

การคัดเลือกแบบที่เรียและภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดดี-แลกติก

นางสาวนุชบาทิพย์ ประเสริฐศักดิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

BACTERIA SELECTION AND OPTIMAL CONDITIONS FOR D-LACTIC ACID
PRODUCTION

Miss Budsabathip Prasirtsak

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Department of Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกแบคทีเรียและภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดดี-แลคติก
โดย	นางสาวบุษบาทิพย์ ประเสริฐศักดิ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร. ณิชฎา ทองจุล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ ธนาสุภวัฒน์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร. ณิชฎา ทองจุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ ธนาสุภวัฒน์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นาทยา งามโรจนวิชัย)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร. สุวัฒนา พลฤกษ์ศรี)

5272390123 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : D-LACTIC ACID BACTERIA / SCREENING / FERMENTATION

BUDSABATHIP PRASIRTSAK : BACTERIA SELECTION AND OPTIMAL CONDITIONS FOR D-LACTIC ACID PRODUCTION. ADVISOR : NUTTHA THONGCHUL, Ph.D., CO-ADVISOR : PROF. SOMBOON TANASUPAWAT, Ph.D., 156 pp.

In this study, screening of D-lactic acid producing bacteria from Thai natural habitats including soil, tree barks, and small plant roots was performed. Among 136 isolates screened from the natural samples, only 5 isolates produced D-lactic acid whereas the remaining were DL- and L-lactic acid producing bacteria. From bacterial identification, it was found that one isolate (NK26-11) might be novel bacterial genus screened in this work. While the remaining 4 isolates obtained, i.e., SK5-2, CU38-12, CU68-1 and CU72-1 acquired the high similarity percentage to *Sporolactobacillus laevolacticus*, *S. kofuensis*, *S. inulinus* and *S. nakayamae* subsp. *nakayamae*, respectively. Later, the 5 isolates were tested for D-lactic acid fermentation. The results show that only SK5-2 and CU72-1 gave the high D-lactic acid yield and productivity with an acceptable optical purity percentage required in poly (D/L-lactic acid) synthesis. SK5-2, a catalase producing isolate, gave the high optical purity of D-lactate at 99.99 % and the final lactate titer of 97.24 g/L with the corresponding yield and productivity of 81.03 % and 1.35 g/L·h, respectively from the glucose fermentation. CU72-1, a non-catalase producing isolate, produced D-lactate at a bit lower optical purity (98.83%ee) with the final titer of 91.87 g/L, yield of 76.56 %, and productivity of 1.28 g/L·h. Later, SK5-2 and CU72-1 were tested for the ability to use various carbon substrates. It was observed that both SK5-2 and CU72-1 were capable of utilizing sucrose for D-lactic acid production but not as good as when consuming glucose. When using tapioca starch as the sole carbon source, only SK5-2 was able to produce D-lactic acid. With the supplemented glucoamylase during tapioca starch fermentation, both SK-2 and CU72-1 were able to produce D-lactic acid at high final titer compared to that obtained from glucose fermentation. To lower the production cost, yeast extract was substituted by an inexpensive nitrogen source. Peptone was replaced by NH₄Cl. The glucose fermentation supplemented with yeast extract (7.5 g/L) and NH₄Cl (10 g/L) by SK5-2 gave the high lactate titer (123.48 g/L), yield (104.24%), and productivity (1.72 g/L·h) with the optical purity of 99.47%ee. Compared with the control medium containing yeast extract (20 g/L) and peptone (10 g/L), replacing peptone with NH₄Cl at the same concentration gave the higher lactate titer (112.63 g/L), yield (98.48%), productivity (1.56 g/L·h) with 98.34%ee in the glucose fermentation by CU72-1.

Department :.....Biotechnology.....

Student's Signature

Academic Year :.....2011.....

Advisor's Signature.....

Co-advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ณัฐฐา ทองจุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ความรู้ การวางแผนงานวิจัย คำปรึกษาในเรื่องต่างๆ แนวทางการแก้ไขปัญหา ตลอดจนตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จและมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. นาตยา งามโรจนวิชย์ อาจารย์ ดร. กิตตินันท์ โกมลภิส และอาจารย์ ดร. สุวัฒนา พลฤกษ์ศรี กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำ ความรู้ และตรวจสอบการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ Dr. Kentaro Kodama ที่ให้ความรู้และเทคนิคต่างๆในงานวิจัย การวางแผนงานวิจัย และแนวทางการแก้ไขปัญหาของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ และนักวิจัยทุกท่าน ในสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้และสอนวิธีการใช้เครื่องมือวิเคราะห์ต่างๆ ทำให้งานวิจัยฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ นักวิจัย เจ้าหน้าที่ เพื่อนๆ พี่ๆ และ น้องๆ ทุกคนในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ และภาควิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้คำแนะนำ ช่วยเหลืองานวิจัย ตลอดจนคำปรึกษาถึงปัญหาต่างๆในทุกเรื่อง

ขอกราบขอบพระคุณทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ที่สนับสนุนงานวิจัยในเรื่องค่าใช้จ่ายต่างๆ เช่น สารเคมี วัสดุอุปกรณ์ รวมถึงค่าส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ พี่ชาย และทุกคนในครอบครัว ที่คอยเป็นกำลังใจ สนับสนุนด้านการเงิน และช่วยเหลือทุกเรื่องตลอดจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญภาพ	ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ณ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 วิธีดำเนินงานวิจัย	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 กรดแลกติก (Lactic acid)	5
2.2 ประโยชน์ของกรดแลกติก	6
2.3 กระบวนการสังเคราะห์กรดแลกติก	8
2.4 การจัดจำแนกแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก	12
2.5 แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ตามการกระบวนการหมักโดยน้ำตาล.....	15
2.6 แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกแบ่งเป็น 3 กลุ่ม โดยความต่างของแลคเตดดีไฮโดรจีเนส	17
2.7 สกุล <i>Sporolactobacillus</i>	18
2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก	20
2.9 กรดแลกติกในปัจจุบัน	33
2.10 กระบวนการแยกและทำบริสุทธิ์กรดแลกติก	34

บทที่	หน้า
3	อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย 35
	3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี..... 35
	3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย 38
	3.3 วิธีการวิเคราะห์สารตัวอย่าง..... 43
4	ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 46
	4.1 การเก็บตัวอย่างและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความจำเพาะต่อการผลิต กรดดีแลคติกที่มีความบริสุทธิ์เชิงแสงสูง 46
	4.2 ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดดีแลคติกจาก แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยทำการทดลองการหมักในระดับขวดเขย่า 48
	4.3 ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดดีแลคติกจาก แหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นและชนิดที่แตกต่างกัน โดยทำการทดลอง การหมักในระดับขวดเขย่า..... 49
	4.4 ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดดีแลคติกจากแหล่ง ไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นและชนิดที่แตกต่างกัน โดยทำการทดลอง การหมักในระดับขวดเขย่า..... 63
	4.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่ผลิตกรดดีแลคติกที่คัดเลือกได้..... 75
5	สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ..... 83
	รายการอ้างอิง 86
	ภาคผนวก 92
	ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และการเตรียมสารเคมี 93
	ภาคผนวก ข สูตรการคำนวณและข้อมูลผลการทดลอง 102
	ภาคผนวก ค ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียผลิตกรดดีแลคติก 151
	ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 156

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของกรดแลกติก	6
2.2	ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก.....	8
2.3	แบคทีเรียที่มีชนิดไอโซเมอร์ที่แตกต่างกัน.....	18
2.4	แบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่มีชนิดไอโซเมอร์และกระบวนการหมักที่แตกต่างกัน	20
2.5	การเจริญของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกที่อุณหภูมิต่างๆ	22
2.6	สารควบคุมพีเอชในการหมักกรดแลกติก	23
2.7	การแสดงองค์ประกอบของไนโตรเจนจากแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน	27
2.8	การแสดงองค์ประกอบของกรดอะมิโนจากแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน	27
2.9	แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนจากวัตถุดิบทางการเกษตรสำหรับการผลิตกรดแลกติก	29
2.10	การผลิตกรดดีแลกติกจากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ โดยใช้แหล่งอาหารที่แตกต่างกัน.....	31
4.1	ผลจากการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตกรดดีแลกติก จากตัวอย่างดิน เปลือกไม้และรากไม้ตามสถานที่ต่าง ๆ	46
4.2	การศึกษาคุณลักษณะพื้นฐานรูปร่าง สปอร์ การเจริญที่อุณหภูมิสูง 50 องศาเซลเซียส และผลทดสอบกะตะเลส	47
4.3	สรุปผลการผลิตกรดดีแลกติกจากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย CU72-1.....	53
4.4	สรุปผลการผลิตกรดดีแลกติกจากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย SK5-2	58
4.5	สรุปการเปรียบเทียบกระบวนการหมักกรดดีแลกติกจากแป้งมันสำปะหลังโดย CU72-1และ SK5-2	59
4.6	การเปรียบเทียบงานวิจัยที่ผลิตกรดดีแลกติกโดยแบคทีเรียชนิดต่างๆจากทางเลือกแหล่งคาร์บอนที่หลากหลาย	62
4.7	สรุปผลการผลิตกรดดีแลกติกจากแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน โดย CU72-1...	66

ตารางที่	หน้า
4.8	สรุปผลการผลิตกรดดีแลกติกจากแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน โดย SK5-2..... 71
4.9	การเปรียบเทียบงานวิจัยที่ผลิตกรดดีแลกติกโดยแบคทีเรียต่างชนิดจาก ทางเลือกแหล่งไนโตรเจนที่หลากหลาย..... 74
4.10	ลักษณะความแตกต่างทางพีโนไทป์ของ SK5-2 CU38-12 CU68-1 และ CU72-1 เทียบกับ <i>Sporolactobacillus</i> species..... 77
4.11	ลักษณะความแตกต่างทางพีโนไทป์ของ NK26-11 เทียบกับ <i>Scopulibacillus</i> species..... 82
ข.1	คุณสมบัติของไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากการเก็บตัวอย่างตามแหล่งธรรมชาติ ครั้งที่ 1..... 103
ข.2	คุณสมบัติของไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากการเก็บตัวอย่างตามแหล่งธรรมชาติ ครั้งที่ 2..... 103
ข.3	คุณสมบัติของไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากการเก็บตัวอย่างตามแหล่งธรรมชาติ ครั้งที่ 3..... 104
ข.4	คุณสมบัติของไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากการเก็บตัวอย่างตามแหล่งธรรมชาติ ครั้งที่ 4..... 105
ข.5	คุณสมบัติของไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากการเก็บตัวอย่างตามแหล่งธรรมชาติ ครั้งที่ 5..... 106
ข.6	คุณสมบัติของไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากการเก็บตัวอย่างตามแหล่งธรรมชาติ ครั้งที่ 6..... 106
ข.7	คุณสมบัติของไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากการเก็บตัวอย่างตามแหล่งธรรมชาติ ครั้งที่ 7..... 107
ข.8	คุณสมบัติของไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากการเก็บตัวอย่างตามแหล่งธรรมชาติ ครั้งที่ 8..... 108
ข.9	ค่าการผลิตกรดแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ครั้งที่ 1..... 109
ข.10	ค่าการผลิตกรดแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ครั้งที่ 2..... 110
ข.11	ค่าการผลิตกรดแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ครั้งที่ 3..... 112

ตารางที่	หน้า
ข.12	ค่าการผลิตกรดแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ครั้งที่ 4 114
ข.13	ค่าการผลิตกรดแลกติก และความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ครั้งที่ 5 115
ข.14	ค่าการผลิตกรดแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ครั้งที่ 6 116
ข.15	ค่าการผลิตกรดแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ครั้งที่ 7 117
ข.16	ค่าการผลิตกรดแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ครั้งที่ 8 120
ข.17	ค่าการผลิตกรดดีแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากกลูโคสที่ความเข้มข้น 100 120 และ 160 กรัมต่อลิตร โดย CU72-1 122
ข.18	ค่าการผลิตกรดดีแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากซูโครสที่ความเข้มข้น 100 120 และ 160 กรัมต่อลิตร โดย CU72-1 123
ข.19	การเปรียบเทียบการเติมและไม่เติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจาก แป้งมันสำปะหลัง โดย CU72-1 124
ข.20	ค่าการผลิตกรดดีแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแป้งมันสำปะหลัง ที่ความเข้มข้น 100 120 และ 160 กรัมต่อลิตร โดย CU72-1 125
ข.21	ค่าการผลิตกรดดีแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากกลูโคสที่ความเข้มข้น 100 120 และ 160 กรัมต่อลิตร โดย SK5-2..... 126
ข.22	แสดงค่าการผลิตกรดดีแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากซูโครสที่ความ เข้มข้น 100 120 และ 160 กรัมต่อลิตร โดย SK5-2 127
ข.23	การเปรียบเทียบการเติมและไม่เติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจาก แป้งมันสำปะหลัง โดย SK5-2 128
ข.24	ค่าการผลิตกรดดีแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแป้งมันสำปะหลัง ที่ความเข้มข้น 100 120 และ 160 กรัมต่อลิตร โดย SK5-2..... 129
ข.25	ค่าการผลิตกรดดีแลกติก Yield และ Productivity จากกลูโคส ซูโครสและแป้ง มันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 100 120 และ 160 กรัมต่อลิตร โดย CU72-1..... 130

ตารางที่	หน้า
ข.26	ค่าการผลิตกรดดีแลกติก Yield และ Productivity จากกลูโคส ซูโครส และ แป้งมันสำปะหลัง ที่ความเข้มข้น 100 120 และ 160 กรัมต่อลิตร โดย SK5-2 130
ข.27	ค่าการผลิตกรดดีแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแหล่งไนโตรเจนที่มี ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ โดย CU72-1..... 131
ข.28	ปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นที่มีอยู่ในอาหารสำหรับไอโซเลทไม่ผลิตอะเซเตส 134
ข.29	ปริมาณไนโตรเจนสุดท้ายหลังจากกระบวนการหมักกรดดีแลกติกโดย CU72-1 136
ข.30	ค่า Yield และ Productivity จากแหล่งไนโตรเจนที่มีชนิดและความเข้มข้น ต่างๆ โดย CU72-1 139
ข.31	ค่าการผลิตกรดดีแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแหล่งไนโตรเจนที่มี ชนิดและความเข้มข้นต่างๆ โดย SK5-2 140
ข.32	ปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นที่มีอยู่ในอาหารสำหรับไอโซเลทผลิตอะเซเตส 142
ข.33	ปริมาณไนโตรเจนสุดท้ายหลังจากกระบวนการหมักกรดดีแลกติกโดย SK5-2.. 143
ข.34	ค่า Yield และ Productivity จากแหล่งไนโตรเจนที่มีชนิดและความเข้มข้น ต่างๆ โดย SK5-2..... 145
ข.35	ลักษณะความแตกต่างทางฟีโนไทป์ทั้งหมดของ SK5-2 CU38-12 CU68-1 และ CU72-1 เทียบกับ <i>Sporolactobacillus</i> species 146
ข.36	ลักษณะความแตกต่างทางฟีโนไทป์ทั้งหมดของ NK26-11 เทียบกับ <i>Scopulibacillus</i> species 149

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	สูตรโครงสร้างของกรดแลกติก.....	5
2.2	กระบวนการผลิตกรดแลกติกโดยใช้วัตถุดิบแป้งเป็นสารตั้งต้น	12
2.3	การสร้างกรดแลกติกของแบคทีเรียโดยผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม ของไฮโมเฟอร์เมนเททีฟ และเฮเทอร์โรเฟอร์เมนเททีฟ	16
2.4	การสร้างกรดแลกติกของแบคทีเรียโดยผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม เฮเทอร์โรเฟอร์เมนเททีฟ.....	17
2.5	โครงสร้างทางเคมีของแลคโทสเปลี่ยนเป็นกรดแลกติก.....	24
2.6	โครงสร้างทางเคมีของซูโครสเปลี่ยนเป็นกรดแลกติก	25
2.7	การย่อยแป้งเป็น Dextrose และ Maltose เพื่อผลิตกรดแลกติก.....	25
2.8	กระบวนการเมแทบอลิซึมของน้ำตาลเพนโทสของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก	26
2.9	วัฏจักรของพอลิแลกติกแอซิด	33
4.1	การผลิตกรดดีแลกติกของ SK5-2 NK26-11 CU38-12 CU68-1 และ CU72-1....	48
4.2	ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงของแบคทีเรียที่ผลิตกรดดีแลกติกทั้ง 5 ไอโซเลท	49
4.3	แสดงผลของค่า Productivity และ Yield ของแบคทีเรียที่ผลิตกรดดีแลกติก.....	49
4.4	ปริมาณกลูโคสที่เหลือหลังจากกระบวนการหมักกรดดีแลกติกจากแหล่ง กลูโคส ซูโครส และแป้งมันสำปะหลัง ที่ความเข้มข้น 100 120 และ 160 กรัมต่อลิตร โดย CU72-1	50
4.5	ปริมาณน้ำตาลฟรักโทสที่เหลือหลังจากกระบวนการหมักกรดดีแลกติกจาก แหล่งคาร์บอนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย CU72-1.....	50
4.6	การผลิตกรดดีแลกติกจากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดและความเข้มข้น โดย CU72-1	51
4.7	ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง (%ee) จากแหล่งจากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดและ ความเข้มข้น โดย CU72-1.....	51
4.8	ผลของค่า Yield จากแหล่งจากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดและความเข้มข้น โดย CU72-1	52
4.9	ผลของค่า Productivity จากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดและความเข้มข้น โดย CU72-1	52

ภาพที่	หน้า
4.10 ปริมาณกลูโคสที่เหลือหลังจากกระบวนการหมักกรดดีแลกติกจากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย SK5-2	56
4.11 การผลิตกรดดีแลกติกจากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย SK5-2.....	56
4.12 ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง (%ee) จากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย SK5-2	57
4.13 ผลของค่า Yield จากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย SK5-2	57
4.14 ผลของค่า Productivity จากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย SK5-2	58
4.15 ปริมาณกลูโคสที่เหลือหลังจากกระบวนการหมักกรดดีแลกติกจากแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย CU72-1.....	63
4.16 การผลิตกรดดีแลกติกจากแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย CU72-1	64
4.17 ผลของค่า Yield จากแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย CU72-1....	64
4.18 ผลของค่า Productivity จากแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย CU72-1	65
4.19 ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง (%ee) จากแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย CU72-1.....	65
4.20 ปริมาณไนโตรเจนที่ใช้หลังจากกระบวนการหมักกรดดีแลกติกโดย CU72-1	66
4.21 ปริมาณกลูโคสที่เหลือหลังจากกระบวนการหมักกรดดีแลกติกจากแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย SK5-2	68
4.22 การผลิตกรดดีแลกติกจากแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย SK5-2.....	69
4.23 ผลของค่า Yield จากแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย SK5-2	69
4.24 ผลของค่า Productivity จากแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย SK5-2.....	70
4.25 ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง (%ee) จากแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย SK5-2	70
4.26 ปริมาณไนโตรเจนที่ใช้หลังจากกระบวนการหมักกรดดีแลกติกโดย SK5-2.....	71

ภาพที่		หน้า
4.27	การสร้างสปอร์ของ SK5-2.....	76
4.28	การสร้างแผนภูมิ Phylogenetic tree ของทั้ง 4 ไอโซเลท เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน.....	76
4.29	การสร้างสปอร์ของ NK26-11	80
4.30	การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ โดยการสร้างแผนภูมิ Phylogenetic tree ของ NK26-11 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน.....	81

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

สัญลักษณ์	ความหมาย
%	เปอร์เซ็นต์
g	กรัม
kg	กิโลกรัม
mg	มิลลิกรัม
L	ลิตร
ml	มิลลิลิตร
g/L	กรัมต่อลิตร
g/L.h	กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง
M	โมลาร์
h	ชั่วโมง
°C	องศาเซลเซียส
°F	องศาฟาเรนไฮต์
μl	ไมโครลิตร
mm	มิลลิเมตร
mmHg	มิลลิเมตรปรอท
KJ	กิโลจูล
mole	โมล
PCR	Polymerase chain reaction
PDLA	พอลิดีแลกติกแอซิด
PLLA	พอลิแลลแลกติกแอซิด
PLA	พอลิแลกติกแอซิด
rpm	รอบต่อนาที
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid

สัญลักษณ์

%ee

subsp.

sp.

*L.**S.**W.**B.**C.**Leuc.**O.**T.**P.*

β

ความหมาย

ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง

Subspecies

Species

*Lactobacillus**Sporolactoacillus**Weissella**Bifidobacterium**Carnobacterium**Leuconostoc**Oenococcus**Tetragenococcus**Pediococcus*

เบต้า

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันพลาสติกที่ได้จากการสังเคราะห์สารตั้งต้นจากปิโตรเลียมมีการนำมาใช้งานอย่างแพร่หลาย ซึ่งส่งผลกระทบต่อปริมาณที่ลดลงของแหล่งปิโตรเลียมที่มีอยู่ตามธรรมชาติ และยังส่งผลด้านมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม ผลกระทบดังกล่าวเป็นแรงผลักดันให้เกิดงานวิจัยเพื่อหาวัตถุดิบทางเลือกเพื่อนำมาทดแทนพลาสติกจากปิโตรเลียม โดยงานวิจัยที่กำลังเป็นที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่งได้แก่ งานวิจัยด้านพลาสติกชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพอลิแลคติกแอซิด ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพและไม่มีความเป็นพิษ พอลิเมอร์ชนิดนี้ผลิตจากการสังเคราะห์ทางเคมีของกรดแอลหรือดีแลคติกบริสทุธิ์ ที่เรียกว่า พอลิแลคติกแอซิด หรือ PLA โดยที่ผ่านมาได้มีความมุ่งหวังให้มีการนำ PLA ไปใช้ทดแทนพลาสติกที่มาจากปิโตรเคมี เพื่อช่วยลดปัญหาด้านแหล่งวัตถุดิบที่ลดลงและราคาของปิโตรเคมีที่สูงขึ้น และผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม (Bustos และคณะ, 2004; Fukushima และคณะ, 2004; สารโจน์ ศิริศันสนียกุล, 2547) ปัจจัยสำคัญในการสังเคราะห์ PLA คือความบริสุทธิ์เชิงแสงของกรดแลคติกที่ใช้เป็นสารตั้งต้น PLA ที่มีผลต่อการเรียงตัวเชิงโครงสร้างผลึก (Stereocomplex) และอุณหภูมิหลอม (Melting temperature, T_m) ของพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการขึ้นรูปของพอลิเมอร์ชนิดนี้โดยกรดแลคติกที่จะนำไปเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ PLA ควรมีความบริสุทธิ์เชิงแสงมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ (Bustos และคณะ, 2004) ในระยะแรกทีผลิตได้เป็นชนิด PLLA หรือ พอลิแอลแลคติกแอซิด โดยมีมอนอเมอร์ชนิดแอลของกรดแลคติกเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชัน (Polymerization) เนื่องจากกรดแลคติกมีจำหน่ายแพร่หลายในท้องตลาด โดย PLLA ที่สังเคราะห์ได้จะมีอุณหภูมิหลอมที่ 175 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม เมื่อนำกรดดีแลคติกมาสังเคราะห์ร่วมกับกรดแลคติกเป็นพอลิดีแอลแลคติกแอซิด หรือ PDLLA เกิดเป็น Stereocomplex พบว่าสมบัติเชิงโครงสร้างผลึกของพอลิเมอร์ชนิดนี้เด่นกว่า PLLA โดยมีอุณหภูมิหลอมสูงถึง 230 องศาเซลเซียส ซึ่งทำให้สะดวกต่อกระบวนการขึ้นรูป (Calabia และ Tokiwa, 2007) ดังนั้น หากต้องการยกระดับการผลิต PLA ให้สามารถแข่งขันกับพลาสติกจากปิโตรเคมีที่ใช้กันในปัจจุบัน PDLA น่าจะเป็นทางเลือกประการสำคัญในเชิงของสมบัติและคุณภาพของพอลิเมอร์ที่ผลิตได้ และการนำไปประยุกต์ใช้จริงในอุตสาหกรรมการขึ้นรูปโดยหลีกเลี่ยงการปรับเปลี่ยนกระบวนการขึ้นรูปที่มีอยู่แล้วในปัจจุบันให้น้อยที่สุด อย่างไรก็ตาม สารตั้งต้น ได้แก่ มอ

นอเมอร์บริสุทธิชนิดดีของกรดแลกติกหาได้ค่อนข้างยากในปัจจุบัน เนื่องจากยังไม่มีอุตสาหกรรมใดที่ผลิตกรดชนิดนี้ออกเพื่อจำหน่าย อีกทั้งงานวิจัยด้านการผลิตกรดดีแลกติกยังมีอยู่จำนวนไม่มากนัก (Benthin และ Villadsen, 1995; Lee, 2007) โดยงานวิจัยส่วนใหญ่เน้นการหมักกรดดีแลกติกโดยจุลินทรีย์ที่ผ่านการตัดต่อทางพันธุกรรม (Genetically modified microorganism) ซึ่งประเด็นการใช้จุลินทรีย์จำพวกนี้ในทางการค้ายังไม่เป็นที่ยอมรับในกลุ่มสหภาพยุโรป และญี่ปุ่นทำให้การผลิตเชิงการค้าของกรดดีแลกติกโดยจุลินทรีย์จำพวกนี้อาจไม่ได้รับการยอมรับ และเกิดการกีดกีดเชิงการค้าได้ อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ตามธรรมชาติที่มีความจำเพาะต่อการผลิตกรดดีแลกติกยังคงมีอยู่บ้างถึงแม้ว่าจะมีจำนวนไม่มากนักเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะต่อการผลิตกรดแอลแลกติก

ดั่งงานวิจัยด้านการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิตกรดดีแลกติกที่ได้จากตัวอย่างดินของ Yanagida และคณะ (1997) พบแบคทีเรีย 5 สปีชีส์ ที่มีความจำเพาะต่อการผลิตกรดดีแลกติกได้แก่ *Sporolactobacillus inulinus* *S. nakayamae* subsp. *nakayamae* *S. terrae* *S. kofuensis* และ *S. lactosus* นอกจากนี้ Tanasupawat และคณะ (1998) แยกเชื้อจากปลาร้าพบว่า *Leuconostoc* sp. สามารถผลิตกรดดีแลกติกได้ และ De Martinis และ Freitas (2003) ได้คัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตกรดดีแลกติกจากเนื้อ (Brazilian meats) ซึ่งพบว่าเป็นแบคทีเรียชนิด *Leuconostoc* sp.20 ต่อมา Fujita และคณะ (2010) พบ *S. putidus* sp. ได้จากการคัดแยกเชื้อจากน้ำส้มเน่า หลังจากนั้นในปี 2011 Tashiro และคณะ ได้คัดเลือกเชื้อจากคราบสกปรกในอ่างล้างหน้าพบว่าเป็นแบคทีเรียที่สามารถทนอุณหภูมิสูงถึง 50 °C คือ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* QU41 เมื่อศึกษาการผลิตกรดดีแลกติกพบว่า ในปี 2004 Bustos และคณะพบว่า *L. coryniformis* subsp. *torquens* CECT 4129T สามารถผลิตกรดดีแลกติกได้ถึง 58.9 กรัมต่อลิตร จากอาหารที่ประกอบด้วย Corn steep liquor 5 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ 3.6 กรัมต่อลิตร และเปปโทน 10 กรัมต่อลิตร ต่อมา Calabria และ Tokiwa (2007) ศึกษาการหมักกรดดีแลกติกโดย *L. delbrueckii* JCM 1148 จากอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน 3 ชนิด ได้แก่ กากน้ำตาล 119 กรัมต่อลิตร น้ำอ้อย 133 กรัมต่อลิตร และน้ำหัวบีท 105 กรัมต่อลิตร พบว่าได้กรดดีแลกติก 104 118 และ 82 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยกรดดีแลกติกที่ได้มีค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงในช่วง 97.2-98.3 เปอร์เซ็นต์ Fukushima และคณะ (2004) รายงานว่า *L. delbrueckii* LD0028 สามารถผลิตกรดดีแลกติกจากแป้งข้าวเจ้า โดยมีอัตราผลผลิตมากถึง 70 เปอร์เซ็นต์ และความบริสุทธิ์เชิงแสงมากกว่า 97.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วน *S. inulinus* (SI0073 และ SI0074) ให้ผลผลิตกรดดีแลกติกที่มีความบริสุทธิ์เชิงแสงถึง 98.9 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยอื่นๆ ซึ่งให้เห็นว่าเราสามารถใส่แลกโทสเป็นแหล่งคาร์บอนได้อีกด้วย ดังนั้น เราอาจเลือกใช้ผลิตภัณฑ์ที่เหลือจากอุตสาหกรรมซึ่งมีราคาค่อนข้างถูกมาใช้เป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในการหมักกรดแลกติกโดยแบคทีเรียดังกล่าวได้ งานวิจัยของ Fukushima

และคณะ (2004) ซึ่งให้เห็นว่าหากต้องการลดต้นทุนในการหมัก เราสามารถนำแหล่งไนโตรเจนราคา ถูก เช่น สารสกัดจากมอลท์ (Malt extract) น้ำที่ึ่งจากโรงโม่แป้งข้าวโพด (Corn steep liquor) หรือ แป้งถั่วเหลือง (Soybean flour) เพื่อทดแทนปริมาณการใช้สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) หรือ เปปโตน (Peptone)

จากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น ซึ่งให้เห็นว่าเราสามารถคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียจาก ธรรมชาติที่มีความจำเพาะต่อการผลิตกรดแลคติกได้ ดังนั้นจึงสามารถหลีกเลี่ยงการใช้จุลินทรีย์ที่ ผ่านการตัดต่อทางพันธุกรรมในกระบวนการหมักได้ อย่างไรก็ตาม งานวิจัยดังกล่าวยังไม่มีการ กล่าวถึงความบริสุทธิ์เชิงแสงของกรดแลคติกที่ถูกผลิตขึ้นมาจากแบคทีเรียที่คัดเลือกมาได้หรือ ความบริสุทธิ์เชิงแสงของกรดแลคติกที่ได้ยังคงต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานสำหรับการนำไปสังเคราะห์ เป็น PLA (>99.5 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนี้ผลของปัจจัย เช่น อาหาร ภาวะที่เหมาะสมในการหมักที่มี ความสำคัญต่อการหมักในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ ค่าอัตราผลผลิตกรดแลคติก และผลผลิตเชิง ปริมาตรยังไม่ได้มีการศึกษาอย่างครบถ้วน ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์ แบคทีเรียจากธรรมชาติที่มีความจำเพาะต่อการผลิตกรดแลคติก กล่าวคือ ผลิตกรดแลคติกที่มี ความบริสุทธิ์เชิงแสงสูง และทำการศึกษาภาวะที่เหมาะสม ต่อการเจริญและผลิตกรดแลคติกในระ ดับขวดเขย่าเพื่อให้ได้อัตราผลผลิตและผลผลิตเชิงปริมาตรในปริมาณมากจากแหล่งคาร์บอนและ ไนโตรเจนที่หลากหลาย นอกจากนี้ยังทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เพื่อระบุ สายพันธุ์ ทั้งนี้ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะสามารถนำไปประยุกต์เป็นข้อมูลนำร่องเพื่อใช้ในการ พัฒนาอุตสาหกรรมการผลิตกรดแลคติกต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

คัดเลือกแบคทีเรียจากแหล่งธรรมชาติที่มีความจำเพาะต่อการผลิตกรดแลคติกที่มีความ บริสุทธิ์เชิงแสงสูง และหาภาวะการเจริญและสร้างกรดแลคติกที่เหมาะสมของแบคทีเรียที่ คัดเลือกได้ รวมถึงการพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกโดยคัดเลือกจากแหล่งธรรมชาติ และนำมาทำการทดลอง การหมักในระดับขวดเขย่าเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถผลิตกรดแลคติกที่มีค่าความ บริสุทธิ์เชิงแสงสูงและผลิตกรดแลคติกในปริมาณสูง ต่อมาทำการทดลองการหมักในระดับขวด

เขย่าโดยใช้อาหารที่มีความเข้มข้นและชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่แตกต่างกันเพื่อหา
ภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้อัตราผลผลิตและผลผลิตเชิงปริมาณในปริมาณมาก จากนั้นนำแบคทีเรีย
ที่ผ่านการคัดเลือกมาศึกษาหาคุณลักษณะของแบคทีเรียและการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

1.4.1 เก็บตัวอย่างรากพืช เปลือกไม้ ดิน ปุ๋ยอินทรีย์

1.4.2 คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความจำเพาะต่อการผลิตกรดดีแลกติกที่มีความบริสุทธิ์เชิงแสง
สูง

1.4.3 ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดดีแลกติกจากแบคทีเรียที่
คัดเลือกได้ โดยทำการทดลองการหมักในระดับขวดเขย่า

1.4.4 ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดดีแลกติกจากแหล่งคาร์บอนที่
มีความเข้มข้นและชนิดที่แตกต่างกัน โดยทำการทดลองการหมักในระดับขวดเขย่า

1.4.5 ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดดีแลกติกจากแหล่งไนโตรเจน
ที่มีความเข้มข้นและชนิดที่แตกต่างกัน โดยทำการทดลองการหมักในระดับขวดเขย่า

1.4.6 พิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่ผลิตกรดดีแลกติกที่คัดเลือกได้

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

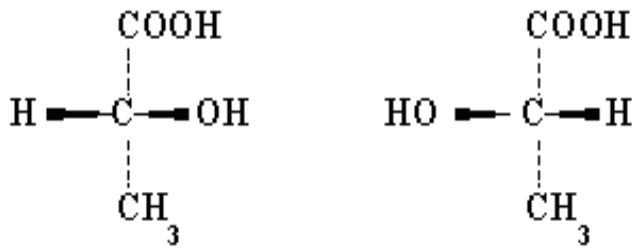
ได้แบคทีเรียที่มีความจำเพาะและทราบภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดดีแลกติกที่มี
ปริมาณและค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงสูง จากแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่แตกต่างกัน และยังสามารถ
บ่งบอกชนิดและคุณลักษณะของแบคทีเรียที่ผลิตกรดดีแลกติก

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 กรดแลกติก (Lactic acid)

กรดแลกติกเป็นกรดอินทรีย์ที่มีชื่อทางเคมีว่า 2-Hydroxypropanoic acid ซึ่งมีสูตรทางเคมี $C_3H_6O_3$ มีน้ำหนักมวลโมเลกุล 90.08 กรดแลกติกมี 2 ไอโซเมอร์ คือ กรดดีแลกติก และกรดแอลแลกติก ซึ่งแตกต่างกันที่การวางตัวของหมู่ไฮดรอกซิลตรงตำแหน่งของไครัลคาร์บอน แสดงดังรูปที่ 2.1 และแบ่งเป็น 3 ชนิด คือ กรดแอลแลกติก กรดดีแลกติก และกรดดีแอลแลกติก กรดแอลแลกติก มีจุดเดือด และจุดหลอมเหลว คือ 82-85 และ 16.8-33 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ในขณะที่กรดดีแลกติก มีจุดเดือด และจุดหลอมเหลวคือ 103 และ 52.8-53.6 องศาเซลเซียส กรดแลกติกสามารถละลายได้ในน้ำ เอทานอล และอะซิโตน แต่ไม่ละลายในคลอโรฟอร์ม ปิโตรเลียมอีเทอร์ และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งคุณสมบัติของกรดแลกติก แสดงดังตารางที่ 2.1 (Budavari และคณะ, 1989; Holten และคณะ, 1971; Reddy และคณะ, 2008)



กรดดี (-) แลกติก

กรดแอล (+) แลกติก

รูปที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของกรดแลกติก

ในทางธรรมชาติจะพบกรดแอลแลกติกได้ง่าย เช่น องค์ประกอบอาหารโดยเฉพาะอย่างยิ่ง กลุ่มอาหารหมักดอง นอกจากนี้กรดแอลแลกติกยังถูกพบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งในร่างกายของมนุษย์และสัตว์ ส่วนกรดดีแลกติกมักพบในปริมาณน้อยตามสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ เพราะกรดชนิดนี้หากมีในปริมาณมากจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของมนุษย์ ทั้งนี้เนื่องจากระบบเมแทบอลิซึมในร่างกายมนุษย์มีความจำเพาะต่อเฉพาะกรดแอลแลกติกเท่านั้น จึงทำให้กรดดีแลกติกที่เกิดและดูดซึมเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์หากไม่สามารถถูกกำจัดได้ และตกค้างอยู่ภายในร่างกายในปริมาณมากอาจก่อให้เกิดอันตรายได้ ดังนั้นองค์การอนามัยโลกจึงมีการกำหนดว่ามนุษย์บริโภค

กรดดีแลกติกได้ไม่เกิน 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักร่างกาย 1 กิโลกรัมต่อวัน (Lee, 2007; สารโจน์ ศิริ สันสนียกุล, 2547)

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของกรดแลกติก

Chemical Abstracts Registration CAS.-Reg.-No	[79-33-4]
สูตรทางเคมี	$C_3H_6O_3$
ชื่อทางเคมี	2-Hydroxy-propanoic acid
มวล โมเลกุล	90.08
ลักษณะทางกายภาพ	Aqueous solution
รสชาติ	รสกรดอ่อน
จุดหลอมเหลว	53 °C/127 °F
จุดเดือด	122 °C at 14 mm Hg
Dissociation Constant, Ka	1.37×10^{-4}
pKa	3.85
Physical state	Colorless to slightly yellow syrupy liquid
Toxicity	Oral rat LD50:3543 mg/kg
NFPA ratings	Health 3 Flammability 1 Reactivity 1
Specific gravity	1.2
Flash point	112 °C
Heat of combustion, ΔH_c	1361 KJ/mole
Specific heat, C_p at 20 °C	190 J/mole/°C

(ที่มา : คัดแปลงจาก Narayanan และคณะ, 2004; Vaidya และคณะ, 2005)

2.2 ประโยชน์ของกรดแลกติก

กรดแลกติกเป็นกรดอินทรีย์ที่มีประโยชน์สามารถนำมาประยุกต์ได้อย่างหลากหลาย เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเวชภัณฑ์ อุตสาหกรรมพลาสติก อุตสาหกรรมตัวทำละลาย และ อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ซึ่งในปัจจุบันมีแนวโน้มความต้องการกรดแลกติกมากขึ้นในแต่ละปี

2.2.1 อุตสาหกรรมอาหาร

กรดแลกติกเป็นองค์ประกอบสำคัญช่วยปรับปรุงรสชาติความเป็นกรด ช่วยป้องกันการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์พวกอาหาร และเครื่องดื่ม เช่น สลัด ผักดอง และเบียร์ ใช้เป็นตัวปรับสภาพความเป็นกรดในอาหาร เนื่องจากรสชาติเป็นกรดอ่อน นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารกันบูดเพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของอาหาร และยังมีคุณสมบัติเป็น Probiotic ที่ช่วยกระตุ้นให้ระบบภูมิคุ้มกันการตอบสนองดีขึ้น โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกรดแลกติกแสดงดังตารางที่ 2.2

2.2.2 อุตสาหกรรมเวชภัณฑ์

อุตสาหกรรมด้านเวชภัณฑ์ เช่น การเตรียมยา การขนส่งยาไปยังเป้าหมายที่ต้องการ การปรับพีเอชสารละลาย ซึ่งในปัจจุบันนิยมมาทำวัสดุอุปกรณ์ปลูกถ่าย เช่น ไหมละลาย อวัยวะเทียม วัสดุปิดแผล ตัวเย็บแผล และอุปกรณ์ยึดกระดูก เนื่องจากพอลิแลกติกแอซิดเป็นพอลิเมอร์ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable) สามารถเข้ากับเนื้อเยื่อได้ ซึ่งถูกนำมาใช้ทางด้านนี้มานานกว่า 2 ทศวรรษ สามารถเป็นวัสดุสำหรับนำพาหรือปลดปล่อยด้วยยาโดยควบคุมอัตราการปลดปล่อยได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.2.3 อุตสาหกรรมพลาสติก

สามารถใช้กรดแลกติกเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตพลาสติกชีวภาพ ที่เรียกว่าพอลิแลกติกแอซิด เพื่อทดแทนพลาสติกที่สังเคราะห์ได้จากแหล่งปิโตรเคมี ในการทำพลาสติกชีวภาพต้องมีค่าความบริสุทธิ์สูงมาก และทนต่ออุณหภูมิสูงได้ เช่น ทนต่อสารละลายกรด ไม่เกิดสีที่อุณหภูมิสูง 180 องศาเซลเซียส เป็นต้น ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้งานได้หลากหลาย เช่น ฟิล์ม กระดาษกันน้ำ ถุง แพ้เมเอกสาร ถาดอาหาร และเปลือกลูกอม ขั้นตอนการทำ Polymerization ต้องได้แลกไทด์ (Lactide) ที่มีความบริสุทธิ์สูงถึง 99 %ee

2.2.4 อุตสาหกรรมตัวทำละลาย

ใช้ทำเป็นตัวทำละลายในผลิตภัณฑ์แลกเกอร์ น้ำยาทาเล็บ หรือผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด เนื่องจากไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม และไม่เกิดการกัดกร่อน

2.2.5 อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง

ใช้ในการควบคุมค่าพีเอช มีคุณสมบัติทำให้ผิวมีความชุ่มชื้นจึงนำมาใช้เป็นองค์ประกอบของครีมทาผิว และมอยเจอร์ไรเซอร์ในเครื่องสำอาง นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการทำงานของ

เอนไซม์ Tyrosinase โดยยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานินที่มีผลต่อความขาวของผิว ใช้ Ethyl lactate เป็นส่วนประกอบในการเตรียมยาต้านสิว (Bustos และคณะ, 2004; Chang และคณะ, 2008; Fukushima และคณะ, 2004; Wee และคณะ, 2006; ศาโรจน์ ศิริสันสนียกุล, 2547)

ตารางที่ 2.2 ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก

ชนิดของผลิตภัณฑ์	แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก
เนย	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
โยเกิร์ต	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>S. thermophilus</i>
นม	<i>L. casei</i> <i>L. acidophilus</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. johnsonii</i> <i>B. lactis</i> <i>B. bifidum</i>
น้ำปลา	<i>L. alimentarius</i> <i>C. piscicola</i>
Sauerkraut	<i>Leuc. mesenteroides</i> <i>L. plantarum</i> <i>P. acidilactici</i>
ซีอิ๊ว	<i>T. halophilus</i>
Sourdough	<i>L. sanfransiscensis</i> <i>L. farciminis</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. brevis</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. amylovorus</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. pontis</i> <i>L. panis</i> <i>L. alimentarius</i> <i>W. cibaria</i>
ไวน์	<i>O. oeni</i>
Rice wine	<i>L. sakei</i>

B., *Bifidobacterium*; *C.*, *Carnobacterium*; *L.*, *Lactobacillus*; *Leuc.*, *Leuconostoc*; *O.*, *Oenococcus*; *P.*, *Pediococcus*; *S.*, *Streptococcus*; *T.*, *Tetragenococcus*; *W.*, *Weissella*
(ที่มา : คัดแปลงจาก Leroy และ Vuyst, 2004)

2.3 กระบวนการสังเคราะห์กรดแลกติก

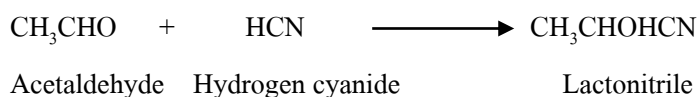
กรดแลกติกสามารถสังเคราะห์ได้ 2 วิธี คือ กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี และ กระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์

2.3.1 กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี

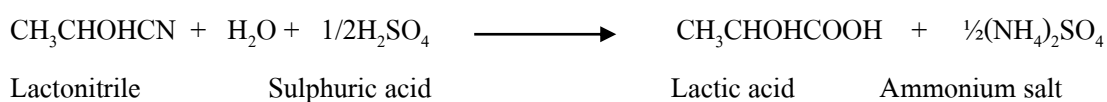
กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีเริ่มจากการที่ Hydrogencyanide ทำปฏิกิริยากับ Acetaldehyde ได้ Lactonitrile ดังขั้นตอนที่ 1 ต่อมาเข้าสู่กระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรด

ซัลฟูริก ได้เป็นกรดแลกติกและเกลือแอมโมเนียม ดังขั้นตอนที่ 2 หลังจากนั้นเข้าสู่กระบวนการทำบริสุทธิ์โดยกระบวนการเอสเทอร์ริฟิเคชัน (Esterification) ด้วย Methanol ได้ Methyl lactate ดังขั้นตอนที่ 3 และผ่านขั้นตอนการไฮโดรไลซิสด้วยน้ำได้กรดแลกติก ดังขั้นตอนที่ 4

