รายงานการวิจัย

เรื่อง การปรับปรุงการผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACTT 11842 และ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* NRRLB 445

Improvement of Lactic Acid Production by Continuous Fermentation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACTT 11842 and *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* NRRLB 445

โดย

รศ. สุขใจ ชูจันทร์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2553

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การปรับปรุงการผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACTT 11842 และ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* NRRLB 445

Improvement of Lactic Acid Production by Continuous Fermentation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACTT 11842 and *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* NRRLB 445

สุขใจ ชูจันทร์

สาขาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

Department of Applied Biology, Faculty of science, King Mongkut's Institute of Technology Lardkrabang

บทคัดย่อ

การศึกษากระบวนการผลิตแบบต่อเนื่องสำหรับการผลิตกรดแลกติก โดยใช้น้ำลำไยเป็นซับสเตรตเพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนแหล่งใหม่ พบว่าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติกคือเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 1339 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 และปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกมากที่สุดคือ ใช้ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 10 การใช้น้ำลำไยซึ่งมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตรและสารสกัดยีสต์ร่วมกันเพื่อใช้เป็นซับสเตรต จะทำให้ได้ปริมาณกรดแลกติกสูงกว่าการใช้อาหารสังเคราะห์ในการผลิตกรดแลกติก และช่วยลดระยะเวลาการผลิตให้น้อยลงได้ มีการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมคือ สารสกัดยีสต์ ทริปติกซอย ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต และโซเดียมไนเตรต พบว่า สารสกัดยีสต์มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนมากที่สุด โดยใช้ในปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการผลิตในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร จะได้ปริมาณกรดแลกติกปริมาณ 24.69 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48 มีผลผลิต 0.308 กรัมต่อกรัม และมีอัตราการผลิต 0.514 กรัมต่อลิตรชั่วโมง เมื่อทำการผลิตแบบกะในถังหมักขนาด 2 ลิตร จะได้ปริมาณกรดแลกติก 29.28 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 36 มีผลผลิต 0.310 กรัมต่อกรัม และมีอัตราการผลิต 0.816 กรัมต่อลิตรชั่วโมง และเมื่อทำการผลิตแบบต่อเนื่องในถังหมักขนาด 2 ลิตร ทำให้ได้ปริมาณกรดแลกติก 27.04 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 30 มีอัตราการผลิต 0.901 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ซึ่งการผลิตแบบต่อเนื่องให้อัตราการผลิตที่สูงกว่าการผลิตแบบกะ จากการศึกษาครั้งนี้เป็นการค้นพบและได้ความรู้ใหม่ว่าน้ำลำไยสามารถนำมาผลิตกรดแลกติกได้ เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิต และการใช้การหมักแบบต่อเนื่องจะช่วยเพิ่มอัตราการผลิตกรดแลกติกให้สูงขึ้นได้

คำสำคัญ: กรดแลกติก ลำไย การหมักแบบต่อเนื่อง

RECAP QD 305 .A1 ส๔๓๘ ๒๕๕๔

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาขาวิ.....
เลขทะเบียน 115492
วัน,เดือน,ปี 15 มี.ค. 2554

b 12311972
i.....

ABSTRACT

Continuous fermentation of lactic acid by using *Lactobacillus dellbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 1339 from longan juice which was new substrate using as carbon source was investigated. Various inoculum sizes were *Lactobacillus dellbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 1339 and *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108, which is found that the optimum inoculum size is 10%*Lactobacillus dellbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Using longan juice combined yeast extract as substrate to carbon source, it was reduced fermentation time and produced lactic acid higher than modified synthetic medium. The optimum medium for lactic acid production was longan juice with 120 g/l of sugar concentration (pure longan juice). Among different nitrogen source added to longan juice (yeast extract, tryptic soy, urea, $(NH_4)_2SO_4$ and $NaNO_3$), yeast extract was the most efficient. The addition of yeast extract at 10 g/l to longan juice could be produced maximum lactic acid 24.69 g/l in 48 h, yield was 0.308 g/g and productivity was 0.514 g/lh in a 2 liters flask. Batch fermentation was conducted in a 2 liters fermentor, was produced lactic acid 29.28 g/l in 36 h, yield was 0.310 g/g and productivity was 0.816 g/lh. The continuous fermentation using a 2 liters fermentor was produced the maximum lactic acid of 27.04 g/l in 30 h, and productivity was 0.901 g/lh. We found that the continuous fermentation result give the productivity of lactic acid higher than the batch fermentation. From this study we was found a new knowledge in to produced lactic acid fermentation from longan juice which reduced the cost of production and can be enhanced the lactic acid productivity by continuous fermentation system.

KEYWORDS: lactic acid, longan, continuous fermentation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

กรดแลกติกและอนุพันธ์ของกรดแลกติก เช่น แลกทีเลตเตต โมโนกลีเซอร์ไรด์และแลกทีเลตเตตไดกลีเซอร์ไรด์ของกรดไขมัน (lactylated mono-and diglycerides of fatty acids), glyceryl lactostearate และ glyceryl lactopalmitate ได้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในด้านอาหาร เภสัชกรรม อุตสาหกรรมฟอกหนัง และอุตสาหกรรมสิ่งทอ (Kadam และคณะ, 2006) กรดแลกติกเป็นวัตถุดิบในการผลิตพอลีแลกติกแอซิด (polylactic acid) เป็นพอลิเมอร์ในการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ ทดแทนพลาสติกที่ได้จากการสังเคราะห์จากปิโตรเลียม เป็นสารปรับความเป็นกรดด่าง (Acidity Regulator) ใช้เป็นวัตถุกันเสีย สำหรับแคลเซียมแลกเตตมีการใช้เป็นวัตถุทำให้คงรูป (Firming Agents) ใช้กับผลไม้ที่นำมาผลิตแยม ใช้ในผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ เพื่อช่วยป้องกันการสลายตัวของเพกติน ในทางการแพทย์ใช้แคลเซียมแลกเตตเป็นส่วนผสมของยาลดกรดในกระเพาะ และช่วยรักษาการขาดแคลเซียมในร่างกาย (Milcent และCarrere, 2001)

การผลิตกรดแลกติกสามารถผลิตได้จากกระบวนการทางเคมีและกระบวนการทางชีวภาพ แต่การผลิตทางเคมีจะทำให้ได้กรดแลกติกที่อยู่ในรูปผสม (DL-Lactic) ดังนั้นการทำให้บริสุทธิ์จึงมีค่าใช้จ่ายสูงและมีความยุ่งยาก แต่การผลิตโดยกระบวนการทางชีวภาพสามารถเลือกผลิตให้อยู่ในรูป D (-)Lactic หรือ L (+) Lactic โดยการคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่เหมาะสม สามารถเจริญได้ในวัตถุดิบที่มีราคาถูก ให้ผลผลิตสูง (Tango and Ghaly, 1999) การหมักแบบกะเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรม พบว่าการหมักแบบกะมีการใช้เซลล์อิสระถึงร้อยละ 50 แต่พบว่าผลผลิตที่ได้มีปริมาณน้อย ดังนั้นจึงมีการศึกษาเพื่อเพิ่มผลผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีการหมักแบบต่างๆ ซึ่งกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มผลผลิต (Adolf และคณะ.,2006 ; Gao และคณะ, 2005) นอกจากนี้การผลิตโดยใช้เชื้อผสมยังสามารถเพิ่มปริมาณกรดแลกติกให้สูงขึ้นได้อีกด้วย (Plessas และคณะ, 2008)

