# การผลิตกรดแลกติกจากไฮโดรไลเซทของกระดาษหนังสือพิมพ์ โดยแบคทีเรีย *Enterococcus faecium* SU-1

**ญาณิกา วัชรเทวินทร์กุล [1] จุรีรัตน์ พุดตาลเล็ก [2]**
มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม 73000
**วิไล รังสาดทอง [3]**
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ กรุงเทพฯ 10800
**และ ดุษฎี อุตภาพ [4]**
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี บางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

## บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยกระดาษหนังสือพิมพ์ด้วยกรดซัลฟูริกในฟลาสก์เขย่าโดยแบคทีเรีย SU-1 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างต้นข้าวโพดหมัก พบว่า ที่ pH เริ่มต้น 7 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที เมื่อใช้อาหาร MRS ที่เติมไฮโดรไลเซทร้อยละ 60 และร้อยละ 80 โดยปริมาตร (หรือคิดเป็นความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเท่ากับ 15 และ 20 กรัม/ลิตร) ได้ผลผลิต (yield, Yp/s) ของกรดแลกติกเท่ากับ 0.42 และ 0.33 กรัม/กรัมของน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไป ตามลำดับ ส่วนในอาหารที่มีไฮโดรไลเซทร้อยละ 40 โดยปริมาตร (ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 10 กรัม/ลิตร) ได้ Yp/s ของกรดแลกติกเพียง 0.03 กรัม/กรัมของน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไป และในอาหารที่มีไฮโดรไลเซทร้อยละ 100 โดยปริมาตร (ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 29 กรัม/ลิตร) แบคทีเรียมีการเติบโตน้อยมาก การศึกษาผลของ pH เริ่มต้นต่อการผลิตกรดแลกติกพบว่าในอาหารที่มีไฮโดรไลเซทร้อยละ 60 โดยปริมาตร ในสภาวะที่เป็นกลาง (pH 7) แบคทีเรีย SU-1 สามารถผลิตกรดแลกติกได้ดีกว่าในสภาวะที่เป็นกรด (pH 5) โดยได้ Yp/s เท่ากับ 0.42 และ 0.38 ตามลำดับ การเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าทำให้ค่า Yp/s ของกรดแลกติกสูงขึ้น โดยพบว่าเมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าจาก 50 เป็น 100 และ 150 รอบต่อนาที ทำให้ Yp/s เพิ่มขึ้นจาก 0.13 เป็น 0.22 และ 0.42 ตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มความเร็วรอบในการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที Yp/s มีค่าลดลงเป็น 0.25 ผลการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรีย SU-1 โดยวิธี 16S Ribosomal DNA พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงตำแหน่งที่ 13-605 และ 936-1401 bp มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียกรดแลกติก *Enterococcus faecium* ถึงร้อยละ 95 และร้อยละ 98 ตามลำดับ

**คำสำคัญ :** กรดแลกติก / เซลลูโลส / ไฮโดรไลเซท / หนังสือพิมพ์

---

[1] *นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม*

[2] *อาจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม*

[3] *รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์*

[4] *รองศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

# Production of lactic acid from hydrolysate of newspaper by *Enterococcus faecium* SU-1

**Yanika Watcharatewinkul [1], Chureerat Puttanlek [2],**
Silpakorn University, Nakorn Pathom 73000
**Vilai Rungsardthong [3],**
King Mongkut's Institute of Technology North Bangkok, Bangkok, 10800
**and Dudsadee Uttapap [4]**
King Mongkut's University of Technology Thonburi, Thakham, Bangkhuntian, Bangkok, 10150

## Abstract

Study of production of lactic acid from newspaper hydrolysate in shake flasks by a bacterial strain; SU-1 isolated from silage was carried out. Parameters such as hydrolysate concentration, pH and shaking speed were examined. Lactic acid product yields (at 37 °C, pH 7 and 150 rpm) of 0.42 and 0.33 were obtained when MRS medium containing 60 and 80 % (v/v) (total sugar amounts of 15 and 20 g/l) hydrolysate, respectively, were used. While using 40% (v/v) (equivalent to 10 g total sugar/l) hydrolysate as carbon source, the bacterial strain; SU-1 produced lactic acid in small amount (Yp/s = 0.03). The bacterial growth was very low when cultured in 100 % hydrolysate (29 g total sugar/l). Study of the effect of pH on lactic acid production from the hydrolysate showed that the bacterial strain; SU-1 preferred the medium with pH 7 than pH 5 (Yp/s = 0.42 and 0.38, respectively). Increase in the shaking speed from 50 to 100 and 150 rpm improved the lactic acid yields from 0.13 to 0.22 and 0.42, respectively, but when the shaking speed reached 200 rpm the lactic acid yield decreased to 0.25. 16S Ribosomal DNA sequence analysis of SU-1 showed 95 (13-605 bp) and 98% (936-1401 bp) similarity of nucleotide sequences to *Enterococcus faecium*.

**Keywords :** Lactic Acid / Cellulose / Hydrolysate / Newspaper

[1] *Graduated Student, Department of Biotechnology, Faculty of Engineering and Industrial Technology.*
[2] *Lecturer, Department of Biotechnology, Faculty of Engineering and Industrial Technology.*
[3] *Associate Professor, Department of Agro-Industrial Technology, Faculty of Applied Science.*
[4] *Associate Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Tehnology.*

## 1. บทนำ

กรดแลกติกเป็นสารเคมีที่มีความสำคัญและใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น ใช้เป็นสารเพื่อให้รสและกลิ่นในอุตสาหกรรมอาหาร รวมถึงใช้ในการรักษาสภาพอาหาร ในอุตสาหกรรมยาใช้กรดแลกติกเพื่อปรับสภาพความเป็นกรดด่าง นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมประเภทอื่นๆ ก็มีการใช้ประโยชน์จากกรดแลกติกเช่นกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการผลิต polylactic acid ซึ่งเป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติกที่มีคุณสมบัติที่สามารถย่อยสลายได้ซึ่งมีประโยชน์มากในปัจจุบัน [1-4]

การใช้กรดแลกติกในอุตสาหกรรมหลายชนิดทำให้มีความต้องการกรดแลกติกในปริมาณสูงเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการของโรงงานอุตสาหกรรมซึ่งขยายตัวอย่างรวดเร็ว สำหรับประเทศไทยความต้องการกรดแลกติกมีอัตราการขยายตัวเพิ่มขึ้นและมีการสั่งนำเข้ากรดแลกติกปีละหลายแสนกิโลกรัมคิดเป็นมูลค่าหลายล้านบาท ปัจจุบันการผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมักของจุลินทรีย์มีแนวโน้มที่มุ่งเน้นการใช้วัตถุดิบที่มีราคาถูกและมีปริมาณมากเพียงพอต่อความต้องการ เนื่องจากราคาของวัตถุดิบคิดเป็นร้อยละ 40 ของต้นทุนทั้งหมดในกระบวนการผลิต [5] นอกจากวัตถุดิบประเภทแป้งและน้ำตาลซึ่งเป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตทางการค้าแล้ว วัตถุดิบประเภทเซลลูโลส เช่น กระดาษและวัสดุทางการเกษตร ก็จัดเป็นวัตถุดิบที่สามารถนำมาผลิตกรดแลกติกได้เช่นกัน การผลิตกรดแลกติกจากวัตถุดิบประเภทเซลลูโลสจะต้องผ่านกระบวนการย่อยก่อนจะเข้าสู่กระบวนการหมัก โดยอาจจะดำเนินการแบบทีละขั้นตอน (simple saccharification; SS) หรือดำเนินการไปพร้อมกัน (simultaneous saccharification and fermentation; SSF) ซึ่งมีรายงานว่ามีประสิทธิภาพสูงกว่าการดำเนินการทีละขั้นตอน เนื่องจากกลูโคสที่ได้จากการย่อยวัตถุดิบด้วยเอนไซม์จะเข้าสู่กระบวนการหมักทันที จึงทำให้ไม่เกิดการสะสมของกลูโคสและเซลโลไบโอส (cellobiose) ซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส ทำให้ได้ผลผลิตกรดแลกติกสูงกว่า

รายงานการศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากวัตถุดิบประเภทเซลลูโลส ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากวัตถุดิบทางการเกษตรและใช้กระบวนการหมักแบบ SSF แต่จะมีความแตกต่างกันในเรื่องกระบวนการ pretreatment ของวัตถุดิบและแบคทีเรียที่ใช้ โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลกติกในกลุ่ม Lactobacilli [2-4] [6-8] Garde และคณะ [9] ใช้เฮมิเซลลูโลสไฮโดรไลเซท (จากฟางข้าวสาลี) ที่ย่อยด้วยเอนไซม์หรือกรดซัลฟูริกเป็นวัตถุดิบในการผลิตกรดแลกติกโดย *L. pentosus* ได้ Yp/s สูงถึงร้อยละ 88 ในขณะที่ *L. brevis* ได้ Yp/s 51 และร้อยละ 61 ของผลผลิตสูงสุดทางทฤษฎี (theoretical maximum yield) ตามลำดับ Nakasaki และคณะ [5] ศึกษาการผลิตกรดแลกติกจาก sludge จากโรงงานกระดาษโดยย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลสที่มีกิจกรรม 6,180 U/mg เมื่อนำไฮโดรไลเซทที่ได้ไปหมักโดยแบคทีเรียกรดแลกติกได้ Yp/s สูงถึง 0.90 กรัม/กรัมกลูโคส อย่างไรก็ตาม การย่อยวัตถุดิบประเภทเซลลูโลสด้วยเอนไซม์นั้นมีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำจึงต้องใช้เอนไซม์ในปริมาณมากและมีค่าใช้จ่ายสูง กระบวนการย่อยวัตถุดิบประเภทนี้ด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิและความดันสูง จัดเป็นวิธีการหนึ่งที่สามารถนำมาใช้แทนเพื่อจะลดต้นทุนค่าใช้จ่ายลงได้ [10]

กระดาษหนังสือพิมพ์เป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกและมีปริมาณมาก กระดาษหนังสือพิมพ์ที่ใช้แล้วส่วนใหญ่ไม่ได้นำไปใช้ประโยชน์หรือแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อย่างอื่นนอกจากรอการกำจัดเพื่อนำกลับมาใช้ใหม่ การแปรรูปกระดาษหนังสือพิมพ์ให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง เช่น กรดแลกติก จึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจสำหรับประเทศไทยเพื่อ

พัฒนาให้เกิดการผลิตโดยกระบวนการหมักที่มีประสิทธิภาพโดยแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ที่ให้กรดแลกติกสูงจากวัตถุดิบที่หาง่าย ราคาถูก ซึ่งจะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการนำเข้าและเป็นการลงทุนที่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ นอกจากนี้ยังเป็นการแปรรูปวัตถุดิบราคาถูกให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้นอีกด้วย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาการผลิตกรดแลกติกจากกระดาษหนังสือพิมพ์โดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากต้นข้าวโพดหมักและฟางข้าว

## 2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

### 2.1 แหล่งหัวเชื้อ

- ฟางข้าว
- ต้นข้าวโพดหมัก (รวมกับส่วนประกอบอื่น ได้แก่ กากน้ำตาล มันสำปะหลัง และแกนสับปะรด)

### 2.2 เชื้อจุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อ

- แบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์อ้างอิงที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
- อาหาร MRS [11] ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (ไม่มีการเติม sodium acetate และ tri-ammonium citrate) ประกอบด้วยส่วนประกอบต่างๆ (ต่อลิตร) ดังนี้คือ glucose 20 กรัม peptone 10 กรัม, beef extract 10 กรัม, yeast extract 5 กรัม, $K_2HPO_4$ 2 กรัม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 กรัม, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.2 กรัม และ tween 80 จำนวน 1 มิลลิลิตร

### 2.3 วิธีการทดลอง

**การคัดแยกแบคทีเรีย**

การคัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งหัวเชื้อชนิดต่างๆ คือ ต้นข้าวโพดหมักและฟางข้าว ทำโดยเจือจางตัวอย่างแหล่งหัวเชื้อ 1 กรัมในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร หยดสารละลายจากการเจือจางตัวอย่างจำนวน 1-2 หยดลงบนอาหารวุ้น MRS ที่มีกลูโคสร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอนและเติม $CaCO_3$ ร้อยละ 1 เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าของอาหารและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในโถปราศจากออกซิเจน (anaerobic jar) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วจึงคัดเลือกแบคทีเรียที่ให้ส่วนใส (clear zone) รอบโคโลนีมาทดสอบความสามารถในการผลิตกรดแลกติกต่อไป

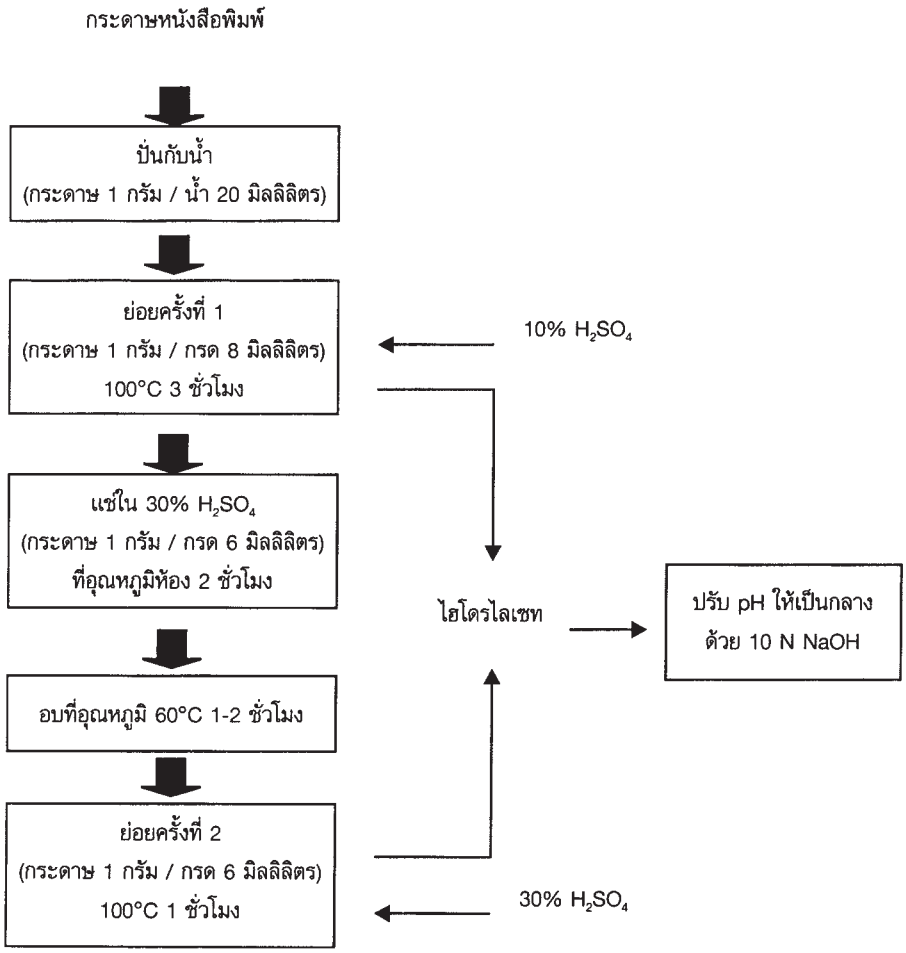
**การผลิตกรดแลกติกจากกลูโคสโดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในฟลาสก์เขย่า**

