สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานวิจัย

การเพิ่มมูลค่าของกากมันสำปะหลัง: การปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียผลิตกรดแลคติกด้วยการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์และการพัฒนาสภาวะการหมักที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติกจากกากมันสำปะหลัง

Value Added Enhancement of Cassava bagasse: Improvement of Lactic Acid Bacteria by Induced Mutation and Optimization of Fermentation Conditions for Lactic Acid Production from Cassava bagasse

คณะผู้วิจัย

ดร.กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์

ดร. สมจิตต์ ปาละกาศ

- 6 มิ.ย. 2556 เริ่มบริการ
Ref 156742
321225 - 1 ส.ค. 2556

ทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยบูรพา งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2553 -2554

อภินันทนาการ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ เป็นการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก *Lactobacillus plantarum* TISTR 926 เพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตกรดแลคติก โดยการฉายรังสีเหนือม่วง การได้รับสาร 2-aminoanthracene และการฉายรังสีเหนือม่วงร่วมกับการได้รับสาร 2-aminoanthracene พบว่า เมื่อนำเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* TISTR 926 ที่ได้จากการฉายรังสีเหนือม่วงเพียงอย่างเดียวเป็นเวลา 2 นาที ซึ่งสามารถสร้างโคโลนีได้เพียง 1 โคโลนี และมีขนาดใหญ่ที่สุดมาเลี้ยงในขวดทดลองเพื่อปรับปรุงสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลคติก พบว่าการใช้กากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยร้อยละ 6 เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำแช่ข้าวโพดในอัตราส่วน 6:1 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดเท่ากับ 13.96 กรัมต่อลิตร และเมื่อขยายขนาดการเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่า การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ได้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถให้ผลผลิตกรดแลคติกเพิ่มขึ้น 3 เท่า (42.35 กรัมต่อลิตร) ของการเลี้ยงแบบในขวดทดลอง

Abstract

In the present study, improvement of lactic acid production potential of *Lactobacillus plantarum* TISTR 926 by induced mutation has been conducted using ultraviolet radiation and 2- aminoanthracene as mutagens. Bacteria have been exposed to one of those mutagens or both of them. After exposed to ultraviolet radiation alone during 2 min, only one biggest colony was found. Culturing of the latter in laboratory, using 6% of hydrolyzed cassava bagasse as carbon source in the presence of ammonium sulfate and corn steep liqueur mixture (6:1), it gave highest lactic production of 13.96 g/l. Thereafter, when the culture has been scaled up to 5 l fermentor during culture time of 48 h, 42.35 g/l of lactic acid production (about 3 times of laboratory scale) was observed.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณมหาวิทยาลัยบูรพาและสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เป็นอย่างสูงที่เป็นผู้สนับสนุนให้ทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2553 และ 2554 เป็นระยะเวลา 2 ปี ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี และขอขอบพระคุณ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์ในการดำเนินงานวิจัยด้วยดีมาตลอด

ดร. กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์

หัวหน้าโครงการวิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย	17
บทที่ 4 ผลการดำเนินการวิจัย	21
สรุปผลการวิจัย	33
เอกสารอ้างอิง	50
ภาคผนวก	39

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างสามมิติของกรดแลคติก	4
2	อุตสาหกรรมการแปรรูปแป้งมันสำปะหลัง	10
3	จลนพลศาสตร์ในการเจริญของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MRS	23
4	การเลี้ยงในอาหารสูตร MRS ในสภาวะการเลี้ยงแบบเขย่าและแบบไม่เขย่า	23
5	ความสามารถในการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MRS ในสภาวะการเลี้ยงแบบเขย่าและไม่เขย่า	24
6	การเจริญของเชื้อแบคทีเรียเป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหารวุ้น	26
7	ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อแบคทีเรียในอาหาร MRS	31
8	ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อแบคทีเรีย ในอาหาร MRS ดัดแปลงที่มีกากมันสำปะหลังร้อยละ 6	32
9	ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อแบคทีเรียในอาหารสูตร MRS ดัดแปลงที่มีกากมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 2	37
10	ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อแบคทีเรียในอาหาร MRS ดัดแปลงที่มีแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน	42
11	ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อแบคทีเรียในอาหาร MRS ดัดแปลงที่มีไนโตรเจนผสม	46
12	ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ซึ่งเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนทดแทน 7 สูตร	53
13	การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ซึ่งเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนทดแทน 7 สูตร	54
14	การเปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติกของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ซึ่งเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตร MRS ที่มีแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนทดแทน 9 สูตร	57
15	การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ซึ่งเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตร MRS ที่มีแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนทดแทน 9 สูตร	58

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
16	ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ซึ่งเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตร MRS ที่มีแหล่งไนโตรเจน ผสมระหว่างอินทรีย์ไนโตรเจนและอนินทรีย์ไนโตรเจน 10 สูตร	61
17	การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ซึ่งเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตร MRS ที่มีแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างอินทรีย์ไนโตรเจนและอนินทรีย์ไนโตรเจน 10 สูตร	62
18	ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ซึ่งเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตร MRS ที่เติมและไม่เติมเหล็กซัลเฟตและแมงกานีสซัลเฟต 4 สูตร	64
19	การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ซึ่งเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตร MRS ที่เติมและไม่เติมเหล็กซัลเฟตและแมงกานีสซัลเฟต 4 สูตร	65
20	ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการฉายรังสีเหนือม่วง ซึ่งเลี้ยงในถังหมักแบบกะ	67

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบภายในกากมันสำปะหลัง	11
2	Bioprocesses involving cassava bagasse	12
3	สูตรอาหารที่ใช้ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน	24
4	การเปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติกและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลงแหล่งคาร์บอน	26
5	อัตราการรอดของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต	29
6	อัตราการรอดของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการทรีตด้วยสาร 2- อะมิโนแอนทราซีน	30
7	อัตราการรอดของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับการทรีตด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน	31
8	ปริมาณกรดแลคติกของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำซึ่งเลี้ยงในอาหาร MRS ที่มีกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน	35
9	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำเลี้ยงในอาหาร MRS ที่ใช้กากมันสำปะหลังทดแทน	37
10	ปริมาณกรดแลคติก ของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ซึ่งเลี้ยงในอาหาร MRS ดัดแปลง ที่ใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนต่างกัน	40
11	การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ซึ่งเลี้ยงในอาหาร MRS ดัดแปลง ที่ใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนต่างกัน	41
12	การเปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติกของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ซึ่งเลี้ยงในอาหาร MRS ดัดแปลงที่มีแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนต่างกัน	43
13	การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ซึ่งเลี้ยงในอาหาร MRS ดัดแปลง ที่มีแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนต่างกัน	45
14	การเปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติกของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ซึ่งเลี้ยงในอาหาร MRS ดัดแปลงที่มีแหล่งไนโตรเจนผสม	47

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
15	การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ซึ่งเลี้ยงในอาหาร MRS ดัดแปลง ที่มีแหล่งไนโตรเจนผสม	49
16	อัตราการรอดของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสีเหนือม่วง	51
17	ปริมาณกรดแลคทีติกในการเลี้ยงด้วยถังหมักแบบกะ	66

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำงานวิจัย

กระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังของประเทศไทยมีประสิทธิภาพการใช้แป้งจากหัวมันสำปะหลังในการผลิตโดยเฉลี่ยประมาณร้อยละ 72 หรือกล่าวได้ว่ามีการสูญเสียแป้งไปในกระบวนการผลิตคิดเป็นปริมาณสูงร้อยละ 28 โดยแป้งที่สูญเสียไปจะอยู่ในรูปของกากมันสำปะหลังซึ่งเกิดขึ้นประมาณ 60 กิโลกรัมต่อเมตริกตันหัวมันสำปะหลัง (กล้าณรงค์ ศรีรอด, 2546) ทั้งนี้ อัตราการแปรรูปแป้งมันสำปะหลังขึ้นอยู่กับปริมาณแป้งในหัวมันสด โดยในการผลิตแป้ง 1 กิโลกรัม จะใช้หัวมันสด 5 กิโลกรัม และจะเหลือเป็นกากมันสำปะหลังประมาณ 0.4 ถึง 0.5 กิโลกรัม โดยส่วนของกากมันสำปะหลังถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการแปรรูปเป็นอาหารสัตว์ ทั้งภายในประเทศและภายนอกประเทศ แต่ก็ต้องประสบกับปัญหาด้านราคาที่มีการรับซื้อในราคาต่ำมากและมีปริมาณการรับซื้อที่ไม่แน่นอน นอกจากนี้เมื่อกลุ่มประชาคมเศรษฐกิจยุโรปได้มีมาตรการยกเลิกการนำเข้ากากมันสำปะหลังอัดเม็ดเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ ปริมาณความต้องการกากมันสำปะหลังได้ลดลงอย่างมากผู้ประกอบการจำเป็นต้องใช้วิธีการตากกากมันสำปะหลังและเผาเป็นเชื้อเพลิง ซึ่งจะดำเนินการได้เฉพาะในช่วงฤดูร้อน แต่ในช่วงฤดูฝนไม่สามารถตากกากมันสำปะหลัง ได้ก่อให้เกิดปัญหากับโรงงานและประชาชนที่พักอาศัยอยู่โดยรอบโรงงานเป็นอย่างมาก ทั้งนี้จากการที่นักวิจัยได้มีโอกาสร่วมการประชุมและให้คำปรึกษาในการใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังกับผู้ประกอบการผลิตแป้งมันสำปะหลัง พบว่าผู้ประกอบการมีความต้องการความช่วยเหลือทางวิชาการ เพื่อแสวงหาแนวทางการเพิ่มมูลค่าให้กับกากมันสำปะหลังด้วยวิธีการอื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งโครงการที่โรงงานสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จริงและมีการลงทุนต่ำ นอกเหนือจากการนำมาผลิตแอลกอฮอล์ ข้อมูลดังกล่าวได้นำมาสู่การกำหนดแนวคิดในการวิจัยเพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับกากมันสำปะหลัง โดยการสร้างผลิตภัณฑ์ใหม่ในกลุ่มของกรดอินทรีย์ คือกรดแลคติก ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้อย่างหลากหลาย เช่น อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมเครื่องหนัง อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง รวมทั้งใช้ทางการแพทย์และเภสัชกรรม นอกจากนี้ในปัจจุบันได้มีการนำไปใช้ในการผลิตเป็นสารโพลีเมอร์ชีวภาพซึ่งสามารถย่อยสลายได้เพื่อทดแทนโพลิเมอร์จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีที่ส่งผลกระทบต่อ

สิ่งแวดล้อมหลายประการ ทั้งนี้พบว่าในปัจจุบันได้มีการใช้กรดแลคติกในอุตสาหกรรมต่างๆ ทั่วโลกคิดเป็นปริมาณ 150,000 ตันต่อปี และมีปริมาณความต้องการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Sauer, *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2008; Datta and Henry, 2006; Rojan *et al.*, 2005; John *et al.*, 2007)

ในการวิจัยครั้งนี้ จะให้ความสำคัญกับการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดแลคติกได้สูงโดยจะใช้วิธีการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ขึ้นในแบคทีเรียสายพันธุ์เดิม ในกลุ่มของ Amylolytic lactic acid bacteria ที่มีความสามารถในการผลิตกรดแลคติก พร้อมทั้งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนพร้อมกับสารอาหารอื่นๆ ที่จำเป็นต่อการผลิตกรดแลคติก ก่อนนำไปสู่การพัฒนาการเพิ่มปริมาณการผลิตในถังหมักตลอดจนการผลิตในโรงงานต้นแบบต่อไป

ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ ประกอบด้วยงานการศึกษาวิจัยสำคัญ 2 ส่วน ดังนี้

ส่วนแรก เป็นการคัดเลือกสภาวะการเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลกติกจากกากมันสำปะหลัง โดยใช้แบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารก่อกลายพันธุ์และรังสี รังสีและสารเคมี

ส่วนที่สอง เป็นการพัฒนาสภาวะการเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยจะให้ความสำคัญกับการศึกษาระดับความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังที่เหมาะสม ชนิดและระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน ผลของการเติมและไม่เติมอิออนของโลหะ รวมทั้งค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นของอาหารที่ใช้ในกระบวนการหมักเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการพัฒนาการหมักในระดับถังหมักและการใช้ประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรมเพื่อสนับสนุนการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับกากมันสำปะหลังซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1) เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่ได้จากการเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียในกลุ่ม Amylolytic lactic acid bacteria ด้วยสารเคมีก่อกลายพันธุ์ และรังสีเหนือม่วง

2) เพื่อปรับปรุงสภาวะการหมักที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกจากกากมันสำปะหลังของเชื้อแลคทีเรียแลคติกที่ผ่านการกลายพันธุ์บนเครื่องเขย่า

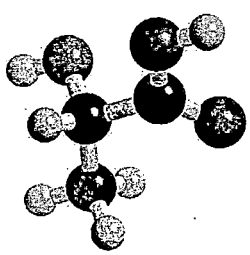
3) เพื่อพัฒนาสภาวะการหมักและการควบคุมของการเลี้ยงแบคทีเรียที่ได้จากการคัดเลือกเพื่อผลิตกรดแลคติกในระดับถังหมัก

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กรดแลคติก

กรดแลคติกหรือกรดนม ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ มีชื่อทางเคมีว่า 2-hydroxypropionic หรือ Hydroxycarboxylic acid (ภาพที่ 1) ซึ่งมีองค์ประกอบสำคัญที่ช่วยเพิ่มรสชาติและช่วยป้องกันการเสื่อมเสียในอาหารหมักดองและในผลิตภัณฑ์นมที่บริโภคกันอยู่ทุกวันนี้ จากการสำรวจการผลิตกรดแลคติกทั่วโลก ประมาณกันว่ามีอยู่ถึง 50,000 ตันต่อปี โดยปริมาณสองในสามส่วนผลิตได้มาจากกระบวนการหมัก ส่วนที่เหลือผลิตได้มาจากกระบวนการทางเคมี กรดแลคติกที่ผลิตได้ส่วนใหญ่ประมาณร้อยละ 85 ถูกนำมาใช้กันอยู่ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ในด้านเวชภัณฑ์ อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมเครื่องหนัง อุตสาหกรรมเคมี เครื่องสำอาง และที่กำลังเป็นที่สนใจกันอยู่ในขณะนี้ก็ คือ การใช้กรดแลคติกบริสุทธิ์เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายทางชีวภาพ ที่เรียกว่า พอลิแลคติก (polylactic) เพื่อใช้ทดแทนพลาสติกที่ได้จากปิโตรเคมี ในปัจจุบันกรดแลคติกที่เป็นเกรดอาหารที่ใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหารมีราคาตั้งแต่ 1.4 - 1.90 ดอลลาร์สหรัฐ/กิโลกรัม ซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นร้อยละ 50 - 80 โดยจะต้องเป็นกรดแลคติกที่ไม่มีสีและเกือบจะไม่มีกลิ่น แต่ถ้านำไปใช้เป็นวัตถุดิบของการผลิตพลาสติกชีวภาพก็จะต้องเป็นกรดแลคติกที่มีเกณฑ์ของความบริสุทธิ์สูงมากและสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ อาทิ สารละลายกรดแลคติกที่มีความบริสุทธิ์สูงที่มีความเข้มข้นร้อยละ 88 จะต้องไม่เกิดสีที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นต้น (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล , 2547)



ภาพที่ 1 โครงสร้างสามมิติของกรดแลคติก

ที่มา : http://www.3dchem.com/imagesofmolecules/lactic-acid.jpg

ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดแลคติกสามารถผลิตโดยกระบวนการทางเคมีและชีวภาพ ซึ่งกระบวนการทางชีวภาพอาศัยจุลินทรีย์ ส่วนในกระบวนการทางเคมีอาศัยปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของพรอพีนด้วยกรดไนตริกหรือใช้ไนโตรเจนเพอร์ออกไซด์ (nitrogenperoxide) ในภาวะที่มีแก๊สออกซิเจนร่วมอยู่ด้วย ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่เรียกว่า กรดแอลฟา-ไนตราโตพรอพิโอนิก (α - nitratopropionic acid) ซึ่งสามารถถูกไฮโดรไลซ์ต่อไปได้เป็นกรดแลคติก (lactic acid) และกรดไนตริก (nitric acid) (Datta และคณะ, 1995 ; John และคณะ, 2007) ส่วนในการผลิตกรดแลคติกทางชีวภาพจะใช้สับสเตรทที่มีความแตกต่างกัน เช่น น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลแมนโนส น้ำตาลไซโลส และน้ำตาลกาแลคโตส ซึ่งการใช้น้ำตาลบริสุทธิ์ในกระบวนการหมัก ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์มีความบริสุทธิ์และยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ แต่อย่างไรก็ตามการใช้น้ำตาลบริสุทธิ์นั้นไม่ถูกต้องตามหลักเศรษฐศาสตร์ เนื่องจากน้ำตาลบริสุทธิ์มีราคาแพง และกรดแลคติกมีราคาถูก จึงมีการนำส่วนเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้เป็นทางเลือกหนึ่ง เพื่อให้เกิดประโยชน์แทนการใช้วัสดุที่มีราคาแพง สำหรับในประเทศไทยพบว่าในการผลิตกรดแลคติกเพื่อใช้ในประเทศไทยไม่เพียงพอจึงต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศเป็นจำนวนมากถึงปีละหลายแสนกิโลกรัม โดยกรดแลคติดที่ใช้กันทั่วโลกร้อยละ 90 มาจากการหมักโดยจุลินทรีย์ (Hofvendahl และ Hahn-Hägerdal, 2000; Oh และคณะ, 2005)

แบคทีเรียที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิต คือ *Lactobacillus delbruckii* โดยการใช้ของเหลือทิ้งทางการเกษตรมาเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก (John และคณะ, 2006) ดังนั้นถ้ามีการใช้ประโยชน์จากสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่เก็บรักษาเพื่อสามารถผลิตกรดแลคติกได้ และใช้วัตถุดิบในที่หาง่าย ราคาถูก จะช่วยลดค่าใช้จ่ายเป็นจำนวนมาก อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าแก่ผลผลิตโดยการนำวัตถุดิบที่เหลือใช้จากอุตสาหกรรมทางการเกษตรที่มีราคาถูกมาเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าและสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้อีกด้วย ในกระบวนการหมักกรดแลคติกนั้นมีขั้นตอนของกระบวนการหมักจะประกอบด้วยวัตถุดิบที่เป็นน้ำตาลกลูโคสหรือซูโครส ที่มีความเข้มข้น 120 - 180 กรัมต่อลิตร และสารอาหารไนโตรเจนชนิดอนินทรีย์ (เช่น แอมโนเนีย แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมฟอสเฟต) หรือสารอาหารไนโตรเจนชนิดอินทรีย์ (เช่น น้ำแช่ข้าวโพด ยีสต์สกัด เพปโตน โปรตีนไฮโดรไลเซต) ที่มีความเข้มข้นรวม 1 - 10 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังประกอบด้วยแร่ธาตุปริมาณน้อยชนิดต่างๆ อาทิ แมกนีเซียม แมงกานีส เหล็ก เป็นต้น ในการหมักถูกหมักในถังหมักสแตนเลสที่สามารถป้องกันการกัดกร่อนของกรดได้ ในการหมักสภาวะที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิปานกลางถึงอุณหภูมิค่อนข้างสูง ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิด

ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ จึงจำเป็นต้องมีการควบคุมอุณหภูมิด้วยระบบให้ความร้อนและระบบหล่อเย็นควบคู่กันเสมอและเพื่อควบคุมความเป็นกรดด่างของน้ำหมักให้เหมาะสมเท่ากับ 5.5 – 6.0 จึงต้องมีการเติมเกลือแคลเซียมคาร์บอเนต เพื่อทำให้กรดแลคติกอิสระที่ผลิตขึ้นระหว่างการหมักอยู่ในรูปของเกลือแลกเทต สำหรับกล้าเชื้อที่ใช้ในการหมักเตรียมได้จากการถ่ายโอนเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง และทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นลำดับหลายครั้งจนกระทั่งได้ปริมาตรร้อยละ 10 ของการเพาะเลี้ยงจริง ทำการเลี้ยงในถังหมักการหมักแบบเบ็ดเสร็จ (Batch fermentation) อาจใช้เวลาประมาณ 2 - 6 วัน ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแหล่งอาหารคาร์บอนในอาหารเพาะเลี้ยง ในระหว่างการหมักแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจากเกลือแคลเซียมคาร์บอเนตสลายตัวจะช่วยป้องกันอากาศไหลเข้าสู่ถังหมักและช่วยรักษาสภาพไร้ออกซิเจนในถังหมัก นอกจากนี้การหมักที่อุณหภูมิค่อนข้างสูงยังสามารถช่วยป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่พึงประสงค์ได้อีกด้วย กรณีที่ใช้เกลือแคลเซียมออกไซด์เป็นตัวปรับค่าความเป็นกรดของกรดแลคติกด้วยการหมักกรดแลคติกสามารถใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลได้สูงถึง 260 กรัมต่อลิตร โดยที่ยังสามารถควบคุมการตกตะกอนของเกลือแคลเซียมแลกเทตที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในระหว่างการหมัก ซึ่งอาจได้ผลของกรดแลคติกสูงถึงร้อยละ 96.6 แต่โดยทั่วไปมีค่าร้อยละ 85 - 95 ของค่าผลได้ทางทฤษฎี และอาจจะมีผลพลอยได้ที่เป็นกรดแอซีติก (acetic acid) และกรดพรอพิโอนิก (propionic) เกิดขึ้นได้ประมาณร้อยละ 2 ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาวะที่แปรผันในระหว่างการหมัก เช่น ค่าความเป็นกรดด่าง และความเข้มข้นของแหล่งอาหารคาร์บอน อันมีสาเหตุมาจากสภาวะของการผสมอย่างไม่ทั่วถึงในถังหมัก จึงทำให้แบคทีเรียแลคติกปรับเปลี่ยนวิถีของการสังเคราะห์ไปเป็นแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (Heterofermentative) และทำให้การผลิตกรดแลคติกลดต่ำลง (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล , 2547)

ประโยชน์ของแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกมีความสามารถในการหมักผลิตภัณฑ์หลายประเภท และสามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ประโยชน์สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้หลายด้านเช่น การผลิตนมหมักโดยมีการหมักน้ำตาลแลคโตส การพัฒนารสชาติ การปรับปรุง ทางด้านวิศวกรรมของผลิตภัณฑ์นมหมัก ตลอดจนกระบวนการผลิตนมหมักชนิดต่างๆ เช่น นมหมักจากบัตเตอร์มิลล์ นมหมักจากเชื้อแลคโตบาซิลลัส นมหมักจากแบคทีเรียแลคติกที่ชอบอุณหภูมิสูง นมหมักจากแบคทีเรียแลคติกและยีสต์ การหมักเนื้อ ทำให้ได้เป็นอาหารหมักจากสัตว์หลายชนิด ทั้งอาหารหมักจากเนื้อสัตว์และอาหารหมักจากเนื้อปลา การหมักผักทำให้ได้เป็นอาหารหมักจาก

พืชหลายชนิด น้ำปรุงรสถั่วเหลือง เครื่องดื่ม และหญ้าหมัก (silage) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักของแบคทีเรียแลคติกเหล่านี้มีประโยชน์มากมาย โดยเฉพาะนมหมักเช่น โยเกิร์ต และยาคูลท์ เป็นต้น ซึ่งจะช่วยในการส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภคให้ดียิ่งขึ้น (อัจฉรา เพิ่ม, 2550)

ในปัจจุบันวัตถุดิบหลักที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดแลคติก โดยอาศัยแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก หรือ lactic acid bacteria คือ น้ำตาลจากอ้อยและน้ำตาลจากหัวบีท รองลงมาคือ การใช้แป้งซึ่งมีต้นทุนต่ำ โดยต้องมีการทำงานสองขั้นตอน คือ ในขั้นตอนแรกต้องมีการย่อยสลายแป้งโดยผ่านกระบวนการ saccharification ก่อน จากนั้นจึงจะใช้การหมักด้วยแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกเพื่อให้เกิดกรดแลคติกต่อไป โดยจำเป็นต้องมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต เช่น ความเข้มข้นของแป้งเริ่มต้น ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น การควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการหมัก รวมถึงการใช้สารเสริมปฏิกิริยาเพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างผลิตภัณฑ์ได้สูงขึ้นและสามารถทำให้เกิดขึ้นไปพร้อม ๆ กันในการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์และทำการหมักเพื่อผลิตกรดแลคติกด้วยจุลินทรีย์ โดยกระบวนการที่เรียกว่า Simultaneous Saccharification and Fermentation (Marques, *et al.*, 2008 ; Romaní, *et al.*, 2008 ; Rojan, *et al.*, 2007) นอกจากแป้งแล้วยังมีวัตถุดิบอื่นที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตกรดแลคติก เช่น กากน้ำตาล หางนม รำข้าว สาลี กากเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตเบียร์ และวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งวัตถุดิบในการหมักนี้เป็นต้นทุนที่สำคัญในกระบวนการการผลิต (Gao, *et al.*, 2008 ; Gao, *et al.*, 2006 Marques, *et al.*, 2008 ; Anuradha *et al.*,1999 ; Tsao *et al.*,1999)

จากรายงานการศึกษากระบวนการผลิตกรดแลคติกด้วยการหมัก พบว่ามีจุลินทรีย์ในกลุ่มมีแบคทีเรียกลุ่ม Amylolytic lactic acid bacteria ที่สามารถย่อยสลายแป้งดิบได้เพียงขั้นตอนเดียว เช่น แบคทีเรียในกลุ่มของ *Lactobacillus* และ *Lactococcus* (Zhang and Cheryan, 1994 ; Vishnu *et al.*, 2002 ; Naveena *et al.*, 2005) แต่ในการใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนของวัตถุดิบในการผลิต จำเป็นจะต้องศึกษาความเหมาะสมของปริมาณแป้งเริ่มต้น โดยพบว่าการใช้ความเข้มข้นของแป้งต่ำให้ผลผลิตของกรดแลคติกสูงกว่าการใช้ความเข้มข้นของแป้งสูง นอกจากนี้ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น การควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการหมักและการใช้โคแฟคเตอร์ เช่น แมงกานีสไอออน ก็มีส่วนสำคัญต่อการผลิตกรดแลคติก (Mercier *et al.*, 1992; Yumoto and Ikeda, 1995; Ohkouchi and Inoue, 2006; Mussatto *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2008)

นอกจากสภาวะการหมักที่เหมาะสมแล้ว สิ่งสำคัญอีกประการหนึ่งสำหรับกระบวนการผลิตกรดแลคติกคือ สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ที่มักเป็นสายพันธุ์ที่ได้จากการปรับปรุงด้วยการเหนี่ยว