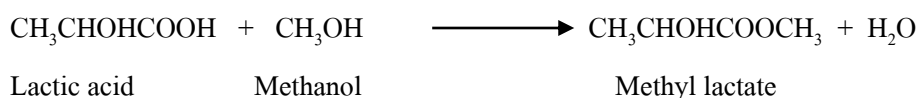
ขั้นตอนที่ 1 : การเติมไฮโดรเจนไซยาไนด์ (Hydrogen cyanide)



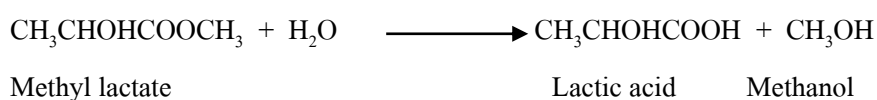
ขั้นตอนที่ 2 : การไฮโดรไลซิสด้วยกรดซัลฟูริก (Hydrolysis by H_2SO_4)



ขั้นตอนที่ 3 : การเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน (Esterification)



ขั้นตอนที่ 4 : การไฮโดรไลซิสด้วยน้ำ (Hydrolysis by H_2O)



ข้อเสียของกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีคือ เกิดภาวะที่รุนแรงในการทำปฏิกิริยา ใช้วัตถุดิบตั้งต้นเป็นพวกแหล่งปิโตรเคมี ซึ่งมีราคาสูง และไม่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้กรดแลกติกที่ผลิตได้อยู่ในรูปของไอโซเมอร์ผสม (Calabia และ Tokiwa, 2007; Wee และคณะ, 2006) กรดแลกติกสามารถสังเคราะห์ทางเคมีได้จากกระบวนการอื่น เช่น ปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำตาลด้วยด่าง ปฏิกิริยาการออกซิเดชันของ Propylene glycol ปฏิกิริยาระหว่าง Acetaldehyde กับคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำภายใต้อุณหภูมิและความดัน และปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิสของ Chloropropionic acid (John และคณะ, 2009)

2.3.2 กระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์

นอกจากการสังเคราะห์กรดแลกติกโดยกระบวนการทางเคมีแล้ว ยังพบว่ายังมีจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดแลกติกซึ่งพบได้ในกลุ่มของราและแบคทีเรีย

2.3.2.1 กระบวนการหมักโดยรา

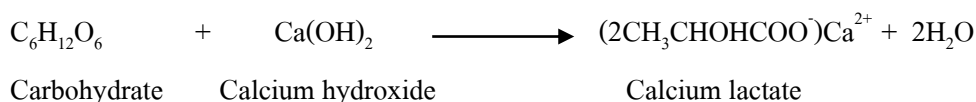
ราที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ เช่น *Rhizopus oryzae* และ *R. arrhizus* ซึ่งอรากลุ่มนี้สามารถผลิตกรดแลกติกบริสุทธิ์ได้จากน้ำตาล และแป้ง ซึ่งเป็นแหล่งวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีราคาถูก นอกจากนี้ยังมีอะไมเลสที่สามารถเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลเพื่อผลิตกรดแลกติก แต่ยังมีข้อเสีย คือต้องการอากาศในการเจริญเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์ ซึ่งก่อให้เกิดการใช้พลังงานจำนวนมากในการให้อากาศจึงส่งผลให้เพิ่มต้นทุนในการผลิต กระบวนการหมักของราเป็นแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (Heterofermentative) สามารถผลิตกรดแลกติก และผลิตภัณฑ์ข้างเคียง เช่น เอทานอล คาร์บอน ไดออกไซด์ และกรดฟumaric อีกด้วย ในการติดตั้งถังหมักของร่าก่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากมีลักษณะรูปร่างเป็นเส้นใย อาจเกิดข้อจำกัดในการขนส่งออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ได้ ส่งผลให้ผลิตกรดแลกติกในปริมาณต่ำ (John และคณะ, 2009) แต่ขั้นตอน Downstream ของร่าง่ายและสะดวกเมื่อเทียบกับแบคทีเรีย (Vaidya และคณะ, 2005)

2.3.2.2 กระบวนการหมักโดยแบคทีเรีย

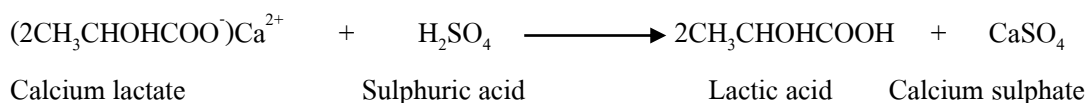
แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกมีคุณสมบัติทนภาวะที่ออกซิเจนน้อยและความเป็นกรดต่ำได้ดี ขั้นตอนการติดตั้งถังหมักของแบคทีเรียค่อนข้างง่ายและไม่ยุ่งยากเหมือนรา เนื่องจากแบคทีเรียมีลักษณะไม่เป็นเส้นใย และไม่ต้องการอากาศเพื่อการเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจึงไม่สิ้นเปลืองงบประมาณในการติดตั้งถังหมัก ในกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ เริ่มจากกระบวนการหมักในแหล่งน้ำตาลและเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์เพื่อควบคุมพีเอช ดังขั้นตอนที่ 1 ต่อมาเข้าสู่กระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยกรดซัลฟิวริก ได้เป็นกรดแลกติกและแคลเซียมซัลเฟต ดังขั้นตอนที่ 2 หลังจากนั้นเข้าสู่กระบวนการทำบริสุทธิ์โดยเอสเตอร์ริฟิเคชัน ด้วย Methanol ได้ Methyl lactate ดังขั้นตอนที่ 3 และผ่านขั้นตอนการไฮโดรไลซิสด้วยน้ำได้กรดแลกติก ดังขั้นตอนที่

4

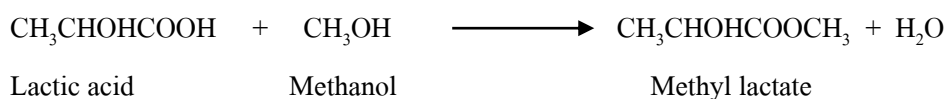
ขั้นตอนที่ 1 : กระบวนการหมักและการควบคุมพีเอช (Fermentation and neutralization)



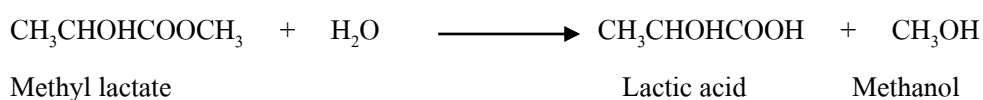
ขั้นตอนที่ 2 : การไฮโดรไลซิสด้วยกรดซัลฟิวริก (Hydrolysis by H₂SO₄)



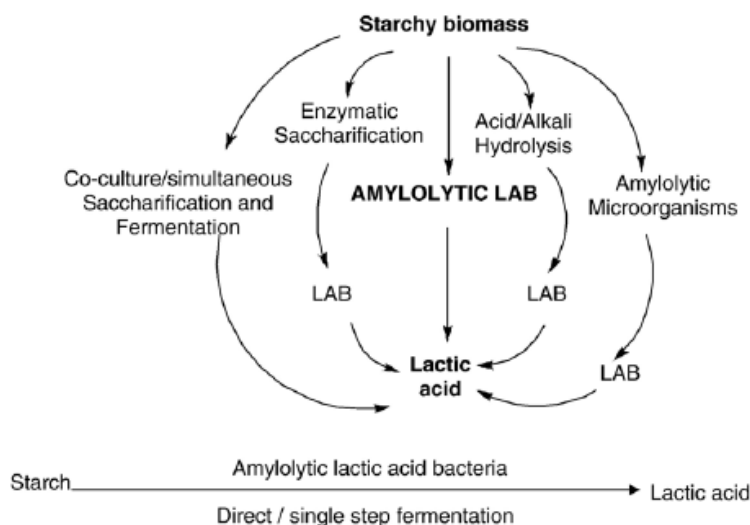
ขั้นตอนที่ 3 : การเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชัน (Esterification)



ขั้นตอนที่ 4 : การไฮโดรไลซิสด้วยน้ำ (Hydrolysis by H₂O)



ในกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์มีข้อดีกว่ากระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากสามารถเลือกใช้วัตถุดิบทางการเกษตรที่เหลือใช้และหลากหลายเป็นสารตั้งต้น เช่น กากน้ำตาล แป้ง เซลลูโลส ซึ่งช่วยลดต้นทุนในการผลิต ขั้นตอนการสังเคราะห์โดยจุลินทรีย์ใช้พลังงานการเผาไหม้ที่ต่ำ นอกจากนี้ยังสามารถให้ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงไอโซเมอร์ชนิดแอลหรือดีแลกติกได้ ในปัจจุบันการผลิตกรดแลกติกประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตได้จากกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ (John และคณะ, 2009; Li และคณะ, 2010) แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกส่วนใหญ่ไม่สามารถย่อยแป้งได้ เนื่องจากไม่มีเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลเพื่อผลิตกรดแลกติก ซึ่งแตกต่างจากราที่มีคุณสมบัติในการใช้แป้งเป็นแหล่งวัตถุดิบได้ แบคทีเรียบางกลุ่มที่สามารถใช้แป้งเป็นแหล่งอาหารเพื่อผลิตกรดแลกติกได้ เนื่องจากมี α -amylases เช่น *Lactobacillus fermentum* *L. amylophilus* *L. plantarum* และ *L. amylovorus* (Reddy และคณะ, 2008) กระบวนการใช้แป้งเป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับการผลิตกรดแลกติก แสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 กระบวนการผลิตกรดแลกติกโดยใช้วัตถุดิบแป้งเป็นสารตั้งต้น (Reddy และคณะ, 2008)

2.4 การจัดจำแนกแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก

แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลกติกจัดอยู่ในไฟลัม (Phylum) ของ *Firmicutes* ซึ่งประกอบไปด้วย *Lactococcus* *Lactobacillus* *Streptococcus* *Leuconostoc* *Pediococcus* *Aerococcus* *Carnobacterium* *Enterococcus* *Oenococcus* *Tetragenococcus* *Vagococcus* และ *Weissella* ส่วนใหญ่ที่พบจะเป็นสกุลของ *Lactobacillus* มีประมาณกว่า 80 สปีชีส์ แบคทีเรียมีลักษณะรูปร่างแท่งหรือกลม แกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่ผลิตคะตะเลส ไม่มีระบบ Cytochrome สามารถทนภาวะที่พีเอชต่ำได้ดี แบคทีเรียกลุ่มนี้ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ที่พีเอช 4.4 และเหมาะสมในช่วงพีเอช 5.5-6.5 เจริญในสภาวะออกซิเจนต่ำ ต้องการอาหารที่สมบูรณ์ รวมถึงวิตามินเสริม กรดอะมิโน เปปไทด์ และกรดนิวคลีอิก เนื่องจากแบคทีเรียมีข้อจำกัดในการสังเคราะห์สิ่งเหล่านี้ ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียไม่ก่อโรคสามารถพบได้ในร่างกาย เช่น ช่องคลอด และเชือบุในท่อทางเดินอาหารสามารถพบได้ตามแหล่งธรรมชาติ เช่น ดิน เปลือกไม้ ชีส อาหารหมักดอง ผลิตภัณฑ์พวกเนื้อหมัก เครื่องในสัตว์ เครื่องดื่ม และนม (Reddy และคณะ, 2008) แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกสามารถจำแนกได้เป็น 12 สกุล ตามคุณลักษณะที่แตกต่างกันได้แก่

2.4.1 *Streptococcus*

เซลล์มีลักษณะรูปร่างกลมหรือรูปไข่ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8-1.2 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นสายโซ่ หรือคู่ ผลิตกรดแลกติก เป็นโฮโมเฟอร์เมนเททิฟ สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20-42 องศาเซลเซียส มี mol %G+C ระหว่าง 34 -46 % (Hardie และ Whiley, 1995)

2.4.2 *Vagococcus*

เป็นแบคทีเรียที่สามารถเคลื่อนที่ได้ ยกเว้นบางสายพันธุ์ ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *Vagococcus fluvialis* ซึ่งเดิมอยู่ใน *Streptococcus* และ *V. salmoninarum* (Stlies และ Holzappel, 1997)

2.4.3 *Lactococcus*

เซลล์มีลักษณะรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 - 1 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวเป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ผลิตรกรดแลคติก สามารถพบได้ใน ผักกาด ถั่ว และ หน่อ ปัจจุบันประกอบด้วย 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Lactococcus lactis* ssp. *lactic* *Lc. lactis* ssp. *cremoris* *Lc. lactis* ssp. *hordniae* *Lc. garvieae* *Lc. plantarum* *Lc. raffinolactis* และ *Lc. piscium* มี mol %G +C ระหว่าง 34-43 % (Teuber, 1995)

2.4.4 *Enterococcus*

เซลล์มีลักษณะรูปไข่ จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว หรือสายโซ่สั้น ๆ ผลิตรกรดแลคติก สามารถเจริญในช่วงอุณหภูมิ 10 หรือ 45 องศาเซลเซียส ประกอบด้วย 5 กลุ่ม ได้แก่ *Enterococcus faecalis* *Ent. avium* *Ent. gallinarum* และ *Ent. cecorum* มี mol %G+C ระหว่าง 37-40 % (Devriese และ Pot, 1995)

2.4.5 *Pediococcus*

เซลล์มีลักษณะรูปร่างกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36-0.143 ไมครอน แบ่งตัวลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน โดยแบ่งตัวครั้งที่ 2 ในทิศด้านขวามือของครั้งแรก ทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็นเซลล์ 4 เซลล์ติดกันคล้ายจตุรัส (Tetrad formation) ในภาวะไม่มีอากาศ ผลิตรกรดแลคติกชนิด ดีแอลและแอลแลคติก จากกระบวนการหมักโดยกลูโคส ปัจจุบันประกอบด้วย 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Pediococcus acidilactici* *P. damonosus* *P. dextrinicus* *P. inopinatus* *P. parvulus* และ *P. pentosaceus* มี mol %G+C ระหว่าง 34-44 % (Simson และ Taguchi, 1995)

2.4.6 *Tetragenococcus*

การแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* เนื่องจากเดิม คือ สปีชีส์ *P. halophilus* ได้จัดจำแนกใหม่จากการเจริญในอาหารซึ่งมีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 18 % และมีลำดับเบสบน 16s rRNA gene

ใกล้เคียงกับเชื้อสกุล *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าสกุลเดิม (Stlies และ Holzapfel, 1997)

2.4.7 *Aerococcus*

กลุ่มนี้มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *Aerococcus viridians* และ *A. urinae* ซึ่งเปลี่ยนแปลงจาก *P. homari* และ *P. urinae-equi* ตามลำดับ โดย *A. viridians* ทำให้กึ่งลอบสเตอร์เกิดโรคและเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในคน (Stlies และ Holzapfel, 1997)

2.4.8 *Leuconostoc*

เซลล์มีพื้นฐานขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ในอาหารที่มีกลูโคสเซลล์มีลักษณะยัดออกคล้ายกลุ่ม *Lactobacilli* แต่ในน้ำนมเซลล์จะมีรูปร่างกลม การจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว อยู่เป็นคู่หรือเป็นสาย โซ่สั้นถึงปานกลาง ผลิตรกรดแลคติก เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และสารหอมระเหยจากการหมักกลูโคส (Heterofermentative) ช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดอง ปัจจุบันประกอบด้วย 8 สปีชีส์คือ *Leuconostoc mesenteroides* *Leuc. lactis* *Leuc. gelidum* *Leuc. carnosum* *Leuc. pseudomesenteroides* *Leuc. citreum* *Leuc. argentinum* และ *Leuc. fallax* มี mol %G+C ระหว่าง 37-40 % (Dellaglio และคณะ, 1995)

2.4.9 *Oenococcus*

ประกอบด้วยสปีชีส์เดียวคือ *Oenococcus oeni* มีคุณสมบัติการทนกรดและเอทานอลในปริมาณที่สูง (Dellaglio และคณะ, 1995)

2.4.10 *Weissella*

มีลักษณะคล้าย *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* รูปร่างเซลล์เป็นแท่งและกลม แต่มีลักษณะแตกต่างคือ ขาดกรดอะมิโนบางชนิดที่ผนังเซลล์ คือกรดแอสปาทิก และกรดไดอะมิโนพิมิดิก ประกอบด้วยแบคทีเรีย 7 สปีชีส์ ซึ่งเดิมอยู่ในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* คือ *Leuc. paramesenteroides* (*Weissella paramesenteroides*) *Lactobacillus confusus* (*W. confusus*) *Lb. halotolerans* (*W. halotolerans*) *Lb. kandleri* (*W. kandleri*) *Lb. minor* (*W. minor*) และ *Lb. viridescens* (*W. viridescens*) (Stlies และ Holzapfel, 1997)

2.4.11 *Lactobacillus*

เป็นแบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่มใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายด้านฟีโนไทป์ สรีรวิทยาและชีวเคมี เนื่องจากความแตกต่างของ mol %G+C ภายในสูง คือระหว่าง 32- 53 % เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งซึ่งแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ Obligately homofermentative lactobacilli Facultatively heterofermentative lactobacilli และ Obligately heterofermentative lactobacilli

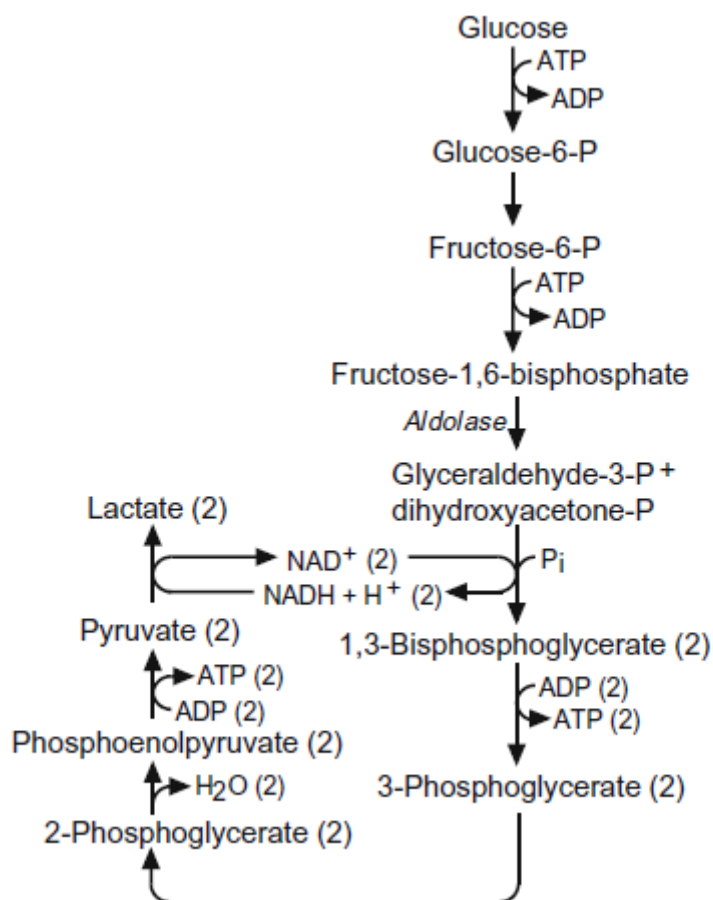
2.4.12 *Carnobacterium*

เซลล์มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อนตรงขนาดสั้นถึงปานกลางหรือเป็นท่อนเรียว (Slender rod) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-0.7 ไมครอน และยาว 1.1-3.0 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ มักไม่พบการเรียงเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลกติก คาร์บอนไดออกไซด์ อะซิติก และเอทานอลจากการหมักเฮกโซส ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ คือ *Carnobacterium divergens* *C. piscicola* *C. mobile* *C. funditum* และ *C. alterfunditum* มี mol %G+C ระหว่าง 31.6 - 37.2 % (Stlies และ Holzapfel, 1997)

2.5 แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกสามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ตามการกระบวนการหมักน้ำตาล

2.5.1 โฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (Homofermentative)

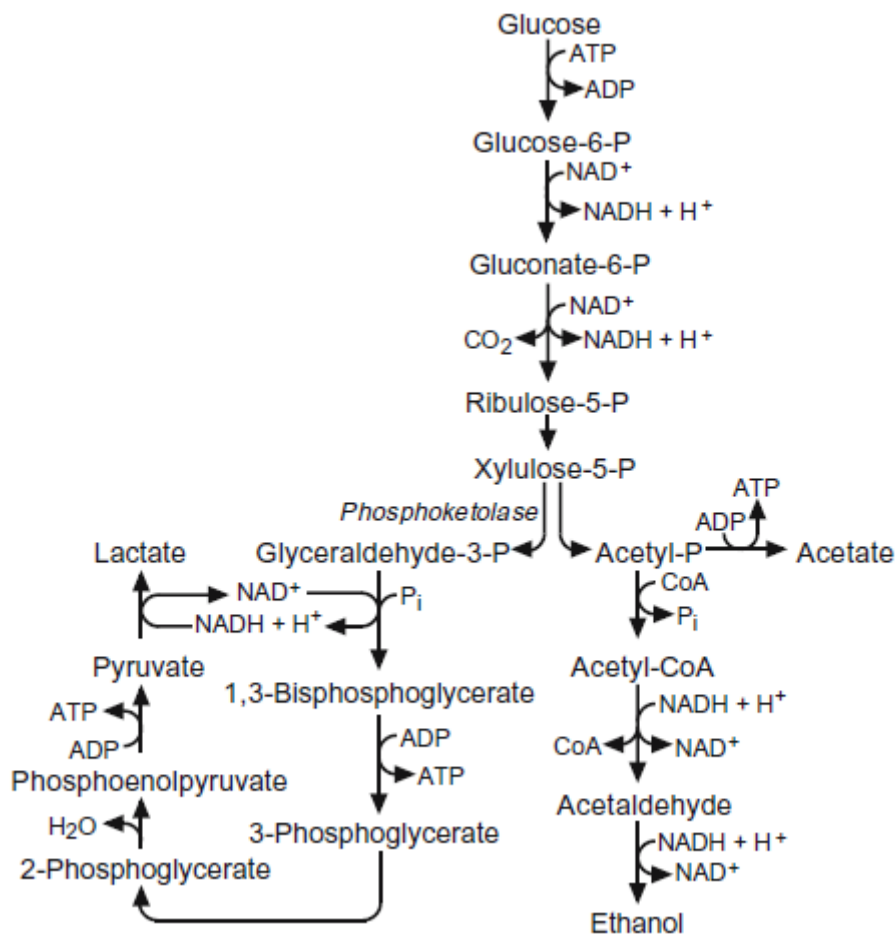
แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่ไม่สามารถใช้เพนโทสหรือกลูโคเนตเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ซึ่งในกระบวนการผลิตได้กรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก โดยเปลี่ยนกลูโคส 1 โมล เป็นกรดแลกติก 2 โมล และพลังงานในรูปของ ATP 2 โมล ในกระบวนการนี้สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงถึง 85-95 % โดยอาศัยปฏิกิริยาไกลโคไลซิส (Glycolysis pathway) ดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 การสร้างกรดแลกติกของแบคทีเรียโดยผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมของโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ

2.5.2 เฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (Heterofermentative)

แบคทีเรียกลุ่มนี้เปลี่ยนกลูโคส 1 โมล เป็นกรดแลกติก 1 โมล เอทานอล 1 โมล คาร์บอนไดออกไซด์ 1 โมล และได้พลังงานในรูปแบบของ ATP เพียงแค่ 1 โมลเท่านั้น จึงทำให้อัตราการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มนี้ต่ำกว่าอัตราการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ ซึ่งในกระบวนการนี้สามารถให้กรดแลกติกประมาณ 50 % โดยอาศัยปฏิกิริยาฟอสโฟลิโตเลส (Phosphoketolase pathway) (Reddy และคณะ, 2008) ดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 การสร้างกรดแลกติกของแบคทีเรียโดยผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมของเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ

2.6 แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกแบ่งเป็น 3 กลุ่ม โดยความต่างของแลคเตตดีไฮโดรจีเนส

แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกสามารถผลิตไอโซเมอร์ได้ 2 ชนิด คือ ดี หรือ แอลแลกติก และมี 3 ชนิดคือ กรดดีแลกติก กรดแอลแลกติก และกรดดีแอลแลกติก ขึ้นอยู่กับเอนไซม์แลคเตตดีไฮโดรจีเนส (Lactate dehydrogenase) ที่มีอยู่ในเซลล์แบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่มีเอนไซม์แอลแลกเตตดีไฮโดรจีเนสจะผลิตไอโซเมอร์ชนิดแอลแลกติก ถ้ามีเอนไซม์ดีแลคเตตดีไฮโดรจีเนสจะผลิตไอโซเมอร์ชนิดดีแลกติก ในแบคทีเรียบางกลุ่มสามารถผลิตไอโซเมอร์ได้ทั้ง 2 ชนิด คือ กรดดีแอลแลกติก เนื่องจากมีทั้งเอนไซม์ดีแลคเตตดีไฮโดรจีเนสและแอลแลกเตตดีไฮโดรจีเนส ตัวอย่างแบคทีเรียที่มีไอโซเมอร์แตกต่างกัน แสดงดังตารางที่ 2.3 (Hofvendahl และ Hagerdal, 2000)

ตารางที่ 2.3 แบคทีเรียที่มีชนิดไอโซเมอร์ที่แตกต่างกัน

กรดดีแลคติก	กรดแอลแลคติก	กรดดีแอลแลคติก
<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. amyamylophilus</i>	<i>L. acidophilus</i>
<i>L. coryniformis</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. helveticus</i>
<i>L. lactis</i>	<i>L. delbrueckii</i>	
<i>L. jensenii</i>	<i>L. casei</i>	
<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. bavaricus</i>	
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. maltaromicus</i>	
<i>Sporolactobacillus</i>		

หมายเหตุ : *L. Lactobacillus*

(ที่มา : คัดแปลงจาก Hofvendahl และ Hagerdal, 2000; สาขาวิชา สิริสัมพันธ์, 2547)

2.7 สกุล *Sporolactobacillus*

นอกจากสกุล *Lactobacillus* แล้วยังพบว่ามีสกุล *Sporolactobacillus* ที่สามารถผลิตกรดดีแลคติกจัดอยู่ใน Phylum *Firmicutes* Class *Bacilli* Order *Bacillales* Family *Sporolactobacillaceae* โดยทั่วไป *Sporolactobacillus* แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง สร้างสปอร์ ไม่ผลิตคะตะเลส การหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททิฟ ผลิตกรดดีแลคติก ส่วนใหญ่สามารถเคลื่อนที่ได้ องค์ประกอบผนังเซลล์ประกอบด้วย *meso*-diaminopimelic acid มี MK-7 องค์ประกอบ Fatty acid เป็น Anteiso และ Iso-branched-chain fatty acid มี mole %G+C ในช่วง 43-50 % ประกอบด้วย *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *nakayamae* *S. nakayamae* subsp. *racemicus* *S. inulinus* *S. terrae* *S. kofuensis* *S. lactosus* *S. laevolacticus* *S. putidus* และ *S. vineae* (Chang และคณะ, 2008; Yanagida และคณะ, 1997)

2.7.1 *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *nakayamae*

สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15-40 °C และที่ความเข้มข้น 3-7 %NaCl ผลิตกรดได้จาก Maltose galactose sucrose trehalose แต่ไม่สามารถผลิตกรดจาก Arabinose ribose xylose rhamnose lactose cellobiose melibiose salicin และ starch มี mole %G+C ในช่วง 43-47 % ซึ่งสามารถแยกเชื้อได้จากดิน (Yanagida และคณะ, 1997)

2.7.2 *Sporolactobacillus terrae*

สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15-40 °C และที่ความเข้มข้น 3-5 %NaCl ผลิตกรดได้จาก Trehalose galactose sucrose และ inulin แต่ไม่สามารถผลิตกรดจาก Ribose xylose rhamnose lactose sorbitol arabinose melibiose และ starch มี mole %G+C ในช่วง 43-46 % สามารถแยกเชื้อได้จากดิน (Yanagida และคณะ, 1997)

2.7.3 *Sporolactobacillus kofuensis*

สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 25-40 °C และที่ความเข้มข้น 3-7 %NaCl ผลิตกรดได้จาก Galactose maltose sucrose raffinose mannitol และ inulin แต่ไม่สามารถผลิตกรดจาก Arabinose ribose xylose rhamnose cellobiose lactose และ sorbitol มี mole %G+C คือ 43 % สามารถแยกเชื้อได้จากดิน (Yanagida และคณะ, 1997)

2.7.4 *Sporolactobacillus lactosus*

สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15-45 °C และที่ความเข้มข้น 3-4 %NaCl ผลิตกรดได้จาก Galactose lactose melibiose trehalose สายพันธุ์นี้ส่วนใหญ่ผลิตกรดได้จาก Maltose sucrose raffinose inulin มี mole %G+C ในช่วง 43-46 สามารถแยกเชื้อได้จากดิน (Yanagida และคณะ, 1997)

2.7.5 *Sporolactobacillus putidus*

โคโลนีมีลักษณะกลมขนาด 1-2 มิลลิเมตร เจริญได้ที่อุณหภูมิ 30-45°C เจริญได้ในช่วงพีเอช 3.5-5.5 ไม่สร้าง Oxidase และคะตะเลส ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรด กรดผลิตได้จาก Galactose D-glucose D-fructose D-mannose mannitol maltose sucrose และ trehalose มีองค์ประกอบ Fatty acid คือ Iso-C16:0 anteiso-C15:0 anteiso-C17:0 มี Menaquinone 7 mole % G+C ในช่วง 47.5 % แยกเชื้อได้จากน้ำส้มบูด (Fujita และคณะ, 2010)

2.7.6 *Sporolactobacillus vineae*

สามารถเจริญได้ในช่วงพีเอช 6-7 เจริญที่อุณหภูมิ 25-40 °C เจริญที่ความเข้มข้น 7 %NaCl สามารถสร้างกรดได้จากกลูโคส Fructose mannose และ sorbitol ไม่สามารถรีดิวซ์ไนเตรด ไม่ผลิตคะตะเลส และออกซิเดส มีองค์ประกอบ Fatty acid คือ Iso-C15:0 anteiso-C15:0 anteiso-C17:0 มี

Menaquinone 7 มี mole %G+C คือ 47.5 % คัดแยกเชื้อได้จากดินในไร่ร่องนจากประเทศเกาหลี (Chang และคณะ, 2008)

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติก

ในกระบวนการผลิตกรดแลกติกโดยจุลินทรีย์นั้นต้องมีการควบคุม และหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเพื่อให้ได้ปริมาณผลผลิต และอัตราการผลิตที่สูง โดยปัจจัยที่มีผลได้แก่ สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ อุณหภูมิ พีเอช และองค์ประกอบอาหาร

2.8.1 สายพันธุ์ของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์สายพันธุ์ดีจะส่งผลให้สร้างผลผลิตในปริมาณที่สูง สายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกควรเป็นประเภทโฮโมเฟอร์เมนเททิฟ ซึ่งมีความสามารถในการผลิตกรดแลกติกสูงถึง 85-95 % เนื่องจากสามารถสร้างพลังงานได้มากถึง 2 โมล ในขณะที่เฮเทอโรเฟอร์เมนเททิฟให้พลังงานแค่ 1 โมล ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 แบคทีเรียผลิตกรดแลกติกที่มีชนิดไอโซเมอร์และกระบวนการหมักที่แตกต่างกัน

สกุลแบคทีเรีย	ชนิดกระบวนการหมัก	ผลิตภัณฑ์หลัก	ชนิดกรดแลกติก
<i>Streptococcus</i>	Homofermentative	Lactate	L
<i>Pediococcus</i>	Homofermentative	Lactate	DL และ L
<i>Thermobacterium</i>	Homofermentative	Lactate	D L และ DL
<i>Streptobacterium</i>	Heterofermentative	Lactate : Acetate (1:1)	D L และ DL
<i>Betabacterium</i>	Heterofermentative	Lactate : Acetate : CO ₂ (1:1:1)	DL
<i>Leuconostoc</i>	Heterofermentative	Lactate : Acetate : CO ₂ (1:1:1)	D
<i>Bifidobacterium</i>	Heterofermentative	Lactate : Acetate (2:3)	L

(ที่มา : สาโรจน์ ศิริสันสนียกุล, 2547)

2.8.2 อุณหภูมิ

ผลของอุณหภูมิมิผลต่อการเจริญ และการผลิตกรดแลกติก แบคทีเรียในกลุ่มของมีโซไฟล์ (Mesophile) สามารถเจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 28-45 องศาเซลเซียส ในขณะที่แบคทีเรียกลุ่มเทอร์โมไฟล์ (Thermophile) เจริญได้ดีในช่วง 45-62 องศาเซลเซียส ดังนั้นถ้าเลือกใช้อุณหภูมิไม่เหมาะสมกับแบคทีเรียแต่ละกลุ่ม อาจส่งผลให้อัตราการผลิตกรดแลกติกต่ำลงได้ โดยทั่วไป อุณหภูมิของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกจะอยู่ในช่วง 37-45 องศาเซลเซียส เช่น *Lactobacillus casei* สามารถผลิตกรดแลกสูงสุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และผลิตกรดแลกติกต่ำลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (Hujanin และ Linko, 1996) จากงานวิจัยของ Tashiro และคณะ (2011) พบว่า *L.delbrueckii* subsp. *lactis* QU 41 เป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกที่อุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงจึงเป็นประโยชน์ต่อการติดตั้งถังหมักเนื่องจากลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ตัวอื่น (Vaidya และคณะ, 2005) ตัวอย่างของแบคทีเรียที่เจริญในอุณหภูมิต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.5

2.8.3 พีเอช (pH)

สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่จะมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอช ในกระบวนการหมักกรดแลกติก จะเกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่าง เนื่องจากเมื่อระยะเวลาผ่านไปจะเกิดการผลิตกรดแลกติก เพิ่มขึ้นส่งผลให้น้ำหมักเกิดภาวะความเป็นกรดมากเกินไป โดยทั่วไปแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกกักยับยั้งการเจริญที่พีเอชต่ำกว่า 4.5 จึงต้องมีการควบคุมพีเอชค่าความเป็นกรดต่างของน้ำหมัก ให้เหมาะสมให้อยู่ในช่วงพีเอช 5.5-6.5 โดยใช้ NH_4OH CaCO_3 หรือ NaOH ดังตารางที่ 2.6 การควบคุมภาวะของพีเอชให้คงที่ และมีความเหมาะสมจะส่งผลให้การผลิตกรดแลกติก Yield และค่า Productivity มีค่าเพิ่มขึ้นและคงที่ตลอดการทดลอง โดยให้ผลผลิตที่ดีกว่าการทดลองในภาวะไม่ควบคุมพีเอช (Hofvendahl และ Hagerdal, 2000; Vaidya และคณะ, 2005)

ตารางที่ 2.5 การเจริญของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกที่อุณหภูมิต่างๆ

สายพันธุ์	อุณหภูมิ	แหล่งคาร์บอน	กรดแลกติก (g/L)	%Yield	Productivity (g/L.h)
<i>L. amylophilus</i> ATCC 49845	28	Starch	29	0.58	0.44
	35	Starch	30	0.60	0.33
<i>L. casei</i> NRRL B-441	30	Glucose	80	0.89	3.2
	37	Glucose	80	0.89	5.6
	45	Glucose	42	0.47	1.2
<i>L. casei</i> NRRL B-441	37	Hydrolysate barley starch	140	0.98	-
	41	Hydrolysate barley starch	117	0.82	-
<i>L. paracasei</i> No 8	30	Sweet sorghum	-	-	1.5
	36	Sweet sorghum	-	-	1.9
	44	Sweet sorghum	-	-	2.2
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 10863	30	Glucose	67	0.74	3.3
	37	Glucose	70	0.78	3.3
	45	Glucose	75	0.83	3.3
<i>Lc. lactis</i> sp. <i>lactis</i> ATCC 19435	30	Maltose	3.2	0.70	1.0
	37	Maltose	4.0	0.80	1.1
	30	Glucose	60	1.3	2.2
	34	Glucose	65	1.5	2.8
	37	Glucose	60	1.5	2.3
	40	Glucose	50	1.2	1.5

หมายเหตุ : *L.*, *Lactobacillus*; *Lc.*, *Lactococcus*

(ที่มา : คัดแปลงจากตาราง Hofvendahl และ Hagerdal, 2000)

ตารางที่ 2.6 สารควบคุมพีเอชในการหมักกรดแลกติก

สายพันธุ์	แหล่งคาร์บอน	pH	สารควบคุมพีเอช	กรดแลกติก (g/L)	%Yield	Productivity (g/L.h)
<i>L. amylophilus</i> ATCC 49845	Glucose	6.5	NaOH	-	-	1.2
	Glucose	7.1	NaOH	-	-	1.0
<i>L. delbrueckii</i> IFO 3534	Cellulose	4.2	CaCO ₃	15	0.30	-
	Cellulose	5.0	CaCO ₃	26	0.52	-
	Cellulose	5.9	CaCO ₃	18	0.36	-
<i>L. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> ATCC 11842	Sorghum	6.5	NH ₃	-	-	2.3
	Sorghum	6.0	NH ₃	-	-	4.5
<i>L. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> ATCC 55163	Whey	6.0	NH ₄ OH	50	0.64	-
<i>L. delbrueckii</i> sp. <i>bulgaricus</i> NRRL B-548	Cellulose	4.2	NH ₄ OH	27	0.27	0.23
	Cellulose	5.0	NH ₄ OH	52	0.58	0.43
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 10863	Glucose	7.5	NH ₄	-	-	17
	Glucose	6.3	NH ₄	-	-	23
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469	Glucose	6.2	CaCO ₃	26	0.81	2.6
<i>Lc. lactis</i> sp. <i>lactis</i> ATCC 19435	Hydrolysate wheat	6.0	NaOH	96	0.76	3.0
<i>Lc. lactis</i> sp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> CNRZ 2125	Lactose + Citrate	5.0	NaOH	7.0	0.13	0.83
	Lactose + Citrate	6.5	NaOH	38	0.73	7.7
<i>L. salivarius</i> sp. <i>salivarius</i> ATCC 11742	Soy molasses	5.6	NaOH	5.5	0.85	-
	Soy molasses	6.4	NaOH	4.9	0.82	-

หมายเหตุ : *L.*, *Lactobacillus*; *Lc.*, *Lactococcus*

(ดัดแปลงจากราย Hofvendahl และ Hagerdal, 2000)

2.8.4 องค์ประกอบอาหาร

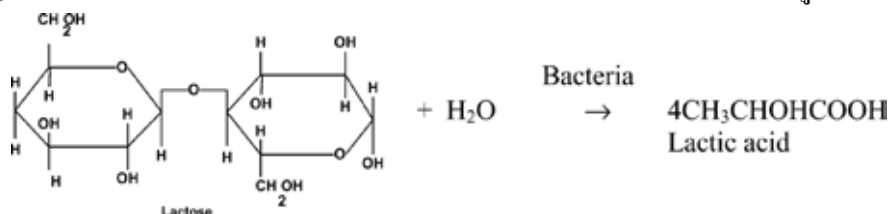
แบคทีเรียจะเจริญและสร้างกรดแลกติกต้องมีอาหารที่สมบูรณ์ซึ่งค่อนข้างซับซ้อน และมีพวกวิตามินเสริม กรดอะมิโน เปปไทด์ เกลือแร่ กรดนิวคลีอิก และกรดไขมัน (Reddy และคณะ, 2008) เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้มีข้อจำกัดในการสร้างวิตามิน และสารบางอย่างที่จำเป็นต่อการเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์เพื่อตัวมันเองได้ แหล่งอาหารพื้นฐานประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนเช่น กลูโคส และสารอาหารไนโตรเจนพวกสารอินทรีย์ เช่น ยีสต์สกัด เปปโทน น้ำแช่ข้าวโพด หรือแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมฟอสเฟต นอกจากนี้ยังต้องการแร่ธาตุต่างๆ เช่น แมกนีเซียม แมงกานีส และเหล็ก เป็นต้น

2.8.4.1 แหล่งคาร์บอน

อาหารพื้นฐานที่ซับซ้อนและสมบูรณ์ส่วนใหญ่มีราคาแพง ดังนั้นเพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตกรดแลกติก จำเป็นต้องหาวัตถุดิบตั้งต้นที่ราคาถูก อุดมสมบูรณ์ และมีขั้นตอนการ Pretreatment ของวัตถุดิบที่ไม่ซับซ้อน ในประเทศไทยพบว่ามีวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตรซึ่งมีราคาถูกและหลากหลาย เช่น ชูโครสจากโรงงานผลิตน้ำตาลทราย หางนมในอุตสาหกรรมนมแป็งจากโรงงานมันสำปะหลังหรือข้าวสาลี หรือจากลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose)

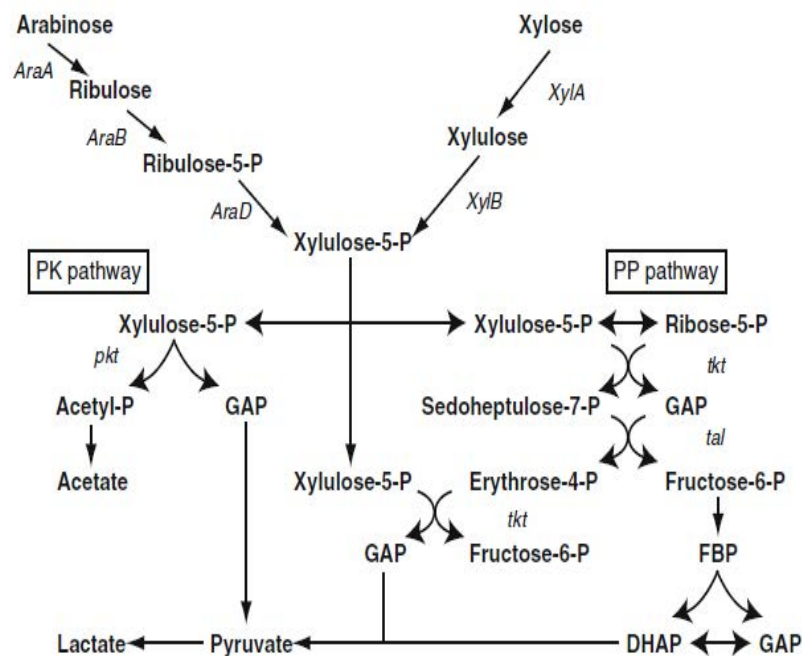
หางนม (Whey)

ในการผลิตกรดแลกติกส่วนใหญ่สามารถใช้หางนม (Whey) เป็นแหล่งวัตถุดิบ ซึ่งได้จากโรงงานอุตสาหกรรมทำชีส ในหางนมประกอบไปด้วย โปรตีน เกลือ และแลคโทส เมื่อถูก Hydrolyzed จะได้องค์ประกอบของกลูโคส และแลคโทส ในกระบวนการหมักกรดแลกติกโดยหางนมเป็นแหล่งคาร์บอนมักใช้ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนของยีสต์สกัด เปปโทน หรือ Corn steep liquor สายพันธุ์ส่วนใหญ่ที่นิยม คือ *Lactobacillus bulgaricus* และ *L. helveticus* (Hofvendahl และ Hagerdal, 2000) โครงสร้างทางเคมีของแลคโทสเปลี่ยนเป็นกรดแลกติก แสดงดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของแลคโทสเปลี่ยนเป็นกรดแลกติก (Vaidya และคณะ, 2005)

ลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบหลักของน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม คือ กลูโคส กาแลกโทส (Galactose) แมนโนส (Mannose) และน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม คือ ไซโลส (Xylose) และ อะราบิโนส (Arabinose) สามารถพบได้ในกระดาษ และองค์ประกอบของจากพวกไม้ (Hofvendahl และ Hagerdal, 2000) การเลือกใช้ลิกโนเซลลูโลส มีข้อดีคือ เป็นแหล่งที่อุดมสมบูรณ์ และราคาไม่แพง แต่แบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนนี้ได้ ต้องผ่านขั้นตอนการ Pretreatment เช่น SSF เนื่องจากลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบของเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบหลัก จำเป็นต้องผ่านการทำ Pretreatment โดยกระบวนการทางกายภาพ เคมี และเอนไซม์ต่างๆ เช่น Endoglucanase cellobiohydrolase และ β -glucosidase (Okano และคณะ, 2010) แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกเลือกใช้น้ำตาล Xylose และ Arabinose แสดงดังรูปที่ 2.8 โดยแบคทีเรียจะเปลี่ยน Xylose เป็นกรดแลกติก และกรดอะซิติก โดยกระบวนการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ Xylose เปลี่ยนไปเป็น Xylulose โดย Xylose isomerase และเปลี่ยนเป็น Xylulose-5-phosphate โดย Xylulokinase สำหรับ Xylulose-5-phosphate เปลี่ยนไปเป็น Glyceraldehyde-3-phosphate และ Acetylphosphate โดย Phosphoketolase ซึ่ง Glyceraldehyde-3-phosphate ถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดแลกติก โดยผ่านกระบวนการฟอสโฟคีโตเลส (Phosphoketolase pathway) (Yoshida และคณะ, 2011)



