ศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะการหมักที่เหมาะสม ในการผลิตกรดแลคติกจากมันเทศ

Optimization of Medium Components and Fermentation Conditions for Lactic Acid Production from Sweet Potato

นายอำนวย อรรถลังรอง[๑/] ผศ. ดร. เชาวรีย์ อรรถลังรอง[๒/]
อังฐิกา สิริธนเจริญ[๓/] อจลา ประชาญสิทธิ์[๓/]

บทคัดย่อ

การศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักกรดแลกติก โดยใช้ซับสเตรตจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศมาหมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus casei* TISTR ๔๕๓ ได้แก่ อุณหภูมิและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม การศึกษาในระดับขวดเขย่า พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมัก คือ ๓๗ องศาเซลเซียส ส่วนองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ๔ ปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรีดิวซ์ แคลเซียมคาร์บอเนต ยีสต์ที่เหลือทิ้งจากโรงงานผลิตไวน์ และแมงกานีสซัลเฟต เมื่อศึกษาด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology, RSM) และใช้แผนการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (central composite design, CCD) พบว่า ค่าที่เหมาะสมของปัจจัยดังกล่าว คือ ๑๑๗.๐๐, ๕๖.๐๐, ๑๖.๐๐ และ ๐.๐๖๔ กรัมต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งให้ค่ากรดแลคติกมากถึง ๑๐๑.๘๖ กรัมต่อลิตร สอดคล้องกับค่าการทำนายด้วยสมการที่สร้างขึ้นจากวิธี RSM ที่ได้ ๑๐๔.๑๒ กรัมต่อลิตร เมื่อหมักเป็นระยะเวลา ๗๒ ชั่วโมง เมื่อนำภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวไปทดลองหมักกรดแลคติกในถังหมักขนาด ๕ ลิตร และปรับปรุงเพิ่มความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรีดิวซ์เป็น ๑๓๐ กรัมต่อลิตร ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ ๖.๐ ตลอดการหมัก พบว่า *L. casei* TISTR ๔๕๓ สามารถผลิตกรดแลคติกได้มากถึง ๑๑๓.๔๒ กรัมต่อลิตรในเวลา ๔๘ ชั่วโมง หรือ ๒.๓๖ กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

[๑/]สถาบันวิจัยพืชสวน
[๒/]มหาวิทยาลัยศิลปากร *
[๓/]มหาวิทยาลัยศิลปากร * (นักศึกษา) * วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์

๑. คำนำ

มันเทศมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Ipomoea batatas* L. เป็นพืชที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง จึงจัดเป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญเป็นอันดับที่ ๗ ของโลก (Ruiz *et al*., ๑๙๘๑) หัวมันเทศประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตและแร่ธาตุต่างๆหลายชนิด มันเทศบางสายพันธุ์ยังมีการสะสมสารที่ให้สีในพืช Phytopigments) เช่น แอนโธไซยานิน (anthocyanin) และบีตาแคทีน (β-carotene) ที่มีประสิทธิภาพเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidants) (Panda *et al*., ๒๐๐๙) แหล่งปลูกของมันเทศมากกว่าร้อยละ ๘๐ ของโลกอยู่ในภูมิภาคเอเชีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในจีนและอินเดีย โดยส่วนใหญ่มันเทศจะถูกใช้บริโภคโดยตรงหรืออาจนำไปสกัดเป็นแป้งมันเทศ โดยทั่วไปมันเทศเป็นพืชที่ปลูกง่าย ระยะเวลาเพาะปลูกสั้น ปลูกได้ตลอดปี และมีราคาถูก ดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะนำมันเทศมาใช้ประโยชน์ในการผลิตผลิตภัณฑ์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ (Panda *et al*., ๒๐๐๙; Panda and Ray, ๒๐๐๗; ๒๐๐๘) เช่น การผลิตกรดแลคติก เป็นต้น

กรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร เคมี เภสัชกรรม เครื่องสำอาง และอื่น ๆ อีกหลากหลายชนิด ในปัจจุบันยังมีการนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตโพลีแลคติก (polylactic acid, PLA) ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพและมีราคาสูงมาก (Hofvendahl and Hahn-Hägerdal, ๒๐๐๐; Narayanan *et al*., ๒๐๐๔; Wee *et al*., ๒๐๐๖) จากประโยชน์มากมายดังกล่าวข้างต้น จึงมีการประมาณความต้องการใช้ประโยชน์จากกรดแลคติกทั่วโลกสูงถึง ๑๕๐,๐๐๐ เมตริกตันในแต่ละปี และมีแนวโน้มความต้องการเพิ่มขึ้นทุกปี (Reddy *et al*., ๒๐๐๘)

ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรพิจิตรได้คัดเลือกมันเทศจนได้พันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตแป้งและเอทานอล และนำไปพันธุ์ดังกล่าวไปปลูกเปรียบเทียบในพืนที่ต่างๆ ระหว่างปี ๒๕๕๑-๒๕๕๓ พบว่า มันเทศพันธุ์ไต้หวันให้ผลผลิตดีที่สุดเมื่อปลูกทดสอบเกือบทุกฤดูกาลระหว่าง ๓.๕-๖.๑ ตัน/ไร่ และมีอายุเก็บเกี่ยวสั้นเพียง ๙๐ วัน เมื่อปลูกที่กาญจนบุรี (ทิพย์ดรุณี และคณะ ๒๕๕๓) จึงมีความน่าสนใจอย่างยิ่งในการนำมันเทศมาใช้เป็นซับสเตรตในการผลิตกรดแลคติก เพื่อประยุกต์ให้เกิดประโยชน์และเพิ่มมูลค่าของมันเทศ จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำตาลกลูโคสจากมันเทศ โดยกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์สองชนิด คือ แอลฟา-อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส พบว่า การย่อยมันเทศที่ภาวะเหมาะสมให้สารละลายที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลรีดิวซ์ถึง ๙๕-๙๘ กรัมต่อลิตร และ ๑๐๕-๑๑๒ กรัมต่อลิตรตามลำดับ (Adthalungrong *et al*., ๒๐๑๒) จึงมีความเหมาะสมที่จะใช้สารละลายน้ำตาลที่ผลิตจากมันเทศเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการหมักกรดแลคติก

ซึ่งความสำเร็จในการผลิตกรดแลคติกส่วนหนึ่งเกิดจากการเลือกใช้วัตถุดิบราคาถูก และกระบวนการหมักที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้น นอกเหนือจากการใช้มันเทศซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกเป็นแหล่งคาร์บอนแล้ว การเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งจำเป็นเช่นเดียวกัน แหล่งไนโตรเจนที่สำคัญที่มีรายงานว่าให้ผลที่ดีในการหมักกรดแลคติก ได้แก่ สารสกัดจากยีสต์ (Fitzpatrick *et al*., ๒๐๐๑) จึงมีการใช้อย่างแพร่หลายในงานวิจัยที่เกี่ยวกับการผลิตกรดแลคติก แต่สารสกัดจากยีสต์ชั้นคุณภาพระดับห้องปฏิบัติการมีราคาค่อนข้างสูง ทำให้มีต้นทุนการผลิตสูงและอาจไม่เหมาะสมกับการใช้งานจริงในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทดลองใช้ยีสต์ที่เหลือจากการหมักไวน์ มาใช้ทดแทนสารสกัดจากยีสต์ดังกล่าว ตลอดจนปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก เพื่อให้ได้ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกโดย *L. casei* TISTR ๔๕๓ เมื่อใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศเป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ยีสต์ที่เหลือจากการหมักไวน์เป็นแหล่งไนโตรเจน

