รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การพัฒนากระบวนการผลิตคีเฟอรันด้วยเชื้อผสมโดยใช้วัสดุเศษเหลือเวย์จากอุตสาหกรรมนม

โดย

รองศาสตราจารย์ ดร. เบญจมาส เชียรศิลป์

และนางสาวศิริลออ ราชบุตร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปี พ.ศ. 2553

สัญญาเลขที่ AGR530195S

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินรายได้มหาวิทยาลัยประจำปี พ.ศ. 2553 รหัสโครงการ AGR530195S คณะผู้วิจัยขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัยในครั้งนี้ และคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้การสนับสนุนห้องปฏิบัติการ ตลอดจนอุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัย

บทคัดย่อ

คีเฟอรันเป็นสารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus kefiranofaciens* JCM 6985 ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกจะมีการผลิตกรดแลคติกควบคู่ไปกับการเติบโต ทำให้เกิดการสะสมของกรดแลคติกและส่งผลยับยั้งการเติบโตและการผลิตคีเฟอรัน ในงานวิจัยนี้จึงศึกษาการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกร่วมกับยีสต์ที่มีสมบัติช่วยลดการสะสมของกรดแลคติกภายในระบบและส่งเสริมการผลิตคีเฟอรัน และเพื่อการผลิตคีเฟอรันในระดับอุตสาหกรรมจึงศึกษาการใช้น้ำตาลแลคโตสจากหางนมซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการผลิตเนยแข็งเป็นแหล่งคาร์บอนและคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม จากการคัดเลือกยีสต์ 6 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *Torulaspora delbruekii* IFO 1626, *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0216, *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155, *Saccharomyces exiguus* TISTR 5081, *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR 5044 และ *Saccharomyces carlsbergensis* TISTR 5018 โดยทำการเลี้ยงร่วมกับ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ในอาหารที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ร่วมกับ *S. cerevisiae* IFO 0216 มีผลทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้นเป็น 0.81 และ 0.94 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่าและมีการเขย่า ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการผลิตโดยใช้เชื้อเดี่ยวที่ผลิตได้เพียง 0.58 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมพบว่าการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียวก็เพียงพอสำหรับการผลิตคีเฟอรัน สำหรับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคีเฟอรันโดยเชื้อผสมพบว่า การเลี้ยง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ร่วมกับ *S. cerevisiae* IFO 0216 ในอาหารที่มีน้ำตาลแลคโตสจากหางนมและยีสต์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พีเอชของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 โดยมีปริมาณ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 และ*S. cerevisiae* IFO 0216 เริ่มต้นเท่ากับ 2.1×10^{7} และ 4.0×10^{6} cfu/ml ตามลำดับ ส่งผลให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ผลิตคีเฟอรันสูงสุด 1.07 กรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 120 ชั่วโมง และจากการศึกษาการผลิตคีเฟอรันโดยเชื้อผสมในถังหมัก พบว่าการเลี้ยงเชื้อผสมภายใต้สภาวะที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำร้อยละ 5 ร่วมกับการควบคุมพีเอชของระบบให้คงที่ที่ 5.5 มีผลทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 สามารถผลิตคีเฟอรันสูงสุดได้ 2.58 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบกะ และ 3.25 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบกึ่งกะ

ABSTRACT

Kefiran is an exopolysaccharide produced by lactic acid bacteria, *Lactobacillus kefiranofaciens* JCM 6985. Due to the accumulation of lactic acid produced by lactic acid bacteria could inhibit cell growth and kefiran production. The aim of this study was to perform the mixed culture of lactic acid bacteria with yeasts that are able to reduce lactic acid and promote kefiran production. And also to evaluate the feasibility of producing kefiran industrially, lactose from skim milk, a by-product from dairy industry, was used as carbon source and the suitable nitrogen source was investigated. Six strains of yeasts were examined: *Torulaspora delbrueki* IFO 1626, *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0216, *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155, *Saccharomyces exiguus* TISTR 5081, *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR 5044 and *Saccharomyces carlsbergensis* TISTR 5018. The results showed that the mixed culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and *S. cerevisiae* IFO 0216 gave the highest kefiran production. The kefiran production was increased from 0.58 g/l in the pure culture to 0.81 and 0.94 g/l in the mixed culture under static and shaking conditions, respectively. This study also showed that lactose from skim milk and yeast extract could be a low cost carbon source and a suitable nitrogen source, respectively, for kefiran production. The maximum kefiran production by the mixed culture of 1.07 g/l was achieved with 4% (w/v) lactose from skim milk, 4% (w/v) yeast extract, initial pH 5.5 and initial amounts of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and *S. cerevisiae* IFO 0216 of 2.1×10^{7} and 4.0×10^{6} cfu/ml, respectively, for 120 h of fermentation time. The scale up of mixed culture in fermentor with aeration control at 5% dissolved oxygen and pH control at 5.5 gave of 2.58 g/l kefiran production in batch culture and 3.25 g/l in fed-batch culture.

สารบัญ

หน้า

สารบัญ..... (4)

LIST OF TABLE..... (5)

LIST OF FIGURE..... (9)

บทที่

1 บทนำ..... 1

บทนำต้นเรื่อง..... 1

การตรวจเอกสาร..... 2

2 วิธีการวิจัย..... 26

วิธีการดำเนินการ..... 26

วัสดุและอุปกรณ์..... 33

3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 36

4 บทสรุปและข้อเสนอแนะ..... 68

เอกสารอ้างอิง..... 69

ภาคผนวก..... 78

ประวัติผู้เขียน..... 103

ผลงานวิจัย..... 107

LIST OF TABLE

Table		Page
1.	Yeasts found in kefir grains	15
2.	Bacteria found in kefir grains	16
3.	Typical composition of sweet whey and acid whey	24
4.	Residual reducing sugar and amount of reducing sugar utilized by yeasts in modified MRS skim milk lactose medium at 48 h under shaken with 60 rpm	37
5.	Residual lactic acid and amount of lactic acid utilized by yeasts in modified MRS-lactic acid medium at 48 h under shaken with 200 rpm	38
6.	Cells growth of the pure culture and the mixed cultures at 60 h and 120 h under static condition at room temperature	85
7.	Total kefiran production of the pure culture and the mixed cultures at 60 h and 120 h under static condition at room temperature	86
8.	Cells growth of the pure culture and the mixed cultures at 60 h and 120 h under shaking condition at 60 rpm at room temperature	86
9.	Total kefiran production of the pure culture and the mixed cultures at 60 h and 120 h under shaking condition at 60 rpm at room temperature	87
10.	Cells growth by the mixed culture in a modified MRS-skim milk lactose medium with various nitrogen sources at 60 h and 120 h under shaking condition at 60 rpm at room temperature	87
11.	Total kefiran production by the mixed culture in a modified MRS-skim milk lactose medium with various nitrogen sources at 60 h and 120 h under shaking condition at 60 rpm at room temperature	88
12.	Effect of reducing sugar concentration from skim milk on cells growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature	88
13.	Effect of reducing sugar concentration from skim milk on cells growth of *S. cerevisiae* IFO 0216 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature	89

LIST OF TABLE (CONT.)

Table		Page
14.	Effect of of reducing sugar concentration from skim milk on total kefiran production by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.....	89
15.	Effect of reducing sugar concentration from skim milk on reducing sugar in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.....	90
16.	Effect of reducing sugar concentration from skim milk on pH in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature	90
17.	Effects of reducing sugar concentration from skim milk on $Y_{p/s}$ and productivity of kefiran by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature	90
18.	Effect of yeast extract concentration on cells growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature	91
19.	Effect of yeast extract concentration on cells growth of *S. cerevisiae* IFO 0216 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature	91
20.	Effect of yeast extract concentration on total kefiran production by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.....	92
21.	Effect of yeast extract concentration on reducing sugar in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature	92
22.	Effect of yeast extract concentration on pH in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.....	93
23.	Effects of yeast extract concentration on $Y_{p/s}$ and productivity of kefiran by *L. kefiranofaciens* JCM6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.....	93
24.	Effect of initial pH on cells growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.....	93

LIST OF TABLE (CONT.)

Table		Page
25.	Effect of initial pH on cells growth of *S. cerevisiae* IFO 0216 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.....	94
26.	Effect of initial pH on total kefiran production by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperatur.....	94
27.	Effect of initial pH on reducing sugar in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.....	95
28.	Effect of initial pH on pH in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.....	95
29.	Effects of initial pH on $Y_{p/s}$ and productivity of kefiran by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.	95
30.	Effect of yeast amount on cells growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature	96
31.	Effect of yeast amount on cells growth *S. cerevisiae* IFO0216 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.....	96
32.	Effect of yeast amount on total kefiran production by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature..	97
33.	Effect of yeast amount on reducing sugar in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature	97
34.	Effect of yeast amount on pH in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.....	98
35.	Effects of yeast amount on $Y_{p/s}$ and productivity of kefiran by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.....	98
36.	Effect of aeration on cells growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 of the mixed culture in batch culture at room temperature	98
37.	Effect of aeration on cells growth of *S. cerevisiae* IFO 0216 of the mixed culture in batch culture at room temperature	99

LIST OF TABLE (CONT.)

Table		Page
38.	Effect of aeration on total kefiran production by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 of the mixed culture in batch culture at room temperature	99
39.	Effect of aeration on reducing sugar of the mixed culture in batch culture at room temperature.....	100
40.	Effect of aeration on pH of the mixed culture in batch culture at room temperature.....	100
41.	$Y_{p/s}$ and productivity of kefiran by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in batch culture at room temperature	101
42.	Cell growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 of the mixed culture in batch and fed-batch culture at room temperature	101
43.	Cell growth of *S. cerevisiae* IFO 0216 of the mixed culture in batch and fed-batch culture at room temperature	101
44.	Total kefiran production by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in batch and fed-batch culture at room temperature	102
45.	Residual lactose of the mixed culture in batch and fed-batch culture at room temperature.....	102

LIST OF FIGURE

Figure		page
1.	Generalized diagram of the conversion of lactose and galactose to EPS and glycolysis in lactic acid bacteria	6
2.	Structure of exopolysaccharide from *S. themophilus* S3	11
3.	Structure of exopolysaccharide from *L. delbrueckii.* subsp. *bulgaricus* NCFB 2074	11
4.	Structure of exopolysaccharide from *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LBB.B26	11
5.	Structure of kefiran	13
6.	Process of making cheese	25
7.	Cells growth and total kefiran production of the pure culture and the mixed cultures at 60 h and 120 h under static condition at room temperature	40
8.	Cells growth and total kefiran production of the pure culture and the mixed cultures at 60 h and 120 h under shaking condition at 60 rpm at room temperature	41
9.	Cells growth and total kefiran production by the mixed culture in a modified MRS-skim milk lactose medium with various nitrogen sources at 60 h and 120 h under shaking condition at 60 rpm at room temperature	43
10.	Effects of reducing sugar concentration from skim milk on cells growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and *S. cerevisiae* IFO 0216 and total kefiran production in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature	46
11.	Effects of reducing sugar concentration from skim milk on reducing sugar and pH in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature	47
12.	Effects of reducing sugar concentration from skim milk on $Y_{p/s}$ and productivity of kefiran by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring conditionat 120 rpm at room temperature	48

LIST OF FIGURE (CONT.)

Figure		Page
13.	Effects of yeast extract concentration on cells growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and *S. cerevisiae* IFO 0216 and total kefiran production in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.....	50
14.	Effects of yeast extract concentration on reducing sugar and pH in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.....	51
15.	Effects of yeast extract concentration on $Y_{p/s}$ and productivity of kefiran by *L. kefiranofaciens* JCM6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.....	52
16.	Effects of initial pH on cells growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 *S. cerevisiae* IFO 0216 and total kefiran production in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.....	54
17.	Effects of initial pH on reducing sugar and pH in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature	55
18.	Effects of initial pH on $Y_{p/s}$ and productivity of kefiran by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.....	56
19.	Effects of yeast amount on cells growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and *S. cerevisiae* IFO0216 and total kefiran production in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm	58
20.	Effects of yeast amount on reducing sugar and pH in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature	59
21.	Effects of yeast amount on $Y_{p/s}$ and productivity of kefiran by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm.	60
22.	Effects of aeration on cells growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and *S. cerevisiae* IFO 0216 and total kefiran production of the mixed culture in batch culture at room temperature	62

LIST OF FIGURE (CONT.)

Figure		page
23.	Effects of aeration on reducing sugar and pH of the mixed culture in batch culture at room temperature	63
24.	Yield and productivity of kefiran by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture of batch culture at room temperature	64
25.	Cells growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and *S. cerevisiae* IFO 0216 and total kefiran production of the mixed culture in batch and fed-batch culture at room temperature	66
26.	Reducing sugar of the mixed culture in batch and fed-batch culture at room temperature	67
27.	Composition of skim milk and pretreated skim milk with lactose glucose and gaclactose	79
28.	Standard curve of total sugar analyzed by Anthone method	81
29.	Standard curve of reducing sugar analyzed by Nelson-Somogyi method	82
30.	Standard curve of lactic acid analyzed by HPLC method	83
31.	Standard curve of bovine serum albumin by Lowry method	84

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

คีเฟอรันเป็นสารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะเป็นเมือกเหนียวมีความยืดหยุ่นสูง สามารถผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus kefiranofaciens* ที่สามารถคัดแยกได้จากก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรนซึ่งใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับหมักนมเปรี้ยวของชนพื้นเมืองในประเทศรัสเซีย ในทางการแพทย์พบว่าคีเฟอรันมีสมบัติเป็นสารต้านมะเร็งสามารถใช้เป็นยารักษาเนื้องอก (Shiomi *et al.*, 1982) นอกจากนี้ยังพบว่าคีเฟอรันมีสมบัติเป็นสารยับยั้งการเติบโตของ จุลินทรีย์ก่อโรคบางสายพันธุ์ และสามารถใช้เป็นสารช่วยสมานแผลที่เกิดจากการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในหนู (Rodrigues *et al.*, 2005) รวมทั้งมีรายงานการใช้คีเฟอรันเป็นสารเพิ่มความหวานในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่มและใช้เป็นสารเพิ่มความหนืดหรือสารทดแทนไขมันในอุตสาหกรรมนม (Kobayama *et al.*, 1997; Cheirsilp *et al.*, 2003) จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* พบว่าเมื่อกระบวนการหมักผ่านไประยะหนึ่ง ปริมาณกรดแลคติกที่สะสมในระบบเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากในกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแลคติกจะมีการผลิตกรดแลคติกขึ้นภายในเซลล์และมีการขับออกสู่ภายนอกเซลล์ในเวลาต่อมา มีผลทำให้เกิดการยับยั้งการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* นอกจากนี้จากรายงานการศึกษาลักษณะทางกายภาพของก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรนพบว่าภายในก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรนมีจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติกอาศัยอยู่ร่วมกันในสภาวะพึ่งพา (symbiosis) โดยยีสต์จะอยู่บริเวณส่วนผิวด้านนอกของก้อนคีเฟอร์เกรน คอยทำหน้าที่ควบคุมปริมาณกรดแลคติกและรักษาสภาวะไร้อากาศให้กับแบคทีเรียกรดแลคติก ในขณะที่แบคทีเรียกรดแลคติกจะฝังตัวอยู่บริเวณภายในของก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรน และมีการผลิตสารบางอย่างที่มีความจำเป็นสำหรับการเติบโตของยีสต์ ทำให้ยีสต์สามารถเติบโตได้ (Marshall *et al.*, 1984; Margulis, 1995; Cheirsilp *et al.*, 2003) ดังนั้นการเลี้ยง *L. kefiranofaciens* ร่วมกับยีสต์จึงน่าจะมีส่วนช่วยให้ *L. kefiranofaciens* มีการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งยีสต์ที่สามารถใช้กรดแลคติกได้ จากการศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* พบว่าน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้การเติบโตและการผลิตคีเฟอรันได้ดีที่สุด (Yokoi and Watanabe, 1992) แต่อย่างไรก็ตามน้ำตาลแลคโตสถือเป็นวัตถุดิบที่มีราคาแพง ทำให้ต้นทุนในกระบวนการผลิตสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจวัตถุดิบที่จะใช้แทนน้ำตาลแลคโตส คือ หางนม ซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากการผลิตเนยแข็งที่ไม่มีราคาแต่อุดมด้วยน้ำตาลแลคโตส จึงเป็นการช่วยลดต้นทุนในกระบวนการผลิตคีเฟอรัน อีกทั้งสามารถช่วยลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดของเสียจากอุตสาหกรรม

แปรรูปเนยแข็งได้อีกด้วย โดยในงานวิจัยครั้งนี้ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* โดยการเลี้ยงร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถลดการสะสมของกรดแลคติกภายในระบบและมีสมบัติช่วยส่งเสริมการผลิตคีเฟอรันเมื่อใช้หางนมเป็นวัตถุดิบ รวมทั้งศึกษาพัฒนาปรับเปลี่ยนชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจน เพื่อให้มีความสะดวกในการเตรียมอาหารสำหรับการผลิตคีเฟอรันและเป็นการลดต้นทุนในกระบวนการผลิต นอกจากนี้ยังศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ และสุดท้ายศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ภายใต้การหมักแบบกะและกึ่งกะ

การตรวจเอกสาร

1. สารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (Exopolysaccharide, EPS)

เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (Exopolysaccharide) เป็นสารโพลีเมอร์อินทรีย์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ในขณะที่เซลล์กำลังเติบโตและขับออกสู่ภายนอกเซลล์ มีลักษณะเป็นเมือกเหนียวหรือเป็นยางหนืด ซึ่งองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นเพื่อป้องกันอันตรายสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมและป้องกันการถูกกิน (phagocytosis) จากโปรโตซัว (Van den Berg *et al.*, 1993) โดยทั่วไปเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์มักมีมวลโมเลกุลสูงกว่า 10^6 ดาลตัน Agira (1992 อ้างโดย วรารัตน์ วงศ์ศุภชาติ, 2551)

1.1 การจำแนกประเภทเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์

การจัดจำแนกประเภทของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ขึ้นอยู่กับหลักเกณฑ์ที่ใช้แบ่งซึ่งมีดังต่อไปนี้

1.1.1 การจำแนกตามลักษณะการสร้างสารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของจุลินทรีย์

การสร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของจุลินทรีย์มักจะมีความสัมพันธ์กับลักษณะโครงสร้างของเซลล์ ซึ่งการจำแนกสารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยหลักการดังกล่าวสามารถจัดจำแนกได้ 2 ประเภท คือ

1) สารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่เกาะติดรอบผนังเซลล์ (capsular exopolysaccharide) เป็นเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีลักษณะรูปร่างแน่นอน โดยมีการเกาะติดรอบๆ ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ Agira (1992 อ้างโดย วรารัตน์ วงศ์ศุภชาติ, 2551)

2) สารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่สะสมในน้ำหมัก (broth exopolysaccharide) เป็นเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถพบได้โดยทั่วไป มีลักษณะเป็นเมือกเหนียว รูปร่างไม่แน่นอน

ซึ่งการผลิตสารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดดังกล่าวมีผลทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดเพิ่มขึ้น (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2530; Gassem *et al.*, 1997)

1.1.2 การจำแนกตามชนิดของโมโนเมอร์ (monomer) ที่เป็นองค์ประกอบ สามารถจำแนกได้ 4 ประเภท คือ (Sutherland, 1995)

1) เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีสารอินทรีย์เป็นองค์ประกอบ สารอินทรีย์ที่สามารถพบในโครงสร้างของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้แก่ อะซิเตต ไพรูเวท ซักซิเนต และโพรพิโอเนต ซึ่งสารเหล่านี้จะมีผลต่อประจุโดยรวม (overall charge) ของพอลิแซ็กคาไรด์ นอกจากสามารถพบกรดอะมิโนบางชนิด เช่น ซีรีน หรือกรดกลูตามิก เป็นองค์ประกอบภายในโครงสร้างของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากแบคทีเรียบางสายพันธุ์

2) เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีสารอินทรีย์ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบ สารอินทรีย์ฟอสเฟตที่พบจะมีลักษณะคล้ายกรด teichoic ที่อยู่ในรูป phosphorelated exopolysaccharide ซึ่งจะพบได้ในส่วนผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก

3) โฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ (homopolysaccharide) เป็นเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีโมโนเมอร์หรือนิวคลีโอไทด์ของน้ำตาลเพียงชนิดเดียวต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะไกลโคซิดิก ซึ่งโดยส่วนใหญ่มักจะเป็นน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลฟรุคโตส สามารถจำแนกได้เป็น 4 กลุ่มย่อยๆ ดังต่อไปนี้

ก. กลุ่ม α-β- glucan เช่น กลูแคน (glucan) ภายในโมเลกุลจะประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายยาว โดยแต่ละชนิดจะมีพันธะที่จับแตกต่างกัน ทำให้สามารถแบ่งกลูแคนได้เป็นหลายชนิด เช่น bacterial cellulose (β-D glucan) pullulan (α–D glucan) และ scleroglucan (1,3-β-D glucan)

ข. กลุ่ม β - D-glucan เช่น curdian (1, 3-β-glucan)

ค. กลุ่ม fructans เช่น ลีแวน (levan) เป็นเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีน้ำตาลฟรุคโตสเป็นนิวคลีโอไทด์จับกันด้วยพันธะ β-2-6 glycosidic ผลิตโดย *Streptococcus salivarius* (Cerning, 1990)

ง. กลุ่มอื่น ๆ เช่น polygalactan

4) เฮทเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ (heteropolysaccharide) เป็นเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่สามารถพบได้โดยทั่วไป โครงสร้างภายในประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ของน้ำตาลมากกว่า 1 ชนิดที่ต่อกันเป็นสายด้วยพันธะไกลโคซิดิก เฮทเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบส่วนใหญ่จะมีนิวคลีโอไทด์ของน้ำตาลกลูโคสกับกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบ แต่ก็มีที่พบ แรมโนส ฟรุคโตส หรือแมนโนส เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้อาจมีองค์ประกอบอื่น ๆ เช่น sn-glycerol–3–phosphate, *N*-acetyl aminosugar หรือหมู่ acetyl เป็นองค์ประกอบรวมอยู่ด้วย (ระพีพรรณ เติมตันท์, 2547) การมีองค์ประกอบภายในโมเลกุลที่แตกต่างกัน จะทำให้สมบัติของสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์มีความแตกต่างกัน

1.1.3 การจำแนกตามประจุไฟฟ้าภายในโครงสร้างของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (หนึ่ง เตียอำรุง, 2532) สามารถจำแนกได้เป็น 3 ประเภท คือ

1) เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุลบ (anionic exopolysaccharide) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีโครงสร้างประกอบด้วยโมเลกุลของกรดยูโรนิก กรดอินทรีย์ หรือ หมู่อะซิติล ตัวอย่างเช่น เจลแลน (gellan) เป็นเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Sphigomonas paucimobilis* ภายในโมเลกุลประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ของกลูโคสต่อกับกรดกลูโคโรนิคและน้ำตาลแรมโนสตามลำดับ หรือแซนแทน (xanthan) ที่มีนิวคลีโอไทด์ของน้ำตาลแมนโนสต่อกับกรดกลูโคโรนิก (Nampoothiri *et al.*, 2003; Winter,1978)

2) เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง (neutral exopolysaccharide) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีเพียงนิวคลีโอไทด์ของน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ เช่น เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Streptococcus thermophilus* SY ภายในโมเลกุลประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ของน้ำตาลกลูโคสต่อกับกาแลคโตสและแมนโนส ในอัตราส่วน 2:4.5:1 ตามลำดับ (Ricciardi *et al.*, 2002)

3) เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีประจุบวก (cationic exopolysaccharide) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบได้น้อย โดยส่วนใหญ่ผลิตโดยเชื้อรา

1.2 กระบวนการผลิตสารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์

สารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เป็นผลผลิตจากสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์หรือพืชบางสายพันธุ์ ภายในโมเลกุลจะประกอบด้วยด้วยนิวคลีโอไทด์ของน้ำตาลแบบซ้ำๆ ระหว่าง 3-7 หน่วยต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) ในปัจจุบันมีการนำเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์มาใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในวงการอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อาหารเพื่อสุขภาพ หรือแม้แต่ในวงการแพทย์ก็ตาม แต่อย่างไรก็ตามเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มักได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคส่วนใหญ่จะเป็นผลผลิตที่ได้จากจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถพบได้โดยทั่วไปในอาหารหมัก จนได้รับการยอมรับว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัยและไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค (Generally Recognize As Safe, GRAS) สำหรับขั้นตอนและกระบวนการสังเคราะห์สารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกดังแสดงใน Figure 1 ซึ่งการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จะเริ่มต้นเมื่อเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกมีการนำโมเลกุลของแลคโตส (น้ำตาลโมเลกุลคู่โครงสร้างประกอบด้วยกลูโคสต่อกับกาแลคโตสด้วยพันธะไกลโคซิดิก) เข้าสู่เซลล์โดยผ่านช่องโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อชนิดของน้ำตาลบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ด้วยการทำงานของ phosphoenolpyruvate (PEP)-sugar phosphotransferase system (PTS) พร้อมกับมีการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับแลคโตส (lactose-6-P) ก่อนจะมีการเคลื่อนที่เข้าสู่ไซโตพลาสซึม เมื่อโมเลกุลของ lactose-6-P

เข้าสู่ภายในเซลล์ lactose-6-P จะถูกสลายพันธะไกลโคซิดิกที่จับกันระหว่างโมเลกุลของกลูโคสและกาแลคโตส ได้เป็นโมเลกุลของกลูโคสและ galactose-6-P โดยมี phospho-β- galactosidase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา สำหรับโมเลกุลของกลูโคสที่ได้จะเข้าสู่กระบวนการไกลโคไลซีสและกระบวนการสังเคราะห์เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ส่วนโมเลกุลของ galactose-6-P จะถูกเปลี่ยนเป็น tagatose-6-P และ tagatose-1,6-diP โดยมีเอนไซม์ galactose-6-phosphate kinase และ tagatose-6-phosphate isomerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาตามลำดับ ก่อนเข้าสู่กระบวนการไกลโคไลซีส ในขณะที่บางโมเลกุลของน้ำตาลแลคโตสมีการเคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์โดยกระบวนการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งมีเอนไซม์ β-galactoside permease เป็นตัวนำเข้าสู่เซลล์ (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, 2546) เมื่อโมเลกุลของแลคโตสเคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์ ลำดับต่อมาจะเกิดกระบวนการสลายพันธะไกลโคซิดิกของน้ำตาลแลคโตสได้เป็นโมเลกุลของกลูโคสและกาแลคโตสโดยมีเอนไซม์β-galactosidase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และในขณะเดียวกันจะมีการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโมเลกุลของกลูโคสโดยมี glucokinase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้เป็น glucose-6-phosphate ซึ่งจะเข้าสู่กระบวนการไกลโคไลซีสและกระบวนการสังเคราะห์เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ต่อไป สำหรับโมเลกุลของน้ำตาลกาแลคโตสจะถูกเติมหมู่ฟอสเฟตโดยมีเอนไซม์ galactokinase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้เป็น galactose-1-phophate และเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เช่นกัน

1.3 การผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแบคทีเรียกรดแลคติก

ในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของจุลินทรีย์จำเป็นต้องอาศัยกระบวนการหมักภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการเติบโตและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่ง Linton และคณะ (1991 อ้างโดย ศุภศิลป์ มณีรัตน์, 2543) รายงานว่าเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากจุลินทรีย์จะมีความหลากหลายมากกว่าเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จากสิ่งที่มีชีวิตชนิดอื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้แตกต่างกันถึงแม้จะใช้วัตถุดิบชนิดเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่าจุลินทรีย์ในสกุลเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ จะมีการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่แตกต่างกัน ซึ่งการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกจะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช ปริมาณออกซิเจน และระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก (Cerning, 1990) รวมทั้งสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ Linton และคณะ (1991 อ้างโดย ศุภศิลป์ มณีรัตน์, 2543)

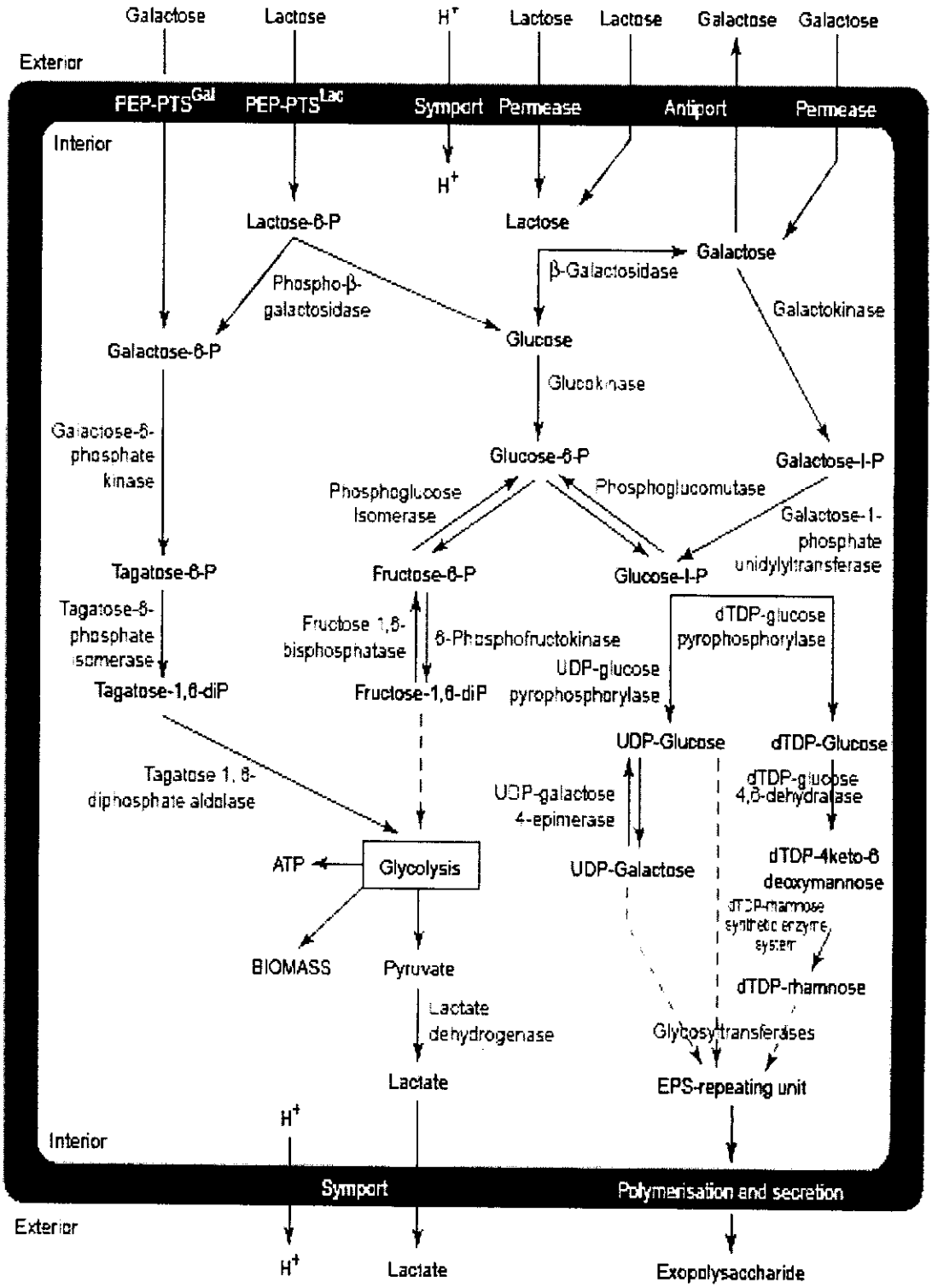

Figure 1. Generalized diagram of the conversion of lactose and galactose to EPS and glycolysis in lactic acid bacteria.

ที่มา : Welman และ Maddox (2003)

1.3.1 แหล่งคาร์บอน

แบคทีเรียกรดแลคติกใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลสำหรับการสังเคราะห์พลังงานเพื่อใช้ในกระบวนการเติบโตและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งโดยทั่วไปแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์จะมีความสามารถในการใช้น้ำตาลแต่ละชนิดแตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของน้ำตาลไม่เหมือนกัน ดังที่ Cerning และคณะ (1994) ศึกษาการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Lactobacillus casei* CG11 เมื่อใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส แลคโตส มอลโตส ซูโครส และเมลิไบโอส ปริมาณ 2-20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการใช้กลูโคสปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร ทำให้ *L. casei* CG11 สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด 160 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน *L. casie* CG11 จะผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบมากกว่าร้อยละ 86 แต่หากใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบเพียงร้อยละ 63 ส่วนที่เหลือเป็นน้ำตาลกาแลคโตส ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Grobben และคณะ (1997) ที่ศึกษาการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 พบว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้เชื้อสามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงถึง 95 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อใช้น้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเชื้อสามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้เพียง 24 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ Tallon และคณะ (2003) พบว่าการเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* EP56 ในอาหารที่มีแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้เชื้อมีการเติบโตและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุด แต่หากทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้น้อยที่สุด นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้หางนมเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ภายใต้รูปแบบการผลิตแบบต่อเนื่องโดย Shene และ Brovo (2007) ซึ่งพบว่าเชื้อสามารถผลิตสารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด 860 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อให้อัตราการไหลของสับสเตรทเท่ากับ 0.36 ลิตรต่อชั่วโมง และจากการทดลองของ Gassem และคณะ (1997) ที่เพาะเลี้ยง *Lactobacillus delbruekii* ssp. *bulgaricus* RR ในอาหารที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน ภายใต้สภาวะที่มีพีเอชของอาหารเริ่มต้น 6.2 ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าการเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะดังกล่าวมีผลทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เป็นผลเนื่องจากเชื้อมีการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์และขับออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ปริมาณเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์พบว่ามีปริมาณ 0.8 กรัมต่อลิตร

1.3.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนมีบทบาทที่สำคัญต่อการเติบโตและการสังเคราะห์เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของจุลินทรีย์ จากผลการศึกษาของ Kimmel และคณะ (1998) พบว่าการใช้ bacto-casitone ปริมาณ 30 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR มีการเติบโตและผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้นเป็น 354 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีอัตราการผลิตจำเพาะเท่ากับ 101.4 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ Macedo และคณะ (2002) ศึกษาการใช้หางนมเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Lactobacillu rhamnosus* RW-9595M แต่พบว่าหางนมไม่เหมาะสำหรับใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ทั้งนี้เนื่องจากมีปริมาณองค์ประกอบของแหล่งไนโตรเจนน้อยเกินไป แต่จากที่ Vaningelgem และคณะ (2004) ศึกษาการใช้ whey protein hydrolysis (lactalbumin hydrolysate) เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการเติบโตและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Streptococcus thermophilus* ST 111 พบว่าการเติม whey protein hydrolysis ปริมาณร้อยละ 1.6 ทำให้เชื้อมีการเติบโตและผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้นเป็น 5.5×10^{8} cfu/ml และ 330 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติม whey protein hydrolysis ที่มีปริมาณเชื้อและเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เพียง 2.5×10^{8} cfu/ml และ 70 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วน Amatayakul และคณะ (2006) ศึกษาผลของสัดส่วนระหว่างโปรตีนเคซีนต่อเวย์ต่อการเติบโตและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติก 2 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์ที่มีลักษณะการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เป็นแบบสารเมือก (ropy culture) กับสายพันธุ์ที่มีลักษณะการผลิตเป็นแบบเกาะรอบเซลล์ (capsular culture) ซึ่งพบว่าปริมาณโปรตีนเคซีนที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้แบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์มีการเติบโตเพิ่มขึ้น โดยชุดการทดลองที่มีปริมาณโปรตีนเคซีนต่อเวย์ในอัตราส่วน 4:1 ส่งผลให้แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์มีการเติบโตสูงสุด และการใช้โปรตีนเคซีนต่อเวย์ในอัตราส่วน 3:1 ทำให้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองสายพันธุ์ให้การผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์การผลิตสูงสุด แต่อย่างไรก็ตาม Cerning (1990) มีการรายงานว่ายีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสำหรับการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติก ทั้งนี้เนื่องจากยีสต์สกัดมีวิตามินและแร่ธาตุที่จำเป็น ซึ่งทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ให้กับเอนไซม์บางชนิดภายในเซลล์ จึงมีผลช่วยส่งเสริมการเติบโตและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติก (Cappuccino and Sherman, 2008; สมใจ ศิริโภค, 2547) และจากที่ Ricciardi และคณะ (2002) ศึกษาปริมาณยีสต์สกัดที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Streptococcus thermophilus* SY พบว่าการใช้ยีสต์สกัด 4 กรัมต่อลิตร ทำให้เชื้อมีการเติบโตและผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด 152 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพิ่มปริมาณยีสต์สกัดเป็น 8 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อจะมีการเติบโตเพิ่มขึ้นแต่มีปริมาณการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ลดลงโดยมีปริมาณ 35 มิลลิกรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kimmel และคณะ (1998) ที่พบว่าการใช้ bacto-casitone

มากกว่า 30 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำให้ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR มีการเติบโตเพิ่มขึ้นแต่การผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ลดลง ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้น ทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกมีการเติบโตเพิ่มขึ้น จึงใช้แหล่งคาร์บอนในการสังเคราะห์เปปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) และกรดไทโคอิก (teichoic acid) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์มากกว่าการสังเคราะห์เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (Gassem *et al.*, 1997)

1.3.3 พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ

พีเอชของระบบถือเป็นปัจจัยทางเคมีที่มีผลต่อการเติบโตและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์จะมีช่วงพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์แตกต่างกัน แต่โดยทั่วไปแล้วช่วงพีเอชที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วงพีเอชประมาณ 5.5-6.5 (Salminen and Wright, 1998) ทั้งนี้เนื่องจากกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นสารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จะมีประสิทธิภาพสูงสุดเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชประมาณ 5.8 ในขณะที่น้ำตาลจะถูกเปลี่ยนเป็นมวลเซลล์ได้ดีเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีพีเอชประมาณ 6.0 (De Vuyst *et al.*, 1998; Van den Berg *et al*, 1995) และจากที่ Kimmel และคณะ (1998) ศึกษาผลของพีเอชต่อการเติบโตและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR พบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีพีเอช 5.0 ทำให้เชื้อสามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด 354 มิลลิกรัมต่อลิตร Gamar-Nourani และคณะ (1998) พบว่าการเลี้ยง *Lactobacillus rhamnosus* C83 ในอาหารที่มีพีเอช 6.2 ทำให้เชื้อผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด 131 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยคิดเป็นผลผลิตต่อหน่วยเซลล์ได้เท่ากับ 116 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับ Ricciardi และคณะ (2002) ที่พบว่าการเลี้ยง *Streptococcus thermophilus* SY ในอาหารที่มีพีเอช 6.4 ทำให้เชื้อผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด 152 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีพีเอช 5.6 พบว่าเชื้อผลิตสารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุดเพียง 40 มิลลิกรัมต่อลิตร Mozzi และคณะ (1996) พบว่าการเลี้ยง *Lactobacillus casei* CRL 87 ในอาหารที่มีพีเอช 6.0 ทำให้เชื้อสามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด 488 มิลลิกรัมกรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกภายใต้ระบบที่มีการควบคุมพีเอชตลอดกระบวนการหมักจะทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกมีการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้น ดังที่ Gassem และคณะ (1997) ศึกษาการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Lactobacillus delbrueckii* supsp. *bulgaricus* RR เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะที่มีการควบคุมพีเอชของระบบที่ 6.2 ตลอดกระบวนการหมัก ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดมากกว่าการเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีการควบคุมพีเอช ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากปริมาณกรดแลคติกที่เพิ่มขึ้นทำให้โมเลกุลของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ถูกย่อยเป็นสายสั้นลง ซึ่งมีผลทำให้ความหนืดของอาหารลดลง (Van den Berg *et*

al., 1995) หรืออาจเป็นผลเนื่องจากเชื้อถูกยับยั้งการเติบโตด้วยกรดแลคติก (Cheirsilp, 2003; Velaso *et al.*, 2006)

1.3.4 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีบทบาทต่อการเติบโตและการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ Cerning และคณะ (1992) กล่าวว่าแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์จะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตและผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์แตกต่างกัน ดังที่ Gassem และคณะ (1997) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเติบโตและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Lactobacillus delbrueckii* supsp. *bulgaricus* ที่เลี้ยงในอาหารสูตร lactose–enriched sweet whey permeate พบว่าเชื้อสามารถเติบโตและผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส และการเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 32 องศาเซลเซียส พบว่ามีผลทำให้อัตราการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อลดลง เช่นเดียวกับ Ricciardi และคณะ (2002) ที่พบว่าการเพาะเลี้ยง *Streptococcus thermophilus* SY ที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส ทำให้เชื้อผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์สูงสุด 152 มิลลิกรัมต่อลิตร และการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อจะลดลงเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ Vaningelgem และคณะ (2004) ที่พบว่า *S. thermophilus* ST 111 มีการเติบโตและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีเมื่อเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีอุณหภูมิ 32-42 องศาเซลเซียส โดยจะมีการเติบโตและสามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และการผลิตสารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จะลดลงเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 49 องศาเซลเซียส ในขณะที่ Tallon และ คณะ (2003) พบว่า *L. plantarum* EP56 สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด 135.8 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส และการเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 25 และ 30 องศาเซลเซียส มีผลทำเชื้อผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้น้อยกว่าการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ร้อยละ 16 และ 24 ตามลำดับ ในขณะที่ Aslim และคณะ (2005) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเติบโตและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B3, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* G12 และ *Streptococcus thermophilus* พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด 263, 238 และ 127 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

1.3.5 สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติก

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความสามารถในการผลิตสารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้แตกต่างกันถึงแม้ใช้วัตถุดิบชนิดเดียวกัน นอกจากนี้จุลินทรีย์สกุลเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์จะผลิตสารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ต่างกัน ดังที่ Faber และคณะ (2001) ศึกษาลักษณะโครงสร้างของสารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Streptococcus thermophilus* S3 เมื่อใช้นมพร่อง

มันเนยเป็นวัตถุดิบพบว่าลักษณะโครงสร้างของสารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้ประกอบด้วยน้ำตาลกาแลคโตส (β-D-gal) และแรมโนส (α-L-rha) ในอัตราส่วน 2:1 ดังแสดงใน Figure 2

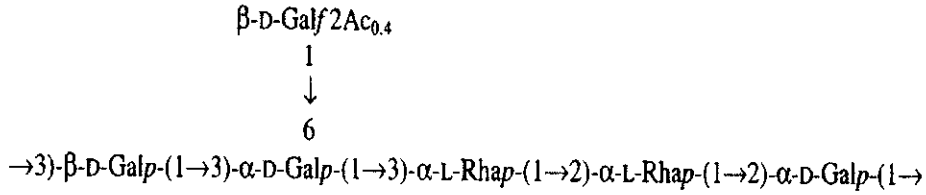

Figure 2. Structure of exopolysaccharide from *S. thermophilus* S3.

