



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากขาน้อย

โดย นายพัฒนา เหล่าไพญญ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
รศ.ดร.วิเชียร ลีลาวัชรมาศ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

พฤษภาคม 2549

สัญญาเลขที่ MRG4680006

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากชานอ้อย

คณะผู้วิจัย สังกัด

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

สนับสนุนโดยทบวงมหาวิทยาลัย และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย ทบวงฯ และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

การศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากชานอ้อย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดย *Lactococcus lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส ไซโลส หรือน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้การเลี้ยงแบบกะ ศึกษาวิธีการใช้น้ำตาลไซโลส เมแทบอลิซึมพลั๊กซ์ของการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตกรดแลกติกสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยค่าและกรด และการผลิตกรดแลกติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยโดยการแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลกลูโคสผ่านกระบวนการหมักแบบโฮโมแลกติกทั้งในสภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่ำและสูง ส่วนการหมักน้ำตาลไซโลสพบว่า ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสต่ำ (5 และ 10 กรัมต่อลิตร) *Lc. lactis* IO-1 ผลิตกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ในขณะที่กรดแลกติกถูกสร้างเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสสูง (30 และ 50 กรัมต่อลิตร) ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเป็นปัจจัยหลักที่ควบคุมเมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลส ในการผลิตกรดแลกติกในน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสพบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการเจริญแบบ diauxic และในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลผสมพบว่า *Lc. lactis* IO-1 สร้างกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในทุกสภาวะของการทดลอง ซึ่งผลการทดลองที่ได้คล้ายกับเมื่อใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสมที่ความเข้มข้น 15, 25, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ในขณะที่กรดอะซิติกถูกสร้างเป็นผลิตภัณฑ์หลักในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสมที่ความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร สำหรับการศึกษาวิธีการใช้น้ำตาลไซโลสภายใต้สภาวะการหมักแบบกะพบว่า น้ำตาลไซโลสถูกใช้ผ่านวิถีฟอสโฟทีโกลีสและวิถีเพนโตสฟอสเฟตพร้อมกันทุกสภาวะการทดลอง การวิเคราะห์เมแทบอลิซึมพลั๊กซ์ของ *Lc. lactis* IO-1 ในการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลไซโลสพบว่า วิถีฟอสโฟทีโกลีสและวิถีเพนโตสฟอสเฟตเป็นวิถีหลักของคาร์บอนเมแทบอลิซึม ซึ่งผลการทดลองอธิบายด้วยวิธีการใช้น้ำตาลไซโลสและแอกติวิตีของเอนไซม์ที่แตกต่างกันในโพรวอดเมแทบอลิซึม สำหรับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยสารละลายค่าเพื่อสกัดเออลิกนินออก จากนั้นนำไปไฮโดรไลซ์ด้วยกรดเพื่อให้ได้สารละลายที่มีน้ำตาลสูง 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 ส่วนการผลิตกรดแลกติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยพบว่าผลได้ของกรดแลกติกสูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.26 กรัมของกรดแลกติกต่อกรัมของน้ำตาลที่ถูกใช้เมื่อเติมขี้สาคั่วที่ความเข้มข้น 7 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าการลดความเป็นพิษของสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยนอกจากจะทำให้ *Lc. lactis* IO-1 เจริญได้ดีขึ้นแล้ว ยังช่วยเพิ่มความสามารถในการหมักกรดแลกติกด้วย

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 มีความสำคัญอย่างยิ่งในการใช้เป็น จุลินทรีย์เริ่มต้น (starter culture) ในผลิตภัณฑ์นมหมัก และผลิตภัณฑ์นมต่าง ๆ กรดแลคติกที่ได้จากจุลินทรีย์เป็นกรดอินทรีย์ที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้เป็นสารให้ความเปรี้ยว (acidulate) และสารถนอมอาหาร (preservative) ประเภทเนื้อ ปลา และผัก กรดนี้ยังนำมาใช้ในอุตสาหกรรมนมและผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับนม อุตสาหกรรมลูกกวาดและขนมโดยใช้เป็น acidifier อุตสาหกรรมเคมีโดยใช้ในรูปกรดโพลิแลคติก (PLA) และพลาสติกที่ย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ (biodegradable plastic) อุตสาหกรรมการทำสบู่โดยใช้ในรูปโซเดียมแลคเตท (sodium lactate) อุตสาหกรรมการผลิตเซลโลเฟน (cellophane) อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ยาง วงจรอิเล็กทรอนิกส์ (electronic circuits) chip boards และกระดาษ เป็นต้น นอกจากนี้กรดแลคติกถูกนำมาใช้ทำพลาสติกสำหรับผลิตฟีนอลฟอร์มาดีไฮด์เรซิน (phenol-formaldehyde resins) และสามารถทำปฏิกิริยากับแอลกอฮอล์และกรดในการทำโพลีเอสเตอร์ (polyester) ซึ่งใช้เป็น plasticizer กรดแลคติกนี้ยังถูกนำมาใช้ทำให้เส้นไหมและไหมสังเคราะห์ (rayon) ให้มีความแวววาว และใช้ในการย้อมสีในอุตสาหกรรมสิ่งทอ

การผลิตกรดแลคติกนิยมผลิตโดยใช้กระบวนการหมักเนื่องจากเป็นกระบวนการที่มีต้นทุนต่ำ ใช้พลังงานน้อย มีความหลากหลายของกลิ่นรส และเป็นวิธีที่ยอมรับของผู้บริโภค

ชานอ้อยเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดหนึ่งพบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งชานอ้อยประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์หลายชนิด เช่น เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส เมื่อไฮโดรไลซ์จะได้น้ำตาลกลูโคสและไซโลสที่อาจจะสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกระบวนการหมักกรดแลคติกได้

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

การศึกษการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) พบว่า *Lc. lactis* IO-1 สร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักผ่านกระบวนการหมักแบบโฮโมแลคติกแอซิโดเฟอร์เมนเทชัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลกลูโคสผ่านวิถีไกลโคไลซิส 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 ในขณะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 30 และ 50 กรัมต่อลิตร *Lc. lactis* IO-1 สร้างกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักโดยผ่านกระบวนการหมักแบบเฮเทอโรแลกติกแอสิดเฟอว์เมนต์เทชัน หรือมิกแอสิดเฟอว์เมนต์เทชัน สำหรับการศึกษาการผลิตกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลผสมคือ น้ำตาลกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 2.5, 5, 10, 15, 25, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) พบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการเจริญแบบ diauxic และมีการสร้างกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ยกเว้นเมื่อใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสมที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 15 กรัมต่อลิตร ซึ่งที่สภาวะดังกล่าวนี้ *Lc. lactis* IO-1 สร้างกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก นอกจากนี้ยังพบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูงสุดในน้ำตาลผสมที่ไม่มีผลยับยั้งการใช้น้ำตาลไซโลสมีค่าเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร

การศึกษาวิถีการใช้ น้ำตาลไซโลสในการผลิตกรดแลกติกโดย *Lc. lactis* IO-1 ภายใต้อุณหภูมิการหมักแบบกะ พบว่า *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลสผ่านวิถีเพนโตสฟอสเฟต และวิธียูสโกลิโคเลสพร้อมกัน เนื่องจากตรวจพบฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต เอนไซม์ทรานส์คีโตเลส และเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลสในสารละลายเซลล์สกัดของ *Lc. lactis* IO-1

การศึกษามหาผลผลิตหลักในการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลไซโลสพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสมีผลต่อการสร้างแลกเตท โดยปริมาณแลกเตทมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้น และพบว่า น้ำตาลไซโลสถูกนำเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตมากกว่าวิธียูสโกลิโคเลสภายใต้สภาวะที่ศึกษา ยกเว้นเมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร

การศึกษาวินิจฉัยฟิลิโนคของไซลูโลส-5-ฟอสเฟตและไพรวูเวตพบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสมีผลต่อปริมาณไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่ถูกนำเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิธียูสโกลิโคเลส และพบว่าปริมาณไซลูโลส-5-ฟอสเฟตสูงสุดที่นำเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิธียูสโกลิโคเลสเท่ากับ 67 และ 58 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 50 และ 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสยังมีผลต่อเมแทบอลิซึมของไพรวูเวต และการสร้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมัก โดยพบว่าไพรวูเวตที่สร้างขึ้นจะถูกนำไปใช้ในการผลิตแลกเตทเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสที่เพิ่มขึ้น

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยพบว่า การไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้อง สามารถสกัดกลีโคลินได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 322 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อนำชานอ้อยไปไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 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 เมื่อศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยพบว่า ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญ และการผลิตกรดแลกติกของ *Lc. lactis* IO-1 โดยพบว่า การเติมยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 7 กรัมต่อลิตร ให้ผลได้ของกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 0.26 กรัมของกรดแลกติกต่อกรัม น้ำตาลผสมที่ถูกใช้ นอกจากนี้ยังพบว่า สารดูดซับแอมเบอร์ไลซ์สามารถลดความเป็นพิษของสารยับยั้งในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยได้ ส่งผลให้ *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในสารละลายได้เพิ่มขึ้น โดยผลิตภัณฑ์ที่ตรวจพบในระหว่างกระบวนการหมักคือ กรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากขานอ้อย” สำเร็จลุล่วงลงได้ คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) ที่ได้ให้การสนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่และอำนวยความสะดวกด้าน อุปกรณ์และเครื่องมือที่จำเป็นสำหรับการทดลองและวิเคราะห์ด้านต่างๆ

คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ รศ.ดร. วิเชียร ลีลาวัชรมาศ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้ให้ความกรุณาเป็นนักวิจัยพี่เลี้ยงในการทำวิจัยในครั้งนี้ และใคร่ขอขอบคุณ คุณอาทิตย์ ธานี คุณวันชนะ สืบไวย คุณนพพร ชูศิริพิรุณชัย คุณรุ่งรัตน์ โยทองยศ และคุณโสภิตา แสงงาม นักศึกษา ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือในการทำให้งานวิจัยสำเร็จ ลุล่วงได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คุณอาทิตย์ ธานี ที่มีส่วนสำคัญในการช่วยเหลือ

สุดท้ายคณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณ รศ.ดร. ถังขณา เหล่าไพบูลย์ และ ผศ.ดร. อรุณวดี ชนวงษ์ ที่คอยช่วยเหลือในทุกๆ ด้านตลอดระยะเวลาในการทำวิจัยในครั้งนี้ และใคร่ขอขอบคุณผู้ที่มีอุปการคุณทุกท่านที่ได้ถ่ายทอด ความรู้ ประสบการณ์ และให้คำแนะนำอันมีค่าสำหรับการทำงานวิจัยในครั้งนี้

คณะผู้วิจัย

พฤษภาคม 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 แลคติกแอซิคแบคทีเรีย	4
2.2 ชนิดของกรดแลคติก	7
2.3 ประโยชน์ของกรดแลคติก	7
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างกรดแลคติก	8
2.5 สารตั้งต้นที่สำคัญในการสร้างไพรูเวตและแลคเตต	9
2.6 การขนส่งโมเลกุลของน้ำตาลในแลคติกแอซิคแบคทีเรีย	13
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากแลคติกแอซิคแบคทีเรีย	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 การศึกษาการผลิตกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)	40
4.3 การศึกษาการผลิตกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)	47
4.4 การศึกษาการผลิตกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 2.5, 15, และ 25 กรัมต่อลิตร)	58
4.5 การศึกษาวิธีการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตกรดแลกติกโดย <i>Lc. lactis</i> IO-1	68
4.6 การวิเคราะห์เมแทบอลิซึมฟลักซ์ในการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)	77
4.7 การวิเคราะห์พรีนซิเพิลโนด (principal node) ของการใช้น้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดย <i>Lc. lactis</i> IO-1 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ	84
4.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย	87
4.9 การศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากชานอ้อย	99
บทที่ 5 วิจัยผลการผลิตทดลอง	110
5.1 การศึกษาการผลิตกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)	110
5.2 การศึกษาการผลิตกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)	111
5.3 การศึกษาการผลิตกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)	112
5.4 การศึกษาการผลิตกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 2.5, 15, และ 25 กรัมต่อลิตร)	113
5.5 การศึกษาวิธีการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตกรดแลกติกโดย <i>Lc. lactis</i> IO-1	114
5.6 การวิเคราะห์เมแทบอลิซึมฟลักซ์ในการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)	115
5.7 การวิเคราะห์พรีนซิเพิลโนดของการใช้น้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นต่างๆ โดย <i>Lc. lactis</i> IO-1 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ	116

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ขานอ้อย	117
5.9 การศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากขานอ้อย	121
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	125
เอกสารอ้างอิง	127
ภาคผนวก	134
ภาคผนวก ก คู่มือการคำนวณค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์	135
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงและน้ำหนักเซลล์แห้ง ของ <i>Lc. lactis</i> IO-1	138
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ไฮโดรไลส อะราบีโนส กรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก เอทานอล 2,3-บิวเทนไดออล คาร์บอนได ออกไซด์ และเฟอฟูรอล	140
ภาคผนวก ง กราฟมาตรฐานของลิกนิน โปรตีน และฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต	145
ภาคผนวก จ โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ไฮโดรไลส อะราบีโนส กรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก 2,3-บิวเทนไดออล และเอทานอล	147
ภาคผนวก ฉ การเผยแพร่ผลงานวิจัย	149

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่อผลได้ของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 ในสูตร อาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)	39
ตารางที่ 2 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสต่อผลได้ของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 ในสูตร อาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)	46
ตารางที่ 3 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสต่อผลได้ของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อ <i>Lc. lactis</i> IO-1 ใช้น้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)	55
ตารางที่ 4 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสต่อผลได้ของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อ <i>Lc. lactis</i> IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)	56
ตารางที่ 5 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสต่อผลได้ของเซลล์ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 ใน น้ำตาลผสม (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)	57
ตารางที่ 6 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสต่อผลได้ของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อ <i>Lc. lactis</i> IO-1 ใช้น้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร)	64
ตารางที่ 7 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสต่อผลได้ของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อ <i>Lc. lactis</i> IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร)	65
ตารางที่ 8 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสต่อผลได้ของเซลล์ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 ในน้ำตาลผสม (อย่างละ 2.5, 15 และ 50 กรัมต่อลิตร)	66
ตารางที่ 9 ปริมาณฟรุก-1,6-ไดฟอสเฟตและแอกติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลสในสารละลาย เซลล์สกัดของ <i>Lc. lactis</i> IO-1 ที่เลี้ยงในน้ำตาลไซโลส ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ	72
ตารางที่ 10 ผลของความเข้มข้นและชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อผลได้ของเซลล์ และผลได้ของ ผลิตภัณฑ์	106

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 วิธีไกลโคไลซิส	5
ภาพที่ 2 วิธีฟอสโฟทีโอเลส	6
ภาพที่ 3 โครงสร้างของกรดแลกติก	7
ภาพที่ 4 ไพรูเวตที่เกิดขึ้นจากเมแทบอลิซึมของน้ำตาลกลูโคส	10
ภาพที่ 5 ไพรูเวตที่เกิดขึ้นจากเมแทบอลิซึมของน้ำตาลเพนโตส	11
ภาพที่ 6 โพลีออลส์บางชนิดสามารถเปลี่ยนเป็นแลกเตท	11
ภาพที่ 7 กรดอินทรีย์บางชนิดสามารถเปลี่ยนเป็นแลกเตท	12
ภาพที่ 8 กรดอะมิโนบางชนิดสามารถเปลี่ยนเป็นแลกเตท	12
ภาพที่ 9 เมแทบอลิซึมของไพรูเวตในแลคติกแอซิดแบคทีเรีย	13
ภาพที่ 10 เมแทบอลิซึมของน้ำตาลกาแลกโตสในแลคติกแอซิดแบคทีเรีย	14
ภาพที่ 11 การจัดเรียงตัวของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในซานฮอย	18
ภาพที่ 12 โครงสร้างของเซลลูโลส	19
ภาพที่ 13 โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส	19
ภาพที่ 14 โครงสร้างของลิกนิน	20
ภาพที่ 15 ปฏิกริยาของเอนไซม์ทรานส์อัลโคเลส ไดร โอสฟอสเฟตไอโซเมอเรส และแอลฟา-กลีเซอโรฟอสเฟตดีไฮโดรจิเนส ในการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโคเลส	30
ภาพที่ 16 ปฏิกริยาของเอนไซม์อัลโคเลส ไดร โอสฟอสเฟตไอโซเมอเรส และแอลฟา-กลีเซอโรฟอสเฟตดีไฮโดรจิเนส ในการวิเคราะห์ฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต	32
ภาพที่ 17 การเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร	35
ภาพที่ 18 การเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร	36
ภาพที่ 19 การเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร	37
ภาพที่ 20 การเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร	38
ภาพที่ 21 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (molar product yields) และอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) ที่ได้จากการเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ	40
ภาพที่ 22 การเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร	41
ภาพที่ 23 การเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 10 กรัมต่อลิตร	42
ภาพที่ 24 การเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 30 กรัมต่อลิตร	44

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 25 การเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 50 กรัมต่อลิตร	45
ภาพที่ 26 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (molar product yields) และอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) เมื่อเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ	47
ภาพที่ 27 การเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและไซโลส อย่างละ 5 กรัมต่อลิตร	49
ภาพที่ 28 การเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและไซโลส อย่างละ 10 กรัมต่อลิตร	50
ภาพที่ 29 การเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและไซโลส อย่างละ 30 กรัมต่อลิตร	52
ภาพที่ 30 การเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและไซโลส อย่างละ 50 กรัมต่อลิตร	53
ภาพที่ 31 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (molar product yields) และอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) เมื่อ <i>Lc. lactis</i> IO-1 ใช้น้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ	55
ภาพที่ 32 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (molar product yields) และอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) เมื่อ <i>Lc. lactis</i> IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ	56
ภาพที่ 33 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (product yield) และผลได้ของเซลล์ (biomass yield) เมื่อเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและน้ำตาลไซโลส (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)	58
ภาพที่ 34 การเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและไซโลส อย่างละ 2.5 กรัมต่อลิตร	60
ภาพที่ 35 การเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและไซโลส อย่างละ 15 กรัมต่อลิตร	61
ภาพที่ 36 การเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและไซโลส อย่างละ 25 กรัมต่อลิตร	62
ภาพที่ 37 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (molar product yields) และอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) เมื่อ <i>Lc. lactis</i> 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 <i>Lc. Lactis</i> IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ	65
ภาพที่ 39 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (product yields) และผลได้ของเซลล์ (biomass yield) เมื่อเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร)	67
ภาพที่ 40 เมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสในวิธีเพนโดสฟอสเฟต	70
ภาพที่ 41 เมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสในวิธีฟอสโฟคีโตเลส	71
ภาพที่ 42 วิธีเพนโดสฟอสเฟต	74
ภาพที่ 43 วิธีฟอสโฟคีโตเลส	75
ภาพที่ 44 วิธีการใช้น้ำตาลไซโลสของ <i>Lc. lactis</i> IO1 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะในสูตรอาหารพื้นฐาน	76
ภาพที่ 45 วิธีการใช้น้ำตาลไซโลสของ <i>Lc. lactis</i> IO-1 ที่เลี้ยงในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร	79
ภาพที่ 46 วิธีการใช้น้ำตาลไซโลสของ <i>Lc. lactis</i> IO-1 ที่เลี้ยงในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 10 กรัมต่อลิตร	80
ภาพที่ 47 วิธีการใช้น้ำตาลไซโลสของ <i>Lc. lactis</i> IO-1 ที่เลี้ยงในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 30 กรัมต่อลิตร	82
ภาพที่ 48 วิธีการใช้น้ำตาลไซโลสของ <i>Lc. lactis</i> IO-1 ที่เลี้ยงในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 50 กรัมต่อลิตร	83
ภาพที่ 49 ปริมาณฟิลโนคของไซลูโลส-5-ฟอสเฟตภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสต่าง ๆ กัน	85
ภาพที่ 50 ปริมาณฟิลโนคของไพรูเวตภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสต่าง ๆ กัน	86
ภาพที่ 51 ปริมาณลิแกซินที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยเอนไซม์ไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	88
ภาพที่ 52 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบินโนส ไซโลส กรดอะซิติก เฟอร์ูล และประสิทธิภาพที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส	90
ภาพที่ 53 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบินโนส ไซโลส กรดอะซิติก เฟอร์ูล และประสิทธิภาพที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส	91

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 54 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส ไชโลส กรดอะซิดิก เฟอฟูรอล และประสิทธิภาพ ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส	92
ภาพที่ 55 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส ไชโลส กรดอะซิดิก เฟอฟูรอล และประสิทธิภาพ ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส	93
ภาพที่ 56 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส ไชโลส กรดอะซิดิก เฟอฟูรอล และประสิทธิภาพ ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส	95
ภาพที่ 57 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส ไชโลส กรดอะซิดิก เฟอฟูรอล และประสิทธิภาพ ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส	96
ภาพที่ 58 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส ไชโลส กรดอะซิดิก เฟอฟูรอล และประสิทธิภาพ ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส	97
ภาพที่ 59 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบิโนส ไชโลส กรดอะซิดิก เฟอฟูรอล และประสิทธิภาพ ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส	98
ภาพที่ 60 การเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยที่ไม่มี การเติมแหล่งไนโตรเจน	99
ภาพที่ 61 การเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยที่มีการ เติมยีสต์สกัด (a) 3, (b) 5 และ (c) 7 กรัมต่อลิตร	101
ภาพที่ 62 การเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยที่มีการ เติมเพปโตน (a) 3, (b) 5 และ (c) 7 กรัมต่อลิตร	102
ภาพที่ 63 การเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยที่มีการ เติมแอมโมเนียมซัลเฟต (a) 3, (b) 5 และ (c) 7 กรัมต่อลิตร	104
ภาพที่ 64 การเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยที่มีการ เติมยีสต์สกัด เพปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟต อย่างละ 5 กรัมต่อลิตร	105
ภาพที่ 65 ผลของชนิดและปริมาณไนโตรเจนต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของ <i>Lc. lactis</i> IO-1 ที่เลี้ยงในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อย	107

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 66 การเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยและ เติมยีสต์สกัด 7 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน	108
ภาพที่ 67 การเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่ผ่าน การลดความเป็นพิษและเติมยีสต์สกัด 7 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน	109
ภาพที่ 68 การเลี้ยง <i>Lc. lactis</i> IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่ผ่าน การลดความเป็นพิษและปรับความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสให้เท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร โดยเติมยีสต์สกัด 7 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน	109
ภาพที่ 69 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงและน้ำหนักเซลล์แห้งของ <i>Lc. lactis</i> IO-1	139
ภาพที่ 70 กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นของ (a) น้ำตาลกลูโคส (b) น้ำตาล ไซโลส และ (c) น้ำตาลอะราบินอส	141
ภาพที่ 71 กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นของ (d) กรดแลกติก (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) ฟรุคโตส-1,6-ไดฟอสเฟต	146
ภาพที่ 75 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานกลูโคส (9.298) ไซโลส (9.928) อะราบินอส (10.797) กรดแลกติก (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 โดยเฉพาะการส่งออกไปยังต่างประเทศ ในรูปของน้ำตาล ในปี พ.ศ. 2543 พบว่าประเทศไทยส่งน้ำตาลออกไปขายยังตลาดต่างประเทศได้มากถึง 3.82 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่าการส่งออกประมาณ 24,000 ล้านบาท และประเทศไทยยังเป็นผู้ส่งออกน้ำตาลรายใหญ่อันดับ 3 รองจากบราซิล และออสเตรเลีย (นรชัย ลือกุลวัฒน์ชัย, 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 ใจคิด, 2545) อย่างไรก็ตามในช่วงปี 2544-2545 พบว่าอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลมีราคาตกต่ำ เพราะปริมาณผลผลิตอ้อยและน้ำตาลเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่ราคาน้ำตาลในตลาดโลกตกต่ำ ทำให้ประเทศที่เป็นคู่แข่ง (เช่น บราซิล และออสเตรเลีย) หุ้มน้ำตาลเพื่อแข่งกับตลาดน้ำตาลของประเทศไทย ส่งผลให้รายได้ของเกษตรกรชาวไร่อ้อยลดลง จากอ้อยราคา 600 บาทต่อตัน เหลือเพียง 530 บาทต่อตัน (ศูนย์วิจัยกสิกรรมไทย, 2545) ต่อมาในปี พ.ศ. 2546-2547 ประเทศไทยได้ส่งออกน้ำตาลเป็นอันดับ 2 รองจากบราซิล ซึ่งหากเปรียบเทียบราคาน้ำตาลทรายระหว่างประเทศพบว่า 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 พบว่าราคาน้ำตาลทรายเพิ่มขึ้นจาก 530 บาทต่อตัน เป็น 580 บาทต่อตัน ในขณะที่เกษตรกรชาวไร่อ้อยบางกลุ่มนำกากน้ำตาลมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตปุ๋ยน้ำชีวภาพ ซึ่งในปัจจุบันพบว่าได้รับความนิยมเป็นอย่างมากเพราะเป็นการลดการใช้ปุ๋ยเคมี จากการประเมินผลผลิตทางการเกษตรในช่วงปี พ.ศ. 2544-2545 พบว่าประเทศไทยมีผลผลิตทางการเกษตรประมาณ 116 ล้านตัน และผลผลิตที่มาจากอ้อยมีประมาณ 60 ล้านตัน เมื่อผ่านกระบวนการผลิตน้ำตาลแล้วพบว่าเหลือชานอ้อยประมาณ 3.6 ล้านตัน ซึ่งจากรายงานดังกล่าวจะเห็นได้ว่าวัสดุเหลือทิ้งที่มาจากอ้อยมีปริมาณสูงมาก ดังนั้นหากสามารถนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านี้มาแปรรูปให้เป็นผลิตภัณฑ์อื่น ๆ จะสามารถสร้างรายได้ให้กับประเทศได้ไม่น้อย อย่างไรก็ตามการสร้างรายได้จำเป็นต้องอาศัยการสนับสนุนและส่งเสริมจากภาครัฐ เพื่อให้เกิดการศึกษาวิจัยการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเหล่านี้ต่อไป (www.dede.go.th/dede/index.php)