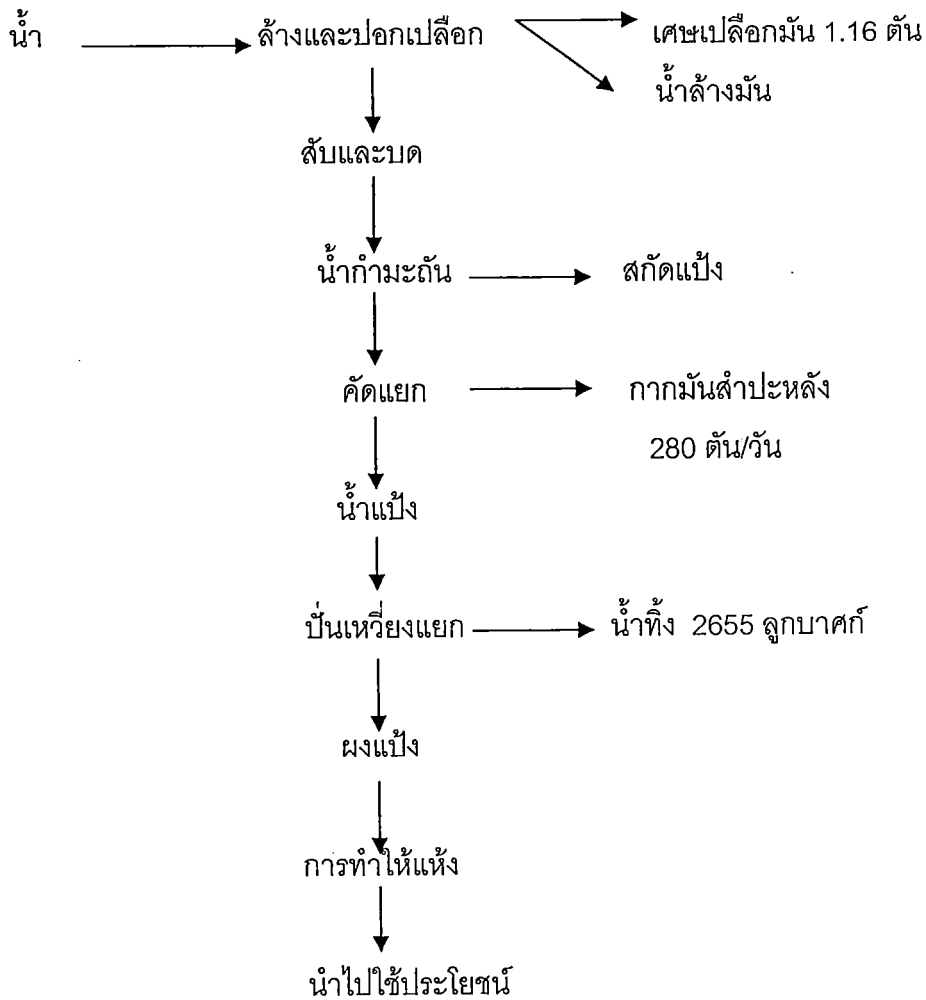
นำให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อให้สามารถสร้างผลิตภัณฑ์ได้มากกว่าเดิมหรืออาจมีอัตราการใช้สารอาหารต่ำหรือเป็นสายพันธุ์ที่สามารถในการใช้สารอาหารจากแหล่งอาหารราคาต่ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรหรืออุตสาหกรรมเกษตรที่มีความสำคัญและได้รับความสนใจเป็นอันดับแรก เพราะนอกจากจะเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งแล้วยังอำนวยประโยชน์ในการลดผลกระทบต่อสิ่งแวด ล้อมได้อีกทางหนึ่ง สำหรับการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์สามารถทำได้หลายวิธี อาทิ การตัดต่อพันธุกรรม การใช้สารก่อกลายพันธุ์และการใช้รังสี (Rojan, *et al.*, 2007 ; Miyamoto *et al.*, 1983 ; Kirimura *et al.*, 1992 ; Bai *et al.*, 2004 ; Ikram-ul *et al.*, 2004 ; Abosereh *et al.*, 2006 ; Kodam *et al.*, 2006; Lotfy *et al.*, 2007[ab]; Singh *et al.*, 2006 Helanto *et al.*, 2005) แต่อย่างไรก็ตามรายงานเกี่ยวกับการเหนี่ยวนำให้จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกเกิดการกลายพันธุ์มีไม่มากนักอาจมีสาเหตุเนื่องจากเมื่อศึกษาแล้วได้ถูกจดสิทธิบัตร (http://www.freepatentsonline.com/7241610.html,http://www.wikipatents.com/7300787.html, http://www.patentstorm.us/patents/6413765.html) เป็นต้น

กากมันสำปะหลัง (Cassava bagasse)

ประเทศไทยมีการปลูกมันสำปะหลังเชิงการค้ามาเป็นเวลานานกว่า 30 ปี โดยผลผลิตหัวมันสดที่ได้ส่วนใหญ่จะถูกแปรรูปเป็นแป้งมันสำปะหลังเพื่อใช้เป็นอาหารคนและใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การทำกาว อุตสาหกรรมกระดาษ สิ่งทอ เป็นต้น หัวมันสำปะหลังสด และอีกส่วนหนึ่งจะถูกแปรรูปเป็นมันเส้นและมันอัดเม็ดเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์

กากมันสำปะหลังเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากขั้นตอนการแยกสกัดแป้งในกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง ดังแสดงในภาพที่ 2 ซึ่งมีกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง คือ หัวมันสำปะหลังจะถูกนำไปล้างทำความสะอาดและสับเป็นชิ้นเล็กๆนำเข้าเครื่องโม่บดให้ละเอียดซึ่งจะได้ของเหลวที่ประกอบด้วยแป้ง น้ำ และกากมันสำปะหลังปนอยู่ จากนั้นนำของเหลวดังกล่าวเข้าเครื่องสกัดกาก เพื่อแยกกากมันสำปะหลังออกจากน้ำแป้งโดยอาศัยแรงเหวี่ยง จากนั้นนำน้ำแป้งที่ได้เข้าเครื่องอบแห้งแล้วบรรจุถุง ส่วนของกากมันสำปะหลังที่ได้จากเครื่องสกัดกากถูกนำไปเข้าเครื่องอัดกากแล้วตากแห้งในลานตาก (พักตร์ประไพ ประจำเมือง, 2546)

รากมันสำปะหลังสด (250-300 ตัน/วัน)



ภาพที่ 2 อุตสาหกรรมการแปรรูปแป้งมันสำปะหลัง
ที่มา: Pandey และคณะ (2000)

ในกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังโดยทั่วไปรากมันสำปะหลังสด 1 เมตริกตัน จะผลิตแป้งมันสำปะหลังได้ประมาณ 0.20-0.22 เมตริกตัน และมีส่วนกากมันสำปะหลัง หรือ Cassava waste หลังจากการสกัดแป้งมันประมาณ 0.06 เมตริกตัน ซึ่งจะเป็นส่วนของของแข็งที่มีแป้งเกาะติดอยู่ กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของจุลินทรีย์ที่สามารถนำมาเพิ่มมูลค่าได้ เช่น จากรายงานของ Sriroth *et al.* (2000) ที่ได้นำวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังมาใช้ในการปรับปรุงการผลิตมวลชีวภาพ โดยศึกษาความเหมาะสมของการใช้เอนไซม์

2 ชนิด เป็นตัวย่อยวัสดุเหลือทิ้งส่วนของแข็งที่มีแป้งติดอยู่ประมาณร้อยละ 50-60 ของน้ำหนักแห้ง พบว่าการใช้เอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับเอนไซม์เพคติเนส สามารถปรับปรุงความสามารถในการสกัดแป้งออกมาจากโครงสร้างที่ซับซ้อนได้เม็ดแป้งดีกว่าการใช้เอนไซม์ชนิดเดียว ซึ่งไม่สามารถสกัดแป้งออกมาได้มาก โดยในการผลิตแป้งมันแต่ละครั้งทำให้ได้กากมันสำปะหลังสูงถึงร้อยละ 10 ของน้ำหนักหัวมันสำปะหลังสด โดยกากมันสำปะหลังจะถูกนำไปใช้ผสมเป็นอาหารสัตว์หรือใช้ในการทำปุ๋ยหมัก เนื่องจากมีราคาต่ำและองค์ประกอบส่วนใหญ่คือคาร์โบไฮเดรตและเส้นใย (ตารางที่ 1) ซึ่งมีปริมาณรวมกันกว่าร้อยละ 80 โดยน้ำหนัก นอกจากนี้ปริมาณองค์ประกอบของกากมันสำปะหลังขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของหัวมันสำปะหลังที่ใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตแป้งมันด้วย (Sriroth และคณะ, 2000) โดยคาร์โบไฮเดรตที่มีอยู่ในหัวมันสด ส่วนใหญ่คิดเป็นแป้งร้อยละ 80 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีมากกว่าในข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวโอ๊ต ยกเว้นข้าวเจ้า ส่วนปริมาณโปรตีนและไขมันค่อนข้างต่ำ (<1 เปอร์เซ็นต์) และมีฟอสฟอรัสน้อยกว่าร้อยละ 0.04 (Grace และ Jump, 1977)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบภายในกากมันสำปะหลัง

ส่วนประกอบ	% กากมันสำปะหลังบด	% กากมันสำปะหลังแห้ง
แป้ง	17.80 ± 1.24	68.89 ± 4.00
ความชื้น	72.00 ± 0.08	-
เถ้า (Ash)	0.44 ± 0.00	1.70 ± 0.01
โปรตีน	0.4[illegible] ± 0.00	1.55 ± 0.03
เส้นใย	7.17 ± 0.06	27.75 ± 0.20
ไขมัน	0.03 ± 0.00	0.12 ± 0.01
พีเอช	4.99	4.99

ที่มา : Sriroth และคณะ (2000)

จากรายงานศักยภาพการใช้กากมันสำปะหลังที่เป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรในกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ ของ Pandey *et al.* (2000) กล่าวว่า กากมันสำปะหลังมีส่วนประกอบของแป้งตกค้างอยู่ประมาณร้อยละ 30-50 โดยน้ำหนักแห้ง และยังมีส่วนประกอบที่เป็นสารอินทรีย์เหลืออยู่ในปริมาณที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ประโยชน์ โดยมีรายงานการนำกาก

มันสำปะหลังมาใช้ทำงานวิจัยในการสร้างผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น เอทานอล โปรตีนเซลล์เดียว กรดอินทรีย์ สารประกอบที่ให้กลิ่นต่างๆ ดังสรุปได้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 Bioprocesses involving cassava bagasse

Micro-organism	Process[1/]	Application	Reference
A. niger LPB 21	SSF	Citric acid	Kolicheski *et al.* (1995)
A. niger NRRL 2001	SSF	Citric acid	Vandenberghe *et al.* (1999)
A. niger CFTRI 30	SSF	Citric acid	Shankaranand and Lonsane (1994)
Candida lipolytica	SmF	Citric acid	Vandenberghe *et al.* (1998b)
C. fimbriata	SSF	Aroma compounds	Christen *et al.* (1997)
C. fimbriata	SSF	Aroma compounds	Bramorski *et al.* (1998a)
K. marxianus	SSF	Aroma compounds	Medeiros (1998)
L. edodes	SSF	Mushroom	Beux *et al.* (1995)
P. sajor-caju	SSF	Mushroom	Barbosa *et al.* (1995)
Rhizopus sp.	SSF	Biotransformation	Soccol *et al.* (1995°,b,c)
R. arrahizus	SmF	Fumaric acid	Carta *et al.* (1999)
R. ciricians	SmF	Fumaric acid	Carta *et al.* (1999)
R. delemer	SmF	Fumaric acid	Carta *et al.* (1999)
R. formosa	SmF	Fumaric acid	Carta *et al.* (1998, 1999)
R. oligosporus	SmF	Fumaric acid	Carta *et al.* (1999)
R. oryzae	SmF	Fumaric acid	Carta *et al.* (1999)
R. oryzae	SSF	Aroma compounds	Bramorski *et al.* (1998b)

หมายเหตุ: [1/]SSF: solid-state fermentation, SmF: submerged fermentation.

ที่มา: Pandey *et al.* (2000)

ในการผลิตกรดแลคติกด้วยกระบวนการหมักด้วยแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก หรือ Lactic acid bacteria ที่มีอยู่ประมาณ 20 สกุล สามารถแบ่งย่อยได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม homofermentative lactic acid bacteria เช่นแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* และ *Lactococcus* ที่ให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือกรดแลคติกอย่างเดียว ส่วนแบคทีเรียอีกกลุ่มคือ heterofermentative lactic bacteria ที่ให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ผลิตออกมา คือกรดแลคติก แอลกอฮอล์ และคาร์บอนไดออกไซด์ เช่น แบคทีเรียในสกุล *Leuconostoc* (Stiles and

Holzapfel, 1997) โดยสามารถใช้วัตถุดิบในการผลิตได้หลากหลาย เช่น หางนม กากน้ำตาล แป้ง วัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานแป้ง น้ำตาลหัวบีท เป็นต้น วัตถุดิบในการหมักนี้ถือเป็นต้นทุนที่สำคัญในกระบวนการผลิตกรดแลคติก (Anuradha, *et al.*,1999 ; Tsao, *et al.*, 1999) ในกรณีของการใช้คาร์โบไฮเดรตจำพวกแป้งที่มีต้นทุนต่ำ ต้องมีการทำงานสองขั้นตอนคือจะต้องมีการย่อยสลายแป้ง โดยผ่านกระบวนการ saccharification จากนั้นจึงใช้การหมักด้วยแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกเพื่อย่อยสลายน้ำตาลเพื่อให้ให้กรดแลคติกอีกครั้งหนึ่ง อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่า แบคทีเรียในกลุ่ม Amylolytic lactic acid bacteria สามารถย่อยสลายแป้งดิบและผลิตกรดแลคติกได้ในขั้นตอนเดียว โดยแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* และ *Lactococcus* จัดอยู่ในกลุ่มนี้เช่นกัน (Zhang and Cheryan, 1994; Vishnu *et al.*, 2002; Naveena, *et al.*, 2005) แต่ในการใช้กลุ่มแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนของวัตถุดิบในการผลิตต้องมีการศึกษาความเหมาะสมของปริมาณแป้งเริ่มต้น พบว่าการใช้ความเข้มข้นของแป้งต่ำให้ผลผลิตของกรดแลคติกสูงกว่าการใช้ความเข้มข้นของแป้งสูง นอกจากนี้ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้น การควบคุมค่าความเป็นกรดเป็นด่างในระหว่างการหมัก และการใช้โคแฟคเตอร์ เช่น แมงกานีสไอออนมีส่วนสำคัญต่อการผลิตกรดแลคติกอีกด้วย (Mercier, *et al.*, 1992; Yumoto and Ikeda, 1995; Ohkouchi and Inoue, 2006; Mussatto *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2008) เช่น รายงานของ Xiaodong *et al.* (1997) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกของ *Lactobacillus amylovorus* โดยใช้แป้งข้าวโพด แป้งข้าวสาลี แป้งข้าว แป้งมันสำปะหลังและแป้งมันฝรั่ง เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเติมเปปโตนร้อยละ 1 ลงในอาหารดัดแปลงสูตร Basal medium ซึ่งใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหารทำให้ปริมาณกรดแลกติกเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 43 เป็นร้อยละ 70 ส่วนรายงานของ Ohkouchi and Inoue (2006) ศึกษาการผลิตกรดของแบคทีเรีย *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011โดยใช้วัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานอาหารและแป้ง พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณกรดแลคติก ได้แก่ ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเริ่มต้นที่ใช้ในกระบวนการ saccharification การควบคุมค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการหมัก และการเติมแมงกานีสอิออนมีผลโดยตรงต่อการเพิ่มปริมาณกรดแลคติก นอกจากนี้ได้มีการใช้กระบวนการ Simultaneous Saccharification and Fermentation หรือ SSF เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลคติกจากคาร์โบไอเดรตที่มีโครง สร้างซับซ้อน เช่นรายงานการศึกษาของ Marques และคณะ (2008) รายงานการทำ SSF ในการผลิตกรดแลคติกจากน้ำทิ้งโรงงานกระดาษที่ผ่านทรีตแล้ว ซึ่งมีปริมาณโพลีแซคคาไรด์สูง โดยนำมาย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อให้ได้กลูโคสและไซโลส เมื่อนำไปหมักด้วยเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 ซึ่งเติมอาหารเสริมตามสูตรอาหาร MRS และแคลเซียมคาร์บอเนต

พบว่าได้ปริมาตรผลผลิตคิดเป็น 2.9 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งเป็นปริมาณผลิตภัณฑ์ 0.97 กรัมกรดแลคติกต่อกรัมของคาร์โบไฮเดรต เช่นเดียวกับรายงานการผลิตกรดแลคติกด้วยเซลลูโลสที่เหลือในนำทิ้งจากโรงงานผลิตเยื่อกระดาษด้วยระบบ SSF พบว่าในการเติมและไม่เติมสารอาหารเสริมจากสูตรอาหาร MRS ให้ผลผลิตที่ไม่แตกต่างกันโดยสามารถผลิตกรดแลคติกได้เท่ากับ 39.4 กรัมต่อลิตรหลังจากการเลี้ยง 48 ชั่วโมง (Roman, *et al.*, 2008) ซึ่งเป็นการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ทำไปพร้อมๆ กับการย่อยสลายหรือการปรับสภาพสารอาหารโดยใช้สารเคมีหรือเอนไซม์ เพื่อให้ได้สารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญ ดังเช่นรายงานการใช้รำข้าวและวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งพบว่าการผ่านการปรับสภาพด้วยการย่อยสลายด้วยกรดและเอนไซม์ ซึ่งจะทำให้ได้วิตามินในกลุ่มไทอามีนและไพริด็อกซินเพิ่มมากขึ้นโดยการเติมยีสต์ร่วมด้วยทำให้เชื้อผลิตกรดแลคติกได้สูงขึ้น (Gao, *et al.*, 2008) ส่วนการเลี้ยง *Lactobacillus delbrueckii* เพื่อผลิตกรดแลคติกด้วยเซลลูโลสไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายในกระบวนการผลิตเบียร์ ซึ่งสามารถให้ผลผลิตสูงเมื่อเติมอาหารเสริมจากสูตรอาหาร MRS และควบคุมพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 โดยผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดคิดเป็น 35.54 กรัมต่อลิตร หรือมีอัตราการผลิตคิดเป็น 0.82 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงที่ระยะเวลาเลี้ยง 12 ชั่วโมง (Mussatto *et al.*, 2008)

สำหรับการปรับปรุงพันธุ์แบคทีเรียเพื่อผลิตกรดแลคติด โดยอาศัยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เป็นวิธีที่สำคัญที่จะทำให้ได้ผลิตผลิตเพิ่มสูงขึ้น ดังเช่นรายงาน การศึกษาการผลิตกรดแลคติกโดยใช้กระบวนการ Simultaneous Saccharification and Fermentation หรือ SSF เพื่อลดระยะเวลาในการผลิตให้สั้นลง ซึ่งอาจทำควบคู่ไปกับการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของจุลินทรีย์ เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการสร้างผลิตได้สูงและใช้เวลาสั้น ตัวอย่าง การศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2025 โดยการทำโพรโตพลาสฟิวชั่น (protoplasmic fusion) กับเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 23842 ซึ่งมีความสามารถย่อยแป้งได้ดีที่อุณหภูมิสูง โดยได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในเลี้ยงด้วยกากมันสำปะหลังร่วมกับการเติมอาหารเสริมได้แก่ ยีสต์สกัดและเปปโตนในอัตราร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงคิดเป็น 40 กรัมต่อลิตรจากปริมาณกากมันสำปะหลังที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน 83 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้หัวเชื้อกลายพันธุ์ปริมาตรร้อยละ 3 และใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นบัฟเฟอร์ (Rojan, *et al.*, 2008) ในการปรับปรุงพันธุ์ของเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 โดยการใช้รังสีอัลตร้าไวโอเลต พบว่า เมื่อนำมาเลี้ยงด้วยกากน้ำตาลจากอ้อยที่ผ่านการย่อยสลายที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนหลายชนิด พบว่ายีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้จุลินทรีย์มีการผลิตกรดแลคติกได้สูงที่สุดคิดเป็น 135 กรัมต่อลิตร

และเชื้อที่ผ่านการกลายพันธุ์ได้แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการเจิญอย่างรวดเร็ว มีระยะ lag phase สั้น มีประสิทธิภาพในการสร้างกรดแลคติกได้ในปริมาณสูง (Kadam,*et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของจุลินทรีย์ผลิตกรดแลคติก แต่ได้รับการจดสิทธิบัตร เนื่องจากเชื้อที่ผ่านการกลายพันธุ์ได้ถูกนำมาใช้ในทางการค้า

รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

Altaf และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาเรื่อง การนำของเหลือทิ้งจากกระบวนการเกษตร จำพวก red lentil flour (RL) และ baker's yeast (YC) มาใช้แทนเปปโตน และยีสต์สกัด ในสูตรอาหาร MRS เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดแลคติก โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus amylophilus* GV6 ซึ่งในการผลิตกรดแลคติกนั้นให้ผลผลิตคิดเป็นร้อยละ 96 (กรัมของกรดแลคติกต่อกรัมของสับสเตรท) และมีประสิทธิภาพการผลิตกรดแลคติกคิดเป็นร้อยละ 77.6 (กรัมของกรดแลคติกต่อกรัมของสับสเตรท)

Chatterjee และคณะ (1997) กล่าวถึง การแยกเชื้อ *Lactobacillus cellobiosus* จากน้ำเสียชุมชน จากนั้นนำมาศึกษาในเรื่องเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสและการผลิตกรดแลคติก โดยกระบวนการหมักของเสียจากมันฝรั่ง ซึ่งในกระบวนการหมักใช้มันฝรั่งร้อยละ 5 (โดยน้ำหนัก) ร่วมกับแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 3 (โดยน้ำหนัก) พบว่าสามารถผลิตกรด แลคติกได้ถึงร้อยละ 50 ภายใน 48 ชั่วโมง

Hofvendahl และ Hahn-Hägerdal (2000) ได้ศึกษาเปรียบเทียบชนิดของสารอาหารที่แตกต่างกันรวมทั้งศึกษาผลกระทบของสารอาหารที่เติมลงไปในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตกรดแลคติก พบว่า การเติมส่วนประกอบอาหารสูตร MRS จะช่วยกระตุ้นการหมักได้ดีกว่าการเติมยีสต์สกัด เนื่องจากยีสต์สกัดและสารอาหารอื่นๆ เช่น เนื้อสกัด เปปโตนและเกลือ มีอยู่แล้วในอาหารสูตร MRS

Mussatto และคณะ (2007) ได้รายงานการศึกษา การนำธัญพืชที่เหลือจากกระบวนการหมักเบียร์มาใช้เป็นสับสเตรทในกระบวนการผลิตกรดแลคติกโดยทำการย่อยสลายเพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคสใช้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* สายพันธุ์ UFV H2B20 พบว่าการผลิตกรดแลคติกที่ดีที่สุดเกิดจากการหมักในไฮโดรไลเซตที่เติมสารอาหารสูตร MRS และมีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 ทำให้สามารถผลิตกรดแลคติกได้เท่ากับ 35.54 กรัมต่อลิตร โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 0.99 กรัมต่อกรัม ซึ่งปริมาณกรดแลคติกที่ได้จากกระบวนการหมักตอนสุดท้ายเท่ากับ 0.59 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และในระหว่าง 12 ชั่วโมงแรก มีปริมาณกรดแลคติกสูงสุดเท่ากับ 0.82 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Xiaodong และคณะ (1997) ได้รายงานการศึกษา การผลิตกรดแลคติกโดยการใช้วัตถุดิบ คือ แป้งข้าวโพด แป้งข้าวเจ้า และแป้งข้าวสาลี ซึ่งใช้เชื้อ *Lactobacillus amylovorus* พบว่า มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลคติก คือ 10.1, 7.9 และ 7.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่การใช้กากมันสำปะหลังและแป้งมันฝรั่งทดแทนแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหาร basal จะมีประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลคติก คิดเป็น 4.8 และ 4.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเติมเปปโตนร้อยละ 1 ทำให้มีอัตราการผลิตกรดแลคติกเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 43 เป็นร้อยละ 70

สุธิดา อยู่สำราญ และคณะ (2547) ได้ศึกษาศักยภาพของเชื้อ *Lactobacillus mali* NRIC 1692 ในการผลิตกรดแลคติกด้วยอาหารสูตร MRS ปกติกับอาหารสูตรดัดแปลง MRS ที่มีการใช้กากน้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร แทนการใช้กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลงที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลคติก คือ ลดเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร และทดแทนการใช้น้ำตาลกลูโคสด้วยกากน้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถผลิตกรดแลคติกได้คิดเป็น 22 กรัมต่อลิตร เมื่อหมักนานถึง 69 ชั่วโมง

บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

วัตถุดิบ

วัตถุดิบ คือ กากมันสำปะหลังแห้งและน้ำทิ้งจากการผลิตแป้งมันสำปะหลังจากโรงงานซอไชวัฒน์อุตสาหกรรมจำกัด โดยนำกากมันสำปะหลังที่ได้มาบดด้วยเครื่องบดเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน

เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* TISTR 926 ได้จากศูนย์เก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์แห่งประเทศไทย สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

สารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS (Atlas, 1946)

2- aminoanthacene

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งอย่างละเอียด METTIER รุ่น AE 200
2. เครื่องชั่งอย่างหยาบ OHAUS รุ่น Adventure ARC 1200
3. กล้องจุลทรรศน์ Olympus รุ่น CH-2
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง HERMLE รุ่น Z 323 K
5. เครื่อง Vortex Heidolph รุ่น REAX 2000
6. เครื่อง Hot plate รุ่น VELP scientifica
7. หม้อนึ่งความดันไอ HIRAYAMA รุ่น HA-300 MII
8. เครื่อง Sonicator Cole-paramer รุ่น 8893
9. เครื่อง dispenser BioHT Rroline prosenser
10. ตู้อบความร้องสูง SHEL LAB รุ่น SL 1375 FX Sheldon manufacturing Inc.
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ SHEL LAB รุ่น Sheldon manufacturing Model 1265
12. ตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิ SHEL LAB รุ่น Sheldon manufacturing Inc. Model 1925
13. ปิเปตดูดสารปริมาณน้อย Gilson ขนาด 100-1000 µl และรุ่น BiOHiT 20-200 µl

14. คิวเวตแก้ว Hellma ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
15. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ SHIMADZU รุ่น UV-1601
16. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) METTLER TOLEDO รุ่น DELTA 320
17. ชุดเครื่องแก้ววิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก

วิธีการทดลอง

ตอนที่ 1

1. การเตรียมหัวเชื้อ

ทำการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS ปริมาตร 100 มิลลิตร บรรจุลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมหัวเชื้อแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 926 โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 - 5 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเพื่อตรวจสอบจลนพลศาสตร์การเจริญของเชื้อ

2. การศึกษาความสามารถในการผลิตกรดแลคติกที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์

ถ่ายหัวเชื้อเริ่มต้นของ *Lactobacillus plantarum* TISTR 926 ที่เตรียมไว้ปริมาตรร้อยละ 2 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะที่เขย่าและไม่เขย่า เก็บตัวอย่างทุกวัน เพื่อตรวจสอบการผลิตกรดแลคติกและการใช้น้ำตาลรีดิวส์ติดตามการเปลี่ยนแปลงด้วยการวัดความเป็นกรดด่าง

3. การตรวจสอบความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อในอาหารดัดแปลงแหล่งคาร์บอน

ถ่ายหัวเชื้อเริ่มต้นของ *Lactobacillus plantarum* TISTR 926 ที่เตรียมไว้ปริมาตรร้อยละ 2 ลงในอาหารสูตรอาหารดัดแปลง MRS ซึ่งใช้กากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3 และ 4 แป้งสำปะหลังร้อยละ 2 และ Soluble starch ร้อยละ 2 เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน เลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง โดยไม่เขย่า

4. การเหนี่ยวนำให้เกิดการให้เกิดการกลายพันธุ์ของแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก

4.1 การศึกษาการเหนี่ยวนำเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต

การเหนี่ยวนำเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต เตรียมโดย นับจำนวนเซลล์ให้ได้เป็น 1×10^{6} เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำเซลล์ที่ได้มาปั่นเหวี่ยง (5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที) ล้างเซลล์ด้วยฟอตเฟสบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง เจือจางด้วยฟอตเฟสบัฟเฟอร์ให้ได้เป็น 1×10^{6} เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ซึ่งมีระยะห่างในการฉาย 13.5 เซนติเมตร ทำการฉายทุก 1 นาทีเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการฉายรังสีไปสเปรดเพลต (spread plate method)

4.2 การศึกษาการเหนี่ยวนำเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ด้วยสารเคมี

การเหนี่ยวนำเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน เตรียมโดยนับจำนวนเซลล์ให้ได้เป็น 1×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำเซลล์ที่ได้มาปั่นเหวี่ยง (5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที) ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วนำไปทรีตด้วยสารด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน ที่ความเข้มข้น 250, 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที ล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง และเจือจางด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการทรีตด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีนไปสเปรดเพลต

4.3 การศึกษาการเหนี่ยวนำเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ด้วยการฉายรังสีร่วมกับสารเคมี

การเหนี่ยวนำเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตร่วม กับสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน เตรียมโดยนับจำนวนเซลล์ให้ได้เป็น (1×10^{8}เซลล์ต่อมิลลิลิตร) นำเซลล์ที่ได้มาปั่นเหวี่ยง (5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที) ล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง จากนั้นเจือจางด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้ได้เป็น 1×10^{6} เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ทุก 1 นาทีเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที) ล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง แล้วนำไป ทรีตด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีนที่ความเข้มข้น 250, 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 และ 20 นาที ล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง และเจือจางด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการทรีตไปสเปรดเพลต

5. การศึกษาความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อแบคทีเรีย ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วย การฉายรังสีอัลตราไวโอเลต สารเคมี และรังสีร่วมกับสารเคมีในอาหาร MRS

ถ่ายหัวเชื้อเริ่มต้นของ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำ (1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS เลี้ยงที่อุณหภูมิห้องในสภาวะนิ่ง โดยเลี้ยงเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิม ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 7 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรดด่างและปริมาณกรดแลคติก

6. การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกากมันสำปะหลังในการผลิตกรดแลคติก

ถ่ายหัวเชื้อเริ่มต้นของ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำ (1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS ดัดแปลงซึ่งใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน ร้อยละ 2, 4 และ 6 ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะนิ่ง ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 7 วัน เพื่อวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณกรดแลคติก และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

7. การศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของไนโตรเจนในการผลิตกรดแลคติก

เลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร MRS ดัดแปลงที่ใช้กากมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 2 (จากข้อ 5.5) เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันคือ อินทรีย์ไนโตรเจน อนินทรีย์ไนโตรเจน และแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างอินทรีย์ไนโตรเจนและอนินทรีย์ไนโตรเจนทำการปรับค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่ 4.5

7.1 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ในสูตรอาหาร MRS ดัดแปลง โดยใช้เปปโตน และยีสต์สกัด เพื่อใช้เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน (เปปโตน 10 กรัมต่อลิตรร่วมกับยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร)

7.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในสูตรอาหารดัดแปลง MRS โดยใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อใช้เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน (แอมโมเนียมคลอไรด์ร้อยละ 5 และแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 5)

7.3 ศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์และอนินทรีย์

ทำการคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 7.1 – 7.2 เพื่อใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องในสภาวะนิ่ง เก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 7 วัน เพื่อวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณกรดแลคติก และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ตอนที่ 2

เนื่องจากเชื้อที่คัดแยกได้ตาย จึงทำการเริ่มต้นศึกษาใหม่อีกครั้งโดยเลือกผลการทดลองที่ดีที่สุดที่ได้ในตอนแรกมาเป็นพื้นฐานในการศึกษา ทำการศึกษาดังนี้

1. การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับการทดลอง

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ *L. plantarum*TISTR 926 ซึ่งเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยนำมาเลี้ยงบนอาหารวุ้นเอียง MRS และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน เพื่อนำมาใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทดลอง

2. การศึกษาการเหนี่ยวนำเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ด้วยการฉายรังสีเหนือม่วง

การเหนี่ยวนำเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ด้วยการฉายรังสีเหนือม่วง เตรียมโดยนับจำนวนเซลล์ให้ได้เท่ากับ 1×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำเซลล์ที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 2 ครั้ง แล้วใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เจือจางให้ได้เท่ากับ 1×10^{6} เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปฉายด้วยรังสีเหนือม่วงที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ทำการฉายทุก 1 นาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำเซลล์ที่ผ่านการฉายรังสีไปสเปรดเพลต (spread plate method)

3. การเตรียมกากมันสำปะหลัง

3.1 การเตรียมกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย

โดยนำกากมันสำปะหลังแห้งมาทำการบดให้ละเอียดโดยใช้เครื่องบด เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926

3.2 การเตรียมกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยสลาย

นำกากมันสำปะหลังแห้งบดความเข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) บรรจุในถังปฏิกรณ์ขนาด 10 ลิตร เติมเอนไซม์อะไมเลสให้มีความเข้มข้นร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อน้ำหนักกากมันสำปะหลังแห้ง) กวนผสมให้เข้ากัน ทำการย่อยที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

นำมากรองแยกส่วนของเหลวที่ได้จากการย่อยสลายที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลายคำนวณได้จาก

$$\text{ผลได้ (yield) (\%)} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยสลาย (กรัมต่อลิตร)} \times 100}{\text{ปริมาณกากมันที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)}}$$

4. การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยสลายและไม่ผ่านการย่อยสลายในการผลิตกรดแลคติก

ทำการถ่ายหัวเชื้อเริ่มต้นของ *L. plantarum* TISTR 926 (1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ที่ผ่านการฉายรังสีเหนือม่วงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลง MRS ซึ่งใช้กากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยสลายและไม่ผ่านการย่อยสลายเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน โดยคิดเป็นร้อยละ 2, 4 และ 6 ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องในสภาวะนิ่ง ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 5 วัน เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าความเป็นกรดด่าง

5. การศึกษาชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของไนโตรเจนในการผลิตกรดแลคติก

เลี้ยงเชื้อในอาหารดัดแปลงสูตร MRS ที่ใช้กากมันสำปะหลังที่คัดเลือกจากข้อ 2.4 เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันคือ อินทรีย์ไนโตรเจน อนินทรีย์ไนโตรเจน และแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างอินทรีย์ไนโตรเจนและอนินทรีย์ไนโตรเจนโดยมีการศึกษาดังนี้ คือ

5.1 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในสูตรอาหารดัดแปลง MRS โดยใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนคือ น้ำแช่ข้าวโพด และนมถั่วเหลือง โดยคิดเป็นร้อยละ 1.5, 3, 4.5 และ 6 ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องในสภาวะนิ่ง ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 5 วัน เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าความเป็นกรดด่าง

5.2 ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ร่วมกับอนินทรีย์ไนโตรเจน

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในสูตรอาหารดัดแปลง MRS โดยใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่คัดเลือกมาจากข้อ 2.5.1 ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อใช้เป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนและอนินทรีย์ไนโตรเจน โดยใช้อัตราส่วนร้อยละ 7 : 0, 0 : 7, 6 : 1,1 : 6, 5 : 2, 2 : 5, 4 : 3, 3 : 4 และ 3.5 : 3.5 เลี้ยงที่อุณหภูมิห้องในสภาวะนิ่ง ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 5 วัน เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าความเป็นกรดด่าง

6. การศึกษาผลของการเติมและไม่เติมอิออนของโลหะในการผลิตกรดแลคติก

ทำการถ่ายหัวเชื้อเริ่มต้นของ *L. plantarum* TISTR 926 (1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลง MRS ที่ใช้กากมันสำปะหลังและแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกจากข้อ 2.5.2 เพื่อทดสอบอิทธิพลของการเติมและไม่เติมอิออนของโลหะโดยใช้เหล็กซัลเฟต 0.05 กรัมต่อลิตรแมงกานีสซัลเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร และเหล็กซัลเฟต 0.025 กรัมต่อลิตรร่วมกับแมงกานีสซัลเฟต 0.025 กรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิห้องในสภาวะนิ่ง ทำการเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 5 วัน เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าความเป็นกรดด่าง

7. การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผ่านการกลายด้วยถังหมักแบบกะ

ในการเลี้ยงในถังหมักระดับปฏิบัติการขนาด 5 ลิตร โดยมีปริมาตรน้ำหมัก 3 ลิตร เลี้ยงด้วยอาหารสูตรดัดแปลงซึ่งได้จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4 ถึง ข้อ 6 ประกอบด้วยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยร้อยละ 6 เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำแช่ข้าวโพดในอัตราส่วน 6 : 1 ใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้ความเร็วของใบกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการใช้อากาศเท่ากับ 1 ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของเหลวต่อนาที (vvm)

บทที่ 4

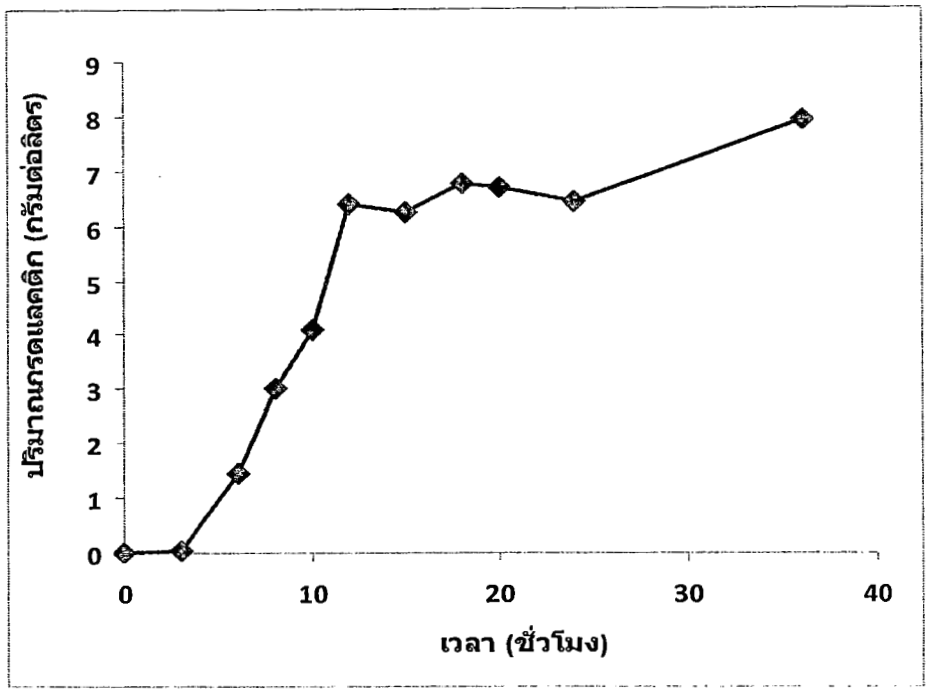
ผลและอภิปรายผลการดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1

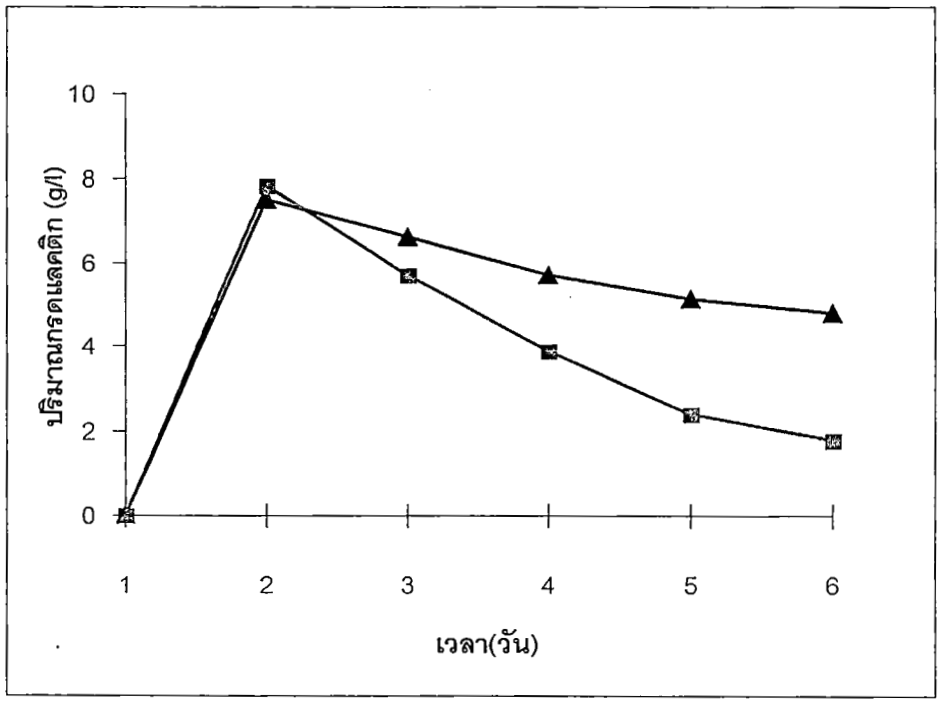
1. ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกโดยตรงของเชื้อแบคทีเรียในอาหารสังเคราะห์

จากการตรวจสอบจลนศาสตร์ของการเจริญของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ในอาหารสูตร MRS เพื่อดูความสามารถในการเจริญและการสร้างกรดแลคติกพบว่า มีระยะการเจริญก้าวหน้าของเชื้ออยู่ในช่วงโมงที่ 5 - 6 ของการเลี้ยง ดังแสดงในภาพที่ 3 โดยเชื้อจะเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่หลังจากระยะเวลาเลี้ยง 10 ชั่วโมง ดังนั้นในการศึกษาจึงใช้ระยะเวลาในการเตรียมหัวเชื้อที่มีอายุ 5-6 ชั่วโมงตลอดการทดลอง จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 926 ในอาหารสูตร MRS โดยการเลี้ยงแบบเขย่าและไม่เขย่าที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการวิเคราะห์ค่าต่างๆ คือ ปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าความเป็นกรดด่าง พบว่า ปริมาณกรดแลคติกในการเลี้ยงแบบเขย่าและไม่เขย่า (ภาพที่ 4) เป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือ เพิ่มขึ้นในช่วง 2 วันแรก หลังจากนั้นปริมาณกรดแลคติกจะค่อยๆ ลดลง โดยการเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าและไม่เขย่า สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด คิดเป็น 7.81 ± 1.04 และ 7.51 ± 0.52 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเป็นไปในทำนองเดียวกันกับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่ามีแนวโน้มไปในทิศทาง เดียวกัน คือ ในช่วงวันแรกมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นอยู่ ในช่วง 63.52 - 64.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะค่อยๆ ลดลงจนสิ้นสุดกระบวนการ (ภาพที่ 5) ส่วนการตรวจสอบค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการเจริญพบว่า ในทุกชุดการทดลองมีแนวโน้มเดียวกัน คือ มีค่าความเป็นกรดด่างคงที่ ซึ่งอยู่ในช่วงระหว่าง 5.99 – 7.30 จากการทดลองครั้งนี้เป็นไปตามรายงานของกาญจนาพร อารีรัตน์และคณะ (2549) ในการศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากหางนมของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย รหัส PNT11 แบบเขย่าและไม่เขย่า มีปริมาณการผลิตกรดแลคติกได้ไม่แตกต่างกัน คือ 20.04 และ 19.08 กรัมต่อลิตร ดังนั้น ในการศึกษาต่อไปจึงเลือกใช้การเลี้ยงเชื้อแบบไม่เขย่า เพื่อใช้ปรับปรุงสภาวะอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อไป

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

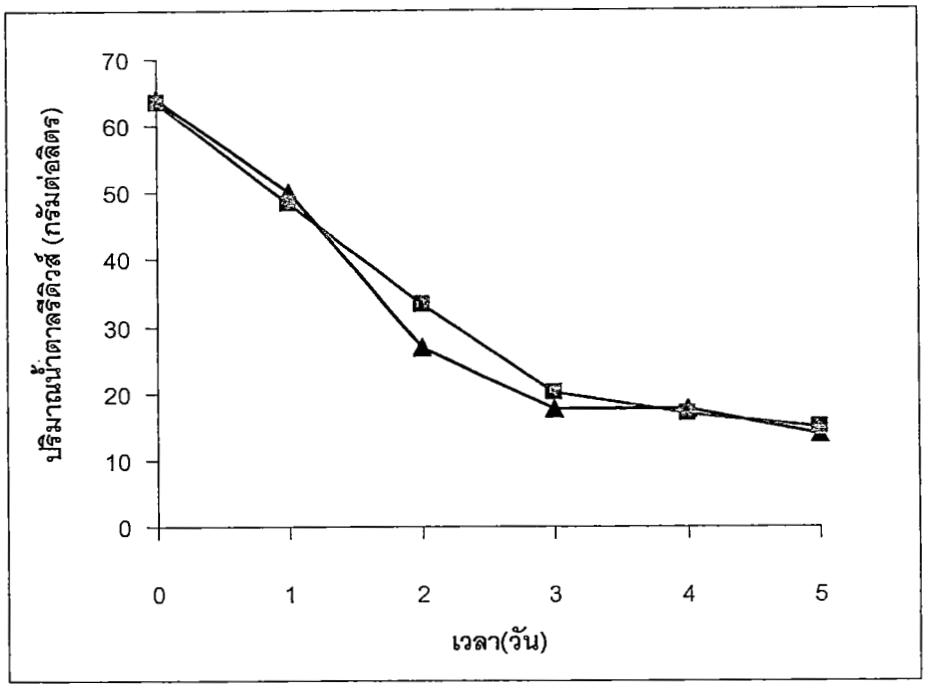


ภาพที่ 3 จลนพลศาสตร์ในการเจริญของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MRS



ภาพที่ 4 การเลี้ยงในอาหารสูตร MRS ในสภาวะการเลี้ยง ▩ แบบเขย่า ▲ แบบไม่เขย่า

321225
579.31
ก186ก
ฉ.2



ภาพที่ 5 ความสามารถในการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ ของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MRS ในสภาวะการเลี้ยง ▩ แบบเขย่า ▲ แบบไม่เขย่า

2. ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อในอาหารดัดแปลงแหล่งคาร์บอน

ในการศึกษาชนิดความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 926 โดยทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในสูตรอาหารดัดแปลง MRS ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3 คือ

ตารางที่ 3 สูตรอาหารที่ใช้ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน

สูตรที่	แหล่งคาร์บอน	ร้อยละ
1	กากมันสำปะหลัง	1
2	กากมันสำปะหลัง	2
3	กากมันสำปะหลัง	3
4	กากมันสำปะหลัง	4
5	Soluble starch	2
6	แป้งมันสำปะหลัง	1
7	ชุดควบคุม สูตรอาหาร MRS	

ในการผลิตกรดแลคติก พบว่า อาหารทั้ง 6 สูตร จะมีปริมาณกรดแลคติกมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ จะค่อยๆ เพิ่มขึ้น หลังจากนั้นจะค่อยๆ ลดลง โดยการใช้กากมันสำปะหลังร้อยละ 4 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด ในวันที่ 4 คิดเป็น 6.61 ± 1.38 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ กากมันสำปะหลังร้อยละ 3 สามารถผลิตกรดแลคติกได้ คิดเป็น 5.11 ± 0.52 กรัมต่อลิตร ส่วนกากมันสำปะหลังร้อยละ 2 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดในวันที่ 2 คิดเป็น 5.41 ± 0.52 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 4) จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติแล้ว พบว่า การใช้กากมันสำปะหลังร้อยละ 2 และ 4 มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งเป็นไปตามรายงานของ Xiaodong และคณะ (1997) ได้รายงานการศึกษา การผลิตกรดแลคติกโดยใช้กากมันสำปะหลังและแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า สามารถผลิตกรดแลคติกคิดเป็น 4.8 และ 4.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่า มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ ในช่วงวันแรกมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเพียงเล็กน้อย และจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นสูงสุด ในช่วงวันที่ 4 โดยอยู่ในช่วงระหว่าง 10.77 - 18.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะค่อยๆ ลดลงจนสิ้นสุดกระบวนการ จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ในช่วงระหว่าง 6.41 - 11.62 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4) ในการตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้ง พบว่า ในทุกสูตรอาหารมีแนวโน้มในทิศทางเดียวกัน คือ ในวันแรกจะมีค่ากิจกรรมย่อยแป้งอยู่ในช่วง 0.03 – 0.08 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และจะค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้น จนถึงวันสุดท้ายซึ่งอยู่ในช่วงระหว่าง 0.53 – 0.77 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยสูตรอาหารที่ 6 ซึ่งใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ย่อยแป้งสูงสุด คิดเป็น 8.47 ± 3.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นไปตามรายงานของ สมใจ ศิริโภค (2547) กล่าวว่า สารตั้งต้นที่จะชักนำให้เกิดการสร้างในสภาวะที่มีสารตั้งต้นที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสตัวชักนำที่สำคัญคือเซลลูโลสส่วนการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งตัวชักนำ คือ แป้งหรือเดกซ์ตริน จากการตรวจสอบค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการเจริญ พบว่า ในทุกสูตรอาหารมีแนวโน้มเดียวกัน คือ มีค่าความเป็นกรดด่างคงที่ โดยอยู่ในช่วงระหว่าง 5.52 - 6.81 ซึ่งค่าความเป็นกรดด่างเป็นไปตามคำกล่าวของ Silva และ Mancilha (1991) คือ ค่าความเป็นกรดด่างเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดแลคติกโดยค่าความเป็นกรดด่างภายนอกเซลล์จะช่วยเร่งปฏิกิริยาและเร่งกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ ในการผลิตกรดแลคติกมีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 5.0 – 7.0 และขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงเลือกสูตรอาหารที่ใช้กากมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ2 เนื่องจากปริมาณกรดแลคติกไม่มีความแตกต่างกันกับการใช้กากมันสำปะหลังร้อยละ 4

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติก และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR 926 ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง MRS โดยใช้ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน

ระยะเวลา (วัน)	สูตรที่ 1 กากมันสำปะหลัง 1 %		สูตรที่ 2 กากมันสำปะหลัง 2 %		สูตรที่ 3 กากมันสำปะหลัง 3 %		สูตรที่ 4 กากมันสำปะหลัง 4 %	
	กรดแลคติก (g/l)	น้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)	กรดแลคติก (g/l)	น้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)	กรดแลคติก (g/l)	น้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)	กรดแลคติก (g/l)	น้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)
1	0.00	2.37 ± 0.38^{a}	0.00	2.46 ± 0.14^{a}	0.00	3.03 ± 1.08^{a}	0.00	0.79 ± 0.22^{a}
2	3.90 ± 0.52^{ns}	2.62 ± 0.43^{a}	3.90 ± 0.52^{ns}	3.72 ± 0.61^{a}	3.90 ± 0.52^{ns}	4.00 ± 1.16^{a}	3.90 ± 0.52^{ns}	2.47 ± 0.69^{a}
3	4.20 ± 0.52^{ns}	6.30 ± 0.28^{ab}	5.41 ± 0.90^{ns}	10.66 ± 0.69^{c}	4.51 ± 0.90^{ns}	15.10 ± 0.89^{d}	5.41 ± 0.90^{ns}	8.53 ± 0.81^{bc}
4	3.90 ± 0.52^{a}	5.45 ± 0.94^{a}	4.80 ± 0.52^{ab}	10.47 ± 1.65^{ab}	5.11 ± 0.52^{ab}	16.68 ± 2.84^{bc}	6.61 ± 1.38^{b}	18.03 ± 2.01^{c}
5	3.90 ± 0.52^{ns}	5.17 ± 0.69^{a}	4.66 ± 0.26^{ns}	10.22 ± 1.29^{ab}	4.51 ± 0.00^{ns}	13.01 ± 3.28^{bc}	5.11 ± 1.88^{ns}	12.69 ± 2.18^{bc}
6	3.60 ± 0.00^{ns}	4.91 ± 0.89^{a}	4.20 ± 0.52^{ns}	7.88 ± 2.45^{a}	4.20 ± 0.52^{ns}	10.32 ± 3.17^{ab}	4.81 ± 2.08^{ns}	11.62 ± 1.05^{ab}

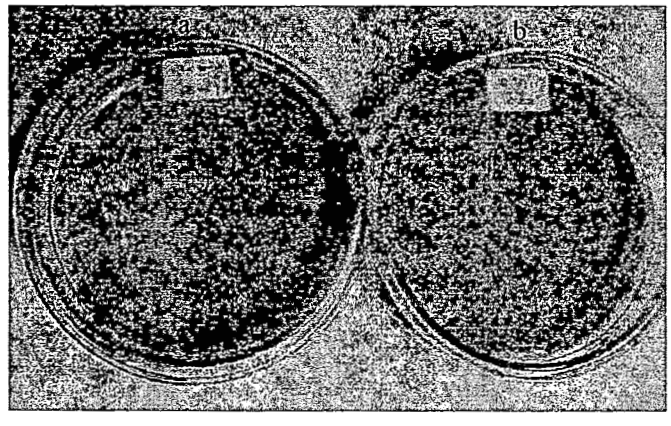
ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติก และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR 926 ที่เลี้ยงในสูตรอาหารดัดแปลง MRS โดยใช้ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน (ต่อ)

ระยะเวลา (วัน)	สูตรที่ 5 Soluble starch 2 %		สูตรที่ 6 แป้งมันสำปะหลัง 1 %		สูตรที่ 7 ชุดควบคุม (MRS)	
	กรดแลคติก (g/l)	น้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)	กรดแลคติก (g/l)	น้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)	กรดแลคติก (g/l)	น้ำตาลรีดิวซ์ (mg/ml)
1	0.00	1.72 ± 1.00^{a}	0.00	1.35 ± 0.29^{a}	0.00	45.46 ± 5.62^{b}
2	3.90 ± 0.52^{ns}	2.54 ± 0.70^{a}	4.20 ± 0.52^{ns}	1.62 ± 0.55^{a}	4.20 ± 0.52^{ns}	39.57 ± 2.62^{b}
2	4.51 ± 0.00^{ns}	5.35 ± 0.39^{a}	4.51 ± 0.00^{ns}	5.60 ± 1.46^{a}	5.11 ± 0.52^{ns}	31.89 ± 1.71^{e}
4	4.81 ± 0.52^{ab}	7.55 ± 2.02^{a}	4.51 ± 0.00^{a}	10.77 ± 2.07^{abc}	5.41 ± 0.00^{ab}	30.96 ± 4.86^{d}
5	4.20 ± 0.52^{ns}	18.05 ± 1.24^{c}	4.81 ± 1.38^{ns}	10.06 ± 2.31^{ab}	4.81 ± 0.52^{ns}	25.75 ± 2.41^{d}
6	3.60 ± 0.00^{ns}	11.25 ± 1.99^{ab}	4.20 ± 0.52^{ns}	6.41 ± 0.99^{a}	4.51 ± 0.00^{ns}	15.08 ± 4.47^{b}

3. การเหนี่ยวนำเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus plantarum* TISTR 926

3.1 การเหนี่ยวนำโดยใช้การฉายรังสีอัลตราไวโอเลต

จากการทดลองการเหนี่ยวนำเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ด้วยการฉายรังสีอัลตรา-ไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ฉายทุก 1 นาที เป็นเวลา 15 นาที พบว่า เมื่อฉายรังสีอัลตราไวโอเลต เป็นเวลาตั้งแต่ 8 - 14 นาที เชื้อมีอัตราการรอดน้อยอยู่ในช่วงร้อยละ 0.01 - 0.02 โดยน้อยกว่าการฉายรังสีที่เวลาตั้งแต่ 1 - 7 นาที ซึ่งเชื้อมีอัตราการรอดอยู่ในช่วงร้อยละ 0.04 - 0.12 ส่วนที่เวลา 15 นาทีไม่มีการเจริญของเชื้อ (ตารางที่ 5) ในการคัดเลือกจะพิจารณาจากเชื้อที่มีความสามารถในการทนต่อรังสีอัลตราไวโอเลตได้มากที่สุดโดยมีอัตราการรอดน้อยที่สุด พบว่าที่เวลา 14 นาที เชื้อจุลินทรีย์มีอัตราการรอดน้อยที่สุดร้อยละ 0.01 ที่ระยะเวลาในการฉายมากที่สุด (ภาพที่ 6) โดยเชื้อที่ได้กำหนดรหัสเป็น Up-14 ซึ่งเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำโดยวิธีดังกล่าวจะมีลักษณะเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปจากเชื้อสายพันธุ์เดิม คือเซลล์มีลักษณะเป็นท่อนยาวกว่าเชื้อสายพันธุ์เดิม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bai และคณะ (2004) พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Rhizopus oryzae* กลายพันธุ์มีความแตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์เดิม



ภาพที่ 6 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียเป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหารวุ้นที่ระดับการเจือจาง $1:10^6$

a : *L. plantarum* TISTR 926 code Up-14 (ผ่านการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 14 นาที)

b : *L. plantarum* TISTR 926

ตารางที่ 5 อัตราการรอดของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต

เวลาในการฉายรังสี (นาที)	การเจริญของเชื้อในเพลต	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml)	อัตราการรอด (%)	รหัสเชื้อ (Code No.)
1	+	1.2×10^{9}	0.12	Up-1
1	+	6.0×10^{8}	0.06	Up-1
1	+	6.0×10^{8}	0.07	Up-3
1	+	5.0×10^{8}	0.06	Up-3
5	+	5.0×10^{8}	0.06	Up-5
5	O	-	-	-
5	+	1.2×10^{9}	0.06	Up-1
[illegible]	+	1.2×10^{9}	0.06	Up-8
9	+	1.0×10^{8}	0.06	Up-9
10	+	1.0×10^{8}	0.06	Up-10
10	O	-	-	-
10	+	5.0×10^{8}	0.07	Up-12
10	+	5.0×10^{8}	0.06	Up-12
10	+	5.0×10^{8}	0.07	Up-10
15	O	-	-	-

หมายเหตุ : เครื่องหมาย + เชื้อมีการเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยว O ไม่มีการเจริญของเชื้อ

ดังนั้นจึงเลือกเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำโดยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตที่เวลา 14 นาทีไปใช้ในการศึกษาหัวข้อต่อไป

3.2 การเหนี่ยวนำโดยใช้สารเคมี 2- อะมิโนแอนทราซีน

ในการเหนี่ยวนำเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 โดยทรีตด้วยสารเคมี 2- อะมิโนแอนทราซีน ที่ความเข้มข้น 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที พบว่าการทรีตด้วยสาร 2- อะมิโนแอนทราซีน ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันส่งผลต่ออัตราการรอดของเชื้อดังนี้ คือ เมื่อทรีตสารความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที เชื้อมีอัตราการรอดน้อยที่สุดคิดเป็นร้อยละ 0.1 รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เวลา 20