ลำไยเป็นผลไม้ที่มีมากในประเทศไทยโดยเฉพาะภาคเหนือที่มีการปลูกเป็นจำนวนมาก จนบางครั้งทำให้มีปริมาณลำไยล้นตลาดทำให้ราคาลำไยตกต่ำ ชาวสวนขาดทุน ดังนั้นผู้วิจัยจึงคิดหาแนวทางเพื่อนำลำไยมาใช้ให้เกิดประโยชน์ และเพื่อเพิ่มมูลค่าของลำไย และสาเหตุสำคัญอีกประการหนึ่ง คือลำไยมีปริมาณน้ำตาลรีดิวส์สูง ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้น้ำตาลรีดิวส์เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต และสร้างผลผลิตต่างๆได้ จึงคาดหวังว่าลำไยที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวส์สูงจะส่งผลให้เชื้อที่ใช้ในงานวิจัยนี้สามารถผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณมากตามไปด้วย โดยเป็นแนวทางการวิจัยเพื่อนำลำไยมาใช้เพื่อเป็นซับสเตรตใหม่ในการผลิตกรดแลกติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาการเพิ่มปริมาณผลผลิตกรดแลกติกโดยการหมักแบบต่อเนื่องของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACTT 11842 และ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* NRRLB 445 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร
2. ศึกษาการใช้ประโยชน์จากน้ำลำไยในการผลิตกรดแลกติกเพื่อเพิ่มมูลค่าของลำไย ในขณะเดียวกันก็เป็นแนวทางในการพัฒนาไปสู่ระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. เป็นการศึกษาการใช้ประโยชน์จากลำไยเพื่อผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACTT 11842 และ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* NRRLB 445
2. เป็นการศึกษาหาหัวเชื้อ และปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกจากน้ำลำไย
3. เป็นการศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกจากน้ำลำไย
4. เป็นการศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยวิธีการหมักแบบต่อเนื่องของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ACTT 11842 และ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* NRRLB 445 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำน้ำลำไยซึ่งเป็นผลผลิตทางการเกษตรมาใช้เป็นซับสเตรตในการผลิตกรดแลกติก
2. เพื่อทราบถึงหัวเชื้อ และปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกจากน้ำลำไย
3. เพื่อทราบถึงสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกจากน้ำลำไย
4. สามารถเพิ่มปริมาณผลผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมักทางชีวภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 ประวัติความเป็นมาและความสำคัญของกรดแลกติก

แบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติกเป็นที่รู้จักและนำมาใช้ประโยชน์เป็นเวลานานในการผลิตนมเปรี้ยว เนยแข็ง ผักและผลไม้หมักดอง และขนมปังจากโดเปรี้ยว กรดแลกติกได้ผลิตขึ้นเป็นการค้าแรกที่เมืองลิทเทลตัล (Littleton) รัฐแมสซาซูเซ็ตส์ (Massachusetts) ในปีค.ศ.1881 และในปีค.ศ.1980 สหรัฐอเมริกาและยุโรปผลิตกรดแลกติกในระดับอุตสาหกรรมมากถึง 40,000 ตัน โดยการหมักแบบกะและการสังเคราะห์ทางเคมี เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมฟอกหนัง อุตสาหกรรมสิ่งทอ และอุตสาหกรรมอาหาร กรดแลกติกเป็นวัตถุดิบในการผลิตพอลีแลกติกแอซิด (polylactic acid) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ในการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ ทดแทนพลาสติกที่ได้จากการสังเคราะห์จากปิโตรเลียม

กรดแลกติกมีคุณสมบัติดูดความชื้นได้ง่ายอาจอยู่ในรูปเป็นผลึกหรือของเหลวข้น ไม่มีสี มีกลิ่นครีมอ่อนๆ ละลายน้ำได้ดีให้รสเปรี้ยวปานกลาง ในอุตสาหกรรมอาหารจะมีการใช้กรดแลกติกเป็นสารปรับความเป็นกรดด่าง (Acidity Regulator) และเป็นตัวทำละลาย เช่น ใช้ผสมกับน้ำยาที่ใช้ช่วยเพิ่มความแข็งให้กับเซลโลเฟนเพื่อใช้ในการบรรจุอาหาร น้ำยาล้างฟิล์มถ่ายรูป การพิมพ์สิ่งทอ น้ำยาเคลือบโลหะและขัดเงา ใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหาร ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการใช้กรดแลกติก ได้แก่ แยม เยลลี เชอร์เบต ผลิตภัณฑ์ขนมหวานแลเครื่องดื่มชนิดต่างๆ ซอสและผักดอง เป็นต้น โดยอาจจะใช้กรดแลกติกเพียงชนิดเดียวหรือรวมกับกรดชนิดอื่นๆ

ในด้านเภสัชกรรมนิยมใช้เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางครีม และเป็นส่วนผสมของครีมเพื่อป้องกันสิว พอลิเมอร์ของกรดแลกติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ได้นำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์เช่น ไหมเย็บแผล การทำศัลยกรรมกระดูก เป็นต้น

แคลเซียมแลคเตตมีการใช้ทำเป็นวัตถุทำให้คงรูป (Firming Agents) ใช้กับผลไม้ที่นำมาผลิตแยม ใช้ในผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ เพื่อช่วยป้องกันการสลายตัวของเพคติน ทำให้ผักและผลไม้มีความคงตัวมากขึ้น ช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงของสีและกลิ่นรสของผักและผลไม้ในระหว่างกระบวนการแปรรูป สำหรับในผลิตภัณฑ์ปลา เนื้อ และสัตว์ปีก มีการใช้กรดแลกติกหรือเกลือแลคเตตเพื่อช่วยยืดอายุการเก็บรักษา ในผลิตภัณฑ์ขนมอบช่วยทำให้เกิดเจลที่ดีขึ้น ช่วยปรับปรุงคุณภาพของนมผง นมข้น ในทางการแพทย์ใช้แคลเซียมแลคเตตเป็นส่วนผสมของยาลดกรดในกระเพาะ และช่วยรักษาการขาดแคลเซียมในร่างกาย ส่วนผู้ขาดธาตุเหล็ก สังกะสีและแมกนีเซียม ก็สามารถบริโภคอาหารที่มีการเสริมด้วยเฟอรัสแลคเตต (ferrous lctate) ซิงค์แลคเตต(zinc lactate) และแมกนีเซียมแลคเตต (magnesium lactate)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อนุพันธ์ของกรดแลกติกชนิดอื่น เช่น แลคทีเลตเตตโมโนกลีเซอร์ไรด์และแลคทีเลตเตตไดกลีเซอร์ไรด์ของกรดไขมัน (lactylated mono-and diglycerides of fatty acids),กลีเซอรอลแลคโตเทียเรท (glyceryl lactostearate) และ กลีเซอรอลแลคโตปามิเตต (glyceryl lactopalmitate) นิยมใช้เป็นตัวกระทำอิมัลชันในผลิตภัณฑ์ขนมอบ โดยเฉพาะในแป้งเค้กสำเร็จรูปและเนยขาว เป็นต้น ส่วนแคลเซียมสเตียริล-2-แลคทีเลต (calcium stearyl-2-lactylate) นิยมใช้เป็นตัวกระทำอิมัลชันในผลิตภัณฑ์ขนมปัง

2.2 คุณสมบัติทางเคมีและทางกายภาพของกรดแลกติก

คุณสมบัติทางเคมีของกรดแลกติก

กรดแลกติกมีชื่อทางเคมีว่า 2-hydroxypropanoic acid หรือ 2-hydroxypropionic acid สูตรโมเลกุล $C_3H_6O_3$ กรดแลกติกมี2ไอโซเมอร์ดังรูป 1

D(-) lactic acid L(+) Lactic acid

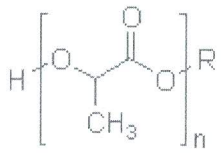
รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของกรดแลกติก

ที่มา: http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY251/dlwrong.html

การเปลี่ยนรูปของ L(+) Lactic acid และ D(-)Llactic acid เกิดจากการหมุนของเอทิลีนออกไซด์บริจด์ (ethylene oxide bridge) ระหว่างคาร์บอนอะตอมที่หนึ่งและอะตอมที่สองโดยเกิด tautomeric shift ของไฮดรอกซิลกรุ๊ป (hydroxyl group) บนคาร์บอนอะตอมที่สองไปเป็นคาร์บอนิลกรุ๊ป (carbonyl group) ของคาร์บอกซิล(carboxyl) กรดแลกติกที่มีความบริสุทธิ์สูงจะไม่มีสี กรดแลกติกสามารถละลายน้ำ เอทานอล อะซีโตน อีเทอร์ และไม่ละลายในคลอโรฟอร์ม ปิโตรเลียมอีเทอร์ และคาร์บอนซัลไฟด์

กรดแลกติกมารวมกันหลายๆโมเลกุล ทำให้เกิดพอลิแลกติกแอซิดดังรูปที่2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Polylactic Acid

รูปที่2 พอลิแลกติกแอซิด

ที่มา : www.cem.msu.edu/~smithmr/Lactide.htm

กรดแลกติกที่เกิดเป็นไซคลิกพอลิเมอร์ (cyclic polymers) เช่น lactide (3,6-dimerthyl-1,4-dioxane-2,5-dione) ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติก โครงสร้างไซคลิกพอลิเมอร์ของกรดแลกติก ดังรูปที่3

