การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคีเฟอรันจากแหล่งอาหารราคาถูก และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เสริมความงาม

Optimization of Kefiran Production from Low-Cost Nutrients Sources and Its Application in Cosmetics

อภิสรา เอียดเจริญ

Apisara Iadcharoen

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Biotechnology
Prince of Songkla University
2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคีเฟอรันจากแหล่งอาหารราคาถูกและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เสริมความงาม

ผู้เขียน นางสาวอภิสรา เอียดเจริญ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

.....

(ศาสตราจารย์ ดร. เบญจมาส เชียรศิลป์)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ปิยะรัตน์ บุญแสวง)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. เบญจมาส เชียรศิลป์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ชูฤทธิ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งสาง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....
(ศาสตราจารย์ ดร. เบญจมาส เชียรศิลป์)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....
(นางสาวอภิสรา เอียดเจริญ)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวอภิสรา เอียดเจริญ)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคีเฟอรันจากแหล่งอาหารราคาถูกและการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เสริมความงาม

ผู้เขียน นางสาวอภิสรา เอียดเจริญ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

คีเฟอรันเป็นเอ็กโซโพลีแซ็คคาไรด์ที่สามารถใช้เป็นสารเพิ่มความคงตัวและมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ คีเฟอรันสามารถผลิตได้จากหัวเชื้อคีเฟอร์เกรนที่เลี้ยงในนมสดหรือนมถั่วเหลือง หรือผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus kefiranofaciens* JCM 6985 ซึ่งพบว่าการเลี้ยงหัวเชื้อคีเฟอร์เกรนในนมถั่วเหลืองให้คีเฟอรันสูงกว่าในนมสด คิดเป็นผลผลิตเท่ากับ 30.5±0.6 มิลลิกรัมคีเฟอรันต่อกรัมสารตั้งต้น แต่หากผลิตคีเฟอรันโดยเชื้อแบคทีเรียแลคติกให้ผลผลิตคีเฟอรันสูงกว่าคือเท่ากับ 45.4±0.8 มิลลิกรัมคีเฟอรันต่อกรัมสารตั้งต้น อย่างไรก็ตามเนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีราคาสูงทำให้ต้นทุนการผลิตคีเฟอรันสูงตามไปด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจใช้ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมเกษตรเพื่อเป็นแหล่งอาหารราคาถูกในการผลิตคีเฟอรัน ซึ่งได้แก่ น้ำมะพร้าวแก่ และเวย์แลคโตสในการเลี้ยงเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ผลการทดลองพบว่าน้ำมะพร้าวแก่ให้ผลผลิตคีเฟอรันสูงเทียบเท่ากับการใช้น้ำตาลบริสุทธิ์ และสูงกว่าการใช้เวย์แลคโตส และพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคีเฟอรันจากน้ำมะพร้าวแก่ คือ การใช้น้ำมะพร้าวแก่ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 3 และควบคุมพีเอชที่ 5.5 ตลอดการหมักเพื่อลดการยับยั้งโดยกรดแลคติกที่เชื้อผลิตขึ้นระหว่างการเจริญ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวพบว่าเชื้อสามารถเจริญและให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.78±0.12 กรัมต่อลิตร และผลิตคีเฟอรันได้เท่ากับ 2.04±0.08 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตคีเฟอรันเท่ากับ 67.7±3.0 มิลลิกรัมคีเฟอรันต่อกรัมสารตั้งต้น และพบว่าเชื้อมีการใช้น้ำตาลมากกว่าร้อยละ 98 และผลิตกรดรวมเท่ากับร้อยละ 3.05 จากการศึกษาการเติมแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ และควบคุมพีเอชระหว่างการหมัก พบว่าการเติมยีสต์สกัดที่ 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ทำให้การผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้นเป็น 3.26±0.03 กรัมต่อลิตรและผลิตกรดรวมได้ร้อยละ 5.90 จากการวิเคราะห์โครงสร้างคีเฟอรันพบว่าคีเฟอรันที่ผลิตโดยใช้น้ำมะพร้าวแก่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับคีเฟอรันที่สกัดได้จากหัวเชื้อคีเฟอร์เกรน จากการเพาะเลี้ยงแบบกะซ้ำต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ขนาด 1 ลิตร สามารถผลิตคีเฟอรันได้มากกว่า 2.02±0.03 กรัมต่อลิตร ถึง 6 รอบของการหมัก ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าน้ำมะพร้าวสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารต้นทุนต่ำสำหรับการผลิตคีเฟอรันโดยเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985

ได้ จากการขยายขนาดการผลิตคีเฟอรันในถังปฏิกรณ์ขนาด 7 ลิตร โดยใช้น้ำมะพร้าวแก่เป็นแหล่งอาหารเพียงอย่างเดียว และเก็บข้อมูลการใช้สารเคมี ค่าไฟฟ้า ค่าแก๊สในการผลิตและสกัดคีเฟอรัน พบว่าการผลิตคีเฟอรันจากน้ำมะพร้าวแก่มีต้นทุนอยู่ที่ 8.94 บาทต่อกรัมคีเฟอรัน จากการศึกษาการประยุกต์ใช้คีเฟอรันและกรดแลคติกเป็นส่วนผสมในโลชั่นบำรุงผิว และทำการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสกับผู้ทดสอบโดยใช้ 9-point hedonic scale พบว่าโลชั่นบำรุงผิวที่มีส่วนผสมของคีเฟอรันได้รับคะแนนความชุ่มชื้นแก่ผิวสูงสุดเท่ากับ 6.40 และคะแนนความชอบโดยรวมสูงสุดเท่ากับ 6.85 ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมคีเฟอรันและกรดแลคติกที่ได้รับคะแนนความชอบโดยรวมเท่ากับ 6.25 อีกทั้งยังพบว่าโลชั่นบำรุงผิวที่มีส่วนผสมคีเฟอรันมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ สำหรับโลชั่นที่มีส่วนผสมของคีเฟอรันและกรดแลคติกได้รับคะแนนความชอบโดยรวมรองลงมาอันดับสองเท่ากับ 6.25 สำหรับโลชั่นที่มีส่วนผสมของกรดแลคติกได้รับคะแนนการซึมซับเข้าสู่ผิวสูงสุดเท่ากับ 6.65

Thesis title Optimization of Kefiran Production from Low-Cost Nutrients Sources and Its Application in Cosmetics

Author Miss Apisara Iadcharoen

Major Program Biotechnology

Academic Year 2018

ABTRACT

Kefiran is a functional exopolysaccharide that can be used as stabilizers and also has antioxidant and antimicrobial properties. Kefiran could be produced either by kefir grains cultivated in milk/soymilk or pure culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* JCM 6985. It was found that kefiran produced by kefir grains in soymilk was higher than that in milk at 30.5±0.6 mg-kefiran/g-substrate but the lactic acid bacteria can produce kefiran higher at 45.4±0.8 mg-kefiran/g-substrate. However, the production costs of kefiran are high, mainly due to the high cost of fermentation media. Therefore, utilizing byproducts from agro-industries would be economically attractive. Mature coconut water (MCW) and whey lactose (WL) are byproducts from industries that could be as low-cost nutrient sources for kefiran production by *L. kefiranofaciens* JCM 6985. It was found that MCW gave high kefiran yield comparable to that obtained from pure sugars and from the use of WL. The optimal conditions for kefiran production from MCW were: initial sugar concentration of 3% and controlling pH at 5.5 during fermentation to reduce the inhibitory effect from growth-associated byproduct, lactic acid. The maximum dry cell weight and kefiran production were 2.78±0.12 g/L and 2.04±0.08 g/L, respectively. The sugar consumption and total acid production were also as high as >98% and 3.05%, respectively. When the MCW was added with yeast extract at 3 g-N/L, the kefiran production was increased up to 3.26±0.03 g/L. The total acid production was 5.9%. The structure analysis indicated that kefiran produced using MCW had similar structure to that extracted from kefir grains. The repeated-batch cultivation in 1 L bioreactor could produce the kefiran > 2.02±0.03 g/L up to 6 cycles. These results indicate that MCW could be used as a suitable low-cost nutrient source for kefiran production by *L. kefiranofaciens*. The scale up of kefiran production in 7 L of bioreactor with mature coconut only and collect data of chemicals, electric and gas for producing and extracting kefiran. It was found that the production of kefiran from mature coconut water has cost was 8.94 baht/g-kefiran. The produced kefiran and lactic acid

as a by-product were used as ingredients in skin lotion and evaluated for the sensory quality with the testers by 9-point hedonic scale used scale. The skin lotion added with kefiran received the highest score of 6.4 for giving moisture and the highest overall liking score of 6.85. While the control that contained no kefiran and lactic acid received overall liking score of 6.25.The skin lotion added with kefiran has also antioxidant property. The skin lotion added with kefiran and lactic acid received the overall liking score of 6.25 and the skin lotion added with lactic acid received the highest absorbing score of 6.65.

LIST OF TABLES

Table		page
1	Principle producers and culture conditions for exopolysaccharides production	9
2	Applications and linkages of functional exopolysaccharides from lactic acid bacteria	12
3	Effect of carbon sources on cell growth and kefiran production by *L. kefiranofaciens* JCM6985	18
4	The nutritional analysis of the mature coconut	25
5	Constituent in sweet whey power	26
6	Total nitrogen of MRS medium	44
7	Kefiran production, kefiran yield and total acid production using kefir grain and pure culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985	57
8	Effect of carbon source on kefiran production and analysis of nutrient cost	61
9	Effect of Nitrogen source on kefiran production and analysis of nutrient cost	74
10	Kefiran production in other studies	74
11	Monosaccharide compositions of kefiran	78
12	Results achieved during repeated batch fermentation by *L. kefiranofaciens* JCM 6985	81
13	Overall production cost of kefiran from mature coconut juice using gas for pasteurization	83
14	Chemical and physical characteristics of the lotion	85
15	Effect of antioxidant in all development formulas	85
16	Liking scores of 6 attributes in all development formulas	87
17	Product Standard follow the STD.551/ 2553 of Thai Industrial Standards Institute (TISI) by GreenTech Biolab Co., LTD	87

LIST OF FIGURES

Figures		Page
1	Biosythetic pathways leading to EPS synthetic in lactic acid bacteria	6
2	Structure of kefiran from *L. kefiranofaciens*	15
3	Method of analysis kefiran	38
4	Inoculum preparation and scale up from 100 mL to 1 L.	45
5	Preparation of mature coconut juice for fermentation	46
6	Diagram of pasteurization equipment.	47
7	Pictures of pasteurization equipment.	48
8	Inoculation of 1 L inoculum into 7 L fermenter and incubation for 5 days.	49
9	Kefiran recovery from fermented broth by cool ethanol precipitation.	49
10	Centrifuge to separate liquid (culture broth+ethanol) and precipitate.	50
11	Dissolve precipitate in distilled water and centrifuge to separate kefiran solution from protein precipitate and repeat ethanol precipitation before drying.	50
12	Overall processes for kefiran production and recovery.	51
13	Method of kefiran recovery for 1 L bioreactor.	52
14	Physical appearance of kefir grain (A) and photograph under microscope 100x (B).	57
15	Effect of different carbon source on growth, kefiran production, pH, TA(%) and total sugar consumption by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 at 30 ˚C,100 rpm, 120 h and initial pH 5.5. The sugar concentration was the same at 30 g/L.	60
16	Effect of different carbon sources on dry cell weight yield (g/g) (a) and (b) kefiran yield (g/g) by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 at 30 ˚C, 100 rpm, 120 h and initial pH 5.5. The sugar concentration was the same at 30 g/L.	61
17	Effect of initial sugar concentration on growth, kefiran production, pH, total acid (TA, %) and total sugar consumption by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 under condition without pH control at initial pH 5.5, 30 ˚C and 100 rpm.	63

LIST OF FIGURES (CONT.)

Figures		page
18	Effect of initial sugar concentration on growth, kefiran production, total acid (TA, %) and total sugar consumption by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 under condition with pH control at 5.5, 30 ˚C and 100 rpm.	66
19	Comparative effect of initial sugar on dry cell weight yield (g/g) (a) and (b) kefiran yield (g/g) by *L. kefiranofaciens* JCM 6985. Data were taken after cultivations at initial pH 5.5, 30 ˚C and 100 rpm for 120 h. Difference letters on the bar indicate significant differences between treatments.	67
20	Effect of initial sugar concentration on specific growth rate (μ). (a) Condition on without control pH, (b) condition on pH control at 30 ˚C, 100 rpm, 120 h and initial pH 5.5.	67
21	Effect of nitrogen concentrations of yeast extract on cell growth, kefiran production, total acid (TA, %) and total sugar consumption by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 under condition with pH control at 30 ˚C,100 rpm, 120 h and initial pH 5.5	71
22	Effect of different nitrogen concentrations of Monosodium glutamate on cell growth, kefiran production, total acid (TA, %) and total sugar consumption by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 under condition with pH control at 30 ˚C,100 rpm, 120 h and initial pH 5.5.	72
23	Comparative effect of different nitrogen sources and nitrogen concentrations on dry cell weight yield (g/g) (a) and (b) kefiran yield (g/g) by L. kefiranofaciens JCM 6985. Data were taken after cultivation at 30 ˚C, 100 rpm, 120 h and initial pH 5.5. Difference letters on the bar indicate significant differences between treatments.	73
24	Effect of initial nitrogen concentration on specific growth rate (μ) under conditions with pH control at 5.5, 30˚C and 100 rpm for 120 h. (a) Yeast extract and (b) Monosodium glutamate.	73
25	^{1}H-NMR spectrum of kefiran in D_2O at 60°C	75
26	FTIR spectrum of the exopolysaccharide in kefir grain (This study)	77

LIST OF FIGURES (CONT.)

Figures		Page
27	FTIR spectrum of the exopolysaccharide in modified mature coconut water (This study)	77
28	FTIR spectra of (a) kefiran nanofiber and (b) purified extracted kefiran	77
29	(a) Dry cell weight (b) kefiran production (c) total acid (TA%) (d) sugar consumption in repeated batch fermentation by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in mature coconut water added with yeast extract under pH control at 30 ˚C,100 rpm, 120 h and initial pH 5.5.	80
30	Cultivation of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in 7 L fermenter at 30˚C and initial pH 5.5 for 120 h.	82
31	9-point hedonic of lotion added with kefiran, kefiran-lactic acid, lactic acid scale was used for attributes of odor, viscosity, skin absorption, moisturize on skin, oily on skin (after use) and overall liking.	86
32	Growth curve of bacteria *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in MRS broth 5 day.	100
33	Standard curve of glucose	101
34	Standard curve of lactose.	102
35	Standard curve of sugar analyzed by HPLC method	104
36	Monosaccharide composition of the kefiran produced by pure culture of *L. kefiranofacien* JCM 6985 in modified mature coconut water analyzed by HPLC method.	105
37	Monosaccharide composition of the kefiran produced by kefir grain in soy milk analyzed by HPLC method.	106
38	DPPH radical scavenging (%) of BHT concentration.	107
39	Product Standard follow the STD.551/2553 of Thai Industrial Standards Institute (TISI) by GreenTech Biolab Co., LTD.	110

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. เบญจมาส เชียรศิลป์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำเป็นที่ปรึกษา ให้กำลังใจ ชี้แนวทางในการทำวิจัย การค้นคว้าและสนับสนุนทุนในการวิจัยครั้งนี้ ตลอดจนการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และคุณแอนโทนี่ ชัยกุลที่เกื้อกูล และให้คำแนะนำให้ทำวิจัยเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ในบริษัทกรีนเทคไบโอแลบและขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ปิยะรัตน์ บุญแสวง ประธานกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ชูฤทธิ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่าในการให้ข้อคิดเห็น ข้อเสนอแนะ และการตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคณาอาจารย์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม ทุกท่านที่คอยอบรมสั่งสอนให้ความรู้ คอยแนะนำในการศึกษาแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบคุณครอบครัว ด้วยความเคารพอย่างยิ่งที่คอยให้กำลังใจสนับสนุน และให้กำลังใจเสมอมาแก่ข้าพเจ้าตลอดมา และขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตรที่คอยให้กำลังใจ และช่วยเหลือตลอดการทำวิจัยครั้งนี้

อภิสรา เอียดเจริญ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	(5)
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(13)
สารบัญ	(14)
LIST OF TABLES	(9)
LIST OF FIGURES	(10)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจสอบเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	32
ขอบเขตงานวิจัย	32
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	
วัสดุและอุปกรณ์	33
วิธีการวิเคราะห์	36
วิธีการวิจัย	41
3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	56
4 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	88
เอกสารอ้างอิง	90
ภาคผนวก	100
ประวัติผู้เขียน	111

บทที่ 1
บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

คีเฟอรัน (Kefiran) ประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตสต่อกันเป็นสายยาวในอัตราส่วน 1:1 (Zajsek and Gorsek, 2010) ซึ่งจัดเป็นสารประกอบเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์สายยาวที่สามารถละลายน้ำได้ ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus kefiranofaciens* โดยความหลากหลายขององค์ประกอบจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเฉพาะแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ตลอดจนพีเอช และอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ โดยเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกได้รับความสนใจ เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่มีความปลอดภัย (Generally Recognized As Safe; GRAS) ซึ่งคีเฟอรันที่ผลิตโดยเชื้อ *L. kefiranofaciens* สามารถสกัดได้โดยตรงจากคีเฟอร์เกรน (Piermaria *et al*., 2016) ซึ่งเป็นก้อนเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรียแลคติกและยีสต์ที่นิยมใช้สำหรับหมักนมเปรี้ยวของชาวพื้นเมืองในประเทศรัฐเชีย หรือผลิตโดยเชื้อเดี่ยว *L. kefiranofaciens* ซึ่งคีเฟอรันที่ผลิตโดยเชื้อเดี่ยวมีทั้งที่ขับออกนอกเซลล์ (broth kefiran) และที่เกาะติดอยู่กับผนังเซลล์ในรูปของแคปซูล (capsular kefiran) (Cheirsilp *et al*., 2001)

คีเฟอรันสามารถประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง ไม่ว่าจะเป็นอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมผลิตเครื่องสำอางหรือเภสัชกรรม เนื่องจากคีเฟอรันมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Sabaghi *et al.,* 2015) ที่มีความสามารถในการต่อต้านริ้วรอย (Sun *et al.,* 2015) ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องสำอางบำรุงผิว นอกจากนี้มีรายงานว่าการใช้นมคีเฟอร์ทาใบหน้าจะช่วยกระชับรูขุมขน ทำให้ใบหน้าดูอ่อนเยาว์ เต่งตึง และยังช่วยขจัดสิว (พรผจง เลาหวิเชียร, 2009) สำหรับอุตสาหกรรมอาหารสามารถใช้เป็นสารเพิ่มความคงตัวในอาหาร สารทดแทนไขมัน และเป็นสารทำให้เกิดเจล (Dimitreli *et al*., 2016) อีกทั้งสามารถประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์เนื่องจากมีคุณสมบัติในการต้านแบคทีเรีย เชื้อรา และมีกิจกรรมการต้านเนื้องอก (Ghasemlou *et al*., 2012) จากคุณสมบัติดังกล่าวทำให้มีหลายงานวิจัยที่ต้องการพัฒนาการผลิตคีเฟอรันระดับอุตสาหกรรม โดยแหล่งคาร์บอนที่สามารถนำมาเลี้ยงเชื้อ *L. kefiranofaciens* เพื่อผลิตคีเฟอรัน ได้แก่ น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส (Blandn et al., 2018) และแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เลี้ยงเชื้อได้แก่ ทริปโตน ยีสต์สกัด เนื้อสกัด และไตรแอมโมเนียมซิเตรต ซึ่งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเหล่านี้มีราคาค่อนข้างสูง ทำให้การผลิตคีเฟอรันยังคงมีต้นทุนของอาหารสำหรับการผลิตสูง ดังนั้นหากมีงานวิจัยที่ศึกษาหาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนราคาถูกในการเลี้ยงเชื้อก็จะเป็นการลดต้นทุนการผลิตคีเฟอรัน นอกจากนี้ในระหว่างการเจริญและการ

ผลิตคีเฟอรันของเชื้อ *L. kefiranofaciens* พบว่าเชื้อจะมีการสร้างกรดแลคติกไปพร้อมกับการเจริญ ซึ่งกรดแลคติกสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตพลาสติกชีวภาพได้อีกด้วย (สุวรรณี สุขแสวง, 2016)

งานวิจัยนี้สนใจศึกษาการผลิตคีเฟอรันต้นทุนต่ำโดยใช้วัสดุเศษเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมเกษตร โดยเริ่มจากการเปรียบเทียบการผลิตคีเฟอรันจากหัวเชื้อคีเฟอร์เกรนกับการผลิตคีเฟอรันโดยใช้เชื้อเดี่ยว *L. kefiranofaciens* JCM 6985 และศึกษาการใช้น้ำมันมะพร้าวแก่ทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อ การใช้เวย์แลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน การเติมแหล่งไนโตรเจนราคาถูก ได้แก่ เซลล์ยีสต์ใช้แล้ว กากถั่วเหลือง และโมโนโซเดียมกลูตาเมต เปรียบเทียบกับการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน รวมทั้งศึกษาโครงสร้างคีเฟอรันที่ผลิตจากแหล่งอาหารราคาถูก จากนั้นจึงขยายขนาดการผลิตคีเฟอรันขนาด 7 ลิตร เพื่อศึกษาต้นทุนการผลิต และสุดท้ายศึกษาการประยุกต์ใช้คีเฟอรันและกรดแลคติกที่เป็นผลพลอยได้จากการเลี้ยงเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ในผลิตภัณฑ์โลชั่นบำรุงผิว

บทตรวจสอบเอกสาร

1. สารประกอบเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ (Exopolysaccharides, EPS)

เอ็กโซโพลิแซ็คคาไรด์ เป็นสารที่จุลินทรีย์สร้างหรือผลิตขึ้นในขณะที่มีการเจริญและขับออกมาภายนอกผนังเซลล์ มีลักษณะเป็นเมือกเหนียวหรือเป็นยางหนืด ซึ่งองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นเพื่อป้องกันอันตรายจากสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมและป้องกันการกัดกินจากโปรโตซัว (Ven den Berg *et al*., 1993 อ้างโดย ศิริลออ ราชบุตร, 2552) การผลิตเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์โดยจุลินทรีย์เป็นการผลิตผ่านกระบวนการหมัก เอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์มักมีน้ำหนักโมเลกุลสูง และโครงสร้างโดยทั่วไปจะประกอบด้วยโมเลกุลเดี่ยวหลายๆ โมเลกุลต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก โดยที่โมเลกุลของน้ำตาลจะต่อแบบซ้ำๆ กันระหว่าง 3-7 หน่วย เอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์จากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีโครงสร้างที่แตกต่างกันและจุลินทรีย์สกุลเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ก็จะมีองค์ประกอบทางเคมีของเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่ต่างกันด้วย โดยจะมีความหลากหลาย และมีลักษณะเฉพาะตัวมากกว่าพอลิแซ็คคาไรด์จากพืชหรือสาหร่าย ซึ่งอาจมีมากถึง 200 ชนิด (Agira, 1992 อ้างโดย สุวรรณี สุขแสวง, 2559) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าองค์ประกอบและสมบัติทางเคมีกายภาพของเอ็กโซโพลีแซ็คคาไรด์(EPSs) ยังขึ้นอยู่กับแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้ออีกด้วย (Polak *et al*., 2015)

1.1 การจำแนกประเภทเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์

การจัดจำแนกประเภทของเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ขึ้นอยู่กับหลักเกณฑ์ที่แบ่งใช้ ดังนี้ (Agira, 1992 อ้างโดย สุวรรณี สุขแสวง, 2559)

1.1.1 การจำแนกตามลักษณะการสร้างสารประกอบเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ของจุลินทรีย์

การสร้างเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ของจุลินทรีย์มักมีความสัมพันธ์กับลักษณะโครงสร้างของเซลล์ ซึ่งการจำแนกสารประกอบเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์สามารถจัดจำแนกได้ 2 ประเภท คือ

1) สารประกอบเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่เกาะติดรอบผนังเซลล์ (capsular exopolysaccharides) เป็นเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่มีลักษณะเป็นเมือกเหนียว มีรูปร่างไม่แน่นอน เกาะติดรอบๆ เซลล์ของจุลินทรีย์

2) สารประกอบเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ที่สะสมในน้ำหมัก (broth exopolysaccharides) เป็นเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่พบได้ทั่วไป มีลักษณะเป็นเมือกเหนียว มีรูปร่างไม่แน่นอน ซึ่งการผลิตสารประกอบเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ชนิดนี้มีผลทำให้อาหารมีความหนืดขึ้นเพิ่มขึ้น (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2530; Gassem *et al*., 1997)

1.1.2 การจำแนกตามชนิดของโมโนเมอร์ (monomer) ที่เป็นองค์ประกอบ

การจำแนกตามชนิดของโมโนเมอร์ (monomer) สามารถจำแนกได้ 4 ประเภท ดังนี้

1) เอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่มีองค์ประกอบเป็นสารอินทรีย์ โดยสารอินทรีย์ที่พบในโครงสร้างของเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ ได้แก่ อะซิเตท ไพรูเวท ซักซิเนต และโพรพิโอเนต ซึ่งสารอินทรีย์เหล่านี้จะมีผลต่อประจุรวมบนโมเลกุลของเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ และนอกจากนี้ยังพบกรดอะมิโน ได้แก่ ซีรีน และ กรดกลูตามิกในโครงสร้างของเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่ได้จากแบคทีเรียบางชนิดด้วย

2) เอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ ที่มีองค์ประกอบเป็นสารอินทรีย์ฟอสเฟตซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่พบได้บ่อยในโครงสร้างของเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ ซึ่งจะเหมือนกับกรด teichoic โดยจะอยู่ในรูปของ phosphorylate exopolysaccharides พบในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกนอกจากพบฟอสเฟตในโครงสร้างของเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์แล้ว ยังพบเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ชนิดซัลเฟตอยู่ในโครงสร้างของโมเลกุลด้วย

3) โฮโมโพลีแซ็คคาไรด์ (homopolysaccharides) เป็นเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่ประกอบด้วยโมโนแซ็คคาไรด์เพียงชนิดเดียว ต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะไกลโคซิดิก ซึ่งโดยส่วนใหญ่มักเป็นน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลฟรุคโตสสามารถจำแนกได้ 4 กลุ่มย่อยๆ ดังนี้

ก) กลุ่ม α-*ß*-glucan เช่น กลูแคน ภายในโมเลกุลประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายยาว โดยแต่ละชนิดมีพันธะที่จับแตกต่างกัน ทำให้สามารถแบ่งกลูแคนได้เป็นหลายชนิด เช่น bacterial cellulose (*ß*-D glucan) pullulan (α-D glucan) และ scleroglucan (1,3-*ß*-D glucan)

ข) กลุ่ม *ß*-D glucan เช่น curdian (1,3-*ß*-glucan)

ค) กลุ่ม fructans เช่น levan เป็นเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ ที่มีโครงสร้างน้ำตาลฟรุคโตสจับกันด้วยพันธะ *ß*-2-6 glycosidic ผลิตโดย *Streptococcus salivarius* (Cerning, 1994)

ง) กลุ่มอื่นๆ เช่น polygalactan

4) เฮทเทอโรพอลิแซ็คคาไรด์ (heteropolysaccharide) เป็นเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่สามารถพบได้ทั่วไป โครงสร้างทั่วไปประกอบด้วยน้ำตาลมากกว่า 1 ชนิดที่ต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะไกลโคซิดิก เฮทเทอโรพอลิแซ็คคาไรด์ที่พบส่วนใหญ่จะประกอบไปด้วยโครงสร้างของน้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบ แต่ก็มีพบ แรมโนส ฟรุคโตส หรือแมนโนส เป็นองค์ประกอบได้บ้างเช่นกัน นอกจากนี้อาจมีองค์ประกอบอื่นๆ เช่น sn-glycerol-3-phosphate, *N*-acetyl-aminosugar หรือ หมู่ acetyl เป็นองค์ประกอบรวมอยู่ด้วย (ระพีพรรณ เติมตันทร์, 2547) การมีองค์ประกอบภายในโมเลกุลที่แตกต่างกัน จะทำให้สมบัติของสารประกอบพอลิแซ็คคาไรด์มีความแตกต่างกัน

1.1.3 การจำแนกตามประจุไฟฟ้าภายในโครงสร้างของเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์

จำแนกตามประจุไฟฟ้าภายในโครงสร้างของเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ ได้เป็น 3 ประเภท ดังนี้ (หนึ่ง เตียอำรง, 2532)

1) เอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่มีประจุลบ (anionic exopolysaccharides) เป็นเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่ประกอบด้วยมวลโมเลกุลของกรดยูโรนิค กรดอินทรีย์ หรือ หมู่อะซิติล ตัวอย่างเช่น เจลแลน (gellan) เป็นเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่ผลิตโดย *Sphigomonas paucimobilis* ภายในโมเลกุลประกอบด้วยโครงสร้างของกลูโคสต่อกับกรดกลูโคโรนิคและน้ำตาลแรมโนส ตามลำดับ หรือ แซนแทน (xanthan) ที่มีโครงสร้างน้ำตาลแมนโนสต่อกับกรดกลูโคโรนิค (Nampoothiri *et al*., 2003; Winter, 1978)

2) เอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่มีประจุเป็นกลาง (neutral exopolysaccharides) เป็นเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่มีเพียงโครงสร้างของน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ เช่น เอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่ผลิตโดย *Streptococcus thermopilus* SY ภายในโมเลกุลประกอบด้วยโครงสร้างของน้ำตาลกลูโคสต่อกับกาแลคโตสและแมนโนส ในอัตราส่วน 2:4:5:1 (Ricciardi *et al*., 2002)

3) เอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่มีประจุบวก (cationic exopolysaccharides) เป็นเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่พบได้น้อย โดยส่วนใหญ่ผลิตโดยเชื้อรา

1.2 การผลิตเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์จากแบคทีเรียแลคติก

ในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรค์ของจุลินทรีย์จำเป็นต้องอาศัยการหมักภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อกระบวนการเจริญเติบโตและการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ (Linton *et al*., 1991 อ้างโดย ศุภศิลป์ มณีรัตน์, 2543) การผลิตเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ของแบคทีเรียแลคติกจะขึ้นกับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยง ได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช ปริมาณออกซิเจน และระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก รวมทั้งสายพันธุ์ (Cerning, 1990)

การสังเคราะห์เอ็กโซพอลิแซ็คคาไรค์ของแบคทีเรียมีความซับซ้อนและมีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของยีนหลายๆชิ้น โดยยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์และการทำงานของโปรตีนเพื่อผลิตเฮเทอโรโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียแลคติกกลุ่ม mesophilic เช่น *Lactococus* จะอยู่บนพลาสมิด ส่วนแบคทีเรียแลคติกกลุ่ม thermophilic เช่น *Lactobacilli* จะอยู่บนโครโมโซม (Law *et al.,* 2001)

วิถีการสังเคราะห์เฮเทอโรพอลิแซ็คคาไรค์สามารถ แบ่งย่อยออกได้เป็น 4 ปฏิกิริยาต่อเนื่องกัน โดยขั้นตอนแรก คือ การนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์หรือไซโตพลาสซึม ขั้นตอนที่สอง คือ การสังเคราะห์ sugar-1-phosphates ขั้นตอนที่สาม คือ การกระตุ้นและการต่อกันของน้ำตาล และสุดท้าย คือการนำเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรค์ออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งสามารถแสดงได้ดัง Figure 1

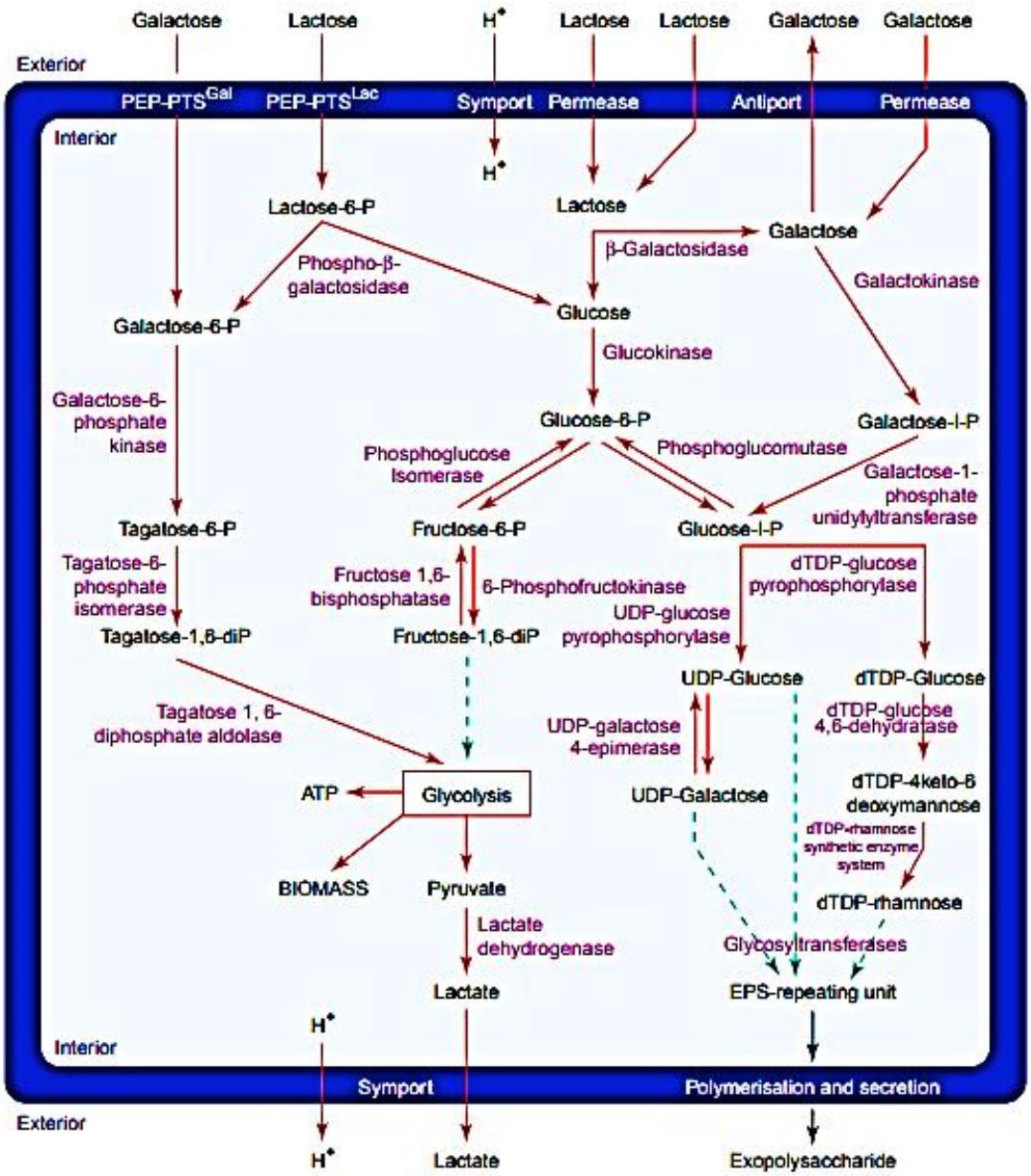


Figure 1 Biosythetic pathways leading to EPS synthetic in lactic acid bacteria

ที่มา: Welman และ Maddox (2003)

ขั้นตอนแรกของการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์โดยการทำงานของ phosphoenolpyruvate (PEP)-sugar phosphotransferase system (PTS) ซึ่ง PEP-PTS ประกอบด้วยกลุ่มของโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการจับกับน้ำตาล นำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์และเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับน้ำตาล อย่างไรก็ตามแบคทีเรียแลคติกบางสายพันธ์อาจจะใช้ non-PEP-PTS ในการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ เช่น primary และ

secondary transport system คือการนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ผ่านช่องโปรตีนของเซลล์โดยการใช้ protons (Law *et al*., 2001)

ขั้นตอนที่สอง คือการสังเคราะห์ sugar-1-phosphate เพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์เอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ อย่างไรก็ตามเซลล์จะมีระบบเพื่อควบคุมการสังเคราะห์ทั้ง sugar-1-phosphate และ sugar-6-phosphate เพราะ sugar-6-phospate จะใช้ในกระบวนการ catabolism ซึ่งระบบที่ทำการควบคุมการสังเคราะห์ว่าจะเป็น sugar-1-phosphate หรือ sugar-6-phospate คือ phosphoglucomutases (PGMs) เช่น ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของมอลโทส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่นั้น *Lactococcus lactis* จะนำมอลโทสเข้าสู่เซลล์โดยเอนไซม์ permease แล้วมอลโตสจะถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคสและ *ß*-glucose-1-phosphate ถ้า *ß*-glucose-1-phosphate ถูกใช้ในกระบวนการ catabolic พบว่า *ß*-glucose-1-phosphate ก็จะถูกเปลี่ยนเป็น glucose-6-phosphate โดยการทำงานของ *ß*-PGMs ในกรณีของ α-PGMs จะทำหน้าที่ตรงกันข้ามคือจะเปลี่ยน glucose-6-phosphate ไปเป็น glucose-1-phosphate และสังเคราะห์เอ็กโซพอลิแซ็คไรด์

ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฟรุคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ฟรุคโตสจะถูกนำเข้าเซลล์โดย PEP-Fructose PTS ซึ่งจะทำให้ได้เป็น fructose-1-phosphate แล้ว fructose-1-phosphate จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น fructose-1,6 –biphosphate และ fructose-6-phosphate และ glucose-6-phosphate และ glucose-1-phosphate ตามลำดับ แต่วิธีนี้จะสั้นลงถ้าเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยกลูโคสจะถูกเปลี่ยนโดย PEP-glucose PTS ได้เป็น glucose-6-phosphate และ glucose-1-phosphate ตามลำดับ

ขั้นตอนที่สาม คือการสังเคราะห์ sugar nucleotide และการต่อสายพอลิแซ็คคาไรด์ โดย sugar nucleotide หลักในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ คือ UDP-glucose, UDP-galactose และ dTDP-rhamnose ซึ่ง sugar nucleotide เหล่านี้ ใช้เป็น precursor ของ repeat unit ของเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ ส่วนขั้นต่อไปในการสังเคราะห์เอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์จำเป็นต้องใช้ EPS-specific enzymes ซึ่งเอนไซม์ที่มีความสำคัญคือ glycosyltransferase

ขั้นตอนสุดท้ายคือการขับเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ รายละเอียดในส่วนของการขับเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ จาก plasma membrane ผ่านชั้น peptidoglycan ของแบคทีเรียแกรมบวกยังไม่มีมากนัก อย่างไรก็ตาม subunits ของเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์จะถูกสร้างอยู่บนที่ undecaprenol lipid carrier ซึ่งอยู่ในส่วนของ cytoplasmic และเอนไซม์ polymerase ทำหน้าที่ในการควบคุมความยาวเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ (Law *et al*., 2001 อ้างโดย สุวรรณี สุขแสวง, 2559)

1.3 สายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติก

แหล่งของแบคทีเรียแลคติกมีผลต่อคุณสมบัติของเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่ผลิตได้โดยการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ (Badel, 2011) ในปัจจุบันจะใช้เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหาร เนื่องจากพบว่าเชื้อที่แยกได้สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่มีความบริสุทธ์สูงมี *Lactobacilli* ประมาณ 30 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ เช่น *Lactobacillus casei, L. acidophilus, L. brevis, L. curvatus, L. delbrueckii* bulgaricus, *L. helveticus, L. rhamnosus, L. plantarum, L. johnsonii* เป็นต้น โดยทั่วไปอ้างว่า *Lactobacillus* sp. ไม่ใช่สายพันธุ์ที่ผลิตพอลิแซ็คคาไรค์ที่ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียจากดิน เช่น *Xanthomonas campestris* ที่ผลิต แซนแทนมากกว่า 2000 ตันต่อปี เพื่อใช้บริโภคเป็นสารเพิ่มความข้นหนืด (Sutherland, 2002) โดยการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ พีเอช ปริมาณออกซิเจน เป็นต้น และพบว่าน้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับ *Lactobacilli* สายพันธุ์ต่างๆ (Van Gee Schutten *et al*., 1998) นมและอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะทำให้เชื้อผลิตเอ็กโซพอลิแซ็ค คาไรด์มากที่สุด Table 1 แสดงการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์โดยใช้สายพันธุ์ *L. rhamnosus* ในแหล่งอาหารชนิดต่างๆ พบว่า *L. rhamnosus* ให้การผลิตเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 2.7 กรัมต่อลิตร