ที่มา : Faber และคณะ (2001)

Harding และคณะ(2005) ศึกษาโครงสร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้จาก *Lactobacillus debrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2074 เมื่อใช้นมพร่องมันเนยเป็นวัตถุดิบพบว่าสารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส (α-D-Glc) และกาแลคโตส (α.β-D-Gal) ในสัดส่วน 3:4 ดังแสดงใน Figure 3

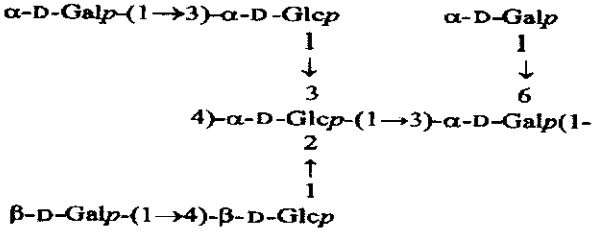

Figure 3. Structure of exopolysaccharide from *L. delbrueckii.* subsp. *bulgaricus* NCFB 2074.

ที่มา: Harding และคณะ (2005)

Sanchez-Medina และคณะ (2007) ศึกษาลักษณะโครงสร้างของสารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดย *Lactobacillus delbrueckii* supsp. *bulgaricus* LBB.B26 เมื่อใช้นมพร่องมันเนยเป็นวัตถุดิบ พบว่าลักษณะโครงสร้างสารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้มีองค์ประกอบของน้ำตาลกลูโคส (α-D-Glc) และกาแลคโตส (α.β-D-Gal) ในอัตราส่วน 2:3 ดังแสดงใน Figure 4

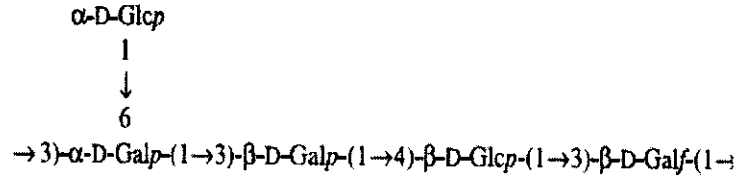

Figure 4. Structure of exopolysaccharide from *L. delbrueckii* supsp. *bulgaricus* LBB. B26.

ที่มา : Sanchez-Medina และคณะ (2007)

1.3.6 การให้อากาศ

การให้อากาศมีผลต่อการเติบโตและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้ดีภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำ ซึ่งจากการศึกษาการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Streptococcus themophilus* พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้เพิ่มขึ้นเมื่อระบบมีปริมาณออกซิเจนลดลง (De Vuyst *et al.*, 1998) เช่นเดียวกับ Gamar-Nourani และคณะ (1998) ที่ศึกษาการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *Lactobacillus rhamnosus* C83 ภายใต้ระบบที่มีออกซิเจนปริมาณร้อยละ 0, 10, 20, 40, และ 60 พบว่าการเลี้ยงเชื้อภายใต้ระบบที่มีออกซิเจนปริมาณร้อยละ 10 ทำให้เชื้อสามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้สูงสุด 131 มิลลิกรัมต่อกรัม แต่เมื่อปริมาณออกซิเจนเพิ่มเป็นร้อยละ 40 พบว่าเชื้อมีการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ลดลงร้อยละ 39 เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่มีออกซิเจนร้อยละ 10

1.4 การประยุกต์ใช้สารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์

ปัจจุบันมีการนำสารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกมาใช้กันอย่างแพร่หลายในด้านอุตสาหกรรมอาหาร โดยใช้เป็นสารเพิ่มเนื้อสัมผัสหรือใช้เป็นสารทดแทนไขมันในอุตสาหกรรมการผลิตโยเกิร์ต หรือใช้เป็นสารปรุงแต่งในอาหารซึ่งมีความปลอดภัยและราคาถูกกว่าการใช้สารเคมี (Cerning, *et al.*, 1994; Duenas *et al.*, 2003) นอกจากนี้ในทางการแพทย์พบว่าเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์บางชนิดมีสมบัติเป็นสารยับยั้งการเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบางสายพันธุ์ อีกทั้งสามารถใช้เป็นตัวยารักษาเนื้องอกหรือลดระดับคลอเรสเตอรอลในเลือดให้กับผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานได้เช่นกัน (Shiomi *et al.*, 1982; Maeda *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2005)

2. คีเฟอรัน (Kefiran)

คีเฟอรันเป็นสารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยนิวคลีโอไทด์ของน้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตสในอัตราส่วน 1:1 (Kooiman, 1968) ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติก *L. kefiranofaciens* ที่สามารถคัดแยกได้จากก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรนซึ่งเป็นหัวเชื้อที่ใช้สำหรับหมักนมเปรี้ยวของชาวพื้นเมืองในประเทศรัสเซีย โดยมีความเชื่อกันว่าเป็นยาอายุวัฒนะ สำหรับการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* พบว่ามี 2 ลักษณะคือ คีเฟอรันที่ถูกขับออกนอกเซลล์ (broth kefiran) และคีเฟอรันที่ยังคงเกาะติดอยู่กับผนังเซลล์ในรูปของแคปซูล (capsular kefiran) โดยทั่วไปมวลโมเลกุลของคีเฟอรันจะอยู่ในช่วง 1,000-4,000 กิโลดาลตัน โดยมวลโมเลกุลของคีเฟอรันในส่วน capsular kefiran จะน้อยกว่าในส่วนของ broth kefiran (Yokoi *et al.*, 1990) สำหรับลักษณะของคีเฟอรันที่

สามารถสกัดได้จากน้ำหมักจะมีลักษณะเป็นเมือกเหนียว สีเหลืองนวล และมีความยืดหยุ่นสูง องค์ประกอบภายในโมเลกุลของคีเฟอรันมีลักษณะดังแสดงใน Figure 5

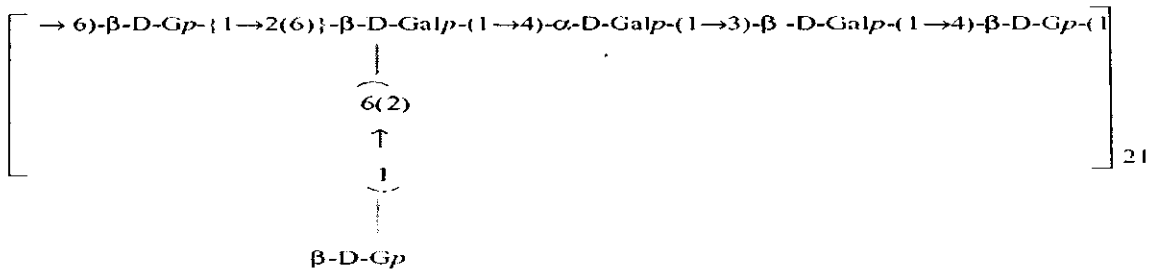

Figure 5. Structure of kefiran.

ที่มา : Kooiman (1968)

2.1 หัวเชื้อคีเฟอร์เกรน (Kefir grains)

คีเฟอร์เกรนเป็นก้อนเชื้อผสมระหว่างยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีการฝังตัวอยู่ในสารเมือกเหนียวที่เรียกว่าคีเฟอรัน มีลักษณะเป็นก้อนตะปุ่มตะป่ำคล้ายดอกกะหล่ำสีขาว ขนาดตั้งแต่ 5-20 มิลลิเมตร (Arihara *et al.*, 1990) ขณะที่ก้อนเชื้ออยู่ในน้ำนมเชื้อจุลินทรีย์จะมีกระบวนการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนอย่างต่อเนื่องพร้อมกับมีการสร้างสารพอลิแซ็กคาไรด์ (คีเฟอรัน) ควบคู่กันไป ดังนั้นคีเฟอร์เกรนจึงเป็นเสมือนก้อนเชื้อผสมที่ตรึงตัวเองอยู่บนก้อนสารเมือก ทำให้สามารถใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตได้อย่างต่อเนื่องไม่สิ้นสุด จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของก้อนคีเฟอร์เกรน พบว่าจุลินทรีย์ภายในก้อนคีเฟอร์เกรนประกอบด้วยยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติก สำหรับสายพันธุ์ของยีสต์ภายในก้อนคีเฟอร์เกรนมีการรายงานไว้แตกต่างกันโดย La Riviere และ Kooiman (1967) รายงานว่ายีสต์ที่พบร้อยละ90 เป็น *Saccharomyces delbrueckii* ซึ่งไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสสำหรับกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ได้ ในขณะที่ Iwasawa และคณะ (1982) รายงานว่า *Saccharomyces exiguous* เป็นยีสต์ที่พบมากในก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรน นอกจากนี้สามารถพบ *Candida* (*Torula*) *kefir* และ *Candida pseudotropicalis* ในคีเฟอร์เกรนที่ได้จากแหล่งอื่นๆ สำหรับแบคทีเรียกรด แลคติกที่พบส่วนใหญ่คือ *Lactobacillus* spp. และพบ *Leuconostoc* spp. และ *Streptococcus* spp. อยู่ประมาณร้อยละ 1 และ 0.1 ตามลำดับ โดยในช่วงแรกที่มีการศึกษาสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกในก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรนพบว่าส่วนใหญ่ที่พบเป็นกลุ่มเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative) ได้แก่ *Lactobacillus brevis* จึงมีข้อสันนิฐานว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวมีบทบาทในการสร้างสารเมือก (La Riviere and Kooiman, 1967) แต่ต่อมามีรายงานการพบแบคทีเรียชนิดใหม่ที่มีชื่อว่า *Lactobacillus kefiranofaciens* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการสร้างคีเฟอรันอย่างแท้จริง (Toba *et al.*, 1986; Fujisawa *et al.*, 1988) สำหรับการอยู่ร่วมกันระหว่างยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติกภายในก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรน พบว่าเป็นการอยู่ร่วมกันในลักษณะการพึ่งพาอาศัยกัน

(symbiosis) (Margulis, 1995) เนื่องจากยีสต์ที่พบส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสในน้ำนมสำหรับกระบวนการเมแทบอลิซึมได้ จึงจำเป็นต้องอาศัยสารอาหารบางอย่างที่สังเคราะห์โดยแบคทีเรียกรดแลคติกสำหรับการเติบโต ในขณะที่แบคทีเรียกรดแลคติกก็มีความจำเป็นที่ต้องใช้สารส่งเสริมการเติบโตที่ได้จากเซลล์ยีสต์ที่ตายแล้ว จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่อยู่ภายในก้อนเชื้อผสมมีรูปร่างลักษณะเป็นแท่งสั้น (short rod) และแท่งโค้งยาว (curved rod) เมื่อสังเกตลักษณะการเปลี่ยนแปลงของกล้าเชื้อผสม พบว่าก่อนที่กล้าเชื้อจะมีลักษณะเป็นตะปุ่มตะป่ำคล้ายดอกกะหล่ำจะมีเชื้อจุลินทรีย์อาศัยอยู่รวมกันบนแผ่นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตทั้งด้านที่มีลักษณะเป็นผิวเรียบและผิวขรุขระ ด้านเรียบจะประกอบด้วยแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นแท่งสั้นๆ ส่วนด้านขรุขระประกอบด้วยยีสต์และแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นแท่งโค้งยาวที่ฝังตัวอยู่ในสารเมือก ดังนั้นจึงมีข้อสันนิฐานว่าแบคทีเรียชนิดดังกล่าวเป็นตัวสร้างคีเฟอรัน (Marshall *et al.*, 1984) ซึ่งต่อมาพบว่าแบคทีเรียดังกล่าวคือ *L. kefiranofaciens* และเป็นแบคทีเรียที่มีการผลิตคีเฟอรัน (Toba *et al.*, 1986; Fujisawa *et al.*, 1988) นอกจากนี้ยังมีผู้สนใจศึกษาคัดแยกยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติกจากก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรนเป็นจำนวนมาก โดยพบว่ายีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติกที่เป็นองค์ประกอบภายในก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรนประกอบด้วยสายพันธุ์ต่างๆ ดัง Table 1 และ 2 ตามลำดับ

สำหรับสมบัติเฉพาะที่น่าสนใจของก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรนสามารถจำแนกได้ดังต่อไปนี้ (Arihara *et al.*, 1990)

1) เซลล์ในก้อนเชื้อสามารถเพิ่มขนาดและจำนวนได้อย่างต่อเนื่องโดยเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดยังคงตรึงอยู่ในก้อนเมือก

2) โดยปกติก้อนเชื้อสามารถเกิดการหมักได้เป็นเวลานาน ถ้าอยู่ในสภาวะเพาะเลี้ยงเช่นเดิม

3) ถึงแม้ว่าสภาวะที่ใช้ในการหมักจะมิได้ปลอดเชื้อแต่จะไม่พบการปนเปื้อนในกระบวนการหมัก ด้วยเหตุผลที่ยังไม่ทราบแน่ชัดแต่คาดว่าอาจจะเนื่องจากการที่เชื้อตรึงตัวในสารเมือกนั้นส่งผลให้เซลล์มีระบบป้องกันและสามารถดำเนินบทบาทของตัวเองต่อไปได้''

4) การอยู่ร่วมกันของเซลล์ยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติกในก้อนเชื้อ ทำให้เกิดกระบวนการหมักที่สามารถผลิตสารที่มีคุณค่าทางโภชนาการและมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

Table 1. Yeasts found in kefir grains.

Strains	Reference
Kluyveromyces marxianus	Koreleva (1991); Lin *et al.* (1999); Ottogalli *et al.* (1973)
Saccharomyces sp.	Garrote *et al.*(2001)
Saccharomyces cerevisiae	Koreleva (1991); Rosi (1978); Dousset and Caillet (1993)
Saccharomyces unisporus	Pintado *et al.* (1996); Wyder and Puhan (1997); Engel *et al.* (1986)
Saccharomyces exiguus	Iwasawa *et al.* (1982)
Saccharomyces turicensis	Wyder and Puhan (1997)
Saccharomyces delbrueckii	Rosi (1978)
Saccharomyces dairensis	Rohm *et al.* (1992)
Torulaspora delbrueckii	Koreleva (1991); Wyder and Puhan (1997); Angulo *et al.* (1993)
Brettanomyces anomalus	Wyder and Puhan (1997);
Issatchenkia occidentalis	Engel *et al.* (1986)
Candida friedrichii	Rohm *et al.* (1992)
Candida pseudotropicalis	Ottogalli *et al.* (1973)
Candida tenuis	Ottogalli *et al.* (1973)
Candida inconspicua	Simova *et al.* (2002)
Candida maris	Simova *et al.*(2002)
Candida lambica	Engel *et al.* (1986)
Candida tannotelerans	Dousset and Caillet (1993)
Candida valida	Dousset and Caillet (1993)
Candida kefyr	Koreleva (1991); Engel *et al.* (1986); Rohm *et al.* (1992)
Candida holmii	Engel *et al.* (1986); Angulo *et al.* (1993)
Pichia fermentans	Lin *et al.* (1999); Angulo *et al.* (1993); Rohm *et al.* (1992)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Farnworth (2005)

Table 2. Bacteria found in kefir grains.

Strains	Reference
Lactobacilli	
Lactobacillus kefir	Koreleva (1991); Pintado *et al.* (1996); Simova *et al.* (2002)
Lactobacillus kefiranofaciens	Fujisawa *et al.*(1998); Takisawa *et al.* (1994); Santos *et al.* (2003)
Lactobacillus kefirgranum	Takisawa *et al.* (1994)
Lactobacillus parakefir	Takisawa *et al.*(1994); Garrote *et al.* (2001)
Lactobacillus brevis	Ottogalli *et al.* (1973); Simova *et al.* (2002); Santos *et al.* (2003)
Lactobacillus plantarum	Garrote *et al.* (2001); Santos *et al.* (2003)
Lactobacillus helveticus	Koreleva (1991); Lin et *et al.* (1999); Simova *et al.* (2002)
Lactobacillus acidophilus	Ottogalli *et al.* (1973); Santos *et al.* (2003); Angulo *et al.* (1993)
Lactobacillus delbrueckii	Koreleva (1991); Simova *et al.* (2002) Santos *et al.* (2003)
Lactobacillus rhamnosus	Koreleva (1991); Angulo *et al.* (1993)
Lactobacillus casei	Simova *et al.* (2002)
Lactobacilli paracasei	Santos *et al.* (2003)
Lactobacillus fructivorans	Yoshida and Toyoshima (1994)
Lactobacillus hilgardii	Yoshida and Toyoshima (1994)
Lactobacillus fermentum	Angulo *et al.* (1993)
Lactobacillus viridescens	Angulo *et al.* (1993)
Lactococci	
Lactococcus lactis subsp.	Koreleva (1991); Pintado *et al.* (1996); Dousset and Caillet (1993)
lactis	Ottogalli *et al.* (1973); Simova *et al.* (2002); Garrote *et al.* (2001)
Lactococcus lactis subsp.	Koreleva (1991); Yuksekdag *et al.* (2004); Dousset and Caillet
cremoris	(1993)
Streptococci	
Streptococcus thermophilus	Yuksekdag *et al.* (2004); Simova *et al.* (2002)
Enterococci	
Enterococcus durans	Rosi (1978); Yuksekdag *et al.* (2004)
Leuconostocs	
Leuconostoc sp.	Angulo *et al.* (1993)
Leuconostoc mesenteroides	Koreleva (1991); Lin *et al.* (1999); Ottogalli *et al.* (1973)

Table 2. (cont.)

strains	Reference
Acetic acid bacteria	
Acetobacter sp.	Garrote *et al.* (2001)
Acetobacter pasteurianus	Ottogalli *et al.* (1973)
Acetobacter aceti	Koreleva (1991); Rosi (1978)
Other bacteria	
Bacillus sp.	Angulo *et al.* (1993)
Bacillus subtilis	Ottogalli *et al.* (1973)
Micrococcus sp.	Angulo *et al.* (1993)
Escherichia coli	Angulo *et al.* (1993)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Farnworth (2005)

2.2 สมบัติของคีเฟอรัน

สารประกอบโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์หรือพืชชั้นสูงบางชนิด สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ได้ ซึ่งคีเฟอรันก็เป็นโพลีแซคคาไรด์อีกชนิดที่มีสมบัติเป็นสารต่อต้านมะเร็ง (antitumor) สามารถใช้ผลิตยารักษาโรคเนื้องอกได้ อีกทั้งยังมีสมบัติเป็นสารที่ช่วยบำรุงร่างกาย (Shiomi *et al.*, 1982) Rodrigues และคณะ (2005) ศึกษาสมบัติในการช่วยสมานแผลจากการติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในหนู Wistar และฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบางสายพันธุ์ของสารสกัดจากคีเฟอร์และคีเฟอรัน พบว่าตัวอย่างหนูที่ได้รับเจลคีเฟอร์ปริมาณร้อยละ 70 สามารถลดการอักเสบและเพิ่มการเชื่อมติดของแผลได้ภายใน 7 วัน โดยพบว่าการใช้เจลคีเฟอร์ให้ผลในการสมานแผลดีกว่าการใช้สาร neomycin-clostebol emulsion ที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนการศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรคของสารสกัดจากคีเฟอร์และคีเฟอรัน พบว่าสารสกัดทั้งสองสามารถยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* และ *Escherichia coli* ได้ นอกจากนี้ Santos และคณะ (2003) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus* spp. จำนวน 58 สายพันธุ์ ที่สามารถคัดแยกได้จากนมหมักคีเฟอร์ โดยทำการศึกษากับ Caco-2 cells ซึ่งมีลักษณะคล้ายลำไส้มนุษย์ที่มีความทนต่อกรดและเกลือน้ำดี จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 58 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเติบโตของ *Salmonella typhimurium* ใน Caco-2 cells ได้ โดย *L. acidophilus*

CYC 10051 และ *L. kefiranofaciens* CYC 10058 มีฤทธิ์ต้านการเติบโตของ *S. typhimurium* ได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่า *L. kefiranofaciens* CYC 10058 สามารถผลิตสารประกอบคีเฟอรันซึ่งมีสมบัติเป็นสารต้านมะเร็งได้ ส่วน Maeda และคณะ (2004) ศึกษาสมบัติของคีเฟอรันต่อการลดระดับไขมัน ปริมาณน้ำตาล และอาการท้องผูกในหนู โดยทำการผสมคีเฟอรันที่ผลิตโดย *L. kefiranofaciens* ในอาหารสูตร rice hydrolyzate เพื่อเป็นอาหารสำหรับหนู จากการศึกษาพบว่าระดับคลอเลสเตอรอล ความดันโลหิต และปริมาณน้ำตาลในเลือดของหนูลดลงเมื่อหนูได้รับอาหารที่ผสมคีเฟอรัน และพบว่าระดับความรุนแรงของโรคเบาหวานและอาการทองผูกของหนูก็ลดลงเช่นกัน สำหรับในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารและเครื่องดื่มพบว่ามีการนำคีเฟอรันมาใช้เป็นสารเพิ่มความหวานในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่มและโยเกิร์ต ซึ่งในทางการแพทย์พบว่าคีเฟอรันสามารถตอบสนองต่อระบบ immune response system ของร่างกาย ช่วยให้เกิดความรู้สึกผ่อนคลายในคนที่เกิดอาการเครียด (Kobayama *et al.*, 1997; Cheirsilp *et al.*, 2003) สำหรับประโยชน์ทางด้านสุขภาพอีกอย่างของผลิตภัณฑ์นมหมักคีเฟอร์และคีเฟอรันคือความสามารถในการรักษาอาการภูมิแพ้ และการช่วยบำบัดอาการผิดปกติเกี่ยวกับระบบของกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก และจากการสำรวจผู้บริโภคที่บริโภคผลิตภัณฑ์นมหมักคีเฟอร์หรือโยเกิร์ตที่มีส่วนผสมของคีเฟอรันเป็นประจำพบว่าผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีการตอบสนองต่อร่างกายผู้บริโภคดังต่อไปนี้ (Saloff-cose, 2005; Farnworth, 2005)

1) ช่วยเพิ่มความสามารถในการย่อยผลิตภัณฑ์นม ในผู้ป่วยบางรายที่ขาดเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส ทำให้มีอาการท้องเสียเมื่อรับประทานนม เนื่องจากร่างกายไม่สามารถย่อยสลายน้ำตาลแลคโตสในนมได้ การรับประทานนมหมักคีเฟอร์จะช่วยเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดสในระบบทางเดินอาหาร ทำให้ผู้ป่วยสามารถรับประทานนมได้

2) รักษาอาการท้องร่วง องค์การอนามัยโลก (World Health Organization: WHO) แนะนำให้ผู้ปกครองรักษาอาการท้องร่วงในเด็กโดยให้เด็กรับประทานโยเกิร์ตหรือนมหมักแทนนมสดชั่วคราว เพื่อรักษาอาการท้องร่วง รวมทั้งยังเป็นการช่วยป้องกันการขาดสารอาหารในเด็กขณะที่เกิดอาการท้องร่วงได้อีกด้วย

3) การตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย สารที่มีสมบัติเป็นสาร prebiotic ในผลิตภัณฑ์นมหมักคีเฟอร์จะทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้เพิ่มจำนวนของ B-lymphocytes เพิ่มกิจกรรมการสังเคราะห์ natural killer cells และลดการเกิดภูมิแพ้จากอากาศ

4) ลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็ง แพทย์สาขาวิชาระบาดวิทยาในฝรั่งเศสมีการศึกษาพบว่าการบริโภคอาหารในปัจจุบันมีโอกาสเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็งสูงขึ้น แต่สำหรับผู้ที่บริโภคนมหมักคีเฟอร์เป็นประจำ จะช่วยรักษาอาการอักเสบของกระเพาะ อีกทั้งช่วยให้เซลล์ที่ผิดปกติในลำไส้ลีบฝ่อ จึงเป็นการช่วยลดภาวะการเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็งในระบบทางเดินอาหาร

5) ควบคุมระดับคอเรสเตอรอลในเลือด เนื่องจากสารที่ให้ความหวานในผลิตภัณฑ์คีเฟอร์มีระดับคอเลสเตอรอลต่ำ (hypochlolesterollemic properties) จึงไม่ก่อให้เกิดการสะสมของระดับคอเลสเตอรอลในเลือดทั้งยังสามารถช่วยป้องกันหลอดเลือดหัวใจอุดตันได้อีกด้วย

2.3 การผลิตคีเฟอรัน

ในปัจจุบันหลายประเทศกำลังให้ความสนใจกับการผลิตคีเฟอรันอย่างจริงจัง เนื่องจากคีเฟอรันเป็นสารที่มีประโยชน์สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้อย่างกว้างขวาง รวมทั้งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ได้ การผลิตคีเฟอรันเริ่มต้นจากที่ Toba และคณะ (1986) คัดแยก *Lactobacillus kefiranofaciens* ได้จากก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรน และเมื่อนำ *L. kefiranofaciens* ไปเลี้ยงในอาหารที่มีไวท์ขาวเป็นองค์ประกอบ พบว่า *L. kefiranofaciens* สามารถผลิตคีเฟอรันได้ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร ต่อมา Yokoi และคณะ (1991) คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในลักษณะที่เกาะติดรอบเซลล์ จากก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรนจำนวน 5 สายพันธุ์ ประกอบด้วย KPB-167A, KPB-167B, KPB-167C, KPB-167D และ KPB-167E และเมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารที่มีหางนมเป็นองค์ประกอบพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 5 สายพันธุ์ สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีน้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบ ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาณ 300-400 มิลลิกรัม โดยมีการปลดปล่อยสารดังกล่าวออกสู่น้ำหมักร้อยละ 60-80 ของปริมาณการผลิตทั้งหมด ต่อมาในปี 1992 Yokoi และ Watanabe ทำการศึกษาเลี้ยง *Lactobacillus* sp. KPB-167B ในอาหารสูตร Man-Rogosa Sharpe Lactose (MRSL) ที่มีน้ำตาลแลคโตสเป็นองค์ประกอบ พบว่า *Lactobacillus* sp. KPB-167B สามารถผลิตคีเฟอรันได้ปริมาณสูงกว่า *L. kefiranofaciens* ที่เคยศึกษามา และในปี 1998 Mitsue และคณะ ศึกษาดัดแปลงลักษณะทางพันธุ์ของ *Lactobacillus kefiranofaciens* KF-75 โดยใช้แสงอัลตร้าไวโอเลตเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันเชื้อให้มีความเหมาะสมสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม และเมื่อนำเชื้อที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงด้วยระบบกะสามารถผลิตคีเฟอรันได้ปริมาณ 2.5 กรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 7 วัน ต่อจากนั้น Mitsue และคณะ (1999) ทำการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* KF-75 โดยการเลี้ยงร่วมกับ *Torulaspora delbrueckii* IFO 1626 ซึ่งเป็นยีสต์ที่สามารถคัดแยกได้จากก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรน และพบว่าการเลี้ยงเชื้อผสมทำให้ *L. kefiranofaciens* KF-75 ผลิตคีเฟอรันสูงขึ้นเป็น 3.74 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตที่ใช้ *L. kefiranofaciens* KF-75 เพียงอย่างเดียว (1.88 กรัมต่อลิตร)

Cheirsilp และคณะ (2001) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 เพื่อสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์สำหรับการผลิตคีเฟอรันโดยเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว ซึ่งจากการเลียนแบบแบบจำลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคีเฟอรันคือการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร MRSL ที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.0 ซึ่งเป็นช่วงพีเอชที่เหมาะสำหรับ

สำนักหอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

การเติบโตของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ในช่วงแรก จากนั้นจึงค่อยปรับพีเอชของน้ำหมักเป็น 4.5 เพื่อให้เหมาะสมสำหรับการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ในช่วงหลัง ทำให้ *L. kefiranofaciens* สามารถผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้นร้อยละ 20 เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ในระบบที่มีพีเอชคงที่ 5.0 ต่อมา Cheirsilp และคณะ (2003) ศึกษาเปรียบเทียบอัตราการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ระหว่างการเลี้ยงเชื้อเดี่ยวกับการเลี้ยงเชื้อผสมร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่คัดแยกได้จากก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรน พบว่าการเลี้ยงเชื้อผสมทำให้อัตราการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 เพิ่มขึ้นเป็น 36 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อเดี่ยว *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีอัตราการผลิตคีเฟอรันเพียง 24 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และพบว่าอัตราการผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้นเป็น 44 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อผสมภายใต้ระบบที่มีการให้อากาศ นอกจากนี้ Tada และคณะ (2007) ได้ศึกษาพัฒนาการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 โดยการเลี้ยงร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0216 ภายใต้ระบบที่มีการหมักแบบกึ่งกะ ที่มีการเติมสารอาหารใหม่แก่ระบบในลักษณะ Feedback และ Feedforward ในช่วง 92-102 ชั่วโมง เพื่อควบคุมสมดุลการเติบโตของยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติก ทำให้ปริมาณกรดแลคติกภายในระบบคงที่ ผลการทดลองพบว่าการเลี้ยงเชื้อผสมภายใต้ระบบดังกล่าวทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 สามารถผลิตคีเฟอรันได้ 6.3 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อผสมภายใต้การหมักแบบกะที่ผลิตคีเฟอรันได้เพียง 4.5 กรัมต่อลิตร

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตคีเฟอรันจากแบคทีเรียกรดแลคติก

2.4.1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก. แหล่งคาร์บอน

Yokoi และ Watanabe (1992) ศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของ *Lactobacillus* sp. KPB-67bB พบว่าน้ำตาลแลคโตสที่ความเข้มข้นเริ่มต้นร้อยละ10 มีความเหมาะสมสำหรับการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของ *Lactobacillus* sp. KPB-67bB ซึ่งสอดคล้องกับ Micheli และคณะ (1999) ที่พบว่า *Lactobacillus* LM 17 มีการผลิตคีเฟอรันปริมาณ 2 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน Cheirsilp และคณะ (2001) ศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตสเริ่มต้นต่ออัตราการเจริญจำเพาะและการใช้สารตั้งต้นของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตสเริ่มต้นมากกว่า 20 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้อัตราการเจริญจำเพาะของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ลดลง ในขณะที่อัตราการใช้สารตั้งต้นของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 จะลดลงเมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตสเริ่มต้นมากกว่า 60 กรัมต่อลิตร Taniguchi และคณะ (2001) พบว่า *L. kefiranofaciens* JCM 6985 สามารถผลิตคีเฟอรันได้สูงสุด 1040 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อใช้น้ำตาลแลคโตสปริมาณ 75

กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากการใช้น้ำแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนแล้วยังมีงานวิจัยที่ใช้แป้งสาคูเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 โดย Yeesang และคณะ (2008) ซึ่งพบว่า *L. kefiranofaciens* JCM 6985 สามารถผลิตคีเฟอรันได้สูงสุด 0.85 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้แป้งสาคูเริ่มต้นร้อยละ 4 เป็นแหล่งคาร์บอน

ข. แหล่งไนโตรเจน

Yokoi และ Watanabe (1992) ศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของ *Lactobacillus* sp. KPB-167B พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่ประกอบด้วยทริปโตน เนื้อสกัด ยีสต์สกัด และไดรแอมโมเนียมซิเตรต ร้อยละ 2, 2, 1 และ 0.4 ตามลำดับ มีผลทำให้เชื้อสามารถผลิตคีเฟอรันได้สูงสุด 1.69 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ Taniguchi และคณะ (2001) ศึกษาผลของยีสต์สกัดต่อการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 พบว่าการเติมยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร มีผลช่วยส่งเสริมการเติบโตและการผลิตคีเฟอรัน ทำให้เชื้อผลิตคีเฟอรันได้ปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 460 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ Cheirsilp และคณะ (2003) ศึกษาพัฒนาและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* โดยการเลี้ยง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0216 ภายใต้ระบบที่มีการหมักแบบกึ่งกะ (fed batch) ที่มีการเติมสารอาหารใหม่ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลแลคโตส 300 กรัมร่วมกับยีสต์สกัด 100 กรัม เข้าสู่ระบบที่ 46 และ 60 ชั่วโมง พบว่ามีผลทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้นเป็น 5.41 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าการผลิตภายใต้การหมักแบบกะที่เชื้อผลิตคีเฟอรันได้เพียง 2.64 กรัมต่อลิตร

2.4.2 สภาวะการเพาะเลี้ยง

ก. พีเอช

Yokoi และคณะ (1991) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของ *Lactobacillus* sp. KPB-167B พบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร MRSL ที่มีพีเอชของอาหารเริ่มต้น 5.5 เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตและการผลิตคีเฟอรัน เช่นเดียวกับ Cheirsilp และคณะ (2001) ที่พบว่าการเลี้ยง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ในอาหารสูตร Man-Rogosa Sharpe Lactose (MRSL) ที่มีพีเอชอยู่ในช่วง 5.5 เป็นช่วงที่เหมาะสำหรับการเติบโตและการผลิตคีเฟอรัน ซึ่งสอดคล้องกับ Taniguchi และคณะ (2001) ที่พบว่าการเลี้ยง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ในอาหารสูตร MRSL พีเอชเริ่มต้น 5.5 ทำให้เชื้อผลิตคีเฟอรันได้สูงสุด 460 และ 650 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายใต้ระบบที่ไม่มีการควบคุมพีเอชและมีการควบคุมพีเอชตามลำดับ เช่นเดียวกับ จิตตรา ยี่แสง (2550) ที่พบว่า *L. kefiranofaciens* JCM 6985 สามารถผลิตคีเฟอรันได้สูงสุด 0.51 และ 0.85 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีแป้งสาคูเป็นแหล่งคาร์บอนภายใต้ระบบที่ไม่มีการควบคุมพีเอชและมีการควบคุมพีเอชตามลำดับ

ข. อุณหภูมิ

Yokoi และ Watanabe (1992) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของ *Lactobacillus* sp. KPB-167B พบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรอาหาร MRSL ภายใต้ระบบที่มีการควบคุมพีเอช ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำให้ *Lactobacillus* sp. KPB-167B สามารถเติบโตและผลิตคีเฟอรันได้สูงร้อยละ 87 เช่นเดียวกับ Taniguchi และคณะ (2001) ที่พบว่าการเลี้ยง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ในอาหารสูตร MRSL ภายใต้ระบบที่มีการควบคุมพีเอช ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการผลิตคีเฟอรันได้สูงสุด 650 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่ Yeesang และคณะ (2008) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 เมื่อใช้แป้งสาคูปริมาณร้อยละ 2 เป็นวัตถุดิบ พบว่าเชื้อสามารถเติบโตและผลิตคีเฟอรันได้สูงสุด 0.65 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเช่นกัน

ค. การให้อากาศ

Cheirsilp และคณะ (2003) ศึกษาผลของการให้อากาศและอัตราการกวนต่อการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 พบว่าการพ่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และก๊าซไนโตรเจนเข้าสู่ระบบถังหมักเพื่อรักษาสภาวะไร้อากาศให้แก่ระบบ ไม่มีส่วนช่วยส่งเสริมการผลิตคีเฟอรันของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อภายในระบบที่มีการให้อากาศ พบว่าเชื้อมีการเติบโตเพิ่มขึ้นแต่การผลิตคีเฟอรันลดลง ส่วนการศึกษาผลของอัตราการกวนภายใต้สภาวะไร้อากาศต่อการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 พบว่าอัตราการกวนที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้การเติบโตของเชื้อเพิ่มขึ้นแต่การผลิตคีเฟอรันลดลง ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกับการศึกษาการให้อากาศ

ง. การเติมเอทานอล

Cheirsilp และคณะ (2003) ศึกษาผลของการเติมเอทานอลในกระบวนการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ทั้งนี้เนื่องจาก *L. kefiranofaciens* JCM 6985 เป็นเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับยีสต์ภายในก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรน จึงมีข้อสัณนิฐานว่าเอทานอลที่ผลิตโดยยีสต์ อาจมีส่วนช่วยกระตุ้นการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 แต่จากการศึกษาพบว่าการเติมเอทานอลปริมาณร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีผลทำให้การเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ลดลง

จ. การหมักแบบกึ่งกะ

การหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch) เป็นการหมักที่มีการเติมสารอาหารบางอย่างเพิ่มลงในอาหารที่ใช้หมักจุลินทรีย์เป็นระยะ เพื่อให้จุลินทรีย์เติบโตและใช้สารอาหารได้อย่างเต็มที่ โดยไม่มีการถ่ายอาหารออก การหมักแบบนี้ส่วนใหญ่ใช้เพื่อแก้ปัญหาเกี่ยวกับข้อจำกัดในเรื่องความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น ซึ่งถ้าใช้มากเกินไปอาจมีผลยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ หรืออาจทำให้มี

ปัญหาในการให้ออกซิเจนในปริมาณที่เพียงพอ ดังนั้นจึงมีการนำระบบการหมักแบบกึ่งกะมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น การผลิตเซลล์ยีสต์ การผลิตเอนไซม์ หรือยาปฏิชีวนะบางชนิด ซึ่งการผลิตในระบบกึ่งกะสามารถควบคุมปริมาณสับสเตรทที่เหลือให้มีความเข้มข้นต่ำมาก ๆ ช่วยลด repressive effect ของแหล่งคาร์บอนที่จุลินทรีย์ใช้ได้อย่างรวดเร็วและสามารถลดความเป็นพิษของส่วนประกอบบางชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการศึกษาการผลิตคีเฟอรันของ Cheirsilp และคณะ (2003) ที่เปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* IFO0216 ภายใต้การหมักแบบกะและกึ่งกะ พบว่าการหมักแบบกึ่งกะที่มีการเติมสารอาหารใหม่ในชั่วโมงที่ 46 มีผลทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 สามารถผลิตคีเฟอรันได้ปริมาณ 4.14 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการหมักแบบกะที่ผลิตคีเฟอรันได้เพียง 2.64 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ Tada และคณะ (2007) พบว่าการผลิตคีเฟอรันโดยเชื้อผสมระหว่าง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 กับ *S. cerevisiae* IFO 0216 ภายใต้การหมักแบบกึ่งกะที่มีการเติมสารอาหารแบบ Feedback/ Feedforward ในชั่วโมงที่ 92-102 เพื่อรักษาสมดุลการเติบโตระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ ทำให้สามารถควบคุมปริมาณกรดแลคติกตลอดกระบวนการหมักให้มีปริมาณไม่เกิน 6 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 สามารถเจริญและผลิตคีเฟอรันได้ปริมาณ 6.3 กรัมต่อลิตร โดย *L. kefiranofaciens* JCM 6985 สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้สูงสุดถึง 190 กรัม คิดเป็นผลผลิตต่อหน่วยสับสเตรทเท่ากับ 0.033 กรัมต่อกรัมสับสเตรท ซึ่งสูงกว่าการผลิตคีเฟอรันโดยเชื้อผสมภายใต้การหมักแบบกะที่ผลิตคีเฟอรันได้เพียง 4.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นผลผลิตต่อหน่วยสับสเตรทเท่ากับ 0.027 กรัมต่อกรัมสับสเตรท

3. วัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมนม

3.1 กระบวนการผลิตเนยแข็ง

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีการผลิตสินค้าทางการเกษตรออกจำหน่ายสู่ท้องตลาดเป็นจำนวนมาก จากกระบวนการแปรรูปสินค้ามักมีวัสดุเศษเหลือที่สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตสินค้าบางประเภทโดยเชื้อจุลินทรีย์ได้ ดังเช่นในกระบวนการผลิตเนยแข็งซึ่งมีขั้นตอนและวิธีการดัง Figure 6 จากกระบวนการผลิตพบว่านมสด 10 กิโลกรัมสามารถผลิตเนยแข็งได้ 1 กิโลกรัม ส่วนที่เหลือ 9 กิโลกรัม เป็นของเหลวใสที่ต้องระบายทิ้งออกจากระบบซึ่งเรียกว่าหางนม (Akasu and Eren, 2005) หางนมโดยทั่วไปมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มน้ำตาลแลคโตส ซึ่งสามารถใช้เป็นวัตถุดิบหรือเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเชื้อจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ เพื่อใช้ในการผลิตสินค้าบางประเภท หางนมสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ หางนมเปรี้ยว (acid whey) และ หางนมหวาน (sweet whey) (Panesar *et al.*, 2007)

- หางนมเปรี้ยว (acid whey) เป็นหางนมที่แยกได้จากกระบวนการผลิตเนยแข็ง โดยการใช้กรดเคมีอินทรีย์ในการตกตะกอนแยกโปรตีน

- หางนมหวาน (sweet whey) เป็นหางนมที่แยกได้จากกระบวนการผลิตเนยแข็ง โดยการใช้เอนไซม์เรนเนทในการตกตะกอนโปรตีน

จากการศึกษาปริมาณและองค์ประกอบทางเคมีของหางนมแต่ละประเภท พบว่าหางนมหวานมีปริมาณน้ำตาลแลคโตสสูงกว่าหางนมเปรี้ยวเล็กน้อย ในขณะที่ส่วนประกอบอื่นๆ มีปริมาณใกล้เคียงกัน ซึ่งแสดงดัง Table 3

Table 3. Typical composition of sweet whey and acid whey.