นาที เชื้อมีอัตราการรอดร้อยละ 1 (ตารางที่ 6) โดยเชื้อที่ได้มีลักษณะเซลล์กลมรีแตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์เดิมเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ดังนั้น การศึกษาในหัวข้อต่อไปจึงเลือกเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำโดยการทรีตด้วยสารเคมี 2- อะมิโนแอนทราซีน ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาทีไปใช้ศึกษา เนื่องจากมีอัตราการรอดของเชื้อน้อยที่สุด โดยเชื้อที่ได้กำหนดรหัสเป็น Ap-4

ตารางที่ 6 อัตราการรอดของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำโดยการทรีตด้วยสาร 2- อะมิโนแอนทราซีน

ความเข้มข้นสาร (µg/ml)	เวลาทรีตสาร (นาที)	การเจริญของเชื้อในเพลต	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml)	อัตราการรอด (%)	รหัสเชื้อ (Code No.)
250	10	O	-	-	-
	20	+	1×10^6	-	Ap-1
	20	+	1×10^6	2	Ap-2
250	10	+	3×10^6	2	Ap-2
	20	+	1×10^6	0.1	Ap-4
	30	O	-	2	-

หมายเหตุ : เครื่องหมาย + เชื้อมีการเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยว O ไม่มีการเจริญของเชื้อ

3.3 การเหนี่ยวนำโดยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับการทรีตด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน

จากผลการศึกษาการเหนี่ยวนำเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 โดยด้วยการฉายรังสีอัลตรา ไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตรทุก 1 นาที เป็นเวลา 15 นาที ร่วมกับการทรีตด้วยสาร 2- อะมิโนแอนทราซีน ความเข้มข้น 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10 และ 20 นาที พบว่า การฉายรังสีอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 1 นาที ร่วมกับการทรีตสาร 2- อะมิโนแอนทราซีน ความเข้มข้นสูงขึ้นและใช้ระยะเวลาในการทรีตมากขึ้น มีผลต่ออัตราการรอดของเชื้อลดลง ซึ่งที่ความเข้มข้นสาร 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เวลา 20 นาที เชื้อมีอัตราการรอดน้อยที่สุด คิดเป็นร้อยละ 0.01 โดยเชื้อที่ได้กำหนดรหัสให้เป็น Uap-4 ส่วนการฉายรังสีที่เวลา 2- 15 นาที

ร่วมกับการทรีตด้วยสารเคมี พบว่าไม่มีการเจริญของเชื้อในจานเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 7) โดยเชื้อที่ได้มีลักษณะเซลล์กลมรีแตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์เดิมเมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ตารางที่ 7 อัตราการรอดของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับการทรีตด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน

เวลาในการฉายรังสี		**1 (นาที)**				**2-15 (นาที)**			
ความเข้มข้นสาร 2AA (µg/ml)	เวลาทรีตสาร 2AA (นาที)	การเจริญของเชื้อในเพลต	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml)	อัตราการรอด (%)	รหัสเชื้อ	การเจริญของเชื้อในเพลต	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml)	อัตราการรอด (%)	รหัสเชื้อ
250	10	+	1×10^{9}	0.1	Uap-1	O	-	-	-
	20	+	4×10^{8}	0.04	Uap-2	O	-	-	-
500	10	+	2×10^{8}	0.02	Uap-3	O	-	-	-
	20	+	1×10^{8}	0.01	Uap-4	O	-	-	-

หมายเหตุ : เครื่องหมาย + เชื้อมีการเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยว O ไม่มีการเจริญของเชื้อ

ดังนั้นการศึกษาต่อไปจึงเลือกเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 1 นาที ร่วมกับการทรีตด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เวลา 20 นาที นำไปใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป

4. ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำในอาหารเหลว

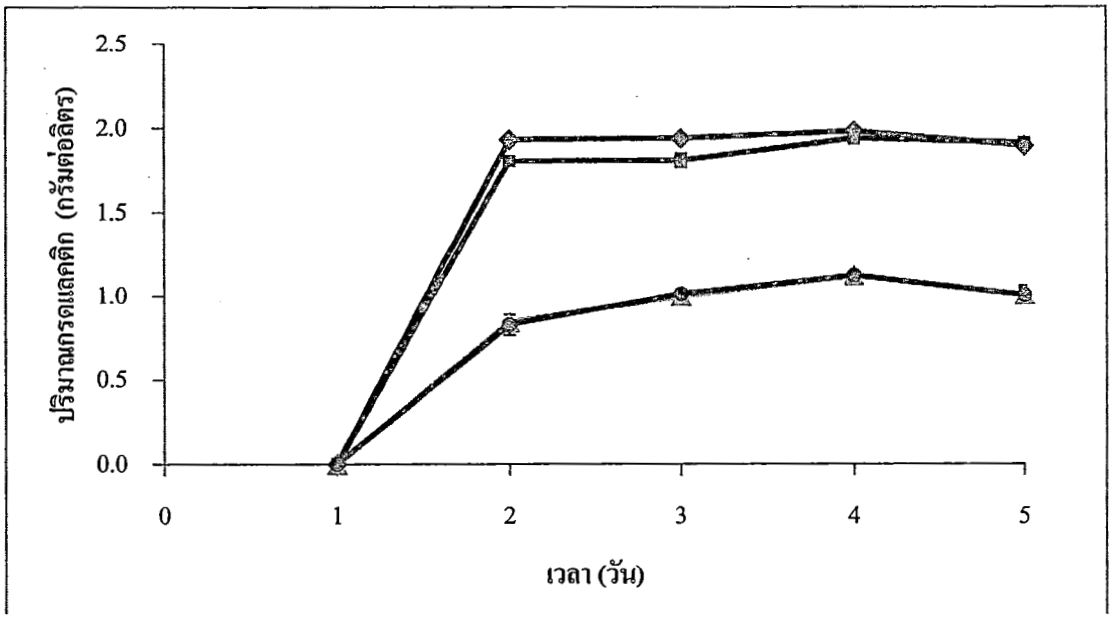
ในการใช้เชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำรหัสต่างๆ ดังนี้ คือ เชื้อรหัส Up-14 (ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 14 นาที) เชื้อรหัส Ap-4 (ผ่านการทรีตด้วยสาร 2- อะมิโนแอนทราซีนความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที) และเชื้อรหัส Uap-4 (ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 1 นาทีร่วมกับการทรีตด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีนความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที) เปรียบเทียบกับเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 สายพันธุ์เดิม ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม จากการทดลองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการเหนี่ยวนำในอาหารเหลวสูตร MRS ที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการวิเคราะห์ค่าต่างๆ คือ

ปริมาณกรดแลคติกและค่าความเป็นกรดด่าง พบว่า ปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้จากเชื้อ Up-14 สามารถผลิตกรดแลคติกได้ปริมาณสูงใกล้เคียงกับเชื้อสายพันธุ์เดิมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดในวันที่ 4 คิดเป็น 1.94 ± 0.00 กรัมต่อลิตร ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์เดิมผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด คือ 1.98 ± 0.00 กรัมต่อลิตร สำหรับเชื้อ Ap-4 และเชื้อ Uap-4 สามารถผลิตกรดแลคติกได้ปริมาณใกล้เคียงกันโดยให้ปริมาณสูงสุดเท่ากัน คือ 1.12 ± 0.00 กรัมต่อลิตร ของการเลี้ยงในวันที่ 4 ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าเชื้อสายพันธุ์เดิม (ภาพที่ 7) โดยให้ผลแตกต่างกับรายงานการศึกษาของ Kadam และคณะ (2006) กล่าวว่าเชื้อ *L. delbrueckii* NCIM 2365 ซึ่งผ่านการกลายพันธุ์โดยใช้สภาวะการเพิ่มความเป็นกรดและการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต พบว่าเชื้อสายพันธุ์กลายสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงกว่าเชื้อสายพันธุ์เดิมถึง 2 - 2.5 เท่า เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร MRS ดัดแปลง ซึ่งประกอบด้วย ซานอ้อยที่ผ่านการย่อยร้อยละ 10 และแคลเซียมคาร์บอเนต ร้อยละ 0.5

จากการตรวจวัดค่าความเป็นกรดด่างของเชื้อแต่ละชนิด พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างมีแนวโน้มลดลง ในช่วงวันที่ 1 - 2 จากนั้นจะเริ่มคงที่ ซึ่งเชื้อ Up-14 และเชื้อสายพันธุ์เดิม จะมีค่าความเป็นกรดด่างน้อยกว่าเชื้อ Ap-4 และ Uap-4 ซึ่งอยู่ในช่วง 3.07 - 6.06 และ 4.03 - 6.23 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ อัจฉรา เพิ่ม (2549) พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม คือ 5.58 - 6.20 แต่โดยทั่วไปแบคทีเรียแลคติกสามารถเจริญได้ที่ค่าความเป็นกรดด่างน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5

5. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของกากมันสำปะหลังในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยว

ในการศึกษาการผลิตกรดแลคติกของเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำรหัสต่างๆ ดังนี้ คือ เชื้อรหัส Up-14 (ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 14 นาที) เชื้อรหัส Ap-4 (ผ่านการทรีตด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีนความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที) และเชื้อรหัส Uap-4 (ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตเป็นเวลา 1 นาที ร่วมกับ การทรีตด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีนความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที) เปรียบเทียบกับเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 สายพันธุ์เดิมซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม นำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MRS ดัดแปลงที่ใช้กากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน มีความเข้มข้นที่แตกต่างกันดังนี้ สูตรที่ 1 อาหารสูตร MRS ร่วมกับกากมันสำปะหลังร้อยละ 2 สูตรที่ 2 อาหารสูตร MRS ร่วมกับกากมันสำปะหลังร้อยละ 4 สูตรที่ 3 อาหารสูตร MRS ร่วมกับกากมันสำปะหลังร้อยละ 6 และสูตรที่ 4 อาหารสูตร MRS (ชุดควบคุม)



ภาพที่ 7 ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อแบคทีเรียในอาหารสูตร MRS โดยที่ Up-14 (■) Ap-4 (▲) Uap-4 (●) Control (◆)

หมายเหตุ : Up-14 คือ เชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต

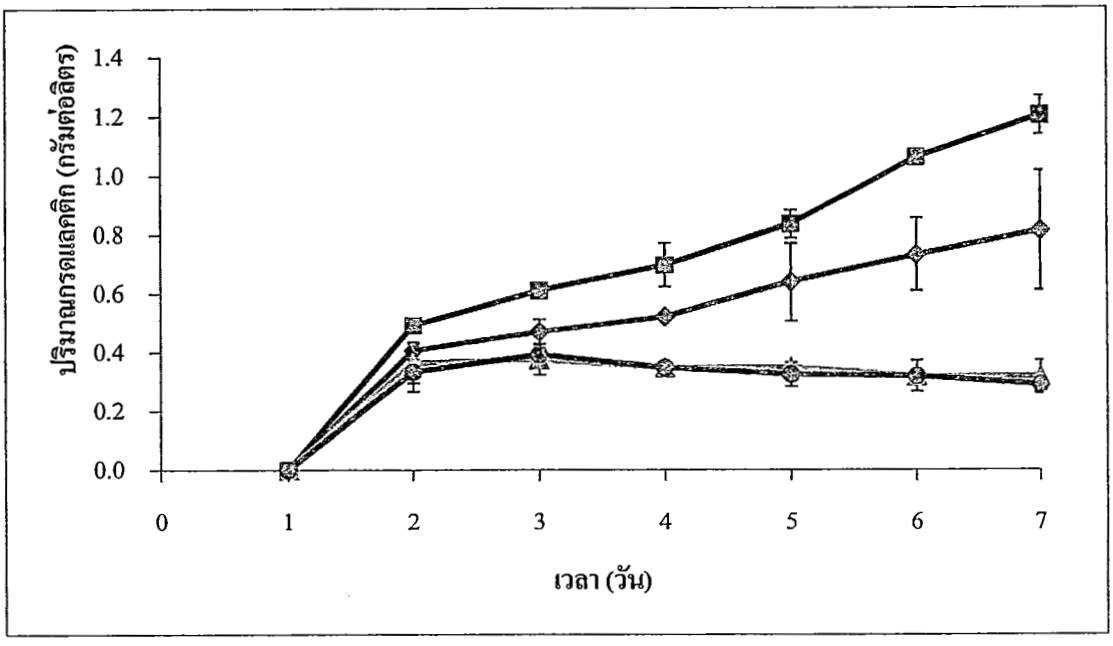
Ap-4 คือ เชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการทรีตด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน

Uap-4 คือ เชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับการทรีตด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน

Control คือ เชื้อ *L. plantarum* TISTR 926

ในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์เดิมพบว่าอาหารในสูตรที่ 1, 2 และ 3 มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดแลคติกไปในทิศทางเดียวกัน คือ เมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้นปริมาณกรดที่ผลิตได้จะเพิ่มขึ้น ซึ่งอาหารสูตรที่ 3 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูง (1.20 ± 0.06 กรัมต่อลิตร) รองลงมาคืออาหารสูตรที่ 2 (1.11 ± 0.03 กรัมต่อลิตร) และสูตรที่ 1 (1.07 ± 0.01 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ (ตารางที่ 8) และเมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติแล้ว พบว่า การใช้กากมันความเข้มข้นร้อยละ 2, 4 และ 6 มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมจะให้ค่าการผลิตกรดน้อยกว่า ซึ่งเป็นไปตามการศึกษาของกรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ และคณะ (2553) พบว่า การเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ในอาหารสูตร MRS ดัดแปลงที่มีกากมันความเข้มข้นร้อยละ 2 และ 4 เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน สามารถผลิตกรดแลคติกได้ 6.61 ± 1.38 และ 5.41 ± 0.52 กรัมต่อลิตร

ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ส่วนการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารแต่ละสูตร (ภาพที่ 8) พบว่า เชื้อสายพันธุ์ Up-14 สามารถผลิตกรดแลคติกได้ปริมาณสูงสุด คิดเป็น 1.20 ± 0.06 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ เชื้อสายพันธุ์เดิม เชื้อสายพันธุ์ Ap-4 และเชื้อสายพันธุ์ Uap-4 ซึ่งมีปริมาณกรดแลคติกคิดเป็น 0.81 ± 0.17, 0.32 ± 0.04 และ 0.29 ± 0.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 3 เป็นเวลา 7 วัน และเมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่า เชื้อสายพันธุ์ Up-14 สามารถผลิตกรดแลคติกได้ปริมาณสูงแตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 8 ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อแบคทีเรียในอาหาร MRS ดัดแปลงที่มีกากมันสำปะหลังร้อยละ 6 เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน โดยที่ Up-14 (■) Ap-4 (▲) Uap-4 (●) Control (◆)

หมายเหตุ : Up-14 คือ เชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต

Ap-4 คือ เชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการทรีตด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน

Uap-4 คือ เชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับการทรีตด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน

Control คือ เชื้อ *L. plantarum* TISTR 926

ตารางที่ 8 ปริมาณกรดแลคติกของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำ ซึ่งเลี้ยงในอาหาร MRS ที่มีกากมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

วัน/ เชื้อ	สูตร 1 (กากมันสำปะหลังร้อยละ 2)				สูตร 2 (กากมันสำปะหลังร้อยละ 4)			
	เชื้อดั้งเดิม	Up-14	Ap-4	Uap-4	เชื้อดั้งเดิม	Up-14	Ap-4	Uap-4
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.51 ± 0.02^{Ba}	0.52 ± 0.00^{Ba}	0.38 ± 0.04^{Bb}	0.38 ± 0.02^{Bb}	0.44 ± 0.00^{Ba}	0.52 ± 0.00^{Ba}	0.39 ± 0.04^{Bb}	0.38 ± 0.04^{Bb}
3	0.52 ± 0.07^{Ba}	0.55 ± 0.02^{Ba}	0.39 ± 0.04^{Bb}	0.35 ± 0.00^{Bb}	0.49 ± 0.03^{Ba}	0.62 ± 0.02^{Ba}	0.33 ± 0.03^{Bb}	0.36 ± 0.02^{Bb}
4	0.57 ± 0.06^{Ba}	0.68 ± 0.02^{Ba}	0.35 ± 0.00^{Ba}	0.31 ± 0.04^{Ba}	0.52 ± 0.06^{Ba}	0.66 ± 0.03^{Ba}	0.35 ± 0.00^{Ba}	0.33 ± 0.02^{Ba}
5	0.57 ± 0.10^{Ba}	0.84 ± 0.04^{Ba}	0.36 ± 0.02^{Ba}	0.38 ± 0.02^{Bb}	0.64 ± 0.04^{Ba}	0.81 ± 0.03^{Ba}	0.28 ± 0.02^{Ba}	0.32 ± 0.04^{Ba}
6	0.74 ± 0.15^{Bb}	0.99 ± 0.03^{Ba}	0.31 ± 0.04^{Bc}	0.20 ± 0.04^{Bc}	0.76 ± 0.08^{Bb}	0.99 ± 0.03^{Ba}	0.26 ± 0.00^{Bc}	0.26 ± 0.07^{Bc}
7	0.86 ± 0.2^{Bb}	1.07 ± 0.01^{Ba}	0.36 ± 0.05^{Bc}	0.23 ± 0.04^{Bc}	0.79 ± 0.14^{Bb}	1.11 ± 0.03^{Ba}	0.26 ± 0.00^{Bc}	0.23 ± 0.04^{Bc}
วัน/ เชื้อ	สูตร 3 (กากมันสำปะหลังร้อยละ 6)				สูตร 4 (ชุดควบคุม)			
	เชื้อดั้งเดิม	Up-14	Ap-4	Uap-4	เชื้อดั้งเดิม	Up-14	Ap-4	Uap-4
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7	0.41 ± 0.02^{Ba}	0.49 ± 0.02^{Ba}	0.36 ± 0.06^{Bb}	0.33 ± 0.0^{Bb}	1.93 ± 0.0^{Aa}	1.75 ± 0.02^{Aa}	0.81 ± 0.02^{Ab}	0.784 ± 0.00^{Ab}
3	0.47 ± 0.04^{Ba}	0.61 ± 0.00^{Ba}	0.38 ± 0.05^{Bb}	0.39 ± 0.00^{Bb}	1.92 ± 0.00^{Aa}	1.8 ± 0.04^{Aa}	1.05 ± 0.00^{Ab}	0.856 ± 0.02^{Ab}
4	0.52 ± 0.00^{Ba}	0.70 ± 0.06^{Ba}	0.35 ± 0.00^{Ba}	0.35 ± 0.00^{Ba}	1.82 ± 0.00^{Aa}	1.90 ± 0.02^{Aa}	1.15 ± 0.02^{Ab}	1.00 ± 0.04^{Ab}
1	0.64 ± 0.11^{Ba}	0.84 ± 0.04^{Ba}	0.35 ± 0.00^{Ba}	0.33 ± 0.03^{Ba}	1.89 ± 0.02^{Aa}	1.90 ± 0.02^{Aa}	1.18 ± 0.04^{Ab}	1.07 ± 0.02^{Ab}
6	0.73 ± 0.10^{Bb}	1.06 ± 0.02^{Ba}	0.32 ± 0.04^{Bc}	0.32 ± 0.04^{Bc}	1.84 ± 0.02^{Ab}	1.81 ± 0.05^{Aa}	1.26 ± 0.04^{Ac}	1.11 ± 0.02^{Ac}
7	0.81 ± 0.17^{Bb}	1.20 ± 0.06^{Ba}	0.32 ± 0.04^{Bc}	0.29 ± 0.02^{Bc}	1.83 ± 0.00^{Ab}	1.79 ± 0.04^{Aa}	1.22 ± 0.00^{Ac}	1.07 ± 0.04^{Ac}

หมายเหตุ : ปริมาณกรดแลคติกมีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

อักษร A, B, C ที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึงสูตรอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

อักษร a, b, c ที่แตกต่างกันตามแนวนอน หมายถึง เชื้อแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ในการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่า อาหารทั้ง 4 สูตร มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 9) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ John และคณะ (2009) พบว่า เชื้อ *L. plantarum* จัดเป็นแบคทีเรียแลคติกในกลุ่มอะไมโลไลติกแลกติกแบคทีเรีย (amylolytic lactic acid bacteria) ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ย่อยแป้ง คือ เอนไซม์อะไมเลส (amylase enzyme) ในระหว่างกระบวนการหมักของแลคติกแบคทีเรียเพื่อผลิตกรดแลคติกทำให้ได้น้ำตาลกลูโคสและเดกซ์ตรินเกิดขึ้น

สำหรับการวัดค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการเจริญ พบว่าเชื้อ Up-14 และเชื้อสายพันธุ์เดิม มีแนวโน้มลดลงในอาหารทั้ง 4 สูตร ส่วนเชื้อ Ap-4 และ Uap-4 มีแนวโน้มลดลงในช่วงวันที่ 1-4 จากนั้นเริ่มคงที่หรือเพิ่มขึ้น ซึ่งในอาหารสูตรที่ 1, 2 และ 3 จะมีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 4.07 - 6.38 และในอาหารสูตรที่ 4 จะมีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 3.56 - 6.14

ดังนั้น จึงเลือกใช้กากมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน ในการศึกษาขั้นต่อไป เนื่องจากปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้จากอาหารสูตร MRS ดัดแปลงที่มีความเข้มข้นของกากมันร้อยละ 2, 4 และ 6 มีค่าการผลิตกรดแลคติกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

6. ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกของเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำ

ในการคัดเลือกชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำ ซึ่งในการศึกษาจะใช้เชื้อรหัสต่างๆ ดังนี้ คือ เชื้อรหัส Up-14 (ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 14 นาที) เชื้อรหัส Ap-4 (ผ่านการทรีตด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีนความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที) และเชื้อรหัส Uap-4 (ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสีอัลตรา-ไวโอเลตเป็นเวลา 1 นาทีร่วมกับการทรีตด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที) เปรียบเทียบกับเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 สายพันธุ์เดิม ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม นำมาเลี้ยงในอาหารสูตร MRS ดัดแปลงที่ใช้กากมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับการใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันคือ อินทรีย์ไนโตรเจน อนินทรีย์ไนโตรเจน และแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างอินทรีย์ไนโตรเจนและอนินทรีย์ไนโตรเจน

ตารางที่ 9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการเหนี่ยวเลี้ยงในอาหาร MRS ที่ใช้กากมันสำปะหลังทดแทน

วัน/ เชื้อ	สูตร 1 (กากมันสำปะหลังร้อยละ 2)				สูตร 2 (กากมันสำปะหลังร้อยละ 4)			
	เชื้อดั้งเดิม	Up-14	Ap-4	Uap-4	เชื้อดั้งเดิม	Up-14	Ap-4	Uap-4
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	1.07 ± 0.03^{ABa}	0.34 ± 0.01^{ABb}	0.46 ± 0.07^{ABb}	0.35 ± 0.01^{ABb}	1.06 ± 0.02^{ABa}	0.36 ± 0.02^{ABb}	0.43 ± 0.07^{ABb}	0.42 ± 0.11^{ABb}
1	1.58 ± 0.23^{Aa}	1.35 ± 0.05^{Aa}	1.24 ± 0.08^{Ab}	1.16 ± 0.07^{Ab}	1.34 ± 0.24^{Aa}	1.33 ± 0.09^{Aa}	1.09 ± 0.03^{Ab}	1.16 ± 0.07^{Ab}
4	1.23 ± 0.07^{Aab}	1.79 ± 0.07^{Aa}	1.19 ± 0.02^{Abc}	1.05 ± 0.17^{Ac}	1.26 ± 0.17^{Aab}	1.64 ± 0.11^{Aa}	0.99 ± 0.09^{Abc}	0.99 ± 0.12^{Ac}
2	1.15 ± 0.17^{Bb}	1.99 ± 0.08^{Ba}	1.14 ± 0.08^{Bb}	1.17 ± 0.04^{Bb}	1.42 ± 0.39^{Bb}	1.63 ± 0.27^{Ba}	1.16 ± 0.09^{Bb}	1.31 ± 0.25^{Bb}
6	1.46 ± 0.51^{Ba}	1.57 ± 0.02^{Ba}	1.14 ± 0.03^{Bb}	1.01 ± 0.06^{Bb}	1.72 ± 0.33^{Ba}	1.46 ± 0.01^{Ba}	0.95 ± 0.07^{Bb}	1.18 ± 0.34^{Bb}
7	1.81 ± 0.38^{Ba}	1.81 ± 0.07^{Ba}	1.19 ± 0.04^{Bb}	1.12 ± 0.16^{Bb}	2.06 ± 0.29^{Ba}	1.68 ± 0.07^{Ba}	1.06 ± 0.07^{Bb}	1.51 ± 0.37^{Bb}
วัน/ เชื้อ	สูตร 3 (กากมันสำปะหลังร้อยละ 6)				สูตร 4 (ชุดควบคุม)			
	เชื้อดั้งเดิม	Up-14	Ap-4	Uap-4	เชื้อดั้งเดิม	Up-14	Ap-4	Uap-4
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.62 ± 0.05^{Aa}	0.35 ± 0.16^{Ab}	0.53 ± 0.07^{Ab}	0.49 ± 0.11^{Ab}	0.58 ± 0.02^{Ba}	0.40 ± 0.010^{Bb}	0.34 ± 0.04^{Bb}	0.34 ± 0.02^{Bb}
3	1.35 ± 0.15^{Aa}	1.47 ± 0.11^{Aa}	1.00 ± 0.24^{Ab}	1.06 ± 0.07^{Ab}	1.44 ± 0.18^{Ba}	1.00 ± 0.10^{Ba}	0.65 ± 0.05^{Bb}	0.63 ± 0.07^{Bb}
4	1.16 ± 0.13^{Aab}	2.46 ± 0.72^{Aa}	1.02 ± 0.03^{Abc}	0.99 ± 0.14^{Ac}	1.97 ± 0.20^{Aab}	1.14 ± 0.03^{Aa}	1.01 ± 0.01^{Abc}	0.99 ± 0.04^{Ac}
3	0.92 ± 0.05^{Bb}	2.26 ± 0.03^{Ba}	1.28 ± 0.04^{Bb}	0.84 ± 0.12^{Bb}	3.24 ± 0.39^{Ab}	2.88 ± 0.10^{Aa}	2.33 ± 0.33^{Ab}	2.35 ± 0.19^{Ab}
6	1.33 ± 0.24^{Ba}	1.90 ± 0.03^{Ba}	1.10 ± 0.09^{Bb}	0.68 ± 0.01^{Bb}	3.55 ± 0.21^{Aa}	3.03 ± 0.08^{Aa}	2.67 ± 0.04^{Ab}	2.50 ± 0.04^{Ab}
3	1.93 ± 0.31^{Ba}	2.19 ± 0.18^{Ba}	1.18 ± 0.09^{Bb}	1.01 ± 0.07^{Bb}	3.45 ± 0.07^{Aa}	2.87 ± 0.30^{Aa}	2.88 ± 0.10^{Ab}	2.76 ± 0.08^{Ab}

หมายเหตุ : ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

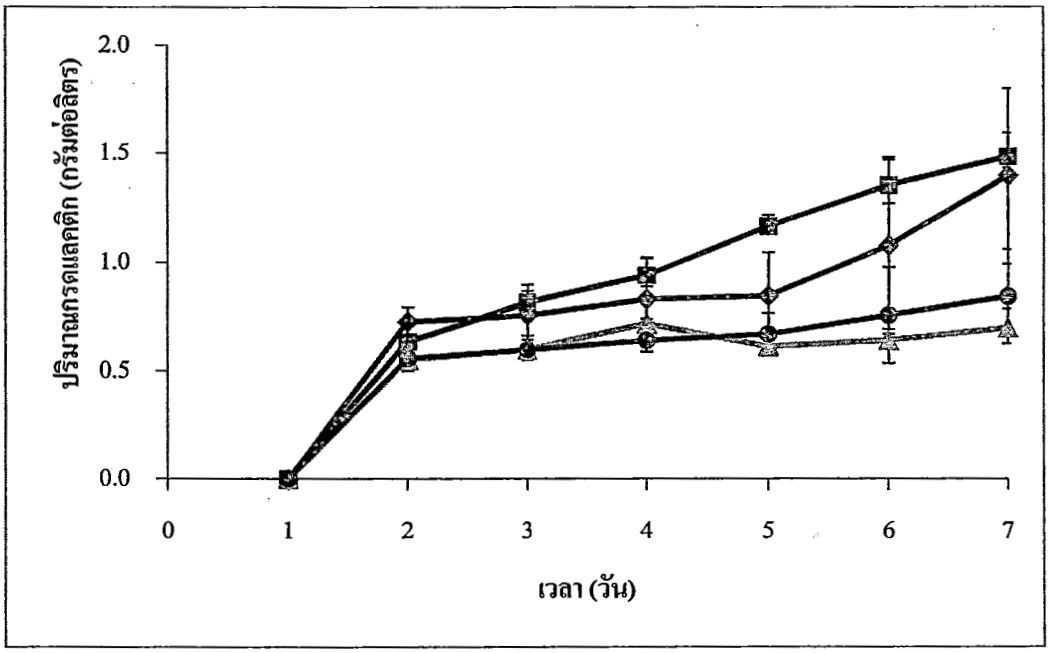
อักษร A, B, C ที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึงสูตรอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