Table 1 Principle producers and culture conditions for exopolysaccharides production

Microorganisms	Media	EPS	Temperature (°C)	Time (h)	pH	Yield (mg/L)	Ref.
L. rhamnosus 9595 M	BMM[a]	/	32-37	72	6	~1000	Dupont *et al*., 2000
L. delb. bulgaricus RR	Whey	Dextran	38	24-8	5	95-110	Briczinski *et al*., 2002
L. rhamnosus R	BMM[a]	/	37	72	6	500	Pham *et al*., 2000
L. delb. bulgaricus	Milk	Dextran	42	24	/	110	Bouzar *et al*., 1996
L. delb. bulgaricus	MRS	Dextran	40	18	/	263	Aslim *et al*., 2005
L. rhamnosus GG	Milk	/	37	20	/	80	Landersjo *et al*., 2002
L.delb. bulgaricus 291	Skimmed milk	Dextran	37	22	/	80	Faber *et al*., 2001
L. casei CG11	Skimmed milk	Alginate	25	48	/	130	Cerning *et al*., 1994
L. helveticus	Whey(protein free)	/	37	60	5	730	Lin *et al*., 2007
L. delb. bulgaricus	Whey permeate	Dextran	37	18	6	800	Shene *et al*., 2007
L. rhamnosus 9595	BMM[a]	/	37	24	6	2775	Macedo *et al*., 2002
L. paracasei		Dextran	32-37	72	6	~80	Dupont *et al*., 2000

[a]BMM: Basal Minimal Medium /: Not available

ดัดแปลงจาก Badel (2011)

1.4 การใช้ประโยชน์เอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์

1.4.1 การใช้เอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร

พอลิแซ็คคาไรด์ที่ได้จากพืชส่วนใหญ่ถูกนำมาใช้ในอาหารและใช้เอนไซม์ช่วยในการปรับปรุงคุณสมบัติ เช่น cellulose, starch, pectin, alginate และ carrageenan แต่เนื่องจากเอนไซม์โดยส่วนใหญ่จะมีความจำเพาะกับสารแต่ละชนิดทำให้มีความยุ่งยากในการนำมาใช้ประโยชน์ จึงได้มีการนำเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์มาประยุกต์ใช้ในอาหาร ซึ่งมีข้อดีคือมีความหนืดสูงแม้จะใช้ที่ความเข้มข้นต่ำและมีคุณสมบัติเหมือนพลาสติก

เอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์สามารถใช้เป็นสารเพิ่มเนื้อสัมผัส เพิ่มความคงตัว ปรับปรุงลักษณะปรากฏของอาหารหลายชนิด และป้องกันการไหลเยิ้มของเจล สารทดแทนไขมันในอุตสาหกรรมการผลิตโยเกิร์ต หรือใช้เป็นสารปรุงแต่งในอาหาร ซึ่งมีความปลอดภัยและราคาถูกกว่าการใช้สารเคมี (Cerning, *et al*., 1994; Duenas *et al*., 2003) ตัวอย่างของเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์จากแบคทีเรีย ได้แก่ เด็กซแทรน ซึ่งเป็นเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ตัวแรกที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติก ถูกนำมาใช้ในการผลิตเจล ความแตกต่างของโครงสร้างทำให้เด็กซแทรนมีคุณสมบัติทั้งละลายน้ำได้และไม่ละลายน้ำ จึงนำมาใช้ในการผลิตลูกกวาด หมากฝรั่ง และเจลลี่ แด็ซแทรนจะช่วยป้องกันการไหลเยิ้มของเจล ไอศกรีม และส่วนผสมในการทำขนมพุดดิ้ง และแซนแทนกัม ซึ่งเป็นเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่ผลิตจาก *Xanthanmonas campetris* ซึ่งก่อโรคในพืชในปี 1969 แต่ได้รับการยอมรับให้สามารถนำมาใช้ในอาหาร และผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น นม เครื่องดื่ม ลูกกวาด ซอส ขนมปัง น้ำผลไม้และอาหารสัตว์ หรือใช้ในอุตสาหกรรมน้ำมัน อุตสาหกรรมยา อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง อุตสาหกรรมกระดาษ อุตสาหกรรมสี และอุตสาหกรรมสิ่งทอ ต้นทุนการผลิตแซนแทนกัมค่อนข้างถูกเนื่องจากสารตั้งต้นที่ใช้ คือกลูโคส และเชื้อสามารถเปลี่ยนกลูโคสเป็นพอลิเมอร์ได้สูงร้อยละ 60-70 (Waites *et al*., 2009 อ้างโดย สุวรรณี สุขแสวง, 2559) รายงานจาก Gibson (2004) พบว่าแบคทีเรียแลคติก 600 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากไส้กรอกหมักชนิดแห้ง(salami) มีแบคทีเรียแลคติก 30 สายพันธุ์ที่ผลิตเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ได้ และพบว่าเชื้อ *L. sake* O-1 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ชนิดแซนแทนที่มีความหนืดสูงและให้ผลผลิตสูง (1.4 กรัมต่อลิตร) สามารถนำไปใช้กับอาหารได้หลายชนิด

1.4.2 การใช้เอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ทางเภสัชกรรม

พอลิเมอร์ที่นิยมใช้ในทางเภสัชกรรมนั้นมีมากมายทั้งที่ใช้เป็นตัวยาสำคัญเป็นส่วนประกอบในตำรับ หรือใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ พอลิเมอร์ที่นิยมใช้ในทางเภสัชกรรม เช่น ไคติน ไคโตแซน แด็กซ์แตรน เพคติน โดยส่วนใหญ่นำมาใช้เป็นสารช่วยในตำรับยาต่างๆ โดยเป็นสารช่วยควบคุมการปลดปล่อยยาหรือให้ตัวยาออกฤทธิ์นาน สารก่อฟิล์ม สารก่อเจล บางตำราสามารถทำให้ตัวยาละลายหรือแตกตัวได้ดีขึ้น (จุไรรัตน์ นันทานิชม, 2546)

Maragkoudakis (2006) พบว่าเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* KVS20 สามารถยับยั้งมะเร็งชนิด Sarcoma-180 ได้เมื่อทดสอบโดยการฉีดเข้าช่องท้องของหนูทดลองและยังพบว่าเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่ผลิตโดยเชื้อ *L. helveticus* spp. *jugurti* ช่วยยับยั้งการเกิดมะเร็งในหนู โดยพบว่าการฉีดเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ 20 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมให้กับหนูเมื่อครบ 9 วัน สามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งได้ร้อยละ 44 และเมื่อเพิ่มปริมาณเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์เป็น 40 หรือ 80 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัม สามารถยับยั้งการเกิดมะเร็งได้สูงถึงร้อยละ 33

นอกจากนี้ยังพบว่าเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่ผลิตจากเชื้อ *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* SBT 0495 สามารถกระตุ้นการผลิต antibody ในหนูและกระตุ้นการทำงานของ T-lymphocyte macrophage และ cytokine ได้อีกด้วย (Law, 2001)

Liu และคณะ (2002) ทดสอบการยับยั้งมะเร็งชนิด Sarcoma-180 ของนมวัวหมักคีเฟอร์และนมถั่วเหลืองหมักคีเฟอร์โดยการฉีดเข้าช่องท้องของสัตว์ทดลองทางปาก พบว่ามีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเนื้องอกร้อยละ 64.8 และ 70.9 ตามลำดับ และยังพบว่าเกิดการสลายเซลล์มะเร็งผล การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่านมหมักคีเฟอร์และนมถั่วเหลืองหมักคีเฟอร์อาจมีองค์ประกอบที่มีแนวโน้มป้องกันโรคมะเร็งและเพิ่มประสิทธิภาพของความต้านทานต่อการติดเชื้อในระบบทางเดินอาหารได้

Blandon และคณะ (2016) ศึกษาการใช้คีเฟอรันร่วมกับอัลจิเนต ในการห่อหุ้มยาปฏิชีวนะ พบว่าคีเฟอรันช่วยในการรักษาเสถียรภาพทนความร้อนและกรดในกระเพาะอาหาร โดยจัดเป็นไบโอโพลิเมอร์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่ได้รับว่าปลอดภัยนำมาใช้ห่อหุ้มยา อีกทั้งยังช่วยเพิ่มกิจกรรมทางชีวภาพต่อต้านจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น

1.4.3 การใช้ประโยชน์ของเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

เอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์จากแบคทีเรียแลคติกในกลุ่ม *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Acetobacillus* และ *Streptococcus* spp. พบว่ามีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ *Salmonelia, Helicobacillus, Shigella, Streptococcus* และ *Escherichia coli* จากการทดลองของ Rodrigues และคณะ (2005) พบว่าเมื่อนำคีเฟอรันที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี agar well diffusion โดยพบว่า *S. pyogenes* มีความไวต่อคีเฟอรันมากที่สุดรองลงมาคือ *S. aureus, S. salivarius, Salmonelia typhinmurium*, *Candida albicans* และ *Lueconostoc monocytogenase* ตามลำดับในขณะที่ *Psudomonas aerogioosa* และ *E. coli* มีความไวต่อคีเฟอรันน้อยมาก

Rodrigues และคณะ (2005) ศึกษาคุณสมบัติของการเป็นสาร antimicrobial agents ของสารสกัดจากคีเฟอร์และคีเฟอรัน และผลของการสมานแผลติดเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในหนู Wistar พบว่าKefir gel ความเข้มข้นร้อยละ 70 สามารถลดอาการอักเสบสมานแผลได้ภายใน 7 วัน และให้ผลการสมานแผลได้ดีกว่าหนูในกลุ่มที่สมานแผลด้วย neomycin-clostebol emulsion ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

Table 2 แสดงการประยุกต์ใช้เอ็กโซพอลีแซคคาไรด์ ได้แก่ เดกซ์แทน, อินนูลิน, ลีแวน, คีเฟอรัน โดยพบว่าเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์เหล่านี้มีคุณสมบัติเป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบางสายพันธุ์ อีกทั้งสามารถใช้เป็นตัวยาที่รักษาเนื้องอกต้าน

มะเร็ง และลดระดับคลอเรสเตอรอลในเลือดให้กับผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานได้ด้วยเช่นกัน เป็นต้น (Shiomi *et al*., 1982; Maeda *et al* 2004; Rodrigues *et al*., 2005)

Blandon และคณะ (2018) ทดสอบคุณสมบัติของคีเฟอรันต่อการเป็น biocidal properties โดยใช้วิเคราะห์แบบ Live/Dead BacLight real time พบว่าคีเฟอรันมีกิจกรรมต่อต้านเชื้อก่อโรค พวกเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium* และเชื้อ *S. typhimurium*

Table 2 Applications and linkages of functional exopolysaccharides from lactic acid bacteria

EPS	แบคทีเรียแลคติก	โครงสร้าง	การนำไปประยุกต์ใช้
เดกซ์แทน (Dextran)	*Leuconostoc mesenteroides* *Streptococcus mutans*	α-1,6 glycosidic linkages in main chain and α-1,2, α-1,3 and α-1,4 branched glycosidic linkages	-ใช้เป็นสารเพิ่มความคงตัว -ใช้ในอุตสาหกรรมกระดาษ
อัลเทอแนน (Alternan)	*Leuconostoc mesenteroides*	α-1,6and α-1,3 glycosidic linkages, with some α-1,3 branchings	-ใช้เป็นสารพรีไบโอติก - ใช้เป็นสารให้ความหวาน -ใช้เป็นสารแทนความหนืด
ลีแวน (Levan)	*Steptococcus salivarius* *Steptococcus mutans* *Leuconostoc mesenteroides* *Lactobacillus sanfranciscensis* *Lactobacillus reuteri*	β-2, 6 glycosidic bonds β-2,1-linked side chains	-ใช้เป็นสารพรีไบโอติก - ใช้เป็นสารต้านมะเร็ง -ใช้เป็นสารเพิ่มความหนืด
อินนูลิน (Inulin)	*Lactobacillus johnsonii* *Streptococcus mutans* *Leuconostoc citreum* *Lactobacillus reuteri*	β-1,2 glycosidic	-ใช้เป็นสารพรีไบโอติก - ใช้เป็นสารต้านจุลินทรีย์ -ใช้เป็นสารทดแทนไขมัน -ใช้เป็นสารขนส่งยา -ใช้เป็นสารต้านมะเร็ง
คีเฟอรัน (kefiran)	*Lactobacillus kefiranofaciens* *Lactobacillus kefirgranum*	Glucose and galactose monomers	- มีคุณสมบัติความหนืดของยางเจลที่เป็นกรด - คุณสมบัติต้านเชื้อจุลินทรีย์

Lactobacillus parakefir *Lactobacillus kefir*	และสมานแผล - ความสามารถในการลดความดันโลหิตและคอเลสเตอรอล - มีความสามารถในการชะลอการเติบโตของเนื้องอก - เพิ่มภูมิคุ้มกันของลำไส้

ดัดแปลงจาก Patel และคณะ (2012)

1.4.4 คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของเอ็กโซพอลีแซ็คคาไรด์

อนุมูลอิสระหมายถึงสารที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยวในอะตอมหรือโมเลกุล เป็นสาเหตุของโรคต่างๆ มากมาย ได้แก่ โรคชรา โรคมะเร็ง โรคหัวใจขาดเลือด โรคความจำเสื่อม โรคข้ออักเสบ โรคภูมิแพ้โรคความดัน โลหิต โรคเหงือก โรคเกี่ยวกับสายตา เกิดความผิดปกติของปอด และระบบประสาท เป็นต้น ธรรมชาติหรือร่างกายของสิ่งมีชีวิต จึงมีการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาเพื่อทำหน้าที่ในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งกลไกในการต้านอนุมูลอิสระมีหลายรูปแบบ เช่น การดักจับอนุมูลอิสระ การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอนการจับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน การหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระการเสริมฤทธิ์และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระมีทั้งจากธรรมชาติและจากการสังเคราะห์ (บุหรัน พันธุ์สวรรค์ ,2556)

Sun และคณะ (2015) รายงานว่าเอ็กโซพอลีแซ็คคาไรด์บางชนิดมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และมีความสามารถในการกักเก็บความชุ่มชื้นได้ และได้รับการประเมินความปลอดภัย และนิยมใช้ในด้านอาหาร เครื่องสำอางยา และชีวการแพทย์และมีพอลีแซ็คคาไรด์ Fucose สามารถประยุกต์ใช้เป็นองค์ประกอบของสารต่อต้านมะเร็งและยาต้านการอักเสบในการจัดทำครีมเพื่อเร่งการรักษาบาดแผลและเป็นสารให้ความชุ่มชื้นและต่อต้านริ้วรอย (Peterszegi *et al*., 2003a, b; Cescutti *et al*., 2005) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า fucogel และ fucogel oligosaccharides มีฤทธิ์ต่อต้านริ้วรอยผิวซึ่งโดยกลไกการกระตุ้นการแพร่ขยายและการรอดชีพของไฟโบรบลาสต์ (Peterszegi *et al*., 2003a) Chen และคณะ (2015) ศึกษากิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรนพบว่าเอ็กโซโพลีแซ็คคาไรด์มีการคำนวณค่าความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถทำให้ความเข้มข้นของ DPPH ลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ (IC50) สำหรับการยับยั้ง (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH) ของ 1.73 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีกิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระถึงร้อยละ 52.23

2. คีเฟอรัน (kefiran)

คีเฟอรันเป็นสารประกอบเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่พบในคีเฟอร์เกรน (Piermaria *et al*., 2016) ซึ่งคีเฟอร์เกรนคือก้อนเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรียแลคติกและยีสต์ที่นิยมใช้สำหรับหมักนมเปรี้ยวคีเฟอร์ของชาวพื้นเมืองในประเทศรัฐเชีย เอ็กโซโพลีแซ็คคาไรด์มีที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติคได้รับความสนใจเพิ่มขึ้น เนื่องจากโดยทั่วไปได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย Zajsek และ Gorsek (2010) รายงานว่าโครงสร้างของคีเฟอรันนั้นประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตสในอัตราส่วน 1:1 โดยโครงสร้างของคีเฟอรันดังแสดงใน Figure 2 ในขณะ Wang และคณะ (2008) รายงานว่าโครงสร้างของคีเฟอรันนั้นสามารถเปลี่ยนแปลงไปได้ตามแหล่งคาร์บอนที่ใช้ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Blandon และคณะ (2018) ที่ได้ศึกษาการใช้น้ำตาลหลายชนิดและพบว่าโครงสร้างของคีเฟอรันสามารถเปลี่ยนแปลงตามชนิดของน้ำตาลแต่ยังคงมีคุณสมบัติเช่นเดิม โดยคีเฟอรันอยู่ในรูปที่ถูกขับออกนอกเซลล์ (broth kefiran) และที่เกาะติดอยู่กับผนังเซลล์ในรูปของแคปซูล (capsular kefiran) (Cheirsilp *et al*., 2001) คีเฟอรันถูกใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมผลิตเครื่องสำอางหรือเภสัชกรรม เนื่องจากเป็นสารเพิ่มประสิทธิภาพในอาหาร สารเพิ่มความคงตัวในอาหาร สารทดแทนไขมัน และเป็นสารทำให้เกิดเจล (Dimitreli *et al*., 2016) และห่อหุ้มในผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรมได้ด้วย (Blandon *et al*., 2016) และยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Chen *et al*., 2015) และสารต้านแบคทีเรียเชื้อก่อโรค เชื้อรา และมีกิจกรรมของการต้านเนื้องอก (Ghasemlou *et al*., 2012; Blandon *et al*., 2016; Blandon *et al.,* 2018) ซึ่งคุณสมบัตินี้เป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง นอกจากนี้พรผจง เลาหวิเชียร (2009) ได้ศึกษาสรรพคุณของนมหมักคีเฟอร์ (บัวหิมะ) และพบว่าคีเฟอรันที่สกัดได้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง เช่น การใช้เป็นเครื่องสำอางทาใบหน้าช่วยกระชับรูขุมขน ทำให้ใบหน้าดูอ่อนเยาว์ เต่งตึง และยังช่วยขจัดสิว คีเฟอรันยังช่วยป้องกันการเกิดแผลพุพองในปากที่เกิดจากเชื้อรา (Thrush) ชนิด *C. alhicans* นอกจากนี้คีเฟอรันช่วยเพิ่มการผลิตของ interferon b-cortisol และ noradrenaline ในเซลล์ของมนุษย์ และใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อลดความเครียดได้ (Wang *et al*., 2008)

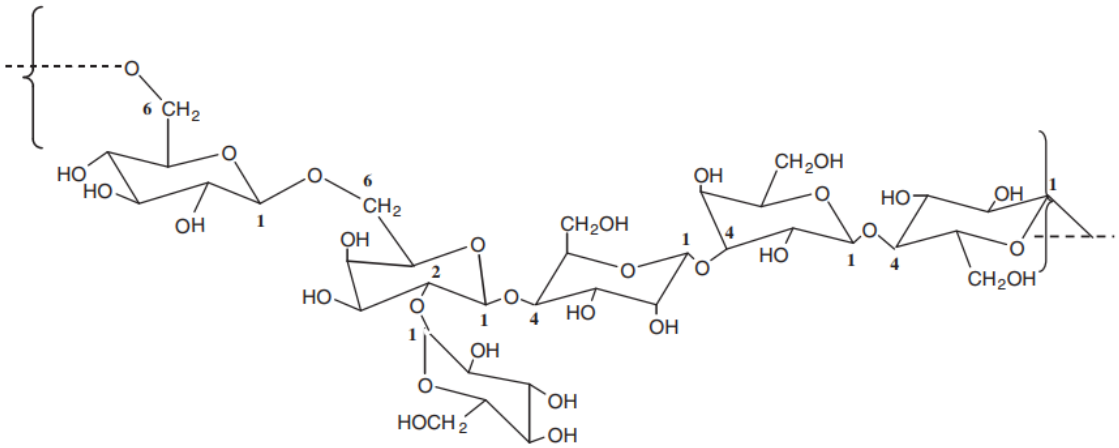


Figure 2 Structure of kefiran from *L. kefiranofaciens*
ที่มา: Badel และคณะ (2011)

3. คีเฟอร์เกรน (kefir grains)

คีเฟอร์เกรนเป็นก้อนเชื้อผสมระหว่างยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีการฝังตัวอยู่ในสารเมือกเหนียวที่เรียกว่า คีเฟอรัน ซึ่งลักษณะของคีเฟอร์เกรนนั้นเป็นก้อนตะปุ่มตะป่ำคล้ายดอกกระหล่ำสีขาว โดยมีขนาดตั้งแต่ 5-20 มิลลิเมตร (Arihara *et al*., 1990) คีเฟอร์เกรนเป็นหัวเชื้อนมหมักพื้นเมืองของชาวคอเคซัส นมหมักที่ได้มีคุณสมบัติที่ได้ประโยชน์ มีรสเปรี้ยวและมีแอลกอฮอล์ผสมอยู่ด้วย (Zajsek and Gorsek, 2010) ขณะที่ก้อนเชื้อจุลินทรีย์ในน้ำนมจะมีกระบวนการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนอย่างต่อเนื่องพร้อมกับมีการสร้างสารพอลิแซ็คคาไรด์ (คีเฟอรัน) ควบคู่กันไป ดังนั้นคีเฟอร์เกรนจึงเป็นเสมือนก้อนเชื้อผสมที่ตรึงตัวเองอยู่บนก้อนสารเมือก ทำให้สามารถใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตได้อย่างต่อเนื่องไม่สิ้นสุด (Habibi *et al*., 2011) จากการศึกษาลักษณะทางกายภาพของก้อนคีเฟอร์เกรนพบว่าจุลินทรีย์ภายในก้อนคีเฟอร์เกรนนั้นประกอบด้วยยีสต์และแบคทีเรียแลคติก สำหรับสายพันธุ์ของยีสต์ภายในก้อนคีเฟอร์เกรน มีการรายงานไว้แตกต่างกันโดย La Riviere และ Kooiman (1967) รายงานว่ายีสต์ที่พบร้อยละ 90 เป็น *Saccharomyces delbrueckii* ซึ่งไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสสำหรับกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ได้ ในขณะที่ Iwasawa และคณะ (1982) รายงานว่า *Saccharomyces exiguous* เป็นยีสต์ที่พบมากในก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรน สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบส่วนใหญ่คือ *Lactobacillus* spp. และพบ *Leuconostoc* spp. และ *Streptococcus* spp. อยู่ประมาณร้อยละ 1 และ 0.1 ตามลำดับ โดยในช่วงแรกที่มีการศึกษาสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกในก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรนพบว่าส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม Heterofermentative ได้แก่ *Leuconostoc brevis* จึงมีข้อสันนิฐานว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวมีบทบาทสร้างเมือก (La Riviere และ Kooiman, 1967) แต่ต่อมามีรายงานการพบ

แบคทีเรียชนิดใหม่ที่ชื่อว่า *Lactobacillus kefiranofaciens* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการสร้างคีเฟอรันอย่างแท้จริง (Toba *et al*., 1986; Fujisawa *et al*., 1988) สำหรับสมบัติเฉพาะที่น่าสนใจของก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรนสามารถจำแนกได้ดังต่อไปนี้ (Arihara *et al*., 1990)

1) เซลล์ในก้อนเชื้อนี้มีความสามารถในการเพิ่มขนาดและจำนวนได้อย่างต่อเนื่องโดยเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดยังคงตรึงอยู่ในก้อนเมือก

2) โดยปกติก้อนเชื้อสามารถเกิดการหมักได้เป็นเวลานาน ถ้าอยู่ในสภาวะการเพาะเลี้ยงเช่นเดิม

3) ถึงแม้ว่าสภาวะที่ใช้ในการหมักจะไม่ได้ปลอดเชื้อ แต่จะไม่พบการปนเปื้อนในกระบวนการหมัก ด้วยเหตุผลที่ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่คาดว่าอาจจะเนื่องจากการที่เชื้อตรึงตัวในสารเมือกนั้นส่งผลให้เซลล์มีระบบป้องกันและสามารถดำเนินบทบาทของตัวเองต่อไปได้

4) การอยู่ร่วมกันของเซลล์ยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติกในก้อนเชื้อ ทำให้เกิดกระบวนการหมักที่สามารถผลิตสารที่มีคุณค่าทางโภชนาการและมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

4. การผลิตคีเฟอรัน

ในปัจจุบันหลายประเทศกำลังให้ความสนใจกับการผลิตคีเฟอรันอย่างจริงจัง เนื่องจากคีเฟอรันเป็นสารที่มีประโยชน์สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้อย่างกว้างขวางรวมทั้งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ได้ ซึ่งคีเฟอรันสามารถผลิตได้ทั้งจากก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรนหรือผลิตโดยเชื้อ *L. kefiranofaciens*

4.1 การผลิตคีเฟอรันจากก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรน

Zajsek และคณะ (2013) ศึกษาการผลิตคีเฟอรันจากเชื้อผสมที่อยู่ในคีเฟอร์เกรน โดยใช้นมสดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีการเติมแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร คือน้ำตาลฟรุคโตส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลแลคโตส พบว่าการเติมแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลแลคโตสทำให้น้ำหนักคีเฟอร์เกรนเพิ่มขึ้นสูงที่สุด เท่ากับ 12 กรัมต่อลิตร และให้การผลิตคีเฟอรันเท่ากับร้อยละ 4.3 ของน้ำหนักคีเฟอร์เกรน รองลงมาคือ น้ำตาลซูโครส ให้น้ำหนักคีเฟอร์เกรนเท่ากับ 9 กรัมต่อลิตร และให้การผลิตคีเฟอรันเท่ากับร้อยละ 3 ของน้ำหนักคีเฟอร์เกรน ในขณะที่น้ำตาลฟรุคโตสน้ำตาลกลูโคส ให้น้ำหนักคีเฟอร์เกรนเพียง 7 และ 6 กรัมต่อลิตร และให้การผลิตคีเฟอรันเท่ากับร้อยละ 4 และ 2.5 ของน้ำหนักคีเฟอร์เกรน ตามลำดับ

4.2 การผลิตคีเฟอรันจากแบคทีเรียแลคติก

การผลิตคีเฟอรันโดยเชื้อเดี่ยวเริ่มต้นจากที่ Yokoi และคณะ(1990) คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ในลักษณะที่เกาะติดรอบเซลล์จากก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรน จำนวน 5 สายพันธุ์ ประกอบด้วย KPB-167A, KPB-167B, KPB-167C, KPB-167D, KPB-167E เมื่อ

นำไปเลี้ยงในอาหารที่มีหางนมเป็นองค์ประกอบพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 5 สายพันธุ์ สามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์ที่มีน้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบในอัตราส่วน 1:1 หรือที่เรียกว่าคีเฟอรัน ปริมาณ 300-400 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีการปลดปล่อยคีเฟอรันออกสู่น้ำหมักร้อยละ 60-80 ของปริมาณการผลิตทั้งหมด ต่อมา Mitsue และคณะ (1998) ศึกษาการชักนำการกลายพันธุ์ของเชื้อ *Lactobacillus kefiranofaciens* KF-75 โดยใช้แสงอัลตร้าไวโอเลตเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพคีเฟอรันทำให้เชื้อมีความเหมาะสมสำหรับการผลิตในอุตสาหกรรม เมื่อนำเชื้อที่ถูกชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์มาเพาะเลี้ยงด้วยระบบกะสามารถผลิตคีเฟอรันได้ 2.5 กรัมต่อลิตร ภายในเวลา 7 วัน นอกจากนี้ Mitsue และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันของเชื้อ *L. kefiranofaciens* KF-75 โดยการเลี้ยงร่วมกับยีสต์ *Torulaspora delbrueckii* IFO 1626 ซึ่งเป็นยีสต์ที่คัดแยกได้จากคีเฟอร์เกรน และพบว่าการเลี้ยงเชื้อผสมทำให้ *L. kefiranofaciens* KF-75 ผลิตคีเฟอรันสูงขึ้นเป็น 3.74 กรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นสองเท่าของการผลิตที่ใช้ *L. kefiranofaciens* KF-75 เพียงชนิดเดียว 1.88 กรัมต่อลิตร

โดยปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตคีเฟอรันจากแบคทีเรียแลคติก ได้แก่

4.2.1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1) แหล่งคาร์บอน

คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญต่อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการเจริญ การสร้างเซลล์และผลิตภัณฑ์ จากงานวิจัยของ Yokoi และ Watanabe (1992) ที่ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตคีเฟอรันโดยเชื้อ *Lactobacillus* sp. KPB-167B โดยเปรียบเทียบการเติมน้ำตาลแลคโตสความเข้มข้น 2, 5, 7.5 และ 10 น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลซูโครสร้อยละ 10 และน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 5 เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าน้ำตาลแลคโตสที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ให้การผลิตคีเฟอรันสูงสุดเท่ากับ 1.53 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือน้ำตาลซูโครส และน้ำตาลกลูโคส ให้การผลิตคีเฟอรันเท่ากับ 0.82, 0.52 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และพบว่าน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 5 ผสมกับน้ำตาลกาแลคโตสร้อยละ 5 เป็นแหล่งคาร์บอนที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อและการผลิตคีเฟอรัน โดยเชื้อให้การผลิตคีเฟอรันเพียง 0.32 กรัมต่อลิตร

Cheirsilp และคณะ (2003) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* โดยการเลี้ยง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0216 ภายใต้ระบบที่มีการหมักแบบกึ่งกะที่มีการเติมสารอาหารใหม่ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลแลคโตส 300 กรัมร่วมกับยีสต์สกัด 100 กรัม เข้าสู่ระบบที่ 46 และ 60 ชั่วโมง พบว่ามีผลทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM6985 ผลผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้นจาก 44 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในระบบการหมักแบบกะเป็น 62 มิลลิกรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในระบบการหมักแบบกึ่งกะ

นอกจากนี้ Tada และคณะ (2007) ได้ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตคีเฟอรันของเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ที่เลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* IFO 0216 ภายใต้ระบบการหมักแบบกึ่งกะที่มีการเติมน้ำตาลแลคโตสในลักษณะ feedback และ feedforward พร้อมทั้งควบคุมปริมาณกรดแลคติกในระบบให้ต่ำกว่าระดับที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ ผลการทดลองพบว่าการเลี้ยงเชื้อผสมภายใต้ระบบดังกล่าวทำให้ เชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 สามารถผลิตคีเฟอรันได้ 6.3 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อผสมภายใต้การหมักแบบกะที่ผลิตคีเฟอรันได้เพียง 4.5 กรัมต่อลิตร

Wang และ Bi (2008) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตคีเฟอรันของเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 โดยใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ คือ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรุคโตส น้ำตาลกาแลคโตส และโซลูเบิลสตาร์ช ที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่าเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 สามารถใช้น้ำตาลมอลโตสในการเจริญและผลิต คีเฟอรันได้สูงสุด เท่ากับ 1.76 และ 1.60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และแหล่งคาร์บอนที่เป็นโซลูเบิลสตาร์ชให้การผลิตคีเฟอรันน้อยที่สุด 1.22 กรัม ต่อลิตร ดังตารางแสดงใน Table 3

Table 3 Effect of carbon sources on cell growth and kefiran production by *L. kefiranofaciens* JCM6985

Source	Dry cell weight (g/L)	Kefiran (g/L)
Glucose	16.7±0.2	1.6±0.08
Lactose	16.7±0.3	1.76±0.05
Maltose	20.2±0.2	2.27±0.09
Sucrose	17.4±0.4	1.48±0.1
Fructose	14.3±0.4	1.36±0.06
Galactose	13.7±0.4	1.33±0.08
Soluble Starch	12.8±0.6	1.22±0.07

ที่มา: ดัดแปลงจาก Wang และ Bi (2008)

Yeesang และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตคีเฟอรันจากเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 โดยใช้แป้งสาคูเป็นแหล่งคาร์บอนและเติมเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ในการเปลี่ยนแป้งสาคูให้เป็นน้ำตาลกลูโคส โดยศึกษาความเข้มข้นของแป้งสาคูที่ 20, 30, 40, 50 กรัม

ต่อลิตร และใช้เอนไซม์ผสมระหว่างอัลฟาและกลูโคสอะไมเลส ในอัตราส่วน 50:50 ผลการทดลองพบว่าแป้งสาคูที่เข้มข้น 40 กรัมต่อลิตร ให้การผลิตคีเฟอรันที่สูงที่สุดเท่ากับ 0.83 กรัมต่อลิตร และพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นแป้งสาคูเป็น 50 กรัมต่อลิตร ให้การผลิตคีเฟอรันลดลงเล็กน้อยเท่ากับ 0.80 กรัมต่อลิตร

Cheirsilp และ Radchabut (2011) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันของเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM6985 โดยเลี้ยงร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* IFO 0216 และใช้แหล่งคาร์บอนทดแทนจากเวย์แลคโตสความเข้มข้นร้อยละ 4 พบว่าการเลี้ยงเชื้อผสมส่งเสริมให้มีการผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้นจากการเลี้ยงเชื้อเดี่ยวที่ผลิตได้ 568 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 870 และ 938 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการเลี้ยงเชื้อผสมภายใต้สภาวะให้อากาศและไม่ให้อากาศ ตามลำดับ ต่อมา Ghasemlou และคณะ (2012) ศึกษาการผลิตคีเฟอรันจากเชื้อผสมในคีเฟอร์เกรนโดยใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกจากเวย์แลคโตส และสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตคีเฟอร์รันด้วยวิธี Response surface methodology (RSM) โดยปัจจัยที่ศึกษาคือ ความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตสในช่วง 20-100 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของยีสต์สกัดในช่วง 0-24 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นของอาหารในช่วง 3.5-7.5 และอุณหภูมิในช่วง 15-35 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นน้ำตาลแลคโตส 67 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของยีสต์สกัด 13 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.7 และอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคีเฟอรัน โดยให้การผลิตคีเฟอรันสูงที่สุดเท่ากับ 712 มิลลิกรัมต่อลิตร

Dailin และคณะ (2015) ศึกษาการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อ *L. kefiranofaciens* เพื่อให้ได้ผลผลิตคีเฟอรันสูงขึ้น ซึ่งแหล่งคาร์บอนที่ศึกษาคือ น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลแมนโนส, น้ำตาลซูโครส, น้ำตาลแลคโตส ที่มีความเข้มข้นเท่ากัน 20 กรัมต่อลิตร พบว่าน้ำตาลแลคโตสให้ปริมาณการผลิต คีเฟอรันมากที่สุด เท่ากับ 0.36 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงถึงร้อยละ 56 เมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคส นอกจากนี้นักวิจัยได้มีการศึกษาความเข้มข้นน้ำตาลแลคโตสที่ต่างกันที่ 0.0-100 กรัมต่อลิตร และพบว่าการเจริญเติบโตของเซลล์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของแลคโตส โดยให้น้ำหนักเซลล์แห้ง 1.4 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นน้ำตาลแลคโตส 100 กรัมต่อลิตร ในขณะที่น้ำตาลแลคโตสที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตรให้การผลิตคีเฟอรันสูงสุดเท่ากับ 0.76 กรัมต่อลิตร

Suksawang และคณะ (2016) ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 เพื่อผลิตคีเฟอรัน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลแลคโตส และน้ำตาลซูโครส ที่ความเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร พบว่าน้ำตาลแลคโตสให้ปริมาณคีเฟอรันสูงถึง 283.33 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับน้ำตาลชนิดอื่น อีกทั้งยังมีการศึกษาแหล่งคาร์บอกราคาถูก

โดยใช้กากน้ำตาล (molasses) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าการใช้กากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตรสามารถให้การผลิตคีเฟอรันสูงสุดถึง 1286 มิลลิกรัมต่อลิตร

Blandón และคณะ (2018) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการเติมน้ำตาลแต่ละชนิดในหางนม ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลแลคโตส และน้ำตาลซูโครส พบว่าที่การผลิตคีเฟอรันด้วยหางนมที่เติมน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 15 ทำให้ได้คีเฟอรันสูงที่สุด เท่ากับ 0.2 กรัมต่อลิตร

2) แหล่งไนโตรเจน

จุลินทรีย์ใช้แหล่งไนโตรเจนในการสังเคราะห์เอนไซม์ที่มีความจำเป็นต่อการเจริญและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อของจุลินทรีย์มีทั้งแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ เช่น ยีสต์สกัด ทริปโตน และสารที่มีองค์ประกอบของกรดอะมิโน เช่น โปรตีนต่างๆ และแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ เช่น เกลือแอมโมเนียม และเกลือไนเตรท (วริญดา สุภทรประทีป, 2552)

Yokoi และ Watanabe (1992) ศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของเชื้อ *Lactobacillus* sp. KPB-167B พบว่าแหล่งไนโตรเจนผสมที่ประกอบด้วย ทริปโตน เนื้อสกัด ยีสต์สกัด และไตรแอมโมเนียมซิเตรต ร้อยละ 2.0, 2.0, 1.0 และ 0.4 ตามลำดับ มีผลทำให้เชื้อสามารถผลิตคีเฟอรันได้สูงสุด 1.69 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ Taniguchi และคณะ (2001) ศึกษาผลของการใช้ยีสต์สกัดเพียงอย่างเดียวต่อการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 พบว่าการเติมยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร มีผลช่วยส่งเสริมการเติบโตและการผลิตคีเฟอรัน ทำให้เชื้อผลิตคีเฟอรันได้ 460 มิลลิกรัมต่อลิตร

Wang และ Bi (2008) ศึกษาผลของการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์และอนินทรีย์ในการผลิตคีเฟอรันของเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 โดยใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ดังนี้ เปปโตน เคซีน เซลล์ยีสต์ผง ทริปโตน ยีสต์สกัด ยูเรีย แอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร และใช้น้ำตาลแลคโตสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ให้การเจริญและการผลิตคีเฟอรันสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ และแหล่งไนโตรเจนที่เป็นเซลล์ยีสต์ผงให้การเจริญสูงสุด ในขณะที่เคซีนให้การผลิตคีเฟอรันสูงสุดเท่ากับ 1.78 กรัมต่อลิตร และพบว่ายีสต์สกัดให้ร้อยละของผลผลิตคีเฟอรันต่อน้ำหนักเซลล์สูงสุดเท่ากับ 8.6 จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่เหมาะสมต่อการผลิต คีเฟอรันของเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 โดยศึกษาที่ความเข้มข้นช่วง 20-120 กรัมต่อลิตร และใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลแลคโตสความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองพบว่า

การเพิ่มความเข้มข้นของยีสต์สกัดทำให้เชื้อมีการเจริญและผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้น โดยยีสต์สกัดความเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร ให้การผลิตคีเฟอรันสูงสุดเท่ากับ 2.25 กรัมต่อลิตร