๒. วิธีดำเนินการ

- วัสดุและอุปกรณ์

๑. หัวมันเทศพันธุ์ไต้หวัน

๒. ยีสต์ที่เหลือจากการหมักไวน์ (จาก บริษัท สยามไวเนอรี่ จำกัด จังหวัดสมุทรสาคร)

๓. แอลฟา-อะไมเลส (EC ๓.๒.๑.๑) ชนิดทนความร้อน (thermostable **α**-amylase) ที่ใช้คือ BAN™ ๒๔๐L (Novozymes A/S, Denmark) ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* โดยมีกิจกรรม ≥ ๒๕๐ หน่วยต่อกรัม

๔. กลูโคอะไมเลสที่ใช้คือ Spirizyme® Fuel (Novozymes A/S, Denmark) โดยมีกิจกรรม ≥๗๕๐ หน่วยต่อกรัม

๕. โซเดียมไฮดรอกไซด์และโพแทสเซียมทาร์เทรตเป็นผลิตภัณฑ์ของ UNIVAR (Ajax Finechem, Australia)

๖. กลูโคส (Biomark™ Laboratory, India)

๗. ๓,๕-ไดไนโตรซาลิไซลิก พีจีโอเอนไซม์ เพรปแพเรชัน (PGO Enzyme Preparation)

๘. ออร์โธ-ไดอะนิซิดีน ไดไฮโดรคลอไรด์ และ สารเคมีอื่นๆ ทุกชนิดเป็นผลิตภัณฑ์ของ SIGMA-ALDRICH (U.S.A.)

๙. อาหารเหลว de Man Rogosa and Sharpe (MRS) เป็นผลิตภัณฑ์ของ HiMedia Laboratories, Mumbai (India)

๑๐. อุปกรณ์และเครื่องมือในห้องทดลอง

- วิธีการ

๑. ปลูกมันเทศพันธุ์ไต้หวันและเก็บเกี่ยวหัวมันเทศเมื่ออายุ ๑๒๐ วัน คัดเลือกหัวมันเทศที่มีคุณภาพดี น้ำหนักไม่น้อยกว่า ๓๐๐ กรัม นำมาล้างและนึ่งให้สุก ปอกเปลือกและบดผสมเนื้อมันเทศที่นึ่งสุกให้เป็นเนื้อเดียว เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลองต่อไป

๒. การเตรียมสารละลายน้ำตาลจากมันเทศ ย่อยมันเทศในข้อ ๑ ด้วยเอนไซม์ตามวิธีการของ Adthalungrong (๒๐๑๒) โดยนำมันเทศมาล้างและนึ่งให้สุกเป็นเวลา ๓๐ นาที ปอกเปลือกและบดผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไปใช้ในขั้นตอนการย่อยมันเทศให้ได้น้ำตาลกลูโคส โดยใช้มันเทศต่อน้ำกลั่น ๕๐:๕๐ (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้เท่ากับ ๖.๐ นำมาย่อยด้วยแอลฟา-อะไมเลสโดยเติมเอนไซม์ ๐.๑๐% ของน้ำหนักมันเทศ ควบคุมอุณหภูมิที่ ๗๕ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๒๐ นาที จากนั้น ปรับลดอุณหภูมิลงมาที่ ๖๕ องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง ๔.๕ เติมกลูโคอะไมเลส ๐.๑๐% ของน้ำหนักมันเทศ และย่อยต่อไปอีก ๔๘ ชั่วโมง ซึ่งเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการย่อยมันเทศแล้ว จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลรีดิวซ์ ๙๕-๙๘ กรัมต่อลิตร และ ๑๐๕-๑๑๒ กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นำสารละลายน้ำตาลที่ได้ไปต้มที่ ๑๐๐ องศาเซลเซียสนาน ๕ นาที เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ แยกตะกอนทิ้งโดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ ๖,๐๐๐ รอบต่อนาที อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียส นาน ๑๕ นาที เมื่อได้สารละลายน้ำตาลที่ใสแล้วทำให้เข้มข้นขึ้น โดยนำไปต้มหรือระเหยน้ำออกด้วยวิธี evaporation ซึ่งจะได้สารละลายน้ำตาลที่พร้อมสำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการหมักกรดแลคติก หรืออาจเก็บไว้ที่อุณหภูมิ ๔ องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

๓. การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก งานวิจัยนี้ทุกการทดลองใช้ *L. casei* TISTR ๔๕๓ ซึ่งสั่งซื้อจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยเก็บรักษาเชื้อดังกล่าวแบบถาวรในอาหารเหลว de Man Rogosa and Sharpe (MRS) ที่มีกลีเซอรอล ๑๕% ในถังไนโตรเจนเหลว และเก็บแบบชั่วคราวเพื่อใช้งานบนอาหารแข็ง MRS ที่ ๔ องศาเซลเซียส โดยถ่าย

เชื้อทุกเดือน การเตรียมหัวเชื้อโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS บ่มที่ ๓๗ องศาเซลเซียส นาน ๒๔ ชั่วโมง ใช้หัวเชื้อ ๑๐% ซึ่งจะได้เชื้อเริ่มต้นในอาหารหมักประมาณ $๑๐^{๖}$ CFU/ml

๔. การเตรียมตัวอย่างและวิเคราะห์ผล เมื่อเสร็จสิ้นการหมักของแต่ละการทดลอง เก็บตัวอย่าง ๒๐ มิลลิลิตร วัดค่าความเป็นกรดด่างโดยใช้เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter, ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Metrohm Siam ประเทศไทย) ปรับค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายตัวอย่างให้มีค่า ๑.๘–๒.๐ ด้วย ๔M HCl แล้วปรับปริมาตรเป็น ๔๐ มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น นำสารละลายตัวอย่างที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างและปรับปริมาตรแล้วมาปั่นเหวี่ยงที่ ๖,๐๐๐ รอบต่อนาที เป็นเวลา ๑๕ นาที เก็บส่วนใสมาวิเคราะห์ผลดังนี้

๔.๑ กรดแลคติกโดยปรับปรุงจากวิธีของ Barker and Summerson (๑๙๔๑) ดังนี้

- เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดแลคติกความข้มข้น ๐.๐, ๐.๐๑, ๐.๐๒, ๐.๐๓, ๐.๐๔, ๐.๐๕, ๐.๐๖, ๐.๐๗, ๐.๐๘, ๐.๐๙ และ ๐.๑๐ กรัมต่อลิตร ใส่ eppendrorf ที่มีน้ำกลั่นอยู่แล้ว ๐.๘ มิลลิลิตร eppendrorf ละ ๐.๑ มิลลิลิตร
- เติม ๒๐%$CuSO_{๔}$ ลงไป หลอดละ ๐.๑ มิลลิลิตร
- เติม $Ca(OH)_{๒}$ ๑.๐ กรัม เขย่าแรงๆ วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ ๓๐ นาที
- นำไปปั่นเหวี่ยงที่ ๔ องศาเซลเซียส ที่ ๖,๐๐๐ รอบต่อนาที เป็นเวลา ๑๕ นาที
- ดูดสารละลายส่วนใส ๐.๕ มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง
- เติม ๔% $CuSO_{๔}$ ๐.๐๒๕ มิลลิลิตร และเติม Conc. $H_{๒}SO_{๔}$ ๓ มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
- นำไปต้มในน้ำเดือด ๕ นาที แล้วหยุดปฏิกิริยาในน้ำเย็นที่อุณหภูมิต่ำกว่า ๒๐ องศาเซลเซียส
- เติม P–hydroxybiphenyl ๐.๐๕ มิลลิลิตร
- วางในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๓๐ นาที
- นำไปต้มในน้ำเดือด ๙๐ วินาที แล้ววางในน้ำเย็นที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัด OD ๕๖๐ นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน

๔.๒ น้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลกลูโคส

- วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS method) ซึ่งปรับปรุงจาก Miller (๑๙๕๙) โดยนำตัวอย่าง ๑ มิลลิลิตรที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในค่าที่เหมาะสมมาผสมกับ ไดไนโตรซาลิไซลิก รีเอเจ้นท์ (DNS reagent) ๑ มิลลิลิตร ต้มที่ ๑๐๐ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๑๐ นาที และแช่ในน้ำเย็น ๓ นาที แล้วเติมน้ำกลั่น ๑๐ มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ๕๔๐ นาโนเมตร และเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน
- วิเคราะห์น้ำตาลกลูโคส โดยใช้พีจีโอเอนไซม์ เพรปแพเรชัน โดยนำตัวอย่าง ๐.๒๕ มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในค่าที่เหมาะสมมาผสมกับ ๒.๕ มิลลิลิตรของพีจีโอเอนไซม์ รีเอเจ้นท์ที่มีออร์โธ-ไดอะนิซิดีน บ่มที่ ๓๗ องศาเซลเซียส เป็นเวลา ๓๐ นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ ๔๒๕ นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การทดลองที่ ๑ การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตกรดแลคติก

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมักประกอบด้วยสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศ ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ ๑๒๐ กรัมต่อลิตร เปปโทน ๑๐.๐ กรัมต่อลิตร สารสกัดจากเนื้อ (meat extract) ๑๒.๐ กรัมต่อลิตร ยีสต์ที่เหลือจากการหมักไวน์ ๑๐.๐ กรัมต่อลิตร (คิดจากน้ำหนักแห้ง) ทวีน ๘๐ ปริมาตร ๑.๐ มิลลิลิตรต่อลิตร ไดแอมโมเนียมซิเตรต ๒.๘๓ กรัมต่อลิตร โซเดียมอะซิเตต ๕.๐ กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต ๐.๒ กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต ๐.๐๕ กรัมต่อลิตร และแคลเซียมคาร์บอเนต ๖๐.๐ กรัมต่อลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่ ๑๒๑ องศาเซลเซียส ความดัน ๑๕ ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน ๑๕ นาที ปล่อยให้เย็นลง ใช้อาหาร ๙๐ มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อที่เตรียมไว้ ๑๐ มิลลิลิตร หมักในขวดรูปชมพู่ขนาด ๑๒๕ มิลลิลิตร วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน ๔ ซ้ำ ๔ กรรมวิธี ได้แก่ อุณหภูมิในการหมัก ๓๐, ๓๔, ๓๗ และ ๔๐ องศาเซลเซียส หมักเป็นเวลา ๗๒ ชั่วโมง โดยเขย่าที่ ๑๕๐ รอบต่อนาที

การทดลองที่ ๒ การศึกษาองค์ประกอบที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมักกรดแลคติกด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology)

๒.๑ การทดลองในระดับขวดเขย่า (shaking flask)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมักด้วยวิธีการดังอธิบายในการทดลองที่ ๑ ยกเว้นความเข้มข้นที่ใช้ขององค์ประกอบที่ศึกษา ๔ ปัจจัย ซึ่งจะแปรผันตามแผนการทดลองแบบส่วนประสมกลาง (Central composite design, CCD) ดังตารางที่ ๑ และ ๒ เพื่อให้ได้ค่าที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก ซึ่งองค์ประกอบที่ศึกษาทั้ง ๔ ปัจจัยที่กำหนดให้เป็นตัวแปรอิสระ คือ น้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศ แคลเซียมคาร์บอเนต ยีสต์ที่เหลือจากการหมักไวน์ และแมงกานีสซัลเฟต โดยเหตุผลที่เลือกศึกษาองค์ประกอบ ๔ ปัจจัยดังกล่าว เนื่องจากเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศและยีสต์ที่เหลือจากการหมักไวน์นั้นเป็นสารแหล่งคาร์บอนและสารแหล่งไนโตรเจนของหัวเชื้อ ตามลำดับ แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารควบคุมค่าความเป็นกรดด่างให้เหมาะสมต่อหัวเชื้อ และแมงกานีสซัลเฟตเป็นแร่ธาตุที่สำคัญในการผลิตกรดแลคติกโดย *Lactobacillus* หมักที่อุณหภูมิที่ ๓๗ องศาเซลเซียส นาน ๗๒ ชั่วโมง เขย่าที่ ๑๕๐ รอบต่อนาที

ตารางที่ ๑ ปัจจัยที่ศึกษาและระดับของแต่ละปัจจัยที่ใช้ใน CCD

ปัจจัยและสัญลักษณ์	ระดับของปัจจัยและความเข้มข้นในแต่ละระดับ				
	-๒	-๑	๐	๑	๒
น้ำตาลรีดิวซ์ (ก./ล.), X_1	๖๐.๐	๘๐.๐	๑๐๐.๐	๑๒๐.๐	๑๔๐.๐
แคลเซียมคาร์บอเนต (ก./ล.), X_2	๓๐.๐	๔๐.๐	๕๐.๐	๖๐.๐	๗๐.๐
ยีสต์ที่เหลือจากการหมักไวน์ (ก./ล.), X_3	๕.๐	๑๐.๐	๑๕.๐	๒๐.๐	๒๕.๐
แมงกานีสซัลเฟต (ก./ล.), X_4	๐.๐๐๐	๐.๐๒๕	๐.๐๕๐	๐.๐๗๕	๐.๑๐๐

ตารางที่ ๒ การวางแผนการทดลองแบบ Central composite design ชนิด ๔ ปัจจัย เพื่อศึกษาผลของน้ำตาลรีดิวซ์ แคลเซียมคาร์บอเนต ยีสต์ที่เหลือจากการหมักไวน์ และแมงกานีสซัลเฟตต่อการผลิตกรดแลคติก

การทดลอง	ปัจจัย			
	X_1	X_2	X_3	X_4
๑	-๑	-๑	-๑	-๑
๒	๑	-๑	-๑	-๑
๓	-๑	๑	-๑	-๑

๔	๑	๑	-๑	-๑
๕	-๑	-๑	๑	-๑
๖	๑	-๑	๑	-๑
๗	-๑	๑	๑	-๑
๘	๑	๑	๑	-๑
๙	-๑	-๑	-๑	๑
๑๐	๑	-๑	-๑	๑
๑๑	-๑	๑	-๑	๑
๑๒	๑	๑	-๑	๑
๑๓	-๑	-๑	๑	๑
๑๔	๑	-๑	๑	๑
๑๕	-๑	๑	๑	๑
๑๖	๑	๑	๑	๑
๑๗	-๒	๐	๐	๐
๑๘	๒	๐	๐	๐
๑๙	๐	-๒	๐	๐
๒๐	๐	๒	๐	๐
๒๑	๐	๐	-๒	๐
๒๒	๐	๐	๒	๐
๒๓	๐	๐	๐	-๒
๒๔	๐	๐	๐	๒
๒๕	๐	๐	๐	๐
๒๖	๐	๐	๐	๐
๒๗	๐	๐	๐	๐
๒๘	๐	๐	๐	๐
๒๙	๐	๐	๐	๐
๓๐	๐	๐	๐	๐
๓๑	๐	๐	๐	๐

โดย x_1, x_2, x_3, x_4 แทนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แคลเซียมคาร์บอเนต ยีสต์ที่เหลือจากการหมักไวน์ และแมงกานีสซัลเฟต ตามลำดับ ตัวเลข -๒, -๑, ๐, ๑, ๒ เป็นรหัสแสดงปริมาณที่เติมของแต่ละปัจจัย ซึ่งค่าของแต่ละปัจจัยแสดงดังตารางที่ ๑