ชานอ้อยเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีส่วนประกอบของโพลีแซคคาไรด์หลายชนิดเช่น 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 และผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักระหว่างกระบวนการหมักโดยใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงาน (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) ในขณะที่วิธีการเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสไปเป็นกรดแลคติกยังไม่มีรายงานที่ชัดเจน (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) และยังพบว่าความต้องการใช้กรดแลคติกในสหรัฐอเมริกามีมากถึง 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 ซึ่งเป็นโฮโมเฟอไรเม้นท์เททีฟแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (homo-fermentative lactic acid bacteria) สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและ/หรือน้ำตาลไซโลสได้ (Kanagachadran, 1998) ดังนั้น *Lc. lactis* IO-1 จึงน่าจะมีศักยภาพในการใช้น้ำตาลที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย ซึ่งส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลกลูโคสและไซโลส วิธีการใช้น้ำตาลไซโลสยังไม่มีรายงานที่ชัดเจน ในขณะที่วิธีการใช้น้ำตาลกลูโคส คือวิถีไกลโคไลซิส ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะศึกษาวิธีการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตกรดแลคติกจากอาหารสังเคราะห์ 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 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยค่าและกรดไฮโดรคลอริก หรือกรดซัลฟูริก

1.2.5 เพื่อหาชนิดและปริมาณของน้ำตาลจากสารละลายที่ได้หลังจากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อย

1.2.6 เพื่อศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากสารละลายที่ได้หลังจากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อย โดยการแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

เป็นงานวิจัยประยุกต์เพื่อศึกษาการผลิตกรดแลคติก โดยครอบคลุมถึงการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส โซโลส และน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและโซโลส การหาวิธีของการใช้น้ำตาลโซโลสในการผลิตกรดแลคติก การวิเคราะห์เมแทบอลิซึมหลักซ์ในการผลิตกรดแลคติก การเปรียบเทียบหลักซ์ในการผลิตกรดแลคติกภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลต่าง ๆ การศึกษาการสกัดลิกนินด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ การศึกษาอุณหภูมิ ชนิดและปริมาณกรด (กรดไฮโดรคลอริกหรือกรดซัลฟูริก) ที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ขานอ้อย การศึกษาชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่ได้หลังจากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อย การผลิตกรดแลคติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยโดยการแปรผันชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจน

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ประโยชน์ในเชิงเศรษฐศาสตร์

การศึกษากลไกเบื้องต้นในการผลิตกรดแลคติก เพื่อให้ได้กรดแลคติกในปริมาณสูงจากสารละลายที่ได้หลังจากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อย เป็นแนวทางหนึ่งในการประยุกต์ใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรให้เกิดประโยชน์และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรอื่น ๆ ที่มีปริมาณมาก เช่น ฟางข้าว ฟางหวาน และกากมันสำปะหลัง เป็นต้น ซึ่งกรดที่ได้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านเกษตรและอุตสาหกรรม นอกจากได้กรดแลคติกแล้วยังเป็นการลดปัญหาสิ่งแวดล้อม และในขณะเดียวกันเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรดังกล่าว และเป็นการเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรอีกทางหนึ่งด้วย

1.4.2 ประโยชน์ในเชิงวิชาการ

เป็นการเพิ่มพูนความรู้ใหม่ และยังช่วยพัฒนาองค์ความรู้ให้แก่วงการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีของประเทศไทย โดยเฉพาะเรื่องการวิเคราะห์เมแทบอลิซึมหลักซ์ เพื่อให้ก้าวทันกับความก้าวหน้าทางด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสมัยใหม่

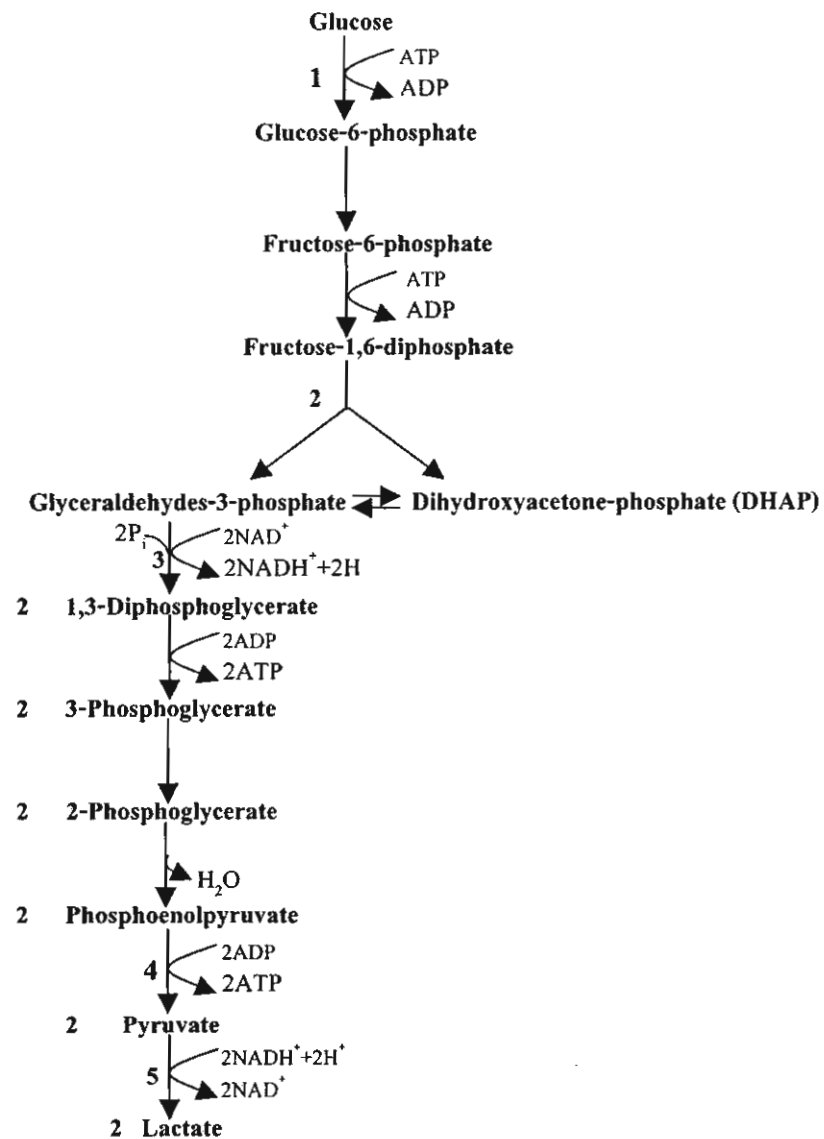
บทที่ 2

การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

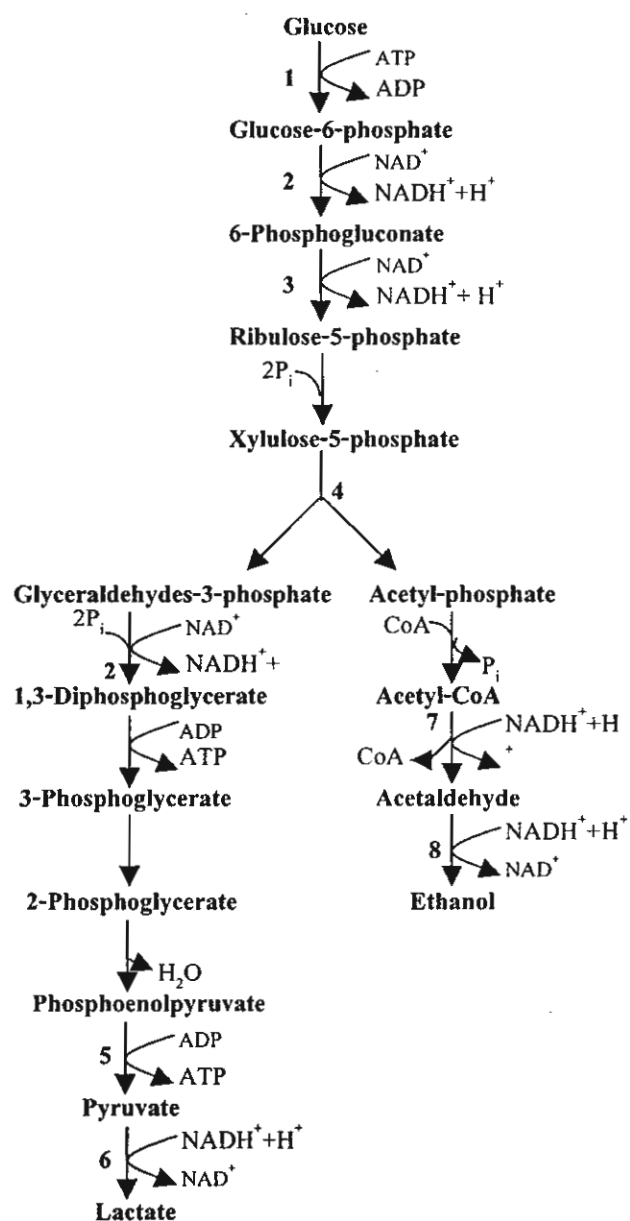
2.1 แลคติกแอซิดแบคทีเรีย

แลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram-positive) มีรูปร่างกลม (cocci) หรือแท่ง (rod) เคลื่อนที่ไม่ได้ (nonmotile) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) ไม่ผลิตเอนไซม์คะตาเลส (catalase) เจริญได้ทั้งในที่ไม่มีอากาศ (anaerobic condition) และในที่ที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) ผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักระหว่างกระบวนการหมัก โดยใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงาน (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 คือ โฮโมแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (homo-lactic acid bacteria) แลคติกแอซิดแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลคติกได้มากกว่า 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 โดยผ่านวิถีฟอสโฟไทโดเลส (phosphoketolase) (Axelsson, 1993) จำนวนโมลของกรดแลคติกและพลังงานที่ได้เท่ากับ 1 โมล (โมลของกรดแลคติกต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้) และ 1 โมล ATP ตามลำดับ (ภาพที่ 2) ตัวอย่างของแลคติกแอซิดแบคทีเรียได้แก่ *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Aerococcus* และ *Vaganococcus* (Stiles & Hozapfel, 1997)



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

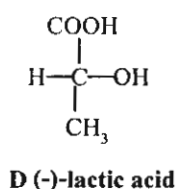
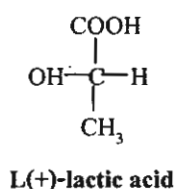


ภาพที่ 2 วิถีฟอสโฟไทด์เลส 1: glucokinase; 2: glucose-6-phosphate dehydrogenase; 3: 6-phosphogluconate dehydrogenase; 4: phosphoketolase; 5: pyruvate kinase; 6: lactate dehydrogenase; 7: acetaldehyde dehydrogenase; 8: alcohol dehydrogenase (Axelsson, 1993)

2.2 ชนิดของกรดแลกติก

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

มนุษย์และสัตว์สามารถใช้กรดแลกติกในรูปของ L(+) เท่านั้น เพราะภายในร่างกายของมนุษย์และสัตว์มีเอนไซม์ L-lactate dehydrogenase ดังนั้นมนุษย์และสัตว์จึงไม่สามารถใช้กรดแลกติกในรูปของ D(-) ได้ หากร่างกายมีการสะสมกรดแลกติกชนิด D(-) ในปริมาณมาก (เกิน 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักร่างกาย 1 กิโลกรัมต่อ 1 วัน) จะส่งผลให้มีการสะสมของกรดแลกติกดังกล่าวในเลือดสูงขึ้น ทำให้เกิดสภาวะที่เรียกว่า hyperacidity (Akerberg & Zacchi, 2000)



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

2.3 ประโยชน์ของกรดแลกติก

กระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดแลกติกด้วยจุลินทรีย์เป็นสิ่งจำเป็น และมีความต้องการอย่างมากเพื่อใช้ในการถนอมอาหารเพราะเป็นกระบวนการที่มีต้นทุนต่ำ ใช้พลังงานน้อยในกระบวนการผลิต และการเตรียมวัตถุดิบเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค นอกจากนี้ยังมีความหลากหลายของกลิ่นรส (Oda et al. 2000) จากการสำรวจของ Hofvendahl & Hahn-Hägerdal (2000) พบว่ามีการผลิตกรดแลกติกประมาณ 80,000 ตันทั่วโลก และปริมาณของกรดแลกติก 90 เปอร์เซ็นต์ ได้จากกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ และส่วนที่เหลือได้จากกระบวนการทางเคมี กรดแลกติกถูกนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง 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. ใช้โพลิแลกติกแอซิด (poly lactic acid) ในการทำไหมเย็บแผลที่ละลายได้

2. ใช้เป็นสารตัวกลาง (intermediate) ในอุตสาหกรรมการผลิตยา
3. ใช้เป็นยาแก้อักเสบ (anti-inflammatory drug) โดยใช้ในรูปของเอทิลแลคเตท (ethyl lactate)
4. ใช้เป็นสารช่วยห้ามเลือด (proof coagulant) 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 อุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น

1. ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเซลโลเฟน (cellophane)
2. ใช้ในการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ (biodegradable plastic) ในรูปของโพลิแลคติกแอซิด
3. ใช้โซเดียมแลคเตท (sodium lactate) ในอุตสาหกรรมการผลิตสบู่
4. ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตวงจรอิเล็กทรอนิกส์
5. ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยาง
6. ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสิ่งทอ (textile)

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างกรดแลคติก

2.4.1 พีเอช

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

2.4.2 ออกซิเจน

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

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

2.4.3 ปริมาณและชนิดของสับสเตรต

ปริมาณและชนิดของสับสเตรตที่ใช้ในกระบวนการหมักของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย มีผลต่อการสร้างผลิตภัณฑ์ โดยพบว่าเมื่อเลี้ยง *Lactococcus lactis* แบบกะในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสอย่างจำกัดพบว่า ปริมาณของกรดแลคติกที่ถูกสร้างขึ้นลดลง 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* ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอน *R. oryzae* สามารถผลิตกรดแลคติกได้มากกว่า (ประมาณ 3 เท่า) เมื่อเปรียบเทียบกับเลี้ยง *R. oryzae* ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

2.4.4 อุณหภูมิ

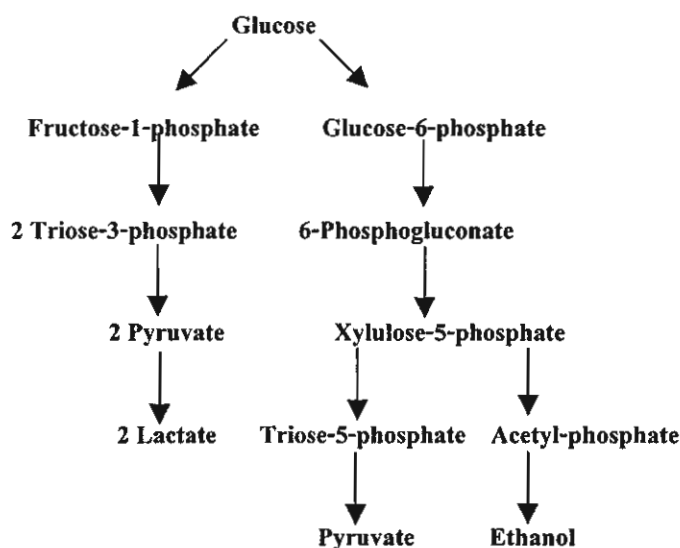
อุณหภูมิมีบทบาทสำคัญในการแสดงออกของเอนไซม์บางชนิดที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดแลคติกในแลคติกแอซิดแบคทีเรีย โดยพบว่าการแสดงออกของเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจิเนส (lactate dehydro genase) ใน *Lb. rhamnosus* ที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีค่าลดลง และส่งผลให้การผลิตกรดแลคติกที่สภาวะดังกล่าวลดลงด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับเลี้ยง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

2.5 สารตั้งต้นที่สำคัญในการสร้างไพรูเวตและแลคเตท

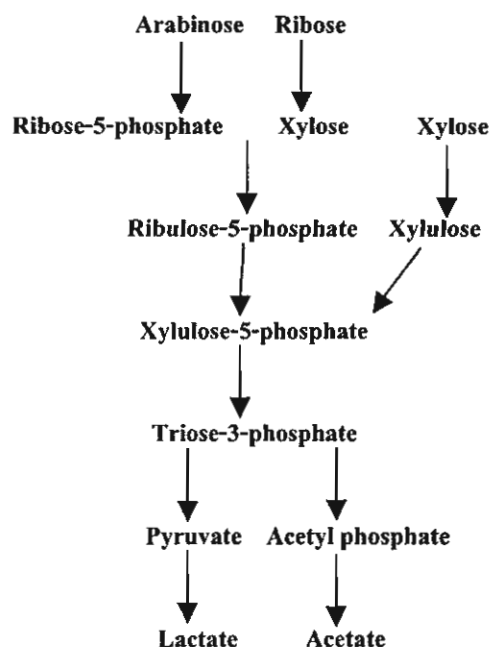
ไพรูเวต (pyruvate) เป็นสารตัวกลางที่สำคัญชนิดหนึ่งก่อนที่จะถูกเปลี่ยนเป็นแลคเตทโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรีย การสร้างไพรูเวตเกิดขึ้นได้จากสารตั้งต้นหลายชนิดและผ่านวิถีที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Lui, 2003) การสร้างไพรูเวตสามารถเกิดขึ้นได้จากวิธีดังต่อไปนี้

2.5.1 วิถีเมแทบอลิซึมแบบปกติ (Common metabolic pathway)

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



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



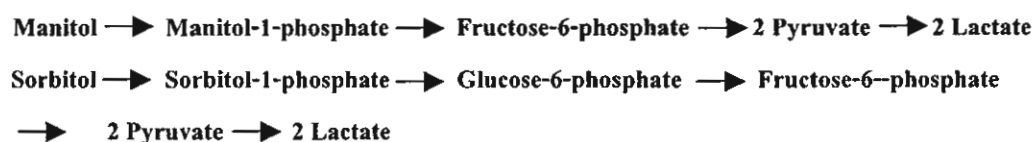
ภาพที่ 5 ไพรูเวตที่เกิดขึ้นจากเมแทบอลิซึมของน้ำตาลเพนโตส (Kandler, 1983; Axelsson, 1993)

2.5.2 วิถีเมแทบอลิซึมแบบไม่ปกติ (Uncommon metabolic pathway)

นอกเหนือจากการสร้างไพรูเวตและแลคเตทจากน้ำตาลแล้ว สารดังกล่าวยังถูกสร้างขึ้นได้จากสารตั้งต้นต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

2.5.2.1 โพลีออลส์ (Polyols)

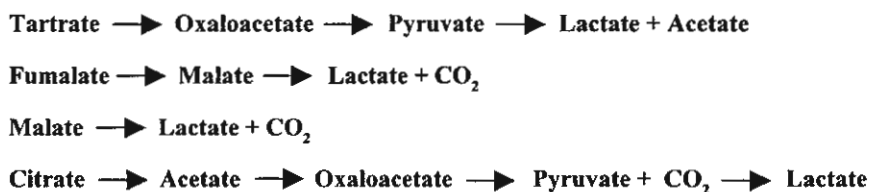
แลคติกแอซิดแบคทีเรียทั่วไปไม่สามารถใช้สารในกลุ่มนี้เพื่อสร้างไพรูเวตและแลคเตทได้ ยกเว้นโพลีออลส์บางชนิดเช่น แมนิทอล (manitol) และซอร์บิทอล (sorbitol) เป็นต้น (ภาพที่ 6) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า *Lactobacillus plantarum* สามารถใช้สารตั้งต้นในกลุ่มโพลีออลส์ในการสร้างแลคเตทได้ (Jordan & Cogan, 1994)



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

2.5.2.2 กรดอินทรีย์ (Organic acids)

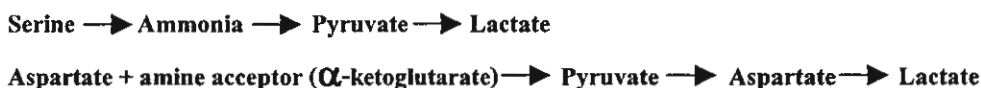
กรดอินทรีย์ถูกใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับแลคติกแอซิดแบคทีเรียบางชนิด เพื่อสร้างกรดแลคติก (Radler, 1975; Pilone, 1975; Kunkee, 1991; Hugenholtz, 1993; Sarantinopoulos et al., 2001) ตัวอย่างกรดอินทรีย์ที่ถูกเปลี่ยนเป็นแลคเตทได้แก่ ทาร์เตรต (tartrate) ฟูมาเลท (fumarate) มาเลท (malate) และ ซิเตรต (citrate)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



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

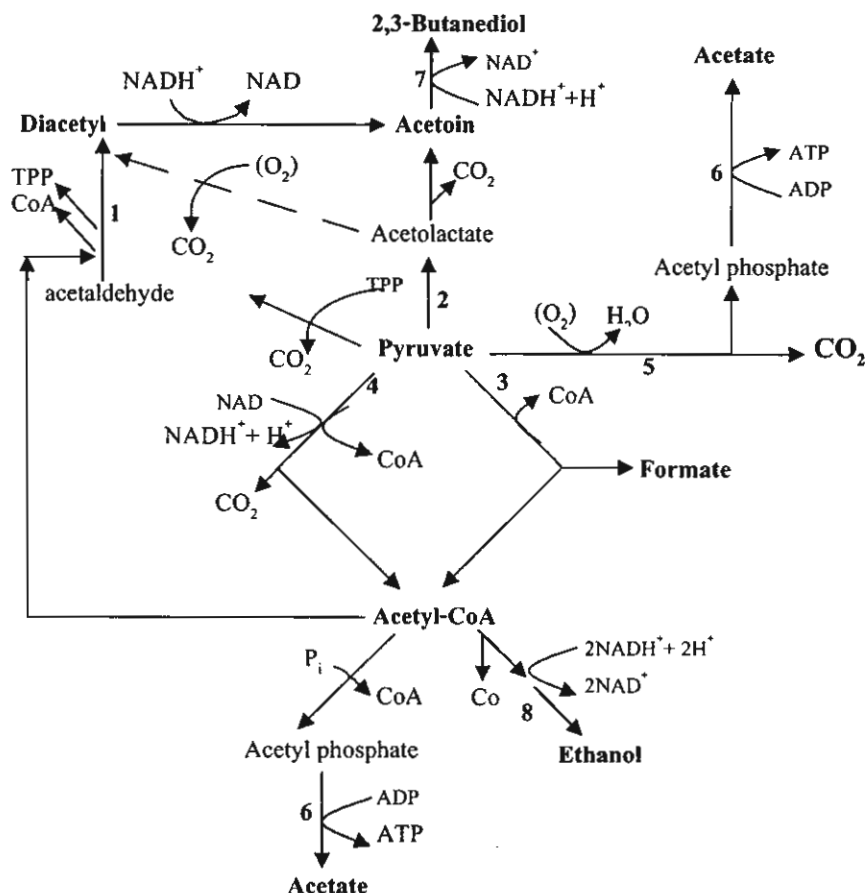
2.5.2.3 กรดอะมิโน (Amino acids)