Dailin และคณะ (2015) ศึกษาการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อ *L. kefiranofaciens* เพื่อให้ได้ผลผลิตคีเฟอรันสูงขึ้น โดยใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ที่พีเอชเริ่มต้น 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง และศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ได้แก่ ยีสต์สกัด เปปโทน เนื้อสกัด และเคซีนไฮโดรไลซิส พบว่ายีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตคีเฟอรัน ตามด้วย เปปโทน เคซีสไฮโดรไลซิส โดยยีสต์สกัดให้ปริมาณคีเฟอรัน และอัตราการผลิตคีเฟอรันจำเพาะเท่ากับ 0.75 กรัมต่อลิตร, 0.71 กรัมคีเฟอรันต่อกรัมเซลล์ ตามลำดับ นอกจากนี้นักวิจัยได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่แตกต่างกันในช่วง 0-14 กรัมต่อลิตรต่อการเจริญของเซลล์และการผลิตคีเฟอรัน พบว่าความเข้มข้นยีสต์สกัด 12 กรัมต่อลิตร ให้การผลิตคีเฟอรันสูงสุดเท่ากับ 1.25 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังมีรายงานอื่นที่พบว่าทริปโตนและเนื้อสกัดให้การผลิตคีเฟอรันดีกว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ (Zajsek และคณะ, 2013)

4.2.2 สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยง

1) พีเอช

พีเอชเป็นปัจจัยที่สำคัญที่ส่งผลต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ การควบคุมค่าพีเอชมีหลายวิธี ไม่ว่าจะเป็นการควบคุมค่าพีเอชเริ่มต้น (Hofvendahl and Hahn-Hagerdal, 2000) เมื่อมีการผลิตกรดแลกติกที่มากขึ้น ความเป็นกรดจะมากขึ้นด้วย การควบคุมค่าเอช จึงเป็นสิ่งสำคัญเพื่อลดผลกระทบต่อการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ สารที่ใช้ในการควบคุมค่าพีเอช เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) หรือแคลเซียมคาร์บอร์เนต ($CaCO_3$) (Akerberg and Zacchi, 2000)

Cheirsilp และคณะ (2001) พบว่าการเลี้ยง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ในสูตรอาหาร Man-Rogosa Sharpe Lactose (MRSL) ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เป็นพีเอชที่เหมาะสำหรับการเติบโตและการผลิตคีเฟอรัน ซึ่งสอดคล้องกับ Taniguchi และคณะ (2001) ที่พบว่าการเลี้ยง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ในอาหารสูตร MRSL พีเอชเริ่มต้น 5.5 ทำให้เชื้อผลิตคีเฟอรันได้สูงสุด 650 มิลลิกรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Wang และ Bi (2008) ที่ศึกษาผลของพีเอชต่อการผลิตคีเฟอรันของเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ที่มีพีเอชอยู่ในช่วง 3.0-8.0 พบว่าที่พีเอชต่ำกว่า 3.0 หรือมากกว่า 8.0 เชื้อไม่สามารถเจริญได้ สำหรับการผลิตคีเฟอรันพบว่าเชื้อมีการผลิตคีเฟอรันที่พีเอชตั้งแต่ 5.0 ขึ้นไปและให้การผลิตคีเฟอรันสูงสุดที่พีเอช 5.5 ซึ่งผลิตได้เท่ากับ 0.46 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับรายงานของ Yokoi และคณะ (1991) ที่ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตและการผลิตคีเฟอรันของเชื้อ *L. kefiranofaciens* sp. KPB-167B พบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหาร

สูตร MRSL ที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5 เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตและการผลิตคีเฟอรัน ซึ่งในงานวิจัยของ Yeesang และคณะ (2008) ที่ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตคีเฟอรันจากแป้งสาคูโดยเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 โดยศึกษาพีเอชเริ่มที่ 5.0, 5.5, 6.0 พบว่าพีเอชเริ่มต้น 5.5 เชื้อให้การผลิตคีเฟอรันสูงเท่ากับ 0.65 กรัมต่อลิตร และที่พีเอช 5.0 และ 6.0 เชื้อจะผลิตคีเฟอรันลดลงมาเท่ากับ 0.43 และ 0.54 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Yokoi และคณะ (1991) ที่พบว่าหากเพิ่มพีเอชมากกว่า 5.5 เชื้อจะมีการผลิตคีเฟอรันลดลง (Yokota *et al*., 1995; Gassem *et al*., 1997) ในขณะที่มีการใช้พีเอชเริ่มต้นต่ำกว่า 5.0 แบคทีเรียแลคติกจะเจริญเติบโตได้เพียงเล็กน้อย และจะผลิตคีเฟอรันน้อย

2) อุณหภูมิ

จากรายงานการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ชีวภาพจากแบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่พบว่าอุณหภูมิจะมีผลต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ของเชื้อเป็นอย่างมาก โดยที่อุณหภูมิต่ำเชื้อมีอัตราการเจริญและการผลิตได้ดีกว่าที่อุณหภูมิสูง (Hofvendahl and Haha-Hagerdal, 2000; Yumoto and Ikeda, 1995)

Taniguchi และคณะ (2001) พบว่าการเลี้ยง *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารสูตร MRSL ภายใต้ระบบที่มีการควบคุมพีเอช ทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการผลิตคีเฟอรันได้สูงสุด 650 มิลลิกรัมต่อลิตร ในขณะที่งานวิจัยของ Yeesang และคณะ (2008) ศึกษาผลอุณหภูมิต่อการผลิตคีเฟอรันจากแป้งสาคูโดยเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 และเติมทริปโตนร้อยละ1 ยีสต์สกัดร้อยละ 2 เนื้อสกัดร้อยละ 0.2 เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 28, 30, 32, 35 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถผลิตคีเฟอรันได้สูงสุดเท่ากับ 0.65 กรัมต่อลิตร และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 32 และ 35 องศาเซลเซียส เชื้อผลิตคีเฟอรันลดลงเท่ากับ 0.46 และ 0.36 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในงานวิจัยของ Wang และ Bi (2008) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตคีเฟอรันของเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 โดยศึกษาที่อุณหภูมิ 30, 35, 40 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อผลิตคีเฟอรันเท่ากับ 1.9, 1.7 และ 1.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อจะผลิตคีเฟอรันมากที่สุด

3) สภาวะไร้อากาศ

แบคทีเรียมีการใช้หรือทนต่ออากาศที่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถแบ่งแบคทีเรียออกเป็นกลุ่มๆ ได้ดังนี้ anaerobes (facultative anaerobe, obligate anaerobes) และaerobes (obligate aerobes, facultative aerobe, microaerophile) Cheirsilp และคณะ (2003) ศึกษาผลของการเลี้ยงแบบสภาวะไร้อากาศต่อการเจริญและการผลิตคีเฟอรันของเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ร่วมกับ *S. cerevisiae* IFO0216 w พบว่าการพ่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 0.2 ลิตรต่อนาทีเข้าสู่ระบบถังหมัก

เพื่อรักษาสภาวะไร้อากาศในการเลี้ยงเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 พบว่าการเจริญของเชื้อและผลิตคีเฟอรันเท่ากับ 2.49 และ 12.81 กรัมต่อลิตร ต่อมามีการศึกษาการเลี้ยงเชื้อภายใต้ระบบที่มีการให้อากาศเล็กน้อยโดยการพ่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และพ่นอากาศอย่างละ 0.1 ลิตรต่อนาที ให้การผลิตคีเฟอรันลดลงเท่ากับ 2.02 กรัมต่อลิตร และจากการศึกษาอัตราการหมุนที่ความเร็วรอบ 400 รอบต่อนาที ซึ่งพบว่าการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นแต่การผลิตคีเฟอรันลดลงเท่ากับ 14.24 กรัมต่อลิตร และ 2.26 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

4) การหมักแบบกึ่งกะ

การหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch) เป็นการหมักที่มีการเติมสารอาหารบางอย่างเพิ่มเป็นระยะ เพื่อให้จุลินทรีย์เติบโตและใช้สารอาหารได้เพิ่มขึ้น โดยไม่มีการถ่ายอาหารออก การหมักแบบนี้ส่วนใหญ่เพื่อแก้ปัญหาเกี่ยวกับข้อจำกัดในเรื่องความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น ซึ่งถ้าใช้มากเกินอาจมีผลต่อการเติบโตของจุลินทรีย์ หรืออาจทำให้ปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอ นอกจากนี้การผลิตในระบบกึ่งกะยังสามารถควบคุมความเข้มข้นของสับสเตรทในระบบให้มีความเข้มข้นต่ำมากๆ ช่วยลด repressive effect ของแหล่งคาร์บอน และสามารถลดความเป็นพิษขององค์ประกอบบางชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ในการศึกษาการผลิตคีเฟอรันของ Cheirsilp และคณะ (2003) ที่เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตคีเฟอรันของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* IFO 0216 ภายใต้การหมักแบบกะและกึ่งกะ พบว่าการหมักแบบกึ่งกะที่มีการเติมสารอาหารใหม่ในชั่วโมงที่ 46 มีผลทำให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 สามารถผลิตคีเฟอรันได้ปริมาณ 4.14 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าแบบการหมักแบบกะที่ผลิตคีเฟอรันได้ 2.64 กรัมต่อลิตร

Tada และคณะ (2007) ศึกษาการหมักแบบกึ่งกะพบว่าการผลิตคีเฟอรันโดยเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ผสมกับ *S. cerevisiae* IFO0216 ในระบบที่มีการเติมสารอาหารแบบ Feedback/Feedforward ในชั่วโมงที่ 92-102 เพื่อรักษาสมดุลการเติบโตระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกและยีสต์ ทำให้สามารถควบคุมความเข้มข้นของกรดแลคติกตลอดกระบวนการหมักให้มีปริมาณไม่เกิน 6 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 สามารถเจริญและผลิตคีเฟอรันได้สูงถึง 6.3 กรัมต่อลิตร

ศิริลออ ราชบุตร (2009) ศึกษาการผลิตคีเฟอรันจากหางนมโดยเชื้อผสมของ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 และยีสต์*S. cerevisiae* IFO 0216 พบว่าการเลี้ยงเชื้อผสมภายใต้สภาวะที่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายน้ำร้อยละ 5 ร่วมกับการควบคุมพีเอชของระบบให้คงที่ที่ 5.5 มีผลทำให้เชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 สามารถผลิตคีเฟอรันได้สูงสุดเท่ากับ 2.58 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบกะและผลิตได้เพิ่มขึ้นเป็น 3.25 กรัมต่อลิตร ในการหมักแบบกึ่งกะที่มี

การเติมอาหารใหม่ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์จากหางนมความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 4 ที่ชั่วโมงที่ 24 และ 48

5. วัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน

5.1 แหล่งคาร์บอน

แหล่งคาร์บอนที่สามารถนำมาเลี้ยงเชื้อ *L. kefiranofaciens* เพื่อผลิตคีเฟอรัน ได้แก่ น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครส (Wang and Bi, 2008) ซึ่งมีราคาสูง ทำให้ต้นทุนการผลิตสูงตามไปด้วย ดังนั้นจึงมีงานวิจัยที่สนใจใช้ของเสียจากภาคอุตสาหกรรม มาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อลดต้นทุนการผลิต (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2554) ตัวอย่างวัสดุเศษเหลือที่สามารถใช้เป็นแหล่งอาหารราคาถูก คือ น้ำมะพร้าวแก่ สำหรับวัสดุเศษเหลือที่สนใจใช้เป็นแหล่งคาร์บอนทดแทนได้ คือ เวย์แลคโตส

น้ำมะพร้าวแก่ (mature coconut)

น้ำมะพร้าวพบในประเทศฟิลิปปินส์ ศรีลังกา ไทย และประเทศอื่น ๆ (Azam-Ali and Battcock, 1998) น้ำมะพร้าวประกอบด้วย น้ำ, คาร์โบไฮเดรต, ไขมัน, แคลเซียม, ฟอสฟอรัส, เหล็ก, กรดอะมิโน, วิตามินซี, วิตามินบี และเกลือแร่ (Table 4) น้ำมะพร้าวได้รับการยอมรับให้เป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีสำหรับการเจริญเติบโต (growth factor) และการผลิตโพลิแซ็คคาไรด์โดยเชื้อจุลินทรีย์ ดังเช่นในงานวิจัยของ Kongruang (2005) ที่พบว่าน้ำมะพร้าวมีประสิทธิภาพสำหรับการผลิตแซนแทน (xanthan) โดย *Xanthomomas campestitris* TISTR 1100 และน้ำมะพร้าวยังสามารถใช้ประโยชน์ในการผลิตเอ็กโซโพลีแซ็คคาไรด์โดย *Agrobacterium* sp. CFR24 (Shivakumar and Vijayendra, 2006) น้ำมะพร้าวที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนควรเป็นมะพร้าวแก่ เนื่องจากเป็นของเสียจากกระบวนการผลิตน้ำกะทิ ทำให้สามารถลดต้นทุนของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ (growth factor) (สมศรี ลีปิพัฒนวิทย์, 2531 อ้างโดย โกวิท สุวรรณหงษ์, 2555)

Table 4 The nutritional analysis of the mature coconut

Mature Coconut Water	Composition
Total solids (%)	5.4
Reducing sugars (%)	0.2
Minerals (%)	0.5
Protein (%)	0.1
Fat (%)	0.1
Acidity mg (%)	60.0
pH	5.2
Potassium mg (%)	247.0
Sodium mg (%)	48.0
Calcium mg (%)	40.0
Magnesium mg (%)	15.0
Phosphorous mg (%)	6.3
Iron mg (%)	79.0
Copper mg (%)	26.0

ที่มา: ดัดแปลงจาก Krishnankutty (1987)

โดยทั่วไปแล้วน้ำมะพร้าวแก่มีปริมาณน้ำตาลรวมประมาณร้อยละ 3-5 ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตส แร่ธาตุ และวิตามินอีกหลายชนิด (Van der bert, 1945) ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Kongruang (2005) ที่รายงานว่าน้ำมะพร้าวถือเป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน (arginine, alanine และอื่นๆ) และแร่ธาตุที่มีคุณค่าสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดย Kuberski และคณะ (1979) ได้วิเคราะห์น้ำตาลที่มีอยู่ในน้ำมะพร้าว และพบน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลซูโครสในสัดส่วนประมาณร้อยละ 50, 35 และ 15 ตามลำดับ การศึกษาในปัจจุบันพบว่าสัดส่วนของน้ำตาลต่างๆ ขึ้นอยู่กับการเจริญเติบโตของมะพร้าว ซึ่งน้ำตาลกลูโคสจะอยู่ในช่วงร้อยละ 34-45 น้ำตาลซูโครสอยู่ในช่วงร้อยละ 53-18 และน้ำตาลฟรุกโตสอยู่ในช่วงร้อยละ 12-36 ฌาลิศา ยุวอมรพิทักษ์ (2540) รายงานว่าน้ำมะพร้าวแก่เป็นแหล่งอาหารที่ดีในการผลิตแซนแทนกัมจาก *Xanthomonas* sp. TISTR 840 น้ำมะพร้าวแก่เจือจางต้องเติมน้ำตาลทรายให้มีความเข้มข้นและเติมโซเดียมไนเตรทร้อยละ 0.03 จึงจะให้ผลผลิตแซนแทนกัมได้ และพบว่าการเติมโซเดียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนในน้ำมะพร้าวเจือจาง มีผลทำ

ให้ปริมาณแซนแทนกัมเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้น้ำมะพร้าวยังใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับ *Acetobacter xylinum* ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเซลลูโลสแบคทีเรียสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารเอเชียตะวันออกเฉียงใต้อีกด้วย (Kongruang, 2005) และการศึกษาก่อนหน้านี้ยังชี้ให้เห็นว่าน้ำมะพร้าวสามารถเพิ่มผลผลิตเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ได้อีกด้วย (Shivakumar และVijayendra, 2006) อาทิตยา กาวีอ้าย (2008) ศึกษาการผลิตเอกซ์โซโพลีแซกคาไรด์โดยเชื้อ *Lactobacillus confusus* CMU 198 และใช้น้ำมะพร้าวแก่เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน พบว่าสามารถใช้น้ำมะพร้าวแก่เป็นแหล่งวัตถุดิบทดแทนเปปโตน ยีสต์สกัด และเนื้อสกัด ได้บางส่วนในอาหาร MRS สูตรปรับปรุง โดยสามารถลดเปปโตน ยีสต์สกัด และเนื้อสกัด ลงอย่างละครึ่งจาก 10.0, 5.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร เป็น 5.0, 2.5 และ 2.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และพบว่าการแทนที่น้ำที่ใช้ในการเตรียมอาหารด้วยน้ำมะพร้าวแก่ ทำให้เชื้อสามารถผลิตเอ็กโซโพลีแซกคาไรด์สูงสุดเท่ากับ 12.05 กรัมต่อลิตร

เวย์แลคโตส (whey lactose)

เวย์แลคโตสเป็นผลิตภัณฑ์ของเสียจากการผลิตชีส ซึ่งเป็นปัญหามลพิษที่สำคัญในประเทศในอุตสาหกรรมนม เวย์แลคโตสโดยทั่วไปมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มน้ำตาลแลคโตสดังแสดงใน Table 5 สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเชื้อจุลินทรีย์บางสายพันธุ์เพื่อใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์บางชนิดได้ (Panesar *et al.,* 2007) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Pais และคณะ (2009) และ Obruca และคณะ (2009) ที่รายงานว่าเวย์แลคโตสสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับจุลินทรีย์ได้ เพราะมีปริมาณของน้ำตาลแลคโตสที่สูง ซึ่งการใช้ประโยชน์เวย์แลคโตสเป็นแหล่งน้ำตาลแลคโตสกำลังได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากราคาถูกกว่าน้ำตาลแลคโตสบริสุทธิ์มาก

Table 5 Constituent in sweet whey power

Chemical Parameters	Amount (g/L)
Total solid	0.63
Lactose	46
Protein	6
Phosphate	1
Lactate	2
Chloride	1.1
Calcium	0.4

ที่มา: ดัดแปลงจาก Panesar และคณะ (2007)

จากงานวิจัยที่ใช้เวย์แลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับใช้เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า Mustafa และคณะ (1997) ศึกษาการใช้เวย์แลคโตสในการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็กคาไรด์โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* สำหรับการหมักที่พีเอช 6.5 ผลการทดลองพบว่าเชื้อพอลิแซ็คคาไรด์สูงอยู่ในช่วง 1.55-2.13 กรัมต่อลิตร Rodrigues และคณะ (2006) ศึกษาการใช้เวย์แลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับเชื้อ *Lactococcus lactis* 53 และ *Streptococcus thermophiles* A เพื่อผลิตสารลดแรงตึงผิวโดยผลิตได้ 1.2-1.5 เท่าของผลผลิตต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง และพบว่าการใช้เวย์แลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถลดต้นทุนได้ถึงร้อยละ 60-80 นอกจากนี้ Cheirsilp และ Radchabut (2011) ได้ศึกษาการนำเวย์แลคโตสมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตคีเฟอรันของเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 โดยเลี้ยงร่วมกับยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* IFO 0216 พบว่าเชื้อมีการผลิตคีเฟอรันได้สูงสุด เท่ากับ 0.94 กรัมต่อลิตร Ghasemlou และคณะ (2012) ศึกษาการใช้แหล่งคาร์บอนราคาถูกจากเวย์แลคโตสเช่นกัน ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคีเฟอรันคือความเข้มข้นของน้ำตาลแลคโตสในเวย์แลคโตส 67 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของยีสต์สกัด 13 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.7 และอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส ทำให้เชื้อสามารถผลิตคีเฟอรันได้สูงที่สุดเท่ากับ 712 มิลลิกรัมต่อลิตร

5.2 แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์เป็นอย่างมากเนื่องจากจุลินทรีย์ใช้แหล่งไนโตรเจนในการสังเคราะห์เอนไซม์ที่มีความจำเป็นต่อการเจริญและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อของจุลินทรีย์มีทั้งแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ และแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ โดยงานวิจัยที่สนใจใช้ของเสียจากภาคอุตสาหกรรม มาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน เพื่อลดต้นทุนการผลิต (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2554) ตัวอย่างวัสดุเศษเหลือที่สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนราคาถูก ได้แก่ เซลล์ยีสต์ใช้แล้ว กากถั่วเหลือง และ ผงชูรสหรือโมโนโซเดียมกลูตาเมต

เซลล์ยีสต์ใช้แล้ว (spent cell yeast)

เซลล์ยีสต์ใช้แล้วเป็นยีสต์ผงที่ได้จากอุตสาหกรรมเบียร์ ซึ่งมีโปรตีนสูงถึงร้อยละ 30-46 (Tacon *et al.,* 2009) ทำให้สามารถนำไปใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ได้ มีรายงานว่าเซลล์ยีสต์ผงประกอบไปด้วยกรดอะมิโน 16 ชนิด เกลือแร่ 14 ชนิด วิตามิน 17 ชนิด นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ โครเมี่ยม สังกะสี เหล็ก ฟอสฟอรัส และเซเลเนียม อีกทั้งเซลล์ยีสต์ผงยังถือเป็นแหล่งสำคัญของโปรตีนถึง 16 กรัมต่อปริมาณยีสต์ 30 กรัม (Sombutyanuchit *et al*., 2001) จากงานวิจัยของสุวรรณี สุขแสวง (2559) ที่ศึกษาการผลิตคีเฟอรันโดยการใช้เซลล์ยีสต์

ใช้แล้วเป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับเลี้ยงเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 พบว่าเชื้อผลิตคีเฟอรันสูงสุดเท่ากับ 480 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ สุวรรณี สุขแสวง (2559) ยังศึกษาการย่อยเซลล์ยีสต์ให้เป็นโปรตีนไฮโดรไลสเสต เพื่อทำให้โมเลกุลของโปรตีนเล็กลงและง่ายต่อการนำไปใช้โดยเชื้อจุลินทรีย์

จากงานวิจัยของ Champagne และคณะ (2003) ที่ศึกษาผลของการใช้เซลล์ยีตส์ใช้แล้วที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการออโตไลซิส (Autolysis) หรือกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ในตัวยีสต์เอง พบว่าการใช้เซลล์ยีสต์ที่ผ่านการย่อยแล้ว 100 กรัมต่อลิตร ทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตได้ดี โดยวัดค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.264 ซึ่งสูงกว่าการใช้เซลล์ยีสต์ปกติที่ไม่ผ่านกระบวนการย่อยให้ค่าดูดกลืนแสงเพียง 0.383 นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Gao และคณะ (2006) ที่ทำการศึกษาผลของการเลี้ยงเชื้อ *L. rhamnosus* เพื่อผลิตกรดแลคติก โดยใช้เซลล์ยีตส์ใช้แล้วเป็นแหล่งไนโตรเจนเทียบกับการใช้ยีสต์สกัด ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร พบว่าเซลล์ยีสต์ใช้แล้วให้การผลิตกรดแลคติกสูงมากกว่าการใช้ยีสต์สกัด

กากถั่วเหลือง (soybean meal)

กากถั่วเหลืองเป็นส่วนเหลือจากการทำน้ำเต้าหู้ กากถั่วเหลืองสามารถใช้เป็นทั้งแหล่งโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตได้ เนื่องจากประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 50 และคาร์โบไฮเดรตประมาณร้อยละ 30 (กัลทิมา พิชัย, 2549) เนื่องจากกากถั่วเหลืองเป็นของเหลือที่ ปราศจากสารพิษ และมีอยู่เพียงพอที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ได้ (Dahod, 1999) จากงานวิจัยของ Zhang และคณะ (2015) พบว่ากากถั่วเหลืองมีองค์ประกอบโปรตีนร้อยละ 44-50, คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 20-30, ไขมันร้อยละ 0.5, ไฟเบอร์ร้อยละ 7 และความชื้นร้อยละ 12 และจากการย่อยกากถั่วเหลืองก่อนนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าได้โปรตีนไฮโดรไลเซท 10-15 กรัมต่อลิตร นอกจากโปรตีนแล้วยังประกอบด้วยสตาร์ทโรส ประมาณ 10.7 กรัมต่อลิตร กลูโคสประมาณ 1.7 กรัมต่อลิตร และกาแลคโตสประมาณ 2.7 กรัมต่อลิตร เมื่อนำกากถั่วเหลืองไฮโดรไลซิสมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยงเชื้อ *Rhizopus oryzae* ATCC 20344 พบว่าการใช้กากถั่วเหลืองไฮโดรไลซิสเข้มข้นร้อยละ 30 โดยปริมาตร และใช้สปอร์เข้มข้น 8×10^{7} ต่อลิตร ทำให้เชื้อผลิตกรดฟูมาริกสูงเท่ากับ 50.2 กรัมต่อลิตร โดยคิดเป็นผลผลิตเท่ากับ 0.72 กรัมต่อกรัมกลูโคส โดยงานวิจัยนี้ได้สรุปว่ากากถั่วเหลืองไฮโดรไลซิสทำให้สปอร์เจริญเติบโตเร็ว ระยะพักเซลล์สั้น

ผงชูรสหรือโมโนโซเดียมกลูตาเมต (monosodium glutamate)

โมโซเดียมกลูตาเมตเป็นสารประกอบประเภทกลูตาเมตซึ่งเป็นเกลือของกรดกลูตามิก (glutamic acid) อันเป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของโปรตีนทั่วไป เช่น โปรตีนในเนื้อสัตว์ โปรตีนในนม และโปรตีนในพืช โดยกลูตาเมตจะจับอยู่กับกรดอะมิโนตัวอื่นๆ

เกิดเป็นโครงสร้างของโปรตีน กลูตาเมตที่อยู่ในรูปของโปรตีนจะไม่มีกลิ่นรสและไม่มีคุณสมบัติทำให้เกิดรสอร่อยในอาหาร แต่เมื่อเกิดการย่อยสลายของโปรตีน เช่น เกิดกระบวนการหมัก การบ่ม การสุกงอมของผักและผลไม้ การทำให้สุกด้วยความร้อน จะทำให้กลูตาเมตในโปรตีนเกิดการสลายแยกตัวออกมาเป็นกลูตาเมตอิสระ ซึ่งเป็นตัวที่ทำให้เกิดรสอร่อยในอาหาร นอกจากนี้ยังได้มีการค้นพบว่าสารที่เกิดจากการย่อยสลายไรโบนิวคลีโอไทด์ในนิวเคลียสของเซลล์สิ่งมีชีวิตซึ่งได้แก่ ไอโนซิเนต(inosinate) และกัวไนเลต(guanylate) ก็มีคุณสมบัติให้รสอร่อยช่นเดียวกับกลูตาเมตอิสระ

Auer และคณะ (1990) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันเพื่อการผลิตพอลิแซคคาไรด์โดยเชื้อ *Aureobasidium pullulans* ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบกะ พบว่าการใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจน 0.5 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ทำให้ได้ชีวมวลถึง 9.88 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตพลูแลนได้ 3.94 กรัมต่อลิตรต่อมา ศิริพร และคณะ (2544) ศึกษาการใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตทางการค้าแทนกรดกลูตามิกบริสุทธิ์เพื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ *Proteus mirabili* SM 13, *Bacillus subtilil* SM29 และ *Bacillus subtilis* SM 29 ในการผลิตพอลิเมอร์ พบว่าสามารถใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ให้ผลผลิตพอลิเมอร์ถึง 39.18, 34.35, 31.45 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ต่อมาChen และคณะ (2010) ศึกษาการใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิต squalene โดยเชื้อ *Aurantiochytrium* sp. พบว่าการใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตที่ความเข้มข้น 13.53 กรัมต่อลิตร ทำให้เชื้อเจริญและให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 8.09 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิต squalene เท่ากับ 2.59 มิลลิกรัมต่อลิตร

6. กรดแลคติกและกรดแลคติกจากเชื้อแบคทีเรียแลคติก

กรดแลคติกเป็นผลิตผลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์แบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) กรดแลคติกที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์กรดแลคติกมีอยู่ 3 ชนิด คือ L(+),D(-) และ DL (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2547) ในทางอุตสาหกรรมอาหารกรดแลคติกทำหน้าที่เป็นตัวปรับสภาพเป็นกรดในอาหาร เพื่อให้เกิดรสชาติของความเปรี้ยวที่พึงประสงค์ของอาหารและเครื่องดื่ม ตลอดจนการใช้ในอาหารแปรรูปและผลิตภัณฑ์ขนมอบ กรดแลคติกยังถูกใช้เป็นสารกันบูดเพื่อป้องกันการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์อาหารได้

ปัจจุบันได้เริ่มมีการสนใจที่จะนำกรดแลคติกไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตโพลิเมอร์ที่สามารถถูกย่อยสลายได้โดยสิ่งมีชีวิตรวมถึงจุลินทรีย์ ได้แก่ poly-L-lactate (PLLA) ซึ่งเป็น biodegradable polymer หรือเรียกว่า bioplastic ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในหลายๆ ด้าน เช่น ในทางการแพทย์ ด้านศัลยกรรมมีการนำไปทำเป็นไหมเย็บแผล หรือหมุดยึดกระดูก โดยหลังการผ่าตัดไม่ต้องนำออกมา ร่างกายจะย่อยสลายได้ในที่สุด ด้านเภสัชกรรมสามารถนำไปใช้ทำแคปซูล

ยา สำหรับยาบางชนิดที่ต้องการให้ยาถูกปลดปล่อยออกมาอย่างช้าๆส่วนในด้านประโยชน์ต่อสิ่งแวดล้อม โดยวัสดุภัณฑ์ต่างๆ ที่ทำจากสารไบโอพลาสติกนั้น เมื่อทิ้งลงสู่สิ่งแวดล้อมจะถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ (Dhatta *et al*., 1995) นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้สำหรับปรับสภาพความเป็นกรด-ด่างของน้ำ ที่ใช้ในกระบวนการผลิตอุตสาหกรรมต่างๆ อาทิ อุตสาหกรรมพลาสติก อุตสาหกรรมผลิตเส้นใย อุตสาหกรรมยานยนต์ การผลิตเครื่องมือทางการแพทย์ เป็นต้น

อุตสาหกรรมเครื่องสำอางถือเป็นอุตสาหกรรมที่นำกรดแลคติก และกรดที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกมาใช้อย่างแพร่หลาย (De Bruyn *et al*., 1988) ไม่ว่าจะเป็นผลิตภัณฑ์บำรุงผิว โดยนิยมใช้ กรดแลคติก แลคเตท แคลเซียมแลคเตท โซเดียมแลคเตท เพื่อเป็นสารเร่งการผัดผิวใหม่ ให้ความชุ่มชื้น ลดการเกิดสิว ควบคุมพีเอช ในส่วนของผลิตภัณฑ์สำหรับช่องปาก ใช้สารแคลเซียมแลคเตท มาใช้เพื่อป้องกันฟันผุ และยับยั้งการก่อตัวของหินปูน ในรูปของส่วนผสมของยาสีฟันและน้ำยาบ้วนปาก นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์บำรุงเส้นผม โดยใช้กรดแลคติกเป็นส่วนผสม เพื่อทำหน้าที่ เคลือบให้เส้นผมเงางาม และผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดร่างกาย โดยใช้แคลเซียมแลคเตทเป็นส่วนผสมเพื่อทำหน้าที่ให้ความชุ่มชื้น และขัดเซลผิว อาทิ ครีมอาบน้ำ สบู่ก้อน สบู่เหลว โลชันทาผิว ยาสระผม และทำหน้าที่รักษาความชุ่มชื้นให้กับผลิตภัณฑ์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแลคติกมีวิถีของการสังเคราะห์กรดแลคติกตามวิถีการสร้างและสลายที่เรียกว่า ไกลโคไลซิส ที่ทำให้ได้กรดแลคติกสองโมลจากน้ำตาลกลูโคสหนึ่งโมล นอกจากนี้เชื้อยังสามารถใช้ในนมเป็นวัตถุดิบของการผลิตกรดแลคติกได้เป็นอย่างดี กรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์ที่สำคัญที่ใช้ในทางเคมี, ยา และอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งกรดในรูป L(+) ง่ายต่อการดูดซึมเข้าร่างกายมนุษย์ ทำให้มีการผลิตมากที่สุดในเชิงพาณิชย์ (Rodrigues *et al*., 2017) สำหรับการผลิตกรดแลคติกโดยวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพ เป็นการหมักนมด้วยจุลินทรีย์ที่ไม่ทำให้เกิดโรคหรือไม่ทำให้เกิดพิษ นมหมักที่พบจำหน่ายในท้องตลาดจะมี 2 รูปแบบ คือ นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม มีลักษณะเป็นน้ำเหมือนน้ำนมทั่วไป บริโภคง่าย และโยเกิร์ต ซึ่งมีลักษณะกึ่งแข็ง กึ่งเหลว โดยจุลินทรีย์ที่นำมาผลิตนมเปรี้ยวต้องเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่เปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสในนมให้เป็นกรดแลคติกเท่านั้น ซึ่งแบคทีเรียที่ผู้ผลิตนิยมนำมาใช้ในกรรมวิธีการผลิตนมเปรี้ยวก็ คือ *Lactobacillus bulgaricus* (เสาวนีย์ ธรรมสถิติ, 2547) *Lactobacillus bulgaricus* เป็นแบคทีเรียที่พบโดยทั่วไปในอาหารหมักดองหลายชนิด เป็นเชื้อที่ช่วยทำให้เกิดการถนอมอาหารโดยกระบวนการหมัก อีกทั้งเป็นแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพอีกด้วย แบคทีเรียชนิดนี้มีความสามารถในการต่อต้านการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่นๆ รวมทั้งพวกที่ทำให้อาหารเน่าเสียหรือพวกที่เป็นเชื้อก่อโรค ความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียชนิดนี้มีข้อดี คือ เนื่องจากกรดแลคติกที่เกิดขึ้นจะทำให้พีเอชในบริเวณนั้นๆต่ำลงจนกระทั่งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่ไม่เป็นที่ต้องการนั้นไม่สามารถ

เจริญเติบโตได้ จากงานวิจัยที่เกี่ยวกับการผลิตคีเฟอรันโดยเชื้อ *L. kefiranofaciens* พบว่าเชื้อมีการผลิตกรดแลคติกขึ้นไปพร้อมกับการผลิตคีเฟอรัน ซึ่งกรดแลคติกถือเป็นผลพลอยได้จากการผลิตคีเฟอรัน (Cheirsilp *et al*., 2003)

7. การใช้วัสดุเศษเหลืออุตสาหกรรมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติก

ประเทศไทยมีวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ลำต้นข้าวฟ่างหวาน เปลือกข้าวโพด และวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมเกษตร เช่น กากชานอ้อย และกากมันสำปะหลัง เป็นต้น ปัจจุบันมีความพยายามนำวัสดุเหลือทิ้งทางเกษตรและวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมการเกษตรมาใช้ผลิตน้ำตาล เนื่องจากวัสดุเหล่านี้ประกอบด้วย เซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส ซึ่งสามารถเปลี่ยนให้เป็นน้ำตาลได้ เมื่อนำมาหมักด้วยยีสต์หรือแบคทีเรียจะสามารถผลิตกรดแลคติก ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมต่างๆ (ธนพร วิชัย, 2554) แบคทีเรียแลคติกสามารถที่จะเติบโตในสภาพแวดล้อมที่อุดมไปด้วยคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นแหล่งที่มีศักยภาพของสารอาหารเพื่อการผลิตสารประกอบที่มีคุณค่าได้ ไม่ว่าจะเป็น กรดต่าง หรือ สารพอลิแซ็คคาไรด์ (Novik *et al.,* 2017)

Kotzamanidis และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากกากน้ำตาลจากหัวผักกาด โดยใช้ *L. delbrueckii* NCIMB 8130 โดยใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อผลิตกรดแลคติกได้ 45 กรัมต่อลิตร Wee และคณะ (2004) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจาก *Enterococcus faecalis* โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลความเข้มข้น 333 กรัมต่อลิตร (170 กรัมน้ำตาลทั้งหมดต่อลิตร) สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด 134.9 กรัมต่อลิตร Jyothi และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตกรดแลคติกจากเศษเหลือแป้งมันสำปะหลังและกากอ้อย โดยเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* ด้วยกระบวนการย่อยพร้อมการหมัก และใช้เอนไซม์ทางการค้าในการย่อยสารตั้งต้น ทำการทดลองที่อุณหภูมิต่างกัน (25, 30, 37, 44, และ 51 องศาเซลเซียส) พบว่าที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อมากที่สุด โดยเชื้อสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด 249 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์ และในงานวิจัยของ Buenaventurada และคณะ (2007) พบว่าสามารถผลิตกรดแลคติกจากกากน้ำตาลอ้อยที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 119 กรัมต่อลิตร และน้ำอ้อย 133 กรัมต่อลิตร ได้ผลผลิตกรดแลคติกเท่ากับ 107 และ 120 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อใช้น้ำตาลหัวผักกาดเข้มข้นร้อยละ 10 (105 กรัมน้ำตาลทั้งหมดต่อลิตร) เชื้อสามารถผลิตกรดแลคติกได้เท่ากับ 84 กรัมต่อลิตร ส่วนงานวิจัยของ Briczinski และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์โดยเชื้อ *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* RR และใช้เวย์เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอ็กโซพอลิแซ็คคาไรด์เท่ากับ 110 มิลลิกรัมต่อลิตร

วัตถุประสงค์ของโครงงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาการใช้วัสดุเศษเหลืออุตสาหกรรมเกษตรในการผลิตคีเฟอรันต้นทุนต่ำเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลบริสุทธิ์และยีสต์สกัด
2. เพื่อศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตคีเฟอรัน
3. เพื่อศึกษาการขยายขนาดในการผลิตระบบต้นแบบและคำนวณต้นทุนในการผลิต
4. เพื่อประยุกต์ใช้คีเฟอรันและกรดแลคติกที่เป็นผลพลอยได้ในผลิตภัณฑ์โลชั่นบำรุงผิว

ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาการใช้วัสดุเศษเหลืออุตสาหกรรมเกษตร ได้แก่ มะพร้าวแก่ และเวย์แลคโตส เป็นแหล่งอาหารราคาถูกในการผลิตคีเฟอรันต้นทุนต่ำโดยการเลี้ยงเชื้อ *L. kefiranofacien* JCM 6985 เปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลบริสุทธิ์ และศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนราคาถูก ได้แก่ กากถั่วเหลือง เซลล์ยีสต์ใช้แล้ว และโมโนโซเดียมกลูตาเมต เปรียบเทียบกับการใช้ยีสต์สกัด จากนั้นจึงศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม การควบคุมพีเอชระหว่างการหมัก การหมักแบบกะซ้ำ รวมทั้งศึกษาโครงสร้างคีเฟอรัน การขยายขนาดการผลิต การคำนวณต้นทุน และการประยุกต์ใช้คีเฟอรันและกรดแลคติกที่เป็นผลพลอยได้ในการผลิตภัณฑ์โลชั่นบำรุงผิว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถใช้วัสดุเศษเหลืออุตสาหกรรมเกษตรในการผลิตคีเฟอรันต้นทุนต่ำ
2. ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคีเฟอรัน
3. ได้ระบบต้นแบบและทราบต้นทุนการผลิตคีเฟอรันจากวัสดุเศษเหลือที่เหมาะสม
4. ได้ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่มีส่วนผสมของคีเฟอรันและกรดแลคติก

บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

วัสดุและอุปกรณ์

1. วัตถุดิบสำหรับการผลิตคีเฟอรัน

โมโนโซเดียมกลูตาเมต จากร้านค้าในจังหวัดสงขลา เซลล์ยีสต์แห้งใช้แล้ว ซื้อจากบริษัท เอนแทค ฟาร์ม น้ำมะพร้าวแก่ จากร้านคั้นกะทิสด ในจังหวัดสงขลา เวย์แลคโตส ซื้อจากร้าน ฟู้ด ดี ดี ในกรุงเทพมหานคร

1.1 การเตรียมน้ำมะพร้าวแก่

นำน้ำมะพร้าวแก่ที่ได้มากรองด้วยผ้าขาวบาง เพื่อกรองเศษสิ่งสกปรก แล้วเติมน้ำตาลกลูโคสเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาล จากนั้นนำน้ำมะพร้าวแก่ที่ทำเข้มข้นแล้วไปกรองฆ่าเชื้อด้วยกระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดก่อนนำมาใช้