รูปที่ 2.8 กระบวนการเมแทบอลิซึมของน้ำตาลเพนโทสของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติก (Okano และคณะ, 2010)

2.8.4.2 แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสารอาหารหลักในการผลิตกรดแลกติก โดยปริมาณไนโตรเจน และกรดอะมิโนแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งไนโตรเจน แสดงดังตารางที่ 2.7 และ 2.8 แหล่งไนโตรเจนสารอินทรีย์ เช่น ยีสต์สกัด และเปปโทนมียาราคาแพง จึงจำเป็นต้องหาแหล่งไนโตรเจนอื่นทดแทน เช่น น้ำแช่ข้าวโพด (CSL) ไฮโดรไลเสตของข้าวสาลี (Wheat bran) ถั่วเหลือง โปรตีนไฮโดรไลเสต แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมฟอสเฟต (Hofvendahl และ Hagerdal, 2000) การผลิตกรดแลกติกโดยใช้แหล่งอาหารที่มีองค์ประกอบคาร์บอนและไนโตรเจนที่หลากหลาย แสดงดังตารางที่ 2.9 และ 2.10 ตามลำดับ

ตารางที่ 2.7 การแสดงองค์ประกอบของไนโตรเจนจากแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

แหล่งไนโตรเจน	ไนโตรเจนรวม (%)	α -อะมิโนไนโตรเจน (%)	อะมิโนไนโตรเจน/ไนโตรเจนรวม	ผลิตภัณฑ์
ยีสต์สกัด	9.0	3.0	0.33	ยีสต์
Wheat bran	4.6	1.0	0.21	Wheat
CSL	3.6	1.44	0.4	ข้าวโพด

(ที่มา : Li และคณะ, 2010)

ตารางที่ 2.8 การแสดงองค์ประกอบของกรดอะมิโนจากแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

กรดอะมิโน	ยีสต์สกัด	ไฮโดรไลเสตของข้าวสาลี	CSL
Aspartamine/-ate	6.4	5.08	11.05
Threonine	4.5	0.20	4.57
Serine	6.15	0.44	9.87
Glutamine/-ate	14.45	0.51	7.37
Glycine	24.7	0.73	3.83
Alanine	15.65	0.89	15.03
Cysteine	N/D	1.10	3.98
Valine	9.55	0.44	10.02
Isoleucine	7.55	N/D	4.86
Leucine	16.6	0.20	19.16
Tyrosine	9	0.13	2.51

ตารางที่ 2.8 (ต่อ) การแสดงองค์ประกอบของกรดอะมิโนจากแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

กรดอะมิโน	ยีสต์สกัด	ไฮโดรไลเสตของข้าวสาลี	CSL
Phenylalanine	11.05	0.08	8.10
Histidine	5.75	1.16	6.34
Lysine	10	0.29	6.78
Arginine	10.05	1.86	9.87
Proline	N/D	0.25	11.64

(ที่มา : Li และคณะ, 2010)

ตารางที่ 2.9 แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนจากวัตถุดิบทางการเกษตรสำหรับการผลิตกรดแลกติก

สายพันธุ์	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	กรดแลกติก (กรัมต่อลิตร)	%Yield	Productivity (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	ที่มา
<i>L. delbrueckii</i> <i>sowjieskij</i>	Sucrose	20 %YE	21	1.1	1.0	Hofvendahl และ Hagerdal, 2000
	Sucrose	1%YE + 0.5 %Pep	18	0.90	0.83	
<i>L. acidophilus</i> R	Whey	YE	20	0.34	-	
<i>L. casei</i> NRRL B-441	Glucose	Malt sprouts	93	0.93	2.3	
	Glucose	YE	96	0.96	3.9	
<i>L. delbrueckii</i> <i>sp. bulgaricus</i> ATCC 11842	Wheat flour, SSF	-	18	0.11	0.56	
	Wheat flour, SSF	YE	26	0.18	0.9	
<i>L. delbrueckii</i> <i>sp. delbrueckii</i> ATCC 9649	Glucose	MRS + 1 %YE	58	0.48	0.72	
	Glucose	MRS + 3 %YE	67	0.56	1.4	
<i>L. delbrueckii</i> <i>sp. lactis</i> ATCC 12315	Hydrolysate potato	-	100	1.0	-	
	Hydrolysate potato waste	CSL	93	0.78	-	
<i>L. salivarius</i> <i>sp. salivarius</i> ATCC 11742	Soy	-	4.2	0.76	-	
	Soy molasses	YE	5.5	0.85	-	
<i>L. delbrueckii</i> NRRL-B445	Glucose	YE + NH ₄ SO ₄	23	95.6	0.36	

ตารางที่ 2.9 (ต่อ) แหล่งสารอาหารคาร์บอนและไนโตรเจนจากวัตถุดิบทางการเกษตรสำหรับการผลิตกรดแลกติก

สายพันธุ์	แหล่งคาร์บอน	แหล่งไนโตรเจน	กรดแลกติก (g/L)	%Yield	Productivity (g/L.h)	ที่มา	
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 10863	Hydrolysate wood	YE + Pep	27	0.96	2.3	Hofvendahl และ Hagerdal, 2000	
	Hydrolysate wood, SSF	YE + Pep	29	1.0	1.5		
<i>L. helveticus</i> ATCC 15009	Lactose	MRS	17	0.38	-		
	Whey	-	8.9	0.20	-		
<i>L. paracasei</i> No 8	Sweet sorghum	-	106	0.79	10		
	Sweet sorghum	YE + Pep	91	0.91	10		
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 10863	Hydrolysate molasses, SSF	-	16	0.81	-		
	Hydrolysate molasses, SSF	YE + Pep	14	0.70	-		
<i>L. rhamnosus</i> ATCC 10863	Glucose	0.25 %YE+0.5 %Trp	57	0.81	-		
	Glucose	0.5 %YE+1 %Trp	58	0.95	-		
<i>L. lactis</i> IFO 12007+ <i>Aspergillus</i> <i>awamori</i>	Potato starch	Potato starch		25	0.50		
	Potato starch	YE = Trp	10	0.20	0.43		
<i>L. rhamnosus</i>	Wheat bran hydrolysate	30 g/L CSL	74	0.99	3.75		Li และคณะ, 2009
<i>L. rhamnosus</i>	Glucose	Soytone+Vitamin	125	92	2.27		Kwon และคณะ, 2000
<i>L. delbrueckii</i> NRRL-B445	Glucose	10 g CSL+10 g Peptone	76.71	0.85	-	TE' LLEZ-LUIS และ คณะ, 2003	

ตารางที่ 2.10 การผลิตกรดดีแลกติกจากแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ โดยแหล่งอาหารที่แตกต่างกัน

แบคทีเรีย	แหล่งอาหาร	กรดดีแลกติก (g/L)	Yield (%)	Productivity (g/L.h)	ค่าความบริสุทธิ์ เชิงแสง (%ee)	ที่มา
<i>L. plantarum</i> (Δ ldhLI)	Cellooligosaccharide และ β -glucan	1.38	83.63	0.05	99.5	Okano และคณะ 2010
<i>Corynebacterium glutamicum</i> (<i>IdhA</i> /pCRB204)	Mineral salt	120	-	4	99.99	Okino และคณะ 2008
<i>L. plantarum</i> (Δ ldhLI)	Xylose+Glucose	74.2	78	2.06	99.5	Yoshida และคณะ, 2011
<i>L. plantarum</i> NCIMB8826	Xylose	41.2	0.89	0.69	99.2	Okano และคณะ 2009
<i>L. plantarum</i> strain <i>ldhL1::amyA</i>	Raw corn starch	73.2	-	-	99.6	Okano และคณะ 2009
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> QU41	MRS	87.4	10	0.52	99.9	Tashiro และคณะ, 2011
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> ATCC 25600	Cellulose	24	89	0.5	-	Y'añez และคณะ, 2003
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> IFO 3202	Rice bran	28	78	0.77	95	Tanaka และคณะ, 2006
<i>L. delbrueckii</i> (LD0025)	Maltose	66.6	-	0.93	99.5	Lee, 2007
<i>L. delbrueckii</i> (LD0028)	Maltose	83.5	-	1.16	96.9	Lee, 2007
<i>L. coryniformis</i>	Glucose+CSL+YE +Peptone	58.9	-	0.61	-	Bustos และคณะ, 2004
<i>L. SM18</i>	Glucose+ CSL+ YE	41.42	-	1.29	-	Bolner de Lima และคณะ , 2009
<i>L. delbrueckii</i> HG106	ข้าวที่ไม่ได้ขัดสี + YE	80.24	-	1.14	-	Lu และคณะ , 2009

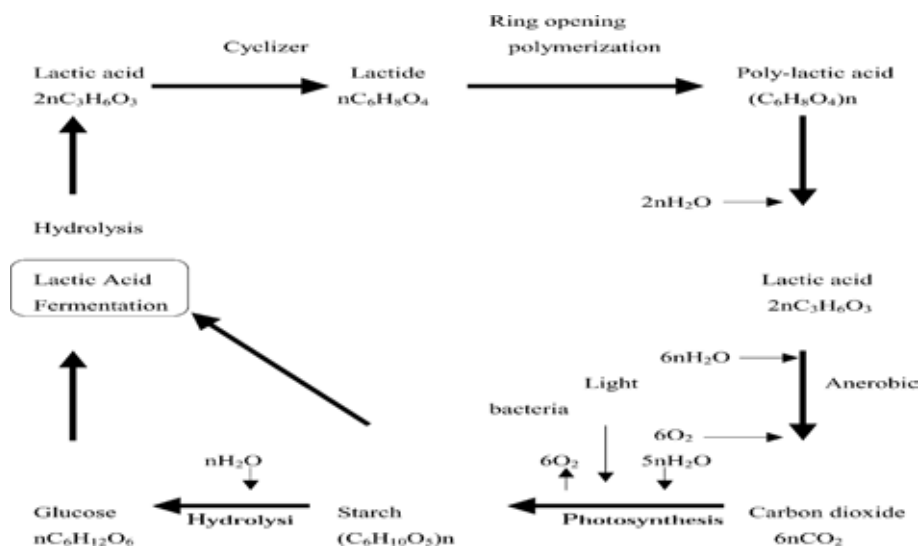
ตารางที่ 2.10 (ต่อ) การผลิตกรดดีแลกติกจากแบคทีเรียซึ่งใช้แหล่งอาหารที่แตกต่างกัน

แบคทีเรีย	แหล่งอาหาร	กรดดีแลกติก (g/L)	Yield (%)	Productivity (g/L.h)	ค่าความบริสุทธิ์ เชิงแสง (%ee)	ที่มา
<i>L. delbrueckii</i> HG106	ข้าวที่ไม่ได้ขัดสี + YE + CSL	74.70	-	1.29	-	Lu และคณะ, 2009
<i>L. delbrueckii</i> HG106	ข้าวที่ไม่ได้ขัดสี + YE + Soy bean meal powder	78.35	-	1.39	-	Lu และคณะ, 2009
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B512	Cheese whey	41.16	-	0.85	-	Coelho และคณะ, 2011
	Molass	38.4	-	0.80	-	
	Sugarcane juice	43.8	-	0.91	-	
	Sugarcane juice + YE	59.2	-	2.3	-	
	Sugarcane juice + CSL	36	-	1.25	-	
<i>L. plantarum</i> Δ ldhL1	Glucose	86.6	89	4.54	99.7	Okano และคณะ, 2010
<i>L. plantarum</i> Δ ldhL1/pCUS α A	Starch	73.2	85	3.86	99.6	
<i>L. plantarum</i> Δ ldhL1-xpk1::tkl	Arabinose	38.6	82	3.78	99.9	
<i>L. plantarum</i> Δ ldhL1-xpk1::tkl- Δ xpk2/pCU-PXylAB	Xylose	41.2	89	1.60	99.2	

2.9 กรดแลกติกในปัจจุบัน

แหล่งฟอสซิลนี้เป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีอยู่อย่างจำกัดในธรรมชาติ ได้ถูกนำมาใช้สร้างพลังงานกระแสไฟฟ้า ความร้อน เชื้อเพลิงในการขนส่ง และพลาสติกสังเคราะห์ จึงก่อให้เกิดการขาดแคลนของแหล่งปิโตรเคมี และเกิดปัญหาภาวะสิ่งแวดล้อม เช่น ภาวะโลกร้อน จึงต้องการหาวัสดุที่ได้จากแหล่งธรรมชาติเพื่อทดแทนพลาสติกที่สังเคราะห์จากแหล่งปิโตรเคมี ทางเลือกในปัจจุบันที่กำลังนิยมได้แก่ พอลิแลกติกแอซิด ผลิตได้จากจุลินทรีย์สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ จึงไม่เป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม (Vaidya และคณะ, 2005) ซึ่งวัฏจักรของพอลิแลกติกแอซิด แสดงดังรูปที่ 2.9

แนวโน้มปัจจุบันความต้องการของกรดแลกติกกำลังเป็นที่ต้องการของท้องตลาดโดยในปี 2010 มีความต้องการกรดแลกติกมากถึง 500,000 เมตริกตันต่อปี กรดแลกติกที่ใช้ในอาหารระดับผู้เกรดที่มีความบริสุทธิ์ 50 เปอร์เซ็นต์ ราคาอยู่ที่ 1.38 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม ถ้ามีความบริสุทธิ์ 88 เปอร์เซ็นต์ ราคาอยู่ที่ 1.54 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม (John และคณะ, 2009) ปริมาณการผลิตกรดแลกติกค่อนข้างต่ำ เนื่องจากมีต้นทุนการผลิตที่สูงจึงส่งผลให้ได้ผลิตภัณฑ์ราคาแพง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการควบคุมจัดการในกระบวนการผลิตพอลิแลกติกแอซิด (Okano และคณะ, 2010)



รูปที่ 2.9 วัฏจักรของพอลิแลกติกแอซิด (Vaidya และคณะ, 2005)

ปัจจัยทางกายภาพของพอลิแลกติกแอซิดขึ้นอยู่กับไอโซเมอร์ของกรดแลกติก เนื่องจากไอโซเมอร์บริสุทธิ์ของกรดแลคติก หรือแอลแลกติก ถูกนำมาสังเคราะห์เป็นพอลิเมอร์ที่เป็นโครงสร้างผลึก

ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการสังเคราะห์พลาสติก (Patil และคณะ, 2006) ปัจจัยสำคัญในการสังเคราะห์ PLA คือความบริสุทธิ์เชิงแสงของกรดแลคติกที่ใช้เป็นสารตั้งต้น PLA ที่มีผลต่อการเรียงตัวเชิงโครงสร้างผลึก (Stereocomplex) และอุณหภูมิหลอมเหลว (Melting temperature, T_m) ของพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการขึ้นรูปของพอลิเมอร์ชนิดนี้โดยกรดแลคติกที่จะนำไปเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ PLA ควรมีความบริสุทธิ์เชิงแสงมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ (Bustos และคณะ, 2004) ในระยะแรกที่ผลิตได้เป็นชนิด PLLA หรือ พอลิแอลแลคติกแอซิด โดยมีมอนอเมอร์ชนิดแอลของกรดแลคติกเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชัน (Polymerization) เนื่องจากกรดแลคติกมีจำหน่ายแพร่หลายในท้องตลาด โดย PLLA ที่สังเคราะห์ได้จะมีอุณหภูมิหลอมที่ 175 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม เมื่อนำกรดแลคติกมาสังเคราะห์ร่วมกับกรดแลคติกเป็นพอลิแอลแลคติกแอซิด หรือ PDLLA เกิดเป็น Stereocomplex พบว่าสมบัติเชิงโครงสร้างผลึกของพอลิเมอร์ชนิดนี้เด่นกว่า PLLA โดยมีอุณหภูมิหลอมสูงถึง 230 องศาเซลเซียส ซึ่งทำให้สะดวกต่อกระบวนการขึ้นรูป ดังนั้นในปัจจุบันจึงสนใจที่จะผลิตกรดแลคติกเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของพอลิแอลแลคติก (Calabia และ Tokiwa, 2007; Lu และคณะ, 2009) สำหรับพอลิแอลแลคติกสามารถพบเห็นได้โดยทั่วไป เช่น วัสดุอุปกรณ์ปลูกถ่าย เหมุด เส้นเอ็น และไหมละลาย เนื่องจากมีความสามารถในการยืดหยุ่น และค่าโมดูลัสที่เหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้งานด้านต่างๆ (Reddy และคณะ, 2008)

2.10 กระบวนการแยกและทำบริสุทธิ์กรดแลคติก

ขั้นตอนการทำ Downstream ของกระบวนการหมักกรดแลคติกค่อนข้างยุ่งยาก และซับซ้อนจึงมีวิธีการแยกและทำบริสุทธิ์ที่หลายขั้นตอน น้ำหมักกรดแลคติกอยู่ในรูปของเกลือแคลเซียมแลคเตต จึงต้องมีการแยกกรดแลคติกออกจากน้ำหมักโดยอาศัยความร้อนเพื่อละลายเกลือแคลเซียมแลคเตตในน้ำหมักก่อน หลังจากนั้นนำมากรองโดยใช้เซลลูโลสอะซิเตตเมมเบรน (Cellulose acetate membrane) เพื่อกำจัดกากเซลล์แบคทีเรีย และเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 78 เปอร์เซ็นต์ เพื่อแยกได้กรดแลคติกกับเกลือแคลเซียมซัลเฟต และนำมากรองเพื่อแยกเกลือแคลเซียมซัลเฟตออกไป ต่อไปนำมาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยการผ่านคอลัมน์แลกเปลี่ยนประจุ (Ion exchange chromatography) หรือการทำเอสเทอร์ฟิเคชัน (Esterification) โดยทำปฏิกิริยากับเมทานอลได้เมทิลแลคเตต หลังจากนั้นผ่านการไฮโดรไลซิสด้วยน้ำเพื่อแยกได้กรดแลคติกและเมทานอล (สาโรจน์ศิริสันสนียกุล, 2547)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัท	ประเทศ
กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)	Alphaphot-2 YS2-H	Nikon	ญี่ปุ่น
เครื่องชั่งแบบละเอียด (Electronic balance)	ML204/01	Mettler Toledo AG	สวิตเซอร์แลนด์
เครื่องชั่งแบบหยาบ (Electronic balance)	ML3002E/01	Mettler Toledo AG	สวิตเซอร์แลนด์
เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter)	AB15	Fisher Scientific, Ltd.	สิงคโปร์
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบ หมุน (Rotary incubator shaker)	G25	New Brunswick Scientific Co., Inc.	สหรัฐอเมริกา
เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer)	K-550-GE	Scientific Industries, Inc	สหรัฐอเมริกา
เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)	KT-40L	ALP Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
เครื่องไฮเปอร์ฟอร์แมนซ์ลิกวิดโคร มาโทกราฟี (High Performance Liquid Chromatography)	Shimadzu LC- 6A	Shimadzu Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar flow hood)	NK system Clean bench	International Scientific Supply	ไทย
ตู้อบแห้ง (Oven)	UL-80	Memmert Co., Ltd.	เยอรมัน
เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)	MC-15A	Tomy Seiko Co., Ltd.	ญี่ปุ่น

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัท	ประเทศ
เครื่องกลั่นไนโตรเจน	K-350	Bushi, Ltd.	สวีตเซอร์แลนด์
PCR	PCR system 2700	Applied Biosystem	สิงคโปร์
Gel electrophoresis	Mupid 0863	Advance Co., Ltd.	ญี่ปุ่น
PCR DNA fragment extraction kit	-	Geneaid Biotech, Ltd.	ไต้หวัน

3.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
Agar (วุ้นผงตราเจีอก)	พัฒนาตินเอ็นเตอร์ไพรส์	ไทย
Calcium carbonate (CaCO ₃)	Sigma	เยอรมัน
Copper sulfate (CuSO ₄ .5H ₂ O)	Fluka	ฝรั่งเศส
Hydrochloric acid (HCl)	Merck	เยอรมัน
Magnesium sulfate (MgSO ₄ .7H ₂ O)	Merck	เยอรมัน
Sodium hydroxide (NaOH)	แกรนด์ เคมีคอล	ไทย
Sulfuric acid (H ₂ SO ₄)	Merck	เยอรมัน
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	สยามชัยเคมีคอล	ไทย
Iron sulfate heptahydrate (FeSO ₄ .7H ₂ O)	Merk	เยอรมัน
Magnesiumsulfate heptahydrate (MgSO ₄ .7H ₂ O)	Riedel-de Haen	เยอรมัน
Potassium phosphate monobasic (KH ₂ PO ₄)	Riedel-de Haen	เยอรมัน
Potassium phosphate dibasic (K ₂ HPO ₄)	Riedel-de Haen	เยอรมัน
Ammonium choride (NH ₄ Cl)	Riedel-de Haen	เยอรมัน
Hydrogenperoxide (H ₂ O ₂)	Merck	เยอรมัน
Sodium choride (NaCl)	Sigma	เยอรมัน
Yeast extract	Bio springer	ฝรั่งเศส
Peptone	Fluka	ฝรั่งเศส
Sucrose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	Sigma	เยอรมัน
Tapioca starch	สยามชัยเคมีคอล	ไทย

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
Phenol (C ₆ H ₆ O)	Carlo Erba	อิตาลี
Lysozyme from hen egg white	Fluka	เบลเยียม
Ethanol (C ₂ H ₆ O)	Merck	เยอรมัน
Sodium dodecyl sulfate (SDS) (NaC ₁₂ H ₂₅ SO ₄)	Fluka	ญี่ปุ่น
Sodium acetate (CH ₃ COONa)	Carlo Erba	อิตาลี
Boric acid (H ₃ BO ₃)	Merck	เยอรมัน
Potassium nitrate (KNO ₃)	Fluka	ฝรั่งเศส
Sorbitol (C ₆ H ₁₄ O ₆)	Fluka	ฝรั่งเศส
Raffinose (C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆)	Fluka	ฝรั่งเศส
Lactose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	Fluka	ฝรั่งเศส
D(+) maltose monohydrate (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ ·H ₂ O)	Fluka	ฝรั่งเศส
D(+) xylose (C ₅ H ₁₀ O ₅)	Fluka	ฝรั่งเศส
D(+) manitol (C ₆ H ₁₄ O ₆)	Fluka	ฝรั่งเศส
D(+) mannose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Fluka	ฝรั่งเศส
D(-) ribose (C ₅ H ₁₀ O ₅)	Sigma	เยอรมัน
D-galactose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Difco	สหรัฐอเมริกา
L(-) sorbose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Sigma	เยอรมัน
L(+) arabinose (C ₅ H ₁₀ O ₅)	Fluka	ฝรั่งเศส
D(+) cellobiose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	Fluka	ฝรั่งเศส
Inulin from dahlia tuber (C _{6n} H _{10n+2} O _{5n+1})	Sigma	ฝรั่งเศส
D(-) fructose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Fluka	ฝรั่งเศส
Ribitol (C ₅ H ₁₂ O ₅)	Fluka	ฝรั่งเศส
D(+) melibiose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	Fluka	ฝรั่งเศส
Dextran (H(C ₆ H ₁₀ O ₅) _x OH)	Sigma	เยอรมัน
Dulcitol (C ₆ H ₁₄ O ₆)	Fluka	ฝรั่งเศส
D(+) arabitol (C ₅ H ₁₂ O ₅)	Wako	ญี่ปุ่น
D(+) trehalose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	Fluka	ฝรั่งเศส
Chloroform (CHCl ₃)	Lab Scan	ไทย

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
Amygdalin ($C_{20}H_{27}NO_{11}$)	Fluka	ฝรั่งเศส
D(+) Melezitose hydrate ($C_{18}H_{32}O_{16} \cdot H_2O$)	Sigma	เยอรมัน
Meso-erythritol ($C_4H_{10}O_4$)	Fluka	ฝรั่งเศส
N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylene diamine dihydrochloride ($C_{10}H_{16}N_2 \cdot 2HCl$)	Fluka	ฝรั่งเศส
L(+) Arginine HCl ($C_6H_{14}N_4O_2 \cdot HCl$)	Sigma	เยอรมัน
Phenol red ($C_{19}H_{14}O_5S$)	May & Baker	อังกฤษ
Ninhydrin ($C_9H_6O_4$)	Merck	เยอรมัน
Bromthymol blue ($C_{27}H_{28}Br_2O_5S$)	BDH	อังกฤษ
Neutral red ($C_{15}H_{17}ClN_4$)	Merk	เยอรมัน
Soluble starch	Univar	ออสเตรเลีย
Agarose	Takara	ญี่ปุ่น
Pyridine (C_5H_5N)	Merck	เยอรมัน

3.2 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.2.1 เก็บตัวอย่างรากพืช เปลือกไม้ ดิน ปุ๋ยอินทรีย์

เก็บตัวอย่างเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกโดยเลือกตัวอย่างจาก ดิน รากพืช เปลือกไม้ที่ผุพัง หรือบริเวณที่มีค่าพีเอชค่อนข้างต่ำ เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้มีความจำเพาะต่อการเจริญในภาวะที่เป็นกรดได้ดี

3.2.2 คัดเลือกแบคทีเรียที่มีความจำเพาะต่อการผลิตกรดดีแลกติกที่มีความบริสุทธิ์เชิงแสงสูง

นำตัวอย่าง 0.25 มิลลิกรัม ใส่ในอาหารเหลว Enrichment (ภาคผนวก ก1.1) แล้วนำไปบ่มที่ภาวะไร้อากาศ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 วัน ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อลงในอาหารร่วน GYP (ภาคผนวก ก1.2) แล้วนำไปบ่มต่อที่ภาวะเดียวกัน คัดเลือกโคโลนีเดี่ยวที่สร้าง Clear zone ถ่ายใส่อาหารร่วน GYP แล้วนำไปที่บ่มที่ภาวะเดียวกัน แล้วนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้มาละลายในสารละลาย Saline ลงในอาหารร่วน GYP แล้วนำไปบ่มที่ภาวะเดียวกัน จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยว ถ่ายใส่อาหารร่วนเอียง บ่มที่ภาวะเดียวกัน นาน 2 วัน จากนั้นนำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ถ่ายลงในอาหารร่วน GYP อีกครั้ง

บ่มที่ภาวะเดียวกัน นาน 2 วัน เพื่อทำการเก็บรักษาแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในอาหาร Skim milk และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี คือการทดสอบการสร้างคะตะเลสโดยนำโคโลนีเดี่ยวมาถ่ายใส่อาหาร รุ้น GYP บ่มที่ภาวะมีอากาศ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2 วัน และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี คือการทดสอบการสร้างคะตะเลสโดยนำโคโลนีเดี่ยวมาถ่ายใส่อาหาร รุ้น GYP บ่มที่ภาวะมีอากาศ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2 วัน หลังจากนั้นนำโคโลนีที่เจริญได้ในภาวะมีอากาศมาหยด 3% H₂O₂ โดยจะแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ตามคุณสมบัติของคะตะเลส กลุ่มแรกคือแบคทีเรียที่ไม่สร้างคะตะเลส (Negative catalase) เป็นแบคทีเรียที่เจริญในภาวะไม่มีอากาศหรือเจริญได้เล็กน้อยในภาวะมีอากาศ และไม่สร้างคะตะเลส กลุ่ม 2 คือ แบคทีเรียที่สร้างคะตะเลส (Positive catalase) เป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญในภาวะมีอากาศและสร้างคะตะเลส

3.2.3 ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดดีแลกติกจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยทำการทดลองการหมักในระดับขวดเขย่า

นำแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.2.2 มาทำการทดลองการหมักในระดับขวดเขย่า โดยจะแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ตามคุณสมบัติของคะตะเลสคือ แบคทีเรียที่ไม่สร้างคะตะเลส (Negative catalase) และแบคทีเรียที่สร้างคะตะเลส (Positive catalase)

3.2.3.1 แบคทีเรียที่เจริญในภาวะไม่มีอากาศหรือเจริญได้เล็กน้อยในภาวะมีอากาศ และไม่สร้างคะตะเลส นำหัวเชื้อที่เก็บในอาหาร รุ้นเอียง GYP มาถ่ายลงบนอาหารชนิดเดียวกัน แล้วบ่มที่ภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายหัวเชื้อลงอาหารเหลว Preculture (ภาคผนวก ก1.6) แล้วบ่มที่ภาวะเดียวกัน นาน 26 ชั่วโมง ต่อมาถ่ายหัวเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว Fermentation ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ก1.2) ที่มีกลูโคสเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร แล้วบ่มต่อที่ภาวะเดียวกัน นาน 72 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่าง นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ นำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสที่เหลือและกรดแลกติก (ทั้งชนิดไอโซเมอร์ดี และแอล)

3.2.3.2 แบคทีเรียสามารถเจริญในภาวะมีอากาศและสร้างคะตะเลส นำหัวเชื้อที่เก็บไว้ในอาหาร รุ้นเอียง GYP มาถ่ายลงบนอาหารชนิดเดียวกัน แล้วบ่มที่ภาวะมีอากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงอาหารเหลว Preculture (ภาคผนวก ก1.9) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง ที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จากนั้น ถ่ายหัวเชื้อที่ได้ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ลงในสารละลายกลูโคสเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มในภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิเดียวกัน นาน 48 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ นำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณกลูโคสที่เหลือและกรดแลกติก (ทั้งชนิด

ไอโซเมอร์ดีและแอลแลกติก)

3.2.4 ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดดีแลกติกจากแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นและชนิดที่แตกต่างกันโดยทำการทดลองการหมักในระดับขวดเขย่า

นำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.2.3 ที่สามารถผลิตกรดดีแลกติกในปริมาณที่สูงและมีค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงที่สูง มาศึกษาการผลิตกรดดีแลกติกจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่เลือกศึกษา ได้แก่ กลูโคส ซูโครส และแป้งมันสำปะหลัง (Tapioca starch) ที่ความเข้มข้น 100 120 และ 160 กรัมต่อลิตร โดยวิธีการทดลองเหมือนดังข้อ 3.2.3

3.2.5 ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดดีแลกติกจากแหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นและชนิดที่แตกต่างกันโดยทำการทดลองการหมักในระดับขวดเขย่า

นำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.2.3 ที่สามารถผลิตกรดดีแลกติกในปริมาณที่สูงและมีค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงที่สูง โดยแบ่งกลุ่มศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนเป็น 2 กลุ่มตามคุณสมบัติการสร้างคะตะเลส

3.2.5.1 แบคทีเรียที่ไม่สร้างคะตะเลส แบ่งแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ดังนี้ 1) สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร และไม่ใส่เปปโทน 2) สารสกัดจากยีสต์ 10 กรัมต่อลิตร และไม่ใส่เปปโทน 3) สารสกัดจากยีสต์ 20 กรัมต่อลิตร และไม่ใส่เปปโทน 4) สารสกัดจากยีสต์ 30 กรัมต่อลิตร และไม่ใส่เปปโทน 5) ไม่ใส่สารสกัดจากยีสต์ และเปปโทน 10 กรัมต่อลิตร 6) สารสกัดจากยีสต์ 20 กรัม และ เปปโทน 10 กรัมต่อลิตรเป็นตัวควบคุม 7) สารสกัดจากยีสต์ 10 และแอมโมเนียมคลอไรด์ 5 กรัมต่อลิตร 8) สารสกัดจากยีสต์ 10 และแอมโมเนียมคลอไรด์ 20 กรัมต่อลิตร 9) สารสกัดจากยีสต์ 20 และแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร 10) สารสกัดจากยีสต์ 5 และแอมโมเนียมคลอไรด์ 25 กรัมต่อลิตร และ 11) สารสกัดจากยีสต์ 5 และแอมโมเนียมคลอไรด์ 20 กรัมต่อลิตร

3.2.5.2 แบคทีเรียที่สร้างคะตะเลส แบ่งแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ดังนี้ 1) สารสกัดจากยีสต์ 7.5 กรัมต่อลิตร และไม่ใส่แอมโมเนียมคลอไรด์ 2) สารสกัดจากยีสต์ 15 กรัมต่อลิตร และไม่ใส่แอมโมเนียมคลอไรด์ 3) ไม่ใส่สารสกัดจากยีสต์ และแอมโมเนียมคลอไรด์ 8 กรัมต่อลิตร 4) สารสกัดจากยีสต์ 15 และแอมโมเนียมคลอไรด์ 4 กรัมต่อลิตรเป็นตัวควบคุม 5) สารสกัดจากยีสต์ 7.5 และแอมโมเนียมคลอไรด์ 4 กรัมต่อลิตร 6) สารสกัดจากยีสต์ 7.5 และแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร 7) สารสกัดจากยีสต์ 3.75 และแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร และ 8) สารสกัดจากยีสต์ 3.75 และแอมโมเนียมคลอไรด์ 15 กรัมต่อลิตร

3.2.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่ผลิตกรดดีแลคติกที่คัดเลือกได้

3.2.6.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญ

นำแบคทีเรียที่ผลิตกรดดีแลคติกมาถ่ายลงในอาหารวุ้น A medium (ภาคผนวก ก 1.12) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นตรวจสอบลักษณะโคโลนี ขนาด รูปร่าง พื้นผิว การย้อมสีแกรม และทดสอบการสร้างสปอร์โดยบ่มสภาวะเดียวกันนาน 7 วัน

3.2.6.2 การศึกษาทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (Tanasupawat และคณะ, 1998)

เลี้ยงเชื้ออาหารเหลว A medium โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะไร้อากาศ ระยะเวลา 5 วัน เพื่อศึกษาการเจริญที่อุณหภูมิ 15-45 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น NaCl 0 - 10 % และพีเอช 4 - 8.5 ศึกษาการสร้างก๊าซ เลี้ยงในอาหารที่มีหลอดดักก๊าซ (Durham tube) อยู่ข้างใน ศึกษาคุณสมบัติการรีดิวซ์ไนเตรดโดยใช้ระยะเวลา 15 วัน หลังจากนั้นนำมาหยดด้วยสารละลาย A และ B (ภาคผนวก ก2.10) ปริมาตร 3 หยด ศึกษาการย่อยแป้ง ตรวจสอบการย่อยแป้งโดยนำสารละลายไอโอดีนเทลงในเชื้อที่บ่มไว้ ศึกษาการย่อยสลายอาร์จินีน (Arginine) ศึกษา Oxidase นำสารละลาย N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylene diamine dihydrochloride (ภาคผนวก ก2.12) มาหยดลงแผ่นกระดาษกรอง หลังจากนั้นนำโคโลนีของแบคทีเรียมาเขียนลงบนบริเวณที่สารละลายหยด และสังเกตสีของของโคโลนีที่เปลี่ยนไป ศึกษาการสร้างกรดจากแหล่งคาร์โบไฮเดรตคือ Sorbitol raffinose sucrose lactose D(+) maltose monohydrate D(+) xylose D(+) manitol D(+) mannose D(-) ribose D-galactose L(-) sorbose L(+) arabinose D(+) cellobiose inulin D(-) fructose ribitol D(+) melibiose dextran dulcitol D(+) arabitol D(+) trehalose amygdalin D(+) melezitose hydrate meso-erythritol ต่อมานำมาหยดสาร Mixed indicator (ภาคผนวก ก2.11) และไทเทรตด้วย 0.1 N NaOH

3.2.6.3 การวิเคราะห์ผนังเซลล์ (Komagata และ Suzuki, 1987)

นำตะกอนเซลล์มา Hydrolyze ด้วย 6 N HCl ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร ในหลอดฝาเกลียวปิด และให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 3 ชั่วโมง ต่อมานำมาตั้งทิ้งที่อุณหภูมิห้องเพื่อลดอุณหภูมิลงและกรองแยกสารละลายออกมา หลังจากนั้นแช่เย็นจนแข็งเพื่อทำ Lyophilization เมื่อระเหิดกรดออกไปจะได้เซลล์ในรูปของแข็งแห้ง และเติมน้ำปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วจึงมา Spot ลง TLC cellulose (Merck No. 5716) โดยใช้สารมาตรฐานปริมาตร 1 ไมโครลิตร 0.01 M DL-diaminopimelic acid และเป่าให้แห้ง หลังจากนั้นนำมา Developed ด้วยสารละลาย Methanol: Water: 6N HCl: Pyridine (80: 26: 4: 10) ที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง และนำ TLC

cellulose มา Spray ด้วยสารละลาย 0.5 % Ninhydrin นำไปอบที่ความร้อน 100 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 2 นาที

3.2.6.4 การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16s rRNA gene และการสร้าง Phylogenetic tree (Chen และคณะ, 2005; Saito และ Miura, 1983)

การแยกและการทำบริสุทธิ์ดีเอ็นเอ แยกเซลล์ออกจากน้ำหมักด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ควบคุมอุณหภูมิ ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm ระยะเวลา 5 นาที และนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาล้าง ด้วย TE buffer (ภาคผนวก ก2.21) ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร 2 ครั้ง โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm ระยะเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม TE buffer และ Lysozyme ปริมาตร 380 ไมโครลิตร และ 0.5 กรัม ตามลำดับ และนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer) แล้วบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์แตก ต่อมาเติม 10 % SDS ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติม สารละลาย Phenol : Chloroform (ภาคผนวก ก2.16) และนำไปเข้าเครื่องเขย่าผสม แล้วปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 13,000 rpm ระยะเวลา 15 นาที สารละลายที่ได้จะแยกเป็น 2 ชั้น ให้ดูดสารละลายชั้น บนสุดซึ่งเป็นสารละลายนิวคลีโอไทด์ประกอบด้วย DNA และ RNA ลงในหลอดใหม่ และทำซ้ำ ขั้นตอนการเติมสารละลาย Phenol : Chloroform หลังจากนั้นดูดสารละลายชั้นบนสุดซึ่งเป็น สารละลายนิวคลีโอไทด์ลงในหลอดใหม่ ต่อมาเติม 3 M NaOAc pH 7 (เติม 1/10 เท่าของปริมาตร นิวคลีโอไทด์ที่ดูดมาได้) และ Absolute ethanol (เติม 2 เท่าของปริมาตรนิวคลีโอไทด์ที่ดูดมาได้) และนำมาเขย่าด้วยเครื่องเขย่าแบบผสม หลังจากนั้นนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอเกิดการตกตะกอน แล้วจึงใช้แท่งแก้วพันสายดีเอ็นเอขึ้นมาและทำ ให้แห้ง ต่อมาเติมน้ำ Ultra pure ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การทำ Polymerase Chain Reaction (PCR) นำ PCR reaction mixture (ภาค ผนวก ก2.13) ที่ผสมอยู่ในหลอด PCR มาเข้าเครื่อง PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ โดยมี รอบการทำปฏิกิริยา คือ Initial denature : อุณหภูมิ 94 เซลเซียส 3 นาที Denature : อุณหภูมิ 94 เซลเซียส 1 นาที Annealing : อุณหภูมิ 50 เซลเซียส 1 นาที Extention : อุณหภูมิ 72 เซลเซียส 2 นาที และ Final extention : อุณหภูมิ 72 เซลเซียส 3 นาที โดยมีรอบการทำปฏิกิริยา 26 รอบ

การทำ Gel electrophoresis นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ PCR ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาผสมกับ Loading dye และนำ Ladder Marker 1 kb ปริมาตร 1 ไมโครลิตร โหลกลง 0.8 % Agarose gel ซึ่งใช้กระแสไฟฟ้า 100 V ระยะเวลาการแยกดีเอ็นเอ ประมาณ 25 นาที ต่อมานำ เจลแช่ในสารละลาย Ethidiumbromide นาน 15 นาที และแช่ในน้ำเปล่า นาน 5 นาที หลังจากนั้น

นำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอจะปรากฏตำแหน่งบริเวณ 1500 bp ภายใต้รังสียูวี

การทำบริสุทธิ์ PCR product ใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของ Geneaid โดยมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้คือ Binding DNA : ควบ PCR product ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงใน Microcentrifuge tube และเติมสารละลาย DF buffer 5 เท่าของปริมาตร PCR product แล้วนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม และถ่ายสารละลายทั้งหมดนี้ลงในชุด DF column ที่ต่อกับ Collection tube และจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 g ระยะเวลา 1 นาที หลังจากนั้นเทสารละลายที่ผ่าน Collection tube ด้านล่างทิ้งไป หลังจากนั้นทำ Wash silica membrane : เติม Wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ลงในหลอด DF column พร้อมกับ Collection tube ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 g ระยะเวลา 1 นาที หลังจากนั้นเทสารละลายที่ผ่าน Collection tube ด้านล่างออก ต่อมาทำ Dry silica membrane : นำไปปั่นเหวี่ยงให้แห้งที่ความเร็วรอบ 14,000 g ระยะเวลา 3 นาที เพื่อให้ Matrix แห้ง ขั้นสุดท้ายทำ Elute DNA : โดยย้าย DF column มาต่อเข้ากับ Microcentrifuge tube ขึ้นใหม่ และเติม Elution buffer ตรงกลาง Matrix ปริมาตร 20 ไมโครลิตร หลังจากนั้นตั้งทิ้ง 2 นาที ที่อุณหภูมิห้องเพื่อสารละลายดูดซับ Matrix และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000 g ระยะเวลา 2 นาที หลังจากนั้นจะได้สารละลายดีเอ็นเอบริสุทธิ์

การวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ

นำ DNA ที่ผ่านการทำ PCR ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA gene ยังหน่วยงาน MacroGen โดยเลือกใช้ Primer 27F 518F 800R และ 1492R หลังจากนั้นนำผลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นำมาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่นในฐานข้อมูลโดยการ Blast ผ่าน www.eztaxon.com และสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้ Mega 5.0

3.3 วิธีการวิเคราะห์สารตัวอย่าง

3.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก อะซิติก เอทานอล และน้ำตาลกลูโคสที่เหลือในน้ำหมักด้วยเครื่อง HPLC

นำน้ำหมักที่ได้จากกระบวนการหมักระดับขวดเขย่ามาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 10 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์และแคลเซียมคาร์บอเนตออกไป และดูดสารละลายส่วนใสด้านบนมาเจือจาง 100 เท่า หลังจากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตท

คอลัมน์ (Column)

Biorad Aminex HPX-87H ion exclusion organic acid column

ขนาด 300 มิลลิเมตร × 7.8 มิลลิเมตร

สารละลายตัวพา (Mobile phase)	0.005 mM กรดซัลฟิวริก
อุณหภูมิ	45 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล (Flow rate)	0.6 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจวัด (Detector)	Refractive index detector ของ Shimadzu รุ่น RID-6A
เวลาที่วิเคราะห์	25 นาที
ปริมาตรสารที่วิเคราะห์	15 ไมโครลิตร
ความเข้มข้นสารมาตรฐาน	0.25 0.50 1.00 1.50 และ 2.00 กรัมต่อลิตร

ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	สารละลายเทียบมาตรฐาน (μ l)	น้ำบริสุทธิ์ (μ l)
0.25	125	875
0.5	250	750
1.0	500	500
1.5	750	250
2.0	1000	-

นำค่าที่วิเคราะห์ได้มาคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแลกติก กรดอะซิติก เอทานอล และปริมาณน้ำกลูโคสที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร

3.3.2 การวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของกรดแลกติกในน้ำหมักด้วยเครื่อง HPLC

นำน้ำหมักที่ได้จากกระบวนการหมักระดับขวดเข้ามาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และดูดส่วนใสมาเจือจาง 100 เท่า หลังจากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองเซลลูโลสอะซิเตท

คอลัมน์ (Column)	Sumi Chiral OA-5000 ขนาด 150 มิลลิเมตร x 4.6 มิลลิเมตร
สารละลายตัวพา (Mobile phase)	1 mM คอปเปอร์ซัลเฟต
อุณหภูมิ	40 องศาเซลเซียส
อัตราการไหล (Flow rate)	1 มิลลิลิตรต่อนาที
เครื่องตรวจวัด (Detector)	UV detector 254 nm
เวลาที่วิเคราะห์	30 นาที
ปริมาตรสารที่วิเคราะห์	15 ไมโครลิตร
ความเข้มข้นสารมาตรฐาน	0.25 0.50 1.00 1.50 และ 2.00 กรัมต่อลิตร

ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	สารละลายเทียบมาตรฐาน (µl)	น้ำบริสุทธิ์ (µl)
0.25	5	995
0.5	10	990
1.0	20	980
1.5	30	970
2.0	40	960

คำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดดี และแอลแลกติก โดยค่า Retention time ของกรด แอลแลกติก ประมาณ 18.9 นาที และค่า Retention time ของกรดดีแลกติกประมาณ 24.1 นาที

3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกและน้ำตาลกลูโคสโดยเครื่อง Biochemistry analyzer (YSI)

นำน้ำหมักที่ได้จากกระบวนการหมักระดับขวดเขย่ามาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และดูดส่วนใสมาเจือจาง 100 เท่า

3.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนของน้ำหมักโดยวิธีเจลดาล์ (Kjeldahl protein)