รูปที่3 ไซคลิกพอลิเมอร์ของกรดแลกติก

ที่มา : www.cem.msu.edu/~smithmr/Lactide.htm

กรดแลกติกที่สิ่งมีชีวิตผลิตได้จะมีปริมาณความเข้มข้นต่ำ โดยกรดแลกติกความเข้มข้นสูงเป็นอันตรายต่อร่างกายทั้งภายนอกและภายใน เมื่อกรดสัมผัสกับผิวหนังจะเหมือนถูกไฟลวก เมื่อกรดถูกดวงตาสามารถทำให้ตาบอดได้ ในกรณีที่กรดถูกดวงตาหรือผิวหนังควรล้างออกด้วยน้ำสะอาดหลายๆครั้ง

คุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติก

คุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติกแสดงในตารางที่1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 แสดงคุณสมบัติทางกายภาพของกรดแลกติก

คุณสมบัติทางกายภาพ	ค่าพารามิเตอร์
น้ำหนักโมเลกุล	90.08
จุดหลอมเหลว	16.8 °C
จุดเดือด	82 °C ที่ความดัน 0.5 mm.Hg หรือ 122 °C ที่ความดัน 14 mm.Hg
ค่าคงที่ของการแตกตัว (Ka ที่อุณหภูมิ 25 °C)	1.37×10-4
ค่าความร้อนของการเผาไหม้ (ΔHc)	1361 KJ/mole
ค่าความร้อนจำเพาะ (Cp ที่อุณหภูมิ 20 °C)	190 J/mole/°C

ที่มา : Narayanan และคณะ, (2004)

2.3 กระบวนการผลิตกรดแลกติก

การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีการทางเคมี

การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีทางเคมีแบ่งได้ 3 ขั้นตอนดังนี้

1. นำไฮโดรเจนไซยาไนด์ (hydrogen cyanide) ทำปฏิกิริยากับอะซิตีลดีไฮด์ (acetaldehyde) ได้แลคโตไนทรัล (lactonitrile) ที่ความดันบรรยากาศ ดังสมการที่ 1

$$CH_3CHO + HCN \xrightarrow{\text{Liquid phase at high Atmospheric pressures}} CH_3CHOHCN \quad \text{(สมการที่1)}$$

อะซิตีลดีไฮด์ ไฮโดรเจนไซยาไนด์ แลคโตไนทรัล

2. นำแลคโตไนทรัลมาย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก หรือ กรดซัลฟิวริกจะได้กรดแลกติกและเกลือแอมโมเนียม ดังสมการที่ 2

$$CH_3CHOHCN + H_2O + \tfrac{1}{2}H_2SO_4 \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + \tfrac{1}{2}(NH_4)_2SO_4 \quad \text{(สมการที่2)}$$

แลคโตไนทรัล น้ำ กรดซัลฟิวริก กรดแลกติก เกลือแอมโมเนียม

3. นำกรดแลกติกที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ โดยทำให้เป็นอนุพันธ์เอสเทอร์ คือเมทิลแลคเตต มากลั่นและย่อยจะได้กรดแลกติก ส่วนเมทานอล ไฮโดรเจนไซยาไนด์และสารปนเปื้อนอื่นๆจะกำจัดออกโดยนำมาผ่านถ่านกัมมันต์และการแลกเปลี่ยนไอออนดังสมการที่ 3 และสมการที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

$CH_3OHCOOH + CH_3OH \longrightarrow CH_3CHOCOOCH_3 + H_2O$ (สมการที่3)

กรดแลกติก เมทานอล เมทิลแลคเตต น้ำ

$CH_3CHOHCOOCH_3 + H_2O \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + CH_3OH$ (สมการที่4)

เมทิลแลคเตต น้ำ กรดแลกติก เมทานอล

ที่มา : Narayananและคณะ, (2004)

การผลิตกรดแลกติกด้วยวิธีการทางชีวภาพ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกมี 2 ชนิดคือ โฮโมแลกติกแบคทีเรียและเฮเทอโรแลกติกแบคทีเรีย ซึ่งขั้นตอนในการผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้แสดงดังสมการที่ 5 และสมการที่ 6

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CH_3CHOCOOH$ (สมการที่5)

กลูโคส กรดแลกติก

$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow CH_3CHOHCOOH + C_2H_5OH + CO_2$ (สมการที่6)

กลูโคส กรดแลกติก เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์

นอกจากนี้กรดแลกติกยังสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียชนิดอื่นและฟังไจ ซึ่งสามารถหมักได้แบบกะ กึ่งกะและแบบต่อเนื่อง มีรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดแลกติกโดยวิธีการทางชีวภาพ ดังนี้

2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติก

แลกติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic Acid Bacteria ; LAB) จัดอยู่ในแฟมิลี่แลคโตบาซิลลาเซีย (Latobacillacea) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีเอนไซม์คะตะเลส ไม่มีไซโตโครม ทนต่อสภาวะมีอากาศ (aerotolerant) ทนกรด มีทั้งลักษณะรูปร่างกลมและรูปร่างท่อน ในการเจริญได้ทั้งพลังงานจากกระบวนการหมัก (fermentation) น้ำตาลชนิดต่างๆ โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคส มีความต้องการอาหารเชิงซ้อน (complex medium) ลักษณะที่สำคัญของแลกติกแอซิดแบคทีเรีย คือมีความสามารถในการย่อยน้ำตาลให้เป็นกรด ซึ่งทำให้เกิดรสชาติที่ต้องการในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น ผักดอง เนยแข็ง แลกติกแอซิดแบคทีเรียมีบทบาทในการหมักอาหารและเครื่องดื่มหลายชนิดด้วยกัน เช่น นมเปรี้ยว เนยชนิดต่างๆ ผักและผลไม้ดอง ไส้กรอก เบียร์ ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดต่างๆ แลกติกแอซิดแบคทีเรียต้องการแหล่งไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโนและนิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้ยังต้องการวิตามินและเกลือแร่อีกหลายชนิดในการเจริญ ซึ่งความต้องการสารอาหารต่างๆเหล่านี้จะแตกต่างกันไปตามชนิดและสายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

115492

Salminen และคณะ (2004) ได้อธิบายถึงแบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติกว่าเป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างแท่ง (rod) หรือกลม (cocci) สร้างกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในกระบวนการหมัก การจัดสกุลต่างๆเข้าสู่แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกพิจารณาจากรูปร่างสัณฐาน การหมักน้ำตาลกลูโคส การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ ลักษณะกรดแลกติกที่สร้าง ความสามารถในการเจริญในบริเวณที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง การทนต่อความเป็นกรดและด่าง ประกอบด้วยสกุลที่มีความสำคัญทาด้านเทคโนโลยีด้านอาหาร เช่น *Aerococcus* , *Carnobacteriu* , *Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus* , *Tetragenococcus* , *Vagococcus* และ *Weissella*

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

2.5.1 แหล่งคาร์บอน

Rojan และคณะ (2007) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนโดยใช้เชื้อผสมของ Lactobacillus casei และ Lactobacillus delbrueckii พบว่าได้ปริมาณผลผลิตกรดแลกติกสูง 81 กรัมต่อลิตร ซึ่งใช้กากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วร้อยละ 15 (น้ำหนัก/ปริมาตร)

Kadamและคณะ (2006) ศึกษาแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโคส ซูโครส แลกโตส กาแลกโตส ไซโลส มอลโตส ที่สามารถให้ปริมาณกรดที่สูง โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* พบว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่สามารถให้ปริมาณกรดแลกติกสูงสุด และได้ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด น้ำแช่ข้าวโพด(corn steep liquor) ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต ที่เติมลงในอาหารสังเคราะห์โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 พบว่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนปริมาณกรดแลกติกสูงถึง 89 กรัมต่อลิตร

Yun และคณะ (2003) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลแลคโตส กลีเซอรอล ไซโลส เวย์และแป้ง พบว่าการใช้ไซโลส กลีเซอรอล เวย์ และแป้งเป็นซับสเตรต ให้ปริมาณกรดแลกติกที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับการใช้กลูโคส ฟรุกโตส และมอลโตส เป็นซับสเตรต