1.2 การเตรียมเวย์แลคโตส

ชั่งเวย์แลคโตส 40 กรัม ละลายในน้ำ 1 ลิตร แล้วนำไปให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นนำมากรองด้วยผ้าขาวบ้าง 2 รอบ เพื่อเอาตะกอนที่ตกหลังให้ความร้อนออก แล้วนำส่วนใสไปวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดก่อนนำมาใช้

1.3 การเตรียมน้ำมะพร้าวแก่ที่เติมน้ำตาลและแหล่งไนโตรเจน

นำน้ำมะพร้าวแก่ที่ได้มากรองด้วยผ้าขาวบาง เพื่อกรองเศษสิ่งสกปรก แล้วเติมน้ำตาลกลูโคสเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาล จากนั้นนำน้ำมะพร้าวแก่ที่ทำเข้มข้นมาเติมแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นที่กำหนด แล้วไปกรองฆ่าเชื้อด้วยกระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปวัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดก่อนนำมาใช้

2. จุลินทรีย์

Lactobacillus kefiranofaciens JCM 6985 เป็นแบคทีเรียแลคติกที่ใช้สำหรับการผลิตคีเฟอรัน สั่งซื้อจาก Japan Collection of Microorganisms ประเทศญี่ปุ่น เก็บหัวเชื้อเริ่มต้นในกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 30 ภายใต้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรนจากประเทศญี่ปุ่น และร้านค้าในกรุงเทพมหานคร เก็บหัวเชื้อเริ่มต้นในนมสดยูเอชทีทางการค้าเปลี่ยนอาหารทุก 1 เดือน ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. อุปกรณ์สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และสำหรับการวิเคราะห์

ชื่อเครื่องมือ	รุ่น	บริษัท
ตู้เก็บเชื้ออุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส	SF-C697(GYN)	Sanyo, Thailand
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ	SS-325	Tomy Seiko Co Ltd, Japan
ตู้ปลอดเชื้อ	5270044	Hotpack, China
เครื่องกวนสาร	ST5	FinePCR, Korea
เครื่องให้ความร้อน	HS 115	Ika Labotechnic, Germany
เครื่องกวนแม่เหล็ก	RO 5	Ika Labotechnic, Germany
เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ	5203	Hitachi, Japan
ตู้อบความร้อนแห้ง	UM 200-800	Memmert, Germany
เครื่องเขย่า	Contomate	B. Braun Biotech
	MOII	International, Germany
เครื่องวัดพีเอช	420 A	Orion Research, Inc., Japan
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ	W350	Memmert, Germany
เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	U-200	Teachical Cooperation,
เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง	BP 210-s	Japan
เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง	HF-1200	Sartorius, Germany
		A&D Company, Ltd, Japan

4. สารเคมี

สารเคมีสำหรับตรวจวิเคราะห์ปริมาณคีเฟอรัน และปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ภาคผนวก) สารเคมีที่ใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ

5. อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารสำเร็จรูปสูตร Man-Rogosa Sharpe (MRS) ยี่ห้อ Hi-media สำหรับเตรียมหัวเชื้อ

สารเคมี	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
Dipotassium phosphate	10.00
Meat extract	2.00
Yeast extract	5.00
Glucose	20.00
Polysorbate 80	1 มิลลิลิตรต่อลิตร
Ammonium citrate	2.00
Sodium acetate	5.00
Magnesium sulfate	0.10
Manganese sulfate	0.05
Peptone	10.00
Agar	15.00

อาหาร modified-MRS คืออาหาร MRS ที่แทนกลูโคสด้วยเวย์แลคโตส หรือแทนแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ด้วยแหล่งไนโตรเจนราคาถูก (สุวรรณี สุขแสวง, 2559)

สารเคมี	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไนโตรเจน (กรัมต่อลิตร)
Tryptone*	20.00	2.40
Meat extract*	20.00	2.50
Yeast extract*	10.00	1.09
Glucose	30.00	
Polysorbate 80	1 มิลลิลิตรต่อลิตร	
Tri-ammonium citrate	4.00	
Sodium acetate	5.00	
Magnesium sulfate	0.58	
Manganese sulfate	0.28	
Calcium chloride	0.74	

* หมายถึง แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่จะถูกทดแทนด้วยแหล่งไนโตรเจนราคาถูกในอาหาร Modified MRS โดยจะแทนที่ในปริมาณกรัมไนโตรเจนที่เท่ากัน

วิธีการเตรียม

ชั่งส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายในหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการวิเคราะห์

1. การวัดการเจริญของจุลินทรีย์

การวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD_{660}) โดยนำน้ำหมักมาเจือจางให้มีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.2 -0.8 เพื่อดูอัตราการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

2. การวัดน้ำหนักเซลล์แห้งของเซลล์และการคำนวณค่าทางจลนพลศาสตร์

วัดโดยดัดแปลงจากวิธีของ Papanikolaou และคณะ (2002) ปิเปตตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดพลาสติก แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วนำตะกอนไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ คือประมาณ 48-72 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่ง บันทึกผล

การคำนวณหา

น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) $=(A-B) \times 1,000/4$

เมื่อ A = น้ำหนักหลอด +น้ำหนักเซลล์หลังจากอบแห้ง

B = น้ำหนักของหลอดที่อบแห้ง

ผลผลิตเซลล์ (กรัมต่อกรัมสับสเตรท) $= (X_{120}- X_o)/(S_0-S_{120})$

เมื่อ X_o = ปริมาณเซลล์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

X_{120} = ปริมาณเซลล์ที่เวลา 120 ชั่วโมง (กรัมต่อลิตร)

S_0 = ปริมาณสับสเตรทเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

S_{120} = ปริมาณสับสเตรทที่เวลา 120 ชั่วโมง (กรัมต่อลิตร)

อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)$= (\ln X_t - \ln X_o)/t$

เมื่อ X_t = น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาใดๆ (กรัมต่อลิตร)

X_o = น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลาใดๆ (กรัมต่อลิตร)

t = ช่วงเวลาที่เจริญเติบโต

3. การวิเคราะห์ปริมาณคีเฟอรัน

วัดปริมาณคีเฟอรันในรูปของผลรวมระหว่างคีเฟอรันในส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ (broth kefiran) กับคีเฟอรันที่เกาะรอบเซลล์ (capsular kefiran) ของแบคทีเรียแลคติก (Cheirsilp *et al.,* 2001)

ก. การวัดปริมาณคีเฟอรันในส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ (broth kefiran)

นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตกตะกอนคีเฟอรันด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 (-20 องศาเซลเซียส) ในอัตราส่วน 1:1 วางทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสออกจากตะกอน โดยการตกตะกอนภายใต้สภาวะนี้ไม่ทำให้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือโมเลกุลคู่ตกตะกอนลงมาด้วย จากนั้นละลายตะกอนที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำสารละลายดังกล่าวปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่าเดิมนาน 10 นาที แยกส่วนใสออกจากตะกอนที่ไม่ละลายน้ำซึ่งเป็นตะกอนโปรตีน ตกตะกอนส่วนใสซ้ำอีกครั้งด้วยเอทานอลที่มีความเข้มข้นเท่าเดิม วางทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเท่าเดิมนาน 10 นาที แยกส่วนใสออกจากตะกอนละลายตะกอนที่ได้ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงที่เหมาะสมเพื่อวิเคราะห์ปริมาณคีเฟอรันโดยการวัดน้ำตาลทั้งหมด แสดงขั้นตอนทั้งหมดดัง Figure 3

สำหรับตัวอย่างที่เป็นนม ทำการตกตะกอนโปรตีนนมดัดแปลงวิธีจาก Zajšek และคณะ (2013) ด้วย Trichloroacetic acid (TCA) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำการแยกตะกอนโปรตีนโดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนใสออกจากตะกอนแล้วนำส่วนใสที่ได้มาตกตะกอนคีเฟอรันดังที่กล่าวในข้างต้น

ข. การวัดปริมาณคีเฟอรันที่เกาะรอบเซลล์ (capsular kefiran)

ตะกอนเซลล์ที่แยกได้จากส่วนแรกนำมาละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 30 นาที ปั่นเหวี่ยงสารผสมที่ได้ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกสารละลายคีเฟอรันออกจากตะกอนเซลล์ ซึ่งการตกตะกอนและวิเคราะห์ปริมาณคีเฟอรันในส่วนของ capsular kefiran โดยทำตามวิธีการเดียวกับการตกตะกอน และวิเคราะห์ปริมาณคีเฟอรันในส่วนใส (broth kefiran) ในข้อ ก. แสดงขั้นตอนทั้งหมดดัง Figure 3

Figure 3 Method of analysis kefiran

ที่มา: Cheirsilp และคณะ (2001)

วิเคราะห์หาปริมาณคีเฟอรันทั้งหมด จากนั้นนำมาหาค่าผลผลิตคีเฟอรัน

ผลผลิตคีเฟอรัน $=(P_{120}-P_0)/(S_0-S_{120})$

เมื่อ P_0 = ปริมาณคีเฟอรันเริ่มต้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)

P_{120} = ปริมาณคีเฟอรันที่เวลา 120 ชั่วโมง (มิลลิกรัมต่อลิตร)

S_0 = ปริมาณสับสเตรทเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

S_{120} = ปริมาณสับสเตรทที่เวลา 120 ชั่วโมง (กรัมต่อลิตร)

5. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธีแอนโทรน (Cheirsilp *et al*., 2001) เตรียมสารละลายที่ใช้วัดโดยชั่งแอนโทรน 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมค่อยๆ เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 300 มิลลิลิตร เจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงที่เหมาะสมแล้วดูดสารละลายตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาดเล็กเติมสารละลายแอนโทรนปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ทำให้เย็นทันที วัดค่าการดูดกลืนแสงในความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ลบกับปริมาณคีเฟอรันที่วัดได้เพื่อคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

6. **การวิเคราะห์นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (^{1}H-NMR spectrum)**

เตรียมสารละลายตัวอย่างความเข้มข้นร้อยละ 1 ลงในดิวเทียมออกไซด์ (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) ที่อุณหภูมิห้อง และใส่สารละลายตัวอย่าง 700 ไมโครลิตร ถ่ายโอนไปยังท่อตัวอย่าง NMR ^{1}H เรโซแนนซ์แม่เหล็กนิวเคลียร์ (^{1}H-NMR) ได้รับการบันทึกในสเปกโตรมิเตอร์ Varian Unity Plus (Varian, Palo Alto, USA) ที่ 60 องศาเซลเซียส โดยใช้ความถี่เรโซแนนซ์ 400 เมกะเฮิร์ตซ์ การเปลี่ยนแปลงทางเคมีปรากฏใน ppm (δ) ข้อมูลจะถูกนำมาใช้ในซอฟต์แวร์ MestReNova 9.0(Mestrelab Research) ในการประมวลผลภาพ

7. การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชั่นของคีเฟอรันโดยเทคนิค FourierTransform–Infrared (FTIR) Spectroscopy

นำคีเฟอรันอบแห้งตัวอย่างที่สกัดและผ่านการอบแห้งมาบดละเอียดลงบนแผ่นกระดาษทิชชู่แล้วที่ตัดขนาด 1 cm × 1 cm นำ ตัวอย่างที่เตรียมไว้ไปใส่ที่แท่นวางตัวอย่างของเครื่อง FTIR (Fourier Transform Infrared Spectrometer, Vertex70, Bruker, Germany) ตามวิธีของ Xu และ Li (2013) ทำการวิเคราะห์คีเฟอรันแห้งตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างที่ได้มาวางติดอยู่บนแผ่นกระดาษทิชชู่ที่เตรียมไว้ทำการวิเคราะห์ Spectra ที่ได้โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของ Spectra ที่ได้จากตำแหน่งของพีคบน IR Spectrum และบันทึกคลื่นช่วง 4000-400 cm^{-1} ข้อมูลที่ได้จะถูกนำมาใช้ OPUS/IR NT 4.0 spectroscopic ซอฟแวร์ ถูกติดตั้งอยู่ในเครื่อง FTIR โดยเทียบผลการวิเคราะห์คีเฟอรันบริสุทธิ์จากงานวิจัยของ Esnaashari และคณะ (2014) ที่ใช้สภาวะในการวิเคราะห์เช่นเดียวกันกับงานวิจัยนี้

8. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของคีเฟอรันโดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ศึกษาชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของคีเฟอรันที่ได้ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยการเตรียมตัวอย่างคีเฟอรันแห้ง ปริมาณ 40 มิลลิกรัม เติมกรดไตรฟลูออโรอะซิติก (Trifluoro acetic acid; TFA) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร 0.2 โมลาร์ ย่อยที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ 14 โมลาร์ หยดจนให้พีเอชเท่ากับ 7 และใส่น้ำกลั่นเจือจางจนได้ปริมาตรเท่ากับ 25 มิลลิตร ทำให้ตัวอย่างมีอุณหภูมิเป็น 4 องศาเซลเซียส(อ้างอิงจาก Pop *et al.,* 2015) ก่อนนำไปวิเคราะห์ HPLC ส่งตรวจวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ใช้น้ำตาลมาตรฐาน 4 ชนิด น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลฟรุคโตส น้ำตาลซูโครส

วิธีการ

สภาวะที่ใช้ในการทดสอบคือ ใช้ตัวอย่างที่ผ่านการย่อยปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยเครื่องมือ คอลัมน์: Lichrocart NH4 (250×4 mm) ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Mobile phase) คือ อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile) และน้ำ (Water) ในอัตราส่วน 90:10 อัตราการไหลของตัวทำละลายเคลื่อนที่คือ 1.9 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจจับคือ Evaporative light scattering detector; ELSD 80 องศาเซลเซียส ใช้แก๊สไนโตรเจนที่อัตราเร็ว 2.0 ลิตรต่อนาที

9. การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกโดยเทคนิค HPLC

วิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกโดยเทคนิค HPLC โดยดัดแปลงตามวิธีของ Olano-Maetin และคณะ (2000)

สารเคมี

ก. สารมาตรฐานกรดแลคติก

ข. กรดซัลฟูริก

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

Mobile phase: 0.005 M H_2SO_4

Flow rate: 0.6 ml/min

Temp: 50 ^{o}C

Detecter: UV 215 nm

Injet: 20 μL

วิธีการ

ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนในออกจากตะกอน นำส่วนใสที่ได้กรองผ่านกระดาษกรองไนลอนขนาด 0.2 ไมโครเมตร และฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าสู่คอลัมม์ เปรียบเทียบปริมาณสารที่ได้กับสารมาตรฐานของกรดแลคติกที่มีความเข้มข้น 100, 50, 25 และ 2.5 มิลลิโมลาร์

10. การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดโดยการไตเตรต

เตรียมสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล เตรียมได้โดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร หยดฟีนอล์ฟธาลีนไป 2-3 หยด นำไปไตเตรต กับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล จนถึงจุดยุติ เมื่อสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณหาค่าเฉลี่ยของค่างที่ใช้ และคำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมด

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมดคิดเทียบกรดแลคติก(\%)} = \frac{\text{โซเดียมไฮดรอกไซด์ (มล.)} \times N \times 90.9}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง (มล.)} \times 1000} \times 100$$

11. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ คำนวณค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD) วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ one way ANOVA และ Duncan's multiple range teat($p<0.05$) โดยใช้โปรแกรม SPSS ซอฟต์แวร์รุ่น 1

วิธีการทดลอง

1. การผลิตคีเฟอรันจากก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรน

ทำการเติมก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรนร้อยละ 0.5 ลงในนมสดยูเอชทีทางการค้าที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้นร้อยละ 2 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับการเลี้ยงในนมถั่วเหลืองยูเอชทีทางการค้าที่มีน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 8 บ่มที่อุณหภูมิที่ 30±2 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมดเพื่อนำมาวัดปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณกรด และปริมาณก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรนที่เพิ่มขึ้น และทำการสกัดคีเฟอรันจากทั้งในนมและก้อนเชื้อ

2. การศึกษาการผลิตคีเฟอรันจากเชื้อเดี่ยว

ถ่ายหัวเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารสูตร modified-MRS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดซีรั่มขนาด 125 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมง 48, 72 ทำการเก็บตัวอย่างทั้งหมดเพื่อนำมาวัดปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณกรด และปริมาณหัวเชื้อคีเฟอร์เกรนที่เพิ่มขึ้น และทำการสกัดคีเฟอรัน

3. การผลิตคีเฟอรันจากแหล่งคาร์บอนราคาถูกเปรียบเทียบกับน้ำตาลชนิดอื่นๆ

ถ่ายหัวเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารสูตร modified-MRS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดซีรั่มขนาด 125 มิลลิลิตร ทำการทดลองทั้งหมด4 ชุดการทดลองคือ

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารสูตร modified-MRS ที่ใช้น้ำตาลกลูโคส (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารสูตร modified-MRS ที่ใช้น้ำตาลแลคโตส (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารสูตร modified-MRS ที่แทนน้ำตาลแลคโตสด้วยเวย์แลคโตส

ชุดการทดลองที่ 4 น้ำมะพร้าวแก่อย่างเดียว

โดยทุกชุดการทดลองใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 3 ปรับพีเอชเริ่มต้นอาหารเท่ากับ 5.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช วัดปริมาณกรดแลคติก และปริมาณ

คีเฟอรันที่เชื้อผลิตได้ เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อและการผลิตคีเฟอรันจากแหล่งคาร์บอน น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตส เวย์แลคโตส และน้ำมะพร้าวแก่

4. การศึกษาผลของการเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลและการควบคุมพีเอช

ถ่ายหัวเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในอาหาร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดซีรั่มขนาด 125 มิลลิลิตร ปรับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่ร้อยละ 3, 5 และ7 ปรับพีเอชเริ่มต้นอาหารเท่ากับ 5.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30$\pm$2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยชุดการทดลองที่มีการควบคุมพีเอชจะทำการปรับพีเอชตัวอย่างให้อยู่ในช่วง 5-6 ทุก 12 ชั่วโมง ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 10 นอร์มอล จากนั้นนำไปวิเคราะห์การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช วัดปริมาณกรดแลคติก และปริมาณคีเฟอรันที่เชื้อผลิตได้ เลือกความเข้มข้นน้ำตาลที่เหมาะสมที่ทำให้การผลิตคีเฟอรันสูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

5. การผลิตคีเฟอรันจากแหล่งไนโตรเจนราคาถูกและการศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

ทำการศึกษาการใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 4 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในขวดดูแรนปริมาตร 100 มิลลิลิตรโดยใช้ช่วงความเข้มข้นไนโตรเจนตามสูตรอาหาร MRS คือ 5.99 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร แสดงดัง Table 6 และศึกษาการใช้ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 7, 5, 3, 1, 0.5 และ 0.11 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร เปรียบเทียบกับการใช้ยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นไนโตรเจนเท่ากัน

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2 เลือกแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นที่ให้การผลิตคีเฟอรันสูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

Table 6 Total nitrogen of MRS medium

Medium	Amount (g/L)	Amount N (g/L)
Tryptone*	20.00	2.40
Meat extract*	20.00	2.50
Yeast extract*	10.00	1.09
Glucose	30.00	Total N = 5.99
Polysorbate 80	1 ml/L	
Tri-ammonium citrate	4.00	
Sodium acetate	5.00	
Magnesium sulphate	0.58	
Manganese sulphate	0.28	
Calcium chloride	0.74	

ที่มา: สุวรรณี สุขแสวง, 2559

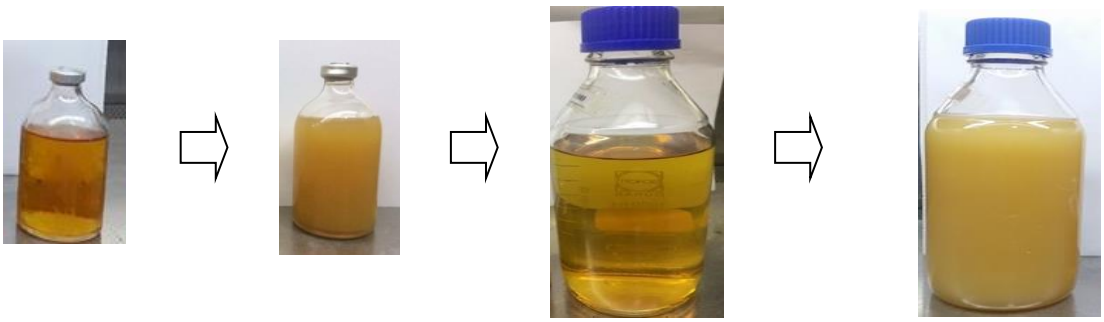
6. การขยายขนาดการทดลองและการหมักแบบกะซ้ำ (Repeated batch fermentation)

นำสภาวะที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อที่ 5 มาทำการขยายขนาดถังหมักเป็น 1 ลิตร ทำการทดลองแบบกะซ้ำโดยทำการเติมอาหารเพิ่มทุก 48 ชั่วโมง ก่อนเติมอาหารใหม่ทำการดึงอาหารเก่าออกร้อยละ 90 ของน้ำหมักทั้งหมด ทำการบ่มที่อุณหภูมิเท่ากับ 30±2 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 6 รอบ เก็บตัวอย่างทดสอบทุก 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และค่าพีเอช และปริมาณคีเฟอรันที่เชื้อผลิตได้ เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อและการผลิตคีเฟอรัน และคำนวณคำนวณผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้ง ($Y_{x/s}$) ผลผลิตคีเฟอรันต่อสารตั้งต้น ($Y_{P/S}$)

7. ระบบต้นแบบการผลิตคีเฟอรันจากน้ำมะพร้าวแก่ต้นทุนต่ำ

7.1 การเตรียมหัวเชื้อ

ในการเตรียมหัวเชื้อเพื่อลงถังปฏิกรณ์ต้นแบบ ทำการขยายขนาดการเตรียมหัวเชื้อ 2 ระดับ คือ จากหัวเชื้อลงอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร และขยายต่อไปลงอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร โดยมีรายละเอียดดังนี้ ถ่ายหัวเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ลงในอาหารเหลว MRS ที่ผ่านการปรับค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 และผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จนได้ค่าความขุ่น (OD_{660}) เท่ากับ 0.2 จากนั้นนำหัวเชื้อที่ได้ถ่ายลงอาหาร MRS ปริมาตร 1 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จนได้ค่าความขุ่น เท่ากับ 0.2 ขั้นตอนแสดงดัง Figure 4



MRS medium 100 mL inoculum 1 L MRS medium 1 L inoculum

Figure 4 Inoculum preparation and scale up from 100 mL to 1 L.

7.2 การเตรียมน้ำมะพร้าวแก่

นำน้ำมะพร้าวแก่ที่ได้มากรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อกำจัดเศษสิ่งสกปรกออก แล้วปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.5 แล้วนำมาฆ่าเชื้อโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าน้ำมะพร้าวแก่มีความเข้มข้นน้ำตาลเพิ่มขึ้นเป็น 50 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว และบรรจุใส่ลงขวดขนาด 7 ลิตร โดยบรรจุน้ำมะพร้าวแก่เพียง 450 มิลลิลิตร Figure 5 แสดงรูปการเตรียมน้ำมะพร้าวแก่

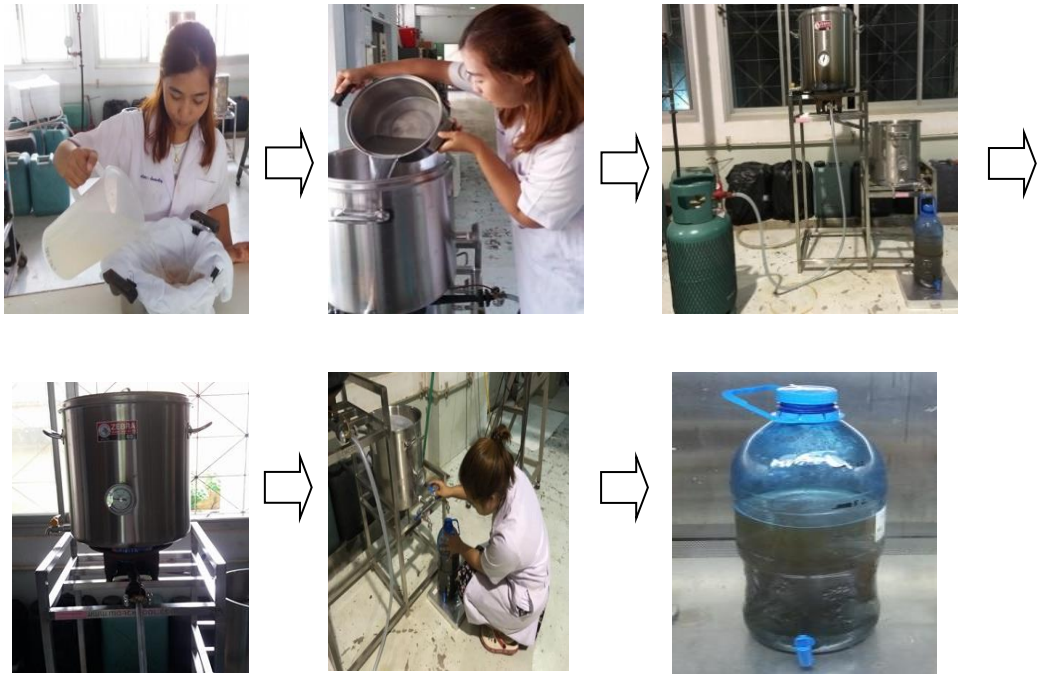


Figure 5 Preparation of mature coconut juice for fermentation

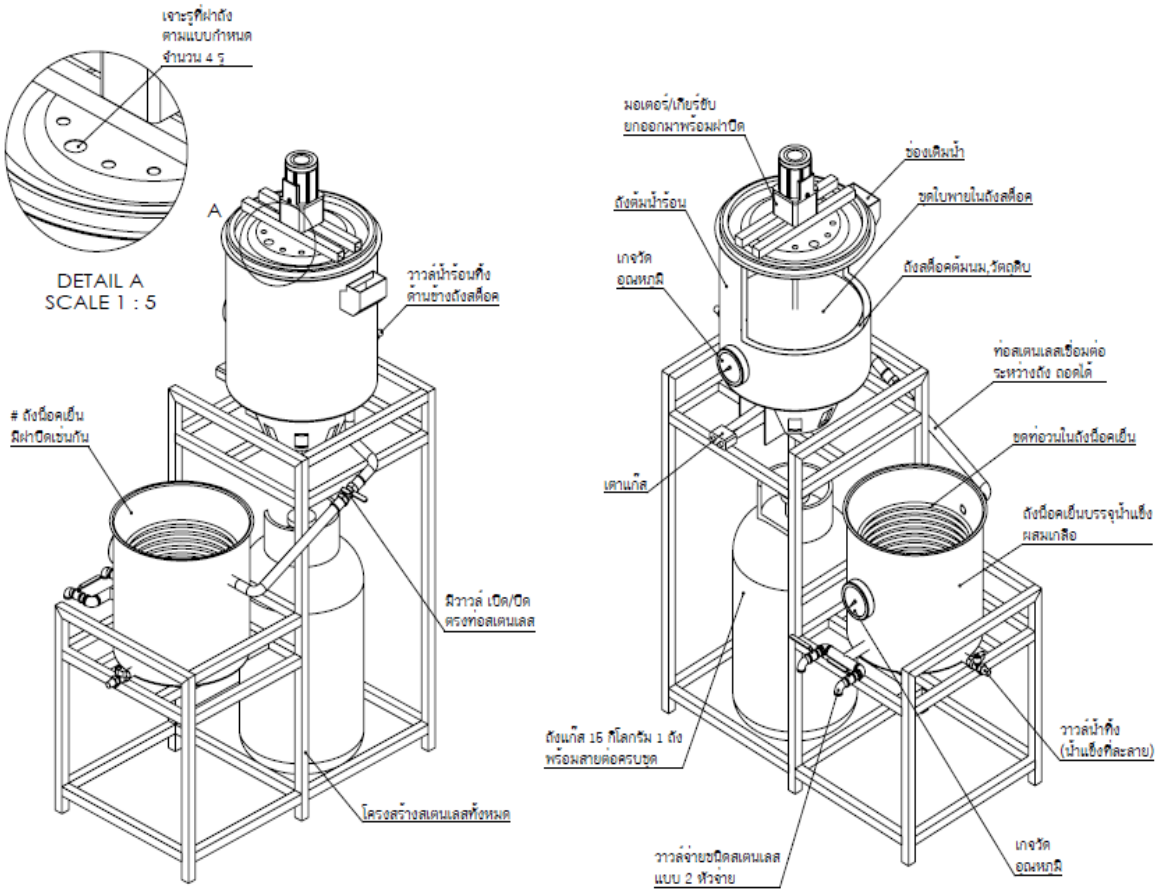


Figure 6 Diagram of pasteurization equipment.

Source: http://www.marchcool.com/en/SME-Pasteurized-mini-set

Figure 7 Pictures of pasteurization equipment.

7.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตคีเฟอรัน

นำหัวเชื้อที่ได้ถ่ายลงอาหารน้ำมะพร้าวแก่ที่ผ่านการทำเข้มข้นน้ำตาล 50 กรัมต่อลิตร และปรับ พีเอช 5.5 แล้วจึงถ่ายเชื้อจากขวด 1 ลิตร ลงไปในถังหมักขนาด 7 ลิตร แล้วบ่มเป็นเวลา 5 วัน เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เมื่อครบ 5 วัน เตรียมนำน้ำหมักที่ได้ไปแช่เย็นในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปสกัด คีเฟอรัน

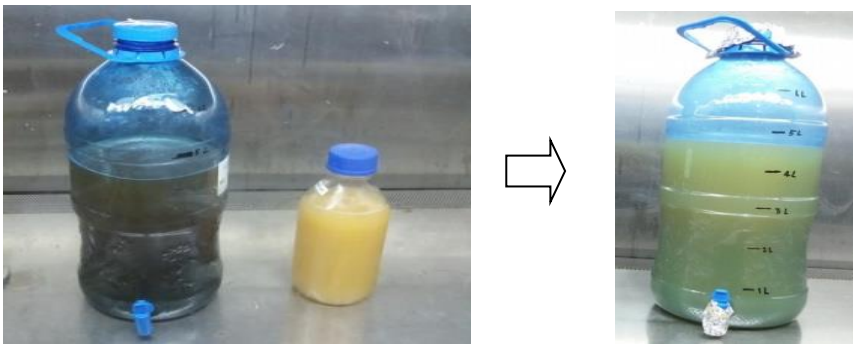


Figure 8 Inoculation of 1 L inoculum into 7 L fermenter and incubation for 5 days.

7.4 การตกตะกอนคีเฟอรันแยกออกจากน้ำหมัก

นำน้ำหมักมาทำให้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วเติมเอทานอลเย็น -20 องศาเซลเซียสเพื่อตกตะกอนคีเฟอรัน ในอัตราส่วนเอทานอลต่อน้ำหมักที่ 1:1 เขย่าอย่างแรงให้น้ำหมักกับเอทานอลเข้ากัน และนำไปแช่เย็นห้อง 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 1 คืน จากนั้นแยกของเหลวออกจากตะกอนคีเฟอรัน

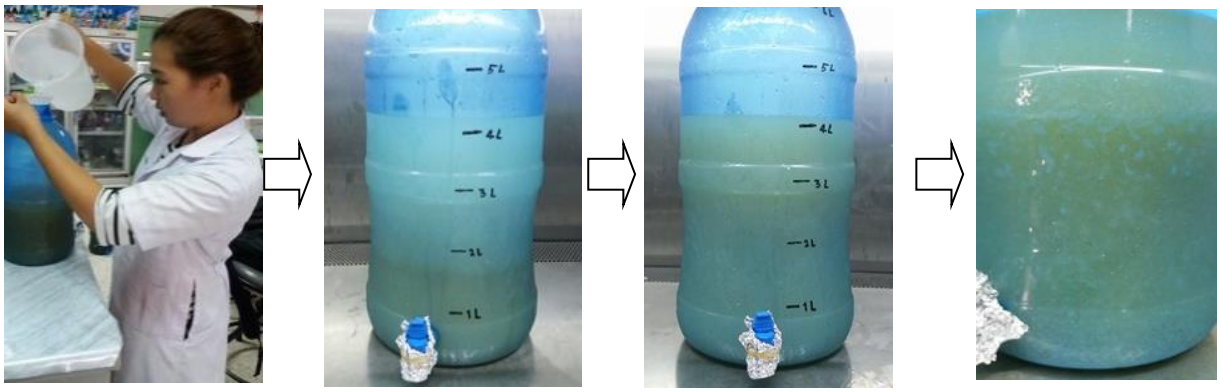


Figure 9 Kefiran recovery from fermented broth by cool ethanol precipitation.

นำส่วนใสแยกตะกอนออกจากเอทานอลมาหมุนเหวี่ยงที่ 8,500 รอบต่อนาที 15 นาที แล้วนำส่วนใสไประเหยเอาเอทานอลกลับมาใช้ซ้ำ และนำน้ำหมักไปเก็บเกี่ยวกรดแลคติกต่อไป สำหรับส่วนที่เป็นตะกอนนำมาละลายในน้ำกลั่น อาจมีการให้ความร้อนเพื่อช่วยให้คีเฟอรันออกจากตะกอนได้เร็วขึ้น จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงแยกตะกอนที่ไม่ใช้คีเฟอรันออก ในที่นี้คือตะกอนโปรตีน เก็บส่วนใสคีเฟอรันมาตกตะกอนอีกครั้ง จากนั้นนำตะกอนไปทำให้แห้งโดยการอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ขั้นตอนทั้งหมดแสดงดัง Figure 13

Figure 10 Centrifuge to separate liquid (culture broth+ethanol) and precipitate.

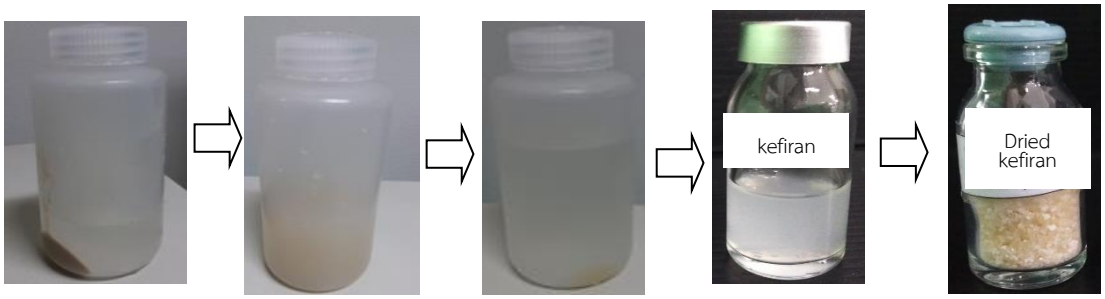


Figure 11 Dissolve precipitate in distilled water and centrifuge to separate kefiran solution from protein precipitate and repeat ethanol precipitation before drying.

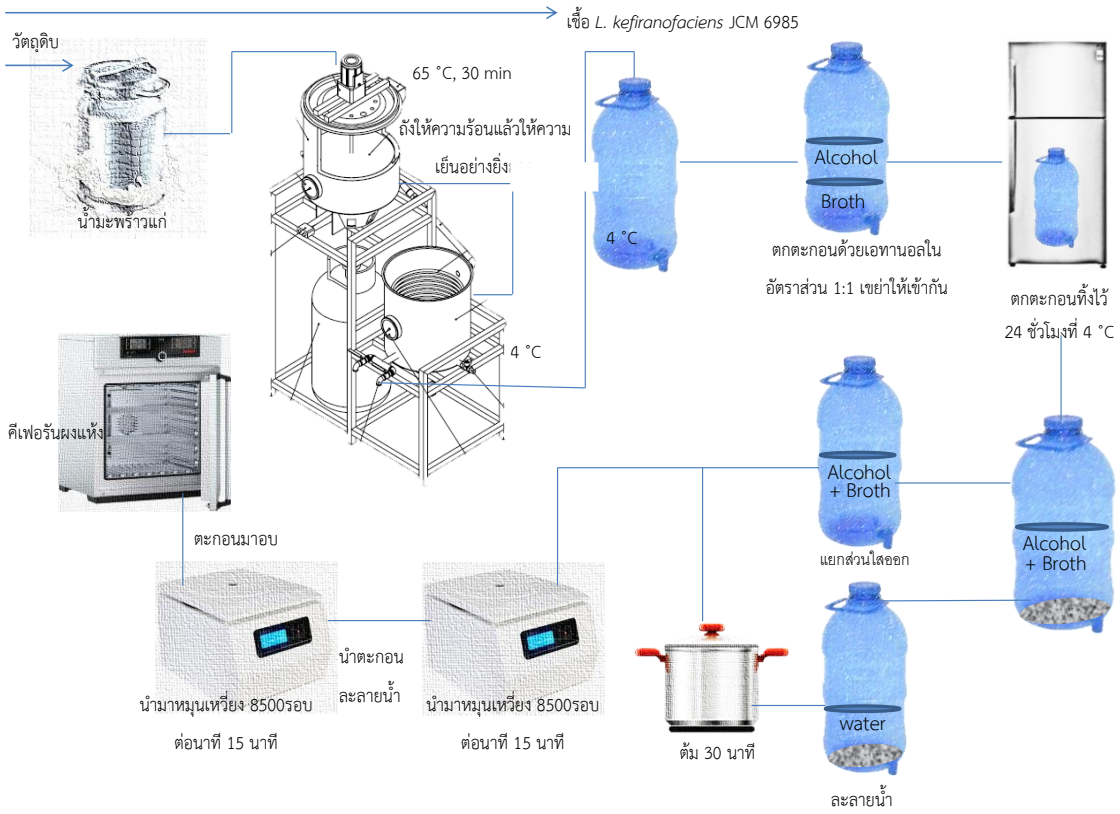


Figure 12 Overall processes for kefiran production and recovery.

8. การคำนวณต้นทุนการผลิตคีเฟอรัน

นำข้อมูลจากผลการทดลองข้างต้นมาคำนวณต้นทุนการผลิตคีเฟอรัน

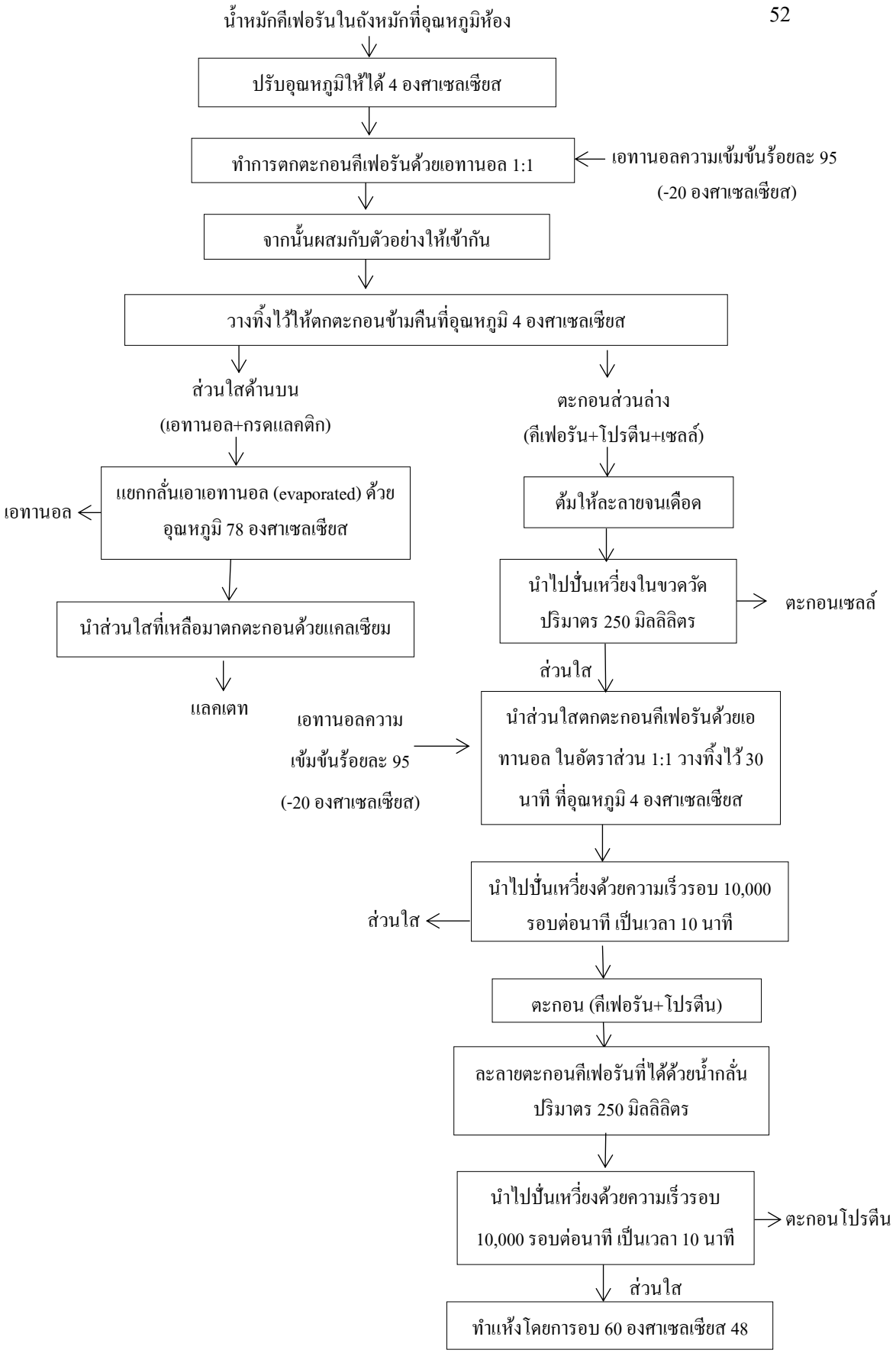


Figure 13 Method of kefiran recovery for 1 L bioreactor.