ดูดน้ำหมักปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ในขวดกลั่นและเติม โพรแตสเซียมซัลเฟตและคอปเปอร์ซัลเฟตที่มีอัตราส่วน 95:5 ลงไป 7 กรัม จากนั้นเติมกรดซัลฟูริก 15 มิลลิลิตร และนำไปย่อยบนเตาหลุมเป็นเวลา 45 นาที สารที่ได้จะมีลักษณะใสสีเขียว รอดูหมักมีลงประมาณ 15 นาที และนำมาเติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร พร้อมกับนำสารละลาย 4 % กรดบอริกปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่หยดอินดิเคเตอร์ 3 หยด มาประกอบเข้ากับเครื่องกลั่นไนโตรเจน หลังจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์จะเกิดเป็นสารละลายสีดำ และนำสารละลายที่ได้หลังจากเข้าเครื่องกลั่นมาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอริก 0.097 โมลาร์ และบันทึกปริมาตรกรดที่ใช้เพื่อคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเก็บตัวอย่างและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความจำเพาะต่อการผลิตกรดดีแลกติกที่มีความบริสุทธิ์เชิงแสงสูง

จากการเก็บตัวอย่าง เช่น ดิน เปลือกไม้ และรากไม้ ตามแหล่งสถานที่ต่างๆ ที่มีการสะสมของจุลินทรีย์ที่หลากหลาย และบริเวณภาวะความเป็นกรด พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดเลือกได้จากจังหวัดนครปฐม สมุทรสาคร กรุงเทพฯ อุดรธานี เพชรบูรณ์ และลพบุรี ทั้งหมด 136 ไอโซเลทมีเพียง 5 ไอโซเลทเท่านั้น ที่สามารถผลิตกรดดีแลกติกได้ คือ SK5-2 NK26-11 CU38-12 CU68-1 และ CU72-1 ซึ่งแยกเก็บได้จากดินและเปลือกไม้ แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลจากการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตกรดดีแลกติก จากตัวอย่างดิน เปลือกไม้ และรากไม้ ตามสถานที่ต่าง ๆ

ครั้งที่	จังหวัด	ตัวอย่าง	จำนวน	หมายเลขไอโซเลท
1	นครปฐม สมุทรสาคร	ดิน ดิน	7	SK5-2 NK26-11
2	นครปฐม กรุงเทพฯ	ดินและเปลือกไม้	20	CU38-12
3	อุดรธานี	ดินและเปลือกไม้	26	-
4	กรุงเทพฯ	ดินและเปลือกไม้	13	CU68-1 CU72-1
5	นครปฐม กรุงเทพฯ	ดินและเปลือกไม้	13	-
6	เพชรบูรณ์	ดินและเปลือกไม้	8	-
7	ลพบุรี	ดินและเปลือกไม้	34	-
8	นครปฐม	รากไม้	15	-

แบคทีเรียที่ผลิตกรดดีแลกติก มีลักษณะรูปร่างแท่ง สร้างสปอร์ ไม่ผลิตกะตะเลส เป็นการคัดเลือกพื้นฐานของแบคทีเรียผลิตกรดดีแลกติก ซึ่งทั้ง 5 ไอโซเลท มีคุณสมบัติตามที่เลือกไว้ ยกเว้นผลการทดสอบคุณสมบัติกะตะเลสพบว่า SK5-2 และ NK26-11 สามารถผลิตกะตะเลสเพื่อใช้ในการย่อยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ ในขณะที่ CU38-12 CU68-1 และ CU72-1 ไม่สามารถผลิตกะตะเลสได้ แสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 การศึกษาคุณลักษณะพื้นฐานรูปร่าง สปอร์ การเจริญที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และผลทดสอบคะตะเลส

รหัสไอโซเลท	รูปร่าง	สปอร์ ^a	การเจริญภาวะไร้อากาศที่ 50 องศาเซลเซียส ^b	ผลคะตะเลส ^c
SK5-2	แท่ง	+	-	+
NK26-11	แท่ง	+	-	+
CU38-12	แท่ง	+	-	-
CU68-1	แท่ง	+	-	-
CU72-1	แท่ง	+	-	-

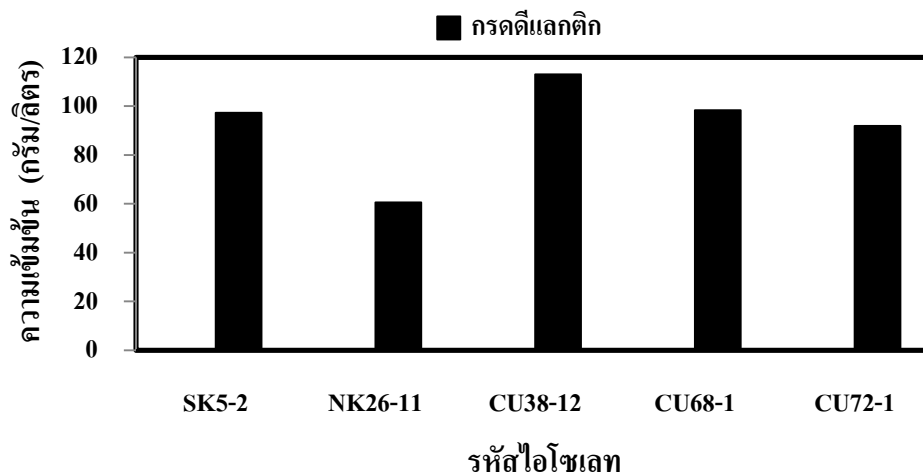
หมายเหตุ : ^a+, สร้างสปอร์; ^b-, ไม่เจริญ

^c+, ผลิตคะตะเลส; -, ไม่ผลิตคะตะเลส

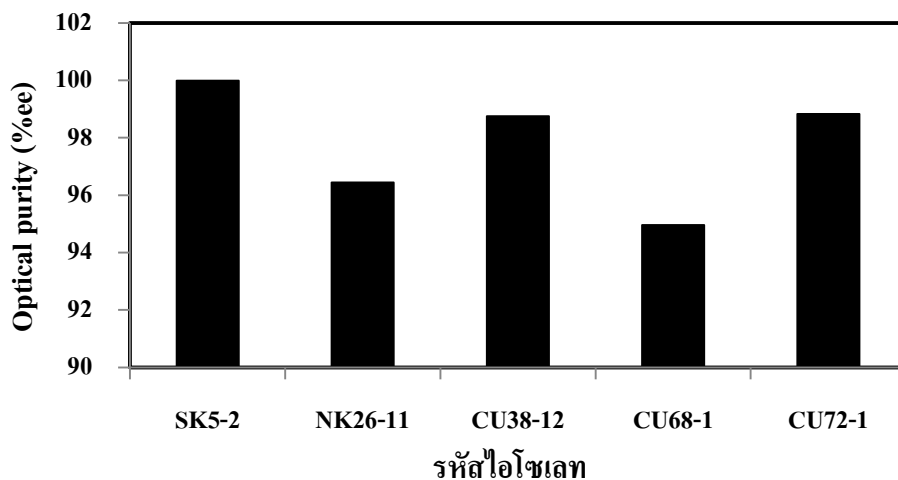
จากการทดลองพบว่ามิงงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตกรดดีแลคติกไม่หลากหลายมากนัก เช่น Tanasupawat และคณะ (1998) แยกเชื้อจากปลาร้าที่จังหวัดชัยภูมิพบ *Leuconostoc* sp. สามารถผลิตกรดดีแลคติก รูปร่างกลม และไม่สร้างสปอร์ ต่อมาในปี 2002 ค้นพบเชื้อ *Lactobacillus* sp. ซึ่งคัดเลือกได้จากชีอิ้ว แบคทีเรียชนิดนี้ไม่สร้างสปอร์ ที่สำคัญยังสามารถผลิตกรดดีแลคติกในสัดส่วน ไอโซเมอร์ของแอลและดีแลคติก คือ 0 และ 100 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ De Martinis และ Freitas (2003) ได้คัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตกรดดีแลคติกจากเนื้อ (Brazilian meats) ซึ่งพบว่าเป็น *Leuconostoc* sp.20. จากที่กล่าวไปทั้ง *Leuconostoc* sp. *Lactobacillus* sp. และ *Leuconostoc* sp. 20 ไม่สามารถเจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของทั้ง 5 ไอโซเลท ไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ในปี 1997 จากงานวิจัยของ Yanagida และคณะ ได้แยกเชื้อจากดินพบว่าแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดดีแลคติก ได้แก่ *Sporolactobacillus inulinus* *S. nakayamae* subsp. *nakayamae* *S. terrae* *S. kofuensis* และ *S. lactosus* เป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดดีแลคติก โดยทั่วไปจีโนมของ *Sporolactobacillus* ไม่ผลิตคะตะเลส และสร้างสปอร์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ได้ทำการทดลองของเชื้อ CU38-12 CU68-1 และ CU72-1 พบว่าไม่สามารถผลิตคะตะเลสได้ และยังมีงานวิจัยของ Fujita และคณะ (2010) พบ *S. putidus* สามารถผลิตกรดดีแลคติกได้เช่นกัน ซึ่งแยกเชื้อได้จากน้ำส้มเน่า ต่อมาในปี 2011 Tashiro และคณะได้แยกเชื้อที่ผลิตกรดดีแลคติกจากคราบสกปรกในอ่างล้างหน้าพบว่าเป็นแบคทีเรียที่สามารถทนอุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส คือ *L. delbrueckii* subsp. *lactis* QU41

4.2 ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดดีแลกติกจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยทำการทดลองการหมักในระดับขวดเย้า

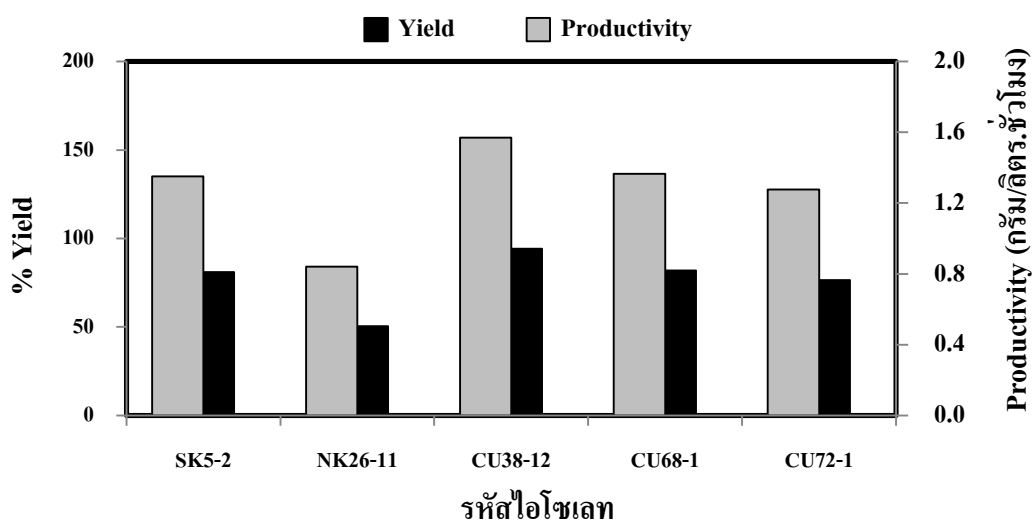
ผลจากการทดสอบคุณสมบัติของคะตะเลส พบว่าแบ่งเชื้อเป็น 2 กลุ่ม ในการเจริญและผลิตกรดดีแลกติกคือ Catalase positive และ Catalase negative โดยคัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกสูงประมาณ 60 กรัมต่อลิตร แล้วจึงนำมาวิเคราะห์หาค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดดีแลกติก 5 ไอโซเลท คือ SK5-2 NK26-11 CU38-12 CU68-1 และ CU72-1 แบคทีเรียในกลุ่มของ Catalase positive คือแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในภาวะมีอากาศและสร้างคะตะเลส ได้แก่ SK5-2 และ NK26-11 ดังนั้นจึงเลี้ยงในภาวะที่มีอากาศ Catalase negative คือแบคทีเรียที่ไม่เจริญหรือเจริญภาวะมีอากาศ และไม่สร้างคะตะเลสเพื่อย่อยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นสารพิษอันตรายต่อเซลล์ ดังนั้นจึงต้องเลี้ยงในภาวะไร้อากาศ ได้แก่ CU38-12 CU68-1 และ CU72-1 จากการทดลองหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดดีแลกติก โดยใช้กลูโคส 120 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง พบว่า CU38-12 สามารถผลิตกรดดีแลกติกได้มากที่สุดคือ 113.04 กรัมต่อลิตร โดยใช้ น้ำตาลกลูโคสหมด แต่ให้ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงที่ต่ำเพียง 98.76 %ee จากทั้งหมด 5 ไอโซเลท พบว่า SK5-2 เป็น Catalase positive ให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติก Yield Productivity และค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงสูงคือ 97.24 กรัมต่อลิตร 81.03 เปอร์เซ็นต์ 1.35 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 99.99 %ee ตามลำดับ CU72-1 เป็น Catalase negative ให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติก Yield Productivity และค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงที่สูงคือ 91.87 กรัมต่อลิตร 76.56 เปอร์เซ็นต์ 1.28 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 98.83 %ee ตามลำดับ (แสดงดังรูปที่ 4.1-4.3) ทั้ง 2 ไอโซเลทนี้ให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติก รวมถึงความบริสุทธิ์เชิงแสงที่สูงเพียงพอในการผลิตพอลิแลกติกแอซิดจึงเหมาะสมที่จะคัดเลือกเพื่อหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดดีแลกติกจากแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในขั้นตอนถัดไป



รูปที่ 4.1 การผลิตกรดดีแลกติกของ SK5-2 NK26-11 CU38-12 CU68-1 และ CU72-1



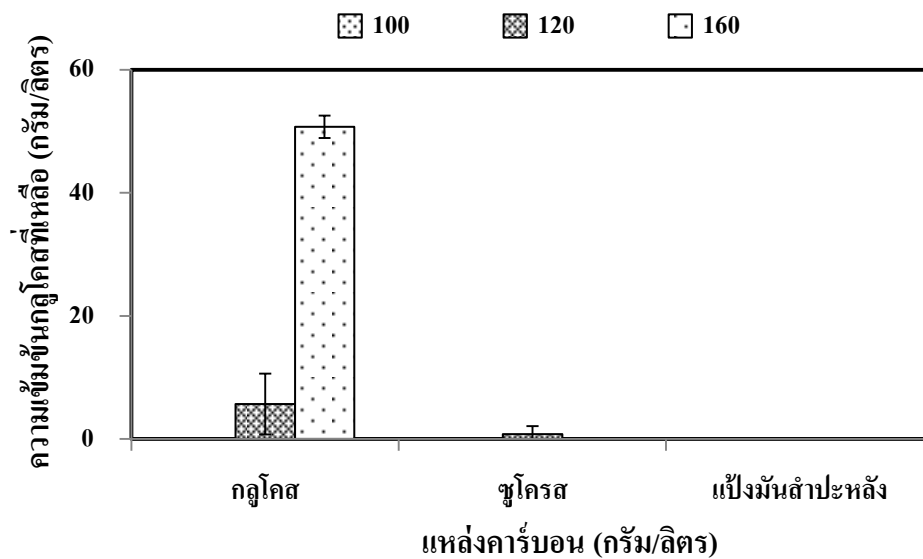
รูปที่ 4.2 ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงของเบคทีเรียที่ผลิตกรดดีแลกติกทั้ง 5 ไอโซเลท



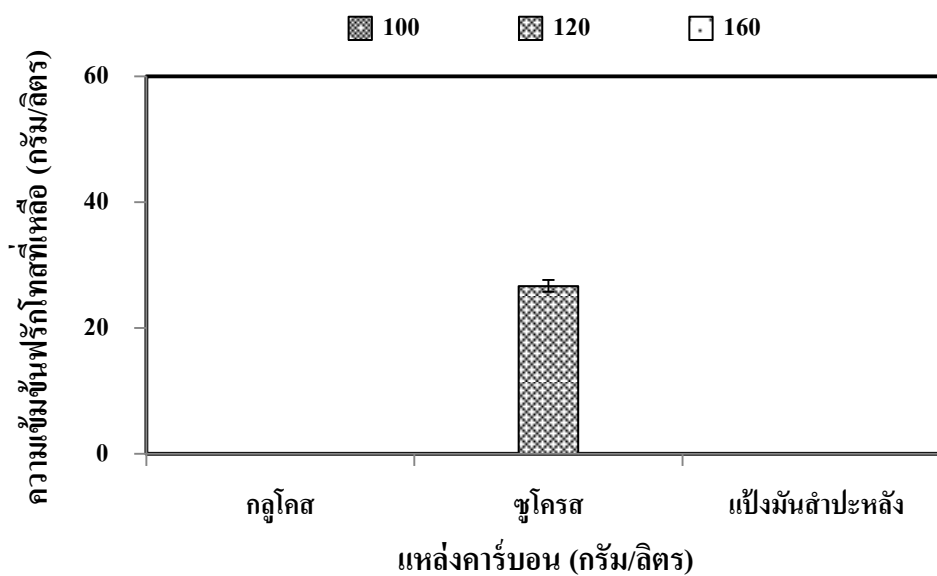
รูปที่ 4.3 แสดงผลของค่า Productivity และ Yield ของเบคทีเรียที่ผลิตกรดดีแลกติก

4.3 ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดดีแลกติกจากแหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นและชนิดที่ต่างกันโดยทำการทดลองการหมักในระดับขวดเขย่า

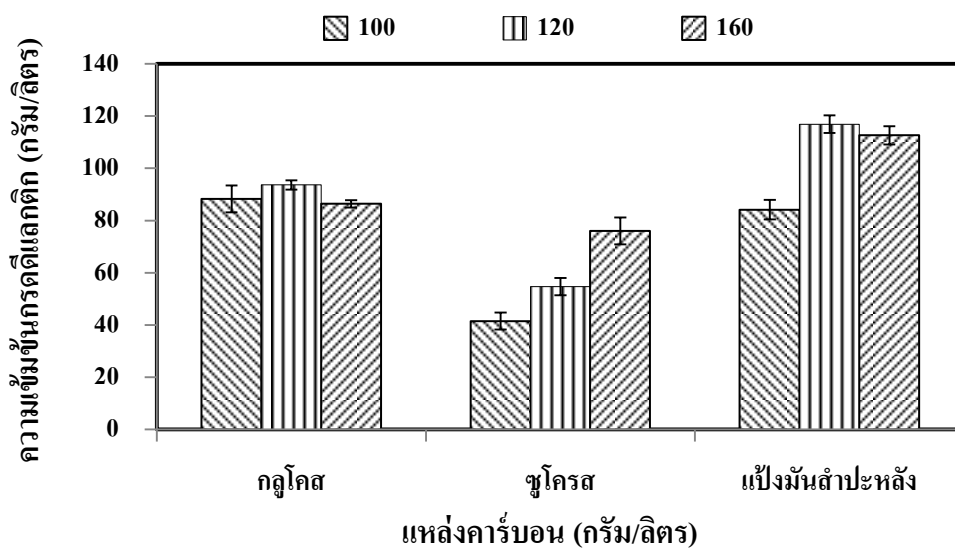
หลังจากหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดดีแลกติกจากเบคทีเรียที่คัดเลือกได้ พบว่า SK5-2 และ CU72-1 มีความเหมาะสมในการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดดีแลกติก จากการเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่มีชนิดและความเข้มข้นที่ต่างกันอย่างคือ กลูโคส ซูโครส และ แป้งมันสำปะหลัง ที่ความเข้มข้น 100 120 และ 160 กรัมต่อลิตร



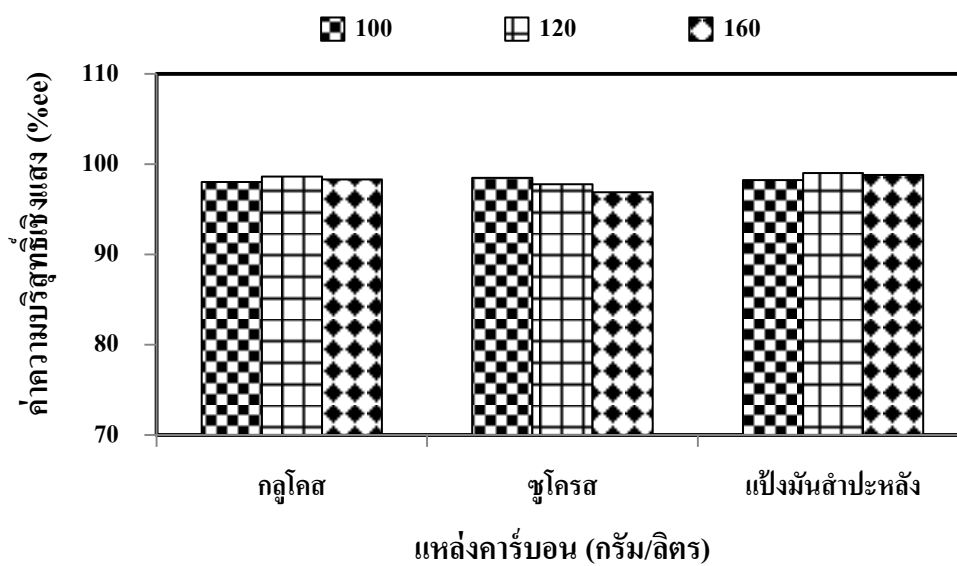
รูปที่ 4.4 ปริมาณกลูโคสที่เหลือหลังจากกระบวนการหมักกรดดีแลกติกจากแหล่งกลูโคส ซูโครส และแป้งมันสำปะหลัง ที่ความเข้มข้น 100 120 และ 160 กรัมต่อลิตร โดย CU72-1



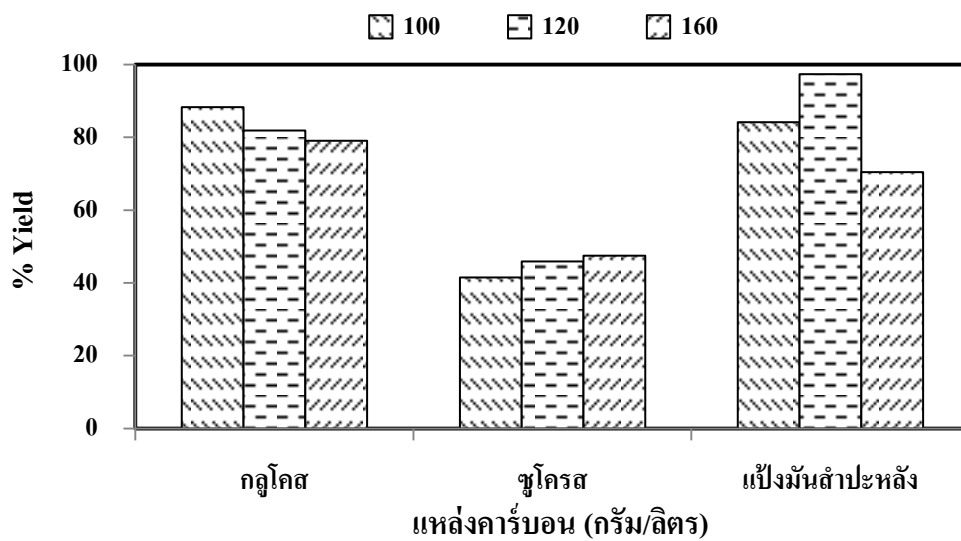
รูปที่ 4.5 ปริมาณน้ำตาลฟรักโทสที่เหลือหลังจากกระบวนการหมักกรดดีแลกติกจากแหล่งต่างชนิด และความเข้มข้นกัน โดย CU72-1



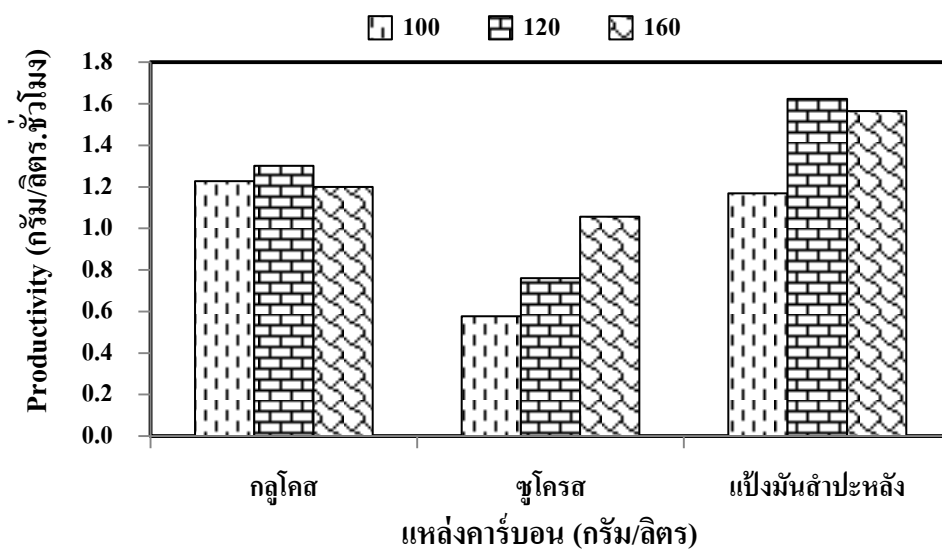
รูปที่ 4.6 การผลิตกรดดีแลกติกจากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดและความเข้มข้น โดย CU72-1



รูปที่ 4.7 ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง (%ee) จากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดและความเข้มข้น โดย CU72-1



รูปที่ 4.8 ผลของค่า Yield จากจากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดและความเข้มข้น โดย CU72-1



รูปที่ 4.9 ผลของค่า Productivity จากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดและความเข้มข้น โดย CU72-1

ตารางที่ 4.3 สรุปผลการผลิตกรดดีแลกติกจากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดและความเข้มข้น โดย CU72-1

แหล่งคาร์บอน	ความเข้มข้น (g/L)	กรดดีแลกติก				ความเข้มข้นสารตั้งต้นสุดท้าย (g/L)	
		ความเข้มข้นสุดท้าย (g/L)	% Yield	Productivity (g/L.h)	%ee	กลูโคส	ฟรักโทส
กลูโคส	100	88.34	88.34	1.23	98.03	0	0
	120	93.63	81.91	1.30	98.63	5.68	0
	160	86.40	79.06	1.20	98.28	50.72	0
ซูโครส	100	41.54	41.54	0.58	98.46	0	0
	120	54.69	45.87	0.76	97.78	0.76	26.70
	160	76.00	47.50	1.06	96.88	0	0
แป้งมันสำปะหลัง	100	84.18	84.18	1.17	98.21	0	0
	120	116.88	97.40	1.62	99.02	0	0
	160	112.64	70.40	1.56	98.80	0	0

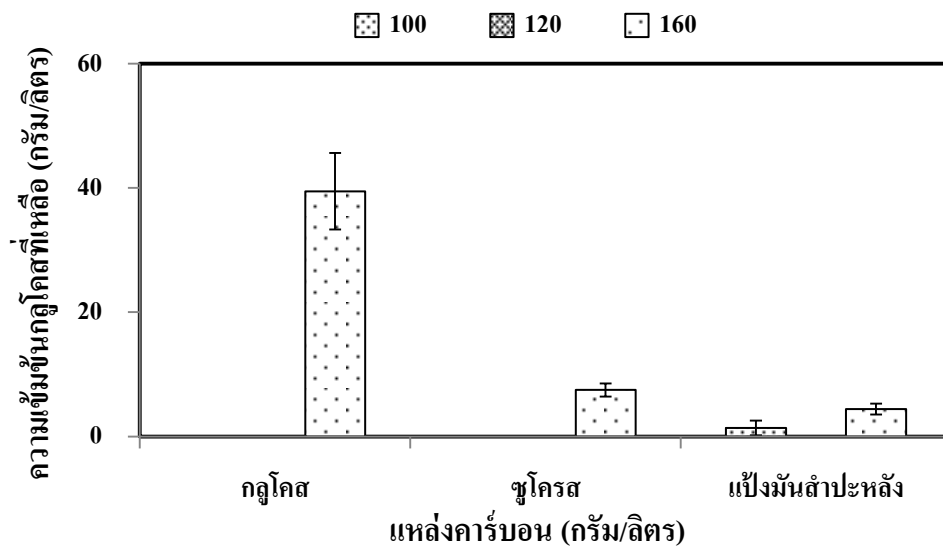
จากการทดลองใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสของ CU72-1 พบว่าเมื่อความเข้มข้นกลูโคสเพิ่มขึ้นจากความเข้มข้น 100 เป็น 120 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกมากขึ้น โดยที่ความเข้มข้นกลูโคส 120 กรัมต่อลิตร ให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกมากที่สุดคือ 93.63 กรัมต่อลิตร มีค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง Yield และ Productivity คือ 98.63 %ee 81.91 เปอร์เซ็นต์ และ 1.30 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ (แสดงดังรูปที่ 4.5-4.9) และสามารถใช้กลูโคสได้ทั้งหมด แต่ประสิทธิภาพการผลิตกรดดีแลกติกต่ำลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นกลูโคสเป็น 160 กรัมต่อลิตร ให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกเพียง 86.40 กรัมต่อลิตร เหลือกลูโคส 51 กรัมต่อลิตร จากการทดลองของกลูโคสทั้ง 3 ความเข้มข้นพบว่า CU72-1 มีความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคสประมาณ 110 กรัมต่อลิตร (แสดงดังรูปที่ 4.4) เพียงพอที่จะผลิตกรดดีแลกติก ที่ความเข้มข้นกลูโคส 120 กรัมต่อลิตร ให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกมากกว่าที่ความเข้มข้นกลูโคส 160 กรัมต่อลิตร (แสดงดังรูปที่ 4.6) เนื่องจากที่ความเข้มข้นของกลูโคส 160 กรัมต่อลิตร อาจเกิด Product inhibition ทำให้เกิดภาวะความเป็นกรดมากเกินไป จึงยับยั้งการเจริญและผลิตกรดแลกติก (Gocaives และคณะ, 1990; John และคณะ, 2007) ดังนั้นจึงส่งผลให้ผลิตกรดดีแลกติกต่ำลงมาเพียงเล็กน้อยโดยจะสังเกตเห็นได้ว่าค่าการผลิตกรดดีแลกติกไม่แตกต่างกันมากเหลือกลูโคสเพียงเล็กน้อย และค่า Yield ที่ได้ยังสูงอยู่

เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นซูโครสทั้ง 3 ความเข้มข้น พบว่าเมื่อความเข้มข้นซูโครสเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ค่าการผลิตกรดแลคติกมากขึ้นเช่นกัน โดยความเข้มข้นซูโครส 160 กรัมต่อลิตร ให้ค่าการผลิตกรดแลคติก Yield และ Productivity สูงสุดคือ 76 กรัมต่อลิตร 47.50 เปอร์เซ็นต์ และ 1.06 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ (แสดงดังรูปที่ 4.6 4.8-4.9) จากการทดลองพบว่าการใช้แหล่งซูโครสเทียบกับกลูโคสที่ความเข้มข้นเท่ากัน พบว่าการใช้ซูโครสส่งผลให้ค่าการผลิตกรดแลคติก รวมถึงค่า Yield ต่ำกว่ากลูโคสอย่างเห็นได้ชัดประมาณครึ่งหนึ่ง ซึ่งซูโครสทั้ง 3 ความเข้มข้นไม่เหลือกลูโคสหลังจากกระบวนการหมักกรด แสดงว่าใช้กลูโคสได้หมด แต่ไม่สามารถใช้ฟรักโทสเพื่อผลิตกรดแลคติกได้ จึงให้ค่าการผลิตกรดแลคติกต่ำกว่ากลูโคสที่ความเข้มข้นเดียวกันประมาณครึ่งหนึ่ง ซูโครสสามารถแตกตัวได้กลูโคสและฟรักโทสโดย Glucansucrase มีประสิทธิภาพที่ดีจึงสามารถย่อยซูโครสเปลี่ยนเป็นกลูโคสเพื่อผลิตกรดแลคติก ในขณะที่ Fructansucrase อาจมีข้อจำกัดในการเปลี่ยนซูโครสเป็นฟรักโทสโดยขึ้นกับผลของ อุณหภูมิ พีเอช ความเข้มข้นซูโครส หรืออาจเกี่ยวข้องกับการทำให้เกิดกลไกการทำงานของเอนไซม์ที่จะเปลี่ยนซูโครสเป็นกลูโคสและฟรักโทส (Van Hijum และคณะ, 2006) จึงส่งผลให้ค่าการผลิตกรดแลคติกต่ำลงประมาณครึ่งหนึ่งเมื่อเทียบกับกลูโคสที่ความเข้มข้นเดียวกัน กระบวนการหมักโดยซูโครสสามารถให้ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงที่ต่ำตรงข้ามกับปริมาณกรดแลคติกที่ผลิตได้ แสดงดังรูปที่ 4.7 ส่วนสาเหตุค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงต่ำยังไม่มีใครทราบถึงสาเหตุได้ (Lee, 2007)

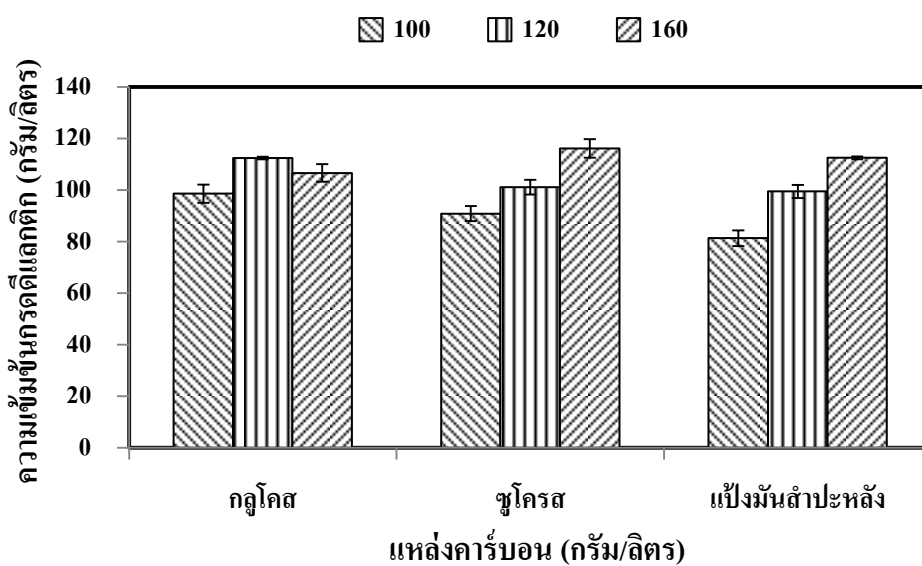
เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า ถ้าไม่เติมกลูโคอะไมเลสจะไม่สามารถผลิตกรดแลคติกได้จากกระบวนการหมัก แต่เมื่อเติมกลูโคอะไมเลสส่งผลให้การผลิตกรดแลคติกในปริมาณสูงกว่าเดิมโดยความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง 120 กรัมต่อลิตร ให้ค่าการผลิตกรดแลคติกสูงถึง 116.89 กรัมต่อลิตร (แสดงดังตารางที่ 4.3) ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง 100 กรัมต่อลิตร มีปริมาณกลูโคส 110 กรัมต่อลิตร ควรให้ค่าการผลิตกรดแลคติกมากพอๆ กับความเข้มข้นของกลูโคสที่ 120 กรัมต่อลิตร เนื่องจากกลูโคสที่ 120 กรัมต่อลิตร เหลือปริมาณกลูโคส 5 กรัมต่อลิตรเท่านั้น แต่กลับให้ค่าการผลิตกรดแลคติกที่ต่ำกว่า อาจเนื่องมาจากกลูโคอะไมเลสสามารถย่อยแป้งเปลี่ยนเป็นกลูโคสได้เร็วเกินไป และ CU72-1 มีประสิทธิภาพในการย่อยโอลิโกแซคคาไรด์ได้ดี ดังนั้นเซลล์จึงนำไปใช้เพื่อการเจริญ และสร้างพลังงานมากกว่าที่จะผลิตกรดแลคติก เหลือกลูโคสในปริมาณที่น้อยลงจึงส่งผลให้ค่าการผลิตกรดแลคติกต่ำลง ที่ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง 120 กรัมต่อลิตร สามารถให้ค่าการผลิตกรดแลคติกมากที่สุดคือ 116.88 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ค่า Yield และ Productivity มีค่ามากที่สุด คือ 97.40 เปอร์เซ็นต์ และ 1.62 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ (แสดงดังตารางที่ 4.3) รวมถึงค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงที่มากถึง 99.02 %ee ให้ค่าการผลิตกรดแลคติกสูงสุด อาจเนื่องมาจากกลูโคอะไมเลสมีประสิทธิภาพในการย่อยโอลิโกแซคคาไรด์ที่

สมบูรณ์ไม่ช้า หรือเร็วจนเกิน และได้กลูโคสในปริมาณที่เพียงพอและเหมาะสมต่อการเจริญและผลิตกรดดีแลคติกจึงส่งผลให้ผลิตกรดดีแลคติกมากที่สุด เมื่อเพิ่มความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังเป็น 160 กรัมต่อลิตร กลับให้ค่าการผลิตกรดดีแลคติกต่ำลงคือ 112.64 กรัมต่อลิตร ไม่เหลือกลูโคสและโอลิโกแซคคาไรด์ หลังจากกระบวนการหมักกรดแสดงว่าเกิดการย่อยได้สมบูรณ์จึงได้กลูโคสปริมาณที่มากเพื่อผลิตกรดดีแลคติก และส่งผลให้ค่าการผลิตกรดดีแลคติกมากขึ้นจนทำให้เกิด Product inhibition จากการทดลองพบว่า เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเท่ากับกลูโคสให้ค่าการผลิตกรดดีแลคติกมากกว่าการใช้กลูโคส เนื่องจากสามารถเปลี่ยนแป้งเป็นกลูโคสเพื่อผลิตกรดดีแลคติกได้อย่างสมบูรณ์ และในแป้งมันสำปะหลังมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนรวมถึงโปรตีนเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้ในการเจริญและผลิตกรดแลคติก (<http://www.food-info.net/uk/carbs/starch.htm>) ดังนั้นจึงส่งผลให้ค่าการผลิตกรดดีแลคติกมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee (2007) เมื่อความเข้มข้นแป้งมากขึ้นค่าการผลิตกรดดีแลคติกมากขึ้น เนื่องจากแป้งถูกย่อยเป็นมอลโทส และเปลี่ยนเป็นกลูโคสในปริมาณที่มากขึ้น เพื่อใช้ในการผลิตกรดแลคติกจึงสามารถผลิตกรดแลคติกได้มากกว่าการใช้กลูโคส

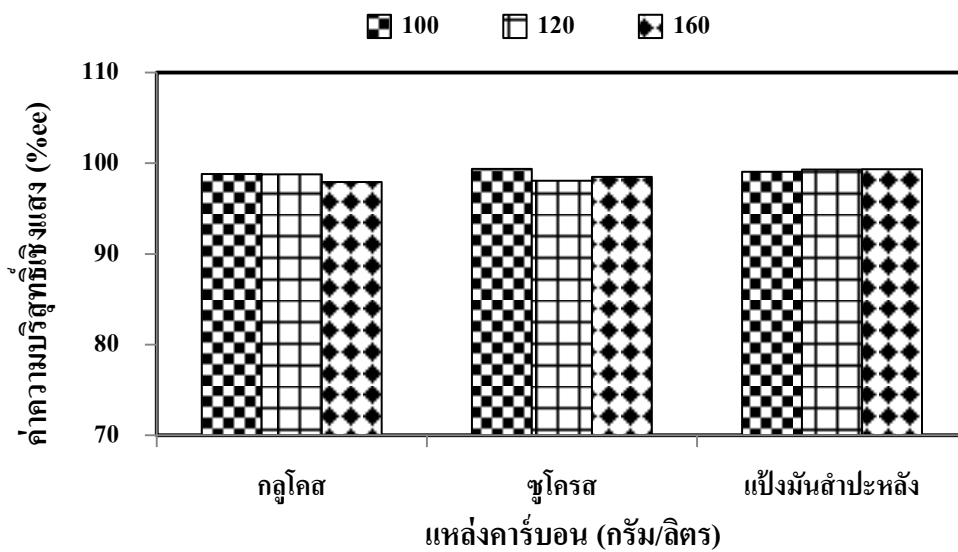
ดังนั้นจากการทดลองพบว่า CU72-1 ที่กลูโคสความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร ให้ค่าการผลิตกรดแลคติกมากที่สุด เมื่อใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าประสิทธิภาพผลิตกรดดีแลคติกต่ำกว่าการใช้จากกลูโคสประมาณครึ่งหนึ่ง โดยพบค่าการผลิตกรดดีแลคติกมากที่สุดที่ความเข้มข้น 160 กรัมต่อลิตร และเมื่อใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนโดยไม่เติมกลูโคอะไมเลสจะไม่สามารถผลิตกรดดีแลคติกได้ แต่เมื่อเติมกลูโคอะไมเลสในระหว่างกระบวนการหมักสามารถผลิตกรดดีแลคติกในปริมาณสูงกว่าเดิม โดยความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง 120 กรัมต่อลิตร ให้ค่าการผลิตกรดดีแลคติกมากที่สุด และผลจากการหมักพบว่าไม่เหลือส่วนของโอลิโกแซคคาไรด์ แสดงว่ากลูโคอะไมเลสสามารถย่อยโอลิโกแซคคาไรด์เปลี่ยนเป็นกลูโคสได้อย่างสมบูรณ์ (แสดงดังตารางที่ 4.3) แต่เอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการทำ Liquefaction และ Saccharification มีราคาที่สูงและขั้นตอนการ Pretreatment ยุ่งยากและเสียเวลามากกว่าเมื่อเทียบกับการใช้แหล่งคาร์บอนจากกลูโคสหรือซูโครส



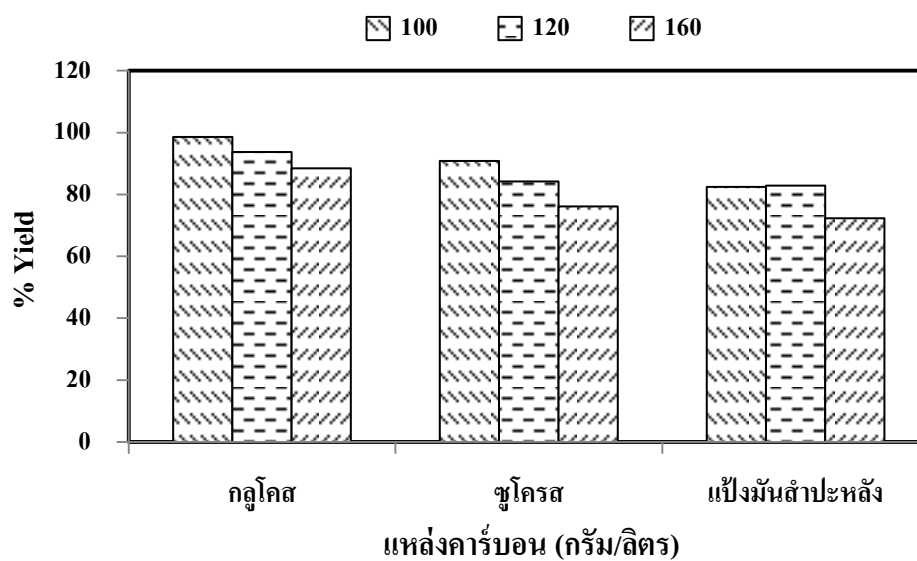
รูปที่ 4.10 ปริมาณกลูโคสที่ปล่อยหลังจากกระบวนการหมักกรดดีแลกติกจากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย SK5-2



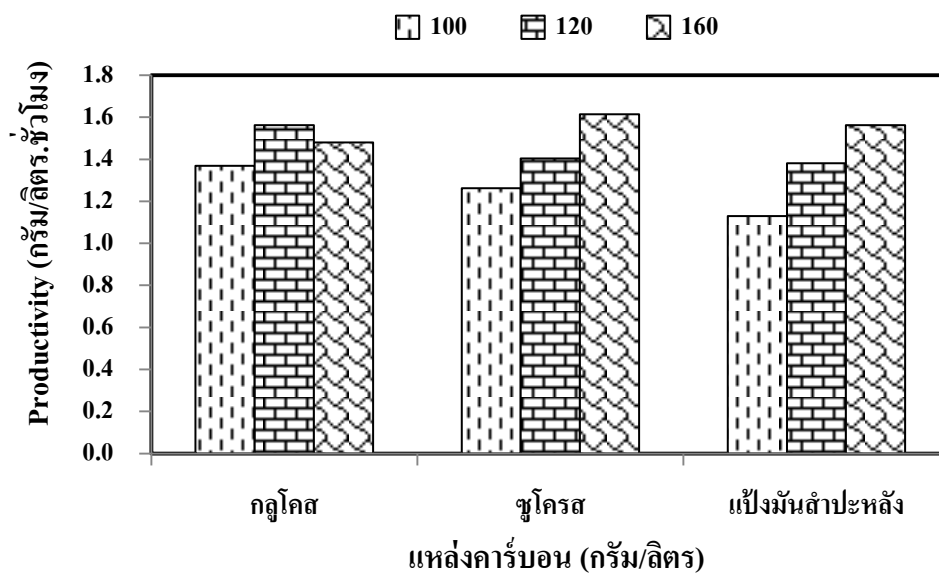
รูปที่ 4.11 การผลิตกรดดีแลกติกจากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดและความเข้มข้น โดย SK5-2