2.5.2 แหล่งไนโตรเจน

Kadam และคณะ (2006) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน ประกอบด้วย สารสกัดยีสต์ ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) และ skim milk ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 236 พบว่า สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกมากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wee และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากกากน้ำตาล โดยแปรผันปริมาณสารสกัดยีสต์ 5, 10, 15 และ 20 กรัมต่อลิตร พบว่าการเติมสารสกัดยีสต์ 20 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดแลกติกได้มากที่สุดถึง 5.3 กรัมต่อลิตรชั่วโมง

Pauli และ Fitzpatrick (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์ โดยมีการเติมสารสกัดจากมอลต์ และสารสกัดยีสต์ ลงไปเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าเมื่อเติมสารสกัดจากมอลต์ และสารสกัดยีสต์ลงไป ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้จะสูงกว่าเมื่อไม่มีการเติม

Nancib และคณะ (2001) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ สารสกัดยีสต์ เปปโตน ยูเรีย corn steep และแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในน้ำอินทผลัม โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสามารถผลิตกรดแลกติกได้ดี คือ สารสกัดยีสต์

Hofvendahl และ Hagerdal (1997) ศึกษาผลของการเติมสารสกัดยีสต์ในสารสกัดแป้งสาลี (wheat flour hydrolysate) เพื่อผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* และ *Lactobacillus bulgaricus* พบว่าการเติมสารสกัดยีสต์ 5 กรัมต่อลิตรทำให้การผลิตกรดแลกติกของเชื้อทั้งสองสูงกว่าเมื่อไม่มีการเติม

2.5.3 แหล่งแร่ธาตุ

Ohkouchi และ Inoue (2006) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งและเศษอาหารที่เหลือทิ้งจากโรงอาหาร โดยเชื้อ *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18011 พบว่าเมื่อเติมแมงกานีสลงไปปริมาณกรดแลกติกจะสูงกว่าเมื่อเทียบกับการไม่เติมแมงกานีส

Kim และคณะ (2003) ศึกษาผลของแร่ธาตุที่มีต่อการผลิตกรดแลกติกในเศษอาหารเหลือทิ้งจากโรงงาน พบว่าการเติม $MgSO_4.7H_2O$, $FeSO_4.7H_2O$ และ $MnSO_4.H_2O$ ทำให้ปริมาณกรดแลกติกเพิ่มขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง

Fitzpatrick และคณะ (2001) ศึกษาอิทธิพลของแมงกานีสที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ที่มีการเติมแมงกานีสในรูป $MnSO_4.H_2O$ ร่วมกับยีสต์สกัดลงไปในเวย์ พบว่าเวลาที่ใช้ในการผลิตกรดจะสั้นลงและเชื้อสามารถเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสได้ดี แต่เมื่อไม่มีการเติมแมงกานีสเวลาที่ใช้ในการผลิตจะนานขึ้น และเชื้อไม่สามารถนำน้ำตาลแลคโตสไปใช้ได้เท่าที่ควร

2.5.4 พีเอช

Chauhan และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากน้ำอินทผลัม โดยเชื้อ *Lactabacillus* sp. KCPO1 พบว่าการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 45.59 กรัมต่อลิตร เทียบกับการไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งสามารถผลิตได้เพียง 16.5 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Huang และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันฝรั่งโดยเชื้อ *Rhizopus oryzae* และ *Rhizopus arrhizus* พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกอยู่ระหว่าง 6 - 7

Wee และคณะ (2004) ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกจากกากน้ำตาล โดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* RKY 1 พบว่าพีเอช 6 สามารถให้ปริมาณกรดแลกติกสูงถึง 96.1 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 96.3

Pauli และ Fitzpatrick (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าการควบคุมให้ค่าพีเอชอยู่ที่ 5.4 เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

Roukas และ Kotzekidou (1998) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากเวย์ โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* และ *Lactococcus lactis* ได้มีการปรับค่าพีเอชอยู่ในช่วง 5.7 – 6.3 พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้สูงถึงร้อยละ 48.4

2.5.5 อุณหภูมิ

Idris และ Suzuna (2006) ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสับปะรดโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ซึ่งในการทดลองได้ศึกษาอุณหภูมิที่ระดับ 27, 30, 37, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซลเซียส จุลินทรีย์สามารถผลิตกรดแลกติกได้ดีที่สุด และนอกจากนั้นยังได้ทำการศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุเหลือทิ้งของการผลิตน้ำสับปะรดโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* บว่าที่พีเอช 6.5 การใช้น้ำตาลจะเร็ว และให้ปริมาณกรดแลกติกที่สูง

John และคณะ (2006) ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2025 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37 องศาเซลเซียสสามารถผลิตกรดแลกติกได้มากที่สุด

Oh และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากวัสดุทางการเกษตรที่มีราคาถูกโดยเชื้อ *Enterococus faecalis* RKY 1 มีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 38 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้มีปริมาณสูง

Wee และคณะ(2004) ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากกากน้ำตาลโดยเชื้อ *Enterococcus faecalis* พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกคือ 38 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์การวิจัย

3.1.1 เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท HACH รุ่น DR/4000

คิวเวตแก้ว

เครื่องHigh Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของบริษัท SHIMADZU รุ่น C-R7 Ae plus

เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Falcon 6/300

เครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ของบริษัท Hirayama รุ่น HA-300 HIV

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท SHIMADZU รุ่นLIBROR EB-40000 H

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น A 200 S

เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของบริษัท Denver Instrument รุ่น Model 215

เครื่องอบร้อนของบริษัท Binder

ตู้เย็นอุณหภูมิ -83 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO รุ่น MDF-U 4086S

ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO

ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ของบริษัท Gallenkamp

ตู้เขี่ยเชื้อ (Lamina flow) ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT 123

ถังหมักขนาด 2 ลิตร ของบริษัทBiotech International Gmb H.D-34212 Melhungen, Germany)

บีกเกอร์ (beaker)ของบริษัท PYREX^{R}

ปิเปตต์ (pipette)

ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)

หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท PYREX^{R}

3.1.2 สารเคมี

ทริปติกซอย (tryptic soy)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)

เปปโตน (peptone)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยูเรีย

แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 .4\ H_2O$)

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7H_2O$)

โซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$)

สารสกัดยีสต์ (yeast extract)

3.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 1339 และ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.2.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 1339 และ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 โดยเชื้อแต่ละชนิดมีวิธีการเก็บรักษา คือใช้ลวดเขี่ยเชื้อแล้วลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งMRS แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Youssef และคณะ, 2000) เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันปิดปากหลอดทดลองให้แน่น เก็บหลอดทดลองดังกล่าวไว้ในถุงพลาสติกแล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ (subculture) ทุกๆ 2 สัปดาห์

3.2.2 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อแต่ละชนิด จำนวน 2 ลูป ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ที่อยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (Senthuran และคณะ, 1999) (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว) จะได้หัวเชื้อเริ่มต้นที่นำไปใช้ในการวิจัย

สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัยมีดังนี้

3.4 สูตรอาหารที่ใช้ในการวิจัย

3.4.1 อาหารสังเคราะห์ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 2

แลคโตส	50	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด	5	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	10	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.25	กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แมงกานีสซัลเฟต	0.03	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.10	กรัมต่อลิตร
แคลเซียมคาร์บอเนต	20	กรัมต่อลิตร

ใช้น้ำเป็นตัวทำละลายจากนั้นปรับปริมาตรเท่ากับ 1 ลิตร

3.5 การศึกษาหาหัวเชื้อ และปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก

ทำการศึกษาโดยใช้หัวเชื้อและปริมาณของหัวเชื้อ ดังนี้ *L. rhamnosus* 5 %, *L. delbrueckii* 5% , *L. rhamnosus* 10 % และ *L. delbrueckii* 10% ทำการผลิตในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง โดยใช้อาหารสังเคราะห์ในการผลิต

3.6 การศึกษาเปรียบเทียบชนิดของอาหารที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

ในการศึกษาจะใช้อาหารที่มีส่วนประกอบต่าง ๆ เปรียบเทียบกัน โดยมีอาหารสังเคราะห์เป็นชุดควบคุม เปรียบเทียบกับอาหารที่มีน้ำลำไยเพียงอย่างเดียว, น้ำลำไยที่เติมแร่ธาตุ, น้ำลำไยที่เติมสารสกัดยีสต์, น้ำลำไยที่เติมสารสกัดยีสต์และแร่ธาตุ ทำการผลิตในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