9. การประยุกต์ใช้คีเฟอรันในผลิตภัณฑ์โลชั่น

ทำการเตรียมโลชั่นบำรุงผิวโดยแบ่งส่วนประกอบเป็น วัตภาคน้ำ A (water phase) และวัตภาคน้ำมัน B (oil phase)

Phase	Chemical	Amount
A	น้ำกลั่น	0.78 kg
	เมทิลพาราเบน (Methyparaben)	10 g
B	สเตียริก เอซิค (Stearic acid)	60 g
	ซิทิล แอลกอฮอล์ (Cetyl alcohol)	30 g
	ไอโซโพรพิล ไมริสเตท (Isopropyl mysistate (IPM))	30 g
	ทวิน 20 (Tween 20)	50 g
C	น้ำหอม (Fragrance)	1 g

1. นำ Phase A มารวมกัน แล้วนำไปให้ความร้อน
2. นำ Phase B มารวมกัน แล้วนำไปให้ความร้อน
3. กวนจนข้อ 2, 3 ละลายจนหมด
4. นำข้อ 1 เทผสมลงในข้อ 2 แล้วกวนต่อไปเรื่อยๆ จนโลชั่นเซตตัวหนืดขึ้น

เมื่ออุณหภูมิลดลงเติมน้ำหอม Phase C ลงไปแล้วกวนให้เข้ากันและศึกษาการเติมคีเฟอรันและกรดแลคติกตามชุดการทดลองด้านล่าง

ชุดการทดลองที่ 1 โลชั่นชุดควบคุมที่ไม่เติมคีเฟอรันและกรดแลคติก

ชุดการทดลองที่ 2 โลชั่นผสมคีเฟอรันร้อยละ 1

ชุดการทดลองที่ 3 โลชั่นผสมกรดแลคติกร้อยละ 1

ชุดการทดลองที่ 4 โลชั่นผสมกรดแลคติกร้อยละ 0.5 และคีเฟอรันร้อยละ 0.5

หลังจากผสมส่วนผสมทุกอย่างรอให้อุณหภูมิลดลง 35 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำไปประเมินคุณสมบัติทางกายภาพ, ทางทางเคมี, ทางจุลชีววิทยา, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และทางด้านประสาทสัมผัส (เสาวนีย์ กระสานติสุข และหทัยชนก รุณรงค์, 2549)

1) วิเคราะห์ทางกายภาพ โดยดูจากลักษณะภายนอกของโลชั่น โดยพิจารณาในเรื่องต่อไปนี้

- ลักษณะเนื้อโลชั่น สังเกตลักษณะเนื้อโลชั่นที่มองเห็นโดยใช้คำอธิบายลักษณะดังนี้ เนื้อละเอียด หยาบ มันวาว มีผลึกแห้ง มีหยดน้ำมัน แล้วบันทึกผลลงตาราง
- สี สังเกตสีของโลชั่นที่มองเห็นว่าเป็นสีขาว สีเหลือง หรือสีอื่นๆ
- การไหลของโลชั่น นำขวดของโลชั่นมาเอียงทำมุม 45 องศากับแนวระดับ จับเวลาตั้งแต่เริ่มเอียงจนโลชั่นไหลมาถึงปากภาชนะ โดยแบ่งเป็นระดับดังนี้

$\leq$ 3 วินาที ไหลได้ดีมาก ++++ $\geq$ 10 วินาที ไหลได้ช้า ++

4-10 วินาที ไหลได้ดี +++ ไม่ไหลเลย +

- ความหนืดวัดโดยเครื่องวัดความหนืด Brook field

2) วิเคราะห์ทางเคมี โดยทดสอบความเป็นกรด – ด่าง pH 1- 11 แล้วบันทึกผล

3) วิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาทั้งหมด ใช้วิธีดรอปเพลท (Drop plate count) โดยใช้ MRS agar บ่มที่ 37 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน

\+ มีการเจริญของจุลินทรีย์หรือเชื้อรา - ไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์หรือเชื้อรา

4) การทดสอบคุณสมบัติฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH เริ่มจากการเตรียมสารละลาย (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; DPPH radical) ในเอทานอลความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ โดยใส่ตัวอย่างโลชั่นในข้อ 7 ลงในหลอดทดลองสีทึบและเติม DPPH ลงไปในสารตัวอย่างที่ได้เตรียมไว้ในอัตราส่วน 1ต่อ1 เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 30นาที นำไปวัดค่าดูดกลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อยืนยันผลและทำการหาค่าเฉลี่ย โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน (Butylated hydroxytoluene; BHT) จากนั้นทำการคำนวณร้อยละ radical scavenging (Manosroi *et al.,* 2011)

การคำนวณ

$$\% \text{ radical scavenging} = [1-(A_{sample}-A_{blank}/A_{control})] \times 100$$

เมื่อ A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารตัวอย่างที่ใส่ DPPH

$A_{control}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ DPPH

A_{blank} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างในสารละลาย

5) วิเคราะห์ทางด้านประสาทสัมผัส การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยผู้ทดสอบประเมินความชอบต่อตัวอย่าง โดยดูความชอบโดยรวม โดยใช้ 9-point hedonic scale (อ้างอิงจาก พัลลภัช และคณะ 2557)

- การซึมซาบเข้าสู่ผิวหนัง - ความเหนอะหนะ
- สี - ความชุ่มชื้น
-ความรู้สึกมันบนผิวหลังทา - ความน่าใช้

สีลักษณะทางกายภาพ ทางเคมี และความคงตัวของโลชั่นแล้วบันทึกผลลงตาราง ดังนี้

9 = ชอบมากที่สุด 8 = ชอบมาก 7 = ชอบปานกลาง
6 = ชอบเล็กน้อย 5 = เฉยๆ 4 = ไม่ชอบเล็กน้อย
3 = ไม่ชอบปานกลาง 2 = ไม่ชอบมาก 1 = ไม่ชอบมากที่สุด

***หมายเหตุ** คุณสมบัติของอาสาสมัคร คัดเลือกอาสาสมัครที่มีอายุ 18 ปีขึ้นไป เพศหญิง จำนวน 20 คน (เสาวนีย์ กระสานติสุข และหทัยชนก รุณรงค์, 2549)

บทที่ 3
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การผลิตคีเฟอรันจากก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรนเปรียบเทียบกับเชื้อเดี่ยว *L. kefiranofaciens* JCM 6985

การผลิตคีเฟอรันสามารถผลิตได้จากก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรน และเชื้อเดี่ยว *L. kefiranofaciens* (Habibi *et al*., 2011) จึงได้ทำการเลี้ยงคีเฟอร์เกรนในนมสดทางการค้าและนมถั่วเหลืองทางการค้าเพื่อผลิตคีเฟอรันเปรียบเทียบกับการผลิตโดยเชื้อเดี่ยว โดยการศึกษานี้จะใช้ปริมาณหัวเชื้อคีเฟอร์เกรนร้อยละ 0.5 ในนม 20 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และศึกษาการเลี้ยงเชื้อเดี่ยว *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ในอาหาร MRS ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากผลการทดลองแสดงดัง Table 7 พบว่าการเลี้ยงคีเฟอร์เกรนในนมถั่วเหลืองทางการค้าเพื่อผลิตคีเฟอรันให้ปริมาณคีเฟอรันสูงที่สุดเท่ากับ 1.92±0.06 กรัมต่อลิตร เนื่องจากในนมถั่วเหลืองที่ใช้เป็นสารตั้งต้นนั้นมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่สูงถึงร้อยละ 8 และมีโปรตีนอะบูมิน และกรดอะมิโนหลายชนิดเช่น ซิสทีอีส ไลซีน และโกลบูลิน และยังมีไอโซฟาโนวซึ่งจัดเป็นเอสโตรเจนสามารถช่วยในการดูดซับสารอาหาร แร่ธาตุ และวิตามิน ทำให้เชื้อมีการผลิตคีเฟอรันสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Botelho และคณะ (2014) ที่ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากการหมักก้อนเชื้อเฟอร์เกรนในนมถั่วเหลือง พบว่ามีการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์สูงถึง 18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตคีเฟอรันต่อกรัมน้ำตาลพบว่าเชื้อเดี่ยวให้ผลผลิตคีเฟอรันที่สูงกว่าเท่ากับ 0.0454±0.0008 กรัมคีเฟอรันต่อกรัมสารตั้งต้น และให้ผลผลิตกรดทั้งหมดสูงสุดเท่ากับร้อยละ 1.25±0.03 ภายในเวลา 72 ชั่วโมง และเมื่อเลี้ยงต่อไปจนครบ 120 ชั่วโมงให้ผลผลิตคีเฟอรันสูงขึ้นถึง 0.0620+0.0001 กรัมคีเฟอรันต่อกรัมสารตั้งต้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรนประกอบไปด้วยเชื้อหลายชนิดผสมระหว่างยีสต์และแบคทีเรียกรดแลคติก (Arihara *et al*., 1990) ทำให้เกิดการแย่งอาหารกัน และทำให้เชื้อแบคทีเรียที่ผลิตคีเฟอรันได้รับอาหารน้อยกว่าและทำให้ผลิตคีเฟอรันได้น้อยกว่าการใช้เชื้อเดี่ยว อย่างไรก็ตามการใช้เชื้อเดี่ยวที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้านั้น จะมีต้นทุนของอาหารที่สูงเนื่องมาจากแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาสูง จึงจำเป็นต้องศึกษาหาแหล่งอาหารราคาถูกเพื่อลดต้นทุนในการผลิตคีเฟอรัน

Table 7 Kefiran production, kefiran yield and total acid production using kefir grain and pure culture of *L. kefiranofaciens* JCM 6985

Starter	Substrate	Time (h)	Kefiran (g/L)	$Y_{P/S}$	TA (%)
Kefir grain	Milk (2%)	72	0.58 ± 0.01^{d}	0.0290 ± 0.0001^{d}	0.38 ± 0.25^{c}
	Soymilk (8%)	72	1.92 ± 0.06^{a}	0.0305 ± 0.0006^{cd}	0.26 ± 0.03^{c}
Pure culture	Modified-	72	0.59 ± 0.01^{c}	0.0454 ± 0.0008^{b}	1.25 ± 0.03^{b}
L. kefiranofaciens JCM 6985	MRS (3%)	120	1.61 ± 0.02^{b}	0.0629 ± 0.0001^{a}	2.67 ± 0.04^{a}

Different superscript letters in the same column indicate significant difference between treatments ($p\leq 0.05$).

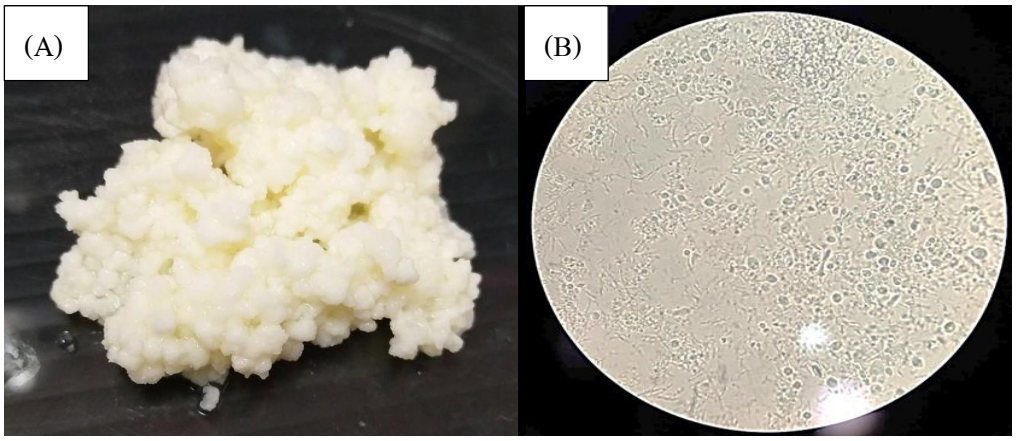


Figure 14 Physical appearance of kefir grain (A) and photograph under microscope 100X (B).

2. การผลิตคีเฟอรันจากแหล่งคาร์บอนราคาถูกเปรียบเทียบกับน้ำตาลบริสุทธิ์

คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญต่อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการเจริญ การสร้างเซลล์และผลิตภัณฑ์ โดยเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลได้หลายชนิด ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรุคโตส น้ำตาลกาแลคโตส เป็นต้น (Wang and Bi, 2008) อย่างไรก็ตามการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำตาลบริสุทธิ์จะทำให้มีต้นทุนสูง จากงานวิจัยของสุวรรณี สุขแสวง (2016) ที่ศึกษาการใช้กากน้ำตาลที่เป็นวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมน้ำตาล พบว่าเชื้อมีการผลิตคีเฟอรันได้น้อย ทั้งนี้อาจเนื่องจากในกากน้ำตาลมีสารเจือปน เช่น ไฮดรอกซิลเมธิลเฟอร์ฟูรัล ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อและการผลิตคีเฟอรัน งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้วัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมน้ำกะทิ นั่นคือ น้ำมะพร้าวแก่แทนอาหารเลี้ยงเชื้อและใช้วิธีการกรองฆ่าเชื้อ รวมทั้งศึกษาการใช้เวย์แลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกเปรียบเทียบกับการใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลบริสุทธิ์ คือ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแลคโตส กำหนดความเข้มข้นน้ำตาลให้เท่ากันที่ร้อยละ 3 ในอาหาร MRS ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 30$\pm$2 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะการกวนด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 60, 120 เพื่อวัดปริมาณคีเฟอรัน, น้ำหนักเซลล์แห้ง, ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป และพีเอชที่ลดลงระหว่างการเลี้ยง ผลการทดลองแสดงดัง Figure 15 พบว่าเชื้อสามารถใช้น้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลแลคโตส, เวย์แลคโตส และน้ำมะพร้าวแก่ ในการเจริญและให้น้ำหนักเซลล์แห้งในชั่วโมงที่ 60 สูงใกล้เคียงกัน คือเท่ากับ 2.70$\pm$0.00, 2.2$\pm$0.00, 2.50$\pm$0.05 และ 2.20$\pm$0.14 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่พบว่าในชั่วโมงที่ 120 มีเพียงน้ำมะพร้าวแก่ที่ให้การเจริญเติบโตของเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 2.70$\pm$0.08 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงใกล้เคียงกับงานวิจัยของสุวรรณี สุขแสวง (2016) ที่ใช้น้ำตาลกาแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนและพบว่าเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 2.76 กรัมต่อลิตร อีกทั้งพบว่าค่าพีเอชของน้ำมะพร้าวแก่ลดลงน้อยกว่าน้ำตาลชนิดอื่น ทั้งนี้อาจเนื่องจากในน้ำมะพร้าวมีความเป็นบัฟเฟอร์และมีองค์ประกอบของแคลเซียมที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับ H_3O^+ ทำให้พีเอชเปลี่ยนแปลงน้อยมาก (Krishnankutty, 1987)

สำหรับการผลิตคีเฟอรันพบว่าระหว่างการเจริญเชื้อจะขับคีเฟอรันออกมาเกาะรอบเซลล์ก่อนปล่อยสู่น้ำหมัก ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณคีเฟอรันที่เกาะรอบเซลล์มีน้อยมาก 2.50-0.50 กรัมต่อลิตร ในงานวิจัยนี้จึงได้แสดงผลในรูปคีเฟอรันทั้งหมด พบว่าน้ำมะพร้าวแก่และน้ำตาลแลคโตสให้การผลิตคีเฟอรันสูงสุดใกล้เคียงกันเท่ากับ 1.95$\pm$0.06 และ1.96$\pm$0.02 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ รองลงมาคือเวย์แลคโตส และน้ำตาลกลูโคสที่ให้การผลิตคีเฟอรันเท่ากับ 1.82$\pm$0.13 และ 1.29$\pm$0.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับในขณะที่น้ำตาลกลูโคสให้กรดทั้งหมดสูงสุดถึงร้อยละ 2.61 รองลงมาคือ

น้ำตาลแลคโตสและเวย์แลคโตสที่ให้การผลิตกรดทั้งหมดร้อยละ 2.27-2.32 สำหรับน้ำพร้าวแก่ให้กรดทั้งหมดน้อยสุดร้อยละ 1.39 จากการคำนวณผลผลิตของน้ำหนักเซลล์แห้งและผลผลิตคีเฟอรันแสดงดัง Figure 16 พบว่าน้ำมะพร้าวแก่ให้ผลผลิตเชื้อสูงที่สุดเท่ากับ 0.090±0.005 กรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเตรท รองลงมาคือน้ำตาลแลคโตสและเวย์แลคโตส ที่ให้ผลผลิตของเชื้อเท่ากับ 0.710±0.09 0 กรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเตรท สำหรับผลผลิตคีเฟอรันพบว่าน้ำตาลแลคโตส เวย์แลคโตส และน้ำมะพร้าวแก่ให้ผลการผลิตคีเฟอรันใกล้เคียงกันคือ เท่ากับ 0.065±0.004, 0.060±0.009 และ0.064±0.002 กรัม คีเฟอรันต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ เนื่องจากองค์ประกอบในน้ำมะพร้าวมีวิตามินบี 12 กรดอะมิโน และแร่ธาตุหลายชนิด ซึ่งสนับสนุนการเจริญของเชื้อ (Kongruang, 2005) ในขณะที่น้ำตาลกลูโคสให้ผลผลิตคีเฟอรันต่ำที่สุดเท่ากับ 0.043±0.002 กรัมคีเฟอรันต่อกรัมสับสเตรท จากรายงาน Wang และBi (2008) ที่ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตคีเฟอรัน โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลมอลโตส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลฟรุคโตส น้ำตาลกาแลคโตส และโซลูเบิลสตาร์ชร่วมกับการใช้ยีตส์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร พบว่าน้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุคโตสให้การผลิตคีเฟอรันเท่ากับ 1.36, 1.60 และ 1.48 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเป็นไปได้ว่าน้ำตาลในน้ำมะพร้าวแก่ที่มีทั้งน้ำตาลกลูโคส, น้ำตาลซูโครส และน้ำตาลฟรุคโตส ซึ่งเป็นกลุ่มน้ำตาลที่เหมาะสมที่เชื้อสามารถนำไปผลิตคีเฟอรันได้ดีกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสเพียงชนิดเดียว

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่าน้ำมะพร้าวแก่ให้ผลผลิตของเชื้อและผลผลิตคีเฟอรันใกล้เคียงกับน้ำตาลแลคโตส และเมื่อเปรียบเทียบต้นทุนแหล่งคาร์บอนต่อผลผลิตคีเฟอรัน พบว่าน้ำมะพร้าวแก่มีต้นทุนถูกที่สุดเท่ากับ 1.05 บาทต่อกรัมคีเฟอรัน ในขณะที่ต้นทุนน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลแลคโตส และเวย์แลคโตส รวมกับต้นทุนอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้มีต้นทุนอาหารเลี้ยงเชื้อสูงถึง 81.55, 59.39 และ 62.20 บาทต่อกรัมคีเฟอรัน ตามลำดับ Table 8 ดังนั้นจึงเลือกน้ำมะพร้าวแก่เป็นแหล่งอาหารเลี้ยงเชื้อราคาถูกในการทดลองต่อไป

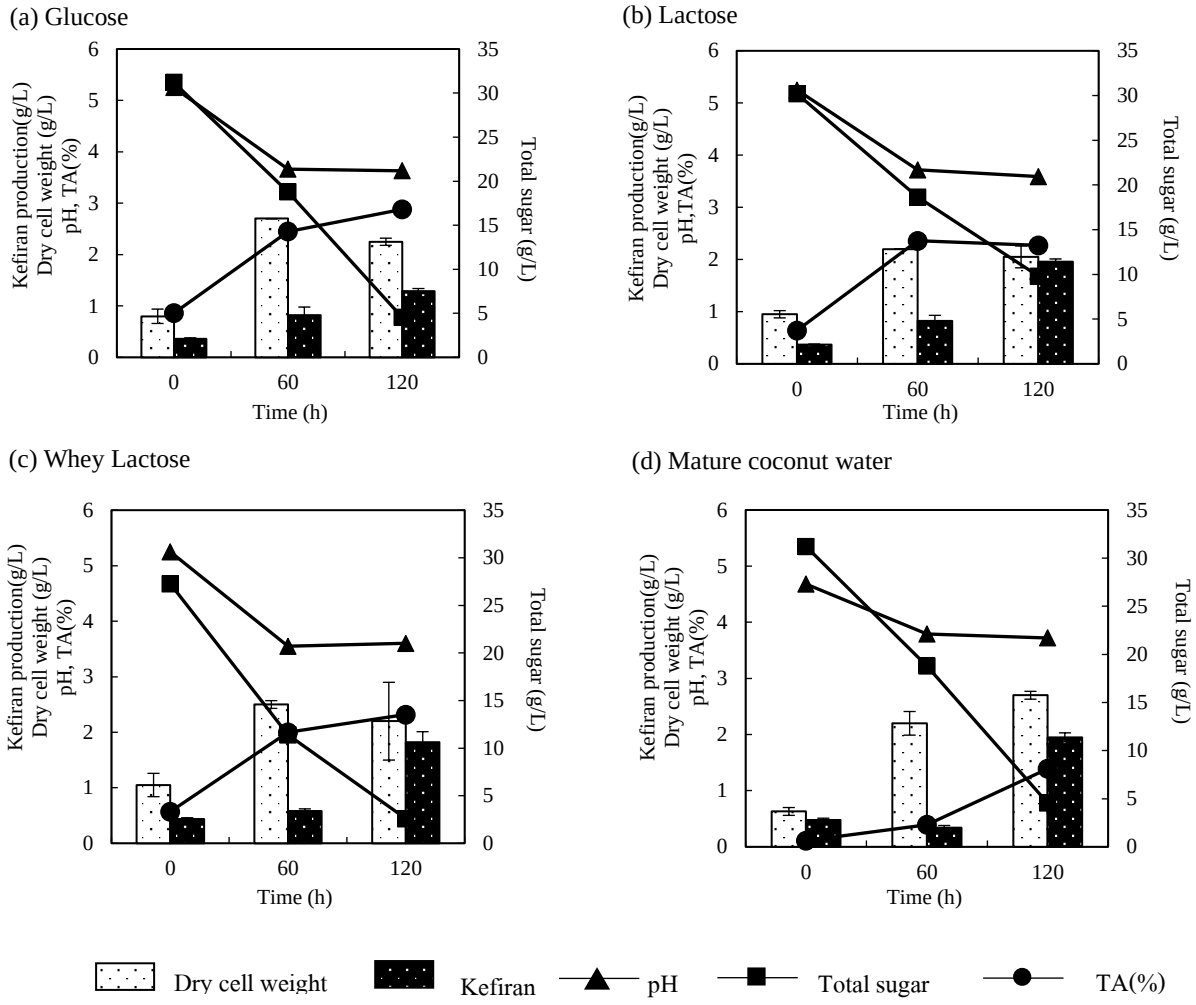


Figure 15 Effect of different carbon source on growth, kefiran production, pH, TA(%) and total sugar consumption by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 at 30 ˚C,100 rpm, 120 h and initial pH 5.5. The sugar concentration was the same at 30 g/L.

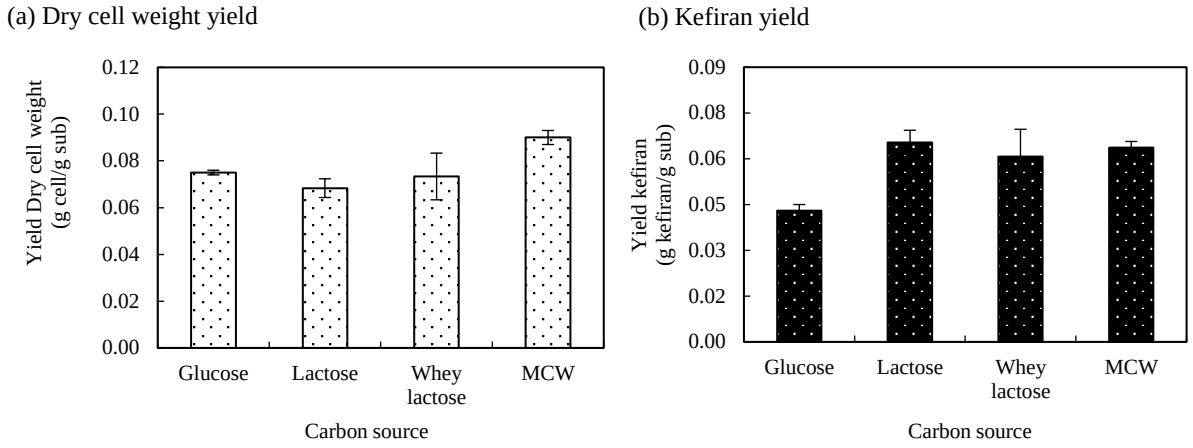


Figure 16 Effect of different carbon sources on dry cell weight yield (g/g) (a) and (b) kefiran yield (g/g) by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 at 30 ˚C, 100 rpm, 120 h and initial pH 5.5. The sugar concentration was the same at 30 g/L.

Table 8 Effect of carbon source on kefiran production and analysis of nutrient cost

Media (Sugar 30 g/L)	Kefiran (g/L), A	Cost of carbon source (Baht/L), B	Cost of modified MRS (Baht/L),C	Nutrient cost for kefiran production (Baht/g-kefiran), (B+C)/A
Modified MRS-Glucose	1.29	3.2	102	81.55
Modified MRS-Lactose	1.96	14.4	102	59.39
Modified MRS-Whey lactose	1.82	11.2	102	62.20
Mature Coconut mature	1.91	2.0	-	1.05

3. ผลของการเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลและการควบคุมพีเอชในน้ำมะพร้าวแก่

3.1 ผลของการเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลภายใต้สภาวะที่ไม่ควบคุมพีเอช

ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนถือเป็นปัจจัยที่สำคัญปัจจัยหนึ่งในการเจริญเติบโตและการผลิตคีเฟอรัน จากการศึกษาการทำให้น้ำมะพร้าวแก่เข้มข้นโดยการให้ความร้อน พบว่าเชื้อมีการเจริญและให้น้ำหนักเซลล์แห้งน้อยลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากความร้อนทำให้สารอาหาร เช่น วิตามิน และเกลือแร่ ในน้ำมะพร้าวแก่เสียสภาพ ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลโดยการเติมน้ำตาลกลูโคส และศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 3, 5 และ 7 ปรับพีเอชเริ่มต้นให้เท่ากับ 5.5 แล้วกรองฆ่าเชื้อก่อนนำมาลงหัวเชื้อร้อยละ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะการกวนด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 120 ชั่วโมง Figure 17 แสดงการเจริญของเชื้อ การผลิตคีเฟอรัน ค่าพีเอช การผลิตกรดทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลที่เหลือ พบว่าเชื้อมีการเจริญใกล้เคียงกัน และให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งในช่วง 2.3-2.7 กรัมต่อลิตร ส่วนการผลิตคีเฟอรันพบว่าที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 3-5 เชื้อมีการผลิตคีเฟอรันใกล้เคียงกันเท่ากับ 1.91-1.99 กรัมต่อลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 7 ให้การผลิตคีเฟอรันน้อยกว่าที่ 1.45± 0.12 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นได้ว่าการใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่สูงเกินไปมีผลยับยั้งการเจริญและการผลิตคีเฟอรัน และพบว่าค่าพีเอชลดลงต่ำกว่า 4 อย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 24-48 ซึ่งเกิดจากการที่เชื้อผลิตกรดแลคติก จากการไตเตรทกรดทั้งหมดพบว่าที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 5 ให้ปริมาณกรดทั้งหมดร้อยละ 2.10±0.21 ในขณะที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 3 และ7 ให้ปริมาณกรดทั้งหมดร้อยละ 1.38±0.04 และ 1.35±0.00 ตามลำดับ และพบว่าการใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 3 มีน้ำตาลเหลือเมื่อสิ้นสุดการหมักเท่ากับ 1.48±0.27 กรัมต่อลิตร ส่วนการใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 5 มีน้ำตาลเหลือ 6.69±0.40 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นสูงถึงร้อยละ 7 ทำให้มีน้ำตาลเหลือมากที่สุดคือ 24.03±0.28 กรัมต่อลิตร

Figure 19 แสดงผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นต่อผลผลิตเชื้อและผลผลิตคีเฟอรันภายใต้สภาวะที่ไม่ควบคุมพีเอช พบว่าความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 3 ให้ผลผลิตเชื้อและผลผลิตคีเฟอรันสูงสุดเท่ากับ 0.0772±0.0005 กรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเตรท และ 62.5±3.4 มิลลิกรัมคีเฟอรันต่อกรัมสับสเตรท ตามลำดับ จากการคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ (Figure 20a) พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นสูงกว่าร้อยละ 3 ไม่ได้ทำให้อัตราการเจริญจำเพาะเพิ่มสูงขึ้น

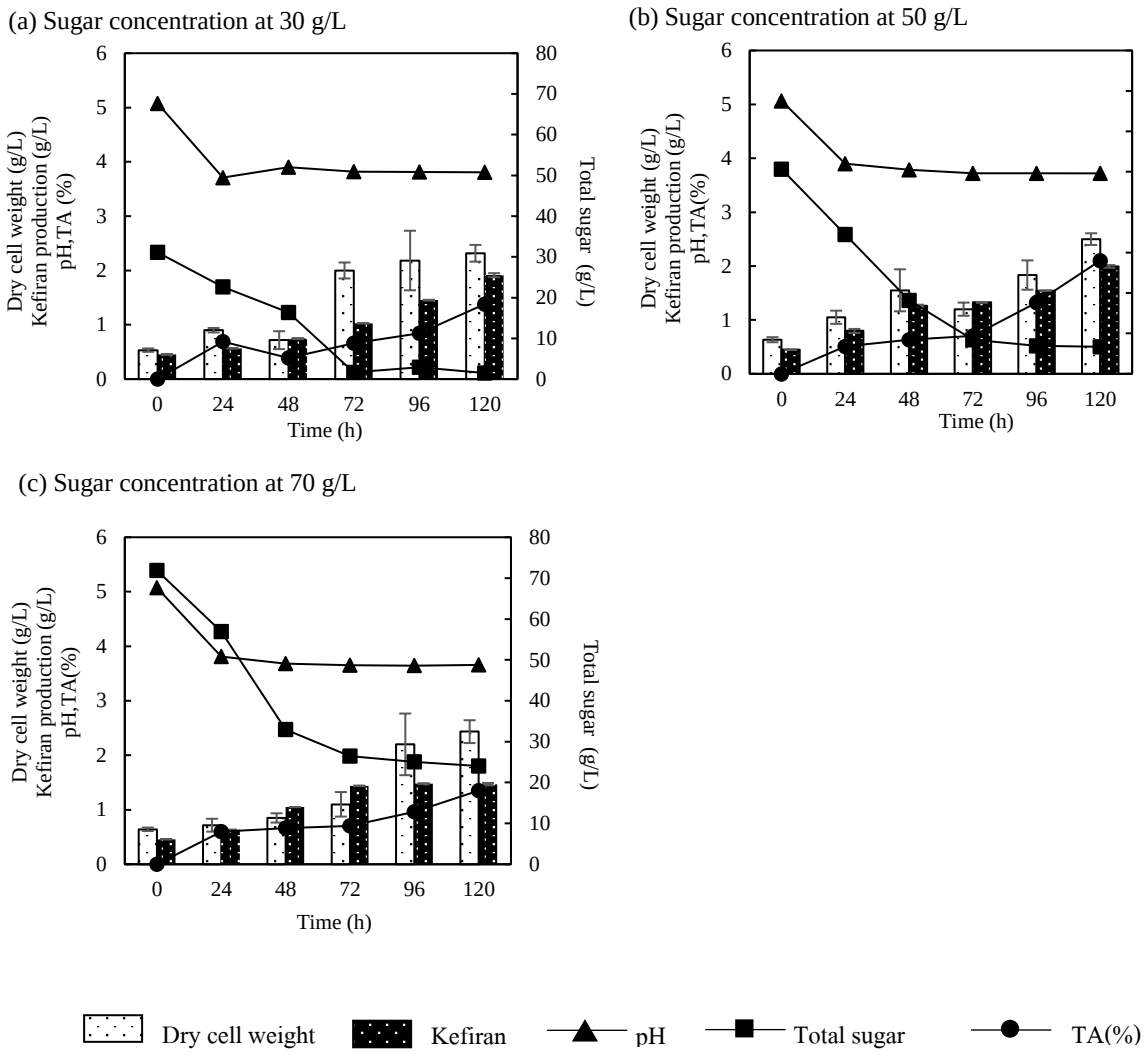


Figure 17 Effect of initial sugar concentration on growth, kefiran production, pH, total acid (TA, %) and total sugar consumption by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 under condition without pH control at initial pH 5.5, 30 ˚C and 100 rpm.

จากงานวิจัยที่ผ่านมาของ Wang และ Bi (2008) ที่ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตคีเฟอรันของเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 โดยใช้ที่ความเข้มข้นสูงถึงร้อยละ 10 แต่พบว่าเชื้อผลิตคีเฟอรันได้เท่ากับ 2.27 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลผลิตคีเฟอรันต่อสับสเตรทเพียง 22.7 มิลลิกรัมคีเฟอรันต่อกรัมสับสเตรท และจากงานวิจัยของ Dailin และคณะ (2015) ที่ศึกษาการใช้น้ำตาลซูโครสเพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 2-6 พบว่าน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 ทำให้เชื้อผลิตคีเฟอรันได้เพียง 0.83 กรัมต่อลิตร จะเห็นได้ว่าการใช้น้ำมะพร้าวแก่ และทำการเติมน้ำตาลในงานวิจัยนี้ให้ผลผลิตคีเฟอรันสูงกว่าในงานวิจัยที่ผ่านมา

3.2 ผลของการเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลภายใต้สภาวะที่ควบคุมพีเอช

โดยทั่วไปเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 มีการผลิตกรดแลคติคเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อซึ่งส่งผลทำให้ค่าพีเอชในอาหารลดลง ความเป็นกรดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตคีเฟอรัน ดังนั้นการควบคุมพีเอชระหว่างการเลี้ยงจึงมีความจำเป็นต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตคีเฟอรันโดยจะศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 3, 5 และ 7 ปรับพีเอชเริ่มต้นให้เท่ากับ 5.5 แล้วกรองฆ่าเชื้อก่อนนำมาลงหัวเชื้อร้อยละ 10 บ่มที่อุณหภูมิ 30$\pm$2 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะการกวนด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที และควบคุมพีเอชทุก 12 ชั่วโมง ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 นอร์มอล

Figure 18 แสดงผลของการควบคุมพีเอชระหว่างการหมัก พบว่าการปรับพีเอชให้คงที่ที่ 5.5 ทำให้เชื้อมีการเจริญและการผลิตคีเฟอรันสูงขึ้น โดยการใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 5 ให้น้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นเป็น 3.10$\pm$0.43 กรัมต่อลิตร และผลิตคีเฟอรันได้เท่ากับ 2.23$\pm$0.05 กรัมต่อลิตร คิดเป็นสองเท่าของการทดลองแบบไม่ควบคุมพีเอช และพบว่าเชื้อมีการใช้น้ำตาลได้เร็วและผลิตกรดได้มากขึ้นเป็นร้อยละ 5.59$\pm$0.00

Figure 19 แสดงผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นต่อผลผลิตเชื้อและผลผลิตคีเฟอรันภายใต้สภาวะที่ควบคุมพีเอช พบว่าความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 3 ให้ผลผลิตเชื้อและผลผลิตคีเฟอรันสูงสุดเท่ากับ 0.0928$\pm$0.0006 กรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเตรท และ 67.9$\pm$2.6 มิลลิกรัมคีเฟอรันต่อกรัมสับสเตรท และพบว่าสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่มีการควบพีเอช นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการเจริญจำเพาะภายใต้สภาวะที่ควบคุมพีเอช สูงกว่าสภาวะที่ไม่ควบคุมพีเอช (Figure 20b) แสดงให้เห็นว่าการควบคุมพีเอชสามารถลดการยับยั้งการเจริญและการผลิตคีเฟอรันได้

จากงานวิจัยของ Cheirsilp และคณะ (2003) ที่ศึกษาการผลิตคีเฟอรันโดยเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 โดยใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ควบคุมพีเอชของอาหารให้คงที่ตลอดการทดลองที่ 5.0 พบว่าเชื้อเจริญและให้น้ำหนักเซลล์

แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.5 กรัมต่อลิตร และให้การผลิตคีเฟอรันเท่ากับ 2.50 กรัมต่อลิตร ต่อมาสุวรรณี สุขแสวง (2559) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 และใช้น้ำตาลแลคโตสที่ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร และควบคุมพีเอชที่ 5.5 พบว่าการควบคุมพีเอชทำให้เชื้อมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดท่ากับ 3.16 กรัมต่อลิตร และผลิตคีเฟอรันได้เท่ากับ 1.69 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ควบคุมพีเอชที่ให้การผลิตคีเฟอรันเพียง 0.64 กรัมต่อลิตร

จะเห็นได้ว่าการใช้น้ำมะพร้าวแก่ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 3 และควบคุมพีเอชระหว่างการทดลอง ทำให้เชื้อมีการเจริญให้ผลผลิตน้ำหนักเซลล์แห้งและผลผลิตคีเฟอรันสูงสุด

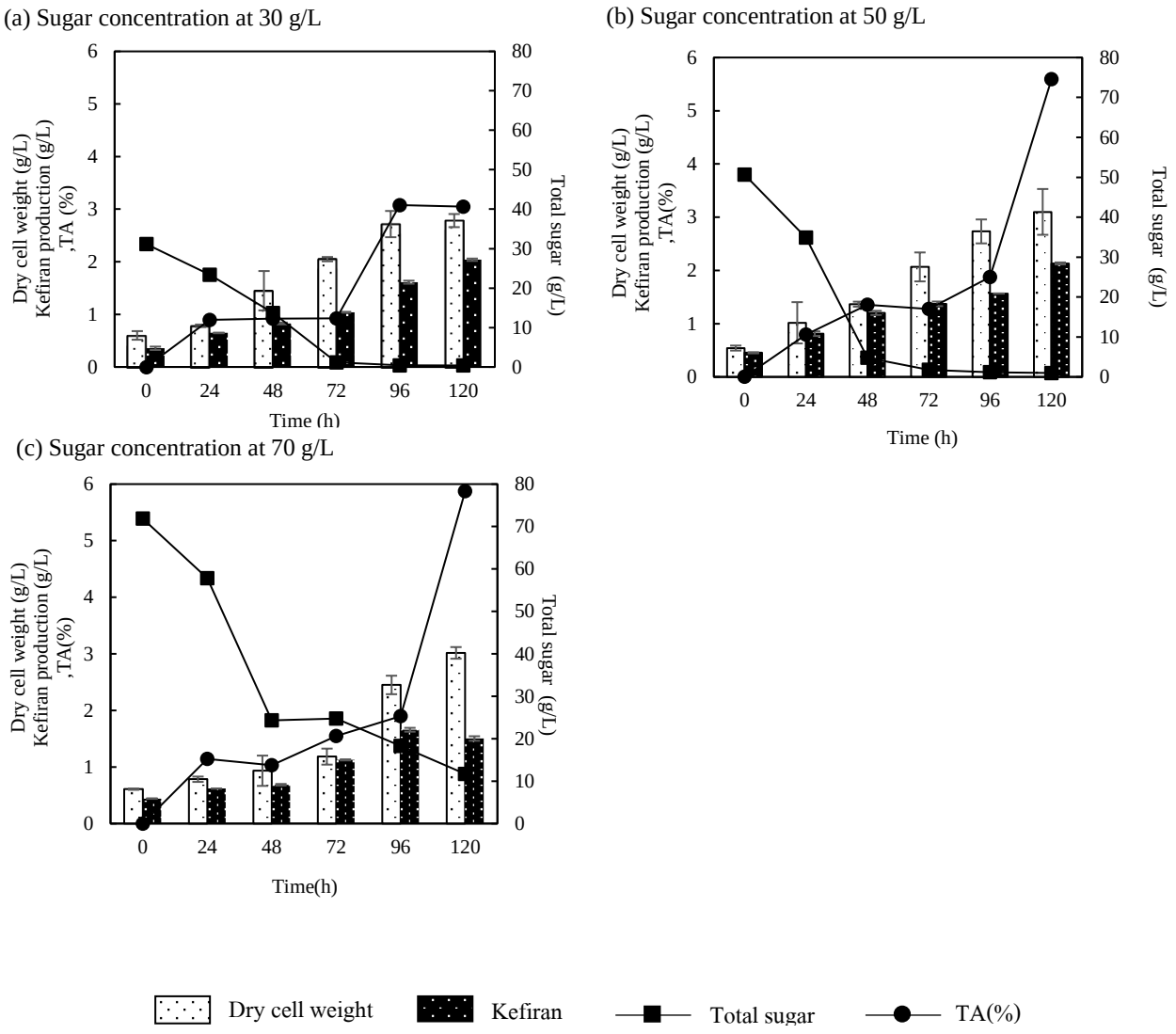


Figure 18 Effect of initial sugar concentration on growth, kefiran production, total acid (TA, %) and total sugar consumption by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 under condition with pH control at 5.5, 30 ˚C and 100 rpm.