๒.๒ ศึกษาการหมักกรดแลคติก ในถังหมักขนาด ๕ ลิตร

ทดลองหมักกรดแลคติกในถังหมักขนาด ๕ ลิตร (BIOSTAT® B, B Braun) โดยใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้างต้นในระดับขวดเขย่า หมักกรดแลคติกที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส และกวนที่ ๑๕๐ รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก ๆ ๒๔ ชั่วโมง จนครบเวลา ๗๒ ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณกรดแลคติกและน้ำตาลรีดิวซ์เช่นเดียวกับที่อธิบายในระดับฟลาสก์ จากนั้นทดลองหมักกรดแลคติกในถังหมักขนาด ๕ ลิตรโดยเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเป็น ๑๓๐ กรัมต่อลิตร เพื่อให้มีสารแหล่งคาร์บอนที่จะนำไปผลิตกรดแลคติกได้เพิ่มขึ้น อีกทั้งปรับวิธีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างให้มีค่า ๖.๐ คงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก โดยใช้สารละลาย ๑๐M NaOH ทดแทนการใช้แคลเซียมคาร์บอเนต หมักที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส กวนที่ ๑๕๐ รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่างทุก ๆ ๒๔ ชั่วโมงจนครบ ๗๒ ชั่วโมง

- เวลาและสถานที่

เวลา ต.ค. ๒๕๕๓ - ก.ย. ๒๕๕๖ สถานที่ มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ จ.นครปฐม

๓. ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตกรดแลคติก

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญซึ่งส่งผลต่อการเจริญและการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรีย (Wee *et al*., ๒๐๐๖) จากการทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลคติกโดย *L. casei* TISTR ๔๕๓ พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด ๘๒.๕๗ กรัมต่อลิตรที่ ๓๗ องศาเซลเซียส รองลงมาคือที่ ๔๐ องศาเซลเซียส (ตารางที่ ๓) ซึ่งปริมาณกรดที่ผลิตได้ในระดับสูงนี้สอดคล้องกับค่าความเป็นกรดด่างที่มีค่าต่ำถึง ๕.๒๓ และสอดคล้องกับรายงานของ Hofvendahl และ Hägerdal (๒๐๐๐) ซึ่งรายงานว่า *L. casei* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกอยู่ในช่วงระหว่าง ๓๗ – ๔๔ องศาเซลเซียส จากผลการทดลองแม้จะพบว่าที่อุณหภูมิ ๓๐ องศาเซลเซียสมีค่าผลผลิตกรดแลคติกต่อน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้ ($Y_{L/S}$) สูงสุด แต่อุณหภูมิดังกล่าวยังไม่ใช่ค่าที่เหมาะสม เนื่องจากผลิตกรดแลคติกได้ค่อนข้างต่ำเพียง ๖๔.๖๑ กรัมต่อลิตร และเหลือน้ำตาลรีดิวซ์ อยู่ค่อนข้างมากเช่นกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าที่ ๓๐ องศาเซลเซียสนั้น ไม่สามารถส่งเสริมการใช้น้ำตาลและการผลิตกรดแลคติกของหัวเชื้อได้ดีนัก ดังนั้น จึงเลือกอุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทดลองต่อไป

ตารางที่ ๓ ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตกรดแลคติกจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศ หมักโดย *L. casei* TISTR ๔๕๓

อุณหภูมิ (°เซลเซียส)	pH	กรดแลคติก (LA) (ก./ล.)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ก./ล.)	$Y_{L/S}$ (ก. LA/ก. น้ำตาล)
๓๐	๕.๖๓^{b} ± ๐.๑๒	๖๔.๖๑^{c} ± ๐.๘๘	๔๖.๐๒^{c} ± ๐.๗๒	๐.๘๗
๓๔	๕.๖๗^{b} ± ๐.๑๕	๖๔.๙๐^{c} ± ๐.๑๑	๓๓.๐๖^{b} ± ๐.๕๒	๐.๗๕
๓๗	๕.๒๓^{a} ± ๐.๑๕	๘๒.๕๗^{a} ± ๒.๗๕	๑๔.๒๒^{a} ± ๐.๘๑	๐.๗๘
๔๐	๕.๓๓^{a} ± ๐.๑๗	๗๒.๔๐^{b} ± ๑.๓๓	๑๕.๐๖^{a} ± ๐.๘๘	๐.๖๙

หมายเหตุ ๑. ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ยของผลการทดลอง ๓ ซ้ำ

๒. หมักโดยใช้น้ำตาลเริ่มต้น ๑๒๐ กรัมต่อลิตร ระยะเวลา ๗๒ ชั่วโมง เขย่าที่ ๑๕๐ รอบต่อนาที

๓. ^{abcd} ตัวอักษรกำกับที่ต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < ๐.๐๕$) เมื่อเปรียบเทียบภายในคอลัมน์เดียวกันด้วยวิธี DMRT

การศึกษาองค์ประกอบที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมักกรดแลคติกด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง

การศึกษาองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ๔ ปัจจัย คือ น้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศ แคลเซียมคาร์บอเนต ยีสต์ที่เหลือจากการหมักไวน์ และแมงกานีสซัลเฟต เพื่อหาค่าที่เหมาะสม และศึกษาความสัมพันธ์ขององค์ประกอบดังกล่าว ให้ผลการทดลองดังที่แสดงในตารางที่ ๔-๕

ตารางที่ ๔ ปริมาณกรดแลคติกจากการผลทดลองและค่าที่ทำนายได้จากสมการทำนาย ด้วยแผนการทดลองแบบ Central composite design (CCD) ชนิด ๔ ปัจจัย จำนวน ๓๑ การทดลอง

การทดลอง	$X_{๑}$	$X_{๒}$	$X_{๓}$	$X_{๔}$	กรดแลคติก (ก./ล.)	
					ค่าจากการทดลอง	ค่าทำนาย
๑	-๑	-๑	-๑	-๑	๖๔.๕๖	๖๕.๔๙
๒	๑	-๑	-๑	-๑	๗๒.๘๙	๗๘.๖๓
๓	-๑	๑	-๑	-๑	๖๙.๘๓	๗๐.๘๓
๔	๑	๑	-๑	-๑	๘๙.๔๒	๙๑.๗๖
๕	-๑	-๑	๑	-๑	๖๑.๗๘	๗๒.๗๑
๖	๑	-๑	๑	-๑	๘๘.๕๘	๘๙.๓๙
๗	-๑	๑	๑	-๑	๖๗.๖๑	๗๐.๔๘
๘	๑	๑	๑	-๑	๙๐.๕๓	๙๔.๙๕
๙	-๑	-๑	-๑	๑	๗๑.๕๐	๗๑.๑๓
๑๐	๑	-๑	-๑	๑	๘๗.๑๙	๘๙.๓๕
๑๑	-๑	๑	-๑	๑	๗๐.๙๔	๗๕.๑๖
๑๒	๑	๑	-๑	๑	๑๐๘.๐๓	๑๐๑.๑๖
๑๓	-๑	-๑	๑	๑	๖๙.๘๓	๗๒.๕๒
๑๔	๑	-๑	๑	๑	๙๑.๒๒	๙๔.๒๗
๑๕	-๑	๑	๑	๑	๗๐.๖๖	๖๘.๙๗
๑๖	๑	๑	๑	๑	๙๔.๔๒	๙๘.๕๒
๑๗	-๒	๐	๐	๐	๕๕.๒๕	๔๙.๔๙
๑๘	๒	๐	๐	๐	๙๕.๕๒	๙๒.๑๐
๑๙	๐	-๒	๐	๐	๙๓.๗๒	๘๕.๒๘
๒๐	๐	๒	๐	๐	๙๕.๕๓	๙๔.๘๐
๒๑	๐	๐	-๒	๐	๗๘.๕๘	๗๘.๕๔
๒๒	๐	๐	๒	๐	๙๒.๑๙	๘๓.๑๒
๒๓	๐	๐	๐	-๒	๘๙.๙๗	๗๙.๙๘
๒๔	๐	๐	๐	๒	๘๘.๓๑	๘๙.๑๙
๒๕	๐	๐	๐	๐	๙๖.๒๒	๙๗.๕๑
๒๖	๐	๐	๐	๐	๙๖.๕๐	๙๗.๕๑
๒๗	๐	๐	๐	๐	๙๗.๗๕	๙๗.๕๑
๒๘	๐	๐	๐	๐	๙๗.๑๙	๙๗.๕๑
๒๙	๐	๐	๐	๐	๙๘.๐๓	๙๗.๕๑
๓๐	๐	๐	๐	๐	๙๗.๖๑	๙๗.๕๑
๓๑	๐	๐	๐	๐	๙๙.๒๘	๙๗.๕๑