3.7 การศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลในน้ำลำไยที่มีต่อการผลิตกรดแลกติก

ในการศึกษาจะใช้อาหารที่มีน้ำลำไยและเติมสารสกัดยีสต์ โดยผันแปรปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่ในน้ำลำไย ดังนี้ 120 100 80 60 และ 40 กรัมต่อลิตร ทำการผลิตในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

3.8 การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆที่มีต่อการผลิตกรดแลกติก

ในการศึกษาจะใช้อาหารที่มีน้ำลำไยซึ่งมีปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสม และเติมแหล่งไนโตรเจน โดยผันแปรแหล่งไนโตร ดังนี้ สารสกัดยีสต์ (yeast extract) ทริปติกซอย (tryptic soy) ยูเรีย (urea) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) และโซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) ในปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร ทำการผลิตในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.9 การศึกษาผลของการเติมยูเรียและแอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับสารสกัดยีสต์ในน้ำลำไยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

ในการศึกษาจะใช้อาหารที่มีน้ำลำไยซึ่งมีปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมที่เติมสารสกัดยีสต์ผสมกับยูเรีย และแอมโมเนียมไนเตรต โดยชุดควบคุมคือ น้ำลำไยที่เติมสารสกัดยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร ทำการผลิตในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง

3.10 การผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมักแบบกะในฟลาสก์ และถังหมักขนาด 2 ลิตร

เลือกใช้สูตรอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกมากที่สุดที่ได้จากการศึกษาข้างต้นมาทำการศึกษาเปรียบเทียบการผลิตในระดับฟลาสก์และถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยการหมักแบบกะ สภาวะที่ใช้ทำการศึกษาในระดับฟลาสก์ คือ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง สภาวะที่ใช้ทำการศึกษาในระดับถังหมัก คือ ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที พีเอช 6.5 โดยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 โมลาร์

3.11 การผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

เลือกใช้สูตรอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกมากที่สุดที่ได้จากการศึกษาข้างต้นมาทำการศึกษาโดยมีการควบคุมสภาวะที่ใช้ในการผลิต คือ ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที พีเอช 6.5 โดยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 โมลาร์

3.12 การวิเคราะห์

นำตัวอย่างปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกด้วยเครื่อง HPLC (SHIMADZU Co., Tokyo, Japan) คอลัมน์ชนิด Inertsil C8-3 โดยมีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 3 ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เป็นเฟสเคลื่อนที่ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตร นำพื้นที่ใต้กราฟเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลซูโครสวิเคราะห์โดยวิธี Lane and Eynon (A.O.A.C., 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.13 การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของปริมาณกรดแลกติกโดยวิธี Duncan New Multiple Range test โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 ผลของปริมาณหัวเชื้อที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้หัวเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 1339 และ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 108 ในอาหารสังเคราะห์ เมื่อทำการผลิตในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 1 พบว่าเมื่อใช้หัวเชื้อ *L. delbrueckii* ปริมาณร้อยละ 10 สามารถผลิตกรดแลกติกได้มากที่สุดคือ 20.07 กรัมต่อลิตร มีผลผลิต 0.530 กรัมต่อกรัม มีอัตราการผลิต 0.238 กรัมต่อลิตรชั่วโมง เหลือปริมาณน้ำตาล 2.13 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 1 แสดงผลของปริมาณหัวเชื้อเดี่ยวและหัวเชื้อผสมที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

Innoculum	Fermentation Time (h)	Lactic acid concentration (g/l)	Yield (g/g)	Productivity (g/lh)	Residued sugar (g/l)
L. rhamnosus 5 %	72	$10.94^{e} \pm 0.151$	0.340±0.020	0.151 ±0.002	7.80
L. delbrueckii 5%	84	$12.98^{d} \pm 0.552$	0.392±0.018	0.154±0.001	6.89
L. rhamnosus 10 %	72	$15.83^{c} \pm 0.191$	0.461±0.036	0.219±0.001	5.66
L. delbrueckii 10%	84	$20.07^{a} \pm 0.273$	0.530±0.005	0.238±0.003	2.13

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (a,b,c,d,e) แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากผลการศึกษาในครั้งนี้หากปริมาณหัวเชื้อมีมากเกินไปจะทำให้เกิดการแย่งสารอาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากความเข้มข้นของอาหารนั้นมีผลต่ออัตราการเจริญ (rate-limiting substrate concentration) ส่งผลให้อัตราการเจริญลดลง ในขณะเดียวกันหากปริมาณหัวเชื้อน้อยเกินไปส่งผลให้การเจริญในช่วง lag phase ยาวนาน เนื่องจากต้องปรับตัวให้เข้ากับความเข้มข้นของอาหารที่มีปริมาณมากกว่าหัวเชื้อ (Kun, 2006) ดังนั้นในการทดลองในขั้นตอนต่อไปจึงเลือกใช้หัวเชื้อ *L. delbrueckii* ร้อยละ 10 เพื่อใช้ในการผลิตกรดแลกติกในขั้นตอนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การเปรียบเทียบชนิดของอาหารที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยใช้เชื้อผสมในอาหารชนิดต่างๆที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร โดยใช้อาหารสังเคราะห์เป็นชุดควบคุม เมื่อทำการผลิตในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงชนิดของอาหารที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

Fermentation medium	Fermentation Time (h)	Lactic acid (g/l)	Yield (g/g)	Productivity (g/lh)	Residued sugar (g/l)
Control	72	$20.26^{c} \pm 0.124$	0.514± 0.034	0.281±0.001	0.58
Longan juice	84	$16.59^{d} \pm 0.321$	0.505±0.127	0.197±0.004	7.14
Longan juice + minerals	72	$16.34^{d} \pm 0.173$	0.501±0.341	0.226±0.001	7.38
Longan juice + yeast extract	48	$24.06^{a} \pm 0.251$	0.613±0.058	0.501±0.002	0.75
Longan juice + yeast extract+ minerals	72	$22.36^{b} \pm 0.320$	0.597±0.133	0.310±0.002	2.54

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (a,b,c,d) แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากการทดลองพบว่าอาหารจากน้ำลำไยที่เติมสารสกัดยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดแลกติกได้มากที่สุดเท่ากับ 24.06 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48 มีผลผลิตกรดแลกติก 0.613 กรัมต่อกรัม มีอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.501 กรัมต่อลิตรชั่วโมง โดยเหลือปริมาณน้ำตาล 0.75 กรัมต่อลิตร ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพมากกว่าอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ นอกจากนั้นในน้ำลำไยที่ไม่เติมสารสกัดยีสต์ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนทำให้ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้น้อยกว่า ดังนั้นการผลิตกรดแลกติกจากน้ำลำไยจำเป็นต้องเติมแหล่งไนโตรเจน แต่ไม่จำเป็นต้องเติมแร่ธาตุหรือแหล่งคาร์บอนชนิดอื่น ๆ ซึ่งถือว่าเป็นการลดต้นทุนการผลิต

4.3 ผลของปริมาณน้ำตาลในน้ำลำไยที่มีต่อการผลิตกรดแลกติก

จากการศึกษาการใช้น้ำลำไยซึ่งมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร เติมสารสกัดยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดแลกติกได้ดีกว่าอาหารสูตรอื่นๆ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงผันแปรความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำลำไย (น้ำลำไยมีน้ำตาลทั้งหมด 120 กรัมต่อลิตร) เท่ากับ 120 100 80 60 และ 40 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณน้ำตาลในน้ำลำไยที่มีต่อการผลิตกรดแลกติก

Sugar concentration (g/l)	Fermentation Time (h)	Lactic acid (g/l)	Yield (g/g)	Productivity (g/lh)	Residued sugar (g/l)
40	48	21.32 ^{c} ± 0.164	0.545±0.025	0.444±0.002	0.9
60	60	23.56 ^{b} ± 0.239	0.429±0.143	0.392±0.001	6.1
80	72	26.11 ^{a} ± 0.553	0.350±0.178	0.362±0.004	6.5
100	60	26.01 ^{a} ± 0.261	0.330±0.056	0.433±0.002	22.3
120	48	25.87 ^{a} ± 0.162	0.322±0.071	0.538±0.001	39.8