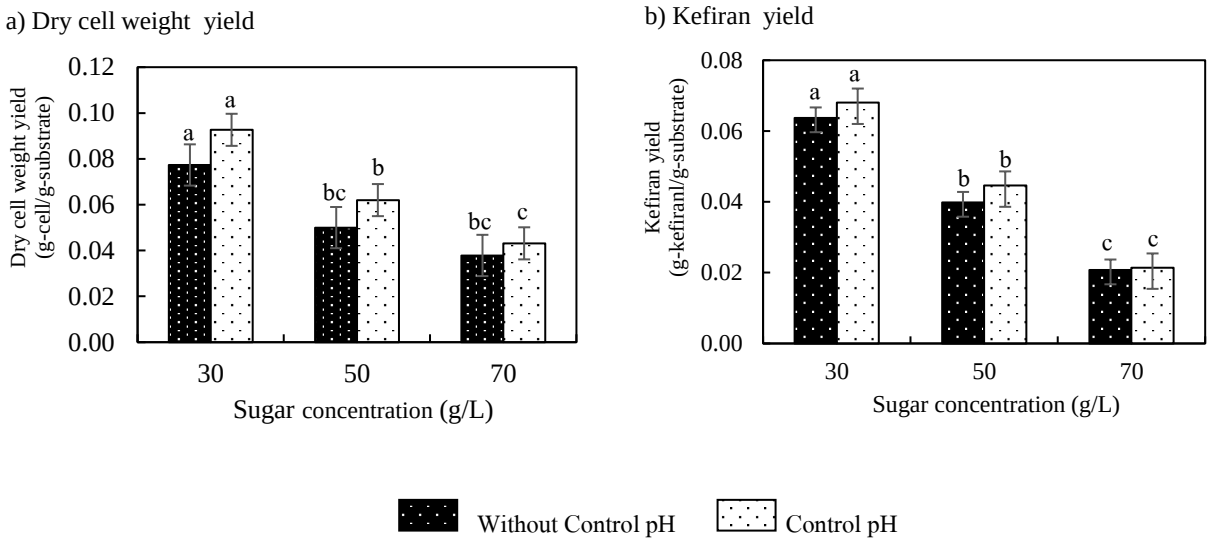


Figure 19 Comparative effect of initial sugar on dry cell weight yield (g/g) (a) and (b) kefiran yield (g/g) by *L. kefiranofaciens* JCM *6985.* Data were taken after cultivations at initial pH 5.5, 30 ˚C and 100 rpm for 120 h. Difference letters on the bar indicate significant differences between treatments.

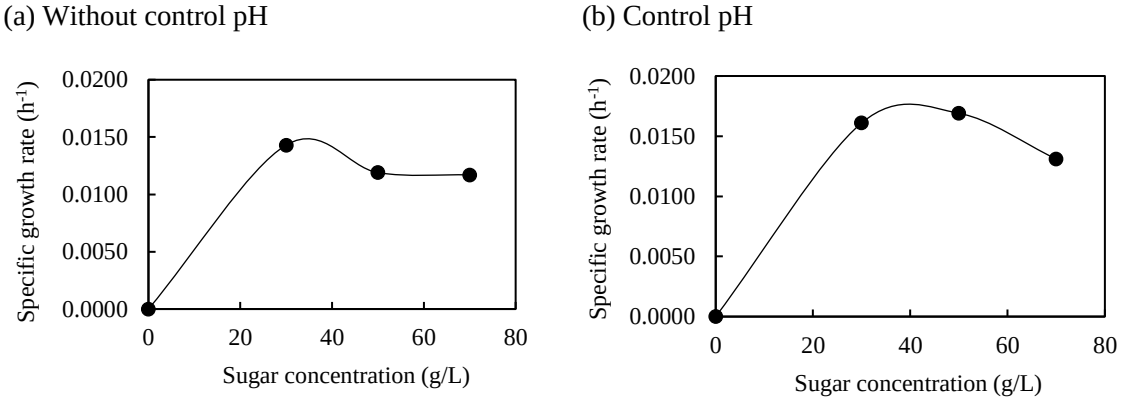


Figure 20 Effect of initial sugar concentration on specific growth rate (μ). (a) Condition on without control pH, (b) condition on pH control at 30 ˚C, 100 rpm, 120 h and initial pH 5.5.

4. ผลของแหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์ใช้แหล่งไนโตรเจนในการสังเคราะห์เอนไซม์ที่มีความจำเป็นต่อการเจริญและการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ซึ่งในการทดลองก่อนหน้านี้พบว่าน้ำมะพร้าวแก่สามารถใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อโดยไม่จำเป็นต้องเติมแหล่งไนโตรเจน แต่อย่างไรก็ตามปริมาณไนโตรเจนในน้ำมะพร้าวมีปริมาณเพียง 0.11 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งน้อยกว่าปริมาณที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป (5-7 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร) ดังนั้นการเพิ่มแหล่งไนโตรเจนคาดว่าน่าจะทำให้เชื้อมีการเจริญและผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้น โดยแหล่งไนโตรเจนที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไป ได้แก่ ทริปโตน ยีสต์สกัด เนื้อสกัด และไตรแอมโมเนียมซิเตรต ซึ่งถือว่าเป็นแหล่งไนโตรเจนที่มีราคาค่อนข้างสูง งานวิจัยนี้จึงสนใจการใช้แหล่งไนโตรเจนราคาถูก คือ เซลล์ยีสต์ใช้แล้วและกากถั่วเหลืองแทนที่แหล่งไนโตรเจนทางการค้า แต่พบว่าการย่อยเซลล์ยีสต์ใช้แล้วและกากถั่วเหลืองด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 3 นอร์มอล ก่อนนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้เกิดปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลหรือปฏิกิริยาเมลลาร์ดเกิดขึ้นระหว่างน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) กับกรดแอมิโน โปรตีน หรือสารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ โดยมีความร้อนเร่งปฏิกิริยา นอกจากนี้กรดและความร้อนยังอาจทำให้เกิดการสลายตัวของน้ำตาลเปลี่ยนไปเป็นอนุพันธุ์ของน้ำตาลที่เชื้อไม่สามารถนำไปใช้ได้ และยังมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออีกด้วย (Wei *et al.,* 2018) งานวิจัยนี้จึงศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่ไม่ต้องทำการย่อย คือผงชูรสหรือโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่มีราคาถูก โดยเปรียบเทียบกับการใช้ยีสต์สกัดที่เติมลงในน้ำมะพร้าวแก่ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 3 และใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตและยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นไนโตรเจนเท่ากับ 0.5, 1, 3, 5 และ7 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30$\pm$2 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะการกวนด้วยความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที และควบคุมพีเอชทุก 12 ชั่วโมง ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 นอร์มอล ผลการทดลองการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างๆ แสดงดัง Figure 21 พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของยีสต์สกัดจาก 0.5 เป็น 5 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ทำให้เชื้อมีการเจริญเพิ่มสูงขึ้น โดยที่ความเข้มข้น 5 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร เชื้อให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 6.03$\pm$0.57 กรัมต่อลิตร และให้การผลิตกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน และพบว่าความเข้มข้นไนโตรเจน 7 กรัมต่อลิตร ให้การผลิตกรดทั้งหมดสูงสุดเท่ากับร้อยละ 9.34 แต่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งลดลงเป็น 5.40$\pm$0.04 กรัมต่อลิตร สำหรับการผลิตคีเฟอรันพบว่าเชื้อให้การผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นไนโตรเจนจาก 0.5 เป็น 5 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณคีเฟอรันใกล้เคียงกันในช่วง 3.26-3.64 กรัมต่อลิตร ซึ่งการเติมไนโตรเจนความเข้มข้นสูงขึ้น ทำให้เชื้อมีความสามารถใช้น้ำตาลเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน ทั้งนี้เนื่องจากยีตส์สกัดมีสารอาหารจำพวกวิตามินบี 12 กรดอะมิโนหลายชนิด เช่น กลูตามิก แอสปาติก

อะลานีน เป็นต้น และน้ำตาลกาแลคโตส ซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อและการผลิตคีเฟอรัน สอดคล้องกับรายงานของ Taniguchi และคณะ (2001) ที่พบว่าเพิ่มยีสต์สกัด 5 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ในอาหารดัดแปลง MRS ทำให้เชื้อ *L. kefiranofaciens* มีการผลิตคีเฟอรันสูงขึ้นเท่ากับ 0.65 กรัมต่อลิตร

สำหรับการใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตซึ่งเป็นเกลือของกรดกลูตามิก กลูตาเมตและกลูตามีนมีบทบาทสำคัญในการเผาผลาญของไนโตรเจนในจุลินทรีย์และสามารถเปลี่ยนเป็นสารประกอบไนโตรเจนอื่นๆได้ (Ter *et al*., 2000) ซึ่งสามารถช่วยให้เชื้อเจริญเติบโตและผลิตผลิตภัณฑ์ชีวภาพได้ ผลการทดลองใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจนแสดงดัง Figure 22 พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไนโตรเจนจาก 0.5 ถึง 5 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ทำให้เชื้อมีการเจริญสูงขึ้น แต่ที่ความเข้มข้นไนโตรเจนถึง 7 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ให้ผลการเจริญของเชื้อไม่แตกต่างกัน โดยให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งอยู่ในช่วง 4.83- 5.33 กรัมต่อลิตร สำหรับการผลิตคีเฟอรันพบว่าความเข้มข้นไนโตรเจนให้ผลการผลิตคีเฟอรันไม่แตกต่างกันในช่วง 0.68 - 2.01 กรัมต่อลิตร และพบว่าเชื้อมีการผลิตกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงร้อยละ 3.78-5.52

จาก Figure 23 และ Figure 24 ที่แสดงผลผลิตเชื้อ ผลผลิตคีเฟอรัน และอัตราการเจริญจำเพาะที่ใช้แหล่งไนโตรเจนและความเข้มข้นต่างกัน พบว่าการใช้ความเข้มข้นของยีสต์สกัด 5 กรัมไนโตรเจนต่อลิตรให้ผลผลิตเชื้อสูงสุดเท่ากับ 0.200$\pm$0.020 กรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเตรท และการใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนทำให้เชื้อมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงกว่าการใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจนเล็กน้อย สำหรับผลผลิตคีเฟอรันพบว่าความเข้มข้นไนโตรเจน 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ให้ผลผลิตคีเฟอรันสูงใกล้เคียงกับการใช้ความเข้มข้นไนโตรเจน 5-7 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Dailin และคณะ (2016) ที่ศึกษาผลของความเข้มข้นแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตคีเฟอรันของเชื้อ *Lactobacillus kefiranofaciens* พบว่าความเข้มข้นไนโตรเจนช่วง 5 - 6 กรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตคีเฟอรัน สำหรับการใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมต พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นไนโตรเจนทำให้ผลผลิตเชื้อเพิ่มขึ้น แต่การใช้ความเข้มข้นในช่วง 3-7 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ไม่มีผลต่อผลผลิตคีเฟอรัน

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่ายีสต์สกัดให้ผลผลิตคีเฟอรันสูงกว่าโมโนโซเดียมกลูตาเมต ซึ่งอาจเนื่องมาจากยีสต์สกัดมีสารอาหารจำพวกวิตามินบี 12 และสารอาหารแร่ธาตุต่างๆ กรดอะมิโนหลากหลายชนิดที่มากกว่าจึงช่วยส่งเสริมการผลิตคีเฟอรัน ซึ่งต่างจากโมโนโซเดียมกลูตาเมตที่มีเพียงกรดอะมิโน คือ กรดกลูตามิก และการเติมไนโตรเจนความเข้มข้นสูง ทำให้เชื้อมีความสามารถใช้น้ำตาลเพิ่มมากขึ้นเช่นกัน จากรายงานของ Auer และคณะ (1990) ที่ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันเพื่อการผลิตพอลิแซคคาไรด์โดยเชื้อ *Aureobasidium pullulans* ใน

อาหารเลี้ยงเชื้อแบบกะ พบว่าการใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจน 0.5 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ทำให้ได้ชีวมวลถึง 9.88 กรัมต่อลิตร และสามารถผลิตพลูแลนได้ถึง 3.94 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Chen และคณะ (2010) ที่ศึกษาการผลิต squalene โดย *Aurantiochytrium* sp. และใช้โมโนโซเดียมกลูตาเมตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 13.53 กรัมต่อลิตร และพบว่าเชื้อเจริญและให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 8.09 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิต squalene เท่ากับ 2.59 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากผลการทดลองข้างต้นทำให้สามารถสรุปได้ว่าการเติมยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคีเฟอรันและจากการวิเคราะห์ต้นทุนวัตถุดิบแสดงดัง Table 9 พบว่าต้นทุนอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตคีเฟอรันโดยใช้น้ำมะพร้าวแก่และเติมยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนมีค่าเท่ากับ 13.72 บาทต่อกรัมคีเฟอรัน ซึ่งถูกกว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้ามากถึง 6 เท่า และผลผลิตคีเฟอรันในงานวิจัยนี้มีปริมาณใกล้เคียงกับงานวิจัยก่อนหน้า ดังแสดงใน Table 10

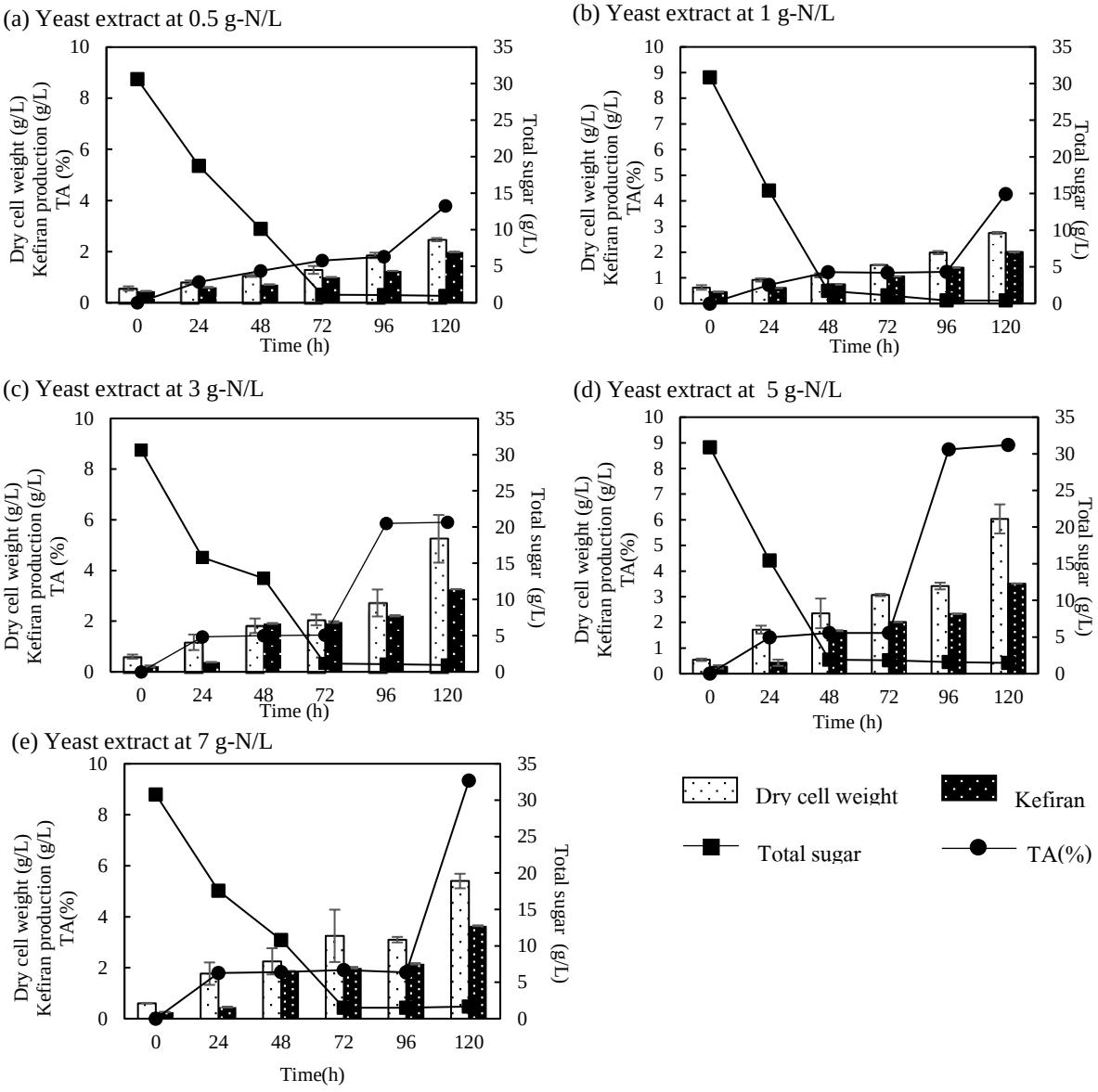


Figure 21 Effect of nitrogen concentrations of yeast extract on cell growth, kefiran production, total acid (TA, %) and total sugar consumption by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 under condition with pH control at 30 ˚C,100 rpm, 120 h and initial pH 5.5

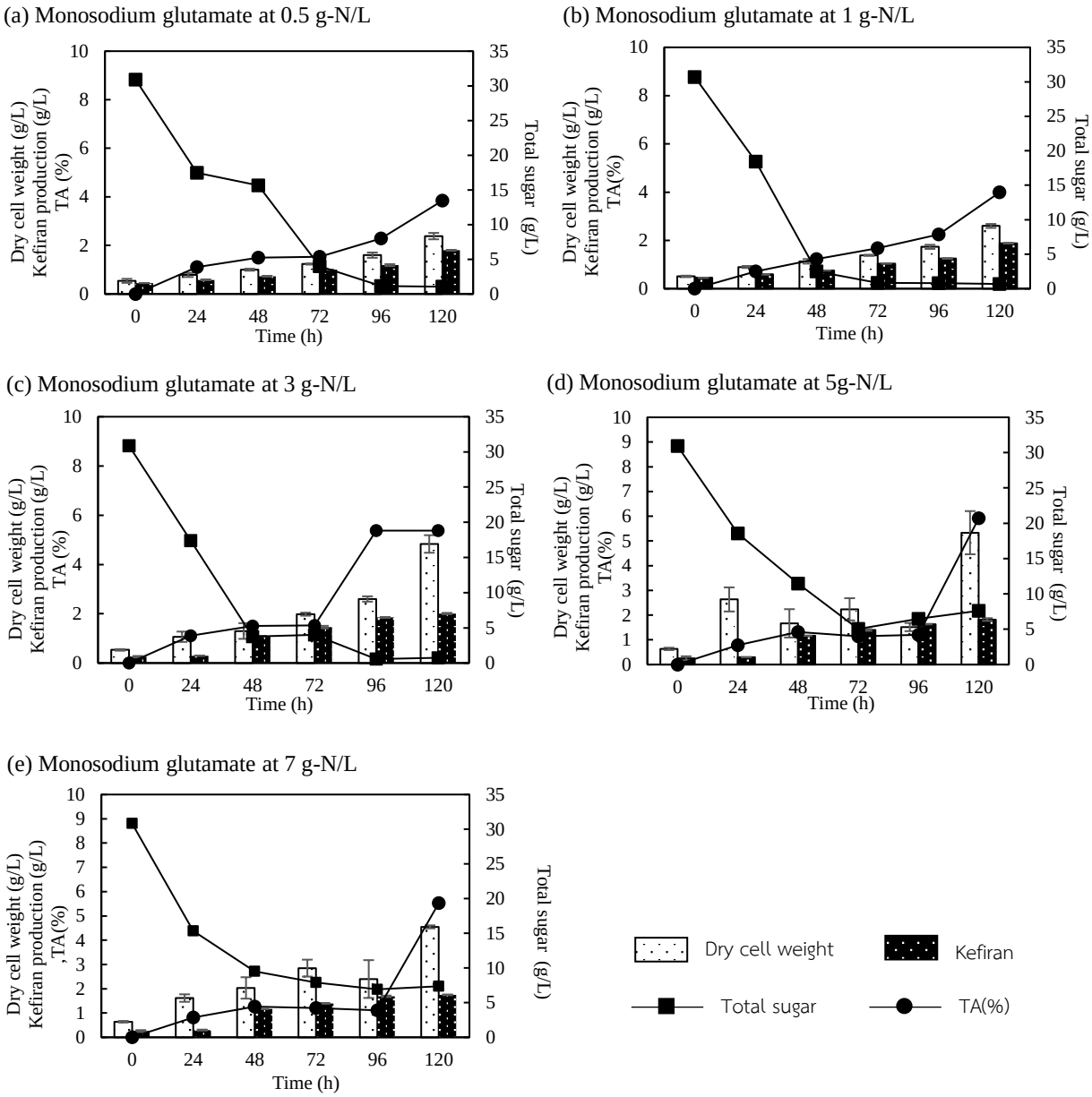


Figure 22 Effect of different nitrogen concentrations of Monosodium glutamate on cell growth, kefiran production, total acid (TA, %) and total sugar consumption by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 under condition with pH control at 30 °C,100 rpm, 120 h and initial pH 5.5.

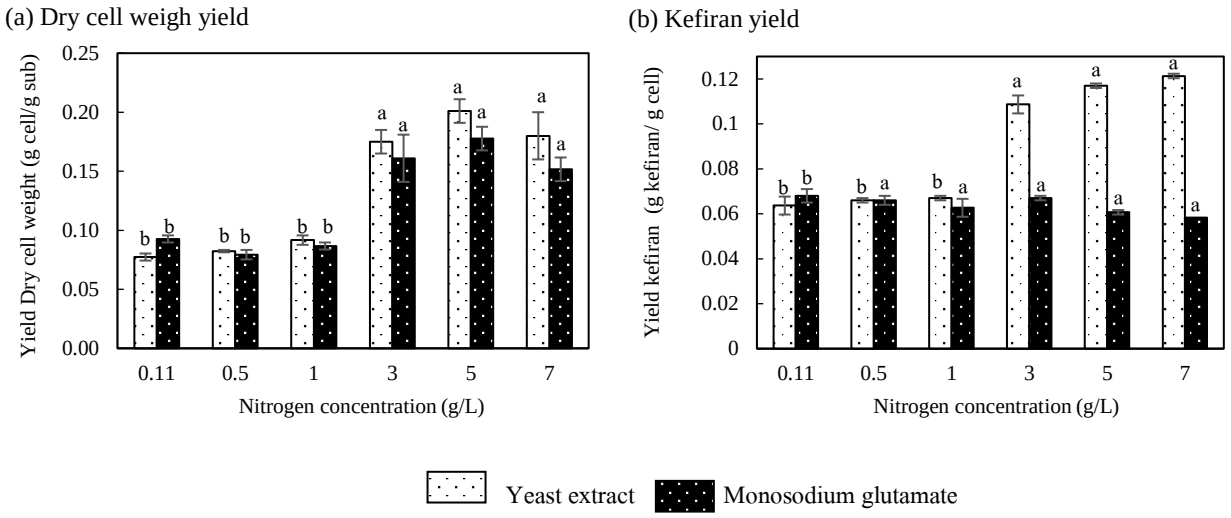


Figure 23 Comparative effect of different nitrogen sources and nitrogen concentrations on dry cell weight yield (g/g) (a) and (b) kefiran yield (g/g) by *L. kefiranofaciens* JCM *6985*. Data were taken after cultivation at 30 ˚C, 100 rpm, 120 h and initial pH 5.5. Difference letters on the bar indicate significant differences between treatments.

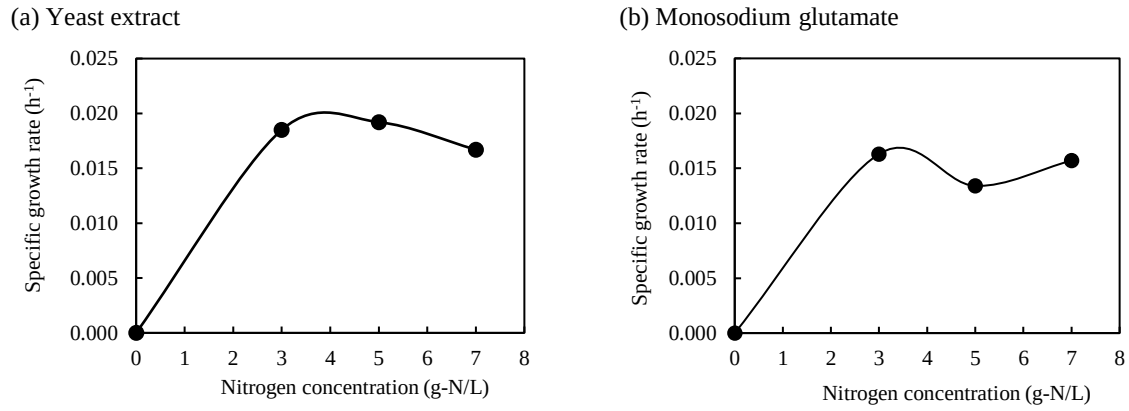


Figure 24 Effect of initial nitrogen concentration on specific growth rate (μ) under conditions with pH control at 5.5, 30˚C and 100 rpm for 120 h. (a) Yeast extract and (b) Monosodium glutamate.

Table 9 Effect of Nitrogen source on kefiran production and analysis of nutrient cost

Media (Sugar: 30 g/L)	Kefiran (g/L),A	Cost of carbon source (Baht/L),B	Cost of N (Baht/L),C	Nutrient cost (Baht/g-kefiran), (B+C)/A
MRS-Glucose	1.29	3.2	102.00	81.55
Mature coconut water (0.11g-N/L)	1.91	2.0	-	1.05
- Monosodium glutamate 3 g-N/L	2.00	2.0	8.26	5.13
- Monosodium glutamate 5 g-N/L	1.81	2.0	13.76	7.64
- Monosodium glutamate 7 g-N/L	1.75	2.0	19.27	11.01
- Yeast extract 3 g-N/L	3.26	2.0	41.28	13.27
- Yeast extract 5 g-N/L	3.51	2.0	68.80	20.17
- Yeast extract 7 g-N/L	3.64	2.0	96.33	27.01

Table 10 Kefiran production in other studies

Strain	Substrate	Kefiran (g/L)	Reference
L. kefiranofaciens JCM 6985	Mature coconut water (3%) + Yeast extract (0.3%)	3.26	This study
Kefir grains	Whey milk+ glucose (15%)	0.2	Blandon *et al*., 2018
L. kefiranofaciens JCM 6985	Modified -MRS add molasses	1.29	Suksawang, 2016
L. kefiranofaciens JCM 6985	Modified -MRS add lactose(5%)+ Yeast extract 1.2%	1.25	Dailin *et al*., 2015
L. kefiranofaciens JCM 6985 +*S.cerevisiae* IFO 0216	Whey lactose (4%) +Yeas extract (1.3%)	2.27	Cheirsilp *et al*., 2012
L. kefiranofaciens JCM 6985+ *S.cerevisiae* IFO 0216	Modified -MRS add lactose (15%)	4.5	Tada *et al*., 2012
L. kefiranofaciens JCM 6985	Modified -MRS add maltose (10%)	2.27	Wang *et al*., 2008

5. การวิเคราะห์โครงสร้างของคีเฟอรัน

5.1 การวิเคราะห์นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโตรสโคปี (^{1}H-NMR spectrum)

^{1}H-NMR spectroscopy เป็นเครื่องมือพื้นฐานเพื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของพอลิแซ็คคาไรด์ มีการใช้เทคนิค ^{1}H-NMR spectroscopy ร่วมกับเทคนิคอื่นๆ เนื่องจากมีข้อดีที่น่าสนใจ เช่น ทำการเตรียมตัวอย่างได้ง่าย ทำการสอบเทียบอุปกรณ์ได้ง่าย และได้ผลอย่างรวดเร็ว (Radhouani *et al.,* 2018) ผลการวิเคราะห์แสดงดัง Figure 25 พบว่าสเปกตรัม ^{1}H-NMR มีค่าสูงสุดที่ 4.90 ppm ไฮโดรเจนเบต้า anomeric แสดงสัญญาณ 6 ตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี คือ 4.90, 4.89, 4.73, 4.60, 4.58 และ 4.48 ppm ซึ่ง ณ ตำแหน่ง 4.60 แสดงถึง D-Galp สอดคล้องกับกับสัดส่วนของการต่อซ้ำของหน่วย 2,3,4-tri-O-methyl D-galactose และตำแหน่ง 4.90, 4.89, 4.73, 4.60, 4.58 และ 4.48 ppm แสดงถึง pyranose ring เป็นวงแหวนของน้ำตาลที่ต่อกันซ้ำๆ สำหรับไฮโดรเจนแอลฟา anomeric หลายชนิดที่กำหนดให้น้ำตาลเมื่อมีการแยกสาขา ด้วยผลลัพธ์ที่ได้จากเทคนิคนี้มีความเป็นไปได้ที่จะระบุว่าโครงสร้างโมเลกุลของคีเฟอรันในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับโครงสร้างโมเลกุลของคีเฟอรันที่ผลิตโดย *L. kefiranofaciens* ของงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Maeda *et al.,* 2004) อย่างไรก็ตามเพื่อที่จะระบุองค์ประกอบพื้นฐานของคีเฟอรันให้ละเอียดขึ้น ควรที่จะใช้เทคนิค FTIR ร่วมด้วย (Radhouani *et al.,*2018)

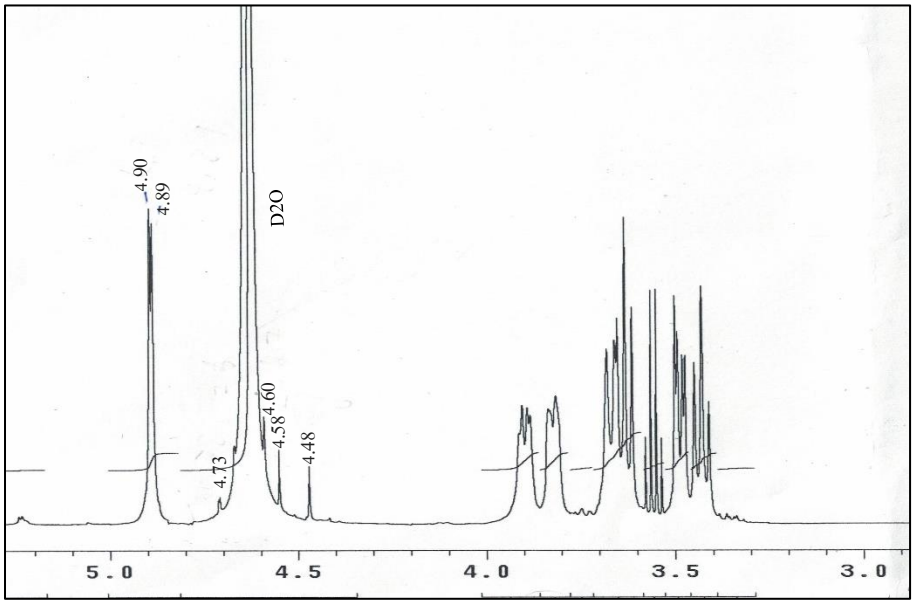


Figure 25 ^{1}H-NMR spectrum of kefiran in D_2O at 60°C

5.2 การวิเคราะห์หมู่ฟังก์ชั่นของคีเฟอรันโดยเทคนิค FourierTransform–Infrared (FTIR) Spectroscopy

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างคีเฟอรัน 2 ตัวอย่าง คือ คีเฟอรันที่ได้จากก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรนในนมถั่วเหลืองเปรียบเทียบกับคีเฟอรันที่ผลิตโดยเชื้อเดียว *L. kefiranofacien* JCM 6985 เมื่อเลี้ยงในน้ำมะพร้าวแก่ที่เติมยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจน โดยใช้เทคนิค FTIR (Figure 26 และ 27) พบว่าอินฟราเรดสเปกตรัมที่ได้จากตัวอย่างคีเฟอรันทั้งสองมีลักษณะคล้ายกันกับอินฟราเรดสเปกตรัมของคีเฟอรันที่รายงานโดย Zhina และคณะ (2015) โดยที่เลขคลื่น 3423, 3285 cm^{-1} เป็นตัวบ่งชี้ถึงกลุ่มไฮดรอกซิล O-H stretching ซึ่งเป็นพันธะที่เกี่ยวข้องกับพอลิแซคคาไรด์ที่ (Wang *et al*., 2008) เลขคลื่นที่ 2926, 2924 cm^{-1} แสดงถึง C-H stretching และมี O-H stretching ที่เกิดจากพันธะของน้ำ เลขคลื่นที่ 1655, 1642 cm^{-1} และเลขคลื่นที่ 1346, 1345 แสดงถึง C-H stretching (Ghasemlou *et al*., 2012) สำหรับอินฟราเรดสเปกตรัมที่สำคัญอีกส่วนคือส่วนที่เป็นลายพิมพ์อินฟราเรดสเปกตรัม (Fingerprint spectral region) ซึ่งอยู่ในช่วง 1200-950 cm^{-1} เกี่ยวข้องกับ stretching ของวงแหวนคาร์โบไฮเดรต (C-O-C, C-OH และ C-H) ซึ่งจุด 1016, 1003 cm^{-1} ยืนยันได้ว่าเป็นคุณลักษณะของพอลิแซคาไรด์ และเลขคลื่นที่ 909, 916 cm^{-1} แสดงถึงการสั่นสะเทือนของโมเลกุลของกลูโคสกับกาแลคโตส และพบการเชื่อมโยงของพันธะ β-linkage ในโครงสร้างของคีเฟอรันบริสุทธิ์ (Piermaria *et al*., 2011; Esnaashari *et al*., 2014) จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบและพันธะข้างต้น สามารถสรุปได้ว่าคีเฟอรันจากก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรนและคีเฟอรันจากเชื้อเดี่ยว *L. kefiranofacien* JCM 6985 ที่หมักในน้ำมะพร้าวแก่เติมยีสต์สกัดเป็นคีเฟอรันที่มีพันธะและลักษณะทั่วไปที่คล้ายกัน และคล้ายกับโครงสร้างของคีเฟอรันบริสุทธิ์ ดังแสดงใน Figure 28

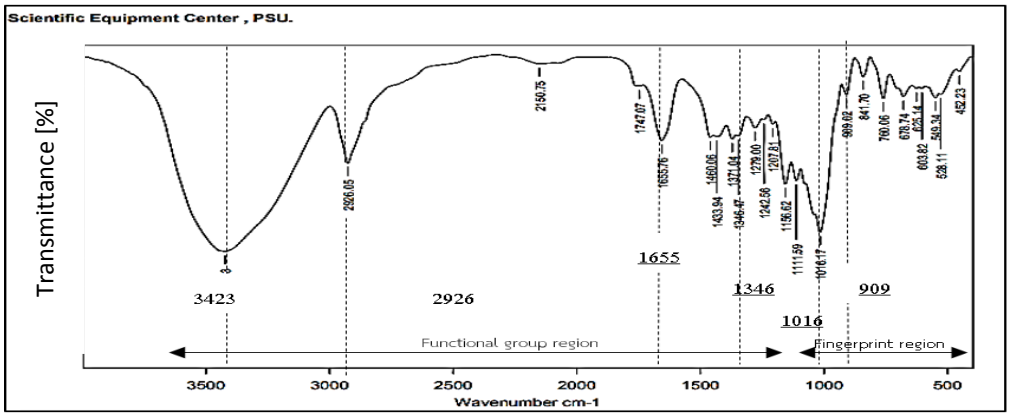


Figure 26 FTIR spectrum of the exopolysaccharide in kefir grain (This study)

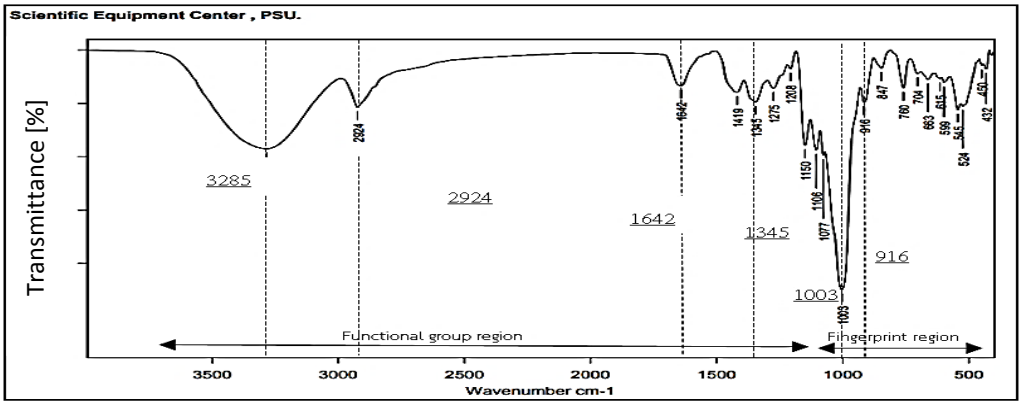


Figure 27 FTIR spectrum of the exopolysaccharide in modified mature coconut water (This study)

