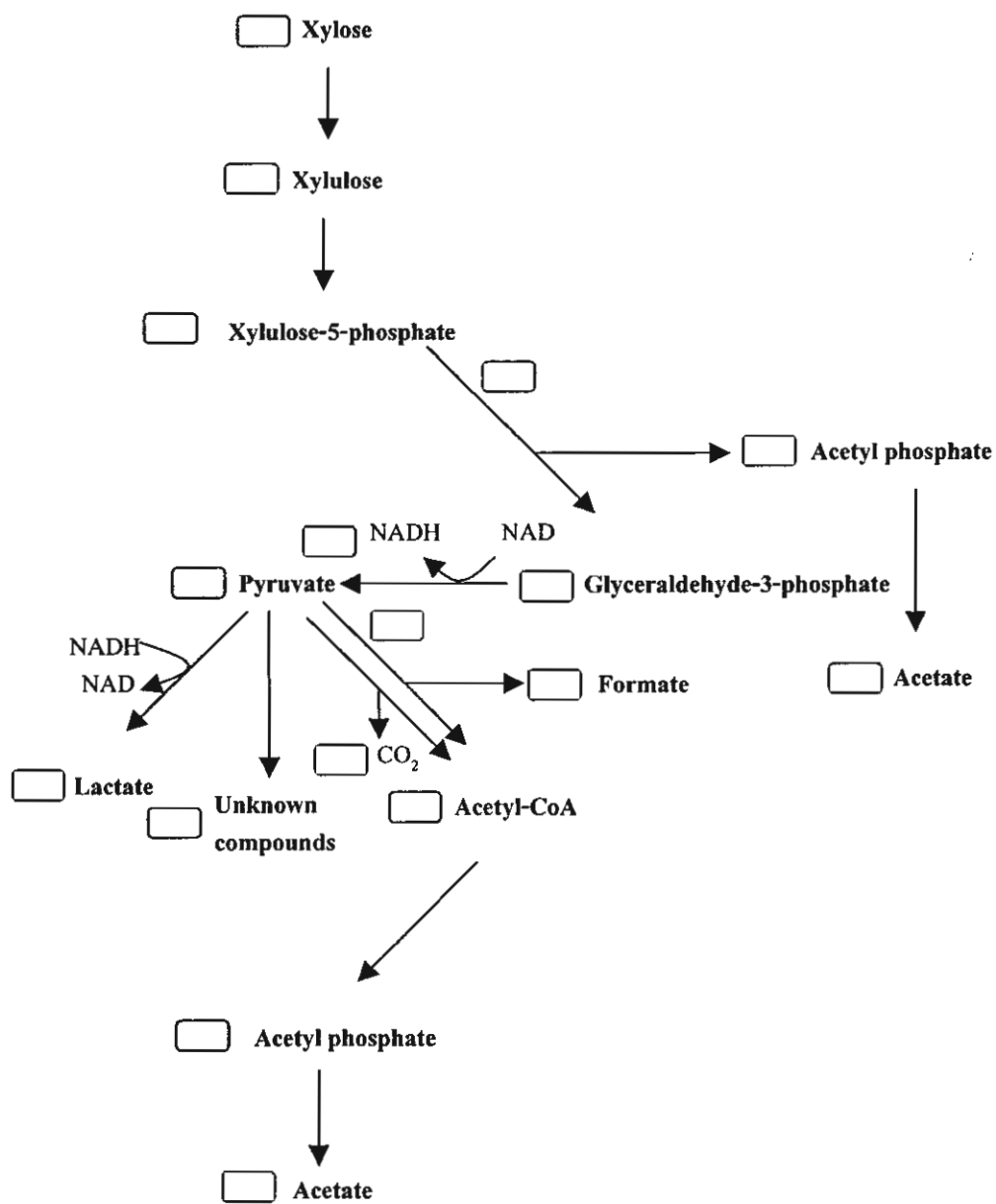
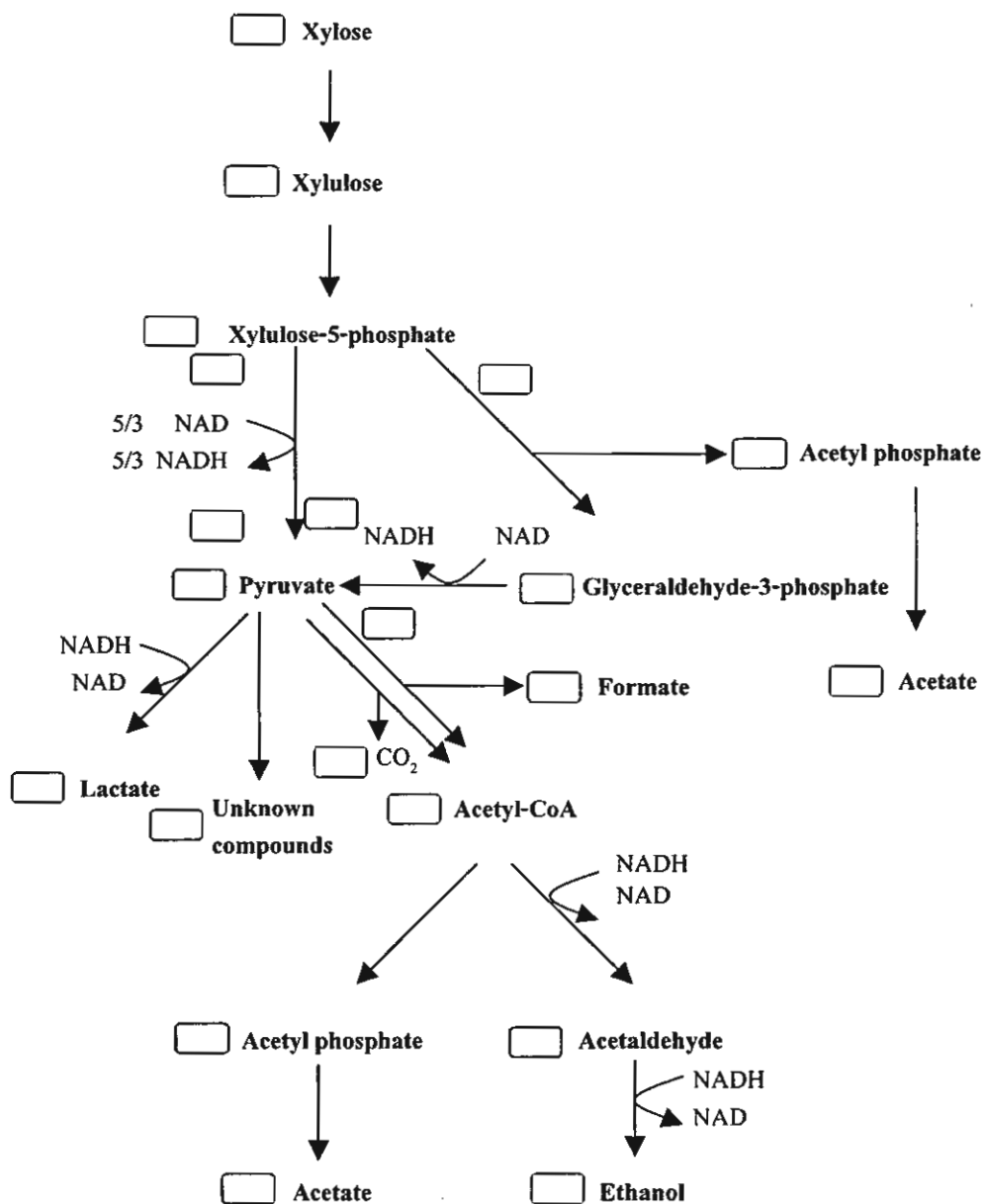




ภาพที่ 43 วิถีฟอสโฟคีโตเลส



ภาพที่ 44 วิธีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO1 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะในสูตรอาหารพื้นฐาน

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

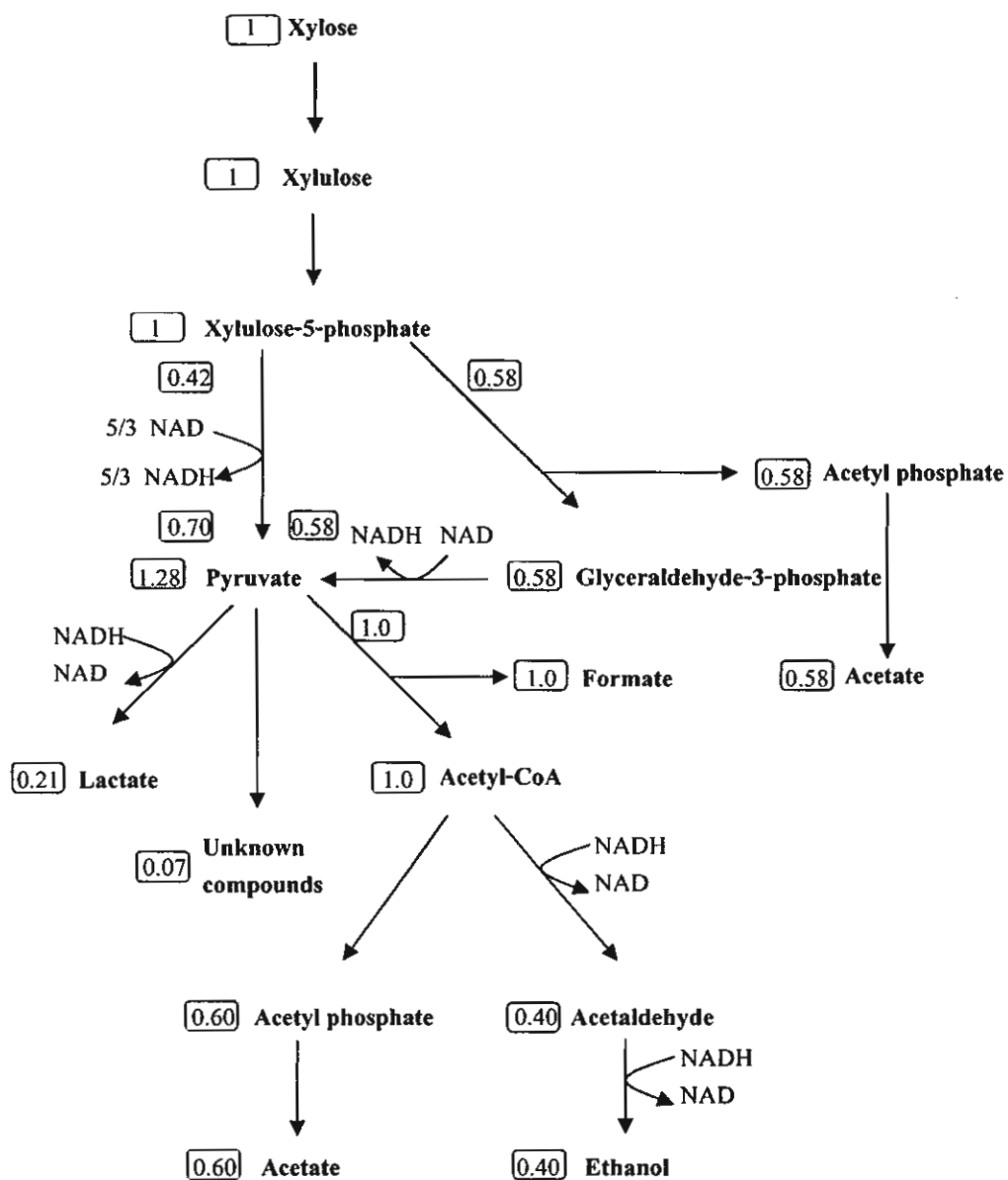
การวิเคราะห์เมแทบอลิซึมหลักจะอาศัยข้อมูลที่ได้จากกระบวนการหมัก ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสต่างกันโดยการวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ (กรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และ 2,3-บิวเทนไดออล) และปริมาณน้ำตาลไซโลสที่เวลาต่าง ๆ ในรูปของโมลผลิตภัณฑ์ต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ จากนั้นจะนำข้อมูลที่ได้ไปบันทึกและคำนวณในวิถีของการใช้น้ำตาลไซโลส (ภาพที่ 44) จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส พบว่าน้ำตาลไซโลสส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์ (เปอร์เซ็นต์ carbon recovery อยู่ในช่วง 87.9-95.0) ในขณะที่ผลได้ของเซลล์ (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้) มีค่าต่ำ ซึ่งจากการรายงานของ Novák & Loubière. (2000) พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่ถูกสร้างขึ้นมาจากกรดอะมิโน กรดนิวคลิก และนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญที่ใช้ในการเจริญของแบคทีเรีย โดยสารดังกล่าวมักพบในแหล่งไนโตรเจน เช่น ยีสต์สกัด และเพปโตน เป็นต้น ส่วนปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ตรวจพบมีปริมาณน้อย (2.7×10^{-6} – 4×10^{-4} โมลต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้) นอกจากนี้ยังพบว่า *Lc. lactis* IO-1 ไม่ผลิต 2,3-บิวเทนไดออลในระหว่างกระบวนการหมักภายใต้สภาวะที่ศึกษา ดังนั้นในการวิเคราะห์เมแทบอลิซึมหลักในการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลไซโลส จึงไม่นำปริมาณเซลล์ คาร์บอนไดออกไซด์ และ 2,3-บิวเทนไดออล มาใช้ในการวิเคราะห์เมแทบอลิซึมหลัก

หลักการวิเคราะห์เมแทบอลิซึมหลักในการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลไซโลส จำเป็นต้องวัดปริมาณของสับสเตรคที่ให้เข้าไปในระบบ (input) และวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ถูกสร้างขึ้น (output) ในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงในรูปของโมลผลิตภัณฑ์ต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ จากนั้นนำข้อมูลที่ได้ดังกล่าวไปบันทึกลงในวิถีของการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 การคำนวณปริมาณผลิตภัณฑ์รวมทั้งสารตัวกลางต่าง ๆ ที่ถูกสร้างขึ้นในวิถี สามารถทำได้โดยบันทึกข้อมูลของผลิตภัณฑ์ (โมลผลิตภัณฑ์ต่อโมลน้ำตาลที่ถูกใช้) ที่ทราบลงไปก่อน ซึ่งข้อมูลดังกล่าวได้จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) น้ำตาลไซโลสถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลสและไซลูโลส-5-ฟอสเฟต ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (โมลต่อโมล) สำหรับปริมาณอะซิติก-โคเอที่ถูกสร้างขึ้นมีค่าเท่ากับปริมาณของฟอร์มेटที่ได้จากการทดลอง จากนั้นอะซิติก-โคเอจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิติกฟอสเฟตและอะซิตาลดีไฮด์ ซึ่งปริมาณของอะซิตาลดีไฮด์มีค่าเท่ากับปริมาณของเอทานอลที่ได้จากการทดลอง ดังนั้นผลต่างระหว่างอะซิติก-โคเอกับอะซิตาลดีไฮด์ คือปริมาณของอะซิติกฟอสเฟตและอะซิเทตที่ถูกสร้างขึ้นหลังไพรูเวตเมแทบอลิซึม สำหรับปริมาณอะซิติกฟอสเฟตและอะซิเทตที่ถูกสร้างขึ้นก่อนไพรูเวตเมแทบอลิซึม คือผลต่างระหว่างปริมาณของอะซิเทตที่ได้จากการทดลองกับอะซิเทตที่เกิดขึ้นหลังไพรูเวตเมแทบอลิซึม และมีค่าเท่ากับปริมาณของกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตและไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่เข้าสู่วิถีฟอสโฟไคโดเลส ส่วนปริมาณไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่เข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟต คือผลต่างระหว่างปริมาณไซลูโลส-5-ฟอสเฟตเริ่มต้น (เท่ากับ 1 โมล) กับปริมาณไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่เข้าสู่วิถีฟอสโฟไคโดเลส เนื่องจากในวิถีเพนโตสฟอสเฟต ไซลูโลส 3 โมล ถูกนำไปใช้ในการสร้างไพรูเวต 5 โมล ดังนั้นปริมาณไพรูเวตที่ถูกสร้างขึ้นในวิถี จึงมาจากผลรวมของปริมาณไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่เข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟต (คูณ 5/3) กับปริมาณของกลีเซอรอลดีไฮด์-3-

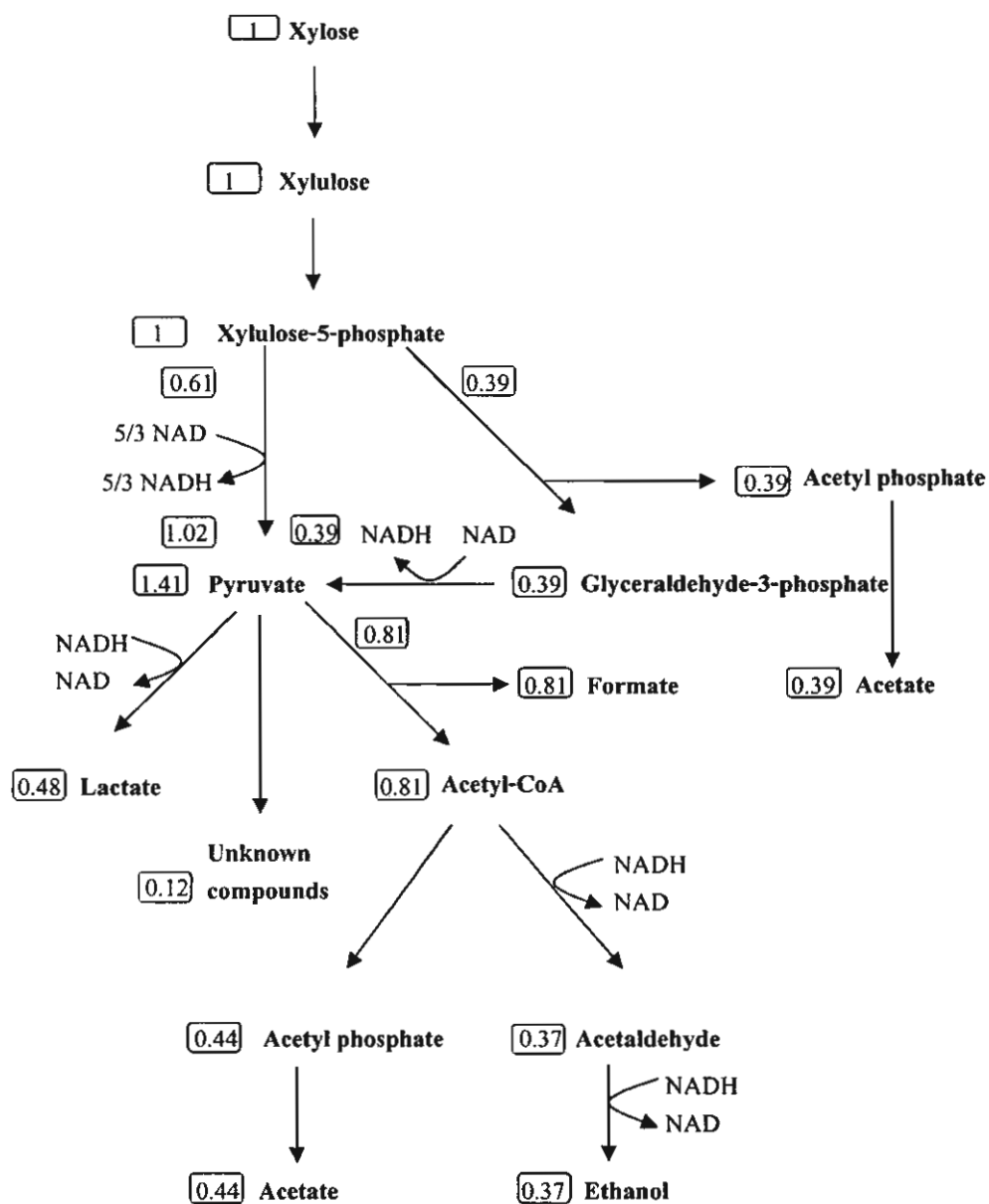
ฟอสเฟตที่ถูกสร้างขึ้น สำหรับปริมาณสารที่ไม่ได้ตรวจวัดในการทดลอง (unknown) สามารถคำนวณได้จากปริมาณของไพรูเวตที่เหลือจากการนำไปสร้างแลคเตทและอะซิติก-โคเอ

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

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



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

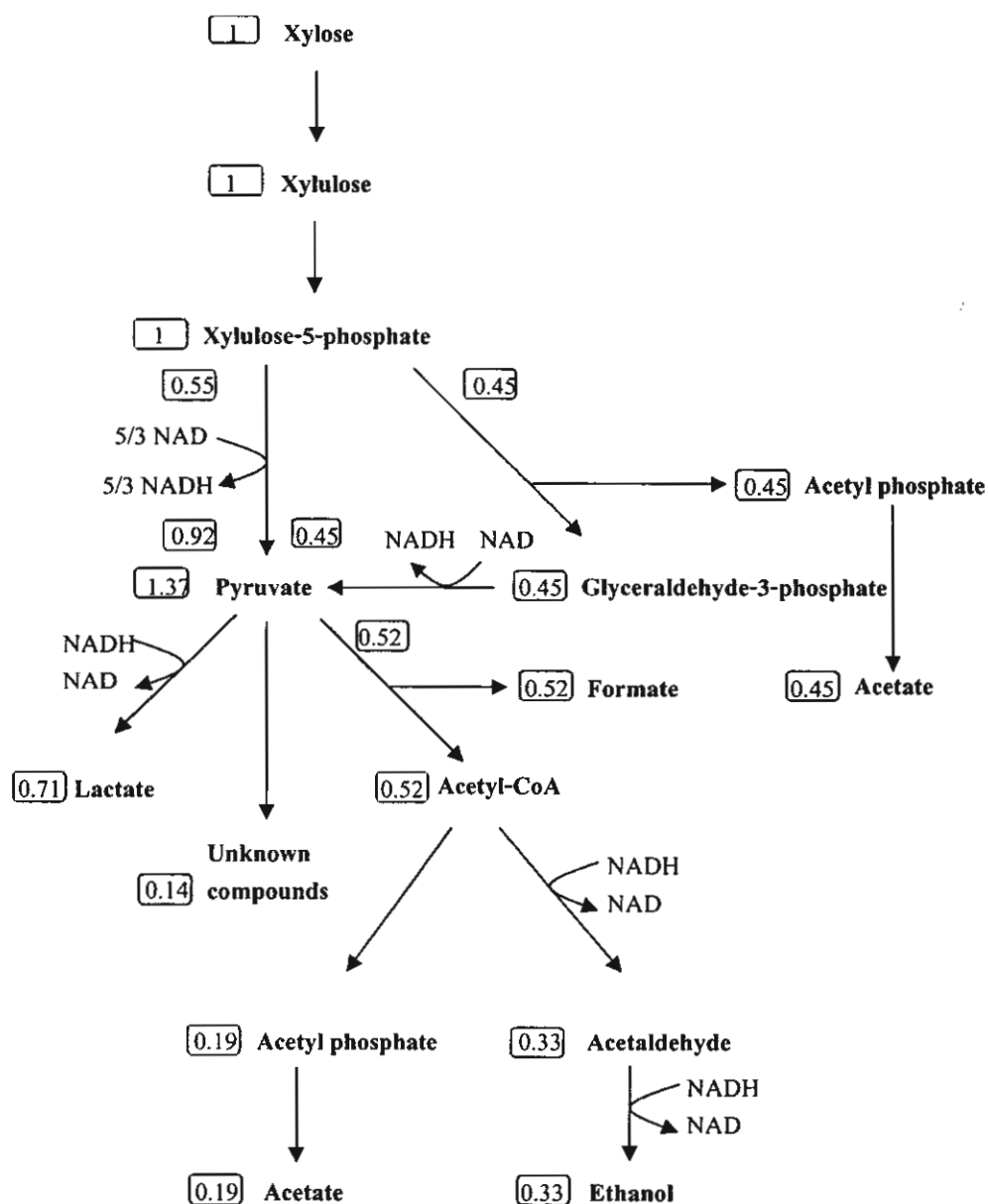


ภาพที่ 46 วิธีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ที่เลี้ยงในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 10 กรัมต่อลิตร