Element	Amount (g/l)	
	sweet whey	acid whey
Total solid	63 - 70	63 - 70
Lactose	46 - 52	44 - 46
Protein	6 - 10	6 – 8
Phosphate	1 - 3	1.2 - 1.6
Lactate	2	2 – 4.5
Chloride	1.1	6.4
Calcium	0.4 - 0.6	1.1

ที่มา: Jelen (2003 อ้างโดย Panesar *et al.*, 2007)

3.2 การใช้ประโยชน์จากหางนม

การผลิตเนยแข็งจะมีหางนมเป็นวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการผลิตเป็นจำนวนมาก หากไม่มีกระบวนการจัดการที่ดี อาจก่อให้เกิดการหมักหมมของของเสียซึ่งจะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและอาจเป็นสาเหตุของการเกิดโรคบางอย่างที่ไม่พึงประสงค์ เนื่องจากหางนมมีองค์ประกอบหลักที่สำคัญคือน้ำตาลแลคโตส จึงมีผู้สนใจการนำหางนมมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับจุลินทรีย์เพื่อลดต้นทุนในกระบวนการผลิตสินค้า ดังเช่น Aksu และ Eren (2005) ศึกษาการการผลิตแคโรทีนอยด์ของ *Rhodotorula mucilaginosa* เมื่อการใช้กากน้ำตาลและหางนมเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งพบว่า *R. mucilaginosa* สามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด 89 มิลลิกรัมต่อลิตรเมื่อใช้กากน้ำตาลปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตแคโรทีนอยด์ได้สูงสุด 35 มิลลิกรัมแคโรทีนอยด์ต่อกรัมเซลล์น้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อใช้หางนม 13.2 กรัมต่อลิตร เป็นวัตถุดิบ ในขณะที่ Rodrigues และคณะ (2006) พบว่าการใช้หางนมและกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้ *Lactococcus lactis* 53

และ *Streptococcus thermophilus* A ผลิตสารลดแรงตึงผิวได้ 1.2-1.5 เท่า ของผลผลิตต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และพบว่าการใช้หางนมและกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ถึงร้อยละ 60-80 นอกจากนี้ Koutinas และคณะ (2007) พบว่าหางนมสามารถใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอลโดยยีสต์บางสายพันธุ์ที่คัดแยกจากก้อนเชื้อดีเฟอร์เกรน

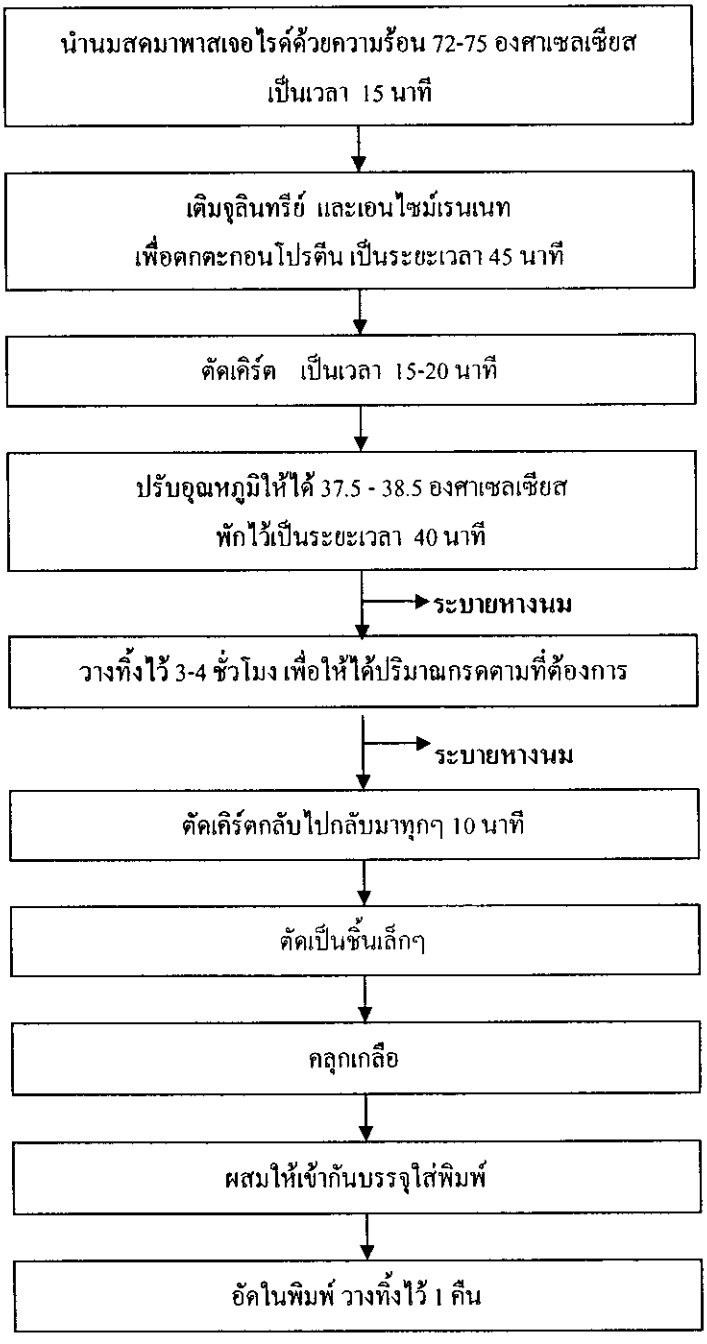

Figure 6. Process of making cheese.

ที่มา: เนยแข็งเชดดา (2004)

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วิธีดำเนินการ

1. วิธีการวิเคราะห์

1.1 การวัดค่าพีเอช

ค่าพีเอชของสารละลายวัดโดยเครื่องวัดพีเอช

1.2 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

ก. แบคทีเรีย

ถ่าย *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากหัวเชื้อที่เก็บในกลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ลงในอาหารสูตร MRS (Hi-media) ที่มีพีเอช 5.5 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ข. ยีสต์

ถ่ายหัวเชื้อยีสต์แต่ละสายพันธุ์ที่เก็บในกลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารสูตร YP ที่มีพีเอช 5.5 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.3 การวัดการเจริญของจุลินทรีย์

- แบคทีเรีย *L. kefiranofaciens* JCM 6985

เจือจางตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 1.2 ก. 10 เท่า ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0.85 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD_{660}) หรือตรวจวัดจำนวนด้วยวิธี drop plate (ดัดแปลงจาก ธนุสรา เหล่าเจริญสุข, 2546) โดยการขีดแบ่งพื้นที่บนผิวหน้าอาหาร MRS-agar เป็นสามส่วนและหยดตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่เจือจางตามความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร โดยแต่ละส่วนหยดสารละลายตัวอย่างจำนวน 5 จุด รอจนสารละลายซึมลงในอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ภายในโถดูดความชื้นที่มีการจุดเทียนไขเพื่อกำจัดอากาศภายในโถ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร คำนวณและรายงานผลปริมาณเชื้อทั้งหมดในรูป cfu/ml

- ยีสต์

เจือจางตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อจากข้อ 1.2 ข. 10 เท่า ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0.85 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD_{660}) หรือตรวจวัดจำนวนด้วยวิธี spread plate โดยหยดสารละลายตัวอย่างของยีสต์ที่เจือจางตามความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร บนผิวหน้าอาหาร YP-agar ทำการ spread plate จนผิวหน้าอาหารแห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร คำนวณและรายงานผลปริมาณเชื้อทั้งหมดในรูป cfu/ml โดยทำการทดลองเป็นจำนวน 3 ซ้ำ

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณคีเฟอรัน (Cheirsilp *et al.*, 2001)

ปริมาณคีเฟอรันที่รายงานอยู่ในรูปของผลรวมระหว่างคีเฟอรันในส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ (broth kefiran) กับคีเฟอรันที่เกาะรอบเซลล์ (capsular kefiran) ของแบคทีเรียกรดแลคติก

ก. การวัดปริมาณคีเฟอรันในส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ (broth kefiran)

นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตกตะกอนคีเฟอรันด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 (-20 องศาเซลเซียส) ในอัตราส่วน 1:1 วางทิ้งไว้ 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสออกจากตะกอน ละลายตะกอนที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำสารละลายดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่าเดิมนาน 10 นาที แยกส่วนใสออกจากตะกอน ตกตะกอนส่วนใสซ้ำอีกครั้งด้วยเอทานอลที่มีความเข้มข้นและอัตราส่วนเท่าเดิม วางทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบเท่าเดิมนาน 10 นาที แยกตะกอนออกจากส่วนใส ละลายตะกอนที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เจือจางสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงที่เหมาะสมเพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีแอนโทรนโดยดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก เติมสารละลายสารละลายแอนโทรนในกรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc.H_2SO_4) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ทำให้เย็นทันทีวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณคีเฟอรันโดยเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลแลคโตสที่ความต่างๆ ดังแสดงในภาคผนวก ข. 1

ข. การวัดปริมาณคีเฟอรันที่เกาะรอบเซลล์ (capsular kefiran)

ละลายตะกอนเซลล์ที่แยกได้จากส่วนแรกด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 30 นาที ปั่นเหวี่ยงสารผสมที่ได้ด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกสารละลายคีเฟอรันออกจากตะกอนเซลล์ ซึ่งการตกตะกอนและวิเคราะห์ปริมาณคีเฟอรันในส่วนของ capsular kefiran โดยทำตามวิธีการเดียวกับการตกตะกอนและวิเคราะห์ปริมาณคีเฟอรันในส่วนใส (broth kefiran) ในข้อ ก.

1.5 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Nelson-Somogyi (ธนุสรา เหล่าเจริญสุข, 2546)

ปั่นเหวี่ยงสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยเจือจางสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลอยู่ในช่วงที่เหมาะสม ดูดสารตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดกลางเติมสารละลายคอปเปอร์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ทำให้เย็นทันทีเติมสารละลายเนลสันปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบกำหนดจึงเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร (OD_{520}) และคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลแลคโตสที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงในภาคผนวก ข. 2

1.6 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกโดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (ดัดแปลงตามวิธี Olano-Martin *et al.*, 2000)

ปั่นเหวี่ยงสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสออกจากตะกอน กรองสารละลายตัวอย่างผ่านกระดาษกรองไนลอนขนาด 0.2 ไมโครเมตรซ้ำอีกครั้ง และฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตรเข้าสู่คอลัมน์ (BIO-RAD Aminex HPX-87 H Ion Exclusion column ขนาด 300 mm x 7.8 mm) ภายใต้สภาวะที่มีกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.005 โมลาร์ เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยมีอัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที คำนวณปริมาณกรดแลคติก โดยเปรียบเทียบกับพื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐานของกรดแลคติกที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงในภาคผนวก ข. 3

1.7 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (ดัดแปลงตามวิธี Lowry *et al.*, 1951)

ดูดสารละลายตัวอย่างที่เจือจางให้อยู่ในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก เติมสารละลายอัลคาไลน์คอปเปอร์ (alkaline copper reagent) (ประกอบด้วย Na_2CO_3 ร้อยละ 2, $CuSO_4$ ร้อยละ 1, และ $NaKC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ ร้อยละ 2) ในอัตราส่วน 100:1:1) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติมสารละลายโฟลิน (Folin-Ciocalteu' phenol reagent) ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน1:1 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวางทิ้งไว้ 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร คำนวณปริมาณโปรตีน โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังแสดงในภาคผนวก ข. 4

1.8 การวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatography (TLC)

(ดัดแปลงตามวิธี วิไลวรรณ ไชยศร, 2551)

จุดสารละลายมาตรฐานของน้ำตาลแลคโตส กลูโคส กาแลคโตส และตัวอย่างหางนมที่ผ่านการเตรียมแล้วลงบนแผ่น TLC ชนิด TLC aluminium sheet siliga gel 60 F254 เป่าให้แห้ง นำไปแช่ในแชมเบอร์ที่มีตัวทำละลายเคลื่อนที่ประกอบด้วย isopropyl alcohol:ethyl acetate:H_2O ในอัตราส่วน 3:3:1 เมื่อตัวทำละลายเคลื่อนที่เคลื่อนที่ถึงระยะทางที่ต้องการบนแผ่น TLC นำแผ่น TLC ออกจากแชมเปอร์ เป่าให้แห้ง จุ่มลงในตัววิเคราะห์ที่ประกอบด้วย N-(1-naphthylethylene diamine) 0.3 กรัมในร้อยละ 5 กรดซัลฟูริกในเมทานอลและอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เปรียบเทียบระยะทางการเคลื่อนที่ของสารแต่ละตัว (R_f) ซึ่งสามารถคำนวณได้ตามสมการดังต่อไปนี้

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่สารเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ตัวทำละลายเคลื่อนที่}}$$

2. วิธีการศึกษา

2.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงร่วมกับ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ในการผลิตคีเฟอรัน

2.1.1 ความสามารถในการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของยีสต์แต่ละสายพันธุ์

ถ่ายหัวเชื้อยีสต์เริ่มต้นที่เตรียมจากข้อ 1.2 ข. ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารสูตร modified MRS-skim milk reducing sugar ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์จากหางนมร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็ว 60 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือด้วยวิธี Nelson-Somogyi เปรียบเทียบปริมาณการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ คัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์เพื่อทำการศึกษาสมบัติขั้นต่อไป

2.1.2 ความสามารถในการใช้กรดแลคติกของยีสต์แต่ละสายพันธุ์

ดูดหัวเชื้อเริ่มต้นของยีสต์ที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 2.1.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารสูตร modified MRS - lactic acid ที่มีกรดแลคติกร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นองค์ประกอบ และมีพีเอชของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกที่เหลือด้วยเทคนิค HPLC ตามวิธีในภาคผนวก ข.3 เปรียบเทียบปริมาณการใช้กรดแลคติกของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ คัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่มีการใช้กรดแลคติกเพื่อทำการศึกษาสมบัติขั้นต่อไป

2.1.3 ความสามารถในการส่งเสริมการผลิตคีเฟอรันของยีสต์แต่ละสายพันธุ์

ดูดหัวเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับหัวเชื้อยีสต์แต่ละสายพันธุ์ที่ผ่าการคัดเลือกจากข้อ 2.2.2 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ถ่ายลงอาหารสูตร modified MRS-skim milk reducing sugar ที่มีพีเอช 5.5 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยไม่มีการเขย่า เก็บตัวอย่างที่ 60 และ 120 ชั่วโมง วิเคราะห์การเติบโตของเชื้อผสมด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และปริมาณคีเฟอรันที่ผลิตโดย *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ในแต่ละชุดการทดลอง เปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างการเลี้ยงเชื้อผสมภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่ากับสภาวะที่มีการให้อากาศโดยการเขย่าด้วยความเร็ว 60 รอบต่อนาที คัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่มีสมบัติส่งเสริมให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการผลิตคีเฟอรันสูงสุด เพื่อทำการศึกษาขั้นต่อไป

2.2 การคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตคีเฟอรันโดยเชื้อผสม

เพื่อคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม เตรียมอาหารสูตร modified MRS-skim milk lactose ในหลอดทดลองขนาดกลาง (16×150 mm) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร พีเอชของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 โดยในแต่ละชุดการทดลองประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนชนิดและปริมาณต่างๆ ดังต่อไปนี้คือ

การทดลองที่ 1	ประกอบด้วย ทริปโตนร้อยละ2, เนื้อสกัด (Meat extract) ร้อยละ 2 และยีสต์สกัดร้อยละ 1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
การทดลองที่ 2	ประกอบด้วย ยีสต์สกัดร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
การทดลองที่ 3	ประกอบด้วย ทริปโตนร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
การทดลองที่ 4	ประกอบด้วย เนื้อสกัดร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

ถ่าย *L. kefiranofaciens* JCM 6985 และยีสต์ที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 2.1 ลงในอาหารแต่ละชุดการทดลอง โดยกำหนดปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์เริ่มต้นประมาณ 2.1×10^{7} cfu/ml และ 4×10^{6} cfu/ml ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีความเหมาะสมตามข้อ 2.1.3 เก็บตัวอย่างที่ 60 และ120 ชั่วโมง วิเคราะห์การเติบโตของเชื้อผสมด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และปริมาณคีเฟอรันที่ผลิตโดย *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ในแต่ละชุดการทดลอง คัดเลือกชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตคีเฟอรันโดยเชื้อผสมเพื่อทำการศึกษาขั้นต่อไป

2.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตคีเฟอรันโดยเชื้อผสม

2.3.1 ปริมาณแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

เตรียมอาหารสูตร modified MRS-skim milk reducing sugar ที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากหางนมเริ่มต้นร้อยละ 2, 4, 6 และ 8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 ร้อยละ 5 ปริมาตร100 มิลลิลิตร ในขวดดูแรนขนาด 100 มิลลิลิตร ถ่าย *L. kefiranofaciens* JCM 6985 และยีสต์ที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 2.1 ลงในอาหารแต่ละชุดการทดลอง โดยกำหนดปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์เริ่มต้นประมาณ 2.1×10^{7} cfu/ml และ 4×10^{6} cfu/ml ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส กวนด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง ตรวจนับการเติบโตของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 และยีสต์ ด้วยวิธี drop plate และ spread plate ตามลำดับ วิเคราะห์ปริมาณคีเฟอรัน น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ และพีเอชน้ำหมัก คำนวณผลผลิตต่อหน่วยสับสเตรทที่ใช้ ($Y_{p/s}$) ตามสมาการ

$$Y_{p/s} = \left(\frac{\text{ปริมาณคีเฟอรันทั้งหมด}}{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ใช้}} \right) \text{X } 100$$

และประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 โดยการหาความชันของการผลิตคีเฟอรันในช่วงชั่วโมงที่ 0-48 ของแต่ละชุดการทดลอง คัดเลือกชุดการทดลองที่ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ให้ประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันสูงสุดเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

2.3.2 ปริมาณแหล่งไนโตรเจนเริ่มต้นที่เหมาะสม

เตรียมอาหารสูตร modified MRS-skim milk reducing sugar ที่มีแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 2.2 ปริมาณร้อยละ 2, 4, 5 และ 6 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากหางนมในปริมาณที่เหมาะสมตามข้อ 2.3.1 เป็นแหล่งคาร์บอน ถ่าย *L. kefiranofaciens* JCM 6985 และยีสต์ที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 2.1 ลงในอาหารดังกล่าวที่มีพีเอชของอาหารเริ่มต้น 5.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.3.1 คัดเลือกชุดการทดลองที่ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ให้ประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันสูงสุด เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

2.3.3 พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม

เตรียมอาหารสูตร modified MRS-skim milk reducing sugar ที่ประกอบด้วยน้ำตาลรีดิวซ์จากหางนมและแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 2.3.1 และ 2.3.2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยมีพีเอชของอาหารเริ่มต้นที่ 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 ตามลำดับ ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.3.1 คัดเลือกชุดการทดลองที่ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ให้ประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันสูงสุด เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

2.3.4 ปริมาณเชื้อยีสต์ที่เหมาะสม

เตรียมอาหารสูตร modified MRS-skim milk reducing sugar ที่ประกอบด้วยน้ำตาลรีดิวซ์จากหางนมและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมจากข้อ 2.3.1 และ 2.3.2 โดยมีพีเอชของอาหารเริ่มต้นที่เหมาะสมตามข้อ 2.3.3 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ถ่าย *L. kefiranofaciens* JCM 6985 และยีสต์ลงในอาหารดังกล่าว โดยกำหนดปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเริ่มต้นเท่ากับ 2.1×10^{7} cfu/ml ในขณะที่ยีสต์ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.6×10^{6} cfu/ml, 4×10^{6} cfu/ml และ 9.1×10^{6} cfu/ml ตามลำดับ ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.3.1 เปรียบเทียบผลการทดลองแต่ละชุดการทดลอง คัดเลือกชุดการทดลองที่ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ให้ประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันสูงสุดเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

2.4 การผลิตคีเฟอรันในถังหมัก

2.4.1 การหมักแบบกะ

เตรียมอาหารสูตร modified MRS-skim milk reducing sugarที่ประกอบด้วยน้ำตาลรีดิวซ์จากหางนมและแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่เหมาะสมจากข้อ 2.3.1 และ 2.3.2 ปริมาตร 1 ลิตร ลงในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยมีพีเอชของอาหารเริ่มต้นที่เหมาะสมตามข้อ 2.3.3 ถ่าย *L. kefiranofaciens* JCM 6985 และยีสต์ลงในถังหมัก โดยกำหนดปริมาณยีสต์ที่เหมาะสมจากข้อ 2.3.4 เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์การเติบโตของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 และยีสต์ ปริมาณคีเฟอรัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ พีเอชน้ำหมัก เปรียบเทียบผลการทดลองในแต่ละชุดการทดลอง ซึ่งประกอบด้วย

การทดลองชุดที่ 1 กวนด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที

การทดลองชุดที่ 2 ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำร้อยละ 5 ของออกซิเจนละลายน้ำอิ่มตัวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (โดยกำหนดอัตราการกวนสูงสุดไม่เกิน 500 รอบต่อนาที)

การทดลองชุดที่ 3 ควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำร้อยละ 5 ของออกซิเจนละลายน้ำอิ่มตัวที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (โดยกำหนดอัตราการกวนสูงสุดไม่เกิน 500 รอบต่อนาที) ร่วมกับการควบคุมพีเอชคงที่ที่ 5.5 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์

คัดเลือกชุดการทดลองที่ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ให้ประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันสูงสุดเพื่อทำการศึกษาขั้นต่อไป

2.4.2 การหมักแบบกึ่งกะ

เตรียมอาหารสูตร modified MRS-skim milk reducing sugar ที่ประกอบด้วยน้ำตาลรีดิวซ์จากหางนมและแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่เหมาะสมตามข้อ 2.3.1 และ 2.3.2 ปริมาตร 1 ลิตร ลงในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยมีพีเอชของอาหารเริ่มต้นที่เหมาะสมตามข้อ 2.3.3 ถ่ายเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 และยีสต์ลงในถังหมัก โดยกำหนดปริมาณยีสต์ที่เหมาะสมจากข้อ 2.3.4 ลงในถังหมัก ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 2.4.1 และเติมสารอาหารใหม่ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์จากหางนมปริมาณ 30 กรัม ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 24 และ 48 ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.4.1 เปรียบเทียบปริมาณการผลิตคีเฟอรันระหว่างการผลิตแบบกะและกึ่งกะ

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัตถุดิบสำหรับการผลิตคีเฟอรัน

หางนมผง (skim milk powder) จัดซื้อจากร้านสะดวกซื้อ ในตลาดสดเขตบางกะปี กรุงเทพมหานคร เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบแทนเวย์ เตรียมวัตถุดิบโดยชั่งหางนมผง 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอชสารละลายเป็น 4.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 5 โมลาร์ และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้เย็น นำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสที่เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้นสำหรับการผลิตคีเฟอรัน (ดัดแปลงจาก Shene and Brovo, 2007)

2. จุลินทรีย์

Lactobacillus kefiranofaciens JCM 6985 เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้สำหรับการผลิตคีเฟอรัน สั่งซื้อจาก Japan Collection of Microorganisms เก็บหัวเชื้อเริ่มต้นในกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 25 ภายใต้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ส่วนยีสต์สำหรับการศึกษาสมบัติที่ช่วยส่งเสริมการผลิตคีเฟอรันของแบคทีเรียกรดแลคติกประกอบด้วยสายพันธุ์ต่างๆ ดังต่อไปนี้ คือ *Torulaspora delbruekii* IFO 1626, *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0216, *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155, *Saccharomyces exiguus* TISTR 5081, *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR 5044 และ *Saccharomyces carlsbergensis* TISTR 5018 สั่งซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) เก็บหัวเชื้อเริ่มต้นของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ในกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 25 ภายใต้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 อาหารสำหรับเลี้ยงหัวเชื้อ

- อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 คืออาหารสูตร Man-Rogosa Sharpe (MRS) ซึ่งมีส่วนประกอบดังต่อไปนี้ เปปโตนร้อยละ 1 , ยีสต์สกัดร้อยละ 0.5, เนื้อสกัดร้อยละ 0.2, กลูโคสร้อยละ 2, K_2HPO_4ร้อยละ 0.1, triammonium citrate ร้อยละ 0.2, sodium acetate ร้อยละ 0.5, Polyrorbate 80 ร้อยละ 0.1, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ร้อยละ 0.005 และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ร้อยละ 0.01

- อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับยีสต์ คืออาหารสูตร Yeast-Peptone (YP) ที่ประกอบด้วย กลูโคสร้อยละ 1, โพลีเปปโตนร้อยละ 1 และยีสต์สกัดร้อยละ 1

3.2 อาหารสำหรับผลิตคีเฟอรัน

การผลิตคีเฟอรันใช้อาหารสูตรMRS ดัดแปลง (Cheirsilp *et al.*, 2003) ซึ่งมีส่วนประกอบดังต่อไปนี้ ทริปโตนร้อยละ 2 , ยีสต์สกัดร้อยละ 1, เนื้อสกัดร้อยละ 2, K_2HPO_4ร้อยละ 0.2, triammonium citrate ร้อยละ 0.4, sodium acetate ร้อยละ 0.5, Tween 80 ร้อยละ 0.1, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ร้อยละ 0.028, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ร้อยละ 0.058, $CaCl_2 \cdot H_2O$ ร้อยละ 0.074 และมีน้ำตาลรีดิวซ์จากหางนมร้อยละ 2 เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส

3.3 อาหารสำหรับตรวจนับการเติบโตของจุลินทรีย์

- อาหาร MRS-agar (Difco, USA) ที่เติมไซโคลเฮกซาไมด์ (cyclohexamide) ร้อยละ 0.0005 สำหรับตรวจนับเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985

- อาหาร YP-agar ที่ประกอบด้วย กลูโคสร้อยละ 1, โพลีเปปโตนร้อยละ 1, ยีสต์สกัดร้อยละ 1 และผงวุ้นร้อยละ 1.5 สำหรับตรวจนับยีสต์

3.4 อาหารสำหรับวิเคราะห์สมบัติของยีสต์แต่ละสายพันธุ์

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับวิเคราะห์สมบัติการใช้น้ำตาลรีดิวซ์และกรดแลคติกของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ คืออาหารสูตร MRS ดัดแปลง modified MRS-skim milk reducing sugar ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 2 และอาหารสูตร modified MRS-lactic acid ที่มีกรดแลคติกร้อยละ 2 แทนแหล่งคาร์บอนที่เป็นกลูโคส

4. สารเคมี

ก. สารเคมีสำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Nelson-Somogyi method)

ข. สารเคมีสำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry method)

ค. สารเคมีสำหรับตรวจวิเคราะห์ชนิดน้ำตาล (Thin-Layer Chromatography)

ง. สารเคมีสำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณคีเฟอรัน (Anthrone method)

จ. สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ

5. อุปกรณ์

5.1 อุปกรณ์สำหรับเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

- ขวดดูแรนมีฝาปิดขนาด 100 มิลลิลิตร
- โถดูดความชื้น (Desiccator)
- ตู้เก็บเชื้ออุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น SF-C697 (GYN) บริษัท Sanyo, Thailamd
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seiko Co., Ltd, Japan
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) รุ่น 527044 บริษัท Hotpack, China
- เครื่องกวนสาร (stirrer) รุ่น ST5 บริษัท FinePCR, Korea
- เครื่องให้ความร้อน (hot plate) รุ่น HS115 บริษัท Ika Labotechnic, Germany
- แท่งกวนแม่เหล็ก (magnetic stirrer) รุ่น RO 5 บริษัท Ika Labotechnic, Germany
- เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge) รุ่น 5203 บริษัท Hitachi, Japan
- ตู้อบความร้อนแห้ง (Universal oven) รุ่น UM 200-800 บริษัท Memmert, Germany
- เครื่องเขย่า รุ่น Contomate MOII บริษัท B. Braun Biotech International, Germany
- ถังหมัก รุ่น Biostat B บริษัท B. Braun Biotech International, Germany
- เครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

5.2 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์

- เครื่องวัดพีเอช รุ่น 420 A บริษัท Orion Research, Inc., Japan
- เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น 5403 บริษัท Eppendrof, Germany
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น W350 บริษัท Memmert, Germany
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น U-2000 บริษัท Technical Cooperation, Japan
- เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP210-s บริษัท Sartorius, Germany
- เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น HF-1200 บริษัท A&D Company, Ltd, Japan

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงร่วมกับ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ในการผลิตคีเฟอรัน

1.1 การใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากหางนมของยีสต์แต่ละสายพันธุ์

จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตคีเฟอรันพบว่า *L. kefiranofaciens* สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันได้ดีที่สุด (Yokoi and Watanabe, 1992) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจการผลิตคีเฟอรันจากหางนม โดยการเลี้ยง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ร่วมกับยีสต์ และเพื่อลดการแย่งแหล่งคาร์บอนที่ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 จะนำไปใช้ในการเจริญและการผลิตคีเฟอรัน และลดการสะสมของกรดแลคติกที่เกิดจากการเจริญของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 จึงทำการคัดเลือกยีสต์ที่ใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากหางนมได้น้อยหรือไม่สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้ แต่สามารถใช้กรดแลคติกในการเจริญได้มาเลี้ยงร่วมกับ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ซึ่งจากการเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ประกอบด้วย *Torulaspora delbruekii* IFO 1626, *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0216, *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155, *Saccharomyces exiguus* TISTR 5081, *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR 5044 และ *Saccharomyces carlsbergensis* TISTR 5018 ในอาหารสูตร modified MRS-skim milk reducing sugar ภายใต้สภาวะที่มีการเขย่าด้วยความเร็ว 60 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ายีสต์ส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากหางนมเป็นแหล่งคาร์บอนได้ยกเว้น *T. delbruekii* IFO 1626 โดยที่ *T. delbruekii* IFO 1626 มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากหางนมสูงถึง 4.34 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 4 ถึงแม้ Mitsue และ Fujio (1999) จะมีรายงานว่า *T. delbruekii* IFO 1626 ซึ่งสามารถคัดแยกได้จากก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรน มีผลช่วยส่งเสริมให้ *L. kefiranofaciens* KF-75 ผลิตคีเฟอรันได้สูงสุดเมื่อใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อเปรียบเทียบกับ *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0216 และ *Candida kefir* IFO 10278 แต่จากการทดลองนี้ *T. delbrueckii* IFO 1626 มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เป็นแหล่งคาร์บอนจึงไม่เหมาะที่จะนำมาเลี้ยงร่วมกับ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 เพราะอาจเกิดการแย่งแหล่งคาร์บอนและทำให้ประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันลดลง ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากหางนม ซึ่งประกอบด้วย *S. cerevisiae* IFO 0216, *D. hansenii* TISTR 5155, *S. exiguus* TISTR 5081, *Z. rouxii* TISTR 5044 และ *S. carlsbergensis* TISTR 5018 เพื่อไปคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้กรดแลคติกต่อไป

1.2 การใช้กรดแลคติกของยีสต์แต่ละสายพันธุ์

การเจริญและการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มักมีการผลิตกรดแลคติกเป็นผลพลอยได้ ทำให้ระบบมีปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้น ส่งผลให้การเจริญและการผลิตคีเฟอรันลดลง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจการเลี้ยง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถใช้กรดแลคติกได้ เพื่อใช้ยีสต์เป็นตัวควบคุมปริมาณกรดแลคติกในระบบ ซึ่งจากการศึกษาสมบัติการใช้กรดแลคติกของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 1.1 ในอาหารสูตร[36] modified-MRS lactic acid ที่มีกรดแลคติกปริมาณร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นองค์ประกอบภายใต้สภาวะที่มีเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงใน Table 5 พบว่ายีสต์ทุกสายพันธุ์สามารถใช้กรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอนได้ยกเว้น *Z. rouxii* TIS[36] 5044 โดย *S. cerevisiae* IFO 0216 เป็นยีสต์ที่สามารถใช้กรดแลคติกได้ดีที่สุดคือ 6.23 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ *S. exiguus* TISTR 5081 (2.46 กรัมต่อลิตร) ซึ่งการใช้กรดแลคติกของยีสต์จะเกิดขึ้นเมื่อภายในระบบมีเพียงกรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอน โดยยีสต์สามารถใช้กรดแลคติกได้โดยการเปลี่ยนแลคเตตเป็นไพรูเวต (pyruvate) จากนั้นไพรูเวตจะถูกเปลี่ยนเป็นออกซาโลอะซิเตต (oxaloacetate) โดยมีเอนไซม์ไพรูเวตคาร์บอกซิเลส (pyruvate carboxylase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์กลูโคสเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานของเซลล์ (ยุพดี ชัยสุขสันต์, 2548) จึงคัดเลือกยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่สามารถใช้กรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ประกอบด้วย *S. cerevisiae* IFO 0216, *D. hansenii* TISTR 5155, *S. exiguus* TISTR 5081 และ *S. carlsbergensis* TISTR 5018 มาเลี้ยงร่วมกับ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ในการผลิตคีเฟอรันจากหางนม

Table 4. Residual reducing sugar and amount of reducing sugar utilized by yeasts in modified MRS-skim milk lactose medium at 48 h under shaking condition at 60 rpm.

Strain	Residual reducing sugar (g/l)*	Amount of reducing sugar utilized (g/l)
Torulaspora delbruekii IFO 1626	21.90 ± 0.11	4.34 ± 0.1[a]
Saccharomyces cerevisiae IFO 0216	25.27 ± 1.12	0.97 ± 0.5[b]
Debaryomyces hansenii TISTR 5155	25.93 ± 1.83	0.31 ± 0.5[b]
Saccharomyces exiguus TISTR 5081	26.97 ± 0.90	0.00 ± 0.0[b]
Zygosaccharomyces rouxii TISTR 5044	25.95 ± 1.09	0.29 ± 0.3[b]
Saccharomyces carlsbergensis TISTR 5018	25.48 ± 0.33	0.75 ± 0.1[b]

* Initial reducing sugar concentration was 26.24 ± 0.41 g/l.