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (a,b,c) แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำลำไย 120, 100 และ 80 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดแลกติกได้โดยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่าปริมาณน้ำตาลในน้ำลำไย 120 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดแลกติก โดยใช้เวลาเพียง 48 ชั่วโมง ทำให้อัตราการผลิตกรดแลกติกมีค่ามากที่สุด ดังนั้นจึงเลือกน้ำลำไยที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

4.4 ผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆที่มีต่อการผลิตกรดแลกติก

จากการศึกษาการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆในน้ำลำไยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก ประกอบด้วย สารสกัดยีสต์ (yeast extract) ทริปติกซอย (tryptic soy) ยูเรีย (urea) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) และโซเดียมไนเตรต ($NaNO_3$) 10 กรัมต่อลิตร ในน้ำลำไยที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4

จากการทดลองพบว่าน้ำลำไยที่เติมสารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถผลิตกรดแลกติก ได้มากที่สุดเท่ากับ 24.69 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48 มีผลผลิตกรดแลกติก 0.308 กรัมต่อกรัม มีอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.514 กรัมต่อลิตรชั่วโมง รองลงมาคือ ทริปติกซอย แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย สำหรับโซเดียมไนเตรตพบว่าเชื้อไม่สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้

จากการศึกษาของ Nancib และคณะ (2001) ศึกษาอิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่ สารสกัดยีสต์ เปปโตน ยูเรีย น้ำแช่ข้าวโพด และแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงในน้ำอินทผลัม โดยเชื้อ *Lactobacillus casei* พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่มีประสิทธิภาพสามารถผลิตกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แลกติกได้ดี คือ สารสกัดยีสต์ เนื่องจากในสารสกัดยีสต์มีสารอาหารต่าง ๆ เช่น วิตามิน กรดอะมิโน หลากหลายชนิดที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

Kadam และคณะ (2006) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจน ประกอบด้วย สารสกัดยีสต์ ยูเรีย แอมโมเนียมซัลเฟต น้ำแช่ข้าวโพด (corn steep liquor) และ skim milk ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 236 พบว่า สารสกัดยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกมากที่สุด

ตารางที่4 แสดงผลของแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการผลิตกรดแลกติก

Nitrogen sources	Fermentation Time (h)	Lactic acid (g/l)	Yield (g/g)	Productivity (g/lh)	Residued sugar (g/l)
Yeast extract	48	24.69 [a] ±0.564	0.308±0.012	0.514±0.001	39.83
Tryptic soy	60	22.81 [b] ±0.434	0.294±0.034	0.380±0.002	42.41
$(NH_4)_2SO_4$	60	20.71 [c] ±0.218	0.295±0.0215	0.345±0.002	49.79
Urea	72	20.10 [c] ±0.365	0.291±0.157	0.279±0.003	50.92
$NaNO_3$	-	-	-	-	120

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (a,b,c) แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.5 ผลของการเติมยูเรียและแอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับสารสกัดยีสต์ในน้ำลำไยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติก พบว่าสารสกัดยีสต์สามารถผลิตกรดแลกติกได้มากที่สุด แต่เนื่องจากสารสกัดยีสต์มีราคาแพง การใช้แหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูกกว่าจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ในการทดลองนี้จึงนำสารสกัดยีสต์ และแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรียในอัตราส่วนต่างๆมาใช้ในการผลิตกรดแลกติก โดยชุดควบคุมคือ สารสกัดยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 5

จากผลการทดลองแม้ว่าจะนำสารสกัดยีสต์ผสมกับยูเรียหรือแอมโมเนียมไนเตรตในอัตราส่วนต่าง ๆ การผลิตกรดแลกติกจากน้ำลำไยที่เติมสารสกัดยีสต์ 10 กรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุด แม้ว่าปริมาณไนโตรเจนจะเพิ่มขึ้น 20 กรัมต่อลิตรแต่ปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้ก็ไม่เพิ่มขึ้น ดังนั้นการใช้สารสกัดยีสต์ 10 กรัมต่อลิตรจึงเพียงพอต่อการนำมาใช้ในการผลิตกรดแลกติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงผลของชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

Nitrogen sources	Ratio (g/l)	Fermentation Time (h)	Lactic acid (g/l)	Yield (g/g)	Productivity (g/lh)	Residued sugar (g/l)
yeast extract:$(NH_4)_2SO_4$	5:5	60	22.15 ^{c} ±0.315	0.295 ±0.017	0.369 ±0.004	44.91
	5:10	48	23.64 ^{b} ±0.423	0.302 ±0.211	0.492 ±0.001	41.72
	10:5	48	24.38 ^{ab} ±0.126	0.306 ±0.034	0.507 ±0.003	40.33
	10:10	48	24.54 ^{a} ±0.254	0.305 ±0.062	0.511 ±0.002	39.54
yeast extract : urea	5:5	60	20.87 ^{d} ±0.112	0.278 ±0.221	0.347 ±0.001	44.92
	5:10	48	20.83 ^{c} ±0.326	0.267 ±0.043	0.433 ±0.002	41.98
	10:5	48	24.12 ^{ab} ±0.145	0.307 ±0.069	0.502 ±0.001	41.43
	10:10	48	24.06 ^{ab} ±0.087	0.304 ±0.033	0.501 ±0.003	40.86
yeast extract	10	48	24.69 ^{a} ±0.120	0.308 ±0.128	0.514 ±0.002	39.83

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกัน (a,b,c,d) แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.6 การผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมักแบบกะในฟลาสก์ และถังหมักขนาด 2 ลิตร

การผลิตกรดแลกติกโดยใช้เชื้อผสมของ *L. rhamnosus* ร้อยละ 5 และ *L. delbrueckii* ร้อยละ 10 ในน้ำลำไยที่เติมยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง และในถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ใช้อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที พีเอช 6.5 โดยการเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5 โมลาร์ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 6 รูปที่ 1 และ รูปที่ 2

จากตารางพบว่าการผลิตกรดแลกติกในถังหมักขนาด 2 ลิตร สามารถผลิตกรดแลกติกได้มากที่สุดเท่ากับ 29.28 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 36 มีผลผลิตกรดแลกติก 0.313 กรัมต่อกรัม มีอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.816 กรัมต่อลิตรชั่วโมง โดยเหลือปริมาณน้ำตาล 26.33 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การผลิตกรดแลกติกในระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 25.40 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48 มีผลผลิตกรดแลกติก 0.297 กรัมต่อกรัม มีอัตราการผลิตกรดแลกติก 0.529 กรัมต่อลิตรชั่วโมง โดยเหลือปริมาณน้ำตาล 34.7 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์พบว่าสามารถผลิตกรดแลกติกได้น้อยกว่าในถังหมัก เนื่องจากไม่มีการควบคุมพีเอช ทำให้พีเอชในอาหารมีความเป็นกรดสูงซึ่งเกิดจากกรดแลกติกที่เชื้อผลิตขึ้น ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่เชื้อสร้างขึ้น (product inhibition)

การผลิตกรดแลกติกในถังหมักพบว่ามีประสิทธิภาพดีกว่าการผลิตในฟลาสก์เนื่องจากสามารถควบคุมสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติกได้ เช่น พีเอช อุณหภูมิ นอกจากนั้นยังมีการกวน เพื่อให้เซลล์สัมผัสกับสารอาหารได้อย่างทั่วถึง และนำสารอาหารไปใช้ได้ดียิ่งขึ้น ทำให้ผลิตกรดแลกติกได้มากภายในระยะเวลาอันรวดเร็ว (Stanbury and Whitaker, 1984)

ตารางที่ 6 แสดงผลของการผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์ และถังหมักขนาด 2 ลิตร

Fermentation conditions	Fermentation Time (h)	Lactic acid (g/l)	Yield (g/g)	Productivity (g/lh)	Residued sugar (g/l)
Flask	48	25.40±0.190	0.297±0.122	0.529±0.002	34.7
Fermentor	36	29.28±0.030	0.313±0.215	0.816±0.001	26.33
p-value	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001