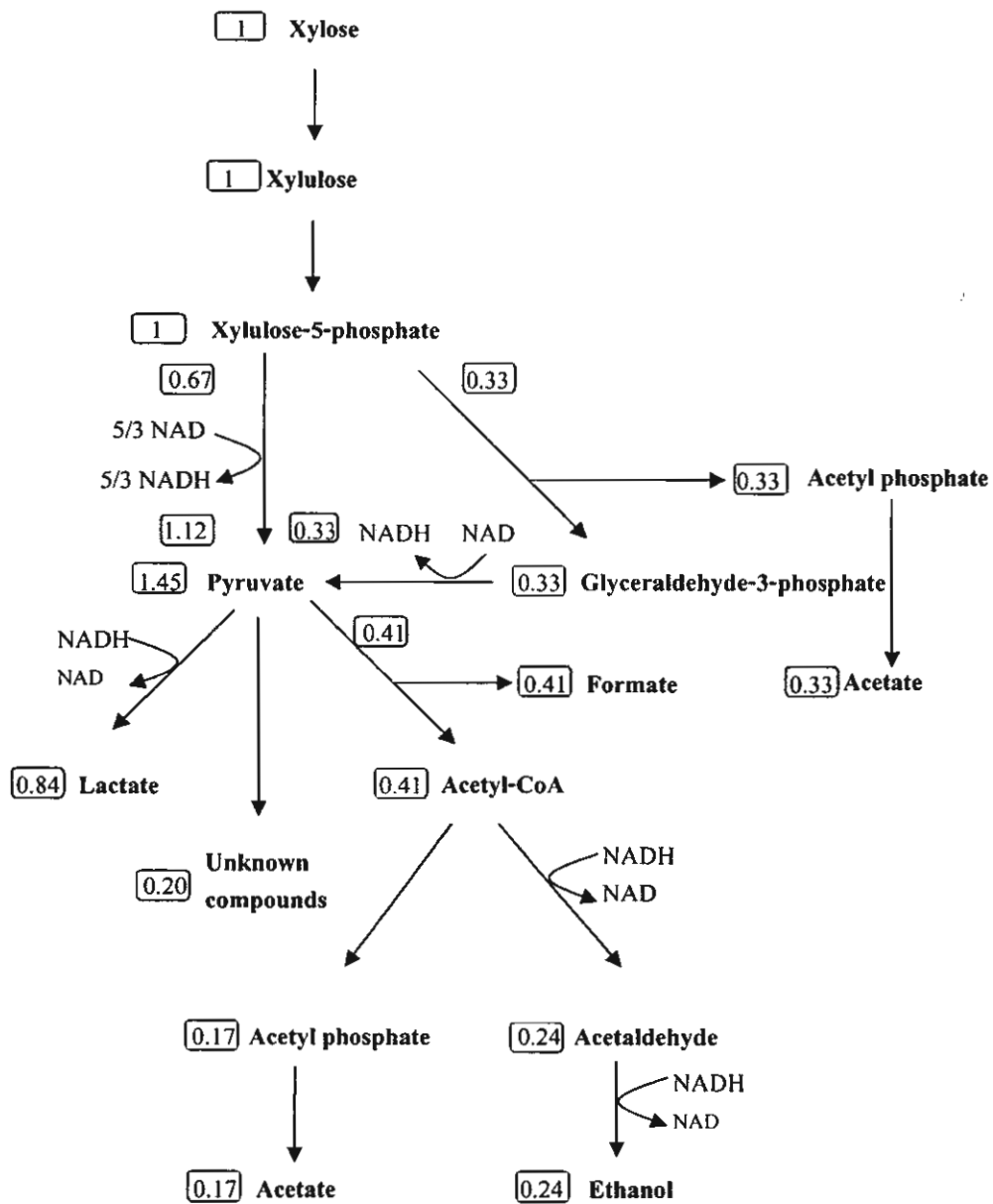
ผลการทดลอง (ภาพที่ 47) การใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 30 กรัมต่อลิตร พบว่าน้ำตาลไซโลสเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตมากกว่าวิถีฟอสโฟคิโตเลส 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลไซโลส 1 โมล ถูกเปลี่ยนและถูกฟอสโฟรีเลตไปเป็นไซลูลอส-5-ฟอสเฟต 1 โมล จากนั้นไซลูลอส-5-ฟอสเฟต 0.55 และ 0.45 โมล ถูกนำเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคิโตเลส ตามลำดับ อะซิเทต 0.45 และ 0.19 โมล ถูกสร้างขึ้นก่อนและหลังไพรูเวตเมแทบอลิซึม ตามลำดับ จากนั้นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต 0.45 โมล และไซลูลอส-5-ฟอสเฟต 0.92 โมล ถูกนำไปใช้ในการสร้างไพรูเวต 1.37 โมล หลังไพรูเวตเมแทบอลิซึม พบ แลกเตท ฟอรัเมต เอทานอล และสารที่ไม่ได้ตรวจวัด 0.71, 0.52, 0.33 และ 0.14 โมล ตามลำดับ

ผลการทดลอง (ภาพที่ 48) การใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 50 กรัมต่อลิตร พบว่าน้ำตาลไซโลสเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตมากกว่าวิถีฟอสโฟคิโตเลส 34 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลไซโลส 1 โมล ถูกเปลี่ยนและถูกฟอสโฟรีเลตเป็นไซลูลอส-5-ฟอสเฟต 1 โมล จากนั้นไซลูลอส-5-ฟอสเฟต 0.67 และ 0.33 โมล ถูกนำเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคิโตเลส ตามลำดับ อะซิเทต 0.33 และ 0.17 โมล ถูกสร้างขึ้นก่อนและหลังไพรูเวตเมแทบอลิซึม ตามลำดับ จากนั้นกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต 0.33 โมล และไซลูลอส-5-ฟอสเฟต 1.12 ถูกนำไปใช้ในการสร้างไพรูเวต 1.45 โมล หลังไพรูเวตเมแทบอลิซึม พบ แลกเตท ฟอรัเมต เอทานอล และสารที่ไม่ได้ตรวจวัด 0.84, 0.41, 0.24 และ 0.20 โมล ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์เมแทบอลิซ์ฟลักซ์ของการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) พบว่าปริมาณแลกเตทมีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณฟอรัเมต อะซิเทต และเอทานอลมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้น



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



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

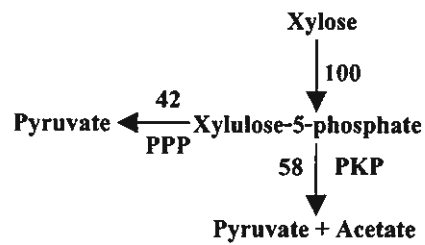
4.7 การวิเคราะห์พริ้นซิเพิลโนด (principal node) ของการใช้น้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดย *Lc. lactis* IO-1 ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ

เนื่องจากวิธีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ผ่านทั้งวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟกลีโคเลตพร้อมกัน ซึ่งทั้ง 2 วิธีสามารถเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต โดยการทำงานของเอนไซม์ ดี-ไซลูโลโคเนส นอกจากนี้ทั้ง 2 วิธีสามารถสร้างไพรูเวตซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการนำไปสร้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมัก ดังนั้นจึงควรวิเคราะห์พริ้นซิเพิลโนดของไซลูโลส-5-ฟอสเฟตและไพรูเวต เพราะจะทำให้ทราบปริมาณไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่ถูกเมแทบอลิซึมผ่านวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟกลีโคเลต นอกจากนี้ยังทำให้ทราบปริมาณไพรูเวตที่ถูกนำไปใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์ต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก

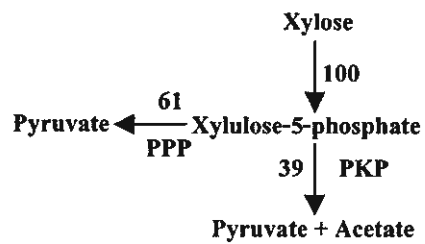
ภาพที่ 49 แสดงพริ้นซิเพิลโนดของไซลูโลส-5-ฟอสเฟตภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสต่าง ๆ ผลการทดลองพบว่า เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสภาวะที่มีน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร ไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่ถูกสร้างขึ้นจะเข้าสู่วิถีฟอสโฟกลีโคเลต (58 เปอร์เซ็นต์) มากกว่าวิถีเพนโตสฟอสเฟต (42 เปอร์เซ็นต์) (ภาพที่ 49 a) และเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้นเป็น 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่ถูกสร้างขึ้นมีแนวโน้มจะเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตมากกว่าวิถีฟอสโฟกลีโคเลต โดยไซลูโลส-5-ฟอสเฟตจะถูกนำไปเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟต 61, 55 และ 67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่พบว่าไซลูโลส-5-ฟอสเฟตเข้าสู่วิถีฟอสโฟกลีโคเลต 39, 45 และ 33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 49b-49d) นอกจากนี้ผลการทดลองยังพบว่าปริมาณไซลูโลส-5-ฟอสเฟต สูงสุดที่เข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟกลีโคเลตมีค่าเท่ากับ 67 และ 58 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 50 และ 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

ภาพที่ 50 แสดงพริ้นซิเพิลโนดของไพรูเวตภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสต่าง ๆ กัน ผลการทดลองพบว่า เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสภาวะที่มีน้ำตาลไซโลส 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ไพรูเวตส่วนใหญ่ (78 และ 57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) จะถูกนำไปใช้ในการสร้างฟอर्मेटกับอะซิติก-โคเอ ในขณะที่ไพรูเวต 17 และ 34 เปอร์เซ็นต์ ถูกนำไปใช้ในการสร้างแลกเตท และไพรูเวตอีก 5 และ 9 เปอร์เซ็นต์ ถูกเปลี่ยนเป็นสารที่ไม่ได้ตรวจวัดในการทดลอง ตามลำดับ (ภาพที่ 50a-50b) และเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้นเป็น 30 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่า ไพรูเวตส่วนใหญ่ (52 และ 58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ถูกนำไปใช้ในการสร้างแลกเตท ในขณะที่ไพรูเวต 38 และ 28 เปอร์เซ็นต์ ถูกนำไปใช้ในการสร้างฟอर्मेटกับอะซิติก-โคเอ และไพรูเวตอีก 10 และ 14 เปอร์เซ็นต์ ถูกเปลี่ยนเป็นสารที่ไม่ได้ตรวจวัดในการทดลอง ตามลำดับ (ภาพที่ 50c-50d) นอกจากนี้ผลการทดลองยังพบว่าปริมาณไพรูเวตที่ถูกนำไปใช้ในการสร้างแลกเตทมีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณฟอर्मेटกับอะซิติก-โคเอ มีค่าลดลง เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้น ปริมาณไพรูเวตสูงสุดที่ถูกนำไปใช้ในการสร้างแลกเตทมีค่าเท่ากับ 58 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 50 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 50d) ในขณะที่ปริมาณไพรูเวตสูงสุดที่ถูกนำไปใช้ในการสร้างฟอर्मेटและอะซิติก-โคเอ มีค่าเท่ากับ 78 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 50a)

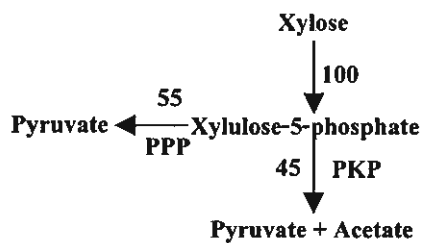
a) ไซโลส 5 กรัมต่อลิตร



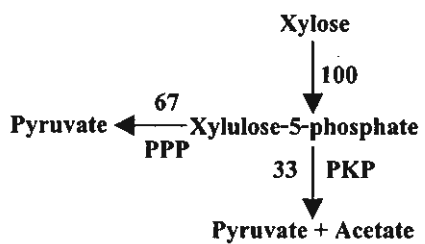
b) ไซโลส 10 กรัมต่อลิตร



c) ไซโลส 30 กรัมต่อลิตร

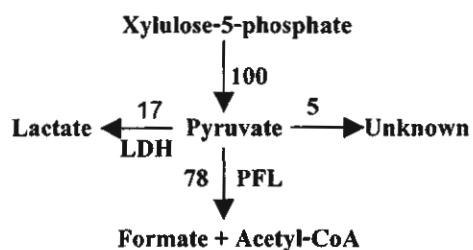


d) ไซโลส 50 กรัมต่อลิตร

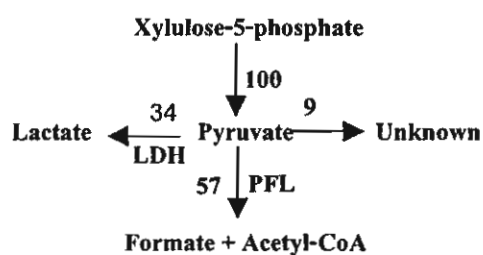


ภาพที่ 49 ปริมาณไซโลส-5-ฟอสเฟตภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสต่าง ๆ กัน
เมื่อ PPP และ PKP คือ วิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลส ตามลำดับ

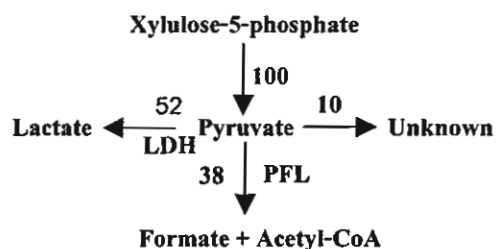
a) ไซโลส 5 กรัมต่อลิตร



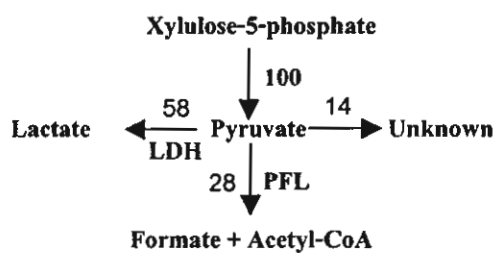
b) ไซโลส 10 กรัมต่อลิตร



c) ไซโลส 30 กรัมต่อลิตร



d) ไซโลส 50 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 50 ปริมาณฟิโนคของไพรูเวตภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสต่าง ๆ กัน เมื่อ LDH และ PFL คือเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจิเนสและเอนไซม์ไพรูเวตฟอร์เมตไลเอส ตามลำดับ

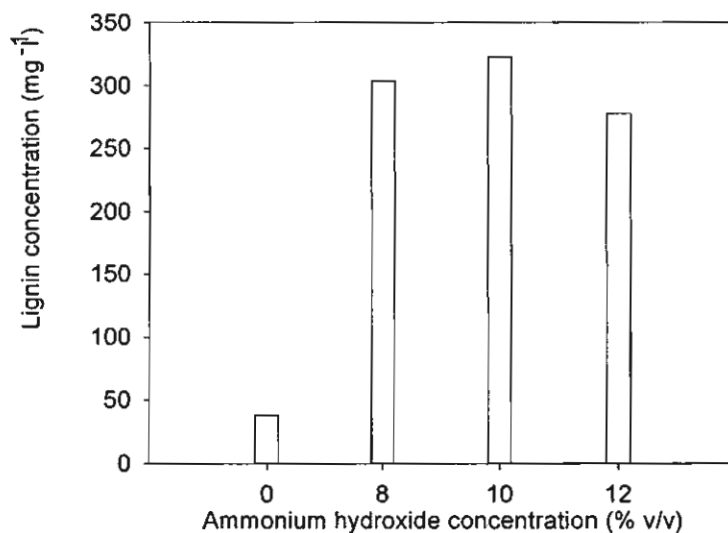
4.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ขานอ้อย

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ขานอ้อย เพื่อให้ได้สารละลายที่มีปริมาณน้ำตาลสูงในขั้นตอนแรกจะนำขานอ้อยมาไฮโดรไลซ์ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่แปรผันความเข้มข้น 8, 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) เพื่อสกัดลิกนินออก จากนั้นขานอ้อยที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ จะนำไปไฮโดรไลซ์ต่อด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือกรดซัลฟูริก (0.5, 2, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 90, 100, 110 และ 120 องศาเซลเซียส การหาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยจะพิจารณาจากค่าประสิทธิภาพ (Rodriguez-Chong et al., 2004) โดย

$$\text{ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์ขานอ้อย} = \frac{\text{ผลรวมของน้ำตาลที่ได้ (กลูโคส ไซโลส และอะราบินอส) (กรัมต่อลิตร)}}{(1 + \text{ปริมาณสารยับยั้ง (กรดอะซิติคและเฟอฟูรอล)) (กรัมต่อลิตร)}}$$

4.8.1 การไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์

จากผลการทดลองในภาพที่ 51 พบว่า เมื่อไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร สามารถสกัดลิกนินออกจากขานอ้อยได้มากที่สุดคือ 322.19 มิลลิกรัมต่อลิตร (3.22 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณลิกนินในขานอ้อย) ส่วนการไฮโดรไลซ์ด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 8 และ 12 เปอร์เซ็นต์ พบว่าได้ปริมาณลิกนินเท่ากับ 303.39 และ 277.46 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การไฮโดรไลซ์ขานอ้อยในชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่นสามารถสกัดลิกนินได้เพียง 38 มิลลิกรัมต่อลิตร เท่านั้น ดังนั้นจึงเลือกไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ในการสกัดลิกนินจากขานอ้อยก่อนที่จะนำขานอ้อยไปไฮโดรไลซ์ต่อด้วยกรดไฮโดรคลอริกหรือกรดซัลฟูริกในการทดลองขั้นต่อไป



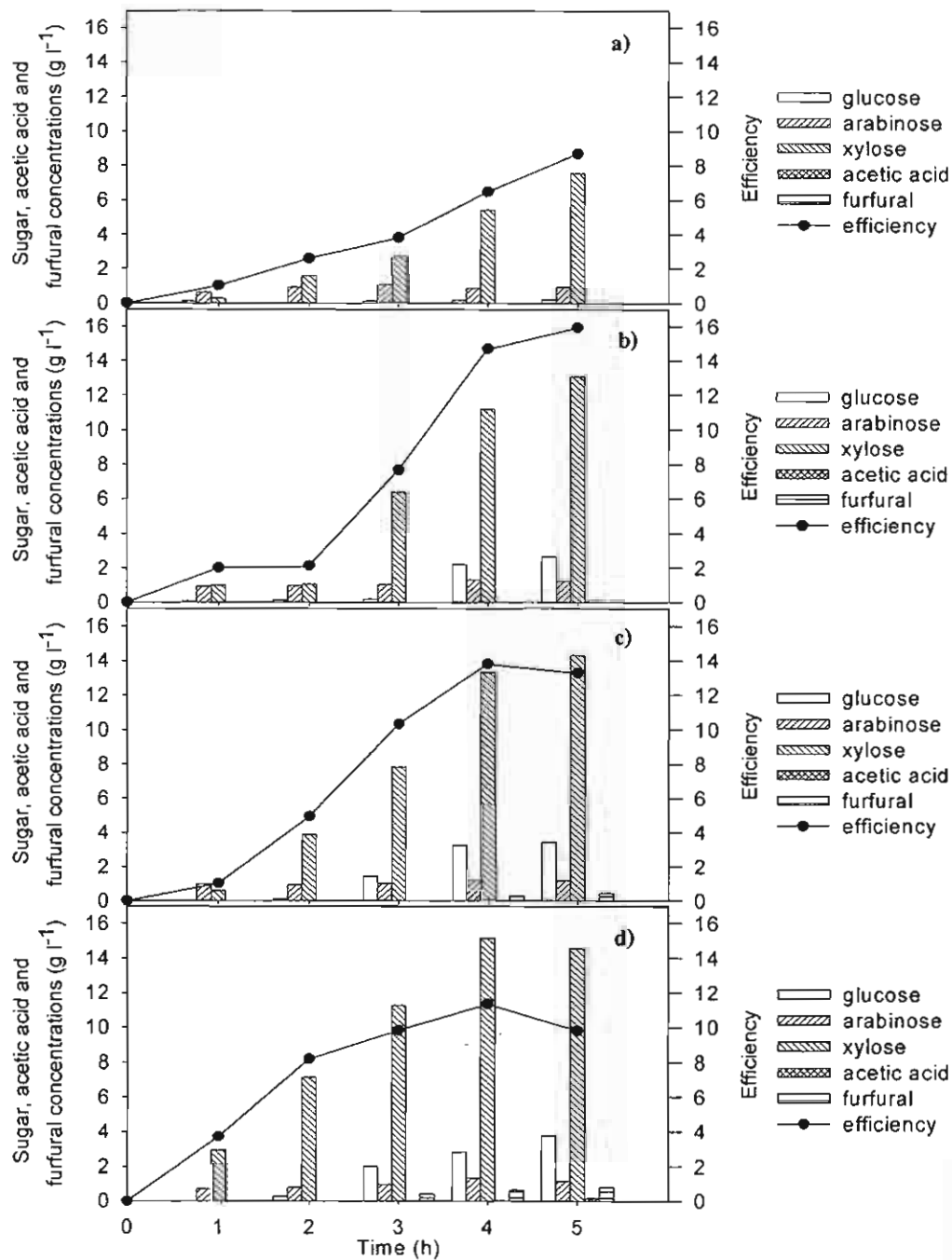
ภาพที่ 51 ปริมาณลิกนินที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

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

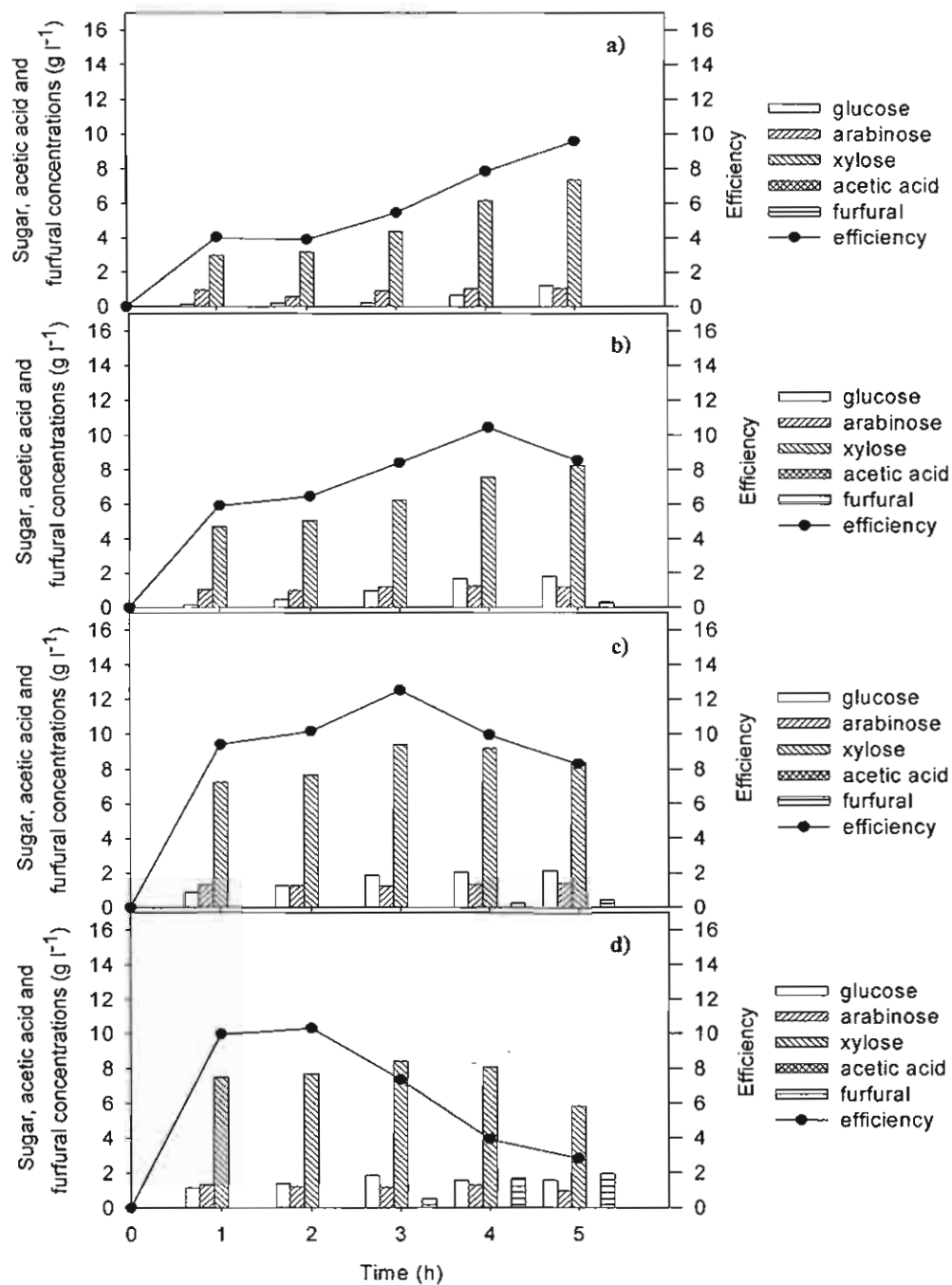
การไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5, 2, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 90, 100, 110 และ 120 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 52-55) พบว่าจะได้น้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก โดยพบปริมาณน้ำตาลไซโลสสูงสุดเท่ากับ 15.16 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก 0.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ที่เวลา 4 ชั่วโมง นอกจากนี้พบว่าได้น้ำตาลไซโลสมากกว่าน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลอะราบินอส กรดอะซิดิก และเฟอฟูรอล ยกเว้นการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (อุณหภูมิ 90 และ 110 องศาเซลเซียส ที่เวลา 1 ชั่วโมง) จะได้น้ำตาลอะราบินอสมากกว่าน้ำตาลไซโลส และที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ที่เวลา 5 ชั่วโมง) และ 5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เวลา 4 และ 5 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เวลา 3, 4 และ 5 ชั่วโมง) โดยที่สภาวะดังกล่าวจะได้น้ำตาลกลูโคสมากกว่าน้ำตาลไซโลส นอกจากนี้พบว่าที่สภาวะการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก 5 เปอร์เซ็นต์ จะได้น้ำตาลกลูโคสสูงกว่าสภาวะการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก 0.5, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ที่เวลา 4 และ 5 ชั่วโมง คือ 3.14 และ 5.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ที่เวลา 3, 4 และ 5 ชั่วโมง จะได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคส 6.25, 8.43 และ 10.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณน้ำตาลอะราบินอสที่ได้อยู่ในช่วง 0.62-1.48 กรัมต่อลิตร และปริมาณกรดอะซิดิกที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกอยู่ในช่วง 0.02-0.22 กรัมต่อลิตร โดยพบกรดอะซิดิกเมื่อไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 100 และ 120 องศาเซลเซียส) และ 5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 90, 100, 110

และ 120 องศาเซลเซียส) นอกจากนี้ยังพบเฟอฟูรอลเมื่อไฮโดรไลซ์ซานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 110 และ 120 องศาเซลเซียส) และกรณีการใช้กรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 2, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 100, 110 และ 120 องศาเซลเซียส) โดยปริมาณเฟอฟูรอลมีค่า 0.31-3.13 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามไม่พบเฟอฟูรอลเมื่อไฮโดรไลซ์ซานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5, 2, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส และที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ที่ 100 องศาเซลเซียส