Different letters in the same parameter studied indicate significant differences ($p < 0.05$).

Table 5. Residual lactic acid and amount of lactic acid utilized by yeasts in modified MRS-lactic acid medium at 48 h under shaking condition at 200 rpm.

Strain	Residual lactic acid* (g/l)	Amount of utilized lactic acid (g/l)
Saccharomyces cerevisiae IFO 0216	14.3 ± 0.5	6.2 ± 0.5 [a]
Debraryomyces hansenii TISTR 5155	19.2 ± 0.5	1.2 ± 0.5 [a]
Saccharomyces exiguus TISTR 5081	17.9 ± 0.7	2.5 ± 0.7 [a]
Zygosaccharomyces rouxii TISTR 5044	20.1 ± 0.9	0.0 ± 0.9 [b]
Saccharomyces carlsbergensis TISTR 5018	18.6 ± 1.6	1.8 ± 1.6 [a]

* Initial lactic acid concentration was 20.4 ± 1.8 g/l.

Different letters in the same parameter studied indicate significant differences ($p < 0.05$).

1.3 การส่งเสริมการผลิตคีเฟอรันของยีสต์แต่ละสายพันธุ์

จากการศึกษาสมบัติที่ช่วยส่งเสริมการผลิตคีเฟอรันของยีสต์แต่ละสายพันธุ์เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ในอาหารสูตร modified MRS-skim milk reducing sugar ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์จากหางนมร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเป็นองค์ประกอบ ภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่า ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 7 พบว่าภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่าชุดการทดลองที่เลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 กับ *D. hansenii* TISTR 5155 มีการเติบโตสูงที่สุด โดยสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD_{660}) ได้เท่ากับ 8.07 ที่ 120 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อเดี่ยวที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 6.83 และพบว่าการเลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 กับยีสต์แต่ละสายพันธุ์มีผลทำให้การผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้น โดยชุดการทดลองที่เลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 กับ *S.cerevisiae* IFO 0216 มีการผลิตคีเฟอรันสูงที่สุด 0.81 กรัมต่อลิตรในเวลา 120 ชั่วโมง รองลงมาคือชุดการทดลองที่เลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 กับ *S. carlsbergensis* TISTR 5018 ที่มีการผลิตคีเฟอรัน 0.79 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อเดี่ยวของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่าพบว่ามีการผลิตคีเฟอรันได้เพียง 0.57 กรัมต่อลิตร (Figure 7b) อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมไม่มีความแตกต่างในทางสถิติ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่ายีสต์อาจจะมีการเติบโตเพียงเล็กน้อย (Figure 7a) ดังนั้นเพื่อเพิ่มการเติบโตของยีสต์ในการเลี้ยงร่วมกับ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 จึงมีการศึกษาการเลี้ยงเชื้อผสมภายใต้สภาวะที่มีการให้อากาศโดยการเขย่าด้วยความเร็ว 60 รอบต่อนาที ผลการทดลองดังแสดง

ใน Figure 8 พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 เดี่ยวภายใต้สภาวะที่มีการเขย่าด้วยความเร็ว 60 รอบต่อนาที ไม่ทำให้การเติบโตของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงภายใต้สภาวะที่ไม่เขย่า และพบว่าเชื้อผสมมีการเติบโตเพิ่มขึ้นโดยชุดการทดลองที่เลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 กับ *Z. rouxii* TISTR 5044 มีการเติบโตสูงสุดสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 120 ชั่วโมงได้ 9.90 (Figure 8a) แต่เมื่อพิจารณาการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ พบว่าการเลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 กับ *S. exiguus* TISTR 5081, *Z. rouxii* TISTR 5044 และ *D. hansenii* TISTR 5155 ภายใต้สภาวะที่มีการเขย่าทำให้การผลิตคีเฟอรันลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อผสมภายใต้สภาวะที่ไม่เขย่า(Figure 7b และ 8b) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากภายใต้สภาวะที่มีการเขย่ายีสต์มีการเติบโตเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการแย่งชิงแหล่งไนโตรเจนของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มากกว่าสภาวะที่ไม่มีการเขย่า ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 กับ *S. cerevisiae* IFO 0216 ภายใต้สภาวะที่มีการเขย่า พบว่า *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้นเป็น 0.94 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าสภาวะที่ไม่มีการเขย่า (Figure 7b และ 8b) โดยผลการทดลองเป็นไปในทำนองเดียวกับ Cheirsilp และคณะ (2003) ที่พบว่า *S. cerevisiae* IFO 0216 เป็นยีสต์ที่มีสมบัติช่วยส่งเสริมการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 โดย *L. kefiranofaciens* JCM 6985 จะมีอัตราการผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้นจาก 24 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงเมื่อเลี้ยงเชื้อเดี่ยวเป็น 36 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเลี้ยง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ร่วมกับ *S. cerevisiae* IFO 0216 ภายใต้สภาวะไร้อากาศ และมีอัตราการผลิตคีเฟอรันเพิ่มเป็น 44 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อผสมภายใต้สภาวะที่มีการให้อากาศ นอกจากนี้ Tada และคณะ (2007) พบว่าการเลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 กับ *S. cerevisiae* IFO 0216 ภายใต้การหมักแบบกึ่งกะที่มีการเติมสารอาหารใหม่ในช่วงชั่วโมงที่ 92-102 ทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ผลิตคีเฟอรันได้เพิ่มขึ้น 6.3 กรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 102 ชั่วโมง คิดเป็นผลผลิตต่อหน่วยสับสเตรทได้เท่ากับ 0.033 กรัมต่อกรัมสับสเตรท และจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 กับ *S.cerevisiae* IFO 0216 โดย Cheirsilp และคณะ (2003) พบว่าการสัมผัสกันระหว่าง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 กับ *S. cerevisiae* IFO 0216 ทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการสร้างคีเฟอรันในส่วนที่เกาะรอบเซลล์ (capsular kefiran) เพิ่มขึ้นจึงทำให้ปริมาณคีเฟอรันทั้งหมดเพิ่มขึ้น จากผลการทดลองที่พบว่าการเลี้ยง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ร่วมกับ *S. cerevisiae* IFO 0216 ภายใต้สภาวะที่มีการเขย่า ทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงเลือก *S. cerevisiae* IFO 0216 และสภาวะที่มีการเขย่าสำหรับการศึกษาผลิตคีเฟอรันในขั้นต่อไป

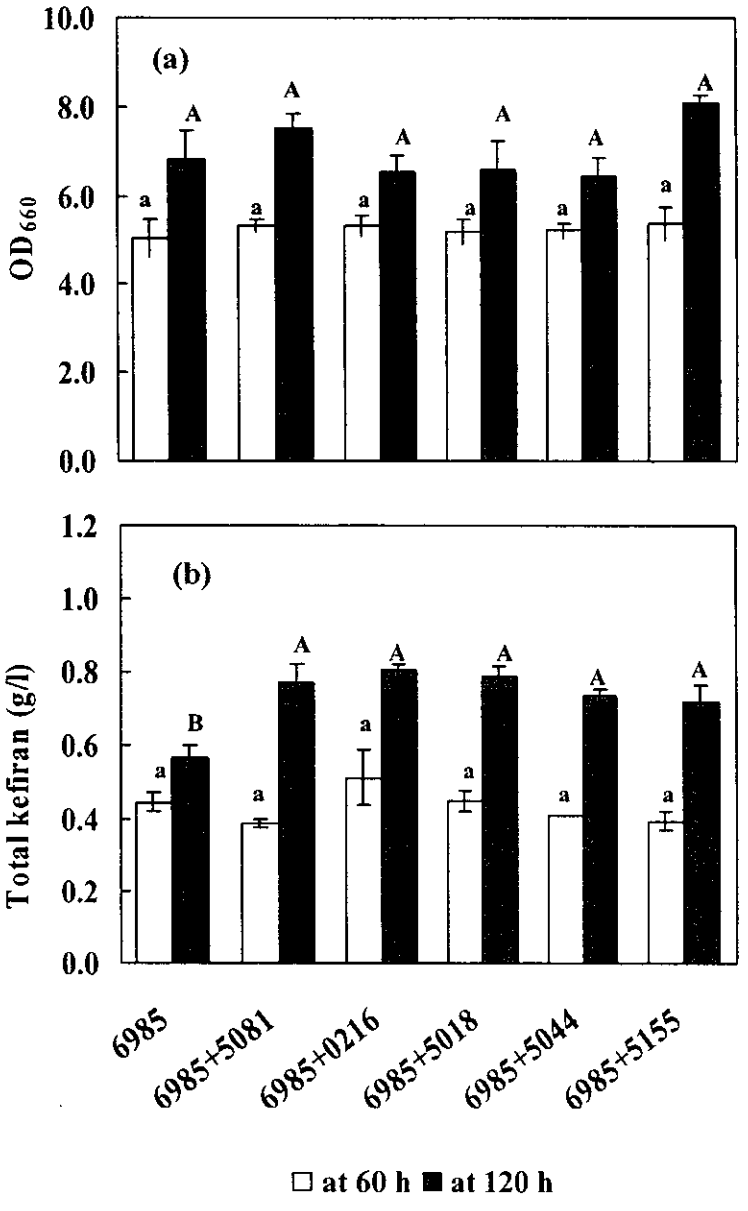

Figure 7. Cells growth (a) and total kefiran production (b) of the pure culture and the mixed cultures at 60 h and 120 h under static condition at room temperature. Different letters (A-B, a) in the same parameter studied indicate significant differences ($p < 0.05$).

6985 : pure culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985

6985+5081 : mixed culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and *S. exiguus* TISTR 5081

6985+0216 : mixed culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and *S. cerevisiae* IFO 0216

6985+5018 : mixed culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and *S. carlsbergensis* TISTR 5018

6985+5044 : mixed culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and *Z. rouxii* TISTR 5044

6985+5155 : mixed culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and *D. hansenii* TISTR 5155

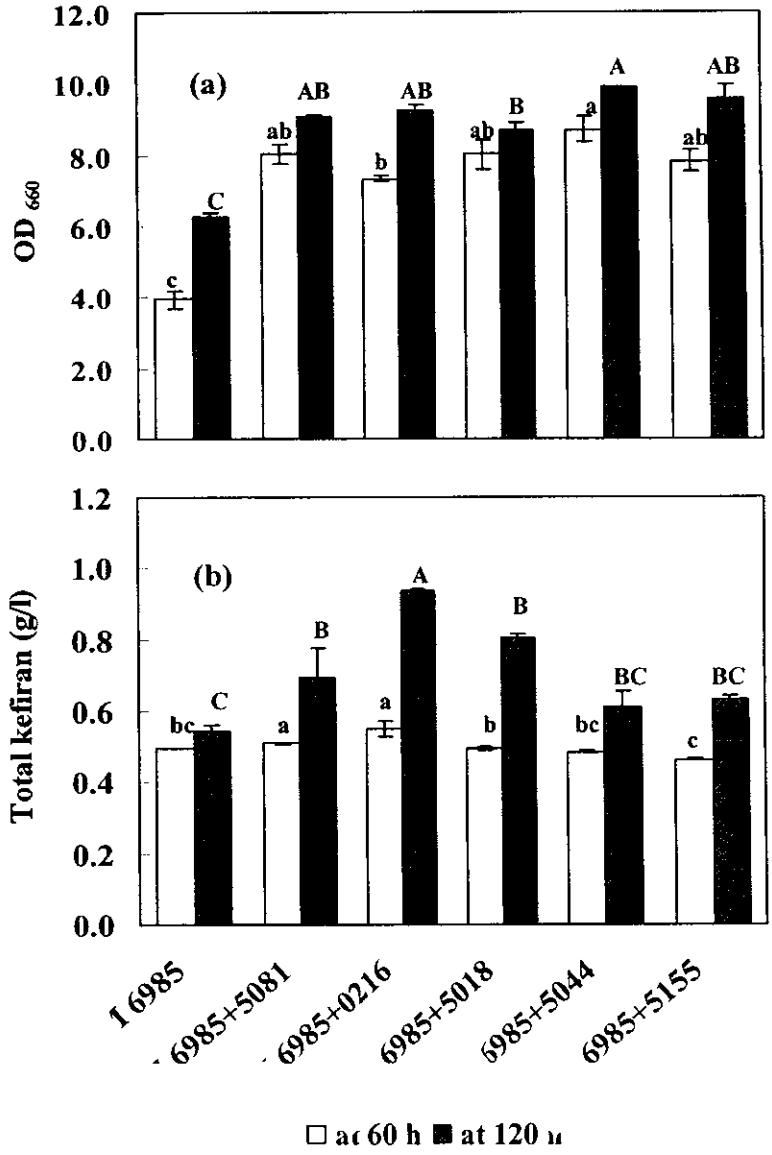

Figure 8. Cells growth (a) and total kefiran production (b) of the pure culture and the mixed cultures at 60 h and 120 h under shaking condition at 60 rpm at room temperature. Different letters (A-B, a) in the same parameter studied indicate significant differences ($p < 0.05$).

6985 : pure culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985

6985+5081 : mixed culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and *S. exiguus* TISTR 5081

6985+0216 : mixed culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and *S. cerevisiae* IFO 0216

6985+5018 : mixed culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and *S. carlsbergensis* TISTR 5018

6985+5044 : mixed culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and *Z. rouxii* TISTR 5044

6985+5155 : mixed culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and *D. hansenii* TISTR 5155

2. ชนิดของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตคีเฟอรันโดยเชื้อผสมภายใต้สภาวะที่มีการเขย่า

อาหาร MRS ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นสูตรอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกโดยทั่วไป ซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ประกอบด้วย ยีสต์สกัด ทริปโตน และ เนื้อสกัดร้อยละ 1, 2 และ 2 ตามลำดับ นอกจากนี้มีสารประกอบสารอนินทรีย์อื่นๆ ที่เป็นองค์ประกอบ ซึ่งการมีองค์ประกอบหลายชนิดทำให้ขั้นตอนและวิธีการเตรียมมีความซับซ้อนไม่เหมาะสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นเพื่อลดขั้นตอนที่ซับซ้อนจึงมีการศึกษาคัดเลือกชนิดของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตคีเฟอรันโดยเชื้อผสมของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 กับ *S. cerevisiae* IFO 0216 ทำการทดลองโดยเลี้ยงในอาหาร modified MRS-skim milk lactose ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 2 และมีแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แก่ ยีสต์สกัด เนื้อสกัด ทริปโตน และแหล่งไนโตรเจนผสมความเข้มข้นร้อยละ 5 ภายใต้สภาวะที่มีการเขย่าด้วยความเร็ว 60 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 9 เมื่อพิจารณาการเติบโตของเชื้อผสมพบว่าชุดการทดลองที่เติมยีสต์สกัดร้อยละ 5 แทนแหล่งไนโตรเจนทั้งหมด ทำให้เชื้อผสมมีการเติบโตสูงที่สุดโดยสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 10.21 ที่ 120 ชั่วโมง (Figure 9a) รองลงมาคือ ชุดการทดลองที่เติมเนื้อสกัดร้อยละ 5 ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ 8.02 ส่วนปริมาณการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 พบว่าชุดการทดลองที่เติมยีสต์สกัดร้อยละ 5 ทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการผลิตคีเฟอรันสูงสุด 0.84 กรัมต่อลิตร ที่ 120 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการใช้แหล่งไนโตรเจนผสมที่ผลิตคีเฟอรันได้ 0.79 กรัมต่อลิตร (Figure 9b) ในขณะที่ชุดการทดลองที่เติมเนื้อสกัดและทริปโตนร้อยละ 5 พบว่า *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ผลิตคีเฟอรันได้เพียง 0.62 และ 0.57 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Figure 9b) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เพียงชนิดเดียวก็เพียงพอสำหรับการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ทั้งนี้เนื่องจากยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่อุดมด้วยกรดอะมิโนและวิตามินหลายชนิดที่มีความจำเป็นสำหรับการเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ (สมใจ ศิริโภค, 2547) ในขณะที่เนื้อสกัดจะมีเพียงกรดอะมิโนบางชนิดที่เป็นองค์ประกอบของโปรตีนในเนื้อสัตว์ ส่วนทริปโตนก็มีเพียงกรดอะมิโนบางชนิดที่อยู่ในโปรตีนเคซีนซึ่งได้จากการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ทริปซิน นอกจากนี้ Yokoi และคณะ (1990) รายงานว่ายีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตคีเฟอรันของ *Lactobacillus* sp. KPB-167B เช่นเดียวกับ Cerning (1990) ที่พบว่ายีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีความเหมาะสำหรับการเติบโตและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติก นอกจากนี้ Taniguchi และคณะ (2001) ที่ศึกษาผลของยีสต์สกัดต่อการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 พบว่าการใช้ยีสต์สกัดปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร ทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการผลิตคีเฟอรันเท่ากับ 650 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการใช้ยีสต์สกัด

ปริมาณ 2.5 กรัมต่อลิตร ที่ผลิตคีเฟอรันได้เพียง 300 มิลลิกรัมต่อลิตรสอดคล้องกับ Ricciardi และคณะ (2002) ที่พบว่าการใช้ยีสต์สกัด 4 กรัมต่อลิตร ทำให้ *Streptococcus thermophilus* มีการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มเป็น 152 มิลลิกรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตต่อสับสเตรทได้ร้อยละ 3.8

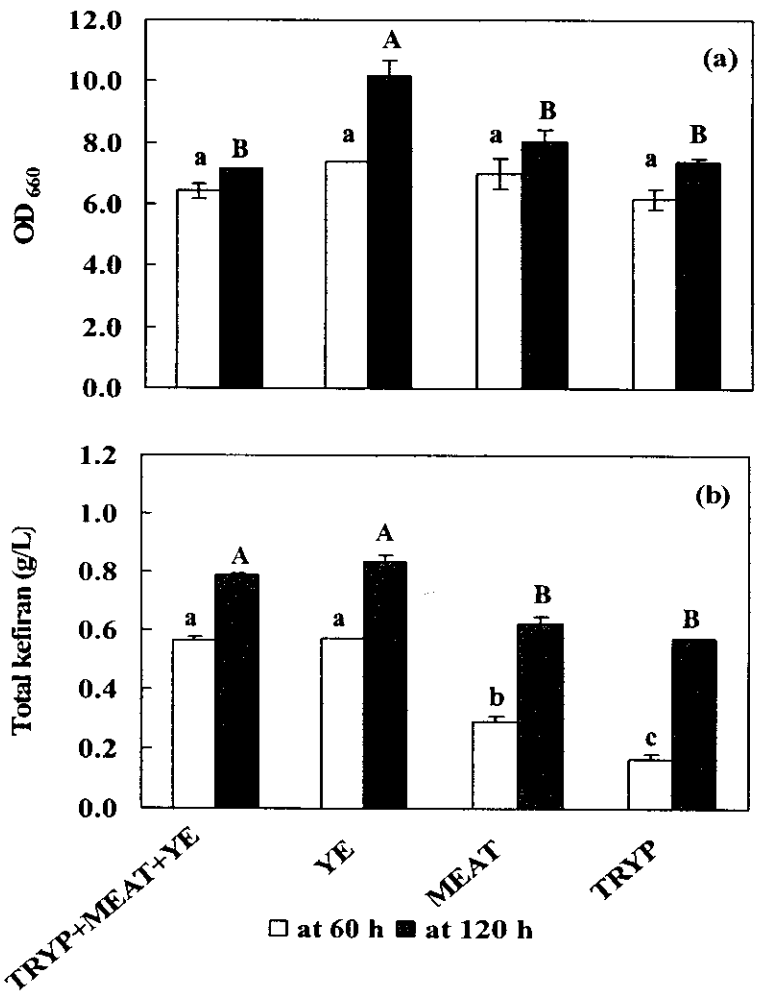

Figure 9. Cells growth (a) and total kefiran production (b) by the mixed culture in a modified MRS-skim milk lactose medium with various nitrogen sources at 60 h and 120 h under shaking condition at 60 rpm at room temperature. Different letters (A-B, a) in the same parameter studied indicate significant differences ($p < 0.05$).

TRYP+MEAT+YE : 2% tryptone, 2% meat extract and 1%yeast extract

YE : 5% yeast extract

MEAT : 5% meat extract

TRYP : 5% tryptone

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตคีเฟอรันโดยเชื้อผสม

3.1 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นที่เหมาะสม

แหล่งคาร์บอนถือเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญสำหรับการเติบโตของจุลินทรีย์ จากการศึกษาปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตคีเฟอรันโดยเชื้อผสมระหว่าง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 กับ *S. cerevisiae* IFO 0216 เมื่อใช้หางนมที่มีน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นร้อยละ 2, 4, 6 และ 8 ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 10 และ 11 พบว่าเมื่อใช้หางนมที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 2 *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการเติบโตอย่างต่อเนื่องและสูงสุดเท่ากับ 1.1×10^{9} cfu/ml ที่ชั่วโมงที่ 96 และการเติบโตของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 จะลดลงเท่ากับ 5.1×10^{8} cfu/ml เมื่อใช้หางนมที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 8 (Figure 10a) ในขณะที่การเติบโตของยีสต์สูงสุดที่ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นการเติบโตของยีสต์จะลดลงในทุกชุดการทดลอง (Figure 10b) และพบว่า *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการผลิตคีเฟอรันควบคู่ไปกับการเติบโตโดยมีการผลิตคีเฟอรันสูงสุดที่ 120 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 0.90, 1.01, 1.03 และ 1.00 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้หางนมที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 2, 4, 6 และ 8 ตามลำดับ (Figure 10c) โดยปริมาณการผลิตคีเฟอรันเมื่อใช้หางนมที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 4, 6 และ 8 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับการใช้น้ำตาลรีดิวซ์พบว่า *L. kefiranofaciens* JCM 6985 สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้เท่ากับ 23.09, 26.30, 27.37 และ 29.42 กรัมต่อลิตร (Figure11a) คิดเป็นผลผลิตต่อหน่วยสับสเตรทได้ร้อยละ 3.9, 3.8, 3.8 และ 3.4 โดยน้ำหนัก เมื่อใช้ความเข้มข้นของหางนมที่มีน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นร้อยละ 2, 4, 6 และ 8 ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามในแต่ละชุดการทดลอง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ไม่สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้หมด ทั้งนี้เนื่องจากในการเติบโตของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการผลิตกรดแลคติกเป็นผลพลอยได้ ทำให้พีเอชของน้ำหมักลดลงน้อยกว่า 3.86 ซึ่งเป็นช่วงพีเอชที่กรดแลคติกมีผลยับยั้งการเติบโตของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ทำให้การใช้สับสเตรทสิ้นสุดลง (นงลักษณ์ สุวรรณพินิช และ ปรีชา สุวรรณพินิช, 2547; Cheirsilp, 2003) แต่หากมีการควบคุมพีเอชของระบบให้คงที่ตลอดการกระบวนการหมัก จะทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์และการผลิตคีเฟอรันได้เพิ่มขึ้น (Yeesang และคณะ, 2008; Gassem และคณะ, 1997) จากการพิจารณาประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 โดยการคำนวณอัตราการผลิตคีเฟอรันในช่วง 0-48 ชั่วโมง พบว่าการใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากหางนมร้อยละ 4 ทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันสูงที่สุดโดยมีค่าเท่ากับ 15.09 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่การใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากหางนมที่ความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 4 มีผลทำให้ประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ลดลงโดยมีค่าเท่ากับ 14.59 และ 14.42 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ในหางนมร้อยละ 6 และ 8 ตามลำดับ (Figure12) ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Cheirsilp และคณะ (2003)

ที่พบว่าการใช้น้ำตาลแลคโตสมากกว่าร้อยละ 4 มีผลทำให้อัตราการเติบโตจำเพาะและการใช้สารตั้งต้นจำเพาะของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ลดลง เช่นเดียวกับ Yeesang และคณะ (2008) ที่พบว่าการผลิตคีเฟอรันจากแป้งสาคูด้วยกระบวนการ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) หากใช้แป้งสาคูมากกว่าร้อยละ 4 มีผลทำให้อัตราการเติบโตและอัตราการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ลดลง ในขณะที่ Petryและคณะ (2000) พบว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสมากกว่าร้อยละ 1 มีผลทำให้ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ลดลง ทั้งนี้เป็นผลเนื่องจากความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่สูงเกินไปมีผลยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ (Bebic *et al.*, 2000) ดังนั้นในขั้นตอนการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จากหางนมที่เหมาะสมสำหรับการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* IFO 0216 จึงสรุปได้ว่าการใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากหางนมร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นความเข้มข้นที่มีความเหมาะสมที่ให้ประสิทธิภาพในการผลิตคีเฟอรันสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลรีดิวซ์จากหางนมร้อยละ 2, 6 และ 8

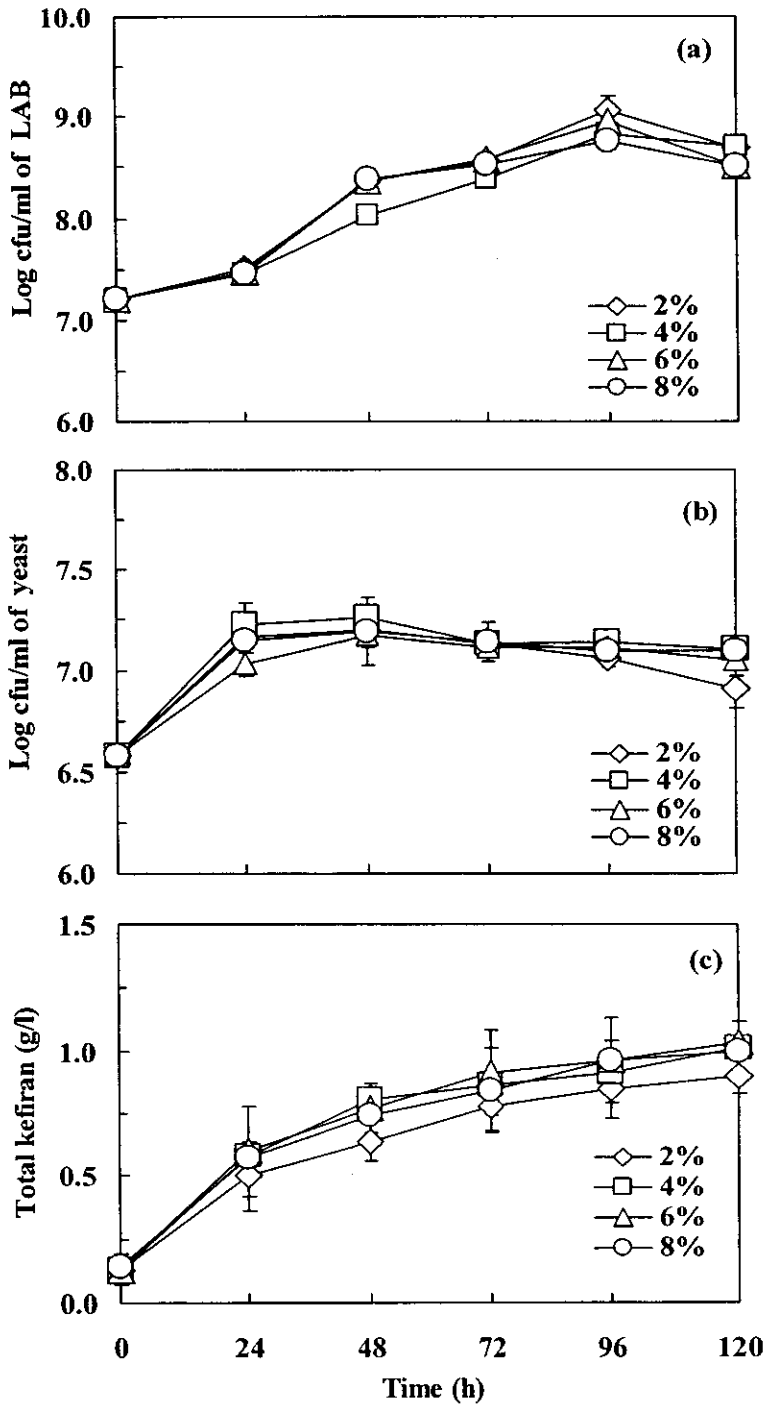

Figure 10. Effects of reducing sugar concentration from skim milk on cells growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 (a) and *S. cerevisiae* IFO 0216 (b) and total kefiran production (c) in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

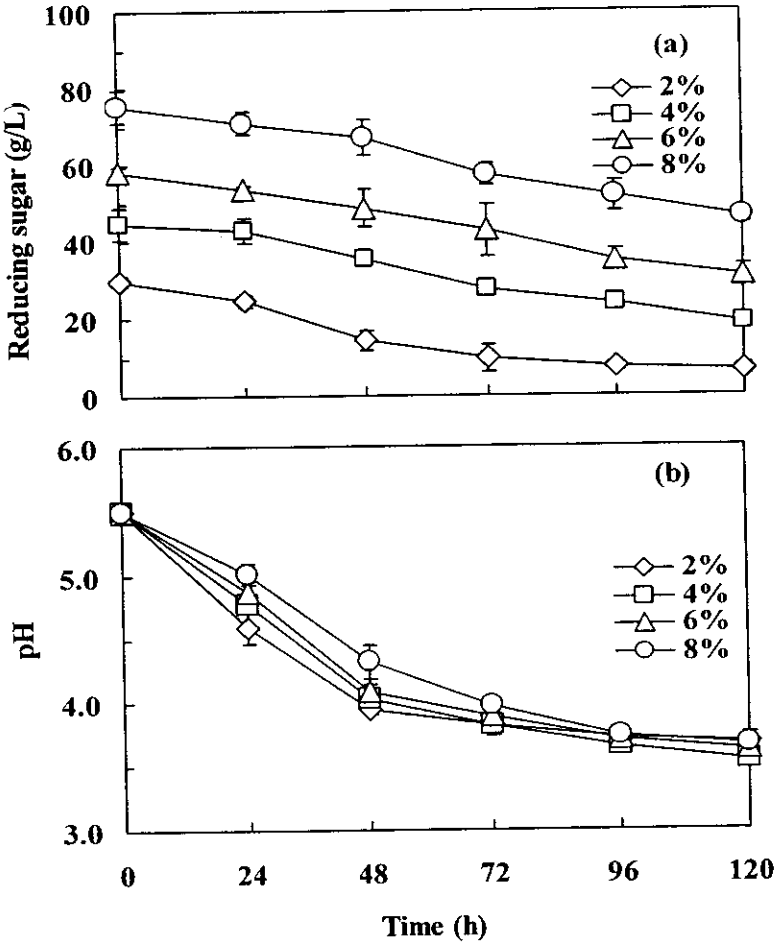

Figure 11. Effects of reducing sugar concentration from skim milk on reducing sugar (a) and pH (b) in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

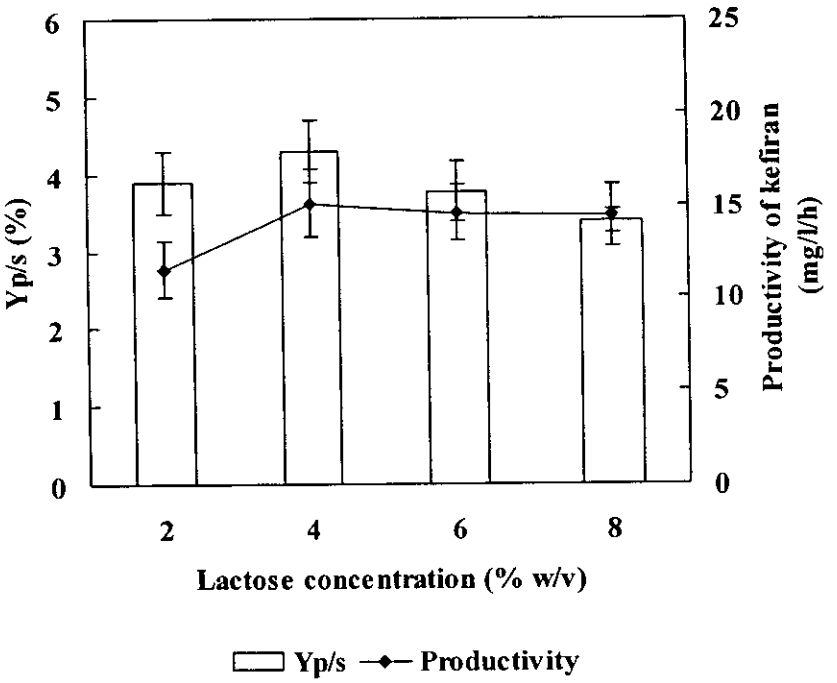

Figure 12. Effects of reducing sugar concentration from skim milk on $Y_{p/s}$ and productivity of kefiran by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

3.2 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

จากการคัดเลือกแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตคีเฟอรัน พบว่าการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนเพียงชนิดเดียวก็เพียงพอสำหรับการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ในการศึกษาความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่เหมาะสมสำหรับการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* IFO 0216 ในอาหารสูตร modified MRS-skim milk reducing sugar ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์จากหางนมร้อยละ 4 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้ความเข้มข้นยีสต์สกัดเท่ากับร้อยละ 2, 4, 5 และ 6 ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 13 และ 14 พบว่า *S. cerevisiae* IFO 0216 มีการเติบโตใกล้เคียงกันในทุกชุดการทดลอง โดยจะเติบโตสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง (Figure 13b) ในขณะที่พบว่าการเติบโตของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 เพิ่มขึ้นเมื่อใช้ยีสต์สกัดเพิ่มขึ้น โดยชุดการทดลองที่เติมยีสต์สกัดร้อยละ 6 *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการเติบโตสูงสุดเท่ากับ 1.4×10^{9} cfu/ml ที่ 96 ชั่วโมง (Figure 14a) และเมื่อพิจารณาการผลิตคีเฟอรันพบว่า *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 120 ซึ่งเมื่อใช้ยีสต์สกัดร้อยละ 2 พบว่า *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการผลิตคีเฟอรันได้เพียง 0.53 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยีสต์สกัดเป็นร้อยละ 4, 5 และ 6 *L. kefiranofaciens* JCM 6985 จะผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้นเป็น 1.07, 1.14 และ 1.19 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในเชิง

สถิติ (Figure 13c) ส่วนการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 พบว่าในทุกชุดการทดลองมีปริมาณการใช้ใกล้เคียงกันในช่วง 29-31 กรัมต่อลิตร (Figure 15a) สามารถคำนวณเป็นผลผลิตคีเฟอรันต่อหน่วยสับสเตรทได้ร้อยละ 1.8, 3.5, 3.7, และ 4.1 โดยน้ำหนัก เมื่อใช้ยีสต์สกัดเริ่มต้นร้อยละ 2, 4, 5 และ 6 ตามลำดับ จากการพิจารณาประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 โดยการคำนวณอัตราเร็วการผลิตคีเฟอรันในช่วง 0-48 ชั่วโมง พบว่าการใช้ยีสต์สกัดมากกว่าร้อยละ 2 เป็นแหล่งไนโตรเจน มีผลทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้น โดยจะเห็นได้ว่าการใช้ยีสต์สกัดเพิ่มเป็นร้อย 4 และ 5 ทำให้อัตราการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 เพิ่มขึ้นเป็น 15.2 และ 16.6 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามหากมีการใช้ยีสต์สกัดมากกว่าร้อยละ 5 จะพบว่าอัตราการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ลดลง ซึ่งผลการทดลองมีความสอดคล้องกับ Lo และคณะ (1997) ที่ศึกษาผลของสัดส่วนระหว่างกลูโคสกับยีสต์สกัดต่อการเติบโตและการผลิตแซนแทนของ *Xanthomonas campestris* และพบว่าสัดส่วนระหว่างกลูโคสกับยีสต์สกัดที่ลดลงหรือการเพิ่มปริมาณยีสต์สกัดมีผลทำให้ *X. campestris* มีอัตราการเติบโตเพิ่มขึ้นแต่อัตราการผลิตแซนแทนไม่เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับการทดลองของ Ricciardi และคณะ (2002) ที่พบว่าการใช้ยีสต์สกัด 4 กรัมต่อลิตรมีผลช่วยกระตุ้นให้ *S. thermophilus* มีการเติบโตและผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยีสต์สกัด 2 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเพิ่มปริมาณยีสต์สกัดเป็น 8 กรัมต่อลิตร พบว่า *S. thermophilus* มีการเติบโตเพิ่มขึ้นแต่การผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ไม่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากการมีแหล่งไนโตรเจนมากเกินไป ทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกมีการเติบโตอย่างรวดเร็ว และใช้แหล่งคาร์บอนในการสังเคราะห์เปปทิโดไกลแคนและกรดไทโคอิกซึ่งเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์มากกว่าการสังเคราะห์เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ (Gassem *et al.*, 1997) ดังนั้นในขั้นตอนการศึกษาความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่เหมาะสมสำหรับการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* IFO 0216 พบว่าการใช้ยีสต์สกัดร้อยละ 4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นความเข้มข้นที่มีความเหมาะสมที่ให้การผลิตคีเฟอรันและประสิทธิภาพการผลิตสูงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ยีสต์สกัดปริมาณร้อยละ 5 และ 6

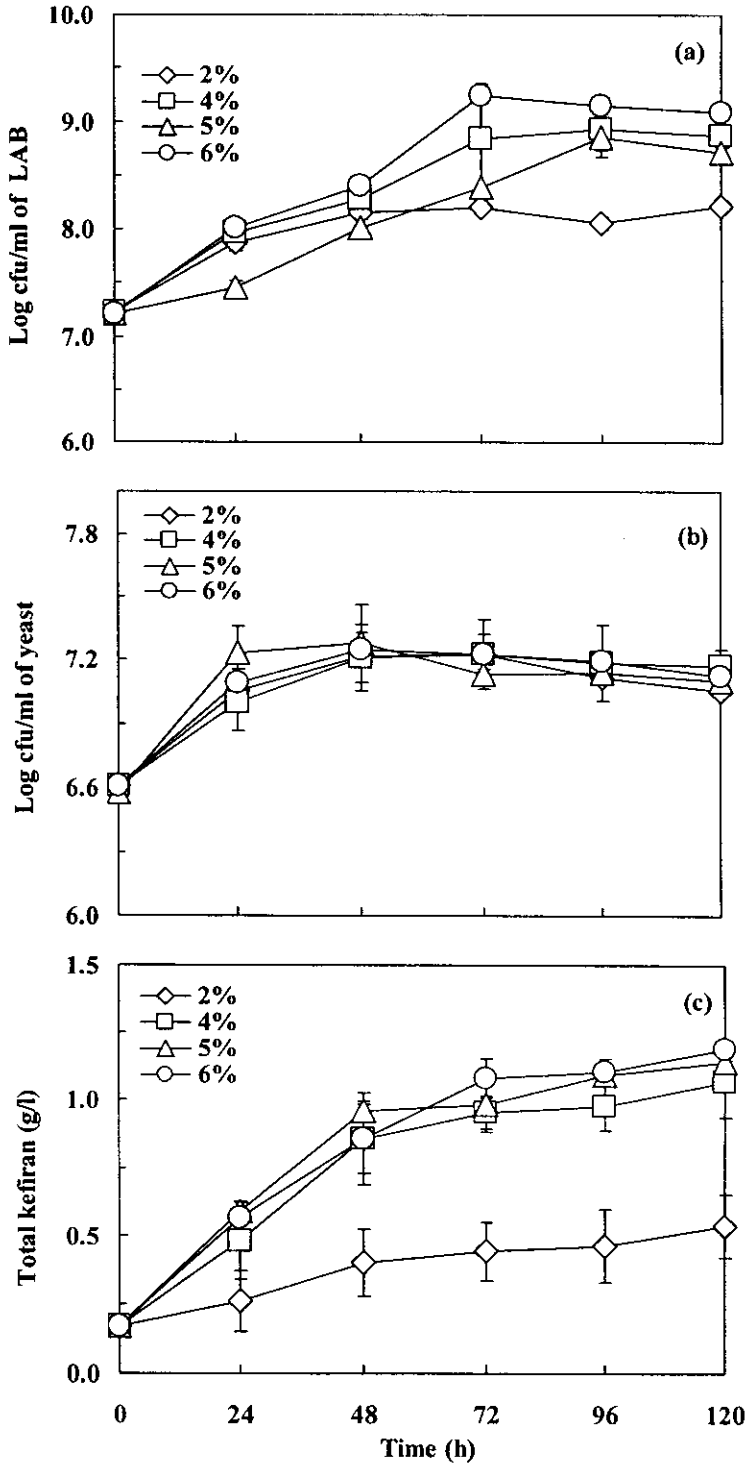

Figure 13. Effects of yeast extract concentration on cells growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 (a) and *S. cerevisiae* IFO 0216 (b) and total kefiran production (c) in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

