่อกรัมของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ และพบว่าอัตราการเจริญจำเพาะมีค่า 1.52, 1.40 และ 1.38 ชั่วโมง$^{-1}$ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลได้ (โมลต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้) ของกรดแลคติกและกรดอะซิติกมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลผสมเพิ่มขึ้น ในขณะที่ผลได้ของกรดฟอร์มิกมีค่าเท่ากัน คือ 0.09 โมลต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสม 15 และ 25 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าผลได้ของกรดฟอร์มิกที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 2.5 กรัมต่อลิตร ส่วนผลได้ของเอทานอลที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสม 15 และ 25 กรัมต่อลิตร มีค่าใกล้เคียงกัน คือ 0.10 และ 0.11 โมลต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าผลได้ของเอทานอลที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสม 2.5 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าเปอร์เซ็นต์ carbon recovery อยู่ในช่วง 90.7 – 98.8 (ตารางที่ 6)

จากตารางที่ 7 และภาพที่ 38 พบว่าผลได้ของเซลล์สูงสุดมีค่า 0.06 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสม 2.5 กรัมต่อลิตร และผลได้ของเซลล์มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลผสมเพิ่มขึ้น คือมีค่า 0.03 และ 0.02 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ นอกจากนี้อัตราการเจริญจำเพาะมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลผสมเพิ่มขึ้น ผลได้ (โมลต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้) ของกรดแลคติกมีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่ผลได้ของกรดฟอร์มิกและกรดอะซิติกมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสมเพิ่มขึ้น ส่วนเปอร์เซ็นต์ carbon recovery อยู่ในช่วง 94.5–96.4 (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 6 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสต่อผลได้ของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร)

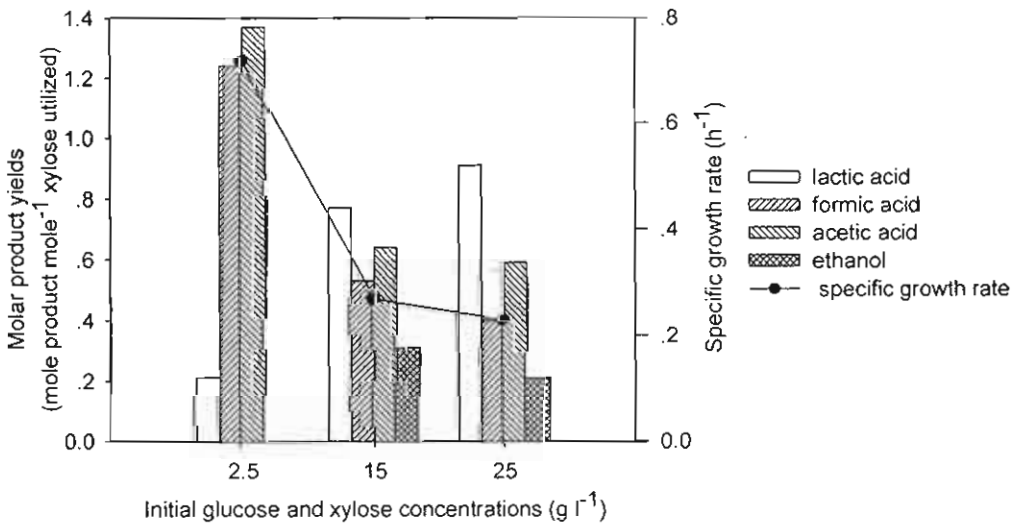
น้ำตาลผสม (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของเซลล์ (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลกลูโคสที่ใช้)	อัตราการเจริญจำเพาะ ($ชั่วโมง^{-1}$)	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (โมลผลิตภัณฑ์ต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้)				เปอร์เซ็นต์ carbon recovery
			กรดแลคติก	กรดฟอร์มิก	กรดอะซิติก	เอทานอล	
2.5	0.13	1.52	1.90	0	0.11	0	98.8
15	0.08	1.40	1.66	0.09	0.10	0.10	91.5
25	0.05	1.38	1.64	0.09	0.08	0.11	90.7



ภาพที่ 37 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (molar product yields) และอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) เมื่อ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ

ตารางที่ 7 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสต่อผลได้ของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร)

น้ำตาลผสม (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของเซลล์ (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลไซโลสที่ใช้)	อัตราการเจริญจำเพาะ ($ชั่วโมง^{-1}$)	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (โมลผลิตภัณฑ์ต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้)				เปอร์เซ็นต์ carbon recovery
			กรดแลคติก	กรดฟอร์มิก	กรดอะซิติก	เอทานอล	
2.5	0.06	0.72	0.21	1.24	1.37	0	93.2
15	0.03	0.27	0.77	0.53	0.64	0.31	94.5
25	0.02	0.23	0.91	0.40	0.59	0.21	94.8

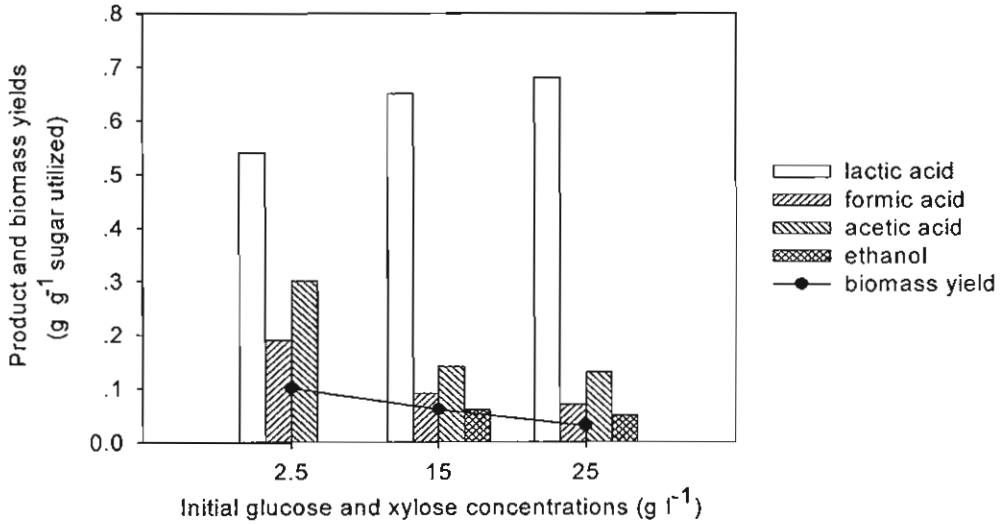


ภาพที่ 38 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (molar product yields) และอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) เมื่อ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ

เมื่อพิจารณาผลได้ของเซลล์ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery (ตารางที่ 8 และภาพที่ 39) ต่อน้ำตาลผสมที่ถูกใช้ พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 2.5 กรัมต่อลิตร ผลได้ของเซลล์สูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.10 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมของน้ำตาลผสมที่ถูกใช้ และผลได้ของเซลล์มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลผสมเพิ่มขึ้น คือมีค่า 0.06 และ 0.03 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมของน้ำตาลผสมที่ถูกใช้ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 15 และ 25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลได้ของกรดแลคติก (กรัมต่อกรัมของน้ำตาลผสมที่ถูกใช้) ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 15 และ 25 กรัมต่อลิตร มีค่าใกล้เคียงกัน และสูงกว่าผลได้ของกรดแลคติกที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 2.5 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ผลได้ของกรดฟอร์มิกและกรดอะซิติกมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลผสมเพิ่มขึ้น ส่วนผลได้ของเอทานอลที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 15 และ 25 กรัมต่อลิตร มีค่าใกล้เคียงกัน และสูงกว่าผลได้ของเอทานอลที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 2.5 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าเปอร์เซ็นต์ carbon recovery อยู่ในช่วง 92.8– 96.0 (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสต่อผลได้ของเซลล์ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลผสม (อย่างละ 2.5, 15 และ 50 กรัมต่อลิตร)

น้ำตาลผสม (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของเซลล์ (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลผสมที่ใช้)	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมของน้ำตาลผสมที่ใช้)				เปอร์เซ็นต์ carbon recovery
		กรดแลคติก	กรดฟอร์มิก	กรดอะซิติก	เอทานอล	
2.5	0.10	0.54	0.19	0.30	0	96.0
15	0.06	0.65	0.09	0.14	0.06	93.0
25	0.03	0.68	0.07	0.13	0.05	92.8



ภาพที่ 39 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (product yields) และผลได้ของเซลล์ (biomass yield) เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร)

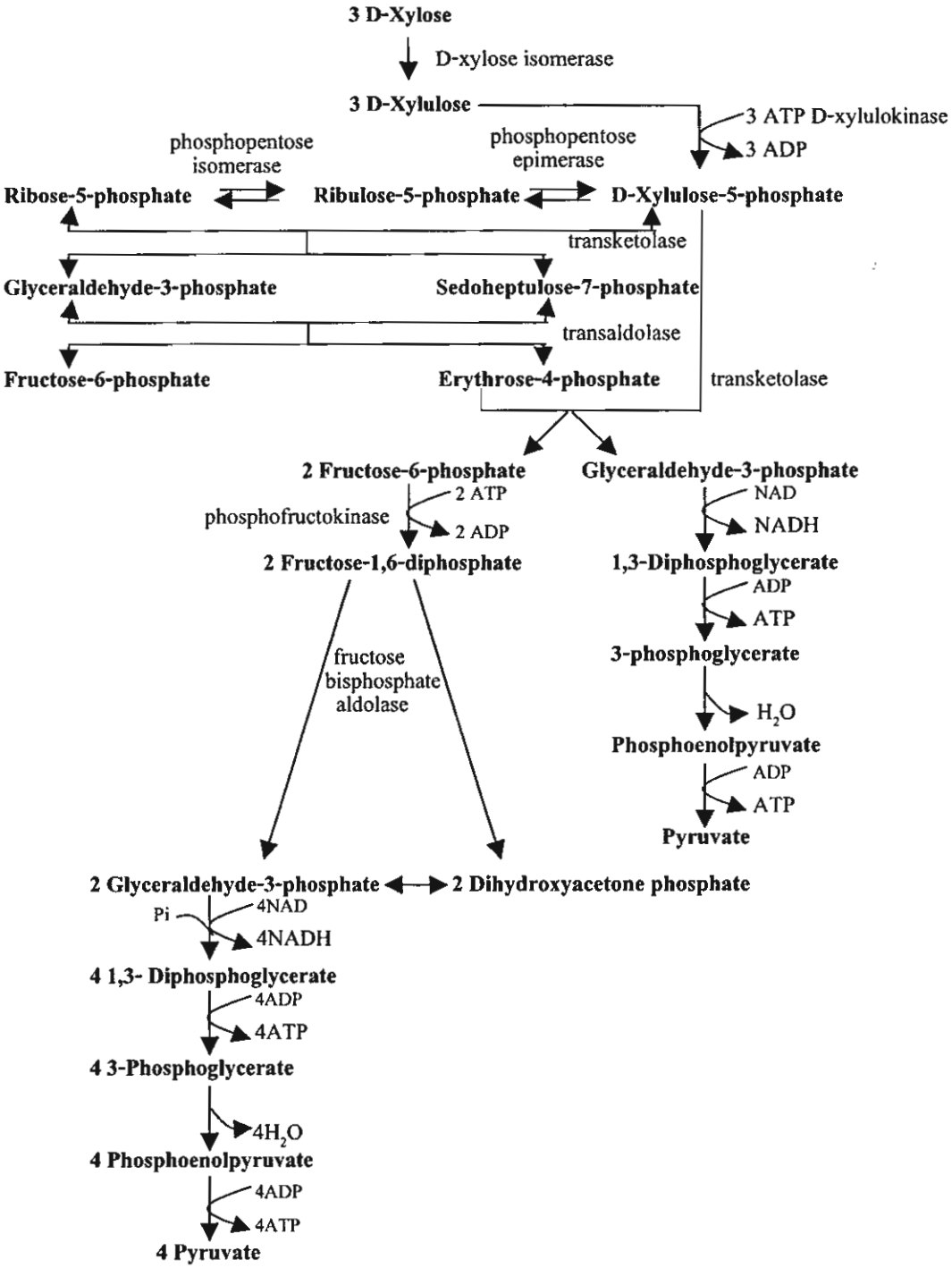
4.5 การศึกษาวิถีการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตกรดแลคติกโดย *Lc. lactis* IO-1

น้ำตาลไซโลสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่จัดอยู่ในกลุ่มของน้ำตาลเพนโตส (คาร์บอน 5 อะตอม) แลคติกแอซิดแบคทีเรียบางกลุ่มสามารถใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลคติก โดยน้ำตาลไซโลสจะถูกนำเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยระบบเพอร์มีเอส (Axelsson, 1993) จากรายงานของ Fraenkel (1987) และ Axelsson (1993) พบว่าการใช้น้ำตาลไซโลสของแลคติกแอซิดแบคทีเรียจะผ่านวิถีเพนโตสฟอสเฟต นอกจากนี้ Erlandson et al. (2000) รายงานว่าไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่ถูกสร้างขึ้นจากน้ำตาลไซโลสใน *Lc. lactis* จะถูกเมแทบอไลท์ผ่านทั้งในวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลส ซึ่งไซลูโลส-5-ฟอสเฟตเป็นสารตัวกลางที่สำคัญซึ่งพบในทั้ง 2 วิถี นอกจากนี้ยังพบว่าไพรูเวตที่ถูกสร้างขึ้นทั้งในวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลส จะถูกนำไปใช้ในการสร้างแลคเตท ฟอร์เมต อะซิเทต และเอทานอล

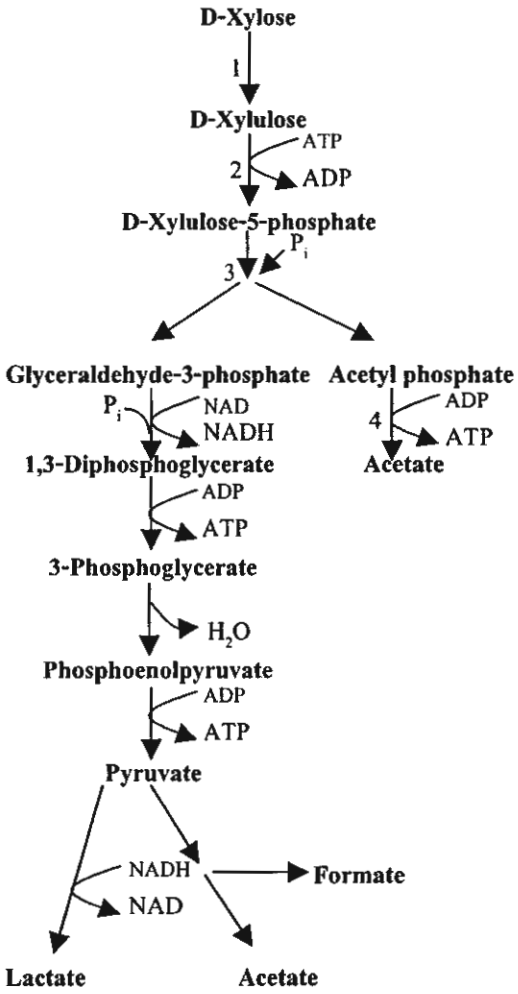
น้ำตาลไซโลสที่ถูกเมแทบอไลท์ผ่านวิถีเพนโตสฟอสเฟต จะถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลส (xylulose) โดยการทำงานของเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอเรส (xylose isomerase) จากนั้นไซลูโลสจะถูกฟอสโฟริเลต (เติมหมู่ฟอสเฟต) โดยผ่านกระบวนการฟอสโฟริเลชั่น (phosphorylation) โดยการทำงานของเอนไซม์ไซลูโลไคเนส (xylulokinase) ได้ไซลูโลส-5-ฟอสเฟต (xylulose-5-phosphate) (Erlandson et al., 2000) จากนั้นไซลูโลส-5-ฟอสเฟตจะถูกไอโซเมอไรซ์กลายเป็นไรบูโลส-5-ฟอสเฟต (ribulose-5-phosphate) และไรโบส-5-ฟอสเฟต (ribose-5-phosphate) โดยเอนไซม์ฟอสโฟเพนโตสอิพิเมอเรส (phosphopentose epimerase) และเอนไซม์ฟอสโฟเพนโตสไอโซเมอเรส (phosphopentose isomerase) ตามลำดับ ในขณะเดียวกันไซลูโลส-5-ฟอสเฟตจะถูกฟอสโฟริเลต กลายเป็นฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต และกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (คาร์บอน 3 อะตอม) โดยการทำงานของเอนไซม์ทรานส์คีโตเลส ในขณะที่ไซลูโลส-5-ฟอสเฟตสามารถทำปฏิกิริยากับไรโบส-5-ฟอสเฟตได้กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตและซิโดเฮปทูโลส-7-ฟอสเฟต (sedoheptulose-7-phosphate) โดยการทำงานของเอนไซม์ทรานส์คีโตเลส จากนั้นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตจะทำปฏิกิริยากับซิโดเฮปทูโลส-7-ฟอสเฟตเปลี่ยน เป็นฟรุกโตส-6-ฟอสเฟตและอิริโทส-4-ฟอสเฟต โดยการทำงานของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลส อิริโทส-4-ฟอสเฟตที่ถูกสร้างขึ้นจะถูกเมแทบอไลท์ไปเป็นฟรุกโตส-6-ฟอสเฟตและกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต จากนั้นฟรุกโตส-6-ฟอสเฟตจะถูกเปลี่ยนเป็นฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต โดยการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟฟรุกโตไคเนส จากนั้นฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟตจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต และไดไฮดรอกซีอะซิโตนฟอสเฟต ซึ่งเป็นน้ำตาลไตรโอสที่จะถูกนำไปใช้ในการสร้างไพรูเวต (ภาพที่ 40)

ส่วนเมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสในวิถีฟอสโฟคีโตเลส น้ำตาลไซโลสจะถูกฟอสโฟริเลตกลายเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟตโดยการทำงานของเอนไซค์ไซลูโลไคเนส (Kandler, 1983; Hahn-Hägerdal et al., 1994; Aristidou & Penttilä, 2000) จากนั้นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต จะถูกเปลี่ยนเป็นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตและอะซิติลฟอสเฟต (คาร์บอน 2 อะตอม) โดยการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส จากนั้นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตจะถูกนำไปใช้ในการสร้างไพรูเวต และไพรูเวตจะถูกนำไปใช้ในการสร้างแลคเตท ฟอร์เมต และอะซิเตท ส่วนอะซิติลฟอสเฟตจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิเตทโดยการทำงานของเอนไซม์อะซิเตทไคเนส ดังนั้นจะเห็นได้ว่าในวิถีฟอสโฟคีโตเลสมีการสร้างอะซิเตทขึ้น 2 ตำแหน่ง คือก่อนและหลังไพรูเวตเมแทบอลิซึม (ภาพที่ 41)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ทรานส์คีโตเลส และเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลสเป็นเอนไซม์หลักที่สำคัญในเมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสในวิถีเพนโตสฟอสเฟต ส่วนเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลสเป็นเอนไซม์หลักที่สำคัญที่พบเฉพาะในวิถีฟอสโฟคีโตเลสเท่านั้น ถ้าตรวจพบเอนไซม์ดังกล่าวในเซลล์ของ *Lc. lactis* IO-1 จะทำให้ทราบถึงวิถีของการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ไม่สามารถตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์คีโตเลสและเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลสเนื่องจากไม่มีไซลูโลส-5-ฟอสเฟตซึ่งเป็นสับสเตรตที่สำคัญในการตรวจหาเอนไซม์ดังกล่าว ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงตรวจหาเฉพาะเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลสและฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่สำคัญในวิถีเพนโตสฟอสเฟต



ภาพที่ 40 เมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสในวิถีเพนโตสฟอสเฟต (ดัดแปลงจาก Fraenkel, 1987)



ภาพที่ 41 เมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสในวิถีฟอสโฟคีโตเลส (pentose pathway) 1: xylose isomerase; 2: D-xylulose kinase; 3: phosphoketolase; 4: acetate kinase (ดัดแปลงจาก Kandler, 1983)

การศึกษาวิถีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสต่าง ๆ (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) โดยการตรวจวัดฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟตและเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลส ผลการทดลอง (ตารางที่ 9) พบว่า ปริมาณฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต มีค่า 1.38± 0.13, 1.95± 0.17, 3.7±0.27 และ 4.2± 0.39 (x 10^{-3}) มิลลิโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้น 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในขณะเดียวกันไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลสในเซลล์ของ *Lc. lactis* IO-1

ตารางที่ 9 ปริมาณฟรุก-1,6-ไดฟอสเฟตและแอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลสในสารละลายเซลล์สกัดของ *Lc. lactis* IO-1 ที่เลี้ยงในน้ำตาลไซโลส ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ

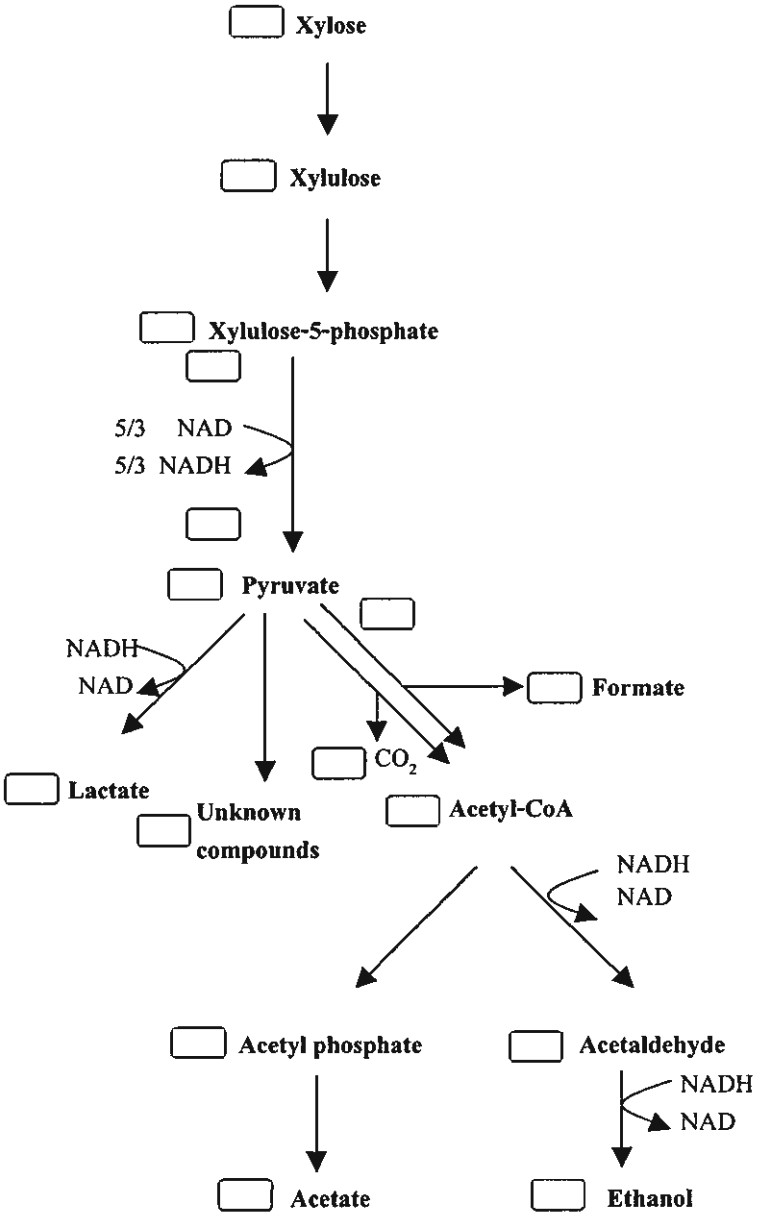
น้ำตาลไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ฟรุกโตสไดฟอสเฟต (x 10^{-3} มิลลิโมล / มิลลิกรัมเซลล์แห้ง)	แอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลส (ไมโครโมลเอ็นเอดีเอชต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน)
5	1.38± 0.13	0
10	1.95±0.17	0
30	3.70±0.27	0
50	4.20± 0.39	0

จากการศึกษาของ Laopaiboon (2001) พบว่าเมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ สามารถตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์คีโตเลสและเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส โดยแอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์คีโตเลสที่ Laopaiboon (2001) ตรวจพบมีค่า 1.26±0.83, 1.11±0.28, 0.81±0.21 และ 0.53±0.22 (x10^{-1}) ไมโครโมลเอ็นเอดีเอชต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในขณะที่แอคติวิตีของเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลสมีค่า 1.13± 0.53, 0.13±0.06, 0.15±0.03 และ 0.18±0.01 (x 10^{-1}) ไมโครโมลเอ็นเอดีเอชต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้น 5.05, 10.08, 20.94 และ 50.61 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจากผลการทดลองและข้อมูลดังกล่าวคือ การตรวจพบฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟตและพบแอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์คีโตเลสและเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส จึงสรุปได้ว่าวิถีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ จะเกิดทั้งวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลสพร้อมกัน (ภาพที่ 42 และ 43 ตามลำดับ) และเมื่อนำทั้ง 2 วิถีมารวมกันจะได้ดังภาพที่ 44 อย่างไรก็ตามการที่ตรวจไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลสซึ่งอยู่ในวิถีเพนโตสฟอสเฟต อาจเป็นเพราะวิธีที่ใช้ในการตรวจวัดเอนไซม์ดังกล่าวนี้ยังไม่ไว (sensitivity) เพียงพอ

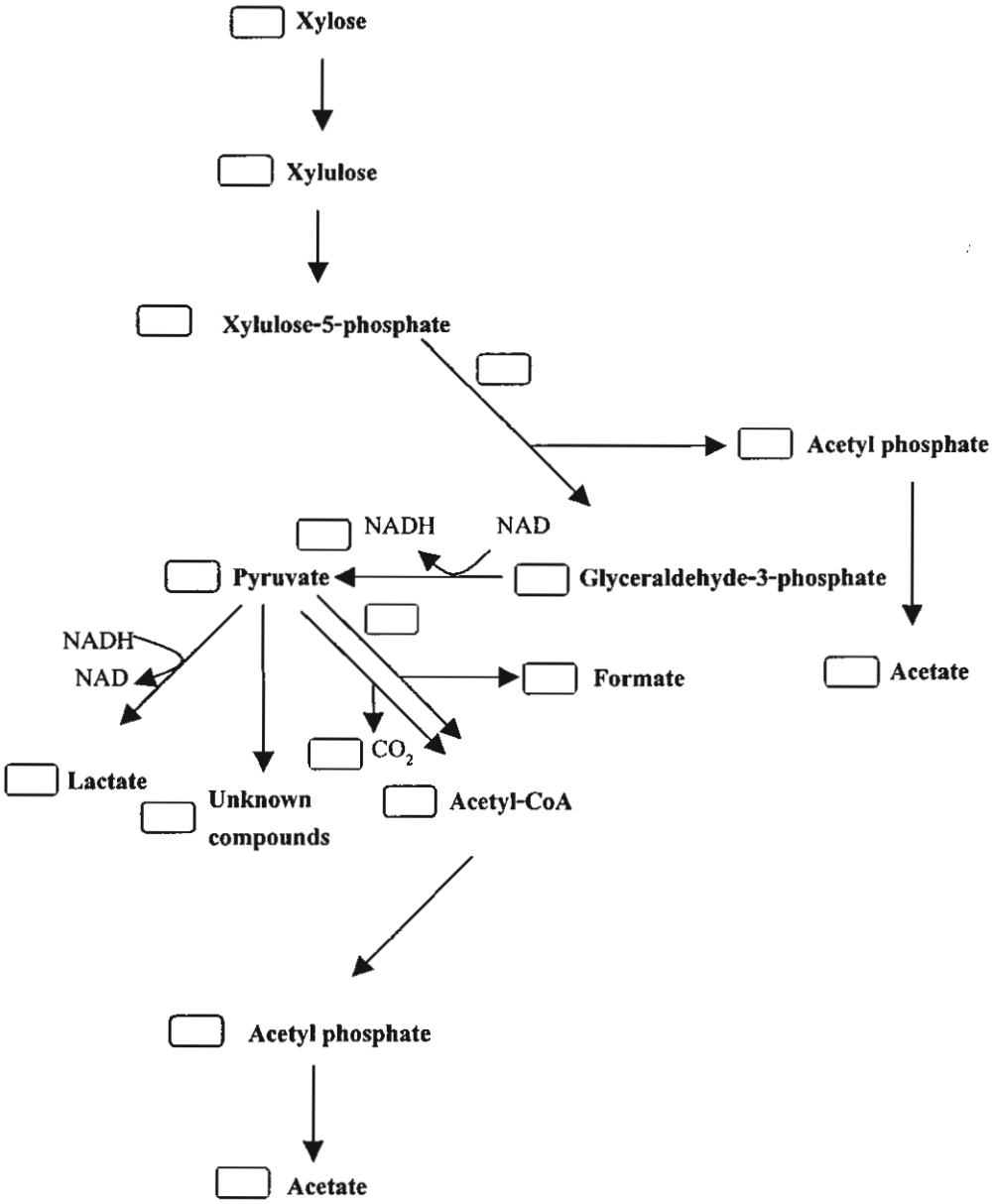
จากภาพที่ 44 แสดงวิถีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ผ่านวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลสซึ่งในทั้ง 2 วิถีจะพบว่ามีการสร้างไซลูโลส-5-ฟอสเฟตและไพรูเวตเพื่อนำไปใช้ในการสร้างแลคเตท ฟอร์เมต อะซิเตท และเอทานอล ในวิถีเพนโตสฟอสเฟตจะพบว่าไซลูโลส-5-ฟอสเฟต 3 โมลจะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวต

5 โมล (ภาพที่ 40) แต่ในวิถีฟอสโฟคีโตเลส ไซลูโลส-5-ฟอสเฟต 1 โมล จะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวต 1 โมล (ภาพที่ 41) เท่านั้น

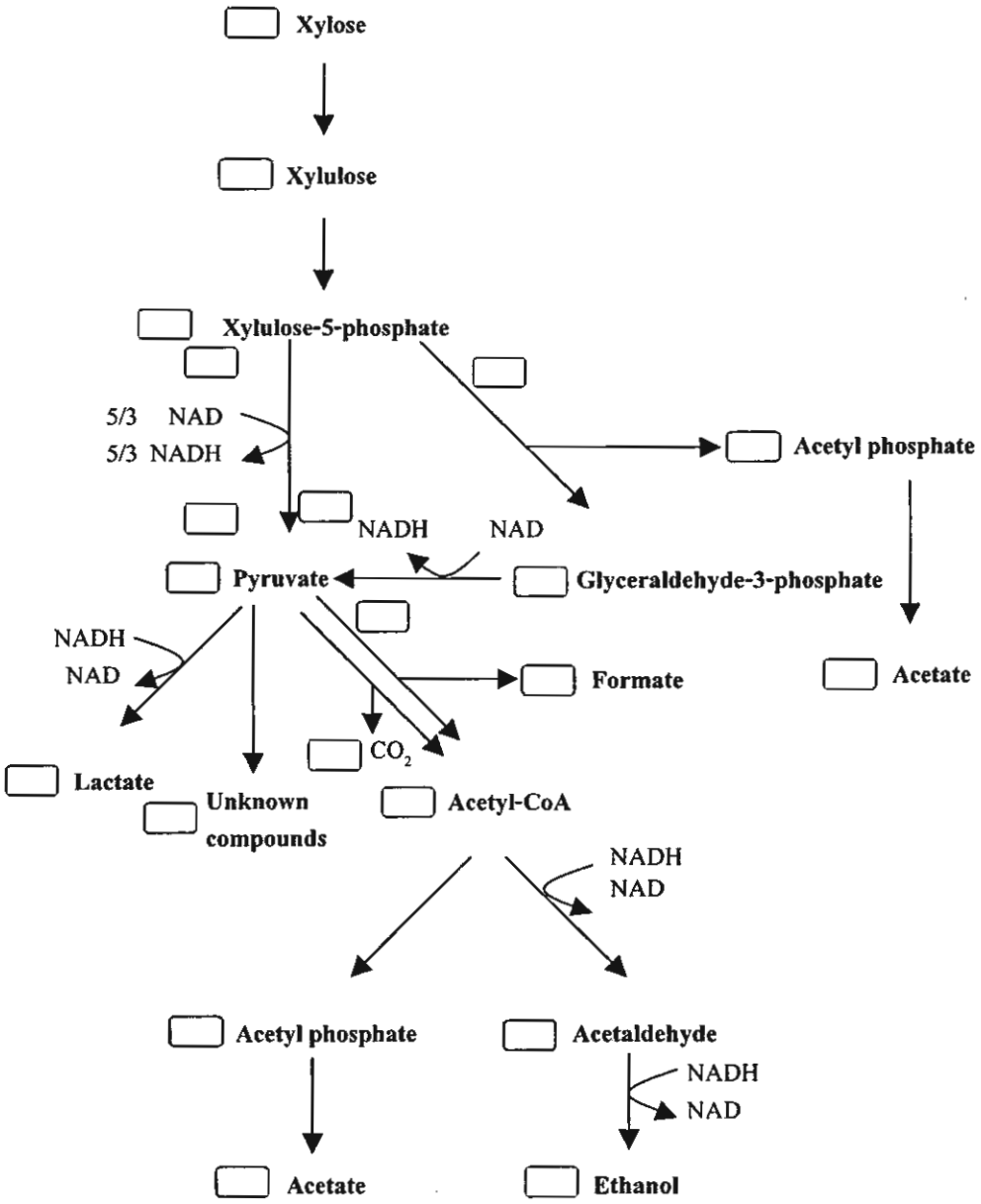
จากผลการทดลองการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) พบว่าสามารถตรวจพบปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่สร้างขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในวิถีมาจากการสร้างอะซิติล-โคเอจากการสลายไพรูเวต โดยการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวตดีไฮโดรจิเนส (pyruvate dehydrogenase; PDH) แสดงว่ามีการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวใน *Lc. lactis* IO-1 นอกจากนี้คาร์บอนไดออกไซด์สามารถถูกสร้างขึ้นจากการสลายไพรูเวตในวัฏจักรเครบส์ (Kreb's cycle หรือ TCA cycle) แต่จากการรายงานของ Cogan (1987) และ Hols et al. (1999) พบว่าไม่ปรากฏวัฏจักรเครบส์ในเมแทบอลิซึมของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ดังนั้นในการศึกษาเมแทบอลิกซ์ฟลักซ์ในการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลไซโลสจึงไม่นำวัฏจักรเครบส์เข้ามาเกี่ยวข้อง



ภาพที่ 42 วิถีเพนโตสฟอสเฟต



ภาพที่ 43 วิถีฟอสโฟคีโตเลส



ภาพที่ 44 วิถีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO1 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะในสูตรอาหารพื้นฐาน