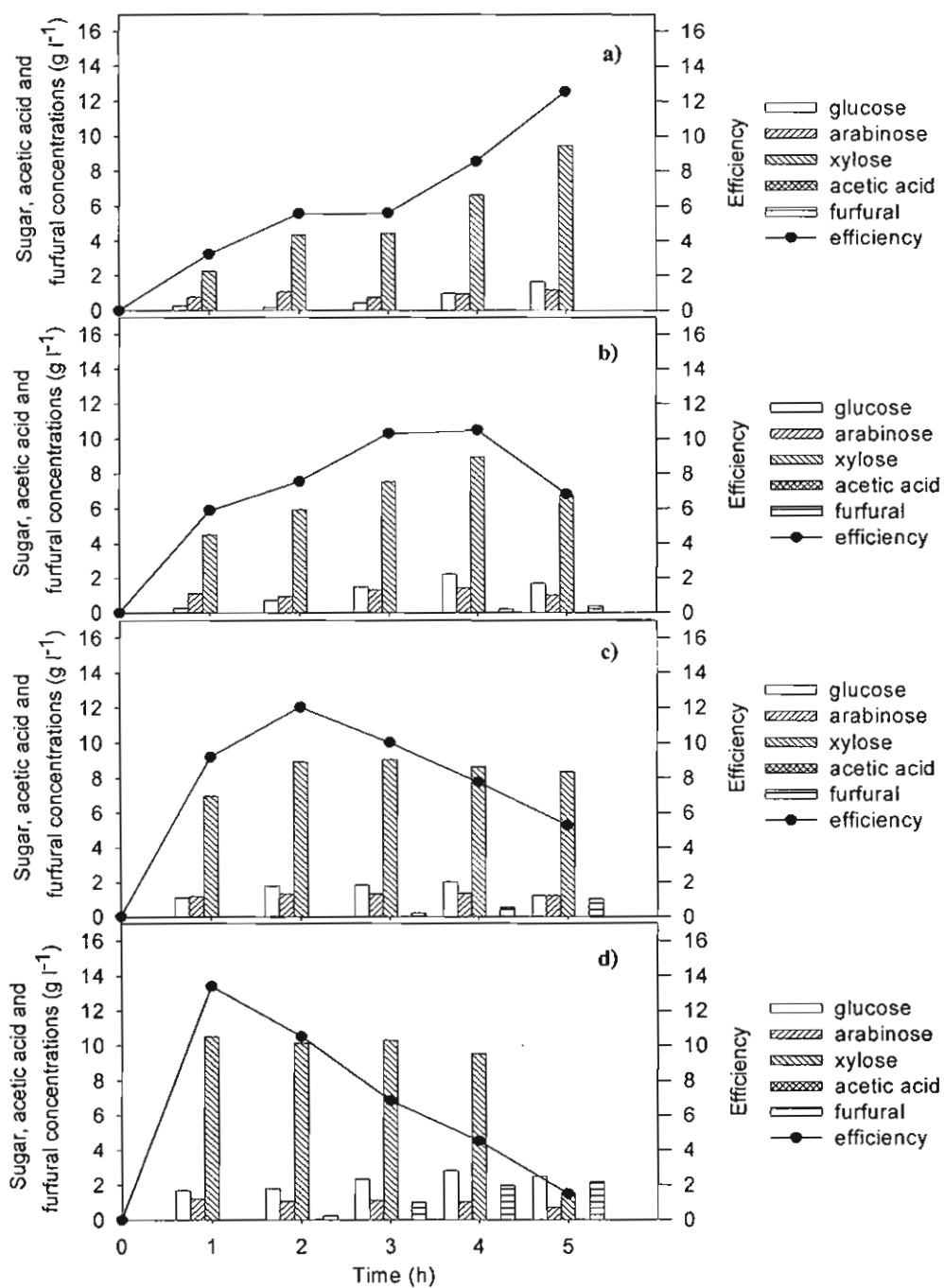
เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์ซานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก พบว่ากรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ที่เวลา 5 ชั่วโมง จะให้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์สูงสุดเท่ากับ 15.95 นอกจากนี้ยังพบว่า ภายใต้สภาวะการไฮโดรไลซ์ซานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 90 และ 100 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส และที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จะให้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์ซานอ้อยเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้น นอกเหนือจากสภาวะดังกล่าวข้างต้นพบว่าประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซ์ซานอ้อยจะเพิ่มขึ้นในช่วงแรกของเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์ จากนั้นประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซ์จะลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้น



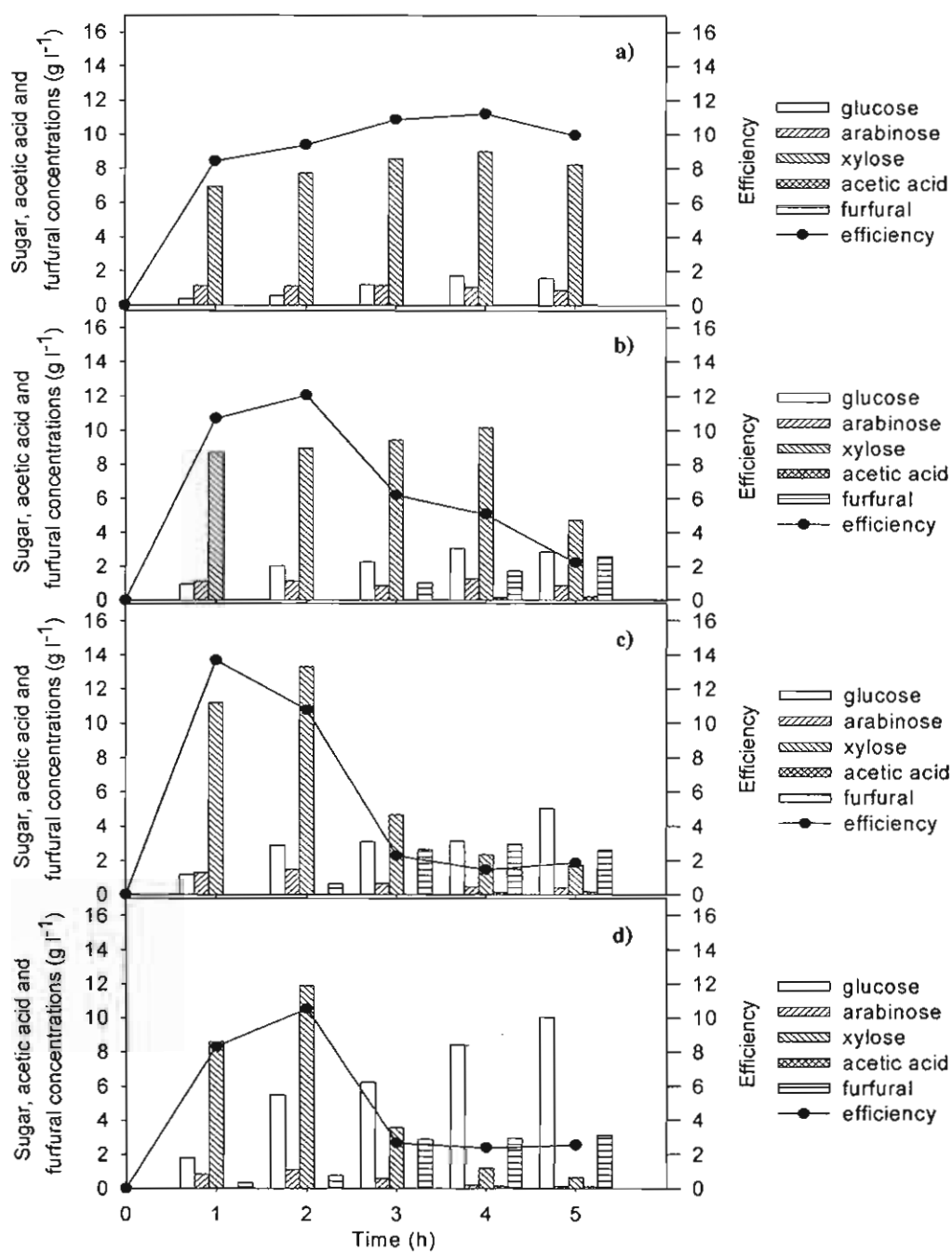
ภาพที่ 52 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อาราบิโนส ไซโลส กรดอะซิติก เฟอร์ฟูรอล และประสิทธิภาพ ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 53 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบินอส ไซโลส กรดอะซิติก เฟอร์ูล และประสิทธิภาพ ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส



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

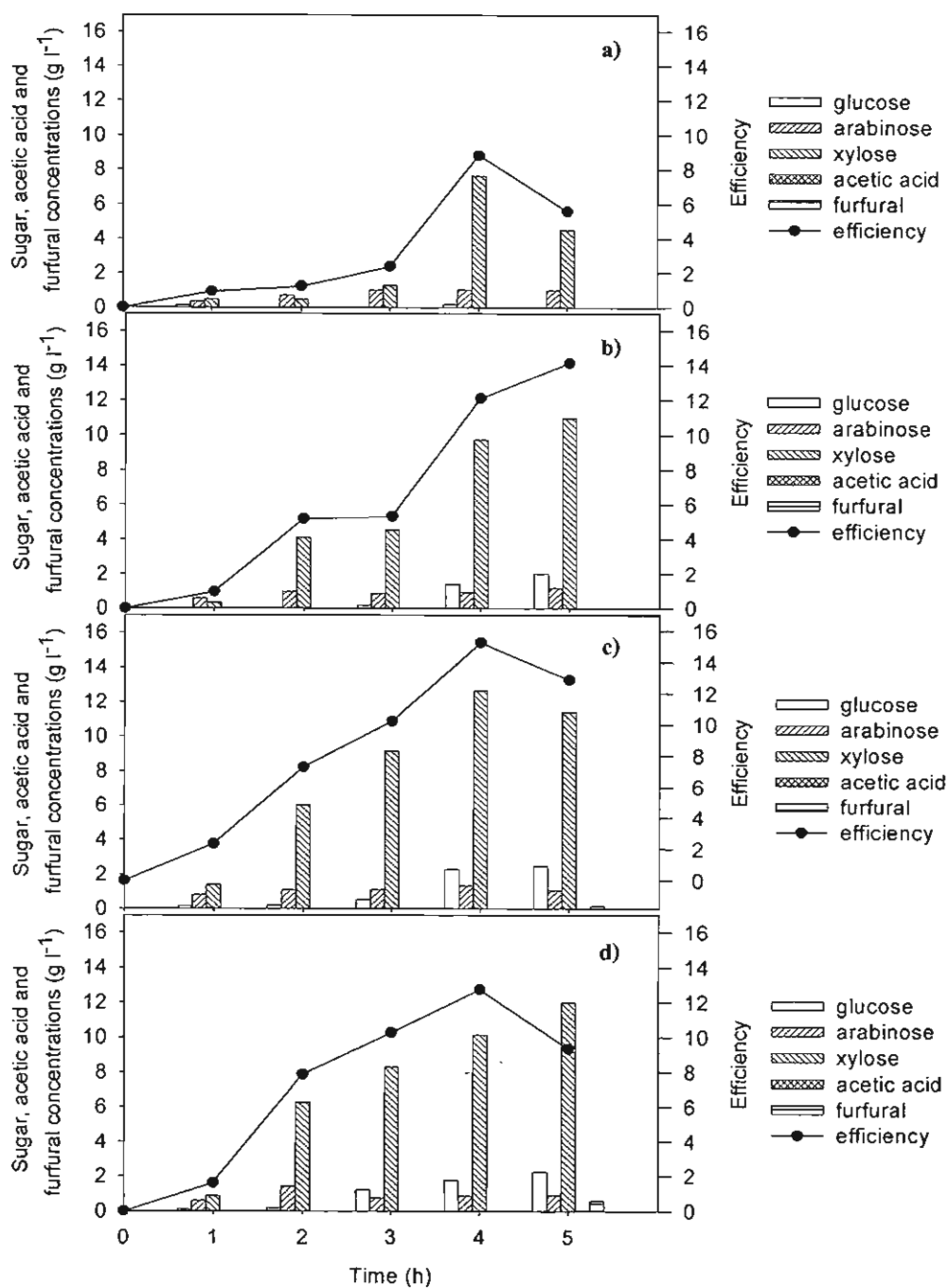


ภาพที่ 55 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบินอส ไซโลส กรดอะซิติก เฟอฟูรอล และประสิทธิภาพ ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส

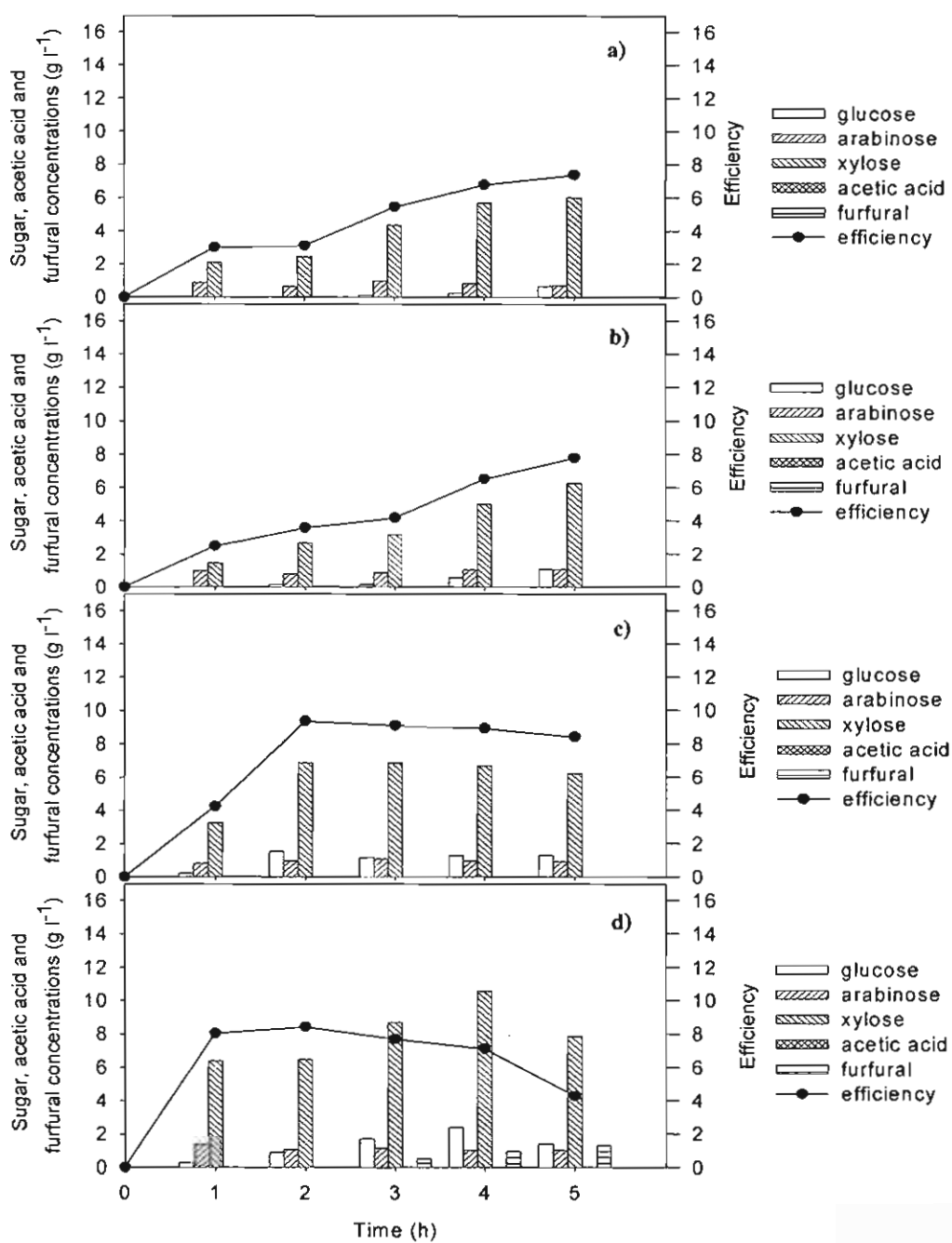
4.8.3 การไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริก (0.5, 2, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ (90, 100, 110 และ 120 องศาเซลเซียส)

จากการทดลอง (ภาพที่ 56-59) พบว่า การไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกจะได้น้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก โดยพบปริมาณน้ำตาลไซโลสสูงสุดเท่ากับ 12.64 กรัมต่อลิตร เมื่อไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ที่เวลา 4 ชั่วโมง นอกจากนี้พบว่าทุกสภาวะที่ไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกจะได้น้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ยกเว้นการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เวลา 1 ชั่วโมง) ที่สภาวะดังกล่าวจะได้น้ำตาลอะราบินอส (0.57 กรัมต่อลิตร) มากกว่าน้ำตาลไซโลส และพบว่าที่สภาวะการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เวลา 5 ชั่วโมง จะได้น้ำตาลกลูโคส (8.85 กรัมต่อลิตร) มากกว่าน้ำตาลไซโลส ส่วนปริมาณน้ำตาลอะราบินอสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกพบว่ามีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกับที่พบในสภาวะอื่น ๆ โดยพบปริมาณน้ำตาลอะราบินอสสูงสุด 1.42 กรัมต่อลิตร เมื่อไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ที่เวลา 2 ชั่วโมง ปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยมีค่าน้อย คืออยู่ระหว่าง 0.04-0.14 กรัมต่อลิตร โดยพบกรดอะซิติกเฉพาะในกรณีการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 110 และ 120 องศาเซลเซียส เวลา 5 ชั่วโมง) และ 5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 100 และ 120 องศาเซลเซียส เวลา 5 ชั่วโมง) ส่วนปริมาณเฟอรูลิกมีค่าอยู่ระหว่าง 0.16-2.24 กรัมต่อลิตร โดยพบปริมาณเฟอรูลิกสูงสุดเท่ากับ 2.24 กรัมต่อลิตร เมื่อไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ที่เวลา 5 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบเฟอรูลิกในกรณีที่ไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 110 และ 120 องศาเซลเซียส เวลา 5 ชั่วโมง) 2 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เวลา 3, 4 และ 5 ชั่วโมง) 3 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เวลา 3 และ 4 ชั่วโมง และ 120 องศาเซลเซียส ที่เวลา 3, 4 และ 5 ชั่วโมง) และ 5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 100, 110 องศาเซลเซียส เวลา 3, 4 และ 5 ชั่วโมง และ 120 องศาเซลเซียส ที่เวลา 2, 3, 4 และ 5 ชั่วโมง)

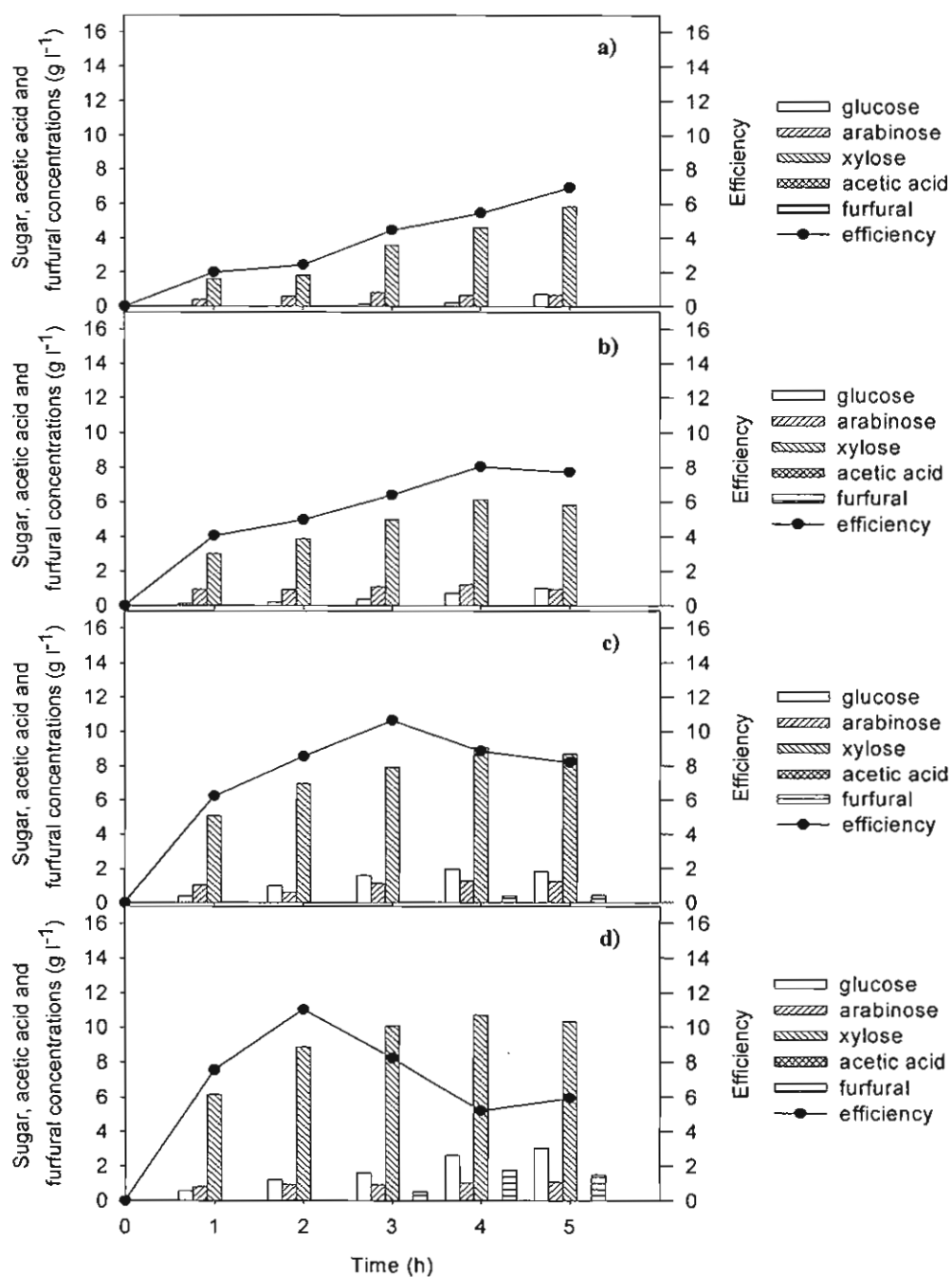
เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริก พบว่าเมื่อไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ที่เวลา 4 ชั่วโมง จะได้ประสิทธิภาพสูงสุดเท่ากับ 15.26 นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส) 2 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 90 และ 100 องศาเซลเซียส) 3 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส) และ 5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส) จะให้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยเพิ่มขึ้น เมื่อเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้น ในขณะที่นอกเหนือจากสภาวะดังกล่าวข้างต้นพบว่าประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยเพิ่มขึ้นในช่วงแรกของเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์ จากนั้นประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซ์จะลดลง เมื่อเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้น



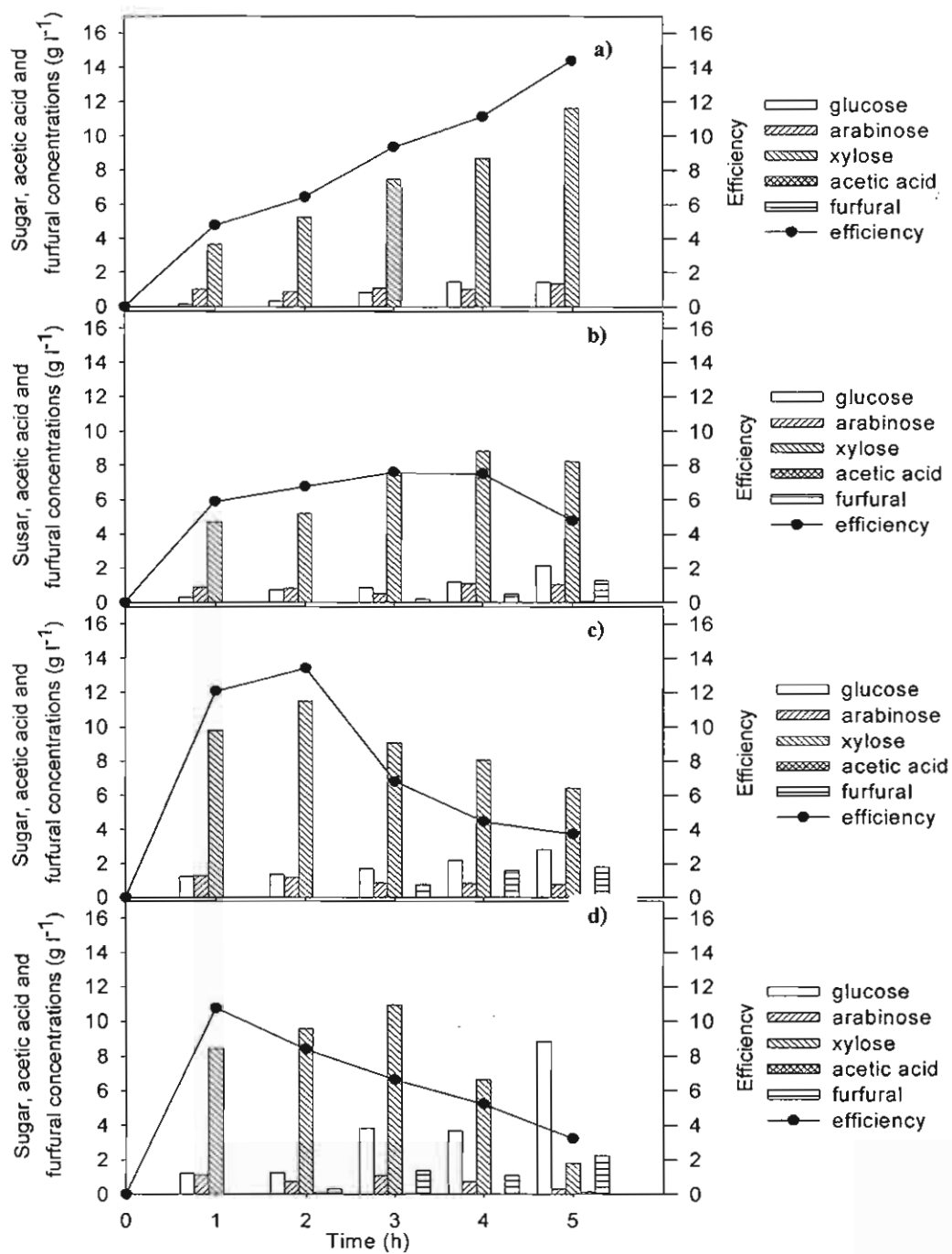
ภาพที่ 56 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบินอส ไซโลส กรดอะซิติก เฟอฟูรอล และประสิทธิภาพ ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 57 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบินอส ไซโลส กรดอะซิติก ฟอฟูรอล และประสิทธิภาพ ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส



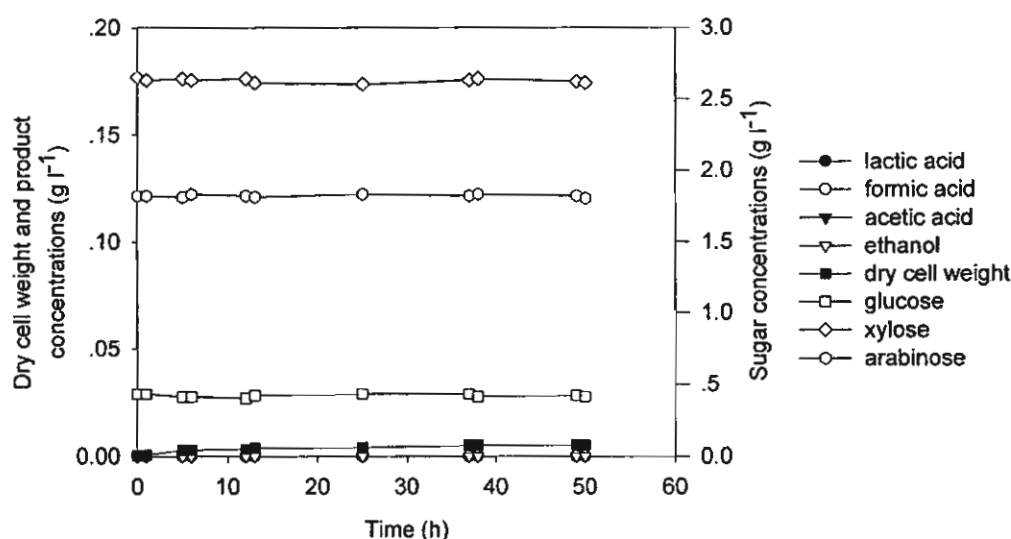
ภาพที่ 58 ปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบินอส ไซโลส กรดอะซิติก เฟอฟูรอล และประสิทธิภาพ ที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ (a) 90, (b) 100, (c) 110 และ (d) 120 องศาเซลเซียส



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

4.9 การศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากขานอ้อย

ประสิทธิภาพที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยสูงสุด (ในข้อ 4.8) คือ การไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง ถูกนำมาปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.0 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 โมลาร์ จากนั้นสารละลายที่ได้ดังกล่าวถูกนำไปใช้ในการศึกษาการผลิตกรดแลกติก ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยใช้ปริมาตรน้ำหมัก 1 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อย เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสารละลายที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน พบว่า *Lc. lactis* IO-1 ไม่สามารถใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในสารละลายได้ และไม่พบการสร้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมัก ในขณะที่พบว่าการเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 มีอัตราการเจริญที่ต่ำ โดยพบน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.01 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 60) ดังนั้นในการศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาทั้งชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เติมลงไปในการเลี้ยง

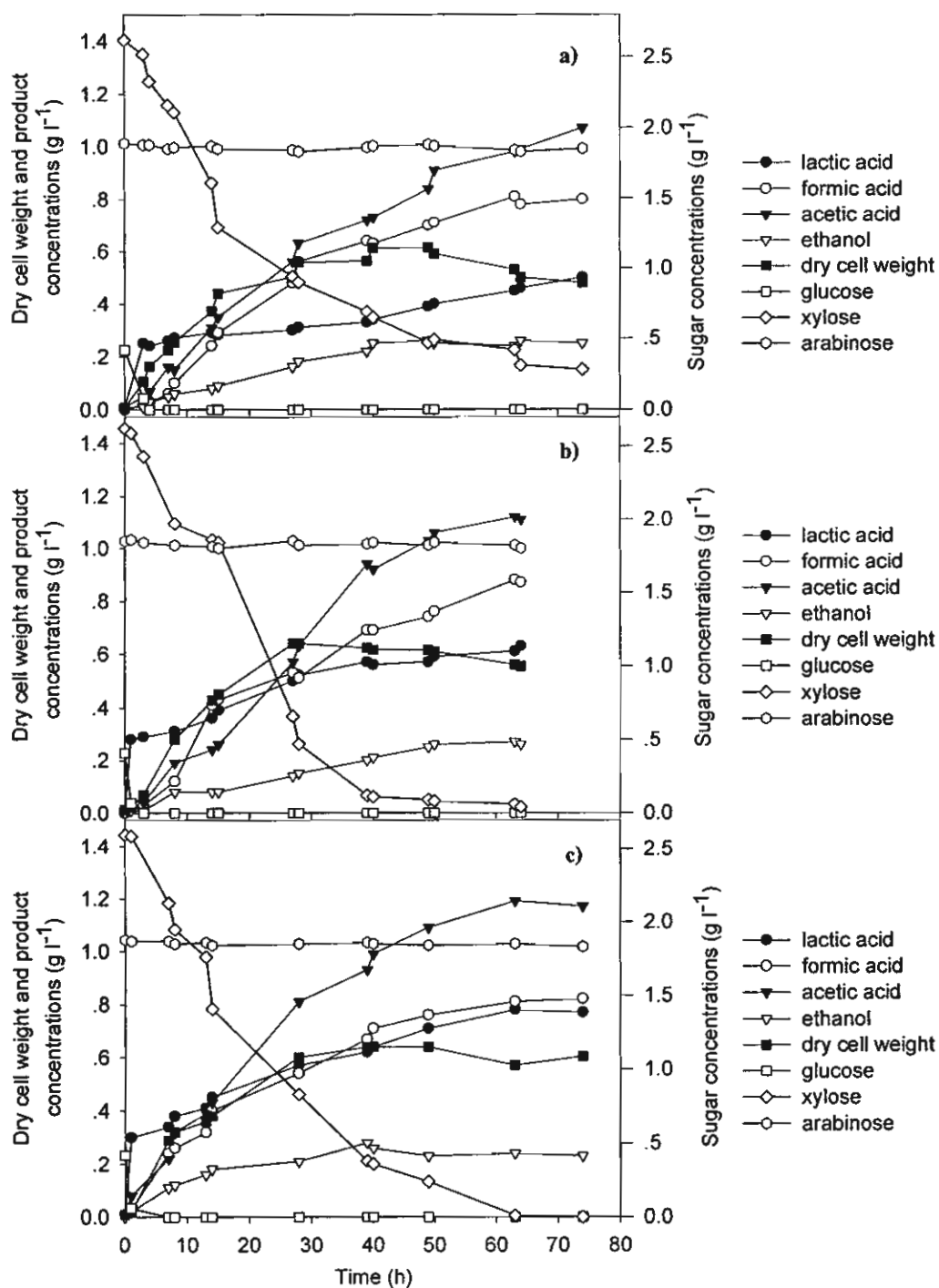


ภาพที่ 60 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน

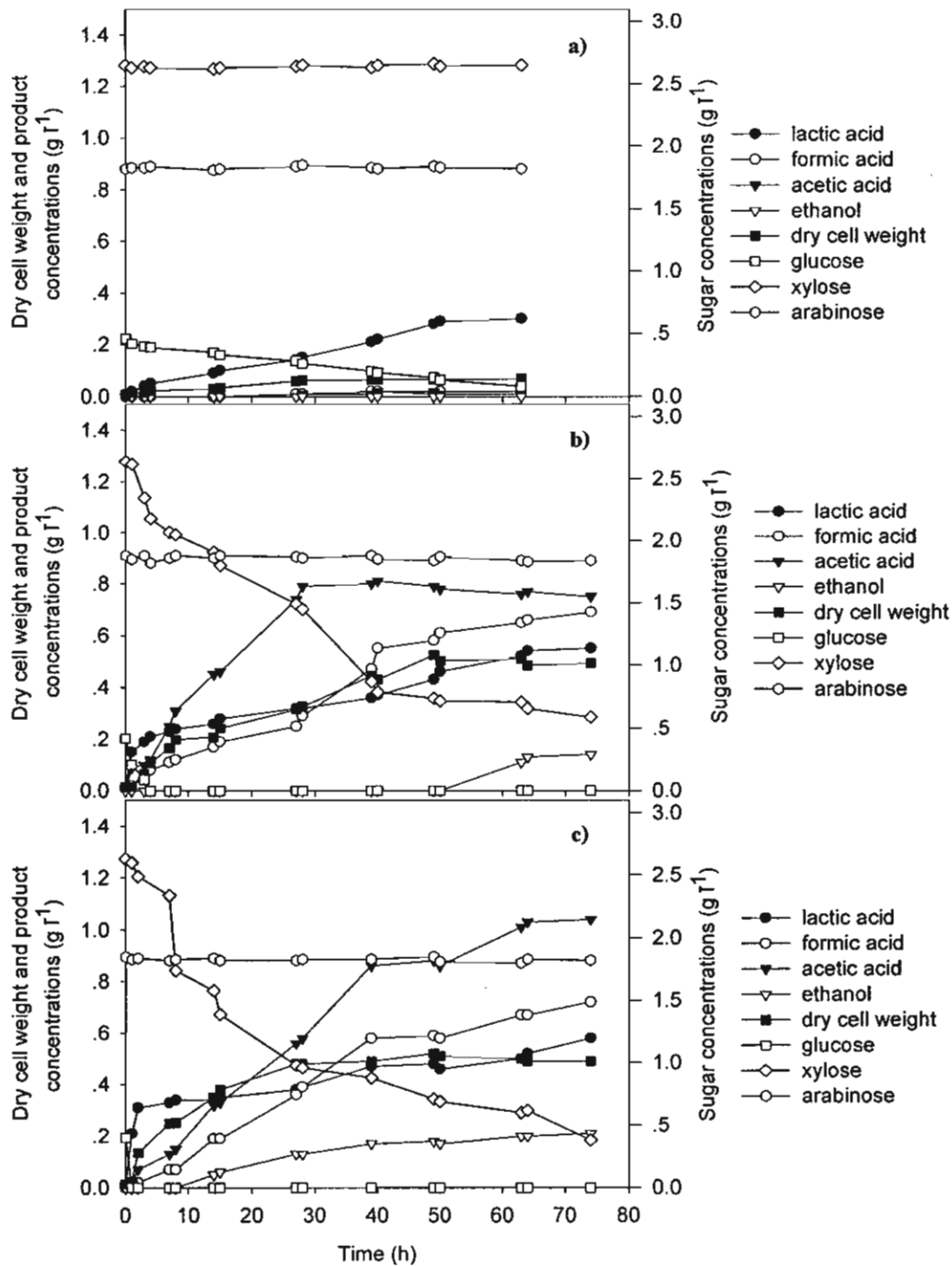
ผลการทดลอง (ภาพที่ 61) เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยที่มีการเติมยีสต์สกัด 3, 5 และ 7 กรัมต่อลิตร พบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส (0.42 กรัมต่อลิตร) ได้หมด ในขณะที่น้ำตาลไซโลส (2.62 กรัมต่อลิตร) ถูกใช้หมดเฉพาะกรณีการเติมยีสต์สกัด 5 และ 7 กรัมต่อลิตร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

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

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



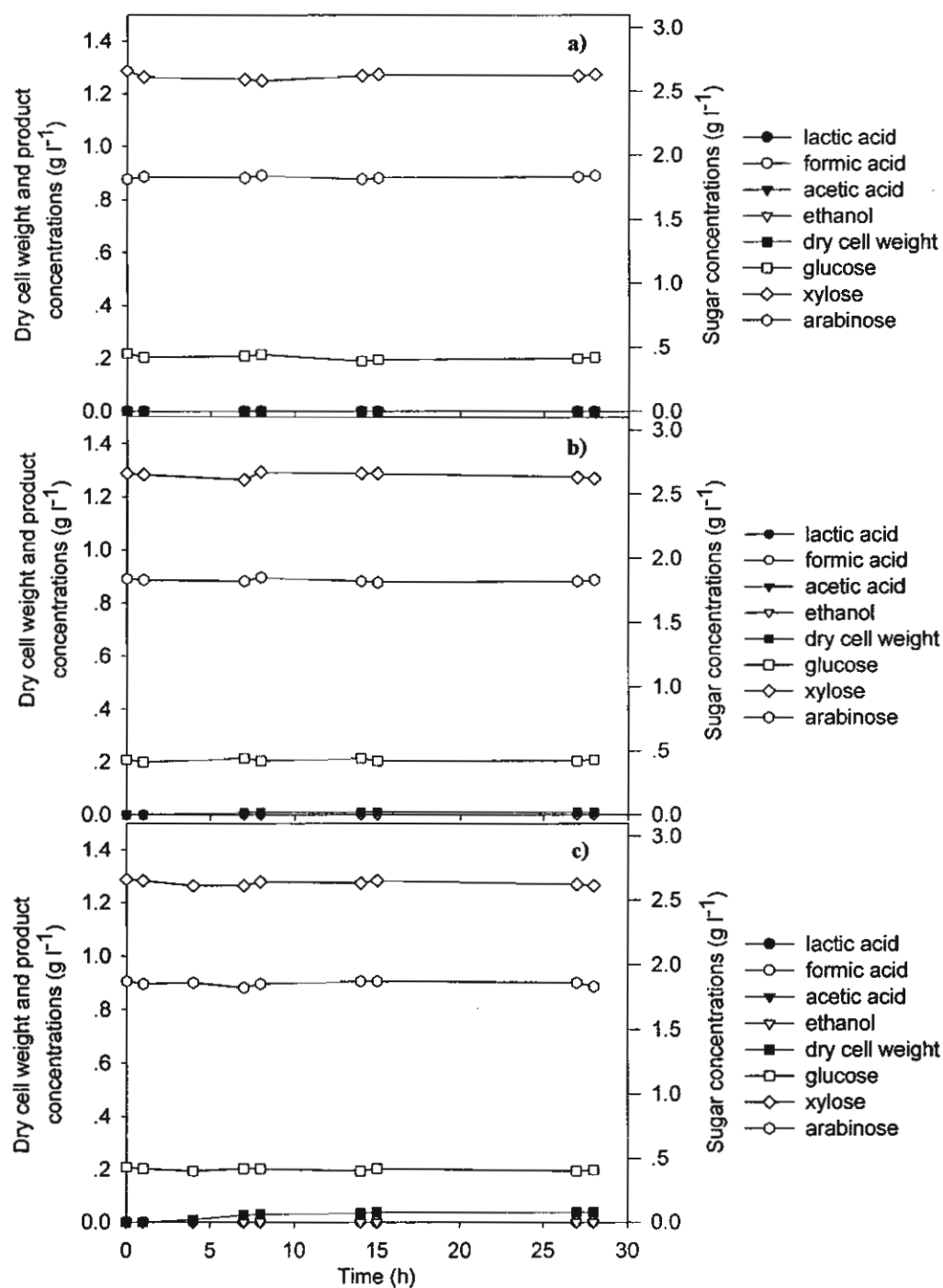
ภาพที่ 61 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยที่มีการเติมยีสต์สกัด (a) 3, (b) 5 และ (c) 7 กรัมต่อลิตร



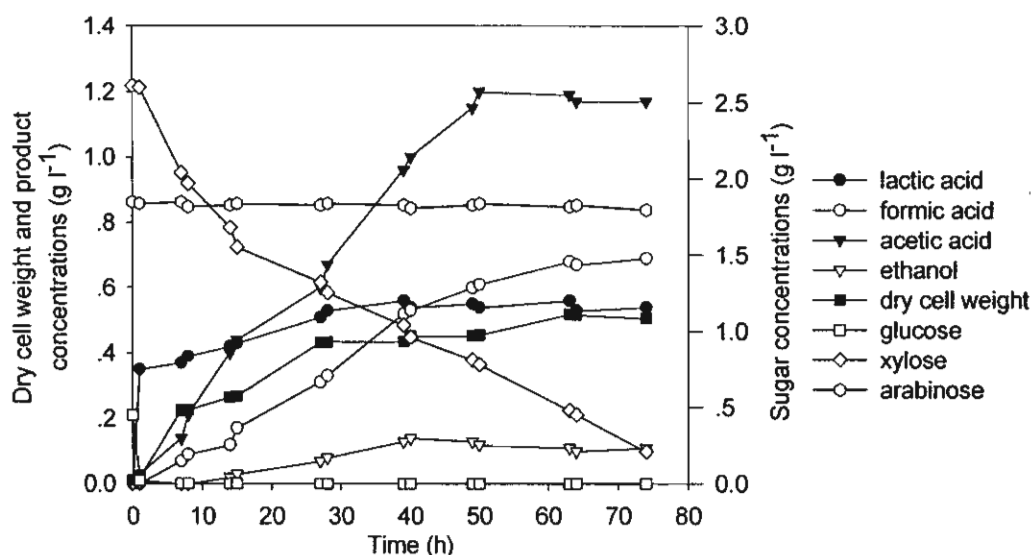
ภาพที่ 62 การเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยที่มีการเติมเพปโติน
(a) 3, (b) 5 และ (c) 7 กรัมต่อลิตร

ผลการทดลอง (ภาพที่ 63) เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 3, 5 และ 7 กรัมต่อลิตร พบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการเจริญที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ การเติมยีสต์สกัดหรือเพปโตน โดยพบน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่า 0.04, 0.01 และ 0.01 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 7, 5 และ 3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า *Lc. lactis* IO-1 ไม่มีการใช้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลอะราบินอส และไม่พบ การสร้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมัก (ภาพที่ 63a-63c)

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



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



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

จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย โดยการแปรผันชนิดและปริมาณของไนโตรเจน พบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสได้ในกรณีที่มีการเติมยีสต์สกัดหรือเพปไตน์ และไม่พบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในสารละลายเมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟต (3, 5 และ 7 กรัมต่อลิตร) ผลการทดลองเมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟตคล้ายกับผลการทดลองในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน โดยพบว่า *Lc. lactis* IO-1 ไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและไซโลสในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการเจริญของ *Lc. lactis* IO-1 เมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟตและในชุดควบคุมมีค่าค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับกรณีการเติมยีสต์สกัดหรือเพปไตน์ ส่วนการเติมยีสต์สกัดเพปไตน์และแอมโมเนียมซัลเฟตอย่างละ 5 กรัมต่อลิตรในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย พบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและไซโลสที่มีอยู่ในสารละลายได้คล้ายกับการเติมยีสต์สกัดหรือเพปไตน์ ยกเว้นกรณีการเติมเพปไตน์ 3 กรัมต่อลิตร ซึ่งพบว่า *Lc. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลกลูโคสอย่างเดียวนั้น นอกจากนี้พบว่าภายใต้ทุกสภาวะที่ทดลอง *Lc. lactis* IO-1 ไม่สามารถใช้น้ำตาลอะราบินโนสที่มีอยู่ในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยได้ และไม่พบการสร้างคาร์บอนไดออกไซด์และ 2,3-บิวเทนไดออลในระหว่างกระบวนการหมัก

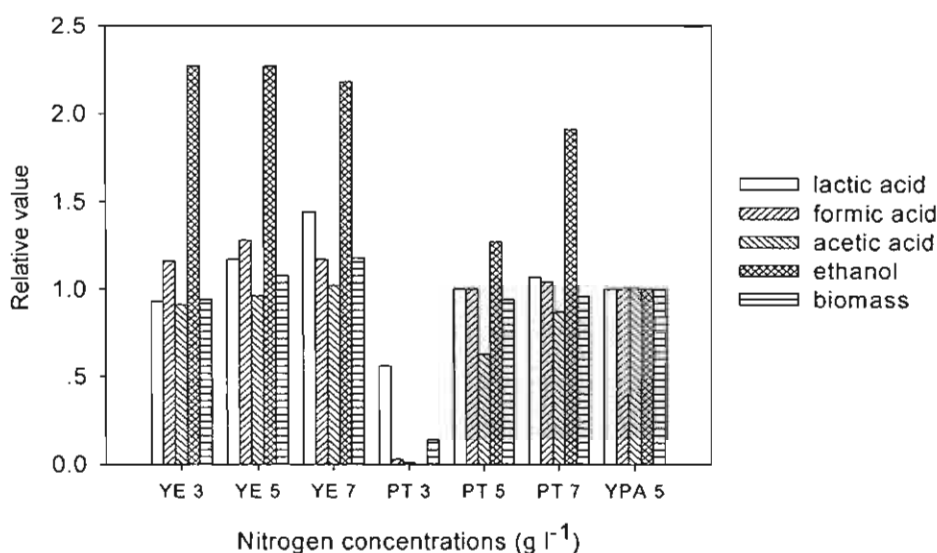
ผลการทดลอง (ตารางที่ 10 และภาพที่ 65) พบว่า ผลได้ของเซลล์มีค่าเพิ่มขึ้นในกรณีที่มีการเติมยีสต์สกัดคือมีค่า 0.17, 0.18 และ 0.20 (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมของน้ำตาลที่ถูกใช้) เมื่อเติมยีสต์สกัด 3, 5 และ 7 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ผลได้ (กรัมต่อกรัมของน้ำตาลที่ถูกใช้) ของกรดแลกติกมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของยีสต์สกัดเพิ่มขึ้น ส่วนผลได้ของกรดฟอริก กรดอะซิติก และเอทานอลมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ในกรณีการเติมเพปไตน์ (5 และ 7 กรัมต่อลิตร) พบว่าผลได้ของเซลล์มีค่าไม่แตกต่างกัน ผลได้ (กรัมต่อกรัมของน้ำตาลที่ถูกใช้)

ของกรดอะซิติก และเอทานอล มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเพปโตนมากขึ้น ส่วนผลได้ของกรดแลกติกมีค่าใกล้เคียงกัน ในขณะที่ผลได้ของกรดฟอร์มิกมีค่าไม่แตกต่างกันระหว่างการเติมเพปโตนม 5 และ 7 กรัมต่อลิตร กรณีการเติมยีสต์สกัด เพปโตนม และแอมโมเนียมซัลเฟต อย่างละ 5 กรัมต่อลิตร พบว่า ผลได้ของเซลล์มีค่า 0.18 กรัมต่อกรัมของน้ำตาลที่ถูกใช้ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกับผลได้ของเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีการเติมยีสต์สกัด (3 และ 5 กรัมต่อลิตร) หรือเพปโตนม (3, 5 และ 7 กรัมต่อลิตร) ส่วนผลได้ของกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล ที่สภาวะดังกล่าว มีค่า 0.19, 0.24, 0.41 และ 0.04 กรัมต่อกรัมของน้ำตาลที่ถูกใช้ ตามลำดับ การเติมแอมโมเนียมซัลเฟต (3, 5 และ 7 กรัมต่อลิตร) พบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการเจริญค่อนข้างต่ำ และไม่สามารถสร้างผลิตภัณฑ์ได้ (ตารางที่ 10 และภาพที่ 65)

ตารางที่ 10 ผลของความเข้มข้นและชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อผลได้ของเซลล์ และผลได้ของผลิตภัณฑ์

แหล่งไนโตรเจน	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	ผลได้ของ เซลล์ (กรัม เซลล์แห้งต่อ กรัมน้ำตาล ผสมที่ใช้)	ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมของน้ำตาลผสมที่ใช้)			
			กรด แลกติก	กรด ฟอร์มิก	กรด อะซิติก	เอทานอล
ยีสต์สกัด	3	0.17	0.18	0.28	0.36	0.07
	5	0.18	0.21	0.30	0.38	0.08
	7	0.20	0.26	0.27	0.39	0.08
เพปโตนม	3	0.18* ¹	0.78* ¹	0.05* ¹	0.03* ¹	0
	5	0.19	0.22	0.28	0.30	0.05
	7	0.18	0.20	0.27	0.38	0.08
แอมโมเนียม ซัลเฟต	3	* ²	0	0	0	0
	5	* ²	0	0	0	0
	7	* ²	0	0	0	0
ยีสต์สกัด+เพป โตนม+แอมโมเนียม ซัลเฟต (อย่างละ 5 กรัมต่อลิตร)	5	0.18	0.19	0.24	0.41	0.04
ชุดควบคุม	0	* ²	0	0	0	0

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



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

relative value คำนวณจากอัตราส่วนระหว่าง

ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ใด ๆ ที่ได้จากการเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในแต่ละสภาวะ (กรัมต่อลิตร)

(ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์นั้น ๆ ที่ได้จากการเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในสภาวะที่มีการเติมยีสต์สกัด

เพป्टอน และแอมโมเนียมซัลเฟต อย่างละ 5 กรัมต่อลิตร)

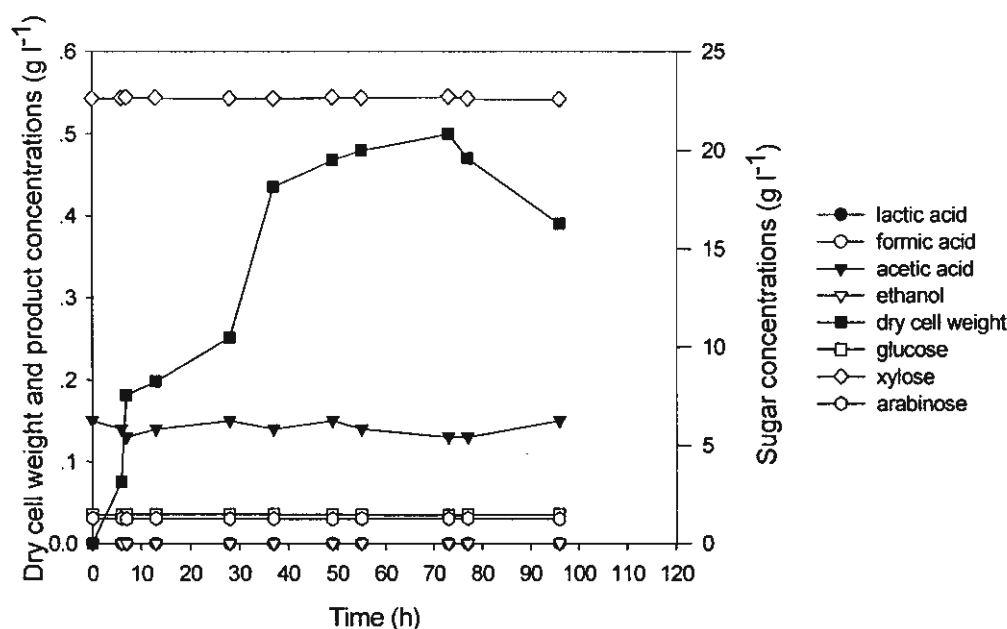
จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ไซโลส และอะราบินอส 22.0, 1.49 และ 1.29 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเติมยีสต์สกัดความเข้มข้น 7 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการเจริญในสภาวะดังกล่าวโดยพบปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งมีค่า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

เมื่อนำสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยไปลดความเป็นพิษ (detoxify) ด้วยสารดูดซับแอมเบอร์ไลต์ (amberlite) พบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ในสารละลายได้อย่างรวดเร็วจากนั้นใช้น้ำตาลไซโลสได้อย่างรวดเร็วเช่นกัน และน้ำตาลไซโลสหมดหลังจากชั่วโมงที่ 39 ที่เวลา 74 ชั่วโมง พบปริมาณกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล มีค่าเท่ากับ 4.81, 5.59, 6.91 และ 3.97 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณน้ำหนักรเซลล์แห้งสูงสุดมีค่าเท่ากับ 1.42 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 67) ในขณะเดียวกันไม่พบการใช้น้ำตาลอะราบินอสโดย *Lc. lactis* IO-1 อย่างไรก็ตามจากการทดลองในสภาวะดังกล่าวพบว่า *Lc. lactis* IO-1 สร้าง

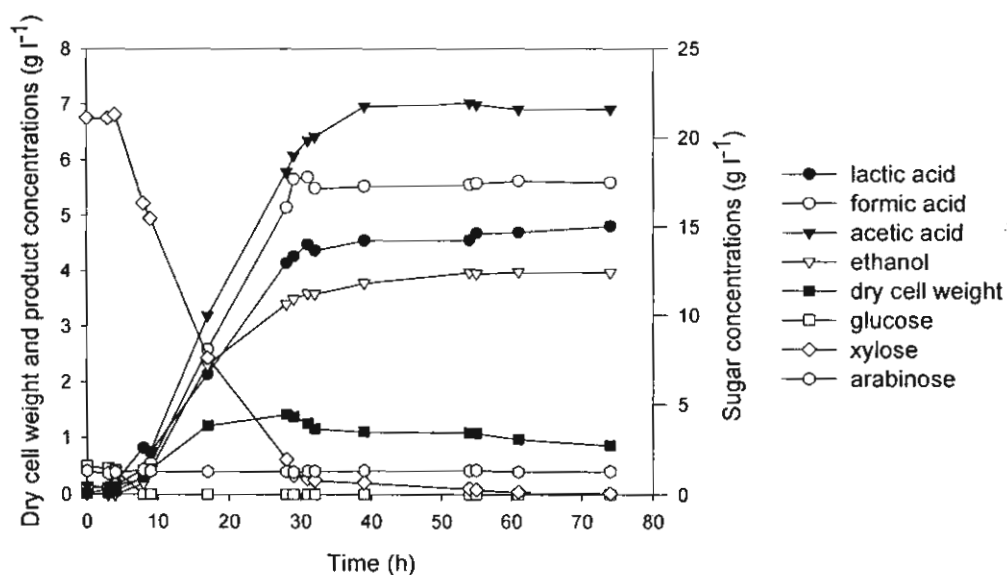
กรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีการเติมน้ำตาลไซโลสที่มีความเข้มข้นสูง (30 และ 50 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งคาร์บอน (ภาพที่ 24 และ 25) ซึ่งในสภาวะดังกล่าวพบว่ากรดแลกติกถูกสร้างเป็นผลิตภัณฑ์หลัก

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

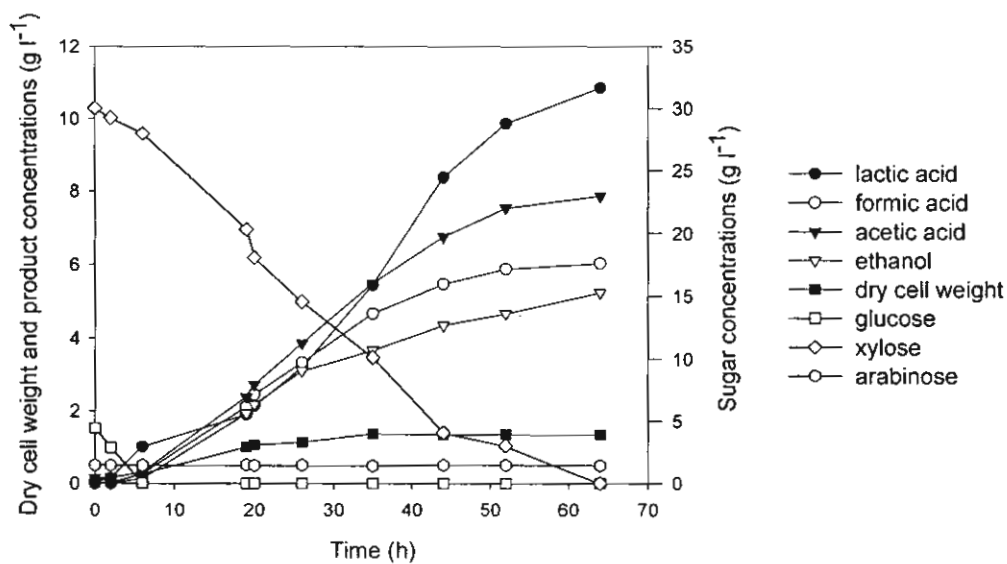
ผลการทดลองที่ได้จากภาพที่ 68 สอดคล้องกับผลการทดลองจากภาพที่ 24a เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 แบบกะในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีไซโลส 30 กรัมต่อลิตร คือได้กรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้สารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อย ปริมาณแลกติกสูงสุดลดลงจาก 12.69 กรัมต่อลิตร เป็น 10.85 กรัมต่อลิตร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



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



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



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

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

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

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

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

จากการศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลกลูโคสพบว่า เปอร์เซ็นต์ carbon recovery มีค่าระหว่าง 87.2–96.5 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลกลูโคสส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้ในการสร้าง

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

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

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

เมื่อพิจารณาผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักพบว่า ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 5 และ 10 กรัมต่อลิตร *Lc. lactis* IO-1 สร้างกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ในขณะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 30 และ 50 กรัมต่อลิตร *Lc. lactis* IO-1 สร้างกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักผ่านกระบวนการหมักแบบ เซโทโรแลกติกแอซิดเฟอร์เมนเทชันหรือมิกแอซิดเฟอร์เมนเทชัน (mixed acid fermentation) (Axelsson, 1993) ในขณะที่การใช้น้ำตาลกลูโคสจะผ่านกระบวนการหมักแบบโฮโมแลกติกแอซิดเฟอร์เมนเทชัน ดังนั้นจากการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสมีผลต่อไพรูเวตเมแทบอลิซึม และการสร้างผลิตภัณฑ์ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Thomas *et al.* (1980) ที่รายงานว่าชนิดและความ

เข้มข้นของสับสเตรมีผลต่อรูปแบบของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักของแบคทีเรีย นอกจากนี้จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลสพบว่า เปอร์เซ็นต์ carbon recovery ที่ได้มีค่าอยู่ระหว่าง 87.9-95.0 แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลไซโลสส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์ เช่นกรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำตาลไซโลสส่วนหนึ่งถูกนำไปใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ได้ตรวจวัดในการทดลองครั้งนี้ เช่นโคอะซิติก อะซิโตน และอะซิลาติไซด์ เป็นต้น (Cocaign-Bousquet et al., 1996; Liu, 2003)

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

จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 5, 10 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) พบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการเจริญแบบ diauxic ในทุกสภาวะของการทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสได้หมดในกรณีที่เลี้ยงในน้ำตาลผสมที่มีความเข้มข้นอย่างละ 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลผสมอย่างละ 30 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้หมดในขณะที่น้ำตาลไซโลสถูกใช้เพียง 25.6 และ 32.87 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสาเหตุที่ทำให้ *Lc. lactis* IO-1 ไม่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้หมดอาจเนื่องมาจากปริมาณกรดแลกติกที่สร้างขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักมีผลยับยั้งการเจริญของ *Lc. lactis* IO-1 หรืออาจเกิดจากปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เติมลงไปในการไม่เพียงพอต่อการเจริญของ *Lc. lactis* IO-1 ภายใต้อาหารดังกล่าว (Ishizaki et al., 1990; Ishizaki et al., 1993; Kenji et al., 1995; Preziosi-Belloy et al., 1997; Kanagachandran et al., 1997) หรือความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสอาจมีผลยับยั้งการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ภายใต้อาหารดังกล่าว เมื่อพิจารณาการใช้ น้ำตาลกลูโคสในน้ำตาลผสม พบว่า *Lc. lactis* IO-1 ผลิตกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักผ่านกระบวนการหมักแบบโฮโมแลกติกแอซิดเฟอร์เมนเทชัน ในขณะที่การใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสมจะผ่านกระบวนการหมักแบบเฮเทอโรแลกติกแอซิดเฟอร์เมนเทชัน หรือมิกซ์แอซิดเฟอร์เมนเทชัน เช่นเดียวกับการใช้น้ำตาลกลูโคสหรือไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงอย่างเดียว ตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลได้ของเซลล์พบว่าผลได้ของเซลล์มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลผสมมีค่าเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามผลได้ของเซลล์ในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลกลูโคสมีค่าเท่ากับผลได้ของเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ น้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของ *Lc. lactis* IO-1 มีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลผสมมีค่าเพิ่มขึ้น และเมื่อพิจารณาอัตราการเจริญจำเพาะในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลกลูโคสพบว่า มีค่าใกล้เคียงกันกับอัตราการเจริญจำเพาะเมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียวและมีค่าสูงกว่าอัตราการเจริญจำเพาะในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลไซโลส ซึ่งสาเหตุดังกล่าวอาจเกิดจากปริมาณกรดแลกติกที่ถูกสร้างขึ้นในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลกลูโคสมีผลไปยับยั้งการใช้น้ำตาลไซโลสของเซลล์ ทำให้ผลได้ของเซลล์และอัตราการเจริญจำเพาะในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลไซโลสมีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ น้ำตาลไซโลสเพียงอย่างเดียว เมื่อพิจารณาผลได้ของผลิตภัณฑ์พบว่า ผลได้ของผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่คือกรดแลกติก แม้ว่าในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลไซโลสภายใต้อาหารที่มีน้ำตาลผสมอย่างละ 5 และ 10 กรัมต่อลิตร จะมีการสร้างกรดอะซิติกเป็น

ผลิตภัณฑ์หลักแต่ปริมาณกรดอะซิติกที่ถูกสร้างขึ้นภายใต้สภาวะดังกล่าวมีค่าต่ำกว่าปริมาณกรดแลคติกที่ถูกสร้างขึ้นในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลกลูโคสภายในน้ำตาลผสม

5.4 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 2.5, 15 และ 25 กรัมต่อลิตร)

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

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

อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลผสมที่มีความเข้มข้น 30 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าที่สภาวะดังกล่าว เหลือน้ำตาลไซโลส 4.4 และ 17.13 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ น้ำตาลกลูโคสที่มากที่สุดในน้ำตาลผสมที่ไม่มีผลยับยั้งการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 มีค่าเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร นอกเหนือจากกรดแลคติกที่ถูกสร้างขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักจะมีผลยับยั้งการใช้น้ำตาล ไซโลสแล้ว กลูโคสซึ่งเป็นตัวยับยั้ง (repressor) ยังมีผลต่อการกด (repress) การใช้น้ำตาลไซโลส ส่งผลให้ *Lc. lactis* IO-1 ไม่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้หมดในระหว่างกระบวนการหมัก จากการรายงานของ Kanagachandran et al. (1997) ที่ได้ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ภายใตสภาวะการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง พบว่าน้ำตาลกลูโคสมีผลไปกีดการใช้น้ำตาลไซโลสในระหว่าง กระบวนการหมัก นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำตาลกลูโคสมีผลไปกีดการทำงานของเอนไซม์ไซโลสไอโซเมอเรส ในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ซึ่งพบว่าแอกติวิตีของเอนไซม์ดังกล่าวของ *Lc. lactis* IO-1 ที่ เลี้ยงในน้ำตาลไซโลสอย่างเดียวมีค่า 1.3 ไมโครโมลเอ็นเอคิเอสต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน และแอกติวิตีของ เอนไซม์มีค่าลดลงเหลือ 0.7 ไมโครโมลเอ็นเอคิเอสต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเลี้ยง *Lc. lactis* IO-1 ในน้ำตาล ผสมระหว่างกลูโคสและไซโลส ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในวิธีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1

5.5 การศึกษาวิธีการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตกรดแลคติกโดย *Lc. lactis* IO-1

แลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลไซโลสผ่านวิถีฟอสโฟคีโตเลส และมีการสร้างกรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมัก (Kandler, 1983; Chaillou et al., 1998 อ้างถึง ใน Garde et al., 2002) Fraenkel (1987) และ Axelsson (1993) รายงานว่า การใช้น้ำตาลไซโลสของแลคติกแอซิด แบคทีเรียจะผ่านวิถีเพนโตสฟอสเฟต นอกจากนี้ Erlandson et al. (2000) รายงานว่าไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่ถูก สร้างขึ้นจากน้ำตาลไซโลสใน *Lc. lactis* จะถูกเมแทบอลิซึมผ่านทั้งในวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคี โตเลส ซึ่งไซลูโลส-5-ฟอสเฟตเป็นสารตัวกลางสำคัญที่พบได้ในทั้ง 2 วิถี (ภาพที่ 40 และ 41) นอกจากนี้ยังพบว่า ไพรูเวตที่ถูกสร้างขึ้นทั้งในวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลส จะถูกนำไปใช้ในการสร้างแลคเตท ฟอร์ เมต อะซิเตต และเอทานอล ดังนั้นจากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่าเมแทบอลิซึมของน้ำตาลไซโลสสามารถเกิดขึ้น ได้ทั้งในวิถีเพนโตสฟอสเฟตหรือวิถีฟอสโฟคีโตเลส หรือสามารถเกิดขึ้นได้พร้อมกันทั้ง 2 วิถี ในขณะเดียวกัน การใช้น้ำตาลกลูโคสของโฮโมแลคติกแอซิดแบคทีเรียจะผ่านวิถีไกลโคไลซิส ส่วนเฮเทอโรแลคติกแอซิดแบค ทีเรียจะใช้น้ำตาลกลูโคสผ่านวิถีฟอสโฟคีโตเลส (Axelsson, 1993) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะ ศึกษาวิถีของการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1

เอนไซม์ทรานส์คีโตเลสและเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลสเป็นเอนไซม์หลักที่สำคัญ ในเมแทบอลิซึมของ การใช้น้ำตาลไซโลสในวิถีเพนโตสฟอสเฟต ส่วนเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลสเป็นเอนไซม์หลักที่สำคัญที่พบเฉพาะ ในวิถีฟอสโฟคีโตเลสเท่านั้น ดังนั้นการตรวจพบเอนไซม์ดังกล่าวข้างต้นในเซลล์ของ *Lc. lactis* IO-1 จะทำให้ ทราบถึงวิถีของการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ไม่สามารถตรวจหาแอกติวิตี ของเอนไซม์ทรานส์คีโตเลสและเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลสได้ เนื่องจากไม่มีไซลูโลส-5-ฟอสเฟตซึ่งเป็นสับสเตรค ที่สำคัญในการตรวจหาเอนไซม์ดังกล่าว ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงตรวจหาเฉพาะเอนไซม์ทรานส์อัลโดเลสและฟรุก

โคส-1,6-ไดฟอสเฟต ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่สำคัญในวิถีเพนโทสฟอสเฟต ในสารละลายเซลล์สกัด (free cell extract) ของ *Lc. lactis* IO-1 ที่เก็บในช่วงกลางของระยะที่มีการเจริญสูงสุด (mid-log phase) ซึ่งจากผลการทดลอง พบฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟตในทุกสภาวะของการศึกษา และความเข้มข้นของฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟตมีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส ในขณะที่จากการทดลองไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์คีโตเลสในทุกสภาวะของการศึกษา อาจเป็นเพราะวิธีที่ใช้ในการตรวจหาเอนไซม์ดังกล่าวนี้ยังไม่ไวเพียงพอจากการศึกษาของ Laopaiboon, (2001) ได้รายงานว่าสามารถตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ทรานส์คีโตเลสและฟอสโฟคีโตเลสในสารละลายเซลล์สกัดของ *Lc. lactis* IO-1 ที่เลี้ยงในอาหารสูตรพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นจากข้อมูลข้างต้นจึงสรุปได้ว่าวิถีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 จะผ่านทั้งวิถีเพนโทสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลส

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

จากการวิเคราะห์เมแทบอลิซึมฟลักซ์ในการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลไซโลสที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ โดยอาศัยข้อมูลจากการวัดปริมาณน้ำตาลไซโลสที่ให้และผลิตภัณฑ์ที่ถูกสร้างขึ้น (กรดแลกติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์) ในระหว่างกระบวนการหมักในหน่วยของโมลผลิตภัณฑ์ต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้ จากการศึกษการผลิตกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลส 5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าคาร์บอนไดออกไซด์ที่ตรวจพบมีปริมาณน้อย (2.7×10^{-6} ถึง 4×10^{-4} โมลคาร์บอนไดออกไซด์ต่อโมลของน้ำตาลไซโลสที่ถูกใช้) ดังนั้นในการวิเคราะห์เมแทบอลิซึมฟลักซ์จึงไม่นำโมลคาร์บอนไดออกไซด์มาใช้ในการคำนวณเมแทบอลิซึมฟลักซ์

จากการวิเคราะห์เมแทบอลิซึมฟลักซ์ในการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลไซโลสโดยผ่านวิถีฟอสโฟคีโตเลสและวิถีเพนโทสฟอสเฟต ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร พบว่าไซโลส 1 โมล ถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลสและไซลูโลส-5-ฟอสเฟต จากนั้นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต 0.42 และ 0.58 โมล เข้าสู่วิถีเพนโทสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟคีโตเลส ตามลำดับ ภายใต้สภาวะนี้มีการสร้างอะซิเตตเป็นผลิตภัณฑ์หลัก (1.18 โมล) โดยอะซิเตต 0.58 และ 0.60 โมลถูกสร้างขึ้นก่อนและหลังไพรูเวตเมแทบอลิซึม ตามลำดับ ส่วนแลกเตท ฟอร์มเมต และเอทานอล ที่ถูกสร้างขึ้นจากวิถีไพรูเวตมีค่า 0.21, 1.0 และ 0.40 โมล ตามลำดับ และไพรูเวต 0.07 โมล ถูกเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่นในวิถีไพรูเวตที่ไม่ได้ตรวจวัดในการทดลองเช่น ไดอะซิติก อะซิตาลดีไฮด์ และอะซิโตอิน (Cocaing-Bousquet et al., 1996) เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร พบว่าเมแทบอลิซึมฟลักซ์ของน้ำตาลไซโลสผ่านวิถีเพนโทสฟอสเฟตมากกว่าวิถีฟอสโฟคีโตเลส 22 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ถูกสร้างขึ้น โดยพบว่าภายใต้สภาวะนี้มีการสร้างอะซิเตตเป็นผลิตภัณฑ์หลัก (0.83 โมล) เช่นเดียวกับสภาวะที่มีน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร แต่ปริมาณอะซิเตตที่สร้างขึ้นมีค่าน้อยกว่า โดยพบว่าอะซิเตต 0.39 และ 0.44 โมล ถูกสร้างขึ้นก่อนและหลังไพรูเวตเมแทบอลิซึม แลกเตท ฟอร์มเมต และเอทานอล ที่ถูกสร้างขึ้นจากวิถีไพรูเวต มีค่า 0.48, 0.81 และ 0.37 โมล ตามลำดับ ในขณะที่ไพรูเวต 0.12 โมล ถูกเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่นในวิถีไพรูเวตที่ไม่ได้ตรวจวัดในการทดลอง อย่างไรก็ตามภายใต้สภาวะนี้จะเห็นว่าปริมาณแลกเตทมีค่าเพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณอะซิเตต ฟอร์มเมต และเอทา

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

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

เนื่องจากการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 ผ่านทั้งวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟทีโคเลสพร้อมกัน ซึ่งทั้ง 2 วิธียสามารถเปลี่ยนน้ำตาลไซโลสเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต โดยการทำงานของเอนไซม์ดี-ไซลูโลโคเนส นอกจากนี้ทั้ง 2 วิธียังสามารถสร้างไพรูเวตซึ่งเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในการนำไปสร้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมัก ดังนั้นการวิเคราะห์พริ้นซิเพิลโนคของไซลูโลส-5-ฟอสเฟตและไพรูเวตจึงมีความสำคัญเพราะจะทำให้ทราบถึงปริมาณไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่ถูกเมแทบอลิซึมผ่านวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟทีโคเลส และปริมาณไพรูเวตที่ถูกนำไปใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก

จากการวิเคราะห์พริ้นซิเพิลโนคของไซลูโลส-5-ฟอสเฟต พบว่าภายใต้สภาวะที่มีน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร ไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่ถูกสร้างขึ้นจะเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟทีโคเลส 42 และ 52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งภายใต้สภาวะดังกล่าวไซลูโลส-5-จะเข้าสู่วิถีฟอสโฟทีโคเลสมากกว่าวิถีเพนโตส

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

จากการวิเคราะห์พรีนิซิเพิลโนคของไพรูเวต พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ไพรูเวตที่ถูกสร้างขึ้นส่วนใหญ่จะถูกนำไปใช้ในการสร้างฟอร์เมตและอะซิติก-โคเอ 78 และ 57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ไพรูเวตอีกส่วนหนึ่งถูกนำไปใช้ในการสร้างแลคเตท 17 และ 34 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไพรูเวตอีก 5 และ 9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ถูกเปลี่ยนเป็นสารที่ไม่ได้ตรวจวัดในวิถีไพรูเวตในการทดลองนี้ จากการตรวจพบฟอร์เมตและแลคเตทภายใต้สภาวะดังกล่าว แสดงให้เห็นว่ามีการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวตฟอร์เมตไลเอส (pyruvateformate lyase; PFL) และแลคเตทดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase; LDH) เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้นเป็น 30 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่า ไพรูเวตส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้ในการสร้างแลคเตท 52 และ 58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ไพรูเวตอีกส่วนหนึ่งถูกนำไปใช้ในการสร้างฟอร์เมตกับอะซิติก-โคเอ 38 และ 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และไพรูเวตอีก 10 และ 14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ถูกเปลี่ยนเป็นสารที่ไม่ได้ตรวจวัดในวิถีไพรูเวตในการทดลองนี้ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่สภาวะดังกล่าวมีการทำงานของเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนสมากกว่าเอนไซม์ไพรูเวตฟอร์เมตไลเอส เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่มีน้ำตาลไซโลส 5 และ 10 กรัมต่อลิตร

อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่าฟอร์เมตกับอะซิติก-โคเอ ที่ถูกสร้างขึ้นจากไพรูเวตค่าลดลง ในขณะที่ปริมาณแลคเตทมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ไพรูเวตฟอร์เมตไลเอส และเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนส ในวิถีไพรูเวตของ *Lc. lactis* IO-1 นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณสารที่ไม่ได้ตรวจวัดในวิถีไพรูเวตของการทดลองมีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสที่เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าน้ำตาลไซโลสถูกนำไปใช้ในการสร้างผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ได้ตรวจวัดในการทดลองนี้ เช่น ไดอะซิติก อะซิติก-โคเอ และอะซิโอิน เป็นต้น (Cocaing-Bousquet et al., 1996)

5.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ขานอ้อย

การไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดโดยตรงนอกจากจะได้ปริมาณน้ำตาลต่ำแล้ว ยังได้ผลพลอยได้อื่น ๆ เช่น กรดอะซิติก กรดลิวลินิก สารประกอบฟีนอล ฟูราน และอนุพันธ์ (เช่น เฟอฟูรอล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟูรอล) (Bonn et al., 1985; Martin et al., 2002) ซึ่งสารเหล่านี้มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมัก (Watson et al., 1984; Larsson et al., 1999; Rodriguez-Chong et al., 2004) จากผลการทดลองของ Dominquez et al., 1997 พบว่าการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร) สามารถสกัดลิกนินได้ในปริมาณสูง จากนั้นจึงนำขานอ้อยไปไฮโดรไลซ์ต่อด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและ/หรือกรดซัลฟูริก พบว่าจะได้น้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่มีปริมาณสูง

(ประมาณ 130 กรัมต่อลิตร) เนื่องจากสารละลายต่างจะทำให้ลิกนินซึ่งเป็นโครงสร้างที่ทำให้ผนังเซลล์ของพืชมีความแข็งแรง เกิดการยืดหยุ่นและพองตัว ทำให้ลิกนินสามารถละลายในน้ำได้มากขึ้น และเมื่อนำไปไฮโดรไลซ์ด้วยกรดจะทำให้ได้น้ำตาลในปริมาณสูง จากการทดลองของ Dominquez et al. 1997 ยังพบว่าการไฮโดรไลซ์ซังข้าวโพดด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ก่อนที่จะนำไปไฮโดรไลซ์ด้วยกรด นอกจากจะทำให้ได้น้ำตาลในปริมาณสูงแล้วยังพบว่าสามารถลดปริมาณสารยับยั้ง (inhibitors) ลงได้อีกด้วย ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Cao et al. 1996 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์มาไฮโดรไลซ์ขานอ้อยก่อน จากนั้นจึงนำขานอ้อยที่ได้ไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรด ไฮโดรคลอริกและ/หรือกรดซัลฟิวริกที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

5.8.1 การไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (8, 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร)

จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (8, 10 และ 12 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 24 ชั่วโมง พบว่าการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถสกัดลิกนินออกจากขานอ้อยได้มากที่สุดคือ 322.19 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 8 และ 12 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถสกัดลิกนินออกได้ 303.39 และ 277.46 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การไฮโดรไลซ์ขานอ้อยในชุดควบคุมโดยใช้น้ำกลั่นสามารถสกัดลิกนินได้เพียง 38 มิลลิกรัมต่อลิตร การใช้แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ในการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยจะมีผลทำให้โครงสร้างของลิกนินมีความยืดหยุ่นและพองตัว ทำให้ลิกนินสามารถละลายในน้ำได้ดีขึ้น (Martin et al., 2002; Dominquez et al., 2003) ดังนั้นการสกัดลิกนินออกจากขานอ้อยก่อนจึงเป็นวิธีหนึ่งที่จะทำให้การไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Dominquez et al., 1997)

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

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

เฟอฟูรอลเมื่อไฮโดรไลซ์ซันอ้อยที่อุณหภูมิ 90 (ที่ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก 0.5, 2, 3 และ 5 เปอร์เซ็นต์) และ 100 องศาเซลเซียส (ที่ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก 0.5 เปอร์เซ็นต์) นอกเหนือจากกรณีดังกล่าวจะพบเฟอฟูรอล โดยเฉพาะกรณีการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ที่เวลา 5 ชั่วโมง) ซึ่งพบว่าจะได้เฟอฟูรอลสูงสุดเท่ากับ 3.13 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของกรดและอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อปริมาณเฟอฟูรอล ปริมาณเฟอฟูรอลมีค่าเพิ่มขึ้นในขณะที่ปริมาณน้ำตาลไซโลสมีค่าลดลง ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากน้ำตาลไซโลสส่วนหนึ่งถูกเปลี่ยนไปเป็นเฟอฟูรอลในระหว่างกระบวนการไฮโดรไลซิส (Fengel & Wegener, 1984; Bustos et al., 2002) เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลกลูโคส พบว่าน้ำตาลกลูโคสมีค่าเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์ โดยเฉพาะกรณีการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส พบว่าจะได้น้ำตาลกลูโคสสูงสุดเท่ากับ 10.04 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณน้ำตาลอะราบินโนสที่ได้มีค่าค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง ยกเว้นกรณีการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 110 และ 120 องศาเซลเซียส) พบว่าปริมาณน้ำตาลอะราบินโนสมีค่าลดลงอย่างชัดเจน เมื่อเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากน้ำตาลอะราบินโนสส่วนหนึ่งถูกเปลี่ยนเป็นเฟอฟูรอล (Fengel & Wegener, 1984) อย่างไรก็ตามปริมาณน้ำตาลอะราบินโนสที่ได้มีค่าค่อนข้างต่ำคืออยู่ในช่วง 0.11-1.48 กรัมต่อลิตร ดังนั้นปริมาณเฟอฟูรอลที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จึงน่าจะมาจากน้ำตาลไซโลส ส่วนปริมาณกรดอะซิติกที่ได้จากการไฮโดรไลซ์มีค่าค่อนข้างต่ำ (0.02-0.22 กรัมต่อลิตร) ผลการทดลองที่ได้ดังกล่าวคล้ายกับการศึกษาของ Dominguez et al. (1997) โดยพบว่าเมื่อไฮโดรไลซ์ซังข้าวโพดที่ผ่านการสกัดเอาลิกนินออกโดยใช้สารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (10 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร) ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (1 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส) จะได้น้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก (71.9 กรัมต่อลิตร) นอกจากนี้ยังพบปริมาณน้ำตาลกลูโคส อะราบินโนส กรดอะซิติก และเฟอฟูรอล เท่ากับ 6.7, 5.3, 1.82 และ 0.74 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และพบว่าเมื่อไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้นต่ำ (1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส) มีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลไซโลสและกลูโคสเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์ ส่วนน้ำตาลอะราบินโนสและกรดอะซิติกที่ได้มีค่าเพียงเล็กน้อยตลอดการทดลอง และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของ Rodriguez-Chong et al. (2004) พบว่าเมื่อไฮโดรไลซ์ซันอ้อยด้วยกรดไนตริก (6 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส) จะได้น้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์หลักซึ่งมีค่าสูงสุดเท่ากับ 21 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 180 นาที นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณน้ำตาลไซโลสจะลดลงเมื่ออุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้น

เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของการไฮโดรไลซ์ซันอ้อยพบว่า การไฮโดรไลซ์ซันอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ที่เวลา 5 ชั่วโมง จะให้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์สูงสุดเท่ากับ 15.95 (ได้น้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบินโนส และกรดอะซิติก เท่ากับ 2.66, 13.09, 1.22 และ 0.06 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) เนื่องจากผลรวมของน้ำตาลที่ได้จากสภาวะดังกล่าวมีค่าสูงในขณะที่ปริมาณสารยับยั้งที่ได้มีปริมาณต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่าภายใต้สภาวะการไฮโดรไลซ์ซันอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5 (ที่อุณหภูมิ 90 และ 100 องศาเซลเซียส), 2 (ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส) และ 3 เปอร์เซ็นต์ (ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส) จะให้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์ซันอ้อยเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์เพิ่มขึ้น นอกเหนือจากสภาวะดังกล่าวข้างต้นพบว่า ประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซ์ซันอ้อยจะเพิ่มขึ้นในช่วงแรก

ของเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์ จากนั้นประสิทธิภาพในการไฮโดรไลซ์จะลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์เพิ่ม ขึ้น เนื่องจากปริมาณสารยับยั้ง (กรดอะซิติกและเฟอฟูรอล) ที่สภาวะดังกล่าวมีค่าเพิ่มขึ้น

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

การไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกจะได้น้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก เช่นเดียวกับการใช้กรดไฮโดรคลอริก โดยพบปริมาณน้ำตาลไซโลสสูงสุดเท่ากับ 12.64 กรัมต่อลิตร เมื่อไฮโดรไลซ์ด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ที่เวลา 4 ชั่วโมง) ซึ่งน้ำตาลไซโลสที่ได้นี้มีค่าน้อยกว่าน้ำตาลไซโลสสูงสุดที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก (15.16 กรัมต่อลิตร) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ชนิดและความเข้มข้นของกรดมีผลต่อปริมาณน้ำตาลไซโลสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลกลูโคสพบว่าค่าเพิ่มขึ้นตามเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์ ซึ่งมีแนวโน้มคล้ายกับการใช้กรดไฮโดรคลอริก และเมื่อไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ที่เวลา 5 ชั่วโมง พบว่า จะได้น้ำตาลกลูโคสสูงสุดเท่ากับ 8.85 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้มีค่าน้อยกว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงสุดที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก (10.04 กรัมต่อลิตร) ส่วนปริมาณน้ำตาลอะราบินโนสที่ได้มีค่าอยู่ระหว่าง 0.30-1.42 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาล อะราบินโนสที่ได้จากการใช้กรดไฮโดรคลอริก (0.11-1.48 กรัมต่อลิตร) ในขณะที่ปริมาณกรดอะซิติกมีค่าอยู่ระหว่าง 0.02-0.14 กรัมต่อลิตร โดยพบกรดอะซิติกในกรณีการใช้กรดซัลฟูริกไฮโดรไลซ์ที่อุณหภูมิ 90 (ที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์), 100 (ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์), 110 (ที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์) และ 120 องศาเซลเซียส (ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 5 เปอร์เซ็นต์) จากผลการทดลองที่ได้พบกรดอะซิติกมีค่าค่อนข้างต่ำเช่นเดียวกับการใช้กรดไฮโดรคลอริกไฮโดรไลซ์ (0.02-0.22 กรัมต่อลิตร) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าชนิด ความเข้มข้นของกรด อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์มีผลต่อปริมาณกรดอะซิติกน้อยมาก นอกจากนี้พบปริมาณเฟอฟูรอลที่ได้มีค่าอยู่ระหว่าง 0.16-2.24 กรัมต่อลิตร เมื่อไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ที่เวลา 5 ชั่วโมง พบว่าจะได้ปริมาณเฟอฟูรอลสูงสุด (2.24 กรัมต่อลิตร) ซึ่งเป็นสภาวะเดียวกับที่พบเฟอฟูรอลสูงสุด (3.13 กรัมต่อลิตร) เมื่อไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณเฟอฟูรอลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของกรดและอุณหภูมิเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกพบว่า ประสิทธิภาพสูงสุดมีค่าเท่ากับ 15.26 เมื่อไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ที่เวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งประสิทธิภาพสูงสุดที่ได้มีค่าน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กรดไฮโดรคลอริก (15.95) ในการไฮโดรไลซ์ ผลการทดลองดังกล่าวคล้ายกับการศึกษาของ Aguilar et al. (2002) ที่ศึกษาการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริก โดยพบว่าการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดซัลฟูริกที่ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) อุณหภูมิ 122 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ ที่สภาวะดังกล่าวพบปริมาณน้ำตาลไซโลส น้ำตาลกลูโคส กรดอะซิติก และเฟอฟูรอล เท่ากับ 21.6, 3, 3.65 และ 0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำตาลไซโลสส่วนหนึ่งถูกเปลี่ยนเป็นเฟอฟูรอล ในขณะที่

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

น้ำตาลไซโลสที่เป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก หรือกรดซัลฟูริกมาจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของไซแลนที่ต่ออยู่กับเฮมิเซลลูโลส ส่วนน้ำตาลกลูโคสได้มาจากการสลายตัวของทั้งเฮมิเซลลูโลสและเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบมากในขานอ้อย (Dominquez et al., 1997; Aguilar et al., 2002; Rodriquez-Chong et al., 2004) แต่เมื่อพิจารณาโครงสร้างพบว่าเซลลูโลสมีความแข็งแรงกว่าเฮมิเซลลูโลส เพราะภายในโครงสร้างของเซลลูโลสมีการจัดเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบ ดังนั้นน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยส่วนใหญ่จึงน่าจะมาจากเฮมิเซลลูโลส (Aguilar et al., 2002) แต่จากการรายงานของ Rodriquez-Chong et al. (2004) พบว่าน้ำตาลกลูโคสที่ได้ส่วนใหญ่มาจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเซลลูโลส เนื่องจากเซลลูโลสมีความไวในการทำปฏิกิริยากับกรดในตริกมากกว่า อย่างไรก็ตาม Aguilar et al. (2002) รายงานว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดที่ใช้ในการไฮโดรไลซ์ตลอดจนสภาวะที่ใช้ในภาทดลอง สำหรับน้ำตาลอะราบินโนสได้มาจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของอะราบินโนไซแลน (arabinoxylan) ซึ่งเป็นเฮเทอโรโพลิเมอร์ (heteropolymer) ของเฮมิเซลลูโลส ในขณะเดียวกันการสลายตัวของหมู่ะซิดิกที่ต่ออยู่กับไซแลนจะทำให้เกิดกรดอะซิดิกในระหว่างกระบวนการไฮโดรไลซิส (Garrote et al., 2001) ส่วนเฟอฟูรอลเป็นสารในกลุ่มอัลดีไฮด์ (aldehyde) ที่เกิดจากการสลายตัวของน้ำตาลเพนโตส (เช่น น้ำตาลไซโลสและอะราบินโนส) โดยเฉพาะในกรณีการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยในสภาวะที่มีความเข้มข้นของกรดและอุณหภูมิสูง พบว่ามีการเกิดเฟอฟูรอลสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกรไฮโดรไลซ์ขานอ้อยในสภาวะที่มีความเข้มข้นของกรดและอุณหภูมิต่ำ (Fengel & Wegener, 1984; Dominquez et al., 1997; Aguilar et al., 2002; Rodriquez-Chong et al., 2004)

5.9 การศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากขานอ้อย

สารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง ถูกนำมาใช้ในการศึกษาการผลิตกรดแลคติกภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที และไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน ผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* IO-1 ไม่สามารถใช้ น้ำตาลที่มีอยู่ในสารละลายได้ และไม่พบการสร้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมัก ในขณะเดียวกันพบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีอัตราการเจริญที่ต่ำ โดยพบน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 0.01 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า สารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลคติกของ *Lc. lactis* IO-1 เพราะแลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่ต้องการอาหารสมบูรณ์ในการเจริญ (Marshall et al., 1984) ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Garde et al. (2001) ที่ได้รายงานว่า การเติมแหล่งไนโตรเจนลงในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ผลอินทผลัม มีผลต่ออัตราการเจริญและการผลิตกรดแลคติกของ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีการศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อย ซึ่งได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโตน และแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 3, 5 และ 7 กรัมต่อลิตร จากผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้ได้ทั้งน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลส และพบว่าการสร้างกรดแลคติก กรดฟอर्मิก กรดอะซิดิก และเอทานอล

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

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

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

เมื่อพิจารณาการผลิตกรดแลกติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่ผ่านการลดความเป็นพิษและมีการเติมยีสต์สกัด (7 กรัมต่อลิตร) เป็นแหล่งไนโตรเจน (ภาพที่ 67) ซึ่งในสารละลายที่ได้ดังกล่าวประกอบด้วยน้ำตาลไซโลสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก (22 กรัมต่อลิตร) กลูโคส (1.49 กรัมต่อลิตร) และอะราบิโนส (1.29 กรัมต่อลิตร) ผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลได้อย่างรวดเร็วภายใน 32 ชั่วโมง แต่ภายใต้สภาวะนี้ *Lc. lactis* IO-1 ผลิตกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก (6.91 กรัมต่อลิตร) ส่วนกรดแลกติกถูกสร้างเพียง 4.81 กรัมต่อลิตร ซึ่งแตกต่างจากการผลิตกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่มีน้ำตาลไซโลสที่ความเข้มข้น 30 และ 50 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 24-25) หรือในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสมที่ความเข้มข้น 15 และ 25 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 35-36) ซึ่งภายใต้สภาวะนี้ *Lc. lactis* IO-1 ผลิตกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก จากผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าอาจมีสารบางชนิดในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ชานอ้อยที่มีผลต่อการสร้างผลิตภัณฑ์ของเซลล์ในระหว่างกระบวนการหมัก และเมื่อปรับความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสในสารละลายให้มีค่าเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าเซลล์มีการสร้างกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก (10.85 กรัมต่อลิตร) ในระหว่างกระบวนการหมัก (ภาพที่ 68) จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสมีผลต่อการสร้างกรดแลกติกของ *Lc. lactis* IO-1 ในระหว่างกระบวนการหมัก

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

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

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

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

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

การศึกษากการผลิตรกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส (5, 10, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) พบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสมีผลต่อการผลิตรกรดแลกติกในระหว่างกระบวนการหมักของ *Lc. lactis* IO-1 โดยพบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 5 และ 10 กรัมต่อลิตร *Lc. lactis* IO-1 สร้างกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ในขณะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 30 และ 50 กรัมต่อลิตร *Lc. lactis* IO-1 สร้างกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักผ่านกระบวนการหมักแบบหมักแบบเฮเทอโรแลกติกแอซิดเฟอร์เมนเทชัน หรือหมักแอซิดเฟอร์เมนเทชัน

จากการศึกษากการผลิตรกรดแลกติกในสูตรอาหารพื้นฐานที่แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลผสมระหว่างน้ำตาลกลูโคสและไซโลส (อย่างละ 2.5, 5, 10, 15, 25, 30 และ 50 กรัมต่อลิตร) พบว่า *Lc. lactis* IO-1 มีการเจริญแบบ diauxic และมีการสร้างกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ยกเว้นในช่วงที่มีการใช้น้ำตาลไซโลสในน้ำตาลผสมที่ความเข้มข้นอย่างละ 2.5, 5 และ 10 กรัมต่อลิตร ซึ่งที่สภาวะดังกล่าว *Lc. lactis* IO-1 มีการสร้างกรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก นอกจากนี้ยังพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่มากที่สุดในน้ำตาลผสมที่ไม่มีผลยับยั้งการใช้ น้ำตาลไซโลส มีค่าเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร

การศึกษากการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตรกรดแลกติกโดย *Lc. lactis* IO-1 ภายใต้สภาวะการหมักแบบกะพบว่า วิธีการใช้น้ำตาลไซโลสของ *Lc. lactis* IO-1 จะผ่านวิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟกลีโคเลตพร้อมกันเนื่องจากตรวจพบฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต เอนไซม์ทรานส์คีโตเลส และเอนไซม์ฟอสโฟกลีโคเลตในสารละลายเซลล์สกัดของ *Lc. lactis* IO-1

การศึกษากการเมแทบอลิซึมฟลักซ์ในการผลิตรกรดแลกติกจากน้ำตาลไซโลสพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสมีผลต่อการสร้างแลกเตท โดยปริมาณแลกเตทมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเพิ่มขึ้นและยังพบว่าน้ำตาลไซโลสถูกนำเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตมากกว่าวิถีฟอสโฟกลีโคเลตภายใต้สภาวะที่ศึกษา ยกเว้นในกรณีที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 5 กรัมต่อลิตร

การศึกษากการพินิจพิเคราะห์ของไซลูโลส-5-ฟอสเฟตและไพรูเวต พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสมีผลต่อปริมาณไซลูโลส-5-ฟอสเฟตที่ถูกนำเข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟกลีโคเลต และพบว่าปริมาณไซลูโลส-5-ฟอสเฟตสูงสุดที่เข้าสู่วิถีเพนโตสฟอสเฟตและวิถีฟอสโฟกลีโคเลต มีค่า 67 และ 58 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 50 และ 5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสยังมีผลต่อเมแทบอลิซึมของไพรูเวต และการสร้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมัก โดยพบว่าไพรูเวตที่สร้างขึ้นจะถูกนำไปใช้ในการผลิตแลกเตทเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสที่เพิ่มมากขึ้น

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยพบว่า การไฮโดรไลซ์ขานอ้อยด้วยสารละลายแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้อง สามารถสกัดลิกนินได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 322.19 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อนำขานอ้อยไปไฮโดรไลซ์ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง จะให้ประสิทธิภาพการไฮโดรไลซ์สูงสุดเท่ากับ 15.95 และที่สภาวะดังกล่าวจะได้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลไซโลส น้ำตาลอะราบินอส และกรดอะซิติก เท่ากับ 2.66, 13.09, 1.22 และ 0.06 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

การศึกษากิจกรรมการเกิดกรดแลคติกจากสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยพบว่า ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการเจริญและการผลิตกรดแลคติกของ *Lc. lactis* IO-1 และพบว่าการเติมยีสต์สกัดที่ความเข้มข้น 7 กรัมต่อลิตร จะให้ผลได้ของกรดแลคติกสูงสุดเท่ากับ 0.26 กรัมกรดแลคติกต่อกรัมน้ำตาลผสมที่ถูกใช้นอกจากนี้ยังพบว่า สารดูดซับแอมเบอร์ไลซ์มีประสิทธิภาพในการลดความเป็นพิษของสารยับยั้งในสารละลายที่ได้จากการไฮโดรไลซ์ขานอ้อยและส่งผลให้ *Lc. lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในสารละลายได้และพบการสร้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการหมัก เช่น กรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และเอทานอล อย่างไรก็ตามไม่สามารถตรวจพบคาร์บอนไดออกไซด์ และ 2,3-บิวเทนไดออล

เอกสารอ้างอิง

- ประสิทธิ์ ใจคิด. พืชทดแทนพลังงานที่มีศักยภาพ. เอกสารประกอบการสัมมนาระดมความคิดเห็น; 12-13 พฤษภาคม 2545; คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- นรัช ลือกุลวัฒน์ชัย. ตลาดน้ำตาลปี' 43 และแนวโน้มปี' 44. ว. อุสาหกรรมพรรณ 2543; 7 (25): 37-38.
- ศูนย์วิจัยกสิกรไทย จำกัด. อ้อยและน้ำตาลปี' 45 : เกษตรกรทำใจ รายได้หด. ว. มอเกษตรธุรกิจ 2545; 8(990): 3-5
- เส้นใยธรรมชาติ. [ออนไลน์] 17 สิงหาคม 2545 [อ้างเมื่อ 2 มกราคม 2548]. จาก http://www.dnp.go.th/bio_com/Garbage_fiber.html
- Aguilar R, Ramirez JA, Garrote G, Vázquez M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Food Engineering** 2002; 55: 309-318.
- Akerberg C, Zacchi G. An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour. **Bioresouce Tecnology** 2000; 75: 119-126.
- Arasaratnan V, Senthuran A, Balasubramaniam K. Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. **Enzyme and Microbial Technology** 1996; 19: 482-486.
- Aristidou A, Penttilä M. Metabolic engineering application to renewable resource utilization. **Biotechnology** 2000; 11: 187-198.
- Atlas RM. Microbial physiology-cellular biology. In: Atlas R M, editors. **Principles of Microbiology**. 2nd ed. London: Wm.C. Brown Publishers; 1997. p. 170 – 172.
- Axelsson LT. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In: Salminen S, von Wright A, editors. **Lactic acid bacteria**. New york: Marcel; 1993. p. 1-63.
- Bobillo M, Marshall VM. Effect of acidic pH and salt on acid end-products by *Lactobacillus plantarum* in aerated, glucose-limited continuous culture. **Applied Bacteriology** 1992; 73: 67-70.
- Bond DR, Tsi BM, Russell JB. The diversion of lactose carbon through the tagatose pathway reduces the intracellular fructose 1,6 diphosphate and growth rate of *Streptococcus bovis*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 1998; 49: 600-605.
- Bonn G. Analytical determination of 1,6-anhydro-β-D-glucopyranose and kinetic studies under hydrothermal conditions. **Journal of Carbohydrate Chemistry** 1985; 4: 405-419.
- Bottazzi V. An introduction in rod-shaped lactic acid bacteria. **Biochimie** 1988; 70: 303-315.
- Bustos G, Ramirez JA, Vázquez M. **Hydrolysis of sugar cane bagasse with hydrochloric acid at atmospheric pressure to obtain xylose**. Paper presented at the International Conference on The Annual Meeting and Food Expo; 2002 June 17; Anaheim, California.
- Bulut S, Elibol M, Ozer D. Effect of different carbon sources on L(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. **Journal of Biochemical Engineering** 2004; 21: 33-37.

- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 1976; 72: 248-254.
- Cao NJ, Krishnan MS, Du JX, Gong CS, Ho NWY, Chen ZD, Tsao GT. Ethanol production from corn pretreated by the ammonia steeping process using genetically engineered yeast. **Biotechnology Letter** 1996; 18: 1013-1018.
- Carr JG, Whiting GC. Microbiological aspects of production and spoilage of ciders. **Applied Bacteriology** 1971; 34: 81-93.
- Carr JG, Davies PA. Homofermentative lactobacilli of ciders including *Lactobacilli mali* nov. appec. **Applied Bacteriology** 1970; 33: 768-774.
- Chaillou S, Lokman BC, Leer RJ, Posthuma C, Posma PW, Pouwels PH. Cloning sequence analysis and characterization of the genes involved in isoprimeverose metabolism in *Lactobacillus pentosus*. **Journal of Bacteriology** 1998; 180: 2312-2320.
- Champagne CP, Gardner N, Doyon G. Production of *Leuconostoc oenos* biomass under pH control. **Applied and Environmental Microbiology** 1989; 55: 2488-2492.
- Christensen JE, Dudley GE, Pederson JA, Steele JL. Peptidase and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek** 1999; 76: 217-246.
- Cocaing-Bousquet M, Garrigues C, Loubière P, Lindley ND. Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. **Antonie van Leeuwenhoek** 1996; 70: 253-267.
- Condon S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. **FEMS Microbiology Review** 1987; 46: 269-280.
- Cogan TM. Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc* spp. : effects on growth, substrate and products. **Applied Bacteriology** 1987; 63: 551-558.
- Cox GC, Mac Bean RD, Chandler G. Lactic acid production by *Lactobacillus bulgaricus* in supplemented whey ultrafiltrate. **Australia Journal Dairy Technology** 1977; 32: 19-22.
- De Figueroa RM, Oliver G, Benito de Cardenas IL. Influence of temperature on flavour compound production from citrate by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 4769. **Microbiology Research** 2001; 155: 257-262.
- de Varies W, Kaptyn WMT, van der Beek EG, Stouthamer AH. Molar growth yield and fermentation balances of *Lactobacillus casei* L3 in batch cultures and continuous cultures. **General Microbiology** 1970; 63: 333-345.
- Domínguez JM, Cao N, Gong CS, Tsao GT. Dilute acid hemicellulose hydrolysates from corncob for xylitol production by yeast. **Bioresource Technology** 1997; 61: 85-90.
- Erlandson KA, Park J-H, Khal WE, Kao H-H, Basaran P, Brydges S, Batt CA. Dissolution of xylose metabolism in *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology** 2000; 66(9): 3974-3980.
- Fengel D, Wegener G. **Wood Chemistry: ultrastructure and reaction**. 1st ed. Berlin: Water de Gruyter; 1984.

- Fraenkel DG. Glycolysis, pentose phosphate pathways and Enter-Doudoroff pathway. In: Neidhardt FC, editor. *E. coli and Salmonella typhimurium-cellular and molecular biology*, 1987; p 142-150. Washington DC: American Society for Microbiology.
- Garde A, Jonsson G, Schmidt AS, Ahring BK. Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*. **Bioresource Technology** 2002; 81: 217-223.
- Garvie EI. Bacterial lactate dehydrogenase. **Microbiology Review** 1980; 44: 106-139.
- Garrote G, Domínguez H, Parajo JC. Kinetic modeling of corncob autohydrolysis. **Process Biochemistry** 2001; 36: 571-578.
- Gong CS, Chen CS, Chen LF. Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by yeast. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 1993; 39/40: 83-88.
- Guyot JP, Morlon-Guyot J. Effect of different cultivation conditions on *Lactobacillus manihotivoran* OND32^T, an amylolytic lactobacillus isolated from sour starch cassava fermentation. **Food Microbiology** 2001; 67: 217-225.
- Hahn-Hägerdal B, Jeppsson H, Stoog K, Prior BA. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology** 1994; 16: 933-943.
- Hammes WP, Weiss N, Holzapfel WP. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harder W and Schleifer KH editors. **The prokaryote-A Handbook on the biology of bacteria**: Ecophysiology, Isolation, Identification, Application. 1st ed. New York: Springer; 1991.p. 1535-1594.
- Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology** 2000; 26: 87-107.
- Hols P, Kleerebezem M, Schanck AN, Ferain T, Hugenholtz J, Del cour J, de Vos WM. Conversion of *Lactococcus lactis* from homolactic to homoalanine fermentation through metabolic engineering. **Nature Biotechnology** 1999; 17: 588-592.
- Holtzapple MT, Jun JH, Ashok G, Patibandla SL, Dale BE. The ammonia freeze explosion (AFEX) process: A practical lignocellulose pretreatment. **Applied Biochemistry and Bioengineering** 1991; 28/29: 59-74.
- Hugenholtz J. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Review** 1993; 12: 165-178.
- Ingram LO, Aldrich HC, Borges ACC, Causey TB, Martínez A, Morales et al. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. **Biotechnology Progress** 1999; 15: 277-292.
- Ishizaki A, Ohta T. Batch culture kinetics of L-lactate fermentation employing *Streptococcus* sp. IO-1. **Fermentation and Bioengineering** 1988; 67: 46-51.