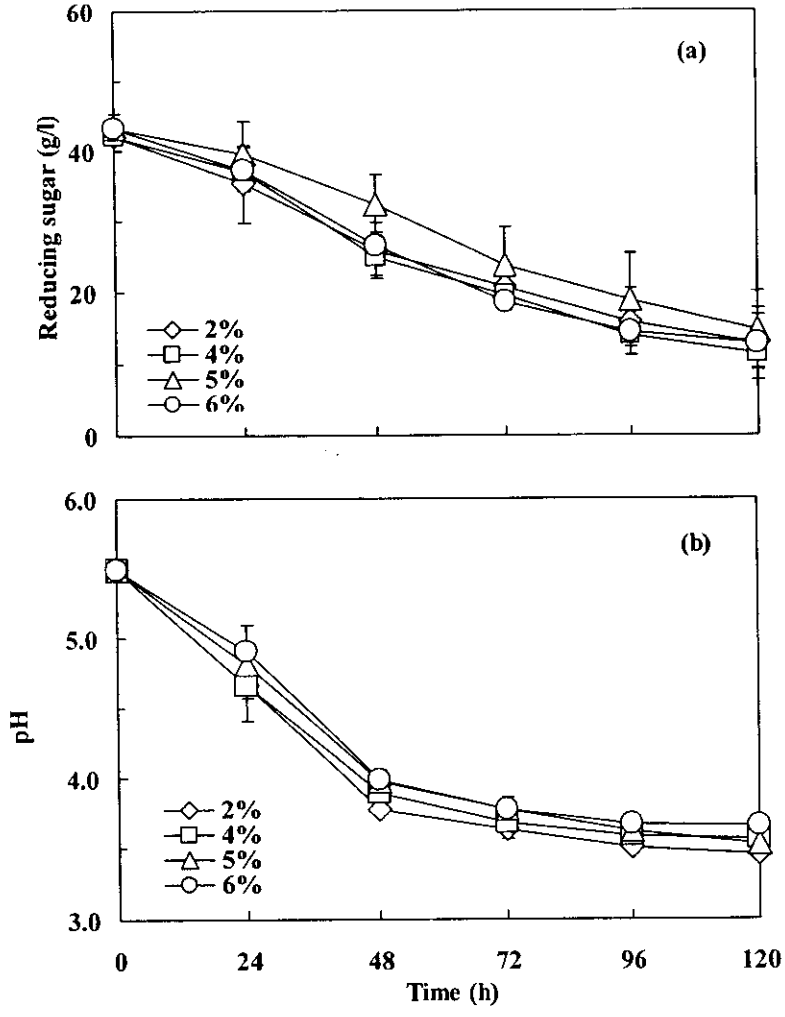

Figure 14. Effects of yeast extract concentration on reducing sugar (a) and pH (b) in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

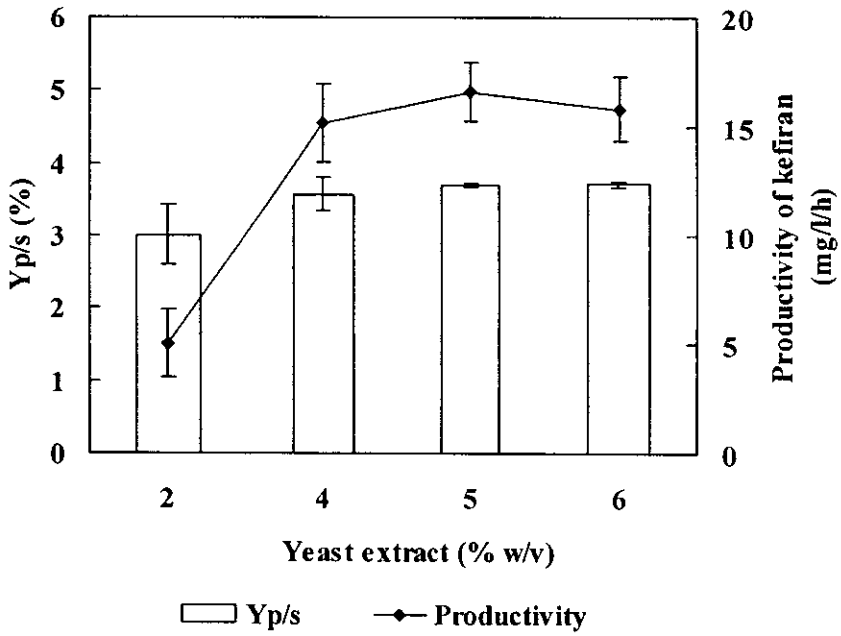

Figure 15. Effects of yeast extract concentration on $Y_{p/s}$ and productivity of kefiran by *L. kefiranofaciens* JCM6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

3.3 พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม

พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยทางเคมีที่เป็นตัวกำหนดทิศทางการเติบโตและการผลิตสารประกอบเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 จากการศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตคีเฟอรันโดย *L. kefiranofaciens* JCM 6985 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* IFO 0216 ในอาหารสูตร modified MRS-skim milk reducing sugar ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์และยีสต์สกัดปริมาณร้อยละ 4 เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ โดยมีพีเอชของอาหารเริ่มต้น 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 16 และ 17 พบว่า *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการเติบโตอย่างต่อเนื่องโดยมีปริมาณสูงสุดที่ 96 ชั่วโมง โดยชุดการทดลองที่มีพีเอชของอาหารเริ่มต้น 5.5 *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการเติบโตสูงสุดเท่ากับ 1.3×10^{9} cfu/ml ในขณะที่ชุดการทดลองที่มีพีเอชของอาหารเริ่มต้น 4.5 *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการเติบโตน้อยที่สุดโดยมีปริมาณเท่ากับ 4.6×10^{7} cfu/ml (Figure 16a) และพบว่า *S. cerevisiae* IFO 0216 มีการเติบโตสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง โดยชุดการทดลองที่มีพีเอชของอาหารเริ่มต้น 6.0 *S. cerevisiae* IFO 0216 มีการเติบโตสูงสุดเท่ากับ 2.0×10^{7} cfu/ml ในขณะที่ชุดการทดลองที่มีพีเอชของอาหารเริ่มต้น 4.5 *S. cerevisiae* IFO 0216 มีการเติบโตน้อยที่สุดเท่ากับ 1.0×10^{7} cfu/ml เช่นเดียวกับ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 (Figure 16b) สำหรับการผลิตคีเฟอรันพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ผลิตคีเฟอรันได้เท่ากับ 0.60, 0.72,

1.07 และ 0.86 กรัมต่อลิตรตามลำดับ (Figure 16c) และมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 20.5, 23.0, 30.6 และ 21.2 กรัมต่อลิตร (Figure 17a) คิดเป็นผลผลิตคีเฟอรันต่อหน่วยสับสเตรทได้ร้อยละ 2.9, 3.8, 3.6 และ 3.4 โดยน้ำหนักตามลำดับ (Figure 18) โดยในชุดการทดลองที่มีพีเอชของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้สูงสุด ในขณะที่ชุดการทดลองที่มีของอาหารเริ่มต้น 4.5 *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ได้น้อยที่สุด ทั้งนี้เป็นผลเนื่องจากระบบที่ใช้พีเอชเริ่มต้นต่ำ เมื่อปริมาณกรดแลคติกที่สะสมในน้ำหมักเพิ่มขึ้น จะทำให้พีเอชของระบบลดลงอย่างรวดเร็ว จึงทำให้การเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ลดลง และทำให้การใช้สับสเตรทของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 สิ้นสุดลง นอกจากนี้ยังพบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5 ทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีอัตราการผลิตคีเฟอรันสูงที่สุด 15.2 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่การเลี้ยงผสมในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 4.5 พบว่า *L. kefiranofaciens* JCM 6985 จะมีอัตราการผลิตคีเฟอรันน้อยที่สุด (Figure 18) เช่นเดียวกันการเติบโต การผลิตคีเฟอรัน และการใช้สับสเตรทของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ซึ่งผลการทดลองมีความสอดคล้องกับ Cheirsilp (2003) ที่ศึกษาผลของกรดแลคติกต่ออัตราการเติบโตจำเพาะและอัตราใช้สารตั้งต้นจำเพาะของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 พบว่าปริมาณกรดแลคติคในระบบที่เพิ่มขึ้นทำให้อัตราการเติบโตจำเพาะและอัตราการใช้สารตั้งต้นจำเพาะของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ลดลง เช่นเดียวกับ Velaso และคณะ (2006) ที่พบว่าปริมาณกรดแลคติกที่เพิ่มขึ้นทำให้ *Pediococcus parvulus* มีการเติบโตลดลง ดังนั้นในขั้นตอนการศึกษาพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* IFO 0216 พบว่าการเลี้ยงเชื้อผสมในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5 มีความเหมาะสมสำหรับการผลิตคีเฟอรัน ซึ่งผลการทดลองมีความสอดคล้องกับ Yokoi และคณะ (1991) ที่พบว่า *Lactobacillus* sp. KPB-167 (*L. kefiranofaciens*) มีการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันได้ดีที่สุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5 เช่นเดียวกับ Cheirsilp และคณะ (2003) ที่พบว่า *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารสูตร Man-Rogosa Sharpe lactose (MRSL) ที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5 นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Yeesang และคณะ (2008) ที่ศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 เมื่อใช้แป้งสาคูเป็นวัตถุดิบก็พบว่า *L. kefiranofaciens* JCM 6985 สามารถเติบโตและผลิตคีเฟอรันได้สูงสุด เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5 ในขณะที่ Taniguchi และคณะ (2001) พบว่าการเลี้ยง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ภายใต้ระบบที่มีการควบคุมพีเอชตลอดกระบวนการหมัก ทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับ Gassem และคณะ (1997) ที่พบว่า *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* RR มีการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้น เมื่อเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะที่มีการควบคุมพีเอช

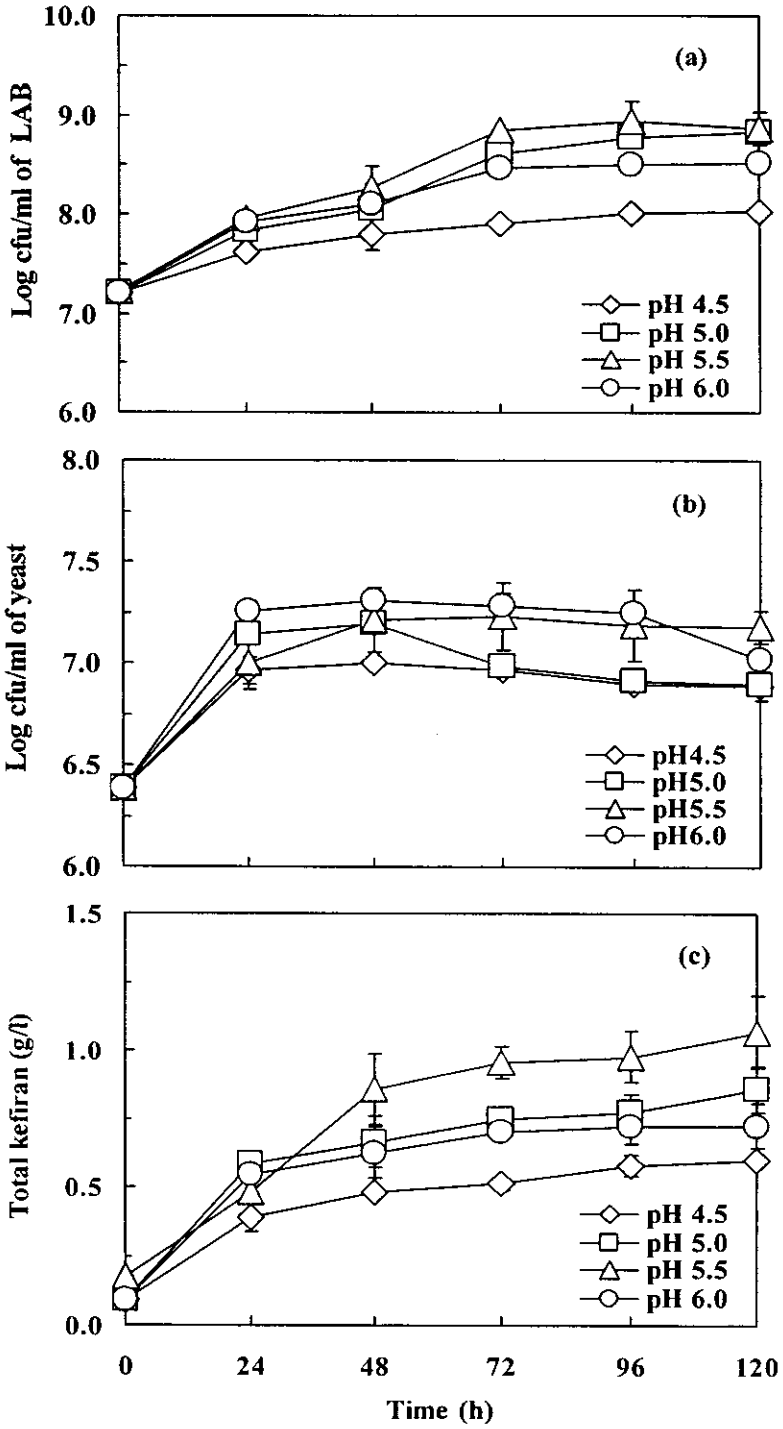

Figure 16. Effects of initial pH on cells growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 (a) *S. cerevisiae* IFO 0216 (b) and total kefiran production in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

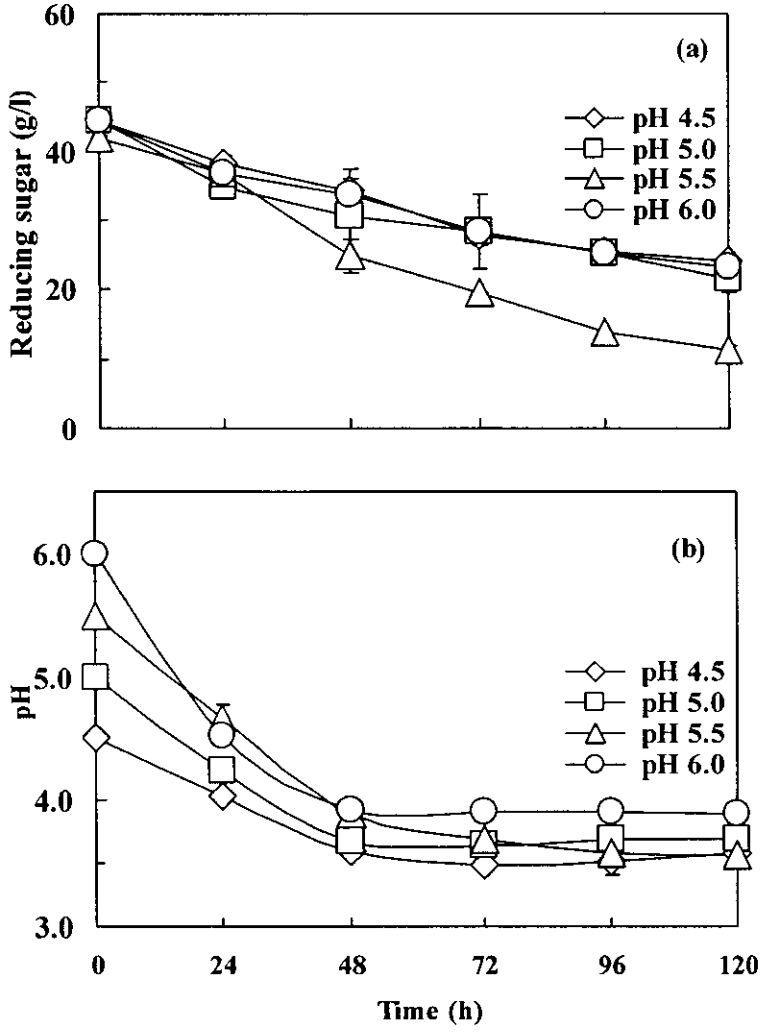

Figure 17. Effects of initial pH on reducing sugar (a) and pH (b) in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

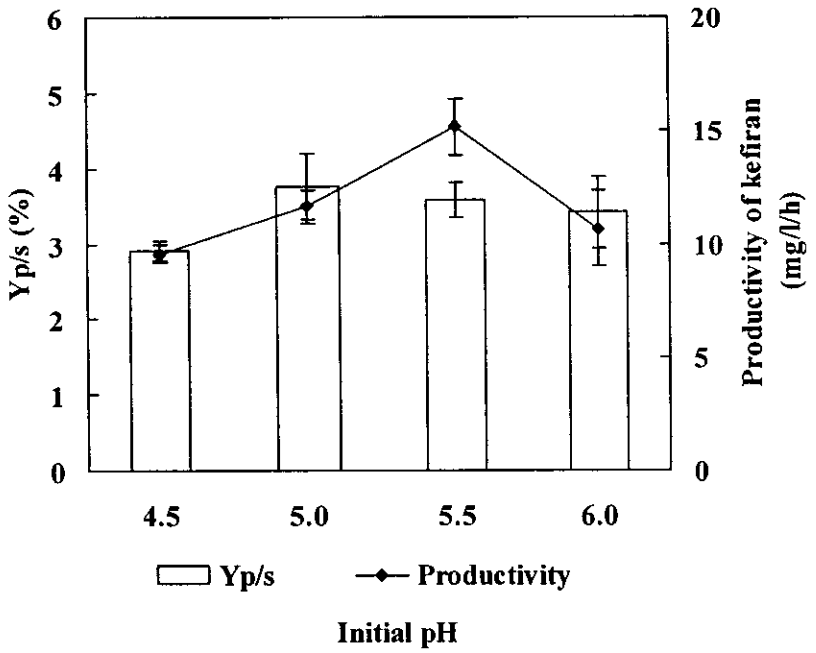

Figure 18. Effects of initial pH on $Y_{p/s}$ and productivity of kefiran by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

3.4 ปริมาณยีสต์ที่เหมาะสม

ในการศึกษาปริมาณ *S. cerevisiae* IFO 0216 เริ่มต้นต่อการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 เมื่อเลี้ยงร่วมกันในอาหารสูตร modified MRS-skim milk reducing sugar ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์และยีสต์สกัดร้อยละ 4 เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ พีเอชของอาหารเริ่มต้น 5.5 โดยใช้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 เริ่มต้นเท่ากับ 2.1×10^7 cfu/ml และใช้ปริมาณยีสต์เริ่มต้นแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 1.6×10^6, 4.0×10^6 และ 9.1×10^6 cfu/ml ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 19 และ 20 พบว่าการเพิ่มปริมาณยีสต์ทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการเติบโตเพิ่มขึ้นและสูงสุดที่ 96 ชั่วโมงเท่ากับ 4.5×10^8, 8.5×10^8 และ 2.3×10^9 cfu/ml เมื่อเลี้ยงร่วมกับปริมาณยีสต์เริ่มต้นเท่ากับ 1.6×10^6, 4.0×10^6 และ 9.1×10^6 cfu/ml ตามลำดับ (Figure 19a) และพบว่ายีสต์มีการเติบโตสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง และหลังจากนั้นการเติบโตของยีสต์จะลดลงในทุกชุดการทดลอง ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากการเพาะเลี้ยงในสภาวะดังกล่าวมีปริมาณออกซิเจนในระบบน้อยไม่เพียงพอสำหรับการเติบโตของยีสต์ (Figure 19b) และเมื่อพิจารณาการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 พบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ปริมาณยีสต์เริ่มต้นเพิ่มขึ้น โดยจะมีการผลิตคีเฟอรันสูงสุดเท่ากับ 0.90, 1.07 และ 1.15 กรัมต่อลิตรที่ 120 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงร่วมกับยีสต์ในปริมาณเริ่มต้นเท่ากับ 1.6×10^6, 4.0×10^6 และ 9.1×10^6 cfu/ml ตามลำดับ (Figure 19c) สำหรับปริมาณการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ในแต่ละชุดการทดลองพบว่าอยู่ในช่วง 29-30 กรัมต่อลิตร (Figure 20a) ซึ่งคิดเป็นผลผลิตคีเฟอรันต่อหน่วยสับสเตรทได้ร้อยละ 3.0, 3.6 และ 3.8 โดยน้ำหนัก และพบว่า *L.*

kefiranofaciens JCM 6985 จะมีประสิทธิภาพในการผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ปริมาณยีสต์เริ่มต้นเพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก *S. cerevisiae* IFO 0216 เป็นยีสต์ที่สามารถใช้กรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเติบโตได้ ดังนั้นการเพิ่มปริมาณยีสต์จึงทำให้ปริมาณการสะสมของกรดแลคติกในน้ำหมักลดลง ส่งผลให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 สามารถเติบโตและผลิตคีเฟอรันได้เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ Cheirsilp และคณะ (2003) ที่พบว่า *S. cerevisiae* IFO 0216 สามารถใช้กรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเติบโตได้ จึงทำให้ระบบที่เลี้ยง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ร่วมกับ *S. cerevisiae* IFO 0216 มีการสะสมของกรดแลคติกเพียง 63 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อเดี่ยวของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีกรดแลคติกสะสมในระบบสูงกว่า 100 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบว่าการสัมผัสกันระหว่าง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 กับ *S. cerevisiae* IFO 0216 ทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 สามารถผลิตคีเฟอรันได้เพิ่มขึ้น (Cheirsilp, 2003) แต่อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้พบว่าการเพิ่มปริมาณยีสต์เริ่มต้นมากกว่า 4.0×10^6 cfu/ml ไม่ได้ส่งเสริมให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีอัตราการผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้น (Figure 21) ซึ่งสอดคล้องกับที่ Cheirsilp (2003) ศึกษาผลของปริมาณ *S.cerevisiae* IFO 0216 เริ่มต้นต่อการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ภายใต้สภาวะไร้อากาศ และพบว่าสัดส่วนของยีสต์ที่เพิ่มขึ้นไม่มีส่วนช่วยให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากภายใต้สภาวะไร้อากาศ *S. cerevisiae* IFO 0216 ไม่สามารถเติบโตได้เท่าที่ควร จึงทำให้การใช้กรดแลคติกเกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์ ในขณะที่ Tada และคณะ (2007) ศึกษาการพัฒนาและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 โดยการเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* IFO 0216 ภายใต้การหมักแบบกึ่งกะ โดยมีปริมาณ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 และ *S. cerevisiae* IFO 0216 เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^8 cfu /ml และ 4×10^7 cfu/ml ตามลำดับ ส่งผลให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการผลิตคีเฟอรันสูงถึง 6.3 กรัมต่อลิตร โดยมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ 190 กรัม คิดเป็นผลผลิตต่อหน่วยสับสเตรทได้เท่ากับ 0.033 กรัมต่อกรัมสับสเตรท จากการศึกษาปริมาณของยีสต์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 พบว่าปริมาณยีสต์เริ่มต้นที่ 4.0×10^6 และ 9.1×10^6 cfu/ml ให้การผลิตคีเฟอรันไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงเลือกใช้ปริมาณยีสต์เริ่มต้นเท่ากับ 4.0×10^6 cfu/ml ในการศึกษาขั้นต่อไป

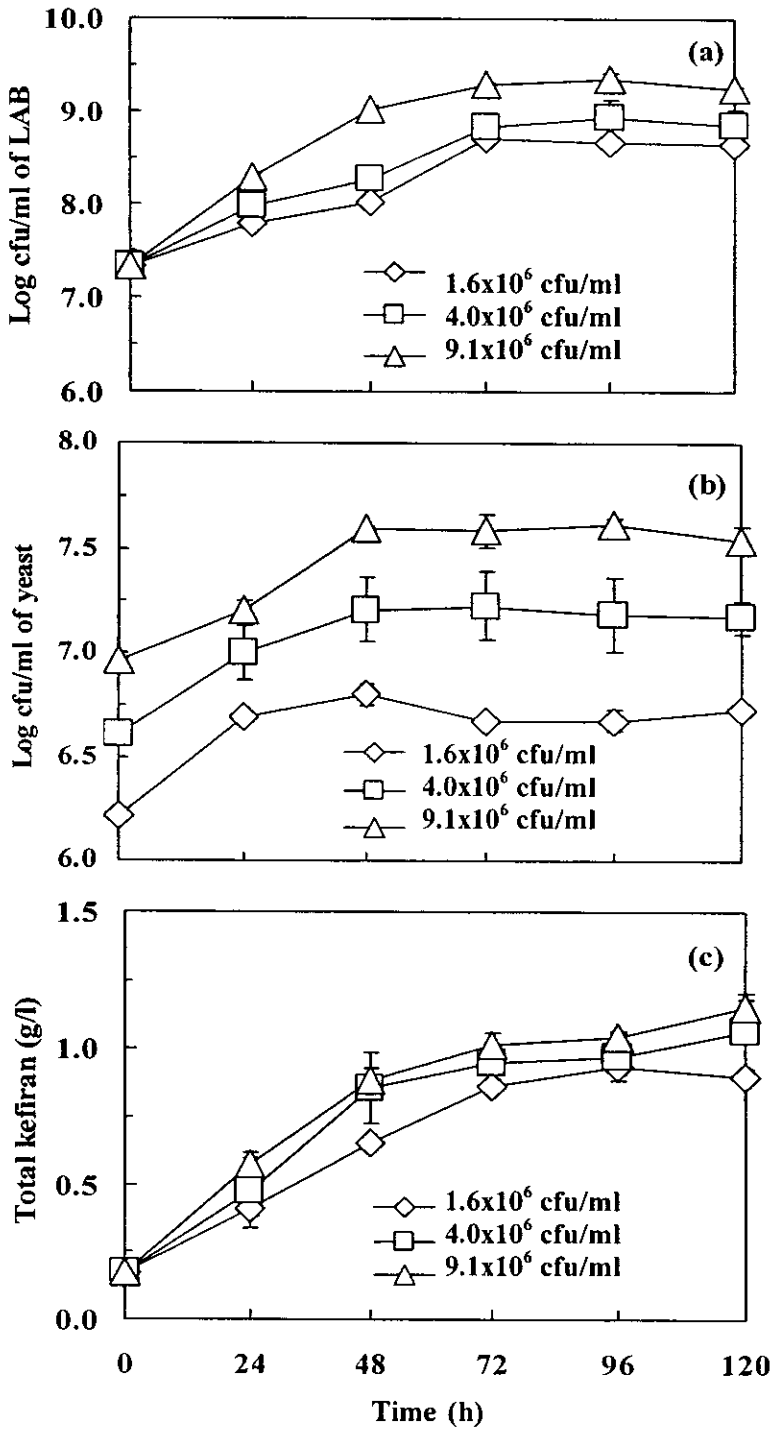

Figure 19. Effects of yeast amount on cells growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 (a) and *S. cerevisiae* IFO0216 (b) and total kefiran production (c) in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

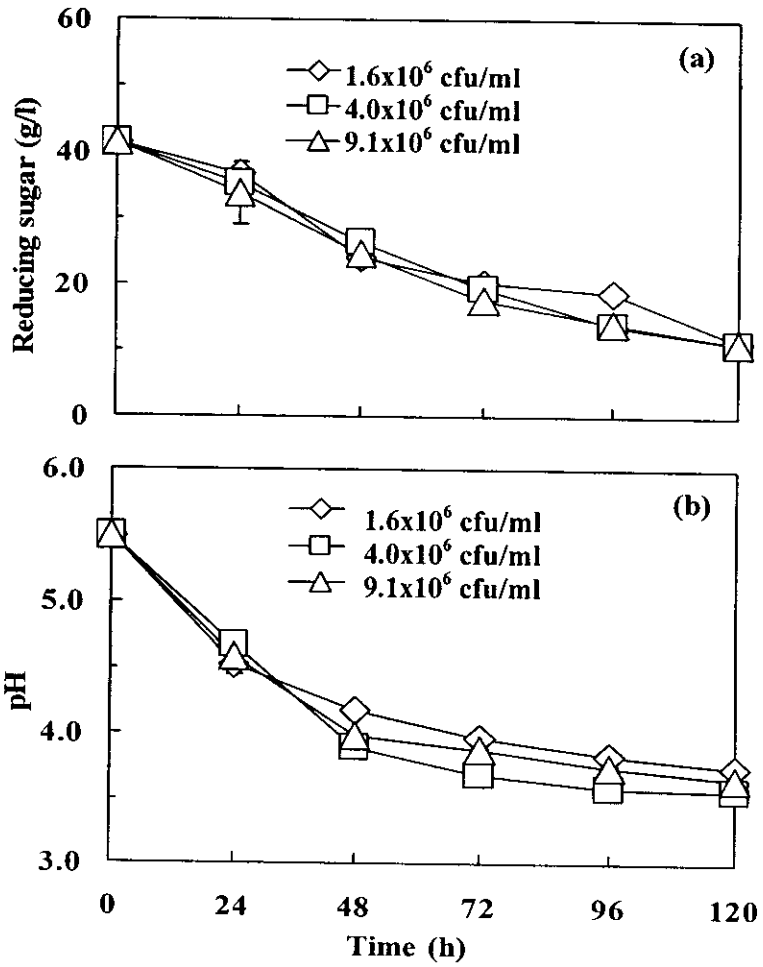

Figure 20. Effects of yeast amount on reducing sugar (a) and pH (b) in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

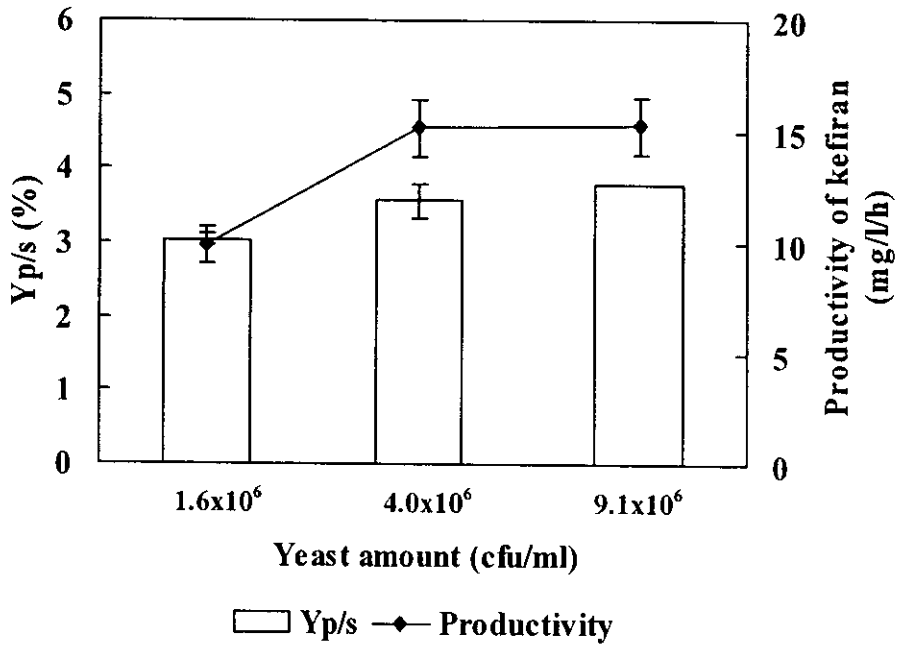

Figure 21. Effects of yeast amount on $Y_{p/s}$ and productivity of kefiran by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

4. การผลิตคีเฟอรันในถังหมัก

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* IFO 0216 ซึ่งเป็นยีสต์ที่สามารถพบได้ในก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรนและมีสมบัติช่วยส่งเสริมการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 จึงนำไปสู่การศึกษาการผลิตคีเฟอรันโดยเชื้อผสมในถังหมักแบบกะ (batch culture) และกึ่งกะ (fed-batch culture)

4.1 การหมักแบบกะ

จากการศึกษาการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* IFO 0216 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่บรรจุอาหารสูตร modified MRS-skim milk reducing sugar ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์จากหางนมและยีสต์สกัดร้อยละ 4 เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ พีเอชของอาหารเริ่มต้น 5.5 ปริมาตร 1 ลิตร ภายใต้การเลี้ยง 3 สภาวะคือ สภาวะที่ไม่มีการให้อากาศ สภาวะที่มีการให้อากาศโดยมีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำร้อยละ 5 ของออกซิเจนละลายน้ำอิ่มตัว และสภาวะที่มีการให้อากาศโดยมีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำร้อยละ 5 ของออกซิเจนละลายน้ำอิ่มตัวร่วมกับการควบคุมพีเอชที่ 5.5 ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 22 และ 23 พบว่าการเลี้ยงเชื้อผสมภายใต้ระบบที่มีการให้อากาศร่วมกับการควบคุมพีเอช มีผลทำให้ *S. cerevisiae* IFO0216 มีการเติบโตเพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.4×10^8 ที่ 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อผสมภายใต้สภาวะที่ไม่

มีการให้อากาศ จากการเติบโตของ *S. cerevisiae* IFO 0216 ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีการให้อากาศและการควบคุมพีเอช จึงส่งผลให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้น โดย *L. kefiranofaciens* JCM สามารถผลิตคีเฟอรันได้ 2.58 กรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 120 ชั่วโมง และเมื่อพิจารณาปริมาณการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 พบว่าภายใต้สภาวะที่มีการให้อากาศร่วมกับการควบคุมพีเอชทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ 43 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อผสมภายใต้สภาวะที่ไม่มีการให้อากาศ พบว่ามีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เพียง 27 กรัมต่อลิตร ซึ่งคำนวณเป็นผลผลิตต่อหน่วยสับสเตรทได้ร้อยละ 5.9 และ 4.5 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ส่วนประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ซึ่งสามารถคำนวณจากอัตราเร็วการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ในช่วง 0-48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อผสมภายใต้สภาวะที่ไม่มีการให้อากาศ สภาวะที่มีการให้อากาศ และสภาวะที่มีการให้อากาศร่วมกับการควบคุมพีเอช *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีอัตราการผลิตคีเฟอรัน 14.49, 16.47 และ 20.27 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ โดยจะเห็นว่าการเลี้ยงเชื้อผสมภายใต้สภาวะที่ไม่ได้ให้อากาศ *S. cerevisiae* IFO 0216 มีการเติบโตน้อย ทำให้พีเอชของระบบลดลงอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ถูกยับยั้งการเติบโตด้วยกรดแลคติก ส่วนการเลี้ยงเชื้อผสมภายใต้สภาวะที่มีการให้อากาศ พบว่ามีผลทำให้ *S. cerevisiae* IFO 0216 มีการเติบโตเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อผสมภายใต้สภาวะที่ไม่ได้ให้อากาศ แต่อย่างไรก็ตามพีเอชของระบบยังคงลดลง ทั้งนี้เนื่องจากในกระบวนการเมแทบอลิซึมของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ภายใต้ระบบที่มีน้ำตาลรีดิวซ์มากกว่า 20 กรัมต่อลิตร แบคทีเรียกรดแลคติกจะมีการขับน้ำตาลกาแลคโตสบางส่วน ซึ่งเป็นผลผลิตจากการสลายน้ำตาลรีดิวซ์ออกสู่ภายนอกเซลล์ (Cheirsilp, 2003) ซึ่งอาจทำให้ *S. cerevisiae* IFO 0216 ใช้น้ำตาลกาแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนมากกว่ากรดแลคติก ดังนั้น พีเอชของระบบจึงยังคงลดลง อย่างไรก็ตาม Cheirsilp และคณะ (2003) มีรายงานว่า *S. cerevisiae* IFO 0216 มีส่วนช่วยส่งเสริมการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 โดยการสัมผัสกันระหว่าง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 กับ *S. cerevisiae* IFO 0216 ทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการสร้างคีเฟอรันในส่วนที่เกาะรอบเซลล์ (capsular kefiran) เพิ่มขึ้น จึงทำให้ปริมาณคีเฟอรันทั้งหมดเพิ่มขึ้น สำหรับการเลี้ยงเชื้อผสมภายใต้สภาวะที่มีการให้อากาศร่วมกับการควบคุมพีเอชพบว่า *S. cerevisiae* IFO 0216 มีการเติบโตได้ดี และพีเอชของระบบที่คงที่ ทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ไม่ถูกยับยั้งการเจริญด้วยกรดแลคติก ส่งผลให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้น ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Cheirsilp (2003) ที่พบว่าการเลี้ยงเชื้อผสมภายใต้สภาวะที่มีการให้อากาศทำให้ *S. cerevisiae* IFO 0216 มีการเติบโตและการใช้กรดแลคติกเพิ่มขึ้น ในขณะที่การควบคุมพีเอชของระบบทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้น

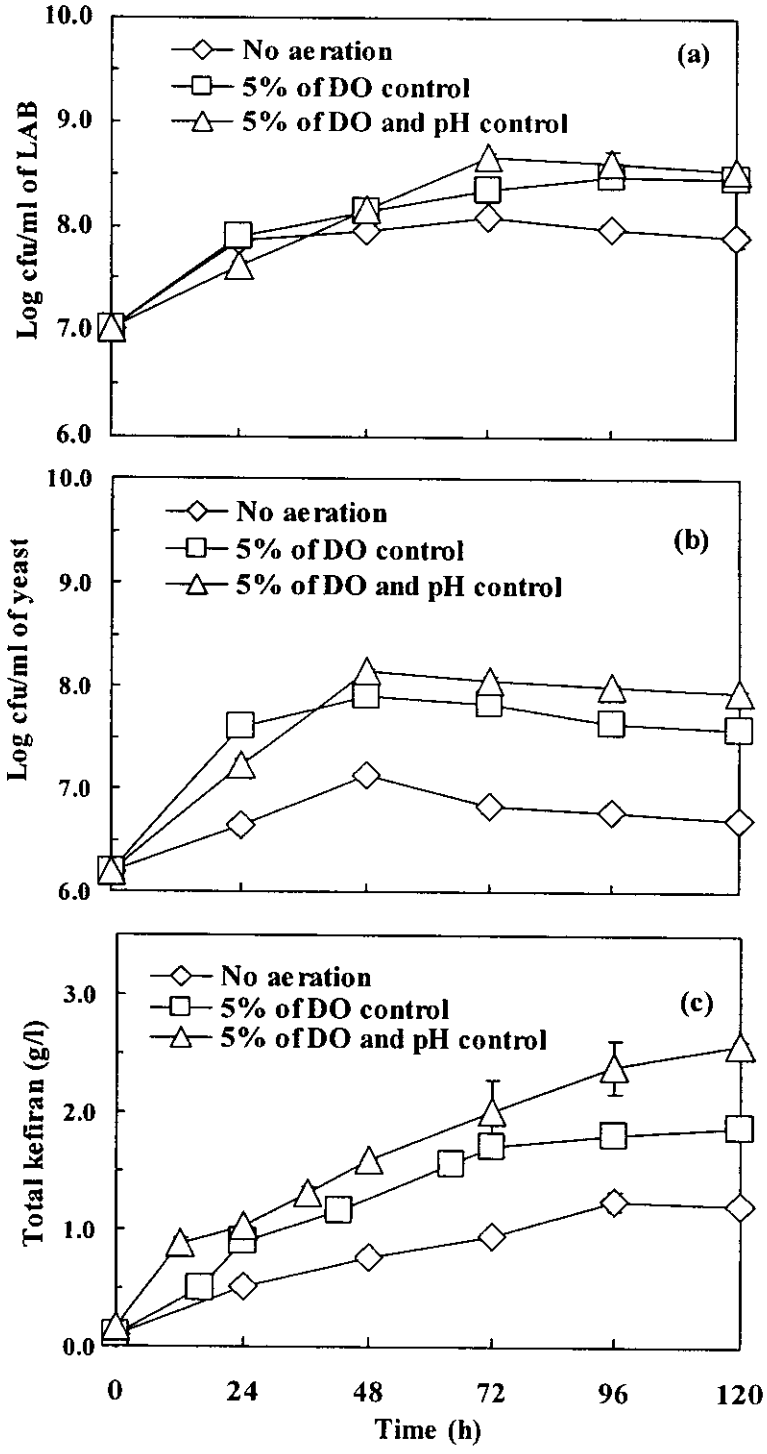

Figure 22. Effects of aeration on cells growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 (a) and *S. cerevisiae* IFO 0216 (b) and total kefiran production (c) of the mixed culture in batch culture at room temperature.