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้ซึ่งให้ส่วนใสรอบโคโลนีบนอาหารวุ้นมาทดสอบการผลิตกรดแลกติกในอาหารเหลว MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนคือ น้ำตาลกลูโคสร้อยละ 2 ทำการบ่มเลี้ยงเชื้อปริมาณ 1 loop ในอาหารดังกล่าวในฟลาสก์เขย่าขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาตรในการทดสอบทั้งหมด 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วในการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุก 24 ชั่วโมง ตัวอย่างที่ได้จะนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อตกตะกอนเซลล์ แยกส่วนของเหลวใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก หลังจากนั้นจะนำเชื้อที่มีศักยภาพในการผลิตกรดแลกติกมาทดสอบการผลิตกรดแลกติกเปรียบเทียบกับ *L. plantarum* TISTR 050 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่นิยมใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตพืชอาหาร

สัตว์หมักหรือไซเลจ [12-13] ในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีกลูโคสร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะที่ไม่มีการปรับ pH เริ่มต้นของอาหาร (pH 7.3) และในสภาวะที่ปรับ pH เริ่มต้นของอาหาร (pH 5) ด้วยกรดไฮโดรคลอริก โดยใช้ปริมาตรและสภาวะในการทดสอบเหมือนกับที่กล่าวแล้วข้างต้น แต่ใช้กล้าเชื้อที่มี $OD_{600}$ เริ่มต้นเท่ากับ 1.0 ในปริมาณร้อยละ 1 (โดยปริมาตร) กล้าเชื้อที่ใช้เตรียมโดยบ่มเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบบนวุ้นอาหาร MRS 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายลงในอาหารเหลว MRS ที่ปราศจากแหล่งคาร์บอน นำไปวัดค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 600 nm ($OD_{600}$) เจือจางให้ได้ค่า $OD_{600}$ เท่ากับ 1.0 การเก็บตัวอย่างจะทำทุก 24 ชั่วโมง โดยแบ่งเก็บเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปวัดค่า $OD_{600}$ เพื่อดูการเจริญของแบคทีเรีย ส่วนที่สองนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที 10 นาทีเพื่อตกตะกอนเซลล์แล้วแยกส่วนของเหลวใสไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกและน้ำตาลกลูโคส

**การผลิตกรดแลกติกจากไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยกระดาษหนังสือพิมพ์ด้วยกรด**

ทดสอบการผลิตกรดแลกติกโดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้เทียบกับ *L. plantarum* TISTR 050 ในอาหารเหลว MRS ที่ใช้ไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยกระดาษหนังสือพิมพ์ด้วยกรดซัลฟูริก (รูปที่ 1) เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส โดยใช้ไฮโดรไลเซทที่มีความเข้มข้นร้อยละ 40, 60, 80 และ 100 (โดยปริมาตร) หรือคิดเป็นความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในอาหารเหลวเท่ากับ 10, 15, 20 และ 29 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (หมายเหตุ: งานวิจัยนี้ได้ทำการเตรียมไฮโดรไลเซท 2 ชุด โดยชุดแรกมีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 25 กรัม/ลิตร และชุดที่สองมีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 29 กรัม/ลิตร ในการทดลองที่ใช้ไฮโดรไลเซทที่มีความเข้มข้นร้อยละ 40, 60 และ 80 โดยปริมาตร ใช้ไฮโดรไลเซทจากชุดแรก ส่วนการทดลองที่ใช้ไฮโดรไลเซทร้อยละ 100 ใช้ไฮโดรไลเซทจากชุดที่สอง) โดยทำการทดสอบในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรในการทดสอบ 50 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ปริมาณกล้าเชื้อ ($OD_{600}$ เริ่มต้นเท่ากับ 1.0 ) ร้อยละ 1 โดยปริมาตร โดยมีการปรับสภาวะในการทดสอบดังต่อไปนี้ ได้แก่ การทดสอบในสภาวะที่ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7 และ 5 และการทดสอบในสภาวะที่ใช้ความเร็วในการเขย่าเท่ากับ 50, 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกและน้ำตาลทั้งหมดต่อไป




**รูปที่ 1** ขั้นตอนการย่อยกระดาษหนังสือพิมพ์ด้วยกรดซัลฟูริก [14]

**การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้โดยวิธี 16S Ribosomal DNA**

สกัดดีเอ็นเอจีโนมตามวิธีของ Sambrook และคณะ [15] เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ Taq DNA polymerase ในปฏิกิริยา PCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ fD1 และ rP1 [16]

| Primer | Sequence (5′ to 3′) |
|---|---|
| fD1 | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG |
| rP1 | ACGGTTACCTTGTTACGACTT |

ดีเอ็นเอที่ได้จะส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่หน่วยบริการชีวภาพ (Bioservice Unit) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ โดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

### 2.4 วิธีการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกในตัวอย่างน้ำหมักใช้วิธี High pressure liquid chromatography (HPLC) โดยมีสภาวะในการดำเนินการดังนี้ column: OA-1000 ORGANIC ACID, detector: Waters 486 tunable absorbance detector (UV 210 nm), mobile phase: 0.01 N $H_2SO_4$, flow rate: 0.6 ml/min, injection volume: 20 μl ส่วนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ใช้วิธี Dinitrosalicylic acid [17] และวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) โดยวิธี Phenol-sulfuric acid (Dubois และคณะ, 1956)

## 3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

### 3.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลกติก

จากผลการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างแหล่งหัวเชื้อ 2 ชนิดได้แก่ ฟางข้าวและต้นข้าวโพดหมัก พบว่าได้แบคทีเรียที่ให้ส่วนใสรอบโคโลนีบนอาหารวุ้น MRS ที่มีกลูโคสร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอนดังนี้คือ แบคทีเรีย SU-1 ซึ่งคัดแยกได้จากต้นข้าวโพดหมัก แบคทีเรีย RG-1 และ RG-2 ที่คัดแยกได้จากฟางข้าว และจากการสังเกตลักษณะโคโลนีบนอาหารวุ้น พบว่าโคโลนีของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดมีลักษณะกลมนูน ขอบเรียบ โดยโคโลนีของ SU-1 มีสีขาวและมีขนาดเล็กกว่าโคโลนีของ RG-1 และ RG-2 ซึ่งมีสีเหลืองและขาว ตามลำดับ