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



ภาพที่ 8 กรดอะมิโนบางชนิดสามารถเปลี่ยนเป็นแลคเตท (Loubiere et al., 1996)

อย่างไรก็ตามไพรูเวทที่ถูกสร้างขึ้นโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถถูกเมแทบอลิไทป์ไปเป็นผลิตภัณฑ์อื่น นอกเหนือจากปฏิกิริยาข้างต้น เช่น อะซิเตท ฟอร์เมต เอทานอล ไดอะซีติล อะซิโตน 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 การขนส่งโมเลกุลของน้ำตาลในแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

กลไกการขนส่งโมเลกุลของน้ำตาลทั้งที่อยู่ในรูปของโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) หรือโมเลกุลคู่ (disaccharide) ผ่านเข้าสู่เซลล์ในแลคติกแอซิดแบคทีเรานั้น มีกลไกการขนส่งที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของน้ำตาลและแลคติกแอซิดแบคทีเรีย โดยทั่วไปพบว่ามียกลไกที่สำคัญ 2 กลไก ในการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ในแลคติกแอซิดแบคทีเรียคือ

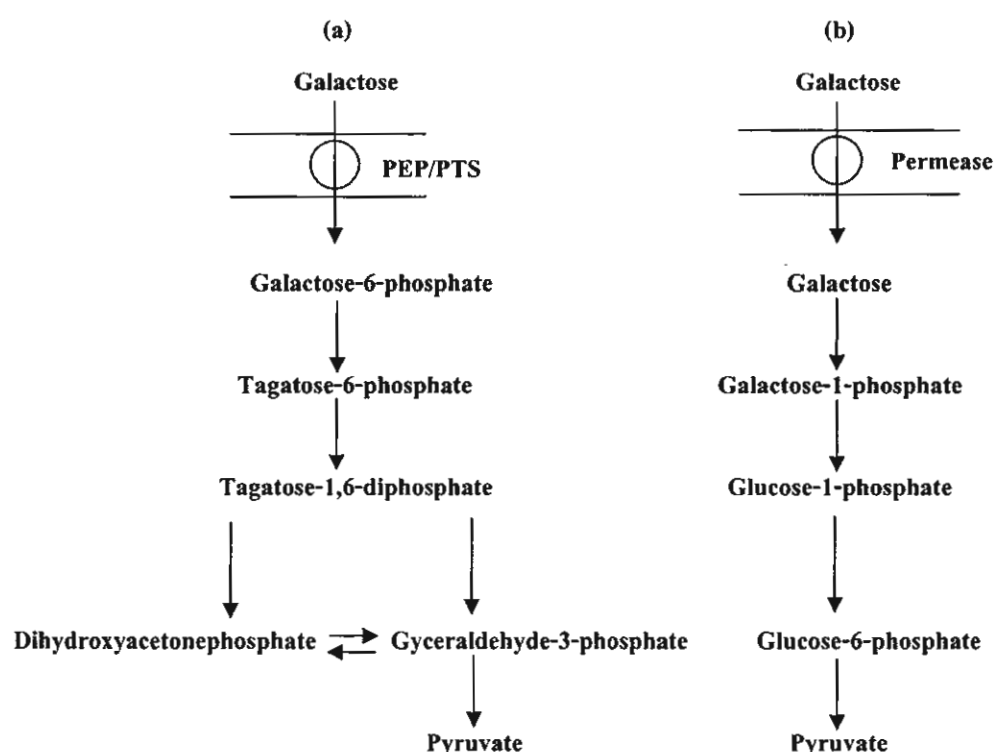
2.6.1 ระบบฟอสโฟอินอลไพรูเวต-ฟอสโฟทรานส์เฟอร์เรส (Phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system, PEP/PTS)

การขนส่งน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียด้วยวิธีนี้ ส่วนใหญ่จะพบในกลุ่มของ *Lactobacilli* ซึ่งพบว่าน้ำตาลที่ผ่านเข้าสู่เซลล์จะถูกเติมหมู่ฟอสเฟต โดยกระบวนการฟอสโฟริเลชัน (phospho

ylation) จากนั้นจึงถูกเมแทบอลิไทต์ต่อ 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 จะถูกเมแทบอลิไทต์ผ่านวิถีทากาโทส-6-ฟอสเฟต (tagatose-6-phosphate) (ภาพที่ 10a)

2.6.2 ระบบเพอร์มิเอส (Permease system)

น้ำตาลที่ถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์ด้วยวิธีนี้ จำเป็นต้องอาศัยพลังงานจากเซลล์ในการขนส่งโมเลกุลของน้ำตาลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ส่วนใหญ่จะพบใน *Leuconostocs* และในกลุ่มของแบคทีเรียที่ทนความร้อน (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 เมแทบอลิซึมของน้ำตาลกาแลคโตสในแบคทีเรีย (a) : phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system (PEP/PTS); (b) : permease system (Axelsson, 1993)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

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

Arasaratnan et al. (1996) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลกลูโคส โดย *Lb. delbrueckii* ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ โดยควบคุมที่อุณหภูมิห้อง พีเอช 6.5 ผลการทดลองพบว่าเมื่อเลี้ยง *Lb. delbrueckii* ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร และไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน *Lb. delbrueckii* ไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้หมด และพบว่าที่เวลา 72 ชั่วโมง น้ำตาลกลูโคสถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลกติกเพียง 12 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เดียวกันเมื่อมีการเติมยีสต์สกัด (10 กรัมต่อลิตร) ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร พบว่า *Lb. delbrueckii* สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสหมดภายในเวลา 48 ชั่วโมง ที่เวลาดังกล่าวพบกรดแลกติก 22.5 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลกติกได้มากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต

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

Senthuran et al. (1999) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดย *Lb. casei* ในรูปของเซลล์ตรึง (immobilized cells) และเซลล์อิสระ (free cells) ซึ่งมีน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะซ้ำ (recycle batch) โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าน้ำตาลแลคโตสส่วนใหญ่ถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลกติก และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตกรดแลกติกพบว่า การใช้เซลล์ตรึงรูปจะมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้เซลล์อิสระในทุกสภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตสเท่ากัน อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลกติกของเซลล์ตรึงรูปมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตส และจำนวนครั้งของการใช้เมล็ดเซลล์ตรึงรูปเพิ่มขึ้น

Kwon et al. (2000) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลกลูโคสและแลคโตสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์กากถั่วเหลือง โดย *Lb. rhamnosus* ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที และนำสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์กากถั่วเหลืองมาเติมด้วยวิตามินชนิดต่างๆ จากการทดลองพบว่าการเติมวิตามินจะช่วยเพิ่มอัตราผลผลิต (productivity) กรดแลกติก โดยเฉพาะการเติมวิตามินในรูปของกรดแพนโทเทนิค (pantothenic acid) ร่วมกับการเติมซอโยตोन (soytone) 19.3 กรัมต่อลิตร เป็น

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

Guyot & Morlon-Guyot (2001) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกันโดย *Lb. manihotivorans* OND32^T ผลการทดลองพบว่า น้ำตาลกลูโคส มอลโตส เซลโลไบโอส ฟรุคโตส และซูโครส ส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้ในการสร้างกรดแลกติก 12.1, 9.1, 11.6, 9.7 และ 10.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลได้ของกรดแลกติกที่สภาวะดังกล่าวมีค่า 0.95, 0.93, 0.96, 0.82 และ 0.83 กรัมกรดแลกติกต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ ในขณะที่ผลได้ของเซลล์มีค่าเท่ากับ 0.07, 0.11, 0.11, 0.08 และ 0.06 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ

Nancib et al. (2001) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตกรดแลกติกโดย *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 ปริมาณเซลล์และกรดแลกติกมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในสารละลาย (10-60 กรัมต่อลิตร) และพบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร จะได้เซลล์และกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 2.24 และ 32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเซลล์และกรดแลกติกที่ได้นี้มีค่าต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ใช้อาหาร MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร) คือมีค่า 5.8 และ 45 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้ยังพบว่าปริมาณเซลล์และกรดแลกติกที่ได้มีค่าต่ำเนื่องจากขาดแหล่งไนโตรเจน ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการนำไปใช้ในการเจริญของเซลล์ จากนั้นจึงมีการเติมยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (0, 5, 10, 20 และ 30 กรัมต่อลิตร) ลงในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ผลอินทผลัม (ที่มีน้ำตาลกลูโคส 60 กรัมต่อลิตร) พบว่าปริมาณเซลล์และกรดแลกติกมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามความเข้มข้นของยีสต์สกัด (0-20 กรัมต่อลิตร) โดยเซลล์และกรดแลกติกสูงสุดมีค่าเท่ากับ 5.81 และ 46 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเติมยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ผลการทดลองยังพบว่าการเติมไนโตรเจนมีผลทำให้เซลล์สามารถใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในสารละลายได้มากขึ้น โดยพบว่าเหลือน้ำตาลกลูโคสเพียง 6.4 กรัมต่อลิตร เมื่อเติมยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหลือมีค่าน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะอื่น นอกจากนี้จากผลการทดลองเปรียบเทียบชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตกรดแลกติก พบว่าการเติมยีสต์สกัด (20 กรัมต่อลิตร) จะให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด อัตราผลิตกรดแลกติก และเปอร์เซ็นต์การใช้สับสเตรต สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นที่ความเข้มข้นเท่ากัน

Yun & Ryu (2001) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกันด้วย *E. faecalis* RKY1 ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 38 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที พบว่าน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และมอลโตส (อย่างละ 150 กรัมต่อลิตร) ส่วนใหญ่ถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลกติกผ่านกระบวนการหมักแบบไฮโมแลกติกแอสิดเฟอเรนเมนท์แทน อัตราผลิตกรดแลกติกจากการใช้น้ำตาลกลูโคส

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

Garde et al. (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ฟางข้าวสาลี (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 ถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลกติก 6.7 และ 4.7 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเลี้ยง *Lb. pentosus* และ *Lb. brevis* ร่วมกันจะสามารถผลิตกรดแลกติกได้มากกว่าการใช้เชื้อบริสุทธิ์เพียงชนิดเดียว โดยพบว่าน้ำตาลไซโลสถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลกติกได้มากถึง 95 เปอร์เซ็นต์

Wee et al. (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากกากน้ำตาล (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) น้ำตาลถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลกติกได้มากถึง 95.7 กรัมต่อลิตร ผลได้และอัตราผลผลิตกรดแลกติกมีค่าเท่ากับ 94.9 เปอร์เซ็นต์ และ 4 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ในขณะที่น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าเท่ากับ 14.4 กรัมต่อลิตร และยังพบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เดิม (น้ำตาลรวมเท่ากับ 68 - 170 กรัมต่อลิตร) นอกจากนี้ผลการทดลองยังพบว่า เมื่อเติมยีสต์สด 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนจะให้น้ำหนักเซลล์แห้งและอัตราผลผลิตกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 16.1 กรัมต่อลิตร และ 5.3 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราผลผลิตกรดแลกติกและน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าลดลงเมื่อเลี้ยง *E. faecalis* RKY1 ในสูตรอาหารที่มีกากน้ำตาล 333 กรัมต่อลิตร (น้ำตาลรวมเท่ากับ 170 กรัมต่อลิตร) เนื่องจากความเข้มข้นของสับสเตรตและปริมาณกรดแลกติกที่สร้างขึ้น มีผลต่อการเจริญของ *E. faecalis* RKY1

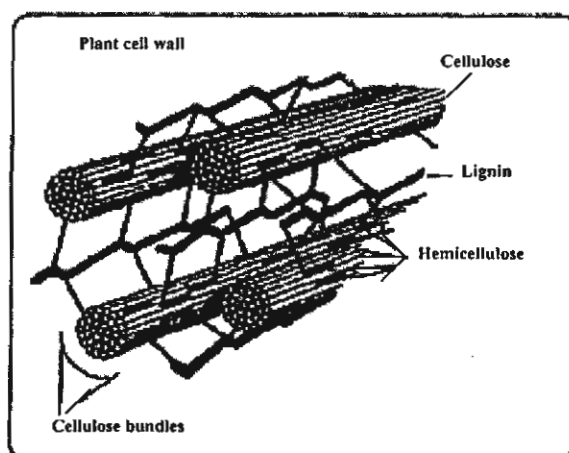
Oh et al. (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรด้วย *Enterococcus faecalis* RKY1 ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 38 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที โดยใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ข้าวสาลี ข้าวบาเลย์ และข้าวโพดด้วยเอนไซม์ เป็นแหล่งคาร์บอน ผลการทดลองพบว่า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

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

2.8 ขานอ้อย (Sugar cane bagasse)

2.8.1 องค์ประกอบทางกายภาพและเคมีของขานอ้อย

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

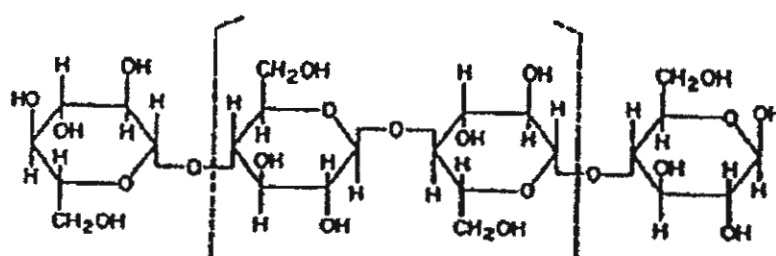


ภาพที่ 11 การจัดเรียงตัวของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินในขานอ้อย (http://www.dnp.go.th/bio_com/garbage_fiber.html)

2.8.1.1 เซลลูโลส

เซลลูโลส (cellulose) เป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) เชิงเส้นตรงซึ่งประกอบด้วยหน่วยซ้ำๆ กันของน้ำตาลกลูโคสประมาณ 2,000-14,000 หน่วย ที่ต่อกันด้วยพันธะเบตา 1→4 โกลโคซิดิก (β -1,4- glycosidic linkage) มีสูตรโมเลกุลทั่วไปคือ $C_6H_{10}O_5$ เซลลูโลสเป็นโครงสร้างในเนื้อเยื่อพืช โดยพบร่วมกับลิกนิน เพนโตแซน (pentosan) กัม (gum) แทนนิน (tannin) ไขมัน (lipid) และสารที่ทำให้เกิดสี (pigment) เป็นต้น เซลลูโลสมีหมู่ไฮดรอกซิล 3 หมู่ สามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน และเกิดเป็นลักษณะที่เรียกว่าไฟบริล (fibrils) โครงสร้างของเซลลูโลสมีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบและมีแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลสูง ทำ

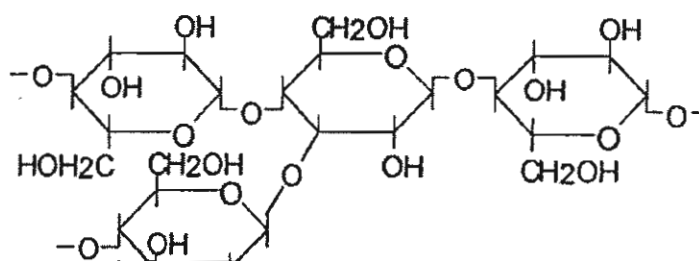
ให้เซลลูโลสมีโครงสร้างที่แข็งแรง (ภาพที่ 12) นอกจากนี้เซลลูโลสยังมีความเป็นผลึกสูง ทำให้อุณหภูมิจนการหลอมตัวสูงตามไปด้วย เซลลูโลสมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ในกรดเข้มข้น เช่น กรดไฮโดรคลอริก และกรดซัลฟูริก เป็นต้น โดยเซลลูโลสจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ในสารละลายกรดที่อุณหภูมิห้อง และปฏิกิริยาจะหยุดลงที่อุณหภูมิต่ำ (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

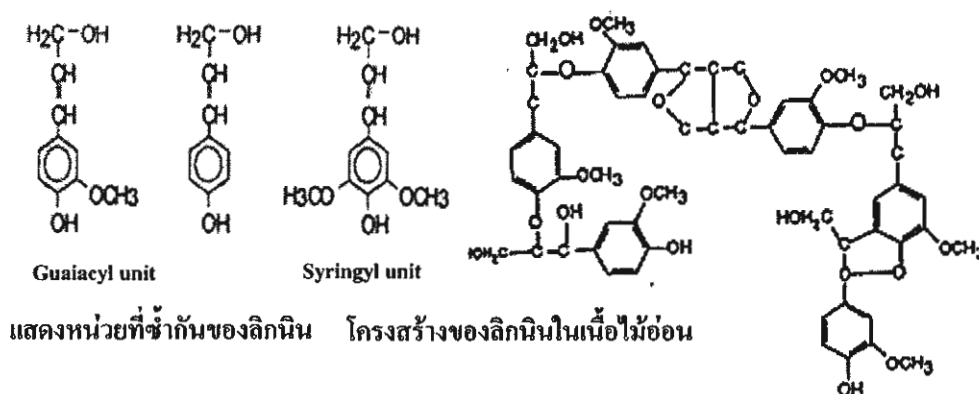
เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) เป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ชนิดหนึ่ง ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับเซลลูโลส แต่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายชนิด เช่น กลูโคส กาแลกโตส แมนโนส ไซโลส อะราบิโนส รวมทั้งกรดกลูโคนิก และกาแลกทูโรนิก ที่เรียงต่อกันด้วยพันธะเบตา 1→4 และเบตา 1→6 ไกลโคซิดิก (β -1,6- glycosidic linkage) (ภาพที่ 13) เฮมิเซลลูโลสพบในเนื้อเยื่อของพืชโดยอยู่ร่วมกับสารอื่นๆ เช่น ลิกนิน และเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสทำหน้าที่เป็นโครงสร้างของผนังเซลล์ มีสูตรทางเคมีคือ $(C_6H_{12}O_5)_n$



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

2.8.1.3 ลิกนิน

ลิกนิน (lignin) เป็นสารประกอบอะโรมาติกเชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มักพบอยู่ร่วมกับ เซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ภายใน โครงสร้างของลิกนินประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน รวมกัน เป็นหน่วยย่อยหลายชนิด ลิกนินเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำและ โครงสร้างไม่มีการบิดงอ (ภาพที่ 14) ดังนั้นจึงทำให้ พืชที่มีลิกนินมากจะมีความแข็งแรงมาก เมื่อพืชตายลิกนินจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ลิกเนส (lignase) หรือลิกนินเนส (ligninase) ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวสามารถพบได้ในเชื้อราบางชนิด



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

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1. ไธอะมีนไพโรฟอสเฟต (thiamine pyrophosphate)	Sigma, U.S.A
2. อิริโทรส-4-ฟอสเฟต (erythrose-4-phosphate disodium salt)	Sigma, U.S.A
3. อัลโดเลส (aldolase)	Biochemika, U.S.A
4. โซเดียมแลคเตต (sodium lactate sodium salt)	Sigma, U.S.A
5. กลูตาไธโอน (glutathione reduced form)	Sigma, U.S.A
6. โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin)	Fluka, Switzerland
7. 2,3-บิวเทนไดออล (2,3 butanediol)	Aldrich, Australia
8. ไตรโอสฟอสเฟตไอโซเมอเรส (triose phosphate isomerase)	Sigma, U.S.A
9. อัลฟา-กลีเซอรอฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (alpha-glycerophosphate dehydrogenase)	Sigma, U.S.A
10. เบตา-นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (beta-NAD reduced form)	Sigma, U.S.A
11. ฟรุคโตส-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. ฟรุคโตส-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. อาหารไซโอไกลโคเลต (thioglycolate medium)	Difco, Germany
18. เอ็น-ไกลซิลไกลซีน (N-glycylglycine)	BDH, England
19. แอล(+)-อะราบินโนส (L(+)-arabinose)	Fluka, Switzerland
20. เพปโตน (peptone)	Himedia, India
21. ยีสต์สกัด (yeast extract)	BBL, England
22. แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate)	Sigma, U.S.A
23. เมทิลเอมีนไฮโดรคลอไรด์ (methylamine hydrochloride)	Sigma, Switzerland
24. เมทิลออร์เรนจ์ (methyl orange sodium salt)	LABCHEM,Australia
25. ซิลิโคน 510/50 cS (Dow coming 510/50 cS silicone fluid)	BDH, England
26. ซิลิโคน 550 cS (Dow coming 550 silicone fluid)	BDH, England

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
27. กลีเซอรอล (glycerol)	Labchem, Australia
28. โซเดียมฟอร์มเมต (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. เพอฟูรอล	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. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (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)		Shimadzu, Japan
- คอลัมน์	GC-17A	U.S.A
- ตัวตรวจวัด	Molecular sieve-5A 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. อิเล็กโทรดวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH electrode)	Hamilton CH-7402	Hamilton, Switzerland
12. คิวเวต (cuvette)	Hellma quartz glass	Hellma, Australia
13. เข็มฉีดยาสำหรับ HPLC (syringe for HPLC)	SGE	SGE, Australia
14. เข็มฉีดยาสำหรับ 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

บิสต์สกัด	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 ภายใต้อัตราความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3.3.2 สูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ประกอบด้วย

บิสต์สกัด	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 ภายใต้อัตราความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3.3.3 สูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลส ประกอบด้วย

บีสต์สก็ด	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 ภายใต้อัตราความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3.3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อไรโอไกลโคเลต (thioglycolate medium) ประกอบด้วย

อาหารไรโอไกลโคเลต	25	กรัมต่อลิตร
-------------------	----	-------------

เตรียมโดยชั่งอาหารไรโอไกลโคเลต 25 กรัม เติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร คนให้ละลาย แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้อัตราความดัน 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 การเก็บแบบไลโอไฟล์ไลซ์ (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 มาเลี้ยงในอาหารไรโอไกลโคเลต ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

3.4.2.2 การเตรียมกล้าเชื้อ

ปิเปตเชลล์ที่เลี้ยงในข้อ 3.4.2.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารสูตรพื้นฐาน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยยีสต์สกัด เพปโตน โซเดียมคลอไรด์ อย่างละ 5 กรัมต่อลิตร และน้ำตาล กลูโคส 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 ขานอ้อยที่ใช้ในการทดลอง

ขานอ้อยสายพันธุ์สุพรรณบุรี 501

3.6 วิธีการทดลอง

3.6.1 การศึกษาการผลิตกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 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 (กรดแลกติก กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก) เอทานอล 2,3-บิวเทนไดออล และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ HPLC และ GC

3.6.2 การศึกษาการผลิตกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 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 (กรดแลกติก กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก) เอทานอล 2,3-บิวเทนไดออล และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ HPLC และ GC

3.6.3 การศึกษาการผลิตกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลส (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 (กรดแลกติก กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก) เอทานอล 2,3-บิวเทนไดออล และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ HPLC และ GC

3.6.4 การศึกษาการผลิตกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลส (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 เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์น้ำตาลกลูโคส ไซโลส กรด (กรดแลกติก กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก) เอทานอล 2,3-บิวเทนไดออล โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ HPLC และ GC

3.6.5 การศึกษาวิธีการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตกรดแลกติก

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 แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปหาวิธีของการใช้น้ำตาลไซโลส

3.6.6 การศึกษาเมแทบอลิซึมของผลิตภัณฑ์ในการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลไซโลส

นำข้อมูลผลได้ของผลิตภัณฑ์ (โมลผลิตภัณฑ์ต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้) ที่ได้จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส (ในหัวข้อ 3.6.2) ไปบันทึกและคำนวณในวิธีการใช้น้ำตาลไซโลสที่ได้จากหัวข้อ 3.6.5

3.6.7 การศึกษาพรีนิซิฟิลโนคของไซลูโลส-5-ฟอสเฟตและไพรวอด

นำข้อมูลปริมาณของไซลูโลส-5-ฟอสเฟต และไพรวอดที่ถูกสร้างขึ้นในวิธีของการใช้น้ำตาลไซโลสได้ภายใต้สถานะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสต่าง ๆ กันไปบันทึกและคำนวณในพรีนิซิฟิลโนคของไซลูโลส-5-ฟอสเฟตและไพรวอด