โดย $X_{๑}$, $X_{๒}$, $X_{๓}$, $X_{๔}$ แทนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แคลเซียมคาร์บอเนต ยีสต์ที่เหลือจากการหมักไวน์ และแมงกานีสซัลเฟต ตามลำดับ ตัวเลข -๒, -๑, ๐, ๑, ๒ เป็นรหัสแสดงปริมาณที่เติมของแต่ละปัจจัย ซึ่งค่าของแต่ละปัจจัยแสดงดังตารางที่ ๑

ตารางที่ ๕ ผลการวิเคราะห์โดย Multiple regression analysis

Term	Coefficient	SE Coefficient	T-value	P-value
Constant	๙๗.๕๑๑๔	๒.๓๑๓	๔๒.๑๖๑	๐.๐๐๐
Reducing sugars (x_1)	๑๐.๖๗๑๓	๑.๒๔๙	๘.๕๔๓	๐.๐๐๐
$CaCO_3$ (x_2)	๒.๓๙๖๒	๑.๒๔๙	๑.๙๑๘	๐.๐๗๓
Winery yeast disposal (x_3)	๑.๑๔๕๔	๑.๒๔๙	๐.๙๑๗	๐.๓๗๓
$MnSO_4.H_2O$ (x_4)	๒.๓๐๒๙	๑.๒๔๙	๑.๘๔๔	๐.๐๘๔
x_1^2	-๖.๖๖๘๖	๑.๑๔๔	-๕.๘๒๘	๐.๐๐๐
x_2^2	-๑.๘๕๘๖	๑.๑๔๔	-๑.๖๒๔	๐.๑๒๔
x_3^2	-๔.๑๖๘๖	๑.๑๔๔	-๓.๖๔๓	๐.๐๐๒
x_4^2	-๓.๒๒๙๘	๑.๑๔๔	-๒.๘๒๓	๐.๐๑๒
x_1x_2	๑.๙๔๖๙	๑.๕๓๐	๑.๒๗๓	๐.๒๒๑
x_1x_3	๐.๘๘๕๖	๑.๕๓๐	๐.๕๗๙	๐.๕๗๑
x_1x_4	๑.๒๖๘๑	๑.๕๓๐	๐.๘๒๙	๐.๔๑๙
x_2x_3	-๑.๘๙๑๙	๑.๕๓๐	-๑.๒๓๗	๐.๒๓๔
x_2x_4	-๐.๓๒๙๔	๑.๕๓๐	-๐.๒๑๕	๐.๘๓๒
x_3x_4	-๑.๔๕๘๑	๑.๕๓๐	-๐.๙๕๓	๐.๓๕๕

R-Sq = ๘๙.๓% R-Sq (adj) = ๗๙.๙%

การพิจารณาความสำคัญของปัจจัยต่าง ๆ ที่ศึกษานั้น สามารถพิจารณาได้จากค่า P-value ของปัจจัยนั้น ๆ (Box and Draper, ๒๐๐๗) ซึ่งจากตารางที่ ๕ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ส่งผลต่อการผลิตกรดแลคติกโดย *L. casei* TISTR ๔๕๓ อย่างมีนัยสำคัญ (ค่า P-value < ๐.๐๕) ทั้งนี้ เนื่องจากน้ำตาลรีดิวซ์เป็นสารแหล่งคาร์บอนของหัวเชื้อและเป็นซับสเตรตสำหรับการหมัก จากรายงานของ Adthalungrong และคณะ (๒๐๑๒) น้ำตาลชนิดหลักที่เกิดขึ้นจากการย่อยมันเทศ คือ น้ำตาลกลูโคสมีปริมาณมากกว่าร้อยละ ๙๐ ของน้ำตาลทั้งหมดที่ได้ ซึ่งน้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้ง่าย และจากค่าทางทฤษฎีตามปฏิกิริยาการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม homofermentative นั้น น้ำตาลกลูโคส ๑ โมลจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติก ๒ โมล (Narayanan *et al*., ๒๐๐๔) ดังนั้น การแปรผันปริมาณน้ำตาลจึงส่งผลโดยตรงต่อปริมาณกรดแลคติกที่เกิดขึ้น

ขณะที่ตัวแปรอิสระอีก ๓ ปัจจัยมีค่า P-value สูงกว่า ๐.๐๕ แสดงว่าปัจจัยดังกล่าวไม่ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการผลิตกรดแลคติก เมื่อแปรผันปริมาณในระดับที่กำหนดในแผนการทดลอง โดยอาจเกิดจากอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ที่มีการเติมสารอีกหลายชนิด เช่น เปปโทน สารสกัดจากเนื้อ เป็นต้น ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนและสารที่ส่งเสริมการเจริญชนิดอื่นได้ (Stanbury et al., ๒๐๐๓) ดังนั้นจึงอาจไม่จำเป็นต้องเติมยีสต์ที่เหลือจากการหมักไวน์หรืออาจเติมในปริมาณไม่มากนัก สำหรับแคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งเป็นสารที่มีบทบาทช่วยควบคุมไม่ให้ค่าความเป็นกรดด่างลดต่ำลงมากจนเกินไปเมื่อมีการสร้างกรดเกิดขึ้น แต่ผลจากการทดลอง พบว่า การเติมแคลเซียมคาร์บอเนตระหว่าง ๓๐-๗๐ กรัมต่อลิตรนั้น ไม่ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการผลิตกรดแลคติกเช่นกัน ส่วนผลของแมงกานีสซัลเฟตต่อการผลิตกรดแลคติก พบว่า มีค่า P-value สูงกว่า ๐.๐๕ แม้ว่าแมงกานีสจะเป็นแร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อการผลิตกรดแลคติก เนื่องจากเป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ lactate dehydrogenase มีรายงานว่า *L. casei* และแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่น ๆ บางชนิดต้องการแมงกานีสในปริมาณเล็กน้อย เพื่อให้สามารถผลิตกรดได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Narayanan *et al*., ๒๐๐๔) เนื่องจากแมงกานีสเป็นแร่ธาตุที่มีอยู่โดยธรรมชาติในวัตถุดิบหลายชนิด และบางองค์ประกอบ

ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศ หรือยีสต์ที่เหลือจากการหมักไวน์ก็อาจมีสารดังกล่าวอยู่เพียงพอต่อความต้องการของหัวเชื้อ