อักษร a, b, c ที่แตกต่างกันตามแนวนอน หมายถึง เชื้อแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

6.1 อินทรีย์ไนโตรเจน

ในการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกของเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการเหนี่ยวนำ โดยทำการเลี้ยงในอาหารสูตร MRS ดัดแปลง มีการเลือกใช้ชนิดของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนทดแทนตามการศึกษาของ นทีทิพย์ หลีนวรัตน์ (2551) ซึ่งให้ผลการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ในปริมาณสูงสุดสองอันดับแรก เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนชนิดอื่นๆ โดยมีชนิดและความเข้มข้นของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนแตกต่างกันดังนี้ สูตรที่ 1 เปปโตน 10 กรัมต่อลิตรและยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร สูตรที่ 2 ยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร และสูตรที่ 3 MRS ดัดแปลงที่มีกากมันความเข้มข้นร้อยละ 2 (ชุดควบคุม)

จากการทดลองพบว่า การผลิตกรดแลคติกของเชื้อสายพันธุ์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์เดิมในอาหารสูตรที่ 1, 2 และ 3 มีแนวโน้มการผลิตกรดแลคติกเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มขึ้น โดยอาหารในสูตรที่ 3 MRS ดัดแปลงที่มีกากมันความเข้มข้นร้อยละ 2 ซึ่งเป็นชุดควบคุม สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด (1.57 ± 0.07 กรัมต่อลิตร)รองลงมาคือสูตรที่ 1 (1.49 ± 0.09 กรัมต่อลิตร) และสูตรที่ 2 (1.33 ± 0.08 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า อาหารสูตรที่ 1 และสูตรที่ 3 ซึ่งเป็นชุดควบคุม มีค่าการผลิตกรดแลคติกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 10) ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Xiaodong และคณะ (1997) พบว่าเมื่อเติมเปปโตนร้อยละ 1 ร่วมยีสต์สกัดร้อยละ 3 ในอาหารสูตร basal ดัดแปลงที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน สามารถเพิ่มผลผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. amylovorus* ได้ 1.6 เท่า เมื่อเปรียบเทียบอาหารสูตร basal ดัดแปลงที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารแต่ละสูตร พบว่า เชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่แตกต่างกันจะมีความสามารถในการผลิตกรดแลคติกได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยเชื้อสายพันธุ์ Up-14 สามารถผลิตกรดแลคติกได้ปริมาณสูงสุดมีค่าเท่ากับ 1.57 ± 0.07 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 7 ของการเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 3 รองลงมาคือ เชื้อสายพันธุ์เดิม เชื้อสายพันธุ์ Ap-4 และ เชื้อสายพันธุ์ Uap-4 ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณกรด คิดเป็น 1.36 ± 0.04, 0.76 ± 0.11 และ 0.68 ± 0.21 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อแบคทีเรียในอาหารสูตร MRS ดัดแปลงที่มีกากมันสำปะหลังความเข้มข้นร้อยละ 2 (ชุดควบคุม) โดยที่ Up-14 (■) Ap-4 (▲) Uap-4 (●) Control (◆)

หมายเหตุ : Up-14 คือ เชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต

Ap-4 คือ เชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการทรีตด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน

Uap-4 คือ เชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับการทรีตด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน

Control คือ เชื้อ *L. plantarum* TISTR 926

การตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าอาหารทั้ง 3 สูตรมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ในทิศทางเดียวกันโดยเชื้อสายพันธุ์ Up-14 และเชื้อสายพันธุ์เดิมจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเพิ่มมากขึ้น ส่วน เชื้อสายพันธุ์ Ap-4 และสายพันธุ์ Uap-4 จะมีค่าสูงสุดในวันที่ 3-5 ของการเลี้ยงและค่อยๆ ลดลง (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 10 การเปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติก ของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ซึ่งเลี้ยงในอาหาร MRS ดัดแปลง ที่ใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน ต่างกัน

วัน/เชื้อ	สูตร 1 (เปปโตน 10 g/l + ยีสต์สกัด 10 g/l)				สูตร 2 (ยีสต์สกัด 20 g/l)				สูตร 3 ควบคุม			
	เชื้อดั้งเดิม	Up-14	Ap-4	Uap-4	**เชื้อดั้งเดิม**	Up-14	Ap-4	Uap-4	**เชื้อดั้งเดิม**	Up-14	Ap-4	Uap-4
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.73 ± 0.05^{Aa}	0.63 ± 0.03^{Aa}	0.55 ± 0.04^{Aa}	0.56 ± 0.04^{Aa}	0.65 ± 0.04^{Aa}	0.76 ± 0.04^{Aa}	0.67 ± 0.04^{Aa}	0.67 ± 0.04^{Aa}	0.57 ± 0.10^{Aa}	0.70 ± 0.04^{Aa}	0.62 ± 0.01^{Aa}	0.72 ± 0.11^{Aa}
3	0.76 ± 0.12^{Aab}	0.81 ± 0.04^{Aa}	0.60 ± 0.05^{Ab}	0.60 ± 0.06^{Ab}	0.78 ± 0.01^{Aab}	0.76 ± 0.04^{Aa}	0.55 ± 0.04^{Ab}	0.62 ± 0.01^{Ab}	0.65 ± 0.12^{Aab}	0.81 ± 0.09^{Aa}	0.61 ± 0.00^{Ab}	0.67 ± 0.12^{Ab}
4	0.83 ± 0.15^{Aab}	0.94 ± 0.07^{Aa}	0.72 ± 0.02^{Abc}	0.64 ± 0.04^{Ac}	0.84 ± 0.08^{Aab}	0.81 ± 0.11^{Aa}	0.72 ± 0.03^{Abc}	0.65 ± 0.02^{Ac}	0.86 ± 0.05^{Aab}	1.00 ± 0.03^{Aa}	0.67 ± 0.04^{Abc}	0.71 ± 0.09^{Ac}
5	0.84 ± 0.16^{Ab}	1.16 ± 0.04^{Aa}	0.61 ± 0.00^{Ac}	0.67 ± 0.08^{Ac}	0.91 ± 0.06^{Ab}	1.02 ± 0.04^{Aa}	0.61 ± 0.07^{Ac}	0.610 ± 0.00^{Ac}	1.03 ± 0.07^{Ab}	1.25 ± 0.11^{Aa}	0.64 ± 0.04^{Ac}	0.65 ± 0.11^{Ac}
6	1.07 ± 0.33^{Aa}	1.35 ± 0.09^{Aa}	0.64 ± 0.04^{Ab}	0.75 ± 0.18^{Ab}	0.99 ± 0.05^{Aa}	1.13 ± 0.07^{Aa}	0.70 ± 0.00^{Ab}	0.62 ± 0.02^{Ab}	1.29 ± 0.09^{Aa}	1.36 ± 0.08^{Aa}	0.70 ± 0.12^{Ab}	0.70 ± 0.21^{Ab}
7	1.16 ± 0.33^{Aa}	1.49 ± 0.09^{Aa}	0.70 ± 0.07^{Ab}	0.84 ± 0.18^{Ab}	1.15 ± 0.05^{Aa}	1.33 ± 0.08^{Aa}	0.66 ± 0.04^{Ab}	0.62 ± 0.08^{Ab}	1.36 ± 0.04^{Aa}	1.57 ± 0.07^{Aa}	0.76 ± 0.11^{Ab}	0.68 ± 0.21^{Ab}

ตารางที่ 11 การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ซึ่งเลี้ยงในอาหาร MRS ดัดแปลง ที่ใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนต่างกัน

วัน/เชื้อ	สูตร 1 (เปปโตน 10 g/l + ยีสต์สกัด 10 g/l)				สูตร 2 (ยีสต์สกัด 20 g/l)				สูตร 3 ควบคุม			
	เชื้อดั้งเดิม	Up-14	Ap-4	Uap-4	เชื้อดั้งเดิม	Up-14	Ap-4	Uap-4	เชื้อดั้งเดิม	Up-14	Ap-4	Uap-4
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	1.24±0.37^{Ab}	0.90±0.11^{Ab}	1.99±0.05^{Aa}	0.95±0.05^{Aa}	0.87±0.07^{Ab}	0.91±0.11^{Ab}	1.57±0.10^{Aa}	1.53±0.19^{Aa}	1.01±0.07^{Bb}	0.63±0.08^{Bb}	1.66±0.08^{Ba}	0.90±0.13^{Ba}
3	1.33±0.20^{Ab}	1.09±0.07^{Ab}	2.33±0.12^{Aa}	2.46±0.12^{Aa}	1.20±0.04^{ABb}	0.91±0.10^{ABb}	2.58±0.12^{ABa}	2.10±0.52^{ABa}	1.09±0.11^{Bb}	1.16±0.02^{Bb}	2.33±0.13^{Ba}	1.83±0.25^{Ba}
4	1.65±0.43^{Ab}	1.63±0.02^{Ab}	2.28±0.21^{Aa}	2.13±0.22^{Aa}	1.18±0.04^{Ab}	1.29±0.13^{Ab}	2.28±0.20^{Aa}	2.37±0.18^{Aa}	1.47±0.09^{Ab}	1.58±0.08^{Ab}	2.31±0.19^{Aa}	2.22±0.24^{Aa}
5	1.90±0.32^{Ab}	1.66±0.06^{Ab}	2.24±0.22^{Aa}	2.03±0.05^{Aa}	1.51±0.13^{Ab}	1.69±0.17^{Ab}	2.09±0.18^{Aa}	2.31±0.24^{Aa}	1.58±1.80^{Ab}	1.51±0.11^{Ab}	2.30±0.24^{Aa}	2.36±0.39^{Aa}
6	1.73±0.16^{Aa}	1.91±0.24^{Aa}	2.30±0.08^{Aa}	1.80±0.13^{Aa}	1.32.01^{Ba}	1.63±0.04^{Ba}	1.64±0.12^{Ba}	1.88±0.11^{Ba}	1.98±0.34^{Aa}	1.92±0.05^{Aa}	2.17±0.54^{Aa}	2.17±0.57^{Aa}
7	2.14±0.26^{Aa}	2.30±0.28^{Aa}	2.34±0.23^{Aa}	1.81±0.26^{Aa}	1.65±0.23^{Aa}	2.27±0.27^{Aa}	1.96±0.02^{Aa}	1.97±0.15^{Aa}	2.42±0.61^{Aa}	1.89±0.09^{Aa}	1.68±0.26^{Aa}	2.05±0.49^{Aa}

หมายเหตุ : ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

อักษร A, B, C ที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึงสูตรอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

อักษร a, b, c ที่แตกต่างกันตามแนวนอน หมายถึง เชื้อแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ส่วนการวัดค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการเจริญ พบว่าทั้ง 4 ชนิด มีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารทั้ง 3 สูตร ซึ่งมีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 3.61 - 4.74 ดังนั้นจึงเลือกสูตรอาหารสูตรที่ 1 ซึ่งใช้แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนเป็นเปปโตน 10 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตรไปทำการต่อในขั้นต่อไป

6.2 แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน

ในการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกของเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการเหนี่ยวนำ โดยทำการเลี้ยงในอาหารสูตร MRS ดัดแปลง ซึ่งมีการเลือกใช้ชนิดของแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนทดแทนตามการศึกษาของ นทีทิพย์ หลีนวรัตน์ (2551) ซึ่งให้ผลการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ในปริมาณสูงสุดสองอันดับแรก เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนชนิดอื่นๆ โดยมีชนิดและความเข้มข้น ของอนินทรีย์ไนโตรเจนที่แตกต่างกันดังนี้ สูตรที่ 1 แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 5 สูตรที่ 2 แอมโมเนียมคลอไรด์ร้อยละ 5 และสูตรที่ 3 MRS ดัดแปลงที่มีกากมันความเข้มข้นร้อยละ 2 (ชุดควบคุม)

จากการทดลองพบว่า ในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์เดิม ในอาหารทั้ง 3 สูตรมีแนวโน้มในทิศทางเดียวกัน คือ มีปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นในช่วง 3 วันแรก จากนั้นจะมีปริมาณคงที่ โดยการเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 1 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด (1.25 ± 0.08 กรัมต่อลิตร) รองลงมาคือสูตรที่ 2 (1.22 ± 0.18 กรัมต่อลิตร) และ 3 (0.90 ± 0.04 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่า อาหารสูตรที่ 1 และสูตรที่ 3 มีค่าการผลิตกรดแลคติกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 12) แตกต่างจากการศึกษาของ Gao และคณะ (2008) ได้รายงานว่าการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 4.98 กรัมต่อลิตรในอาหารที่ประกอบด้วยรำข้าวผ่านการย่อยด้วยกรด ไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณกรดแลคติกโดยเชื้อ *L. rhamnosus* NBRC 3863

ในการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารแต่ละสูตร พบว่าเชื้อสายพันธุ์เดิมมีความสามารถในการผลิตกรดได้สูงที่สุด คิดเป็น 1.25 ± 0.08 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือเชื้อสายพันธุ์ Up-14 ,สายพันธุ์ Ap-4 และสายพันธุ์ Uap-4 ซึ่งมีปริมาณกรดแลคติกคิดเป็น 1.19 ± 0.04, 1.10 ± 0.04 และ 1.06 ± 0.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 1 เป็นเวลา 7 วัน (ภาพที่ 10) และเมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่า เชื้อสายพันธุ์ Up-14 สามารถผลิตกรดแลคติกได้ปริมาณสูงไม่แตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

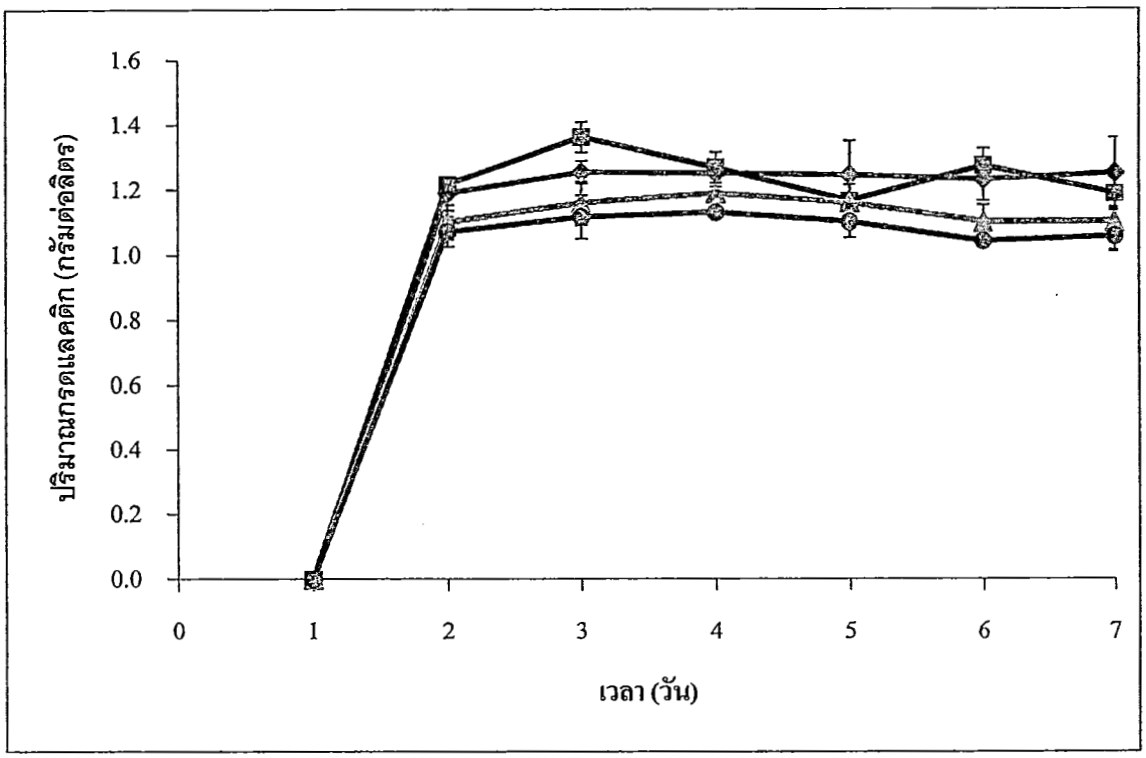
ตารางที่ 12 การเปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติกของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำ ซึ่งเลี้ยงในอาหาร MRS ดัดแปลงที่มีแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนต่างกัน

วัน/เชื้อ	สูตร 1($(NH_4)_2SO_4$ 5%)				สูตร 2 (NH_4Cl 5%)				สูตร 3 (ควบคุม)			
	เชื้อดั้งเดิม	Up-14	Ap-4	Uap-4	เชื้อดั้งเดิม	Up-14	Ap-4	Uap-4	เชื้อดั้งเดิม	Up-14	Ap-4	Uap-4
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	1.10 ± 0.04^{Aa}	1.22 ± 0.00^{Aa}	1.10 ± 0.04^{Aa}	1.07 ± 0.04^{Aa}	1.10 ± 0.04^{Aa}	1.10 ± 0.04^{Aa}	1.00 ± 0.04^{Aa}	1.00 ± 0.04^{Aa}	0.85 ± 0.03^{Ba}	0.87 ± 0.01^{Ba}	0.73 ± 0.04^{Ba}	0.65 ± 0.03^{Ba}
3	1.26 ± 0.03^{Aa}	1.36 ± 0.04^{Aa}	1.16 ± 0.04^{Aa}	1.12 ± 0.05^{Aa}	1.21 ± 0.02^{Aa}	1.19 ± 0.05^{Aa}	1.15 ± 0.14^{Aa}	1.02 ± 0.04^{Aa}	0.91 ± 0.03^{Ba}	0.93 ± 0.04^{Ba}	0.70 ± 0.00^{Ba}	0.70 ± 0.00^{Ba}
4	1.25 ± 0.01^{Aa}	1.27 ± 0.04^{Aa}	1.19 ± 0.04^{Ab}	1.13 ± 0.00^{Bb}	1.21 ± 0.02^{Ba}	1.19 ± 0.07^{Ba}	1.05 ± 0.00^{Bb}	0.97 ± 0.02^{Ba}	0.90 ± 0.02^{Ca}	0.94 ± 0.04^{Ca}	0.67 ± 0.06^{Cb}	0.70 ± 0.01^{Cb}
5	1.25 ± 0.08^{Aa}	1.16 ± 0.04^{Aab}	1.16 ± 0.04^{Abc}	1.10 ± 0.04^{Bc}	1.19 ± 0.04^{Ba}	1.09 ± 0.09^{Bab}	1.07 ± 0.03^{Bbc}	1.00 ± 0.04^{Ba}	0.95 ± 0.05^{Ca}	0.94 ± 0.05^{Cab}	0.68 ± 0.02^{Cbc}	0.65 ± 0.03^{Cc}
6	1.23 ± 0.05^{Aa}	1.28 ± 0.04^{Aa}	1.10 ± 0.04^{Ab}	1.05 ± 0.00^{Bb}	1.19 ± 0.02^{Ba}	1.12 ± 0.06^{Ba}	1.09 ± 0.06^{Bb}	0.99 ± 0.04^{Ba}	0.99 ± 0.02^{Ca}	0.87 ± 0.00^{Ca}	0.65 ± 0.04^{Cb}	0.67 ± 0.04^{Cb}
7	1.25 ± 0.08^{Aa}	1.19 ± 0.04^{Aa}	1.10 ± 0.04^{Ab}	1.06 ± 0.05^{Ab}	1.22 ± 0.18^{Aa}	1.13 ± 0.07^{Aa}	1.07 ± 0.04^{Ab}	0.99 ± 0.04^{Aa}	0.90 ± 0.04^{Ba}	0.99 ± 0.08^{Ba}	0.65 ± 0.04^{Bb}	0.66 ± 0.02^{Bb}

หมายเหตุ : ปริมาณกรดแลคติกมีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

อักษร A, B, C ที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึงสูตรอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

อักษร a, b, c ที่แตกต่างกันตามแนวนอน หมายถึง เชื้อแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 10 ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อแบคทีเรียในอาหาร MRS ดัดแปลงที่มีแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$ 5%)โดยที่ Up-14 (■) Ap-4 (▲) Uap-4 (●) Control (◆)

หมายเหตุ : Up-14 คือ เชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต

Ap-4 คือ เชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการทรีตด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน

Uap-4 คือ เชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับการทรีตด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน

Control คือ เชื้อ *L. plantarum* TISTR 926

สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสูตรอาหารทั้ง 3 มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นในช่วง 3 วันแรก จากนั้นจะมีค่าคงหรือลดลงในเชื้อแต่ละชนิด (ตารางที่ 13) ส่วนค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการเจริญพบว่าในสูตรที่ 1และ 3 มีแนวโน้มเดียวกัน ซึ่งอยู่ในช่วงระหว่าง 3.90 - 4.72 ดังนั้นจึงเลือกสูตรที่ 1 ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 5 และสูตรที่ 2 ซึ่งมีแอมโมเนียมคลอไรด์ร้อยละ 5 เป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป เนื่องจากเมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่า อาหารสูตรที่ 1 และ สูตรที่ 2 มีค่าการผลิตกรดแลคติกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 13 การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำ ซึ่งเลี้ยงในอาหาร MRS ดัดแปลง ที่มีแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนต่างกัน

วัน/เชื้อ	สูตร 1($(NH_4)_2SO_4$ 5%)				สูตร 2 (NH_4Cl 5%)				สูตร 3 (ควบคุม)			
	เชื้อดั้งเดิม	Up-14	Ap-4	Uap-4	เชื้อดั้งเดิม	Up-14	Ap-4	Uap-4	เชื้อดั้งเดิม	Up-14	Ap-4	Uap-4
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.54 ± 0.07^{Ba}	0.67 ± 0.06^{Ba}	0.56 ± 0.05^{Ba}	0.41 ± 0.04^{Ba}	0.37 ± 0.04^{Ba}	0.42 ± 0.02^{Ba}	0.58 ± 0.02^{Ba}	0.60 ± 0.04^{Ba}	0.79 ± 0.03^{Aa}	0.77 ± 0.05^{Aa}	2.61 ± 0.24^{Aa}	2.50 ± 0.09^{Aa}
3	0.48 ± 0.07^{Bbc}	0.42 ± 0.07^{Bc}	0.57 ± 0.05^{Ba}	0.43 ± 0.01^{Bab}	0.96 ± 0.10^{Bbc}	0.93 ± 0.07^{Bc}	0.89 ± 0.04^{Ba}	0.85 ± 0.03^{Bab}	0.83 ± 0.02^{Abc}	0.75 ± 0.05^{Ac}	2.64 ± 0.09^{Aa}	2.69 ± 0.03^{Aab}
4	0.52 ± 0.08^{Bb}	0.44 ± 0.09^{Bb}	0.55 ± 0.04^{Bb}	0.58 ± 0.08^{Ba}	0.51 ± 0.01^{Bb}	0.46 ± 0.02^{Bb}	0.65 ± 0.04^{Bb}	0.44 ± 0.03^{Bb}	0.90 ± 0.08^{Ab}	0.84 ± 0.09^{Ab}	2.51 ± 0.08^{Ab}	2.64 ± 0.07^{Aa}
5	0.52 ± 0.09^{Bbc}	0.47 ± 0.03^{Bc}	0.40 ± 0.06^{Bab}	0.50 ± 0.08^{Ba}	0.48 ± 0.02^{Bbc}	0.48 ± 0.01^{Bc}	0.59 ± 0.05^{Bab}	0.62 ± 0.03^{Ba}	0.87 ± 0.02^{Abc}	0.86 ± 0.01^{Ac}	2.61 ± 0.02^{Aab}	2.64 ± 0.05^{Aa}
6	0.55 ± 0.07^{Bb}	0.47 ± 0.08^{Bb}	0.5 ± 0.10^{Bab}	0.49 ± 0.04^{Ba}	0.52 ± 0.05^{Bb}	0.47 ± 0.04^{Bb}	0.51 ± 0.07^{Bab}	0.61 ± 0.04^{Ba}	0.91 ± 0.0^{Ab}	0.82 ± 0.04^{Ab}	2.43 ± 0.28^{Aab}	2.46 ± 0.09^{Aa}
7	0.49 ± 0.07^{Bb}	0.43 ± 0.07^{Bb}	0.54 ± 0.06^{Bab}	0.57 ± 0.06^{Ba}	0.46 ± 0.01^{Bb}	0.42 ± 0.02^{Bb}	0.44 ± 0.02^{Bab}	0.31 ± 0.03^{Ba}	0.75 ± 0.10^{Ab}	0.80 ± 0.07^{Ab}	2.61 ± 0.13^{Aab}	2.54 ± 0.09^{Aa}

หมายเหตุ : ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

อักษร A, B, C ที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึงสูตรอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

อักษร a, b, c ที่แตกต่างกันตามแนวนอน หมายถึง เชื้อแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

6.3 การใช้ไนโตรเจนผสมระหว่างอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจน

ในการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างอินทรีย์ไนโตเจน และอนินทรีย์ไนโตรเจน ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลคติกของเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการเหนี่ยวนำโดยเลี้ยงในอาหารสูตร MRS ดัดแปลง ซึ่งมีชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจนที่แตกต่างกันดังนี้ สูตรที่ 1 เปปโตน 10 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ5 สูตรที่ 2 เปปโตน 10 กรัมต่อลิตร และยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ร้อยละ 5 และสูตรที่ 3 MRS ดัดแปลงที่มีกากมันความเข้มข้นร้อยละ 2 (ชุดควบคุม)

จากการทดลองพบว่า การผลิตกรดแลคติกของเชื้อสายพันธุ์ที่ผ่านการเหนี่ยวนำเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์เดิม พบว่า ในอาหารทั้ง 3 สูตรมีแนวโน้มในทิศทางเดียวกัน คือ มีปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นในช่วง 3 วันแรก จากนั้นจะมีปริมาณคงที่ โดยการเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 1 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด (1.38 ± 0.00กรัมต่อลิตร) รองลงมาคือสูตรที่ 2 (1.33 ± 0.04 กรัมต่อลิตร) และสูตรที่ 3 (0.95 ± 0.12 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่า อาหารสูตรที่ 1 และ สูตรที่ 3 มีค่าการผลิตกรดแลคติกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 14) ส่วนการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารแต่ละสูตร พบว่าเชื้อสายพันธุ์เดิมมีความสามารถในการผลิตกรดได้สูงที่สุดเป็น 1.28 ± 0.02 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือเชื้อสายพันธุ์ Up-14 , สายพันธุ์ Ap-4 และ สายพันธุ์ Uap-4 ซึ่งมีปริมาณกรดแลคติกคิดเป็น 1.13 ± 0.00, 1.10 ± 0.04 และ 1.08 ± 0.06 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตรที่ 1 เป็นระยะเวลา 4 วัน (ภาพที่ 11) และเมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่า เชื้อสายพันธุ์ Up-14 สามารถผลิตกรดแลคติกได้ปริมาณสูงไม่แตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์เดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