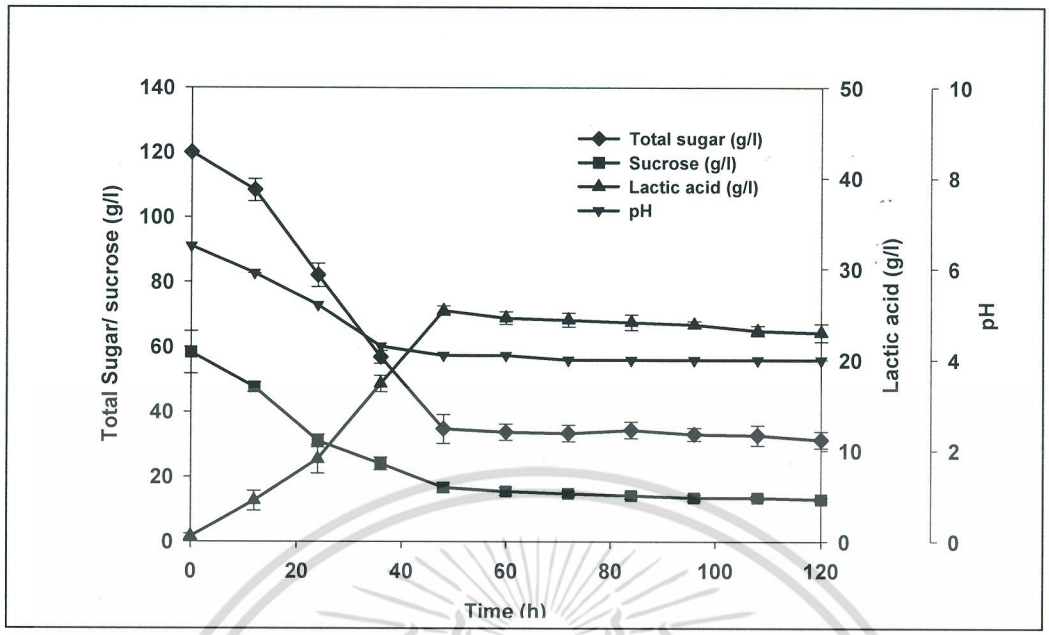
หมายเหตุ

ค่า p-value < 0.01 = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 99

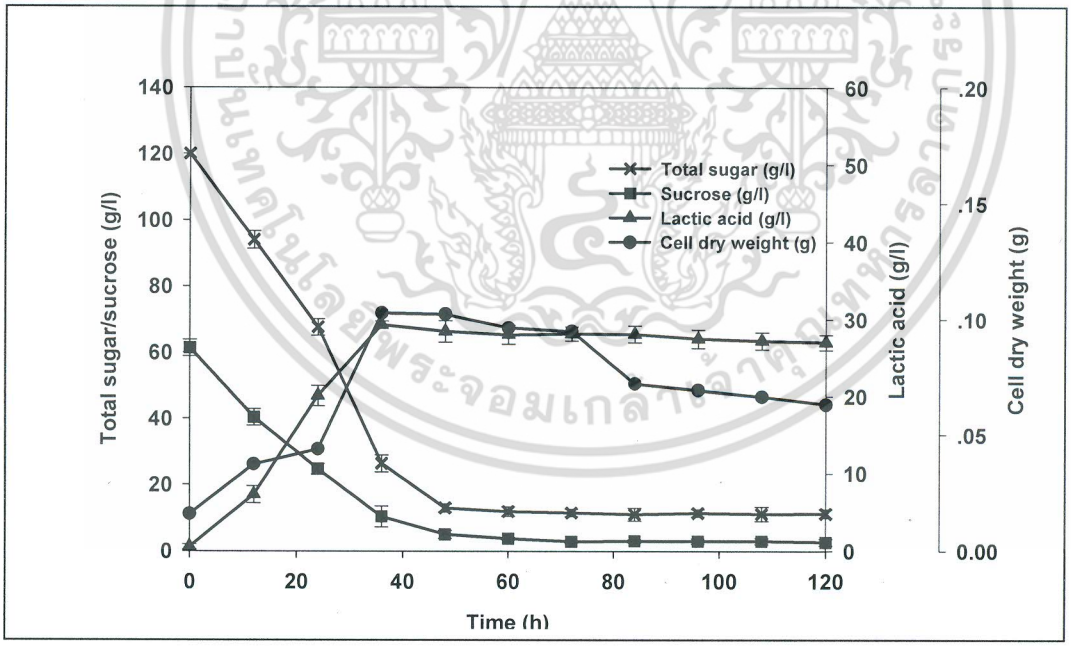
ค่า p-value อยู่ในช่วง 0.01 < p-value<0.05 = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95

ค่า p – value > 0.05 = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 แสดงการผลิตกรดแลกติกในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง



รูปที่ 2 แสดงการผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมักแบบกะ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 ใช้อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

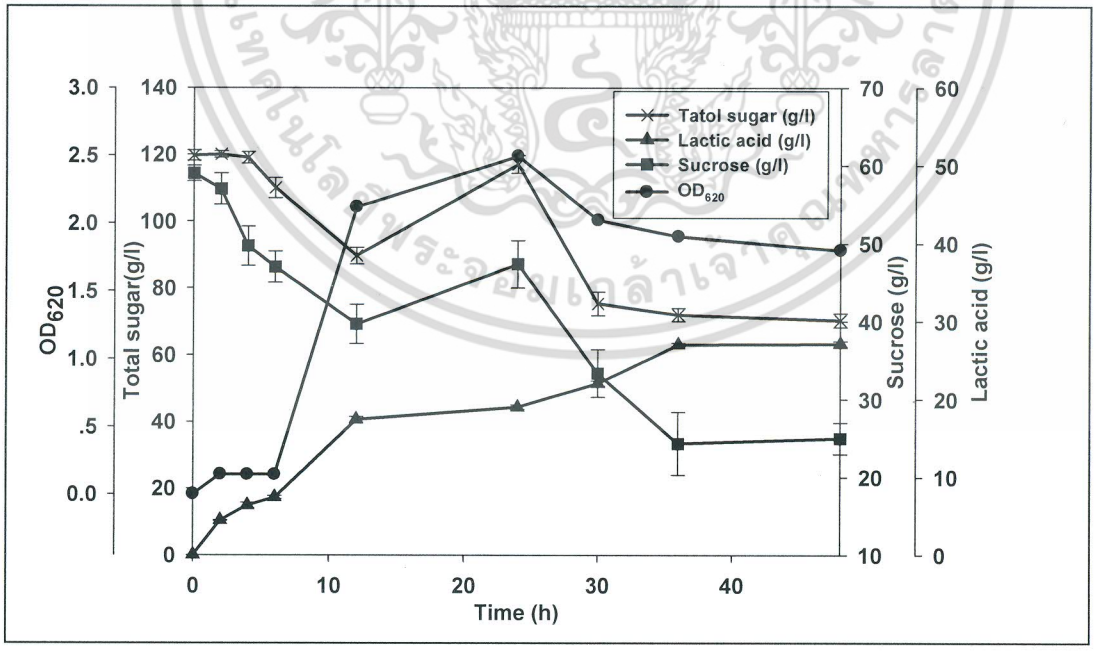
4.7 การผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

นำค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการบวนการหมักแบบกะในถังหมัก มาเขียนกราฟระหว่างระยะเวลาที่ใช้ในการผลิต กับค่าลอกกาลิทึมของค่าความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ณ เวลานั้น ๆ จะได้กราฟเส้นตรงที่สามารถหาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, μ) ซึ่งได้ค่าเท่ากับ 0.0685

จากสูตร $\mu = F/V$ เมื่อ F คือ อัตราการไหล และ V คือ ปริมาตรของถังหมัก เมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตที่คงที่ ค่า μ จะเท่ากับค่า D เมื่อ D คือค่าอัตราการเจือจาง (Dilution rate) เมื่อแทนค่าต่าง ๆ ในสมการจะค่าอัตราการไหลเท่ากับ 0.4175 มิลลิลิตรต่อนาที

สำหรับเวลาที่จะทำการนำอาหารเข้าและออกจากถังหมักนั้นได้มาจากการคำนวณจากสมการ $t_d = 0.693/\mu$ เมื่อ t_d (doubling time) คือเวลาที่เหมาะสมสำหรับการนำอาหารเข้าและออกจากถังหมัก เมื่อแทนค่าพารามิเตอร์จึงได้ค่า t_d เท่ากับ 12 ชั่วโมง

การผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 27.04 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 30 ดังแสดงในรูปที่ 3 ถึงแม้ว่าการผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องจะได้ปริมาณกรดแลกติกน้อยกว่าการหมักแบบกะ แต่ใช้ระยะเวลาในการผลิตที่เร็วกว่า จึงทำให้มีอัตราการผลิตที่เร็วกว่าการหมักแบบกะซึ่งมีค่าอัตราการผลิตที่ 0.901 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 7