รูปที่ 4.12 ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง (%ee) จากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดและความเข้มข้น โดยSK5-2



รูปที่ 4.13 ผลของค่า Yield จากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดและความเข้มข้น โดย SK5-2



รูปที่ 4.14 ผลของค่า Productivity จากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดและความเข้มข้น โดย SK5-2

ตารางที่ 4.4 สรุปผลการผลิตกรดดีแลกติกจากแหล่งคาร์บอนต่างชนิดและความเข้มข้น โดย SK5-2

แหล่งคาร์บอน	ความเข้มข้น (g/L)	กรดดีแลกติก				ความเข้มข้นสารตั้งต้นสุดท้าย (g/L)	
		ความเข้มข้นสุดท้าย (g/L)	% Yield	Productivity (g/L.h)	%ee	กลูโคส	ฟรักโทส
กลูโคส	100	98.59	98.59	1.36	98.80	0	0
	120	112.45	93.71	1.56	98.79	0	0
	160	106.61	88.45	1.48	97.95	39.48	0
ซูโครส	100	90.87	90.87	1.26	99.37	0	0
	120	101.12	84.27	1.40	98.09	0	0
	160	116.16	76.17	1.61	98.49	7.50	0
แ่งมันสำปะหลัง	100	81.32	82.44	1.13	99.05	1.358	0
	120	99.46	82.89	1.38	99.31	0	0
	160	112.52	72.32	1.56	99.35	4.421	0

ตารางที่ 4.5 การเปรียบเทียบกระบวนการหมักกรดดีแลกติกจากแป้งมันสำปะหลัง โดย CU72-1 และ SK5-2

รหัสไอโซเลท	ไม่เติมกลูโคสไมเลส	เติมกลูโคสไมเลส
	กรดดีแลกติก (กรัมต่อลิตร)	กรดดีแลกติก (กรัมต่อลิตร)
CU72-1	23.74	116.89
SK5-2	54.21	97.53

จากการเลือกแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสโดย SK5-2 พบว่าเมื่อความเข้มข้นกลูโคสเพิ่มขึ้น จากความเข้มข้น 100 เป็น 120 กรัมต่อลิตร ค่าการผลิตกรดดีแลกติกมากขึ้นโดยความเข้มข้น กลูโคส 120 กรัมต่อลิตร ให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกมากที่สุดคือ 112.45 กรัมต่อลิตร สามารถใช้ กลูโคสได้ทั้งหมด ซึ่งให้ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงที่มีค่าสูงสุด Yield และ Productivity คือ 98.79 %ee 93.71 เปอร์เซ็นต์ และ 1.56 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ (แสดงดังรูปที่ 4.10-4.14) แต่ ประสิทธิภาพการผลิตกรดดีแลกติกต่ำลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นกลูโคสเป็น 160 กรัมต่อลิตร พบว่า ให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกเพียง 106.61 กรัมต่อลิตร และกลูโคสเหลือ 39.48 กรัมต่อลิตร จากการ ทดลองจากการใช้กลูโคส พบว่า SK5-2 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสประมาณ 120 กรัมต่อลิตร เพียง พอที่จะผลิตกรดดีแลกติก ซึ่งพบได้ในความเข้มข้นกลูโคส 120 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นกลูโคส 160 กรัมต่อลิตร เกิด Product inhibition ส่งผลให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกต่ำลงมาเพียงเล็กน้อย แสดงดังรูปที่ 4.11

เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นซูโครส พบว่าเมื่อความเข้มข้นซูโครสเพิ่มขึ้นค่าการผลิตกรดดี แลกติกมากขึ้นเช่นกัน ที่ซูโครสความเข้มข้น 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติก คือ 90.87 และ 101.12 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกต่ำกว่าการใช้จาก กลูโคสที่ความเข้มข้นเดียวกันประมาณ 10 กรัมต่อลิตร เท่านั้นอาจเนื่องจากซูโครสแตกตัวได้ กลูโคสและฟรักโทส อาจใช้กลูโคสทั้งหมดในการผลิตกรดดีแลกติกเนื่องจากไม่เหลือกลูโคส แต่ ฟรักโทสจำนวนหนึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ซูเครสที่จะเปลี่ยนซูโครสเป็นกลูโคส และฟรักโทส จึงส่งผลให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกต่ำกว่าเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยที่ความเข้มข้น ซูโครส 160 กรัมต่อลิตร ให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกสูงสุด คือ 116.16 กรัมต่อลิตร และให้ค่า Yield Productivity และค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง คือ 76.17 เปอร์เซ็นต์ 1.61 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 98.49 %ee ตามลำดับ (แสดงดังรูปที่ 4.11-4.14) ซึ่งให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกในปริมาณที่สูงพอๆ กับกลูโคสที่ความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร คือ 112.45 กรัมต่อลิตร แสดงว่าสามารถใช้น้ำตาล

กลูโคสเพียงพอต่อการเจริญและผลิตรดดีแลกติก เนื่องจากเหลือกลูโคส 8 กรัมต่อลิตร และใช้ฟรักโทสส่วนหนึ่งเป็นน้ำตาลในปริมาณที่เพียงพอต่อการผลิตรดดีแลกติก ดังนั้นชูโครสที่ความเข้มข้น 160 กรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสุดในการผลิตรดดีแลกติก เนื่องจากไม่เกิดการยับยั้งการผลิตรดดีแลกติก จะสังเกตเห็นได้ว่ามีปริมาณกลูโคสที่เหลือเพียงเล็กน้อยเท่านั้น แสดงให้เห็นว่าการแตกตัวของชูโครสเป็นกลูโคสและฟรักโทสมีปริมาณที่เพียงพอต่อการผลิตรดดีแลกติก และจากการใช้ชูโครสที่ความเข้มข้นสูงจะส่งผลให้ได้ปริมาณฟรักโทสและกลูโคสมากกว่าที่ความเข้มข้นต่ำ จึงได้ปริมาณกลูโคสและฟรักโทสเพียงพอในการผลิตรดแลกติก ดังนั้นจึงทำให้ค่าการผลิตรดดีแลกติกสูงขึ้น

ในขณะที่เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าที่ความเข้มข้น 100 และ 120 กรัมต่อลิตร ให้ค่าการผลิตรดดีแลกติกต่ำกว่าการใช้จากกลูโคสที่ความเข้มข้นเดียวกัน อาจเนื่องมาจากหลังจากกระบวนการหมักกรดแลกติกเหลือโอลิโกแซคคาไรด์จำนวนหนึ่งทำให้ได้ปริมาณกลูโคสที่น้อย จึงส่งผลให้ความสามารถในการผลิตรดดีแลกติกต่ำกว่าการใช้จากกลูโคสที่ความเข้มข้นเท่ากัน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังเป็น 160 กรัมต่อลิตร สามารถค่าการผลิตรดดีแลกติกสูงสุดถึง 112.52 กรัมต่อลิตร โดยมีกลูโคสเหลือ 4 กรัมต่อลิตร ค่าการผลิตรดดีแลกติกมีค่าเท่ากับการใช้จากกลูโคส 120 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่า SK5-2 สามารถผลิตรดดีแลกติกจากแป้งมันสำปะหลังได้แม้ไม่เติมกลูโคอะไมเลส สามารถผลิตได้ 55 กรัมต่อลิตร เมื่อเติมกลูโคอะไมเลสในขั้นตอนการหมัก จะช่วยเร่งให้เกิดการผลิตรดดีแลกติกสูงขึ้นกว่าเดิมคือ 97.53 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับ CU72-1 จากกระบวนการหมักโดยใช้แหล่งแป้งมันสำปะหลังพบว่าหากไม่เติมกลูโคอะไมเลส CU72-1 ไม่สามารถสร้างกรดดีแลกติกได้ แต่ SK5-2 สามารถผลิตได้ เมื่อเติมกลูโคอะไมเลส CU72-1 ให้ค่าการผลิตรดดีแลกติกมากกว่า SK5-2 อาจเนื่องมาจาก SK5-2 สามารถสร้างเอนไซม์เพื่อใช้ในการเปลี่ยนแป้งเป็นกลูโคสเพื่อผลิตรดแลกติก โดยใช้ระยะเวลาในการสร้างเอนไซม์ ในขณะที่เดียวกันเมื่อเติมกลูโคอะไมเลสลงไป SK5-2 อาจมีโปรตีนเอสที่ส่งผลให้กลูโคอะไมเลสเกิดสูญเสียสภาพบางส่วน และจากการที่ใช้ระยะเวลาในการสร้างเอนไซม์รวมถึงกลูโคอะไมเลสสูญเสียสภาพจึงทำให้เหลือส่วนของโอลิโกแซคคาไรด์บางส่วนที่ไม่ถูกย่อย จึงส่งผลให้ได้กลูโคสในปริมาณที่น้อยทำให้ค่าการผลิตรดดีแลกติกไม่สูงมากนัก และ SK5-2 อาจมีกลไกการควบคุมไม่ให้ผลิตรดดีแลกติกมากขึ้น เนื่องจากยังมีส่วนของโอลิโกแซคคาไรด์ที่ยังไม่ถูกย่อย ในขณะที่ CU72-1 อาจมีโปรตีนเอสที่กิจกรรมไม่สูงมากนักจึงไม่ส่งผลต่อกลูโคอะไมเลส และกลูโคอะไมเลสมีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแป้งเป็นกลูโคสเพื่อผลิตรดดีแลกติกได้ทั้งหมด โดยไม่เหลือส่วนของโอลิโกแซคคาไรด์หลังจากกระบวนการหมักกรดดีแลกติก ทำให้ได้กลูโคสปริมาณมากส่งผลให้ค่าการผลิตรดดีแลกติกสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (แสดงดังตาราง

ที่ 4.5)

ดังนั้นจากการทดลองพบว่า SK5-2 เมื่อใช้กลูโคสความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร ให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกมากที่สุด และสามารถใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนได้โดยมีประสิทธิภาพการผลิตกรดดีแลกติกไม่ดีเมื่อเทียบกับกลูโคส โดยซูโครสความเข้มข้น 160 ให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกสูงสุด นอกจากนี้ยังสามารถใช้แป้งมันสำปะหลังในการผลิตกรดดีแลกติกได้แม้ไม่เติมกลูโคอะไมเลส โดยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 160 กรัมต่อลิตร ให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกมากที่สุดแต่มีประสิทธิภาพการผลิตกรดดีแลกติกต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการใช้จากแหล่งกลูโคส

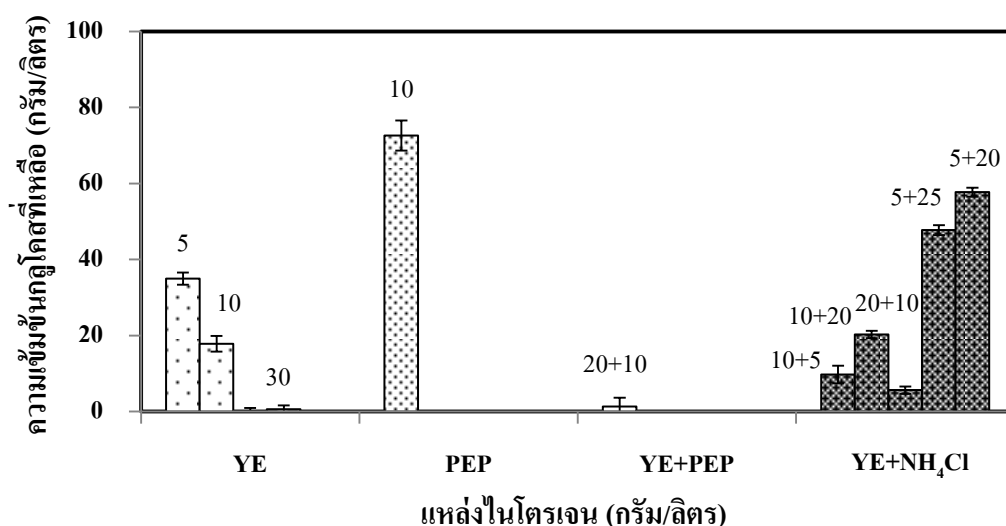
เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียผลิตกรดดีแลกติก จากการใช้แหล่งคาร์บอนเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกยังไม่หลากหลายมากนัก โดยเฉพาะสกุล *Sporolactobacillus* งานวิจัยในครั้งนี้ CU72-1 และ SK5-2 มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดดีแลกติกโดยให้ค่า Yield และ Productivity ที่สูงจากแหล่งคาร์บอนทั้งกลูโคส ซูโครส และแป้งมันสำปะหลัง ทั้งที่เป็นการทดลองการหมักในระดับขวดเขย่าเท่านั้น แสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 การเปรียบเทียบงานวิจัยที่ผลิตกรดแลคติกโดยแบคทีเรียชนิดต่างๆจากทางเลือกแหล่งคาร์บอนที่หลากหลาย

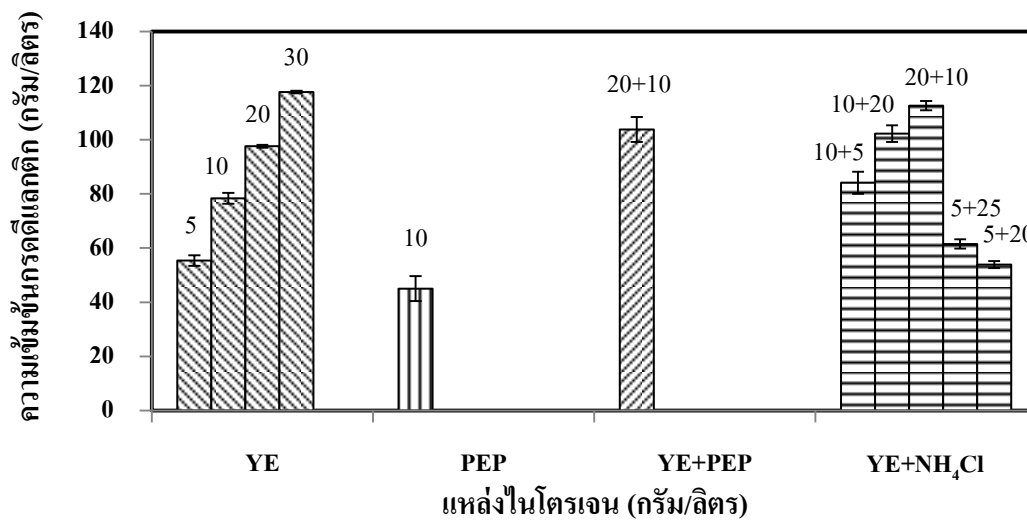
Bacteria	Culture mode	Substrate	D-lactic acid (g/L)	Yield (%)	Productivity (g/L.h)	Optical purity (%ee)	Reference
<i>Lactobacillus plantarum</i> (Δ ldhL1)	-	Cellooligosaccharide β -glucan	1.38	83.63	0.05	99.5	Okano และคณะ (2010)
<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> ATCC25600	SSF	Cellulose	24	89	0.5	-	Y'añez และคณะ (2003)
<i>L. plantarum</i> NCIMB8826	Batch fermentation	Xylose	41.2	89	0.69	99.2	Okano และคณะ (2009)
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> QU41	Batch fermentation	MRS	87.4	10	0.52	99.9	Tashiro และคณะ (2011)
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> IFO 3202	SSF	Rice bran	28	78	0.77	95	Tanaka และคณะ (2006)
<i>L. delbrueckii</i> (LD0025)	Flask scale	Maltose	66.6	-	0.93	99.5	Lee (2007)
<i>L. delbrueckii</i> (LD0028)	Flask scale	Maltose	83.5	-	1.16	96.9	
<i>L. plantarum</i> Δ ldhL1/pCUSQA	Batch fermentation	Starch	73.2	85	3.86	99.6	Okano และคณะ (2010)
<i>L. delbrueckii</i>	Batch fermentation	Sugar cane molass	104	90	1.48	< 97.0	Calabia และ Tokiwa (2007)
		Sugar cane juice	118	95	1.66	<97.0	
		Sugar beet juice	112	88	1.16	<97.0	
CU72-1	Flask scale	Glucose	93.63	81.91	1.30	98.63	งานวิจัย
SK5-2		Glucose	112.45	93.71	1.56	98.79	
SK5-2		Sucrose	116.16	76.17	1.61	98.49	
SK5-2		Tapioca starch	112.519	72.323	1.56	99.35	
CU72-1		Tapioca starch	116.88	97.40	1.62	99.02	

4.4 ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดดีแลคติกจากแหล่งไนโตรเจนที่มีความเข้มข้นและชนิดที่ต่างกันโดยทำการทดลองการหมักในระดับขวดเขย่า

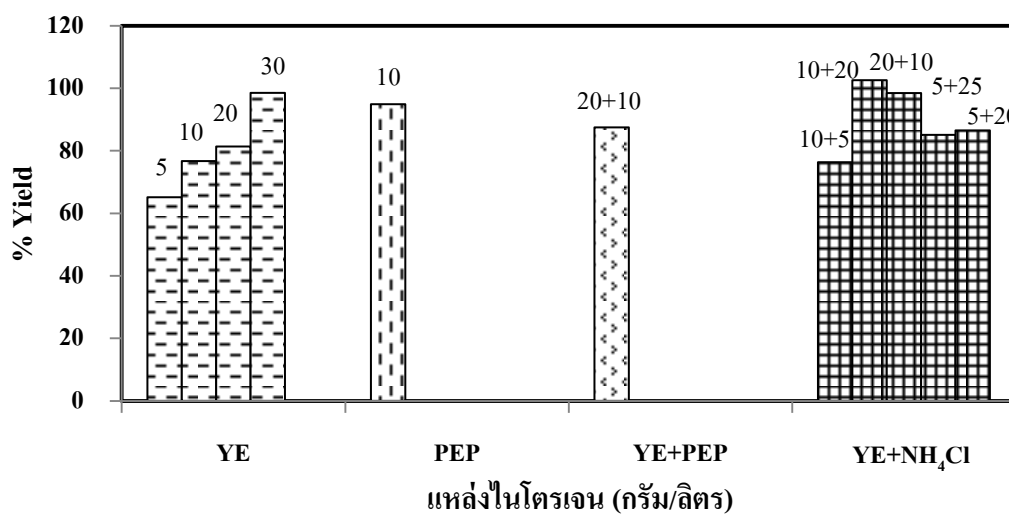
ภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดดีแลคติกจากแหล่งไนโตรเจนที่มีชนิดและความเข้มข้นที่ต่างกัน โดยเลือกใช้สารอนินทรีย์เข้ามาทดแทนสารอินทรีย์ที่มีราคาสูง ในการทดลองเลือกใช้กลูโคสความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนเนื่องจากเป็นน้ำตาลพื้นฐาน ซึ่งจากผลการทดลองในข้อ 4.3 พบว่า CU72-1 และ SK5-2 ที่ความเข้มข้นกลูโคส 120 กรัมต่อลิตร สามารถให้ค่าการผลิตกรดดีแลคติกที่มากและเหมาะสมที่สุด ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกใช้กลูโคสความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนที่ต่างกัน โดย YE คือสารสกัดจากยีสต์ PEP คือเปปโทน และ NH_4Cl คือแอมโมเนียมคลอไรด์



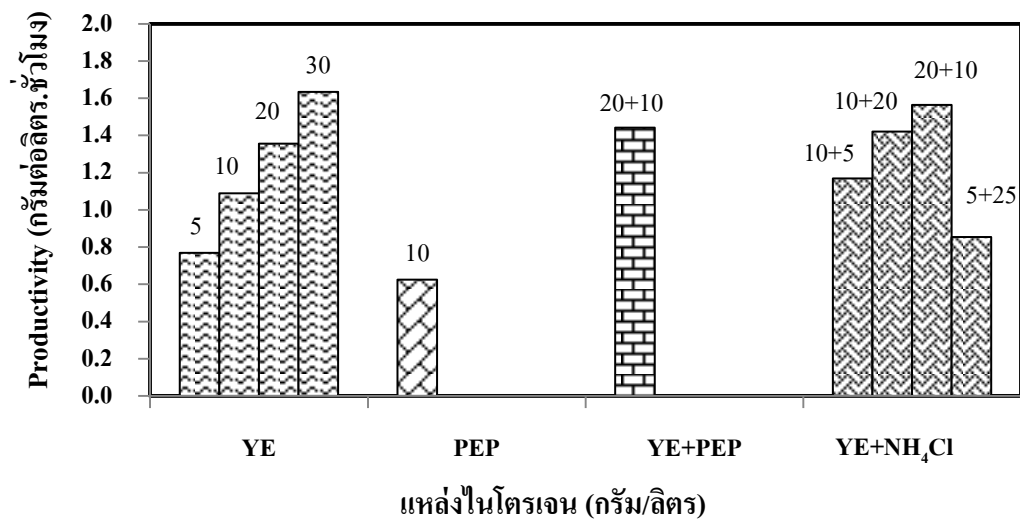
รูปที่ 4.15 ปริมาณกลูโคสที่เหลือหลังจากกระบวนการหมักกรดดีแลคติกจากแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย CU72-1



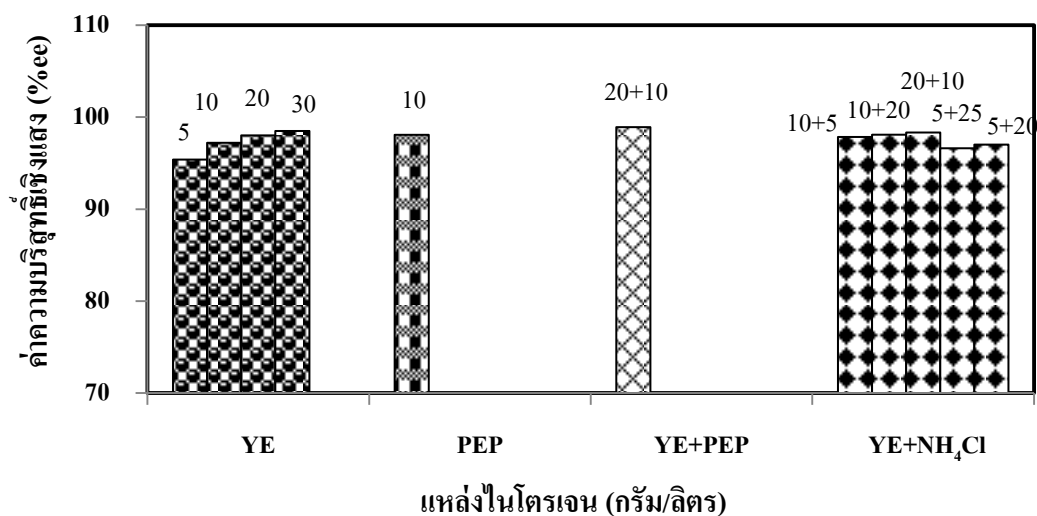
รูปที่ 4.16 การผลิตกรดอะมิโนจากแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย CU72-1



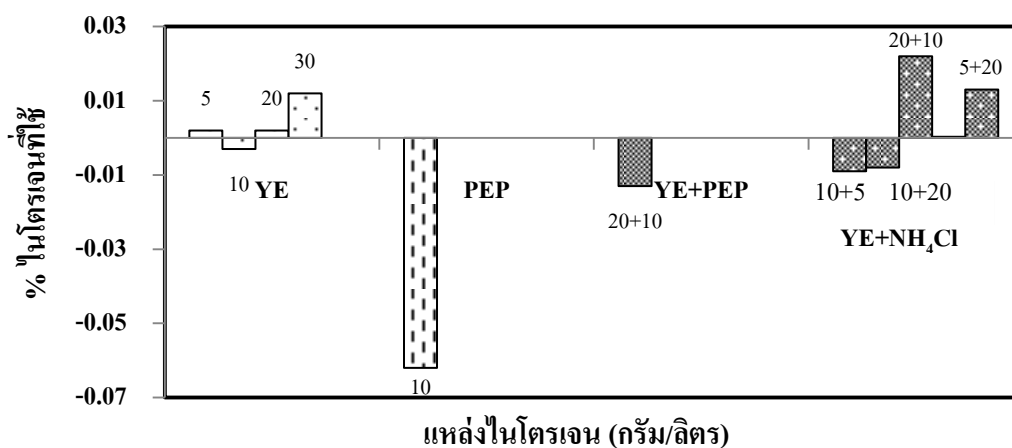
รูปที่ 4.17 ผลของค่า Yield จากแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย CU72-1



รูปที่ 4.18 ผลของค่า Productivity แหล่งจากแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดและความเข้มข้นโดยโดย CU72-1



รูปที่ 4.19 ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง (%ee) จากแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย CU72-1



รูปที่ 4.20 ปริมาณไนโตรเจนที่ใช้หลังจากกระบวนการหมักกรดดีแลกติกโดย CU72-1

ตารางที่ 4.7 สรุปผลการผลิตกรดดีแลกติกจากแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันโดย CU72-1

กลุ่มทดลอง	ภาวะ	กรดดีแลกติก				ความเข้มข้น กลูโคสสุดท้าย (g/L)
		ความเข้มข้น สุดท้าย (g/L)	%Yield	Productivity (g/L.h)	%ee	
1. YE	1. YE = 5	55.40	65.15	0.77	95.39	34.97
	2. YE = 10	78.39	76.72	1.09	97.22	17.83
	3. YE = 20	97.66	81.39	1.36	98.02	0
	4. YE = 30	117.67	98.55	1.63	98.50	0.60
2. PEP	5. PEP = 10	45.00	94.91	0.62	98.08	72.59
3. YE+PEP	6. YE = 20 + PEP = 10 (ตัวควบคุม)	103.84	87.550	1.44	98.92	1.33
4. YE+ NH ₄ Cl	7. YE = 10 + NH ₄ Cl = 5	84.19	76.36	1.17	97.85	9.75
	8. YE = 10 + NH ₄ Cl = 20	102.31	102.60	1.42	98.10	20.28
	9. YE = 20 + NH ₄ Cl = 10	112.63	98.49	1.56	98.34	5.64
	10. YE = 5 + NH ₄ Cl = 25	61.50	85.11	0.85	96.62	47.75
	11. YE = 5 + NH ₄ Cl = 20	53.89	86.54	0.75	97.02	57.72

จากการทดลองหาภาวะที่เหมาะสมโดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่มีชนิดและความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ CU72-1 โดยแบ่งการทดลองเป็น 4 กลุ่มใหญ่ คือ 1. เดิมแก่สารสกัดจากยีสต์ 2. เดิม

แค่เปปโทน 3. สารสกัดจากยีสต์ผสมกับเปปโทน และ 4. สารสกัดจากยีสต์ผสมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ (YE, สารสกัดจากยีสต์; PEP, เปปโทน; NH_4Cl , แอมโมเนียมคลอไรด์) โดยตัวเลขที่ระบุบนกราฟแท่งคือความเข้มข้นของสารในแต่ละองค์ประกอบแหล่งไนโตรเจน

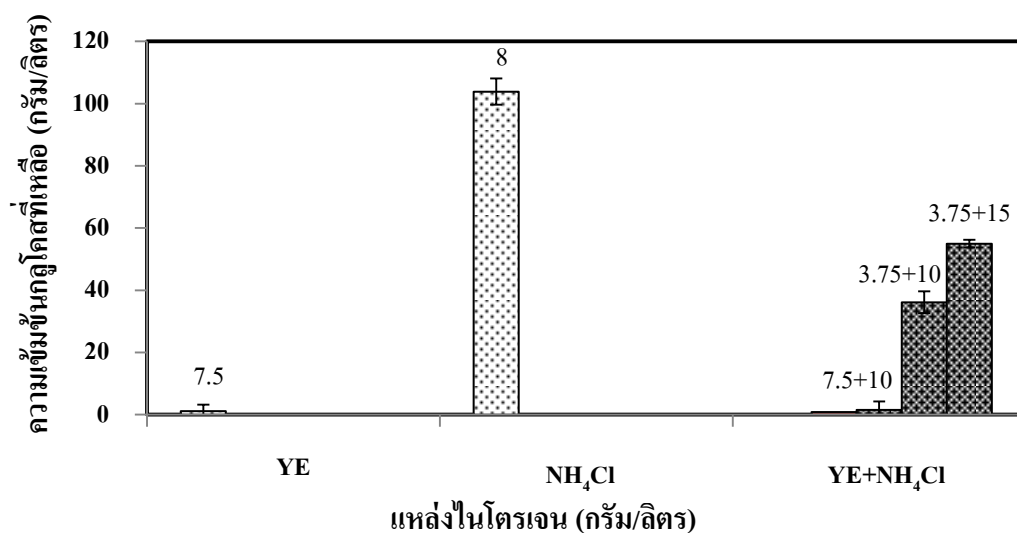
พบว่าเมื่อความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์เพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกมากขึ้นเช่นกัน (แสดงดังรูปที่ 4.16) แสดงว่าสารสกัดจากยีสต์มีผลต่อการผลิตกรดดีแลกติก โดยเฉพาะในการเจริญเติบโตของเซลล์ และการผลิตกรดดีแลกติก เนื่องจากสารสกัดจากยีสต์ประกอบไปด้วยเพียวรีน ไพริมิดีน และวิตามินบี ซึ่งแบคทีเรียจำเป็นต้องใช้เพื่อการเจริญเติบโตและผลิตกรดแลกติก เพราะตัวมันเองมีข้อจำกัดในการสังเคราะห์กรดอะมิโนและวิตามิน (Hujanen และ Linko, 1995) ถ้าใส่แค่เปปโทนอย่างเดียวจะส่งผลให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกต่ำลงอย่างเห็นได้ชัด โดยเหลือกลูโคสในปริมาณที่มาก (แสดงดังรูปที่ 4.15) ซึ่งการผลิตกรดดีแลกติกได้ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้นเดียวกัน เพราะในเปปโทนมีองค์ประกอบของกรดอะมิโน และเปปไทด์ แต่ไม่มีวิตามินบี จึงส่งผลให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกต่ำกว่าการใช้สารสกัดจากยีสต์ (Loginova และคณะ, 2001) แสดงว่าสารสกัดจากยีสต์มีผลต่อการเจริญและผลิตกรดดีแลกติกมากกว่าเปปโทน เมื่อเลือกใช้สารสกัดจากยีสต์ผสมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ พบว่าเมื่อความเข้มข้นแอมโมเนียมคลอไรด์มากขึ้นส่งผลให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกมากขึ้น แสดงว่าแอมโมเนียมคลอไรด์มีผลต่อการผลิตกรดดีแลกติก (แสดงดังรูป 4.16) เมื่อทดลองใช้สารสกัดจากยีสต์และแอมโมเนียมคลอไรด์คือ 20 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกสูงสุดคือ 112.63 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ค่า Yield Productivity และค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง คือ 98.48 เปอร์เซ็นต์ 1.56 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 98.34 %ee ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าตัวควบคุมที่ใช้สารสกัดจากยีสต์และเปปโทนคือ 20 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกที่ต่ำกว่าคือ 103.84 กรัมต่อลิตร มีค่า Yield Productivity และค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง คือ 87.5 เปอร์เซ็นต์ 1.44 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 98.92 %ee ตามลำดับ (แสดงดังรูป 4.16-4.19) จากการทดลองหากเพิ่มความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์น้อยเกินไปถึงแม้จะใส่แอมโมเนียมคลอไรด์สูง พบว่าค่าการผลิตกรดดีแลกติกต่ำลงเนื่องจากมีวิตามินที่ได้จากสารสกัดจากยีสต์ไม่เพียงพอต่อการผลิตกรดดีแลกติก

เมื่อพิจารณาไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตกรดดีแลกติกพบว่าใช้ปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้นในการผลิตกรดดีแลกติก (แสดงดังรูปที่ 4.20) อาจเนื่องจากแบคทีเรียจำเป็นต้องใช้กรดอะมิโน และวิตามินเพื่อใช้ในการรักษาสภาพตัวมันเองให้มีกิจกรรมในการผลิตกรดดีแลกติกได้ ถ้าหากมีกรดอะมิโน และวิตามินในปริมาณที่น้อยเกินไปจะส่งผลให้การผลิตกรดดีแลกติกต่ำ เนื่องจากเซลล์ใช้ Cofactor เหล่านี้หมุนเวียนภายในเซลล์ ซึ่งอาจนำมาใช้ไม่เพียงพอต่อการผลิตกรดดีแลกติก

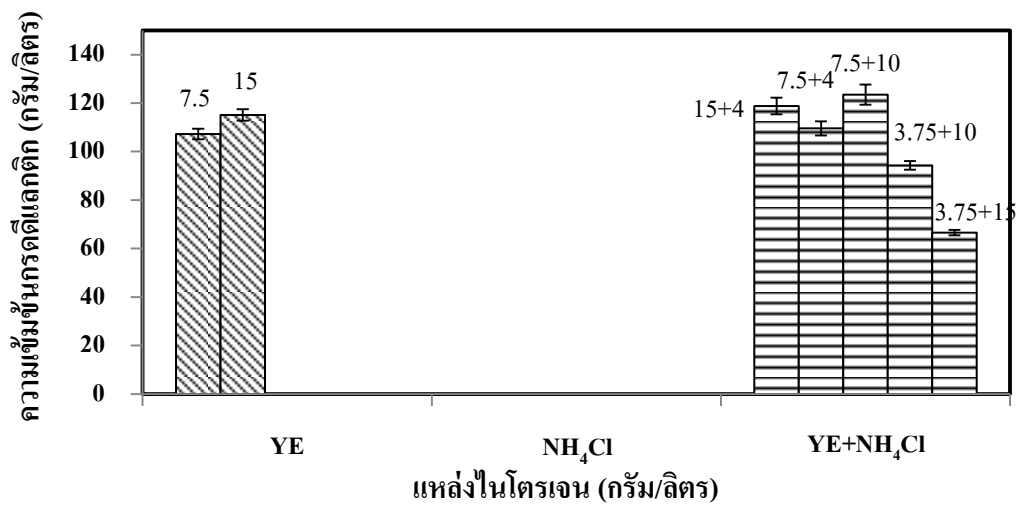
ในรายงานวิจัยของ Nancib และคณะ (2005) ผลิตกรดแลกติกจากกระบวนการหมักของ

L. casei subsp. *rhamnosus* NRRL-B445 พบว่าเมื่อใช้ NH_4SO_4 ให้ค่าการผลิตกรดแลกติกได้มากกว่าเปปโทน ซึ่งคล้ายคลึงกับงานวิจัยในครั้งนี้อันที่เลือกใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ร่วมกับสารสกัดจากยีสต์ คือ 20 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยสามารถให้ค่าการผลิตกรดแลกติกสูงสุด

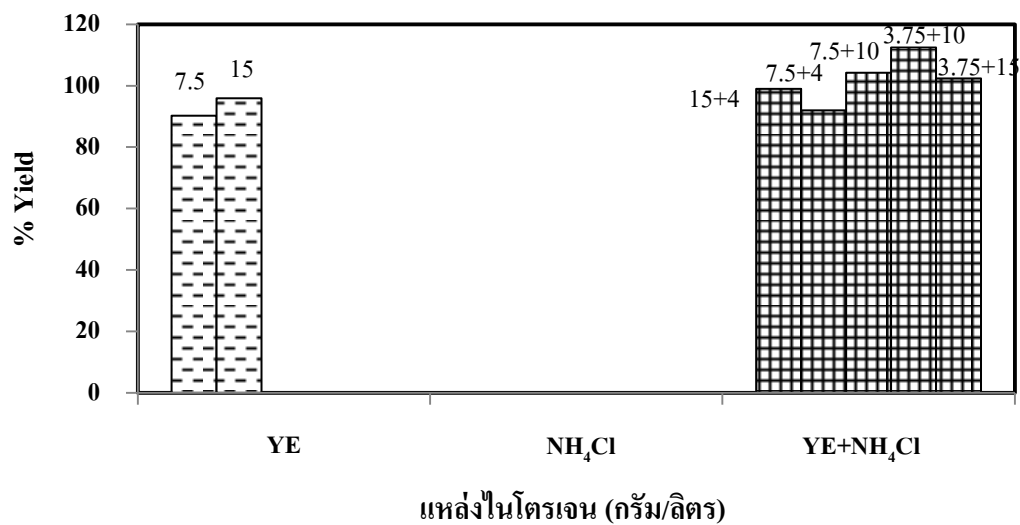
จากการหาภาวะที่เหมาะสมจากการใช้แหล่งไนโตรเจนของ CU72-1 พบว่าเมื่อปริมาณสารสกัดจากยีสต์เพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่าการผลิตกรดแลกติกมากขึ้นเช่นกัน ซึ่งสารสกัดจากยีสต์มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกมากกว่าการใช้เปปโทน อีกทั้งเปปโทนยังมีราคาที่สูงกว่าสารสกัดจากยีสต์จึงจำเป็นต้องหาแหล่งไนโตรเจนอื่นทดแทน ซึ่งหนึ่งในทางเลือกนั้นคือแอมโมเนียมคลอไรด์ เนื่องจากมีราคาถูก และใช้งานง่าย ภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตกรดแลกติกคือสารสกัดจากยีสต์ 20 และแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ให้ค่าการผลิตกรดแลกติก Yield และ Productivity คือ 112.63 กรัมต่อลิตร 98.49 เปอร์เซ็นต์ และ 1.56 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมากกว่าตัวควบคุมสารสกัดจากยีสต์ และเปปโทนคือ 20 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (แสดงดังตารางที่ 4.7) ซึ่งสามารถผลิตกรดแลกติกในปริมาณที่มากกว่าเดิมและช่วยลดต้นทุนในการผลิตอีกด้วย



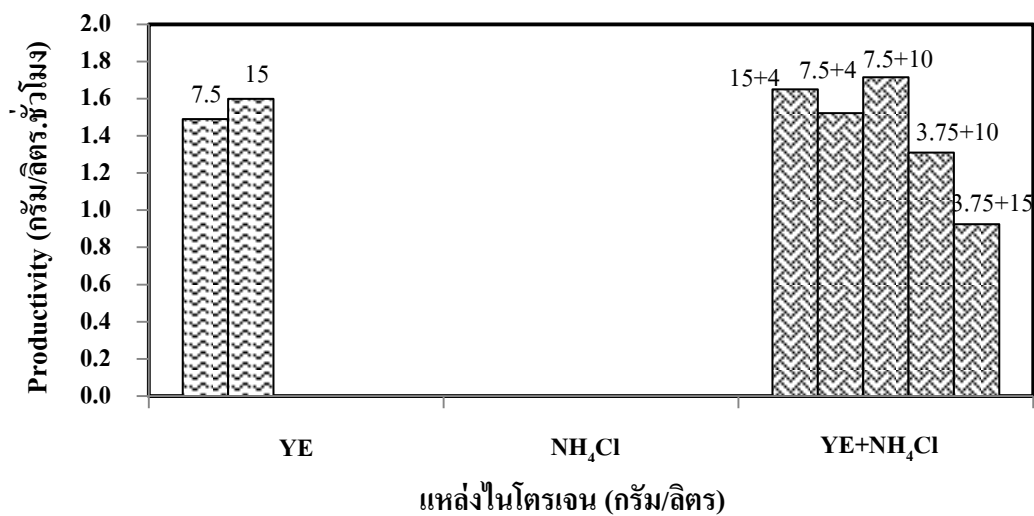
รูปที่ 4.21 ปริมาณกลูโคสที่เหลือหลังจากกระบวนการหมักกรดแลกติกจากแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย SK5-2



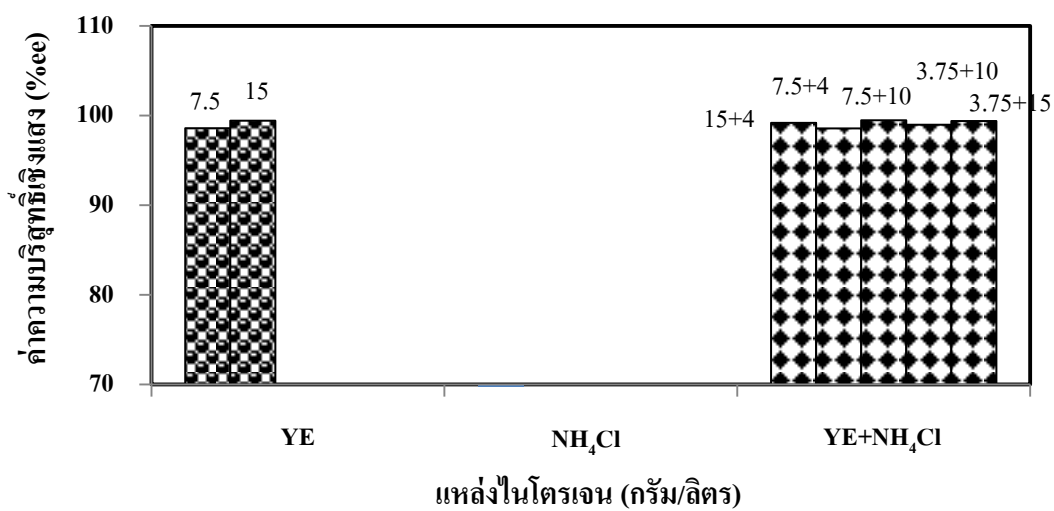
รูปที่ 4.22 การผลิตกรดดีแลคติกจากแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย SK5-2



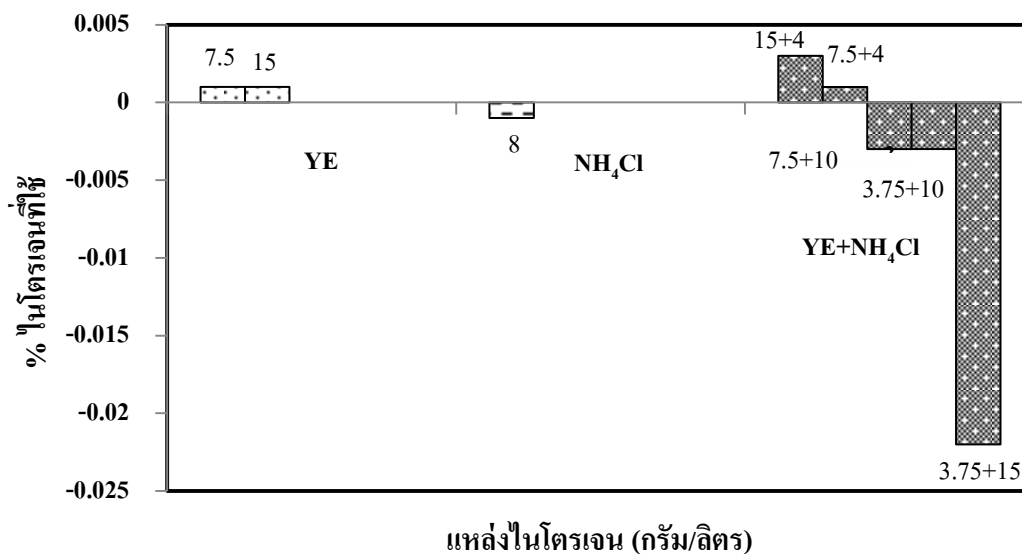
รูปที่ 4.23 ผลของค่า Yield จากแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดและความเข้มข้นโดย SK5-2



รูปที่ 4.24 ผลของค่า Productivity จากแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดและความเข้มข้น โดย SK5-2



รูปที่ 4.25 ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง(%ee)จากแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดและความเข้มข้น โดย SK5-2



รูปที่ 4.26 ปริมาณไนโตรเจนที่ใช้หลังจากกระบวนการหมักกรดดีแลกติกโดย SK5-2

ตารางที่ 4.8 สรุปผลการผลิตกรดดีแลกติกจากแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันโดย SK5-2

กลุ่มทดลอง	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	กรดดีแลกติก				ความเข้มข้น กลูโคสสุดท้าย (g/L)
		ความเข้มข้น สุดท้าย (g/L)	%Yield	Productivity (g/L.h)	%ee	
1. YE	1. YE = 7.5	107.25	90.25	1.49	98.59	1.16
	2. YE = 15	115.10	95.92	1.60	99.42	0
2. NH ₄ Cl	3. NH ₄ Cl = 8	0	0	0	0	103.87
3. YE+NH ₄ Cl	4. YE = 15 + NH ₄ Cl = 4 (ตัวควบคุม)	118.78	98.99	1.65	99.18	0
	5. YE = 7.5 + NH ₄ Cl = 4	109.60	91.99	1.52	98.56	0.87
	6. YE = 7.5 + NH ₄ Cl = 10	123.48	104.24	1.72	99.47	1.54
	7. YE = 3.75 + NH ₄ Cl = 10	94.31	112.46	1.31	98.97	36.14
	8. YE = 3.75 + NH ₄ Cl = 15	66.57	102.38	0.92	99.39	54.98

จากการทดลองหาภาวะที่เหมาะสมจากแหล่งไนโตรเจนที่มีชนิดและความเข้มข้นที่แตกต่างกันของ SK5-2 โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 กลุ่มหลัก คือ 1. เดิมแก่สารสกัดจากยีสต์ 2. เดิมแก่แอมโมเนียมคลอไรด์ และ 3. สารสกัดจากยีสต์ผสมกับแอมโมเนียมคลอไรด์ (YE, สารสกัดจาก