### 3.2 การผลิตกรดแลกติกจากกลูโคสในฟลาสก์เขย่าโดยแบคทีเรียที่คัดแยกได้

เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดมาทดสอบการผลิตกรดแลกติกในอาหารเหลว MRS ที่มีกลูโคสร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามีเพียงแบคทีเรีย SU-1 ที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้ สำหรับแบคทีเรีย RG-1 และ RG-2 นั้นถึงแม้ว่าจะให้ส่วนใสรอบโคโลนีบนอาหารวุ้น MRS ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่เมื่อนำมาทดสอบในอาหารเหลวชนิดเดียวกันและวิเคราะห์หากรดแลกติกด้วย HPLC กลับไม่พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดมีการผลิตกรดแลกติก ซึ่งจากผลการทดสอบดังกล่าวทำให้สรุปได้ว่าส่วนใสรอบโคโลนีที่เกิดขึ้นไม่ได้เกิดจากกรดแลกติก แต่อาจเกิดจากกรดอินทรีย์ชนิดอื่น จากผลการวิเคราะห์กรดแลกติกด้วย HPLC แบคทีเรีย SU-1 จึงเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้เพียงชนิดเดียวที่ผลิตกรดแลกติกโดยใช้กลูโคสเป็นสับสเตรท ในลำดับต่อมาจึงนำแบคทีเรียกรดแลกติกคือ *L. plantarum* TISTR 050 มาทำการทดสอบการผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลกลูโคสเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย SU-1 ที่คัดแยกได้

### 3.3 การผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลกลูโคสโดยแบคทีเรีย SU-1 และ *L. plantarum* TISTR 050

ผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรีย SU-1 และ *L. plantarum* สามารถเจริญและผลิตกรดแลกติกในอาหารเหลว MRS ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีในสภาวะที่ pH เริ่มต้นต่างกัน แบคทีเรีย SU-1 ผลิตกรดแลกติกและเจริญได้ดีในสภาวะที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.3 (ไม่ได้ปรับ) โดยได้ Yield (Yp/s) ของกรดแลกติกเท่ากับ 0.78 กรัม/กรัมน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป ขณะที่การทดสอบในสภาวะที่ pH เริ่มต้นเป็นกรด (pH 5.0) แบคทีเรีย SU-1 ผลิตกรดแลกติกได้ Yp/s เท่ากับ 0.57 กรัม/กรัมน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป ต่างจากแบคทีเรีย *L. plantarum* ซึ่งเจริญและผลิตกรดแลกติกได้ดีในสภาวะที่ pH เริ่มต้นต่ำกว่าคือ pH 5.0 โดยได้ Yp/s เท่ากับ 0.62 กรัม/กรัมน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป แต่ให้ Yp/s ของกรดแลกติกลดลงเหลือ 0.51 กรัม/กรัมน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ไป เมื่อทดสอบในอาหารที่

มี pH เริ่มต้นเป็นกลาง (ตารางที่ 1) ถึงแม้ว่าโดยทั่วไปพบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถทนต่อสภาวะที่ pH ภายในเซลล์ (internal pH; pHi) ต่ำและอยู่ในช่วงที่กว้างกว่าแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ อย่างไรก็ตามก็ยังคงมีความแตกต่างกันในระหว่างกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลกติก โดยในกลุ่มของ lactobacilli นั้นจะสามารถทนต่อสภาวะที่มี pHi ต่ำได้ดีกว่ากลุ่ม enterococci, leuconostoc และ streptococci [19]

เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลกลูโคสในกระบวนการหมักกรดแลกติกระหว่างแบคทีเรีย SU-1 และ *L. plantarum* พบว่า *L. plantarum* ใช้น้ำตาลกลูโคสในปริมาณมากกว่าแบคทีเรีย SU-1 อย่างเห็นได้ชัด โดยในสภาวะที่ค่า pH เริ่มต้นต่างๆ กัน พบว่าความเข้มข้นเฉลี่ยของน้ำตาลกลูโคสที่เหลือหลังจากการหมัก 120 ชั่วโมงของแบคทีเรีย SU-1 จะเหลือประมาณ 11.50 กรัม/ลิตร ขณะที่ *L. plantarum* เหลือประมาณ 4 กรัม/ลิตร คิดเป็นร้อยละ 58 และ 19 ของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น ซึ่งจัดว่าเหลืออยู่ในปริมาณมาก โดยทั่วไปในกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดแลกติกซึ่งใช้กล้าเชื้อร้อยละ 5 - 10 (v/v) และความเข้มข้นของน้ำตาล (กลูโคสหรือซูโครส) ร้อยละ 15 ความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหลือเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักจะน้อยกว่าร้อยละ 0.1 [20] ดังนั้นการที่เหลือน้ำตาลในกระบวนการหมักในปริมาณมากอาจมีสาเหตุมาจากปริมาณกล้าเชื้อที่ใช้ในการทดสอบน้อยเกินไป คือร้อยละ 1 (v/v) รวมถึงไม่มีการควบคุมระดับ pH ในระหว่างการหมักทำให้ค่า pH ในระบบลดลงเนื่องจากแบคทีเรียมีการผลิตกรดแลกติก การลดลงของ pH ระหว่างกระบวนการหมักสามารถยับยั้งการเจริญและการใช้น้ำตาลในกระบวนการหมักของแบคทีเรียได้ [5, 21] ดังนั้นการเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อรวมถึงการควบคุมระดับของ pH ให้คงที่ในระหว่างกระบวนการหมักอาจทำให้แบคทีเรียมีการใช้น้ำตาลกลูโคสและผลิตกรดแลกติกในปริมาณที่มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการคุม pH ในกระบวนการหมักให้คงที่จะทำให้เกิดเกลือของกรดแลกติก (sodium lactate) ซึ่งไม่เป็นที่ต้องการ [21]

**ตารางที่ 1** การผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรีย SU-1 และ *L. plantarum* TISTR 050 ในอาหารเหลว MRS ที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 และ 7.3 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที

| แบคทีเรีย/pH | เวลา[1] (ชั่วโมง) | กรดแลกติก[2] (กรัม/ลิตร) | น้ำตาลกลูโคสที่ถูกใช้ไป[2] (กรัม/ลิตร) | Yp/s (กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคสที่ใช้ไป) | Productivity (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง) |
|---|---|---|---|---|---|
| SU-1 | | | | | |
| 5.0 | 120 | 5.26 | 9.16 | 0.57 | 0.04 |
| 7.3 | 120 | 4.32 | 5.52 | 0.78 | 0.04 |
| *L. plantarum* | | | | | |
| 5.0 | 96 | 10.80 | 17.32 | 0.62 | 0.11 |
| 7.3 | 120 | 8.50 | 16.83 | 0.51 | 0.07 |

[1] เวลาในการเพาะเลี้ยงที่ให้ผลผลิตกรดแลกติกสูงสุด
[2] ค่าเฉลี่ยของการทดสอบสองซ้ำ