4.6 การวิเคราะห์เมแทบอลิกซ์ฟลักซ์ในการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)

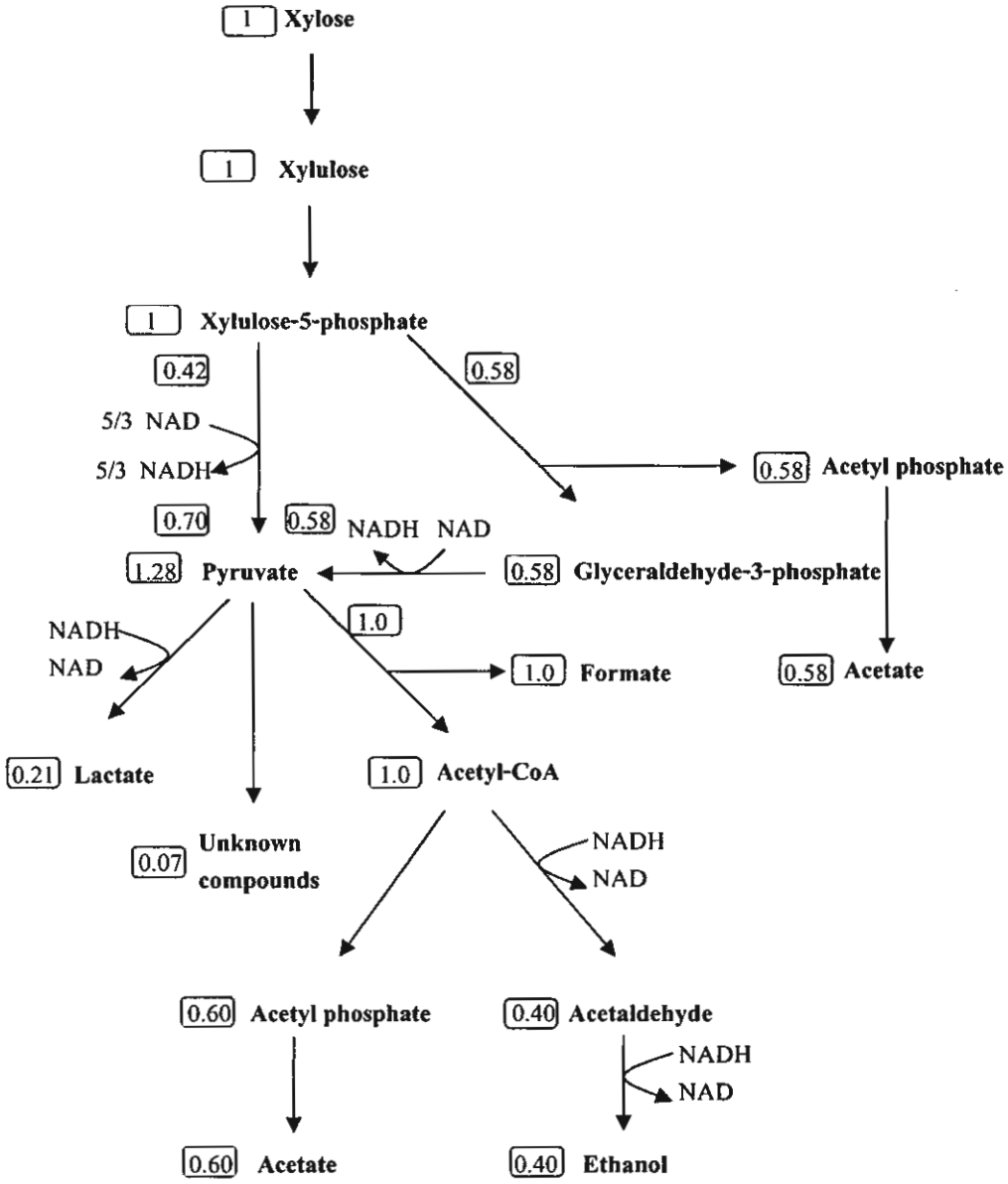
การวิเคราะห์เมแทบอลิกฟลักซ์จะอาศัยข้อมูลที่ได้จากกระบวนการหมัก ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสต่างกันโดยการวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ (กรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และ 2,3-บิวเทนไดออล) และปริมาณน้ำตาลไซโลสที่เวลาต่าง ๆ ในรูปของโมลผลิตภัณฑ์ต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ จากนั้นจะนำข้อมูลที่ได้ไปบันทึกและคำนวณในวิถีของการใช้น้ำตาลไซโลส (ภาพที่ 44) จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส พบว่าน้ำตาลไซโลสส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์ (เปอร์เซ็นต์ carbon recovery อยู่ในช่วง 87.9-95.0) ในขณะที่ผลได้ของเซลล์ (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้) มีค่าต่ำ ซึ่งจากการรายงานของ Novák & Loubière. (2000) พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่ถูกสร้างขึ้นมาจากกรดอะมิโน กรดนิวอิก และนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่ใช้ในการเจริญของแบคทีเรีย โดยสารดังกล่าวมักพบในแหล่งไนโตรเจน เช่น ยีสต์สกัด และเพปโตน เป็นต้น ส่วนปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ตรวจพบมีปริมาณน้อย ($2.7x10^{-6}$– $4x10^{-4}$ โมลต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้) นอกจากนี้ยังพบว่า *Lc. lactis* IO-1 ไม่ผลิต 2,3-บิวเทนไดออลในระหว่างกระบวนการหมักภายใต้สภาวะที่ศึกษา ดังนั้นในการวิเคราะห์เมแทบอลิกซ์ฟลักซ์ในการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลไซโลส จึงไม่นำปริมาณเซลล์ คาร์บอนไดออกไซด์ และ 2,3-บิวเทนไดออล มาใช้ในการวิเคราะห์เมแทบอลิกซ์ฟลักซ์

หลักการวิเคราะห์เมแทบอลิกซ์ฟลักซ์ในการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลไซโลส จำเป็นต้องวัดปริมาณของสับสเตรตที่ให้เข้าไปในระบบ (input) และวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ถูกสร้างขึ้น (output) ในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงในรูปของโมลผลิตภัณฑ์ต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ดังกล่าวไปบันทึกลงในวิถีของการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 การคำนวณปริมาณผลิตภัณฑ์รวมทั้งสารตัวกลางต่าง ๆ ที่ถูกสร้างขึ้นในวิถี สามารถทำได้โดยบันทึกข้อมูลของผลิตภัณฑ์ (โมลผลิตภัณฑ์ต่อโมลน้ำตาลที่ถูกใช้) ที่ทราบลงไปก่อน ซึ่งข้อมูลดังกล่าวได้จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) น้ำตาลไซโลสถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลสและไซลูโลส-5-ฟอสเฟต ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (โมลต่อโมล) สำหรับปริมาณอะซิติล-โคเอที่ถูกสร้างขึ้นมีค่าเท่ากับปริมาณของฟอร์เมตที่ได้จากการทดลอง จากนั้นอะซิติล-โคเอจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิติลฟอสเฟตและอะซิตาลดีไฮด์ ซึ่งปริมาณของอะซิตาลดีไฮด์มีค่าเท่ากับปริมาณของเอทานอลที่ได้จากการทดลอง ดังนั้นผลต่างระหว่างอะซิติล-โคเอกับอะซิตาลดีไฮด์ คือปริมาณของอะซิติลฟอสเฟตและอะซิเทตที่ถูกสร้างขึ้นหลังไพรูเวตเมแทบอลิซึม สำหรับปริมาณอะซิติลฟอสเฟตและอะซิเทตที่ถูกสร้างขึ้นก่อนไพรูเวตเมแทบอลิซึม คือผลต่างระหว่างปริมาณของอะซิเทตที่ได้จากการทดลองกับอะซิเทตที่เกิดขึ้นหลังไพรูเวตเมแทบอลิซึม และมีค่าเท่ากับปริมาณของกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตและไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่เข้าสู่วิถีฟอสโฟคีโตเลส ส่วนปริมาณไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่เข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟต คือผลต่างระหว่างปริมาณไซลูโลส-5-ฟอสเฟตเริ่มต้น (เท่ากับ 1 โมล) กับปริมาณไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่เข้าสู่วิถีฟอสโฟคีโตเลส เนื่องจากในวิถีเพนโตสฟอสเฟต ไซโลส 3 โมล ถูกนำไปใช้ในการสร้างไพรูเวต 5 โมล ดังนั้นปริมาณไพรูเวตที่ถูกสร้างขึ้นในวิถี จึงมาจากผลรวมของปริมาณไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่เข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟต (คูณ 5/3) กับปริมาณของกลีเซอรอลดีไฮด์-3-

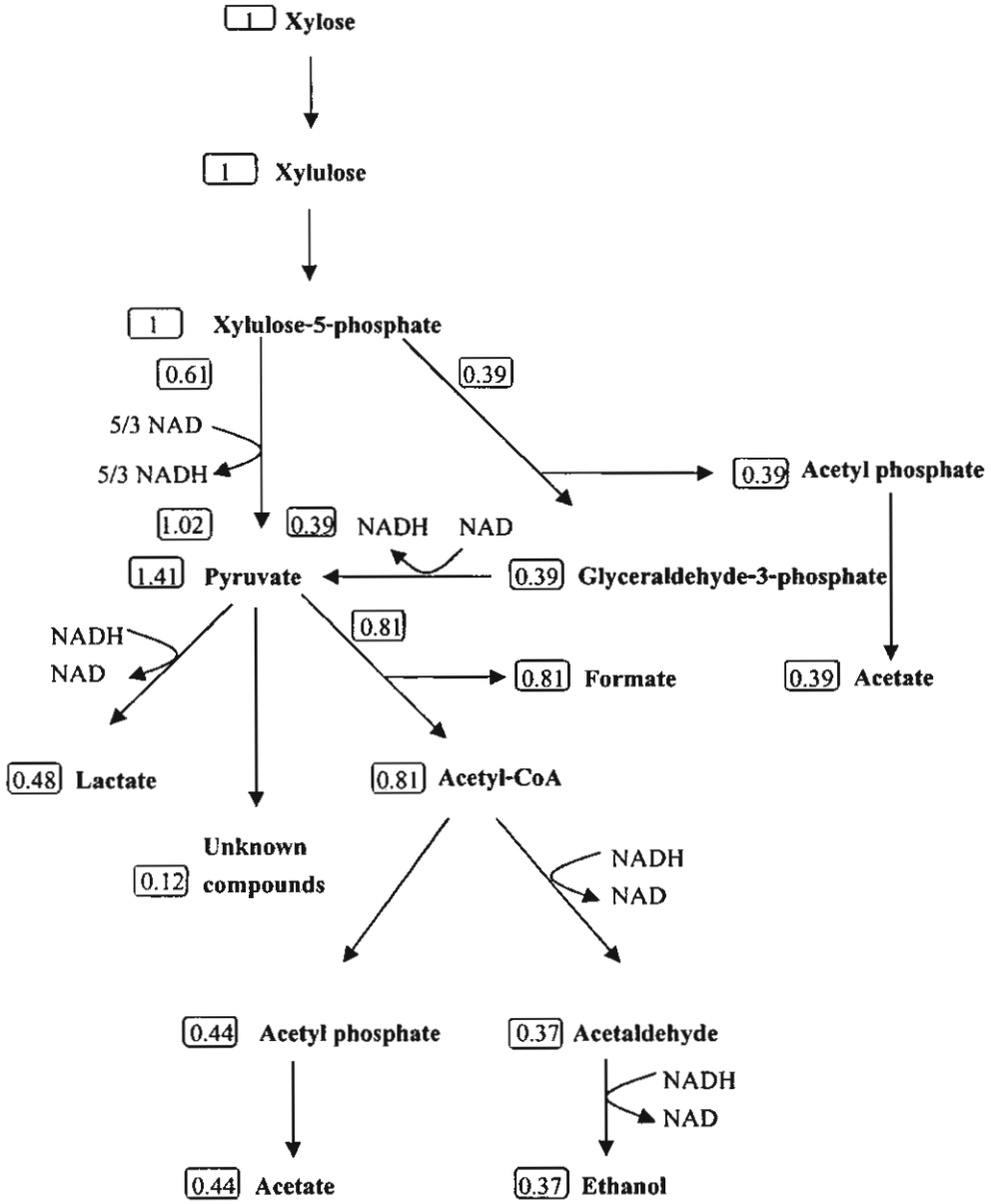
ฟอสเฟตที่ถูกสร้างขึ้น สำหรับปริมาณสารที่ไม่ได้ตรวจวัดในการทดลอง (unknown) สามารถคำนวณได้จากปริมาณของไพรูเวตที่เหลือจากการนำไปสร้างแลคเทตและอะซิติล-โคเอ

การคำนวณเมแทบอลิกฟลักซ์ในการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 45) ผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลส 1 โมลเปลี่ยนไปเป็นไซลูโลส 1 โมล จากนั้นไซลูโลสจะถูกฟอสโฟริเลตไปเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต 1 โมล ไซลูโลส-5-ฟอสเฟต 0.42 และ 0.58 โมล ถูกนำเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลส ตามลำดับ โดยน้ำตาลไซโลสเข้าสู่วิถีฟอสโฟคีโตเลสมากกว่าวิถีเพนโตสฟอสเฟต 16 เปอร์เซ็นต์ อะซิเทต 0.58 และ 0.60 โมลถูกสร้างขึ้นก่อน (pre-pyruvate) และหลังไพรูเวตเมแทบอลิซึม (post-pyruvate) ตามลำดับ จากนั้นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต 0.58 โมล และไซลูโลส-5-ฟอสเฟต 0.70 โมล ถูกนำไปใช้ในการสร้างไพรูเวต 1.28 โมล หลังไพรูเวตเมแทบอลิซึม พบ แลคเตท ฟอร์เมต เอทานอล และสารที่ไม่ได้ตรวจวัด (unknown compounds) ถูกสร้างขึ้น 0.21, 1.0, 0.40 และ 0.07 โมล ตามลำดับ (ภาพที่ 45)

ผลการทดลอง (ภาพที่ 46) การใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 10 กรัมต่อลิตร พบว่าน้ำตาลไซโลสเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตมากกว่าวิถีฟอสโฟคีโตเลส 22 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลไซโลส 1 โมล ถูกเปลี่ยนและถูกฟอสโฟริเลตไปเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต 1 โมล จากนั้นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต 0.61 และ 0.39 โมล ถูกนำเข้าสูวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลส ตามลำดับ อะซิเทต 0.39 และ 0.44 โมล ถูกสร้างขึ้นก่อนและหลังไพรูเวตเมแทบอลิซึม ตามลำดับ จากนั้นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต 0.39 โมล และไซลูโลส-5-ฟอสเฟต 1.02 โมล ถูกนำไปใช้ในการสร้างไพรูเวต 1.41 โมล หลังไพรูเวตเมแทบอลิซึม พบ แลคเตท ฟอร์เมต เอทานอล และสารที่ไม่ได้ตรวจวัด 0.48, 0.81, 0.37 และ 0.12 โมล ตามลำดับ



ภาพที่ 45 วิถีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ที่เลี้ยงในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร

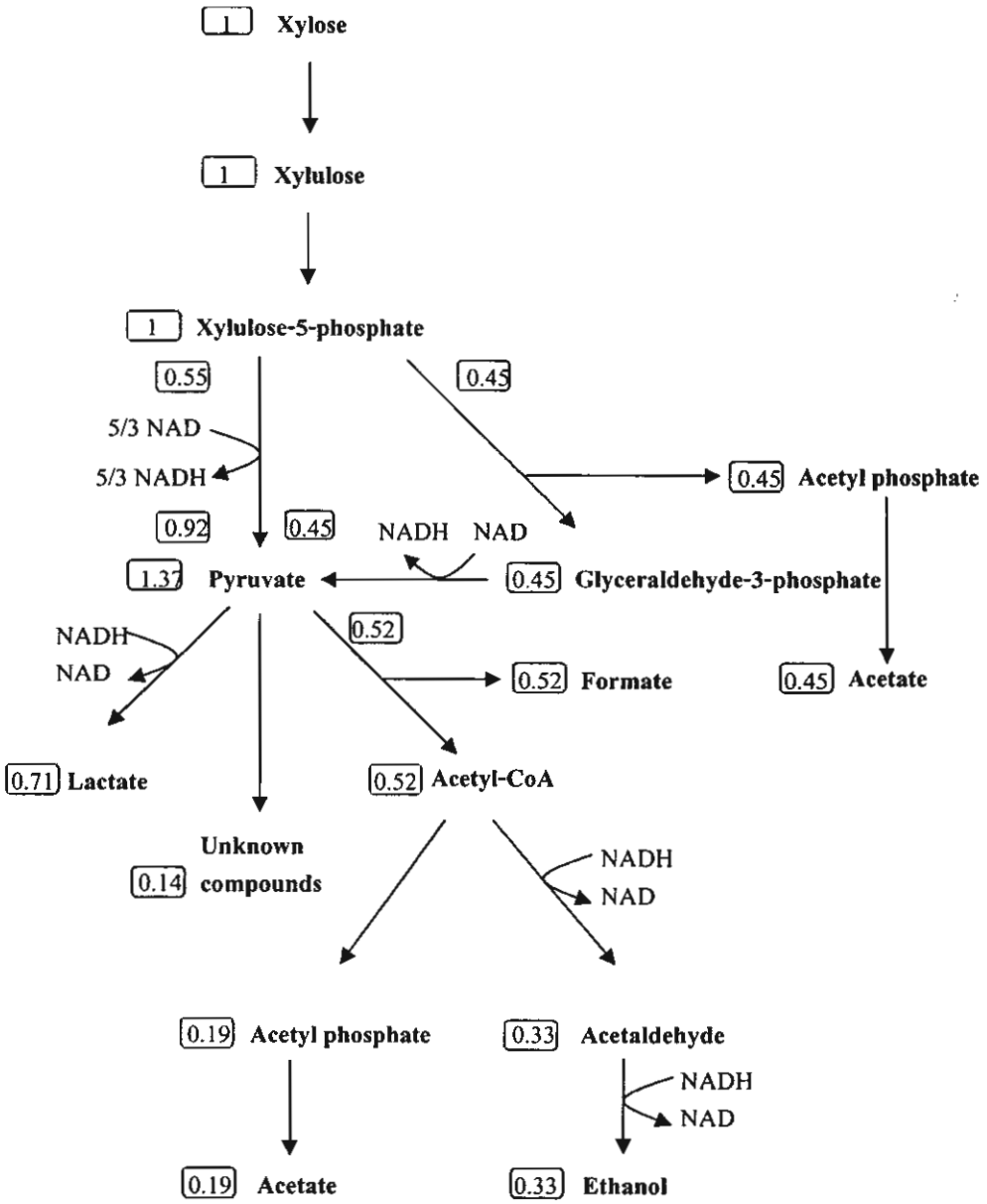


ภาพที่ 46 วิถีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ที่เลี้ยงในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 10 กรัมต่อลิตร

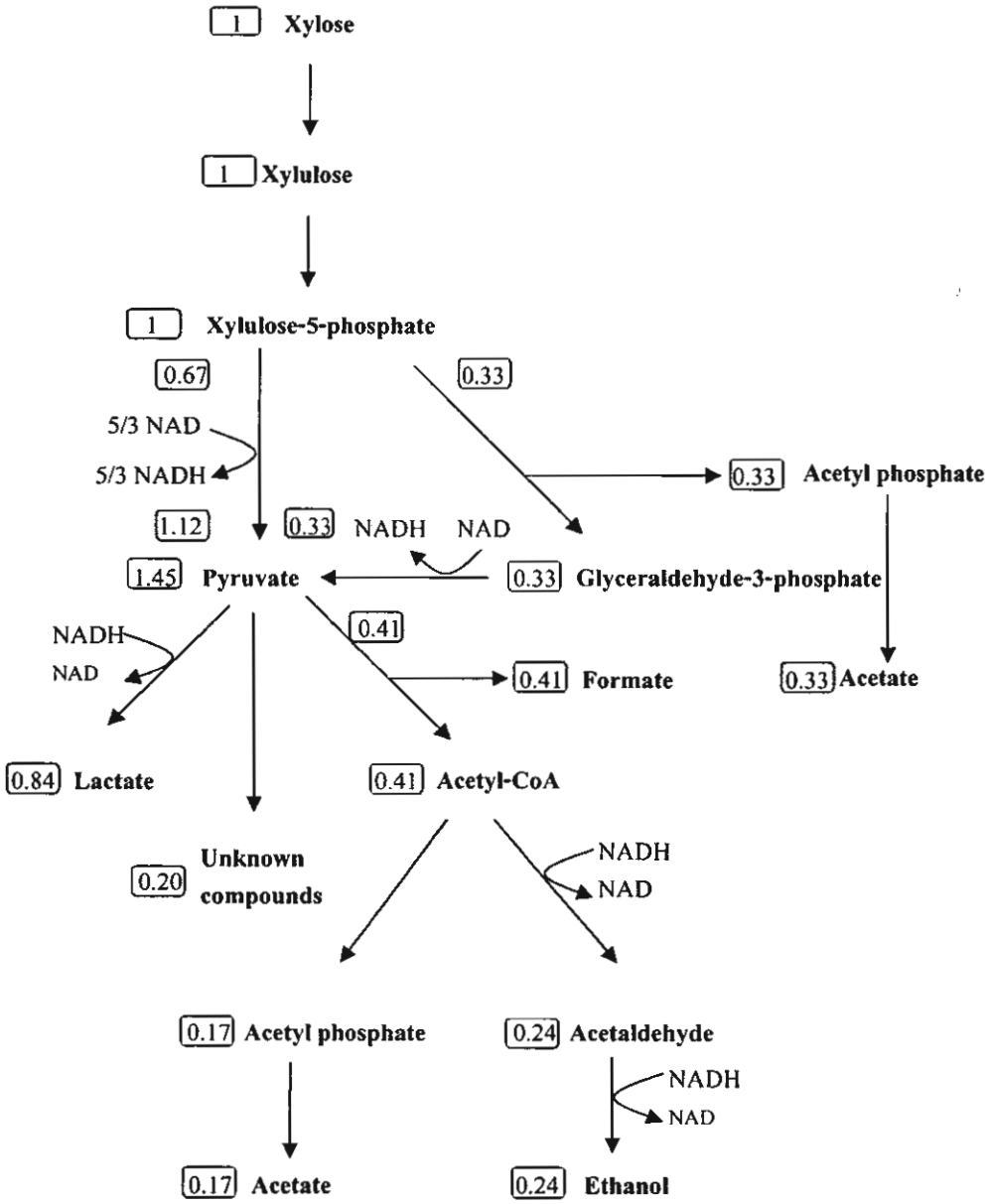
ผลการทดลอง (ภาพที่ 47) การใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 30 กรัมต่อลิตร พบว่าน้ำตาลไซโลสเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตมากกว่าวิถีฟอสโฟคีโตเลส 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลไซโลส 1 โมล ถูกเปลี่ยนและถูกฟอสโฟริเลตไปเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต 1 โมล จากนั้นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต 0.55 และ 0.45 โมล ถูกนำเข้าสูวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลส ตามลำดับ อะซิเทต 0.45 และ 0.19 โมล ถูกสร้างขึ้นก่อนและหลังไพรูเวตเมแทบอลิซึม ตามลำดับ จากนั้นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต 0.45 โมล และไซลูโลส-5-ฟอสเฟต 0.92 โมล ถูกนำไปใช้ในการสร้างไพรูเวต 1.37 โมล หลังไพรูเวตเมแทบอลิซึม พบ แลคเตท ฟอร์เมต เอทานอล และสารที่ไม่ได้ตรวจวัด 0.71, 0.52, 0.33 และ 0.14 โมล ตามลำดับ

ผลการทดลอง (ภาพที่ 48) การใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 50 กรัมต่อลิตร พบว่าน้ำตาลไซโลสเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตมากกว่าวิถีฟอสโฟคีโตเลส 34 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลไซโลส 1 โมล ถูกเปลี่ยนและถูกฟอสโฟริเลตเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต 1 โมล จากนั้นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต 0.67 และ 0.33 โมล ถูกนำเข้าสูวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลส ตามลำดับ อะซิเทต 0.33 และ 0.17 โมล ถูกสร้างขึ้นก่อนและหลังไพรูเวตเมแทบอลิซึม ตามลำดับ จากนั้นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต 0.33 โมล และไซลูโลส-5-ฟอสเฟต 1.12 ถูกนำไปใช้ในการสร้างไพรูเวต 1.45 โมล หลังไพรูเวตเมแทบอลิซึม พบ แลคเตท ฟอร์เมต เอทานอล และสารที่ไม่ได้ตรวจวัด 0.84, 0.41, 0.24 และ 0.20 โมล ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์เมแทบอลิกซ์ฟลักซ์ของการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) พบว่าปริมาณแลคเตทมีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณฟอร์เมต อะซิเทต และเอทานอลมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้น



ภาพที่ 47 วิถีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ที่เลี้ยงในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 30 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 48 วิถีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ที่เลี้ยงในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 50 กรัมต่อลิตร

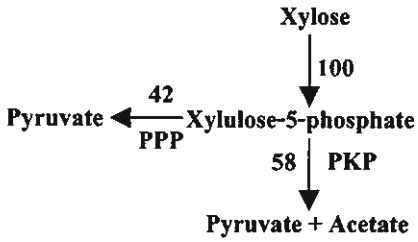
4.7 การวิเคราะห์พรินซิเพิลโนด (principal node) ของการใช้น้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดย *Lc. lactis* IO-1 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ

เนื่องจากวิถีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ผ่านทั้งวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลสพร้อมกัน ซึ่งทั้ง 2 วิถีสามารถเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต โดยการทำงานของเอนไซม์ดี-ไซลูโลไคเนส นอกจากนี้ทั้ง 2 วิถีสามารถสร้างไพรูเวตซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการนำไปสร้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมัก ดังนั้นจึงควรวิเคราะห์พรินซิเพิลโนดของไซลูโลส-5-ฟอสเฟตและไพรูเวต เพราะจะทำให้ทราบปริมาณไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่ถูกเมแทบอไลซ์ผ่านวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลส นอกจากนี้ยังทำให้ทราบปริมาณไพรูเวตที่ถูกนำไปใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก

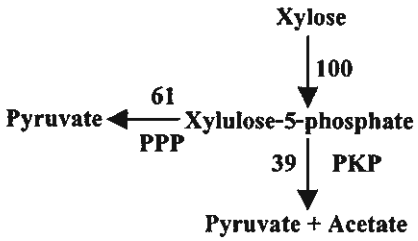
ภาพที่ 49 แสดงพรินซิเพิลโนดของไซลูโลส-5-ฟอสเฟตภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสต่าง ๆ ผลการทดลองพบว่า เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสภาวะที่มีน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร ไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่ถูกสร้างขึ้นจะเข้าสู่วิถีฟอสโฟคีโตเลส (58 เปอร์เซ็นต์) มากกว่าวิถีเพนโตสฟอสเฟต (42 เปอร์เซ็นต์) (ภาพที่ 49 a) และเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้นเป็น 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่ถูกสร้างขึ้นมีแนวโน้มจะเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตมากกว่าวิถีฟอสโฟคีโตเลส โดยไซลูโลส-5-ฟอส เฟตจะถูกนำเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟต 61, 55 และ 67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่พบว่าไซลูโลส-5-ฟอสเฟตเข้าสู่วิถีฟอสโฟคีโตเลส 39, 45 และ 33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 49b-49d) นอกจากนี้ผลการทดลองยังพบว่าปริมาณไซลูโลส-5-ฟอสเฟต สูงสุดที่เข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลสมีค่าเท่ากับ 67 และ 58 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 50 และ 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ภาพที่ 50 แสดงพรินซิเพิลโนดของไพรูเวตภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสต่าง ๆ กัน ผลการทดลองพบว่า เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสภาวะที่มีน้ำตาลไซโลส 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ไพรูเวตส่วนใหญ่ (78 และ 57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) จะถูกนำไปใช้ในการสร้างฟอร์เมตกับอะซิติล-โคเอ ในขณะที่ไพรูเวต 17 และ 34 เปอร์เซ็นต์ ถูกนำไปใช้ในการสร้างแลคเตท และไพรูเวตอีก 5 และ 9 เปอร์เซ็นต์ ถูกเปลี่ยนเป็นสารที่ไม่ได้ตรวจวัดในการทดลอง ตามลำดับ (ภาพที่ 50a-50b) และเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้นเป็น 30 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่า ไพรูเวตส่วนใหญ่ (52 และ 58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ถูกนำไปใช้ในการสร้างแลคเตท ในขณะที่ไพรูเวต 38 และ 28 เปอร์เซ็นต์ ถูกนำไปใช้ในการสร้างฟอร์เมตกับอะซิติล-โคเอ และไพรูเวตอีก 10 และ 14 เปอร์เซ็นต์ ถูกเปลี่ยนเป็นสารที่ไม่ได้ตรวจวัดในการทดลอง ตามลำดับ (ภาพที่ 50c-50d) นอกจากนี้ผลการทดลองยังพบว่าปริมาณไพรูเวตที่ถูกนำไปใช้ในการสร้างแลคเตทมีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณฟอร์เมตกับอะซิติล-โคเอ มีค่าลดลง เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้น ปริมาณไพรูเวตสูงสุดที่ถูกนำไปใช้ในการสร้างแลคเตทมีค่าเท่ากับ 58 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 50 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 50d) ในขณะที่ปริมาณไพรูเวตสูงสุดที่ถูกนำไปใช้ในการสร้างฟอร์เมตและอะซิติล-โคเอ มีค่าเท่ากับ 78 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 50a)

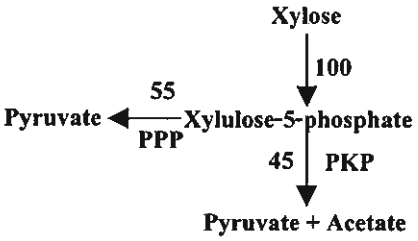
a) ไซโลส 5 กรัมต่อลิตร



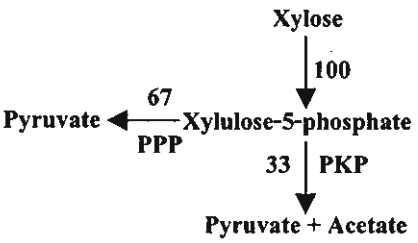
b) ไซโลส 10 กรัมต่อลิตร



c) ไซโลส 30 กรัมต่อลิตร

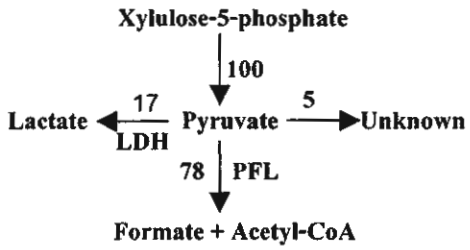


d) ไซโลส 50 กรัมต่อลิตร

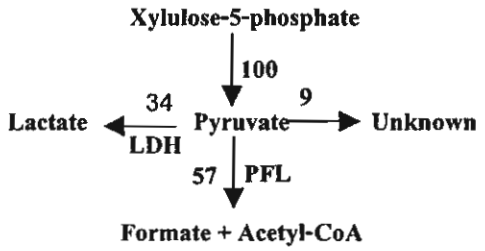


ภาพที่ 49 พรินซิเพิลโนดของไซลูโลส-5-ฟอสเฟตภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสต่าง ๆ กัน เมื่อ PPP และ PKP คือ วิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลส ตามลำดับ

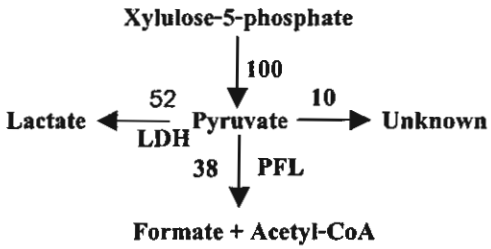
a) ไซโลส 5 กรัมต่อลิตร



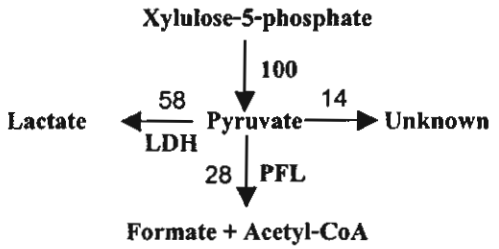
b) ไซโลส 10 กรัมต่อลิตร



c) ไซโลส 30 กรัมต่อลิตร



d) ไซโลส 50 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 50 พรินซิเพิลโนดของไพรูเวตภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสต่าง ๆ กัน เมื่อ LDH และ PFL คือเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจิเนสและเฮนไซม์ไพรูเวตฟอร์เมตไลเอส ตามลำดับ

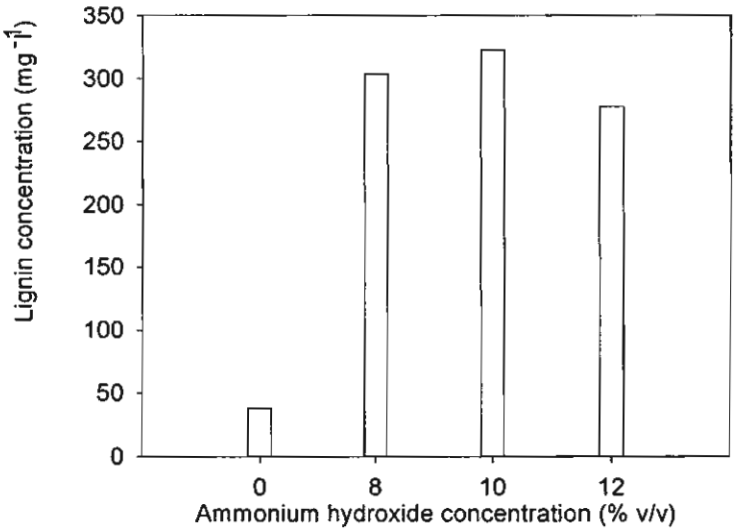
4.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย เพื่อให้ได้สารละลายที่มีปริมาณน้ำตาลสูงในขั้นตอนแรกจะนำชานอ้อยมาไฮโดรไลซ์ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่แปรผันความเข้มข้น 8, 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) เพื่อสกัดลิกนินออก จากนั้นชานอ้อยที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ จะนำไปไฮโดรไลซ์ต่อด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือกรดซัลฟูริก (0.5, 2, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 90, 100, 110 และ 120 องศาเซลเซียส การหาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยจะพิจารณาจากค่าประสิทธิภาพ (Rodriquez-Chong et al., 2004) โดย

$$\text{ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย} = \frac{\text{ผลรวมของน้ำตาลที่ได้ (กลูโคส ไซโลส และอะราบิโนส) (กรัมต่อลิตร)}}{(1 + \text{ปริมาณสารยับยั้ง (กรดอะซิติกและเฟอฟูรอล)}) \text{ (กรัมต่อลิตร)}}$$