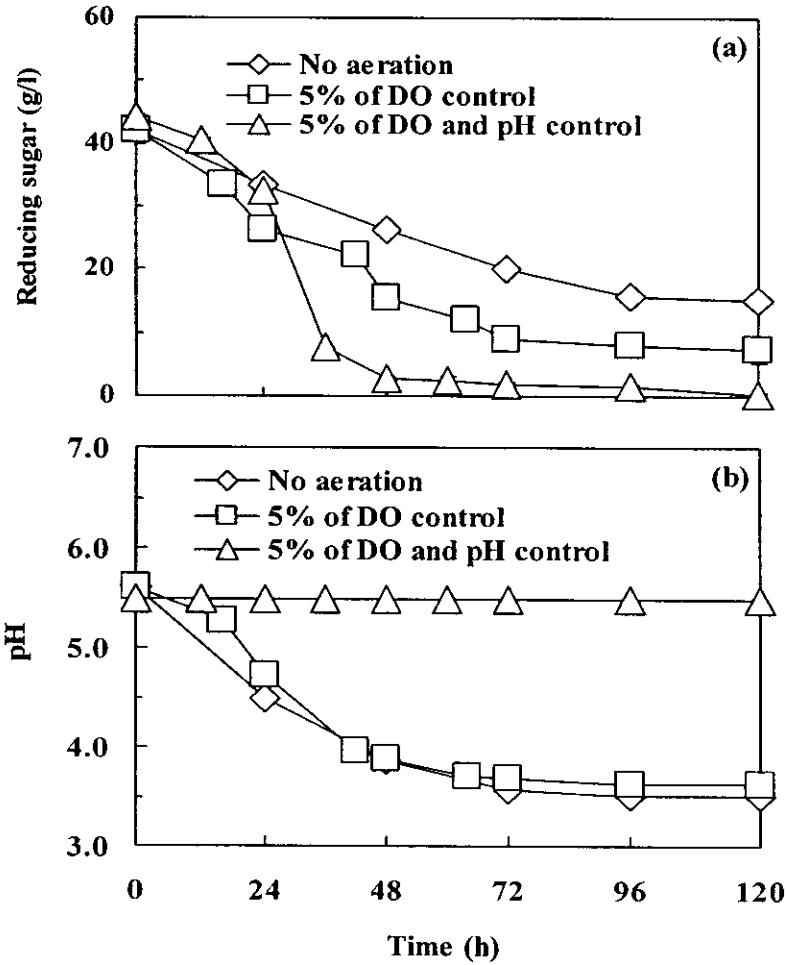

Figure 23. Effects of aeration on reducing sugar (a) and pH (b) of the mixed culture in batch culture at room temperature.

เช่นเดียวกับ Petry และคณะ(2000) และ Gassem และคณะ (1997) ที่พบว่าการเลี้ยง *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ภายใต้ระบบที่มีการควบคุมพีเอช ทำให้เชื้อมีการเติบโตและการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อภายใต้ระบบที่ไม่มีการควบคุมพีเอช

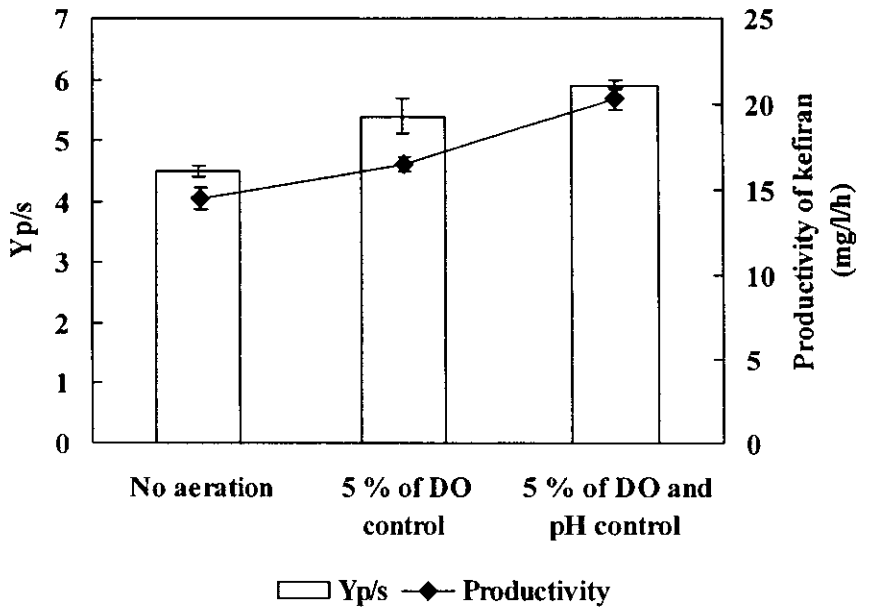

Figure 24. Yield and productivity of kefiran by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture of batch culture at room temperature.

4.2 การหมักแบบกึ่งกะ

จากการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์จากหางนมเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น ทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้น แต่การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นที่สูงเกินไป จะมีผลยับยั้งการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 (Cheirsilp *et al.*, 2001) ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงนำไปสู่การศึกษาการหมักแบบกึ่งกะ โดยการเติมสารอาหารใหม่ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์จากหางนม 30 กรัม ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เข้าสู่ระบบที่ชั่วโมงที่ 24 และ 48 เพื่อรักษาระดับความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในระบบให้คงที่ที่ 40 กรัมต่อลิตร เนื่องจากในขั้นตอนการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหมาะสม พบว่าการใช้น้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร ทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันสูงสุด ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 25 พบว่าภายใต้การหมักแบบกึ่งกะ ทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการเติบโตสูงกว่าการหมักแบบกะ (Figure 25a) ในขณะที่พบว่าการเติบโตของ *S. cerevisiae* IFO 0216 ใกล้เคียงกันทั้งการหมักแบบกะและกึ่งกะ (Figure 25b) และพบว่าในการหมักแบบกึ่งกะทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ผลิตคีเฟอรันสูงสุดเท่ากับ 3.25 กรัมต่อลิตร ที่ 96 ชั่วโมง โดยมีการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ 86.3 กรัม คิดเป็นผลผลิตต่อสับสเตรทได้ร้อยละ 5.6 โดยน้ำหนัก ในขณะที่การหมักแบบกะ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ผลิตคีเฟอรันได้เพียง 2.58 กรัมต่อลิตร (Figure 25c) คิดเป็นผลผลิตต่อสับสเตรทเท่ากับร้อยละ

5.9 โดยน้ำหนัก สำหรับประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 พบว่า *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีอัตราการผลิตคีเฟอรัน 22.6 และ 35.9 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อหมักแบบกะและกึ่งกะตามลำดับ โดยจะเห็นว่าการหมักแบบกึ่งกะ ทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้น ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Cheirsilp และคณะ (2003) ที่พบว่า *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* IFO 0216 ภายใต้การหมักแบบกึ่งกะ โดย *L. kefiranofaciens* JCM 6985 สามารถผลิตคีเฟอรันได้ 4.14 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าการหมักแบบกะที่ผลิตคีเฟอรันได้เพียง 2.64 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับ Tada และคณะ (2007) ที่พบว่าการเลี้ยง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ร่วมกับ *S. cerevisiae* IFO 0216 ภายใต้การหมักแบบกึ่งกะ ที่มีการเติมสารอาหารใหม่แบบ feedback และ feedforword ในช่วงชั่วโมงที่ 96-102 โดยใช้พีเอชของระบบเป็นตัวควบคุมปริมาณการเติมสารอาหาร เพื่อควบคุมสมดุลการเติบโตระหว่าง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 กับ *S. cerevisiae* IFO 0216 มีผลทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 สามารถผลิตคีเฟอรันได้ 6.3 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าการหมักแบบกะที่ผลิตคีเฟอรันได้เพียง 4.5 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตต่อหน่วยสับสเตรทได้ 0.033 กรัมต่อกรัมแลคโตส และ 0.027 กรัมต่อกรัมแลคโตส ตามลำดับ นอกจากนี้ Kim และคณะ (2006) พบว่าการหมัก *Ganoderma resinaceum* แบบกึ่งกะที่มีการเติมสารอาหารใหม่เมื่อระยะเวลาผ่านไป 6 วัน ทำให้ *G. Resinaceum* สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้เพิ่มขึ้นเท่ากับ 3.04 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบกะที่ผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้เพียง 1.49 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับ Tang และคณะ (2002) ที่พบว่าการหมัก *G. lucidum* แบบกึ่งกะ โดยมีการเติมสารอาหารใหม่ในวันที่ 10 ทำให้ *G. lucidum* สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์เพิ่มขึ้นเป็น 0.87 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบกะที่ผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้เพียง 0.61 กรัมต่อลิตร

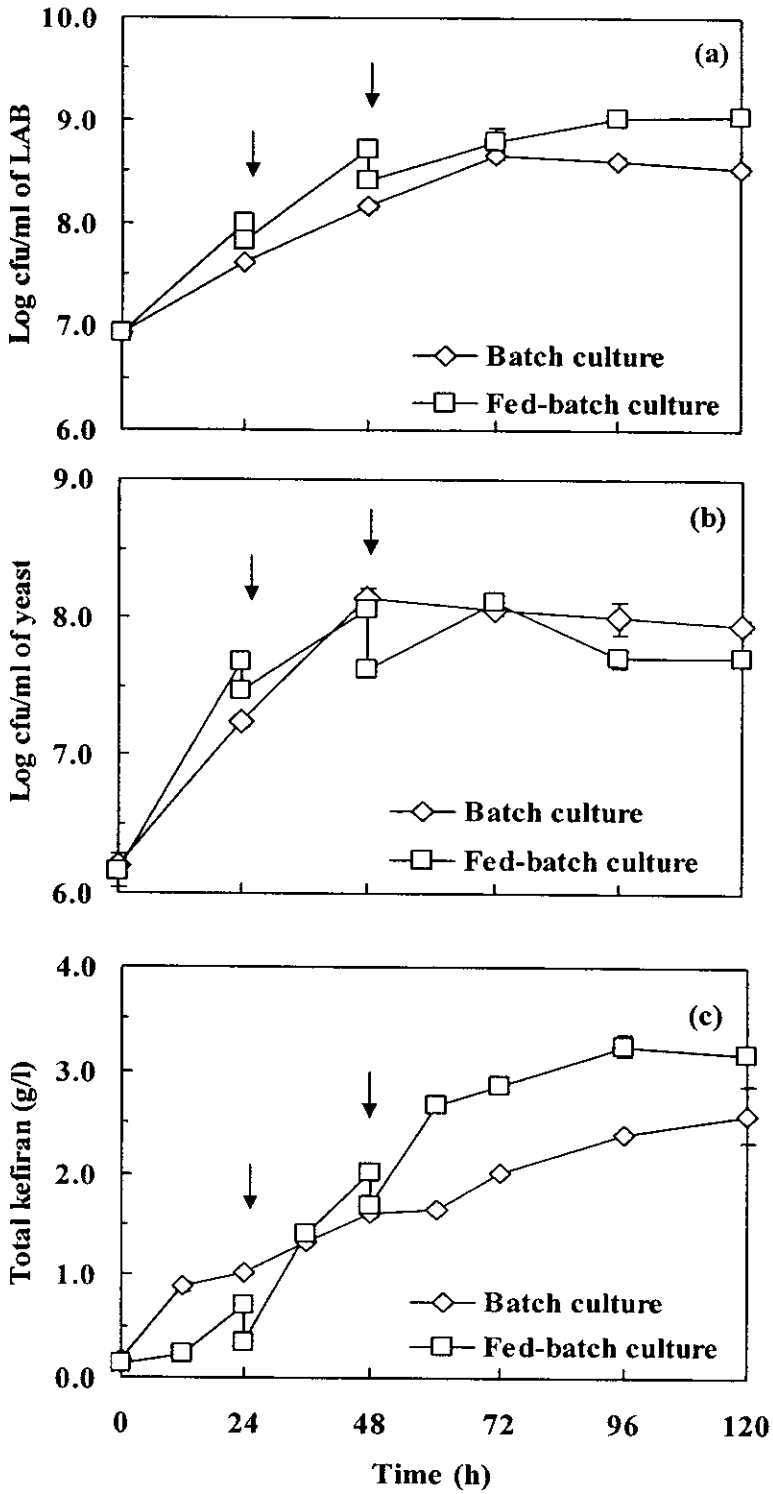

Figure 25. Cells growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 (a) and *S. cerevisiae* IFO 0216 (b) and total kefiran production (c) of the mixed culture in batch and fed batch culture. Arrows indicated lactose addition time in fed-batch culture at room temperature.

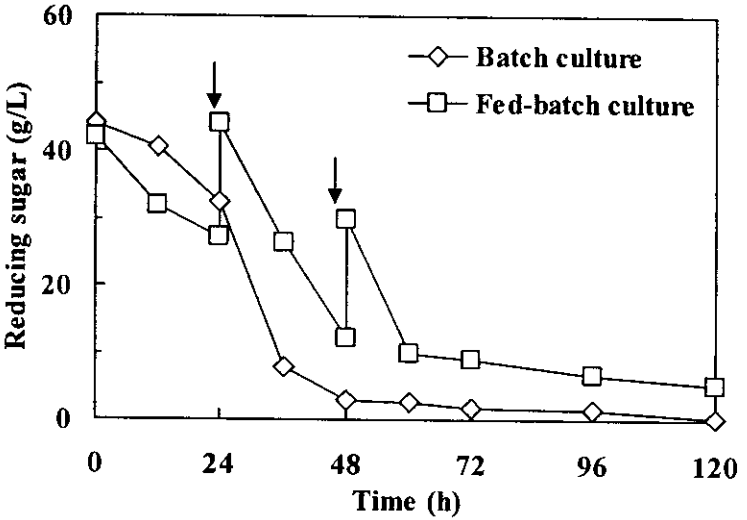

Figure 26. Reducing sugar of the mixed culture in batch and fed batch culture. Arrows indicated lactose addition time in fed-batch culture at room temperature.

บทที่ 4

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์เพื่อเลี้ยงร่วมกับ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ในการผลิตคีเฟอรันพบว่า *S. cerevisiae* IFO 0216 เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสม เนื่องจาก *S. cerevisiae* IFO 0216 สามารถใช้กรดแลคติกเป็นแหล่งคาร์บอนได้ อีกทั้งมีสมบัติช่วยส่งเสริมการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ทั้งภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่าและมีการให้อากาศโดยการเขย่าด้วยความเร็ว 60 รอบต่อนาที โดยพบว่าการเลี้ยงเชื้อผสมระหว่าง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 กับ *S. cerevisiae* IFO 0216 ภายใต้สภาวะที่มีการเขย่า ทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 สามารถผลิตคีเฟอรันได้สูงสุด 0.94 กรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 120 ซึ่งสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อเดี่ยวที่ผลิตได้เพียง 0.57 กรัมต่อลิตร และการเลี้ยงเชื้อผสมภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่าที่ผลิตได้ 0.81 กรัมต่อลิตร และพบว่าการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์เพียงชนิดเดียวก็เพียงพอสำหรับการเติบโตและการผลิตคีเฟอรัน ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคีเฟอรันโดยเชื้อผสมระหว่าง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 กับ *S. cerevisiae* IFO 0216 พบว่าอาหารสูตร modified MRS-skim milk reducing sugar ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์จากหางนมและยีสต์สกัดเริ่มต้นร้อยละ 4 เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน พีเอชของอาหารเริ่มต้น 5.5 โดยมีปริมาณ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 และ *S. cerevisiae* IFO 0216 เริ่มต้นเท่ากับ 2.1×10^{7} cfu/ml และ 4.0×10^{6}cfu/ml ตามลำดับ ภายใต้สภาวะที่มีการกวนด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 สามารถผลิตคีเฟอรันได้สูงสุด 1.07 กรัมต่อลิตร และมีประสิทธิภาพการผลิตเท่ากับ 15.2 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และจากการศึกษาการผลิตคีเฟอรันโดยเชื้อผสมระหว่าง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 กับ *S. cerevisiae* IFO 0216 ภายในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่บรรจุอาหารปริมาตร 1 ลิตร พบว่าการหมักแบบกะภายใต้ระบบที่มีการให้อากาศโดยมีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำร้อยละ 5 ร่วมกับการควบคุมพีเอชที่ 5.5 ทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 สามารถผลิตคีเฟอรันได้สูงสุด 2.58 กรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 120 ชั่วโมง และการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 จะเพิ่มเป็น 3.25 กรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลา 96 ชั่วโมง เมื่อหมักแบบกึ่งกะ อย่าไรก็ตามเพื่อให้งานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ที่เลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* IFO0216 โดยใช้หางนมเป็นวัตถุดิบมีความสมบูรณ์แบบมากขึ้น ในขั้นตอนการผลิตคีเฟอรันโดยใช้ระบบการผลิตแบบกึ่งกะที่มีการเติมสารอาหารใหม่ในชั่วโมงที่ 24 และ 48 ควรมีการเติมยีสต์สกัดร่วมด้วย เพื่อเพิ่มการเติบโต และการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ให้สูงขึ้น นอกจากนี้ควรมีการศึกษาผลการของการใช้แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ในการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 เพื่อลดต้นทุนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

เอกสารอ้างอิง

จิตตรา ยี่แสง. 2550. การผลิตคีเฟอรันจากแป้งสาคูโดยเชื้อ *Lactobacillus kefiranofaciens*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ชนินาถ รุ่งทิวาสุวรรณ. 2548. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการแยกโปรตีนเคซีนจากน้ำนมเพื่อส่งเสริมโภชนาการในพื้นที่ห่างไกล (ออนไลน์). สืบค้นจาก: http://202.29.77.139/articles/articles detail.asp? ID=128. (14 กรกฎาคม 2548)

ระพีพรรณ เติมตันท์. 2547. องค์ประกอบและสมบัติของสารชีวภาพจากแบคทีเรียทนร้อน *Acinebacter* sp. FT3 และ *Gemella* sp. CH11. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธนุสรา เหล่าเจริญสุข. 2546. วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์. *ใน* จุลชีววิทยาในอุตสาหกรรม. หน้า 12-13. ปัตตานี: ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิช และ ปรีชา สุวรรรพินิช. 2547. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 4. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2546. พันธุ์ศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

มนตรี จุฬาวัฒนพล และคณะ. 2542. ชีวเคมี. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพมหานคร.

ยุพดี ชัยสุขสันต์. 2548. เอกสารประกอบการเรียนวิชาชีวเคมี. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี.

วรารัตน์ วงศ์ศุภชาติ. 2551. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากอาหารหมักพื้นบ้านและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิลาวัฒย์ เจริญจิระตระกูล. 2530. จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร. *ใน* จุลชีววิทยาทางอาหาร. หน้า 1-16. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิไลวรรณ ไชยศร. 2551. การผลิตและสมบัติของพอลิเมอร์จากแบคทีเรียทนร้อนและการใช้ในการบำบัดน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์ม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศุภศิลป์ มณีรัตน์. 2543. เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียกรดแลคติก. ว. สงขลานครินทร์ (วิทย์.) 3: 397-402.

สมใจ ศิริโภค. 2547. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. พิมพ์ครั้งที่ 2. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ. กรุงเทพมหานคร.

หนึ่ง เตียอำรุง. 2532. การผลิตสเคลอโรกลูแคนจากเชื้อรา *Sclerotium rotfsii*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลวิทยาอุตสาหกรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เนยแข็งเชดดา (ออนไลน์).2004. สืบค้นจาก : http://kanchanapisek.or. th/kp1/data .html. (30 กันยายน 2550)

Agira, H., Urasshima, E., Ito, M., Morizono, N., Kimura, T. and Takahashi, S. 1992. Extracellular polysaccharide from endcapsulated *Streptococcus salivalivallius* subsp. *themopholus* OR 901 isolated from commercial yogurt. J. Food Sci. 57: 624-628.

Aksu, Z. and Eren, T. 2005. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. Process Biochem. 40: 2985-2991.

Arihara, F. K., Toba, T. and Adachi, S. 1990. Immunofluorescence microscopic studied on distribution of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Lactobacillus kefir* in kefir grain. Int. J. Food Microbiol. 11: 127-134.

Amatayakul, T., Halmos, A. L., Sherkat, F. and Shah, N. P. 2006. Physical characteristics of yoghurts made using exopolysaccharide producing starter cultures and varying casein to whey protein ratios. Int. Dairy J. 16: 40–51.

Aslim, B., Yuksekdag, Z., Beyatli, N. and Mercen, N. 2005. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains under different growth condition. World J. Microbiol. Biotechnol. 21: 673-677.

Bebic, Z., Jakovljevic, J. and Baras, J. 2000. The corn starch hydrolyzate as a fermentation substrate for ethanol production. Chem. Ind. 54: 5-9.

Cappuccino, J. and Sherman, N. 2008. Cultivation of Microorganisms: Nutritional and Physical Requirements, and Enumeration of Microbial Population. *In* Microbiology a laboratory manual. (Novak, D., ed.). p. 95-96. Pearson Benjamin Cummings. San Francisco.

Cerning, J. 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 87: 113-130.

Cerning, J., Renard, C. M. G. C., Thibault, J. F., Boullanne, C., Landon, M., Desmazeaud, M. and Topisirovic, L. 1994. Carbon source and requirement for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casie* CG11 and partial structure analysis of the polymer. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3914-3915.

Cerning, J., Bouillanne, C., Landon, M. and Desmazeaud, M. 1992. Isolation and characterization of exopolysaccharide from slime-forming mesophilic lactic acid bacteria. J. Dairy Sci. 75: 692-699.

Cheirsilp, B. 2003. Development of kefiran fermentation process by *Lactobacillus kefiranofaciens.* Ph.D. Dissertation. Osaka University.

Cheirsilp, B., Shimizu, H. and Shioya, S. 2003. Enhanced kefiran production by mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae.* J. Biotechnol. 100: 43-53.

Cheirsilp, B., Shimizu, H. and Shioya, S. 2001. Modelling and optimization of environmental conditions for kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 57: 639-646.

De Vuyst, L., Vanderveken, F., Van de Ven, S. and Degeest, B. 1998. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. J. Appl. Microbiol. 84:1059-1068.

Duenas, M., Munduate, A., Perea, A. and Irastorza, A. 2003. Exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus* 2.6 in semidefined medium under different growth conditions. J. Food Microbiol. 87: 113-120.

Faber, E. J., Haak, M. J., Kamerling, P. and Vliegenthart, J. F. G. 2001. Structure of the exopolysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* S3. Carbohydr. Res. 331: 173-182.

Farah, Z. and Riesen, M. F. 1985. Separation and characterization of major components of camel milk casein. Milchwissenschaft. 40: 669-671.

Farnworth, E. D. 2005. Kefir a complex probiotic (Online). Available: http://www.foodsciencecen tral. com/fsc/bulletin-ff-free. html. (14 August 2008)

Fujisawa, T., Adachi, S., Toba, T., Arihara, K. and Mitsuoka, T. 1988. *Lactobacillus kefiranofaciens* sp. nov. isolated from kefir grain. J. Systematic Bacteriol. 38: 12-14.

Gamar-Nourani, L., Blondeau, K. and Simonet, J. M. 1998. Influence of culture condition on exopolysaccharide production by *Lactobacillus Rhamnosus* strain C83. J. Appl. Microbiol. 85: 664-672.

Gassem, M. A., Schmidt, K. A. and Frank, J. F. 1997. Exopolysaccharide production from whey lactose by fermentation with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. J. Food Sci. 62: 171-173, 207.

Grobben, G. J., Van Casteran, W. H. M., Schols, H. A., Oosterveld, A., Sala, G., Smith, M. R., Sikkema, J. and De Bont, J. A. M. 1997. Analysis of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 growth in continous culture on glucose and fructose. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48: 516-532.

Harding, L. P., Marshall, V. M., Hernandez, Y., Gu, Y., Maqsood, M., Mclay, N. and Laws, A. P. 2005. Structural characterization of highly branched exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2074. Carbohydr. Res. 331: 173-182.

Iwasawa, S., Ueda, M., Miyata, N., Hirota,T., and Ahiko, K. 1982. Identification and fermentation character of kefir yeast. Agri. Biol. Chem. 46: 2631-2636.

Kim, H. M., Paik, S. Y., Soo R. K., Boo K. K., Yun, J. W. and Choi, J. W. 2006. Enhanced production of exopolysaccharides by fed-batch culture of *Ganoderma resinaceum* DG-6556. J. Gen. Microbiol. 44: 233-242.

Kimmel, S. A., Roberts, R. F. and Ziegler, G. R. 1998. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR grown in a semi defined medium. Appl. Environ. Microbiol. 64: 659-664.

Kobayama, S., Osada, K., Tachibana, H., Katakura, Y. and Shirahata, S. 1997. Enhancing effects of food components on the production of interferon B from animal cells suppressed by stress homones . Cytotechnology. 23: 119-125.

Kooiman, P. 1968. The chemical structure of kefiran, the water soluble polysaccharide of the kefir grain. Carbohydr. Res. 7: 220-211

Koutinas, A. A., Athanasiadis, I., Bekatorou, A., Psarianos, P., Kanellaki, M., Agouridis, N. and Blekas, G. 2007. Industrail scale-up of alcoholic fermention of whey, promoted by rasin extracts, using kefir granular biomass. Enzyme Microb. Technol. 141: 189 – 229.

La Riviere, J. W. M. and Kooiman, P. 1967. Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. J. Gen. Microbiol. 59: 269-278.

Lo, Y. M., Yang, S. T. and Min, D. B. 1997. Effects of yeast extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomonas campestris*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47: 689-694.

Lowry, O. H., Rosebrough, J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Biol. Chem. 193: 265-275.

Maeda, H., Zhu, X., Omura, K., Suzuki, S. and Kitamura, S. 2004. Effects of exopolysaccharide (kefiran) on lipid, blood pressure, blood glucose, and constipation. J. Biosci. Microfora. 23: 149-153.

Macedo, M. G., Lacroix, C., Garder, N. J. and Champagne, C. P. 2002. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. Int. Dairy J. 12: 419-426.

Margulis, L. 1995. From kefir to death. *In* How things are: 69-78. Brockman, J. and Matson, K., editor. William Morrow and Co., New York, USA.

Marshall, V., Cole, M. and Brooker, B. E. 1984. Observations on the structure of kefir grain and the distribution of the microflora. J. Appl. Bacteriol. 59: 491-497.

Micheli, L., Uccelletti, C., Palleschi, C. and Crescenzi, V. 1999. Isolation and characterization of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide, kefiran. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53: 69-74.

Mitsue,T., Tachibana, K. and Fujio, Y. 1998. Isolation of kefiran producing lactic acid bacteria from kefir grain and improvement of kefiran productivity. Seibutsukougakudaishi. 76: 447-450 (in Japanese).

Mitsue, T., Tachibana, K. and Fujio, Y. 1999. Efficient kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* KF-75 and yeast strains. Seibutsukougakudaishi. 77: 90-103 (in Japanese).

Mozzi, F., De Giori, G. S., Oliver, G. and De Valdez, G. F. 1996. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus casei* under controlled pH. Biotechnol. Lett. 18: 435-439.

Nampoothiri, K. M., Singhania, R. R., Sabarinath, C. And Pandey, A. 2003. Fermentative production of gellan using *Sphingomonas paucimobilis*. Process Biochem. 38: 1513-1519.

Olano-Martin, E., Mountzouris, K. C., Gibson, G. R. and Rastall, R. A. 2000. In vitro ferment ability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria. Brit. J. Nutr. 83: 247-255.

Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Gandhi, D. N. and Bunko, K. 2007. Bioutilisation of whey for lactic acid production. Food Chem. 105: 1-14.

Petry, S., Furlan, S. and Crepeau, M. J. 2000. Factors affection exocellular polysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. Appl. Environ. Microbiol. 66: 3427-3431.

Ricciardi, A., Parente, E., Crudele, M.A., Zanetti, F., Scolari, G. and Mannazzu, I. 2002. Exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* SY: production and preliminary characterization of the polymer. J. Appl. Microbiol. 92: 297-306.

Rodrigues, K. L., Caputo, L. G., Carvalho, J. T., Evangelista, J. and Schneedorf, J. M. 2005. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. Int. J. Antimicrob. Agents. 25: 404-408.

Rodrigues, L. R., Teixeira, J. A. and Oliveira, R. 2006. Low cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. Biochem. Eng. J. 32: 135-142.

Salminen, S. and Wright, A. V. 1998. Industrial Use and Production of Lactic Acid Bacteria. *In* Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects. Vol. III. Ed. (Salminen, S. and Wright, A.V., ed). p. 73-102. Marcel Dekker. New York.

Saloff-cose, C. J. 2005. Kefir grains (Online). Available: http://www.torontoadvisors.com/Kefir/article. html. (24 August 2007)

Sanchez-Medina, I., Gerwig, G. J., Urshev, Z. L. and Kamerling, P. J. 2007. Structure of a neutral exopolysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* LBB.B26. Carbohydr. Res. 342: 2430-2439.

Santos, A., Mauro, M. S., Sanchez, A., Torres, J. M. and Marquina, D. 2003. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. Isolated from kefir. System Appl. Microbiol. 26: 434-437.

Shene, C. and Brovo, S. 2007. Whey fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* for exopolysaccharide production in continuous culture. Enzyme Microb. Technol. 26: 87-95.

Shiomi, M., Sasaki, K., Murofushi, M. and Aibara, K. 1982. Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain. Japan J. Med. Sci. Biol. 35: 75-80.

Sutherland, I. W. 1995. Biosynthesis and composition of gram-negative bacteria extracellular and cell wall polysaccharides. Annu. Rev. Microbiol. 39: 243-270.

Tada, S., Katakura, Y., Ninomiya, K. and Shioya, S. 2007. Fed-batch coculture of *Lactobacillus kefiranofaciens* with *Saccharomyces cerevisiae* for effective production of kefiran. J. Biosci. Bioeng. 103: 557-562.

Tang, Y. J. and Zhong, J. J. 2002. Fed-batch fermentation of *Ganoderma lucidum* for hyperproduction of polysaccharide and ganoderic acid. Enzyme Microb. Technol. 31: 20-28.

Taniguchi, M., Nomura, M., Itaya, T and Tanaka, T. 2001. Kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens* under the culture conditions established by mimicking the existence and activities of yeast in kefir grain. Food Sci. Technol. Res. 7: 333-337.

Tallon, R., ressolier, P. and Ucadi, M. C. 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharide production by *Lactobacillus plantanum* EP56. Res. Microbiol. 154: 705-712.

Toba, T., Abe, S., Arihara, K. and Adachi, S. 1986. A medium for the isolation of capsular bacteria from kefir grain . Agri. Biol. Chem. 50: 2673-2674.

Van den Berg, D. J. C., Robijn, G. W., Janssen, A. C., Giuseppin, M. L. F., Vreeker, R., Kamering, J. P., Vliegenthart, J. F. G., Ledeboer, A. M. andVerrips, C. T. 1995. Production of a novel extracellular polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and characterization of the polysaccharide. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2840-2844.

Van dern Berg, D.J.C., Smits, A., Pot, B., Leader, A. M., Kerster, S. M. A. and Verrips, C. T. 1993. Isolation screening and identification of lactic acid bacteria from traditional food fermentation process and culture collections. Food Biotechnol. 7: 189-205

Vaningelgem, F., Zamfir, M., Adriany, T. and De Vuyst, L. 2004. Fermentation conditions affecting the bacterial growth and exopolysaccharide production by *Streptococcus thermophilus* ST 111 I the milk-based medium. J. Appl. Microbiol. 97: 1257-1273.

Velasco, S., Arskold, E., Paese, M., Grage, H., Irastorza, A., Radstrom, P. and Van Niel, E. W. J. 2006. Environmental factors influencing growth of and exopolysaccharide formation by *Pediococcus parvulus* 2.6. J. Food Microbiol. 111: 252-258.

Welman, A.D. and Maddox, I.S. 2003. Exopolysaccharide and extracellular metabolite production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* growth on lactose in continuous culture. Biotechnol. Lett. 25: 1515-1520.

Winter, R. 1978. Xanthan gum. (Online) Available: http://food.oregonstate.edu/glossary/x/xanthangum.html. (26 February 2009)

Yeesang, C., Chanthachum, S. and Cheirsilp, B. 2008. Sago starch as a low-cost carbon source for exopolysaccharide production by *Lactobacillus kefiranofaciens*. World J. Microbiol. Biotechnol. 24: 1195-1201.

Yokoi, H. and Wantanabe, T. 1992. Optimum culture condition of production of kefiran by *Lactobacillus* sp. KPB-167B isolated from kefir grain. J. Ferment. Bioeng. 74: 327-329.

Yokoi, H., Watanabe, T. and Fujio, Y., Fujii, Y., Mukai, T., Toba, T. and Adachi, S. 1991. Some taxonomical characteristics of encapsulated *Lactobacillus* sp. KPB-167B isolated from kefir grain and characterization of its extracellular polysaccharide. J. Food Microbiol. 13: 257-264.

Yokoi, H., Watanabe, T. and Fujio, Y. 1990. Isolation and characterization of polysaccharide producing bacteria from kefir grain. J. Dairy Sci. 73: 1684-1689.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมวัตถุดิบและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียมหางนม (ดัดแปลงจาก Shene and Brovo, 2007)

สารเคมี

หางนม

กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 5 โมลาร์

วิธีการเตรียม

ชั่งหางนมผง 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับพีเอชของสารละลายหางนมเป็น 4.5 (pH = pI ของโปรตีนเคซีน) ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ให้ความร้อนแก่สารละลายหางนมที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้เย็น จึงนำสารละลายที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แยกส่วนใสออกจากตะกอน และจากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและน้ำตาลรีดิวซ์ในส่วนใส พบว่ามีปริมาณร้อยละ 0.40 และ 15.81 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ชนิดของน้ำตาลด้วยเทคนิค Thin-Layer Chromatography (TLC) พบว่าองค์ประกอบในสารละลายส่วนใหญ่ยังคงเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายหางนมก่อนมีการให้ความร้อน ซึ่งมีค่า Rf เท่ากับ 0.20, 0.19 และ 0.20 ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 27

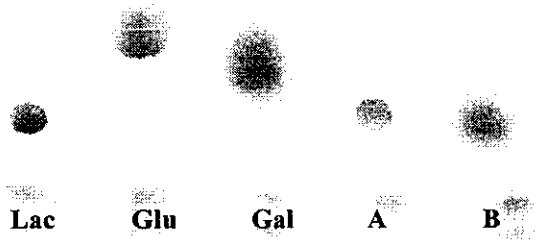

Figure 27. Composition of skim milk (A) and pretreated skim milk (B) with lactose (Lac) glucose (Glu) and gaclactose (Gal).

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Man Rogasa Sharpe (MRS) สำหรับเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

สารเคมี	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
Dipotassium phosphate	10.00
Beef extract	2.00
Yeast extract	5.00
Dextrose	20.00
Polysorbate 80	1.00 มิลลิลิตรต่อลิตร
Ammonium citrate	2.00
Sodium acetate	5.00
Magnesium sulphate	0.10
Manganes sulphate	0.05
Proteose peptone	10.00

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหารหนัก 52 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากัน ปรับพีเอชเป็น 5.5 บรรจุใส่หลอดทดลองขนาดกลางปริมาตร 9 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายในหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast-Peptone (YP) สำหรับยีสต์

สารเคมี

	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร
Glucose	10
Polypeptone	10
Yeast extract	10

วิธีการเตรียม

ชั่งสารเคมีตามสัดส่วนที่ระบุไว้ข้างต้น ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร คนให้เข้ากัน ปรับพีเอชให้ได้ 5.5 บรรจุใส่หลอดทดลองขนาดกลางปริมาตร 9 มิลลิลิตร และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายในหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

1. **วิธีการวิเคราะห์ปริมาณคีเฟอรัน** (Cheirsilp *et al.*, 2001)

สารเคมี

ก. Sulfuric acid (conc. H_2SO_4)

ข. Anthone

วิธีการ

ดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก เติมสารละลายสารละลายแอนโทรนในกรดซัลฟูริกเข้มข้น (conc.H_2SO_4) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ทำให้เย็นทันทีวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณคีเฟอรันโดยเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีคิวซ์ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.5 กรัมต่อลิตร

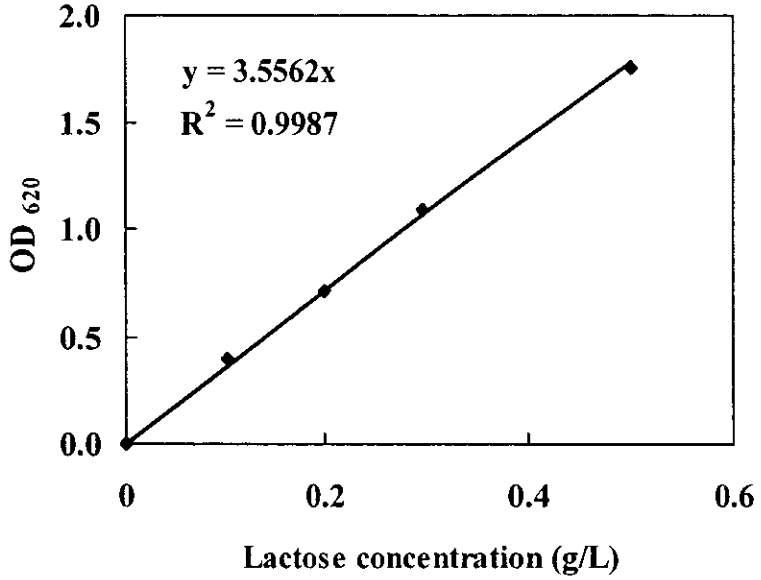

Figure 28. Standard curve of total sugar analyzed by Anthone method.

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ธนุสรา เหล่าเจริญสุข, 2546)

สารเคมี

ก. สารละลายคอปเปอร์

ข. สารละลายเนลสัน

วิธีการ

เจือจางสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลอยู่ในช่วงที่เหมาะสม ดูดสารตัวอย่างปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาดกลางเติมสารละลายคอปเปอร์ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ทำให้เย็นทันที เติมสารละลายเนลสันปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบกำหนดจึงเติมน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร (OD_{520}) และคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลรีดิวซ์ที่ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.3 0.5 และ 0.7 กรัมต่อลิตร

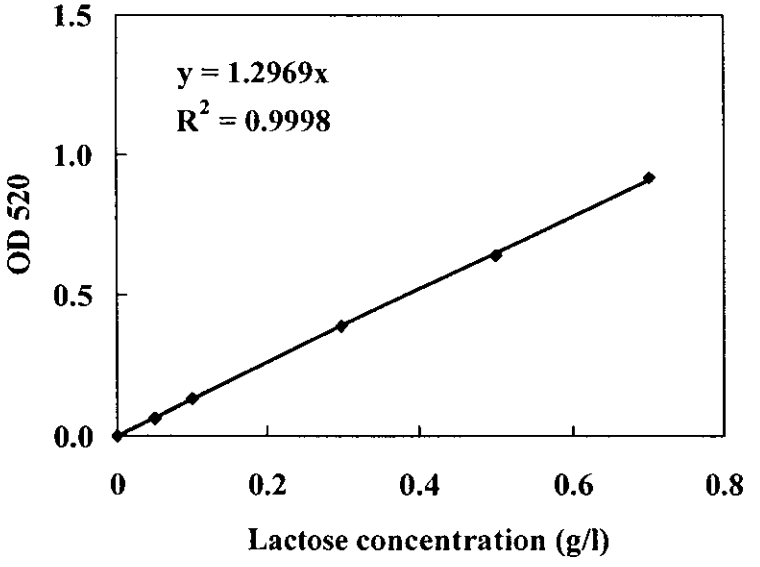

Figure 29. Standard curve of reducing sugar analyzed by Nelson-Somogyi method .

3. การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกโดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (ดัดแปลงตามวิธี Olano-Martin *et al.*, 2000)

สารเคมี

ก. สารมาตรฐานกรดแลคติก

ข. กรดซัลฟูริก

เครื่องมือ

Column : BIO-RAD Aminex HPX-87 H Ion Exclusion column (300 mm x 7.8mm)

Mobile phase : 0.005 M H_2SO_4

Flow rate : 0.6 ml/min

Temp : 50 ^{o}C

Detecter : UV 215 nm

Inject : 20μL

วิธีการ

ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสออกจากตะกอน นำส่วนใสที่ได้กรองผ่านกระดาษกรองในลอนขนาด 0.2 ไมโครเมตร และฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าสู่คอลัมน์ เปรียบเทียบปริมาณสารที่ได้กับสารมาตรฐานของกรดแลคติกที่ความเข้มข้น 200, 50, 25 และ 2.5 มิลลิโมลาร์

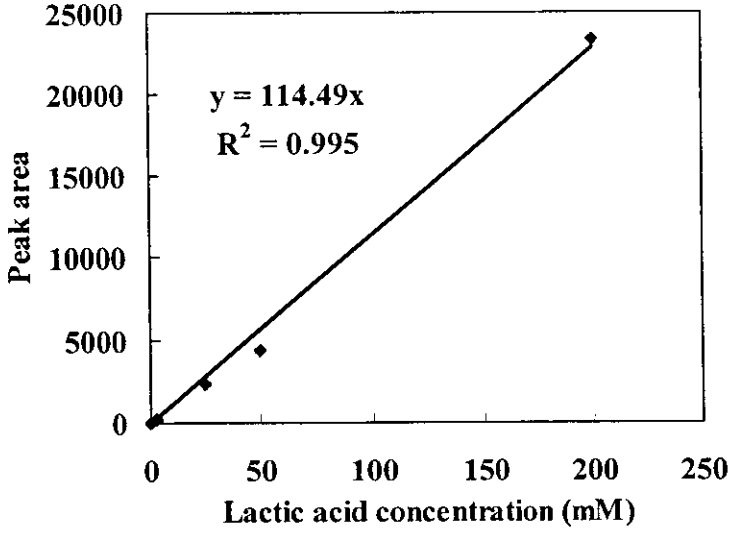

Figure 30. Standard curve of lactic acid analyzed by HPLC method

4. **การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry** (ดัดแปลงตามวิธี Lowry *et al.*, 1951)

สารเคมี

ก. สารละลาย I ละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ใน1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์

ข. สารละลาย II เตรียม CuSO4.5H2O ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย Sodium potassium tartrate ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์

ค. สารอัลคาไลน์คอปเปอร์ (alkaline copper solution) เตรียมโดยผสมสารละลาย I ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และสารละลาย II ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลาย ก:ข:ค ในอัตราส่วน 50:1:1

ง. สารละลาย Folin – ciocolteau เตรียมโดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 อย่างรวดเร็วก่อนใช้

วิธีทำ

ดูดสารละลายตัวอย่างที่เจือจางให้อยู่ในช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก เติมสารละลายอัลคาไลน์คอปปริมาตร 3 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันวางทิ้งไว้ 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร คำนวณปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 0, 0.2, 0.4 และ0.6 กรัมต่อลิตร

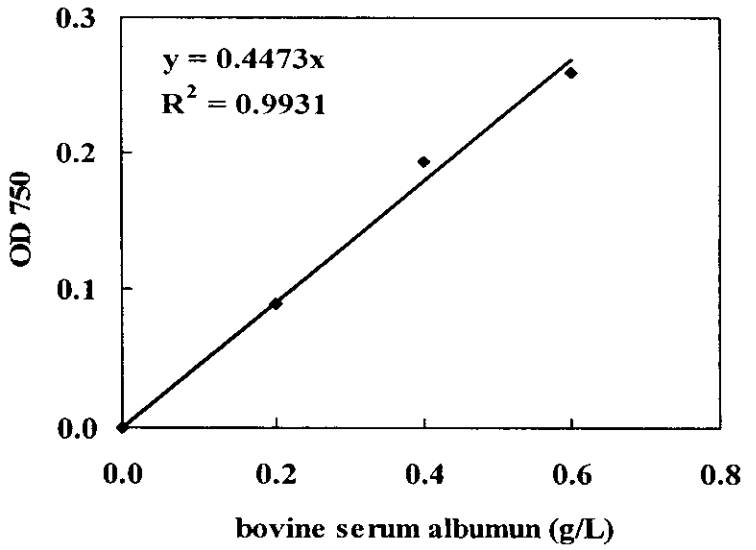

Figure 31. Standard curve of bovine serum albumin analyzed by Lowry method.

ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

Table 6. Cells growth of the pure culture and the mixed cultures at 60 h and 120 h under static condition at room temperature.

Culture	OD_{660}	
	At 60 h	At 120h
L. kefiranofaciens JCM 6985	5.05 ± 0.41	6.83 ± 0.63
L. kefiranofaciens JCM 6985 and *S. exiguus* TISTR 5081	5.34 ± 0.13	7.51 ± 0.36
L. kefiranofaciens JCM 6985 and *S. cerevisiae* IFO 0216	5.32 ± 0.23	6.56 ± 0.34
L. kefiranofaciens JCM 6985 and *S. carlsbergensis* TISTR 5018	5.18 ± 0.27	6.60 ± 0.62
L. kefiranofaciens JCM 6985 and *Z. rouxii* TISTR 5044	5.22 ± 0.16	6.43 ± 0.46
L. kefiranofaciens JCM 6985 and *D. hansenii* TISTR 5155	5.37 ± 0.37	8.07 ± 0.21

Table 7. Total kefiran production of the pure culture and the mixed cultures at 60 h and 120 h under static condition at room temperature.

Culture	Total kefiran (g/l)	
	At 60 h	At 120 h
L. kefiranofaciens JCM 6985	0.45 ± 0.03	0.57 ± 0.03
L. kefiranofaciens JCM 6985 and *S. exiguus* TISTR 5081	0.39 ± 0.01	0.77 ± 0.05
L. kefiranofaciens JCM 6985 and *S. cerevisiae* IFO 0216	0.51 ± 0.08	0.81 ± 0.02
L. kefiranofaciens JCM 6985 and *S. carlsbergensis* TISTR 5018	0.45 ± 0.03	0.79 ± 0.03
L. kefiranofaciens JCM 6985 and *Z. rouxii* TISTR 5044	0.41 ± 0.00	0.74 ± 0.02
L. kefiranofaciens JCM 6985 and *D. hansenii* TISTR 5155	0.39 ± 0.03	0.72 ± 0.05

Table 8. Cells growth of the pure culture and the mixed cultures at 60 h and 120 h under shaking condition at 60 rpm at room temperature.

Culture	OD_{660}	
	At 60 h	At 120 h
L. kefiranofaciens JCM 6985	3.96 ± 0.25	6.27 ± 0.11
L. kefiranofaciens JCM 6985 and *S. exiguus* TISTR 5081	8.04 ± 0.30	9.07 ± 0.07
L. kefiranofaciens JCM 6985 and *S. cerevisiae* IFO 0216	7.34 ± 0.11	9.27 ± 0.15
L. kefiranofaciens JCM 6985 and *S. carlsbergensis* TISTR 5018	8.01 ± 0.44	8.67 ± 0.27
L. kefiranofaciens JCM 6985 and *Z. rouxii* TISTR 5044	8.71 ± 0.35	9.90 ± 0.00
L. kefiranofaciens JCM 6985 and *D. hansenii* TISTR 5155	7.83 ± 0.30	9.60 ± 0.38

Table 9. Total kefiran production of the pure culture and the mixed cultures at 60 h and 120 h under shaking condition at 60 rpm at room temperature.

NO.	Total kefiran (g/l)	
	At 60 h	At 120 h
L. kefiranofaciens JCM 6985	0.49 ± 0.00	0.54 ± 0.02
L. kefiranofaciens JCM 6985 and *S. exiguus* TISTR 5081	0.51 ± 0.01	0.69 ± 0.06
L. kefiranofaciens JCM 6985 and *S. cerevisiae* IFO 0216	0.55 ± 0.02	0.94 ± 0.01
L. kefiranofaciens JCM 6985 and *S. carlsbergensis* TISTR 5018	0.50 ± 0.01	0.80 ± 0.02
L. kefiranofaciens JCM 6985 and *Z. rouxii* TISTR 5044	0.49 ± 0.00	0.61 ± 0.04
L. kefiranofaciens JCM 6985 and *D. hansenii* TISTR 5155	0.46 ± 0.01	0.63 ± 0.01

Table 10. Cells growth by the mixed culture in a modified MRS-skim milk lactose medium with various nitrogen sources at 60 h and 120 h under shaking condition at 60 rpm at room temperature.

Nitrogen source	OD_{660}	
	At 60 h	At 120 h
2% Tryptone, 2% Meat extract and 1% Yeast extract	6.43 ± 0.23	7.16 ± 0.00
5% of Yeast extract	7.39 ± 0.00	10.21 ± 0.49
5% of Meat extract	6.99 ± 0.51	8.02 ± 0.42
5% of Tryptone	6.17 ± 0.33	7.37 ± 0.11

Table 11. Total kefiran production by the mixed culture in a modified MRS-skim milk lactose medium with various nitrogen sources at 60 h and 120 h under shaking condition at 60 rpm at room temperature.

Nitrogen source	Total kefiran (g/l)	
	At 60 h	At 120 h
2% Tryptone, 2% Meat extract and 1% Yeast extract	0.57 ± 0.01	0.79 ± 0.01
5% of Yeast extract	0.57 ± 0.00	0.84 ± 0.02
5% of Meat extract	0.29 ± 0.01	0.62 ± 0.02
5% of Tryptone	0.16 ± 0.02	0.57 ± 0.00

Table 12. Effect of reducing sugar concentration from skim milk on cells growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

Time (h)	Cell growth (Log cfu/ml)			
	2%	4%	6%	8%
0	7.20 ± 0.01	7.20 ± 0.01	7.20 ± 0.01	7.20 ± 0.01
24	7.51 ± 0.01	7.46 ± 0.07	7.47 ± 0.02	7.46 ± 0.06
48	8.37 ± 0.01	8.02 ± 0.07	8.36 ± 0.01	8.38 ± 0.02
72	8.56 ± 0.01	8.38 ± 0.01	8.57 ± 0.01	8.53 ± 0.01
96	9.05 ± 0.15	8.83 ± 0.17	8.95 ± 0.06	8.76 ± 0.00
120	8.68 ± 0.05	8.71 ± 0.05	8.51 ± 0.09	8.51 ± 0.03

Table 13. Effect of reducing sugar concentration from skim milk on cells growth of *S. cerevisiae* IFO 0216 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

Time (h)	Cell growth (Log cfu/ml)			
	2%	4%	6%	8%
0	6.58 ± 0.04	6.58 ± 0.04	6.58 ± 0.04	6.58 ± 0.04
24	7.16 ± 0.08	7.23 ± 0.12	7.03 ± 0.05	7.15 ± 0.18
48	7.20 ± 0.07	7.26 ± 0.18	7.17 ± 0.06	7.19 ± 0.17
72	7.13 ± 0.01	7.13 ± 0.02	7.11 ± 0.01	7.14 ± 0.10
96	7.06 ± 0.05	7.14 ± 0.03	7.11 ± 0.01	7.09 ± 0.03
120	6.91 ± 0.10	7.10 ± 0.03	7.05 ± 0.08	7.09 ± 0.03

Table 14. Effect of reducing sugar concentration from skim milk on total kefiran production by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

Time (h)	Total kefiran (g/l)			
	2%	4%	6%	8%
0	0.13 ± 0.06	0.13 ± 0.05	0.13 ± 0.05	0.14 ± 0.04
24	0.50 ± 0.14	0.58 ± 0.13	0.60 ± 0.18	0.57 ± 0.21
48	0.64 ± 0.08	0.81 ± 0.14	0.77 ± 0.10	0.74 ± 0.10
72	0.78 ± 0.10	0.86 ± 0.12	0.91 ± 0.17	0.84 ± 0.17
96	0.85 ± 0.12	0.91 ± 0.13	0.96 ± 0.08	0.96 ± 0.17
120	0.90 ± 0.07	1.01 ± 0.07	1.03 ± 0.03	1.00 ± 0.12

Table 15. Effect of reducing sugar concentration from skim milk on reducing sugar in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

Time (h)	Reducing sugar (g/l)			
	2%	4%	6%	8%
0	29.75 ± 1.47	44.73 ± 4.33	58.22 ± 11.22	75.25 ± 4.25
24	24.49 ± 1.60	42.77 ± 3.40	53.36 ± 0.95	70.88 ± 2.99
48	14.30 ± 2.65	35.31 ± 0.67	48.59 ± 4.92	66.96 ± 4.44
72	9.54 ± 3.66	27.58 ± 0.34	42.66 ± 6.75	57.19 ± 2.84
96	7.34 ± 0.97	23.51 ± 0.71	34.86 ± 2.65	51.40 ± 4.10
120	6.66 ± 1.34	18.43 ± 1.60	30.85 ± 2.52	45.83 ± 1.64

Table 16. Effect of reducing sugar concentration from skim milk on pH in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

Time (h)	pH of broth			
	2%	4%	6%	8%
0	5.50 ± 0.00	5.50 ± 0.00	5.50 ± 0.00	5.50 ± 0.00
24	4.59 ± 0.13	4.77 ± 0.19	4.87 ± 0.15	5.01 ± 0.09
48	3.95 ± 0.04	4.03 ± 0.04	4.09 ± 0.05	4.32 ± 0.13
72	3.82 ± 0.08	3.83 ± 0.07	3.89 ± 0.08	3.97 ± 0.06
96	3.72 ± 0.04	3.65 ± 0.06	3.71 ± 0.04	3.74 ± 0.03
120	3.68 ± 0.08	3.54 ± 0.07	3.63 ± 0.01	3.67 ± 0.03

Table 17. Effects of reducing sugar concentration from skim milk on $Y_{p/s}$ and productivity of kefiran by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

Whey lactose concentration (%w/v)	$Y_{p/s}$ (%w/w)	Productivity of kefiran (mg/l/h)
2	3.9 ± 0.4	11.6 ± 1.5
4	4.3 ± 0.4	15.1 ± 1.8
6	3.8 ± 0.4	14.6 ± 1.5
8	3.4 ± 0.2	14.4 ± 1.7

Table 18. Effect of yeast extract concentration on cells growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

Time (h)	Cell growth (Log cfu/ml)			
	2%	4%	5%	6%
0	7.22 ± 0.09	7.22 ± 0.09	7.21 ± 0.01	7.21 ± 0.09
24	7.87 ± 0.07	7.97 ± 0.04	7.46 ± 0.07	8.02 ± 0.03
48	8.15 ± 0.02	8.27 ± 0.05	8.02 ± 0.07	8.40 ± 0.00
72	8.20 ± 0.03	8.84 ± 0.71	8.38 ± 0.01	9.24 ± 0.02
96	8.06 ± 0.06	8.93 ± 0.20	8.85 ± 0.17	9.15 ± 0.03
120	8.21 ± 0.02	8.86 ± 0.16	8.71 ± 0.05	9.09 ± 0.00

Table 19. Effect of yeast extract concentration on cells growth of *S. cerevisiae* IFO 0216 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

Time (h)	Cell growth (Log cfu/ml)			
	2%	4%	5%	6%
0	6.61 ± 0.02	6.61 ± 0.02	6.58 ± 0.04	6.61 ± 0.02
24	7.05 ± 0.04	7.00 ± 0.13	7.23 ± 0.12	7.09 ± 0.06
48	7.22 ± 0.05	7.21 ± 0.16	7.28 ± 0.18	7.25 ± 0.07
72	7.23 ± 0.01	7.23 ± 0.16	7.13 ± 0.02	7.22 ± 0.10
96	7.12 ± 0.01	7.19 ± 0.18	7.14 ± 0.03	7.20 ± 0.05
120	7.06 ± 0.02	7.17 ± 0.08	7.10 ± 0.03	7.12 ± 0.03

Table 20. Effect of yeast extract concentration on total kefiran production by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

Time (h)	Total kefiran (g/l)			
	2%	4%	5%	6%
0	0.17 ± 0.00	0.17 ± 0.00	0.17 ± 0.00	0.17 ± 0.00
24	0.26 ± 0.11	0.48 ± 0.14	0.59 ± 0.04	0.57 ± 0.02
48	0.40 ± 0.12	0.86 ± 0.13	0.96 ± 0.04	0.86 ± 0.17
72	0.44 ± 0.11	0.95 ± 0.06	0.98 ± 0.10	1.08 ± 0.07
96	0.46 ± 0.14	0.98 ± 0.09	1.09 ± 0.00	1.10 ± 0.05
120	0.53 ± 0.11	1.07 ± 0.13	1.14 ± 0.01	1.19 ± 0.02

Table 21. Effect of yeast extract concentration on reducing sugar in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

Time (h)	Reducing sugar (g/l)			
	2%	4%	5%	6%
0	42.17 ± 0.13	41.98 ± 0.27	41.79 ± 0.05	41.98 ± 0.27
24	35.28 ± 5.51	36.88 ± 2.40	36.08 ± 0.04	37.27 ± 3.11
48	25.83 ± 3.91	24.79 ± 2.52	29.24 ± 0.02	26.51 ± 1.85
72	20.77 ± 6.01	19.44 ± 0.17	19.85 ± 0.01	18.60 ± 1.18
96	15.75 ± 4.62	13.88 ± 0.04	14.21 ± 0.01	14.53 ± 1.47
120	12.72 ± 5.04	11.41 ± 0.50	10.88 ± 0.02	12.84 ± 3.87

Table 22. Effect of yeast extract concentration on pH in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

Time (h)	pH of broth			
	2%	4%	5%	6%
0	5.50 ± 0.00	5.50 ± 0.00	5.50 ± 0.00	5.50 ± 0.00
24	4.66 ± 0.25	4.67 ± 0.10	4.81 ± 0.07	4.91 ± 0.19
48	3.78 ± 0.04	3.90 ± 0.05	3.97 ± 0.08	3.99 ± 0.01
72	3.63 ± 0.07	3.69 ± 0.04	3.77 ± 0.08	3.77 ± 0.01
96	3.50 ± 0.01	3.59 ± 0.02	3.63 ± 0.04	3.66 ± 0.01
120	3.46 ± 0.01	3.57 ± 0.01	3.53 ± 0.01	3.66 ± 0.03

Table 23. Effects of yeast extract concentration on $Y_{p/s}$ and productivity of kefiran by *L. kefiranofaciens* JCM6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

Yeast extract concentration (%w/v)	$Y_{p/s}$ (%w/w)	Productivity of kefiran (mg/l/h)
2	3.0 ± 0.91	5.0 ± 3.5
4	3.6 ± 0.23	15.2 ± 1.8
5	3.7 ± 0.03	16.6 ± 1.4
6	3.7 ± 0.04	15.8 ± 1.5

Table 24. Effect of initial pH on cells growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

Time (h)	Cell growth (Log cfu/ml)			
	pH 4.5	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0
0	7.20 ± 0.00	7.20 ± 0.00	7.22 ± 0.00	7.20 ± 0.00
24	7.62 ± 0.04	7.85 ± 0.04	7.97 ± 0.01	7.93 ± 0.05
48	7.81 ± 0.02	8.06 ± 0.73	8.27 ± 0.04	8.10 ± 0.09
72	7.91 ± 0.01	8.61 ± 0.00	8.84 ± 0.00	8.46 ± 0.01
96	8.01 ± 0.02	8.77 ± 0.06	8.93 ± 0.20	8.50 ± 0.03
120	8.05 ± 0.02	8.84 ± 0.02	8.86 ± 0.16	8.52 ± 0.05

Table 25. Effect of initial pH on cells growth of *S. cerevisiae* IFO 0216 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

Time (h)	Cell growth (Log cfu/ml)			
	pH 4.5	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0
0	6.39 ± 0.00	6.39 ± 0.00	6.39 ± 0.02	6.39 ± 0.00
24	6.96 ± 0.07	7.14 ± 0.04	7.00 ± 0.13	7.25 ± 0.06
48	7.00 ± 0.00	7.19 ± 0.03	7.21 ± 0.16	7.31 ± 0.03
72	6.96 ± 0.01	6.98 ± 0.00	7.23 ± 0.16	7.28 ± 0.06
96	6.89 ± 0.03	6.91 ± 0.02	7.19 ± 0.18	7.24 ± 0.01
120	6.89 ± 0.07	6.90 ± 0.03	7.17 ± 0.08	7.02 ± 0.03

Table 26. Effect of initial pH on total kefiran production by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

Time (h)	Total kefiran (g/l)			
	pH 4.5	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0
0	0.09 ± 0.04	0.09 ± 0.04	0.17 ± 0.00	0.09 ± 0.04
24	0.39 ± 0.02	0.58 ± 0.04	0.48 ± 0.14	0.54 ± 0.01
48	0.48 ± 0.01	0.66 ± 0.02	0.86 ± 0.13	0.62 ± 0.09
72	0.51 ± 0.02	0.75 ± 0.02	0.95 ± 0.06	0.70 ± 0.01
96	0.58 ± 0.04	0.77 ± 0.03	0.98 ± 0.09	0.72 ± 0.06
120	0.60 ± 0.01	0.86 ± 0.01	1.07 ± 0.13	0.72 ± 0.08

Table 27. Effect of initial pH on reducing sugar in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

Time (h)	Reducing sugar (g/l)			
	pH 4.5	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0
0	44.52 ± 1.09	44.52 ± 1.09	41.98 ± 0.27	44.52 ± 1.09
24	38.22 ± 1.26	34.95 ± 0.67	36.88 ± 2.40	36.91 ± 1.60
48	34.12 ± 1.51	30.43 ± 6.89	24.79 ± 2.52	33.76 ± 2.19
72	27.64 ± 1.09	28.35 ± 5.46	19.44 ± 0.17	28.18 ± 1.77
96	25.50 ± 0.92	25.26 ± 0.42	13.88 ± 0.04	25.26 ± 0.42
120	24.01 ± 0.67	21.52 ± 2.02	11.41 ± 0.50	23.30 ± 0.50

Table 28. Effect of initial pH on pH in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

Time (h)	pH of broth			
	pH 4.5	pH 5.0	pH 5.5	pH 6.0
0	4.50 ± 0.00	5.00 ± 0.00	5.50 ± 0.00	6.00 ± 0.00
24	4.04 ± 0.01	4.24 ± 0.01	4.67 ± 0.10	4.53 ± 0.01
48	3.60 ± 0.06	3.67 ± 0.01	3.90 ± 0.05	3.93 ± 0.01
72	3.49 ± 0.05	3.65 ± 0.06	3.69 ± 0.04	3.91 ± 0.01
96	3.52 ± 0.11	3.69 ± 0.06	3.59 ± 0.02	3.91 ± 0.03
120	3.58 ± 0.13	3.70 ± 0.02	3.57 ± 0.01	3.90 ± 0.03

Table 29. Effects of initial pH on $Y_{p/s}$ and productivity of kefiran by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

Initial pH	$Y_{p/s}$ (%w/w)	Productivity of kefiran (mg/l/h)
4.5	2.9 ± 0.1	9.6 ± 0.4
5.0	3.8 ± 0.4	11.7 ± 0.7
5.5	3.6 ± 0.2	15.2 ± 1.2
6.0	3.4 ± 0.5	10.7 ± 1.7

Table 30. Effect of yeast amount on cells growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

Time (h)	Cell growth (Log cfu/ml)		
	1.4×10^6 cfu/ml	4.0×10^6 cfu/ml	9.1×10^6 cfu/ml
0	7.33 ± 0.15	7.33 ± 0.15	7.33 ± 0.15
24	7.79 ± 0.04	7.97 ± 0.01	8.30 ± 0.04
48	8.01 ± 0.05	8.27 ± 0.04	9.02 ± 0.05
72	8.70 ± 0.04	8.84 ± 0.00	9.28 ± 0.04
96	8.67 ± 0.05	8.93 ± 0.20	9.36 ± 0.05
120	8.64 ± 0.02	8.86 ± 0.16	9.24 ± 0.02

Table 31. Effect of yeast amount on cells growth *S. cerevisiae* IFO0216 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

Time (h)	Cell growth (Log cfu/ml)		
	1.4×10^6 cfu/ml	4.0×10^6 cfu/ml	9.1×10^6 cfu/ml
0	6.21 ± 0.01	6.61 ± 0.02	6.96 ± 0.01
24	6.69 ± 0.01	7.00 ± 0.13	7.20 ± 0.05
48	6.80 ± 0.05	7.21 ± 0.16	7.60 ± 0.02
72	6.67 ± 0.01	7.23 ± 0.16	7.59 ± 0.08
96	6.68 ± 0.05	7.19 ± 0.18	7.62 ± 0.03
120	6.73 ± 0.03	7.17 ± 0.08	7.54 ± 0.07

Table 32. Effect of yeast amount on total kefiran production by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

Time (h)	Total kefiran (g/l)		
	1.4×10^6 cfu/ml	4.0×10^6 cfu/ml	9.1×10^6 cfu/ml
0	0.17 ± 0.00	0.17 ± 0.00	0.17 ± 0.00
24	0.41 ± 0.03	0.48 ± 0.14	0.58 ± 0.02
48	0.65 ± 0.02	0.86 ± 0.13	0.89 ± 0.04
72	0.86 ± 0.01	0.95 ± 0.06	1.02 ± 0.04
96	0.93 ± 0.03	0.98 ± 0.09	1.05 ± 0.02
120	0.90 ± 0.03	1.07 ± 0.13	1.15 ± 0.03

Table 33. Effect of yeast amount on reducing sugar in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

Time (h)	Reducing sugar (g/l)		
	1.4×10^6 cfu/ml	4.0×10^6 cfu/ml	9.1×10^6 cfu/ml
0	41.37 ± 0.59	41.37 ± 0.59	41.37 ± 0.59
24	36.67 ± 4.62	35.19 ± 1.68	33.82 ± 2.77
48	24.19 ± 2.10	26.57 ± 1.93	24.79 ± 1.09
72	20.33 ± 1.34	19.32 ± 2.27	17.77 ± 1.26
96	18.84 ± 1.09	13.85 ± 0.92	14.21 ± 2.61
120	11.59 ± 0.92	11.06 ± 0.34	11.12 ± 1.43

Table 34. Effect of yeast amount on pH in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

Time (h)	pH of broth		
	1.4×10^6 cfu/ml	4.0×10^6 cfu/ml	9.1×10^6 cfu/ml
0	5.50 ± 0.00	5.50 ± 0.00	5.50 ± 0.00
24	4.52 ± 0.07	4.67 ± 0.10	4.59 ± 0.04
48	4.18 ± 0.03	3.90 ± 0.05	3.99 ± 0.02
72	3.97 ± 0.01	3.69 ± 0.04	3.88 ± 0.01
96	3.83 ± 0.01	3.59 ± 0.02	3.75 ± 0.01
120	3.75 ± 0.01	3.57 ± 0.01	3.65 ± 0.03

Table 35. Effects of yeast amount on $Y_{p/s}$ and productivity of kefiran by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture under stirring condition at 120 rpm at room temperature.

Yeast amount (cfu/ml)	$Y_{p/s}$ (%w/w)	Productivity of kefiran (mg/l/h)
1.4×10^6	3.0 ± 0.1	9.9 ± 0.8
4.0×10^6	3.6 ± 0.2	15.2 ± 1.2
9.1×10^6	3.8 ± 0.0	15.3 ± 1.3

Table 36. Effect of aeration on cells growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 of the mixed culture in batch culture at room temperature.

Time (h)	Cell growth (Log cfu/ml)		
	No aeration	5 % of DO control	5 % of DO and pH control
0	7.02 ± 0.07	7.02 ± 0.06	7.02 ± 0.03
24	7.85 ± 0.03	7.90 ± 0.08	7.62 ± 0.03
48	7.96 ± 0.02	8.14 ± 0.05	8.16 ± 0.06
72	8.09 ± 0.02	8.34 ± 0.03	8.66 ± 0.04
96	7.97 ± 0.05	8.47 ± 0.03	8.60 ± 0.12
120	7.89 ± 0.08	8.46 ± 0.03	8.52 ± 0.04

Table 37. Effect of aeration on cells growth of *S. cerevisiae* IFO 0216 of the mixed culture in batch culture at room temperature.

Time (h)	Cell growth (Log cfu/ml)		
	no aeration	5 % of DO control	5 % of DO and pH control
0	6.20 ± 0.17	6.20 ± 0.01	6.20 ± 0.03
24	6.65 ± 0.07	7.61 ± 0.05	7.23 ± 0.05
48	7.14 ± 0.07	7.90 ± 0.01	8.15 ± 0.02
72	6.84 ± 0.01	7.83 ± 0.00	8.05 ± 0.04
96	6.78 ± 0.03	7.65 ± 0.07	8.00 ± 0.02
120	6.70 ± 0.08	7.58 ± 0.05	7.95 ± 0.02

Table 38. Effect of aeration on total kefiran production by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 of the mixed culture in batch culture at room temperature.

Total kefiran (g/l)					
Time (h)	no aeration	Time (h)	5 % of DO control	Time (h)	5 % of DO and pH control
0	0.10 ± 0.00	0	0.10 ± 0.00	0	0.16 ± 0.01
24	0.52 ± 0.01	16	0.51 ± 0.01	12	0.88 ± 0.05
48	0.77 ± 0.02	24	0.89 ± 0.01	24	1.03 ± 0.00
72	0.95 ± 0.03	42	1.16 ± 0.05	36	1.32 ± 0.04
96	1.24 ± 0.08	64	1.56 ± 0.02	48	1.61 ± 0.00
120	1.22 ± 0.02	72	1.71 ± 0.01	72	2.01 ± 0.27
		96	1.82 ± 0.00	96	2.40 ± 0.23
		120	1.88 ± 0.06	120	2.58 ± 0.03

Table 39. Effect of aeration on reducing sugar of the mixed culture in batch culture at room temperature.

Reducing sugar (g/l)					
Time (h)	No aeration	Time (h)	5 % of DO control	Time (h)	5 % of DO and pH control
0	42.17 ± 1.77	0	42.17 ± 2.02	0	44.09 ± 0.30
24	33.29 ± 0.34	16	33.35 ± 0.76	12	40.47 ± 0.41
48	26.27 ± 1.01	24	26.15 ± 0.17	24	32.47 ± 0.88
72	20.21 ± 0.17	42	22.23 ± 0.67	36	7.78 ± 0.03
96	15.75 ± 0.92	48	15.39 ± 0.92	48	2.87 ± 0.34
120	15.10 ± 1.01	64	12.13 ± 0.67	60	2.54 ± 0.41
		72	8.98 ± 1.43	72	1.82 ± 0.27
		96	8.14 ± 1.09	96	1.51 ± 0.24
		120	7.43 ± 2.10	120	0.41 ± 0.17

Table 40. Effect of aeration on pH of the mixed culture in batch culture at room temperature.

pH of broth					
Time (h)	No aeration	Time (h)	5 % of DO control	Time (h)	5 % of DO and pH control
0	5.5	0	5.5	0	5.5
24	4.5	16	5.28	12	5.5
48	3.86	24	4.72	24	5.5
72	3.56	42	3.96	36	5.5
96	3.51	48	3.89	48	5.5
120	3.51	64	3.7	60	5.5
		72	3.68	72	5.5
		96	3.62	96	5.5
		120	3.62	120	5.5

Table 41. $Y_{p/s}$ and productivity of kefiran by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in batch culture at room temperature.

Conditions	$Y_{p/s}$ (%w/w)	Productivity of kefiran (mg/l/h)
No aeration	4.5 ± 0.1	14.5 ± 0.6
5 % of DO control	5.4 ± 0.3	16.5 ± 0.4
5 % of DO and pH control	5.9 ± 0.1	20.3 ± 0.6

Table 42. Cell growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 of the mixed culture in batch and fed-batch culture at room temperature.

Time (h)	Cell growth (Log cfu/ml)	
	Batch culture	Fed-batch culture
0	6.93 ± 0.03	6.93 ± 0.04
24	7.62 ± 0.03	8.00 ± 0.04
24	7.62 ± 0.03	7.81 ± 0.02
48	8.16 ± 0.03	8.71 ± 0.05
48	8.16 ± 0.03	8.41 ± 0.03
72	8.66 ± 0.04	8.79 ± 0.13
96	8.60 ± 0.12	9.01 ± 0.06

Table 43. Cell growth of *S. cerevisiae* IFO 0216 of the mixed culture in batch and fed-batch culture at room temperature.

Time (h)	Cell growth (Log cfu/ml)	
	Batch culture	Fed-batch culture
0	6.20 ± 0.03	6.16 ± 0.12
24	7.23 ± 0.03	7.68 ± 0.06
24	7.23 ± 0.03	7.47 ± 0.03
48	8.15 ± 0.06	8.06 ± 0.06
48	8.15 ± 0.06	7.63 ± 0.07
72	8.05 ± 0.04	8.11 ± 0.01
96	8.00 ± 0.12	7.70 ± 0.06
120	7.95 ± 0.04	7.70 ± 0.02

Table 44. Total kefiran production by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in batch and fed-batch culture at room temperature.

Time (h)	Total kefiran (g/l)	
	Batch culture	Fed-batch culture
0	0.16 ± 0.01	0.13 ± 0.02
12	0.88 ± 0.05	0.23 ± 0.03
24	1.03 ± 0.00	0.70 ± 0.07
24	1.03 ± 0.00	0.34 ± 0.02
36	1.32 ± 0.04	1.40 ± 0.02
48	1.61 ± 0.00	2.01 ± 0.02
48	1.61 ± 0.00	1.69 ± 0.06
60	1.66 ± 0.00	2.68 ± 0.07
72	2.01 ± 0.27	2.86 ± 0.01
96	2.40 ± 0.23	3.25 ± 0.11
120	2.58 ± 0.03	3.17 ± 0.02

Table 45. Reducing sugar of the mixed culture in batch and fed-batch culture at room temperature.

Time (h)	Reducing sugar (g/l)	
	Batch culture	Fed-batch culture
0	44.09 ± 0.30	42.06 ± 0.61
12	40.47 ± 0.41	31.84 ± 1.42
24	32.47 ± 0.88	27.26 ± 0.74
24	32.47 ± 0.88	43.92 ± 0.95
36	7.78 ± 0.03	26.40 ± 1.01
48	2.87 ± 0.34	12.27 ± 0.20
48	2.87 ± 0.34	29.88 ± 1.08
60	2.54 ± 0.41	9.88 ± 0.20
72	1.82 ± 0.27	9.12 ± 0.61
96	1.51 ± 0.24	6.59 ± 0.54
120	0.41 ± 1.17	5.20 ± 1.15

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวเบญจมาส เชียรศิลป์

(ภาษาอังกฤษ) Miss Benjamas Cheirsilp

หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์และโทรสาร

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112
โทรศัพท์ (074) 286374 โทรสาร (074) 446727
E-mail: benjamas.che@psu.ac.th

ประวัติการศึกษา

พ.ศ.	วุฒิปริญญา	สาขาวิชา	สถาบัน
2546	Ph.D	Biotechnology Engineering	Osaka University Japan
2542	M.Eng.	Biotechnology Engineering	Osaka University Japan
2540	B.Eng.	Chemical Engineering	Tohoku University Japan

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสาร

Shibasaki-Kitakawa, N., **Cheirsilp, B.**, Iwamura, K., Kushibiki, M., Kitakawa, A. and Yonemoto, T. (1998) Kinetic model for oligosaccharide hydrolysis using suspended and immobilized enzymes. Biochem. Eng. J. 1(3): 201-209.

Cheirsilp, B., Shimizu, H. and Shioya, S. (2001) Modelling and optimization of environmental conditions for kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 57:639-646.

Cheirsilp, B., Shimizu, H. and Shioya, S. (2003) Enhanced kefiran production of *Lactobacillus kefiranofaciens* by mixed culture with *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biotechnol. 100(1): 43-53.

Cheirsilp, B., Shoji, H., Shimizu, H. and Shioya, S. (2003) Interactions between *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae* in mixed culture of kefiran production. J. Biosci. Bioeng. 96 (3): 279-284.

Shioya, S., **Cheirsilp, B.**, Egawa, S., Wardani, A.K., Nagahisa, K., Tada, S., Katakura, K. and Shimizu, H. (2004) Production from mixed culture of lactic acid bacteria and yeast. J. Biotechnol. 82(9): 438-439. (Japanese)

Shimizu, H., **Cheirsilp, B.**, and Shioya, S. (2005) Development of co-culture systems of lactic acid bacteria and yeasts for bioproduction. Japanese J. Lactic Acid Bacteria. 16 (1): 2-10.

Cheirsilp, B. (2006) Study on interaction of two microorganisms in mixed culture for kefiran fermentation by model analysis. Thai J. Biotechnol. 7(1): 52-59.

Cheirsilp, B. (2006) Simulation of kefiran production of Lactobacillus kefiranofaciens JCM6985 in fed-batch reactor. Songklanakarin J. Sci. Technol. 28(5): 1059-1069.

Jeamjounkhaw, P., H-Kittikun, A. and **Cheirsilp, B.** (2007) Optimization of lipase entrapment in alginate gel bead for palm olein hydrolysis. Songklanakarin J. Sci. Technol. 29 (Suppl. 2): 261-267. (Thai)

Cheirsilp, B., Shimizu, H. and Shioya, S. (2007) Kinetic modeling of kefiran production in mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. Process Biochem. 42: 570-579.