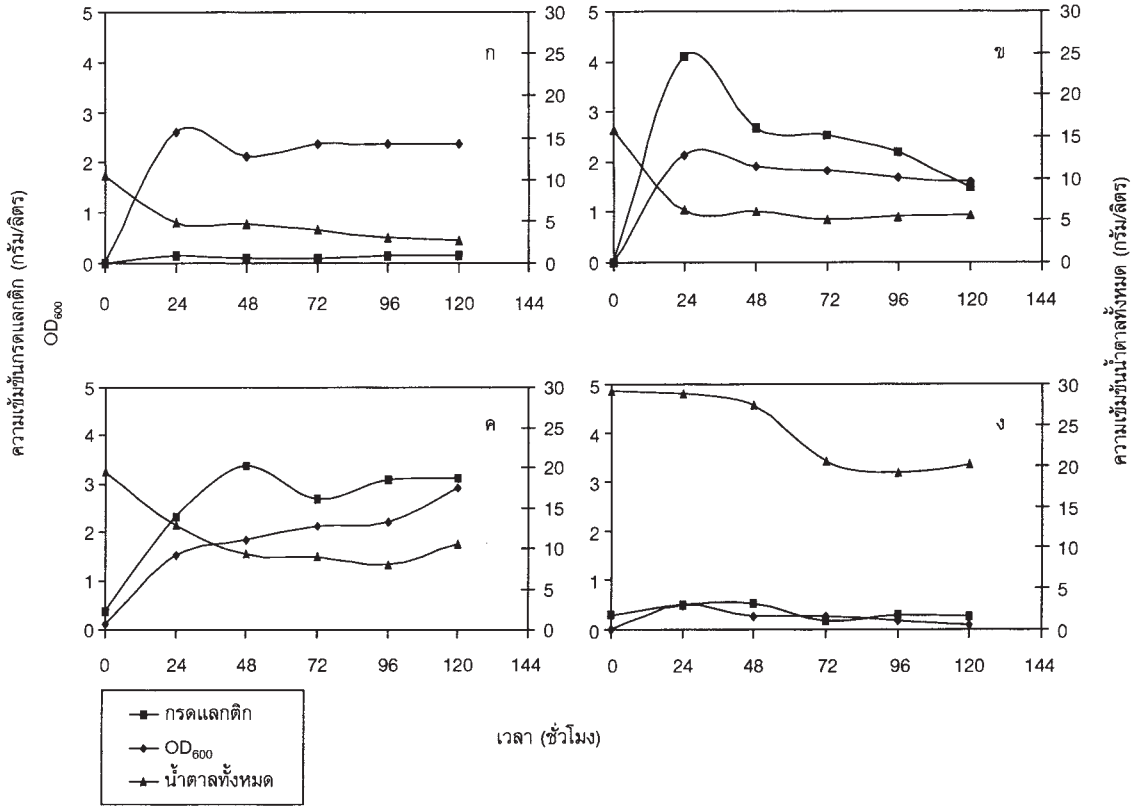
## 3.4 การผลิตกรดแลกติกจากไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยกระดาษหนังสือพิมพ์ด้วยกรดซัลฟูริก

### 3.4.1 ผลของความเข้มข้นของไฮโดรไลเซทต่อการผลิตกรดแลกติก

การผลิตกรดแลกติกจากไฮโดรไลเซทที่เตรียมจากการย่อยกระดาษหนังสือพิมพ์ด้วยกรดซัลฟูริก โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย SU-1 เปรียบเทียบกับ *L. plantarum* TISTR 050 ในอาหาร MRS ที่มีไฮโดรไลเซทเข้มข้นร้อยละ 40, 60, 80 และ 100 (โดยปริมาตร) หรือคิดเป็นความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 10, 15, 20 และ 29 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

***ก. การผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรีย SU-1***

แบคทีเรีย SU-1 สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีไฮโดรไลเซทเข้มข้นตั้งแต่ร้อยละ 40 - 80 ($OD_{600}$ เท่ากับ 2.60, 2.13 และ 2.90 ตามลำดับ) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นไฮโดรไลเซทเป็นร้อยละ 100 แบคทีเรียมีการเจริญต่ำมาก ($OD_{600}$ เท่ากับ 0.50) (รูปที่ 2) ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากสารประกอบบางชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญมีปริมาณมากเกินกว่าที่แบคทีเรียจะทนได้ การใช้ไฮโดรไลเซทจากวัตถุดิบประเภทเซลลูโลสในกระบวนการหมักมักประสบกับปัญหาการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อันเนื่องมาจากสารประกอบที่เกิดจากการใช้สภาวะที่รุนแรงในกระบวนการ pretreatment วัตถุดิบ ได้แก่ acetic acid, furfural, 5-hydroxymethyl furfural และ levulinic acid [9] โดยสารดังกล่าวจะมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น ยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae*) ได้ [4, 10]



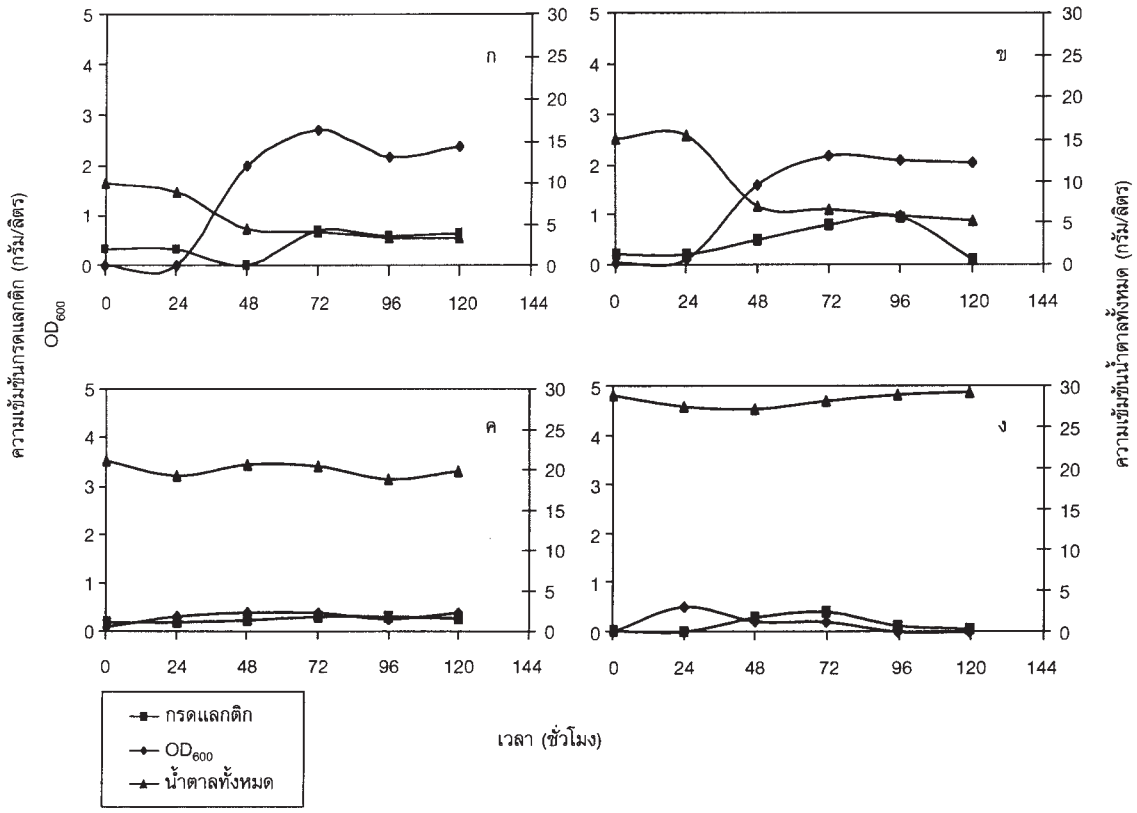

**รูปที่ 2** การผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรีย SU-1 ในอาหารเหลว MRS ที่มีไฮโดรไลเซทร้อยละ (ก) 40 (ข) 60 (ค) 80 และ (ง) 100 เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะที่ pH เริ่มต้น 7 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที

การทดสอบในอาหารที่มีไฮโดรไลเซทร้อยละ 40 และ 60 แบคทีเรียมีการเจริญและมีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการหมัก โดยปริมาณน้ำตาลลดลงจาก 10 กรัม/ลิตร เป็น 5 กรัม/ลิตร เมื่อทดสอบในอาหารที่มีไฮโดรไลเซทร้อยละ 40 และปริมาณน้ำตาลลดลงจาก 15 กรัม/ลิตร เป็น 6 กรัม/ลิตร เมื่อทดสอบในอาหารที่มีไฮโดรไลเซทร้อยละ 60 หลังจากนั้นการใช้น้ำตาลในกระบวนการหมักจะเริ่มคงที่เช่นเดียวกับการเจริญ ส่วนการทดสอบในไฮโดรไลเซทเข้มข้นร้อยละ 80 แบคทีเรีย SU-1 มีการเจริญอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาในการหมัก 120 ชั่วโมง และปริมาณน้ำตาลกลูโคสจะลดลงอย่างรวดเร็วจาก 20 กรัม/ลิตร เป็น 9 กรัม/ลิตร ในช่วง 48 ชั่วโมงแรก การทดสอบในอาหารที่มีไฮโดรไลเซทร้อยละ 100 พบว่าแบคทีเรีย SU-1 มีการเจริญต่ำมากและมีน้ำตาลเหลืออยู่มากเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก น้ำตาลที่เหลือนี้นอกจากจะเป็นกลูโคสแล้ว ยังอาจเป็นน้ำตาลชนิดอื่นๆ อีก เช่น แมนโนส กาแลคโตส อะราบิโนส เซลโลไบโอส รวมทั้งไซโลส ซึ่งน้ำตาลดังกล่าวจะพบได้ในไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยวัตถุดิบประเภทเซลลูโลส [9-10, 22] นอกจากนี้มีรายงานวิจัยที่กล่าวว่าน้ำตาลไซโลสนั้นนำมาใช้ในกระบวนการหมักได้ยาก [23] ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่น้ำตาลส่วนที่เหลือในไฮโดรเซทคือน้ำตาลไซโลสซึ่งแบคทีเรีย SU-1 และแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 050 ไม่สามารถนำไปใช้ได้

ในส่วนของการผลิตกรดแลกติก แม้ว่าแบคทีเรีย SU-1 มีการเจริญและใช้น้ำตาลในระหว่างกระบวนการหมักเมื่อทดสอบในไฮโดรไลเซทร้อยละ 40 แต่พบว่าผลิตกรดแลกติกในปริมาณน้อยมาก (0.15 กรัม/ลิตร) โดยให้ผลผลิต (Yp/s) ของกรดแลกติกเพียง 0.03 กรัม/กรัมของน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไป (ตารางที่ 2) ขณะที่การทดสอบในอาหารที่มีไฮโดรไลเซทร้อยละ 60 และ 80 แบคทีเรีย SU-1 ผลิตกรดแลกติกได้ความเข้มข้นสูงถึง 4.10 และ 3.4 กรัม/ลิตร คิดเป็นค่า Yp/s เท่ากับ 0.42 และ 0.33 กรัม/กรัมน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไป ตามลำดับ ผลผลิตกรดแลกติกที่ได้นี้ใกล้เคียงกับรายงานของ Schmidt และ Padukone [1] ที่ผลิตกรดแลกติกจากกระดาษหนังสือพิมพ์โดย *L. delbrueckii* B445 (Yp/s ของกรดแลกติกเท่ากับ 0.35 กรัม/กรัมเซลลูโลส แต่ต่ำกว่ารายงานของ Abe และ Takagi [6] ที่ใช้กระดาษหนังสือพิมพ์เป็นวัตถุดิบเช่นกัน แต่ใช้แบคทีเรีย *L. delbrueckii* IFO 3534 พบว่าให้ Yp/s สูงถึง 0.81 กรัม/กรัมเซลลูโลส การที่กรดแลกติกไม่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไฮโดรไลเซทเป็นร้อยละ 80 และ 100 อาจเป็นผลเนื่องมาจากการเกิด product inhibition เนื่องจากโดยทั่วไปในกระบวนการหมักกรดอินทรีย์จะถูกยับยั้งด้วยผลิตภัณฑ์สุดท้าย (end product) ของกระบวนการ [24]

***ข. การผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรีย L. plantarum***

*L. plantarum* สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีไฮโดรไลเซทเข้มข้นร้อยละ 40 - 60 ($OD_{600}$ เท่ากับ 2.70 และ 2.21) (รูปที่ 3) โดยมีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 24-48 ชั่วโมง ซึ่งต่างจากรูปแบบการเจริญของแบคทีเรีย SU-1 ที่มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรก แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไฮโดรไลเซทให้สูงขึ้นเป็นร้อยละ 80 และ 100 พบว่าแบคทีเรีย *L. plantarum* มีการเจริญลดลงมาก ($OD_{600}$ เท่ากับ 0.39 และ 0.50) การใช้น้ำตาลในอาหารที่มีไฮโดรไลเซทร้อยละ 40 และ 60 พบว่ามีความสอดคล้องกับการเจริญของแบคทีเรีย โดยปริมาณน้ำตาลจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 48 ชั่วโมงแรกของการหมัก เมื่อเพิ่มความเข้มข้นไฮโดรไลเซทเป็นร้อยละ 80 และ 100 พบว่า *L. plantarum* ใช้น้ำตาลน้อยมากหรือไม่ใช้เลย ซึ่งจะเห็นได้จากปริมาณของน้ำตาลทั้งหมดที่ค่อนข้างคงที่ตั้งแต่เริ่มกระบวนการหมักจนถึงสิ้นสุดกระบวนการหมัก




**รูปที่ 3** การผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 050 ในอาหารเหลว MRS ที่มีไฮโดรไลเซทร้อยละ (ก) 40 (ข) 60 (ค) 80 และ (ง) 100 เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะที่ pH เริ่มต้น 7 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที

แม้ว่า *L. plantarum* สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีไฮโดรไลเซทร้อยละ 40 และ 60 แต่พบว่าผลิตกรดแลกติกในปริมาณน้อยมาก (เท่ากับ 0.70 และ 0.95 กรัม/ลิตร ตามลำดับ) และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นไฮโดรไลเซทเป็นร้อยละ 80 และ 100 พบว่า *L. plantarum* มีการเจริญต่ำมากและแทบจะไม่มีการใช้น้ำตาลจากไฮโดรไลเซท

จากผลการทดสอบดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย SU-1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากต้นข้าวโพดหมักสามารถใช้ไฮโดรไลเซทจากกระดาษหนังสือพิมพ์ในการผลิตกรดแลกติกได้อย่างมีประสิทธิภาพกว่า *L. plantarum* ซึ่งใช้เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิง ดังนั้นการทดสอบในลำดับต่อไปจึงมุ่งเน้นการทดสอบโดยใช้แบคทีเรีย SU-1 เพียงชนิดเดียว

**ตารางที่ 2** การผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรีย SU-1 และ *L. plantarum* TISTR 05 ในอาหารเหลว MRS (pH 7) ที่มีไฮโดรไลเซทร้อยละ 40, 60, 80 และ 100 โดยปริมาตร (ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 10, 15, 20 และ 29 กรัม/ลิตร ตามลำดับ) เป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 150 รอบต่อนาที

| แบคทีเรีย % ไฮโดรไลเซท (น้ำตาลเริ่มต้น) | เวลา[1] (ชั่วโมง) | กรดแลกติก[2] (กรัม/ลิตร) | น้ำตาลทั้งหมดถูกใช้ไป[2] (กรัม/ลิตร) | Yp/s (กรัมกรดแลกติก/กรัมน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ไป) | Productivity (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง) |
|---|---|---|---|---|---|
| SU-1 | | | | | |
| 40% (10) | 24 | 0.15 | 5.59 | 0.03 | 0.01 |
| 60% (15) | 24 | 4.10 | 9.65 | 0.42 | 0.17 |
| 80% (20) | 48 | 3.36 | 10.26 | 0.33 | 0.07 |
| 100% (29) | 48 | *n.d.* | 1.65 | - | - |
| *L. plantarum* | | | | | |
| 40% (10) | 72 | 0.70 | 5.86 | 0.12 | 0.01 |
| 60% (15) | 96 | 0.95 | 9.46 | 0.10 | 0.01 |
| 80% (20) | 72 | *n.d.* | 0.69 | - | - |
| 100% (29) | 72 | *n.d.* | 0.68 | - | - |

[1] เวลาในการเพาะเลี้ยงที่ให้ผลผลิตกรดแลกติกสูงสุด
[2] ค่าเฉลี่ยของการทดสอบสองซ้ำ

### 3.4.2 ผลของค่า pH เริ่มต้นต่อการผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรีย SU-1

จากการทดสอบการผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรีย SU-1 ในอาหารเหลว MRS ที่มีไฮโดรไลเซทร้อยละ 60 โดย pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7 พบว่าแบคทีเรีย SU-1 ผลิตกรดแลกติกได้ 4.10 กรัม/ลิตร โดยให้ Yp/s 0.42 กรัม/กรัม ที่เวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อทดสอบการผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรีย SU-1 โดยปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5 พบว่าแบคทีเรีย SU-1 จะมีการเจริญต่ำกว่า ($OD_{600}$ เท่ากับ 1.16) ในสภาวะที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7 ($OD_{600}$ เท่ากับ 2.13) แต่ยังสามารถผลิตกรดแลกติกได้ 2.94 กรัม/ลิตร โดยให้ Yp/s 0.38 กรัม/กรัม ซึ่งผลการทดสอบดังกล่าวมีความสอดคล้องกับการทดสอบการผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรีย SU-1 จากน้ำตาลกลูโคสข้างต้น ซึ่งแบคทีเรีย SU-1 ให้ผลผลิตกรดแลกติกในสภาพที่ pH เริ่มต้นที่เป็นกลางสูงกว่าในสภาวะที่ pH เริ่มต้นเป็นกรด

### 3.4.3 ผลของความเร็วรอบในการเขย่าต่อการผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรีย SU-1

ในการศึกษาผลของความเร็วรอบในการเขย่าที่มีต่อการผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรีย SU-1 จากไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยกระดาษหนังสือพิมพ์ด้วยกรด โดยทดสอบการผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรีย SU-1 จากไฮโดรไลเซทร้อยละ 60 (โดยปริมาตร) pH 7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยควบคุมความเร็วรอบในการเขย่าให้อยู่ในระดับต่างๆ กัน คือ 50, 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที พบว่าความเข้มข้นของ

กรดแลกติกที่แบคทีเรียผลิตได้จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเร็วรอบในการเขย่าเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของกรดแลกติกที่ได้กลับมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มความเร็วในการเขย่าเป็น 200 รอบต่อนาที เช่นเดียวกับค่า Yp/s (ตารางที่ 3) จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าในการผลิตกรดแลกติกของ SU-1 ต้องการอากาศในกระบวนการหมักพอสมควร จึงจัดให้แบคทีเรียกรดแลกติกอยู่ในกลุ่ม facultative anaerobes ทั้งนี้เพราะออกซิเจนมีบทบาทสำคัญในการเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) ในกระบวนการเมตาบอลิซึม โดยในสภาวะที่มีออกซิเจนนั้น แบคทีเรียกรดแลกติกบางชนิดจะมีการสร้างเซลล์เพิ่มขึ้น [25] ซึ่งทำให้มีการผลิตกรดอินทรีย์ในปริมาณที่มากขึ้นได้ นอกจากนี้มีรายงานว่าแบคทีเรีย *L. brevis* สามารถสลายน้ำตาลกลูโคสในกระบวนการหมักกรดแลกติกในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น [19]

**ตารางที่ 3** การผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรีย SU-1 ในอาหารเหลว MRS ที่มีไฮโดรไลเซทร้อยละ 60 โดยปริมาตร (คิดเป็นความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 15 กรัม/ลิตร) เป็นแหล่งคาร์บอน ในสภาวะที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

| ความเร็วรอบในการเขย่า (รอบต่อนาที) | เวลา [1] (ชั่วโมง) | กรดแลกติก [2] (กรัม/ลิตร) | น้ำตาลทั้งหมดที่ถูกใช้ไป [2] (กรัม/ลิตร) | Yp/s (กรัมกรดแลกติก/กรัมกลูโคสที่ใช้ไป) | Productivity (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง) |
|---|---|---|---|---|---|
| 50 | 48 | 1.00 | 7.57 | 0.13 | 0.02 |
| 100 | 24 | 1.93 | 8.59 | 0.22 | 0.08 |
| 150 | 24 | 4.10 | 9.65 | 0.42 | 0.17 |
| 200 | 24 | 2.05 | 8.12 | 0.25 | 0.09 |

[1] เวลาในการเพาะเลี้ยงที่ให้ผลผลิตกรดแลกติกสูงสุด
[2] ค่าเฉลี่ยของการทดสอบสองซ้ำ

### 3.5 ผลการระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรีย SU-1 โดยวิธี 16S Ribosomal DNA

การศึกษารูปร่างลักษณะของแบคทีเรียนี้เบื้องต้นโดยการย้อมสีแกรมพบว่าเซลล์มีรูปร่างกลม (cocci) และย้อมติดสีแกรมบวก เมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรีย SU-1 กับฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่วงตำแหน่งที่ 13-605 และ 936-1401 มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียกรดแลกติก *Enterococcus faecium* ถึงร้อยละ 95 และ 98 ตามลำดับ