4.8.1 การไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์

จากผลการทดลองในภาพที่ 51 พบว่า เมื่อไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร สามารถสกัดลิกนินออกจากชานอ้อยได้มากที่สุดคือ 322.19 มิลลิกรัมต่อลิตร (3.22 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณลิกนินในชานอ้อย) ส่วนการไฮโดรไลซ์ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 8 และ 12 เปอร์เซ็นต์ พบว่าได้ปริมาณลิกนินเท่ากับ 303.39 และ 277.46 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การไฮโดรไลซ์ชานอ้อยในชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่นสามารถสกัดลิกนินได้เพียง 38 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่านั้น ดังนั้นจึงเลือกไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ในการสกัดลิกนินจากชานอ้อยก่อนที่จะนำชานอ้อยไปไฮโดรไลซ์ต่อด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือกรดซัลฟูริกในการทดลองขั้นต่อไป



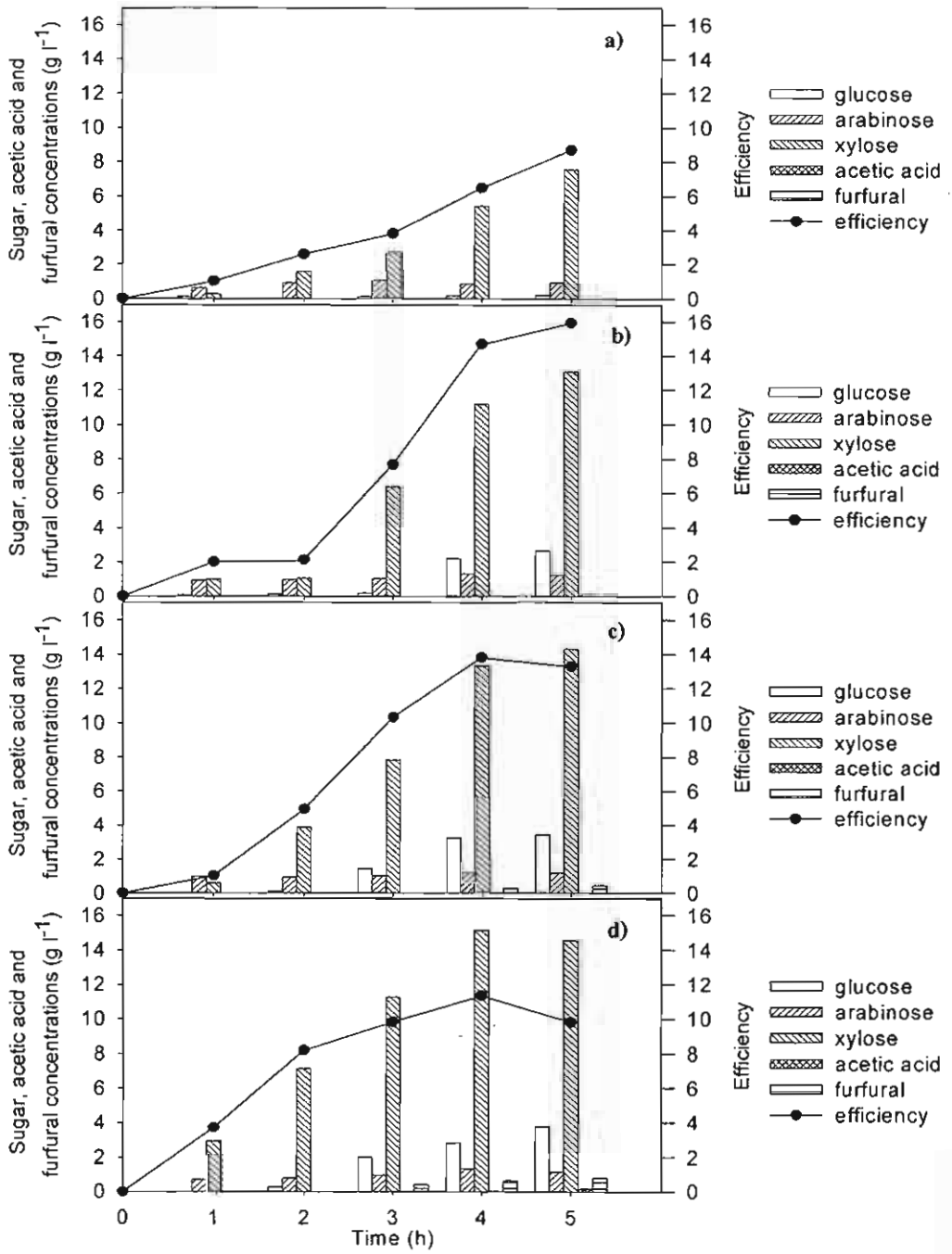
ภาพที่ 51 ปริมาณลิกนินที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

4.8.2 การไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก (0.5, 2, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (90, 100, 110 และ 120 องศาเซลเซียส)

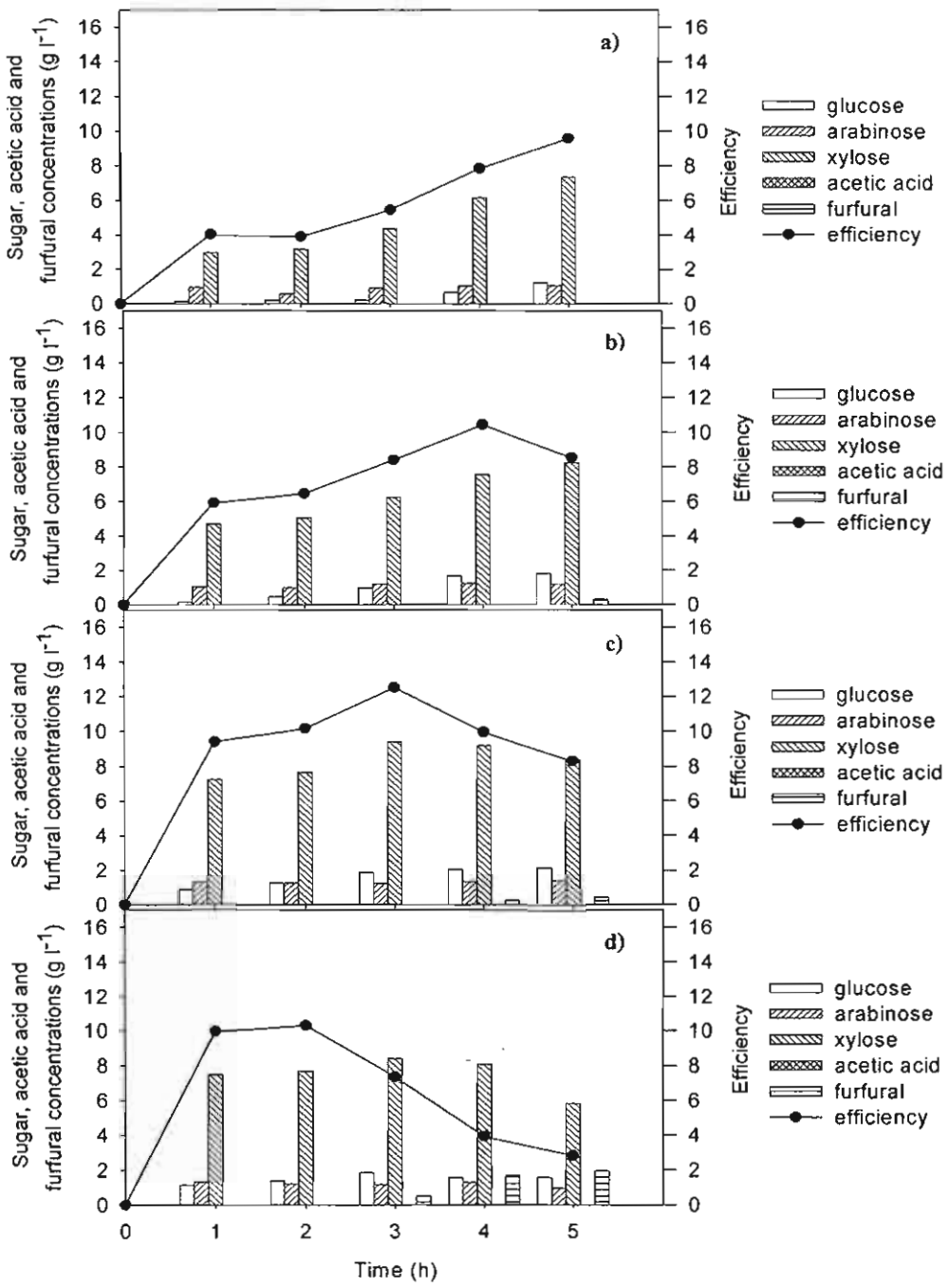
การไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5, 2, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 90, 100, 110 และ120 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 52-55) พบว่าจะได้น้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก โดยพบปริมาณน้ำตาลไซโลสสูงสุดเท่ากับ 15.16 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก 0.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ที่เวลา 4 ชั่วโมง นอกจากนี้พบว่าจะได้น้ำตาลไซโลสมากกว่าน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลอะราบิโนส กรดอะซิติก และเฟอฟูรอล ยกเว้นการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (อุณหภูมิ 90 และ 110 องศาเซลเซียส ที่เวลา 1 ชั่วโมง) จะได้น้ำตาลอะราบิโนสมากกว่าน้ำตาลไซโลส และที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ที่เวลา 5 ชั่วโมง) และ 5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เวลา 4 และ 5 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซีส เวลา 3, 4 และ 5 ชั่วโมง) โดยที่สภาวะดังกล่าวจะได้น้ำตาลกลูโคสมากกว่าน้ำตาลไซโลส นอกจากนี้พบว่าที่สภาวะการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก 5 เปอร์เซ็นต์ จะได้น้ำตาลกลูโคสสูงกว่าสภาวะการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.5, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ที่เวลา 4 และ 5 ชั่วโมง คือ 3.14 และ 5.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ที่เวลา 3, 4 และ 5 ชั่วโมง จะได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคส 6.25, 8.43 และ 10.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณน้ำตาลอะราบิโนสที่ได้อยู่ในช่วง 0.62-1.48 กรัมต่อลิตร และปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกอยู่ในช่วง 0.02-0.22 กรัมต่อลิตร โดยพบกรดอะซิติกเมื่อไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 100 และ 120 องศาเซลเซียส) และ 5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 90, 100, 110

และ 120 องศาเซลเซียส) นอกจากนี้ยังพบเฟอฟูรอลเมื่อไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์ เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 110 และ 120 องศาเซลเซียส) และกรณีการใช้กรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 2, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 100, 110 และ 120 องศาเซลเซียส) โดยปริมาณเฟอฟูรอลมีค่า 0.31-3.13 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามไม่พบเฟอฟูรอลเมื่อไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5, 2, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส และที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ที่ 100 องศาเซลเซียส

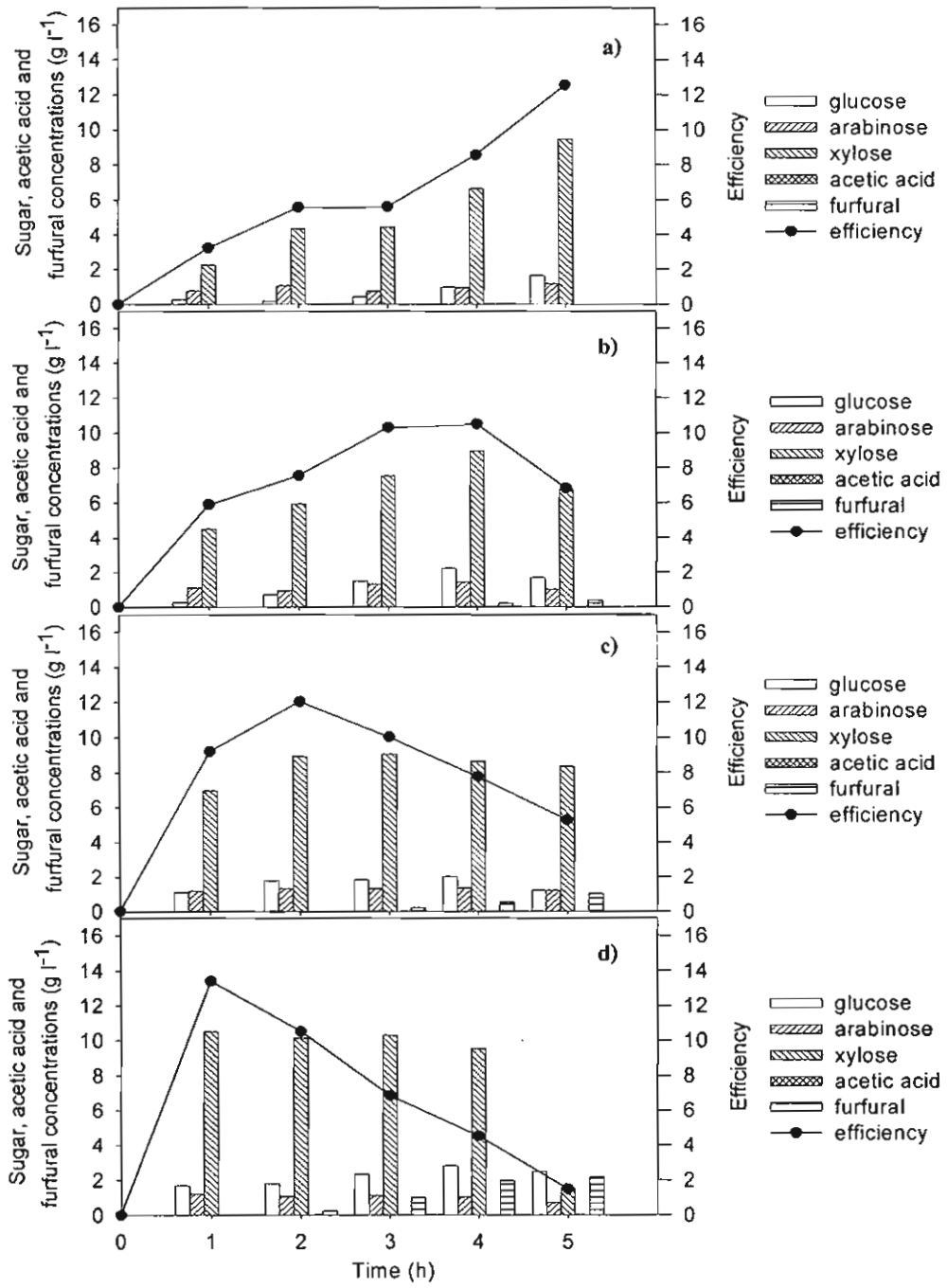
เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก พบว่ากรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ที่เวลา 5 ชั่วโมง จะให้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์สูงสุดเท่ากับ 15.95 นอกจากนี้ยังพบว่า ภายใต้สภาวะการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 90 และ 100 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส และที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จะให้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้น นอกเหนือจากสภาวะดังกล่าวข้างต้นพบว่าประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยจะเพิ่มขึ้นในช่วงแรกของเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์ จากนั้นประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซ์จะลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้น



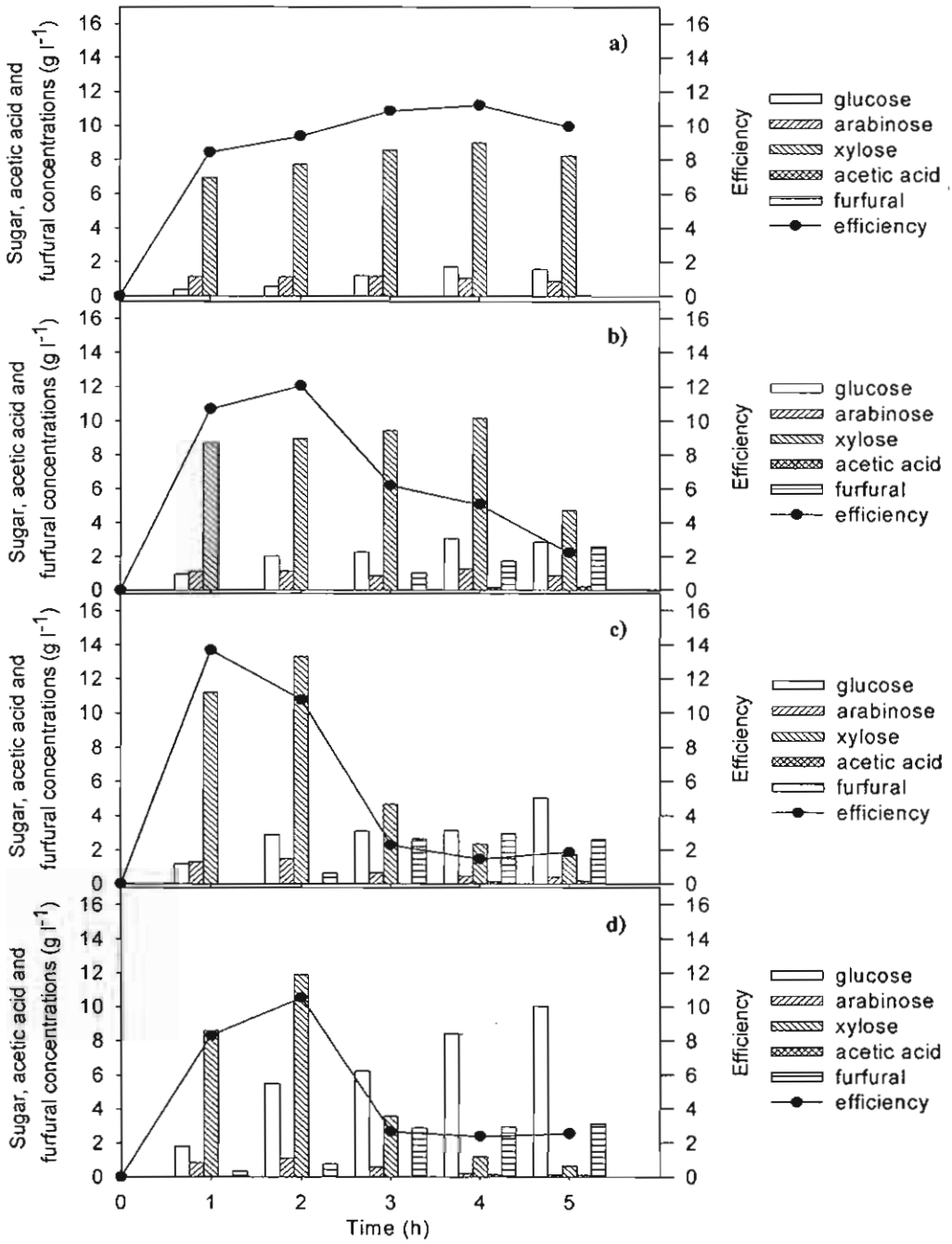
ภาพที่ 52 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส ไซโลส กรดอะซิติก เฟอฟูรอล และประสิทธิภาพ ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 53 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส ไซโลส กรดอะซิติก เฟอฟูรอล และประสิทธิภาพ ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 54 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส ไซโลส กรดอะซิติก เฟอฟูรอล และประสิทธิภาพ ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส

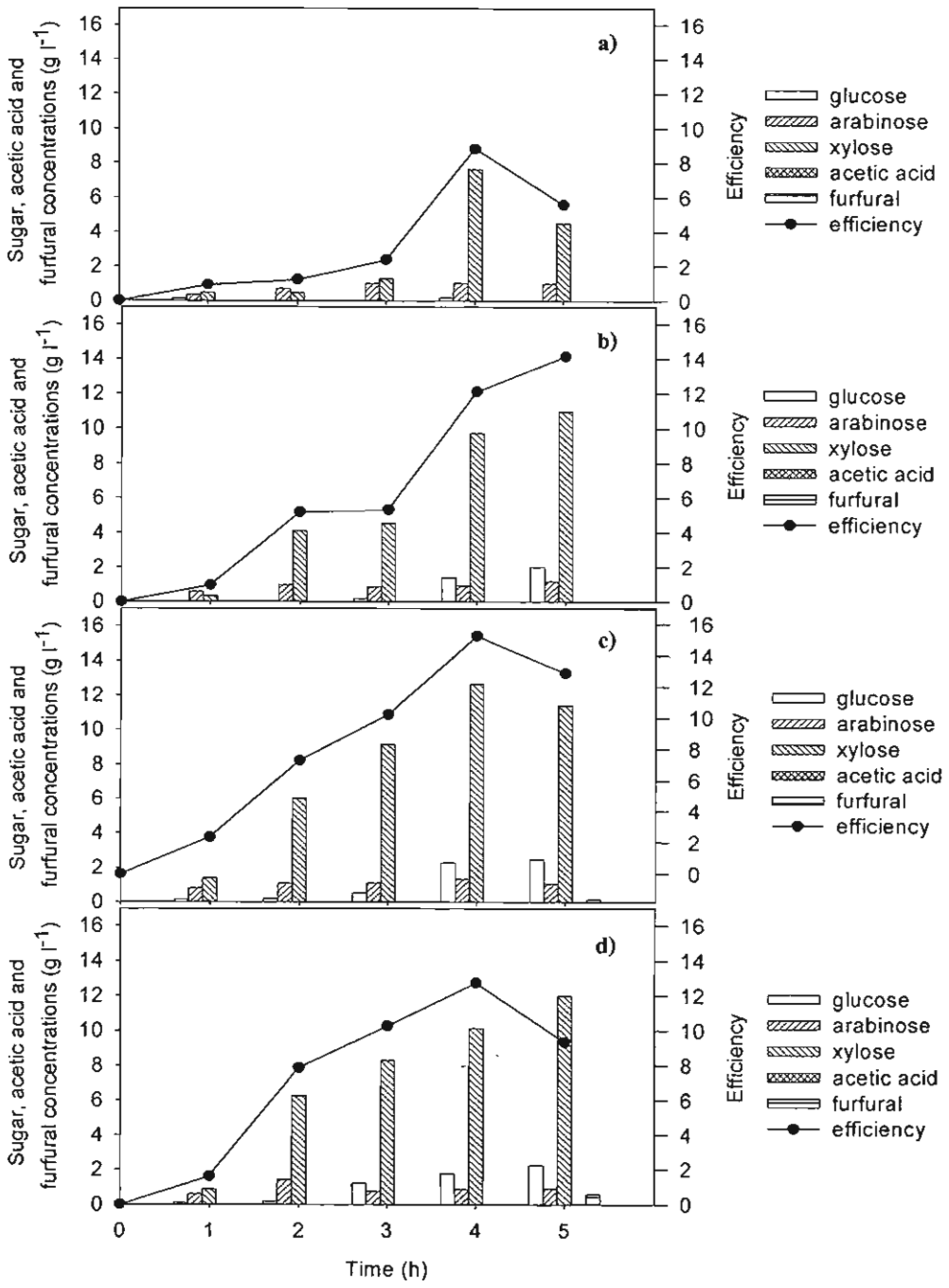


ภาพที่ 55 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส ไซโลส กรดอะซิติก เฟอฟูรอล และประสิทธิภาพ ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส

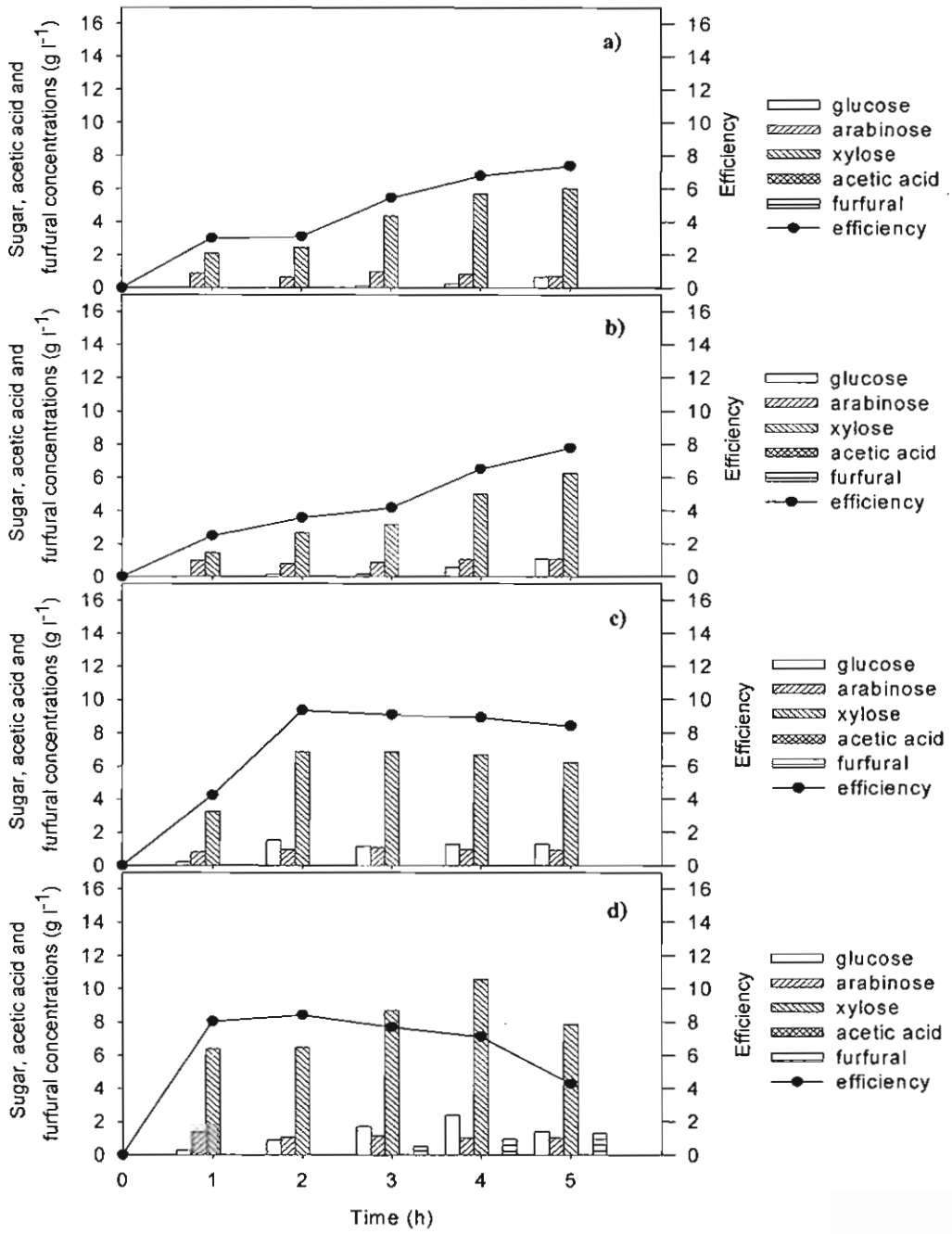
4.8.3 การไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริก (0.5, 2, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (90, 100, 110 และ 120 องศาเซลเซียส)

จากการทดลอง (ภาพที่ 56-59) พบว่า การไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกจะได้น้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก โดยพบปริมาณน้ำตาลไซโลสสูงสุดเท่ากับ 12.64 กรัมต่อลิตร เมื่อไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ที่เวลา 4 ชั่วโมง นอกจากนี้พบว่าทุกสภาวะที่ไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกจะได้น้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ยกเว้นการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง) ที่สภาวะดังกล่าวจะได้น้ำตาลอะราบิโนส (0.57 กรัมต่อลิตร) มากกว่าน้ำตาลไซโลส และพบว่าที่สภาวะการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เวลา 5 ชั่วโมง จะได้น้ำตาลกลูโคส (8.85 กรัมต่อลิตร) มากกว่าน้ำตาลไซโลส ส่วนปริมาณน้ำตาลอะราบิโนสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกพบว่ามีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกับที่พบในสภาวะอื่น ๆ โดยพบปริมาณน้ำตาลอะราบิโนสสูงสุด 1.42 กรัมต่อลิตร เมื่อไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ที่เวลา 2 ชั่วโมง ปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยมีค่าน้อย คืออยู่ระหว่าง 0.04-0.14 กรัมต่อลิตร โดยพบกรดอะซิติกเฉพาะในกรณีการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 110 และ 120 องศาเซลเซียส เวลา 5 ชั่วโมง) และ 5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 100 และ 120 องศาเซลเซียส เวลา 5 ชั่วโมง) ส่วนปริมาณเฟอฟูรอลมีค่าอยู่ระหว่าง 0.16-2.24 กรัมต่อลิตร โดยพบปริมาณเฟอฟูรอลสูงสุดเท่ากับ 2.24 กรัมต่อลิตร เมื่อไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ที่เวลา 5 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบเฟอฟูรอลในกรณีที่ไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 110 และ 120 องศาเซลเซียส เวลา 5 ชั่วโมง) 2 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เวลา 3, 4 และ 5 ชั่วโมง) 3 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เวลา 3 และ 4 ชั่วโมง และ 120 องศาเซลเซียส ที่เวลา 3, 4 และ 5 ชั่วโมง) และ 5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 100, 110 องศาเซลเซียส เวลา 3, 4 และ 5 ชั่วโมง และ 120 องศาเซลเซียส ที่เวลา 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง)

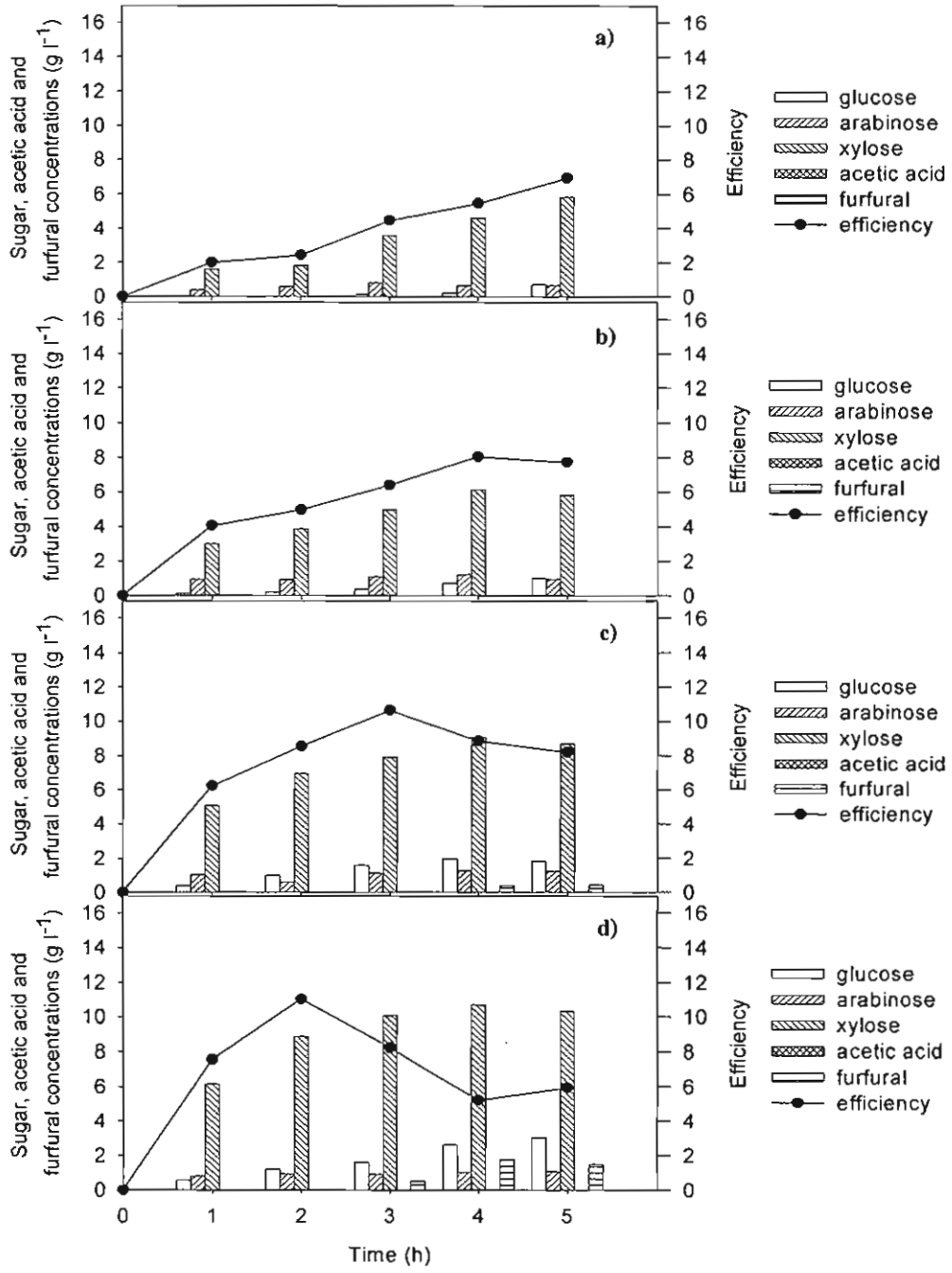
เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริก พบว่าเมื่อไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ที่เวลา 4 ชั่วโมง จะได้ประสิทธิภาพสูงสุดเท่ากับ 15.26 นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส) 2 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 90 และ 100 องศาเซลเซียส) 3 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส) และ 5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส) จะให้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยเพิ่มขึ้น เมื่อเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้น ในขณะที่นอกเหนือจากสภาวะดังกล่าวข้างต้นพบว่าประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยเพิ่มขึ้นในช่วงแรกของเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์ จากนั้นประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซ์จะลดลง เมื่อเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้น