- Ishizaki A, Osajima K, Nakamura K, Kimura K, Hara T, Ogata S. General character and taxonomic study of *Lactococcus lactis* IO-1 JCM 7638. **Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University** 1990; 35(1.2): 1-7.
- Ishizaki A, Osajima K, Nakamura K, Kimura K, Hara T, Ezaki T. Biochemical characterization of *Lactococcus lactis* IO-1 whose optimal temperature is as high as 37 °C. **Genetic Applied Microbiology** 1990; 36: 1-6.
- Ishizaki A, Ueda T, Tanaka K, Stanbury PF. The kinetics of end-product inhibition of L-lactate production from xylose and glucose by *Lactococcus lactis* IO-1. **Biotechnology Letters** 1993; 15: 489-494.
- Ishizaki A, Ueda T. Growth kinetics and product inhibition of *Lactococcus lactis* IO-1 culture in xylose medium. **Fermentation and Bioengineering** 1995; 3: 287-290.
- Ishizaki A. Solution of environmental problem through biomass conversion using microbial technology. In: Proceeding ACS Symposium Series on Fuels and Biochemical from Biomass. **Biomass conversion to solve environmental problem**. American Chemical Society; 1997 (666). p. 336 – 344.
- Jarvis L. 2001 **Lactic acid outlook up as polyacid near market**. Chemical Market Reporter 259(9) : 5–14.
- Jonsson LJ, Palmqvist E, Nilvebrant NO, Hahn-Hägerdal B. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Applied Microbiology and Technology** 1998; 49: 691-697.
- Jordan KN, Cogan TM. Identification and growth of non starter lactic acid bacteria in Irish Cheddar cheese. **Ir. Agricultural Food Research** 1994; 32: 47-55.
- Kanagachadran K, Stanbury PF, Hall SJ, Ishizaki A. Glucose repression of xylose utilization by *Lactococcus lactis* IO-1. **Biotechnology Letters** 1997; 19: 923-925.
- Kandler O. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek** 1983; 49: 209-239.
- Kim SB, Lee YY. Kinetics in acid-catalyzed hydrolysis of hardwood hemicellulose. **Biotechnology Bioengineering** 1987; 17: 71-84.
- Konings WN, Kok J, Kuipers O P, Poolman B. Lactic acid bacteria : the bugs of the new millennium. **Current Opinion in Biotechnology** 2000; 3(3): 276 – 282.
- Kunkee RE. Some roles of malic acid in malolactic fermentation in winemaking. **FEMS Microbiology Research** 1991; 88: 55-72.
- Kwon S, Lee PC, Lee EG, Chang YK, Chang N. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. **Enzyme and Microbiology Technology** 2000; 36: 209-215.
- Laopaiboon P. **The physiology of xylose utilization by *Lactococcus lactis* IO-1**. [Ph.D. Thesis in Fermentation Technology]. England: University of Hertfordshire; 2001.

- Larsson S, Plamqvist E, Hahn-Hägerdal B, Tengborg C, Stenberg K, Zacchi G, Nilvebrant NO. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology** 1999; 24: 151-159.
- Lawford HG, Rousseau JD. Improving fermentation performance of recombinant *Zymomonas* in acetic acid-containing media. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 1998; 70-72: 161-172.
- Lawrence RC, Thomas TD. The fermentation of milk by lactic acid bacteria. In: Bull AT, Ellwood DC, Ratledge C. editors. **Proceeding of the symposium 29 on Microbial Technology**: Current state, Future Prospects. Society for General Microbiology. P. 187-219. Chambridge UK. Cambridge University Press.
- Lerner M. **Lactic acid is reshuffling**. *Chemical marketing Reporter* 1996; 249, 7.
- Levering PR, Dijkhuizen L. Hydrocarbon and methylotrophy (transaldolase isoenzyme from *Arthobacter* P1) In: Lidstrom ME. editor. **Method in Enzymology**. 1986. P. 405-411. New York and London: Academic Press.
- Liu S-Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentation. **Food Microbiology** 2003; 83: 115-131.
- Lopez de Felipe F, Hugenholtz J. Pyruvate flux distribution in NADH-oxidase overproducing *Lactococcus lactis* strain as a function of culture conditions. **FEMS Microbiology Letter** 1999; 179: 461-466.
- Loubiere P, Novák L, Cocaing-Bousquet M, Lindley ND. Besoins nutritionnels des bacteries lactiques: **interaction entre flux de carbone et d' azote**. *Lait*, 1996: 76: 5-12.
- Lynd LR, Wyman CE, Gerngross TU. Biocommodity engineering. **Biotechnology Progress** 1999; 15: 777 – 793.
- Madigan TM, Martinko JM, Parker J. Prokaryotic diversity In: Madigan TM, Martinko JM, Parker J, editors. **bacteria**. 8th ed. London Prentice Hall International Inc: Brock Biology of Microorganism; 1997; p. 635–740.
- Maloney MT, Chapman TW, Baker AJ. Dilute acid hydrolysis of paper birch: Kinetic study of xylan and acetyl group hydrolysis. **Biotechnology and Bioengineering** 1985; 27: 355-361.
- Maicas S, Ferrer S, Pardo I. NAD(P)H regeneration is the key for heterolactic fermentation of hexoses in *Oenococcus oeni*. **Microbiology** 2002; 148: 325-322.
- Marshall VM. Review article: fermented milks and their future trends: I. Microbiological aspects. **Diary Research** 1996; 54: 559-574.
- Marshall VM, Law BA. The physiology and growth of dairy lactic acid bacteria. In “ The Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk” ed by Davies FL, Law BA. **Elsevier Applied Science Publishs**, Essex .p. 70.

- Martin C, Galbe M, Wahlborn FC, Hahn-Hägerdal B, Jonsson LJ. Ethanol production from enzymatic hydrolyzates of sugar cane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology** 2002; 31: 274-282.
- Nancib N, Nancib A, Boudjelal A, Benslimane C, Blanchard F, Boudrant J. The effect of supplementation by different nitrogen sources on the production of lactic acid from date juice by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. **Bioresource Technology** 2001; 78: 149-153.
- Novák L, Loubière P. The metabolic network of *Lactococcus lactis* : Distribution of ^{14}C labeled substrate between catabolic and anabolic pathways. **Journal of Bacteriology** 2000; 182(4): 1136-1143.
- Oda Y, Ito M, Kikuta Y, Park BS, Tonomura K. Comparison and characterization of *Lactobacillus amylovorus* strains for lactic acid fermentation of by-product. **Food Microbiology** 2000; 17: 341– 347.
- Oh H, Wee YJ, Yun JS, Han SH, Jung S, Ryu HW. Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. **Bioresource Technology** (serial online) 2004 Aug-Nov (cited 2005 Jan). Available from: www.sciencedirect.com
- Olsson L, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology** 1996; 18: 312-331.
- Pilone GJ. Control of malo-lactic acid fermentation in table wines by addition of fumaric acid. In: Carr JG, Cutting CV, Whiting GC. (Eds). **Lactic acid bacteria in beverages and food**. Academic Press; London. 1975; p. 121-138
- Premi L, Sandine WE, Elliker PR. Lactose hydrolyzing enzyme of *Lactobacillus* species. **Applied Microbiology** 1972; 24: 51.
- Preziosi-Belloy L, Nolleau V, Navarro JM. Fermentation of lignocellulosic sugars and sugar mixtures to xylitol by *Candida parapsilosis*. **Enzyme and Microbial Technology** 1997; 21: 124-129.
- Radler F. The metabolism of organic acids by lactic acid bacteria. In Carr JG, Cutting CV, Whiting GC, editors. **Lactic acid bacteria in beverages and food**. Academic Press, London. 1975; p. 17-27.
- Ramirez JA, Bustos G. and Vázquez M. **Xylose from hydrolysis of sugar cane bagasse using hydrochloric acid at autoclave pressure**. Paper presented at the International Conference on The Annual Meeting and Food Expo; 2002 June 17; Anaheim, California.
- Rodríguez-Chong A, Ramírez JA, Garrote G, Vázquez M. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. **Food Engineering** 2004; 60: 143-152.
- Roberto IC, Lacis LS, Barbosa M, De Mancilha IM. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysates by *Pichia stipulis* for the production of ethanol. **Process Biochem** 1991; 26: 15-21.
- Sarantinopoulos P, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E. Citrate metabolism by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 229. **Applied Environmental Microbiology** 2001; 67: 5482-5487.

- Senthuran A, Senthuran V, Hatti-Kaul R, Mattiasson B. Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reactor: a step towards optimization. **Journal of Biotechnology** 1999; 73: 61-70.
- Stiles ME, Holzapfel WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **Food Microbiology** 1997; 36: 1-29.
- Swindell SR, Benson KH, Griffin HG, Renault P, Ehrlich SD, Gasson MJ. Genetic manipulation of the pathway for diacetyl metabolism in *Lactococcus lactis*. **Applied Environmental Microbiology** 1996; 62: 2641-2643.
- Taso GT, Hanson TP. Extended monod equation for batch cultures with multiple exponential phases. **Biotechnology Bioengineer** 1975; 17: 1591-1598.
- Thomas TD. Acetate production from lactate and citrate by non-starter bacteria in Cheddar cheese. **N. Z. J. Dairy Science Technology** 1987; 22: 25-38.
- Thompson J, Chassey BM, Egan W. Lactose metabolism in *Streptococcus lactis* studies with a mutant lacking glucokinase and manosephosphotransferase activities. **Journal of Bacteriology** 1985; 162: 217-223.
- Tseng CP, Montville TJ. Metabolic regulation of end product distribution in lactobacilli: causes and consequences. **Biotechnology Progress** 1993; 9: 113-121.
- van Zyl C, Prior BA, Du Preez J. Acetic acid inhibition of D-xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Enzyme and Microbial Technology** 1991; 13: 82-86.
- Watson NE, Prior BA, Lategan P. Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from D-xylose by *Pichia tannophilus*. **Enzyme and Microbial Technology** 1984; 6: 451-455.
- Wee JY, Kim JN, Yun JS, Ryu HW. Utilization of sugar molasses for enomical L(+)-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. **Enzyme and Microbial Technology** 2004; 35: 568-573.
- Weimer B, Seefeldt K, Dias B. Sulphur metabolism in bacteria associated with cheese. **Antonie van Leeuwenhoek** 1999; 76: 247-261.
- Yun JS, Ryu HW. Lactic acid production and carbon catabolite repression from single and mixed sugars using *Enterococcus faecalis* RKY1. **Process Biochem** 2001; 37: 235-240.
- Yvon M, Rijnen L. Cheese flavour formation by amino acid metabolism. **Int. Dairy Journal** 2001; 11: 185-201.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรการคำนวณค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์

สูตรการคำนวณค่าพารามิเตอร์จลนพลศาสตร์

1. ผลได้ของเซลล์ (กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลที่ถูกใช้)

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

2. อัตราการเจริญจำเพาะ (ชั่วโมง⁻¹)

อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) คำนวณจากสมการ

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

3. ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (โมลผลิตภัณฑ์ต่อโมลของน้ำตาลที่ถูกใช้)

3.1 ผลได้ของกรดแลกติก

$$\frac{\text{กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)} / 90 \text{ (กรัมต่อ โมล)}}{\text{น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)} / \text{น้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาล (กรัมต่อ โมล)}}$$

3.2 ผลได้ของกรดฟอร์มิก

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

3.3 ผลได้ของกรดอะซิติก

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

3.4 ผลได้ของเอทานอล

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

เมื่อน้ำหนักโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไซโลส เท่ากับ 180 และ 150 กรัมต่อโมล ตามลำดับ

4. ผลได้ของผลิตภัณฑ์ (กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมของน้ำตาลที่ถูกใช้)

4.1 ผลได้ของกรดแลกติก

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

4.2 ผลได้ของกรดฟอร์มิก

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

4.3 ผลได้ของกรดอะซิติก

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

4.4 ผลได้ของเอทานอล

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

5. คาร์บอนไดออกไซด์

5.1 คาร์บอนไดออกไซด์ (โมล)

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

5.2 ผลได้ของคาร์บอนไดออกไซด์ (โมลต่อโมลของน้ำตาลที่ถูกใช้)

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

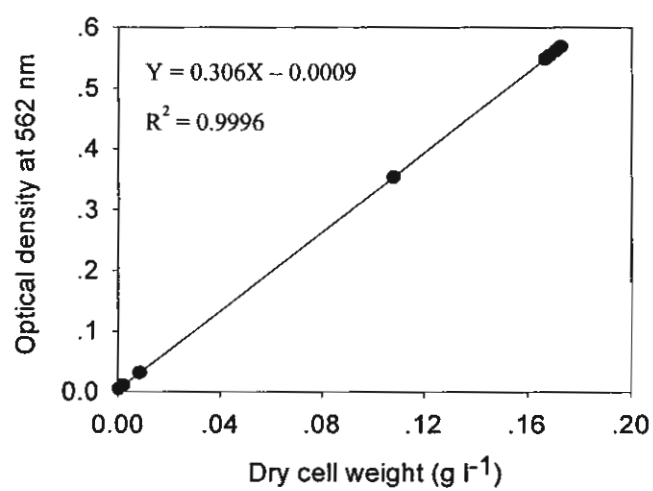
6. เปอร์เซ็นต์ carbon recovery

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

เมื่อจำนวนอะตอมคาร์บอนในน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไซโลส เท่ากับ 6 และ 5 อะตอม ตามลำดับ

ภาคผนวก ข

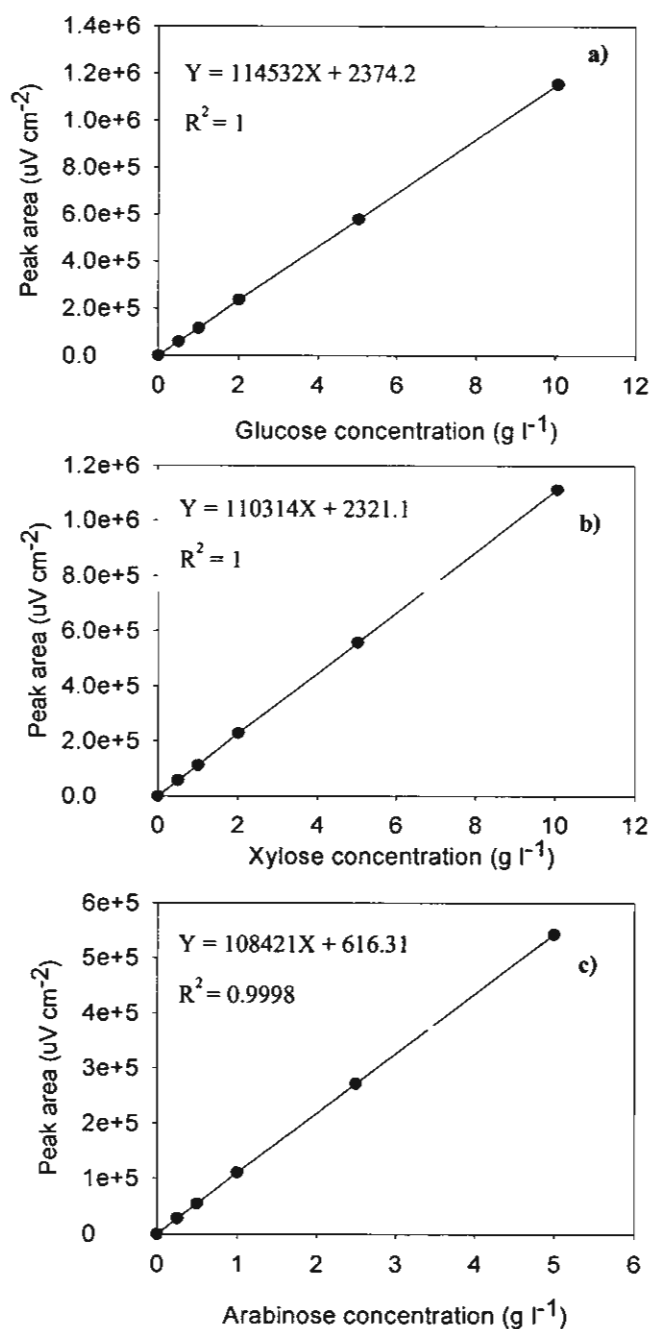
กราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงและน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Lc. lactis* IO-1



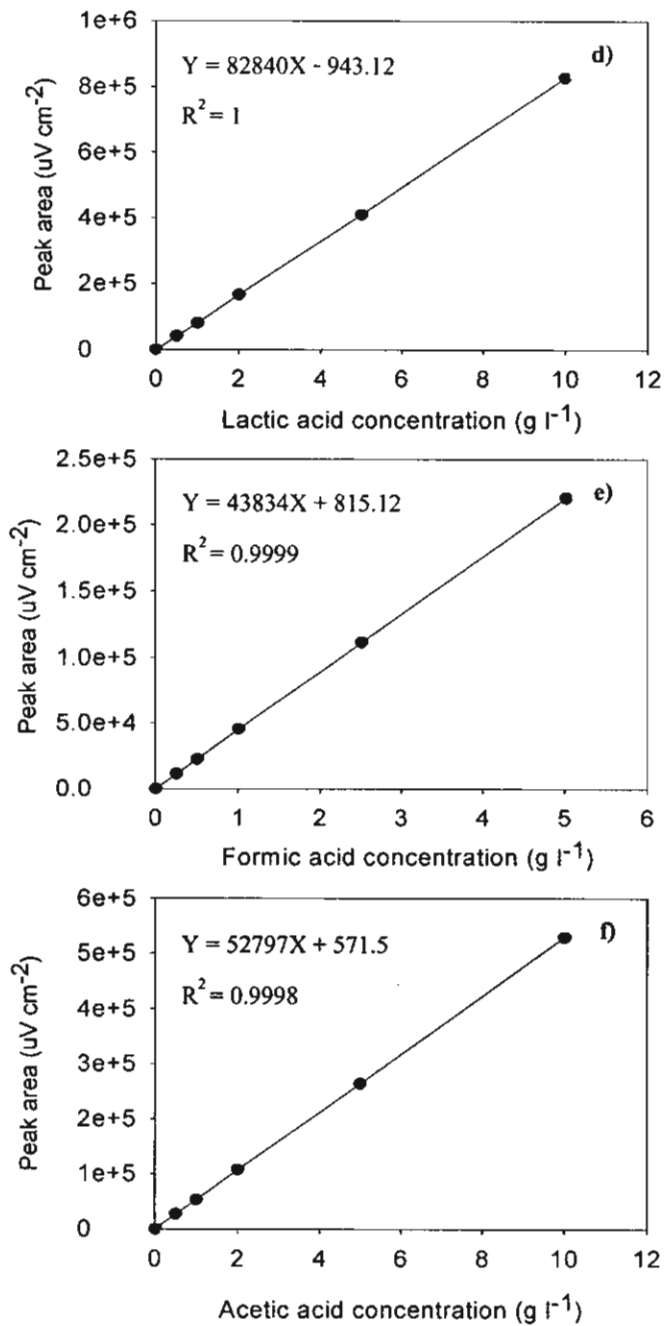
ภาพที่ 69 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงและน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Lc. lactis* IO-1

ภาคผนวก ค

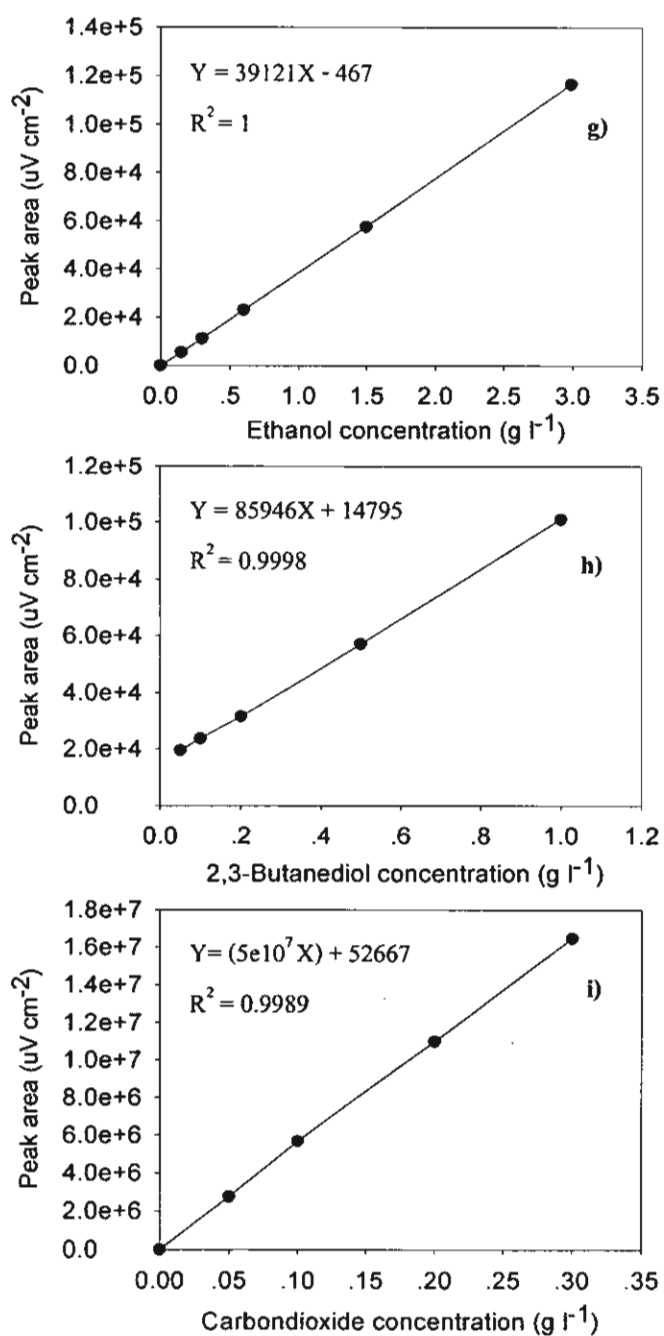
**กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบีโนส กรดแลคติก กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก เอทานอล
2,3-บิวเทนไดออล คาร์บอนไดออกไซด์ และเฟอฟูรอล**



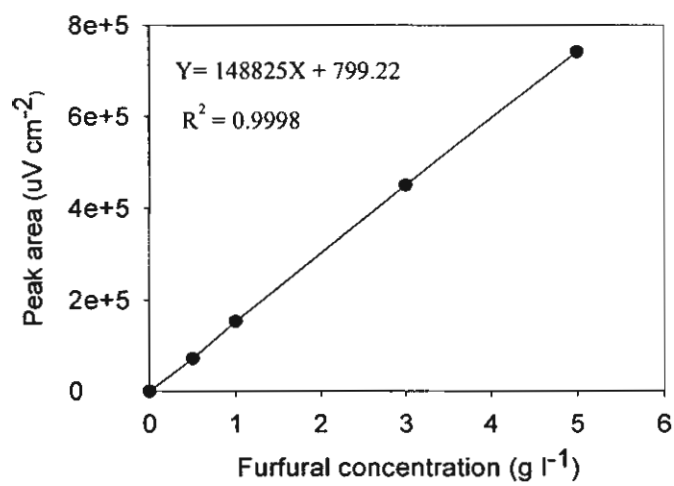
ภาพที่ 70 กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นของ (a) น้ำตาลกลูโคส (b) น้ำตาลไซโลส และ (c) น้ำตาลอะราบินอส



ภาพที่ 71 กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีกและความเข้มข้นของ (d) กรดแลกติก (e) กรดฟอร์มิก และ (f) กรดอะซิติก



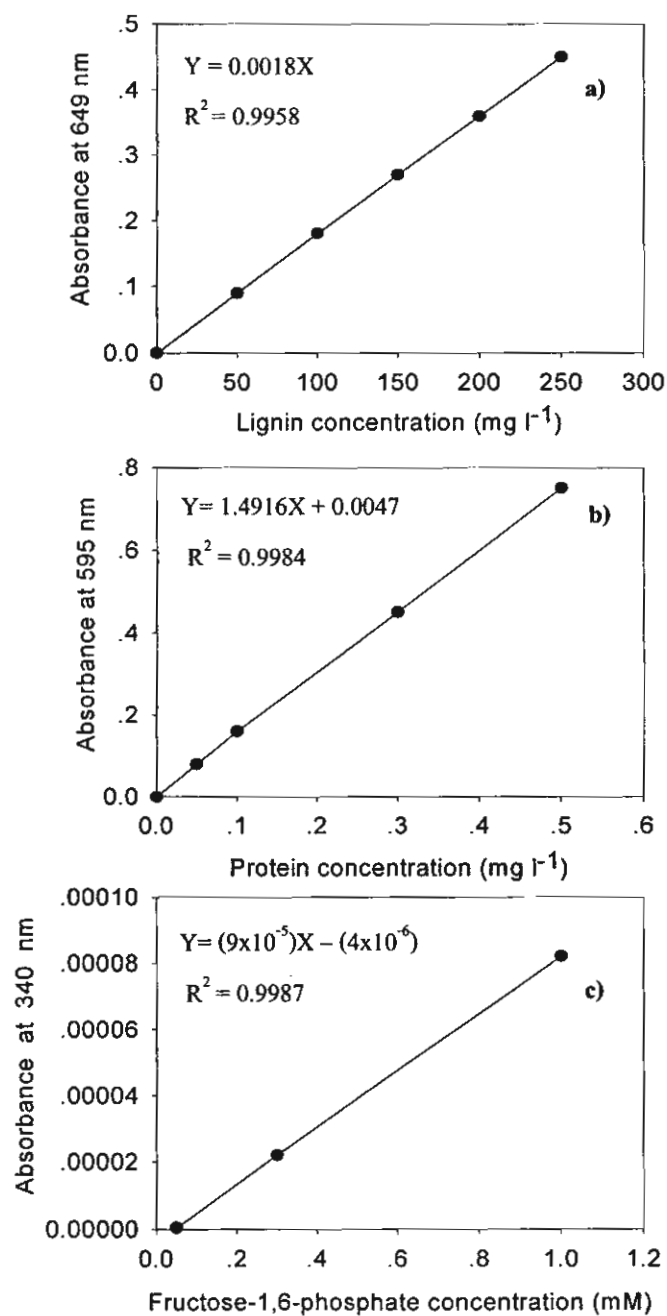
ภาพที่ 72 กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีกและความเข้มข้นของ (g) เอทานอล (h) 2,3-บิวเทนไดออล และ (i) คาร์บอนไดออกไซด์