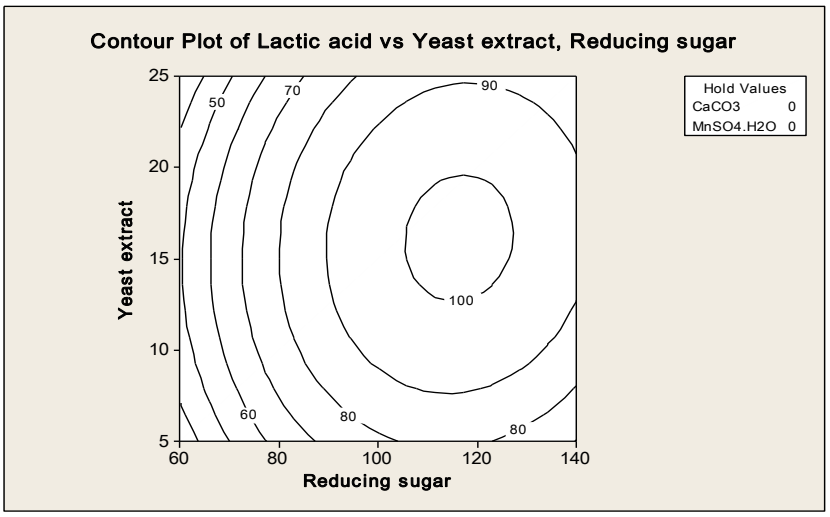
นอกจากนี้ค่า x_i^2 ของ x_1, x_3, x_4 ซึ่งแสดงค่า P-value < ๐.๐๕ ยังชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของปัจจัยต่อการผลิตกรดแลคติกที่เป็นลักษณะสมการกำลังสอง (Quadratic equation) แต่เมื่อพิจารณาถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยที่ศึกษา (x_ix_j) พบว่า ปัจจัยที่ศึกษาทั้งหมดไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน (P-value ของ Interaction effect > ๐.๐๕) (ตารางที่ ๕)

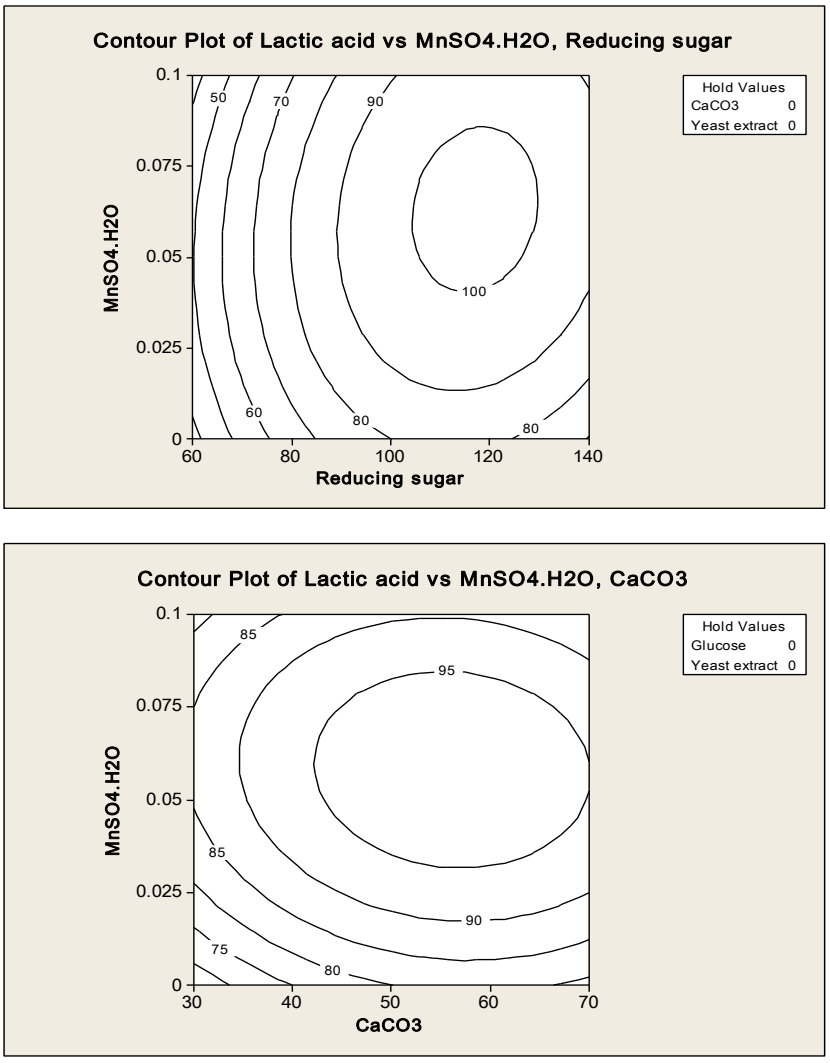
ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิตินี้สามารถสร้างสมการเพื่อทำนายความเข้มข้นของกรดแลคติกที่จะเกิดขึ้นเมื่อใช้ค่าของปัจจัยทั้งสี่ปัจจัยที่ระดับต่างๆ ดังสมการที่ ๒ ซึ่งกำหนดให้ x_1, x_2, x_3, x_4 แทนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แคลเซียมคาร์บอเนต ยีสต์ที่เหลือจากการหมักไวน์ และแมงกานีสซัลเฟต ตามลำดับ และ Y หมายถึงความเข้มข้นของกรดแลคติกที่จะเกิดขึ้น

$$Y = ๙๗.๕๑๑๔+(๑๐.๖๗๑๓x_1)+(๒.๓๙๖๒x_2)+(๑.๑๔๕๔x_3)+(๒.๓๐๒๙x_4)-(๖.๖๖๘๖x_1^2)-(๑.๘๕๘๖x_2^2)-(๔.๑๖๘๖x_3^2)-(๓.๒๒๙๘x_4^2)+(๑.๙๔๖๙x_1x_2)+(๐.๘๘๕๖x_1x_3)+(๑.๒๖๘๑x_1x_4)-(๑.๘๙๑๙x_2x_3)-(๐.๓๒๙๔x_2x_4)-(๑.๔๕๘๑x_3x_4) \quad .....(๒)$$

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติของความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยต่างๆ ที่สนใจศึกษา และค่าการตอบสนองต่อปริมาณกรดแลคติก ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ ๙๕ (P < ๐.๐๕) มีค่า R-Sq = ๘๙.๓% ซึ่งค่า R-Sq ที่ได้บ่งชี้ว่าสมการที่ได้นี้ (สมการที่ ๒) สามารถนำไปใช้ในการอธิบายผลการทดลองได้ใกล้เคียงค่าจริงในค่าการตอบสนองต่อการผลิตกรดแลคติก ๘๙.๓%