Cheirsilp, B., Kaewthong, W. and H-Kittikun, A. (2007) Kinetic study of glycerolysis of palm olein for monoacylglycerol production by immobilized lipase. Biochem. Eng. J. 35: 71-80.

Cheirsilp, B. and H-Kittikun, A. (2007) A mathematical model approach to a glycerolysis reaction for monoacylglycerol production. WIT Transactions on Modelling and Simulation 46: 225-232.

Yeesang, C., Chanthachum, S. and **Cheirsilp, B.** (2008) Sago starch as a low-cost carbon source for exopolysaccharide production by *Lactobacillus kefiranofaciens*. World J. Microbiol. Biotechnol. 24(7): 1195-1201.

Cheirsilp, B. and Umsakul, K. (2008) Processing of banana-based wine product using pectinase and α-amylase. J. Food Process Eng. 31: 78-90.

H-Kittikun, A., Kaewthong, W. and **Cheirsilp, B.** (2008) Continuous production of monoacylglycerols from palm olein in packed-bed reactor with immobilized Lipase PS. Biochem. Eng. J. 40: 116-120.

Cheirsilp, B., H-Kittikun, A. and Limkatanyu, S. (2008) Impact of transesterification mechanisms on the kinetic modeling of biodiesel production by immobilized lipase. Biochem. Eng. J. 42: 261–269.

Kitcha, S., Maneerat, S. and **Cheirsilp, B.** (2008) Cyclodextrin glycosyltransferase from a newly isolated alkalophilic *Bacillus* sp. C26. Songklanakarin J. Sci. Technol. 30(6): 723-728.

Cheirsilp, B., Jeamjounkhaw, P. and H-Kittikun, A. (2009) Optimizing an alginate immobilized lipase for monoacylglycerol production by the glycerolysis reaction. J. Mol. Catal. B: Enzym. 59: 206-211.

Tran, H.T.M., **Cheirsilp, B.**, Hodgson, B. and Umsakul, K. (2010) Potential use of *Bacillus subtilis* in a co-culture with *Clostridium butylicum* for acetone–butanol–ethanol production from cassava starch. Biochem. Eng. J. 48: 260–267.

Cheirsilp, B., Kitcha, S. and Maneerat, S. (2010) Kinetic characteristics of beta-cyclodextrin production by cyclodextrin glycosyltransferase from newly isolated *Bacillus* sp. C26. Electron. J. Biotechnol. 13(4) Article Number: 6

Tongboriboon, K., **Cheirsilp, B.**, H-Kittikun, A. (2010) Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. J. Mol. Catal. B: Enzym. 67 (1-2): 52-59.

Saenge, C., **Cheirsilp, B.**, Suksaroge, T.T., Bourtoom, T. (2010) Potential use of oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* for the bioconversion of crude glycerol from biodiesel plant to lipids and carotenoids. Process Biochem. 46(1): 210-218.

Yeesang, C., **Cheirsilp, B.** (2010) Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. Bioresour. Technol. 102(3): 3034-3040.

Saenge, C., **Cheirsilp, B.**, Suksaroge T., Bourtoom, T. (2011) Efficient concomitant production of lipids and carotenoids by oleaginous red yeast *Rhodotorula glutinis* cultured in palm oil mill effluent and application of lipids for biodiesel production. Biotechnol. Bioprocess Eng. 16(1): 23-33.

Sri, R.M., **Cheirsilp, B.**, Kitcha, S. (2011) Effect of substrate concentration and temperature on the kinetics and thermal stability of cyclodextrin glycosyltransferase for the production of β-cyclodextrin: Experimental results vs. mathematical model. Process Biochem. 46: 1399–1404.

Cheirsilp, B., Suwannarat, W., Niyomdecha, R. (2011) Mixed culture of oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* and microalga *Chlorella vulgaris* for lipid production from industrial wastes and its use as biodiesel feedstock. New Biotechnol. 28 (4):362-368.

Cheirsilp, B., Radchabut, S. (2011) Use of whey lactose from dairy industry for economical kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens* in mixed cultures with yeasts. New Biotechnol. (Article in press)

Suphatharaprateep, W., **Cheirsilp, B.**, Jongjareonrak, A. (2011) Production and properties of two collagenases from bacteria and their application for collagen extraction. New Biotechnol. (Article in press)

ชื่อ สกุล นางสาวศิริลออ ราชบุตร

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5011020034

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมี-ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2549

ผลงานวิจัย

ผลงานตีพิมพ์

Cheirsilp, B., Radchabut, S. (2011) Use of whey lactose from dairy industry for economical kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens* in mixed cultures with yeasts. New Biotechnol. 28(6): 574-580.

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Sirilaor Radchabut, Aran H-Kittikun and Benjamas Cheirsilp. 2008. Screening of yeast strains for mixed culture with Lactobacillus kefiranofaciens to enhance kefiran production. The 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology, TSB 2008 : Biotechnology for Global Care. Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand. 14-17 October 2008.

ELSEVIER

Use of whey lactose from dairy industry for economical kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens* in mixed cultures with yeasts

Benjamas Cheirsilp and Sirilaor Radchabut

Department of Industrial Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, Hat-Yai, 90112, Thailand

To evaluate the feasibility of producing kefiran industrially, whey lactose, a by-product from dairy industry, was used as a low cost carbon source. Because the accumulation of lactic acid as a by-product of *Lactobacillus kefiranofaciens* inhibited cell growth and kefiran production, the kefir grain derived and non-derived yeasts were screened for their abilities to reduce lactic acid and promote kefiran production in a mixed culture. Six species of yeasts were examined: *Torulaspora delbrueckii* IFO 1626; *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0216; *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155; *Saccharomyces exiguus* TISTR 5081; *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR 5044; and *Saccharomyces carlsbergensis* TISTR 5018. The mixed culture of *L. kefiranofaciens* with *S. cerevisiae* IFO 0216 enhanced the kefiran production best from 568 mg/L in the pure culture up to 807 and 938 mg/L in the mixed cultures under anaerobic and microaerobic conditions, respectively. The optimal conditions for kefiran production by the mixed culture were: whey lactose 4%; yeast extract 4%; initial pH of 5.5; and initial amounts of *L. kefiranofaciens* and *S. cerevisiae* IFO 0216 of 2.1×10^7 and 4.0×10^6 CFU/mL, respectively. Scaling up the mixed culture in a 2 L bioreactor with dissolved oxygen control at 5% and pH control at 5.5 gave the maximum kefiran production of 2580 mg/L in batch culture and 3250 mg/L in fed-batch culture.

Introduction

Kefiran is a water-soluble exopolysaccharide that consists of approximately equal amounts of glucose and galactose [1]. It is produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* derived from kefir grains [2]. Kefiran is applied in many fields as a thickener, stabilizer, emulsifier, fat substitute or gelling agent. Additionally, it also has an antitumor activity [3,4], an antimicrobial activity [5] and has positive effects on cholesterol metabolism [6,7]. Because of these properties, kefiran production from *L. kefiranofaciens* has been studied mainly for industrial purposes.

However, in the production of useful materials such as polysaccharides and antibiotic substances by lactic bacteria (LAB), lactic acid accumulation becomes a serious problem. Lactic acid accumulation inhibits the growth of LAB, resulting in a decrease in the productivity of useful metabolites, because these products are usually growth-associated. Lactic acid should be removed from the media to enhance growth and produce useful metabolites production. To remove the lactic acid, continuous culture systems equipped with a separation membrane and/or electrodialyzers have been developed [8]. However, these separation systems make the entire fermentation process mechanically complex and costly.

It is widely known that kefir grains form a complex microflora consisting of more than 100 kinds of bacteria and yeasts firmly embedded [9]. The interaction of microorganisms in the flora was presumed by Adachi *et al.* [10] to be as follows: the microorganisms are classified into four groups, namely homofermentative lactic acid bacteria, heterofermentative lactic acid bacteria, lactose-assimilating yeast, and non-lactose-assimilating yeast. The non-lactose-assimilating yeast was assumed to survive by consuming galactose and lactic acid as a carbon source and energy source [11,12]. It was expected that the removal of lactic acid from the culture medium by these non-lactose-assimilating yeast might enhance kefiran production.

Corresponding author: Cheirsilp, B. (benjamas.che@psu.ac.th)

1871-6784/$ - see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved. doi:10.1016/j.nbt.2011.01.009

Whey lactose is a waste product from cheese production that represents a major pollution problem for countries depending on the dairy economics. It can be used as a carbon source for microorganisms because it contains high amount of lactose [13–15]. The utilization of whey lactose as a substrate for kefiran production has been of interest as they are inexpensive energy rich resources and also eliminate large-scale accumulation. In this study, a co-culture system of kefiran producing *L. kefiranofaciens* with lactic acid assimilating yeast was created to improve the yield and the productivity of kefiran by removing lactic acid from the medium. Firstly, the non-lactose-assimilating yeast strains that could reduce lactic acid in the medium were screened. Secondly, the mixed cultures of *L. kefiranofaciens* with the screened yeast strains under anaerobic and microaerobic conditions were performed to select the suitable yeast that could enhance kefiran production. Then the optimal culture conditions for kefiran production by the mixed culture including whey lactose concentration, nitrogen source and its concentration, initial pH and ratio of *L. kefiranofaciens* to yeast were determined. Furthermore, the fed-batch fermentation technique was applied to enhance the kefiran production by the mixed culture.

Materials and methods

Microorganisms

Lactobacillus kefiranofaciens JCM 6985, which was used to produce kefiran in this study, was obtained from Japan Collection of Microorganisms (JCM), RIKEN, Japan. The cultures were stored at −20°C in 20% glycerol until required and were reactivated in commercial Man-Rogosa Sharpe (MRS) broth medium at 30 ± 2°C and an initial pH of 5.5 for 48 h.

For the mixed culture, six species of yeasts were examined. *Torulaspora delbrueckii* IFO 1626 and *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0216 were obtained from the collection at the Institute for Fermentation Osaka (IFO), Japan. *Debaryomyces hansenii* TISTR 5155, *Saccharomyces exiguus* TISTR 5081, *Zygosaccharomyces rouxii* TISTR 5044, and *Saccharomyces carlsbergensis* TISTR 5018 were obtained from the culture collection at Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR), Thailand. The cultures were stored at −20°C in 20% glycerol until required and were reactivated in Yeast-Peptone (YP) medium at 30 ± 2°C and initial pH of 6.0 for 24 h.

Medium

MRS medium was composed of 2% glucose, 2% tryptone, 1% yeast extract, 2% meat extract, 0.2% K_2HPO_4, 0.4% triammonium citrate, 0.5% sodium acetate, 0.1% Tween 80, 0.028%, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0.058% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, and 0.074% $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ and with an initial pH of 5.5. YP medium was composed of 1% glucose, 1% polypeptone and 1% yeast extract and initial pH at 6. The medium for kefiran production was a modified MRS-whey lactose medium in which glucose was replaced by whey lactose. The main compositions (%, w/w) of the whey lactose powder employed in this study were lactose, 76.5 and protein, 0.2.

Cultivation

The pre-cultured cells were separated by centrifugation at 10,000 rpm, 4°C for 10 min and then inoculated into 100 mL of fresh medium (modified MRS-whey lactose medium) at an initial optical density at 660 nm of about 0.2. Cultivation was performed anaerobically in 100-mL screw capped bottles filled with 100 mL of medium which were slowly stirred by a magnetic stirrer. The cultivation under microaerobic condition was performed in 250 mL flasks containing 100 mL of medium which were shaken at 60 rpm.

Assays

Cell concentration was measured based on an optical density at 660 nm (OD_{660}). In the mixed culture, the viable-cell count of bacteria was determined as the number of colony forming units (CFUs) on a selective agar medium. This was commercially available MRS containing 0.0005% cycloheximide and 1.5% agar. The viable-cell count of yeast was determined as the number of CFUs on the agar medium, which contained 1% glucose, 0.5% polypeptone, 0.5% yeast extract and 1.5% agar.

Extracellular kefiran in the supernatant named as broth kefiran was precipitated by the addition of the same volume of cold ethanol (−20°C) as that of the sample and then centrifuged at 10,000 rpm, 4°C for 10 min. The precipitate was re-dissolved in distilled water. To remove any remaining undissolved materials, the solution was centrifuged (at the same speed as above) and the clear supernatant was again precipitated in the same way. The resulting precipitate was re-dissolved in distilled water. Broth kefiran was then quantified calorimetrically by adding 1 mL of anthrone reagent to 0.1 mL of the broth kefiran solution. The reaction mixture was incubated for 10 min at 100°C and cooled to room temperature. The absorbance at 620 nm was measured. The concentration of broth kefiran was calculated using the standard curve of lactose.

The kefiran surrounding the cells named as capsular kefiran was extracted from the cells by boiling in distilled water at 100°C for 30 min. The mixture was centrifuged, the clear supernatant was decanted, and the amount of capsular kefiran in the supernatant was measured using the same method as that for broth kefiran. The total kefiran was the sum of broth and capsular kefiran.

The residual lactose was determined by high-pressure liquid chromatography (HPLC) method under the following conditions: Column, Zorbax Carbohydrate 4.6 × 150 mm, 5 μm; mobile phase, acetonitrile:water (70:30); flow rate, 1.5 ml min^{-1}; column temperature, 35°C; Refractive Index Detector (Agilent 1100 series HPLC). The amount of lactic acid was determined by HPLC equipped with an Aminex HPX-87H column (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). The column was eluted with 0.005 M H_2SO_4 at a flow rate of 0.6 mL/min. All the data presented in this paper under various conditions were the means of at least duplicates. Appropriate tests of significance, analysis of variance (ANOVA) and confidence of difference at the 5% level were used for evaluating the data.

Results and discussion

Screening of yeast strains for the mixed culture with L. kefiranofaciens

A strong inhibitory effect of lactic acid concentration on the growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 was observed by Cheirsilp *et al.* [16]. Therefore, in this study the removal of lactic acid by a co-culture with yeast strain was attempted in this study to overcome the inhibition by lactic acid. To avoid whey lactose competition

TABLE 1

Growth and lactose consuming ability of yeasts in modified MRS-whey lactose medium compared with growth and lactic acid consuming ability of yeasts in modified MRS-lactic acid medium at 48 h under shaking condition at 200 rpm

Strain	Modified MRS-whey lactose medium		Modified MRS-lactic acid medium	
	OD_{660}	Lactose consuming ability	OD_{660}	Lactic acid consuming ability
T. delbruekii IFO 1626	1.98 ± 0.01^{d}	1.89 ± 0.1^{a}	7.09 ± 0.23^{d}	0.0 ± 0.2^{c}
S. cerevisiae IFO 0216	1.82 ± 0.01^{e}	0.8 ± 0.7^{b}	7.89 ± 0.21^{cd}	6.2 ± 0.5^{a}
D. hansenii TISTR 5155	4.80 ± 0.03^{b}	0.4 ± 0.1^{b}	9.24 ± 0.33^{b}	1.2 ± 0.5^{b}
S. exiguus TISTR 5081	1.59 ± 0.02^{f}	0.9 ± 0.5^{b}	8.04 ± 0.15^{cd}	2.5 ± 0.7^{b}
Z. rouxii TISTR 5044	5.14 ± 0.02^{a}	0.0 ± 0.3^{b}	16.41 ± 0.09^{a}	0.0 ± 0.9^{c}
S. carlsbergensis TISTR 5018	2.47 ± 0.01^{c}	0.6 ± 0.1^{b}	8.42 ± 0.47^{bc}	1.8 ± 0.6^{b}

Initial OD_{660} was 0.2. Different letters within the same column indicate significant differences ($P < 0.05$).

with *L. kefiranofaciens* JCM 6985, yeast strains that do not assimilate lactose were selected. The ability of six yeast strains for consuming lactose or lactic acid was tested by cultivation in a modified MRS medium in which glucose was replaced by whey lactose or lactic acid. It was found that all yeast strains could grow in either a modified MRS-whey lactose medium or a modified MRS-lactic acid medium (Table 1). Considering the amount of lactose consumed at 48 h, only *T. delbruekii* IFO 1626 was a lactose-consuming strain, whereas the other strains were not. Among the lactic acid-consuming strains, *S. cerevisiae* IFO 0216 was the most effective one for lactic acid removal from the culture medium, whereas *T. delbruekii* IFO 1626 and *Z. rouxii* TISTR 5044 were not lactic acid-consuming strain.

The mixed cultures of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 with each yeast strain were performed under anaerobic and microaerobic conditions using a modified MRS-whey lactose medium. Fig. 1a shows the optical density at 660 nm and kefiran production by the pure culture and the mixed culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 with each yeast strain under anaerobic condition at 60 h and 120 h. The optical density of the mixed cultures with *D. hansenii* TISTR 5155

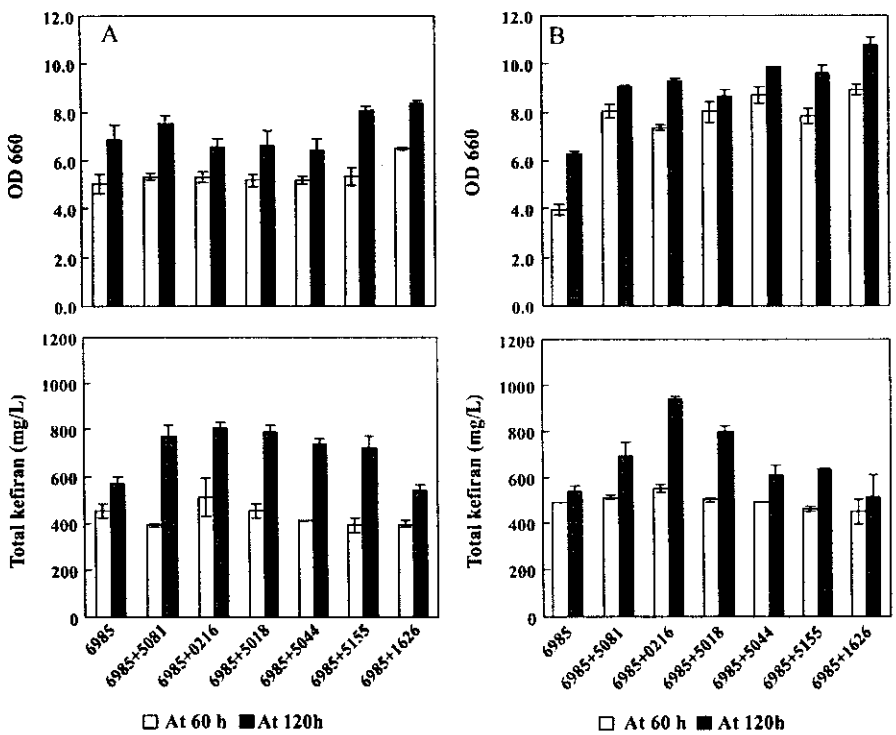

FIGURE 1

Cell growth and total kefiran production of the pure culture and the mixed cultures at 60 h and 120 h under anaerobic condition **(a)** and microaerobic **(b)** condition. 6985: pure culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985; 6985 + 5081: mixed culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and *S. exiguus* TISTR 5081; 6985 + 0216: mixed culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and *S. cerevisiae* IFO 0216; 6985 + 5018: mixed culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and *S. carlsbergensis* TISTR 5018; 6985 + 5044: mixed culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and *Z. rouxii* TISTR 5044; 6985 + 5155: mixed culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and *D. hansenii* TISTR 5155; 6985 + 1626: mixed culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and *T. delbruekii* IFO 1626.

and *T. delbruekii* IFO 1626 increased more than that of the pure culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985. This could be due to the growth of yeast along with the growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985. However, there was no significant difference between the optical density of the pure culture and the mixed culture *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and the other yeasts. This might be because these yeasts could not grow well under anaerobic condition.

Apart from the mixed culture with *T. delbruekii* IFO 1626, all the mixed cultures gave higher total kefiran production at 120 h compared with the pure culture (568 mg/L). This included the mixed culture with *Z. rouxii* TISTR 5044 which was not a lactic acid-consuming strain. These results suggest that the yeast may enhance kefiran production not only by removal of lactic acid, but also by other factors. Challinor and Rose [17] reported that under unfavorable fermentation conditions for cell growth, yeast grown with lactic acid bacteria was able to synthesize and excrete factors required to support bacterial growth. Because high levels of capsular kefiran were detected in the mixed cultures (data not shown), it was thought that there was some type of physical contact that occurred between the two microorganisms. Among the mixed cultures in which kefiran production was enhanced, the mixed culture with *S. cerevisiae* IFO 0216 gave the highest total kefiran production of 807 mg/L. Although, the enhancement of kefiran production by the mixed culture of both strains was previously reported [11], the enhancement by the mixed cultures with other yeast strains has not been reported before. Because *T. delbruekii* IFO 1626 could consume lactose, competition with *L. kefiranofaciens* JCM 6985 might occur and cause the reduction in kefiran production when mixed with *T. delbruekii* IFO 1626.

Fig. 1b shows the results of the mixed cultures under microaerobic condition compared with those of the pure culture. It was found that under microaerobic condition the optical density of the mixed culture was higher than that under anaerobic condition. This could be because yeast could grow better under the microaerobic condition. The growth and kefiran production of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the pure culture under microaerobic condition were slightly lower than those under anaerobic condition. Under microaerobic condition, the mixed culture *L. kefiranofaciens* JCM 6985 with *S. cerevisiae* IFO 0216 gave the highest total kefiran production and even higher than under anaerobic condition. This could be because under microaerobic condition yeast could grow and consume more lactic acid than under anaerobic condition. Therefore, *S. cerevisiae* IFO 0216 was selected as a suitable yeast strain to co-culture with *L. kefiranofaciens* JCM 6985 for enhancing kefiran production from whey lactose.

Optimizing kefiran production by the mixed culture

The suitable nitrogen source among yeast extract, meat extract and tryptone was screened for kefiran production using the mixed culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and *S. cerevisiae* IFO 0216 under microaerobic condition. When the yeast extract was used as a sole nitrogen source the total kefiran production was higher than when using other nitrogen sources (data not shown). The reason might be because meat extract and tryptone contain only some amino acids and casein protein, respectively. However, yeast extract contains various amino acids and more vitamins [18], which are growth factors for cell growth. Yokoi *et al.* [19] pointed out that the essential nutrient for the pure culture of *Lactobacillus* sp. KPB-167B was yeast extract. In this study, the enhanced cell growth and kefiran production in the mixed culture also appeared to be mainly due to the abundant vitamin groups in the yeast extract. Therefore, for the purpose of simplifying the composition of the medium, the yeast extract was used as a sole nitrogen source for kefiran production.

The effect of concentration of whey lactose was investigated by varying the initial whey lactose concentrations from 2% to 8%. The initial amounts of *L. kefiranofaciens* and *S. cerevisiae* IFO 0216 for the mixed culture were 2.1×10^7 and 1.4×10^6 CFU/mL, respectively. The results are shown in Fig. 2. *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and *S. cerevisiae* IFO 0216 grew well up to 96 h and 24 h, respectively. The cell growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985

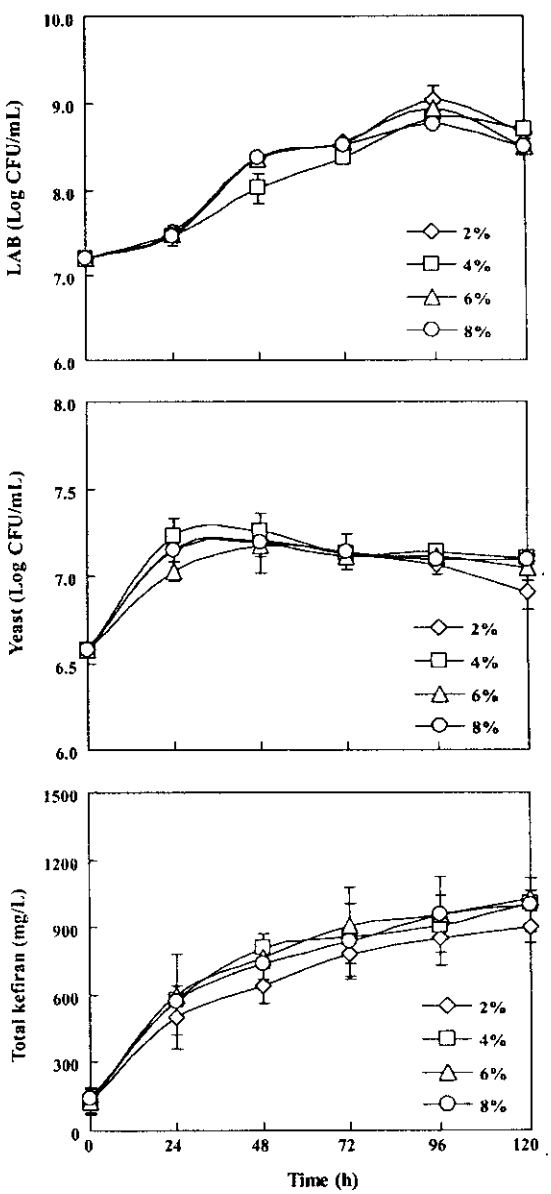

FIGURE 2

Effect of whey lactose concentration on cell growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 (LAB) and *S. cerevisiae* IFO 0216 (yeast) and production of total kefiran by the mixed culture.

was not significantly affected by increasing the whey lactose concentration. The total kefiran production increased when the whey lactose was increased up to 4% and beyond this level there was no significant increase. One explanation could be that kefiran production was inhibited at high concentration of whey lactose. In the pure culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985, it was reported that the lactose concentration beyond 2% inhibited cell growth and kefiran production [16].

The effect of the concentration of yeast extract was examined. As shown in Fig. 3, the cell growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture increased with the increase in the amount of yeast extract. The highest total kefiran production of 1176 mg/L was achieved from the mixed culture with 6% yeast extract. However, this was not significantly different from that with 4% yeast extract (1091 mg/L). Lo *et al.* [20] reported that a higher yeast extract concentration gave a higher cell growth but lower production of metabolites. However, in this study there was no significant effect of yeast extract concentration on the cell growth of yeast.

The effect of the initial pH on kefiran production by the mixed culture was investigated as shown in Fig. 4. The optimum cell growth and kefiran production of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in the mixed culture were obtained at an initial pH of 5.5. The maximum concentration of kefiran was 1140 mg/L. It was reported that cell growth and kefiran production of lactic acid bacteria were optimized at pH 5.5 [21]. This study has showed that this pH was also optimal for kefiran production by the mixed culture. At a low initial pH, the inhibitory effect of lactic acid would become more

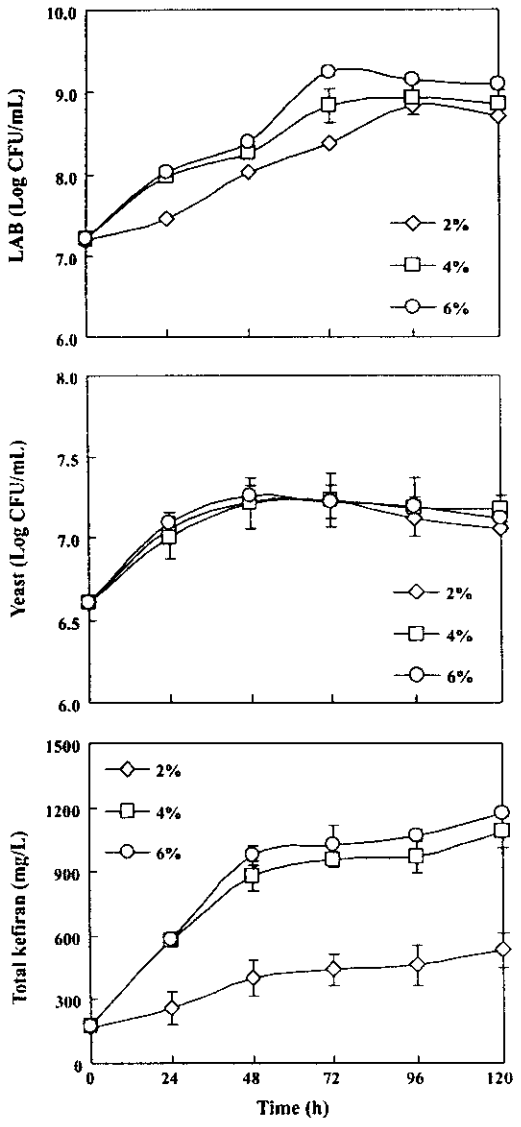

FIGURE 3

Effect of yeast extract concentration on cell growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 (LAB) and *S. cerevisiae* IFO 0216 (yeast) and production of total kefiran by the mixed culture.

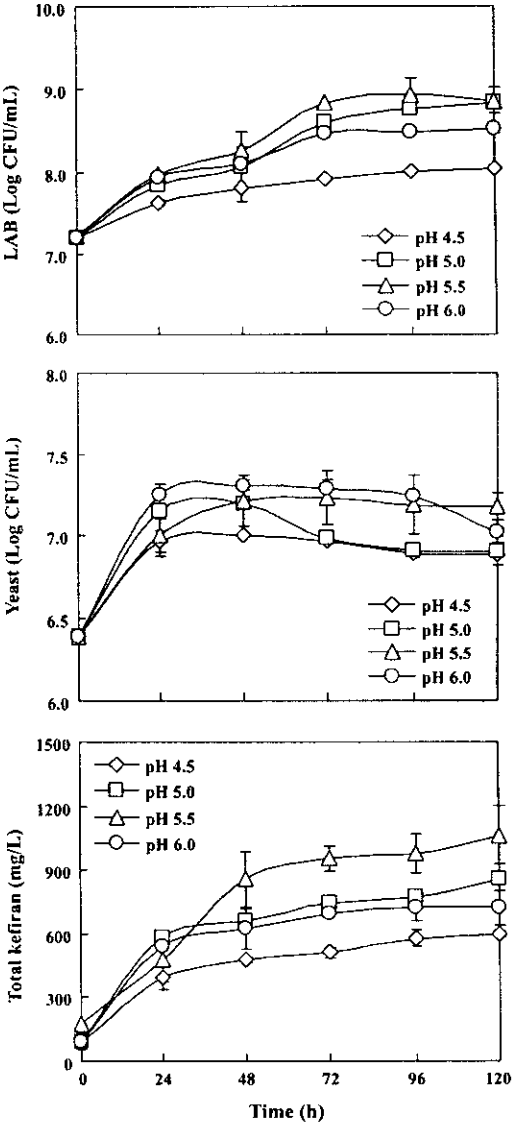

FIGURE 4

Effect of initial pH on cell growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 (LAB) and *S. cerevisiae* IFO 0216 (yeast) and production of total kefiran by the mixed culture.

severe than that at a higher initial pH. Although the optimum cell growth of yeast was observed at pH 6.0, at this pH *L. kefiranofaciens* JCM 6985 grew more slowly than that at pH 5.5, resulting in lower kefiran production.

The effect of the initial amount of *S. cerevisiae* IFO 0216 was also investigated by increasing the amount of *S. cerevisiae* IFO 0216 from 1.4×10^6 CFU/mL to 4.0×10^6 CFU/mL and 9.1×10^6 CFU/mL. It was found that increasing the amount of *S. cerevisiae* IFO 0216 could enhance the cell growth of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 (data not shown). However, there was no significant difference between the kefiran production by the mixed culture with an initial amount of *S. cerevisiae* IFO 0216 at 4.0×10^6 CFU/mL and 9.1×10^6 CFU/mL.

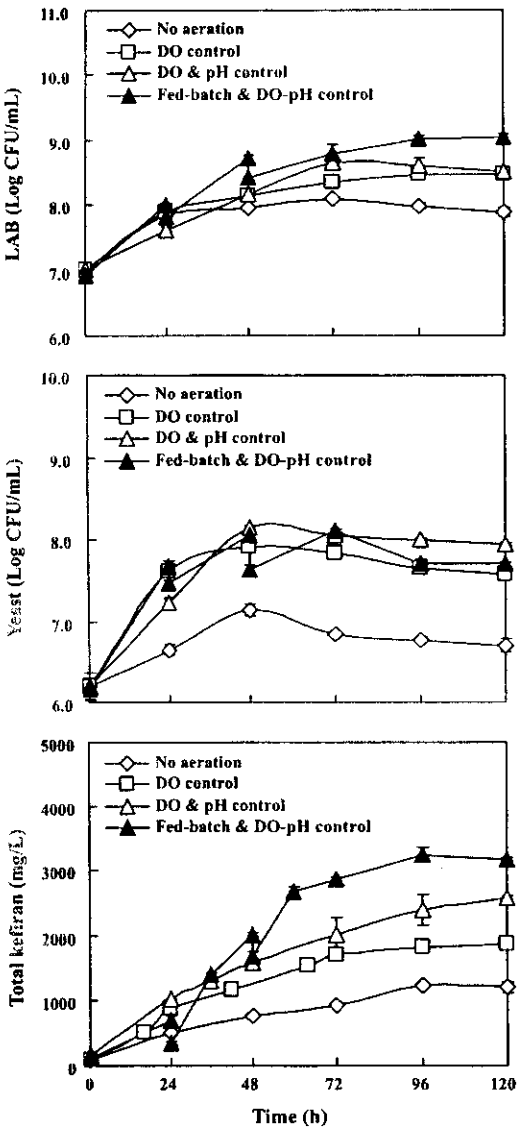

FIGURE 5

Batch and fed-batch fermentation of the mixed culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 (LAB) and *S. cerevisiae* IFO 0216 (yeast). No aeration: batch fermentation with agitation speed at 100 rpm and without aeration; DO control: batch fermentation with DO control at 5% of saturation by changing agitation speed and aeration rate; DO and pH control: batch fermentation with DO control at 5% of saturation and pH control at 5.5; Fed-batch and DO-pH control: fed-batch fermentation with DO control at 5% of saturation and pH control at 5.5.

Batch and fed-batch fermentation

To further increase the production of kefiran by the mixed culture, batch fermentation was carried out in a 2 L bioreactor equipped with aeration and pH control systems (Fig. 5). The mixed culture in which the dissolved oxygen (DO) was controlled at 5% of saturation by changing agitation speed and aeration rate was compared with the mixed culture without aeration. In the latter the agitation speed was maintained at 100 rpm. The yeast grew faster under the aerobic condition in which the DO was controlled at 5% compared with that without aeration. Even though the DO level was controlled at 5% of saturation, the DO concentration became quite low (almost zero) during fermentation because of the consumption by the higher yeast concentration and the limitations of the apparatus. In the aerobic mixed culture, the stimulation of growth and kefiran production of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 by yeast began in the early exponential growth phase. An increase in kefiran production was mostly due to an increase in broth kefiran (from 1210 to 1730 mg/L whereas capsular kefiran increased only from 110 to 150 mg/L). Because of a high cell concentration of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in this phase the production rate of kefiran became significantly higher at the end of this phase.

Without pH control, the pH in the medium declined from 5.5 to 3.51 which indicated that the production of lactic acid by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 was higher than the consumption by the yeast. When the pH was controlled by adding sodium hydroxide, there was a slight increase in the amounts of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 and yeast and resulting in increased kefiran production up to 2580 mg/L which included broth kefiran, 2430 mg/L and capsular kefiran, 150 mg/L. This could be because the inhibitory effect of low pH was alleviated.

The fed-batch fermentation was performed to avoid substrate inhibition and to enhance the production of kefiran by feeding additional substrate. The culture with an initial working volume of 1 L was first operated at batch mode. Then 250 mL of whey lactose and yeast extract were added after 24 h and 48 h of fermentation time. The DO was controlled at 5% of saturation. The pH of the culture was controlled at 5.5 throughout the fermentation process. The feeding of the substrate increased kefiran production from 2580 mg/L in the batch mode up to 3250 mg/L (broth kefiran, 2951 mg/L and capsular kefiran, 299 mg/L) in the fed-batch mode.

Conclusion

This study has shown that whey lactose could be used as a carbon source for kefiran production. Because lactic acid is the main inhibitor of kefiran fermentation, the stimulation of the kefiran production of *L. kefiranofaciens* was successfully performed by the mixed culture with lactic acid consuming *S. cerevisiae* IFO 0216. The mixed culture under microaerobic condition gave higher kefiran production than under anaerobic condition. The yeast extract was considered as a suitable nitrogen source for kefiran production by the mixed culture using whey lactose as carbon source. Optimal conditions for kefiran production by the mixed culture were obtained. Kefiran production by the mixed culture was greatly improved by the fed-batch fermentation.

References

1 Kooiman, P. (1968) The chemical structure of kefiran, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain. *J. Carbohydr. Res.* 7, 220–221

2 Toba, T. *et al.* (1986) A medium for the isolation of capsular bacteria from kefir grains. *Agric. Biol. Chem.* 50, 2673–2674

3 Shiomi, M. *et al.* (1982) Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain. *Japan J. Med. Sci. Biol.* 35, 75–80

4 Santos, A. *et al.* (2003) The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. isolated from kefir. *System Appl. Microbiol.* 26, 434–437

5 Rodrigues, K.L. *et al.* (2005) Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. *J. Antimicrob. Agents.* 25, 404–408

6 Kiessling, G. *et al.* (2002) Long-term consumption of fermented dairy products over 6 months increases HDL cholesterol. *J. Clin. Nutr.* 56, 843–849

7 Xiao, J.Z. *et al.* (2003) Effects of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* 16 Kefir – a complex probiotic E.R. Farnworth on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers. *J. Dairy Sci.* 86, 2452–2461

8 Nomura, Y. *et al.* (1991) Factors affecting lactic acid production rate in built-in electrodialysis fermentation, and approach to high speed batch culture. *J. Ferment. Bioeng.* 71, 450–452

9 Takizawa, S. *et al.* (1998) The composition of the lactobacillus flora in kefir grains. *J. Appl. Microbiol.* 21, 121–127

10 Adachi, S. *et al.* (1990) Ecology of lactic acid bacteria with special reference to kefir-granule formation by *Lactobacillus kefiranofaciens*. *Biseibutsu* 6, 15–25

11 Cheirsilp, B. *et al.* (2003) Enhanced kefiran production by mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 100, 43–53

12 Tada, S. *et al.* (2007) Fed-Batch coculture of *Lactobacillus kefiranofaciens* with *Saccharomyces cerevisiae* for effective production of kefiran. *J. Biosci. Bioeng.* 103, 557–562

13 Pais, J. *et al.* (2009) Bioplastics production from cheese whey by recombinant *E. coli*. *New Biotechnol.* 25 (Suppl. 1), S220

14 Sharifzadeh Baei, M. *et al.* (2010) Optimization PHAs production from dairy industry wastewater (cheese whey) by *Azohydromonas lata* DSMZ 1123. *Iranica J. Energy Environ.* 1 (2), 132–136

15 Obruca, S. *et al.* (2009) Production of polyester-based bioplastics by *Bacillus megaterium* grown on waste cheese whey substrate under exogenous stress. *New Biotechnol.* 25 (Suppl. 1), S257

16 Cheirsilp, B. *et al.* (2001) Modeling and optimization of environmental condition for kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 639–646

17 Challinor, S.W. and Rose, A.H. (1954) Inter-relationships between yeast and bacterium when growing together in a defined medium. *Nature* 174, 877–878

18 Sykita, B. (1983) *Methods in Industrial Microbiology*. Ellis Horwood Limited

19 Yokoi, H. *et al.* (1990) Isolation and characterization of polysaccharide producing bacteria from kefir grain. *J. Dairy Sci.* 73, 1684–1689

20 Lo, Y.M. *et al.* (1997) Effects of yeast extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomonas campestris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 689–694

21 Yokoi, H. and Wantanabe, T. (1992) Optimum culture condition of production of kefiran by *Lactobacillus* sp. KPB-167B isolated from kefir grain. *J. Ferment. Bioeng.* 74, 327–329