3.6.8 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย

3.6.8.1 การสกัดลิกนินจากชานอ้อย

นำชานอ้อยมาอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นผลไม้แล้วกรองด้วยตะแกรงขนาด 5 มิลลิเมตร นำชานอ้อยที่ผ่านการกรองไปไฮโดรไลซ์ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 8, 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Dominguez 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 โดยใช้อัตราส่วนขานอ้อยต่อสารละลายกรด 1 ต่อ 15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ดัดแปลงจาก Dominquez et al., 1997) เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (กลูโคส ไสโลส และอะราบิโนส) กรดอะซิติก และเฟอรูล ด้วย HPLC

3.6.9 การศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อย

3.6.9.1 การลดความเป็นพิษของสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อย

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

3.6.9.2 การผลิตกรดแลกติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อย

สารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยในข้อ 3.6.8 (พิจารณาจากประสิทธิภาพของการไฮโดรไลซ์โดยคำนวณจากอัตราส่วนระหว่างน้ำตาลกลูโคส ไสโลส และอะราบิโนสต่อสารขี้ (กรดอะซิติก และเฟอรูล)) นำมาปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 โมลาร์ (Garde et al., 2001) นำสารละลายที่ปรับพีเอชส่วนหนึ่งไปลดความเป็นพิษ จากนั้นนำสารละลายดังกล่าวไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ภายใต้อากาศดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 25 นาที จากนั้นนำไปศึกษาการผลิตกรดแลกติกภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ น้ำตาล (กลูโคส ไสโลส และอะราบิโนส) กรด (กรดแลกติก กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก) เอทานอล 2,3-บิวเทนไดออล เฟอรูล และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยใช้เครื่อง สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ HPLC และ GC

3.6.10 การศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อย

เลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อย โดยแปรผันแหล่งไนโตรเจน 3 ชนิด คือ บิสต์สก๊ต 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 ไสโลส และอะราบิโนส) กรด (กรดแลกติก กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก) เอทานอล 2,3-บิวเทนไดออล และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ HPLC และ GC

3.7 วิธีการวิเคราะห์

3.7.1 การวัดการเจริญของจุลินทรีย์

3.7.1.1 การวัดความขุ่น (turbidity)

นำตัวอย่างเซลล์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร (Ishizaki, 1990)

3.7.1.2 การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ (dry cell weight)

นำตัวอย่างสารละลายเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ (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 นำไปใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (microcentrifuge tube) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ดูดเอาเฉพาะส่วนใส (supernatant) เก็บที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เพื่อร่อนนำไปวิเคราะห์น้ำตาล (กลูโคส, ไซโลส และอะราบิโนส) กรด (กรดแลกติก กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก) เอทานอล และ 2,3-บิวเทนไดออล โดยใช้ HPLC และที่เวลาต่างๆ ตัวอย่างแก๊สในถังหมักถูกดูดผ่านไซริงค์ฟิเตอร์ของถังหมัก ปริมาตร 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) ส่วนในการวิเคราะห์ด้วย GC จะใช้แก๊สตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตรและใช้แก๊สอาร์กอนเป็นแก๊สนำพาหะ (carrier gas) และใช้คอลัมน์ Molecular sieve 5A ที่ความดัน 100 kPa โดยควบคุมอุณหภูมิของอินเจกเตอร์ คอลัมน์ และตัวตรวจวัด ที่ 100, 100 และ 220 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และใช้ตัวตรวจวัดแบบ TCD (thermal conductivity detector)

3.7.3 การเตรียมสารมาตรฐานเพื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC และ GC

ซังกลูโคส 0.2551 กรัม ไซโลส 0.2551 กรัม อะราบิโนส 0.125 กรัม ไซเตียมแลกเตท 0.3210 กรัม ไซเตียมอะซิเตท 0.3509 กรัม ไซเตียมฟอร์มเมต 0.1889 กรัม ปิเปดเอทานอล 2,3-บิวเทนไดออล และเฟอฟูรอล ปริมาตร 95, 26 และ 109 ไมโครลิตร ตามลำดับ ลงในบีกเกอร์ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 2 ขั้นตอน 10 มิลลิลิตร คนให้ละลาย จากนั้นถ่ายลงในขวดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 25 มิลลิลิตร และปรับ

ปริมาตรให้ครบ 25 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น 2 ชั้นตอน ซึ่งจะได้อาหารละลายมาตรฐานกลูโคส ไซโลส อะราบีโนส กรดแลกติก กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก เอทานอล และ 2,3-บิวเทนไดออล และเฟอฟูรอลที่ความเข้มข้น 10, 10, 5, 10, 10, 5, 3, 1 และ 5 กรัมต่อลิตร 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. สารละลายคาร์บอเนตทาร์เทรต (Carbonate-tartrate reagent)

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 200 กรัม และโซเดียมทาร์เทรต ($\text{NaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 12 กรัม ละลายในน้ำกลั่นร้อนปริมาตร 750 มิลลิลิตร ถ่ายลงในขวดปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น 2 ชั้นตอน เก็บสารละลายที่ได้ไว้ในที่มืดเพื่อใช้วิเคราะห์ต่อไป

3.7.4.2 การวิเคราะห์ปริมาณลิกนินในตัวอย่าง

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

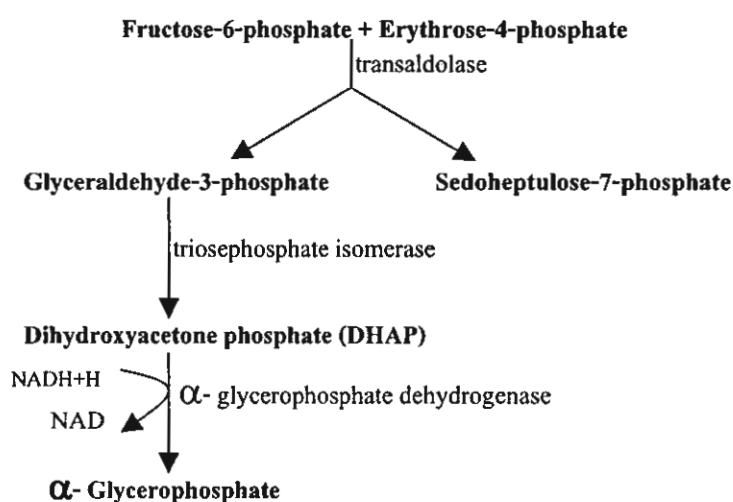
3.7.5 การเตรียมสารละลายเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลส (transaldolase)

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-มาเลตบัฟเฟอร์ (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 ไปวิเคราะห์แอกติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลส

3.7.5.1 หลักการวัดแอกติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลส

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

โรฟอสเฟตโดยการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลีเซอรโรฟอสเฟตดีไฮโดรจิเนส (ภาพที่ 15) ซึ่งมีเอ็นเอดีเอชเป็นโคเอนไซม์ (co-enzyme) แอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโคเลสจะถูกวัดทางอ้อมโดยการวัดค่าดูดกลืนแสงของเอ็นเอดีเอชที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 15 ปฏิกริยาของเอนไซม์ทรานส์อัลโคเลส ไตร โอสฟอสเฟตไอโซเมอเรส และแอลฟา-กลีเซอรโรฟอสเฟต ดีไฮโดรจิเนส ในการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโคเลส

3.7.5.2 วิธีการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโคเลส

ติดตามแอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโคเลสโดยการเคาะสารละลายไตรเอทาโนลามีน-เอทีลินไดอะมินเตตราอะซิติกแอซิด (TEA-EDTA) พีเอช 8.0 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ดี-ฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต (100 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แอลฟา-กลีเซอรโรฟอสเฟตดีไฮโดรจิเนส ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไตรโอสฟอสเฟตไอโซเมอเรส ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และสารละลายสก็ดเซลล์ (ในข้อ 3.7.5) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในคิวเวท (ขนาด 1400 ไมโครลิตร) 2 คิวเวท โดยคิวเวทหนึ่งเป็นคิวเวทอ้างอิง (reference cuvette) ส่วนคิวเวทหนึ่งเป็นคิวเวทตัวอย่าง (sample cuvette) จากนั้นนำไปปรับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นปรับค่าดูดกลืนแสงให้เท่ากับศูนย์ นำคิวเวทอ้างอิงที่ประกอบด้วยสารละลายข้างต้นไปเติมน้ำกลั่น ปริมาตร 240 ไมโครลิตร นำคิวเวทตัวอย่างเติมด้วยสารละลายนิโคตินาไมด์อะคิโนโคนิวคลีโอไทด์แบบรีดิวซ์ (NADH) และน้ำกลั่น ปริมาตร 50 และ 190 ไมโครลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำคิวเวทไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร แล้วนำคิวเวททั้ง 2 ไปเคาะสารละลายดี-อีริทโรส-4-ฟอสเฟต (50 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงอีกครั้งที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่เวลาต่างๆ แอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโคเลสสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 1

วิธีการคำนวณแอกติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลส

$$\text{แอกติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลส} = \frac{\Delta \text{Abs } 340 \text{ min} \times V_t}{\epsilon \times L_p \times V_s \times P_c} \quad \text{สมการที่ 1}$$

เมื่อ V_t = ปริมาตรทั้งหมดที่ใช้ในการวิเคราะห์ = 0.91 มิลลิลิตร

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

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 ซึ่งโปรตีนมาตรฐานที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์คือ โบวีนซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin) และแกมมาโกลบูลิน (gamma globulin) เนื่องจากสารมาตรฐานดังกล่าวสามารถทำปฏิกิริยากับสีที่ใช้ในการวิเคราะห์อย่างสมบูรณ์และไม่เกิดสารรบกวน (interfere) ที่ได้จากการทำปฏิกิริยา ซึ่งจะเพิ่มความแม่นยำในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

3.7.6.2 วิธีการวัดโปรตีน

1. การเตรียมสารมาตรฐานโปรตีน

ชั่งโบวีนซีรัมอัลบูมิน 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

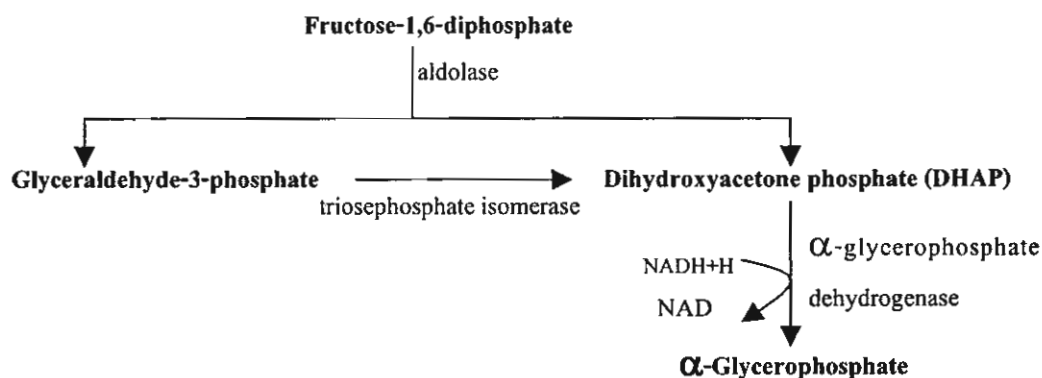
3. การวัดปริมาณโปรตีนในสารตัวอย่าง

ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายสี Coomassie brilliant blue G-250 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานโปรตีนโบวีนซีรัมอัลบูมิน (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-ฟอสเฟตจะถูกไอโซเมอไรซ์เป็นไดไฮดรอกซีอะซิโตนฟอสเฟตโดยการทำงานของเอนไซม์ไตรออสฟอสเฟตไอโซเมอเรส จากนั้นไดไฮดรอกซีอะซิโตนฟอสเฟตจะถูกเปลี่ยนเป็นแอลฟา-กลีเซโรฟอสเฟต โดยการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลีเซโรฟอสเฟตดีไฮโดรจิเนส ซึ่งมีเอ็นเอดีเอชเป็นโคเอนไซม์ (ภาพที่ 16) ปริมาณของฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟตจะถูกวัดทางอ้อม โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงของของเอ็นเอดีเอชที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต



ภาพที่ 16 ปฏิกริยาของเอนไซม์ อัลโดเลส ไตรออสฟอสเฟตไอโซเมอเรส และแอลฟา-กลีเซโรฟอสเฟตดีไฮโดรจิเนส 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 ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวส์ ที่เติมกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 1.69 นอร์มอล ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับเมทิลอลเรนจ์ 0.01 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเททับด้วยซิลิโคนออย (ซิลิโคนออย 550 : 510/50cS อัตราส่วน 1 ต่อ 3 โดยปริมาตร) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เพื่อแยกเอาเซลล์ออกจากน้ำหมัก ดูดเอาเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำหมักและซิลิโคนออยทิ้งไป จากนั้นผสมเซลล์และส่วนกรดเปอร์คลอริกเข้าด้วยกัน แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 25 นาที (ทำเช่นนี้ประมาณ 2-3 หลอด เพื่อให้ได้ปริมาณมากพอที่จะนำไปวิเคราะห์) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ปิเปตส่วนใสปริมาตร 75 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวส์อีกหลอด ค่อย ๆ เติม 50 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ไปดิสเซียมคาร์บอเนตจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีส้มเป็นสีเหลือง (พีเอชมากกว่า 4.5) นำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000

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

บทที่ 4

ผลการทดลอง

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

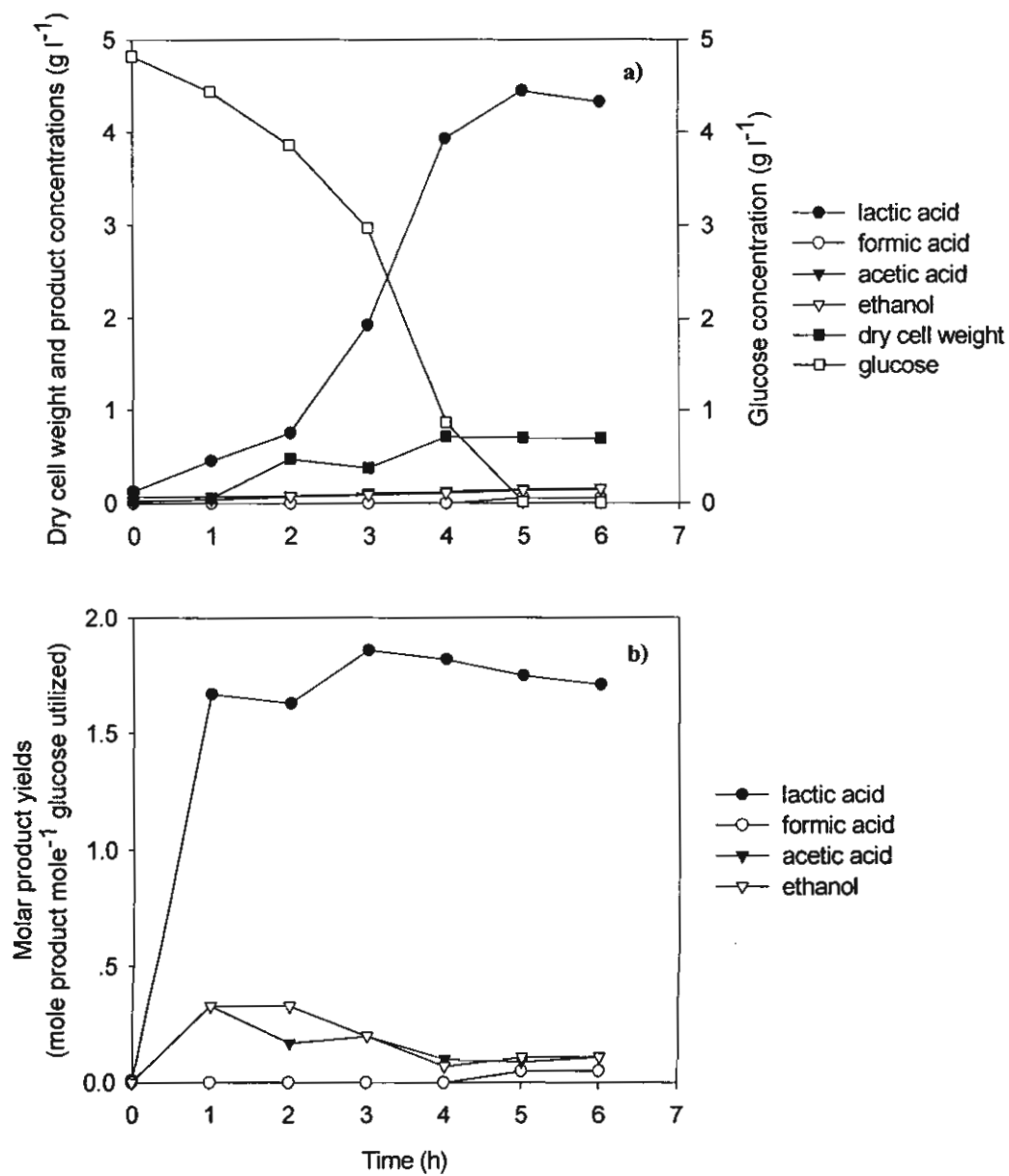
เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสหมดภายในเวลา 5 ชั่วโมง และที่เวลาดังกล่าวมีการผลิตกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล 4.45, 0.06, 0.15 และ 0.14 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 0.72 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 17a) นอกจากนี้พบว่า ผลได้ (yield) ของกรดแลกติก 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 ที่เวลาดังกล่าวมีการผลิตกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล 8.32, 0.16, 0.28 และ 0.29 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 0.97 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 18a) ส่วนผลได้ของกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล ที่เวลาดังกล่าวมีค่าเท่ากับ 1.65, 0.06, 0.08 และ 0.11 โมลต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ตามลำดับ (ภาพที่ 18b)

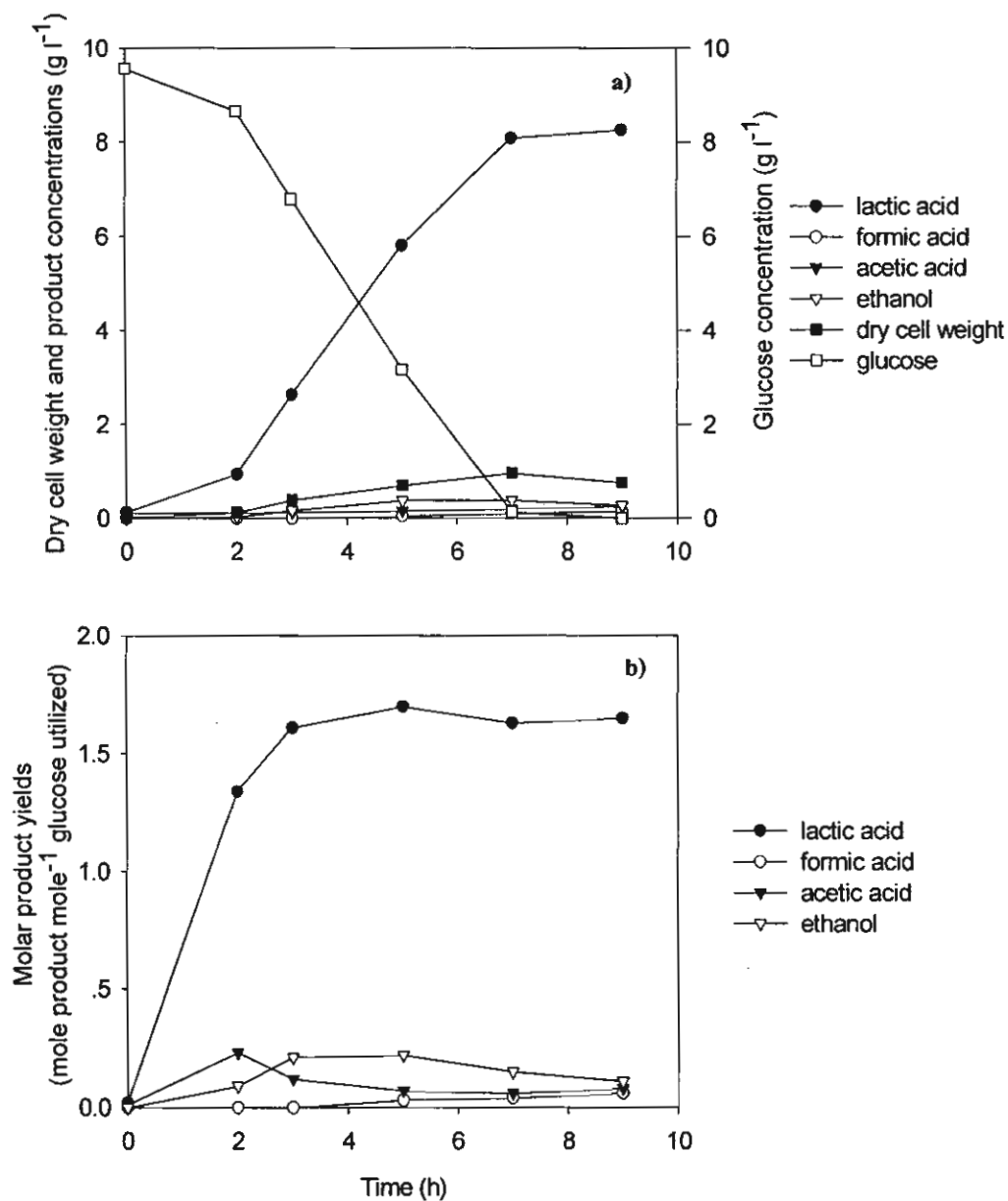
เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสหมดภายในเวลา 20 ชั่วโมง และที่เวลาดังกล่าวมีการผลิตกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล เท่ากับ 24.7, 0.8, 0.67 และ 0.89 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ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

เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า น้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมดภายในเวลา 40 ชั่วโมง ที่เวลาดังกล่าวมีการผลิตกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล 39.8, 1.42, 1.06 และ 1.37 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 1.16 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 20a) และได้ผลได้ของกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล ที่เวลาดังกล่าวมีค่าเท่ากับ 1.59, 0.11, 0.06 และ 0.11 โมลต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ตามลำดับ (ภาพที่ 20b)

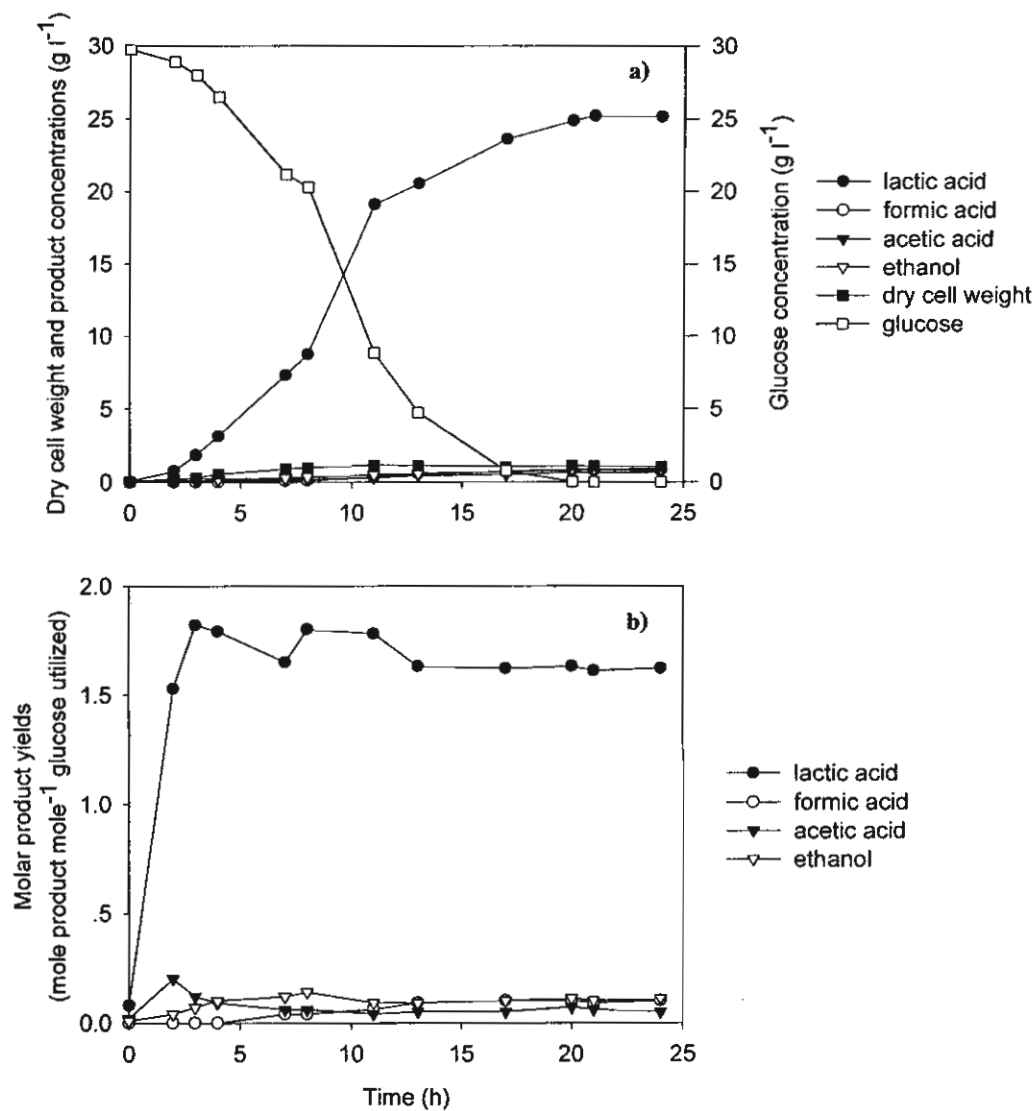
จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) พบว่า *Lc. lactis* IO-1 ไม่ผลิต 2,3-บิวเทนไดออล นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ผลิตขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักมีค่าต่ำ คือมีค่าเท่ากับ 0.02, 0.08, 3.81 และ 6.68 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส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