ยีสต์; NH_4Cl , แอมโมเนียมคลอไรด์) โดยตัวเลขที่ระบุด้านบนกราฟแท่งคือความเข้มข้นของสารในแต่ละองค์ประกอบแหล่งไนโตรเจน

พบว่าเมื่อความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์เพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกมากขึ้น แสดงดังรูปที่ 4.22 แสดงว่าสารสกัดจากยีสต์มีผลต่อการเจริญของเซลล์ และการผลิตกรดดีแลกติก ถ้าใส่แค่แอมโมเนียมคลอไรด์อย่างเดียวจะไม่สามารถผลิตกรดดีแลกติกได้เลย และเหลือกลูโคสในปริมาณที่มาก แสดงดังรูปที่ 4.21 เมื่อใส่สารสกัดจากยีสต์ผสมกับแอมโมเนียมคลอไรด์พบว่าเมื่อความเข้มข้นแอมโมเนียมคลอไรด์มากขึ้นส่งผลให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกมากขึ้น โดยสารสกัดจากยีสต์และแอมโมเนียมคลอไรด์ 7.5 และ 10 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าสามารถให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกสูงสุด ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง Yield และ Productivity คือ 123.48 กรัมต่อลิตร 99.47 %ee 104.24 เปอร์เซ็นต์ และ 1.72 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งให้ค่ามากกว่าตัวควบคุมสารสกัดจากยีสต์ 15 และแอมโมเนียมคลอไรด์ 4 กรัมต่อลิตร มีค่าการผลิตกรดดีแลกติก ความบริสุทธิ์เชิงแสง Yield และ Productivity คือ 118.78 กรัมต่อลิตร 99.18 %ee 98.99 เปอร์เซ็นต์ และ 1.65 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อลดสารสกัดจากยีสต์เหลือเพียง 3.75 กรัมต่อลิตร แต่เพิ่มแอมโมเนียมคลอไรด์มากขึ้นเป็น 10 และ 15 กรัมต่อลิตร พบว่าที่แอมโมเนียมคลอไรด์ 15 กรัมต่อลิตรให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกต่ำลง และมีปริมาณกลูโคสเหลือมากกว่าการใช้แอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร อาจเนื่องจากแอมโมเนียมไอออนอาจเป็นอันตรายต่อเซลล์ โดยส่งผลให้เกิดภาวะความเป็นด่างมากขึ้นจึงทำให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกต่ำลง (Leejeerajumnean และคณะ, 2000) การมีปริมาณไนโตรเจนมากเกินไปอาจยับยั้งการเจริญและสร้างกรดดีแลกติกได้เช่นกัน (Bolner de Lima และคณะ, 2009)

เมื่อพิจารณาไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตกรดดีแลกติก พบว่าใช้ปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ในการผลิตกรดดีแลกติก (แสดงดังรูปที่ 4.26) อาจเนื่องจากแบคทีเรียจำเป็นต้องใช้กรดอะมิโน และวิตามิน เพื่อใช้ในการรักษาสภาพตัวเองให้มีกิจกรรมในการผลิตกรดดีแลกติก หากมีกรดอะมิโน และวิตามินในปริมาณที่น้อยเกินไปจะส่งผลให้ผลิตกรดดีแลกติกต่ำ เนื่องจากเซลล์ใช้ Cofactor หมุนเวียนภายในเซลล์ ซึ่งอาจนำมาใช้ไม่เพียงพอต่อการผลิตกรดดีแลกติก

จากการหาภาวะที่เหมาะสมจากการใช้แหล่งไนโตรเจนของ SK5-2 พบว่าเมื่อความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์มากขึ้นส่งผลต่อการผลิตกรดดีแลกติกมากขึ้น ภาวะที่เหมาะสมสุดในการผลิตกรดดีแลกติกคือ สารสกัดจากยีสต์ 7.5 และแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร โดยให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติก ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง Yield และ Productivity มากสุดคือ 123.48 กรัมต่อลิตร 99.47 %ee 104.24 เปอร์เซ็นต์ และ 1.72 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ จากการที่สามารถใช้สารพวกอนินทรีย์ที่มีราคาถูกทดแทนสารอินทรีย์จะช่วยลดต้นทุนในกระบวนการผลิตอีกทั้งยังเพิ่ม

ปริมาณการผลิตกรดดีแลกติกให้มากขึ้นอีกด้วย

เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียที่ผลิตกรดดีแลกติกจากแหล่งไนโตรเจนที่หลากหลาย ดังตารางที่ 4.9 พบว่า CU72-1 และ SK5-2 สามารถให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติก Yield และ Productivity ในปริมาณที่สูงเมื่อเทียบกับงานวิจัยอื่นทั้งที่เป็นการทดลองในระดับขวดเย้าเท่านั้น

ตารางที่ 4.9 การเปรียบเทียบงานวิจัยที่ผลิตกรดดีแลคติกโดยแบคทีเรียต่างชนิดจากทางเลือกแหล่งไนโตรเจนที่หลากหลาย

Bacteria	Culture mode	Substrate	D-lactic acid (g/L)	Yield (%)	Productivity (g/L.h)	Optical purity (%ee)	Reference
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	Flask scale	Glucose + CSL + Yeast extract + Peptone	58.9	-	0.61	-	Bustos และคณะ (2004)
<i>L. SM18</i>	Batch fermentation	Glucose + CSL + Yeast extract	41.42	-	1.29	-	Bolner de Lima และคณะ (2009)
<i>L. delbrueckii</i> HG106	Batch fermentation	Wheat bran powder + Yeast extract	74.7	-	1.29	-	Lu และคณะ (2009)
<i>Sporolactobacillus</i> sp. CASD	Fed batch fermentation	Peanut meal	207	93	3.8	99.3	Wang และคณะ (2011)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> B512	Flask scale	Sugarcane juice + Yeast extract	59.2	-	2.3	-	Coelho และคณะ (2011)
		Sugarcane juice + CSL	36	-	1.25	-	
CU72-1	Flask scale	Yeast extract + NH ₄ Cl	112.63	98.49	1.56	98.34	งานวิจัย
SK5-2		Yeast extract + NH ₄ Cl	123.48	104.24	1.72	99.47	

4.5 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่ผลิตกรดดีแลคติกที่คัดเลือกได้

จากการศึกษาคุณลักษณะด้านสัณฐานวิทยา (Morphology) สรีรวิทยา (Physiology) และชีวเคมี (Biochemical) ของแบคทีเรียที่ผลิตกรดดีแลคติกที่คัดเลือกได้ สามารถแบ่งแบคทีเรียเป็น 2 กลุ่ม คือ *Sporolactobacillus* และแบคทีเรียสกุลใหม่ที่ใกล้เคียงกับ *Scopulibacillus*

4.5.1 สกุล *Sporolactobacillus*

SK5-2 CU38-12 CU68-1 และ CU72-1 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง โคโลนีมีลักษณะกลม ผิวหนูนเล็กน้อย เส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง 1.0-2.4 มิลลิเมตร มีสีขาวคล้ายสิ่งขำง เซลล์เคลื่อนที่ได้ และสร้างสปอร์ (แสดงดังรูปที่ 4.27) เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20-40 องศาเซลเซียส SK5-2 และ CU68-1 เจริญที่ความเข้มข้น 3 %NaCl และ CU38-12 เจริญที่ความเข้มข้น 7 %NaCl และ CU72-1 เจริญที่ความเข้มข้น 5 %NaCl เจริญได้ในช่วงพีเอช 4.5-8.5 หมักน้ำตาล กลูโคสแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ ไม่สร้าง Oxidase ไม่มีดิวิชันในเทรต ไม่สามารถย่อยสลายแป้ง และอาร์จินีน มีองค์ประกอบผนังเซลล์ชนิด meso-DAP สามารถผลิตกรดได้จาก D(+) fructose glucose D(+) maltose D(+) mannose sucrose และ D(+) trehalose แต่ไม่ผลิตกรดจาก amygdalin D(+) cellobiose dulcitol meso-erythritol D-galactose lactose D(+) melezitose ribitol และ D(+) xylose และสามารถผลิตกรดจากแหล่งน้ำตาลที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 4.10

เมื่อนำผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสบนสาย 16s rRNA gene ของ SK5-2 CU38-12 CU68-1 และ CU72-1 มาเปรียบเทียบกับข้อมูลของสายพันธุ์โดย www.eztaxon.com และสร้างแผนภูมิ Phylogenetic tree พบว่าทุกไอโซเลทจัดอยู่ในสกุล *Sporolactobacillus* (Yanagida และคณะ, 1997) แสดงดังรูปที่ 4.28

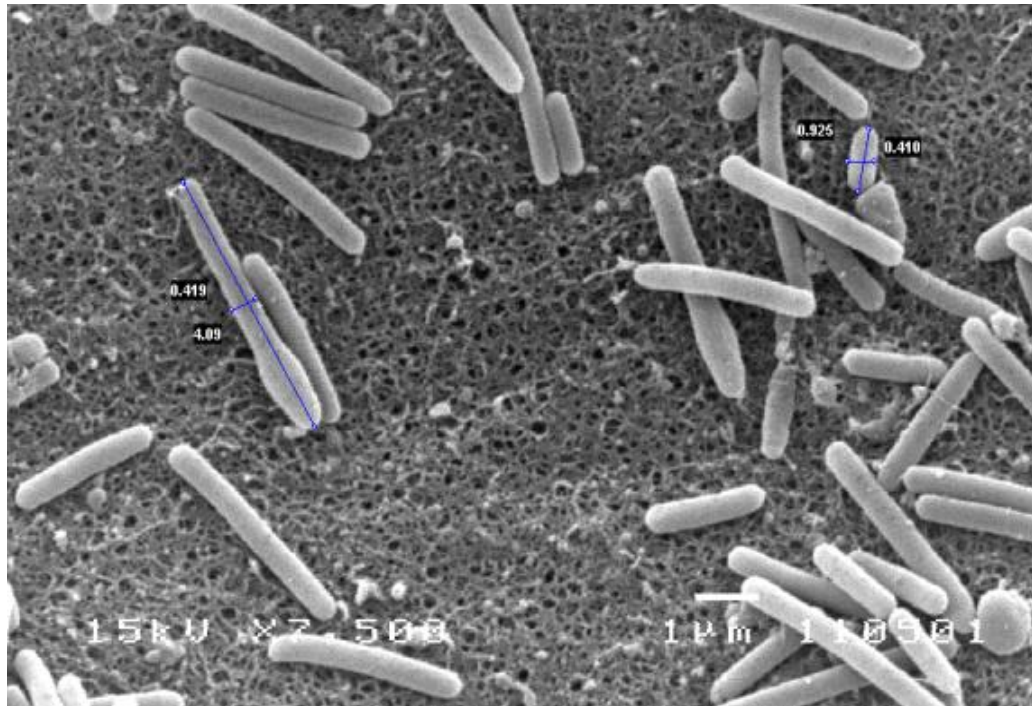
SK5-2 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 99.5 เปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกับ *Sporolactobacillus laevolacticus* IAM12321^T จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ไอโซเลท SK5-2 เป็น *S. laevolacticus*

CU38-12 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกับ *Sporolactobacillus kofuensis* DSM 11701^T จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ไอโซเลท CU38-12 เป็น *S. kofuensis*

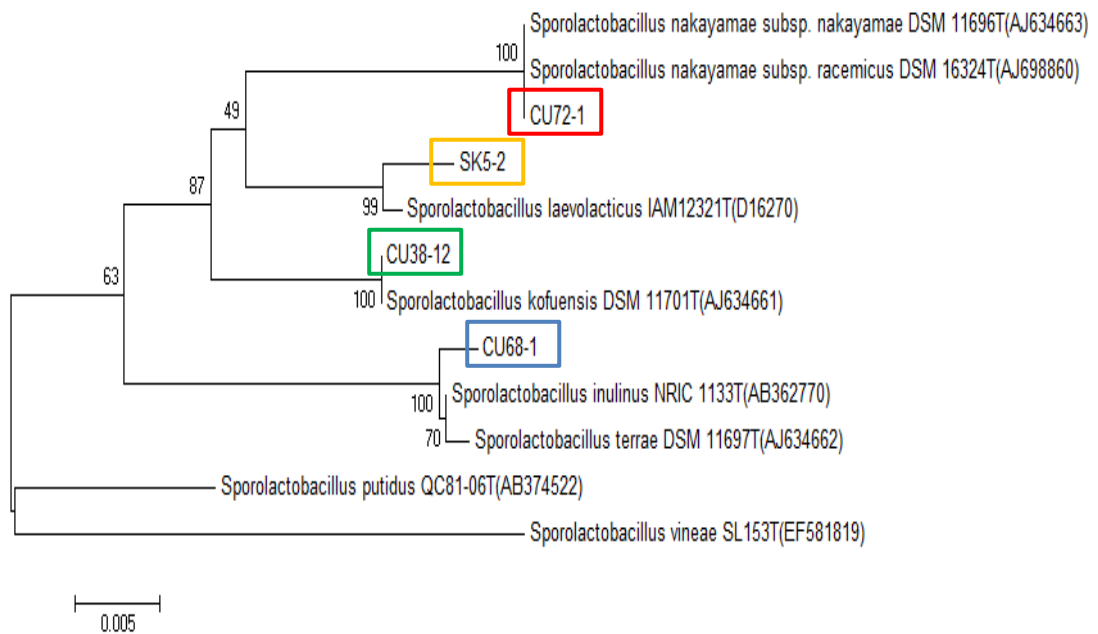
CU68-1 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 99.7 เปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกับ *Sporolactobacillus terrae* DSM 11697^T และ *Sporolactobacillus inulinus* NRIC 1133^T แต่ไอโซเลท CU68-1 มีลักษณะทางพีโนไทป์ใกล้เคียงกับ *S. inulinus* NRIC 1133^T จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ไอโซเลท CU68-1 เป็น *S. inulinus*

CU72-1 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับ *Sporolactobacillus nakayama* subsp. *nakayamae* DSM11696^T จึงพิสูจน์เอกลักษณ์ไอโซเลท CU72-1 เป็น

S. nakayamae subsp. *nakayamae*



รูปที่ 4.27 การสร้างสปอร์ของ SK5-2



รูปที่ 4.28 แผนภูมิ Phylogenetic tree ของทุกไอโซเลทเปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน

ตารางที่ 4.10 ลักษณะความแตกต่างทางฟีโนไทป์ของ SK5-2 CU38-12 CU68-1 และ CU72-1 เทียบกับ *Sporolactobacillus* species

Characteristic	SK5-2	<i>S. laevolacticus</i>	CU38-12	<i>S. kofuensis</i>	CU68-1	<i>S. terrae</i>	<i>S. inulinus</i>	CU72-1	<i>S. nakayamae</i> subsp. <i>nakayamae</i>	<i>S. nakayamae</i> subsp. <i>racemicus</i>
Colony size (mm)	1.4-2.0	1.0-1.8	<1.0-1.4	1.2-2.6	1.0-2.3	1.0-2.3	0.9-2.2	1.0-2.3	0.9-2.1	<1.0-2.4
Shape	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Spore	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temperature range for growth (°C)	20-40	20-40	20-40	20-40	20-40	20-40	20-40	20-40	20-40	20-45
NaCl (%)	3	3	7	3	3	5	3	5	3	3
pH range for growth	4.5-8.5	4.5-8.5	4-8.5	4-8.5	4.5-8.5	4.5-8.5	4.5-8.5	4.5-8.5	4.5-8.5	5-8.5
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid production from Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D(+) Arabitol	w	-	-	+	-	+	+	w	w	-
Dextran	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4.9 (ต่อ) ลักษณะความแตกต่างทางฟีโนไทป์ของ SK5-2 CU38-12 CU68-1 และ CU72-1 เทียบกับ *Sporolactobacillus* species

Characteristic	SK5-2	<i>S. laevolacticus</i>	CU38-12	<i>S. kofuensis</i>	CU68-1	<i>S. terrae</i>	<i>S. inulinus</i>	CU72-1	<i>S. nakayamae</i> subsp. <i>nakayamae</i>	<i>S. nakayamae</i> subsp. <i>racemicus</i>
Dulcitol	-	-	-	+	-	-	-	-	W	-
D(+) Cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D(+) Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Inulin	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Lactose	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
D(+) Maltose	w	+	+	+	+	w	w	+	+	-
D(+) Mannitol	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
D(+) Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D(+) Melibiose	-	+	-	-	w	-	-	-	-	w
D(+) Melezitose	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
Raffinose	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
D(-) Ribose	-	-	w	+	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w

ตารางที่ 4.9 (ต่อ) ลักษณะความแตกต่างทางฟีโนไทป์ของ SK5-2 CU38-12 CU68-1 และ CU72-1 เทียบกับ *Sporolactobacillus* species

Characteristic	SK5-2	<i>S. laevolacticus</i>	CU38-12	<i>S. kofuensis</i>	CU68-1	<i>S. terrae</i>	<i>S. inulinus</i>	CU72-1	<i>S. nakayamae</i> subsp. <i>nakayamae</i>	<i>S. nakayamae</i> subsp. <i>racemicus</i>
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-
L(-) Sorbose	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
D(+) Trehalose	w	+	+	+	+	+	+	+	+	-

หมายเหตุ : *S. laevolacticus* IAM12321^T, *S. kofuensis* DSM 11701^T, *S. terrae* DSM 11697^T, *S. inulinus* NRIC 1133^T, *S. nakayamae* subsp. *nakayamae* DSM11696^T, *S. nakayamae* subsp. *racemicus* DSM 16324^T

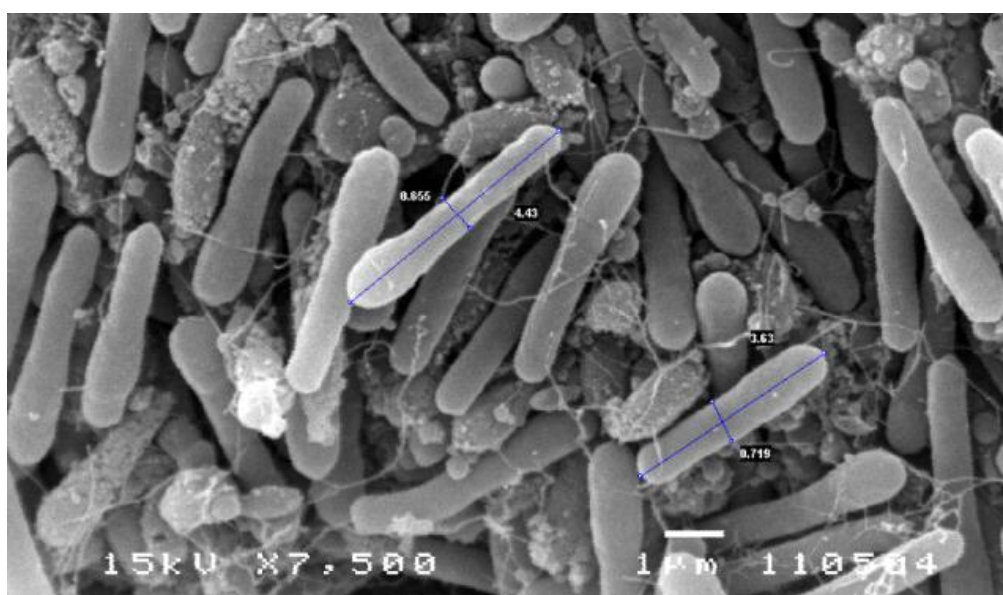
+, ผลิตรกรด; -, ไม่ผลิตรกรด; w, ผลิตรกรดเล็กน้อย; ND, ไม่มีข้อมูล

4.5.2 สกุล *Scopulibacillus*

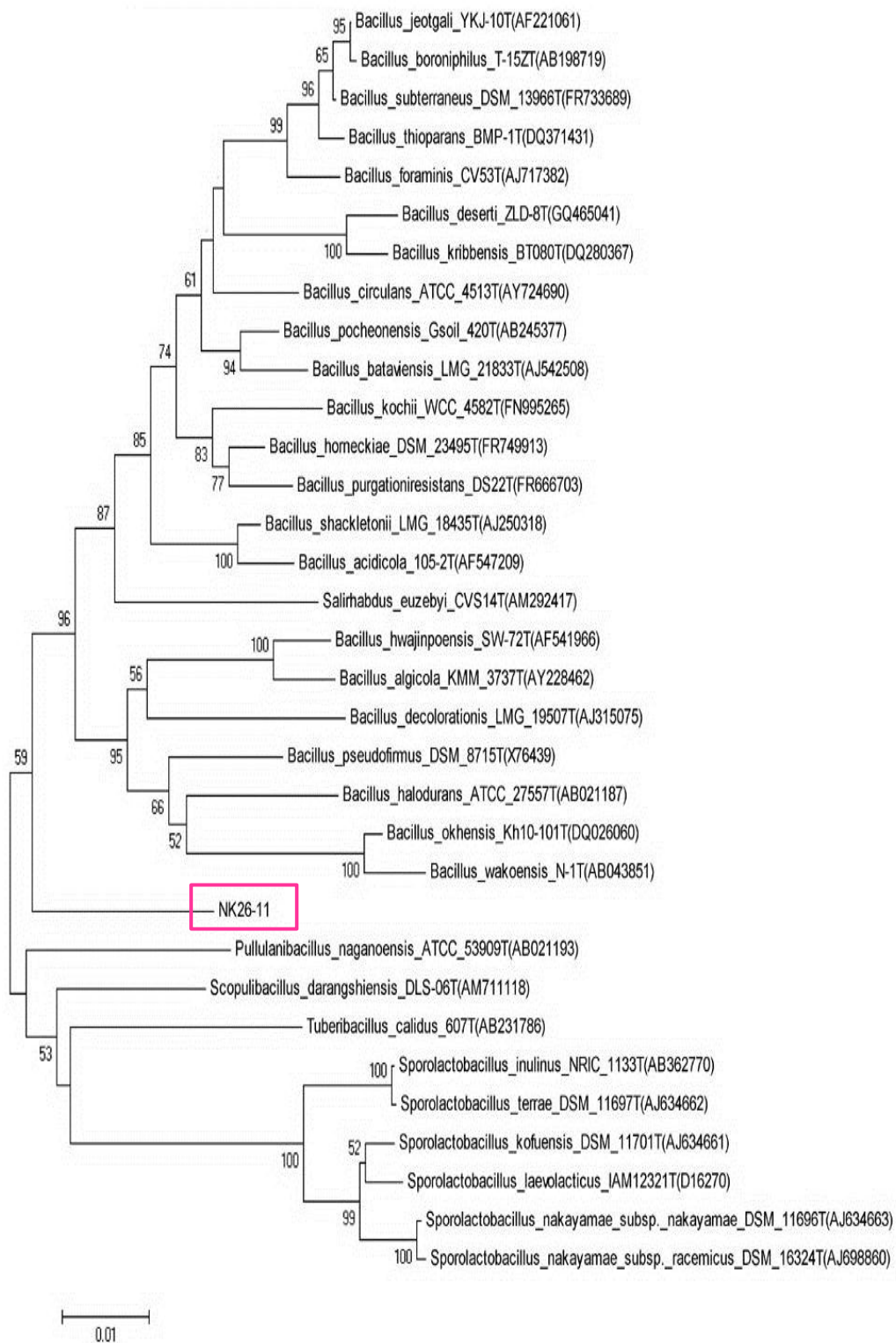
NK26-11 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างแท่ง โคโลนีมีลักษณะกลม ผิวมันเล็กน้อย เส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ในช่วง 1.0-1.4 มิลลิเมตร มีสีขาวคล้ายสิ่งข้าง และสร้างสปอร์ (แสดงดังรูปที่ 4.29) เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 20-45 องศาเซลเซียส เจริญได้ที่ความเข้มข้น 3 %NaCl เจริญได้ในช่วงพีเอช 5-8.5 หมักน้ำตาลกลูโคสแบบโฮโมเฟอร์เมนเททิฟ ไม่สร้าง Oxidase สามารถรีดิวซ์ไนเตรต ไม่สามารถย่อยสลายแป้ง และอาร์จินีน มีองค์ประกอบผนังเซลล์ชนิด *meso*-DAP สามารถผลิตกรดได้จาก D(+) Fructose glucose lactose D(+) mannose D(+) maltose raffinose sucrose และ D(+) trehalose แต่ไม่สามารถผลิตกรดได้จาก amygdalin D(+) arabitol L(+)arabinose D(+) cellobiose dextran dulcitol *meso*-erythritol D-galactose inulin D(+) mannitol D(+) melibiose D(+) melezitose ribitol D(-) ribose sorbitol L(-) sorbose และ D(+)xylose ซึ่งไอโซเลท NK26-11 มีความแตกต่างทางฟีโนไทป์เทียบกับ *Scopulibacillus* species แสดงดังตารางที่ 4.11

เมื่อนำผลการวิเคราะห์หาลำดับเบสบนสาย 16s rRNA gene ของไอโซเลท NK26-11 มาเปรียบเทียบกับข้อมูลของสายพันธุ์โดย www.eztaxon.com และสร้างแผนภูมิ Phylogenetic tree พบว่าไอโซเลทนี้ใกล้เคียงกับสกุล *Scopulibacillus* แสดงดังรูปที่ 4.30

NK26-11 มีความเหมือน 95.5 เปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกับ *Scopulibacillus darangshiensis* DLS-06^T (Lee และ Lee, 2009) เนื่องจาก NK26-11 มีความแตกต่างกับ *Sc. darangshiensis* DLS-06^T ที่สามารถรีดิวซ์ไนเตรตได้ และสร้างกรดจาก Fructose lactose D(+)maltose D(+)mannose และ sucrose ดังนั้นจึงพิสูจน์เอกลักษณ์ไอโซเลท NK26-11 ได้เป็นสกุลใหม่



รูปที่ 4.29 การสร้างสปอร์ของ NK26-11



รูปที่ 4.30 แผนภูมิ Phylogenetic tree ของ NK26-11 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน

ตารางที่ 4.11 ลักษณะความแตกต่างทางฟีโนไทป์ของ NK26-11 เทียบกับ *Scopulibacillus* species

Characteristic	NK26-11	<i>Scopulibacillus darangshiensis</i> DLS-06 ^T
Colony size (mm)	<1.0-1.4	ND
Spore	+	+
Temperature range for growth(°C)	20-45	25-30
NaCl (%)	3	4
pH range for growth	5-8.5	6.1-9.1
Nitrate reduction	+	-
Acid production from : Amygdalin	-	ND
D(+) Cellobiose	-	-
meso-Erythritol	-	-
D(+) Fructose	+	-
D-Galactose	-	-
Inulin	-	-
Lactose	+	-
D(+) Maltose	+	-
D(+) Mannitol	-	-
D(+) Mannose	+	-
D(+) Melibiose	-	-
Raffinose	w	-
Sorbitol	-	-
L(-) Sorbose	-	-
Sucrose	+	-

หมายเหตุ : +, ผลิตรวดมาก; -, ไม่ผลิตรวด; w, ผลิตรวดเล็กน้อย; ND, ไม่มีข้อมูล

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกทั้งหมด 136 ไอโซเลท จากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย เช่น ดิน เปลือกไม้ และรากไม้ พบว่ามีเพียง 5 ไอโซเลท เท่านั้น ที่สามารถผลิตกรดดีแลกติกได้ คือ SK5-2 NK26-11 CU38-12 CU68-1 และ CU72-1 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท พบว่ามี 1 ไอโซเลท (NK26-11) จัดเป็นแบคทีเรียสกุลใหม่ที่คัดเลือกได้จากงานวิจัยนี้ และอีก 4 ไอโซเลท ได้แก่ SK5-2 CU38-12 CU68-1 และ CU72-1 มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนสูงเทียบได้กับ *Sporolactobacillus laevolacticus* *S. kofuensis* *S. inulinus* และ *S. nakayamae* subsp. *nakayamae* ตามลำดับ

จากการทดลองการผลิตกรดดีแลกติกของทั้ง 5 ไอโซเลท พบว่า SK5-2 และ CU72-1 สามารถให้ปริมาณผลผลิต และอัตราการผลิตกรดดีแลกติก รวมถึงความบริสุทธิ์เชิงแสงที่สูงเพียงพอต่อการยอมรับได้ในการสังเคราะห์พอลิแลกติกแอซิด โดย SK5-2 สามารถผลิตกะเตเลส และให้ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงของกรดดีแลกติกสูงถึง 99.99 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นกรดดีแลกติกสุดท้าย 97.24 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าปริมาณผลผลิต และอัตราการผลิตคือ 81.03 เปอร์เซ็นต์ และ 1.35 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ จากการหมักโดยกลูโคส สำหรับ CU72-1 เป็นแบคทีเรียไม่ผลิตกะเตเลส สามารถผลิตกรดดีแลกติกที่ให้ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงที่ต่ำกว่า SK5-2 เล็กน้อย (98.83 %ee) และค่าความเข้มข้นกรดดีแลกติกสุดท้าย 91.87 กรัมต่อลิตร ปริมาณผลผลิต 76.56 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการผลิต 1.28 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ต่อมานำ SK5-2 และ CU72-1 ทดสอบความสามารถในการหมักกรดแลกติกจากแหล่งคาร์บอนอื่นๆ เช่น ชูโครส และแป้งมันสำปะหลัง เปรียบเทียบกับกลูโคส พบว่า CU72-1 ที่ความเข้มข้นกลูโคส 120 กรัมต่อลิตร ให้ความเข้มข้นกรดดีแลกติกสูงสุด คือ 93.63 กรัมต่อลิตร มีค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง ปริมาณผลผลิต และอัตราการผลิต คือ 98.63 %ee 81.91 เปอร์เซ็นต์ และ 1.30 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อทดสอบการใช้ชูโครสพบว่ามีความสามารถในการใช้ชูโครสเพื่อผลิตกรดดีแลกติก แต่ประสิทธิภาพไม่ดีเทียบเท่ากลูโคส โดยความเข้มข้นชูโครส 160 กรัมต่อลิตร ให้ความเข้มข้นกรดดีแลกติกสุดท้าย ปริมาณผลผลิต และอัตราการผลิตคือ 76 กรัมต่อลิตร 47.50 เปอร์เซ็นต์ และ 1.06 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และให้ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงต่ำเพียง 96.88 %ee เมื่อทดสอบการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า CU72-1 ไม่สามารถผลิตกรดดีแลกติกได้ แต่เมื่อเติมกลูโคสไม่เลสในระหว่างการหมักด้วยแป้งมันสำปะหลังสามารถผลิตกรดดีแลกติกได้ในปริมาณที่สูง โดยเทียบกับผลผลิตที่ได้จากการหมักกลูโคส ที่ความเข้มข้น

ของแป้งมันสำปะหลัง 120 กรัมต่อลิตร สามารถให้ความเข้มข้นกรดดีแลกติกสุดท้ายคือ 116.88 กรัมต่อลิตร ปริมาณผลผลิต และอัตราการผลิตคือ 97.40 เปอร์เซ็นต์ และ 1.62 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ รวมถึงค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงที่มากถึง 99.02 %ee การหมักกรดดีแลกติกจากกลูโคสโดย SK5-2 ที่ความเข้มข้นกลูโคส 120 กรัมต่อลิตร ให้ความเข้มข้นกรดดีแลกติกสุดท้ายคือ 112.45 กรัมต่อลิตร ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง ปริมาณผลผลิต และอัตราการผลิต คือ 98.79 %ee 93.71 เปอร์เซ็นต์ และ 1.56 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และมีความสามารถในการใช้ซูโครสเพื่อผลิตกรดดีแลกติกแต่ประสิทธิภาพไม่ดีเทียบเท่ากลูโคส โดยเมื่อความเข้มข้นซูโครสเพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติกมากขึ้น ที่ความเข้มข้นซูโครส 160 กรัมต่อลิตร ให้ความเข้มข้นกรดดีแลกติกสุดท้ายคือ 116.16 กรัมต่อลิตร และปริมาณผลผลิต อัตราการผลิต และค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง คือ 76.17 เปอร์เซ็นต์ 1.61 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 98.49 %ee ตามลำดับ เมื่อทดสอบการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า SK5-2 สามารถผลิตกรดดีแลกติกได้ และเมื่อเติมกลูโคสไม่เหลือในระหว่างการหมักด้วยแป้งมันสำปะหลัง สามารถผลิตกรดดีแลกติกได้ในปริมาณที่สูงกว่าเดิม ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง 160 กรัมต่อลิตร ค่าความเข้มข้นกรดดีแลกติกสุดท้ายคือ 112.52 กรัมต่อลิตร และให้ปริมาณผลผลิต อัตราการผลิต และค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง คือ 72.32 เปอร์เซ็นต์ 1.56 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 99.35 %ee ตามลำดับ

เพื่อลดต้นทุนในการผลิตกรดดีแลกติก แหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูกได้ถูกนำมาใช้ทดแทนสารสกัดจากยีสต์ และเปปโทน โดยเปปโทนถูกแทนที่ด้วยแอมโมเนียมคลอไรด์ และลดปริมาณการใช้สารสกัดจากยีสต์ โดย CU72-1 เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่เป็นตัวควบคุมซึ่งประกอบไปด้วยสารสกัดจากยีสต์ 20 กรัมต่อลิตร และเปปโทน 10 กรัมต่อลิตร โดยนำแอมโมเนียมคลอไรด์มาแทนที่เปปโทนที่ความเข้มข้นเดียวกัน ส่งผลให้ค่าผลผลิตกรดดีแลกติกมากถึง 112.63 กรัมต่อลิตร ค่าปริมาณผลผลิต 98.48 เปอร์เซ็นต์ อัตราการผลิต 1.56 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยให้ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง 98.34 %ee ของการหมักกลูโคส สำหรับ SK5-2 เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารที่เป็นตัวควบคุมซึ่งประกอบไปด้วยสารสกัดจากยีสต์ 15 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมคลอไรด์ 4 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้สารสกัดจากยีสต์ 7.5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมคลอไรด์ 10 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นกรดดีแลกติกสูงถึง 123.48 กรัมต่อลิตร ปริมาณผลผลิต 104.24 เปอร์เซ็นต์ และ อัตราการผลิต 1.72 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ความบริสุทธิ์เชิงแสง 99.47 %ee ของการหมักกลูโคส ซึ่งมากกว่าอาหารที่เป็นตัวควบคุมอย่างเห็นได้ชัด

ทั้ง 2 ไอโซเลทนี้เมื่อเปรียบเทียบกับผลงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสามารถให้ค่าการผลิตกรดดีแลกติก ปริมาณผลผลิต และอัตราการผลิต ที่ถือว่าสูงทั้งที่เป็นการทดลองในระดับขวดเขย่าเท่านั้น

ข้อเสนอแนะ

1. จากการที่สามารถใช้ซูโครส และแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนได้ นับว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง เนื่องจากสามารถเลือกวัตถุดิบทางการเกษตรเหลือใช้ เช่น กากน้ำตาล น้ำอ้อย มันสำปะหลัง และมันฝรั่ง เป็นทางเลือกวัตถุดิบที่มีราคาถูกในการผลิตกรดดีแลกติก เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่ากรดแลกติก และลดต้นทุนในการผลิต
2. การเลือกใช้สารอินทรีย์ที่มีราคาถูกมาทดแทนสารอินทรีย์ที่มีราคาแพง เช่น แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมฟอสเฟต และแอมโมเนียมซัลเฟต เป็นหนึ่งในทางเลือกแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาถูกซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าของกรดดีแลกติก และยังช่วยลดต้นทุนในการผลิตอีกด้วย
3. ไอโซเลท NK26-11 อาจเป็นแบคทีเรียสกุลใหม่ ดังนั้นจำเป็นต้องศึกษาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงทั้งลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี องค์กรประกอบผนังเซลล์ องค์กรประกอบกรดไขมัน และ mole %G+C

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

สาโรจน์ ศิริสันสนียกุล. 2547. เทคโนโลยีชีวภาพอาหาร การหมัก และสิ่งแวดล้อม. 1, 1. กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

- Arasaratnam, V., Senthuran, A. and Balasubramaniam, K. 1996. Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. *Enzyme and Microbial Technology*. 19: 482-486.
- Benthin, S. and Villadsen, J. 1995. Production of optically pure D-lactate by *Lactobacillus bulgaricus* and purification by crystallization and liquid/liquid extraction. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 42: 826-829.
- Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, A. and Heckelman, P.E. 1998. The merck index 11th (ed.), Merck, Rahway. N.J.
- Bustos, G., Moldes, A.B., Alonso, J.L. and Vazquez, M. 2004. Optimization of D-lactic acid production by *Lactobacillus coryniformis* using response surface methodology. *Food Microbiology*. 21: 143-148.
- Calabia, B.P. and Tokiwa, Y. 2007. Production of D-lactic acid from sugarcane molasses, sugarcane juice and sugar beet juice by *Lactobacillus delbrueckii*. *Biotechnology Letters*. 29: 1329-1332.
- Chang, Y.H., Jung, M.Y., Park, I.S. and Oh, H.M. 2008. *Sporolactobacillus vineae* sp. nov., a spore-forming lactic acid bacterium isolated from vineyard soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58: 2316-2320.
- Chen, Y.S., Yanagida, F. and Shinohara, T. 2005. Isolation and identification of lactic acid bacteria from soil using an enrichment procedure. *Letters in Applied Microbiology*. 40: 195-200.
- Coelho, L.F., De Lima, C.J.B., Bernardo, M.P. and Contiero, J. 2011. D(-)-Lactic acid production by *Leuconostoc mesenteroides* B512 using different carbon and nitrogen source. *Applied Biochemical Biotechnology*. 164: 1160-1171.
- Coelho, L.F., De Lima, C.J.B., Rodovalho, C.M., Bernardo, M.P. and Contiero, J. 2011. Lactic

- acid production by new *Lactobacillus plantarum* LMISM6 grown in molass: optimization of medium composition. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 28: 27-36.
- Dellaglio, F., Dick, L.M.T and Torriani, S. 1995. The genus *Leuconostoc*. In B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel (ed.), *The General of Lactic acid bacteria*, pp. 235-236. London : Blackie Academic & Professional.
- De Martinis, E.C.P. and Freitas, F.Z. 2003. Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocin formation. *Food Control*. 14: 197-200.
- Devriese, L.A and Pot, B. 1995. The genus *Enterococcus*. In B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel (ed.), *The General of Lactic acid bacteria*, pp. 125-163. London : Blackie Academic & Professional.
- Fujita, R., Mochida, K., Kato, Y. and Goto, K. 2010. *Sporolactobacillus putidus* sp. nov., an endospore forming lactic acid bacteria isolate from spoiled orange juice. *International Journal of Systematic and Microbiology*. 60: 1499-1503.
- Fukushima, K., Sogo, K., Miura, S. and Kimura, Y. 2004. Production of D-lactic acid bacterial fermentation of rice starch. *Macromolecular Bioscience*. 4: 1021-1027.
- Gonçalves, L.M.D., Xavier, A.M.R.B., Almeida, J.S. and Carrondo, M.J.T. 1991. Concomitant substrate and product inhibition kinetics in lactic acid production. *Enzyme Microbiology and Technology*. 13: 314-319.
- Hardie, J.M and Whiley, R.A. 1995. The genus *Streptococcus*. In B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel (ed.), *The General of Lactic acid bacteria*, pp. 55-58. London : Blackie Academic & Professional.
- Hofvendahl, K. and Hägerdal, B.H. 2000. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 87-107.
- Holten, C.H., Muller, A. and Rehbinder, D. 1971. Lactic acid –Properties and Chemistry of Lactic acid and Derivatives VCH, Weinheim, Germany.
- Holzapfel, W.H. and Botha, S.J. 1988. Physiology of *Sporolactobacillus* strains isolated from different habitats and the indication of in vitro antagonism against *Bacillus* species. *International Journal of Food Microbiology*. 7: 161-169.
- Hujanen, M. and Linko, Y.Y. 1996. Effect of temperature and various nitrogen sources on L

- lactic acid production by *Lactobacillus casei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 45: 307-313.
- John, R.P., Anisha, G.S, Nampoothiri, K.M. and Pandey, A. 2009. Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. *Biotechnology Advances*. 27: 145-172.
- Karst, D. and Yang, Y.Q. 2006. Molecular modeling study of the resistance of PLA to hydrolysis based on the blending of PLLA and PDLA. *Polymer*. 47: 4845-4850.
- Komagata, K. and Suzuki, K. 1987. Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematic. In R.R. Colwell and R. Grigorava (ed.), *Methods in Microbiology*, pp. 161-207. London : Academic Press Limited.
- Kwon, S., Cheon, P., Eun, L., Lee, G., Keun., Chang, Y. and Chang, N. 2000. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 209–215.
- Lee, C.W. 2007. Production of D-lactic acid by bacterial fermentation of rice. *Fiber and Polymers*. 8: 571-578.
- Lee, S.D. and Lee, D.W. 2009. *Scopulibacillusarangshiensis* gen. nov., sp. nov., Isolate from rock. *Journal of Microbiology*. 47: 710-715.
- Leejeerajumnean, A., Ames, J.M. and Owens, J.D. 2000. Effect of ammonia on the growth of *Bacillus* species and some other bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. 30: 385-389.
- Leroy, F. and De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food and Technology*. 15: 67-78.
- Li, Z., Hana, L., Ji, Y., Wanga, X. and Tana, T. 2010. Fermentative production of l-lactic acid from hydrolysate of wheat bran by *Lactobacillus rhamnosus*. *Biochemical Engineering Journal*. 49: 138–142.
- Loginova, L.I., Manuilova, V.P. and Tolstikov, V.P. 1974. Content of free amino acids in peptone and the dynamics of their consumption in the microbiological synthesis of dextran. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 8: 249-251.
- Lu, Z., Lu, M., He, F. and Yu, L. 2009. An economical approach for D-lactic acid production utilizing unpolished rice from aging paddy as major nutrient source. *Bioresource Technology*. 100: 2026-2031.

- Nancib, A., Nancib, N., Meziane-Cherif, D., Boubendir, A., Fick, M. and Boudrant, J. 2005. Joint effect of nitrogen source and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Bioresource Technology*. 96: 63-67.
- Narayanan, N., Roychoudhury, P.K. and Srivastava, A. 2004. L(+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Journal of Biotechnology*. 7: 167-178.
- Okano, K., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H. and Kondo, A. 2010. Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives and limits. *Applied Biochemical and Biotechnology*. 85: 413-423.
- Okano, K., and others. 2009. Improve production of homo-D-lactic acid via xylose fermentation by introduction of xylose assimilation gene and redirection of the phosphoketolase pathway to the pentose phosphate pathway in L-lactate dehydrogenase gene-deficient *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 78: 7858-7861.
- Okano, K., and others. 2010. D-lactic acid production from cellooligosaccharides and β -glucan using L-LDH gene-deficient and endoglucanase-secreting *Lactobacillus plantarum*. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*. 85: 643-650.
- Okino, S., Suda, M., Fujikura, K., Inui, M. and Yukawa, H. 2008. Production of D-lactic acid by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 78: 449-454.
- Patil, S.S., Kadam, S.K., Bastawde, K.B., Khire, J.M. and Gokhale, D.V. 2006. Production of lactic acid and fructose from media with cane sugar using mutant of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM2365. *Letters in Applied Microbiology* ISSN 02668254. 43: 53-57.
- Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B.J., Venkateshwar, M. and Kumar, E.V. 2008. Amyolytic bacterial lactic acid fermentation-A review. *Biotechnology Advances*. 26: 22-34.
- Saito, H. and Miura, K. 1963. Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochemical and Biophysical*. 72: 619-629.
- Simson, W.J and Tagushi, H. 1995. The genus *Pediococcus* with notes on the general *Tetragenococcus* and *Aerococcus*. In B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel (ed.), *The General of Lactic acid bacteria*, pp. 125-163. London : Blackie Academic & Professional.

- Stiles, M.E and Holzapel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Food Microbiology*. 36: 1-29.
- Tanaka, T., and others. 2006. Production of D-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*. 97: 211–217.
- Tanasupawat, S., Okada, S. and Komagata, K. 1998. Lactic acid bacteria found in fermented fish in Thailand. *Journal of General and Applied Microbiology*. 44: 193-200.
- Tanasupawat, S., Thongsanit, J., Okada, S. and Komagata, K. 2002. Lactic acid bacteria isolated from soy sauce mash in Thailand. *Journal of General and Applied Microbiology*. 48: 201-209.
- Tashiro, y., and others. 2011. Continuous D-lactic acid production by a novel thermotolerant *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* QU41. *Biotechnological production and process engineering*. 89: 1741-1750.
- Te' Llez-Luis, S.J., Moldes, A.B., Va' Zquez, M. and Alonso, J.L. 2003. Alternative Media For Lactic Acid Production By *Lactobacillus delbrueckii* Nrrl B-445. 81: 250-256.
- Teuber, M. The genus *Lactococcus*. In B.J.B. Wood and W.H. Holzapel (ed.), *The General of Lactic acid bacteria*, pp. 173-230. London : Blackie Academic & Professional, 1995.
- Vaidya, A.N., and others. 2005. Production and recovery of lactic acid for polylactide-An overview. *National Environmental Engineering Research Institute, Nebru Marg Nagpur, India*. 35: 429-467.
- Van Hijum, A.F., and others. 2006. Structure-function relationships of glucansucrase and fructansucrase enzymes from lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70: 157-176.
- Wang, L., and others. 2011. Highly efficient production of D-lactate by *Sporolactobacillus* sp. CASD with simultaneous enzymatic hydrolysis of peanut meal. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 89: 1009–1017.
- Wee, Y.J., Kim, J.N. and Ryu, H.W. 2006. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technology and Biotechnology*. 44: 163-172.
- Wee, Y.J., Kim, J.N., Yun, J.S. and Ryu, H.W. 2005. Optimum conditions for the biological production of lactic acid by a newly isolate lactic acid bacterium, *Lactobacillus* sp. RK Y2. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 10: 23-28.