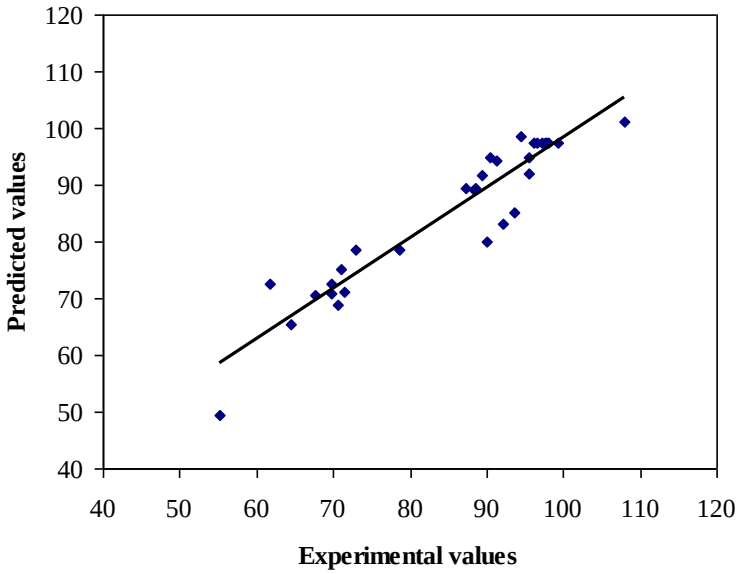
เมื่อนำสมการที่สร้างขึ้นนี้ ไปใช้ในการทำนายความเข้มข้นของกรดแลคติกตามแผนการทดลองต่างๆที่กำหนด มีค่าการทำนายตามที่แสดงไว้ในตารางที่ ๔ โดยผลที่ได้จากการทำนายมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทดลองในทุกๆการทดลอง เมื่อสร้างกราฟ contour plot (ภาพที่ ๑) จากสมการดังกล่าวแล้ว พบว่าค่าที่เหมาะสมของปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ แคลเซียมคาร์บอเนต ยีสต์ที่เหลือจากการหมักไวน์ และแมงกานีสซัลเฟต คือ ๑๑๗.๐๐, ๕๖.๐๐, ๑๖.๐๐ และ ๐.๐๖๔ กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าทำนายผลผลิตกรดแลคติกเท่ากับ ๑๐๔.๑๒ กรัมต่อลิตร เมื่อการทดลองหมักอีกครั้งด้วยภาวะที่เหมาะสมข้างต้น เพื่อตรวจสอบความแม่นยำของการทำนาย พบว่าได้กรดแลคติกจากการทดลอง ๑๐๑.๘๖ กรัมต่อลิตร แสดงว่าสมการที่ได้นี้มีประสิทธิภาพในการทำนายผลที่จะเกิดขึ้นได้ใกล้เคียงค่าจริงมาก





รูปที่ ๑ กราฟ contour plot ที่สร้างจากจากสมการที่ ๒ เพื่อหาค่าที่เหมาะสมของปัจจัยที่ศึกษาสำหรับการผลิตกรดแลคติกโดย *L. casei* TISTR ๔๕

เมื่อนำค่ากรดแลคติกที่ได้จากการทดลองและจากการทำนายมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ในรูปเส้นตรง (รูปที่ ๒) พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก ชี้ให้เห็นถึงประสิทธิภาพของสมการที่สร้างขึ้น



รูปที่ ๒ กรดแลคติกที่ได้จากการทดลองและจากการทำนาย

การหมักกรดแลคติก ในถังหมักขนาด ๕ ลิตร

เมื่อได้ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลคติกในระดับขวดเขย่าแล้ว จึงได้ทดลองในถังหมักขนาด ๕ ลิตร หมักกรดแลคติกที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส กวนที่ ๑๕๐ รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก ๆ ๒๔ ชั่วโมง จนครบเวลา ๗๒ ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียผลิตกรดแลคติกได้ ๑๐๖.๗๒ กรัมต่อลิตร ที่เวลา ๔๘ ชั่วโมง ซึ่งได้ปริมาณกรดใกล้เคียงกันแต่เร็วกว่าการหมักในระดับฟลาสก์ถึง ๒๔ ชั่วโมง เนื่องจากการหมักในถังหมักนั้น สามารถควบคุมสภาวะแวดล้อมได้ดีกว่าในระดับฟลาสก์ ดังเช่น การกวนและอุณหภูมิในการหมัก จึงทำให้การหมักมีประสิทธิภาพที่ดีและใช้เวลาน้อยลง

อย่างไรก็ตาม ปัญหาที่พบระหว่างการหมักทั้งในระดับขวดเขย่าและถังหมักคือ น้ำหมักมีความหนืดเพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อหมักเป็นระยะเวลานาน ดังนั้น การทดลองในระดับถังหมักครั้งต่อมาจึงได้ปรับปรุงวิธีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างให้มีค่า ๖.๐ คงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก โดยใช้สารละลาย ๑๐M NaOH ทดแทนการใช้แคลเซียมคาร์บอเนต พบว่า สามารถกวนได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น และยังได้เพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นเป็น ๑๓๐ กรัมต่อลิตร เพื่อให้มีสารแหล่งคาร์บอนที่จะนำไปผลิตกรดแลคติกได้มากขึ้น ซึ่งพบว่าสามารถผลิตกรดได้สูงขึ้น โดยระหว่าง ๒๔ ชั่วโมงแรกพบอัตราการใช้น้ำตาลสูง และกรดแลคติกถูกสร้างอย่างรวดเร็ว อีกทั้งมีผลผลิตกรดแลคติกต่อชั่วโมง (productivity) สูง หลังจากนั้นในช่วง ๒๔-๔๘ ชั่วโมง แบคทีเรียยังคงผลิตกรดแลคติกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนได้ความเข้มข้น ๑๑๓.๔๒ กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่าผลผลิตกรดแลคติก ๐.๙๕ กรัมของกรดแลคติกต่อ ๑ กรัมของกลูโคสที่ใช้ไป และค่าผลผลิตต่อชั่วโมงที่ ๒.๓๖ กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ ๖) ซึ่งเป็นค่าที่สูงและน่าพอใจ

แต่การยืดระยะเวลาการหมักให้ยาวนานขึ้นเป็น ๗๒ ชั่วโมง พบว่า มีการสร้างกรดเพิ่มขึ้นอีกเพียงเล็กน้อย และค่าผลผลิตกรดแลคติกต่อชั่วโมงต่ำลงอย่างมาก (ตารางที่ ๖) เนื่องจากน้ำตาลถูกใช้หมดไป ดังนั้น เวลา ๔๘ ชั่วโมงจึงเหมาะสมและเพียงพอ เนื่องจากได้ปริมาณกรด ผลผลิตกรดแลคติกต่อน้ำตาลที่ใช้

และผลผลิตกรดแลคติกต่อชั่วโมงในระดับสูงน่าพอใจ สอดคล้องกับการทดลองของ Ray และคณะ (๒๐๐๙) และ Yu และคณะ (๒๐๐๘)

ตารางที่ ๖ การหมักกรดแลคติกในระดับถังหมักขนาด ๕ ลิตร เมื่อหมักโดย *L. casei* TISTR ๔๕๓ ที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส กวนที่ ๑๕๐ รอบต่อนาที น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น ๑๓๐ กรัมต่อลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	กรดแลคติก (LA) (ก./ล.)	น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (ก./ล.)	$Y_{L/S}$ (ก. LA/ก. น้ำตาล)	Productivity (ก. LA/ลิตร/ชั่วโมง)
๒๔	๗๕.๓๖ ± ๑.๗๐	๔๘.๔๒ ± ๐.๗๖	๐.๙๒	๓.๑๔
๔๘	๑๑๓.๔๒ ± ๑.๔๙	๑๐.๔๙ ± ๐.๑๓	๐.๙๕	๒.๓๖
๗๒	๑๑๗.๙๔ ± ๑.๕๓	๐.๐๐ ± ๐.๐๐	๐.๙๑	๑.๖๔