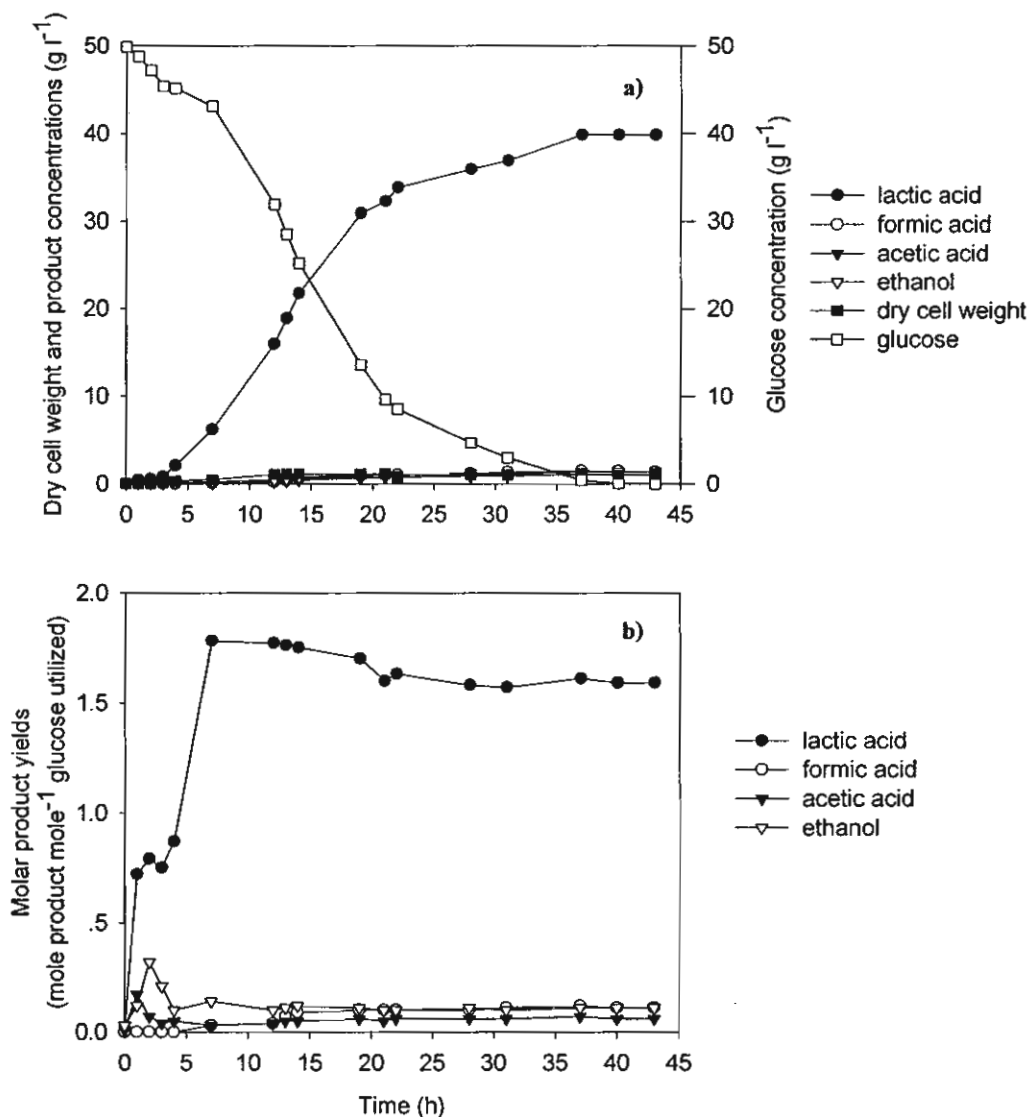
ภาพที่ 17 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส 5 กรัมต่อลิตร เมื่อ a คือ ความเข้มข้นของเซลล์แห้ง ผลิตภัณฑ์ และน้ำตาลกลูโคส และ b คือ ผลได้ของผลิตภัณฑ์



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



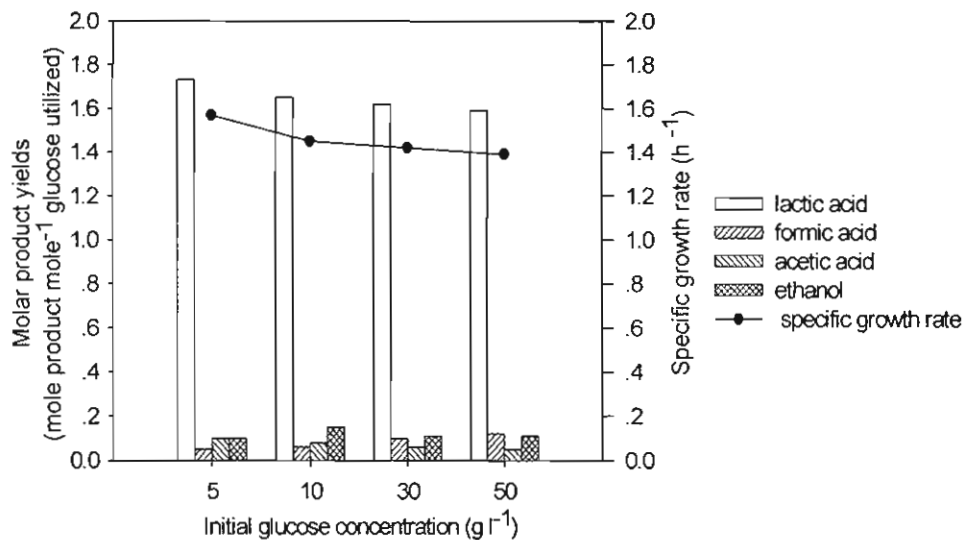
ภาพที่ 20 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร เมื่อ a คือ ความเข้มข้นของเซลล์แห้ง ผลึกภัณฑ์ และน้ำตาลกลูโคส และ b คือ ผลได้ของผลิตภัณฑ์

จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคส (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 ในขณะที่อัตราการเจริญจำเพาะมีค่าลดลง 1.45, 1.42 และ 1.39 ชั่วโมง⁻¹ ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลได้ (โมลต่อโมลของน้ำตาลกลูโคส

ที่ถูกใช้) ของกรดแลกติก และกรดอะซิติกลดลง ในขณะที่ผลได้ของกรดฟอร์มิกเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้เพิ่มขึ้น ส่วนผลได้ของเอทานอลมีค่าเท่ากัน คือ 0.11 โมลต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ จาก การทดลองพบเปอร์เซ็นต์ carbon recovery อยู่ในช่วง 87.2-96.5

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

กลูโคส (กรัม ต่อลิตร)	ผลได้ของ เซลล์ (กรัม เซลล์แห้ง ต่อกรัมน้ำตาล ตาลที่ใช้)	อัตราการ เจริญ เฉพาะ (ชั่วโมง ⁻¹)	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (โมลผลิตภัณฑ์ต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้)				เปอร์เซ็นต์ carbon recovery
			กรด แลกติก	กรด ฟอร์มิก	กรด อะซิติก	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

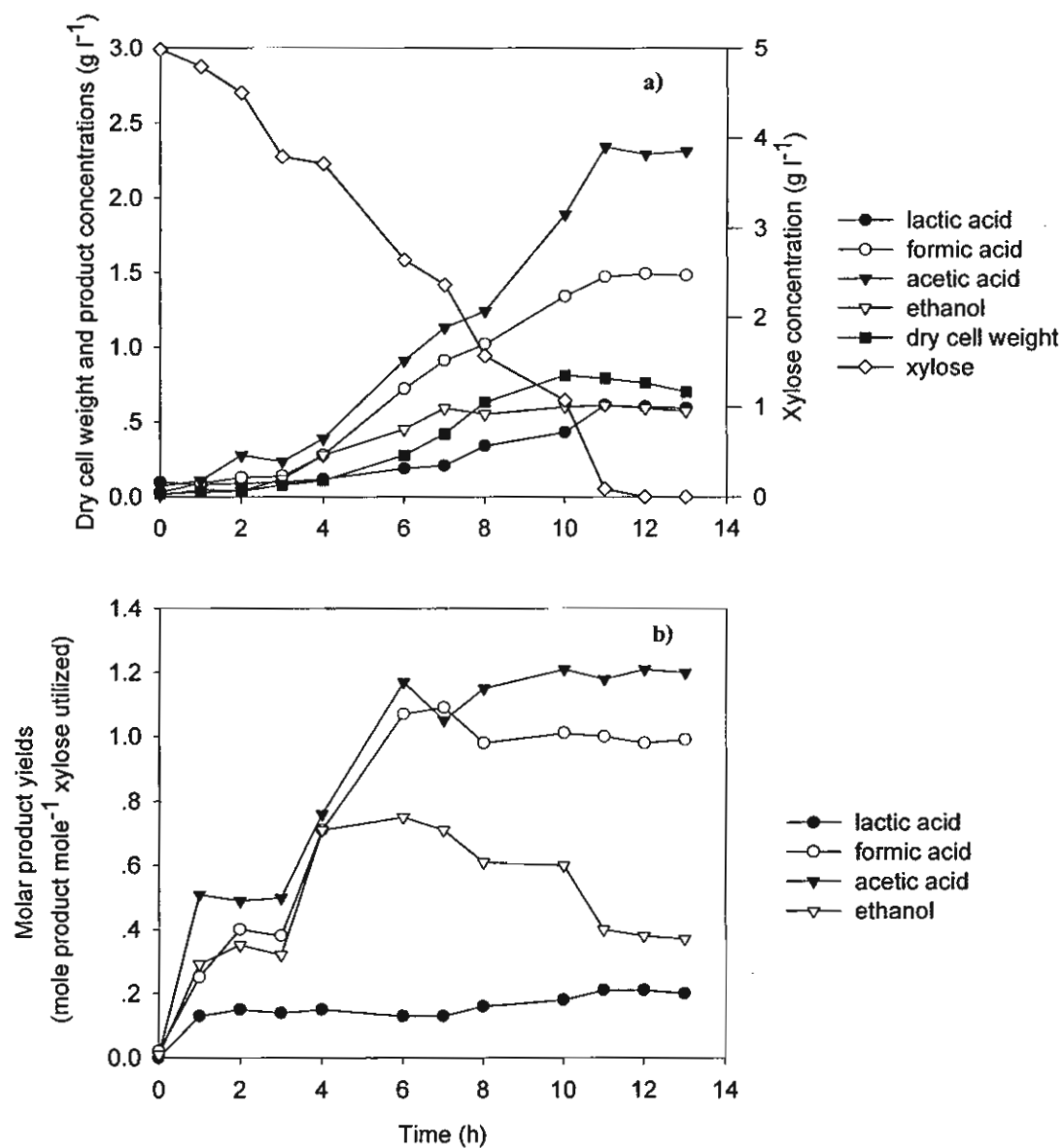


ภาพที่ 21 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (molar product yields) และอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) ที่ได้จาก การเลี้ยง *Lc. alctis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ

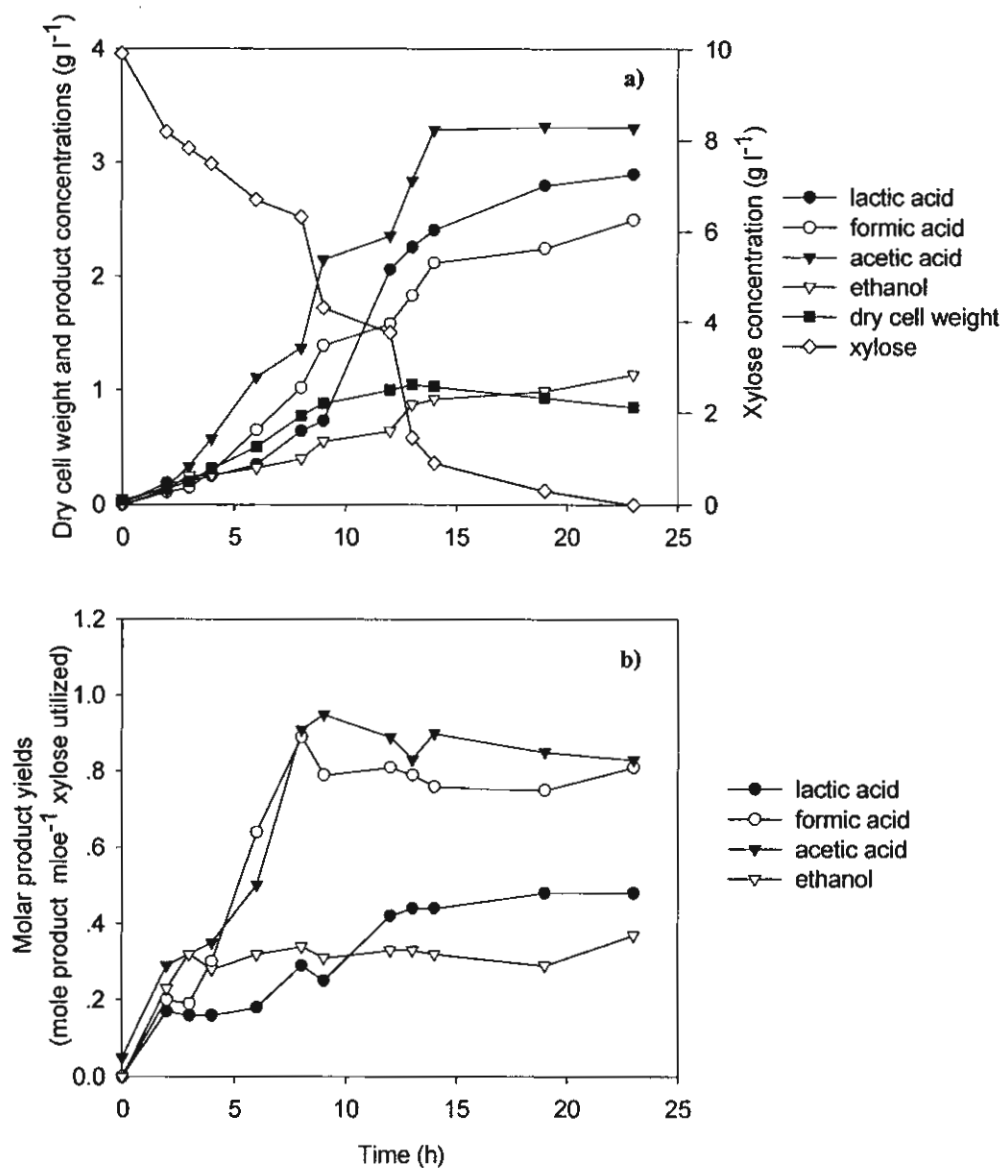
4.2 การศึกษาการผลิตกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)

เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 22) ผลการทดลอง พบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลไซโลสหมดหลังจากชั่วโมงที่ 11 ซึ่งใช้เวลาในการหมักนานกว่าเมื่อ เปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นเดียวกัน (ภาพที่ 17a) และที่เวลาดังกล่าว พบปริมาณกรด แลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล 0.62, 1.52, 2.34 และ 0.61 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์ แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 0.70 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 22a) ในขณะที่ผลได้ของกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล ที่เวลาดังกล่าว มีค่าเท่ากับ 0.21, 1.0, 1.18 และ 0.40 โมลต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 22b)

ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 23) พบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลไซโลสหมดที่ชั่วโมงที่ 23 ซึ่งใช้เวลาในการหมักนานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นเดียวกันถึง 2.5 เท่า (ภาพที่ 18a) ปริมาณกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอลที่เวลาดังกล่าว มีค่าเท่ากับ 2.90, 2.50, 3.32 และ 1.14 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมี ค่า 0.85 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 23a) ในขณะที่ผลได้ของกรดแลกติก 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



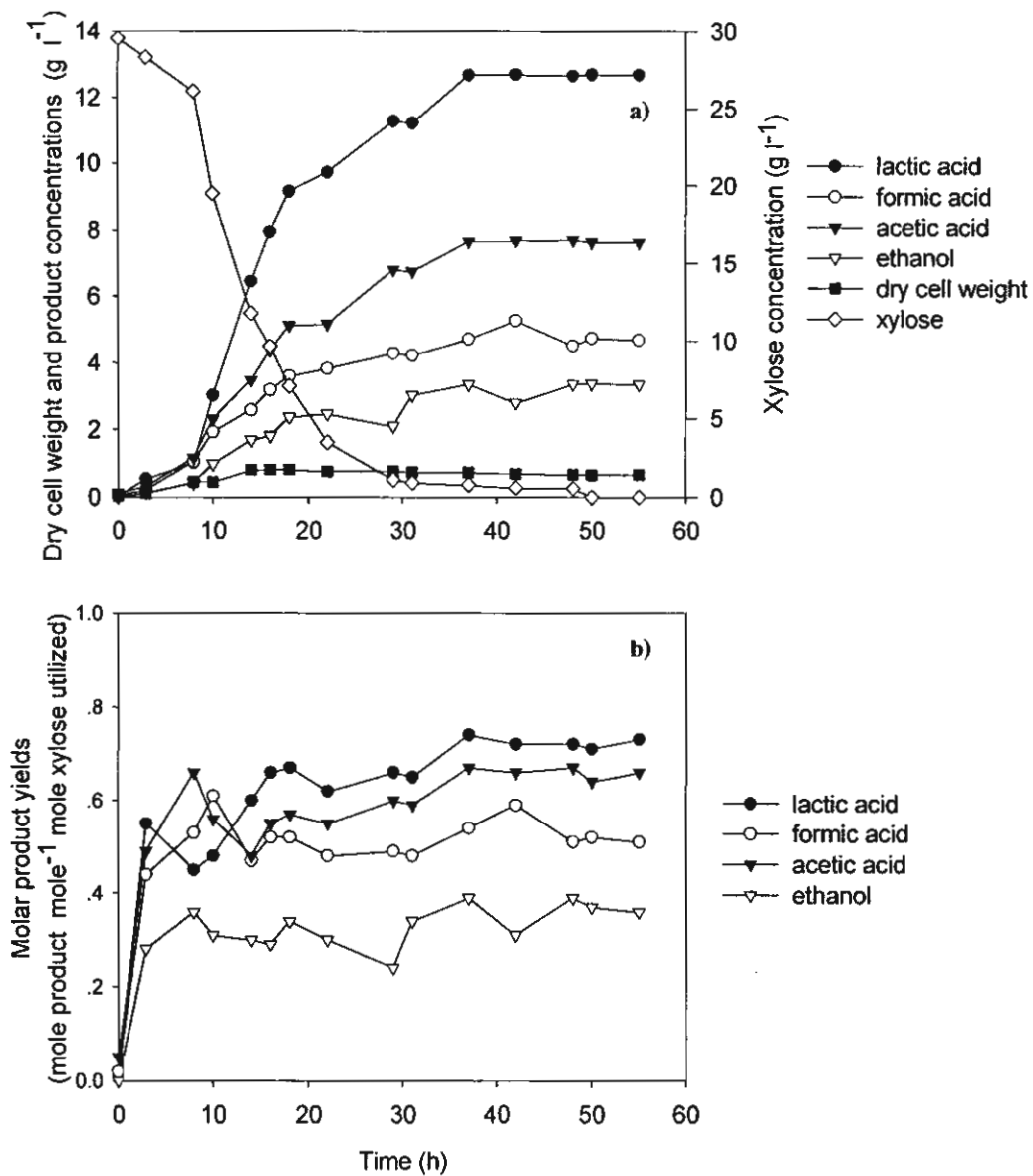
ภาพที่ 23 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 10 กรัมต่อลิตรเมื่อ a คือ ความเข้มข้นของเซลล์แห้ง ผลิตภัณฑ์ และน้ำตาลไซโลส และ b คือ ผลได้ของผลิตภัณฑ์

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) ที่เวลาดังกล่าวมีการผลิตกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล เท่ากับ 12.69, 4.75, 7.64 และ 3.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าว

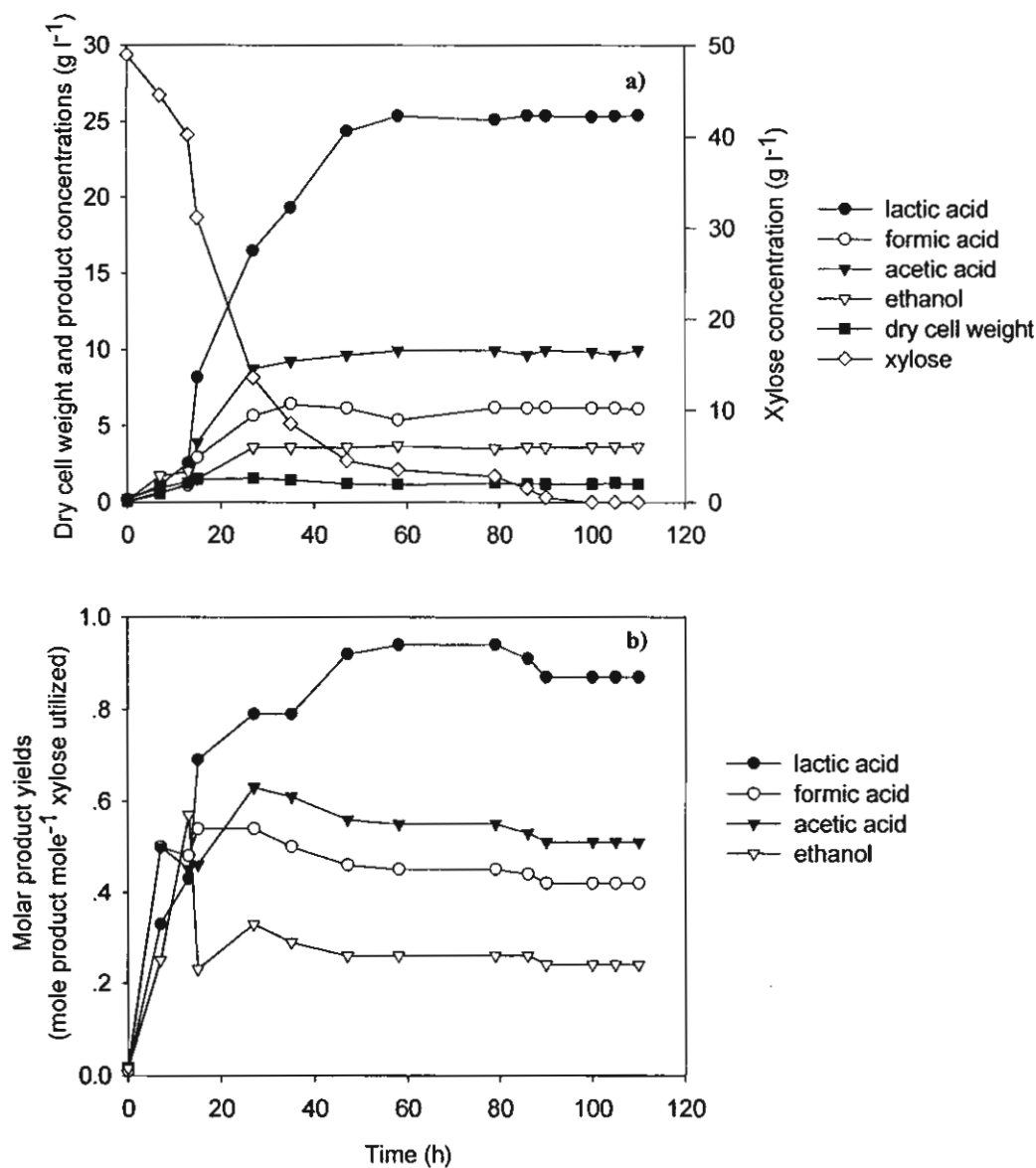
มีค่า 0.82 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 24a) ในขณะที่ผลได้ของกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล ที่เวลาดังกล่าว มีค่าเท่ากับ 0.71, 0.52, 0.64 และ 0.33 โมลต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 24b)