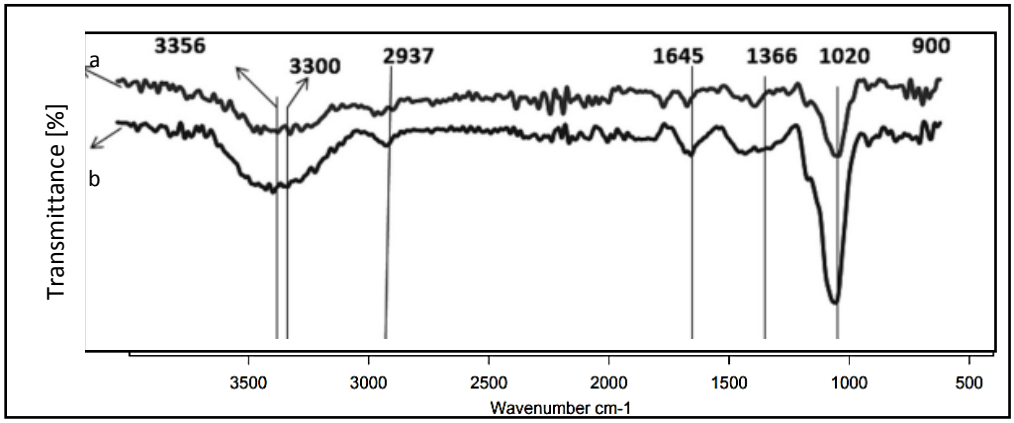


Figure 28 FTIR spectra of (a) kefiran nanofiber and (b) purified extracted kefiran

Source: Esnaashari *et al*. (2014)

5.3 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของคีเฟอรันโดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

ในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของคีเฟอรันที่ผลิตขึ้นภายใต้แหล่งอาหารที่กำหนด ต้องทำการย่อยคีเฟอรันด้วยกรดไตรฟลูออโรอะซิติก (Trifluoro acetic acid; TFA) ผลการทดลองแสดงดัง Table 11 พบว่าคีเฟอรันที่ผลิตโดยเชื้อเดี่ยว *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ที่เลี้ยงในน้ำมะพร้าวแก่เติมยีสต์สกัด มีอัตราส่วนองค์ประกอบน้ำตาลกลูโคสต่อน้ำตาลกาแลคโตสเท่ากับ 1:0.85 ซึ่งในรายงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าคีเฟอรันที่ผลิตโดยเชื้อเดี่ยว *L. kefiranofaciens* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และมีน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน มีอัตราส่วนองค์ประกอบน้ำตาลกลูโคสต่อน้ำตาลกาแลคโตสเท่ากับ 1:1 (Zajsek and Gorsek, 2010) และพบว่าการใช้น้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้เอนไซม์ β-Galactosidase เปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสไปเป็นน้ำตาลกาแลคโตส และทำให้อัตราส่วนของการเกิดน้ำตาลกาแลคโตสในโมเลกุลของคีเฟอรันสูงเพิ่มขึ้นกว่าการใช้น้ำตาลชนิดอื่นเป็นแหล่งคาร์บอน (Wang *et al*., 2008) สำหรับการผลิตคีเฟอรันโดยก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรน พบว่าอัตราส่วนองค์ประกอบน้ำตาลกลูโคสต่อน้ำตาลกาแลคโตสเท่ากับ 1:2.13 ซึ่งสัดส่วนกาแลคโตสที่สูงขึ้นแสดงให้เห็นถึงส่วนของแขนงที่มากขึ้น และมีผลทำให้พอลิเมอร์มีความเหนียวและความยืดหยุ่นเพิ่มมากขึ้น (Guo *et al.*, 2017) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าสัดส่วนกลูโคสและกาแลคโตสยังส่งผลต่อคุณสมบัติในการแสดงกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย (Zhang *et al.*, 2014)

Table 11 Monosaccharide compositions of kefiran

Substrate	Inoculum	Glucose/Galactose	References
Mature coconut water	*L. kefiranofaciens* JCM6985	1:0.85	This study
Soy milk + Sucrose	Kefir grain	1:2.13	This study
Lactose	*L. kefiranofaciens* JCM6985	1:4	Wang *et al*., 2008
Maltose + Lactose	*L. kefiranofaciens* JCM6985	1:6	Wang *et al*., 2008
Milk	Kefir grain	1:0.67	Zajsek *et al*., 2011
Milk	Kefir grain	1:1.08	Pop *et al.,*2015

6. ผลของการหมักแบบกะซ้ำ

การหมักแบบกะซ้ำเป็นกระบวนการที่ดึงน้ำหมักออกในช่วงเวลาที่น้ำหมักถูกเชื้อใช้น้ำตาลเกือบหมดและคงเชื้อส่วนหนึ่งไว้เป็นหัวเชื้อสำหรับการหมักในกะต่อไป โดยการหมักแบบกะซ้ำสามารถเพิ่มผลผลิตและมีข้อได้เปรียบหลายประการเมื่อเทียบกับการหมักแบบกะเดียว ได้แก่ ลดต้นทุนการเตรียมหัวเชื้อ เพิ่มผลผลิตผลิตภัณฑ์ได้ สามารถลดระยะเวลาในการหมักได้เนื่องจากความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่สูงส่งผลให้สามารถเพิ่มอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ และยังสามารถลดการเกิดการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ได้ Dashti และคณะ (2016) ในการทดลองนี้จะทำการขยายขนาดการทดลองจากในขวดซีรั่ม 100 มิลลิลิตร เป็นถังปฏิกรณ์ขนาด 1 ลิตร กวนด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และใช้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ บ่มที่อุณหภูมิ 30$\pm$2 องศาเซลเซียส ทำการหมักเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการดึงน้ำหมักออกร้อยละ 90 แล้วจึงเติมอาหารเลี้ยงเชื้อชุดใหม่เข้าไปที่ความเข้มข้นน้ำตาลเดิมคือร้อยละ 3 และความเข้มข้นยีสต์สกัด 3 กรัมไนโตรเจนต่อลิตร ควบคุมพีเอชทุก 12 ชั่วโมง ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 นอร์มอล ทำการหมักแบบกะซ้ำทั้งหมด 6 รอบ ผลการทดลองแสดงดัง Figure 29 พบว่าในการหมักกะแรกน้ำตาลจะถูกใช้ไปมากกว่าร้อยละ 90 เชื้อมีการเจริญและให้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.95$\pm$0.03 กรัมต่อลิตร สำหรับการหมักรอบที่ 2 เชื้อมีการเจริญและให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.03$\pm$0.11 กรัมต่อลิตร สำหรับการหมักรอบที่ 3 – 6 เชื้อมีการเจริญและให้น้ำหนักเซลล์แห้งน้อยลงเล็กน้อยในช่วง 3.2 – 3.7 กรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับอัตราการใช้น้ำตาลที่น้อยลง

สำหรับการผลิตคีเฟอรันพบว่าในรอบที่ 1 ให้การผลิตคีเฟอรันเท่ากับ 1.94$\pm$0.04 กรัมต่อลิตร และรอบที่ 2 -5 ให้การผลิตคีเฟอรันในช่วง 2.2 – 2.7 กรัมต่อลิตร เชื้อมีการผลิตคีเฟอรันลดลงเล็กน้อยในรอบที่ 6 เท่ากับ 2.02$\pm$0.03 กรัมต่อลิตร และพบว่าในรอบที่ 1 ของการหมักให้การผลิตกรดรวมเท่ากับร้อยละ 2.43 การผลิตกรดรวมเพิ่มขึ้นในรอบที่ 2 - 6 ในช่วงร้อยละ 3.3 – 3.6 ซึ่งจะเห็นได้ว่าเชื้อมีการผลิตคีเฟอรันและกรดที่สอดคล้องกับการเจริญของเชื้อ และพบการผลิต คีเฟอรันหลังจากที่เชื้อหยุดการเจริญด้วย เนื่องจากการผลิตคีเฟอรันเป็นการผลิตทั้งระหว่างการเจริญและช่วงที่เชื้อไม่มีการเจริญหรือเรียกว่า mixed growth associated production และพบว่ารอบการหมักที่ 4 ให้การผลิตคีเฟอรันสูงที่สุดเท่ากับ 2.7 กรัมต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ในรายงานวิจัยที่ผ่านมาเช่นงานวิจัยของ Macedo และคณะ (2002) ที่ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M ในอาหารที่มีเวย์โปรตีน ยีสต์สกัด และวิตามิน เกลือแร่ และกรดอะมิโน โดยเป็นสูตรดัดแปลงจากอาหาร BMM และพบว่าการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ใกล้เคียงกันเท่ากับ 2.775 กรัมต่อลิตร และงานวิจัยของ Bergmaier และคณะ (2003) ที่ศึกษาการผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จาก *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M ใน

อาหารดัดแปลงที่ใช้เวย์เป็นแหล่งคาร์บอน โดยให้ผลผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์เท่ากับ 2.75 กรัมต่อลิตร Table 12 แสดงผลผลิตคีเฟอรันแต่ละรอบและพบว่าในรอบที่ 4 ให้ผลผลิตคีเฟอรันสูงสุดเท่ากับ 0.0922±0.001 กรัมคีเฟอรันต่อกรัมสารตั้งต้น

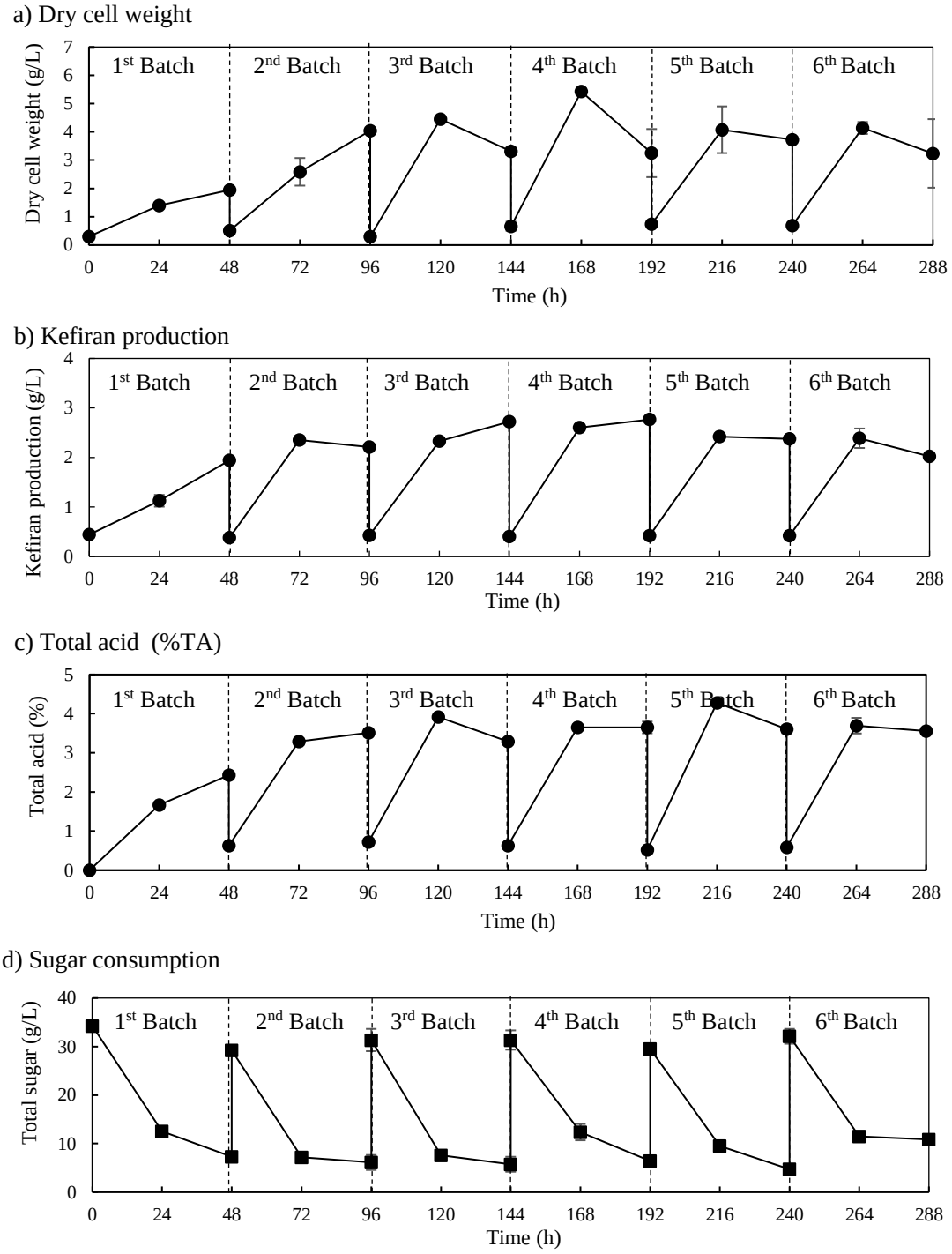


Figure 29 (a) Dry cell weight (b) kefiran production (c) total acid (TA%) (d) sugar consumption in repeated batch fermentation by *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in mature coconut water added with yeast extract under pH control at 30 ˚C,100 rpm, 120 h and initial pH 5.5.

Table 12 Results achieved during repeated batch fermentation by *L. kefiranofaciens* JCM 6985

Batch number	Dry cell weight (g/L)	Kefiran (g/L)	$Y_{P/S}$	$Y_{X/S}$	TA (%)
Batch 1st	1.95±0.03	1.94±0.04	0.0647±0.001^{e}	0.0650±0.001^{f}	3.51±0.09^{ab}
Batch 2nd	4.03±0.11	2.21±0.01	0.0737±0.001^{d}	0.1345±0.004^{a}	3.29±0.09^{d}
Batch 3rd	3.31±0.14	2.72±0.01	0.0907±0.002^{b}	0.1105±0.005^{d}	3.65±0.05^{a}
Batch 4th	3.63±0.48	2.76±0.00	0.0920±0.001^{a}	0.1208±0.016^{c}	3.60±0.14^{ab}
Batch 5th	3.73±0.10	2.38±0.01	0.0790±0.002^{c}	0.1240±0.003^{b}	3.60±0.09^{ab}
Batch 6th	2.53±0.51	2.01±0.03	0.0670±0.001^{e}	0.0845±0.017^{e}	3.55±0.05^{ab}

7. ระบบต้นแบบการผลิตคีเฟอรันจากน้ำมะพร้าวแก่ต้นทุนต่ำ

ในงานวิจัยนี้ได้ออกแบบระบบต้นแบบการผลิตที่ผู้ประกอบการสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ และเพื่อลดต้นทุนการผลิตที่ถูกจึงได้เลือกแหล่งอาหารในการผลิตคีเฟอรันเป็นน้ำมะพร้าวแก่ที่ไม่เติมน้ำตาลและแหล่งไนโตรเจนเพิ่ม รวมทั้งทำการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอไรเซชั่นและไม่ควบคุมพีเอช ผลการทดลองแสดงดัง Figure 30 พบว่าในชั่วโมงที่ 12 ถึง 48 เชื้อมีการใช้น้ำตาลสูง และเชื้อมีการเจริญเติบโตขึ้นส่งผลให้มีการผลิตคีเฟอรันเพิ่มขึ้นตามลำดับ และพบว่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง จากการเลี้ยง 5 วัน พบว่าเชื้อผลิตคีเฟอรันที่ได้ 1.86 กรัมต่อลิตร โดยที่น้ำตาลเหลืออยู่ 5.74 กรัมต่อลิตร

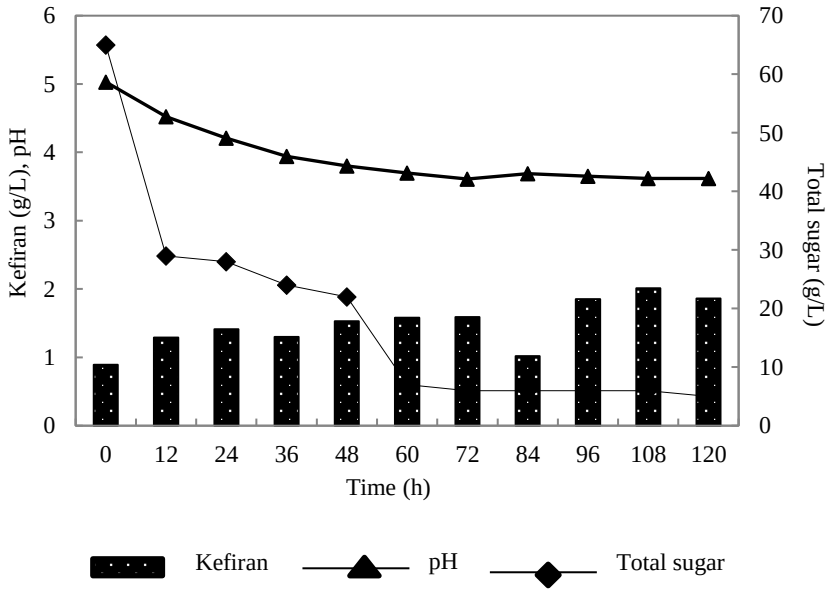


Figure 30 Cultivation of *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in 7 L fermenter at 30˚C and initial pH 5.5 for 120 h.

8. คำนวณค่าใช้จ่ายในการผลิตคีเฟอรันจากน้ำมะพร้าวแก่

จากการขยายขนาดการทดลองผลิตคีเฟอรันโดยใช้น้ำมะพร้าวแก่เป็นแหล่งอาหารเพียงอย่างเดียวในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติก และเก็บข้อมูลการใช้สารเคมี ค่าไฟฟ้า และค่าแก๊สในการผลิตและสกัด คีเฟอรัน ผลการวิเคราะห์ต้นทุนการเตรียมน้ำมะพร้าวแก่โดยวิธีการฆ่าเชื้อแบบการพลาสเจอไรซ์แสดงดัง Table 13 พบว่าสามารถผลิตคีเฟอรันจากน้ำมะพร้าวแก่ได้ โดยมีต้นทุนอยู่ที่ 8.94 บาทต่อกรัมคีเฟอรัน โดยการทดลองสามารถเปลี่ยนจากการใช้แก๊สเป็นการใช้ไฟฟ้าเพื่อให้ความร้อนในการฆ่าเชื้อทดแทน และเพิ่มอัตราการผลิตต่อหน่วยของคีเฟอรันมากขึ้นจะสามารถลดต้นทุนต่อหน่วยการผลิตได้เยอะขึ้น หรือจะทำคีเฟอรันในรูปแบบของเหลวไม่ต้องผ่านการทำแห้งสามารถลดต้นทุนการทำแห้งลงถึง 1.20 บาทต่อกรัมคีเฟอรัน

Table 13 Overall production cost of kefiran from mature coconut juice using gas for pasteurization

Items	Amount	Unit cost	Total cost	Cost (baht)/ g-kefiran
Materials				
- Mature coconut juice	20 L	2 baht/L	40 baht	1.08
Energy				
- Gas for pasteurization	1.5 kg	22 baht/kg	33 baht	0.89
Extraction				
- Ethanol lost during reuse process 10% of 20 L	2 L	70 baht/L	140 baht	6.97
- Recovery Ethanol (4.5 kW 5 h)	22.5 kW.h	2.4 baht/kW.h	54 baht	
- Centrifugation (1000L/h)	7.5 kW.h	2.4 baht/kW.h	18 baht	
- Drying (0.4 kW 48 h)	19.2 kW.h	2.4 baht/kW.h	46 baht	
Operating cost for 37 g kefiran			331 baht	-
Production cost of kefiran (Bath/g-kefiran)				8.94

*Calculated from maximum capacity of 20 L

9. การประยุกต์ใช้คีเฟอรันในผลิตภัณฑ์โลชั่นบำรุงผิว

เนื่องจากมีรายงานว่าคีเฟอรันมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความสามารถในการต่อต้านริ้วรอย (Sun *et al.,* 2015) และการใช้นมคีเฟอร์ทาใบหน้าจะช่วยกระชับรูขุมขน ทำให้ใบหน้าดูอ่อนเยาว์ เต่งตึง และยังช่วยขจัดสิว (พรผจง เลาหวิเชียร, 2009) งานวิจัยนี้จึงสนใจประยุกต์ใช้คีเฟอรันในผลิตภัณฑ์โลชั่นบำรุงผิว โดยมีชุดการทดลองที่ 1 เป็นชุดควบคุมโลชั่นบำรุงผิวผสมระหว่างวัตภาคน้ำ A และวัตภาคน้ำมัน B ชุดการทดลองที่ 2 เป็นโลชั่นบำรุงผิวที่เติมคีเฟอรันร้อยละ 1 ชุดการทดลองที่ 3 เป็นโลชั่นบำรุงผิวที่เติมคีเฟอรัน-กรดแลคติกร้อยละ 1 และชุดการทดลองที่ 4 เป็นโลชั่นบำรุงผิวที่เติมกรดแลคติกร้อยละ 1 จากนั้นทำการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพ ทางทางเคมี ทางจุลชีววิทยา ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และทางด้านประสาทสัมผัส ผลการประเมินแสดงดัง Table 14 พบว่าโลชั่นทุกชุดการทดลองให้ลักษณะผิวเรียบเนียนสีขาวใกล้เคียงกัน แต่ลักษณะการไหลของโลชั่นที่มีการผสมคีเฟอรันมีลักษณะการไหลได้น้อยที่สุดสอดคล้องกับค่าความหนืดที่สูงกว่าชุดการทดลองอื่น โดยมีค่าความหนืดที่สูงที่สุดเท่ากับ 3020 เซนติพอยส์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากคีเฟอรันเป็นพอลิแซคคาไรด์ที่มีความสามารถในการเพิ่มความหนืดของโลชั่น สำหรับโลชั่นที่ผสมทั้งคีเฟอรันและกรดแลคติกให้ความหนืดรองลงมาเท่ากับ 2085 เซนติพอยส์ เนื่องจากกรดแลคติกทำให้สายเอ็กโซพอลิแซคคาไรด์ของคีเฟอรันสั้นลง ส่งผลทำให้ความหนืดลดลง ซึ่งสูงกว่าค่าความหนืดของชุดควบคุมเล็กน้อย ที่มีค่าความหนืดเท่ากับ 2010 เซนติพอยส์ ความหนืดของโลชั่นเกิดจากการเติมกรดไขมันอิ่มตัวที่ใช้เป็นสารเพิ่มความหนืด สำหรับชุดการทดลองที่เติมกรดแลคติกให้ค่าความหนืดน้อยที่สุดเท่ากับ 1230.6 เซนติพอยส์ ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเติมกรดแลคติกทำให้ค่าพีเอชของโลชั่นต่ำลงและทำให้ความหนืดของโลชั่นลดลง สำหรับการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาทั้งหมด ใช้วิธีดรอปเพลท บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน ไม่พบจุลินทรีย์ทั้ง 4 ตัวอย่าง ใช้วิธีอ้างอิงจากเสาวนีย์ กระสานติสุข และหทัยชนก รุณรงค์ (2549)

Table 14 Chemical and physical characteristics of the lotion

Characteristics	General lotion	Lotion-kefiran	Lotion-kefiran-lactic	Lotion-lactic
Appearance	Smooth	Smooth	Smooth	Smooth
Color	White	White	White	White
Flow	+++[a]	++	++++	+++++
Viscosity	2010 cp	3020 cp	2085 cp	1230.6 cp
pH	4.3	3.59	3.51	3.50
Microorganism	-[b]	-	-	-

[a] level of flow [b] Growth of microorganisms (+ found growth, - not found growth)

DPPH คืออนุมูลอิสระที่มีความเสถียร (stable free radical) เป็นสารที่นิยมใช้เป็นตัวชี้วัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารที่สนใจ ใช้หลักการของ DPPH• ในรูปของอนุมูลอิสระที่อยู่ในสารละลายจะมีสีม่วงเข้ม และดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร การสูญเสียอิเล็กตรอนอิสระให้กับโมเลกุลอื่นหรือสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH• จะเกิดการเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปออกซิไดซ์ และทำให้สีม่วงจางลง เมื่อวัดการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงก็จะสามารถคำนวณการลดลงของ DPPH• ที่เป็นผลมาจากปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระได้ จากการทดลองพบว่าโลชั่นชุดที่มีการเติมคีเฟอรันร้อยละ 1 ให้กิจกรรมการยับยั้งครึ่งหนึ่งของอนุมูลอิสระที่ร้อยละ 41.89±1.00 รองลงมาคือโลชั่นชุดที่มีการเติมคีเฟอรันและกรดแลคติกร้อยละ1 ให้ผลร้อยละ 35.38±1.45 ตามด้วยโลชั่นชุดที่เติมกรดแลคติกร้อยละ 1 ให้ผลเท่ากับร้อยละ 22.81±0.55 และน้อยที่สุดคือโลชั่นสูตรทั่วไปที่ไม่ได้เติมคีเฟอรันและกรดแลคติก ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen และคณะ (2015) ที่ศึกษากิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ที่ผลิตจากก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรนและพบว่าเอ็กโซโพลีแซ็คคาไรด์ที่ความเข้มข้น 1.73 กรัมต่อลิตร ให้ค่ากิจกรรมสารต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 52.23 (Table 15)

Table 15 Effect of antioxidant in all development formulas

Example	% Radical scavenging
General lotion	6.59±0.19[d]
Lotion-kefiran	41.89±1.00[a]
Lotion-kefiran-lactic acid	35.38±1.45[b]
Lotion-lactic acid	22.81±0.55[c]

Different superscript letters in the same column indicate significant difference between treatments ($p \leq 0.05$).

สำหรับการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยผู้ทดสอบใช้ ทำการประเมินความชอบต่อตัวอย่างจากความชอบโดยรวมโดยใช้ 9-point hedonic scale พิจารณาจากการซึมซับเข้าสู่ผิวหนัง ความเหนอะหนะ สี ความชุ่มชื้น ความรู้สึกมันบนผิวหลังทา และความน่าใช้ ผลการทดลองแสดงดังTable 16 และ Figure 31 พบว่าชุดการทดลองทั้ง 4 ชุดให้ผลกลิ่นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับความหนืดพบว่าโลชั่นผสมคีเฟอรันได้รับคะแนนความชอบสูงสุดเท่ากับ 6.10±1.73 รองลงมาคือโลชั่นผสมคีเฟอรันกับกรดแลคติก สำหรับโลชั่นที่ผสมกรดแลคติกได้รับคะแนนความชอบไม่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ผลการประเมินการซึบซับเข้าสู่ผิวหนัง พบว่าโลชั่นผสมกรดแลคติกได้รับคะแนนความชอบสูงสุดเท่ากับ 6.65±1.38 และโลชั่นผสมคีเฟอรันได้รับคะแนนการให้ความชุ่มชื้นสูงสุดเท่ากับ 6.40±1.31 และคะแนนความรู้สึกมันหลังทาสูงสุดเท่ากับ 6.55±1.24 เมื่อสรุปผลความชอบโดยรวมจากคะแนนความน่าใช้ พบว่าโลชั่นที่ผสมคีเฟอรันได้รับคะแนนสูงสุดเท่ากับ 6.25±1.18 รองลงมาคือชุดควบคุม โลชั่นผสมคีเฟอรันผสมกรดแลคติก และโลชั่นผสมกรดแลคติก

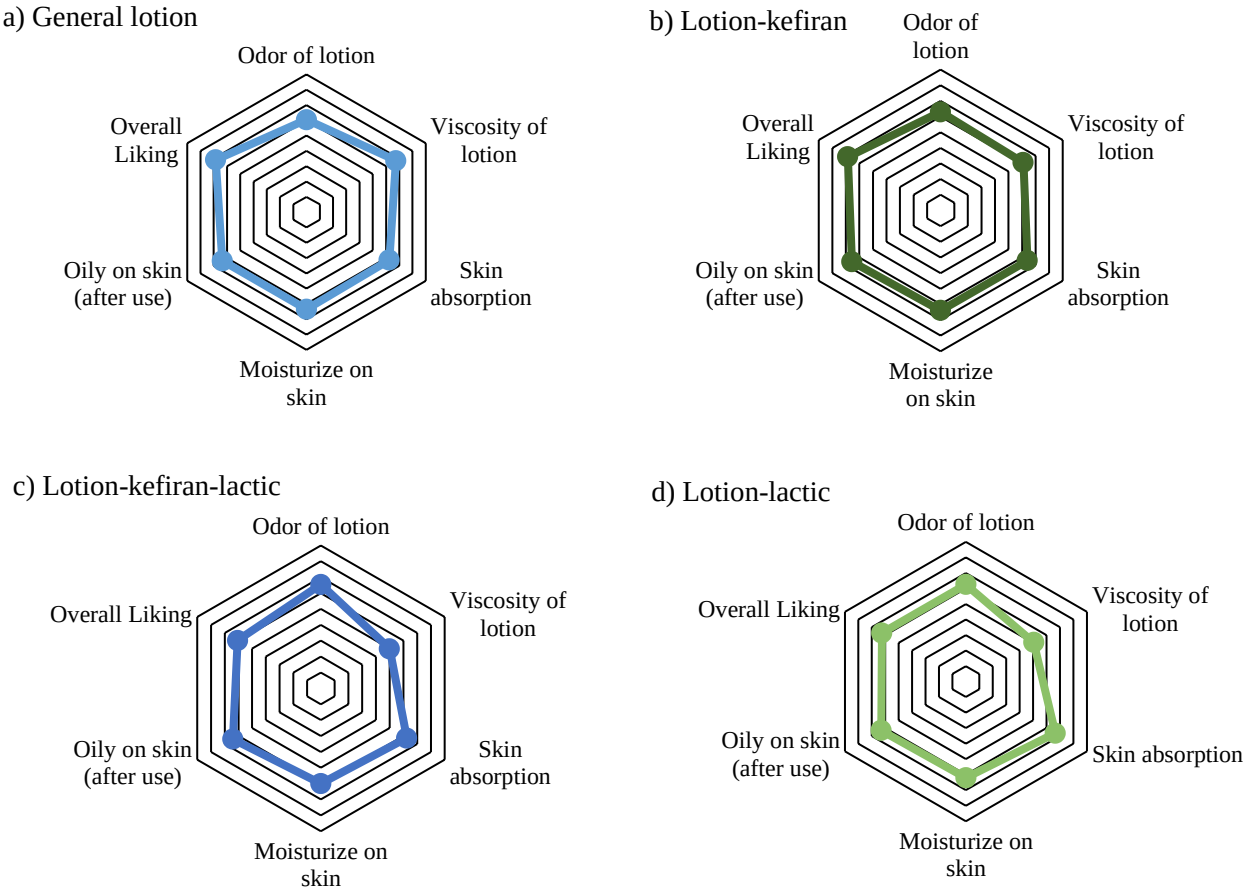


Figure 31 9-point hedonic of lotion added with kefiran, kefiran-lactic acid, lactic acid scale was used for attributes of odor, viscosity, skin absorption, moisturize on skin, oily on skin (after use) and overall liking.

Table 16 Liking scores of 6 attributes in all development formulas

Attribute	Liking score			
	General lotion	Lotion-kefiran	Lotion-kefiran-lactic acid	Lotion-lactic acid
Odor of lotion	5.80±0.81[a]	6.30±1.58[a]	6.55±1.74[a]	6.25±1.61[a]
Viscosity of lotion	5.35±1.82[ab]	6.1±1.73[a]	5.80±1.61[ab]	5.05±1.46[ab]
Skin absorption	5.75±1.63[b]	6.40±1.56[a]	6.25±1.48[b]	6.65±1.38[a]
Moisturize on skin	5.95±1.20[b]	6.40±1.3[a]	6.00±1.4[bc]	6.20±1.36[b]
Oily on skin (after use)	5.95±1.39[bc]	6.55±1.24[a]	6.40±1.11[a]	6.30±1.05[b]
Overall Liking	6.25±1.18[b]	6.85±1.01[a]	6.25±0.94[b]	6.15±1.18[b]

Different superscript letters in the same column indicate significant difference between treatments ($p \leq 0.05$).

จากการตรวจผลตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน ผลิตภัณฑ์บำรุงผิว มาตรฐานเลขที่ มผช.๕๕๑/๒๕๔๗ โดยส่งตรวจที่บริษัท กรีนเทคไบโอแลปซึ่งเป็นบริษัทผลิตผลิตภัณฑ์เสริมความงามในจังหวัดสงขลา ทำการตรวจสารต้องห้ามดังนี้ สารปรอท ไฮโดรควิโนน และสารสเตียรอยด์ พบว่า ผลิตภัณฑ์ทั้ง4 สูตร ไม่มีการตรวจพบสารต้องห้ามดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ในระดับหนึ่ง (ภาคผนวก)

Table 17 Product Standard follow the STD.๕๕๑/๒๕๕๓ of Thai Industrial Standards Institute (TISI) by GreenTech Biolab Co., LTD.

Formular	Mercury	Hydroquinone	Steroids
General lotion	nd	nd	nd
Lotion-kefiran	nd	nd	nd
Lotion-kefiran-lactic	nd	nd	nd
Lotion-lactic	nd	nd	nd

บทที่ 4
บทสรุปและข้อเสนอแนะ

บทสรุป

จากการศึกษาการผลิตคีเฟอรันจากก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรนและเชื้อเดี่ยว *Lactobacillus kefiranofaciens* พบว่าเชื้อเดี่ยวสามารถผลิตคีเฟอรันได้สูงกว่าก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรน เพื่อเป็นการลดต้นทุนอาหารเลี้ยงเชื้อ งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการใช้น้ำมะพร้าวแก่เป็นแหล่งอาหารราคาถูก โดยพบว่าน้ำมะพร้าวแก่ให้ผลผลิตคีเฟอรันสูงใกล้เคียงกับการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้าที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่เมื่อเปรียบเทียบต้นทุนอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตคีเฟอรัน พบว่าน้ำมะพร้าวแก่มีต้นทุนต่ำที่สุด จึงเหมาะสมในการนำมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อและผลิตคีเฟอรัน จากการศึกษาการเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและควบคุมพีเอช พบว่าการใช้น้ำมะพร้าวแก่ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 3 การควบคุมพีเอชระหว่างการทดลองที่ 5.5 และการเติมยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นไนโตรเจน 3 กรัมต่อลิตร เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคีเฟอรันที่มีต้นทุนวัตถุดิบเท่ากับ 13.72 บาทต่อกรัมคีเฟอรัน จากการศึกษาโครงสร้างคีเฟอรัน พบว่าอินฟราเรดสเปกตรัมที่ได้จากตัวอย่างคีเฟอรันมีลักษณะคล้ายกันกับรายงานก่อนหน้านี้ เมื่อทำการขยายขนาดการผลิตในถังปฏิกรณ์และทำการหมักแบบกะซ้ำ 6 รอบ ทำให้สามารถผลิตคีเฟอรันได้ 37 กรัมจากน้ำมะพร้าวแก่ 20 ลิตร และคิดต้นทุนการผลิตที่ไม่รวมค่าแรงได้เท่ากับ 8.94 บาทต่อกรัมคีเฟอรัน และการประยุกต์ใช้คีเฟอรันในผลิตภัณฑ์โลชั่นบำรุงผิว ทำให้โลชั่นมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และได้รับคะแนนการยอมรับจากผู้ทดสอบสูงสุด ซึ่งคีเฟอรันจัดเป็นสารสกัดจากจุลินทรีย์ที่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย (Generally Recognized As Safe; GRAS) สามารถใช้ทดแทนวิตามินอีที่ใช้ในการแสดงออกถึงความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระทั่วไปทางการค้าโดยมีราคาสูงถึง 32 บาทต่อกรัม

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาวิธีการย่อยแหล่งไนโตรเจนทดแทนพวกกากถั่วเหลืองและเซลล์ยีสต์ที่ไม่ทำให้เกิดสารยับยั้งเพื่อนำมาใช้ในการผลิตคีเฟอรัน
2. ควรมีการศึกษาการหมักแบบกะซ้ำด้วยการเติมน้ำมะพร้าวเข้มข้นในระหว่างการหมักเพื่อลดต้นทุนในการผลิตแบบกะซ้ำ
3. ควรมีการคัดแยกเชื้อใหม่จากก้อนเชื้อคีเฟอร์เกรนเพื่อนำไปใช้ในการผลิตทางการค้า
4. จากการทดลองศึกษาความเข้มข้นน้ำตาลควรใช้น้ำตาลซูโครสแทนน้ำตาลกลูโคส เนื่องจากเป็นน้ำตาลที่มีรายงานว่าเป็นน้ำตาลที่ทำให้ผลิตคีเฟอรันได้สูงกว่าน้ำตาลกลูโคส
5. ควรศึกษาสัดส่วนของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเป็นการทดลองแบบ factorial design

เอกสารอ้างอิง

กัลทิมา พิชัย. 2549. เทคโนโลยีการหมัก. เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่.

โกวิท สุวรรณหงษ์. 2555. ศักยภาพการผลิตพลาสติกชีวภาพจากวัสดุเหลือใช้จากเกษตรกรรม. รายงานการวิจัย. มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา.

จุไรรัตน์ นันทานิช. 2546. แนวทางการใช้ไคติน ไคโตแซนในตำหรับยาและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพในเทคโนโลยีพอลิเมอร์เพื่อพัฒนาตำรับยาเครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ.

จิตตรา ยี่แสง. 2549. การผลิตคีเฟอรันจากแป้งสาคูโดยเชื้อ *Lactobacillus kefiranofaciens*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ.

ฒาลิศา ยุวอมรพิทักษ์. 2540. การผลิตแซนแทนกัมจากน้ำมะพร้าว. วารสารสงขลานครินทร์ วทท. 19: 429-436.

ธนพร วิชัย และ วรรัตน์ ปัตรประกร. 2554. การผลิตกรดแอล(+)–แลคติกจากวัสดุหลือใช้ทางการเกษตรโดย *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ในการเพาะเลี้ยงแบบอาหารเหลว. การประชุมวิชาการนานาชาติวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่งประเทศไทย. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

พรผจง เลาหวิเชียร. 2009. (ออนไลน์). แหล่งที่มา: http://www.watkhaosukim.com/sara/download/01_kefir.pdf วันที่สืบค้น 17 มีนาคา 2017.

ระพีพรรณ เติมตันทร์. 2547. องค์ประกอบและสมบัติของสารชีวภาพจากแบคทีเรียทนร้อน *Acinebacrer* sp. FT3 และ *Gemella* sp. CH11. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วริญดา สุภทรประทีป. 2552. การคัดแยกและจำแนกเชื้อที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสและการประยุกต์ใช้เอนไซม์คอลลาจิเนสในการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต.สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2530. จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหารในจุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 1-16.

ศิริลออ ราชบุตร. 2552. การผลิตคีเฟอรันโดยเชื้อผสมของ *Lactobacillus kefiranofaciens* JCM 6985 และยีสต์จากหางนม.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต.สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศุภศิลป์ มณีรัตน์. 2543. เอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียแลคติก. วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 22(3): 397-402.

สมศรี ลีปิพัฒนวิทย์. 2531. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับทำวุ้นสวรรค์จากน้ำมะพร้าวแก่. วารสารอาหาร. 18(4): 239-249.

สุวรรณี สุขแสวง. 2559. การผลิตคีเฟอรันและกรดแลคติกจากแหล่งคาร์บอนราคาถูกโดยเชื้อ *Lactobacillus kefiranofaciens* JCM 6985 และการใช้กรดแลคติกในการผลิตพอลิไฮดรอกซีอัลคาโนเอต.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ.

เสาวนีย์ ธรรมสถิติ. 2547. แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพ เซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์. สถาบันพัฒนาสาธารณสุขอาเซียน. นครปฐม.