๔. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ภาวะที่เหมาะสมในการหมักกรดแลคติกระดับขวดเขย่า โดยใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยมันเทศและหมักด้วย *L. casei* TISTR ๔๕๓ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลรีดิวซ์ แคลเซียมคาร์บอเนต ยีสต์ที่เหลือทิ้งจากโรงงานผลิตไวน์ และแมงกานีสซัลเฟต ปริมาณ ๑๑๗.๐๐, ๕๖.๐๐, ๑๖.๐๐ และ ๐.๐๖๔ กรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยมีส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้ออื่นๆ ได้แก่ เปปโทน ๑๐.๐ กรัมต่อลิตร สารสกัดจากเนื้อ (meat extract) ๑๒.๐ กรัมต่อลิตร ทวีน ๘๐ ปริมาตร ๑.๐ มิลลิลิตรต่อลิตร ไดแอมโมเนียมซิเตรต ๒.๘๓ กรัมต่อลิตร โซเดียมอะซิเตต ๕.๐ กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต ๐.๒ กรัมต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ ๓๗ องศาเซลเซียส ส่วนการหมักในระดับถังหมักขนาด ๕ ลิตร พบว่า การใช้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น ๑๓๐.๐๐ กรัมต่อลิตร ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ ๖.๐ ด้วยสารละลาย ๑๐M NaOH ตลอดการหมัก และกวนที่ ๑๕๐ รอบต่อนาที โดยควบคุมภาวะอื่นๆ เช่นเดียวกับในระดับขวดเขย่า สามารถให้กรดแลคติกมากถึง ๑๑๓.๔๒ กรัมต่อลิตรภายในเวลา ๔๘ ชั่วโมง หรือ ๒.๓๖ กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

๕. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

– พัฒนาต่อโดยสกัดให้ได้สารที่บริสุทธิ์ขึ้นและนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น พลาสติกย่อยสลายได้ เป็นต้น

– เผยแพร่ในการประชุมวิชาการ International Conference on Global Trends in Academic Research – GTAR-๒๐๑๔ ระหว่างวันที่ ๒-๓ มิถุนายน ที่ Pan Pacific Nirwana, Bali, INDONESIA โดยใช้ชื่อเรื่อง Lactic acid production from sweet potato by *Lactobacillus casei* TISTR ๔๕๓ ได้รับรางวัลผลงานวิจัยดีเด่น และการนำเสนอผลงานดีเด่นจากการประชุมวิชาการดังกล่าว

– ผลิตและพัฒนาบุคลากรทางการศึกษา ส่งเสริมทักษะและแนวทางการทำงานวิจัยให้แก่นักศึกษาระดับปริญญาตรีจำนวน ๒ คน

๖. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนด้านงบประมาณจากกรมวิชาการเกษตร และได้รับการสนับสนุนสถานที่ทดลองและครุภัณฑ์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

๗. เอกสารอ้างอิง

ทิพย์ดรุณี สิทธินาม ณรงค์ แดงเปี่ยม จารุวรรณ บางแวก และปัญญา พุกสุ่น. ๒๕๕๓. การทดสอบพันธุ์มันเทศเพื่ออุตสาหกรรมการผลิตแป้งและเอทานอล. ๓๖-๔๙ น. ใน รายงานผลงานวิจัยประจำปี ๒๕๕๓ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเกษตรกาญจนบุรี อ.เมือง จ.กาญจนบุรี.

Adthalungrong, A., Adthalungrong, C., Sangsuwan, K., and Ruenchon, M. ๒๐๑๒. Production of glucose syrup from sweet potato by enzymatic processes. The ๒๔th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology (Proceedings). Ubon Ratchathani University, Thailand.

Barker, S.B., Summerson, W.H. ๑๙๔๑. The colorimetric determination of lactic acid in biological material. Journal of Biological Chemistry ๑๓๘: ๕๓๕-๕๕๔.

Box, G.E.P and Draper, N.R. ๒๐๐๗. Response Surfaces, Mixtures, and Ridge Analysis. ๒nd edition. New York: John Wiley & Sons.

Bradbury, J.H. and W.D. Holloway. ๑๙๘๘ Chemistry of Tropical Root Crops: Significance for Nutrition and Agriculture in the Pacific. ACIAR Monograph No. ๖, Canberra. ๒๐๑ p.

Duvernay, W.H., M.S. Chinn and G.C. Yencho. ๒๐๑๒. Hydrolysis and fermentation of sweetpotatoes for production of fermentable sugars and ethanol. Industrial Crops and Products, Vol. ๔๒, ๕๒๗-๕๓๗.

Fitzpatrick, J.J., Ahrens, M. and Smith, S. ๒๐๐๑. Effect of manganese on *Lactobacillus casei* fermentation to produce lactic acid from whey permeate. Process Biochemistry ๓๖: ๖๗๑-๖๗๕.

Hofvendahl, K., Hahn-Hägerdal, B. ๒๐๐๐. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. Enzyme and Microbial Technology ๒๖: ๘๗-๑๐๗.

Marchal, L.M. ๑๙๙๙. Partial Enzymatic Hydrolysis of Starch to Maltodextrins on the Laboratory Scale. p ๑๑๙-๑๒๘. In: Carbohydrate Biotechnology Protocols. Edited by C. Bucke. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey.

Miller G.L. ๑๙๕๙. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. ๓๑: ๔๒๖-๔๒๘.

Narayanan N, Roychoudhury PK, Srivastava A. ๒๐๐๔. *L*(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. Electronic Journal of Biotechnology ๗(๒):๑๖๗-๑๗๙. viewed ๑๒ July ๒๐๑๓. <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol๗/issue๒/full/๗/>.

Omemu A.M., I. Akpan, M.O. Bankole and O.D. Teniola. ๒๐๐๕. Hydrolysis of raw tuber starches by amylase of Aspergillus niger AM๐๗ isolated from the soil. African Journal of Biotechnology Vol. ๔ (๑), pp.๑๙-๒๕.

Panda S.H. and R.C. Ray. ๒๐๐๗. Lactic acid fermentation of β-carotene rich sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) into lacto-juice. Plant Food Hum. Nutr. ๖๒: ๖๕-๗๐.

Panda S.H. and R.C. Ray. ๒๐๐๘. Direct conversion of raw starch to lactic acid by *Lactobacillus plantarum* MTCC ๑๔๐๗ in semi-solid fermentation using sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) flour. J. Sci. Ind. Res. ๖๗: ๕๓๑-๕๓๗.

Panda S.H., S.K. Naskar, P.S. Sivakumar and R.C. Ray. ๒๐๐๙. Lactic acid fermentation of anthocyanin-rich sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) into lacto-juice. Int. J. Food Sci. Technol. ๔๔: ๒๘๘-๒๙๖.

Ray, R.C., Sharma, P. and Panda, S.H. ๒๐๐๙. Lactic acid production from cassava fivrous residue using Lactobacillus plantarum MTCC ๑๔๐๗. Journal of Environmental Biology ๓๐:๘๔๗-๘๕๒.

Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B.J., Venkateshwar, M. and Kumar, E.V. ๒๐๐๘. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation-A review. Biotechnology Advances ๒๖: ๒๒-๓๔.

Ruiz M.E., E. Lozano and A. Ruiz. ๑๙๘๑. Utilization of sweet potato (*Ipomoea batata* (L.) Lam) in animal feeding III. Addition of various levels of roots and urea to sweet potato forage silages. Trop. Anim. Prod. ๖:๓, ๒๓๔-๒๔๔.

Sherry X., Xie, Qiang Liu, and Steve W. Cui. ๒๐๐๕. Starch Modification and Applications. p ๓๕๗-๔๐๕. In Food carbohydrates : chemistry, physical properties, and applications Edited by S. W. Cui, CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida

Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J. ๒๐๐๓. Principles of Fermentation Technology. ๒nd edition. Oxford. Butterworth-Heinemann.

Waites M.J., N.L. Morgan, J.S. Rockey and G. Higton. ๒๐๐๑. Industrial Microbiology: An Introduction. Oxford: Blackwell Science. ๓๐๔ p.

Wee, Y.J., Kim, J.N., Ryu, H.W. ๒๐๐๖. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. Food Technology and Biotechnology ๔๔(๒): ๑๖๓-๑๗๒.

Yu, L., Lei, T., Ren, X., Pei, X. and Feng, Y. ๒๐๐๘. Response surface optimization of L-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC ๑๔๖๖. Biochemical Engineering Journal ๓๙: ๔๙๖-๕๐๒.