- Yanagida, F., Suzuki, K.I., Kozaki, M. and Komagata, K. 1997. Proposal of *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *nakayamae* sp. nov., *Sporolactobacillus nakayamae* subsp. *racemicus* subsp. nov., *Sporolactobacillus terrae* sp. nov., *Sporolactobacillus kofuensis* sp. nov., and *Sporolactobacillus lactosus* sp. nov. *Journal of Systematic Bacteriology*. 47: 499-504.
- Y'añez, R., Moldes, A.B., Alonso, J.L. and Paraj'ó, J.C. 2003. Production of D(–)-lactic acid from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation using *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*. *Biotechnology Letters*. 25: 1161–1164.
- Yoshida, S., Okano, K., Tanaka, T., Ogino, C. and Kondo, A. 2011. Homo-D-lactic acid production from mixed sugars using xylose-assimilating operon-integrated *Lactobacillus plantarum*. 92: 67-76.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และการเตรียมสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1.1 อาหาร Enrichment

กลูโคส	10	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัมต่อลิตร
เปปโทน	5	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	0.25	กรัมต่อลิตร
K_2HPO_4	0.25	กรัมต่อลิตร
Salt solution	10	มิลลิลิตรต่อลิตร

ปรับพีเอชให้เป็น 4.4 ด้วย HCl และปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

1.2 อาหารวุ้นแข็ง GYP

อาหารวุ้นแข็ง GYP มีองค์ประกอบหลักเหมือนอาหาร Enrichment ต่างตรงที่มีการเติม CaCO_3 5 และวุ้น 20 กรัมต่อลิตร และปรับค่าพีเอชเป็น 6.8 ด้วย NaOH ต่อมาปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

1.3 Salt solution

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	400	มิลลิกรัม
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	20	มิลลิกรัม
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20	มิลลิกรัม
NaCl	20	มิลลิกรัม

หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร

1.4 สารละลาย 0.85% Saline

ชั่ง NaCl 8.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

1.5 10 % Skim milk

ชั่ง Skim milk 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส 10 นาที

1.6 อาหาร Preculture ของแบคทีเรียไม่ผลิตตะกั่ว

กลูโคส	10	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์	5	กรัมต่อลิตร
เปปโทน	5	กรัมต่อลิตร
KH ₂ PO ₄	0.25	กรัมต่อลิตร
K ₂ HPO ₄	0.25	กรัมต่อลิตร
Salt solution	10	มิลลิลิตรต่อลิตร
CaCO ₃	5	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชให้เป็น 6.8 ด้วย NaOH และปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส, 15 นาที

1.7 อาหาร Fermentation ของแบคทีเรียไม่ผลิตตะกั่ว

กลูโคส	120	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์	20	กรัมต่อลิตร
เปปโทน	10	กรัมต่อลิตร
KH ₂ PO ₄	0.5	กรัมต่อลิตร
K ₂ HPO ₄	0.5	กรัมต่อลิตร
Salt solution	20	มิลลิลิตรต่อลิตร

ปรับพีเอชให้เป็น 6.8 ด้วย NaOH และปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร โดยมีการเติม CaCO₃ 4 กรัม หลังจากนั้นทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

1.8 อาหาร Preculture ของแบคทีเรียผลิตตะกอล

กลูโคส	10	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์	15	กรัมต่อลิตร
NH ₄ Cl	4	กรัมต่อลิตร
KH ₂ PO ₄	0.5	กรัมต่อลิตร
K ₂ HPO ₄	0.5	กรัมต่อลิตร
CaCO ₃	5	กรัมต่อลิตร
Salt solution	20	มิลลิลิตรต่อลิตร

ปรับพีเอชให้เป็น 6.8 ด้วย NaOH และปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตรหลังจากนั้นทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

1.9 อาหาร Fermentation ของแบคทีเรียผลิตตะกอล

อาหาร Fermentation ประกอบด้วย กลูโคส 120 กรัมต่อลิตร และมีการเติม CaCO₃ 4 กรัม หลังจากนั้นทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

1.10 แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 24%

เตรียมแป้ง 24% (w/w) สารละลายน้ำแป้ง (Liquified tapioca starch solution)

Tapioca starch	120	กรัม
น้ำกลั่น	380	มิลลิลิตร

นำ Tapioca starch มาผสมกับน้ำกลั่น และปรับพีเอชให้ได้ 5.8 ด้วย 1N HCl ต่อมาหยด Spezyme ethyl ปริมาตร 48 ไมโครลิตร และนำไปชั่งน้ำหนักรวม หลังจากนั้นนำไปต้มจนเดือดประมาณ 90 นาที และปรับปริมาตรหลังจากต้มเสร็จให้ได้ปริมาตรน้ำหนักเท่าเดิม

1.11 สารละลายกลูโคอะไมเลส (Glucoamylase)

นำกลูโคอะไมเลส 120 มิลลิกรัม ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 3.88 มิลลิลิตร และนำมากรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาด 0.4 ไมโครเมตร โดยเทคนิคปลอดเชื้อ

1.12 อาหาร A medium

กลูโคส	10	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์	10	กรัมต่อลิตร

เปปไทน์	10	กรัมต่อลิตร
CH ₃ COONa	10	กรัมต่อลิตร
Salt solution	5	มิลลิลิตรต่อลิตร
CaCO ₃	5	กรัมต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชให้เป็น 6.8 ด้วย NaOH และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำให้
ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

1.13 อาหารทดสอบ Nitrate reduction

สารสกัดจากยีสต์	5	กรัมต่อลิตร
เปปไทน์	10	กรัมต่อลิตร
NaCl	10	กรัมต่อลิตร
KNO ₃	1	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชให้เป็น 6.8 ด้วย NaOH และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำให้
ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

1.14 อาหารการสร้างสปอร์

กลูโคส	1	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์	10	กรัมต่อลิตร
เปปไทน์	10	กรัมต่อลิตร
CH ₃ COONa	10	กรัมต่อลิตร
Salt solution	5	มิลลิลิตรต่อลิตร
CaCO ₃	5	กรัมต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชให้เป็น 6.8 ด้วย NaOH และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำให้
ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

1.15 อาหารสำหรับการสร้างกรดจากน้ำตาล

แหล่งคาร์บอน	0.5	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.5	กรัม

เปปโทน	0.5	กรัม
CH ₃ COONa	0.5	กรัม
Salt solution	0.25	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชให้เป็น 6.8 ด้วย NaOH และปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 10 นาที

1.16 อาหารการย่อยแป้ง

Soluble starch	20	กรัมต่อลิตร
สารสกัดจากยีสต์	10	กรัมต่อลิตร
เปปโทน	10	กรัมต่อลิตร
CH ₃ COONa	10	กรัมต่อลิตร
Salt solution	5	มิลลิลิตรต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชให้เป็น 6.8 ด้วย NaOH และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

1.17 อาหารการย่อยสลาย Arginine

เปปโทน	1	กรัมต่อลิตร
NaCl	5	กรัมต่อลิตร
K ₂ HPO ₄	0.3	กรัมต่อลิตร
L(+) arginine HCl	10	กรัมต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร

ปรับพีเอชให้เป็น 6.8 ด้วย NaOH และหยดสารละลาย Phenol red indicator ลงไปในสารละลายจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้มแดง หลังจากนั้นทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2. สารเคมีและวิธีการเตรียมสารเคมี

2.1 0.005 mM H₂SO₄

ดูดสารละลาย Conc. H₂SO₄ ปริมาตร 556 μ l ละลายในน้ำ 2 ลิตร และนำมากรองด้วยเมม

เบรขนาด 0.45 μm หลังจากนั้นเข้าเครื่อง Sonicate ระยะเวลา 30 นาที

2.2 1 mM CuSO_4

ซึ่ง CuSO_4 0.5 กรัม ละลายในน้ำ 2 ลิตร และนำมากรองด้วยเมมเบรขนาด 0.45 μm หลังจากนั้นเข้าเครื่อง Sonicate ระยะเวลา 30 นาที

2.3 สารละลายมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์กรดแลคติก กลูโคส เอทานอล และกรดอะซิติก (ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร)

ซึ่งกลูโคส และ Lactate. $5\text{H}_2\text{O}$ อย่างละ 0.1 และ 0.1712 กรัม ตามลำดับ หลังจากนั้นเติม เอทานอล และกรดอะซิติก ปริมาตร 105.3 และ 95 ไมโครลิตร ตามลำดับ พร้อมปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

2.4 $\text{K}_2\text{SO}_4 : \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

นำ K_2SO_4 95 กรัม ผสมกับ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5 กรัม

2.5 32% NaOH

นำ NaOH 320 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

2.6 4% Boric acid

นำกรดบอริก 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร

2.7 Ammonium oxalate crystal violet

สารละลาย A : Crystal violet	2	กรัม
Ethyl alcohol	20	มิลลิลิตร
สารละลาย B : Ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

2.8 Lugol' s solution

Iodine	1	กรัม
KI	2	กรัม

น้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร

2.9 Counterstain solution

Safranin O 10 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2.10 สารละลายทดสอบในเทอร์ต

สารละลาย A : Sulfanilic acid 0.8 กรัม

Acetic acid (5N) 100 มิลลิลิตร

ละลาย Sulfanilic acid ใน Acetic acid โดยมีการให้ความร้อนเพื่อช่วยต่อการละลาย

สารละลาย B : Dimethyl-naphthylamine 0.06 กรัม

Acetic acid (5N) 100 มิลลิลิตร

2.11 Mixed indicator

Bromthymol blue 0.2 กรัม

Neutral red 0.1 กรัม

Ethanol 300 มิลลิลิตร

2.12 สารละลาย N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylene diamine dihydrochloride

N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylene diamine dihydrochloride 1 Loop มาละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จะได้สารละลายสีม่วงอ่อน

2.13 PCR reaction mixture

เตรียม PCR reaction mixture ต่อ 1 Reaction ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ซึ่งใช้ชุด Kit สำเร็จรูป มีองค์ประกอบหลัก ดังนี้

สาร	Stock	1 Volume (100 μ l)
Forward Primer : 20F	10 pmol/ μ l	4
Reward Primer : 1530R	10 pmol/ μ l	4
10 x <i>Taq</i> buffer (NH ₄ SO ₄ -MgCl ₂)	10 x	10

สาร	Stock	1 Volume (100 μ l)
dNTP	2.0 mM	2
MgCl ₂	25 mM	8
<i>Taq</i> DNA polymerase	5 Unit/ μ l	0.5
Ultra pure water	-	66.5
Template	Undilute	5

ในการเตรียม PCR reaction mixture จะเตรียมทุกองค์ประกอบสารยกเว้น Template และใส่ *Taq* DNA polymerase เป็นตัวสุดท้าย หลังจากนั้นจึงถ่าย PCR reaction mixture ที่ได้ลงใน DNA Template ที่เตรียมไว้แล้ว

2.14 0.8 % Agarose gel

ชั่ง Agarose 0.8 กรัม ละลายใน 1 x TAE Buffer 100 มิลลิลิตร

2.15 สารละลาย Ninhydrin

Ninhydrin	0.3	กรัม
1-Butanol	100	มิลลิลิตร
Glacial acetic acid	3	มิลลิลิตร

นำมาละลายและผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

2.16 Phenol: Chloroform

นำผลึกของ Phenol มาหลอมเหลวใน Water bath ที่อุณหภูมิ 65 °C หลังจากนั้นนำ Chloroform มาผสมในปริมาตรอัตราส่วน 1:1

2.17 3M Sodium acetate

ชั่ง Sodium acetate 408.1 กรัม ละลายใน Ultra pure water และปรับพีเอชมีค่า 5.2 หลังจากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร และทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2.18 10% SDS

ชั่ง SDS 10 กรัม ละลายใน Ultra pure water ที่ปลอดเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.19 1 M Tris-HCl pH8

ชั่ง Tris base 121.1 กรัม ละลายใน Ultra pure water ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร โดยปรับพีเอชด้วย Conc. HCl ให้มีค่าเท่ากับ 8 หลังจากนั้นทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2.20 0.3 M EDTA pH8

ชั่ง EDTA 10.898 กรัม ละลายใน Ultra pure water ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และปรับพีเอชมีค่าเป็น 8 หลังจากนั้นทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2.21 TE buffer

เตรียมสารละลาย 100 mM Tris pH 8 และ 30 mM EDTA pH 8 และปรับพีเอชให้เป็น 8 ด้วย Glacial acetic acid หลังจากนั้นทำให้ปลอดเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2.22 สารละลาย Ethidium bromide

ชั่ง Ethidium bromide 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่มีฟอยหุ้มและไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2.23 50 x TAE buffer

Tris base	242	กรัม
Glacial acetic acid	57.1	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100	มิลลิลิตร

ละลายในน้ำกลั่น หลังจากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

สูตรการคำนวณและข้อมูลผลการทดลอง

สูตรการคำนวณ

1. ค่า Yield

$$\text{Yield} = \frac{\text{(กรดแลกติกที่ได้ (กรัมต่อลิตร))}}{\text{(กลูโคสเริ่มต้น - กลูโคสสุดท้าย (กรัมต่อลิตร))}}$$

2. ค่า Productivity (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

$$\text{Productivity} = \frac{\text{(กรดแลกติกที่ได้ (กรัมต่อลิตร))}}{\text{(เวลาในการหมักกรดแลกติก (ชั่วโมง))}}$$

3. ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง (%ee)

$$\text{ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง} = \frac{\text{(พื้นที่กรดดีแลกติก - พื้นที่กรดแอลแลกติก)}}{\text{(พื้นที่กรดดีแลกติก + พื้นที่กรดแอลแลกติก)}} \times 100$$

4. ค่า Nitrogen

$$\text{ไนโตรเจน} = (V_{\text{HCl จากการไทเทรตตัวอย่าง}} - V_{\text{HCl จากการไทเทรต Blank}}) \times 0.014007 \times 0.0974 \text{ N HCl}$$

5. % Nitrogen

$$\% \text{ Nitrogen} = \frac{\text{ค่าไนโตรเจน} \times 100}{\text{ปริมาตรสารตัวอย่าง}}$$

ข้อมูลผลการทดลอง

ตารางที่ ข.1 คุณสมบัติของไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากการเก็บตัวอย่างตามแหล่งธรรมชาติ ครั้งที่ 1

ครั้งที่ 1					
Isolate No.	ชื่อตัวอย่าง	เจริญภาวะไม่มีอากาศ (50 °C) ^a	เจริญภาวะมีอากาศ (30 °C) ^a	ผลคะ ทะเลส ^b	รูปร่าง
SK5-2	ดินใต้ต้นไม้	-	+	+	แท่ง
NK25-23	ดินใต้ต้นชวนชม	-	+	w	กลม
NK26-11	ดินใต้ต้นกุหลาบ	-	+	+	แท่ง
NK27-11	ดินใต้ต้นมะม่วง	-	+	+	แท่ง
NK27-12	ดินใต้ต้นมะม่วง	-	+	+	แท่ง
NK28-13	ดินใต้ต้นมะม่วง	-	-	-	กลม
NK29-22	ดินใต้ต้นมะม่วง	-	+	+	กลม

ตารางที่ ข.2 คุณสมบัติของไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากการเก็บตัวอย่างตามแหล่งธรรมชาติ ครั้งที่ 2

ครั้งที่ 2					
Isolate No.	ชื่อตัวอย่าง	เจริญภาวะไม่มีอากาศ (50 °C) ^a	เจริญภาวะมีอากาศ (30 °C) ^a	ผลคะ ทะเลส ^b	รูปร่าง
NK30-12	ดินใต้ต้นวาสนา	-	+	+	แท่ง
NK30-13	ดินใต้ต้นวาสนา	-	+	+	แท่ง
NK30-21	ดินใต้ต้นวาสนา	-	+	+	แท่ง
NK31-12	ดินใต้ต้นมะขาม	-	+	+	แท่ง
NK31-13	ดินใต้ต้นมะขาม	-	+	+	แท่ง
CU32-11	ดินใต้ต้นมะขาม	-	-	-	แท่ง
CU34-12	ดินใต้ต้นสน	-	-	-	กลม
CU35-11	ดินใต้ต้นจามจุรี	-	+	-	กลม
CU35-12	ดินใต้ต้นจามจุรี	-	-	-	แท่ง
CU36-11	ดินใต้ต้นมะขาม	-	-	-	กลม
CU37-21	ดินใต้ต้นสาละ	-	+	-	กลม
CU37-12	ดินใต้ต้นสาละ	-	+	-	กลม
CU38-11	เปลือกต้นไม้	-	+	+	กลม
CU38-12	เปลือกต้นไม้	-	-	-	แท่ง
CU38-21	เปลือกต้นไม้	-	-	-	แท่ง

ตารางที่ ข.2 (ต่อ) คุณสมบัติของไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากการเก็บตัวอย่างตามแหล่งธรรมชาติ ครั้งที่ 2

ครั้งที่ 2					
Isolate No.	ชื่อตัวอย่าง	เจริญภาวะไม่มีอากาศ (50 °C) ^a	เจริญภาวะมีอากาศ (30 °C) ^a	ผลคะ ทะเลส ^b	รูปร่าง
CU39-21	เปลือกต้นจามจุรี	-	+	-	กลม
CU39-11	เปลือกต้นจามจุรี	-	+	-	กลม
CU39-12	เปลือกต้นจามจุรี	-	+	-	กลม
CU40-11	ดินใต้ต้นหูกวาง	-	+	-	กลม
CU40-12	ดินใต้ต้นหูกวาง	-	+	-	กลม

ตารางที่ ข.3 คุณสมบัติของไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากการเก็บตัวอย่างตามแหล่งธรรมชาติ ครั้งที่ 3

ครั้งที่ 3					
Isolate No.	ชื่อตัวอย่าง	เจริญภาวะไม่มีอากาศ (50 °C) ^a	เจริญภาวะมีอากาศ (30 °C) ^a	ผลคะ ทะเลส ^b	รูปร่าง
UD41	เปลือกต้นกฐิน	-	+	-	กลม
UD42	เปลือกต้นจันทน์	-	+	-	กลม
UD43	เปลือกต้นมะขาม	-	-	-	กลม
UD44	เปลือกต้นแก้วมังกร	-	+	-	กลม
UD45	ดินใต้ต้นจอมปลวก	-	+	-	กลม
UD46	ต้นฝอยทอง	-	+	w	กลม
UD47	เปลือกใต้ต้นขี้เหล็ก	-	+	+	กลม
UD48	เปลือกต้นตะโก	-	+	-	กลม
UD49	ดินใต้ต้นกล้วย	-	+	-	กลม
UD50	เปลือกต้นคูณ	-	+	-	กลม
UD51	วัชพืช	-	+	-	กลม
UD52	เปลือกต้นสัก	-	+	-	กลม
UD53	ดินใต้ต้นปาล์ม	-	+	-	กลม
UD54	เปลือกต้นมะม่วง	-	+	-	กลม
UD55	ดินใต้ต้นพุทรา	-	+	+	แท่ง
UD56	เปลือกต้นกล้วย	-	+	-	กลม
UD57	ลูกตะขบ	-	+	-	กลม

ตารางที่ ข.3 (ต่อ) คุณสมบัติของไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากการเก็บตัวอย่างตามแหล่งธรรมชาติ ครั้งที่ 3

ครั้งที่ 3					
Isolate No.	ชื่อตัวอย่าง	เจริญภาวะไม่มีอากาศ (50 °C) ^a	เจริญภาวะมีอากาศ (30 °C) ^a	ผลคะ ตะเลส ^b	รูปร่าง
UD58	เปลือกต้นตะขบ	-	+	-	แท่ง
UD59	เปลือกต้นมะม่วง	-	+	-	กลม
UD60	เปลือกต้นมะขาม	-	+	-	กลม
LP61	เปลือกต้นมะขาม	-	+	-	กลม
LP62	เปลือกต้นมะขาม	-	+	w	กลม
LP63	เปลือกต้นมะขาม	-	+	-	กลม
LP64	เปลือกต้นมะขาม	-	+	-	กลม
LP65	เปลือกต้นมะขาม	-	+	-	กลม
LP66	เปลือกต้นมะขาม	-	+	-	กลม

ตารางที่ ข.4 คุณสมบัติของไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากการเก็บตัวอย่างตามแหล่งธรรมชาติ ครั้งที่ 4

ครั้งที่ 4					
Isolate No.	ชื่อตัวอย่าง	เจริญภาวะไม่มีอากาศ (50 °C) ^a	เจริญภาวะมีอากาศ (30 °C) ^a	ผลคะ ตะเลส ^b	รูปร่าง
CU67-1	เปลือกต้นไม้	+	+	-	กลม
CU68-1	เปลือกต้นไม้	-	+	-	แท่ง
CU68-2	เปลือกต้นไม้	-	+	-	แท่ง
CU69-1	เปลือกต้นไม้	+	+	-	กลม
CU69-2	เปลือกต้นไม้	+	+	-	กลม
CU70-1	เปลือกต้นไม้	+	+	-	กลม
CU70-2	เปลือกต้นไม้	+	+	-	กลม
CU71-1	เปลือกต้นไม้	+	+	-	กลม
CU71-2	เปลือกต้นไม้	+	+	-	กลม
CU72-1	เปลือกต้นไม้	-	-	-	แท่ง
CU72-2	เปลือกต้นไม้	-	+	-	กลม
CU73-1	เปลือกต้นไม้	-	-	-	กลม
CU73-2	เปลือกต้นไม้	+	+	w	แท่ง
BK74-1	เปลือกต้นขย	-	+	+	แท่ง

ตารางที่ ข.5 คุณสมบัติของไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากการเก็บตัวอย่างตามแหล่งธรรมชาติ ครั้งที่ 5

ครั้งที่ 5					
Isolate No.	ชื่อตัวอย่าง	เจริญภาวะไม่มีอากาศ (50 °C) ^a	เจริญภาวะมีอากาศ (30 °C) ^a	ผลคะ ตะเลส ^b	รูปร่าง
BK75	เปลือกต้นหางนกยูง	-	+	+	กลม
BK76	เปลือกต้นเทียนทอง	-	+	w	กลม
BK77	เปลือกต้นปาล์ม	-	+	-	กลม
BK78-1	เปลือกต้นมะขาม	-	+	-	กลม
BK78-2	เปลือกต้นมะขาม	-	+	-	กลม
NK79	ใบเฟียง	-	+	-	กลม
NK80	เปลือกต้นกระดังงา	-	+	-	กลม
NK81-1	เปลือกต้นฝรั่ง	-	+	-	กลม
NK81-2	เปลือกต้นฝรั่ง	-	+	-	กลม
NK82	เปลือกต้นมะขาม	-	+	-	กลม
NK83-1	เปลือกต้นวาสนา	-	+	-	กลม
NK83-2	เปลือกต้นวาสนา	-	+	-	กลม

ตารางที่ ข.6 คุณสมบัติของไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากการเก็บตัวอย่างตามแหล่งธรรมชาติ ครั้งที่ 6

ครั้งที่ 6					
Isolate No.	ชื่อตัวอย่าง	เจริญภาวะไม่มีอากาศ (50 °C) ^a	เจริญภาวะมีอากาศ (30 °C) ^a	ผลคะ ตะเลส ^b	รูปร่าง
PB84	เปลือกต้นมะขาม	-	+	-	กลม
PB85-1	ดินใต้ต้นมะขาม	-	+	-	กลม
PB85-2	ดินใต้ต้นมะขาม	-	+	-	กลม
PB86	ดินใต้ต้นมะขาม	-	+	+	แท่ง
PB87-1	เปลือกต้นมะขาม	-	+	+	กลม
PB87-2	เปลือกต้นมะขาม	-	+	+	แท่ง
PB87-3	เปลือกต้นมะขาม	-	+	-	กลม
PB88	เปลือกต้นมะขาม	-	+	-	กลม

ตารางที่ ข.7 คุณสมบัติของไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากการเก็บตัวอย่างตามแหล่งธรรมชาติ ครั้งที่ 7

ครั้งที่ 7					
Isolate No.	ชื่อตัวอย่าง	เจริญภาวะไม่มีอากาศ (50 °C) ^a	เจริญภาวะมีอากาศ (30 °C) ^a	ผลคะตະเลส ^b	รูปร่าง
LP89	ดินใต้ต้นมะขาม	+	+	-	กลม
LP90	ดินใต้ต้นมะขาม	-	+	-	แท่ง
LP91	ดินใต้ต้นมะขาม	-	-	-	กลม
LP92	ดินใต้ต้นมะขาม	-	+	-	กลม
LP93	ดินใต้ต้นมะขาม	-	+	-	กลม
LP94-1	ดินใต้ต้นมะขาม	-	+	-	กลม
LP94-2	ดินใต้ต้นมะขาม	-	+	-	กลม
LP95	ดินใต้ต้นมะขาม	-	+	-	แท่ง
LP96-1	ดินใต้ต้นมะขาม	-	-	-	กลม
LP96-2	ดินใต้ต้นมะขาม	+	+	-	กลม
LP97-1	ดินใต้ต้นมะขาม	+	+	-	กลม
LP97-2	ดินใต้ต้นมะขาม	-	+	-	กลม
LP98	ดินใต้ต้นมะขาม	+	+	-	กลม
LP99	ดินใต้ต้นมะขาม	-	+	-	กลม
LP100-1	ดินใต้ต้นมะขาม	-	+	-	กลม
LP100-2	ดินใต้ต้นมะขาม	+	+	-	กลม
LP101	เปลือกต้นมะขาม	-	+	-	กลม
LP102	เปลือกต้นมะขาม	-	+	+	กลม
LP103	เปลือกต้นมะขาม	-	+	-	กลม
LP104	เปลือกต้นมะขาม	+	+	-	กลม
LP105	เปลือกต้นมะขาม	+	+	+	แท่ง
LP106	เปลือกต้นมะขาม	+	+	+	กลม
LP107	เปลือกต้นมะขาม	+	+	-	กลม
LP108	เปลือกต้นมะขาม	-	+	+	แท่ง
LP109	เปลือกต้นมะขาม	-	+	-	กลม
LP110	เปลือกต้นมะขาม	-	-	-	แท่ง
LP111	เปลือกต้นมะขาม	+	+	-	กลม
LP112-1	เปลือกต้นมะขาม	-	+	-	กลม
LP112-2	เปลือกต้นมะขาม	-	+	-	กลม

ตารางที่ ข.7 (ต่อ) คุณสมบัติของไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากการเก็บตัวอย่างตามแหล่งธรรมชาติ ครั้งที่ 7

ครั้งที่ 7					
Isolate No.	ชื่อตัวอย่าง	เจริญภาวะไม่มีอากาศ (50 °C) ^a	เจริญภาวะมีอากาศ (30 °C) ^a	ผลคะตะเลส ^b	รูปร่าง
LP113-1	เปลือกต้นมะขาม	-	+	+	แท่ง
LP113-2	เปลือกต้นมะขาม	-	+	+	แท่ง
LP114	เปลือกต้นมะขาม	+	+	+	แท่ง
LP115	เปลือกต้นมะขาม	-	+	-	กลม
LP116	เปลือกต้นมะขาม	-	+	-	กลม

ตารางที่ ข.8 คุณสมบัติของไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากการเก็บตัวอย่างตามแหล่งธรรมชาติ ครั้งที่ 8

ครั้งที่ 8					
Isolate No.	ชื่อตัวอย่าง	เจริญภาวะไม่มีอากาศ (50 °C) ^a	เจริญภาวะมีอากาศ (30 °C) ^a	ผลคะตะเลส ^b	รูปร่าง
NK117	รากต้นกระสังข์	-	+	-	กลม
NK118	รากต้นกระสังข์	-	+	-	ทกลม
NK119	รากต้นกระสังข์	-	+	+	แท่ง
NK120	รากต้นกระสังข์	-	+	-	กลม
NK121	รากต้นกระสังข์	-	+	-	กลม
NK122	รากต้นลูกใต้ใบ	-	+	-	กลม
NK123	รากต้นกระสังข์ พันธุ์เล็ก	-	+	+	กลม
NK124	รากต้นกระสังข์	-	+	+	แท่ง
NK125	รากต้นกระสังข์	-	+	+	แท่ง
NK126	รากต้นกระสังข์	-	+	w	กลม
NK127	รากต้นกระสังข์	-	+	-	กลม
NK128	รากต้นกระสังข์	-	+	w	กลม
NK129	รากต้นกระสังข์	-	+	-	กลม
NK130	รากต้นกระสังข์	-	+	-	กลม
NK131	รากต้นกระสังข์	-	+	-	กลม

หมายเหตุ : ^a +, เจริญภาวะมีอากาศ; -, ไม่เจริญภาวะมีอากาศ

^b +, ผลิตคะตะเลส; -, ไม่ผลิตคะตะเลส; w, ผลิตคะตะเลสเล็กน้อย

ตารางที่ ข.9 ค่าการผลิตกรดแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ครั้งที่ 1

ครั้งที่ 1													
Isolate No.	YSI		Aminex HPX-87H – HPLC				Sumi chiral OA5000 - HPLC				ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง (% e.e)		ชนิดไอโซเมอร์
	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		พื้นที่				
	กลูโคส	กรดแลคติก	กลูโคส	กรดแลกติก	อะซิติก	เอทานอล	กรดแลคติก	กรดดีแลกติก	กรดแลคติก	กรดดีแลกติก	กรดแลคติก	กรดดีแลกติก	
SK5-2	0	0.70	0	97.242	0	0	-3.609	98.616	75	1546938	0	99.99	D
NK25-23	12.1	45.85	15.668	40.124	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NK26-11	1.5	9.30	0	60.522	0	0	-2.289	62.545	18063	999298	0	96.44	D
NK27-11	24.78	45.12	23.108	30.934	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NK27-12	2.54	56.84	2.889	50.762	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NK28-13	78.56	34.091	67.452	30.091	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NK29-22	46.17	45.18	45.143	50.789	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ตารางที่ ข.10 ค่าการผลิตกรดแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ครั้งที่ 2

ครั้งที่ 2													
รหัสเชื้อ	YSI		Aminex HPX-87H – HPLC				Sumi chiral OA5000 - HPLC				ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง (%) c.c		ชนิดไอโซเมอร์
	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		พื้นที่				
	กลูโคส	กรดแลกติก	กลูโคส	กรดแลกติก	อะซิติก	เอทานอล	กรดแลกติก	กรดดีแลกติก	กรดแลกติก	กรดดีแลกติก	กรดแลกติก	กรดดีแลกติก	
NK30-12	50.12	35.60	56.80	20.67	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NK30-13	92.20	34.30	95.319	17.823	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NK30-21	75.40	71.20	40.596	57.949	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NK31-12	71.00	2.80	79.193	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NK31-13	33.40	1.20	32.041	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CU32-11	80.50	0	87.243	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CU40-11	21.50	59.20	24.039	52.136	0	0	36.255	14.587	543442	271186	0	0	DL
CU40-12	26.10	61.00	28.75	55.609	0	0	38.475	13.21	573710	250283	0	0	DL
CU34-12	50.20	87.10	54.133	59.514	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CU35-11	59.30	41.20	64.747	49.421	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CU35-12	62.00	82.20	57.235	57.939	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CU36-11	108.00	0	119.276	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CU37-21	7.10	69.30	0	56.742	0	0	44.82	12.127	660198	233833	0	0	DL

ตารางที่ ข.10 (ต่อ) ค่าการผลิตกรดแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ครั้งที่ 2

ครั้งที่ 2													
Isolate No.	YSI		Aminex HPX-87H – HPLC				Sumi chiral OA5000 - HPLC				ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง (%) e.e		ชนิดไอโซเมอร์
	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		พื้นที่				
	กลูโคส	กรดแลคติก	กลูโคส	กรดแลคติก	อะซิติก	เอทานอล	กรดแลคติก	กรดดีแลคติก	กรดแลคติก	กรดดีแลคติก	กรดแลคติก	กรดดีแลคติก	
CU37-12	24.10	68.40	27.619	56.623	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CU38-11	5.40	124.00	0	89.341	0	0	82.932	-3.177	1179689	1475	99.75	0	L
CU38-12	0	1.90	0	113.041	0	0	-2.843	69.506	10512	1679401	ND	98.76	D
CU38-21	61.60	84.20	53.489	50.3	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CU39-21	21.70	85.60	25.659	66.036	0	0	52.139	6.678	759954	151103	66.82	0	L
CU39-11	63.40	79.80	50.821	48.24	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CU39-12	64.70	82.40	67.643	50.996	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ตารางที่ ข.11 ค่าการผลิตกรดแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ครั้งที่ 3

ครั้งที่ 3													
Isolate No.	YSI		Aminex HPX-87H – HPLC				Sumi chiral OA5000 - HPLC				ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง (% e.c)		ชนิดไอโซเมอร์
	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		พื้นที่				
	กลูโคส	กรดแลกติก	กลูโคส	กรดแลกติก	อะซิติก	เอทานอล	กรดแลกติก	กรดดีแลกติก	กรดแลกติก	กรดดีแลกติก	กรดแลกติก	กรดดีแลกติก	
UD41	51.90	45.40	53.456	27.773	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
UD44	50.90	47.00	44.587	27.931	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
UD45	55.60	45.90	64.363	28.416	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
UD46	58.60	39.60	53.056	21.819	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
UD48	50.70	48.20	65.696	35.721	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
UD49	54.10	44.60	41.961	26.256	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
UD52	0.00	46.20	0	52.258	0	0	28.208	17.015	433763	308043	0	0	DL
UD53	39.10	35.70	26.463	41.926	0	0	20.4	15.913	327341	291320	0	0	DL
UD54	53.30	46.80	58.519	26.729	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
UD55	53.00	76.00	31.158	48.11	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
UD57	19.50	51.60	22.522	70.26	0	0	30.912	20.688	470621	363806	0	0	DL
UD58	14.80	48.60	1.195	54.503	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
UD59	59.60	46.90	62.488	24.592	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
UD60	6.10	47.40	0	51.081	0	0	27.366	19.677	422289	348465	0	0	DL

ตารางที่ ข.11 (ต่อ) ค่าการผลิตกรดแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ครั้งที่ 3

ครั้งที่ 3													
Isolate No.	YSI		Aminex HPX-87H – HPLC				Sumi chiral OA5000 - HPLC				ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง (%) c.c		ชนิด ไอโซเมอร์
	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		พื้นที่				
	กลูโคส	กรดแลคติก	กลูโคส	กรดแลคติก	อะซิติก	เอทานอล	กรดแลคติก	กรดดีแลคติก	กรดแลคติก	กรดดีแลคติก	กรดแลคติก	กรดดีแลคติก	
LP61	33.40	75.80	0.898	50.528	0	0	54.182	0	787801	0	100	0	L
LP62	55.00	45.30	56.79	21.194	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ตารางที่ ข.12 ค่าการผลิตกรดแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ครั้งที่ 4

ครั้งที่ 4													
Isolate No.	YSI		Aminex HPX-87H – HPLC				Sumi chiral OA5000 - HPLC				ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง (%) c.c		ชนิดไอโซเมอร์
	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		พื้นที่				
	กลูโคส	กรดแอลแลกติก	กลูโคส	กรดแลกติก	อะซิติก	เอทานอล	กรดแอลแลกติก	กรดดีแลกติก	กรดแอลแลกติก	กรดดีแลกติก	กรดแอลแลกติก	กรดดีแลกติก	
CU67-1	66.60	76.00	49.373	47.749	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CU68-1	0	3.60	0	98.296	0	0	-0.844	93.011	37765	1461846	0	94.96	D
CU68-2	4.10	37.50	0	55.298	0	0	19.545	30.462	315676	512207	0	0	DL
CU69-1	58.60	70.30	65.559	46.961	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CU69-2	63.60	81.80	60.233	49.43	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CU70-1	57.30	90.30	49.182	54.598	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CU70-2	62.30	83.10	58.803	50.229	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CU71-1	83.20	63.00	86.146	34.46	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CU71-2	80.50	66.20	71.596	33.36	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CU72-1	0.00	0.30	0	91.873	0	0	-2.941	99.411	9177	1559004	0	98.83	D
CU72-2	47.70	99.10	37.553	60.721	0	0	67.407	-2.231	968071	15843	96.78	0	L
CU73-1	55.0	30.05	50.343	32.101	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ตารางที่ ข.13 ค่าการผลิตกรดแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ครั้งที่ 5

ครั้งที่ 5													
Isolate No.	YSI		Aminex HPX-87H – HPLC				Sumi chiral OA5000 - HPLC				ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง (% e.e)		ชนิดไอโซเมอร์
	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		พื้นที่				
	กลูโคส	กรดแลกติก	กลูโคส	กรดแลกติก	อะซิติก	เอทานอล	กรดแลกติก	กรดดีแลกติก	กรดแลกติก	กรดดีแลกติก	กรดแลกติก	กรดดีแลกติก	
BK74-1	18.60	101.00	23.220	74.939	2.398	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BK75	32.20	0.50	34.098	13.714	7.438	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BK76	15.90	25.60	22.31	15.067	5.897	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BK77	60.00	80.60	66.64	49.344	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BK78-1	36.20	62.30	40.567	56.169	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
BK78-2	36.30	55.10	41.513	44.257	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NK79	68.60	73.00	69.733	43.450	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NK80	72.51	46.43	72.51	46.428	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NK81-1	55.00	90.80	56.769	56.251	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NK81-2	52.60	92.80	54.740	61.128	1.396	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NK82	63.30	86.50	62.912	53.708	2.003	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NK83-1	60.90	81.30	61.024	49.678	2.241	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NK83-2	56.10	90.10	50.204	53.676	2.536	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ตารางที่ ข.14 ค่าการผลิตกรดแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ครั้งที่ 6

ครั้งที่ 6													
Isolate No.	YSI		Aminex HPX-87H – HPLC				Sumi chiral OA5000 - HPLC				ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง (% e.c)		ชนิดไอโซเมอร์
	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		พื้นที่				
	กลูโคส	กรดแลกติก	กลูโคส	กรดแลกติก	อะซิติก	เอทานอล	กรดแลกติก	กรดดีแลกติก	กรดแลกติก	กรดดีแลกติก	กรดแลกติก	กรดดีแลกติก	
PB84	47.90	94.50	42.610	55.20	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PB85-1	80.50	60.20	74.920	32.130	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PB85-2	70.60	61.30	65.49	30.860	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PB86	123.00	0.00	122.00	14.780	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PB87-1	78.80	0.20	81.900	26.180	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PB87-2	75.10	0.30	68.390	22.710	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ตารางที่ ข.15 ค่าการผลิตกรดแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ครั้งที่ 7

ครั้งที่ 7													
Isolate No.	YSI		Aminex HPX-87H – HPLC				Sumi chiral OA5000 - HPLC				ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง (% e.e)		ชนิดไอโซเมอร์
	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		พื้นที่				
	กลูโคส	กรดแลกติก	กลูโคส	กรดแลกติก	อะซิติก	เอทานอล	กรดแลกติก	กรดดีแลกติก	กรดแลกติก	กรดดีแลกติก	กรดแลกติก	กรดดีแลกติก	
LP89	87.00	42.00	84.887	26.348	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP90	94.00	0	91.826	14.950	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP91	80.65	25.05	90.101	20.989	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP92	92.20	35.10	90.696	19.787	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP93	65.30	63.00	67.694	40.968	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP94-1	72.20	61.30	67.54	37.173	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP94-2	53.50	84.00	48.687	53.691	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP95	83.20	0	83.534	20.365	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP96-1	72.3	58.60	70.345	16.101	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP96-2	106	20.90	103.524	11.381	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP97-1	66.1	47.20	60.695	40.004	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP97-2	82.7	45.70	78.395	28.839	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP98	84.7	45.10	95.057	27.698	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP99	75.9	54.00	77.379	34.639	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ตารางที่ ข.15 (ต่อ) ค่าการผลิตกรดแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ครั้งที่ 7

ครั้งที่ 7													
Isolate No.	YSI		Aminex HPX-87H – HPLC				Sumi chiral OA5000 - HPLC				ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง (%) c.c		ชนิดไอโซเมอร์
	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		พื้นที่				
	กลูโคส	กรดแลกติก	กลูโคส	กรดแลกติก	อะซิติก	เอทานอล	กรดแลกติก	กรดดีแลกติก	กรดแลกติก	กรดดีแลกติก	กรดแลกติก	กรดดีแลกติก	
LP100-1	77.30	54.30	63.072	32.779	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP100-2	61.10	50.50	55.38	44.357	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP101	52.40	92.50	86.092	72.093	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP102	93.20	0	72.093	12.589	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP103	76.60	63.20	69.825	35.289	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP104	88.70	43.40	82.032	21.658	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP105	47.20	80.50	32.586	44.559	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP106	48.30	69.10	33.372	38.144	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP107	69.90	33.30	93.569	15.677	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP108	87.40	51.70	67.06	27.068	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP109	90.45	34.15	93.142	17.761	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP110	29.70	32.90	30.675	31.090	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP111	86.30	52.50	72.456	26.498	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP112-1	82.00	13.00	76.352	11.675	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ตารางที่ ข.15 (ต่อ) ค่าการผลิตกรดแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ครั้งที่ 7

ครั้งที่ 7													
Isolate No.	YSI		Aminex HPX-87H – HPLC				Sumi chiral OA5000 - HPLC				ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง (% e.c)		ชนิดไอโซเมอร์
	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		พื้นที่				
	กลูโคส	กรดแลคติก	กลูโคส	กรดแลกติก	อะซิติก	เอทานอล	กรดแลคติก	กรดดีแลกติก	กรดแลคติก	กรดดีแลกติก	กรดแลคติก	กรดดีแลกติก	
LP112-2	51.40	51.30	43.32	51.526	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP113-1	29.80	82.90	19.202	51.453	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP113-2	76.70	44.30	58.143	20.068	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP114	29.50	82.10	20.202	51.467	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP115	88.00	47.80	88.218	25.931	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LP116	33.00	99.10	91.993	14.674	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ตารางที่ ข.16 ค่าการผลิตกรดแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ครั้งที่ 8

ครั้งที่ 8													
Isolate No.	YSI		Aminex HPX-87H – HPLC				Sumi chiral OA5000 - HPLC				ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง (%) e.e		ชนิดไอโซเมอร์
	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		พื้นที่				
	กลูโคส	กรดแลกติก	กลูโคส	กรดแลกติก	อะซิติก	เอทานอล	กรดแลกติก	กรดดีแลกติก	กรดแลกติก	กรดดีแลกติก	กรดแลกติก	กรดดีแลกติก	
NK117	103.00	13.70	92.096	15.952	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NK118	69.60	44.30	64.082	57.769	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NK119	214.00	72.50	100.567	27.491	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NK120	75.90	89.90	61.07	50.96	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NK121	29.50	90.70	17.073	77.306	0	0	21.505	33.480	319276	442671	0	0	DL
NK122	25.50	30.65	15.001	40.456	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NK123	169.00	94.60	86.973	43.534	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NK124	64.30	209.00	27.319	98.11	0	0	61.815	27.172	2437802	1102691	0	0	DL
NK125	127	17.90	50.661	85.336	0	0	65.853	29.134	2609358	1189637	0	0	DL
NK126	142	95.10	75.609	50.614	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NK127	90.5	37.70	72.026	34.119	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NK128	175	98.20	77.672	28.851	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NK129	98.2	83.20	54.735	53.219	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ตารางที่ ข.16 (ต่อ) ค่าการผลิตกรดแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ครั้งที่ 8

ครั้งที่ 8													
Isolate No.	YSI		Aminex HPX-87H – HPLC				Sumi chiral OA5000 - HPLC				ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสง (% e.c)		ชนิด ไอโซเมอร์
	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		พื้นที่				
	กลูโคส	กรดแอลแลกติก	กลูโคส	กรดแลกติก	อะซิติก	เอทานอล	กรดแอลแลกติก	กรดดีแลกติก	กรดแอลแลกติก	กรดดีแลกติก	กรดแอลแลกติก	กรดดีแลกติก	
NK130	94.3	85.50	72.331	44.78	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NK131	76.50	66.30	65.255	42.444	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ตารางที่ ข.17 ค่าการผลิตกรดดีแลกติกและความบริสุทธิ์ซึ่งได้จากกลูโคสที่ความเข้มข้น 100 120 และ 160 กรัมต่อลิตร โดย CU72-1

ความเข้มข้น กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	การ ทดลอง	YSI		Aminex HPX-87H - HPLC				Sumi chiral OA5000 - HPLC				(% D)
		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		พื้นที่		
		กลูโคส	กรดแอส แลกติก	กลูโคส	ค่าเฉลี่ย	กรด แลกติก	ค่าเฉลี่ย	กรดแอส แลกติก	กรดดี แลกติก	กรดแอส แลกติก	กรดดี แลกติก	
100	1	0.2	0	0		88.841						98.026
	2	0.4	0.2	0	0	93.2	88.335	6.566	106.166	15450	1550092	
	3	3.0	จ	0		82.964						
120	1	13.3	1.0	8.958		91.766						98.628
	2	24.8	0	8.093	5.684	93.799	93.632	6.246	109.053	11013	1594858	
	3	6.2	0	0		95.331						
160	1	64.0	0.4	50.596		85.51						98.284
	2	62.7	0.4	48.95	50.720	88.013	86.401	6.16	113.169	9814	1658674	
	3	67.0	0.2	52.601		85.681						

ตารางที่ ข.18 ค่าการผลิตกรดดีแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากซูโครสที่ความเข้มข้น 100 120 และ 160 กรัมต่อลิตร โดย CU72-1

ความเข้มข้นซูโครส (กรัมต่อลิตร)	การทดลอง	YSI		Aminex HPX-87H - HPLC						Sumi chiral OA5000 - HPLC				(% D)	
		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)						ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		พื้นที่			
		กลูโคส	กรดแอลแลกติก	กลูโคส	ค่าเฉลี่ย	กรดแอลแลกติก	ค่าเฉลี่ย	ซูโครส	ฟรักโทส	ค่าเฉลี่ย	กรดแอลแลกติก	กรดดีแลกติก	กรดแอลแลกติก		กรดดีแลกติก
100	1	0	0.8	0	0	40.111	41.536	0	0	0	6.104	81.279	9038	1164279	98.459
	2	0	0.2	0		45.312		0	0						
	3	0	0.3	0		39.185		0	0						
120	1	0.2	0	0	0.760	50.900	54.695	0	27.760	26.696	6.188	64.715	10211	907478	97.775
	2	0.5	0.1	2.281		56.670		0	26.322						
	3	0	0.4	0		56.514		0	26.007						
160	1	0.1	1.7	0	0	78.293	76.003	0	0	0	7.088	98.514	22675	1431463	96.881
	2	0.2	1.3	0		79.595		0	0						
	3	1.2	1.3	0		70.120		0	0						

ตารางที่ ข.19 การเปรียบเทียบการเติมและไม่เติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากแป้งมันสำปะหลังโดย CU72-1

การทดลอง	YSI				Aminex HPX-87H - HPLC							
	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)							
	ไม่เติม กลูโคอะไมเลส		เติม กลูโคอะไมเลส		ไม่เติมกลูโคอะไมเลส				เติมกลูโคอะไมเลส			
	กลูโคส	กรดแอลแลกติก	กลูโคส	กรดแอลแลกติก	กลูโคส	ค่าเฉลี่ย	กรดแอลแลกติก	ค่าเฉลี่ย	กลูโคส	ค่าเฉลี่ย	กรดแอลแลกติก	ค่าเฉลี่ย
1	0.2	31.4	0	0	0	0	31.754	23.737	0	0	113.040	116.881
2	0	0	0	0	20.863		0		119.290			
3	0	0	0	0	18.593		0		118.314			

ตารางที่ ข.20 ค่าการผลิตกรดดีแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 100 120 และ 160 กรัมต่อลิตร โดย CU72-1

ความเข้มข้น แป้งมัน สำปะหลัง (กรัมต่อลิตร)	การ ทดลอง	YSI		Aminex HPX-87H - HPLC				Sumi chiral OA5000 - HPLC				(% D)
		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		พื้นที่		
		กลูโคส	กรดแอล แลกติก	กลูโคส	ค่าเฉลี่ย	กรด แลกติก	ค่าเฉลี่ย	กรดแอล แลกติก	กรดดี แลกติก	กรดแอล แลกติก	กรดดี แลกติก	
100	1	0	0	0	0	87.828	84.178	6.373	97.514	12775	1415959	98.212
	2	0	0	0		80.449						
	3	0	0	0		84.256						
120	1	0	0.5	0	0	113.040	116.881	6.117	126.986	9223	1872879	99.02
	2	0.3	0.3	0		119.290						
	3	0.2	0.4	0		118.314						
160	1	0	0.5	0	0	111.260	112.643	6.324	135.008	12088	1997242	98.797
	2	0	0.6	0		116.600						
	3	0	0.7	0		110.068						

ตารางที่ ข.21 ค่าการผลิตกรดดีแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากกลูโคสที่ความเข้มข้น 100 120 และ 160 กรัมต่อลิตรโดย SK5-2

ความเข้มข้น กลูโคส (กรัมต่อลิตร)	การ ทดลอง	YSI		Aminex HPX-87H - HPLC				Sumi chiral OA5000 - HPLC				(% D)
		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		พื้นที่		
		กลูโคส	กรดแอล แลกติก	กลูโคส	ค่าเฉลี่ย	กรด แลกติก	ค่าเฉลี่ย	กรดแอล แลกติก	กรดดี แลกติก	กรดแอล แลกติก	กรดดี แลกติก	
100	1	0	0	0	0	102.649	98.594	6.267	126.631	11294	1867372	98.798
	2	0.1	0.2	0		97.051						
	3	0.1	0	0		96.083						
120	1	0	0.3	0	0	112.249	112.454	6.207	125.573	11294	1850997	98.787
	2	0.4	0.1	0		112.058						
	3	0	0	0		113.055						
160	1	49.9	1.6	47.715	39.477	108.483	106.605	6.786	121.256	18498	1784037	97.948
	2	42	1.6	34.61		108.672						
	3	43.9	1.6	36.106		102.66						

ตารางที่ ข.22 ค่าการผลิตกรดดีแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากซูโครสที่ความเข้มข้น 100 120 และ 160 กรัมต่อลิตรโดย SK5-2

ความเข้มข้นซูโครส (กรัมต่อลิตร)	การทดลอง	YSI		Aminex HPX-87H - HPLC						Sumi chiral OA5000 - HPLC				(% D)
		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)						ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		พื้นที่		
		กลูโคส	กรดแอลแลกติก	กลูโคส	ค่าเฉลี่ย	กรดแลกติก	ค่าเฉลี่ย	ซูโครส	ฟรักโทส	กรดแอลแลกติก	กรดดีแลกติก	กรดแอลแลกติก	กรดดีแลกติก	
100	1	0	0	0		90.123		0	0					99.370
	2	0.1	0	0	0	88.374	90.873	0	0	5.845	117.531	5456	1726284	
	3	0	0.1	0		94.123		0	0					
120	1	0	0.3	0		104.363		0	0					98.085
	2	0	0.2	0	0	99.998	101.118	0	0	6.524	105.358	14867	1537572	
	3	0.5	0.1	0		98.993		0	0					
160	1	28.5	0.9	6.666		115.454		0	0					98.493
	2	23.8	0.4	7.142	7.499	120.030	116.162	0	0	6.596	140.957	15867	2089469	
	3	26.8	0.3	8.688		113.001		0	0					

ตารางที่ ข.23 การเปรียบเทียบการเติมและไม่เติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจากแป้งมันสำปะหลังโดย SK5-2

การทดลอง	YSI				Aminex HPX-87H - HPLC							
	ความเข้มข้น(กรัมต่อลิตร)				ความเข้มข้น(กรัมต่อลิตร)							
	ไม่เติม กลูโคอะไมเลส		เติม กลูโคอะไมเลส		ไม่เติมกลูโคอะไมเลส				เติมกลูโคอะไมเลส			
	กลูโคส	กรดแอลแลกติก	กลูโคส	กรดแอลแลกติก	กลูโคส	ค่าเฉลี่ย	กรดดีแลกติก	ค่าเฉลี่ย	กลูโคส	ค่าเฉลี่ย	กรดดีแลกติก	ค่าเฉลี่ย
1	0	0	0	0	0		50.372				96.435	
2	0.2	0	0	0	0	0	57.451	54.217	0	0	97.182	97.530
3	0.0	0.1	0	0	0		54.827				98.985	

ตารางที่ ข.24 ค่าการผลิตกรดดีแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 100 120 และ 160 กรัมต่อลิตรโดย SK5-2

ความเข้มข้น แป้งมัน สำปะหลัง (กรัมต่อลิตร)	การ ทดลอง	YSI		Aminex HPX-87H - HPLC				Sumi chiral OA5000 - HPLC				(% D)
		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		พื้นที่		
		กลูโคส	กรดแอล แลกติก	กลูโคส	ค่าเฉลี่ย	กรด แลกติก	ค่าเฉลี่ย	กรดแอล แลกติก	กรดดี แลกติก	กรดแอล แลกติก	กรดดี แลกติก	
100	1	0	0	0	1.4	84.800	81.321	5.909	92.142	6341	1332691	99.053
	2	0	0.5	0		79.126						
	3	0	0	1.9		80.037						
120	1	0	0	0	0	97.570	99.463	5.855	110.847	5595	1622663	99.313
	2	0	0	0		102.317						
	3	0	0	0		98.503						
160	1	0	0	4.979	4.421	112.0	112.519	5.883	124.982	5985	1841803	99.352
	2	0	0.2	4.876		112.4						
	3	0	0	3.408		113.1						

ตารางที่ ข.25 ค่าการผลิตกรดดีแลกติก Yield และ Productivity จากการหมักของกลูโคส ซูโครส และแป้งมันสำปะหลัง ที่ความเข้มข้น 100 120 และ 160 กรัมต่อลิตรโดย CU72-1

แหล่งคาร์บอน	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		% Yield	Productivity (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
		กลูโคสที่เหลือ	กรดดีแลกติก		
กลูโคส	100	0	88.335	88.335	1.227
	120	5.684	93.632	81.906	1.300
	160	50.716	86.401	79.061	1.200
ซูโครส	100	0	41.536	41.536	0.577
	120	0.760	54.695	45.870	0.760
	160	0	76.003	47.502	1.056
แป้งมันสำปะหลัง	100	0	84.178	84.178	1.169
	120	0	116.881	97.401	1.623
	160	0	112.643	70.402	1.564

ตารางที่ ข.26 ค่าการผลิตกรดดีแลกติก Yield และ Productivity จากการหมักกลูโคส ซูโครส และแป้งมันสำปะหลัง ที่ความเข้มข้น 100 120 และ 160 กรัมต่อลิตรโดย SK5-2

แหล่งคาร์บอน	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		% Yield	Productivity (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
		กลูโคสที่เหลือ	กรดดีแลกติก		
กลูโคส	100	0	98.594	98.594	1.369
	120	0	112.454	93.712	1.562
	160	39.477	106.605	88.452	1.481
ซูโครส	100	0	90.873	90.873	1.262
	120	0	101.118	84.265	1.404
	160	7.499	116.162	76.171	1.613
แป้งมันสำปะหลัง	100	1.358	81.321	82.440	1.129
	120	0	99.463	82.886	1.381
	160	4.421	112.519	72.323	1.563

ตารางที่ ข.27 ค่าการผลิตกรดดีแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแหล่งไนโตรเจนที่มีชนิดและความเข้มข้นต่างๆโดย CU72-1

สถานะ	แหล่งไนโตรเจน	การทดลอง	YSI		Aminex HPX-87H - HPLC				Sumi chiral OA5000 - HPLC				(% D)
			ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		พื้นที่		
	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		กลูโคส	กรดแอลแลกติก	กลูโคส	ค่าเฉลี่ย	กรดแลกติก	ค่าเฉลี่ย	กรดแอลแลกติก	กรดดีแลกติก	กรดแอลแลกติก	กรดดีแลกติก	
1 Control	ยีสต์สกัด = 5 เปปโทน = 0	1	55.5	2.6	36.213		57.313						95.391
		2	57.1	1.9	35.572	34.97	53.381	55.396	5.408	65.748	68491	2903841	
		3	53.2	2.0	33.124		55.493						
2	ยีสต์สกัด = 10 เปปโทน = 0	1	32.2	1.9	16.165		80.571						97.216
		2	35.7	1.8	20.138	17.827	76.477	78.39	4.998	81.295	51269	3631705	
		3	31	1.9	17.177		78.121						
3	ยีสต์สกัด = 20 เปปโทน = 0	1	6.2	1.8	0		97.267						98.022
		2	7.0	1.6	0	0	99.283	97.662	4.878	102.556	46209	4627075	
		3	7.7	1.2	0		96.436						
4	ยีสต์สกัด = 30 เปปโทน = 0	1	0	0.8	1.798		117.747						98.501
		2	3.1	0.9	0.0	0.599	118.139	117.667	3.723	112.961	38251	5065312	
		3	1.2	0.8	0.0		117.115						

ตารางที่ ข.27 (ต่อ) ค่าการผลิตกรดดีแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแหล่งไนโตรเจนที่มีชนิดและความเข้มข้นต่างๆโดย CU72-1

สถานะ	แหล่งไนโตรเจน	การทดลอง	YSI		Aminex HPX-87H - HPLC				Sumi chiral OA5000 - HPLC				(% D)
			ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		พื้นที่		
	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		กลูโคส	กรดแอลแลกติก	กลูโคส	ค่าเฉลี่ย	กรดแลกติก	ค่าเฉลี่ย	กรดแอลแลกติก	กรดดีแลกติก	กรดแอลแลกติก	กรดดีแลกติก	
5	ยีสต์สกัด = 0 เปปโทน = 10	1	90.5	0	76.253	72.593	41.399	44.996	4.693	88.567	38426	3972173	98.084
		2	98.9	0	73.138		43.404						
		3	95.1	0	68.389		50.185						
6	ยีสต์สกัด = 20 เปปโทน = 10	1	8.8	0.6	0	1.333	109.179	103.84	4.403	107.015	26271	4835860	98.919
		2	13.9	0.9	3.999		100.579						
		3	8.9	0.8	0		101.749						
7	ยีสต์สกัด = 10 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 5	1	25.5	1.5	12.114	9.751	83.713	84.19	4.968	112.501	37998	5031834	97.850
		2	18.0	1.5	7.525		88.484						
		3	23.7	1.9	9.614		80.362						
8	ยีสต์สกัด = 10 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 20	1	40.1	0.9	20.563	20.28	100.214	102.307	3.939	109.546	47146	4907571	98.097
		2	17.3	1.8	19.243		105.811						
		3	19.5	1.9	21.042		100.895						

ตารางที่ ข.27 (ต่อ) ค่าการผลิตรวดดีแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากไนโตรเจนที่มีชนิดและความเข้มข้นต่างๆ โดย CU72-1

สถานะ	แหล่ง ไนโตรเจน	การ ทดลอง	YSI		Aminex HPX-87H - HPLC				Sumi chiral OA5000 - HPLC				(% D)
			ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		พื้นที่		
	กลูโคส		กรดแอล แลกติก	กลูโคส	ค่าเฉลี่ย	กรด แลกติก	ค่าเฉลี่ย	กรดแอล แลกติก	กรดดี แลกติก	กรดแอล แลกติก	กรดดี แลกติก		
9	ยีสต์สกัด = 20	1	8.8	0.8	8.516	5.644	114.289	112.626	3.767	106.59	40041	4771041	98.335
	แอมโมเนียม	2	7.5	0.1	5.801		113.697						
	คลอไรด์ = 10	3	1.6	0.5	2.615		109.891						
10	ยีสต์สกัด = 5	1	53.5	0.1	48.302	47.745	61.434	61.496	3.826	56.821	42486	2472163	96.621
	แอมโมเนียม	2	44.4	0.1	48.678		59.799						
	คลอไรด์ = 25	3	54.6	0.08	46.255		63.254						
11	ยีสต์สกัด = 5	1	52.9	0.1	57.086	57.723	52.487	53.894	3.573	70.45	46916	3101739	97.020
	แอมโมเนียม	2	45.1	0.1	57.02		54.285						
	คลอไรด์ = 20	3	44.1	0.1	59.062		54.909						

ตารางที่ ข.28 ปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นที่มีอยู่ในอาหารสำหรับไอโซเลทไม่ผลิตคะตะเลส

ภาวะ	แหล่งไนโตรเจน	การทดลอง	ปริมาตรกรด HCl (มิลลิลิตร)		ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	% ไนโตรเจน
	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ที่ใช้	ค่าเฉลี่ย		
1	ยีสต์สกัด = 5 เปปโทน = 0	1	0.80	0.77	0.00091	0.030
		2	0.75			
		3	0.75			
2	ยีสต์สกัด = 10 เปปโทน = 0	1	1.35	1.33	0.00168	0.056
		2	1.35			
		3	1.30			
3	ยีสต์สกัด = 20 เปปโทน = 0	1	2.55	2.58	0.00339	0.113
		2	2.55			
		3	2.65			
4	ยีสต์สกัด = 30 เปปโทน = 0	1	4.45	4.47	0.00596	0.199
		2	4.50			
		3	4.45			
5	ยีสต์สกัด = 0 เปปโทน = 10	1	1.45	1.47	0.00186	0.062
		2	1.45			
		3	1.50			
6	ยีสต์สกัด = 20 เปปโทน = 10	1	3.75	3.75	0.00498	0.166
		2	3.70			
		3	3.80			
7	ยีสต์สกัด = 10 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 5	1	2.65	2.70	0.00355	0.118
		2	2.70			
		3	2.75			
8	ยีสต์สกัด = 10 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 20	1	7.05	7.08	0.00953	0.318
		2	7.10			
		3	7.10			

ตารางที่ ข.28 (ต่อ) ปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นที่มีอยู่ในอาหารสำหรับไอโซเลทไม่ผลิตคะตะเลส

ภาวะ	แหล่งไนโตรเจน	การทดลอง	ปริมาตรกรด HCl (มิลลิลิตร)		ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	% ไนโตรเจน
			ที่ใช้	ค่าเฉลี่ย		
9	ยีสต์สกัด = 20 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 10	1	6.20	6.15	0.00825	0.275
		2	6.10			
		3	6.15			
10	ยีสต์สกัด = 5 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 25	1	7.90	7.72	0.01039	0.346
		2	7.60			
		3	7.65			
11	ยีสต์สกัด = 5 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 20	1	6.55	6.53	0.00878	0.293
		2	6.50			
		3	6.55			

ตารางที่ ข.29 ปริมาณไนโตรเจนสุดท้ายหลังจากกระบวนการหมักกรดดีแลกติกโดย CU72-1

ภาวะ	แหล่งไนโตรเจน	การทดลอง	ปริมาตรกรด HCl (มิลลิลิตร)				ค่าเฉลี่ยรวม	ไนโตรเจนสุดท้าย		ไนโตรเจนที่ใช้	
			การทดลอง			ค่าเฉลี่ย		ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	% ไนโตรเจน	ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	% ไนโตรเจน
	1		2	3	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)						
1	ยีสต์สกัด = 5 เปปโทน = 0	1	0.7	0.7	0.65	0.68	0.72	0.00084	0.028	0.00007	0.002
		2	0.75	0.75	0.75	0.75					
		3	0.7	0.75	0.7	0.72					
2	ยีสต์สกัด = 10 เปปโทน = 0	1	1.45	1.4	1.4	1.42	1.39	0.00177	0.059	-0.00008	-0.003
		2	1.35	1.3	1.35	1.33					
		3	1.4	1.45	1.45	1.43					
3	ยีสต์สกัด = 20 เปปโทน = 0	1	2.5	2.5	2.5	2.50	2.53	0.00332	0.111	0.00007	0.002
		2	2.5	2.55	2.55	2.53					
		3	2.55	2.6	2.55	2.57					
4	ยีสต์สกัด = 30 เปปโทน = 0	1	4.25	4.25	4.25	4.25	4.20	0.00559	0.186	0.00036	0.012
		2	4.25	3.55	4.20	4.00					
		3	4.20	4.60	4.25	4.35					

ตารางที่ ข.29 (ต่อ) ปริมาณไนโตรเจนสุดท้ายหลังจากกระบวนการหมักกรดดีแลคติกโดย CU72-1

ภาวะ	แหล่งไนโตรเจน	การทดลอง	ปริมาตรกรด HCl (มิลลิลิตร)				ค่าเฉลี่ยรวม	ไนโตรเจนสุดท้าย		ไนโตรเจนที่ใช้	
			การทดลอง			ค่าเฉลี่ย		ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	% ไนโตรเจน	ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	% ไนโตรเจน
	1		2	3							
5	ยีสต์สกัด = 0 เปปโทน = 10	1	2.8	2.85	2.80	2.82	2.84	0.00374	0.125	-0.00187	-0.062
		2	2.85	2.80	2.80	2.82					
		3	2.90	2.85	2.90	2.88					
6	ยีสต์สกัด = 20 เปปโทน = 10	1	4.05	4.05	4.05	4.05	4.03	0.00536	0.179	-0.00038	-0.013
		2	3.95	4.05	4.05	4.02					
		3	4.05	4	4	4.02					
7	ยีสต์สกัด = 10 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 5	1	2.85	2.95	2.95	2.92	2.91	0.00383	0.128	-0.00028	-0.009
		2	2.9	2.9	2.95	2.92					
		3	2.9	2.95	2.8	2.88					
8	ยีสต์สกัด = 10 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 20	1	7.25	7.30	7.30	7.28	7.25	0.00975	0.325	-0.00023	-0.008
		2	7.15	7.25	7.20	7.20					
		3	7.25	7.25	7.30	7.27					

ตารางที่ ข.29 (ต่อ) ปริมาณไนโตรเจนสุดท้ายหลังจากกระบวนการหมักกรดดีแลคติกโดย CU72-1

ภาวะ	แหล่งไนโตรเจน	การทดลอง	ปริมาตรกรด HCl (มิลลิลิตร)				ไนโตรเจนสุดท้าย		ไนโตรเจนที่ใช้		
			การทดลอง			ค่าเฉลี่ย	ค่าเฉลี่ยรวม	ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	% ไนโตรเจน	ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	% ไนโตรเจน
	1		2	3	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)						
9	ยีสต์สกัด = 20 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 10	1	5.60	5.90	5.65	5.72	5.67	0.00759	0.253	0.00066	0.022
		2	5.40	5.70	5.50	5.53					
		3	5.80	5.70	5.75	5.75					
10	ยีสต์สกัด = 5 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 25	1	7.6	7.8	7.65	7.68	7.71	0.01038	0.346	0.00001	0.0003
		2	7.85	7.8	7.8	7.82					
		3	7.65	7.65	7.6	7.63					
11	ยีสต์สกัด = 5 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 20	1	6.15	6.2	6.2	6.18	6.26	0.00840	0.280	0.00038	0.013
		2	6.25	6.3	6.25	6.27					
		3	6.35	6.30	6.30	6.32					

ตารางที่ ข.30 ค่า Yield และ Productivity จากแหล่งไนโตรเจนที่มีชนิดและความเข้มข้นต่างๆ โดย CU72-1

ภาวะ	แหล่งไนโตรเจน	% Yield	Productivity (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		
1	ยีสต์สกัด = 5 เปปโทน = 0	65.148	0.769
2	ยีสต์สกัด = 10 เปปโทน = 0	76.722	1.089
3	ยีสต์สกัด = 20 เปปโทน = 0	81.385	1.356
4	ยีสต์สกัด = 30 เปปโทน = 0	98.548	1.634
5	ยีสต์สกัด = 0 เปปโทน = 10	94.915	0.625
6	ยีสต์สกัด = 20 เปปโทน = 10	87.502	1.442
7	ยีสต์สกัด = 10 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 5	76.36	1.169
8	ยีสต์สกัด = 10 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 20	102.597	1.421
9	ยีสต์สกัด = 20 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 10	98.487	1.564
10	ยีสต์สกัด = 5 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 25	85.109	0.854
11	ยีสต์สกัด = 5 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 20	86.538	0.749

ตารางที่ ข.31 ค่าการผลิตกรดดีแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแหล่งไนโตรเจนที่มีชนิดและความเข้มข้นต่างๆโดย SK5-2

ภาวะ	แหล่งไนโตรเจน	การทดลอง	YSI		Aminex HPX-87H - HPLC				Sumi chiral OA5000 - HPLC				(%D)
			ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		พื้นที่		
	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		กลูโคส	กรดแอลแลกติก	กลูโคส	ค่าเฉลี่ย	กรดแลกติก	ค่าเฉลี่ย	กรดแอลแลกติก	กรดดีแลกติก	กรดแอลแลกติก	กรดดีแลกติก	
1	ยีสต์สกัด = 7.5 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 0	1	8.5	0.7	0	1.161	105.025	107.25	4.655	114.164	36838	5170570	98.585
		2	7.3	0.5	0		107.237						
		3	12.6	0.8	3.483		109.481						
2	ยีสต์สกัด = 15 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 0	1	3.3	0.3	0	0	113.491	115.1	4.108	106.099	13857	4792962	99.423
		2	4.0	0.5	0		117.798						
		3	2.5	0.2	0		114.019						
3	ยีสต์สกัด = 0 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 8	1	137	0.3	108.585	103.865	0.0	0	0	0	0	0	0
		2	131	0	100.53		0.0						
		3	125	0	102.481		0.0						
4	ยีสต์สกัด = 15 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 4	1	3.2	0.6	0	0	122.437	118.78	4.263	109.296	20333	4942658	99.181
		2	4.9	0.9	0		118.195						
		3	5.0	0.8	0		115.719						

ตารางที่ ข.31 (ต่อ)ค่าการผลิตกรดดีแลกติกและความบริสุทธิ์เชิงแสงจากแหล่งไนโตรเจนที่มีชนิดและความเข้มข้นต่างๆโดย SK5-2

ภาวะ	แหล่งไนโตรเจน	การทดลอง	YSI		Aminex HPX-87H - HPLC				Sumi chiral OA5000 - HPLC				(%D)
			ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)				ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		พื้นที่		
			กลูโคส	กรดแอลแลกติก	กลูโคส	ค่าเฉลี่ย	กรดแลกติก	ค่าเฉลี่ย	กรดแอลแลกติก	กรดดีแลกติก	กรดแอลแลกติก	กรดดีแลกติก	
5	ยีสต์สกัด = 7.5 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 4	1	9.5	1.2	0		112.65						98.562
		2	10.3	1.2	2.595	0.865	109.349	109.6	4.56	100.618	32851	4536341	
		3	6.9	0.9	0		106.785						
6	ยีสต์สกัด = 7.5 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 10	1	0	0.2	0		127.876						99.469
		2	0.8	0.4	4.617	1.539	119.551	123.483	3.112	109.08	12995	4886060	
		3	1.7	0.3	0.0		123.023						
7	ยีสต์สกัด = 3.75 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 10	1	31.5	0.2	33.781		94.991						98.973
		2	30.0	0	34.432	36.139	95.698	94.307	3.317	93.308	21450	4157564	
		3	33.4	0	40.205		92.231						
8	ยีสต์สกัด = 3.75 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 15	1	54.4	0	55.390		67.146						99.387
		2	52.6	0	55.999	54.977	67.279	66.572	3.032	71.429	9680	3146938	
		3	51.3	0	53.542		65.292						

ตารางที่ ข.32 ปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นที่มีอยู่ในอาหารสำหรับไอโซเลทผลิตตะละเลส

ภาวะ	แหล่งไนโตรเจน	การทดลอง	ปริมาตรกรด HCl (มิลลิลิตร)		ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	% ไนโตรเจน
	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		ที่ใช้	ค่าเฉลี่ย		
1	ยีสต์สกัด = 7.5 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 0	1	1.15	1.17	0.00146	0.049
		2	1.20			
		3	1.15			
2	ยีสต์สกัด = 15 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 0	1	2.10	2.13	0.00277	0.092
		2	2.20			
		3	2.10			
3	ยีสต์สกัด = 0 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 8	1	2.50	2.50	0.00327	0.109
		2	2.50			
		3	2.50			
4	ยีสต์สกัด = 15 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 4	1	3.20	3.27	0.00432	0.144
		2	3.25			
		3	3.35			
5	ยีสต์สกัด = 7.5 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 4	1	2.35	2.35	0.00307	0.102
		2	2.30			
		3	2.40			
6	ยีสต์สกัด = 7.5 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 10	1	4.20	4.20	0.00559	0.186
		2	4.20			
		3	4.20			
7	ยีสต์สกัด = 3.75 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 10	1	3.60	3.62	0.00480	0.160
		2	3.60			
		3	3.65			
8	ยีสต์สกัด = 3.75 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 15	1	3.80	3.82	0.00507	0.169
		2	3.80			
		3	3.85			

ตารางที่ ข.33 ปริมาณไนโตรเจนสุดท้ายหลังจากกระบวนการหมักกรดดีแลคติกโดย SK5-2

ภาวะ	แหล่งไนโตรเจน	การทดลอง	ปริมาตรกรด HCl (มิลลิลิตร)				ค่าเฉลี่ยรวม	ไนโตรเจนสุดท้าย		ไนโตรเจนที่ใช้	
			การทดลอง			ค่าเฉลี่ย		ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	% ไนโตรเจน	ไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)	% ไนโตรเจน
	1		2	3	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)						
1	ยีสต์สกัด = 7.5 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 0	1	1.15	1.20	1.25	1.20	1.15	0.00143	0.048	0.00002	0.001
		2	1.20	1.15	1.10	1.15					
		3	1.15	1.10	1.05	1.10					
2	ยีสต์สกัด = 15 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 0	1	2.00	2.15	2.25	2.13	2.11	0.00274	0.091	0.00003	0.001
		2	2.00	2.20	2.10	2.10					
		3	2.15	2.15	2.00	2.10					
3	ยีสต์สกัด = 0 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 8	1	2.60	2.50	2.50	2.53	2.51	0.00329	0.110	-0.00001	0.000
		2	2.45	2.50	2.45	2.47					
		3	2.55	2.50	2.50	2.52					
4	ยีสต์สกัด = 15 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 4	1	3.25	3.20	3.35	3.27	3.19	0.00422	0.141	0.00010	0.003
		2	3.20	3.15	3.20	3.18					
		3	2.80	3.20	3.35	3.12					

ตารางที่ ข.33 (ต่อ) ปริมาณไนโตรเจนสุดท้ายหลังจากกระบวนการหมักกรดดีแลกติกโดย SK5-2

ภาวะ	แหล่งไนโตรเจน	การทดลอง	ปริมาตรกรด HCl (มิลลิลิตร)				ค่าเฉลี่ยรวม	ไนโตรเจนสุดท้าย		ไนโตรเจนที่ใช้	
			การทดลอง			ค่าเฉลี่ย		ไนโตรเจน(กรัมต่อลิตร)	% ไนโตรเจน	ไนโตรเจน(กรัมต่อลิตร)	% ไนโตรเจน
	1		2	3	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)						
5	ยีสต์สกัด = 7.5 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 4	1	2.30	2.45	2.45	2.40	2.33	0.00304	0.101	0.00003	0.001
		2	2.40	2.35	2.40	2.38					
		3	2.20	2.15	2.25	2.20					
6	ยีสต์สกัด = 7.5 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 10	1	4.25	4.20	4.25	4.23	4.26	0.00568	0.189	-0.00008	-0.003
		2	4.25	4.25	4.20	4.23					
		3	4.30	4.30	4.35	4.32					
7	ยีสต์สกัด = 3.75 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 10	1	3.65	3.65	3.70	3.67	3.69	0.00490	0.163	-0.00010	-0.003
		2	3.70	3.70	3.70	3.70					
		3	3.75	3.70	3.70	3.72					
8	ยีสต์สกัด = 3.75 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 15	1	4.30	4.35	4.30	4.32	4.33	0.00574	0.191	-0.00067	-0.022
		2	4.30	4.30	4.35	4.32					
		3	4.35	4.35	4.35	4.35					

ตารางที่ ข.34 ค่า Yield และ Productivity จากแหล่งไนโตรเจนที่มีชนิดและความเข้มข้นต่างๆ โดย

SK5-2

สภาวะ	แหล่งไนโตรเจน	% Yield	Productivity (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		
1	ยีสต์สกัด = 7.5 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 0	90.246	1.49
2	ยีสต์สกัด = 15 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 0	95.919	1.599
3	ยีสต์สกัด = 0 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 8	0	0
4	ยีสต์สกัด = 15 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 4	98.986	1.65
5	ยีสต์สกัด = 7.5 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 4	91.992	1.522
6	ยีสต์สกัด = 7.5 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 10	104.239	1.715
7	ยีสต์สกัด = 3.75 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 10	112.456	1.310
8	ยีสต์สกัด = 3.75 แอมโมเนียมคลอไรด์ = 15	102.38	0.924

ตารางที่ ข.35 ลักษณะความแตกต่างทางฟีโนไทป์ทั้งหมดของ SK5-2 CU38-12 CU68-1 และ CU72-1 เทียบกับ *Sporolactobacillus* species

Characteristic	SK5-2	<i>S. laevolacticus</i>	CU38-12	<i>S. kofuensis</i>	CU68-1	<i>S. terrae</i>	<i>S. inulinus</i>	CU72-1	<i>S. nakayamae</i> subsp. <i>nakayamae</i>	<i>S. nakayamae</i> subsp. <i>racemicus</i>
Colony size (mm)	1.4-2.0	1.0-1.8	<1.0-1.4	1.2-2.6	1.0-2.3	1.0-2.3	0.9-2.2	1.0-2.3	0.9-2.1	<1.0-2.4
Cell form	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motile	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Spore	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Temperature range for growth (°C)	20-40	20-40	20-40	20-40	20-40	20-40	20-40	20-40	20-40	20-45
NaCl (%)	3	3	7	3	3	5	3	5	3	3
pH range for growth	4.5-8.5	4.5-8.5	4-8.5	4-8.5	4.5-8.5	4.5-8.5	4.5-8.5	4.5-8.5	4.5-8.5	5-8.5
Gas from Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arginine hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ ข.35 (ต่อ) ลักษณะความแตกต่างทางฟีโนไทป์ทั้งหมดของ SK5-2 CU38-12 CU68-1 และ CU72-1 เทียบกับ *Sporolactobacillus* species

Characteristic	SK5-2	<i>S. laevolacticus</i>	CU38-12	<i>S. kofuensis</i>	CU68-1	<i>S. terrae</i>	<i>S. inulinus</i>	CU72-1	<i>S. nakayamae</i> subsp. <i>nakayamae</i>	<i>S. nakayamae</i> subsp. <i>racemicus</i>
Peptidoglycan type: meso-DAP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid production from : Amygdalin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L(+) Arabinose	-	-	w	-	-	-	-	-	-	-
D(+) Arabitol	w	-	-	+	-	+	+	w	w	-
D(+) Cellobiose	-	w	-	-	-	-	-	-	-	+
Dextran	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	+	-	-	-	-	w	-
Meso-Erythritol	-	-	-	-	-	w	-	-	-	-
D(+) Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Galactose	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Lactose	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
D(+) Maltose	w	+	+	+	+	w	w	+	+	-

ตารางที่ ข. 35 (ต่อ) ลักษณะความแตกต่างทางฟิโนไทป์ทั้งหมดของ SK5-2 CU38-12 CU68-1 และ CU72-1 เทียบกับ *Sporolactobacillus* species

Characteristic	SK5-2	<i>S. laevolacticus</i>	CU38-12	<i>S. kofuensis</i>	CU68-1	<i>S. terrae</i>	<i>S. inulinus</i>	CU72-1	<i>S. nakayamae</i> subsp. <i>nakayamae</i>	<i>S. nakayamae</i> subsp. <i>racemicus</i>
D(+) Mannitol	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
D(+) Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D(+) Melibiose	-	+	-	-	w	-	-	-	-	w
D(+) Melezitose	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
Raffinose	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
Ribitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	w
D(-) Ribose	-	-	w	+	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-
L(-) Sorbose	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D(+) Trehalose	w	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D(+) Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ ข.36 ลักษณะความแตกต่างทางฟีโนไทป์ทั้งหมดของ NK26-11 เทียบกับ *Scopulibacillus* species

Characteristic	NK26-11	<i>Scopulibacillus darangshiensis</i> ^T
Colony size (mm)	<1.0-1.4	ND
Cell form	Rod	Rod
Gram	+	+
Spore	+	+
Temperature range for growth(°C)	20-45	25-30
NaCl (%) range for growth	0-3	0-4
pH range for growth	5-8.5	6.1-9.1
Gas from Glucose	-	ND
Nitrate reduction	+	-
Oxidase	-	-
Starch hydrolysis	-	-
Arginine hydrolysis	-	ND
Peptidoglycan type: meso-DAP	+	+
Acid production from : Amygdalin	-	ND
L(+) Arabinose	-	-
D(+) Arabitol	-	ND
D(+) Cellobiose	-	-
Dextran	-	ND
Dulcitol	-	ND
Meso-Erythritol	-	-
D(+) Fructose	+	-
D-Galactose	-	-
Glucose	-	-
Inulin	-	ND
Lactose	+	-

ตารางที่ ข. 36 (ต่อ) ลักษณะความแตกต่างทางฟีโนไทป์ทั้งหมดของ NK26-11 เทียบกับ
Scopulibacillus species

Characteristic	NK26-11	<i>Scopulibacillusarangshiensis</i> ^T
D(+) Maltose	+	-
D(+) Mannitol	-	-
D(+) Mannose	+	-
D(+) Melibiose	-	-
D(+) Melezitose	-	ND
Raffinose	w	-
Ribitol	-	ND
D(-) Ribose	-	ND
Sorbitol	-	-
L(-) Sorbose	-	-
Sucrose	+	-
D(+) Trehalose	w	-
D(+) Xylose	-	-

ภาคผนวก ค

ลำดับของนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียที่ผลิตกรดดีแลกติก

Primer

27 F : AGAGTTTGATCMTGGCTCAG
 518 F : CCAGCAGCCGCGGTAATACG
 800 R : TACCAGGGTATCTAATCC
 1492 R : TACGGYTACCTTGTTACGACTT

ลำดับเบสของ 16s rRNA gene ของ SK5-2

ACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGCATCGATGGGAGCTTGC
 TCCCTGAAGTGAGCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTCAGATC
 GGGATAACTGTGGGAAACCGCAGCTAATACCGGATAATCCTTCGCACCGCATGGTGC
 GGAGTTGAAAGATGGTTTCGGCCATCACTGACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGTTA
 GTTGGCGGGGTAACGGCCACCAAGACAGCGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGA
 TCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG
 AATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGT
 TTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCTGGAGAAGAACGAGTGCGAGAGGAAATGCTCGT
 ACTGTGACGGTATCCAGCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA
 ATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGC
 TTCTTAAGTCTGATGTGAAATCTTGC GGCTCAACCGCAAACGGTCATTGGAAACTGG
 GAAGCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTAGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTA
 GAGATGTGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGA
 GGCGCGAAAGCGTGGGGAGCCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAA
 ACGATGAATGCTAGGTG

ลำดับเบสของ 16s rRNA gene ของ CU38-12

CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGCACAGAGGGGAGCTTGCTCCCT

GAGGTGAGCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTCAGACTGGGA
 TAACTGTGGGAAACCGCAGCTAATACCGGATAATCCTCTGCACCGCATGGTGCAGGG
 TTGAAAGATGGTTTCGGCCATCACTGACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGTTAGTTG
 GCGGGGTAACGGCCCACCAAGACCGCGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG
 CCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATC
 TTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGTTTTCG
 GATCGTAAAGCTCTGTTGCTGGAGAAGAACGAGTGCTAGAGGAAATGCTAGTGCTGT
 GACGGTATCCAGCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
 GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCCGGCTTCT
 TAAGTCTGATGTGAAATCTTGCGGCTCAACCGCAAACGGTCATTGGAAACTGGGAAG
 CTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTAGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGA
 TGTGGAGGAATACCAGTGGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGC
 GCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACG
 ATGAATG

ลำดับเบสของ 16s rRNA gene ของ CU68-1

GTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGCACAGAAGGGAGCTTGCTCCCCGACGTGAGC
 GGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACGGGGATAACTTCGG
 GAAACCGGAGCTAATACCGGATAATCCCTCGCACCGCATGGTGCAGGTTGAAAGAT
 GGTTTCGGCCATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGCGGGGTAA
 CGGCCACCAAGACTGCGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGG
 GACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAAT
 GGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAA
 AGCTCTGTTGCCGAGAAGAACGAGTGCCAGAGGAAATGCTGGTGCTGTGACGGTAT
 CCGGCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGG
 CAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCGCGCAGGCCGGCTTCTTAAGTCTG
 ATGTGAAATCTTGCGGCTCAACCGCAAAGGTCATTGGAAACTGGGGAGCTTGAGTG
 CAGAAGAGGAGAGTAGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGG
 AATACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCA
 TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGAATGCTA

GGTGTTAGGGGGTCCAACCCCTTAGTGCTGAAGTTAACACATTAAGCATTCCGCCT
 GGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC
 AGTGGAGCATGTGGTTTAATTTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACAT
 CCTCTGACAAGCCTAGAGATAGGCCGTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTGGT
 GCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC
 AACCCCTGATCTTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGAC
 AAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATCTGGGCTA
 CACACGTGCTACAATGGGCGGTACAAAGGGCAGCGAAACCGCAAGGTCAAGCGAAT
 CCCATAAAGCCGCCCCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGG
 AATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATCCGTTCCCGGGCCTTGAC
 ACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGTGGGAACCTTT
 ATGGACCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAAATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA
 GCCGTA

ลำดับเบสของ 16s rRNA gene ของ CU72-1

CGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGCATTGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTG
 AGCGGCGGATGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTCAGATTGGGATAACTGT
 GGGAAACCGCAGCTAATACCGAATGATCCCCTGCACCACATGGTGCAGGGTTGAAA
 GATGGTTTCGGCCATCACTGACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGCGGGG
 TAACGGCCACCAAGACAGCGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAT
 TGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCAC
 AATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGTTTTCGGATCG
 TAAAGCTCTGTTGCCGAGAAGAATGAGTATGAGAGGAAATGCTTGTACTGTGACGG
 TATCCGGCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT
 GGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTTCTTAAGTC
 TGATGTGAAATCTTGCGGCTCAACCGCAAATGGTCATTGGAAACTGGGAAGCTTGAG
 TGCAGAAGAGGAGAGTAGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATGTGGA
 GGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACTGACGCTGAGGCGCGAAA
 GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAAT
 GCTAGGTGTTAGGGGGTCCAACCCCTTAGTGCTGAAGTTAACACATTAAGCATTCCGC

CTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAA
 GCAGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGAC
 ATCCTCTGACAAGTCTAGAGATAGGCCGTTCCCCTTCGGGGGACAGAGTGACAGGTG
 GTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
 GCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTG
 ACAAACCGGAGGAAGGTGGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGATCTGGG
 CTACACACGTGCTACAATGGGTGGTACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTCAAGCG
 AATCCATAAAGCCACCCCCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGC
 CGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGGTGAATCCGTTCCCGGGCCTT
 GTACACACCGCCCGTCACACCACGAAGAGTTTGTAACACCCCGAAGTCCGGTGCGAG
 AACCTTTATGGGCTCAG

ลำดับเบสของ 16s rRNA gene ของ NK26-11

GGGTGCGTTTTGTGGAATGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCT
 GTAAGACGGGGATAACTTCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGGTAATCTTTTGCATCG
 CATGATGCAAGGGTAAAAGATGGTTCTGCCATCGCTTACAGATGGGCCCGCGGTGTA
 TTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATACATAGCCGACCTGAGA
 GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA
 GTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAT
 GAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGAGAAGAATAGGTATCATAGGAAAT
 GATGGTACTGTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
 GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCA
 GGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCAGCTCAACTGGGGAGGGTCATTGGA
 AACTGGGAACTTGAGTACAGAAGAGGAGAGTAGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAA
 TGCGTAGAGATGTGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTGA
 CGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
 CCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGGGGTCCAACCCTTAGTGCTGAAGTTAACA
 CATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGAC
 GGGGGCCCGCACAAAGCAGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACC
 TTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAAGCCTAGAGATAGGCCGTTCCCCTTCGGGGG

ACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCAGTTGGGCACTCT
AAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG
CCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAAAGGGCAGCGAAG
CCGCGAGGCCGAGCCAATCCATAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAAC
TCGCCTGCATGAAGCCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATC
CGTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACACCCGAA
GTCGGTGAGGTAACCTTTTGGGGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAAATGATTGGGGGT
GAAGTCGTAACAAGGTA

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวบุษบาทิพย์ ประเสริฐศักดิ์ เกิดวันที่ 22 กันยายน พ.ศ. 2528 ที่จังหวัดนครปฐม สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร ในปีการศึกษา 2550 ต่อมาได้เข้ารับการศึกษาคือในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552

การเสนอผลงานวิจัย

Prasirtsak, B., Tanasupawat, S., Kodama, K. and Thongchul, N. Bacterial isolation for industrial D-lactic acid production from natural sources. Poster presentation and proceedings. The 23rd Annual Meeting and International of the Thai Society for Biotechnology “TSB 2011: Systems Biotechnology : Quality and Success”. 27-28 October 2011, Imperial Queen’s Park Hotel, Bangkok, Thailand.