ภาพที่ 73 กราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้พีคและความเข้มข้นของเฟอฟูรอล

ภาคผนวก ง

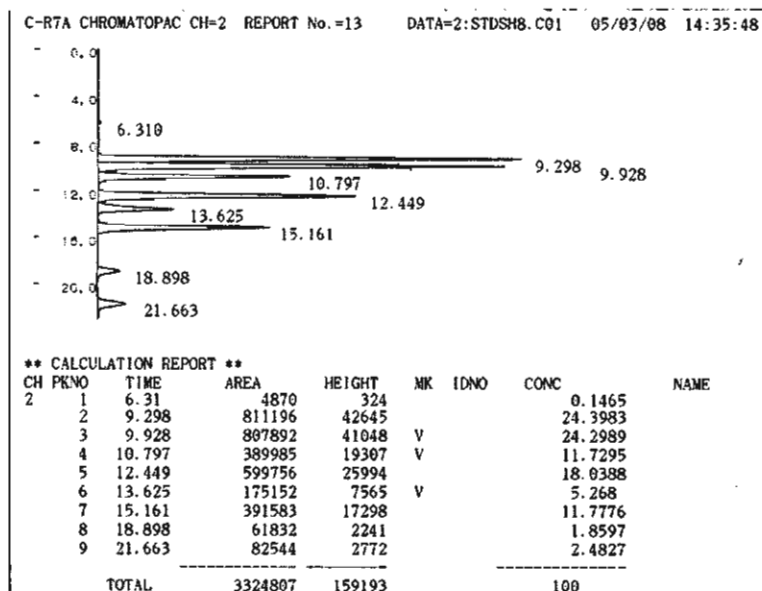
กราฟมาตรฐานของลิกกินิน โปรตีน และฟรุคโตส-1,6-ไดฟอสเฟต



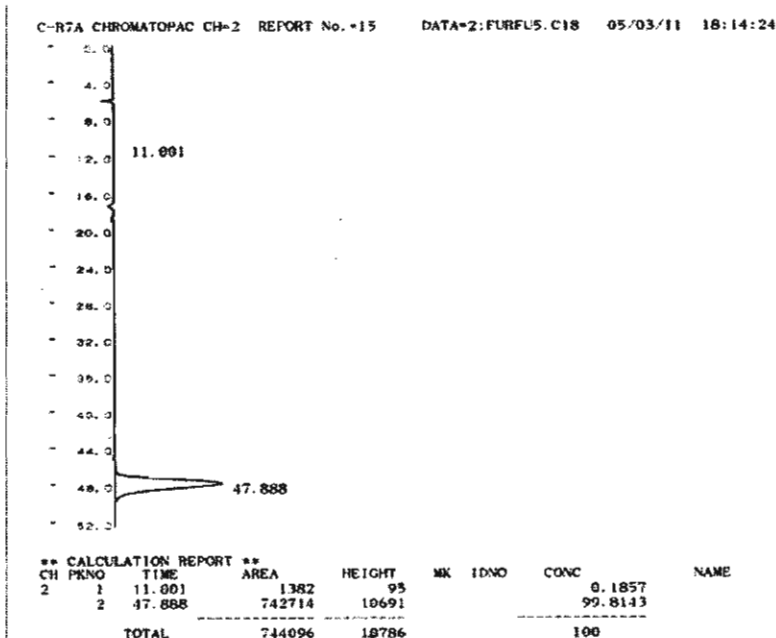
ภาพที่ 74 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ (a) ลิกนิน (b) โปรตีน และ (c) ฟรุคโตส-1,6-ไดฟอสเฟต

ภาคผนวก จ

**โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบินอส กรดแลคติก กรดฟอร์มิก
กรดอะซิติก 2,3-บิวเทนไดออล และเอทานอล**



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



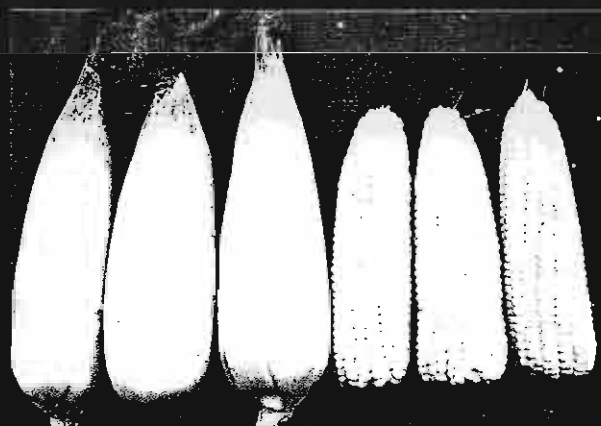
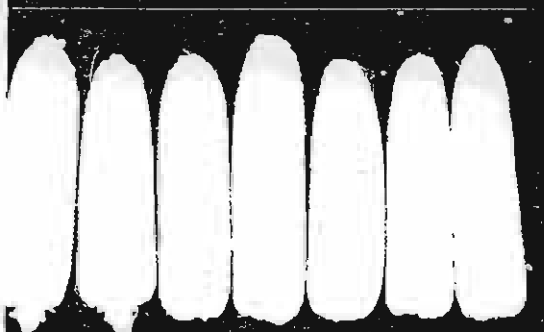
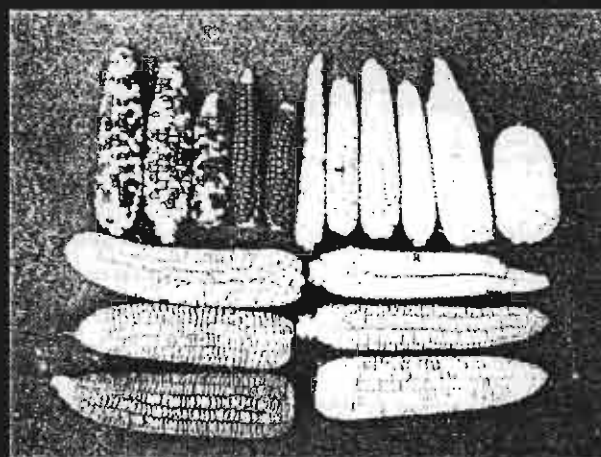
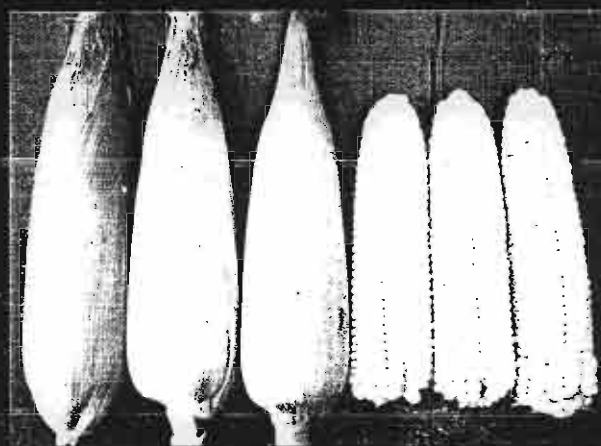
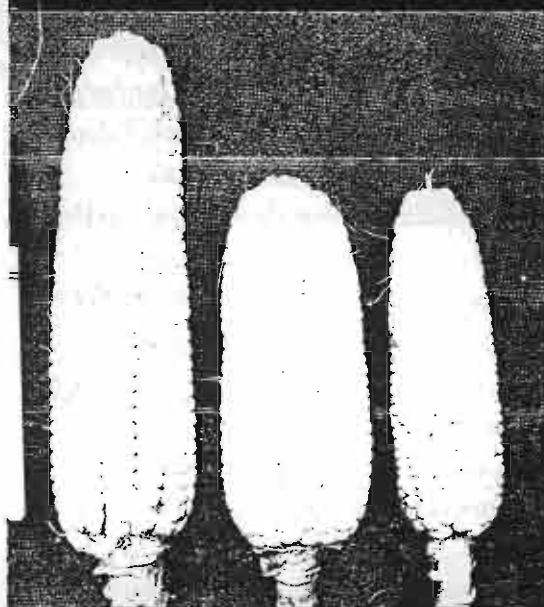
ภาพที่ 76 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐานเฟอฟูรอล (47.888)

ภาคผนวก ง
การเผยแพร่ผลงานวิจัย



วารสารวิจัย มม. KKU RESEARCH JOURNAL

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





วารสารวิจัย มช.

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

สารบัญ

■ หน้า

แฉดววงวิจัย มช.

นักปรบปร่งพ่นร้พชดเด่น: รค ดร.กมล เลิศรัตน์..... 1

วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

จำนวนโครโมโซมของพืชวงศ์ขิงในประเทศไทย

สุรพล แสนสุข และปิยะพร แสนสุข..... 3

การใช้สารสกัดจากรากหางไหลแ่งในการควบคุมลูงน้ำยุง

สมบุรณ์ แสงมณีเดช และคณะ..... 10

การหมักน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลส โดย *Lactococcus lactis* IO-1 เพื่อผลิตกรดแลคติก

พัฒนา เหล่าไพบูลย์ และคณะ..... 16

วิทยาศาสตร์สุขภาพ

การศึกษาหาสาร Melhamidophos และ Methyl-Parathion ตกค้างในผักปลอดสารพิษในห้วงแม่โคร จังหวัดขอนแก่น

สกุลรัตน์ อุษณาวรงค์, ธนาบุษ เมืองนาง และอริศรา สุดแสน..... 23

การจัดการด้านกากของเสียและมลพิษที่เกิดขึ้นจากการประกอบอาชีพอุตสาหกรรมในครัวเรือนภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

กาญจนา นาคะพินธุ และคณะ 29

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำไมโครเอนแคปซูลของสารสกัดขมิ้น

ภัทรวดี จันทรแจ่ม และอรุณศรี ปรีเปรม..... 39

วิทยาศาสตร์กายภาพ

การประเมินเพื่อคาดการณ์ภัยพิบัติที่เกิดจากการยุบตัวของโพรงเกลือหินใต้ผิวดินในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ : กรณีศึกษาที่หนองหาน กุมภวาปี จังหวัดอุดรธานี และหนองบ่อ อำเภอบรบือ จังหวัดมหาสารคาม

เพ็ญดา สาทรักษ์ และคณะ 48

การพัฒนาเครื่องกะเทาะเมล็ดกระบก

สมโภชน์ สุดาจันทร์ และสมนึก ชูศิลป์..... 61

การศึกษาเชิงทฤษฎีของปฏิกิริยาการดูดซับไฮโดรเจนบน benzene-1, 4-dicarboxylate

สุนันทา เขงรัมย์ และรัชนิกร พิลาสสมบัติ..... 75

การศึกษาผลของลักษณะของแผ่นกระจายไอน้ำและชั้นวางวัสดุที่มีต่อระยะเวลาที่ความร้อนใช้ในการแทรกซึมผ่านหีบห่อวัสดุในห้องสเตอร์ไรส์ของเครื่องสเตอร์ไรส์ด้วยไอน้ำชนิดแทนที่ด้วยแรงโน้มถ่วง

อนุสรณ์ ชินสุวรรณ..... 87

การหมักน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสโดย *Lactococcus lactis* IO-1 เพื่อผลิตกรดแลกติก

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

พัฒนา เหล่าไพบูลย์ (Pattana Laopaiboon)¹, อาทิตย์ ธาณี (Arthit Thani)²,
ลักขณา เหล่าไพบูลย์ (Lakkana Laopaiboon)³, วิเชียร ลีลาวัชรามาศ (Vichean Leelavatcharamas)⁴

บทคัดย่อ

Lactococcus lactis IO-1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกพวกโฮโมเฟอร์เมนเททิฟ เมื่อเลี้ยงแบบกะในน้ำตาลผสมระหว่างกลูโคสและไซโลสในปริมาณที่เท่ากัน ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า *L. lactis* IO-1 ผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก และเกิดการเจริญแบบไดออกซิด นอกจากนั้นยังพบว่า แบคทีเรียชนิดนี้ผลิตกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และเอทานอลเป็นผลพลอยได้ เมื่อเลี้ยง *L. lactis* IO-1 ในน้ำตาลผสมที่ความเข้มข้นต่ำคือ 5 และ 10 กรัมต่อลิตร พบว่า กลูโคสและไซโลสถูกใช้หมด ในขณะที่เมื่อเลี้ยงในน้ำตาลผสมที่ความเข้มข้นสูงคือ 30 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่า กลูโคสถูกใช้หมด ส่วนไซโลสถูกใช้เพียง 25.6 และ 32.9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ การสังเกตนี้อาจเกิดจากกลูโคสเหนี่ยวนำการกีดการใช้ไซโลส และการผลิตกรดแลคติกที่สูงอาจยับยั้งการใช้ไซโลส ส่วนผลได้โมลาร์ของกรดแลคติกเมื่อ *L. lactis* IO-1 ใช้น้ำตาลกลูโคส สูงกว่าผลได้โมลาร์ของกรดแลคติกเมื่อใช้น้ำตาลไซโลสอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบที่ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เท่ากัน นอกจากนี้ยังพบว่าผลได้โมลาร์ของกรดแลคติกเมื่อใช้น้ำตาลผสมขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสเป็นหลัก

Abstract

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

คำสำคัญ : กรดแลคติก น้ำตาลผสม *Lactococcus lactis*

Keywords : Lactic acid, mixed sugar, *Lactococcus lactis*,

¹ รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² นักศึกษาระดับปริญญาตรี ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

³ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

⁴ รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

INTRODUCTION

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

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

Hemicellulose is a major constituent of plant cell wall materials and makes up 30-40 % of many agricultural residues (Amartei and Jeffries, 1994). After pretreatment and hydrolysis of lignocellulosic materials, the hemicellulose fraction is liquefied to make sugars (xylose and glucose) accessible to fermenting microorganisms (Lynd et al., 1999; Aristidou and Penttilä, 2000). However not all fermenting microorganisms can utilize xylose (5-carbon). There are many evidences indicating that *Lactococcus lactis* IO-1 is one of fermenting microorganisms which can utilise both carbon substrates for lactic acid production (Kanagachandran

et al. 1997). The aim of this work is to study the effect of dual sugar i.e. glucose and xylose on lactic acid production in batch cultures by *Lactococcus lactis* IO-1. Molar product yields of glucose and xylose utilisation of the microorganism are also investigated.

Materials and methods

Microorganism

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

Medium

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

Inoculum

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

Culture conditions

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

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

Analytical methods

Bacterial growth was monitored by spectrophotometric measurement at 562 nm (UV-1601 spectrophotometer, Shimadzu, Japan) and converted to cell dry weight from standard calibration curve. Determination of sugars (glucose and xylose) and metabolic end products (lactic acid, formic acid, acetic acid and ethanol) from fermentation supernatant was performed by HPLC with a refractometer detector (RID-6A, Shimadzu, Japan) using an Aminex HPX 87H⁺ column (300 mm X 7.8 mm, Bio - Rad Lab, CA, USA) under the following conditions: a temperature of 45 °C and 5 mmol l⁻¹ of H₂SO₄ as a mobile phase at a flow rate of 0.6 ml min⁻¹.

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

Results

During the batch growth of *L. lactis* IO-1 at various concentrations of glucose and xylose, mixtures of lactic acid, formic acid, acetic acid and ethanol were produced (Fig. 1). When *L. lactis* IO-1 was grown in the medium containing a mixture between 5 g glucose l⁻¹ and 5 g xylose l⁻¹ (Fig. 1A), initially only glucose was utilised and xylose utilisation started after glucose was completely consumed. Completion of both glucose and xylose

utilisation was observed at 23 h. At this time, biomass, lactic acid, formic acid, acetic acid and ethanol concentrations were 0.52, 5.02, 1.12, 1.50 and 0.52 g l⁻¹ respectively. When *L. lactis* IO-1 was grown in the medium containing 10 g glucose l⁻¹ and 10 g xylose l⁻¹, complete utilisation of the dual substrates was observed at 31 h (Fig. 1B). The result showed that the profiles of glucose and xylose utilisation and product formation were similar to those on the medium containing 5 g glucose l⁻¹ and 5 g xylose l⁻¹. At 31 h, biomass, lactic acid, formic acid, acetic acid and ethanol concentrations were 0.91, 10.95, 3.34, 4.01 and 1.04 g l⁻¹ respectively.

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

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

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

Discussion

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

strain preferred glucose to xylose. Approximately 29–49 % of supplied xylose was left unutilised in the fermented broth.

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

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

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

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

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

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

Acknowledgement

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

References

- Amartey, S. and Jeffries, T.W. 1994. Comparison of corn steep liquor with other nutrients in the fermentation of D-xylose by *Pichia stipitis* CBS 6054. *Biotechnol. Lett.* 16 : 211-214.
- Aristidou, A. and Penttilä, M. 2000. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Curr. Opin. Biotech.* 11 : 187-198.
- Axelsson, L.T. 1993. Lactic acid bacteria : classification and physiology. In: Salminen, S. and Wright, A., (Eds.), *Lactic acid bacteria*. Marcel Dekker, New York, pp. 1-63.
- Bibal, B., Goma, G., Vayssier, Y. and Pareilleux, A. 1988. Influence of pH, lactose and lactic acid on the growth of *Streptococcus cremoris* : a kinetic study. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28 : 340-344.
- Bothast, R.J., Saha, B.C., Vance, F.A. and Ingram, L.O. 1994. Fermentation of L-arabinose, D-xylose and D-glucose by ethanologenic recombinant *Klebsiella oxytoca* strain P2. *Biotechnol. Lett.* 16 : 401-406.
- Brandt, B.W., Kelpin, F.D.L., van Leeuwen, I.M.M. and Kooijman, S.A.L.M. 2004. Modelling microbial adaptation to changing availability of substrates. *Water Research.* 38 : 1003-1013.
- Brown, W.V. and Collins, E.B. 1977. End products and fermentation balances for lactic *Streptococci* grown aerobically on low concentrations of xylose. *Appl. Environ. Microbiol.* 33 : 38-42.

- Cocaign-Bousquet, M., Garrigues, C., Loubière, P. and Lindley, N.D. 1996. Physiology of pyruvate metabolism in *Lactococcus lactis*. *Antoni van Leeuwenhoek*. 70 : 253-267.
- Delgenes, J.P., Moletta, R. and Navarro, J.W. 1989. Fermentation of D-xylose, D-glucose and L-arabinose mixtures by *Pichia stipitis*: Effect of the oxygen transfer rate on fermentation performance. *Biotechnol. Bioeng.* 34 : 398-402.
- Erten, H. 1998. Metabolism of fructose as an electron acceptor by *Leuconostoc mesenteroides*. *Proc. Biochem.* 33 : 735-739.
- González-Vara, Y.R.A., Vaccari, G., Dosi, E., Trilli, A., Rossi, M. and Matteuzzi, D. 2000. Enhanced production of L-(+)-lactic acid in chemostat by *Lactobacillus casei* DSM 20011 using ion-exchange resins and cross-flow filtration in a fully automated pilot plant controlled via NIR. *Biotechnol. Bioeng.* 67 (2) : 147-156.
- Hofvendahl, K. and Hahn-Høgerdal, B. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb. Tech.* 26 : 87-107.
- Ishizaki, A. and Ueda, T. 1995. Growth kinetics and product inhibition of *Lactococcus lactis* IO-1 culture in xylose medium. *J. Ferment. Bioeng.* 80 (3) : 287-290.
- Kanagachandan, K., Stanbury, P.F., Hall, S.J. and Ishizaki, A. 1997. Glucose repression of xylose utilisation by *Lactococcus lactis* IO-1. *Biotechnol. Lett.* 19 (9) : 923-925.
- Laopaiboon, P. 2001. The physiology of xylose utilisation by *Lactococcus lactis* IO-1, University of Hertfordshire, UK, Thesis PhD.
- Laopaiboon, P. and Laopaiboon, L. 2003. Effect of aeration on xylose fermentation in batch cultures by *Lactococcus lactis*. *KKU Research Journal*. 8 (1) : 13-19.
- Lynd, L.R., Wyman, C.E., and Gerngross, T.U. 1999. Biocommodity engineering. *Biotechnol. Progress*. 15 : 777-793.
- Sakamoto, M. and Komagata, K. 1996. Aerobic growth and activities of NADH oxidase and NADH peroxidase in lactic acid bacteria. *J. Ferment. Bioeng.* 82 : 210-216.
- Naritomi, T., Kouda, T., Yano, H. and Yoshinaka, F. 1998. Effect of lactate on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. *J. Ferment. Bioeng.* 85 (1) : 89-95.
- Novák, L., Cocaign-Bousquet, M., Lindley, N.D. and Loubière, P. 1997. Metabolism and energetics of *Lactococcus lactis* during growth in complex or synthetic media. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (7) : 2665-2670.
- Tohyama, M., Takagi, S. and Shimizu, K. 2000. Effect of controlling lactate concentration and periodic change in DO concentration on fermentation characteristics of a mixed culture of *Lactobacillus delbrueckii* and *Ralstonia eutropha* of PHB production. *J. Bioscience Bioeng.* 89 (4) : 323-328.
- Tyree, R.W., Clausen, E.C. and Goddy, J.L. 1990. The fermentative characteristics of *Lactobacillus xylosus* on glucose and xylose. *Biotechnol. Lett.* 12 : 51-56.
- Vickroy, T.B. 1985. Lactic acid. In: Blanch, H.W., Drew, S. and Wang, D.I.C., (Eds.), *The practice of biotechnology : commodity products*. Pergamon Press, Elmsford, NY, pp. 761-776.

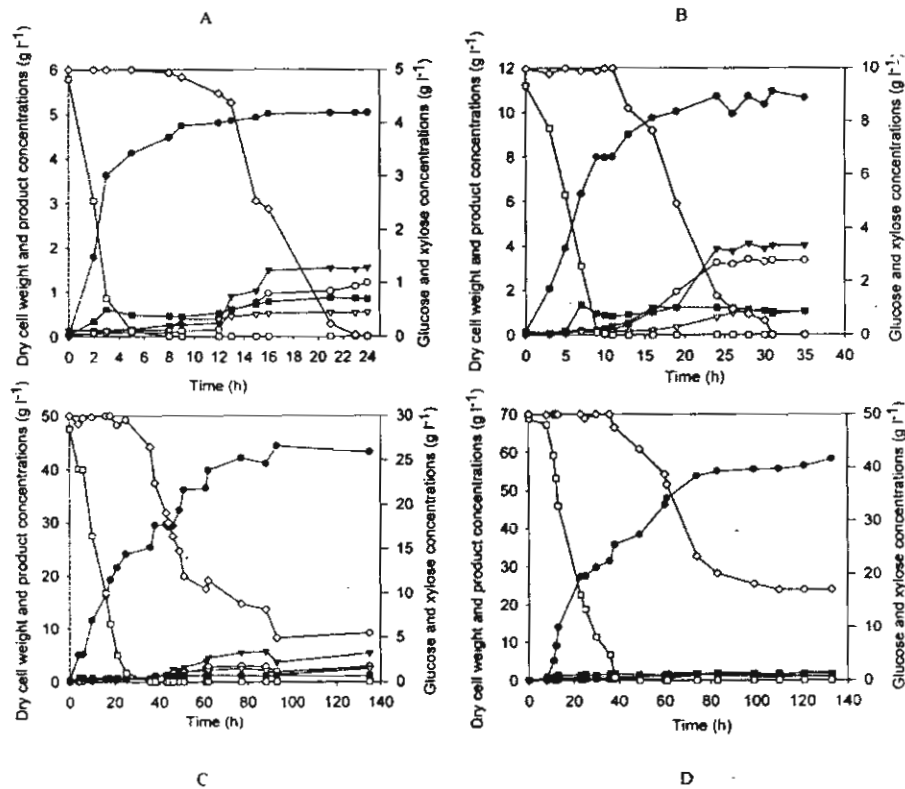


Fig. 1 Batch culture profiles of *L. lactis* IO-1 grown on glucose and xylose mixtures (A) 5 g, (B) 10 g, (C) 30 g and (D) 50 g l⁻¹: lactic acid (●), formic acid (▽), acetic acid (▼), ethanol (○), dry cell weight (■), glucose (□), xylose (◇).

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

Initial glucose concentrations (g l ⁻¹)	Molar product yields (mol product mol ⁻¹ glucose utilised)			
	Lactic acid	Formic acid	Acetic acid	Ethanol
5	1.75	0.05	0.13	0.11
10	1.62	0.07	0.09	0.10
30	1.61	0.09	0.05	0.11
50	1.52	0.10	0.04	0.10
Initial xylose concentrations (g l ⁻¹)	Molar product yields (mol product mol ⁻¹ xylose utilised)			
	Lactic acid	Formic acid	Acetic acid	Ethanol
5	0.12	1.03	1.18	0.53
10	0.22	0.97	0.90	0.31
30	0.54	0.32	0.58	0.24
50	0.91	0.12	0.08	0.13