รูปที่ 3 แสดงการผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 ใช้อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 แสดงผลการผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องและแบบกะ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

System of fermentation	Fermentation Time (h)	Lactic acid (g/l)	Productivity (g/lh)	Residued sugar (g/l)
Batch	36	29.28±0.030	0.816±0.001	26.33
Continuous	30	27.04±0.100	0.901±0.001	71.00
p-value	-	0.000	0.000	-

หมายเหตุ

ค่า p-value < 0.01 = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 99

ค่า p-value อยู่ในช่วง 0.01 < p-value<0.05 = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95

ค่า p – value > 0.05 = ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ผลการศึกษาครั้งนี้ได้ผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Min และคณะ (2005) ซึ่งทำการศึกษาการผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องของเชื้อ *Lactobacillus helveticus* และพบว่าการหมักแบบต่อเนื่องจะทำให้ได้อัตราการผลิตกรดแลกติกที่มากขึ้น ซึ่งเมื่อทำการหมักแบบกะจะได้ปริมาณกรดแลกติก 11.3 กรัมต่อลิตร และเมื่อทำการหมักแบบต่อเนื่องจะได้ปริมาณกรดแลกติก 9.2 กรัมต่อลิตร แต่การหมักแบบต่อเนื่องมีอัตราการผลิตที่มากกว่า คือ 3.0 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ในขณะที่การหมักแบบกะมีอัตราการผลิต 2.8 กรัมต่อลิตรชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

การศึกษาการใช้ประโยชน์จากน้ำลำไยสำหรับการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อ *L. delbrueckii* ซึ่งใช้ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 10 พบว่าน้ำลำไยเป็นซับสเตรตที่มีความเหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติกมากกว่าการใช้อาหารสูตรสังเคราะห์ แต่น้ำลำไยเพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกรดแลกติก ดังนั้นจึงต้องมีการเติมสารสกัดยีสต์เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติมลงไปในน้ำลำไย โดยเติมสารสกัดยีสต์ในปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการผลิตกรดแลกติกแบบกะโดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมในถังหมักขนาด 2 ลิตร ทำให้ได้ปริมาณกรดแลกติก 29.28 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิต 0.816 กรัมต่อลิตรชั่วโมง ซึ่งมากกว่าการผลิตกรดแลกติกในฟลาก์ขนาด 2 ลิตร แต่การผลิตที่ทำให้ได้อัตราการผลิตมากที่สุด คือการผลิตแบบต่อเนื่องในถังหมักขนาด 2 ลิตร ซึ่งได้อัตราการผลิต 0.901 กรัมต่อลิตรชั่วโมง และนอกจากนี้การผลิตแบบต่อเนื่องจะช่วยลดระยะเวลาในการหมักให้น้อยลงได้ ดังนั้นการปรับปรุงกระบวนการผลิตกรดแลกติกในครั้งนี้จึงเป็นการเพิ่มอัตราการผลิตกรดแลกติกให้มากขึ้น และใช้ซับสเตรตที่มีราคาถูกเป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับการผลิตกรดแลกติกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Adolf, W.S., Jules, T. and Christophe, L. 2006. Continuous lactic acid production in whey permeate/yeast extract medium with immobilized *Lactobacillus helveticus* in a two-stage process : Model and experiments. Enzyme and Microbial Technology. 38:324 – 337.

A.O.A.C. 2000. Official Method of Analysis of A.O.A.C. International. 17th ed. A.O.A.C. International.The United States of America.

Chauhan, K., Trivedi, Ujjval. and Patel, K.C. 2005. Statistical screening of medium components by Plackett-Burman design for lactic acid production by *Lactobacillus* sp. KCP01 using date juice. Bioresource Tchnology. 98:98-103.

Fitzpatrick, JJ. And O'Keeffe, U. 2001. Influence of whey proteinhydrolysate addition to whey permeate batch fermentation for producing lactic acid. Process Biochemistry. 37:183-186.

Gao M., Michiteru, K., Rie, G., Hirokazu. T., Makoto, H., and Tadashi, H. 2005. Development of a continuous electrodialysis fermentation system for production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus*. Process Biochemistry. 40:1033-1036.

Hofvendahl, K. and Hagerdal, H. 1997. L-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*. Enzyme and microbial technology. 20: 301-307.

Huang, L.P., Jin, B., Lant, P., Zhou, J. 2005. Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. Biochemical Engineering Journal. 23:265-276.

Idris, A. and Suzana, W. 2006. Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. Proess. Biochemistry. 41:1117 – 1123.

John, R.P., Nampoothiri, K.M. and Pandey, A. 2006. Solid state fermentation for L-Lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. Process Biochemistry. 41:759-763.

Kadam, S.R., Patil, S.S., Bastawde, K.B., Khire, J. M. and Gokhale, D.V. 2006. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. Proess. Biochemistry. 41:120 – 126.

Kim, K.I., Kin, W.K., Seo, D.K., Yoo, I.S., Kim, E.K. and Yoon, H.K. 2003. Production of lactic acid from food waste. Applied Biochemistry and Biotechnology. 105:637-647.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kun, Yuan, Lee. 2006. Microbiol Biotechnol 2nd. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.

Milcent, S. and H. Carrere. 2001. Clarification of lactic acid fermentation broths. Sep.Pur.Technol. 22-23:393-401.

Min, G., Koide, M., Gotou, R., Takanashi, H., Hirata, M. and Hano, T. 2005. Development of a continuous electrodialysis fermentation system for production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus*. Proess. Biochemistry. 40:1033-1036.

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

Narayanan, N., Roychoudhury, P.K., Srivastava, A. 2004. L(+) Lactic acid fermentation and its product polymerization. Electronic Journal of Biotechnology. 7:167-179.

Oh, H., Wee, Y.J., Yun, J.S., Han, S.H., Jung, S. and Ryu, H.W. 2005. Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. Bioresource Technology. 96:1492-1498.

Ohkouchi, Y. and Inoue, Y. 2006. Direct production of L(+) lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG 18011. Bioresource Technology. 97:1554-1562.

Pauli, T. and Fitzpatrick, J.J. 2002. Malt combing nuts as a nutrient supplement to whey permeate for producing lactic by fermentation with *Lactobacillus casei*. Process Biochemistry. 38:1-6.

Plessas, S., Bosnea, L., Psarianos, C., Koutinas, A.A., Marchant, R., Banat, M.I. 2008. Lactic acid production by mixed cultures of *Kluyveromyces marxianus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Lactobacillus helveticus*. Bioresource Technology. 99:5951-5955.

Rojan, P., John, K., Madhavan, N. and Ashok, P. 2007. Solid-state fermentation for L-lactic acid production from agro wastes using *Lactobacillus delbrueckii*. Process Biochemistry. 41:759-763.

Roukas, T and kotzekidou, P. 1998. Lactic acid production from deproteinized whey by mixed cultures of free and coimmobilized *Lactobacillus casei* and *Lactococcus lactis* cells using fedbatch culture. Enzyme and Microbial Technology. 22:199 – 204.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Salminen, S., Wright, A. and Ouwehand, A. 2004. Lactic acid bacteria. 3 rd ed. New York : Marcel Dekker.

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

Stanbury, P. and Whitaker, A. 1984. Principles of fermentation technology. Great Britain: BPCC Wheatons Ltd.

Tango, M.S.A. and A.E.Ghaly. 1999. Effect of temperature on lactic acid production from cheese whey using *Lactobacillus helveticus* under batch condition. Biomass Bioenergy. 16:61-78.

Wee, Y.J., Kim, J.N., Yun, J.S. and Ryu, H.W. 2004. Utilization of sugar molasses for economical L(+)–lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* . Enzyme and Microbial Technology. 35:568 – 573.

Youssef, C.B., Guillou, V. and Dichara, A.O. 2000. Modelling and adaptive control strategy in lactic acid fermentation process. Control Engineering Practice. 8:1297-1307.

Yun, J.S., Wee, Y.J. and Ryu, H.W. 2003. Production of optically pure L(+) lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of Enterococcus faecalis RKY1. Enzyme and Microbial Technology. 33:416-423.

www. http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY251/dlwrong.html

www.cem.msu.edu/~smithmr/Lactide.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้