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) ปริมาณกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอลมีค่า 25.32, 6.16, 9.87 และ 3.61 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 1.21 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 25a) ในขณะที่ผลได้ของกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล มีค่า 0.84, 0.41, 0.50 และ 0.24 โมลต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 25b)

จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกแบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) พบว่า *Lc. lactis* IO-1 ไม่ผลิต 2,3-บิวเทนไดออก্স 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 ผลึกภัณฑ์ และน้ำตาลไซโลส และ b คือ ผลได้ของผลิตภัณฑ์



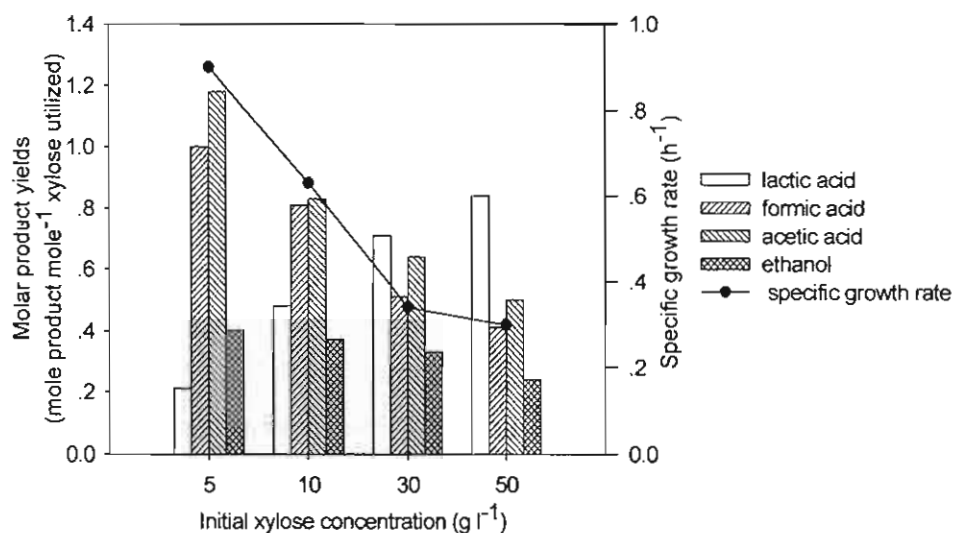
ภาพที่ 25 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 50 กรัมต่อลิตร เมื่อ a คือ ความเข้มข้นของเซลล์แห้ง ผลิตภัณฑ์ และน้ำตาลไซโลส และ b คือ ผลได้ของผลิตภัณฑ์

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 ในขณะที่ตัวกันอัตราการเจริญจำเพาะมีค่าลดลง 0.63, 0.34 และ 0.30 ชั่วโมง⁻¹ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้คล้ายกับการศึกษาการผลิตกรดแลกติกในน้ำตาลกลูโคส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) นอกจากนี้พบว่าผลได้ (โมลต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้) ของกรดแลกติกเพิ่มขึ้น ในขณะที่ผลได้ของกรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอลลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสที่ใช้เพิ่มขึ้น จากการทดลองพบเปอร์เซ็นต์ carbon recovery อยู่ใน ช่วง 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 (กรัม ต่อลิตร)	ผลได้ของ เซลล์ (กรัม เซลล์แห้ง ต่อกรัมน้ำตาล ที่ใช้)	อัตราการ เจริญ จำเพาะ (ชั่วโมง ⁻¹)	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (โมลผลิตภัณฑ์ต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ใช้)				เปอร์เซ็นต์ carbon recovery
			กรด แลกติก	กรด ฟอร์มิก	กรด อะซิติก	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

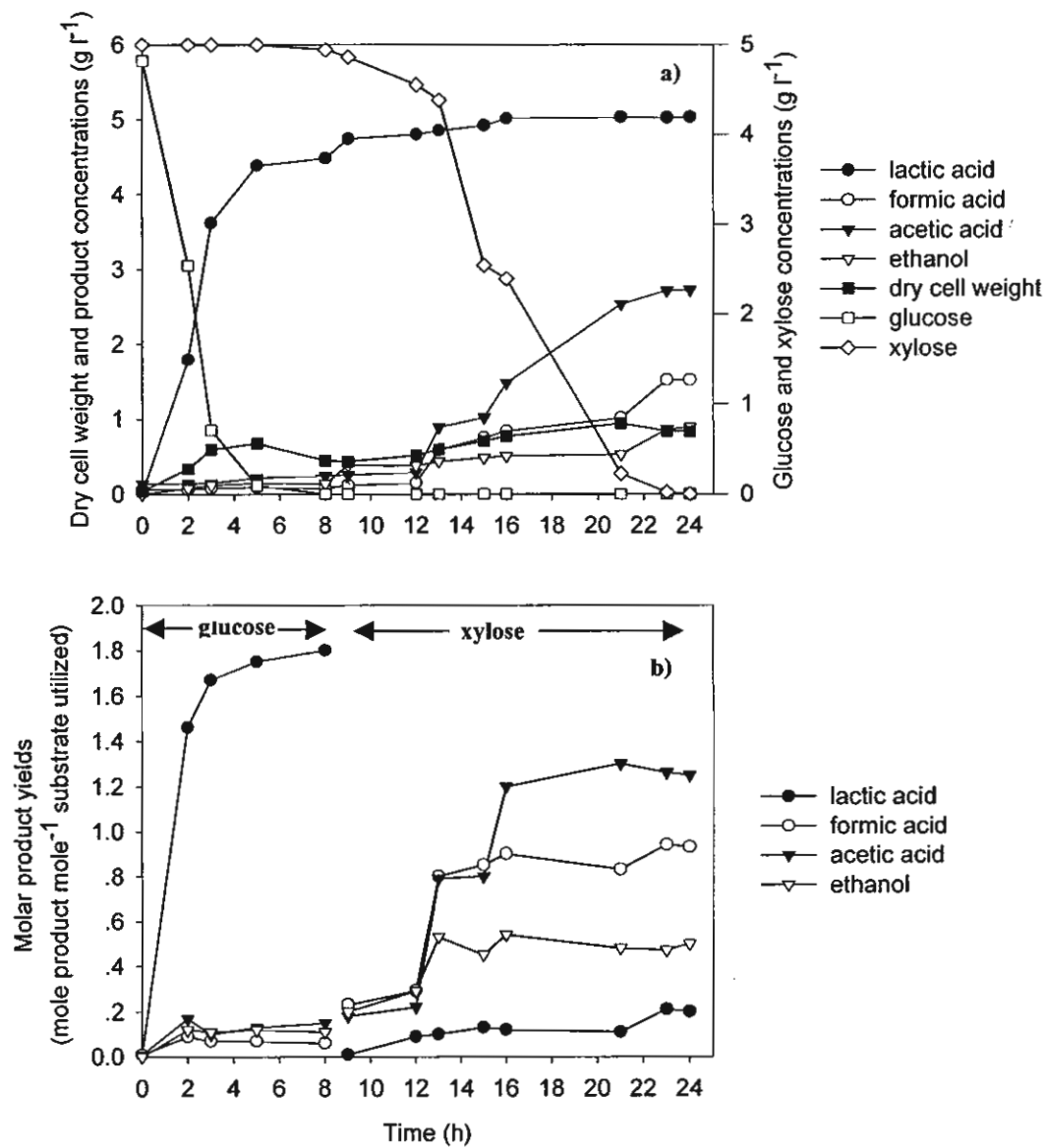
4.3 การศึกษาการผลิตกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร)

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

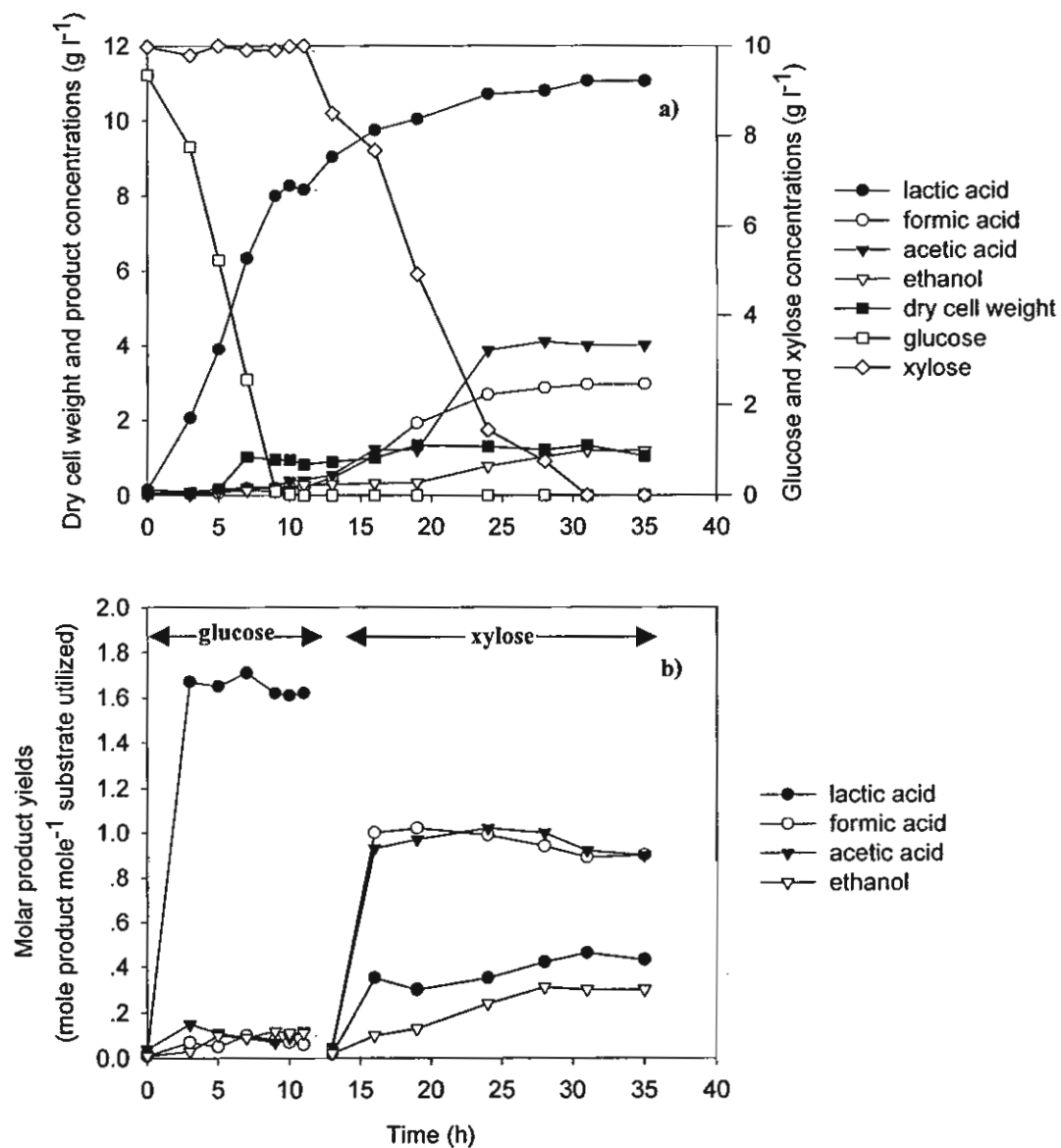
เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสความเข้มข้นอย่างละ 5 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า การเจริญของ *Lc. lactis* IO-1 เป็นแบบ diauxic โดย *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้น้ำตาลกลูโคสก่อนที่จะใช้น้ำตาลไซโลส ซึ่งน้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมดภายในเวลา 5 ชั่วโมง และที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลกติก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

กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 0.94 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 27a) ผลได้ของกรดแลกติก 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 ปริมาณกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอลเพิ่มขึ้นจากช่วงที่ใช้น้ำตาลกลูโคส 0.64, 1.44, 2.49 และ 0.71 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณกรดแลกติกที่สร้างขึ้นนี้มีปริมาณต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้กลูโคส (ประมาณ 6.8 เท่า) อย่างไรก็ตามปริมาณกรดแลกติกที่เพิ่มขึ้นนี้มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณกรดแลกติกเมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 22a)

เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลส อย่างละ 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 ที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล 8.27, 0.22, 0.40 และ 0.28 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 0.95 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 28a) ผลได้ของกรดแลกติก 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 ที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล เท่ากับ 11.06, 2.95, 4.10 และ 1.20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 1.34 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 28a) ผลได้ของกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล ในช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลส มีค่าเท่ากับ 0.46, 0.89, 0.92 และ 0.3 โมลต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 28b) นอกจากนี้พบว่าเมื่อน้ำตาลไซโลสถูกใช้หมด ปริมาณกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล เพิ่มขึ้นจากช่วงที่มีการใช้น้ำตาลกลูโคส 2.79, 2.73, 3.70 และ 0.92 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณกรดแลกติกที่สร้างขึ้นมีปริมาณต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้น้ำตาลกลูโคส (ประมาณ 3 เท่า) อย่างไรก็ตามปริมาณกรดแลกติกที่เพิ่มขึ้นนี้มีค่าใกล้เคียงกับปริมาณกรดแลกติกเมื่อเลี้ยง *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



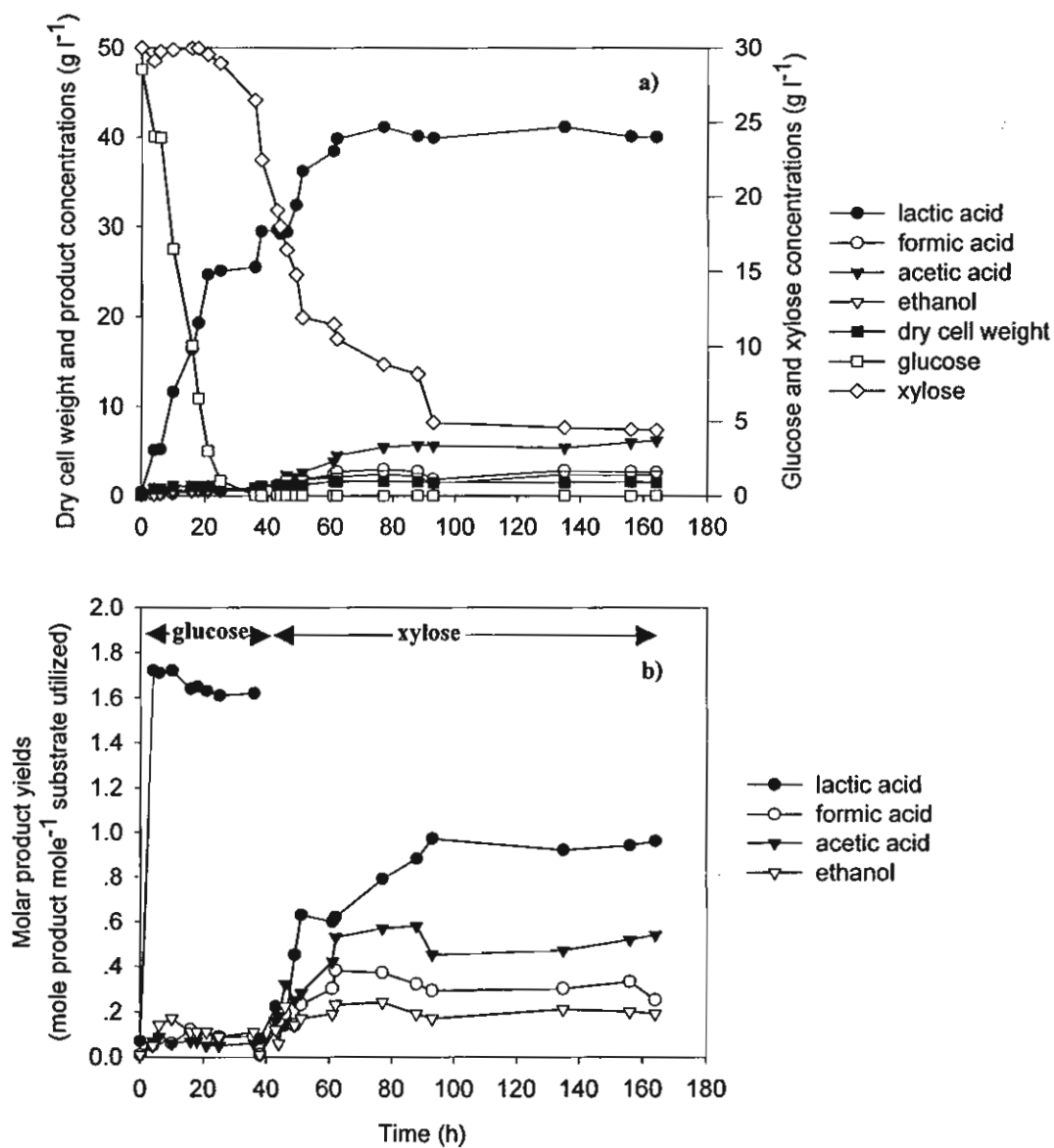
ภาพที่ 28 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและไซโลสอย่างละ 10 กรัม ต่อลิตร เมื่อ a คือ ความเข้มข้นของเซลล์แห้ง ผลิตภัณฑ์ และน้ำตาลกลูโคสและไซโลส และ b คือ ผลได้ของผลิตภัณฑ์

เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลส อย่างละ 30 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการเจริญแบบ diauxic และมีการใช้น้ำตาลกลูโคส ก่อนที่จะใช้น้ำตาลไซโลส โดยน้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมดหลังจากชั่วโมงที่ 21 และที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรด แลคติก 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 พบว่า ปริมาณน้ำตาลไซโลสมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย (จนถึงเวลา 164 ชั่วโมง พบปริมาณน้ำตาลไซโลส เหลืออยู่เพียง 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 และเอทานอลเพิ่มขึ้นจากช่วงที่ใช้น้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 15.24, 1.93, 5.58 และ 1.50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณกรดแลคติกที่สร้างขึ้นนี้มีปริมาณต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้น้ำตาลกลูโคส (ประมาณ 1.6 เท่า) อย่างไรก็ตามปริมาณกรดแลคติก ที่เพิ่มขึ้นมีค่าสูงกว่าปริมาณกรดแลคติกเมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลไซโลส 30 กรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียวประมาณ 2.5 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 24a)

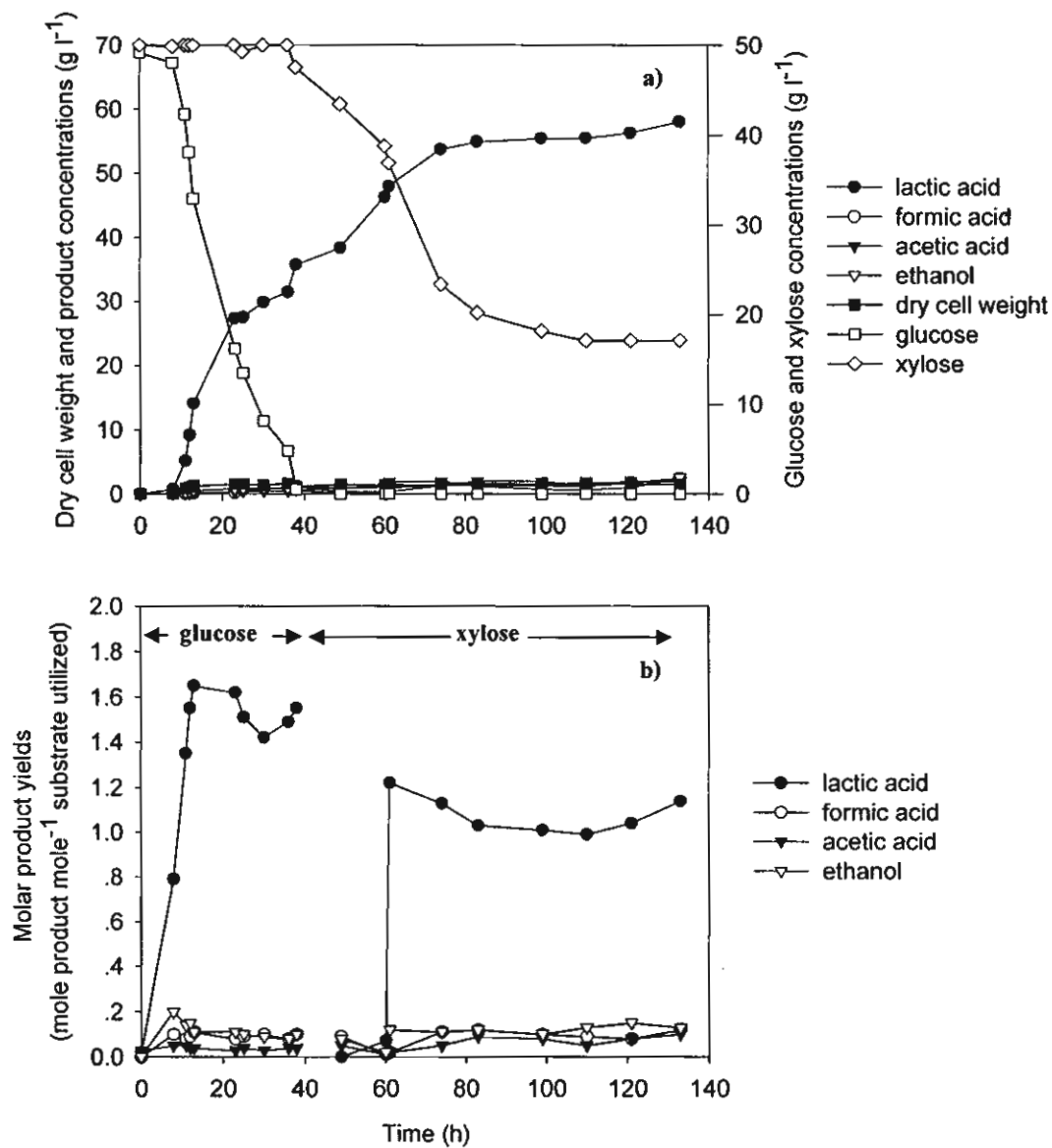
เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลส อย่างละ 50 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการเจริญแบบ diauxic และ *Lc. lactis* IO-1 ยังคงใช้น้ำตาลกลูโคสก่อนน้ำตาลไซโลส โดยน้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมดหลังจากชั่วโมงที่ 38 ที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลคติก 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 ปริมาณกรดแลคติก 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 *L. 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 กรัม ต่อลิตร เมื่อ a คือ ความเข้มข้นของเซลล์แห้ง ผลิตภัณฑ์ และน้ำตาลกลูโคสและไซโลส และ b คือ ผล ผลิตของผลิตภัณฑ์

จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและไซโลสที่แปรผันความเข้มข้น (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

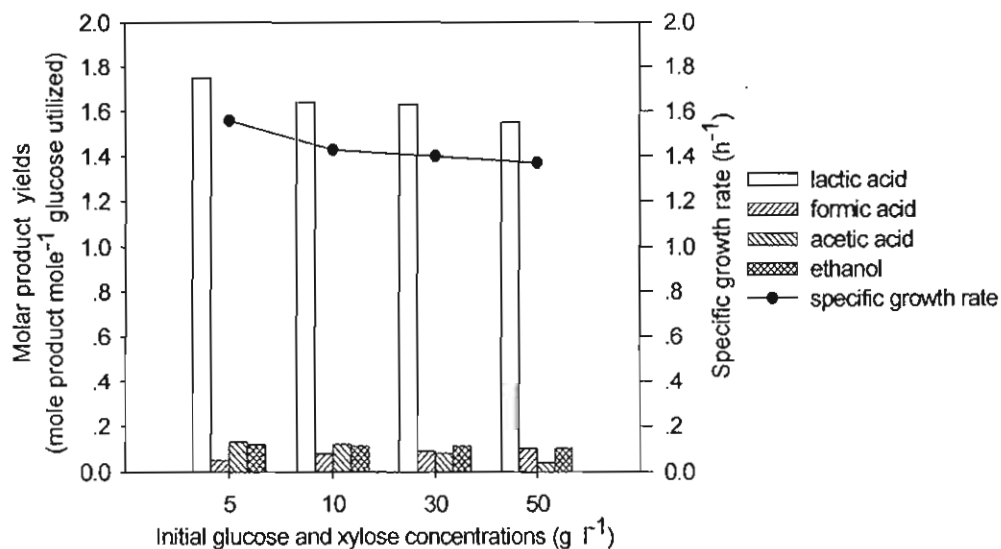
ตารางที่ 3 และภาพที่ 31 แสดงผลได้ของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ ผลได้ของผลิตภัณฑ์และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery ในช่วงของการใช้น้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลส ในขณะที่ตารางที่ 4 และภาพที่ 32 แสดงผลได้ของเซลล์ อัตราการเจริญจำเพาะ ผลได้ของผลิตภัณฑ์และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery ในช่วงของการใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลส 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) ของกรดแลกติกและกรดอะซิติกลดลง ในขณะที่ผลได้ของกรดฟอร์มิกเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ในน้ำตาลผสมเพิ่มขึ้น ส่วนผลได้ของเอทานอลมีค่าไม่แตกต่างกัน ส่วนเปอร์เซ็นต์ carbon recovery อยู่ในช่วง 83.9-97.1 นอกจากนี้ยังพบว่า ผลได้ของกรดแลกติก 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) ของกรดแลกติกมีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่ผลได้ของกรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอลมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสที่ใช้ในน้ำตาลผสมเพิ่มมากขึ้น ส่วนเปอร์เซ็นต์ carbon recovery อยู่ในช่วง 80.0-98.2 ผลการทดลองที่ได้นี้คล้ายกับผลการทดลองของการเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลไซโลสเพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 2)

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

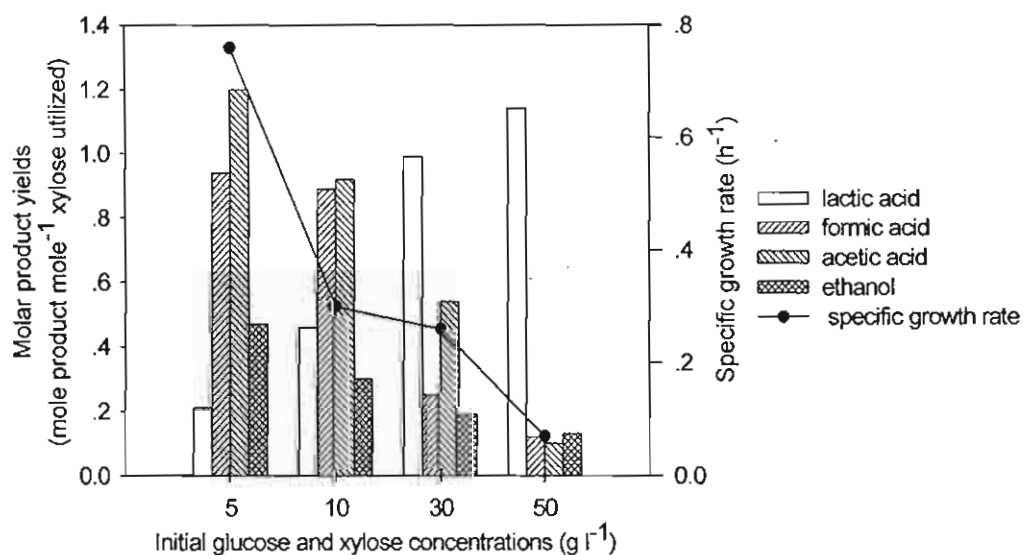
น้ำตาล ผสม (กรัม ต่อ ลิตร)	ผลได้ของ เซลล์ (กรัม เซลล์แห้ง ต่อกรัม น้ำตาล กลูโคสที่ ใช้)	อัตราการ เจริญ จำเพาะ (ชั่วโมง ⁻¹)	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (โมลผลิตภัณฑ์ต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้)				เปอร์เซ็นต์ carbon recovery
			กรด แลกติก	กรด ฟอร์มิก	กรด อะซิติก	เอทานอล	
5	0.14	1.56	1.75	0.06	0.13	0.12	97.1
10	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
			กรดแลกติก	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

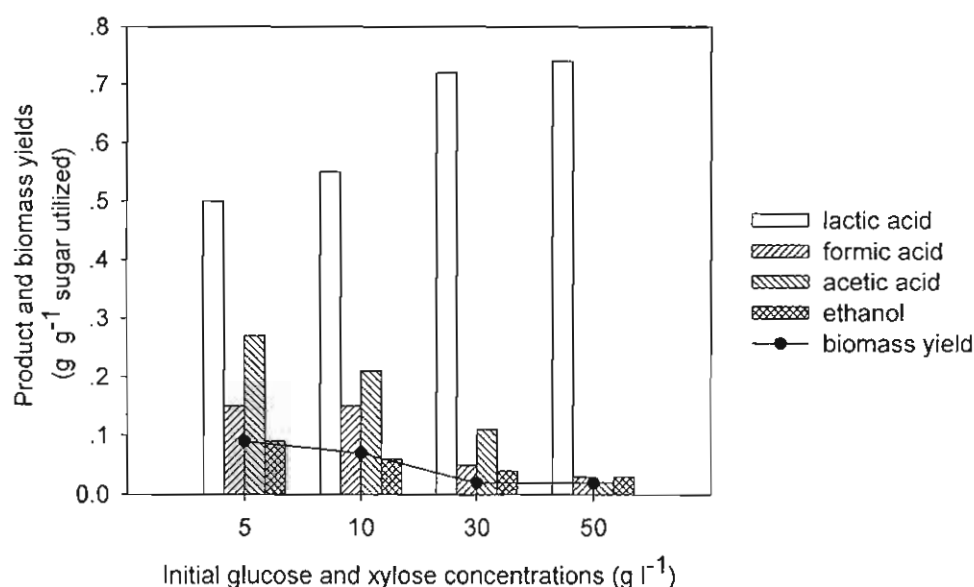


ภาพที่ 32 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (molar product yields) และอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) เมื่อ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ

ผลการทดลองในตารางที่ 5 และภาพที่ 33 พบว่า ผลได้ของเซลล์สูงสุดมีค่า 0.09 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัม น้ำตาลผสมที่ถูกใช้ และผลได้ของเซลล์มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลผสมเพิ่มขึ้น คือมีค่า 0.07, 0.03 และ 0.02 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัม น้ำตาลผสมที่ถูกใช้ เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลผสมที่ความเข้มข้นอย่างละ 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลได้ของกรดแลกติก ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 30 และ 50 กรัมต่อลิตร มีค่าใกล้เคียงกันคือ 0.72 และ 0.74 กรัมต่อกรัมของน้ำตาลผสมที่ถูกใช้ ซึ่งสูงกว่าผลได้ของกรดแลกติกที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ส่วนผลได้ (กรัมต่อกรัมของน้ำตาลผสมที่ถูกใช้) ของกรดฟอर्मิกที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 5 และ 10 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากัน คือ 0.15 กรัมต่อกรัมของน้ำตาลผสมที่ถูกใช้ ซึ่งสูงกว่าผลได้ของกรดฟอर्मิกที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 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 (กรัมเซลล์แห้ง ต่อกรัมน้ำตาล ผสมที่ใช้)	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมของน้ำตาลผสมที่ใช้)				เปอร์เซ็นต์ carbon recovery
		กรด แลกติก	กรด ฟอर्मิก	กรด อะซิติก	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 การศึกษาการผลิตกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร)

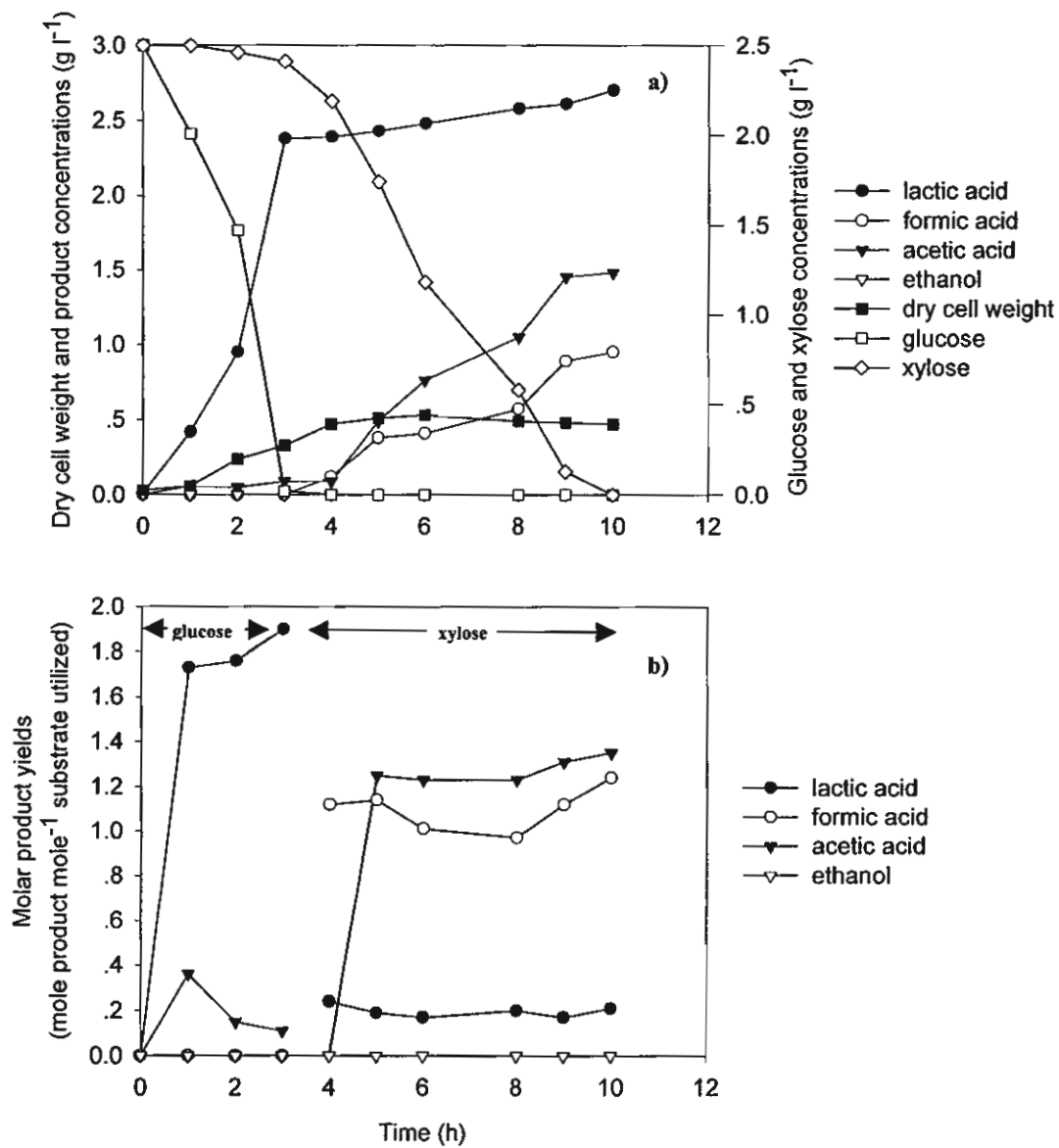
การทดลองนี้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคส และไซโลสที่มีความเข้มข้นอย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร เพื่อจะได้ทราบถึงลักษณะการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ของ *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารที่มีแหล่งคาร์บอน 2 ชนิด ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิดเป็นครึ่งหนึ่งของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสในหัวข้อ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

เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสกับน้ำตาลไซโลสอย่างละ 2.5 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า การเจริญของ *Lc. lactis* IO-1 เป็นแบบ diauxic ภายใต้อุณหภูมิดังกล่าว *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสหมดภายในเวลา 3 ชั่วโมง ที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลกติกและกรดอะซิติก 2.38 และ 0.09 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 0.33 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 34a) ผลได้ของกรดแลกติกและกรดอะซิติก มีค่า 1.90 และ 0.11 โมลต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 34b) นอกจากนี้ยังพบว่าภายใต้สภาวะดังกล่าว ไม่มีการสร้างกรดฟอर्मิกและเอทานอลในช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลผสม เมื่อน้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมด *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้น้ำตาลไซโลสและหมดที่เวลา 10 ชั่วโมง ที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลกติก กรดฟอर्मิก และกรดอะซิติก 2.70, 0.95 และ 1.48 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่า 0.48 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 34a) ผลได้ของกรดแลกติก กรดฟอर्मิก และกรดอะซิติก

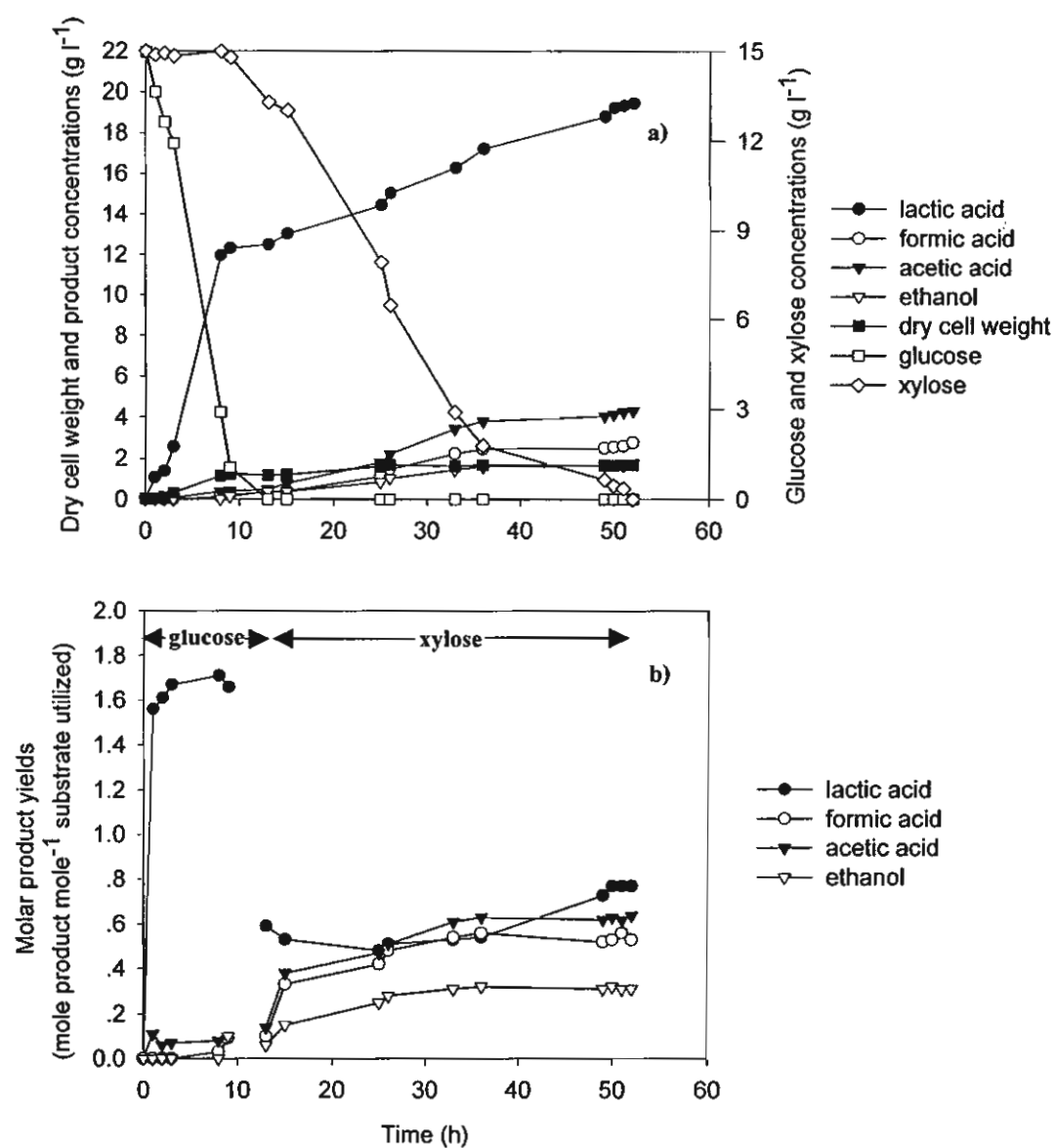
ซิดิกในช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้น้ำตาลไซโลสมีค่า 0.21, 1.24 และ 1.35 โมลต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 34b) จากผลการทดลองยังพบว่าปริมาณกรดแลกติก กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก ที่เพิ่มขึ้นจากช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้น้ำตาลกลูโคส มีค่า 0.32, 0.95 และ 1.39 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณกรดแลกติกที่เพิ่มขึ้นมีค่าต่ำกว่าปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้น้ำตาลกลูโคส ประมาณ 7.4 เท่า อย่างไรก็ตามภายใต้สภาวะการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลผสมที่ความเข้มข้น 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 ที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล 12.50, 0.35, 0.48 และ 0.38 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 1.26 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 35a) ผลได้ของกรดแลกติก 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 ที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล 19.43, 2.77, 4.31 และ 1.79 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่า 1.69 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 35a) ผลได้ของกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล ในช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้น้ำตาลไซโลส มีค่า 0.77, 0.53, 0.64 และ 0.31 โมลต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 35b) ปริมาณกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล ที่เพิ่มขึ้นจากช่วงที่มีการใช้น้ำตาลกลูโคส มีค่า 6.93, 2.42, 3.83 และ 1.41 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณกรดแลกติกที่เพิ่มขึ้นมีค่าต่ำกว่าปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้น้ำตาลกลูโคส ประมาณ 1.8 เท่า

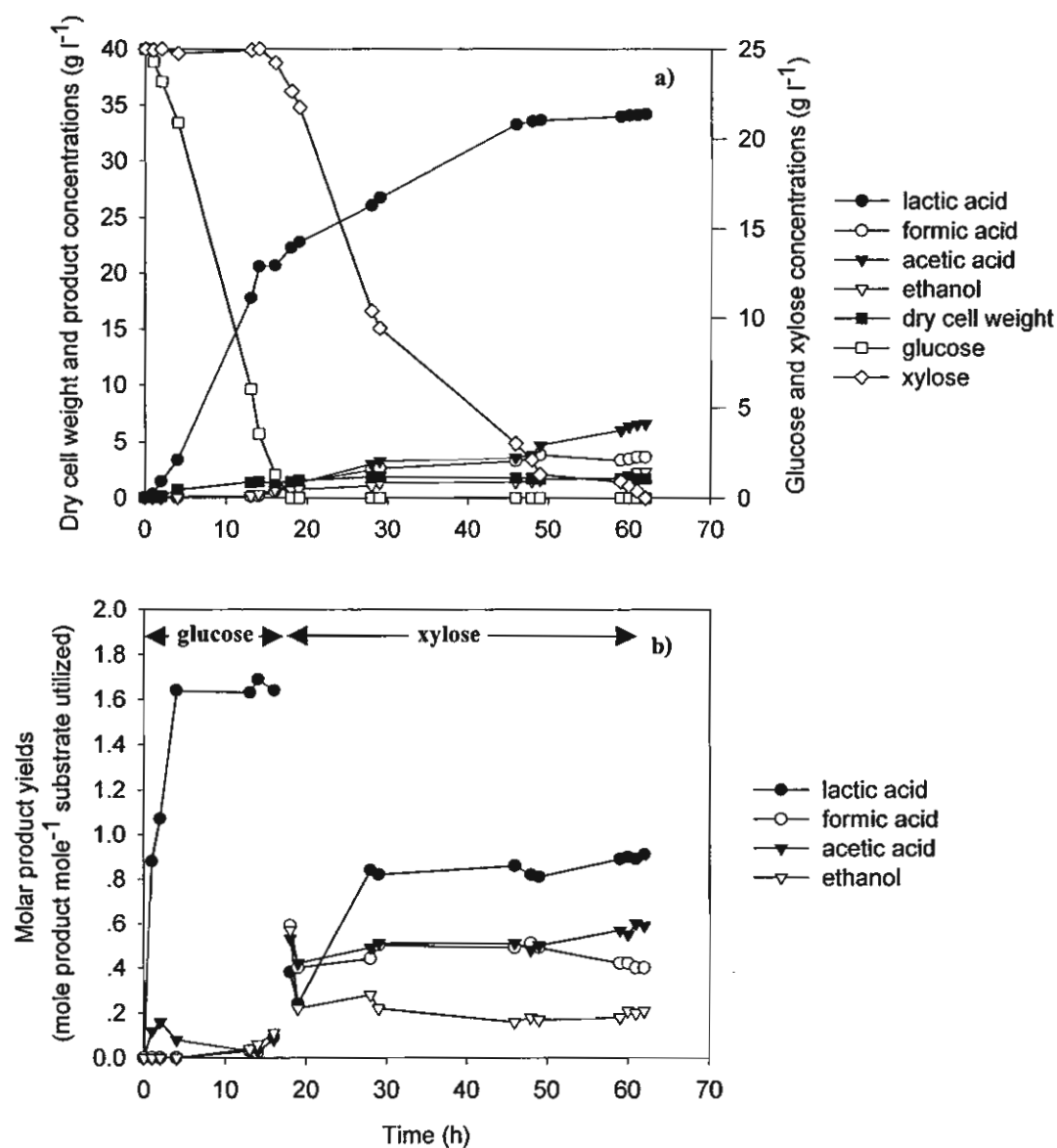
เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสกับไซโลสอย่างละ 25 กรัมต่อลิตร พบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการเจริญแบบ diauxic และสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสหมดหลังจากชั่วโมงที่ 16 ที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล 20.52, 0.55, 0.67 และ 0.70 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 1.34 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 36a) ผลได้ของกรดแลกติก 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 ที่เวลาดังกล่าวพบปริมาณกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล 34.2, 3.62, 6.58 และ 2.32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาดังกล่าวมีค่า 1.73 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 36a) ผลได้ของกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอลในช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้น้ำตาลไซโลสมีค่า 0.91, 0.40, 0.59 และ 0.21 โมลต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ ตามลำดับ (ภาพที่ 36b) ปริมาณกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล ที่เพิ่มขึ้นจากช่วงที่มีการใช้น้ำตาลกลูโคสมีค่า 13.68, 3.07, 5.91 และ 1.62 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณกรดแลกติกที่เพิ่มขึ้นมีค่าต่ำกว่าปริมาณกรดแลกติกที่ได้จากช่วงที่ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลกลูโคส ประมาณ 1.5 เท่า



ภาพที่ 34 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและไซโลสอย่างละ 2.5 กรัม ต่อลิตร เมื่อ a คือ ความเข้มข้นของเซลล์แห้ง ผลิตภัณฑ์ และน้ำตาลกลูโคสและไซโลส และ b คือ ผล ได้ของผลิตภัณฑ์



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



ภาพที่ 36 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสและไซโลสอย่างละ 25 กรัม ต่อลิตร เมื่อ a คือ ความเข้มข้นของเซลล์แห้ง ผลิตภัณฑ์ และน้ำตาลกลูโคสและไซโลส และ b คือ ผล ได้ของผลิตภัณฑ์

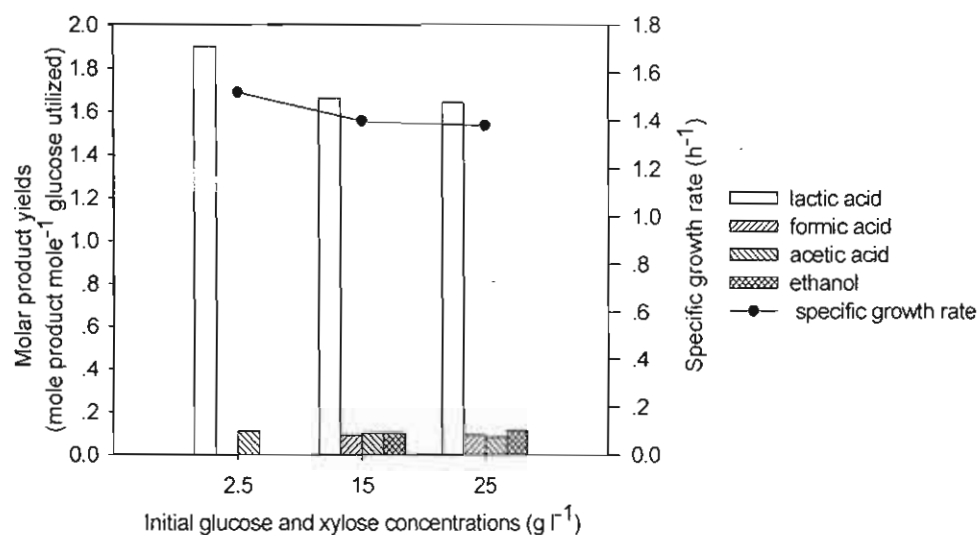
จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร) โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที พีเอช 6.0 ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะ ผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลผสมได้หมดภายใต้ทุกสภาวะของการทดลอง (ภาพที่ 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 ผลได้ของเซลล์สูงสุคมีค่า 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) ของกรดแลกติกและกรดอะซิติกมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลผสมเพิ่มขึ้น 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 พบว่าผลได้ของเซลล์สูงสุคมีค่า 0.06 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสม 2.5 กรัมต่อลิตร และผลได้ของเซลล์มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลผสมเพิ่มขึ้น คือมีค่า 0.03 และ 0.02 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ นอกจากนี้อัตราการเจริญจำเพาะมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลผสมเพิ่มขึ้น ผลได้ (โมลต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้) ของกรดแลกติกมีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่ผลได้ของกรดฟอร์มิกและกรดอะซิติกมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสมเพิ่มขึ้น ส่วนเปอร์เซ็นต์ carbon recovery อยู่ในช่วง 94.5–96.4 (ตารางที่ 7)

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

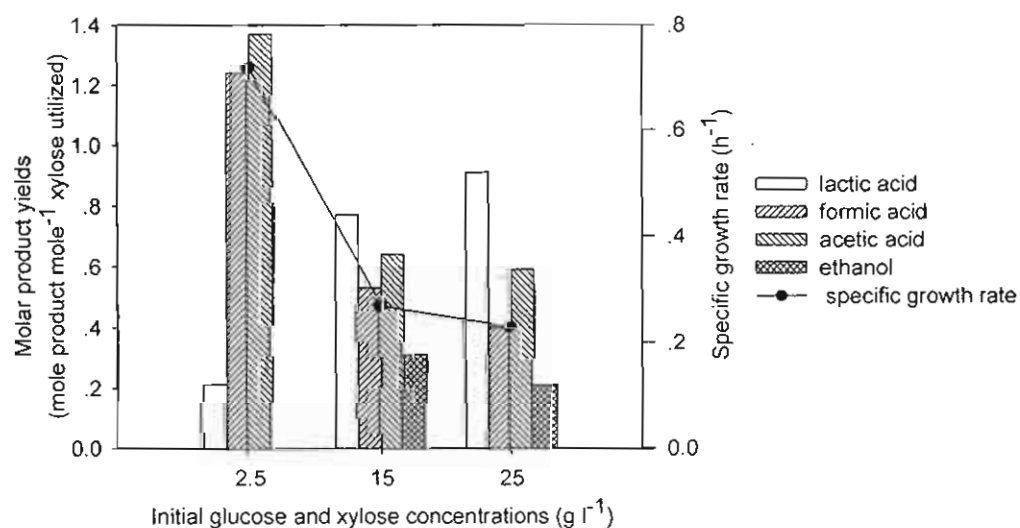
น้ำตาล ผสม (กรัม ต่อ ลิตร)	ผลได้ของ เซลล์ (กรัม เซลล์แห้ง ต่อกรัม น้ำตาล กลูโคสที่ ใช้)	อัตราการ เจริญ จำเพาะ (ชั่วโมง ⁻¹)	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (โมลผลิตภัณฑ์ต่อโมลของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้)				เปอร์เซ็นต์ carbon recovery
			กรด แลคติก	กรด ฟอร์มิก	กรด อะซิติก	เอทานอล	
2.5	0.13	1.52	1.90	0	0.11	0	98.8
15	0.08	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 อัตราการเจริญ
จำเพาะ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลส
ในน้ำตาลผสม (อย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร)

น้ำตาล ผสม (กรัม ต่อ ลิตร)	ผลได้ของ เซลล์ (กรัม เซลล์แห้ง ต่อกรัม น้ำตาล ไซโลสที่ ใช้)	อัตราการ เจริญ จำเพาะ (ชั่วโมง ⁻¹)	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (โมลผลิตภัณฑ์ต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้)				เปอร์เซ็นต์ carbon recovery
			กรด แลกติก	กรด ฟอร์มิก	กรด อะซิติก	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

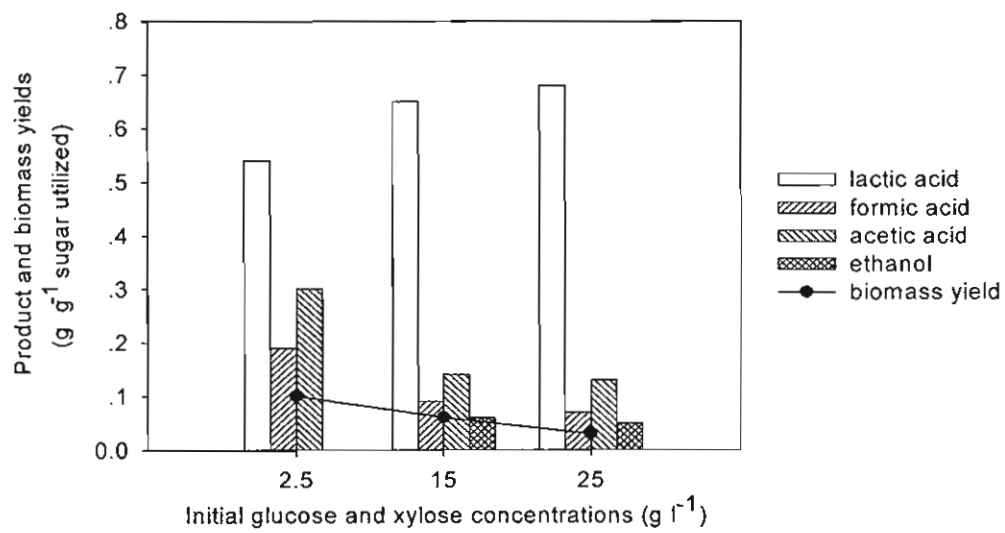


ภาพที่ 38 ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (molar product yields) และอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) เมื่อ *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสม (อย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ

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 ผลได้ของกรดแลกติก (กรัมต่อกรัมของน้ำตาลผสมที่ถูกใช้) ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 15 และ 25 กรัมต่อลิตร มีค่าใกล้เคียงกัน และสูงกว่าผลได้ของกรดแลกติกที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 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 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโตสต่อผลได้ของเซลล์ ผลได้ของผลิตภัณฑ์ และเปอร์เซ็นต์ carbon recovery เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลผสม (อย่างละ 2.5, 15 และ 50 กรัมต่อลิตร)

น้ำตาลผสม (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของเซลล์ (กรัมเซลล์แห้ง ต่อกรัมน้ำตาล ผสมที่ใช้)	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมของน้ำตาลผสมที่ใช้)				เปอร์เซ็นต์ carbon recovery
		กรด แลกติก	กรด ฟอร์มิก	กรด อะซิติก	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)

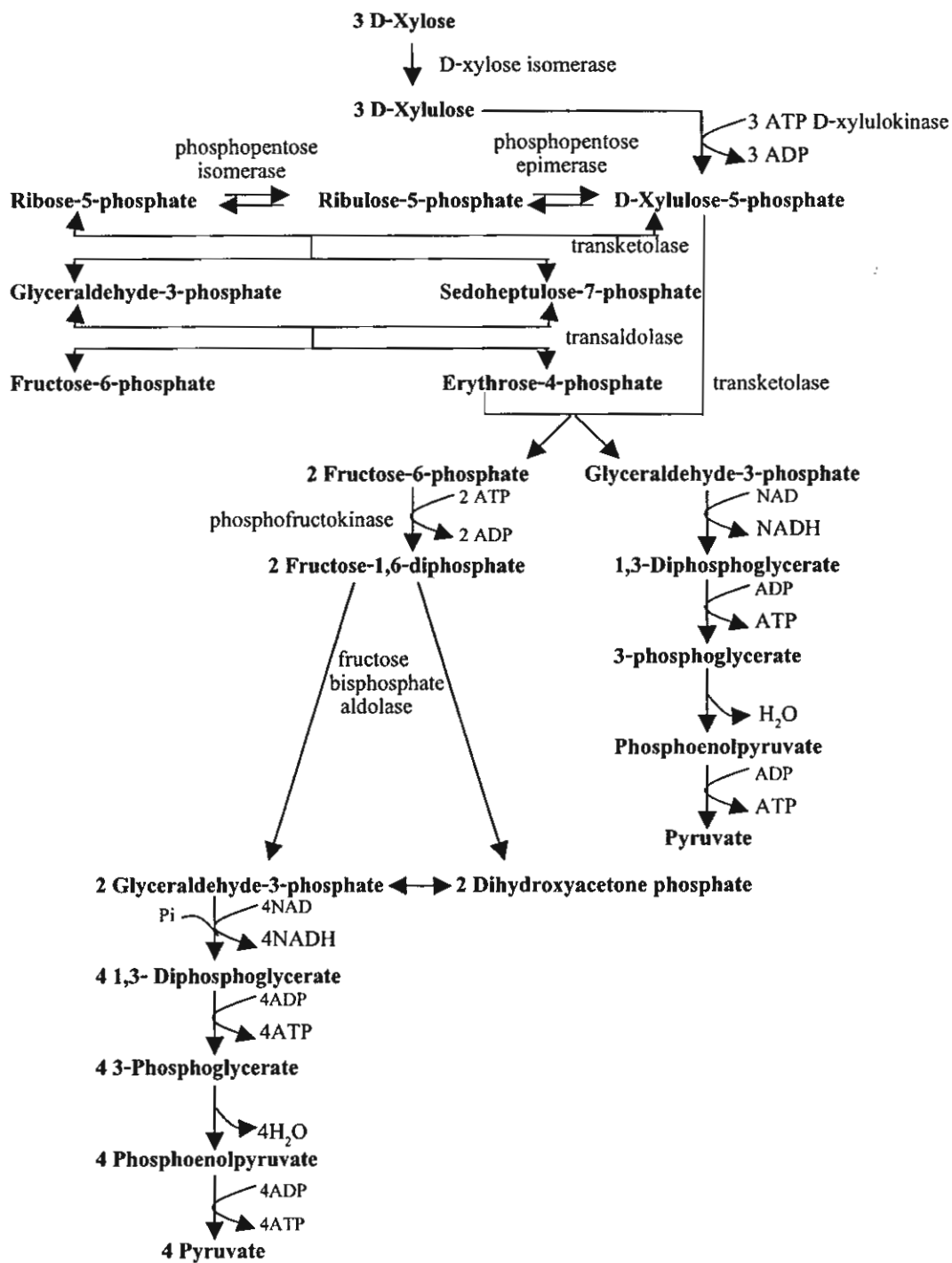
4.5 การศึกษาวิธีการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตกรดแลกติกโดย *Lc. lactis* IO-1

น้ำตาลไซโลสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่จัดอยู่ในกลุ่มของน้ำตาลเพนโตส (คาร์บอน 5 อะตอม) แลกติกแอซิดแบคทีเรียบางกลุ่มสามารถใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลกติก โดยน้ำตาลไซโลสจะถูกนำเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยระบบเพอร์มีเอส (Axelsson, 1993) จากรายงานของ Fraenkel (1987) และ Axelsson (1993) พบว่าการใช้น้ำตาลไซโลสของแลกติกแอซิดแบคทีเรียจะผ่านวิถีเพนโตสฟอสเฟต นอกจากนี้ Erlandson et al. (2000) รายงานว่าไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่ถูกสร้างขึ้นจากน้ำตาลไซโลสใน *Lc. lactis* จะถูกเมแทบอลิซึมผ่านทั้งในวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟลิกโตเลส ซึ่งไซลูโลส-5-ฟอสเฟตเป็นสารตัวกลางที่สำคัญซึ่งพบในทั้ง 2 วิถี นอกจากนี้ยังพบว่าไพรูเวตที่ถูกสร้างขึ้นทั้งในวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟลิกโตเลส จะถูกนำไปใช้ในการสร้างแลกเตท ฟอर्मेट อะซิเตท และเอทานอล

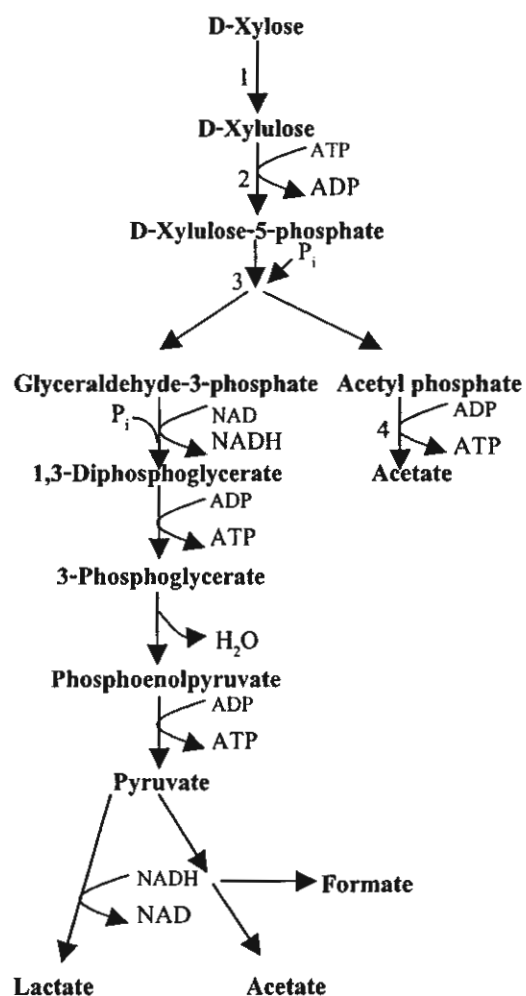
น้ำตาลไซโลสที่ถูกเมแทบอลิซึมผ่านวิถีเพนโตสฟอสเฟต จะถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลส (xylulose) โดยการทำงานของเอนไซม์ไซโลไอโซเมอเรส (xylose isomerase) จากนั้นไซลูโลสจะถูกฟอสโฟรีเลต (เติมหมู่ฟอสเฟต) โดยผ่านกระบวนการฟอสโฟรีเลชัน (phosphorylation) โดยการทำงานของเอนไซม์ไซลูโลไคเนส (xylulokinase) ได้ไซลูโลส-5-ฟอสเฟต (xylulose-5-phosphate) (Erlandson et al., 2000) จากนั้นไซลูโลส-5-ฟอสเฟตจะถูกไอโซเมไรซ์กลายเป็นไรบูโลส-5-ฟอสเฟต (ribulose-5-phosphate) และไรโบส-5-ฟอสเฟต (ribose-5-phosphate) โดยเอนไซม์ฟอสโฟเพนโตสอีพิเมอเรส (phosphopentose epimerase) และเอนไซม์ฟอสโฟเพนโตสไอโซเมอเรส (phosphopentose isomerase) ตามลำดับ ในขณะที่เดียวกันไซลูโลส-5-ฟอสเฟตจะถูกฟอสโฟรีเลต กลายเป็นฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต และกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (คาร์บอน 3 อะตอม) โดยการทำงานของเอนไซม์ทรานส์คีโตเลส ในขณะที่ไซลูโลส-5-ฟอสเฟตสามารถทำปฏิกิริยากับไรโบส-5-ฟอสเฟตได้กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตและซีโคเฮปทูโลส-7-ฟอสเฟต (sedoheptulose-7-phosphate) โดยการทำงานของเอนไซม์ทรานส์คีโตเลส จากนั้นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตจะทำปฏิกิริยากับซีโคเฮปทูโลส-7-ฟอสเฟตเปลี่ยนเป็นฟรุกโตส-6-ฟอสเฟตและอิริโทส-4-ฟอสเฟต โดยการทำงานของเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลส อิริโทส-4-ฟอสเฟตที่ถูกสร้างขึ้นจะถูกเมแทบอลิซึมไปเป็นฟรุกโตส-6-ฟอสเฟตและกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต จากนั้นฟรุกโตส-6-ฟอสเฟตจะถูกเปลี่ยนเป็นฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต โดยการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟฟรุกโตไคเนส จากนั้นฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟตจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต และไดไฮดรอกซีอะซิโตนฟอสเฟต ซึ่งเป็นน้ำตาลไตรโอสที่จะถูกนำไปใช้ในการสร้างไพรูเวต (ภาพที่ 40)

ส่วนเมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสในวิถีฟอสโฟลิกโตเลส น้ำตาลไซโลสจะถูกฟอสโฟรีเลตกลายเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟตโดยการทำงานของเอนไซม์ไซลูโลไคเนส (Kandler, 1983; Hahn-Hägerdal et al., 1994; Aristidou & Penttilä, 2000) จากนั้นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต จะถูกเปลี่ยนเป็นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตและอะซีติลฟอสเฟต (คาร์บอน 2 อะตอม) โดยการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟลิกโตเลส จากนั้นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตจะถูกนำไปใช้ในการสร้างไพรูเวต และไพรูเวตจะถูกนำไปใช้ในการสร้างแลกเตท ฟอर्मेट และอะซิเตท ส่วนอะซีติลฟอสเฟตจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิเตทโดยการทำงานของเอนไซม์อะซิเตทไคเนส ดังนั้นจะเห็นได้ว่าในวิถีฟอสโฟลิกโตเลสมีการสร้างอะซิเตทขึ้น 2 ตำแหน่ง คือก่อนและหลังไพรูเวตเมแทบอลิซึม (ภาพที่ 41)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ทรานส์คีโตเลส และเอนไซม์ทรานส์อัลโคเลสเป็นเอนไซม์หลักที่สำคัญในเมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสในวิถีเพนโตสฟอสเฟต ส่วนเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลสเป็นเอนไซม์หลักที่สำคัญที่พบเฉพาะในวิถีฟอสโฟคีโตเลสเท่านั้น ถ้าตรวจพบเอนไซม์ดังกล่าวในเซลล์ของ *Lc. lactis* IO-1 จะทำให้ทราบถึงวิถีของการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ไม่สามารถตรวจหาแอกติวิตีของเอนไซม์ทรานส์คีโตเลสและเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลสเนื่องจากไม่มีไซลูโลส-5-ฟอสเฟตซึ่งเป็นสับสเตรตที่สำคัญในการตรวจหาเอนไซม์ดังกล่าว ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงตรวจหาเฉพาะเอนไซม์ทรานส์อัลโคเลสและฟรุกโตส-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-ไดฟอสเฟตและเอนไซม์ทรานส์อัลโคเลส ผลการทดลอง (ตารางที่ 9) พบว่า ปริมาณฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต มีค่า 1.38 ± 0.13 , 1.95 ± 0.17 , 3.70 ± 0.27 และ 4.20 ± 0.39 ($\times 10^{-3}$) มิลลิโมลต่อมิลลิกรัมเซลล์แห้ง เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลไซโลส ที่ความเข้มข้น 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในขณะเดียวกัน ไม่พบแอกติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโคเลสในเซลล์ของ *Lc. lactis* IO-1

ตารางที่ 9 ปริมาณฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟตและแอกติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโคเลสในสารละลายเซลล์สกัดของ *Lc. lactis* IO-1 ที่เลี้ยงในน้ำตาลไซโลส ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ

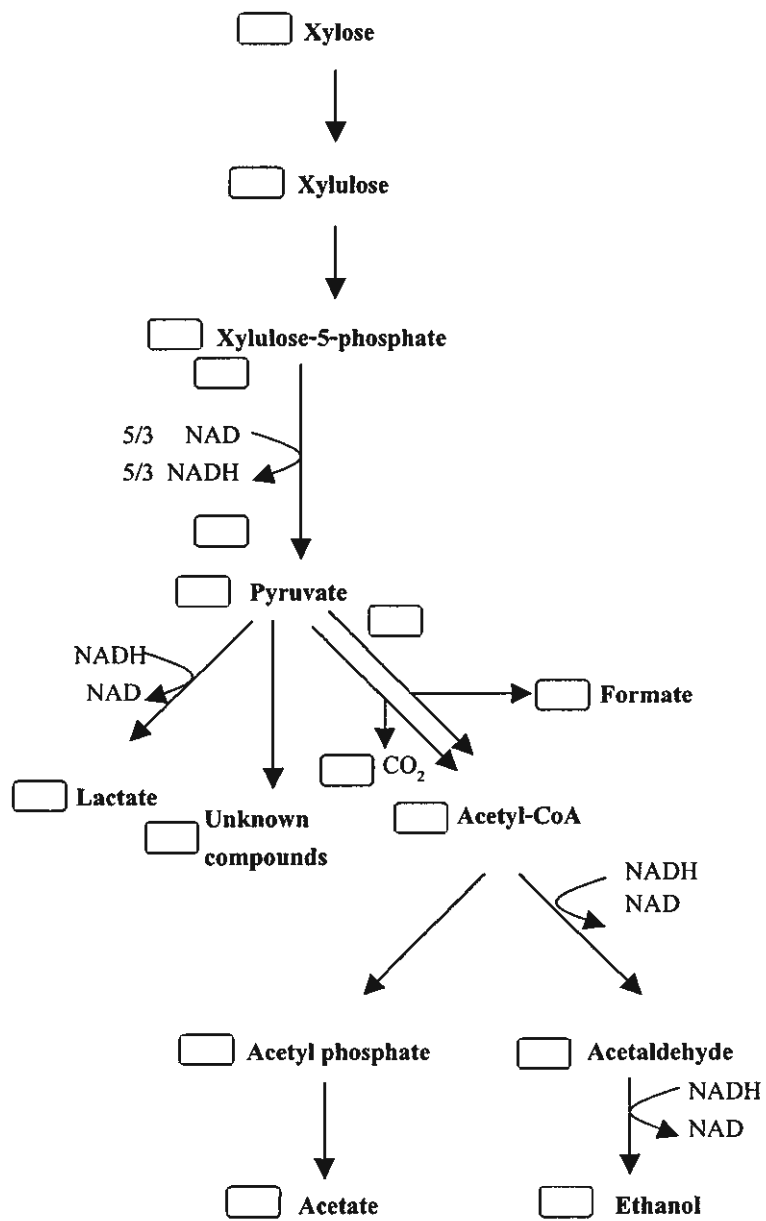
น้ำตาลไซโลส (กรัมต่อลิตร)	ฟรุกโตสไดฟอสเฟต ($\times 10^{-3}$ มิลลิโมล / มิลลิกรัมเซลล์แห้ง)	แอกติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโคเลส (ไมโครโมลเอ็นเอคิเอสต่อนาที่ต่อมิลลิกรัม โปรตีน)
5	1.38 ± 0.13	0
10	1.95 ± 0.17	0
30	3.70 ± 0.27	0
50	4.20 ± 0.39	0

จากการศึกษาของ Laopaiboon (2001) พบว่าเมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ สามารถตรวจพบแอกติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโคเลสและเอนไซม์ฟอสโฟคีโคเลส โดยแอกติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโคเลสที่ Laopaiboon (2001) ตรวจพบมีค่า 1.26 ± 0.83 , 1.11 ± 0.28 , 0.81 ± 0.21 และ 0.53 ± 0.22 ($\times 10^{-1}$) ไมโครโมลเอ็นเอคิเอสต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ในขณะที่แอกติวิตีของเอนไซม์ฟอสโฟคีโคเลสมีค่า 1.13 ± 0.53 , 0.13 ± 0.06 , 0.15 ± 0.03 และ 0.18 ± 0.01 ($\times 10^{-1}$) ไมโครโมลเอ็นเอคิเอสต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้น 5.05, 10.08, 20.94 และ 50.61 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นจากการทดลองและข้อมูลดังกล่าวคือ การตรวจพบฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟตและพบแอกติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโคเลสและเอนไซม์ฟอสโฟคีโคเลส จึงสรุปได้ว่าวิถีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ จะเกิดทั้งวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโคเลสพร้อมกัน (ภาพที่ 42 และ 43 ตามลำดับ) และเมื่อนำทั้ง 2 วิธีมารวมกันจะได้ดังภาพที่ 44 อย่างไรก็ตามการที่ตรวจไม่พบแอกติวิตีของเอนไซม์ทรานส์อัลโคเลสซึ่งอยู่ในวิถีเพนโตสฟอสเฟต อาจเป็นเพราะวิธีที่ใช้ในการตรวจวัดเอนไซม์ดังกล่าวนี้ยังไม่ไว (sensitivity) เพียงพอ

จากภาพที่ 44 แสดงวิถีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ผ่านวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโคเลสซึ่งในทั้ง 2 วิถีจะพบว่ามีโครงสร้างไซลูลอส-5-ฟอสเฟตและไพรูเวตเพื่อนำไปใช้ในการสร้างแลกเตท พอร์เมต อะซิเตท และเอทานอล ในวิถีเพนโตสฟอสเฟตจะพบว่าไซลูลอส-5-ฟอสเฟต 3 โมลจะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวต

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

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



ภาพที่ 42 วิธีเพนโตสฟอสเฟต