## 4. สรุปผลการวิจัย

แบคทีเรีย *Enterococcus faecium* SU-1 ซึ่งคัดแยกได้จากต้นข้าวโพดหมักมีความสามารถในการผลิตกรดแลกติกทั้งจากน้ำตาลกลูโคสและไฮโดรไลเซทจากการย่อยสลายกระดาษหนังสือพิมพ์ด้วยกรดซัลฟูริก การทดสอบการผลิตกรดแลกติกจากไฮโดรไลเซทแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย SU-1 สามารถผลิตกรดแลกติกในอาหาร MRS ที่มีไฮโดรไลเซทเข้มข้นร้อยละ 60 (ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 15 กรัม/ลิตร) ให้ผลผลิตกรดแลกติก (Yp/s) 0.42 กรัม/กรัม อย่างไรก็ตามผลผลิตที่ได้ยังค่อนข้างต่ำ จึงควรมีการพัฒนากระบวนการหมักเพื่อให้ได้ผลผลิตที่สูงขึ้นต่อไป โดยศึกษาถึงปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสม นอกจากนี้ควรศึกษาถึงชนิดของน้ำตาลหลังสิ้นสุดกระบวนการหมักซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นน้ำตาลชนิดที่แบคทีเรียนำไปใช้ได้ยาก เช่น น้ำตาลไซโลส ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ไม่

สามารถเพิ่มผลผลิตของกรดแลกติกให้สูงขึ้นได้ ดังนั้นการพัฒนาและคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียเพื่อให้สามารถใช้ได้ทั้งน้ำตาลเพนโตสและน้ำตาลเฮกโซสได้ในกระบวนการหมัก รวมทั้งการพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการย่อยกระดาษหนังสือพิมพ์ให้ได้ไฮโดรไลเซทที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสในปริมาณมากขึ้น จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตกรดแลกติกจากไฮโดรไลเซทให้คุ้มทุนและสามารถพัฒนาไปสู่ระดับอุตสาหกรรมได้ในอนาคต

## 5. เอกสารอ้างอิง

1. Schmidt, S. Padukone, N., 1997, "Production of Lactic Acid From Wastepaper as a Cellulosic Feedstock," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 18, pp. 10-14.

2. Iyer, P. V. and Lee, Y. Y., 1999a, "Product Inhibition in Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulose into Lactic Acid," *Biotechnol. Lett.*, Vol. 21, pp. 371-373.

3. Sreenath, H. K., Moldes, A. B., Koegel, R. G., Straub, R. J., 2001a, "Lactic Acid Production from Agriculture Residues." *Biotechnol. Lett.*, Vol. 23, pp. 179-184.

4. Sreenath, H. K., Moldes, A. B., Koegel, R. G., Straub, R. J., 2001b, "Lactic Acid Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation of Alfalfa Fiber," *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 92, pp. 518-523.

5. Nakasaki, K., Akakura, N., Adachi, T., Akiyama, T., 1999, "Use of Waste Water Sludge as a Raw Material for Production of L-lactic Acid." *Environ, Sci. Technol.,* Vol. 33, pp. 198-200.

6. Abe, S., Takagi, M., 1990, "Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulose to Lactic Acid," *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 37, pp. 93-96.

7. Venkatesh, K. V., 1997, "Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulose to Lactic Acid," *Biores. Technol.*, Vol. 62, pp. 91-98.

8. Moldes, A. B., Alonso, J. L., Parajo, J. C., 2000, "Multi-step Feeding System for Lactic Acid Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation of Processed Wood," *Bioproc. Eng.* Vol. 22, pp. 175-180.

9. Garde, A., Jonsson, G., Schmidt, A. S., Ahring, B. K., 2002, "Lactic Acid Production from Wheat Straw Hemicellulose Hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*," *Biores. Technol.*, Vol. 81, pp. 217-223.

10. Brandberg, T., Franzen, C. J., and Gustafsson, L., 2004, "The Fermentation Performance of Nine Strains of *Saccharomyces cerevisiae* in Batch and Fed-batch Cultures in Dilute-acid Wood Hydrolysate," *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 98, pp. 122-125.

11. De Man, J. C., Rogosa, M., and Sharpe, M. E., 1960, "A Medium for the Cultivation of Lactobacilli," *J. Appl. Bacteriol.*, Vol. 23, pp. 130-133.

12. Lindgern, S. E., Axelsson, L. T., and MacFeeters, R. F., 1990, "Anaerobic L-lactate Degradation by *Lactobacillus plantarum*," *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol. 66, pp. 209-214.

13. อำนาจ เจรีรัตน์, 2540, "การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการหมักไซเลจ," วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 115 น.

14. Badger, P. C., 2002, "Ethanol from Cellulose: A General Review," In: Janick, J., Whipkey, A. (Eds.), *Trends in New Crops and New Uses*, ASHS Press, Alexandria, VA. pp. 17-21.

15. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., 1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

16. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., and Lane, D. J., 1991, "16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study," *J. Bacteriol.*, Vol. 173, pp. 697-703.

17. Chaplin, M. E., 1986, "Monosaccharides," in M. E. Chaplin and J. F. Kenedy, (Eds.), *Carbohydrate: A Practice Approach*, IRL Press, Oxford. pp. 1-13.

18. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F., 1956, "Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances," *Anal. Chem.*, Vol. 8, pp. 350-356.

19. Axelsson, L., 1998, "Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology," in S. Salmimen, A. Wright, (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, Dekker, New York, pp. 1-24.

20. Vickroy, T. B., 1986, "Lactic Acid," in Moo-Young, M. (Eds.), *Comprehensive Biotechnology*, Vol. 3, Pergamon Press, Oxford, pp. 761-774.

21. Hofvendahl, K. and Hahn-Hägerdal, B., 1997, "L-lactic Acid Production from Whole Wheat Flour Hydrolysate using Strains of Lactobacilli and Lactococci," *Enz., Micro. Technol.*, Vol. 20, pp. 301-307.

22. Ivarson, K. C. and Morita, H., 1982, "Single-cell Protein Production by the Acid Tolerant Fungus *Scytalidium acidophilum* from Acid Hydrolysate of Waste Paper," *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 43, pp. 643-647.

23. Lee, J., 1997, "Biological Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol," *J. Biotechnol.*, Vol. 56, pp. 1-24.

24. Iyer, P. V. and Lee, Y. Y., 1999b, "Simultaneous Fermentation and Extractive Fermentation of Lignocellulosic Materials into Lactic Acid in Two-zone Fermenter-extractor System," *Appl. Biochem. Technol.*, Vol. 77-79, pp. 409-420.

25. Schiraldi, C., Adduci, V., Valli, V., Maresca, C., Giuliano, M., Lamberti, M., Carteni, and M., De Rosa, M., 2003, "High Cell Density Cultivation of Probiotics and Lactic Acid Production," *Biotechnol. Bioeng.*, Vol. 82, pp. 213-222.

26. Miranda, M., Ramos, A., Veiga-Da-Cunha, M., Loureiro-Dias, M. C., and Santos, H., 1997, "Biochemical Basis for Glucose-induced Inhibition of Malolactic Fermentation in *Leuconostoc oenos*," *J. Bacteriol.*, Vol. 179, pp. 5347-5354.