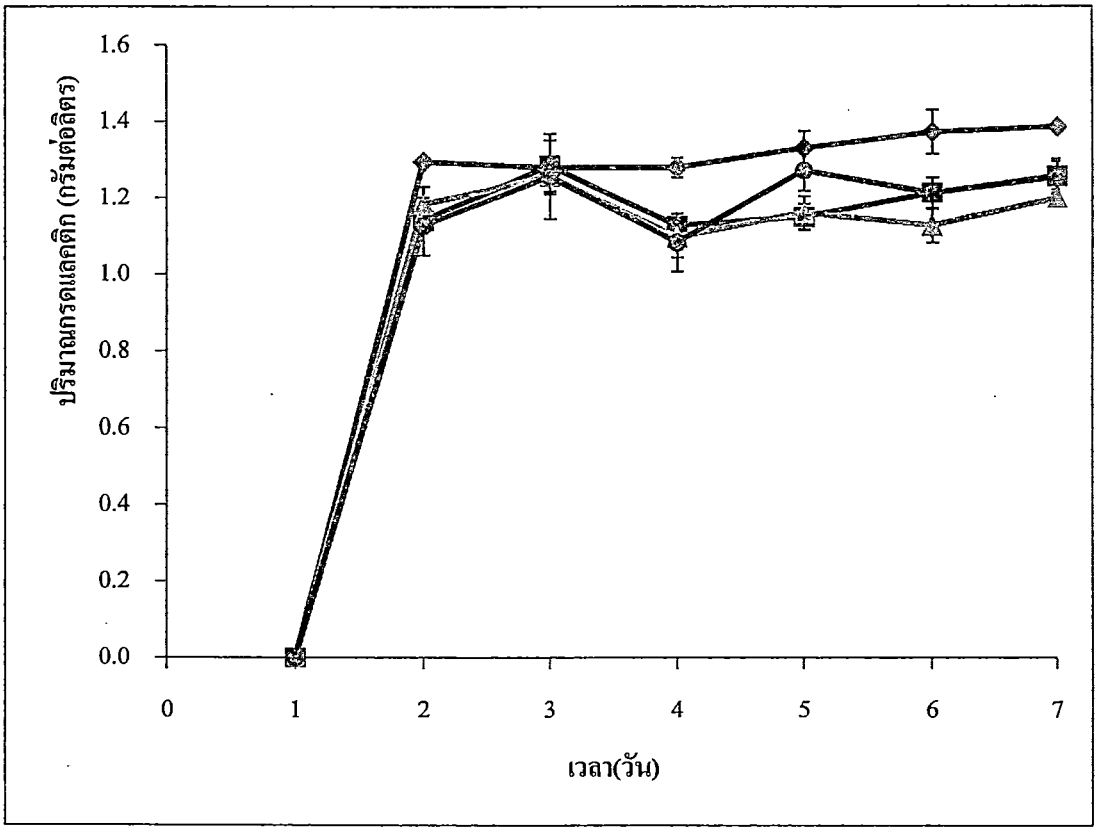
ตารางที่ 14 การเปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติกของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำ ซึ่งเลี้ยงในอาหาร MRS ดัดแปลง ที่มีแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจน

วัน/	สูตร 3				สูตร 3				สูตร 3			
เชื้อ	เชื้อดั้งเดิม	Up-14	Ap-4	Uap-4	เชื้อดั้งเดิม	Up-14	Ap-4	Uap-4	เชื้อดั้งเดิม	Up-14	Ap-4	Uap-4
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	1.29 ± 0.01^{Ba}	1.14 ± 0.15^{Bab}	1.18 ± 0.04^{Bb}	1.13 ± 0.06^{Bb}	1.39 ± 0.01^{Aa}	1.30 ± 0.12^{Aab}	1.23 ± 0.05^{Ab}	1.24 ± 0.02^{Ab}	0.81 ± 0.06^{Ca}	0.82 ± 0.00^{Cab}	0.69 ± 0.00^{Cb}	0.63 ± 0.08^{Cb}
3	1.28 ± 0.02^{Ba}	1.28 ± 0.05^{Ba}	1.26 ± 0.06^{Ba}	1.25 ± 0.04^{Ba}	1.41 ± 0.04^{Aa}	1.33 ± 0.08^{Aa}	1.33 ± 0.08^{Aa}	1.34 ± 0.03^{Aa}	0.87 ± 0.05^{Ca}	0.79 ± 0.04^{Ca}	0.70 ± 0.07^{Ca}	0.69 ± 0.10^{Ca}
4	1.28 ± 0.02^{Ba}	1.13 ± 0.00^{Bb}	1.10 ± 0.04^{Bb}	1.08 ± 0.06^{Bb}	1.27 ± 0.08^{Aa}	1.30 ± 0.00^{Ab}	1.18 ± 0.04^{Ab}	1.15 ± 0.02^{Ab}	0.92 ± 0.04^{Ca}	0.70 ± 0.01^{Cb}	0.72 ± 0.04^{Cb}	0.68 ± 0.10^{Cb}
5	1.33 ± 0.04^{Aa}	1.15 ± 0.03^{Ab}	1.16 ± 0.04^{Ab}	1.27 ± 0.06^{Ab}	1.31 ± 0.07^{Aa}	1.23 ± 0.04^{Ab}	1.24 ± 0.04^{Ab}	1.15 ± 0.04^{Ab}	0.87 ± 0.07^{Ba}	0.70 ± 0.01^{Bb}	0.69 ± 0.00^{Bb}	0.56 ± 0.19^{Bb}
6	1.37 ± 0.05^{Aa}	1.21 ± 0.04^{Ab}	1.13 ± 0.00^{Ab}	1.21 ± 0.00^{Ab}	1.37 ± 0.02^{Aa}	1.27 ± 0.13^{Ab}	1.25 ± 0.04^{Ab}	1.17 ± 0.04^{Ab}	0.88 ± 0.09^{Ba}	0.78 ± 0.00^{Bb}	0.69 ± 0.05^{Bb}	0.68 ± 0.05^{Bb}
7	1.38 ± 0.00^{Aa}	1.25 ± 0.04^{Aab}	1.20 ± 0.02^{Abc}	1.25 ± 0.03^{Ac}	1.33 ± 0.04^{Aa}	1.30 ± 0.07^{Aab}	1.21 ± 0.00^{Abc}	1.18 ± 0.04^{Ac}	0.95 ± 0.12^{Ba}	0.78 ± 0.04^{Bab}	0.72 ± 0.01^{Bbc}	0.59 ± 0.08^{Bc}

หมายเหตุ : ปริมาณกรดแลคติกมีหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

อักษร A, B, C ที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึงสูตรอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

อักษร a, b, c ที่แตกต่างกันตามแนวนอน หมายถึง เชื้อแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 11 ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อแบคทีเรียในอาหาร MRS ดัดแปลงที่มีไนโตรเจนผสม (peptone + yeast extract + $(NH_4)_2SO_4$)โดยที่ Up-14 (■) Ap-4 (▲) Uap-4 (●) Control (◆)

หมายเหตุ : Up-14 คือ เชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต

Ap-4 คือ เชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการทรีตด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน

Uap-4 คือ เชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับการทรีตด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน

Control คือ เชื้อ *L. plantarum* TISTR 926

สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสูตรอาหารทั้ง 3 มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นในช่วง 3 วันแรก จากนั้นจะมีค่าคงที่หรือลดลงในเชื้อแต่ละชนิด (ตารางที่ 15) ส่วนค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการเจริญพบว่าในสูตรที่ 1 และ 3 มีแนวโน้มเดียวกัน ซึ่งอยู่ในช่วงระหว่าง 4.12 - 4.64 เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติ พบว่า อาหารสูตรที่ 1 และสูตรที่ 2 มีค่าการผลิตกรดแลคติกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่จะมีความแตกต่างในอาหารสูตรที่ 3 ซึ่งเป็นชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 15 การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำ ซึ่งเลี้ยงในอาหาร MRS ดัดแปลง ที่มีแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างอินทรีย์กับอนินทรีย์ไนโตรเจน

วัน/เชื้อ	สูตร 1				สูตร 3				สูตร 3			
	เชื้อดั้งเดิม	Up-14	Ap-4	Uap-4	เชื้อดั้งเดิม	Up-14	Ap-4	Uap-4	เชื้อดั้งเดิม	Up-14	Ap-4	Uap-4
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.63 ± 0.05^{Bb}	0.60 ± 0.03^{Ba}	0.65 ± 0.04^{Ba}	0.67 ± 0.03^{Bab}	0.62 ± 0.05^{Bb}	0.62 ± 0.06^{Ba}	0.59 ± 0.05^{Ba}	0.47 ± 0.06^{Bab}	0.90 ± 0.04^{Ab}	2.65 ± 0.19^{Aa}	2.79 ± 0.06^{Aa}	2.56 ± 0.13^{Aab}
3	0.64 ± 0.07^{b}	0.55 ± 0.07^{Ba}	0.47 ± 0.01^{Bab}	0.49 ± 0.02^{Bab}	0.65 ± 0.07^{Bb}	0.62 ± 0.03^{Ba}	0.60 ± 0.03^{Bab}	0.64 ± 0.00^{Bab}	1.02 ± 0.06^{Ab}	2.85 ± 0.24^{Aa}	2.51 ± 0.40^{Aab}	2.69 ± 0.06^{Aab}
4	0.67 ± 0.05^{Bc}	0.65 ± 0.02^{Ba}	0.73 ± 0.05^{Bbc}	0.73 ± 0.00^{Bab}	0.68 ± 0.03^{Bc}	0.67 ± 0.04^{Ba}	0.58 ± 0.09^{Bbc}	0.71 ± 0.12^{Bab}	1.09 ± 0.13^{Ac}	3.40 ± 0.17^{Aa}	2.27 ± 0.14^{Abc}	2.58 ± 0.06^{Aab}
5	0.69 ± 0.07^{Bb}	0.71 ± 0.07^{Ba}	0.72 ± 0.01^{Ba}	0.73 ± 0.04^{Bab}	0.64 ± 0.05^{Bb}	0.63 ± 0.08^{Ba}	0.72 ± 0.02^{Ba}	0.70 ± 0.02^{Bab}	1.07 ± 0.22^{Ab}	3.17 ± 0.28^{Aa}	2.65 ± 0.16^{Aa}	2.29 ± 0.20^{Aab}
6	0.66 ± 0.02^{Bb}	0.59 ± 0.07^{Ba}	0.73 ± 0.04^{Ba}	0.70 ± 0.04^{Bab}	0.66 ± 0.03^{Bb}	0.72 ± 0.04^{Ba}	0.67 ± 0.04^{Ba}	0.59 ± 0.01^{Bab}	1.13 ± 0.20^{Ab}	3.12 ± 0.14^{Aa}	2.66 ± 0.06^{Aa}	2.42 ± 0.36^{Aab}
7	0.48 ± 0.03^{Bb}	0.49 ± 0.10^{Ba}	0.54 ± 0.07^{Bab}	0.46 ± 0.01^{Bab}	0.06 ± 0.03^{Bb}	1.12 ± 0.77^{Ba}	0.67 ± 0.13^{Bab}	0.62 ± 0.02^{Bab}	1.19 ± 0.19^{Ab}	3.51 ± 0.53^{Aa}	2.66 ± 0.09^{Aab}	2.68 ± 0.13^{Aab}

หมายเหตุ : ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

อักษร A, B, C ที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึงสูตรอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

อักษร a, b, c ที่แตกต่างกันตามแนวนอน หมายถึง เชื้อแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ตอนที่ 2

1. การเหนี่ยวนำเชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus plantarum* TISTR 926

จากการทดลองการเหนี่ยวนำเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ด้วยการฉายรังสีเหนือม่วง ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ฉายทุก 1 นาที เป็นเวลา 15 นาที พบว่า เมื่อฉายรังสีเหนือม่วง ที่เวลา 2, 4 และ 6 นาที มีจำนวนโคโลนีเพียง 1 โคโลนี ที่เวลา 3 นาที มีจำนวนโคโลนี 2 โคโลนี และที่เวลา 1 นาที มีจำนวนโคโลนี 9 โคโลนี ส่วนช่วงเวลาที่ 7-15 นาที ไม่มีการเจริญของเชื้อ ดังตารางที่ 16 ในการคัดเลือกพิจารณาจากเชื้อที่มีความสามารถในการทนต่อรังสีเหนือม่วงได้มากที่สุด โดยมีจำนวนโคโลนีเหลือน้อยที่สุดซึ่งที่เวลา 2 นาที เชื้อจุลินทรีย์มีจำนวนโคโลนีเพียง 1 โคโลนี และมีลักษณะโคโลนีใหญ่ที่สุด โดยเชื้อที่ได้กำหนดรหัสเป็น UV-2 ซึ่งไม่สอดคล้องกับตอนที่ 1 ซึ่งพบว่า เชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตที่เวลา 14 นาที มีอัตราการเจริญของเชื้อน้อยสุด โดยเชื้อมีอัตราการรอดอยู่ในช่วงร้อยละ 0.01-0.02

ดังนั้นจึงเลือกใช้เชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำโดยการฉายรังสีเหนือม่วงที่เวลา 2 นาทีไปใช้ในการศึกษาหัวข้อต่อไป

2. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยสลายและไม่ผ่านการย่อยสลายในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อที่ผ่านการฉายรังสีเหนือม่วง

ในการศึกษาการผลิตกรดแลคติกของเชื้อที่ผ่านการฉายรังสีเหนือม่วง ซึ่งในการศึกษาจะใช้เชื้อรหัส UV-2 (ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสีเหนือม่วง เป็นเวลา 2 นาที) นำมาเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตร MRS ที่ใช้กากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยสลายและไม่ผ่านการย่อยสลายเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน โดยมีความเข้มข้นแตกต่างกันดังนี้

สูตรที่ 1 อาหารสูตร MRS ร่วมกับกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยสลายร้อยละ 2

สูตรที่ 2 อาหารสูตร MRS ร่วมกับกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยสลายร้อยละ 4

สูตรที่ 3 อาหารสูตร MRS ร่วมกับกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยสลายร้อยละ 6

สูตรที่ 4 อาหารสูตร MRS ร่วมกับกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการย่อยสลายร้อยละ 2

สูตรที่ 5 อาหารสูตร MRS ร่วมกับกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการย่อยสลายร้อยละ 4

สูตรที่ 6 อาหารสูตร MRS ร่วมกับกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการย่อยสลายร้อยละ 6

สูตรที่ 7 อาหารสูตร MRS (ชุดควบคุม)

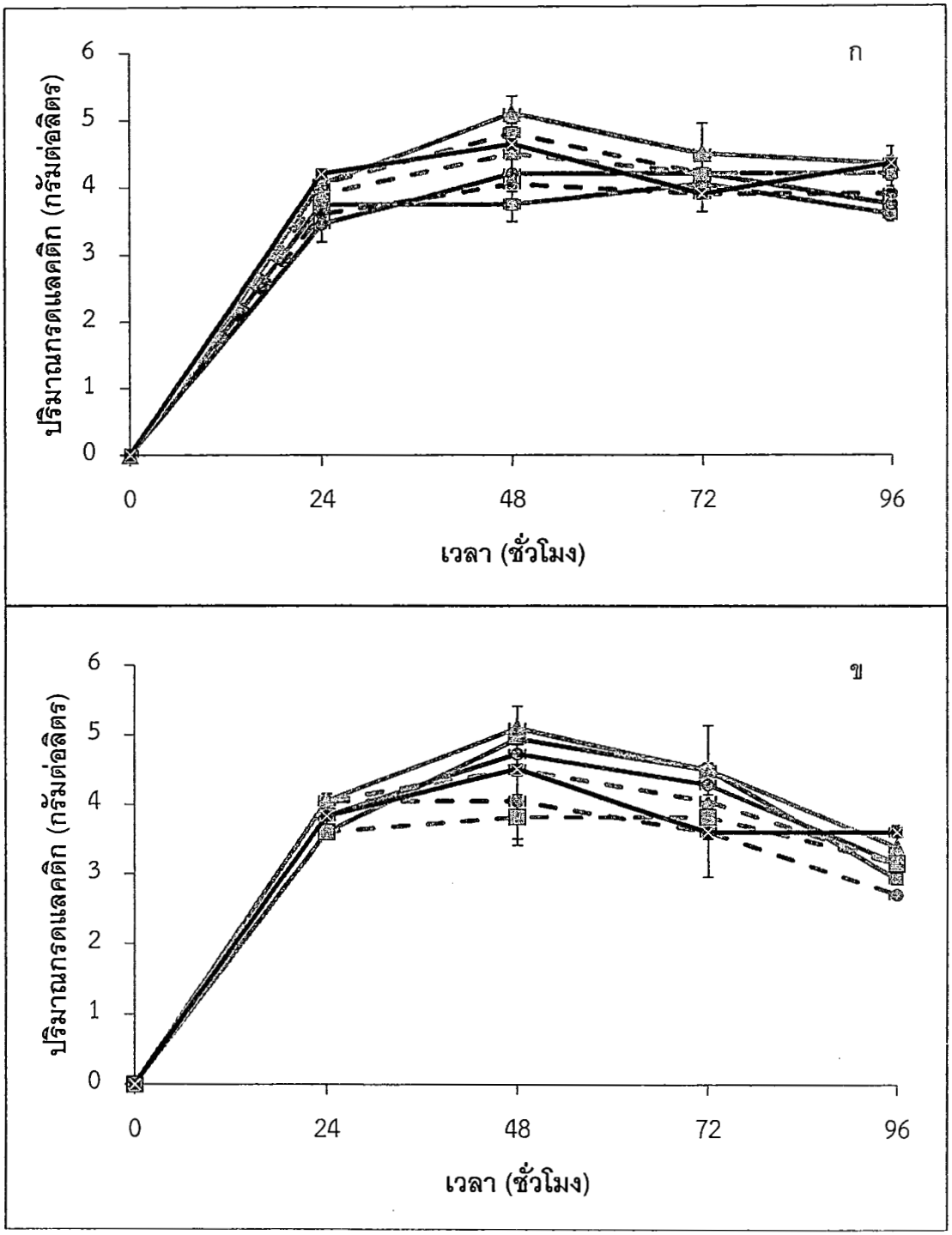
ตารางที่ 16 อัตราการรอดของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสี

เวลาในการฉายรังสี (นาที)	การเจริญของเชื้อในเพลต	จำนวนโคโลนี	รหัสเชื้อ (Code No.)	ขนาดโคโลนี (มิลลิเมตร)
+	+	9	UV-1	0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.4, 0.35, 0.4, 0.45 และ 0.5
2	+	1	UV-2	0.9
2	+	1	UV-2	0.4 และ 0.5
4	+	1	UV-4	0.9
2	O	-	UV-5	-
6	+	-	UV-5	-
2	O	1	UV-7	-
4	O	1	UV-8	-
8	O	1	UV-9	-
10	O	1	UV-10	-
11	O	-	UV-11	-
12	O	-	UV-12	-
12	O	-	UV-13	-
14	O	1	UV-14	-
16	O	-	UV-15	-

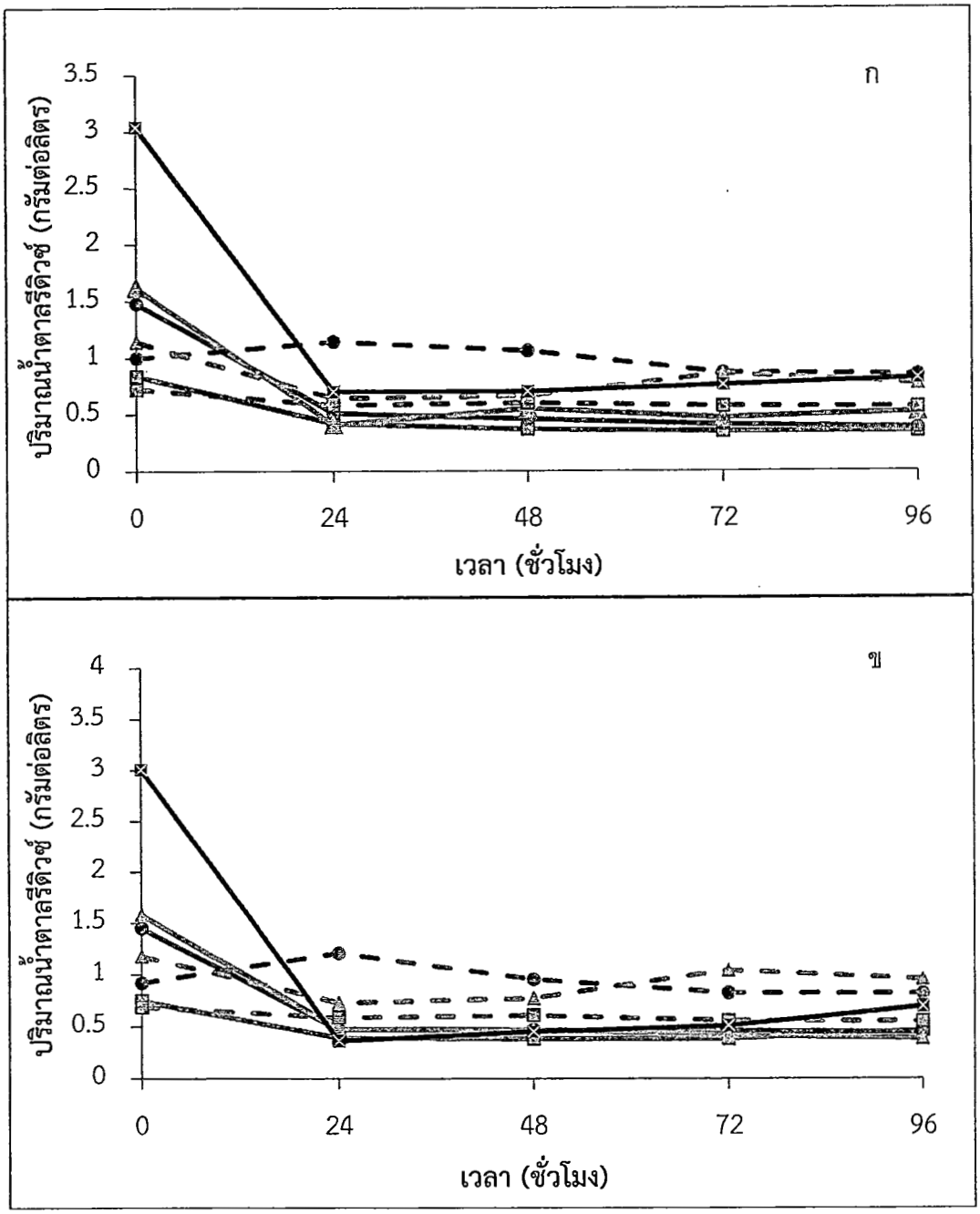
หมายเหตุ : เครื่องหมาย + เชื้อมีการเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยว O ไม่มีการเจริญของเชื้อ

ในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อที่ผ่านการฉายรังสีเหนือม่วงเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์เดิม พบว่า อาหารในแต่ละสูตรมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดแลคติกไปในทิศทางเดียวกัน คือ กรดแลคติกจะเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ของระยะเวลาในการเลี้ยง หลังจากนั้นจะมีค่าลดลง ในอาหารสูตรที่ 3 ซึ่งเป็นอาหารดัดแปลงสูตร MRS ที่เติมกากมันสำปะหลังผ่านการย่อยสลายที่ความเข้มข้นร้อยละ 6 พบว่าเชื้อที่ผ่านการฉายรังสีเหนือม่วงและเชื้อสายพันธุ์เดิม สามารถผลิตกรดแลคติกได้เท่ากันคิดเป็น 5.10±0.26 กรัมต่อลิตร และ 5.10±0.32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดัง

ภาพที่ 12 แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในอาหารชุดควบคุม ซึ่งเป็นอาหาร MRS ที่ไม่มีการเติมกากมันสำปะหลัง พบว่ามีค่าการผลิตกรดแลคติกต่ำกว่า ซึ่งไม่สอดคล้องกับการรายงานของ Nattha และคณะ (2009) ที่ผลิตกรดแลคติกได้จาก *Rhizopus oryzae* โดยใช้กากมันสำปะหลังผ่านการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลส แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส พบว่ากากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ผสมทั้งสามชนิดให้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุดเท่ากับ 16±0.91 กรัมต่อลิตร จากการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่า ในทุกแหล่งอาหารมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะมีค่าลดลงในชั่วโมงที่ 0-48 ชั่วโมง และค่อยๆเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น โดยในอาหารชุดควบคุม ของเชื้อที่ผ่านการฉายรังสีเหนือม่วง มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำสุดคิดเป็น 0.36±0.06 กรัมต่อลิตร ดังภาพที่ 13 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ สุธิดา อยู่สำราญ และคณะ (2547) พบว่า ในการผลิตกรดแลคติกจากกากน้ำตาล โดยเชื้อ *Lactobacillus mali* NRIC 1692 น้ำตาลรีดิวซ์มีค่าลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น และมีปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้น สำหรับค่าการวัดความเป็นกรดด่างในระหว่างการเจริญ พบว่าในอาหารแหล่งคาร์บอนทดแทนต่างๆ มีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นซึ่งในสูตรอาหารทั้ง 7 สูตรมีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 5.60-6.45 ดังนั้น จึงเลือกใช้กากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยสลายความเข้มข้นร้อยละ 6 เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในสูตรอาหาร MRS โดยเรียกว่าอาหารดัดแปลงสูตร MRS ในการศึกษาขั้นต่อไปจึงเลือกใช้กากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยสลายร้อยละ 6 เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน เนื่องจากให้ปริมาณการผลิตกรดแลคติกสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งคาร์บอนอื่นๆ



ภาพที่ 12 ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 เชื้อที่ผ่านการฉายรังสีเหนือม่วง (ก) และเชื้อสายพันธุ์เดิม (ข) ซึ่งเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนทดแทน 7 สูตร โดยที่ สูตรที่ 1 (– ■ –) สูตรที่ 2 (—●—) สูตรที่ 3 (—▲—) สูตรที่ 4 (– ▣ –) สูตรที่ 5 (– ● –) สูตรที่ 6 (– ▲ –) และสูตรที่ 7 (—×—)



ภาพที่ 13 การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 เชื้อที่ผ่านการฉายรังสีเหนือม่วง (ก) และเชื้อสายพันธุ์เดิม (ข) ซึ่งเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนทดแทน 7 สูตร โดยที่ สูตรที่ 1 (▬▩▬) สูตรที่ 2 (—●—) สูตรที่ 3 (–△–) สูตรที่ 4 (–▩–) สูตรที่ 5 (–●–) สูตรที่ 6 (–△–) และสูตรที่ 7 (—×—)

2. ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน

ในการคัดเลือกชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการฉายรังสีเหนือม่วง ซึ่งในการศึกษาจะใช้เชื้อรหัส UV-2 (ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการฉายรังสีเหนือม่วง เป็นเวลา 2 นาที) นำมาเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตร MRS ที่ใช้กากมันสำปะหลังผ่านการย่อยสลายความเข้มข้นร้อยละ 6 เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน ร่วมกับการใช้แหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันคือ อินทรีย์ไนโตรเจน และแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างอินทรีย์ไนโตรเจนกับอนินทรีย์ไนโตรเจน

2.1 อินทรีย์ไนโตรเจน

ในการศึกษาชนิดของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกของเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการฉายรังสีเหนือม่วง โดยทำการเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตร MRS โดยใช้ชนิดและความเข้มข้นของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนทดแทนแตกต่างกันดังนี้