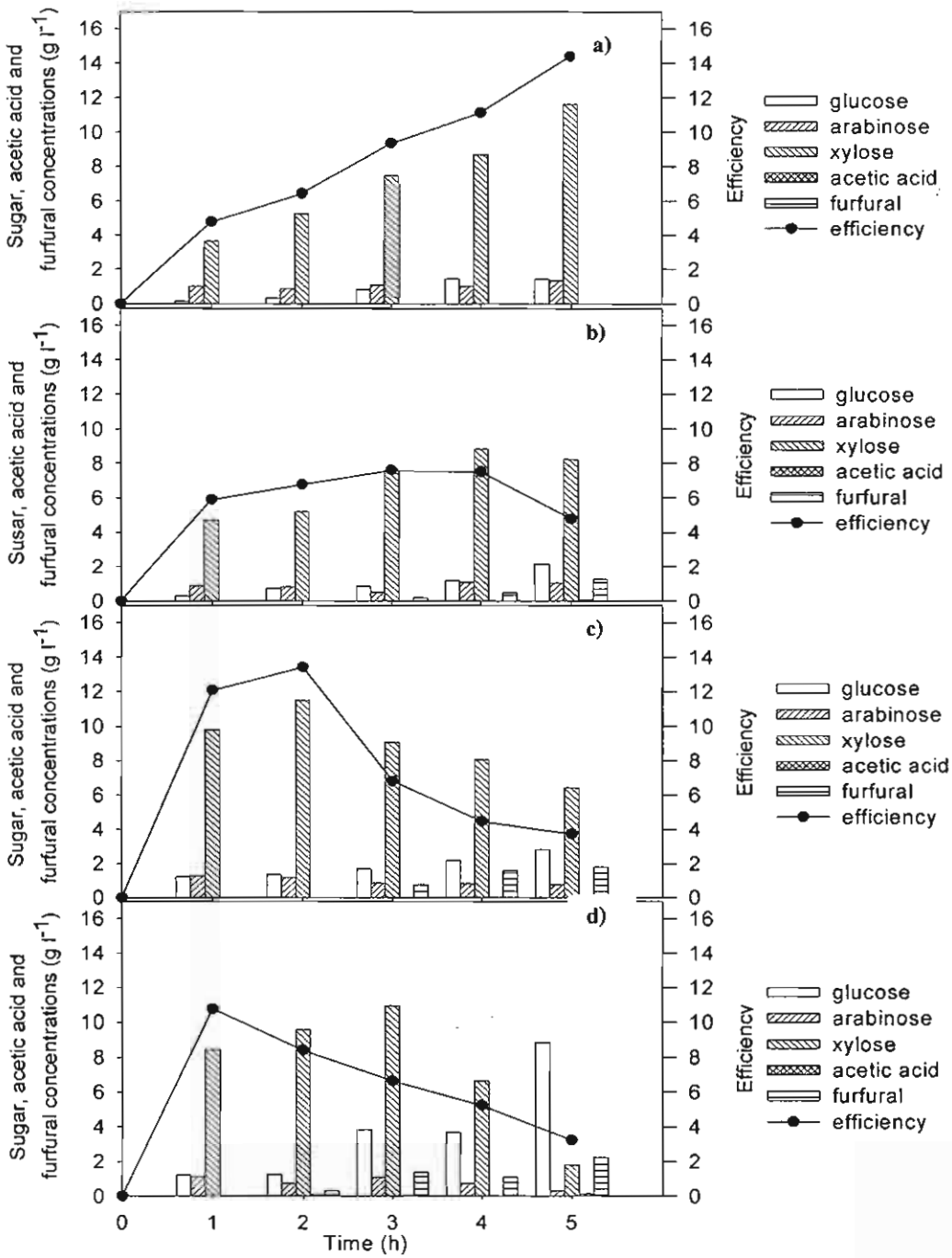
ภาพที่ 56 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส ไซโลส กรดอะซิติก เฟอฟูรอล และประสิทธิภาพ ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 57 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส ไซโลส กรดอะซิติก เฟอฟูรอล และประสิทธิภาพ ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส



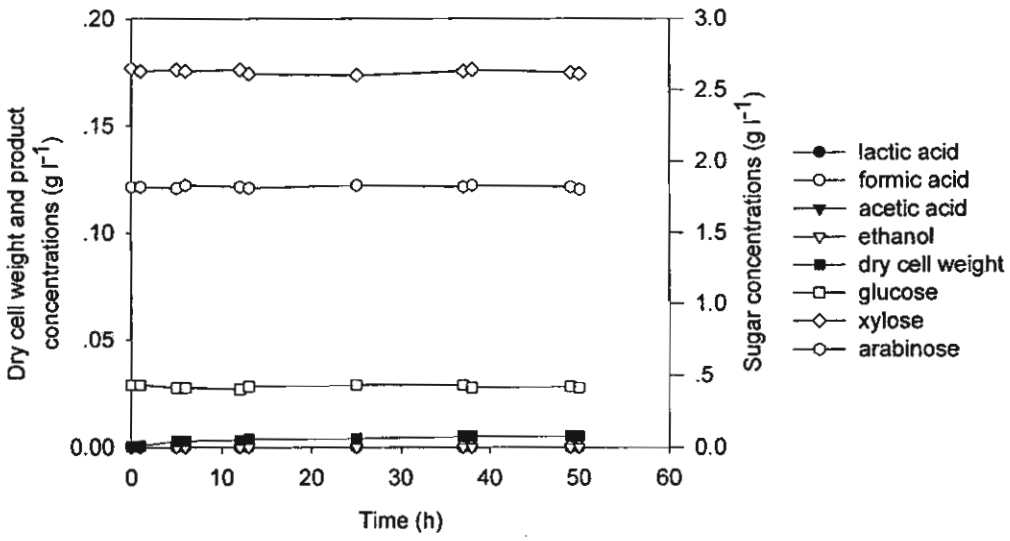
ภาพที่ 58 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส ไซโลส กรดอะซิติก เฟอฟูรอล และประสิทธิภาพ ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 59 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส ไซโลส กรดอะซิติก เฟอฟูรอล และประสิทธิภาพ ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส

4.9 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากชานอ้อย

ประสิทธิภาพที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยสูงสุด (ในข้อ 4.8) คือ การไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง ถูกนำมาปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 โมลาร์ จากนั้นสารละลายที่ได้ดังกล่าวถูกนำไปใช้ในการศึกษาการผลิตกรดแลคติก ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้ปริมาตรน้ำหมัก 1 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสารละลายที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน พบว่า *Lc. lactis* IO-1 ไม่สามารถใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในสารละลายได้ และไม่พบการสร้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมัก ในขณะเดียวกันพบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีอัตราการเจริญที่ต่ำ โดยพบน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.01 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 60) ดังนั้นในการศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาทั้งชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เติมลงไปในสารละลาย

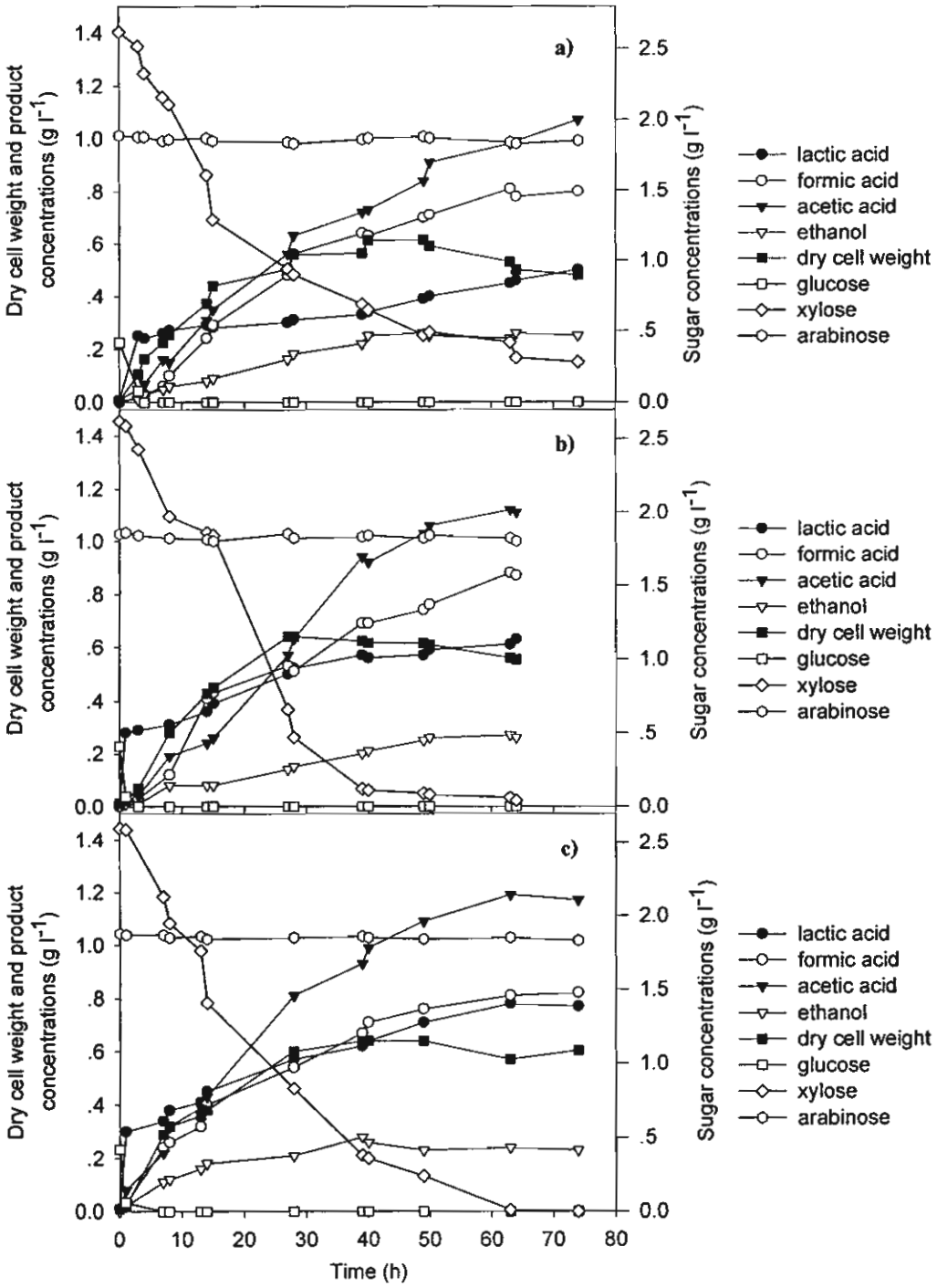


ภาพที่ 60 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน

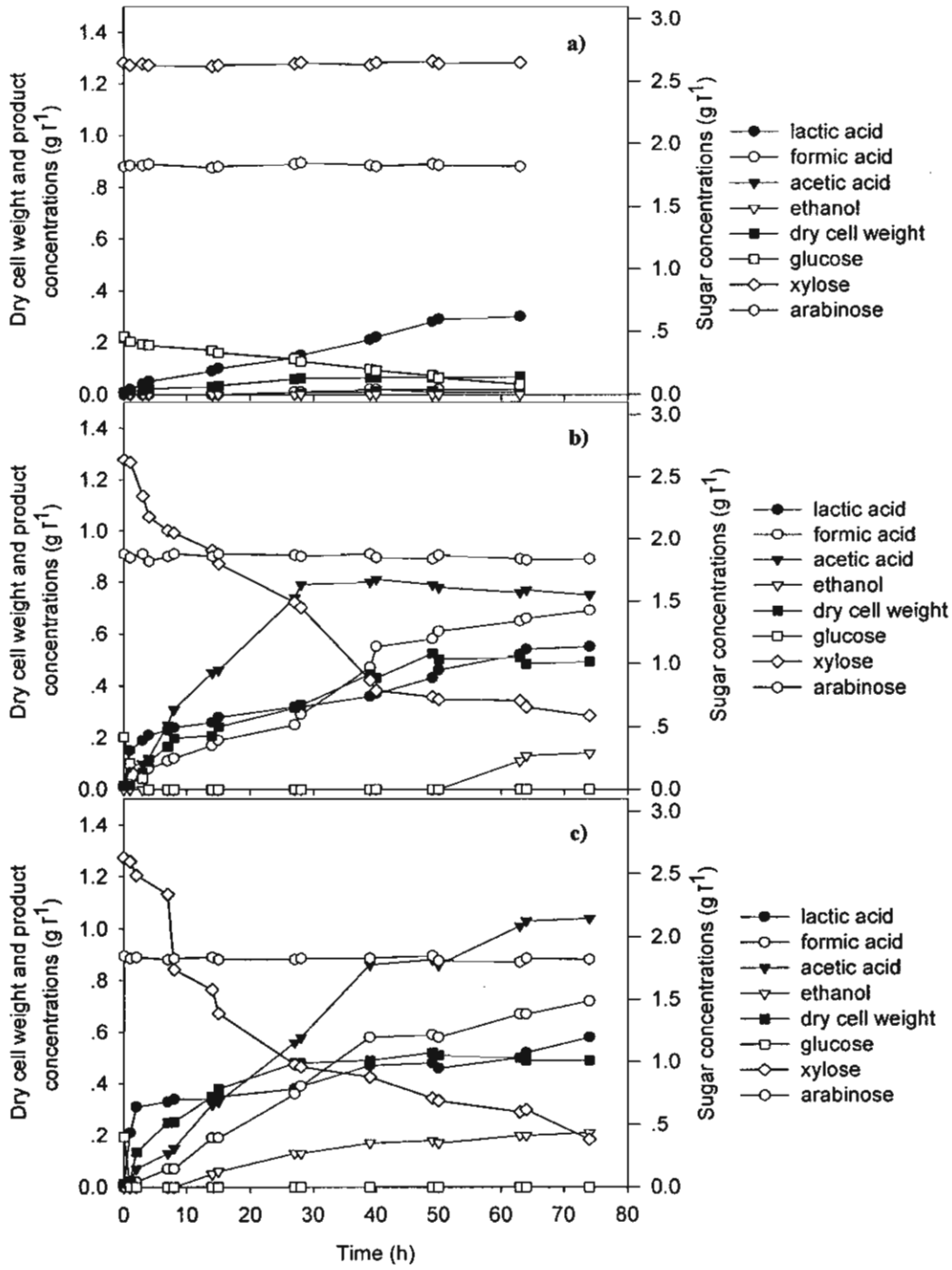
ผลการทดลอง (ภาพที่ 61) เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่มีการเติมยีสต์สกัด 3, 5 และ 7 กรัมต่อลิตร พบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส (0.42 กรัมต่อลิตร) ได้หมด ในขณะที่น้ำตาลไซโลส (2.62 กรัมต่อลิตร) ถูกใช้หมดเฉพาะกรณีการเติมยีสต์สกัด 5 และ 7 กรัมต่อลิตร เท่านั้น ส่วนการเติมยีสต์สกัด 3 กรัมต่อลิตรพบว่า *Lc. lactis* IO-1 ไม่สามารถใช้น้ำตาลไซโลส (2.62 กรัมต่อลิตร) ได้หมด โดยพบว่าที่เวลา 74 ชั่วโมง เหลือน้ำตาลไซโลส 0.28 กรัมต่อลิตร ที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล 0.50, 0.80, 1.07 และ 0.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 0.48 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 61a) ในขณะที่การเติมยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร พบปริมาณกรดแลคติก

กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอลที่เวลา 64 ชั่วโมง มีค่า 0.63, 0.88, 1.12 และ 0.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 0.55 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 61b) ส่วนปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล ที่ได้จากการเติมยีสต์สกัด 7 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 74 ชั่วโมง มีค่า 0.78, 0.81, 1.19 และ 0.24 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลาดังกล่าวพบน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.6 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 61c) อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองพบว่าปริมาณกรดแลคติกที่ได้จากการเติมยีสต์สกัด 7 กรัมต่อลิตร มีค่าสูงสุด (0.78 กรัมต่อลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับการเติมยีสต์สกัด 5 และ 3 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้พบว่าภายใต้สภาวะที่มีการเติมยีสต์สกัด 3, 5 และ 7 กรัมต่อลิตร *Lc. lactis* IO-1 ไม่สามารถใช้น้ำตาลอะราบิโนสได้

ผลการทดลอง (ภาพที่ 62) เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่มีการเติมเพปโตน 5 และ 7 กรัมต่อลิตร พบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส (0.43 กรัมต่อลิตร) ได้หมด ส่วนกรณีการเติมเพปโตน 3 กรัมต่อลิตร พบว่าอัตราการใช้น้ำตาลกลูโคสของ *Lc. lactis* IO-1 มีค่าค่อนข้างต่ำ และที่เวลา 63 ชั่วโมง เหลือน้ำตาลกลูโคส 0.10 กรัมต่อลิตร ในขณะเดียวกันพบว่าน้ำตาลไซโลส (2.64 กรัมต่อลิตร) ถูกใช้เพียง 2.25 และ 2.05 กรัมต่อลิตร เมื่อเติมเพปโตน 7 และ 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ในกรณีที่มีการเติมเพปโตน 3 กรัมต่อลิตร พบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้เฉพาะน้ำตาลกลูโคสเท่านั้น และที่เวลา 63 ชั่วโมง พบปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก 0.30, 0.02 และ 0.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และไม่พบการสร้างเอทานอลภายใต้สภาวะดังกล่าว และพบน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่า 0.07 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 62a) ส่วนการเติมเพปโตน 5 กรัมต่อลิตร พบว่า *Lc. lactis* IO-1 ไม่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้หมด โดยพบว่าที่เวลา 74 ชั่วโมงมีน้ำตาลไซโลสเหลือ 0.59 กรัมต่อลิตร ที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล 0.54, 0.69, 0.74 และ 0.14 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่า 0.48 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 62b) ในขณะที่ปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล ที่ได้จากการเติมเพปโตน 7 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 74 ชั่วโมง มีค่า 0.58, 0.72, 1.02 และ 0.21 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 0.49 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 62c) อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองพบว่า ปริมาณกรดแลคติกที่ได้จากการเติมเพปโตน 5 และ 7 กรัมต่อลิตร มีค่าใกล้เคียงกัน และสูงกว่าปริมาณกรดแลคติกที่ได้จากการเติมเพปโตน 3 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้พบว่าภายใต้สภาวะที่มีการเติมเพปโตน 3, 5 และ 7 กรัมต่อลิตร *Lc. lactis* IO-1 ไม่สามารถใช้น้ำตาลอะราบิโนสได้



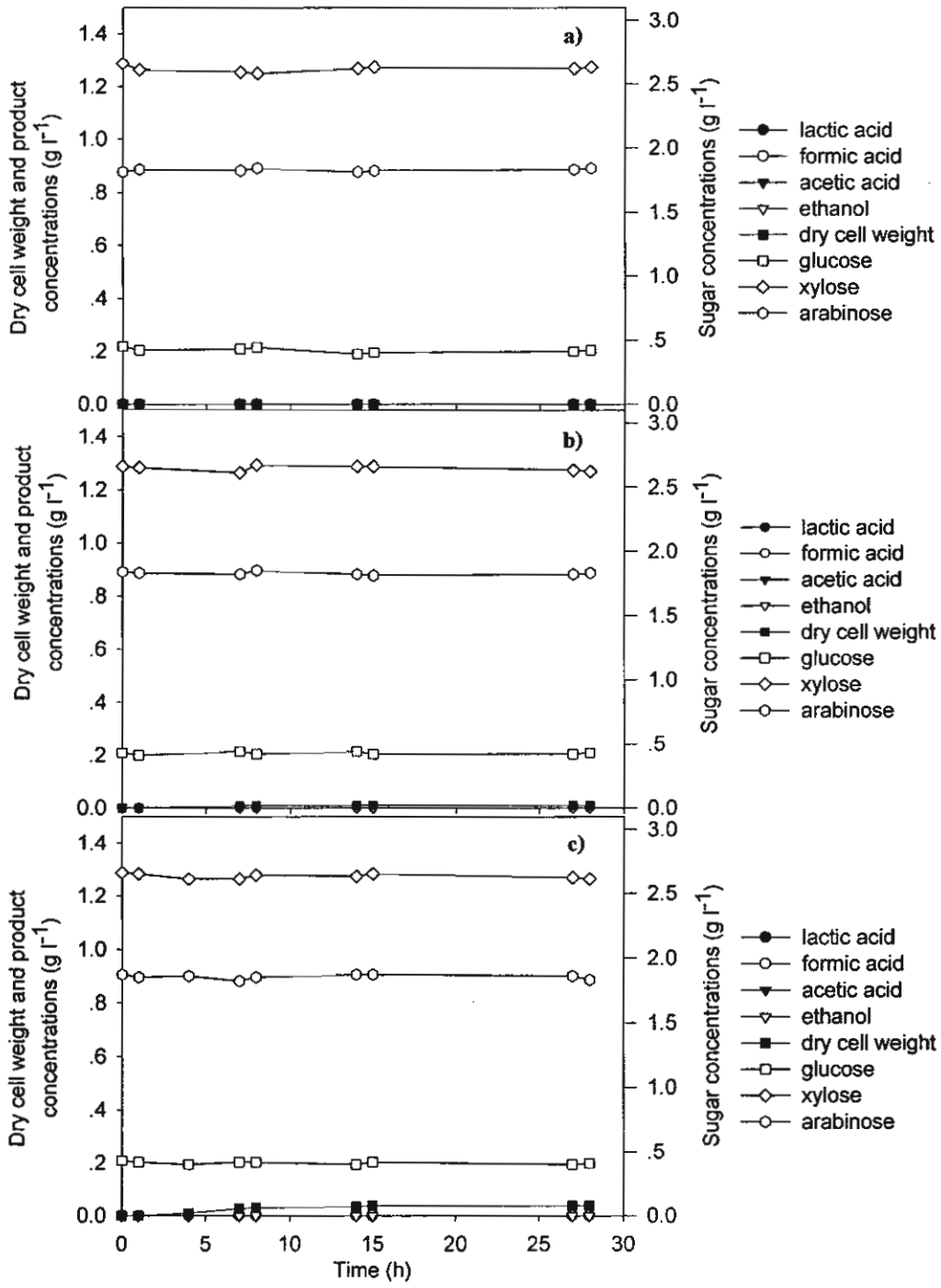
ภาพที่ 61 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่มีการเติมยีสต์สกัด (a) 3, (b) 5 และ (c) 7 กรัมต่อลิตร



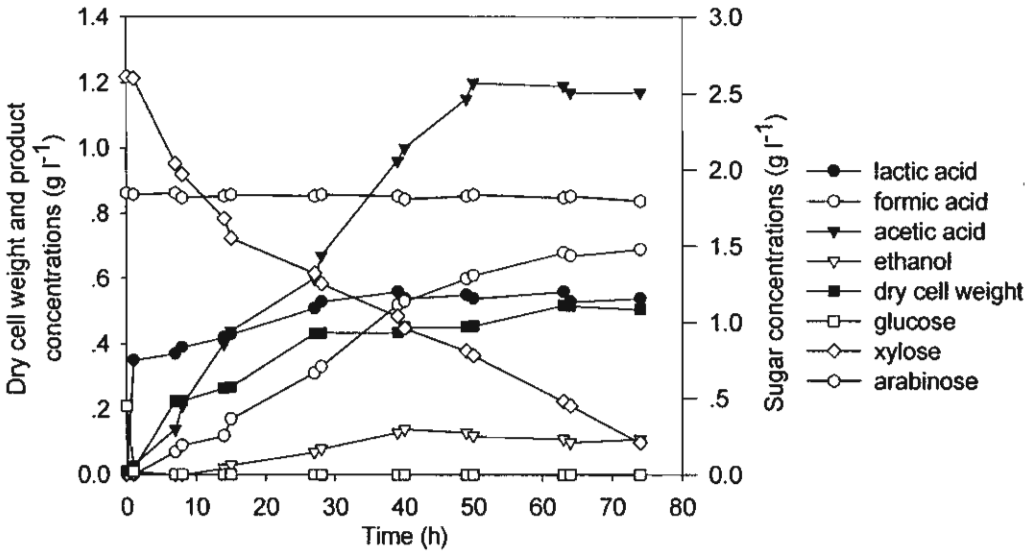
ภาพที่ 62 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่มีการเติมเพปโตน (a) 3, (b) 5 และ (c) 7 กรัมต่อลิตร

ผลการทดลอง (ภาพที่ 63) เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 3, 5 และ 7 กรัมต่อลิตร พบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการเจริญที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการเติมยีสต์สกัดหรือเพปโตน โดยพบน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่า 0.04, 0.01 และ 0.01 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 7, 5 และ 3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า *Lc. lactis* IO-1 ไม่มีการใช้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลอะราบิโนส และไม่พบการสร้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมัก (ภาพที่ 63a-63c)

ผลการทดลอง (ภาพที่ 64) เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่มีการเติมยีสต์สกัด เพปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟต อย่างละ 5 กรัมต่อลิตร พบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส (0.45 กรัมต่อลิตร) ได้หมด ในขณะที่น้ำตาลไซโลส (2.61 กรัมต่อลิตร) ถูกใช้เพียง 2.41 กรัมต่อลิตร ส่วนน้ำตาลอะราบิโนสพบว่า *Lc. lactis* IO-1 ไม่สามารถใช้น้ำตาลดังกล่าวได้ และที่เวลา 74 ชั่วโมง พบปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก เอทานอล และน้ำหนักเซลล์แห้ง 0.54, 0.69, 1.17, 0.11 และ 0.51 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 63 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต (a) 3, (b) 5 และ (c) 7 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 64 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่มีการเติมยีสต์สกัด เพปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟต อย่างละ 5 กรัมต่อลิตร

จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย โดยการแปรผันชนิดและปริมาณของไนโตรเจน พบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสได้ในกรณีที่มีการเติมยีสต์สกัดหรือเพปโตน และไม่พบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในสารละลายเมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟต (3, 5 และ 7 กรัมต่อลิตร) ผลการทดลองเมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟตคล้ายกับผลการทดลองในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน โดยพบว่า *Lc. lactis* IO-1 ไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและไซโลสในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญของ *Lc. lactis* IO-1 เมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟตและในชุดควบคุมมีค่าค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการเติมยีสต์สกัดหรือเพปโตน ส่วนการเติมยีสต์สกัดเพปโตนและแอมโมเนียมซัลเฟตอย่างละ 5 กรัมต่อลิตรในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย พบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและไซโลสที่มีอยู่ในสารละลายได้คล้ายกับการเติมยีสต์สกัดหรือเพปโตน ยกเว้นกรณีการเติมเพปโตน 3 กรัมต่อลิตร ซึ่งพบว่า *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลกลูโคสอย่างเดียวเท่านั้น นอกจากนี้พบว่าภายใต้ทุกสภาวะที่ทดลอง *Lc. lactis* IO-1 ไม่สามารถใช้น้ำตาลอะราบิโนสที่มีอยู่ในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยได้ และไม่พบการสร้างคาร์บอนไดออกไซด์และ 2,3-บิวเทนไดออลในระหว่างกระบวนการหมัก

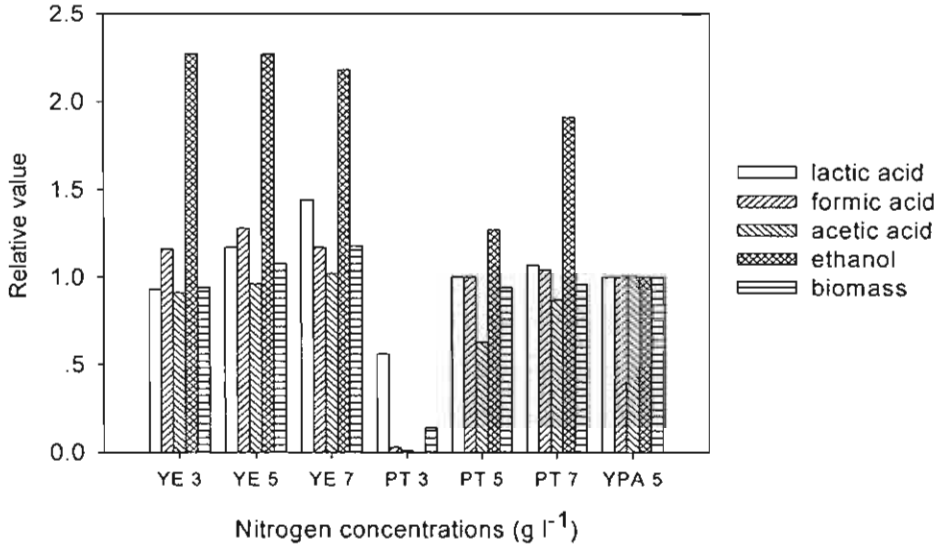
ผลการทดลอง (ตารางที่ 10 และภาพที่ 65) พบว่า ผลได้ของเซลล์มีค่าเพิ่มขึ้นในกรณีที่มีการเติมยีสต์สกัด คือมีค่า 0.17, 0.18 และ 0.20 (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมของน้ำตาลที่ถูกใช้) เมื่อเติมยีสต์สกัด 3, 5 และ 7 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลได้ (กรัมต่อกรัมของน้ำตาลที่ถูกใช้) ของกรดแลคติกมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของยีสต์สกัดเพิ่มขึ้น ส่วนผลได้ของกรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอลมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ในกรณีการเติมเพปโตน (5 และ 7 กรัมต่อลิตร) พบว่าผลได้ของเซลล์มีค่าไม่แตกต่างกัน ผลได้ (กรัมต่อกรัมของน้ำตาลที่ถูกใช้)

ของกรดอะซิติก และเอทานอล มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเพปโตนมากขึ้น ส่วนผลได้ของกรดแลคติกมีค่าใกล้เคียงกัน ในขณะที่ผลได้ของกรดฟอร์มิกมีค่าไม่แตกต่างกันระหว่างการเติมเพปโตน 5 และ 7 กรัมต่อลิตร กรณีการเติมยีสต์สกัด เพปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟต อย่างละ 5 กรัมต่อลิตร พบว่า ผลได้ของเซลล์มีค่า 0.18 กรัมต่อกรัมของน้ำตาลที่ถูกใช้ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกับผลได้ของเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับการเติมยีสต์สกัด (3 และ 5 กรัมต่อลิตร) หรือเพปโตน (3, 5 และ 7 กรัมต่อลิตร) ส่วนผลได้ของกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล ที่สภาวะดังกล่าว มีค่า 0.19, 0.24, 0.41 และ 0.04 กรัมต่อกรัมของน้ำตาลที่ถูกใช้ ตามลำดับ การเติมแอมโมเนียมซัลเฟต (3, 5 และ 7 กรัมต่อลิตร) พบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการเจริญค่อนข้างต่ำ และไม่สามารถสร้างผลิตภัณฑ์ได้ (ตารางที่ 10 และภาพที่ 65)

ตารางที่ 10 ผลของความเข้มข้นและชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อผลได้ของเซลล์ และผลได้ของผลิตภัณฑ์

แหล่งไนโตรเจน	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของเซลล์ (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลผสมที่ใช้)	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมของน้ำตาลผสมที่ใช้)			
			กรดแลคติก	กรดฟอร์มิก	กรดอะซิติก	เอทานอล
ยีสต์สกัด	3	0.17	0.18	0.28	0.36	0.07
	5	0.18	0.21	0.30	0.38	0.08
	7	0.20	0.26	0.27	0.39	0.08
เพปโตน	3	0.18*[1]	0.78*[1]	0.05*[1]	0.03*[1]	0
	5	0.19	0.22	0.28	0.30	0.05
	7	0.18	0.20	0.27	0.38	0.08
แอมโมเนียมซัลเฟต	3	*[2]	0	0	0	0
	5	*[2]	0	0	0	0
	7	*[2]	0	0	0	0
ยีสต์สกัด+เพปโตน+แอมโมเนียมซัลเฟต (อย่างละ 5 กรัมต่อลิตร)	5	0.18	0.19	0.24	0.41	0.04
ชุดควบคุม	0	*[2]	0	0	0	0

*[1]เปรียบเทียบกับน้ำตาลกลูโคส เพราะกรณีการเติมเพปโตน 3 กรัมต่อลิตร พบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้เฉพาะน้ำตาลกลูโคสเท่านั้น และ *[2]ผลได้ของเซลล์ที่ได้จากการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตและในชุดควบคุมไม่สามารถหาค่าได้ เนื่องจากในสภาวะดังกล่าว *Lc. lactis* IO-1 ไม่มีการใช้น้ำตาลและไม่มีการสร้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมัก



ภาพที่ 65 ผลของชนิดและปริมาณไนโตรเจนต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของ *Lc. lactis* IO-1 ที่เลี้ยงในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย เมื่อ YE 3, YE 5 และ YE 7 คือ ยีสต์สกัด 3, 5 และ 7 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ PT 3, PT 5 และ PT 7 คือ เพปโตน 3, 5 และ 7 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ YPA 5 คือ ยีสต์สกัด เพปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟต อย่างละ 5 กรัมต่อลิตร

relative value คำนวณจากอัตราส่วนระหว่าง

$$\frac{\text{ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ใด ๆ ที่ได้จากการเลี้ยง } \textit{Lc. lactis} \text{ IO-1 ในแต่ละสภาวะ (กรัมต่อลิตร)}}{\text{(ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์นั้น ๆ ที่ได้จากการเลี้ยง } \textit{Lc. lactis} \text{ IO-1 ในสภาวะที่มีการเติมยีสต์สกัด เพปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟต อย่างละ 5 กรัมต่อลิตร)}}$$

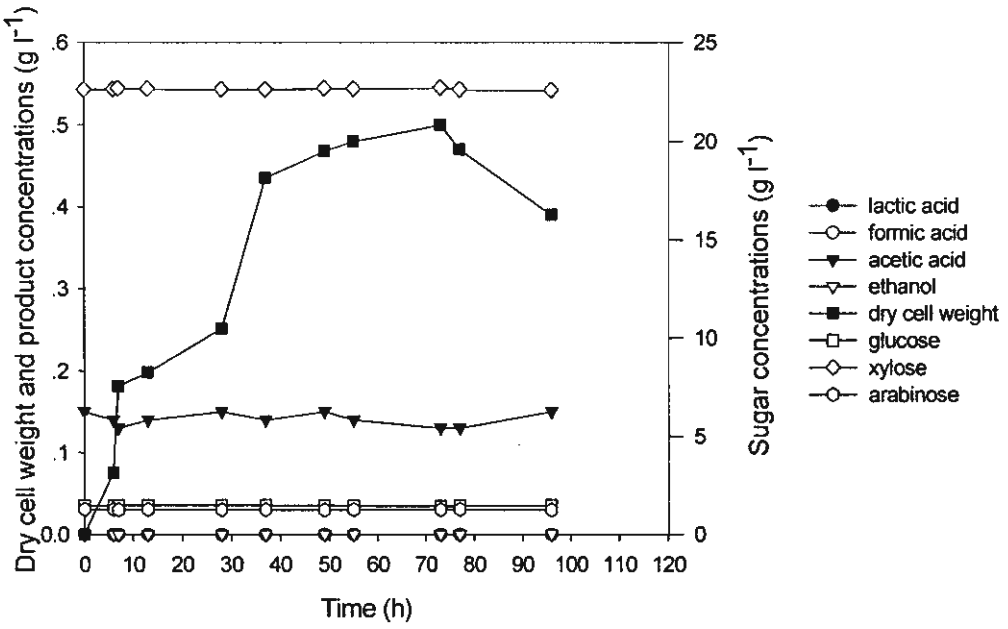
จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ไซโลส และอะราบิโนส 22.0, 1.49 และ 1.29 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเติมยีสต์สกัดความเข้มข้น 7 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการเจริญในสภาวะดังกล่าวโดยพบปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่า 0.5 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม *Lc. lactis* IO-1 ไม่สามารถใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในสารละลายได้ และไม่พบการสร้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมัก (ภาพที่ 66)

เมื่อนำสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยไปลดความเป็นพิษ (detoxify) ด้วยสารดูดซับแอมเบอร์ไลซ์ (amberlite) พบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ในสารละลายได้อย่างรวดเร็วจากนั้นใช้น้ำตาลไซโลสได้อย่างรวดเร็วเช่นกัน และน้ำตาลไซโลสหมดหลังจากชั่วโมงที่ 39 ที่เวลา 74 ชั่วโมง พบปริมาณกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานฮล มีค่าเท่ากับ 4.81, 5.59, 6.91 และ 3.97 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดมีค่าเท่ากับ 1.42 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 67) ในขณะเดียวกันไม่พบการใช้น้ำตาลอะราบิโนสโดย *Lc. lactis* IO-1 อย่างไรก็ตามจากการทดลองในสภาวะดังกล่าวพบว่า *Lc. lactis* IO-1 สร้าง

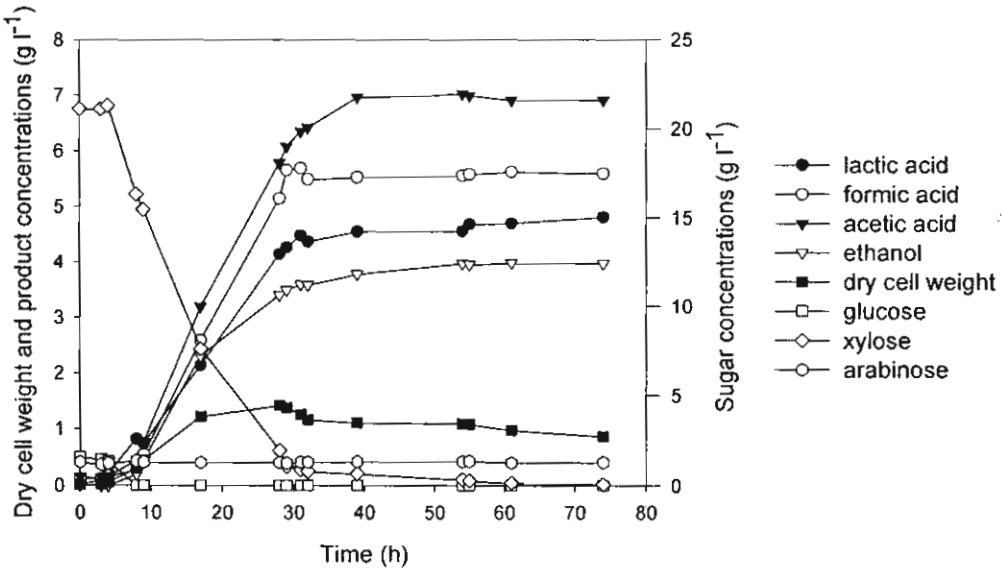
กรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีการเติมน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นสูง (30 และ 50 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งคาร์บอน (ภาพที่ 24 และ 25) ซึ่งในสภาวะดังกล่าวพบว่ากรดแลคติกถูกสร้างเป็นผลิตภัณฑ์หลัก

อย่างไรก็ตามเมื่อนำสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่ผ่านการลดความเป็นพิษไปปรับความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสที่มีอยู่ในสารละลายให้มีค่าเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร พบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในสารละลายได้หมดหลังจากชั่วโมงที่ 52 และในสภาวะดังกล่าวพบว่า *Lc. lactis* IO-1 สร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก (10.85 กรัมต่อลิตร) และพบกรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล เท่ากับ 6.04, 7.87 และ 5.24 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่า 1.34 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 68)

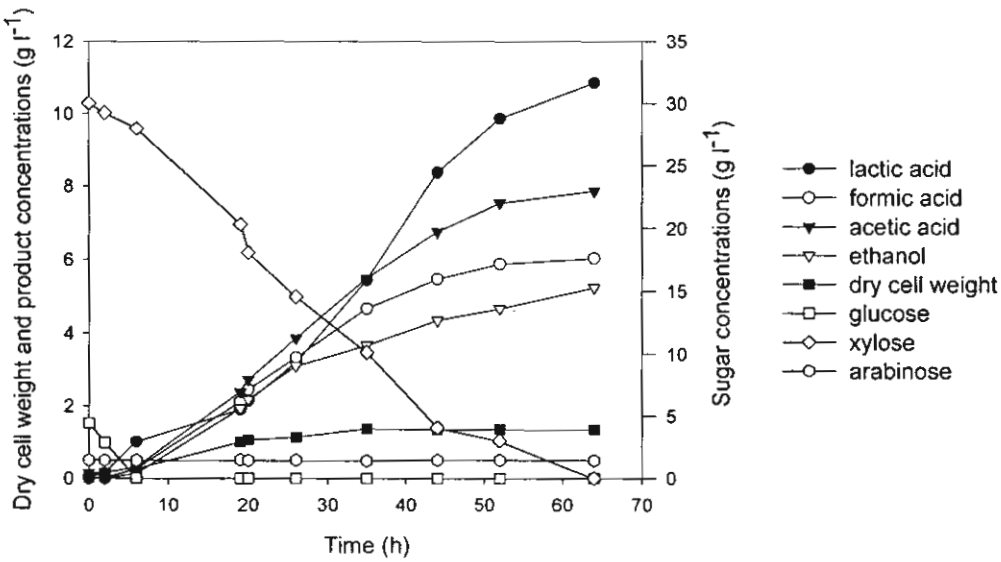
ผลการทดลองที่ได้จากภาพที่ 68 สอดคล้องกับผลการทดลองจากภาพที่ 24a เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีไซโลส 30 กรัมต่อลิตร คือได้กรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้สารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย ปริมาณแลคติกสูงสุดลดลงจาก 12.69 กรัมต่อลิตร เป็น 10.85 กรัมต่อลิตร และเวลาที่ใช้ในการหมักเพิ่มขึ้นจาก 36 ชั่วโมง เป็น 64 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับการใช้อาหารสูตรพื้นฐานดังกล่าว



ภาพที่ 66 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยและเติมยีสต์สกัด 7 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน



ภาพที่ 67 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ซานอ้อยที่ผ่านการลดความเป็นพิษและเติมยีสต์สกัด 7 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน



ภาพที่ 68 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ซานอ้อยที่ผ่านการลดความเป็นพิษและปรับความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสให้เท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยเติมยีสต์สกัด 7 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)

จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) พบว่า *Lc. lactic* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสหมดทุกสภาวะการทดลอง และพบว่า *Lc. lactis* IO-1 สร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักผ่านกระบวนการหมักแบบโฮโมแลคติกแอซิดเฟอร์เมนท์เทชัน ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสของ *Lc. lactic* IO-1 ผ่านวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (Cocaing-Busquet., 1996; Axelsson, 1993) นอกจากนี้ภายใต้สภาวะดังกล่าวยังพบว่ามีการสร้างกรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Nancib et al. (2003) ที่รายงานว่าน้ำตาลกลูโคสส่วนใหญ่ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ผลอินทผลัมถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลคติกภายใต้สภาวะการหมักแบบกะโดย *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* นอกจากนี้ผลการทดลองดังกล่าวยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Oh et al. (2004) ที่พบว่า *Enterococcus faecalis* RKY 1 สร้างกรดแลคติก (38 กรัมต่อลิตร) เป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการใช้น้ำตาลกลูโคส (40.4 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ

เมื่อพิจารณาผลได้ของเซลล์พบว่ามีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเพิ่มขึ้น ซึ่งผลได้ของเซลล์สูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.14 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ ที่ความความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการเจริญจำเพาะมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมีค่าเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน ซึ่งอาจเกิดจากกรดแลคติกที่ถูกสร้างขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักมีผลไปยับยั้งการเจริญของ *Lc. lactis* IO-1 ทำให้ผลได้ของเซลล์และอัตราการเจริญจำเพาะมีค่าลดลง ผลการทดลองดังกล่าวคล้ายกับผลการทดลองของ Laopaiboon (2001) ที่ศึกษาการใช้น้ำตาลกลูโคสของ *Lc. lactis* IO-1 ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ โดยพบว่าผลได้ของเซลล์มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสมีค่าเพิ่มขึ้น คือมีค่าเท่ากับ 0.16 และ 0.03 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ เมื่อเลี้ยง *Lc. lactic* IO-1 ในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส 5.5 และ 53.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ Ishizaki & Ohta (1988) ได้ศึกษาจลนพลศาสตร์ของการผลิตกรดแลคติกโดย *Streptococcus* sp. IO-1 ผลการทดลองพบว่า เมื่อเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 50 และ 100 กรัมต่อลิตร เซลล์สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้หมดที่เวลา 27 และ 85.5 ชั่วโมง ตามลำดับ และมีการสร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในระหว่างกระบวนการหมัก นอกจากนี้ Ishizaki & Ohta (1988) ยังได้ศึกษาผลของกรดแลคติกต่อการเจริญของ *Str.* sp. IO-1 ซึ่งพบว่า การเติมกรดแลคติกในรูปของโซเดียมแลคเตท (10 กรัมต่อลิตร) ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร จะได้ปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 1.29 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมกรดแลคติก (1.75 กรัมต่อลิตร) จากผลการทดลองของ Ishizaki & Ohta (1988) แสดงให้เห็นว่ากรดแลคติกมีผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์

จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสพบว่า เปอร์เซ็นต์ carbon recovery มีค่าระหว่าง 87.2–96.5 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลกลูโคสส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้ในการสร้าง

ผลิตภัณฑ์ คือ กรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำตาลกลูโคสส่วนหนึ่งอาจถูกนำไปใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ได้ตรวจวัดในการทดลองครั้งนี้ เช่น ไดอะซิติล อะซิตาลดีไฮด์ และอะซิโตอิน เป็นต้น (Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996; Liu, 2003) เพราะเปอร์เซ็นต์ carbon recovery ที่ได้มีค่าต่ำกว่า 100 เปอร์เซ็นต์

5.2 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)

จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) พบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้หมดในทุกสภาวะของการทดลอง เช่นเดียวกับการใช้น้ำตาลกลูโคส แต่ใช้เวลาในการหมักนานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคส นอกจากนี้ยังพบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการผลิตกรดแลคติก กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และเอทานอล เมื่อพิจารณาผลได้ของเซลล์ พบว่าผลได้ของเซลล์สูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.14 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าเท่ากับผลได้ของเซลล์สูงสุดที่ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามผลได้ของเซลล์มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับการใช้น้ำตาลกลูโคส ซึ่งสาเหตุอาจมาจากปริมาณกรดแลคติกที่สร้างขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์ (Ishizaki et al., 1993; Ishizaki & Ueda; 1995; Laopaiboon, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการเจริญจำเพาะมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสมีค่าเพิ่มขึ้น โดยอัตราการเจริญจำเพาะมีค่าเท่ากับ 0.90 ชั่วโมง$^{-1}$ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญจำเพาะที่ได้มีค่าต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการเจริญจำเพาะที่ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคสในทุกสภาวะของการทดลอง ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากน้ำตาลกลูโคสถูกเมแทบอไลซ์ได้ง่ายกว่าน้ำตาลไซโลส (Bulut et al., 2004) จึงทำให้เวลาที่ใช้ในการหมักน้ำตาลไซโลสนานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคสในทุกสภาวะของการทดลองที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากัน ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Ishizaki & Ueda (1995) ที่ศึกษาจลนพลศาสตร์ของการเจริญของ *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยพบว่าผลได้ของเซลล์มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้น คือมีค่าเท่ากับ 0.04, 0.03 และ 0.02 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 29, 31 และ 32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ผลการทดลองดังกล่าวยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Ishizaki et al. (1993) ที่รายงานว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของ *Lc. lactis* IO-1 มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสมีค่าเพิ่มขึ้น

เมื่อพิจารณาผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักพบว่า ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 5 และ 10 กรัมต่อลิตร *Lc. lactis* IO-1 สร้างกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ในขณะเดียวกันที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 30 และ 50 กรัมต่อลิตร *Lc. lactis* IO-1 สร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักผ่านกระบวนการหมักแบบ เฮเทอโรแลคติกแอซิดเฟอร์เมนท์เทชันหรือมิกแอซิดเฟอร์เมนท์เทชัน (mixed acid fermentation) (Axelsson, 1993) ในขณะที่การใช้น้ำตาลกลูโคสจะผ่านกระบวนการหมักแบบโฮโมแลคติกแอซิดเฟอร์เมนท์เทชัน ดังนั้นจากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสมีผลต่อไพรูเวตเมแทบอลิซึม และการสร้างผลิตภัณฑ์ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Thomas et al. (1980) ที่รายงานว่าชนิดและความ

เข้มข้นของสับสเตรตมีผลต่อรูปแบบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักของแบคทีเรีย นอกจากนี้จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลสพบว่า เปอร์เซ็นต์ carbon recovery ที่ได้มีค่าอยู่ระหว่าง 87.9-95.0 แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลไซโลสส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์ เช่นกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำตาลไซโลสส่วนหนึ่งถูกนำไปใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ได้ตรวจวัดในการทดลองครั้งนี้ เช่นไดอะซิติล อะซิโตอิน และอะซิตาลดีไฮด์ เป็นต้น (Cocaign-Bousquet et al., 1996; Liu, 2003)

5.3 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)

จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 5, 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) พบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการเจริญแบบ diauxic ในทุกสภาวะของการทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสได้หมดในกรณีที่เลี้ยงในน้ำตาลผสมที่ความเข้มข้นอย่างละ 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ในขณะเดียวกันที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 30 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้หมดในขณะที่น้ำตาลไซโลสถูกใช้เพียง 25.6 และ 32.87 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสาเหตุที่ทำให้ *Lc. lactis* IO-1 ไม่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้หมดอาจเนื่องมาจากปริมาณกรดแลคติกที่สร้างขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักมีผลยับยั้งการเจริญของ *Lc. lactis* IO-1 หรืออาจเกิดจากปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงไปในอาหารไม่เพียงพอต่อการเจริญของ *Lc. lactis* IO-1 ภายใต้สภาวะดังกล่าว (Ishizaki et al., 1990; Ishizaki et al., 1993; Kenji et al., 1995; Preziosi-Belloy et al., 1997; Kanagachandran et al., 1997) หรือความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสอาจมีผลยับยั้งการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ภายใต้สภาวะดังกล่าว เมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลผสม พบว่า *Lc. lactis* IO-1 ผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักผ่านกระบวนการหมักแบบโฮโมแลคติกแอซิดเฟอร์เมนท์เทชัน ในขณะที่การใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสมจะผ่านกระบวนการหมักแบบเฮเทอโรแลคติกแอซิดเฟอร์เมนท์เทชัน หรือมิกซ์แอซิดเฟอร์เมนท์เทชัน เช่นเดียวกับการใช้น้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลได้ของเซลล์พบว่าผลได้ของเซลล์มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลผสมมีค่าเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามผลได้ของเซลล์ในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลกลูโคสมีค่าเท่ากับผลได้ของเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของ *Lc. lactis* IO-1 มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลผสมมีค่าเพิ่มขึ้น และเมื่อพิจารณาอัตราการเจริญจำเพาะในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลกลูโคสพบว่า มีค่าใกล้เคียงกันกับอัตราการเจริญจำเพาะเมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียวและมีค่าสูงกว่าอัตราการเจริญจำเพาะในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลไซโลส ซึ่งสาเหตุดังกล่าวอาจเกิดจากปริมาณกรดแลคติกที่ถูกสร้างขึ้นในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลกลูโคสมีผลไปยับยั้งการใช้น้ำตาลไซโลสของเซลล์ ทำให้ผลได้ของเซลล์และอัตราการเจริญจำเพาะในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลไซโลสมีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลไซโลสเพียงอย่างเดียว เมื่อพิจารณาผลได้ของผลิตภัณฑ์พบว่า ผลได้ของผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่คือกรดแลคติก แม้ว่าในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลไซโลสภายใต้สภาวะที่มีน้ำตาลผสมอย่างละ 5 และ 10 กรัมต่อลิตร จะมีการสร้างกรดอะซิติกเป็นผ

ผลิตภัณฑ์หลักแต่ปริมาณกรดอะซิติกที่ถูกสร้างขึ้นภายใต้สภาวะดังกล่าวมีค่าต่ำกว่าปริมาณกรดแลคติกที่ถูกสร้างขึ้นในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลกลูโคสภายในน้ำตาลผสม

5.4 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร)

จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร) พบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลผสมได้หมดในทุกสภาวะของการทดลอง และมีการสร้างกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมัก นอกจากนี้ยังพบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการเจริญแบบ diauxic โดยมีการใช้น้ำตาลกลูโคสหมดก่อนที่จะมีการใช้น้ำตาลไซโลส เช่นเดียวกับการใช้น้ำตาลผสมที่ความเข้มข้นอย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลผสมพบว่า *Lc. lactis* IO-1 ผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักผ่านกระบวนการหมักแบบโฮโมแลคติกแอซิดเฟอร์เมนท์เทชัน ในขณะเดียวกันการใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสมจะผ่านกระบวนการหมักแบบเฮเทอโรแลคติกแอซิดเฟอร์เมนท์เทชันหรือมิกแอซิดเฟอร์เมนท์เทชัน และพบว่าการใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสมที่ความเข้มข้นอย่างละ 2.5 กรัมต่อลิตร *Lc. lactis* IO-1 จะผลิตกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักเช่นเดียวกับการใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสมที่ความเข้มข้นอย่างละ 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ในขณะเดียวกันเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสมเพิ่มขึ้นเป็น 15 และ 25 กรัมต่อลิตร พบว่า *Lc. lactis* IO-1 ผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักเช่นเดียวกับการใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสมที่ความเข้มข้นอย่างละ 30 และ 50 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสน่าจะมีผลต่อเมแทบอลิซึมของไพรูเวตและการผลิตกรดแลคติกของ *Lc. lactis* IO-1 อย่างไรก็ตามในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลผสมที่ความเข้มข้นอย่างละ 2.5 กรัมต่อลิตร ไม่พบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการสร้างกรดฟอร์มิก และเอทานอล ดังนั้นจึงไม่น่าจะมีการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวตฟอร์เมตไลเอสและเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจิเนส (ภาพที่ 9) แต่ช่วงของการใช้น้ำตาลไซโลสภายใต้สภาวะดังกล่าวพบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการสร้างกรดฟอร์มิกขึ้น แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไพรูเวตฟอร์เมตไลเอสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสร้างกรดฟอร์มิกมีการทำงาน (ภาพที่ 9)

เมื่อพิจาณาผลได้ของเซลล์พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลผสมลดลง ผลการทดลองนี้คล้ายกับผลการทดลองเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลผสมที่ความเข้มข้นอย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ผลได้ของเซลล์สูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.10 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมของน้ำตาลผสมที่ถูกใช้ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 2.5 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของน้ำตาลผสมมีผลต่อการเจริญของ *Lc. lactis* IO-1 ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Yun & Ryu (2001) ที่ได้รายงานว่าผลได้ของเซลล์ของ *Enterococcus faecalis* RKY1 มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลผสมมีค่าเพิ่มขึ้น เนื่องจากปริมาณกรดแลคติกที่สร้างขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย และนอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Ishizaki & Ueda (1995) เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลไซโลสภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาความสามารถในการใช้น้ำตาลผสมภายใต้สภาวะดังกล่าว (อย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร) พบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลผสมได้หมด

อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลผสมที่ความเข้มข้น 30 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าที่สภาวะดังกล่าวเหลือน้ำตาลไซโลส 4.4 และ 17.13 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่มากที่สุดในน้ำตาลผสมที่ไม่มีผลยับยั้งการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 มีค่าเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร นอกเหนือจากกรดแลคติกที่ถูกสร้างขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักจะมีผลยับยั้งการใช้น้ำตาลไซโลสแล้ว กลูโคสซึ่งเป็นตัวยับยั้ง (repressor) ยังมีผลต่อการกด (repress) การใช้น้ำตาลไซโลส ส่งผลให้ *Lc. lactis* IO-1 ไม่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้หมดในระหว่างกระบวนการหมัก จากการรายงานของ Kanagachandran et al. (1997) ที่ได้ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง พบว่าน้ำตาลกลูโคสมีผลไปกดการใช้น้ำตาลไซโลสในระหว่างกระบวนการหมัก นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำตาลกลูโคสมีผลไปกดการทำงานของเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอเรสในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ซึ่งพบว่าแอคตีวิตีของเอนไซม์ดังกล่าวของ *Lc. lactis* IO-1 ที่เลี้ยงในน้ำตาลไซโลสอย่างเดียวมีค่า 1.3 ไมโครโมลเอ็นเอดีเอ็ชต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน และแอคตีวิตีของเอนไซม์มีค่าลดลงเหลือ 0.7 ไมโครโมลเอ็นเอดีเอ็ชต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลส ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในวิถีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1

5.5 การศึกษาวิถีการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตกรดแลคติกโดย *Lc. lactis* IO-1

แลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลไซโลสผ่านวิถีฟอสโฟคีโตเลส และมีการสร้างกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมัก (Kandler, 1983; Chaillou et al., 1998 อ้างถึงใน Garde et al., 2002) Fraenkel (1987) และ Axelsson (1993) รายงานว่าการใช้น้ำตาลไซโลสของแลคติกแอซิดแบคทีเรียจะผ่านวิถีเพนโตสฟอสเฟต นอกจากนี้ Erlandson et al. (2000) รายงานว่าไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่ถูกสร้างขึ้นจากน้ำตาลไซโลสใน *Lc. lactis* จะถูกเมแทบอไลท์ผ่านทั้งในวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลส ซึ่งไซลูโลส-5-ฟอสเฟตเป็นสารตัวกลางสำคัญที่พบได้ในทั้ง 2 วิถี (ภาพที่ 40 และ 41) นอกจากนี้ยังพบว่าไพรูเวตที่ถูกสร้างขึ้นทั้งในวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลส จะถูกนำไปใช้ในการสร้างแลคเตท ฟอร์เมต อะซิเทต และเอทานอล ดังนั้นจากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าเมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในวิถีเพนโตสฟอสเฟตหรือวิถีฟอสโฟคีโตเลส หรือสามารถเกิดขึ้นได้พร้อมกันทั้ง 2 วิถี ในขณะเดียวกันการใช้น้ำตาลกลูโคสของโฮโมแลคติกแอซิซิดแบคทีเรียจะผ่านวิถีไกลโคไลซิส ส่วนเฮเทอโรแลคติกแอซิดแบคทีเรียจะใช้น้ำตาลกลูโคสผ่านวิถีฟอสโฟคีโตเลส (Axelsson, 1993) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาวิถีของการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1

เอนไซม์ทรานส์คีโตเลสและเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลสเป็นเอนไซม์หลักที่สำคัญ ในเมแทบอลิซึมของการใช้น้ำตาลไซโลสในวิถีเพนโตสฟอสเฟต ส่วนเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลสเป็นเอนไซม์หลักที่สำคัญที่พบเฉพาะในวิถีฟอสโฟคีโตเลสเท่านั้น ดังนั้นการตรวจพบเอนไซม์ดังกล่าวข้างต้นในเซลล์ของ *Lc. lactis* IO-1 จะทำให้ทราบถึงวิถีของการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ไม่สามารถตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์คีโตเลสและเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลสได้ เนื่องจากไม่มีไซลูโลส-5-ฟอสเฟตซึ่งเป็นสับสเตรตที่สำคัญในการตรวจหาเอนไซม์ดังกล่าว ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงตรวจหาเฉพาะเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลสและฟรุก

โตส-1,6-ไดฟอสเฟต ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่สำคัญในวิถีเพนโตสฟอสเฟต ในสารละลายเซลล์สกัด (free cell extract) ของ *Lc. lactis* IO-1 ที่เก็บในช่วงกลางของระยะที่มีการเจริญสูงสุด (mid-log phase) ซึ่งจากผลการทดลองพบฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟตในทุกสภาวะของการศึกษา และความเข้มข้นของฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟตมีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ในขณะเดียวกันจากการทดลองไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลสในทุกสภาวะของการศึกษา อาจเป็นเพราะวิธีที่ใช้ในการตรวจหาเอนไซม์ดังกล่าวนี้ยังไม่ไวเพียงพอ จากการศึกษาของ Laopaiboon, (2001) ได้รายงานว่าสามารถตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์คีโตเลสและฟอสโฟคีโตเลสในสารละลายเซลล์สกัดของ *Lc. lactis* IO-1 ที่เลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นจากข้อมูลข้างต้นจึงสรุปได้ว่าวิถีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 จะผ่านทั้งวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลส

5.6 การวิเคราะห์เมแทบอลิกซ์ฟลักซ์ในการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)

จากการวิเคราะห์เมแทบอลิกซ์ฟลักซ์ในการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลไซโลสที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ โดยอาศัยข้อมูลจากการวัดปริมาณน้ำตาลไซโลสที่ให้และผลิตภัณฑ์ที่ถูกสร้างขึ้น (กรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์) ในระหว่างกระบวนการหมักในหน่วยของโมลผลิตภัณฑ์ต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าคาร์บอนไดออกไซด์ที่ตรวจพบมีปริมาณน้อย ($2.7x10^{-6}$ ถึง $4x10^{-4}$ โมลคาร์บอนไดออกไซด์ต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้) ดังนั้นในการวิเคราะห์เมแทบอลิกซ์ฟลักซ์จึงไม่นำโมลคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้ในการคำนวณเมแทบอลิกซ์ฟลักซ์

จากการวิเคราะห์เมแทบอลิกซ์ฟลักซ์ในการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลไซโลสโดยผ่านวิถีฟอสโฟคีโตเลสและวิถีเพนโตสฟอสเฟต ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร พบว่าไซโลส 1 โมล ถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลสและไซลูโลส-5-ฟอสเฟต จากนั้นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต 0.42 และ 0.58 โมล เข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลส ตามลำดับ ภายใต้สภาวะนี้มีการสร้างอะซิเทตเป็นผลิตภัณฑ์หลัก (1.18 โมล) โดยอะซิเทต 0.58 และ 0.60 โมลถูกสร้างขึ้นก่อนและหลังไพรูเวตเมแทบอลิซึม ตามลำดับ ส่วนแลคเตท ฟอร์เมต และเอทานอล ที่ถูกสร้างขึ้นจากวิถีไพรูเวตมีค่า 0.21, 1.0 และ 0.40 โมล ตามลำดับ และไพรูเวต 0.07 โมล ถูกเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่นในวิถีไพรูเวตที่ไม่ได้ตรวจวัดในการทดลองเช่น ไดอะซิติล อะซิตาลดีไฮด์ และอะซิโตอิน (Cocaing-Bousquet et al., 1996) เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลเพิ่มขึ้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร พบว่าเมแทบอลิกฟลักซ์ของน้ำตาลไซโลสผ่านวิถีเพนโตสฟอสเฟตมากกว่าวิถีฟอสโฟคีโตเลส 22 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ถูกสร้างขึ้น โดยพบว่าภายใต้สภาวะนี้มีการสร้างอะซิเทตเป็นผลิตภัณฑ์หลัก (0.83 โมล) เช่นเดียวกับสภาวะที่มีน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร แต่ปริมาณอะซิเทตที่สร้างขึ้นมีค่าน้อยกว่า โดยพบว่าอะซิเทต 0.39 และ 0.44 โมล ถูกสร้างขึ้นก่อนและหลังไพรูเวตเมแทบอลิซึม แลคเตท ฟอร์เมต และเอทานอล ที่ถูกสร้างขึ้นจากวิถีไพรูเวต มีค่า 0.48, 0.81 และ 0.37 โมล ตามลำดับ ในขณะที่ไพรูเวต 0.12 โมล ถูกเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่นในวิถีไพรูเวตที่ไม่ได้ตรวจวัดในการทดลอง อย่างไรก็ตามภายใต้สภาวะนี้จะเห็นว่าปริมาณแลคเตทมีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณอะซิเทต ฟอร์เมต และเอทา

นอล มีค่าลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่มีการใช้น้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเป็น 30 กรัมต่อลิตร พบว่าไซลูโลส-5-ฟอสเฟต 0.55 และ 0.45 โมล ผ่านวิถีเพนโตสฟอสเฟตและฟอสโฟคีโตเลส ตามลำดับ และพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ถูกสร้างขึ้น ซึ่งภายใต้สภาวะนี้มีการสร้างแลคเตทเป็นผลิตภัณฑ์หลัก (0.71 โมล) อะซิเทต 0.45 และ 0.19 โมล ถูกสร้างขึ้นก่อนและหลังไพรูเวตเมแทบอลิซึม ตามลำดับ ปริมาณแลคเตท ฟอร์เมต และเอทานอล ที่ถูกสร้างจากวิถีไพรูเวตมีค่า 0.71, 0.52 และ 0.33 ตามลำดับ และพบว่าไพรูเวต 0.14 โมล ถูกเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่นในวิถีไพรูเวตที่ไม่ได้ตรวจวัดในการทดลอง ภายใต้สภาวะนี้พบว่าปริมาณอะซิเทต ฟอร์เมต และเอทานอล มีค่าลดลง ในขณะที่ปริมาณแลคเตทมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่มีน้ำตาลไซโลส 5 และ 10 กรัมต่อลิตร สำหรับการวิเคราะห์ เมแทบอลิกซ์ฟลักซ์ในสภาวะที่มีน้ำตาลไซโลส 50 กรัมต่อลิตร พบว่าไซลูโลส-5-ฟอสเฟต 0.67 และ 0.33 โมล ผ่านวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลส ตามลำดับ และพบว่าภายใต้สภาวะดังกล่าวมีการสร้างแลคเตทเป็นผลิตภัณฑ์หลักเช่นเดียวกันกับสภาวะที่มีน้ำตาลไซโลส 30 กรัมต่อลิตร และแลคเตทที่สร้างขึ้นมีค่ามากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่มีน้ำตาลไซโลส 5, 10 และ 30 กรัมต่อลิตร อะซิเทต 0.33 และ 0.17 โมล ถูกสร้างขึ้นก่อนและหลังไพรูเวตเมแทบอลิซึม ตามลำดับ ปริมาณแลคเตท ฟอร์เมต และเอทานอล ที่ถูกสร้างขึ้นจากวิถีไพรูเวต มีค่า 0.84, 0.41 และ 0.24 โมล ตามลำดับ ในขณะที่ไพรูเวต 0.20 โมล ถูกเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่นในวิถีไพรูเวตที่ไม่ได้ตรวจวัดในการทดลอง จากผลการทดลองดังกล่าวจะพบว่าไซลูโลส-5-ฟอสเฟตจะเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตมากกว่าเข้าสู่วิถีฟอสโฟคีโตเลสเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณแลคเตทมีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณอะซิเทต ฟอร์เมต และเอทานอล มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสมีผลต่อวิถีไพรูเวตเมแทบอลิซึม นอกจากนี้การตรวจพบฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟตที่มีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสที่เพิ่มมากขึ้น แสดงให้เห็นว่าฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟตอาจมีผลต่อการสร้างแลคเตทในระหว่างกระบวนการหมัก Cocaing-Bousquet et al., 1996 รายงานว่าความเข้มข้นของฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟตที่เพิ่มขึ้นมีผลไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจิเนสให้เพิ่มขึ้น ซึ่งเอนไซม์นี้เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสร้างแลคเตท

5.7 การวิเคราะห์พรินซิเพิลโนดของการใช้น้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดย *Lc. lactis* IO-1 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ

เนื่องจากการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ผ่านทั้งวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลสพร้อมกัน ซึ่งทั้ง 2 วิถีสามารถเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต โดยการทำงานของเอนไซม์ดี-ไซลูโลไคเนส นอกจากนี้ทั้ง 2 วิถียังสามารถสร้างไพรูเวตซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการนำไปสร้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมัก ดังนั้นการวิเคราะห์พรินซิเพิลโนดของไซลูโลส-5-ฟอสเฟตและไพรูเวตจึงมีความสำคัญเพราะจะทำให้ทราบถึงปริมาณไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่ถูกเมแทบอไลซ์ผ่านวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลส และปริมาณไพรูเวตที่ถูกนำไปใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก

จากการวิเคราะห์พรินซิเพิลโนดของไซลูโลส-5-ฟอสเฟต พบว่าภายใต้สภาวะที่มีน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร ไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่ถูกสร้างขึ้นจะเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลส 42 และ 52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งภายใต้สภาวะดังกล่าวไซลูโลส-5-จะเข้าสู่วิถีฟอสโฟคีโตเลสมากกว่าวิถีเพนโตส

ฟอสเฟต 16 เปอร์เซ็นต์ เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้น (10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) พบว่าไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่ถูกสร้างขึ้นจะเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตมากกว่าวิถีฟอสโฟคีโตเลส โดยพบปริมาณไซลูโลส-5-ฟอสเฟตเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟต 61, 55 และ 67 เปอร์เซ็นต์ และเข้าสู่วิถีฟอสโฟคีโตเลส 39, 45 และ 33 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสมีผลต่อเมแทบอลิซึมของไซลูโลส-5-ฟอสเฟตใน *Lc. lactis* IO-1 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ

จากการวิเคราะห์พรินซิเพิลโนดของไพรูเวต พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ไพรูเวตที่ถูกสร้างขึ้นส่วนใหญ่จะถูกนำไปใช้ในการสร้างฟอร์เมตและอะซิติล-โคเอ 78 และ 57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ไพรูเวตอีกส่วนหนึ่งถูกนำไปใช้ในการสร้างแลคเตท 17 และ 34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไพรูเวตอีก 5 และ 9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ถูกเปลี่ยนเป็นสารที่ไม่ได้ตรวจวัดในวิถีไพรูเวตในการทดลองนี้ จากการตรวจพบฟอร์เมตและแลคตเทตภายใต้สภาวะดังกล่าว แสดงให้เห็นว่ามีการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวตฟอร์เมตไลเอส (pyruvateformatelyase; PFL) และแลคเตทดีไฮโดรจิเนส (lactate dehydrogenase; LDH) เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้นเป็น 30 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่า ไพรูเวตส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้ในการสร้างแลคเตท 52 และ 58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ไพรูเวตอีกส่วนหนึ่งถูกนำไปใช้ในการสร้างฟอร์เมตกับอะซิติล-โคเอ 38 และ 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไพรูเวตอีก 10 และ 14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ถูกเปลี่ยนเป็นสารที่ไม่ได้ตรวจวัดในวิถีไพรูเวตในการทดลองนี้ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่สภาวะดังกล่าวมีการทำงานของเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจิเนสมากกว่าเอนไซม์ไพรูเวตฟอร์เมตไลเอส เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่มีน้ำตาลไซ โลส 5 และ 10 กรัมต่อลิตร

อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่าฟอร์เมตกับอะซิติล-โคเอ ที่ถูกสร้างขึ้นจากไพรูเวตค่าลดลง ในขณะเดียวกันปริมาณแลคเตทมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวตฟอร์เมตไลเอส และเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจิเนส ในวิถีไพรูเวตของ *Lc. lactis* IO-1 นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณสารที่ไม่ได้ตรวจวัดในวิถีไพรูเวตของการทดลองมีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสที่เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าน้ำตาลไซโลสถูกนำไปใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ได้ตรวจวัดในการทดลองนี้ เช่น ไดอะซิติล อะซิตาลดีไฮด์ และอะซิโตอิน เป็นต้น (Cocaing-Bousquet et al., 1996)

5.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย

การไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดโดยตรงนอกจากจะได้ปริมาณน้ำตาลต่ำแล้ว ยังได้ผลพลอยได้อื่น ๆ เช่น กรดอะซิติก กรดลิวูลินิก สารประกอบฟีนอล ฟูราน และอนุพันธ์ (เช่น เฟอฟูรอล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟูรอล) (Bonn et al., 1985; Martin et al., 2002) ซึ่งสารเหล่านี้มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมัก (Watson et al., 1984; Larsson et al., 1999; Rodriquez-Chong et al., 2004) จากผลการทดลองของ Dominquez et al., 1997 พบว่าการไฮโดรไลซ์ซังข้าวโพดด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (10 เปอร์เซ็น โดยปริมาตร) สามารถสกัดลิกนินได้ในปริมาณสูง จากนั้นจึงนำซังข้าวโพดไปไฮโดรไลซ์ต่อด้วยสารละลายกรดไฮโรคลอริกและ/หรือกรดซัลฟูริก พบว่าจะได้น้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่มีปริมาณสูง

(ประมาณ 130 กรัมต่อลิตร) เนื่องจากสารละลายด่างจะทำให้ลิกนินซึ่งเป็นโครงสร้างที่ทำให้ผนังเซลล์ของพืชมีความแข็งแรง เกิดการยืดหยุ่นและพองตัว ทำให้ลิกนินสามารถละลายในน้ำได้มากขึ้น และเมื่อนำไปไฮโดรไลซ์ต่อด้วยกรดจะทำให้ได้น้ำตาลในปริมาณสูง จากการทดลองของ Dominquez et al. 1997 ยังพบว่าการไฮโดรไลซ์ซังข้าวโพดด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ก่อนที่จะนำไปไฮโดรไลซ์ต่อด้วยกรด นอกจากจะทำให้ได้น้ำตาลในปริมาณสูงแล้วยังพบว่าสามารถลดปริมาณสารยับยั้ง (inhibitors) ลงได้อีกด้วย ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Cao et al. 1996 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์มาไฮโดรไลซ์ชานอ้อยก่อน จากนั้นจึงนำชานอ้อยที่ได้ไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรด ไฮโดรคลอริกและ/หรือกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

5.8.1 การไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (8, 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร)

จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (8, 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง พบว่าการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถสกัดลิกนินออกจากชานอ้อยได้มากที่สุดคือ 322.19 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 8 และ 12 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถสกัดลิกนินออกได้ 303.39 และ 277.46 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การไฮโดรไลซ์ชานอ้อยในชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่นสามารถสกัดลิกนินได้เพียง 38 มิลลิกรัมต่อลิตร การใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ในการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยจะมีผลทำให้โครงสร้างของลิกนินมีความยืดหยุ่นและพองตัว ทำให้ลิกนินสามารถละลายในน้ำได้ดีขึ้น (Martin et al., 2002; Dominquez et al., 2003) ดังนั้นการสกัดลิกนินออกจากชานอ้อยก่อนจึงเป็นวิธีหนึ่งที่จะทำให้การไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Dominquez et al., 1997)

5.8.2 การไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง (0.5, 2, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน (90, 100, 110 และ 120 องศาเซลเซียส)

ชานอ้อยที่ผ่านการสกัดเอาลิกนินออก โดยการไฮโดรไลซ์ด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร) ถูกนำมาไฮโดรไลซ์ต่อด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จากผลการทดลองพบว่า จะได้น้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์หลักโดยพบปริมาณน้ำตาลไซโลสสูงสุดเท่ากับ 15.16 กรัมต่อลิตร เมื่อไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ที่เวลา 4 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลไซโลสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในกรณีที่มีการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 90, 100 และ 110 องศาเซลเซียส) 2 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 90 และ 100 องศาเซลเซียส) และ 3 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส) นอกเหนือจากกรณีที่กล่าวมาจะพบว่าปริมาณน้ำตาลไซโลสจะมีค่าเพิ่มขึ้นในช่วงแรกของการไฮโดรไลซ์ จากนั้นปริมาณน้ำตาลไซโลสจะมีค่าลดลง โดยเฉพาะในกรณีไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส) 2 เปอร์เซ็นต์ (110 และ 120 องศาเซลเซียส) 3 เปอร์เซ็นต์ (อุณหภูมิ 100 และ 120 องศาเซลเซียส) และ 5 เปอร์เซ็นต์ (อุณหภูมิ 100, 110 และ

เฟอฟูรอลเมื่อไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่อุณหภูมิ 90 (ที่ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก 0.5, 2, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์) และ 100 องศาเซลเซียส (ที่ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก 0.5 เปอร์เซ็นต์) นอกเหนือจากกรณีดังกล่าวจะพบเฟอฟูรอล โดยเฉพาะกรณีการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ที่เวลา 5 ชั่วโมง) ซึ่งพบว่าจะได้เฟอฟูรอลสูงสุดเท่ากับ 3.13 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของกรดและอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อปริมาณเฟอฟูรอล ปริมาณเฟอฟูรอลมีค่าเพิ่มขึ้นในขณะที่ปริมาณน้ำตาลไซโลสมีค่าลดลง ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากน้ำตาลไซโลสส่วนหนึ่งถูกเปลี่ยนไปเป็นเฟอฟูรอลในระหว่างกระบวนการไฮโดรไลซิส (Fengel & Wegener, 1984; Bustos et al., 2002) เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลกลูโคส พบว่าน้ำตาลกลูโคสมีค่าเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์ โดยเฉพาะกรณีการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส พบว่าจะได้น้ำตาลกลูโคสสูงสุดเท่ากับ 10.04 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณน้ำตาลอะราบิโนสที่ได้มีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง ยกเว้นกรณีการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 110 และ 120 องศาเซลเซียส) พบว่าปริมาณน้ำตาลอะราบิโนสมีค่าลดลงอย่างชัดเจน เมื่อเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากน้ำตาลอะราบิโนสส่วนหนึ่งถูกเปลี่ยนเป็นเฟอฟูรอล (Fengel & Wegener, 1984) อย่างไรก็ตามปริมาณน้ำตาลอะราบิโนสที่ได้มีค่าค่อนข้างต่ำคืออยู่ในช่วง 0.11-1.48 กรัมต่อลิตร ดังนั้นปริมาณเฟอฟูรอลที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จึงน่าจะมาจากน้ำตาลไซโลส ส่วนปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากการไฮโดรไลซ์มีค่าค่อนข้างต่ำ (0.02-0.22 กรัมต่อลิตร) ผลการทดลองที่ได้ดังกล่าวคล้ายกับการศึกษาของ Dominquez et al. (1997) โดยพบว่าเมื่อไฮโดรไลซ์ซังข้าวโพดที่ผ่านการสกัดเอาลิกนินออกโดยใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร) ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (1 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส) จะได้น้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก (71.9 กรัมต่อลิตร) นอกจากนี้ยังพบปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส กรดอะซิติก และเฟอฟูรอล เท่ากับ 6.7, 5.3, 1.82 และ 0.74 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และพบว่าเมื่อไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นต่ำ (1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส) มีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลไซโลสและกลูโคสเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์ ส่วนน้ำตาลอะราบิโนสและกรดอะซิติกที่ได้มีค่าเพียงเล็กน้อยตลอดการทดลอง และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของ Rodriquez-Chong et al. (2004) พบว่าเมื่อไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไนตริก (6 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส) จะได้น้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์หลักซึ่งมีค่าสูงสุดเท่ากับ 21 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 180 นาที นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลไซโลสจะลดลงเมื่ออุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้น

เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยพบว่า การไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ที่เวลา 5 ชั่วโมง จะให้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์สูงสุดเท่ากับ 15.95 (ได้น้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส และกรดอะซิติก เท่ากับ 2.66, 13.09, 1.22 และ 0.06 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) เนื่องจากผลรวมของน้ำตาลที่ได้จากสภาวะดังกล่าวมีค่าสูงในขณะที่ปริมาณสารยับยั้งที่ได้มีปริมาณต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่าภายใต้สภาวะการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5 (ที่อุณหภูมิ 90 และ 100 องศาเซลเซียส), 2 (ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส) และ 3 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส) จะให้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้น นอกเหนือจากสภาวะดังกล่าวข้างต้นพบว่า ประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยจะเพิ่มขึ้นในช่วงแรก

ของเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์ จากนั้นประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซ์จะลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์เพิ่ม ขึ้น เนื่องจากปริมาณสารยับยั้ง (กรดอะซิติกและเฟอฟูรอล) ที่สภาวะดังกล่าวมีค่าเพิ่มขึ้น

5.8.3 การไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริก (0.5, 2, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (90, 100, 110 และ 120 องศาเซลเซียส)

การไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกจะได้น้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก เช่นเดียวกับการใช้กรดไฮโดรคลอริก โดยพบปริมาณน้ำตาลไซโลสสูงสุดเท่ากับ 12.64 กรัมต่อลิตร เมื่อไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ที่เวลา 4 ชั่วโมง) ซึ่งน้ำตาลไซโลสที่ได้นี้มีค่าน้อยกว่าน้ำตาลไซโลสสูงสุดที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก (15.16 กรัมต่อลิตร) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ชนิดและความเข้มข้นของกรดมีผลต่อปริมาณน้ำตาลไซโลสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลกลูโคสพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์ ซึ่งมีแนวโน้มคล้ายกับการใช้กรดไฮโรคลอริก และเมื่อไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ที่เวลา 5 ชั่วโมง พบว่า จะได้น้ำตาลกลูโคสสูงสุดเท่ากับ 8.85 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้มีค่าน้อยกว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุดที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก (10.04 กรัมต่อลิตร) ส่วนปริมาณน้ำตาลอะราบิโนสที่ได้มีค่าอยู่ระหว่าง 0.30-1.42 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาล อะราบิโนสที่ได้จากการใช้กรดไฮโดรคลอริก (0.11-1.48 กรัมต่อลิตร) ในขณะที่ปริมาณกรดอะซิติกมีค่าอยู่ระหว่าง 0.02-0.14 กรัมต่อลิตร โดยพบกรดอะซิติกในกรณีการใช้กรดซัลฟูริกไฮโดรไลซ์ที่อุณหภูมิ 90 (ที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์), 100 (ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์), 110 (ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์) และ 120 องศาเซลเซียส (ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์) จากผลการทดลองที่ได้พบกรดอะซิติกมีค่าค่อนข้างต่ำเช่นเดียวกับการใช้กรดไฮโดรคลอริกไฮโดรไลซ์ (0.02-0.22 กรัมต่อลิตร) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าชนิด ความเข้มข้นของกรด อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์มีผลต่อปริมาณกรดอะซิติกน้อยมาก นอกจากนี้พบปริมาณเฟอฟูรอลที่ได้มีค่าอยู่ระหว่าง 0.16-2.24 กรัมต่อลิตร เมื่อไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ที่เวลา 5 ชั่วโมง พบว่าจะได้ปริมาณเฟอฟูรอลสูงสุด (2.24 กรัมต่อลิตร) ซึ่งเป็นสภาวะเดียวกับที่พบเฟอฟูรอลสูงสุด (3.13 กรัมต่อลิตร) เมื่อไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณเฟอฟูรอลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของกรดและอุณหภูมิเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกพบว่า ประสิทธิภาพสูงสุดมีค่าเท่ากับ 15.26 เมื่อไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ที่เวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งประสิทธิภาพสูงสุดที่ได้มีค่าน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กรดไฮโดรคลอริก (15.95) ในการไฮโดรไลซ์ ผลการทดลองดังกล่าวคล้ายกับการศึกษาของ Aguilar et al. (2002) ที่ศึกษาการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริก โดยพบว่าการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) อุณหภูมิ 122 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ ที่สภาวะดังกล่าวพบปริมาณน้ำตาลไซโลส น้ำตาลกลูโคส กรดอะซิติก และเฟอฟูรอล เท่ากับ 21.6, 3, 3.65 และ 0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำตาลไซโลสส่วนหนึ่งถูกเปลี่ยนเป็นเฟอฟูรอล ในขณะ

ที่น้ำตาลกลูโคสถูกเปลี่ยนเป็นไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟูรอล เมื่อความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก อุณหภูมิ และเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้น (Kim et al., 1987)

น้ำตาลไซโลสที่เป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือกรดซัลฟูริกมาจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไซแลนที่ต่ออยู่กับเฮมิเซลลูโลส ส่วนน้ำตาลกลูโคสได้มาจากการสลายตัวของทั้งเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบมากในชานอ้อย (Dominquez et al., 1997; Aguilar et al., 2002; Rodriquez-Chong et al., 2004) แต่เมื่อพิจารณาโครงสร้างพบว่าเซลลูโลสมีความแข็งแรงกว่าเฮมิเซลลูโลส เพราะภายในโครงสร้างของเซลลูโลสมีการจัดเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ ดังนั้นน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยส่วนใหญ่จึงน่าจะมาจากเฮมิเซลลูโลส (Aguilar et al., 2002) แต่จากการรายงานของ Rodriquez-Chong et al. (2004) พบว่าน้ำตาลกลูโคสที่ได้ส่วนใหญ่มาจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเซลลูโลส เนื่องจากเซลลูโลสมีความไวในการทำปฏิกิริยากับกรดไนตริกมากกว่า อย่างไรก็ตาม Aguilar et al. (2002) รายงานว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์ตลอดจนสภาวะที่ใช้ในกาทดลอง สำหรับน้ำตาลอะราบิโนสได้มาจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของอะราบิโนไซแลน (arabinoxylan) ซึ่งเป็นเฮเทอโรโพลิเมอร์ (heteropolymer) ของเฮมิเซลลูโลส ในขณะเดียวกันการสลายตัวของหมู่อะซิติลที่ต่ออยู่กับไซแลนจะทำให้เกิดกรดอะซิติกในระหว่างกระบวนการไฮโดรไลซิส (Garrote et al., 2001) ส่วนเฟอฟูรอลเป็นสารในกลุ่มอัลดีไฮด์ (aldehyde) ที่เกิดจากการสลายตัวของน้ำตาลเพนโตส (เช่น น้ำตาลไซโลสและอะราบิโนส) โดยเฉพาะในกรณีการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยในสภาวะที่มีความเข้มข้นของกรดและอุณหภูมิสูง พบว่ามีการเกิดเฟอฟูรอลสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยในสภาวะที่มีความเข้มข้นของกรดและอุณหภูมิต่ำ (Fengel & Wegener, 1984; Dominquez et al., 1997; Aguilar et al., 2002; Rodriquez-Chong et al., 2004)

5.9 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากชานอ้อย

สารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง ถูกนำมาใช้ในการศึกษาการผลิตกรดแลคติกภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* IO-1 ไม่สามารถใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในสารละลายได้ และไม่พบการสร้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมัก ในขณะเดียวกันพบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีอัตราการเจริญที่ต่ำ โดยพบน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.01 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า สารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลคติกของ *Lc. lactis* IO-1 เพราะแลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่ต้องการอาหารสมบูรณ์ในการเจริญ (Marshall et al., 1984) ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Garde et at. (2001) ที่ได้รายงานว่าการเติมแหล่งไนโตรเจนลงในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ผลอินทผลัม มีผลต่ออัตราการเจริญและการผลิตกรดแลคติกของ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีการศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย ซึ่งได้แก่ ยีสต์สกัด เพปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 3, 5 และ 7 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้ได้ทั้งน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลส และพบว่ามีการสร้างกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล

เมื่อมีการเติมยีสต์สกัด (3, 5 และ 7 กรัมต่อลิตร) เพปโตน (5 และ 7 กรัมต่อลิตร) รวมถึงการเติมแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิด (อย่างละ 5 กรัมต่อลิตร) ส่วนกรณีการเติมเพปโตน 3 กรัมต่อลิตร พบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้เฉพาะน้ำตาลกลูโคสเท่านั้น อาจเป็นเพราะแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงไปไม่เพียงพอต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของ *Lc. lactis* IO-1 สำหรับการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต (3, 5 และ 7 กรัมต่อลิตร) พบว่า *Lc. lactis* IO-1 ไม่สามารถใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในสารละลายได้และไม่พบการสร้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมัก แสดงให้เห็นว่า *Lc. lactis* IO-1 ต้องการสารอาหารอื่นนอกเหนือจากแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้ในการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ ซึ่งสารอาหารเหล่านั้นมีในยีสต์สกัดและเพปโตน แต่ไม่มีในแอมโมเนียมซัลเฟต เนื่องจากในแอมโมเนียมซัลเฟตมีเฉพาะแหล่งไนโตรเจนเท่านั้น ในขณะที่ยีสต์สกัดและเพปโตนมีสารอาหารชนิดอื่นนอกเหนือจากแหล่งไนโตรเจน เช่น กรดอะมิโน เพปไทด์ วิตามินบี และกรดอินทรีย์บางชนิด (เช่น กรดไพรูวิก และกรดกลีเซอริก) ซึ่งสารอาหารเหล่านี้มีผลต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Cox et al., 1997; Taso & Hanson, 1975) อย่างไรก็ตามจากการรายงานของ Arasaratnam et al. (1996) พบว่ามีแลคติกแอซิดแบคทีเรียในกลุ่มของแลคโตบาซิลไล (lactobacilli) สามารถใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเจริญและการสร้างกรดแลคติก นอกจากนี้ยังพบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตจะถูกนำไปใช้ในการสร้างกรดอะมิโนบางชนิดและโปรตีนภายในเซลล์

เมื่อพิจารณาผลได้ของเซลล์ในกรณีที่มีการเติมยีสต์สกัด พบว่าผลได้ของเซลล์มีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 10) และการเติมยีสต์สกัด 7 กรัมต่อลิตร จะให้ผลได้ของเซลล์สูงสุด (0.20 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมของน้ำตาลผสมที่ถูกใช้) ซึ่งสูงกว่าผลได้ของเซลล์สูงสุดที่ได้จากการเติมเพปโตน 5 กรัมต่อลิตร (0.19 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมของน้ำตาลผสมที่ถูกใช้) และการเติมแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิดอย่างละ 5 กรัมต่อลิตร (0.18 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมของน้ำตาลผสมที่ถูกใช้) ส่วนผลได้ของกรดแลคติกสูงสุดมีค่า 0.26 กรัมต่อกรัมของน้ำตาลผสมที่ถูกใช้ ซึ่งพบในกรณีที่มีการเติมยีสต์สกัด 7 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 10) อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* IO-1 สร้างกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในระหว่างกระบวนการหมัก ยกเว้นในกรณีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตและเพปโตน (3 กรัมต่อลิตร) ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลส (2.5, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร) โดยพบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการสร้างกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลไซโลส และปริมาณกรดแลคติกที่ได้มีค่าต่ำเนื่องจากปริมาณน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสโดยเฉลี่ยที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยมีค่าน้อย คือ 0.43 และ 2.62 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลและระยะเวลาที่ใช้ในการหมักภายใต้สภาวะดังกล่าว พบว่า *Lc. lactis* IO-1 ใช้เวลาในการหมักนานและมีอัตราการใช้น้ำตาลค่อนข้างช้าเมื่อเปรียบทียบกับสภาวะที่เลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลกลูโคสและ/หรือน้ำตาลไซโลสในสูตรอาหารพื้นฐาน และในบางสภาวะพบว่า *Lc. lactis* IO-1 ไม่สามารถใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในสารละลายได้หมด เช่นในกรณีการเติมยีสต์สกัด (3 กรัมต่อลิตร) เพปโตน (3, 5 และ 7 กรัมต่อลิตร) รวมทั้งการเติมแหล่งไนโตรเจนทั้ง 3 ชนิด (อย่างละ 5 กรัมต่อลิตร) สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณไนโตรเจนที่เติมไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ในการเจริญของ *Lc. lactis* IO-1 และอาจเกิดจากสารยับยั้ง (inhibitors) ที่มีอยู่ในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย เช่น เฟอฟูรอล 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟูรอล กรดลิวูลินิก และสารประกอบฟีนอล ซึ่งสารเหล่านี้มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียในระหว่างกระบวนการหมัก (Olsson & Hahn-Hägerdal., 1996; Martin et al., 2002; Garde et al., 2002) อย่างไรก็ตามเมื่อนำ

สารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยไปลดความเป็นพิษโดยการนำสารละลายดังกล่าวผ่านลงในคอลัมน์ที่บรรจุด้วยสารดูดซับแอมเบอร์ไลซ์จากนั้นจึงนำสารละลายที่ได้ไปใช้ในการผลิตกรดแลคติก (ภาพที่ 67-68) ผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในสารละลายได้อย่างรวดเร็วซึ่งแตกต่างจากการผลิตกรดแลคติกในสารละลายที่ไม่ผ่านการลดความเป็นพิษ (ภาพที่ 60-66) จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารดูดซับแอมเบอร์ไลซ์สามารถลดความเป็นพิษในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย และมีผลทำให้ *Lc. lactis* IO-1สามารถใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในสารละลายได้และพบการสร้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมัก ผลการทดลองดังกล่าวคล้ายกับการศึกษาของ Dominques et al. (1997) ที่ศึกษาการผลิตไซลิทอล (xylitol) จากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ลำต้นข้าวโพดโดย *Candida* sp. 11-2 ซึ่งผลการทดลองพบว่า *Candida* sp. 11-2 สามารถใช้น้ำตาลไซโลสซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ในสารละลายที่ผ่านการลดความเป็นพิษด้วยสารดูดซับแอมเบอร์ไลซ์ และในสภาวะดังกล่าวยังพบว่าเซลล์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลไซโลส (เริ่มต้น 133 กรัมต่อลิตร) มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ไปเป็นไซลิทอลได้ 70 กรัมต่อลิตร ภายใน 36 ชั่วโมง ด้วยอัตราการผลิตเท่ากับ 1.94 กรัมไซลิทอลต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกจากนี้ผลการทดลองยังพบว่า *Candida* sp. 11-2 ไม่สามารถใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในสารละลายได้ในกรณีที่ไม่มีการลดความเป็นพิษของสารละลายก่อนทำการหมัก และพบว่า *Candida* sp. 11-2 สามารถเจริญได้ในสภาวะดังกล่าวแต่เจริญในอัตราที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่มีการลดความเป็นพิษของสารละลาย และในการทดลองของ Dominques et al. (1997) ได้เสนอว่าสารดูดซับแอมเบอร์ไลซ์สามารถลดปริมาณกรดอะซิติก สารประกอบฟีนอล และสารในกลุ่มฟูรานได้ ซึ่งสารในกลุ่มดังกล่าวมีผลต่อการใช้น้ำตาลของเซลล์ในระหว่างกระบวนการหมัก

เมื่อพิจารณาการผลิตกรดแลคติคจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่ผ่านการลดความเป็นพิษและมีการเติมยีสต์สกัด (7 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน (ภาพที่ 67) ซึ่งในสารละลายที่ได้ดังกล่าวประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก (22 กรัมต่อลิตร) กลูโคส (1.49 กรัมต่อลิตร) และอะราบิโนส (1.29 กรัมต่อลิตร) ผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลได้อย่างรวดเร็วภายใน 32 ชั่วโมง แต่ภายใต้สภาวะนี้ *Lc. lactis* IO-1 ผลิตกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก (6.91 กรัมต่อลิตร) ส่วนกรดแลคติกถูกสร้างเพียง 4.81 กรัมต่อลิตร ซึ่งแตกต่างจากการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้น 30 และ 50 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 24-25) หรือในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสมที่ความเข้มข้น 15 และ 25 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 35-36) ซึ่งภายใต้สภาวะนี้ *Lc. lactis* IO-1 ผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก จากผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าอาจมีสารบางชนิดในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่มีผลต่อการสร้างผลิตภัณฑ์ของเซลล์ในระหว่างกระบวนการหมัก และเมื่อปรับความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสในสารละลายให้มีค่าเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าเซลล์มีการสร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก (10.85 กรัมต่อลิตร) ในระหว่างกระบวนการหมัก (ภาพที่ 68) จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสมีผลต่อการสร้างกรดแลคติกของ *Lc. lactis* IO-1 ในระหว่างกระบวนการหมัก

จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยพบว่า *Lc. lactis* IO-1 ไม่สามารถใช้น้ำตาลอะราบิโนสในระหว่างกระบวนการหมักได้ ซึ่งอาจเกิดจากความไม่สามารถในการใช้น้ำตาลอะราบิโนสของ *Lc. lactis* IO-1 หรือสารยับยั้งที่มีอยู่ในสารละลายหรืออาจเกิดจากปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เติมไม่เพียงพอ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Garde et al. (2002) พบว่า *Lb. pentosus* และ *Lb.*

brevis สามารถใช้น้ำตาลอะราบิโนสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ฟางข้าวในสภาวะที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนอย่างเพียงพอ ซึ่งการใช้น้ำตาลอะราบิโนสของแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดดังกล่าวจะเกิดขึ้นหลังจากที่มีการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสหมดแล้วเท่านั้น นอกจากนี้ผลการทดลองที่ได้ยังสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Nancib et al. (2001) ที่ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตกรดแลคติกใน *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* โดยพบว่าการเติมยีสต์สกัด (5-20 กรัมต่อลิตร) ลงในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ผลอินทผลัมจะมีผลทำให้ปริมาณเซลล์ และอัตราผลผลิตกรดแลคติกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะเดียวกันการเพิ่มปริมาณของยีสต์สกัดยังช่วยทำให้ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* สามารถใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในสารละลายได้มากขึ้น นอกจากนี้ Nancib et al. (2001) ยังพบว่าการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตกรดแลคติกจะมีประสิทธิภาพมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เพปโตน แอมโมเนียมซัลเฟต หรือยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน

อย่างไรก็ตาม ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่ใช้ในการศึกษาการผลิตกรดแลคติกนี้มีค่าค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยภายใต้สภาวะเดียวกันกับการศึกษาเบื้องต้นจากการทดลองที่ 4.8 (คือการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง ภายในหลอดทดลอง ซึ่งได้น้ำตาลกลูโคส ไซโลส และอะราบิโนส 2.66, 13.09 และ 1.22 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) ซึ่งสาเหตุอาจมาจากเมื่อขยายขนาด (scale up) ของการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยเพิ่มขึ้นโดยการใช้ขวดแก้วขนาด 10 ลิตร ที่มีขนาดใหญ่และหนา อาจมีผลทำให้ชานอ้อยได้รับความร้อนไม่ทั่วถึงภายในระยะเวลาที่กำหนด และในขณะทดลองพบว่าชานอ้อยมีการอัดตัวกันเพิ่มขึ้น ซึ่งสาเหตุดังกล่าวอาจมีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลที่ได้มีค่าน้อยลง (ได้น้ำตาลกลูโคส ไซโลส และอะราบิโนส 0.43, 2.62 และ 1.82 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามเมื่อไฮโดรไลซ์ชานอ้อยในถังย่อยวัสดุชีวภาพ (กากมัน) ภายใต้สภาวะข้างต้น คือการใช้กรดไฮโดรคลอริก 0.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง และมีการกวน (90 รอบต่อนาที) ตลอดระยะเวลาของการไฮโดรไลซ์ พบว่าปริมาณน้ำตาลไซโลสที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้น (22 กรัมต่อลิตร) ในขณะที่น้ำตาลกลูโคสและอะราบิโนสมีค่าเพียง 1.50 และ 1.29 กรัมต่อลิตร ซึ่งสารละลายที่ได้ดังกล่าวถูกนำไปใช้ในการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในภาพที่ 66-68 จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการกวนชานอ้อยในระหว่างกระบวนการไฮโดรไลซ์มีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลที่ได้มีค่าสูงขึ้น ดังนั้นจากผลการทดลองจึงพบว่าการศึกษาเพื่อหาแนวทางในการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยเพื่อให้ได้น้ำตาลในปริมาณสูงเป็นสิ่งที่สำคัญก่อนนำสารละลายไปศึกษาการผลิตกรดแลคติก นอกจากนี้ควรพิจารณาเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมนอกเหนือจากการใช้ยีสต์สกัดซึ่งมีราคาแพง หรือการเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูกร่วมกับการใช้ยีสต์สกัด เช่น การใช้กากน้ำตาลทราย หรือน้ำแช่ฟางข้าวโพด เป็นต้น เพื่อลดต้นทุนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงคุณภาพของสารละลายที่ได้หลังจากกระบวนการไฮโดรไลซ์ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญ เพราะนอกจากมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบในสารละลายแล้วอาจมีสารยับยั้งที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียดังที่ได้กล่าวข้างต้นแล้ว ดังนั้นสารละลายที่ได้จึงจำเป็นต้องผ่านกระบวนการลดความเป็นพิษ (detoxification) ด้วยวิธีที่เหมาะสม เช่น การใช้เอนไซม์ (เช่น ฟีนอลออกซิเดสและแลคเคส) การใช้โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange chromatography) การใช้ผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) การปรับสภาพสารละลายให้เป็นกลาง (neutralization) และการปรับพีเอชด้วยสารละลายด่าง เป็นต้น (Watson et al., 1984; Roberto et al., 1991; van Zyl et al., 1991; Gong et al., 1993; Jonsson et al., 1998; Larsson et al., 1999) จากนั้นจึงนำสารละลายที่ได้ดังกล่าวไปใช้เป็นสับสเตรตในกระบวนการหมักต่อไป

บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

การศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) พบว่า *Lc. lactis* IO-1 สร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ผ่านกระบวนการหมักแบบโฮโมแลคติกแอซิดเฟอร์เมนท์เทชัน แสดงให้เห็นว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสของ *Lc. lactis* IO-1 ผ่านวิถีไกลโคไลซิส และนอกจากนี้พบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการสร้างกรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล เป็นผลพลอยได้ในระหว่างกระบวนการหมัก

การศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) พบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสมีผลต่อการผลิตกรดแลคติกในระหว่างกระบวนการหมักของ *Lc. lactis* IO-1 โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 5 และ 10 กรัมต่อลิตร *Lc. lactis* IO-1 สร้างกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ในขณะเดียวกันที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 30 และ 50 กรัมต่อลิตร *Lc. lactis* IO-1 สร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักผ่านกระบวนการหมักแบบหมักแบบเฮเทอโรแลคติกแอซิดเฟอร์เมนท์เทชัน หรือมิกแอซิดเฟอร์เมนท์เทชัน

จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 2.5, 5, 10, 15, 25, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) พบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการเจริญแบบ diauxic และมีการสร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ยกเว้นในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสมที่ความเข้มข้นอย่างละ 2.5, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ซึ่งที่สภาวะดังกล่าว *Lc. lactis* IO-1 มีการสร้างกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่มากที่สุดในน้ำตาลผสมที่ไม่มีผลยับยั้งการใช้น้ำตาลไซโลส มีค่าเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร

การศึกษาวิถีการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตกรดแลคติกโดย *Lc. lactis* IO-1 ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะพบว่า วิถีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 จะผ่านวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลสพร้อมกันเนื่องจากตรวจพบฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต เอนไซม์ทรานส์คีโตเลส และเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลสในสารละลายเซลล์สกัดของ *Lc. lactis* IO-1

การศึกษาเมแทบอลิกซ์ฟลักซ์ในการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลไซโลสพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสมีผลต่อการสร้างแลคเตท โดยปริมาณแลคเตทมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้นและยังพบว่าน้ำตาลไซโลสถูกนำเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตมากกว่าวิถีฟอสโฟคีโตเลสภายใต้สภาวะที่ศึกษา ยกเว้นในกรณีที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร

การศึกษาพรินซิเพิลโนดของไซลูโลส-5-ฟอสเฟตและไพรูเวต พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสมีผลต่อปริมาณไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่ถูกนำเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลส และพบว่าปริมาณไซลูโลส-5-ฟอสเฟตสูงสุดที่เข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลส มีค่า 67 และ 58 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 50 และ 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสยังมีผลต่อเมแทบอลิซึมของไพรูเวต และการสร้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมัก โดยพบว่าไพรูเวตที่สร้างขึ้นจะถูกนำไปใช้ในการผลิตแลคเตทเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสที่เพิ่มมากขึ้น

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยพบว่า การไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้อง สามารถสกัดลิกนินได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 322.19 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อนำชานอ้อยไปไฮโดรไลซ์ต่อด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง จะให้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์สูงสุดเท่ากับ 15.95 และที่สภาวะดังกล่าวจะได้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลอะราบิโนส และกรดอะซิติก เท่ากับ 2.66, 13.09, 1.22 และ 0.06 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

การศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยพบว่า ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดแลคติกของ *Lc. lactis* IO-1 และพบว่าการเติมยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 7 กรัมต่อลิตร จะให้ผลได้ของกรดแลคติกสูงสุดเท่ากับ 0.26 กรัมกรดแลคติกต่อกรัมน้ำตาลผสมที่ถูกใช้ นอกจากนี้ยังพบว่า สารดูดซับแอมเบอร์ไลซ์มีประสิทธิภาพในการลดความเป็นพิษของสารยับยั้งในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยและส่งผลให้ *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในสารละลายได้และพบการสร้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมัก เช่น กรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล อย่างไรก็ตามไม่สามารถตรวจพบคาร์บอนไดออกไซด์ และ 2,3-บิวเทนไดออล

เอกสารอ้างอิง

ประสิทธิ์ ใจศิล. **พืชทดแทนพลังงานที่มีศักยภาพ.** เอกสารประกอบการสัมมนาระดมความคิดเห็น; 12-13 พฤษภาคม 2545; คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

นรชัย ลือกุลวัฒนะชัย. ตลาดน้ำตาลปี' 43 และแนวโน้มปี' 44. **ว. อุสาหกรรมทรรศน์** 2543; 7 (25): 37-38.

ศูนย์วิจัยกสิกรไทย จำกัด. อ้อยและน้ำตาลปี' 45 : เกษตรกรทำใจ รายได้หด. **ว. มองเศรษฐกิจ** 2545; 8(990): 3-5

เส้นใยธรรมชาติ. [ออนไลน์] 17 สิงหาคม 2545 [อ้างเมื่อ 2 มกราคม 2548]. จาก http://www.dnp.go.th/bio_com/Garbage_fiber.html

Aguilar R, Ramírez JA, Garrote G, Váquez M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Food Engineering** 2002; 55: 309-318.

Akerberg C, Zacchi G. An economic evoluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour. **Bioresouce Tecnology** 2000; 75: 119-126.

Arasaratnan V, Senthuran A, Balasubramaniam K. Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. **Enzyme and Microbial Technology** 1996; 19: 482-486.

Aristidou A, Penttilä M. Metabolic engineering application to renewable resource utilization. **Biotechnology** 2000; 11: 187-198.

Atlas RM. Microbial physiology-cellular biology. In: Atlas R M, editors. **Principles of Microbiology**. 2nd ed. London: Wm.C. Brown Publishers; 1997. p. 170 – 172.

Axelsson LT. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In: Salminen S, von Wright A, editors. **Lactic acid bacteria.** New york: Marcel; 1993. p. 1-63.

Bobillo M, Marshall VM. Effect of acidic pH and salt on acid end-products by *Lactobacillus plantarum* in aerated, glucose-limited continuous culture. **Applied Bacteriology** 1992; 73: 67-70.

Bond DR, Tsi BM, Russell JB. The diversion of lactose carbon through the tagatose pathway reduces the intracellular fructose 1,6 diphosphate and growth rate of *Streptococcus bovis*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 1998; 49: 600-605.

Bonn G. Analytical determination of 1,6-anhydro-β-D-glucopyranose and kinetic studies under hydrothermal conditions. **Journal of Carbohydrate Chemistry** 1985; 4: 405-419.

Bottazzi V. An introduction in rod-shaped lactic acid bacteria. **Biochimie** 1988; 70: 303-315.

Bustos G, Ramirez JA, Vázquez M. **Hydrolysis of sugar cane bagasse with hydrochloric acid at atmospheric pressure to obtain xylose.** Paper presented at the International Conference on The Annual Meeting and Food Expo; 2002 June 17; Anaheim, California.

Bulut S, Elibol M, Ozer D. Effect of different carbon sources on L(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. **Journal of Biochemical Engineering** 2004; 21: 33-37.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quatities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 1976; 72: 248-254.

Cao NJ, Krishnan MS, Du JX, Gong CS, Ho NWY, Chen ZD, Tsao GT. Ethanol production from corn pretreated by the ammonia steeping process using genetically engineered yeast. **Biotechnology Letter** 1996; 18: 1013-1018.

Carr JG, Whiting GC. Microbiological aspects of production and spoilage of ciders. **Applied Bacteriology** 1971; 34: 81-93.

Carr JG, Davies PA. Homofermentative lactobacilli of ciders including *Lactobacilli mali* nov. apec. **Applied Bacteriolgy** 1970; 33: 768-774.

Chaillou S, Lokman BC, Leer RJ, Posthuma C, Posma PW, Pouwels PH. Cloning sequence analysis and characterization of the genes involved in isoprimeverose metabolism in *Lactobacillus pentosus*. **Journal of Bacteriology** 1998; 180: 2312-2320.

Champagne CP, Gardner N, Doyon G. Production of *Leuconostoc oenos* biomass under pH control. **Applied and Environmental Microbiology** 1989; 55: 2488-2492.

Christensen JE, Dudley GE, Pederson JA, Steele JL. Peptidase and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leewenhoek** 1999; 76: 217-246.

Cocaing-Bousquet M, Garrigues C, Loubière P, Lindley ND. Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. **Antonie van Leeuwenhoek** 1996; 70: 253-267.

Condon S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. **FEMS Microbiology Review** 1987; 46: 269-280.

Cogan TM. Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc* spp. : effects on growth, substrate and products. **Applied Bacteriology** 1987; 63: 551-558.

Cox GC, Mac Bean RD, Chandler G. Lactic acid production by *Lactobacillus bulgaricus* in supplemented whey ultrafiltrate. **Australia Journal Dairy Technology** 1977; 32: 19-22.

De Figueroa RM, Oliver G, Benito de Cardenas IL. Influence of temperature on flavour compound production from citrate by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 4769. **Microbiology Research** 2001; 155: 257-262.

de Varies W, Kaptyn WMT, van der Beek EG, Stouthamer AH. Molar growth yield and fermentation balances of *Lactobacillus casei* L3 in batch cutures and continuous cultures. **General Microbiology** 1970; 63: 333-345.

Domínquez JM, Cao N, Gong CS, Tsao GT. Dilute acid hemicellulose hydrolysates from corncob for xylitol production by yeast. **Bioresource Technology** 1997; 61: 85-90.

Erlandson KA, Park J-H, Khal WE, Kao H-H, Basaran P, Brydges S, Batt CA. Dissolution of xylose metabolism in *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology** 2000; 66(9): 3974-3980.

Fengel D, Wegener G. **Wood Chemistry**: ultrastructure and reaction. 1st ed. Berlin: Water de Gruyter; 1984.

Fraenkel DG. Glycolysis, pentose phosphate pathways and Enter-Doudoroff pathway. In: Neidhardt FC, editor. ***E. coli* and *Salmonella typhimurium*-cellular and molecular biology**, 1987; p 142-150. Washington DC: American Society for Microbiology.

Garde A, Jonsson G, Schmidt AS, Ahring BK. Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*. **Bioresource Technology** 2002; 81: 217-223.

Garvie EI. Bacterial lactate dehydrogenase. **Microbiology Review** 1980; 44: 106-139.

Garrote G, Domínquez H, Parajo JC. Kinetic modeling of corncob autohydrolysis. **Process Biochemistry** 2001; 36: 571-578.

Gong CS, Chen CS, Chen LF. Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by yeast. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 1993; 39/40: 83-88.

Guyot JP, Morlon-Guyot J. Effect of different cultivation conditions on *Lactobacillus manihotivoran* OND32^T ,an amylolytic lactobacillus isolated from sour starch cassava fermentation. **Food Microbiology** 2001; 67: 217-225.

Hahn-Hägerdal B, Jeppsson H, Stoog K, Prior BA. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology** 1994; 16: 933-943.

Hammes WP, Weiss N, Holzapfel WP. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W and Schleifer KH editors. **The prokaryote-A Handbook on the biology of bacteria**: Ecophysiology, Isolation, Identification, Application. 1st ed. New York: Springer; 1991.p. 1535-1594.

Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology** 2000; 26: 87-107.

Hols P, Kleerebezem M, Schanck AN, Ferain T, Hugenholtz J, Del cour J, de Vos WM. Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering. **Nature Biotechnology** 1999; 17: 588-592.

Holtzapple MT, Jun JH, Ashok G, Patibandla SL, Dale BE. The ammonia freeze explosion (AFEX) process: A practical lignocellulose pretreatment. **Applied Biochemistry and Bioengineering** 1991; 28/29: 59-74.

Hugenholtz J. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Review** 1993; 12: 165-178.

Ingram LO, Aldrich HC, Borges ACC, Causey TB, Martínez A, Morales et al. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. **Biotechnology Progress** 1999; 15: 277-292.

Ishizaki A, Ohta T. Batch culture kinetics of L-lactate fermentation employing *Streptococcus* sp. IO-1. **Fermentation and Bioengineering** 1988; 67: 46-51.

Ishizaki A, Osajima K, Nakamura K, Kimura K, Hara T, Ogata S. General character and taxonomic study of *Lactococcus lactis* IO-1 JCM 7638. **Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University** 1990; 35(1.2): 1-7.

Ishizaki A, Osajima K, Nakamura K, Kimura K, Hara T, Ezaki T. Biochemical characterization of *Lactococcus lactis* IO-1 whose optimal temperature is as high as 37 °C. **Genetic Applied Microbiology** 1990; 36: 1-6.

Ishizaki A, Ueda T, Tanaka K, Stanbury PF. The kinetics of end-product inhibition of L-lactate production from xylose and glucose by *Lactococcus lactis* IO-1. **Biotechnology Letters** 1993: 15: 489-494.

Ishizaki A, Ueda T. Growth kinetics and product inhibition of *Lactococcus lactis* IO-1 culture in xylose medium. **Fermentation and Bioengineering** 1995; 3: 287-290.

Ishizaki A. Solution of environmental problem through biomass conversion using microbial technology. In: Proceeding ACS Symposium Series on Fuels and Biochemical from Biomass. **Biomass conversion to solve environmental problem.** American Chemical Society; 1997 (**666**). p. 336 – 344.

Jarvis L. 2001 **Lactic acid outlook up as polyacid near market.** Chemical Market Reporter 259(9) : 5–14.

Jonsson LJ, Palmqvist E, Nilvebrant NO, Hahn-Hägerdal B. Detoxification of wood hydrolsates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Applied Microbiology and Technology** 1998; 49: 691-697.

Jordan KN, Cogan TM. Identification and growth of non starter lactic acid bacteria in Irish Cheddar cheese. Ir. **Agricultural Food Research** 1994; 32: 47-55.

Kanagachadran K, Stanbury PF, Hall SJ, Ishizaki A. Glucose repression of xylose utilization by *Lactococcus lactis* IO-1. **Biotechnology Letters** 1997; 19: 923-925.

Kandler O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek** 1983; 49: 209-239.

Kim SB, Lee YY. Kinetics in acid-catalyzed hydrolysis of hardwood hemicellulose. **Biotechnology Bioengineering** 1987; 17: 71-84.

Konings WN, Kok J, Kuipers O P, Poolman B. Lactic acid bacteria : the bugs of the new millennium. **Current Opinion in Biotechnology** 2000; 3(3): 276 – 282.

Kunkee RE. Some roles of malic acid in malolactic fermentation in winemaking. **FEMS Microbiology Research** 1991; 88: 55-72.

Kwon S, Lee PC, Lee EG, Chang YK, Chang N. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. **Enzyme and Microbiology Technology** 2000; 36: 209-215.

Laopaiboon P. **The physiology of xylose utilization by *Lactococcus lactis* IO-1**.[Ph.D. Thesis in Fermentation Technology]. England: University of Hertfordshire; 2001.

Larsson S, Plamqvist E, Hahn-Hägerdal B, Tengborg C, Stenberg K, Zacchi G, Nilvebrant NO. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology** 1999; 24: 151-159.

Lawford HG, Rousseau JD. Improving fermentation performance of recombinant *Zymomonas* in acetic acid-containing media. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 1998; 70-72: 161-172.

Lawrence RC, Thomas TD. The fermentation of milk by lactic acid bacteria. In: Bull AT, Ellwood DC, Ratledge C. editors. **Proceeding of the symposium 29 on Microbial Technology**: Current state, Future Prospects. Society for General Microbiology. P. 187-219. Chambridge UK. Cambridge University Press.

Lermer M. **Lactic acid is reshuffling**. *Chemical marketing Reporter* 1996; 249, 7.

Lervering PR, Dijkhuizen L. Hydrocarbon and methylotrophy (transaldolase isoenzyme from Arthobacter P1) In: Lidstrom ME. editor. **Method in Enzymology**. 1986. P. 405-411. New York and London: Academic Press.

Liu S-Q. Practical implications of lactate and pyruvate mrtabolisim by lactic acid bacteria in food and beverage fermentation. **Food Microbiology** 2003; 83: 115-131.

Lopez de Felipe F, Hugenholtz J. Pyruvate flux distribution in NADH-oxidase overproducing *Lactococcus lactis* strain as a function of culture conditions. **FEMS Microbiology Letter** 1999; 179: 461-466.

Loubiere P, Novák L, Cocaing-Bousquet M, Lindley ND. Besoins nutritionels des bacteries lactiques: **interaction entre flux de carbone et d' azote**. Lait, 1996: 76: 5-12.

Lynd LR, Wyman CE , Gerngross TU. Biocommodity engineering. **Biotechnology Progress** 1999; 15: 777 – 793.

Madigan TM, Martinko JM, Parker J. Prokaryotic diversity In: Madigan TM, Martinko JM, Parker J, editors. **bacteria**. 8th ed. London Prentice Hall International Inc: Brock Biology of Microorganism; 1997; p. 635–740.

Maloney MT, Chapman TW, Baker AJ. Dilute acid hydrolysis of paper birch: Kinetic study of xylan and acetyl group hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering** 1985; 27: 355-361.

Maicas S, Ferrer S, Pardo I. NAD(P)H regeneration is the key for heterolactic fermentation of hexoses in *Oenococcus oeni*. **Microbiology** 2002; 148: 325-322.

Marshall VM. Review article: fermented milks and their future trends: I. Microbiological aspects. **Diary Research** 1996; 54: 559-574.

Marshall VM, Law BA. The physiology and growth of daily lactic acid bacteria. In " The Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk" ed by Davies FL, Law BA. **Elsevier Applied Science Publishs**, Essex .p. 70.

Martin C, Galbe M, Wahlbom FC, Hahn-Hägerdal B, Jonsson LJ. Ethanol production from enzymatic hydrolyzates of sugar cane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology** 2002; 31: 274-282.

Nancib N, Nancib A, Boudjelal A, Benslimane C, Blanchard F, Boudrant J. The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. **Bioresource Technology** 2001; 78: 149-153.

Novák L, Loubière P. The metabolic network of *Lactococcus lactis* : Didtribution of ^{14}C labeled substrate between catabolic and anabolic pathways. **Journal of Bacteriology** 2000; 182(4): 1136-1143.

Oda Y, Ito M, Kikuta Y, Park BS, Tonomura K. Comparison and characterization of *Lactobacillus amylovorus* strains for lactic acid fermentation of by-product. **Food Microbiology** 2000; **17**: 341– 347.

Oh H, Wee YJ, Yun JS, Han SH, Jung S, Ryu HW. Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. **Bioresource Technology** (serial online) 2004 Aug-Nov (cited 2005 Jan). Available from: www. sciencedirect.com

Olsson L, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology** 1996; 18: 312-331.

Pilone GJ. Control of malo-lactic acid fermentation in table wines by addition of fumaric acid. In: Carr J G, Cutting CV, Whiting GC. (Eds). **Lactic acid bacteria in beverages and food**. Academic Press; London. 1975; p. 121-138

Premi L, Sandine WE, Elliker PR. Lactose hydrolyzing enzyme of *Lactobacillus* species. **Applied Microbiology** 1972; 24: 51.

Preziosi-Belloy L, Nolleau V, Navarro JM. Fermentation of lignocellulosic sugars and sugar mixtures to xylitol by *Candida parapsilosis*. **Enzyme and Microbial Technology** 1997; 21: 124-129.

Radler F. The metabolism of organic acids by lactic acid bacteria. In Carr JG, Cutting CV, Whiting GC, editors. **Lactic acid bacteria in beverages and food.** Academic Prees, London. 1975; p. 17-27.

Ramirez JA, Bustos G. and Vázquez M. **Xylose from hydrolysis of sugar cane bagasse using hydrochloric acid at autoclave pressure.** Paper presented at the International Conference on The Annual Meeting and Food Expo; 2002 June 17; Anaheim, California.

Rodríguez-Chong A, Ramírez JA, Garrote G, Váquez M. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. **Food Engineering** 2004; 60: 143-152.

Roberto IC, Lacis LS, Barbosa M, De Mancilha IM. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysates by *Pichia stipulis* for the production of ethanol. **Process Biochem** 1991; 26: 15-21.

Sarantinopoulos P, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E. Citrate metabolism by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 229. **Applied Environmental Microbiology** 2001; 67: 5482-5487.

Senthuran A, Senthuran V, Hatti-Kaul R, Mattiasson B. Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reactor: a step towards optimization. **Journal of Biotechnology** 1999; 73: 61-70.

Stiles ME, Holzapfel WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **Food Microbiology** 1997; 36: 1-29.

Swindell SR, Benson KH, Griffin HG, Renault P, Ehrlich SD, Gasson MJ. Genetic manipulation of the pathway for diacetyl metabolism in *Lactococcus lactis*. **Applied Environmental Microbiology** 1996; 62: 2641-2643.

Taso GT, Hanson TP. Extented monod equation for batch cultures with multiple exponential phases. **Biotechnology Bioengineer** 1975; 17: 1591-1598.

Thomas TD, Acetate production from lactate and citrate by non-starter bacteria in Chaddar cheese. **N. Z. J. Dairy Science Technology** 1987; 22: 25-38.

Thompson J, Chassey BM, Egan W. Lactose metabolism in *Streptococcus lactis* studies with a mutant lacking glucokinase and manosephosphotransferase activities . **Journal of Bacteriology** 1985; 162: 217-223.

Tseng CP, Montville TJ. Metabolic regulation of end product distribution in lactobacilli: causes and consequences. **Biotechnology Progrees** 1993; 9: 113-121.

van Zyl C, Prior BA, Du Preez J. Acetic acid inhibition of D-xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Enzyme and Microbial Technology** 1991; 13: 82-86.

Watson NE, Prior BA, Lategan P. Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from D-xylose by *Pichia tannophilus*. **Enzyme and Microbial Technology** 1984; 6: 451-455.

Wee JY, Kim JN, Yun JS, Ryu HW. Utilization of sugar molasses for enomical L(+)-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. **Enzyme and Microbial Technology** 2004; 35: 568-573.

Weimer B, Seefeldt K, Dias B. Sulphur metabolism in bacteria associated with cheese. **Antonie van Leeuwenhoek** 1999; 76: 247-261.

Yun JS, Ryu HW. Lactic acid production and carbon catabolite repression from single and mixed sugars using *Enterococcus faecalis* RKY1. **Process Biochem** 2001; 37: 235-240.

Yvon M, Rijnen L. Cheese flavour formation by amino acid metabolism. **Int. Dairy Journal** 2001; 11: 185-201.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรการคำนวณค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์

สูตรการคำนวณค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์

1. ผลได้ของเซลล์ (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลที่ถูกใช้)

$$\frac{\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)}}{\text{น้ำตาลเริ่มต้นก่อนการหมัก –น้ำตาลสุดท้ายที่เหลือหลังจากการหมัก (กรัมต่อลิตร)}}$$

2. อัตราการเจริญจำเพาะ ($ชั่วโมง^{-1}$)

อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) คำนวณจากสมการ

$$\mu = \frac{1}{x}\frac{dx}{dt}$$

3. ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (โมลผลิตภัณฑ์ต่อโมลของน้ำตาลที่ถูกใช้)

3.1 ผลได้ของกรดแลคติก

$$\frac{\text{กรดแลคติก (กรัมต่อลิตร) / 90 (กรัมต่อโมล)}}{\text{น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร) / น้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาล (กรัมต่อโมล)}}$$

3.2 ผลได้ของกรดฟอร์มิก

$$\frac{\text{กรดฟอร์มิก (กรัมต่อลิตร) / 46 (กรัมต่อโมล)}}{\text{น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร) / น้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาล (กรัมต่อโมล)}}$$

3.3 ผลได้ของกรดอะซิติก

$$\frac{\text{กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร) / 60 (กรัมต่อโมล)}}{\text{น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร) / น้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาล (กรัมต่อโมล)}}$$

3.4 ผลได้ของเอทานอล

$$\frac{\text{เอทานอล (กรัมต่อลิตร) / 46 (กรัมต่อโมล)}}{\text{น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร) / น้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาล (กรัมต่อโมล)}}$$

เมื่อน้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไซโลส เท่ากับ 180 และ 150 กรัมต่อโมล ตามลำดับ

4. ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมของน้ำตาลที่ถูกใช้)

4.1 ผลได้ของกรดแลคติก

$$\frac{\text{กรดแลคติก (กรัมต่อลิตร)}}{\text{น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)}}$$

4.2 ผลได้ของกรดฟอร์มิก

$$\frac{\text{กรดฟอร์มิก (กรัมต่อลิตร)}}{\text{น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)}}$$

4.3 ผลได้ของกรดอะซิติก

$$\frac{\text{กรดอะซิติก (กรัมต่อลติร)}}{\text{น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)}}$$

4.4 ผลได้ของเอทานอล

$$\frac{\text{เอทานอล (กรัมต่อลิตร)}}{\text{น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)}}$$

5. คาร์บอนไดออกไซด์

5.1 คาร์บอนไดออกไซด์ (โมล)

$$\frac{\text{คาร์บอนไดออกไซด์ที่วัดได้ (มิลลิลิตร)} \times 1 \text{ (โมล)}}{1000 \text{ (มิลลิลิตรต่อลิตร)} \times 22.4 \text{ (ลิตร)}}$$

5.2 ผลได้ของคาร์บอนไดออกไซด์ (โมลต่อโมลของน้ำตาลที่ถูกใช้)

$$\frac{\text{คาร์บอนไดออกไซด์ที่วัดได้ (มิลลิลิตร)} \times 1 \text{ (โมล)} \times \text{น้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาล (กรัมต่อโมล)}}{1000 \text{ (มิลลิลิตรต่อลิตร)} \times 22.4 \text{ (ลิตร)} \times \text{น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)}}$$

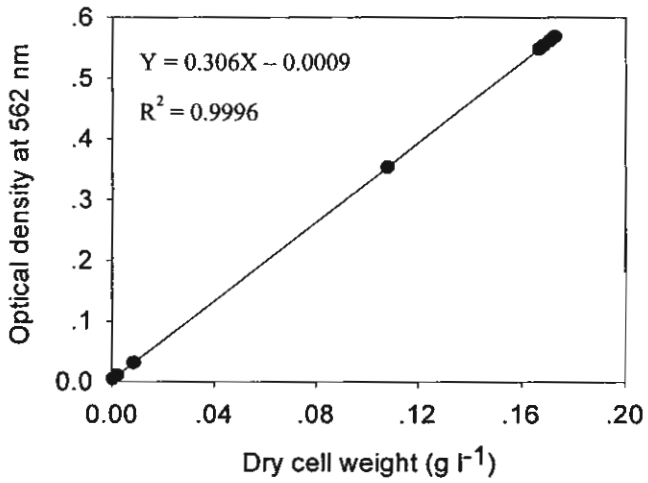
6. เปอร์เซ็นต์ carbon recovery

$$\left(\frac{\text{ความเข้มข้น(กรดแลคติก} \times 36/90) + (\text{กรดฟอร์มิก} \times 12/46) + (\text{กรดอะซิติก} \times 24/60) + (\text{เอทานอล} \times 24/46)}{\dfrac{\text{น้ำตาลที่ถูกใช้} \times \text{จำนวนอะตอมคาร์บอนในน้ำตาล} \times 12}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาล}}} \right) \times 100$$

เมื่อจำนวนอะตอมคาร์บอนในน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไซโลส เท่ากับ 6 และ 5 อะตอม ตามลำดับ

ภาคผนวก ข

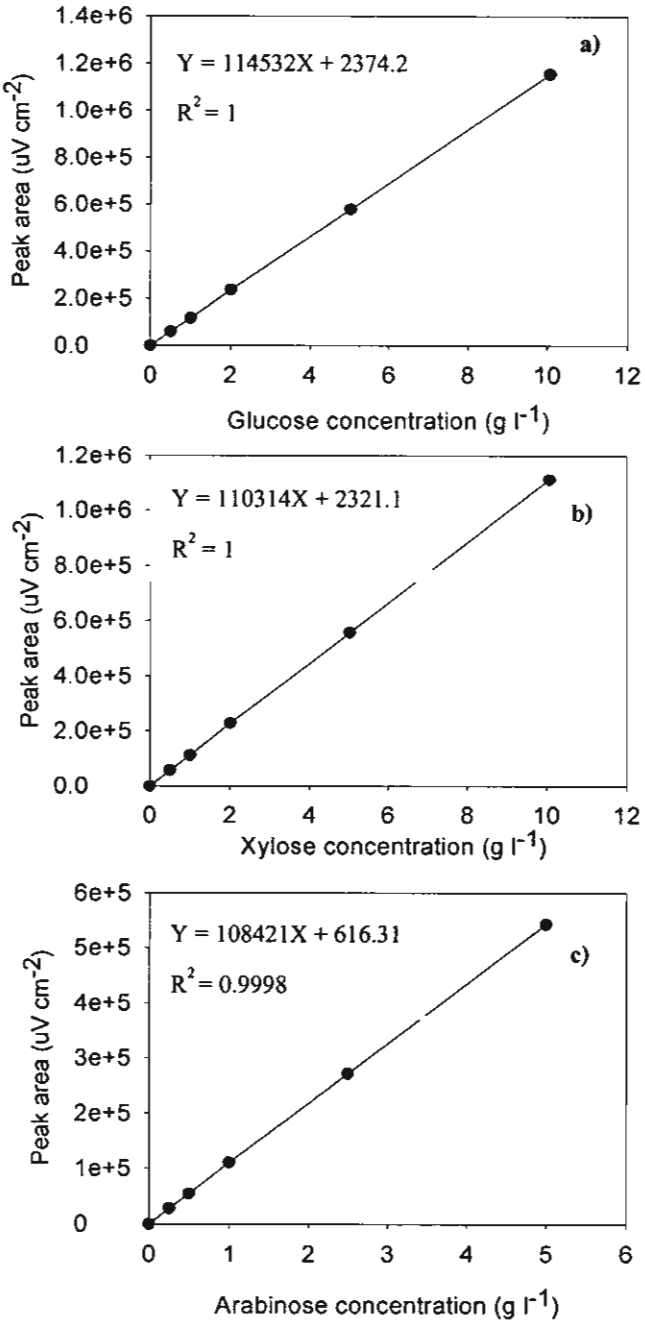
กราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงและน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Lc. lactis* IO-1



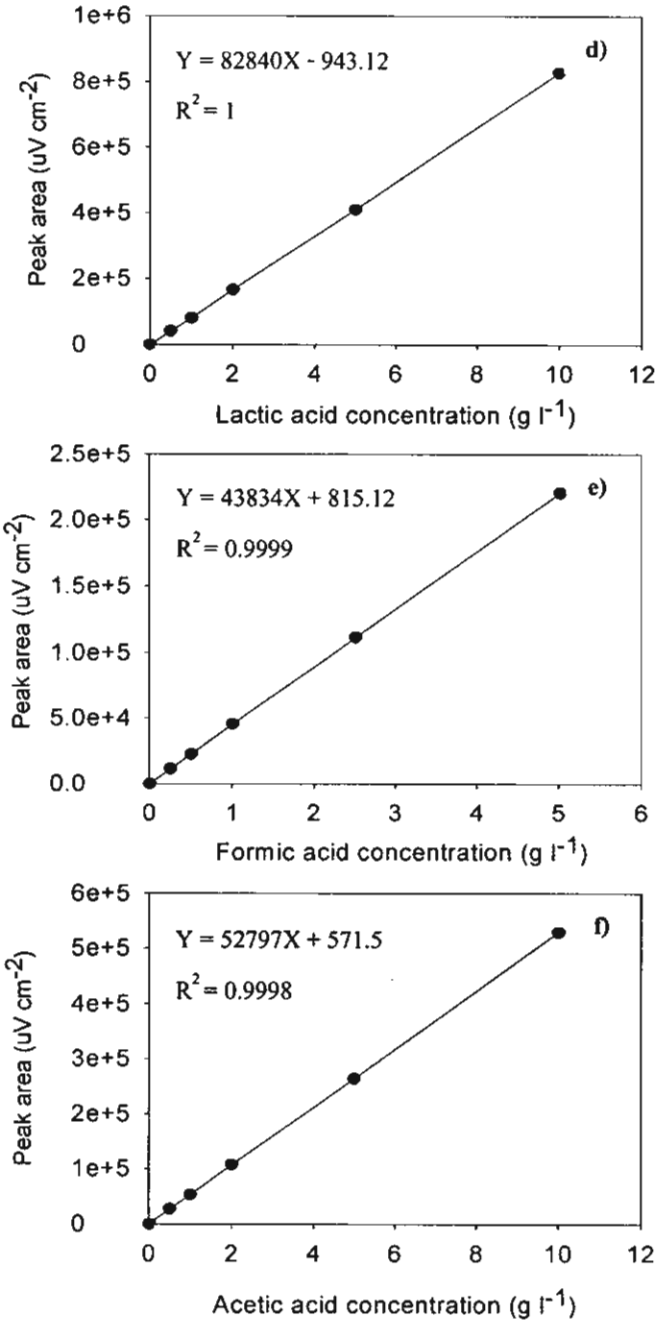
ภาพที่ 69 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงและน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Lc. lactis* IO-1

ภาคผนวก ค

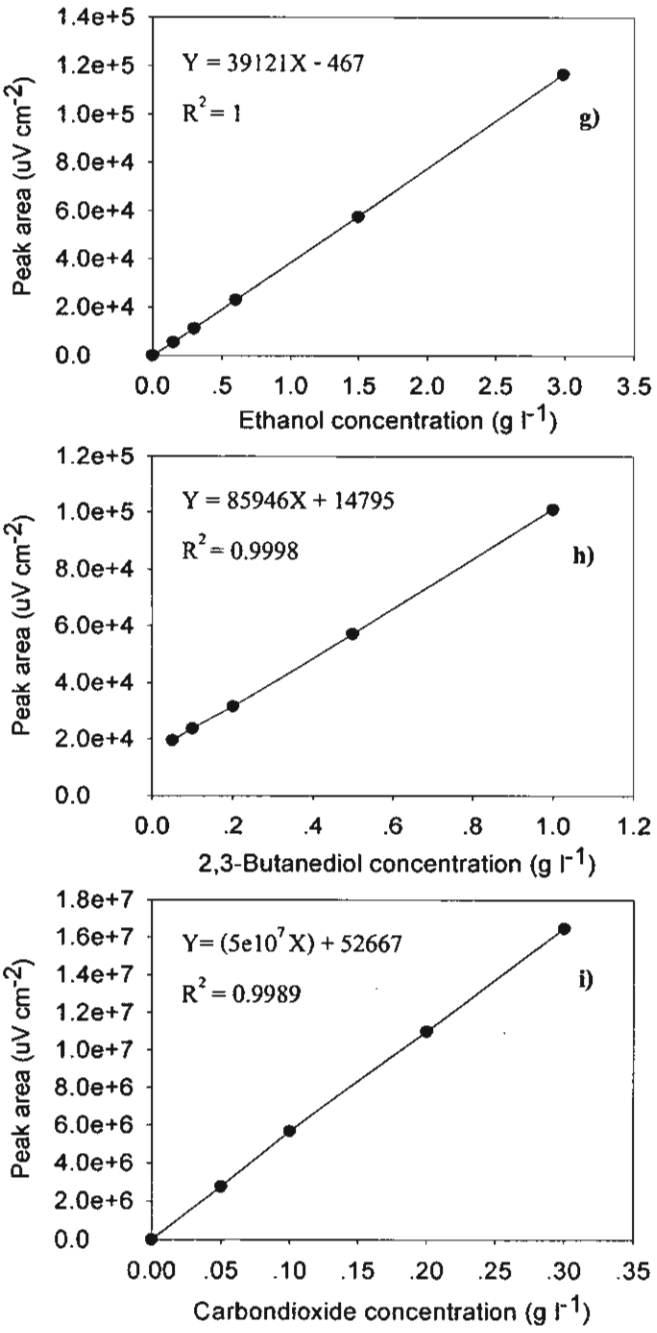
กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส กรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก เอทานอล 2,3-บิวเทนไดออล คาร์บอนไดออกไซด์ และเฟอฟูรอล



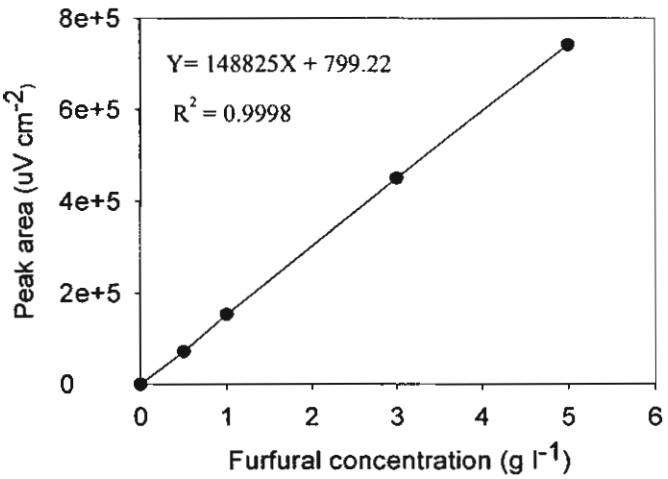
ภาพที่ 70 กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นของ (a) น้ำตาลกลูโคส (b) น้ำตาลไซโลส และ (c) น้ำตาลอะราบิโนส



ภาพที่ 71 กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นของ (d) กรดแลคติก (e) กรดฟอร์มิก และ (f) กรดอะซิติก



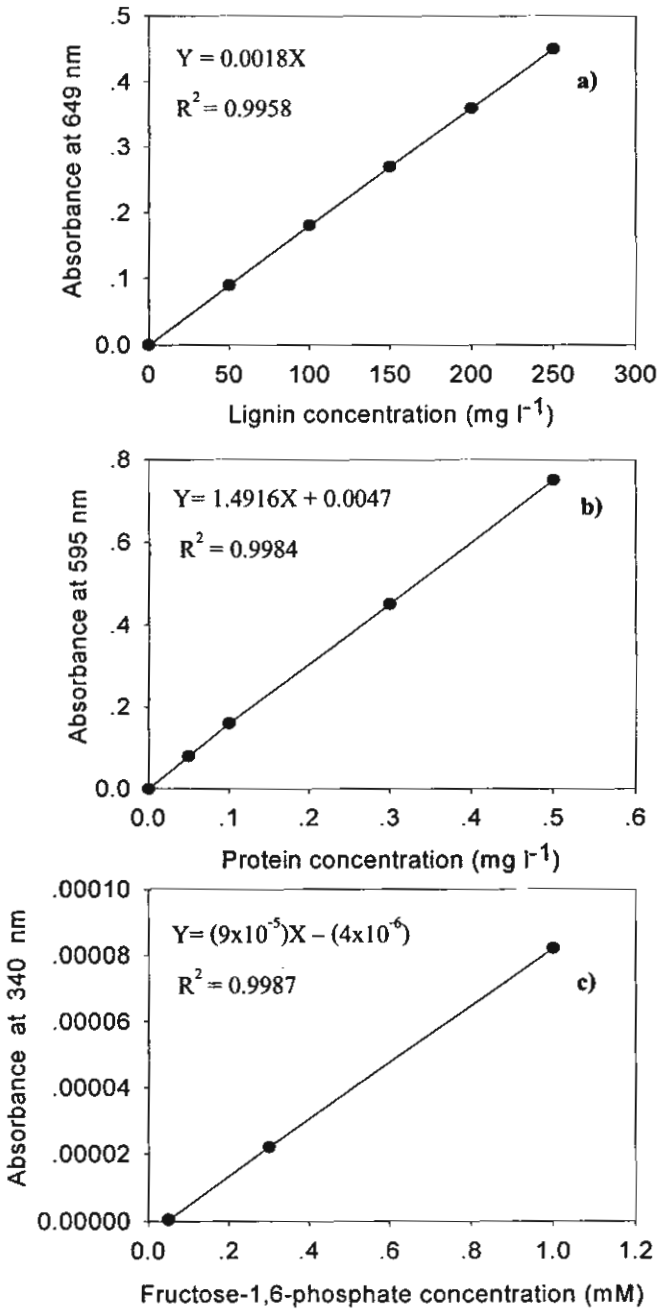
ภาพที่ 72 กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นของ (g) เอทานอล (h) 2,3-บิวเทนไดออล และ (i) คาร์บอนไดออกไซด์



ภาพที่ 73 กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นของเฟอฟูรอล

ภาคผนวก ง

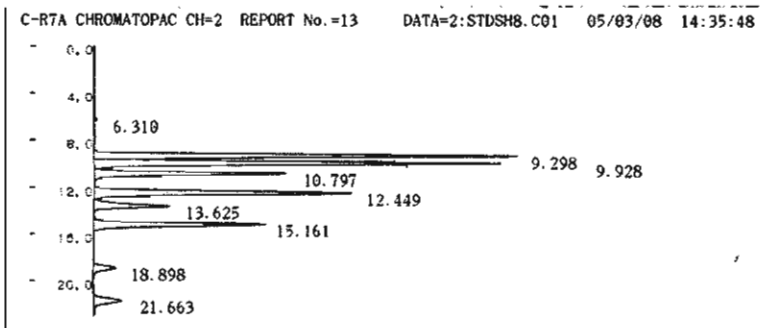
กราฟมาตรฐานของลิกนิน โปรตีน และฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต



ภาพที่ 74 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ (a) ลิกนิน (b) โปรตีน และ (c) ฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต

ภาคผนวก จ

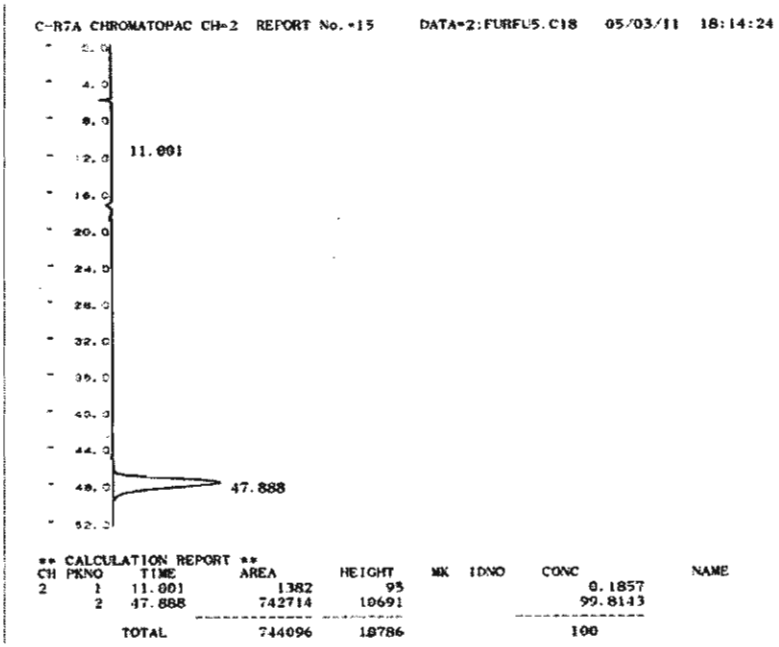
โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส กรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก 2,3-บิวเทนไดออล และเอทานอล



** CALCULATION REPORT **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
2	1	6.31	4870	324			0.1465	
	2	9.298	811196	42645			24.3983	
	3	9.928	807892	41048	V		24.2989	
	4	10.797	389985	19307	V		11.7295	
	5	12.449	599756	25994			18.0388	
	6	13.625	175152	7565	V		5.268	
	7	15.161	391583	17298			11.7776	
	8	18.898	61832	2241			1.8597	
	9	21.663	82544	2772			2.4827	
		TOTAL	3324807	159193			100	

ภาพที่ 75 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานกลูโคส (9.298) ไซโลส (9.928) อะราบิโนส (10.797) กรดแลคติก (12.449) กรดฟอร์มิก (13.625) กรดอะซิติก (15.161) 2,3-บิวเทนไดออล (18.898) และเอทานอล (21.663)



** CALCULATION REPORT **

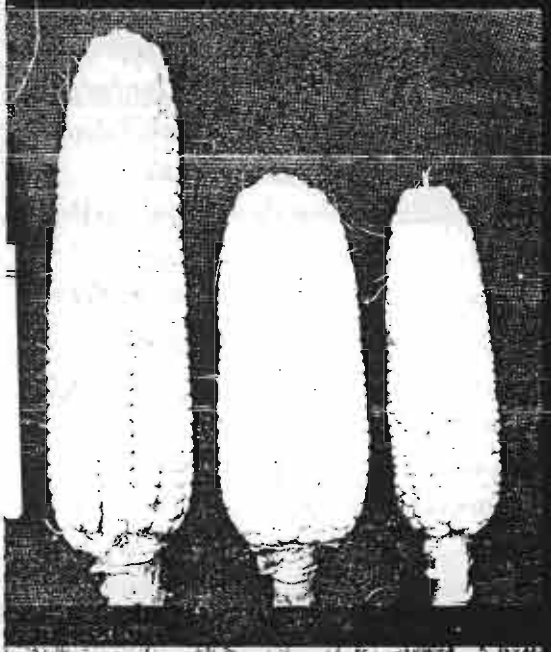
CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
2	1	11.001	1382	95			0.1857	
	2	47.888	742714	18691			99.8143	
		TOTAL	744096	18786			100	

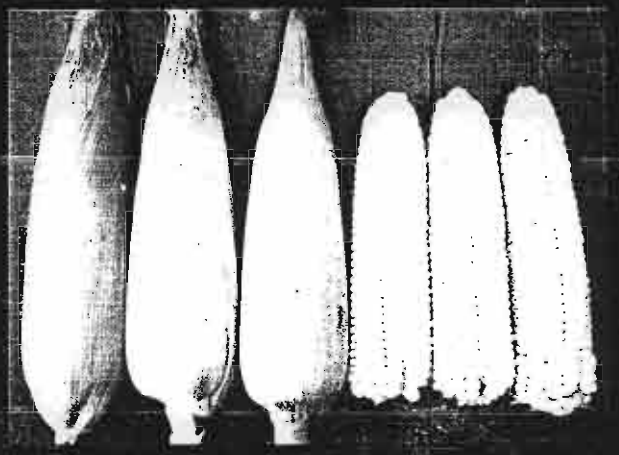
ภาพที่ 76 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานเฟอฟูรอล (47.888)

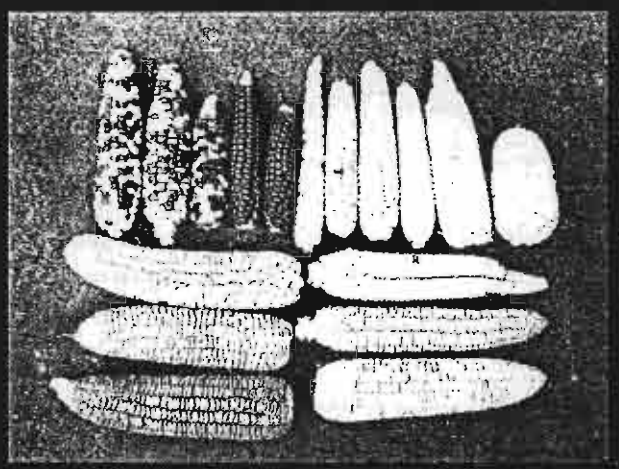
ภาคผนวก ฉ
การเผยแพร่ผลงานวิจัย

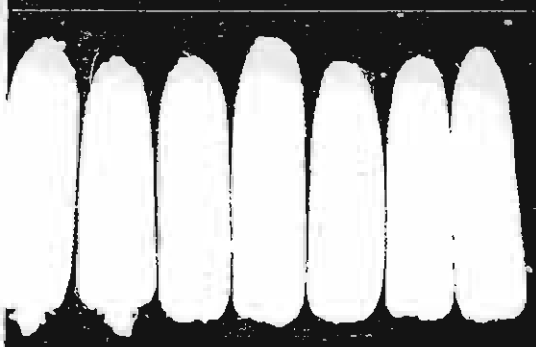
วารสารวิจัย มข.
KKU RESEARCH JOURNAL

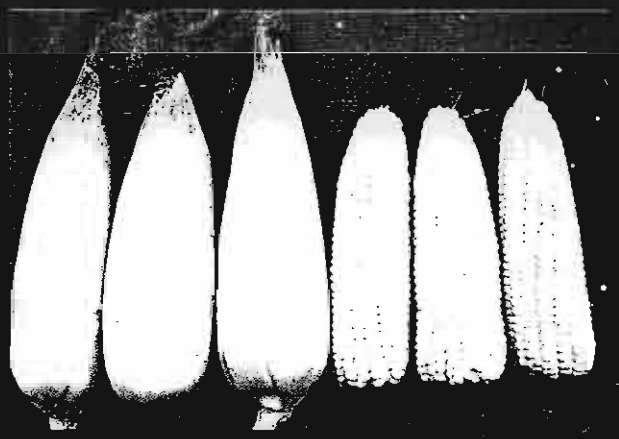
ISSN 0859-3957 ปีที่ 9 ฉบับที่ 1 มกราคม-มิถุนายน 2547
VOL. 9 NO.1 January-June 2004











วารสารวิจัย มข.

ISSN 0859-3957 ปีที่ 9 ฉบับที่ 1 มกราคม-มิถุนายน 2547

สารบัญ

หน้า

แวดวงวิจัย มข.

นักปรับปรุงพันธุ์พืชดีเด่น: รศ ดร.กมล เลิศรัตน์ 1

วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

จำนวนโครโมโซมของพืชวงศ์ขิงในประเทศไทย

สุรพล แสนสุข และปิยะพร แสนสุข 3

การใช้สารสกัดจากรากหางไหลแห้งในการควบคุมลูกน้ำยุง

สมบูรณ์ แสงมณีเดช และคณะ 10

การหมักน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลส โดย *Lactococcus lactis* IO-1 เพื่อผลิตกรดแลคติค

พัฒนา เหล่าไพบูลย์ และคณะ 16

วิทยาศาสตร์สุขภาพ

การศึกษาหาสาร Methamidophos และ Methyl-Parathion ตกค้างในผักปลอดสารพิษในห้างแม็กโคร จังหวัดขอนแก่น

สกุลรัตน์ อุษณาวรงค์, ธนานุช เมืองนาง และอริศรา สุดแสน 23

การจัดการด้านกากของเสียและมลพิษที่เกิดขึ้นจากการประกอบอาชีพอุตสาหกรรมในครัวเรือนภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

กาญจนา นาถะพินธุ และคณะ 29

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำไมโครเอนแคปซูลของสารสกัดขมิ้น

ภัทรวดี จันทร์แจ่ม และอรุณศรี ปรีเปรม 39

วิทยาศาสตร์กายภาพ

การประเมินเพื่อคาดการณ์ภัยพิบัติที่เกิดจากการยุบตัวของโพรงเกลือหินใต้ผิวดินในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ : กรณีศึกษาที่หนองหาน กุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี และหนองบ่อ อำเภอบรบือ จังหวัดมหาสารคาม

เพียงตา สาตรักษ์ และคณะ 48

การพัฒนาเครื่องกะเทาะเมล็ดกระบก

สมโภชน์ สุดาจันทร์ และสมนึก ชูศิลป์ 61

การศึกษาเชิงทฤฎีของปฏิกริริยาการดูดซับไฮโดรเจนบน benzene-1, 4-dicarboxylate

สุนันทา เฮงรัศมี และรัชนีกร พิลาสมบัติ 75

การศึกษาผลของลักษณะของแผ่นกระจายไอน้ำและชั้นวางวัสดุที่มีต่อระยะเวลาที่ความร้อนใช้ในการแทรกซึมผ่านหีบห่อวัสดุในห้องสเตอร์ริไลซ์ของเครื่องสเตอร์ริไลซ์ด้วยไอน้ำชนิดแทนที่ด้วยแรงโน้มถ่วง

อนุสรณ์ ชินสุวรรณ 87

การหมักน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสโดย *Lactococcus lactis* IO-1 เพื่อผลิตกรดแลคติค

Fermentation of glucose and xylose mixtures by *Lactococcus lactic* IO-1 for lactic acid production

พัฒนา เหล่าไพบูลย์ (Pattana Laopaiboon)[1], *อาทิตย์ ธานี (Arthit Thani)*[2],
ลักขณา เหล่าไพบูลย์ (Lakkana Laopaiboon)[3], *วิเชียร ลีลาวัชรมาศ (Vichean Leelavatcharamas)*[4]

บทคัดย่อ

Lactococcus lactis IO-1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลคติคพวกโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ เมื่อเลี้ยงแบบกะในน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสในปริมาณที่เท่ากัน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า L. lactis IO-1 ผลิตกรดแลคติคเป็นผลิตภัณฑ์หลัก และเกิดการเจริญแบบไดออกสิค นอกจากนี้ยังพบว่า แบคทีเรียชนิดนี้ผลิตกรดอะซิติค กรดฟอร์มิค และเอทานอลเป็นผลพลอยได้ เมื่อเลี้ยง *L. lactis* IO-1 ในน้ำตาลผสมที่ความเข้มข้นต่ำคือ 5 และ 10 กรัมต่อลิตร พบว่า กลูโคสและไซโลสถูกใช้หมด ในขณะที่เมื่อเลี้ยงในน้ำตาลผสมที่ความเข้มข้นสูงคือ 30 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่า กลูโคสถูกใช้หมด ส่วนไซโลสถูกใช้เพียง 25.6 และ 32.9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ การสังเกตนี้อาจเกิดจากกลูโคสเหนี่ยวนำการกดการใช้ไซโลส และการผลิตกรดแลคติคที่สูงอาจยับยั้งการใช้ไซโลส ส่วนผลได้โมลาร์ของกรดแลคติคเมื่อ L. lactis IO-1 ใช้น้ำตาลกลูโคส สูงกว่าผลได้โมลาร์ของกรดแลคติคเมื่อใช้น้ำตาลไซโลสอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เท่ากัน นอกจากนี้ยังพบว่าผลได้โมลาร์ของกรดแลคติคเมื่อใช้น้ำตาลผสมขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเป็นหลัก

Abstract

Lactococcus lactis IO-1, a homofermentative lactic acid bacterium, was grown on mixtures of the same amount of glucose and xylose at various concentrations in batch culture. The results showed that *L. lactis* IO-1 produced lactic acid as a main product and a diauxic growth was observed. In addition it produced acetic acid, formic acid and ethanol as by-products. When *L. lactis* IO-1 was grown on the mixtures of sugars at low concentrations (5 and 10 g l^{-1}), glucose and xylose were completely utilised. At high concentrations (30 and 50 g l^{-1}), glucose was completely consumed whereas xylose was utilised only 25.6 and 32.9 g l^{-1} respectively. This was possible due to glucose induces the repression of xylose utilisation and high lactic acid production may inhibit xylose utilisation. At the same sugar concentrations, molar yields of lactic acid during glucose utilisation were significantly higher than those during xylose utilisation. In addition the molar yields from glucose and xylose mixtures mainly depends on xylose concentration.

คำสำคัญ : กรดแลคติค น้ำตาลผสม *Lactococcus lactis*
Keywords : Lactic acid, mixed sugar, *Lactococcus lactis*,

[1] *รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[2] *นักศึกษาบัณฑิตศึกษา ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[3] *ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[4] *รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*

INTRODUCTION

Lactic acid has been produced commercially by fermentation process since 1881 and its fermentative production accounts for half of the world production (Vickroy, 1985). Lactic acid is used as acidulant, flavour and preservative in food, pharmaceutical, leather and textile industries. It is also used for polymerization to biodegradable polylactic acid (PLA) which is used for medical applications such as sutures and clips for wound closure or posthetic devices. Additionally, it is used for the production of basic chemicals (Hofvendahl and Hahn-Hägerdal, 2000).

Lactic acid bacteria (LAB) are believed to be facultative or microaerophilic microorganisms, obtaining their energy through the Embden-Meyerhof-Parnas pathway or phosphoketolase pathway (Sakamoto and Komagata, 1996). There are many evidences indicating that products occurred from carbohydrate metabolism depend on species of LAB, substrates and cultured conditions (Axelsson, 1993).

Hemicellulose is a major constituent of plant cell wall materials and makes up 30-40 % of many agricultural residues (Amartey and Jeffries, 1994). After pretreatment and hydrolysis of lignocellulosic materials, the hemicellulose fraction is liquefied to make sugars (xylose and glucose) accessible to fermenting microorganisms (Lynd et al., 1999; Aristidou and Penttila, 2000). However not all fermenting microorganisms can utilize xylose (5-atom carbon). There are many evidences indicating that *Lactococcus lactis* IO-1 is one of fermenting microorganisms which can utilise both carbon substrates for lactic acid production (Kanagachandran et al. 1997). The aim of this work is to study the effect of dual sugar i.e. glucose and xylose on lactic acid production in batch cultures by *Lactococcus lactis* IO-1. Molar product yields of glucose and xylose utilisation of the microorganism are also investigated.

Materials and methods

Microorganism

Lactococcus lactis IO-1 (JCM 7638) was donated by Peter F. Stanbury, University of Hertfordshire, Hatfield, UK. The microorganism from stock culture was transplanted into a sterile Borosilicate culture tube containing 9 ml of sterile thioglycolate medium (Difco, USA) at two weeks intervals and stored in a refrigerator at 4°C.

Medium

The basal medium was composed of (per litre of distilled water) 5.0 g yeast extract (Oxoid, England), 5.0 g peptone (Oxoid, England) and 5.0 g NaCl (BDH, England). The medium was supplemented with 5, 10, 30 and 50 g glucose (Fluka, Switzerland) and the same amount of xylose (Fluka, Switzerland) and adjusted to pH 6.0 with 2 mol l^{-1} of HCl.

Inoculum

The stock culture was rejuvenated by incubation in 10 ml of thioglycolate medium for 18 h at 37°C in a static incubator. The 18-h culture (10 ml) was then transferred into 100 ml of basal medium containing mixtures of glucose and xylose (5, 10, 30 and 50 g l^{-1}) and incubated at 37°C with agitation 150 rpm for 3 h. An inoculum (5% by volume) was used to initiate the batch cultures.

Culture conditions

All batch fermentations throughout this work were conducted in a Biostat B (B.Braun, Germany)

2.5-litre fermenter with the working volume of one litre. The culture was agitated at 200 rpm and the temperature was controlled at 37 ?C. The pH of the cultures was monitored using an in situ pH electrode and maintained at pH 6.0 by automatic addition of 2.5 mol l^{-1} of NaOH. Steady-state conditions were indicated by stable of biomass, substrates and product levels.

Analytical methods

Bacterial growth was monitored by spectrophotometric measurement at 562 nm (UV-1601 spectrophotometer, Shimadzu, Japan) and converted to cell dry weight from standard calibration curve. Determination of sugars (glucose and xylose) and metabolic end products (lactic acid, formic acid, acetic acid and ethanol) from fermentation supernatant was performed by HPLC with a refractometer detector (RID-6A, Shimadzu, Japan) using an Aminex HPX 87H$^+$ column (300 mm X 7.8 mm, Bio - Rad Lab, CA, USA) under the following conditions: a temperature of 45 °C and 5 mmol l^{-1} of H_2SO_4 as a mobile phase at a flow rate of 0.6 ml min^{-1}.

Molar yields of product were calculated as mole of product produced per mole of sugar utilised.

Results

During the batch growth of *L. lactis* IO-1 at various concentrations of glucose and xylose, mixtures of lactic acid, formic acid, acetic acid and ethanol were produced (Fig. 1). When *L. lactis* IO-1 was grown in the medium containing a mixture between 5 g glucose l^{-1} and 5 g xylose l^{-1} (Fig. 1A), initially only glucose was utilised and xylose utilisation started after glucose was completely consumed. Completion of both glucose and xylose utilisation was observed at 23 h. At this time, biomass, lactic acid, formic acid, acetic acid and ethanol concentrations were 0.52, 5.02, 1.12, 1.50 and 0.52 g l^{-1} respectively. When *L. lactis* IO-1 was grown in the medium containing 10 g glucose l^{-1} and 10 g xylose l^{-1}, complete utilisation of the dual substrates was observed at 31 h (Fig. 1B). The result showed that the profiles of glucose and xylose utilisation and product formation were similar to those on the medium containing 5 g glucose l^{-1} and 5 g xylose l^{-1}. At 31 h, biomass, lactic acid, formic acid, acetic acid and ethanol concentrations were 0.91, 10.95, 3.34, 4.01 and 1.04 g l^{-1} respectively.

During the batch growth of *L. lactis* IO-1 on the medium containing 30 g glucose l^{-1} and 30 g xylose l^{-1} (Fig. 1C), only glucose was completely utilised whereas xylose was utilised only 25.6 g l^{-1} At the beginning of steady state (93 h), biomass, lactic acid, formic acid, acetic acid and ethanol concentrations were 1.00, 45.57, 2.62, 6.18 and 2.35 g l^{-1} respectively. When *L. lactis* IO-1 was grown in the presence of 50 g glucose l^{-1} and 50 g xylose l^{-1}, complete utilisation of glucose was also observed whereas xylose was utilised only 32.9 g l^{-1} (Fig. 1D). The system reached steady state at 133 h. At this time, biomass, lactic acid, formic acid, acetic acid and ethanol concentrations were 1.65, 58.15, 0.98, 1.96 and 0.79 g l^{-1} respectively.

Molar product yields calculated from the batch culture profiles of the dual sugars (Fig. 1) are summarised in Table 1. At glucose consumption phase, the molar product yields of each product were similar at all glucose concentrations. High molar yield of lactic acid (1.52 - 1.75 mol mol^{-1} glucose utilised) and low molar yields of the by-product

(0.04 – 0.13 mol mol^{-1} glucose utilised) were observed at this phase. At xylose consumption phase, the molar yields of lactic acid increased whereas the molar yields of the by-products decreased with increasing xylose concentration. At the second phase, lower molar yields of lactic acid and higher molar yields of the by-products were observed when compared to those of the first phase at the same sugar concentrations.

Discussion

Co-fermentation of glucose and xylose was carried out by using *L. lactis* IO-1. The experiments indicated that a classic diauxic profile was exhibited. Sequential utilisation resulting in diauxic growth has often been observed (Brandt et al., 2004). Acetic acid, formic acid and ethanol were markedly produced as a result of xylose utilisation and, thus, appeared late in the batch cultures. Preferential utilisation of glucose over xylose and catabolite repression of xylose uptake has been described in various studies. When *Pichia stipitis* Y 7124 was grown in multiple substrates, sequential substrate consumption was observed. Initially, *Pichia stipitis* Y 7124 assimilated glucose and xylose utilisation occurred immediately after glucose depletion (Delgenes et al., 1989). Tyree et al. (1990) investigated the substrate utilisation and product formation of *Lactobacillus xylosus* on glucose-xylose mixtures in batch cultures. They found that glucose completely prevented xylose utilisation when *L. xylosus* was grown on 5 g glucose l^{-1} and 30 g xylose l^{-1}. Bothast et al. (1994) reported the ability of *Klebsiella oxytoca* strain P2 to ferment glucose, xylose and arabinose mixtures in batch cultures. The strain preferred glucose to xylose. Approximately 29-49 % of supplied xylose was left unutilised in the fermented broth.

In this study, the time to reach steady state in the batch cultures increased with increasing sugar concentration (Fig. 1). Similar observations were reported in fructose batch cultures of *Acetobacter xylinum* subsp. *sucrofermentans* BPR 3001A and BPR 2001 (Naritomi *et al.*, 1998).

Ishizaki and Ueda (1995) revealed that the levels of acetic acid produced in xylose batch culture did not inhibit growth of *L. lactis* IO-1 whereas lactic acid was responsible for end-product inhibition. Growth inhibition in other LAB such as *Lactobacillus casei* (Gonzàlez-Vara et al., 2000) and *L. delbrueckii* (Tohyama et al., 2000) by lactic acid has also been demonstrated.

At the high concentrations of the substrates i.e. 30 and 50 g l^{-1}, glucose was completely utilised but xylose was utilised only 85 and 66 % respectively. The observation might be due to glucose induces the repression of xylose utilisation and lactic acid produced during glucose consumption may inhibit xylose utilisation. A similar observation was reported by Bibal et al. (1988) who studied lactic acid production of from lactose by *Streptococcus cremoris* at an initial sugar concentration of 50 g l^{-1}.

Lactic acid production during glucose fermentation indicates that glucose is metabolised to lactic acid via Embden-Meyerhof-Parnas pathway (EMP) (Axelsson, 1993; Erten, 1998; Laopaiboon, 2001). At xylose consumption phase, the molar yields of lactic acid increased and there was a decrease in the molar yields of formic acid, acetic acid and ethanol when xylose concentration increased. This suggests

that xylose may be metabolised to lactic acid via the pathway of heterolactic fermentation or mixed acid fermentation (Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996). In addition ethanol was produced during the batch growth of *L. lactis* IO-1 at all mixed sugar concentrations indicating that the reducing equivalent equilibrium necessitated the reduction of acetyl-Co A to ethanol (Laopaiboon, 2003). However, ethanol production in the medium containing 50 g glucose l^{-1} and 50 g xylose l^{-1} was less than those at the lower dual sugar concentrations suggesting that the reducing equivalent equilibrium during batch growth of *L. lactis* IO-1 at 50 g glucose l^{-1} and 50 g xylose l^{-1} necessitated the reduction of less acetyl-Co A to ethanol than those at the lower mixed sugar concentrations. These results are in agreement with those of Brown and Collin (1977) and Nov?k et al. (1997) using glucose as a substrate for *Streptococcus sp.* and *L. lactis* respectively.

Lactic acid production and its molar yield from glucose and xylose mixtures in batch culture of *L. lactis* IO-1 highly depends on xylose concentration. Therefore, an optimisation of xylose utilisation by the microorganism has to be investigated to maximise xylose conversion to product and to minimise the difficulties of effluent treatment.

Acknowledgement

The authors would like to thank The Thailand Research Fund (TRF) for financial support and the Fermentation Research Center for Value Added Agricultural Products (FerVAAP) and Department of Biotechnology, Faculty of Technology, Khon Kaen University for instrumentation support of this research.

References

Amartey, S. and Jeffries, T.W. 1994. Comparison of corn steep liquor with other nutrients in the fermentation of D- xylose by *Pichia stipitis* CBS 6054. **Biotechnol. Lett.** 16 : 211-214.

Aristidou, A. and Penttila, M. 2000. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. **Curr. Opin. Biotech.** 11 : 187-198.

Axelsson, L.T. 1993. Lactic acid bacteria : classification and physiology. In: Salminen, S. and Wright, A., (Eds.), **Lactic acid bacteria.** Marcel Dekker, New York, pp. 1-63.

Bibal, B., Goma, G., Vayssier, Y. and Pareilleux, A. 1988. Influence of pH, lactose and lactic acid on the growth of *Streptococcus cremoris* : a kinetic study. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 28 : 340-344.

Bothast, R.J., Saha, B.C., Vance, F.A. and Ingram, L.O. 1994. Fermentation of L-arabinose, D-xylose and D-glucose by ethanologenic recombinant *Klebsiella oxytoca* strain P2. **Biotechnol. Lett.** 16 : 401-406.

Brandt, B.W., Kelpin, F.D.L., van Leeuwen, I.M.M. and Kooijman, S.A.L.M. 2004. Modelling microbial adaptation to changing availability of substrates. **Water Research.** 38 : 1003-1013.

Brown, W.V. and Collins, E.B. 1977. End products and fermentation balances for lactic Streptococci grown aerobically on low concentrations of xylose. **Appl. Environ. Microbiol.** 33 : 38-42.

Cocaign-Bousquet, M., Garrigues, C., Loubière, P. and Lindley, N.D. 1996. Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. **Antoni van Leeuwenhoek.** 70 : 253-267.

Delgenes, J.P., Moletta, R. and Navarro, J.W. 1989. Fermentation of D-xylose, D-glucose and L-arabinose mixtures by *Pichia stipitis*: Effect of the oxygen transfer rate on fermentation performance. **Biotechnol. Bioeng.** 34 : 398-402.

Erten, H. 1998. Metabolism of fructose as an electron acceptor by *Leuconostoc mesenteroides*. **Proc. Biochem.** 33 : 735-739.

Gonźalez-Vara. Y.R.A., Vaccari, G., Dosi, E., Trilli, A., Rossi, M. and Matteuzzi, D. 2000. Enhanced production of L-(+)-lactic acid in chemostat by *Lactobacillus casei* DSM 20011 using ion-exchange resins and cross-flow filtration in a fully automated pilot plant controlled via NIR. **Biotechnol. Bioeng.** 67 (2) : 147-156.

Hofvendahl, K. and Hahn-H?gerdal, B. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. Enzyme Microb. Tech. 26 : 87-107.

Ishizaki, A. and Ueda, T. 1995. Growth kinetics and product inhibition of *Lactococcus lactis* IO-1 culture in xylose medium. J. **Ferment. Bioeng.** 80 (3) : 287-290.

Kanagachandan, K., Stanbury, P.F., Hall, S.J. and Ishizaki, A. 1997. Glucose repression of xylose utilisation by *Lactococcus lactis* IO-1. **Biotechnol. Lett.** 19 (9) : 923-925.

Laopaiboon, P. 2001. The physiology of xylose utilisation by *Lactococcus lactis* IO-1, University of Hertfordshire, UK, Thesis PhD.

Laopaiboon, P. and Laopaiboon, L. 2003. Effect of aeration on xylose fermentation in batch cultures by *Lactococcus lactis*. **KKU Research Journal.** 8 (1) : 13-19.

Lynd, L.R., Wyman, C.E., and Gerngross, T.U. 1999. Biocommodity engineering. **Biotechnol. Progrees.** 15 : 777-793.

Sakamoto, M. and Komagata, K. 1996. Aerobic growth and activities of NADH oxidase and NADH peroxidase in lactic acid bacteria. **J. Ferment. Bioeng.** 82 : 210-216.

Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H. and Yoshinaka, F. 1998. Effect of lactate on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. **J. Ferment. Bioeng.** 85 (1) : 89-95.

Novák, L., Cocaign-Bousquet, M., Lindley, N.D. and Loubi?ne, P. 1997. Metabolism and energetics of *Lactococcus lactis* during growth in complex or synthetic media. **Appl. Environ. Microbiol.** 63 (7) : 2665-2670.

Tohyma, M., Takagi, S. and Shimizu, K. 2000. Effect of controlling lactate concentration and periodic change in DO concentration on fermentation characteristics of a mixed culture of *Lactobacillus delbrueckii* and *Ralstonia eutropha* of PHB production. **J. Bioscience Bioeng.** 89 (4) : 323-328.

Tyree, R.W., Clausen, E.C. and Goddy, J.L. 1990. The fermentative characteristics of *Lactobacillus xylosus* on glucose and xylose. **Biotechnol. Lett.** 12 : 51-56.

Vickroy,T.B. 1985. Lactic acid. In: Blanch, H.W., Drew, S. and Wang, D.I.C., (Eds.), **The practice of biotechnology : commodity products.** Pergamon Press, Elmsford, NY, pp. 761-776.

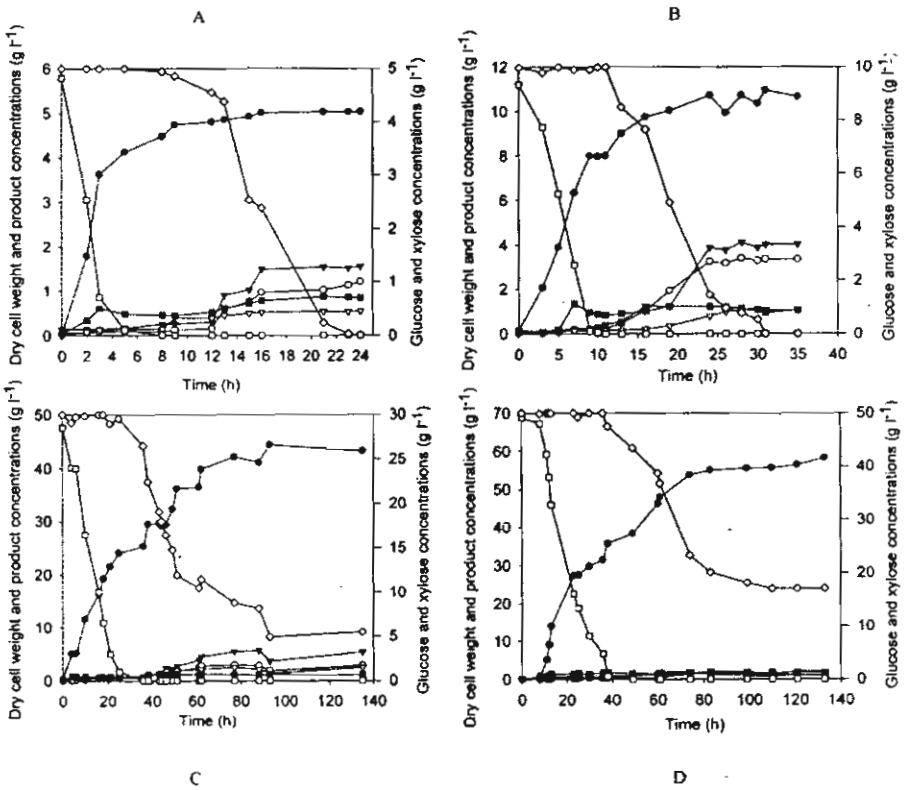


Fig. 1 Batch culture profiles of *L. lactis* IO-1 grown on glucose and xylose mixtures (A) 5 g, (B) 10 g, (C) 30 g and (D) 50 g l^{-1} : lactic acid (●), formic acid (▽), acetic acid (▼), ethanol (○), dry cell weight (■), glucose (□), xylose (◇).

Table 1 Effect of initial glucose and xylose concentrations on molar product yields in batch cultures of *Lactococcus lactis* IO-1.

Initial glucose concentrations (g l^{-1})	Molar product yields (mol product mol^{-1} glucose utilised)			
	Lactic acid	Formic acid	Acetic acid	Ethanol
5	1.75	0.05	0.13	0.11
10	1.62	0.07	0.09	0.10
30	1.61	0.09	0.05	0.11
50	1.52	0.10	0.04	0.10
Initial xylose concentrations (g l^{-1})	Molar product yields (mol product mol^{-1} xylose utilised)			
	Lactic acid	Formic acid	Acetic acid	Ethanol
5	0.12	1.03	1.18	0.53
10	0.22	0.97	0.90	0.31
30	0.54	0.32	058	0.24
50	0.91	0.12	0.08	0.13