เสาวนีย์ กระสานติสุข และ หทัยชนก รุณรงค์. 2549. การพัฒนาตำรับโลชั่นบำรุงผิว. วิทยานิพนธ์ปริญญาเภสัชศาสตรบัณฑิต. ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล วรสิทธิ์ โทจำปา และประวิทย์ วงศ์คงคาเทพ. 2544. วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 2. พิมพ์ครั้งที่1. หน้า 129-130, 157-174. สำนักพิมพ์.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล. 2547. เทคโนโลยีชีวภาพอาหารการหมักและสิ่งแวดล้อม.กรุงเทพฯ. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล. 2554. สรรสาระเทคโนโลยีชีวภาพ. วารสารคณะกรรมการสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพแห่งประเทศไทย ฉบับประจำเดือนมีนาคม หน้า 11-12.

หนึ่ง เตียอำรุง. 2532. การผลิตสเคลอโรกลูแคนจากเชื้อรา *Sclerottium rotfsii.*วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สาขาจุลวิทยาอุตสาหกรรม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อาทิตยา กาวีอ้าย. 2008. การผลิตเอกซ์โซโพลีแซกคาไรด์โดย *Lactobacillus confusus* CMU 198 โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนทดแทน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

อำพิน กันธิยะ. 2552. การใช้ประโยชน์จากของเหลือทิ้งจากการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร: น้ำมะพร้าวแก่. สารปริทรรศน์อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 1 (1).

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

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

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

Azam-Ali, S. and Battcock, M. 1998. Fermented fruits and vegetables: A global perspective. FAO Agricultural services bulletin No. 134.

Badel, S., Bernardi, T and Michaud, P. 2011. New perspectives for Lactobacilli exopolysaccharide. Biotechnol Adv. 29: 54-66.

Briczinsk, E. P. and Roberts, R. F. 2002. Production of an exopolysaccharide-containing whey protein concentrate by fermentation of whey. J. Dairy Sci. 85: 3189-3197.

Blandón, L. M., Noseda, M. D., Islan, G. A., Castro, G. R., de Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V. and Soccol, C. R. 2018. Optimization of culture conditions for kefiran production in whey: The structural and biocidal properties of the resulting polysaccharide. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre.

Buenaventurada, P. C. and Tokiwa, Y. 2007. Production of D-lactic acid from sugarcane molasse sugarcane juice and sugar beet juice by *Lactobacillus delbrueckii*. Biotech. Lett. 29: 1329-1332.

De Bruyn, I.N., Holzapfel, W.H., Visser, L and Louw, A.l. 1988. Glucose metabolism by *Lactobacillus divergens.* J. Microbiol.134: 2103-2109.

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 soure and requirement for exopolysaccharide production by *Lactobacillus casie* CG11 and partial structure analysis of the polymer. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3914-3915.

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

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

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

Dailin, D. J., Elsayed, E. A., Othman, N. Z., Malek, R. A., Ramli, S. O. L. L. E. H., Sarmidi, M. R. and El Enshasy, H. A. 2015. Development of cultivation medium for high yield kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens*. Int. J. Pharm. Pharm. Sci, 7: 159-163.

Dailin, D. J., Elsayed, E. A., Othman, N. Z., Malek, R., Phin, H. S., Aziz, R. and El Enshasy, H. A. 2016. Bioprocess development for kefiran production by *Lactobacillus kefiranofaciens* in semi industrial scale bioreactor. Saudi j. Biol. Sci. 23(4): 495-502.

Dahod, S. K. 1999. Raw materials selection and medium development for industrial fermentation processes. In A. L. Demain & J. E. Davies (Eds.), Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology (2nd ed., pp. 213-220). Washington, D.C.: American Society for Microbiology.

Dashti, M. G. and Abdeshahian, P. 2016. Batch culture and repeated-batch culture of *Cunninghamella bainieri* 2A1 for lipid production as a comparative study. Saudi j. Biol. sci. 23(2): 172-180.

Datta, R., Tsai, S. P., Bonsignor P., Moon S. and Frank J. 1995. Technological and economical potential of polylactic acid and lactic acid derivatives. FEMS Microbiol. 16: 221-231.

Dimitreli, G., Exarhopoulos, S., Goulas, A., Antonioul, K. D. and Raphaelides, S. N. 2016. Effect of kefiran and milk proteins addition on the rheological. behavior or glucono δ-lactone induced milk gels. J. Food Res. 5(1): 121-128.

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

Esnaashari, S. S., Rezaei, S., Mirzaei, E., Afshari, H., Rezayat, S. M. and Faridi-Majidi, R. 2014. Preparation and characterization of kefiran electrospun nanofibers. International journal of biological macromolecules. 70: 50-56

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

Gao, M.T., Hirata, M., Toorisaka, E. and Hano,T. 2006. Study on acid-hydrolysis of spent cells for lactic acid fermentation. Biochem. Eng. J. 28: 87-91.

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.

Ghasemlou, M., Khodaiyan, F., Jahanbin, K., Gharibzahedi, S. M. T. Taheri, S. 2012. Structural investigation and response surface optimization for improvement of kefiran production yield from a low-cost culture medium. Food Chem. 133: 383-389.

Gibson, G. R. 2004. Prebiotic. J. Gastroenterol. Suppl. 18: 287-298.

Guo, M. Q., Hu, X., Wang, C. and Ai, L. 2017. Polysaccharides: Structure and Solubility. In Solubility of Polysaccharides. In Tech.

Habibi, N.,Soleimanain-Zad, S. and Zeinoddin,M.S. 2011. Exopolysaccharides produce by pure culture of *Lactobacillus, Lactococcus* and yeast isolated from kefir grain by microtiter plate assay: optimization and comparison. World App. Sci. J. 12(6): 742-750.

Hofvendahl, K. and Haha-Hagerdal, B. 2000. Factors effecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. Enzyme Microbiol. Technol. 26: 87- 107.

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.

Judith, P., Bengoecheab, C. Abrahama, AG. and Guerrero, A. 2016. Shear and extensional properties of kefiran. Carbohydr. Polym. 152: 97–104.

Jyothi, N. A., Sasikiran, K., Nambisan, B. and Balagopalan, C. 2005. Optimization of glutamic acid production from cassava starch factory residues using *Brevibacterium divaricatum*. Process Biochem. 40: 3576-3579.

Kotzamanidis, C. H., Roukas, T. and Skaracis, G. 2002. Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* KCIMB 8130. World J. Microbiol. Biotechnol. 18: 441-448.

Kongruang, S. 2005. Quantitative analysis of exopolysaccharide production in a stirred tank bioreactor. AIChE Annual International Meeting, October 30-November 4, Cinergy center Cincinnati Ohio, USA.

Kuberski, T., Roberts, A., Linehan, B., Bryden, RN. and Teburae, M. 1979. Coconut water as a rehydration fluid. N Z Med. J. 90: 98-100.

Laws, A., Gu, Y. and Marshall, V. 2001. Biosynthesis, characterization and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. Biotechnol. Adv. 19: 597-625.

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.

Liu, J. R. and Lin, C. W. 2000. Production of kefir from soymilk with or without added glucose, lactose or sucrose. J. Food Sci. 65: 716-719.

Liu, J. R., Wang, S. Y. Lin, Y. Y. and Lin, C. W. 2002. Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. Nutr. Cancer. 44(2): 182-187.

Li, Q. Z., Jiang, X. L., Feng, X. J., Wang, J. M., Sun, C., Zhang, H. B. and Liu, H. Z. 2015. Recovery processes of organic acids from fermentation broths in the biomass-base industry. J. Microbiol. Biotech 26(1): 1-8.

Linton, J. D., Ash, S. G., & Huybrechts, L. 1991. Microbial polysaccharides. In Biomaterials. Palgrave Macmillan UK. 215-261.

Low, D., Ahlgren, J. A., Horne, D., Mcmahon, D.J., Oberg, C.J. and Broadbent, J. R. 1998. Role of *Streptococcus thermophiles* MR-IC capsular exopolysaccharide in cheese moisture retention. Appl. Environ. Microbiol. 64(6): 2147-2151.

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

Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulu, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. and Tsakalidou, E. 2006. Probitic potential of *Lactobaillus strains* isolated from dairy products. Int. Dairy. J. 16: 189-199.

Methacanon, P., Madla, S., Kirtikara, K and Prasitsil, M. 2005. Structural elucidation of bioactive fungi-derived polymers. Carbohyd. Polym. 60:199-203.

Mitsue, T., Tachibana, K. and Fujio, Y. 1998. Isolation of kefiran producing by mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* KF-75 and yeast strains. J. biotechnol. 100(1): 43-53.

Mitsue, T., Tachibana, K. and Fujio, Y. 1999. Efficient kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefiranofaciens* KF-75 and yeast strains. J. Biosci. and Bioeng. 3(87): 77: 400.

Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R. M. and Remaud-Simen, M. 2001. Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. Int. Dairy J. 11: 675-686.

Mustafa, A., Gassem, Kevin, A., Sims and Joseph F. Frank. 1997. Extracellular polysaccharides production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricu*s RR in a Continuous fermentor. Food Sci. Technol. 30: 273–278.

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

Novik, G., Meerovskaya, O. and Savich, V. 2017. Waste degradation and utilization by lactic acid bacteria: Use of Lactic Acid Bacteria in Production of Food Additives, Bioenergy and Biogas. In Food Additives. InTech.

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.

Pais, J., Farinha, I., Serafim, L. S., Prieto, M. A., Arévalo-Rodríguez, M. and Reis, M. A. M. 2009. Bioplastics production from cheese whey by recombinant *E. coli*. New Biotechnol. 25(1): 220.

Pop, C., Rotar, A. M., Salanta L. C., Semeniuc, C. A., Socaciu, C. and Sindic, M. 2015. Fingerprint profiling of polysaccharide kefiran extracted from kefir grains biomass. J. Agro. Processes and Technol. 21(2): 207-212.

Obruca, S., Marova, I., Melusova, S. and Ondruska, V. 2009. Production of polyester-based bioplastics by *Bacillus megaterium* grown on waste cheese whey substrate under exogenous stress. New Biotechnol. 25(1): 257.

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

Papanikolaou, S., Chevalot, I., Komaitis, M., Marc, I. and Aggelis, G. 2002. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58: 308-312.

Radhouani, H., Gonçalves, C., Maia, F. R., Oliveira, J. M., & Reis, R. L. (2018). Kefiran biopolymer: Evaluation of its physicochemical and biological properties. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 33(5), 461-478.

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

Ruan, W., Chen, J. and Lun, S. 2003. Production of biodegradable polymer by *Alcaligenes eutrophus* using volatile fatty acids from acidified wastewater. Process Biochem. 39: 295-299.

Rodrigues, C.L.P.S. Van den berghe. 2017. Production and application of lactic acid. In Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. 76: 543–556.

Rodrigues, K.L., Caputo, L.G., Carvalho, J.T., Evangelista, J. and Schneedorf, J.M. 2005. Antimicrobialand healing activity of kefir and kefiran extract. Int. J. Antimicro. 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.

Satyavati Krishnankutty. 1987. Analysis of mature and tender coconut Water (ออนไลน์). สืบค้นจาก http://coconutboard.gov.in/tendnutr.htm#tender. วันที่สืบค้น 20 ธันวาคม 2559.

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

Shivakumar, S. and Vijayendra, S.V.N. 2006. Production of exopolysaccharides by *Agrobacterium* sp.CFR-24 using coconut water – a byproduct of food industry. Lett. Appl. Microbial. 42: 477–482.

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: 75-805.

Sombutyanuchit, P., Suphantharika, M. and Verduyn, C. 2001. Preparation of 5'–GMP-rich yeast extracts from spent brewer's yeast. World J. Microbiol. Biot. 17: 163-168.

Sutherland, I. W. 2002. A sticky business. Microbial exopolysaccharides: current products and future trends. Microbiol. Today. 29: 70-71.

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.

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

Tacon, A. G. J., Metian, M. and Hasan, M. R. 2009. Feed ingredients and fertilizers for farmed aquatic animals: sources and composition. (Online). Available at: http://www.fao.org/docrep/012/i1142e/i1142e.pdf [Accessed 2 January 2013].

Teclua, D., Tivcheva, G., Laingb, M. and Wallis, M. 2009. Determination of the elemental composition of molasses and its suitability as carbon source for growth of sulphate-reducing bacteria. J. Hazard. Mate. 161: 1157-1165.

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 Geel-Schutten, G., Flesch, F., ten Brink, B. et al. 1998. Screening and characterization of *Lactobacillus* strains producing large amounts of exopolysaccharides. Appl Microbiol. Biotech. 50: 697-705.

Van der bert, JM. 1945. Nutritive value of coconut water. Nature. 156: 174-175.

Waites, M. J., Morgan, N. L., Rockey, J. S. and Higton, G. 2009. Industrial microbiology: an introduction. John Wiley & Sons.

Wang, M., and Bi, J. 2008. Modification of characteristics of kefiran by changing the carbon source of *Lactobacillus kefiranofaciens*. J. Sci. Food Agric. 88: 763-769.

Wang, Y., Ahmed, Z., Feng, W., Li, C. and Song, S. 2008. Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. Int. J. Biol. Macro. 43(3): 283-288.

Wee, Y. J., Kim, J. N., Yun, J. S. and Ryu, H. W. 2004. Utilization of sugar molasses for economical l(+)-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. Enzym. Microbiol. Technol. 35: 568-573.

Wei, C. K., Thakur, K., Liu, D. H., Zhang, J. G. and Wei, Z. J. 2018. Enzymatic hydrolysis of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) protein and sensory characterization of Maillard reaction products. Food chemistry. 263: 186-193.

Welman, A. D. and Maddox, I. S. 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. Trends Biotech. 21(6): 269-274.

Winter, R. 1978. Xanthangum, (Online) Available: http://food.oregonstate.edu/glossary/x/xanthangum.html. (26 June 2014).

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. Biotech. 24: 1195-1201.

Yokoi, H., Watanabe, T. and Fujii, Y. 1990. Isolation and characterization of polysaccharides producing bacteria from kefir grains. J. Dairy Sci. 73(7): 1684–1689.

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. 1992. Optimum culture condition of production of kefiran by *Lactobacillus* sp. KPB 167-B isolated from kefir grains. J. Ferment. Bioeng. 74: 327-329.

Yokota, A., Amachi, S., Ishii, S. and Tomita, F. 1995. Acid sensitivity of mutant of *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* C2 with reduced membrane bound ATPase activity. Biosci. Biochem. 59: 2004-2007.

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

Zajsek, K. and Gorsek, A. 2010. Mathematical modelling of ethanol production by mixed kefirgrains yeast population as a function of temperature variations. Biochem. Eng. J. 49: 7-12.

Zajsek, K., Gorsek, A. and Kolar, M. 2013. Cultivating conditions effects on kefiran productionby the mixed culture of lactic acid bacteria imbedded within kefir grains. Food Chem. 139: 970-977.

Zhang, X., Liu, L. and Lin, C. 2014. Isolation, structural characterization and antioxidant activity of a neutral polysaccharide from Sisal waste. Food Hydrocolloids. 39: 10-18.

Zhang, K. Yu, C. and Yang, ST. 2015. Effects of soybean meal hydrolysate as the nitrogen source on seedculture morphology and fumaric acid production by *Rhizopus oryzae*. Process Biochem. 50: 173–179.

ภาคผนวก

1. ศึกษาอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ในอาหาร MRS Broth

นำเชื้อ *Lactobacillus kefiranofaciens* JCM 6985 ที่เก็บเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในกลีเซอรอลความเข้มข้นร้อยละ 30 ภายใต้อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นำมา 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงอาหาร MRS Broth ปริมาตร 9 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5วัน เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง ดูอัตราการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร (OD660) โดยเจือจางน้ำหมักให้ค่าการดูดกลืนแสง อยู่ในช่วง 0.2 - 0.8 เพื่อดูช่วงการเจริญเติบโตที่ดีที่สุดไปใช้ในการเลี้ยงเพื่อผลิตคีเฟอรัน

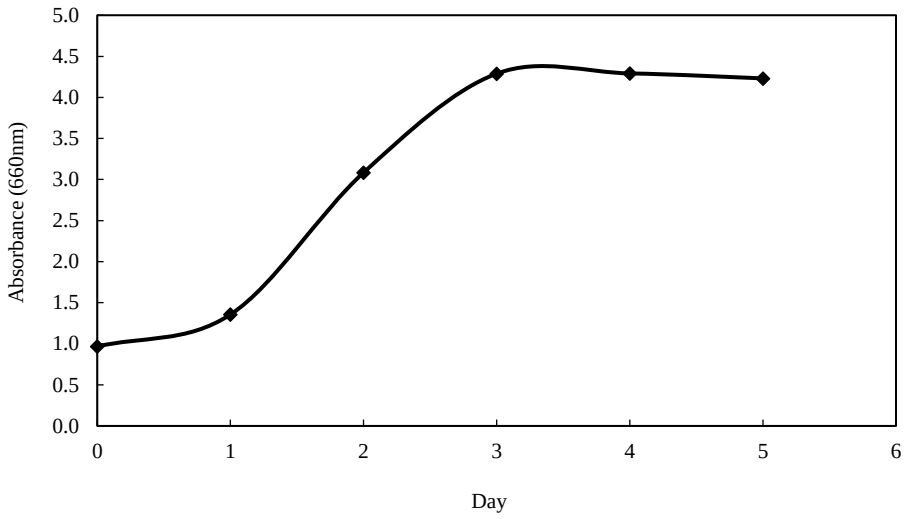


Figure 32 Growth curve of the bacterium *L. kefiranofaciens* JCM 6985 in MRS broth 5 day.

2. การเตรียมสารละลายแอนโทรน

ชั่งสารแอนโทรน (Anthrone: 9,10-Dihydro-9-oxoanthracene) 0.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เทกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 98 ลงไปผสม 300 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันในฟาสก์แล้วนำกระดาษฟอยล์ ห่อให้สนิทเพื่อไม่ให้โดนแสง และนำไปทำให้เย็นก่อนนำไปใช้งาน

3. การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

ชั่งน้ำตาลกลูโคสจำนวน 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นทำการเจือจางสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.5 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการดูดสารละลายกลูโคสที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่เตรียมไว้ จากนั้นทำการเติมสารละลายแอนโทรน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเขย่าให้เข้ากัน และนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้น หยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปแช่ในน้ำเย็นทันที สำหรับแบลงค์ให้ใช้น้ำกลั่นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และทำทุก อย่างเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น จากนั้นนำตัวอย่างดังกล่าวไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

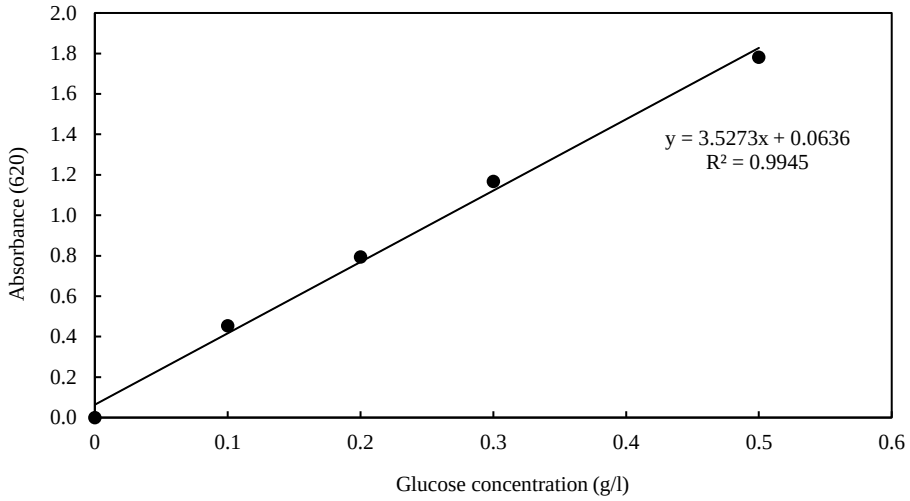


Figure 33 Standard curve of glucose.

4. การเตรียมกราฟมาตรฐานน้ำตาลแลคโตส

ชั่งน้ำตาลแลคโตสจำนวน 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร จากนั้นทำการเจือจางสารละลายน้ำตาลแลคโตสที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.5 กรัมต่อลิตร จากนั้นทำการดูดสารละลายแลคโตสที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่เตรียมไว้ จากนั้นทำการเติมสารละลายแอนโทรน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองเขย่าให้เข้ากัน และนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้น หยุดปฏิกิริยาโดยการนำไปแช่ในน้ำเย็นทันที สำหรับแบลงค์ให้ใช้น้ำกลั่นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และทำทุก อย่างเช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น จากนั้นนำตัวอย่างดังกล่าวไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

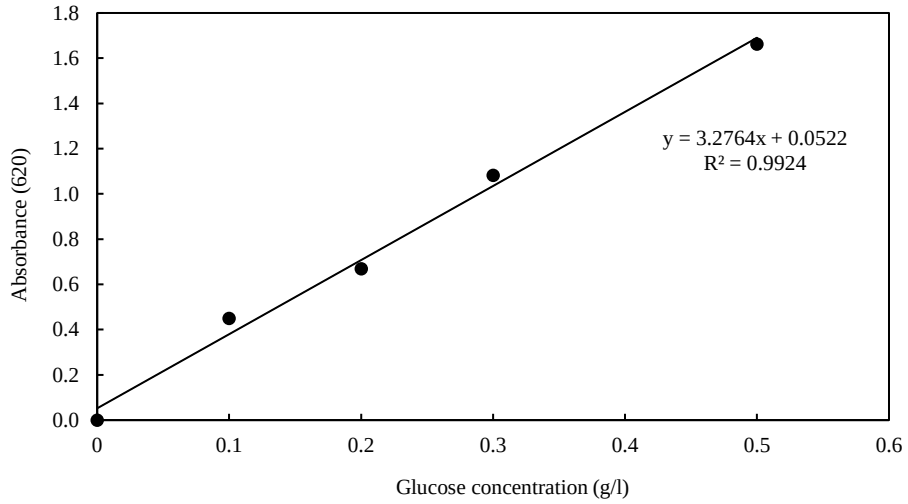


Figure 34 Standard curve of lactose.

5. การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของคีเฟอรัน โดยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

เครื่องมือ

คอลัมน์: Lichrocart NH4 (250×4 mm)

ตัวทำละลายเคลื่อนที่ (Mobile phase) คือ อะซิโตไนไตรล์ (Acetonitrile) และน้ำ (Water) ในอัตราส่วน 90:10

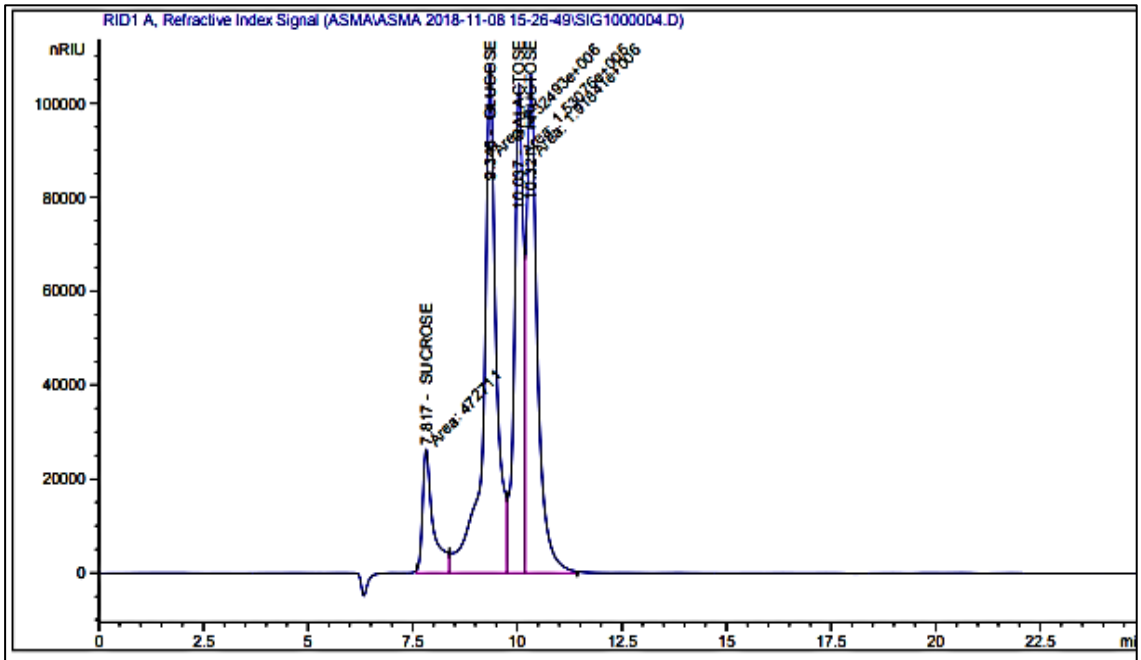
อัตราการไหลของตัวทำละลายเคลื่อนที่ คือ 1.9 มิลลิลิตรต่อนาที ตัวตรวจจับคือ Evaporative light scattering detector; ELSD

อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ใช้แก๊สไนโตรเจนที่อัตราเร็ว 2.0 ลิตรต่อนาที

ตัวอย่างที่ผ่านการย่อยปริมาตร 10 ไมโครลิตร

วิธีการ

ศึกษาชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบของคีเฟอรันที่ได้ด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยการเตรียมตัวอย่างมาตรฐานน้ำตาล กลูโคส ซูโครส กาแลคโตส ฟรุคโตส นำมากรองด้วยกระดาษไนลอนขนาด 0.2 ไมโครเมตร และฉีดตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร เข้าสู่คอลัมน์ เปรียบเทียบปริมาณสารที่ได้กับสารละลายมาตรฐาน



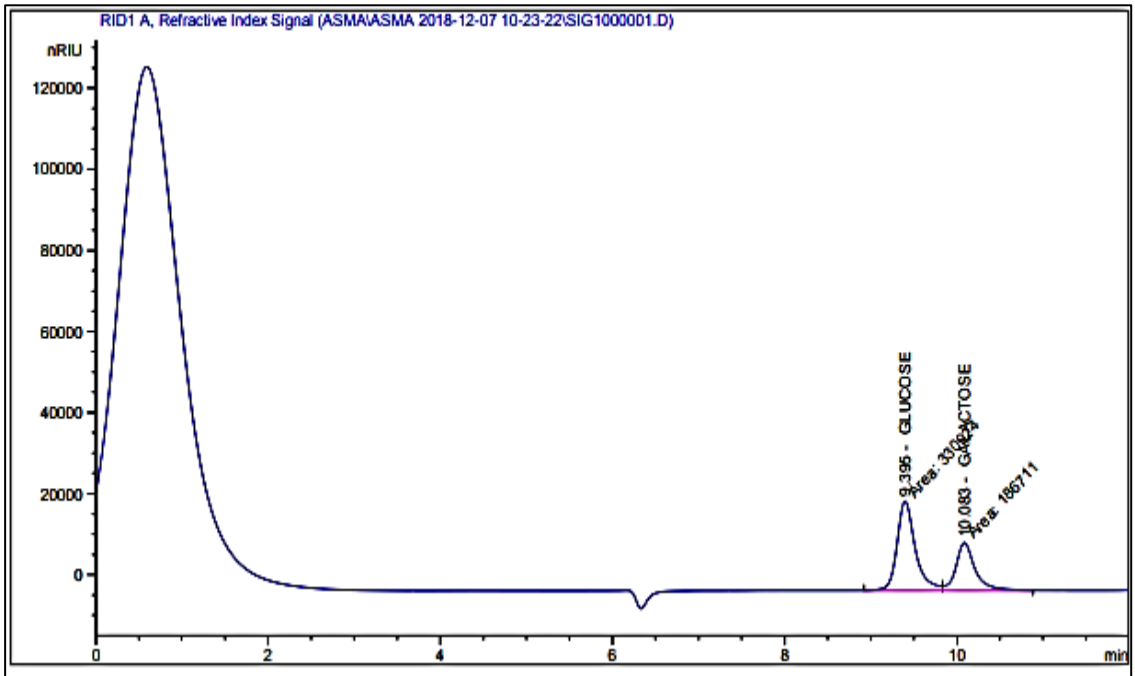

```
=====================================================================
           External Standard Report (Sample Amount is 0!)
=====================================================================

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      Tuesday, November 13, 2018 10:45:47 AM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :      1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime  Type     Area      Amt/Area    Amount   Grp   Name
 [min]          [nRIU*s]                [g/l]
-------|------|----------|----------|----------|--|-----------------
  7.817 MF T+I 4.72711e5  2.10325e-5    9.94230    SUCROSE
  9.346 MF T+I 2.32493e6  4.31472e-6   10.03144    GLUCOSE
 10.037 MF T+I 1.53076e6  6.55840e-6   10.03934    GALACTOSE
 10.321 MF T+I 1.91841e6  5.19485e-6    9.96584    FRUCTOSE
```

Figure 35 Chromatogram of sugar analyzed by HPLC method



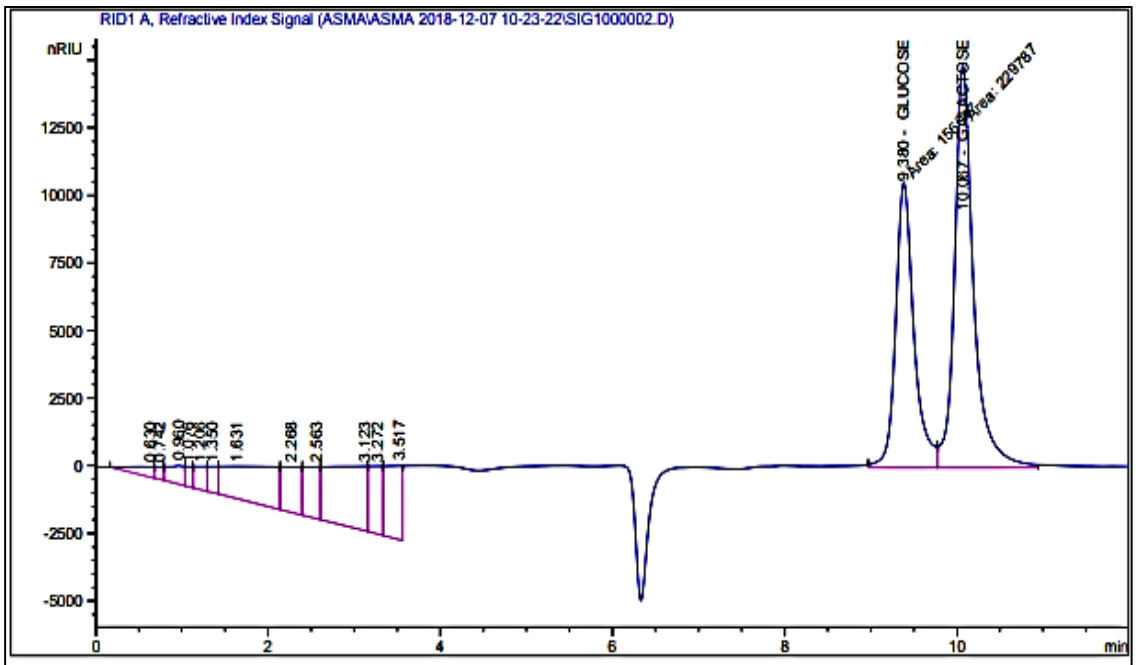

```
=====================================================================
           External Standard Report (Sample Amount is 0!)
=====================================================================

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      Tuesday, November 13, 2018 10:45:47 AM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :     10.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime  Type     Area      Amt/Area    Amount   Grp   Name
 [min]          [nRIU*s]                [g/l]
-------|------|----------|----------|----------|--|-----------------
  7.817            -          -          -          SUCROSE
  9.395 MF T+I 3.30924e5  4.43347e-6   14.67139     GLUCOSE
 10.083 MF T+I 1.86711e5  6.66917e-6   12.45209     GALACTOSE
 10.321            -          -          -          FRUCTOSE
```

Figure 36 Monosaccharide composition of the kefiran produced by pure culture of *L. kefiranofacien* JCM 6985 in modified mature coconut water analyzed by HPLC method.




```
------------------------------------------------------------------------
          External Standard Report (Sample Amount is 0!)
------------------------------------------------------------------------

Sorted By             :      Signal
Calib. Data Modified  :      Tuesday, November 13, 2018 10:45:47 AM
Multiplier            :      1.0000
Dilution              :     10.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: RID1 A, Refractive Index Signal

RetTime  Type     Area      Amt/Area    Amount   Grp   Name
 [min]         [nRIU*s]                 [g/l]
-------|------|----------|----------|----------|--|-----------------
  7.817           -           -          -          SUCROSE
  9.380 MF T+I 1.56047e5  4.58862e-6    7.16043    GLUCOSE
 10.067 MF T+I 2.29787e5  6.64552e-6   15.27057    GALACTOSE
 10.321           -           -          -          FRUCTOSE
```

Figure 37 Monosaccharide composition of the kefiran produced by kefir grain in soy milk analyzed by HPLC method.

6. กราฟมาตรฐานวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH

เริ่มจากการเตรียมสารละลาย DPPH radical ในเอทานอลความเข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ (เตรียม DPPH 0.00789 กรัม ในขวดปรับปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้เอทานอลในการปรับปริมาณตั้งให้แตกตัว 30 นาที) และเตรียมสารตัวอย่างที่เข้มข้น 10,000 ppm ใน เมทานอล จากนั้นเจือจางสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นในช่วง 10-1000 ppm และเติม DPPH ลงไปในสารละลายแต่ละความเข้มข้นที่ได้เตรียมไว้ 1:1 เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 30นาที นำไปวัดค่าดูดกลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อยืนยันผลและทำการหาค่าเฉลี่ย โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานBHT ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 จากนั้นทำการคำนวณเปอร์เซ็นต์ radical scavenging และคำนวณหาค่า IC_{50} จากผลการทดลองที่ได้โดยคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ radical scavenging (Manosroi *et al.,* 2011)

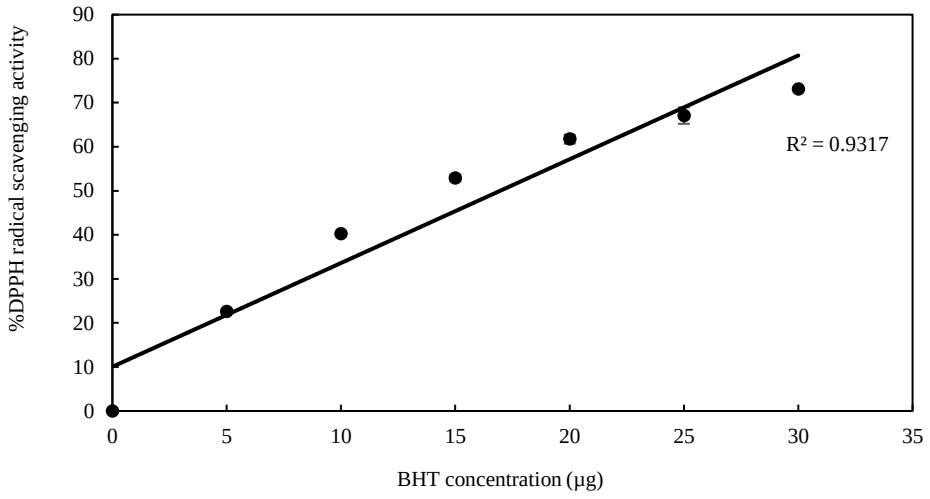


Figure 38 DPPH radical scavenging (%) of BHT concentration.

7. อาหารสำเร็จรูปเลี้ยงเชื้อสูตร Man-Rogosa Sharpe (MRS) ยี่ห่อ Hi-media สำหรับเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น *L. kefiranofaciens* JCM 6985

สารเคมี	ปริมาณ (กรัมต่อลิตร)
Dipotassium phosphate	10.00
Meat extract	2.00
Yeast extract	5.00
Glucose	20.00
Polysorbate 80	1 มิลลิลิตรต่อลิตร
Ammonium citrate	2.00
Sodium acetate	5.00
Magnesium sulphate	0.10
Manganese sulphate	0.05
Peptone	10.00
Agar	15.00

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหาร MRS 55.15 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันปรับพีเอชเป็น 5.5 สำหรับใช้เป็นอาหารเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อ *L. kefiranofaciens* JCM 6985 ถ้าเป็น MRS Agar เติม agar และ 15 กรัม แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อภายในหม้อนึ่งความดัน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. แบบทดสอบประสาทสัมผัส

การทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยวิธี 9-Point Hedonic scale

พัฒนาผลิตภัณฑ์โลชั่นสูตรผสมสารต้านอนุมูลอิสระ

ชื่อผู้ทดสอบ…….....…อายุ….....ปี เพศ…… ชุดที่……..

คำแนะนำ กรุณาทดลองตัวอย่างต่อไปนี้ จากซ้ายไปขวา ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสแล้วให้คะแนนความชอบตาม

ลำดับคะแนนที่ได้ กำหนดไว้ด้านล่างตามปัจจัยคุณภาพ และกรุณาบ้วนปากระหว่างตัวอย่าง

9 = ชอบมากที่สุด	8 = ชอบมาก	7 = ชอบปานกลาง
6 = ชอบเล็กน้อย	5 = เฉยๆ	4 = ไม่ชอบเล็กน้อย
3 = ไม่ชอบปานกลาง	2 = ไม่ชอบมาก	1 = ไม่ชอบมากที่สุด

รหัสตัวอย่าง	.....	.....	.....	.....
กลิ่น				
ความหนืด				
การซึมซาบเข้าสู่ผิวหนัง				
ความชุ่มชื้นแก่ผิวหลังทา				
ความรู้สึกมันหลังทา				
ความน่าใช้				

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

บริษัท กรีนเทคไบโอแลบ จำกัด
731 ซ.ทวีรัตน์ ต.คอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110
โทรศัพท์ 074 892 897

รายงานผลการทดสอบ

วันที่ 12 ธันวาคม 2561

เรียน คุณอภิสรา เอียดเจริญ

ตามใบตัวอย่างเลขที่ T01/2561 ลงวันที่ 30/11/2561 บริษัท กรีนเทคไบโอแลบ จำกัด ได้รับตัวอย่างเพื่อการทดสอบสารปรอท ไฮโดรควิโนน และสเตียรอยด์ จาก คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่อยู่ ตู้ปณ.38 ปณฝ.คอหงส์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110 บัดนี้การทดสอบได้เสร็จสิ้นแล้ว โดยมีผลการทดสอบดังนี้

ชื่อตัวอย่าง	1. Control
	2. Kefiran
	3. Kefiran+lactic acid
	4. Lactic acid
วิธีการทดสอบ	Chemical test kits
ผลการทดสอบ	
	ตรวจไม่พบ ปรอท
	ตรวจไม่พบ ไฮโดรควิโนน
	ตรวจไม่พบ สเตียรอยด์

หมายเหตุ: รายงานผลการทดสอบนี้รับรองเฉพาะตัวอย่างที่ทำการทดสอบตามที่ระบุไว้ข้างต้นเท่านั้น ห้ามนำรายงานนี้ไปคัดลอก หรือทำสำเนาเฉพาะบางส่วนโดยไม่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษร

ขอแสดงความนับถือ

(นาย แอนโทนี่ ชัยกุล)
กรรมการผู้จัดการ

Figure 39 Product Standard follow the STD.551/2553 of Thai Industrial Standards Institute (TISI) by GreenTech Biolab Co., LTD.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวอภิสรา เอียดเจริญ

รหัสประจำตัว 5911020030

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัญ	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่	2558

ทุนการศึกษา

ทุนโครงการทักษะนักอุตสาหกรรมเกษตร

ทุนอุดหนุนการศึกษาวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Abstract

Iadcharoen, A. and Cheirsilp, B. Utilization of Agro-Industrial Byproducts as Low-cost Media for Exopolysaccharides Production. International conference "The Water and Environment Technology Conference 2018" at Ehime University, Matsuyama, Ehime, Japan during 14th–15th July 2018 (Oral and poster presentation).

Proceedings

Iadcharoen, A. and Cheirsilp, B. Utilization of Agro-Industrial Byproducts as Low-cost Media for Production of Exopolysaccharides, Kefiran. National conference "The 2nd" Graduate School Conference 2018" at Suan Sunandha Rajabhat University, Bangkok, Thailand on 30th November 2018 (Good oral presentation award).