สูตรที่ 1 อาหารดัดแปลงสูตร MRS ร่วมกับน้ำแช่ข้าวโพดร้อยละ 1.5

สูตรที่ 2 อาหารดัดแปลงสูตร MRS ร่วมกับน้ำแช่ข้าวโพดร้อยละ 3

สูตรที่ 3 อาหารดัดแปลงสูตร MRS ร่วมกับน้ำแช่ข้าวโพดร้อยละ 4.5

สูตรที่ 4 อาหารดัดแปลงสูตร MRS ร่วมกับน้ำแช่ข้าวโพดร้อยละ 6

สูตรที่ 5 อาหารดัดแปลงสูตร MRS ร่วมกับนมถั่วเหลืองร้อยละ 1.5

สูตรที่ 6 อาหารดัดแปลงสูตร MRS ร่วมกับนมถั่วเหลืองร้อยละ 3

สูตรที่ 7 อาหารดัดแปลงสูตร MRS ร่วมกับนมถั่วเหลืองร้อยละ 4.5

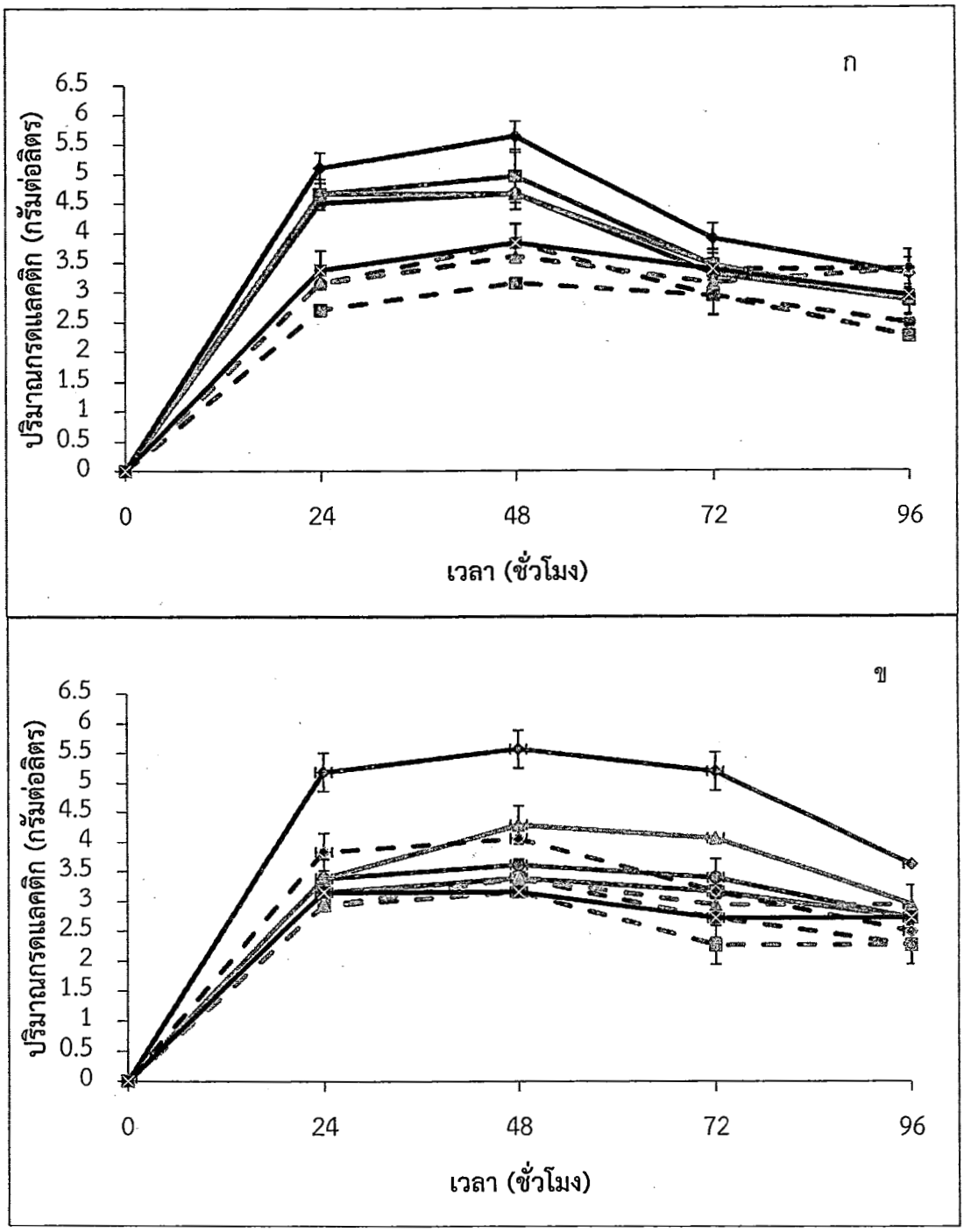
สูตรที่ 8 อาหารดัดแปลงสูตร MRS ร่วมกับนมถั่วเหลืองร้อยละ 6

สูตรที่ 9 ชุดควบคุม อาหารดัดแปลงสูตร MRS (MRS+กากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยสลายร้อยละ 6)

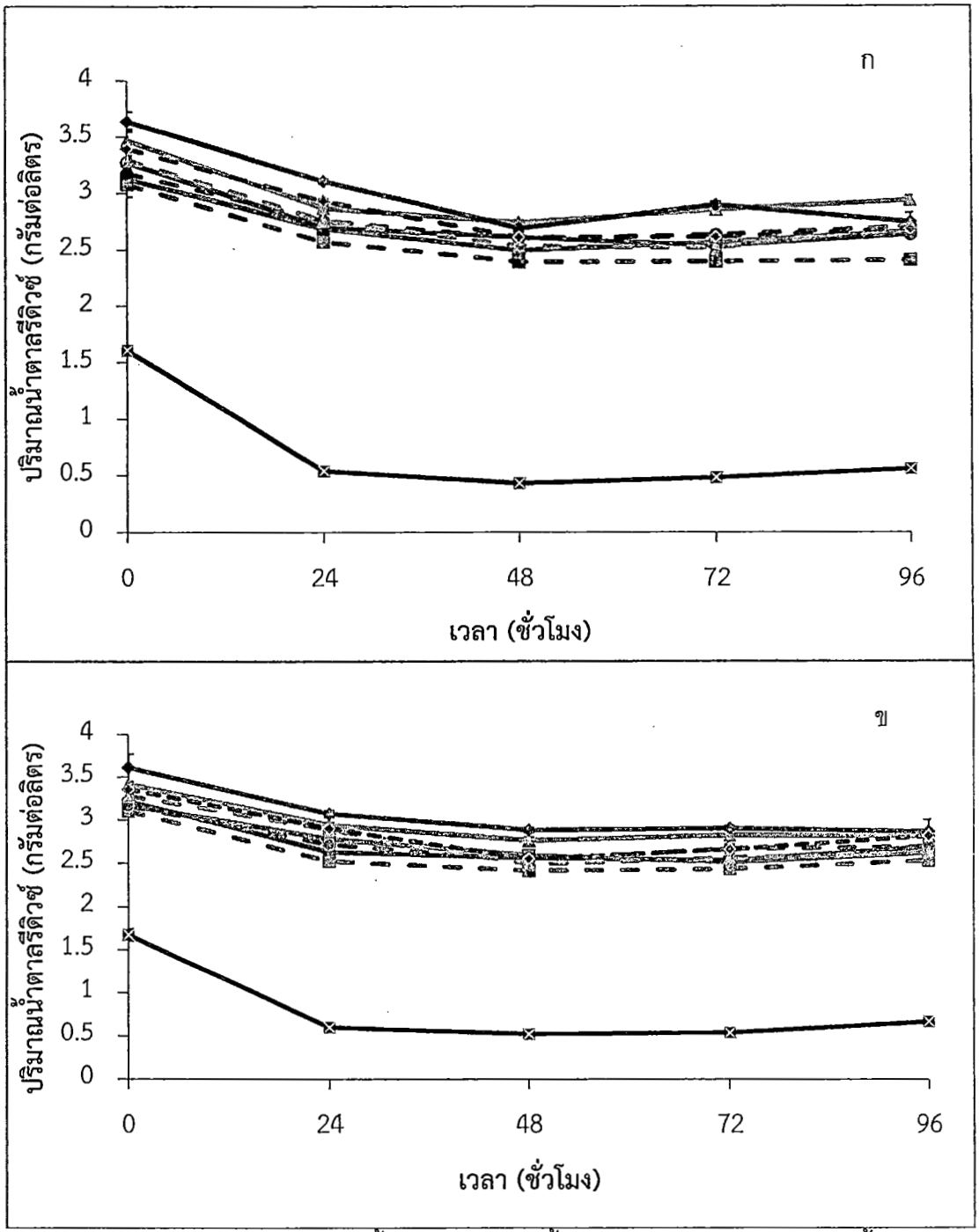
ในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อที่ผ่านการฉายรังสีเหนือม่วงเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์เดิม พบว่า อาหารในแต่ละสูตรมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดแลคติกไปในทิศทางเดียวกัน คือ กรดแลคติกจะเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ของระยะเวลาในการเลี้ยง หลังจากนั้นจะมีค่าลดลง ซึ่งในอาหารดัดแปลงสูตร MRS ที่เติมน้ำแช่ข้าวโพดนั้น มีปริมาณกรดแลคติกมากกว่าอาหารดัดแปลงสูตร MRS ที่เติมนมถั่วเหลือง และในอาหารสูตรที่ 4 ซึ่งเป็นอาหารดัดแปลงสูตร MRS ที่เติมน้ำแช่ข้าวโพดร้อยละ 6 เชื้อที่ผ่านการฉายรังสีเหนือม่วงสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดคิดเป็น 5.63±0.26 กรัมต่อลิตร และเชื้อสายพันธุ์เดิมสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด 5.56±0.32

กรัมต่อลิตร ดังภาพที่ 14 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Bai และคณะ (2003) พบว่า น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทนที่มีความเหมาะสมในการผลิตกรดแลค ติกที่ความเข้มข้น 12 กรัมต่อลิตร และได้กรดแลคติกสูงสุด 72.4 กรัมต่อลิตร

ในการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่า ในทุกแหล่งอาหารมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงในชั่วโมงที่ 0-48 ชั่วโมง และค่อยๆเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น โดยในอาหารชุดควบคุมของเชื้อที่ผ่านการฉายรังสีเหนือม่วงมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำสุดคิดเป็น 0.43±0.02 กรัมต่อลิตร ดังภาพที่ 15 สำหรับค่าการวัดความเป็นกรดด่างในระหว่างการเจริญ พบว่าในอาหารทั้ง 9 สูตรมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสูตรอาหารทั้ง 9 สูตรมีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 5.08-6.92 ดังนั้นจึงเลือกแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่เป็นน้ำแช่ข้าวโพดไปทำการศึกษาต่อ เนื่องจากมีปริมาณกรดแลคติกมากกว่าแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่เป็นนมถั่วเหลือง



ภาพที่ 14 การเปรียบเทียบปริมาณกรดแลคติกของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 เชื้อผ่านการฉายรังสีเหนือม่วง (ก) และเชื้อสายพันธุ์เดิม (ข) ซึ่งเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตร MRS ที่มีแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนทดแทน 9 สูตร โดยที่ สูตรที่ 1 (—■—) สูตรที่ 2 (—●—) สูตรที่ 3 (—▲—) สูตรที่ 4 (—◆—) สูตรที่ 5 (– ■ –) สูตรที่ 6 (– ● –) สูตรที่ 7 (– ▲ –) สูตรที่ 8 (– ◆ –) และ สูตรที่ 9 (—×—)



ภาพที่ 15 การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 เชื้อผ่านการฉายรังสีเหนือม่วง (ก) และเชื้อสายพันธุ์เดิม (ข) ซึ่งเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตร MRS ที่มีแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนทดแทน 9 สูตร โดยที่ สูตรที่ 1 (—■—) สูตรที่ 2 (—●—) สูตรที่ 3 (—▲—) สูตรที่ 4 (—◆—) สูตรที่ 5 (– ■ –) สูตรที่ 6 (– ● –) สูตรที่ 7 (– ▲ –) สูตรที่ 8 (– ◆ –) และ สูตรที่ 9 (—×—)

2.2 การใช้แหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างอินทรีย์ไนโตรเจนและอนินทรีย์ไนโตรเจน

ในการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างอินทรีย์และอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการฉายรังสีเหนือม่วงโดยเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตร MRS ซึ่งใช้กากมันสำปะหลังผ่านการย่อยสลายร้อยละ 6 เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน และน้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนมีชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างอินทรีย์ไนโตรเจนและอนินทรีย์ไนโตรเจนที่แตกต่างกันดังนี้

สูตรที่ 1 อาหารดัดแปลงสูตร MRS ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำแช่ข้าวโพดในอัตราส่วนร้อยละ 7 : 0

สูตรที่ 2 อาหารดัดแปลงสูตร MRS ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำแช่ข้าวโพดในอัตราส่วนร้อยละ 0 : 7

สูตรที่ 3 อาหารดัดแปลงสูตร MRS ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำแช่ข้าวโพดในอัตราส่วนร้อยละ 6 : 1

สูตรที่ 4 อาหารดัดแปลงสูตร MRS ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำแช่ข้าวโพดในอัตราส่วนร้อยละ 1 : 6

สูตรที่ 5 อาหารดัดแปลงสูตร MRS ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำแช่ข้าวโพดในอัตราส่วนร้อยละ 5 : 2

สูตรที่ 6 อาหารดัดแปลงสูตร MRS ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำแช่ข้าวโพดในอัตราส่วนร้อยละ 2 : 5

สูตรที่ 7 อาหารดัดแปลงสูตร MRS ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำแช่ข้าวโพดในอัตราส่วนร้อยละ 4 : 3

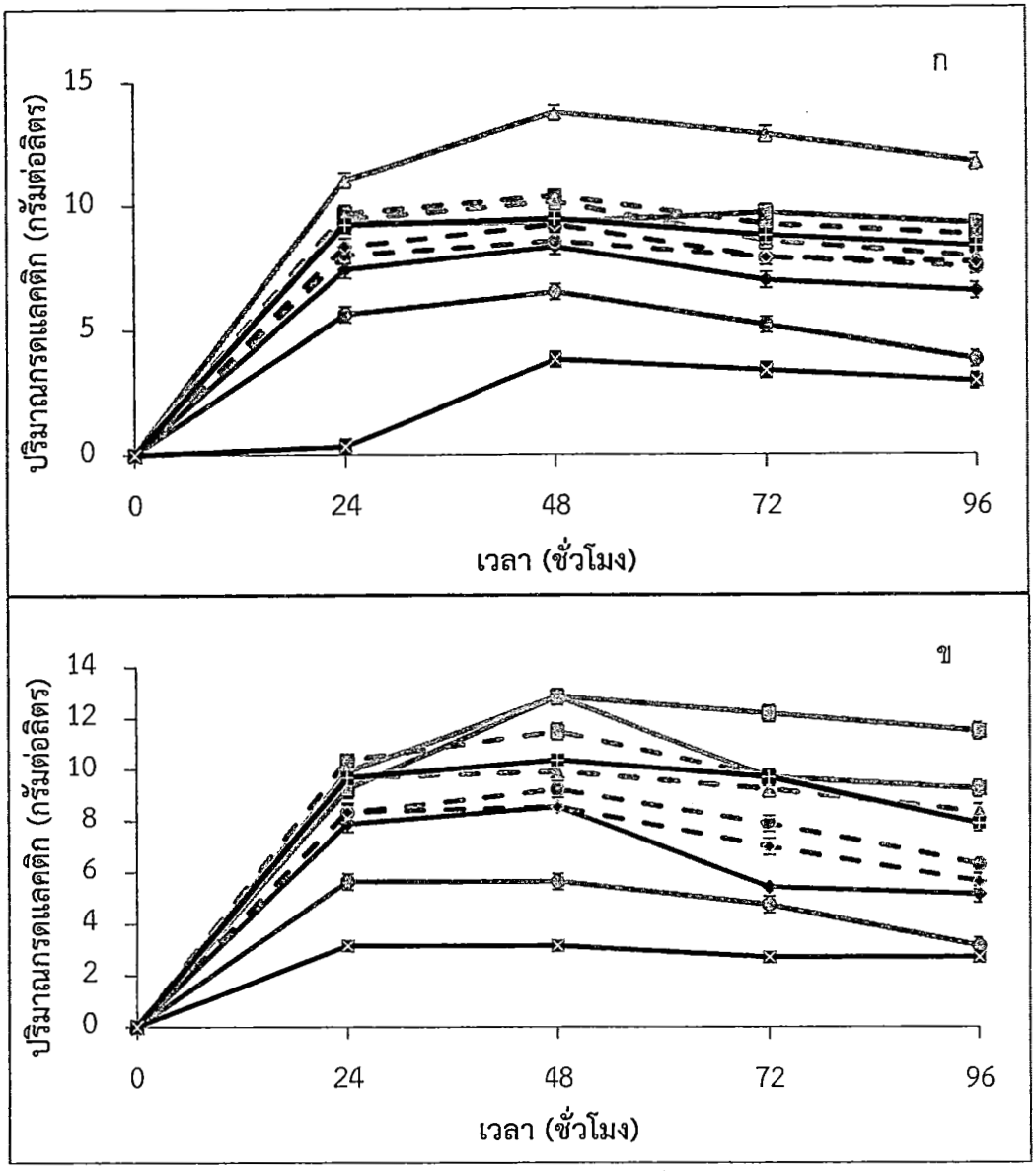
สูตรที่ 8 อาหารดัดแปลงสูตร MRS ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำแช่ข้าวโพดในอัตราส่วนร้อยละ 3 : 4

สูตรที่ 9 อาหารดัดแปลงสูตร MRS ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำแช่ข้าวโพดในอัตราส่วนร้อยละ 3.5 : 3.5

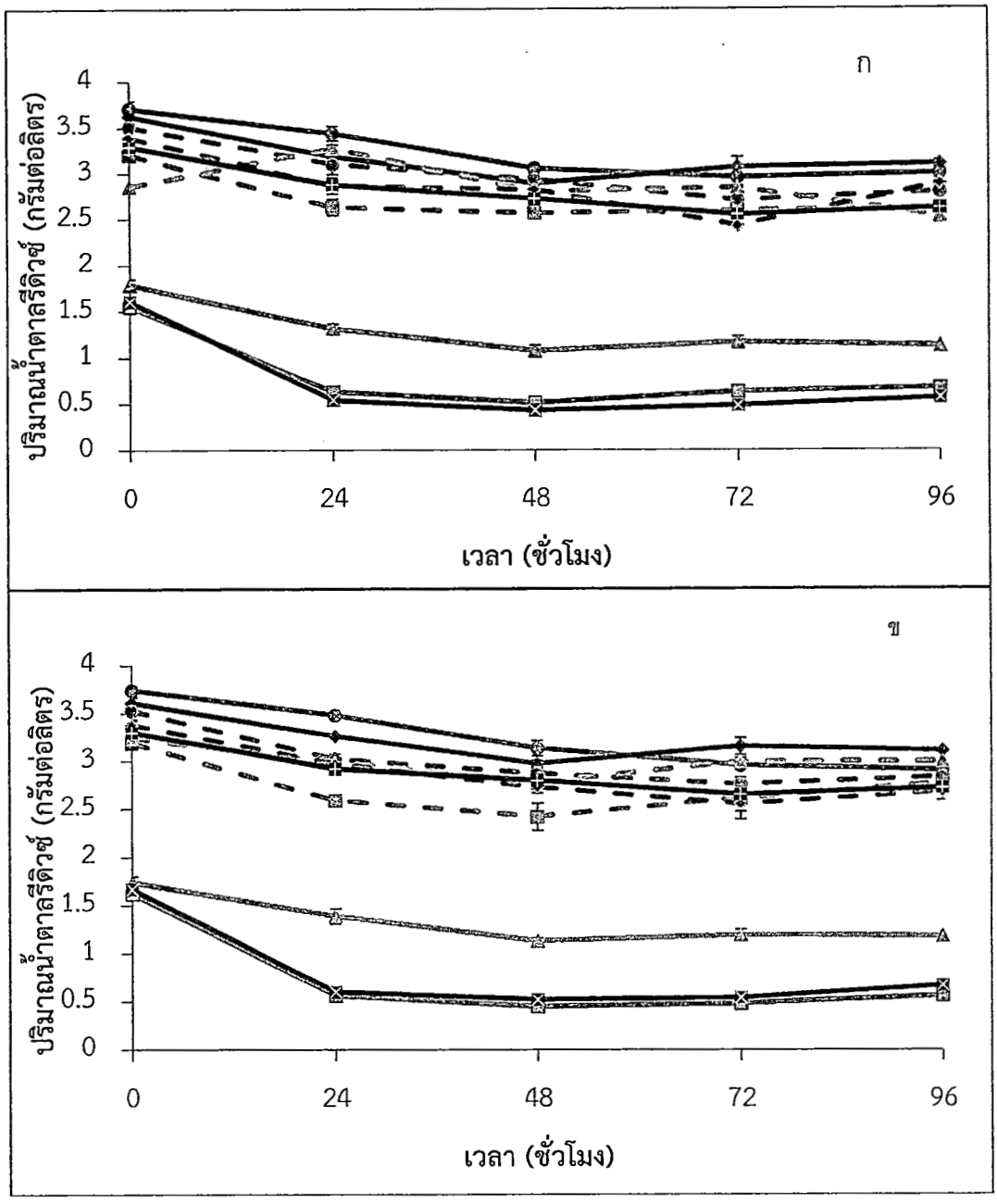
สูตรที่ 10 ชุดควบคุม อาหารดัดแปลงสูตร MRS (MRS+กากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยสลายร้อยละ 6)

ในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อที่ผ่านการฉายรังสีเหนือม่วงเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์เดิม พบว่า อาหารในแต่ละสูตรมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดแลคติกไปในทิศทางเดียวกัน คือ กรดแลคติกจะเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ของระยะเวลาในการเลี้ยง หลังจากนั้นจะมีค่าลดลง ในอาหารสูตรที่ 3 ซึ่งเป็นอาหารดัดแปลงสูตร MRS ที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำแช่ข้าวโพดในอัตราส่วนร้อยละ 6:1 เชื้อที่ผ่านการฉายรังสีเหนือม่วงสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดคิดเป็น 13.74±0.32 กรัมต่อลิตร และเชื้อสายพันธุ์เดิมสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด 12.83±0.32 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 16) ซึ่งไม่สอดคล้องกับการรายงานของ Yin และคณะ (1997) ที่ผลิตกรดแลคติกด้วยเชื้อ *Rhizopus oryzae* NRRL โดยใช้แป้งข้าวโพด 120 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต 1.35 กรัมต่อลิตร และแร่ธาตุสำคัญต่าง ๆ ในถังปฏิกรณ์ พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงถึง 102 กรัมต่อลิตร

ในการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าในทุกแหล่งอาหารมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงในชั่วโมงที่ 0-48 ชั่วโมง และจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น โดยในอาหารชุดควบคุมของเชื้อสายพันธุ์เดิมมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำสุดคิดเป็น 0.43±0.02 กรัมต่อลิตร ดังภาพที่ 17 สำหรับค่าการวัดความเป็นกรดด่างในระหว่างการเจริญ พบว่าในอาหารทั้ง 10 สูตรมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสูตรอาหารทั้ง 10 สูตรมีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 5.11-6.55 ดังนั้น จึงเลือกใช้อาหารดัดแปลงสูตร MRS ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำแช่ข้าวโพดในอัตราส่วนร้อยละ 6:1 เป็นแหล่งไนโตรเจนในการศึกษาขั้นต่อไป เนื่องจากให้ปริมาณการผลิตกรดแลคติกสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ



ภาพที่ 16 ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 เชื้อผ่านการฉายรังสีเหนือม่วง (ก) และเชื้อสายพันธุ์เดิม (ข) ซึ่งเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตร MRS ที่มีแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างอินทรีย์ไนโตรเจนและอนินทรีย์ไนโตรเจน 10 สูตร โดยที่ สูตรที่ 1 (—▩—) สูตรที่ 2 (—●—) สูตรที่ 3 (—▲—) สูตรที่ 4 (—◆—) สูตรที่ 5 (–▩–) สูตรที่ 6 (–●–) สูตรที่ 7 (–▲–) สูตรที่ 8 (–◆–) สูตรที่ 9 (—+—) และ สูตรที่ 10 (—×—)



ภาพที่ 17 การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการฉายรังสีเหนือม่วง (ก) และเชื้อสายพันธุ์เดิม (ข) ซึ่งเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตร MRS ที่มีแหล่งไนโตรเจนผสมระหว่างอินทรีย์ไนโตรเจนและอนินทรีย์ไนโตรเจน 10 สูตร โดยที่ สูตรที่ 1 (—■—) สูตรที่ 2 (—●—) สูตรที่ 3 (—▲—) สูตรที่ 4 (—◆—) สูตรที่ 5 (– ■ –) สูตรที่ 6 (– ● –) สูตรที่ 7 (– ▲ –) สูตรที่ 8 (– ◆ –) สูตรที่ 9 (—+—) และ สูตรที่ 10 (—×—)

3. ผลของการเติมและไม่เติมอิออนของโลหะต่อการผลิตกรดแลคติก

การเติมอิออนที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการฉายรังสีเหนือม่วงโดยเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตร MRS ซึ่งใช้กากมันสำปะหลังผ่านการย่อยสลายร้อยละ 6 เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนและใช้แอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับน้ำแช่ข้าวโพดในอัตราส่วนร้อยละ 6:1 เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทนซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม เปรียบเทียบกับการเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลงต่างๆ ดังนี้

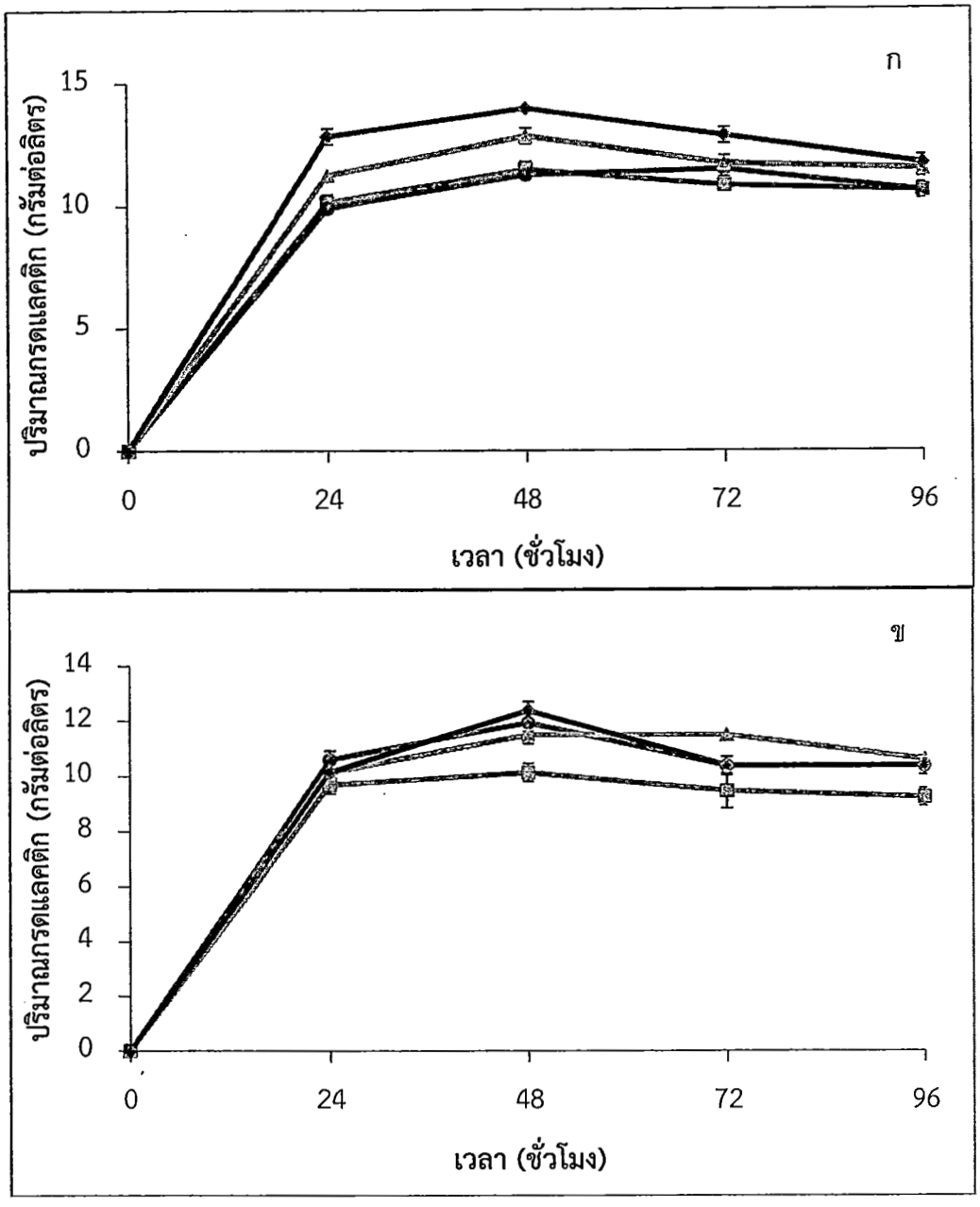
สูตรที่ 1 อาหารดัดแปลงสูตร MRS ร่วมกับการเติมเหล็กซัลเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร

สูตรที่ 2 อาหารดัดแปลงสูตร MRS ร่วมกับการเติมแมงกานีสซัลเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร

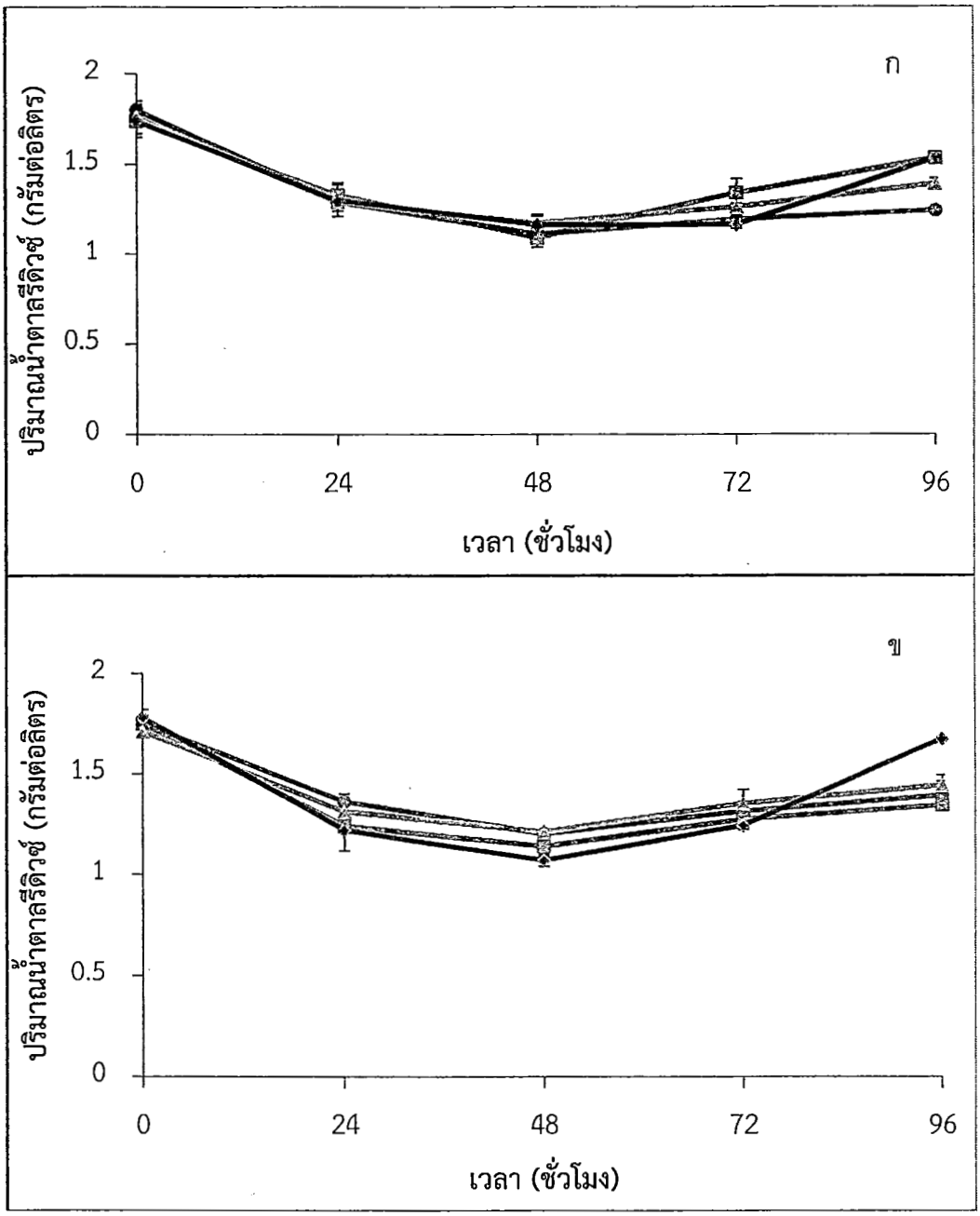
สูตรที่ 3 อาหารดัดแปลงสูตร MRS ร่วมกับการเติมเหล็กซัลเฟตและแมงกานีสซัลเฟต 0.025 กรัมต่อลิตร

สูตรที่ 4 ชุดควบคุม อาหารดัดแปลงสูตร MRS (MRS+แอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำแช่ข้าวโพดในอัตราส่วนร้อยละ 6:1)

ในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อที่ผ่านการฉายรังสีเหนือม่วงเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์เดิม พบว่า อาหารในแต่ละสูตรมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดแลคติกไปในทิศทางเดียวกัน คือ กรดแลคติกจะเพิ่มขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ของระยะเวลาในการเลี้ยง หลังจากนั้นจะมีค่าลดลงหรือคงที่ ในอาหารสูตรที่ 4 ซึ่งเป็นชุดควบคุมนั้น เชื้อที่ผ่านการฉายรังสีเหนือม่วงสามารถผลิตกรดแลคติกสูงสุดคิดเป็น 13.96±0.00 กรัมต่อลิตร และเชื้อสายพันธุ์เดิมสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด 12.38±0.32 กรัมต่อลิตร ดังภาพที่ 18 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Zhou และคณะ (1999) พบว่า การไม่เติมเหล็กซัลเฟตและแมงกานีสซัลเฟตให้ปริมาณกรดแลคติกสูงกว่าการเติมเหล็กซัลเฟตและแมงกานีสซัลเฟต โดยการไม่เติมอิออนทั้งสองนั้นมีปริมาณกรดแลคติก 66.2 กรัมต่อลิตร ในการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่า ในทุกแหล่งอาหารมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงในชั่วโมงที่ 0-48 ชั่วโมง และค่อยๆ เพิ่มตามระยะเวลาการเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น โดยในอาหารชุดควบคุมของเชื้อสายพันธุ์เดิมมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำสุดคิดเป็น 1.07±0.03 กรัมต่อลิตร ดังภาพที่ 19 สำหรับค่าการวัดความเป็นกรดด่างในระหว่างการเจริญ พบว่าในอาหารทั้ง 4 สูตรมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสูตรอาหารทั้ง 4 สูตรมีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 5.02-6.66



ภาพที่ 18 ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 เชื้อผ่านการฉายรังสีเหนือม่วง (ก) และเชื้อสายพันธุ์เดิม (ข) ซึ่งเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตร MRS ที่เติมและไม่เติมเหล็กซัลเฟตและแมงกานีสซัลเฟต 4 สูตร โดยที่ สูตรที่ 1 (—■—) สูตรที่ 2 (—●—) สูตรที่ 3 (—▲—) สูตรที่ 4 (—◆—)



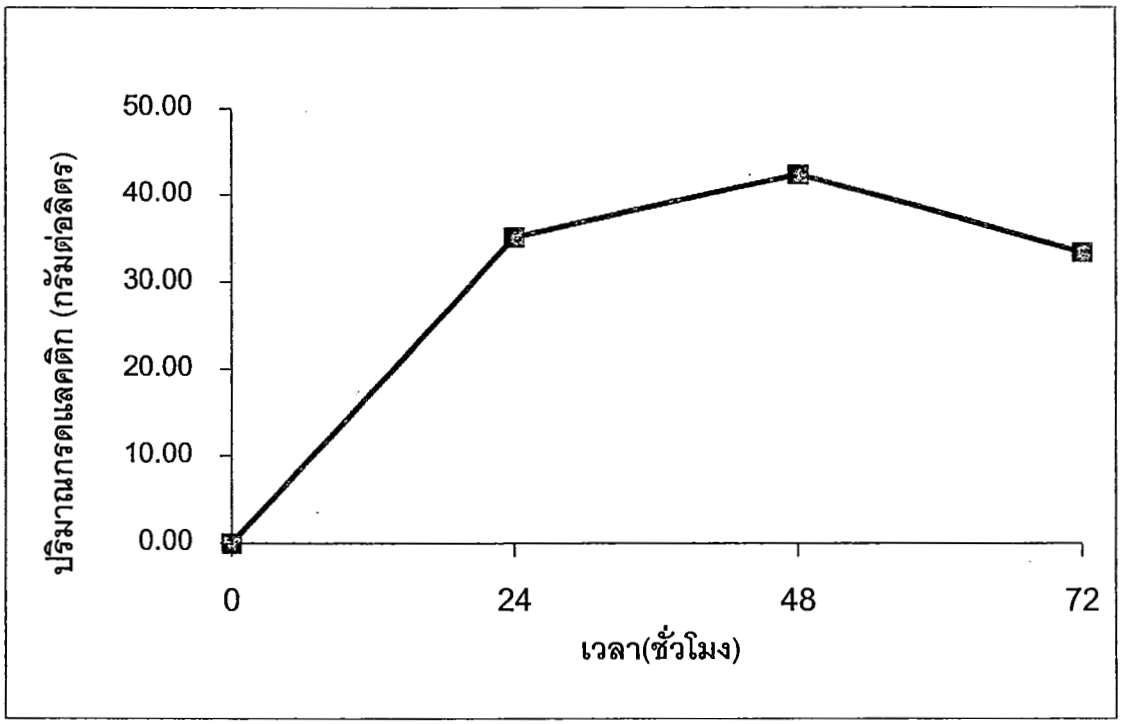
ภาพที่ 19 การเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 เชื้อผ่านการฉายรังสีเหนือม่วง (ก) และเชื้อสายพันธุ์เดิม (ข) ซึ่งเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตร MRS ที่เติมและไม่เติมเหล็กซัลเฟตและแมงกานีสซัลเฟต 4 สูตร โดยที่ สูตรที่ 1 (—■—) สูตรที่ 2 (—●—) สูตรที่ 3 (—▲—) สูตรที่ 4 (—◆—)

4. ผลการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 เชื้อผ่านการฉายรังสีเหนือม่วง ในถังหมักแบบกะ

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 เชื้อผ่านการฉายรังสีเหนือม่วง ในถังหมักแบบกะขนาด 5 ลิตร โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้ความเร็วของใบกวน 200 รอบต่อนาที อัตราการใช้อากาศเท่ากับ 1 ปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของเหลวต่อนาที (vvm) มีปริมาตรน้ำหมัก 3 ลิตร เลี้ยงด้วยอาหารสูตรดัดแปลงซึ่งประกอบด้วยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยร้อยละ 6 เป็นแหล่งคาร์บอน ร่วมกับการเติมแหล่งไนโตรเจนจากแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำแช่ข้าวโพดในอัตราส่วน 6 : 1 พบว่าแบคทีเรียมีการผลิตกรดอย่างรวดเร็วสูงสุดที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง โดยมีปริมาณกรดแลค ติกเท่ากับ 42.35 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 17 และภาพที่ 20

ตารางที่ 17 ปริมาณกรดแลคทีติกในการเลี้ยงด้วยถังหมักแบบกะ

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความเป็นกรดด่าง	ปริมาณกรดแลคติก (กรัม/ลิตร)
0	6.26	0.00
24	6.26	35.14
48	5.87	42.35
72	5.52	33.34



ภาพที่ 20 ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการฉายรังสีเหนือม่วง ซึ่งเลี้ยงในถังหมักแบบกะ

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกโดยตรงของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่เลี้ยงในอาหารสูตร MRS พบว่า การเลี้ยงแบบเขย่าและไม่เขย่า สามารถผลิตกรดแลคติกได้ไม่แตกต่างกัน คือ อยู่ในช่วงระหว่าง 7.51 - 7.81 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเลือกใช้การเลี้ยงแบบไม่เขย่าเพื่อศึกษาเรื่องต่อไป สำหรับในชนิดและความเข้มข้นของคาร์บอนที่เหมาะสม ในการผลิตกรดแลคติกโดยเปลี่ยนแหล่งคาร์บอน พบว่า กากมันสำปะหลังร้อยละ 2 และ 4 สามารถผลิตกรดแลคติกได้ไม่แตกต่างกัน คือ อยู่ในช่วงระหว่าง 5.41 - 6.61 กรัมต่อลิตร

จากการศึกษาการเหนี่ยวนำเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR 926 ด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต การทรีตด้วยสาร 2- อะมิโนแอนทราซีน และการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับการทรีตด้วยสาร2- อะมิโนแอนทราซีน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลคติก ซึ่งสรุปผลการศึกษาได้ดังนี้

การเหนี่ยวนำเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ด้วยการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต การทรีตด้วยสาร 2- อะมิโนแอนทราซีน และการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับการทรีตด้วยสาร 2- อะมิโนแอนทราซีน พบว่ามีอัตราการเจริญของเชื้อน้อยที่สุด เมื่อใช้การฉายรังสีอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นเวลา 14 นาที การทรีตด้วยสาร 2- อะมิโนแอนทราซีน ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 20 นาที และการฉายรังรังสีอัลตราไวโอเลต เป็นเวลา 1 นาที ร่วมกับการทรีตด้วยสาร 2-อะมิโนแอนทราซีน ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เวลา 20 นาที ซึ่งมีอัตราการรอดร้อยละ 0.01, 0.1 และ 0.01 ตามลำดับ จากการนำมาตรวจสอบความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการเหนี่ยวนำซึ่งเลี้ยงในอาหารสูตร MRS พบว่า เชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ที่ผ่านการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตและเชื้อสายพันธุ์เดิมสามารถผลิตกรดแลคติกได้ปริมาณสูงใกล้เคียงกัน คิดเป็น 1.94 ± 0.00 และ 1.98 ± 0.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนเชื้อที่ผ่านการทรีตด้วยสาร 2- อะมิโนแอนทราซีน และการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตร่วมกับการทรีตด้วยสาร 2- อะมิโนแอนทราซีน สามารถผลิตกรดแลคติกได้ปริมาณสูงสุดเท่ากันคือ 1.12 ± 0.00 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าเชื้อสายพันธุ์เดิม

จากการศึกษาเลือกวิธีการการเหนี่ยวนำเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR 926 ด้วยการฉายรังสีเหนือม่วง มาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลคติก ซึ่งสรุปผลการวิจัยการเหนี่ยวนำเชื้อ *L. plantarum* TISTR 926 ด้วยการฉายรังสีเหนือม่วง พบว่ามีอัตราการเจริญของเชื้อน้อยที่สุด เมื่อใช้การฉายรังสีเหนือม่วงความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นเวลา 2 นาที

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR 926 ด้วยการฉายรังสีเหนือม่วง มาศึกษาความสามารถในการผลิตกรดแลคติก โดยเลี้ยงในอาหารดัดแปลงสูตร MRS ที่ใช้กากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยและไม่ผ่านการย่อยที่ความเข้มข้นร้อยละ 2-6 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ในอาหารที่ใช้กากมันสำปะหลังผ่านการย่อยสลายความเข้มข้นร้อยละ 6 มีความเหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกมากที่สุด โดยให้ค่าการผลิตกรดแลคติกคือ 5.10±0.32 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการเปรียบเทียบการเลี้ยงด้วยแหล่งไนโตรเจนทั้งชนิดอินทรีย์ไนโตรเจนและอนินทรีย์ไนโตรเจนที่แตกต่างกันทั้งชนิดและความเข้มข้นและการใช้แหล่งไนโตรเจนผสมในอัตราส่วนต่างๆ กัน พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำแช่ข้าวโพดในอัตราส่วนร้อยละ 6:1 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด คือ 13.74±0.32 กรัมต่อลิตร ส่วนการเติมอิออนโลหะ พบว่า การเติมเหล็กซัลเฟตและแมงกานีสซัลเฟตไม่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก

จากการเลี้ยงในถังหมักแบบกะขนาด 5 ลิตร มีปริมาตรน้ำหมัก 3 ลิตร เลี้ยงด้วยอาหารสูตรดัดแปลงซึ่งประกอบด้วยกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยร้อยละ 6 ร่วมกับการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตและน้ำแช่ข้าวโพดในอัตราส่วน 6 : 1 โดยใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 พบว่าแบคทีเรียมีการผลิตกรดแลคติกเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ระยะเวลาการเลี้ยง 48 ชั่วโมง โดยมีปริมาณกรดแลคติกสูงกว่าการเลี้ยงในฟลากส์ โดยให้ปริมาณกรดแลคเพิ่มขึ้นเกือบ 3 เท่า คิดเป็น 42.35 กรัมต่อลิตร

เอกสารอ้างอิง

กาญจนาพร อารีรัตน์ พัชรี แซ่ฉั่ว สาวิตรี กำแพงคำ และ เชาวรีย์ เรืองวิไลทรัพย์. 2549. การผลิตกรดแลคติกจากหางนมโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรีย. *รายงานการวิจัย*, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยศิลปากร. นครปฐม.

กล้าณรงค์ ศรีรอต. 2538. ความรู้เบื้องต้นในการผลิตกลูโคสซีรัปจากแป้งและกากมันสำปะหลัง. เอกสารประกอบการอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่องความรู้เบื้องต้นในการผลิตกลูโคสซีรัปจากแป้งและกากมันสำปะหลัง วันที่ 25-26 สิงหาคม 2538. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

นทีทิพย์ หลีนวรัตน์ (2551). การผลิตกรดแลคติกจากกากมันสำปะหลังโดยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ TISTR 926. ปัญหาพิเศษทางเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล. (2547). *เทคโนโลยีชีวภาพอาหารการหมักและสิ่งแวดล้อม*. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 326 หน้า.

สุธิดา อยู่สำราญ ศวรรณี เหลืองสุนทรชัย สาวิตรี วทัญญูไพศาล และ จันทรพร ผลากรกุล. (2547). ศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกจากกากน้ำตาลของ *Lactobacillus mali* NRIC 1692. *วารสารวิชาการพระจอมเกล้าพระนครเหนือ*. 14(4), 53-59.

อัจฉรา เพิ่ม. (2549). *Lactic acid bacteria*. สงขลา: คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.

Abosereh, N. A., Soliman, E.A.M., Abd El-Khalek, A. B. 2006. Mutation Induction for Genetic Improvement of *Saccharomyces boulardii* Which Used as Probiotic Yeast. *J. of Agriculture and Biological Science*. 2(6): 478-482.

Akerberg F C., Zacchi, G. 2000. An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour. *Bioresour. Technol.* 75, 119–126.

Anuradha, R., Suresh, A.K., Venkatesh, K.V. 1999. Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid. *Process Biochem.* 35, 367–75.

Bai D.M., Zhao, X.M., Li, X.G., Xub, S.M. 2004. Strain improvement of *Rhizopus oryzae* for over-production of L-(+)-lactic acid and metabolic flux analysis of mutants. *J. Biochem Eng*. 18:41–48.

Datta R., Henry M. 2006. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies-a review. *J. Chem Technol Biotechnol.* 81, 1119–1129.

Gao, M.T., Kaneko, M. , Hirata, M., Toorisaka, E., Hano, T. 2008. Utilization of rice bran as nutrient source for fermentative lactic acid production. *Bioresou. Technol,* 99(9), 3659-3664.

Haq, U.I., Ali, S., Qadeer, M.A.., Iqbal, J. 2004. Citric acid production by selected mutants of *Aspergillus niger* from cane molasses. *Bioresour. Technol.* 93, 125–130.

Helanto, M., Aarnikunnas, J., Weymarn N.V., Airaksinen, U., Palva, A., Leisola, M. 2005. Improved mannitol production by a random mutant of *Leuconostoc pseudomesenteroides. J. of Biotechnology*, 116, 283–294.

John, R.P., Nampoothiri, K.M., Pandey, A. 2007. Production of L(+) lactic acid from cassava starch hydrolyzate by immobilized Lactobacillus delbrueckii. *J. Basic Microbiol.* 47, 25–30.

Kadam, S.R., Patli, S.S., Bastawde, K.B. 2006. Strain improvet of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. *Process Biochem.* 41, 120-126.

Lotfy, W. A., Ghanem, K. M., El-Helow, E. R. 2007. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: I. Mutagenesis and cost reduction studies. *Bioresour. Technol.* 98, 3464–3469.

Marques S., Santos, J. A.L., Gírio, F. M., Roseiro, J. C. 2008. Lactic acid production from recycled paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 41(3), 210-216.

Mercier, P., Yerushalami, L., Rouleau, D., Dochania, D. (1992) Kinetics of lactic acid fermentations on glucose and corn by *Lactobacillus amylophilus. J Chem Technol Biotechnol.* 55, 111–121.

Miyamoto T., Reddy, N.S. Nakae T.1983. Induction of Mutation in *Lactobacillus casei* subsp. alactosus by Nitrosoguanidine Agric. Biol. Chem., 47 (12), 2755-2759.

Mussatto S., I., Fernandes M., Mancilha, I. M., Roberto, I.C. 2008. Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain. *J. Biochemical Engineering.* 40, 437–444.

Nandasana, A. D., Kumar, S. 2008. Kinetic modeling of lactic acid production from molasses using *Enterococcus faecalis* RKY1. *Biochemical Engineering Journal*, 38, 277–284.

Naveena, B.J., Altaf, M.d.; Bhadrayya, K., Madhavendra, S.S., Reddy, G. 2005. Direct fermentation of starch to L(+) lactic acid in SSF by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using wheat bran as support and substrate—medium optimization using RSM. *Process Biochem.* 40, 681–690.

Ohkouchi, Y., Inoue, Y. 2006. Direct production of L(+)-lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011. *Bioresour. Technol.* 97, 1554–1562.

Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam P., Soccol. V. T., Vandenberghe, L. P.S., Mohan, R. 2000. Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresour. Technol.* 74, 81 – 87.

Reddy, G. , Altaf, B.J. Naveena, M. Venkateshwar, E. Kumar V. 2008. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation - A review. *Biotechnol. Advances*, 26(1), 22-34.

Rojan, P.J., Nampoothiri, K.M., Nair, A.S., Pandey, A., 2005. L(+) Lactic acid production using Lactobacillus casei in solid-state fermentation. *Biotechnol. Lett.* 27, 1685–1688.

Rojan, P. J., Rajeev, K. Sukumaran, K. Nampoothiri, M., Pandey, A. 2007. Statistical optimization of simultaneous saccharification and L(+)-lactic acid fermentation from cassava bagasse using mixed culture of lactobacilli by response surface methodology. *Biochemical Engineering Journal*, 36(3), 262-267.

Rojan P. J., Dhanya, G. K. Madhavan, N. 2008. Genome shuffling of *Lactobacillus delbrueckii* mutant and *Bacillus amyloliquefaciens* through protoplasmic fusion for L-lactic acid production from starchy wastes. *Bioresour. Technol*, 99, 8008–8015.

Roman, A., Remedios, Y. n˜ez, Garrote, G., Alonso, J. L. 2008. SSF production of lactic acid from cellulosic biosludges. *Bioresour. Technol.* 99, 4247–4254.

Sauer, M., Porro,D., Mattanovich,D., Branduardi, P. 2008. Microbial production of organic acids: expanding the markets *Trends in Biotechnology*, 26(2), 100-108.

Singh, S. K. Ahmed, S.U. Pandey, A. 2006. Metabolic engineering approaches for lactic acid production. *Process Biochemistry*. 41, 991–1000.

Sriroth, K., Chollakup, R., Chotineeranat, S., Piyachomkwan, K., Oates, C.G. 2000. Processing of cassava waste for improved biomass utilization. *Bioresour. Technol.* 71, 63-69.

Stiles, M.E., Holzapfel, W.H. 1997. Review article: lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol.* 36, 1-29.

Tsao, G.T., Cao, N.J., Cong, C.S. 1999. Production of multifunctional organic acids from renewable sources. *Adv Bioeng Biotechnol.* 65, 245–277.

Vishnu, C., Seenayya, G., Reddy, G. 2002. Direct fermentation of various pure and crude starchy substrates to L(+) lactic acid using *Lactobacillus amylophilus* GV6. *World J Microbiol Biotechnol.* 18, 429–433.

Wiseman, A. 1995. Handbook of enzyme biotechnology. London : Ellis Horwood. 738 p.

Xiaodong, W., Xuan, G., Rakshit, S.K. 1997. Direct fermentation of lactic acid from cassava or other starch substrates. *Biotechnol Lett.* 9, 841–843.

Xu, Guo-Qian, Chu, Ju Zhuang, Ying-Ping, Wang, Yong-Hong ,Zhang, Si-Liang. 2008. Effects of vitamins on the lactic acid biosynthesis of *Lactobacillus paracasei* NERCB 0401.*Biochemical Engineering Journal*, 38, 189–197.

Yu, L. , Lei, T., , Ren, X., Pei, X., Feng, Y.2008. Response surface optimization of l-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466. *Biochemical Engineering Journal* 39,496–502

Yumoto, I., Ikeda, K. 1995. Direct fermentation of starch to L(+)-lactic acid using *Lactobacillus amylophilus. Biotechnol Lett* . 17, 543–546.

Zhang, D.X., Cheryan, M. 1994. Starch to lactic acid in a continuous membrane reactor. *Process Biochem.* 29, 145–150.

Lactic acid bacteria overproducing exopolysaccharides

http://www.freepatentsonline.com/7241610.html เข้าถึงวันที่ 23 กันยายน 2551

Lactobacillus strains and use thereof in fermentation for L-lactic acid production

http://www.wikipatents.com/7300787.html เข้าถึงวันที่ 23 กันยายน 2551

Genetically modified lactic acid bacteria having modified diacetyl reductase activities

http://www.patentstorm.us/patents/6413765.html เข้าถึงวันที่ 23 กันยายน 2551

ภาคผนวก

1. กรดทั้งหมด (Total acidity) ปรับปรุงจาก AOAC (1980)

สารเคมี

1. น้ำกลั่น

2. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 นอร์มัล เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร เก็บในขวดแก้วที่กันคาร์บอนไดออกไซด์ได้และเป็นแก้วที่ทนด่าง

การหาความเข้มข้นมาตรฐานของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 นอร์มัล ทำโดยการชั่งโพแทสเซียมพาธาเลต (อบ 2 ชั่วโมง 120 องศาเซลเซียส แล้วทำให้เย็นในโถอบแห้ง) 0.3 กรัม เติมลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ (เตรียมโดยการนำน้ำกลั่นมาต้ม 20 นาที) 90-100 มิลลิลิตร เมื่อโพแทสเซียมพาธาเลต ($KHC_8H_4O_4$) ละลาย จากนั้นเติมสารละลายฟีนอฟทาลีน 3 หยด แล้วไตเตรทด้วยสารละลาย 0.1 NaOH ความเข้มข้นมาตรฐานคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นมาตรฐาน (N)} = \frac{\text{กรัม } KHC_8H_4O_4 \times 100}{\text{มิลลิลิตร NaOH} \times 204.229}$$

3. สารละลายฟีนอฟทาลีน (phenolphthalein) ชั่งฟีนอฟทาลีน 1 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์ นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เจือจางในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอฟทาลีน 3 หยด แล้วไตเตรทด้วยสารละลาย 0.1 NaOH จนกระทั่งถึงจุดยุติสีชมพูอ่อน ปริมาณกรดคำนวณเป็นกรดแลคติกตามสูตร

$$\text{กรดแลคติก (กรัมต่อ 100 มล.)} = \frac{\text{ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์} \times \text{ความเข้มข้น} \times 90.1 \times 100}{1{,}000 \times \text{ปริมาตรตัวอย่าง}}$$

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

2.1 การเตรียมสารละลาย Dinitrosalicylic Acid Reagent Solution ประกอบด้วย

3,5 – dinitrosalicylic acid (DNS)	10	กรัม
NaOH	16	กรัม
Na-k tartrate	300	กรัม

ชั่ง DNS (3,5 – dinitrosalicylic acid) 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เติมสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH 16 กรัม / น้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร) ทีละน้อย คนให้เข้ากัน นำไปตั้งบนฮอตเพลตจนสารละลายใส แล้วเติมโซเดียมโพแทสเซียมตาร์เตรท (Na-k tartrate) ลงไปทีละน้อยจนครบ 300 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา ทิ้งไว้ค้างคืนก่อนนำมาใช้งาน

2.2 กราฟมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการละลายกลูโคส 1 กรัม ในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายกลูโคสให้ได้ความเข้มข้น ดังแสดงในตาราง

หลอดที่	ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	สารละลายกลูโคส (ไมโครลิตร)
1	0	500	0
2	0.5	475	25
3	1.0	450	50
4	1.5	425	75
5	2.0	400	100
6	3.0	350	150

นำหลอดทดลองทั้ง 6 หลอดตามปริมาตรข้างต้น เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำหลอดทดลองไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในอ่างน้ำเย็น 5 นาที เติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ความเข้มข้นของน้ำตาลกับค่าการดูดกลืนแสง

2.3 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี 3,5 – dinitrosalicylic acid (Miller, 1959)

วิธีการวิเคราะห์

1. ปิเปตตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ ปริมาตรไม่เกิน 500 ไมโครลิตร (ควรมีน้ำตาลไม่เกิน 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ถ้ามีปริมาณมากกว่าจะต้องทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่น) ลงในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที
4. นำตัวอย่างไปแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที
5. เติมน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ความเข้มข้นของน้ำตาลกับค่าการดูดกลืนแสง

2.4 การคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (มก./มล.)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชันจากกราฟมาตรฐาน}}$$

3. **อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร** MRS (Atlas, 1946)

Peptone	10	กรัมต่อลิตร
Beef extract	8	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	4	กรัมต่อลิตร
Glucose	20	กรัมต่อลิตร
Tween 80	1	มิลลิลิตรต่อลิตร
K_2HPO_4	2	กรัมต่อลิตร
Sodium acetate	5	กรัมต่อลิตร
Tri-ammonium citrate	2	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัมต่อลิตร
$MnSO_4.7H_2O$	0.05	กรัมต่อลิตร
Distilled water	1	ลิตร

321225

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ถ่ายลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสูตรดัดแปลง MRS

ชั่งอาหาร MRS สูตรสำเร็จ 67.15 กรัม ผสมกับ Soluble starch 2 เปอร์เซ็นต์ ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้เข้ากัน จากนั้นนำไปให้ความร้อนจนอาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน แบ่งใส่หลอดทดลองให้มีปริมาตร 7 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที